

최 종  
연구보고서

약용작물에서 우량종묘 대량생산과 병저항성기작  
구명 및 내병성 품종육성

Mass Production of Plantlets, Mechanism of Disease  
Resistance and Breeding of Resistant  
Variety in Medicinal Crops

약용작물에서 생물반응기를 이용한 종묘의 대량생산  
Production of Plantlets via Bioreactor Culture in Medicinal Crops

병유도 단백질 유전자의 탐색과 이용  
Search and Utilization of Pathogen Related Protein Gene

약용작물에서 내병성 품종 육성  
Selection of Disease Resistant Breeding Lines in Medicinal Crops

연구기관

주관연구기관 서울대학교

협동연구기관 강원대학교

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “약용작물에서 우량 종묘 대량생산과 병 저항성기작  
구명 및 내병성 품종 육성”의 최종보고서로 제출합니다.

2001년 10월 일

주관연구기관명 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 채 영 암

연 구 원 : 김 수 일

협동연구기관명 : 강원대학교

협동연구책임자 : 유 창 연

여 백

여 백

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 가. 연구개발 결과

#### 1) 지황 줄기조직에서 multiple shoots 형성을 통한 종묘 생산 방법

- (1) 줄기, 엽병, 잎 조직에서 직접체세포배를 유도하여 종묘를 생산하는 것보다 줄기조직에서 multiple shoots를 발생시켜 종묘를 생산하는 것이 보다 효율적이고 경제적이다(제 5절 결론 참조).
- (2) 무균 식물체 유지는 줄기조직을 0.5-0.8cm로 잘라 1.2% 아가를 첨가한 MS 고체배지에서 매 1개월마다 계대배양으로 증식 및 유지한다(표 1, 2).
- (3) 무균 식물체 유지용 배지는 MS 배지가 가장 좋았으며 탄소원으로 sucrose 3%가 적절하였다(표 1).
- (4) 지황 줄기 절편을 생물반응기에서 배양하여 직접 신태를 유도하는 것보다 MS 고체배지에서 먼저 신태를 형성시킨 다음 생물반응기에서 배양하는 것이 신태 수의 증가는 물론 건전한 신태를 얻을 수 있다(표 1, 그림 1).
- (5) 고체배지에서 신태를 유도할 때 thidiazuron 1.0mg/l를 처리하면 신태 수를 더욱 증가시킬 수 있다(표 3).
- (6) 고체배지에서 신태를 유도할 때 thidiazuron 1.0mg/l에 paclobutrazol 0.3mg/l를 함께 처리하면 신태의 투명화를 억제할 수 있다(표 4, 그림 3, 4).
- (7) 2.5L 생물반응기에서 줄기 조직이 적정 배양밀도는 90절편이다(표 3).
- (8) MES를 이용하여 배양 기간 중 pH를 일정하게 유지해주면 신태 수가 증가한다(표 4).
- (9) 생물반응기 배양에서 ABA는 신태의 동조화보다는 신태 형성을 억제하는 경향이 있다(표 5).
- (10) 신태의 투명화 방지를 위한 antivirifying agent의 적정 처리농도는 5mg/l이다(표 6, 그림 6).
- (11) 생물반응기에서 신태의 신장 즉 신태의 마디수 증가와 절간신장 및 새로운 신태의 발생을 피하고자할 때 thidiazuron 1.0mg/l를 처리하는 것이 효과적이다(표 4, 그림 5). 2.5L 생물반응기의 적정 배양밀도는 신태

약 400개(100-150g)이다.

- (12) 신초의 발근은 아가를 1.2% 첨가한 1/2X MS 배지에서 가장 양호하였다(표 7).
- (13) 신초의 기내 순화시 paclobutrazol 0.4mg/l를 처리한 경우 뿌리의 발달이 양호하고 잎도 진한 녹색을 띠었다(표 8, 그림 6).
- (14) 기내에서 발근과 순화를 시킬 때 공기가 유통이 되는 필터를 부착한 배양병을 이용하는 것이 필터가 없는 완전 밀폐된 배양병보다 유리하다(표 6, 7).
- (15) 기내순화 식물체는 보수력이 좋은 SUN 1 상토를 이용하여 plug 묘판에서 plug 묘를 먼저 양성하여 2주간 외기에 순화 배양한 후 포장에 이식하는 것이 토양활착이 잘 된다(표 9).
- (16) 순화된 묘는 포장에서 정상적인 생육과 수량을 나타내었다(그림 8).
- (17) 줄기조직에서 신초를 형성하여 종묘를 생산하는 과정은 그림 9와 같이 요약하였다.

## 2) 현삼 줄기조직에서 multiple shoots 형성을 통한 종묘 생산 방법

- (1) 잎, 엽병, 줄기조직에서 직접체세포배를 형성시키기보다는 줄기조직에서 multiple shoots를 발생시켜 이용하는 것이 보다 효율적이다(제 4장 결론 참조).
- (2) 현삼 배양의 적정 생물반응기의 종류는 air-lift 형으로 실린더형보다는 구형인 sphere 형이 알맞고, 특히 구형에서 inner loop을 제거한 경우 신초 형성이 더욱 잘 되었다(표 15).
- (3) MS 배지 내의 암모니아태 질소와 질산태 질소의 비율은 413 : 1900mg/l로 암모니아태 질소를 1/4로 줄인 것이 신초 발생에 효과적이다. MS 배지의 적합한 탄소원과 농도는 sucrose 3%이다(표 ).
- (4) 2.5L 생물반응기에서 현삼 줄기조직(0.8-1.0cm 적절 배양밀도는 300 절편이다(표 1).
- (5) 신초의 투명화 방지를 위한 antivirifying agent의 효과는 없었다(표 2,3,4).

- (6) 생물반응기에서 4주 보다 6주 동안 배양한 후 발근 배지로 옮기는 것이 신초 수도 많고 또 발근이 잘 된다(표 5,6).
- (7) 생물반응기 배양에서 6주간 배양한 후 1/2X MS 고체배지로 옮겨야 신초에서 잎이 전개된다. 액체배지에서는 잎이 전개되지 않는다(표 7,8).
- (8) 신초는 1/2X MS 배지에 1.2% 아가 농도 처리에서 잎이 완전히 전개된 개체수가 많고 잎 수도 많아 상대적으로 건전한 묘가 육성된다(표 1).
- (9) 기내에서 발근과 순화를 시킬 때 공기가 유통이 되는 필터를 부착한 배양병을 이용하는 것이 필터가 없는 완전 밀폐된 배양병보다 유리하다(표 2).
- (10) 기내 순화묘는 plug 묘판에서 plug 묘를 양성한 다음 포장에 이식해야 한다(표 3).
- (11) Plug 묘 상토는 SUN 1 상토가 양호하였다(표 3).
- (12) 순화 묘는 포장에서 정상적으로 생육하였으며, 개체당 뿌리 수는 평균 5개로, 한 뿌리의 무게는 평균 15g 정도이었다.

#### 나. 활용에 대한 건의

- 1) 생물반응기를 이용한 지황종묘는 무병 상태이기 때문에 종근 저장에서 오는 병 감염을 예방할 수 있다. 이 기술은 농업지도 업무에 또는 상업적 종묘 생산에 활용할 수 있다.
- 2) 매년 건전종묘를 생산 공급하므로 재배시 발생하는 병해를 회피하거나 경감시키는데 활용할 수 있다.

## 요 약 문 (Ⅱ)

### I. 제목

병유도단백질(Pathogenesis-Related Protein, PRs) 유전자 탐색과 이용

### Ⅱ. 연구개발의 목적

- 가. 지황과 벼의 병유도단백질 유전자 탐색 및 재조합 단백질 생산
- 나. 재조합 병유도단백질의 지황 병원균에 대한 항균 효과 검증

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

- 가. 지황 PR protein의 순수 분리 및 효소적 특성 구명
- 나. 지황 PR protein 유전자 분리 및 벼 PR protein 유전자 확보
- 다. 대장균과 고초균에서 재조합 PR protein의 발현 및 대량생산
- 라. 재조합 PR protein의 지황 병원균에 대한 항균활성 검증

### Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

#### 가. 연구개발 결과

- 1) 지황과 벼의 병유도단백질 유전자 탐색 및 재조합 단백질 생산
  - (1) 지황으로부터 세 가지 염기성 chitinase(P1, P2, P3)와 한 가지 산성 chitinase를 분리, 정제하였다(그림 4, 5).
  - (2) 순수분리한 네 가지 단백질의 효소적 특성을 살펴본 결과 기질에 대해 P2만이 exo-type으로 작용하고 다른 세 chitinase는 endo-type으로 작용하였다(표 3).

- (3) 벼 도열병균인 *Magnaporthe grisea*에 대한 항균활성을 검정한 결과 conidia 형성 저해 및 appresorium 형성 저해 활성 등의 항균활성을 보유하고 있다(표 5).
- (4) 지황 교배종 genomic DNA를 주형으로 하여 PCR을 통해 418bp의 산물을 얻었으며 염기서열을 분석, 비교하여 chitinase임을 확인하였다(그림 7).
- (5) 418bp의 염기서열을 아미노산 서열로 번역하여 타 chitinase와의 유사성을 검색한 결과, 산성 class III chitinase임을 확인하였다(그림 9).
- (6) 교배종 지황에는 산성 class III chitinase가 single gene으로 존재한다(그림 8, 10).
- (7) 418bp의 유전자 절편을 이용하여 RACE(Rapid Amplification of cDNA End) 방법으로 지황의 산성 class III chitinase 유전자 JHIII를 분리하였다(그림 11).
- (8) pRSET vector를 이용해 대장균에 JHIII를 삽입, 발현시킨 결과 JHIII는 29kDa의 분자량을 가지는 단백질로서 대부분이 inclusion body로 발현된다(그림 12).
- (9) pUBL140 vector를 이용해 고초균에서 JHIII를 발현시킨 결과 세포 생장의 정지기 초기에 효소활성이 최고가 됨을 알 수 있다(그림 13).
- (10) 한외여과를 통해 고초균에서 발현시킨 재조합 단백질들을 농축하였다(표 7).
- (11) PCR 방법을 통해 벼 PR protein 중 PR1, PR3(chitinase), PR5(glucanase) 유전자를 분리하였다(그림 18, 19, 20).
- (12) pRSET vector를 이용해 대장균에서 PR protein을 발현시킨 후 western blot을 통해 확인하였다(그림 23).
- (13) pUBL140 vector를 이용해 고초균에서 PR protein을 발현시킨 후 효소활성 검정(PR2,PR3)과 12.5% SDS-PAGE(PR1, PR5)를 통해 발현을 확인하였다(그림 24).

## 2) 재조합 병유도단백질의 지황 병원균에 대한 항균 효과 검증

- (1) JHⅢ와 glucanase를 지황 병원균인 *Fusarium oxysporum* R2에 처리한 결과 36시간 후 재조합 효소 처리구의 균사에서 결가지 발달이 대조구에 비해 현저히 떨어짐을 관찰할 수 있었다(그림 17).
- (2) JHⅢ와 glucanase의 혼합처리에 의한 생장억제 상승효과는 크지는 않지만있는 것으로 나타났다.
- (3) JHⅢ와 glucanase에 의한 *Fusarium oxysporum* R2의 생장 저해는 생장 속도를 늦추는 저해이다.
- (4) PR1과 PR5를 동시에 처리한 경우 30% 이상의 저해효과를 보이고, PR2와 PR3는 함께 처리하면 저해 상승효과가 크게 나타난다(그림 25).
- (5) *Fusarium oxysporum* R2 포자에  $\beta$ -1,3-glucanase(PR2)와 rice chitinase(CH16)를 처리하면 96시간 이후에 균사 생장이 대조구에 비해 현저히 떨어진다(그림 26).
- (6) Transmission Electron Microscopy(TEM)을 이용해 96시간째 균사를 관찰한 결과 재조합 효소를 처리한 경우 세포벽의 용해가 진행됨을 알 수 있다(그림 27).

## 나. 활용에 대한 건의

- 1) 지황 산성 chitinase(JHⅢ)는 벼 chitinase에 비해 기질 분해능이 크기 때문에 이 단백질을 과발현 시킬 경우 병원균에 대한 지황의 저항성 증대를 꾀할 수 있을 것이다.
- 2) 벼의 PR protein을 지황에 도입한다면 이들이 이미 존재하는 지황의 chitinase와 함께 작용하여 병저항성이 증가된 형질전환 지황을 개발할 수 있다.

## 요 약 문 (Ⅲ)

### I. 제목

내병성 지황, 현삼 품종육성

### II. 연구개발의 목적

가. 세포배양을 통한 돌연변이체 유기

나. *Agrobacterium*을 이용한 GST(Glutathione-S-Transferase),  
Rs-AFP(radish-seed antifungal protein), PAP  
(*Phytolacca* antiviral protein) 유전자 형질전환체확립.

다. 형질전환 식물체의 내병성 검정 및 내병성 식물체 선발

### III. 연구 개발 내용 및 범위

가. 돌연변이물질을 이용한 돌연변이 식물체 유기

나. 온실, 포장에서의 돌연변이 식물체 내병성 검정

다. 기내에서 재분화 조건 구명

라. 항생제에 대한 저항성 조사

마. 형질전환시 각 단계에서의 적합한 조건 구명

바. 형질전환 식물체 선발

사. 형질전환 식물체의 기내에서의 내병성 검정

아. 기내식물체의 순화조건 구명

자. 포장에서의 내병성 검정

차. 형질전환 식물체 특성조사 및 수량성 조사

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 가. 연구개발 결과

- 1) 지황 식물체 *Agrobacterium*을 이용한 GST(Glutathione-S-Transferase)유전자 형질전환체확립
  - (1) 기내에서의 지황식물체의 재분화에 적당한 배지는 MS배지이며(Fig.), 엽기부를 포함한 절편 조직에서 재분화가 가장 높았다(Fig. 5).
  - (2) 식물생장조절물질 단독 처리시 TDZ 1.0mg/L 첨가하였을 때 줄기와 잎에서 줄기 분화가 각각 9개와 12개로 양호하였다(Table 4, 5).
  - (3) 식물생장조절물질 0.5mg/L BA+ 0.5mg/L 2iP+ 0.1 mg/L TDZ 조합처리시 절편체 당 13개의 싹을 형성하였다(Table 6).
  - (4) 4주째는 잎과 줄기에서 kanamycin 농도가 50, 70, 100mg/L에서는 분화율이 저조하거나 고사하였다 (Table 7).
  - (5) 형질전환시 접종식물과 *Agrobacterium*의 공동배양은 3일에서 가장 양호하였다(Fig. 6).
  - (6) *Agrobacterium tumefaciens*을 이용한 형질전환시 첨가된 acetosyringone의 형질전환율은 50~200  $\mu$ M에서 좋은 효과를 나타내었다(Fig. 7).
  - (7) 선발배지에 옮긴 후 식물체의 암처리는 4주까지가 가장효과 적으로 나타났다(Fig. 8).
  - (8) 재분화배지 (1.0 BA+ 1.0 TDZ+0.1 NAA)에 항생제 (Km 50+ Cx 250mg/L)를 첨가한 선발배지에서 형질전환된 식물체의 선발이 양호하였다 (Table 8).
  - (9) 선발배지에서 4주부터 줄기가 분화되었으며, kanamycine이 함유된 배지에서 뿌리를 유도하였다(Fig. 9).
  - (10) PCR 분석을 통해 형질전환 식물체에서 700bp DNA band를 확인하였다(Fig. 10).
  - (11) PCR 분석으로 control 식물체에서는 나타나지 않는 C-GST 988bp DNA band가 형질전환된 식물체에서 나타났다(Fig. 11).
  - (12) 식물체를 순화하였을 때 형질전환된 식물체는 형질전환되지 않은 식물체의 44%보다 높은 80~86%의 높은 순화율을 보였다(Table 9).
  - (13) 형질전환된 C-3, C-6, C-7 식물체는 내병성 검정에서 병원균

*Fusarium oxysporum*의 R-3, R-10 병원균에 비교적 높은 저항성을 나타내었다(Table 10).

- (14) 형질전환된 식물체의 GST 활성이 형질전환되지 않은 식물체에 비하여 비교적 높은 활성을 나타내었다(Fig. 12).
- (15) 형질전환된 식물체의 GST 활성은 역병, 탄저병보다 *Fusarium* 병원균에 대해 다소 높은 활성을 보였다(Fig. 12).
- (16) GST 활성은 접종 후 48h 일 때 가장 높은 활성을 보였다(Fig. 13).
- (17) 지하부 생체중에 있어서 형질전환된 식물체는 병원체를 감염시키지 않은 경우에서도 형질전환되지 않은 식물체 보다 1.5-2 배의 지하부 생체중 증가를 나타내었으며 병원체를 감염시킨 경우에서도 이와 같은 결과를 나타내어 병원체에 대한 저항성을 나타내었다(Table 13).
- (18) C-5계통의 경우 뿌리의 굵기는 형질전환되지 않은 식물체의 약 1.7배, 뿌리의 무게는 약 2.2배의 우수함을 나타내었다(Table 14).

## 2) 현삼 식물체의 형질전환 체계 확립

- (1) 현삼 식물체의 kanamycin 저항성 측정 결과 kanamycin 50mg/l 이 첨가된 배지에서 분화가 급격히 감소하고 kanamycin 100mg/l 가 가 된 배지에서는 분화가 되지 않았다(Table 21).
- (2) Km 10mg/l + Cb 500 mg/l 첨가배지에서는 액아와 줄기조직에서 잎 절편체 보다 높은 재분화율 보였다(Fig. 5).
- (3) 현탁배양에 의하여 fusaric acid 저항성인 세포주를 선발하였고, 선발된 20개의 세포주의 저항성 정도는 세포주에 따라 상이한 차이를 보였다.
- (4) Fusaric acid 저항성 세포주들의 식물체 분화능력은 세포주에 따라 사이하였으며, 50  $\mu$ M fusaric acid 농도에서도 13개의 세포주들의 1개 이상의 줄기가 분화되었고 두 개의 세포주는 분화가 되지 않았다.
- (5) 형질전환 식물체의 PCR 분석한 결과 형질전환을 수행하지 않은 식물체에서는 나타나지 않는 700bp 크기의 band가 형질전환 된 식물체에서 조사되었다(Fig. 8).
- (6) 형질전환체 GST activity 측정결과 형질전환 된 식물체는 유도체 처리를 하지 않은 경우에는 CDNB 기질에 대하여 control 식물체보다 약 2배

정도의 GST 활성 증가를 보여 주었다(Fig. 20).

- (7) GST 유전자로 형질전환 현삼 식물체의 항미생물의 활성실험을 수행한 결과 박테리아 피검균 *Bacillus subtilis*에서 형질전환 식물체가 형질전환되지 않은 식물체보다 2배가량의 활성을 보여 주었다(Table 29).
- (8) 시간에 따른 GST 활성을 조사한 결과 *F. oxysporum*, *P. infestanse*, *Collectoricum spp.*등을 처리시 모두 48시간 때부터 활성이 높아졌고 120시간 때에 제일 높은 수치를 기록하였으며 그 뒤로는 활성이 떨어지는 경향을 나타내었다(Fig. 22).
- (9) AFP, PAP, GST유전자로 형질전환 식물체와 형질전환되지 않은 식물체의 포장저항성 검정 결과 *F. oxysporum*, *P. infestanse*, *Collectoricum spp.*에 대하여 저항성을 나타내었으며, PAP유전자로 형질전환된 식물체는 *F. oxysporum*에 저항성을 보이는 계통이 이었으며 AFP유전자로 형질전환된 식물체의 경우 *F. oxysporum*, *P. infestanse*, *Collectoricum spp.*에 저항성을 보이는 계통이 선발되었다(Table 35).
- (10) AFP 형질전환 식물체를 계통별로 살펴보면 A-2, 5, 7, 9, 10계통이 *F. oxysporum*에 저항성을 보였으며, A-5, 8, 10 계통이 *P. infestanse*, *Collectoricum spp.*에 저항성을 보였다. 특히 A-5계통은 이들 세 병원균에 대하여 저항성을 보였다(Table 35).
- (11) AFP유전자로 형질전환된 식물체의 계통 중 A-5, A-8계통이 수확량과 내병성에서 우수한 결과를 보임으로써 품종 등록 중에 있다(Table 35, 36).
- (12) PAP유전자가 형질전환된 식물체중에 P-1, 3, 8, 10계통이 *F. oxysporum*에 저항성을 보였으며, P-3,9,10계통은 *F. oxysporum*, *P. infestanse*, *Collectoricum spp.*에 저항성을 보였다.

## 나. 활용에 대한 건의

- 1) Fusaric acid를 사용하여 현탁배양한 세포로부터 fusaric acid에 저항성인 세포주를 선발함으로써 *F. oxysporum*에 의한 피해를 줄일 수 있다.
- 2) GST, AFP, PAP 유전자로 형질전환된 지황과 현삼의 경우 뿌리 무게 및 병원균의 저항성이 높게 나타났다. 이러한 형질전환기술은 농업지도 업무 또는 상업적 종묘 생산에 활용할 수 있다.
- 3) 외래유전자를 도입함으로써 내병성 종묘를 생산 공급하므로 재배시 발생하는 병해에 의한 생산량 감소에 따른 피해를 경감시킬 수 있다.

# S U M M A R Y (I)

## I. Tittle

Production of plantlets through bioreactor culture of *Rehmania glutinosa* and *Scrophularia buergeriana*.

## II. Oblectives

1. Establishment of bioreactor culture system for *Rehmania glutinosa* and *Scrophularia buergeriana*.
2. Establishment of rooting, acclimization and soil culture system of the shoots developed in vitro culture.

## III. Contents of Study

1. Investigation of disease free plantlets initiation and maintenance.
2. Investigation of direct somatic embryogenesis from explants.
3. Culture and environmental factors affecting bioreactor culture.
4. Investigation of multiple shoots formation from stem segments.
5. Investigation of rooting and acclimating shoots formed in *in vitro* culture.
6. Investigation of shoots acclimating on plug tray and transplanting to soil.

## **IV. Results and Recommendation**

### **A. Production of plantlets from the multiple shoots developed from stem explants of *Rehmania glutinosa*.**

1. Use of multiple shoots from stem segments was more practical than use of direct somatic embryogenesis from leaf, petiole and stem explants.
2. Subculture of stem explants sized from 0.5 to 0.8cm every 4 weeks provided plant good and enough materials for necessary experiments.
3. MS medium was proper for maintenance of plantlets.
4. Formation of shoots on solid MS medium rather than direct culture of stem in bioreactor provided more shoots and healthy.
5. More shoots were formed in case of addition of thidiazuron 1.0mg/l to solid MS medium.
6. When induction of shoots on solid MS medium, add of paclobutrazol reduced vitrification rate of shoots formed.
7. Proper culture density in 2.5L bioreactor was 90 stem segments.
8. More shoots was formed when maintain the pH level constantly by add of MES.
9. ABA had no synchronization effect of shoots in bioreactor culture.
10. Add of antivitrification agent 5mg/l reduced vitrification rate of shoots formed.
11. Add of thidiazuron 1.0mg/l in bioreactor culture affected positively elongation and internode length of shoots. Proper culture density in 2.5L bioreactor is about 400 shoots(100-150g).
12. Rooting of shoots was effective on half strength MS medium with 1.2% agar.
13. Add of 0.4mg/l paclobutrazol promoted better rooting and dark green colored plantlets developed.

14. Use of vessels with membrane filter which permit gas exchange freely in the vessels promoted rooting and acclimating rate of shoots formed.
15. Grow of plantlets for 2 weeks on plug tray before transplanting to soil provided higher survival rate on the field.
16. Plug plantlets grew normally and good yielded in the field condition.
17. Figure 9 shows the whole scheme of bioreactor culture system to produce plantlets via multiple shoots induction, rooting of shoots and acclimating.

**B. Production of plantlets from the multiple shoots developed from stem explants of *Scrophularia buergeriana*.**

1. Use of multiple shoots from stem segments was more practical than use of direct somatic embryogenesis from leaf, petiole and stem explants.
2. Sphere type of air-lift bioreactor was proper for *Scrophularia buergeriana*, especially removal of inner loop was more effective in the formation of shoots from stem explants.
3. MS medium with reduced one forth in ammonium type nitrogen level was effective for shoots formation.
4. Proper inoculum density in 2.5L bioreactor was 300 stem(0.8-1.0cm) segments.
5. Antivitrification agent was not effective for reducing vitrification of shoots formed.
6. Rootingrate and root number per shoot was effective in the shoots cultured for 6 weeks in bioreactor.

7. Leaf of shoots was expanded only on the solid medium after 6 weeks cultured in bioreactor.
8. Shoots with fully expanded leaves was produced more on the half strength MS medium with 1.2% agar.
9. Use of vessels with membrane filter which permit gas exchange freely in the vessels promoted rooting and acclimating rate of shoots formed.
10. Acclimated shoots need further hardening period on plug tray for 2 weeks before transplanting in the field.
11. Plug plantlets grew normally and good yielded in the field condition.

### **C. Recommendation**

This technique for producing disease free shoots through bioreactor culture of stem segments in *Rehmania glutinosa* could be utilized for commercial production of plug plantlets which can be directly transplanted on the field.

## **SUMMARY ( II )**

### **I . Title**

Search and utilization of PRs(Pathogenesis-Related Protein) gene.

### **II . Objectives**

1. Search of PRs gene in *Rehmania* and rice and production of recombinant PRs.
2. Antifungal effect test of recombinant PRs against *Fusarium oxysporum* R2.

### **III . Contents of Study**

1. Purification of PR proteins from *Rehmania glutinosa* and characterization of its enzymatic properties.
2. Isolation of PRs gene from *Rehmania glutinosa* and rice
3. Expression of recombinant PRs gene in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*.
4. Investigation of PRs antifungal activity against *Rehmania glutinosa*.

## IV. Results and Recommendation

### A. Search of PRs gene from *Rehmania* and rice and production of recombinant PRs

1. Three basic chitinases(P1, P2, P3) and an acidic chitinase(P4) were isolated from *Rehmania glutinosa*.
2. According to the result of enzymatic characterization, P2 is an exo-type chitinase and other three chitinase(P1, P3, P4) are endo-type chitinase.
3. Purified chitinases has antifungal activity that repress production of *Magnaporthe grisea* conidia and appresorium.
4. It is obtained to 418bp gene fragment using the *Rehmania* genomic DNA as a template through PCR and determined on chitinase by analysis and comparison of nucleotide sequence.
5. 418bp nucleotide sequences were translated to amino acid sequence. As it is compared with other chitinase, it is certain of acidic class III chitinase.
6. Acidic class III chitinase gene exist as a single gene in *Rehmania glutinosa*.
7. Acidic class III chitinase gene was isolated from *Rehmania glutinosa* using RACE(Rapid Amplification of cDNA End) method with 428bp gene fragment.
8. JHIII was inserted in *Escherichia coli* using the pRSET vector and JHIII have 29kDa molecular weight and almost express into inclusion body.
9. JHIII was expressed in *Bacillus subtilis*, JHIII has a greatest activity at early stationary phase.
10. Recombinant PRs that expressed in *Bacillus subtilis* were concentrated by ultrafiltration.
11. PR1, PR2, and PR5 genes were isolated from rice PRs genes by PCR method.
12. PRs genes were expressed in *Escherichia coli* using of pRSET vector and identified with western blot
13. PRs genes were expressed in *Bacillus subtilis* using pUBL140 vector

and identified with enzymatic activity and SDS-PAGE

## **B. Antifungal effect test of recombinant PRs against *Fusarium oxysporum* R2**

1. *Fusarium oxysporum* spores were treated with recombinant JHIII and  $\beta$ -1,3-glucanase.
2. The combination of JHIII and rice  $\beta$ -1, 3-glucanase inhibited fungal growth more effectively than JHIII or rice  $\beta$ -1,3-glucanase.
3. Microscopical observation showed that development of side hyphae was decreased in the inhibited fungi, resulting in smooth filaments.
4. The combination of PR1 and PR5(TLP) inhibited fungal growth over 30% and a great improvement in antifungal activity was detected when  $\beta$ -1,3-glucanase and rice chitinase(CH16) were treated together.
5.  $\beta$ -1,3-glucanase and rice chitinase(CH16) was treated effectively at *Fusarium oxysporum* R2. After 96hrs, the hyphae growth was decreased evidently in comparing with control.
6. As a result of observing the hyphae using Transmission Electron Microscopy(TEM) after 96hrs, it was confirmed that the fungal cell wall was decomposed by recombinant proteins.

## **C. Recommendation**

Recombinant PRs show inhibitory effect against *Fusarium oxysporum* R2. Moreover combinatorial treatments of PRs were more effective than single treatment of them on the inhibition of *Rehmania* pathogens. This results can be utilized to develop the new *Rehmania glutinosa* that increase the pathogenic resistance effectively through gene transformation.

## S U M M A R Y (III)

### I. Title

Breeding of disease resistant *Rehmania glutinosa* and *Scrophularia buergeriana* through cell culture and gene transformation.

### II. Objectives

1. Selection of mutant plants through cell culture.
2. Establishment of gene transformation system of GST, AFP, and PAP gene by *Agrobacterium*.
3. Breeding of disease resistant transgenic plants through pathogenicity test in in vitro and field.

### III. Contents of Study

1. Induction of mutant plants by mutagen treatments.
2. Investigation of disease resistance of mutant plants in greenhouse and field.
3. Investigation of regeneration system for gene transformation.
4. Investigation of suitable antibiotic concentration and efficient transformation factors.
5. Selection of transgenic plants by PCR and Southern blotting.
6. Investigation of disease resistance of transgenic plants in in vitro and field.
7. Selection of high yield and disease resistant transgenic lines.
8. Investigation of agronomic characters of transgenic lines.

#### IV. Results and Recommendation

##### A. Breeding of disease resistant *Rehmania glutinosa* through cell culture and gene transformation.

1. MS medium was proper for regeneration of *Rehmania glutinosa*
2. When TDZ 1.0mg/l was added on MS medium, the number of shoots regenerated from leaf and stem explants was better than other single treatments.
3. The addition of BA 0.5mg/l, 2iP 0.5mg/l and TDZ 0.1mg/l on MS medium produced the most number of shoots in *Rehmania glutinosa*
4. The efficient coculture period was 3 days
5. Addition of 50– 200uM acetosyringone increased the rate of transformation by *Agrobacterium*.
6. The proper antibiotic concentration in gene transformation was kanamycine 50 mg/l + ccefotaxime 250mg/l).
7. Transgenic plants were detected by PCR analysis of marker gene and GST gene
8. The rate of acclimation in transgenic plants was better than that in nontransgenic plants. The survival rate in transgenic plants was over 80% and in nontransgenic plants was about 44%.
9. Three transgenic lines including C-3, C-6, and C-7 line showed the resistance to *Fusarium oxysporum* strains, R-3, and R-10.
10. Transgenic plants showed the higher activity in GST activity than nontransgenic plants
11. The GST activity in transgenic plants was higher when *Fusarium oxysporum* was inoculated then when *Collectorichum*

sp. and *Phytophthora infestans* were inoculated.

12. The GST activity was higher after 48 hours inoculation
13. The fresh weight of root rhizomes in transgenic plants was 1.5 to 2 times heavier than that in nontransgenic plants
14. Three transgenic lines having high yield and disease resistance were selected

B. Breeding of disease resistant *Scrophularia buergeriana* through cell culture and gene transformation.

1. Twenty fusaric acid resistant cell lines were selected by step wise suspension culture.
2. SB-9, SB-11, and SB-15 lines showed the better callus growth at 100  $\mu$ M fusaric acid.
3. Regeneration capacity of fusaric acid-tolerant cell lines was different depending on cell line and fusaric acid concentrations.
4. The proper concentration of antibiotics for transformation was kanamycine 10 mg/l + cefotaxime 500mg/L.
5. Transgenic plants were selected by PCR analysis and Southern blotting,
6. Transgenic plants showed the band of nptII gene and AFP. PAP, and GST gene.
7. Transgenic plants showed the higher GST activity than nontransgenic plants.
8. Transgenic plants also showed the higher microbial activity than nontransgenic plants.
9. The GST activity in transgenic plants was increased according to the treatment times and the GST activity was the highest after 120 treatment hours.

10. The disease resistance in transgenic plants differed depending on transgenic line and transformed gene.
11. The disease resistant of AFP transgenic plants differed depending on line and pathogens treated. Transgenic lines, A-2, 5, 7, 10 showed the resistant to *Fusarium oxysporum*. Transgenic lines, A-5, 8, 10 showed the resistant to *Phytophthora infestanse*, and transgenic lines, A-5, 8, 10 showed the resistant to *Collectorichum* sp. .
12. Transgenic line of A-5 showed the resistant to *Collectorichum* sp., *Phytophthora infestanse*, and *Fusarium oxysporum*.
13. The disease resistant of PAP transgenic plants differed depending on line and pathogens treated. Transgenic lines, P-1, 3, 8, 10 showed the resistant to *Fusarium oxysporum*. Transgenic lines, P-3, 9, 10 showed the resistant to *Collectorichum* sp., *Phytophthora infestanse*, and *Fusarium oxysporum*.
14. Transgenic lines, P-3, 9, 10 showed the higher yield in root fresh weight and disease resistance.
15. Transgenic lines, A-5, 7, 9, 10 showed the higher yield in root fresh weight and disease resistance.

### C. Recommendation

This techniques for selecting and breeding the disease resistant plants through cell culture and gene transformation in *Rehmania glutinosa* and *Scrophullaria buergeriana* could be utilized for production the efficient production of disease resistant plants which have the difficulty in propagation and crossing.

# C O N T E N T S

Heading .....	1
Summary in Korea .....	3
Summary in English .....	15
Contents in English .....	26
Contents in Korea .....	29
Text .....	31
Chapter 1. Introduction .....	31
Section 1. Background of research and objectives .....	31
Section 2. Scope of research .....	33
Section 3. Research methods .....	33
Section 4. Expected results and recommendation .....	34
Chapter 2. Production of plantlets via bioreactor culture in <i>Rehmania</i> <i>glutinosa</i> .....	35
Section 1. Introduction .....	35
Section 2. Development of disease for plants .....	35
Section 3. Plantlets via direct embryogenesis .....	37
Section 4. Bioreactor type .....	47
Section 5. Summary and conclusion for the direct somatic embryogenesis .....	48
Section 6. Plantlet production via multiple shoots from stem .....	50
Section 7. Plantlet growth in bioreactor .....	67
Section 8. Rooting and acclimatization of shoots harvested from bioreactor .....	69
Section 9. Field cultivation of plantlets .....	78

Chapter 3. Production of plantlets via bioreactor culture in <i>Scrophularia</i> <i>buergeriana</i> .....	84
Section 1. Introduction .....	84
Section 2. Development of disease for plants .....	84
Section 3. Somatic embryogenesis .....	86
Section 4. Summary and conclusion of somatic embryogenesis .....	94
Section 5. Formation of shoots in suspension culture .....	95
Section 6. Multiple shoots development in bioreactor culture .....	99
Section 7. Rooting and acclimatization of shoots .....	108
Section 8. Field cultivation .....	113
 Chapter 4. Search and utilization of PRs(Pathogenesis-Related Protein) gene .....	 117
Section 1. Introduction .....	117
Section 2. Assay for growth inhibition of <i>Fusarium oxysporum</i> R2 using <i>Rehmannia</i> PR-proteins .....	 127
1. Isolation of PR gene from <i>Rehmannia glutinosa</i> .....	127
2. Expression of <i>JHIII</i> gene in <i>Escherichia coli</i> .....	141
3. Expression and production of <i>JHIII</i> and rice glucanase gene in <i>Bacillus subtilis</i> .....	 143
4. Antigungal effect test of recombinant PR proteins against <i>Fusarium oxysporum</i> R2 .....	 146
Section 3. Assay for growth inhibition of <i>Fusarium oxysporum</i> R2 using rice PR proteins .....	 150
1. Obtainment of PR gene from rice .....	150
2. Expression and production of rice PR-protein .....	154
3. Test of antifungal activity .....	159

Chapter 5. Selection of disease resistant breeding lines in <i>Rehmania</i>	
<i>glutinosa</i> .....	165
Section 1. Introduction .....	165
Section 2. Screen the degree of disease resistance in the local collections	
.....	167
Section 3. Induction of variant lines resistant to disease by use of EMS	
treatment .....	169
Section 4. Establishment of transformation system by using GST and	
development of disease resistant lines .....	175
 Chapter 6. Selection of disease resistant breeding lines in <i>Scrophularia</i>	
<i>buengeriana</i> .....	206
Section 1. Introduction .....	206
Section 2. Selection of resistant lines to fusaric acid .....	208
Section 3. Transformation of Rs-AFP, PAP and GST by <i>Agrobacterium</i>	
.....	227
 Reference .....	263

# 목 차

제출문 .....	1
요약문 .....	3
영문요약문 .....	15
영문목차 .....	26
목차 .....	29
본문 .....	31
제 1 장 서론 .....	31
제 1 절 연구배경 및 목적 .....	31
제 2 절 연구내용 및 범위 .....	33
제 3 절 연구 방법 .....	33
제 4 절 기대 효과 및 활용 .....	34
제 2 장 생물반응기를 이용한 지황종묘의 대량 생산 .....	35
제 1 절 서설 .....	35
제 2 절 무균식물체 양성 .....	35
제 3 절 직접 체세포 형성을 통한 종묘 생산 .....	37
제 4 절 생물반응기 종류 및 배지 순환 방식 .....	47
제 5 절 직접 체세포배 형성 연구결과 요약 및 결론 .....	48
제 6 절 줄기조직에서 multiple shoot 형성을 통한 종묘 생산 .....	50
제 7 절 생물반응기에서 신초의 신장 .....	67
제 8 절 생물반응기에서 수확한 신초의 기내 발근과 순화 .....	69
제 9 절 기내 순화묘의 포장 재배 .....	78
제 3 장 생물반응기를 이용한 현삼 종묘 생산 .....	84
제 1 절 서설 .....	84
제 2 절 무균 식물체 양성 및 종묘생산용 재료의 유티와 보존 .....	84
제 3 절 직접 체세포 생산을 통한 종묘 생산 .....	86
제 4 절 직접 체세포 형성 연구 결과 요약 및 결론 .....	94
제 5 절 액체 배양에서 신초 형성 .....	95
제 6 절 생물반응기에서 multiple shoots 형성 .....	99

제 7 절	신초의 발근과 순화 .....	108
제 8 절	포장 재배 .....	113
제 4 장	병유도단백질(PR-Protein) 유전자 탐색과 이용 .....	117
제 1 절	서설 .....	117
제 2 절	지황 병유도 단백질을 이용한 지황 병원균에 대한 항균 효과 검정 .....	127
	1. 지황 PR-Protein 유전자 확보 .....	127
	2. 대장균에서 JHIII 발현 .....	141
	3. 고초균에서 JHIII 및 베타 glucanase 발현 및 생산 .....	143
	4. 재조합 효소에 의한 지황 병원균 성장 저해 검정 .....	146
제 3 절	다른 PR-Protein을 이용한 지황병원균에 대한 효과검정 .....	150
	1. 베타 PR-Protein 유전자 확보 .....	150
	2. 베타 PR-Protein의 생산 .....	154
	3 항균 활성 검정 .....	159
제 5 장	내병성 지황품종 육성 .....	165
제 1절	서설 .....	165
제 2절	모집종별로 내병성을 나타내는 모집종의 스크린, 내병성 정도 조사 .....	167
제 3절	EMS 처리에 의한 병저항성 변이주 유기 .....	169
제 4절	GST 유전자 형질전환체계 확립 및 내병성 식물체 육성 .....	175
제 6장	내병성 현삼품종 육성 .....	206
제 1절	서설 .....	206
제 2절	Fusaric acid에 대한 저항성 세포주 선발 .....	208
제 3절	Agrobacterium을 이용한 Rs-AFP, PAP 및 GST 유전자의 형질전환 .....	227
참고문헌	.....	263

# 제 1 장 서 론

## 제 1절 연구배경과 연구목적

우리 나라는 국민 생활수준의 향상으로 건강에 관한 관심도가 계속 높아가고 있으며, 특히 1987년 한방의료보험이 실시됨에 따라 생약의 중요성이 더욱 높게 평가되고 있다. 이에 따라 생약의 수요가 급증하여 고품질 생약의 안정적 공급이 요구되고 있는 가운데, 우리 나라에서 특용작물의 전체 재배면적과 생산량에서 볼 때 약용작물이 차지하는 재배면적과 생산량이 매년 증가하고 있다.

지황과 현삼은 처방에 가장 많이 이용되는 한약재이나 국내 생산량으로 수요량을 충족시키지 못하고 있어 국내 생산이 안정적으로 이루어져야 한다.

또한 약용작물은 생약재나 추출물을 사람이 직접 이용하기 때문에 농약의 잔류성과 같은 안전성이 크게 문제가 되고 있다. 따라서 내병성 품종을 육성하여 무병 종묘를 매년 생산하여 재배할 필요성이 절실히 요구되고 있다.

지황(地黃)은 현삼과(*Scrophulariaceae*)에 속하고, 이용부위는 뿌리줄기이며, 수확한 그대로나 모래속에 저장한 것을 생지황, 그대로 말린 것을 건지황, 생지황이나 건지황을 술에 담그었다가 질그릇 속에서 아홉번 쪄낸 것을 숙지황이라 한다. 지황에는 마닌트(Manint), 당, 레호만닌, 카로텐, 싸이토스테롤, 비타민A, 카탈폴 등이 함유되어 있으며, 약뿌리 만드는 과정에 따라 약효가 다르나 대체적으로 지혈, 해열, 강심, 이뇨, 해독, 당뇨, 보혈기, 자양강장, 신경쇠약 등의 한약 원료로 널리 쓰이고 있다.

지황은 자가불화합성으로 종자번식이 불가능하여 종근으로 번식하나 종근은 저장중에 병원균에 감염되어 재배시 병 피해가 심하게 나타나고 있다. 따라서 무병종묘의 대량 생산 체계의 확립이 시급히 요구되고 있다. 종근은 병이 없고 굵기가 6mm, 길이 6cm 정도로서 선단과 끝부분을 잘라낸 중간부위를 쓰는 것이 좋으며, 머리부분을 심으면 뿌리가 가늘고 길게만 자랄 뿐 비대하지 않는 것이 많다. 반대로 직경 1cm 이상 굵은 뿌리를 종근으로 쓰면 꽃대 발생량이 많아진다.

근래에 이렇게 널리 사용되는 지황의 재배방법이 제안된 바 있으나, 보다 양질의 종묘를 생산 및 수득하기 위한 효과적인 배양 및 재배방법에 대한 요구가 계속되고 있는 실정이다.

지황의 조직배양에 관한 연구는 Jiang과 Mao(1979)가 기내 종자 발아에서 캘러스 유도 및 신초 및 뿌리 분화에 성공한 이래 배양에 이용되는 조직 부위, 배지와 생장 조절물질의 종류 및 조성 등에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다. 국내에서도 지황의 기내 배양에 관한 연구가 많이 이루어져서 캘러스 현탁배양을 통한 체세포배 형성(Chae and Park, 1993; Park et al., 1995), 체세포배를 이용한 인공종자의 생산, 플라스크 조건에서 직접체세포배 형성을 통한 종묘 생산(Park and Chae, 1997, 1999; Park et al., 1999) 등이 보고된 바 있다.

무병주의 대량증식에 있어 기내 배양은 비록 우수한 방법이기도 하지만 아직까지는 증식 속도가 늦고 비용이 많이 드는 단점이 있다. 지황의 경우에도 현재까지 이루어진 연구 결과의 대부분은 아가(agar)배지와 소규모의 배양용기를 이용하여 왔기 때문에 종묘의 기내 대량생산이라는 전제를 만족시키지 못하고 있는 실정이다. 이러한 단점을 극복하기 위한 방법의 하나로 생물반응기(bioreactor)를 이용한 대규모의 배양방식은 작업에 필요한 노동력을 감소시키고 동시에 축아의 증식률을 높일 수 있는 장점이 있는 것으로 보고되었다(Styer, 1985).

반면 소염, 인후염, 혈당강하 등에 효과가 있는 현삼은 실생번식이 가능한 하나 1년간 육묘기간이 필요하며, 당년에는 뿌리가 작아 수량이 저하된다. 묘두나 묘근 이용시 번식율이 낮아 종묘의 대량 생산체계 확립이 필요하다.

지황은 포장재배시 병의 종류가 많아 피해가 크지만 내병성 품종육성에 관한 연구가 전혀 없을 뿐만 아니라 기존의 교잡육종법으로는 내병성 품종육성이 안 되기 때문에 병원균의 독소 선별과 접종방법, 세포주의 저항성 평가와 선별방법 등 생물공학적인 기법에 의한 우량 변이의 창출 및 계통선발 방법의 개발이 필요하다. 내병성 품종육성을 위해서는 자기방어 기작에 관련되는 병유도단백질(PR-protein)에 대한 효소 및 유전자 차원의 연구가 또한 기본적으로 선행되어야 한다.

생약재의 수요에 부응하기 위해 생산의 안전성을 높여야 하나 아직 무병우량 종묘의 대량 생산과 공급에 관한 실용화 연구가 전혀 되어 있지 않다. 본 연구

에서는 시급히 해결하여야 할 주요 연구 분야를 다음과 같이 설정하였다. (1) 생물반응기(bioreactor)를 이용한 지황과 현삼의 종묘의 대량생산 체계확립, (2) 지황과 현삼에서 내병성 품종 육성, (3) 병유도단백질(PR-protein) 유전자 탐색과 이용연구이다.

## 제 2절 연구내용 및 범위

생물반응기를 이용하여 지황, 현삼 기내종묘의 대량생산 체계확립 연구에서는 연중공급을 위한 배양 시료의 유지와 증식법 확립, 생물반응기의 배양조건 및 환경 확립, 생물반응기에서 체세포배 생산 최적조건 구명, 체세포배의 순화와 이식의 *in situ* 방법 개발 및 체세포배의 순화 및 토양이식 조건을 확립하고자 하였다.

병유도단백질(PR-protein) 유전자 탐색과 이용연구에서는 PR-protein의 화학적, 효소적 성질 구명, 내병성 품종간 비교연구와 유전자 클로닝, 내병성품종 병유도단백질 유전자 분리와 구조분석 및 재조합 미생물에서 유전자 발현, 항균활성 검정 등을 검토하고자 하였다.

내병성 품종 육성연구에서는 내병성 세포주 선발방법 개발, 균접종 방법개발, 내병성 세포주 안정성 유지방법 개발, 내병성 세포주 분화체계 확립, 내병성 교차저항성 식물체 육성, 내병성 식물체 변이조사, 내병성 우량식물체 선발, 내병성 품종육성 및 수량성을 조사하고자 하였다.

## 제 3절 연구방법

생물반응기를 이용하여 지황, 현삼 기내종묘의 대량생산 체계확립 연구에서는 지황, 현삼에서 간접 및 직접 체세포배 발생 및 증식을 위한 현탁배양 조건 규명, 연중공급을 위한 배양시료의 장기저장과 재생, Scale-up flask에서 bioreactor로의 전이에 필요한 배양 조건 규명 즉 탄소원, 질소원, 홀몬의 종류와 농도 그리고 산도, 온도, 광도등 배양환경 확립, 적정 생물반응기의 종류 선정, 배양병의 종류와 배지순환방식, 용존산소 및 회전속도 등의 특징별 비교, 배양시료의 균질화와 적정 배양밀도 선정, 간접 및 직접 체세포배 형성의 동조화에 관여하는 생장억제물질 평가, 투명화 경감 방법 조사, 생물반응기로 부터 신초수확 최

적시기 조사, 기내활착 조건 확립, 토양활착 조건 확립 및 생육특성과 수량성을 조사하였다.

병유도단백질(PR-protein) 유전자 탐색과 이용연구에서는 지황으로부터 병유도단백질 추출, chitinase, glucanase 효소활성 측정, chromatography, 효소적 특성조사, 순수분리 효소의 아미노산 염기서열분석, 내병성 품종간의 PR-protein 수준비교, 지황의 chitinase 또는 glucanase 유전자 cloning, 내병성관련 chitinase 또는 glucanase 유전자 분리와 구조구명 및 병유도단백질 유전자의 *E. coli* 또는 yeast에서 발현 생산, 성질검토 그리고 병원균 성장 저해 실험을 수행하였다.

내병성 품종 육성연구에서는 내병성 세포주 선발, 돌연변이 물질처리 및 변이 유도물질 종류에 따른 선발, 균 저해활성 검정 비교, 내병성 세포주 안정성 및 유지와 증식법 조사, 저항성세포주 분화요인 구명, 내병성 교차 저항성조사, 내병성식물체의 형태, 염색체 및 RAPD분석, 분화된 식물체의 내병성 검정, 포장에서 내병성 조사와 선발, 개체별 성장 특성조사 비교 그리고 포장에서 저항성 유지 및 수량을 조사하였다.

#### 제 4 절 기대효과 및 활용

생물반응기의 배양체계 확립으로 우량종묘의 대량생산이 가능해지며, 생산된 식물체의 기내순화와 기외순화 체계 및 발근을 향상으로 건설한 종묘를 생산할 수 있다. 식물의 자기방어기작 관련 단백질의 성질구명, 저항성 관련 유전자의 구조구명 및 발현기작 구명과 내병성 품종육성의 생화학적 지표를 제공할 수 있다. 세포배양에 의한 내병성 품종이 육성된다. 내병성 메카니즘의 이해와 관련 유전자가 전이된 형질전환 식물체의 획득이 가능해질 것이다.

생물반응기를 이용한 세포배양은 상당히 어려운 기술로 인정되고 있어 이러한 기술 축적은 다양한 다른 작물에 응용이 가능하고, 내병성 세포주의 선발과 평가방법은 다른 실생번식이 안되는 약용작물의 품종육성에 활용할 수 있다. 저항성 품종육성의 생화학적 지표를 제공하고 종묘의 대량생산 기법은 농산물 생산의 공장화에 응용할 수 있다.

# 제 2장 생물반응기를 이용한 지황 종묘의 대량 생산

(Patent Applied No. 10-2001-0061412)

## 제 1절 서 설

지황(*Rehmannia glutinosa*)은 자가불화합성으로 종자번식이 불가능하여 종근으로 번식하나 종근은 저장중에 병원균에 감염되어 재배시 병 피해가 심하게 나타나고 있다. 그러므로 무병종묘의 대량 생산 체계의 확립이 시급히 요구되고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위한 방법으로 생물반응기(bioreactor)를 이용하면 좁은 공간에서 년중 무병종묘 생산이 가능해질 것으로 기대된다. 그러나 국내외적으로 이러한 기술은 시험관 조건에서 실험적으로 연구는 되었으나 생물반응기를 이용한 종묘의 대량생산체계는 아직 이루어지지 못하고 있다. 따라서 본 연구의 최종 목표는 (1) 생물반응기를 이용하여 지황 기내종묘의 대량생산 체계를 확립하고, (2) 기내생산 종묘의 순화와 토양 활착법을 확립하여 무병 우량종묘 생산시스템을 개발하고자 하였다. 생물반응기를 이용한 조직배양은 상당히 어려운 기술로 인정되고 있어 이러한 기술 축적은 다양한 다른 작물에서도 응용이 가능해질 것이다.

생물반응기를 이용한 지황 종묘의 생산은 직접체세포배 형성과정을 통해 추구하고자 하였다. 그러나 직접체세포배 형성은 생물반응기에서 체세포배의 형성과 신초의 유도를 동시에 이루어져야 하기 때문에 배양기간이 8주 이상이 소요된다. 이 과정에서 유도된 신초가 연약하여질 뿐만 아니라 신초의 투명화가 발생하여 건전한 종묘를 육성하는데 큰 어려움이 있었다. 따라서 본 연구에서는 multiple shoots 형성을 통한 종묘 생산 연구에 집중하였다.

## 제 2 절 무균 식물체 양성

무균 식물체는 중국종과 재래종의 교배종자를 무균 상태에서 받아시켜 식물체를 얻는다. 생장점 배양은 배양하고자 하는 생장점의 크기나 오염으로 인하

여 무균 식물체를 확보하기가 매우 어려우며, 뿌리 배양도 종근의 평균 감염으로 무균 식물체를 얻기가 불가능하다. 최근 수원 1호로 보급되고 있는 중국 도입종은 자연상태에서 꿀벌에 의한 타화수정으로 종자를 맺는 경우가 있으므로 이 종자를 이용할 수도 있다. 그러나 재래종에서는 이러한 현상이 없어 종자를 얻을 수 없다. 교배종자의 발아 조건 구명실험결과는 표 1 및 2와 같다.

### 1. 발아조건 구명실험

지황 종자의 발아에 적합한 온도와 광 조건을 찾기 위한 실험결과는 표1과 같다. 이 실험에서 25℃와 28℃ 조건 사이에서는 발아율에 큰 차이를 보이지 않았지만 20℃에서는 현저히 떨어지는 것으로 보아 지황종자는 25℃이하의 저온에서는 발아가 어려움을 알 수 있었다. 그리고 광을 차단하거나 16시간 일장을 준 조건에서 발아율에 큰 차이를 보이지 않는 것으로 보아 광 조건은 그다지 영향하지 않는 것으로 나타났다.

Table 1. Effect of temperature and photoperiod on seed germination in *Rehmannia glutinosa* after 2 weeks.

	20℃		25℃		28℃	
	Light*	Dark	Light	Dark	Light	Dark
Germination rate (%)	2	1	54	44	47	40

\*: 16 hours photoperiod

중국종 지황을 재래종 지황과 정역교배하여 수확한 종자를 각각 GA<sub>3</sub> 용액에 농도별로 침지한 후 MS 배지 상에서 발아시켜 발아율을 조사한 결과는 표 2와 같다. 표에서 보면 지황종자를 GA<sub>3</sub>용액에 농도별로 침종하였을 때, 25mg/l 농도에서 가장 낮은 발아율을 나타내었고, 50mg/l 이상의 농도에서 상대적으로 높은 발아율을 보였지만 GA<sub>3</sub>용액에 침종하지 않은 결과(Table 1)와

비교한다면 GA<sub>3</sub> 처리효과는 크지 않은 것으로 생각되었다.

그러나 중국종을 모본으로 한 F1 종자에 비해 재래종을 모본으로 한 F1 종자의 발아율은 현저하게 떨어졌고, 이후 성장도 불량한 것으로 나타났다. 이와 같은 결과로 볼 때, 지황에서 생육이나 성장에 우수한 형질을 도입하기 위한 교배육종을 할 때에는 그 형질을 가진 품종을 모본으로 하는 것이 유리할 것으로 보인다.

Table 2. Effect of GA<sub>3</sub> on germination in the seeds obtained from reciprocal crosses between Hyokyung variety(China) and Korean local cultivar in *R. glutinosa*.

Conc. of GA <sub>3</sub> (mg/l)	Germination rate (%)	
	Chinese × Domestic	Domestic × Chinese
25	39	8
50	59	10
100	64	6
200	56	10

### 제 3절 직접체세포배 형성을 통한 종묘생산

#### 1. MS 고체배지에서 직접체세포배 형성

MS 고체배지에서 체세포배 발생에 영향을 주는 BA와 NAA의 효과를 알기 위하여 지황 잎절편을 치상하여 6주간 배양한 결과는 표 3과 같다. BA를 단독으로 처리한 실험구에서만 직접적으로 체세포배가 형성·발달되었고, NAA를 상대적으로 높은 농도의 BA와 조합처리한 실험구에서는 캘러스를 거쳐 간접적으로 체세포배가 형성되었다. 그러나 낮은 농도의 BA와 조합처리한 경우에는 캘러스만 형성되어 지황의 체세포배 형성에는 BA가 필요하다는 것을 제시하고 있다.

Table 3. Combinational effects of NAA and BA on direct somatic embryogenesis from leaf segments of *R. glutinosa* on solid agar medium after 6 weeks.

Growth regulator (mg/l)	Formation of somatic embryo
BA 1	D *
BA 1 + NAA 0.5	C
+ NAA 1.0	C
BA 2	D
BA 2 + NAA 0.5	T
+ NAA 1.0	T

\*: D : Direct somatic embryogenesis, T : Through callus, C : Callus only

## 2. MS 액체배지에서 직접체세포배 형성

표 4는 생물반응기에서 체세포배 대량생산 조건을 결정하기 위한 실험의 일환으로 MS 액체배지에 IAA, IBA, NAA와 같은 auxin류를 농도별로 처리하여 지황 잎절편을 8주간 배양한 결과이다. IAA, IBA, NAA를 처리한 모든 실험구에서 저농도에서는 체세포배가 형성되지 않았고, 비교적 고농도에서 형성되었는데 그 수는 많지 않았다. 또한, IAA 1.0mg/l 처리구에 잎절편에 염병이 부착된 상태로 배양한 경우 새로운 shoot가 생성되어 이로부터 발근이 되었고, 줄기조직만을 배양하였을 때에는 뿌리만 발생하는 경우도 있었다. 이것으로 보아 식물체의 부위별로 반응하는 양상이 다르기 때문에 성장조절제의 종류나 농도의 결정과 더불어 식물체의 부위를 정확히 결정하는 실험도 필요할 것으로 생각되었다(참조 약작지 5(4):289-293, 1997).

Table 4. Effect of auxins on direct somatic embryogenesis from leaf segments of *R. glutinosa* in MS liquid medium after 8 weeks.

Conc. (mg/l)	Auxins		
	IAA	IBA	NAA
0.1	-*	-	-
0.5	+	-	+
1.0	+	+	-

\*: - : none, + : poor, ++ : good

표 5는 액체배지에서 체세포배 발생에 cytokinin이 미치는 영향을 알아 보고자 BA, Kinetin, Zeatin을 농도별로 처리한 결과이다. Auxin을 단독처리한 실험결과와 마찬가지로 저농도 처리구에서는 전혀 반응하지 않았고 치상조직이 피사하였다. 어느 cytokinin이나 2.0 mg/l에서 가장 좋은 체세포배 발생을 나타내었고, 그 이상의 농도에서는 오히려 억제되거나 zeatin과 같이 변화가 없는 것으로 보아 cytokinin을 단독처리할 경우에는 2.0mg/l가 가장 적합할 것으로 생각되었다.

Table 5. Effect of cytokinins on direct somatic embryogenesis from leaf segments of *R. glutinosa* in MS liquid medium after 8 weeks.

Conc.(mg/l)	Cytokinin		
	BA	Kinetin	Zeatin
1.0	-*	-	-
2.0	++	++	++
5.0	+	+	++

\*: - : none, + : poor, ++ : good

표 6은 IAA를 1.0 mg/l로 고정시키고, cytokinin을 종류별·농도별로 조합처

리한 배지에서 잎절편을 8주간 배양하여 체세포배 발생에 적합한 조합과 농도를 찾기 위해 실험한 결과이다. 절편당 체세포배의 형성 개수에 있어 cytokinin의 종류·농도별로 차이를 보였다. BA를 조합처리하였을 때에는 농도에 관계없이 일정한 발생빈도를 보였지만 그 수는 적었고, kinetin의 경우는 2.0 mg/l 농도로 조합처리 했을 때 비교적 많은 체세포배가 형성되었다. 다른 cytokinin과 비교했을 때 zeatin을 조합처리한 시험구에서 좋은 결과를 보였다. 특히 그 농도가 2.0 mg/l일 때 가장 많이 형성되었고, 다른 처리구에서보다 조금 더 빠른 배양 후 6주 정도에 체세포배가 형성되어 같은 기간 중 더 성숙하고 건전하게 발달되었다(참조 약작지 5(4):289-293, 1997).

Table 6. Combinational effects of IAA and cytokinins on direct somatic embryogenesis from leaf segments of *R. glutinosa* in MS liquid medium after 8 weeks.

Cytokinin \ IAA	BA(mg/l)			Kinetin(mg/l)			Zeatin(mg/l)		
	1.0	2.0	5.0	1.0	2.0	5.0	1.0	2.0	5.0
1.0	+	+	+	-	++	+	++	+++	++

\*: - : none, + : 1~3 somatic embryos per explant,  
 ++ : 4~6 somatic embryos per explant,  
 +++ : 7 < somatic embryos per explant

표 7은 직접체세포배 발생에 적합한 접종부위를 결정하기 위하여 MS배지에 IAA 1.0mg/l와 zeatin 2mg/l를 첨가한 배지에 접종부위를 줄기, 엽병, 잎을 각각 달리하여 배양한 결과이다. 표에서 보면 줄기조직에서는 엽병이나 잎조직에 비해 짧은 기간 내에 싹(shoot)이 발생하였는데, 이는 완벽한 직접 체세포배

발생 과정을 거쳤다가 보다는 기관분화에 의한 multiple shoot에 가깝다고 생각되어진다. 반면 잎을 재료로 하였을 경우, 그 발생기간은 비교적 길었지만, 8주 후의 발생율에 있어서는 오히려 다른 조직에 비해 더 높았다. 또한 한 식물체에서 얻어질 수 있는 재료를 고려하여 볼 때 잎조직이 유리할 것으로 생각되었다.

Table 7. Effects of kinds of explants and culture periods on direct somatic embryogenesis and shoot development *R. glutinosa*.

Explant Period(weeks)	Stem	Petiole	Leaf
6	++*	+	+
7	++	++	++
8	++	++	+++

\*: + : poor, ++ : fair, +++ : good

### 3. 연중공급을 위한 배양시료의 장기저장과 재생

표 8은 지황의 직접체세포배 발생을 위한 재료를 주년 공급하기 위하여, 줄기, 엽병, 잎 각각의 조직을 4℃와 8℃에서 저온 저장하여 1개월 간격으로 꺼내어 액체배지에서 6주간 배양하여 직접체세포배의 발생율을 조사한 것이다. 표에서 보면 저장하지 않고 배양한 시험구나 4℃ 조건에서 저장한 후 배양한 시험구보다 8℃ 조건에서 저장하여 배양한 시험구에서 더 좋은 결과를 보였다. 특히 잎절편이 다른 조직에 비해 저장에 적합한 것으로 나타났다. 또한 잎절편의 경우에는 3개월간 저장한 후에도 어느 정도 일정한 체세포배 발생율을 유지하는 것으로 보아 장기간 저장이 가능할 것으로 생각되었다.

Table 8. Effect of storage temperature and period on direct somatic embryogenesis from leaf, petiole, stem segments of *R. glutinosa* after 6 weeks.

Period (month)	Temp. (°C)	Somatic embryo formation								
		Stem			Petiole			Leaf		
		Cont.*	4	8	Cont.	4	8	Cont.	4	8
1		++**	++	++	+	+	++	++	++	+++
2		.	+	++	.	+	+	.	+	++
3		.	+	+	.	+	+	.	+	++

\*: liquid culture without storage

\*\* : + ; 1~3 somatic embryos explant

++ ; 4~6 somatic embryoshoots explant

+++ ; over 7 somatic embryos explant

#### 4. 직경 배양밀도

지황의 경우 500ml 삼각플라스크에 zeatin 2.0mg/l 와 IAA 1.0mg/l가 첨가된 MS 액체배지를 150ml씩 채우고 지황의 잎절편을 각각 30, 60, 90 절편을 접종하여 체세포배 발생양상을 비교한 결과 절편수를 90절편까지 늘려도 발생이 양호하였다 (Table 9).

Table 9. Effect of inoculum density on somatic embryo production of *R. glutinosa* in liquid culture after 8 weeks.

Medium volume (ml)	No. of explant	Somatic embryogenesis
150	30	+
	60	++
	90	++

+ : 1~3 somatic embryos per explant, ++ : 4~6 somatic embryos per explant

## 5. 배지성분의 최적화

### 가. 질소원의 농도

배지 내의 질산태 질소와 암모니아태 질소의 농도 변화가 직접체세포배 발생에 미치는 영향을 검토하기 위하여 MS배지에 포함되는  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 와  $\text{KNO}_3$ 의 농도를 각각 0 : 1900, 413 : 1900, 825 : 1900, 1650 : 1900, 1650 : 950, 1650 : 475, 1650 : 0(mg/l)로 처리하여 잎조직을 4주간 배양한 후 체세포배의 발생을 조사하여 최적의 질소원 농도비율을 조사하고자 하였다. 대조구인 ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1650 +  $\text{KNO}_3$  1900mg/l)와  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  :  $\text{KNO}_3$ 의 비율이 825 : 1900(mg/l)인 처리구가 직접체세포배의 발생에 효과적이었다(Table 10).

Table 10. Effect of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  :  $\text{KNO}_3$  ratio on direct somatic embryogenesis from leaf segments of *R. glutinosa* in liquid culture after 4 weeks.

$\text{NH}_4\text{NO}_3$ (mg/L)	$\text{KNO}_3$ (mg/L)	Mean No. of embryo / explant
0	1900	+
413	1900	+
825	1900	++
1650	1900	++
1650	950	+
1650	475	-
1650	0	-

- : poor, + : fair, ++ : good

### 나. 탄소원의 종류

Sucrose와 glucose를 각각 1, 3, 5 %로 처리하여 4주간 배양한 후 체세포배의 발생양상을 조사한 결과, sucrose나 glucose 모두 5%의 고농도에서는 효과가 나타나지 않았고 1%로 낮추었을 경우에도 발생이 저해되는 것으로 나타나, 적정 탄소원의 농도는 sucrose 3%인 것으로 확인되었다 (Table 11).

Table 11. Effect of carbon source on direct somatic embryogenesis from leaf segments of *R. glutinosa* in liquid culture after 4 weeks.

Carbon source (%)		Somatic embryogenesis
Sucrose	1	+
	3	++
	5	+
Glucose	1	+
	3	+
	5	-

- : poor, + : fair, ++ : good

#### 다. Hormone 조건

지황의 직접체세포배 발생효율을 높이는데 있어 배지의 종류와 strength가 영향을 미치는지 알아보려고 500ml 플라스크 조건에서 MS(Murashige-Skoog) 배지와 간접체세포배 형성에 효과적이었던 LS(Linsmaier-Skoog) 배지의 strength를 각각 1/2X, 1X, 2X로 달리하여 BA를 각각 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 mg/l로 처리하여 4주간 배양하였다. 그 결과, LS배지보다는 MS배지가 적합한 것으로 나타났고, MS 배지 중에서도 half strength보다 full strength의 처리구가 더 효과적이었으며, 이 경우 적절한 BA의 농도는 2.0mg/l이었다 (Table 12). 이러한 결과를 바탕으로 BA와 NAA의 혼용 효과를 알아보기 위하여 실험한 결과를 Table 13에 나타내었다. 표 9에서 보면, BA 1mg/l와 NAA 0.5mg/l 조합이나 BA 4mg/l와 NAA 0.5mg/l의 조합도 대조구에 비해 비교적 나은 결과를 나타냈지만, 보다 적절한 조합은 BA 2mg/l와 NAA 0.1mg/l의 조합이었다.

Table 12. Effect of medium and strength on direct somatic embryogenesis from leaf segments of *R. glutinosa* in liquid culture after 4weeks.

Media	BA	Somatic embryogenesis
Half strength LS	1.0	+
	2.0	+
	5.0	-
	10.0	-
Full strength LS	1.0	+
	2.0	-
	5.0	-
	10.0	-
Half strength MS	1.0	+
	2.0	+
	5.0	+
	10.0	-
Full strength MS	1.0	+
	2.0	++
	5.0	+
	10.0	-

- : poor, + : fair, ++ : good

Table 13. Effect of BA and NAA on direct somatic embryogenesis from leaf segments of *R. glutinosa* in liquid culture after 4 week.

Hormone		No. of somatic embryo
BA(mg/l)	NAA(mg/l)	
1	0.1	4.79 ± 0.85
	0.5	5.30 ± 1.18
	1.0	4.98 ± 1.34
2	0.1	5.31 ± 1.38
	0.5	4.79 ± 0.84
	1.0	4.69 ± 1.09
4	0.1	4.62 ± 0.74
	0.5	5.24 ± 1.79
	1.0	4.75 ± 1.20
Control( Zeatin 2.0 mg/l + IAA 1.0 mg/ l)		4.64 ± 0.86

또한, 배양 중 배지를 교환해 주는 적절한 시기를 결정하고자 실험을 수행하였는데, 배양 개시 1주일 째부터 7일 간격으로 배지를 각각 교환해 주었고, 회수된 배지는 HPLC를 이용하여 sucrose, glucose 및 fructose의 농도 변화를 검측하였다. 시료의 당 분석 결과, sucrose는 배양 후 1주부터 감소하기 시작하여 3주 째에는 거의 고갈되었고 fructose와 glucose는 3주 째에 가장 많이 축적된 이후 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 1).

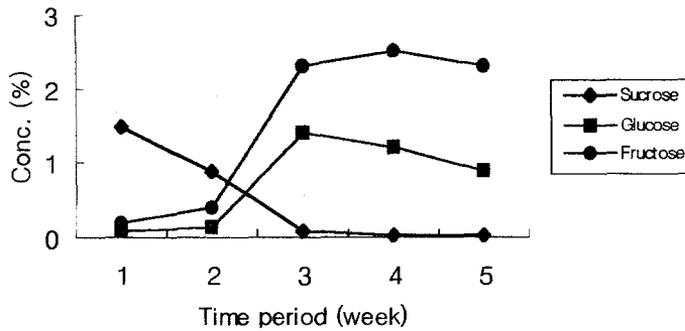


Fig. 1. Variation of sucrose concentration during somatic embryogenesis of *R. glutinosa* in 500ml flask culture.

#### 제 4절 Bioreactor Vessel 종류 및 배지 순환 방식

지황의 체세포배 발생에 적합한 생물반응기의 aeration 방식과 vessel의 종류를 결정하기 위하여 air-lift type과 stirrer type bioreactor에서 4주간 배양 후 결과를 조사하였다 (Table 14). 표에서 보면 cylinder형의 air-lift type과 stirrer type이 체세포배 발생에 효과적이었다. 두 경우 모두 플라스크 배양과 비교할 때 그 발생율이 낮았지만 이 같은 결과는 배지와 air를 순환시키는데 이용되는 impeller에 의한 기계적 손상 때문인 것으로 생각된다.

Table 14. Comparison of bioreactor types on direct somatic embryogenesis and organogenesis of *R. glutinosa* after 4 weeks.

Bioreactor type	% of Organogenesis	% of Somatic embryogenesis	Mean number of S. E. / explant
Air-lift (Sphere type)	≒ 30	≒ 20	1.30 ± 0.3
Air-lift (Cylinder type)	≒ 20	≒ 40	2.87 ± 0.5
Stirrer type	≒ 20	≒ 40	3.07 ± 1.5

S. E. : Somatic embryo

## 제 5절 직접체세포배 형성 연구결과 요약 및 결론

### 1. 요약

- 가. MS 고체배지에서 지황의 직접 체세포배 발생은 BA를 단독 처리한 경우에만 이루어졌다. 반면 NAA를 조합처리한 경우는 캘러스를 통한 간접 체세포배가 형성되었다.
- 나. MS 액체배지에서 지황의 잎조직에서 직접체세포배는 auxin이나 cytokinin 단독 처리보다는 zeatin 2mg/l에 IAA 1mg/l로 조합한 경우가 양호하였다.
- 다. 직접체세포배 형성은 줄기나 엽병 조직보다는 잎 조직이 좋았으나 8주가 소요되었다.
- 라. 지황의 직접체세포배 발생 조직의 저장조건은 4°C보다는 8°C에서 저장하는 것이 효과적이며, 잎 조직은 3개월까지 저장이 가능하였다.
- 마. 대조구인 (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1650 + KNO<sub>3</sub> 1900mg/l)와 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> : KNO<sub>3</sub>의 비율이 825 : 1900(mg/l)인 처리구가 직접체세포배의 발생에 효과적이었다 (Table 3).
- 바. 적정 탄소원의 농도는 sucrose 3%인 것으로 확인되었다 (Table 5).
- 사. MS 배지중에서도 half strength보다 full strength의 처리구가 더 효과적이었으며 이 경우 적정한 BA의 농도는 2.0mg/l이었다 (Table 8)

## 2. 결론

- 가. 생물반응기에서 직접체세포배 형성은 잎 조직에서 효과적이었으나 배양기간이 8주로 길고, 뿌리형성을 유도하려면 배양기간을 더 연장해야 한다. 이 과정에서 발생된 신초는 투명화가 되고 약해지기 때문에 건전한 종묘를 많이 확보하기가 매우 어렵다.
- 나. 직접체세포배 형성은 항상 높은 것만은 아니었다.
- 다. Cylinder형의 air-lift type과 stirrer type이 체세포배 발생에 효과적이었으나, 모두 플라스크 배양에 비해 발생율이 낮았다. 이와 같은 결과는 배지와 공기를 순환시키는데 이용되는 impeller에 의한 기계적 손상 때문이다.
- 라. 줄기조직에서는 엽병이나 잎 조직에 비해 짧은 기간 내에 신초(shoot)가 발생하였는데, 이는 완벽한 직접 체세포배 발생 과정을 거쳤다가 보다는 기관분화에 의한 multiple shoot가 형성된 것으로 판단된다.
- 마. 따라서 줄기조직을 배양하여 multiple shoots를 형성시켜 이를 이용하는 방법이 보다 효율적이라고 결론을 내렸다.

## 제 6절 줄기조직에서 multiple shoots 형성을 통한 종묘 생산

### 1. 무균 식물체 유지 및 보존

무균 식물체 유지는 줄기 절편을 0.5-0.8cm 크기로 마디가 포함되도록 자른 후 Murashige-Skoog(1962) 고체배지(sucrose 3%)에 아가 농도를 1.2%로 조절 한 배지에 치상하여, 온도 25<sup>0</sup>C, 16시간 조명 하에서 배양한다. 매 1개월마다 계 대배양을 하여 무균 식물체를 유지 보존하면서 종묘 생산용 재료로 이용한다. 치상은 마젠타 배양병에 5개 줄기절편을 치상하여 식물체로 생육시킨다. 이 조건은 지상부 생육과 뿌리의 발달을 동시에 향상시켜 준다.

#### 가. 재료 유지를 위한 지황에서 측아 형성의 적정 아가 농도

식물체로의 과도한 수분 흡수를 억제하여 투명화율을 감소시키는 동시에 지상부 및 뿌리의 발달을 향상시키기 위해 아가의 농도를 기존의 0.8%보다 1.5배, 2배를 증가시킨 1.2%와 1.6%가 첨가된 MS 고체배지에 마디를 포함한 줄기조직을 치상하여 4주간 배양한 후 재분화율, 초장, 엽수(측아수), 근장, 생체중을 조사하였다.

아가의 농도를 1.2%로 높인 배지에서 생육한 식물체는 측아수, 근장, 생체중 모두 대조구에 비해 높아 생육이 건전함을 알 수 있었다(표 15). 이로써 지황 무균 식물체의 유지 및 보존을 위한 계대배양용 배지는 1.2% 아가가 포함된 MS 기본 고체배지를 이용하는 것이 지상부의 생육과 뿌리의 발달을 동시에 향상시켜 건전한 실험용 재료를 생산할 수 있다.

Table 15. Effect of agar concentrations on the axillary bud formation in *R. glutinosa* after 4 weeks culture.

Agar (%)	Regeneration rate(%) *	Plant height (cm)	No. of leaves	Root length (cm)	Fresh weight (g)
0.8	100	†6.15±0.85 <sup>a</sup> ‡	6.96±1.47 <sup>b</sup>	2.59±0.76 <sup>b</sup>	0.79±0.24 <sup>b</sup>
1.2	98	6.37±0.61 <sup>a</sup>	8.04±1.54 <sup>a</sup>	3.31±0.83 <sup>a</sup>	0.91±0.23 <sup>a</sup>
1.6	86	5.61±0.67 <sup>b</sup>	6.08±1.31 <sup>c</sup>	2.62±0.91 <sup>b</sup>	0.70±0.18 <sup>c</sup>

\* ; Regenerated buds/total buds×100 (%).

† ; Each value represents the mean±S.D.

‡ ; Within columns, means followed by the same letters are not significantly different at p=0.05 according to Duncan's multiple range test.

#### 나. 무균식물체 유지용 적정 배지와 탄소원 농도

지황에서의 실험재료를 기내에서 무균 식물체로 보존할 때 측아를 발생시켜 많은 양의 재료를 빠른 시일 내에 확보할 수 있는 배지 조건을 찾아주고자, MS, B5, White 배지와 비타민이 포함되지 않은 MS배지에 탄소원으로 자당을 각각 1~5% 농도로 처리하고, 하나의 측아를 포함하도록 식물체를 잘라 치상한 후 4주간 배양한 결과는 표 16과 같다. 표에서 보면 MS 배지가 신초의 길이 생장은 다른 배지에 비해 다소 떨어지는 것으로 나타났지만 다른 배지에서 나타나는 투명화의 정도가 낮아 건전한 생장을 보였고, 새로운 측아도 가장 많이 발생하여 MS 배지가 가장 적합한 것으로 판단되었다. 또한 자당의 농도 조건은 모든 배지에서 3% 보다 농도를 높였을 때 오히려 신초의 생장이나 측아의 발달은 억제되어 적정 자당의 농도는 3%인 것으로 생각되었다.

Table 16. Effect of various medium and concentration of sucrose on axillary bud and shoot development in *R. glutinosa* after 4 weeks culture.

Medium	Sucrose (%)	No. of buds / explant ( $\pm$ S.E)	Shoot length (cm $\pm$ S.E)
MS	1	6.1 $\pm$ 0.6	6.23 $\pm$ 0.56
	2	6.7 $\pm$ 0.6	5.90 $\pm$ 0.68
	3	7.1 $\pm$ 0.8	6.36 $\pm$ 0.97
	4	6.7 $\pm$ 0.8	5.51 $\pm$ 0.70
	5	5.9 $\pm$ 0.6	3.61 $\pm$ 0.41
B5	1	6.4 $\pm$ 0.4	6.70 $\pm$ 0.43
	2	6.1 $\pm$ 0.6	8.07 $\pm$ 0.82
	3	6.2 $\pm$ 0.8	7.46 $\pm$ 0.96
	4	6.1 $\pm$ 0.5	7.29 $\pm$ 0.44
	5	5.7 $\pm$ 1.5	2.96 $\pm$ 0.73
White	1	6.0 $\pm$ 0.9	6.67 $\pm$ 0.80
	2	5.4 $\pm$ 0.8	5.95 $\pm$ 0.84
	3	6.3 $\pm$ 0.9	7.26 $\pm$ 0.92
	4	5.2 $\pm$ 0.8	5.19 $\pm$ 0.69
	5	4.9 $\pm$ 0.7	4.24 $\pm$ 0.48
MS without vitamins	1	5.3 $\pm$ 0.6	5.98 $\pm$ 0.75
	2	5.9 $\pm$ 1.2	5.44 $\pm$ 0.92
	3	3.4 $\pm$ 1.2	3.52 $\pm$ 1.22
	4	5.6 $\pm$ 1.4	6.38 $\pm$ 1.57
	5	4.9 $\pm$ 1.4	4.96 $\pm$ 1.38

## 2. 생물반응기 내에서 신초의 유도

### 가. 前培養의 효과

지황에서 신초의 생산 효율을 높이기 위한 방법의 하나로 줄기 절편을 재료로 BA와 NAA를 각각 농도별로 조합 처리한 MS 액체배지가 든 100ml 삼각 플라스크에서 2주간 전배양을 한 후, 여러 호르몬 조합에 대한 반응을 검토하기 위해 500ml 삼각 플라스크 조건에서 6주간 배양한 결과는 표 17과 같다. 표에서 보면 대체적으로 BA 2mg/l 가 처리된 배지에서 전배양을 한 시험구가 전배

양을 하지 않은 시험구보다 형성된 신초 수로 보아 더욱 유리한 것으로 나타났다. 특히 NAA 0.5 mg/l를 조합 처리한 배지에서 가장 많은 신초가 발생하여 이 조합이 적합한 배양 조건임을 알 수 있었다. 한편, 신초의 발생양상을 보면 직접 체세포배 발생과는 달리 조직 절편의 양 말단에서 발생하는 것으로 관찰되어 adventitious shoot 발생 과정을 거친 것으로 판단되었다. 이와 같은 결과를 토대로 배양재료 저장의 용이성과 공간이용의 효율성을 고려하여 같은 조성의 배지에 아가를 0.8% 첨가하여 petri-dish에서 2~3주 배양하였을 때 액체배지에서의 발생양상과 비슷한 결과를 보이는 것을 확인하였다 (그림 2). Petri-dish(90x20mm)에 마디를 포함하지 않은 0.8-1.0cm 크기의 줄기절편을 10개 치상하여 4주간 배양하면 그림 2A와 같이 절편의 양쪽 끝에서 신초가 많이 발생한다. 여기서 형성된 신초를 생물반응기에서 3주간 배양하면 신초가 새로 형성될 뿐만아니라 배양한 신초의 마디 수가 증가하고 절간생장이 이루어진다. 유도된 adventitious shoot는 계대배양으로 계속 증식시킬 수 있다(그림 2B). 지황의 신초 발생을 위해 생물반응기를 이용할 경우에는 지황의 절편을 직접 생물반응기에 접종하여 신초를 발생시키는 것보다 먼저 고체배지가 든 petridish에서 신초를 발생시켜 이를 생물반응기에서 배양하면 신초 발생율이 증가하였다. 따라서 고체배지가 든 petridish에서 신초를 먼저 발생시킨 후 생물반응기에서 신초의 신장을 유도하는 것이 중요하다.

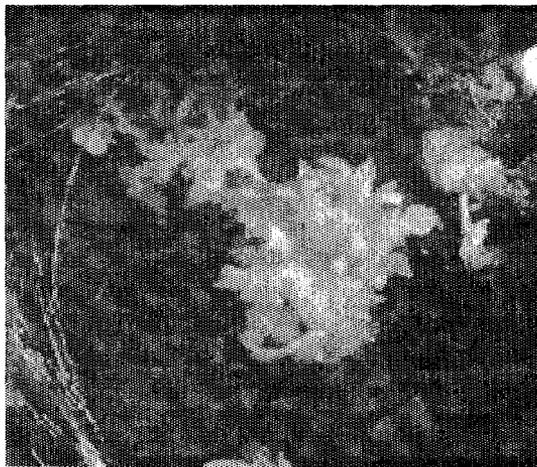
Table 17. Effect of BA and NAA combination on shoot formation after 6 week's culture of the stems got from the shoots developed in pre-culture of stem for two weeks on petri-dish in *R. glutinosa*

Hormone (mg/l)	No. of shoots / flask ( $\pm$ S.E)	Fresh weight (g $\pm$ S.E)
Control	82.1 $\pm$ 3.4	42.20 $\pm$ 5.32
BA 0.5 NAA 0.1	50.1 $\pm$ 2.1	24.88 $\pm$ 6.83
	69.7 $\pm$ 3.4	31.90 $\pm$ 3.31
	66.2 $\pm$ 4.3	31.26 $\pm$ 4.61
BA 1.0 NAA 0.1	72.3 $\pm$ 3.6	35.84 $\pm$ 2.60
	84.8 $\pm$ 1.4	39.40 $\pm$ 3.13
	82.6 $\pm$ 2.8	40.90 $\pm$ 4.23
BA 2.0 NAA 0.1	131.0 $\pm$ 3.9	49.10 $\pm$ 5.75
	142.3 $\pm$ 4.8	59.90 $\pm$ 2.50
	88.0 $\pm$ 2.2	23.10 $\pm$ 2.23
BA 4.0 NAA 0.1	62.5 $\pm$ 3.7	12.50 $\pm$ 3.48
	96.3 $\pm$ 3.5	23.60 $\pm$ 4.30
	72.3 $\pm$ 4.3	14.20 $\pm$ 2.86

Control : without pre-culture in MS medium supplemented with BA 2 mg/l and NAA 0.1 mg/l



A



B

Fig. 2. Induction of adventitious shoots from pre-culture on solid MS medium(A) and it's multiplication (B) after subculture for 3 weeks on solid MS medium.

나. 전배양에서 신초의 생산 효율 증대

1) Antivitrifying agent의 영향

지황을 petridish에서 전배양하여 multiple shoot가 유도된 explant를 생물반응기에서 배양할 경우, 지황의 절편을 직접 생물반응기에 접종하여 multiple shoot를 얻는 경우보다 multiple shoot의 발생율이 상대적으로 증가하는 효과를 얻을 수 있었다. 그러나 신초의 투명화 현상이 더욱 증가되는 경향이 나타났다. 이러한 결과는 정상적인 신초 발생율을 저하시키는 결과를 초래하므로 지황의 생물반응기 배양에서 이용되고 있는 antivitrifying agent(Sigma)를 전배양 단계에 처리하였다. 표 18에서와 같이 전배양 단계에서 antivitrifying agent의 효과가 뚜렷하게 나타났으며, antivitrifying agent 5g/L의 농도에서는 대조구에서의 투명화율을 1/2로 경감하는 효과를 보였다. 그러나 이에 비해 절편당 신초 형성율은 antivitrifying agent의 첨가 농도가 높아질수록 감소하는 경향을 나타내어 최종 수확율이 감소함으로써 건전한 식물을 다량 확보하는 데 있어서는 큰 효과를 얻을 수 없는 것으로 판단되었다.

Table 18. Effect of antivitrifying agent(A.V.A) on vitrification rate and multiple shoot formation in *R. glutinosa* for 4 weeks preculture on solid media.

A.V.A. (g/l)	Vitrification rate (%) †	No. of shoots (/explant)	No. of normal shoots (/explant)
control	10.24	* 4.68 ± 2.53 <sup>a</sup> ‡	4.28 ± 2.24 <sup>a</sup>
3	10.60	3.49 ± 2.19 <sup>b</sup>	3.12 ± 2.02 <sup>b</sup>
4	8.14	3.19 ± 2.05 <sup>bc</sup>	2.93 ± 2.03 <sup>bc</sup>
5	5.76	3.00 ± 1.86 <sup>bcd</sup>	2.83 ± 1.82 <sup>bc</sup>
6	6.38	2.32 ± 1.74 <sup>cd</sup>	2.17 ± 1.78 <sup>bc</sup>
7	6.43	2.22 ± 1.69 <sup>d</sup>	2.08 ± 1.09 <sup>c</sup>

†; vitrified shoots/total shoots×100(%)

\*; Each value represents the mean±S.D.,

‡; within columns, mean followed by the same letter are not significantly different at p=0.05 according to Duncan's multiple range test,

Control : MS medium supplemented with BA 2.0 mg/L and NAA 0.5 mg/L.

## 2) Thidiazuron의 영향

Cytokinin류의 일종으로 신초 생성에 효과가 인정된 thidiazuron(TDZ)을 지황의 전배양 단계에서 첨가하였을 때 신초 생성 효율에 미치는 영향을 살펴보았다. 전배양은 MS 기본배지에 BA 2.0mg/L와 NAA 0.5mg/L를 첨가한 것을 대조구로 하고, 이에 TDZ는 농도별로 첨가한 후 4주간 고체배지에서 배양하여 신초 발생 정도를 조사하였다(표 19). TDZ 1.0mg/L의 농도로 처리한 배지에서 가장 많은 신초가 발생하여 TDZ를 지황의 전배양에 이용할 경우 이 농도로 처리하는 것이 적합하다는 것을 알 수 있었다. TDZ 처리에 따라 신초 형성율은 증가하였으며, TDZ 1.0mg/L 농도 처리가 가장 효과적인 것으로 나타나 이후 전배양 단계에 TDZ 1.0 mg/L가 처리된 배지를 사용하였다.

Table 19. Effect of thidiazuron(TDZ) on multiple shoots formation in *R. glutinosa* after 4 weeks culture.

Hormone (mg/L)	No. of shoots /explant	No. of shoots /petridish
BA 2.0 + NAA 0.5	* 4.65 ± 2.36 <sup>bc</sup> †	42.10 ± 20.45 <sup>ab</sup>
TDZ 0.05	3.73 ± 1.47 <sup>c</sup>	33.57 ± 18.24 <sup>b</sup>
TDZ 0.1	5.64 ± 2.56 <sup>ab</sup>	50.78 ± 20.31 <sup>ab</sup>
TDZ 0.5	5.59 ± 2.65 <sup>ab</sup>	50.00 ± 15.49 <sup>ab</sup>
TDZ 1.0	6.06 ± 2.24 <sup>a</sup>	54.50 ± 8.09 <sup>a</sup>
TDZ 2.0	5.41 ± 2.13 <sup>ab</sup>	48.67 ± 15.56 <sup>ab</sup>

\*; Each value represents the mean±S.D.

†; within columns, means followed by the same letter are not significantly different at p=0.05 according to Duncan's multiple range test.

## 3) Anti-GA의 영향

앞서의 실험에서 A.V.A.는 투명화의 발생율은 감소하였으나 신초 형성율도 함께 감소하는 결과를 초래하였기 때문에 이의 처리 대신, 조직의 치밀성을 높

혀 투명화 억제 효과를 유도할 수 있는 anti-GA계열 성장조절제인 paclobutrazol과 flurprimidol의 영향을 살펴보고자 하였다. 지황의 전배양에서 신초의 투명화를 경감시키고 신초의 생육을 충실하게 하기 위한 방법의 하나로, 표 2에서와 같이 지황의 신초 형성에 효과적이었던 thidiazuron 1.0mg/L에 paclobutrazol 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/L와 flurprimidol 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 mg/L를 각 농도별로 처리하여 신초 생성과 투명화 발생을 조사한 결과는 표 20과 같다. Paclobutrazol과 flurprimidol의 처리 농도에 따라 투명화 억제의 효과를 나타내었다. 특히 paclobutrazol 0.3mg/L의 농도에서는 투명화 발생율이 1/2로 감소된 반면, 절편체당 생성되는 신초수의 감소율은 매우 적게 나타나 정상 개체수 확보에 효과적인 것으로 판단되었다. 이상의 결과는 전배양시 고체 배지에서 TDZ이 지황 절편체로부터의 신초 형성에 미치는 영향을 살펴본 것으로 TDZ 1.0mg/L와 paclobutrazol 0.3mg/L 처리시 투명화 경감과 신초형성에 효과적인 것으로 구명되었다.

그림 3은 paclobutrazol과 flurprimidol의 처리 농도에 따라 투명화 억제 효과를 보여주고 있다. 특히 paclobutrazol 0.3mg/L의 농도에서는 투명화 발생율이 반으로 감소된 반면, 절편체당 생성되는 신초의 감소율은 매우 적게 나타나 정상 개체의 확보에 효과적인 것으로 나타났다. 그림 4는 thidiazuron(TDZ) 1.0mg/L 단독처리 및 thidiazuron 1.0mg/L와 paclobutrazol(PAC) 0.3mg/L의 조합처리에 의해 발생한 신초를 비교한 것이다. Thidiazuron 단독처리의 경우 많은 수의 신초가 생성되었으나 신초의 색이 연하고 일부 투명화된 것을 관찰할 수 있었다. 반면에 thidiazuron과 paclobutrazol을 조합처리한 경우에는 신초가 진한 녹색을 나타내면서 생육이 건전함을 알 수 있었다.

이상의 결과, 고체 배지에서 지황의 줄기 절편을 이용해 신초 발생을 유도할 경우 thidiazuron 1.0mg/L와 paclobutrazol 0.3mg/L의 조합처리에 의해 신초 발생율의 증가와 투명화율의 감소 효과를 동시에 얻을 수 있음을 알 수 있었다. 또한 이로 인해 신초 발생의 다음 과정인 액체 배지를 이용한 신초의 신장 단계에서도 신초가 쉽게 투명화 되지 않아 정상적인 식물체로의 순화에 효과적이며, 최종적으로 정상 개체수의 확보에 유리한 것으로 판단되었다.

Table 20. Combinational effects of Thidiazuron(TDZ) with Paclobutrazol(PAC) and Flurprimidol(FLU) on inhibition of shoot vitrification in *R. glutinosa* after 4 weeks culture.

Anti-GA	Concentration (mg/L)	Number of shoots/explant	vitrification rate (%) †
Control		6.08 ± 2.36 <sup>a</sup>	8.96
Paclobutrazol	0.1	* 5.65 ± 2.98 <sup>ab</sup> †	8.95
	0.2	5.54 ± 1.93 <sup>ab</sup>	5.71
	0.3	5.21 ± 1.94 <sup>abc</sup>	4.55
	0.4	4.73 ± 1.96 <sup>bcd</sup>	10.14
	0.5	4.57 ± 1.82 <sup>bcd</sup>	10.27
Flurprimidol	0.1	3.98 ± 2.03 <sup>def</sup>	10.72
	0.5	4.09 ± 2.11 <sup>cdef</sup>	10.33
	1.0	3.48 ± 1.81 <sup>ef</sup>	10.12
	2.5	3.00 ± 1.79 <sup>t</sup>	5.32
	5.0	1.84 ± 1.09 <sup>g</sup>	5.52

\* ; Each value represents the mean ± S.D.

† ; within columns, means followed by the same letter are not significantly different at p=0.05 according to Duncan's multiple range test.

‡ ; vitrified shoots/total shoots × 100 %

Control ; MS medium supplemented with thidiazuron 1.0mg/L.

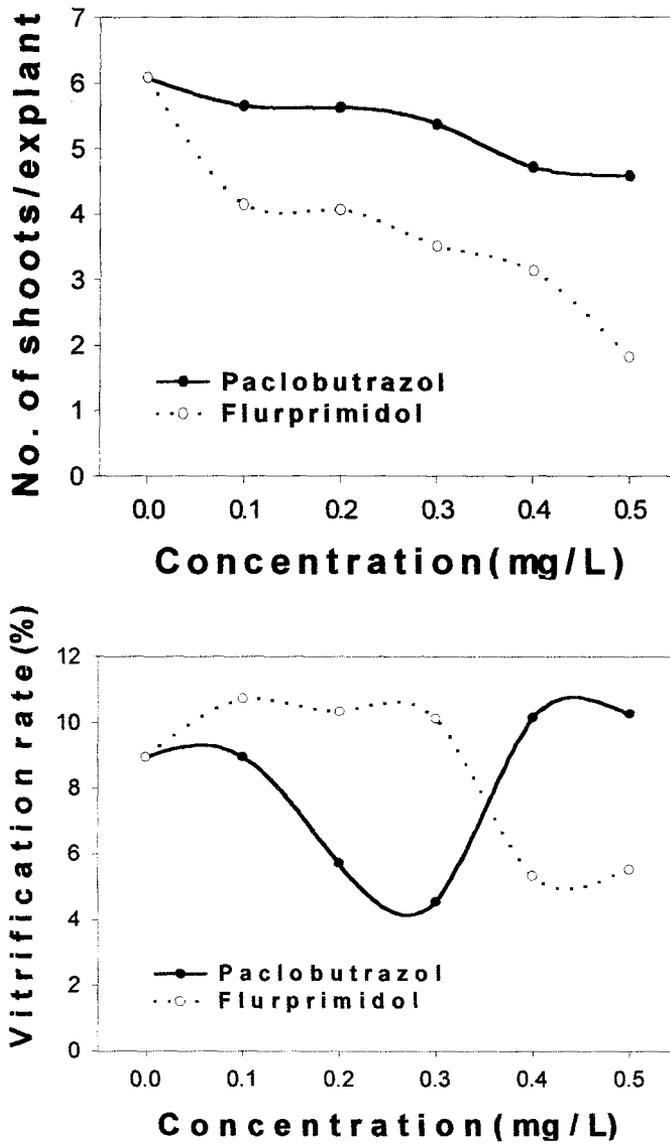
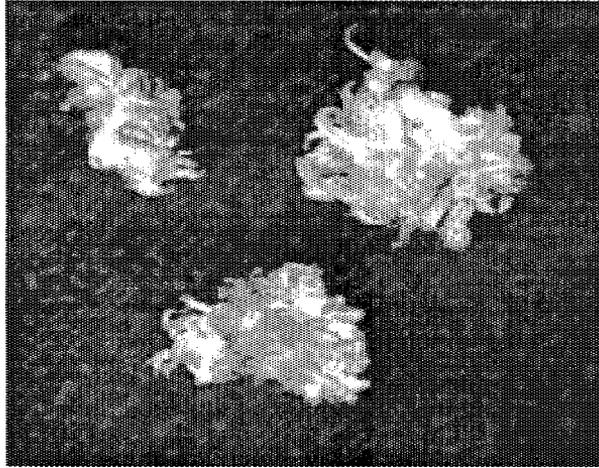


Figure 3. Effect of Thidiazuron combined with Paclobutrazol and Flurprimidol on inhibition of shoot vitrification in *R. glutinosa* after 4 weeks culture.



TDZ 1.0mg/L



TDZ 1.0mg/L+PAC 0.3mg/L

Figure 4. Effect of thidiazuron(TDZ) on inhibition of shoot vitrification in *R. glutinosa* after 4 weeks culture.

### 3. 생물반응기의 적정 배양밀도

지황 절편을 생물반응기에서 배양할 때 적절한 배양 밀도를 알아보기 위하여 앞에서 결정된 MS 기본배지에 BA 2.0 mg/l와 NAA 0.5 mg/l가 포함된 액체배지에서 2주간 전배양을 한 후 1.5L 배지에 재료가 각각 30g(절편 수 약 50개) 과 50g(절편 수 약 90개)이 되도록 배양밀도를 조절하여 stirrer type과 air-lift type bioreactor에서 3주간 배양한 결과는 표 21과 같다. Stirrer type에서는 배양밀도를 30g에서 50g으로 높였을 때 조직이 성장하면서 impellor에 상처를 입거나 조각이 나는 등의 이유로 발생된 신초의 수는 급격히 줄었다. Air-lift type에서는 배양밀도가 높아지더라도 큰 영향은 받지 않았지만, 50g 이상 밀도를 높였을 경우에는 조직이 커가면서 서로 심하게 뒤엉키게 되어 수확에 문제가 되었다. 따라서 적정 배양밀도는 50g 정도가 적절할 것으로 판단되었지만, 이 결과는 액체배지에서 배양된 시료를 사용했기 때문에 조직이 함유한 수분의 양을 무시할 수 없어 순수한 배양 시료의 무게라고 보기에는 어렵다. 따라서 시료의 무게보다는 배양되는 절편의 개수로 배양밀도를 결정하는 것이 효율적인 것으로 판단되어 이후 실험은 고체배지에서 전배양된 신초 90개를 이용하였다. 고체배지에서 유도시킨 신초에서 마디를 포함한 신초 90개 정도를 생물반응기에서 3주 동안 배양하면 발근, 순화용으로 사용할 500-600개 정도의 신초를 생산할 수 있다.

Table 21. Effect of culture density in bioreactor culture of *R. glutinosa* after 4 weeks.

Inoculum density (g)	Number of shoots	
	Stirrer	Air-lift
30	235	418
50	< 50	572

#### 4. pH와 aeration의 효과

MES [2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid]를 이용하여 배양기간 중 pH를 어느 정도 일정하게 유지할 수 있는 조건에서 배양하였을 경우와 기존의 방법인 배지 멸균 전에만 조정하여 배양하였을 경우를 비교하여 pH의 영향을 알아보고 이와 동시에, 주입되는 공기의 양을 각각 0.5 vvm과 1.0 vvm으로 조절해 주어 aeration의 영향을 알아보기 위한 실험 결과는 표 22와 같다. 배지 내에 MES를 처리했을 경우가 그렇지 않은 경우보다 더 높은 신초 발생율을 보여 pH가 지황의 신초 발생에 어느 정도 영향을 미치는 것으로 나타났다. 또한 주입되는 공기의 양은 1.0 vvm 보다는 0.5 vvm으로 조정하는 것이 효과적이었는데, 이는 공기의 양이 많아지면서 배양병 내에 많은 양의 거품이 생성되어 조직의 호흡이나 용기내 통기를 오히려 저해했기 때문으로 판단되었다.

Table 22. Effect of pH and aeration on shoot formation in bioreactor culture of *R. glutinosa*. after 3 weeks..

	No. of shoots
A †	321
B	245
C	460
D	298

†: A : without MES and 0.5 vvm, B : without MES and 1.0 vvm  
 C : with MES and 0.5 vvm, D : with MES and 1.0 vvm

#### 5. 생물반응기 내에서 체세포배 형성의 동조화

지황을 생물반응기에서 배양시 신초의 발생 및 생장을 일정하게 하여 수확 후 기내종묘의 균일성을 확보하기 위하여 배지에 ABA를 각각 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mg/l씩 배양 2주 후에 첨가하여 배양한 결과는 표 23과 같다. 0.1mg/l 이상의 농도에서는 동조화에 도움이 되기 보다는 신초 발생 자체를 저해하는

효과를 보여 적절하지 않은 것으로 보였고, 그 이하의 농도에서도 발생 수가 적어 동조화를 기대하기는 힘들었다. 한편 액체배지가 아닌 고체배지에서 유도된 재료들은 앞의 그림 2에서 보이듯 발생단계의 균일성을 보였고 생물반응기에서 배양한 후 수확된 싹들도 거의 일정한 크기와 생육을 보여 이 부분은 크게 고려하지 않아도 될 부분으로 판단되었다.

Table 23. Effect of abscisic acid(ABA) on synchronization of shoot formation in *R. glutinosa* after 5 weeks.

ABA (mg/l)	Synchronization
0.01	+
0.05	+
0.1	-
0.5	-
1.0	-

++ : good, + : fair, - : poor

#### 6. 싹의 투명화(vitrification) 경감

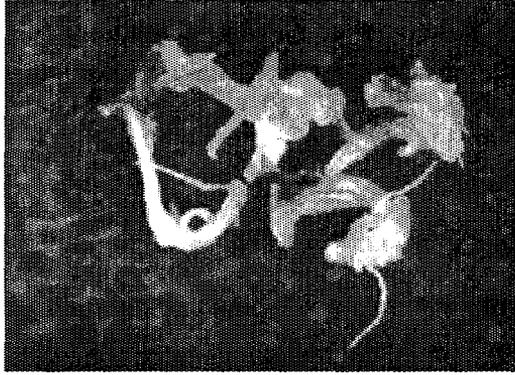
지황의 액체배양에서 가장 문제시되는 투명화를 억제하기 위해 antivitrifying agent(Sigma, #A0807))를 농도별로 처리하여 그 효과를 살펴본 실험결과는 표 24와 같다. 표에서 보면 대체적으로 antivitrifying agent를 처리하여 배양하였을 경우, 수분을 다량 함유하여 발생한 싹의 수에 비해 생체중이 지나치게 높게 나타난 대조구와는 달리 생체중이 낮으면서도 싹의 수는 더 많았고, 그 형태에 있어서도 건전한 생육을 나타내어 antivitrifying agent의 효과가 인정되었다 (Fig. 5). 특히 5g/l의 농도로 처리하였을 경우 대조구보다 싹의 수는 월등히 많이 발생하면서 생체중도 낮게 나타나 이 농도 처리가 적절할 것으로 생각되었다.

Table 24. Effect of anti-vitrifying agent on shoots formation in *R. glutinosa* after 4 weeks culture.

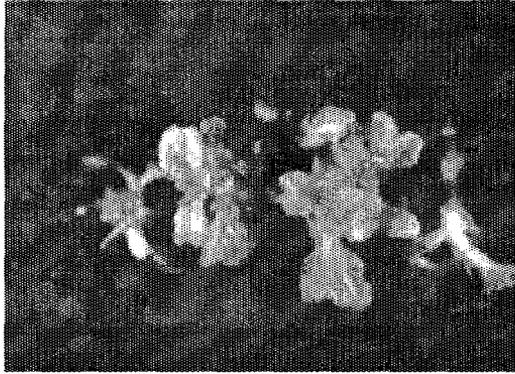
Conc. (mg/l)	Mean no. of shoots / flask ( $\pm$ S.E)	Fresh weight (g $\pm$ S.E)
Control	22.0 $\pm$ 2.4	10.32 $\pm$ 0.44
3	8.0 $\pm$ 1.6	1.05 $\pm$ 0.18
4	9.0 $\pm$ 2.5	1.20 $\pm$ 0.14
5	39.3 $\pm$ 1.7	5.45 $\pm$ 0.33
6	31.3 $\pm$ 7.2	3.28 $\pm$ 0.61
7	31.8 $\pm$ 4.9	3.30 $\pm$ 0.54

Control : MS medium supplemented with BA 2.0 mg/l and NAA 0.5 mg/l

S.E : standard error



A



B

Fig. 5. Comparison of control(A) and 5g/l A.V.A. treatment(B) in liquid culture of *R. glutinosa*.

## 제7절 생물반응기에서 신초의 신장 (마디수 증가와 절간신장)

Thidiazuron 1.0mg/L가 처리된 고체배지에서 발생한 신초를 액체배지와 생물반응기를 이용하여 추가적으로 신초를 발생시키는 동시에 신초의 마디수를 증가시키고 또한 절간신장을 시키고자 하였다. 생물반응기를 이용해 신초를 발생 및 신장시키기에 앞서, thidiazuron 단독처리와 thidiazuron 및 paclobutrazol의 조합처리 하에서 유도된 신초를 이용하여 신초의 신장에 적합한 성장조절제의 종류와 농도를 조사하고 신초 유도에 사용되었던 paclobutrazol이 신초의 신장에 미치는 영향을 알아보기 위해 100ml 삼각 플라스크를 이용하여 실험하였다. 여기에 신초의 신장을 유도하기 위한 성장조절제로써 thidiazuron보다 활성이 낮은 BA와 NAA를 조합처리한 경우와 thidiazuron을 단독처리한 경우로 나누어 실험을 수행하였다.

그 결과 thidiazuron 1.0mg/L에서 증식에 가장 중요한 마디수와 신초의 수가 가장 많이 발생하였다(표 4). 신초 유도 시 paclobutrazol을 조합처리한 경우에는 발생된 마디수가 적었는데 이는 paclobutrazol의 성장억제 작용에 의한 것으로 생각되었다. 또한 그림 2에서 BA와 NAA의 조합처리 농도 중 가장 효과적이었던 BA 2mg/L와 NAA 0.5mg/L의 조합처리구에서는 생체중이 가볍고 발생된 신초의 수가 가장 적었다. 신초 유도시 사용되었던 성장조절제에 따라서는 현저한 차이를 나타내지 않았다. 그림 6는 표 25의 결과 신초의 신장에 가장 효과가 있었던 thidiazuron 1.0mg/L 처리구로써 신초의 유도시 paclobutrazol을 조합처리하였을 경우(오른쪽 그림) thidiazuron 단독처리(왼쪽 사진)에 비해 초장이 현저히 작게 나타났으며 발생된 마디의 수가 적었다. 따라서 지황 신초의 발생을 유도하기 위한 고체 배지와 신초의 신장을 위한 액체 배지에는 성장조절제로써 thidiazuron 1.0mg/L만을 처리하는 것이 효과적임을 알 수 있었다.

Table 25. Effect of Thidiazuron(TDZ) on shoot elongation in *R. glutinosa* after 3 weeks culture.

Shoot induction hormone (mg/L)	Shoot elongation hormone (mg/L)	Fresh weight (g/shoot)	Fresh weight (g/flask)	No. of nodes /shoot	No. of shoots
TDZ 1.0	Control	†0.72±0.35 <sup>det</sup> ‡	11.42±2.25 <sup>d</sup>	4.92±2.11 <sup>et</sup>	16.50±4.51 <sup>et</sup>
	TDZ 0.05	0.81±0.49 <sup>cde</sup>	13.63±4.09 <sup>cd</sup>	4.93±2.38 <sup>et</sup>	18.29±6.82 <sup>det</sup>
	0.1	0.90±0.68 <sup>bcd</sup>	16.41±3.35 <sup>bc</sup>	6.25±2.94 <sup>bc</sup>	27.13±7.43 <sup>bc</sup>
	0.5	1.04±0.71 <sup>ab</sup>	20.17±5.52 <sup>ab</sup>	6.57±2.55 <sup>b</sup>	29.86±6.23 <sup>b</sup>
	1.0	1.12±0.45 <sup>a</sup>	21.23±2.61 <sup>a</sup>	7.68±2.10 <sup>a</sup>	41.25±6.82 <sup>a</sup>
	2.0	0.92±0.38 <sup>abcd</sup>	18.92±4.47 <sup>ab</sup>	5.90±1.76 <sup>bcd</sup>	23.50±3.94 <sup>bcde</sup>
	BA 2 + NAA 0.5	0.65±0.50 <sup>ef</sup>	8.94±3.90 <sup>d</sup>	4.80±2.77 <sup>et</sup>	13.67±5.02 <sup>f</sup>
TDZ 1.0 + PAC 0.3	Control	0.56±0.30 <sup>f</sup>	9.58±0.84 <sup>d</sup>	4.85±2.12 <sup>det</sup>	15.33±5.20 <sup>f</sup>
	TDZ 0.05	0.79±0.66 <sup>cde</sup>	13.15±4.65 <sup>cd</sup>	4.64±1.75 <sup>f</sup>	15.50±5.69 <sup>f</sup>
	0.1	0.87±0.47 <sup>bcd</sup>	16.00±3.46 <sup>bc</sup>	6.04±1.71 <sup>bc</sup>	25.20±8.11 <sup>bcd</sup>
	0.5	1.00±0.49 <sup>abc</sup>	20.29±4.03 <sup>ab</sup>	6.26±1.72 <sup>bc</sup>	27.57±6.27 <sup>bc</sup>
	1.0	1.06±0.43 <sup>ab</sup>	20.49±1.90 <sup>ab</sup>	6.33±1.71 <sup>bc</sup>	29.38±9.17 <sup>b</sup>
	2.0	0.87±0.46 <sup>bcd</sup>	18.75±5.44 <sup>ab</sup>	5.98±1.61 <sup>b</sup>	21.00±4.97 <sup>bcde</sup>
	BA 2 + NAA 0.5	0.76±0.48 <sup>de</sup>	10.16±3.56 <sup>d</sup>	5.59±2.41 <sup>cde</sup>	15.25±4.10 <sup>f</sup>

Control ; No hormone treatment during the stage of shoot elongation.

†; Each value represents the mean±S.D.

‡; Within columns, means followed by the same letters are not significantly different at p=0.01 according to Duncan's multiple range test.

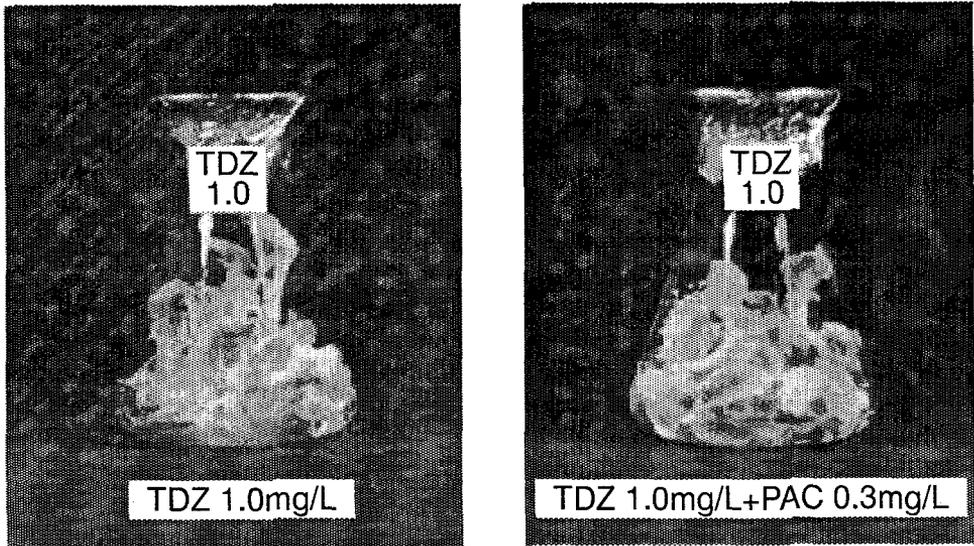


Figure 6. Effect of Thidiazuron(TDZ) and Paclobutrazol(PAC) on shoot elongation in *R. glutinosa*.

## 제 8절 생물반응기에서 수확한 신초의 기내 발근과 순화

### 1. 신초의 발근에 미치는 배지와 아가 농도

생물반응기 배양 후 수확된 신초를 재배하기 위해서는 발근 과정이 필수적이다. 발근 과정 없이 이식하여 생장을 살펴보았을 때 생존률은 급격히 떨어졌고 생장도 발근 과정을 거친 식물체에 비해 지연되었다 (그림 7). 따라서 생물반응기에서 배양 중 발근을 유도하여 이용하려는 실험을 수행하였으나 발근이 되기까지 너무 오랜 기간(6주 이상)이 소요되었고 이 과정에서 투명화가 심하게 이루어져 일단 3주간 배양 후 수확하여 이들에게서 발근을 유도할 수 있는 조건

을 구명하고자 하였다. 지황 신초의 순화용 배지는 신초의 발생과 신장에 이용하였던 배지보다 농도를 낮게 하여 서서히 자가영양형으로 바뀌주고자 MS 배지 농도를 낮추었고, 투명화를 회복시키는 동시에 발근을 향상을 위해 아가 농도를 높여주었다. MS 배지와 아가 농도의 조합처리에 따른 신초 생존율과 발근율을 조사한 결과는 표 26과 같다. MS 배지의 농도가 높을수록, 아가의 농도가 낮을수록 생존율이 높게 나타나는 반면, 발근율에 있어서는 MS 배지의 농도가 낮을수록, 아가 농도가 높을수록 효과적이었다. 배지의 농도가 낮을수록 생존율이 감소하여 증식에는 다소 불리하였으나, 이들을 기외로 이식하였을 경우에는 기존의 농도로 처리한 배지에서 순화한 것들보다 자가영양형으로 바뀌는 기간이 단축되어 더욱 높은 생존율을 얻을 수 있으므로 최종 수확 개체수는 증가하게 될 것이다. 한편 순화시 배지 내 아가의 농도를 높여 주었을 경우에는, 생물반응기를 이용해 액체 배양하는 전단계에서 발생한 신초의 투명화를 극복하는 데 유리하였다. 따라서 MS 배지의 농도가 너무 낮아 생존율이 지나치게 감소되는 1/4배 농도의 배지보다 1/2배 농도의 배지를 이용하고, 아가의 농도를 높이면 발근에는 효과적이지만 이것 또한 생존율을 감소시키게 되므로 아가는 기존 0.8% 농도보다 1.5배 증가시킨 1.2%로 처리하는 것이 지황의 발근과 순화를 동시에 향상시킬 수 있을 것으로 생각되었다. 표 26과 27을 비교해보면, 상토에서 발근을 유도하는 것보다는 MS 배지에서 유도하는 것이 생존율이나 발근 유도에 있어 더 유리한 것으로 나타났다.

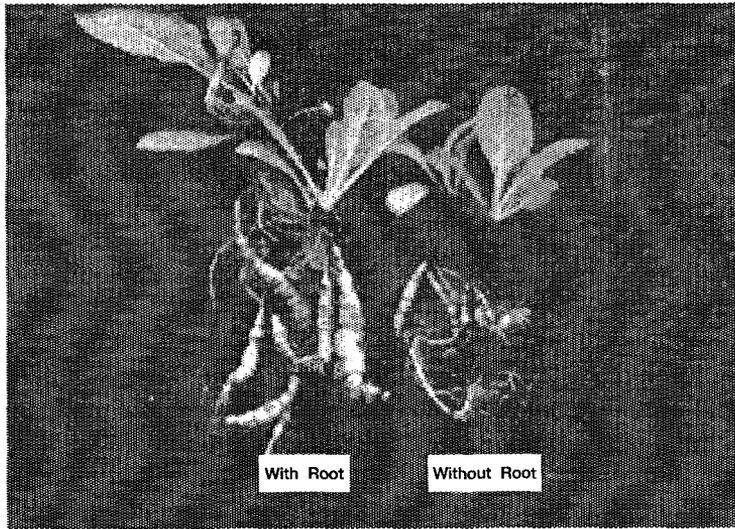


Fig. 7. Comparison of root development between the plants transplanted after rooting(left) and without rooting(right).

Table 26. Effects of agar concentration and MS medium strength on rooting from shoots of *R. glutinosa* harvested after 3 weeks culture in bioreactor.

MS salt strength	Agar (%)	Survival rate(%)*				Rooting rate(%)**			
		0.8	1.2	1.6	mean †	0.8	1.2	1.6	mean
1/4 X		78	66	60	72.7 <sup>b †</sup>	89.7	93.9	96.7	92.5 <sup>a</sup>
1/2X		94	94	68	85.3 <sup>ab</sup>	76.6	91.9	94.1	88.2 <sup>ab</sup>
1 X		100	96	90	90.7 <sup>a</sup>	76.0	79.2	86.7	80.8 <sup>b</sup>
mean		95.3 <sup>a</sup>	85.3 <sup>a</sup>	68.0 <sup>b</sup>		80.6 <sup>b</sup>	87.4 <sup>ab</sup>	93.5 <sup>a</sup>	

\*: survival shoots/total shoots×100 (%)

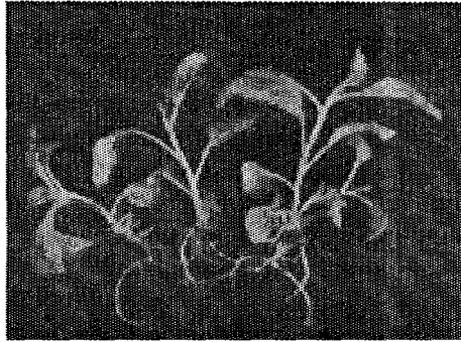
\* \*: rooted shoots/survival shoots×100 (%)

†; within columns, means followed by the same letter are not significantly different at p=0.05 according to Duncan's multiple rage test.

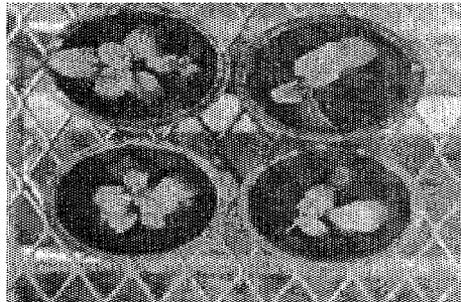
Table 27. Survival and rooting of the shoots harvested after 3 weeks in bioreactor culture on vermiculite and baroker mixed soil bed.

	Survival rate (%)	Rooting rate (%)
MS 액체배지 1 X	20	10
1/2 X	40	10
1/4 X	60	50

그림 8은 air-lift type bioreactor에서 수확한 신초를 기내에서 발근을 유도한 후 온실에서 2주간 순화시킨 식물체의 사진들로 정상적으로 성장하고 있음을 볼 수 있다.



A



B



C

Fig. 8. Root formation(A) of the shoots cultured in bioreactor, acclimating on pot(B) and their roots(C)

## 2. Paclobutrazol이 신초의 발근 및 순화에 미치는 영향

생물반응기에서 배양된 지황의 신초를 기내 순화할 때 도장을 억제하고 뿌리의 발달을 향상시키기 위해 anti-GA계열 생장조절제인 paclobutrazol, flurprimidol, chlorocholine chloride를 각 농도별로 처리하여 그 효과를 살펴본 결과는 표 28과 같다. Paclobutrazol의 처리구는 지나친 생육억제 효과를 나타내지 않으면서도 생체중은 증가하여 식물체의 조직이 치밀해졌음을 알 수 있었고, 특히 0.3~0.4mg/L 처리구에서는 뿌리가 다른 처리구에 비해 잘 발달되어 순화는 물론이고 순화의 다음 단계인 토양 활착에 유리하리라 판단되었다. 반면, flurprimidol 처리의 경우에는 저농도에서도 생육이 과도하게 억제되었으며 뿌리의 발달도 가장 저조하였고 생체중이 가벼워 식물체의 생육이 건실하지 않았다. 그리고 chlorocholine chloride의 경우에는 초장과 엽수 등에서 대조구와 차이가 없었다.

그림 9는 순화에 효과적이었던 paclobutrazol 0.4mg/L가 처리된 배지에서 생육 중인 식물체이다. 대조구에 비해 잎의 크기가 크고 짙은 녹색을 띠며 뿌리의 발달이 양호한 것을 볼 수 있다. 따라서 이상의 결과에 의해 3%의 sucrose와 1.2%의 아가가 포함된 1/2배 MS배지에 paclobutrazol 0.4mg/L를 처리하여 생물반응기에서 수확한 신초의 순화배지로 이용하는 것이 효과적임을 알 수 있었다.

## 3. 기내발근 및 순화시 aeration의 효과

생물반응기에서 수확한 신초의 순화 및 발근 유도시 aeration이 어떠한 영향을 미치는지 살펴보고자 0.2 $\mu$ m polypropylene membrane filter가 부착된 Magenta GA-7 vessel(Sigma)을 이용하여 aeration이 되는 조건에서 순화시킨 것과 필터가 부착되지 않은 일반 Magenta GA-7 vessel을 이용하여 완전히 밀폐된 조건에서 순화시킨 것을 비교하였다. 1/2로 희석된 MS 배지에 paclobutrazol 0.4mg/L를 첨가한 순화배지에 생물반응기에서 수확된 신초를 4주간 배양 후 생육조사 하였다. Membrane filter가 부착된 마젠타에서 순화된 신초들의 생육이 필터가 부착되지 않은 것에서 순화된 것에 비해 건전한 생육을 보여, 초장은 물론 엽수나 근장 등 모든 항목에서 대조구보다 우수하였다(표

29). 따라서 생물반응기에서 수확된 지황의 싹초를 순화할 경우에는 membrane filter가 부착된 Magenta를 이용하는 것이 효과적인 것으로 판단되었다.

Table 28. Effect of anti-GAs on *in vitro* acclimatization of *R. glutinosa* shoots harvested after 3 weeks culture in bioreactor.

Anti-GA	Conc. (mg/L)	Plant height (cm) *	Number of leaf	Root length (cm)	Fresh weight (g)
Paclobutrazol	0	8.67±1.67 <sup>a†</sup>	8.20±1.82 <sup>bc</sup>	3.71±1.77 <sup>def</sup>	0.36±0.12 <sup>g</sup>
	0.1	8.62±2.03 <sup>a</sup>	9.10±2.47 <sup>ab</sup>	3.86±1.87 <sup>cdef</sup>	0.66±0.21 <sup>e</sup>
	0.2	8.50±2.08 <sup>a</sup>	8.90±2.17 <sup>ab</sup>	4.28±1.81 <sup>cde</sup>	0.89±0.28 <sup>c</sup>
	0.3	8.27±1.48 <sup>a</sup>	9.20±2.04 <sup>ab</sup>	5.76±1.98 <sup>ab</sup>	1.31±0.29 <sup>b</sup>
	0.4	8.12±2.13 <sup>a</sup>	9.85±2.46 <sup>a</sup>	6.29±1.51 <sup>a</sup>	1.42±0.23 <sup>a</sup>
	0.5	6.72±1.63 <sup>b</sup>	7.45±1.47 <sup>c</sup>	4.41±1.62 <sup>cd</sup>	1.29±0.19 <sup>b</sup>
Flurprimidol	0	8.67±1.67 <sup>a</sup>	8.20±1.82 <sup>bc</sup>	3.71±1.77 <sup>def</sup>	0.36±0.12 <sup>g</sup>
	0.1	5.62±1.28 <sup>cd</sup>	5.25±1.41 <sup>de</sup>	3.31±1.40 <sup>efg</sup>	0.28±0.12 <sup>g</sup>
	0.2	6.21±0.87 <sup>bc</sup>	5.65±1.14 <sup>d</sup>	3.19±1.25 <sup>fgh</sup>	0.35±0.11 <sup>g</sup>
	0.3	4.83±1.09 <sup>de</sup>	4.60±0.99 <sup>def</sup>	2.33±1.20 <sup>gh</sup>	0.32±0.12 <sup>g</sup>
	0.4	4.16±0.55 <sup>ef</sup>	4.25±0.72 <sup>ef</sup>	2.47±1.12 <sup>gh</sup>	0.31±0.10 <sup>g</sup>
	0.5	3.44±0.57 <sup>f</sup>	3.60±0.75 <sup>f</sup>	2.18±0.98 <sup>h</sup>	0.30±0.06 <sup>g</sup>
Chlorocholine chloride	0	8.67±1.67 <sup>a</sup>	8.20±1.82 <sup>bc</sup>	3.71±1.77 <sup>def</sup>	0.36±0.12 <sup>g</sup>
	0.1	9.06±1.43 <sup>a</sup>	8.65±1.35 <sup>b</sup>	3.81±1.09 <sup>cdef</sup>	0.49±0.11 <sup>f</sup>
	0.5	8.60±0.98 <sup>a</sup>	8.30±1.17 <sup>bc</sup>	4.59±1.48 <sup>cd</sup>	0.71±0.19 <sup>de</sup>
	1.0	8.72±1.23 <sup>a</sup>	8.35±1.31 <sup>bc</sup>	4.71±1.33 <sup>cd</sup>	0.76±0.18 <sup>de</sup>
	2.5	8.76±1.24 <sup>a</sup>	8.50±1.28 <sup>bc</sup>	4.88±1.84 <sup>bc</sup>	0.79±0.20 <sup>cd</sup>
	5.0	8.87±1.81 <sup>a</sup>	8.45±1.73 <sup>bc</sup>	4.81±1.63 <sup>bcd</sup>	0.81±0.17 <sup>cd</sup>

†; within columns, means followed by the same letter are not significantly different at p=0.05 according to Duncan's multiple range test.

\*; Each value represents the mean±S.D.

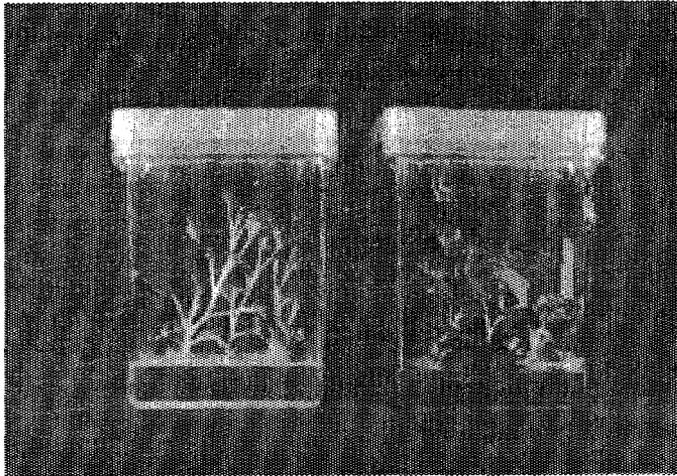


Fig. 9. Effect of paclobutrazol on in vitro acclimating of the shoots harvested from 3 weeks in bioreactor culture. Left: control, Right: paclobutrazol 0.4mg/l

Table 29. Effect of vessel with 0.2 $\mu$ m membrane filter on shoots growth of *R. glutinosa* harvested after 3 weeks culture in bioreactor.

Vessel type	Plant height (cm)	No. of leaf	Fresh weight (g)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Root length (cm)
without Membrane filter	7.4 $\pm$ 1.6 *	7.7 $\pm$ 1.8	1.0 $\pm$ 0.6	3.21 $\pm$ 0.79	1.67 $\pm$ 0.29	3.84 $\pm$ 1.09
with Membrane filter	8.2 $\pm$ 1.0	10.1 $\pm$ 1.7	1.3 $\pm$ 0.4	4.85 $\pm$ 0.71	2.72 $\pm$ 0.48	5.64 $\pm$ 1.11
LSD <sub>0.05</sub>	0.7	0.9	0.3	0.4	0.2	0.6

\* ; Each value represents the mean $\pm$ S.D.

Membrane filter가 부착된 마젠타에서 순화된 싌초들의 생육은 우수하였으나 유묘 생산 과정에서 중요한 것은 기내 식물체를 기외의 환경에서 활착시킬 때 유묘의 생존율이므로 이에 대해 살펴보고자 하였다. Membrane filter가 부착된 마젠타와 필터가 부착되지 않은 일반 마젠타에서 순화시켜 수확한 유식물체를 Sun 1 상토가 담긴 50구 plug 묘판과 한국원예시험장 표준 양액을 이용하여 2주간 재배한 후 생존율, 초장, 엽수 조사하였다(Table 30). Membrane filter가 부착된 마젠타에서 순화된 싌초가 필터가 부착되지 않은 마젠타에서 자란 싌초보다 plug 묘판에서의 생육은 물론 생존율도 훨씬 높아 우수한 유묘의 생산이 가능하였다. 이는 필터를 통해 가스가 이동할 수 있으므로 이로 인해 마젠타 배양병 내의 습도를 낮춤으로써 잎에서의 과도한 증산을 완화시켜 결국 기외의 환경에서도 수분부족으로 위조하지 않게 된 것으로 생각되었다(Table 30).

Table 30. The growth and survival rate of shoots on plug tray after transplanting of the four week-cultured young plantlet in vessel with 0.2 $\mu$ m membrane filter in *R. glutinosa*.

Magenta type	Survival rate (%)	Plant height (cm)	No. of leaf
with membrane filter	96	9.81 $\pm$ 2.39 $\dagger$	9.47 $\pm$ 1.80
without membrane filter	78	8.49 $\pm$ 2.11	7.50 $\pm$ 1.55
LSD <sub>0.05</sub>	-	1.20 *	0.88 * *

$\dagger$ ; Each value represents the mean $\pm$ S.D.

\*, \* \*; Significant at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.

## 제 9절 기내 순화묘의 포장재배

### 1. Plug 묘를 이용한 순화시킨 신초의 활착 및 유묘 생산

기내에서 순화과정을 거친 지황의 신초를 이용하여 유묘를 생산하는 데 적절한 상토조성과 양액 조건을 살펴보고자 하였다. 상토의 종류로는 Sun 1 상토(Sun Gro Co., Canada), 비접목묘용 바로커 상토 및 훈탄을 단용 또는 혼합하여 처리하였다. 여기에 한국원예시험장 표준양액, Hoagland solution, Hyponex 및 sucrose를 제외한 1/4 농도의 MS 기본배지를 조합처리 하였다. 50구 plug 묘판에 이식 후, 온실조건에서 2주간 재배한 후 생육조사를 한 결과는 표 31와 같다. Sun 1 상토를 단용 처리한 경우 유묘 생존율과 생육이 월등히 우수하였다. 훈탄을 단용 또는 상토와 혼용하였을 경우에는 묘가 거의 생존하지 못했을 뿐만 아니라 생육 또한 저조하였다. 생존율이 떨어지는 경우는 대부분 고사하는 경향을 보임에 따라, 기외 환경에서 수분흡수가 원활히 진행되지 않았던 것으로 추정되었다. 주로 peatmoss와 perlite로 이루어진 Sun 1 상토의 경우 보수력이 좋아 습도에 민감한 신초의 생육에 좋은 영향을 주었을 것으로 추정되었다. 상대적으로 보수력이 떨어지는 바로커 상토와 훈탄의 경우에는 신초의 고사가 증가함에 따라, 상토에 따른 관수량이나 회수를 조절하여야 할 것이다. 또한 배양액의 경우 1/4X 농도의 MS 배지와 Hyponex보다는 한국원예시험장 표준액과 Hoagland solution이 유묘의 생존율과 생육에 유리했다. 따라서 조직배양된 지황의 신초를 이용하여 유묘를 생산할 경우에는 보수력이 좋은 상토에 한국원예시험장 표준액이나 Hoagland solution을 사용하는 것이 적절할 것으로 판단되었다.

Table 31. The effect of bed soil and nutrient solution on growth of young plantlet of *R. glutinosa* in plug tray.

Media †	Survival rate(%) *					Plant height(cm)					Number of Leaf				
	A	B	C	D	mean	A	B	C	D	mean	A	B	C	D	mean
Sun I	96	96	92	92	94 <sup>a</sup>	9.70	9.50	8.54	8.38	9.04 <sup>a</sup>	8.54	8.37	7.30	7.30	7.89 <sup>a</sup>
						±	±	±	±		±	±	±	±	
Baroker	76	72	14	10	43 <sup>b</sup>	2.69	2.66	2.53	2.93	6.02 <sup>b</sup>	1.96	1.95	2.20	2.14	7.02 <sup>a</sup>
						±	±	±	±		±	±	±	±	
Carbonized chaff	8	8	0	0	8 <sup>b</sup>	6.09	6.29	5.96	5.51	5.38 <sup>b</sup>	7.63	7.11	6.78	6.00	5.25 <sup>b</sup>
						±	±	-	-		±	±	-	-	
Sun I + Carbonized chaff	40	44	12	8	26 <sup>b</sup>	1.14	1.23	1.23	0.99	5.39 <sup>b</sup>	2.13	2.39	1.17	2.16	5.08 <sup>b</sup>
						±	±	-	-		±	±	-	-	
Baroker + Carbonized chaff	8	12	8	8	9 <sup>b</sup>	5.45	5.30			4.26 <sup>b</sup>	5.50	5.00			5.33 <sup>b</sup>
						±	±				±	±			
mean	45.6	46.4	31.5	29.5		5.46	5.50	5.80	3.85		4.90	5.09	5.33	5.50	
						±	±	±	±		±	±	±	±	
						0.96	0.94	0.81	0.35		1.19	1.44	1.52	0.70	
						4.55	6.50	4.45	4.50		6.50	6.33	4.50	3.50	
						±	±	±	±		±	±	±	±	
						1.20	0.70	1.20	2.68		0.71	2.01	0.71	0.70	
						7.42	7.31	7.29	7.15		7.42	7.14	6.86	6.65	
						a	a	a	a		a	a	a	a	

†; A: Korea Horticultural Experimental Station's standard solution,

B: Hoagland solution,

C: 1/4X MS basal medium without sucrose, D: Hyponex,

\*; survival plantlet/total plantlet×100 (%).

Each value represents the mean ± S.D(Standard deviation).

## 2. 포장재배

고체배지에서 유도된 지황의 신초를 생물반응기를 이용해 신장시킨 후 기내 순화된 유식물체를 plug 묘판에 활착시킴으로써 완성된 조직 배양묘를 이용하여 포장에 재배하였다.

#### 가. 이식시기에 따른 순화 묘의 생장 변화

기내에서 신초의 유도과 신장 및 순화 과정을 거친 지황 조직 배양묘를 plug 묘판에 심은 후 활착시켰다. 이러한 plug묘를 5월 2일, 5월 22일, 6월 12일 3회에 걸쳐 포장에 이식한 후 1개월 간격으로, 그리고 3회의 수확일(10월 15일, 10월 25일, 11월 5일)마다 생육을 조사하였다(그림 10).

지황은 전반적으로 7, 8월에 가장 왕성한 생육을 하다가 점점 하위엽부터 고사해감에 따라 생육이 감소되는 경향을 나타내었다. 초기의 생육에서 5월 2일 이식과 5월 22일 이식간에 거의 차이가 없었으나 생육이 가장 좋았던 7월과 8월에는 5월 22일에 이식한 것이 가장 우수한 생육양상을 나타내었다. 6월 12일 이식한 것은 초기 생육면에서 다른 시기에 이식한 것보다 많이 저조하였으나 생육 후기인 수확기에는 가장 좋은 생육을 나타내었다.

#### 나. 이식시기와 수확시기에 따른 뿌리의 특성

그림 11은 이식시기와 수확시기를 달리했을 때 뿌리의 특성을 조사한 것이다. 초기 생육이 좋았던 5월 12일에 이식하고 10월 25일에 수확한 것이 뿌리의 생체중, 근장, 건물중에서 현저하게 높은 수치를 보여주고 있다. 이로써 지황 뿌리의 생육에는 초기의 생육이 중요하다는 것을 알 수 있었으며 지황의 뿌리는 10월 중순에서 하순 사이에 많이 비대해지기 때문에 10월 25일경에 수확하는 것이 효과적임을 알 수 있었다. 그러나 보다 중요한 것은 종근으로 재배하는 것이상으로 기내육성 종묘로부터 충분한 수량을 확보할 수 있었다는 것이다. 그림 12는 지황의 기내증식에서부터 순화과정을 거쳐 포장에서 재배한 후 수확에 이르기까지의 과정을 나타낸 것이다. A는 지황의 줄기절편으로부터 유도된 신초(multiple shoot), B는 생물반응기를 이용한 신초의 신장 과정, C는 신초의 발근과 순화 과정, D는 조직배양묘의 활착 과정, E는 포장에서 생육 중인 지황, F는 수확한 직후의 모습이다.

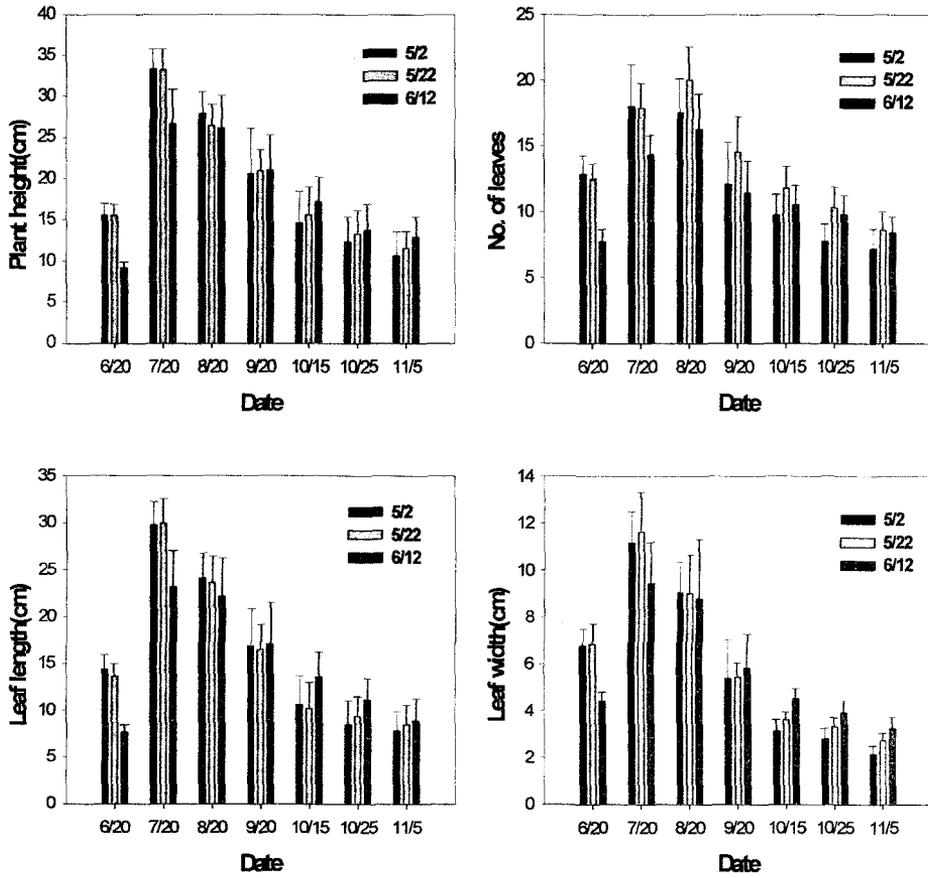


Figure 10. Changes of growth characteristics in *R. glutinosa* according to transplanting date.

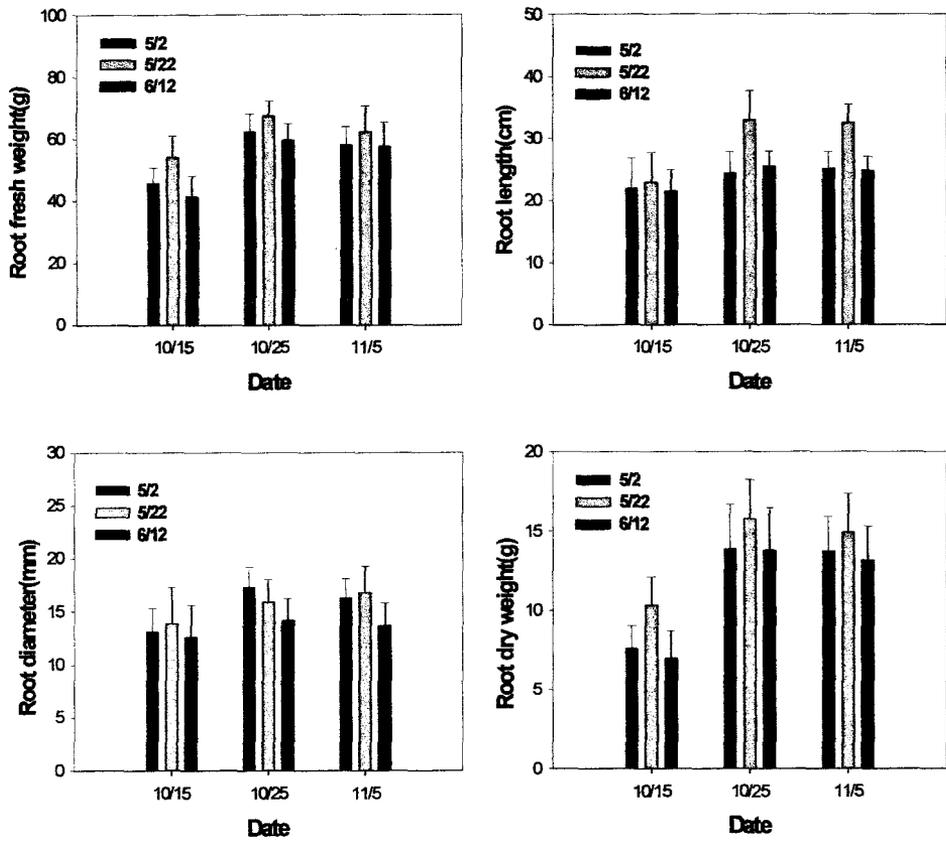


Figure 11. Effect of transplanting and harvesting date on root characteristics in *R. glutinosa*.

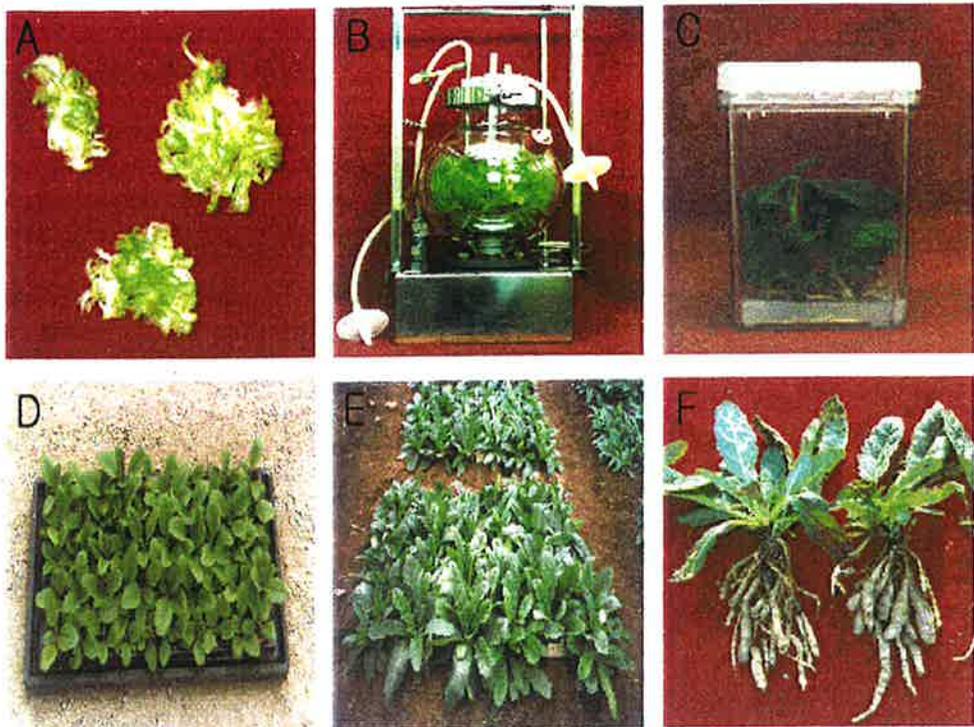


Fig. 12. Outline of plantlets production via bioreactor culture in *R. glutinosa*.

- A : Multiple shoots from stem segments,
- B : Shoot development and elongation in bioreactor,
- C : Shoots acclimatization and rooting,
- D : Plug seedlings on plug tray,
- E : Transplanted plug seedlings in the field,
- F : Roots of harvested plants grown in the field.

## 제 3장 생물반응기를 이용한 현삼 종묘 생산

### 제 1절 서 설

현삼은 종자로 번식이 가능하나 종자를 이용하는 실생번식의 경우 1년간의 육묘 기간이 필요하며, 당년에는 뿌리가 작아 수량이 저하된다. 그러므로 이를 극복하기 위한 한 방법으로 생물반응기 내에서 식물체 조직을 직접 배양하여 신초를 발생시키고, 이를 기내에서 발근과 순화과정을 거친 다음 plug 묘판을서 plug 묘를 만들어 경화처리 한 다음 포장에 이식 재배하는 방법을 구명하고자 하였다. 아직 현삼에서 생물반응기를 이용하여 종묘를 대량생산하는 기술에 대한 연구가 전무한 상태이므로 이에 대한 조건 확립이 필요하다.

### 제2절 무균식물체 양성 및 종묘 생산용 재료의 유지와 보존

#### 1. 종자소독과 발아

현삼 종자를 0.25% sodium hypochlorite 용액에 15분간 표면살균한 후 멸균수로 4-5회 세척하여 MS 기본배지(3% sucrose, 0.8% agar)에서 발아시켰다. 발아한 유육식물은 1개월마다 교체 MS 배지에서 무균적으로 증식시켜 실험재료로 이용하였다.

#### 2. 측아 형성 적정 배지와 무균 식물체 유지

현삼에서 직접체세포배 및 신초 형성 조건을 연구하기 위한 재료 확보를 위하여 종자를 발아시킨 후 기내에서 무균 식물체로 보존할 때 측아를 발생시켜 많은 양의 재료를 빠른 시일 내에 확보할 수 있는 배지 조건을 찾고자 MS, B5, White 배지에 마디(측아)를 포함한 줄기조직을 치상하여 3주간 배양한 결과는 표 1에서 보는 바와 같이 MS배지에서 신초의 생장이 가장 양호하였다.

MS배지 내에서도 아가의 농도에 따라서 발근 정도가 뚜렷하게 차이가 나타났다. 전체적인 신훈의 생장은 12g/L의 농도로 아가가 첨가된 경우가 가장 좋았으며, 절간의 길이도 가장 길었다. B5배지의 경우 전 체적인 생장은 양호하였지만 MS 배지에 미치지 못하였다. White배지는 측아 생육에 부적합하였다. 반면, MS나 B5 배지에서 자란 현삼은 절간의 마디 길이가 길어서 줄기를 체세포배 증식의 재료로 사용하고자 할 때 매우 유리한 것으로 생각되었다. 무균 식물체 유지에 매 1개월마다 마디를 포함한 줄기조직을 1.2% 아가를 첨가한 MS 배지에 계대배양하여 유식물체 확보 및 유지시킬 수 있다.

Table 1. Effect of media and agar concentration on development of lateral bud of *Scrophularia buergeriana* on solid agar medium after 3 weeks.

Media	Conc. of agar (g/L)	Mean root number per explant	Mean shoot length (cm/explant)	Mean internode length (cm/explant)
MS	8	1.31±0.8	2.39±0.48	0.97±0.15
	12	0.59±0	3.96±0.55	1.25±0.12
	16	0.17±0.17	2.76±0.76	1.14±0.21
B5	8	0.82±0.47	3.44±0.41	1.23±0.17
	12	1.21±0.49	2.24±0.33	0.87±0.12
	16	1.13±0.56	2.57±0.19	1.09±0.12
White	8	0.69±0.46	1.11±0.34	0.78±0.23
	12	0.86±0.59	1.24±0.28	0.92±0.19
	16	0.41±0.3	1.39±0.34	0.91±0.20

### 제 3절 직접체세포 생산을 통한 종묘 생산

#### 1. MS 고체배지에서 체세포배 유도

MS 고체배지에서 체세포배 발생에 영향을 미치는 BA와 IAA/IBA의 효과를 알기 위하여 잎, 줄기, 엽병절편을 대상으로 6주간 배양한 결과는 표 2, 표 3, 표 4와 같다. 같은 배지 조성이라고 하더라도 식물체의 부위에 따라 전혀 다른 양상을 나타내었다. 줄기조직에서 가장 빠른 시일 내에 가장 많은 shoot가 생성되었다. 반면, 잎 절편체로부터 유도된 체세포배는 엽병과 줄기에 비해 재분화 정도가 상당히 뒤떨어졌으며, 재분화된 shoot수에 비해 생체중이 비교적 큰 경우인 BA 1.0mg/L와 IAA 0.5mg/의 조합처리는 재분화된 식물체의 생장과 캘러스의 생장이 함께 이루어져 치상조직의 생체중이 다른 것보다 무거웠다. 그러나 대부분의 BA와 IAA 및 IBA의 조합처리에서 직접체세포배의 발생과정을 거쳐서 완전한 식물체로 발달하였다.

줄기에서는 대체로 상당히 많은 수의 shoot가 분화되었으나 cotyledon의 형성 이후의 뿌리의 발달은 이루어지지 않았다. 즉 완벽한 형태의 직접체세포배의 발달이 이루어졌다고 보다는 multi-shoot가 형성된 것이라고 보여진다.

Table 2. Combinational effects of BA and IAA on somatic embryogenesis from leaf segments of *S. buergeriana* on solid agar medium after 6 weeks.

Growth regulators (mg / L)		Formation of somatic embryo	Mean shoot length (cm/explant)	Fresh weight (g/explant)	Mean Root number per explant
BA 0.5	IAA 0.1	D	5.00±0.70	0.70±0.09	2.20±0.63
	IAA 0.5	D	5.20±1.26	0.85±0.17	2.20±0.56
BA 1.0	IAA 0.1	D	3.80±0.84	0.79±0.18	2.80±0.56
	IAA 0.5	T	4.67±1.28	1.31±0.27	1.33±1.25
BA 2.0	IAA 0.1	D	3.00±1.05	0.44±0.10	1.20±0.28
	IAA 0.5	D	3.25±1.22	0.62±0.18	2.25±0.37
BA 0.5	IBA 0.1	D	6.87±1.31	0.67±0.08	1.75±0.37
	IBA 0.5	D	2.80±0.91	0.43±0.06	1.00±0.70
BA 1.0	IBA 0.1	D	4.67±1.33	0.61±0.13	1.83±0.67
	IBA 0.5	D	2.70±0.30	0.46±0.14	1.57±1.03
BA 2.0	IBA 0.1	D	4.67±1.51	0.98±0.28	1.17±0.44
	IBA 0.5	D	3.33±0.72	0.71±0.13	0.59±0.39

\*: D : Direct somatic embryogenesis,

T : Through callus

Table 3. Combinational effects of BA and IAA on somatic embryogenesis from petiole segments of *S. buergeriana* on solid medium after 6 weeks.

	Growth regulators (mg / L)	Formation of somatic embryo	Mean shoot length (cm/explant)	Fresh weight (g/explant)	Mean root No/explant
BA 0.5	IAA 0.1	D	9.50±2.94	1.02±0.28	4.00±1.95
	IAA 0.5	D	9.30±1.25	1.43±0.32	3.67±1.01
BA 1.0	IAA 0.1	D	7.50±	0.77±	3.00±
	IAA 0.5	D	6.00±3.02	0.91±0.28	0
BA 2.0	IAA 0.1	D	4.00±0.49	0.34±0.04	0.50±0.48
	IAA 0.5	D	9.30±1.76	1.28±0.35	1.67±1.01
BA 0.5	IBA 0.1	D	19.67±0.50	0.93±0.14	4.67±1.01
	IBA 0.5	D	9.00±4.40	0.43±0.12	1.25±0.37
BA 1.0	IBA 0.1	D	7.75±1.22	0.78±0.15	1.25±0.73
	IBA 0.5	D	3.67±1.01	0.49±0.30	1.33±0.50
BA 2.0	IBA 0.1	D	15.00±3.77	1.37±0.35	1.67±3.04
	IBA 0.5	D	6.50±2.94	0.66±0.98	1.50±1.30

\* D : Direct somatic embryogenesis,

Table 4. Combinational effects of BA and IAA on somatic embryogenesis from stem segments of *S. buergeriana* on solid agar medium after 6 weeks.

Growth regulators (mg / L)	Formation of somatic embryo	Mean shoot length (cm/explant)	Fresh weight (g/explant)	Mean root No/explant	
BA 0.5	IAA 0.1	D	22.25±3.06	1.82±0.26	5.50±0.73
	IAA 0.5	D	12.00±3.78	1.78±0.36	3.33±0.52
BA 1.0	IAA 0.1	D	16.20±3.99	1.17±0.34	4.20±0.84
	IAA 0.5	D	19.25±3.18	2.05±1.25	0
BA 2.0	IAA 0.1	D	26.00±2.80	2.56±0.44	2.40±0.76
	IAA 0.5	D	15.00±1.75	1.06±0.24	3.60±0.77
BA 0.5	IBA 0.1	D	18.00±2.45	1.39±0.25	8.60±0.77
	IBA 0.5	D	21.00±2.96	1.53±0.23	4.14±1.36
BA 1.0	IBA 0.1	D	14.40±2.38	1.76±0.25	1.80±0.28
	IBA 0.5	D	9.67±4.27	0.71±0.23	2.00±1.51
BA 2.0	IBA 0.1	D	9.50±2.53	0.92±0.26	0.16±0.22
	IBA 0.5	D	14.28±3.05	1.21±0.21	2.71±1.24

\* D : Direct somatic embryogenesis,

## 2. MS 액체배지에서 직접체세포배 발생

표 5는 생물반응기에서 체세포배 대량생산 조건을 결정하기 위하여 MS 액체 배지에 BA와 IAA/NAA를 조합처리하여 잎, 엽병, 줄기절편을 3주간 배양한 결과이다. 줄기가 가장 빠른 반응을 보여, BA를 단독으로 처리한 줄기의 절편에서 직접체세포의 발생보다는 multi-shoot가 생성되어 절편체당 7개이상의 식물체가 발생하여 빠르게 성장하였다. 따라서 이것은 아마도 직접체세포배로부터 분화되기보다는 기관분화에 의한 multiple shoots의 형성으로 생각된다. IAA와 NAA가 단독으로 첨가된 모든 경우에는 체세포배가 형성되지 않았으며, 부정근이 발생되었다. 잎절편의 경우 3주간 배양에서는 절편체의 절단부위만이 직접체세포배를 형성하기 위한 변화를 보였을 뿐 직접 배를 육안으로 관찰할 수 없었다. 그러나 8주간 배양을 지속한 결과 완전한 식물체로의 재분화가 이루어져 줄기와 엽병과는 다르게 체세포배를 형성하는데 상당히 많은 시간을 필요로 하였다.

Table 5. Combinational effects of BA and IAA/IBA on direct somatic embryogenesis from leaf, petiole, stem segments of *S. buergeriana* in MS liquid medium after 3 weeks.

Growth regulators (mg / L)		Formation of somatic embryo			Formation of roots		
		Leaf	Petiole	Stem	Leaf	Petiole	Stem
BA 0	auxin 0	-	-	-	-	-	-
	IAA 0.1	-	-	++	-	+++	+
	IAA 0.5	-	+	++	-	+	+
	NAA 0.1	-	+	++	+	++	+++
	NAA 0.5	-	+	-	+	++	+++
BA 0.5	auxin 0	-	+++	+++	-	-	-
	IAA 0.1	-	+++	+++	-	-	-
	IAA 0.5	-	+++	+++	-	-	-
	NAA 0.1	-	++	+++	-	-	-
	NAA 0.5	-	+	+	-	+	+
BA 1.0	auxin 0	-	++	+++	-	-	-
	IAA 0.1	-	++	++	-	-	-
	IAA 0.5	-	+++	+++	+	-	-
	NAA 0.1	-	+	+++	-	-	+
	NAA 0.5	-	+	++	-	-	+
BA 2.0	auxin 0	-	+	+++	-	-	-
	IAA 0.1	-	+	+++	-	-	-
	IAA 0.5	-	+	++	-	-	-
	NAA 0.1	-	++	+++	-	-	-
	NAA 0.5	-	+++	++	-	-	-

\* means, - : none, + : 1~3 somatic embryos or roots per explant,  
 ++ : 4~6 somatic embryos or roots per explant,  
 +++ : 7 < somatic embryos or roots per explant

### 3. 간접체세포배 증식 및 유지를 위한 현탁배양

BA 1mg/L와 NAA mg/L가 포함된 MS배지에서는 배발생 캘러스가 생성되었다. 이렇게 얻은 배발생 캘러스를 생물반응기에서 체세포배 대량생산 조건을 결정하기 위하여 MS, B5, White 액체배지에서 3주간 현탁배양한 결과를 표 6에서 보면, MS배지가 체세포배 형성에 가장 효과적이었고 B5나 White배지는 MS배지에 비하면 효율이 떨어졌다.

Table 6. Effect of basal media on somatic embryo development in suspension culture of *S. buergeriana* after 3 weeks.

Media	Stages of somatic embryo development		
	Globlar stage	Cotyledon stage	Multishoot
MS	7.67±3.52	5.33±1.26	2.67±0.50
B5	7.67±3.27	12.33±2.01	1.33±0.50
White	16.33±2.77	2.66±0.50	0

### 4. 연중공급을 위한 배양시료의 장기저장과 재생

표 7은 줄기, 엽병, 잎 조직을 일정기간 저온에 저장한 후 액체배양하여 직접체세포배 발생을 통한 대량증식에 사용할 재료를 연중 공급할 수 있는지 알아보기 위하여 4℃와 8℃에서 저장한 각각의 조직을 1개월 간격으로 꺼내어 액체배지에서 3주간 배양하여 싹(shoot)의 발생율을 조사한 결과이다. 표에서 보면, 줄기의 경우 어느 저장조건에서나 비슷한 양상을 나타내었지만 엽병이나 잎의 경우에는 오히려 8℃ 조건에서 저장한 시험구에서 더 나은 shoot 발생율을 보였다. 이는 3개월간 저장한 후 액체배양했을 때에도 같은 양상이었다. 저장 조직간의 차이를 보면, 잎은 shoot 발생율에 있어 저장기간이 길어질수록 줄기나 엽병에 비해 현저하게 저하되어 저장에는 적합하지 않은 것으로 생각되었다.

Table 7. Effect of storage temperature and period on shoot development from leaf, petiole, stem segments of *S. buergeriana* after 3weeks culture on medium.

Period	Temp. (°C)	Rate of shoot development								
		Stem			Petiole			Leaf		
		Cont. *	4	8	Cont	4	8	Cont.	4	8
1 month		+++**	+++	+++	++	++	+++	+	+	+
2 month		.	++	++	.	++	++	.	+	+
3 month		.	++	+++	.	+	+++	.	+	+

\* : liquid culture without storage

\*\* means, + ; 1~7 shoots development per explant

++ ; 8~15 shoots development per explant

+++ ; over 16 shoots development per explant

## 제 4절 직접체세포배 형성 연구결과 요약 및 결론

### 1. 요약

- 가. MS 고체배지에서 줄기가 엽병이나 잎 조직보다 체세포배 형성율이 높았고, 잎조직에서 가장 반응이 낮았다.
- 나. MS 액체배지에서는 고체배지에서보다 체세포배 형성이 빨랐다. 고체배지에서의 결과와 마찬가지로 줄기 조직에서 체세포배 형성율이 가장 높았다.
- 다. 액체배양에서 잎 조직은 8주 후에 직접체세포배 형성을 통한 완전한 식물체가 재생되었으나 시간이 많이 소요되는 단점이 있다.

### 2. 결론

- 가. 잎 조직에서는 배양기간이 많이 소요되긴 하지만 직접체세포배 발생으로 완전한 식물체가 재생되었다.
- 나. 체세포배 형성율이 가장 높았던 줄기조직에서는 완전한 체세포배 형성 과정을 통한 식물체 재생이라기 보다는 multiple shoots가 발생한 것으로 판단되어, 이후 생물반응기를 이용한 종묘 생산에는 multiple shoots를 이용하는 방향으로 실험하는 것이 보다 실용적이고 효율적이라고 판단하였다.

## 제 5절 액체배양에서 신초 형성

고체배지에서는 신초 발생이 매우 저조하기 때문에 액체배양에서 신초를 유도하고자 하였다. 그러나 생물반응기에서 직접 실험을 하기에는 너무나 많은 재료가 일시에 필요하므로 500ml 플라스크 조건에서 먼저 액체배양에 필요한 조건을 알기 위한 실험을 수행하였다.

### 1. 적정 배양밀도

현삼의 줄기 절편체(0.8~1cm) 20, 30, 40개를 150ml의 배지(MS배지 + BA 1mg/l + IAA 0.1mg/l)가 든 500ml 플라스크에 접종하여 직접체세포배 발생 양상을 비교하였다 (Table 8). Scale-up 됨에 따라 배지의 양이 증가하고 이에 따른 식물체의 접종량도 증가되어야 하는 경향을 나타내었다. 배지 150ml에 줄기 절편체 30개를 접종하는 것이 식물 재료와 배양 밀도에 적정한 것으로 나타났다.

Table 8. Effect of innocuous volume on somatic embryogenesis in *S. buergeriana* after 8 weeks in liquid culture.

No. of explant	Source of explant	Leaf	Stem
	20		+
30		+	+++++
40		++	+++++

- + : 1~3 somatic embryos per explant,
- ++ : 3~6 somatic embryos per explant
- +++ : 6~9 somatic embryos per explant ,
- ++++ : 9~15 somatic embryos per explant

## 2. 배지성분의 개량

### 가. 질소원 농도

배지 내의 질산태 질소와 암모니아태 질소의 농도 변화가 싹 발생에 미치는 영향을 검토하기 위하여 MS배지에 포함되는  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 와  $\text{KNO}_3$ 의 농도를 각각 0 : 1900, 413 : 1900, 825 : 1900, 1650 : 1900, 1650 : 950, 1650 : 475, 1650 : 0(mg/l)로 처리하여 4주간 배양한 후 싹 발생을 조사하여 최적 질소원 농도비율을 구명하고자 하였다. 표 9에서 보는 것과 같이 암모니아태질소의 농도를 1/4로 줄인 413 : 1900(mg/l)의 처리구에서 효과적이었다. 암모니아태 질소의 함량을 증가시키거나, 질산태 질소원의 함량을 감소시킬수록 싹 발생이 감소되어, 질산태 질소가 주요 영양원으로 이용되고 있었다.

Table 9. Effect of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  :  $\text{KNO}_3$  ratio on shoot formation in *S. buergeriana* after 4 weeks culture.

$\text{NH}_4\text{NO}_3$ (mg/L)	$\text{KNO}_3$ (mg/L)	Mean No. of shoots / explant
0	1900	12±1.49
413	1900	18.83±0.94
825	1900	10.69±1.34
1650	1900	7.83±0.94
1650	950	6.67±1.07
1650	475	5.67±0.107
1650	0	3.34±0.62

### 나. 탄소원 종류

현삼의 싹 발생에 있어 탄소원의 종류에 따른 효과를 살펴보기 위해 sucrose, glucose 및 fructose를 각각 3%로 처리한 MS 액체배지에서 5주간 배양한 후 접종 조직의 생체중과 접종조직으로부터 생성된 싹의 개수를 조사한 결과를 표 10에서 보면, 탄소원 중 싹의 수와 접종된 절편체의 생체중이 가장

높았던 것은 fructose 처리구이었다. 그러나 fructose 처리구에서의 신초는 투명화로 인해 생체중이 높게 나타난 것으로, 대부분 투명화 현상이 심하여 건전한 식물체로 발육하지 못하였다. 탄소원으로는 sucrose 처리가 효과적이었다.

Table 10. Effect of carbon source on shoot formation in *S. buergerana* after 5 weeks in liquid culture.

Carbon source	No. of shoot	Fresh weight (mg/L)
Sucrose (3%)	3.33±0.53	1.81±0.41
Fructose (3%)	5.5±0.93	2.97±1.03
Glucose (3%)	3.75±0.82	2.53±0.47

### 3. Hormone 조건

현삼에서는 신초 발생 이후 완전한 개체로의 발전을 위해서는 신초 발생과 함께 발근이 이루어져야 하므로, 이에 효과적인 옥신의 종류와 농도를 구명하고자 하였다.

먼저, 앞의 실험 결과로 얻어진 직접체세포배 발생에 효과적인 배지조건에 줄기 절편체를 접종하여 4주간 배양한 후, 배지 수준을 1/10으로 감소시킨 MS 기본배지에 IAA, IBA 및 NAA의 농도를 6수준으로 500ml 플라스크에 처리하여 4주간 배양한 결과, 발근수와 발생된 뿌리의 길이를 표 11과 12에서 보면, 발근 개수 및 뿌리의 길이 생장에 가장 효과적인 옥신 종류는 IBA이었으며, 농도는 0.05mg/l로 매우 저 농도에서 효율이 높았다.

Table 11. The effect of auxins on rooting in shoots of *S. buergeriana*.

Concentration (mg/l)	No. of root		
	IAA	IBA	NAA
0	-	0.800 <sup>cd</sup>	-
0.001	2.600 <sup>bc</sup>	1.500 <sup>ca</sup>	0.167 <sup>d</sup>
0.01	1.000 <sup>cd</sup>	1.000 <sup>cd</sup>	0.500 <sup>ca</sup>
0.05	3.400 <sup>ab</sup>	<b>4.600<sup>a</sup></b>	0.000 <sup>d</sup>
0.1	0.800 <sup>cd</sup>	0.000 <sup>d</sup>	1.833 <sup>cd</sup>
0.5	0.400 <sup>d</sup>	1.600 <sup>ca</sup>	4.250 <sup>a</sup>
1	0.400 <sup>d</sup>	3.500 <sup>b</sup>	0.167 <sup>d</sup>

Means with the same letter are not significantly different according to Duncan

Table 12. The effect of auxins on root elongation in shoots of *S. buergeriana*.

Concentration (mg/l)	Root length(cm)		
	IAA	IBA	NAA
0	-	1.800 <sup>cde</sup>	-
0.001	3.900 <sup>bc</sup>	4.100 <sup>b</sup>	0.1667 <sup>e</sup>
0.01	2.625 <sup>bcd</sup>	1.200 <sup>de</sup>	0.625 <sup>de</sup>
0.05	4.900 <sup>ab</sup>	<b>5.800<sup>a</sup></b>	0.000 <sup>e</sup>
0.1	1.400 <sup>de</sup>	0.000 <sup>e</sup>	2.200 <sup>cd</sup>
0.5	0.600 <sup>de</sup>	3.200 <sup>bc</sup>	3.900 <sup>bc</sup>
1	0.800 <sup>de</sup>	2.800 <sup>bcd</sup>	0.167 <sup>e</sup>

Means with the same letter are not significantly different according to Duncan

## 제 6절 생물반응기에서 multiple shoots 형성

### 1. 적정 생물반응기 종류

현삼 배양에 적합한 생물반응기를 선정하고자 vessel 형태가 각기 다른 air-lift type bioreactor에 대한 결과를 비교하였다. 표 13에서 보면 적합한 생물반응기는 air-lift type으로, 특히 구형(sphere type)이 cylinder 형에 비해 절편당 신초 발생수로 보아 더 효과적이었다. 구형에서도 inner loop를 제거한 경우가 신초 형성에 가장 좋았다. Stirrer type에서는 절편체가 모두 shear stress에 의해 cell의 lysis가 진행되었을 뿐만 아니라, 조직화가 되기보다는 탈분화의 callusing이 진행되어 작은 크기의 cell cluster로 생장이 이루어질 뿐이었다. 생물반응기 운영은 공기 유입량 0.6ml/sec, 광주기 16시간(명)/ 8시간(암), 온도는 25°C를 유지하였다.

Table 13. Comparison of vessel type in air lift bioreactor on shoot formation of *S. buergeriana* after 6 weeks.

Bioreactor type	No. of shoot/g
Air-lift (Sphere type)	7.47b
Air-lift (Sphere type) without inner loop	13.08a
Air-lift (Cylinder type)	4.51c
Stirrer type	-

a, b, c : The same letters are not significantly different at the 5% level by DMRC

## 2. Multiple shoots 유도

기본 MS 액체배지 (BA 1mg/l, IAA 0.1mg/l 첨가) 1.5L 와 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>를 413mg / l로 조절한 MS 액체배지 (BA 1mg/l, IAA 0.1mg/l 첨가) 1.5L에 현삼 줄기조직(0.8-1cm)을 각각 300개체씩 접종하여 배양 후 4주부터 7일 간격으로 시료를 채취하여 형성된 신초의 수와 생체중을 조사한 결과를 표 14에서 보면, 기본 MS 배지와 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 양을 1/4로 줄인 시험구 모두 배양기간이 길수록 생체중과 신초의 수가 증가되는 경향을 보였다. 신초의 수는 배양기간 동안 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 양을 1/4로 줄인 MS 배지에서 full strength의 MS 배지에서 보다 증가되었으나 생체중은 감소되었다. 이는 기본 MS 배지에 비해 신초의 투명화가 진전되지 않았기 때문으로 생각된다. 따라서 생물반응기에서 현삼 신초 형성을 위한 배양은 MS 기본배지의 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 양을 1/4로 줄여 413mg/l의 농도로 하고, BA 1mg/l와 IAA 0.1mg/l를 첨가한 MS 배지에서 5주 이상 배양하는 것이 신초의 유도에 유리한 것으로 판단되었다.

Table 14. Effect of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> concentration and culture period on multiple shoot development/explant in bioreactor culture of *S. buergeriana*.

Culture period (week)	No. of shoot			Fresh weight(g)		
	MS	1/4 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> MS	Mean (F-Test**)	MS	1/4 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> MS	Mean (F-Test**)
4	8.5	11.6	10.10 <sup>c</sup>	1.45	0.29	0.84 <sup>c</sup>
5	9.6	12.5	10.96 <sup>ab</sup>	2.45	1.07	1.72 <sup>p</sup>
6	10.4	12.9	11.61 <sup>a</sup>	2.72	1.92	2.30 <sup>a</sup>
Mean (F-Test)	9.56 <sup>p(**)</sup>	12.30 <sup>a(**)</sup>		2.21 <sup>a(**)</sup>	1.09 <sup>p(**)</sup>	

### 3. 적정 배양밀도

플라스크(500ml) 조건에서 MS 배지의  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 의 양을 1/4로 줄였을 때 신초 형성율이 높았는데, 이 조건이 생물반응기에서도 같은지를 살펴보고, 아울러 현삼 조직의 적정 접종량을 결정하고자 BA 1mg/l 와 IAA 0.1mg/l 가 첨가된 MS 배지의  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 를 413mg/l 로 조절한 배지를 배양에 이용하였다. 배지 1.5L에 현삼 줄기조직(0.8-1cm) 300절편과 400절편씩을 각각 접종하였다. 생물반응기 배양 조건은 공기 유입량 0.6 ml/sec, 16시간 일장이었으며 온도는 25℃를 유지하였고, 배양 후 4주부터 7일 간격으로 시료를 채취하여 발생된 신초의 수와 생체중을 조사하였다 (Table 15).

조사결과 300개체를 접종한 시험구가 400개체를 접종한 시험구에 비해 신초의 수와 생체중이 양호하였다. 이는 400개체 이상을 접종할 경우 생물반응기 내에서 발생된 현삼의 신초들이 과밀화된 상태로 성장하게 되기 때문에 오히려 생육이 저해되고, 생물반응기 중심부 및 배지 위로 노출된 신초의 경우 괴사하게 되기 때문인 것으로 판단되었다. 또한 MS 배지에 첨가되는  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 의 양을 1/4로 줄여 배양한 결과  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 의 양을 1/4로 줄인 시험구에서 생체중은 다소 적었으나 신초의 수가 증가되었다. 따라서 다량의 신초 수를 확보하기 위해서는  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 의 양을 1/4로 줄인 MS 배지를 사용하고, 배양시 절편 수는 300개체로 하는 것이 유리한 것으로 판단되었다.

Table 15. Effect of inoculum density on multiple shoot development in bioreactor culture of *S. buergeriana*.

Culture period	300 explant		400 explant	
	Mean of no. shoot	Fresh weight(g)	Mean of no. shoot	Fresh weight(g)
4week	11.55 ± 0.31	0.29 ± 0.02	10.86 ± 0.44	0.75 ± 0.07
5week	12.42 ± 0.80	1.07 ± 0.08	11.89 ± 0.47	1.39 ± 0.07
6week	12.85 ± 0.46	1.92 ± 0.17	11.55 ± 0.39	1.48 ± 0.10

\* ± = SE

#### 4. 신초의 투명화 경감

현삼 배양에서 투명화를 경감시키기 위해 anti-vitrifying agent(Sigma, #A0807)를 농도별로 처리하여 위 항목에서 결정된 배지를 대조구로 하여 6주간 배양한 후 발생된 신초 수와 생체중을 조사하였다 (Table 16). 표에서 보면 antivitrifying agent의 농도가 높아질수록 신초의 발생형태와 초기생육이 불량하여 발생된 신초의 수는 감소하였고, 투명화의 경감 효과는 미미하였으나, 수확시 신초의 분리가 대조구보다 쉽게 이루어져 발근 배지로 옮겨줄 경우 작업이 용이하였다. 이와 같은 결과로 미루어 볼 때 antivitrifying agent는 생육을 억제하는 효과가 있기 때문에 배양 초기부터 처리하는 것보다는 배양이 진행되는 도중 적당한 시기에 처리하는 것이 효과적일 것으로 생각되어 1주 후부터 5주 후 까지 1주일 단위로 antivitrifying agent 5 g/l 가 포함된 배지로 교환 처리하여 antivitrifying agent의 처리 시기를 알아보았다 (Table 17). 실험결과 antivitrifying agent 처리가 빠를수록 현삼 조직의 신초 형성이 억제되었으며 모든 처리구에서 무처리구에 비해 신초의 수가 적게 형성되었다.

표 18은 antivitrifying agent를 처리한 액체 배지에서 6주간 배양한 후 수확한 신초를 MS 기본배지(0.8% agar, 3% sucrose)로 이식하여 4주 후 신초의 발근과 지상부 생육을 조사한 결과이다. 실험결과 antivitrifying agent를 처리한 시험구에서 수확한 신초가 처리하지 않은 처리구에서 수확한 것보다 뿌리의 발생과 생육이 좋지 않았고, antivitrifying agent를 7g/l 로 처리한 구에서 투명화 경감 효과가 다소 나타났으나 지상부, 지하부의 생육이 저조하였다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 생물반응기에서 현삼의 줄기 조직을 배양하는데 있어 antivitrifying agent의 처리는 적합하지 않다고 판단되었다.

Table 16. Effect of antivitrifying agent on multiple shoot development in liquid culture of *S. buergeriana* after 6 weeks.

Conc. (mg/l)	Mean no. shoot ( $\pm$ S.E)	Fresh weight (g)
Control	12.6 $\pm$ 0.43	1.61
3	11.33 $\pm$ 0.31	1.74
4	10.92 $\pm$ 0.52	1.45
5	11.50 $\pm$ 0.48	1.09
6	9.92 $\pm$ 0.47	1.12
7	7.77 $\pm$ 0.39	0.94

Table 17. Effect of antivitrifying agent treatment on multiple shoot development in liquid culture of *S. buergeriana*

Treatment (after week)	Mean no. shoot	Fresh weight (g)
Cont.	12.36 $\pm$ 1.25	1.94 $\pm$ 0.19
1	9.90 $\pm$ 1.72	0.82 $\pm$ 0.18
2	9.20 $\pm$ 1.57	1.04 $\pm$ 0.32
3	10.1 $\pm$ 1.32	1.37 $\pm$ 0.35
4	11.42 $\pm$ 1.05	1.41 $\pm$ 0.33
5	11.68 $\pm$ 1.23	1.43 $\pm$ 0.27

\*  $\pm$  = SE

Table 18. Shoot development and rooting of harvested shoot of *S. buergeriana* on solid media after pre-cultured in antivitrifying agent containing liquid media.

Conc. (g/l)	No. of shoot	No. of root	Root length (cm)	No. of shoot with leaf	Shoot length (cm)	No. of leaf per shoot	Frseh weight (g/explant)
Control	12.54 ± 0.38	18.25 ± 0.63	3.00 ± 0.32	11.5 ± 0.87	4.48 ± 0.31	6.25 ± 0.63	2.53 ± 0.12
3	11.68 ± 0.42	0.14 ± 0.14	0.33 ± 0.33	4.57 ± 0.48	2.59 ± 0.28	4.57 ± 0.53	2.63 ± 0.12
4	11.04 ± 0.39	2.38 ± 0.78	1.71 ± 0.52	7.00 ± 0.53	2.40 ± 0.14	4.88 ± 0.40	2.33 ± 0.12
5	11.43 ± 0.32	2.57 ± 0.58	1.86 ± 0.38	8.57 ± 0.78	2.66 ± 0.20	5.29 ± 0.42	2.04 ± 0.19
6	10.01 ± 0.49	1.75 ± 0.67	0.91 ± 0.32	3.88 ± 0.52	2.10 ± 0.19	4.13 ± 0.44	1.93 ± 0.13
7	7.74 ± 0.55	0	0	3.25 ± 0.49	1.65 ± 0.64	3.75 ± 0.48	1.99 ± 0.30

\* ± = SE

##### 5. 생물반응기에서 발근 유도

생물반응기에서 배양한 현삼 신초의 적정 수확시기를 알아보기 위하여 BA 1mg/l 와 IAA 0.1mg/l 가 첨가된 MS 배지 1.5L에 줄기 조직 300 절편을 접종하여 배양 4주 후부터 7일 간격으로 각 절편 당 발생된 신초의 수와 생체중을 조사하였다 (Table 19). 이 신초들은 앞의 연구결과 결정된 발근 유도 배지 (1/10X MS+ IBA 0.05mg/l)로 옮겨 100ml 플라스크 조건에서 2주간 배양한 후 발생된 뿌리의 수와 길이를 조사하였다 (Table 20).

실험결과 배양 후 6주까지 싹 수와 생체중은 지속적으로 증가하였다. 발근 양상은 생물반응기에서 6주간 배양 후 발근 배지로 옮겨 배양한 시험구에서 뚜렷하게 증가하여, 이때가 생물반응기에서의 수확적기라고 판단되었다. 그러나 생물반응기에서 6주간 생육 후 peristaltic pump를 이용하여 생물반응기 내 배지를 발근 배지로 교환한 후 2주간 배양하였을 때, 전체 시료의 약 68%가 발근되었다. 이 때 뿌리의 수는 평균 1.05개, 뿌리의 평균 길이는 1.98cm으로 100ml 플라스크 조건에서 수행한 실험 결과와 차이를 보였다. 이는 생물반응기 내에서 조직들이 과밀화되어 있어 발근에 영향을 미친 것으로 판단되었다.

Table 19. Shoot growth depends on the period of bioreactor culture in *S. buergeriana*.

Culture period	Mean no. of shoot	Fresh weight(g)
4week	8.67 ± 0.59	1.45 ± 0.13
5week	9.58 ± 0.59	2.45 ± 0.16
6week	10.41 ± 0.48	2.72 ± 0.19

\* ± = SE

Table 20. Root growth depends on the period of bioreactor culture of *S. buergeriana*.

Culture period	Mean no. of root	Root length(cm)
4week + 2week	0.9 ± 0.19	0.65 ± 0.27
5week + 2week	1.2 ± 0.20	0.70 ± 0.36
6week + 2week	3.8 ± 0.35	3.35 ± 0.49

\* + 2week : Treatment period of rooting media

± = SE

6. 생물반응기에서 신초의 수확시기, 배지 종류와 농도 및 배양방법이 신초형성과 생육에 미치는 영향.

생물반응기에서 배양하여 발생된 신초의 생육과 발근에 적합한 배지의 농도와 형태를 결정하기 위한 실험으로, MS 배지에 첨가되는  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 의 양을 1/4로 줄이고 IBA 0.05mg/l를 첨가한 배지를 기본배지로 하였다. 이 기본배지의 농도를 각각 1X, 1/2X, 1/4X, 1/10X로 처리한 MS 액체배지와, 배지의 농도를 각각 1X, 1/2X, 1/4X로 처리한 MS 고체배지(0.8% agar, 3% sucrose)에 생물반응기에서 4주 동안 배양한 후 수확한 신초와 6주 동안 배양한 후 수확한 신초를 각각 치상하여 4주 동안 배양한 다음 발근과 신초의 생육양상을 조사하였다. 생물반응기에서 4주간 배양한 후 액체배지로 옮겨졌을 경우 1X의 농도에서 발생된 뿌리의 수와 길이 등으로 보아 생육이 가장 좋게 나타났으며, 6주간 배양한 후 옮겨준 시험구에서는 배지의 농도가 낮을 때 (1/10X) 뿌리의 생육이 좋았다. 이는 4주 후 발근 배지로 옮겨졌을 경우 multiple shoot의 생장이 완전히 이루어지지 않아 성장에 필요한 양분을 많이 필요로 하는 반면 6주 후 발근 배지로 옮겨졌을 경우에는 multiple shoot의 생육이 늦춰지고 뿌리의 생육이 활성화됨으로, 6주 후 뿌리의 생육에는 적은 양의 배지가 효과적인 것으로 판단되었다 (Table 21).

고체배지에서 생육을 시켰을 경우 생물반응기에서 4주간 배양한 재료나 6주간 배양한 재료 모두 지상부 생육은 1X의 농도에서 가장 좋았으나 투명화 현상을 나타내었다. 뿌리의 발생과 성장에는 4주간 배양한 후 배지로 옮겨졌을 경우 1X의 농도에서 양호한 것으로 나타났으나, 6주간 배양한 후 배지로 이식한 경우에는 1/4X의 농도에서 가장 좋았다. 이는 액체배지에서와 같은 경향으로 여겨진다. 그러나 1/4X의 농도의 경우 잎이 전개된 신초의 수와 신초당 잎의 수는 적었다. 이상을 종합하여 볼 때 생물반응기에서 6주간 배양 후 1/2X 고체배지로의 이식이 가장 유리한 것으로 판단되었다(Table 22). 또한 배지로 옮겨준 이후 잎이 전개되는 신초는 고체배지에서만 나타나고 액체배지에서는 잎이 전개되지 않거나 투명화가 심하였다. 따라서 생물반응기에서 발근을 유도하기 위해 과밀한 상태로 6주 이상 배양하여 해를 입는 것보다는 적정 시기에 고체배지로 옮겨 발근과 동시에 잎이 전개된 정상적인 형태의 신초 발생이 이루어지도록 하는 것이 필요하다.

Table 21. Effects of concentration of the MS liquid medium on shoot formation and rooting in *S. buergeriana*.

Strength	Mean no. shoot		Mean no. root		Root length(cm)		Fresh weight(g)	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1 X	12.67 ± 0.76	12.45 ± 0.65	2.33 ± 0.49	2.75 ± 0.36	1.10 ± 0.27	2.37 ± 0.24	1.26 ± 0.21	2.94 ± 0.14
1/2 X	13.00 ± 0.45	12.69 ± 0.72	1.00 ± 0.32	2.68 ± 0.33	0.66 ± 0.28	2.84 ± 0.21	1.38 ± 0.18	2.36 ± 0.12
1/4 X	10.80 ± 0.80	11.92 ± 0.61	0.20 ± 0.20	3.27 ± 0.29	0.24 ± 0.24	3.15 ± 0.19	0.74 ± 0.09	1.82 ± 0.18
1/10 X	10.80 ± 0.49	11.85 ± 0.74	0	3.62 ± 0.31	0	3.46 ± 0.26	0.65 ± 0.09	1.43 ± 0.26

transferred to rooting media after 4 weeks (A), and 6 weeks(B)

\* ± Standard error

Table 22. Effects of concentration of the MS solid medium on shoot formation and rooting in *S. buergeriana*.

Strength	No. of shoot		No. of root		Root length (cm)		No. of shoot with leaf		Shoot length (cm)		No. of leaf per shoot		Fresh weight (g/explant)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1 X	12.67	12.38	7.83	7.0	2.7	2.35	4.17	8.89	2.74	2.11	4.17	5.11	1.83	2.31
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.76	0.63	0.48	0.89	0.28	0.42	0.48	0.75	0.33	0.12	0.54	0.35	0.07	0.20
1/2 X	11.67	11.85	5.11	4.5	2.29	2.46	2.63	8.33	1.86	2.22	2.63	5.55	1.16	1.60
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.53	0.49	0.35	0.56	0.37	0.25	0.38	0.44	0.29	0.17	0.32	0.32	0.12	0.10
1/4 X	10.63	11.37	4	9.75	2.31	2.97	0.88	7.86	0.78	1.94	1.13	4.13	0.97	1.67
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.46	0.43	0.76	0.56	0.25	0.21	0.40	0.26	0.37	0.12	0.44	0.35	0.16	0.15

transferred to rooting media after 4 weeks (A), and 6 weeks(B)

\* ± S.E

## 제 7절 신초의 발근과 순화

### 1. 발근, 순화 배지의 성분 및 농도

현삼의 multiple shoot 중 잎이 전개되어 정상적인 식물체로 성장하는 것은 고체배지에서만 나타났다. 따라서 현삼의 신초 중 잎이 전개되어 정상적인 식물체로 성장하는 것이 고체배지에서만 나타났다. 따라서 현삼 신초의 발근과 잎이 전개되는 정상적 소식물체의 생장에 적합한 고체배지의 성분과 농도 및 적정 아가 농도를 구명하기 위하여 기본 MS 배지와  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  의 농도를 413mg/ℓ 로 조절한 배지에 아가의 농도를 달리 조합하여 처리한 결과는 표 23과 같다. 전체적으로 보아 지상부 생육은 기본 MS 배지에서, 지하부 생육은  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  를 413mg/ℓ 첨가한 배지의 농도를 1/2로 조절한 배지에서 양호하였다. 뿌리의 수와 길이, 잎 전개 신초의 수와 길이, 엽수, 생체중에서 배지성분과 아가 농도

에 따른 유의성이 인정되었으나, 신초의 수에서는 유의성이 없었다. MS 기본 배지에 치상하였을 경우 배지 농도가 1X인 경우에는 아가 농도가 1.6%일 때, 1/2X인 경우에는 1.2%일 때 생육이 가장 좋았다.  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 를 413mg/l로 조절 한 배지일 때에는 아가의 농도가 1.2%일 때 가장 양호하였다. 배지의 농도가 높을수록 아가의 농도 역시 높은 것이 유리하였는데, 이경우 높은 아가 농도가 신초의 생육에는 크게 영향하지 않았다.

그러나  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 를 413mg/l로 조절한 배지에서 생장한 현삼 신초는 투명화가 많이 진전되어 상토 및 포장 이식시 적절치 못한 것으로 생각되었다.  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 를 1/4로 줄인 배지가 현삼 신초의 유도에는 유리하지만, 잎이 전개된 정상적인 식물체로의 성장에는 적합치 않은 것으로 판단되었다. 배지 농도가 1X인 MS 기본 배지에 1.6%의 아가 농도에서 생육한 현삼은 배지농도 1/2X, 아가농도 1.2%의 배지에서 생육한 현삼에 비해 도장하는 경향이 나타났다. 따라서  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 를 413mg/l로 조절한 배지 혹은 배지농도가 1X인 MS 기본 배지에 1.6% 아가 농도보다는, 1/2X MS기본배지에 1.2% 아가 농도 농도에서 잎이 완전히 전개된 개체수가 많고, 신초의 길이나 잎수가 상대적으로 많으면서도 생체중이 크지 않다는 것은 투명화 비율이 상대적으로 낮다는 것을 나타내고 있음을 알 수 있다.

## 2. 순화시 aeration의 효과

배양 용기 내의 공기 조성은 식물체의 성장과 투명화에 크게 영향하는 주요 요소로서, 주로  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ , 에틸렌 등이며 배양 용기 마개를 가스 교환이 용이한 것으로 사용함으로써 투명화를 억제할 수 있을 것이다. 현삼의 기내 순화시 공기의 유통이 순화에 어떠한 영향을 미치는 가를 알아보기 위하여 공극이 0.2 $\mu\text{m}$ 인 필터가 부착된 마개를 순화 용기의 마개로 사용하여 실험한 결과는 표 24와 같다. 대조구와 가스투과용 마개를 사용한 것을 비교했을 때 대부분의 형질들은 유의적인 차이가 없었으나 가스투과용 마개가 달린 용기에서 자란 신초의 생체중은 대조구의 것보다 유의적으로 작았다. 이러한 결과를 볼 때 가스투과용 마개를 사용함으로써 순화기간 중 투명화를 억제하고 건전한 유식물체로 성장하는데 유리하게 작용할 것으로 보인다.

Table 23. Effects of concentration of the MS medium and agar at acclimating stage on shoot growth and rooting in *S. buergeriana*.

MS media strength	Agar conc. (%)	No. of shoot				No. of root			
		0.84 <sup>1</sup>	1.2	1.6	Mean	0.8	1.2	1.6	Mean
					(F-Test NS)				(F-Test **)
1X <sup>1)</sup>		11.9	11.4	12.8	11.85	4.0	5.3	5.8	4.85 <sup>c</sup>
1/2X		11.4	12.6	11.6	11.91	4.2	6.8	6.0	5.8 <sup>ab</sup>
1x <sup>2)</sup>		11.8	11.4	11.5	11.57	6.8	4.3	5.1	5.43 <sup>bc</sup>
1/2x <sup>3)</sup>		11.6	13.1	12.0	12.23	5.6	7.9	6.3	6.52 <sup>a</sup>
Mean		11.68	12.13	11.85		5.3 <sup>b</sup>	5.8 <sup>ab</sup>	6.0 <sup>a</sup>	
(F-Test)		(NS)	(NS)	(NS)					

MS media strength	Agar conc. (%)	Root length(cm)			No. of C.R.P <sup>5)</sup> per explant				
		0.8 <sup>4)</sup>	1.2	1.6	Mean	0.8	1.2	1.6	Mean
					(F-Test **)				(F-Test **)
1X <sup>1)</sup>		1.03	1.78	2.25	1.57 <sup>d</sup>	5.5	5.5	6.5	5.85 <sup>a</sup>
1/2X		2.20	2.18	2.40	2.26 <sup>d</sup>	3.9	6.4	4.6	5.04 <sup>ab</sup>
1x <sup>2)</sup>		2.40	1.53	1.83	1.93 <sup>c</sup>	4.4	4.1	4.8	4.43 <sup>b</sup>
1/2x <sup>3)</sup>		2.30	3.00	3.13	2.80 <sup>a</sup>	4.3	6.9	4.6	5.17 <sup>a</sup>
Mean		1.97 <sup>b</sup>	2.11 <sup>b</sup>	2.43 <sup>a</sup>		4.52 <sup>b</sup>	5.73 <sup>a</sup>	4.96 <sup>ab</sup>	

MS media strength	Agar conc. (%)	Shoot length of C.R.P <sup>5)</sup> (cm)				No. of leaf per C.R.P			Fresh weight(g)				
		0.8 <sup>4)</sup>	1.2	1.6	Mean	0.8	1.2	1.6	Mean	0.8	1.2	1.6	Mean
					(F-Test **)				(F-Test **)				(F-Test t **)
1X <sup>1)</sup>		3.01	2.91	4.05	3.18 <sup>a</sup>	5.0	4.8	6.8	5.25 <sup>a</sup>	3.12	2.52	2.48	2.75 <sup>a</sup>
1/2X		2.43	3.14	3.02	2.88 <sup>b</sup>	4.3	4.6	4.9	4.61 <sup>b</sup>	2.54	2.36	1.44	2.10 <sup>b</sup>
1x <sup>2)</sup>		2.55	2.34	2.64	2.52 <sup>c</sup>	3.3	3.3	3.4	3.30 <sup>c</sup>	2.58	2.63	2.88	2.70 <sup>a</sup>
1/2x <sup>3)</sup>		3.03	3.16	3.15	3.11 <sup>ab</sup>	3.9	4.4	4.8	4.35 <sup>b</sup>	2.59	2.30	1.83	2.24 <sup>b</sup>
Mean		2.76 <sup>b</sup>	2.90 <sup>ab</sup>	3.10 <sup>a</sup>		4.10 <sup>b</sup>	4.30 <sup>ab</sup>	4.68 <sup>a</sup>		2.71 <sup>a</sup>	2.45 <sup>b</sup>	2.11 <sup>c</sup>	

1) MS media, 2) MS media with NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 413mg/ℓ,

3) 1/2X MS media with NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 206.5mg/ℓ, 4) Agar concentration(%)

5) Completely regenerated plant.

\*\* : Within columns, means with the same letter are not significantly different at p=0.05 as Duncan's multiple range test.

Table 24. Effect of aeration at acclimation stage on shoot growth and rooting in *S. buergeriana*

Treatment	No. of shoot (ea)	No. of root (ea)	Root length (cm)	Shoot			F.W. (g)
				No. of C.R.P*	length of C.R.P (cm)	No. of leaf per C.R.P	
No filter	12.6	6.8	2.18	6.4	3.14	4.6	3.02
Filter	13.5	7.8	1.53	4.8	3.1	3.8	2.36
LSD <sub>0.05</sub>	1.77	1.74	0.67	2.23	0.86	0.89	0.37*

C.R.P : Completely regenerated plant.

### 3. 발근·순화과정에 적합한 옥신 종류와 농도

생물반응기에서 6주간 배양된 신초를 옮겨 Magenta vessel에서 4주간 발근·순화과정을 거쳐 성장한 묘의 뿌리는 매우 가늘고 길어도 작으며 개수도 적어 전체적으로 발육이 미약하였다. 이러한 묘를 상토로 이식하였을 생존하는 비율이 낮았다. 또한 성장한 묘 중에서 dense clump 형태로 자란 것이 많아서 지상부와 지하부가 모두 건전하게 생육하는 식물체의 생산을 증가시켜야 할 것이다. 따라서 발근에 적합한 옥신의 종류와 농도를 찾기 위해 NAA와 IBA를 0, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1mg/L로 각각 농도를 달리하여 1/2X MS 배지(agar 1.2%)에 첨가한 후 공극이 0.2 $\mu$ m인 필터가 부착된 마젠타 배양병에서 4주간 발근·순화과정을 거친 후 묘의 지상부 생육과 지하부 생육을 조사한 결과는 표25 및 26과 같다.

대조구와 NAA와 IBA를 처리한 실험구를 비교했을 때 전반적으로 대조구가 생체중이 월등히 높았으나 옥신처리구는 초장, 근장, 엽수, 뿌리의 수에서 높았

다. 이러한 원인은 대조구에서는 dense clump 형태로 자란 개체가 많아서 전반적으로 처리구에 비해 지상부, 지하부 생육이 더 불량하였기 때문인 것으로 생각되었다. NAA 처리구와 IBA 처리구를 비교했을 때 IBA를 처리한 것이 거의 모든 생육 면에서 유리하였다. NAA 처리구에서는 0.01mg/L에서 가장 양호한 생육을 보였고 IBA 처리구에서는 0.005mg/L에서 가장 양호한 생육을 보였다. 하지만 IBA 0.005mg/L 처리가 NAA 0.01mg/L 처리에 비해 초장, 근장, 엽수, 근수가 더 높은 결과를 나타내었다.

Table 25. Effect of NAA on shoot growth and rooting at acclimation stage in *S. buergeriana*.

NAA (mg/L)	Plant height (cm ± S.D)	Root length (cm ± S.D)	No. of leaf (± S.D)	No. of root (± S.D)	Fresh weight (g ± S.D)
0	2.82 ± 1.09 <sup>D</sup>	1.9 ± 1 <sup>a</sup>	3.86 ± 1.81 <sup>D</sup>	2.33 ± 1.21 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.26 <sup>a</sup>
0.005	3.3 ± 1.36 <sup>ab</sup>	2 ± 1.13 <sup>a</sup>	3.87 ± 1.74 <sup>D</sup>	2.37 ± 1.02 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.21 <sup>D</sup>
0.01	3.60 ± 1.25 <sup>a</sup>	2.5 ± 1.47 <sup>a</sup>	5.73 ± 2.01 <sup>a</sup>	2.6 ± 1.22 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.19 <sup>D</sup>
0.05	3.19 ± 1.29 <sup>ab</sup>	2.15 ± 1.16 <sup>a</sup>	4.27 ± 1.14 <sup>D</sup>	2.3 ± 1.06 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.19 <sup>D</sup>
0.1	3.25 ± 1.26 <sup>ab</sup>	2 ± 1.22 <sup>a</sup>	6 ± 1.74 <sup>a</sup>	2.23 ± 0.77 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.25 <sup>D</sup>

Means with the same letter are not significantly according to Duncan.

Table 26. Effect of IBA on shoot growth and rooting at acclimation stage in *S. buergeriana*.

IBA (mg/L)	Plant height (cm ± S.D)	Root length (cm ± S.D)	No. of leaf (± S.D)	No. of root (± S.D)	Fresh weigh (g ± S.D)
0	2.81 ± 1.09 <sup>b</sup>	1.9 ± 1 <sup>a</sup>	3.87 ± 1.81 <sup>c</sup>	2.33 ± 1.21 <sup>b</sup>	0.58 ± 0.26 <sup>a</sup>
0.005	4.17 ± 1.31 <sup>a</sup>	2.56 ± 1.44 <sup>a</sup>	6.33 ± 1.90 <sup>a</sup>	3.47 ± 1.63 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.18 <sup>b</sup>
0.01	3.77 ± 1.40 <sup>a</sup>	2.37 ± 1.53 <sup>a</sup>	5.87 ± 2.51 <sup>ab</sup>	2.7 ± 1.42 <sup>b</sup>	0.30 ± 0.17 <sup>b</sup>
0.05	3.52 ± 1.23 <sup>a</sup>	2.51 ± 1.32 <sup>a</sup>	5.6 ± 1.92 <sup>ab</sup>	2.6 ± 1.28 <sup>b</sup>	0.32 ± 0.15 <sup>b</sup>
0.1	3.47 ± 1.41 <sup>ab</sup>	2.39 ± 1.53 <sup>a</sup>	4.87 ± 1.80 <sup>bc</sup>	2.43 ± 0.77 <sup>b</sup>	0.37 ± 0.22 <sup>b</sup>

Means with the same letter are not significantly according to Duncan.

## 제 8 절 포장재배

### 1. Plug 묘 양성(토양종류)

MS배지(1/2X, agar 1.2%)를 포함하고 공극이 0.2 $\mu$ m인 필터가 부착된 마젠타 배양병에서 4주간 발근·순화시킨 현삼 신초의 잎이 3-4매가 된 때 바로커 상토, SUN1 상토, 훈탄, 바로커 상토+훈탄(1:1), SUN1 상토+훈탄(1:1)을 각각 채운 50구 plug 묘판에 이식하여 2주간 생육시킨 뒤 생존율, 초장, 엽수, 엽폭, 엽장 등을 조사하였다. 영양액은 원시표준액을 사용하였다.

기내 순화된 현삼 신초를 직접 포장에 이식하면 기내환경에서 성장한 식물체의 뿌리는 포장의 토양 환경에 적응하지 못하여 토양 활착이 어렵고 생존율이 떨어진다. 이러한 점을 극복하기 위해 plug묘를 생산하여 이것을 포장에 이식할 경우 뿌리의 생육이 충분히 이루어지고 신초의 생육도 잘 되어 포장에서 생존 비율이 높아질 수 있을 것이다. 이에 본 실험에서는 plug 묘 생산시 토양 종류

를 결정하기 위해 바로커 상토(서울농자재), SUN1 상토(Sun Gro. Co., Canada), 훈탄, 바로커 상토+훈탄(1:1), SUN1 상토+훈탄(1:1)을 각각 채운 plug 묘판에 기내에서 발근과 순화가 된 무균 식물체를 심어서 2주간 생육시킨 뒤 생존율과 생육을 비교하였다(Table 27). 사용한 5가지상토 중 SUN1 상토를 단독처리했을 경우와 훈탄과 혼합처리했을 경우 신초의 생존율과 생육이 다른 3가지 처리구에 비하여 양호했다. 그러나 바로커 상토와 훈탄의 단독처리와 혼합처리에서는 신초의 생존율과 생육이 매우 저조하였다. 따라서 현삼의 plug묘 생산시 바로커 상토와 훈탄 보다는 SUN1 상토를 사용하는 것이 유리한 것으로 판단된다. 하지만 5처리구 모두 유식물체의 생종율이 높지 않은 결과를 보였다. 각 토양의 수분 보유력을 비교하면 SUN1 상토가 가장 높고 그 다음이 바로커 상토이고, 가장 낮은 것은 훈탄이다. 따라서 앞서 설명한 저조한 생존율의 원인은 각 토양에 적합한 수분 공급체계가 이루어지지 않은 이유로 생각되며 이에 대한 실험이 이루어져야 할 것이다.

## 2) 포장이식 과 생육

Plug 묘판에서 순화시킨 현삼 종묘를 5월 15일 포장에 이식하였으며, 생육상황은 그림 1에서 보는 것과 같다. 현삼은 최종 순화단계인 plug 묘판에서도 뿌리의 발달이 미약하여 토양에서 활착이 어려웠다. 60개체가 포장에서 활착이 되었고 여기서 수확한 결과는 표 28에서와 같이 개체당 평균 뿌리 수는 4.8개이었으며 개체당 평균 생체중은 73.4g이었다. 환산된 뿌리당 무게는 15.3g으로 나타났다. 따라서 현삼의 기내육성 종묘는 종자 파종시 소요되는 1년간의 육묘기간을 거치지 않아도 정상적인 수량을 기대할 수 있다고 판단되었다.

Table 27. Effect of bed soil on growth of seedlings on plug tray in *S. buergeriana* after 2 weeks

	Survival rate (%)	Plant height (cm)	No. Leaf	Leaf width (cm)	Leaf length (cm)
B	2	2.1±0,28 *	5.0±1.41	0.65±0.21	1.10±0.14
S	25	3.04±0.65	6.04±1.54	0.84±0.32	1.35±0.29
C	2	2.0±0.28	4.50±0.71	0.65±0.07	1.25±0.07
B+C	5	2.04±0.40	5.6±1.52	0.68±0.18	1.04±0.15
S+C	20	2.92±0.82	5.85±1.23	0.82±0.17	1.42±0.31

B: Baroker, S: SUN1, C: carbonized chaff

\*, standard deviation

Table 28. Mean root numbers per plant and fresh root weight in *S. buergeriana* grown in field.

Variable	N	Mean	Minimum	Maximum
No.of root/plant(each)	60	4.8	1.0	18.0
Fresh root wt/plant(g)	60	73.4	13.0	262.0
Fresh root wt/root(g)		15.3	-	-

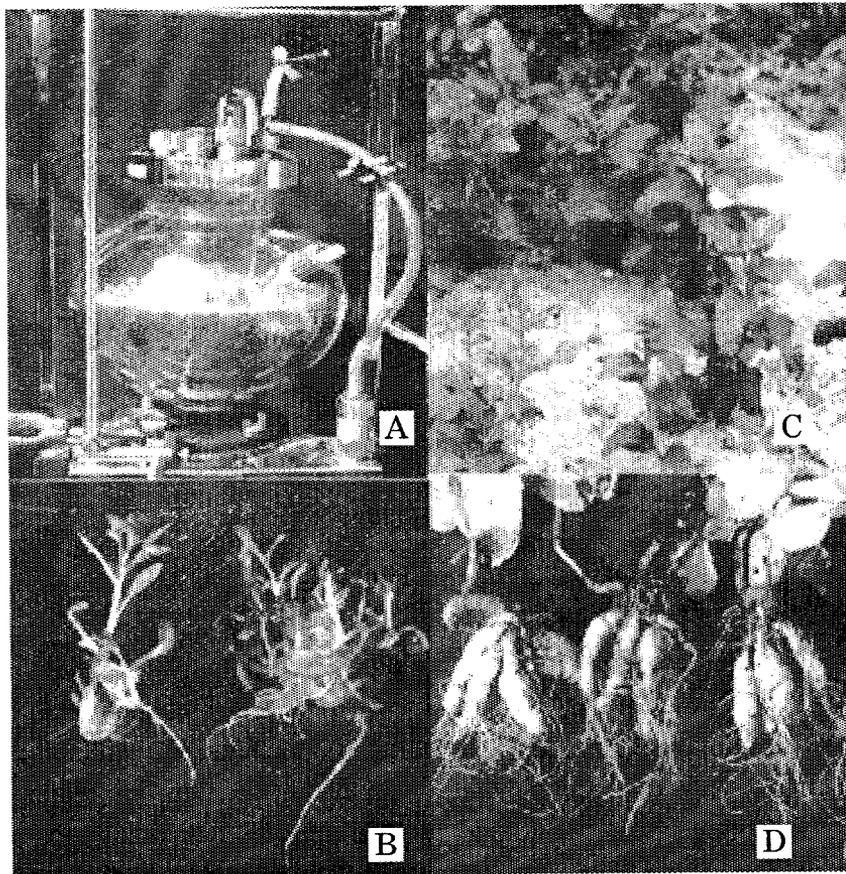


Fig. 1. Outline of plantlets production via bioreactor culture of *S. buergeriana*.

A : Bioreactor culture of stem segments,

B: Harvested shoots from bioreactor,

C: Transplanting in the field,

D: Roots from plants grown in the field.

## 제 4장 내병성 지황 개발을 위한

### Pathogenesis-Related Protein(PR) 이용

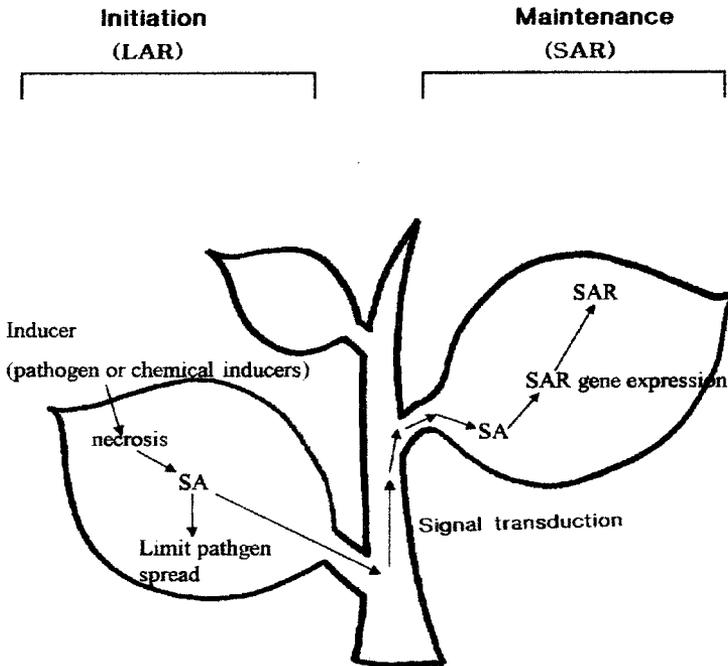
#### 제 1절 서설

식물체는 냉해, 고온, 기계적 상해 등과 같은 물리적인 자극 및 바이러스, 곰팡이, 세균 등 병원성 미생물의 침입과 같은 생물적 자극에 대한 자가방어 반응으로서 여러 가지 물질들을 합성하여 이러한 자극에 대항한다. 식물체가 세균, 곰팡이, 바이러스와 같은 병원성 미생물에 감염되거나 여러 가지 화학 물질 등에 노출되면, 식물체는 감염 또는 손상부위 주변에서 발생하는 localized acquired-resistance (LAR)와 감염되지 않은 부위에서 발생하는 systemic acquired-resistance (SAR)등의 자가 방어 반응을 나타낸다.

그림 1에서 보는 것처럼 감염 초기에는 병원균이나 화학물질 등이 감염부위에서 necrosis와 같은 과민반응(hypersensitive reaction)이 일어나게 되고 과민반응에 의한 LAR의 결과로 salicylic acid(SA), ethylene, systemin 등을 생합성한다. 생성된 SA는 먼저 감염부위에서 자가방어기작과 관련된 몇 가지 물질들 즉, 강력한 항균활성을 지닌 phytoalexin류, phenol 유도체, protease inhibitor, peroxidase, 병원성 미생물의 세포벽을 가수분해하는 효소인 chitinase와  $\beta$ -1,3-glucanase 등을 포함하는 pathogenesis-related proteins(PRs) 등의 생합성을 유도함으로써 병원성 미생물이나 환경 변화에 대항하여 자신을 방어하게 된다. 병원균에 의해 유도되는 단백질인 PRs는 식물체의 과민반응에 의해 생산되는 대표적인 산물로서 담배 모자이크 바이러스(TMV)에 감염된 담배 잎에서 처음 발견된 이래 담배 이외에도, 감자, 옥수수, 사탕무, 해바라기, 토마토, 면화 등 다수의 고등식물에서 보고되고 있다.

Van Loon은 담배에서 추출, 정제한 PRs들을 혈청학적 연관 및 부분 아미노산 서열을 기준으로 PR-1, -2, -3, -4, -5 등으로 분류하였으며, 이후 토마토 등의 PRs와 비교, 효소적, 생물학적 역할을 고려하여 모두 11 개 군(PR-1~PR-11)으로 분류하였다. PR-1은 항균 활성을 보유하고 있으나, 아직 효소활성

은 밝혀져 있지 않다. 반면, PR-2는  $\beta$ -1,3-glucanase, PR-3, PR-4, PR-8 및 PR-11은 chitinase 활성을 보유하고 있으며, PR-5는 thaumatin과 아미노산 서열이 유사한 단백질로서 항균 활성을 보유하며, PR-6은 proteinase inhibitor, PR-7은 endoproteinase, PR-9는 peroxidase 활성을 각각 지니고 있는 것으로 보고되었으며, PR-10은 ribonuclease와 유사한 단백질로 알려져 있다(표 1).



Phytoalexin  
 Phenol derivatives  
 Proteinase inhibitor  
 PRs

PRs  
 SAR 8.2  
 Peroxidase  
 Gly-rich protein

그림 1. Conceptual model for the pathway leading to the establishment of SAR

Æ 1. Pathogenesis-related proteins.

<b>Protein family</b>	<b>Type member</b>	<b>Biochemical function</b>
PR 1	Tobacco PR-1a	Unknown Antifungal in vivo activity
PR 2	Tobacco PR-2	$\beta$ -1,3-Glucanase, enhances chitinase, antifungal activity
PR 3	Tobacco P, Q	Chitinase In vitro and in vivo antifungal activity
PR 4	Tobacco R	Chitinase
PR 5	Tobacco S	Thaumatin-like and a protease/ $\alpha$ -amylase inhibitor In vivo antifungal activity
PR 6	Tomato inhibitor I	Protease inhibitor in plant-microbe and plant-insect interactions
PR 7	Tomato P <sub>69</sub>	Endoproteinase
PR 8	Cucumber chitinase	Chitinase
PR 9	Tobacco "lignin-forming peroxidase"	Peroxidase
PR 10	Parsley "PR1"	"Ribonuclease-like"
PR 11	Tobacco class V chitinase	Chitinase

이러한 PRs는 산성 pH에서 선택적으로 추출되며, 열에 안정하며, 단백질분해 효소에 대해 강한 저항성을 지닌 저분자 단백질로서 주로 세포간극 (intercellular space)에 위치하는 공통점을 지닌다.

식물체는 감염부위에서 과민반응에 의해 시작된 저항성을 유지하기 위하여 감염부위에서 생성된 systemic endogenous signal인 SA, ethylene, systemin, jasmonic acid 등을 식물체의 감염되지 않은 건전한 부위로 전달하여 다른 부위에서도 chitinase와  $\beta$ -1,3-glucanase등 여러 가지 SAR 관련 유전자의 발현을 유도하게 된다. 현재 SAR 관련 단백질들은 8 종류가 보고되어 있다(표 2). 담배, 토마토 등에서 보고된 PRs이외에도 오이, 감자, 애기장대풀에서는 SAR에 의해 peroxidase, SAR 8.2, glycin-rich protein 등의 단백질들이 유도되어 세포벽을 강화함으로써 식물체의 저항성을 증가시키는 것으로 보고되었다. SA 이외에도 benzothiazole 및 그 유도체 등이 담배와 애기장대풀 등에서 SAR관련 단백질을 유도하는 것으로 확인되었다.

곰팡이의 일종인 *Phytophthora infestans*에 감염된 감자 잎에서 유도된 다량의 PRs 중 chitinase와  $\beta$ -1,3-glucanase들이 존재함이 알려졌으며, 이후, 토마토, 옥수수, 콩, 완두, 사탕무, 오이, 감자 등에서도 이와 유사한 결과들이 보고되었다. 이처럼 감염부위에서나 건전한 부위에서 생성된 chitinase와  $\beta$ -1,3-glucanase가 병원성 미생물에 대한 방어기작에 참여한다는 가능성은 이들이 PRs의 일종임이 알려지기 전부터 제시되었으며, 이는 chitinase 기질인 chitin (*N*-acetylglucosamine의  $\beta$ -1,4-결합으로 이루어진 중합체)이 현재까지 식물체내에서는 그 존재가 보고된 바 없으며,  $\beta$ -1,3-glucanase 기질인  $\beta$ -1,3-glucan과 함께 많은 곰팡이들의 세포벽을 구성하는 주성분이기 때문이다(그림 2.). Mauch 등은 식물체내에 존재하는  $\beta$ -1,3-glucanase가 단독으로보다는 chitinase와 상호작용으로 *in vitro*에서 곰팡이 생육을 강력하게 저해한다고 보고하였다. 대부분의 식물체내에서 낮은 수준의 구성 효소로서 발견되어 존재하는 이들 chitinase와  $\beta$ -1,3-glucanase 두 효소는 식물체의 발달단계에 따라 또는 ethylene처리와 같은 외부자극, 곰팡이, 세균 또는 바이러스의 감염 등에 의해 유도되며, 서로 상보적으로 작용하여 병원균 침입에 대해 저항성을 나타낸다. 먼저  $\beta$ -1,3-glucanase가 곰팡이 세포외벽을 분해하여 내부 chitin이 노출되면 이들이 chitinase에 의해 분해되어 항균 활성을 나타내는

것으로 알려져 있다.

여러 식물에서 발견되어진 chitinase는 대부분 endo형 효소로 chitin으로부터 N-acetylchitooligosaccharide를 생산하며 비교적 열이나 산에 안정하고, 병원균 침입이외에도 미생물 세포벽 추출물, chitin 가수분해물, 식물 호르몬 등 생물적 elicitor나 SA, acetyl-SA(ASA) 등 비생물적 elicitor 처리에 의하여 chitinase활성이 3~80 배정도 증가, 유도되는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 chitinase 발현은 어떤 기관이나 조직 안에서는 발달단계에 따라 조절되어지며, 초기 배 발달단계에서는 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있는데 이것은 방어기작과는 무관한 chitinase의 내생적 기능에 의한 것으로 보인다. 이와 같이 chitinase는 발아기간 동안에 세포신장 조절, 화분관 성장 조절, 담배, 포도, 완두 등의 개화, 당근의 배 발달 등에 관여하는 것으로 보고되고 있다. 특히, chitinase는 *Rhizobium*에 의해 생산되는 lipo-oligosaccharide 신호물질을 비활성화 시킬 수 있다. 이 물질은 뿌리털 기형을 유도하거나, 콩과식물 뿌리에서 피질 세포분열, 또는 뿌리혹 발달에 관여하는 것으로 보고되고 있다.

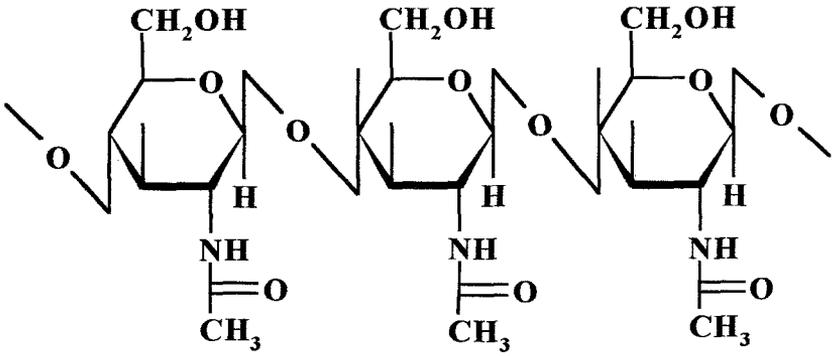
식물 chitinase는 chitin과 결합하는 부위로 알려진 hevein domain의 존재 여부, catalytic domain의 상동성, hevein domain과 catalytic domain을 연결해주는 hinge domain 및 C-terminal extension의 존재여부에 따라 class I, II, III, IV, V 등 5 개의 class로 분류한다(그림 3).

Chitin이 결합하는 chitin-binding domain(CBD)은 고무나무(*Hevea brasiliensis*) latex에서 추출한 43 개 아미노산의 polypeptide인 hevein과 상동성이 매우 높아 hevein domain이라 불린다. Cys과 Gly이 많은 약 40 개의 아미노산 EQCGSQAGGALCPNCLCCSQYGWCGSTSAYCGSGCQSQCS를 기본 배열로 하여 일부 변형이 이루어져 있다. 항균 활성을 지니는 것으로 알려진 win(wound-induced) proteins 및 wheat germ agglutin과 같은 다른 식물체의 단백질에서도 이와 유사한 아미노산 배열이 발견되고 있다. 사탕무우 (*Beta vulgaris*) 잎에서 추출한 chitin-binding peptide는 Cys과 Gly이 많은 30개 아미노산으로 구성된 peptide로서 hevein-domain과 상당히 높은 상동성을 나타내며, *Cerocospora*에 대해 강한 항균 활성을 나타내는 것으로 보고되었다.

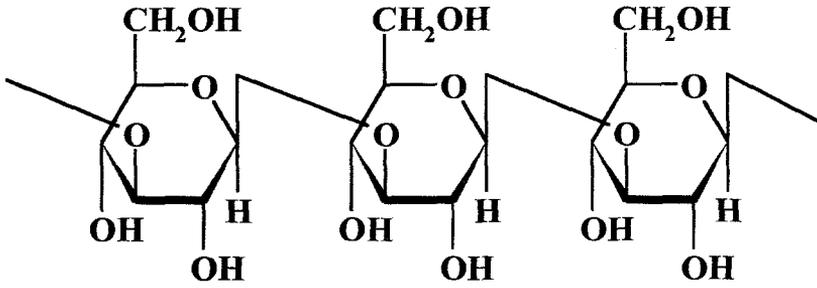
Æ 2. Classes of proteins accumulating systemically in plants after local infection.

Class	Possible role in defense	Tobacco	Cucumber	<i>Arabidopsis</i> <sup>1</sup>
Peroxidase	strengthen cell walls generate the toxic free radicals	P61, P65 (cv. Xanthi) P37, P35 (cv. KY14)	30-33 kD isoforms	ND <sup>2</sup>
PR-1	unknown	PR-1a, -1b, -1c	ND	PR-1 homologue
Chitinase	antifungal	PR-P PR-Q (PR-3a, -3b)	class III chitinase	ND
Glucanase	enhance antifungal activity of chitinase	PR-2 PR-N PR-O (PR-2a, -2b, -2c)	glucanase	glucanase
PR-4	chitinase	PR-R (PR-4a, 4b)	ND	ND
Thaumatococcal-like proteins	antifungal $\alpha$ -amylase/ protease inhibitor	PR-S (PR-5a, -5b)	ND	PR-5 homologue
SAR 8.2	unknown	SAR 8.2 protein	ND	ND
Glycine-rich protein	strengthen cell walls	GRP-8 <sup>3</sup>	ND	GRP

1. Transcript levels of *Arabidopsis* protein are enhanced by salicylic acid treatment.
2. ND ; Not demonstrated
3. Presence deduced from systemic increase in corresponding mRNA



Chitin



$\beta$ -1,3-Glucan

그림 2. Schematic structure of chitin and  $\beta$ -1,3-glucan.

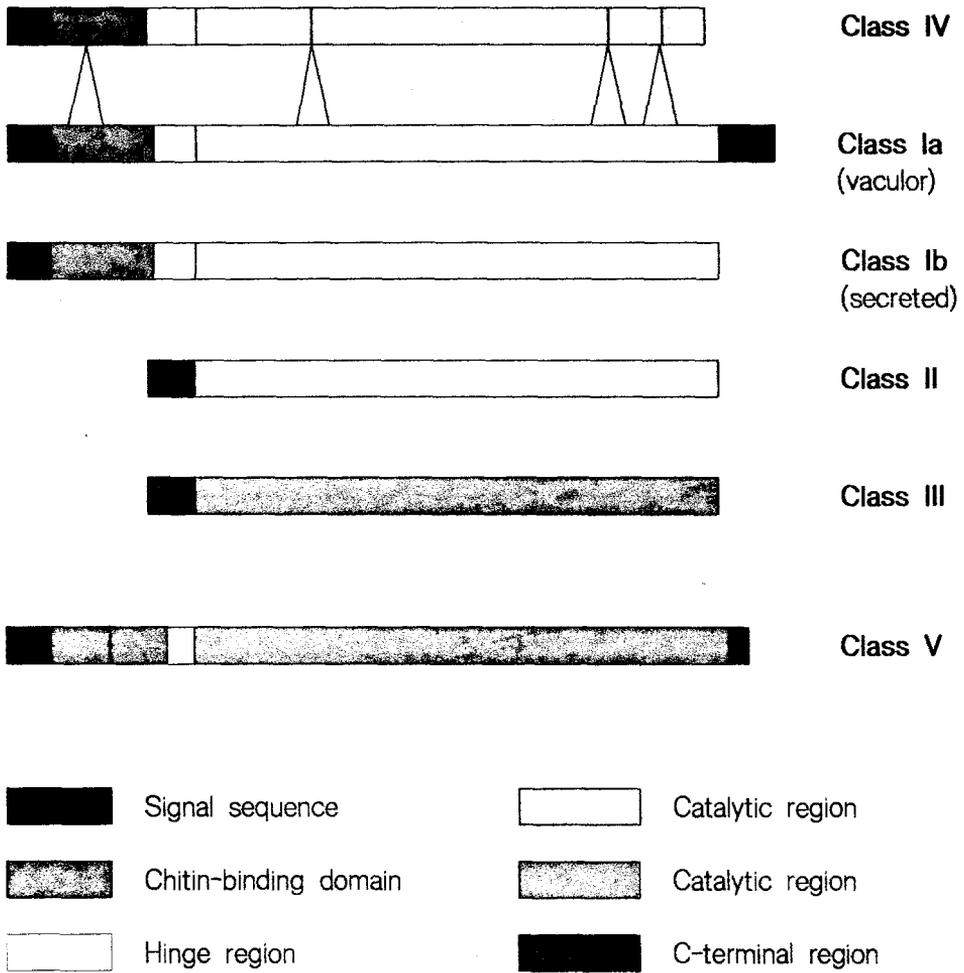


그림 3. The structure of plant chitinase proteins.

*Amaranthus caudatus* 종자로부터 추출한 30개 아미노산의 chitin-binding peptide도 강력한 항균 활성을 보유하고 있으나 곰팡이를 완전히 죽이지는 못하는 것으로 보고되고 있다. 또한, Stinging nettle(*Urtica dioica*)로부터 추출한 chitinase-free-lectin도 *Botrytis cinerea*, *Trichoderma hamatum*, *Phycomyces blakesleeanus* 등의 성장을 저해하지만, lectin 자체가 포자나 균 사체를 죽일 수 있는 능력이 있는 것은 아니다. Chitin-binding domain이 없는 chitinase는 기질에 대한 친화도가 상당히 저하되어 비활성은 낮아지지만, CBD가 효소활성이나 항균 활성을 나타내는데 있어서 반드시 필요한 것은 아닌 것으로 보고되고 있다. Hinge domain은 일종의 spacer domain으로서 chitinase 종류에 따라 다르며, 효소 내 catalytic region과 hevein domain 사이에 존재하여 이들을 연결해 주고 있다.

PR5는 담배, 감자, 토마토, 대두, 옥수수 등 다양한 식물에서 발견되어진 201~229개의 아미노산으로 구성된 분자량 22~26 kDa 정도의 단백질로써 매우 용해성이 크며, 16개의 Cys이 8개의 disulfide 결합을 하고 있어 단백질 분해 효소, pH와 열에 의한 변성에 매우 안정하고, 조직 특이적, 세포내 구성성분, 세포밖 등 다양한 부위에 존재한다. 또한, TLP는 pI가 3.4~12의 다양한 범위를 가져 이를 근거로 산성, 중성, 염기성 TLP로 구분하며 세포밖에 존재하는 TLP는 산성인 경향이 강하고 액포에 존재하는 TLP의 경우 염기성인 경향이 강하다.

옥수수 씨앗에서 분리된 zeamatin은 thaumatin뿐만 아니라 담배의 두 TLP인 osmotin, PR-R과 아미노산 서열이 매우 유사한 단백질로 *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Trichoderma reesei* 등에 대하여 항균 활성을 갖는다고 보고되어 TLP가 항균활성을 나타낼 가능성이 있음을 시사하였다. 그 후 TMV에 감염된 담배에서 분리된 TLP인 AP24와 토마토에서 분리된 NP24가 *Phytophthora infestans*의 포자낭 분해 원인이 된다는 보고와 담배로부터 분리된 osmotin, PR-S 등이 식물 병원균인 *Cercospora beticola*에 대하여 항균 활성을 갖는다는 보고 등에 의하여 TLP가 항균 활성을 갖는다는 것이 입증되었다. 이후에도 많은 연구가 수행되어 TLP가 *Phytophthora infestans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Verticillium albo-atrum*, *Verticillium dahliae*, *Cercospora*

*beticola*, *Fusarium oxysporum*과 *Alternaria solani* 등과 같은 병원성 곰팡이와 *Oomycetes*, *Hyphomycetes*와 *Ascomycetes* 강에 속하는 곰팡이의 포자 발아 단계와 균사 성장 단계 모두를 저해하는 것으로 나타났으며, 다양한 식물원으로부터 TLP의 항균활성이 Stintzi 등에 의하여 정리되었다.

*Erysiphe graminis*에 감염된 보리 잎에서 19kDa TLP의 유도, *Erysiphe graminis* 균사를 처리한 밀의 발아시 TLP mRNA의 14시간 내 유도, *Puccinia graminis*에 감염된 호밀 발아시 네 개의 서로 다른 TLP mRNA의 24시간 내 유도, *Pseudomonas syringae*가 감염된 *Arabidopsis thaliana*에서 TLP mRNA의 6일내 유도 등 TLP는 바이러스와 곰팡이의 감염 모두에 대하여 빠른 시간내에 유도되는 PRs이며 쌍떡잎 식물과 외떡잎 식물 모두에서 유도되는 것으로 알려졌다.

병원균에 감염된 식물은 항균 활성을 가진 PRs를 비롯한 여러 단백질의 발현을 유도한다. Chitinase(PR3)와  $\beta$ -1,3-glucanase(PR2) 같은 PRs는 세포벽 구성성분이 chitin과  $\beta$ -1,3-glucan인 병원균에 대한 항균활성 능력을 가진 반면, 세포벽이 chitin은 없고  $\beta$ -1,3-glucan으로만 구성된 *Oomycetes* 강에 속하는 곰팡이에 대하여는 항균 활성을 보이지 못하였지만 TLP(PR5)는 *Phytophthora infestans*를 포함한 *Oomycetes* 강의 곰팡이에 대하여 항균 활성을 나타내었다.

또한, 콩 chitinase 유전자를 도입한 감자와 담배, 페튜니아와 담배의 chitinase 유전자를 도입한 오이 등의 유전자 재조합 식물체에서 chitinase 발현 수준이 증가하면 병원균 침입에 의해 발생하는 손상이 감소하는 것으로 보고되었다.

이러한 연구 결과들을 통해 PR protein의 항균활성을 이용하여 병원균에 대해 저항성을 가지는 내병성 지황 육종의 가능성을 확인하였다. 이번 연구는 이러한 가능성의 확인에 중점을 두고 수행하였으며 구체적으로는 지황병원균을 저해할 수 있는 지황 PR protein과 타 작물의 PR protein을 탐색하고, 이들 PR protein에 의한 지황 병원균의 저해 mechanism을 고찰하였다.

## 제 2절 지황 병유도단백질(JHIII)을 이용한 지황 병원균에 대한 항균 효과 검정

### 1. 지황 PR-protein 유전자 확보

처음 연구를 시작하면서 chitinase를 순수 분리할 병 유도 단백질로 선정하였다. Chitinase는 이 효소의 기질이 식물체에 존재하지 않으나 in vitro에서 식물 병원균의 세포벽을 분해하는 것으로부터 식물의 병저항성 기작과 관련지어 많이 연구되었으며, 최근 냉해에 저항성을 부여하는 antifreezing protein의 일종일 것이라는 보고도 있었다. 이러한 관심에서 그림 4, 5와 같은 정제 과정을 통해 지황에서 단백질의 순수 분리를 시도하였다.

산성조건 추출에서는 염기성 chitinase group이 염기성조건 추출에서는 산성 chitinase group이 분리되며 이로부터 우리는 PAGE gel elution을 이용해 세 가지 염기성 chitinase(P1, P2, P3)와 한 가지 산성 chitinase(P4)를 분리, 정제하였다. 순수 분리된 단백질의 효소적 특성을 살펴보면 다음과 같다. P1은 pH 3, 60°C에서 최대의 활성을 보이고 N-acetylchito올리고당을 이용한 분해 실험을 통해 중합도 4이상의 기질에 대해 endo형으로 작용함을 알 수 있다. P2는 pH 5, 60°C에서 최대 활성을 가지고 N-acetylchito올리고당을 이용한 실험에서는 P1과는 달리 중합도 4 이상의 기질에 대해 exo형으로 작용하는 chitinase임을 밝혀냈다. P3는 pH 5, 50°C에서 최대의 활성을 나타내고 중합도 4이상의 기질에 대해 중합도 2로 가수분해하는 활성이 큰 exochitinase이다. 마지막 산성 chitinase인 P4는 pH 7, 50°C에서 최적의 활성을 나타내고 중합도 3이상의 기질에 대해 endo형으로 작용을 한다. 이상의 효소적 특성을 하나의 표로 나타내면 다음의 표 3과 같다. 순수 분리한 네 가지 chitinase의 아미노산 서열을 분석한 결과 P1은 N-말단 아미노산 서열을 분석한 결과 P1의 N말단 17개의 아미노산은 최근 항균활성을 보유한 단백질로 많이 보고되는 thaumatin-like protein(TLP)임을 확인하였다. 그러나 P2와 P3는 N말단이 blocking되어 서열을 결정할 수 없어 CNBr cleavage와 trypsin cleavage를 이용해 일부 아미노산의 서열을 밝혀냈다(표 4). 이러한 결과를 통해 지황 내 발현 양이 높은 염기성 chitinase P1과 P2는 기존에 타 식물에서 발표된 chitinase와는 다소 다른 성질을 갖고 있음을 알게 되었다.

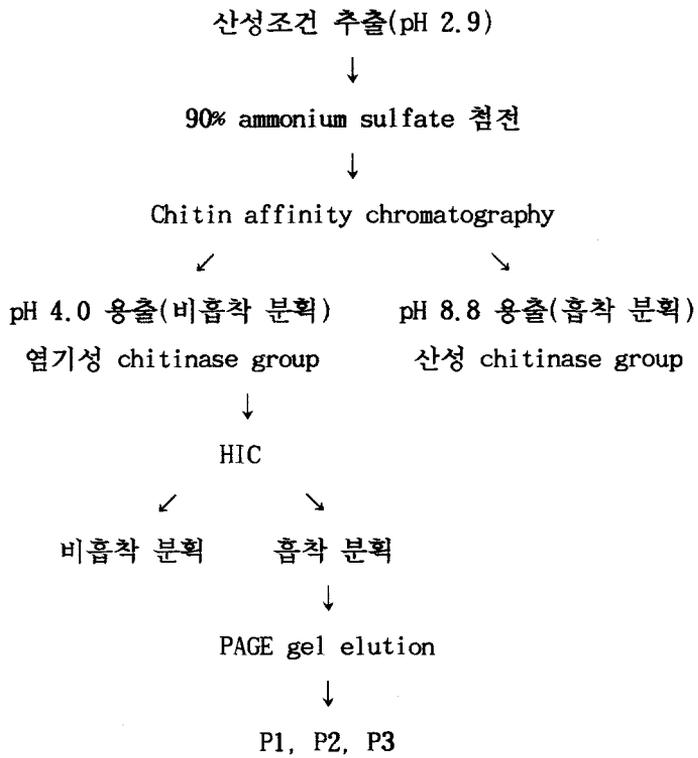


그림 4. 산성 추출 조효소로부터 염기성 chitinase P1, P2, P3의 정제 과정

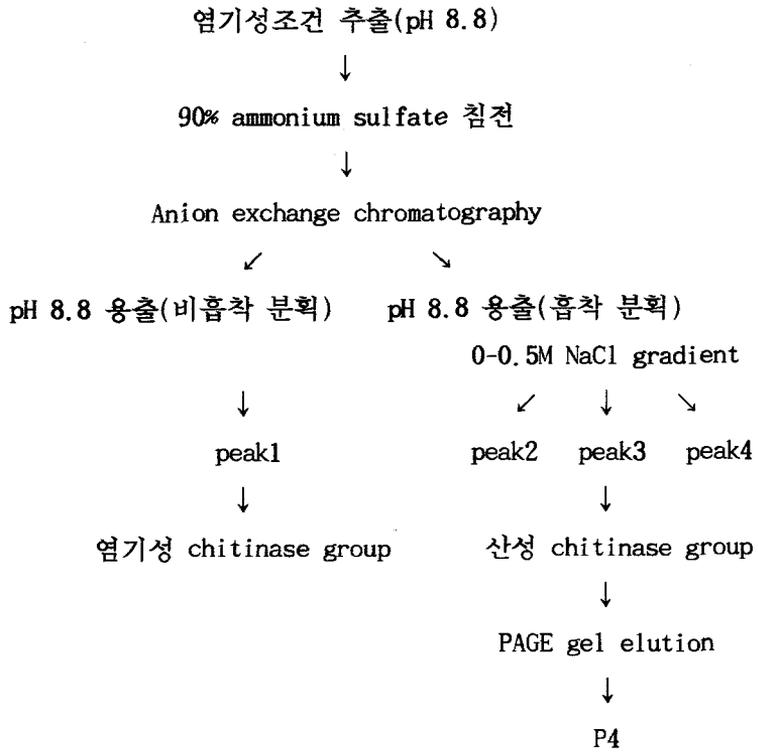


그림 5. 염기성 추출 조효소로부터 산성 chitinase P4의 정제 과정

표 3. 순수분리 단백질 P1, P2, P3, P4의 특징 비교

	P1	P2	P3	P4
8% Native PAGE에서 이동도(Rf)	0.31	0.38	0.47	0.68
분자량(kDa)	21	28.6	28.6	30
최적 pH	3.0	5.0	5.0	7.0
최적 온도(°C)	60	60	50	50
작용 양상	endo	exo	endo	endo
비활성 (unit/mg protein)	0.19	0.44	0.58	2.77
Km(mM)	0.27	8.85	2.00	0.32
Vmax(mK/min)	2.27	0.039	20	10.42
Kcat(min <sup>-1</sup> )	8.41	0.0044	10	32.56

표 4. 혐기성 chitinase P1, P2, P3의 일부 아미노산 서열

Chitinase	Treatment	Peptide	Sequence
P1	N-terminal		ATFDI TNRCS YTVWA AA
	CNBr	1-CN	AQIPI QDYXQ YQVXA
P2	N-terminal		Blocked
	CNBr	2-CN1	Blocked
		2-CN2	Blocked
	Trypsin	2-TR4	NVANR FKQNK
2-TR7		VYLKA APQ	
P3	N-terminal		Blocked
	CNBr	3-CN	Blocked

이렇게 분리한 단백질의 항균활성을 검정하기 위해 서울대학교 농업생명과학 대학 이용환 교수님께 의뢰, 벼 도열병균인 *Magnaporthe grisea*에 대한 microassay 방법을 이용해 항균활성을 검정하였다. 결과는 표 5과 같으며 지황 추출물의 염기성 group뿐만 아니라 산성 group에도 시험 균주의 conidia 형성 저해 및 appressorium 형성 저해 활성 등의 항균활성을 보유하고 있음을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 이들 두 염기성 chitinase 유전자와 발현 양이 낮아 비록 단백질 수준에서는 많은 연구가 이루어지지 못했지만 산성 chitinase 유전자를 분리하여 이들이 지황의 병원균 감염과정에서 어떤 역할을 할 지 구명하고자 하였다.

표 5. Blast fungus인 *Magnaporthe grisea*의 conidia 형성 저해 및 appresorium 형성 저해에 대한 지황 시료의 효과

시료명	단백질 농도 (mg/ml)	Conidia Germination(%)	Appresorium Formation(%)
Control(멸균 증류수)		100.0	100.0
지황 조효소	4.880	0.0	-
	0.097	99.0	33.0
염기성 분액	4.880	0.0	-
	0.097	99.3	29.0
산성 분액	4.840	0.0	-
	0.096	100.0	42.0
P1	0.170	100.0	54.0
P2	0.410	99.3	47.0
	0.200	100.0	66.0

### 가. 산성 class III chitinase 유전자 분리

지황의 산성 chitinase는 낮은 발현 수준으로 인하여 정제가 어려웠으며, 아미노산 서열 정보도 얻을 수 없었다. 따라서, 이미 발표된 타식물의 산성 chitinase 아미노산 및 유전자 염기 서열(그림 6)을 참고하여 PCR primer P 5, P3를 표 6와 같이 제작한 다음 교배종 genomic DNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다.

그 결과 그림 7에서처럼 약 420bp 정도의 PCR 산물을 확인할 수 있었다 (lane 3 화살표). 이 band를 gel로부터 용출하여 pGEM-T easy plasmid vector에 subcloning하여 pGEMJH라 명명하였다. pGEMJH에 cloning된 PCR 산물의 염기 서열은 그림 8과 같으며 식물 class III chitinase와 높은 상동성을 보여 본 PCR 산물은 chitinase 유전자의 일부임을 확인하였다. PCR 산물의 염기서열을 아미노산서열로 바꾸어 담배의 산성 및 염기성 class III chitinase 아미노산서열과 비교하였다. 418 염기의 PCR 산물로부터 번역된 139개 아미노산의 peptide('JHCHIT'로 명명)는 그림 9와 같이 담배 산성 class III chitinase와 95개, 담배 염기성 class III chitinase와 86개 아미노산이 일치하는 위치에 보존되어 있어 각각 68%, 62%의 상동성을 나타냈다. JHCHIT의 구성 아미노산 잔기로부터 계산된 pI는 4.40으로 나타나, JHCHIT는 지황의 산성 class III chitinase의 일부로 생각되었다. 418bp PCR 산물을 탐침자로 하여 genomic DNA Southern blot analysis한 결과 그림 10과 같이 EcoR I digest에서 0.9와 0.5kb 그리고, Hind III digest에서 2.3과 0.95kb의 각각 2개의 signal band를 얻었다. 이는 그림 8에서 보는 것처럼 418bp PCR 산물에 이들 두 제한효소자리가 각각 1개씩 존재하기 때문이다. 이로부터 교배종 지황에는 산성 class III chitinase가 single gene으로 존재함을 알 수 있다.

```

arabidopsis      MTNMTLRKHVIYFLFFISCSLSKPSDASRGGIAIYWQNGNEGNSLTCATCATGRYAYVNVVA
tobacco_basic   ---MNIKVSLLFILPIFLLLT--SKVKAGDIVVYWGQDVGEGKLIDTCNSGLYIVNIA
tobacco_acidic  ---MIKYS--FLTALVLFRL-ALKLEAGDIVIYWQNGNEGSLADTCATNNYAIVNIA
cucumber        ----MAAHKITTTLISIFFLLSSIFRSSDAAGIAIYWQNGNEGSLASTCATGNYEFVNI
                *          * **** * * * * * * * *
arabidopsis      FLVKFGNGQTPELNLGHCNPAANTCTHFGSQVKDCQSRGIKVMLSLGGGIGNYSIGSRE
tobacco_basic   FLSSFGNFQTPKLNLAGHCPEPSSGGCQLIKSIRHCQSIGIKIMLSIGGGTPTYTLSSVD
tobacco_acidic  FLVVFNGQNPVNLGHCDPNAGACTGLSNDIRACQNGGIKVMLSLGGGAGSYFLSSAD
cucumber        FLSSFSGGQAPVNLGHCNPDNNGCAFLSDEINSCKSQNVKVLISIGGGAGSYLSSAD
                ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *
arabidopsis      DAKVIADYLWNNFLGGKSSSRPLGDAVLGDIDFNIELGSPQHWDDLARSLKFSHRGRKV
tobacco_basic   DARQVADYLWNNFLGGQSSFRPLGDAVLGDIDFDIELGQP-HYIALARRLSEHGQGGKKL
tobacco_acidic  DARNVANYLWNNYLGQSNTPLGDAVLGDIDFDIEGGTTQHWDEIAKTLQSFSQQ-RKV
cucumber        DAKQVANFIWNSYLGQSDSRPLGAAVLDGVDIEDIESGSGQFWDVLAQELKNFGQV---I
                ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                -----> P5
arabidopsis      YLTGAPQCPFPDRMLGSAINTKRFDYVWIQFYNNPPCSYTSGNTQNLFDSWNKWTTISIAA
tobacco_basic   YLTAAPQCPFPDKLLNGALQTGLFDYVWVQFYNNPECFMS--NSENFKRRWNQWTS-IPA
tobacco_acidic  YLTAAPQCPFPDTWLNALSTGLFDYVWVQFYNNPPCQYSGGSADNLKNYWNQWNA-IQA
cucumber        LS-AAPQCPIDAHLDAAIKTGLFDSVWVQFYNNPPCMFAD-NADNLLSSWNQWTA-FPT
                **** * * * * * * * * * * * * * * * *
arabidopsis      QKIFLGLPAAPEAAGSG-YIPDVLTSQILPTLKKSRKYGGVMLWSKFWDKNGYSSSIL
tobacco_basic   KKLYIGLPAAKTAAGNG-YIPKQLMSQVLPFLKGGSKYGGVMLWNRKFDVQCQYSSAIR
tobacco_acidic  GKIFLGLPAAQGAAGSG-FIPSDVLVSQVLPILINGSPKYGGVMLWSKFYD--NGYSSAIAK
cucumber        SKLYMGLPAAREAAPSGGFI PADVLISQVLPITKASSNYGGVMLWSKAFD--NGYSDSIK
                * **** * * * * * * * * * * * * * * * *
                <----- P3
arabidopsis      ASV-
tobacco_basic   GAV-
tobacco_acidic  ANV-
cucumber        GSIG

```

그림 6. 발표된 chitinase 아미노산 서열들의 상동성 조사.  
 arabidopsis; 애기장대풀, tobacco\_basic; 담배(염기성),  
 tobacco\_acidic; 담배(산성), cucumber; 오이, \*: 보존된 아미노산 잔기

표 6. 타식물 chitinase 아미노산 서열을 참조한 PCR primer 제작.

Primer P5	L G A A V L D G 5'----->3' t gga gat gct gtt tta gat gg
Primer P3	Y G G V M L W 3'<-----5' ata cct cca cag tac gaa acc

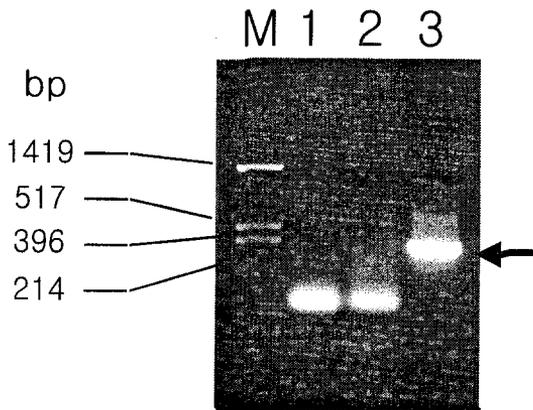


그림 7. PCR 산물의 1.5% agarose gel 전기영동 분석.

lane M: size marker, 1: P1-1/P1-3 primer set,

2: P1-2/P1-3 primer set, 3: P5/P3 primer set

화살표는 PCR 산물을 표시함.



JHCHIT -----  
 담배 산성 -MIKYSFLLTA-LVLFLRALKLEAGDIVIYWQQNGNEGLADTCATNNYAIVNI AFLVVF  
 담배 염기성 MNIKVSLLFILPIFLLLLTSKVKAGDIVVYWQQDVGEGKLI DT CNSGLYIVNIAFLSSF

JHCHIT -----  
 담배 산성 GNGQNPVNLNLAGHCDPNAGACTGLSNDIRACQNQGIKVMLSLGGGAGSYFLSSADDARNV  
 담배 염기성 GNFQTPKLNLAGHCEPSSGGCQQLTKSIRHCQSIGIKIMLSIGGGTPTYTLSSVDDARQV

JHCHIT -----GDAVLDGIDFDIEGRYNLYWDDLARYLSNYGKRGRKVVYLTAA  
 담배 산성 ANYLWNNYLGGSNTRPLGDAVLDGIDFDIEGTTQHWDELAKTLSQFSQQ-RKVYLTAA  
 담배 염기성 ADYLWNNFLGGQSSFRPLGDAVLDGIDFDIELG-QPHYIALARRLSEHGQQGKLYLTAA  
 \*\*\*\*\* \*\* \*\* \* \*\*\*\*\*

JHCHIT PQCFFPDYYIGNALQTGLFDYVWVQFYNNPPCQYSSG-MDSFEKAWKDWNSIPAGEIFLG  
 담배 산성 PQCFFPDTWLNALSTGLFDYVWVQFYNNPPCQYSSGSADNLKNYWNQWNAIQAGKIFLG  
 담배 염기성 PQCFFPDKLLNAGALQTGLFDYVWVQFYNNPECEPMSN-SENFKRRWNQWTSIPAKKLYIG  
 \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \* \* \* \* \*

JHCHIT LPASAQAAGTGFPAGDLTSQVLPALKGS AKYGGVMLW-----  
 담배 산성 LPAAQGAAGSGFIPSDVLSQVLPALINGSPKYGGVMLWSKFYDN--GYSSAIKANV  
 담배 염기성 LPAAKTAAGNGYIPKQVMSQVLPFLKGSSKYGGVMLWNRKFDVQCGYSSAIRGAV  
 \*\*\* \*\* \* \* \* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*

그림 9. PCR 산물로부터 번역된 아미노산서열(JHCHIT)의 담배 산성 및 염기성 class III chitinase와 상동성 비교.

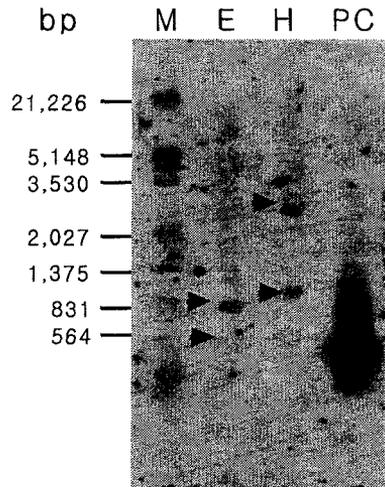


그림 10. 418bp PCR 산물을 탐침자로 한 genomic DNA Southern blot analysis

lane M : lambda/EcoR I + Hind III

E : EcoR I digest

H : Hind III digest

PC : 418bp PCR 산물(positive control)

PCR을 통하여 얻은 418bp의 유전자 절편을 이용하여 RACE(Rapid Amplification of cDNA End) 방법으로 지황의 산성 class III chitinase 유전자 *JHIII*를 분리하였다(그림 11). 분리한 지황 산성 class III chitinase 유전자 *JHIII*는 signal peptide를 코딩하는 염기 일부가 빠진 총 940bp로 272개 아미노산을 코딩하며 이중 mature protein은 271개 아미노산으로 구성된 분자량 29,136Da으로 추정되었다. 계산한 등전점은 pH 5.73으로 산성 단백질임을 알 수 있었다.

1	S G K I S I Y W G Q N G N E G	15
1	T TCA GGC AAA ATC TCA ATC TAC TGG GGC CAA AAC GGC AAC GAA GGC	46
16	T L A E T C A T G N Y H Y V N I	31
47	ACG TTG GCC GAG ACC TGT GCC ACA GGA AAC TAC CAC TAT GTA AAC ATC	94
32	A F L P T F G N G Q T P M I N L	47
95	GCA TTT CTC CCA ACA TTC GGC AAC GGC CAA ACT CCA ATG ATC AAT CTT	142
48	A G H C D P T I T N G C T H L S	63
143	GCA GGC CAT TGT GAC CCT ACG ATC ACC AAT GGC TGC ACA CAC TTG AGC	190
64	S Q I K S C Q A K G I K V M L S	79
191	TCT CAA ATC AAG TCC TGT CAG GCC AAG GGC ATA AAA GTC ATG CTA TCA	238
80	I G G G A G S Y Y L S S S Q D A	95
239	ATC GGA GGC GGG GCC GGT AGC TAC TAC CTT AGT TCT TCT CAG GAT GCC	286
96	K Q V A T Y L F N N F L S G K S	111
287	AAA CAA GTC GCA ACA TAT CTT TTT AAC AAC TTC TTG AGT GGA AAA TCG	334
112	S P R P L G D A I L D G I D L D	127
335	TCC CCA CGT CCT TTA GGC GAC GCT ATT TTG GAT GGG ATC GAT CTT GAT	382
128	I E G G T D L Y W D D L A R Y L	143
383	ATC GAG GGA GGT ACG GAT TTA TAC TGG <u>GAC GAT TTG GCG CGA TAT CTT</u>	430
	<-- GSPJH2	
144	S N Y G K R G R K V Y L T A A P	159
431	TCT AAT TAT GGA AAG AGG GGT AGG AAA GTG TAC TTA ACT GCG GCC CCA	478
160	Q C P F P D Y Y I G N A L Q T G	175
479	CAA TGT CCT TTC CCG GAT TAC TAC ATT GGG AAT GCC CTT CAG ACG GGA	526
176	L F D Y V W V Q F Y N N P P C Q	191
527	CTT TTC GAC TAT GTT TGG GTG CAG TTT TAT AAT AAC CCT CCA TGC CAG	574
	<-- GSPJH7	
192	Y S S G M D S F E K A W K D W N	207
575	<u>TAT TCT TCT</u> GGA ATG <u>GAC AGT TTT</u> GAG AAA GCT TGG AAA GAT TGG AAT	622
	<-- GSPJH1	
	GSPJH8 -->	
208	S I P A G E I F L G L P A S A Q	223
623	TCG ATT CCG GCC GGG GAG ATA TTT CTA GGG TTA CCA GCT TCT GCT CAA	670
224	A A G T G F V P A G D L T S Q V	239
671	GCT GCT GGA ACT GGA TTT GTT CCT GCT GGC GAT CTT ACT TCA CAA GTG	718
240	L P A I K G S A K Y G G V M L W	255
719	CIT CCA GCT ATA AAA GGG TCT GCT AAA TAT GGA GGT GTG ATG CTG TGG	766
256	D K Y H D T G Y S S S I K K D V	271
767	GAT AAG TAT CAT GAT ACT GGA TAT AGT TCT TCT ATC AAG AAG GAT GTT	814
272	*	
815	TGA TCC AGA TAT TTG GAT ATC AAG TTG TGA TTG TTG AAT TTC TGT GGG	862
863	GAG AAT GTA ATT GTA TGT TTG TGT AAT TGT TGT TTA CAT GTA AAA TGT	910
911	ACC TTA ATT TCT GTA AAA AAA AAA AAA AAA	940

그림 11. 지황 산성 class III chitinase 유전자 *JHIII*의 염기서열 및 번역된 아미노산. 밑줄 친 GSPJH1, GSPJH2, GSPJH7, GSPJH8은 RACE에 사용한 primer의 위치 및 염기서열을 표시함.

## 2. 대장균에서 *JHIII* 발현

지황 산성 class III chitinase 유전자 *JHIII*의 mature protein 코딩부위만을 증폭할 수 있는 primer PRSET5(5'-GGATCCGGCAAATCTCAATCTACTGGGGC-3')와 PRSET3(5'-GGTACCTCAAACATCCTTCTTGATAGAAG-3')를 제작하여 교배종 지황의 genomic DNA를 주형으로 PCR하였다. PCR산물을 pCR2.1에 삽입한 후 BamH I과 Kpn I으로 소화하여 발현 운반체인 pRSET A의 동일 제한효소자리에 삽입하여 pRSETJH를 제작하였다. 발현 숙주세포인 대장균 BL21에 pRSETJH를 도입한 후, 형질전환 대장균으로부터 재조합 *JHIII* 생산을 시도하였다. 즉, 형질전환 대장균을 50ml LB 배지에 접종하여 600nm 흡광도가 0.5될 때까지 37°C에서 200rpm으로 진탕배양한 후, IPTG를 2mM까지 첨가하여 4시간 추가 배양하였다. 대조구로 pRSET A 형질전환 대장균을 동일 조건으로 배양하였다. 배양을 종료한 후 대장균의 전체 단백질을 추출하여 전기영동 분석하였다. 그림 12에서 보듯이 약 29kDa 부근에서 발현된 재조합 *JHIII*를 확인할 수 있었다. 그러나, 이들 추출 단백질들은 chitin 분해활성을 보이지 않아 inclusion body로 발현된 것으로 추측되었다.

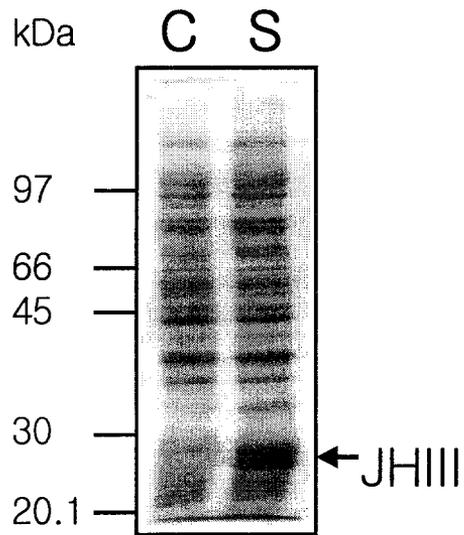


그림 12. 대장균에서 발현된 재조합 지황 산성 class III chitinase JHIII의 10% SDS-PAGE 분석.

C: pRSET A로 형질전환된 대장균의 전체 단백질

S: pRSETJH로 형질전환된 대장균의 전체 단백질

### 3. 고초균에서 *JHIII* 및 베타 glucanase 발현 및 생산

#### 가. 발효기에서 효소 생산

효소 활성을 보유한 재조합 *JHIII*를 생산하기 위하여 *JHIII*를 고초균 발현 운반체인 pUBL140에 삽입하여 고초균 WB600에 도입하였다. 형질전환 고초균을 50ml LB 배지에 접종하여 37°C, 300rpm으로 14시간 배양한 다음 2L LB 배지의 발효기에 전부 접종하였다. 37°C, 500rpm, 3kgf/cm<sup>2</sup>G에서 배양하면서 2시간마다 1ml씩 취하여 600nm 흡광도 측정 및 chitinase 활성을 측정하였다. 그림 13의 A에서 보듯이 세포 생장의 정지기 초기에 효소활성이 최고로 나타났다. 이미 이전의 연구에서 얻은 베타 glucanase 유전자로 형질전환된 고초균도 발효기에서 배양하면서 chitinase와 동일한 실험을 수행하여 그림 13의 B 처럼 세포 생장의 정지기 초기에 효소활성이 최고가 됨을 알 수 있었다. 이로부터 고초균에서 외래 단백질 대량 생산을 위한 배양조건을 확립하였다.

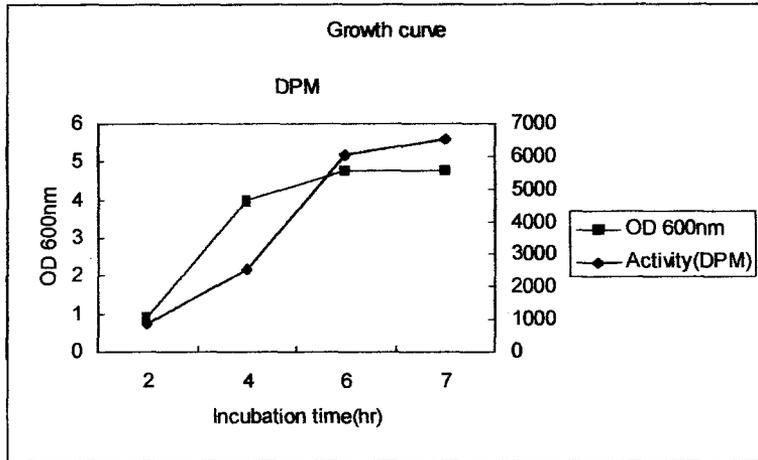
#### 나. 한외여과를 이용한 배양액 농축

가.에서 얻은 배양액을 한외여과로 농축하였다. 농축은 MWC0가 10kDa인 막을 사용하였고 유속 35%, 압력 30psi로 하여 배양액을 10배 가량 농축하였다. 농축액의 chitinase와 glucanase 활성을 측정한 결과, 각각 2배, 6배 정도 효소활성이 증가한 결과를 보였다(표 7).

#### 다. 재조합 효소의 최적활성 pH

병원균과 재조합 효소의 반응조건을 확립하기 위하여 재조합 chitinase와 glucanase의 최적 활성을 나타내는 pH를 결정하였다. pH 3 - 11까지 8종류의 완충용액을 이용해 효소 활성을 측정하여 그림 14의 결과를 얻었다. 즉, chitinase는 pH 5에서 glucanase는 pH 3에서 최적활성을 나타내었다.

**A**



**B**

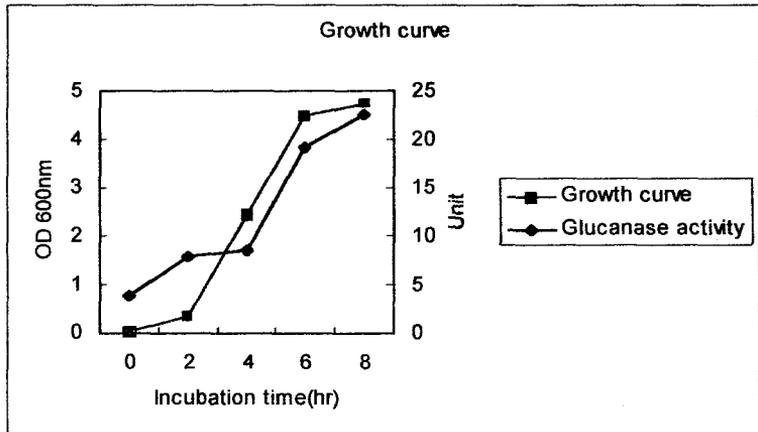


그림 13. 재조합 고초균의 생장에 따른 효소 생산.

A: 재조합 JHII 생산

B: 재조합 벼 glucanase 생산

표 7. 재조합 고초균 배양액의 농축 전후 효소활성 비교

시 료	Chitinase Activity (DPM/ml)	Glucanase Activity (Unit/ml)
배 양 액	37,360	22.53
농 축 액	80,060	132.24
농축정도	2.14 배	5.87 배

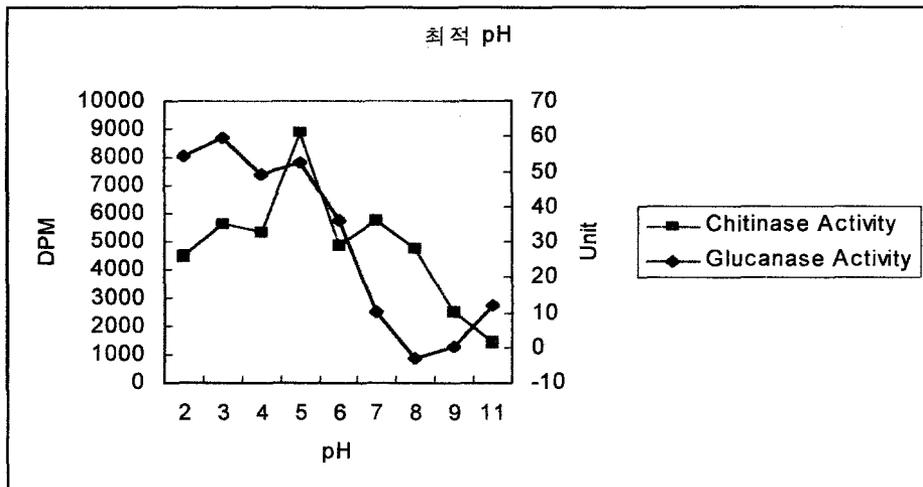


그림 14. 재조합 효소의 최적 pH.

#### 4. 재조합 효소에 의한 지황 병원균 성장 저해 검정

고초균에서 생산된 지황 chitinase와 벼 glucanase의 지황 병원균 성장 저해를 검정하였다. 지황 병원균(*Fusarium oxysporum* R2) 포자에 다음과 같이 4가지 처리를 하여 대조구와 균사 성장 정도를 비교하였다.

- ① Blank : 1X PDB 900 $\mu$ l + Buffer 90 $\mu$ l + 포자 10 $\mu$ l
- ② Case 1 : 5X PDB 200 $\mu$ l + Buffer 90 $\mu$ l + 포자 10 $\mu$ l + Vector 350 $\mu$ l  
+ dH<sub>2</sub>O 350 $\mu$ l
- ③ Case 2 : 5X PDB 200 $\mu$ l + Buffer 90 $\mu$ l + 포자 10 $\mu$ l + Glucanase 350 $\mu$ l  
+ dH<sub>2</sub>O 350 $\mu$ l
- ④ Case 3 : 5X PDB 200 $\mu$ l + Buffer 90 $\mu$ l + 포자 10 $\mu$ l + Chitinase 350 $\mu$ l  
+ dH<sub>2</sub>O 350 $\mu$ l
- ⑤ Case 4 : 5X PDB 200 $\mu$ l + Buffer 90 $\mu$ l + 포자 10 $\mu$ l + Glucanase 350 $\mu$ l  
+ Chitinase 350 $\mu$ l + dH<sub>2</sub>O 350 $\mu$ l

Buffer: 200mM NaOAc/pH 5

포자 : 1000 spores/ $\mu$ l

Vector : pUBL140를 도입한 고초균 배양 농축액

Glucanase : 벼 glucanase 유전자를 도입한 고초균 배양 농축액

Chitinase : 지황 chitinase 유전자 *JHIII*를 도입한 고초균 배양 농축액

Blank를 제외한 모든 경우에는 효소액을 100℃에서 10분 끓인 후 동일하게 처리한 대조구를 두었다. 30℃, 150rpm에서 반응시키면서 3시간 간격으로 36시간까지 600nm 흡광도를 측정하였다. 그림 15와 같이 혼합처리, glucanase, chitinase 순으로 생육저해가 큰 것으로 나타났다. 이것은 그림 16에서 더욱 분명하게 보여지는 데, 36시간 반응 후 재조합 효소 처리구의 균사량이 대조구들의 그것보다 적음을 직접 관찰할 수 있었다. 36시간 반응 후 반응액을 채취하여 400배율의 광학현미경 하에서 균사 성장을 관찰하였다. 그림 17에서 보면 처리구와 대조구의 균사의 형태적 차이는 크지 않지만 재조합 효소 처리구의 균사에서 결가지 발달이 대조구에 비해 현저히 떨어짐을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로부터 지황병원균인 *Fusarium oxysporum* R2는 지황의 산성

class III chitinase에 의하여 생장이 억제되며, 벼의 glucanase에 의해서도 생장이 억제되는 것으로 나타났다. 이들 두 효소의 혼합처리에 의한 생장억제 상승효과는 크지는 않지만 있는 것으로 나타났다. 이들 효소에 의한 *Fusarium oxysporum* R2의 생장 저해는 전혀 생장을 못하게 하는 저해가 아닌 생장 속도를 늦추는 저해임을 관찰하였다. 보다 정확한 결과를 얻기 위해서는 JHIII가 균사에 어떻게 작용하는지 TEM(Transmission Electron Microscopy)을 이용한 직접적인 관찰이 필요하겠으나 후반부에 제시될 벼의 PR protein 처리 효과와 유사하게 균사의 세포벽 용해를 일으키리라 추측해본다.

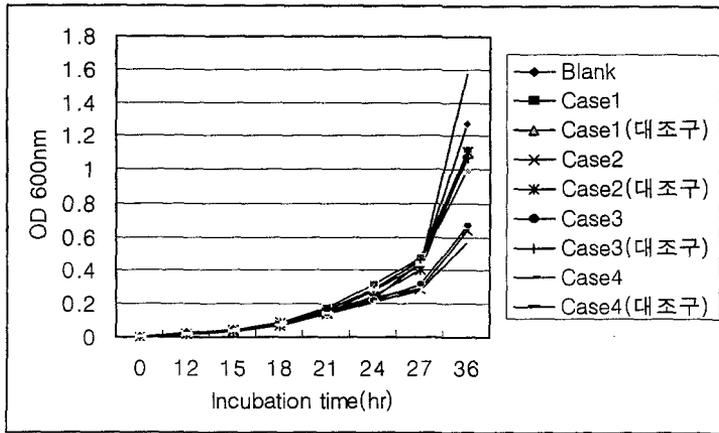


그림 15. 재조합 효소에 의한 지황 병원균의 성장 억제(흡광도 측정).

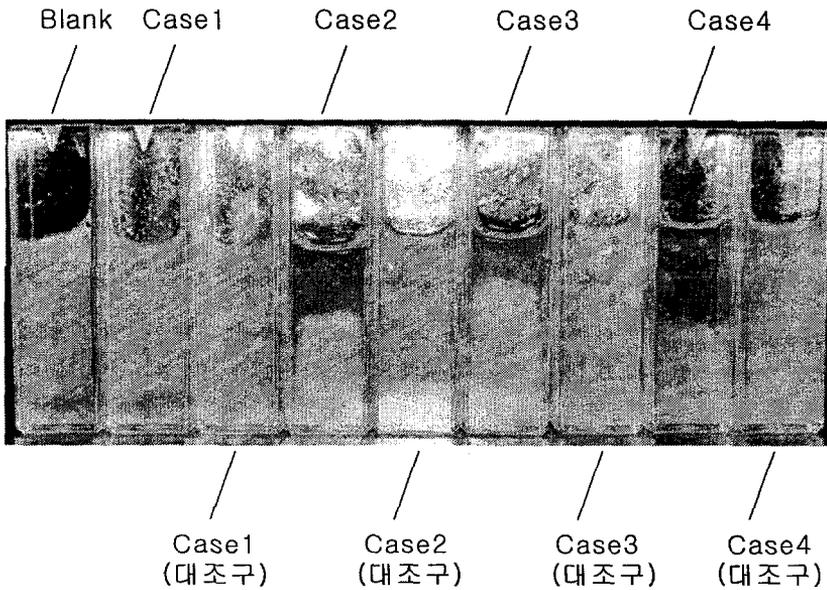


그림 16. 재조합 효소에 의한 지황 병원균의 생육 억제(반응액 관찰).

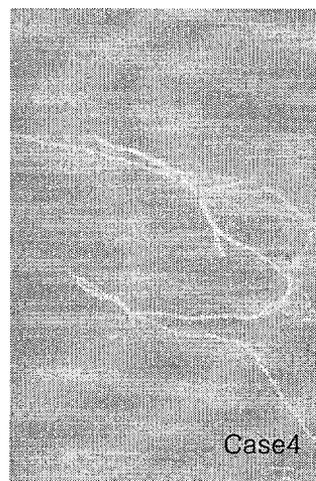
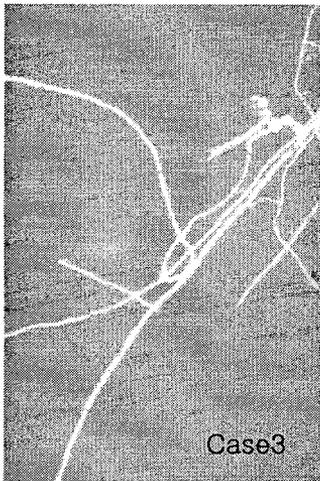
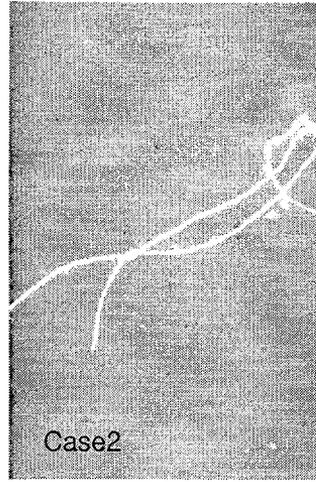


그림 17. 재조합 효소에 의한 지황 병원균의 군사 성장 형태.

(400배율 광학 현미경 관찰)

### 제 3절 다른 PR protein을 이용한 지황 병원균에 대한 항균 효과 검정

#### 1. 벼 PR-protein 유전자 확보

##### 가. PR1과 PR5 유전자

벼 PR-protein 중 PR1과 PR5는 기존에 보고된 유전자의 염기서열을 참고하여 각각 PCR primer를 제작하였다. PR1을 위하여 PR1B(5'GGATCCGGCTCAAACTCCCGCAG3')와 PR1H(5'AAGCTTAGTAAGGCCTCTGTCC3')를 제작하였고, PR5를 위하여 RICETLPB (5'GGATCCGGCGACCTTCACCATCACC3')와 RICETLPH(5'AAGCTTATGGGCAGAAG ACGAC3')를 제작하여 벼 genomic DNA를 주형으로하여 PCR하였다. Agarose gel 전기영동을 통하여 PCR 산물을 확인하였으며(그림 18), 이들을 gel에서 용출하여 pGEM-T easy plasmid 운반체에 subcloning하여 각각의 염기서열을 결정한 다음 이미 보고된 벼의 PR1과 PR5의 염기서열과 비교하였다(그림 19, 20).

##### 나. PR2와 PR3 유전자

식물 PR-protein 중 PR1과 PR5는 특별한 효소활성이 알려져 있지 않은 반면, PR2는  $\beta$ -1,3-glucanase, PR3는 chitinase로 보고되어 있다. 벼 PR2 유전자는 농업과학기술원 세포유전과에서 분양받았으며(pBSGLU), 벼 PR3 유전자는 본 연구실에서 이미 분리한 것(pCH16)을 사용하였다.

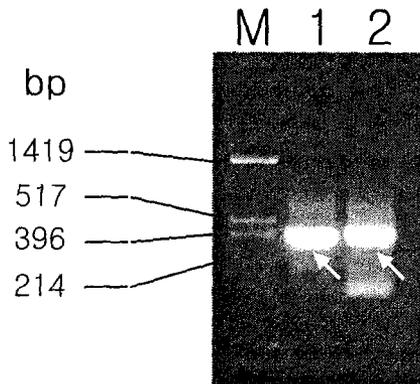


그림 18. PCR 산물의 1.5% agarose gel 전기영동 분석

lane M; size marker,

1; PR1B/PR1H primer set,

2; RICETLPB/RICETLPH primer set

화살표는 PCR 산물을 표시.

RICE PR1 1 ATGGAGGTATCCAAGCTGGCCATTGCTTTGGCCATGGTAGCCGCCATGGCACTCCOCTCC 60  
pGEMPR1

RICE PR1 61 CAAGCTCAAAACTCCCCGCAGGACTACGTGAGGCTCCACAACGCCGCCCGCGCCGCGTC 120  
pGEMPR1 \*\*\*\*\*  
-> PR1B

RICE PR1 121 GGCCTGGGTCCGGTGACCTGGGACACGAGCGTGCAGGCGTTCGCGGAGAACTACGCCAGC 180  
pGEMPR1 \*\*\*\*\*

RICE PR1 181 CAGAGGAGCGCGGACTGCAGCCTGATCCACTCCAGCAACCGGAACAACCTTGGCGAGAAC 240  
pGEMPR1 \*\*\*\*\*A\*\*\*\*\*T\*\*\*\*\*

RICE PR1 241 CTCTTCTGGGGTTCCGCCGGGGGGACTGGACGGCGGCGAGCGGTTGCAGTCGTGGGTG 300  
pGEMPR1 \*\*\*\*\*C\*\*\*\*\*

RICE PR1 301 GGCGAGAAGAGCGACTACGACTACGCCCTCCAACAGCTGCCGCGCAGGGGAAGGTGTGCGGG 360  
pGEMPR1 \*\*\*\*\*

RICE PR1 361 CACTACACGCAGGTGGTGTGGGCGCGTCGACCAGCATCGGCTGCCGCCCGCGTGTCTGTC 420  
pGEMPR1 \*\*\*\*\*

RICE PR1 421 AGCAACGGCCCGCGGCGTCTTCATCACATGCAACTATAAGCCGGCCGCAACTTCGTCCGA 480  
pGEMPR1 \*\*\*\*\*

RICE PR1 481 CAGAGGCTTACTAA 495  
pGEMPR1 \*\*\*\*\*

PR1H <-

그림 19. pGEMPR1에 cloning된 PCR 산물의 염기서열과 벼 PR1 유전자의 염기서열 비교

밑줄은 PCR primer의 염기서열이며, \*는 동일한 염기임.

RICE PR5 1 ATGGCGTCTCCGGCCACCTCTCCGCTGTCTCGTCGTCTCGTGGCGACCTCGCC 60  
pGEMPR5

RICE PR5 61 GCCGGTGGCGCCAACGCGGCGACCTTCACCATCACCAACCGGTGCTCGTTCAOGGTGTGG 120  
pGEMPR5  
\*\*\*\*\*  
-> RICETLPB

RICE PR5 121 CCGGGGGGACGCCGGTGGCGGCGGCGTGCAGCTGAGCCGGGGCAGACGTGGACCATC 180  
pGEMPR5  
\*\*\*\*\*

RICE PR5 181 AACGTGCCCGCCGGGACCAGCTCCGGCAGGGTGTGGGGCCGCACGGGCTGCAGCTTCGAC 240  
pGEMPR5  
\*\*\*\*\*

RICE PR5 241 GGCTCCGGCCGCGGCAGCTGCCACCAGGCGACTGCGCCGGCGCCTGTCTGCACCCCTC 300  
pGEMPR5  
\*\*\*\*\*G\*\*\*\*\*

RICE PR5 301 TCCGGCCAGAAGCCGCTGACGCTGGCGGAGTTCACCATCGGCGGCAGCCAGGACTTCTAC 360  
pGEMPR5  
\*\*\*\*\*

RICE PR5 361 GACCTGTCTGGTATCGACGGCTACAACGTCGCCATGAGCTTCTCCTGCAGCTCCGGCGTG 420  
pGEMPR5  
\*\*\*\*\*

RICE PR5 421 ACGGTCACCTGCAGGGACAGCCGCTGCCCGACGCTTACCTGTTCCCGAAGACAACACC 480  
pGEMPR5  
\*\*\*\*\*C\*\*\*\*\*

RICE PR5 481 AAGACACCGCCTGCAGCGGCAACAGCAACTACCAAGTCGTCCTTCTGCCATAA 534  
pGEMPR5  
\*\*\*\*\*

RICETLPH <-

그림 20. pGEMPR5에 cloning된 PCR 산물의 염기서열과 벼 PR5 유전자의 염기  
서열 비교

밑줄은 PCR primer의 염기서열이며, \*는 동일한 염기임.

## 2. 벼 PR-protein의 생산

### 가. 벼 PR-protein의 대장균에서 생산

확보된 벼 PR-protein 유전자로부터 해당 단백질을 얻기 위하여 대장균에서 각 유전자를 발현시켰다. 대장균의 발현 plasmid vector로는 pRSET을 사용하였다. 그림 21에서 보는 것처럼 pRSET에서 외래 유전자의 발현은 bacteriophage T7 promotor에 의한 전사조절을 받는데 이 promotor는 IPTG에 의하여 전사를 개시한다. 또한 아미노 말단에 His tag이 붙어 발현되므로 이에 대한 항체를 이용하여 발현을 확인할 수 있다. 각각의 발현 plasmid vector가 도입된 *E. coli* BL21을 tetracyclin과 ampicillin이 포함된 LB 액체배지(1% NaCl, 1% peptone, 0.5% yeast extract)에 접종하여 600nm 흡광도가 0.7될 때까지 배양한 뒤 IPTG를 1mM되도록 첨가하여 발현을 유도하였다. 유도 후 3시간 더 배양한 뒤 cell만을 원심분리로 회수하여 초음파로 분쇄하였다. Cell lyzate를 12.5% SDS-PAGE하여 His tag에 대한 항체를 이용한 western blot analysis하여 발현단백질을 확인하였다.

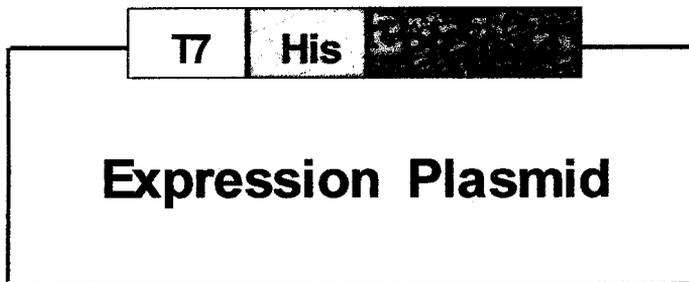


그림 21. 대장균의 발현 plasmid vector 모식도

T7: 전사조절부위, His: His tagging,

PR-gene: 도입된 유전자(PR1, PR2, PR3, PR4)

나. 벼 PR-protein의 고초균에서 생산

벼 PR-protein을 배양액으로 분비 생산하기 위하여 고초균에서 각 유전자를 발현시켰다. 고초균의 발현 plasmid vector로는 pUBL140를 사용하였다. 그림 22에서 보는 것처럼 pUBL140에서 외래 유전자의 발현은 amylase promotor인 amyR<sub>2</sub>에 의한 전사조절을 받는데 이 promotor는 생육의 정지기 초기부터 전사를 개시하는 것으로 알려져 있다. 고초균에서 발현된 단백질은 signal sequence에 의하여 세포 밖으로 분비되므로 배양액에 발현 단백질이 존재하게 된다. 각각의 발현 plasmid vector가 도입된 고초균을 10 $\mu$ g/ml의 kanamycin이 포함된 LB 액체배지에 접종하여 정지기까지 배양한 뒤 배양액을 얻어 각 단백질의 발현을 확인하였다. 효소활성이 없는 PR1과 PR5의 경우에는 배양액을 12.5% SDS-PAGE하여 염색하므로써 발현단백질을 확인하였다. PR2와 PR3는 배양액의  $\beta$ -1,3-glucanase와 chitinase 활성을 측정하므로써 발현을 확인하였다.

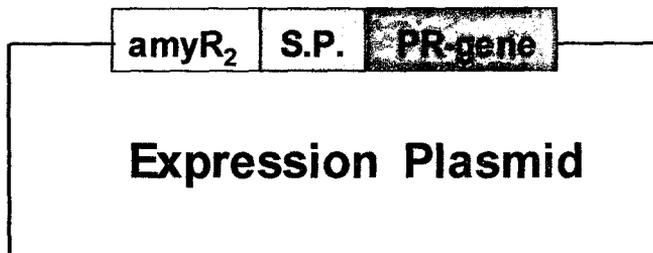


그림 22. 고초균의 발현 plasmid vector 모식도

amyR<sub>2</sub>: 전사조절부위, S.P.: signal peptide,

PR-gene: 도입된 유전자(PR1, PR2, PR3, PR4)

각각의 벼 PR-protein 유전자로 형질전환된 대장균 세포 추출물을 His tag에 대한 항체를 사용하여 western blot analysis를 수행하였다. 그림 23과 같이 각각 예상되는 분자량 크기의 band에서 signal을 보임으로써 각각 PR-protein이 발현, 생산되었음을 확인할 수 있었다. 고초균에서 벼 PR-protein의 발현, 생산의 경우에는 각각의 형질전환 고초균을 정지기까지 배양한 뒤 각 배양액을 얻어 각 단백질의 발현을 확인하였다. 효소활성이 없는 PR1과 PR5의 경우에는 배양액을 12.5% SDS-PAGE하여 발현단백질을 확인하였다. 그림 24의 (A)와 (B)로부터 pUBL140만 도입한 고초균의 배양액에는 없는 단백질 band(화살표)가 PR1과 PR5 유전자를 도입한 고초균 배양액에는 존재하여 이들 유전자의 발현을 확인하였다. PR2와 PR3는 배양액의  $\beta$ -1,3-glucanase와 chitinase 활성을 측정하므로써 발현을 확인하였는데, 각각 115 U/ml, 18 U/ml의 발현량을 나타냈다.  $\beta$ -1,3-glucanase 1U는 37°C에서 1분간 기질 laminarin으로부터 1mmole의 glucose를 생산하는 효소량으로 정의하며, chitinase 1U는 37°C에서 1분간 기질 regenerated chitin으로부터 1mmole의 N-acetylglucosamine을 생산하는 효소량으로 정의하였다.

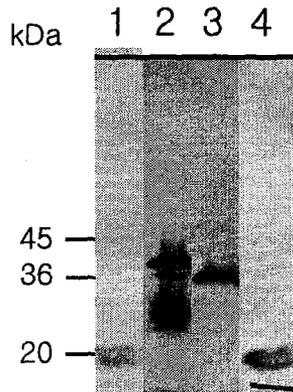


그림 23. 대장균에서 벼 PR-protein의 발현을 확인하기 위한 western blot analysis

lane 1:PR1, 2:PR2, 3:PR3, 4:PR5

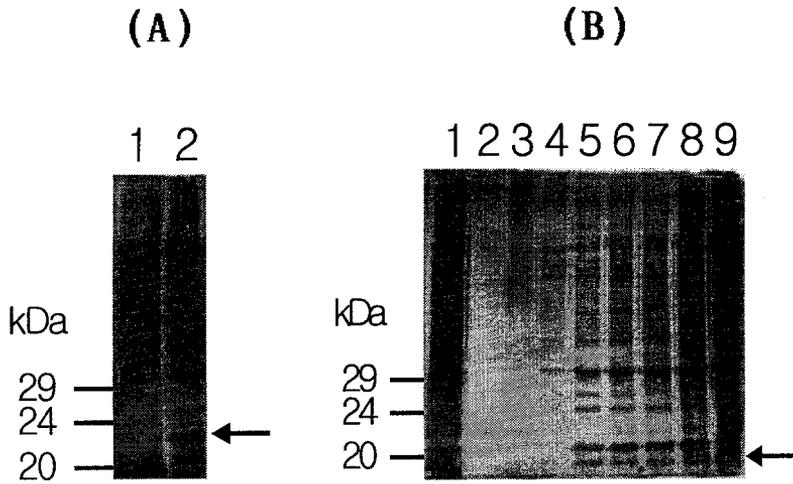


그림 24. 발현단백질 확인을 위한 12.5% SDS-PAGE gel.

(A) PR1 발현 확인(화살표 band)

lane 1: pUBL140만 도입한 고초균 배양액,

lane 2: PR1 유전자 도입 고초균 배양액

(B) PR5 발현 확인(화살표 band)

lane 1: pUBL140만 도입한 고초균 배양액,

lane 2-9: PR5 유전자 도입 고초균의 접종 후 4, 6, 8, 10, 12,  
14, 16, 18시간 경과 배양액

### 3. 항균활성검정

생산된 벼 PR-protein을 지황 병원균인 *Fusarium oxysporum* R2의 포자에 처리하여 생육저해 정도를 조사하였다. *F. oxysporum* R2 포자 3,000개에 각 PR-protein이 발현된 배양액을 각각 또는 2개, 3개, 4개를 조합하여 처리하고 PDB배지를 넣어 전체 부피를 400 $\mu$ l로 하였다. 처리한 각 배양액은 모두 동일하게 200 $\mu$ g의 단백질을 포함하도록 하였다. Plasmid vector인 pUBL140만을 도입한 고초균의 배양액과 100 $^{\circ}$ C에서 10분간 정치한 각 배양액을 처리한 대조구들의 곰팡이 생육저해도를 함께 측정하였다. 각 검정은 3회 반복하였다.

그림 25 (A), (B), (C), (D)는 발현된 각 단백질을 단독으로 처리한 결과인데, PR1과 PR5의 경우에 성장곡선이 대조구들보다 각각 28.5%, 11.6%씩 낮게 나타나 저해효과가 있음을 확인하였다. 두 단백질을 동시에 처리한 경우에는 모두 30% 이상의 저해효과를 보였는데, 특히 PR2와 PR3은 단독으로는 거의 저해효과가 없었으나 함께 처리하면 상승효과가 큰 것으로 나타났다. 세 단백질 또는 네 단백질을 함께 처리한 경우에도 30%이상의 저해효과를 보였으나, 두 단백질을 처리한 경우에 비하여 크게 높지는 않았다. 본 결과로부터 PR-protein은 단독보다는 함께 작용하여 항균활성을 증대시키는 것으로 생각되어지며, 지황병원균 생육저해를 위해서는 벼의 PR1이 효과적임을 알 수 있었다.

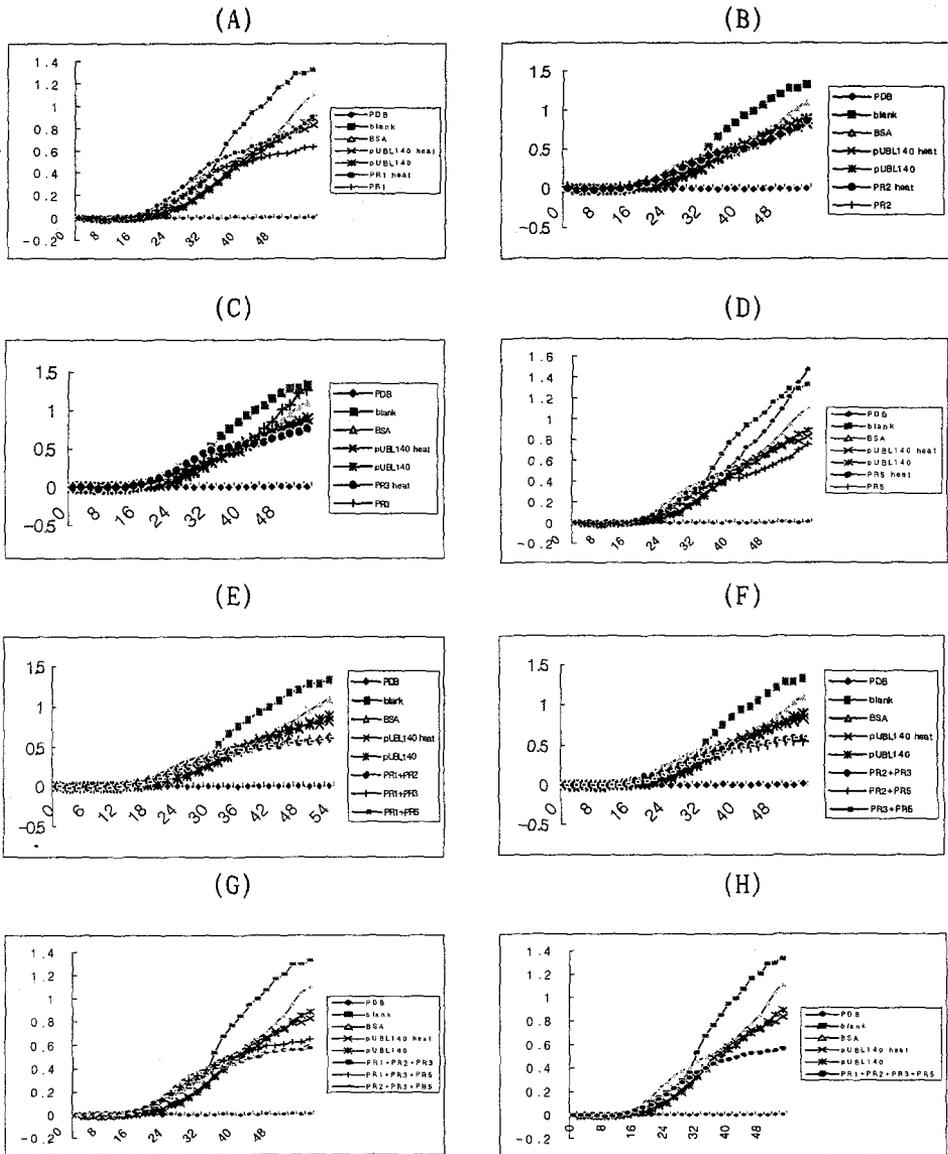


그림 25. *F. oxysporum* R2에 대한 베타PR-protein의 항균활성 검증.

(A)-(D): 각 발현단백질의 단독처리

(E), (F): 각 발현단백질을 2가지씩 조합하여 처리

(G): 각 발현단백질을 3가지씩 조합하여 처리

(H): 발현단백질 4가지를 동시에 처리

벼 chitinase(CH16)와 glucanase의 혼합 처리 효과를 알아보기 위하여 재조합 JHIII에서와 동일하게 재조합 CH16(PR3)와 glucanase(PR2)를 이용하여 지황 병원균 성장 저해를 검증하였다. 지황 병원균(*Fusarium oxysporum* R2) 포자에 다음과 같이 4 가지 처리를 하여 대조구와 균사 성장 정도를 비교하였다.

- ① Blank : 1X PDB 900 $\mu$ l + Buffer 90 $\mu$ l + 포자 10 $\mu$ l
- ② Case 1 : 5X PDB 200 $\mu$ l + Buffer 90 $\mu$ l + 포자 10 $\mu$ l + Vector 350 $\mu$ l  
+ dH<sub>2</sub>O 350 $\mu$ l
- ③ Case 3 : 5X PDB 200 $\mu$ l + Buffer 90 $\mu$ l + 포자 10 $\mu$ l + Chitinase 350 $\mu$ l  
+ dH<sub>2</sub>O 350 $\mu$ l
- ④ Case 4 : 5X PDB 200 $\mu$ l + Buffer 90 $\mu$ l + 포자 10 $\mu$ l + Glucanase 350 $\mu$ l  
+ Chitinase 350 $\mu$ l + dH<sub>2</sub>O 350 $\mu$ l

Buffer: 200mM NaOAc/pH 5

포자 : 1000 spores/ $\mu$ l

Vector : pUBL140를 도입한 고초균 배양 농축액

Glucanase : 벼 glucanase 유전자를 도입한 고초균 배양 농축액

Chitinase : 지황 chitinase 유전자 JHIII를 도입한 고초균 배양 농축액

Blank를 제외한 모든 경우에는 효소액을 100℃에서 10분 끓인 후 동일하게 처리한 대조구를 두었다. 25℃, 150rpm에서 반응시키면서 25시간 간격으로 120시간까지 600nm 흡광도를 측정하였다. 그 결과 그림 26과 같이 혼합처리, glucanase, blank 순으로 생육저해가 큰 것으로 나타났다. 그리고 OD 값의 차이가 증가하기 시작하는 72시간째 반응액을 채취하여 400배율의 광학현미경 하에서 균사 성장을 관찰한 결과 JHIII를 처리했을 때와 유사하게 재조합 효소 처리구의 균사에서 결가지 발달이 대조구에 비해 현저히 떨어짐을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과를 보다 자세히 관찰하고자 시각적 생육의 차이를 보여주는 균사를 Transmission Electron Microscopy(TEM)을 이용하여 관찰함으로써 균사 표면에서의 변화 양상을 관찰하였다. 그 결과 그림 27에서 볼 수 있듯이 blank에 비해 재조합 효소를 처리한 경우 세포벽의 용해가 진행된 것을 알 수 있다(화살표 참고). 이상의 결과로부터 지황병원균인 *Fusarium oxysporum* R2

는 지황의 산성 class III chitinase 뿐만 아니라 벼의 chitinase, glucanase에 의해서도 생장이 억제되는 것으로 나타났다. 이들 두 효소의 혼합처리에 의한 생장억제 상승효과는 TEM에서는 관찰되지 않지만 있는 것으로 나타났다. 이들 효소에 의한 *Fusarium oxysporum* R2의 생장 저해는 전혀 생장을 못하게 하는 저해가 아닌 생장 속도를 늦추는 저해임을 관찰하였다.

지금까지의 연구결과로부터 지황에는 PR3로 추정되는 chitinase 활성을 보이는 단백질 band는 많지만(교배종의 경우 약 10종, 재래종의 경우 약 5종), PR2로 생각되는  $\beta$ -1,3-glucanase의 활성은 거의 없는 것으로 나타났다. 나머지 PR-protein의 경우에는 효소활성이 없으므로 확인할 수 없었다. 지금까지 보고된 바에 의하면 각 PR group의 단백질 사이에는 혈청학적 연관(항체에 의한 교차반응성)이 있으므로, 대장균으로부터 생산된 벼 PR1, 5를 정제하여 항체를 제조한다면, 지황에서의 PR1, 5를 확인할 수 있으며 이들 단백질들이 병원균 감염에 의하여 어떻게 발현 조절되는지를 연구할 수 있을 것이다. 그림 16.의 결과로부터 벼의 PR1 또는 PR2 유전자를 지황에 도입한다면, 이들이 이미 존재하는 지황의 chitinase와 함께 작용하여 병저항성이 증가된 형질전환 지황을 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

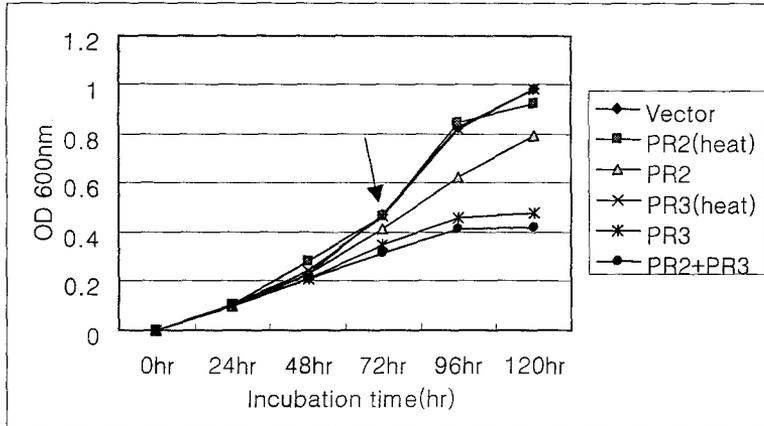
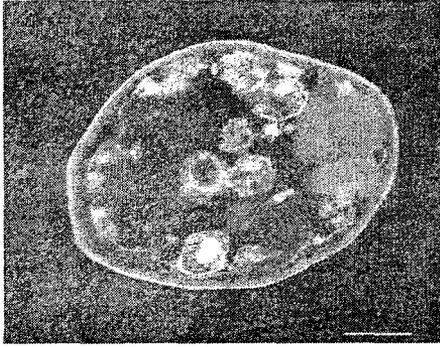


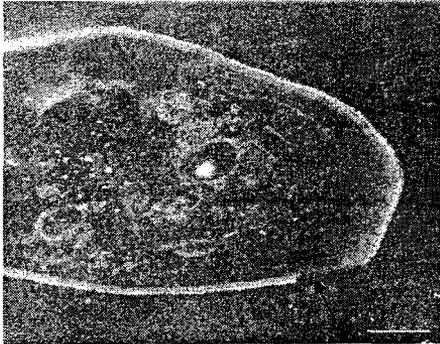
그림 26. 재조합 효소에 의한 지황 병원균의 성장 억제(흡광도 측정).



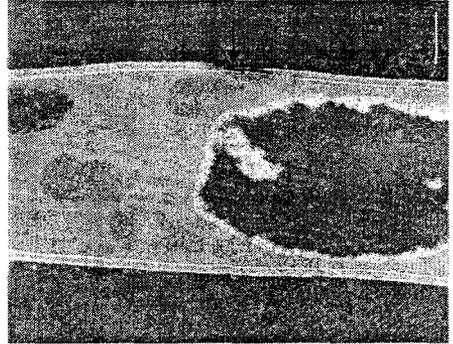
Con



Glu



Ch16



혼합

그림 27. 재조합 효소에 의해 영향을 받은 지황 병원균의 군사 표면 형태  
(12000배율, TEM이용).

## 제 5장. 내병성 지황 품종 육성

### 제 1절 서 설

지황(*Rehmannia glutinosa*)은 현삼과(Scrophulariaceae)에 속하는 200속 중 하나인 다년생 초본 식물로 약 300종이 있고, 전세계적으로 광범위하게 분포되어 있는데 온대지방에 많다(甘, 1986). 지황은 중국이 원산지로서 명조(1590) 때 이미 재배가 시작되었으며 현재 주생산지는 하남, 온현, 맹현, 박애, 심양 등지로 이곳에서 생산되는 지황은 주로 가공용이며, 하북, 산둥, 절강, 요령에서 생산되는 지황은 생체 약용으로 쓰이고 있다(中藥資源學, 1993).

우리나라에서는 오래 전부터 뿌리를 한약재로 이용하고 있으며, 가공 방법에 따라 생지황, 건지황, 열지황으로 구별하며 iridoid, catalpol, leonuride와 당류인 stachyose, raffiiose, sucrose, mannitol, amino acid 등을 함유하고 있고(Hasegawa et al. 1982) 한방에서는 보혈, 강장, 강심, 당뇨병, 해열, 해독 등의 처방약으로 사용되고 있다(최 등, 1995).

지황재배는 주로 무성번식에 의해서 이루어지는데 실생번식에 비하여 생육이 훨씬 저조하며 괴경 이식 후 30일 이상 경과해야 비로소 출묘가 가능하며 출묘율은 60-80%에 이른다(中國藥用植物栽培學, 1991). 그러므로 지황은 번식력이 약해서 분근 또는 어린 뿌리로 번식한다. 번식용 뿌리는 저장하는 동안 병원균에 의한 오염 등 많은 어려움이 있어 집약재배가 장애요소가 되고 있다(박주현, 1994). 지황은 포장재배시 병의 종류가 많아 피해가 크다. 점무늬병, 뿌리 썩음병, 시들음병, 흰비단비병, 갈색점무늬병 등이 많이 발생한다. Virus에 의해 생기는 병으로는 mosaic 병이라는 것이 유발되는데 아직 확실히 밝혀지지 않았다(이은종, 1991). 현재식물에서 virus가 원인이 되어 발생하는 병들은 화학적 방법에 의한 방제가 불가능하기 때문에, 월동 또는 중간 기주인 잡초의 제거, 토양소독, 윤작 등 경종적 방법을 이용하거나, 조직배양을 통한 virus-free 종묘의 생산 또는 저항성 품종의 개발 등이 virus병에 대한 방제 대책으로 시도되고 있지만 큰 효과를 거두지는 못하고 있는 실정이다. 최근 지황재배시 습해에 의한 피해가 만연하고 있다.

최근에는 생물공학기술의 발달과 유전공학의 진보에 의하여 외래의 유용 유전자를 선택적으로 고등식물체내로 도입시켜 관련형질을 전환시키는 형질전환 기술을 이용하여 제초제, 바이러스, 그리고 해충에 대해 저항성을 나타내는 유용농작물을 개발하고자 많은 연구가 활발히 진행되고 있다. 따라서 본연구에서는 1. 지황 모집종별로 내병성을 나타내는 모집종의 Screen, 내병성정도 조사 하였으며 2. EMS(ethyl-methanesulfonate)처리에 의한 병저항성 변이주 유기, 3. 지황을 대상으로 Glutathione S-Transferase (GST)형질전환하는 체계를 확립하여 내병성을 비롯한 다중의 스트레스 저항성 식물체를 개발을 수행하였다.

본 연구에서 사용된 유전자인 Glutathione S-Transferase (GST)는 내병성, 제초제 저항성과 같은 다양한 스트레스 및 중금속 독성발현에 영향을 미치며 식물체에 외적으로 도입되거나 자연적으로 형성된 독성의 물질들을 환원된 glutathione (GSH)과 공유결합적으로 conjugation을 형성하게 하여 이러한 물질들을 무독화 시키는 enzyme이다(Coles et al., 1990; Mannervik et al., 1985; Picket et al., 1983).

GST의 무독화 과정은 생체내 대사(biotransformation)라고 불리는데 이러한 대사과정은 크게 phase I, II, III로 나뉘어진다. Phase I 반응은 산화, 환원, 가수분해 반응을 가리키고, phase II 반응은 conjugation을 비롯한 합성반응이고 phase III는 compartmentation 및 storage에 관계하는 반응이다. GST들은 환원된 형태의 glutathione(GSH)과 친전자적 물질사이에 phase II conjugation을 형성하도록 촉매하며 이렇게 형성된 conjugate들은 분자량이 커져서 세포의 액포 또는 세포질로 이동하여 불활성이며 수용성이고 모성분보다 덜 독성이 있는 물질을 생성한다. 또한 GST는 세포내 돌연변이원의 독소와 발암물질, 또는 다른 독성이 있는 물질을 제거한다( Mannervik et al., 1985; Picket et al., 1983).

본 연구는 지황을 재료로 하여 alkyl기 돌연변이원으로 GC→AT transition을 구성하는 point mutation을 유도하며 핵뿐만 아니라 세포질에서도 돌연변이를 유발시킨다고 보고되어진(Shahin et al., 1986; Vogel et al., 1994) EMS(ethylmethanesulfonate)를 처리하였으며, 내병성, 제초제 저항성과 같은 다양한 스트레스 및 중금속 독성발현에 영향을 미치는 유전자인 Glutathione

S-Transferase(GST)를 *Agrobacterium*을 매개로 하여 지황식물체내에 삽입시켜 형질전환 식물체를 육성하여 병원균에 저항성 품종 및 내스트레스저항성 품종을 선발하기 위하여 실시되었다.

## 제 2절 모집종의 내병성 정도 조사

### 1. 지황 모집종 내병성 스크린 및 내병성 정도 조사

지황 1호, 서천, 정읍, 진안, 춘천종 등 모집종이 *Fusarium* 종에 대한 내병성 조사가 기내와 온실에서 수행된 결과 S-3에 대하여서는 춘천종이 강한 감염성을 나타내었고, R-10에 있어서는 지황 1호가 감염성을 나타내어 모집종간 약간의 내병성 차이가 관찰되었다(Table 1).

Table 1. Effects of isolates of *Fusarium oxysporum* on the growth of *R. glutinosa* cultivars and evaluation of root rot symptom severity<sup>a</sup>

<i>Fusarium</i> isolate	Cultivars	Growth parameter means		Pathogenicity test rating means <sup>b</sup>
		Shoot and leaf weight (g)	Root weight (g)	
S-3	Chuncheon	7.48	3.21	4.5
	Control <sup>c</sup>	8.59	4.20	1.0
	Jiwhang 1	10.34	3.30	3.3
	Control <sup>c</sup>	7.05	5.81	1.0
	Jinan	8.55	3.75	2.2
	Control <sup>c</sup>	11.86	3.94	1.0
	Jungeup	12.56	5.58	1.4
	Control <sup>c</sup>	15.93	6.26	1.0
R-10	Chuncheon	11.53	3.94	2.6
	Control <sup>c</sup>	8.59	4.20	1.0
	Jiwhang 1	8.72	2.64	4.8
	Control <sup>c</sup>	7.05	5.81	1.0
	Jinan	9.14	3.64	3.1
	Control <sup>c</sup>	11.86	3.94	1.0
	Jungeup	11.94	6.03	1.2
	Control <sup>c</sup>	15.93	6.26	1.0
Control <sup>a</sup>				1.0

<sup>a</sup>The results of each treatment were the mean of dual experiments, and the plants were inoculated with suspension of *F. oxysporum*. The results were obtained four weeks after the inoculation. <sup>b</sup>Ratings of the extend of root rot symptoms were assigned to each plant on a scale of 0-5, in which 0 = no diseases, and 5 = death of plants. <sup>c</sup>Control for each different treatment. <sup>d</sup>Control for pathogenicity test.

### 제 3절 EMS(ethyl- methanesulfnate)처리에 의한 병저항성 변이주 유기

#### 1. 지황 뿌리에서의 돌연변이 식물체 유도

지황뿌리의 일정양(50g/1 explant)을 EMS(Ethyl methane sulphonate)를 농도 0.03, 0.06, 0.12M의 solution에 침지하고 3일 후에 포트에 이식하고 이식한 지 6개월 후에 형태적인 특성을 조사한 결과 초장에 있어서는 돌연변이원이 처리된 식물체 보다 control 식물체가 비교적 길었으며 엽수와 엽면적에서는 큰 차이는 없었으나 지하부 생체중은 돌연변이원을 처리한 식물체에서 2-2.5배의 증가를 보여주었다.

식물체의 초장, 입수 조사에서는 control이나 돌연변이 개체에서 별다른 차이가 없었으며 지상부와 지하부의 생체중에서는 0.03M농도로 처리된 식물체에서 다른 것에 비하여 비교적 높은 수치를 보여주어 병원균에 저항성을 보이는 개체가 감수성인 식물체보다 생체중에서 양호함을 나타내었다(Fig.1).

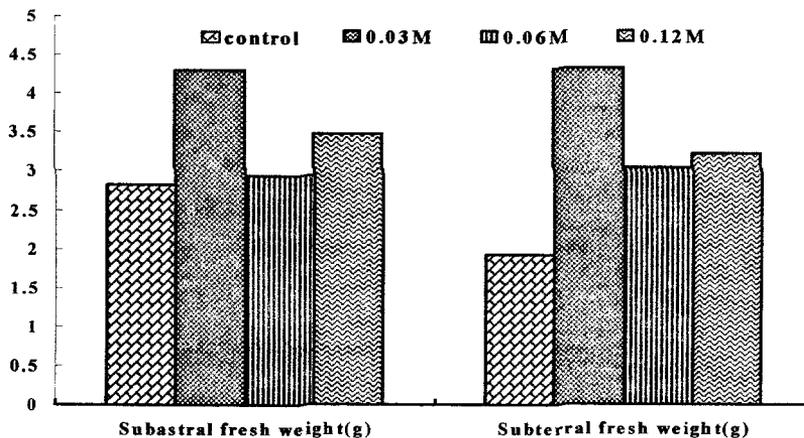


Fig.1. Comparison of characteristic of EMS treated plant in pot

## 2. EMS처리 지황 들연변이 개체의 저항성 검정

화학들연변이원인 EMS를 처리하여 유기 된 들연변이 개체들의 병원성 검정을 수행한 결과 *F. oxysporum* R-10에 있어서 들연변이 물질이 처리되지 않은 대조구 식물체의 모든 개체는 disease severity 3~5를 나타내어 감수성을 나타낸 반면 EMS가 0.03M 처리된 식물체에서는 전체 30개체 중 15개체가 disease severity 2를 나타내어 저항성을 나타내었다. 하지만 0.06M, 0.12M의 높은 농도로 처리되었던 것은 disease severity가 1~5까지 다양하게 분포하고 있으며 오히려 0.03M 농도로 처리된 것보다 감수성인 것으로 나타났다(Table 2).

식물체의 초상, 입수 조사에서는 control이나 들연변이 개체에서 별다른 차이가 없었으며 지상부와 지하부의 생체중에서는 0.03M농도로 처리된 식물체에서 다른 것에 비하여 비교적 높은 수치를 보여주어 병원균에 저항성을 보이는 개체가 다른 감수성인 식물체보다 생체중에서 양호함을 나타내었다.

## 3. EMS처리 지황 들연변이 개체 포장저항성 검정

들연변이원이 처리된 지황식물체와 처리되지 않은 지황 식물체를 포장에 이식하고 *Fusarium oxysporum*을 접종한 후 30일 이후에 접종균의 감염정도와 저항성과 감수성을 나누어 조사한 결과 control 식물체(들연변이원이 처리되지 않은 지황식물체)는 15 개체 중 11개체가 고사하거나 감수성을 보여 평균 3.9의 높은 disease rate 보인 반면 0.12M에서는 3.1, 0.06M에서는 3.3, 0.03M에서는 2.2의 비율을 나타내어 저항성을 보였다. 또한 0.12M이 처리된 개체 중 일부는 심한 이병성을 보여 완전히 고사하였다. 이러한 것은 처리된 들연변이원이 병저항성에 대한 일종의 선발압으로 작용하였다고 추정할 수 있으며 들연변이원의 농도가 높을수록 지하부 생체중이 증가한 실험과 관련하여 들연변이원 처리에 의해 지하부의 생육이 우세하게 되어 저항성에 영향을 미친 것으로 보인다. 따라서 지속적인 개체선발이 이루어져야 할 것이다(Table 3).

Table 2. Effects of *Fusarium oxysporum* on the growth of mutagenic plant in *R. glutinosa* on pot

Mutagenic plant	<i>Fusarium oxysporum</i>	
	R-3	R-10
Control	1 <sup>a</sup> (0 <sup>b</sup> )	1 (0)
	2 (4)	2 (0)
	3 (13)	3 (8)
	4 (9)	4 (4)
	5 (4)	5 (18)
0.03M	1 (0)	1 (4)
	2 (21)	2 (15)
	3 (9)	3 (4)
	4 (0)	4 (3)
	5 (0)	5 (4)
0.06M	1 (2)	1 (2)
	2 (14)	2 (9)
	3 (10)	3 (11)
	4 (4)	4 (4)
	5 (0)	5 (4)
0.12M	1 (0)	1 (0)
	2 (2)	2 (2)
	3 (13)	3 (8)
	4 (5)	4 (10)
	5 (10)	5 (10)

<sup>a</sup>Disease ratings in 1-5 scales; 1 = no disease observed and 5=death of plants. <sup>b</sup>The number of plants showing the disease ratings indicated out of total 30 plants tested.

Table 3. Pathogenicity test of mutant plants in *Rehmania glutinosa*

Line	<i>Fusarium oxysporum</i>															Average
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Control	4	3	4	5	2	4	4	5	4	5	4	3	4	5	4	3.9
0.03M	1	1	2	2	3	4	3	3	2	1	1	2	3	1	2	2.2
0.06M	3	5	3	4	3	2	3	4	2	3	3	4	4	3	2	3.3
0.12M	5	3	3	3	3	3	2	2	3	3	3	4	3	4	3	3.1

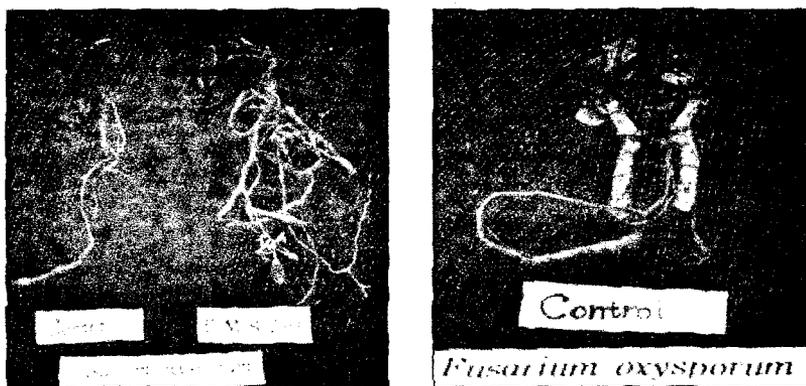
<sup>a</sup>Disease ratings in 1-5 scales; 1=no disease observed and 5=death of plants.

병원균에 대하여 저항성을 나타낸 line에서는 지상부, 지하부의 길이와 무게에서 돌연변이 물질을 처리하지 않은 식물체보다 다소 높은 수치를 나타내었으며 E-A-1와 E-A-10 식물체는 지상부와 지하부 무게가 2배가량 높게 조사되어 내병성인 품종으로 선발되었다(Table 4).

Table 4. Comparison of characteristic of EMS treated plant in field

Line	Shoot F.W	Root F.W	Shoot length	Root length
Control	57	56	4.5	22
E-A-1	129	109	7.1	31.6
E-A-2	119	98	6.5	28.6
E-A-3	91	94	4.1	27.7
E-A-4	94	97	4.8	26.9
E-A-9	90	89	5.0	25.7
E-A-10	123	101	6.9	30.8
E-A-11	115	89	6.0	26.1
E-A-12	95	88	5.6	27.0
E-A-14	110	93	5.7	25.7
E-A-15	102	90	6.4	24.0
E-B-6	86	75	5.5	21.6
E-B-9	90	72	5.1	19.8
E-B-15	91	79	5.7	24.0
E-C-7	84	67	5.0	23.4
E-C-8	89	73	4.9	26.7

E : Ethyl methane sulphonate: A : 0.03M; B : 0.06M; C : 0.12M



(A)

(B)



(C)

Fig.3. Pathogenicity test of mutant plants infected *Fusarium oxysporum* and *Collectotrichum sp.* The arrow indicated symptom caused by pathogen

(A) Comparison of symptom of control and mutant plant infected *Fusarium oxysporum*: Vertical section of control(B) and mutant plant(C) infected *Fusarium oxysporum*.

## 제 4절 Glutathione S-Transferase (GST) 유전자 형질 전환 체계 확립 및 내병성 식물체 육성

### 1. 지황의 식물체 재분화 체계 확립

엽절편 배양에서 얻어진 줄기의 기내 증식에 적합한 배지를 탐색하고자 MS, B5, WPM배지 등 3종류의 배지에 성장조절물질 0.1mg/L NAA와 1.0mg/L의 BA를 첨가하여 배양한 결과 45일 지난 후 증식된 식물체 수는 MS배지에서 4.2개로 가장 많았고 WPM배지에서 3.5개, B5배지에서 3.0개로 조사되었으며 초장은 5.6cm, 엽수의 개수도 7.5개로 MS배지가 가장 양호한 것으로 조사되었다 (Fig. 4).

식물의 종류에 따라서는 특정 배지조성이 배양효율을 증대시키는 것으로 알려져 있는데, 부자의 기내생육은 B5 배지에서 양호하다고 하였고, 산수유는 WPM 배지를 수정한 DKW배지가 신초배양에서 양호한 성장을 보인다고 하였다 (Seong et al., 1993). 지황의 신초증식에 가장 적합한 배지는 MS 배지로 조사되었다.

치상조직을 엽편 부위를 달리하였을 때 신초 형성과 식물체 재분화에 미치는 영향은 Fig. 5와 같다. 엽편은 엽병의 기부를 포함한 기부, 중앙 부위, 엽연을 포함한 상단 부위 절편으로 구분하여 엽 절편을 자른 다음 0.5mg/L BA + 0.5mg/L 2iP + 0.1mg/L TDZ가 첨가된 1/2 MS배지에 치상하였다. 신초형성은 엽 기부 절편 조직에서 95%로 가장 높게 나타났으며 중간 부위 절편조직에서는 52%, 상단 부위 절편에서는 15%로 저조하였다. 식물체 재분화는 신초 형성을로 엽기부조직에서 12개의 재분화 개체가 형성되어 가장 양호하였다. 이러한 원인을 Kuku 등(1977)은 식물조직 내에 형성되는 내생 성장조절물질들이 치상 조직에 따라서 혹은 동일한 치상 조직이라 할지라도 부위에 따라서, 식물체의 생육 단계에 따라서 내생 성장조절물질의 종류나 농도가 다르게 함유되어 있기 때문이라고 판단 된다.

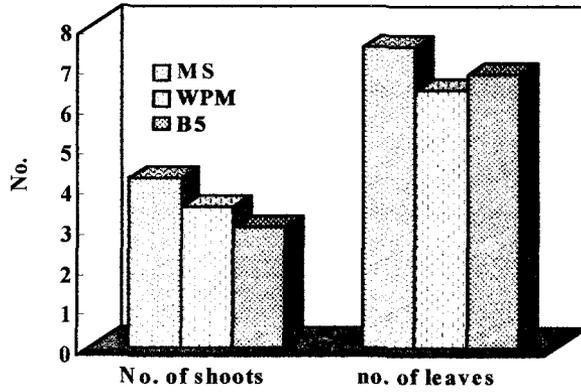
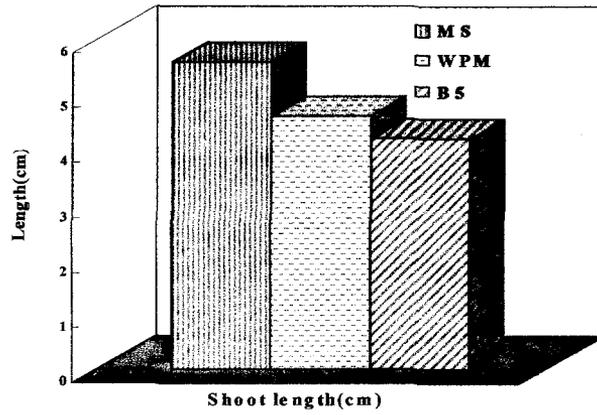


Fig.4. Effect of medium on shoot regeneration from callus cultured for 45days in *Rehmannia, glutinosa*.

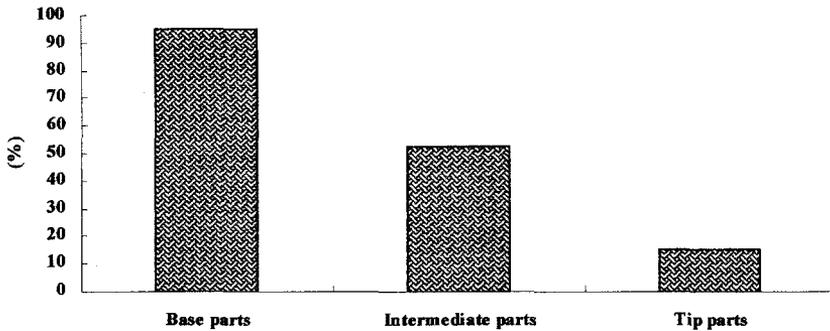


Fig. 5. Comparison of adventitious shoot formation and plantlet regeneration among different parts of leaf from *Rehmannia glutinosa*.

식물체의 치상조직에 따라서 재분화율과 형질전환 효율이 다르게 나타난다는 보고에 근거하여 기내에서 자란 식물체에서 줄기, 잎, 엽병을 취하여 식물생장 조절물질 TDZ, BA, 2,4-D, kinetin이 첨가된 MS배지에 치상하였을 때 엽병에서의 재분화는 4주 이상으로 오랜 시간이 지난 후 재분화가 이루어졌고 생성된 줄기수도 1~2개로 아주 저조한 효과를 나타내었다. 잎과 줄기에서의 2주부터 시작하여 callus가 형성되었으며 4주가 되어서는 줄기의 분화가 이루어졌다. 식물생장조절물질에서의 차이를 보면 1.0mg/L TDZ에서 줄기와 잎에서 각각 9개, 12개로 양호하였으며 1.0mg/L BA에서는 8개, 10개가 형성되어 줄기에서보다 잎에서 더 많은 multiple shoot가 분화됨을 나타내었다(Table 5, Table 6).

식물생장조절물질 첨가의 효과에서 2,4-D에서는 callus의 형성은 잘 되었지만 줄기 분화가 이루어지지 않았기에 2,4-D를 이용할 경우 캘러스 형성배지와 식물체 분화배지를 달리하는 것이 바람직하다고 판단된다. Kinetin 처리한 배지에서는 재분화는 이루어졌지만 줄기와 잎조직에서 절편체당 5개, 8개의 신초가 형성된 것으로 TDZ, BA에 비하여 다소 낮은 효과를 나타내었다. Thidiazuron(N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5yl-urea) 이 다른 cytokine류보다 줄기분화에 더 효과적이라는 사료되며, 사과(Nieuwkerik et al., 1986), 까마중(김 등, 1992)의 배양에서 이와 동일한 결과를 나타냈다.

Table 5. The effect of single treatments of growth regulator on callus induction and shoot regeneration from leaf tissue culture in *Rehmannia, glutinosa*

Growth regulator (mg/L)	No. of explants incubated	No. of callus (%)	No. of shoots	
TDZ	0.01	60	30 (50)	2
	0.1	60	42 (70)	4
	1.0	60	55 (92)	12
	2.0	60	58 (97)	8
BA	0.01	60	27 (45)	3
	0.1	60	36 (60)	4
	1.0	60	49 (82)	10
	2.0	60	57 (91)	7
2,4-D	0.01	60	24 (40)	0
	0.1	60	32 (53)	0
	1.0	60	46 (77)	0
	2.0	60	30 (50)	0
Kinetin	0.01	60	22 (37)	2
	0.1	60	34 (57)	3
	1.0	60	44 (73)	5
	2.0	60	48 (80)	8

식물생장조절물질의 조합처리에서는 2주 후부터 지황 절편체에서 callus형성을 나타내었으며 4주 후 절편체당 줄기형성은 모든 처리구에서 양호한 양상을 나타내었는데 0.5mg/L BA + 0.5mg/L 2iP + 0.1mg/L TDZ에서 절편체당 13개의 싹초를 형성하여 제일 좋은 효과를 보여주었다(Table 7).

Table 6. The effect of single treatments of growth regulator on callus induction and shoot regeneration from stem tissue culture in *Rehmannia glutinosa*

Growth regulator(mg/L)	No. of explants incubated	No. of callus(%)	No. of shoots	
TDZ	0.01	60	28 (47)	3
	0.1	60	41 (68)	3
	1.0	60	58 (97)	9
	2.0	60	57 (95)	7
BA	0.01	60	32 (53)	4
	0.1	60	40 (67)	3
	1.0	60	56 (93)	8
	2.0	60	54 (90)	5
2,4 - D	0.01	60	21 (35)	0
	0.1	60	28 (47)	0
	1.0	60	40 (67)	0
	2.0	60	31 (52)	0
Kinetin	0.01	60	23 (38)	3
	0.1	60	35 (58)	4
	1.0	60	46 (77)	5
	2.0	60	50 (83)	5

Table 7. The effect of treatments of growth regulators on callus induction and shoot regeneration from leaf tissue culture in *Rehmannia glutinosa*

Growth regulators(mg/L)	No. of explants incubated	No. of explant with calli	No. of shoots per a explant	Degree
0.1 NAA	75	58	4	+
1.0 TDZ + 1.0 BA	75	64	4	+
1.0 BA + 1.0 BA + 0.1 NAA	75	70	10	++
0.1 NAA	75	62	3	+
1.0 BA + 1.0 2iP	75	71	7	++
1.0 BA + 1.0 2iP + 0.1 NAA	75	69	8	++
0.1 NAA	75	65	6	++
0.5 BA + 0.5 2iP + 0.1 NAA	75	61	6	++
0.5 BA + 0.1 NAA	75	75	13	+++
0.5 BA + 0.5 2iP + 0.1 TDZ	75	75	13	+++

+ : poor, ++ : good, +++ : very good

## 2. 지황 잎 절편체에서의 kanamycin 저항성 측정

형질전환 실험에서 효율적으로 형질전환된 식물체를 선별하기 위하여 kanamycin 저항성을 측정하였다. 기본배지(MS + 30g/L Sucrose + 1mg/L TDZ + 1mg/L BAP + 0.1mg/L NAA)를 멸균과정을 거친 후 50~55℃가 되었을 때 항생제인 kanamycin을 농도를 각각 0, 20, 30, 50, 75, 100mg/L로 첨가한 후 지황 잎, 줄기 엽병 절편체를 치상하였다. 2주, 4주 두 개의 단계로 조사를 진행한 결과 2주까지는 식물체가 명확히 고사를 나타내지 않고 녹색을 띠고 일부는 callus형성을 나타냈으며, 4주째는 농도가 낮은 0, 20, 30mg/L에서는 식물체가 재분화되어 줄기 형성을 보여주는 반면 잎 절편체에서는 50, 75mg/L의 kanamycin이 첨가된 배지에서는 분화가 급격히 감소하였으며 100mg/L에서는 전

혀 식물체분화가 이루어지지 않고 줄기 절편체에서는 50mg/L의 kanamycin이 첨가된 배지에서 분화가 저조하였으며 75, 100mg/L의 배지에서 고사하였다. 엽병은 20mg/L의 항생제 첨가에서 70%의 갈변을 나타냈고 30mg/L이상의 첨가구에서는 백화현상을 나타내면서 고사하였다(Table 8). Socristan과 Melchers(1987)은 kanamycin배지에서 선발된 재분화식물체의 일부가 PCR이나 Southern 분석에서 형질전환이 확인되지 않은 원인을 kanamycin 내성세포에서 생성되는 식물호르몬이 인접해 있는 형질전환이 되지 않은 세포에 전달되어 식물체가 재분화된다고 보았다.

Table 8. The ratio of kanamycin resistance of leaf and stem explant in *R. glutinosa*

Medium	Explant	Kanamycin (mg/L)	No. of explant	No. of survival explant	Rate of survival (%)
		0	75	75	100
	leaf	20	75	35	47
		30	75	25	33
		50	75	5	5.3
MS		75	75	1	1.3
+ TDZ 1		100	75	0	0
	stem	0	75	75	100
+ BAP 1		20	75	30	40
+ NAA 0.1		30	75	18	24
		50	75	3	4
		75	75	0	0
		100	75	0	0

### 3. *Agrobacterium*에 의한 형질전환

형질전환에 사용하고자 하는 GST 유전자는 2개(T-GST: NT107, CGST: Gh5)의 다른 source로부터 분리된 유전자를 사용하였으며 NT107은 담배의 현탁배양세포로부터 분리된 auxin regulatory gene이며 941bp의 origin base sequence를 가지고 있다. Gh5는 목화에서 분리된 glutathion S-transferase이며 988bp의 origin base sequence를 가지고 있다

#### 가, 형질전환 효율 증대를 위한 전처리 및 공동배양 기간의 효과

형질전환 실험에서 식물체조직 잎, 줄기, 엽병을 상처내어 전처리 배양을 수행하였을 때와 이러한 배양과정을 거치지 않은 효과를 관찰한 결과 별다른 차이를 나타내지 않았다. 형질전환 시 작물에 따라 전처리가 필요한 것이 있으며 *Arabidopsis*, *Datura* 등에서는 전처리를 하면 효율이 높아지는 반면, *Daucus*, *Nicotiana*, *Petunia* 등은 전처리가 크게 요구되지 않는다고 하였다(Pawlick et al., 1992). 본 실험의 지황에서는 전처리를 하지 않아도 형질전환체 재분화가 잘 되어 전처리를 크게 요구하지 않는 것으로 판단된다.

액체배지로 희석한 *Agrobacterium*을 식물체와의 접촉시간을 다르게 하였을 때 5분부터 30분까지는 callus의 형성이나 형질전환율이 점차적으로 상승하는 효과를 나타내었고 접촉시간을 30분간으로 하였을 때 제일 양호한 형질전환 효율을 보여주었다. 접촉시간을 60분까지 하였을 때는 선발배지에서 많은 절편체가 백화현상을 나타내면서 고사하였다.

접종식물체를 공동배양배지에 옮긴 후 암상태에서 *Agrobacterium*과의 공동배양을 1~5일까지 하였을 때 1일부터 3일까지는 상승효과를 나타내었지만 4일부터 5일까지는 형질전환 효율이 낮아지는 추세를 나타내었으며 육안으로 관찰함에 있어서도 식물체의 표면에 *Agrobacterium*이 지나치게 자라나 있었다(Fig. 6). 이러한 균의 성장이 식물체의 재분화에 영향주는 것으로 추측된다. 공동배양기간에 있어서 작물의 특성과 형질전환에 사용하는 strain에 따라 공동배양기간의 효과는 다르며 본 실험의 지황에서 3일이 가장 양호하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 일반적인 형질전환의 공동배양기간이 2~3일이 적당하다는 보고(James et al., 1989; McCormick et al., 1986)와 유사하게 나타났다.

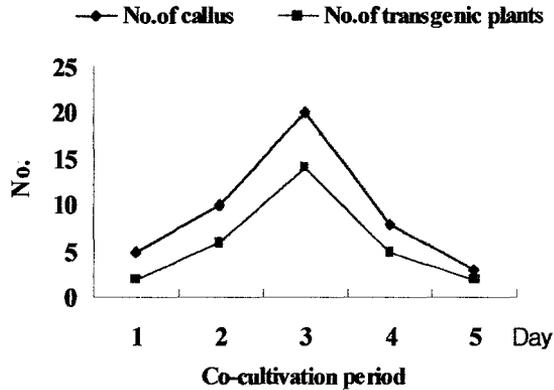


Fig.6. Influence of co-cultivation period on transformation of *R. glutinosa* explants.

나. 형질전환시 acetosyringone의 첨가에 따른 효과

*Agrobacterium tumefaciens*을 매개로 형질전환시킬 경우 첨가된 acetosyringone이 형질전환 효율에 관한 조사에서 50~200  $\mu$ M까지는 상승효과를 나타내었지만 더 높은 농도에서는 그 효율이 점점 낮아졌고 200  $\mu$ M에서 가장 좋은 효과를 나타내었다(Fig.7). 오이의 자엽(Chee, 1990), 잎(Sarmento et al., 1992), 하배축(Nishibayashi et al., 1996)등을 재료로 사용하여 *A. tumefaciens*와 공동배양할 때 acetosyringone을 첨가하면 형질전환율이 높아지는 것으로 보고되어 있다. 그러나 Shimoda등(1990)은 acetosyringone의 첨가가 효과 없는 것으로 보고하였다. 이러한 결과는 식물체종에 따른 반응이 다양하여 종에 따른 Ti-plasmid *vir* region의 활성화의 차이에 기인하는 것이다.

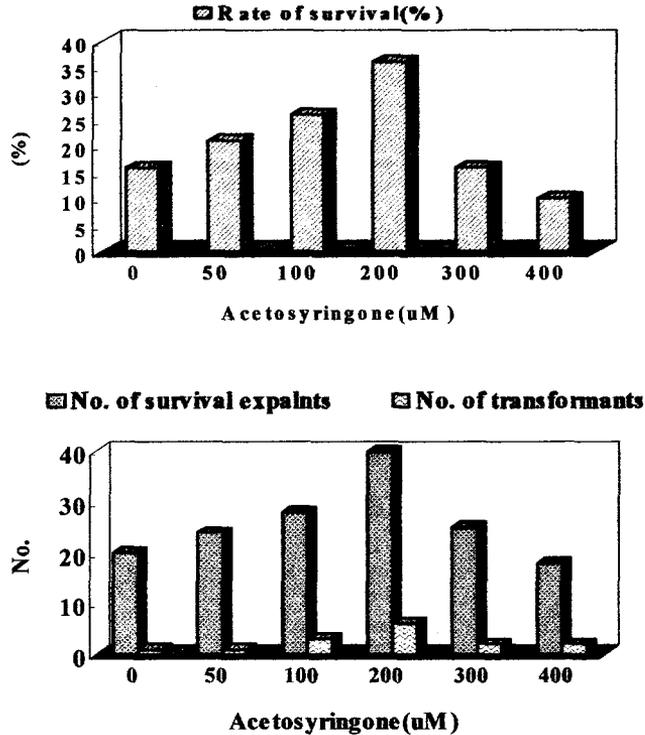


Fig.7. Effect of acetosyringone concentrations on transformation in *R. glutinosa*. Explants were cocultured on feeder plates of co-culture for 3days.

#### 다. 형질전환시 암처리 효과

공동배양 배지에서 *Agrobacterium*과 공동배양 과정을 거친 절편체를 선발배지에 옮긴 후 직접 광조건에서 배양 또는 암처리를 2, 4, 6, 8주로 틀리게 하였을 때 그 재분화 효과와 형질전환 효율을 관찰한 결과 암처리를 4주까지 수행하였을 때 재분화와 형질전환율이 상승하였지만 그 이상의 암처리는 절편체가 백화현상을 나타내면서 효율이 떨어지는 것을 관찰할 수가 있었다. 4주까지의 암처리가 가장 식물절편체의 재분화와 형질전환에 효과적이었음을 관찰할 수 있었다(Fig.8). 이러한 결과는 선발배지에 옮긴 후 식물절편체의 암처리는 Carrizo citrange(Pena et al., 1995a), sweet orange(Pena et al., 1995b)와

lime(Pena 1995c)과 다른 목본 과일나무 종인 사과(Maheswaran et al., 1992)과 pear(Mozer et al., 1982)에서 형질전환된 줄기의 유도에서 효과적이었다는 보고와 일치하였다.

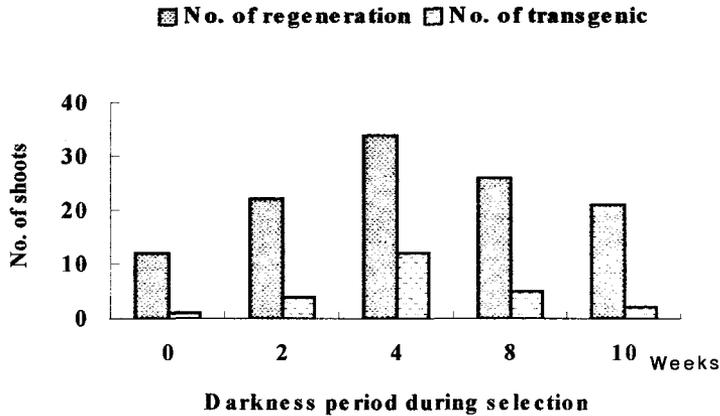


Fig.8. Effect of darkness on the regeneration and transformation in *R. glutinosa*. Explants were cocultured on feeder plates for 3days and then transferred to the selection medium.

#### 라. 형질전환체 유기

식물 절편체를 *Agrobacterium*과 공동배양을 하고 재분화 배지로 옮긴 다음 2주 후 상처부위로부터 callus가 생성되는 것을 관찰할 수 있었다. 4주 후에는 형질전환 되었다고 추측되는 식물체가 절편체에서 줄기의 분화를 나타내었다.

식물생장조절물질 처리에 의한 줄기 재분화 실험에서 양호한 양상을 나타낸 1.0mg/L TDZ, 1.0mg/L BA, 1.0mg/L TDZ + 1.0mg/L BA + 0.1mg/L NAA, 0.5mg/L BA + 0.5mg/L 2IP + 0.1mg/L TDZ배지를 이용하여 재분화 배지로 사용하였으며 항생제인 kanamycin 50, 75mg/L와 Cefotaxim 250mg/L를 첨가하여 형질전환된 식물체를 선발하였다. Kanamycin이 75mg/L가 첨가된 배지에서는 거의 재분화가 이루어지지 않았고 50mg/L의 농도에서 일정하게 줄기의 분화가 형성되었다 (Table 9).

Table 9. Effect of media on shoot regeneration for transformation from leaf in *R. glutinosa*

Growth regulator(mg/L)	Antibiotic level	No. of explants incubated	No. of regenerats survival
1.0 TDZ		250	4
1.0 BA		300	3
1.0 BA + 1.0 TDZ	Km 50mg/L + Cx 250mg/L	260	10
+0.1 NAA			
0.5 BA + 0.5 ZiP		320	13
+0.1 TDZ			
1.0 TDZ		280	1
1.0 BA		310	1
1.0 BA + 1.0 TDZ	Km 75mg/L + Cx 250mg/L	360	2
+0.1 NAA			
0.5 BA + 0.5 ZiP		290	2
+0.1 TDZ			

선발배지에 옮긴 다음 2주 후부터는 절편체에서 형질전환되었다고 추측되는 callus가 형성되었으며 4주부터는 줄기의 분화가 이루어졌다. 이러한 줄기를 kanamycin이 함유된 뿌리유도배지에 옮겨서 뿌리를 유도하였다(Fig. 9).

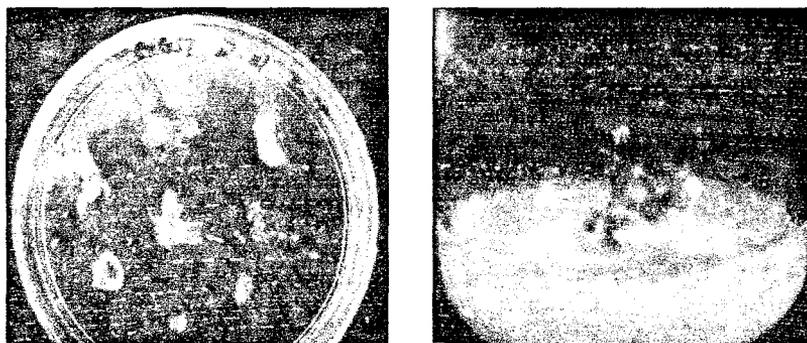


Fig.9. Shoot induced from on 1/2MS medium containing kanamycin and cefotaxime.

#### 마. 형질전환 식물체의 PCR분석

형질전환을 수행하여 재분화 된 지황식물체로부터 분리된 염색체상에 GST 유전자가 존재하는지의 여부를 확인하기 위하여 CTAB방법으로 DNA를 추출하였으며 PCR분석을 진행하였다. 형질전환 선발표지로 사용되는 *nptII gene*의 삽입을 확인하기 위하여 primer : N-1(5' -GAA-GCT-ATT-CGG-CTA-TGA-CTG-3')과 N-2(5' -ATC-GGG-AGC- GGC-GAT-ACC-CTA-3')를 사용하여 PCR을 수행하였다. 형질전환이 안된 식물체에서는 DNA band가 나타나지 않았으나 형질전환된 식물체에서는 700bp의 DNA band가 확인되었다(Fig. 10).

외래 유전자인 C-GST유전자의 도입을 확인하기 위하여 Primer *Gh-5-1*(5'-ATT-ATG-CTG-AGT-GAT-ATC-CCG-CT-3')과 *Gh-5-2*(5'-TGG-TCA-AGA-GCC-AAG-AAA-TA-3')를 사용하여 PCR을 수행한 결과 control 식물체에서는 DNA band가 나타나지 않은 반면 형질전환 된 식물체에서는 988bp DNA band가 나타나 형질전환된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 형질전환된 것으로 추정되었던 일부 식물체 line중에서 DNA band가 나타나지 않았다. 이러한 식물체는 항생제에 저항성을 가짐으로써 선발배지에서 성장하였거나, 형질전환된 callus의 상부에 위치하여 영양물질을 섭취하면서 재분화 과정을 거쳐 식물체로 성장되었다고 추정된다(Fig. 11).

#### 4. 형질전환 된 식물체의 순화와 생존을 조사

토양이식을 위한 적절한 토양조건 구명 실험에서 vermiculite + perlite + 모래(1:1:1)의 혼합과 상토 + 토비랑 + perlite(1:1:1) 조합으로 된 두 가지 토양조건에서 모두 양호하였고 상토, 토비랑, perlite의 조합은 멸균과정을 거치지 않아도 순화에 사용할 수 있었다. 형질전환 된 식물체와 형질전환 되지 않은 식물체의 순화생존율을 조사한 결과 형질전환 식물체는 80%, 86%로 높은 순화율을 보였으며 형질전환 되지 않은 식물체는 44%의 저조한 순화율을 보여주었다. 이러한 결과는 100% 수분조건인 기내에서 자라던 식물체를 수분이 낮고 광도, 온도가 높은 환경조건으로 옮기면서 생기는 여러 가지 스트레스에 대하여 GST유전자가 형질전환 된 식물체에서 발현되어 높은 순화율을 나타내었다고 사료된다(Table 10).



Fig.10. Detection of *nptII* gene in transgenic plants by using N-1, and N-2 primer.

line 1 : pGEM marker DNA.

line 2 : PCR amplication of non-transgenic plant.

line 3 : PCR product of *npt II* gene fragment.

line 4-13 : PCR amplication of transgenic plants selected in medium containing Km 50mg/L.

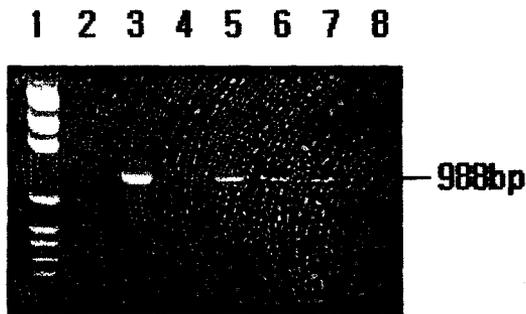


Fig. 11. Detection of C-GST gene in transgenic plants by using *Gh5-1*, and *Gh5-2* primer.

line 1 : pGEM marker DNA.

line 2 : PCR product of non-transgenic plant.

line 3 : PCR product of C-GST gene fragment.

line 4~8 : putative transgenic plants selected in medium containing Km 50mg/ l.

Table 10. Acclimatization rate of control and transgenic plants in soil after 30days

Transgenic plants	No. of plantlets transplanted	No. of plants survived	Rate of survival(%)
Control	23	10	44
C-GST	25	20	80
T-GST	15	13	86

5. 형질전환 된 지황 식물체의 기내 내병성 검정

가. 형질전환된 지황 식물체의 *Fusarium oxysporum*에 대한 기내 내병성 검정

병원균 *Fusarium oxysporum*을 지황식물체에 접종하였을 때 형질전환 된 식물체 C-3, C-6, C-7, C-8 line은 R-3, R-10병원균에 대하여 비교적 높은 저항성을 나타내었으며 그 현상은 현삼 식물체에서와 같은 양상을 보여주었으며, 형질전환 되지 않은 식물체는 감수성을 나타내어 식물체가 투명화 되었으며 시들어 있었다(Table 10). 이러한 결과는 형질전환 된 식물체에 도입된 유전자 GST가 발현하여 병원균에 대하여 저항성을 나타낸 결과로 사료된다. 또한 형질전환 식물체가 병원균에 의하여 나타낸 양상을 관찰해 보면 R-3이 R-10보다 독성이 약한 것으로 판단된다(Table 11).

Table 11. Pathogenicity test of *Rehmannia glutinosa* inoculated by *Fusarium oxysporum* strains

	Disease ratings <sup>a</sup>								
	C-1 <sup>b</sup>	C-3	C-6	C-7	C-8	C-9	C-12	C-14	Non-transgenic
R-3 <sup>c</sup>	3.0 <sup>d</sup>	2.2	2.2	2.3	2.3	3.0	2.4	2.3	4.3
R-10	3.1	2.6	2.5	2.6	2.5	4.0	3.8	3.6	4.7
Control	1	1	0.5	0.5	0.5	1	1	1	1

<sup>a</sup> Disease ratings were based on 0-5 scales; 0=no disease and 5=death of seedlings. <sup>b</sup> *Rehmannia glutinosa* transformed in vitro with fungal-resistant gene. <sup>c</sup> *Fusarium oxysporum* isolates. <sup>d</sup> Mean of average.

## 나. 형질전환식물체 추출단백질의 군사억제효과

각각의 형질전환식물체에서 추출한 단백질의 첨가에 따른 포자발아의 양상을 살펴보면 형질전환되지 않은 식물체의 단백질을 첨가한 구와 포자만 들어있는 구에서는 포자가 발아하여 군사생장이 왕성하였으나 형질전환된 식물체에서 추출한 단백질을 첨가한 구에서는 생장이 저해되었다.

*Asperigillus niger*의 경우에 C-GST와 T-GST 형질전환체의 단백질을 첨가한 경우 모두 포자가 발아하지 못하고 군사생장이 지연되며 군사말단부가 고사하는 특성을 나타냈으며 *Trichoderma viride*에 형질전환체의 단백질을 첨가한 경우 군사의 생장이 진행되지 못하였으며 *Fusarium oxysporum* R-10에 형질전환체의 단백질을 첨가하였을 경우 군사의 생장을 억제하여 포자만 들어있는 대조구와 형질전환 되지 않은 식물체의 단백질을 첨가한 것과 비교하였을 때 그 밀도가 낮은 것으로 관찰되었다. 상기의 결과로부터 지황식물체에 도입한 유전자 GST의 발현으로 인하여 생성된 단백질이 작용에 기인하는 것으로 판단되며 이러한 단백질이 각각 다른 균에 대하여 포자에서 군사의 생장을 억제하는 양상이 다르게 나타났다. *Fusarium oxysporum* R-3에서는 형질전환체의 단백질을 첨가하였지만 대조구와 별다른 차이를 나타내지 않은 것으로 관찰되었다. 형질전환 식물체의 기내내병성 검정에서 *Fusarium oxysporum* R-3보다 *Fusarium oxysporum* R-10 병원균이 독성이 더 강한 것으로 조사되었는데 포자 발아억제 실험을 통하여 독성이 약하거나 일정한 농도로 되어야 도입된 유전자가 그 활성을 나타내어 식물체에서 보호작용을 일으키는 것으로 사료된다.

세균 균주인 *Candida lypolytica*에 형질전환체 단백질을 첨가하였을 때 균의 생장이 진행되지 못한채로 현탁액으로 확인되었지만 균주만 들어있는 대조구와 형질전환 되지 않은 식물체의 단백질을 첨가하였을 때는 균주가 왕성하게 성장하여 96well plate의 밑부분에 침전으로 되어 뭉쳐있는 양상을 나타내었다. 이러한 결과로부터 형질전환체에서 도입된 유전자가 발현되어 세균의 성장을 억제한 것으로 추측된다.

## 6. 포장에서 형질전환식물체의 병원균 처리에 따른 효소활성 및 내병성 조사가. 형질전환식물체의 병원균 처리에 따른 GST activity 조사

형질전환된 지황 식물체와 형질전환 되지 않은 식물체에 병원균 *fusarium*

*oxysporum*, 역병, 탄저병을 접종한 후 GST 활성을 조사하기 위하여 Dean 등의 방법에 따라 조효소액을 추출하여 GST activity를 측정하였다. 형질전환 된 식물체에서 GST활성이 형질전환 되지 않은 식물체에 비하여 비교적 높은 활성을 나타내었으며 *fusarium* 병원균에 대한 활성이 다른 병원균에 비하여 다소 높게 나타났다(Fig.12). 시간에 따른 GST 활성을 조사한 결과 3가지 병원균에서 12, 24시간 때는 별다른 차이가 없었으며 48시간 때에 가장 높은 활성을 나타내었으며 그 뒤로는 활성이 떨어지는 경향을 나타내었다(Fig.13). 현삼 식물체에서는 48시간 때부터 병원균에 대하여 높은 활성을 보여 120시간 때에 가장 높은 수치를 기록하였지만 지황 식물체에서는 24시간까지 별다른 차이가 없다가 48시간 때에 최고치를 기록하여 이러한 것은 같은 유전자에 의하여 형질전환 된 식물체이라 하더라도 식물체가 다름에 의하여 그 활성의 차이가 있음을 보아낼 수 있었다. 따라서 병원균을 처리하였을 때는 마찬가지로 감염 시간이 수요되며 식물체가 체내에서 GST의 활성이 증가되면서 독소물질의 분자구조를 분해시켜 무독화 시키는 과정에 의하여 저항성을 나타내고 있음을 알 수 있었다.

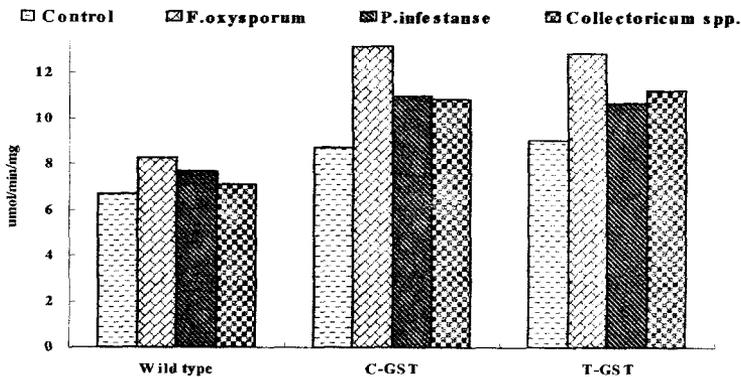


Fig.12. Comparison of GST-activity between control and transgenic plants infected by pathogens in *Rehmannia glutinosa*.

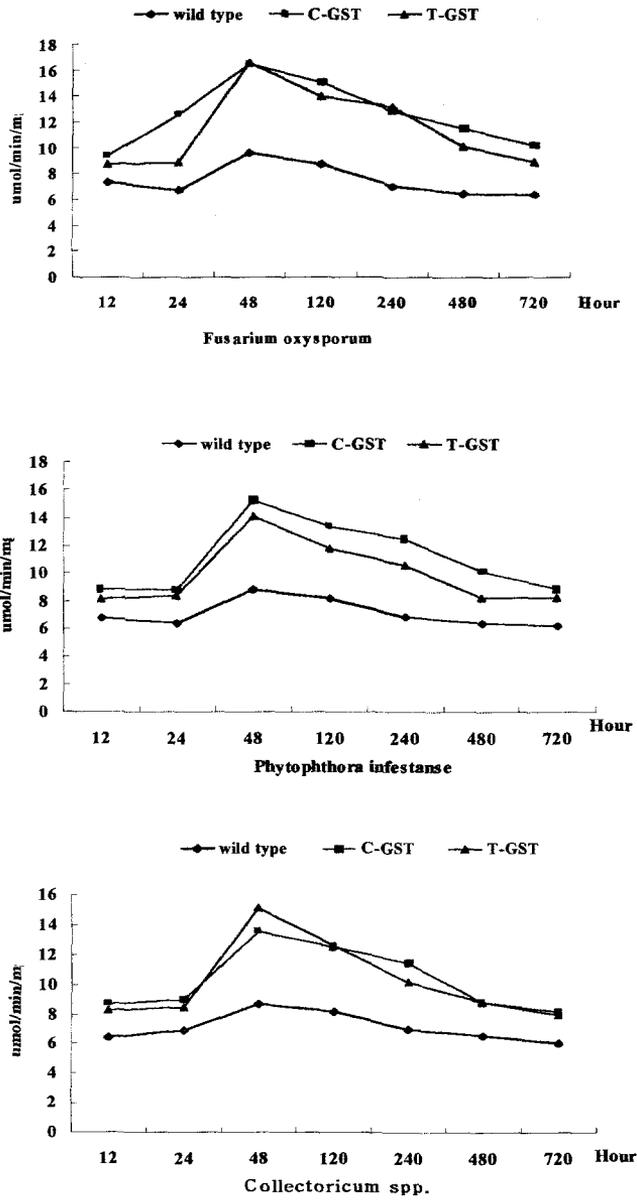


Fig.13. The pattern of GST-activity in control and transgenic (GH-5, cotton-GST; NT-107, tobacco-GST) *R. glutinosa* infected by pathogens after 720 hours.

## 7. 형질전환식물체의 포장에서의 내병성 검정 및 생육특성

### 가. 형질전환 식물체의 포장저항성 검정 및 생육특성

GST유전자에 의해 형질전환된 지황 식물체와 형질전환되지 않은 대조구 식물체를 대상으로 *F. oxysporum*, *P. infestanse*, *Collectoricum spp.*를 감염시키고 2개월 후 각 계통에 대한 생육조사를 수행하였다. 지상부의 생육은 형질전환되지 않은 대조구 식물체에서 우수하게 나타났다. 초장의 경우 형질전환되지 않은 대조구 식물체의 경우 19.9cm로 GST유전자로 형질전환된 식물체(T-GST: 14.9cm, C-GST: 17.3cm)보다 높게 나타났으며, 옆면적에서도 형질전환되지 않은 대조구 식물체의 경우 99.7cm<sup>2</sup>인데 비하여 T-GST유전자로 형질전환된 식물체의 경우 64.5cm<sup>2</sup>, C-GST유전자로 형질전환된 식물체는 74.7cm<sup>2</sup>로 대조구 식물체와 큰 차이를 나타내었다. 또한 병원균을 처리시 형질전환되지 않은 대조구 식물체가 GST유전자로 형질전환된 식물체보다 지상부의 생육상태가 다소 양호한 결과를 나타내었다. *F. oxysporum*를 처리시 형질전환되지 않은 대조구 식물체의 경우 옆 면적이 96.71cm<sup>2</sup>로 GST유전자로 형질전환된 식물체(T-GST: 72.2cm<sup>2</sup>, C-GST: 76.8cm<sup>2</sup>)보다 다소 넓게 조사되었다. *P. infestanse*를 처리 시 형질전환되지 않은 대조구 식물체의 경우 지상부 생체중이 336.5g으로 GST유전자로 형질전환된 식물체(T-GST: 254.7g, C-GST: 133.8g)보다 양호하게 조사되었다. GST유전자로 형질전환된 식물체의 경우 C-GST유전자로 형질전환된 식물체가 T-GST유전자로 형질전환된 식물체보다 식물체 높이, 잎길이, 옆면적 지상부 생체중에서 우수하게 조사 되었으며 *F. oxysporum*, *P. infestanse*, *Collectoricum spp.*을 처리시 T-GST유전자로 형질전환된 식물체가 C-GST유전자로 형질전환된 식물체 지상부의 생육상태가 양호하게 나타나 T-GST유전자가 C-GST유전자보다 병원균에 대하여 다소 우수한 저항성을 나타내는 것으로 사료된다(Table 12).

지황의 주요 이용부위인 지하부에서 뿌리의 길이 및 굵기, 지하부 생체중을 조사하여 본 결과 T-GST나 CGST로 형질전환된 식물체의 뿌리 길이(T-GST: 25cm C-GST: 22.4cm)가 형질전환되지 않은 식물체보다 뿌리 길이가 길게 나타났으나 병원체의 감염에 의한 뿌리길이의 차이는 나타나지 않았다. 이러한 것은 뿌리의 굵기에 대해서도 유사한 경향을 나타내어 형질전환 식물체가 저항성을 나타내었으나 *Collectoricum spp.*을 처리시 T-GST유전자로 형질전환된 식물체는 뿌리굵기가 높이 유지된 반면 C-GST의 경우에는 병원체의 감염된 형질전환되지

않은 식물체보다 낮게 나타나 각 유전자의 저항성 발현의 차이가 남을 나타내고 있다. 지하부 생체중에 있어서 형질전환된 식물체는 병원체를 감염시키지 않은 경우에서도 형질전환되지 않은 식물체 보다 1.5-2 배의 지하부 생체중 증가를 나타내었으며 병원체를 감염시킨 경우에서도 이와 같은 결과를 나타내어 병원체에 대한 저항성을 나타내었다.

Table 12. Comparison of growth characteristics(above) in non-transgenic and transgenic plant infected by pathogens in field

	Infected by pathogens	Plant height(cm)	Leaf length(cm)	Leaf area(cm <sup>2</sup> )	Shoot weight(g)
Non-transgenic	Control	19.9±2.91	24.9±0.78	99.7±3.97	154.9±14.05
	<i>F. oxysporum</i>	19.4±0.94	32.7±0.33	96.7±1.93	165.1±18.62
	<i>P. infestanse</i>	15.2±2.72	29.2±0.52	90.8±3.91	336.5±6.83
	<i>Collectoricum</i>	16.5±3.03	27.4±0.81	92.5±2.17	135.9±12.6
	<i>spp.</i>				
LSD		3.15	1.00	4.94	20.66
T-GST	Control	14.9± 1.80	19.1±1.89	64.5±3.77	122.7±8.72
	<i>F. oxysporum</i>	17.2±1.95	21.7 0.18	72.2±3.15	210.6±6.12
	<i>P. infestanse</i>	17.1± 2.19	22.9±1.27	90.4±2.54	254.7±7.5
	<i>Collectoricum</i>	17.2±2.27	22.4±2.01	87.9±4.01	187.4±849
	<i>spp.</i>				
LSD		2.40	2.03	4.11	8.95
C-GST	Control	17.3±1.09	21.4±1.98	74.7±3.06	154.5±3.25
	<i>F. oxysporum</i>	15.9±0.45	20.5±2.54	76.8±2.49	162.4±2.24
	<i>P. infestanse</i>	15.2±1.37	18.9±0.67	66.2±1.38	133.8±1.37
	<i>Collectoricum</i>	15.4±0.98	21.5±1.14	86.9±2.31	151.3±3.61
	<i>spp.</i>				
LSD		1.71	2.59	3.26	3.77

Table 13. Comparison of growth characteristics(below) in non-transgenic and transgenic plant infected by pathogens in field

	Infected by pathogens	Root length(cm)	Root diameter (cm)	Root weight(g)
Non-transgenic	Control	21.2±1.01	2.0±0.06	297.5±13.11
	<i>F. oxysporum</i>	19.4±1.36	2.0±0.08	214.3±11.18
	<i>P. infestanse</i>	18.8±0.64	2.1±0.02	187.3±9.24
	<i>Collectoricum spp.</i>	19.2±1.19	2.1±0.05	224.5±9.20
LSD		1.71	0.18	13.26
T-GST	Control	23.7±2.08	2.6±0.04	497.6±2.01
	<i>F. oxysporum</i>	25.9±1.41	2.5±0.10	458.4±1.56
	<i>P. infestanse</i>	24.8±0.34	2.5±0.10	421.3±1.03
	<i>Collectoricum spp.</i>	25.5±1.08	2.5±0.07	437.1±1.49
LSD		2.11	0.11	2.47
C-GST	Control	23.2±2.01	2.2±0.12	402.9±8.64
	<i>F. oxysporum</i>	22.6±2.04	2.3±0.16	376.9±7.48
	<i>P. infestanse</i>	21.5±1.13	2.2±0.05	331.4±4.13
	<i>Collectoricum spp.</i>	22.2±1.19	2.0±0.22	328.6±6.48
LSD		2.16	0.25	9.71

#### 나. 저항성 계통의 선발 및 생육특성

각 처리구별로 포장에서의 생육상태를 조사한 결과 형질전환 되지 않은 식물체에 비하여 형질전환된 식물체에서 식물체의 높이 및 잎 생육상태는 다소 저주하였으나 지상부의 무게에서는 약 2배정도, 지하부의 무게에서는 약 2.5배정도 우수함을 나타내었다(Table 14). 결과가 비교적 양호한 10개의 계통을 선발하여 임의로 계통의 번호를 사용하였다. T-GST유전자로 형질전환된 식물체의 경우 T-1, 6, 7, 10계통 형질전환 되지 않은 식물체와 비교하여 약 2~2.5배정도의 뿌리 무게가 무거운 생육특성을 나타내었다. 특히 T-1계통의 경우 생육상태가 다른 계통과 비교하였을 때 매우 우수함을 나타내었다. C-GST유전자로 형질전환된 식물체의 경우 T-GST유전자로 형질전환된 식물체와 비교하였을 때 뿌리·지상부 무게 등에서 다소의 차이를 나타내었다. C-GST유전자로 형질전환된 식물체는 형질전환되지 않은 식물체와 비교하였을 때 지상부의 생육상태는 다

소 저조하였으나 지하부의 생육상태의 경우 약 2배정도 우수함을 보여주었다. 각 계통별로 살펴보면 C-3, 5, 7, 10계통의 경우 지하부의 경우 형질전환 되지 않은 식물체와 비교하여 약 1.5~2배정도의 뿌리 무게가 더 무거운 생육상태를 보여주었다. 특히 C-5계통의 경우 뿌리의 굵기는 형질전환되지 않은 식물체의 약 1.7배, 뿌리의 무게는 약 2.2배의 우수함을 나타내었다(Table 14).

Table 14 . Comparison of growth characteristics(above) in non-transgenic and transgenic plant in field

Line	Plant height (cm)	Leaf length (cm)	Leaf area (cm <sup>2</sup> )	Shoot weight(g)	
Non-transgenic	19.97	24.87	99.73	155.0	
Transgenic plant (T-GST)	T-1	21.0±2.0	26.0±1.6	110.1±1.6	392.5±5.4
	T-2	18.0±1.9	24.4±1.8	82.4±1.6	131.0±6.5
	T-3	13.0±1.0	16.0±1.5	57.5±1.0	176.5±5.9
	T-4	13.0±1.8	13.8±0.8	41.9±1.5	195.0±6.1
	T-5	18.0±1.3	17.4±0.8	54.3±0.9	125.0±5.2
	T-6	22.5±1.5	14.0±0.9	39.7±1.5	226.0±6.8
	T-7	20.0±2.1	26.0±1.6	127.3±1.7	306.5±4.3
	T-8	20.0±2.1	18.0±1.9	68.3±1.3	207.5±1.9
	T-9	12.5±2.1	19.4±1.5	67.4±1.5	63.0±6.6
	T-10	19.0±0.9	19.8±1.1	78.3±1.1	227.5±6.1
LSD	2.13	2.00	1.84	6.91	
Transgenic plant (C-GST)	C-1	22.0±2.2	22.0±2.0	70.9±8.7	190.5±14.1
	C-2	16.6±2.3	14.4±1.9	39.6±7.5	104.5±14.0
	C-3	13.5±2.0	24.0±1.9	98.2±7.3	291.5±9.8
	C-4	21.4±2.1	18.8±1.5	46.5±1.9	231.0±10.9
	C-5	15.3±2.4	22.6±2.0	88.9±5.1	119.0±5.3
	C-6	13.0±2.4	19.8±1.7	137.3±4.3	120.5±12.8
	C-7	22.4±1.2	23.4±1.8	84.9±4.0	341.0±9.9
	C-8	16.1±1.3	20.6±2.0	112.4±3.9	170.5±9.7
	C-9	10.8±0.9	21.0±1.9	57.7±3.5	116.5±8.7
	C-10	15.8±2.6	25.2±1.9	121.3±6.7	157.0±12.4
LSD	2.66	2.09	8.45	15.35	

Table 14 . Comparision of growth characteristics(below) in non-transgenic and transgenic plant in field

Line	Root length (cm)	Root diameter (cm)	Rootweight (g)	
Non-transgenic	21.19	2.03	297.5	
Transgenic plant (T-GST)	T-1	18.0±3.2	2.5±0.2	669.0±9.1
	T-2	21.0±3.0	2.6±0.2	509.5±8.4
	T-3	28.8±2.8	3.1±0.2	530.0±4.5
	T-4	19.0±2.8	2.5±0.2	493.5±4.1
	T-5	27.0±1.6	2.6±0.3	497.0±5.1
	T-6	19.0±2.9	3.2±0.3	582.0±6.9
	T-7	25.0±3.1	2.0±0.1	630.5±7.9
	T-8	21.0±3.1	3.0±0.1	549.0±6.1
	T-9	22.0±1.0	2.1±0.2	490.0±7.1
	T-10	24.0±1.9	2.2±0.1	712.0±5.3
LSD	3.36	0.31	9.51	
Transgenic plant (C-GST)	C-1	22.0±3.9	1.8±0.2	480.5±27.1
	C-2	19.0±4.5	2.1±0.3	434.0±31.4
	C-3	27.5±3.5	2.2±0.3	583.5±49.0
	C-4	19.6±2.9	2.1±0.2	454.0±18.5
	C-5	21.0±4.0	3.4±0.3	652.0±44.6
	C-6	20.0±4.2	2.0±0.5	429.0±24.1
	C-7	24.4±2.1	2.3±0.4	663.0±28.3
	C-8	14.0±1.9	1.5±0.2	487.0±13.2
	C-9	18.0±3.9	3.0±0.1	430.5±21.3
	C-10	22.0±4.0	2.2±0.4	540.0±9.53
LSD	4.87	0.58	51.56	

기내식물체를 포장에 순화시킨 후 *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora infestanse*, *Collectoricum spp.* 등의 병원균을 접종하여 2달후 생육특성을 조사하였다(Fig. 14, 15, 16, 17). 춘천 재래종과 지황 1호를 교배한 품종의 경우 춘천 재래종에 비하여 뿌리의 색이 연한색을 띄었다. 또한 뿌리의 굵기와 분지 정도는 재래종에 비하여 우수하였다. 형질전환된 지황은 교배종에 비하여 뿌리의 굵기는 더욱 굵었으나 뿌리의 분지정도에서는 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 14). 병원균을 접종한 형질전환 식물체는 병원균을 접종한 교배종에 비해 뿌리의 굵기도 더욱 굵었으며 뿌리의 분지수도 많았다(Fig. 15, 16, 17). *Fusarium*

*oxysporum*처리시 뿌리 굵기와 분지수에서 차이를 보였는데 형질전환 식물체의 경우 뿌리굵기가 형질전환되지 않은 교배종에 비해 굵었으며 분지수에 있어서는 형질전환되지 않은 교배종이 형질전환된 식물체에 비해 약간 많았다. 형질전환되지 않은 교배종의 경우 병원균을 처리하였을 때 무처리시 보다 분지정도와 뿌리 굵기의 감소를 보였으나 형질전환된 식물체에서는 병원균을 처리한 개체와 무처리한 개체사이에 뿌리 굵기 및 뿌리 분지수에서 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 외래유전자인 GST유전자가 병원균에 대한 저항성을 나타내기 때문이라고 사료된다.

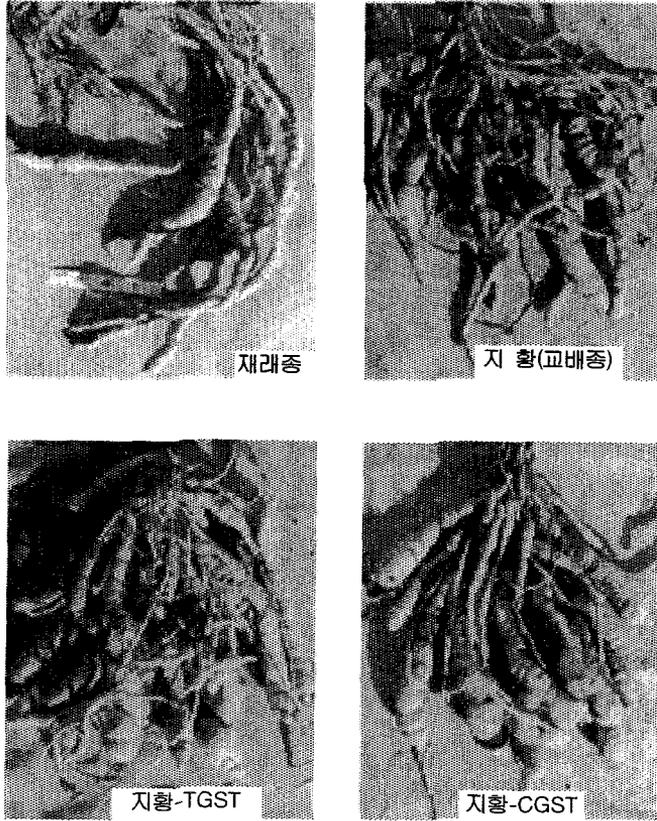


Fig.14. Comparison of growth characteristics in control and transgenic plant.

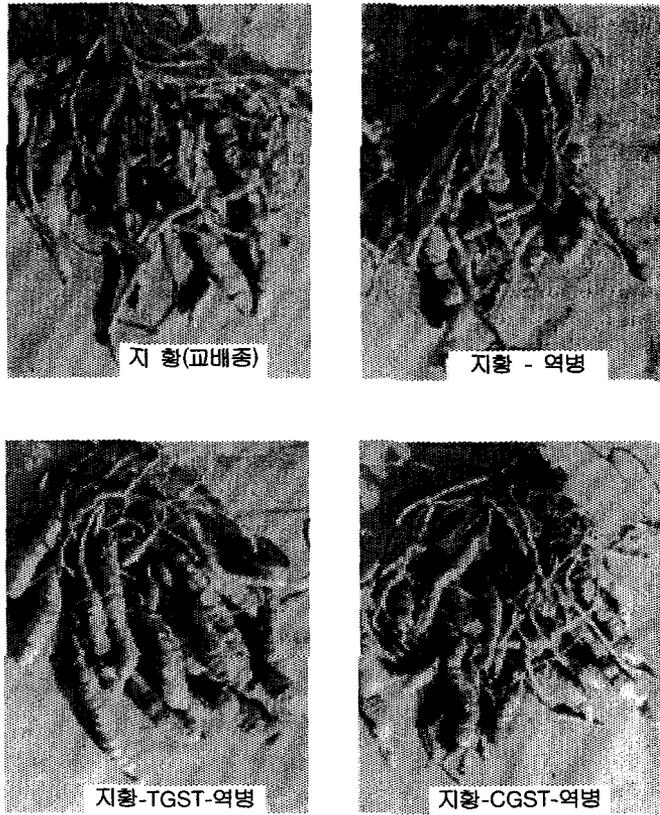


Fig.15. Comparision of growth characteristics in control and transgenic plant infected by *Phytophthora infestanse*.

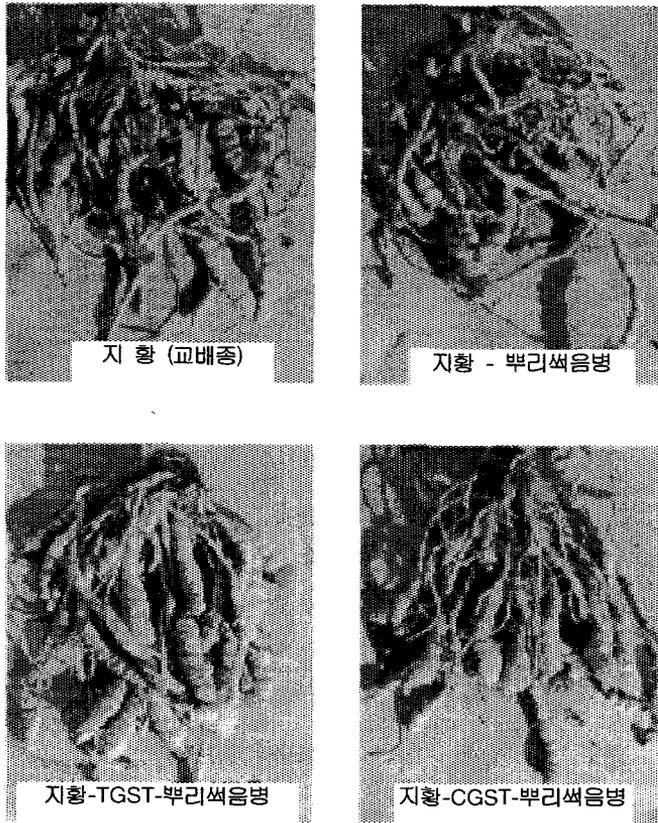


Fig.16. Comparison of growth characteristics in control and transgenic plant infected by *Fusarium oxysporum*.

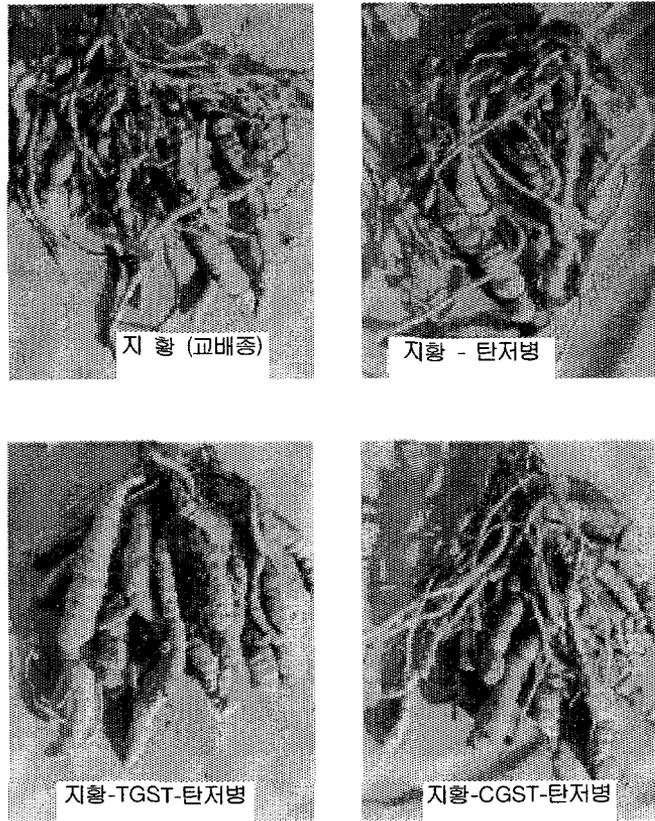


Fig.17. Comparison of growth characteristics in control and transgenic plant infected by *Collectoricum spp.*

#### 다. 포장저항성 검정

형질전환된 식물체와 형질전환되지 않은 식물체간의 병원균에 대한 저항성을 조사하여본 결과 형질전환 되지 않은 지황 식물체의 경우 *F. oxysporum*을 처리시 무처리와 비교하여 62.1%의 뿌리 생육을 보여 38%생육억제를, *P. infestanse* 처리시 무처리시 보다 63%의 뿌리 생육을 보여 37%생육억제를, *Collectoricum spp.* 처리시 무처리시 보다 75.5%의 뿌리 생육을 보여 24.5%의

생육억제를 보였다. 그러나 C-GST유전자로 형질전환된 C-1계통의 식물체는 *F. oxysporum*에서 무처리에 비하여 92.1%, *P. infestanse*를 처리시 무처리의 82.3%의 생육을 보여 8%, 18%정도의 생육억제를 보여 고도의 저항성을 보였으며, *Collectoricum spp.* 처리시 86.1%의 생육을 보여 14%정도 생육억제를 나타냈다. C-2계통 식물체는 *F. oxysporum*처리시 무처리에 비해 96.7%의 생육 특성을 보여 3.3%의 생육억제를 나타냈으며, *P. infestanse*처리시 무처리에 비해 92.4%의 생육특성과 7.6%의 생육억제를 보여 고도의 저항성을 나타냈으며, *Collectoricum spp.* 처리시 무처리에 비해 90.0%의 생육 특성을 보였으며, 10% 정도 생육 억제를 나타냈다. 이러한 결과를 통하여 C-GST유전자로 형질전환된 식물체의 처리구 중 C-1, C-2계통이 비교적 양호한 결과를 보임으로써 품종선발 및 등록에 양호할 것으로 사료된다.

T-GST유전자로 형질전환 계통에서는 C-GST로 형질전환된 계통보다 향상된 값을 보였는데 그중 T-1, 2, 7, 10계통에서 보다 나은 결과를 얻을수 있었다. T-7계통의 식물체는 *F. oxysporum*처리시 무처리에 비해 97.3%의 생육 특성을 보였으며, *P. infestanse*처리시 무처리에 비해 92.9%의 생육 특성을 나타내어 각각 2.7%, 7.1%정도의 생육 억제를 나타내었다. *Collectoricum spp.* 처리시 무처리에 비해 93.3%의 생육 특성과 6.7%의 생육 억제를 나타냄으로써 가장 양호한 결과를 보였다. 이러한 결과를 통하여 C-GST유전자로 형질전환된 식물체의 계통 중 C-1, C-2계통과 T-GST유전자로 형질전환된 계통 중 T-7계통에서 비교적 양호한 계통이 선발되고 현재 품종 등록 신청중에 있다(Table 15).

Table 15 . Disease resistant in non-transgenic and transgenic *R. glutinosa* infected by pathogens in field

Line	% of F.W of control			
	Root F.W Control	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. infestanse</i>	<i>Collectoricum</i> <i>spp.</i>
Non-transgenic	297.5	62.1	63.0	75.5
C-1	480.5	92.1	90.5	86.1
-2	434.0	96.7	92.4	90.0
-3	583.5	81.9	83.1	76.4
Transgenic	454.0	79.3	66.1	81.4
plant	652.0	77.9	71.4	78.4
(C-GST)	429.0	50.3	59.9	81.5
-7	663.0	83.1	71.3	80.8
-8	487.0	78.9	57.5	78.0
-9	430.5	69.4	59.7	59.1
-10	540.0	84.1	77.3	79.5
Transgenic	669.0	94.9	89.2	90.2
plant	509.5	93.3	88.9	95.0
(T-GST)	530.0	87.8	91.2	79.7
-4	493.5	93.6	84.7	89.3
-5	497.0	89.7	83.2	82.9
-6	582.0	95.7	84.4	88.1
-7	630.5	97.3	92.9	93.3
-8	549.0	68.8	79.1	75.9
-9	490.0	71.8	63.9	62.6
-10	712.0	89.3	88.7	91.2

라. 병저항성 계통의 수량성 검정

10a당 재래종, 교배종 및 형질전환된 지황의 수확량을 조사하였으며 뿌리 무게의 평균값을 조사한 결과 (Table 16), 재래종과 지황1호를 교배하여 얻은 교배종은 1785kg/10a으로써 춘천 재래종의 무게가 952kg/10a인데 반하여 약 2배정도의 수확량이 증가 되었다. 교배종을 이용하여 형질전환된 지황식물체들은 형질전환 되지 않은 식물체보다 높은 수치를 보였으며, 그중 T-1, 6, 7 및 C-3, 5, 7계통에서 뿌리 무게가 형질전환 되지 않은 식물체보다 약 1.5~2배정

도 높은 결과를 나타내었다. 또한 각 계통의 수확량의 평균값을 비교해보면 C-GST의 경우 교배종의 뿌리 무게에 비하여 43%의 증가를 보였으며, T-GST의 경우에는 57%의 증가를 나타내었다.

Table 16. Comparison of root weight in wild-type, non-transgenic and transgenic plant in field

Line	Root weight (kg/10a)	Increased harvesting rate(%)	
Wild-type		952	
Non-transgenic		1785	
T-1	2,402±194.3	34.6	
-2	2,170±194.0	21.6	
-3	2,917±201.6	63.3	
Transgenic plant (T-GST)	-4	2,270±188.1	27.2
-5	3,260±134.2	82.3	
-6	2,145±164.8	20.2	
-7	3,315±199.5	85.6	
-8	2,435±100.1	36.4	
-9	2,125±116.2	19.0	
-10	2,700±153.4	51.3	
LSD	251.56		
C-1	3,345±201.5	87.4	
-2	2,547±182.5	42.7	
-3	2,650±176.4	48.5	
Transgenic plant (C-GST)	-4	2,467±120.6	38.3
-5	2,485±143.1	39.2	
-6	2,910±186.9	63.0	
-7	3,152±200.4	76.6	
-8	2,745±199.8	53.8	
-9	2,450±128.4	37.3	
-10	3,360±219.8	88.2	
LSD	261.14		

## 제 6장 내병성 현삼 품종 육성

### 제 1절 서 설

현삼(*Scrophularia buergeriana* Miquel)은 현삼과에 속하는 다년생 초본식물로 주요 약용작물 중 하나이며 주요 성분은 p-methoxycinnamic acid, harpagide, phytosterol 등이며, 건조된 뿌리는 玄蓼이라 하여 소염, 인후염, 비염, 혈압강하, 강심 작용에 쓰인다(육, 1989).

현삼은 50-150cm의 다년초로서 땅속 원줄기 끝에 방추형의 육질근이 몇 가닥 달린다. 줄기는 곧게 서며 네모지고 윗 부분에 털이 약간 있다. 잎은 마주나며 엽병은 길이 0.5-2cm로 털이 약간 있거나 없다. 엽신은 난형으로서 예두(銳頭)에 넓은 설저(楔底)이고 길이 4-10cm, 폭 2-5.5cm이며 앞뒷면에 털이 없거나 약간 있고 가장자리에 톱니가 있다. 7-8월에 길이 5-6mm의 황록색 꽃이 줄기끝 포엽 아귀에서 층층이 집산화서로 피어 전체가 수상원추화서(穗狀圓錐花序)꼴을 이룬다. 꽃받침은 털이 없고 길이 2mm이며 5개로 갈라진다. 화관은 순형으로 상순은 하순보다 1.5mm 길며 2개의 등근 조각으로 갈라지고 하순은 밑으로 젖혀지며 3조각 중 가운데 조각이 보다 작다. 4개의 수술 중 2개가 더 길며 삭과는 난원형으로 길이 0.8mm, 지름 0.4mm이며 8-9월에 익는다. 산골짜기 개울가에서 자라고 있으며 한국, 중국, 일본, 러시아 극동부에 분포되어있다. 주로 뿌리를 이용하여 발진성열병, 폐결핵, 도한, 변비, 토혈, 치은염, 편도선염, 인후염, 혈전성맥관염, 임파선결핵, 용종, 급성임파선염 등의 치료에 쓴다(김 등 1994).

현삼의 기내배양은 고체배지에서의 재분화(채 등, 1993)와 현탁배양을 통한 신초의 유도가 이루어졌다(임, 1998). 현삼을 이용한 조직배양에서 줄기는 BA 1.0mg/L와 IAA 0.1mg/L를 조합한 MS액체배지에 배양하여 신초를 유도하였다(Song et al., 1998)고 보고되었다. 기내에서 형성된 현삼의 다신초는 물리적인 스트레스에 민감한 단점이 있으나 dense clump 형태로 뭉치지 않는 장점이 있다. Akita(1994)는 신초 원기를 이용하면 대용량 생물 반응기를 이용할 때 많은 절편을 별도로 치상하지 않아도 되는 장점이 있다고 하였다.

종자로 번식을 할 경우 발아와 생육이 불균일하며 1년간의 육묘를 거쳐 이식을 해야하는 단점이 있다. 뿌리로 번식을 할 경우 증식율이 낮고 줄기 및 뿌리 병원균의 감염에 의한 수량의 감소 및 종근 보관의 어려움이 있다고 보고되었다(김 등, 1995).

따라서 식물체의 생육에서, 종근보관에서의 병원체 감염에 대한 저항성 획득과 더불어 수량성이 높은 병저항성, 다수확성 품종을 육성하기 위하여 1. fusaric acid에 대한 저항성 세포주의 선발, EMS(ethyl- methanesulfate)처리 에 의한 병저항성 변이 세포주의 선발, 2. *Agrobacterium*을 이용한 Rs-AFP (radish-seed antifungal protein) PAP (*Phytolacca* antiviral protein), GST(Glutathione S-transferase) 유전자의 형질전환 등을 수행하였다.

본 연구에서 형질전환에 사용한 도입 유전자 중 *Phytolacca* antiviral protein(PAP)은 항바이러스성 단백질로서 PAP, PAP-II 그리고 PAP-3 3가지 유형이 있으며 계절적으로 또는 조직적으로 다르게 발현(Houston et al., 1983)되며 antiviral activity 뿐 아니라 antifungal activity도 나타내기도 하는 것으로 알려져 있다. Rs-AFP는 antifungal protein으로서 무 종자로부터 분류하였으며 폭넓은 항균범위를 가지며 양이온에 대해 덜 민감하며 항생제 반응은 섬유질의 fungi에 대한 특이성이 높다고 보고된 바(Terras et al., 1992) 있다. GST 유전자는 병원체의 감염을 비롯한 여러 가지 환경스트레스에 의하여 유도된 독성물질을 glutathion과 conjugation을 형성함으로써 무독화 시키는 enzyme으로서 병원체 감염시 형성되는 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)를 소거시킴과 동시에 스트레스에 의하여 유기된 여러 가지 독소물질을 무독화 시킴으로서 병원체 감염에 대하여 식물체의 안정성 획득할 수 있다.

Fusaric acid는 *Fusarium oxysporum*에서 유도된 non-specific toxin인 phytotoxin으로 현삼 세포배양에서 내병성 돌연변이 선발 및 유도에 적용하였다.

돌연변이원인 EMS(ethyl- methanesulfate)는 alkyl기 돌연변이원으로 GC→AT transition을 구성하는 point mutation을 유도하며 핵 뿐만 아니라 세포질에서도 돌연변이를 유발시킨다고 보고되어졌다(Shahin et al., 1986; Vogel et al., 1994). 이러한 돌연변이원에 의한 변이체의 육성이 병저항성의 방향으로 유도되어질 수 있다.

## 제 2절 Fusaric acid에 대한 저항성 세포주의 선발

### 1. 병원성 검정

현삼이나 지황에서 많이 발생하여 생육과 저장중에 극심한 피해를 주는 *Fusarium oxysporum* 대상으로 저항성 판단의 기준설정을 위하여 병원성이 강한 균주를 선발하고 그 접종방법을 선정하였다. 병원성 검정은 뿌리에 균사를 접종하는 방법과 포자현탁액( $2.0 \times 10^3$  spore/ml)을 접종하는 방법을 나누어 사용하여 비교하였으며 21개의 strain을 사용, 병원성을 비교한 결과 (Tables 1 and 2). 접종 방법에는 큰 차이를 나타내지 않았으며 균사접종에 의한 병원성 검정 결과 병원성이 강한 3개의 균주(R3, R9, S3)를 선발하였다.

Table 1. Result of *in vitro* pathogenicity test with agar plugs containing fusarial mycelia<sup>a</sup>

Isolate No.	Rep. <sup>c</sup>			Root and Stem Rot rating means <sup>p</sup>	
	1	2	3	Ave. <sup>d</sup>	
R-1	0	1	0	0.3bc	
R-2	1	1	1	1.0b	
R-3	3	4	4	3.7a	
R-4	0	1	0	0.3bc	
R-6	0	0	1	0.3bc	
R-7	1	0	1	0.7bc	
R-9	4	3	5	4a	
R-11	1	0	0	0.3bc	
R-12	0	0	0	0c	
R-13	0	0	0	0c	
R-15	0	1	0	0.3bc	
R-16	0	0	1	0.3bc	
S-1	0	0	0	0c	
S-2	0	0	0	0c	
S-3	3	4	4	3.7a	
S-4	0	0	0	0c	
S-5	0	0	0	0c	
control	0	0	0	0c	
LSD(P=0.05)				0.79	

- a. Results of each treatment were the mean of four observation. Results were obtained four weeks after the inoculation.
- b. Disease ratings were based on 0-5 scale where 0=no disease, and 5=death of plantlets.
- c. Rep=Replications.
- d. Ave=Average. Means with the same letter are not significantly different at p=0.05, as determined by a t-test.

Table 2. Result of *in vitro* pathogenicity test with fusarial spore suspension(  $2.0 \times 10^3$  spore/ml )<sup>a</sup>

Isolate No.	Rep. <sup>c</sup>			Root and Stem Rot rating means <sup>d</sup>	Ave. <sup>a</sup>
	1	2	3		
R-1	1	0	0		0.3b
R-2	0	0	0		0b
R-3	4	4	4		4a
R-4	1	0	0		0.3b
R-6	1	0	0		0.3b
R-7	0	0	0		0b
R-9	4	4	5		4.3a
R-11	0	0	0		0b
R-12	0	1	0		0.3b
R-13	0	1	0		0.3b
R-15	0	1	1		0.7b
R-16	0	0	1		0.3b
S-1	1	0	1		0.7b
S-2	0	0	0		0b
S-3	3	4	5		4a
S-4	0	1	1		0.7b
S-5	0	1	1		0.7b
control	0	0	0		0b
LSD(P=0.05)					0.88

- a. Results of each treatment were the mean of four observation.  
Results were obtained four weeks after the inoculation.
- b. Disease ratings were based on 0-5 scale where 0=no disease, and 5=death of plantlets.
- c. Rep=Replications.
- d. Ave=Average. Means with the same letter are not significantly different at  $p=0.05$ , as determined by a t-test.

## 2. 내병성 세포주 선발 위한 callus 형성 조사

현삼의 잎, 줄기 조직을 이용한 조직배양에서 MS, B<sub>5</sub>, SH 배지에서 callus 형성이 모두 양호하였으며 특히 NAA 0.1, 2mg/ℓ, TDZ 0.1, 2mg/ℓ, BAP 0.1mg/ℓ, 2,4-D 0.1, 2mg/ℓ 처리에서 잎, 줄기 절편체에서 모두 100%의 callus 형성을 나타내었다 (Table 3).

Table 3. Effect of media, growth regulator, and explant source on callus formation of *Scrophularia buergeriana* culture

Growth regulator (mg/ℓ)	Rate of callus formation(%)						
	MS media		B <sub>5</sub> media		SH media		
	Stem	Leaf	Stem	Leaf	Stem	Leaf	
NAA	0.01	100	100	90	70	100	50
	0.1	100	100	100	100	100	100
	2	100	100	100	100	100	100
TDZ	0.01	100	100	90	80	100	100
	0.1	100	100	100	100	100	100
	2	100	100	100	100	100	100
BAP	0.01	100	100	100	90	100	100
	0.1	100	100	100	100	100	100
	2	70	40	100	100	0	100
IAA	0.01	100	100	100	0	100	0
	0.1	100	100	100	0	100	0
	2	100	100	100	60	100	80
2,4-D	0.01	100	90	100	60	100	10
	0.1	100	100	100	100	100	100
	2	100	100	100	70	100	100

### 3. Fusaric acid 처리에 따른 clone의 형성

내병성 세포주 선발을 위하여 병독물질(fusaric acid) 농도별로 처리하고 형성되는 clone 형성율을 조사하여 본 결과 10, 30  $\mu$ M의 농도 모두에서 clone 형성율이 양호하였으며, 병독물질의 배지첨가 방법을 결정하기 위하여 병독물질을 filtration과 Autoclave로 나누어 첨가하고 형성된 clone의 생체중을 비교하여 본 결과 filtration에서 형성된 clone의 생체중이 autoclave에서 형성된 clone의 생체중이 더 무거운 것으로 조사되었다(Table 4). 이러한 것은 autoclave를 통한 배지의 pH저하로 인하여 병독물질인 fusaric acid의 독성이 상승적인 효과를 보인 것으로 사료되어지며 병독물질의 첨가 시 filtration을 통하여 첨가하는 것이 선발에 양호할 것으로 판단된다.

Table 4. Fresh weight and number of clone formation in different treatment of fusaric acid on medium

Fusaric acid concentration( $\mu$ M)	No. of callus inoculated	No. of clone formation	% of clone formation	F.W. of clone(g)
-Autoclave-				
10	10	10	100	0.9
30	10	10	100	0.6
- Filtration-				
10	10	10	100	1.1
30	10	10	100	0.8

### 4. 현탁배양과 고체배양에서의 fusaric acid 저항성 세포주 선발

액체 현탁배양상태에서의 형성된 clone을 대상으로 하여 병독물질을 첨가, 그 생존율을 조사하여 저항성 세포주를 선발하였으며 병독물질의 농도가 20  $\mu$ M 일 때 절편체는 100%의 생존율을 보였으나, 50  $\mu$ M에서 78%, 100  $\mu$ M에서는 23%의 생존율을 나타내었고 선발된 개체의 생장은 비교적 양호하였다(Table 5). callus를 대상으로 한 세포주 선발 시에는 fusaric acid의 농도를 100  $\mu$ M이상으로 유지하는 것이 필요할 것이다.

고체배양상태에서의 현삼 식물체의 캘러스로부터 fusaric acid에 저항성인

line이 선발되었으며 선발된 (Table 6) 캘러스의 생체중은 fusaric acid의 농도가 높아질수록 감소하였다(Table 7). 고체 배양 상태에서의 세포주의 연속적인 선발과 fusaric acid의 저항성 세포주의 안정적 유지를 위하여서는 fusaric acid의 농도를 20  $\mu\text{M}$  이상으로 유지하여야 한다는 결과를 나타내었다. fusaric acid의 농도조절에 의한 선발압을 변화시킬 때나 배양상태의 변화시키고자 하는 경우, 각각의 요구되어지는 fusaric acid의 농도가 다르게 조절하여야 하며 배양상태에 맞는 농도의 구멍은 선발 세포주의 안전성을 유지시킬 수 있을 것이다.

Table 5. Effect of fusaric acid concentrations on the rate of callus survived on suspension culture in *Scrophularia buergeriana*

Fusaric acid concentration ( $\mu\text{M}$ )	Rate of survived callus
0	100
10	100
20	100
50	78
100	23

Table 6. Selection of fusaric acid tolerant callus lines from callus culture of *Scrophularia buergeriana* in solid medium

Fusaric acid ( $\mu\text{M}$ )	No. of callus inoculated	No. of callus line selected	Rate of callus line selected(%)
0	60	60	100.0
20	60	15	25.0
30	60	9	15.0
40	60	5	12.0
50	60	1	1.7

Table 7. Fresh weight of *Scrophularia buergeriana* callus lines tolerant to fusaric acid in solid medium

Fusaric acid ( $\mu\text{M}$ )	F.W. of callus selected		F.W. of callus nonselected		F.W. of total callus incubated
	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)
20	39.2	85.6	6.6	14.4	45.8
30	31.5	90.5	3.3	9.5	34.8
40	34.9	88.8	4.4	11.2	39.3
50	18.5	80.1	4.6	19.9	23.1

#### 5. 선발된 캘러스에 대한 fusaric acid의 저항성 확인

선발된 각 clone들을 증식하여 callus를 유지하였으며 증식된 callus들을 대상으로 배지상에서 fusaric acid에 의한 선발압의 영향을 받지 않았거나 저항성을 잃은 callus들을 배제하고자 저항성을 획득여부를 확인하였다. 고체배양에서 fusaric acid의 농도  $20\mu\text{M}$ 에서 선발된 캘러스 line인 FBN20을 대상으로 하여 증식된 callus를 잘게 부수어 fusaric acid가 농도를 0, 30, 40, 50  $\mu\text{M}$ 로 나누어 첨가하고 선발여부를 확인하였다. 고농도인 40, 50  $\mu\text{M}$ 에서는 선발되지 않았고 30  $\mu\text{M}$ 에서는 저항성 개체가 선발이 되었으나 생체중은 대조구와 비교하여 아주 낮은 것으로 조사되었다(Table 8). 30  $\mu\text{M}$ 에서 선발된 FBN30도 40, 50  $\mu\text{M}$ 에서는 선발되지 않았으며 30  $\mu\text{M}$ 에서는 선발되었고 생체중은 FBN20보다 높은 것으로 조사되었다(Table 9). 40  $\mu\text{M}$ 에서 선발된 FBN40은 50  $\mu\text{M}$ 을 제외한 다른 농도에서 모두 생존하였다(Table 10). 이러한 결과는 각각의 농도에서 선발된 line들은 선발된 농도에서 저항성의 한계가 있음을 나타내며 선발압을 높게 조절하여 고농도에서의 선발하고자 하는 경우에는 단계적인 선발압의 증가를 통하여 이루어 질 수 있을 것으로 사료된다.

Table 8. Test for fusaric acid resistance on selective callus FBN20 cultured on media with BAP and NAA

Fusaric acid ( $\mu$ M)	F.W. of callus selected		F.W. of callus nonselected		F.W. of total callus incubated
	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)
0	66.3	81.7	14.9	18.3	81.2
30	9.5	69.3	4.2	30.7	13.7
40	0.0	0.0	1.2	100.0	1.2
50	0.0	0.0	2.5	100.0	2.5

Table 9. Test for fusaric acid resistance on selective indigenous callus FBN30 cultured on media with BAP and NAA

Fusaric acid ( $\mu$ M)	F.W. of callus selected		F.W. of callus nonselected		F.W. of total callus incubated
	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)
0	2.0	1.3	155.4	98.7	157.4
30	22.0	89.1	2.7	10.9	24.7
40	0.0	0.0	0.7	100.0	0.7
50	0.0	0.0	2.7	100.0	2.7

Table 10. Test for fusaric acid resistance on selective indigenous callus FBN40 cultured on media with BAP and NAA

Fusaric acid ( $\mu$ M)	F.W. of callus selected		F.W. of callus nonselected		F.W. of total callus incubated
	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)
0	34.7	21.6	126.3	78.4	161.0
30	3.7	34.3	7.1	65.7	10.8
40	9.9	86.8	1.5	13.2	11.4
50	0.0	0.0	2.9	100.0	2.9

## 6. 돌연변이물질 처리에 의한 내병성 세포주 선발

내병성 세포주의 선발에 효율성을 증대하기 위하여 Fusaric acid가 처리된 배지에 돌연변이 물질인 EMS를 0.01%로 첨가 처리하였을 때 30  $\mu$ M fusaric acid 농도에서 fusaric acid 단독처리보다 선발 효과가 높은 것으로 조사되었으며 선발압의 강도가 높으면 높을수록 그 효과가 큰 것으로 사료된다(Table 11). 이러한 것은 돌연변이원이 유기하는 point mutation의 방향성이 핵뿐만 아니라 세포질에서 gene expression이 방향이 fusaric acid의 저항성으로 유도되어 질 수 있음을 시사한다.

Table 11. Effect of EMS treatment on selection of callus lines tolerant to fusaric acid of *Scrophularia buergeriana*

Fusaric acid ( $\mu$ M)	No. of callus incubated	No. of callus lines selected	
		FA <sup>a</sup>	FA+EMS <sup>b</sup>
0	20	20	20
5	20	20	20
10	20	20	20
30	20	7	14

Notes : a : Only treatment of fusaric acid

b : Treatment of fusaric acid and EMS(0.01%)

## 7. 현탁배양에 의한 fusaric acid 저항성 세포주 선발

현삼의 캘러스를 2,4-D 1mg/l 가 첨가된 Murashige and Skoog 배지에 fusaric acid 농도를 5  $\mu$ M부터 50  $\mu$ M까지 증가시키면서 현탁배양한 후 fusaric acid가 50  $\mu$ M 첨가된 고체배지에서 clone을 형성하는 20개의 세포주를 선발하였다. Fusaric acid 농도를 0, 10, 50, 100  $\mu$ M로 하여 선발이 안된 캘러스와 fusaric acid에 저항성인 20개 세포주의 생체중을 측정하고 선발이 안된 캘러스는 fusaric acid의 농도가 증가함에 따라 고사하여 무처리구 캘러스 생체중의 30%정도를 나타내어 60-70% 이상의 캘러스 성장이 억제됨을 나타내었다. 반면에 선발된 저항성 세포주들은 fusaric acid의 농도가 증가하여도 상대적인 생체중의 억제정도가 낮았었고 SF-5, SF-9, SF-11, SF-13,

SF-15 세포주는 fusaric acid에 대하여 높은 저항성을 나타낸 것으로 조사되었다(Table 12).

Table 12. Effect of fusaric acid concentration on fresh weights of fusaric acid-tolerant *S. buergeriana* cell lines previously grown on fusaric acid 10  $\mu$ M medium for five weeks

Cell Lines	Fusaric acid concentration( $\mu$ M)			
	0	10	50	100
	- mg/callus -	- % fresh weight of control(0 $\mu$ M) -		
S <sup>a</sup>	122.3	38.3	38.3	26.3
SF-1	404.4	104.3	90.4	52.4
SF-3	242.8	56.6	33.5	21.8
SF-4	187.5	88.0	55.9	47.5
SF-5	220.3	89.0	75.1	57.0
SF-6	252.8	45.1	40.9	21.7
SF-7	94.3	167.6	97.9	48.8
SF-8	307.3	50.7	42.1	35.7
SF-9	160.3	186.7	116.2	108.2
SF-10	300.8	68.8	43.9	23.1
SF-11	144.5	103.1	82.4	75.4
SF-12	275.3	134.5	88.8	38.7
SF-13	116.3	133.5	79.8	61.0
SF-14	161.7	86.2	69.7	30.9
SF-15	147.4	133.2	116.7	72.2
SF-16	171.3	115.3	112.0	49.8
SF-17	224.0	62.6	45.0	39.3
SF-18	366.2	80.5	74.4	44.0
SF-19	295.3	47.1	52.8	26.5
SF-20	216.4	124.1	35.2	18.8

<sup>a</sup> Unselected cell line

8. Fusaric acid 저항성 세포주의 안정성 검정

Fusaric acid에서 선발된 세포주가 병독물질에 대한 저항성 안정성을 조사하기 위하여 2,4-D만 첨가된 MS배지에 1개월 이상 배양한 후 병독물질이 농도별로 처리된 배지에서 배양한 뒤 생체중을 측정하여 그 저항성 안정성을 측정한 결과 SF-1, SF-7, SF-9, SF-11, SF-12, SF-13, SF-14, SF-15, SF-16, SF-19 세포주들의 생체중이 높아서 비교적 높은 안정성을 나타낸 것으로 조사되었다 (Table 13).

Table 13. Effect of fusaric acid concentration on fresh weights of fusaric acid-tolerant *S. buergeriana* cell lines previously grown on fusaric acid-free medium for five weeks

Cell lines	- % fresh weight of control(0 $\mu$ M) -			
	0(mg/callus)	10( $\mu$ M)	50( $\mu$ M)	100( $\mu$ M)
S <sup>a</sup>	122.3	38.3	38.3	26.3
SF-1	185.3	133.3	67.2	68.2
SF-3	101.5	144.8	136.0	47.1
SF-4	124.8	115.0	44.9	39.9
SF-5	229.5	61.9	48.7	22.4
SF-6	326.5	91.7	57.4	27.4
SF-7	111.5	101.6	97.1	69.8
SF-8	171.3	83.7	58.1	18.0
SF-9	242.5	150.6	67.5	51.7
SF-10	347.3	65.6	25.3	27.5
SF-11	200.0	119.4	71.5	49.9
SF-12	146.5	183.5	134.1	58.7
SF-13	150.8	100.1	41.4	47.3
SF-14	132.8	97.3	87.7	50.8
SF-15	112.3	146.0	116.0	82.8
SF-16	126.0	152.0	96.4	56.0
SF-17	247.5	62.6	43.6	18.6
SF-18	247.3	62.4	46.6	35.9
SF-19	124.3	137.4	131.4	55.3
SF-20	215.8	140.5	59.1	28.2

<sup>a</sup> Unselected cell line.

### 9. Fusaric acid 저항성 세포주로부터 식물체 분화

저항성을 나타낸 세포주로부터 식물체를 분화시키기 위하여 20개의 세포주들을 fusaric acid가 첨가된 MS배지에서 배양을 수행하였다. Fusaric acid에 감수성인 캘러스와 선발과정에서 저항성을 상실한 callus들은 농도가 증가함에 따라 생장이 지연되다가 고사하는 특성을 나타내었으며 분화가 이루어지지 않았다. 반면, 선발된 세포주들은 고농도로 유지되고 있는 fusaric acid에서도 분화되었으며 각각의 분화능은 세포주와 fusaric acid 농도에 따라 상이하였다(Table 14).

Table 14. Shoot regeneration from fusaric acid-tolerant and unselected *S. buergeriana* cell lines on media with different fusaric acid concentrations after 45 days

Cell lines	No. of shoots (#/callus)				Shoot height (mm)			
	0 $\mu$ M	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	50 $\mu$ M	0 $\mu$ M	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	50 $\mu$ M
S <sup>a</sup>	2.5	0.0	0.0	0.0	1.2	0.0	0.0	0.0
SF-1	4.0	2.7	2.0	2.0	4.2	7.0	7.6	5.7
SF-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
SF-4	2.0	3.0	2.7	1.7	7.4	3.8	3.5	4.0
SF-5	1.0	1.3	2.0	2.0	2.7	6.6	4.5	4.1
SF-6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
SF-7	0.7	1.0	1.3	1.0	3.1	2.7	1.8	3.2
SF-8	3.0	2.3	1.3	1.7	11.0	8.0	10.0	2.5
SF-9	1.3	0.3	0.7	0.3	1.4	2.2	1.3	2.0
SF-10	1.3	1.0	1.0	0.7	2.3	1.8	1.5	1.6
SF-11	5.0	4.7	4.0	3.0	7.5	7.8	8.0	7.2
SF-12	0.3	1.3	0.7	1.0	1.0	3.0	3.3	1.3
SF-13	1.7	2.0	1.7	2.0	5.2	2.5	4.2	4.8
SF-14	2.0	2.0	1.0	0.7	4.0	3.2	2.5	1.2
SF-15	2.0	0.3	1.0	1.0	3.5	1.0	3.5	2.0
SF-16	4.0	3.0	2.0	1.0	10.0	5.2	4.0	3.6
SF-17	1.0	2.3	2.0	1.0	2.3	4.3	2.9	2.3
SF-18	3.0	2.3	2.0	0.7	6.2	3.0	4.2	1.4
SF-19	3.0	1.0	0.7	2.0	3.7	2.8	2.7	2.2
SF-20	0.7	0.3	2.3	0.3	2.0	1.4	3.0	1.2

<sup>a</sup> Unselected cell line.

Fusaric acid가 첨가된 배지에서 저항성인 세포주가 형성되었고 선발된 세포로부터 식물체가 분화되어 기내에서 양호한 성장을 나타내었다(Fig.1).

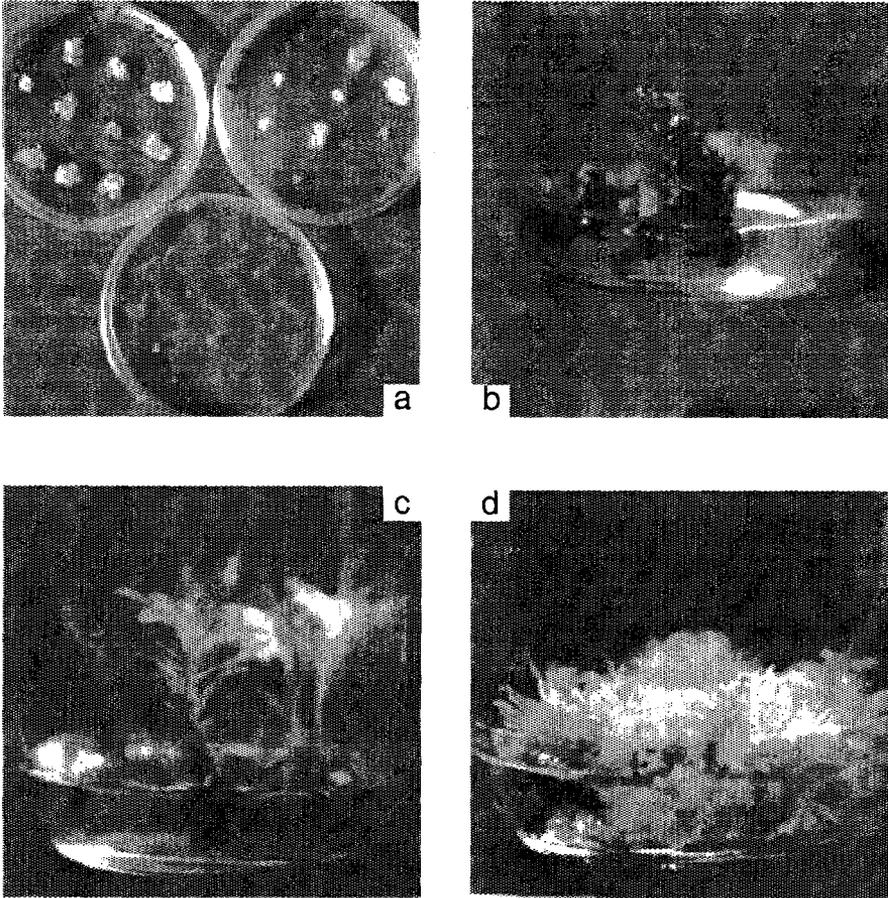


Fig.1. The selection and regeneration of fusaric acid-tolerant cell lines of *S. buergeriana*. A : The growth of fusaric acid-tolerant cell line, RF-7 on different medium. B, C, D : Plant regenerated from fusaric acid-tolerant cell lines

선발된 세포주의 재분화 조건을 구명하기 위하여 polyamine류인 spermine와  $AgNO_3$ 를 처리하여 줄기형성과 신장정도를 비교하여 본 결과 줄기의 형성에서는 spermine을 10mg/l 농도로 처리하였을 때 양호하였고 줄기의 신장에서는 spermine을 1mg/l 농도로 처리하였을 때 양호하였으며 선발된 line에서는 SF-11, SF-15, SF-18의 성장이 우수하였다 (Fig. 2, 3).

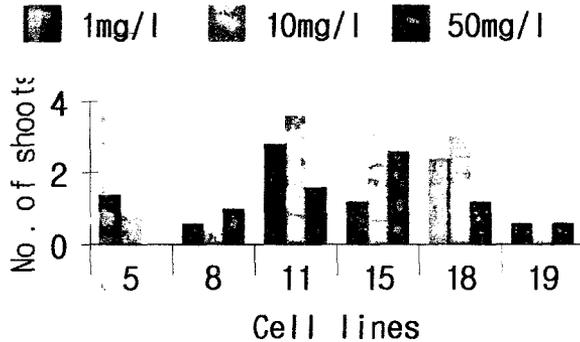


Fig. 2. Effect of spermine on the regeneration of shoot from fusaric acid-tolerant *S. buergeriana* cell lines after 45 days.

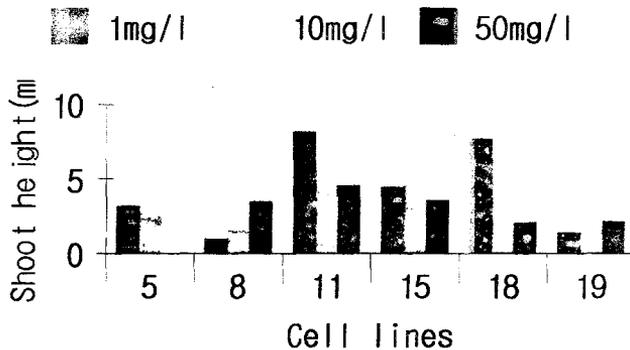


Fig. 3. Effect of spermine on the regeneration of shoot from fusaric acid-tolerant *S. buergeriana* cell lines after 45 days.

식물체 분화를 위한 AgNO<sub>3</sub>를 0.0, 5, 10 mg/ℓ의 농도별로 처리하여 shoot 형성을 비교한 결과 선발되지 않은 cell line이 AgNO<sub>3</sub>을 5, 10 mg/ℓ의 고농도로 처리한 경우 shoot 형성이 이루어지지 않았으나 몇 개의 선발된 line에서는 AgNO<sub>3</sub>를 고농도로 처리하여 줄기 수와 길이에서 양호한 결과를 나타내었다. 선발된 각각의 line에서 요구되어지는 AgNO<sub>3</sub>의 농도는 서로 차이를 나타내었다.

Table 15. Shoot regeneration from fusaric acid-tolerant and unselected *S. buergeriana* cell lines on media with different concentrations of AgNO<sub>3</sub> after 45 days

Cell lines	No. of shoots (#/callus)			Shoot height (mm)		
	0.0mg/ℓ	5mg/ℓ	10mg/ℓ	0.1mg/ℓ	5mg/ℓ	10mg/ℓ
S <sup>a</sup>	1.6	0.0	0.0	3.4	0.0	0.0
SF-1	3.8	4.2	4.8	3.5	3.3	8.4
SF-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
SF-4	2.8	1.6	1.2	5.4	5.2	2.5
SF-5	3.4	3.8	5.2	5.5	6.3	8.1
SF-6	1.0	3.2	3.6	2.6	6.2	3.9
SF-7	0.8	2.4	3.6	4.4	5.7	11.3
SF-8	3.2	3.4	3.8	4.6	5.1	8.3
SF-9	2.4	1.8	0.0	3.2	3.5	0.0
SF-10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
SF-11	4.8	5.6	3.4	5.8	8.2	6.7
SF-12	1.2	4.0	0.8	2.2	4.4	1.2
SF-13	2.0	2.0	0.2	4.1	2.3	1.0
SF-14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
SF-15	1.6	1.4	0.2	6.3	7.1	2.2
SF-16	3.6	0.0	0.0	7.3	0.0	0.0
SF-17	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
SF-18	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
SF-19	1.8	2.2	1.8	3.4	4.2	3.3
SF-20	0.7	2.4	1.4	1.8	3.4	2.1

<sup>a</sup> Unselected cell line

#### 10. 저항성 세포주로부터 재분화 식물체의 형태적 변이

저항성 세포주로부터 분화된 식물체들을 순화하여 온실에서 키운 후 형태적으로 차이를 나타내는 몇 개의 개체를 대상으로 하여 초장, 잎의 길이, 잎의 넓이 등 형태적 특성을 조사하였다(Table 16). 잎의 모양의 차이에 따라서 4가지의 type으로 나누었으며 잎의 모양과 shoot의 길이, 잎의 길이, 엽폭 등은 서로 일련의 상관관계를 나타내었다. 많은 수의 개체가 선발되지 않은 식물체와 유사한 특성을 나타내었으나 SF16-1과 같은 개체는 선발되지 않은 식물체와 현저히 차이가 나는 여러 가지 형태적 특성을 나타내었다.

Table 16. Morphological characteristic of plants regenerated from fusaric acid-tolerant cell lines of *Scrophularia buergeriana*

Line	Shoot height	Leaf length	Leaf width	Leaf shape
Control	34	8.5	5.25	A
SF1-3	22	8	4.85	A
SF1-4	11.5	3.65	1.65	C
SF1-5	23.5	7.25	4.25	A
SF1-7	8.25	4.9	2.6	C
SF5-1	8.5	4.95	2	C
SF5-2	9	4.75	2.2	C
SF5-4	14.5	6.8	3.9	A
SF7-2	22	7.8	4.3	A
SF8-1	18	5	4	B
SF8-2	22	5.6	4.3	B
SF8-3	11.5	4.1	2.95	B
SF8-4	30	7.4	4.8	A
SF13-3	25	6.9	2.7	C
SF16-1	26	8.15	4.5	D
SF16-2	9.25	4.2	2.55	A
SF16-4	19	5.5	3.5	A
SF16-5	6	2.7	1.9	A
SF17-1	15.3	5.04	2.68	A
SF17-2	12.5	3.8	2	A
SF17-3	11	2.9	1.7	A
SF19-2	2.5	2.4	0.8	C

A : 타원형; B : 등근타원형; C : 좁고긴타원형; D : 장타원형으로 주름진 것

### 11. 저항성 세포주로부터 재분화 된 식물체의 RAPD 분석

10 X reaction buffer, 200  $\mu$ M dNTP, 1 unit taq polymerase, 2.5  $\mu$ M primer, 10ng DNA(최종25  $\mu$ l)를 넣어서 반응액을 만들었고 PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 초기 완전 변성한 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분 35 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 2분간을 1cycle로 최종 45회 반복하고 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 후 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 증폭된 PCR 산물을 0.5 X TBE buffer(0.045M Tris-borate, 0.001M EDTA) buffer를 사용하여 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후 관찰하였다(Fig. 4).

PCR 반응은 2반복으로 실시하였으며, minor band는 재현성이 문제가 되므로 major band를 관찰했다. SF-1에서는 57개, SF-2에서는 62개, SF-3에서는 66개, SF-4에서는 75개의 RAPD band가 관찰되었고, variation bands는 SF-1에서 5개, SF-2에서 1개, SF-3에서 2개, SF-4에서 3개가 나타났으며 몇 가지 primer에서 control에 발견되지 않는 새로운 DNA band가 형성되었으며 이것으로 보아 저항성 식물체의 육종 가능성과 분자생물학적 검정을 통한 저항성 세포주의 조기선발을 위한 marker로서의 개발이 가능하리라 기대된다(Table 18).

Table 17. List of primer(10-mers) and their base sequences used for RAPD analysis

Primer No.	Base sequence( 5' to 3')	G + C content
OPA - 1	CAGGCCCTTC	70
OPA - 2	TGCCGAGCTG	70
OPA - 3	ACTGAGCCAC	60
OPA - 4	AATCGGGCTG	60
OPA - 5	AGGGGTCTTG	60
OPA - 7	GAAACGGGTG	60
OPA - 8	GTGACGTAGG	60
OPA - 14	TCTGTGCTGG	60
OPB - 5	TGCGCCCTTC	70

Table 18. The number of variation bands in selected plants

Primer No.	Number of bands			
	SF-1	SF-2	SF-3	SF-4
OPA - 1	6 <sup>a</sup> (0) <sup>b</sup>	6 (0)	9 (0)	10 (0)
OPA - 2	5 (0)	7 (0)	9 (0)	9 (0)
OPA - 3	5 (0)	6 (0)	5 (0)	9 (1)
OPA - 4	5 (0)	8 (0)	8 (0)	7 (0)
OPA - 5	7 (0)	9 (1)	9 (0)	9 (0)
OPA - 7	7 (0)	6 (0)	5 (1)	5 (1)
OPA - 8	11 (1)	12 (0)	8 (0)	13 (0)
OPA - 14	4 (3)	2 (0)	6 (0)	6 (0)
OPB - 5	7 (1)	6 (0)	7 (1)	7 (1)

a: The band number of control plant

b: The numbers in the parenthesis are the numbers of polymorphic bands

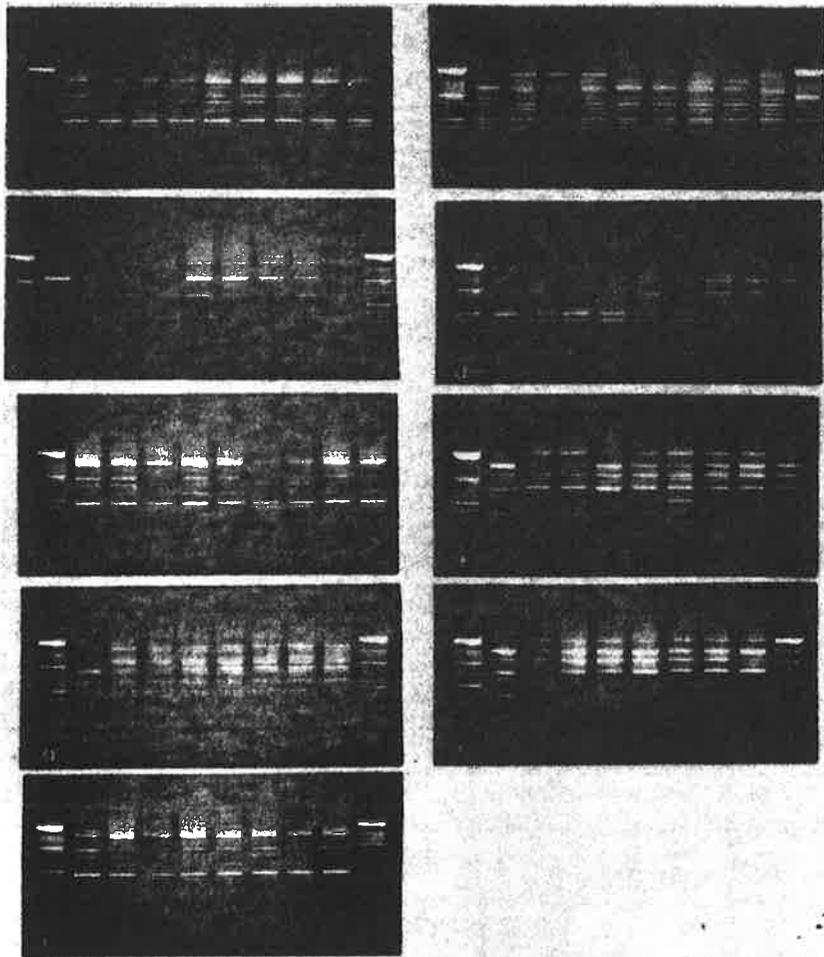


Fig.4. RAPD analysis of plants regenerated from cell lines for *S. buergerian* (A:SF-1; B:SF-1; C:SF-1; D:SF-2; E:SF-3; F:SF-3; G:SF-4; H:SF-4; I:SF-4).

### 제 3절 *Agrobacterium*을 이용한 Rs-AFP (radish-seed antifungal protein) PAP (*Phytolacca antiviral protein*), GST(Glutathione S-transferase) 유전자의 형질전환

#### 1. Rs-AFP (radish-seed antifungal protein) 유전자 형질전환

##### 가. 현삼의 기내배양 및 식물체 재분화

현삼의 잎조직과 줄기조직을 여러 가지 생장조절물질이 첨가된 MS배지에 치상 하였을 때 NAA, 2,4-D, 에서보다 TDZ에서 가장 많은 신초분화를 보이는 것으로 나타났다. 신초 수에 있어서는 줄기를 치상하였을 때 현저하게 많은 수가 나타나는 것을 볼 수 있었고 신초의 길이도 잎을 치상했을 때보다 줄기를 치상했을 때 생장조절물질의 농도에 별다른 관계없이 더 길었다(Table 19).

2,4-D와 TDZ를 조합 처리한 MS배지에 현삼의 잎과 줄기조직을 치상한 결과 낮은 농도의 auxin인 2,4-D 0.01mg/l와 cytokinin인 TDZ(0.01, 0.1, 2.0mg/l) 이 조합처리시 shoot 분화가 좋았으나, 2,4-D의 농도가 높아질수록 TDZ과 조합 처리시 shoot 분화가 잘 안되는 결과를 보였다(Table 20).

##### 나. 현삼 식물체의 kanamycin 저항성 측정

MS + 1mg/ℓ BAP + 0.1mg/ℓ NAA 배지에 kanamycin 0, 50, 100, 150, 200mg/ℓ를 첨가하여 잎 절편체를 치상하여 10~17일간 배양한 결과 kanamycin 50mg/ℓ이 첨가된 배지에서 분화가 급격히 감소하고 kanamycin 100mg/ℓ가 첨가된 배지에서는 분화가 되지 않았다(Table 21). 이러한 결과로부터 형질전환 시 선발을 위하여 kanamycin 농도를 50mg/ℓ보다 높은 농도로 사용해야 할 것으로 생각된다.

Table 19. Effect of NAA, 2,4-D and TDZ on the regeneration and growth of shoots from leaf and stem explants of *Scrophularia buergeriana* after 45 days.

Growth regulators (mg/ l)	No. of shoot		shoot length(mm)	
	Leaf explant	Stem explant	Leaf explant	Stem explant
0.01	0.0	0.0	0.0	0.0
NAA 0.1	0.1±0.1	0.0	7.9±7.9	0.0
2.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.01	0.1±0.1	2.2±1.5	4.4±4.4	13.0±6.9
2,4-D 0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
2.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.01	1.5±0.7	5.8±1.7	6.8±2.9	28.0±7.1
TDZ 0.1	2.1±0.6	8.8±0.9	13.9±4.0	31.0±3.9
2.0	0.6±0.3	9.0±2.9	5.7±2.6	23.2±5.3
LSD(5%)	0.7	3.1	8.7	10.0

Table 20. Effect of combination treatment with 2,4-D and TDZ on the regeneration and growth of shoots from leaf and stem tissue of *Scrophularia buergeriana* after 45days.

Growth regulators (mg/ l)	No. of shoot		shoot length(mm)	
	Leaf explant	Stem explant	Leaf explant	Stem explant
2,4-D TDZ				
0.01	0.8±0.3	3.3±0.5	28.0±7.1	21.3±4.8
0.01 0.1	2.5±0.6	4.3±0.8	31.0±3.9	21.5±1.9
2.0	2.0±1.4	4.0±1.1	23.2±5.3	25.8±5.0
0.01	0.0	0.0	0.0	0.0
0.1 0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
2.0	0.0	1.0±1.0	0.0	1.8±1.8
0.01	0.0	0.0	0.0	0.0
2.0 0.1	0.0	-	0.0	-
2.0	0.0	0.0	0.0	0.0
LSD(5%)	1.5	1.7	7.8	7.4

Table 21. Kanamycin resistance of leaf explant in *Scrophularia buergeriana*

Kanamycin(mg/ ℓ )	No. of leaf	No. of survival explant
0	30	18
50	30	4
100	30	0
150	30	0
200	30	0

다. *Agrobacterium*을 이용한 액아, 줄기배양에 의한 형질전환(AFP)

액아조직을 사용하여 *Agrobacterium*에 접종한 다음 6주 후 관찰한 결과 재분화율은 100%였으나 뿌리 유도 배지에 옮겼을 때 형질전환체들은 뿌리형성을 못하는 결과를 나타내었다 (자료 미제시). 줄기조직을 사용하였을 때 kanamycin 10mg/ ℓ 이 첨가된 배지에서 가장 높은 분화율을 보였고 4주 후와 8주 후에 callus 수를 비교해 보면 4주 후에는 거의 모든 줄기에서 callus가 형성되었으나 PCR analysis 과정에서 거의 제외되었다.

라. *Agrobacterium*을 이용한 잎조직의 형질전환(AFP)

잎조직을 사용하였을 때 callus 형성에서는 4주, 8주 사이에 차이가 없었으며 신초수는 8주 지난 후 더 많았다. 항생제 처리에서 kanamycin이 10mg/ ℓ 첨가되었을 때 재분화율이 높았고, 첨가되지 않은 배지에서 가장 높은 재분화율을 보였다(Table 22, 23).

Table 22. Effect of kanamycin on callus formation and plant regeneration for Rs-AFP1 inserted *Agrobacterium*-mediated transformation of leaf disk

Antibiotic level(mg/ ℓ )	No. of explant incubated	No. of callus formed		Ratio of regeneration(%)	
		weeks		weeks	
		4	8	4	8
Km 0 Cb 500	26	26	26	100	100
Km 10 Cb 500	45	45	45	100	100
Km 50 Cb 500	36	36	36	100	100

Note : Medium used in this study was Murashige & Skoog medium with 1mg/L BAP, 2mg/L TDZ and 0.2mg/L NAA.

Table 23. Effect of kanamycin on shoot formation for Rs-AFP1-inserted *Agrobacterium*- mediated transformation of leaf disk

Antibiotic level(mg/ ℓ )	No. of explant incubated	No. of shoot formed		Ratio of regeneration(%)	
		weeks		weeks	
		4	8	4	8
Km 0 Cb 500	26	7	13	26.9	30.8
Km 10 Cb 500	45	8	4	2.2	28.9
Km 50 Cb 500	36	1	5	11.1	13.9

Note : Medium used in this study was Murashige & Skoog medium with 1mg/L BAP, 2mg/L TDZ and 0.2mg/L NAA.

따. 액아, 잎, 줄기 절편체의 재분화 효율 비교

Kanamycin 10mg/ℓ + Carbenicillin 500 mg/ℓ 이 첨가된 배지에서는 액아와 줄기조직에서 잎절편체보다 높은 재분화율을 보였고(Fig.5) Km 40, 50mg/ℓ + Cb 500 mg/ℓ 첨가배지에서는 액아의 재분화율은 좋았으나 잎과 줄기 절편체의 재분화율은 저조하였다(Fig.6).

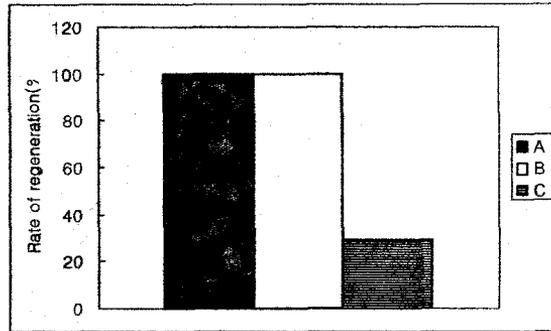


Fig.5. Effect of different explant in medium containing kanamycin, carbenicillin 500mg/ℓ (A: axillary bud, B: stem disk, c: leaf disk).

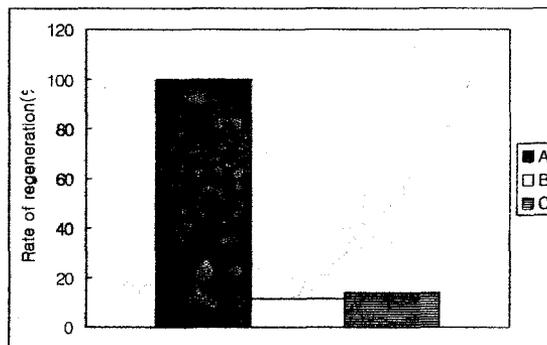


Fig.6. Effect of different explant in medium containing kanamycin 40, 50mg/ℓ, carbenicillin 500mg/ℓ (A: auxillary bud, B: stem disk, C: leaf disk).



Fig.7. Shoot and roots regenerated from stem transformation with Rs-AFP1 on MS medium containing Kanamycin and Cabenicillin.

바. AFP 유전자 형질전환 식물체의 PCR 분석

AFP 유전자 삽입여부를 확인하기 위하여 AF-1(5'-ATG-GCT-AAG-TTT-GCG-TCC-ATC-AT-3')과 AF-2(5'-ACA-AGG-AAA-GTA-GCA-GAT-ACA-CT-3') primer로 PCR 분석을 수행한 결과 형질전환을 수행하지 않은 식물체에서는 나타나지 않는 350bp 크기의 band가 형질전환 된 식물체에서 조사되었다(Fig. 8).

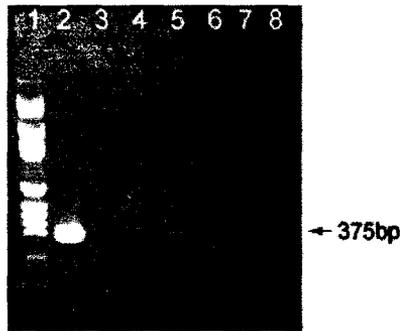


Fig.8. (a) : Detection of Rs-AFP gene in transgenic plant by using F-1 and F-2 primer.

lane 1 : DNA ladder maker, lane 2 : PCR product of AFP gene fragment, lane 3 : PCR amplication of normal plant (wild type, control), lane 4-8 : PCR amplication of transgenic plant selected in medium containing Km 50 mg/L(leaf disk).

사. AFP 유전자로 형질전환된 식물체의 Southern blotting

Southern blotting 결과 형질전환된 식물체에서 gene이 genome에 삽입되어 expression이 되는 것을 확인할수 있었다(Fig.9).

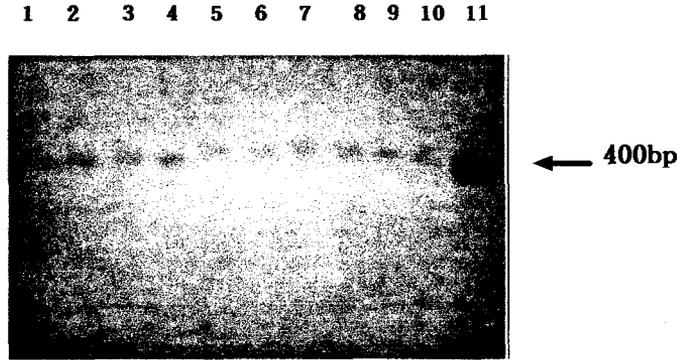


Fig.9. Southern blot analysis of transgenic plants by *Agrobacterium* using nptII probe.

lane 1, pGEM DNA marker; lane 2, nptII fragment(signal); lane 3, L10-4 transgenic plant; lane 4, L10-2 transgenic plant; lane 5, S10-14 transgenic plant; lane 6, S10-2 transgenic plant; lane 7, S10-1 transgenic plant; lane 8, S10-13 transgenic plant; lane 9, S10-5 transgenic plant; lane 10, L10-1 transgenic plant; lane 11, L30-1 transgenic plant; lane 12, L30-2 transgenic plant;

아. 형질전환 식물체의 순화

형질전환된 식물체의 순화과정을 거친 후 생존하여 온실, 포장에서 재배하여 증식하면서 포장저항성 검정에 사용하였다(Fig.10).

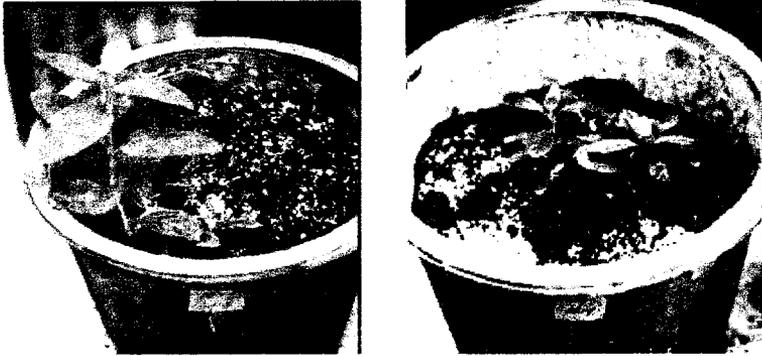


Fig.10. Plants transformed by RS-AFP inserted *Agrobacterium* of *S. buergeriana*.

2. PAP (*Phytolacca antiviral protein*) 유전자 형질전환

가. *Agrobacterium*을 이용한 현삼 식물체의 각 절편체의 형질전환(PAP)

PAP-inserted *Agrobacterium* 에 의한 hypocotyl, cotyledonary petiole, stem disk의 형질전환 실험에서 4주 후와 8주 후 변화를 조사해 보면 cotyledonary petiole과 stem disk의 재분화율은 8주 후에 100%로 모든 식물절편체가 분화되었다. Stem과 cotyledonary petiole disk를 형질전환에 explant로 사용하는 것이 hypocotyl를 사용하는 것보다 양호한 재분화 효율을 나타내었다(Table 24). Stem과 cotyledonary petiole disk을 치상한지 8주 후에 1개의 절편당 2-3개의 shoots가 형성되었으며 절편체의 wound site에서 callus와 신초의 성장이 눈에 띄게 나타났다.

Table 24. Regeneration ratio of *S. buergeriana* using PAP-inserted *Agrobacterium*

Medium	Explant	No. of explant	Ratio of regeneration	
			No. of shoot	
+1 BAP	Hypocotyl	100	4weeks/8weeks	4weeks/8weeks
+2 TDZ			8/70	8/70
+0.2 NAA	Cotyledonary	30	13/30	43/100
+ km 10	Petiole			
+cb 500	Stem	20	6/20	30/100

나. PAP 유전자 형질전환 식물체의 PCR 분석

형질전환 후 재분화 된 현삼식물체로부터 분리된 염색체 상에 유전자가 도입되었는지 여부를 확인하기 위해 PCR 분석을 수행하였다. 형질전환시 선발표지 유전자로 사용되는 NPT II gene의 확인에서는 정상식물체에서는 나타나지 않는 DNA 절편이 형질전환 식물체에서 나타났으며 kanamycin 50 mg/l 첨가된 배지에서 선발된 식물체에서 NPT II gene(700bp)이 plant genome 안으로 삽입되었음을 확인하였다(Fig. 11).

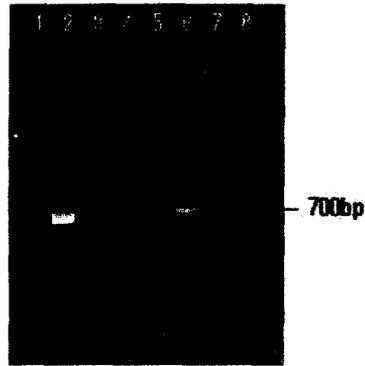


Fig.11. Detection of RIP-PAP gene in transgenic plant by using N-1 and N-2 primer.

lane 1 : DNA ladder maker, lane 2 : PCR product of NPTII gene fragment, lane 3 : PCR amplification of normal plant (wild type, control), lane 4-8 : PCR amplification of transgenic plant selected in medium containing Km 50 mg/L (leaf disk).

### 3. 내병성 유전자 AFP, PAP가 삽입된 형질전환 식물체 항균활성 검정

형질전환된 식물체의 잎에서부터 총단백질을 분리하였으며 *Asperigillus awamori*, *Cladosporium herbarum*을 사용하여 항균성 검정을 수행한 결과 형질전환 되지 않은 대조구 식물체가 균사의 생장이 50% 저해되는 반수저해농도 ( $IC_{50}$ )의 값이  $ml$  당  $500 \mu g$  이상이 요구되어 실제 항균성이 없는 반면 형질전환체 line인 중 AFP(antifungal protein) 유전자가 도입된 10-2-7, 10-4-5 계통에서는 *Cladosporium herbarum*에 대하여  $ml$  당 각각 300와  $280 \mu g$ 의 농도를 요구하여 항균성을 나타내었으며(Fig.12), *Asperigillus awamori*에 대하여서는 대조구 식물체와 같이 항균성이 없는 것으로 나타났다. 특이할만 것은 항바이러스성 단백질인 PAP가 도입된 line인 10-13-1, 10-14-1이  $IC_{50}$ 의 값이 *Asperigillus awamori*에 대해서 각각  $320 \mu g/ml$  과  $300 \mu g/ml$ 으로 나타나 AFP 유전자가 도입된 형질전환개체들 보다 높은 항균성을 나타내었다. PAP로 형질전환된 개체들은 *C. herbarum*에 대해서도  $IC_{50}$  값이 10-13-1 계통에서는  $80 \mu g/$

ml, 10-14-1 계통에서는 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타나 높은 항균성을 나타내었다. 이러한 것은 PAP 유전자가 fungi에 대해서 AFP보다 높은 활성을 가지는 것을 나타내며 보리의 RIP유전자를 대상식물에 형질전환 시킴으로서 fungal infection에 대하여 저항성종을 개발할 수 있다는 보고(Longemann et al., 1992)를 증명하는 것이다. 또한 3차년도에 실시되어진 형질전환 식물체들이 *Fusarium* 균외 2종에 대해 고도의 내병성을 나타내었던 것과 유사하였다(Table 25).

Table 25. Variation of antifungal activity of transgenic lines in *Scrophularia buergeriana*

Fungus	Antifungal activity(IC <sub>50</sub> value) $\mu\text{g}/\text{ml}$				
	Control	AFP		PAP	
		10-2-7	10-4-5	10-13-1	10-14-1
<i>Asperigillus awamori</i> ,	>500	>500	>500	320	300
<i>Cladosporium herbarum</i>	>500	300	280	80	100

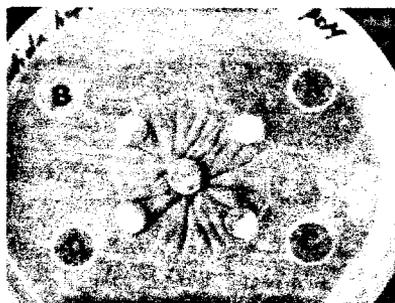


Fig.12. Antifungal activity of transgenic plant in *Scrophularia buergeriana*. Discs contained 25 $\mu\text{l}$  total protein(A), diluted 1 : 5(B), 1 : 10(C), of transgenic plant and control plant(D)

각각의 형질전환식물체에서 추출한 단백질의 첨가에 따른 포자발아의 양상을 살펴보면 형질전환되지 않은 식물체의 단백질을 첨가한 구와 포자만 들어있는 구에서는 포자가 발아하여 균사생장이 왕성하였으나(Fig. 13. A, D) 형질전환된 식물체에서 추출한 단백질을 첨가한 구에서는 생장이 저해되었다.

*Asperigillus awamori*의 경우에 PAP와 AFP 형질전환체의 단백질을 첨가한 경우 모두 포자가 발아하지 못하고 균사생장이 지연되며 균사말단부가 고사하는 특성을 나타냈으며(Fig. 13. B, C) *Cladosporium herbarum*에 AFP 형질전환체의 단백질을 첨가한 경우 균사의 2차 성장(결가지)이 눈에 띄게 저해되었고 성장하는 균사는 곧게 뻗어 가는 형태를 나타내었으며(Fig. 13. E) PAP 형질전환체의 단백질을 첨가한 경우에 균사는 성장되었으나 포자와 성장하는 균사가 투명하여졌으며 성장하는 균사의 굵기도 가늘어지는 특성을 나타내었다(Fig. 13. F). 이러한 것은 도입한 유전자의 발현으로 인한 생성된 단백질의 작용특성이 차이에 기인하는 것으로 판단되며 각각 다른 항균단백질의 첨가에 따라 포자에서 균사의 성장하는 양상이 다르게 나타난다는 보고(Franky et al., 1992)와 유사한 결과를 얻었다. 또한 이런 균사생장을 저해하는 양상이 다르다는 것에 기초하여 AFP로 형질전환된 식물체와 PAP로 형질전환된 식물체에서 추출한 단백질을 섞어 첨가하고 균사생장이 저해하는 양상을 비교실험하고 있으며 이러한 것은 AFP와 PAP의 co-transformation에 의한 내병성 획득에 상승적 효과 (synergistic effect)를 가져올 수 있으리라 사료된다.

병원체 접종 후 시간의 경과에 따른 형질전환 식물체의 SDS-page를 수행한 결과 병원체 감염에 따른 PAP 유전자의 발현에 의하여 형질전환된 식물체에서 형질전환되지 않은 식물체에는 나타나지 않는 32kDa의 밴드가 (Fig. 14), AFP 유전자의 발현에 의하여 10kDa 이하의 band가 명확하게 나타났다. (Fig. 15).

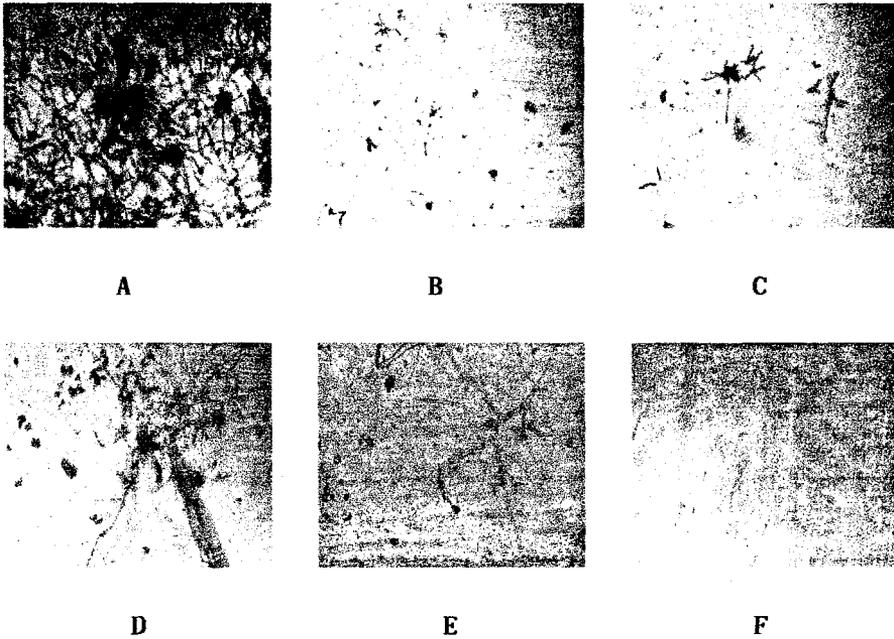


Fig.13. Difference in morphology of inhibited hyphae photomicrograph was taken after 24h of incubation of a *Asperigillus awamori* and *Cladosporium herbarum* spore suspension in 96-well microassay plate. A : *Asperigillus awamori* (control), D : *Cladosporium herbarum* (control), B, E : AFP transgenic plant, C, F : PAP transgenic plant.

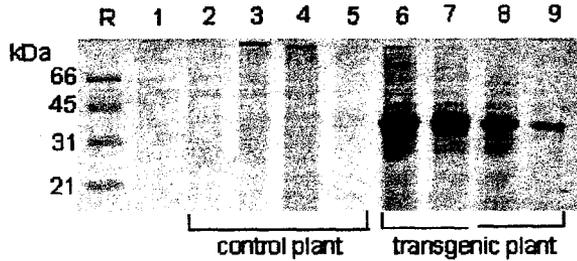


Fig.14. Comparison of protein pattern against *Fusarium oxysporum* infection through SDS-PAGE in the *Scrophularia buergeriana*. R, protein marker, the molecular masses are indicated in the left margin; lane 1, non-infected control plant; lane 2~5, infected control plant(12h, 24h, 72h, 120h respectively); lane 6~9 infected PAP-inserted transgenic plant (12h, 24h, 72h, 120h respectively).

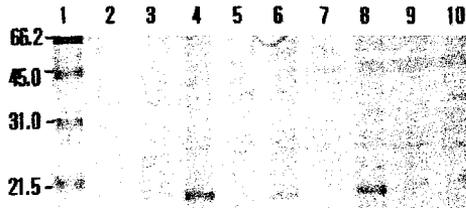


Fig.15. Comparison of protein pattern against *Fusarium oxysporum* infection through SDS-PAGE in the *Scrophularia buergeriana* Miquel. lane 1, protein marker; lane 2, non-infected control plant; lane 3, 5, 7, 9 infected control plant; lane 4, 6, 8, 10 infected AFP-inserted transgenic plant.

4. 내병성 유전자의 도입에 의한 현삼 형질전환체의 온실에서 내병성 검정

PAP의 유전자의 경우 virus 및 fungi의 ribosomal RNA의 elongation factor 활성을 저하시켜 protein으로서 PAP유전자를 현삼에 transformation하였고 이에 대해 병원성 검정을 하였다. 병원성 검정결과 초장이 control 식물체는 평

균 13.3으로 나타났지만 형질전환체 PAP는 17.68cm, 16.41cm, AFP는 13.00cm, 19.18cm로서 형질전환 식물체가 비교적 높았고 엽수에서는 대략 10~15개로서 유의성은 검정할 수가 없었다. 또한 지상부, 지하부의 생체중은 PAP R-10 외에는 형질전환 식물체가 다소 무거웠으며 접종원에 의한 병증발현은 control 식물체에서 *Fusarium*에 의한 전형적인 병징인 뿌리썩음과 유관속 시들음 증상이 나타났고 병징의 scale을 1-5(1: healthy plant, 5 dead plant)로 평가했을 때 3.2와 3.0로 나타났으나 형질전환 식물체의 경우 control에 비하여 건강한 상태를 유지시켰고 scale은 2.0-2.5수준을 나타내었다. 이로서 현삼에 도입된 PAP유전자에 의해 형질전환된 식물체가 fungi에 대해서 저항성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

AFP유전자는 무종자로부터 분리한 항균성 protein으로서 fungi의 성장을 지연시키고 균사의 2차생장을 저해시키는 기능을 갖고 있는 유전자로서 AFP를 현삼에 형질전환 하였고 이에 대해 병원성 검정을 하였다. 병원성 검정결과 초장과 엽수에서는 control 식물체와 별 차이가 없었으나 병원성 검정결과 control 보다 병원균에 대하여 저항성을 나타내었다.

이러한 결과로부터 내병성 유전자인 AFP와 바이러스 저항성 유전자인 PAP가 식물체에 도입되었으며 접종원을 처리하였을 때 그에 대하여 저항성을 나타내면서 일정하게 발현함을 증명하였다(Table 26).

Table 26. Pathogenicity test of transformant *Scrophularia buergeriana*

Genotype /Pathogen	Shoot height (cm)	No. of leaf	Subastral weight(g)	Subterral weight(g)	Disease ratings scales	
Control	R-3	12.32	10	3.58	8.32	3.2
	R-10	14.28	11	4.82	9.20	3.0
PAP	R-3	17.68	13	7.96	11.19	2.4
	R-10	16.41	11	4.26	9.82	2.5
AFP	R-3	13.00	12	6.28	15.41	2.0
	R-10	19.18	15	9.07	15.56	2.0

The pathogen was isolated by infected root.

<sup>a</sup>Disease ratings in 1-5 scales: 1 = no disease observed and 5=death of plants.

## 5. 현삼 형질전환 식물체 포장저항성 검정

2개의 접종균(*Fusarium oxysporum*, *Collectotrichum* sp.)에 대한 각각의 형질전환된 현삼 식물체 (AFP: 4계통, PAP: 3계통)에 대한 포장 저항성 검정을 수행한 결과 *Fusarium oxysporum*에 대해서 control 식물체는 극심한 감수성을 보인 반면 형질전환된 line AFP-S-10-2-1, PAP-P-10-8은 높은 저항성을 보였고 line AFP-P-10-8은 이병개체에서 새로운 신초가 형성되는 것을 관찰할 수 있었으며 이러한 것은 저항성 유전자 발현에 의한 저항성 증대의 결과라 사료된다. *Fusarium oxysporum*(Fig.16,18)과 *Collectotrichum* sp.(Fig.17)에 대하여 control 식물체는 이병성을 보인 반면 형질전환된 line에서는 저항성을 나타내었다.



Transgenic plant(AFP-10-2-1)



Control plant

Fig.16. Pathogenicity test of transgenic plant infected *Fusarium oxysporum*.



Transgenic plant(PAP-P-10-8-2)



Control plant

Fig.17. Pathogenicity test of transgenic plant infected *Fusarium oxysporum*.

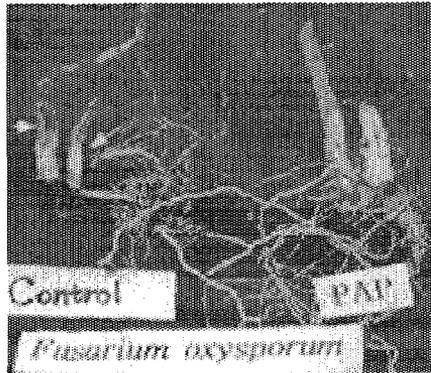


Fig.18. Pathogenicity test of transgenic plant infected *Fusarium oxysporum*. The arrow indicated symptom cause by pathogen, Vertical section of control and transgenic plant infected *Fusarium oxysporum*.

## 6. GST (Glutathion S-transferase) 유전자의 형질전환

### 가. GST 유전자의 형질전환에서 acetosyringon과 암처리에 따른 형질전환 효율 증진

현삼을 대상으로 하는 GST 유전자 형질전환에서 형질전환 효율을 증가시키기 위하여 형질전환체 선발과정에서 치상조직을 암상태로 0, 15, 30, 45, 60, 75 일로 처리하였으며 각 처리구의 재분화된 식물체를 대상으로 한 PCR분석을 통하여 형질전환율을 확인하였다. 선발과정에서 암상태를 30일까지 유지할 경우 높은 형질전환효율을 나타내었다. 형질전환효율증대를 위한 암처리는 30일간 처리가 가장 적당하였으며 그 이상의 처리는 오히려 형질전환효율이 감소하는 결과를 나타내었다(Table 27). 페놀성화합물질인 Acetosyringone을 농도별로 첨가하였을 때 200  $\mu$ M 첨가 시 선발배지에서 높은 생존률을 나타내어 형질전환 효율의 향상을 가져올수 있으리라 사료된다(Table 28).

Table 27. Influence of exposure to darkness on the regeneration potential. Explants were cocultivated on feeder plates for 3days and then transferred to the selection medium. Explants were exposed to darkness for 0, 15, 30, 45, 60, 75days and then transferred to a 16-h photoperiod

Days	No of culture	No of callus (%)	No of plant regeneration (%)	No of transgenic plants
0	180	56(31)	50(28)	1
15	230	40(17)	35(15)	2
30	200	50(25)	40(20)	8
45	210	42(20)	21(10)	3
60	250	38(11)	20(8)	0
75	190	19(10)	8(4)	0

Table 28. Influence of the addition of acetosyringone to coculture-medium on transfor-mation were cocultivated on feeder plates for 3days of *Scrophularia buergeriana*

Acetosyringone ( $\mu$ M)	Explant	No. of explant	No. of survival explant	Rate of survival (%)
50		154	30	19.5
100		200	48	24.0
150		250	80	32.0
200	Leaf	180	98	54.4
250		160	58	36.3
300		230	42	18.3
400		270	38	14.1

나. *Agrobacterium*을 이용한 현삼 식물체의 형질전환(GST)

*Agrobacterium*을 접종한 잎절편체는 4주 후 선발배지에서 캘러스가 형성되었으며 8주 후 줄기분화가 되었다. 0.5~1cm로 자란 줄기를 1/2MS + Km 20mg/ℓ 로 조성된 발근배지로 옮겨 뿌리를 유도하였다.

다. GST 유전자 형질전환 식물체의 PCR 분석

발근배지로 옮겨 3주 후 일정하게 자란 식물체의 잎을 채취하여 DNA를 추출하였으며 GST 유전자 삽입여부를 확인하기 위하여 Gh-1(5'-ATT-ATG-CTG-AGT-GAT-ATC-CCG-CT-3')과 Gh-2(5'-TGG-TCA-AGA-GCC-AAG-AAA-TA-3') primer로 PCR 분석을 수행한 결과 형질전환을 수행하지 않은 식물체에서는 볼 수 없는 988bp 의 band를 관찰할 수 있었다(Fig. 19).

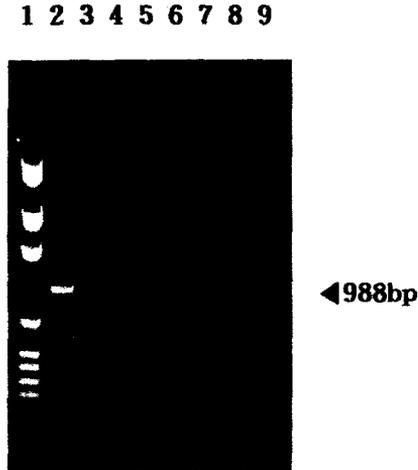


Fig.19. Electrophoresis patterns of PCR products from non-transgenic and transgenic plants of *Scrophularia buergeriana*.

lane 1 : pGEMmarker DNA.

lane 2 : PCR product of C-GST gene fragment.

lane 3 : non-transformant plant.(control)

lane 4~9 : putative transformants plants selected in medium containing Km50mg/ℓ

#### 라. GST 유전자 형질전환체의 GST activity 측정

형질전환 된 식물체는 유도체 처리를 하지 않은 경우에는 CDNB기질에 대하여 control 식물체보다 약 2배 정도의 GST 활성 증가를 보여 주어 GST 유전자가 현삼 식물체내로 도입되었음을 의미한다.

각각의 식물체에서 GST 유전자를 활성화 시킬 수 있는 유도체의 농도가 존재 하며 유도체가 일정 농도 이상이 되면 저해활성을 갖는다는 보고를 기초로 진행한 실험결과 시간의 차이에 관계없이 기질의 농도가 50μM일 때 제일 높은 효소 활성을 나타내었으며 그 이상의 농도로 처리되었을 경우 GST 활성이 점차적으로 감소하였다.

유도체 처리하였을 때 유효 시간을 알아보기 위하여 시간별 처리에서 모든

농도하에서 12시간까지는 효소활성이 점차적으로 증가되어 특히 12시간 되었을 때 활성이 제일 높게 나타났으며 그 이상의 시간에서는 점차적으로 감소하는 것을 보여주었다(Fig. 20).

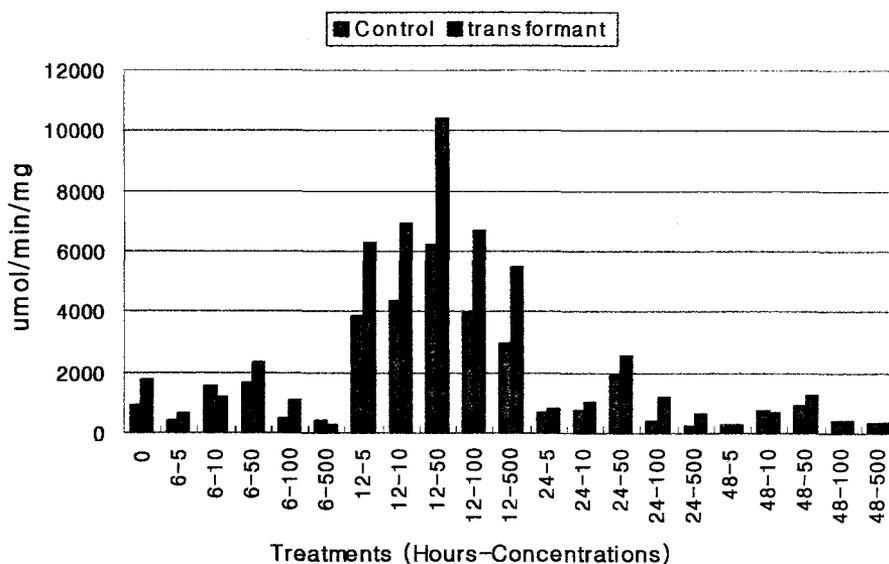


Fig.20. Effect of inducer(2,4-D) concentration and treated time on GST activity in control plant and transgenic plant of *Scrophularia buergeriana*.

#### 마. GST 유전자로 형질전환 현삼 식물체의 항미생물의 활성실험

Fungus 피검균인 *Asperigillus awamori* 에서 형질전환 식물체와 형질전환 되지 않은 식물체의 활성이 같은 수준으로 나타났으며 6시간 처리에서는 균사의 굵기가 가늘고 색깔이 검게 나타내었고 12시간 처리에서는 plate의 중간에서 떨어져 주위에 균사가 붙어있었고 가운데가 검은 색깔을 나타내었다. 6, 12시간 처리시 비교적 높은 활성을 보여주었으며 그 이상의 시간처리에서는 명확한 균사 억제를 나타내지 못하였으며 특히 12시간에서 상대적으로 높은 활성을 나타내었다.

*Cladosporium herbarum*에서 형질전환된 식물체의 활성이 훨씬 높게 나타났으며 유도체 처리에서는 균을 멍치게 하여 균사체 성장을 억제하였으며 6시간 처리에서 비교적 다른 처리에 비하여 높은 활성을 나타내었다.

피검균인 *Saccharomyces cerevisiae*을 대상으로 하여 항균활성을 검정한 결과 형질전환 식물체에서 높은 활성을 보여주었으며 6, 12시간 처리에서 비슷하게 높은 활성을 보여 주었다.

박테리아 피검균 *Bacillus subtilis*에서 형질전환 식물체가 형질전환 되지 않은 식물체보다 2배가량의 활성을 보여 주었으며 낮은 농도인 50 $\mu$ M이하의 유도체 처리에서 비교적 높은 활성을 나타내었다(Table 29).

Table 29. Antimicrobial activity of control and transgenic plant by hour-concentration (H-C) of inducer(2,4-D) treatment in *Scrophularia buergeriana*

H-C	Antimicrobial activity(MIC <sup>**</sup> : ppm)							
	<i>A. awamori</i>		<i>C. herbarum</i>		<i>S. cerevisiae</i>		<i>B. subtilis</i>	
	Control	Transfo -rmant	Control	Transfo -rmant	Control	Transfo -rmant	Control	Transfo -rmant
0	12.5	12.5	25	3.13	25	6.25	12.5	6.25
6-5	25	12.5	6.25	6.25	25	12.5	100	25
6-10	25	6.25	12.5	1.56	50	6.25	50	25
6-50	50	0.78	25	0.78	25	6.25	100	12.5
6-100	50	6.25	25	12.5	50	12.5	100	12.5
6-500	100	12.5	100	25	100	50	100	25
12-5	50	1.56	100	12.5	12.5	3.13	50	6.25
12-10	12.5	1.56	50	12.5	25	3.13	50	3.13
12-50	12.5	1.56	25	6.25	25	12.5	25	3.13
12-100	25	3.13	25	3.13	50	25	100	50
12-500	50	6.25	50	25	50	50	100	100

MIC<sup>\*\*</sup>: The MIC value against bacteria, yeast and fungi was determined by the serial 2-fold dilution method. The growth of bacteria and yeast was evaluated by the degree of turbidity of the culture with the naked eye. The spore germination of fungi was examined under a microscopy.

바. GST 유전자로 형질전환 된 현삼 기내 식물체의 병원성 검증

병원균 *Fusarium oxysporum*을 현삼 식물체에 접종하였을 때 형질전환 된 식물체 C-6 lane은 뿌리부위가 조금 붉은 색을 나타낼 뿐 다른 부위는 모두 정상적인 상태를 나타내어 R-3, R-10병원균에 대하여 비교적 높은 저항성인 것으로 판단되었고 다른 line들도 일정한 저항성을 보였지만 식물체의 뿌리부위의 잎이 경미한 투명화를 나타내었고 약간의 시들음 현상이었으며 형질전환 되지 않은 식물체에서는 감수성을 나타내어 전체 식물체의 잎과 줄기가 투명화 되어 시들었었다. 이러한 결과는 형질전환 된 식물체에 도입된 외래 유전자가 발현하였으며 병원균에 대하여 저항성을 나타내는 것으로 사료된다(Table 30).

Table 30. Pathogenicity test of *Scrophularia buergeriana* inoculated by *Fusarium oxysporum* strains

	Disease ratings <sup>a</sup>									
	C-1 <sup>b</sup>	C-2	C-6	C-8	C-11	C-12	C-14	C-15	C-16	Wild type
R-3 <sup>c</sup>	3.0 <sup>d</sup>	3.4	2.2	2.6	3.5	2.7	2.7	2.8	2.5	4.4
R-10	3.3	4.0	2.4	3.0	4.5	2.8	3.1	3.1	2.8	4.8
Control	1	1.5	1	1	1.5	1	1.5	1	1	1

<sup>a</sup> Disease ratings were based on 0-5 scales; 0=no disease, and 5=death of seedlings.

<sup>b</sup> *Scrophularia buergeriana* transformed in vitro with fungal-resistant gene.

<sup>c</sup> *Fusarium oxysporum* isolates. <sup>d</sup> Mean of average.

사. 형질전환 된 현삼 포장 식물체의 병원균 접종에 따른 GST효소활성 검정

형질전환된 현삼 식물체와 형질전환 되지 않은 식물체에 병원균 *fusarium*, 역병, 탄저병을 접종한 후 GST 활성을 조사하기 위하여 Dean등의 방법에 따라 조효소액을 추출하여 GST activity를 측정하였다. 형질전환 된 식물체에서 GST 활성이 형질전환 되지 않은 식물체에 비하여 비교적 높은 활성을 나타내었으며 *fusarium* 병원균에 대한 활성이 다른 병원균에 비하여 다소 높게 나타났다

(Fig. 21). 시간에 따른 GST 활성을 조사한 결과 3가지 병원균에서 모두 48시간 때부터 활성이 높아졌고 120시간 때에 제일 높은 수치를 기록하였으며 그 뒤로는 활성이 떨어지는 경향을 나타내었다(Fig. 22). 이러한 결과로부터 병원균을 처리하였을 때 일정한 감염 시간이 수요되며 식물체가 체내에서 GST의 활성이 증가되면서 독소물질의 분자구조를 분해시켜 무독화 시키는 과정에 의하여 저항성을 나타내고 있다고 사료되어진다.

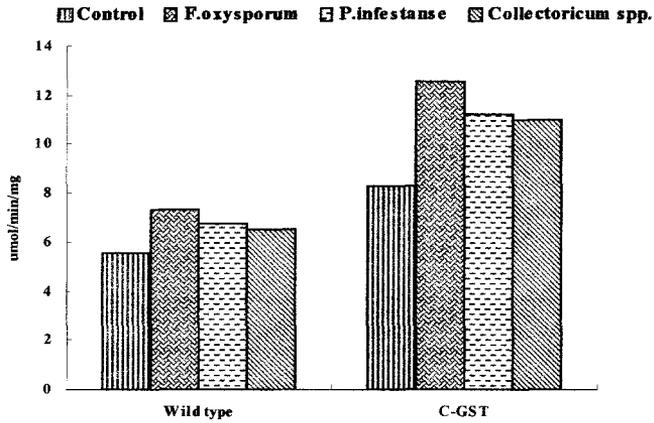
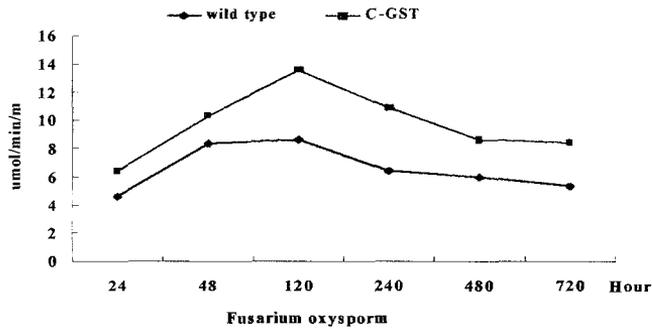


Fig. 21. Comparison of GST-activity between control and transgenic plants infected by pathogens in *Scrophularia buergeriana*.



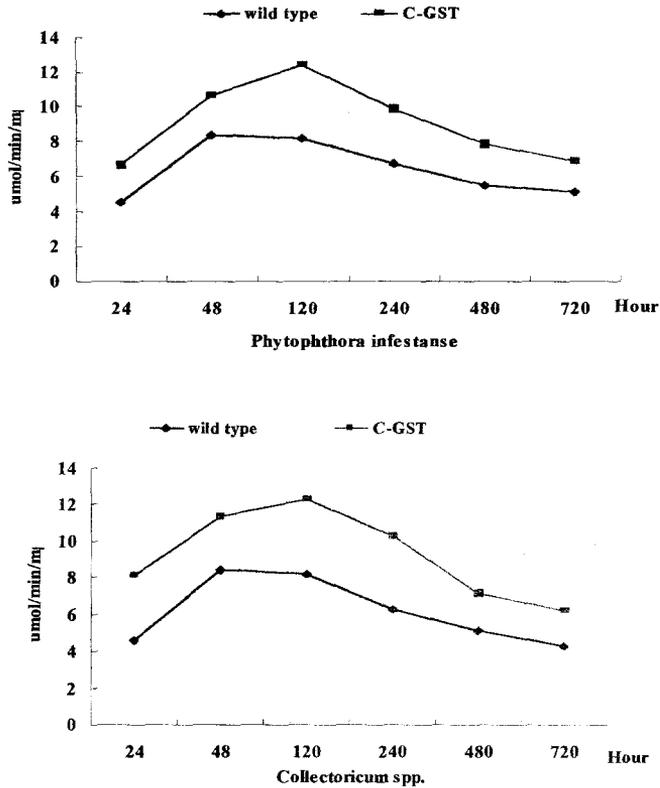


Fig.22. The pattern of GST-activity in control and transgenic (GH-5, cotton-GST) *Scrophularia buergeriana* infected by pathogens after 720 hours.

아. 형질전환 식물체의 포장저항성 검정 및 생육특성,

PAP, AFP 유전자에 의하여 형질전환된 현삼식물체와 형질전환 되지 않은 대조구 식물체를 대상으로 하여 *F. oxysporum*, *P. infestans*, *Collectoricum spp.*를 감염시키고 2개월 후 각 계통에 대한 생육조사를 수행하였다. 초장에 대해서는 형질전환 되지 않은 식물체와 형질전환된 식물체간의 큰 차이를 나타

내지 않았으나 잎 길이 대해서는 *P. infestanse* 감염 시에 AFP나 PAP로 형질 전환된 식물체가(PAP-13.6cm, AFP-11.8cm) 형질전환되지 않은 식물체(8.9cm) 비하여 더 길이가 길었고 엽면적에 있어서는 *P. infestanse* 감염 시 형질전환되지 않은 식물체가(27.1cm<sup>2</sup>) 형질전환된 식물체와 감염이 이루어지지 않은 식물체의 면적(50-60cm<sup>2</sup>) 보다 극히 감소하는 경향을 나타내었다. 대하여 이러한 경향은 지상부의 생체중에서도 동일하게 나타났다. 이러한 것은 형질전환된 식물체에 도입된 유전자의 발현에 의하여 병저항성을 나타내어 병원체의 감염에도 불구하고 감염되지 않은 식물체의 수준으로 생육특성을 나타내는 것으로 사료된다. 현삼에서 형질도입된 유전자간의 저항성 차이는 AFP와 PAP로 형질전환된 식물체에서 *P. infestanse* 의 감염에 대하여 잎길이, 잎면적, 생체중에서 PAP가 AFP보다 높게 나타나 PAP가 AFP보다 다소 우수한 저항성을 나타내는 것으로 사료된다(Table 31).

현삼의 주요 이용부위인 지하부에서 뿌리의 길이 및 굵기, 지하부 생체중을 조사하여 본 결과 뿌리 길이와 굵기, 생체중 모두에 있어서 형질전환되지 않은 식물체에 병원체를 감염시킨 경우 급격히 감소하였으나 형질전환된 식물체에서는 병원체 감염에 대하여 감소하는 경향을 나타내기는 하였으나 커다란 차이를 나타내지는 않았다. 특히 PAP로 형질전환된 식물체에 병원체를 감염시킨 경우 형질전환되지 않은 식물체와 뿌리 굵기를 비교하여 본 결과 형질전환되지 않은 식물체가 급격히 가늘어지는 반면 PAP로 형질전환된 식물체에서는 접종하지 않은 식물체와 유사하거나 오히려 더 굵어지는 특성을 나타내었다. 이러한 것은 지상부의 생육특성과 유사하게 나타난 결과로서 PAP 유전자의 발현이 *F. oxysporum*, *P. infestanse*, *Collectoricum spp.* 등의 병원체에 대하여 AFP의 유전자 발현보다 높은 병저항성을 나타냄을 시사한다고 할 수 있겠다(Table 32).

Table 31. Comparison of growth characteristics(above) in control and transgenic plant after infected by pathogens

Line	Infected by pathogens	Plant height(cm)	Leaf length(cm)	Leaf area(cm <sup>2</sup> )	Shoot weight(g)
Non-transgenic	Control	147.4±6.0	12.8±1.7	55.7±3.8	133.9±6.9
	<i>F. oxysporum</i>	184.5±7.2	15.3±1.0	60.1±2.9	121.1±3.1
	<i>P. infestanse</i>	158.3±12.3	8.9±1.9	27.1±5.9	119.7±7.6
	<i>Collectoricum</i>	152.3±5.6	12.8±2.0	59.9±5.0	117.2±7.0
	<i>spp.</i>				
LSD		26.20	2.95	5.86	7.71
PAP	Control	154.0±7.0	16.5±1.0	67.9±4.0	159.7±4.1
	<i>F. oxysporum</i>	153.5±6.9	13.7±1.1	64.7±4.0	151.9±3.9
	<i>P. infestanse</i>	160.7±5.9	13.6±0.9	63.7±3.8	148.6±3.8
	<i>Collectoricum</i>	144.7±4.8	13.7±0.8	69.6±4.0	150.5±2.1
	<i>spp.</i>				
LSD		7.18	1.29	4.48	4.84
AFP	Control	142.4±10.5	13.1±1.1	62.7±3.0	152.3±4.2
	<i>F. oxysporum</i>	167.4±8.8	13.6±1.1	68.1±3.1	140.8±1.0
	<i>P. infestanse</i>	151.7±12.4	11.8±1.0	56.8±3.2	145.4±3.0
	<i>Collectoricum</i>	156.7±9.4	13.1±1.0	60.6±1.0	148.2±2.1
	<i>spp.</i>				
LSD		13.30	1.14	3.37	4.39

Table 32. Comparison of growth characteristics(below) in control and transgenic plant after infected by pathogens

Line	Infected by pathogens	Root length(cm)	Root diameter (cm)	Root weight(g)
Non-transgenic	Control	15.6±1.1	1.2±0.1	246.1±8.2
	<i>F. oxysporum</i>	11.5±1.5	1.1±0.2	154.3±8.1
	<i>P. infestanse</i>	12.1±0.5	1.1±0.2	179.3±5.4
	<i>Collectoricum</i>	10.9±1.0	1.1±0.4	137.6±3.1
	<i>spp.</i>			
LSD		1.75	0.47	8.36
PAP	Control	17.8±1.4	2.0±0.1	270.2±2.9
	<i>F. oxysporum</i>	20.0±1.3	2.0±0.1	229.4±2.9
	<i>P. infestanse</i>	16.5±1.0	2.2±0.1	239.5±1.5
	<i>Collectoricum</i>	17.9±1.4	2.0±0.1	212.3±2.9
	<i>spp.</i>			
LSD		1.53	0.14	3.73
AFP	Control	13.9±2.1	2.0±0.2	281.7±5.7
	<i>F. oxysporum</i>	16.7±1.9	1.9±0.2	233.9±7.5
	<i>P. infestanse</i>	22.2±0.9	1.6±0.2	231.1±3.6
	<i>Collectoricum</i>	14.8±2.2	1.8±0.3	203.9±7.6
	<i>spp.</i>			
LSD		2.30	0.36	7.67

#### 자. 저항성 계통의 선발 및 생육특성

PAP와 AFP로 형질전환 식물체 중 높은 저항성이 확인된 식물체 중 생육상태가 양호하고 저항성이 높게 발현되는 10개의 계통을 다시 선발하고 임의로 계통 번호를 부여하였다(Table 33). 개체증식 후 각각의 계통에서의 생육특성을 다시 비교하였다. 형질전환된 식물체를 각 계통별로 살펴보면 PAP유전자로 형질전환된 계통의 경우 P-7,9 계통이 형질전환 되지 않은 식물체와 비교하여 지하부 생체중에서 약 1~1.5배정도의 높은 생육특성을 나타내었다. 특히 P-7의 경우 형질전환된 다른 계통과 형질전환되지 않은 식물체에 비교하여 지하부에 대한 높은 수확성을 나타내었다. AFP유전자로 형질전환된 식물체의 경우 PAP유전자로 형질전환된 식물체와 비교하였을 때 지하부 생체중이 양호하였고 형질전환되지 않은 식물체와 비교하였을 때 1.5~2배정도 월등하였다. 반면 지상부

의 생체중은 AFP로 형질전환된 식물체보다 PAP유전자로 형질전환된 식물체가 다소 양호하였다.

AFP 형질전환 식물체를 계통별로 살펴보면 A-4, 5, 7, 9, 10의 경우가 선발된 계통에서 다소 양호하였으며 A-5의 경우 형질전환되지 않은 식물체와 비교하여 약 2배정도의 생육상태를 보여주었다(Table 34).

Table 33. Comparison of growth characteristics(above) in non-transgenic and transgenic plant in field

Line	Plant height (cm)	Leaf length (cm)	Leaf area (cm <sup>2</sup> )	Shoot weight (g)	
Non-transgenic	147.4	12.8	55.7	133.9	
Transgenic plant (PAP)	P-1	172.0±5.8	12.4±1.5	59.1±4.4	121.8±5.9
	P-2	128.0±6.1	14.6±1.4	85.4±3.2	209.8±6.0
	P-3	133.0±4.4	14.3±1.1	69.6±1.6	162.5±4.8
	P-4	189.0±6.6	15.0±1.3	86.0±2.8	183.5±3.4
	P-5	183.0±3.2	15.9±1.1	86.3±3.3	193.0±4.0
	P-6	152.0±3.2	15.6±1.5	95.0±4.4	250.5±2.3
	P-7	174.0±6.7	12.5±1.4	53.2±1.6	233.0±5.4
	P-8	187.0±5.9	14.7±1.6	89.5±2.4	214.5±6.7
	P-9	162.0±6.8	14.1±1.6	70.5±3.7	251.0±2.7
	P-10	155.0±4.9	13.5±1.7	60.1±3.3	191.5±3.4
Mean	163.5	14.3	75.5	201.1	
LSD	6.79	1.68	4.46	6.95	
Transgenic plant (AFP)	A-1	119.0±12.7	10.8±2.1	43.7±5.2	126.6±11.6
	A-2	167.0±11.6	11.2±1.9	83.1±3.7	130.5±10.7
	A-3	161.0±10.8	16.6±1.0	81.2±5.6	157.5±9.9
	A-4	173.0±14.5	16.4±1.5	92.5±2.0	164.6±7.8
	A-5	120.0±12.3	11.6±2.2	41.4±3.9	266.5±6.6
	A-6	153.0±14.0	12.7±2.2	46.4±3.9	149.5±3.5
	A-7	184.0±14.5	15.5±0.7	91.5±4.4	163.0±5.4
	A-8	182.0±9.0	14.2±1.1	68.2±5.1	145.5±6.3
	A-9	189.0±6.3	15.8±1.7	74.0±3.4	266.5±4.1
	A-10	190.0±9.8	16.6±1.1	93.8±5.3	214.9±4.0
Mean	163.8	14.1	71.6	157.76	
LSD	14.62	2.22	5.62	12.00	

Table 34. Comparison of growth characteristics(below) in non-transgenic and transgenic plant in field

Line	Root length (cm)	Root diameter (cm)	Root weight(g)	
Non-transgenic	15.6	1.2	246.1	
Transgenic plant (PAP)	P-1	21.0±2.0	2.6±0.4	288.0±8.8
	P-2	25.0±1.3	1.4±0.4	293.4±8.0
	P-3	13.0±0.9	3.2±0.2	294.5±4.4
	P-4	15.6±2.0	2.4±0.2	312.5±4.0
	P-5	12.0±1.8	1.8±0.3	302.5±3.4
	P-6	29.8±1.3	1.9±0.3	289.5±5.8
	P-7	16.0±2.0	2.2±0.2	372.0±8.6
	P-8	15.0±2.1	2.0±0.2	323.1±6.9
	P-9	19.0±2.1	2.3±0.4	334.1±4.7
	P-10	12.0±1.0	1.7±0.3	298.3±4.5
Mean	17.8	2.2	310.8	
LSD	2.12	0.45	9.78	
Transgenic plant (AFP)	A-1	11.0±3.0	1.8±0.5	285.5±13.9
	A-2	15.0±1.7	2.4±0.4	293.0±10.8
	A-3	15.0±0.9	2.2±0.2	307.5±15.7
	A-4	12.2±2.2	2.4±0.4	351.2±11.6
	A-5	17.0±1.1	2.6±0.6	451.5±13.1
	A-6	14.0±2.0	2.6±0.3	313.0±8.3
	A-7	15.0±2.0	2.5±0.3	383.5±10.5
	A-8	14.0±1.4	1.9±0.2	310.5±6.8
	A-9	17.0±2.7	2.6±0.2	381.5±13.4
	A-10	15.0±2.5	2.6±0.4	353.1±12.8
Mean	13.25	2.15	308.72	
LSD	3.07	0.61	16.63	

AFP, PAP유전자로 형질전환된 현삼 식물체와 형질전환 되지 않은 현삼 식물체의 뿌리 형태의 차이는 큰 차이를 나타내지는 않았으나 형질전환되지 않은 식물체는 잔뿌리가 많은 반면 형질전환 식물체는 잔뿌리가 적고 굵은 뿌리의 수가 형질전환되지 않은 식물체에 비하여 많았다. 병원균을 접종한 식물체에서는 위와 같은 양상이 더욱 크게 나타났다(Fig. 23, 24, 25, 26).

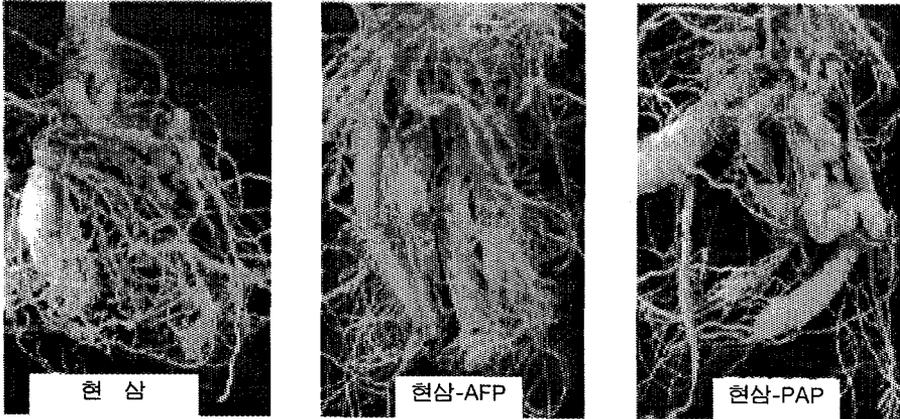


Fig.23. Comparison of growth characteristics in control and transgenic plant

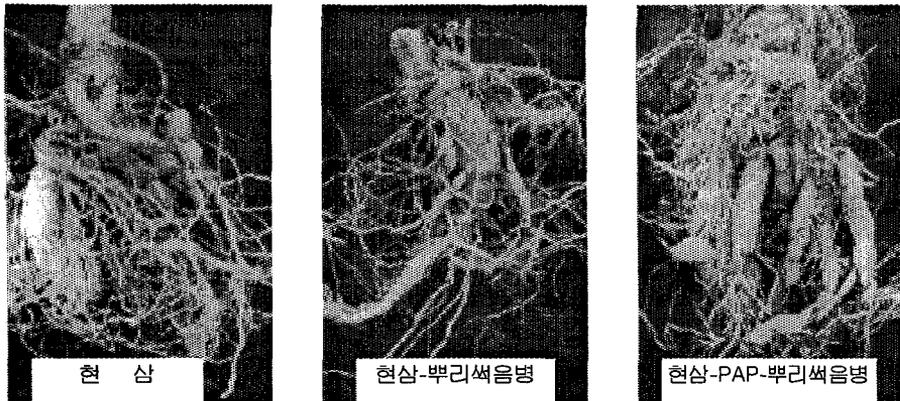


Fig.24. Comparison of growth characteristics in control and transgenic plant infected by *Fusarium oxysporum*.

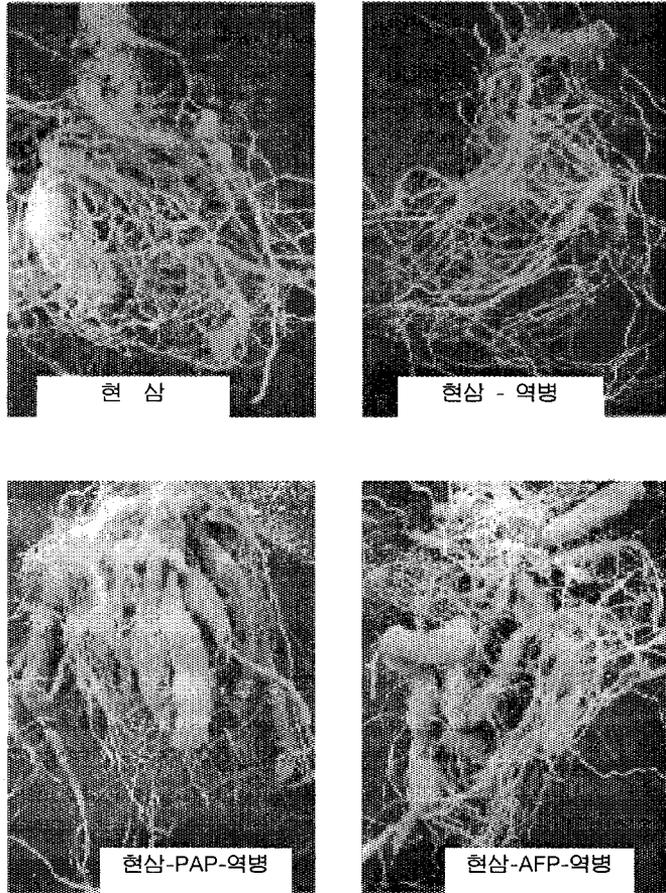


Fig.25. Comparison of growth characteristics in control and transgenic plant infected by *Phytophthora infestanse*.

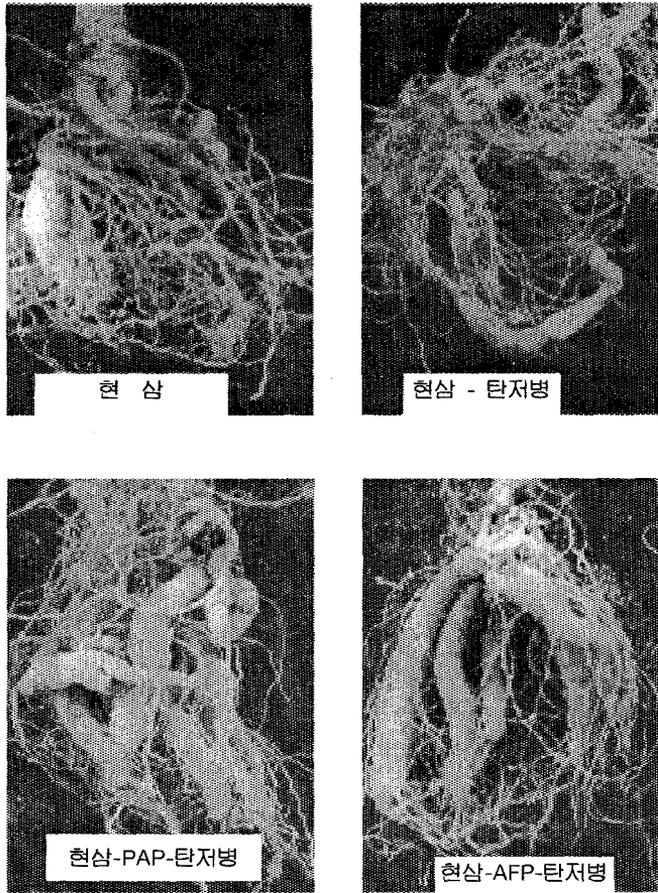


Fig. 26. Comparison of growth characteristics in control and transgenic plant infected by *Collectoricum* spp.

#### 차. 포장저항성 검정

형질전환된 식물체와 형질전환되지 않은 식물체간의 병원균에 대한 저항성을 조사하여본 결과 형질전환되지 않은 현삼 식물체의 경우 *F. oxysporum*균을 처리시 무처리시의 62.7%의 뿌리 생육을 보여 37.3%의 생육억제를 *P. infestanse*균을 처리시 무처리 보다 62.9%의 뿌리 생육을 보여 37.1%의 생육억제를, *Collectoricum spp.*균을 처리시 무처리 보다 65.5%의 뿌리 생육을 보여 34.5%의 생육억제를 보였다. 그러나 PFP유전자로 형질전환된 P-3계통의 식물체는 *F. oxysporum*균 처리시 무처리 보다 78.8% 뿌리 생육을 보여 21.1%정도 생육억제를 보였다. *P. infestanse*균 처리시 무처리 보다 71.6% 뿌리 생육과 28.4%의 생육 감소를, *Collectoricum spp.*균 처리시 무처리 보다 79.2% 뿌리 생육을 보여 20.8%정도 생육억제를 보였다. P-10계통의 식물체는 *F. oxysporum*균 처리시 무처리에 비해 87.6%뿌리 생육을 보여 12.4%정도 생육억제를 보였다. *P. infestanse* 균 처리시 무처리에 비해 72.3%뿌리 생육을 보여 27.7%정도 생육억제를 보였다. 또한 *Collectoricum spp.*균 처리시 무처리에 비해 79.3% 뿌리 생육을 보여 20.7%정도 생육억제를 보였다. 이러한 결과를 통하여 PAP유전자로 형질전환된 식물체의 처리구 중 P-3, P-10계통이 비교적 양호한 결과를 보임으로써 품종선발 및 등록에 양호할 것으로 사료된다.

AFP유전자로 형질전환 계통에서는 PAP로 형질전환된 계통보다 향상된 값을 보였는데 그중 A-2, 5, 8 계통에서 보다 나은 결과를 얻을수 있었다. A-2계통에서 *F. oxysporum*균 처리시 무처리에 비해 90.5%뿌리 생육을 보여 9.5%정도 생육억제를 보였고, *P. infestanse*균 처리시 무처리에 비해 76.5%뿌리 생육을 보여 25.5%정도 생육억제를 보였다. 또한 *Collectoricum spp.*균 처리시 무처리에 비해 79.0%뿌리 생육을 보여 21%정도 생육억제를 보였다. 그러나 A-2계통에서는 A-5, 8 계통과 비교하여 병원균의 저항성은 상대적으로 좋게 나타났으나 뿌리 무게에서 A-5, 8계통에서 비교적 양호하게 나타났다. 이러한 결과를 통하여 AFP유전자로 형질전환된 식물체의 계통 중 A-5, A-8계통이 수확량과 병 저항성에서 비교적 양호한 결과를 보임으로써 품종 등록 중에 있다(Table 35).

Table 35. Disease resistant in non-transgenic and transgenic *S. buergeriana* infected by pathogens in field

Line	% of F.W of control				
	Root F.W Control	<i>F. oxysporum</i> (%)	<i>P. infestanse</i> (%)	<i>Collectoricum spp.</i> (%)	
Non-transgenic	246.1	62.7	62.9	65.5	
P-1	288.0	82.9	70.6	62.3	
P-2	293.4	67.2	64.7	73.0	
P-3	294.5	78.8	71.6	79.2	
Transgenic	P-4	312.5	69.9	70.1	52.3
plant	P-5	302.5	58.6	68.7	55.2
(PAP)	P-6	289.5	70.4	66.0	66.4
	P-7	372.0	71.6	62.9	65.3
	P-8	323.1	77.9	64.5	70.4
	P-9	334.1	75.2	72.0	76.1
	P-10	298.3	87.6	72.3	79.3
	A-1	285.5	59.3	63.9	50.1
	A-2	293.0	90.5	76.5	79.0
	A-3	307.5	71.9	80.2	73.7
Transgenic	A-4	351.2	67.8	55.5	58.3
plant	A-5	451.5	87.7	82.5	77.3
(AFP)	A-6	313.0	72.6	70.1	72.1
	A-7	383.5	73.1	60.9	67.0
	A-8	310.5	84.4	75.5	83.9
	A-9	381.5	78.4	73.8	70.8
	A-10	353.1	77.1	82.5	74.5

카. 병저항성 계통의 수량성 검정

10a당 형질전환된 현삼 뿌리 무게의 평균값을 조사한 결과 (Table 36), 형질 전환 되지 않은 현삼보다 PAP, AFP유전자로 형질전환된 현삼 식물체가 비교적 양호하였다. 그 중 P-7, 9 및 A-5, 7, 9계통에서 뿌리 무게가 형질전환 되지 않은 식물체보다 양호한 결과를 나타내었다. 또한 형질전환된 식물체의 각 계통의 평균값을 비교한 결과 PAP의 경우 형질전환 되지 않은 현삼의 뿌리 무게에 비하여 26.7%의 증가를 보였으며, AFP의 경우에는 40%의 증가를 나타내어 형질전환 식물체의 육성이 병저항성의 발현 뿐만 아니라 수량성에도 영향을 미치는 것으로 판단된다.

Table 36. Comparison of root weight and harvesting rate in non-transgenic and transgenic plant in field

Line	Root weight (kg/10a)	Increased harvesting rate(%)	
Non-transgenic		1,476	
P-1	1,728±203.7	17.1	
P-2	1,760±228.7	19.2	
P-3	1,767±100.8	19.7	
P-4	1,875±99.8	27.0	
Transgenic plant (PAP)	P-5	1,815±173.7	23.0
	P-6	1,737±198.2	17.7
	P-7	2,232±114.7	51.2
	P-8	1,938±198.2	31.3
	P-9	2,004±114.7	35.8
	P-10	1,788±84.2	21.1
LSD	236.72		
A-1	1,713±188.7	16.1	
A-2	1,758±199.7	19.1	
A-3	1,845±258.7	25.0	
A-4	2,107±184.6	42.8	
Transgenic plant (AFP)	A-5	2,706±107.7	83.3
	A-6	1,878±76.2	27.2
	A-7	2,301±97.8	55.9
	A-8	1,863±131.4	26.2
	A-9	2,289±243.9	55.1
	A-10	2,118±183.7	43.5
LSD	262.19		

## 참고 문헌

### 제 2장

- 채영암, 박상언. 1993. 천궁에서 캘러스유도와 식물체재생. 한육지. 25:230-234
- 채영암, 박상언. 1993. 지황의 캘러스유도와 현탁배양에서 체세포 배발생. 한약지.1:184-190
- 채영암, 박상언, 김행훈. 1993. 현삼 잎조직에서 직접 체세포배 발생을 통한 식물체 재생. 식물조직배양학회지. 20: 125-128.
- 채영암, 박상언. 1994. 천궁 현탁배양에서 체세포배의 발생과 식물체 재생. 한약지. 26:177-181.
- 채영암, 박상언. 1994. 천궁의 현탁배양에서 탄소원과 질소원이 체세포배형성에 미치는 영향. 한약지. 2:44-50.
- 채영암, 박주현. 1999. 지황의 액체배양에서 탄소원, 질소원 및 pH가 직접 체세포배 형성에 미치는 영향. 한약지. 7(1):1-6.
- Jiang, L.C. and W.Y. Mao. 1979. Callus formation and plantlet regeneration of *Rehmannia glutinosa*. Chin. Med. Herb. Lett. 2: 41
- 고은정, 채영암. 2001. 지황 신초의 유도과 신장에 미치는 Thidiazuron과 Paclobutrazol의 영향. 약작지. 9(2):146-149.
- Heyerdahl, P.H., O.A.S. Olsen and A.K.Hvoslef-Eide.1995. Engineering aspects of plant propagation in bioreactors. In. eds by Aitken-Christie, J., T. Kozao and M.A.L. Smith., Kluwer press. pp87-124.
- Mao, W.Y., Q.Q. Liu., C.S. Yu. and B.M. Zhu. 1983. Studies on the meristim culture of *Rehmannia glutinosa*. Chin. Bull Bot.. 1:44-46
- Mao, W.Y., X.G. Li and B.M. Zhu.1985. Lp-824, New strain of *Rehmannia glutinosa* from the culture of leaf explants. In: Proc. Rep. *Rehmannia glutinosa* new strains obtained from tissue culture. Shandong Branch. Chin. Med. Comp. 17-21.
- Matsumoto, M., M. Nagano and Y. Shoyama. 1986. New vegetative propagation method of *Rehmannia glutinosa*. Shayakugaku zasshi. 40:193-197.
- 박주현, 채영암. 1995. 천궁 현탁배양에서 체세포배 동조화, 저장 및 식물체 재분화. 한육지. 27:163-169
- 박주현, 박상언, 채영암. 1995. 지황의 현탁배양에서 체세포배 형성에 관여하는 요인분석과 체세포배의 Encapsulation. 한약지. 3:100-106.

- 박주현, 채영암. 1997. 지황의 액체배양에서 식물생장조정제와 치상 조직이 직접 체세포배 형성에 미치는 영향. 한약지. 5(4) : 289-293.
- 박주현, 송지숙, 옥현충, 임완상, 채영암. 1999. 지황과 현삼에서 배양전 저장 온도가 기간이 직접 체세포배 형성에 미치는 영향. 한약지. 7(1):7-10.
- 박주현, 채영암. 2000. 생물반응기에서 지황의 싹초 형성에 관여하는 요인. 약학지. 8(2):123-128.
- Shoyama, Y.M. Nagano and I. Nishioka. 1983. Clonal multiplication of *Rehmannia glutinosa*. *Planta Med.* 48:124-125
- Alexander I.Kuklin et al., 1994. Alfalfa embryo production in airlift vessels via direct somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 38 : 19-23.
- Dana Cazzulino et al., 1991. Bioreactors and image analysis for scale-up and plant propagation. In : "Scale-up and automation in plant cell propagation(I.K.Vasil eds.)". pp.147-177. Academic press.
- Motomu Akita and Shinsaku Takayama. 1994. Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control. *Plant Cell Report.* 13 : 184-187.
- Shigeo Nishimura et al., 1993. Bioreactor culture of somatic embryos for mass propagation of plants. In : "Synseed(K.Redenbaugh eds.)". pp.176-181. CRC press.
- T. H. H. Chen et al., 1987. In vitro production of alfalfa Somatic embryos in fermentation system. *J. Ferment. Technol.* 65(3):353-357.
- 유창연, 김정률, 정재영, 임정대, 채영암. 1999. Fusaric acid 저항성 지황 세포주 선발 및 식물체 재분화. 한약지. 7(4):245-250.
- Veronique Jay et al., 1992. Bioreactor studies on the effect of dissolved oxygen concentrations on growth and differentiation of carrot cell cultures. *Plant Cell Report.* 11 : 605-608
- Veronique Jay et al., 1994. Bioreactor studies of the effect of medium pH on carrot somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 36 : 205-209.
- Akihiro Okamoto, S. Kishine, T. Hirosawa, and A. Nakazono. 1996. Effect of oxygen-enriched aeration on reeneration of rice cell culture. *Plant Cell Report.* 15:731-736

F. Mavituna and S. Buyukalaca 1996. Somatic embryogenesis of pepper in bioreactors : a study of bioreactor type and oxygen-uptake rates. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46 : 327-333

### 제 3장

- 채영암, 박상언. 1993. 천궁에서 캘러스유도와 식물체재생. 한육지. 25:230-234
- 채영암, 박상언. 1994. 천궁 현탁배양에서 체세포배의 발생과 식물체 재생. 한육지. 26:177-181.
- 채영암, 박상언. 1994. 천궁의 현탁배양에서 탄소원과 질소원이 체세포배형성에 미치는 영향. 한약지. 2:44-50.
- 한석훈, 채영암. 2000. 생물반응기에서 현삼의 신초 형성과 발근. 약작지. 8(2):117-122.
- 한석훈, 채영암. 2001. 생물반응기 생산 현삼 신초의 순화에 미치는 배지의 영향. 약작지. 9(1):62-67.
- Heyerdahl, P.H., O.A.S. Olsen and A.K.Hvoslef-Eide.1995. Engineering aspects of plant propagation in bioreactors. In. eds by Aitken-Christie, J., T. Kozao and M.A.L. Smith., Kluwer press. pp87-124.
- 임완상, 채영암. 2000. 현삼에서 탄소원과 질소원의 종류와 농도가 기내 식물체 분화에 미치는 영향. 약작지. 8(1):9-13.
- 박주현, 채영암. 1995. 천궁 현탁배양에서 체세포배 동조화, 저장 및 식물체 재분화. 한육지. 27:163-169
- 박주현, 송지숙, 옥현충, 임완상, 채영암. 1999. 지황과 현삼에서 배양전 저장 온도가 기간이 직접 체세포배 형성에 미치는 영향. 한약지. 7(1):7-10.
- 송지숙, 임완상, 채영암. 1998. 현삼의 액체배양에서 체세포배 형성에 대한 치상조직과 성장조절제의 영향. 한약지. 6(4):294-298.
- 유창연, 성은수, 임정대, 황선애, 채영암. 2001. Agrobacterium을 이용한 PAP 유전자의 현삼으로 도입 및 형질발현. 약작지. 9(2):156-165.

### 제 4 장

Andersen,M.D., Jensen,A., Robertus,J.D., Leah,R., Skriver,K., Heterologous expression and characterization of wild-type and mutant forms of a 26 kDa endochitinase from barley (*Hordeum vulgare* L.), BIOCHEM. J. 1997 vol. 322, no. 3, pp. 815-822

- Gal,SangWan, Choi, Ji-Young, Kim, Cha-Young, Hwa, Cheong-Yong, Choi, Young-Ju, Bahk, Jeong-Dong, Lee, Sang-Yeol, Cho, Moo-Je, Isolation and characterization of the 54-kDa and 22-kDa chitinase genes of *Serratia marcescens* KCTC2172, *FEMS MICROBIOL. LETT.* 1997 vol. 151, no. 2, pp. 197-204
- Mohamed, F., Sehgal, O.P., Characteristics of pathogenesis-related proteins induced in *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto following viral infection, *J. PHYTOPATHOL.* 1997 vol. 145, no. 2-3, pp. 49-58
- Watanabe, T., Kono, M., Isolation of a cDNA encoding a chitinase family protein from cuticular tissues of the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*, *ZOOL. SCI.* 1997 vol. 14, no. 1, pp. 65-68
- Miyashita, K., Fujii, T., Watanabe, A., Ueno, H., Nucleotide sequence and expression of a gene (*chiB*) for a chitinase from *Streptomyces lividans*, *J. FERMENT. BIOENG.* 1997 vol. 83, no. 1, pp. 26-31
- Wang, S.L., Chang, W.T., Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium, *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 1997 vol. 63, no. 2, pp. 380-386
- Chernin, L.S., De-la-Fuente, L., Sobolev, V., Haran, S., Vorgias, C.E., Oppenheim, A.B., Chet, I., Molecular cloning, structural analysis, and expression in *Escherichia coli* of a chitinase gene from *Enterobacter agglomerans*, *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 1997 vol. 63, no. 3, pp. 834-839
- Pan, C.-H., Rhim, S.-L., Kim, S.I., Expression of two cDNAs encoding class I chitinases of rice in *Escherichia coli*, *BIOSCI. BIOTECHNOL. BIOCHEM.* 1996 vol. 60, no. 8, pp. 1346-1348
- Hudspeth, R.L., Hobbs, S.L., Anderson, D.M., Grula, J.W., Characterization and expression of chitinase and 1,3-beta-glucanase genes in cotton, *PLANT MOL. BIOL.* 1996 vol. 31, no. 4, pp. 911-916
- Wubben, J.P., Lawrence, C.B., De-Wit, P.J.G.M., Differential induction of chitinase and 1,3-beta-glucanase gene expression in tomato by *Cladosporium fulvum* and its race-specific elicitors, *PHYSIOL. MOL. PLANT PATHOL.* 1996 vol. 48, no. 2, pp. 105-116
- Andreeva, N.B., Sorokina, T.A., Khmel, I.A., Chitinolytic activity of pigmented

- Pseudomonas and Xanthomonas bacteria, MICROBIOS 1996 vol. 87, no. 350, pp. 53-57
- Kim,Y.J., Hwang,B.K., Purification, N-terminal amino acid sequencing and antifungal activity of chitinases from pepper stems treated with mercuric chloride, PHYSIOL. MOL. PLANT PATHOL. 1996 vol. 48, no. 6, pp. 417-432
- Lawrence,C.B., Joosten,M.H.A.J., Tuzun,S., Differential induction of pathogenesis-related proteins in tomato by Alternaria solani and the association of basic chitinase isozyme with resistance, PHYSIOL. MOL. PLANT PATHOL. 1996 vol. 48, no. 6, pp. 361-377
- Raharjo,S.H.T., Hernandez,M.O., Zhang,Y.Y., Punja,Z.K., Transformation of pickling cucumber with chitinase-encoding genes using Agrobacterium tumefaciens, PLANT CELL REP. 1996 vol. 15, no. 8, pp. 591-596
- Dumas-Gaudot,E., Slezack,S., Dassi,B., Pozo,M.J., Gianinazzi-Pearson,V., Gianinazzi,S., Barea,J.M., Calvet,C., Estaun,V., Camprubi,A.(eds.), Plant hydrolytic enzymes 1. (chitinases and beta -1,3-glucanases) in root reactions to pathogenic and symbiotic microorganisms, Meeting on Arbuscular Mycorrhizas in Sustainable Soil-Plant Systems, Barcelona (Spain), 27-30 Apr 1995
- Ludwig-Mueller,J., Thermann,P., Pieper,K, Hilgenberg,W., Peroxidase and chitinase isoenzyme activities during root infection of Chinese cabbage with Plasmodiophora brassicae, PHYSIOL. PLANT. 1994 vol. 90, no. 4, pp. 661-670
- Ignatius,S.M.J., Chopra,R.K., Muthukrishnan,S., Effects of fungal infection and wounding on the expression of chitinases and beta-1,3-glucanases in near-isogenic lines of barley, PHYSIOL. PLANT. 1994 vol. 90, no. 3, pp. 584-592
- Nielsen,K.K., Jorgensen,P., Mikkelsen,J.D., Antifungal activity of sugar beet chitinase against Cercospora beticola: An autoradiographic study on cell wall degradation, PLANT PATHOL. 1994 vol. 43, no. 6, pp. 979-986

제 5 장

- Dean V. J, Gronwald J. W. and Eberlein C. V. 1990. Induction of glutathione s-transferase isozyme in sorghum by herbicide antidotes. *Plant Physiol.* 92:267-473
- Hasegawa, T., koike, K., Takahashi, S., and Ariyoshi, U. (1982). constituents of leaves and rots of kaikai Jio(*Rehmannia glutinosa* Libosch. formahueichingensis Hsiao)Shoyo kugaku Zasshi, 36 : 1-6.
- Shahin, E. A. and R. Spivey. 1986. A single domant gene for *Fusarium* wilt resistance of protoplast-derived tomato plant. *소택. Appl. Genet.* 73. 164-169.
- Vogel, E. W., Nivard M. J. M. 1994. The subtlety of alkylating ahents in reactions with biological macromolecules. *Mutation Res.* 305. 13-32.
- 甘僞宋. 1986. 藥用植物학. 國立中國醫藥研究所. 臺北
- 이은중, 이영희. (1991). 약용작물 병해도감. 농촌진흥청. pp. 108-117.
- 中國藥用植物栽培學. 1991. 農業出版社. 北京
- 中藥資源學. 1993. 中國醫藥科技出版社. 北京
- 최민식, 박재성, 조진태, 손석영. (1995). 지황재배시 복토깊이가 수량 및 품질에 미치는 영향. 약작지. 3(2) : 120-124

제 6 장

- Chae, Y. A., S. U. Park and H. H. Kim. 1993. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explant of *Scrophularia buergeriana*. *Kor. J. Plant Tissue culture.* 20 : 125-128.
- Dean V. J, Gronwald J. W. and Eberlein C. V. 1990. Induction of glutathione s-transferase isozyme in sorghum by herbicide antidotes. *Plant Physiol.* 92:267-473
- Houston, L. L., Ramakrishnan, S. and Hermodson, M. A.(1983) *J. Biol. Chem.* 258. 9601-9604
- Lim, W. S., Y. A. Chae(2000). Effects of carbon and nitrogen sources on the shoot formatton in bioreator culture of *Scrophularia buergeriana* Miquel.

- Korean J. Medicinal Crop Sci.)8(1) : 9-13
- Shahin, E. A. and R. Spivey. 1986. A single dominant gene for Fusarium wilt resistance of protoplast-derived tomato plant. Theor. Appl. Genet. 73:164-169
- Song, J. S., W. S. Lim and Y. A. Chae(1998). Effect of explants and growth regulators on direct somatic embryogenesis in liquid culture of *Scrophularia buergeriana*. Korean J. Me<sup>o</sup>l. Crop Sci6 : 294-298
- Terras, F. R., Schoots, H. M. E., De Bolle, M. F. C., Van Leuven, F., Rees, S. B., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. S., Broekaert, W. F. (1992). Analysis of two novel classes of antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.* 267 : 15301-15309
- Vogel E. W., Nivard M. J. M. 1994. The subtlety of alkylating agents in reactions with biological macromolecules. *Mutation Res.* 305. 13-32
- 김규원, 백기화, 정근식, 정재동, 최광태. 1995. 식물조직배양 기술(4) : p27-28, p53-54
- 金洙哲, 安相得, 李相來 (1994) 原色白頭山資源植物. 아카데미서적. p:591
- 육창수. 1989. 原色韓國藥用植物圖鑑. 아카데미서적