

## 半夏 캘러스로부터 植物體 再生과 器內 塊莖 生長 誘導

金泰洙\* · 朴文洙\* · 朴昊基\* · 金 先\* · 張榮宣\*

### Plant Regeneration and *in vitro* Tuber Enlargement from Callus in *Pinellia ternata*(Thunb.) Breit.

Tai-Soo Kim\*, Moon-Soo Park\*, Ho-Ki Park\*, Sun Kim\*, and Yeong-Sun Jang\*

**ABSTRACT :** This study carried out to induce plant regeneration and callus formation from leaflet in MS medium with 2,4-D, NAA, and IAA for *in vitro* growth of tuber, Kinetin and BA were used for plant regeneration.

NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> and KNO<sub>3</sub> as a nitrogen source and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as a sulfate source were tested for *in vitro* growth of tuber. The results are as follows :

1. For the callus formation from leaflet and differentiation potency of organ, 2,4-D was more effective than IAA in MS medium under 26°C and light condition of 8 hours a day.
2. For the plant regeneration from callus, MS medium with 2.0 mg/l BA was most effective under 26°C and light condition of 16~24 hours a day.
3. For the *in vitro* growth of tuber, KNO<sub>3</sub> by 3.0g/l in MS medium was effective. This condition enhanced the growth of tuber 2.5 times compared with that in MS medium with 2.0 mg/l BA.

半夏는 朝鮮時代에는 치모읍이라 하고 東醫寶鑑에는 석물웃이라 하여 지금도 一部至域에서는 기무릇이라 불리어지고 있는데 天南星科에 屬하는 雌雄同株의 多年生 草木類로서 塊莖의 外皮를 除去하여 生藥材로 利用하고 있다. 半夏는 全國의 山野에 自生하고 있으며, 줄기에 着生되는 子球와 藥柄部位에서 形成되는 肉芽로써 繁殖하는데 1년에 5.7個 内外로써 繁殖率은 극히 低調하였다<sup>5,6,8,9,10,11,12,14</sup>.

有效成分으로는 알칼로이드 物質인 ephedrine 과 choline이 알려져 있고 精油와 homogentic acid 등을 含有하고 있어 祛痰, 鎮咳, 頭痛, 鎮

吐 등에 效果가 크며 漢方藥으로는 半夏 사심탕, 半夏白朮天麻湯, 소시호탕 등에 使用된다<sup>2,3,5,15,16</sup>.

最近 生藥材로써 消費가 急增하고 있는 半夏는 瑞山, 泰安地方의 생강밭에 自生하고 있는 것을 一部 採取하여 利用하고 있는데, 最近에는 除草劑施用에 의하여 半夏가 거의 消滅되어 가고 있으며, 또 勞動力의 不足으로 採取量이 減少되어 國內 需要를 充當하기에는 生産量이 크게 不足한 實情이다<sup>8</sup>.

이러한 問題點을 解決하기 위하여 器內培養에 의한 大量增殖 研究는 國內에서도 短片의으로 일 부 遂行되고 있는데, 崔等<sup>3</sup>은 callus로부터 clone

\* 호남작물시험장 (Honam Crop Experiment Station, RDA, Iri 570-080, Korea)  
本 實驗은 1993年度 과학기술처 선도기술 개발과제 研究費 지원에 의하여 遂行되었음. <94. 7. 21 접수>

形成과 줄기, 뿌리 分化 過程에 있어서의 發生起源에 대해서 報告한 바 있고, 成等<sup>16)</sup>은 켈러스 形成과 植物體 再分化에는 葉組織이 가장 좋았다고 하였다. 또한 李等<sup>9)</sup>은 器內 및 器外 條件에 따른 子敎 形成能을 비교한 바 있으며, 金等<sup>11)</sup>은 器內에서 얻어진 再分化 植物體의 床土 活着을 위한 適定 培養日數는 培地內에서 callus 移殖 後 110日 內의 培養하여 주었을 때 가장 좋았다고 보고한 바 있다. 이와 같이 培養體 誘導에 관한 研究는 進行되고 있으나 器內에서 塊莖을 年中 生産할 수 있는 體系를 確立하여 勞動力과 時間을 節約하고 生産費用을 節減시킬 수 있는 方法이 時急히 要求되고 있는 實情이다.

따라서 本 研究는 器內에서 塊莖을 直接 大量으로 獲得하고 이에 따른 年中 生産體系를 確立하기 위하여 生長調節物質에 따른 callus 形成能과 植物體 再分化能, 그리고 培地內 窒素源 添加 比率에 따른 塊莖의 肥大 等에 대하여 檢討한 結果를 報告하는 바이다.

## 材料 및 方法

瑞山 地方에서 自生하고 있는 半夏를 蒐集하여 天然物科學研究所로부터 起源植物로 判定을 받은 후 湖南作物試驗場 藥用植物 栽培圃場에서 生育시키면서 培養材料로 使用하였다. callus 形成能을 檢討하기 위하여 葉組織을 Explant로 해서 MS 基本培地에 2, 4-D, NAA, IAA의 添加 濃度を 各各 달리하여 使用하였고, 植物體再分化能은 MS培地에 Kinetin과 BA를 添加하여 比較하였다. 置床 材料의 切片 준비는 NaClO 1% 液에 8~10分間 침지한 다음, 滅菌 蒸溜水로 5회 水洗하여 0.3×0.5cm크기로 葉을 切斷하여 使用하였다. 한편 培養用 MS 基本培地는 3% Source와 0.8% Agar를 넣고 Autocleave 전 pH를 5.8로 調節하여 高壓蒸氣 滅菌器 內에서 121℃ 15분간 滅菌하였다. 適正 培養環境을 究明하기 위하여는 B. O. D. Incubator와 恒溫恒濕機를 利用하여 20℃를 비롯한 23, 26, 29℃의 溫度 4 水準과 光條件으로는 暗培養 時間을 8~24時間으로 各各 調節하여 培養하면서 callus 分化能을 檢討하였다.

또한, 器內에서 塊莖의 肥大條件을 알기 위하여 窒酸鹽으로는 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>와 KNO<sub>3</sub>를, 黃酸鹽으로 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 다르게 組合해서(表 4) 培地內에 添加하여 窒素源에 따른 塊莖 形成能을 觀察하였다.

## 結果 및 考察

### 1. Callus 形成能에 미치는 옥신類의 影響

培地內 옥신의 種類와 濃度を 달리하여 葉組織 切片으로부터 誘起된 callus 形成能에 對하여 培養後 40日에 調査한 結果는 表 1과 같다.

먼저 callus 形成을 위하여는 2,4-D, IAA에 비하여 良好하였고, 濃度別로는 2,4-D는 2~3mg/l, NAA는 mg/l를 첨가하였을 때 88% 以上の 높은 callus 形成率을 나타내었다. 그러나 IAA를 添加한 組合에서는 濃度에 關係없이 callus 形成率 18% 미만으로 低調하였다. 한편 NAA 0.5~1mg/l 添加에서는 callus 形成과 器官分化가 함께 이루어져 培養期間을 短縮할 수 있어 年中 生産에 效果的일 것으로 判斷되었다. IAA를 添加하였을 때는 callus 形成은 거의 이루어지지 않은 대신 explant에서 直接 不定芽가 形成되어 器官分化로 發

Table 1. Effect of 2, 4-D, NAA and IAA on callus formation in *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.

Growth regulator	Concentration (mg/l)	Rate of callus formation (%)	Callus status
2,4-D	0.5	78	F. Very pale yellow
	1.0	82	F. "
	2.0	92	F. C. pale yellow
	3.0	88	F. Very pale yellow
NAA	0.5	84	F. C. Pale yellow
	1.0	88	C. "
	2.0	80	C. "
	3.0	76	C. "
IAA	0.5	8	F. Very pale yellow
	1.0	10	F. "
	2.0	18	F. Pale yellow
	3.0	12	F. Very pale yellow

Culture : MS medium, Explant : Leaf

\* F : Friable callus, C : Compact callus

달되는 것이 觀察되었는데 不定芽 形成數는 3~5 個로 적었으며 器分化力도 매우 低調하였다.

### 2. 溫度와 光 條件에 따른 Callus 形成 및 植物體 分化能

MS 基本培地에 NAA 1mg/l을 添加한 培地에서 callus 形成과 植物體 再分化에 대한 培養條件을 檢討한 結果 表 2와 같다. 溫度 26℃에 明培養 時間을 1日 8時間으로 해 주었을 때 callus 形成率이 94%로 가장 높았으며, 植物體 再分化에 있어서는 溫度 26℃에 1日 16~24時間 明條件에서 培養하였을 때 有利하였으나 明培養時間을 1日 8~12時間 未滿으로 할 경우에는 植物體의 葉生長은 이루어지지 않고 줄기만 過多하게 生長하는 途長현상이 觀察되었다. 趙等<sup>1)</sup>은 감자 shoot 培養에서 器內 小塊莖 形成에 關聯된 條件으로 溫度가 높고 日長이 길수록 측지 및 뿌리수가 많았다고 하였다. 本 實驗의 경우 callus 形成과 植物體 再分化에 있어서 培養 溫度가 26℃~29℃ 以上에서 培養 初期 20日 동안은 1日 16時 暗培養 하여준 다음 以後에는 明條件에서 培養 하였을 때 分裂能이 왕성한 callus가 다수 觀察되었고 活力이 良好한 再分化 植物體를 獲得할 수 있었다.

### 3. Callus로부터 植物體 再分化

半夏의 callus에서 植物體가 分化되는 過程은 綠點이 形成되면서 줄기와 뿌리가 分化되는데<sup>8)</sup>, 完全한 再分化 植物體를 誘導하기 위하여 callus를 再分化 培地에 移植하여 植物體 再分化能을 檢討

Table 2. Effects of temperature and day length on callus formation and plant regeneration.

Culture Temperature ℃	Day length (hour light /dark)				
	0/24	8/26	12/12	16/8	24/0
20	64(22)	68(30)	64(36)	60(48)	60(52)
23	80(24)	90(36)	88(44)	84(70)	80(74)
26	86(28)	94(42)	90(60)	88(78)	86(84)
29	84(28)	90(40)	86(56)	84(74)	82(80)

\* Ratio of callus formation,  
( ) : No. of plant regeneration.

한 結果는 表 3에서와 같다. MS 培地에 BA 2mg/l을 添加하였을 때 가장 良好하였는데 1個의 葉切片에서 誘起된 callus로부터 82個體의 植物體를 얻을 수 있었다. 그러나 Kinetin, BA 모두 4mg/l 添加에서는 再分化 能力을 低下시키는 것으로 생각된다. 이러한 結果는 半夏 植物體 再分化에 있어서 MS 培地에 Kinetin 2mg/l을 添加하였을 때 가장 좋았다고 報告한 李等<sup>9)</sup>의 結果와 一致하는 것으로 再分化 誘導에 있어서 Kinetin과 BA의 效果는 비슷하였으나 添加濃度에 따라서는 큰 差異를 나타내었다.

### 4. 器內 塊莖 肥大에 따른 培地內 室素源의 影響

半夏의 塊莖을 器內에서 直接生産할 수 있는 方法으로써는 不定芽를 誘導하여 直接 植物體를 獲得하는 方法과 器官分化가 이루어지면서 再分化되는 過程에서 培地內에 營養源을 添加해 주어 塊莖의 生育促進을 誘導하는 方法이 있다. 前者의 경우 遺傳적으로 安全性이 높은 植物體를 얻을 수 있는 長點이 있는 反面 增殖效率이 低調한 短點이 있으며, 後者는 大量增殖할 수 있는 利點이 있으나 callus 過程을 거치면서 培養期間이 前者보다 1個月 內外 더 所要되는 것이 短點으로 지적되고 있다<sup>7,8)</sup>.

따라서 增殖效率이 유리한 callus 過程을 利用하여 植物體再分化에 가장 좋았던 MS+BA 2mg/l

Table 3. Effect of kinetin and BA on plant regeneration of callus induced and growth of young plant regeneration at 110 days after callus transfer.

Growth regulator		No. of Condition of in vivo plants				
Kinetin	BA	regene-ration plants	Tuber dia-meter	Root length	No. of roots	10.5
mg/l	mg/l		cm	cm		
-	-	44	0.28	6.4		10.8
1	-	64	0.30	6.7		10.8
2	-	76	0.32	6.7		10.0
3	-	68	0.30	6.0		8.0
4	-	30	0.25	5.0		11.0
-	1	70	0.30	6.7		10.5
-	2	82	0.33	6.7		10.0
-	3	60	0.38	6.0		10.0
-	4	48	0.38	5.4		10.0

添加培地(以下 N1으로 表記)를 대비로 MS 培地の 질소원 중 窒酸鹽과 黃酸鹽의 添加 比率를 달리 하여(표 4), 110日 동안 培養하면서 塊莖의 生育을 調査한 結果 表 5과 같다.

國內 塊莖의 肥大는 培地內 질소원 中 窒酸鹽 添加 比率를  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 는 0.5g/l (N1 대비 1/3減量)와  $\text{KNO}_3$  3.0g/l(N1 대비 1.5배 增量)로 調節하여 添加한 組合에서 매우 良好하였는데, 이 때의 塊莖 크기는 N1 培地에서 生育한 塊莖의 2.5배 以上 生長하였고 子球 形成도 1.2個로 가장 좋았다(사진 1). 그러나  $\text{KNO}_3$ 와  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 比率를 달리하여 混合 添加하였을 때 塊莖의 크기는 0.42cm로 N1 培地에 比하여 肥大에 큰 차이를 나타내지 않았고 子球 形成과 뿌리 分化에 있어서도 비슷한 傾向을 보였는데 이는 培地內 질소원이 半夏 塊莖의 肥大에 선택적으로 作用하고 있는 것으로 생각된다.

笠原<sup>6)</sup>는 圃場栽培 過程에서의 질소비료 施用은 半夏의 生育을 크게 抑制한다고 報告한 바 있는데

Table 4. Concentration of nitrogen sources in the culture media for *in vitro* growth of tuberlets.

Media number	Concentration of nitrogen sources(g/l)		
	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	$\text{KNO}_3$	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
N1	1.65	1.9	-
N2	3.3	-	-
N3	-	3.3	-
N4	-	-	3.3
N5	0.50	3.0	-
N6	-	3.0	0.50

Table 5. Effects of the concentration of nitrogen source in the culture media on tuber formation potentiality at 110 days after transfer.

Media number	Tuber diameter	No. of tuberlets	No. of roots
N1	0.28 <sup>cm</sup>	0.5	10.4
N2	0.50	1.0	12.0
N3	0.35	0.5	10.8
N4	0.30	0.5	10.2
N5	0.72	1.2	11.0
N6	0.42	0.8	10.0

窒素源의 吸收에 따른 機作 究明에 대하여는 더욱 세밀한 檢討가 要求 되어진다. 또한 Pelacho 等<sup>11)</sup>에 의하면 營養繁殖 作物에 있어서 塊莖形成이 促進은 주로 Cytokinin의 증가에 의한 것이라 하였고, 김等<sup>4)</sup>은 하루 주간과 야간의 온도를 다르게 하였을 때 감자 小塊莖 形成이 效果의이었다고 하였으며 培養容器에 의해서도 塊莖의 形成 程度는 달라진다고 報告한 바 있다.

塊莖形成을 誘導 또는 生長시키기 위하여는 培地內 添加物質의 種類와 組合 및 濃度는 물 變溫條件, 營養物質의 移動 經路等 多角의인 檢討가 필수적으로 이루어져야 할 것이지만 이상에서 살펴본 바와 같이 器內에서 塊莖을 直接 肥大시킬 수 있음은 培養期間은 물론 生育期間을 劃期的으로 短縮하여 半夏의 周年생산이 가능할 것으로 判斷되었다.

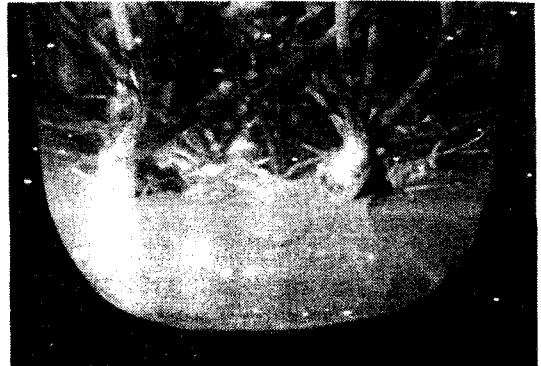


Photo 1. Tuberlets of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit in MS medium supplemented with 0.5g/l  $\text{NH}_4\text{SO}_3$  and 3g/l  $\text{KNO}_3$ .

## 摘 要

半夏의 葉切片을 培養하여 誘導한 Callus로부터 植物再分化에 미치는 溫度와 光條件 그리고 器內 塊莖 肥大를 위한 培地內 窒素源의 影響 등에 대하여 檢討한 結果는 다음과 같다.

1. 葉切片으로부터의 Callus 形成과 器官分化에는
2. 4-D 또는 NAA의 添加가 IAA 添加보다 좋았으며, 培養條件으로는 26℃에서 8時間/日,

- 明培養하는 것이 效果的이었다.
2. Callus로부터 植物體를 재분화하기 위한 適正培地는 MS 培地에 BA 2mg/l를 添加하였을 때 좋았으며, 培養環境은 26℃에서 16~24時間/日 明培養시키는 것이 좋았다.
  3. 培地內에 KNO<sub>3</sub> 3.0g/l處理하였을 때 植物體再分化培地 MS+BA 2mg/l에 비하여 器內塊莖의 肥大가 2.5배 以上에 달하였다.

### 引用文獻

1. 趙丁來, 崔永煥, 金周玟, 姜点淳, 1989. 감자 器內 小塊莖의 實用栽培 條件에 關한 研究. 農試論文集(農業生學協同篇), 32:25~34
2. 陳存仁, 1934. 韓方醫藥大辭典 IV, 258
3. 崔定植, 羅義植, 1986. 組織培養에 의한 半夏(*Pinellia ternata*(Thunb.) Breit)의 大量繁殖에 關한 研究. 韓作誌 31(1):30~42
4. 김현순, 전재용, 박세원, 정 혁, 1992. 밤낮의 變溫處理가 감자의 器內 小塊莖 形成에 미치는 影響. 韓園誌 33(6):432~437
5. 金一赫 등, 1985. 藥品植物學 各論. 韓國學習教材社:91
6. 笠院義正, 1983. 카ラス비시섹의 栽培條件と 鐵吐 活性 日生藥學會誌, 37(4):367~373
7. 金奎元, 1986. 植物組織培養에 의한 有用植物의 大量增殖. 경북대 40주년 Symposium 특집호:85~98
8. 金泰洙, 李映泰, 田炳泰, 朴文洙, 朴錫洪, 1990. 半夏의 器內 大量增殖 研究. 2. 器內 增殖苗의 土壤 活着率 增進方法. 農試論文集(田, 特作篇)32(2):43~47
9. 李映泰, 金泰洙, 金賢順, 林茂相, 羅義植, 1989. 半夏(*Pinellia ternata*(Thunb.) Breit)의 器內 大量增殖에 關한 研究. 1. callus 形成 및 植物體 再分化. 農試論文集(生命工學篇) 31(2):7~11
10. 西本和光, 1988. 半夏と蘇葉, 蘇子の品質. 現代東洋醫學 9(2):52~65
11. 農村振興廳, 1989. 韓國의 自生植物(草本類), 169
12. 박인현, 이상태, 안상득, 송원섭, 1990. 藥用植物栽培. 先進文化社.
13. Pelacho, A.M. and A.M. Mingo-Castel, 1991. Effect of photoperiod on Kinetin induced tuberization of isolated potato stolons cultured in vitro Am. Potato J. 68:533~541
14. 佐佐木亨, 山崎貞一, 1968. 카라스비시섹의 發生と繁殖의 樣相. 日雜草 研究, 7:34~37
15. 幸民教, 1986. 臨床本草學. 南山堂:556
16. 成樂宣, 趙弼衡, 朴耕希, 蘇雄永, 趙德以, 1988. 半夏(*Pinellia ternata*(Thunb.) Breit)의 組織培養에 의한 速成 增殖. 韓國植物組織培養學會誌, 15(2):75~80