

人蔘根 및 子葉 Callus의 器官分化에 關한 研究

崔光泰 · 金明苑 · 申熙錫

韓國人蔘煙草研究所

(1981년 4월 25일 접수)

Root and Shoot Formation in Explant and Callus Derived from Root and Cotyledon of Ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer)

Kwang-Tae Choi, Myong-Won Kim and Hee-Seuk Shin

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Seoul

(Received April 25, 1981)

Abstract

Explants of mature root tissues and calli derived from root and cotyledon of *Panax ginseng* were cultured *in vitro* on Murashige and Skoog medium supplemented with 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D), naphthaleneacetic acid (NAA), benzyladenine, and gibberellic acid to assess their capacity to regenerate organs.

Root formation at high percentage (46.2-61.1%) was obtained 20-30 days after culturing on media supplemented with combinations of NAA (5 mg/ℓ) and kinetin (1 mg/ℓ). And calli derived from cotyledon produced numerous embryoids in media (1/2 MS) containing 2,4-D (0.5 mg/ℓ) and kinetin (0.5 mg/ℓ). Reculture of these embryoids in media (1/2 MS) enriched with 1 mg/ℓ of benzyladenine and 1 mg/ℓ of gibberellic acid resulted in more plantlet regeneration.

緒 論

人蔘은 直射光線을 싫어하고 栽培條件이 매우 까다로운 多年生 陰地植物로서 開花 結實하는데에 3~4년이 걸리므로 品種育成에 長時日이 所要된다. 그리고 優秀系統 및 品種이 育成되었다고 하더라도 增殖이 問題視되므로 一般의인 種子繁殖方法 以外에 時間을 短縮시킬수 있는 다른 增殖方法을 開發하는 것이 절실하다. 故로 母本의 形質을 그대로 가지면서 遺傳的인 素質에는 조금도 차이가 없고 개체증식을 短時間內에 할 수 있는 방법을 강구하고자 組織培養技術을 人蔘育種에 導入한 바 있다.⁶

人蔘의 組織培養은 1968年 Butenko¹가 人蔘의 莖, 花器, 줄기, 뿌리등의 조직에서 callus를 유기한 것을 비롯하여 Chang², Jhang³, 韓⁵, 李⁷ 등에 의하여 callus 유기에 대한 연구결과가 報告된 바 있으며, 최근에는 callus에서 器官을 再分化시키는 研究들^{4,6}이 많이 수행되고 있다. 그러나 器官의 再分化에 대해서는 아직까지 체계적으로 되어 있지 않으며 基礎的인 것에 불과하므로 본실험에서는 우선 人蔘의 根 및 子葉組織에서 유기한 callus의 器官分化能을 구명코자 生長조절물질을 첨가하여 callus를 培養하였던 바 약간의 결과를 얻었기에 이에 보고코저한다.

材料 및 方法

人蔘根(*Panax ginseng* C. A. Meyer)을 7% calcium hypochlorite 수용액으로 20분간 표면 살균후 무균실에서 살균수로 4~5회 세척하여 재료로 사용하였다.

Callus를 유도하기 위하여 MS salt⁹에 myo-inositol 100mg/l, nicotinic acid 0.5 mg/l, pyridoxine-HCl 0.5mg/l, thiamine-HCl 0.1mg/l, yeast extract 5g/l, sucrose 30g/l, Difco-Bacto agar 10g/l를 첨가한 培地를 基本培地로하고 여기에 2,4-D 5mg/l를 첨가한 培地에 人蔘根의 pith tissue를 접종하였다. 탈분화되지 않은 人蔘根組織과 人蔘根에서 유기된 callus에서 뿌리를 再分化시키기 위하여 1/2MS salt에 NAA 0, 0.1, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 15.0mg/l, kinetin 0, 1, 2, 5mg/l씩 각각 첨가한 單用 혹은 混用培養基에 人蔘根組織과 callus를 접종하여 50일간 25±1℃에서 暗培養後 뿌리분화율을 조사 비교하였다. 뿌리분화율 조사는 뿌리절편을 접종한 것은 분화된 뿌리절편수로 하였고 callus를 접종한 것은 분화된 flask수로 하였다.

또한 子葉由來callus에서 기관을 분화시키기 위하여 胚培養한 結果 形成된 子葉을 切取하여 이들을 1/2MS salt에 casein hydrolyzate 2 g/l, 그리고 其他 有機物은 前記한 것과 같은 量을 添加한 培地를 基本培地로하고 여기에 2,4-D 0.5 mg/l, kinetin 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l씩 각각 첨가한 培養基에 접종하여 25±1℃, 16시간 光狀態, 8시간 暗狀態로 조절한 growth chamber에서 5개월간 배양하여 胚形成 및 기관분화율을 조사 비교하였다. 培養中에는 1개월마다 새로운 배지에 계대배양 해 주면서 배양하였다. 분화된 胚form은 脫分化를 방지하기 위하여 다시 子葉培養을 위한 培養基를 기본배지로 하고 여기에 BA 0, 0.1, 1.0, 5.0 mg/l, GA 0, 0.1, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 mg/l씩 첨가한 배양기에서 1개월간 배양한 후 shoot분화율 및 생장을 비교조사하였다.

結果 및 考察

1. 根組織의 切片과 callus의 根分化能

인삼의 根組織 切片을 인공배양하면 20~30日 後부터 뿌리조직이 탈분화되지 않고 根切片 내부의 分枝조직에서 다수의 뿌리가 발생하는 경우가 많으며 또한 callus조직에서도 많은 뿌리가 분화된다. 고로 이들 根組織切片 및 根由來callus組織의 뿌리발생에 대한 生長 조절물질의 효과를 구명하기 위하여 基本培養基에 NAA와 kinetin의 농도를 각각 달리 첨가한 배양기에서 根切片을 培養하였던 바 그 결과는 Tables 1, 2와 같다.

뿌리分化率을 보면 NAA를 첨가하지 않은 배양기와 NAA 0.1 mg/l, 10 mg/l를 각각 첨가한 배양기, 그리고 kinetin 5 mg/l씩 첨가한 배양기에서는 뿌리가 전혀 분화되지 않거나 혹은 분화율이 대단히 낮은 반면에 NAA 5 mg/l, kinetin 1 mg/l를 混用한 培養基에서는 根分化率이 61.1%로서 가장 높은 傾向을 보였다(Table 1). 根組織由來callus에서는 NAA를 첨가하지 않은 배양기에서도 뿌리형성율이 15.4%로서 根組織切片 배양과는 다른

Table 1. Effects of NAA and kinetin on the root differentiation of root explants

Concentration(mg/l)		No. of explants		Per cent
NAA	Kinetin	cultured	differen- tiated	
0	1	18	0	0
0	2	36	0	0
0	5	42	0	0
0.1	1	30	0	0
0.1	2	39	0	0
0.1	5	60	0	0
1.0	1	48	5	10.4
1.0	2	39	1	2.6
1.0	5	42	0	0
2.0	1	45	14	31.1
2.0	2	18	0	0
2.0	5	18	0	0
5.0	1	18	11	61.1
5.0	2	18	2	11.1
5.0	5	36	2	5.6
10.0	1	36	3	8.3
10.0	2	18	0	0
10.0	5	12	0	0
15.0	1	21	0	0
15.0	2	18	0	0
15.0	5	18	0	0

Table 2. Effects of NAA and kinetin on the root differentiation of root callus

Concentration(mg/l)		No. of flask		Per cent
NAA	Kinetin	cultured	differen- tiated	
0	1	13	2	15.4
0	2	20	0	0
0	5	17	0	0
0.1	1	22	0	0
0.1	2	22	0	0
0.1	5	18	0	0
1.0	1	18	1	5.6
1.0	2	15	0	0
1.0	5	17	1	5.6
2.0	1	20	2	10.0
2.0	2	13	2	15.4
2.0	5	23	2	8.7
5.0	1	26	12	46.2
5.0	2	18	8	44.4
5.0	5	24	7	29.2

현상이 나타났으나 뿌리분화율이 가장 높은 배양기는 根組織切片 培養時와 마찬가지로 NAA 5 mg/l, kinetin 1 mg/l 添加培養基로서 뿌리분화에 대한 NAA와 kinetin의 要求度는 根組織切片, callus 共히 같은 경향을 보였다(Table 2).

植物的 組織細胞는 動物細胞와 달라서 全体形成能을 가지고 있기 때문에 組織의 種類에 相關없이 再分化할 수 있는 能力이 있다. 그러나 器官의 再分化能은 植物의 種類와 器官의 種類에 따라 차이가 있고, 또 그 條件도 相異한 경우가 많다¹⁰. 植物組織細胞의 再分化能에 關與하는 條件中 重要な 것으로서 生長調節物質을 들수가 있는데 이것 또한 여러가지 종류가 있어서 植物에 따라 그 要求度가 各各다르다^{2,4,8,10}. 人蔘의 경우를 보면 Chang等⁴은 NAA 2 mg/l, kinetin 0.05 mg/l 混用培養基에서 不定根이 形成되었다고 보고한 바 있는데 本實驗에서도 NAA 2 mg/l 添加培養基에서 根分化가 이루어졌으나 分化率이 大端히 낮은 反面에 NAA 5 mg/l, kinetin 1 mg/l 添加培養基에서 根組織切片 및 Callus 共히 가장 높은 分化率을 보였는데 이는 他植物의 NAA 要求度보다 훨씬 높은 것으로서 人蔘植物의 特性일 것으로 思料된다.

2. 子葉callus의 器官分化能

人蔘의 子葉callus의 器官分化能을 구명하기 위하여 2,4-D 0.5-mg/l, kinetin을 0.5~2.0 mg/l씩 混用한 培養基에서 子葉callus를 배양하였던 바 그 결과는 Tables 3, 4와 같다.

Table 3. Induction of root from cotyledon callus of *Panax ginseng* cultured on different media

Concentration(mg/l)		No. of explants		Per cent
2,4-D	Kinetin	cultured	differen- tiated	
0.5	0.5	35	7	20.0
0.5	1.0	33	0	0
0.5	1.5	30	1	3.3
0.5	2.0	40	1	2.5
0.5	0	36	2	5.6
0	0	3	0	0

Table 5. Induction of shoot from cotyledon callus of *Panax ginseng* cultured on different media

Concentration(mg/l)		No. of explants		Per cent
2,4-D	Kinetin	cultured	differen- tiated	
0.5	0.5	35	9	25.7
0.5	1.0	33	2	6.1
0.5	1.5	30	9	30.0
0.5	2.0	40	2	5.0
0.5	0	36	4	11.1
0	0	3	1	33.3

Table 4. Number of embryos induced from cotyledon callus of *Panax ginseng* cultured on different media

Concentration (mg/l)		No. of embryos at various stage					Total	Per cent
2,4-D	Kinetin	Globular- shaped	Heart- shaped	Torpedo- shaped	Mature	Deformed		
0.5	0.5	41	8	6	6	6	67	47.9
0.5	1.0	9	8	1	0	2	20	14.3
0.5	1.5	8	2	0	5	4	19	13.6
0.5	2.0	3	2	0	0	1	6	4.3
0.5	0	13	6	7	0	1	27	19.3
0	0	1	0	0	0	0	1	0.7
		75	26	14	11	14	140	100.0

子葉callus의 뿌리 分化能을 보면 2,4-D 0.5 mg/l, kinetin 0.5 mg/l을 添加한 培養基에서 20%의 뿌리 分化率을 보여 비교적 良好하였으며 kinetin의 濃度가 증가됨에 따라 뿌리 分化率은 낮았다(Table 3). 그리고 callus에서 完全한 植物체가 形成되기까지는 여러형태의 前단계를 거치는 것이 통례로 되어있는바 본 실험에서도 球型의 原胚를 비롯하여, heart型의 原胚, torpedo型의 胚, 완전히 成熟한 胚, 그리고 奇型의 胚등이 형성되어 이들이 後에 幼植物체로 發達하였으며(Figs 1,2), 1개의 조직절편당 1개의 shoot가 나오는 것이 있는가 하면 여러개의 shoot가 형성되는 경우도 있었다. 그리고 培養基의 組成에 따른 embryo의 stage별 出現율을 조사한 결과 2,4-D 0.5 mg/l, kinetin 0.5 mg/l 첨가배양기에서 전체의 47.9%를 차지하여 가장 많이 形成되었으며, 生長調節物質을 添加하지 않은 培養基에서는 0.7%로서 그 빈도가 生長調節物質을 添加한 培養基보다 훨씬 낮았다(Table 4).

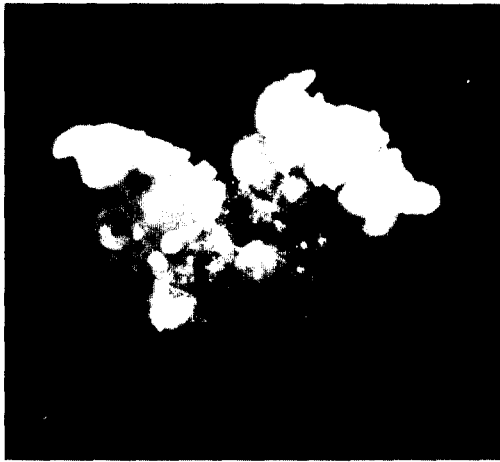


Fig. 1. Various stages of embryoids derived from cotyledon callus.



Fig. 2. Plantlets derived from the callus of ginseng cotyledon.

Shoot分化率은 2,4-D 0.5 mg/l, kinetin 0.5 mg/l 添加培養基에서 25.7%, 2,4-D 0.5 mg/l, kinetin 0.5 mg/l 添加培養基에서 30.0%를 보여 양호한 경향을 보인 反面에 生長調節物質을 전혀 添加하지 않은 배양기에서도 33.3%의 높은 分化率을 보였는데 (Table 5) 이는 배양한 절편수가 매우 적었기 때문에 百分率이 높아진 것이며, 生長調節物質 無添加培養基에서도 shoot가 分化될 수 있는 것은 他植物에서도 가끔 일어나는 現象으로 人蔘의 경우 根의 分化가 전혀 이루어지지 않기 때문에 完全한 幼植物 創生에는 적합치 못한 것으로 思料된다.

Table 6. Effects of BA and GA on the shoot differentiation of cotyledon callus

Concentration(mg/l)		No. of test tube cultured	Shoot differentiated	Root and shoot differentiated	No. of embryo	Total	Per cent
BA	GA						
0	0	10	2	0	0	2	20.0
0.1	0	10	1	0	1	2	20.0
0.1	0.1	10	2	0	1	3	30.0
0.1	1.0	10	2	0	1	3	30.0
1.0	0	10	0	0	0	0	0
1.0	0.1	10	1	2	1	4	40.0
1.0	1.0	12	8	2	0	10	83.4
1.0	2.0	10	4	0	0	4	40.0
5.0	0	9	0	0	0	0	0
5.0	0.1	9	1	0	1	2	22.2
5.0	1.0	10	2	0	1	3	30.0
5.0	5.0	10	6	1	0	7	70.0
5.0	10.0	8	1	0	3	4	50.0

Figures mean the number of test tube.

BA: Benzyl adenine.

GA: Gibberellin A₃.

2,4-D, kinetin混用培養基에서 分化된 embryo는 시간이 오래 지나면 다시 脱分化되어 callus化되는 경향이 있고, 또 完全한 幼植物体 形成率이 낮으므로 이를 보완하기 위하여 분화된 embryo를 callus와 함께 2,4-D를 넣지않고 benzyl adenine(BA)과 gibberrellin (GA)를 첨가한 배양기에 배양하였던바 shoot分化率은 BA 1.0 mg/l, GA 1.0 mg/l 添加 培養基에서 83.4%, BA 5.0 mg/l, GA 5.0 mg/l 添加 培養基에서 70%로서 BA와 GA의 同量 添加培地가 shoot分化에 좋은 경향을 보였다(Table 6).

그러나 BA, GA 각각 5.0 mg/l씩 첨가한 배양기에서는 한개의 explant에서 여러개의 shoot가 分化된 것이 많이 출현하였으며 分化된 shoot는 가늘고 연약하게 성장하여 正常的인 生長을 보이지 못한 경우가 많았다. BA, GA 1.0 mg/l씩 첨가한 배양기에서는 드물게 花器가 形成되기도 하였다.

以上에서 본바와같이 GA와 BA중 어느 특정한 生長調節物質이 shoot分化를 促進시켰다기 보다는 BA와 GA가 상호작용하여 器官分化能을 높여준 것으로서 BA/GA = 1 일 때 상호작용의 효과가 가장크게 나타난 것으로 생각된다.

要 約

人蔘의 根切片, 뿌리 및 子葉에서 由來한 callus로부터 器官을 分化시키기 위하여 NAA, 2-4-D, kinetin, BA, GA 등의 生長調節物質을 여러가지 농도로 달리 添加하여 배양하였던 바 그 결과를 要約하면 다음과 같다.

1. 탈분화되지 않은 根切片의 分절조직과 callus조직 共히 NAA 5 mg/l, kinetin 1 mg/l 添加培地에서 뿌리 分化가 잘 되었다.
2. 2,4-D 0.5 mg/l, kinetin 0.5 mg/l 添加한 培養基에서 embryoid形成이 가장 양호하였다.
3. MS salt의 1/2배지에 BA 1 mg/l, GA 1 mg/l 添加하였을때 shoot分化가 가장 좋았다.

引用文獻

1. Butenko, R. G., *Vopr. Farmakogn.* 21(4), 184(1967).
2. Butenko, R. G., R. V. Grushvitsky and L. I. Slepyan, *Bot. Zh.* 53(7), 906(1968).
3. Chang, W. C. and Y. I. Hsing, *Nat. Sci. Counc.* 6(8), 770(1978).
4. Chang, W. C. and Y. I. Hsing, *Nat. Sci. Counc.* 6(12), 1171(1979).
5. Harn, C., Studies on the tissue culture of *Panax ginseng*. Proc. Intern. Ginseng Symp. 9 (1974).
6. Jhang, J. J., E. J. Staba and J. Y. Kim, *In vitro*, 9(4) . 253- (1974).
7. Lee, C. D., Korean Ginseng Sci. Symp. (Seoul) 69(1974).
8. Lowe, K. W. and B. V. Conger, *Crop Science* 19, 397(1979).
9. Murashige, T. and Skoog, F., *Physiol. Plant*, 15, 473. (1962)
10. Zee, S. Y. and L. H. Hui, *Z. Pflanzenphysiol. Bol.* 82, S, 440(1976).