

지황 부정근을 이용한 식물체 재분화 및 생물반응기 배양

정재훈^{1*}, 유기원³, 김선자³, 최용익², 백기엽³

¹국립산림과학원 생물공학과, ²강원대학교 산림과학대학 산림자원학부, ³충북대학교 첨단원예기술개발연구센터

Plant Regeneration from Adventitious Roots of *Rehmannia glutinosa* Liboschitz and Bioreactor Culture

Jae-Hun Jeong^{1*}, Kee-Won Yu³, Sun-Ja Kim³, Yong-Eui Choi², Kee-Yoeup Paek³

¹Division of Forest Genetics Resources, Korea Forest Research Institute, Suwon, Kyunggi-do 441-350, Korea

²Division of Forest Resources, College of Forest Sciences, Kangwon National University, Chuncheon, Kangwon-do 200-701, Korea

³Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea.

ABSTRACT This experiment was carried out to develop rapid mass propagation via shoot organogenesis system from adventitious roots of *Rehmannia glutinosa*. The induction of adventitious roots from leaf explants was most favorable to MS solid medium supplemented with 2 mg/L IBA. However, the growth of adventitious roots was highest when they were cultured on 1/3 strength MS liquid medium supplemented with 2 mg/L IBA. When the adventitious roots were grown in 10 L bioreactor, 10 g roots as initial inoculum was increased to 225 g after 6 weeks of culture. The harvested roots were cultured onto solid medium to induce plant regeneration. The optimal adventitious shoot formation was observed on MS medium supplemented with 2 mg/L BA. Rooting of individual shoots was induced after transfer to half strength MS medium without growth regulators. Plantlets after acclimatization were successfully transplanted in the field and no phenotypic variation was observed among them.

Key words: Adventitious roots, bioreactor, mass propagation, shoot organogenesis, *Rehmannia glutinosa*

서 론

지황 (*Rehmannia glutinosa* Liboschitz)은 현삼과 (*Scrophulariaceae*)에 속하는 다년생 초본으로 한국과 중국을 비롯하여 전세계적으로 널리 분포되어 있으며, 국내에서는 생약재로 많이 이용되고 있으나 종근으로 번식하는 특성 때문에 증식율이 낮고 바이러스 및 병원균에 의한 감염 등으로 재배에 어려움이 있다 (Tien 1962; Zhu and Chen 1981). 따라서 조직 배양방법을 이용하여 건전묘 생산을 시도하는 연구가 진행되

었는데, 지황의 조직배양에 관한 연구는 Jiang과 Mao (1979)가 기내종자 발아체에서 캘러스와 신초 및 뿌리 분화를 보고한 이후 성장점 배양을 통한 무병주 획득 (Mao et al. 1983), 정단조직을 이용한 다경줄기의 형성 (Shoyama et al. 1983) 등이 보고되었다.

국내에서도 지황의 조직배양 연구가 활발하게 진행되었는데, 체세포 배발생 (Park et al. 1995; Chae and Park 1993), 엽절편을 이용한 식물체 재분화 (Rha and Kim 1996), 성장점 배양을 통한 우량주 생산 (Park et al. 1998a), 캘러스 배양에 의한 기내 대량 증식 (Park et al. 1998b), shoot tip을 이용한 대량 증식 (Paek et al. 1995) 등이 보고 되었으며, 최근에는 생물반응기를 이용한 지황 종묘 생산에 대한 연구가 보고 된 바 있

*Corresponding author Tel 031-670-4692 Fax 031-676-5121

E-mail: bio-jeong@hanmail.net

다 (Park 2000). 그러나 이러한 방법들은 무병주의 증식에는 우수한 방법이지만 대부분 고체배지와 소규모 배양용기를 사용함에 따라 아직까지 증식속도가 느리고 많은 노동력을 요하여 생산비용이 많이 드는 단점이 있어 산업적인 중요생산에는 한계가 있다.

뿌리는 기내에서 배양된 최초의 식물기관으로 White (1934)의 액체배양 조건에서 토마토 뿌리정단배양 실험 이후로 배양기술이 발달되어 다양한 식물기관을 이용한 식물체 재분화가 이루어지고 있으며, 이를 기반으로 생명공학기술들이 발달되었다. 그러나 식물체 재분화를 위한 절편체로써 뿌리를 이용한 연구는 일부 식물체에서만 보고 되고 있는데 (Haque et al. 1997; Akashi et al. 1998; Myers and Simon 1998; Wawrosch et al. 1999; Vinocur et al. 2000; Jeong et al. 2002), 최근 새로운 증식체계인 생물반응기를 이용한 뿌리 배양기술이 성공적으로 개발되면서 (Yu et al. 2000), 증식된 뿌리를 이용한 식물체 생산의 새로운 가능성이 기대되고 있다.

지황의 뿌리로부터 식물체 재분화에 대한 연구는 최근 분자자들에 의해 지황의 부정근으로부터 재분화 및 토양순화에 대한 결과가 보고 된바 있는데, 잎절편에서 부정근을 유도한 후 증식된 부정근을 2 mg/L BA를 첨가한 MS 배지에서 치상하였을 시 재분화가 용이하였으며, 식물생장 조절제를 첨가하지 않은 조건에서도 재분화가 되었다 (Jeong et al. 2002). 지황의 이러한 특성은 유전자원의 보존 및 증식방법으로써 부정근의 이용가능성을 생각할 수 있으며, 이는 매우 간편한 방법이 될 것이다. 또한, 부정근의 대량증식체계는 부정근을 직접 약용원료로 사용할 수 있을 뿐 아니라, 대량증식된 이들 부정근으로부터 식물체 대량증식체계가 확립된다면 우량 증식생산의 새로운 방법으로써 부정근을 이용한 대량 증식체계가 제시될 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 지황 부정근을 이용한 우량 영양계의 번식조건을 확립하고자 부정근의 액체배양 체계 확립과 생물반응기를 이용한 대량 생산 및 증식된 부정근으로부터 직접 기관분화에 의한 식물체 증식체계를 확립하고자 한다.

재료 및 방법

식물재료 및 배양조건

지황 (*Rehmannia glutinosa* Liboschitz) 식물체는 작물시험장으로부터 분양받은 '지황 1호' 품종을 충북대학교 첨단원예기술센터 유리온실에서 식재하여 유지하였다. 기내배양을 위해 지황의 유향조직을 채취하여 수세한 후 70% 에탄올로 30초간 소독하였으며, 2-3방울의 Tween 20을 넣은 1% sodium hypochlorite 용액에 10분 동안 침지하여 표면살균 하였다. 이후 멸균수로 10분에 걸쳐 3회 세척하여 5×5 mm²의 크기로 유향조직을 절단하여 배양재료로 사용하였다.

배지는 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본염에 30 g/L sucrose를 넣고 고체배지는 2.0 g/L gelrite을 첨가하였으며, pH를 5.8로 조정 후 121°C에서 20분간 고압멸균기를 이용하여 살균하여 플라스틱 petri-dish에 각각 30 mL 씩 분주하였다. 지황 부정근에서의 신초재분화를 위한 배양실 조건은 30 μmol m⁻² sec⁻¹, 백색 형광등으로 16시간 명조건, 8시간 암조건으로 온도는 25±2°C로 유지하였다. 한편, 부정근 유도 및 증식은 암조건인 배양실에서 실시하였다.

부정근 유도 및 증식

부정근을 유도하기 위하여 상기 엽절편체를 MS 기본배지에 2 mg/L NAA 또는 IBA를 첨가한 부정근 유도배지에 치상하여 4주간 배양한 후에 유도된 부정근 수를 조사하였다. 또한, 유도된 부정근의 증식은 NAA 및 IBA를 농도별 (0.2, 2 mg/L)로 첨가한 MS 고체배지에 약 2 cm 크기의 부정근을 한 페트리디쉬 당 20개씩 3개의 페트리디쉬에 치상하여 4주간 배양하였으며, 한 절편체당 유도된 부정근 수 및 길이를 조사하여 증식율을 비교하였다.

액체 현탁배양

부정근의 액체 진탕배양시 최적조건의 액체배지 조성을 선별하고자 고체배지에서 유도된 부정근 1 g을 취해 기본적으로 2 mg/L IBA와 3% sucrose를 넣고 염농도를 각각 1/3 MS, 1/2 MS, 1/3 MS으로 조절한 액체배지 100 mL에 접종하였다. 사용된 배양용기는 300 mL 크기의 삼각 플라스크로써 배양은 4주간 100 rpm으로 진탕배양하였으며, 배양 후 생체중을 측정하였다.

생물반응기 배양

액체배지조건에서 진탕배양된 지황 부정근은 생체중 약 10 g을 취하여 10 L 용량의 공기부양식 생물반응기 (ballon type bubble bioreactor)에 8 L의 1/3 MS 액체배지 (1/3 MS salts, 2 mg/L IBA, 30 g/L sucrose, pH 5.8)를 넣고 이를 접종하였다. 생물반응기의 공기 주입량은 0.1 vvm (air volume/culture volume/min)으로 조절하였으며, 배양은 암조건에서 6주간 실시하였으며, 주기적으로 시료를 채취해 생체 증식량을 측정하여 상기 배양조건에서의 성장율을 조사하였다. 생물반응기에서 배양된 지황 부정근은 생체중을 조사한 후 배양조건에 따른 신초 재분화를 위한 재료로 이용되었다.

재분화 및 토양 순화

생물반응기에서 생산된 부정근은 Jeong 등 (2002)의 방법에 따라 2 mg/L BA를 첨가한 MS 고체배지에 치상하여 4주간 배

양하면서 신탄를 유도하였으며, 부정근에서 유도된 약 1 cm 크기의 신탄들은 각각 부정근으로부터 분리한 뒤 1/2 MS 고체배지에 20 g/L의 sucrose, 2 g/L gelite가 첨가된 뿌리 유도 배지가 담긴 시험관에 치상하여 생장시켰으며, 기내에서 정상적으로 뿌리가 유도된 완전한 식물체는 vermiculite와 perlite를 각각 3:1로 혼합한 인공토를 담은 50×35×9 cm 크기의 플라스틱 용기로 옮긴 후 비닐로 덮어 수분의 손실을 막으며, 약 2주간 온실에서 순화시킨 후 비닐을 걷고 생육시켰다.

결과 및 고찰

부정근 유도 및 증식

지황의 잎절편체를 이용한 부정근 유도에 미치는 성장조절 물질의 영향을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 잎절편체로부터 부정근은 배양 2주 후부터 생성되기 시작하였으며, NAA와 IBA 처리구 모두 4주 배양 후 지황의 잎절편체에서 유도된 부정근의 형성율은 90% 이상으로 매우 높았다. 각 절편체당 형성된 부정근의 수는 IBA 처리에서 2.2개, NAA 처리에서 4.5개로 NAA 처리에서 절편체당 형성된 부정근의 수가 2배 높은 결과를 보였다 (Table 1). 한편, 부정근의 증식조건을 확립하기 위해 상기 조건에서 형성된 부정근의 정단을 제거하고 길이가 2 cm 정도의 절편체를 만든 후 NAA와 IBA 호르몬을 농도별 (0, 0.2, 2 mg/L)로 처리한 배지에 치상하여 4주간 배양한 후 새로운 부정근의 유도 및 부정근의 증식을 조사하였을 때 호르몬을 첨가하지 않은 처리구에서는 부정근이 유

도되지 않았으나 NAA, IBA를 처리한 처리구에서는 84~94%의 높은 부정근 유도율을 보였으며, 호르몬에 관계 없이 NAA, IBA 모두 농도가 높을 때 부정근의 생장이 양호하였다. 절편체당 형성된 부정근의 수는 6~16개로 조사되었는데, 2 mg/L IBA 처리구에서 절편체당 16.5개의 부정근이 형성되었으며, 평균 부정근의 길이가 4.5 cm로 가장 양호하였다 (Figure 3A). 2 mg/L의 NAA 처리구에서도 절편체 당 15.2개의 부정근이 형성되어 IBA 처리구와 부정근 유도율은 비슷하였으나 절편체 및 형성된 부정근에서 다시 캘러스가 형성되는 것을 관찰할 수 있었으며(자료 미제시), 유도된 부정근의 길이 생장 또한 IBA 처리보다 좋지 않았다(Table 2). 따라서 지황의 부정근 증식에는 2 mg/L IBA가 적절한 것으로 판단되었다.

식물체의 부정근을 유도한 연구는 주로 인삼과 시호 등과 같은 약용작물을 대상으로 연구되었는데, 인삼은 부정근을 유도하기 위해 먼저 2,4-D, IBA, NAA 등을 농도별 (0.1, 1, 2, 3, 5, 10 mg/L)로 처리하여 캘러스를 유도한 후 증식된 캘러스로부터 부정근을 유도하는 단계를 거치는데, 캘러스로부터 부정근을 유도하기 위해 3 mg/L의 IBA를 사용한다고 보고하였다 (Yu 2000). 시호 역시 캘러스로부터 부정근을 유도하였으며, 잎절편을 0.1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS배지에 치상하여 4주간 배양하여 캘러스를 생성하였으며 배양한 캘러스로부터 평균 5.3개의 부정근을 유도하였다고 보고한 바 있다 (Kim et al. 1995). 반면에 지황은 이들 식물체에서 부정근의 유도를 위해 소요되는 배양기간에 비해 배양 2주 만에 부정근을 유도할 수 있었으며, 2 mg/L IBA에서 캘러스의 형성 단계를 거치지 않고 직접 부정근이 유도되었으며 부정근의 증식 또한 매우 양호하였다.

Table 1. Effect of growth regulators on adventitious roots induction from leaf explants of *Rehmannia glutinosa* after 4 weeks of culture.

Growth regulators (mg/L)	Percentage of regenerated root	Mean number of roots per explant
Control	0	0
NAA 2	92.3±4.7	4.5±1.2
IBA 2	90.0±3.4	2.2±0.7

* Data represent the mean±S.E. of triplicates.

Table 2. Effects of growth regulators on adventitious roots induction and their growth from root explants of *Rehmannia glutinosa* after 4 weeks of culture.

Growth regulators (mg/L)	Percentage of induced root	Mean length of induced roots per explant	Mean number of roots per explant
Control	0	0	0
NAA 0.2	84±4.5	2.1±0.8	6.8±1.2
2.0	90±3.7	2.3±0.6	15.2±2.7
IBA 0.2	88±4.2	3.2±1.4	7.4±1.8
2.0	94±2.8	4.5±0.7	16.5±3.5

* Data represent the mean±S.E. of triplicates.

액체 현탁배양

액체배양은 새로운 배지 및 영양원의 첨가, 배지의 교체, 배양조각의 계대, 배양 중 시료채취 등이 용이 하며, 배양체의 생장 또한 빠른 장점이 있다. 따라서 상기 조건에서 유도된 지황 부정근의 증식을 위해 액체 진탕배양을 시도하였으며, 최적조건의 액체배지 조성을 선별하고자 생체중 1g의 부정근을 각각 MS, 1/2 MS, 1/3 MS 액체배지 100 mL에 접종하여 4주간 100 rpm으로 진탕배양한 결과 액체 배양 초기에는 생육의 차이를 보이지 않았으나 배양 3주가 되면서 급속한 생장을 보이기 시작하였으며, 배양 4주 후 수확하여 생체중을 비교한 결과 MS배지에서는 3.05 g, 1/2 MS에서는 5.52 g, 그리고 1/3 MS에서는 7.35 g으로 1/3 MS배지에서 가장 양호한 생장을 보였다 (Figure 1). 이는 초기 접종량의 7배 이상의 생장을 보인 것이며, 2 mg/L IBA, 3% sucrose, 1/3 MS 조건에서 지황의 부정근이 활발히 생장 함을 보여주는 결과이다. 이러한 결과는 인삼의 부정근 배양시 생장은 총질소함량보다는 질산태 질소의 함량에 따른 영향이 크다는 결과와는 차이가 있으나 (Yu 2000), 지치 (*Lithospermum erythrorhizon*) 모상근

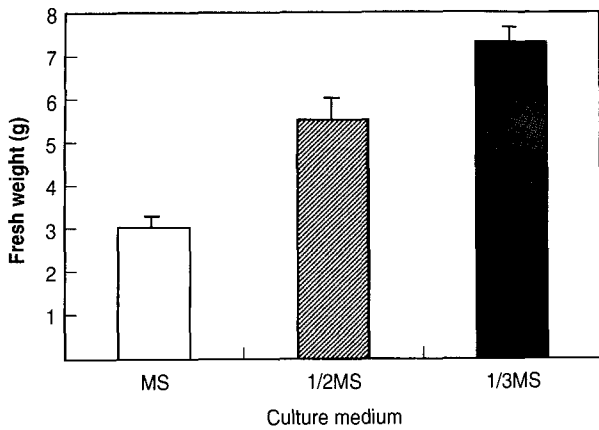


Figure 1. Effects of medium strength on growth of *Rehmannia glutinosa* adventitious roots in 300 ml Erlenmeyer flasks after 4 weeks of culture.

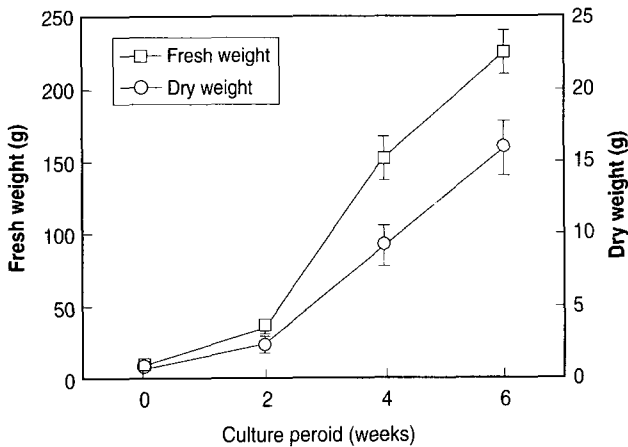


Figure 2. Growth of *Rehmannia glutinosa* adventitious roots in 10 L bioreactor during 6 weeks of culture.

배양시 질소농도가 낮을수록 성장과 shikonin 합성에 효과적이었다는 보고와는 일치하였다 (Shimomura et al. 1991). 따라서 식물체에 따른 부정근 증식을 위한 최적 배지조건을 좀더 체계화 할 필요성이 있다.

한편, 액체현탁배양 시 배양기간이 8주 이상 길어지면, 부정근에서 신초가 유도되는 것을 발견할 수 있었는데 (Figure 3B-right two), 이러한 현상은 배양기간이 지나면서 옥신류의 호르몬의 농도가 낮아지면서 신초가 형성 되는 것으로 사료되며 이러한 결과는 지황 부정근을 호르몬이 첨가되지 않은 배지에 치상하였을 때 신초를 형성하였다는 보고와 일치하는 결과이다 (Jeong et al. 2002).

생물반응기에 의한 부정근 대량 증식

액체현탁배양에 사용된 배양용기가 제한적이며, 배지 및 영양원의 결핍은 부정근 생장에 저해요인이 되므로 보다 큰 생물반응기를 이용하여 부정근을 증식하였다. 부정근 증식 배지는 상기 액체 현탁배양에서 부정근 생장에 최적이었던 2 mg/L

IBA, 3% sucrose, 1/3 MS 배지조건을 이용하였으며, 10 g의 부정근을 접종하여 6주간의 암배양한 결과 배양 2주부터 급속히 성장하면서 대수 증식을 보였으며, 배양 4주 후 부터 증식이 다소 감소하였으나 6주까지 빠른 성장을 보이며 전형적인 식물생장곡선양상을 보였다 (Figure 2). 증식된 부정근의 건물중은 최종 수확 후 약 15.85 g으로 생체중 225 g의 7.04%였으며, 성장기간 동안 지속적인 증가를 보였다. 이러한 결과는 초기 접종량의 22.5배 이상의 성장을 보임으로 액체현탁배양조건에서 보인 7배의 성장속도보다도 3배 이상의 빠른 성장결과였다 (Figure 2, 3C).

한편, 생물반응기에서 배양된 지황 부정근은 생체중을 조사한 후 신초 재분화를 위한 재료로 이용되었는데, 지황의 부정근으로부터 직접 신초 유도과 식물체 재분화는 본 연구자들에 의해 확립되어 보고 된바 있으며, 약 1g의 부정근 덩어리를 2 mg/L의 BA를 첨가한 MS고체배지에 치상하여 4주간 배양하였을 시 66.7%의 재분화율을 보이며, 한 절편체당 7개의 신초가 생성됨을 보고하였다 (Jeong et al. 2002).

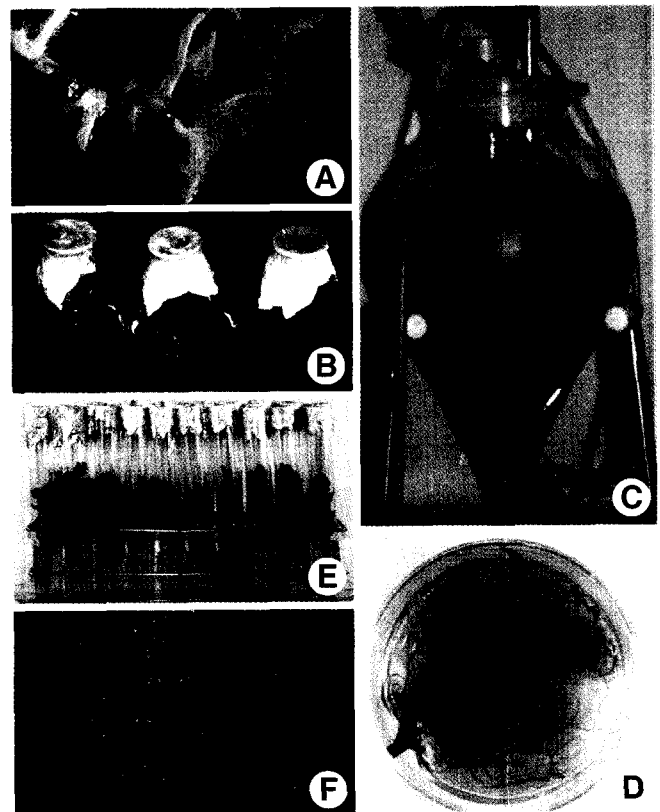


Figure 3. Bioreactor culture of adventitious roots and plantlet regeneration from adventitious roots of *Rehmannia glutinosa*. A, Roots growth in solid medium with 2 mg/L IBA after 4 weeks of culture; B, Roots growth (left) and shoot formation (right two) in 1/3 MS liquid medium with 2 mg/L IBA after 4 (left) and 8 (right two) weeks of culture; C, Bioreactor culture of adventitious roots after 6 weeks; D, Shoot regeneration on adventitious root clumps after 4 weeks of culture; E, Plant regeneration of separated shoots from adventitious roots; F, *Rehmannia glutinosa* plantlets after transfer to the soil.

재분화 및 토양 순화

생물반응기에서 생산된 부정근을 약 0.5 g씩 나누어 2 mg/L BA를 첨가한 MS 고체배지에 치상하여 배양한 결과 배양 1주부터 연노랑색의 지황 부정근의 표면에서 직접 형성되는 돌기들을 관찰할 수 있었으며, 이러한 돌기들은 배양 2주가 되면서 녹색을 띠는 신초로 발달되었다. 배양 3주가 지나면서 형성된 신초들은 핀셋으로 분리할 수 있었으며, 4주까지 배양한 후 형성된 신초들은 뿌리 재분화에 이용하였다 (Figure 3D). 유도된 신초들은 각각 부정근으로부터 분리한 뒤 1/2 MS 고체배지가 담긴 시험관에 치상한 후 뿌리를 유도하여 완전한 식물체로 생육시켰으며 (Figure 3E), 이렇게 기내에서 정상적으로 생육된 식물체들은 vermiculite와 perlite를 각각 3:1로 혼합한 인공토양으로 옮겨 순화시킨 후 온실에서 생육시켰다 (Figure 3F).

지황은 재배 시 종근으로 번식하는 특성으로 인해 증식율이 낮고 바이러스 및 병원균에 의한 감염율이 높아 수확량이 낮고 생산비가 높아 국제적인 경쟁력을 갖추기 위해서는 건전한 바이러스 무병주 생산과 생산된 묘의 대량 증식하는 방법의 개발이 중요하다. 조직배양 기술이 발달되면서 생상점 배양 등의 기술로 바이러스 무병주의 생산이 가능해 졌으며 (Mao et al. 1983; Park et al. 1998a), 다양한 방법에 의한 바이러스 진단 기술이 개발되면서 바이러스 감염 여부를 조기에 진단할 수 있게 되었다 (Zhu and Chen 1981; Jeong et al. 2003). 그러나 개체의 증식 기술은 아직도 노동력에 의존하는 방법에서 벗어나지 못하고 있는 실정이다. 따라서 기존의 노동력에 의존하는 방법을 극복할 수 있는 새로운 방법의 증식 기술이 요구되고 있다.

한편, 지황 종묘의 대량 생산방법으로써 생물반응기를 이용한 연구 보고에 따르면, 지황 줄기 조직으로부터 부정근을 유도한 후 약 50 g의 접종시료를 1.5 L의 액체 배지에 접종하여 3주간 배양한 후 이를 고체배지에 옮겨서 발근과 순화시킨 후 플러그 묘를 생산하였다 (Park 2000). 그러나 본 보고에서는 생물반응기에 접종하기 위한 시료의 양이 많아 산업적인 생산을 위해 더욱 큰 용량의 생물반응기를 이용하기 위해서는 많은 접종시료가 요구되며, 생성된 신초를 각 개체로 분리하기 위한 작업 역시 상당한 노동력과 시간을 요하는 작업이다. 더불어 액체 조건에서 형성된 신초의 유리화 현상과 이를 회복시키기 위한 처리 및 회복하기까지의 시간을 요하는 등의 문제점을 가지고 있다.

최근 생물반응기를 이용하여 모상근 및 부정근을 대량 증식하는 연구가 성공적으로 진행되고 있는데, 뿌리 조직은 식물체의 다른 기관에 비해 변이 및 유리화가 적어 생물반응기 환경에서 증식할 수 있는 식물재료로서 적합하다 (Kim 2002). 따라서 이러한 뿌리기관을 이용하여 대량 증식체계를 갖춘 후 이로부터 효율적인 재분화 체계를 확립한다면 적은 노동력과 시간 안에 대량 급속배양이 가능할 것이다. 본 연구에서

는 지황의 부정근을 생물반응기에 접종하여 6주만에 급속히 증식시킬 수 있었으며, 이렇게 생산된 부정근을 이용하여 신초를 유도한 후 토양에 이식하여 정상적으로 생육함을 확인하였다.

본 결과에서는 10 g의 부정근으로써 6주 만에 22.5배가 증식되어 225 g의 증식이 가능하였으며, 이렇게 생산된 부정근 0.5 g으로 7개의 신초를 생산할 수 있었다. 생산된 신초들은 대부분 토양까지 옮겨져 정상적인 생육을 보였다. 이러한 증식체계는 대략 3-4개월 만에 소량의 부정근에서 최종 요구되는 생산 스케일의 묘로 증식시킬 수 있는 장점을 가지는데, 이는 종묘생산에 있어 주요 품종을 계대 및 유지에 소요되는 비용을 절감할 수 있다. 또한, 바이러스 무병주를 획득한 후 이를 대량 생산 할 수 있는 기간이 단축될 것임으로 빠른 산업화가 가능하리라고 판단되었다. 따라서 본 연구 결과에 따라 생물반응기를 이용하여 지황 부정근을 빠른 시간 안에 대량으로 생산할 수 있었으며, 생산된 부정근을 이용하여 지황의 대량 증식체계를 확립할 수 있었다.

적 요

지황의 부정근을 이용한 기내묘 생산 체계를 확립하였다. 먼저 지황의 잎절편을 2 mg/L IBA 혹은 2 mg/L NAA를 첨가한 MS 고체배지에 치상하여 부정근을 유도하였다. 고체배지에서의 효율적인 증식조건을 확인하기 위해 다양한 옥신 농도에 따른 배지에 부정근을 치상하여 4주간 배양한 후 증식된 부정근의 수와 길이를 측정하여 2 mg/L IBA 조건에서 최적의 생장을 보였다. 상기실험에서 확립된 부정근 증식조건을 이용하여 액체배양을 실시하였으며, 이를 액체 현탁배양하여 액체조건에서의 증식조건을 확립하였다. 또한, 2 mg/L IBA가 첨가된 1/3 MS배지 조건에서 생물반응기에 10 g의 부정근을 접종하여 6주간 암배양하여 255 g의 부정근을 생산할 수 있었으며, 이렇게 생산된 부정근은 2 mg/L BA가 첨가된 MS 고체배지에서 신초를 유도하였다. 신초들은 모두 정상적인 생육을 보이며, 식물체로 성장하였으며, 이들 식물체들은 토양으로 옮겨 순화되었다. 따라서 이러한 증식 체계를 이용하여 지황식물체의 대량증식체계를 확립하였다.

인용문헌

- Akashi R, Hoffmann-Tsay SS, Hoffmann F (1998) Selection of a super-growing legume root culture that permits controlled switching between root cloning and direct embryogenesis. *Theor Appl Genet* 96: 758-764
- Chae YA, Park SU (1993) Callus induction and somatic embryogenesis in suspension culture of *Rehmannia glutinosa*. *Kor*

- J Med Crop Sci 1: 184-190
- Haque MS, Wada T, Hattori K (1997) High frequency shoot regeneration and plantlet formation from root tip of garlic. Plant Cell Tiss Org Cult 50: 83-89
- Jeong JH, Yu KW, Chakrabarty D, Kim SJ, Paek KY (2002) *In vitro* regeneration and plantlet formation from adventitious roots of *Rehmannia glutinosa* Liboschitz. Propagation of Ornamental Plants 2: 19-23
- Jeong JH, Chakrabarty D, Kim YS, Eun JS, Choi YE, Paek KY (2003) A simple detection of sweetpotato feathery mottle virus by reverse transcription polymerase chain reaction. Kor J Plant Biotech 5: 83-86
- Jiang LC and Mao WY (1979) Callus formation and plantlet regeneration of *Rehmannia glutinosa*. Chin Med Herb Lett 2: 41
- Kim SG, Cho DY, Soh WY (1995) Saikosaponin content in adventitious root formed from callus of *Bupleurum falcatum* L. Kor J Plant Tiss Cult 22: 29-33
- Kim YS (2002) Production of ginsenosides through bioreactor cultures of adventitious roots in ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). PhD thesis, Chungbuk National University, Cheongju
- Mao WY, Liu QQ, Yu CS, Zhu BM (1983) Studies on the meristem culture of *Rehmannia glutinosa*. Chinese Bulletin of Botany 1: 444-456
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497
- Myers JM, Simon PW (1998) Continuous callus production and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) using root segments from shoot tip-derived plantlets. Plant Cell Rep 17: 726-730
- Paek KY, Yu KJ, Park SJ, Sung NS, Park CH (1995) Micropropagation of *Rehmannia glutinosa* as medicinal plant by shoot tip and root segment culture. Acta Horti 390: 113-119
- Park CH, Seong NS, Paek KY, Choi HS (1998a) Virus-free healthy plant production through meristem culture in chinese foxglove (*Rehmannia glutinosa*). Kor J Plant Tiss Cult 25: 273-276
- Park CH, Seong NS, Paek KY, Lee CH (1998b) Micropropagation through callus culture in chinese foxglove (*Rehmannia glutinosa*). Kor J Plant Tiss Cult 25: 171-175
- Park JH (2000) Plant propagation in bioreactor and acclimatization of shoots in *Rehmannia glutinosa*. PhD Thesis, Seoul National University, Seoul
- Park JH, Park SJ, Chae YA (1995) Studies on proper medium for somatic embryogenesis in suspension culture of *Rehmannia glutinosa*. Kor J Med Crop Sci 3: 100-106
- Rha ES, Kim JK (1996) Plant regeneration in leaf explant cultures of *Rehmannia glutinosa* Liboschitz. Kor J Plant Tiss Cult 23: 299-302
- Shimomura K, Sudo H, Saga H, Kamada H (1991) Shikonin production and secretion by hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. Plant Cell Rep 10: 282-285
- Shoyama Y, Nagano M, Nichioka I (1983) Clonal multiplication of *Rehmannia glutinosa*. Planta Med 48: 124-125
- Tien P (1962) A virus from degenerated *Rehmannia glutinosa* in Honan. Acta Microbial Sinica 9: 418-419
- Vinocur B, Carmi T, Altman A, Ziv M (2000) Enhanced bud regeneration in aspen (*Populus tremula* L.) roots cultured in liquid media. Plant Cell Rep 19: 1146-1154
- Wawrosch C, Maskay N, Kopp B (1999) Micro-propagation of the threatened Nepalese medicinal plant *Swertia chirato* Buch.-Ham. ex Wall. Plant Cell Rep 18: 997-1001
- White PR (1934) Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. Plant Physiol 9: 585-600
- Yu KW (2000) Production of the useful metabolites through bioreactor culture of Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). PhD thesis, Chungbuk National University, Cheongju
- Yu KW, Hahn EJ, Paek KY (2000) Production of adventitious ginseng roots using bioreactors. Kor J Plant Tiss Cult 27: 309-315
- Zhu BM, Chen ZY (1981) The detection of Dihuang yellow-spot virus by enzyme-linked immuno-sorbent assay. Nature J 4: 319-320

(접수일자 2004년 1월 8일, 수리일자 2004년 3월 17일)