

지황 조직배양주의 수량성과 성분함량 특성

박충헌* · 성낙술 · 김선규¹ · 백기엽¹
농촌진흥청 작물시험장 · ¹충북대학교 원예학과

Characteristics in Tissue Cultured Plants of Chinese foxglove (*Rehmannia glutinosa*)

PARK, Chung Heon* · SEONG, Nak Sul · KIM, Seon Kyu¹ · PAEK, Kee Yoeup¹

National Crop Experiment Station, Suwon, 441-100, Korea

¹Department of Horticulture, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea

ABSTRACT Chinese foxglove (*Rehmannia glutinosa*) is receiving much attention as one of the principal medicinal crops and the crud drug. This study was conducted to obtain the basic breeding information of Chinese foxglove derived from tissue culture. To compare plant characteristics between local variety and tissue cultured seedlings, plant growth and root yield has been investigated. In addition, catalpol and free sugar contents were also analyzed. The ability for the storage of root stock originated from tissue culture seedlings were better than that of local variety. The growth and root yield of *in vitro* propagated plants were superior to those of conventionally propagated plants. Root yield of 1-year-old and 2-year-old seedlings investigated 112% and 246% respectively than Seocheon local shows 384 Kg/10 a. Although there were no significant different between tissue culture seedlings and conventionally propagated one, slight decline of component contents in tissue culture plants were still existed. Investigated sugar content among Seocheon local, 1-year-old tissue culture seedlings, and 2-year-old tissue culture seedlings were 1.86%, 1.21%, and 1.10% respectively. Catalpol content as one of standard materials indicates 0.46% in Seocheon local and 0.40% in tissue cultured ones.

Key words : Chinese foxglove (*Rehmannia glutinosa*), *in vitro* culture, yield trials, catalpol and free sugar contents

서 론

현삼과 (*Scrophulariaceae*)에 속하는 지황 (*Rehmannia glutinosa*)은 우리나라를 비롯한 일본, 중국, 베트남 등지에 분포하는 다년생 숙근초이다. 지황의 국내 재배면적은 '89년에 342 ha이었으나 '97년에는 91 ha로 급격히 감소되고 있는 추세인데 (Ministry of Ariculture and Fishery 1997), 이는 중국으로부터의 생약재 수입이 증가하였기 때문이며, 매년 2,100 M/T정도의 지황이 중국에서 수입되고 있는 실정이다

(Korea Pharmaceutical Trade Association 1997).

바이러스에 감염된 식물에서 영양번식을 반복할 경우 후대 작물들은 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 PVX 등의 바이러스에 심하게 감염되어 있는 것으로 조사되어 생장점 배양기술을 이용한 무병주 생산이 필요하다 (Paek et al. 1995).

지황의 조직배양에 관한 연구는 Jiang과 Mao (1979)가 Goldend No. 1 Sclar 품종을 사용하여 기내종자 발아에서 캘러스와 신초 및 뿌리 분화에 성공한 이래 배양에 이용되는 조직부위, 배지와 생장조절물질의 종류와 조성 등에 대한 많

*Corresponding author. Tel (0331)290-6725, 6719
E-mail parkOch@nces.go.kr

은 연구가 이루어져 왔다. 국내에서도 지황의 기내배양에 관한 연구가 많이 이루어져 왔는데 (Lee et al. 1993), 체세포 배 발생 캘러스의 형성은 Linsmaier Skoog 배지에 BA 4 mg/L 와 NAA 0.5 mg/L 첨가가 효과적이며, 또한 배발생 캘러스로부터 체세포배 형성은 5% sucrose 첨가와 질소원으로 KNO₃ 1,650 mg/L와 NH₄NO₃ 475mg/L 처리가 효과적이라고 하였다 (Chae and Park 1993). 현탁배양에서 체세포배 형성은 polyamine 중에서 spermine 10 mg/L 처리가 가장 양호하였으며, 체세포배를 encapsulation 할 때 인공종자의 구형 형성은 3% sodium alginate 에서 좋았으나, 발아율은 2.5% 처리가 양호하다고 하였다 (Park et al. 1995). 또한 엽절편배양은 1/2MS배지에 BA 3.0 mg/L 첨가한 경우 부정아 발생과 식물체 분화율이 높다고 하였다 (Rha and Kim 1996). 또한 딸기, 마늘 등 영양 번식 작물에서는 성장점배양 등의 방법에 의하여 얻어진 조직배양주의 생육특성과 수량성을 보고한 바 있다 (Choi and Paek 1993; Lee and Lee 1996).

본 연구는 지황 우량 종묘의 생산을 위하여 엽절편 조직과 화경배양에 의하여 생산한 조직배양주와 재래종의 종근 저장

Table 1. Operating conditions of HPLC for analysis of free sugars in Chinese foxglove root.

Instrument	: HPLC/Waters 510
Detector	: RI (Waters 410)
Column	: Supeclo LC-NH ₂ (25.0cm × 4.6mm)
Column temp.	: 40°C
Mobile phase	: Acetonitrile/water (75:25, V/V)
Attenuation	: 32 ×
Flow rate	: 1.5ml/min
Injection volume	: 10 µl
Chart speed	: 0.5cm/min

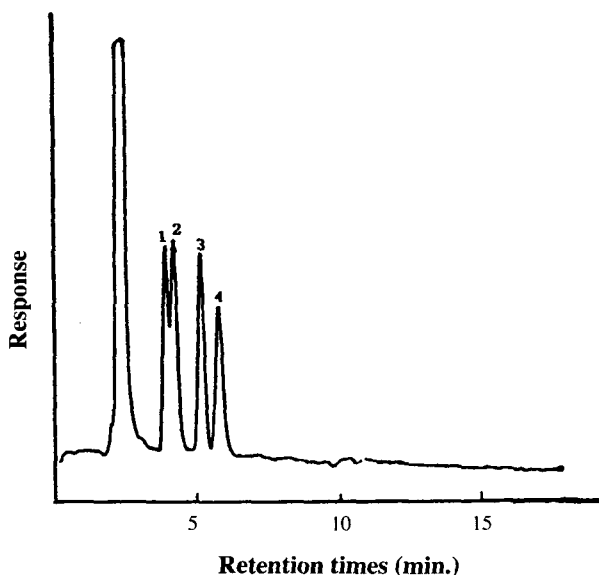


Figure 1. HPLC chromatogram of standard.
1 : Fructose, 2 : Glucose, 3 : Sucrose, 4 : Maltose

성과 수량성 및 성분함량 특성에 관한 실험을 수행한 결과이다.

재료 및 방법

공시재료는 서천 재래종의 엽절편에서 캘러스 유도 후 기 관분화한 엽배양 1년차와 2년차 묘, 단양 재래종의 화경배양 유래의 2년차묘, 그리고 지황 1호 등 4계통을 사용하였다. 전년도에 수확한 종근의 적정 저장조건에 따른 차이를 조사하고자 농가 관행의 상온과 13°C (고구마 저장고) 노천매장 (40 cm와 80 cm) 등 4처리를 하여 월동 후 종근 부패율을 조사하였다. 조직 배양주와 모식물간 파종에 적합한 종근의 크기를 구명하기 위하여 종근을 대 (직경 20 cm), 중 (직경 10

Table 2. Analytical condition of catalpol.

Instrument	: HPLC (Waters 510)
Column	: Capcell pak c18 (4.6 × 250)
Mobile phase	: Water:Acetonitrile=100:1
Flow rate	: 1.2ml/min.
Detection	: UV210nm (TSP co.1 Focus)
Sensitivity	: 0.05 AUFS

*regression equation : $y=7.18E-05 \times +0.011$ ($r=0.999$)**



Figure 2. HPLC chromatogram of catalpol standard.

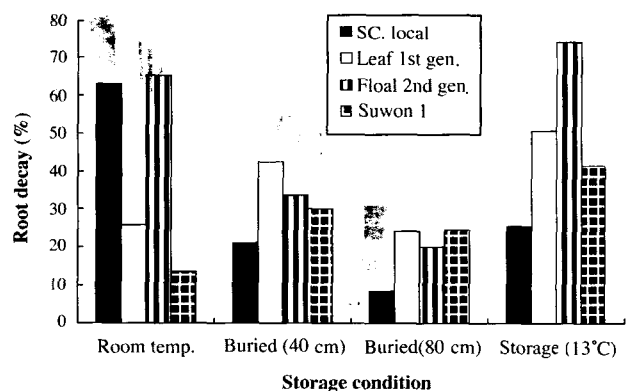


Figure 3. Effect of storage condition on decay of stock root in *R. glutinosa*.

cm), 소 (직경 6 cm)의 3종류로, 길이를 3, 5, 7 cm로 각각 절단하여 파종한 다음, 종근의 크기에 따른 지상부 생육특성과 근 수량을 조사하였다. 성분함량 특성으로는 지표성분인 catalpol과 유리당 함량을 비교하였다. 유리당류의 정량은 HPLC법으로 분석하였다. 지황 생근 10 g에 탈이온수 20 mL를 넣고 마쇄한 후 15,000 rpm으로 30분 동안 원심분리하여 얻은 상등액을 100 mL 용량 플라스크에 따르고 잔사는 다시 탈이온수 20 mL를 넣고 혼합하여 원심 분리하는 조작을 2회

반복하여 얻은 상등액을 100 mL 용량 플라스크에 모두 합하여 정용한 후 다시 15,000 rpm으로 30분 원심 분리한 다음 0.45 µm membrane filter로 여과하고 Sep-pak (NH₂)를 통과시켜 색소 및 불순물을 제거시킨 후 HPLC에 주입하였다. 이때의 HPLC 분석조건은 table 1과 같으며 standard sugar 혼합액의 chromatogram은 figure 1과 같다.

지황의 엑스와 Catalpol함량 측정에 사용한 분석사료의 준비는 처리별로 10 g씩 전체를 마쇄한 후 1g씩 취하여 250

Table 3. Characteristics in growth performance between micropropagated and local variety of *R. glutinosa*.

Origin	Stock root		Plant height (cm)	Leaf			Root			Yield (kg/10 a)	
	Length (cm)			No.	Width (cm)	Length (cm)	No.	Length (cm)	Diameter (mm)		Weight (g)
	Diameter (mm)										
Seocheon local	10	7	7.4	13.7	2.2	6.5	8.7	21.7	4.1	15.2	304
	10	5	8.9	14.4	3.2	8.6	6.3	27.5	5.3	18.9	378
	10	3	7.7	15.4	2.8	7.0	7.1	34.8	5.8	23.6	472
	Mean		8.0	14.5	2.7	7.4	7.4	28.0	5.1	19.2	384
	20	7	13.5	17.6	4.0	11.2	4.7	40.2	6.7	25.0	500
	20	5	12.5	14.5	4.1	10.9	4.9	33.9	5.5	22.5	450
	20	3	11.1	14.0	3.7	10.1	5.0	25.1	4.6	16.5	330
	Mean		12.4	15.4	3.9	10.7	4.9	33.1	5.6	21.3	426
Leaf cultured 1 yr stock root	10	7	11.4	17.7	3.4	9.6	4.4	23.5	5.5	20.3	406
	10	5	9.5	17.8	3.3	8.6	5.9	20.8	6.2	24.1	482
	10	3	14.1	18.7	4.6	12.9	5.2	22.1	5.9	20.2	404
	Mean		11.7	18.1	3.8	10.4	5.2	22.1	5.9	21.5	431
	6	7	12.8	14.9	4.2	11.2	5.1	29.6	5.1	20.0	400
	6	5	14.8	16.1	4.5	13.2	6.5	28.1	6.5	25.3	506
	6	3	14.0	18.5	4.3	11.9	4.4	27.9	6.6	25.4	508
	Mean		13.9	16.5	4.3	12.1	5.3	28.5	6.1	23.6	472
	20	7	15.5	20.4	5.6	15.2	4.4	25.9	6.8	19.1	384
	20	5	16.9	19.3	6.0	15.7	5.1	24.5	6.8	20.5	410
	20	3	18.1	23.9	6.0	17.4	6.1	31.7	6.3	28.3	566
	Mean		16.8	21.2	5.9	16.1	5.2	27.3	6.6	22.6	452
Leaf cultured 2 yrs stock root	10	7	10.5	20.4	6.0	15.8	6.1	28.4	7.6	60.5	1,210
	10	5	16.2	21.7	5.3	14.8	7.5	27.7	6.5	42.8	856
	10	3	13.1	16.9	4.6	12.4	5.6	32.2	7.5	39.0	780
	Mean		13.3	19.7	5.3	14.3	6.4	29.4	7.2	47.4	948
	6	7	19.0	19.1	6.0	17.2	5.8	26.0	7.9	34.9	698
	6	5	18.9	19.6	6.0	16.7	6.0	29.0	7.1	41.2	824
	6	3	19.1	18.1	6.7	17.6	4.9	30.2	7.6	33.7	674
	Mean		19.0	18.9	6.2	17.2	5.5	28.4	7.5	36.6	732
	20	7	16.9	24.0	4.8	12.6	4.1	16.9	5.7	27.1	542
	20	5	15.6	26.0	4.5	13.5	7.4	30.1	4.5	28.9	578
	20	3	13.0	20.2	4.3	11.2	5.8	21.4	5.4	22.8	456
	Mean		15.2	23.4	4.5	12.4	5.7	22.8	5.2	26.2	524
Floral bud cultured 2 yrs stock root	10	7	14.3	18.0	4.5	12.7	4.9	20.4	5.1	21.1	422
	10	5	13.2	21.3	4.0	11.9	6.0	20.7	6.2	26.5	530
	10	3	16.8	20.9	5.3	15.3	5.2	23.6	5.1	25.3	506
	Mean		14.8	20.1	4.6	13.3	5.3	21.6	5.4	24.3	486
	6	7	17.7	26.4	5.3	15.4	5.0	25.5	5.3	21.8	436
	6	5	19.1	21.0	5.7	16.8	5.2	27.4	5.2	19.3	386
	6	3	19.7	20.4	5.6	17.4	5.7	24.0	5.6	26.4	528
	Mean		18.8	22.6	5.5	16.5	5.3	25.6	5.3	22.5	450

Table 4. Free sugar and catalpol contents according to root size among plants derived from tissue culture and local cultivar in *R. glutinosa*.

Source	Root diameter (mm)	Fructose (%)	Glucose (%)	Sucrose (%)	Maltose(%) (%)	Total sugar (%)	Catalpol (%)	Extract (%)
Jiwhang 1	32	-	0.27	1.55	-	1.82	0.31	78.70
	20	0.51	0.15	2.25	-	2.91	0.19	76.81
	12	0.51	0.34	1.92	-	2.77	0.17	66.14
	Mean	0.51	0.25	1.91	-	2.50	0.22	73.88
Seocheon-local	13	0.26	0.30	1.18	-	1.74	0.54	76.26
	8	-	0.31	1.66	-	1.97	0.44	73.02
	5	-	0.23	1.64	-	1.87	0.42	69.31
	Mean	0.26	0.28	1.49	-	1.86	0.46	72.86
Danyang-local	13	-	0.22	1.39	-	1.61	0.45	74.90
	8	-	0.46	1.66	-	2.12	0.44	67.06
	5	-	0.33	1.64	-	1.37	0.47	65.00
	Mean	-	0.34	1.56	-	1.70	0.45	68.99
Leaf culture 1 yr stock root	20	-	-	0.60	-	0.60	0.32	79.94
	10	-	0.17	1.23	-	1.40	0.49	77.56
	6	-	0.19	1.17	0.26	1.62	0.41	66.50
	Mean	-	0.18	1.00	0.26	1.21	0.40	74.67
Leaf culture 2 yrs stock root	20	-	-	0.38	-	0.38	0.34	79.34
	10	-	0.22	0.85	-	1.07	0.38	76.24
	6	-	0.20	1.66	-	1.86	0.48	67.08
	Mean	-	0.21	0.96	-	1.10	0.40	74.22
Floral stem culture 2 yrs stock root	20	-	0.27	1.52	-	1.79	0.36	76.50
	10	-	0.28	1.35	-	1.87	0.41	71.44
	6	-	0.26	2.47	-	2.73	0.23	67.94
	Mean	-	0.27	1.78	-	2.13	0.33	71.96

mL 삼각플라스크에 넣고 80% MeOH로 3회 환류 추출한 다음 rotary vacuum evaporator에서 농축시켜 엑스 함량을 측정하였다. Catalpol 함량은 HPLC를 이용하였으며 기기 분석 조건은 table 2와 같다.

결과 및 고찰

지황 종근의 종류와 저장 조건에 따른 저장성과 생육을 조사한 결과는 figure 3과 같다. 종근의 부패 정도는 13°C 항온 조건으로 사용한 고무마 저장고에서 가장 높아 48%에 달하였고 지하 80 cm에 노천 매장한 경우 부패율 19.3%로 농가 관행의 상온 조건 42%보다 양호한 상태를 보였다. 공시종근의 큰 차이는 없었으나 종근저장성은 조직배양주가 재래종에 비하여 약간 양호한 경향이였다.

서천재래와 엽배양 1, 2년차묘 및 화경배양 2년차묘를 공시하여 종근의 굵기와 길이에 따른 생육 및 수량을 조사한 결과는 다음과 같다 (Table 3). 종근의 굵기에 따른 뿌리의 수량은 굵기가 가늘수록 증수되는 경향을 보였다. 엽배양 1년차묘는 종근굵기 20, 10, 6 mm에서 각각 426, 431, 472 kg/10 a의 수량성을 보여 서천재래주의 384 kg/10 a에 비하여 뚜렷하게 높았다. 이는 조직배양묘의 초기 1년차는 종근 증식용으

로 이용하기 위한 증식용 세대로서 종근 굵기는 직경 6 mm이며 3 cm 길이를 공시한 경우 508 kg/10 a로 수량성이 가장 양호하였다. 엽배양 2세대와 화경배양 2세대는 더욱 높은 경향이었는데, 엽배양과 화경배양주의 수량성은 재래종에 비하여 월등히 뛰어났으며 종근굵기가 중간정도인 10 mm 내외와 길이 5 cm로 하였을 때 생육 및 수량성이 가장 양호하게 조사되었다. 엽배양 유래의 조직 배양묘 2세대는 종근 굵기 10 mm인 경우 948 kg/10 a의 근수량성을 보여 가장 높게 조사되었다. 굵은 종근을 7 cm 길이로 파종했을 경우 지상부 생육은 큰 차이를 보이지 않았으나 근경이 가늘고 근중도 현저히 감소하여 수량성이 가장 낮은 결과를 보이는 특이한 현상을 나타냈는데 이는 종근이 굵고 긴 경우 종근에서 신근으로의 양분전류가 이루어지지 않고 원상태 그대로 남아 있는 것이 관찰되었다.

조직배양주의 유리당과 Catalpol 함량비교

지황의 국내 재래종으로 서천재래와 단양재래, 신품종인 지황 1호 그리고 조직배양주를 작물시험장 표준재배법에 의해 재배한 것을 수확하여 공시한 종근 굵기별 유리당과 catalpol 함량을 비교한 결과는 table 4와 같다. 전당함량은 근경의 굵기에 관계없이 지황 1호가 평균 2.5%로 서천재래 1.86%와

수원재래 1.70%에 비하여 높았다. 근경의 굵기에 따라서도 전당함량은 차이를 보였으며 중간굵기에서 지황 1호 2.91%, 서천재래 1.97%, 수원재래 2.12%로 조사되었다. 또한 지황 1호의 중간굵기와 작은굵기의 종근에서는 0.51%의 과당이 검출되었다. 조직배양 주의 당함량을 분석한 결과는 서천재래종을 공시한 엽배양 1년차와 2년차간에는 큰 차이를 보이지 않아 각각 1.2%, 1.1%를 조사되었다. 단양재래를 공시한 화경배양 2년차묘는 2.13%로 서천재래종에 비하여 비교적 높은 특성을 보여 품종간의 차이를 알 수 있었다. Catalpol 함량은 도입선발 품종인 '지황 1호'가 0.22%인데 비하여 서천재래 0.46%, 단양재래 0.45%로 재래종이 약 2배 정도 높은 특성을 보였다. 뿌리의 굵기를 지름 23 mm, 12 mm, 7 mm의 3종으로 구분하여 엑스함량을 조사한 결과 뿌리가 굵을수록 엑스함량은 높은 경향을 보여 지황 1호의 경우 78.7%, 서천재래는 76.26% 단양재래는 74.9%로 조사되었다. 조직배양주의 지표성분 함량을 조사한 결과는 서천재래종을 공시한 엽조직배양 유래의 1년차와 2년차의 catalpol 함량은 0.4%로 동일하게 조사되었고 단양재래종을 공시한 화경배양 2년차묘는 0.33%였다. 지표성분 함량은 수집종간 차이는 있었으나 조직배양주와 모식물이 큰 차이를 보이지 않아 안정적임을 알 수 있었다.

적 요

지황 (*Rehmannia glutinosa*) 우량종묘 생산을 위하여 조직배양에 의해 생산된 종묘의 포장수량성을 평가하고 지표성분인 Catalpol과 유리당 함량 특성을 비교한 결과는 다음과 같다. 조직배양주의 종근저장성은 재래종에 비하여 약간 양호한 경향이였다. 또한 근장, 근경 등의 뿌리생육이 왕성하여 조직배양주의 수량성은 서천재래종 384 kg/10 a에 비하여 1년차 묘는 112%, 2년차 묘는 246%까지 증수되는 결과를 보였다. 성분함량 특성비교에서는 총당함량이 서천재래 1.86%에 비하여 조직배양 1, 2년차 묘는 각각 1.21, 1.10%를 보였고, 지표성분인 Catalpol도 서천재래 0.46%에 비하여 조직배양 1, 2년차묘는 0.4%로 약간 감소되는 경향이였다.

이상의 결과에서 지황 조직배양주의 수량성은 재래종에 비하여 증수되는 특성을 보였다. 그러나 유리당과 Catalpol 함량은 약간 감소되는 경향이었는데 모본식물과 큰 차이를 보이지는 않았다.

인용문헌

Chae YA, Park SU (1993) Callus induction and somatic

- embryogenesis in suspension culture of *Rehmannia glutinosa*. Kor J Med Crop Sci 1:184-190
- Choi SY, Paek KY, Jo JT (1993) Field performance of tissue cultured garlic (*Allium sativum* L.). Kor J Plant Tiss Cult 20:15-19
- Harn (1984) Fundamental studies for plant breeding. Research Books of Rural Devel Admin, Korea Vol. 10:245-356
- Korea Pharmaceutical Trade Association (1996) Trade list of pharmaceutical product and crude drug in Korea, pp 599
- Jiang LC, Mao WY (1979) Callus formation and plantlet regeneration of *Rehmannia glutinosa*. Chin Med Herb Lett 2:41
- Institute of Medicinal Plant Development, CAMS (1991) Medicinal plant cultivation of China. Agriculture Press, Beijing, pp 1375
- Lee EM, Lee YB (1996) Field trials of micropropagated strawberry plants Kor J Plant Tiss Cult 23:279-282
- 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 Bull 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, pp17-21
- 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 (4):329-332
- Rha ES, Kim JK (1996) Plant regeneration in leaf explant cultures of *Rehmannia glutinosa*. Kor J Plant Tiss Cult 23 (5):299-302
- Ministry of Agriculture and Fishery (1997) Cultivation and production list of industrial crops in Korea, pp 97
- Paek KY, Park SI, Sung NS, Park CH (1995) Field performance test of micropropagated *Rehmannia glutinosa* and virus detection. Acta Hort 390, Medicinal and Aromatic Plants, pp 121-126
- Park JH, Park SU, Chae YA (1995) Studies on proper medium for somatic embryogenesis in suspension culture of *Rehmannia glutinosa* and encapsulation of somatic embryos. Kor J Med Crop Sci 3(2): 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. (Bajaj TPS et al.), pp 501-512