

## 생장점 배양에 의한 지황의 우량주 생산

박충현\* · 성낙술 · 백기엽<sup>1</sup> · 최홍수<sup>2</sup>  
농촌진흥청 작물시험장 · <sup>1</sup>충북대학교 원예학과 · <sup>2</sup>농업과학기술원

### Virus - Free Healthy Plant Production through Meristem Culture in Chinese Foxglove (*Rehmannia glutinosa*)

PARK, Chung Heon\* · SEONG, Nak Sul · PAEK, Kee Yoeup<sup>1</sup> · CHOI, Hong Soo<sup>2</sup>

Nat'l Crop Experiment Station, Suwon, 441-100, Korea : <sup>1</sup>Dept. of Horticulture, Chungbuk Nat'l Univ., Cheongju, 361-763, Korea : and <sup>2</sup>Nat'l Institute of Agri. Sci.&Tech. Suwon, 441-707, 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. Meristem culture was employed for virus free seedling production and micropropagation. Both Jiwhang 1 and domestic local were severely infected by potexvirus and TMV. Several growth regulators were used for the virus free stock production from Jiwhang 1 and Danyang local. Shoot formation and callus induction from the meristem culture seemed to be influenced by the content of various kinds of plant growth regulators. Kinetin supplement was the most effective on shoot formation and NAA addition was good on callus induction among the treatments. The acquired virus free stocks were confirmed using transmission electron microscope and indicate plants.

**Key words :** meristem, growth regulator, TMV

식물조직 배양기술을 이용한 기내 대량증식기술은 농업적으로 유용하게 이용되고 있는데, 이는 식물의 종류와 부위, 그리고 배양 환경조건에 따라 큰 차이를 보이고 있다 (Harn, 1984). 바이러스에 감염된 식물에서 영양번식을 반복할 경우 후대작물들은 바이러스 이병에 의하여 품질과 수량이 저하될 뿐만 아니라 품종의 퇴화를 가져오게 되는데, 생장점 배양은 바이러스 무병주 생산의 주요 수단으로 이용되고 있다. 이러한 현상은 지황에서도 예외가 아니어서 종근을 이용한 영양번식을 하기 때문에 TMV와 potexvirus 등의 바이러스에 심하게 감염되어 있는 것으로 조사되어 생장점 배양기술을 이용한 무병주 생산이 필요하다(Lee et al., 1993). 따라서 바이러스 무병개체인 우량진전 종묘를 생산할 목적으로 바이러스에 감염되지 않은 생장점 부위만을 배양하는 생장점 배양과 배양조직에서 캘러스를 유기시켜 계대배양 함으로써 바이러스 무병 개체를 얻을 수 있다는 보고도 있다(Harn, 1984).

현삼과(*Scrophulariaceae*)에 속하는 지황(*Rehmannia glutinosa*)은 우리나라를 비롯한 일본, 중국, 베트남 등지에

분포하는 다년생 속근초이다. (Institute of Medicinal Plant Development, CAMS 1991).

지황의 조직배양에 관한 연구는 Jiang과 Mao (1979)가 Goldend No. 1 Scolar 품종을 사용하여 기내종자 발아에서 캘러스와 신훈 및 뿌리 분화에 성공한 이래 배양에 이용되는 조직부위, 배지와 생장조절물질의 종류와 조성 등에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다. 생장점 배양을 이용한 우량종묘 생산과 지황의 바이러스 검정에 관한 연구에서 0.1-0.2 mm의 엽원기를 MS배지에 BA 0.3-0.4 mg/L NAA 0.005-0.02 mg/L와 GA 0.1mg/L를 첨가하여 배양하였을 때 무병주의 획득이 양호하다고 하였으며(Mao et al., 1983), Shoyama 등(1983)은 *R. glutinosa* var. *purpurea*의 정단조직을 배양하여 다경줄기의 형성을 보고하였고, 북경1호의 뿌리와 어린줄기 조직에서 캘러스 형성과 식물체 재분화에 성공하였다.

본 연구는 지황의 우량 영양체의 번식을 위하여 재래종과 지황 1호를 공시하여 생장점배양기술을 이용한 바이러스 무병주 생산에 관한 기초자료를 얻고자 실시한 결과이다.

### 재료 및 방법

지황의 우량 건전 종묘 생산을 위한 성장점 배양에는 지황 1호와 서천재래를 공시하였다. 공시재료는 작물시험장 약용작물재배 온실의 육묘상에서 맹아시킨 것을 채취하여 0.5%(v/v) sodium hypochlorite액에 10분간 침지하여 표면살균하고 멸균수에 3회 수세하여 해부현미경하에서 성장점을 적출하여 배양하였다. 배지조성은 MS(Murashige and Skoog, 1962)배지에 성장조절물질을 auxin으로 NAA와 IAA를, cytokinin으로 BA와 kinetin을 각각 0.1, 0.5, 1.0 및 2.0 mg/L씩 단용 첨가하였으며, 배지의 조제는 처리구마다 성분량과 0.8%(w/v) 한천을 넣은 후 121°C 에서 15분간 고압멸균하였다. 배양조건은 광도 24µmol·s<sup>-1</sup>·m<sup>-2</sup> PAR에서 16시간의 일장으로 조절하였으며, 배양실의 온도는 25±1°C로 유지되도록 조절하였다. 공시품종의 성장점을 배양한 후 약 30일 후에 각 처리별 캘러스 형성과 식물체 분화정도를 조사하였다. 성장점 유래의 배양식물체에 대한 바이러스 진단으로 생물검정, 혈청검정, 전자현미경 검정법을 이용하였다. 생물검정은 *C. amaranticolor* 등 20여종의 지표식물을 사용하였고, 혈청검정은 이병엽(*N. rustica*)에 동량의 0.01M 인산완충액(pH 7.0)을 넣어 마쇄한 후 원심분리(8,000rpm, 10분)하여 얻은 상층액을 항원으로 사용하였으며, 항체는 ATCC 등에서 구입한 ORSV와 7종 Tobamovirus를 사용하였다. 혈청반응실험은 0.01M 인산완충액(pH 7.0, 0.85% NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>)으로 조성시킨 0.8% agarose겔에서 한천겔이중 확산법으로 실시하였다. 바이러스의 정제는 지황에서 분리

한 RT<sub>1</sub> isolate를 *N. rustica*에 증식한 후 Figure 1과 같은 방법으로 정제하였다. 채집한 이병엽을 0.01M Na-DIECA와 0.1% thioglycolic acid를 첨가한 0.1M 인산완충액을 넣고 (1:4,w/v)마쇄한 후, 착즙한 조즙액에 8%의 chloroform and butanol(1:1)을 넣어 30분 동안 교반한 후 8,000rpm에 30분 원심분리하였다. 상층액에 8% polyethylene glycol(MW6,000)와 1.75% NaCl을 첨가한 후 8,000rpm에 30분 원심분리하여, 침전물을 0.01M MgCl<sub>2</sub>이 첨가된 0.1M 인산완충액으로 현탁하여 8,000rpm에 30분 원심분리하였다. 이 상층액을 40,000rpm에 2시간 30분 동안 원심분리 후 8,000rpm에 30분 원심분리하여 상층액을 10-40% 당밀도구배원심법으로 28,000rpm에 2시간 30분 원심분리하여 순화된 바이러스를 얻었다. 전자현미경 검정은 정제된 바이러스는 2% phosphotungstic acid(PTA) dipping법에 의해 염색한후 검경하였다. 이병조직의 검경은 지황에서 분리한 RT<sub>1</sub> isolate를 *C. amaranticolor*에 접종한 후, 이병엽을 2.5% glutaraldehyde와 2% osmic acid에 고정하여, epon에 포매, 초박절편한 것을 uranyl acetate와 lead citrate에 이중 염색하여 Hitachi H-800으로 검경하였다.

### 결과 및 고찰

종근을 이용한 영양제 번식을 하는 지황은 바이러스에 심하게 이병되었으므로, 우량 건전 종묘를 생산할 목적으로 수확한 종근을 수분을 유지시킨 상온에서 출아시켜(Figure 2A) 해부현미경하에서 성장점을 적출하여(Figure 2B) 배양한 결과는 Table 1과 같다. 배양 약 1주일 후에는 성장점 조직에서 신초가 형성되었고(Figure 2D), 2주경에는 식물체

**Table 1.** Percentage of callus formation and plantlet development from the meristem culture of *R. glutinosa*.

Phyto <sup>a</sup> hormone (mg/L)	Jiwhang 1		Danyang local	
	Plantlet(%)	Callus(%)	Plantlet(%)	Callus(%)
NAA 0.1	25 <sup>b</sup>	75	20	20
	0.5	40	— <sup>c</sup>	34
	1.0	11	—	—
	2.0	0	17	66
IAA 0.1	—	—	—	—
	0.5	—	—	—
	1.0	—	—	—
	2.0	—	—	—
BA 1.0	33	17	—	—
	0.5	17	50	—
	1.0	50	—	—
	2.0	33	33	14
KIA 0.1	50	—	75	—
	0.5	70	—	—
	1.0	60	—	—
	2.0	60	—	—

<sup>a</sup>Number of explant was twenty meristems in each medium.

<sup>b</sup>The values represents mean percentages of twenty meristem treatments.

<sup>c</sup>No response

Infected leaves ( <i>N. rustica</i> )	
Use material on this side	1. Add to 1 part of leaves 5 parts of 0.1M phosphate buffer, pH 6.3 containing 0.01M Na-DIECA and 0.1% thioglycolic acid
	2. Homogenizer with warning blender for 2 min. and press through cheesecloth
	3. Add 8% of chloroform and butanol (1:1)
	4. Stir at room temperature for 30min.
	5. Centrifuge at 8,000rpm, 30min.
supernatant	6. Add 8% PEG(MW6,000) and 1.75% NaCl
	7. Centrifuge at 8,000rpm, 30min.
pellet	8. Suspend pellet in 0.01M phosphate buffer, pH 7.3 containing 0.01M MgCl <sub>2</sub>
	9. Centrifuge at 8,000rpm, 30min.
supernatant	10. Centrifuge at 40,000rpm, 2.5hrs.
pellet	11. Centrifuge at 8,000rpm, 30min.
supernatant	12. Centrifuge at 40,000rpm, 2.5hrs.
pellet	13. Centrifuge at 8,000rpm, 30min.
supernatant	14. Sucrose density gradient, Centrifuge at 28,000rpm for 2.5hrs.
	15. Obtain a milkish band
	16. Centrifuge at 40,000rpm, 2.5hrs.
pellet	17. Suspend pellet in 0.01M phosphate buffer, pH 7.3
	18. Centrifuge at 8,000rpm, 10min
supernatant(purified virus)	

**Figure 1.** Procedure for purification of TR<sub>1</sub> isolated from *Rehmannia glutinosa*

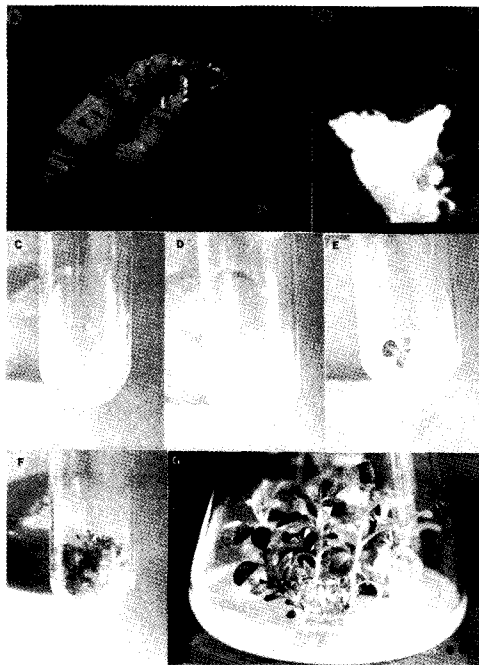


Figure 2. Meristem culture and *in vitro* shoot multiplication of *R. glutinosa*. A) Donor root: B) Isolation of meristem tissue: C) Callus induction: D) Cotyledon formation 2 weeks after culture: E) Multiple shoot regeneration from callus : G) Plantlets developed from multiple shoots.

Table 2. Comparison of virus infection in the plant leaves between field grown and tissue cultured plants by transmission electron microscopy in *R. glutinosa*.

Source	Specimen No		Virus Particulate type		
	Observation	Infection(%)	Rod	Filament	Rod + Filament
Field grown plants	17	10(58.8)	5	2	3
Tissue cultured plants	37	9(24.3)	4	4	1
-Meristem culture	24	4(16.7)	2	2	0
-Callus culture	13	5(38.5)	2	2	1

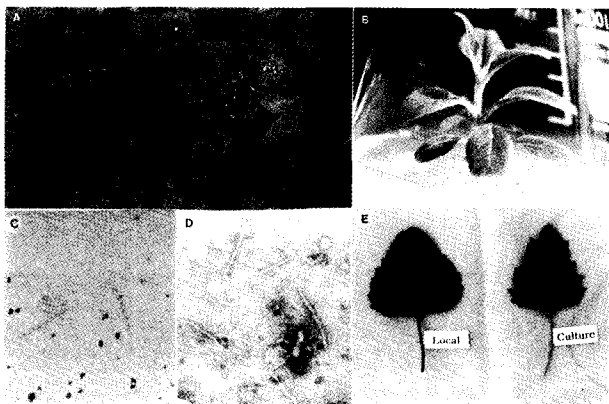


Figure 3. Mosaic symptoms on *R. glutinosa* infected with TMV in field (A), Meristem derived virus-free plant(B), Electron micrograph of rod and filamentous virus particles detected from the leaves of chinesetoxglove in fields(C,D) Necrotic spots on *C. amaranticolor* leaf(E).

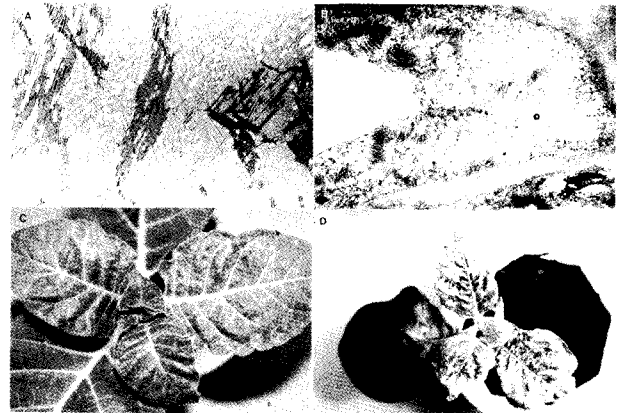


Figure 4. Transmission electron microscopy of rod and filamentous infected (A,B) and indicator plant reaction of *N. tabacum* (C,D) on *R. glutinosa*.

Table 3. Response on the indicator plants for TR<sub>i</sub> isolated from *R. glutinosa*.

Indicator plant	Response on leaves <sup>a</sup>	
	Inoculated	Uppered
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	NL	-
<i>Chenopodium quinoa</i>	CL	CL
<i>Gomphrena globosa</i>	NL	CL,M
<i>Nicotiana glutinosa</i>	NL	-
<i>N. rustica</i>	NL	SM
<i>N. bentamiana</i>	NL	SM
<i>N. clelandii</i>	NL	SM
<i>N. tabacum 'Ky-57'</i>	NL	-
<i>N. tabacum 'X-nc'</i>	NL	-
<i>N. tabacum 'Samsun'</i>	NL	M
<i>N. tabacum 'Bright Yellow'</i>	NL	SM
<i>Phaseolus vulgaris 'Suwonjaerae'</i>	-	-
<i>Tetragonia expansa</i>	CL	-
<i>Vicia faba</i>	-	-
<i>Vigna sesquipedalis</i>	-	CL, M
<i>Physalis floridana</i>	CL	-
<i>Datura stramonium</i>	NL	-
<i>Cucumis sativus</i>	-	-
<i>Lycopersicon esculentum</i>	-	-
<i>Capsicum annuum</i>	NL	-

<sup>a</sup>NL:Necrotic local, CL:Chlorotic local, M:Mosaic, SM:Severe mosaic.

Table 4. Serological reaction in agar gel diffusion test.

Antiserum	Reaction for purified virus
Odontoglossum ringspot virus(ATCC)	-
Radish mosaic virus (Korea)	-
Tobacco mosaic virus - O (Japan)	-
Tobacco mosaic virus - P (Japan)	-
Tobacco mosaic virus - P (Korea)	+
Tobacco mosaic virus - T (Japan)	-
Tobacco mosaic virus - cym (Korea)	-

의 재생(Figure 2E)과 함께 성장조절물질 처리조합에 따라 캘러스도 형성되었다(Figure 2C). 배양 6주경에는 캘러스로부터 다수의 싹초가 분화되었으며(Figure 2F), 이를 계대배양하여 건전한 다수의 식물체를 얻을 수 있었다(Figure 2G). 한편 캘러스형성과 싹초 형성은 성장조절물질의 종류

및 농도에 따라 차이를 보였다. 식물체 형성에는 지황 1호의 경우 BA 1.0 mg/L나, kinetin 1.0-2.0 mg/L 첨가에서 좋았으며, 서천재래에서는 kinetin 첨가구에서 양호한 경향을 보였다. 생장점 배양은 바이러스 무병주 생산을 위하여 영양번식 작물에서 주로 이용되는데, 영양번식을 주로하는 지황의 바이러스 감염정도를 전자현미경으로 검정한 결과는 Table 2와 같다. 재배포장의 경우 바이러스 이병율은 59%로 매우 높은 반면, 배양식물체는 24%로 낮게 조사되었는데, 검출된 바이러스는 막대형인 TMV와 사상형인 potexvirus로 동정되었다(Figure 3C, 3D). 생장점 배양과 엽유래 캘러스에서 분화된 식물체를 구분하여 바이러스 감염을 조사한 결과, 생장점 배양의 경우 24개체 중 4개체에서 바이러스가 관찰되어 감염율이 16.7%였고 엽조직 유래 캘러스에서 분화된 식물체에서는 13개체 중 5개체에서 검출되어 38.5%로 조사되었다. 생장점 배양의 경우 바이러스에 대한 감염율은 낮았지만 일부 개체에서 감염이 관찰됨에 따라 배양 생장점의 채취를 주의하여 치상할 필요가 있다고 생각된다. 또한 지황 바이러스를 지표식물에 접종하였을 때 반응은 Table 3과 같다. 명아주외 19종의 지표식물에 반응한 결과, *C. amaranticolor* 등 8종의 기주식물에는 전신감염이 되어 Tobacco mosaic virus(TMV)의 기주범위와 동일하였다(Figure 3E). 지표식물의 반응은 지황에서 분리한 RT1 isolate는 *C. quinoa*에서 초기에 접종엽 및 상엽에서 국부병반을 형성하였으며, *N. tabacum*'samsun'과 *N. tabacum*'brigh yellow' 등 6종에서는 접종엽에서 국부병반을, 상엽에서는 전신감염으로 조사되었다. 또한 *N. glutinosa* 등 8종에서는 국부병반만 형성하였다(Figure 4C, 4D). TMV-cym에서와 같이 Bright yellow에서의 전신감염은 TMV의 strain에 따라 차이가 있으나, 국부감염은 그보다 환경적인 요인, 즉 온도 차이에 의해 병징의 변화가 있는 것으로 생각된다.

지황에서 분리한 막대형과 TRL isolate 바이러스를 ORSV 등 7종의 Tombamovirus와 반응시켰을 때 TMV-P에서는 양성반응을 보였으나 나머지 6종에서는 음성반응을 보였다(Table 4). 이와 같이 지표식물검정, 혈청검정 및 전자현미경 점정으로 통하여 TMV로 동정되었다(Figure 4A, 4B).

## 적 요

생장점 배양에 의한 바이러스 무병주 생산 여부를 판단하고자 바이러스 감염실태를 조사한 결과 지황1호와 국내재래종 모두 여러 종류의 바이러스에 감염되어 있었고 주종 바이러스는 potexvirus와 TMV였다. 생장점 배양시 신초형성은 kinetin 첨가 배지에서 가장 양호하였으며 2,4-D 첨가 배지에서는 캘러스로 발달하였는데 캘러스로부터 다수의 신초를 획득할 수 있었다. 기내 재분화 식물체의 투과전자현

미경(TEM)과 지표식물을 이용한 바이러스 검정결과 생장점 배양 유래의 식물체들은 83.3%가 바이러스 무병주임을 확인할 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 plbreeding. RDA Res Bull : 245-356
- Institute of Medicinal Plant Development, CAMS (1991) Medicinal plant cultivation of China. Agriculture Press Beijing pp 1375
- Jiang LC and 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 and Park SI (1993) Micropropagation of *Aconitum carmichaeli* and *Rehmannia glutinosa* through the plant tissue culture techniqnes. 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 and 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, and 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
- Rha ES, Kim JK (1996) Plant regeneration in leaf explant cultures of *Rehmannia glutinosa*. Korea J Plant Tissue Culture 23: 299-302
- Ministry of Agriculture and Fishery (1997) Cultivation and production list of industrial crops in Korea pp 97
- 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