

고려인삼과 미국삼의 중간잡종으로부터 재분화된 식물체의 특성

안인옥^{1*}, 이성식¹, 이장호¹, 이범수², 인준교², 양덕춘³
¹KT&G 중앙연구원 원료연구소, ²(주)바이오피아, ³경희대학교 생명과학부

Characteristics of Plantlets Redifferentiated from F1 Hybrid between *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*

In-Ok Ahn^{1*}, Sung-Sik Lee¹, Jang-Ho Lee¹, Bum-Soo Lee², Jun-Gyo In², Deok-Chun Yang³

¹Agro-Tech Research Group, KT&G Central Research Institute, Suwon 441-480, Korea

²Biopia Co. Ltd., Yongin, 449-598 Korea

³Department of Life Science, KyungHee University, Yongin, 449-598 Korea

ABSTRACT The characteristics of plantlets redifferentiated from calli of F1 hybrid between *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* were investigated. Growth of plantlets redifferentiated from F1 hybrid was superior to the plants redifferentiated from Korean ginseng. Stem color of plantlets redifferentiated from F1 hybrid was more purple than that from Korean ginseng and leaf color of the former was also greener than that of the latter. Chunpoong, Yunpoong and Seonweon which are belonged to Korean ginseng showed same PCR band(A), while American ginseng showed different PCR band (B) in Internal Transcribed Spacer (ITS) region. F1 hybrid exhibited both A and B PCR band which belonged to Korean ginseng and American ginseng, respectively. F1 hybrid calli and plantlets redifferentiated from F1 hybrid calli showed same PCR band with that of F1 hybrid plant in ITS region. Therefore it was confirmed that plantlets redifferentiated from F1 hybrid exhibited genetic stability in ITS region.

Key words: Interspecific hybrid, ITS region, *Panax ginseng*, *Panax quinquefolius*,

서 론

고려인삼 (*Panax ginseng*)은 체형이 좋고 약효가 뛰어나지만 고품에 약하고 적변에도 취약한데 반하여 미국인삼 (*Panax quinquefolius*)은 내광성이며 적변에 강하다고 알려져 있다 (Chung et al. 1992). 체형과 약효가 뛰어나면서 광과 적변에 강한 인삼품종을 얻고자 고려인삼과 미국인삼 간의 중간교배를 실시하였다. 고려인삼에 비하여 미국인삼은 개화기가 20일 가량 늦어, 출아기에 미국인삼의 뇌두에 지베렐린을 처리하여 개화시기를 앞당겼다. 재종된 F1 종자는 개갑처리한 후 포장에 파종하였으며, 중간교잡 식물체는 모본 (고려인삼)과 부분 (미국인삼)에 비하여 생육이 월등히 우수하여 잡종강세 현상을 나타내었으며

체형은 모본인 고려인삼을 닮아 우수하였다 (Chung et al. 2003). 이와 같이 우수한 생육특성을 보이는 중간교잡 식물체를 증식시키려면 모본과 부분간에 교배가 이루어져야 하지만, 모부분으로 이용될 고려인삼과 미국인삼은 개화기가 일치하지 않으며 종자결실율도 아주 낮아 수작업을 통한 F1종자의 채종은 경제성이 매우 낮은 형편이다. 최근 원예작물이나 수목류에서는 종묘의 번식수단으로서 채종이나 삽목 등을 이용하는 대신에 조직배양묘의 생산으로 대체해 가고 있으며 (Kim and Lee 1995), 조직배양묘에 종자법을 적용하여 특허권을 인정하고 있는 것이 국제적인 추세이다. 다른 작물과 마찬가지로 인삼에서도 체세포 배발생을 통한 재분화시스템이 구축되어 있지만 (Ahn 1996; Arya et al. 1991), 조직배양과정 중에는 유전적인 변이가 일어나는 경우가 종종 보고되므로 재분화된 유식물체가 조직배양모본인 F1식물체와도 유전적으로 동일한지를 검증할 필요가 있다. 한편 ribosomal RNA를 code하는

*Corresponding author Tel 031-400-1512 Fax 031-419-9434
E-mail: ginbreed@naver.com

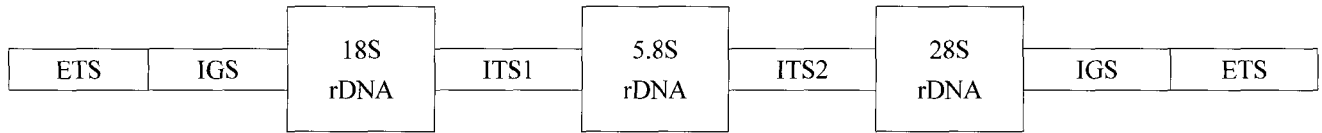


Figure 1. A map of nuclear rDNA region and the position of primer set used for PCR amplification. Internal transcribed spacer (ITS), External transcribed spacer (ETS), Intergenic spacer (IGS).

DNA의 ITS 영역 (Figure 1)은 유전적으로 안정되어 이 부분의 염기서열은 진화학상의 유연관계를 알아내는 데 많은 도움을 주고 있다 (Balwin 1992). 고려인삼과 미국인삼의 경우에도 ITS영역에서 염기서열 한 군데가 서로 다르며, ITS영역을 code하는 특수 primer를 이용하면 고려인삼과 미국인삼에서 각기 고유 DNA 밴드를 확인할 수 있으며 종간 교잡종에서는 고려인삼과 미국인삼의 고유한 DNA 밴드가 모두 나타남이 이미 보고되었다 (Wen and Zimmer 1996). 그런데 배양 과정에서 유전변이가 일어나 재분화된 식물체에서 변이체가 발견되는 경우가 종종 보고되고 있다 (Etienne and Bertrand 2003). 이에 종간교잡식물에서 재분화된 식물도 고려인삼과 미국인삼이 각기 나타내는 고유한 DNA 밴드가 모두 나타나는 지를 알아 봄으로써, F1 재분화식물이 ribosomal DNA의 ITS영역에서 유전적인 안정성을 유지하는 지를 확인하고자 본 실험을 실시하였다.

화 식물체의 잎과 캘러스를 시료로 사용하여 액체질소를 첨가하며 마쇄하였다. 식물 DNA 추출용 kit (Nucleospin Plant, Macherey-Nagel)를 사용하여 마쇄된 시료로부터 DNA를 추출하였다. ITS영역의 증폭에 사용된 oligonucleotide는 Bioneer사 (Chungwon, Korea) 제품을 사용하였다. PCR 증폭에 사용한 primer는 5' 방향에서 ITS 5Fprimer (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAA-GG-3')와 3' 방향의 ITS 4R primer (5'-TCCTCCGCTTAT-TGATATGC-3')를 각기 사용하여 수행하였다 (Figure 1). PCR조건으로는 95℃에서 30초간 denaturation을 하였으며 55℃에서 30초간 annealing하고 72℃에서 1분간 extension하여, 총 36회의 반응을 실시하였다. PCR 반응액은 1% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후 ethidium bromide 용액으로 염색하여 관찰하였다.

재료 및 방법

재분화식물체의 육성

고려인삼 (*panax ginseng*)과 미국인삼 (*Panax quinquefolius*)의 종간교잡종 (F1)의 화서조직 및 고려인삼 종자의 자엽조직을 무균적으로 절취하여 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) 1.0 mg/L와 BAP (benzylaminopurine) 0.1 mg/L을 첨가한 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에 접종하여 배발생세포를 유도하였으며 1개월 간격으로 동일한 배지에서 계대배양하였다. 배발생세포를 동일한 배지에서 4개월가량 방치하면 갈변된 캘러스위에 연노란색의 자엽형배가 관찰되는데 (Ahn et al. 1991, Ahn and Kim 1992), 2, 4-D 1.0 mg/L와 BAP 0.1 mg/L를 첨가한 변형된 MS배지로 자엽형배를 옮겨서 배의 발육 및 성숙을 유도하였다. 1/2 MS배지에 3% sucrose와 5 uM의 GA₃ (gibberellic acid)를 첨가시킨 배양기에서 유식물체의 발아를 유도하였다. 배양온도는 25℃로 유지하였으며 발아 후에는 3000 Lux의 자연광 형광등 하에서 배양하였다.

Genomic DNA 추출 및 PCR-amplification

고려인삼인 천풍, 연풍 및 선원, 미국인삼, 고려인삼과 미국인삼 간의 종간교잡종으로부터 각기 채취한 잎 및 재분

결과 및 고찰

종간교잡종의 재분화 식물체의 특성 비교

고려인삼의 자엽조직에서 유도된 캘러스는 연초록색을 띄었으나 이종간 교잡식물 (F1)의 화서조직에서 유래한 캘러스는 주로 갈색을 띄었고 일부 자색이 섞여 있었다 (Figure 2). 고려인삼의 캘러스에서 재분화된 식물의 줄기는 밑부분에서만 약한 자색을 띄었으며 잎은 연한 녹색을 나타내었으나, 종간교잡종의 캘러스에서 재분화된 식물은

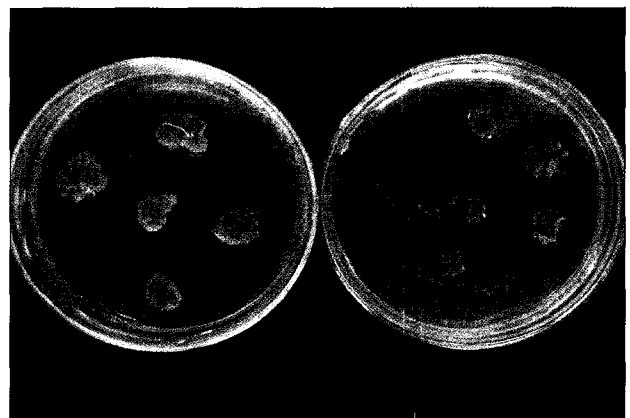


Figure 2. Calli of *Panax ginseng* (left) and interspecific hybrid (right).



Figure 3. Redifferentiated plantlets from *Panax ginseng* (left) and interspecific hybrid (right).

줄기와 뿌리의 절반 이상이 강한 자색을 띠었으며 잎도 진한 녹색을 나타내었다 (Figure 3). 또한 경화배지에서 2개월 정도 생육한 중간교잡종의 재분화식물은 줄기의 길이(경장)와 직경(경직경)이 각기 5.9 cm, 2.5 mm로 고려인삼 재분화식물의 경장과 경직경에 비하여 1.5배 가량 높았는데, 이는 포장에서 재배되는 중간교잡종이 모본인 고려인삼과 부분인 미국인삼에 비하여 경장과 경직경 등의 지상부 생육이 월등히 좋았던 것과 같은 경향이었다 (Chung et al. 2003; Chung 2004). 또한 중간교잡종에서 재분화된 식물의 지하부 생육을 보면 뿌리의 길이(근장)와 직경(근직경)이 각기 3.7 cm, 4.2 mm로 고려인삼 재분화식물의 근장과 근직경에 비하여 1.2배 이상 높게 나타났다 (Table 1). 이와 같이 중간교잡종으로부터 재분화된 식물체의 지상부와 지하부 생육이 모본인 고려인삼 재분화 식물체에 비하여 월등히 좋은 것으로 보아, 재분화과정을 거쳐 생산된 식물체는 중간교잡식물체가 지닌 잡종강세의 특성을 그대로 지니고 있다고 생각되었다.

재분화 식물체의 ribosomal DNA의 ITS 영역

고려인삼과 미국인삼을 구별할 수 있는 SNP primer를 이용하여 고려인삼, 미국인삼, 중간교잡종, 캘러스 및 재분화 식물체를 비교분석하였다. 천풍, 연풍, 선원 등의 고려인삼의 품종 내에서는 ITS 영역에서 PCR-패턴에서 차이점이

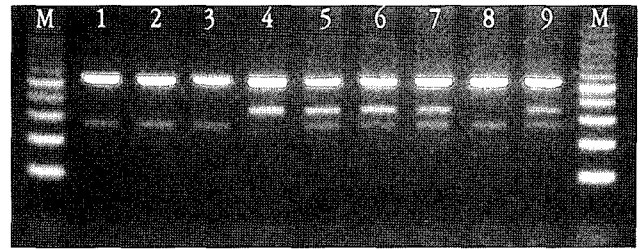


Figure 4. PCR pattern of ITS region from ginseng leaves, calli and redifferentiated plantlets. Lane 1; Chunpoong, lane 2; Yunpoong, lane 3; Seonweon, lane 4; *Panax quinquefolius*, lane 5; F1 Hybrid between *P. ginseng* (Seonweon) and *P. quinquefolius*, lane 6; callus of F1 Hybrid between *P. ginseng* (Seonweon) and *P. quinquefolius*, lane 7; Plantlet redifferentiated from F1 hybrid, lane 8; Callus of Korean ginseng, lane 9; BCF (Chunpoong x Fi)

나타나지 않았다 (Figure 4; lane 1,2,3). 자경계통과 황숙계통은 Ribosomal RNA의 ITS영역에서 SNP를 나타내지만 (Yang et al. 2001), 자경계통에 속한 천풍, 연풍, 선원간에는 SNP를 나타내지 않았다. 한편 미국인삼은 고려인삼에서 보이는 특정한 PCR 밴드 (A)를 보이지 않는 반면에 미국인삼에서만 보이는 PCR-밴드 (B)를 나타내는데 (Figure 4; lane 4) 중간교잡종은 고려인삼과 미국인삼에 각기 나타나는 고유한 PCR 밴드 (A, B)를 모두 나타냈다 (Figure 4; lane 5). 한편 중간교잡 1세대의 화서조직에서 유기된 캘러스에서도 고려인삼과 미국인삼에 각기 나타나는 고유한 PCR 밴드 (A, B)를 모두 갖는 것으로 나타났으며, 고려인삼의 자엽조직에서 유기된 캘러스에서는 고려인삼에서만 나타나는 PCR밴드와 동일한 것으로 (Figure 4; lane 6, 8) 보아, 식물체가 가지고 있는 유전적인 특성이 식물조직에서 유기된 캘러스에서도 그대로 유지되고 있는 것으로 판단되었다. 또한 교잡종의 화서조직 유래 캘러스에서 재분화된 식물체가 교잡종의 잎이나 캘러스와 동일한 PCR 패턴을 보임에 따라 시험관내에서 복잡한 재분화 과정을 거친 식물체일지라도 모본 식물체가 지닌 유전적인 특성을 유지하고 있음을 확인할 수 있었다 (Figure 4; lane 7). 또한 고려인삼에 F1 식물을 여교잡하여 얻은 식물에서는 PCR 밴드 A와 B가 모두 나타나, 1회의 여교잡으로는 미국인삼의 ITS 영역의 DNA를 제거할 수 없음을 알 수 있었다 (Figure 4; lane 9). 그러나 본 연구는 ribosomal DNA의 ITS영역만을 비교

Table 1. Growth of plantlets redifferentiated from *Panax ginseng* and interspecific hybrid (*Panax ginseng* x *Panax quinquefolius*)

Redifferentiated plantlet	Stem length (cm)	Stem diameter (mm)	Root length (cm)	Root diameter (mm)
<i>Panax ginseng</i>	4.1	1.7	2.5	3.0
Interspecific Hybrid	5.9	2.5	3.7	4.1
t-value	**	**	**	**

**; Significant at 1% level

검토하였을 뿐 인삼 게놈 전체를 비교한 것은 아니므로 인삼 중간잡종의 재분화식물체가 유전적으로 안정하다고 단언하기에는 이르다고 생각한다. 추후, AFLP와 SSAR 방법을 도입하여 인삼 중간잡종에서 재분화된 식물체의 유전적인 안정성을 확인할 필요가 있다고 생각된다.

적 요

교잡 1세대의 화서조직에서 재분화된 F1 유식물체는 고려인삼 유식물체에 비하여 지상부와 지하부 생육이 모두 양호하였으며, 줄기 색도 고려인삼 재분화 식물체의 줄기에 비하여 자색을 강하게 띠었으며 잎의 색도 진한 녹색을 나타내었다. 천풍, 연풍, 선원 등의 고려인삼의 품종 내에서는 Internal Transcribed Spacer (ITS) 영역의 DNA PCR 패턴 간에 차이점이 나타나지 않았으나, 고려인삼과 미국인삼은 각기 다른 PCR 패턴을 보였으며, 고려인삼과 미국인삼간의 교잡 1세대는 고려인삼과 미국인삼에 나타나는 고유한 PCR 패턴을 모두 나타내었다. 교잡 1세대에서 유기한 캘러스와 재분화식물체는 조직배양 모본인 교잡 1세대와 동일한 PCR 패턴을 보임에 따라 교잡 1세대의 조직배양체는 ribosomal DNA의 ITS영역에서 유전적인 안정성을 나타내는 것으로 확인되었다

인용문헌

Ahn IO, Choi KT and Kim BD (1991). Relationship between somatic embryogenesis and anthocyanin synthesis in callus cultures of *Panax ginseng*. Korean J Plant Tissue Culture 18: 227-232
 Ahn IO and Kim BD (1992) Transition of cellular oxidation-reduction status in accordance with somatic embryogenesis during the cultures of ginseng (*Panax ginseng*). J.

Kor Soc Hort Sci 33: 231-235
 Ahn IO (1996) Regeneration of ginseng (*Panax ginseng*) through the maturation process of somatic embryos. J. Korean Soc Hort Sci 37: 777-780
 Arya S, Liu JR and Eriksson T (1991) Plant regeneration from protoplast of *Panax ginseng* through somatic embryogenesis. Plant Cell Reports 10: 277-281
 Balwin BG (1992) Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA: an example from the Compositae. Mol Phylogenet Evo 1: 3-16
 Chung YY (2004) Germination of hybrid ginseng seeds and activities of lipoxygenase (LOX) in *Panax ginseng* Species. J Ginseng Research 28: 191-195
 Chung YY, Chung CM, Choi KT and Chung CS (1992) The comparison of growth characteristics of *Panax ginseng* C.A. Meyer and *Panax quinquefolius* L. Korea J Breed 24: 81-86
 Chung YY, Chung CM and Jo JS (2003) Agronomic characteristics and chemical component of hybrid between *Panax ginseng* C.A. Meyer and *Panax quinquefolius* L. J Ginseng Research 27: 183-187
 Etienne H and Bertrand B (2003) Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants. Tree Physiology 23:419 - 426
 Kim HS and Lee BY (1995) *In vitro* production of somatic embryos in *Oenanthe stolonifera* DC. J Korean Soc Hort Sci 36: 38-45
 Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-479
 Wen J and Zimmer EA (1996) Phylogeny and biogeography of *Panax* L. (the Ginseng Genus, Araliaceae): Inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. Mol Phylogenet Evol 6: 167-177
 Yang DC, Yang KJ and Yoon ES (2001) Comparison of ITS (internal transcribed spacer) and 5.8S rDNA sequences among varieties and cultivars in *Panax ginseng*. J Photoscience 8: 55-60

(접수일자 2006년 1월 12일, 수리일자 2006년 2월 27일)