

지황의 캘러스 배양에 의한 기내 대량증식

박충헌¹ · 성낙술¹ · 백기엽² · 이철희²
¹농촌진흥청 작물시험장, ²충북대학교 원예학과

Micropropagation through Callus Culture in Chinese Foxglove(*Rehmannia glutinosa*)

PARK, Chung Heon^{*1} · SEONG, Nak Sul¹ · PAEK, Kee Yoeup² · LEE, Cheal Hee²

¹Nat'l Crop Experiment Station, Suwon, 441-100, Korea:and

²Dept. of Horticulture, Chungbuk Nat'l Univ., Cheongju, 361-763, Korea.*Corresponding author.

Chinese foxglove (*Rehmannia glutinosa*) is receiving much attention as one of the principal medicinal crops and the crude drug demand expands rapidly.

This study was conducted to obtain the basic breeding information of Chinese foxglove. Effects of supplemental plant growth regulators were investigated on leaf tissue for proliferation. 100% callus formation, 31% plantlet regeneration and 6% root differentiation were obtained by adding 0.5 mg/L NAA and 2.0 mg/L BA. 2,4-D and Zeatin treatment also resulted in 95% increase in callus formation, but shoot was not formed. During the subculture, callus propagation rate recorded 15.4% with 0.2 mg/L NAA and 1.0mg/L BA and plant regeneration improved on MS medium supplemented with 0.2 mg/L NAA and 0.5 mg/L kinetin. The number of shoot formed ranged from 1.7 on WPM medium to 3.4 on MS medium with 0.1 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA. Supplementation of 1.0 g/L activated charcoal improved the *In vitro* plant growth.

Key words : Chinese foxglove (*Rehmannia glutinosa*), callus culture, micropropagation.

현삼과(*Scrophulariaceae*)에 속하는 지황(*Rehmannia glutinosa*)은 우리나라를 비롯한 일본, 중국, 베트남 등지에 분포하는 다년생 숙근초이다. 지황의 국내 재배면적은 '89년에 342 ha이었으나 '96년에는 114 ha로 급격히 감소되고 있는 추세인데 (Ministry of Agriculture and Fishery, 1996), 이는 중국으로부터의 생약재 수입이 증가하였기 때문이며, 매년 2,100 M/T정도의 지황이 중국에서 수입되고 있는 실정이다(Korea Pharmaceutical Trade Association, 1997). 우리나라에서 지황은 경북 안동과 영양, 전북 정읍을 비롯하여 충북 제천, 단양 등지에서 많이 재배되고 있다.

최근 식물조직 배양기술을 이용한 기내 대량증식이 가능하여 농업적으로 유용하게 이용되고 있는데, 이는 식물의 종류와 부위, 그리고 배양 환경조건에 따라 큰 차이를 보이고 있다(Ham, 1984).

지황의 조직배양에 관한 연구는 Jiang과 Mao(1979)가 Goldend No. 1 Scolar 품종을 사용하여 기내증자 발아에서

캘러스와 신초 및 뿌리 분화에 성공한 이래 많은 연구가 이루어져 왔다. 성장점 배양을 이용한 우량종묘 생산과 지황의 바이러스 검정에 관한 연구에서 0.1-0.2 mm의 엽원기를 MS배지에 배양하였을 때 무병주의 획득이 양호하다고 하였으며(Mao et al., 1983), Shoyama et al.,(1983)은 *R. glutinosa* var. *purpurea*의 정단조직을 배양하여 다경줄기의 형성을 보고하였고, 북경1호의 뿌리와 어린줄기 조직에서 캘러스 형성과 식물체 재분화에 성공하였다. 원형질체의 분리 배양하여 식물체를 재분화시켰고, 약배양으로부터 소포자 유래 반수성 식물체(n=28)의 획득, 또한 기내 수정을 통한 2배성 자식종자를 얻었다고 하였다(Xu, 1988). 국내에서도 지황의 기내배양에 관한 연구가 많이 이루어져 왔는데, 체세포 배발생(Nat'l Crop Experiment Station 1995, Park et al., 1995, Chae and Park, 1993)과 엽절편배양으로 1/2MS배지에 BA 3.0mg/L 첨가에서 부정아 발생과 식물체 재분화율이 높다고 하였다(Rha and Kim 1996).

본 연구는 우량 영양계의 번식을 위하여 조직배양기술을 이용한 기내대량증식에 적합한 배지조성과 성장조절물질 처리효과 등을 조사한 결과이다.

재료 및 방법

지황의 캘러스 배양에 의한 기내대량증식을 위하여 공시 재료는 작물시험장 약용작물 재배 온실에 식재되어 있는 서천재래 지황의 유엽조직을 채취하여 0.5% sodium hypochlorite액에 10분간 침지 후 표면 살균하고 멸균수로 3회 수세하여 5mm² 크기로 배양하였다. 배지는 MS(Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에 오옥신으로 NAA(1-naphthaleic acetic acid)와 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid)를 각각 0.5 mg/L 넣고 사이토키닌으로 BA (6-benzyl amino purine)와 zeatin (6-[4-hydroxy-3-methylbut-2-enylomino]purine)을 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 및 4.0 mg/L의 농도로 혼합 첨가하였고, 배지 조제는 처리구마다 0.8% 한천을 넣은 후 121℃에서 15분간 고압멸균하였다. 배양조건은 처음 1개월은 암배양하였고 그 후에는 광도 24μmol s⁻¹ m⁻² (PAR)에서 16시간의 일장으로 조절하였으며, 배양실의 온도는 25 ± 1℃로 유지되도록 조절하였다. 배양 30일 후의 캘러스 형성 및 식물체 재분화율을 조사하였다. 조직배양을 통하여 얻어진 줄기의 기내증식에 적합한 배지를 선발하고자 MS, GD(Gresshoff and Doys, 1972), WPM (McCown and Lloyd, 1980), DKW (Driver and Kuniyuki-walnut, 1984) 및 B5 (Gamborg et al., 1985) 등 5종류의 배지에 NAA 0.1 mg/L와 BA 0.5 mg/L를 첨가하여 같은 방법으로 배양한 다음 신초 증식 수를 조사하였다. 신초의 증식 및 생육에 미치는 pH, 활성탄 및 배지 지지물의 영향을 구명하기 위하여 pH는 5.0, 5.5, 5.8 및 6.2로 조절하였고, 활성탄을 0.1, 0.5, 1.0 및 2.0 g/L을 넣어 주었으며, 지지물질로 phytigel을 2, 3, 4 g/L을 첨가하여 배양한 다음 초장과 신초수 등을 조사하였다.

결과 및 고찰

지황의 엽조직 배양에 미치는 성장조절물질의 영향을 검토한 결과는 Table 1과 같다. 엽육조직을 MS 기본배지에 0.5 mg/L NAA와 2.0 mg/L BA를 첨가하여 배양하였을 때 캘러스 형성율이 100%로 가장 높았고, 신초형성율도 31%로 처리중 양호한 경향이었으며, 뿌리의 분화도 6% 정도였다. 2,4-D를 넣어준 경우 zeatin의 농도에 관계없이 약 90% 이상의 왕성한 캘러스 형성율을 보였으며, 0.5 mg/L 2,4-D에 1.0 mg/L zeatin첨가에서 100%로 가장 높았다. 그러나 식물체 분화와 뿌리의 발생은 모든 처리에서 전혀 이루어지지 않았다. 따라서 식물체 분화를 위해서는 2,4-D농도를 더 낮게 첨가해야 할 것으로 판단되며, 성장조절물질로 2,4-D를 이용할 경우 캘러스 형성 배지와 식물체 분화배지를 달리 하는 2단계 배양이 효과적일 것으로 판단된다.

대부분의 식물 조직배양에서 식물 성장조절물질의 첨가는 필수적인 것으로 되어 있으나 식물의 종류와 배양부위 및 시기 등에 따라 반응이 다르게 나타나며 배지에 성장조절물질을 넣어 배양효율을 증진시켰다는 보고는 많다. 유자나무 정단배양에서 캘러스 유기는 2,4-D 0.5~1.0 mg/L 첨가했을 때 가장 좋았으며 캘러스로부터 식물체 분화는 IBA 0.5 mg/L에 BA 0.5 mg/L가 효과적이었고, 달래 성장점 배양에서 캘러스 형성은 2,4-D 1.5 mg/L 첨가에 양호한 반면 식물체 분화에는 제한적으로 작용하였고, kinetin 2 mg/L 첨가에서 식물체 분화가 효과적이라고 하였다. 산수유 액아유래 줄기의 기내증식에서는 BA 0.5 mg/L에 오옥신을 첨가한 결과 2,4-D에서는 캘러스의 형성이 가장 왕성하였으나, 신초의 증식은 전혀 이루어지지 않았고, IAA와 IBA처리구에서는 캘러스가 전혀 유도되지 않는 반면 다수의 신초 형성이 양호하였으며, NAA에서는 캘러스 형성과 신초의 증식이 모두 이루어졌다고 보고하였다(Park et al., 1993). 이와 같이 배양조직에서 캘러스 유도에는 2,4-D, NAA같은 오옥신류가 단독으로 쓰이거나 사이토키닌류와의 혼용이 이용되고 있는데 식물의 종류에 따라 다양하게 사용되고 있다. 지황의

Table 1. Effect of growth regulators on the callus induction and plant regeneration from leaf tissue cultured for 30 days in *R. glutinosa*.

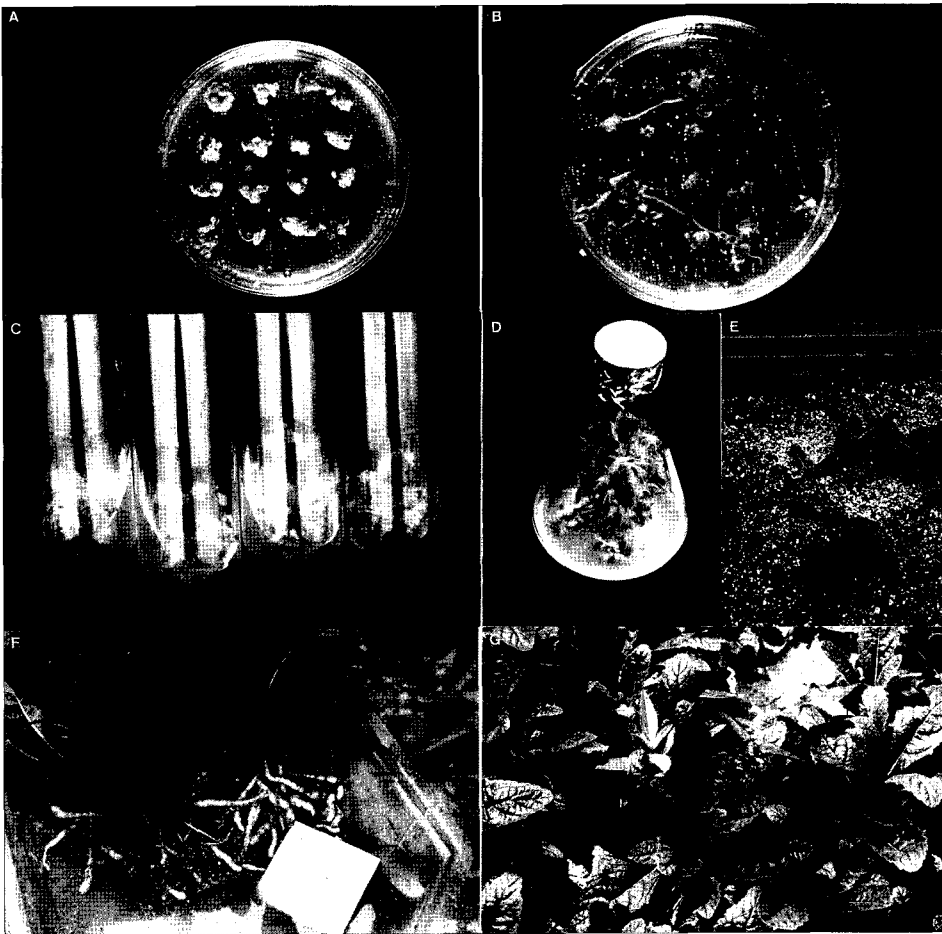
Growth regulators ^a (mg/L)				Leaf culture	Callus induction no.(%)	Plant regeneration no.(%)	Root formation no.(%)
NAA	BA	2,4-D	ZEA				
0.5	0.1			48	35 (73)	0	0
0.5	0.5			48	40 (83)	1 (2)	0
0.5	1.0			48	36 (75)	2 (4)	1 (2)
0.5	2.0			48	48 (100)	15 (31)	3 (6)
0.5	4.0			48	31 (65)	0	3 (6)
		0.5	0.1	48	44 (92)	0	0
		0.5	0.5	48	46 (96)	0	0
		0.5	0.1	48	48 (100)	0	0
		0.5	2.0	48	45 (94)	0	0
		0.5	4.0	48	42 (88)	0	0

^aGrowth regulators were supplemented to MS basal medium.

Table 2. Effect of 0.2 mg/L NAA and 3 different cytokinins on organogenesis from the callus cultured for 2 months in *R. glutinosa*.

Growth regulators ^a (mg/L)	No. of transfered calli	No. of propagated calli (%)	No. of regenerated	No. of formation (%)
NAA 0.2 + BA 0.5	160	14 (8.8)	5 (3.1)	0
1.0	130	20 (15.4)	5 (3.5)	0
+ Kinetin 0.5	120	8 (6.6)	5 (4.2)	1 (0.8)
1.0	130	11 (8.5)	1 (0.8)	19 (14.6)
+ Zeatin 0.5	120	3 (3.0)	4 (3.3)	1 (0.8)
1.0	120	16 (13.3)	2 (1.7)	9 (7.5)

^aSupplemental growth regulator with MS basal medium.

**Figure 1.** Micropropagation of *R. glutinosa* through callus culture.

- A) Callus induction from leaf segment culture,
- B) Plantlets directly regenerated from leaf explants,
- C) Multiple shoot formation from callus culture,
- D) Regenerated plantlets through the leaf tissue culture,
- E) Adaptation to soil of regenerated plants,
- F) Harvested roots about 11 months grown plants,
- G) Field grown healthy plants from callus culture.

엽조직에서 캘러스의 형성에는 2,4-D와 zeatin의 혼용에서 왕성하였으나, 캘러스의 형성과 신초의 분화가 동시에 이루어지는 것은 NAA와 BA 혼합 처리구에서 효과적이었다. 따라서 NAA농도를 더 낮게 첨가한 6종의 식물체 재생배지에 지황의 엽절편 배양에서 형성된 캘러스로부터 2개월 후에 캘러스 증식과 식물체 재분화율 및 뿌리 분화에 대하여 조사한 결과는 Table 2와 같다. 줄기 재분화가 관찰되지 않고 캘러스 증식만 관찰된 것은 NAA 0.2 mg/L와 BA 1.0 mg/L를 혼용한 처리구로 나타났고, zeatin 1.0 mg/L처리구에서 13.3%를 보여 처리 중 가장 양호하였으나 캘러스의 증식은 전반적으로 저조한 경향이었다(Figure 1). 캘러스로부터 식

물체의 재분화율은 3~4% 정도로 초대 배양의 식물체 분화율보다 현저하게 감소되는 경향이였다. 그러나 뿌리의 분화는 NAA 0.2 mg/L에 kinetin 1.0 mg/L에서 14.6%의 발생율을 보여 초대 배양에 비하여 다소 향상되었다. 이 결과로 보아 식물체 재분화에는 배지내 첨가해주는 cytokinin의 함량이 낮은 것이 좋을 것으로 판단된다. 따라서 캘러스 유지에는 1-2 mg/L NAA, 식물체 재생은 0.5-1.0 mg/L의 auxin과 2 mg/L의 cytokinin의 첨가가 적절할 것으로 판단되었다. 식물체 재분화 배지에서의 캘러스의 활력도 전반적으로 저조한 경향을 보이고, 뿌리 분화가 극히 저조하여 재분화 식물체의 발근 배지의 구멍이 필요하다고 생각된다.

Table 3. Effect of media on caulogenesis from callus cultured for 2 months in *R. glutinosa*.

Media ^a	No. of propagated shoot	Shoot length (cm)	Leaves no.
MS	3.4	5.1	7.3
GD	3.2	4.2	7.2
B5	2.8	3.2	8.8
DKW	1.8	3.5	8.8
WPM	1.7	3.9	7.5

^aBasal medium contained 0.1 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA.

MS : Murashige and Skoog (1962)

GD : Gresshoff and Doys (1972)

B5 : Gamborg et al (1968)

DKW : Driver and Kuniyuki (1984)

WPM : McCown and Lloyd (1980)

Table 4. Effect of activated charcoal on shoot growth in *R. glutinosa*.

Activated charcoal ^a (g/L)	No. of shoot	Shoot length (cm)	Leaves no.
0.1	2.9	5.1	5.9
0.5	2.7	4.9	4.6
1.0	3.8	5.1	4.1
2.0	2.4	6.5	6.5

^aMS basal medium contained 0.1 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA was used.

엽절편 배양에서 얻어진 줄기의 기내 증식에 적합한 배지를 탐색하고자 B5, MS, WPM, GD, DKW 배지 등 5종류의 배지에 성장조절물질로 0.1 mg/L NAA와 0.5 mg/L BA를 첨가하여 배양한 결과는 Table 3과 같다. 신훈을 배양하여 약 60일 경에 증식된 식물체수는 MS 배지에서 3.4개로 가장 많았고, GD 배지가 3.2개 B5 배지가 2.8개, DKW와 WPM은 각각 1.8, 1.7개로 저조하였다. 식물체의 생육도 MS 배지에서 양호하여 초장 5.1cm, 평균엽수도 7.3매였다. GD 배지도 평균 초장이 4.2cm를 보였고 엽수는 B5와 DKW 배지에서 8.8매로 많았다.

식물의 종류에 따라서는 특정 배지조성이 배양효율을 증대시키는 것으로 알려져 있는데, 부자의 기내생육은 B5 배지에서 양호하다고 하였고, 산수유는 WPM 배지를 수정한 DKW 배지가 신훈배양에서 양호한 생장을 보인다고 하였다(Park et al., 1993, Seong et al., 1993). MS 배지와 암모니아태 질소와 질산태 질소를 합하여 60mM의 질소를 포함하여 B5 배지는 40mM, GD 배지는 20mM, 그리고 WPM 배지는 10mM을 함유하고 있는데 배지내 암모니아태 질소와 질산태 질소의 비율은 신훈 및 뿌리의 형성과 생육에 중요한 역할을 하며 암모니아태 질소는 세포생장에 효과적이라고 알려져 있다(Ham 1984). 본 실험에서 지황의 신훈증식에 가장 적합한 배지는 MS 배지로 조사되었으므로 식물체의 기내 생육에는 질소원의 함량을 높여주는 것이 효과적

Table 5. Effect of pH on shoot growth in *R. glutinosa*.

pH ^a	No. of propagated shoot	Shoot length (cm)	Leaves no.
5.0	3.9	2.0	10.8
5.5	6.3	2.0	8.6
5.8	4.5	2.1	8.6
6.2	1.0	2.1	8.7

^aMS basal medium contained 0.1 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA was used.

일 것으로 생각된다.

증식된 신훈을 기내에서 건전하게 양성하기 위하여 배지내 활성탄의 첨가효과를 조사한 결과는 Table 4와 같다. 배지내 활성탄의 농도가 증가할수록 개체 생육은 양호하였는데 2.0 g/L 첨가배지에서 초장 6.5 cm, 평균엽수 6.5개로 가장 양호한 생육을 보였다. 그러나 신훈 증식수는 1.0 g/L에서 3.8개로 가장 높게 나타나 신훈 증식배지에도 활성탄 첨가가 바람직할 것으로 생각된다. 기내 배양에서 활성탄의 첨가는 생장을 억제하는 phenylacetic acid, p-hydroxy benzoic acid의 수준을 낮추고 배지를 고압멸균할때 생성되는 억제물질인 5-hydroxymethyl-furfural과 기타 배지에 첨가된 옥신과 사이토키닌 등도 흡수하는 것으로 알려져 있어 몇몇작물의 조직배양에 효과적이라는 것이 밝혀졌다(Lee et al., 1993). 용담의 기내배양에서는 활성탄은 저농도로 조절된 경우에는 신훈의 증식이 많았고 1~2 g/L 첨가한 배지에서는 신훈의 증식수는 약간 감소되었으나, 초장, 엽수 등의 개체생육은 현저하게 증가하였다고 하였고(Seong et al., 1995) 기내에서 무균 발아한 *Dendrobium*의 신훈은 활성탄소의 농도가 1 g/L까지 증가할수록 기내생장이 촉진되고 뿌리형성도 양호하다고 하였고, 바나나의 기내 번식에서도 배지내 활성탄 1~2 g을 함유한 경우에 뿌리의 발생 수가 증가하고 뿌리의 길이도 길어지며 발근 기간도 단축되는 효과가 있다고 하였다. 한편, *Beta vulgaris*의 정단배양에서는 활성탄 0.1~0.5% 첨가 처리는 전반적으로 무첨가 배지에 비해 발근율이 낮아 효과가 인정되지 않는다고 하였는데, 활성탄소는 배양식물체의 생육을 저해하는 유해물질을 흡수하기도 하고 생육을 촉진시키는 성장조절물질까지 과잉 흡착하여 그 작용을 경감하는 것으로 생각된다. 지황의 기내 생육에는 배지내 활성탄의 농도가 1.0 g/L일 때 증식수가 가장 많았고, 2.0 g/L일때는 감소되었는데 이는 활성탄이 배양중에 유해물질 이외의 성장조절물질까지 흡착하기 때문이라고 생각된다.

신훈의 기내 생장에 미치는 수소 이온 농도의 영향을 조사한 결과는 Table 5와 같다. 신훈 증식수는 pH 5.0에서 3.9개인데 비하여 pH 5.5에서 6.3개로 가장 많았으며 그 이상 높아질수록 감소되어 pH 6.2에서 1.0개로 저조하였다. 초장은 2.0~2.1cm로 거의 비슷하게 조사되었으나 평균엽수는

Table 6. Effect of gelling agents and their respective concentrations on caulogenesis in *R. glutinosa*. after 2 month culture.

Gelling agent ^a (g/L)	No. of propagated shoot	Shoot length (cm)	Leaves no.
Agar (10)	5.0	5.8	6.8
Phytigel (2)	6.1	5.0	8.5
" (4)	8.0	5.9	6.6
" (6)6.2	2.4	4.7	78.7

^aMS basal medium contained 0.1 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA was used

신초의 기내증식은 phytigel 4 g/L 첨가한 경우 8.0개로 가장 많았고, 신초 길이도 5.9 cm로 길었으며 엽수는 6.6개로 적었는데 이는 동량의 배지내에서 신초수가 많았기 때문으로 생각된다.

적 요

지황(*Rehmannia glutinosa*)의 캘러스배양을 통한 기내 대량증식을 위하여 엽조직으로부터 캘러스 형성에 미치는 생장조절물질의 영향을 조사한 결과 MS배지에 0.5 mg/L NAA와 2.0 mg/L BA 첨가배지에서 캘러스 형성을 100%, 식물체 분화율 31%로 가장 높았으며, 2,4-D와 zeatin 첨가배지에서는 캘러스 형성은 95% 이상 높았으나 기관분화가 전혀 이루어지지 않았다.

재분화 식물체로부터 다수의 신초 유기에 적합한 배지로는 MS배지에 0.2 mg/L NAA 와 0.5 mg/L BA를 첨가한 배지에서 3.4개와 2.8개로 양호하였다. 다수의 신초 증식을 위하여 1.0 g/L 활성탄을 첨가한 배지에서 가장 많은 3.8개의 신초가 분화되었으나 2.0 g/L 첨가배지에서는 2.4개로 감소된 반면, 초장과 엽수는 증가하여 개체생육은 양호함을 알 수 있었다.

인 용 문 헌

- Anon (1979) A concise dictionary of chinese medicine. People's Health Press. Beijing 723p
- Chae YA, Park SU (1993) Callus induction and somatic embryogenesis in suspension culture of *Rehmannia glutinosa*. Korean J Medicinal Crop Sci 1: 184~190
- Harn CY (1984) Fundamental studies on plant breeding. RDA Res Bull : 245~356
- Institute of Medicinal Plant Development, CAMS (1991) Medicinal plant cultivation of China. Agriculture Press Beijing pp 1375
- Jiang LC, Mao WY (1979) Callus formation and plantlet regeneration of *Rehmannia glutinosa*. Chin Med Herb Lett 2: 41
- Korea Pharmaceutical Trade Association (1996) Trade list of pharmaceutical product and crude drug in Korea pp 599
- Lee ST, Seong NS, Paek KY, Chae YA, Park CH, Park SI (1993) Micropropagation of *Aconitum carmichaeli* and *Rehmannia glutinosa* through the plant tissue culture techniques. RDA Special Res Rep pp 46
- Mao WY, Liu QQ, Yu CS, Zhu BM (1983) Studies on the meristem culture of *Rehmannia glutinosa*. Chin Bul Bot 1: 44~46
- Mao WY, Li XG, Zhi BM (1985) New strain of *Rehmannia glutinosa* from the culture of leaf explants In: Proc Rep *Rehmannia glutinosa* new strain obtained from tissue culture. Shandong Branch Chin Med Comp pp 17~21
- Matsumoto M, Shoyama Y, Nishioka I (1988) Effect of bacterial and virus infection on iridoid glycoside contents in *Rehmannia glutinosa* Libosch. var *purpurea* Makino. Shoyakugaku Zasshi 42: 329~332
- Ministry of Agriculture and Fishery (1997) Cultivation and production list of industrial crops in Korea pp 97
- Rha ES, Kim JK (1996) Plant regeneration in leaf explant cultures of *Rehmannia glutinosa*. Korea J Plant Tissue Culture Vol. 23 No. 5 : 299~302
- Park JH, Park SU, Chae YA (1995) Studies on proper medium for somatic embryogenesis in suspension culture of *Rehmannia glutinosa*. Korean J Medicinal Crop Sci 3: 100~106
- Shoyama Y, Nagano M, Nishioka I (1983) Clonal multiplication of *Rehmannia glutinosa*. Planta Med 48: 124~125
- Xu ZH (1988) *Rehmannia glutinosa* : Tissue culture and its potential for improvement. In biotechnology in agriculture and forestry. Vol 4 Medicinal and aromatic plants I (TPS Bajaj et al.) pp 501~512

(1998년 1월 5일 접수)