

인삼모상근의 생장에 미치는 Auxin과 Casein Hydrolysate의 영향

오승용 · 박효진 · 민병훈* · 양계진** · 양덕춘#

한국인삼연초연구원 신사업연구부, *배재대학교 원예학과, **중부대학교 생명자원학부
(2000년 6월 8일 접수)

The Effects of Auxin and Casein Hydrolysate on the Growth of Ginseng Hairy Root

Seung-Yong Oh, Hyo-Jin Park, Byoung-Hoon Min*, Kye-Jin Yang** and Deok-Chun Yang#

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejeon, 305-345, Korea;

*Development of Horticulure, Paichai University, Taejeon, 302-735, Korea

**College of life Science, Joongbu University, Kumsan, 312-800, Korea

(Received June 8, 2000)

Abstract : In this study, the effects of auxin and casein hydrolysate (CH) on the growth of ginseng hairy root was elucidated. Ginseng hairy root was cultured under light and dark conditions in MS solid and liquid medium with various concentrations of auxin and CH for fifty days. After harvesting the cultures, the fresh and dry weight of cultures were examined, respectively. In the MS solid culture, 1 mg/L of IBA was most effective on the growth of ginseng hairy root under the dark condition, whereas IAA and CH did not affect on the growth of ginseng hairy root. In the MS liquid culture, the growth was maintained regularly by the treatments of IAA and NAA. IBA and CH restrained the growth of ginseng hairy root.

Key words : Auxin, casein hydrolysate, ginseng hairy root, NAA, IBA, IAA.

서 론

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 예로부터 보혈강장 및 불로장생의 영약으로 한방에서 널리 애용되어 왔으며, 단 백질과 핵산의 생합성 촉진,^{1,2)} 간기능회복,³⁾ 항암 및 항산화 효과등이 탁월하다고 알려져 있으며,⁴⁾ 사포닌을 비롯한 몇 가지 인삼의 특정 고유생리활성 성분에 대해서는 생체내에서의 작용기작도 보고되었다.⁵⁾ 그런데 자연에서 자라는 인삼의 뿌리는 생장이 매우 느리기 때문에, 수확기까지는 약 4년 이상의 시간이 걸린다. 따라서 인삼의 생리활성물질을 대량 생산하고자 하는 방안으로 인삼모상근을 유도하여 성장속도가 매우 빠른 모상근을 선발하고 이 모상근을 활용하여 인삼의 대표적인 생리활성물질로 알려진 ginsenosides를 대량 생산하고자 하는 연구가 수행되고 있다.^{6,7)}

*Agrobacterium*이 식물조직의 상처 부위에 감염되면 근두암

종이나 모상근이 유도되는데, 모상근은 *A. rhizogenes*에 있는 Ri-plasmid의 T-DNA가 식물세포에 도입되어 유도된다.⁸⁾ 이와 같은 모상근은 유전적으로 안정하며 식물생장조절제가 첨가되지 않은 배지에서도 성장이 가능한데 이것은 *Agrobacterium*이 가지고 있는 Ri-plasmid의 T-DNA상에 존재하는 식물생장조절제인 auxin과 cytokinin의 합성에 관여하는 유전자가 존재하여 다량의 식물호르몬을 합성할 수 있는 능력이 있기 때문이며, 이러한 모상근은 *in vitro*상태에서 식물생장조절제가 첨가되지 않은 배지에서도 계속 자랄 수 있게 된다.⁹⁻¹¹⁾ 이러한 이유로 인삼모상근은 식물생장조절제 무첨가 배지에서도 빠르게 성장하여 대량배양이 가능한 것으로 알려지고 있으나,^{8,11)} 모상근마다 성장속도에 매우 차이가 있다. 이런 원인은 Ri-plasmid의 식물호르몬 자가합성유전자가 식물세포의 핵내에 삽입되는 위치, copy 수 및 발현정도에 따라 성장속도에 차이가 있다. 따라서 본 실험은 인삼에 *A. rhizogenes*를 도입하여 유도된 인삼모상근을 통한 생리활성물질의 대량생산을 위한 기초실험으로 인삼모상근의 생장에 미치는 식물생장조절제의 효과를 알아보기 위하여 auxin류인 NAA, IBA,

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-866-5434; (팩스) 042-862-2522
(E-mail) dcyang@gttrkgttri.re.kr

IAA와 질소화합물의 일종인 casein hydrolysate(CH)를 농도별로 처리하여 각각에 대한 성장특성을 조사한 실험을 수행했던 바 그 결과를 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 인삼모상근 세포주는 *Agrobacterium rhizogenes* strain A412를 이용하여 형질전환시킨 후 유도된 모상근을 사용하였다.⁷⁾

2. 인삼모상근의 배양

모상근이 7~8 cm 길이로 성장하면 근단으로부터 2~3 cm 길이로 잘라내어 항생제와 식물성장조절제가 첨가되지 않은 1/2 MS(Murashige and Skoog)¹³⁾ 배지에 5~6조각을 치상하여 3주 간격으로 진탕배양기(100 rpm, 23°C)에서 암조건으로 계대배양하며 실험재료로 사용하였다.

3. Auxin과 CH의 처리 및 인삼모상근의 성장특성조사

선발된 인삼모상근을 대상으로 고체배양 및 액체배양시 모상근의 성장에 미치는 auxin과 CH의 효과를 조사하기 위하여 auxin은 NAA 0.05, 0.1, 1, 3, 5, 10 mg/L, IBA 1, 3, 5, 10 mg/L, IAA 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/L등의 농도로, CH

는 0.1, 0.25, 0.5, 1%의 농도로 MS 기본배지에 각각 첨가하였다. 고체배양은 sucrose 3%와 한천 0.8%를 첨가하고 pH를 5.8로 조정한 후, 121°C에서 15분간 고압멸균한 MS배지에 모상근을 접종하여 25°C±2, 3000 lux의 형광등조명 아래에서 1일 16시간 동안의 광배양과 빛을 제거한 암상태로 50일간 배양하였다. 액체배양은 한천을 제거한 MS 배지를 100 mL짜리 삼각플라스크에 40 mL씩 분주하여 모상근을 접종하여 진탕배양기(100 rpm)에서 고체배양과 동일한 조건으로 광 및 암조건으로 50일간 배양한 후 수거하여 각각 생중량과 건중량을 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 고체배양에 의한 인삼모상근의 성장에 미치는 auxin과 CH의 영향

고체배양시 인삼모상근의 성장에 미치는 auxin과 CH의 효과를 조사하기 위하여 MS기본고체배지에서 NAA 0.05, 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 10 mg/L, IBA 1, 3, 5, 10 mg/L, IAA 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/L와 질소화합물인 CH를 0.1, 0.25, 0.5 1%의 농도로 각각 첨가하여 광 및 암상태에서 50일간 배양한 후 수거하여 생중량과 건중량을 조사하였다(Fig. 1a-d).

그 결과 IBA를 처리했을 때 생중량은 암조건에서 처리구 중 저농도인 1 mg/L에서 가장 높은 생장률을 보여 IBA를

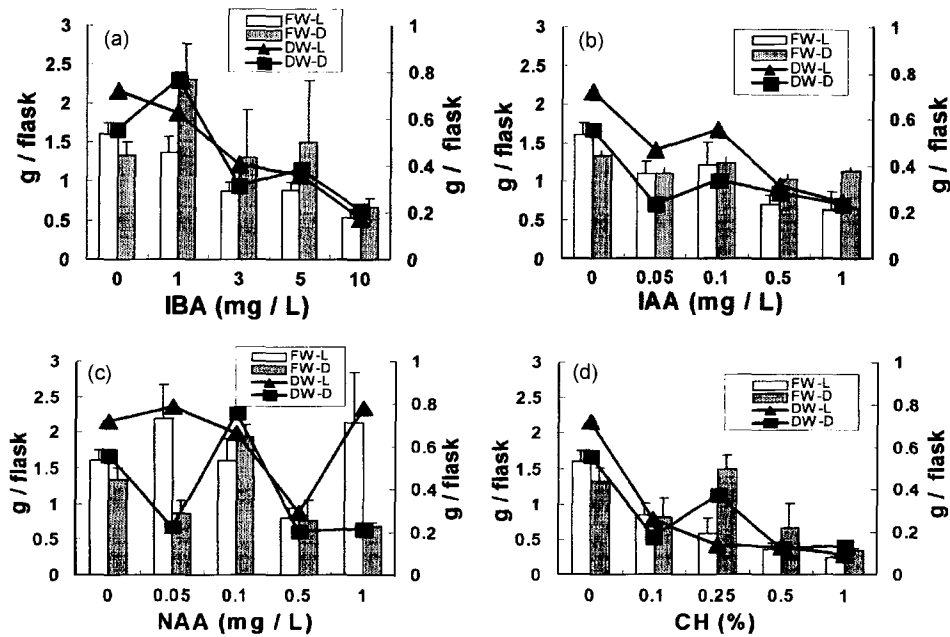


Fig. 1. The effects of auxin and casein hydrolysate on the growth of ginseng hairy roots by MS solid culture. IBA (a), IAA (b), NAA (c) and casein hydrolysate (d). FW-L; fresh weight of light condition culture, FW-D; fresh weight of dark condition culture, DW-L; dry weight of light condition culture, DW-D; dry weight of dark condition culture.

첨가하지 않은 control보다 약 1.7배 가량 높은 생장률을 보이다가 최고농도인 10 mg/L에서는 생장이 급격히 감소하여 control과 1 mg/L에 비해 각각 0.5배, 3.4배가 저하되어 압조건에서의 IBA 처리는 고농도보다 저농도에서 더 효과적인 것으로 밝혀졌다(Fig. 1a). 광조건에서는 압조건과는 달리 압조건에서 생장률이 가장 높았던 1 mg/L와 모든 처리구에서 control보다 낮은 생장률을 나타내어 광조건에서의 IBA 처리는 모상근의 생장을 억제시키는 것으로 밝혀졌다. 건중량은 광조건, 압조건 모두 전체적으로 생중량과 비슷한 형태의 생장양상을 나타내어 고농도로 갈수록 생장이 억제되었다. IBA 첨가시 모상근의 생장에 미치는 광의 효과를 알아본 결과, 생중량은 광배양보다 암배양이 1.2~1.7배 더 높은 생장률을 나타낸 반면, 건중량은 암배양과 광배양 사이에 생장률에 큰 차이를 보이지 않았다. 이상의 결과로 고체배지에서 배양시 모상근의 생장에 미치는 IBA는 저농도(1 mg/L)로 처리하여 암배양하는 것이 효과적으로 나타났다.

IAA를 처리했을 때는 생중량과 건중량 모두 농도가 높아질수록 생장이 억제되는 경향을 나타내었다. 생중량은 암조건 하에서는 농도의 증가와 관계없이 생장이 거의 일정하게 유지된 반면 광조건 하에서는 고농도로 갈수록 생장이 감소하여 최고농도인 1 mg/L에서는 control보다 약 2.5배 낮은 생장률을 나타내었다(Fig. 1b). 건중량은 0.1 mg/L 농도에서 암조건, 광조건 모두 일시적으로 생장률이 증가하였으나 전체적인 경향은 모두 control보다 낮은 생장률을 보여 생중량과 마찬가지로 감소하는 경향을 나타내었다. 모상근의 생장에 미치는 광의 효과는 생중량은 암배양에서는 생장이 거의 일정하게 유지된 반면, 광배양에서는 생장률이 하락했고 건중량은 고농도인 1 mg/L에서 거의 비슷한 수준으로 생장률이 하락하여 광은 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 IAA는 생중량과 건중량 모두 암배양과 광배양에서 control보다 낮은 생장률을 나타내어 모상근의 생장을 억제시켜 모상근 배양에는 효과가 없는 것으로 나타났다.

NAA를 처리했을 때는 생중량은 암조건에서 0.1 mg/L 농도에서 control보다 1.5배 높은 생장률을 보였으며 광조건에서는 저농도인 0.05 mg/L에서 생장률이 증가한 후 농도가 높아질수록 하락하다가 고농도인 1 mg/L에서 다시 생장률이 증가하여 control보다 1.3배 높은 증가율을 보여 IBA와는 달리 각기 최고생장을 나타내는 농도가 다르게 나타났다(Fig. 1c). 건중량은 암조건, 광조건 모두 전체적으로 생중량과 유사한 형태의 생장특성을 나타내었다. 이러한 결과로 NAA는 광조건에서 생장이 다시 증가하기 시작하는 광조건에서 고농도(1 mg/L)로 배양하는 것이 효과적으로 나타났다.

지금까지 식물의 생장에 대한 식물생장조절제의 영향에 대한 보고는 대단히 많다. 식물생장조절제는 기본적인 대사과

정에 적용하여 세포의 분화나 생장을 조절하고, 이것이 2차대사산물의 생산에 크게 영향을 미친다고 생각되지만 그 작용기구는 아직 밝혀지지 않았다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, 인삼모상근의 생장에는 식물생장조절제가 큰 영향을 미치지 않았다. 이는 *A. tumefaciens*의 Ri-plasmid에 의해 유도된 모상근은 모상근내에 충분한 양의 내재식물호르몬을 합성할 수 있는 *A. tumefaciens*의 plasmid에 삽입되어 있는 T-DNA의 식물호르몬 자가합성유전자가 있기 때문이라고 사료된다.¹⁴⁾ 또한 이와 관련지어서 *A. tumefaciens*의 Ti-plasmid에 의해 형질전환된 근두암종의 경우에서 기내조직배양시 생장조절제 전혀 없는 배지에서도 미분화상태의 종양덩어리로 계속 성장하게 되는데 이중 기형의 shoot인 teratoma의 생장과 뿌리형성에 미치는 BA와 IBA의 효과에 대해서 보고된 바 있으나 커다란 효과는 보지 못했다는 보고가 있다.¹⁵⁾

CH를 처리했을 때는 생중량은 암조건 하에서는 0.25%의 농도에서 control과 거의 비슷한 수준의 생장률을 나타내었고 광조건에서는 농도가 높아질수록 생장률이 계속 하락하는 경향을 나타내었다(Fig. 1d). 건중량은 암조건, 광조건 모두 control보다 낮은 생장률을 나타내어 CH는 IAA와 마찬가지로 모상근의 생장을 억제시켜 모상근 배양에는 효과가 없는 것으로 나타났다. CH는 casein에서 만들어진 화합물(특히 아미노산)로 여러 종류의 식물체 증식을 위해 첨가되어지는 단백질 가수분해산물로서 질소화합물의 일종이다.¹⁶⁾ CH가 식물생장에 미치는 연구는 여러 연구자들에 의해 수행되어 체세포배형성과 식물체분화 등에 있어서 효과적인 결과를 얻었다는 보고가 있다.^{17,18)} 한편 CH가 이차대사산물의 증대에도 효과적이었다는 보고도 있는데, Mukherjee¹⁹⁾ 등은 herb의 일종인 *Coleus forskohlii*의 형질전환된 배양세포에 2 g/L의 CH를 첨가했을 때, 괴근에 다량으로 함유되어 있는 이차대사산물인 forskolin의 함량을 매우 높게 향상시켰다고 보고하였다. 본 실험에서는 CH가 인삼모상근의 생장에는 큰 영향을 미치지 않고 생장을 억제시키는 것으로 나타났는데 추후에 광도가 증가할수록 모상근의 성장은 감소하고, 이차대사과정인 ginsenosides의 생성이 촉진된다는 보고²⁰⁾와 연관지어 CH 처리시 모상근의 생리활성물질 생성에 미치는 영향에 대해 조사할 필요가 있다고 사료된다.

2. 액체배양에 의한 인삼모상근의 생장에 미치는 auxin과 CH의 영향

액체배양시 인삼모상근의 생장에 미치는 auxin과 CH의 효과를 조사하기 위하여 MS기본액체배지에서 고체배지와 동일한 조건으로 광 및 암상태에서 50일간 배양한 후 수거하여 생중량과 건중량을 조사하였다(Fig. 2a-d).

그 결과 IBA를 처리했을 때 생중량은 암조건과 광조건 모

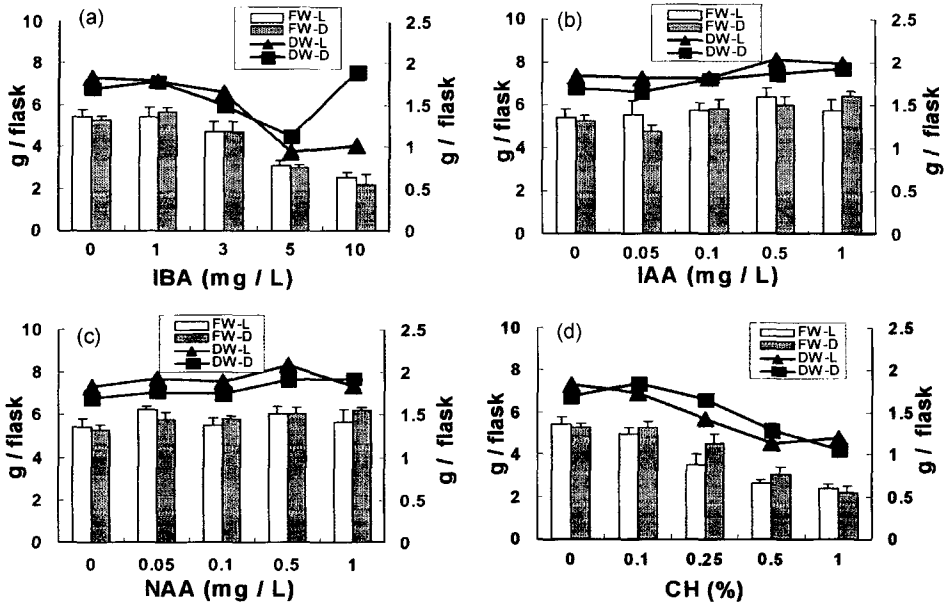


Fig. 2. The effects of auxin and casein hydrolysate on the growth of ginseng hairy roots by MS liquid culture. IBA (a), IAA (b), NAA (c) and casein hydrolysate (d).

두 농도가 증가할수록 생장률이 뚜렷하게 하락했는데 최고농도인 10 mg/L에서는 암조건과 광조건 각각 control에 비해 약 2.4배, 2.1배가 하락하였고 광의 효과도 영향을 미치지 않았다(Fig. 2a). 건중량은 암조건에서 최고농도인 10 mg/L에서 일시적으로 증가하는 경향을 보여 control과 비슷한 수준의 생장률을 나타내었다. 이상의 결과로 IBA는 고체배양과는 달리 모상근의 생장을 억제시켜 배양에는 효과가 없는 것으로 나타났다.

IAA와 NAA를 처리했을 때는 생중량과 건중량 모두 광조건과 암조건에서 농도의 증가에 의한 뚜렷한 생장의 증가는 보이지 않아 control과 비슷하게 거의 일정한 수준으로 생장이 유지되어 IAA와 NAA는 모상근의 생장을 억제시키지는 않고 일정수준으로 유지시켜 IBA와 CH보다는 액체배양시에 모상근의 배양에 효과적으로 나타났다(Fig 2b, c).

CH를 처리했을 때는 생중량과 건중량 모두 암조건과 광조건에서 농도가 증가할수록 생장률이 하락하였다. 생중량은 광조건에서 최고 농도인 1%에서 control에 비해 2.3배, 암조건에서는 2.4배의 하락율을 보였으며 건중량 역시 control보다 생장률이 감소하여 고체배양과 마찬가지로 CH는 모상근 배양에 효과가 없는 것으로 밝혀졌다(Fig. 2d).

Manners와 Way²¹⁾의 보고에 의하면 *A. rhizogenes* A₄ 균주를 이용해 형질전환된 모상근을 잎이나 줄기조직에서 유도하여 *in vitro*에서 액체배양 했을 때, 오랫동안 계대배양 과정에서 안정된 표현형을 유지하며, 성장조절제 무첨가 배지에서도 세포분열과 생장이 지속된다고 하였다. 반면에

Zenk²²⁾는 NAA를 처리한 *Morinda citrifolia*의 액체배양세포를 이용해서 이차대사산물인 anthraquinone 생산에 대한 영향을 연구한 결과, 세포생육은 NAA 2.5×10^{-5} M에서 가장 양호하였고, anthraquinone의 생산은 1.5×10^{-5} M에서 가장 양호하였다고 보고하였다. 이상의 결과를 토대로 *Agrobacterium*에 의해 유도된 모상근은 정상식물체에서 유도된 배양세포와는 달리 성장조절제 첨가에 의한 생장증가를 보이지 않았는데 이는 역시 모상근내에 있는 식물호르몬 자가합성유전자의 영향이라고 사료된다.

요 약

인삼모상근의 생장에 영향을 미치는 auxin과 CH의 효과를 규명하기 위하여 auxin류인 IBA, IAA, NAA와 아미노산 화합물인 CH를 각각 농도별로 처리하여 MS 고체배지와 액체배지에서 50일간 배양후 수거하여 생중량과 건중량을 측정하여 농도별로 생장률을 측정한 결과, 인삼모상근의 생장에 미치는 auxin의 효과는 고체배양시에는 IBA를 1 mg/L의 농도로 암배양하는 것이 가장 효과적이었으며, NAA 1 mg/L의 농도로 광배양 하는 것도 효과적이었다. 반면에 IAA와 CH는 인삼모상근의 생장에 효과가 없었다. 액체배양시에는 IAA와 NAA를 처리했을 때 농도의 증가에 따른 생장의 증가는 보이지 않고 생장의 감소 없이 거의 일정하게 그 수준이 유지되었으며 IBA와 CH는 모두 인삼모상근의 생장을 오히려 억제하는 경향이었다.

인용문헌

1. Lee, K. S. : Proc. 2nd Int. Ginseng Symp. p. 93 (1978).
2. Iijima, M., Higashi, T., Sanada S. and Shoji, T. : *Chem. Pharm. Bull.* **24**, 2400 (1976).
3. Han, B. H., Park, M. W., Woo, W. S. and Han, Y. N. : Proc. 2nd Int. Ginseng Symp. p. 13 (1978).
4. Han, B. H., Park, M. W. and Han, Y. N. : *Arch. Pharm. Res.* **4**, 53 (1981).
5. Kim, N. D. and Kang, S. Y. : Proc. 5th Life Science Sympo. Biomed. Res. with Korea Red Ginseng p. 9 (1994).
6. Yang, D. C., Kim Y. H., Yang, D. C., Shin, S. L. and Choi, K. T. : *Korean J. Plant. Res.* **12**, 1 (1999)
7. Yang, D. C., Kim Y. H., Yang, D. C., Min, B. H., Shin, S. L. and Choi, K. T. : *Korean Society of Plant Tissue culture.* **25**, 6 (1998).
8. Inze D, Lijsebettens M. V, Simones C, Genebello C, Montagu M. V. and Shell J : *Mol. Gen. Genet.* **194**, 265-274,
9. Wullems, G. J., C. Molendijk and R. A. Schllperoort. : *Theor. Appl. Genet.* **56**, 203 (1980).
10. Wullems, G. J., L. Molendijk and, G. Ooms and R. A. Schllperoort. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7 (1981).
11. Chilton, M. D., Tepfer, D. A., Petit, A. and Tempe, J. : *Nature(Lond)* **295**, 432 (1982).
12. Jouanin, L., Vilaine, F., Tourneur, C., Pautot, V., Muller, J. F. and Caboche, M. : *Plant Sci.* **53**, 53 (1987).
13. Murashige, T. and Skoog, F. : *Physiol. Plant* **15**, 497 (1962).
14. Amasino, R. M. and C. O. Miller. : *Plant Physiol.* **69**, 389-392 (1982).
15. Yang, F. M., Montoya, D. J., Merlo, M. H., Drummond, M. D., Chilton, E. W. Nester and M. P. Gorden. : *Mol. Gen. Genet.* **177**, 707-714 (1980).
16. Jun J. H., Chung, K. H., Kang, S. J., Park, S. Y., Yae, B. S. : *Korean J. of Plant Tissue Culture* **25**, 2 (1998).
17. Onay, A., Jeffree, C. E., and Yeoman, M. M. : *Plant Cell Reports* **15**, 192-115 (1998).
18. Acharee, R. and M. G. K. Jones. : *J. of Experimental Botany* **49**, 320 (1998).
19. Mukherjee, S., Ghosh, B. and Jha, S. : *Biotechnology Letters* **22**, 133-136 (2000).
20. Yang, D. C., Choi, H. Y., Kim, Y. H., Yun, K. Y. and Yang, D. C. : *Korea J. of Ginseng Sci.* **20**, 3 (1996).
21. Manners, J. M. and Way, H. : *Plant Cell Reports* **8**, 341-345 (1989).
22. Zenk., M. H. : *Plant Med. Suppl.* 79 (1975)