

IBA와 NAA 처리에 의해 생성된 Ethylene이 인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer) 부정근의 성장과 발달에 미치는 영향

김윤수, 한은주¹, 백기엽^{1*}
동부한농화학(주), ¹충북대학교 첨단원예기술개발연구센터

Effects of Auxin-induced Ethylene on Growth and Development of Adventitious Roots of *Panax ginseng* C.A. Meyer

Yun-Soo Kim, Eun-Joo Hahn¹, Kee-Yoeup Paek^{1*}

Dongbu Advanced Research Institute, 103-2, Moonji-Dong, Daeduck Science Town, Daejeon 305-708, Korea

¹Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

ABSTRACT The effects of IBA and NAA on adventitious root cultures of *Panax ginseng* C.A. Meyer were investigated. Results indicated differences in growth and development of the roots according to 5 mg/L IBA and 2 mg/L NAA. IBA resulted in a normal root development and a higher growth compared to NAA. The roots formed on NAA-containing media were shorter and thicker than those in IBA, showing a hypertrophy of the root tip. NAA induced more than 1.6 times higher ethylene production compared to IBA, which caused inhibition of root growth. Under the ventilation, on the other hand, no difference was observed in ethylene concentration and the root growth between IBA and NAA treatments. Under ventilation ethylene production was not detected until 10 days of culture, while detected from the initial stage under no ventilation. The results suggested the importance of ventilation during the culture for the growth and development of ginseng adventitious roots.

Key words: Adventitious roots, auxin, bioreactor culture, ventilation

서 론

인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 다년생식물로서 재배기간이 4~6년으로 길며, 연작이 불가능하여 재배가능 면적이 점차 줄어들고 있는 실정이다. 또한 재배기간 중의 과도한 농약살포로 수확 후 이용에 많은 문제를 가지고 있어 재배인삼을 이용한 약품, 건강식품 등의 생산에 제약이 되고 있다. 이 같은 문제점을 해결하기 위해 최근 조직배양에 의해 생산된 인삼 캘러스나 뿌리를 재배인삼 대용으로 사용하기 위한 연

구가 꾸준히 진행되고 있다 (Oh et al. 2000; Son and Paek 2001). 이중 인삼의 부정근 배양기술을 이용한 ginsenoside의 생산은 세포배양과 모상근 배양에 비하여 유전적 안전성과 높은 생산을 가지고 있어 산업화를 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다 (Inomata et al. 1993; Kevers et al. 1999; Paek et al. 2001; Yu et al. 2000).

부정근 형성에 미치는 auxin의 영향은 auxin의 종류와 농도, 배양체의 종류, 환경조건 등에 따라 다를 수 있다. 완두 하배축 (Nordstrom and Eliasson 1993)과 토마토 잎 절편 (Coleman et al. 1980) 배양에서는 auxin에 의해 부정근의 형성이 억제되지만 Norway spruce (Bollmark and Eliasson 1990)나 개암나무의 자엽 (Gonzalez et al. 1991)의 경우에는 부정근의 형성이 촉진되기도 한다. 인삼 캘러스로부터의 부정근 형성과 증식은

*Corresponding author Tel 043-261-3227 Fax 043-272-5369
E-mail paekky@chungbuk.ac.kr

대체로 auxin 처리에 의하여 촉진되는데, 이들 auxin의 종류와 적정농도에 대한 보고는 조금씩 다르나 대체로 고농도의 IBA 나 저농도의 NAA에 의해 부정근 생장이 가장 양호한 것으로 알려져 있다 (Choi et al. 2000; Seon et al. 1999; Kim 2002). 또한 같은 종류와 농도의 auxin 처리도 온도, 광도, 환기횟수 등 배양환경에 따라 부정근의 생장에 다른 영향을 미친다는 보고도 있다 (Paek et al. 2001; Yu et al. 2000). 한편 auxin은 ethylene 생성에 영향을 주는데 (Imaseki et al. 1975), auxin에 의해 생성된 ethylene (auxin-induced ethylene)은 부정근의 형성을 억제한다 (Han et al. 1996). Burg와 Burg (1966)에 따르면 auxin의 농도가 특정수준에 이르면 ethylene의 생성이 유도되고, 생성된 ethylene의 작용에 의해 생장억제 현상이 나타난다고 하였다.

최근 들어 약용식물의 조직배양에서 gas의 종류 (CO_2 , O_2 , C_2H_4)와 농도가 배양체의 생장, 분화 및 발달에 미치는 영향에 대한 연구가 활발해지고 있으나 (Huang and Chou 2000; Mark and Forney 2000; Pan et al. 2000) 인삼 부정근 배양에 미치는 gas에 관한 연구는 이루어지고 있지 않다. 따라서 배양과정 중 발생하는 에틸렌이 인삼 부정근의 생장과 발달에 미치는 영향을 알고자 실험을 실시하였다. 특히 배양용기 내 ethylene의 농도는 auxin의 종류, 환기, 배양방법 등에 따라 달라질 수 있을 것으로 생각되어 본 연구에서는 auxin의 종류 (IBA와 NAA)와 배양방법 (고체배양, 액체배양)에 따른 ethylene의 생성과 이들이 인삼 부정근의 발달과 생장에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

식물재료

충청남도 금산군 인삼시장에서 구입한 6년근 인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 주근 (main root)을 적당한 크기 (0.5 cm^3)로 자른 후, 70% (v/v) ethanol에 약 30초간 침지한 다음 2% (v/v) NaOCl에 30분간 살균처리 후 멸균수로 3회 수세하였다. 살균된 절편은 2,4-D 1.0 mg/L, kinetin 0.1 mg/L, sucrose 3% (w/v), gelite 0.2% (w/v)가 첨가된 MS배지에 접종하여 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 암조건에서 캘러스를 유도하였다 (Yu et al. 2000). 부정근을 유도하기 위하여 캘러스는 IBA 3.0 mg/L, sucrose 3% (w/v), gelite 0.2% (w/v)가 포함된 MS배지에 접종하여 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 암조건에서 4주간 배양하였다.

고체배양에서 auxin의 처리

기본배지로는 NH_4NO_3 을 제거한 MS배지 (Yu et al. 2000)를 이용하였고 배지에 sucrose 3% (w/v), gelite 0.2% (w/v)를 첨가하였다. Auxin의 종류와 처리농도는 이전의 실험에서 부정근

의 유도율과 생장이 가장 양호하였던 IBA 5 mg/L과 NAA 2 mg/L로 정하였다 (Kim 2002). 배지는 pH 5.8로 조정하였고, 배양은 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 암조건에서 4주간 실시하였다. 각 플라스틱 petri dish (15×90 mm) 당 6개의 부정근 (길이 약 1.0 cm)을 접종하여 5회 반복하여 시행하였다. 배양 4주 후 부정근의 발달과 생장, ethylene의 농도를 조사하였다.

생물반응기배양에서 auxin의 처리

총 용적이 5 L인 풍선형 생물반응기 (balloon type bubble bioreactor; Paek et al. 2001)를 사용하였으며 배지는 고체배양에서와 동일한 배지를 사용하였고, sucrose는 5% (w/v)로 첨가하였다. Auxin의 종류와 처리농도 역시 고체배양과 동일하게 실시하였다. 각 생물반응기 당 20 g의 부정근을 접종하였으며 3회 반복하여 시행하였다. 용기 내 공기주입량은 0.1 vvm으로 조절하였으며 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 암 조건에서 40일간 배양 후 부정근의 생장과 ethylene의 농도를 조사하였다.

배양용기 내의 ethylene 함량 측정

2시간 동안 밀봉된 각 배양용기로부터 얻어진 0.3 mL의 시료는 gas chromatography (Hewlett-Packard 5890, USA)를 통하여 분석되었다. 실험재료의 ethylene 측정은 flame ionisation detector (FID)로 검출하였고, column은 Porapack-Q, carrier gas는 N_2 를 이용하여 30 mL/min로 하여 분석하였다. Oven, injector 및 detector의 온도는 각각 100, 150, 200°C 로 조정하였다 (Tung et al. 1996).

결과 및 고찰

부정근을 접종한 후 1주일만에 부정근의 내피 (endodermis) 부분이 분열되는 현상을 나타내었는데 (Figure 1A, 1B) NAA 처리보다 IBA 처리에서 더욱 두드러지게 나타났다. 배양 2주 후에는 내피의 안쪽에 위치하고 있는 내초 (pericycle) 부분에서 측근이 형성되었다. IBA 처리구에서는 측근이 절편체의 전 부분에 걸쳐 고르게 형성 (Figure 1C)된 반면, NAA 처리구에서는 절편체의 한 부분에 밀집선상으로 측근이 형성되었고 (Figure 1D) 배양 3주 후에는 측근의 발달이 왕성하게 이루어진 것을 볼 수 있었다. IBA를 포함한 배지에서 생장한 부정근은 전체적인 형태와 근정단 부분 (root tip)이 정상적이고 측근의 형성이 양호한 (Figure 1E) 반면, NAA에서는 측근의 형성이 억제된 것처럼 보이며 근정단 부분이 비대된 형태를 보여주었다 (Figure 1F). 형성된 측근의 수도 NAA에 비해 IBA에서 3배 이상 많았다 (Data not shown). 이상의 결과로 부정근의 뿌리 원기 (root primordia)는 auxin의 처리에 의하여 분열된 내피와 목부 (xylem) 사이의 내초에서 발생한다는 것을 알

수 있었다. Blakely 등(1972)과 Peterson과 Peterson (1986)도 auxin에 의한 식물의 lateral root의 발생 특성에서 이와 유사한 관찰결과를 보고하였다.

고체배양에서 부정근의 생장 역시 NAA에 비해 IBA에서 훨씬 높았다. IBA 처리 시 생체중과 건물중은 218.76 mg, 19.66 mg으로 NAA의 처리구의 104.06 mg, 7.73 mg에 비하여 약 2 배 이상의 생장을 나타냈으며 생체중에 대한 건물중의 비율도 IBA 처리에서 9.0%로 NAA 처리의 7.4%보다 양호하였다 (Figure 2).

그러나 생분반응기를 이용한 액체배양에서는 IBA와 NAA의 처리에 따른 부정근의 생체중 차이가 그다지 뚜렷하지 않았는데, 특히 건물중은 IBA와 NAA처리에서 각각 17.06 g과 17.27g으로 거의 비슷하였고 생체중에 대한 건물중의 비율도 IBA와 NAA 간에 큰 차이를 보이지 않았다 (Figure 3).

배양방법에 따른 부정근 생장의 차이는 용기 내 에틸렌 농도의 차이로 설명할 수 있다. 고체배양의 경우, 환기가 이루어지지 않았기 때문에 IBA와 NAA 처리 후 배양기간이 경과할수록 에틸렌 농도가 높아졌고, 특히 NAA 처리 시 에틸렌 발생이 더 많아 (Figure 4A) IBA 처리에 비해 부정근의 생장이 크게 억제되었으나 (Figure 2), 환기가 이루어진 액체 배양에서는 IBA와 NAA 처리에 따른 에틸렌 농도의 차이가 거의 없었기 때문에 (Figure 4B) 부정근의 생장도 큰 차이가 없었던 것으로 보인다 (Figure 3). 에틸렌의 생성 패턴도 고체배양과 생분반응기를 이용한 액체배양에서 달랐는데 생분반응기의

경우, auxin의 종류와 상관없이 배양 10일까지 ethylene이 생성되지 않았고 부정근의 대수생장기인 10일 이후부터 30일까지 증가한 후 이후 빠르게 감소하였다 (Figure 4B). 반면 고체 배양에서는 배양초기부터 ethylene이 생성되었고 배양후기까지 계속 증가하였다 (Figure 4A). 특히, 고체배양에서 NAA를 처리하였을 때 배양초기 (7일)와 중기 (14일)의 ethylene생성량은 각각 106.4, 155.3 nL/L로 IBA에서의 63.8, 119.1 nL/L보다 높은 수치를 나타내었다. 이러한 차이로 NAA 처리구에서 부정근의 촉진형성이 억제되고 정단부의 비대를 가져온 것으로 생각되며 이와 같은 NAA의 영향은 이전의 실험결과에서도 이미 증명된 바 있다 (Abeles 1973; Tung et al. 1996).

이상의 실험결과로 인삼 부정근 배양에 있어서 IBA와

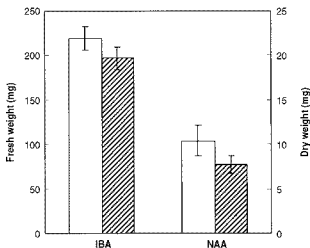


Figure 2. Fresh (open bars) and dry (shade bars) weight of ginseng adventitious roots grown on solid cultures in petri dish with IBA and NAA for 4 weeks without ventilation.

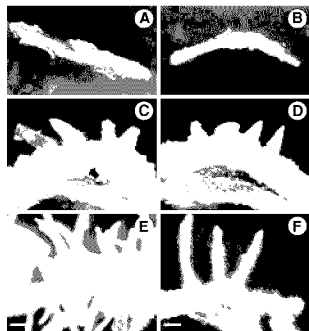


Figure 1. Development of lateral roots from the adventitious root of *Panax ginseng* C.A. Meyer on modified MS medium with IBA (A, C, E) and NAA (B, D, F), respectively. A and B: The adventitious roots after 1 week of culture. C and D: The adventitious roots after 2 week of culture (Arrow in Figure 1C is the root primordia), E and F: The adventitious roots after 3 week of culture. Scale bars=0.3 cm.

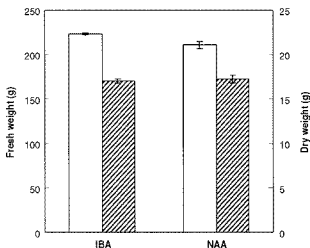


Figure 3. Fresh (open bars) and dry (shade bars) weight of ginseng adventitious roots grown on 5 L bioreactor cultures with IBA and NAA for 40 days with ventilation.

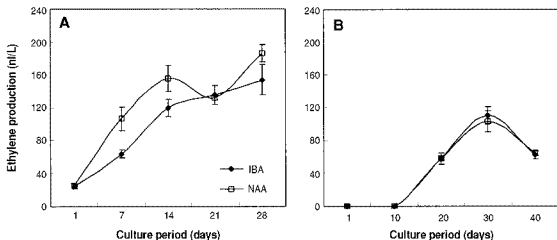


Figure 4. Ethylene production affected by IBA, and NAA in ginseng adventitious root cultures without (A) or with (B) ventilation.

NAA의 이용시 발생하는 ethylene은 부정근의 발달과 생장에 영향을 주며 배양 중의 환기조건이 용기 내의 ethylene 축적을 감소시켜 부정근의 생장을 촉진시키는 것을 알 수 있었다. 이에 따라 부정근의 유도와 발달에는 IBA를 처리하고 증식을 위해서는 배양용기 내의 환기를 해 주는 것이 인삼 부정근 배양에 효과적인 방법으로 생각되었다.

적 요

인삼 부정근의 발달과 생장에 미치는 IBA와 NAA의 영향을 관찰한 결과, 두 처리구 모두 부정근의 내측 부분에서 새로운 측근을 발생시켰다. IBA 처리 배지에서 성장한 부정근은 견체적인 형태와 근정단 부분 (root tip)이 정상적이고 측근의 형성이 양호하였으나 NAA 처리에서는 측근의 형성이 IBA에 비해 억제되었으며 근정단 부분이 비대되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한, IBA 처리에 비해 NAA 처리에서는 1.6배 이상의 에틸렌이 발생하여 부정근의 발생과 생장을 억제하였다. 공기 주입량을 0.1vvm으로 조절한 생물반응기 배양에서는 IBA와 NAA 처리간의 ethylene 발생량에 차이가 없었고 환기를 하지 않았던 처리구에 비해 배양기간 동안의 ethylene 생성량도 1/2 가량 감소되었다. 이에 따라 생물반응기 배양에서는 IBA와 NAA 처리에 따른 부정근 생장이 큰 차이들 보이지 않았다.

사사 - 본 연구는 한국 과학재단지원 충북대학교 첨단원예기술개발센터 지원에 의한 것임.

인용문헌

- Blakeley LM, Rodaway SJ, Hollen RM, Croker SG (1972) Control and kinetics of branch root formation in *Haplopappus ravenii*. *Plant Physiol* 50: 35-42
- Bollmark M, Eliasson L (1990) Ethylene accelerates the breakdown of cytokinins and thereby stimulates rooting in Norway spruce hypocotyl cuttings. *Physiol Plant* 78: 474-483
- Burg SP, Burg EA (1966) The interaction between auxin and ethylene and its role in plant growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 55: 262-269
- Choi SM, Son SH, Yun SR, Kwon OW, Seon JH, Paek KY (2000) Pilot-scale culture of adventitious roots of ginseng in bioreactor system. *Plant Cell Tiss and Org Cult* 62: 187-193
- Coleman W, Huxter TJ, Reid DM, Thorpe TA (1980) Ethylene as an endogenous inhibitor of regeneration in tomato leaf discs cultured *in vitro*. *Physiol Plant* 48: 519-525
- Gonzalez A, Rodriguez R, Tames RS (1991) Ethylene and *in vitro* rooting of hazelnut (*Corylus avellana*) cotyledons. *Physiol Plant* 81: 227-233
- Han TJ, Hong JP, Kim JC, Lim CJ, Jin CD (1996) Effect of ethylene on formation of adventitious roots, trichomes, and calli by NAA in leaf segments of *Arabidopsis thaliana*. *Kor J Plant Tiss Cult* 26: 259-264
- Huang SY, Chou CJ (2000) Effect of gaseous composition on cell growth and secondary metabolite production in suspension culture of *Stizolobium hassjoo* cells. *Bioprocess Eng* 23: 585-593
- Imaseki H, Kondo K, Watanabe A (1975) Mechanism of cytokinin action on auxin-induced ethylene production. *Plant Cell Physiol* 16: 777-787
- Inomata S, Yokoyama M, Gozu T, Shimizu T, Yanagi M (1993) Growth pattern and ginsenoside production of *Agrobacterium*-transformed *Panax ginseng* roots. *Plant Cell Rep* 12: 681-686
- Kevers C, Jacques Ph, Thonart Ph, Gaspar Th (1999) *In vitro* cultures of *Panax ginseng* and *P. quinquefolium*. *Plant Grow Reg* 27: 173-178
- Ableles FB (1973) Ethylene in plant biology. pp 302 Academic Press. New York

- Kim YS (2002) Production of ginsenosides through bioreactor culture of adventitious roots in ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) Ph.D. thesis. Chungbuk National University, Cheongju, Korea
- Mark HD, Fomey CF (2000) The effects of ethylene, depressed oxygen and elevated carbon dioxide on antioxidant profiles of senescing *spinach* leaves. *J Botany* 51: 645-655
- Nordstrom AC, Eliasson L (1993) Interaction of ethylene with indole-3-acetic acid in regulation of rooting in pea cuttings. *Plant Growth Reg* 12: 83-90
- Oh HI, Chang EJ, Lee SK, Park DK (2000) Optimization of submerged culture conditions for the production of ginseng root using response surface method. *J Ginseng Res* 24: 58-63
- Paek KY, Hahn EJ, Son SH (2001) Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37: 149-157
- Pan ZW, Wang HQ, Zhong JJ (2000) Scale-up study on suspension cultures *Taxus chinensis* cells for production of diterpene. *Enzyme Microb Tech* 27: 714-723
- Peterson RL, Peterson PA (1986) Ontogeny and anatomy of lateral roots. In: Jackson MB (ed), *New root formation in plants and cuttings*. Martinus Nijhoff Pub. Dordrecht pp 1-30
- Seon JH, Yu KW, Cui YY, Kim MH, Lee SJ, Son SH, Paek KY (1999) Application of bioreactor for the production of saponin by adventitious root cultures in *Panax ginseng*. In: Altman A (ed), *Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands pp 329-332
- Son SH, Paek KY (2001) Large-scale production of medicinal plant species: The application of bioreactors for production of ginseng roots. In: PK Saxena (ed), *Development of plant-based medicines: Conservation, Efficacy and safety*. Kluwer Academic Publisher, The Netherlands. pp. 139-150
- Tung P, Hooker TS, Tampe PA, Reid DM, Thorpe TA (1996) Jasmonic acid: Effects on growth and development of isolated tomato roots cultured in vitro. *Int J Plant Sci* 157: 713-721
- Yu KW, Hahn EJ, Paek KY (2000) Production of adventitious ginseng roots using bioreactors. *Kor J Plant Tiss Cult* 27: 309-315

(접수일자 2003년 4월 18일, 수리일자 2003년 5월 28일)