

## 高麗人蔘의 組織培養에 관한 研究(II)

### - 2, 4-D 및 Benzyladenine이 人蔘 Callus의 誘起 및 增殖에 미치는 影響 -

忠南大學校 農科大學

曹 在 星

## Studies on the Tissue Culture of Korean Ginseng(II)

### -Effect of 2,4-D and Benzyladenine on the Induction and Growth of Ginseng Callus-

Jae Seong Jo

College of Agriculture, Chungnam National University

#### ABSTRACT

These studies were designed to define the effects of Benzyladenine and 2,4-D on the induction and growth of callus tissue from embryos and plant segments of Korean ginseng.

0.5PPM was the minimum concentration of 2,4-D for the induction of callus tissue from embryos and plant segments of ginseng. Best callus induction occurred at a 2,4-D concentration of 5 mg/liter but growth of this callus was best at a 2,4-D concentration of about 1.0 to 2.0 mg/liter and benzyladenine was ineffective as callus inducer. When the embryos were grown on the media containing 0.5 mg/liter of 2,4-D, 5 to 6 axillary buds were formed at the basal part of epicotyle.

#### 緒 言

最近 20年間 植物의 細胞 및 組織培養에 관한 研究가 여러가지 植物을 對象으로 활발히 進行되어 왔는데 이러한 細胞나 組織의 培養은 植物의 生理的 및 生化學的 特性에 관한 研究나 作物의 育種 및 大量繁殖에 탁월한 利點을 갖고 있다. 특히 人蔘은 多年生 植物으로써 1世代에 3~4年이 所要될 뿐 아니라 圃場內의 環境에 아주 민감한 個體間差異를 나

타내는 作物이므로 이의 生理的 特性에 관한 研究나 育種 및 大量繁殖을 위해서는 人蔘의 細胞나 組織의 培養이 많은 利點을 제공할 것으로 생각된다.

Slepyan<sup>8)</sup> 이래 지금까지 培地의 造成, 人蔘植物體의 培養部位에 따르는 差異, 培養된 Callus 및 單細胞의 化學的 造成 및 藥理的 效果<sup>2,3,9)</sup> 등에 관한 研究들이 報告된 바 있는데 本研究는 高麗人蔘의 胚 및 莖葉組織의 脫分化에 미치는 몇가지 生長調節物質의 影響과 아울러 Callus 誘起에 필요한 이들 生長調節物質의 最低 및 最高濃度를 究明하고자 遂行되었던 바 몇가지 새로운 事實이 發見되었기 報告하는 바이다.

이 研究는 1978年度 峨山社會福祉財團에서 持及하는 研究費로 遂行되었으며 이 研究의 遂行에 많은 뒷받침을 해주신 財團여러분께 감사드립니다.

#### 材料 및 方法

材料로 사용한 高麗人蔘의 胚는 錦山地方에서 購入한 開匣種子를 10月 30日부터 1個月間 0~4°C의 냉장고에서 低溫處理한 후 絹紙를 제거하고 15%의 NaOCl 용액에 15分間 消毒 후 滅菌水로 2회 세척하여 無菌箱에서 摘出하였다. 그리고 材料로 사용한 莖葉片은 Murashige and Skoog 培地에 胚를 移植生長시켜 여기서 얻어진 人蔘의 幼植物에서 얻었다. 基本培地는 Murashige and Skoog 培地를 사용하였으며 여기에 Sucrose 30g/l 및 Agar 8g/l

를 첨가하였고 培地를 100ml의 삼각 Flask에 30cc 씩 注入 固體培地를 만들었으며 材料를 移植 후 21 °C, 3000lux의 生長箱에서 培養하였다.

生長調節物質의 處理는 2,4-D의 경우 그 濃度를 0.01, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 및 5.0 mg/ℓ 로 處理하였으며 Benzyladenine과 2,4-D의 組合處理 경우 2,4-D의 濃度는 0, 0.1, 0.5 및 2.0 mg/ℓ 그리고 Benzyladenine은 0.1, 0.5, 1.0 및 2.0 mg/ℓ로 하여 이들을 (4 × 4)의 Factorial로 배치 實驗하였으며 處理當 Flask의 수는 20個로 하였다.

### 結果 및 考察

人蔘의 Callus를 얻기 위해서는 圃場에서 人蔘 잎

이나 줄기 혹은 뿌리의 단편을 취하여 培地에 移植할 수도 있겠으나 圃場에서 Explant를 취할 경우 대부분 오염이 생겨 곤란하다. 韓<sup>5)</sup> 등은 胚를 器內培養하여 人蔘幼植物을 만들고 여기서 上胚軸, 子葉 및 下胚軸을 각각 Knudson C 培地에 培養하였던 바 子葉에서만 Callus나 生長點과 유사한 돌기가 생기고 여기서 다시 완전한 植物體를 얻을 수 있었음을 報告한 바 있는데 胚에서 직접 Callus를 誘起시킬 경우 오염도 적을뿐 아니라 作業도 간편함, 것으로 생각되어 本實驗에서는 胚를 직접 2,4-D를 첨가시킨 Murashige and Skoog 培地에 移植하였을 경우 2,4-D의 濃度에 따르는 胚의 脫分化 및 Callus의 誘起를 조사하였다(表 1 參照).

2,4-D를 0.01 mg/ℓ 첨가한 培地에서는 胚는 正常的인 生育을 보였으며 0.1 mg/ℓ 첨가한 培地

Table 1. Influence of 2,4-D on the induction of callus from the ginseng embryo.

	2,4-D Concentration mg/ℓ					
	0.01	0.1	0.5	1.0	2.0	5.0
Shoot	N	N	62.5%	—	—	—
Roots	N	P	VP	—	—	—
Callus # 1	—	—	37.5%	+	++	++
Callus # 2	—	—	+	+++	+++	++++

Note ; N=normal growth P=poor VP=very poor  
 —=no induction +=poor ++=moderate  
 # 1=callus from embryo # 2=callus from shoot

에서는 莖葉은 正常的인 生長을 보였으나 根의 伸長은 아주 억제되었다. 2,4-D를 0.5 mg/ℓ 첨가한 培地에서는 62.5%만이 莖葉의 伸長을 보였고 下胚軸은 미미하게 자라 뿌리의 흔적만을 보였으며 37.5%는 上胚軸이 伸長되지 않고 短太해졌으며 子葉은 伸長하면서 Callus化되어 Callus塊로 변하였다. 그리고 2,4-D 1.0 mg/ℓ 이상 處理區에서는 上胚軸이나 下胚軸이 伸長하여 莖이나 根으로는 分化되지 않았고 약간 부풀기만 하였으며 子葉만이 伸長되면서 모두 Callus化하였고 2,4-D 5.0 mg/ℓ 첨가한 區에서는 上, 下胚軸이 모두 Callus化하였으며 Callus의 分化가 가장 빨랐다.

한편 胚를 器內培養하여 幼植物을 만든 후 幼植物에서 줄기와 잎을 절단하여 2,4-D를 濃度別로 첨가한 Murashige and Skoog 培地에 移植하였을 경우 Callus가 誘起되는 最低의 2,4-D 濃度는 0.5 mg/ℓ 이었고 5.0 mg/ℓ에서는 Callus의 誘起가 가장 빠른 경향이였다. 이상의 結果를 綜合해 볼 때 器官이나

組織의 脫分化 및 Callus 誘起를 위한 2,4-D의 最低濃度는 0.5 mg/ℓ 이었으며 1.0 mg/ℓ에서는 쉽게 Callus를 誘起시킬 수 있었다.

그리고 培地가 함유하는 2,4-D 濃度가 Callus의 生長 및 器官의 分化에 미치는 影響을 조사하였던 바(表 2 參照) 1.0 mg/ℓ의 2,4-D를 첨가한 培地

Table 2. Influence of 2,4-D on the callus growth and the organ differentiation from the callus.

	2,4-D Concentration mg/ℓ			
	0.5	1.0	2.0	5.0
Callus growth	124 a	635 b	384 ab	120 a*
Shoot initiation	+++	++	+	—
Root initiation	+++	++	+	—
Bud formation	+++	++	+	—

\* Numbers followed by the same letter are not significantly different at 5% level.

에서 Callus의 生長은 가장 旺盛하였고 다음이 2.0 mg/l이었으며 2,4-D를 5.0 mg/l 첨가한 培地에서는 오히려 Callus의 生長은 낮은 경향이였다. Callus가 어느정도 크기로 生長한 후에는 다시 胚軸部位에서 芽와 뿌리가 상당수 發生되었는데 0.5 mg/l의 2,4-D첨가區에서 싹과 뿌리의 발생이 가장 많았고 2,4-D의 濃도가 높을수록 分化의 程度는 현저히 낮아졌으며 2,4-D處理區에서는 전혀 싹이나 뿌리의 發生이 없었다. 한편 한가지 特異한 現象은 芽의 形成인데 2,4-D 0.5 mg/l 첨가한 培地에 移植하였던 胚에서는 子葉이 Callus化되어 Callus가 어느정도 生長한 후 胚軸部位에서 상당수(5~6개 이상)의 구슬모양(直徑 1.0 mm 내외)의 芽를 形成하였으며 1.0 mg/l區에서는 1~2개 그리고 2.0 mg/l區에서는 1개의 芽가 각각 着生되었으나 5.0 mg/l處理區에서는 전혀 芽의 着生이 없었다. Callus

로부터 再分化된 植物體는 染色體異狀에 基因되는 기형식물의 出現이 많다는 報告가 많은데 本實驗에서도 人蔘Callus에서 再分化된 植物體는 잎의 葉肉이 두껍거나 小葉數가 1枚인 것, 줄기가 아주 굵은 것 등 外見上으로도 현저한 기형을 보이는 個體의 出現빈도가 높아 Callus에서 유래된 個體를 번식에 利用함은 不可할 것으로 인정되는 바 本實驗에서 發見된 이러한 新芽는 個體의 增殖에 극히 有用할 것으로 보여 人蔘의 器內培養에 의한 大量繁殖의 귀중한 可能性을 제시하고 있다.

Benzyladenine과 2,4-D가 人蔘의 胚에서의 Callus의 誘起에 미치는 影響을 究明하고자 두 生長調節物質을 濃度別로 處理한 Murashige and Skoog 培地에 開匣種子의 胚를 移植하고 胚의 變化를 조사하였던 바(表 3 參照) B.A.만을 첨가했을 경우 B.A.의 濃도가 높아짐에 따라 줄기는 短太해지고

Table 3. Influence of 2,4-D with benzyladenine on the induction of callus from the embryo of Korean-ginseng.

2,4-D	B. A.	Stem	Leaf	Root	Epicotyl	Cotyledon	Bud	Callus
0	0.1	N	N	N	—	0.1ET	—	—
0	0.5	ST	D	D	—	0.5ET	—	—
0	1.0	ST	D	—	—	ET	+	—
0	2.0	ST	D	—	—	ET	+	—
0.1	0.1	0.6ST	D	—	0.4T	0.4ET	—	—
0.1	0.5	ST	—	—	—	ET	+	—
0.1	1.0	ST	D	—	—	ETT	+++	—
0.1	2.0	—	—	—	T	ETT	+	—
0.5	0.1	—	—	—	T	ET	+	—
0.5	0.5	—	—	—	T	ET	+	+
0.5	1.0	—	—	—	T	ET	++	—
0.5	2.0	—	—	—	T	ET	—	—
2.0	0.1	—	—	—	TT	ETT	—	++
2.0	0.5	—	—	—	T	ET	—	++
2.0	1.0	—	—	—	T	ET	—	+++
2.0	2.0	—	—	—	T	ET	—	+

Note ; N=normal S=short T=thickened D=degenerated  
E=elongated —=not changed nor induced

잎과 뿌리는 退化 혹은 分化되지 않았으며 子葉의 一部 혹은 전부가 伸長되면서 肥大해졌다. 2,4-D 0.1 mg/l와 B.A. 2.0 mg/l를 同時에 處理하거나 2,4-D 0.5 mg/l이상과 B.A.를 組合處理한 경우 胚에서 줄기, 잎, 뿌리 등은 分化되지 않고 上胚軸만이 圓錐모양으로 부풀었으며 子葉은 伸長되면서 肥

大되었다. 특히 2,4-D 0.1 mg/l 및 B.A. 1.0 mg/l와 2,4-D 0.5 mg/l 및 B.A. 1.0 mg/l를 각각 組合處理한 區에서는 前記한 바와 같은 芽의 出現이 현저히 많았으며 2,4-D의 濃도가 낮을 경우 B.A.는 芽의 生成에 현저한 보조역할을 하는 것으로 생각된다. 한편 Callus의 誘起는 2,4-D 0.5 mg/l 및

B. A. 0.5 mg/l 의 組合處理區에서만 子葉이 약간 Callus 化 되었을 뿐 2,4-D 0.5 mg/l 處理區에서는 B. A.의 濃度가 높을 경우 Callus 가 전혀 誘起되지 않았으며 2,4-D 2.0 mg/l 의 處理組合까지는 어느 정도 Callus의 誘起가 상당량 이루어졌으나 B. A. 2.0 mg/l 處理組合에서는 Callus의 誘起가 현저히 부진하였던 바 B. A.는 Callus의 誘起를 억제하는 方向으로의 效果를 나타내었다.

### 摘 要

高麗人蔘의 胚 및 植物組織片의 脫分化和 Callus의 誘起 및 生長에 미치는 2,4-D 및 Benzyladenine의 效果를 究明하고 Callus와 誘起 및 生長에 필요한 2,4-D의 最低 및 最適濃度를 밝히고져 本研究를 遂行하였던 바 그 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 2,4-D를 0.1 mg/l 첨가한 培地에서는 人蔘의 胚나 植物片에서 Callus가 전혀 誘起되지 않았으나 0.5 mg/l 處理한 培地에서는 全體胚의 1/2에서 Callus가 誘起되었으며 植物片에서는 모두 약간 의 Callus가 誘起되었다.

2. Callus의 誘起는 2,4-D를 5.0 mg/l 處理한 培地에서 가장 빨랐으나 Callus의 生長量은 1.0~2.0 mg/l 의 2,4-D를 첨가한 培地에서 현저히 많은 경향이였다.

3. 2,4-D를 0.5 mg/l 첨가한 培地에 移植한 胚에서는 子葉이 Callus 化되어 Callus가 어느 정도 成長한 후 上胚軸의 基部에서 5~6個이상의 구슬모양의 新芽가 形成되었다.

4. Benzyladenine은 根, 莖 및 葉의 生長을 억제하고 子葉의 伸長肥大를 조장하였으며 高濃度의 Benzyladenine은 Callus의 誘起를 억제하는 效果가 현저하였다.

5. 2,4-D 0.1 mg/l 및 Benzyladenine 1.0 mg/l 를 組合處理한 培地上에 移植된 胚의 上胚軸 基部에서도 5個이상의 구슬모양의 新芽가 形成되었다.

### 引 用 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 tissue culture: growth and examination for saponins. 13th Annual Meeting of the Amer.Soc.Pharm., College of Pharmacy Ohio State 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. 1967. *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 grown 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 designed to define the effects of benzyladenine and 2,4-D on induction and growth of callus tissue from embryos and plant segments of Korean ginseng and to determine the minimum and adequate concentration of 2,4-D for callus induction. The results obtained are as follows;

1. 0.5 mg/liter was the minimum concentration 2,4-D for callus induction from embryos and plant segments of Korean ginseng.
2. The callus induction from embryos as well as plant segments was significantly promoted at 2,4-D concentration of 5.0 mg/liter but best callus growth occurred at 2,4-D concentration of 1.0-2.0 mg/liter.
3. When the embryo was grown on the media containing 0.5 mg/liter 2,4-D, callus was induced at cotyledon and then 5-6 axillary buds were formed at the basal part of epicotyl.
4. Benzyladenine was ineffective as callus inducer.
5. 5 or 6 axillary buds were formed at the basal part of epicotyl of which embryo was grown on the media containing 0.1 mg/liter 2,4-D and 1.0 mg/liter benzyladenine.