



## 인삼 약 배양을 통한 체세포배 발생 유도 및 토양 순화

이정우<sup>1</sup> · 김장욱<sup>2</sup> · 방경환<sup>3</sup> · 김동휘<sup>4</sup> · 조익현<sup>5</sup> · 김영창<sup>6†</sup>

### Somatic Embryogenesis and Acclimatization from Anther Culture of *Panax ginseng* C. A. Meyer

Jung Woo Lee<sup>1</sup>, Jang Uk Kim<sup>2</sup>, Kyong Hwan Bang<sup>3</sup>, Dong Hwi Kim<sup>4</sup>, Ick Hyun Jo<sup>5</sup> and Young Chang Kim<sup>6†</sup>

#### ABSTRACT

Received: 2023 February 10  
1st Revised: 2023 March 6  
2nd Revised: 2023 March 21  
3rd Revised: 2023 March 27  
Accepted: 2023 March 27

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Background:** *Panax ginseng* C. A. Meyer is a valuable crop in Asia especially in Korea and China. However, it takes over 3 years for ginseng to produce seeds due to its lengthy juvenile period. This hinders the industry development and limits potential propagation of new cultivars. Anther cultures could provide homozygous plants within a year, however, *P. ginseng* embryogenesis using alternative cultures have not been reported.

**Methods and Results:** Anthers were inoculated in the callus induction media supplemented with various hormones including auxin and cytokinin. Callus induction occurred in all media, ranging from 62.9% to 83.8%, except for the medium without no hormone. The embryo formation rate was low (0.4% - 4.2%). The highest embryo formation was observed in the medium supplemented with 1.0 mg/ℓ of 2,4-D in isolation. Moreover, addition of gibberellic acid effectively aided in embryo germination. After culturing for 5 months, plantlets with taproot roots were transplanted into the soil and as a result high sprouting rate of approximately 80.0% was observed. The flow cytometry analysis revealed no difference in the ploidy level was found between the anther culture-derived and control plants.

**Conclusions:** Embryogenesis and plant regeneration of *P. ginseng* could be contributed by the anther culture to produce homozygous individuals.

**Key Words:** *Panax ginseng* C. A. Meyer, Anther Culture, Embryogenesis, Plant Regeneration, Acclimatization



## 서 언

고려인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 두릅나무과에 속하는 초본성 다년생 작물로 대한민국의 대표적인 약용작물이며, 주로 대한민국, 중국의 만주 지방, 러시아의 극동지방에서 재배되고 있다. 인삼의 대표적인 기능성 성분은 진세노사이드로, 약 150여 종의 진세노사이드가 보고 되었으며 (Zhao *et al.*, 2015), 다양한 질병에 대한 진세노사이드의 약리 효능이 검증되었다 (Shao *et al.*, 2020).

인삼은 유전자원의 다양성이 부족한데, 이러한 특성으로 인

삼의 품종 육성은 매우 어렵다. 또, 인삼의 종자와 종묘는 일정 기간 휴면하는 특성이 있어 급속한 세대의 진전 역시 어렵다 (Kim *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2018). 현재까지 개발된 모든 인삼 품종은 순계 분리 육종방법으로 육성되었다. 기후변화와 이상기상에 대응한 재해 및 병 저항성 품종의 개발이 필요하지만, 이러한 형질은 복잡한 메커니즘을 가지고 있다. 따라서 순계 분리를 이용한 품종 육성에는 한계가 있으며 새로운 육종방법의 도입이 필요하다 (Lee *et al.*, 2020).

인공교배를 통한 교배 육종은 많은 작물의 품종 육성에 사

†Corresponding author: (Phone) +82-63-238-0883 (E-mail) ycpiano@korea.kr

<sup>1</sup>농촌진흥청 인삼특작부 연구사 / Researcher, Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 27709, Korea.

<sup>2</sup>농촌진흥청 인삼특작부 연구사 / Researcher, Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 27709, Korea.

<sup>3</sup>농촌진흥청 인삼특작부 연구관 / Researcher, Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 27709, Korea.

<sup>4</sup>농촌진흥청 인삼특작부 연구관 / Researcher, Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 27709, Korea.

<sup>5</sup>단국대학교 식량생명공학전공 조교수 / Assistant professor, Department of Crop Science and Biotechnology, Dankook University, Cheonan 31116, Korea.

<sup>6</sup>농촌진흥청 융복합혁신전략팀 연구관 / Researcher, Convergence and Innovation Strategy Team, Research Policy Bureau, RDA, Jeonju 54875, Korea.

용되는 방법이다. 고려인삼은 자가수정을 원칙으로 하지만 인공교배 역시 가능하다고 알려져 있다 (Bang *et al.*, 2020). 하지만 인삼은 종자 파종 후 3 년 이상이 지나야 개화할 수 있다 (Kim *et al.*, 2016a). 이러한 특성으로 인공교배 후에 유전적인 고정을 위해서는 최소 30 년 이상의 오랜 시간이 걸리게 된다. 또, 1 년에 50 개 내외의 후대 종자만이 생산되어 다양한 재조합이 있는 후대를 얻기 힘들다 (Lee *et al.*, 2019).

동정생식은 소포자가 배우체로 발달하지 않고 포자체로 발달하여 배 또는 식물체를 형성하는 것을 말하는데, 1 세대 만에 반수체 또는 배가 반수체 등 동형접합성인 식물체를 얻을 수 있는 장점이 있다 (Ahmadi and Ebrahimzadeh, 2020). 반수체는 Blakeslee 등 (1922)에 의하여 최초로 발견되었는데, 자연적인 반수체의 발생 빈도는 매우 낮아 육종에 실질적으로 활용이 어렵다. 조직배양을 통한 반수체 유도는 Guha와 Maheshwari (1964)이 약 배양에 성공하면서 최초로 보고되었는데, 약 배양은 많은 작물에서 동형접합성 식물체를 얻기 위한 수단으로 광범위하게 사용되고 있다 (Germanà, 2010).

약 배양을 이용한 성공적인 배 발생을 위해서 가장 먼저 고려해야 할 사항은 적합한 배양배지의 선발이다. 그중에서도 적절한 호르몬의 종류와 비율의 선발은 가장 중요하게 고려해야 하는 요소이다 (Qiao *et al.*, 2013). 지금까지 많은 인삼 조직배양 연구가 이루어져 왔지만 (Choi *et al.*, 1998; 1999; Lee *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2021), 인삼 약 배양에 관한 연구는 2 건만이 보고되었을 뿐 약 배양을 통한 배 발생과 식물체의 토양 순화는 지금까지 보고되지 않았다 (Lee *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2013).

본 연구에서는 인삼 약 배양 시 배 발생 캘러스 유도에 적합한 옥신과 사이토키닌 종류를 탐색하고자 하였다. 또한 약 배양으로 형성된 배의 적정 발아 조건을 조사하였으며 재분화 식물체의 배수성을 검정하고 토양 순화 가능성을 밝히고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 식물재료

약 배양 시험에 사용한 재료는 연풍 품종으로 농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부 시험포장에서 제공받았다. 약 배양에 사용할 약은 3월 말부터 4월 중순 사이에 화경을 채취하여 획득하였는데, Kim 등 (2016b)의 연구 결과를 바탕으로 늦은 1 핵기 후반 화분을 가지고 있는 2.33 mm - 2.51 mm 사이의 화뢰를 시험 재료로 사용하였다.

화뢰는 먼저 4°C 냉장고에서 2 일 동안 저온처리를 하였으며 이후 클린벤치 내에서 70% 에탄올에 30 초 동안 소독한 후 멸균수로 2 회 세척하였다. 이후 차아염소산나트륨 2% (NaOCl) (Daejung, Siheung, Korea)을 넣고 조금씩 흔들면서

표면 살균을 20 분 동안 한 후 멸균수로 5 회 동안 세척하였다. 그 후에 멸균된 종이타월에 올려서 5 분 동안 표면에 있는 물기를 말렸다. 약 배양은  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 로 관리하는 배양실에서  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 형광등을 16 시간 동안 조사하면서 수행하였다.

### 2. 캘러스 유도

캘러스 유도배지는 MS (Murashige and Skoog, 1962; Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands) 배지에 호르몬을 다양한 조합으로 첨가하여 제조하였다.

옥신류 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands)와  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA) (Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands)는 각각 0.5, 1.0, 2.0 mg/l 농도를 사용하였고 사이토키닌류 benzyladenine (BA) (Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands), kinetin (KT) (Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands)는 모두 0.1 mg/l 농도를 사용하였다. 호르몬이 전혀 첨가되지 않은 배지는 대조구로 사용하였다. 캘러스 유도배지는 sucrose 3.0% (Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands)와 gelrite 0.3% (Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands)를 첨가하고 pH를 5.7로 맞춘 후 121°C에서 15 분 동안 고압 멸균하여 준비하였다.

약은 화뢰에서 화탁을 제거한 후 핀셋을 이용하여 채취하였다. 약은 캘러스 유도배지에 페트리디시 당 30 개씩 총 90 개를 처리별로 치상하였으며 이 과정을 3 회 반복하였다. 치상 8 주 후에 캘러스 유도율, 캘러스 크기, 부정근 유도율을 조사하였다.

### 3. 체세포배 형성 유도

배 형성을 유도하기 위하여 캘러스를 체세포배 유도배지로 계대배양하였다. 체세포배 유도배지는 MS 배지에 sucrose 3.0%와 gelrite 0.3%를 첨가하여 만들었으며 호르몬은 2,4-D를 1.0 mg/l 의 수준으로 첨가하고, BA와 KT를 각각 0.0, 0.3, 2.5, 5.0, 7.0 mg/l 의 수준으로 조합 처리하였다. 호르몬이 전혀 첨가되지 않은 배지는 대조구로 사용하였다.

모든 배지는 pH를 5.7 적정한 후 autoclave를 이용하여 121°C에서 15 분 동안 고압 멸균을 진행하였다. 캘러스는 배지별로 각각 60 개씩 치상하였으며 이 과정을 3 회 반복하였다. 치상 8 주 후에 배 형성률, 유도된 체세포배 개수를 조사하였다.

### 4. 체세포배 발아

형성된 체세포배는 캘러스에서 분리하여 sucrose 2.0%, agar 0.5%, 1/2 SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) 배지가 첨가된 발아배지로 치상하였다. 발아배지는 121°C에서 15 분 동안

고압 멸균 처리 후 gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) (Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands)를 각각 1.0, 5.0, 10.0 mg/l 의 수준으로 첨가하여 제조하였다. 호르몬이 전혀 첨가되지 않은 배지는 대조구로 사용하였다. 유도된 체세포는 배지별로 10 개씩 치상하였는데 이 과정을 3 회 반복하였으며, 치상 4 주 후 배 발아율을 조사하였다. 발아한 신탄는 Lee 등 (2021)의 연구에서 사용한 생육배지 (1/3 SH, sucrose 2.0%, gelrite 0.5%)로 계대배양하여 추가적인 생장을 유도하였다.

### 5. 토양 순화

생육배지에서 5 개월 동안 배양 후, 유식물체는 지상부가 노화하면서 잠아를 가지고 있는 굵은 뿌리를 형성하였다. 수확한 20 개의 뿌리는 GA<sub>3</sub> 25 mg/l 의 용액에 1 시간 동안 침지한 후 3 : 1 비율로 조합된 상토 (Nonggyung, Jincheon, Korea)에 이식하여 25 ± 2°C로 유지되는 온실에서 출아를 유도하였으며, 4 주 후에 출아율을 조사하였다.

### 6. 배수성 검정

출아한 16 개의 재분화 식물체는 유세포기 (flow cytometry)를 사용하여 배수성을 검정하였다. 대조구로 연풍 묘삼에서 출아한 식물체를 사용하였다.

실험과정을 간략하게 설명하면, 먼저 재분화 식물체와 대조 식물체에서 잎을 채취한 후 페트리디쉬에 담고 CyStain UV precise P 염색 용액 (Sysmex Partec, Görlitz, Germany) 500 µl 를 첨가하였다. 칼날을 이용하여 잎을 절단하여 DNA 를 추출하고 DAPI 염색하였으며, 나일론 메시 (50 µm)에 걸렸다. 배수성은 대조 식물체와 재분화 식물체의 형광 강도를 비교하여 검정하였다.

### 7. 통계 분석

통계 분석은 R 프로그램 (R version 4.1.2, The R foundation

for Statistical Computing, Vienna, Austria)를 이용하여 분산 분석 (ANOVA)을 통하여 유의성을 검정하였다. 유의성이 판별되었을 때 Duncan Multiple Range Test (DMRT)를 이용하여 사후 검정을 하였다 ( $p < 0.05$ ).

## 결 과

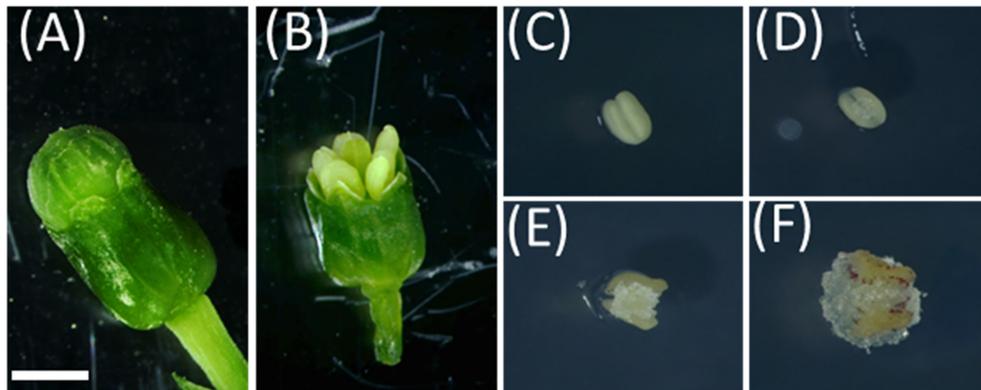
### 1. 캘러스 유도

화뢰에서 분리한 약을 캘러스 유도배지에 치상하였다 (Fig. 1A - 1C). 치상 10 일 후, 캘러스처럼 보이는 형태가 최초로 나타났으며 (Fig. 1D), 2 주 후에는 뚜렷한 캘러스 형태를 보였고 (Fig. 1E), 4 주 후에는 육안으로도 확인할 정도로 캘러스가 성장하였다 (Fig. 1F).

배양 8 주 후, 캘러스 유도배지의 호르몬 종류 및 조합에 의한 영향을 조사하였다. 그 결과, 호르몬이 전혀 첨가되지 않은 배지에서는 캘러스가 형성되지 않았으며, NAA 0.5 mg/l 와 BA 0.1 mg/l 가 첨가된 배지에서 캘러스 유도율은 62.9%로 다른 호르몬이 첨가된 배지에 비하여 유의미하게 낮았다. 나머지 호르몬이 첨가된 배지의 캘러스 유도율은 74.9% - 83.8% 범위로, 처리 별로 유의미한 차이는 발견되지 않았다 (Table 1).

캘러스 크기는 호르몬의 종류와 농도에 따라 중요한 차이가 관찰되었다. 2,4-D와 NAA의 농도가 증가할수록 캘러스 크기는 점차 증가하였는데, NAA에 비하여 2,4-D를 첨가하였을 때, 캘러스 크기가 전반적으로 컸다 (Fig. 2A and 2B).

사이토키닌을 캘러스 유도배지에 첨가하였을 때, 첨가하지 않은 경우보다 캘러스 크기가 증가하였는데, 2,4-D 1.0 mg/l 와 BA 0.1 mg/l 를 첨가한 캘러스 유도배지에서 캘러스 크기가 가장 컸다. BA를 첨가한 캘러스 유도배지가 KT를 첨가한 배지 보다 캘러스 크기가 전반적으로 컸지만, 사이토키닌 종류에 의한 유의미한 차이는 없었다 (Fig. 2C and 2D). 부정

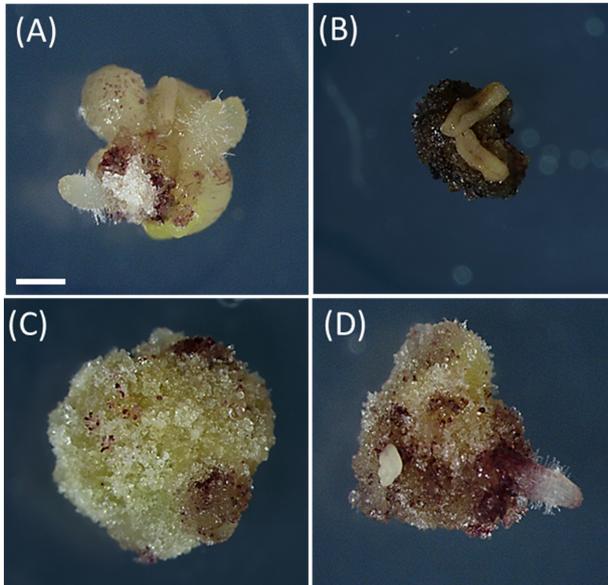


**Fig. 1. Callus induction from anther culture of *P. ginseng*.** (A) collected flower bud, (B) flower bud with petals removed to collect anthers, (C) inoculated anther, (D) callus-like structure 10 days after culture, morphology of callus 20 (E) and 30 (F) days after inoculation, respectively. Scale bar; 1 cm.

**Table 1.** Effect of hormones on callus induction from anther culture of *P. ginseng*.

| 2,4-D <sup>1)</sup> | Growth regulators (mg/ℓ) |                  |                  | Callus induction rate (%) | Callus size (cm)        | Adventitious root induction rate (%) |
|---------------------|--------------------------|------------------|------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
|                     | NAA <sup>2)</sup>        | BA <sup>3)</sup> | KT <sup>4)</sup> |                           |                         |                                      |
| -                   | -                        | -                | -                | 0.0±0.0 <sup>c***</sup>   | 0.0±0.0 <sup>i***</sup> | 0.0±0.0 <sup>f***</sup>              |
| 0.5                 | -                        | -                | -                | 74.9±15.5 <sup>a</sup>    | 1.9±1.5 <sup>f</sup>    | 5.5±2.3 <sup>a</sup>                 |
| 1.0                 | -                        | -                | -                | 80.7±13.4 <sup>a</sup>    | 2.0±0.4 <sup>ef</sup>   | 3.4±2.2 <sup>b</sup>                 |
| 2.0                 | -                        | -                | -                | 78.6±19.0 <sup>a</sup>    | 2.1±0.4 <sup>de</sup>   | 0.4±0.4 <sup>ef</sup>                |
| 0.5                 | -                        | 0.1              | -                | 79.5±16.0 <sup>a</sup>    | 2.5±0.5 <sup>ab</sup>   | 1.6±1.3 <sup>d</sup>                 |
| 1.0                 | -                        | 0.1              | -                | 83.8±11.7 <sup>a</sup>    | 2.6±0.5 <sup>a</sup>    | 1.6±1.3 <sup>d</sup>                 |
| 2.0                 | -                        | 0.1              | -                | 79.0±16.0 <sup>a</sup>    | 2.6±0.5 <sup>a</sup>    | 0.2±0.2 <sup>f</sup>                 |
| 0.5                 | -                        | -                | 0.1              | 77.2±15.1 <sup>a</sup>    | 2.2±0.4 <sup>cd</sup>   | 3.0±1.7 <sup>bc</sup>                |
| 1.0                 | -                        | -                | 0.1              | 78.7±13.7 <sup>a</sup>    | 2.4±0.4 <sup>bc</sup>   | 2.6±1.9 <sup>c</sup>                 |
| 2.0                 | -                        | -                | 0.1              | 81.0±13.2 <sup>a</sup>    | 2.5±0.4 <sup>ab</sup>   | 1.1±1.1 <sup>de</sup>                |
| -                   | 0.5                      | 0.1              | -                | 62.9±17.0 <sup>b</sup>    | 1.3±0.3 <sup>h</sup>    | 0.0±0.0 <sup>f</sup>                 |
| -                   | 1.0                      | 0.1              | -                | 75.5±12.4 <sup>a</sup>    | 1.7±0.3 <sup>g</sup>    | 0.1±0.1 <sup>f</sup>                 |
| -                   | 2.0                      | 0.1              | -                | 77.2±12.1 <sup>a</sup>    | 1.9±0.4 <sup>f</sup>    | 0.1±0.1 <sup>f</sup>                 |

Data were collected 8 weeks after the inoculation of anthers onto callus induction media. The values represent the mean of three independent experiments. <sup>1)</sup>2,4-D; 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, <sup>2)</sup>NAA; α-naphthaleneacetic acid, <sup>3)</sup>BA; benzyladenine, <sup>4)</sup>KT; kinetin. NS; Not significant. \*, \*\*, \*\*\* indicates significant differences ( $p < 0.05, 0.01, 0.001$ , respectively) as revealed by One-way ANOVA. Different letters are significantly different by Duncan's Multiple Range Test (DMRT,  $p < 0.05$ ).



**Fig. 2.** Callus induction from anther culture of *P. ginseng*. (A) callus derived from the medium containing 2,4-D 1.0 mg/ℓ, (B) NAA 1.0 mg/ℓ and BA 0.1 mg/ℓ, (C) 2,4-D 1.0 mg/ℓ and BA 0.1 mg/ℓ and (D) 2,4-D 1.0 mg/ℓ and KT 0.1 mg/ℓ. Scale bar; 1 cm. 2,4-D; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, NAA; α-naphthaleneacetic acid, BA; benzyladenine, KT; kinetin.

근 유도는 2,4-D를 단독으로 첨가한 배지가 다른 배지 보다 대체로 높았으며, 2,4-D 농도의 증가는 부정근 유도에 부정적인 영향을 나타내었다.

## 2. 체세포배 유도

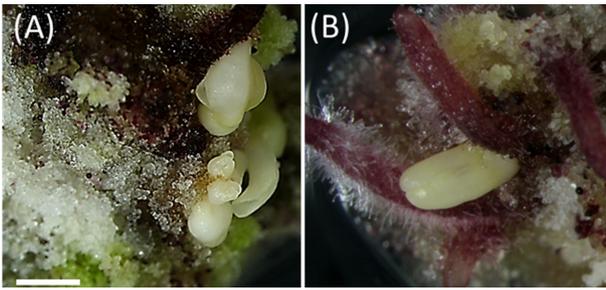
캘러스를 체세포배 유도배지로 계대배양한 8 주 후 체세포배 형성 여부를 조사하였으며, 그 결과는 Table 2와 같다.

호르몬 무첨가 배지에서는 체세포배가 전혀 형성되지 않았던 반면, 호르몬을 첨가한 배지에서는 체세포배가 형성되었는

**Table 2.** Effect of hormones on embryogenesis from anther culture of *P. ginseng*.

| Growth regulators (mg/ℓ) |                  |                  | Embryo formation rate (%) | Number of embryo per callus |
|--------------------------|------------------|------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 2,4-D <sup>1)</sup>      | BA <sup>2)</sup> | KT <sup>3)</sup> |                           |                             |
| -                        | -                | -                | 0.0±0.0 <sup>b**</sup>    | 0.0±0.0 <sup>d***</sup>     |
| 1.0                      | -                | -                | 4.7±1.1 <sup>a</sup>      | 6.0±2.7 <sup>a</sup>        |
| 1.0                      | 0.3              | -                | 0.5±0.9 <sup>c</sup>      | 1.0±0.0 <sup>c</sup>        |
| 1.0                      | 2.5              | -                | 0.5±1.0 <sup>c</sup>      | 2.0±1.0 <sup>b</sup>        |
| 1.0                      | 5.0              | -                | 1.2±2.4 <sup>bc</sup>     | 2.0±0.0 <sup>b</sup>        |
| 1.0                      | 7.0              | -                | 0.6±1.2 <sup>c</sup>      | 2.0±0.0 <sup>b</sup>        |
| 1.0                      | -                | 0.3              | 2.2±1.9 <sup>b</sup>      | 3.5±1.8 <sup>ab</sup>       |
| 1.0                      | -                | 2.5              | 2.0±2.8 <sup>b</sup>      | 2.3±1.9 <sup>b</sup>        |
| 1.0                      | -                | 5.0              | 0.0±0.0 <sup>d</sup>      | 0.0±0.0 <sup>d</sup>        |
| 1.0                      | -                | 7.0              | 0.0±0.0 <sup>d</sup>      | 0.0±0.0 <sup>d</sup>        |

Data were collected 8 weeks after the inoculation of anthers on embryo induction media. The values represent the mean of three independent experiments. <sup>1)</sup>2,4-D; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, <sup>2)</sup>BA; benzyladenine, <sup>3)</sup>KT; kinetin. NS; not significant. \*, \*\*, \*\*\* indicates significant differences ( $p < 0.05, 0.01, 0.001$ , respectively) as revealed by One-way ANOVA. Different letters are significantly different by Duncan's Multiple Range Test (DMRT,  $p < 0.05$ ).

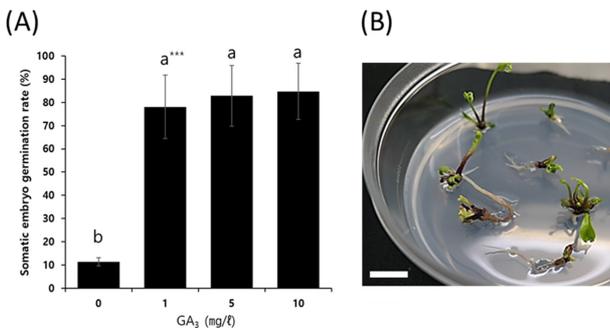


**Fig. 3. Induction of embryo from anther culture of *P. ginseng*.** Embryos derived from the medium containing (A) 2,4-D 1.0 mg/l and (B) 2,4-D 1.0 mg/l and BA 0.3mg/l. Scale bar; 1 cm. 2,4-D; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, KT; kinetin.

데, 배 형성률은 0.4% - 4.2%로 매우 낮은 수준이었다. 2,4-D를 단독으로 1.0 mg/l 첨가한 배지에서 배 형성률이 4.7%로 가장 높았고, 유도된 체세포배의 개수는 절편당 6.0 개로 가장 많았다 (Fig. 3A). 다음으로 2,4-D 1.0 mg/l 와 KT 0.3 mg/l 를 조합 처리한 배지에서 2.2%의 배 형성률과 절편체 당 평균 3.5 개 배가 형성되었는데 (Fig. 3B), 2,4-D 단독 처리보다는 높지 않았다. 전반적으로 사이토키닌을 첨가하였을 때 배 형성률이 감소하였다. 특히, BA는 KT보다 배 형성에 더 불리한 경향이 있었다.

### 3. 체세포배 발아 및 유식물체 유도

유도된 배는 세 가지 농도의 GA<sub>3</sub>가 첨가된 발아배지와 GA<sub>3</sub> 무첨가 발아배지에 치상하였으며, 4 주 후에 발아 여부를 조사하였다. 그 결과 GA<sub>3</sub> 무처리 배지에서는 11.4%의 체세포배 발아율을 보였으나, GA<sub>3</sub> 첨가 배지에서는 발아율이 78.1% - 84.8%로 무처리 대비 7 배 이상 증가하였다 (Fig. 4A



**Fig. 4. Germination of embryos from anther culture of *P. ginseng*.** (A) comparison of embryo germination rates based on GA<sub>3</sub> concentration. (B) formation of shoots and roots after 4 weeks of culture on germination media. Scale bar; 1 cm. GA<sub>3</sub>; gibberellic acid. NS; not significant. \*, \*\*, \*\*\* indicates significant differences ( $p < 0.05$ , 0.01, 0.001, respectively) as revealed by One-way ANOVA. Different letters are significantly different by Duncan's Multiple Range Test (DMRT,  $p < 0.05$ ).



**Fig. 5. Plantlet formation from anther culture and acclimatization of *P. ginseng*.** (A) plantlet formation after 12 weeks of culture on the growth media. (B) harvested *in vitro* grown roots after 5 months of culture on elongation media. (C) shoot sprouting after acclimatization. Scale bar; 1 cm.

and 4B). GA<sub>3</sub>의 농도가 증가할수록 발아율은 점차 증가하였으나 통계적으로 유의적인 차이는 보이지 않았다.

### 4. 유식물체 형성 및 토양순화

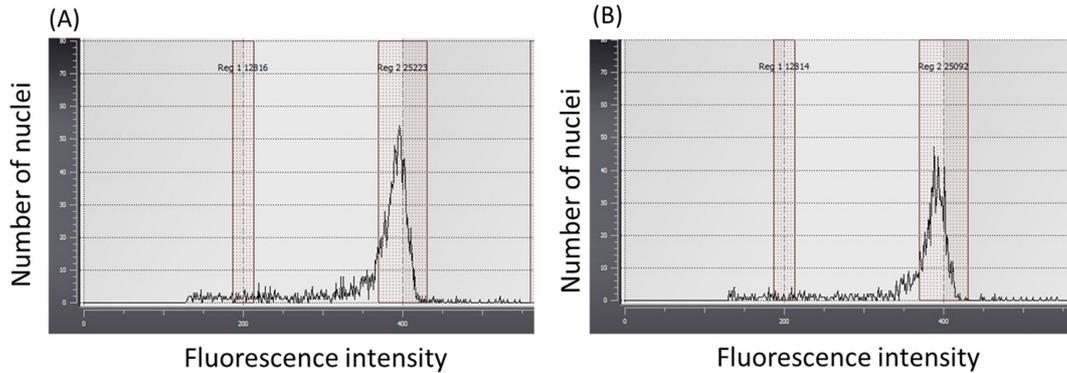
발아한 싹은 생육배지에 계대배양 한 후 지속적으로 성장하였다 (Fig. 5A). 계대배양 없이 생육배지에서 약 5 개월 이상 생육하였을 때 지상부는 노화되었다. 이때, 배지에서 뿌리를 수확하였는데, 잠이를 가지고 있는 굵은 주근이 발달한 형태였다 (Fig. 5B). 수확한 뿌리는 GA<sub>3</sub>를 처리한 후 상토로 이식하였으며 20 개 중 16 개의 뿌리가 살아하여 살아율은 80.0%였다 (Fig. 5C).

### 5. 재분화 식물체의 배수성 검증

유세포기를 이용하여 발아한 재분화 식물체의 배수성을 검증하였다. 그 결과 16 개의 재분화 식물체와 대조 식물체는 모두 상대적 형광 강도 (fluorescence intensity)가 약 400 에서 peak를 보였다(Fig. 6A and 6B).

## 고찰

약 배양은 반수체와 배가 반수체 등 동형접합성 식물체를



**Fig. 6. Ploidy level analysis of the regenerated plants derived of anther culture using flow cytometry.** Histogram fluorescence intensity documenting the relative DNA content of the nuclear suspension from young leave of (A) regenerated plant and (B) control plant.

연구 위하여 사용되는 조직배양 기술이다 (Germanà, 2011). 약 배양에 성공하기 위해서는 적절한 호르몬을 적정 수준으로 사용하는 것이 필수적이다 (Li *et al.*, 2013; Qiao *et al.*, 2013). 인삼의 약으로부터 캘러스를 유도하기 위해 가장 많이 사용되는 옥신 호르몬은 2,4-D와 NAA이며, 사이토키닌 호르몬은 옥신과 함께 사용하였을 때, 캘러스의 유도에 효과적이라고 하였다 (Lee *et al.*, 2013).

본 연구에서 호르몬을 첨가하지 않은 배지에서는 캘러스가 유도되지 않았다. 이러한 결과로 보아 인삼의 약 배양 시 호르몬의 첨가는 캘러스의 유도에 필수적 요소로 판단된다 (Table 1). 이번 연구 결과와 대조적으로 Lee 등 (2009)은 호르몬 첨가 없이 인삼의 약 배양에서 31.8%의 캘러스를 유도하였다. 이 경우를 제외하고 다른 인삼 조직배양 연구에서는 호르몬의 첨가가 캘러스 유도에 필수적인 요소였다 (Zhang *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2019).

본 연구에서 캘러스 유도율은 NAA 0.5 mg/l 와 BA 0.1 mg/l 가 첨가된 배지에서 다른 배지에 비하여 유의미하게 낮았는데, NAA는 2,4-D에 비하여 캘러스 유도율이 전반적으로 낮은 경향이 있었다 (Table 1). 2,4-D 1.0mg/l 와 BA 0.1 mg/l 를 첨가한 캘러스 유도배지에서 83.8%의 가장 높은 캘러스 유도율을 나타내었는데, 사이토키닌이 첨가에 의한 유의미한 차이는 발견되지 않았다. 이와 유사하게 인삼의 엽병을 이용한 캘러스의 유도 연구에서 2,4-D를 단독으로 2.0 mg/l - 4.0 mg/l 첨가한 배지에서 100%에 가까운 캘러스 형성이 보고되었다 (Kim *et al.*, 2019). 이번 연구 결과와 대조적으로 타 작물의 약 배양 연구에서 NAA를 사용한 효과적인 캘러스 유도 (Qiao *et al.*, 2013; Blasco *et al.*, 2015)와 BA 같은 사이토키닌 첨가에 의한 캘러스 유도율의 증가가 보고되었다 (Wang *et al.*, 2018).

캘러스 유도율과는 다르게 캘러스 크기는 호르몬 종류와 농도에 의하여 크게 차이가 발생하였다. 캘러스 유도배지 내 옥

신의 농도 증가는 캘러스 크기에 긍정적인 영향을 끼쳤으며, 2,4-D가 NAA보다 캘러스 크기 증가에 효과적이었다 (Fig. 2A and Fig. 2B). 또한, BA와 KT 같은 사이토키닌류의 첨가는 캘러스 크기를 증가시켰다 (Fig. 2C and 2D). 이와 유사하게 Lee 등 (2013)은 적당한 2,4-D와 BA를 첨가한 배지의 캘러스 크기가 NAA배지의 캘러스 크기보다 크다고 보고한 바 있다.

캘러스 유도율과 캘러스 크기를 고려하였을 때, 2,4-D 1.0 mg/l 와 BA 0.1 mg/l 를 첨가한 캘러스 유도배지가 인삼 약 배양에 가장 적합한 것으로 판단된다.

인삼 약 배양에서 캘러스 형성률이 60% 이상으로 높았던 것과는 다르게 배 형성률은 4.7% 미만으로 매우 낮았다 (Table 2). 호르몬을 첨가하지 않은 배지에서는 배 형성이 전혀 관찰되지 않았다. 이와 유사하게 Kim 등 (2019)의 연구에서 고려인삼과 미국삼의 캘러스를 호르몬이 첨가되지 않은 배지에 치상하였을 때 배가 형성되지 않았다고 하였다. 본 연구에서 2,4-D를 단독으로 첨가한 배 유도배지에 캘러스를 치상하였을 때, 배 형성률이 4.7%로 가장 높았으며 가장 많은 6.0 개의 배 형성이 확인되었다 (Table 2 and Fig. 3A).

BA와 KT를 첨가한 배지에서 2.5 mg/l 농도까지는 KT를 첨가한 배지의 배 형성률과 배의 형성 개수가 많았으나 사이토키닌 호르몬의 첨가에 의한 배 형성률의 증가는 확인할 수 없었다. (Table 2 and Fig. 3B). 이러한 결과로 보아 인삼의 약 배양 시 배 형성에 적합한 호르몬 조건은 2,4-D 1.0 mg/l 의 단독적인 사용으로 판단된다.

Hu (1997)는 약 배양 시 옥신류는 배 형성을 증가시키지만, 사이토키닌은 캘러스 형성을 촉진한다고 보고한 바 있다. 이번 연구 결과와 대조적으로 보리지의 약 배양 연구에서는 호르몬이 첨가되지 않은 배지에서도 배가 유도되었으며 2,4-D 2.0 mg/l 와 BA 1.0 mg/l 를 함께 첨가한 배지의 배 유도 효율성이 가장 높다고 하였다 (Eshaghi *et al.*, 2015).

이러한 사실은 약 배양 시 배 유도의 적정 조건은 작물별로 다르며 해당 작물의 성공적인 약 배양을 위해서는 적정 배지 조건을 다시 확립해야 함을 시사한다. 이전에 인삼 약 배양을 통한 식물체 재분화와 4배체 뿌리 형성은 보고 되었지만, 배 형성은 보고된 바 없었다 (Lee *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2013).

조직배양으로 유도된 인삼 배의 발아를 위해서는 GA<sub>3</sub> 처리가 필수적이라고 알려져 있다 (Zhang *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2019). 본 연구에서도 유사한 결과가 확인되었는데, GA<sub>3</sub>를 첨가하지 않은 발아배지에서는 11.4%의 배가 발아한 것에 비하여, GA<sub>3</sub>를 1.0 mg/l 이상 첨가한 배지에서는 발아율이 78.1% 이상으로 향상되었다 (Fig. 4). 하지만 GA<sub>3</sub> 농도에 의한 발아율 차이는 확인되지 않았다. 조직배양의 결과로 유도된 인삼의 배는 휴면상태에 있으며, 이것의 휴면을 타파하기 위해서는 GA<sub>3</sub> 처리나 저온처리가 필수적이라고 판단된다 (Choi *et al.*, 1999).

조직배양으로 형성된 인삼 재분화 식물체는 순화율이 매우 낮은 편이다. Choi 등 (1998)은 재분화 식물체를 토양으로 이식하였을 때, 생존율이 23%에 불과하다고 하였다. GA<sub>3</sub>를 처리한 후 토양에 이식하였을 때도 순화율은 59.6%로 낮은 수준이었다 (Kim *et al.*, 2013).

조직배양으로 형성된 유식물체는 수개월 동안 추가로 배양하였을 때, 잠아를 갖는 굵은 뿌리가 생성되는데, 이 뿌리를 이용하면 순화율이 향상된다는 연구가 최근에 보고되었다 (Kim *et al.*, 2016c; Lee *et al.*, 2021). 이와 유사하게, 본 연구에서도 약 배양을 통하여 생성된 유식물체는 5 개월의 추가 배양 후에 굵은 뿌리가 형성되었으며 (Fig. 5A and 5B), 이것을 토양으로 옮겨 심었을 때, 출아율은 80.0%로 높았다 (Fig. 5C).

동정생식을 통한 반수체 및 배가배수체의 발생은 많은 작물에서 보고되었다 (Li *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2022). 인삼의 경우에도 약 배양을 통하여 4배체 부정근의 유도가 보고된 바 있다 (Lee *et al.*, 2009). 유세포 분석기는 신속하고 정확하여 배수체 확인에 널리 활용되는 기기로 알려져 있다 (Rebello *et al.*, 2022).

본 연구에서는 유세포 분석기를 이용하여 약 배양으로 형성된 재분화 식물체의 배수성을 검정하였다. 그 결과 16 개의 재분화 식물체와 대조 식물체 사이에 유의미한 차이를 발견할 수 없었다 (Fig. 6). 타 작물에서 약 배양으로 형성된 반수체는 콜히친 처리 없이도 자연적으로 배가 반수체를 형성할 수 있다고 하였다 (Hoveida *et al.*, 2017). 이러한 사실로 보아 인삼 약 배양으로 형성된 재분화 식물체의 일부는 배가 반수체일 가능성이 있다고 판단된다. 하지만 약 벽과 같은 체세포 조직에서 캘러스가 유래될 가능성도 있으므로 마커를 활용한 추가적인 연구가 필요하다.

본 연구에서는 인삼의 약 배양을 이용하여 배의 발생과 식

물체의 재분화 가능성을 증명하였다. 이번 연구에서 사용된 약 배양의 재료는 순도가 높은 연풍 품종이었기 때문에 약 배양으로 형성된 재분화 식물체의 동형접합성을 DNA 마커로 확인할 수는 없었다. 또, 유세포 분석기의 분석 결과, 반수체 및 배수체의 발생도 확인할 수 없었다. 하지만 본 연구로 확립된 인삼 약 배양의 배 발생과 재분화 식물체의 토양 순화 조건은 인삼 약 배양을 통한 동형접합성 식물체의 생산에 크게 기여할 것으로 기대된다. 앞으로의 연구는 품종 간 교배로 형성된 F<sub>1</sub> 계통을 약 배양하여 동형접합성 인삼을 유도하고 이를 확인하는 데 중점을 둘 예정이다.

## 감사의 글

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

## REFERENCES

- Ahmadi B and Ebrahimzadeh H. (2020). *In vitro* androgenesis: Spontaneous vs. artificial genome doubling and characterization of regenerants. *Plant Cell Reports*. 39:299-316.
- Bang KH, Kim YC, Lee JW, Cho IH, Hong CE, Hyun DH and Kim JU. (2020). Major achievement and prospect of ginseng breeding in Korea. *Korean Journal Breeding Science*. 52:170-178.
- Blakeslee AF, Belling J, Farnham ME and Bergner AD. (1922). A haploid mutant in the Jimson weed, *Datura stramonium*. *Science*. 55:646-647.
- Blasco M, Badenes ML and 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.
- Choi YE, Yang DC, Yoon ES and Choi KT. (1998). Plant regeneration via adventitious bud formation from cotyledon explants of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Plant Cell Reports*. 17:731-736.
- Choi YE, Yang DC, Yoon ES and 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 Reports*. 18:493-499.
- Eshaghi ZC, Abdollahi MR, Moosavi SS, Deljou A and Seguí-Simarro JM. (2015). Induction of androgenesis and production of haploid embryos in anther cultures of borage (*Borago officinalis* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 122:321-329.
- Germanà MA. (2011). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 104:283-300.
- Guha S and Maheshwari SC. (1964). *In vitro* production of embryos from anthers of *datura*. *Nature*. 204:497-497.

- Hoveida ZS, Abdollahi MR, Mirzaie-Asl A, Moosavi SS and Seguí-Simarro JM.** (2017). Production of doubled haploid plants from anther cultures of borage(*Borago officinalis* L.) by the application of chemical and physical stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 114:39-49.
- Hu H.** (1997). *In vitro* induced haploids in wheat. In Jain SM *et al.* (ed.). *In vitro* haploid production in higher plants. Springer Science and Business Media. Berlin, Germany. p.73-97.
- Kim DH, Kim YC, Bang KH, Kim JU, Lee JW, Cho IC, Kim YB, Lim JY and Kim KH.** (2016a). Flowering and fruits formation characteristics in major varieties of *Panax ginseng*. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 24:207-213.
- Kim DH, Kim YC, Bang KH, Kim JU, Lee JW, Cho IC, Kim YB, Son SW, Park JB and Kim KH.** (2015). Effects of GA<sub>3</sub> and alternating temperature on breaking bud dormancy of *Panax ginseng* C. A. Meyer Seedling. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 23:379-384.
- Kim JY, Adhikari PB, Ahn CH, Kim DH, Kim YC, Han JY, Kondeti S and Choi YE.** (2019). High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of interspecific ginseng hybrid between *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*. *Journal of Ginseng Research*. 43:38-48.
- Kim JY, Kim DH, Kim YC, Kim KH, Han JY and Choi YE.** (2016c). *In vitro* grown thickened taproots, a new type of soil transplanting source in *Panax ginseng*. *Journal of Ginseng Research*. 40:409-414.
- Kim YC, Park HW, Kim OT, Bang KH, Kim JU, Hyun DY, Kim DH, Cha SW and Choi JE.** (2013). Soil acclimatization of regenerated plants by gibberellic acid treatments of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Korean Journal of Plant Resources*. 26:84-89.
- Kim YJ, Jang MG, Zhu L, Silva J, Zhu X, Sukweenadhi J, Kwon WS, Yang DC and Zhang D.** (2016b). Cytological characterization of anther development in *Panax ginseng* Meyer. *Protoplasma*. 253:1111-1123.
- Lee HY, Khorolragchaa A, Sun MS, Kim YJ, Kim YJ, Kwon WS and Yang DC.** (2013). Plant regeneration from anther culture of *Panax ginseng*. *Korean Journal of Plant Resources*. 26:383-388.
- Lee JE, Park JH, Kim KS, An DH and Cha YL.** (2022). Production of doubled haploid population derived from the microspore culture of rapeseed(*Brassica napus* L.) F<sub>1</sub> generation and analysis of fatty acid composition. *Journal of Plant Biotechnology*. 49:74-81.
- Lee JH, Kim YJ, Jung DY, Shim JS, Kim IH and Yang DC.** (2009). *In vitro* induction of tetraploid roots by various pretreatments from anther of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Journal of Ginseng Research*. 33:65-71.
- Lee JW, Do GR, Jo IH, Hong CE, Bang KH, Kim JU and Park YD.** (2021). Zygotic embryo culture is an efficient way to optimize *in vitro* growth in *Panax ginseng*. *Industrial Crops and Products*. 167:1134971. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669021002612> (cited by 2023 Jan 13).
- Lee JW, Jo IH, Hong CE, Bang KH and Kim JU.** (2020). Effect of gamma-irradiation on seed dehiscence, development, survival, and growth in *Panax ginseng*. *Korean Journal Breeding Science*. 52:1-8.
- Lee JW, Jo IH, Kim JU, Hong CE, Bang KH and Park YD.** (2019). Determination of mutagenic sensitivity to gamma rays in ginseng(*Panax ginseng*) dehiscent seeds, roots, and somatic embryos. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. 60:721-731.
- Lee JW, Jo IH, Kim JU, Hong CE, Kim YC, Kim DH and Park YD.** (2018). Improvement of seed dehiscence and germination in ginseng by stratification, gibberellin, and/or kinetin treatments. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. 59:293-301.
- Lee JW, Kim YC, Kim JU, Jo IC, Kim KH and Kim DH.** (2016). Effects of gibberellic acid and alternating temperature on breaking seed dormancy of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 24:284-293.
- Li Y, Li H, Chen Z, Ji LX, Ye MC, Wang J, Wang L and An XM.** (2013). Haploid plants from anther cultures of poplar (*Populus × beijingensis*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 114:39-48.
- Murashige T and Skoog F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15:473-497.
- Qiao G, Li H, Liu M, Jiang J, Yin Y, Zhang L and Zhuo R.** (2013). Callus induction and plant regeneration from anthers of *Dendrocalamus latiflorus* Munro. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 49:375-382.
- Rebello D, Mariz-Ponte N, Loureiro J, Castro S, Debiassi C, Domingues J, Santos C and Gonçalves JC.** (2022). A protocol for micropropagation of the medicinal species *Tuberaria lignosa* provides ploidy true-to-type plants with high antioxidant capacity. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 150:599-609.
- Schenk RU and Hildebrandt AC.** (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*. 50:199-204.
- Shao JW, Jiang JL, Zou JJ, Yang MY, Chen FM, Zhang YJ and Lee J.** (2020). Therapeutic potential of ginsenosides on diabetes: From hypoglycemic mechanism to clinical trials. *Journal of Functional Foods*. 64:103630. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464619305547> (cited by 2022 Jan 07).
- Wang GF, Qin HY, Sun D, Fan ST, Yang YM, Wang ZX, Xu PL, Zhao Y, Liu YX and Ai J.** (2018). Haploid plant regeneration from hardy kiwifruit(*Actinidia arguta* Planch.) anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 134:15-28.
- Zhang JY, Sun HJ, Song JJ, Bae TW, Kang HG, Ko SM, Kwon YI, Kim IW, Lee JC, Park SY, Lim PO, Kim YH and Lee HY.** (2014). Plant regeneration of Korean wild ginseng(*Panax ginseng* Meyer) mutant lines induced by  $\gamma$ -irradiation(<sup>60</sup>Co) of adventitious roots. *Journal of Ginseng Research*. 38:220-225.
- Zhao H, Xu J, Ghebrezadik H and Hylands PJ.** (2015). Metabolomic quality control of commercial Asian ginseng, and cultivated and wild American ginseng using <sup>1</sup>H NMR and multi-step PCA. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 114:113-120.