

高麗人蔘의 組織培養에 關한 研究(I)

— 溫度의 差異가 人蔘 및 人蔘Callus 生長에 미치는 影響 —

曹 在 星

忠南大學校 農科大學

Studies on the Tissue Culture of Korean-Ginseng (I) -Effect of temperature on the growth of ginseng plant and ginseng callus-

Jo Jae Seong

College of Agriculture, Chungnam National University

ABSTRACT

These studies were designed to define the effects of temperature on the vegetative growth of the Korean ginseng, the induction and growth of the ginseng callus and organ differentiation from the callus of ginseng.

At the temperature over 25°C, the plant growth of ginseng was significantly decreased and the chlorophyll in the central parts of leaflets was deteriorated. Induction and growth of the ginseng callus was best at 25°C.

High temperature of 29°C promoted the initiation of roots from callus tissue but the shoot was not initiated at the temperature over 25°C.

Shoots initiation from the ginseng callus occurred at 21°C or lower temperature.

緒 言

Slepyan 등⁸⁾이 1967年 최초로 人蔘을 材料로 하여 人蔘의 組織培養을 實施한 以來 人蔘에서 Callus의 誘起 및 增殖, Callus 組織에서 植物體의 再分化 그리고 器內培養을 위한 最商培地造成 등에 關한 研究들^{1,4,6)}이 報告된 바 있다. 한편 Furuya 등^{2,3)}은 器內培養한 Callus 組織 및 單細胞의 化學的 成分과 藥理學的 效果에 關해 報告하였던 바 器內培養에서 얻어진 單細胞에는 많은 量의 Ginsenoside가 함유되어 있으며 이는 人蔘根의 抽出物이 나타내는 藥效와 同等한 效果를 나타낸다고 하였고 최근에는 組織培養을 통하여 Callus를 급속히 增殖시켜 人蔘抽出物

의 生産을 工業化하려는 論도 台頭되고 있다.

그런데 人蔘은 陰地性 植物로서 光度는 人蔘의 生育에 크게 影響을 미치는 主要環境要因으로 알려져 왔는데 筆者는 몇가지 基礎實驗을 통하여 溫度 역시 人蔘의 生育에 큰 影響을 미치고 있음을 發見하였던 바 溫度는 人蔘의 生育뿐 아니라 人蔘植物體로부터의 Callus 誘起 및 增殖 그리고 器官의 再分化에도 影響을 미칠 것으로 가정하였다. 지금까지 人蔘의 組織培養에 關한 적지 않은 수의 研究가 國內外에서 遂行報告되었으나 대부분 培地의 造成^{6,7)}, 器官의 分化¹⁰⁾ 및 培養細胞 및 組織의 成分^{2,3)}에 關한 것들이며 溫度의 影響에 關한 報告는 전혀 없었던 바 筆者는 培養溫度가 人蔘植物體로부터 Callus의 誘起, 生長 및 器官의 再分化에 미치는 影響을 究明하는 한편 植物體의 生育에 미치는 影響을 究明하고 이를 比較檢計하고자 本實驗을 遂行하였던 바 몇가지 새로운 事實을 發見하였기에 報告하는 바이다.

이 研究는 1978年度 峨山社會福祉財團에서 支給되는 研究費로 遂行되었으며 특히 이 研究의 遂行에 크게 成원해 주신 財團여러분께 감사를 드린다.

材料 및 方法

溫度의 差異에 따르는 人蔘地上部 莖葉의 生育相을 究明하고자 3月 14日 1年生 苗蔘을 直徑 12cm의 Pot에 2本植으로 栽植하여 17°C, 21°C, 25°C 및 29°C의 生長箱에 각각 10個Pot씩 置床하였던 바 3月 18日부터 出芽하기 시작하였으며 出芽後 30日인 4月 17日 稈長, 葉長, 葉幅 및 掌葉數를 調査하였다. 한편 發芽직후의 幼苗期 生育에 미치는 溫度의 影響을 調査하기 위해 開匣種子를 0~4°C의 냉장고에서 低溫處理한 후 NaOCl 10% 용액에 15分

간 消毒하여 滅菌蒸溜水로 세척한 후 無菌箱에서 胚를 摘出하여 Murashige and Skoog 의 agar培地에 移植하였으며 이들을 각각 17°C, 21°C, 25°C 및 29°C 의 生長箱에 置床하였고 箱内の 光度는 3,000 lux 로 하였으며 發芽後 40日에 生育相의 調査를 실시하였다.

그리고 人蔘의 胚 및 植物體의 組織片으로부터 Callus 組織의 誘起 및 Callus 의 生長과 Callus 組織으로부터 根 및 莖葉器官의 再分化에 미치는 溫度의 影響을 究明하고자 開匣種子를 低溫處理한 種子의 胚와 Murashige and Skoog 의 agar培地에서 얻은 人蔘의 幼植物體의 莖葉를 材料로 사용하였다. 사용한 培地는 Murashige and Skoog 의 基本培地에 Agar 8g/l 및 Sucrose 30g/l 를 첨가하였으며 2,4-D 1mg/l 및 2mg/l 그리고 24-D 와 Benzyladenine

2mg/l 의 3種을 각각 基本培地에 첨가하여 100ml 의 3角Flask에 30ml씩 注入, 固體培地를 만들어 材料를 移植하고 이들을 각각 17°C, 21°C, 25°C 및 29°C 의 生長箱에 置床한 후 150日에 Callus의 生育相을 조사하였다. 그리고 器官再分化에 미치는 溫度의 影響은 25°C 및 29°C에서 生長한 Callus 21°C의 生長箱으로 옮겨 變溫處理 후 器官再分化相을 조사하였다.

結果 및 考察

溫度가 人蔘의 生育에 미치는 影響을 究明하고자 1年生苗蔘을 Pot에 栽植하여 300 lux의 人工照明下에서 溫度의 差異에 따르는 人蔘의 生育을 調査하였던 바 그 結果는 表 1에서 보는 바와 같다. 苗蔘

Table 1. Influence of temperature on the growth of ginseng seedling.

Temperature	Stem length	Leaf length	Leaf width	Number of leaves	Condition of leaves	Chlorophyll
17°C	11.0 a	6.2 a	2.7 ab	2.5	N	N
21°C	8.7 a	6.3 a	3.2 a	2.0	N	N
25°C	6.2 a	4.7 b	2.1 b	2.0	W	D
29°C	3.3 a	3.2 c	1.1 c	2.0	S	D

Note 1 ; W=wrinkled S=stunted D=deteriorated

Note 2 ; Numbers followed by the same letter are not significantly different at the 5% probability level.

의 發芽는 25°C 및 29°C區에서 21°C區에 비해 약 3~4日 빨랐으나 稈長 및 葉長은 17°C 및 21°C區에서 현저히 길었고 溫度가 높아질수록 현저히 짧아지는 경향을 보였다. 葉幅역시 17°C 및 21°C區에서 현저히 넓었으며 29°C의 高溫區에서는 현저히 좁아졌는데 특히 29°C區에서는 出芽期는 빨랐음에도 展葉이 제대로 되지 않았을 뿐아니라 展葉을 하여도 葉의 伸長이 되지 않거나 展葉도중 生育

이 정지되는 현상을 보였으며 25°C區에서는 展葉 후 中央部에서부터 葉綠素가 退化되어 연한 黃白色으로 변하였으며 29°C에서는 葉의 위측 및 葉綠素의 退化현상이 아주 심하였다.

한편 溫度가 人蔘의 幼苗期生育에 미치는 影響을 究明하고자 開匣種子의 胚를 摘出하여 器內培養한 結果는 表 2에서 보는 바와 같다. 稈長, 葉長 및 葉幅

Table 2. Influence of temperature on the growth of ginseng embryo in vitro.

Temperature	Stem length	Stem diam.	Root length	Leaf length	Leaf width	Fresh weight	Chloro-phyll	Plant died
17°C	4.05ab	0.89b	1.25ns	1.48a	0.62a	56.3a	N	-
21°C	4.51a	0.87b	1.32	1.17ab	0.58ab	60.5a	N	-
25°C	3.25bc	0.99a	1.51	1.07b	0.51ab	53.5a	D	-
29°C	2.90c	0.95ab	1.52	0.99b	0.41b	39.3b	SD	25%

Note ; D=deterioraten SD=severely deteriorated

은 17°C 및 21°C區에서는 현저히 길었고 25°C 및 29°C區에서는 溫度가 높아질수록 현저히 짧아졌으나 莖太는 오히려 25°C 및 29°C區에서는 증가되었는데 이는 高溫下에서는 莖의 伸長이 억제되었던데 기인된 결과였다. 幼植物의 生體重은 21°C區에서 가장 무거웠으며 다음이 17°C區였고 25°C 및 29°C

에서는 현저히 가벼웠으며 특히 29°C區에서는 25%의 幼苗가 枯死하였다. 17°C 및 21°C에서는 葉色이 정상적인 綠色을 띄었으나 25°C區에서는 葉의 中央部에서부터 葉綠素가 退化되어 白化되었으며 29°C區에서는 葉綠素退化가 아주 심하여 葉全體가 白化되는 현상을 보였다. 이상의 結果로 미루어 볼

때 人蔘의 地上部 生育 適溫은 21℃ 以下이며 25℃ 以上에서는 生育에 異常을 招來하였던 바 지금까지 人蔘은 陰地性 植物로서 一次的인 生育 制限要因은 光度라는 개념하에서는 모든 栽培 技術이 改善 發展되어 왔는데 이러한 개념은 溫度역시 光度와 같이 重要한 一次的인 生育 制限要因이라는 개념으로 수정되어야 할 것이라 생각된다.

前記한 두가지 實驗에서 人蔘의 生育 適溫을 究明하였는데 人蔘의 組織으로부터 Callus의 誘起나 增殖 그리고 Callus로부터 器官의 分化에 미치는 溫度의 影響은 또 다를 수도 있을 것으로 고려되어 開匣 種子에서 摘出한 胚를 2mg/l의 2,4-D 및 Benzyladenine을 첨가한 Murashige and Skoog agar 培地에 移植하였던 바 溫度에 따르는 結果는 表 3에서 보는 바와 같다. 17℃ 및 21℃에서는 胚軸이

Table 3. Influence of temperature on the induction and growth of callus from the embryos of ginseng on the M.S. medium added 2,4-D and Benzyladenine.

	Temperature			
	17℃	21℃	25℃	29℃
Epicotyl shape	T	T	-	-
Callus induction	+	+	++	++
Callus growth	198mg	132	517	396
Root initiation	-	-	+	+++

Note ; T = thickened



Figure 1. Influence of temperature on The growth of ginseng callus

短太해지면서 胚葉에서 Callus가 誘起되었으나 25℃ 및 29℃에서는 胚軸에 변화없이 胚葉부터 Callus化하였는데 Callus의 誘起程度는 25℃ 및 29℃에서 현저히 빠르고 높았다. Callus의 生長은 25℃에서 가장 빨랐고 다음이 29℃였으며 17℃ 및 21℃에서는 Callus의 生長이 늦었는데 이 結果로 미루어 볼 때 高溫은 人蔘器官의 說分化에 현저한 影響을 미치는 것으로 사료된다. 한편 29℃에서는 어느 정도

Callus가 誘起된 후부터는 Callus表面全體에서 상당히 많은 量의 發根을 보였다.

그리고 2,4-D만 1mg/l첨가한 Murashige and Skoog 培地에 胚를 移植한 경우도 (表 4 參照)

2,4-D 및 Benzyladenine을 2mg/l處理하여 얻은 結果와 同一한 結果를 얻었다. 한편 人蔘幼植物의 組織片으로부터의 Callus誘起 및 生長에 미치는 溫度의 影響을 究明하고자 人蔘幼植物의 줄기 및 잎을 2,4-D 1mg/l 및 2mg/l를 첨가한 Murashige and Skoog 培地에 移植하였던 바 (表 4 參照) 25℃ 및 29℃에서 Callus의 誘起 및 生長은 현저히 촉진되었으며 17℃에서도 상당히 빠른 Callus의 生長을 보였다.

Table 4. Influence of temperature on the induction and growth of callus from embryos and plant segment of ginseng on the M, S, m - edrum added 2,4-D.

	Temperature			
	17℃	21℃	25℃	29℃
Epicotyl shape	T	T	N	N
Callus induction a	+	+	++	+++
Callus growth a	152mg	213	467	600
Root initiation	-	-	-	+++
Callus growth b	+++	++	+++	+++
Callus growth c	++	+	+	++

Note ; a = callus from embryos at 2,4-D 1.0mg/l

b = callus from plant segments at 2,4-D 1.0mg/l

c = callus from plant segments at 2,4-D 2.0mg/l

全體實驗을 통하여 Callus의 誘起 및 增殖 그리고 Callus에서의 器官의 再分化에 미치는 溫度의 影響을 綜合해 보면 (表 5 參照) Callus의 誘起에는 25℃가 가장 效果의이였으며 21℃에서는 誘起速度가 현저히 늦었고 25℃以上の 溫度에서 Callus의 增殖은 현저히 加速되었다. 그런데 대체로 Callus가 誘起된 후 個體에 따라서는 계속 生長하는 경우도 있으나 대체로 어느 정도 Callus가 生長하면 일단 Callus의 生長이 정지되었으며 一定期間 후 다시 Callus가 급속히 生長하는 경향을 볼수 있었는데 이로 미루어 볼때 Callus의 生長에도 休眠現象이 개재하는 것으로 추측되는 바 이를 究明하기 위한 구체적인 研究가 수행되어야 할 것으로 사료된다. 25℃ 이상의 溫度에서는 Callus가 어느 정도 커지면 예외 없이 많은 양의 發根을 보였으나 莖葉의 分化는 전혀 없었던 반면 25℃이상에서 生長시키던 Callus를

Table 5. Influence of temperature on the callus induction and the organ differentiation from ginseng callus.

	Temperature		
	21 °C	25 °C	29 °C
Callus induction	+	+++	++
Callus growth	+	++	+++
Root initiation	-	-	+++
Shoot differentiation	+++	-	-

(2,4-D 2mg/l 첨가한 M.S. 培地上에서 培養한 경우) 다른 生長調節物質을 포함시킨 培地에 옮기지 않고 그대로 溫度만 21 °C로 낮추어 방치하면 Callus에서 곧 芽가 形成되고 줄기와 잎이 分化, 伸長되었던 各 器官의 分化에는 溫度가 가장 重要한 要因임을 發見하였다.

摘 要

人蔘의 栽培 및 器內培養時 Callus 組織의 誘起와 生長 및 Callus 組織으로부터 根 및 莖葉의 再分化에 미치는 溫度의 影響을 究明하고자 本實驗을 遂行하였던 바 그 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 17 °C 내지 21 °C에서는 胚에서 發芽한 幼苗가 正常的인 成長을 보였으며 특히 21 °C에서 가장 왕성한 生育을 보였으나 25 °C에서는 莖의 伸長이 억제되고 葉의 葉綠素가 退化되었으며 29 °C에서는 잎은 白化枯死하고 生育이 정지 되었다.

2. 2年根人蔘의 生育역시 17 °C~21 °C에서는 正常的이 있으나 25 °C에서는 莖葉의 伸長이 억제되고 葉中央部の 葉綠素가 退化되는 現象을 보였으며 29 °C에서는 出芽後 곧 生育이 정지 되었다.

3. 人蔘組織片으로부터의 Callus의 誘起는 25 °C 이상의 溫度에서 현저히 빨랐으며 Callus의 生長도 25 °C에서 가장 旺盛하였다.

4. Callus 組織으로부터의 根의 再分化는 高溫에서 촉진되었으며 29 °C에서 發根量이 가장 많았으나 25 °C 이상의 溫度에서는 莖葉의 分化가 거의 없었다.

5. 25 °C 이상에서 培養하던 Callus를 21 °C로 培養溫度를 낮추면 Callus에서 芽가 形成되고 莖葉이 分化伸長된다.

參 考 文 獻

1. Butenko, R. G. I., V. Brushwitzky and L. I. Slepyan 1968. Organogenesis and somatic embryogenesis in the tissue culture of panax ginseng C. A. Meyer. Bot. zh. 7: 906-913.

2. Furuya, T., H. Kojima, K. Syono and T. Ishii, 1970. Isolation of panaxatriol from panax ginseng callus. Chem. Pharm. Bull. 18: 2371-2372.

3. _____ and T. Ishii, 1973. The manufacturing of Panax plant tissue culture containing crude saponins and crude sapogenins which are identical with those of natural Panax roots. Japan. Patent Appl. No. 48-31917.

4. Harn, C., J. Kim, K. Kim and S. Hong. 1973. Studies on the tissue culture of Panax ginseng. Korean J. Plant Tissue Cult. 1: 1-6.

5. _____ and Y. Lee, 1974. Studies on the cotyledon culture of Panax ginseng. Korean J. of Bot 17: 171-174.

6. Jhang, J. J., E. J. Staba and J. Y. Kim, 1972. American and Korean ginseng culture: growth and examination for saponins. 13th Annual Meeting of Univ., Ohio.

7. _____ and _____. 1974. American and Korean ginseng tissue cultures: growth, chemical analysis and plantlet production. In vitro 9: 253-259.

8. Slepyan, L. I., I. V. Brushwitzky and R. B. Butenko, 1976. Panax ginseng C. A. Meyer as an object for introduction into tissue culture. Probl. Pharmacog. 21: 198-203.

9. _____. 1968. Pharmacological activity of callus tissue of ginseng growth under in-vitro conditions. Trans. Leningrad Khim-Farm. Inst. 26: 236-244.

10. _____. 1971. Callus development in isolated ginseng root tissue culture. Rast. Resur. 7: 175-186.

Summary

These experiments were carried out to define the effect of temperature on the vegetative growth of the Korean ginseng, the induction and growth of the ginseng callus and the organs differentiation from the callus of ginseng. Results obtained are summarized as follows ;

1. Growth of ginseng seedlings was normal at the temperature ranging from 17 °C to 21 °C and the best growth was occurred at 21 °C. At 25 °C the stem of seedling was short and chlorophylls in central part of leaflets were degenerated and

- at 29 °C, the color of leaflets turned to white and soon the seedling was wilted and dead.
2. The plant growth of 2 years old ginseng was normal at the temperature ranging from 17 °C to 21 °C and higher temperature over 25 °C obstructed the normal growth of stem and leaflets. At 29 °C, severe chlorophyll deterioration was occurred from central part of leaflets and stopped the growth in a few weeks after emergence.
 3. The callus induction was significantly promoted at the temperature over 25 °C and best callus growth occurred at 25 °C.
 4. High temperature of 29 °C promoted the redifferentiation of roots from ginseng callus tissue but shoots were not initiated from callus at high temperature over 25 °C.
 5. Shoots initiation from ginseng callus tissue occurred at 21 °C or lower temperature.