

최 종
연구보고서

내적변성 및 생리활성물질 고함유 인삼 품종 개발

Development of Ginseng Superior Lines with Red
Skin Tolerance and High Level of Ginsenosides

연구기관
한국인삼연초연구원

농 립 부

<p>(뒷면)</p> <p>6cm</p> <p>(4호<14포인트>고딕체)</p>	<p>5cm</p> <p>내 적 변 성</p> <p>및</p> <p>생 리 활 성 물 질</p> <p>고 함 유 인 삼 품 종 개 발</p> <p>농 림 부</p> <p>3cm</p>	<div data-bbox="625 291 793 382" style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> 최 종 연구보고서 </div> <p style="text-align: center;">5cm</p> <p style="text-align: center;">내적변성 및 생리활성물질 고함유 인삼 품종 개발</p> <p style="text-align: center;">Development of Ginseng Superior Lines with Red Skin Tolerance and High Level of Ginsenosides</p> <p style="text-align: center;">12cm</p> <p style="text-align: center;">연 구 기 관</p> <p style="text-align: center;">한국인삼연초연구원</p> <p style="text-align: right;">8cm</p> <p style="text-align: center;">18.8cm</p> <p style="text-align: center;">농 림 부</p> <p style="text-align: center;">3.5cm</p>	<p style="text-align: center;">25.9cm</p>
--	--	--	---

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “내적변성 및 생리활성물질 고함유 인삼 품종 개발
에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000년 12 월 일

주관연구기관명 : 한국인삼연초연구원

총괄연구책임자 : 최 광 태

연 구 원 : 이 명 구

연 구 원 : 이 성 식

연 구 원 : 양 덕 춘

연 구 원 : 권 우 생

연 구 원 : 강 제 용

연 구 원 : 인 준 교

요 약 문

I. 제목

내적변성 및 생리활성물질 고품질 인삼품종 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

고려인삼은 반음지성 다년생 약용작물로서 재배기술이 상당히 발전되어 왔으나 아직 까지 품종분화 없이 재래혼계종인 자경종이 재배되고 있는 실정이다. 또한 인삼은 재배기간이 4-6년이 소요되는 다년생 작물로 품종육성에 장기간이 소요되고 목적 부위가 뿌리이기 때문에 생육 초기의 지상부형질을 통하여 인삼뿌리의 상태를 판별하기 어렵고, 또 지하부 형질도 재배기간 중에 채굴 조사 한다는 것은 쉬운일이 아님으로 육종재료로서 까다로운 작물이다.

그러나 재배인삼인 자경종 인삼의 잎과 줄기 그리고 뿌리를 자세히 관찰하여 보면 개체간의 형질변이가 심한 것을 알 수 있으며(최광태 등, 1982; 최광태a, 1983; 최광태b, 1983), 아직 품종의 분화가 이루어지지 않은 혼계상태의 집단이므로 유용한 유전자형을 선발하여 우수품종으로 육성할 수 있는 가능성은 충분하다. 최근에 인삼의 소비는 일정수준을 유지하고 있는 반면에 인삼재배적지 부족으로 생산량이 감소하는 경향을 보이고 있어, 품질이 우수한 고려인삼의 생산을 증대시키기 위한 획기적인 방안이 수립되지 않으면 우리나라 고려인삼의 수급계획에 큰 차질이 발생할 것으로 생각된다(최광태b, 1983). 고품질 인삼 생산과 품질 우수품종에 대한 관심은 경작자들 뿐만 아니라 수요자층에서도 요구도가 높아지고 있으며, 소비자 요구에 부응하는 인삼품종의 개발은 국제 인삼시장에서 고려인삼의 성가 제고에 크게 공헌할 것으로 생각된다. 인삼의 재배면적은 연도별로 차이가 있으나(한국담배인삼공사, 1995) '96년도의 전국 홍삼포 식부계획면적은 800헥타이다. 그러나 6년근 수확면적은 422헥타로서 이

식면적 대비 수확면적은 53%이고, 6년근 수매 인삼중 적변삼 발생율이 60% 이상인 것으로 추정되며, 이것을 2000년도 수매실적을 기준하여, 적변삼 발생으로 인한 농민의 손실액은 약 95억원이며 이것을 백삼포까지 면적까지 적용하면 손실 총액은 대략 600억원이 상회할 것으로 추정된다. 이와같이 적변삼 발생의 해결은 한국인삼 산업의 시급한 문제인 것이다.

인삼포장에서 적변삼이 발생하는 원인은 식물병원균의 감염에 의해서 발생하는 것은 아닌 것으로 보이며(오승환 등, 1978) 토양이 과습하거나(목성균 등, 1996) 배수가 불량한 곳(목성균 등 1995) 미부숙 유기질거름을 사용 하였을 때(김병수 등, 1985) 토양의 물리성이 나쁠 때(목성균 등, 1996) 예정지 관리미비(목성균 등, 1996) 등의 포장조건에서 많이 발생하는 것으로 알려지고 있다. 이와같이 인삼재배 토양환경의 악화 즉 토양 물리성 및 화학성이 악화되거나, 토양내 유해가스 발생 등으로 인삼의 뿌리호흡이 저해 될 때(목성균 등, 1996) 식물체가 자기방어적인 작용으로 근표피에 적변물질을 축적하여 적변삼이 발생하는 것으로 추정되고 있다. 적변삼 관련 물질에 관해서는 정영륜 등(1985)은 인삼근 적변표피에 phenolic compound 함량과 Fe함량이 높다고 하였고, 이태수 등(1995)은 뿌리의 중심주, 피층 및 지세근에 Fe와 Na가 높다고 주장 하였고, 이태수(1990)는 적변표피 층에 phenolic 성 물질 함량이 높다고 하였다. 적변삼 발생감소를 위해 인삼재배 및 토양환경 개선을 추진중이나 우리나라 현재 인삼재배 여건상 농가 노동력의 고령화 및 구득에 어려움이 증가되고, 토양의 물리 화학성 개량을 위해 필요한 청초의 구입이 어려워, 단기간내 토양환경을 개선하여 적변삼 발생을 감소시키기에는 어려운 실정이다. 따라서 다소 열악한 재배 및 토양환경 조건에서도 적변삼 발생율을 낮출 수 있는 인삼 품종을 개발하여 적변삼발생을 감소시킬 필요성이 증대 되었다. 1995 현재 한국인삼연초연구원에서 인삼육종사업을 수행하고 있는데 보유종인 고려인삼 약200여계통 중에는 적변에 강한 것으로 보이는 계통들이 확인되고 있어, 이들계통의 적변내성 여부검정의 방법을 확립하여 적변내성 인삼육성의 필요성이 있다. 고려인삼과 미국삼

(*Fanax quinquefolium* L.)을 같은 토양에서 재배하면 고려인삼은 적변삼이 90% 이상인데 비하여 미국삼은 적변삼의 거의 발생하지 않음을 발견하였는 바 적변은 유전적인 요인이 크다고 생각되어진다(이명구 등, 1995). 그래서 고려인삼(*Fanax ginseng* C. A. Meyer)과 미국삼(*Fanax quinquefolium* L.)을 종간교잡하여 F₁잡종 식물체를 육성중에 있다. 그러나 F₁ 식물체에서는 종자가 결실되지 않는 문제점이 발견되었다. 미국삼의 적변내성 인자를 도입하기 위해서는 F₁ 잡종식물체의 불임타파 연구가 필요하다. 또한 인삼의 육종기간은 장기간이 소요되므로 조기에 적변관련 지표성분을 찾아서 보유계통의 적변내성여부를 조기에 판정에 활용할 수 있는 방법의 개발이 시급하다. 고려인삼이 타국삼보다 고가로 세계시장에서 품질을 인정받고 있지만 가격경쟁력은 중국삼에 비해 낮아서, 앞으로 고려인삼의 성가 유지를 위해서는 품질경쟁력 강화로 타개해 나가야 하며, 타국삼과 차별화 할 수 있는 생리활성물질인 ginsenoside의 종류와 함량이 높은 인삼품종 개발이 시급한 실정이다. 인삼의 약리효능상 중요시하는 성분은 여러 가지가 있으나 그중에서도 인삼 사포닌, 즉 ginsenoside로서 지금까지 29종이 밝혀져 있다(Osamu, 1977; Sanada et al., 1974; Sanada, 1974). 당 연구원에서는 20여 년간 지역별 산지에서 인삼을 선발, 순계분리 방법으로 인삼계통을 육성하여 현재 200여 계통을 확보하고 있으며, 이들 계통중에는 ginsenoside 고함유 계통이 있을 것으로 추정되어 이에 대한 검정의 필요성이 높다.

인삼의 종 중에는 우리나라에서 재배하고 있는 *Fanax ginseng* C. A. Meyer와는 다른 종인 *Fanax quinquefolium* L. (일명 서양삼)은 우리나라 토양 조건에서 *Fanax ginseng* C. A. Meyer와 같은 포지에서 재배한 결과, *Fanax ginseng* C. A. Meyer는 적변삼율이 90% 이상인데 비하여 미국삼은 적변삼이 전혀 발생하지 않음을 발견하였다(이명구, 1995) 식물의 종간교잡은 어려움이 있으나 땅콩에서 몇 가지 처리로서 교잡을 성공시켜 새로운 품종을 개발(안병욱 등, 1994 ; Halward et al., 1987 ; Jahnson et al., 1956 ; 손용룡 등, 1969)하고 있으므로 인삼도 위의 두 종간에 교

잡을 실시하여 적변이 없는 인삼을 육성할 수 있을 것이다. 이 연구의 목적은 RT-PCR을 이용하여 인삼적변에 내성을 가지는 유전자를 탐색하기 위하여 실시되었다. 인삼은 다년생 음지성 작물로서 재배조건이 매우 까다롭고, 종자를 통하여 번식할 수 있으나 채종하는데 3-4년이 소요되어 타식물에 비하여 우수품종 육성에 장구한 세월이 필요하다. 인삼은 보통 4년생에서 1회 종자를 채취하는 것을 원칙으로 하고 있으며 종자 1회 채취시에도 40-50립 정도밖에 채취할 수 없어 기내 배양을 통한 단기간의 식물체 재생기술은 우수형질을 지닌 인삼식물체의 기내증식 또는 형질전환 식물체의 대량생산에 있어서 큰 의미를 지닌다고 할 수 있다. 또한 우수품종을 육성하였다 하더라도 동일한 유전자형을 지닌 개체수 증식에도 상당한 시일이 요구되므로 이러한 불편하고 어려운 점을 해결하기 위하여 인삼의 조직배양기술이 개발 확립되어 단시일내에 homologous gene을 지닌 개체수를 대량으로 증식할 수 있는 기반이 구축되어야 할 것이다. 인삼의 뿌리 절편을 재료로 하여 Butenko등(1968)이 최초로 배발생을 보고한 이래 여러 연구자들이 인삼 조직배양을 통한 식물체의 재생을 보고하였다(Butenko *et al.*, 1968; Chang and Hsing, 1978; Chang and Hsing, 1978; Chilton *et al.*, 1978). 그러나 인삼식물체의 기내증식은 매우 까다롭고, 특히 재생된 식물체가 전혀 뿌리를 발생시키지 못하던가, 부실한 뿌리의 발생이 이루어져 아직 토양에서 순화된 식물체를 보고한 예가 거의 없다. 그 동안의 인삼 재분화 연구는 주로 체세포배의 발생을 통하여 이루어져 왔으며(Furuya and Kajii, 1983; Yoshikawa, and Furuya, 1987) 다른 분화방법에 대해서는 전혀 보고된 바가 없다. 본 연구는 인삼의 재분화 방법에 대한 전반적인 사항을 조사하여 효율적으로 재분화체가 토양에 까지 활착할 수 있는 조건을 구명하고자 수행하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

내적변성 및 생리활성물질 고함유 인삼품종 개발을 위하여 다음과 같은 연구를 수행하였다.

1. 내적변성 및 ginsenoside 고함유 인삼계통 선발

가. 내적변성 인삼계통 선발시험

- 1) 신규선발 시험
- 2) 신규선발에서 적변 내성인 계통의 재확인 시험
- 3) 적변의 유전성 및 환경성 결정시험

나. 적변관련 성분 및 조기검정 방법 검토

- 1) 적변관련 성분 분석
- 2) 적변을 조기에 검정할 수 있는 방법 검토

다. F₁ 잡종식물체의 불임원인 조사

라. 인삼계통의 ginsenoside 함량 분석

2. 내적변성 및 ginsenoside 고함유 인삼의 DNA 분석

가. Amplified Polymorphic DNA 기술을 이용한 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)의 DNA 분석

- 1) 인삼의 RAPD분석

나. 분자마커에 의한 인삼 적변관련 유전자의 분석

- 1) RAPD분석을 위한 PCR 조건
- 2) RAPD를 위한 primer 선정 및 RT-PCR
- 3) 적변관련 cDNA 단편의 data 분석

다. Ginsenoside 고함유 인삼계통의 RAPD 양상

- 1) 인삼근 중에서 ginsenoside 고함유 계통의 RAPD 양상
- 2) 인삼모상근중에서 ginsenoside 고함유 세포주의 RAPD 양상

3. 인삼의 기내증식기술 개발

가. 인삼조직으로부터 체세포유래 단일배의 유기

나. 체세포단일배의 발생의 조직학적특성 및 TIBA의 영향

- 1) 단일배발생시 배양조직의 형태학적 변화
- 2) 단일배발생시 배양세포내의 내재호르몬 효과

다. 체세포배의 성숙 및 발달조건

라. 체세포배의 발생에 미치는 각종 염류의 효과

- 1) 염류처리에 의한 접합자배로부터 인삼체세포배의 발생 및 발육
- 2) 염류처리에 의한 인삼 접합자배의 체세포배 형성과 발아

마. 체세포단일배의 발아 및 유식물체의 생성

- 1) 체세포단일배의 발아에 미치는 GA₃의 영향
- 2) 체세포단일배의 발아에 미치는 저온처리 영향
- 3) 발아과정의 부가전자현미경적 관찰
- 4) 체세포 단일배의 휴면현상
- 5) 인삼 유식물체의 생장에 적합한 최적 배양환경

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 내적변성 및 ginsenoside 고함유 인삼계통 선발

가. 내적변성 인삼계통 선발시험

1) 신규선발 시험

가) 내적변계통 신규선발시험 96년도 채굴 4년생 61계통에서 뿌리의 적변지수가 자경종이 2.8인데 비하여 18계통은(81878, 83795, 김포황숙, 7337-4-1, 78149, 78304, 7318-2-1, 80205, 78142, 86018, KG101, 78222, 80117, KG105, 풍기황숙, 78167, 78206, KG103)0.9이하로 낮아 내적변 유망계통으로 추정된다.

나) 내적변계통 신규선발시험 98년도 채굴 4년생 10계통에서 뿌리의 적변지수가 자경종이 2.0인데 비하여 산양삼, 다416계통은 1.2-1.8로 낮아서 2계통을 선발하였다.

다) 내적변계통 신규선발시험 99년도 채굴 4년생 46계통(음성시험장)에서 뿌리의 적변지수가 자경종이 1.09인데 비하여 84702, 85735, 84776, KG108, 84771, 79201, KG111, 78222 계통은 적변지수가 0-0.47로 현저히 낮아서 적변내성 계통으로 가능성이 제시된다.

라) 내적변계통 신규선발시험 2000년도 채굴 4년생 20계통(음성시험장)에서 뿌리의 적변지수가 자경종이 1.41인데 비하여 83743, 82099, 82114, 82016, 79027 계통은 적변지수가 0.31-0.56으로 현저히 낮아서 적변내성 계통으로 가능성이 제시되었다.

2) 재확인 시험

가) 내적변성 재확인 시험 4년생 16계통(대전시험포)에서 뿌리의 적변지수가 자경종이 1.22인데 비하여 78206, 78149, KG102, KG103계통은 적변지수가 0.33-0.61로 현저히 낮아서 적변내성 계통으로 가능성이 확인되었다.

나) 내적변성 재확인 4년생 15계통(풍기산지포)에서 뿌리의 적변지수가 자경종이 1.93인데 비하여 KG102, 7337-4-1, 78206, KG101, 4계통은 적변지수가

1. 03-1.28로 현저히 낮아서 적변내성 계통으로 가능성이 확인되었다.

3) 유전 및 환경성 검정 시험

가) 적변의 환경 및 유전성 검토시험의 4년생 8계통(대전포지)에서 적변평균지수가 정상포지 0.64에 비해 적변유발포지는 1.02로 적변유발포지에서 현저히 높아서, 환경에 의해서 영향을 받는 것을 알 수 있었다.

나) 80205, 82068, 83795 3계통은 정상포지 및 적변유발포지에서 모두 자경종보다 적변지수가 낮아서 이들 계통은 적변내성이 있는 계통으로 추정되며, 인삼계통의 적변의 유전성은 적변지수가 낮은 계통이 계속적으로 낮은 것으로 보아 유전성이 있는 것으로 생각된다.

나. 적변관련 성분 및 조기검정 방법 검토

1) 적변관련 성분

가) 4년생 적변계통 내용 성분 분석

- (1) Phenolic compound 함량이 적변계통은 건전계통에 비해 피층과 표피부위에서 많았다.
- (2) 적변계통은 건전계통에 비해 피층에서는 K, Ca가 표피부위에서는 Mg의 함량이 현저히 높았다.
- (3) 적변계통은 건전계통에 비해 표피부분에서 Fe, Na, Mn, Al, 및 Si의 함량이 현저히 높았으며, 피층부위에서는 Na의 함량이 높았다.
- (4) 인삼적변 계통의 표피 및 피층부위에 phenolic compound, K, Ca, Mg, Fe, Na, Mn, Al 및 Si의 함량이 높아서 이들성분이 인삼적변 유발과 관계가 있는 것으로 확인되었다.

나) 6년생 적변계통 내용성분 분석

- (1) 적변계통군은 건전계통군에 비하여 표피에서는 Fe의 함량이 높았으며,
- (2) 적변계통 그룹내에서도 적변삼과 건전삼이 혼재하고 있었으며, 적변삼은 건전삼에 비해 피층에서 Ca, Al, Cu가, 표피에서 Ca, P, Fe, Na가 높았

다. 그러나 K의 함량은 표피에서 적변삼이 건전삼보다 더 낮았다.

- (3) 건전한 인삼근을 시료로 사용시 표피에서만 적변계통군은 건전계통군보다 Fe, Al의 함량이 높았다.
- (4) 건전한 인삼근 표피에서 적변계통이 Fe, Al 성분이 높았던 것은 인삼 적변계통들의 유전적 특성으로 추정되어 이 성분들은 인삼적변삼 조기선발 지표 성분으로 가능성이 있을 것으로 생각된다.
- (5) 피층과 표피부위에서 적변계통군은 건전계통군에 비하여 phenolic compound 함량이 높았으며,
- (6) 피층과 표피부위에서 건전계통군에서 적변뿌리는 건전뿌리보다 phenolic compound 함량이 높았으며
- (7) 피층과 표피부위에서 적변계통군에서 적변뿌리는 건전뿌리보다 phenolic compound 함량이 높았으며
- (8) 적변뿌리를 사용한 표피부위에서 적변계통은 건전계통보다 phenolic compound 함량이 높았으며,
- (9) 건전한뿌리를 사용한 표피부위에서 적변계통은 건전계통보다 phenolic compound 함량이 높았다.
- (10) 이상의 결과로 보아 적변내성 계통 조기선발을 위한 적변지표 성분은 6년생 건전 뿌리의 표피조직에서 적변계통은 적변내성계통에 비하여 Fe, Al 과 phenolic compound의 함량이 높아 이들 성분이 적변지표성분으로 가능성이 제시되었다.

2) 조기검정 방법

- 가) 98년도 결과에서 적변내성 계통 조기선발을 위하여 묘삼에서 적변내성 선발 지표 성분을 검토한 결과 적변계통은 건전계통보다 묘삼에서 phenolic compound, K 및 Na 함량이 많았다.

다. F₁ 잡종식물체의 불임원인 조사

- 1) F₁ 잡종식물체의 불임원인을 구명한 결과 고려인삼과 미국삼에는 존재하나 F₁

잡종식물체에는 없는 분자량 31.0-40kDa 와 등전점 5.5-5.9 사이의 단백질, 그리고 양친에는 없으나 F₁ 잡종식물체에는 존재하는 분자량 54.0-60.0kDa와 등전점 5.5-5.9 사이의 단백질과 등전점만 다른 분자량 66.2-97.4kDa 단백질이 불임관여 물질로 추정된다.

라. 인삼계통의 ginsenoside 함량

- 1) 분석계통 중 7234-1-1을 비롯한 13계통은 기존 재래 혼계종인 자경종 8.68 mg/g보다 높은 함량을 보였다.
- 2) 각각의 ginsenoside에서 Rg₁은 분석된 모든 계통에서 대비구인 자경종보다 높았으며, Rf는 9계통이 대비구인 자경종 0.44mg/g 보다 높은 함량을 보였다.
- 3) Re도 분석계통 모두가 대비구보다 높은 함량을 보였으며, SG84086 계통은 2배 이상의 높은 함량을 나타냈다.
- 4) Rd의 경우는 19계통이 대비구보다 높은 함량을 보였고, Rc도 84709외 8계통의 함량이 대비구에 비해 높은 함량을 보였으며, Rb₂의 경우는 13계통이 대비구보다 높았다
- 5) Rb₁은 Rg₁과 더불어 대부분의 분석계통에서 비교적 함량이 많은 ginsenoside로, 특히 84008은 4.80mg/g으로 상당히 높은 함량을 보였으며, 그외 80186, 7234-1-1, 7215-2-1, SG84086계통은 3.00mg/g 이상을 보였다.

2. 내적변성 및 ginsenoside고함유 인삼의 DNA 분석

가. Amplified Polymorphic DNA 기술을 이용한 인삼(*Fanax ginseng* C. A. Meyer)의 DNA 분석

- 1) 인삼의 종 및 변종간의 유전적 다양성을 식물의 분류학적 연구에 이용하여 품종육성을 위한 기초자료로 활용하고자 인삼 조직의 DNA를 사용하여 RAPD primer를 선정하고 RAPD양상을 조사하고자 수행되었다.

- 2) 인삼의 RAPD를 수행함에 있어서 DNA분리에 이용되는 조직의 차이가 PCR이후 DNA band 양상에 어떠한 영향을 미치는 지를 조사하고자 포장에서 정상적으로 생육하고 있는 자경종에서 조직별로 시료를 채취한후 primer를 사용하여 PCR을 수행하여 나타난 band의 양상은 모든 조직에서 동일한 band를 형성하였다.
- 3) 50개의 서로다른 10-mer random primer를 이용하여 band가 확실히 나타나는 18개의 primer를 선발하여 자경종, 풍기황숙, 중국삼, 미국삼의 DNA를 사용하여 PCR 증폭을 하였다.
- 4) 그러한 PCR product를 1.2%의 Agarose gel에 전기영동하여 banding pattern에 따라 분석하였다. 이러한 RAPD 결과를 Cluster analysis 방법을 사용하여 similarity index(SI)로서 원연관계를 조사한 결과 자경종과 풍기황숙이 근연관계를 가졌고 중국삼은 자경종과 약간의 차이를 가졌으며 또한 자경종, 풍기황숙, 중국삼은 미국삼과 차이를 나타냈다.

나. 분자마커에 의한 인삼 적변관련 유전자의 분석

- 1) 고려 인삼종 폐포와 4등급 이하를 유발시키는 원인중 90% 이상이 적변삼이라고 불리는 인삼의 표피 색택이 붉은 삼이 그 원인이다. 이러한 적변삼은 미국삼보다는 고려인삼에서 다량 발견되는 바, 적변은 유전적 요인이 있다고 보여진다.
- 2) 그러므로 이 연구의 목적은 RT-PCR을 이용하여 인삼적변에 내성을 가지는 유전자를 탐색하기 위하여 실시되었다. 고려인삼 3년근 1개체종에서 적변이 발생된 부위와 건전부위의 RNA를 추출하여 형성된 cDNA를 여러개의 random primer를 사용하여 PCR 증폭을 한 결과 정상부위의 cDNA에서 발견되지 않는 band가 적변삼의 부위에서 발견되었다.
- 3) 따라서 band가 형성된 부위의 유전자가 적변과 관련된 가능성이 있는 것으로 사료되고 이러한 유전자는 향후 염기서열을 분석하여 어떠한 유전자인지 판명을 하여야 하며 적변관련 유전자이면 선발마커로서 사용되고 또한 형질전환을 통한 적변내성 인삼계통을 육성할 수 있을것이다.

다. Ginsenoside 고함유 인삼계통의 RAPD 양상

- 1) 인삼의 약리효능상 중요시하는 성분은 ginsenoside로서 한국인삼연초연구원에서는 인삼을 선발하여 순계 분리하는 방법으로 인삼계통을 육성하여 현재 200여 계통을 확보하고 있으며, 이 계통 중에는 ginsenoside 고함유 계통이 있을 것으로 추정된다.
- 2) 최근에는 *In vitro*에서 세포주 육성 및 모상근과 같은 기내증식에 의하여 육종연구를 수행하는 방법도 개발되고 있다. 따라서 본 실험은 선발된 ginsenoside 고함유 계통 인삼과 정상삼 간의 RAPD 분석에 의하여 ginsenoside에 관련된 유전자를 검색하고 이를 마커로 이용하여서 ginsenoside 고함유 계통을 선발하고 보급할 목적으로 행하였다.
- 3) 인삼근과 모상근으로부터 DNA가 추출되고 UBC primer를 사용하여 인삼의 사포닌이 보통 함유계통(KG101) 및 고함유계통(KG103)의 차이를 분석한 결과 36종의 primer-종에서 band를 나타낸 것은 28종이었으며 또한 많은 종에서 KG101과 KG103의 band 차이를 나타내었다.

3. 인삼의 기내증식기술 개발

가. 인삼조직으로부터 체세포유래 단일배의 유기

- 1) 인삼 접합자배의 자엽을 식물호르몬이 전혀 첨가되지 않은 MS기본배지에 배양한 결과 자엽의 기부에서 높은 빈도의 체세포배가 유기되었다.
- 2) 체세포배의 형성빈도는 접합자배 자엽의 성숙도에 따라서 차이가 있었는데 미숙배에서 성숙배로 진행됨에 따라 감소되는 경향을 보였다.
- 3) 미숙자엽의 경우에는 표피세포의 윗 아래층들이 모두 성숙자엽의 세포보다 더 적거나 더 촘촘하였으며, 많은 세포들이 체세포배의 형성에 관여하였으나 뿌리의 형성이 어려운 다배상태로 유기되었다.
- 4) 발아직적의 성숙자엽은 표피세포의 윗층만이 촘촘한 세포로 이루어 졌으며 뿌리의 형성이 가능한 체세포 단일배로 유기되었다. 이런 결과는 체세포배의 기원과 발육이 배발생시 사용한 자엽의 성숙도에 따라서 배발생에 관여한 세포

들이 단일 혹은 다량상태인지에 따라서 결정된다는 것을 의미한다.

나. 체세포단일배 발생의 조직학적특성 및 TIBA의 영향

- 1) 인삼자엽절편을 이용할 경우 68%의 체세포배를 식물호르몬 무첨가배지에서 생산할 수 있는데 이때 형성되는 체세포배는 대부분 극성을 가지고 기부부 위에서만 형성되었다.
- 2) Auxin polar-transport inhibitor인 2,3,5-triiodobenzoic acid(TIBA)를 20 μ M 첨가 할 경우에는 체세포배의 형성이 완전히 억제되었다.
- 3) 5-10 μ M TIBA를 함유한 배지에서는 체세포배는 자엽의 표면에 형성되었으며 정상적인 체세포배로 성장하였으나 간혹 jar 형태의 체세포배도 관찰할 수 있었다. 이런 결과는 체세포배의 형성에 자엽에 원래 함유되어 있는 endogenous auxin이 매우 중요한 역할을 하고 있음을 의미한다.

다. 체세포배의 발생에 미치는 각종 염류의 효과

- 1) 성숙된 인삼 접합자배는 식물호르몬 무첨가 MS배지에서 발아가 된다. 그러나 접합자배를 NH_4NO_3 , KNO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 등을 첨가하여 stress를 주면 생장이 억제되거나 갈색으로 노화되어 고사된다.
- 2) 체세포배와 embryogenic calli는 이런 stress상태에서 직접 배가 형성되기도 하는데 NH_4NO_3 , 61.8mM에서 56.3%로 가장 체세포배의 형성이 양호하였다. 그리고 $\text{NH}_4\text{NO}_3 > \text{KNO}_3 > \text{KH}_2\text{PO}_4 > \text{MgSO}_4 > \text{CaCl}_2$ 순으로 체세포배가 형성되었다. 이런 체세포배는 정상적으로 지상부 및 뿌리가 형성되었으며 일부 유식물체를 토양중에 순화 시킬수 있었다.

라. 체세포단일배의 발아 및 유식물체의 생성

- 1) 발아 직전에 있는 한국인삼의 접합자 배에서 유래된 자엽절편을 이용하여 체세포배를 유도하고 기내휴면여부를 조사하고자 식물호르몬으로써 2,4-D, BAP, kinetin을 첨가하거나 혹은 전혀 식물호르몬이 첨가하지 않은 MS배지에 절편을 배양할 경우 많은 체세포배 혹은 단일배를 획득할 수 있었다.
- 2) 이런 배들은 대부분 자엽형 배(cotyledonary stage) 까지 발육이 가능하지만

발아가 되지 못하여 더 이상 shoot로 생육되지 못하였고 하얀상태의 자엽형 배로 계속 유지되었다. 그러나 gibberellic acid(1.0 mg/l 이상, GA₃)을 처리할 경우 3주 이내에 자엽형 배가 녹색으로 변하면서 발아되었으며, 저온처리 (-2 °C에서 8주간)를 할 경우에도 체세포배가 정상적으로 발아가 되었다.

- 3) 체세포배를 GA₃ 및 저온 처리한 후 세포의 구조적변화를 전자현미경으로 관찰한 결과 무처리 체세포배의 자엽내 세포는 발아되지 않은 인삼접합자배의 세포와 같이 지질과립 및 세포질이 농후하며, 분화되지 않은 미토콘드리아 및 엽록체를 지녀서 세포의 활성이 약한 휴면 상태의 구조를 가지고 있었다. 그러나 저온처리 및 GA₃ 를 처리한 자엽세포는 지질 및 세포질의 분포가 감소된 반면, 잘 발달된 엽록체와 활성이 강한 미토콘드리아의 구조를 보였다. 따라서 저온 및 GA₃ 처리 후 세포의 대사활동이 활발한 것으로 보아 휴면이 타파된 것으로 판단되었다.
- 4) 인삼 미숙배를 식물호르몬 무첨가 MS배지에 첨가할 경우에는 체세포배가 직접형성되지만 이때 대부분 형성된 배는 다배 및 융합된 상태로 형성된다.
- 5) 인삼 자엽에 1.0 M sucrose을 24 - 72시간 처리할 경우 모든 체세포배는 형태적으로 단일배 상태로 형성되었으며 주로 자엽의 표면에 형성되었으며 일반 처리에 비해 약 4배정도 많은 체세포배를 형성하였다.
- 6) 형태학적으로 원형질 전처리된 체세포 인삼 단일배는 단일 세포로부터 유래되었으나 처리되는 않은 자엽의 경우에는 여러개의 세포로부터 형성되었다.
- 7) 성숙된 자엽상태의 체세포배는 어느 상태에는 생장이 멈추고 하얗게 되는데 이런 현상은 휴면으로 생각되면 GA₃를 첨가하거나 저온처리를 할 경우 모두 발아되었다.

4. 결과 활용 건의

- 가. 본 연구에서 선발한 내적변성계통과 ginsenoside고함유 계통들은 금후 계속해서 인삼품종개발 연구에 공시되어 신품종으로 개발되어야 할 것으로 생각된다.
- 나. 인삼조직배양에 의한 기내증식기술은 인삼육종기간단축연구에 활용되어야 할 것으로 생각된다.

SUMMARY

I. Title

Development of Superior Ginseng Lines with Red Skin Tolerance and High Level of Ginsenoside

II. Purpose and importance of the study

Korean ginseng (*Fanax ginseng* C. A. Meyer) has traditionally been considered a medicinal plant of mysterious powers and has more than 5,000 years of history among Oriental people. In the last decades, the products and consumption of ginseng have increased both in and out of the country. Therefore, we have to increased the production per unit area by the development of new varieties which have good quality, high yield, and resistance to diseases. However, it is the fact that a single local variety, Jakyung-jong, has only cultivated across the country without the development of new varieties because breeding of this plant is needed too long time. Fortunately, ginseng superior lines can be developed because prominent variations exist in growth habit, vigor of growth, and the characters of aerial parts and roots. There are serious problems between supply and consumption of ginseng, if we do not plan to increase the production of good quality ginseng, because good cultivation area for production of good quality ginseng, because good cultivation area for production is decreased while the amount of ginseng consumption is increased. High quality ginseng is concerned by not only ginseng farmer but also consumer. To develop new ginseng varieties which satisfy consumer will contribute to praise the name of Korean ginseng in the

international ginseng market. In 1996, transplanting area of ginseng was 800ha in 1996, though it's area is different according to year. But the area of harvest was 422ha, 53% of total transplanting area. Ginseng grower have met with a loss of 9,500,000,000 won on the basis of red skin-ginseng field area per year, because of rusty-root producuion. The total amount of loss would be met with above 60,000,000,000 won, when it would be included total harvested area per year. Therefore, it is very important to solve red skin root problem in Korean ginseng industry. In general, red skin root is produced under such field conditions as high soil water content, bad water drainage in soil, immature manure, bad physical soil condition and not enough manage of pre-transplanting soil. And it is also difficult to decrease red skin root production by the improvement of cultivation method such as improving chemical and/or physical factors of soil in short term. Therefore, it is required to develop new ginseng varieties with red skin resistance.

In addition, it is possible to screen red skin- and ginsenoside-related genes by observing genes, expressing in superior lines with red skin tolerance and/or high level of ginsenosides, which in turn can be used for transformation. And tissue culture procedures could provide an alternative method to propagate genotypically superior lines of ginseng rapidly and could reduce the inherent variability associated with plants derived from seed. Furthermore, the ability to regenerate plantlets *in vitro* could provide opportunities for genetic transformation and development of transgenic plants expressing novel traits. Therefore, it is required to screen red skin-and ginsenoside-related genes and to develop methods of regeneration of plantlets of Korean ginseng through somatic embryogenesis.

III. Contents and Scope of Research

Contents and scope of this study are as follows:

1. Selection of ginseng lines with red skin tolerance and high level of ginsenosides
 - 1) Selection of ginseng lines with red skin tolerance
 - (1) Selection of ginseng lines
 - (2) Reselection of ginseng lines
 - (3) Test of genetic and environmental factors for red skin tolerance
 - 2) Chemical component of red skin-root and early selection method for red skin tolerance
 - 3) Investigation of sterility in F_1 hybrid plant
 - 4) Ginsenoside content of ginseng lines
2. Analysis of DNA in Ginseng Lines with Red Skin Tolerance and High Level of Ginsenosides
 - 1) DNA analysis of the Ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) using the Randomly Amplified Polymorphic DNA Technique
 - 2) Gene Analysis Related to Red-skin Disease of Ginseng by Molecular Marker
 - 3) RAPD Pattern of Ginseng Lines Containing High Ginsenoside
3. *In vitro* Propagation of Ginseng
 - 1) Induction of somatic single embryous from ginseng tissue

- 2) Histological characteristics and effects of TIBA in somatic single embryos
- 3) Effect of inorganic salts on the formation of somatic embryos
- 4) Germination of somatic single embryos and development of plantlet

IV. Results and Recommendation

1. Selection of ginseng lines with red skin tolerance and high level of ginsenosides

1) Selection of ginseng lines with red skin tolerance

(1) Selection of ginseng lines

- 18 ginseng lines(81878, 83795, Kimpohwangasuk, 7337-4-1, 78149, 78304, 7318-2-1, 80205, 78142, 86018, KG101, 78222, 80117, KG105, Poonggi-hwangasuk, 78167, 78206, KG103) with red skin tolerance were selected among 61 lines in 1996.
- Sanyangsam and Da416 ginseng lines with red skin tolerance were selected among 10 lines in 1998.
- 8 ginseng lines(84702, 85735, 84776, KG108, 84771, 79201, KG111, 78222) with red skin tolerance were selected among 46 lines in 1999.
- 5 ginseng lines(83743, 82099, 82114, 82016, 79027) with red skin tolerance were selected among 20 lines in 2000.

(2) Reselection of ginseng lines with red skin tolerance

- 4 ginseng lines(78206, 78149, KG102, KG103) with red skin tolerance

were selected among 16 lines in Daejon field on 2000 year.

- 4 ginseng lines(KG102, 7337-4-1, 78206, KG101) with red skin tolerance were selected among 15 lines in Youngju farm's field in 2000 year.

(3) Test of genetic and environmental factors for with red skin tolerance

- Red skin root was induced by environmental factors, while red skin root was also induced by genetical factors, because the degree of red skin root of 3 lines (80205, 82068, 83795) was lower than that of Jakyungjong in red skin normal soil and inducing soil.

2) Chemical component of red skin root and early selection method for red skin tolerance

- (1) The amounts of phenolic compound, Fe, and Al in epidermis were higher in red skin-susceptible lines than those in tolerant lines.
- (2) In red skin roots, amounts of phenolic compound, Fe and Al in epidermis were higher in susceptible lines than those in tolerant lines and healthy root.
- (3) From these experiments, it is suggested that phenolic compound, Fe, and Al can be used as the chemical markers for the selection of red skin-tolerant lines.

3) Investigation of sterility in F₁ hybrid plants

- (1) Two unique proteins(31.0-40kDa, 5.5-5.9 pl) were detected in the style

tissues of parents and F_1 hybrid by two dimensional gel electrophoresis. These proteins were expressed in the pistil of parents but not expressed in the pistil of F_1 hybrid. Another proteins(54,0-60,0 KDa, 5,5-5,9 pI) were not expressed in the pistil of parents but expressed in the pistil of F_1 hybrid, and the other proteins (66,2-97,4KDa, different pI) were not expressed in the pistil of parents, but expressed in the pistil of F_1 hybrid. From these results, it was suggested that these proteins might play an important role in F_1 hybrid sterility.

4). Ginsenoside contents of ginseng lines

- (1) 13 lines among analyzed 22 ginseng lines have high contents of ginsenoside than 8,68 mg/g in Jakyung.
- (2) Rg1 in analyzed all lines and Rf in 9 lines were showed high contents than Jakyung.
- (3) Re in analyzed all lines also was showed a high content than in control. Especially SG84086 line have twofold Re than in control
- (4) Rd in 19 lines, RC in 9 lines and Rb2 in 13 lines were showed high contents than in control
- (5) Rb1 and Rg1 were abundantly accumulated in most analyzed lines. Especially, 84008 line contained a very high amount with 4,80mg/g and 4 lines (80186, 7234-1-1, 7215-2-1 and SG84085) accumulated Rb1 and Rg1 above 3,00mg/g.

2. Analysis of DNA in ginseng lines with red Skin tolerance and high level of ginsenosides

1) DNA analysis of the ginseng(*Panax ginseng* C.A. Meyer) using the randomly amplified polymorphic DNA technique

- (1) This study was carried out to analyse polymorphism among different ginseng cultivars, and to use it for the basic information on rearing ginseng cultivar.
- (2) In performing RAPD of ginseng, DNA was extracted from the different tissues of 'Jakyung' growing normally in the field. PCR was performed to check if there is difference among different tissues, resulting in the same banding pattern.
- (3) Eighteen of 50 different 10-mer UBC primers showing clear bands were selected, and PCR amplification was performed using DNA extracted from ginseng cultivars, Jakyung, Punggi Hwangsook, China, and America.
- (4) The PCR product amplified was analysed according to banding pattern after electrophoresis in 1.2% agarose gel. Genetic difference based on RAPD result was investigated by similarity index (SI) of Cluster analysis. As a result, Jakyung and Punggi Hwangsook had close relationship, whereas Chinese ginseng had a little difference from Jakyung. Jakyung, Punggi Hwangsook, and Chinese ginseng showed genetic difference from American ginseng.

2) Gene analysis related to red-skin disease of ginseng by molecular marker

- (1) *Panax ginseng* discarded and lower than 4th grade is caused by red skin

disease showing red color skin in ginseng. This kind of red skin ginseng is found a lot in *Panax ginseng* rather than *Panax quinquefolium*, and it is considered that red skin disease might be caused by gene.

- (2) Therefore, this study was carried out to detect genes resistant to red skin disease using RT-PCR. RNA was extracted from three years old ginseng root of both red skin and normal portion in the same root. After RNA extraction, PCR amplification was performed from cDNA using many random primers.
- (3) As a result, specific band for red skin was found. It is considered that the gene forming band has possibility to be related with red skin disease, and this gene should be decided if it's related with red skin disease. If that gene is related with red skin disease, it will be used for transformation to foster for resistance to red skin disease as well as for selection marker. However, if it's not related with red skin disease, more primers should be used to find gene related with red skin disease.

3) RAPD pattern of ginseng lines containing high ginsenoside

- (1) The important component for medical effect is ginsenoside. Korea Ginseng & Tobacco Research Institute contains approximately 200 lines by inbred selection, and it is assumed that ginseng lines containing high ginsenoside content should be included.
- (2) This study was carried out to detect genes related to ginsenoside, and

use it for selection marker, thereby, select and distribute lines containing high ginsenoside content, DNA was extracted from both ginseng root and hairy root, and the difference between high ginsenoside containing line (KG101) and normal ginsenoside containing line (KG103) was analysed,

- (3) As a result, 28 out of 36 primers showed bands, and many primers showed band difference between KG101 and KG103 lines. It is considered that the bands should be analysed to check if those are related to ginsenoside. In case of hairy root of ginseng, almost no difference was found between two lines.

3. *In vitro* propagation of ginseng

1) Induction of somatic single embryos from ginseng tissue

- (1) Excised cotyledon segments of ginseng zygotic embryos cultured on MS basal medium without growth regulators produced somatic embryos near the basal excised portion at a high frequency.
- (2) The frequency of somatic embryo formation on the segments declined along with advancing zygotic embryo maturity.
- (3) In immature cotyledons, all the cells of the epidermis and subepidermis were smaller and more densely cytoplasmic than those in mature cotyledons, and from which multiple cells participated in embryogenic division to form somatic embryos with multiple cotyledons and fasciated radicles (poly-embryos).
- (4) But in germinating cotyledons, only the epidermal cells were densely

cytoplasmic and singularly competent to develop into somatic embryos resulting in single-embryos with closed radicles. This result means that the origin and development of somatic embryos is determined according to whether the cells participating in embryonic division are in a single state or a massive state relative to cotyledon maturity.

2) Histological characteristics and effects of TIBA in somatic single embryos

- (1) Cotyledon explants of ginseng zygotic embryos produced somatic embryos at a high rate(68%) on medium without any growth regulators. Under this culture condition, apparent polar somatic embryogenesis occurred near the basal-excised portion of the cotyledons.
- (2) When the cotyledon explants were cultured on medium containing 2,3,5-triiodobenzoic acid(TIBA), an auxin polar-transport inhibitor, the frequency of somatic embryo formation markedly decreased and was completely inhibited on medium containing 20 μ M TIBA.
- (3) On medium containing 5-10 μ M TIBA, somatic embryos developed sporadically on the surface of the cotyledons and had a normal embryo axis but jar-shaped cotyledons. From these results, it was deduced that endogenous auxin in the cotyledon explants plays an important role in the induction of somatic embryos is also related to the polar transport to endogenous auxin.

3. Effect of inorganic salts on the formation of somatic embryos

- (1) Mature zygotic embryos of ginseng (*Fanax ginseng* C. A. Meyer) were germinated on a Murashige and Skoog medium lacking growth regulators. However, when the zygotic embryos were cultured on MS medium containing increased levels of macrosalts(NH_4NO_3 , KNO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 or CaCl_2) to result in a mild salt stress, growth of zygotic embryos was strongly suppressed and eventually browning occurred.
- (2) Somatic embryos or embryogenic calli were formed directly from these abnormal stressed zygotic embryos. Cotyledons were the most competent tissue for somatic embryo production. The highest frequency of somatic embryo formation(56.3%) was observed on medium containing 61.8mM of NH_4NO_3 . The highest frequency of somatic embryo formation by five different macrosalt treatments occurred in the following order: $\text{NH}_4\text{NO}_3 > \text{KNO}_3 > \text{KH}_2\text{PO}_4 > \text{MgSO}_4 > \text{CaCl}_2$. Somatic embryos were regenerated into plants with a shoot and root, and the plants survived on soil in the greenhouse.

4) Germination of somatic single embryos and development of plantlet

- (1) Somatic embryos were induced directly from cotyledon explants of Korean ginseng(*Fanax ginseng* C.A. Meyer) on Murashige and Skoog (MS) medium with 2,4-D, BAP, kinetin or lacking growth regulators. When somatic embryos formed on all media grew to cotyledonary stage, the further development of embryos was ceased and remained in white color.

- (2) By gibberellic acid(over 1.0 mg/l GA₃) treatment, all the somatic embryos turned rapidly to green and germinated within 3 weeks, Chilling treatment also induced the germination of somatic embryos, The effective temperature regime was -2°C for over 8 weeks but more higher temperature than 0°C did not effective for germination of somatic embryos.
- (3) Ultrastructural observation revealed that the cotyledon cells of somatic embryos without chilling and GA₃ treatment contained numerous lipid reserves, dense cytoplasm, proplastids and non-activated mitochondria with poorly differentiated internal structure, but the cotyledon cells of germinating somatic embryos after chilling or GA₃ treatment highly vacuolated and contained well-developed chloroplasts and active state of mitochondria enclosing numerous cristae. The above results indicate that *In vitro* developed somatic embryos of *Panax ginseng* may be dormant after mature similar to zygotic embryos.
- (4) Cotyledon explants of immature ginseng zygotic embryos cultured on Murashige and Skoog (MS) medium lacking growth regulators formed somatic embryos directly, and most of these embryos were developed into multiple state, fused each other and to the parent cotyledon explants.
- (5) When the cotyledon explants of ginseng were pretreated by 1.0 M sucrose for 24 to 72 hours, all the somatic embryos were developed into morphologically singular state from the all surfaces of cotyledons and the number of somatic embryo per explant greatly enhanced to 4 times.

- (6) Histological observation reveals that all the somatic single embryos from pre-plasmolysed cotyledons were originated from epidermal single cells, whereas all the multiple embryos from cotyledons without pretreatment were originated from epidermal and subepidermal cell masses.
- (7) When the somatic embryos matured to cotyledonary stage, further growth of these embryos was ceased and remained in white color, probably indicating dormant. GA₃ (over 1.0 mg/l) treatment or chilling treatment (-2°C for over 8 weeks) were prerequisite for the germination of somatic embryos.

CONTENTS

Chapter 1	Introduction	
Chapter 2	Development of Ginseng Lines with Red Skin Tolerance and High Level of Ginsenosides	
Section 1	Introduction	
Section 2	Materials and Methods	
Section 3	Results and Discussion	
	1. Selection of ginseng lines with red skin tolerance	
	2. Chemical component of red skin-root and early selection method for red skin tolerance	
	3. Sterility of F_1 hybrid plant	
	4. Level of ginsenosides of ginseng inbred lines	
Section 4	Summary	
	References	
Chapter 3	Analysis of DNA in Ginseng Lines with Red Skin Tolerance and High Level of Ginsenosides	
Section 1	Introduction	
Section 2	Materials and Methods	
Section 3	Results and Discussion	
	1. DNA analysis of the ginseng using the randomly amplified polymorphic DNA technique	
	2. Gene analysis related to Red-skin disease of ginseng by molecular marker	

3. RAPD pattern of ginseng lines containing high ginsenoside	
Section 4 Summary	
References	
Chapter 4 <i>In vitro</i> Propagation of Ginseng	
Section 1 Introduction	
Section 2 Materials and Methods	
Section 3 Results and Discussion	
1. Induction of somatic single embryos from ginseng tissue	
2. Histological characteristics and effects of TIBA in somatic single embryos	
3. Effects of inorganic salts on the formation of somatic embryos	
4. Germination of somatic single embryos and development of plantlet	
Section 4 Summary	
References	

목 차

제 1 장 서 론	
제 2 장 내적변성 및 Ginsenoside 고함유 인삼계통 선발	
제 1 절 서 설	
제 2 절 재료 및 방법	
제 3 절 결과 및 고찰	
1. 내적변성 인삼계통 선발	
2. 적변관련 성분 및 조기검정방법	
3. F1 잡종식물체의 불안	
4. 인삼계통의 ginsenosides 함량	
제 4 절 요 약	
참 고 문 헌	
제 3 장 내적변성 및 Ginsenoside 고함유 인삼의 DNA 분석	
제 1 절 서 설	
제 2 절 재료 및 방법	
제 3 절 결과 및 고찰	
1. Amplified polymorphic DNA 기술을 이용한 인삼의 DNA분석	
2. 분자마커에 의한 인삼적변관련 유전자의 분석	
3. Ginsenoside 고함유 인삼계통의 RAPD 양상	
제 4 절 요 약	
참 고 문 헌	
제 4 장 인삼의 기내증식기술개발	
제 1 절 서 설	
제 2 절 재료 및 방법	

제 3 절 결과 및 고찰	
1. 인삼조직으로부터 체세포배 유래 단일배 유지	
2. 체세포 단일배 발생의 조직학적 특성 및 TIBA의 영향	
3. 체세포배의 성숙 및 발달조건	
4. 체세포배의 발생에 미치는 각종 염류의 효과	
5. 체세포 단일배의 발아 및 유식물체의 생성	
제 4 절 요 약	
참 고 문 헌	

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적

고려인삼은 반음지성 다년생 약용작물로서 재배기술이 상당히 발전되어 왔으나 아직 까지 품종분화 없이 재래혼계종인 자경종이 재배되고 있는 실정이다. 또한 인삼은 재배기간이 4-6년이 소요되는 다년생 작물로 품종육성에 장기간이 소요되고 목적 부위가 뿌리이기 때문에 생육 초기의 지상부형질을 통하여 인삼뿌리의 상태를 판별하기 어렵고, 또 지하부 형질도 재배기간 중에 채굴 조사 한다는 것은 쉬운일이 아님으로 육종재료로서 까다로운 작물이다. 그러나 재배인삼인 자경종 인삼의 잎과 줄기 그리고 뿌리를 자세히 관찰하여 보면 개체간의 형질변이가 심한 것을 알 수 있으며 (최광태 등, 1982; 최광태a, 1983; 최광태b, 1983), 아직 품종의 분화가 이루어지지 않은 혼계상태의 집단이므로 유용한 유전자형을 선발하여 우수품종으로 육성할 수 있는 가능성은 충분하다. 최근에 인삼의 소비는 일정수준을 유지하고 있는 반면에 인삼재배적지 부족으로 생산량이 감소하는 경향을 보이고 있어, 품질이 우수한 고려인삼의 생산을 증대시키기 위한 획기적인 방안이 수립되지 않으면 우리나라 고려인삼의 수급계획에 큰 차질이 발생할 것으로 생각된다(최광태b, 1983). 고품질 인삼 생산과 품질 우수품종에 대한 관심은 경작자들 뿐만 아니라 수요자층에서도 요구도가 높아지고 있으며, 소비자 요구에 부응하는 인삼품종의 개발은 국제 인삼시장에서 고려인삼의 성가 제고에 크게 공헌할 것으로 생각된다. 인삼의 재배면적은 연도별로 차이가 있으나(한국담배인삼공사, 1995) '96년도의 전국 홍삼포 식부계획면적은 800헥타이다. 그러나 6년근 수확면적은 422헥타로서 이식면적 대비 수확면적은 53%이고, 6년근 수매 인삼중 적변삼 발생율이 60% 이상인 것으로 추정되며, 이것을 2000년도 수매실적을 기준으로, 적변삼 발생으로 인한 농민의 손실액은 약 95억원이며 이것을 백삼포까지 면적까지 적용하면 손실 총액은 대략 600억원이 상회할 것으로 추정된

다. 이와같이 적변삼 발생의 해결은 한국인삼 산업의 시급한 문제인 것이다.

인삼의 종 중에는 우리나라에서 재배하고 있는 *Fanax ginseng* C. A. Meyer와는 다른 종인 *Fanax quinquefolium* L. (일명 서양삼)은 우리나라 토양 조건에서 *Fanax ginseng* C. A. Meyer와 같은 포지에서 재배한 결과, *Fanax ginseng* C. A. Meyer는 적변삼율이 90% 이상인데 비하여 미국삼은 적변삼이 전혀 발생하지 않음을 발견하였다. (이명구, 1995) 식물의 종간교잡은 어려움이 있으나 땅콩에서 몇 가지 처리로서 교잡을 성공시켜 새로운 품종을 개발(안병욱 등, 1994; Halward et al., 1987; Johnson et al., 1956; 손용룡 등, 1969)하고 있으므로 인삼도 위의 두 종간에 교잡을 실시하여 적변이 없는 인삼을 육성할 수 있을 것이다. 그리고 인삼의 약리효능상 중요시하는 성분은 ginsenoside로서 지금까지 29종이 밝혀져 있다. (Osamu, 1997; Sanada et al., 1974). 당연구원에서는 20여년간 지역별 산지에서 인삼을 선발, 순계분리방법으로 인삼계통을 육성하여 현재 200여계통을 확보하고 있으며, 이들 계통중에는 ginsenoside고함유 계통이 있을 것으로 추정된다. 이 연구의 목적은 RT-PCR을 이용하여 인삼적변에 내성을 가지는 유전자를 탐색하기 위하여 실시되었다. 인삼은 다년생 음지성 작물로서 재배조건이 매우 까다롭고, 종자를 통하여 번식할 수 있으나 채종하는데 3-4년이 소요되어 타식물에 비하여 우수품종 육성에 장구한 세월이 필요하다. 인삼은 보통 4년생에서 1회 종자를 채취하는 것을 원칙으로 하고 있으며 종자 1회 채취시에도 40-50립 정도밖에 채취할 수 없어 기내 배양을 통한 단기간의 식물체 재생기술은 우수형질을 지닌 인삼식물체의 기내증식 또는 형질전환식물체의 대량생산에 있어서 큰 의미를 지닌다고 할 수 있다. 또한 우수품종을 육성하였다 하더라도 동일한 유전자형을 지닌 개체수 증식에도 상당한 시일이 요구되므로 이러한 불편하고 어려운 점을 해결하기 위하여 인삼의 조직배양기술이 개발 확립되어 단시일내에 homologous gene을 지닌 개체수를 대량으로 증식할 수 있는 기반이 구축되어야 할 것이다. 인삼의 뿌리 절편을 재료로 하여 Butenko등(1968)이 최초로 배발생을 보고한 이래 여러 연구자들이 인삼 조직배양을 통한 식물체의 재생

을 보고하였다(Butenko *et al.*, 1968; Chang and Hsing, 1978; Chang and Hsing, 1978; Chilton *et al.*, 1978). 그러나 인삼식물체의 기내증식은 매우 까다롭고, 특히 재생된 식물체가 전혀 뿌리를 발생시키지 못하던가, 부실한 뿌리의 발생이 이루어져 아직 토양에서 순화된 식물체를 보고한 예가 거의 없다. 그 동안의 인삼 재분화 연구는 주로 체세포배의 발생을 통하여 이루어져 왔으며(, Furuya and Kajii, 1983; Yoshikawa, and Furuya, 1987) 다른 분화방법에 대해서는 전혀 보고된 바가 없다. 본 연구는 인삼의 재분화 방법에 대한 전반적인 사항을 조사하여 효율적으로 재분화체가 토양에 까지 활착할 수 있는 조건을 구명하고자 수행하였다.

제 2 절 연구개발의 내용 및 범위

1. 내적변성 및 ginsenoside 고함유 인삼계통 선발

가. 내적변성 인삼계통 선발시험

- 1) 신규선발 시험
- 2) 신규선발에서 적변 내성인 계통의 재확인 시험
- 3) 적변의 유전성 및 환경성 검정시험

나. 적변관련 성분 및 조기검정 방법 검토

- 1) 적변관련 성분 분석
- 2) 적변을 조기에 검정할 수 있는 방법 검토

다. F₁ 잡종식물체의 불임원인 조사

나. 염류처리에 의한 인삼 접합자배의 체세포배 형성과 발아

염류로서 NH_4NO_3 , KNO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 를 처리하여 접합자배로부터 체세포배의 형성과 발아를 조사한 바, MS배지의 다량원소의 농도가 높을수록 비정상적인 발아율이 높은 경향이었으며 체세포배의 형성은 NH_4NO_3 61.8 mM에서 56.8%로 가장 높았으며, KNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 에서 체세포배의 형성율은 각각 29.4, 11.5, 9.7, 5.7% 이었다(Fig. 4-12).

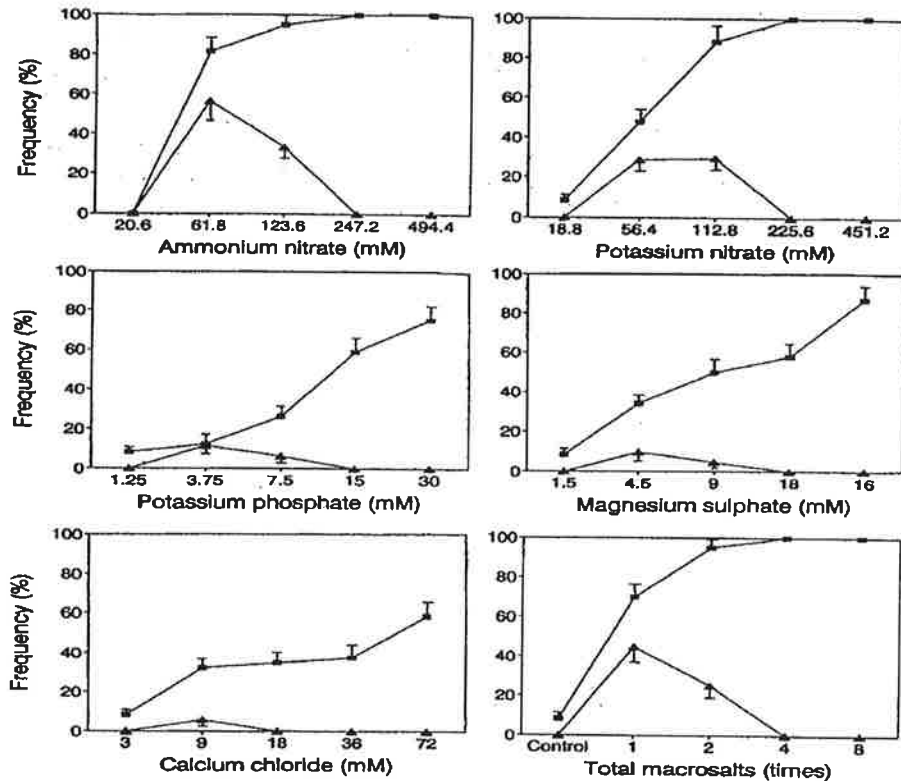


Fig4-12. Relationship between somatic embryo formation (▲) and abnormal germination (■) from zygotic embryos of *Panax ginseng* on MS basal medium with varied levels macro-salts. The levels of macro salts on medium were adjusted to 3, 6, 12, and 24 times the salt concentration in MS medium. In the combined macrosalt treatment, the levels of all five macrosalts were adjusted 2, 4, 6, and 8 times the salt concentration in MS medium. Vertical bars represent standard error of the mean.

라. 인삼계통의 ginsenoside 함량 분석

2. 내적변성 및 ginsenoside고함유 인삼의 DNA 분석

가. Amplified Polymorphic DNA 기술을 이용한 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)의 DNA 분석

1) 인삼의 RAPD분석

나. 분자마커에 의한 인삼 적변관련 유전자의 분석

- 1) RAPD분석을 위한 PCR 조건
- 2) RAPD를 위한 primer 선정 및 RT-PCR
- 3) 적변관련 cDNA 단편의 data 분석

다. Ginsenoside 고함유 인삼계통의 RAPD 양상

- 1) 인삼근 중에서 ginsenoside 고함유 계통의 RAPD 양상
- 2) 인삼모상근중에서 ginsenoside 고함유 세포주의 RAPD 양상

3. 인삼의 기내증식기술 개발

가. 인삼조직으로부터 체세포유래 단일배의 유기

나. 체세포단일배의 발생의 조직학적특성 및 TIBA의 영향

- 1) 단일배발생시 배양조직의 형태학적 변화
- 2) 단일배발생시 배양세포내의 내재호르몬 효과

다. 체세포배의 성숙 및 발달조건

라. 체세포배의 발생에 미치는 각종 염류의 효과

- 1) 염류처리에 의한 접합자배로부터 인삼체세포배의 발생 및 발육
- 2) 염류처리에 의한 인삼 접합자배의 체세포배 형성과 발아

마. 체세포단일배의 발아 및 유식물체의 생성

- 1) 체세포단일배의 발아에 미치는 GA₃의 영향
- 2) 체세포단일배의 발아에 미치는 저온처리 영향
- 3) 발아과정의 부과전자현미경적 관찰
- 4) 체세포 단일배의 휴면현상
- 5) 인삼 유식물체의 생장에 적합한 최적 배양환경

제 2 장 내적변성 및 Ginsenoside 고함유 인삼계통 선발

제 1 절 서 설

고려인삼은 반습지성 다년생 약용작물로서 재배기술이 상당히 발전되어 왔으나 아직 까지 품종분화 없이 재래혼계종인 자경종이 재배되고 있는 실정이다. 인삼식물은 예로부터 재배된 지역에 따라 고려인삼, 만주인삼, 개성인삼, 금산인삼, 풍기인삼 등과 같이 품종명 처럼 부르고 있지만 이러한 종자는 같은 장소와 조건에서 재배하면 형태적으로 거의 구별되지 않는다. 현재 일반농가에서 재배하고 있는 인삼은 품종이나 계통의 구분없이 옛날부터 재배하여 왔기 때문에 기후풍토에 잘 순화되어 있다. 그러나 재배 인삼의 잎과 줄기 그리고 뿌리를 자세히 관찰하여 보면 개체간의 형질변이가 심한 것을 알 수 있다(최광태 등, 1982; 최광태a, 1983; 최광태b, 1983). 인삼식물에 나타나는 형질의 차이는 그것이 갖는 유전 및 환경적인 차이에 의하여 일어나므로 집단내의 변이를 모두 유전적 이라고 할 수는 없다. 그중 환경적인 차이에 의하여 나타나는 환경변이는 우수 품종을 육성하는데 있어서 중요한 문제가 되는 것으로, 아무리 유전적으로 우수한 형질을 가졌어도 유전적인 형질을 발휘할 수 있는 적합한 재배조건을 결정해주지 않으면 소용이 없을 것이다. 특히 인삼은 다른 작물과 달리 해가림 구조하에서 재배하므로 재식위치, 수광량, 강우량, 온도, 바람의 강도, 토양의 비옥도, 수분함량, 통기성, 토양의 경도, 산도, 염류농도 등의 환경적 요인에 따라 형태적, 생태적, 생리적 형질의 변이가 심하다. 또한 인삼은 재배기간이 4-6년이 소요되는 다년생 작물로 품종육성에 장기간이 소요되고 목적 부위가 뿌리이기 때문에 생육 초기의 지상부형질을 통하여 인삼뿌리의 좋고 나쁨을 직접 판별하기 어렵고, 또 지하부 형질도 재배기간 중에 채굴 조사 한다는 것은 쉬운일이 아님으로 육종재료로서 까다로운 작물이다. 그러나 인삼은 아직 품종의 분화가 이루어

지지 않은 혼계상태의 집단이므로 유용한 유전자형을 선발하여 우수품종으로 육성할 수 있는 가능성은 충분하다.

최근에 인삼의 소비는 일정수준을 유지하고 있는 반면에 인삼재배적지는 감소하고 있어 생산량과 재배면적이 감소하는 경향을 보이고 있어, 품질이 우수한 고려인삼의 생산을 증대시키기 위한 획기적인 방안이 수립되지 않으면 우리나라 고려인삼의 수급계획에 큰 차질이 발생할 것으로 생각된다(최광태b, 1983). 고품질 인삼의 생산을 증대시키기 위해서는 재배적인 측면과 육종적인 측면의 두가지 면을 고려하여야 하는데, 재배적인 측면의 경우는 토양의 이화학성 개선, 합리적인 병충해 방제법 개발, 해가림 구조 및 자재개선, 부초재배법 개발 등으로 발전되어 왔으나 재배적인 방법으로는 한계점에 이르렀으며, 인삼육종의 경우도 꾸준히 연구되어 왔지만 파종에서 채종까지의 한 세대가 4년이 소요되므로 아직까지 인삼 경작자들에게 인삼품종 보급이 시도되고 있는 실정이다(최광태b, 1983; 최광태, 1988). 품질이 좋은 우수품종에 대한 관심은 경작자들 뿐만 아니라 생활수준의 향상과 함께 광범위한 수요자층에서도 높아지고 있으며, 나아가 국제 인삼시장에서 고려인삼의 명성을 높이는 것에 크게 공헌할 것으로 생각된다.

인삼의 재배면적은 연도별로 차이가 있으나(한국담배인삼공사, 1995) '96년도의 전국 홍삼포 식부계획면적은 홍삼포가 800헥타이다. 그러나 6년근 수확면적은 422헥타로서 이식면적 대비 수확면적은 53%이고 나머지 47%의 면적은 중도에 폐포가 되었다. 또한 6년근 수매인삼중 1, 2등삼이 14% 이고, 3등 및 등외삼이 86% 이었다. 3등이하 등급삼의 원인은 적변삼율이 60% 이상인 것으로 추정되며, 이것을 2000년도 수매실적을 기준하여, 적변에 의한 농민의 손실액을 6년근 2등삼 생산시를 가산하여 계산하면 6년근 3등 및 등외 의한 것이 약95억원, 폐포에 의한 것이 120억(폐포지 단위면적당 수량: 6년근 평균의 50%, 단가: 6년근 3등 수매단가 대비 4년근 등외품 수매단가를 적용했음), 계 215억원인 것으로 환산된다. 이 금액은 6년에 한한 것이므로 백삼의 경우도 적변발생이 6년근의 비율과 비슷할 것이므로 백삼포 면

적 2,000ha를 반영하면 손실 총액은 대략 600억원이 상회할 것이다. 이는 6년근 총 수매액 약 635억과 비슷할 것으로 추정된다.

이와같이 적변삼 발생의 해결은 한국인삼 산업의 시급한 문제인 것이다.

UR협정의 체결로 1995년 부터는 국내 인삼시장의 2%만큼은 개방해야 하고 2004년에는 3.3%까지 개방해야 한다. 세계 주요 인삼 수출국의 평균 인삼수출 가격 지수를 100으로 하였을 때 수출국별로 1982년, 1992년의 가격지수를 비교하면, 한국은 192.2%, 277.8%이고 중국은 54.4%, 23.5%, 캐나다, 미국, 일본이 1992년도에 141.6%, 206.6%, 246.6%로서 1992년도의 한국인삼(고려인삼) 값보다는 짝 편이고 북한산은 557.5%로 제일 비싸다. 고려삼이 타국삼보다 가격이 높은 것은 세계시장에서 품질을 인정받고 있다는 사실이지만 중국의 백삼의 경우 한국삼에 비하여 값이 훨씬 싸므로 밀수입이 근년에 많아진 이유가 되며 앞으로 정식 수입이 허가되므로 타국의 저가삼은 가격경쟁에서 고려삼보다 우위에 있으므로 수입 쉼터량에 접근 할 수밖에 없을 것이다. 이러한 세계 인삼시장 환경에서 고려삼 가격이 타국삼에 비하여 높으면서도 세계 수출시장의 점유율을 지속적으로 유지, 향상시키기 위하여는 고려삼이 가격경쟁력에서 열세를 우수품질로 타개해 나가야 하므로 타국삼과 차별화 할 수 있는 생리활성물질인 ginsenoside의 종류와 함량이 높은 인삼품종 개발이 시급한 실정이다.

인삼포장에서 적변삼이 발생하는 원인은 식물병원균의 감염에 의해서 발생하는 것은 아닌 것으로 보이며(오승환 등, 1978) 토양이 과습하거나(목성균 등, 1996) 배수가 불량한 곳(목성균 등 1995) 미부숙 유기질거름을 사용 하였을 때(김명수 등, 1985) 토양의 물리성이 나쁠 때(목성균 등, 1996) 예정지 관리미비(목성균 등, 1996) 등의 포장조건에서 많이 발생하는 것으로 알려지고 있다. 이와같이 인삼 재배 토양환경의 악화 즉 토양 물리성 및 화학성이 악화되거나, 토양내 유해가스 발생 등으로 인삼의 뿌리호흡이 저해 될 때(목성균 등, 1996) 식물체가 자기방어적인 작용으로 근표피에 적변물질을 축적하여 적변삼이 발생하는 것으로 추정되고 있다.

적변삼 관련 물질에 관해서는 정영문 등(1985)은 인삼근 적변표피 에 phenolic compound 함량과 Fe함량이 높다고 하였고, 이태수 등(1995)은 뿌리의 중심부, 피층 및 지세근에 Fe와 Na가 높다고 주장 하였고, 이태수(1990)는 적변표피 중에 phenol 성 물질 함량이 높다고 하였다. 적변삼 발생감소를 위해 인삼재배 및 토양환경 개선을 추진중이나 우리나라 현재 인삼재배 여건상 농가 노동력의 고령화 및 구득에 어려움이 증가되고, 토양의 물리 화학성 개량을 위해 필요한 청초의 구입이 어려워, 단기간내 토양환경을 개선하여 적변삼 발생을 감소시키기에는 어려운 실정이다. 따라서 다소 열악한 재배 및 토양환경 조건에서도 적변삼 발생을 낮출 수 있는 인삼품종을 개발하여 적변삼발생을 감소시킬 필요성이 증대 되었다.

1995 현재 한국인삼연초연구원에서 인삼육종사업을 수행하고 있는데 보유중인 고려인삼 약200여계통 중에는 적변에 강한 것으로 보이는 계통들이 확인되고 있어 이들 계통의 적변내성 여부검정의 방법을 확립하여 적변내성 인삼육성의 필요성이 있다.

고려인삼과 미국삼(*Fanax quinquefolium* L.)을 같은 토양에서 재배하면 고려인삼은 적변삼이 90% 이상인데 비하여 미국삼은 적변삼의 거의 발생하지 않음을 발견하였는 바 적변은 유전적인 요인이 크다고 생각되어진다(이명구 등, 1995).

그래서 고려인삼(*Fanax ginseng* C. A. Meyer)과 미국삼(*Fanax quinquefolium* L.)을 중간교잡하여 F₁잡종 식물체를 육성중에 있다. 그러나 F₁ 식물체에서는 불임이 되어 종자가 결실되지 않는 문제점이 발견되었다. 미국삼의 적변내성 인자를 도입하기 위해서는 F₁ 잡종식물체의 불임타파 연구가 필요하다.

또 한 적변삼의 발생원인을 환경과 유전의 양측면에서 검토하여 환경성과 유전성을 검토할 필요가 있다.

인삼의 육종기간은 장기간이 소요되므로 조기에 적변관련 지표성분을 찾아서 보유계통의 적변내성여부를 조기에 관정에 활용할 수 있는 방법의 개발이 시급하다.

인삼의 약리효능상 중요시하는 성분은 인삼 사포닌, 즉 ginsenoside로써 지금까지 29종이 밝혀져 있다(Osamu, 1977; Sanada et al, 1974; Sanada, 1974). 당 연 구원에서는 20여 년간 지역별 산지에서 인삼을 선발, 순계분리 방법으로 인삼계통을 육성하여 현재 200여 계통을 확보하고 있으며, 이들 계통중에는 ginsenoside 고함유

계통이 있을 것으로 추정된다. 이에 대한 검정의 필요성이 높다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 내적변성 인삼계통 선발시험

가. 신규선발 시험

적변내성 인삼계통을 포장에서 선발하기 위하여 인삼계통을 1994년, 1996년, 1997년 및 1998년 4월에 본포에 이식하였으며, 채굴은 4년생 때인 1996년 8월30일에 61계통, 1998년 3월24일에 10계통, 1999년 9월20일에 46계통, 2000년 10월7일에 20계통을 채굴조사하였다. 적변유발을 위한 시험구 처리방법은 시험구 토양에 매년생때 모두 4-8월에 월 1회 10ℓ/칸 관수하여 적변을 유발시켰고, 공시 계통별로 3반복으로 이식하고 반복구당 면적은 1칸(1평)으로 하였다. 적변지수를 등급(표피의 적변면적이 0=건전, 1=1-10%, 2=11-25%, 3=26% 이상)으로 구분하여 개체별로 조사하여 산술평균 하였다.

나. 재확인 시험

포장의 적변 신규선발시험에서 1차로 선발된 적변내성 인삼계통을 1998년 4월에 대전시험포 와 풍기산지 시험포에 이식하였으며, 채굴은 4년생 때인 2000년 9월 27일(대전시험포, 16계통)과 2000년 9월29일(풍기산지, 15계통)에 채굴 조사하였다. 적변유발을 위한 시험구 처리방법은 대전시험구는 토양에 매년생 때 모두 4-8월사에 월 1회 10ℓ/칸 관수하여 적변을 유발시켰고, 산지포지는 토양이 과습한 포장을 시험구로 선정하여 적변을 유발 시켰다. 공시 계통별로 3반복으로 이식하고 반복구당 면적은 1칸(1평)으로 하였다. 적변지수 조사는 신규선발시험과 동일하였다.

다. 유전 및 환경성 검정 시험

인삼표피에서 발생하는 적변현상이 유전적인 환경적인 판정하기 위하여 유전

성 판정을 위해서는 인삼 8계통을 선택하여 계통간 차이를 보고, 환경적 판정을 위해서는 토양에 적변유발을 위해 과습 및 표준처리를 하였다. 과습처리는 시험구 토양에 매년생 때 4-8월사이에 월 1회 10ℓ/칸 관수하였고, 표준처리구는 정상상태로 재배 하였다. 시험구 이식은 1998년 4월에 대전시험포에 이식하였으며, 채굴은 4년생 때인 2000년 9월27일에 채굴 조사하였다. 공시 계통별로 3반복으로 이식하고 반복구당 면적은 1칸(1평)으로 하였다. 적변지수 조사는 신규선발시험과 동일하였다.

2. 적변관련 성분 및 조기검정 방법 검토

가. 적변관련 성분 분석

1) 4년생 적변계통 내용 성분 분석

적변에 강한 계통을 조기검정하는 방법을 모색하기 위하여, 적변유발 물질을 구명하여 적변선발의 지표성분으로 활용가능성을 검토하기 위하여 적변관련 성분분석을 시도하기 위하여, 시험재료로 내적변성 인삼계통 선발시험의 신규선발 시험에서 1994년 4월에 본포에 이식하고, 4년생 때인 1996년 8월30일에 채굴 조사한 61계통중 적변지수가 낮은 10계통은 적변내성계통으로, 적변지수가 높은 10계통은 적변감수성 계통으로 구분하여 적변원인물질 분석 시료로 사용하였다.

적변지수는 신규선발시험과 동일 하였고, phenolic compound 함량은 Nakabayashi 방법(1968)으로, 무기성분은 건식법으로 전기로에서 회화시킨후 원심 분리하여 membrane filter로 여과후 ICP(Inductively Coupled Plasma, ICPS-1000III, Shimadzu Co, Japan)로 측정하였다(AGAC, 1984).

2) 6년생 적변계통 내용 성분 분석

적변원인 물질분석을 계통간에 세부적으로 비교하기 위하여, 시험재료로 1994년 4월에 본포에 이식하고, 6년생 때인 1998년 9월24일에 채굴 조사한 39계통중 적변지수가 낮은 7계통은 적변내성계통으로, 적변지수가 높은 7계통은 적변감수성 계통으

로 구분하여 적변원인물질 분석 시료로 사용하였다. 시험구는 정상적인 포장관리를 하였으며 시험구당 3반복 처리 하였으며, 적변지수, phenolic compound 함량 및 무기성분 함량 분석은 '4 년생 적변계통 내용 성분 분석'과 동일한 방법으로 하였다.

나. 적변계통 조기검정 방법

1) 6년생 시료

적변관련 성분을 내적변 조기검정 지표성분으로 활용 가능성을 검토하기 위하여 시험재료로 '6년생 적변계통 내용 성분 분석 시험'의 1998년 8월24일 제공한 6년생 자경종 동일뿌리내의 건전 및 적변 부위를 선정하였고, phenolic compound 함량 및 무기성분 함량 분석은 '4 년생 적변계통 내용 성분 분석'과 동일한 방법으로 하였다.

2) 묘삼 시료

내적변 조기검정 지표성분을 묘삼상태에서 조기검정 가능성을 검토하기 위하여 시험재료로 1998년 4월20일 제공한 묘삼종 적변내성 10계통과 적변감수성 10계통을 각각 구분하여 각계통군에서 건전한 묘삼을 선별하여 뇌두를 제서한후 사용 하였다. Phenolic compound 함량 및 무기성분 함량 분석은 '4 년생 적변계통 내용 성분 분석'과 동일한 방법으로 하였다.

3. F₁ 잡종식물체의 불임원인 조사

적변인삼의 발생율이 낮은 미국삼을 고려인삼과 교배하여 얻은 F₁ 잡종식물체의 불임원인을 구명하기위하여 시험재료로 F₁ 잡종식물체(*Fanax ginseng* x *Fanax quinquefolium*), 자경종, 미국삼을 사용 하였다. 화분의 이상유무를 검토하기 위하여 화분활력 검정은 0.5M의 sucrose 용액에 1 μ M fluorescein diacetate를 녹여 화분을 염색한후 390nm 형광현미경하에서 검정하는 방법(Heslop-Harrison, 1970)으로

하였다.

Kho & Baer(1968)의 방법을 변형하여 화분관 발아, 뇌수분 및 주두절제 조사를 실시하였는바, 수분후 암술을 $K_2Cr_2O_7$ 포화용액에 담긴 용기내 유리판위에 올려 놓은 다음 실온에 방치하여 시간대별로 암술을 60°C 의 1N NaOH 용액에 1시간 처리후 0.1%(w/v) aniline blue가 첨가된 0.1N K_3PO_4 용액에 암술을 24시간 침지한후 형광 현미경(350-400nm)으로 검경하였다. 화분관 직경만큼 화분관이 신장한 것을 발아한 화분으로 판정하였다. Chung(1997)의 방법에 준하여 화주로부터 protein을 추출하였다. 화주조직 30개씩을 액체질소를 이용하여 마쇄한 후 단백질 추출용액 30 μ l를 가하는 방법을 사용하였다. SDS-PAGE 전기영동은 Gallagher & Smith(1995)와 Dunn(1993)의 방법에 준하였는데 12%의 acrylamide gel을 사용하였고 25mA로 2시간 running 한후 은염색법(Bio-rad, Richmond, CA, USA)으로 염색하였다. 2차원 전기영동에 의한 분석은 Mau등의 방법(1986)으로 하였다.

4. 인삼계통의 Ginsenoside 함량

가. 조사계통 : 1 차분석 26계통 (6년생), 2 차분석 23계통 (6년생)

나. 시료처리 및 분석법 : Ginsenoside분석은 한국인삼연초 연구원 표준분석방법으로 동체부위를 분석하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 내적변성 인삼계통 선발시험

가. 신규선발 시험

1996년도에 내적변성 신규선발 4년생 61계통(음성시험장)을 검정한 결과, 적변정도가 0.3에서 2.9까지 다양하게 분포 되어 계통간 적변발생 정도의 차이가 심하였다(Table2-1, Table 2-1B, Fig.2-1). 적변정도가 자경종 2.8에 비해 공시계통중 18개 계통이 0.9이하로 낮아 내적변 유망계통(81878, 83795, 김포황숙, 7337-4-1, 78149, 78304, 7318-2-1, 80205 78142, 86018, KG101, 78222, 80117, KG105, 풍기황숙, 78167, 78206, KG103)으로 추정되었다($p=0.01$ - $p=0.001$). 내적변 유망계통으로 추정되는 18계통중 생존율이 자경종 80.6%에 비해 우수한계통은 81878, 78149, 80205 였고, 근중이 자경종 35g 보다 무거운 계통은 김포황숙, 7318-2-1 이었다(Table2-1, Table2-1B).

1998년도 적변유발 4년생의 신규 적변성 검정에서 공시 10계통의 적변 유발처리가 너무 강하여 산양삼을 제외한 모든계통에서 적변이 심하게 발생하여 계통간 적변 정도는 유의성 있는 차이는 나타나지 않았다. 특히 산양삼은 적변정도 1.2 생존율 85.2%, 근부율 25.6%로 적변에 내성이고 양호한 지하부 생육을 나타내고 있다(Table2-2).

1999년도 채굴시험에서 내적변성 신규선발 4년생 46계통(음성시험장)에서 뿌리의 적변지수가 자경종이 1.09인데 비하여 84702, 85735, 84776, KG108, 84771 79201, KG111 78222 계통은 적변지수가 0-0.47로 현저히 낮아서 적변내성 계통으로 가능성이 제시되었으며, 적변지수가 높은 계통에서 동활 발생율이 높은 경향이였다(Table2-3, Table2-3B).

2000년 10월 7일 내적변성 신규선발 4년생 20계통(음성시험장)에서 뿌리의 적변지수가 자경종이 1.41인데 비하여 83743, 82099, 82114, 82016, 79027 계통은 적변지수가 0.31-0.56으로 현저히 낮아서 적변내성 계통으로 가능성이 제시되었다(Table2-4, Fig.2-1).

Table 2-1. Root and aerial part growth of ginseng lines in 4-year old plant for screen test of red skin-root(harvest date:30 Aug.1996, Eumsung field)

Lines	Degree ^{a)} of red skin- root	Survival ratio of root (%)	Root fresh weight (g)	Aerial part fresh weight (g)
Jakyungjong	2.8	80.6	35.0	36.7
81878	0.3 ^{***}	86.1	27.7	27.9
83795	0.3 ^{***}	77.8	20.7	27.4
Kimchhwangsook	0.4 ^{***}	75.8	38.8	37.9
7337-4-1	0.5 ^{***}	72.2	28.1	30.8
78149	0.5 ^{***}	91.7	29.7	33.0
78304	0.5 ^{***}	52.8	19.0	16.5
7318-2-1	0.6 ^{***}	63.9	35.3	39.6
80205	0.6 ^{***}	83.3	27.1	30.8
78142	0.7 ^{***}	72.2	18.7	20.9
86018	0.7 ^{**}	90.9	22.7	29.1
KG101	0.7 ^{***}	80.0	21.8	34.5
78222	0.8 ^{***}	61.1	30.4	27.4
80117	0.8 ^{***}	91.7	20.7	22.8
KG105	0.8 ^{***}	77.8	25.0	27.9
Poonghhwangsook	0.8 ^{***}	74.3	25.2	26.9
78167	0.9 ^{***}	75.0	26.5	37.7
78206	0.9 ^{***}	91.7	29.3	37.8
KG103	0.9 ^{***}	91.8	39.1	32.7
80194	1.0	72.2	27.4	26.6
81723	1.0	88.9	25.2	24.3
86038	1.0	87.5	27.1	33.9
78219	1.1	83.3	28.2	35.8
79308	1.1	72.2	35.6	36.8
79309	1.1	80.6	24.3	24.5
86044	1.2	83.3	22.6	24.3
83794	1.3	61.1	32.6	40.0
83914	1.3	80.6	26.7	33.4
86053	1.3	60.6	28.3	29.6
KG104	1.3	77.8	25.3	28.1
78135	1.4	69.4	24.6	22.9
78204	1.4	83.3	20.1	25.5
78215	1.5	63.9	28.4	33.6
86063	1.5	72.2	30.1	33.0

continued(Table 2-1B)

a. Degree of red skin root, 0:healthy, 1:1~10%, 2:11~24%, 3:above 25%
 , * : Significant at p=0.01, p=0.001, respectively.

Table 2-1B. Continued(Table 2-1)

Lines	Degree ^{a)} of red skin- root	Survival ratio of root (%)	Root fresh weight (g)	Aerial part fresh weight (g)
83742	1.6	86.1	30.1	28.4
Rusian ginseng	1.6	69.4	25.1	24.1
Hwangsookjong	1.6	75.0	26.7	28.1
78032	1.7	83.3	26.1	28.6
82036	1.7	72.2	20.5	21.8
78092	1.8	72.2	21.9	23.1
78093	1.8	82.9	22.7	26.2
Mimaki	1.8	63.9	29.4	26.8
79024	1.9	76.5	30.7	31.5
81763	1.9	75.0	20.6	22.9
86004	2.0	58.3	34.1	30.2
86070	2.0	58.3	27.1	33.0
78216	2.1	80.6	19.7	22.9
83793	2.1	52.8	14.8	25.4
80216	2.3	80.6	22.8	23.3
81744	2.3	80.6	29.2	24.6
85021	2.4	66.7	30.4	32.9
Chungkyung(ja)	2.4	80.6	21.3	24.3
79306	2.5	79.3	26.2	28.1
KG102	2.5	83.3	26.2	33.0
Japan jakyung	2.5	80.6	24.5	25.7
78016	2.6	91.7	18.2	24.1
82014	2.6	83.3	31.4	29.3
86017	2.6	77.4	25.1	27.2
Chungkyungjong	2.7	55.6	21.3	23.6
82031	2.8	69.4	25.3	27.5
82068	2.9	75.0	20.1	20.0

a, Degree of red skin root, 0:healthy, 1:1~10%, 2:11~24%, 3:above 25%
 , * : Significant at p=0.01, p=0.001, respectively.

Table 2-2. Root growth of ginseng lines in 4-year old plant for screen test of red skin-root(harvest date: 24 March 1998)

Lines	Degree ^{z)} of red skin-root	Survival ratio of root (%)	Root fresh weight (g)	Ratio of root dehiscence (%)	Ratio of root rot (%)
Jakyungjong	2.0	63.0	17.3	63.7	51.9
sanyangsan	1.2	85.2	15.4	58.2	25.6
Da416	1.8	64.8	17.0	47.2	45.2
80814	1.9	72.2	17.5	36.3	40.1
82098	1.9	37.0	10.5	83.1	31.3
VxYJaF ₂ Hwang	1.9	66.7	15.5	40.1	26.5
79011	2.0	70.4	18.7	58.3	42.0
85074	2.2	72.2	15.4	39.5	45.5
Russian ginseng	2.5	33.3	8.4	69.4	36.5
Japan hwangsook	2.6	57.4	10.6	67.5	50.7

z, Degree of red skin root, 0:healthy, 1:1~10%, 2:11~24%, 3:above 25%
 Nonsignificant between jakyungjong and lines on degree of red skin-root

Table 2-3. Root growth of ginseng lines in 4-year old plant for screen test of red skin-root(harvest date:20 Sep,1999)

Lines	Degree ^{z)} of red skin-root	Root fresh weight (g/plant)	Ratio of root dehiscence (%)	Ratio of root rot (%)
84702	0*	30.3	0	9.0
85735	0*	25.2	0	0
84776	0.10*	27.0	0	10.0
KG108	0.29*	28.8	10	0
84771	0.32*	24.7	6.5	19.0
79201	0.38*	30.0	6.5	6.5
KG111	0.42*	28.6	0	8.7
78222	0.47*	18.0	6.5	13.0
84803	0.50	29.9	0	5.5

continued(Table 2-3B)

z, Degree of red skin root, 0:healthy, 1:1~10%, 2:11~24%, 3:above 25%
 * : Significant 5% between jakyungjong and ginseng lines.

Table 2-3B. Continued(Table 2-3)

Lines	Degree ^{z)} of red skin- root	Root fresh weight (g/plant)	Ratio of root dehiscence (%)	Ratio of root rot (%)
KG102	0.50	39.2	45.9	0
78142	0.61	18.2	18.0	5.5
KG101	0.62	25.0	13.7	13.7
85817	0.65	25.2	7.0	3.5
Nongjakyung	0.66	32.5	22.9	6.5
85090	0.68	17.1	14.6	5.0
KG103	0.72	32.7	15.7	0
78135	0.75	35.8	10.7	4.5
78016	0.86	18.1	24.0	7.0
7264-4-1	0.88	20.0	12.5	12.4
78025	0.90	30.8	30.3	4.4
KG104	0.95	30.3	18.8	6.3
Hwangsookjong	1.01	30.6	36.6	4.0
79011	1.03	29.7	43.8	19.0
Da401	1.04	24.4	20.5	7.0
Jakyungjong	1.09	25.8	15.4	6.2
85035	1.16	20.0	0	19.0
7337-4-1	1.20	21.2	19.6	4.4
80819	1.21	26.6	30.9	14.0
85822	1.24	32.2	29.6	5.1
KG105	1.30	33.0	38.5	0
82886	1.33	33.5	32.1	1.6
82887	1.33	36.7	28.2	4.4
7351-1-1	1.46	36.5	12.9	1.5
78008	1.61	28.0	33.0	0
85237	1.63	29.7	30.7	8.4
85031	1.80*	31.2	26.5	14.7
Da 416	1.91*	29.7	39.2	13.8
78206	1.95*	23.8	34.6	2.0
78093	1.98*	14.3	32.5	21.5
78162	2.05*	30.9	36.7	4.7
82065	2.07*	37.1	58.5	3.6
85041	2.26*	28.0	67.0	9.0
78215	2.38*	33.6	45.7	7.2
85040	2.53*	25.5	24.0	14.5
82036	2.64*	42.0	46.5	10.5
82098	2.77*	15.3	82.0	18.0

z. Degree of red skin root. 0:healthy, 1:1~10%, 2:11~24%, 3:above 25%
 * :Significant 5% between jakyungjong and ginseng lines.

Table 2-4. Degree of red skin-root of ginseng lines in 4-year old plant for screen test of red skin-root(harvest date:7 Oct, 2000)

Lines	Degree ^{z)} of red skin- root	Lines	Degree of red skin- root
83743	0.31	85090	1.11
82099	0.48	82041	1.11
82114	0.53	82097	1.39
82016	0.55	Jakyungjoong	1.41
79027	0.56	78144	1.58
85817	0.69	82096	1.85
85035	0.72	78184	1.96
85237	0.78	82004	2.00
86014	0.88	85041	2.11
82065	0.94	78025	2.19

L.S.D. 5% between ginseng lines: 0.4

z, Degree of red skin root, 0:healthy, 1:1~10%, 2:11~24%, 3:above 25%



Fig.2-1. The difference of red skin-root according to ginseng lines for screen test of red skin-root. (A)Roots were harvested on 30 Aug, 1996. (B)Roots were harvested on 7 Oct, 2000.

나. 재확인 시험

내적변 신규선발 시험에서 적변에 강한계통으로 선발한 계통의 특성을 재확인 하기 위하여 1998년 4월에 이식하여 2000년 9월 27일 채굴한 내적변성 재확인 4년생 16계통(대전시험포)에서 뿌리의 적변지수가 자경종이 1.22인데 비하여 78206, 78149, KG102, KG103계통은 적변지수가 0.33-0.61로 현저히 낮아서 적변내성 계통으로 확인되었다(Table 2-5, Fig. 2-2).

내적변 신규선발 시험에서 적변에 강한계통으로 선발한 계통의 특성을 산지에서 재확인 하기 위하여 1998년 4월에 이식하여 2000년 9월 29일 채굴한 내적변성 재확인 4년생 15계통(풍기산지)에서 뿌리의 적변지수가 자경종이 1.93인데 비하여 KG102, 7337-4-1, 78206, KG101, 4계통은 적변지수가 1.03-1.28로 현저히 낮아서 적변내성 계통으로 가능성이 확인되었다(Table 2-6).

Table 2-5. Degree of red skin-root of ginseng lines in 4-year old plant for repeat screen test of red skin-root(harvest date:27 Sep, 2000, Daejeon field)

Lines	Degree ^{z)} of red skin- root	Lines	Degree of red skin- root
78206	0.33	78304	1.09
78149	0.40	78167	1.11
KG102	0.44	Jakyungjong	1.22
KG103	0.61	Poongkihwangsook	1.29
Kimpohwangsook	0.65	78142	1.29
KG101	0.69	KG105	1.91
7337-4-1	0.70	81878	2.32
78222	0.96	Hwangsookjong	2.66

L.S.D. 5% between ginseng lines: 0.6

z, Degree of red skin root, 0:healthy, 1:1~10%, 2:11~24%, 3:above 25%



Fig. 2-2. The difference of red skin-root according to ginseng lines for repeat screen test of rusty-root. Roots were harvested on 27 Sep, 2000 at Daejon field.

Table 2-6. Degree of red skin-root of ginseng lines in 4-year old plant for repeat screen test of red skin-root(harvest date:29 Sep, 2000, Poongki farm field)

Lines	Degree ^{a)} of red skin- root	Lines	Degree of red skin- root
KG102	1.03	78149	1.88
7337-4-1	1.08	Jakyungjong	1.93
78206	1.20	78142	2.30
KG101	1.28	KG103	2.30
78304	1.40	78222	2.40
Poongkihwangsook	1.45	Hwangsookjong	2.47
Kimpohwangsook	1.50	81878	2.75
78167	1.58		

L, S, D, 5% between ginseng lines: 0.6

z, Degree of red skin root, 0:healthy, 1:1~10%, 2:11~24%, 3:above 25%

다. 유전 및 환경성 검정시험

2000년도 9월27일 채굴한 적변의 환경 및 유전성 검토시험에서 4년생 8계통(대전포지)에서 적변지수가 정상포지0.64에 비해 적변유발포지는 1.02로 적변유발포지에서 현저히 높았다. 이것은 적변이 과습유발 처리를 한 토양조건에서 유발되어 적변이 환경에 의해서 영향을 받는 것을 알수 있었다(Table 2-7).

80205, 82068, 83795 3계통은 정상포지 및 적변유발포지에서 모두 자경종보다 적변지수가 낮아서 이들 계통은 적변내성이 있는 계통으로 추정되며(Table 2-7), 인삼계통의 적변의 유전성은 적변지수가 낮은계통이 계속적으로 낮은 것(Table 2-1 ~ Table 2-7)으로 보아 유전성이 있는 것으로 생각된다.

Table 2-7. Degree of red skin-root of ginseng lines in 4-year old plant for screen test of heritable and environmental variation of red skin-root (harvest date:27 Sep, 2000, Daejeon field)

Lines	Degree ^{ab} of red skin-root	
	Normal field	Induced field for red skin-root
80205	0.27	1.00
78142	0.36	1.20
82068	0.48	0.80
83795	0.51	0.80
Japan jakyung	0.70	0.90
7318-2-1	0.77	1.30
Jakyungjong	0.99	1.10
78304	1.00	1.04
Mean	0.64	1.02

2. 적변관련 성분 및 조기검정 방법 검토

가. 적변관련 성분

2) 4 년생 적변계통 내용 성분 분석

공시한 인삼계통중 뿌리의 적변지수가 81878등 10계통은 0.3-0.7로 자경종등 10계통 2.5-2.9 보다 현저히 낮아서, 81878 등 10계통은 건전계통으로 자경종 등 10계통은 적변계통으로 구분할 수 있었다(Table 2-8).

Phenolic compound 함량이 적변계통은 건전계통에 비해 피층과 표피부위에서 많았고, 그 다음이 지세근 부위였으며, 중심주에서는 차이가 없었다(Table 2-9). 부위별 phenolic compound 함량은 표피>지세근>피층>중심주 순으로 표피에서 가장 높았다.

적변지수가 낮은 계통군과 높은 계통군 간의 무기성분 함량을 부위별로 분석한 결과는 Table 2-10 및 Table 2-11와 같다. 적변계통은 건전계통에 비해 피층에서는 K, Ca가 표피부위에서는 Mg의 함량이 현저히 높았으나 중심주와 지세근 부위에서는 차이가 없었다(Table 2-10).

적변계통은 건전계통에 비해 표피부분에서 Fe, Na, Mn, Al, 및 Si의 함량이 현저히 높았으며, 피층부위에서는 Na가 지세근 부위에서는 Fe의 함량이 높았다(Table 2-11).

인삼적변 계통의 표피 및 피층부위에 phenolic compound, K, Ca, Mg, Fe, Na, Mn, Al 및 Si의 함량이 높아서 이들성분이 인삼적변 계통선발 지표로 활용 가능성이 확인되었다.

Table 2-8. The difference of red skin-root degree between ginseng lines in 4-year old plant(harvest date:24 Sep,1998, Eumsung field)

Lines	Degree of red skin-root ^z	Lines	Degree of red skin-root ^z
(Low degree class)		(Low degree class)	
81878	0.3 ^{***}	79306	2.5
83795	0.3 ^{***}	KG102	2.5
Kimpohwangsook	0.4 ^{***}	Japan hwangsook	2.5
78149	0.5 ^{***}	78016	2.6
78304	0.5 ^{***}	82014	2.6
7318-2-1	0.6 ^{***}	86017	2.6
80205	0.6 ^{***}	Chungkyungjong	2.7
78142	0.7 ^{***}	82031	2.8
KG101	0.7 ^{***}	Jakyungjong	2.8
78222	0.8 ^{***}	82068	2.9

z. Degree of red skin root. 0:healthy, 1:1~10%, 2:11~24%, 3:above 25%
 *** : Significant at 0.1% levels,

Table 2-9. Comparison of phenolic compounds between low and high degree lines of red skin-root in 4-year old ginseng root(harvest date:29 Aug,1996,Eumsung field)

Degree of red skin-root	(unit: %, d.w)			
	Stele	Cortex	Epidermis	Branch & fine root
Low degree class	0.114	0.108	0.189	0.154
High degree class	0.128	0.148	0.294	0.185
t-value	n. s.	***	***	**

** , *** : Significant at 1% and 0.1% levels, respectively.
 n. s. : Not significant at 5% level,

Table 2-10. Comparison of macro element between low and high degree of red skin-root(DRR)² class in 4-year old ginseng roots(harvest date:29 Aug.1996, Eumsung field)
(unit:% d.w.)

Part of root	Degree of red skin root	P	K	Ca	Mg
Stele	Low DRR class	0.55	1.33	0.24	0.12
	High DRR class	0.50	1.41	0.27	0.10
	t-value	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Cortex	Low DRR class	0.36	1.37	0.20	0.09
	High DRR class	0.36	1.75	0.26	0.10
	t-value	n. s.	*	***	n. s.
Epidermis	Low DRR class	0.30	3.11	0.55	0.19
	High DRR class	0.31	3.20	0.50	0.25
	t-value	n. s.	n. s.	n. s.	***
Branch & fine root	Low DRR class	0.47	1.97	0.21	0.14
	High DRR class	0.38	2.19	0.23	0.14
	t-value	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.

². Degree of red skin root(DRR) 0:healthy, 1:1~10%, 2:11~24%, 3:above 25%
*, ** : Significant at 5% and 0.1% levels, respectively.
n. s. : Not significant at 5% level.

Table 2-11. Comparison of micro elements between low and high degree of red skin-root(DDR)² class in 4-year old ginseng roots(harvest date:29 Aug.1996, Eunsung field)

(unit:ppm d. w.)

Part of root	Degree of red skin root	Fe	Na	Mn	Al	Si	Zn	Cu
Stele	Low class	53	334	0	97	36	17	14
	High class	81	300	0	91	130	19	13
	t-value	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Cortex	Low class	68	209	2	114	93	16	13
	High class	94	279	2	129	165	25	13
	t-value	n. s.	**	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Epidermis	Low class	933	193	10	1452	1524	30	26
	High class	2102	314	133	3220	2893	64	28
	t-value	***	**	**	***	*	n. s.	n. s.
Branch & fine root	Low class	442	358	0	640	542	22	18
	High class	608	388	0	826	652	49	16
	t-value	*	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.

². Degree of red skin root(DDR) 0:healthy, 1:1~10%, 2:11~24%, 3:above 25%

*, **, *** : Significant at 5%, 1% and 0.1% levels, respectively.

n. s. : Not significant at 5% level.

1) 6년생 적변계통 내용 성분 분석

공시한 인삼 39계통중 뿌리의 적변지수가 자경종(1.5)에 비해 82041 등 7 계통은 0.4-0.8로 현저히 낮았고, 78216 등 7계통은 2.9- 2.4로 현저히 높았다(Table 2-12). 공시한 인삼계통 중 뿌리의 적변지수가 0.4-0.8인 7계통은 적변에 강한 건전그룹으로, 적변지수가 2.4-2.9인 7계통은 적변에 약한 적변계통그룹으로 분류하였다(Table 2-13).

Table 2-12. The difference of red skin-root degree between ginseng lines in 6-year old plant(harvest date:24 Sep.1998, Eumsung field)

Lines	Degree ^{z)} of red skin- root	Lines	Degree of red skin- root
82041	0.4	79023	1.7
82099	0.5	78219	1.7
78025	0.6	79144	1.7
82025	0.7	Da 416	1.8
82019	0.8	78204	1.8
78167	0.8	78093	1.9
78008	0.8	78135	1.9
78032	0.9	79027	1.9
82001	1.0	82098	1.9
82008	1.1	78092	2.2
78304	1.1	82005	2.2
82096	1.1	79306	2.3
78206	1.2	79093	2.4
78222	1.2	82043	2.5
79305	1.3	82004	2.7
79308	1.4	82065	2.7
Jakvungjong	1.5	78215	2.8
78142	1.5	78016	2.8
78149	1.5	78216	2.9
79309	1.6		

L. S. D. 5% between ginseng lines: 0.7

z. Degree of red skin root, 0:healthy, 1:1~10%, 2:11~24%, 3:above 25%

Table 2-13. The classification of ginseng lines according to red skin-root degree in 6-year old plant(harvest date:24 Sep.1998, Eumsung field)

Lines	Degree ^{z)} of red skin- root	Lines	Degree of red skin- root
(Low degree class)		(High degree class)	
82041	0.4 ^{***}	79093	2.4
82099	0.5 ^{***}	82043	2.5
78025	0.6 ^{***}	82004	2.7
82025	0.7 ^{***}	82065	2.7
82019	0.8 ^{***}	78215	2.8
78167	0.8 ^{***}	78016	2.8
78008	0.8 ^{***}	78216	2.9

z. Degree of red skin root, 0:healthy, 1:1~10%, 2:11~24%, 3:above 25%

*** : Significant at 0.1% levels.

적변계통군은 건전계통군에 비하여 표피에서는 Fe, 지세근 부위에서는 K, Si의 함량이 높았으며, 중심주 및 피층에서는 차이가 없었다(Table 2-14).

적변계통 그룹내 에서도 적변삼과 건전삼이 혼재하고 있었으며, 적변삼은 건전삼에 비해 피층 에서 Ca, Al, Cu가, 표피에서 Ca, P, Fe, Na가, 지세근에서는 Ca, Fe, Si의 함량이 높았으며, 중심주에서는 차이가 없었다. 그러나 K의 함량은 표피에서 적변삼이 건전삼보다 더 낮았다(Table 2-15).

건전한 인삼근을 시료로 사용시 중심주, 피층 및 지세근에서는 차이가 없었고, 단지 표피에서만 적변계통군은 건전계통군보다 Fe, Al의 함량이 높았다(Table 2-16). 건전한 인삼근 표피에서 적변계통이 Fe, Al 성분이 높았던 것은 인삼 적변계통들의 유전적 특성으로 추정되어 이 성분들은 인삼적변삼 조기선발 지표 성분으로 가능성이 있을 것으로 생각된다.

피층과 표피부위에서 적변계통군은 건전계통군에 비하여 phenolic comound 함량이 높았으며, 중심주와 지세근에서는 차이가 없었다(Table 2-17).

피층과 표피부위에서 건전계통군에서 적변뿌리는 건전뿌리보다 phenolic comound 함량이 높았으며, 중심주와 지세근에서는 차이가 없었다(Table 2-18).

피층과 표피부위에서 적변계통군에서 적변뿌리는 건전뿌리보다 phenolic comound 함량이 높았으며, 중심주와 지세근에서는 차이가 없었다(Table 2-19).

적변뿌리를 사용한 표피부위에서 적변계통은 건전계통보다 phenolic comound 함량이 높았으며, 중심주, 피층 및 지세근 에서는 차이가 없었다(Table 2-20).

건전한뿌리를 사용한 표피부위에서 적변계통은 건전계통보다 phenolic comound 함량이 높았으며, 중심주, 피층 및 지세근 에서는 차이가 없었다(Table 2-21).

Table 2-14. Comparison of mineral nutrients between low and high degree lines of red skin-root in 6-year old plant(harvest date:24 Sep,1998, Eumsung field)

Part of root	Lines	(% , d, w)					(ppm, d, w)					
		P	K	Ca	Mg	Fe	Na	Mn	Al	Si	Zn	Cu
Stele	LDL ²	0.38	1.12	0.39	0.15	39	392	33	14	3.8	11	7.4
	HDL ³	0.32	1.08	0.40	0.14	39	425	30	10	5.6	12	8.5
	t-value	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Cortex	LDL	0.28	1.52	0.41	0.16	41	408	41	28	11.7	13	8.1
	HDL	0.25	1.46	0.43	0.14	40	402	38	23	7.6	12	8.4
	t-value	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Epidermis	LDL	0.19	2.25	0.72	0.67	3521	529	228	5083	90	35	59
	HDL	0.20	2.24	0.77	0.78	4242	542	276	5908	112	36	72
	t-value	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	*	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Branch & fine root	LDL	0.38	1.77	0.43	0.18	750	689	46	365	20	22	8.6
	HDL	0.37	1.98	0.47	0.19	750	727	49	405	47	27	9.9
	t-value	n. s.	*	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	*	n. s.	n. s.

² Low degree lines of red skin-root(LDL) were 7 Lines(82041, 82099, 78025, 82025, 82019, 78167, 78008)

³ High degree lines of red skin-root(HDL) were 7 Lines(79093, 82043, 82004, 82065, 78215, 78016, 78216)

Red skin state of root were LDL(0.1), HDL(0.27)

* : Significant at 5% levels,

n. s. : Not significant at 5% level.

Table 2-15. Comparison of mineral nutrients between healthy and red skin root in high degree lines of red skin-root(HDL)² in 6-year old plant(harvest date:24 Sep,1998, Eumsung field)

Part of root	Red skin state of root ³	P	K	Ca	Mg	Fe	Na	Mn	Al	Si	Zn	Cu
		(% , d, w)					(ppm, d, w)					
Stele	Healthy	0.37	1.25	0.44	0.14	34	353	37	11	9.0	11	6.9
	Red skin	0.31	1.08	0.42	0.14	38	402	29	10	5.7	12	8.5
	t-value	n, s.	n, s.	n, s.	n, s.	n, s.	n, s.	n, s.	n, s.	n, s.	n, s.	n, s.
Cortex	Healthy	0.21	1.25	0.36	0.14	35	332	45	18	8.1	11	5.8
	Red skin	0.24	1.45	0.44	0.14	38	388	36	29	8.5	12	8.2
	t-value	n, s.	n, s.	*	n, s.	n, s.	n, s.	n, s.	*	n, s.	n, s.	**
Epidermis	Healthy	0.16	2.88	0.60	0.67	3057	426	289	5113	112	34	74
	Red skin	0.20	2.28	0.77	0.78	4212	535	287	5863	116	36	73
	t-value	**	**	**	n, s.	**	*	n, s.	n, s.	n, s.	n, s.	n, s.
Branch & fine root	Healthy	0.34	1.77	0.34	0.16	196	589	51	315	12	27	8.5
	Red skin	0.37	1.95	0.47	0.18	752	720	49	363	50	26	9.3
	t-value	n, s.	n, s.	**	n, s.	***	n, s.	n, s.	n, s.	**	n, s.	n, s.

² High degree lines of red skin-root(HDL) were 6 Lines(79093, 82043, 82004, 82065, 78215, 78016)

³Red skin state of root were healthy(0.1), red skin(2.7)

*, **, *** : Significant at 5%, 1% and 0.1% levels, respectively.

n, s. : Not significant at 5% level.

Table 2-16. Comparison of mineral nutrients between low and high degree lines of red skin-root in 6-year old healthy root(harvest date:24 Sep.1998, Eumsung field)

Part of root	Lines	P	K	Ca	Mg	Fe	Na	Mn	Al	Si	Zn	Cu
		(% , d, w)					(ppm, d, w)					
Stele	LDL ²	0.41	1.25	0.40	0.15	33	377	30	10	6.5	12	7.3
	HDL ³	0.37	1.25	0.44	0.14	34	353	37	11	9.0	11	6.9
	t-value	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Cortex	LDL	0.23	1.23	0.36	0.16	38	341	38	23	9.1	12	6.0
	HDL	0.21	1.25	0.36	0.14	35	332	45	18	8.1	11	5.8
	t-value	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Epidermis	LDL	0.17	2.90	0.56	0.69	2567	386	207	4133	107	36	53
	HDL	0.16	2.88	0.60	0.69	3057	426	289	5113	112	34	74
	t-value	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	*	n. s.	n. s.	*	n. s.	n. s.	n. s.
Branch & fine root	LDL	0.38	1.66	0.32	0.19	208	605	42	320	24	23	8.3
	HDL	0.34	1.77	0.35	0.16	196	589	51	315	12	27	8.5
	t-value	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.

² Low degree lines of red skin-root(LDL) were 7 lines(82041, 82099, 78025, 82025, 82019, 78167, 78008)

³ High degree lines of red skin-root(HDL) were 6 lines(79093, 82043, 82004, 82065, 78215, 78016)

Red skin state of root were LDL(0.1), HDL(0.1)

* : Significant at 5% levels.

n. s. : Not significant at 5% level.

Table 2-17. Comparison of phenolic compounds between low and high degree lines of red skin-root in 6-year old plant(harvest date:24 Sep,1998, Eumsung field)

(unit: %, d.w)

Lines	Stele	Cortex	Epidermis	Branch & fine root
LDL ²	0.243	0.232	0.452	0.424
HDL ³	0.277	0.294	0.560	0.479
t-value	n, s.	*	*	n, s

² Low degree lines of red skin-root(LDL) were 7 lines(82041, 82099, 78025, 82025, 82019, 78167, 78008)

³ High degree lines of red skin-root(HDL) were 7 lines(79093, 82043, 82004, 82065, 78215, 78016)

Red skin state of root were LDL(0.1), HDL(2.7)

* : Significant at 5% levels,

n, s. : Not significant at 5% level.

Table 2-18. Comparison of phenolic compounds between healthy and red skin root in low degree lines of red skin-root(LDL)² in 6-year old plants(harvest date:24 Sep,1998, Eumsung field)

(unit: %, d.w)

Red skin state of root ³	Stele	Cortex	Epidermis	Branch & fine root
Healthy	0.243	0.232	0.452	0.424
Red skin	0.257	0.262	0.500	0.450
t-value	n, s.	*	*	n, s

² Low degree lines of red skin-root(LDL) were 7 lines(82041, 82099, 78025, 82025, 82019, 78167, 78008)

³ Red skin state of root were LDL(0.1), HDL(2.7)

* : Significant at 5% levels,

n, s. : Not significant at 5% level.

Table 2-19. Comparison of phenolic compounds between healthy and red skin root in high degree lines of red skin-root(LDL)² in 6-year old plants(harvest date:24 Sep,1998, Eumsung field)
(unit: %, d.w)

Red skin state of root ¹	Stele	Cortex	Epidermis	Branch & fine root
Healthy	0.262	0.244	0.504	0.423
Red skin	0.277	0.294	0.560	0.479
t-value	n. s.	*	*	n. s.

² High degree lines of red skin-root(HDL) were 6 lines(79093, 82043, 82004, 82065, 78215, 78016)

¹ Red skin state of root were healthy(0.1), red skin(2.7)

* : Significant at 5% levels,

n. s. : Not significant at 5% level.

Table 2-20. Comparison of phenolic compounds between low and high degree lines of red skin-root in 6-year old red skin root(harvest date:24 Sep.1998, Eumsung field)
(unit: %, d.w)

Lines	Stele	Cortex	Epidermis	Branch & fine root
LDL ²	0.257	0.262	0.500	0.450
HDL ¹	0.277	0.294	0.560	0.479
t-value	n. s.	n. s.	*	n. s.

² Low degree lines of red skin-root(LDL) were 7 lines(82041, 82099, 78025, 82025, 82019, 78167, 78008)

¹ High degree lines of red skin-root(HDL) were 6 lines(79093, 82043, 82004, 82065, 78215, 78016)

Red skin state of root were LDL(2.7), HDL(2.7)

* : Significant at 5% level,

n. s. : Not significant at 5% level.

Table 2-21. Comparison of phenolic compounds between low and high degree lines of red skin-root in 6-year old healthy root(harvest date:24 Sep,1998, Eumsung field)

(unit: %, d.w)

Lines	Stele	Cortex	Epidermis	Branch & fine root
LDL ²	0.243	0.232	0.452	0.424
HDL ³	0.262	0.244	0.504	0.423
t-value	n, s.	n, s.	*	n, s

² Low degree lines of red skin-root(LDL) were 7 lines(82041, 82099, 78025, 82025, 82019, 78167, 78008)

³ High degree lines of red skin-root(HDL) were 6 lines(79093, 82043, 82004, 82065, 78215, 78016)

Red skin state of root were LDL(0.1), HDL(0.1)

* : Significant at 5% level.

n, s. : Not significant at 5% level.

나. 조기검정 방법

1) 6년생 시료

6년생 동일동체내 피층부위에서 적변피층은 건전피층에 비해 phenolic compound 함량이 많았으나, 무기성분 함량은 통계적 유의성이 없었다(Table 2-22).

2) 묘삼 시료

묘삼에서 phenolic compound, K 및 Na함량이 적변계통은 건전계통보다 많았다(Table 2-23). 앞으로 적변계통 조기선발에 이들성분을 지표성분으로 활용 가능성을 제시하였다.

Table 2-22. Comparison of phenolic compound and mineral nutrients between healthy and red skin cortex in same 6-year old ginseng roots

Parts of root	Phenolic compound (% d. w.)	K Ca Mg			Fe Na Mn		
		%			ppm		
Healthy cortex	0.134	1.17	0.24	0.21	142	846	19
Red skin cortex	0.146	1.07	0.23	0.21	155	766	21
t-value	*	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.

* : Significant at 5% levels,
n. s. : Not significant at 5% level.

Table 2-23. Comparison of phenolic compound and mineral nutrients between low and high degree of red skin root(DRR) class in healthy ginseng seedlings

Class	Phenolic compound (% d. w.)	K Ca Mg			Fe Na Mn		
		%			ppm		
Low DRR ²	0.154	2.30	0.15	0.16	150	822	17
High DRR	0.172	2.46	0.16	0.17	150	1033	19
t-value	*	**	n. s.	n. s.	n. s.	*	n. s.

². Degree of red skin root(DRR) 0:healthy, 1:1~10%, 2:11~24%, 3:above 25%
*,** : Significant at 5% and 1% levels, respectively.
n. s. : Not significant at 5% level.

3. F₁ 잡종식물체의 불임원인 조사

가. 화분활력 검정

Fluorescein diacetate로 화분을 염색하여 화분의 활력을 검정한 결과, F₁ 잡종 식물체의 화분은 자경종이나 미국삼의 화분과 같이 형광되어 화분의 활력이 있음이 인정되었다(Fig. 2-3).

나. 뇌수분(蕾受粉) 및 주두(柱頭) 절제 수분

고려인삼과 미국삼의 종간 잡종식물체의 화주조직의 억제물질 유무를 검토하기 위하여 주두의 발육단계별로 수분을 실시한 결과, 개화 6일전부터 개화 직후까지 주두상에서 화분이 전혀 받아되지 않았고, 개화 직후 주두를 절제하여 수분했을때에도 전혀 화분이 받아되지 않았다(Fig. 2-4). 이 사실로 보아 주두 및 화주조직에 억제물질이 존재할 것으로 생각된다.

3. SDS-PAGE 및 2차 전기영동 분석

화주조직내에 화분발아 억제물질 존재 여부를 조사하기 위하여 12% acrylamide gel에서 인삼 화주 추출물을 전기영동으로 분석한 결과(Fig. 2-5), F₁ 잡종식물체 화주조직의 단백질 pattern은 부계인 미국삼과는 현저한 차이를 나타 내었으나, 모계인 자경종과는 거의 비슷한 경향을 나타내었다.

그러나 29kDa 와 9kDa 부근의 단백질이 고려인삼이나 미국삼에는 존재하나 F₁ 잡종식물체에는 거의 없거나 미약하여 이들 단백질이 F₁ 잡종식물체의 불임 관여 물질로 추정된다.

2차원 전기영동에 의한 분석 결과는 Fig. 2-6와 같다. 고려인삼 자경종과 미국삼을 교배하여 얻은 F₁ 잡종식물체의 불임원인을 구명하기 위하여 3종의 화주조직을 채취하여 단백질의 분자량 및 등전점을 결정하였다.

그 결과 자경종과 달리 미국종에서 분자량 54.0-60.0kDa, 등전점 5.4-5.6 사이의 단백질과 분자량 97.0kDa 이상, 등전점 6.6-7.0 사이의 단백질(↓)이 나타나 이두종이 서로 다른 형질을 가진 종임을 확인하였다(Fig. 2-6).

F₁ 잡종식물체의 불임원인 관여 물질은 고려인삼과 미국삼에는 존재하나 F₁ 잡종식물체에는 없는 분자량 31.0-40.0kDa 와 등전점 5.5-5.9 사이의 단백질(·), 양친에는 없으나 F₁ 잡종식물체에는 존재하는 분자량 54.0-60.0kDa와 등전점 5.5-5.9 사이의 단백질, 그리고 등전점만 다른 분자량 66.2-97.4kDa 단백질(*)이 불임관여 물질로 추정된다(Fig. 2-6).

또한 F₁ 잡종식물체에서 미국종만이 가지고 있는 분자량 54.0-60.0kDa, 등전점 5.5-5.9 사이의 단백질(↓)이 나타남에 따라 F₁ 이 자경종 뿐만 아니라 미국종의 형질에도 영향을 받은 것으로 보인다.

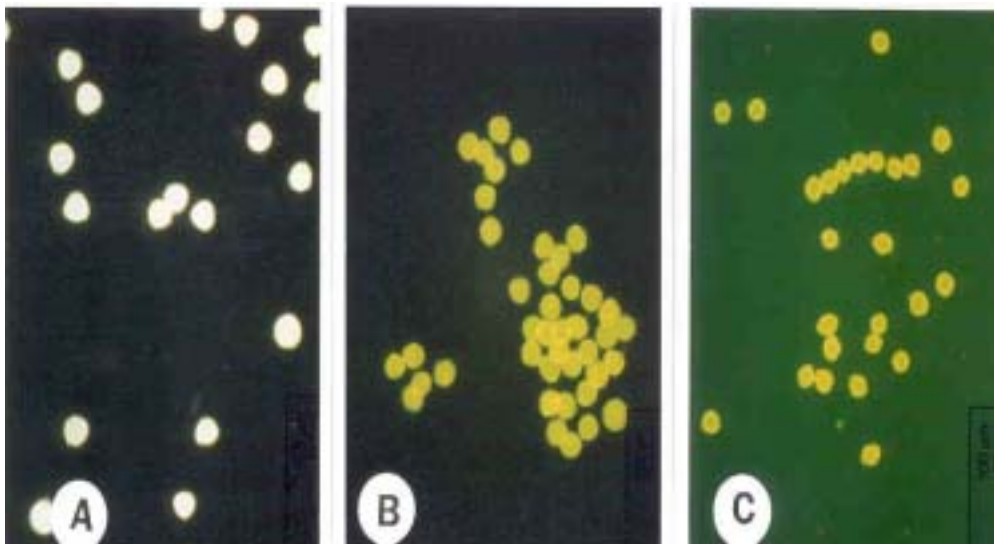


Fig.2-3. Pollen viability test by fluorescein diacetate staining(x200)
A: *Fanax ginseng*, B: *Fanax quinquefolium*, C: F₁ hybrid,

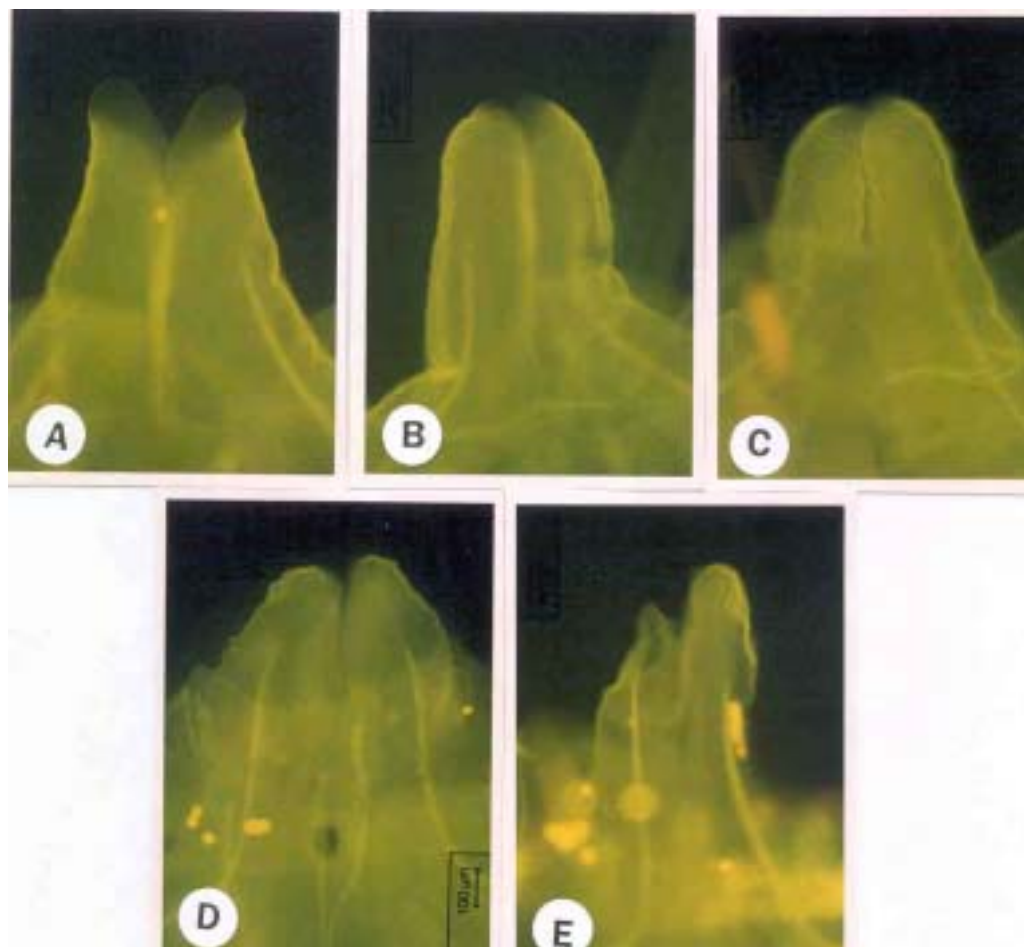


Fig 2-4. Germination patterns of pollen in the pistil during flower development and excised stigma of F_1 (x100).

A: Flowering stages, B: 2 days before flowering, C: 4 days before flowering, D: 6 days before flowering, E: Excised stigma,

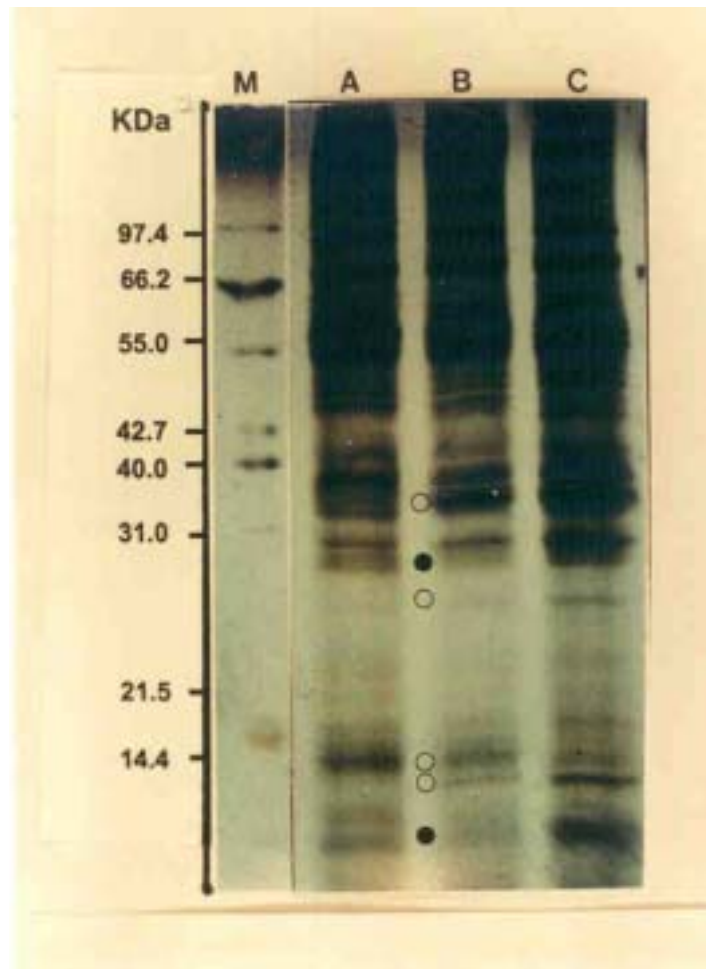


Fig. 2-5. SDS-PAGE analysis from pistil extracts of ginseng species and F_1 . Lane M : molecular size marker, Lane A: pistil protein of *P. ginseng*. Lane B:pistil protein of F_1 . Lane C:pistil protein of *P. quinquefolium*. Protein detecting only one side of *P. ginseng* or *P. quinquefolium* was indicated by ○. Proteins disappearing in the pistil of F_1 was indicated by ●.

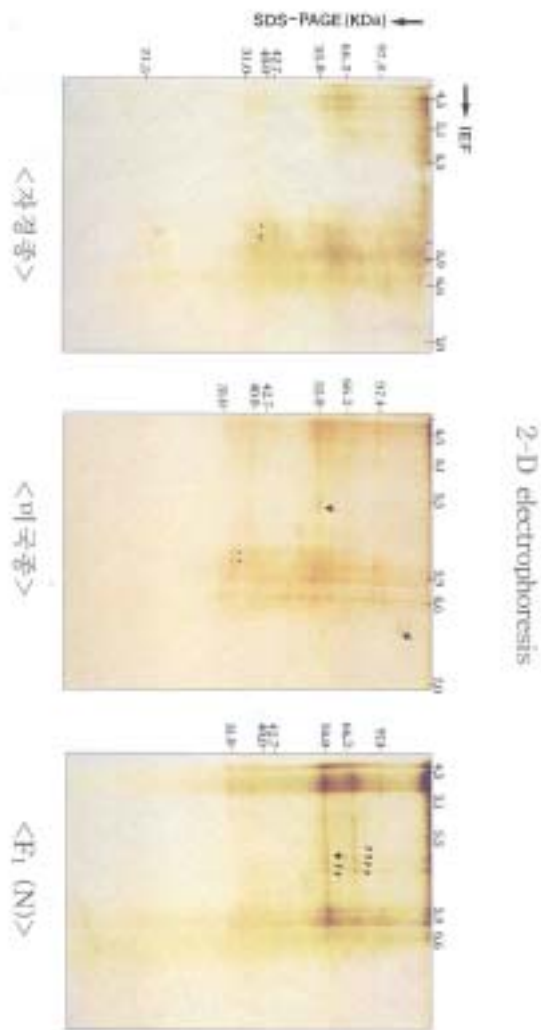


Fig. 2-6. Two dimensional gel electrophoresis of pistil extracts of ginseng species and F₁. Protein size markers are indicated at left in kilodalton, The pI ranges are indicated at the top of panels.

4. 인삼계통의 ginsenoside 함량

재래혼계종인 자경종등 총 26계통의 동체 ginsenosides 함량을 1차 분석하였던 바, 20계통은 자경종의 함량 7.82 mg/g에 비해 높은 함량을 보였으며 특히 7337-4-1, 78184, 78048계통은 2배 이상의 함량을 보였다(Table 2-24). 또한 이차 재래혼계종인 자경종을 포함한 총 23계통의 동체 부위의 ginsenosides 함량을 분석을 하였으며, ginsenoside standard는 Rg1, Rf, Re, Rd, Rc, Rb2 및 Rb1 등 7종류를 사용하였다. 분석된 22계통 중 7234-1-1을 비롯한 13계통은 기존 재래혼계종인 자경종 8.68 mg/g보다 높은 함량을 보였다(Table 2-25). 각각의 ginsenoside에서 Rg1은 분석된 모든 계통에서 대비구인 자경종보다 높았으며, Rf는 9계통이 대비구인 자경종 0.44mg/g 보다 높은 함량을 보였다. Re도 분석계통 모두가 대비구보다 높은 함량을 보였으며, SG84086 계통은 2배 이상의 높은 함량을 나타냈고, Rd의 경우는 19계통이 대비구보다 높은 함량을 보였다. Rc도 84709 외 8계통의 함량이 대비구에 비해 높은 함량을 보였으며, Rb2의 경우는 13계통이 대비구보다 높았다(Table 2-25). Rb1은 Rg1과 더불어 대부분의 분석계통에서 비교적 함량이 많은 ginsenoside 로, 특히 84008은 4.80mg/g으로 상당히 높은 함량을 보였으며, 그외 80186, 7234-1-1, 7215-2-1, SG84086계통은 3.00mg/g 이상을 보였다.

Table 2-24. Contents of ginsenoside of ginseng lines(first data)

Unit : mg/g dw

Lines	Total ginsenosides	Lines	Total ginsenosides
Jakyung-jong	7.82	78167	10.10
7337-4-1	16.90	78218	10.02
78184	16.52	황속종	10.00
78048	15.74	78216	9.90
78219	15.08	78135	9.88
78025	14.20	78008	9.82
78093	13.76	78162	8.94
78026	12.60	78111	8.38
78140	12.48	78092	6.92
680-83-3-1	11.48	7318-2-1	6.68
7365-3-1	11.18	78016	5.86
78215	10.28	7318-3-1	5.34
78142	10.10	78222	5.12

Table 2-25. Contents of ginsenosides of ginseng lines(secondary data)

(unit : mg/g)

	Rg1	Rf	Re	Rd	Rc	Rb2	Rb1	Total
Jakyung-jong1, 38	0.44	0.86	0.26	1.26	1.60	2.88	8.68	
680-29-1-1	1.80	0.18	1.58	0.40	1.16	1.70	2.30	9.12
7215-2-1	2.78	0.58	1.12	0.42	1.10	2.86	3.92	12.78
7234-1-1	3.92	0.74	1.30	0.58	1.24	3.06	4.66	15.50
7237-1-1	2.18	0.36	0.88	0.28	0.92	1.46	1.70	7.78
80145	2.18	0.50	1.12	0.22	0.96	1.50	1.50	7.98
80186	3.42	0.38	1.12	0.50	1.54	3.14	4.74	14.84
80203	3.12	0.64	1.30	0.42	1.68	2.64	2.92	12.72
80305	2.14	0.40	1.10	0.36	1.08	2.98	2.94	11.00
84008	3.80	0.44	1.08	0.58	1.00	2.90	4.80	14.60
84015	2.44	0.24	1.30	0.28	0.78	1.02	2.32	8.38
84016	2.08	0.44	1.20	0.34	0.90	1.02	1.94	7.92
84039	2.96	0.30	1.28	0.38	1.42	2.20	2.12	10.66
84040	2.30	0.50	0.94	0.50	1.40	2.44	2.78	10.86
84051	1.72	0.26	1.32	0.42	1.30	0.94	1.84	7.80
84073	1.80	0.44	0.88	0.24	0.96	1.34	1.64	7.30
84709	3.42	0.78	1.36	0.50	1.94	2.60	2.14	12.74
84790	2.48	0.46	1.02	0.32	0.96	1.26	2.06	8.56
SG84081	2.42	0.54	1.42	0.44	1.32	2.04	2.74	10.88
SG84086	2.80	0.28	1.66	0.44	1.46	2.26	3.22	12.10
SG84088	2.12	0.34	1.32	0.30	1.06	1.50	0.40	7.04
Da401	2.64	0.52	1.24	0.40	1.28	1.74	2.90	10.72
Da416	1.48	0.30	0.88	0.22	1.08	1.02	1.88	6.86

제 4 절 요약

1. 내적변성 인삼계통 선발시험

가. 신규선발 시험

1) 내적변계통 신규선발시험 96년도 채굴 4년생 61계통에서 뿌리의 적변지수가 자경종이 2.8인데 비하여 18계통은(81878, 83795, 김포황숙, 7337-4-1, 78149, 78304, 7318-2-1, 80205 78142, 86018, KG101, 78222, 80117, KG105, 풍기황숙, 78167, 78206, KG103)0.9이하로 낮아 내적변 유망계통으로 추정됨.

2) 내적변계통 신규선발시험 98년도 채굴 4년생 10계통에서 뿌리의 적변지수가 자경종이 2.0인데 비하여 산양삼, 다416계통은 1.2-1.8로 낮아서 2계통을 선발함.

- 내적변계통 신규선발시험 99년도 채굴 4년생 46계통(음성시험장)에서 뿌리의 적변지수가 자경종이 1.09인데 비하여 84702, 85735, 84776, KG108, 84771 79201, KG111 78222 계통은 적변지수가 0-0.47로 현저히 낮아서 적변내성 계통으로 가능성이 제시됨.

- 내적변계통 신규선발시험 2000년도 채굴 4년생 20계통(음성시험장)에서 뿌리의 적변지수가 자경종이 1.41인데 비하여 83743, 82099, 82114, 82016, 79027 계통은 적변지수가 0.31-0.56으로 현저히 낮아서 적변내성 계통으로 가능성이 제시됨

나. 재확인 시험

- 내적변성 재확인 시험 4년생 16계통(대전시험포)에서 뿌리의 적변지수가 자경종이 1.22인데 비하여 78206, 78149, KG102, KG103계통은 적변지수가 0.33-0.61로 현저히 낮아서 적변내성 계통으로 가능성이 확인됨.

- 내적변성 재확인 4년생 15계통(풍기산지포)에서 뿌리의 적변지수가 자경종이 1.93인데 비하여 KG102, 7337-4-1, 78206, KG101, 4계통은 적변지수가 1.03-1.28로 현저히 낮아서 적변내성 계통으로 가능성이 확인됨.

다. 유전 및 환경성 검정 시험

- 적변의 환경 및 유전성 검토시험의 4년생 8계통(대전포지)에서 적변평균지수가 정상포지 0.64에 비해 적변유발포지는 1.02로 적변유발포지에서 현저히 높아서, 환경에 의해서 영향을 받는 것을 알수 있었다.
- 80205, 82068, 83795 3계통은 정상포지 및 적변유발포지에서 모두 자경종보다 적변지수가 낮아서 이들 계통은 적변내성이 있는 계통으로 추정되며, 인삼계통의 적변의 유전성은 적변지수가 낮은계통이 계속적으로 낮은 것으로 보아 유전성이 있는 것으로 생각된다.

2. 적변관련 성분 및 조기검정 방법 검토

가. 적변관련 성분

1) 4 년생 적변계통 내용 성분 분석

- Phenolic compound 함량이 적변계통은 건전계통에 비해 피층과 표피부위에서 많았다
- 적변계통은 건전계통에 비해 피층에서는 K, Ca가 표피부위에서는 Mg의 함량이 현저히 높았다
- 적변계통은 건전계통에 비해 표피부분에서 Fe, Na, Mn, Al, 및 Si의 함량이 현저히 높았으며, 피층부위에서는 Na의 함량이 높았다
- 인삼적변 계통의 표피 및 피층부위에 phenolic compound, K, Ca, Mg, Fe, Na, Mn, Al 및 Si의 함량이 높아서 이들성분이 인삼적변 유발과 관계가 있는 것으로 확인되었다.

1) 6 년생 적변계통 내용 성분 분석

- 적변계통군은 건전계통군에 비하여 표피에서는 Fe의 함량이 높았으며, - 적변계통 그룹내 에서도 적변삼과 건전삼이 혼재하고 있었으며, 적변삼은 건전삼에 비해 피층에서 Ca, Al, Cu가, 표피에서 Ca, P, Fe, Na가 높았다. 그러나 K의 함량은 표피에서 적변삼이 건전삼보다 더 낮았다.

- 건전한 인삼근을 시료로 사용시 표피에서만 적변계통군은 건전계통군보다 Fe, Al의 함량이 높았다.
- 건전한 인삼근 표피에서 적변계통이 Fe, Al 성분이 높았던 것은 인삼 적변계통들의 유전적 특성으로 추정되어 이 성분들은 인삼적변삼 조기선발 지표 성분으로 가능성이 있을 것으로 생각된다.
- 피층과 표피부위에서 적변계통군은 건전계통군에 비하여 phenolic comound 함량이 높았으며,
- 피층과 표피부위에서 건전계통군에서 적변뿌리는 건전뿌리보다 phenolic comound 함량이 높았으며
- 피층과 표피부위에서 적변계통군에서 적변뿌리는 건전뿌리보다 phenolic comound 함량이 높았으며
- 적변뿌리를 사용한 표피부위에서 적변계통은 건전계통보다 phenolic comound 함량이 높았으며,
- 건전한뿌리를 사용한 표피부위에서 적변계통은 건전계통보다 phenolic comound 함량이 높았다.
- 이상의 결과로 보아 적변내성 계통 조기선발을 위한 적변지표 성분은 6년생 건전뿌리의 표피조직에서 적변계통은 적변내성계통에 비하여 Fe, Al 과 phenolic comound의 함량이 높아 이들 성분이 적변지표성분으로 가능성이 제시되었음.

나. 조기검정 방법

- 98년도 결과에서 적변내성 계통 조기선발을 위하여 묘삼에서 적변내성 선발 지표 성분을 검토한 결과 적변계통은 건전계통보다 묘삼에서 phenolic compound, K 및 Na 함량이 많았다.

3. F₁ 잡종식물체의 불임원인 조사

- F₁ 잡종식물체의 불임원인을 구명한 결과 고려인삼과 미국삼에는 존재하나 F₁ 잡

종식물체에는 없는 분자량 31.0-40kDa 와 등전점 5.5-5.9 사이의 단백질, 그리고 양친에는 없으나 F₁ 잡종식물체에는 존재하는 분자량 54.0-60.0kDa와 등전점 5.5-5.9 사이의 단백질과 등전점만 다른 분자량 66.2-97.4kDa 단백질이 불임관여 물질로 추정된다.

4. 인삼계통의 ginsenoside 함량

분석된 22계통 중 7234-1-1을 비롯한 13계통은 기존 재래혼계종인 자경종 8.68 mg/g보다 높은 함량을 보였다.

각각의 ginsenoside에서 Rg1은 분석된 모든 계통에서 대비구인 자경종보다 높았으며, Rf는 9계통이 대비구인 자경종 0.44mg/g 보다 높은 함량을 보였다.

Re도 분석계통 모두가 대비구보다 높은 함량을 보였으며, SG84086 계통은 2배 이상의 높은 함량을 나타냈다.

Rd의 경우는 19계통이 대비구보다 높은 함량을 보였고, Rc도 84709외 8계통의 함량이 대비구에 비해 높은 함량을 보였으며, Rb2의 경우는 13계통이 대비구보다 높았다

Rb1은 Rg1과 더불어 대부분의 분석계통에서 비교적 함량이 많은 ginsenoside 로, 특히 84008은 4.80mg/g으로 상당히 높은 함량을 보였으며, 그외 80186, 7234-1-1, 7215-2-1, SG84086계통은 3.00mg/g 이상을 보였다.

참 고 문 헌

- AOAC: Official Methods of Analysis 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, p.40(1984).
- Choi, K.T., and H.S. Shin 1982. Morphological characteristics inflorescence, flowering bud, fruit and leaf of Korean ginseng. Korean J. Ginseng Soc, 6(1):67-74.
- Chung, I K: 대구효성카톨릭대학교 응용과학연구논문집 5,167-175 (1997)
- Dunn M, J: Gel electrophoresis, Proteins, Bios scientific publishers limited, Oxford, UK, (1993)
- Gallagher S, Smith J, A.: Current protocol in Molecular Biology (1995).
- Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y: Stain Technology 45(3), 115-120 1970.
- Kho YO, Baer J.: Euphytica 17,298-302 (1968).
- Mau S, L., E.G. William, A. Atkinson, M.A.Anderson, E.C.Cornish, B.Greco, R.J. Simpson, A. Kheyr-Pour, and A.E.Clarke,: 1986 Plana 169,184-191.
- Osamu, T. 1977. Recent studies on the chemistry of ginseng saponins, Korea, J. Ginseng Sci, 2(1):9-15.
- Sanada, S., N. Kondo, J. Shoji, O. Tanaka and S. Shibata, 1974. Studies on the saponins of ginseng. I. Structures of ginsenoside -Ro, -Rb₁, -Rb₂, -Rc and -Rd. Chem. Pharm. Bull, 22(2):421-428.
- Sanada, S., N. Kondo, J. Shoji, O. Tanaka and S. Shibata, 1974. Studies on the saponins of ginseng. II. Structures of ginsenoside -Re, -Rf and -Rg₂. Chem. Pharm. Bull, 22(10):2407-2412.
- Toshio Nakabayashi: Japan J. Food Tech, Sci, 15(2), 73(1968).
- 김명수, 이종화, 홍순근, 이태수, 백남인, 한종구. 1985. 인삼연구보고서(재배

- 분야), 한국인삼연초연구소 p. 785
- 목성균, 반유선, 천성기, 이태수, 이성식 1995. 인삼연구보고서(재배분야), 한국인삼연초연구원 p. 51.
- 목성균, 반유선, 천성기, 이태수. 1996. 인삼연구보고서(재배분야), 한국인삼연초연구원 p. 84
- 오승환, 박창석, 김홍진. 1978. 인삼연구보고서(재배분야), 고려인삼연구소, p31.
- 이명구 등. 1995. 인삼의 신품종육성연구. 인삼연구결과 중간보고서(재배분야), 한국인삼연초연구원
- 이태수, 목성균, 천성기, 최강주, 최정. 1995 고려인삼학회지, 19(1), 77.
- 이태수. 1990 박사학위논문, 경북대학교, 대구.
- 정영률, 오승환, 이일호, 박창석. 1985 고려인삼학회지, 9(1), 24.
- 최광태. 1988. 인삼. 21세기를 향한 육종전략. 한국육종학회지 제 20권 별호, 43-45.
- 최광태a. 1983. 인삼재배. 농업기술사. p377-383.
- 최광태b. 1983. 21세기를 향한 육종전략. 한국육종학회지. 20권 별호 p43-45.
- 한국담배인삼공사. 1995. 1995년도 인삼생산 지침

제 3 장 내적변성 및 ginsenoside고함유 인삼의 DNA 분석

제 1 절 서 설

인삼은 오가피과(Araliaceae)의 인삼속(*Fanax genus*)에 속하며, 물분포상 북위 30도에서 48도의 아시아의 극동 지방과 북미에서 주로 재배되는 고려인삼(*Fanax ginseng* C. A. Meyer)과 중국의 운남성에서 재배되는 전칠삼(*Fanax notoginseng*), 그리고 미국, 캐나다의 북부지역에서 재배되는 미국삼(*Fanax quinquefolium*)등이 3대 권역으로 나누어 분포하고 있다. (최신고려인삼, 재배편, 1994; 최신고려인삼, 재배편, 1996) 현재까지 *Fanax*속 식물인 인삼의 종은 연구자에 따라 변종을 포함하여 7-10 종으로 분류하고 있으며(森田俊信, 1986), 일반적으로 인삼은 종의 형태에 따라 고려인삼(*Fanax ginseng* C. A. Meyer), 족절삼(*Fanax japonicum* C. A. Meyer), 전칠삼(*Fanax notoginseng* Burkill), 가인삼(*Fanax pseudo-ginseng* Wall.), 미국삼(*Fanax quinquefolium* Linne)과 삼엽삼(*Fanax trifolium* Linne)등이 있다. 그 중 우리나라 인삼은 해외에서 고려인삼이라는 별칭으로 국제인삼 시장에서 가장 고품질의 인삼으로서 인정받고 있으며 우리나라 최고의 수출농산물이기도 하다.

인삼은 있어서 열매와 줄기의 색소변화에 따른 변종으로만 분리되어 사용되고 있을 뿐 아직까지 품종으로서 확립되지 않고 있는 실정이며, 현재까지 인삼의 표지인자와 경색발현, 조, 만기 출아, 다소엽 발생 등의 계통간 차이점이 있다는 사실 등으로 인삼의 기초적인 유전적 현상 구명이 이루어지고 있으나 특별한 표지인자가 없어 육종적인 측면에서 어려움이 많다. (최신고려인삼(재배편), 1994) 등위원소에 의한 인삼의 분류는 같은 종이라도 시기별로 또는 생육상태에 따라 band 양상이 달라질 수 있는 등의 제약점이 있으나(et al., 1994) 분자 표지의 일종인 restriction amplified polymorphic DNA(RAPD) 방법은 기술이 매우 용이하고 신속하며 소량의

DNA만이 있어도 측정이 가능할 뿐만 아니라 restriction fragment length polymorphism(RFLP) 기술보다도 상대적으로 위험성이 적어 식물의 종 및 품종간의 DNA 양상과 유전자지도 작성 등에 더 많이 사용되고 있다. (Al-Zahim *et al.* ,1997; Foolad *et al.* , 1998 ; Haynes *et al.* ,1997; 이영경 등 ,1996) 인삼(임용표 ,1990), 사과(Yang *et al.*,1997), 벼(안상낙 등,1996), 감자(박영은 등,1996) 등의 품종 분류를 위한 RAPD marker-선발에 성공적이었다고 보고한 바 있다. 그러나 RAPD 방법은 추출된 DNA의 상태에 따라서 재현성이 매우 다르고, primer의 선정 및 PCR조건 등 실험조건에 따라 다소의 차이가 있어 이에 대한 보완책이 시급히 요구되고 있는 실정이다. 따라서 본 연구는 인삼의 RAPD를 위한 인삼의 DNA 분석 가능성을 진단하고자, PCR의 적정조건을 설정하고 자경종, 풍기황숙 그리고 중국삼과 미국삼의 증폭된 DNA band pattern을 조사하여 그 유연관계를 알아보고자 하였다. 한편 인삼의 재배면적은 연차간 약간씩 상이하나 한국담배인삼공사의 자료(한국담배인삼공사, 1995)에 의하면 96년도의 전국 식부 계획면적은 백삼포가 2,000 헥타, 홍삼포가 800 헥타이다. 이중 홍삼포의 경우 식부 면적과 수매실적 자료(한국전매공사, 1989)를 보면 89년에 이식지정면적은 홍삼포 750 헥타, 백삼포 3040 헥타였고 93년도 수매실적자료(한국담배인삼공사, 1993)에 의하면 홍삼제조용 6년근 수확면적은 488헥타로서 89년시 이식면적 대비 수매면적은 65%이고 나머지 35%의 면적은 중도에 폐포가 되었다. 또 6년근 수확, 수매삼종 53%만 3등삼 이상이고 나머지 47%는 4등과 등외 또는 이에 수매에 응하지 못할 정도로 불량한 삼이었다. 폐포와 4등이하 등급의 원인의 90% 이상은 적변삼이라고 불리는 인삼의 표피 색택이 붉은 삼이 그 원인이다. 이를 요약하면 이식삼의 약 40-50%가 적변삼인 것으로 환산된다. 93년도 수매 실적을 기준하여 볼 때, 적변에 의한 농민의 손실액을 6년근 3등삼 생산시를 가상하여 그 차액은 6년근 4등 이하에 의한 것이 약 95억원, 폐포에 의한 것이 120억, 계 215억원인 것으로 환산된다. 이 금액은 6년에 한한 것이므로 백삼의 경우도 적변발생이 6년근의 비율과 비슷할 것이므로 농민의 손실 총액은 대략 600억원

이 상회할 것이다. 이는 6년근 총 수매액 약 635억과 비슷할 것으로 추정된다. 그러므로 적변이 없는 인삼을 생산하는 것이 인삼재배에서는 제일 중요한 과제이나 지금껏 해결을 못한 것은 복잡한 토양환경 등과 더불어 인삼 식물의 대사와 그 생산물 및 그 산물이 어떤 화합물로 식물체 외부로 유출되고 있고 그 유출물과 토양내의 물질과 결합하여 붉은 색소를 띄는 지의 복합적인 요인을 종합 이해하여야 해결될 수 있을 것임을 연구를 진행하여 온 과정에서 새로운 의문으로 대두되기만 하고 있다. 지금껏 토양과 인삼체내 무기원소에 대한 조사(김명수 등, 1982 ; 김명수, 1986), 미생물에 대한 조사(中田, 1957 ; 오승환 등, 1980 ; 上田, 1909) 등이 있었는데 이들은 각각 별개로 단순요인만 조사하였다. 식물의 대사산물, 외부로 유출되는 물질과 토양내의 물질과 결합성분 등의 연구는 없었다. 또 인삼의 종 중에는 우리나라에서 재배하고 있는 *Fanax ginseng* C. A. Meyer와는 다른 종인 *Fanax quinquefolium* L. (일명 서양삼)은 우리나라 토양 조건에서 *Fanax ginseng* C. A. Meyer와 같은 포지에서 재배한 결과, *Fanax ginseng* C. A. Meyer는 적변삼율이 90% 이상인데 비하여 미국삼은 적변삼이 전혀 발생하지 않음을 발견하였다. (이명구, 1995) 식물의 종간교잡은 어려움이 있으나 땅콩에서 몇 가지 처리로서 교잡을 성공시켜 새로운 품종을 개발(안병옥 등, 1994 ; Halward et al., 1987 ; Jahnson et al., 1956 ; 손용룡 등, 1969)하고 있으므로 인삼도 위의 두 종간에 교잡을 실시하여 적변이 없는 인삼을 육성할 수 있을 것이다. 이 연구의 목적은 RT-PCR을 이용하여 인삼적병에 내성을 가지는 유전자를 탐색하기 위하여 실시되었다. 또한 인삼의 약리효능상 중요시하는 성분은 인삼 사포닌, 즉 ginsenoside로서 지금까지 29종이 밝혀졌다. (Osamu, 1977 ; Sanada et al., 1974 ; Sanada et al., 1974) 본 한국인삼연초연구원에서 20여년간 지역별 산지에서 인삼을 선발하여 순계 분리하는 방법으로 인삼계통을 육성하여 현재 200여 계통을 확보하고 있으며, 이들 계통 중에는 ginsenoside 고함유 계통이 있을 것으로 추정된다. 그리고 최근에는 in vitro에서 세포주 육성 및 기내증식에 의하여 육종연구를 수행하는 방법도 개발되고 있다. 최근에는 자연상태의 전형적인 형질

전환 system인 *Agrobacterium*의 plasmid에 의하여 유도된 crown gall tumor는 일반 조직보다 훨씬 많은 이차대사산물을 생산하게 되는 것을 알게 되었다. (Furuya et al., 1970 ; Hagimori et al., 1982 ; Kanada et al., 1986 ; Tarao et al., 1979) 특히 모상근을 이용할 경우 성장도 빠르며 회수도 매우 쉽게 할 수 있을 뿐 아니라 이차대사산물도 다량 함유하고 있어 매우 좋은 세포주로서 각광을 받고 있다. 토양 미생물인 *Agrobacterium rhizogenes*에 의하여 형성된 모상근은 다른 조직에 비해서 성장도 빠르고 많은 이차대사산물을 함유하고 있어 새로운 생약제제의 생산 세포주로서 활용 가능성이 매우 높을 것으로 생각된다. (Hamill et al., 1986 ; Yoshikawa et al., 1987) 세계 인삼시장 환경에서 고려삼 가격이 타국삼에 비하여 높으면서도 세계 수출시장의 점유율을 지속적으로 유지, 향상시키기 위하여는 고려삼이 가격면에서 상대적으로는 뒤지더라도 우수품질삼 생산만이 그 대책일 것이므로 생리활성물질인 ginsenoside의 종류와 함량이 높은 인삼품종 개발이 시급한 실정이다. 따라서 본 실험은 한국인삼연초연구원에서는 인삼 순계 분리 방법에 의하여 육성된 계통중에서 선발된 ginsenoside 고함유 계통 인삼과 정상삼간의 RAPD 분석에 의하여 ginsenoside에 관련된 유전자를 검색하고 이를 마커로 이용하여서 ginsenoside 고함유 계통을 선발하고 보급하므로써 인삼제품 생산시 커다란 경제적 이익을 줄 것으로 기대된다.

제 2 절 재 료 및 방 법

가. 공시재료

본 연구에 사용된 재료는 한국인삼연초연구원의 고려인삼(*Fanax ginseng*, C. A. Meyer)의 변종인 자경종과 황숙종, 그리고 중국에서 재배된 중국삼 (*Fanax ginseng*, C. A. Meyer), 그리고 미국삼(*Fanax. quinquefolium*, C. A. Meyer)의 잎, 뿌리, 열병을 채취하여 종 및 변종 분류에 사용하였다.

나. Total DNA 분리 및 정제

포장에서 채취한 인삼엽조직 0.3g의 시료를 채취하여 1.5mL의 Eppendorf tube에 넣고 600 μ L의 PCR extraction buffer(1.0M Tris-HCl pH 7.5, 10M NaCl, 0.5M EDTA pH 8.0, 10% SDS)를 첨가하여 완전히 마쇄한 후 30초간 vortex하였다. 이 추출액을 12,000 rpm에서 3분간 원심분리 한 후 상등액 500 μ L를 취하여 새로운 tube에 넣고 phenol: chloroform: isoamylalcohol(25:24:1) 500 μ L를 첨가하였다. 이 용액을 다시 30초간 vortex한 후 3분간 12,000rpm으로 원심분리하여 상등액 300 μ L 취하여 새로운 tube로 옮긴 후 200 μ L의 isopropanol을 첨가하여 2분간 실온에서 방치한 후 4°C에서 10분간 12,000rpm으로 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액은 버리고 70% ethanol용액으로 세척 후 건조하였다. 건조가 끝난 DNA pellet은 100 μ L의 TE buffer를 넣고 현탁한 후 RNase 처리한 후 10 μ L의 3M sodium acetate와 220 μ L의 cold ethanol을 첨가한 후 -80°C에서 30분간 보관한 후 12,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하고, 70% ethanol을 이용하여 세척한 다음 건조하였다. 건조된 DNA pellet을 100 μ L의 TE buffer에 용해시켰다.

다. RAPD를 위한 primer

인삼의 DNA를 이용하여 RAPD분석을 하기 위해서 사용된 primer는 The University of British Columbia(UBC)의 Nucleic Acid-Protein Service Unit(Dr. J.B. Hobbs, Director)에서 제작된 UBC No. 1 - 50을 사용하였으며, 그 sequence는 Table 3-1과 같다.

Table 3-1. The sequence and RAPD of tendon from UBC primers

Primer No. (UBC)	Sequence	Primer No. (UBC)	Sequence	Primer No. (UBC)	Sequence
UBC-1	OCTGGGCTTC	UBC-18	GGGCGTTTA	UBC-35	CCGGGGTTAA
UBC-2	OCTGGGCTTG	UBC-19	GCCCGGTTTA	UBC-36	CCGGGGTTAG
UBC-3	OCTGGGCTTA	UBC-20	TCCGGGTTTG	UBC-37	CCGGGGTTTT
UBC-4	OCTGGGCTGG	UBC-21	ACCGGGTTTC	UBC-38	CCGGGGAAAA
UBC-5	OCTGGGTTCC	UBC-22	CCCTTGGGGG	UBC-39	TTAACCGGGC
UBC-6	OCTGGGCCTA	UBC-23	CCCGCCTTCC	UBC-40	TTAACCGGGG
UBC-7	OCTGGGGGTT	UBC-24	ACAGGGGTGA	UBC-41	TTAACCGGGG
UBC-8	OCTGGGGGTA	UBC-25	ACAGGGCTCA	UBC-42	TTAACCGGGC
UBC-9	OCTGGGCTTA	UBC-26	TTTGGGCCCCA	UBC-43	AAAACCGGGC
UBC-10	GGGGGATTA	UBC-27	TTTGGGGGGA	UBC-44	TTACCCCGGC
UBC-11	CCCCCTTTA	UBC-28	COGGCCTTAA	UBC-45	TTAACCCCGG
UBC-12	OCTGGGTCCA	UBC-29	COGGCCTTAA	UBC-46	TTAACCCCGG
UBC-13	OCTGGGTGGA	UBC-30	COGGCCTTAG	UBC-47	TTCCCCAAGC
UBC-14	OCTGGGTTTG	UBC-31	COGGCCTTCC	UBC-48	TTAACGGGGA
UBC-15	OCTGGGTTTG	UBC-32	GGGGCCTTAA	UBC-49	TTCCCCGAGC
UBC-16	GGTGGCGGGA	UBC-33	COGGCCCCAA	UBC-50	TTCCCCGGGC
UBC-17	OCTGGGCCTC	UBC-34	COGGCCCCAA		

라. 인삼의 RAPD분석

인삼의 종간 및 변종간의 유연관계를 확인하기 위해 먼저 고려인삼인 자경종을 사용하여 Table 3-1에서 나타낸 UBC No. 1-50의 primer를 이용하여 RAPD분석을 실

시하였으며, 그 중 band의 구분이 확실한 primer를 선발하고 이를 이용하여 자경종, 풍기황숙, 중국삼, 미국삼의 종간 분류를 위해 사용하였다. 또한 조직별 DNA의 차이가 PCR이후 DNA band의 양상에 어떠한 영향을 미치는 지를 검토하고자 포장에서 정상적으로 생육하고 있는 자경종에서 잎, 뿌리, 엽병의 시료를 채취하여 시험하였다. RAPD를 행함에 있어서는 template DNA, Taq DNA polymerase, dNTP, primer등이 반응액을 구성하는 필수 요소이며 이들 요소가 적절한 조건하에서 일정 횟수 이상의 반복된 PCR과정을 거쳐야만 특정 DNA의 amplification이 이루어질 수 있다. 본 실험에서는 이러한 요소들이 구비되어 있는 Premix™(바이오니아)에 template DNA 50ng, Primer 10pmol, 멸균수를 첨가하여 총 반응액을 20 μ l로 맞추고, mineral oil을 첨가하였다. PCR반응조건은 predenaturation을 96 $^{\circ}$ C에서 2분 반응 후 denaturation 94 $^{\circ}$ C, 1분, annealing 37 $^{\circ}$ C, 1분, extension 72 $^{\circ}$ C, 2분간의 반응을 DNA amplification을 위해 45 cycle로 고정하였으며 post extension을 72 $^{\circ}$ C에서 15분간한 후 반응을 4 $^{\circ}$ C에서 종료시켰다. PCR이 끝난 후에는 PCR반응액 10 μ l를 1.2% agarose gel에 전기영동한 후 DNA 양상을 조사하였다.

마. 인삼 DNA의 RT-PCR

UltraspecII RNA isolation kit를 이용하여 RNA가 추출되었다. 고려인삼 3년근 1개체중에서 적변이 발생된 부위 (R)와 건전부위 (N)의 RNA를 추출하여 사용하였다. Premix-RT/PCR kit를 이용하여 cDNA를 합성하였는데, cDNA를 합성하기 위하여 5 μ l의 10x RT buffer, 5 μ l의 0.1M DTT, 10 μ l의 1mM dNTP, 120pmol Random hexamer, 3 μ g RNA, 500U RNase inhibitor, 100U reverse transcriptase로 하여 총량 50 μ l로 하였다. Reverse transcriptase를 넣기전에 5분간 실온에 방치하고, RT를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 방치하였다. 이렇게 형성된 cDNA는 PCR을 이용하여 증폭되었는데, 5 μ l의 10x PCR buffer, 4 μ l의 2.5mM dNTP, 20pg의 Random

primer, 20ng의 cDNA를 혼합하여 총량이 50 μ l가 되게하였다. PCR 조건으로서 96 $^{\circ}$ C에서 2분간 predenaturation하고서 96 $^{\circ}$ C에서 1분 denaturation, 42 $^{\circ}$ C에서 1분 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 extension으로서 45 cycle로 수행하고서 최종적으로 72 $^{\circ}$ C에서 15분간 post extension하였다.

바. 내적변성 인삼 계통의 DNA 분석

사용한 시료는 고려인삼(*Fanax ginseng*) 3년근 1개체종에서 적변이 발생한 부위(R)와 건전부위(N)의 RNA를 추출하여 사용하였으며 방법은 인삼의 적변부위와 비적변부위를 각각 구별하여 RNA를 추출한 후 추출된 RNA에서 hexamer와 oligo-dT를 이용하여 RT-PCR를 수행한다. 확인된 특이 밴드로 gene clean방법에 의해서 추출한 후 cloning vector에 재조합하여 염기서열을 분석하였다.

사. Ginsenoside 고함유 인삼계통의 RAPD 양성

50ng의 인삼 template DNA, 10ng의 primer의 조건으로 하여 총 20 μ l의 용량으로 PCR을 수행하였다. Primer로는 UBC(University of British Columbia, Canada) primer를 사용하였다. PCR 반응은 96 $^{\circ}$ C에서 2분간 predenaturation한 후, 94 $^{\circ}$ C 1분, 37 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간씩 45 cycle을 하였고, 최종적으로 72 $^{\circ}$ C에서 15분간 수행하였다. PCR의 최적 Annealing 온도를 구명하기 위하여 37 $^{\circ}$ C, 45 $^{\circ}$ C, 55 $^{\circ}$ C로 달리하여 PCR을 실시하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. Amplified Polymorphic DNA 기술을 이용한 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 DNA 분석

가. 인삼의 RAPD분석

인삼의 부위별로 RAPD banding pattern에 차이가 있는 지를 조사한 결과는 Fig. 3-1과 같다. 잎, 뿌리 및 엽병조직으로 부터 분리한 DNA를 UBC-50 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 약 1.2 kb에서 동일한 1개의 band가 출현되었다. 예 등(예병우 등, 1994)은 사과 품종에서 template DNA를 분리해낸 조직의 차이가 RAPD banding pattern에 미치는 영향을 보고자 후지의 잎, 수피, 꽃잎 및 화분으로부터 분리한 DNA를 각각 이용하여 PCR을 한 결과 모든 조직에서 동일한 band가 출현되었다고 보고하였고, 동일한 식물체에서는 채취부위와 상관없이 모든 조직에서 DNA를 분리하여도 아무런 문제가 없었다고 보고하여 본 실험의 결과와도 유사하였다. 예 등(1994)은 사과나무의 RAPD표지를 탐색함에 있어서 PCR에 관여하는 주요 요소들인 template DNA는 10ng, dNTP primer는 2unit, Taq polymerase는 50 μ M, primer 10ng을 각각 첨가하는 것이 가장 적합한 조건이었으며 PCR횟수는 50회로 하는 것이 가장 적당하다고 하였다.

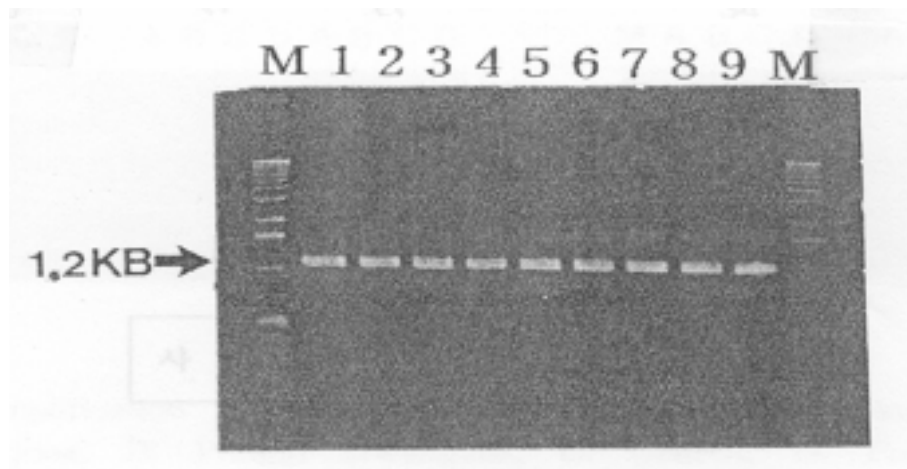


Fig.

3-1. RAPD banding pattern of genomic DNA from various tissues of *P. ginseng* C. A. Meyer using UBC-50 primer. M, molecular marker; 1, 2, 3, Leaf; 4, 5, 6, Root; 7, 8, 9, Stem.

인삼의 종간 유연관계를 확인하기 위해 먼저 고려인삼인 자경종을 사용하여 Table 3-1에서 나타난 50개의 UBC primer를 이용하여 RAPD분석을 실시하였으며 그 중 band의 구분이 확실한 primer를 선발하고 이를 이용하여 자경종, 풍기황숙, 중국삼, 미국삼의 종분류를 위해 사용하였다. 인삼종간의 RAPD분석을 실시하기전에 고려인삼인 자경종을 사용하여 적합한 primer를 선발하고자 50개의 UBC primer를 이용하였다(Table 3-1). 이중 band가 확실한 18개의 primer를 선발할 수 있었으며, 그 결과는 Table3-2에 나타내었다. 선발된 18개의 primer는 자경종, 풍기황숙, 중국삼, 미국삼의 genomic DNA를 대상으로 동일한 조건에서 PCR반응을 실시하였다. 각 개체간 동일 조건에서도 primer종류에 따라서 다양한 band양상을 보였는데 이는 인삼의 종 및 변종간의 차이가 있음을 시사하는 결과라 하겠다. 특히 미국삼의 경우 UBC-6은 1.7kb, 23은 1.7kb, 700bp, 29는 800bp, 34는 600bp, 43은 800bp, 50에서는 1.3kb 등에서 다른 3종

과는 구별되는 band양상을 보였으며, 중국삼의 경우 UBC-6은 1.9kb, 16은 2.1kb, 31은 1.5kb 등에서 특이적 band양상이 관찰되었다. 또한 자경종의 경우 UBC-1은 1.6kb, 2.2kb에서 25는 1.2kb, 26은 1.5kb 등에서 풍기황숙의 경우 UBC-19에서 1.3kb, 25는 1.5kb, 31은 1.5kb에서 다른 종과 구별되는 band를 보였다. 그 결과는 Fig. 3-2와 Table 3-2와 같다. 이에 따른 RAPD 분석결과는 계통분석용 프로그램인 Cluster analysis 방법중 Similarity Index를 구하여 3개의 종과 1개의 고려인삼 변종의 원연관계를 보고자한 결과 자경종과 풍기황숙은 0.816의 SI를 가져 근연관계를 가졌고 중국삼은 1.034 SI로서 자경종과 약간의 차이를 가졌으며 자경종과 미국삼과는 상당한 변이의 차이를 보임으로 종간 구별이 용이하였다(Fig. 3-3). 임(1990)은 RAPD를 이용한 인삼의 변종간 분석 및 변종내 육종계통의 분류를 실시하여 육종계통을 조기선발을 위한 marker를 개발하여 외국으로부터 필수입되는 중국인삼과 고려인삼의 감별법을 개발하고자 인삼의 RAPD 이용가능성을 타진하고 동시에 적절한 primer를 선

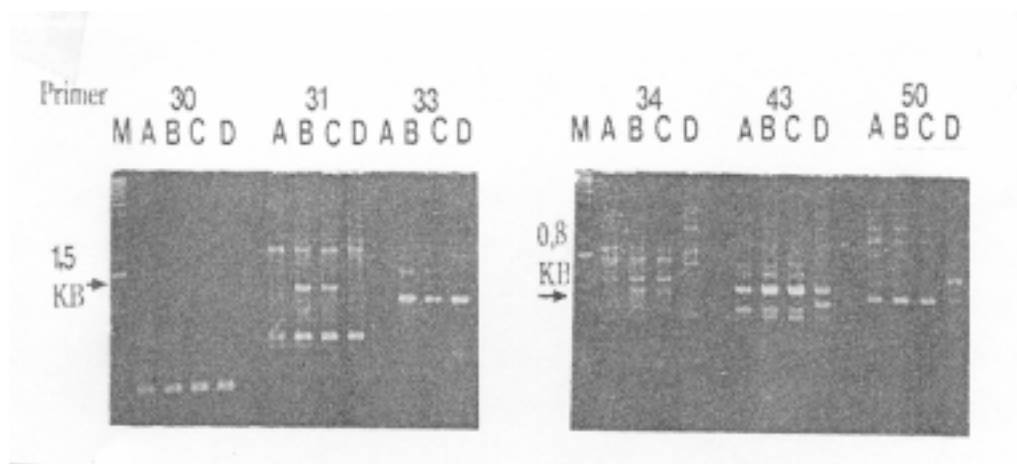


Fig. 3-2. PCR amplification of DNA from 4 species (*Panax ginseng*) using primer: A: Jakyungjong, B: Punggi Hwangasuk, C: China, D: *Panax*

quinquefolium, M, Molecular marker(1Kb DNA ladder).

발하고 이를 이용하여 고려인삼의 변종 및 일부 외국 변종의 유전적 차이를 보고하였으며, 이미 인삼이외에도 사과(Yang *et al.*, 1997 ; J *et al.*,1997), 벼(안상낙 등,1996) , 감자(박영은 등, 1996) 등의 품종 분류를 위한 RAPD marker-선발에 성공적이었다고 보고하였다.

Table 3-2. Bands of ginseng DNA amplified by PCR using UBC primers.

UBC Primer No.	Band Size Formed															
	<0.5 Kb				0.5-1.0 Kb				1.0-1.5 Kb				1.5 Kb>			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1									1	1	1					
4					1	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	3
6								1				1			1	
12									3	1	1		1	2	2	2
13									1	1				1	1	1
16					1	1			2	2	1		1	1	2	
17									1	1			1	1	1	
19									1							
23								1	1	1	1	3	3	3	3	2
25									1	2						
26									1							
29							1	2	1	1	2	1	2	2	2	1
30	1	1	1	1												
31					2	2	2	1		1	1		1	1	1	2
33							1		2	2	2	1	1	1	1	
34								1	1	1	1	1	2	2	2	4
43					2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2
50		1			1	1	1	1	1	1	1		5	4	2	

A, *Fanax ginseng*(Jakyungjong); B, *Fanax ginseng*(Punggi Hwangsuk); C, *Fanax ginseng*(China); D, *Fanax quinquefolium*.

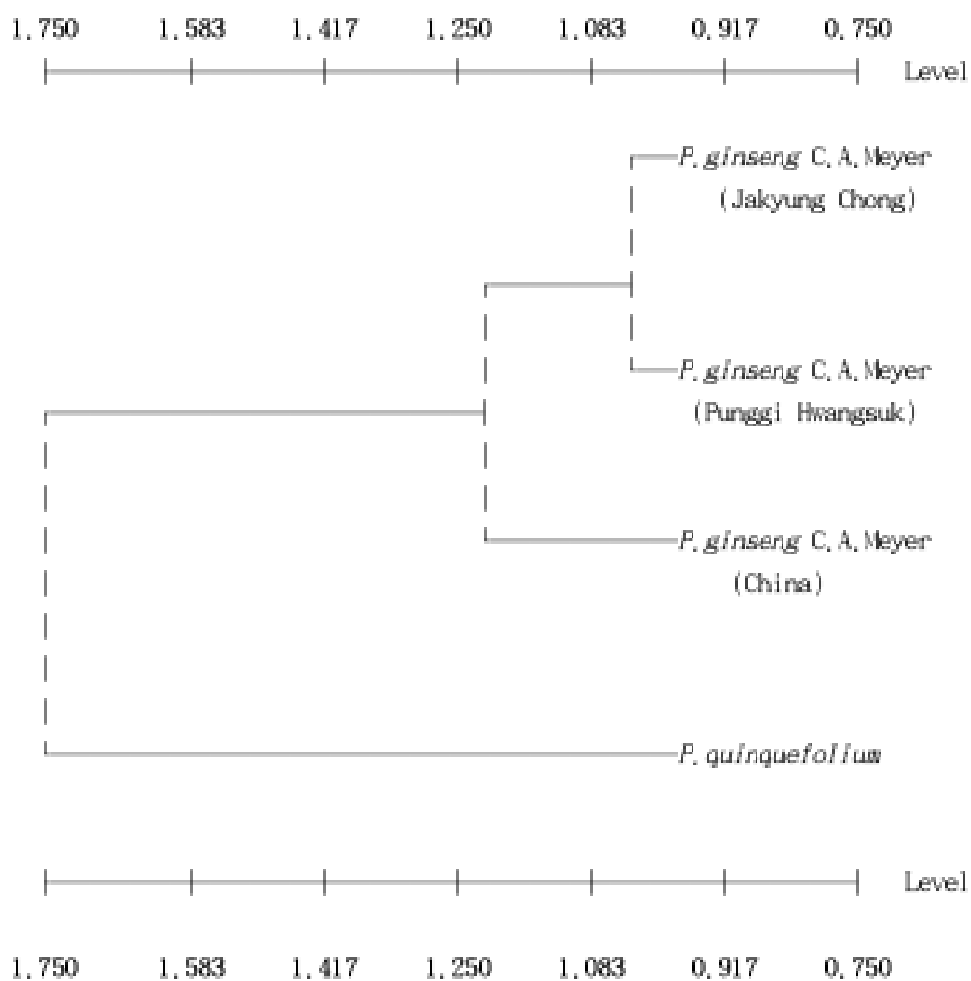


Fig. 3-3. Phenogram of clustering pattern for 4 species and strain of ginseng.

2. 분자마커에 의한 인삼 적변관련 유전자의 분석

가. RAPD분석을 위한 PCR 조건

20 μ l의 Premix(한국생공)에 부가되는 Template DNA, primer의 량을 결정하기 위하여 실험한 결과, 처리간 유의한 차이는 나타내지 않았으나 50ng의 template DNA, 10ng의 primer로서 PCR을 수행하는 것이 가장 구분이 용이한 결과를 나타냈다(Fig. 3-4).

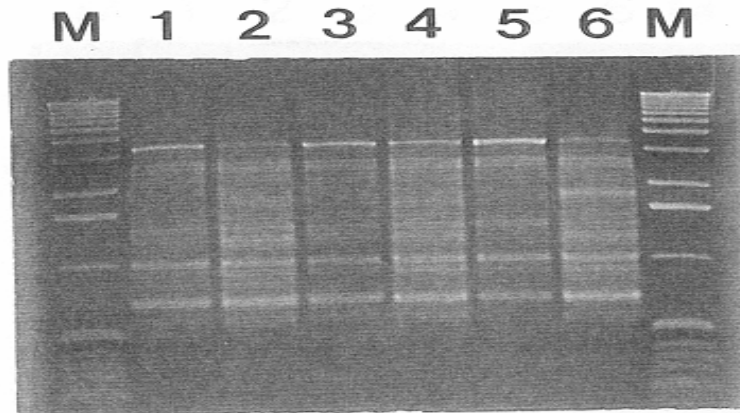


Fig. 3-4. Banding pattern of *Panax ginseng* according to the concentration of DNA and primer. M, Marker: 1, 10ng DNA and 5ng primer: 2, 10ng DNA and 10ng primer: 3, 25ng DNA and 5ng primer: 4, 25ng DNA and 10ng primer: 5, 50ng DNA and 5ng primer: 6, 50ng DNA and 10ng primer

나. RAPD를 위한 primer 선정 및 RT-PCR

300개의 UBC primer중 91개의 primer를 선정하여서 이를 이용하여 RAPD를 수행하였다(Fig. 3-5).

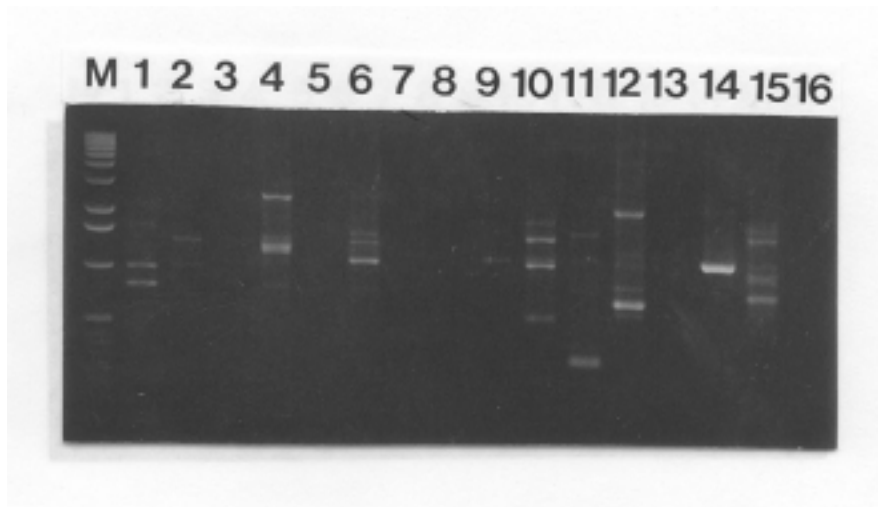


Fig.

3-5. PCR amplification for primer selection.

M, Marker: 1, 4, 7, 10, 13, *Fanax ginseng*: 2, 5, 8, 11, 14, *P. quinquetotium*: 3, 6, 9, 12, 15, *P. japonicum*, 1, 2, 3, UBC-30: 4, 5, 6, UBC-31: 7, 8, 9, UBC-33: 10, 11, 12, UBC-34: 13, 14, 15, UBC-43.

DNA 수준에서 적변저항성 유전자를 탐색하는 대신 RNA 수준에서 탐색하는 방법인 RT-PCR을 사용하는 이유는 RAPD를 사용할 경우 너무 많은 band의 차이가 나와서 그 band가 적변과 관련된 유전자인지를 식별하는 데에 어려움이 있을 것으로 사료되어 1개의 개체내에서 적변을 유발시키는 부위와 유발시키지 않는 부위의 RNA를 추출하여 유전자 발현을 나타내는 부위에서 band의 양상을 살펴보면 그 차이가 나는 band

에서 적변을 유발 또는 저항성을 나타내는 유전자가 될 가능성이 높아질 것을 가정하여서 RT-PCR을 수행하였다. 인삼의 RNA로부터 합성된 cDNA를 UBC-13, 25, 64 등의 primer (Table 3-3)를 사용하여 위에서 선정된 최적조건, 50ng DNA와 50ng primer를 사용하여 PCR 반응을 한 결과 적변 부위와 비 적변 부위간에 cDNA 양상의 차이를 발견할 수 없었다 (Fig. 3-6). 그리고 annealing 온도를 40°C와 42°C로 조사한 결과 거의 차이가 없었지만 42°C에서 약간 더 선명한 band를 확인할 수 있었다. 그러나 UBC-33 primer 사용 시 약 1.2kb에서 정상삼의 cDNA에서 발견되지 않는 밴드가 적변삼의 부위에서 발견되었으며(Fig. 3-7), 이 부위가 적변을 유발시키는 유전자부위일 가능성이 있는 것으로 사료된다. 이러한 차이를 나타내는 band는 차후 cloning하고 sequencing하여 그 homology를 조사하므로써 그 유전자가 적변을 나타내는 유전자와 관계가 있는 지를 확인해 봐야 할 것으로 사료된다. 유전자가 적변에 내성을 나타내는 유전자로서 판명이 되면, 선발 마커로서 이용되어 적변에 강한 품종을 조기에 선발하므로써 노동력을 감소시키고 품질이 우수한, 즉 적변 발생률 적은 품종 육성을 해 나갈 수 있을 것이다. 또한 적변 저항성 유전자를 도입한 새로운 인삼품종을 형질전환 방법에 의하여 개발할 수 있다. 현재 4개의 primer중 1개의 primer에서만 차이가 나는 band를 발견하였지만, 좀 더 많은 primer를 사용하여 그 차이 band를 발견하고 homology를 확인하여 적변과의 관계여부를 조사하므로써 좀 더 확실히 적변과 관계된 유전자를 찾아 낼 수 있을 것이다.

Table 3-3. List of oligonucleotide primers used for RT-PCR analysis

Code	Sequence	G+C content
UBC-13	CCTGGGTGGA	70%
UBC-25	ACAGGGCTCA	60%
UBC-33	CCGGCTGGAA	70%
UBC-64	GAGGGCGGGA	80%

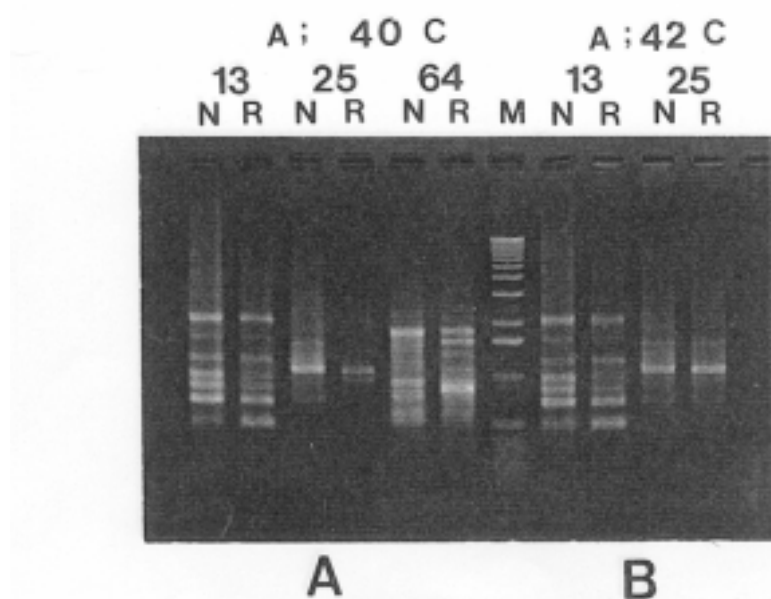


Fig. 3-6. Banding pattern amplified by PCR according to annealing temperature, 40°C and 42°C, of cDNA constructed from RNA extracted from rusty (R) and normal (N) portion of ginseng using primers, UBC-13, 25, and 64.

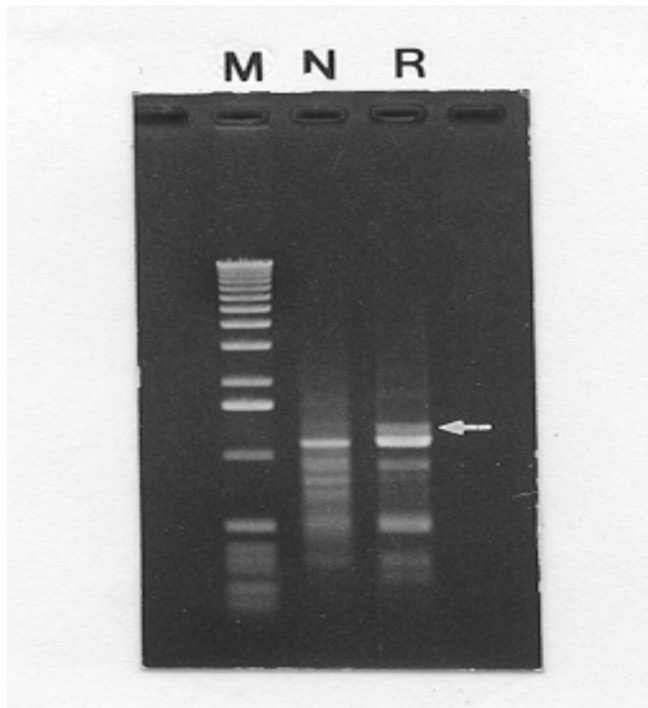


Fig. 3-7.

Banding pattern amplified by PCR on rusty(R) and normal (N) portion of ginseng induced by UBC-33 primer.

다. 적변관련 cDNA 단편의 data 분석

- 1) 적변부위와 비적변부위에서 RNA를 추출하여 cDNA로 합성한 후 33번 primer (CCGGCTGGAA)를 이용하여 PCR를 수행한 결과 차이가 나는 2개의 밴드중 1.2kb의 경우에는 적변부위에서만 나타났으며, 1.6kb의 경우에는 적변부위에서 진하게 나타났다. 또한 64번 primer(GAGGGCCGGA)에서는 약 650bp에서 적변부위에서 약하지만 비적변부위에서는 나타나지 않은 밴드를 확인할 수 있었다. 이 밴드

를 추출하여 염기서열을 분석한 결과는 Figs. 3-8, 9, 10과 같다.

- 1.2kb sequence : GCTTG CATCC ACGCG TTGGG AGCTC TCCAT ATGGT CGACC TGCAG
 GCGGC CGCGA ATTCA CTAGT GATTG CCGCT GGAAG GAAGG AATTT TACTC TTGCG CAGTG
 CCTCC TTCAC ATTAG CTTGA AGTTT TTGAG GTTCT ACATT GGTAT CGATA TCCAG ACCCT
 CAAAT ATCTT ACCCC CCAGA TTACC CGCTT CCTGA ATGCC GCTTC CTGGG ATAGA GCGGG
 CTCGG GAGAG AATGC TGCCA GATGC AGAGG CCAGT GAGCC GATGG CGCTG CCGGT AGCTT
 TAACT GCGCT ACCCA CCAAC ATTGC GCTTA CTATG CTGGT AATAA TCAAC GATGT GGCCC
 AGACG AGGAA ACCAT GAATG AAGCC ATCAT TAGCG GCCAG TGGGC CTGNA NCAAA AGCCC
 CAGCA TCCAG GCTGA CGATA ATGGA CCCAC CTGTC CAAAA CAGCA TGGTC ATGCT TTGCC
 CCATT ATCGG CANCC TCACT GAGAG GGTNC TACCA AAAGC AAGCG GGGNG CNANG GAANN
 ANAGC AGNNC CCACA CNCCG GANAC CACNG CAAGT AGGAN CAGCG CAGCT CTTCT CCAGG
 CGAAA GCGGT CAATC TCATT TCAGG ACCGA TCGAC CAAAA TAAAA GTACC AGACC ACTAA
 GTATA GCGAA CAAGG TGAAT AACAA ACAA GACTG CTTAG TACGA AGAGT TTACA GCGGG
 AATCG AATTC CCGCG NGCCG CCCAT GCGCG GCGGG GAGCA TGCGA CGCGG GAATG TTTGC
 CTTTT CTTCT TCGAG TTCAA CTATC GCCAG TTCC

Fig. 3- 8. Sequences of 1.2 kb of PCR product.

- 1.6kb sequence :GCTTG CTCCA CGCGT TGGGA GCTCT CCCAT ATGGT CGACC TGCAG GCGGC
 CGCGA ATTCA CTAGT GATTG CCGCT GGAAC AGTAA TAGCT ATTGA AATTT TCTAT TTTNT
 ATTCA CCCAT GATCT GGCTT GGTCG ACCCG ATCAT GATAT TTAGG GATGG GACCT TTTCT
 CGAAA AACTC TGGAT CCTGT GTCCA GAAAG TGCAT CTCTT TCTCT GCCAT TCCTA CTTTC
 TTGAT AGTTA TAACC TAATG AATAA GGTCG ATTCA GTCCA GGAGG CTAGT TTCAA ACCCG
 GACTC GCTGA GGTTT ACACA CTTTT CTTTC TTTAT GAAAT TACAC GCAAG CTGGA AGCTT
 GGTAC TAATA GCTTA TAGAG TATAG AGGGG CTATG TAGAG GCGCG CAACT GTGCT TCCTC
 GCTTC GCCAA GAAAA GCACT TGGGT GAAGG GCGCG CTACA GGCTT ACGCT TGNTC CNGAA
 TCTNC GGCTT TTTGG CTGTA TCTTT GCTCC TTTTC TTCGN CTTAA NTNGT CAGCN CTNGC
 TAGAA NNTNG ATTCA AACTG AATAT GGNAC TATGG ATATG CTCGN NCTCC CCGTT CCAAA
 AAACA ANTGC GNTAA NTGAA NGCAG GCGCT TACTT ATCAC AAGAT TCTTN TTAGA TTNTT
 CGGCA CACTC GTGGG GTTCG CTNGA AGTCG TCGCG AGCTC TAGGT TTGAA GCTTC AACAC
 AGTCA CTCCT TAGTA GCTCG TTGCT CTACA ACTTC TCTTT GGCTC GCGCC TATCT CTAAG
 GGGGC TTACG CACAA CATTG GCTCT CTGTT CAGTA GCGGT TTCTT CATTG TTTAG ATAGC
 AGCGT GAGAG CTCTG AAATT CCATC AGGTC CTTAG TTCCA GTCGA ATCGC GAGCA AAGCT
 CGACA CTGCT AGCGA AGCTC TACGA CAGAC GATTT CAATT ATTTG AATTA CAGAG CCAAT
 CACAC TGCTC TCTCT CTTTC CAGCC GGAAT CGAAT TCCCG CGNGC CGCCA GCGCG GCGGG
 GAGCA TGCGA CGTCG

Fig. 3- 9. Sequences of 1.6 kb of PCR product.

- 0.65kb sequence : TGGGC CCGCG TCGCT GCTCC CGGCC GCCTG GCGGC CGCGG GAATT
CGATT TAAGA GAAGA CGCT CTTCT CTTAG GTCCT TTTTT TTCAG TGTA A CACAG GAAAG
CGCCC TCTTT TTGTC ATCCC TGCAG CTTTC CAGAT TTTCT ATTGA ACGCA TGGCG TAGCT
AGGAC CCTTC AAATC ATGTT TGAGC TTATT GTTCA AAGGA AGGGG GTTGC CTCGG GTGGC
TATTT GAGTA AGGCT GGAAA GAATG CCCGC CAAGT TCAGA TAAGG GAATG CTTCC CCCAA
CCATT AAAGG AAAGG CTOGA CCAAA GGGAG AGGAG ATGAA AGGGG GAAGG AAAAG GCTTC
GGAGA TCGAG ATTTT CTTTG TTTTT AATCG AAAAC GAAGA AGGCC GAGGA TGGCC TACGG
TCCGT CTTAT CTGAA GGGAA CACGC TTTTT CGACC GCGGT GGTAT GATTG TCGGG CTCTC
TCCTC GTCOC GCCCT CAATC ACTAG TGAAT TCGCG GCCGC TGCAG GTCGA CCATA TGGGA
GAGCT CCCAA CCGGT

Fig. 3-10. Sequences of 0.65 kb of PCR product.

3. Ginsenoside 고함유 인삼계통의 RAPD 양상

가. 인삼근 중에서 ginsenoside 고함유 계통의 RAPD 양상

UBC primer를 사용하여 인삼의 사포닌이 보통 함유계통(KG101) 및 고함유계통(KG103)의 차이를 분석하였다. 36종의 primer중에서 band를 나타낸 것은 28종이었으며, 이중 UBC-6, 29, 33, 105, 125, 149, 157, 159, 174, 177, 181에서 KG101에서는 형성되지 않는 band가 KG103에서 형성되었으며, UBC-29, 33, 125, 157, 181에서는 KG101에서 band를 형성하였다 (Fig. 3-11-1, 2, Table 3-4). 또한 2차로 UBC-181부터 300까지 선발한 50종의 primer를 대상으로 band를 조사한 결과 32종에서 KG101 및 KG103 모두 band가 형성되었으며, 그 중 9종에서 서로 다른 차이를 보였다. 특히 UBC-181, 218, 220, 250은 KG101에서 band를 형성하였고, UBC-211, 225, 239, 248에서는 KG103에서 band가 형성되었고, UBC-270에

서는 KG103에서 매우 진한 band가 형성되었다.

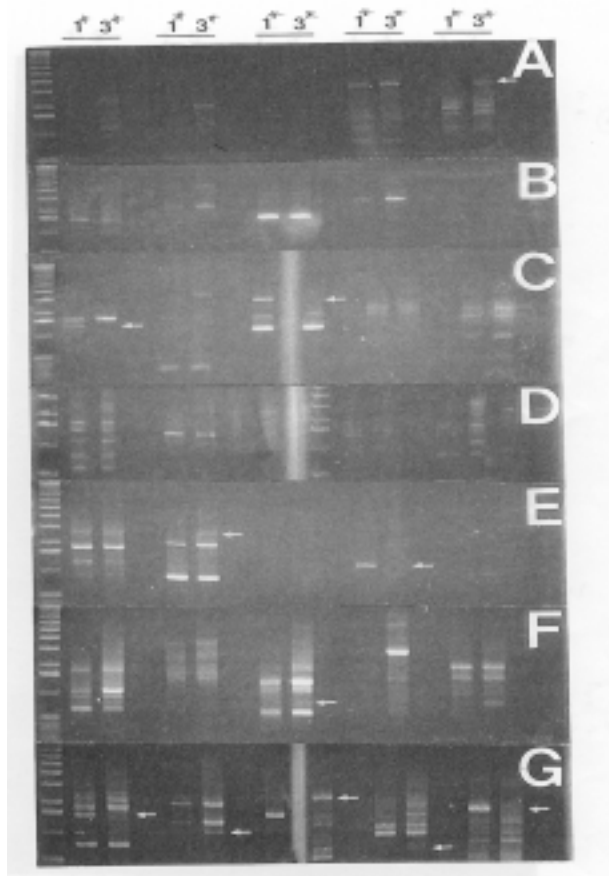


Fig. 3-11-1. RAPD banding pattern of ginseng roots containing normal(1) or high ginsenoside(3) according to different primers. A : UBC-1, 2, 3, 4, 6, (from left to right, respectively) B : UBC-12, 13, 17, 23, 25, C : UBC-29, 30, 33, 34, 63, D : UBC-77, 82, 83, 89, 100, 102, E : UBC-193, 105, 106, 125, 127, F : UBC-137, 147, 149, 150, 155, G : UBC-157, 159, 174, 177, 181.

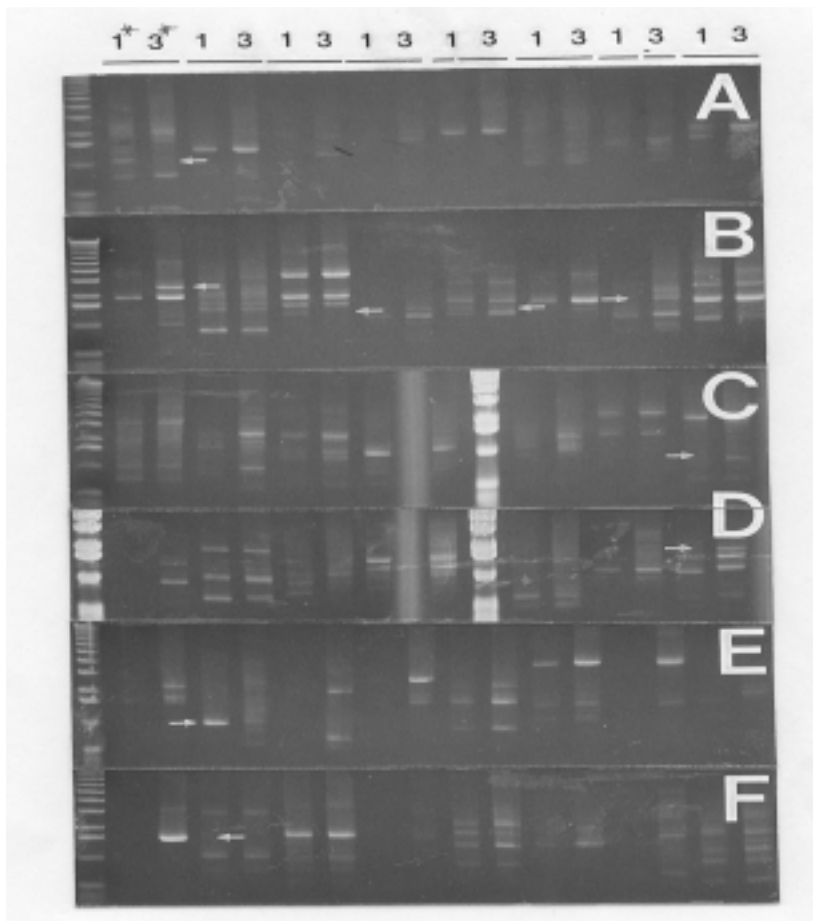


Fig .

3-11-2. RAPD banding pattern of ginseng roots containing normal(1) or high ginsenoside(3) according to different primers. A : UBC-181, 184, 190, 198, 199, 203, 204, 208, (rom left to right, respectively) B : 211, 213, 218, 219, 220, 222, 225, 226, C : 228, 230, 231, 232, 234, 237, 239, D : 240, 241, 243, 244, 245, 246, 248, E : UBC-249, 250, 251, 253, 254, 262, 264, 266, F : UBC-270, 273, 275, 276, 280, 282, 283, 285.

Table 3-4. Characteristics of banding pattern on KG101 and KG 103 according to selected primers

UBC Primer Number	Band Shown		Molecular Weight (Kb)	Number of Band
	KG101	KG103		
6		0	3	5
105		0	2, 5	3
149		0	0, 75	4
159		0	1	3
174		0	2, 5	3
177		0	0, 7	5
29	0		1, 5	2
33	0		3	3
125	0		1	1
157	0		1, 6	5
181	0		1, 8	3
218	0		1, 4	4
220	0		1, 5	4
250	0		1	1
211		0	2, 5	4
225		0	1, 8	3
239		0	0, 8	3
248		0	1, 7	5

나. 인삼모상근종에서 ginsenoside 고함유 세포주의 RAPD 양상

선발한 79종의 primer중에서 모두 band를 나타내지 않거나 확인하기가 어려운 것은 약 10여종이었으며 대부분 band를 형성하였다 (Fig. 3-12). 그러나 두 종간의 차이는 거의 없었으며, 다만 106, 198, 184, 181, 208번에서 다소 차이를 보여, 추후 재확인 후 확실하게 band 차이가 난다면 vector에 ligation 시킨 후 염기서열을 분석할 계획이다. RAPD 분석은 William 등(1990)에 의해 개발된 방법으로서 염기의 수가 9-10개 정도되는 oligonucleotide를 primer로 사용

하여 식물체의 게놈 DNA를 무작위로 PCR 증폭 후 증폭된 산물을 전기영동 하여 분석하는 방법으로 분석절차가 간편하여 최근 많은 실험실에서 사용하고 있는 방법이다. 이러한 RAPD marker가 ginsenoside 고함유 인삼을 선발하기 위하여 본 실험에서 수행되었다. 사용된 36종의 primer-중에서 모두 band를 나타낸 것은 28종이었으며 이중 11종에서 밴드의 차이를 보였다. 이러한 band의 차이는 정확히 ginsenoside와 관련된 유전자의 band 때문인지는 band를 sequencing한 다음 blast search를 통하여 homology를 확인하는 작업을 거쳐야 될 것으로 사료되어 이 부분에 대해서는 계속 실험을 해 나갈 계획이다. 또한 1종류씩의 ginsenoside 보통함유와 고함유 인삼근으로 확인된 band의 차이를 바탕으로 하여 좀 더 많은 계통의 인삼을 시료로 사용하여 통괄적인 band의 차이를 확인해야 될 것으로 보인다. 이러한 연구의 결과로서 인삼에 대해 ginsenoside 고함유 marker가 선발되면 유전자 분석과 조작으로 신품종개발용 자원으로 활용하여 획기적인 인삼 신품종 육성에 활용할 수 있을 뿐 아니라 순계분리에 의하여 선발된 ginsenoside 고함유 인삼계통은 경작자에게 대량 보급하여서 고품질 인삼을 생산할 수 있으리라고 기대된다. 모상근 배양기술을 이용한 2차대사산물의 생산 연구는 모상근이 지니는 여러 가지 장점, 즉 유전적, 생화학적 안정성, 빠른 성장속도, 모식물체와 동일한 유용산물 합성능력 등이 밝혀짐에 따라 배양조건을 최적화 하여 ginsenoside 고함유 인삼을 다량 생산하려는 연구가 현재 진행되고 있다 (Hwang et al., 1989; Yang et al., 1996; Yoshikawa). 이러한 모상근 중에서 ginsenoside 고함유 인삼을 선발하기 위하여 79종의 primer를 사용하여 개체간에 차이가 나오는 지를 확인한 결과 두 종간의 차이가 거의 없었으나 5개의 primer에서 차이가 나는 밴드가 형성되어 추후 염기서열분석을 할 예정이며, 이로 인하여 ginsenoside에 관련된 유전자가 발견된다면 이 유전자를 형질전환에 의해 모상근에 강하게 발현시켜서 ginsenoside 고함유 인삼을 기내에서 단시간에 대량증식을 할 수 있을 것으로 기대된다.

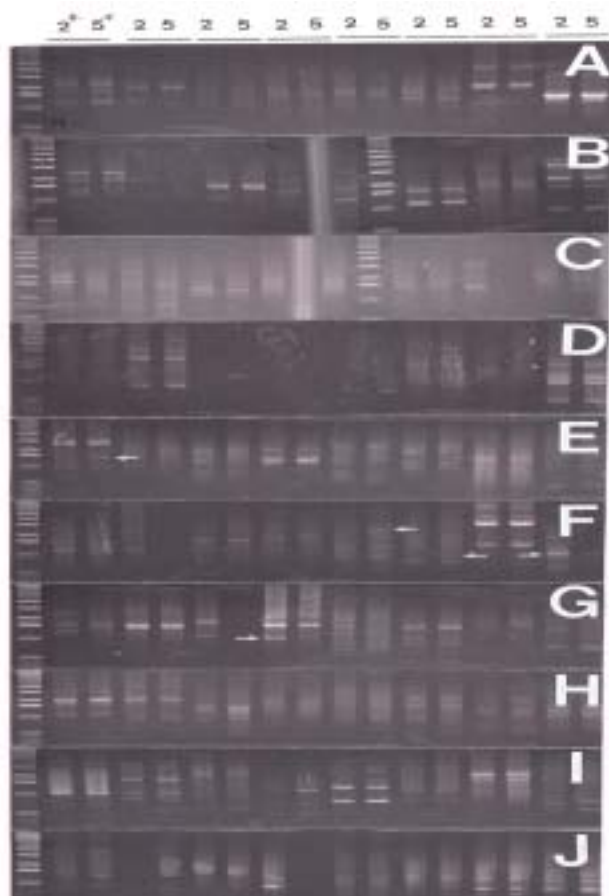


Fig. 3-12. RAPD banding pattern of ginseng hairy root containing low ginsenoside (2) and high ginsenoside(5). A : UBC-1, 2, 3, 4, 6, 12, 13, 17(from left to right, respectively), B : UBC-23, 25, 29, 30, 33, 34, 50, C : UBC-63, 64, 67, 70, 71, 72, 73, D : UBC-77, 82, 83, 89, 100, 102, 103, 105, E : UBC-106, 125, 127, 137, 147, 149, 150, 155, F : UBC-157, 159, 174, 177, 181, 190, 198, G : UBC-199, 203, 204, 208, 211, 213, 218, 219, H : UBC-220, 222, 225, 226, 228, 230, 231, 232, I : UBC-234, 237, 239, 240, 241, 243, 244, 245,

제 4 절 요약

1. Amplified Polymorphic DNA 기술을 이용한 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 DNA 분석

인삼의 종 및 변종간의 유전적 다양성을 식물의 분류학적 연구에 이용하여 품종 육성을 위한 기초자료로 활용하고자 인삼 조직의 DNA를 사용하여 RAPD primer를 선정하고 RAPD양상을 조사하고자 수행되었다. 인삼의 RAPD를 수행함에 있어서 DNA분리에 이용되는 조직의 차이가 PCR이후 DNA band 양상에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하고자 포장에서 정상적으로 생육하고 있는 자경종에서 조직별로 시료를 채취한후 primer를 사용하여 PCR을 수행하여 나타난 band의 양상은 모든 조직에서 동일한 band를 형성하였다. 50개의 서로다른 10-mer random primer를 이용하여 band가 확실히 나타나는 18개의 primer를 선발하여 자경종, 풍기황숙, 중국삼, 미국삼의 DNA를 사용하여 PCR 증폭을 하였다. 그러한 PCR product를 1.2%의 Agarose gel에 전기영동하여 banding pattern에 따라 분석하였다. 이러한 RAPD 결과를 Cluster analysis 방법을 사용하여 similarity index(SI)로서 원연관계를 조사한 결과 자경종과 풍기황숙이 근연관계를 가졌고 중국삼은 자경종과 약간의 차이를 가졌으며 또한 자경종, 풍기황숙, 중국삼은 미국삼과 차이를 나타냈다.

2. 분자마커에 의한 인삼 적변관련 유전자의 분석

고려 인삼종 폐포와 4등급 이하를 유발시키는 원인 중 90% 이상이 적변삼이라고 불리는 인삼의 표피 색택이 붉은 삼이 그 원인이다. 이러한 적변삼은 미국삼보다는 고려인삼에서 다량 발견되는 바, 적변은 유전적 요인이 있다고 보여진다. 그러

므로 이 연구의 목적은 RT-PCR을 이용하여 인삼적변에 내성을 가지는 유전자를 탐색하기 위하여 실시되었다. 고려인삼 3년근 1개체종에서 적변이 발생된 부위와 건전부위의 RNA를 추출하여 형성된 cDNA를 여러개의 random primer를 사용하여 PCR 증폭을 한 결과 정상부위의 cDNA에서 발견되지 않는 band가 적변삼의 부위에서 발견되었다. 따라서 band가 형성된 부위의 유전자가 적변과 관련된 가능성이 있는 것으로 사료되고 이러한 유전자는 향후 염기서열을 분석하여 어떠한 유전자인지 판명을 하여야 하며 적변관련 유전자이면 선발마커로서 사용되고 또한 형질전환을 통한 적변내성 인삼계통을 육성할 수 있을 것이다.

3. Ginsenoside 고함유 인삼계통의 RAPD 양상

인삼의 약리효능상 중요시하는 성분은 ginsenoside로서 본 한국인삼연초연구원에서는 인삼을 선발하여 순계 분리하는 방법으로 인삼계통을 육성하여 현재 200여 계통을 확보하고 있으며, 이들 계통 중에는 ginsenoside 고함유 계통이 있을 것으로 추정된다. 그리고 최근에는 in vitro에서 세포주 육성 및 모상근과 같은 기내증식에 의하여 육종연구를 수행하는 방법도 개발되고 있다. 따라서 본 실험은 선발된 ginsenoside 고함유 계통 인삼과 정상삼 간의 RAPD 분석에 의하여 ginsenoside에 관련된 유전자를 검색하고 이를 마커로 이용하여서 ginsenoside 고함유 계통을 선발하고 보급할 목적으로 행하였다. 인삼근과 모상근으로부터 DNA가 추출되고 UBC primer를 사용하여 인삼의 사포닌이 보통 함유계통(KG101) 및 고함유계통(KG103)의 차이를 분석한 결과 36종의 primer중에서 band를 나타낸 것은 28종이었으며 또한 많은 종에서 KG101과 KG103의 band 차이를 나타내었다.

참고문헌

- Al-Zahim, M., Newbury, H. J. and Ford-Lloyd, B. V. : *hortScience* **32**(6), 1102 (1997).
- 안병옥, 김석동, 박희운, 박장환, 김광호 : 한국육종학회지 **26**, 394 (1994).
- 안상낙, 박희운, 최해춘, 문헌팔 : 한국육종학회지 **28**(2), 178 (1996).
- Foolad, M. R., Chen, F. Q : *Plant Cell Reports* **17**, 306 (1998).
- Furuya, T., Kojima, H., Syono, K. and Ishill, T. : *Chem. Pharm. Bull.* **18**(11), 2371 (1970).
- Hagimori, M., Matsumoto T. and Obi, Y. : *Plant Physiol.* **69**, 653 (1982).
- Halward, T. M. and Stalker, H. T. : *Crop Sci.* **27**, 456 (1987).
- Hamill, J. D., Parr, A. J., Robins, R. J. and Rhodes M. J. C. : *Plant Cell Reports* **5**, 111 (1986).
- 한국담배인삼공사. 1995.
- 한국인삼연초연구원 : 최신고려인삼(재배편) (1994).
- 한국인삼연초연구원 : 최신고려인삼(재배편) (1996).
- Haymes, K. M., Henken, B., Davis, T. M. and van de Weg, W. E : *Theor. Appl. Genet.* **94**, 1097 (1997)
- Hwang, B. and Ko, K. M. : *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **4**, 288 (1989).
- Jahnson, E. L. and Smith, B. W. : *Amer. J. Bot.* **43**, 250 (1956).
- Kanada, H., Okamura, N., Satake, M., Harada, H. and Shinomura, K. : *Plant Cell Reports* **5**, 239 (1986).
- 김명수 : 인삼연구보고서(재배분야), 한국인삼연초연구소, p. 797 (1986).
- 김명수, 목성균 : 인삼연구보고서(재배분야), 한국인삼연초연구소 (1982).
- 이명구 : 인삼연구결과 보고서(재배분야), 한국인삼연초연구원 (1995).

- 이영경, 율용취, 정일선, 이종순, 임상중, 송인규, 김달용 : 한국육종학회지 28(3), 332 (1996).
- 암용표 : 고려인삼학회지 1이4(2), 310 (1990).
- 森田俊信 : 廣島大學, p. 1 (1986)
- Osamu, T. : 고려인삼학회지, 2(1), 9 (1977).
- 오승환, 박창석, 인삼연구보고서(재배분야), 고려인삼연구소 (1980).
- 박영은, 김관수, 정승룡, 유영숙, 송용남, 임학태 : 한국육종학회지 37(3), 386 (1996).
- Sanada, S., Kondo N., Shoji J., Tanaka O. and Shibata S. : Chem. Pharm. Bull. 22(2), 421 (1974).
- Sanada, S., Kondo N., Shoji J., Tanaka O. and Shibata S. : Chem. Pharm. Bull. 22(10), 2407 (1974).
- Schulz, B., Westphal, L. and Wricke, G. : *Euphytica* 74, 67 (1994).
- 손용룡, 진정일 : 한국육종학회지 1, 13 (1969).
- 中田 : 일본 작물도편 p. 607 (1957).
- Tarao, S., Kato, K., Shiraishi, M. and Morimoto, H. : J. Org. Chem. 44(5), 868 (1979).
- 上田 : 일본위생학회지 5(2) (1909).
- Williams, J.G.K., Kubelick, A.R., Livak, K. J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. : *Nucleic Acids Res.* 18, 6531 (1990)
- Yang, D.C., Choi, H. Y., Kim Y. H., Yun, K. Y. and Yang, D. C. *Korean J. Ginseng Sci.* 20, 318 (1996)
- Yang, H. Y. and Korban, S. S : 1997, *J. Amer. Soc. hort. Sci.* 122(1), 47 (1997).

- 예병우, 박한용, 신용여, 이돈균, 김정호, 고광출 : 서울대학교 박사학위논문 (1994).
- Yoshikawa, T. and Furuya, T. : Plant Cell Rep. 6, 449 (1987)
- Yoshikawa, T. and Furuya, T. : Plant Cell Reports 6, 449 (1987).
- 김명수 : 인삼연구보고서(재배분야), 한국인삼연초연구소, p. 797 (1986).
- 김명수, 목성균 : 인삼연구보고서(재배분야), 한국인삼연초연구소 (1982).
- 박영은, 김관수, 정승룡, 유영숙, 송용남, 입학대 : 한국육종학회지 37(3), 386 (1996).
- 森田俊信 : 廣島大學, p. 1 (1986).
- 上田 : 일본위생학회지 5(2) (1909).
- 손응룡, 진정일 : 한국육종학회지 1, 13 (1969).
- 안병옥, 김석동, 박희운, 박장환, 김광호 : 한국육종학회지 26, 394 (1994).
- 안상남, 박희운, 최해준, 문헌팔 : 한국육종학회지 28(2), 178 (1996).
- 예병우, 박한용, 신용여, 이돈균, 김정호, 고광출 : 서울대학교 박사학위논문 (1994).
- 오승환, 박창석. 인삼연구보고서(재배분야), 고려인삼연구소 (1980).
- 이명구 : 인삼연구결과 보고서(재배분야), 한국인삼연초연구원 (1995).
- 이영경, 윤용취, 정일선, 이종순, 임상중, 송인규, 김달용 : 한국육종학회지 28(3), 332 (1996).
- 임용표 : 고려인삼학회지 1이4(2), 310 (1990).
- 中田 : 일본 작물도전 p. 607 (1957).
- 한국담배인삼공사. 1995.
- 한국인삼연초연구원 : 최신고려인삼(재배편) (1994).
- 한국인삼연초연구원 : 최신고려인삼(재배편) (1996).

제 4 장 인삼의 기내증식기술 개발

제 1 절 서 설

인삼은 다년생 음지성 작물로서 재배조건이 매우 까다롭고, 종자를 통하여 번식할 수 있으나 채종하는데 3-4년이 소요되어 타식물에 비하여 우수품종 육성에 장구한 세월이 필요하다. 인삼은 보통 4년생에서 1회 종자를 채취하는 것을 원칙으로 하고 있으며 종자 1회 채취시에도 40-0립 정도밖에 채취할 수 없어 기내 배양을 통한 단기간의 식물체 재생기술은 우수형질을 지닌 인삼식물체의 기내증식 또는 형질전환식물체의 대량생산에 있어서 큰 의미를 지닌다고 할 수 있다. 또한 우수품종을 육성하였다 하더라도 동일한 유전자형을 지닌 개체수 증식에도 상당한 시일이 요구되므로 이러한 불편하고 어려운 점을 해결하기 위하여 인삼의 조직배양기술이 개발 확립되어 단시일내에 homologous gene을 지닌 개체수를 대량으로 증식할 수 있는 기반이 구축되어야 할 것이다. 인삼의 뿌리 절편을 재료로 하여 Butenko등(1968)이 최초로 배발생을 보고한 이래 여러 연구자들이 인삼 조직배양을 통한 식물체의 재생을 보고하였다(Butenko *et al.*, 1968; Chang and Hsing, 1978; Chang and Hsing, 1978; Chilton *et al.*, 1978). 그러나 인삼식물체의 기내증식은 매우 까다롭고, 특히 재생된 식물체가 전혀 뿌리를 발생시키지 못하던가, 부실한 뿌리의 발생이 이루어져 아직 토양에서 순화된 식물체를 보고한 예가 거의 없다. 그 동안의 인삼 재분화 연구는 주로 체세포배의 발생을 통하여 이루어져 왔으며(, Furuya and Kajii, 1983; Yoshikawa, and Furuya, 1987) 다른 분화방법에 대해서는 전혀 보고된 바가 없다. 본 연구는 인삼의 재분화 방법에 대한 전반적인 사항을 조사하여 효율적으로 재분화체가 토양에 까지 활착할 수 있는 조건을 구명하고자 수행하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 인삼조직으로부터 체세포유래 단일배의 유기

가. 시료는 한국 인삼 (*Fanax ginseng* C. A. Meyer) 종자를 증적처리한 다음 시기별로 성숙한 접합자배를 무균적으로 적출 한 후 자엽절편을 배양재료로 사용하였다. 방법은 무균적으로 절취한 자엽을 식물호르몬이 전혀 첨가되지 않은 MS (Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에 치상하여 체세포 단일배의 발생 과정을 관찰하였다. 배양용기는 10×2 cm 페트리디쉬를 사용하였으며, 배양실은 25±2℃로 조절하였고, 24 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 조도에서 16시간 광조명하에 이루어 졌다.

2. 체세포단일배 발생의 조직학적 특성 및 TIBA의 영향

가. 단일배발생시 배양조직의 형태학적 변화조사를 위해서 자엽을 시기별로 배양하여 유도된 체세포 단일배를 재료로 사용하였으며, 방법은 주사전자현미경적 관찰은 유도된 체세포배를 1% glutaraldehyde 로 고정한 후 ethyl alcohol로 탈수하여 임계점까지 건조시킨 후 금박을 씌워서 주사전자 현미경으로 (JSM T330A) 관찰하였다.

나. 단일배발생시 배양세포내의 내재호르몬 효과를 조사하기 위해서 인삼 (*Fanax ginseng* C. A. Meyer)종자를 저온하에서 증적처리하여 접합자배충분히 성숙시킨 후 무균적으로 절취하였다. 내재호르몬의 조사는 자엽절편을 배양재료로 사용하였다. 방법은 단일배의 발생에 미치는 식물호르몬(IAA)의 영향을 조사하기 위해서 우선 IAA의 극성이동을 억제하는 물질로 알려져 있는 TIBA (2,3,5-triiodobenzoic acid)의 영향을 조사하였다. 절취된 자엽은 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에 3% sucrose, 0.7% agar 가 첨가된 배지

에 배양하였다. 또한 체세포배의 발생에 미치는 TIBA효과를 조사하기 위해서 여러농도의 TIBA(0, 5, 10, 20 μ M)를 배지에 첨가 한 후 배양하여 체세포배의 발생양상을 조사하였다.

3. 체세포배의 성숙 및 발달조건 구명

가. 고빈도의 체세포 단일배 유도조건 구명하기 위해서 한국 인삼 (*Fanax ginseng* C. A. Meyer) 종자를 증적처리한 다음 시기별로 성숙한 접합자배를 무균적으로 적출 한 후 사용하였으며 방법은 무균적으로 절취한 자엽을 식물호르몬이 전혀 첨가되지 않은 MS (Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에 치상하여 체세포 단일배의 발생을 유도하였다.

나. 원형질분리방법을 이용한 체세포단일배의 대량생산을 위해서 인삼 접합자배의 자엽으로부터 원형질분리를 유도하여 고빈도의 체세포 단일배를 유도하기 위해서 한국 인삼 (*Fanax ginseng* C. A. Meyer) 종자를 증적처리하여 사용하였다.

4. 체세포배의 발생에 미치는 각종 염류의 효과조사

가. 개갑 및 저온 처리된 인삼의 종자(자엽이 약 6mm정도로 완전 성숙된 배상태임)를 70% EtOH에서 1분간 침지후 1% NaOCl에서 1시간 멸균한 후 다시 멸균수로 3회 세척하였다. 종자로부터 자엽을 적출하여 여러 가지의 염류가 처리된 배지위에 치상하였다. 배지는 3%의 sucrose, 0.7%의 agar를 첨가한 MS기본배지에 염류농도만 추가로 첨가하여 사용하였으며 멸균은 pH 5.8 일 때 121 °C에서 15분간 습열멸균을 하였다. 배양은 24 \pm 2 °C 온도에서 16시간 일장으로 24 μ mol m⁻²s⁻¹의 형광등 상태에서 하였다. 처리는 MS기본배지에 추가

로 NH_4NO_3 , KNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 의 농도를 3, 6, 12, 24배 더 첨가하였다. 발아는 형성된 embryo를 1/2MS배지에 3×10^{-5} M GA_3 가 첨가된 배지에 치상한 후 형성된 유식물체를 다시 GA_3 무첨가 1/3MS배지에 서 뿌리를 유도하였으며 흙과 모래가 1:1로 배합된 토양에 이식하여 온실에서 재배하였다.

5. 체세포단일배의 발아 및 유식물체의 생성조건 구명

가. 시료는 자엽으로부터 발생된 체세포배를 사용하였으며 체세포배는 Petridish에서 torpedo, globular, heart 상태로 성숙된 후 발아되지 않고 그대로 생장이 정지된 상태로 유지된다. 따라서 발아를 유도하기 위해서 저온 대신에 GA_3 를 10mg/L를 단일배 및 다배에 처리하여 생육상태를 조사하였다. 또한 발아된 shoot에서 발근을 유도하기 위해서 ammonium의 농도를 여러 농도로 처리하여 뿌리의 성장상태를 관찰하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 인삼조직으로부터 체세포유래 단일배의 유기

절취한 자엽을 식물호르몬이 전혀 첨가되지 않은 MS에 배양하였던 바, 자엽의 아래 절단 부위에서 많은 체세포배가 형성되었으나 이런 여러개의 배들은 서로 융합하여 대부분 다배상태로 형성되었다(Fig. 4-1-A, D). 형성된 다배에 GA_3 를 처리할 경우 shoot의 생장이 매우 왕성하였으나(Fig. 4-1-B, E), 뿌리를 형성하지는 못하였다(Fig. 4-1-C, F). 따라서 뿌리를 형성할 수 있는 체세포단일배를 유도하기 위해서 자엽의 시기를 달리하여 역시 식물호르몬 무첨가

배지에 치상하여 생육상태를 조사하였다. 그 결과 미숙배(배의 길이 1mm)를 배양할 경우에는 체세포배가 전혀 형성되지 않았지만, 중간성숙배(배의 길이 3mm)에서는 94%의 매우 높은 체세포배의 발생이 있었으며, 발아직전의 성숙배에서(배의 길이 6mm)는 66%의 체세포배가 발생되었다. 그러나 seedling(60mm)에서는 미숙배와 같이 전혀 체세포배가 발생하지 않았다(Fig. 4-2A). 또한 식물호르몬 무첨가 배지에서 많은 체세포배가 발생되긴 하였으나 배의 형태가 다배 및 단일배로 나누어 졌으며, 중간성숙배에서는 체세포배의 발생빈도가 높았으나 다배의 형성율이 96%로 매우 높아 뿌리의 발육이 억제되었다. 그러나 발아직전의 성숙배의 경우에는 비록 체세포배 발생빈도는 중간성숙배에 비해 낮지만 다배는 13%만이 나타났고, 단일배 발생빈도가 87%로 매우 높은 경향을 보였으며, 이런 단일배들은 다배처럼 융합현상이 전혀 일어나지 않고 각각의 globular 상태로 발육하였으며, 뿌리의 발육이 매우 양호하여 발아직전의 접합자배를 단일배발생 재료로 사용하는 것이 매우 효율적일것으로 생각되었다(Fig. 4-2B). 특히 단일배의 모습은 다배의 모습과 매우 차이가 있었는데 (Fig. 4-3-A, B, 다배의 경우), 형성시기부터 원형상태로 개체별로 형성되며 성숙한 단일 embryoid로 발육되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4-3-C, D, 단일배의 경우).



Fig. 4-1.

A - F

Multiple shoot formation from somatic multiple embryos of ginseng. A, D Somatic multiple embryos formed directly from the basal surface of midnature cotyledons on MS basal medium after 1 month of culture (bars: 830 μ m), B, E Greening of cotyledonary multiple embryos just after treatment with 3×10^{-5} M GA₃ for 2 weeks (bars: 2.3cm), C, F Multiple shoots formed from somatic multiple medium (bars: 3.2cm). Arrows in B and C indicate radicle region.

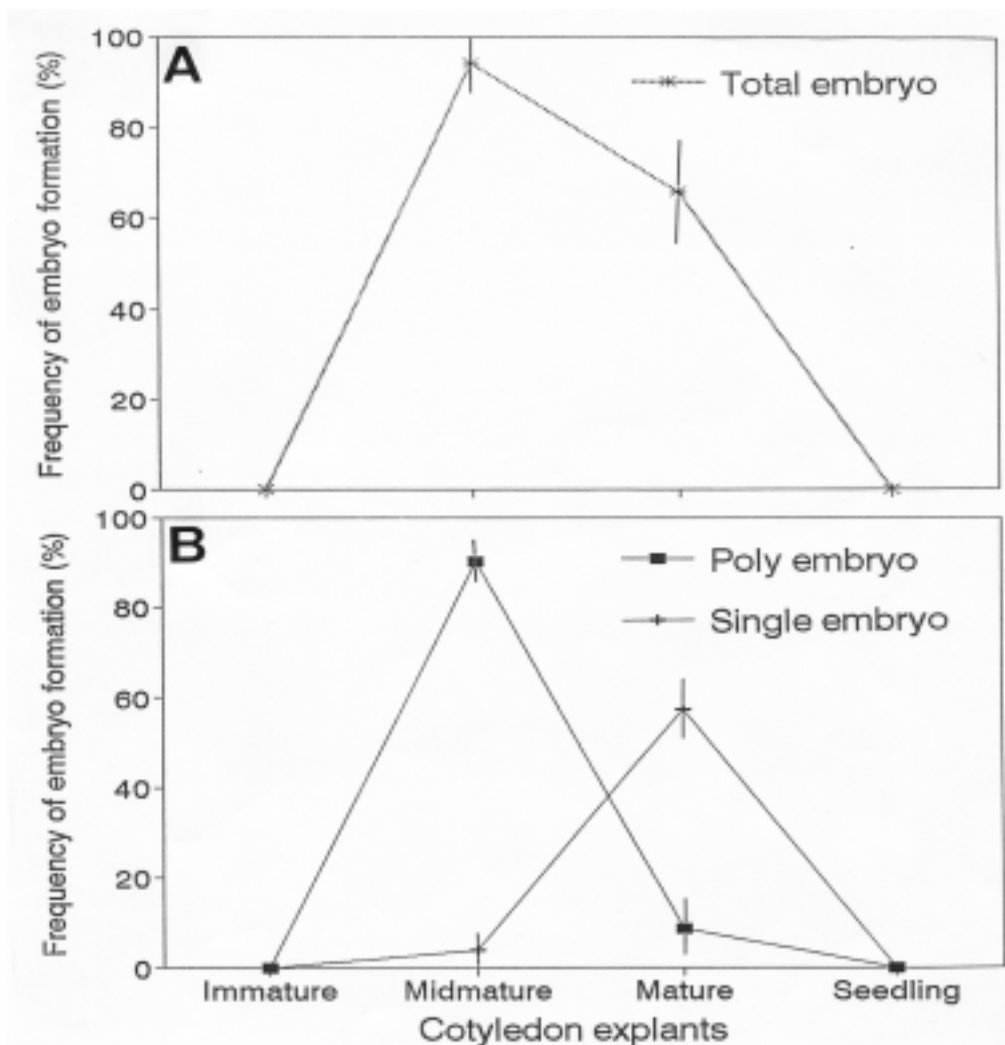


Fig. 4-2. Frequency of poly or single embryo formation in cotyledon explants cultured at the different stages.

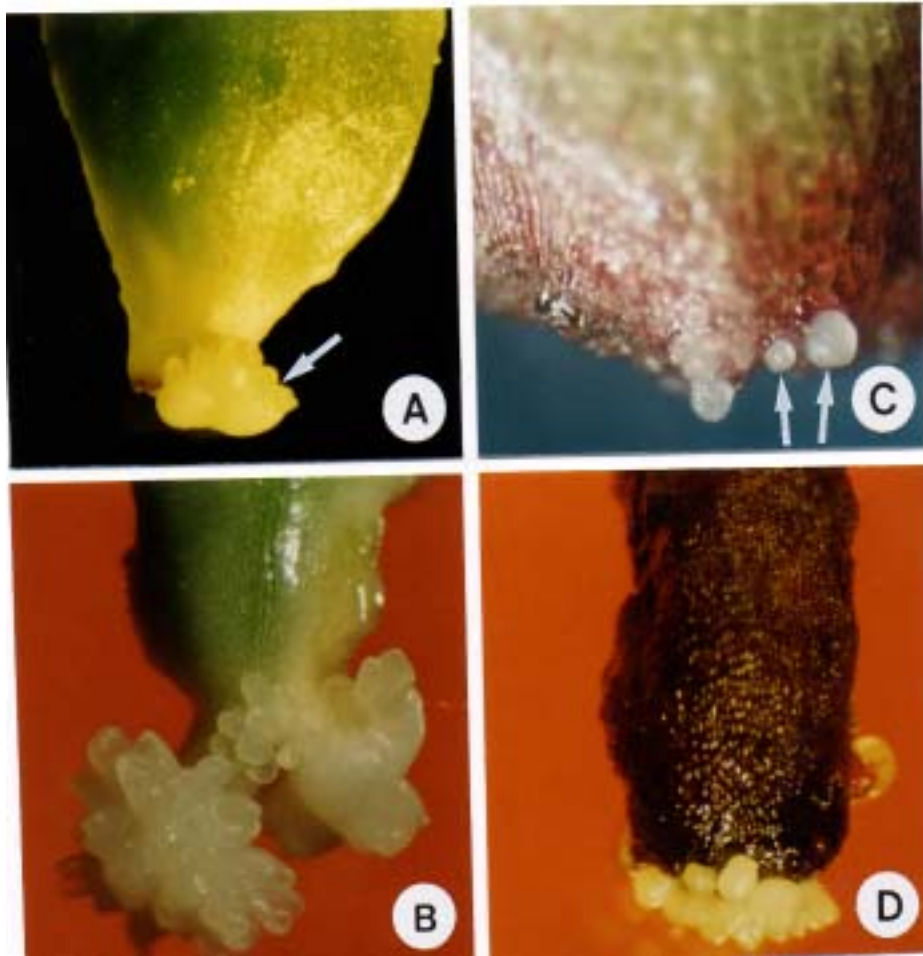


Fig.4-3. Poly- and single-embryos formed the cotyledon of zygotic embryos at different stages. A, B, poly-embryos (arrows) formed from cotyledons of an immature zygotic embryo of 3mm in length. C, D, single-embryos (arrow) formed from cotyledons of a germinating zygotic embryo of 7 mm in length.

2. 체세포단일배의 발생의 조직학적특성 및 TIBA의 영향

2. 체세포단일배의 발생의 조직학적특성 및 TIBA의 영향

가. 단일배발생시 배양조직의 형태학적 변화

기존의 인삼 재분화 연구가 주로 식물호르몬에 의해서 이루어 졌으나 본 연구결과 식물호르몬이 전혀 첨가되지 않은 데에서도 많은 체세포배를 유도할 수 있었으며 또한 단일배로 유도되기 때문에 뿌리의 발육이 매우 양호한 것으로 나타났다. 따라서 인삼 접합자 배에서 단일배가 유도되는 과정을 형태적으로 뿌리의 발육이 비교적 어려운 다배와 비교하여 전자현미경적으로 관찰해보면 다배의 경우에는 조직의 여러 부위에서 원기가 발생하여 융합되어 다배가 형성되었고(Fig. 4-4), 형성과정은 우선 특이 부위의 표피조직으로부터 세포들이 분열하여 단일배와 같이(Fig. 4-5-B,G,H,I) 형성된 것이 아니고, 분열된 세포조직이 융합되면서(Fig. 4-5-A,C,D,E,F) 다배가 형성되는 것을 관찰할 수 있었다.

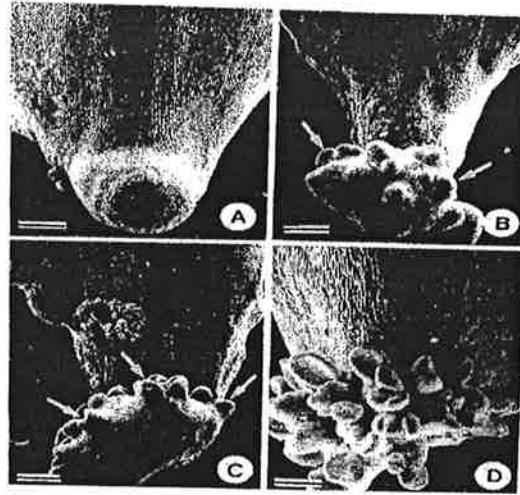


Fig. 4-4. A-D Scanning electron microscopy of somatic multiple embryos arising directly from ginseng cotyledon explants on growth regulator -free medium. A-C Development of somatic multiple embryos from midmature cotyledons. A An embryonic nodular tissue (arrows) formed on the basal portion of a cotyledon after 10 days (bar:180 μ m), B numerous cotyledon primordia (arrows) formed on a nodular tissue after 15days (bar:230 μ m), C-D multiple embryos with numerous cotyledons (arrows) after 1 month (bar: 230 μ m).

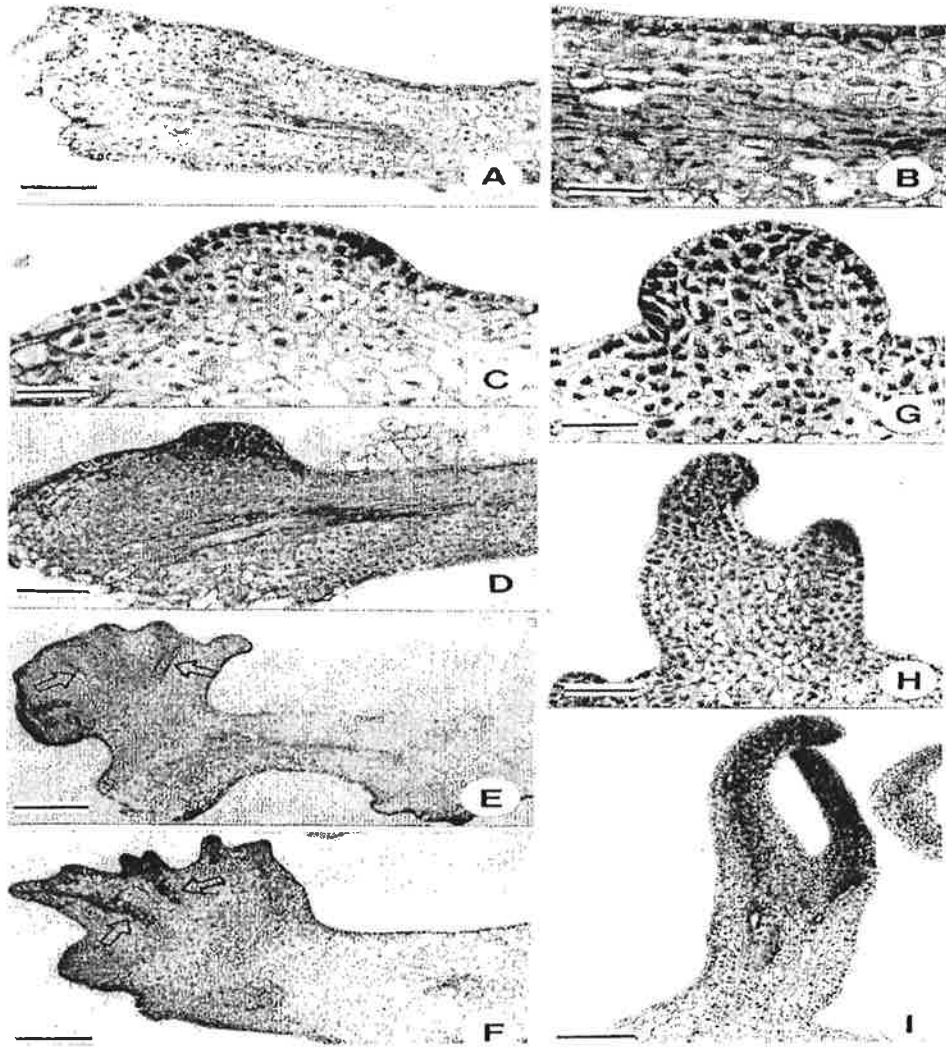


Fig.4-5. Histological observation of somatic poly embryos(A, C, D, E) and single embryos(B, G, H, I) from single cells of the cotyledon epidermis.

반면 단일배의 경우에는 배가 하나씩 떨어진 상태로 생장이 되며(Fig. 4-6), 발생은 표피조직에서 한 개의 세포가 분열하여 각각의 단일배를 생성하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4-6).

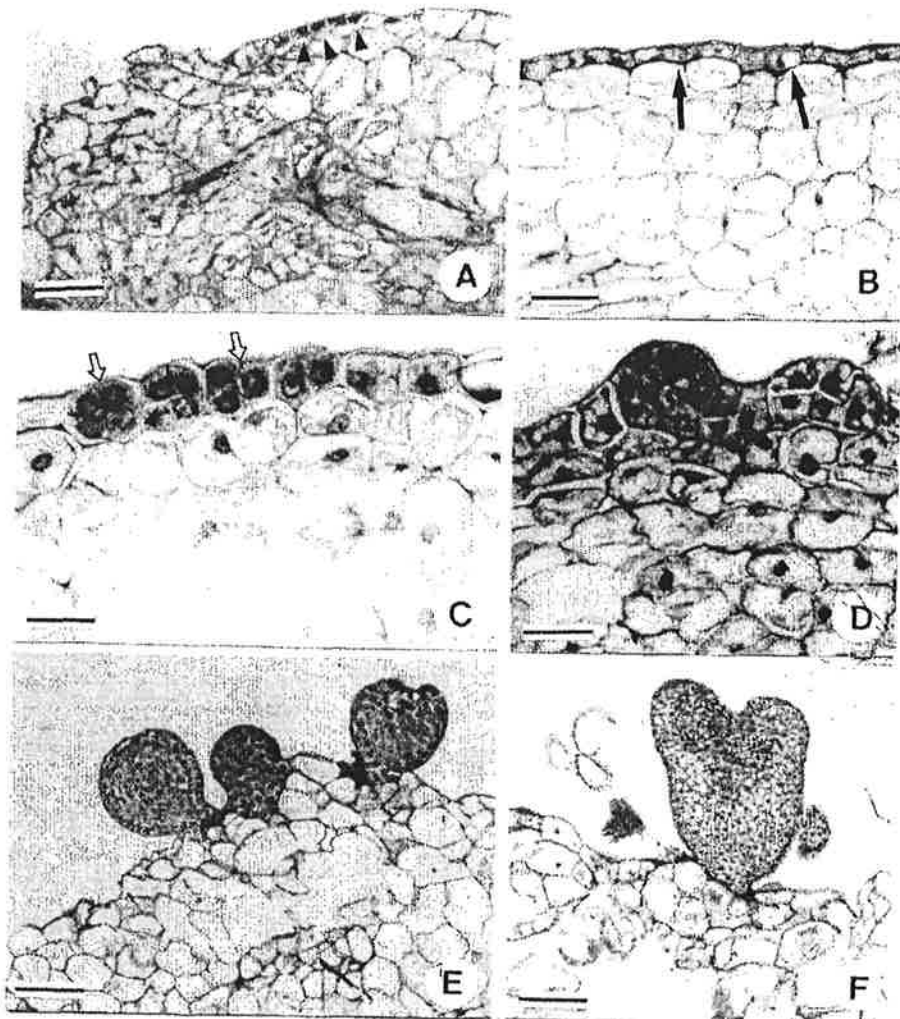


Fig.4-6. Histological observation of somatic single embryos formed from cotyledon explants.

나. 단일배발생시 배양세포내의 내재호르몬 효과

TIBA를 처리하지 않은 경우는 자엽의 기부에서만 체세포배가 발생되었다. 그러나 TIBA를 처리한 경우는 체세포배의 발생률이 급격히 감소되고(Table 4-1), 체세포배의 발생에 자엽의 표면 전부위에서 산발적으로 발생되었다.

Table 4-1. Effects of TIBA on the formation of somatic embryos

Conc. of TIBA (μ M)	Frequency of somatic embryo formation
0	61
5	24
10	4
20	0

형성된 단일배들의 형태는 매우 차이가 있었는데, TIBA무처리구에서 형성된 체세포배(Fig. 4-7-A-C)는 정상적인 cotyledonary 형태이었으나, TIBA처리구에서 형성된 체세포배는 원형형태의 비정상적인 embryoid 가 형성되었으며, TIBA무첨가 배지에서는 기부에 단일배가 형성되었으나, 5 μ M의 TIBA처리구에서는 전면에 단일배가 형성되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4-7-D). 그래서 식물호르몬 무첨가배지에서 유도된 체세포 단일배를 생성초기에 다시 20 μ M의 TIBA가 함유된 배지에 옮겨서 단일배의 형태를 조사한 결과(Fig. 4-7-E-G), 마찬가지로 정상적인 단일배로 형성하지 못하고 둥근 jar 형태의 배로 발육되었다.

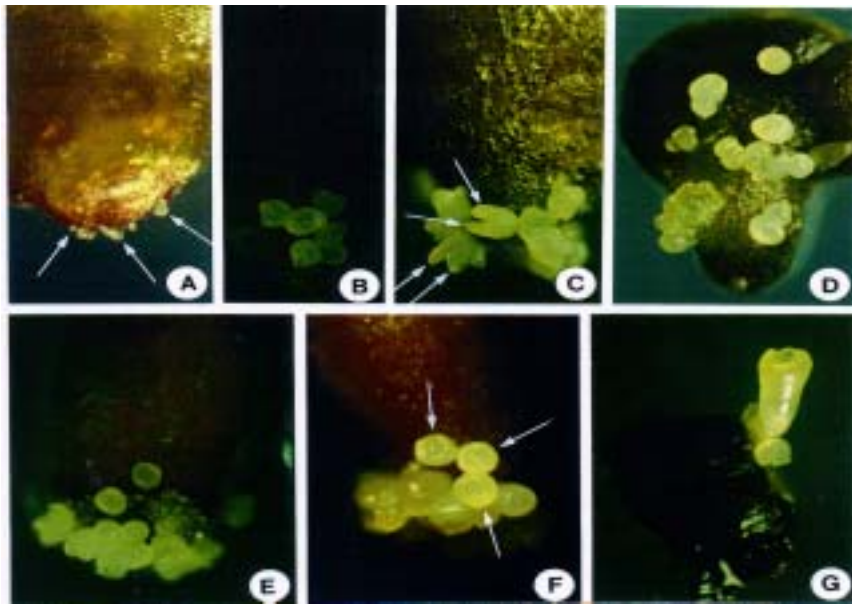


Fig.4-7. A-G Somatic embryos formed from ginseng cotyledons on medium with and without TIBA, A Polar development of globular somatic embryos on near the basal - excised portion of ginseng cotyledons on hormone - free medium after 3 weeks of culture, B Heart shaped embryos with two cotyledon primordia (arrows)on hormone-free medium after 4 weeks of culture, C Torpedo embryos with discrete cotyledons (arrows) on hormone-free medium, .D Somatic embryos with jar-shaped cotyledon on medium containing 5 μ M TIBA, E Embryos with circular ring- like cotyledon primordia(arrows)after transfer of early-globular embryos to medium containing 20 μ M TIBA, F Embryos with jar-shaped cotyledons (arrows) on medium containing 20 μ M TIBA, G Mature embryos with jar-shaped cotyledons on medium containing 20 μ M TIBA,

따라서 체세포배의 발생은 자엽의 내재오옥신인 IAA의 극성이동과 상당한 영향이 있음을 간접적으로 확인할 수 있었다.

일반적으로 쌍자엽식물의 특징인 두 개의 자엽의 구조를 갖는 이유는 구형의 어린배 시기에 두방향으로 오옥신 극성이동이 전개되어 이루어진다는 결과가 있다.

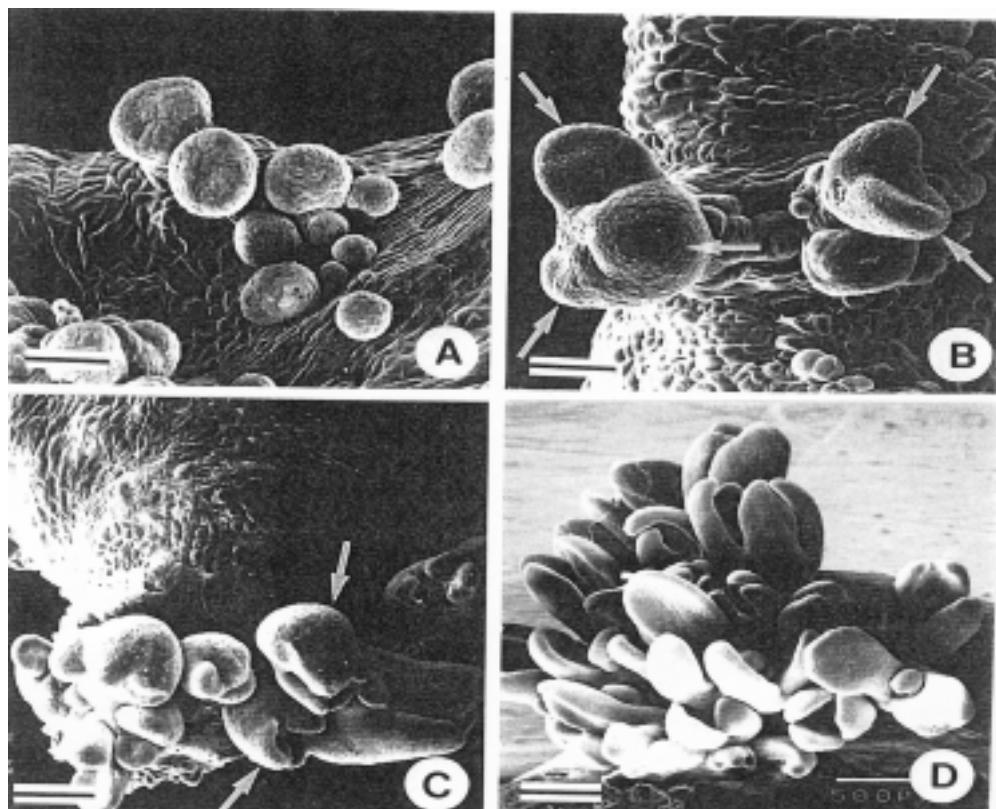


Fig.4-8. A-D Scanning electron micrography of somatic embryos after the transfer of early globular embryos to TIBA-free medium, A Globular somatic embryos after 1 week of culture (bar:153 μ m), B Heart-shaped embryos with discrete cotyledons(arrows) after 2 weeks of culture (bar:153 μ m), C Torpedo-shaped embryos (arrows)after 3 weeks of culture (bar:238 μ m), D Fully mature embryos with well-development cotyledons after 5 weeks of culture (bar: 400 μ m)

따라서 이를 확인하기 위해 5 μ M TIBA의 처리에 의해서 아직 자엽이 발생되지 않은 어린 구형의 인삼 체세포배를 20 μ M TIBA를 처리한 MS배지 및 무처리구에 옮겨 발생하는 체세포배의 구조를 조사하였다.

그 결과 TIBA처리를 하지 않은 경우는 체세포배의 자엽이 2개, 3개, 4개 등 다양한 형태로 발생되었으나, TIBA처리를 한 경우는 자엽의 구조가 나팔형인 단순한 구조만을 지닌 배로 성숙되었다(Fig. 4-8).

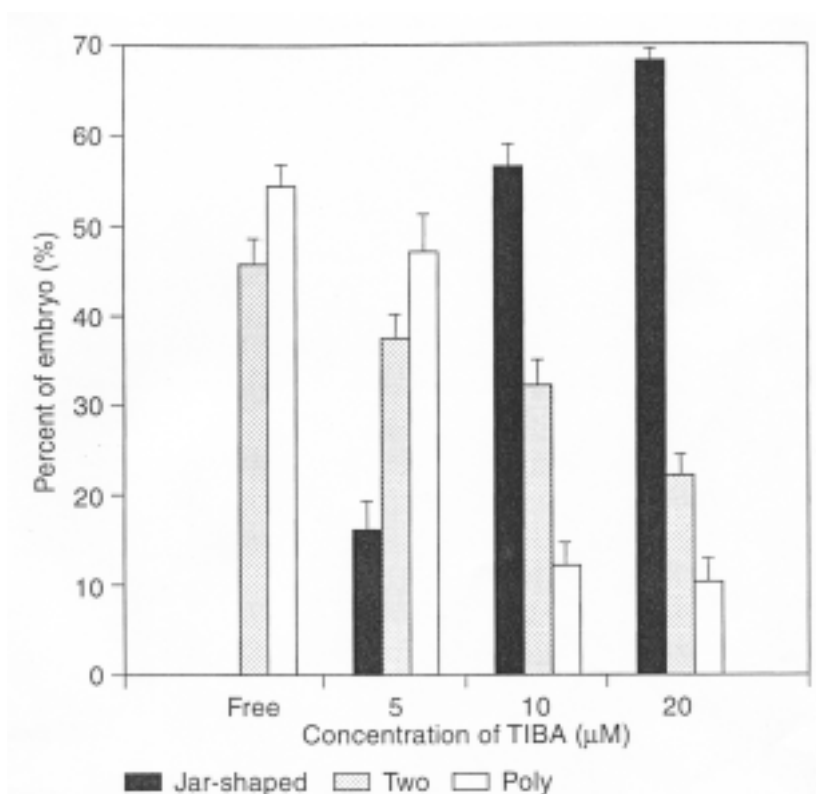


Fig. 4

-9. Effects of TIBA in the frequency of embryos formation and the distribution patterns of embryos to MS medium with varied concentrations. Data represent the values \pm SD from three

independent experiments.

또한 TIBA 의 농도에 따라 단일배, 다배, jar형태의 배등이 형성된 빈도가 다르게 나타났는데 TIBA가 전혀 첨가되지않은 배지에서는 jar형태의 배는 전혀 형성되지 않았지만, 5 μ M TIBA처리구에서는 jar 형태가 15% 정도, 10 μ M TIBA 처리구에서는 55%, 20 μ M TIBA처리구에서는 70%가량이 형성되었다 (Fig. 4-9).

이 결과는 인삼의 체세포배의 자엽발생이 내재오옥신의 극성이동과 관계가 있음을 입증한 결과라고 할 수 있다. 한편 전자현미경으로 관찰한 결과 구형의 체세포배가 두 개의 자엽시원부위를 갖는 심장형의 구조를 갖지 못하고 관상의 구조로 발생된 다음 결국 두 개의 자엽으로 분리되지 않고 나팔형의 자엽구조를 갖는 체세포배로 성숙된 것을 관찰할 수 있었다(그림 4-10). 따라서 인삼 자엽으로부터 식물체를 재생하기 위한 전단계인 체세포배를 유도하기 위해서는 자엽내의 내재오옥신이 매우 중요한 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었다.

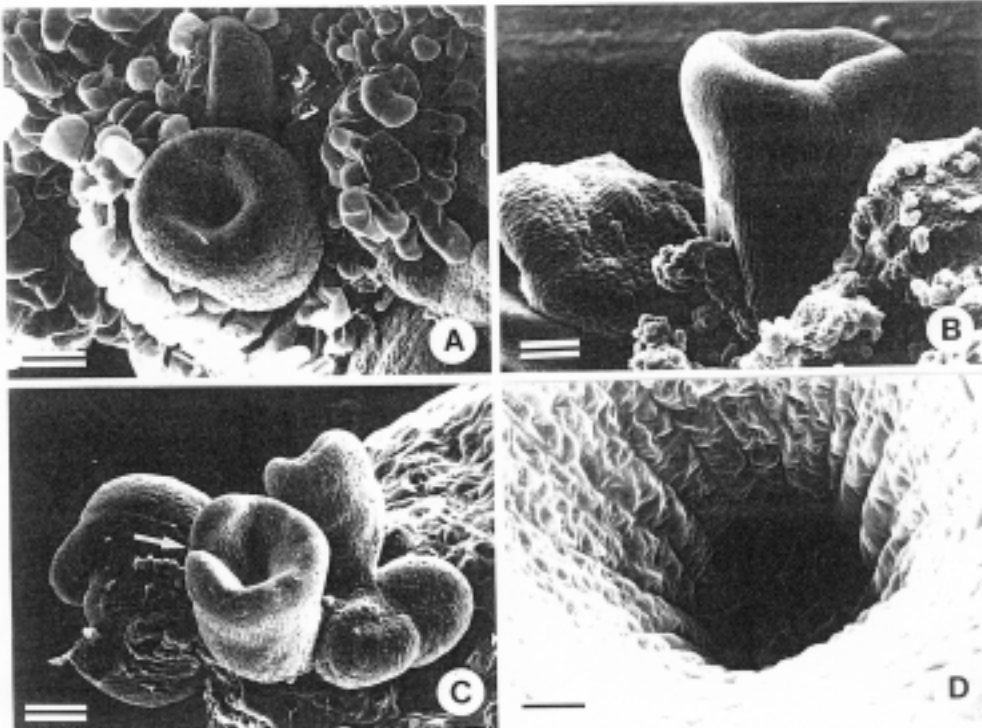


Fig.4-10 A-D Scanning electron micrography of somatic embryos after the transfer of early-globular embryos containing 20 μ M TIBA, A Somatic embryo with globular or jar-shaped cotyledons on TIBA containing medium after 2 weeks of culture (bar:71 μ m), B Somatic embryo with jar-shaped cotyledons after 4weeks of culture on TIBA-containing medium (bar:238 μ m), C Embryos with jar-shaped cotyledons with a furrow on the cotyledon margin(bar:149 μ m), D Magnified view of nearly apical regions of a embryo with jar-shaped cotyledon (bar: 13 μ m).

3. 체세포배의 성숙 및 발달조건

인삼 접합자배의 자엽으로부터 원형질분리를 유도하여 고민도의 체세포 단일배를 유도하기 위해서 한국 인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer) 종자를 증적처리한 다음 성숙한 접합자배를 무균적으로 적출 한 후 자엽절편을 전처리하였다. 자엽을 원형질분리 전처리를 하기 위해서 1.0 M sucrose 용액에 24 시간에서 72 시간동안 담가놓은 다음 0.1 M 설탕용액을 이용하여 50%로 5분 동안 점차 희석시킨 다음 최종적으로 0.1 M sucrose 용액에 담가 놓았다. 그 결과 무처리자엽의 경우에는 약 9개 정도의 체세포의 배가 형성되었으나 원형질분리 전 처리된 자엽에서는 23-37개까지 형성되어 자엽당 배발생수가 약 4배 증가되었다(Table 2). 또한 무처리자엽에서는 자엽의 기부에서만 배가 발생되었으나, 처리자엽에서는 자엽의 전 부위에서 배가 발생되었으며 72시간 처리시에는 다배가 발생되지 않고 대부분 단일배로 발생되었다 (Table 4-2).

Table 4-2. Enhancement of direct somatic single-embryo formation (2 months after culture) from ginseng cotyledons, following plasmolyzing pretreatment (1M sucrose). Data represent the mean values \pm SE of three independent experiment

Sucrose (1 M) pretreatment(h)	Number of somatic embryo/explant	Pattern of embryos(%)	
		single	Multiple
No treatment	9 \pm 2.7 ^a	26	74
24	23 \pm 5.6	67	33
48	36 \pm 6.4	93	7
72	37 \pm 5.7	100	0

4. 체세포배의 발생에 미치는 각종 염류의 효과

가. 염류처리에 의한 접합자배로부터 인삼체세포배의 발생 및 발육

인삼 접합자배의 자엽으로부터 염류처리에 의해서 체세포배의 유도여부를 조사하기 위해서 개갑처리된 한국 인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer) 종자를 사용하였다. 개갑된 접합자배는 93%가 MS기본배지에서는 정상적으로 발아가 되었으며 유식물체로 성장하였다(Fig. 4-11 A, D). 나머지 7%는 성장 반응을 보이지 않거나 하얀상태로 유지되었으나 체세포발생은 없었다. 고농도의 염류처리가 될 경우에는 거의 성장에 반응이 없고 염류의 장애를 받은 것 같았다(Fig. 4-11B). 그러나 약한 농도의 염류처리시에는 한달후에 겨우 1-2cm정도로 생장이 매우 늦었고 결국은 갈색으로 변화되면서 체세포배가 형성되었다(Fig. 4-11F, H). 체세포배발생은 갈색으로 변화된 기형의 접합자배에서만 형성이 되었으며(Fig. 4-11F, J), 주로 자엽의 표면에서 형성되었으나(Fig. 4-11G, H), epicotyl에서는 거의 형성되지 않았다. Radicle를 가지고 있는 아래부위의 hypocotyl에서는 거의 체세포배의 발생이 되지 않았으나 낮은 농도의 NH_4NO_3 처리구에서는 체세포배와 callus가 동시에 형성되었다(Fig. 4-11F). 그러나 다른 종류의 염류에서는 체세포배의 성숙이 정상적으로 이루어졌으며 배양 2개월 후에는 자엽형의 체세포배를 관찰할 수 있었다(Fig. 4-11, H, I).

자엽형의 체세포배로 발육이 되었을 때 채취하여 배양할 경우 접합자배와 같이 성장하였다. (Fig. 4-11J). 체세포배의 발아를 위해서 3×10^{-5} M GA_3 처리 3주후에 1/3MS배지에 계대하였던 바, 76%가 유식물체로 발육이 되었으며 뿌리도 형성되었다(Fig. 4-10K). 뿌리가 형성된 인삼 유식물체를 토양에 이식하였던 바, 23%가 이식 2개월 까지 생육이 가능하였다. (Fig. 4-11L).

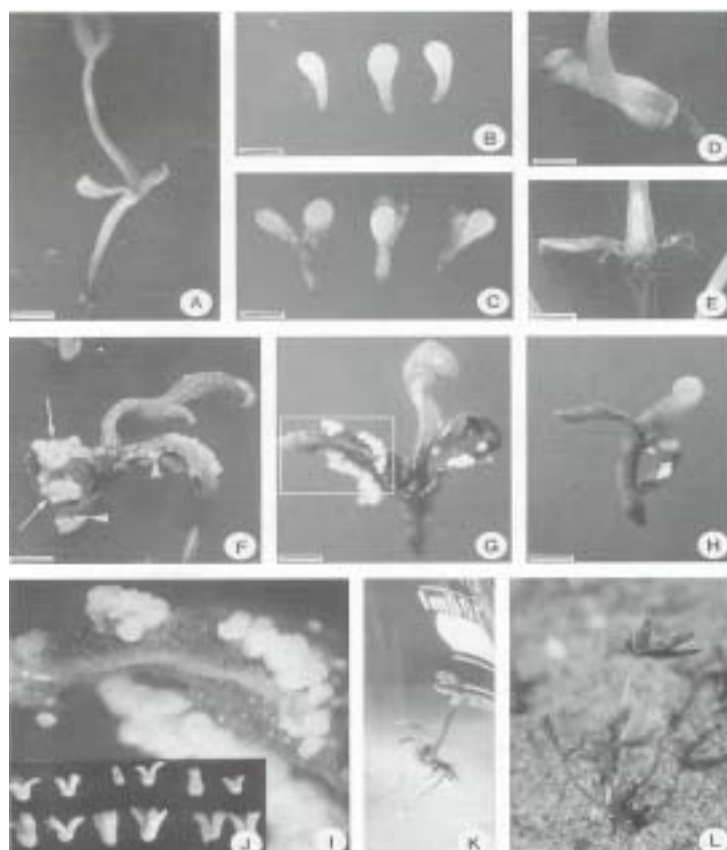


Fig. 4-11

Somatic embryo formation from abnormal zygotic embryos of panax ginseng after macrosalt stresses (NH_4NO_3 , KNO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , or CaCl_2). (A) A seedling grown normally on MS basal medium after one month (bar: $860\mu\text{m}$). (B) Deteriorated zygotic embryos on 494.4mM NH_4NO_3 (bar: $520\mu\text{m}$). (C) Deteriorated zygotic embryos after slight growth on 247.2mM NH_4NO_3 ($520\mu\text{m}$). (D) Normally grown zygotic embryos on MS basal medium ($520\mu\text{m}$). (E) Browned cotyledons with a normal green epicotyl on 123.6mM on the surface of a browned seedling on 61.8mM NH_4NO_3 (bar: $520\mu\text{m}$). (F) embryogenic callus (arrows) and somatic embryos (arrowheads) formed on the surface of a browned seedling on 61.8mM NH_4NO_3 (bar: $520\mu\text{m}$). (G) Somatic embryo formation on 56.4mM KNO_3 (bar: $520\mu\text{m}$). (H) Somatic embryo formation on 3.75mM KH_2PO_4 (bar: $520\mu\text{m}$). (I) Magnified view of white square line in Figure G, note somatic embryos (bar: $230\mu\text{m}$). (J) Selected cotyledonary somatic embryos formed on medium containing 56.4mM KNO_3 (bar: $670\mu\text{m}$). (K) Regenerated plantlets with both shoot and roots on one third-strength MS medium after 6 weeks (bar: $1.5\mu\text{m}$). (L) A survived plant on soil-mixture in greenhouse after two months (bar: $1.5\mu\text{m}$).

나. 염류처리에 의한 인삼 접합자배의 체세포배 형성과 발아

염류로서 NH_4NO_3 , KNO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 를 처리하여 접합자배로부터 체세포배의 형성과 발아를 조사한 바, MS배지의 다량원소의 농도가 높을수록 비정상적인 발아율이 높은 경향이었으며 체세포배의 형성은 NH_4NO_3 61.8 mM에서 56.8%로 가장 높았으며, KNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 에서 체세포배의 형성율은 각각 29.4, 11.5, 9.7, 5.7% 이었다(Fig. 4-12).

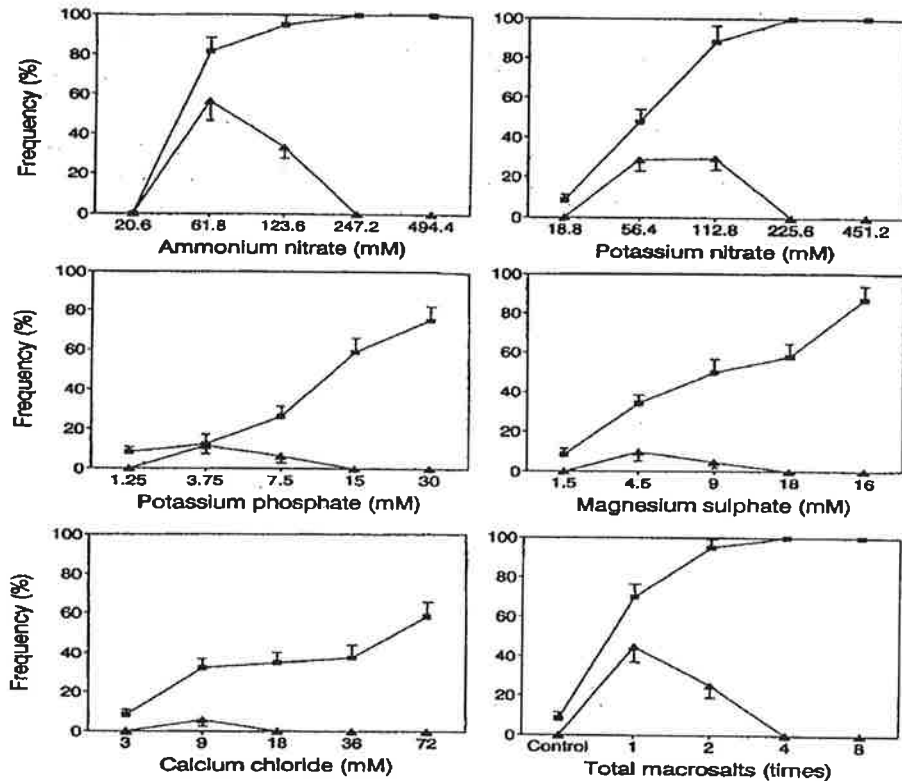


Fig4-12. Relationship between somatic embryo formation (▲) and abnormal germination (■) from zygotic embryos of *Panax ginseng* on MS basal medium with varied levels macro-salts. The levels of macro salts on medium were adjusted to 3, 6, 12, and 24 times the salt concentration in MS medium. In the combined macrosalt treatment, the levels of all five macrosalts were adjusted 2, 4, 6, and 8 times the salt concentration in MS medium. Vertical bars represent standard error of the mean.

5. 체세포단일배의 발아 및 유식물체의 생성

가. 체세포단일배의 발아에 미치는 GA₃의 영향

자엽으로부터 발생된 체세포배는 자엽단계로 성숙된 후 발아되지 않고 그대로 생장이 정지되었기 때문에 접합자배와 같이 휴면한다고 생각된다. 따라서 체세포배의 휴면 여부를 확인하기 위해서 휴면타파제로 잘 알려져 있는 GA₃가 0, 1, 4, 8 mg/l 첨가된 배지에 옮겨 배양한 결과 1 mg/l 이상의 GA₃ 처리의 경우 농도에 관계없이 85% 이상의 체세포배의 발아가 빨리 이루어져 2주 내에 발아되었다(Fig. 4-13).

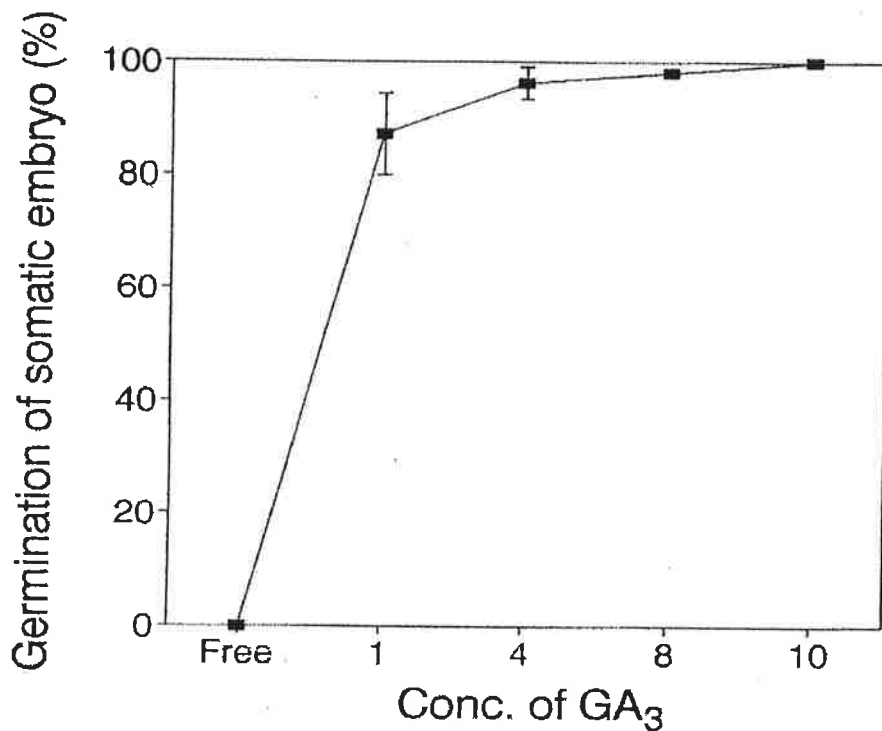


Fig. 4-13. Effect of GA₃ on germination of somatic embryos formed from cotyledon explants of *Panax ginseng*.

from cotyledon explants of *Fanax ginseng*.

나. 체세포단일배의 발아에 미치는 저온처리 영향

체세포배의 발아에 미치는 저온처리 영향을 조사하기 위해서 -2, 0, 4℃의 저온 냉장고에 2주에서 12주간에 걸쳐 저온처리하였다. 앞의 저온 및 GA₃ 처리를 한 후 다시 MS기본배지에 옮겨 2달 후에 체세포배의 발아율을 조사하였다. 그 후 발아된 체세포배는 1/3 농도의 MS배지에 옮겨 식물체로 생장시켰다. 인삼체세포배에 저온처리를 해준 경우 0도에서 10℃ 이상의 저온처리에서는 체세포배의 발아가 무처리와 큰 차이를 보이지 않았으나 빙점이하인 -2℃의 저온하에서 약 8주간 처리하여 주었을 경우 85% 발아 되었다 (Table. 4-3). 따라서 인삼체세포배는 접합자배와 같이 휴면하는 것으로 판단되었다.

Table 4-3. Effect of chilling treatment on the germination of somatic embryos derived from cotyledon explants of *Fanax ginseng*

Chilling t e m p e r e t u r e ($^{\circ}$ C)	Germination after chilling treatment(%)			
	2 weeks		4 weeks	
	8 weeks	12 weeks	8 weeks	12 weeks
No treatment	0	0	0	0
4	0	0	5 \pm 1	8 \pm 2
0	0	6 \pm 3	12 \pm 3	13 \pm 4
-2	14 \pm 2 ^a	18 \pm 4	85 \pm 7	89 \pm 8

다. 발아과정의 부가전자현미경적 관찰

저온 및 GA₃ 처리된 체세포배의 세포구조 변화를 전자현미경으로 관찰하기 위해서 처리 또는 무처리 체세포배의 자엽절편을 1% glutaraldehyde (phosphate buffer pH 6.8)에 4시간동안 4°C 전고정한 후 2% OsO₄에 2 시간 동안 후고정하였다.

시료를 ethyl alcohol로 탈수 후 Epon resins로 메몰시키고 LKB-V ultramicrotome을 이용하여 재료를 절단하였다. 절단된 재료는 1% uranyl acetate와 lead citrate로 염색하였고 부가전자현미경(JEM 1200 EX-II)으로 관찰하였다.

체세포배를 GA₃ 및 저온 처리한 후 세포의 구조적변화를 전자현미경으로 관찰한 결과 무처리 체세포배의 자엽내 세포는 발아되지 않은 인삼접합자배의 세포와 같이 지질과립 및 세포질이 농후하며, 분화되지않은 미토콘드리아 및 엽록체를 지녀서 세포의 활성이 약한 휴면 상태의 구조를 지녔다(Fig. 4-13-A-C). 그러나 저온처리 및 GA₃ 를 처리한 자엽세포는 지질 및 세포질의 분포가 감소된 반면, 잘 발달된 엽록체와 활성이 강한 미토콘드리아의 구조를 보였다(Fig. 4-13 D-G). 따라서 저온 및 GA₃ 처리후 세포의 대사활동이 활발한 것으로 보아 휴면이 타파된 것으로 판단된다.

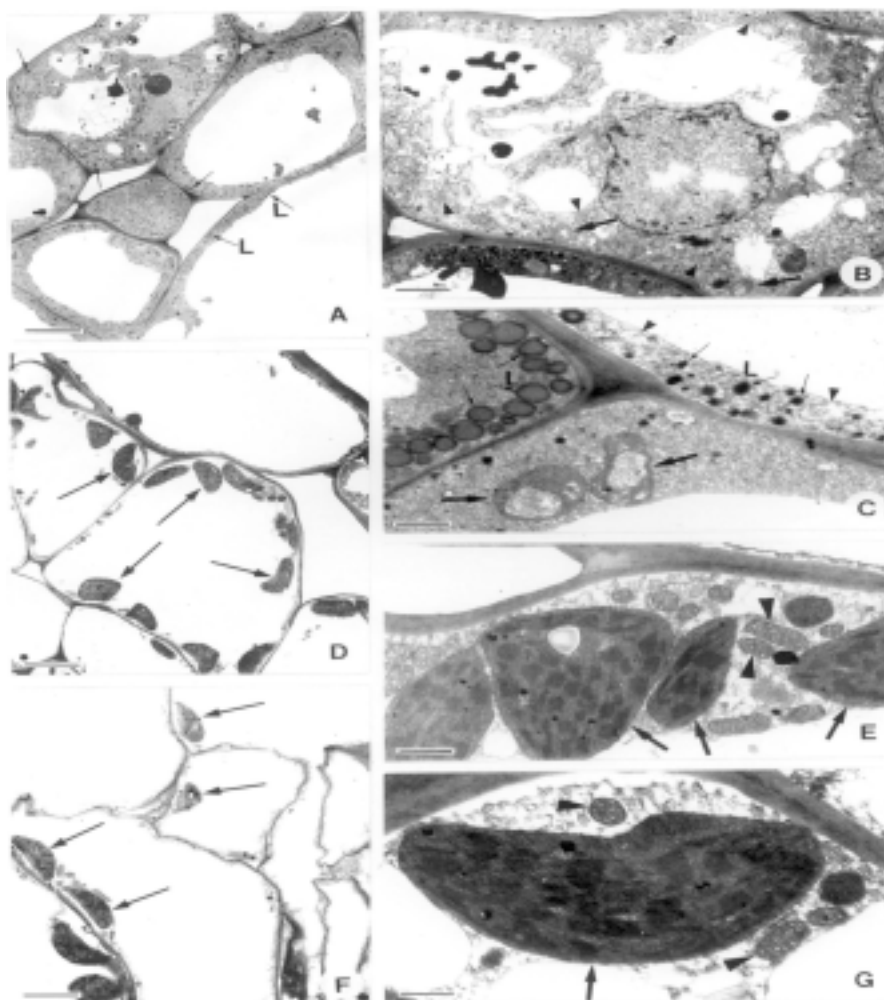


Fig. 4-13 A-H Ultrastructural changes of cotyledon cells of somatic embryos with or without chilling or GA_3 treatment (bars A, D, F $6\mu m$, B $3\mu m$, C, E, G $1\mu m$). A-C Cotyledon cells of somatic embryos without chilling and GA_3 treatment. Note dense cytoplasm, numerous lipid bodies (L, thin arrows), proplastids (thick arrows in B,C) and poorly differentiated mitochondria (arrowheads in B, C). D, E Cotyledon cells after chilling treatment ($-2^\circ C$ for 8 weeks). Note well-developed chloroplasts (arrows) and active-state mitochondria with numerous cristae (arrowheads in E). F, G Cotyledon cells after $8mg/l$ GA_3

treatment. Note silmilar cellular structure to D, E

라. 체세포 단일배의 휴면현상

발아 직전에 있는 한국인삼의 접합자 배에서 유래된 자엽절편을 이용하여 체세포배를 유도하고 기내휴면여부를 조사하고자 하였다. 식물호르몬으로써 2,4-D, BAP, kinetin을 첨가하거나 혹은 전혀 식물호르몬이 첨가하지 않은 MS배지에 절편을 배양할 경우 많은 체세포배 혹은 단일배를 획득할 수 있었다. 그러나 이런 배들은 대부분 자엽형 배(cotyledonary stage) 까지 발육이 가능하지만 발아가 되지 못하여 더 이상 shoot로 생육되지 못하였고 하얀상태의 자엽형 배로 계속 유지되었다. 그러나 gibberellic acid(1.0 mg/l 이상, GA₃)을 처리할 경우 3주 이내에 자엽형 배가 녹색으로 변하면서 발아가 되었으며, 저온처리(-2 °C에서 8주간)를 할 경우에도 체세포배가 정상적으로 발아가 되었다. 체세포배를 GA₃ 및 저온 처리한 후 세포의 구조적변화를 전자현미경으로 관찰한 결과 무처리 체세포배의 자엽내 세포는 발아되지 않은 인삼접합자배의 세포와 같이 지질과립 및 세포질이 농후하며, 분화되지 않은 미토콘드리아 및 엽록체를 지녀서 세포의 활성이 약한 휴면 상태의 구조를 가지고 있었다. 그러나 저온처리 및 GA₃ 를 처리한 자엽세포는 지질 및 세포질의 분포가 감소된 반면, 잘 발달된 엽록체와 활성이 강한 미토콘드리아의 구조를 보였다. 따라서 저온 및 GA₃ 처리 후 세포의 대사활동이 활발한 것으로 보아 휴면이 타파된 것으로 판단되었다.

마. 인삼 유식물체의 생장에 적합한 최적 배양환경

1) 온도 및 광이 인삼유식물체의 도양활착에 미치는 영향

기내유식물체 유기를 위해서는 원형질분리법을 이용한 단일배의 유도방법과 이차배발생방법이 효과적이었으며, 특히 이차배발생률을 더욱더 증진시키기 위해 몇 가지 실험을 수행하였다.

식물 홀몬무첨가배지에서 이차배의 발생에 있어서는 탄소원의 농도가 중요한 요인이기 때문에, 이차배발생을 증진시키기 위해서 체세포배의 자엽을 절취하여 MS배지에 sucrose의 농도를 1%, 3%, 6%, 9%로 달리하여 배양한 결과 sucrose의 농도를 높일 경우 이차배의 발생이 현저히 높아져서 6% 및 9% sucrose를 첨가한 경우 각각 이차배 발생률이 각각 86%, 88%로, 3%의 57%보다 현저히 증가되었다(Table 4-4).

Table 4-4. Effects of sucrose on the formation rate of secondary embryos

Sucrose (%)	Frequency of secondary embryos(%)	
	Pre-germination	Post-germination
1	13	6
3	57	25
6	86	56
9	88	64

앞의 실험에서 식물홀몬을 첨가하지 않은 MS기본배지에서 체세포배를 유도하기 위해서는 높은 농도의 sucrose처리가 효과적인 것으로 나타났다. 이때 sucrose 효과는 저농도의 osmotic stress라고 구분할 수 있는데, 배 발생중

진을 위해서 고농도의 sucrose를 처리하여 원형질분리(plasmolysis)자극 방법을 이용할 경우 단일배의 발생빈도가 높을 것으로 사료되었다. 따라서 형질전환 인삼의 자엽조직을 이차배발생배지에 옮기기 전에 배양조직을 약 1몰의 고농도의 sucrose 용액에 24, 48시간 전 처리를 하여준 다음 약 5분 간격으로 1/2농도 회복시킨 다음 최종적으로 3% sucrose가 되게 하여 원형질분리 처리한 자엽을 MS배지에 3% sucrose를 첨가한 배지에 옮겨 배양한 후 약 2달 후에 이차배의 발생률을 조사하였다. 배양결과 배양절편당 발생된 이차배의 수가 현저히 증가하고 또한 접합자배와 같이 대부분 단일배로 발생되었기 때문에 정상적인 뿌리와 줄기를 지닌 식물체로 재생될 수 있었다. 따라서 고빈도 이차배의 발생을 유도하기 위해서 1몰의 설탕용액에서 약 48시간 전 처리를 하여주는 것이 매우 효과적인 것으로 사료된다(Table 4-5).

Table 4-5. Effect of pre-plasmolysis treatment on the formation of secondary embryos from cotyledon explants

Plasmolysis Pre-treatment	Formation rate of secondary embryos(%)	No. of secondary embryos per explant
0	56	7
24	73	23
48	66	32

일반적으로 기내배양에 의해서 유도된 식물체를 토양에 이식하여 재배하고자 할 때에는 기내유식물체의 경화(hardening) 또는 순화(acclimatization)처

리를 하여야 토양의 활착도를 높일 수 있다. 경화(hardening)처리는 토양에 옮기기 전인 기내에서 식물체에 처리하는 방법인데 본 실험에서는 일차적으로 기내에서 배가 발생되어 식물체로 재생시키기까지는 에너지 공급원으로서 배양액내에 탄소원을 넣어 주기 때문에 광합성에 의한 광독립 영양상태로 전환되지 못한 상태이다. 따라서 인삼형질전환 유식물체를 기내에서 토양에 옮겨 주는 경우 급작스런 광독립영양의 전환이 적절히 이루어지지 않은 경우 영양 결핍에 의해 토양순화율이 크게 떨어진 것으로 생각되었다. 이에 식물체가 지니는 고유특성인 광합성에 의한 독립영양을 촉진시키기 위해 배지내에 탄소원을 점차 감소시켜 주어 식물체가 광독립 영양상태로 전환되도록 유도하며 아울러 배양용기에 광도를 높게 유지하여 주는 방법을 사용하였다. 본 실험에서는 약 5cm정도 자란 인삼형질전환 유식물체를 3% 설탕이든 배지에서 계속 자라게 하고, 일주일 간격으로 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0%로 점차 낮춘 배지에 옮긴 경우와, 3%에서 바로 0%의 설탕에 옮겨주고, 배양조건은 광합성을 촉진시키기 위해 기존의 약 1000 lux보다는 높은 광조명 (3000 lux)하에서 식물체를 배양하였다. 배양 약 2 달이 경과한 후 3%에서 계속 배양한 대조 식물체와 경화처리한 경우를 비교했을 때, 경화처리한 경우 식물체의 전장이 작지만, 잎이 황화 되었다던가 생장의 장애를 받지 않았다(Table 4-6). 그러나 3%의 설탕에서 전혀 첨가되지 않은 배지에 옮길 경우 생장이 둔화되고 다소 잎의 황화현상이 관찰되었다.

Table 4-6. Hardening effects of ginseng plantlets

Treatment (Conc. of sucrose)	Growth of plantlets(cm)	Color of leaves
Subculture in 3%	11	Dark green
3→2→1→0.5→0% Transfer	8.6	Green
3→0% Transfer	6.3	Yellowish green

경화처리된 인삼식물체를 토양에 옮겨 6주후에 생존률을 조사한 결과 설탕의 농도를 점차 감소시켜 경화처리한 경우 토양생존률이 현저히 증가되었다 (Table 4-7).

Table 4-7. Survival rate of transformed plantlets treated with or without hardening

Treatment	Survival rate after 6 weeks(%)
Non-treatment	13
Hardening	32

결과적으로 인삼 유식물체를 기내에서 대량으로 증식시킨 다음 토양 활착률을 증진시키기 위한 경화 또는 순화처리가 적절하게 이루어지면 토양에 옮겨 활착은 물론 성공적인 인삼 형질전환체의 종자를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

바. 재분화된 인삼 유식물체의 토양 활착조건

1) Agar대체 토양의 개발

기내 인삼유식물체의 토양활착을 위해서 기내 hardening를 수행하였다. 기내 토양으로서는 일본 Nisshinbo회사에서 최근 개발된 vermiculite, fiber, cellulose등이 첨가된 토양(Florialite)에 1/2MS배지를 첨가하여 멸균한 후 이차 단일배발생에 의해서 유도된 인삼유식물체를 치상하여 4개월간 배양한 후 뿌리의 활착여부를 조사하였다.



A

B

Fig.4-14. Aerial parts (A) and rootlets (B) of ginseng plantlets cultivated in florialite.

우선 기내 인삼 유식물체는 정상적으로 식물체가 생육하였으며(Fig. 4-14-A), 어느정도 뿌리의 발육이 되었다(Fig. 4-14-B). 그리고 인삼유식물체를 기내에서 유도하여 토양(vermiculite : perlite : peatmoss =3:1:1)에 이식한 결과 유식물체의 토양활착도는 다른 식물에 비해 낮은 경향이었다.

제 4 절 요약

1. 인삼 접합자배의 자엽을 식물호르몬이 전혀 첨가되지 않은 MS기본배지에 배양한 결과 자엽의 기부에서 높은 빈도의 체세포배가 유기되었다.
2. 체세포배의 형성빈도는 접합자배 자엽의 성숙도에 따라서 차이가 있었는데 미숙배에서 성숙배로 진행됨에 따라 감소되는 경향을 보였다.
3. 미숙자엽의 경우에는 표피세포의 윗 아래층들이 모두 성숙자엽의 세포보다 더 적거나 더 촘촘하였으며, 많은 세포들이 체세포배의 형성에 관여하였으나 뿌리의 형성이 어려운 다배상태로 유기되었다.
4. 그러나 발아직적의 성숙자엽은 표피세포의 윗층만이 촘촘한 세포로 이루어 졌으며 뿌리의 형성이 가능한 체세포 단일배로 유기되었다. 이런 결과는 체세포배의 기원과 발육이 배발생시 사용한 자엽의 성숙도에 따라서 배발생에 참여한 세포들이 단일 혹은 다량상태인지에 따라서 결정된다는 것을 의미한다.
5. 인삼자엽절편을 이용할 경우 68%의 체세포배를 식물호르몬 무첨가배지에서 생산할 수 있는데 이때 형성되는 체세포배는 대부분 극성을 가지고 기부부위에서만 형성되었다.
6. 그러나 auxin polar-transport inhibitor인 2,3,5-triiodobenzoic acid(TIBA)를 20 μ M 첨가 할경우에는 체세포배의 형성이 완전히 억제되었다.
7. 5-10 μ M TIBA를 함유한 배지에서는 체세포배는 자엽의 표면에 형성되었으며 정

상적은 체세포배로 성장하였으나 간혹 jar 형태의 체세포배도 관찰할 수 있었다. 이런 결과는 체세포배의 형성에 자엽에 원래 함유되어 있는 endogenous auxin이 매우 중요한 역할을 하고 있음을 의미한다.

8. 성숙된 인삼 접합자배는 식물호르몬 무첨가 MS배지에서 발아가 된다. 그러나 접합자배를 NH_4NO_3 , KNO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 등을 첨가하여 stress를 주면 생장이 억제되거나 갈색으로 노화되어 고사된다.
9. 체세포배와 embryogenic calli는 이런 stress상태에서 직접 배가 형성되기도 하는데 NH_4NO_3 , 61.8mM에서 56.3%로 가장 체세포배의 형성이 양호하였다. 그리고 $\text{NH}_4\text{NO}_3 > \text{KNO}_3 > \text{KH}_2\text{PO}_4 > \text{MgSO}_4 > \text{CaCl}_2$ 순으로 체세포배가 형성되었다. 이런 체세포배는 정상적으로 지상부 및 뿌리가 형성되었으며 일부 유식물체를 토양중에 순화 시킬수 있었다.
10. 발아 직전에 있는 한국인삼의 접합자 배에서 유래된 자엽절편을 이용하여 체세포배를 유도하고 기내휴면여부를 조사하고자 식물호르몬으로써 2,4-D, BAP, kinetin을 첨가하거나 혹은 전혀 식물호르몬이 첨가하지 않은 MS배지에 절편을 배양할 경우 많은 체세포배 혹은 단일배를 획득할 수 있었다.
11. 그러나 이런 배들은 대부분 자엽형 배(cotyledonary stage) 까지 발육이 가능하지만 발아가 되지 못하여 더 이상 shoot로 생육되지 못하였고 하안상태의 자엽형 배로 계속 유지되었다. 그러나 gibberellic acid(1.0 mg/l 이상, GA_3)을 처리할 경우 3주 이내에 자엽형 배가 녹색으로 변하면서 발아되었으며, 저온처리 (-2 °C에서 8주간)를 할 경우에도 체세포배가 정상적으로 발아가 되었다.
12. 체세포배를 GA_3 및 저온 처리한 후 세포의 구조적변화를 전자현미경으로 관찰한 결과 무처리 체세포배의 자엽내 세포는 발아되지 않은 인삼접합자배의 세포와 같이 지질과립 및 세포질이 농후하며, 분화되지 않은 미토콘드리아 및 엽록체를 지녀서 세포의 활성이 약한 휴면 상태의 구조를 가지고 있었다. 그러나 저온처리 및 GA_3 를 처리한 자엽세포는 지질 및 세포질의 분포가 감소된 반면, 잘 발

달린 엽록체와 활성이 강한 미토콘드리아의 구조를 보였다. 따라서 저온 및 GA₃ 처리 후 세포의 대사활동이 활발한 것으로 보아 휴면이 타파된 것으로 판단되었다. .

13. 인삼 미숙배를 식물호르몬 무첨가 MS배지에 첨가할 경우에는 체세포배가 직접 형성되지만 이때 대부분 형성된 배는 다배 및 융합된 상태로 형성된다.
14. 그러나 인삼 자엽에 1.0 M sucrose을 24 - 72시간 처리할 경우 모든 체세포배는 형태적으로 단일배 상태로 형성되었으며 주로 자엽의 표면에 형성되었으며 일반 처리에 비해 약 4배정도 많은 체세포배를 형성하였다.
15. 형태학적으로 원형질 전처리된 체세포 인삼 단일배는 단일 세포로부터 유래되었으나 처리되는 않은 자엽의 경우에는 여러개의 세포로부터 형성되었다.
16. 성숙된 자엽상태의 체세포배는 어느 상태에는 생장이 멈추고 하얗게 되는데 이런 현상은 휴면으로 생각되면 GA₃를 첨가하거나 저온처리를 할 경우 모두 받아되었다.

참고문헌

1. Butenko R.G., R.V. Grushvitsky and L.I. Stepyan. 1968. Organogenesis and embryogenesis in a tissue culture (*Fanax ginseng*) and other *Fanax* L. Species, Bot. Zh., 53(7):906-911.
2. Butenko, R., I.V. Brushwitzky and L.I. Slepyan. 1968. Organogenesis and somatic embryogenesis in the tissue culture of *Fanax ginseng* C.A. Meyer. Bot. Zh., 7:906-911.
3. Chang W.C. and T.I. Hsing. 1978. Callus induction, growth and rhizogenesis from root of *Fanax ginseng* on on a defined medium. Nat. Sci. Coun., 6(8):770-772.
4. Chang, W.C. and T.I. Hsing. 1980. Plant regeneration through embryogenesis in root-derived callus of ginseng (*Fanax ginseng* C.A. Meyer). Theor. Appl. Genet. 57:133-135.
5. Chilton, M.D., M.H. Drummond, D.J. Merlo and E.W. Nester. 1978. Highly conserved DNA of Ti-plasmids overlaps T-DNA maintained in plant tumors. Nature 275:147-149.
6. Choi, K.T., and H.S. Shin 1982. Morphological characteristics inflorescence, flowering bud, fruit and leaf of Korean ginseng. Korean J. Ginseng Soc. 6(1):67-74.
7. Choi, K.T. and D.C. Yang. 1987. Characteristics of the growth of ginseng tumor callus. Korean J. Ginseng Sci. 11(1):56-65.
8. Furuya, T., T. Yoshikawa, T. Ishii, and K. Kajii. 1983 Effects of auxins on growth and saponin production in callus cultures of *Fanax ginseng*. Planta Medica 47: 183-187.
9. Yoshikawa, T. and T. Furuya. 1987. Saponin production by cultures of *Fanax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Reports. 6:449-453.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.