

인삼 약 배양을 통한 배 발생과 식물 재분화 및 유세포 분석기를 이용한 배수성 검정

이정우 · 방경환 · 김동휘 · 김장욱 · 김영창 · 조익현

Embryogenesis and plant regeneration of *Panax ginseng* Meyer via anther culture and ploidy assessment using flow cytometry

Jung-Woo Lee · Kyong-Hwan Bang · Dong-Hwi Kim · Jang-Uk Kim · Young-Chang Kim · Ick-Hyun Jo

Received: 20 February 2023 / Revised: 21 March 2023 / Accepted: 21 March 2023 / Published: 29 March 2023

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Korean ginseng (*Panax ginseng* Meyer) is an economically important plant because of it is rich in saponins. It is mainly cultivated in Asia, including Korea and China. Since ginseng requires a long breeding period due to juvenility, homozygote production techniques, such as anther culture, must be urgently established. In the present study, callus induction and embryogenesis through anther culture were observed in *P. ginseng*. Murashige and Skoog medium was used as the basal medium suitable for callus induction. When the medium was supplemented with 3% sucrose, the callus induction rate was high and the callus size was large. Cold pretreatment did not significantly affect callus induction and embryogenesis. Embryogenesis was the most efficient when the embryo-formation medium was supplemented with 1.0 or 3.0 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Cultivar significantly affected anther culture efficiency. Specifically, ‘Cheongseon’ showed the highest embryo-formation efficiency, whereas no embryogenesis occurred in ‘Sunun’. Ploidy assessment revealed the haploid status of the

induced calli. Embryos derived from anther culture formed shoots upon transfer to germination medium, although no difference in ploidy was noted between the induced callus and control. Overall, the anther culture conditions established in the present study may contribute to the production of homozygous *P. ginseng* plants in the future.

Keywords Anther culture, Embryogenesis, Callus, Medium, Cultivar, Cold pretreatment

서론

두릅나무과(Araliaceae)는 55속 1,500종 있으며, 이들 중 대부분은 약용작물로 널리 이용된다(Wen et al. 2001). 그중에서도 고려인삼(*Panax ginseng* Meyer)은 다량의 사포닌을 함유하고 있어 경제적으로 매우 중요한 작물이며, 한국, 중국 등 아시아 지역에서 주로 재배한다.

인삼은 자가 수정을 주로 하는 초본성 작물이지만 과수와 같이 유년성을 지니고 있어 꽃이 피는데 3년 이상이 소요된다(Kim et al. 2012). 이러한 특성으로 인공교배 후 자가 수정을 통하여 동형접합성을 높이는 데 최소 20년 이상 필요하여 교배육종이 매우 어렵다(Lee et al. 2019). 또한 자가 수정을 8세대 이상 하여도 완벽한 동형접합성을 가지고 있는 개체를 얻기 힘들다. 이러한 이유로 지금까지 육성된 모든 인삼 품종은 순계 분리 육종법을 통하여 개발되었다(Bang et al. 2020).

지난 수십 년 동안 분자 마커, 형질 전환, 반수체 기술 등 새로운 기술이 작물 육종에 이용되고 있다. 그중에서 반수체와 배가 반수체 기술은 한 세대 만에 완벽한 동형접합성을 갖는 식물을 얻을 수 있다는 점에서 주목받고 있다(Datta

J.-W. Lee · K.-H. Bang · D.-H. Kim · J.-U. Kim
농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부
(Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Eumseong 27709, Korea)

Y.-C. Kim
농촌진흥청 연구정책국 융복합혁신전략팀
(Research Policy Bureau, Rural Development Administration, Jeonju 54875, Korea)

I.-H. Jo (✉)
단국대학교 생명공학대학 생명자원학부
(Department of Crop Science and Biotechnology, Dankook University, Cheonan 31116, Korea)
e-mail: intron28@gmail.com

2005). 반수체는 자연적으로도 발생할 수 있지만 빈도가 매우 드물기 때문에(Germana 2011), 대부분은 약 배양과 소포자 배양 등 기내 조직배양을 이용하여 배가 반수체를 유도하고 있다(Dunwell 2010).

배가 반수체는 육종 기간의 단축에 유용하지만 유전체 연구에도 매우 가치가 크다(Zhang et al. 2011). 인삼은 $2n=48$ 개의 염색체를 가지고 있는 이질사배체이며(Waminal et al. 2012), 유전체 내에 반복적인 염기서열이 많아 유전체 연구에 어려움을 겪고 있다(Jayakodi et al. 2018). 이러한 이유로 인삼의 반수체 유도 기술에 관한 관심이 높아지고 있다.

기내 반수체 배양 방법 중에서 약 배양은 다른 방법에 비해 간편하고 효율적인 장점을 가지고 있어 쌀, 보리, 밀, 옥수수 등 주요 작물에서 가장 널리 사용되는 방법이다(Germana 2011). 하지만 모든 작물에 적용할 수 있는 약 배양 방법은 개발되어 있지 않아 작물별로 최적 배양 조건의 구명이 필요하다. 인삼 약 배양 연구는 몇 건만이 보고되었는데, Lee 등(2009)은 캘러스 및 사배체 부정근의 유도를 보고하였으며, Lee 등(2013)은 약 배양을 통한 식물 재생을 최초로 보고한 바 있다. 하지만 인삼에서 약 배양을 통한 배 발생은 보고되지 않았다.

약 배양을 통한 배 발생 유도를 위하여 고려해야 하는 첫 번째 조건은 배지 조성이다. 배지 내 호르몬 종류 및 농도, 기본 배지 종류, 탄소원 종류 및 농도가 약 배양에 주로 영향을 끼친다(Germana 2011). 많은 작물의 약 배양에서 전처리는 배 발생에 필수적이라고 알려져 있는데, 주로 저온 처리와 고온 처리가 이용된다(Kiviharju and Pehu 1998). 또한 약 배양은 유전자형에도 크게 영향을 받는데, 품종에 따라 약 배양 효율성이 매우 다르다고 하였다. 예를 들어 21개의 밀 품종을 약 배양하였을 때 10개의 품종만이 반수체 획득이 가능하였다(Bajaj 1990).

본 연구는 인삼의 약 배양을 통한 캘러스와 배 유도 및 식물체 재분화를 목적으로 한다. 먼저, 기본 배지 종류와 sucrose 농도가 캘러스 유도에 미치는 영향을 조사하였다. 이후, 배 형성에 적합한 호르몬 종류 및 농도를 선발하였다. 또한, 저온 전처리가 캘러스 유도와 배 형성에 미치는 영향을 평가하였으며 약 배양을 통한 인삼 품종별 배 발생 효율성을 검증하였다. 마지막으로 약 배양으로 형성된 배에서 신초를 유도하였으며 약 배양 유래 캘러스와 신초의 배수성을 검증하였다.

재료 및 방법

시험재료

약 배양에 사용한 인삼은 농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부 시험포장에서 제공받았다. 4년생 인삼 품종의

화뢰를 오전 10시에 채취한 후, Kim 등(2016)에 의하여 1핵기 후반기 소포자를 가지고 있다고 알려진 평균 2.2 mm의 화뢰를 선별하여 사용하였다. 천풍, 연풍, 고풍, 금풍, 선운, 청선 등 6품종을 사용하였는데 품종별 약 배양 효율성 시험을 제외한 모든 시험은 연풍 품종만을 사용하였다.

표준 약 배양 조건

인삼 약 배양에 적합한 조건을 확립하기 위하여 화뢰를 70% EtOH에 30초 동안 침지한 후 dH_2O 로 2회 수세하였다. 이후 2% sodium hypochlorite로 20분 동안 표면 살균한 후 dH_2O 로 5회 수세하였다. 미세 핀셋을 이용하여 화뢰에서 약을 채취한 후 캘러스 유도 배지에 치상하였으며 냉장고에서 $2^{\circ}C$ 로 2일 동안 저온 전처리를 하였다. 캘러스 유도 배지는 이전 인삼 약 배양 연구를 참고하여 제조하였는데(Lee et al. 2013), MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에 3% sucrose, 0.3% gelrite, 2,4-Dichlorophenoxyacetic(2,4-D) 1.0 mg/L, benzyladenine (BA) 0.1 mg/L를 첨가하였다. 배 유도 배지는 MS 배지에 3% sucrose, 0.3% gelrite, Indole-3-acetic acid (IBA) 3.0 mg/L를 첨가하여 제조하였다. 유도된 배는 1/2 SH (Schenk and Hildebrandt 1972), 3% sucrose, 0.8% agar, 5.0 mg/L gibberellic acid (GA_3)로 구성된 발아 배지에서 신초를 유도하였다. 사용한 모든 시약은 Duchefa Biochemie, Netherlands에서 구매하였고, 모든 배양 배지는 pH 5.7로 적정하였으며 $121^{\circ}C$ 로 15분 동안 고압 멸균하여 사용하였다. 약 배양으로 유도된 캘러스와 배는 $23^{\circ}C$ 로 관리하는 조직배양실에서 $24 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ 의 백색 형광등을 16시간 조사하면서 유지하였고, 대물 현미경(S8AP0, Leica, Wetzlar, Germany)을 이용하여 유도율, 크기, 개수를 조사하였다.

캘러스 유도 배지

인삼 약 배양에 적합한 캘러스 유도 배지를 선발하기 위하여 기본 배지 종류를 다르게 하여 배지를 제조하였다. 사용된 기본 배지는 MS, NLN (Lichter, 1982), B5 (Gamborg et al. 1968), N6 (Chu, 1978)였으며 나머지 조성은 표준 약 배양 조건을 따랐다.

기본 배지 선발 결과를 바탕으로 MS 배지에 sucrose 농도를 1, 3, 5, 7%로 다르게 하여 캘러스 유도 배지를 제조하였으며 나머지 조건은 표준 약 배양 조건을 따랐다. 약은 배지 별로 75개씩 치상하였으며 이 과정을 3회 반복하였다. 치상 8주 후에 캘러스 유도율은 치상된 전체 약 개수와 캘러스가 유도된 약 개수의 비율로 계산하였다. 캘러스 크기는 처리별로 10개의 캘러스를 이용하여 캘러스 직경 중에 가장 짧은 부분을 측정하였으며 이 과정을 3회 반복하였다.

배 유도 배지

배 유도 배지는 표준 약 배양 조건에 2,4-D와 IBA를 각각 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 mg/L씩 다르게 첨가하여 제조하였다. 배지 별로 60개의 캘러스를 치상하였으며 이 과정을 3회 반복하였다. 치상 60일 후 배 형성률과 배 개수를 조사하였는데, 배 형성률은 총 치상된 캘러스 개수와 배가 형성된 캘러스 수의 비율로 계산하였으며, 배가 형성된 경우 배 개수를 조사하였다.

저온 전처리별 약 배양

이번 연구에서 선발한 캘러스 및 배 유도 배지를 이용하여 저온 전처리별 약 배양의 효율성을 검증하였다. 저온 전처리는 화뢰를 2°C 냉장고에서 1, 2, 4, 8일 동안 처리하였으며 저온 처리하지 않은 것을 대조구로 사용하였다. 캘러스 배지에 약을 치상한 60일 후에 캘러스 유도율을 조사하였으며, 캘러스를 처리별로 배 유도 배지에 옮긴 60일 후에 배 유도율과 배 개수를 조사하였다. 약은 처리별로 75개씩 캘러스 배지에 치상하였으며, 캘러스는 30개씩 배 유도 배지로 옮겨졌으며 이 과정을 3회 반복하였다.

품종별 약 배양

이번 연구에서 확립된 약 배양 조건을 이용하여 인삼 품종별(천풍, 청선, 고평, 금풍, 선운, 연풍) 약 배양 효율성을 검증하였다. 4일 동안 저온 처리한 약은 캘러스 유도 배지(MS 배지, 3% sucrose, 0.8% agar, 2,4-D 1.0 mg/L, BA 0.1 mg/L)에 품종별로 75개씩 치상하였다. 캘러스는 품종별로 30개씩 배 유도 배지(MS 배지, 3% sucrose, 0.8% agar, 2,4-D 1.0 mg/L)로 옮겨졌으며 이 과정을 3회 반복하였다.

배수성 검정 및 식물체 재분화

유세포 분석기(Flow cytometry)를 이용하여 인삼 약에서 유래된 캘러스의 배수성 검정을 검증하였다. 표준 약 배양 조건으로 유도된 20개의 캘러스를 분석하였으며 4년생 연풍에서 채취한 잎을 대조구로 사용하였다. 먼저, 캘러스와 잎에 CyStain UV precise P 염색 용액(Sysmex Partec, Görlitz, Germany) 500 µL를 첨가한 후 칼날로 절단하여 DNA를 추출하였으며 나일론 메시(50 µm)에 걸러 이물질을 제거하였다. 배수성은 대조구와 재분화 식물체의 형광 강도를 비교하여 검증하였다.

약 배양으로 형성된 배는 발아배지로 옮겨 신초를 유도하였는데, 유도된 8개의 신초는 잎을 채취하여 캘러스의 배수성 검정에 사용한 방법으로 배수성을 검증하였다.

통계 처리

모든 실험은 3회 반복하여 평균값과 표준편차를 계산하였다. 통계 분석은 R 프로그램(R version 4.0.3, The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)을 사용하였다. ANOVA (Analysis of variance)를 분석하여 처리 간 차이가 있는 경우 Duncan 다중검정(DMRT)으로 유의성 검정을 하였다($p \leq 0.05$).

결과 및 고찰

인삼 약배양

화뢰에서 인삼의 약을 채취하여 캘러스 유도 배지에 치상하였다(Fig. 1A, B). 배양 10일 후에 캘러스 형성이 최초로 관찰되었으며(Fig. 1C), 캘러스는 점차 성장하였다(Fig. 1D). 배양 60일 후에 배는 관찰되지 않았고, 다수의 부정근이 발생하였다(Fig. 1E). 부정근을 추가적으로 성장시키기 위해 IBA 3.0 mg/L가 첨가된 MS 배지에 계대배양 하였을 때 캘러스 표면에 배 형성이 관찰되었다(Fig. 1F).

이전의 인삼 약 배양 연구는 캘러스 유도, 식물 재분화 및 4배체 부정근 형성만을 보고하였으며, 배 발생에 대한 결과는 없었다(Lee et al. 2009; Lee et al. 2013). 인삼은 종자 내 자엽을 이용한 체세포배 발생 연구는 많이 이루어졌지만(Choi et al. 1999; Kim et al. 2012; Lee et al. 2019), 약을 포함한 뿌리, 엽병 등 다른 조직을 이용한 연구는 많이 이루어지지 않았다(Kim et al. 2019; Zhang et al. 2014).

캘러스 유도배지 선발

인삼 약 배양에 적합한 캘러스 유도 배지를 선발하기 위하여 기본 배지 종류를 다르게 하여 약을 치상하였다. 그 결과, 사용된 모든 기본 배지에서 캘러스가 형성되었다(Fig. 2A). 캘러스 유도율은 N6 배지에서 86.6%로 가장 높았으며, MS 배지에서 83.8%로 그 다음이었다(Table 1). B5 배지에서는 81.6%의 캘러스가 유도되었으며, NLN 배지에서 가장 낮은 74.8%의 캘러스가 유도되었다. 캘러스 크기는 MS 배지에서 가장 컸고, 다음으로 B5, N6 순서였으며, NLN 배지에 캘러스 크기가 가장 작았다. 식물 종별로 약 배양에 적합한 기본 배지는 달랐는데, 기본 배지 성분 중 가장 큰 영향을 끼치는 것은 질소원이었다(Germana 2006). 이번 연구에서 약 배양 시 캘러스 유도에 가장 적합하였던 MS 배지는 질소원 농도가 가장 높았고 가장 좋지 못하였던 NLN 배지는 질소원 농도가 낮았는데, 이러한 차이가 캘러스 유도율과 크기에 차이를 발생시킨 것으로 추정된다.

다음으로 MS 배지 내에 sucrose 농도를 다르게 하여 캘러

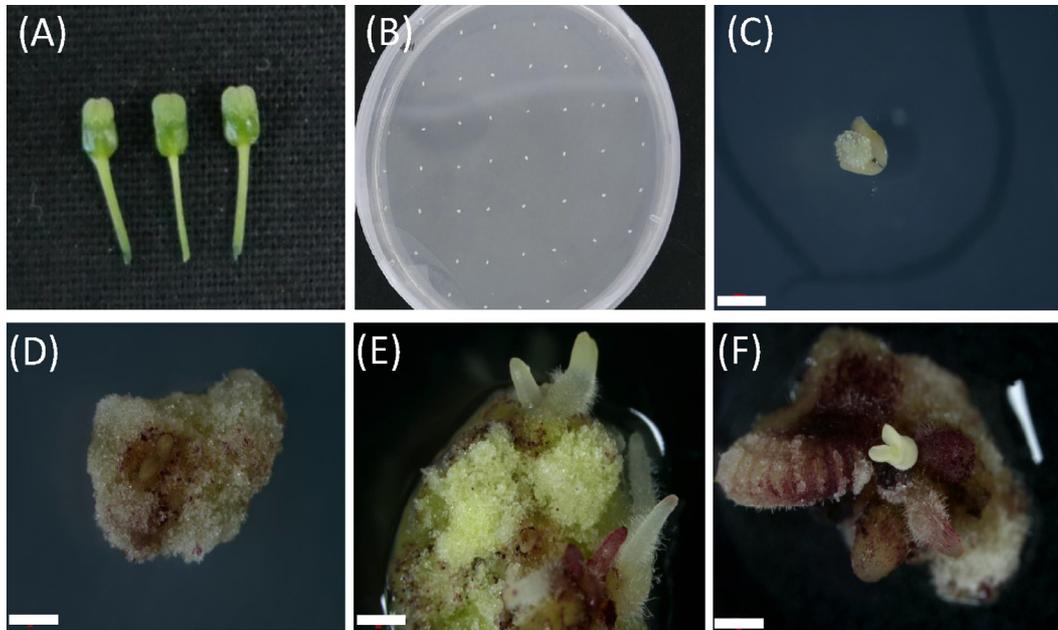


Fig 1 Anther culture in *Panax ginseng* ‘Yunpoong’. (A) Floral buds for anther culture. (B) Anthers inoculated on callus induction medium. (C) A callus emerged 10 days after anther culture. (D) Callus at 30 days after anther culture. (E) Adventitious root formation from the callus following subculture on callus induction medium. (F) Embryogenesis following transfer to Murashige and Skoog medium supplemented with 3.0 mg/L IBA. Scale bars, 10 mm

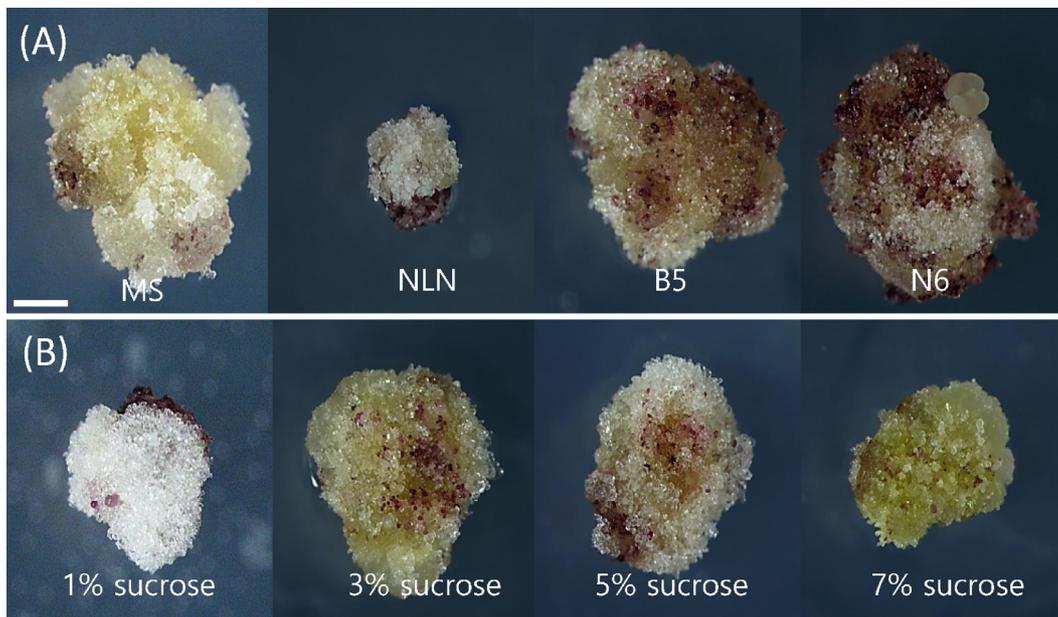


Fig 2 Callus morphology at 8 weeks after anther culture in *Panax ginseng* ‘Yunpoong’ depending on (A) basal medium and (B) sucrose concentration in the callus induction medium. Scale bars, 10 mm

Table 1 Effect of basal medium on callus induction via anther culture in *Panax ginseng* ‘Yunpoong’

Basal medium	Callus induction rate (%)	Callus size (cm)
Murashige and Skoog	83.8 ± 11.5 ^{a,z}	2.6 ± 0.6 ^a
NLN	74.8 ± 17.9 ^b	1.3 ± 0.3 ^c
B5	81.6 ± 14.7 ^{ab}	2.2 ± 0.5 ^b
N6	86.6 ± 8.2 ^a	2.2 ± 0.5 ^b

^zDifferent letters within the same column indicate significant differences at $p \leq 0.05$ according to Duncan’s multiple comparison test.

스를 유도하였다. 그 결과, sucrose 농도에 상관없이 캘러스는 형성되었다(Fig. 2B). 캘러스 유도율은 78.7%–84.8% 범위였는데, sucrose의 농도가 증가할수록 캘러스 유도율은 증가하였지만 통계적으로 유의미한 차이는 없었다(Table 2). 하지만 캘러스 크기는 sucrose 농도별로 차이가 있었는데, 3% sucrose에서 평균 2.6 cm로 가장 컸으며, 1%와 5% sucrose에서는 평균 2.4 cm이었다. 농도가 가장 높은 7% sucrose에서는 캘러스 크기가 평균 2.1 cm로 가장 작았다. 다른 작물의 약 배양에서 주로 사용되는 탄소원은 maltose였는데, 이것은 sucrose 보다 분해 속도가 느려 배지 안정성을 높이기 때문이라고 하였다(Talebi et al. 2007). 하지만 이전 인삼 약 배양 연구에서 3% maltose를 사용하였을 때, 캘러스 유도율은 17.9%로 매우 낮았다(Lee et al. 2013).

이번 연구에서는 7% sucrose를 함유한 배지에서 캘러스 유도율이 84.8%로 가장 높았지만 3% sucrose와 큰 차이가 없었으며, 오히려 캘러스 크기는 3% sucrose에서 가장 컸다(Table 2). 위의 결과를 종합하였을 때, 인삼 약 배양에서 캘러스 유도에 적합한 배지는 3% sucrose가 첨가된 MS배지로 판단된다.

배 유도배지 선발

약에서 형성된 캘러스로부터 배를 유도하기 위하여 배 유도 배지로 계대 배양하였다. 배 유도 배지는 3% sucrose가 첨가된 MS 배지에 2,4-D와 IBA를 각각 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 mg/L 첨가

하여 제조하였다. 그 결과, IBA 5.0 mg/L가 첨가된 배지를 제외한 나머지 배지에서 배 형성이 확인되었는데(Table 3), 배 형성률은 1.4%–6.8% 범위로 낮은 편이었다. 2,4-D 1.0 mg/L가 첨가된 배지에서 6.8%로 배 형성률이 가장 높았으며, 다음으로 2,4-D 3.0 mg/L (5.7%), 0.5 mg/L (4.6%) 순서였다. IBA가 첨가된 배지는 2,4-D에 비하여 배 형성률이 낮았는데, IBA 1.0 mg/L에서 배 형성률이 3.1%였으며 나머지는 2.7% 미만이었다. 캘러스 당 배 개수는 2,4-D 3.0 mg/L가 첨가된 배지에서 평균 5.1개로 가장 많았으며, 다음으로 IBA 1.0 mg/L (평균 4.3개), 2,4-D 1.0 mg/L (평균 4.1개) 순서였다. 배 형성 개수는 2,4-D와 IBA 사이에 큰 차이는 없었지만 농도는 1.0 mg/L 또는 3.0 mg/L에서 가장 적합하였다.

2,4-D는 동정생식 유도에 효과적이어서 많은 작물의 약 배양에 사용되는데(Zhao et al. 1998), 적합한 농도는 작물에 따라 다르다고 하였다(Kruczkowska et al. 2005; Rodrigues et al. 2004; Zheng and Konzak 1999). 2,4-D는 배아 발생 관련 유전자의 발현을 조절하여 동정생식을 활성화할 수 있다고 알려져 있다(Ardebili et al. 2011). 위 결과를 종합하였을 때, 인삼 약 배양에서 2,4-D는 IBA보다 배 형성에 우수하였으며 1.0 mg/L 또는 3.0 mg/L의 농도가 가장 적합하였다.

저온 전처리

이번 시험에서 선발된 캘러스 유도 배지와 배 형성 배지를 사용하여 약의 저온 전처리 기간을 다르게 하여 캘러스와 배

Table 2 Effect of sucrose concentration on callus induction via anther culture in *Panax ginseng* ‘Yunpoong’

Sucrose (%)	Callus induction rate (%)	Callus size (cm)
1	78.7 ± 13.9	2.4 ± 0.6 ^{b z}
3	82.1 ± 10.0	2.6 ± 0.5 ^a
5	83.3 ± 10.6	2.4 ± 0.5 ^b
7	84.8 ± 13.4	2.1 ± 0.4 ^c

^zDifferent letters within the same column indicate significant differences at $p \leq 0.05$ according to Duncan’s multiple comparison test.

Table 3 Effect of hormone concentration on embryogenesis via anther culture in *Panax ginseng* ‘Yunpoong’

Hormones (mg/L)		Embryo formation rate (%)	Number of embryos per callus
2,4-D	IBA		
0.5	-	4.6 ± 2.6 ^{abc z}	2.6 ± 1.4 ^{abc}
1.0	-	6.8 ± 3.2 ^a	4.1 ± 0.6 ^a
3.0	-	5.7 ± 3.7 ^{ab}	5.1 ± 3.4 ^a
5.0	-	1.9 ± 2.2 ^{cd}	2.0 ± 1.0 ^{bc}
-	0.5	1.4 ± 0.9 ^{bcd}	1.5 ± 0.5 ^{bc}
-	1.0	3.1 ± 0.9 ^{bcd}	4.3 ± 3.1 ^a
-	3.0	2.7 ± 2.1 ^{bcd}	3.5 ± 1.9 ^{ab}
-	5.0	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^c

^zDifferent letters within the same column indicate significant differences at $p \leq 0.05$ according to Duncan’s multiple comparison test.

유도 효율성을 검정하였다. 그 결과, 저온 전처리 유무와 처리 기간에 상관없이 80% 이상 캘러스가 유도되었다(Table 4). 배 형성률은 2일 저온 전처리하였을 때 3.2%가 가장 높았으나 처리별로 유의미한 차이는 없었다. 배 개수는 4일 저온 전처리 하였을 때 평균 6.0개로 가장 많았으나 처리별로 통계적으로 유의미한 차이는 없었다.

저온과 고온 처리는 약 배양에서 가장 광범위하게 사용되는 전처리 방법이다(Germana 2011). 이전 인삼 약 배양 연구에서 고온 전처리를 하였을 때 캘러스가 전혀 유도되지 않았기 때문에(Kim et al. 2009), 이번 시험에서는 2°C 저온을 기간을 다르게 하여 전처리 하였다. 그 결과, 저온 전처리에 의한 캘러스 유도율, 배 형성률, 배 개수 향상 효과는 발견할 수 없었다(Table 4). 이번 연구결과와 대조적으로 이전의 인삼 약 배양 연구에서는 저온 전처리에 의한 캘러스 유도율 향상이 보고되었는데, 저온을 전혀 처리 하지 않았을 때 캘러스 유도율이 37.0%이었던 것에 비하여 저온 처리하였을 때 51.1%–69.6%로 향상되었다(Lee et al. 2009). 많은 작물에서 약 배양 시 저온 전처리는 캘러스 유도와 배 발생에 매우 효과적이라고 하였다(Wang et al. 2018; Zhang et al. 2013). 하지만 저온 전처리가 약 배양에 효과가 없었거나 저온 전처리 없이 동정생식을 유도한 결과도 있다(Blasco et al. 2015; Kadota and Niimi 2004). 또, Wang 등(2018)은 저온 전처리 효과는 유전자형에도 크게 영향을 받는다고 하였다.

품종별 약 배양

이번 시험에서 확립된 배양 배지와 저온 전처리 조건을 사용

하여 품종별로 약을 채취하여 캘러스 유도 배지에 치상하여 약 배양 효율성을 검정하였다. 그 결과, 모든 품종에서 78.7% 이상 캘러스가 형성되었는데, 캘러스 유도율은 품종별로 큰 차이가 발견되지 않았다(Table 5). 배 형성률은 청선 품종에서 5.4%로 가장 높았으며, 연풍 품종에서 3.2%로 그다음이었다. 천풍, 금풍, 고품 품종은 1% 내외의 배 형성률을 나타내었으며, 선운 품종은 배가 전혀 형성되지 않았다. 캘러스 당 배 형성 개수는 고품 품종이 평균 2.5개로 가장 많았으나 품종별로 유의미한 차이는 없었다.

이번 연구와 마찬가지로 약 배양에서 유전자형에 의한 배 발생 차이는 많은 작물에서 보고되었다(Doi et al. 2010; Kozak et al. 2012; Zhang and Takahata 2001). Buysler 등(1985)은 약 배양이 모든 유전자형의 동정생식에 적합한 것은 아니라고 하였다.

배수성 검정 및 신초 재분화

인삼 약 배양에서 유래된 캘러스는 유세포 분석기를 이용하여 배수성을 검정하였다. 그 결과 20개의 캘러스 중 19개는 대조구와 같은 2배체였으나 나머지 1개에서 반수체 형태의 캘러스가 유도되었음을 확인하였다(Fig. 3A, B). Lee 등(2009)의 인삼 약 배양 연구에서 4배체 부정근의 유도가 보고된 바 있었지만 반수체 캘러스의 확인은 이전에 보고된 바 없었다. 하지만 반수체로 판명된 캘러스에서에서는 수개월의 추가적인 배양 후에도 배가 전혀 형성되지 않았다(데이터 미제시).

약 배양으로 유도된 배를 발아배지로 옮겨볼 때 8개의 신

Table 4 Effect of cold pretreatment on callus induction and embryogenesis via anther culture in *Panax ginseng* ‘Yunpoong’

Cold pretreatment (days)	Callus induction rate (%)	Embryo formation rate (%)	Number of embryos per callus
0	88.0 ± 9.3 ^z	1.5 ± 1.2	2.0 ± 1.0
1	83.2 ± 9.3	1.4 ± 1.0	3.0 ± 2.7
2	85.0 ± 8.9	3.2 ± 0.9	2.5 ± 2.4
4	80.3 ± 12.1	2.1 ± 3.0	6.0 ± 5.7
8	84.0 ± 11.1	2.1 ± 2.4	3.5 ± 0.7

^zDifferent letters within the same column indicate significant differences at $p \leq 0.05$ according to Duncan’s multiple comparison test.

Table 5 Effect of cultivar on callus induction and embryogenesis via anther culture in *Panax ginseng*

Cultivar	Callus induction rate (%)	Embryo formation rate (%)	Number of embryos per callus
‘Chunpoong’	78.7 ± 13.9	1.4 ± 1.1 ^{bc z}	2.2 ± 1.3 ^a
‘Cheongsun’	79.7 ± 9.8	5.4 ± 1.6 ^a	2.0 ± 0.3 ^a
‘Gopoong’	83.3 ± 10.6	1.0 ± 0.6 ^{bc}	1.0 ± 0.0 ^a
‘Gumpoong’	84.8 ± 13.4	1.4 ± 1.1 ^{bc}	2.5 ± 1.3 ^a
‘Sunun’	81.2 ± 15.8	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^b
‘Yunpoong’	82.1 ± 10.0	3.2 ± 0.9 ^b	1.3 ± 0.4 ^a

^zDifferent letters within the same column indicate significant differences at $p \leq 0.05$ according to Duncan’s multiple comparison test.

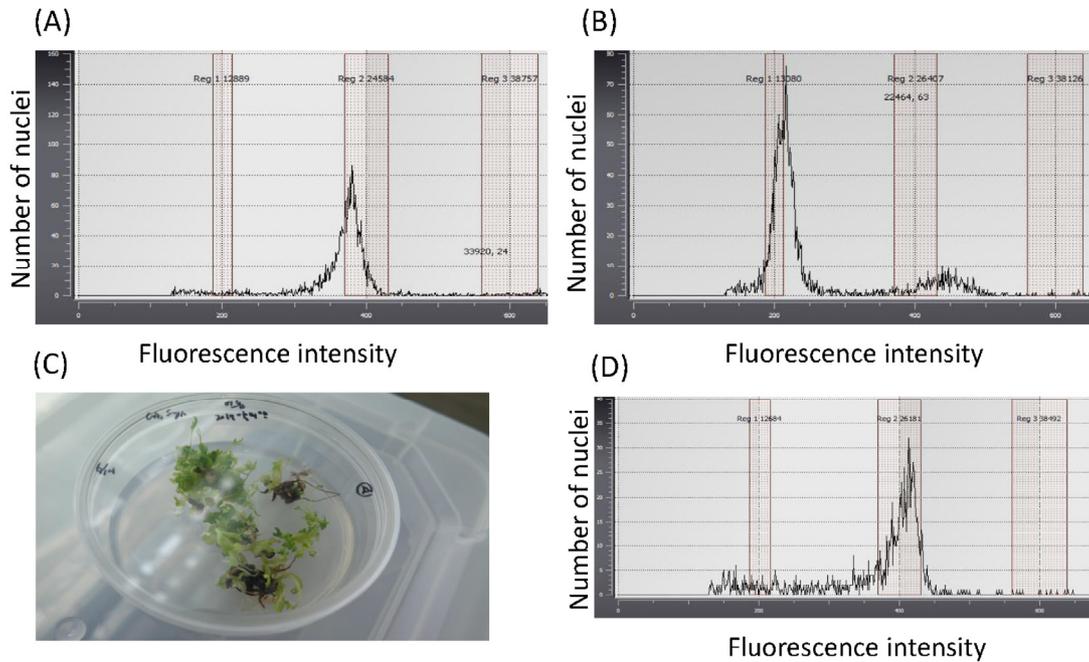


Fig 3 Ploidy level analysis using flow cytometry and plant regeneration from anther culture in *Panax ginseng* ‘Yunpoong’. Histogram of (A) diploid type derived from the control and (B) haploid type derived from callus. (C) Regenerated shoots and (D) histogram of diploid type derived from the shoots

초를 획득할 수 있었다. 이전 인삼 약 배양 연구에서 식물체의 재분화가 보고되었으나(Lee et al. 2013) 배에서 유래된 식물체의 발생은 보고되지 않았다(Fig. 3C). 약 배양 유래 식물체의 배수성을 검정한 결과, 8개의 식물체 모두 2배체로 확인되었다(Fig. 3D).

적 요

이번 연구에서 인삼의 약 배양을 통한 배 형성과 식물체의 재분화가 확인되었다. 인삼의 약 배양에서 캘러스 유도에 적합한 기본 배지는 MS 배지였고 sucrose 농도는 3%였으며, 배 형성에 적합한 호르몬 농도는 2,4-D 1.0 mg/L 또는 3.0 mg/L이었다. 저온 전처리에 의한 인삼 약 배양의 캘러스 유도와 배 형성의 효율성 차이는 확인할 수 없었다. 인삼의 품종별 약 배양의 효율성을 검정한 결과, 청선 품종의 배 형성이 가장 우수하였으며 선운 품종은 배 형성이 관찰되지 않았다. 약 배양으로 유도된 캘러스의 배수성을 검정한 결과, 반수체 캘러스가 확인되었지만 이 캘러스에서 배는 형성되지 않았다. 약 배양 유래의 배를 발아배지에 치상하였을 때 정상적으로 식물체가 재분화하였으며, 이 식물체의 배수성을 검정한 결과, 모두 2배체로 확인되었다. 추후 DNA 마커를 이용한 약 배양 유래 식물체의 동형접합성의 확인이 필요하다고 판단된다. 인삼 약 배양을 통하여 동형접합성 식물체를 생산할 수 있다면 인삼 육종 효율성을 증진시키는데 크게 기여할 수 있을 것이다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청에서 주관하는 인삼 육종효율 증진을 위한 기반기술 개발(과제번호: PJ01018702)의 연구비 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

References

Ardebili SH, Shariatpanahi ME, Amiri R, Emamifar M, Nematzadeh G, Noori SAS, Oroojloo M and Heberle-Bors E (2011) Effect of 2,4-D as a novel inducer of embryogenesis in microspores of *Brassica napus* L. *Czech J Genet Plant Breed* 47:114-122

Bajaj YPS (1990) In vitro production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. *Haploids in crop improvement* 12:1-4

Bang KH, Kim YC, Lee JW, Cho IH, Hong CE, Hyun DH, Kim JU (2020) Major achievement and prospect of ginseng breeding in Korea. *Korean J Breed* 52:170-178

Blasco M, Badenes ML, del Mar Naval M (2015) Embryogenic response from anther culture of cultivars of loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.) from different origins. *Euphytica* 205:337-348

Buyser JD, Henry Y, Taleb G (1985) Wheat androgenesis: Cytogenetical analysis and agronomic performance of doubled haploids. *Z Pflanzenzucht* 95:23-34

Choi YE, Yang DC, Yoon ES, Choi KT (1999) High-efficiency plant production via direct somatic single embryogenesis

- from preplasmolysed cotyledons of *Panax ginseng* and possible dormancy of somatic embryos. *Plant Cell Rep* 18:493-499
- Chu CC (1978) The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. *Proc Symp On Plant Tissue Culture* 43-50
- Datta SK (2005) Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement. *Current Sci* 11: 1870-1878
- Doi H, Takahashi R, Hikage T, Takahata Y (2010) Embryogenesis and doubled haploid production from anther culture in gentian (*Gentiana triflora*). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 102:27-33
- Dunwell JM (2010) Haploids in flowering plants: Origins and exploitation. *Plant biotech J* 8:377-424
- Gamborg OL, Miller R, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151-158
- Germana MA (2006) Doubled haploid production in fruit crops. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 86:131-146
- Germana MA (2011) Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 104:283-300
- Jayakodi M, Choi BS, Lee SC, Kim NH, Park JY, Jang W, Lakshmanan M, Mohan SVG, Lee DY, Yang TJ (2018) Ginseng Genome Database: An open-access platform for genomics of *Panax ginseng*. *BMC plant Biol* 18:1-7
- Kadota M, Niimi Y (2004) Production of triploid plants of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) by anther culture. *Euphytica* 138:141-147
- Kim JY, Adhikari PB, Ahn CH, Kim DH, Kim YC, Han JY, Kondeti S, Choi YE (2019) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of interspecific ginseng hybrid between *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*. *J Ginseng Res* 43:38-48
- Kim YJ, Jang MG, Zhu L, Silva J, Zhu X, Sukweenadhi J, Kwon WS, Yang DC, Zhang D (2016) Cytological characterization of anther development in *Panax ginseng* Meyer. *Protoplasma* 253:1111-1123
- Kim YJ, Lee OR, Kim KT, Yang DC (2012) High frequency of plant regeneration through cyclic secondary somatic embryogenesis in *Panax ginseng*. *J Ginseng Res* 36:442-448
- Kiviharju E, Pehu E (1998) The effect of cold and heat pretreatments on anther culture response of *Avena sativa* and *A. sterilis*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 54:97-104
- Kozak K, Galek R, Waheed, MT, Sawicka-Sienkiewicz E (2012) Anther culture of *Lupinus angustifolius*: callus formation and the development of multicellular and embryo-like structures. *Plant Growth Regul* 66:145-153
- Kruczkowska H, Pawlowska H, Skucińska B (2005) Effect of 2,4-D concentration on the androgenic response in anther culture of barley. *Cereal Res Commun* 33:727-732
- Lee HY, Khorolragchaa A, Sun MS, Kim YJ, Kim YJ, Kwon WS, Yang DC (2013) Plant Regeneration from Anther Culture of *Panax ginseng*. *Korean J Plant Resour* 26:383-388
- Lee JH, Kim YJ, Jung DY, Shim JS, Kim IH, Yang DC (2009) In vitro induction of tetraploid roots by various pretreatments from anther of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *J Ginseng Res* 33:65-71
- Lee JW, Jo IH, Kim JU, Hong CE, Bang KH, Park YD (2019) Determination of mutagenic sensitivity to gamma rays in ginseng (*Panax ginseng*) dehiscent seeds, roots, and somatic embryos. *Hortic Environ Biotechnol* 60:721-731
- Lichter R (1982) Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Pflanzenphysiol* 105:427-434
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiol Plant* 15:473-497
- Rodrigues LR, Terra TF, Bered F, Bodanese-Zanettini MH (2004) Origin of embryo-like structures in soybean anther culture investigated using SSR marker. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 77:287-289
- Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian J Bot* 50:199-204
- Talebi R, Rahemi MR, Arefi H, Nourozi M, Bagheri N (2007) In vitro plant regeneration through anther culture of some Iranian local rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Pakistan J Biol Sci* 10:2056-2060
- Waminal NE, Park HM, Ryu KB, Kim JH, Yang TJ, Kim HH (2012) Karyotype analysis of *Panax ginseng* CA Meyer, 1843 (*Araliaceae*) based on rDNA loci and DAPI band distribution. *Comp Cytogenet* 6:425-441
- Wang GF, Qin HY, Sun D, Fan ST, Yang YM, Wang ZX, Xu PL, Zhao Y, Liu YX, Ai J (2018) Haploid plant regeneration from hardy kiwifruit (*Actinidia arguta* Planch.) anther culture. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 134:15-28
- Wen J, Plunkett GM, Mitchell AD, Wagstaff SJ (2001) The evolution of Araliaceae: A phylogenetic analysis based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Syst Bot* 26:144-167
- Zhang C, Tsukumi T, Ikeda M, Sato M, Okada H, Ohashi Y, Matsuno H, Yamamoto T, Wada M, Yoshikawa N, Matsumoto S, Li J, Mimida N, Watanabe M, Suzuki A, Komori S (2013) Effects of the microspore development stage and cold pre-treatment of flower buds on embryo induction in Apple (*Malus x domestica* Borkh.) anther culture. *J Jan Soc Hort Sci* 82:114-124
- Zhang FL, Takahata Y (2001) Inheritance of microspore embryogenic ability in *Brassica* crops. *Theor Appl Genet* 103:254-258
- Zhang JY, Sun HJ, Song IJ, Bae TW, Kang HG, Ko SM, Kwon YI, Kim IW, Lee JC, Park SY, Lim PO, Kim YH, Lee HY (2014) Plant regeneration of Korean wild ginseng (*Panax ginseng* Meyer) mutant lines induced by γ -irradiation (^{60}Co) of adventitious roots. *J Ginseng Res* 38:220-225
- Zhang SC, Wei AZ, Yang TX (2011) Advances in the research and application of haploid and doubled haploid technologies in fruit trees. *J Fruit Sci* 28:869-874
- Zhao G, Liu Y, Li J (1998) Germination of embryo in soybean anther culture. *Chin Sci Bull* 43:1991-1995
- Zheng MY, Konzak CF (1999) Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on callus induction and plant regeneration in anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep* 19:69-73