

GOVP1200609021

최 종
연구보고서

차나무 육종을 위한 유전특성분석과 효과적인 번식방법 개발

Genetic analysis of characteristics for tea breed-
ing and development of tea propagation

연구 기관

순천대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “차나무 육종을 위한 유전특성분석과 효과적인 번식방법 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 11월 10일

주관연구기관명 : 순천대학교

총괄연구책임자 : 이 선 하

세부책임자 : 배 창 휴

연 구 원 : 허 상 모

연 구 원 : 이 백 령

연 구 원 : 장 석 형

연 구 원 : 황 세 회

협동연구기관 :

전남농업기술원 차시험장

협동연구책임자 : 박 인 진

연 구 원 : 김 길 자

연 구 원 : 김 주 회

연 구 원 : 김 정 운

연 구 원 : 최 정

요 약 문

I. 제 목

차나무 육종을 위한 유전특성분석과 효과적인 번식방법 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 차나무 유전자원의 특성조사 및 성분 분석

본 과제를 수행하는 동안 차나무 유전자원 113점을 수집하였다. 삼수 49점과 종자 54점을 수집하여 삼목 및 파종하여 특성을 파악중에 있다.

국내외 유전자원 150점을 대상으로 형태적 형질은 엽면적 등 33항목, 성분은 총질소 총아미노산 등 6항목을 조사 분석하여 자료화하였다. 형태조사, 성분분석을 통해 우수한 형질을 가진 개체를 선발하고 교잡육종을 실시할 경우 효율적인 형질조합이 가능할 것이다. 또한 변이의 폭이 큰 형질을 보유한 유전자원을 교잡친으로 활용하여 목적형질의 육종년한을 단축시킬 수 있을 것이다.

이렇게 얻어진 차나무 유전자원 150종의 특성 39항목과 잎의 모양 등 사진 3종류를 컴퓨터에 입력하여 관리하면서 DB 프로그램을 개발하였다. 이 프로그램은 입력(수정)창, 검색창으로 구성하였고, 입력창에서는 조사기준 항목인 품종명, 엽면적, 엽폭 등 39개 항목과 사진을 입력하였다. 검색창은 주요특성 검색, 특성조합과 사진 검색으로 이루어졌으며 각각의 검색된 자료는 A4 크기로 인쇄될 수 있도록 하였다.

본 DB 자료는 차를 연구하는 연구자 뿐만 아니라 농민 등 어느 누구나 사용하기 쉽게 한글로 제작하였다.

따라서 차나무 유전자원의 DB 프로그램 개발은 급신장하는 차산업발전의 밑받침으로 차나무 육종재배가, 관련 연구기관, 신생 관련 연구기관에 귀중한 자료로 제공될 것이며 재배농가에도 품종선택과 성분 함량을 이해하는데 귀중한 자료가 될 것이다.

2. 차나무의 유전분석과 DNA maker 개발

본 연구는 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)와 SSR(Simple Sequence Repeat)의 분자생물학적 분석방법에 기초한 국내 수집 차나무 계통의 분자유전학적 특성을 밝혀 차나무 품종

육종에 필요한 기초자료를 제공하고자 수행하였다.

차나무는 타가수정하는 식물의 특성상 식물의 특성이 후대에 그대로 전해지지 않으며 해가 더해감에 따라 유전적 변이의 폭이 점점 커지고 거기에 환경적인 요소가 영향하여 계통과 품종의 육안식별이 어려운 실정이다. 따라서 DNA 수준의 유연관계 정립과 표식인자(marker)의 개발이 필요하다. PCR 기술의 발달로 primer에 따라 다형성이 다르게 나타나는 RAPD분석, AFLP 분석, 개체수준의 식별이 가능한 SSR분석이 필요하다. 특히 SSRs(simple sequence repeats)를 이용한 분석은 작은 DNA 절편과 PCR을 이용함에도 안정적이고 손쉽게 수행할 수 있으며, 이들 마커가 계통 상에 폭넓게 균일한 분포로 존재하고 멘델양식에 따라 유전한다는 점에서 유용한 분석 방법으로 평가되고 있다. 따라서 이들 분석을 통해서 차 특성의 유용유전자를 찾아내서 품종 식별과 새로운 품종 육성에 이용할 필요성이 요구된다.

3. 차나무 효과적 번식법 개발

차나무는 자가불화합성 식물로 자연상태에서 형성된 종자는 대부분 잡종종자이다. 그런데도 불구하고 우리나라 차재배 농가는 기업적인 재배지를 제외하고는 종자에 의한 번식에 의존하고 있다. 차나무는 한번 재식하면 30년 가까이 수확하게 되므로 개원시 묘목의 선택이 매우 중요하다. 종묘의 선택에서 재배농가가 종자를 주로 선택하는 원인으로는 영양번식묘의 공급이 원활하지 못한 점과 종자번식이 용이하다는 점 때문이다. 종자과중으로 얻은 실생묘는 심근성으로 개원시 초기생육에서 생장이 빠르고 환경적응력도 높아 유묘관리가 용이하기 때문에 재배농가들이 나중에 발생하는 문제를 고려하지 않고 손쉬운 방법을 택하기 때문이다. 또 한가지 문제는 영양계 삼목묘의 공급부족이다. 그래서 건전한 삼목묘를 효과적으로 육성하는 방법을 개발해서 보급해야 할 필요성이 제기된다.

차나무는 상록성 목본류로 수시로 신초가 신장하는 성질로 삼목시기 선택과 삼목 관리의 어려움으로 우리나라에서는 성공률이 그다지 높지 못한 실정이다. 그리고 발근하는데 시간을 요하므로 그동안의 관리과정에서 고사엽이 발생하는 것도 문제가 되고 있다. 일본에서는 삼목의 적기가 우기에 해당하여 온도도 상승하지 않고 담천으로 약광의 상태가 장기간 지속되고 공중습도도 높아 비교적 삼목이 용이하다. 그러나 우리나라는 이 시기에 온도가 높고, 강한 광선과 건조한 날씨로 삼목의 실패율이 높다. 그래서 우리 환경에 알맞은 번식 방법을 개발할 필요가 있는 것이다. 차나무는

폴리페놀물질인 탄닌성분 때문에 삽목에 있어서 상록수중에서도 발근이 비교적 까다로운 식물로 나타나고 있다. 삽목묘의 발근율이 높이고 정식에 알맞은 묘목을 육성하기 위해서는 삽목 시기선택, 차광정도, 관수방법, 삽목용토조제, 건묘육성방법 등이 연구되어야 할 과제라고 할 수 있다. 정식에 필요한 건전묘를 조기에 육성하는 방법으로 미생물을 살균한 비료용토의 삽목, 밀폐삽목으로 습도유지와 관수노력 절감, 풋삽목으로 근권의 보호와 이식율 향상 등의 다각적인 연구가 필요하다.

기내 번식은 조직배양에 의한 번식으로 서양란을 위시해서 카네이션, 거베라, 안개초 등 화훼류의 번식에 실용적으로 활용되고 있다. 일시에 대량번식과 무균식물 획득에 효과적이기 때문이다. 목본식물에서도 많은 연구가 이루어졌지만 실용적인 단계까지는 이르지 못하고 있다. 차나무는 다른 목본류보다 형성능이 우수해서 부정아가 쉽게 분화되는 점을 이용한다면 대량증식에 효과적으로 이용할 수 있는 가능성이 충분하여 연구의 필요성이 요구된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 차나무 유전자원의 특성조사 및 성분 분석

차나무 유전자원특성조사 및 성분분석을 위해 다음과 같은 실험을 실시하였다.

시험재료는 전남농업기술원 차시험장에서 유지 보존하고 있는 차나무(*Camellia sinensis*) 유전자원인 중국품종 5, 대만품종 3, 일본품종 6종, 한국 신품종 7종과 수집종 129계통 등 총 150계통이며 외국품종은 영양계 또는 실생계이다.

본 과제를 수행하는 동안 차나무 유전자원 113점을 수집하였다.

국내외 유전자원 150점을 대상으로 엽면적 등 형태적 형질 33항목을 측정 또는 육안관찰하여 조사하였고, 카테킨 등 화학적 성분 6항목을 차의 공정분석법에 의거 분석하여 자료화 하였다.

차나무 유전자원 150종의 형태적 특성 33항목과, 총질소, 총아미노산 등 성분 특성 6항목, 잎의 모양 등 사진 3종류를 컴퓨터에 입력하여 관리하면서 DB 프로그램을 개발하였다. 차나무 유전자원 데이터베이스 프로그램은 입력(수정)창, 검색창으로 구성하였으며 품종(계통)의 특성을 한눈에 알아보고 비교할 수 있도록 만들었으며 차 연구관계자, 농민 등 누구나 쉽게 활용할 수 있도록 개발하였다.

2. 차나무의 유전분석과 DNA maker 개발

본 연구는 우리 나라 차수집종의 유전특성분석과 분자마커개발을 위하여 아래와 같이 수행하였다.

RAPD를 이용한 DNA marker 개발로 차 유전자원의 RAPD 마커를 이용한 유전적 특성분석과 Polymorphic band를 이용한 DNA marker를 개발하였다.

AFLP를 이용한 DNA marker 개발로 AFLP분석의 최적 제한효소조합 구명, AFLP에 따른 DNA marker 개발, AFLP에 따른 유전적 다양성분석 및 분자마커개발을 수행하였다.

SSR-PCR에 따른 DNA marker 개발로 SSR-PCR 적정조건구명, Polymorphic band 선발과 SSR-PCR에 따른 DNA marker 개발을 실시하였다.

3. 차나무의 효과적 번식법 개발

효과적인 차나무의 영양계 번식 방법으로 밀폐삽목, 포트삽목, 기내 번식 방법에 대해서 연구 개발을 추진하였다.

밀폐삽목은 길이 50m× 폭 5m 비닐 하우스내와 포장에 폭 90cm 터널을 만들어 비닐을 덮고, 50% 차광막으로 차광처리한 삽목상에서 실험을 실시하여 삽목하였다. 삽목시기는 신초가 신장 후 정지기인 6월, 8월, 10월을 택하여 실시하였다. 삽목용토는 마사토와 펄라이트를 1:1로 배합하여 사용하였고, 품종은 주품종으로 야부키타를 이용하였으며, 품종비교에서는 Yabukita, Meiryoku, Okumidori, 참록, 명선, 야생차를 사용하였다.

실험은 밀폐 삽목에 영향을 주는 요소를 중심으로 11종류로 나누어 실시하였다. 그 실험의 종류는 용토별 삽목 비교, 삽수조건에 따른 삽목, 비료 및 유기질 처리, 식물생장조절제의 효과, 토양미생물이 삽목에 미치는 영향, 온도의 영향, 밀폐 방식에 따른 삽목의 영향, 밀폐 방식에 따른 삽목의 영향, 차광정도가 삽목에 미치는 영향, 발근의 조직 해부학적 분석과 차나무와 다른 상록수와 삽목 비교하는 실험이었다.

차나무와 다른 상록수와 비교는 아왜나무, 사철나무, 은목서, 치자, 서향, 식나무, 호랑가시, 동백을 사용하였다. 용토별 삽목 비교는 마사토, 펄라이트, 버미큐라이트, 피트모스, 마사토+펄라이트, 버미큐라이트+펄라이트, 부엽토+마사토로 구분하였다. 삽수조건에 따른 삽목은 첫째마디, 둘째마디, 셋째마디, 넷째마디 중 삽목에 알맞은 부위를 알아보는 실험과 삽목에 적당한 잎수를 알아보기 위하여 잎 반장, 잎 한 장, 잎

두장, 잎 세장을 부착하는 실험과 저장기간을 2일, 4일, 6일, 8일, 10일로 하는 실험을 실시하였다. 비료 및 유기질 처리는 비료와 유기질을 일정 비율로 삼목용토에 섞어서 비교하는 실험을 실시하였다. 식물생장조절제의 효과는 IBA 10ppm, IBA 50ppm, IBA 100ppm, IAA 100ppm, NAA 100ppm 용액을 사용하였다. 온도의 영향에 대해서는 15℃, 25℃, 35℃, 의 growth chamber와 온실내 상온처리 실험을 하였다. 밀폐 방식에 따른 삼목의 영향을 알아보기 위해서는 비닐과 차광막 1중처리와 2중처리 실험을 실시하였다. 차광정도가 삼목에 미치는 영향은 차광 0%, 25%, 50%, 75%처리 실험과 삼수의 1일, 2일, 3일, 4일, 5일 암흑처리를 실험을 실시하였다.

포트삼목법을 개발하기 위하여 포트 종류는 연결식 종이포트, 비닐포트, 지피포트, 바이오 포트, 공정육묘판 5종류를 이용하였다. 종이포트는 일본(Nippon Beet Sugar MFG. Co.)에서 개발한 80개 cell이 연결된 연결 종이포트로 한개의 cell은 길이 15cm, 직경 6cm의 6각형으로 되어 있다. 지피포트는 peat moss로 만들어진 것이다. 마대포트는 자체 개발한 포트로서 통기성이 좋은 재질로 길이 14cm 직경 10cm가 되게 만들었다. 공정육묘판은 직경 8cm cell 이 20개 있는 20공구 육묘판을 사용하였다. 삼목 방법은 각 포트에 마사토를 넣고 처리당 30분씩 삼수를 일한 장씩 부착하도록 조제하고 삼목을 실시하고 삼목한 포트는 차광막을 설치한 비닐하우스의 미스트실에 옮겨서 2시간 간격으로 미스트 관수하도록 관리하였다. 종이 포트에서 품종간 삼목율의 변화를 알아보기 위하여 Yabukita, Meiryoku, 참록, 명선 보향의 5품종을 사용하였다. 토양미생물이 삼목에 미치는 영향에 대해서는 마사토, 퍼라이트, 질석, 피트모스, 발효, 배양토, 부엽토 7종류의 삼목용토에 삼목을 실시하고 각 용토에서 발생하는 미생물과 삼수에 발생하는 미생물을 조사하였다. 발근의 조직 해부학적 분석은 차나무 발근과정을 조직 해부학적으로 분석하기 위하여 삼목 후 2일 간격으로 삼수줄기를 microtome으로 10~20um로 절단하여 광학현미경으로 근원기 발생 과정을 관찰하였다.

기내 번식은 무균묘의 대량증식을 목적으로하는데 주로 조직배양 기술을 확립하는 것이다. 잎절편 배양과 줄기절편 배양을 이용해서 callus 증식과 shoot 증식을 유도하는 실험을 실시하였다. 배지는 MS 배지, Agar 0.8%, Sugar 3%에 pH 5.8로 조절하였고 식물호르몬은 IAA, NAA, BA, Kinetin을 조합하여 첨가하였다. 치상 후 16시간 일장, 25℃ 온도의 배양실에서 배양하였다. 줄기 절편 배양에서는 액아를 붙여 채취하는 시기는 5엽 전개기로 신초의 절간을 이용하였다. 성장점 방향으로부터 제 1,

제 2, 제 3 및 제 4 절간별로 나누어 시료의 크기를 1cm길이로 절단하여 치상하였다. 품종은 참록, 보향, 야부키타 품종을 이용하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 차나무 유전자원의 특성조사 및 성분 분석

본 과제를 수행하는 동안 차나무 유전자원 113점을 수집하였다. 삼수 49점과 종자 54점을 수집하여 삼목 및 과종하여 유목기 생육 특성을 파악중에 있으며 묘상선발과정을 거치면서 성목기까지 계속적인 특성평가를 할 예정이다.

국내외 유전자원 150점을 대상으로 형태적 형질은 엽면적 등 33항목, 성분은 총질소 등 6항목을 조사 분석하여 자료화 하였다. 유전자원의 조만성은 조생종 16%, 중생종 43%, 만생종이 41%로 중생종과 만생종이 주를 이루고 있었고 엽면이 딱딱한 것과 부드러운 것이 50 : 50 수준으로 분포하였다. 엽광택은 중간정도가 47%로 가장 많았고 약간 있는 것 28%, 많은 것이 25%순이었다. 엽형은 작은 타원형이 37%, 큰 타원형이 28% 순이었으며 엽의 형태별로 골고루 분포하는 경향이였다. 엽면 주름은 중간정도가 47%, 소가 40%로 주름이 적은편이었다. 모용특성으로 조사종의 99%가 가는 모용을 갖은 것으로 조사되었으며 73%인 전체에 넓게 분포하는 것으로 분석되었다. 꽃의 크기를 대, 중, 소로 구분하여 조사한 결과 중(3.1~4.5cm)이 74%로 가장 많았으며 소는 15%, 대는 11%수준이었다. 암술과 수술의 길이가 같은 것이 40%로 가장 많았으며 암술이 수술보다 길어서 수술위로 올라온 것이 35%, 암술이 더 짧은 것이 25% 였다. 주두 분기점은 가운데 부분(35~65%)에서 분기되는 것이 전체 57%로 가장 많았으며 그 다음으로 35%이하에서 분기되는 것이 30%, 65% 이상의 높이에서 분기되는 것이 13%순으로 나타났다.

성분분석 결과 감칠맛을 내는 총질소 함량은 6.31 ~ 3.13사이에 분포하였으며 평균 4.35%였다. 차의 구수한 감칠맛을 내는 성분인 총아미노산은 보성 Bosung 10호가 3,120mg/100g으로 가장 많았고 그 다음이 Bosung 2호가 3,020mg/100g, BS72계통이 2,900mg/100g순이었다. 범위는 299 ~ 3,120mg/100g이었고 평균 1,480mg/100g이었다. 엽록소 함량은 247 ~ 757mg/100g 사이에 분포하였고 탄닌은 최고 4.68에서 최저 11.28%였으며 평균 7.27%, 카페인 함량은 0.55 ~ 3.7% 사이에 분포하였으며 함량이 매우 낮은 BS115계통이나 BS45계통 등 저카페인 계통의 중간모본으로서 역할이 기대되며. 항산화작용, 항암작용, 혈압상승 억제작용 등 기능성물질인 카테킨은 최고 16.1%에서 4.1%사이에 분포하며 평균 함유량은

9.5%였다. BS63, BS65, BS66 등은 고카테킨 계통으로 중간모본으로 적당한 계통으로 사료된다. 이렇게 형태 및 성분 분포에서 유전자원간 변이의 폭이 크게 나타났으며 이후 육종의 소재로 활용하고자 한다.

차나무 유전자원 150종의 형태적 특성 33항목과, 총질소, 총아미노산 등 성분 특성 6항목, 잎의 모양 등 사진 3종류를 컴퓨터에 입력하여 관리하면서 DB 프로그램을 개발하였으며 그 결과는 다음과 같다.

이 프로그램은 입력(수정)창, 검색창으로 구성하였고, 입력창에서는 조사기준 항목인 품종명, 엽면적, 엽폭 등 39개 항목과 사진을 입력하였다. 검색창은 주요특성 검색, 특성조합과 사진 검색으로 이루어졌으며 각각의 검색된 자료는 A4 크기로 인쇄될 수 있도록 하였다.

본 DB 자료는 차 육종재배 연구자 뿐만 아니라 농민, 차 애호가 등 어느 누구나 사용하기 쉽게 한글로 제작하였다.

따라서 차나무 유전자원의 DB 프로그램 개발은 급신장하는 차산업발전의 밑받침으로 차나무 육종재배가, 관련 연구기관, 신생 관련 연구기관에 귀중한 자료로 제공될 것이며 재배농가에도 품종선택과 성분 함량을 이해하는데 귀중한 자료가 될 것이다.

2. 차나무의 유전분석과 DNA maker 개발

차 45계통을 RAPD 및 유전분석 하여 얻어진 결과를 정리하면 다음과 같다.

(1) RAPD 분석용 시료수집 및 PCR적정조건을 결정하였다. (2) 45종 차에 대하여 80개 primer를 사용하여 RAPD 분석하였으며, 이중 다형성을 보이는 primer 20종을 선발하였다. (3) Clustering 분석과 유전적 거리에 의한 유전적 다양성분석결과 수집 계통들 간에 높은 원연관계를 나타내었으며, 유전적 변이를 많이 포함하고 있을 것으로 평가되었다. (4) RAPD에 기초한 재현성 있는 DNA marker를 선발 중에 있으며, OPA-13 primer 사용시 4번 계통에서 특이밴드가 증폭되었다. (5) 증폭된 특이밴드를 크로닝 하여 염기서열을 결정하였다.

차 수집종 집단의 분자유전학적 특성을 검토하기 위하여 한국 수집종 32계통, 대만종 3품종, 중국종 4품종, 일본종 6품종, 총 45 수집계통에 대하여 AFLP를 수행한 결과, 총 382개 DNA 밴드 중 다형밴드수는 335개로 다형성 비율은 87.7%였다. 총 45 수집계통 간의 유사도지수는 0.05~1.00 범위였고, 한국 수집계통간의 유사도지수는 0.10~0.95로 넓게 분포하였다. 이는 총 수집계통뿐만 아니라 한국수집종간에도 높은 유전

적 다양성이 있음을 시사해준다. 군집분석 결과 총 45 수집계통이 6개 그룹으로 나뉘었다. 한국수집계통의 분포를 보면 13계통은 대만, 중국, 일본품종과는 독립적인 3, 4, 5그룹으로 나타났다. 9계통은 일본, 중국품종과 같은 1그룹에 속하였다. 10계통은 대만, 중국과 같은 2그룹에 속하였다. 그리고 6그룹은 한국수집계통이 속하지 않고 일본, 중국 품종만으로 구성되었다. 증폭된 특이밴드를 크로닝 하여 염기서열을 결정하였다.

차 수집종 집단의 분자유전학적 특성을 검토하기 위하여 한국 수집종 32계통, 대만종 3품종, 중국종 4품종, 일본종 6품종, 총 45 수집계통에 대하여 SSR분석을 수행한 결과, 총 DNA 밴드수 92개 중 87%가 다형성을 나타냈다. 80개의 다형성 DNA 밴드 중 27개가 계통 특이적으로 나타났으며, 이 DNA 밴드는 동정을 통해 차나무 개체식별에 활용될 수 있을 것이다. 총 45 수집계통 간의 유사도지수는 0.10~1.00 범위였고, 한국수집계통간의 유사도지수는 0.10~0.97로 나타났다. 군집분석 결과 총 45 수집계통이 7개 그룹으로 나뉘었다. 한국수집계통은 제4그룹을 제외한 나머지 그룹에 모두 분포하였으며, 이 중 3, 5, 6, 7그룹은 한국 수집종만으로 구성되었다. 증폭된 특이밴드를 크로닝 하여 염기서열을 결정하였다. 이와 같이 SSR 분석을 통하여 본 연구에서 사용된 한국 수집계통은 높은 유전적 다양성을 가지고 있음을 확인할 수 있었으며, 이 수집 차나무집단은 차의 품종육성을 위한 유전자원으로 활용가치가 있을 것으로 기대된다.

분자생물학적 분석기법을 통하여 우리나라 차수집종에서 분석된 유전특성은 차육종의 기초자료로서 활용되고 개발된 분자마커를 이용하여 차 품종 식별에 활용할 수 있는 토대를 구축하였으므로 추후 이의 활용이 기대된다.

3. 차나무의 효과적 번식법 개발

차나무와 다른 상록수 아왜나무, 식나무, 사철나무, 은목서, 호랑가시, 서향과 같이 삼목을 실시한 결과, 아왜나무, 사철나무, 식나무가 삼목율이 매우 높고, 은목서, 동백, 차나무가 저조했다. 서향은 거의 발근되지 않았다. 차나무가 다른 상록수와 비교할 때 삼목번식이 방법에 따라서는 용이하지 않음을 알 수 있었다.

밀폐삼목의 삼목용토로 사용한 7가지 삼목용토중에서 마사토와 마사토+퍼라이트 삼목이 가장 양호하였다. 마사토, 퍼라이트의 배수성이 양호한 결과라고 판단된다. 삼수는 7-8마디 중에서 2-3마디의 발근이 좋았다. 삼수의 잎은 2장 부착이 가장 높은

발근율을 보이고 있으나 한장 삽수도 큰 차이가 없어 삽수확보와 삽목면적의 효율성 면에서 한 장의 잎을 부착시켜 삽목하는 것이 효과적이라고 할 수 있다. 삽수는 채취 후 바로 삽목을 실시하는 것이 가장 바람직하나 5℃의 냉장저장은 5일정도까지 삽목을 감소없이 저장이 가능한 것으로 나타났다. 화학비료나 유기질을 섞어서 삽목한 경우 현저하게 삽목율이 저하하는 현상을 가져왔다. 그러나 발근 후 생육에서는 양호한 생육을 보여주고 있었다. 식물생장조절제는 IBA 100ppm 침지처리가 가장 효과적이었다. 삽목의 온도의 영향은 35℃ 이상 고온은 고사율을 증가시키는 원인이고 15℃ 이하 온도는 발근력을 저하시키는 결과를 초래하여 25℃에서 삽목에 적정온도라는 것이 밝혀졌다. 밀폐 방식에 따른 삽목의 영향에서는 2중으로 터널을 만들어 터널과 터널사이에 공간을 만드는 것이 밀폐에 따른 온도상승을 어느정도 억제시키는 효과가 있어 삽목율을 높이는 데 효과가 있었다. 차광정도는 25%차광에서 발근율과 뿌리 발육이 좋은 것으로 나타났고 차광이 50%, 75% 높을수록 발근율이 저하하는 결과를 초래하였다. 삽목전에 암흑처리는 효과적으로 작용하지 못하는 결과로 나타났다.

종이 포트, 지피 포트, 비닐 포트, 바이오 포트, 플러그 육묘 상자에 삽목을 실시한 결과, 비닐 포트 삽목의 삽목율이 85.1%로 높게 나타났으나 발근수는 다른 포트에 비해서 감소하였다. 발근율은 수분보유력이 높은 결과에서 비롯된 것으로 생각되고 발근율 저조는 비닐포트의 통기성 부족에서 기인하는 것으로 생각된다. 마대로 만든 바이오 포트와 일본에서 개발한 연결식 종이 포트가 다음으로 높은 발근율과 많은 발근수를 보여 주고 있다. 종이포트를 품종별로 삽목을 실시한 결과, 일본 육성종인 Yabukita, Meiryoku 의 발근율이 참록, 명선 보향보다 높게 나타났으며 야생종이 가장 저조한 발근율을 보이고 있다. 최장근, 생체중, 건조중에서도 경향은 비슷한 모습을 보이고 있다. 발근의 모양은 세력이 왕성한 품종일수록 줄기 전반에 뿌리가 고루 형성되는 형이 많았다. 켈루스 형성은 발근을 저해하는 경향을 보였다. 용토의 미생물은 부엽토>상토>발효>퍼라이트>질석>피트모스>마사토 순으로 미생물 숫자가 많았다. 미생물이 삽목시 고사율을 높게하는 원인으로 밝혀졌다. 그러나 일단 발근된 식물에서는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 발근의 전단계하고 할 수 있는 근원기의 형성은 삽목 후 15일경이 관찰되었으며 20일 후에는 많은 세포가 비대하기 시작하였다. 발근은 삽목 후 25일에 관찰되기 시작하였다.

기내 번식에서는 IAA와 Kinnetin을 혼합처리에서 IAA 1.0mg/l 와 Kinnetin 2.0mg/l 조합에서 신초생장과 잎수의 증가가 가장 양호한 것으로 나타났다. Callus

유도는 IAA 2.0mg/l 와 Kinetin 2.0mg/l 일 때 가장 높았으며 Callus 형성은 Kinetin농도가 높을 때 많았고 IAA도 비교적 높은 농도에서 많이 형성되는 경향으로 나타났다. Kinetin은 1.0mg/l 로 동일하게 하고 IAA만 1.0, 2.0, 3.0mg/l 로 변화를 주었을 때는 3.0mg/l 의 배지에서 시기별로 잎수의 변화가 가장 크게 나타났다. Kinetin 2.0mg/l 의 경우는 IAA 1.0mg/l 에서 많은 잎수로 나타나는 결과를 보여 주고 있다.

SUMMARY

I . Characteristics and components of tea collections

1. Characterization and component analysis for genetic resources of tea

For carrying out this study 113 genetic resources of tea were collected. 33 morphological characters such as leaf area and 6 components such as total nitrogen were analyzed and examined for total 150 genetic resources. These analysis of morphological characters and components were used to make a database. By using these data, it will be possible to select individual that have excellent character, carry out efficient cross character in cross breeding and shorten breeding period for target character using genetic resources that have character of extensive variation as crossing parent.

2. Development of database program for genetic resources of tea

The database program was developed that manage 33 morphological characters, 6 components and 3 picture for 150 genetic resources of tea respectively. This program consist of input and retrieval window. The pictures and 39 items such as the variety, leaf area, leaf width, etc. are loaded in input window. The main characters and pictures are retrieved in retrieval window, and the data retrieved are printed to A4 size.

This database program was designed using korean to make anyone as well as researcher to use easily. Therefore this database program will provide useful data to breeder and research institutes for tea industrial development, and help grower to select variety and understand morphological characters and component of tea.

II. Genetic analysis and DNA marker of tea

1. Development of DNA marker of tea accessions based on RAPD analysis

Genetic diversity of 45 tea accessions from Korea, Japan, China and Taiwan was investigated by using RAPD analysis. Out of the eighty primers screened, twenty primers generated 99 polymorphic bands with a polymorphic rate 87.0%. The size of the amplified fragments ranged from about 3,138 bp to 520 bp. By cluster analysis, all of the 45 accessions can be grouped into five groups. Over 90% of the 32 Korean accessions belonged to group II, III, IV and V. Moreover, newly developed Korean cultivars (accession no. 13, 14 and 15) belonged to very different group compared with any other Korean accessions. Among the Korean accessions, the minimum genetic similarity 0.500 was obtained between accession no. 17 and 37 and the largest genetic similarity 0.912 between no. 20 and 21. Line specific RAPD markers were developed.

2. Development of DNA marker of tea accessions based on AFLP analysis

Genetic relationships among 45 tea accessions were estimated using AFLP analysis. Genetic distance (GD) shows very different from 0.500 to 0.964 among the Korean accessions. This indicates that the Korean accessions have somewhat high genetic diversity. By cluster analysis, the 45 accessions were grouped into eleven groups. The Korean 32 accessions belonged to all of groups except for group VII and IX. And twenty seven of the 32 Korean accessions (84%) belonged to group II, III, IV, V and VI. Moreover, newly developed Korean cultivars (accession no. 13, 14 and 15) belonged to group II that four of six Japanese accessions were included. Some of accession line specific DNA bands were observed by the AFLP. Line specific AFLP markers were developed.

Genetic relationships among 45 tea accessions were estimated by using RAPD and AFLP markers. As a result of RAPD analysis with 10 primers, a total of 53 DNA bands were scored and 45 were polymorphic with a polymorphic rate 85.0%, and a total of 382

DNA bands were scored and 335 were polymorphic with a polymorphic rate 87.7% in AFLP analysis with 10 primer combinations. Genetic similarity shows somewhat similar between RAPD and AFLP markers showing from 0.20 to 1.00 in RAPD and 0.05 to 1.0 in AFLP analysis. By cluster analysis, the 45 accessions were grouped into nine in RAPD analysis while six in AFLP analysis. Polymorphic rate and genetic similarity by using RAPD and AFLP markers were very similar, even though the numbers of markers were very different.

3. Development of DNA marker of tea accessions based on SSR-PCR analysis

Simple sequence repeat (SSR) analysis was examined to detect genetic characteristics at molecular level among 45 accessions of tea (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) from Korea, Japan, China and Taiwan. As a result of SSR analysis, a total of 92 DNA bands were detected and 80 were polymorphic with a polymorphic rate 87%. Out of 80 polymorphic bands, 27 DNA bands showed line specific. The DNA bands might be used as molecular marker to detected tea at plant level. Genetic similarity shows very different from 0.10 to 1.00 among the 45 accessions and 0.10 to 0.97 among the Korean accessions. By cluster analysis, the 45 accessions revealed seven groups. The Korean accessions belonged to all groups except group 4. Out of the Korean accessions group 3, 5, 6 and 7 did not have Japanese, Chinese and Taiwanese varieties. The results indicate that the Korean accessions showed high genetic diversity by analyzing SSR markers, thus the Korean accessions will be used as basic gene pool for tea breeding. Line specific SSR markers were developed.

III. Development of tea propagation

1. Closed cuttage

The closed cuttage of tea was performed on the closed cutting bed(90cm width x 120cm long) by plastic film and shading net during June through October. Soils of the beds were mixed by masa soil and perlite(1:1). Yabukita cultivar was used as a main cultivar. The 11 factors of rooting in the closed cuttage were examined in order to find the best way of vegetative tea propagation. When the cuttages of tea and other 8 green trees, *Viburnum awabuki*, *Euonymus japonica*, *Osmanthus frarans*, *Gardenia jasminoides*, *Daphne odora*, *Aucuba japonica*, *Ilex cornuta*, *Camellia japonica* were conducted, The rooting rate of tea was grouped into the low rate trees, *Osmanthus frarans*, *Camellia japonica*, *Daphne odora*. Masa soil and mixed by perlite were more effective to the rooting of tea than peat moss, vermiculite, humus soil as the cuttage soil.. Among 7~8 nodes of stem, 2~3 nodes rooted more than other nodes in the closed cuttage. The stems with two leaves rooted most among stems with one leaf and several leaves, The stems with one leaf rooted more secondly. However, the stems attached one leaf could be recommended to be used for the cutting because of its effectivity in the tea cuttage. securing plants and saving area for the cuttage. the storage of cutting stems at 5℃ did not decrease the rate of rooting by 5 days. The application of chemical and organic fertilizer influenced the stem to root negatively, however, the tea plants grew rapidly after those rooting. The application of IBA 100ppm to the stems before the cuttage increased the rate of rooting. The rate of rooting at 25℃ was higher than that at 15℃ and 35℃. High temperature at 35℃ increased the rotten leaves. The double tunnels could be effecive for the air temperature to become down in the bed during the summer cuttage.

2. Pot cuttage

There are 5 pots, paper pot, vinyl pot, Jiffy pot, Vio pot, Plug plate used in the

pot cuttage. The experiment for the pot cuttage was conducted in the mist bed.using 6 tea cultivars, Yabukita, Meiryoku, Chamrok, Myungseon, Bohyang, Wild tea.

The rate of rooting in paper pots was 93.2%, highest among 5 pot cuttages. The numbers of roots per cutting stem was 37.9, also most in paper pots. Secondly Jiffy pots and Bio pots showed high rooting rates. In paper pot cuttage Yabukita, Meiryoku produced more roots than other Korean cultivars, Chamrok, Myungseon, Bohyang, Wild tea. The higher the cutting stem made the rooting rate, the more there were roots around stem cutted. The microbes were increased in the cuttage bed in order of humus>bed soil>field soil>perlite>vermiculite>peat moss>masa soil. The root primordia were observed on 15 days after the cuttage.

3. *In vitro* propagation

In in vitro propagation there were leaf segment culture and stem with axillary buds culture conducted. MS medium supplemented with the combinations of IAA, NAA, BA, Kinetin was used in conditions of Agar 0.8%, Sugar 3%, pH 5.8.

The stem segments were heavily contaminated than the leaf segments. The callus induction rate was higher from leaf segment when MS medium was supplemented with a combination of IAA 2.0mg/l and Kinetin 2.0mg/l than with other combinations. During the shoot induction culture of tea plant, Multi shoots were effectively induced in culture of a medium supplemented with IAA 1.0mg/l and Kinetin 2.0mg/l. More leaves were observed when Ms medium was supplemented with Kinetin 2.0mg/l and IAA 1.0mg/l. Gibberrelin(5mg/l) was effective for the growth of shoots.

CONTENTS

Heading	
Summary in Korean	1
Summary in English	11
Contents in Korean	16
Contents in English	18
Text	21
Chapter 1. Overview of Research Project	21
Section 1. Background of Research	21
Section 2. Need for Research and Development	21
Section 3. Research Objectives and Goals	25
Chapter 2. Present Status of Technology Development in Domestic and Foreign Countries	28
Section 1. Characteristics and components of tea collections	28
Section 2. Genetic analysis and DNA marker of tea	32
Section 3. Development of tea propagation	33
Chapter 3. Research Methodology and Results	35
Section 1. Characteristics and components of tea collections	35
Section 2. Genetic analysis and DNA marker of tea	68
Section 3. Development of tea propagation	115
Chapter 4. Achievement and Contribution to the Related Areas	142
Section 1. Characteristics and components of tea collections	142
Section 2. Genetic analysis and DNA marker of tea	144
Section 3. Development of tea propagation	145
Chapter 5. Application Plan of Acquired Results	148
Section 1. Characteristics and components of tea collections	148
Section 2. Genetic analysis and DNA marker of tea	148
Section 3. Development of tea propagation	148
Chapter 6. Science and Technology Information Collected from Foreign Countries through the Project	149

Section 1. Characteristics and components of tea collections	149
Section 2. Genetic analysis and DNA marker of tea	151
Section 3. Development of tea propagation	151
Chapter 7. References	153
Section 1. Characteristics and components of tea collections	153
Section 2. Genetic analysis and DNA marker of tea	155
Section 3. Development of tea propagation	157

목 차

제출문	
요약문	1
영문요약문	11
영문목차	16
목차	18
본문	21
제 1 장 서론	21
제 1 절 연구배경	21
제 2 절 연구개발의 필요성	21
제 3 절 연구개발의 목적과 범위	25
제 2 장 국내외 기술개발 현황	28
제 1 절 차나무 유전자원의 특성조사 및 성분 분석	28
제 2 절 차나무의 유전분석과 DNA maker 개발	32
제 3 절 차나무의 효과적 번식법 개발	33
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	35
제 1 절 차나무 유전자원의 특성조사 및 성분 분석	35
제 2 절 차나무의 유전분석과 DNA maker 개발	68
제 3 절 차나무의 효과적 번식법 개	115
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	142
제 1 절 차나무 유전자원의 특성조사 및 성분 분석	142
제 2 절 차나무의 유전분석과 DNA maker 개발	144
제 3 절 차나무의 효과적 번식법 개발	145
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	148
제 1 절 차나무 유전자원의 특성조사 및 성분 분석	148
제 2 절 차나무의 유전분석과 DNA maker 개발	148
제 3 절 차나무의 효과적 번식법 개발	148

제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	149
제 1 절	차나무 유전자원의 특성조사 및 성분 분석	149
제 2 절	차나무의 유전분석과 DNA maker 개발	151
제 3 절	차나무의 효과적 번식법 개발	151
제 7 장	참고문헌	153
제 1 절	차나무 유전자원의 특성조사 및 성분 분석	153
제 2 절	차나무의 유전분석과 DNA maker 개발	155
제 3 절	차나무의 효과적 번식법 개발	157

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구배경

차나무(*Camellia sinensis*)는 *Camellia* 속의 아열대성 목본 상록식물로 년평균 기온이 13℃ 이상인 지역에 광범위하게 분포하고 있으며 재배종은 一葉茶로 지칭되는 중국 대엽종(*Camellia sinensis* var. *macrophylla*)과 홍차 등 발효차로 쓰이고 있는 인도 대엽종(*Camellia sinensis* var. *assamica*), 그리고 우리나라에 자생하는 중국 소엽종(*Camellia sinensis* var. *sinensis*)으로 분류된다.

그런데 차나무는 타가수정 작물로 지금까지 실생번식에 의존하였으며 오랜기간 전파과정을 통해 형태적인 변이가 발생하였고, 환경적인 영향으로 인해 또한 형태적 특성이 다양하게 나타나는데 이러한 차이가 유전적인 변이인지는 확실히 밝혀지지 않고 있다. 이러한 상황에서 외관상 나타나는 특성의 차이만으로 서로 다른 품종이라고 단정하기에는 너무나 큰 오류를 안고 있다.

우리나라 차 재배농가는 대한다업 등 몇몇 대규모 농가를 제외한 대부분이 소규모의 재배규모를 갖추고 있으며 차 생엽 수확시 기계화보다는 손수확을 많이 하고 있다. 그 이유는 평야지 보다는 구릉지 등 산야에 재배되고 있기 때문이며, 또 F1잡종으로 이루어진 차밭이 대부분으로 차의 팽아기가 고르지 않아 기계수확이 불가능하기 때문이다. 이것은 차나무의 품종화가 이루어지지 않았기 때문이라고 말 할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 전국에 산재되어 있는 유전자원을 수집하고 유전자원에 대한 형태적인 정보를 조사·데이터화하여 다음 육종의 재료로 이용할 수 있도록 하고 현재 차시험장에서 교배선발 중에 있는 유전자원에 대해서도 그들의 특성을 면밀히 검토하여 자료화하고자 한다. 또한 차맛의 기호성에서 아주 중요하게 대두되고 있는 성분 에 대한 계통간의 차이를 분석 검토하여 차의 건강식품으로서의 우수성을 재차 확인하고 고품질 차를 생산하는데 기여하고자 한다.

제 2절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

차나무는 자가불화합성을 갖는 타가수정작물로 자연상태에서 형성된 종자는 대부분 잠종종자이다. 그런데도 불구하고 우리나라 차재배 농가는 기업적인 재배지를 제외하고는 종자에 의한 번식에 의존하고 있다. 이것은 아직 우리 고유 품종의 개발이 미진하고 품종의 중요성에 대한 재배 농가의 인식이 부족한 점과 영양번식묘의 공급이 원활하지 못하고 종자번식이 용이하다는 점 때문이다.

차재배와 이용이 우리와 비슷한 중국과 일본은 일찍부터 차육종에 관심을 기울여 많은 품종을 보유하고 있으나 우리는 이제 품종을 만들기 시작하는 초기단계에 있다. 그러나 추운환경에서 야생적으로 생존된 자생종에는 내한성, 내충성, 내병성 등의 유전형질이 내재되어 있는 유전자원이 많다고 할 수 있다. 그러므로 육종을 효율을 높이기 위해서는 유전자원에 대한 세밀한 특성조사와 DNA수준의 유전분석이 필요하다.

영양체 식물에 대해서는 종자은행에서 영양체를 보존할 수가 없기 때문에 유전자원을 육종 재료로 이용하는 기관에서 특성검정을 하고 유전적 분석을 하여 그 결과를 데이터 베이스화 함으로써 유전자원 관리를 쉽게 하고 유용형질을 육종재료로 이용하는데 용이하도록 하고 있는데 대부분이 식량작물과 채소에 국한되어 있다. 차나무는 타가수정하는 식물의 특성상 식물의 특성이 후대에 그대로 전해지지 않으며 해가 더해감에 따라 유전적 변이의 폭이 점점 커지고 거기에 환경적인 요소가 영향하여 계통과 품종의 육안식별이 어려운 실정이다. 따라서 DNA 수준의 유연관계정립과 표식인자(marker)의 개발이 필요하다. PCR 기술의 발달로 Primer에 따라 다형성이 다르게 나타나는 RAPD분석, AFLP 분석, 개체수준의 식별이 가능한 SSR분석이 필요하다. 그리고 이들 분석을 통해서 차 특성의 유용 유전자를 찾아내서 품종 식별과 새로운 품종 육성에 이용할 필요가 있다.

우수한 품종을 재배 농가에 신속하게 보급하는 방법은 영양체 번식에 의한 양묘 육성을 용이하게 하는 것이다. 차나무는 상록성 목본류로 수시로 신초가 신장하는 성질로 삽목시기 선택과 삽목관리의 어려움으로 성공률이 그다지 높지 못한 실정이다. 그리고 발근하는데 시간을 요하므로 관리과정에서 고사율이 발생하는 경우가 많다. 상록수중에서도 발근이 비교적 까다로운 식물로 나타나고 있다. 삽목묘의 발근율이 높이고 정식에 알맞은 묘목을 육성하기 위해서는 삽목 시기선택, 차광정도, 관수방법, 삽목용토조제, 건묘육성방법 등이 연구되어야 할 과제라고 할 수 있다. 정식에 필요한 건전묘를 조기에 육성하는 방법으로 미생물을 살균한 비료용토의 삽목, 밀폐삽목

으로 습도유지와 관수노력 절감, 풋트삼목으로 근권의 보호로 이식율 향상 등 다각적 접근이 필요하다. 그리고 차나무가 목본류보다 형성능이 우수해서 부정아가 쉽게 분화되는 점을 이용하여 기내 번식방법을 개발하면 대량 증식과 연중 번식에 용이하게 이용할 수 있다.

2. 경제·산업적 측면

우리나라는 최근 건강에 관심이 고조되는 분위기속에서 녹차 소비는 급상승커브를 그리면서 증가하고 있다, 국민 1인당 녹차의 소비량은 1995년에 20g, 2000년에 50g 이고, 2010년에는 100g 까지 증가할 것으로 전망하고 있다. 현재 녹차 소비시장은 연간 650억원 규모에 이르는 것으로 추산하고 있다. 그러나 아직 일본의 20분의 1 수준으로 앞으로 증가할 여지는 충분하다고 할 수 있다.

차 재배지는 주로 제주도, 전남, 경남으로 2001년 전체 면적은 1,830 ha로 10년전보다 4.1배로 증가하였고 최근 5년간에는 매년 20ha씩 증가하는 추세에 있다. 연간 생산량은 1,395톤으로 증가하였다. 그러나 단위면적당 생산량은 7.6kg/10a으로 일본의 절반 수준에 못 미치고 있다. 재래종 재배로 저조한 수확량, 종자번식으로 다원의 잡종화, 불리한 재배환경, 미진한 재배 기술 등이 요인으로 작용하고 있다. 그 중에서 종자과중으로 증식과 개원을 하고 있는 현재의 번식방법은 만성적인 저생산성을 갖어오는 심각한 문제라고 할 수 있다. 빨리 시정되어야 할 과제라고 할 수 있다. 이를 위해서 우수한 품종의 영양번식묘를 안정적으로 공급하는 방법을 개발하여 보급하는 길이 시급한 것이다. 그리고 단일품종에 의한 일률적인 생산시스템은 차재배의 기계화를 촉진시키게 될 것이다.

현재 녹차의 소득지수는 타 작물에 비해서 2배 이상에 달하는 것으로 나타나고 있다. 이와 같은 농가의 안정적인 수익증대는 차재배가 가능한 남부지역에서 타 작물의 대체작물로 자리잡게 될 수 있다. 이것은 작물재배의 지역 특성화로 이어지고 농산물의 국가적 생산구조에서 균형을 이루는데에도 기여할 것이다. 2004년 차의 완전 수입개방이 우려되는 바도 있으나 우리 입맛에 맞는 차의 체다법 개발과 거기에 알맞은 품종 개발 등이 이루어진다면 오히려 우리 경제에 호전적으로 작용할 것이라는 관측이다. 따라서 새로운 육종기술을 바탕으로 향후 수출 및 내수용에 적합한 우수품종을 많이 개발한다면 국제 경쟁력이 강화되고 다른 나라에 우리의 품종을 역수출하여 국내 농업발전에 기여하게 될 것이다.

3. 사회·문화적 측면

한국사회에서 녹차는 90년대 이후부터 사회적인 붐을 이루면서 그 이용이 확산되고 있다. 녹차 음료는 물론 녹차냉면, 녹차국수, 녹차김치, 녹돈, 녹차육탕, 심지어는 녹차를 넣은 소주까지 나오고 있는 상황이다. 중국에서 B.C. 2700년전 신농시대부터 차를 이용해 온 것으로 다경에 기록하고 있다. 신라시대에 전해진 차문화가 정치적 우여곡절로 근대에 와서는 일본만큼 일반화되지는 못하였지만 다방(茶房), 다례(茶禮), 전차의식(進茶儀式) 등과 같이 문화 풍습에 깊게 배어 있는 전통적인 음식문화의 하나라고 할 수 있다.

우리나라 차 재배는 일찍이 AD 48년 가락국 김수로왕의妃이신 허황옥이 인도 아유타국에서 *Camellia sinensis* O. Kuntze var. *assamica*로 추정되는 차종자를 가져왔다는 설과 대림이 828년에 지리산에 차를 심었다는 설, 그리고 우리 차가 널리 일본, 중국까지 전래되었다는 설이 있다. 또 일본서기에 의하면 백제의 성왕(523~533)이 담혜화상 등 16명의 일본 스님에게 차를 보냈다는 기록이 있고 송고승전에는 중국 사대명산의 하나로 현재 안휘성 청양현에 있는 구화산에 신라 왕손인金地莊스님이 우리나라 차를 심었다고 하여 이 차를金地茶라 하였다. 이후 고려시대에는 불교문화의 전성과 함께 차문화가 전성기를 맞이하였고, 조선시대 송유역불정책의 영향으로 쇠퇴기를 거쳐 1969년 농특사업으로 전남지역에 대규모 다원이 조성되었으나 활성화되지 못하고 그 명맥만 유지해 오던 중 1980년대 이후 현대식 제다법 도입과 더불어 국민소득 향상으로 국민건강 음료로서 대중화되고 있으며 2000년대에는 재배면적과 녹차의 수요가 급증하고 있다.

최근 차에 대한 약리적 기능성 효능에 대한 연구가 활발하게 이루어져 차 성분 중 polyphenol 화합물인 catechin이 항산화작용, 항암작용, 항혈전, 혈압강화작용, 콜레스테롤 흡수 억제, 충치예방, 환경호르몬 흡수억제 등에 효과가 있는 것으로 밝혀지고 있다. 전량 수입에 의존하고 있는 커피의 소비 패턴에서 녹차 소비로 전환은 국민건강 증진은 물론 농가소득 향상에도 기여할 것으로 기대된다. 그리고 녹차문화의 복원은 전통적인 예의범절을 새롭게 하는 교육적인 효과도 기대해 볼 수 있다.

차나무는 상록성 관목으로 1년생 초본류와 달리 차재배는 연중 경작지에 푸르름을 유지시켜 주위 환경을 정화시키고 쾌적하게 하는 환경친화적인 농업이라고 할 수 있다.

제 3절 연구개발의 목적과 범위

1. 차나무 유전자원의 특성조사 및 성분분석

본 과제 수행을 통해 이용도가 높은 유전자원에 대해 형태적인 특성을 조사 분석하고 성분의 특성을 분석하여 유전자원의 분포양상을 설명하고 품종(계통) 분류 전문 프로그램을 개발하여 데이터 베이스화 하였다. 이 과제는 차나무 유전자원의 체계적인 자료관리와 이용상의 편의성을 도모하고 차 재배농민 및 연구관계자에게 유전자원 홍보 및 정보 제공, 유전자원의 데이터베이스화를 통한 육종사업의 용이성 제고, 유전자원의 off line 홍보를 통한 차시협장의 위상 정립을 목적하고 있다.

연구를 추진한 범위는 다음과 같다.

- 유전자원 특성조사
 - 국내외 유전자원 수집
 - 국내외 유전자원 15종에 대한 형태적 형질조사 : 엽면적 등 33항목
 - 영상자료 : 잎, 꽃, 나무 사진촬영
- 유전자원 성분분석
 - 유전자원별 성분분석 : 총질소, 총아미노산, 탄닌, 카페인, 카테킨, 엽록소
- 유전자원의 데이터베이스화
 - 유전자원 150종에 대한 형태적 형질 33항목, 특성 6항목, 사진 3항목에 대한 데이터베이스 구축
 - DB 프로그램 CD 제작 및 배포

2. 차나무의 유전분석과 DNA maker 개발

이 연구는 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)와 SSR(Simple Sequence Repeat)의 분자생물학적 분석방법에 기초한 국내 수집 차나무 계통의 분자유전학적 특성을 밝혀 차나무 품종 육종에 필요한 기초자료를 제공하고자 수행하였다.

연구를 수행한 범위는 다음과 같다.

- RAPD를 이용한 DNA marker 개발
 - 차 유전자원의 RAPD 분석
 - 시료 확보: 국내 및 국외종 30~50여 계통
 - DNA 추출·정제 및 PCR최적조건 규명
 - Polymorphic band를 이용한 DNA marker 개발
- AFLP를 이용한 DNA marker 개발
 - AFLP분석의 최적 제한효소조합 규명
*EcoRI*과 *MseI* 사용
 - Polymorphic band 선발
라인(또는 품종)간 다형성을 보이는 DNA band를 선발
 - AFLP에 따른 DNA marker 개발
선발된 marker의 재현성을 확인, marker의 이용성 검증
 - AFLP에 따른 유전적 다양성분석
DNA band의 유무를 binary data로 전환, Ward 방법으로 처리한 후 clustering 분석
- SSR-PCR에 따른 DNA marker 개발
 - SSR-PCR 적정조건규명
 - Polymorphic band 선발
 - SSR-PCR에 따른 DNA marker 개발
 - RAPD, AFLP, SSR의 비교분석

3. 차나무의 효과적 번식법 개발

밀폐삽목과 포트삽목에 필요한 용토별 삽목 비교, 삽수조건에 따른 삽목, 비료 및 유기질 처리, 식물생장조절제의 효과, 토양미생물이 삽목에 미치는 영향, 온도의 영향, 밀폐 방식에 따른 삽목의 영향, 밀폐 방식에 따른 삽목의 영향, 차광정도가 삽목에 미치는 영향, 발근의 조직 해부학적 분석에 관한 연구를 실시하여 효과적인 삽목 방법을 개발하고자 하였다. 그리고 기내 번식방법을 통하여 대량증식이 용이한 방법을 모색하고자 연구를 실시하였다.

연구를 수행한 범위는 다음과 같다.

- 밀폐삽목법 개발
 - 용토별, 삽수조건별, 온도별, 발근제 처리구 삽목 비교
 - 비료 및 유기질 처리 비교
 - 밀폐삽목과 미스트삽목, 밀폐방식에 따른 삽목 비교
- 포트삽목법 개발
 - 포트종류가 발근에 미치는 영향
 - 포트삽목의 시기별 품종별 발근율 비교
 - 포트삽목에서 토양미생물이 삽목에 미치는 영향
 - 발근과정의 조직 해부학적 분석
- 기내 삽목법 개발
 - 엽질편배양에 의한 callus 유도
 - shoot 배양으로 multi-shoot 분화

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 차나무 유전자원의 특성조사 및 성분 분석

차나무는 반교목성 식물로 엽이 크고 내한성이 약한 var. *assamica*계통과 관목성으로 엽이 작고 내한성이 강한 중국종(var. *sinensis*)으로 크게 나누어진다(北村, 1950; Sealy, 1958). 자연 분포지역에서는 *assamica*계통이 중국남부에서 운남, 타이, 베트남을 거쳐 인도에 분포하고 있으며 중국종은 양자강 이남으로부터 대만, 한국, 일본의 서남부에 분포하고 있다(Sealy, 1958). 이 두 변종은 개화기에 다소의 차이가 있지만 교잡에는 특별히 지장이 없기 때문에 생식적 격리는 확인되지 않고 있다(Bezbaruah, 1977a ; 吳와徐, 1966). 또 교잡 후대에 있어서도 불임성 등의 장해도 없기 때문에 일본에서는 내한성 홍차용 품종 육성을 위해 변종간 교배가 이루어지고 있다(茶業試驗場, 1963). 따라서 이 두 변종간에는 형태적 또는 생식적 격리가 확인되고 있지 않기 때문에 이들 차의 기원에 대해서는 다양한 의견이 있으나 현재는 var. *assamica*와 var. *sinensis*는 동일한 기원을 가졌고, 그 후 주변에 전파되어 현재와 같이 변이가 형성되었을 것이라는 일원설이 유력하다(橋本と志村, 1978 ; Hasimoto, 1985 ; 吳, 1987 ; 좌, 1992). 차는 3000년 이상 전부터 인류에 이용되어왔고 *Camellia* 속의 다른 종에 비해 현저하게 분포 범위가 넓고 형질 변이도 크다고 하겠다(Sealy, 1958)

성엽의 형질은 차나무의 종내 분류에 있어서 중요한 형질이며(北村 1950; Sealy 1958; 橋本·志村 1978; 張 1981; 閔 1998) 차의 품종 식별에도 부족함이 없다(Wickramaratne 1981). 또한 차나무는 잎을 이용한 작물이기 때문에 잎의 대소는 신초의 대소와도 밀접히 관련하며 수량과의 관련성도 높다고 확인되었다(烏屋尾 1965)

차나무의 특성분류 또는 품종식별형질가운데 하나인 모용은 신초의 뒷면에 분포한다(吳 1964; Amma 1986). 차나무의 주요 병해인 탄저병은 초기 분생자가 신초의 모용에 침입하여 발생한다고 보고한 바 있으며(浜泚屋 1982) 이 때문에 들연변이 품종인 야부기타는 모용이 없어서 탄저병 저항성이 높은 품종으로 알려져 있으며 따라서 모용은 실용형질로 중요하다(武田 1991)고 할 수 있다.

우리나라에서는 박 등(1997)이 12개 야생차나무 집단을 대상으로 형태적 특성을 조사한 결과 엽장, 엽폭, 거치수, 엽맥수, 엽병장, 엽면적 등에서 집단간 및 집단내 개체

간에 고도로 유의적인 차이가 인정되어 변이가 심한 것으로 인정하였다. 또 엽장과 엽면적에 의하여 3개의 군으로 cluster 분석하였다.

Toyao (1999)는 일본재래종, 중국도입종, *assamica*종 등 103계통을 주성분분석하였는데 품종이나 계통에 따라 화기구조가 현저하게 차이가 있었으며 암술의 길이, 분지점의 깊이, 주두의 구부러짐, 암술의 수, 자방의 모용 유무와 다소 등 형질 변이를 조사분석하였다. 또한 영양번식한 집단내 그룹내 형질의 변이도 확인하였으며 차나무의 화기형태는 종내분류에 유용하며, 화기형태를 대상으로 한 수치분류법은 급후 유연관계 해명에 영향을 미칠것이라고 하였다.

Takeda(2002)는 화기형태 6형질(꽃의 크기, 암술의 抽出度, 암술의 분지수, 암술의 분지점의 위치, 암술의 구부러짐 유무, 자방의 모용 유무)에 따라 주성분분석 및 클러스터 분석한 결과 아쌈종, 도입중국종 및 일본재래종·야마차 그룹으로 크게 구분하였다. 이 분류에서 특히 유효한 형질은 암술의 구부러진 위치와 암술의 추출도, 암술의 분지 위치였으며 이 3가지 형질로 27 분류형을 작성하여 녹차용 주요 품종 48종에 적용시킨 결과 12개의 분류형으로 나누었다고 보고하였다. 따라서 화기형태의 분류형은 유효한 식별수단임을 알 수 있다.

Park 등(2001)은 우리나라 야생차 집단 7개 지역에서 채취한 종자를 일본에 파종하여 6년생이 된 차나무와 일본차나무의 특성을 비교분석하였는데 그 결과 잎의 형태는 중국 소엽종의 형태를 나타냈으며, 잎 두께는 일본품종이 더 두꺼운 것으로 나타났다. 화기구조에 있어서는 일본종과 한국종이 크게 다르게 나타나서 번식양식에 차이가 있음을 밝혔다. 또한 RAPD 분석에서도 우리나라 집단과 일본 품종은 2개의 그룹으로 분류되어 유전적인 차이가 있음을 밝혔으며 이 결과는 중국에서 도입된 원집단이 같지 않음을 추정할 수 있었다.

Ikeda(2002)는 한국의 사찰에서 채취한 계통가운데 붉은꽃을 가진 10계통을 확인하였으며 꽃이 붉은색인 것은 반드시 신초 및 성엽의 엽색이 적색을 띤다고 했으며 적색꽃의 유전적 특성은 관찰하고 있지만 유전양식은 불분명하다고 보고하였다.

차의 생엽에는 수분이 75~80%를 점유하고 있으며 20~25%는 고형물이다. 이 고형물의 35~40%는 수용성이고 60~65%는 지용성 비타민 등 불용성 물질인데 수용성 성분에는 탄닌, 아미노산류, 비타민류, 카페인, 당류, 사포닌과 소량의 유기산 및 무기 성분이 들어있다(신다업전서,1988)

차는 카페인을 함유하는 알칼로이드 음료로서 그 생리작용에 의하여 주로 대뇌를

자극하여 완만한 흥분작용을 일으켜서 정신적인 피로회복에 도움이 되는 것이 차의 이용목적이기도 하다(大石, 1985). 녹차의 맛을 구성하고 있는 것은 떫은맛, 쓴맛, 단맛이며, 홍차는 단맛, 쓴맛, 떫은맛, 감칠맛, 신맛, 짠맛이 조화를 이루어 맛을 낸다고 하는데 이것은 차엽에 관련성분이 존재하기 때문이다. 즉 쓰고 떫은맛 성분인 tannin(Hideki, 1993), 쓴맛 성분인 caffeine과 saponine, 감칠맛 성분인 amino acid, 단맛 성분인 당류 그리고 방향성 향 및 각종 화합물이 조화를 이루어 독특한 향기와 맛을 내고 있다. 이 가운데 탄닌은 수렴성을 가지며 또한 여러 금속과 반응하여 갈색, 청록색 등 복합염을 형성하는 성질을 가지는 물질들의 총칭으로 화학구조상 단일물질이 아니다. 식물중에서 탄닌 함량이 많은 것은 커피인데 차와 커피의 탄닌 성분은 서로 다른 화학적 구조를 갖고 있다고 한다(吳普, 1976). 차의 탄닌은 채취시기별, 품종별, 일조량과 길이에 따라 함량이 다르다(Hideki, 1993; 徐, 1991). 차의 탄닌 함량에 대한 분석은 岩淺(1962), Shin(1984), 徐(1991) 등이 보고한 바 있다.

기능성 물질인 카테킨류는 차에 있어서 색깔과 맛에 관여할 뿐만 아니라 약리작용이 뛰어난 화합물이다. 색깔로는 플라보노이드에 속하며 맛으로는 탄닌류에 속한다. 카테킨은 8종이 존재하는데 (-)-epicatechin(EC), (-)-epicatechingallate(ECg), (-)-epigallocatechin(EGC), (-)-epigallocatechingalate(EGCg), (+)-catechin(C), (+)-gallocatechin(GC), (-)-gallocatechingallate(GCg), (-)-catechingallate(Cg)이며, 유리형인 EC, EGC, ECG, ECGC는 90% 이상(中林, 1991)으로 온화한 떫은맛이 나며, ester형인 EGCg, ECg는 약간 쓰고 감미로운 맛을 내기 때문에 카테킨류의 조성에 의해서 맛에 차이가 난다고 보고하였다(中川, 1964, 西條了康, 1981, 永田忠博, 1982). 카테킨은 항암작용, 고혈압 및 동맥경화 억제, 돌연변이 억제, 항산화, 노화억제 및 충치균에 대한 항균작용 등 각종 효능이 인정되어 이에 대한 활발한 연구가 진행중이다(Sakanata, 1990; 南條, 1994; Kei, 1995; Nobuyuki, 1993; Jeong, 1995; 原征彦, 1991).

차엽의 성분중 전질소는 전통적으로 차의 품질을 결정하는 중요 인자이었으나 최근에는 아미노산을 기준으로 판단하는 경향이 있다. 차잎의 전질소 중 약 20%는 카페인이며 그 외의 질소화합물로 아미노산, 아미드, 단백질, 핵산 등이 있다. 차 단백질은 제조과정 중 탄닌과 결합하거나 가열에 의해 응고되어 거의 용출되지 않으나 아미노산과 아미드는 수용성이므로 용출되어 차의 맛에 크게 관여한다(Kato 1971). 大石(1987)과 Takeda(1991)는 차의 아미노산을 총 35종으로 분리하였다.,

카페인을 차의 중요한 성분중의 하나로 Oudry(1827)에 의해 차에서도 발견되어 thein 이라고 불렀으나 커피의 caffeine과 동일하기 때문에 caffeine이라고 하였고, caffeine은 알칼로이드의 일종으로 온수에 잘 녹아 100% 용출되며 녹차의 성분중에서 쓴맛을 나타낸다(Hamata, 1978; Eun, 1985; 오, 1988; Horie, 1993; Park, 1997).

Takeda(2002)는 유전자원 1,534계통을 성분분석하였는데 이 가운데 카페인 함량은 1.64~5.46%, 탄닌은 9.37~26.82%로 큰 변이를 확인하였으며 *assamica*변종은 중국종에 비해 두 성분 모두 높다고 하였고 카테킨계통으로 Ind113을 선발하여 1998년 육종의 중간모본으로 등록하였다. 또한 카테킨과 카페인 함유율은 차의 종내 분류뿐만 아니라 변종내의 분류에도 이용할 수 있다고 밝혔다.

제 2 절 차나무의 유전분석과 DNA maker 개발

차는 자가불화합성 작물로서 종자를 이용하여 번식하게 되면 변이가 심하여 개체 간의 특성이 균일치가 않다. 또한 국내에 자생하고 있는 차나무는 오랜 기간 동안 타가수정에 의한 종자번식을 할 뿐만 아니라 역사적으로 다양한 경로로 여러 계통들이 혼합 식재되어 품종을 구별하기가 힘든 문제점을 가지고 있다. 따라서 국내 자생 차나무의 유전자원 활용을 위해서는 국내 자생 차나무 집단에 대한 형태분류와 분자생물학적 분석에 대한 기초자료가 필요하다.

지금까지 차의 분류 및 형질의 유전적 분석에 관한 많은 연구가 진행되어 왔다(이 등, 1995; 이 등, 2002; Oh and Hong, 1995; 김 등, 2000; 김 등, 2001). 이 중 국내 수집 차나무 집단을 대상으로 한 연구는 주로 RAPD 방법을 이용하였고(박 등, 1997, 2000, 2001; 이 등, 1995), AFLP방법을 이용한 것은 소수이다(이 등, 2003). 특히 다양한 분자생물학적 방법을 사용하여 비교한 예는 찾아보기 힘들다.

1990년대 이전에는 주로 차와 차나무의 형태학적 분류나 지역별 차이에 의한 분류 또는 화학성분분석에 의한 분류 방법으로 차의 유연관계분석이 이루어졌다(김 등, 1969; Takeda and Toao, 1982; 은 등, 1984; Nagata 1986; 김 등, 2000). 그러나 형태학적 분류로는 타가수정으로 인하여 그 변이가 심한 차를 대상으로 명확한 집단 간의 분류가 어려우며, 분석에 소요되는 시간과 작업량이 많다. 화학성분분석에 의한 분류도 재배지의 환경조건에 따라 오차가 발생할 수 있고 조사된 몇 가지 화학성분량으로 여러 집단을 분류하는데는 어느 정도 한계가 있다(Banerjee 1992; Kaundun *et al.*, 2000; 백 등, 2004).

1990년대 초반부터 분자생물학적인 접근방법들이 빠른 속도로 발전되면서 분자생물학적 방법에 의해 많은 연구가 시도되었다. Masumoto 등(1994)과 Takeuchi 등(1994)은 PAL유전자 분석으로 일본종의 유전적인 배경을 밝히는 연구를 수행하였고, Kaundun 등(2000)은 한국자생종과 일본, 대만품종을 RAPD로 유연관계를 분석한 결과 일본종간에는 유연관계가 높아 유전적 다양성이 낮은 반면 한국자생종간에는 유전적 다양성이 높다는 것을 보고하였다. 국내에서도 RAPD 분석을 이용한 차의 유전적 특성연구에서 한국자생종간의 유전적 다양성을 확인한 바 있다(이 등, 1995; Oh and Hong, 1995; 박 등 1997, 2000, 2001).

AFLP 분석은 실험의 결과의 재현성과 안정성이 높아 유연관계분석에 많이 활용되고 있는데, Paul 등(1997)은 인도 차 집단과 케냐 차 집단 간의 유전적 다형성을

보고하였다. Balasaravanan 등(2003)은 인도 차 집단과 중국, 캄보디아 차 집단의 AFLP를 이용한 유연관계 분석결과 군집분석을 통하여 인도, 중국, 캄보디아 3그룹으로 군집이 형성되었다고 하였다. 국내에서도 이 등(2003)이 AFLP를 이용하여 한국차생 차 집단과 일본품종간의 유연관계분석을 하였으나 주로 외국종 중심으로 국내 수집종에 대한 분석자료가 미미한 형편이다. 국내외의 연구결과 AFLP를 이용한 차의 유연관계분석은 RAPD 보다 유연관계분석에 있어 더 효율적으로 다형성밴드를 검출할 수 있음을 보고하였다(Paul *et al.*, 1997; 이 등, 2003).

SSR(simple sequence repeat)은 1개 내지 몇 개의 염기가 반복된 것으로 생명체 게놈 전체에 걸쳐 분포되어 있으며, 전체 길이는 100bp 이하로서 가장 흔히 반복되는 염기서열로는 (A)_n/(T)_n, (CA)_n/(GT)_n 등이 있다. 이들 반복염기서열은 특징적으로 DNA의 non-coding region에 위치하고 있으며 효모나 대장균 등에도 이러한 반복적인 염기서열이 존재한다. 반복된 염기수는 그 다양한 특성 때문에 분자생물학적 표식으로써 관심의 대상이 되고 있다(Kasha, 1998). 이러한 장점 때문에 최근 품종분류에서 RAPD를 대체하는 분석방법으로 다양한 식물에서 분석에 이용되고 있다. 차에서는 Kaundun(2002)와 Matsumoto (2004)가 일본종의 유전적 특성을 연구하였고, Rossetto 등(1999)이 SSR을 이용한 차의 microsatellite의 염기서열 분석을 시도하였다. 또한 Mondal(2002)은 SSR의 변형된 방법인 ISSR을 이용하여 Assam type 차나무의 유전적 다양성을 보고하였다. 국내에서는 아직 차를 대상으로 SSR에 대한 연구결과는 보고되고 있지 않다.

제 3 절 차나무 효과적 번식법 개발

삼목, 접목 등의 영양번식 방법은 양친의 특성을 그대로 이어받고자 할 때 이용하는 전통적인 재배 기술이라고 할 수 있다. 기술적인 중요한 요소는 삼목용토의 선택, 습도유지, 일정온도유지, 광선조절 등이 있다. 삼목에서 건조는 삼수에 치명적이다. 습도유지를 위해서 주기적 관수를 하게 되는데 생리적으로 연약한 상태에 있는 잎의 수분은 고온과 더불어 잎을 고사시키는 원인이 되고 있다. 삼목 후 터널을 만들어 주위를 밀폐시키는 밀폐삽이 동백 등에서 성공을 거두고 있다. 차나무 삼목에서 고사염방지에 효과가 있을 것으로 예상되나 아직 시도된 바 없다. 생태적 연구는 야생 차나무 집단의 토양특성, 임분구조와 물질현존량(박인협외 1998), 야생 차나무 집단의 생태 및 잎의 형태적 특성(박인협외, 1997) 등이 있으며, 차나무의 재배내지 관련된 연

구는 야생차의 임간 재배법(박남창 외 1997), 자생차의 육묘 방법에 관한 연구(이용호외, 2005)가 있으나 영양계 번식에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 차나무는 이식을 기피는 것으로 알려져 있다. 이식시 뿌리손상이 문제가 되기 때문이다. 포트삼목을 실시하면 방지할 수 있을 것이다. 일본에서는 종이포트로 성공한 예가 있다. 이제까지 삼목용토로는 비료끼가 없고 배수가 잘되는 토양을 사용하는 것이 일반적이었다. 그러나 이럴 경우 발근 후에 영양공급을 위해서 육묘장에 이식하여 관리해야 하는 번거로운 노력의 단계가 필요하다. 이 단계를 줄이는 방법으로는 삼목용토로 비료가 섞인 토양을 사용하는 방법이다. 미생물에 의한 삼수부패를 차단할 수만 있다면 가능하다고 할 수 있다. 다른 식물에서도 시도되지 않은 기술이다.

종자에 의한 실생묘는 심근성의 뿌리인데 비해서 삼목묘의 뿌리는 천근성이다. 삼목묘가 본밭 정식 후 활착과 유묘의 생장, 환경적응력이 실생묘와 비교해서 열등해지는 원인이라고 할 수 있다.

차나무 조직배양에 관한 연구는 일본 차시험장의 Nakamura(1988)를 중심으로 오래 전에 연구가 이루어져 왔으나 실용화 단계까지 이르는 결과를 얻지 못하고, 이제는 미미한 연구에 머물고 있다. 조직배양을 이용하여 묘목의 대량생산을 실용화까지 이르기 위해서는 식물체로부터 callus 유도, callus로부터 shoot 유도가 필요한데 callus 단계까지는 용이하게 유도하는 방법을 모색했으나 callus에서 shoot 분화 형성 단계를 극복하지 못하고 있는 것이다. 차나무는 부정아 형성능력이 높은 식물이다. 이 식물체로부터 shoot 형성이 용이한 점을 이용한다면 대량 번식이 가능할 것이다. 기내 삼목, 접목에 관한 연구가 몇가지 식물에 서는 이루어진 바 있다. 차나무와 같이 기내에서 shoot 형성과 신장이 용이하면 그 shoot를 절단해서 배지에 삼목하여 발근시키면 효과적으로 많은 개체를 얻는 방법이 될 수 있을 것이다. 아직 차나무에서는 연구되지 않았다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 차나무 유전자원의 특성조사 및 성분 분석

1. 서론

차나무는 타가수정하는 식물의 특성상 식물의 특성이 후대에 그대로 전해지지 않으며 해가 더해감에 따라 유전적 변이의 폭이 점점 커지고 거기에 환경적인 요소가 영향하여 품종의 육안식별이 어려우며 실제로 개체간의 차이를 설명하기 어려운 실정이다. 또한 대부분의 다원이 실생차밭을 이루고 있으며 일부 다원이 일본의 야부기 다품종으로 형성되어 있다. 이러한 상황에서 한국의 기후와 정서에 맞는 신품종 육성은 중요한 과제이며 역사적 사명이라 할 수 있다. 따라서 차시험장에서는 2001년 처음으로 참녹 등 3품종이 육성되었으며 지금까지 총 7품종이 육성되었다. 또한 고품질, 내한성, 내병성, 고카테킨, 저탄닌 품종 육성을 목표로 신품종 육종에 전력을 다하고 있다. 이와 아울러 신품종 육성의 기본단계로 1992년부터 자생지별로 유전자원을 수집하고 있으며 국외 품종도 도입하여 특성을 분석하고 보존하고 있다.

따라서 이번 과제 수행을 통해 이용도가 높은 유전자원에 대해 형태적인 특성을 조사분석하고 성분적인 특성을 분석하여 유전자원의 분포양상을 설명하고 품종(계통) 분류 전문 프로그램을 개발하여 데이터 베이스화 하였다. 본 과제는 차나무 유전자원의 체계적인 자료관리와 이용상의 편의성을 도모하고 차 재배농민 및 연구관계자에게 유전자원 홍보 및 정보 제공, 유전자원의 데이터베이스화를 통한 육종사업의 용이성 제고, 유전자원의 off line 홍보를 통한 차시험장의 위상 정립에 목표를 두고 있다.

2. 연구방법

가. 식물재료

시험재료는 전남농업기술원 차시험장에서 유지 보존하고 있는 차나무 유전자원인 중국품종 5, 대만품종 3, 일본품종 6종, 한국 신품종 7종과 수집종 129계통 등 총 150계통이며 외국품종은 영양계 또는 실생이며, 한국 재래종은 각지에서 수집 선발된 8~10년생 차나무이다.

나. 차나무 유전자원의 형태적 특성 조사

성엽의 특성은 7월 상순에 신초의 정단부로부터 2번째 또는 3번째 잎을 조사하였다. 잎의 크기는 엽면적 측정기 AM-100(ADC Bio- Scientific Ltd.)를 사용하였으며 잎의 두께, 엽각, 엽병장을 측정하였고 엽형은 잎이 작고 끝이 타원형인 것(1), 잎이 작고 끝이 뾰족한 형(3), 잎이 크고 타원형(5), 잎이 크고 끝이 뾰족한 것(7)으로 구분하여 육안 조사하였다. 엽질은 엽면이 부드러운 것(1)과 딱딱한 것(2)으로 구분 조사하였으며 엽광택은 엽면에 광택이 약간 있는 것, 광택이 중간정도, 광택이 많은 것으로 구분조사 하였다. 엽면주름은 소, 중, 대로 조사하였으며 거치수는 엽 가장자리 한쪽면의 거치수를 조사하여 2배 하였으며 측맥수는 잎의 한쪽면의 측맥수를 조사하였다. 엽록소는 미놀타 SPAD-502를 이용하여 측정하였다.

신초의 특성중 신초의 절간장과 굽기는 신초의 선단으로부터 2번째와 3번째 마디 사이의 길이와 직경을 측정하였으며 분지각은 주지와의 각도를 각도계로 측정하였다. 모용의 특성은 신엽 표면의 모용의 크기, 길이, 밀도, 분포를 최상부의 전개엽과 반전개엽을 현미경하에서 50배로 확대 관찰하였다. 모용의 굽기와 길이, 밀도는 가늘다, 중간, 굽다의 3수준으로 구별하였으며 모용의 분포는 없다, 중맥에만, 중맥과 그 주변에, 잎 안쪽면, 잎 전체로 구분 분포를 조사하였다.

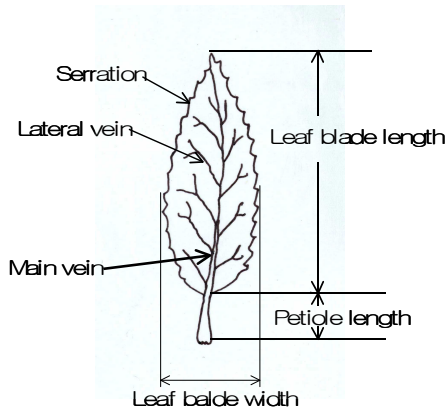


Fig. 1-1. A typical leaf of *Camellia sinensis*

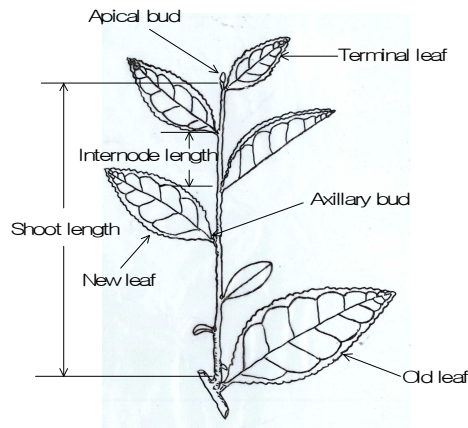


Fig. 1-2. A typical shoot of *Camellia sinensis*.

화기구조는 10월초순부터 중순까지 만개한 꽃을 선택하여 크기는 대(직경 4.5cm 이상), 중(직경 3.1~4.5cm), 소(직경 3.0cm이하)로 구분 조사하였으며 암술 길이는 암술이

수술보다 짧아서 수술속에 감춰진 것(1), 암술과 수술의 길이가 같은 것(2), 암술이 길어서 수술위로 올라온 것(3)으로 구분하였고 주두 형태는 주두 끝의 분기점이 길고 깊은 것(화주의 35% 이하)(1), 분기점이 중간부분인 것(35~65%)(2), 분기점이 얇은 것(65%이상)(3)으로 구분하여 조사하였다.

형태형질 조사를 위한 표본의 크기는 n=10이었다.

Table 1-1. Examination methods for characters

구 성	번 호	분류	표현형태	계급	조사규격	조사기준 및 방법
내 력	1	품종명	계통명, 수집종			
	2	원산지	국가, 지역명 표기			
	3	엽면적	측정값		mm ²	봄눈의 생장이 정지된 상태에서 2~3번째 엽을 엽면적측정기(AM100)로 측정 또는 엽폭×엽길이×0.7
	4	엽길이	측정값		mm	봄눈의 생장이 정지된 상태에서 2~3번째 엽
	5	엽폭	측정값		mm	"
	6	엽두께	측정값		mm	" 캘리퍼스로 측정
성 엽 특 성	7	엽형	엽이 작고 타원형 엽이 작고 끝이 뾰족형 엽이 크고 타원형 엽이 크고 끝이 뾰족형	1 3 5 7		봄눈의 생장이 정지된 상태에서 2~3번째 엽
	8	엽질	엽면이 부드러운 것 엽면이 딱딱한 것	1 3		"
	9	엽광택	광택이 약간 있는 것 광택이 중간 정도인 것 광택이 많은 것	1 3 5		"
	10	엽면주름	소 중 다	1 3 5		"
	11	결각수	측정값		개	"
	12	엽록소 (SPAD 502)	측정값			" SPAD502로 측정
	13	엽색	진녹색 녹색 연녹색 연두색		칼라차트 참조	봄눈의 생장이 정지된 상태에서 2~3번째 엽
	14	엽각	측정값		(°)	"
	15	측맥수	측정값		개	봄눈의 생장이 정지된 상태에서 2~3번째 엽의 한쪽면 측맥수

Table 1-1 Continued

구 성	번 호	분 류	표 현 형 태	계 급	조 사 규 격	조 사 기 준 및 방 법
줄 기 의 특 성	16	분지수	측정값		개	정식 2~3년 된 유목의 가을 생육이 정지되었을 때 분지수
	19	분지각	측정값		(°)	신초 생장이 정지된 가지의 각도
	17	절간장	측정값		cm	신초 생장이 정지된 상태에서 2번째와 3번째엽 사이 길이
	18	굵기	측정값		mm	신초 생장이 정지된 상태에서 2번째와 3번째엽 사이 굵기
신 초 의 특 성	20	100아중	측정값		g	수확시 신초 100개의 생체중
	21	엽수	측정값		개	당년에 자란 가지의 생장이 정지되었을때 엽수
	22	신초장	측정값		cm	당년에 자란 가지의 생장이 정지되었을때 길이
모 용 의 분 포 와 특 성	23	굵기	가늘다	1		신초의 미전개된 정아 또는 전개된 제 1엽의 뒤면을 현미경으로 관찰
			중간	3		
			굵다	5		
	24	길이	짧다	1		"
			중간	3		
			길다	5		
25	분포	없다 중맥 중맥과 그 주변 엽 안쪽 엽 전체			"	
26	밀도	낮다	1		"	
		중간	3			
		높다	5			
27	꽃크기	소 중 대			3.0cm이하 3.1~4.5cm 4.6cm 이상	10월 중순부터 11월초 사이에 활짝핀 꽃의 직경
꽃 의 구 조	28	암술 길이	암술이 수술보다 짧아서 수술 속에 감춰진 것	1		암술과 수술의 길이비교
			암술과 수술의 길이가 같은 것 암술이 길어서 수술위로 올라온 것	3 5		
29	주두 형태	분기점이 길고 깊음 분기점이 중간부분임 분기점이 얇음	1 3 5	35%이하 35~65% 65%이상	주두 분기부 길이/주두길이 ×100	

Table 1-1 Continued

구성 번호	분류	표현형태	계급	조사규격	조사기준 및 방법	
30	맹아의 조만성	조생중 중생중(보향) 만생중			맹아율이 70%에 도달하였을때	
31	나무 형태	직립형(참죽) 중간형 개장형	1 3 5		나무의 자세(樹姿)	
기 타 특 성	32	내한성	매우 약	1	인공처리 및 자연상태 관찰	
			약	3		
			중 강	5 7		
			매우 강	9		
33	탄저병	매우 약 약 중 강 매우 강	1 3 5 7 9		인공접종 또는 자연발병에 의 함(습도 100%에서 2일간 분생 포자를 접종하여 3~4주 후에 조사)	
34	총질소	분석자료		%	Kjeldahl 분석법에 준함	
35	총아미노산	분석자료		mg/100g	차의 공정분석법(1990)에준하며 UV spectrophotometer로 분석	
성 분	36	엽록소	분석자료		mg/100g	UV spectrophotometer
	37	탄닌	분석자료		%	UV spectrophotometer
	38	카페인	분석자료		%	HPLC로 분석
	39	카테킨	분석자료		%	HPLC로 분석
40	성엽	사진			생장이 정지된 상태의 성엽	
사 진	41	꽃	사진			활짝핀 꽃
	42	전체(신초)	사진			5월 신초 또는 신초발생시 나 무전체

다. 성분분석

분석시료 조제 및 추출은 생엽 1檜 3葉(旗) 30g을 채취하여 스팀으로 찢 후 유념(柔捻)하여 80℃ 건조기에 건조 후 분쇄기로 분쇄하여 분석시료로 사용하였으며 시료 추출은 차의 공정분석법(池ヶ谷賢次郎 등 1990)에 준하였다.

총질소는 분말시료 0.2g을 황산 20ml에 분해촉진제를 넣어 태운 후 Kjeldahl분석법을 기본으로 한 Gerhardt사의 Vapodest 50 기기를 사용하여 측정하였다.

총amino acid는 차 공정분석법(池ヶ谷賢 등 1990)에 따라 100ml volumetric flask에 粉末試料 0.1g을 80℃ 熱水 70~80ml에 가해 80℃ 항온수조에서 30분간 加溫 후 放冷하여 여과지로 신속히 여과하고, 여과액에 polyvinylpoly -pyrrolidone(PVPP) 300mg을 가해 진탕하여 30분간 放置後 여과하여 分析溶液으로 사용하였다. 20ml test tube에 시료용액 1ml에 ninhydrin 0.5ml를 가해 잘 혼합한 후 80℃ 항온수조에서 30분간 가온한 후 신속히 냉각하여 희석액 (isoprophylalcohol 1 +H₂O 1)을 5ml 가해 잘 흔들어 준 후 파장 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

Table 1-2. Condition for amino acid analysis in tea leaves

Item	Condition
Instrument	Jasco V-530 UV/VYS
Column	AApak Na ⁺ (100mm×6mm I.D), AEC pak (50mm×4.6mm I.D)
Column oven temp.	60℃
Detector(FP-detector)	Ex:345nm, Em:455nm
Eluent (time programming)	1st, sodium citrate buffer, 0.01N Na ⁺ , pH 3.25 2st, sodium citrate buffer, 0.1 N Na ⁺ , pH 3.28 3rd, sodium citrate buffer, 0.1N Na ⁺ , pH 4.35 4th, sodium citrate buffer, 1.4N Na ⁺ , pH 5.23 5th, sodium citrate buffer, 0.2N NaOH,
Reagent 1	Sodium hypochlorite solution/0.4M, Potassium borate buffer(pH 10.5)
Reagent 2	OPA/0.4M potassium borate buffer(pH 10.5)
Flow rate	0.4ml/min(each)
Reaction coil 1	1m×0.5mm I.D
Reaction coil 2	2m×0.5mm I.D

탄닌 분석은 Anan(1996)의 차 분석법에 준하였다. 시료 분말 0.1g과 80℃ 열수 70 ml을 넣고 80℃ 항온수조에서 30분간 가온 추출하여 방냉 후 100ml로 정량하여 여과하였다. 이때 최초 20ml를 버리고 그후의 여과액을 측정용 시료 용액으로 사용한다. 이렇게 조제된 여과액 5ml와 주석산철시약 (FeSO₄7H₂O 100mg+rochelle salt 500mg/H₂O 100ml) 5ml를 25ml volumetric flask에 넣고 pH 7.5로 조절된 Sorensen's phosphate buffer solution(0.066M Na₂HPO₄ 2H₂O + 0.066M KH₂PO₄/1 l)으로 定量하여 發色시킨 후 spectrophotometer (Milton Roy Spectronic 3000)로 540nm에서 흡광도를 측정하고 ethyl- gallate (Waco chemical industries, Japan)로 표준곡선을 구해 다음 식으로 tannin 함량을 계산하였다.

* $Tannin(\%) = G \times 1.5 \times 100 / W$

G=시료용액 흡광도에 대한 ethyl-gallate량

W=100ml 중의 시료 건물중(mg)

Caffeine은 분말시료 100mg을 증류수 100ml에 넣고 열수 80℃ 항온수조에서 30분간 추출하여 여과한 후 시료의 전처리 없이 0.45μm membrane filter로 여과하여 HPLC로 분석하였다.

Table 1-3. HPLC condition for caffeine analysis in tea leaves

Item	Condition
Instrument	Jasco V-530 UV/VYS
Column	μ-bondapak C18 column(125 Å, 3.9×300mm, waters, USA) connected with a sentri™ μ-bondapak C18 guard column(125 Å, 3.9×20mm, waters, USA)
Mobile phase	A(H ₂ O:CH ₃ CN:85%H ₃ PO ₄ =94.95:5:0.05 v/v/v) B(H ₂ O:CH ₃ CN:85%H ₃ PO ₄ =49.95:50:0.05 v/v/v)를 gradiented.
Detector (UV-detector)	207nm
Column oven	40℃

Catechin은 분말시료 100mg을 증류수 100ml에 넣고 열수 80℃ 항온수조에서 30분 간 추출하여 여과한 후 시료의 전처리 없이 0.45 μm membrane filter로 여과하여 HPLC로 분석하였다.

Table 1-4. HPLC condition for catechin analysis in tea leaves

Item	Condition
Instrument	Jasco CO-965
Column	μ -bondapak C18 column(125 Å, 3.9×300mm, waters, USA) connected with a sentri™ μ -bondapak C18 guard column(125 Å, 3.9×20mm, waters, USA)
Mobile phase	A(H ₂ O:CH ₃ CN:85%H ₃ PO ₄ =94.95:5:0.05 v/v/v) B(H ₂ O:CH ₃ CN:85%H ₃ PO ₄ =49.95:50:0.05 v/v/v)를 gradiented.
Detector (UV-detector)	207nm
Column oven	40℃

엽록소는 분말시료 0.5g을 80% acetone 100ml에 넣어, 5℃ 냉암소에 12~ 18시간 방치하여 Whatman No.2로 여과 후 total 엽록소는 652nm에서, 엽록소a는 663nm에서, 엽록소b는 645nm에서 흡광도를 측정하였다.

라. 데이터베이스 프로그램 개발

앞의 방법으로 차시험장에서 유지 보존하고 있는 주요 유전자원 150종의 형태적 특성 33항목과, 총질소, 총아미노산 등 성분 특성 6항목, 잎의 모양등 사진 3종류를 컴퓨터에 입력하여 관리하면서 DB 프로그램을 개발하였다. 차나무 유전자원 데이터베이스 프로그램은 입력(수정)창, 검색창으로 구성하였고, 입력창에서는 조사기준 항목인 품종명, 엽면적, 엽폭 등 39개 항목과 사진을 입력하였다. 검색창은 주요특성 검색, 특성조합과 사진 검색으로 이루어졌으며 각각의 검색된 자료는 A4 크기로 인쇄될 수 있도록 하였다. 또한 상세검색에서 품종별로 특성 39항목과 사진이 1장에 출력될수 있도록 하였다.

시스템 개발 환경은 Microsoft Windows XP Service Pack 2, Microsoft Visual Studio 6.0, Microsoft Visual Basic 6.0, Microsoft Office Access 2003, Office Access 2000형식, Intel Pentium 4 CPU 1.8GHz 256MB RAM에서 프로그램 개발을 수행하였다.

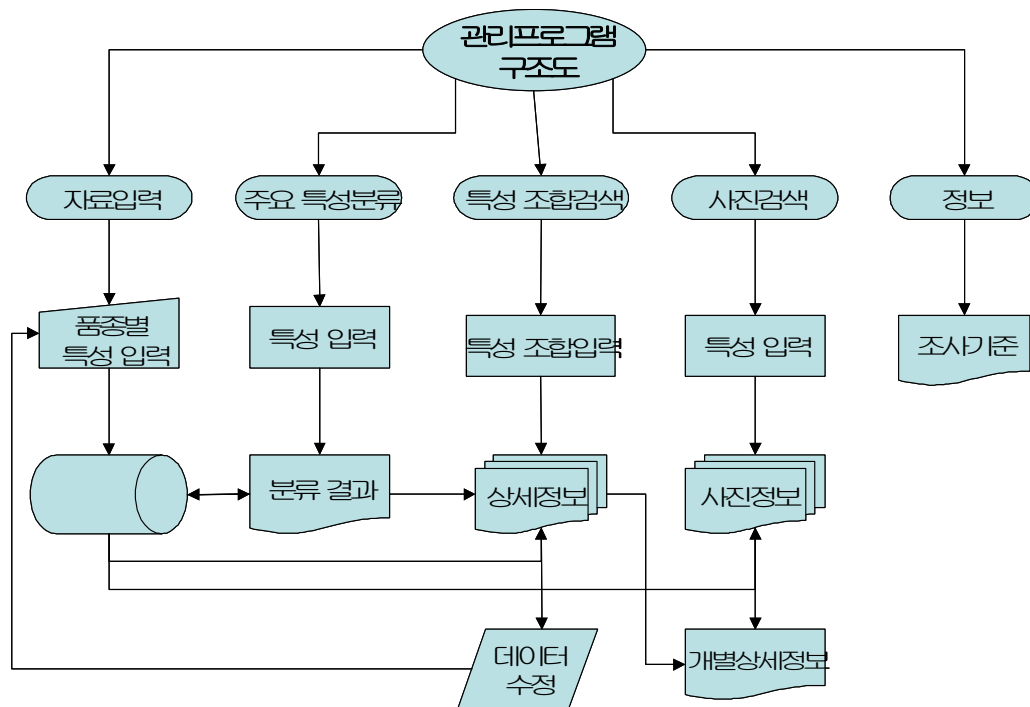


Fig. 1-3. Flow chart of database program for management of genetic resources of tea

3. 연구결과

가. 유전자원 수집 및 형태적 특성

Table 1-5. State of collection in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze germplasm

구분	Total	Korea	Japan	China	India
Cutting	49	17	7	25	-
Seed	54	38	1	-	15

차나무 유전자원은 1992년 차시험장이 설립된 이래 계속적으로 수집하여 3,000여종에 이르며 본과제 수행시 삼수 49점, 종자 54점을 확보(표 5)하여 삼목 및 과중하여 특성을 파악중에 있으며 묘상선발의 과정을 거치면서 특성평가를 할 예정이다. 또한 국내의 유전자원 150점에 대한 특성조사 결과는 차나무 유전자원 DB프로그램에 자세히 수록되어 있으며 여기서는 주요 특성에 대한 결과를 기술하고자 한다.

1) 조만성

맹아기를 중심으로 하여 조만성을 유추한 결과 조생종 16%, 중생종 43%, 만생종이 41%로 중생종과 만생종이 주를 이루고 있었다. 조만성은 첫물차의 소득을 결정하는 중요한 형질이며 또한 대규모 재배농가에서는 작업량조절에도 필요한 매우 중요한 형질이라 할 수 있다.

Table 1-6. Comparison of earliness for *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze germplasm (genetic resources)

earliness	Early	Middle	Late	Total
%	24(16%)	65(43)	61(41)	150(100)

※ 맹아기 기준 : 맹아율이 70%에 도달했을 때

※ 조만성 분류 : 조생종 : 4월 22일 이전 맹아, 중생종 : 4월 23일~4월 30 맹아
만생종 : 5월 1일 이후 맹아

2) 차나무 잎의 주요 특성

Table 1-7. Leaf characters *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze germplasm

No.	Culivar or accession	Origin	Leaf				Shape ^z
			Area (mm ²)	Length (mm)	Width (mm)	Leaf thickness (mm)	
1	BS1	Korea	655	52	18	0.18	small lanceolate
2	BS2	Korea	764	52	21	0.18	small lanceolate
3	BS3	Korea	410	39	15	0.16	small lanceolate
4	BS4	Korea	851	45	27	0.13	small lanceolate
5	BS5	Korea	902	56	23	0.18	large obate
6	BS6	Korea	277	33	12	0.16	large obate
7	BS7	Korea	1,280	74	28	0.21	large lanceolate
8	BS8	Korea	314	32	14	0.12	large obate
9	BS9	Korea	630	45	20	0.2	small obate
10	BS10	Korea	922	60	23	0.20	small obate
11	BS11	Korea	440	37	17	0.14	large obate
12	BS12	Korea	672	48	20	0.18	large lanceolate
13	BS13	Korea	706	56	18	0.2	small lanceolate
14	BS14	Korea	1,144	65	27	0.19	small lanceolate
15	BS15	Korea	464	39	17	0.11	small lanceolate
16	BS16	Korea	1,040	55	27	0.2	large obate
17	BS17	Korea	1,578	80	29	0.15	large lanceolate
18	BS18	Korea	378	36	15	0.16	large obate
19	BS19	Korea	1,264	73	25	0.19	large lanceolate
20	BS20	Korea	1,191	67	24	0.20	large obate
21	BS21	Korea	821	51	23	0.18	large lanceolate
22	BS22	Korea	488	41	17	0.16	small lanceolate
23	BS23	Korea	853	53	23	0.19	large obate
24	BS24	Korea	892	49	26	0.14	large obate
25	BS25	Korea	1,025	63	24	0.48	small obate
26	BS26	Korea	638	48	19	0.13	small lanceolate
27	BS27	Korea	941	56	24	0.18	small lanceolate
28	BS28	Korea	878	57	22	0.14	small lanceolate
29	BS29	Korea	580	46	18	0.17	large lanceolate
30	BS30	Korea	1,355	74	26	0.22	large obate
31	BS31	Korea	858	49	25	0.2	small lanceolate

^z Shape 1 small obate 3 small lanceolate 5 large obate and 7 large lanceolate

Table. 1- 7. Continued

No.	Culivar or accession	Origin	Leaf				Shape ^z
			Area (mm ²)	Length (mm)	Width (mm)	Leaf thickness (mm)	
32	BS32	Korea	1,289	72	26	0.20	large obate
33	BS33	Korea	1,130	66	25	0.16	small lanceolate
34	BS34	Korea	1,025	60	25	0.20	small obate
35	BS35	Korea	809	55	21	2	small lanceolate
36	BS36	Korea	1,069	63	25	0.24	small lanceolate
37	BS37	Korea	605	48	18	0.19	small lanceolate
38	BS38	Korea	1,293	69	27	0.25	large obate
39	BS39	Korea	1,025	63	24	0.21	large obate
40	BS40	Korea	847	60	20	0.18	small lanceolate
41	BS41	Korea	603	41	21	0.16	small lanceolate
42	BS42	Korea	485	33	21	0.19	small lanceolate
43	BS43	Korea	567	45	18	0.15	large obate
44	BS44	Korea	441	35	18	0.14	small lanceolate
45	BS45	Korea	1,219	66	26	0.20	small obate
46	BS46	Korea	987	62	24	0.19	small obate
47	BS47	Korea	1,387	75	28	0.18	small lanceolate
48	BS48	Korea	1,210	66	26	0.20	large obate
49	BS49	Korea	542	43	18	0.16	small obate
50	BS50	Korea	1,385	73	28	0.21	large obate
51	BS51	Korea	1,042	62	24	0.22	large obate
52	BS52	Korea	1,120	63	23	0.17	large obate
53	BS53	Korea	1,240	62	20	0.13	small lanceolate
54	BS54	Korea	1,365	65	21	0.2	large lanceolate
55	BS55	Korea	1,019	69	22	0.19	small lanceolate
56	BS56	Korea	1,564	68	23	0.14	large lanceolate
57	BS57	Korea	2,030	70	29	0.18	small lanceolate
58	BS58	Korea	1,190	68	25	0.17	large obate
59	BS59	Korea	1,560	60	26	0.21	small lanceolate
60	BS60	Korea	2,240	70	32	0.18	small lanceolate
61	BS61	Korea	1,890	70	27	0.17	large lanceolate
62	BS62	Korea	1,775	71	25	0.21	large lanceolate

^z Shape 1 small obate 3 small lanceolate 5 large obate and 7 large lanceolate

Table. 1- 7. Continued

No.	Cultivar or accession	Origin	Leaf				Shape ^z
			Area (mm ²)	Length (mm)	Width (mm)	Leaf thickness (mm)	
63	BS63	Korea	909	59	22	0.24	large obate
64	BS64	Korea	501	55	13	0.2	large lanceolate
65	BS65	Korea	875	50	25	0.2	large lanceolate
66	BS66	Korea	823	56	21	0.24	small obate
67	BS67	Korea	1,650	75	22	0.21	large lanceolate
68	BS68	Korea	1,138	65	25	0.12	large obate
69	BS69	Korea	1,364	62	22	0.18	large obate
70	BS70	Korea	1,122	51	22	0.15	small lanceolate
71	BS71	Korea	868	62	20	0.23	large obate
72	BS72	Korea	617	49	18	0.11	small lanceolate
73	BS73	Korea	1,178	62	19	0.13	large obate
74	BS74	Korea	874	52	24	0.16	small obate
75	BS75	Korea	1,453	80	26	0.27	large lanceolate
76	BS76	Korea	911	62	21	0.16	small lanceolate
77	BS77	Korea	1,564	68	23	0.19	large lanceolate
78	BS78	Korea	936	52	18	0.19	large obate
79	BS79	Korea	1,197	57	21	0.22	large lanceolate
80	BS80	Korea	1,488	62	24	0.21	small lanceolate
81	BS81	Korea	1,792	64	28	0.18	small lanceolate
82	BS82	Korea	1,302	62	21	0.19	small lanceolate
83	BS83	Korea	1,680	60	28	0.22	small lanceolate
84	BS84	Korea	1,536	64	24	0.16	small lanceolate
85	BS85	Korea	1,482	57	26	0.15	small lanceolate
86	BS86	Korea	1,380	60	23	0.2	small lanceolate
87	BS87	Korea	668	53	18	0.15	large obate
88	BS88	Korea	1,342	78	25	0.20	large lanceolate
89	BS89	Korea	1,407	70	28	0.23	large obate
90	BS90	Korea	1,971	73	27	0.15	small obate
123	BS91	China	3,920	100	56	0.23	large obate
91	BS92	Korea	882	49	18	0.2	large lanceolate
92	BS93	Korea	1,361	70	29	0.22	large obate
93	BS94	Korea	1,564	68	23	0.22	small lanceolate

^z Shape 1 small obate 3 small lanceolate 5 large obate and 7 large lanceolate

Table. 1- 7. Continued

No.	Culivar or accession	Origin	Leaf				Shape ^z
			Area (mm ²)	Length (mm)	Width (mm)	Leaf thickness (mm)	
94	BS95	Korea	665	50	19	0.2	large lanceolate
95	BS96	Korea	1,750	70	25	0.23	large lanceolate
96	BS97	Korea	1,452	66	22	0.2	small lanceolate
97	BS98	Korea	798	57	20	0.15	large lanceolate
98	BS99	Korea	1,100	55	20	0.14	small lanceolate
99	BS100	Korea	1,296	54	24	0.2	small lanceolate
100	BS101	Korea	736	46	16	0.22	large lanceolate
101	BS102	Korea	1,300	52	25	0.19	small lanceolate
102	BS103	Korea	2,010	67	30	0.14	small lanceolate
103	BS104	Korea	2,310	77	30	0.18	small lanceolate
104	BS105	Korea	1,512	54	28	0.17	large lanceolate
105	BS106	Korea	704	44	16	0.18	small obate
106	BS107	Korea	1,134	54	21	0.2	small obate
107	BS108	Korea	896	56	16	0.12	small lanceolate
108	BS109	Korea	1,273	73	26	0.23	large lanceolate
109	BS110	Korea	704	44	16	0.15	large obate
110	BS111	Korea	792	44	18	0.19	large obate
111	BS112	Korea	2,050	82	25	0.17	large lanceolate
112	BS113	Korea	1,809	67	27	0.22	large lanceolate
113	BS114	Korea	1,675	67	25	0.14	small lanceolate
114	BS115	Korea	1,283	72	26	0.23	small lanceolate
115	BS116	Korea	756	54	20	0.15	large obate
116	BS117	Korea	1,725	69	25	0.13	small obate
117	BS118	Korea	945	45	21	0.21	small obate
118	BS119	Korea	1,680	60	28	0.15	small obate
119	BS120	Korea	420	40	15	0.16	small lanceolate
120	BS121	Korea	1,440	60	24	0.19	large lanceolate
121	BS122	Korea	1,586	61	26	0.14	large lanceolate
122	BS123	Korea	2,117	73	29	0.13	small lanceolate
124	Bo-hyang	Korea(JH)	454	54	12	0.18	small lanceolate
125	Bokjeongdaebaek	Korea	1,215	62	28	0.22	large obate
126	Bosung10	Korea	1,254	64	28	0.22	small lanceolate

^z Shape 1 small obate 3 small lanceolate 5 large obate and 7 large lanceolate

Table. 1- 7. Continued

No.	Culivar or accession	Origin	Leaf				Shape ^z
			Area (mm ²)	Length (mm)	Width (mm)	Leaf thickness (mm)	
127	Bosung2	Korea	1,575	75	30	0.21	small lanceolate
128	Bosung4	Korea	1,617	70	33	0.17	small lanceolate
129	Bosung6	Korea	1,663	72	33	0.2	large lanceolate
130	Bosung7	Korea	886	55	23	0.13	small lanceolate
131	Bosung8	Korea	1,365	65	30	0.21	small lanceolate
132	Bosung9	Korea(KR)	1,050	60	25	0.14	small lanceolate
133	Charm-nok	Korea(BS)	1,247	66	27	0.21	large lanceolate
134	Chinsin Olong	Korea(BS)	1,219	67	26	0.19	large lanceolate
135	Fujimidori	China	812	58	20	0.17	large lanceolate
136	Hangju7-4	Korea	2,317	92	35	0.20	large obate
137	Jinhyang	China	1,394	68	30	0.20	small obate
138	Keungok-ro	Korea	1,859	77	34	0.25	large obate
139	Kukaengjong	Taiwan	2,818	114	38	0.19	large lanceolate
141	Kurasawa	Japan	1,631	80	30	0.18	large obate
140	Mihyang	Japan	1,488	74	30	0.20	large obate
142	Myung-seon	China	1,930	88	31	0.22	large lanceolate
143	Osun	Japan	2,666	112	37	0.17	large lanceolate
144	Saemidori	Korea	1,098	63	26	0.24	small obate
145	Shunmei	Japan	1,564	79	29	0.20	large obate
146	Sunhyang	Japan	1,122	68	23	0.21	large obate
147	TTES27	Taiwan	2,699	101	41	0.18	large obate
148	TTES29	Taiwan	3,461	115	45	0.20	large obate
149	Yabukita	Japan	1,632	89	30	0.20	large lanceolate
150	Yingshuang	China	1,695	81	31	0.12	large lanceolate

^z Shape 1 small obate 3 small lanceolate 5 large obate and 7 large lanceolate

3) 차나무 잎의 일반적 특징

차시험장 보유 유전자원은 엽면이 딱딱한 것과 부드러운 것이 50:50 수준으로 분포하였으며 광택은 중간정도가 47%로 가장 많았고 약간 있는 것 28%, 많은 것이 25% 순이었다. 엽형은 적은 타원형이 37%, 큰 타원형이 28% 순이었으며 엽의 형태별로 골고루 분포하는 경향이었다. 엽면 주름은 중간정도가 47%, 소가 40%로 주름이 적은 편이었다.

Table 1-8. Leaf texture

Leaf texture	Hard leaf surface	Soft leaf surface	Total
Germplasm number(%)	75(50)	75(50)	150(100)

Table 1-9. Leaf luster

Leaf luster	Dull	Intermediate	Luster	Total
Germplasm number(%)	41(28)	71(47)	38(25)	150(100)

Table 1-10. Leaf shape

Leaf shape	1 ^z	3	5	7	계
Germplasm number(%)	55(37)	16(11)	42(28)	37(24)	150(100)

※ ^z Shape 1 small obate 3 small lanceolate 5 large obate and 7 large lanceolate

Table 1-11. Leaf wrinkling

Leaf wrinkling	Little	Intermediate	Severe	Total
Germplasm number(%)	59(40)	71(47)	20(13)	150(100)



Fig. 1- 4. Leaf shape^z

※ ^zShape 1: small obate 3: small lanceolate 5: large obate and 7: large lanceolate

Fig. 1-5. Leaf wrinkling^y

※ ^yLeaf wrinkling 1: Little, 2: Intermediate and 3: Severe

Fig. 1-6. Leaf luster^x

※ ^x Leaf luster 1: Dull, 2: Intermediate and 3 : Luster

4) 차나무 신초의 모용 특성

Table 1-12. Distribution of *C. sinensis* (L.) O. Kuntze germplasms by hair thickness on new leaves

Origin	Leaf hair thickness			Total
	Fine	Intermediate	Thick	
Korea	134(99)	2(1)	-	136
Japan	6	-	-	6
China	5	-	-	5
Taiwan	3	-	-	3
Total(%)	148(99)	2(1)		150(100)

조사종의 99%가 가는 모용을 갖은 것으로 조사되었으며 이는 Takeda(2002)가 조사한 내용과는 다르게 나타났는데 중국종은 모용의 굵기가 중간((20~40)인 계통이 77.5%였고 일본재래종은 98.7%가 굵은계통으로 관찰되었다. assamica 계통은 짧은계통이 43.9%, 중간인 계통이 40.4%였다고 보고한 바 있다. 이처럼 연구결과가 다른 것은 아주 작은 모용을 육안판단함에 있어서 연구자에 따른 오류나 판단의 근거가 달랐기 때문인 것으로 생각된다.

모용의 길이는 한국재래계통의 경우 중간인 것이 40%로 가장 많았고 짧은 것 35%, 긴 것이 25%순이었다. 반면 일본종은 모용의 길이가 중간정도인 것이 83% 많았다. Takeda(2002)는 모용의 길이를 짧은 것(<400 μ), 중간(400~800 μ), 긴 것(>800 μ)으로 분류하였는데 중국종은 긴 것이 86%였으며 아쌌종은 짧은 것이 44%로 가장 많았고 중간이 40%, 긴 것이 16%순으로 중국종은 모용이 대체로 길고 아쌌종은 짧은 것으로 보고하였다. 또 한국재래종과 일본종은 공히 모용이 길고 밀도가 높으며 전면(全面)에 분포하는 것이 많다고 보고하였다. 또 池田·根角(1996 b, 1999)에 의하면 한국종은 모용이 길고 밀도가 중간이거나 높은계통이 가장 많고 길이가 짧거나 밀도가 낮은 것도 있어 일본 재래종보다 변이가 크다고 한 바 있어 본 시험의 결과와 유사한 경향이며 이는 모용의 변이가 크다는 것을 의미한다.

Table 1-13. Frequency(%) of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze by length of hairs on new leaves

Origin	Leaf hair length			Total
	Short	Medium	Long	
Korea	47(35)	55(40)	34(25)	136(100)
Japan	1(17)	5(83)	-	6(100)
China	2(40)	1(20)	2(40)	5(100)
Taiwan	2(1)	1(1)	-	3
Total(%)	14(35)	14(41)	36(24)	150(100)

3) 모용의 분포

표 19와 같이 한국재래종은 73%가 잎의 전면에 분포하였으며 모든계통에 모용이 존재하였고 대부분이 전면에 분포하는 경향이였다. 모용은 품종식별 형질로 유용하나 (뮌 1964, Amma 1986) 모용 단일 형질만으로 품종을 식별하기는 곤란하다. 일본재래종에서는 모용에 대한 변이가 적어서 모용으로 식별이 불가능하지만 인도 다질링에서 도입한 'Cd5'(아쌈종)는 모용으로 어느정도 식별이 가능하며 중국종과 아쌈종을 분류하는 지표로써 유용하다. 모용이 없는 대만재래종(대만야마차-반교목성으로 내한성이 약하고 개화기가 늦으며 발효성이 높은 등 일반적으로 아쌈종으로 분류됨)등 특별히 특징 있는 그룹의 식별에도 이용가능하다(Takeda 2002). 박 등(2001)에 의하면 한국재래종 신엽에서 모용 분포는 대부분이 全面에 분포한다고 보고한 바 있다. 모용은 모양이나 밀도가 병해충 저항력과 관계가 깊은 것으로 알려져 있는데 특히 모용이 많으면 탄저병에 약하다고 한다. 일반적으로 한국재래종은 일본의 야부기다보다 탄저병 저항성이 높다고 알려져 있다. 따라서 모용과 병해충과의 관련성은 좀 더 심도 깊은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각되며 유전자원의 보존과 선발과정 중 지속적인 관찰이 요구되어진다.

Table 1-14. Classification of *Camellia sinensis* (L.)O.Kuntze germplasms by hair distribution on new leaves

Origin	Hairs distribution on new leaves				Total
	None	Midrib	Midrib and its vicinity	Surface in whole	
Korea	-	3(2)	35(25)	98(73)	32(100)
Japan	-	2(33)	-	4(67)	6(100)
Taiwan	-	1(33)	1(33)	1(33)	3(100)
China	-	1(20)	1(33)	3(40)	3(100)
Total(%)	-	7(5)	37(25)	106(70)	150(100)

4) 모용의 밀도

한국재래종은 모용밀도가 중간정도인 것이 59%였고 높은 것이 23%, 짧은 것이 18%순이었으며 일본종은 중간정도(100%)로 나타났다.

Table 1-15. Frequence(%) of *Camellia sinensis* (L.)O.Kuntze germplasms by hair density on new leaves

Origin	Leaf hair density			Total
	Low	Intermediate	High	
Korea	25(18)	80(59)	31(23)	136(100)
Japan	-	6(100)	-	6(100)
Taiwan	1(33)	1(33)	1(33)	3(100)
China	3(60)	2(40)	-	5(100)
Total(%)	29(19)	89(60)	32(21)	150(100)

뮷(1964)는 여름차 채취기에는 모용밀도 및 모용길이에 안정성이 결여되어 조사에 부적합하다고 하였으나 Takeda(2002)는 첫물차 채취기와 6월 두물차 채취기, 7월 세물차 채취기에 각각 모용 형태조사를 하였는데 조사시기에 따른 차이는 특별히 발견할 수 없었다고 보고한 바 있다. 본 시험에서 모용 조사시기는 7월 여름차 채취기였음을 밝혀두며 첫물차기와의 차이에 대해서는 조사하지 못했다. 다만 여름차 채취기에 新芽 상부의 전개엽 또는 반전개엽을 현미경으로 관찰하였으며 조사계통마다 동일한 시기에 실시하였으므로 계통간 모용특성을 파악하는데는 큰 문제가 없을 것이

라고 생각한다.

라. 화기의 형태적 특성

1) 꽃의 크기

꽃의 크기를 대, 중, 소로 구분하여 조사한 결과 중(3.1~4.5cm)이 74%로 가장 많았으며 소는 15%, 대는 11%수준이었다. 한국종의 경우 중간크기가 75%로 가장 많았다. 인도 아쌘종은 꽃이 크고 암술이 돌출되어 있으며 아쌘종과 일본재래종은 암술의 형태가 일정한 형태를 갖추고 있다고 하였다(志村 1949; 吳 1962; 大石 1983).

Table 1-16. *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze germplasms grouped by flower size

Origin	flower size			Total
	~3.0	3.1~4.5	4.6~	
Korea	23(17)	102(75)	11(8)	136(100)
Japan	-	3(50)	3(50)	6(100)
China	-	4(80)	1(20)	5(100)
Taiwan	-	2(67)	1(33)	3(100)
Total(%)	23(15)	111(74)	16(11)	150

2) 암술길이

암술과 수술의 길이가 같은 것이 40%로 가장 많았으며 암술이 수술보다 길어서 수술위로 올라온 것이 35%, 암술이 더 짧은 것이 25% 다. Takeda(2002)는 아쌘계통과 중국도입종에서 암술의 길이가 수술보다 더 긴 것이 많고 일본재래종이나 일본야마차는 암술과 수술의 길이가 같은 것이 더 많다고 보고하였다. 암술의 형태는 아쌘종과 중국종간의 차이보다 중국종과 일본재래종간의 차이가 크다고 하였다(大石 1983).

Table 1-17. *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze germplasms grouped by relative length of styles to stamens

Origin	Relative length of style to stamen			Total
	Longer	Equal	Shorter	
Korea	50(37)	56(41)	30(22)	136(100)
Japan	1(17)	3(50)	2(33)	6(100)
China	2(40)	1(20)	2(40)	5(100)
Taiwan	-	-	3(100)	3(100)
Total(%)	53(35)	60(40)	37(25)	150

3) 주두 분기점

주두 분기점은 가운데 부분(35~65%)에서 분기되는 것이 전체 57%로 가장 많았으며 그 다음으로 35%이하에서 분기되는 것이 30%, 65% 이상의 높이에서 분기되는 것이 13%순으로 나타났다.

Table 1-18. *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze germplasms grouped by position of style ramification

Origin	Position of style ramification			Total
	Low (<35%)	Intermediate (35~65%)	High (>65%)	
Korea	43(32)	78(57)	15(11)	136(100)
Japan	1(17)	3(50)	2(33)	(100)6
China	-	3(60)	2(40)	5(100)
Taiwan	19(33)	2(67)	-	3(100)
Total(%)	45(30)	86(57)	19(13)	150(100)

2) 차나무 유전자원 성분분석

차나무 유전자원의 성분분석 결과 총질소 함량은 범위 6.31 ~ 3.13사이에 분포하여 높은 유전적 변이를 나타내었고 평균은 4.35%였다. 신포종 선향과 미향의 총질소 함량은 각각 5.2%, 5.1%로 상위 그룹에 속함을 알 수 있었다.

차의 감칠맛을 내는 가장 중요한 요소인 총아미노산 함량은 보성 Bosung 10호가 3,120mg/100g으로 가장 많았고 그 다음이 Bosung 2호가 3,020mg/100g, BS72계통이 2,900mg/100g순이었다. 범위는 299 ~ 3,120mg/100g이었고 평균 1,480mg/100g이었다.

엽록소 함량은 247 ~ 757mg/100g이고 평균 449mg/100g였으며 떫은 맛과 관련 있는 탄닌은 최고 4.68에서 최저 11.28%였으며 평균 7.27%로 유전자원간 변이의 폭이 큼을 알 수 있었다. 이처럼 큰 변이의 폭은 이후 육종의 소재로 활용하면 유익한 소재가 될 것이다.

카페인 함량은 0.55 ~ 3.7% 사이에 분포하였으며 유전자원간 평균은 2.06%였다. 카페인은 중추신경 흥분과 수면방지 작용 등을 유발한다는 이유로 저카페인 계통 육성이 시급한데 카페인 함량이 낮은 BS115계통이나 BS45계통 등 저카페인 계통은 중간모본으로의 활용이 기대된다.

항산화작용, 항암작용, 혈압상승 억제 등 기능성물질인 카테킨은 최고 16.1%에서 4.1%사이에 분포하며 평균 함유량은 9.5%였다. BS63, BS65, BS66 등은 고카테킨 계통으로 교배 중간모본으로 선발하였으며 우수계통으로 선발하여 활용할 예정이다.

이처럼 성분분석을 통해 우수한 형질을 가진 개체를 선발하고 교잡육종을 실시할 경우 효율적인 형질 조합이 이루어질 것이다.

Table 1-19. Distribution component by total nitrogen in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze germplasms


Cultivar and accession	Total nitrogen(%)	Total amino acid (mg/100g)	Chlorophyll (mg/100g)	Tannin (%)	Caffeine (%)	Catechin (%)
BS121	6.31	1,190	415	8.25	2.29	11.4
BS63	5.48	2,420	460	7.42	3.18	16.1
BS122	5.36	1,563	562	7.21	2.35	12.1
BS119	5.35	1,777	389	6.27	2.35	11.3
BS66	5.24	1,874	590	6.78	2.9	14.7
Sunhyang	5.2	2,755	580	7.21	2.7	9.5
BS102	5.11	2,740	512	7.55	2.87	10.8
Mihyang	5.1	2,265	620	7.65	3.4	13.9
BS65	5.01	2,004	621	8.02	2.69	15.0
BS101	4.92	2,403	589	7.18	2.78	11.6
BS18	4.9	1,176	477	7.31	2	8.9
BS21	4.9	1,426	539	6.42	2	10.5
BS95	4.9	1,184	453	6.38	2.2	9.1
BS64	4.87	1,960	632	7.5	2.23	14.4
BS15	4.8	1,400	335	7.98	1.8	8.8
BS16	4.8	1,160	506	5.82	2.2	10.3
BS26	4.8	1,366	407	6.16	1.9	8.4
BS87	4.8	2,710	480	6.45	2.8	12.9
						
BS109	3.56	871	280	7.69	1.47	7.0
BS25	3.53	1,398	247	7.88	1.32	6.0
BS38	3.47	1,138	281	10.65	1.28	10.1
BS115	3.13	726	252	7.26	0.55	6.0
Range	6.31~3.13	299~3120	247~757	4.68~11.28	0.55~3.7	4.1~16.1
Average	4.35	1,480	449	7.27	2.06	9.5

Table 1-20. Distribution component by total amino acid in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze germplasms


Cultivar and accession	Total nitrogen(%)	Total amino acid (mg/100g)	Chlorophyll (mg/100g)	Tannin (%)	Caffeine (%)	Catechin (%)
Bosung10	4.2	3,120	570	7.54	2.6	11.5
Bosung2	4.5	3,020	630	10.3	2.7	10.1
BS72	4.3	2,900	510	6.98	2.8	14.0
Sunhyang	5.2	2,755	580	7.21	2.7	9.5
BS102	5.11	2,740	512	7.55	2.87	10.8
BS87	4.8	2,710	480	6.45	2.8	12.9
Hangju7-4	4.7	2,630	441	6.51	3.7	10.1
Bosung4	4.4	2,570	423	8.62	2.7	9.5
BS70	3.9	2,540	450	7.56	2.6	13.0
Bosung8	4.3	2,520	560	7.69	2.2	12.4
Bosung9	4.2	2,480	430	8.65	3.7	10.6
Bosung6	4.2	2,460	428	7.21	2.3	12.0
BS113	4.70	2,447	607	7.98	2.58	9.9
BS63	5.48	2,420	460	7.42	3.18	16.1
BS101	4.92	2,403	589	7.18	2.78	11.6
Bosung7	4.3	2,350	520	6.87	3.3	10.9
BS51	4.2	2,318	430	8.21	2.6	10.9
Mihyang	5.1	2,265	620	7.65	3.4	13.9
BS103	4.61	2,100	468	9	2.53	10.9
						
BS96	4.32	1,987	406	7.35	2.51	11.0
BS120	4.1	1,982	452	5.65	2.5	12.5
BS56	4.45	1,980	418	7.15	2.14	9.6
BS77	4.39	1,843	390	6.47	2.49	11.7
Range	6.31~3.13	299~3120	247~757	4.68~11.28	0.55~3.7	4.1~16.1
Average	4.35	1,480	449	7.27	2.06	9.5

Table 1-21. Distribution component by Caffeine in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze germplasms



Cultivar and accession	Total nitrogen (%)	Total amino acid (mg/100g)	Chlorophyll (mg/100g)	Tannin (%)	Caffeine (%)	Catechin (%)
BS115	3.13	726	252	7.26	0.55	6.0
Keungok-ro	4.21	470	511	5.08	0.79	4.1
BS45	3.57	914	265	6.80	0.88	5.4
Saemidori	4.12	744	454	5.85	1.14	5.3
BS47	3.79	648	408	5.86	1.19	5.3
BS40	3.73	796	327	6.51	1.20	5.5
Bokjeongdaebaek	4.07	720	385	6.96	1.28	6.8
BS38	3.47	1,138	281	10.65	1.28	10.1
BS30	3.93	902	459	7.49	1.29	6.1
BS89	3.75	901	497	7.27	1.30	6.8
BS25	3.53	1,398	247	7.88	1.32	6.0
BS36	3.96	1,094	456	8.20	1.33	7.2
BS17	3.94	797	489	7.93	1.35	7.4
Fujimidori	3.66	299	666	5.42	1.35	4.6
BS50	3.79	669	413	7.46	1.38	6.9
Yabukita	4.18	713	432	6.76	1.38	6.4
BS55	3.67	949	346	8.02	1.39	6.6
BS5	4.4	1,464	480	6.67	1.4	7.7
BS6	4.5	1,204	398	6.74	1.4	7
						
BS32	4.01	1,343	373	8.10	1.60	6.5
BS48	3.90	723	362	8.78	1.63	7.8
BS75	3.99	1,043	392	8.37	1.64	5.7
BS10	4.06	997	379	9.82	1.64	9.1
Range	6.31~3.13	299~3120	247~757	4.68~11.28	0.55~3.7	4.1~6.1
Average	4.35	1,480	449	7.27	2.06	9.5

Table 1-22. Distribution component by Catechin in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze germplasms

Cultivar and accession	Total nitrgen (%)	Total amio acid (mg/100g)	Chlorophyll (mg/100g)	Tannin (%)	Caffeine (%)	Catechin (%)
BS63	5.48	2,420	460	7.42	3.18	16.1
BS65	5.01	2,004	621	8.02	2.69	15.0
BS66	5.24	1,874	590	6.78	2.9	14.7
BS64	4.87	1,960	632	7.5	2.23	14.4
BS72	4.3	2,900	510	6.98	2.8	14.0
Mihyang	5.1	2,265	620	7.65	3.4	13.9
BS106	4.01	863	530	8.15	2.57	13.7
BS70	3.9	2,540	450	7.56	2.6	13.0
BS67	4.40	1,783	651	6.65	2.67	12.9
BS87	4.8	2,710	480	6.45	2.8	12.9
Osun	4.6	1,890	510	9.5	2.7	12.7
BS62	4.42	1,580	452	5.87	2.55	12.7
BS61	4.47	1,943	543	10.56	2.57	12.6
BS97	4.32	1,577	376	6.18	2.54	12.5
BS120	4.1	1,982	452	5.65	2.5	12.5
BS104	4.32	1,437	420	21	2.57	12.4
Bosung8	4.3	2,520	560	7.69	2.2	12.4
BS54	4.28	1,400	423	6.98	2.51	12.3
BS59	4.27	1,520	478	6.45	2.49	12.2
BS122	5.36	1,563	562	7.21	2.35	12.1
						
BS88	4.16	1,481	415	6.03	1.44	4.9
BS33	3.91	970	403	6.37	1.51	4.8
Fujimidori	3.66	299	666	5.42	1.35	4.6
BS52	3.76	650	382	5.58	1.43	4.6
Keungok-ro	4.21	470	511	5.08	0.79	4.1
Range	6.31~3.13	299~3120	247~757	4.68~11.28	0.55~3.7	4.1~16.1
Average	4.35	1,480	449	7.27	2.06	9.5

3) 차나무 유전자원 DB 프로그램 개발

차나무 유전자원 DB 프로그램은 150계통에 대하여 특성 39항목과 3종류 사진으로 구성되어 있으며 메인 메뉴에는 입력하기(수정하기), 특성분류 검색, 특성조합 검색, 사진 검색, 종료, 정보로 구성되어 있다. 또한 상세 인쇄하기, 리스트 출력 기능 등이 있으며 내용은 그림 1-7 ~ 1-14와 같다.



Fig. 1-7 .Main menu of program

내력		원산지 :	
품종명 :			
성엽특성			
엽면적(mm ²) :		엽형 :	↓
엽길이(mm) :		엽질 :	↓
엽폭(mm) :		엽광력 :	↓
엽두께(mm) :		엽면주름 :	↓
		엽록소(SPAD502) :	
		엽색 :	↓
		엽각(°) :	
		축력수 :	
줄기의 특성		기타 특성	
분지수 :		절간장(cm) :	
줄기의 굵기(mm) :		분지각(°) :	
신초의 특성		팽아의 조만성 : ↓ (팽아출이 70%에 도달하였을때) 나무의 형태 : ↓ 내한성 : ↓ 탄저병 : ↓	
100아중(g) :		신초당 엽수 :	
신초장(cm) :			
모용의 분포와 특성			
모용의 굵기 :	↓	모용의 분포 :	↓
모용의 길이 :	↓	모용의 밀도 :	↓
꽃의 구조			
꽃의 크기 :	↓	암술 길이 :	↓
		주두 형태 :	↓
성분			
총질소(%) :		엽록소(mg/100g) :	
총아미노산(mg/100g) :		탄닌(%) :	
		카페인(%) :	
		카테킨(%) :	
비고			

Fig. 1-8. Input window



Fig. 1-9. Retrieval window

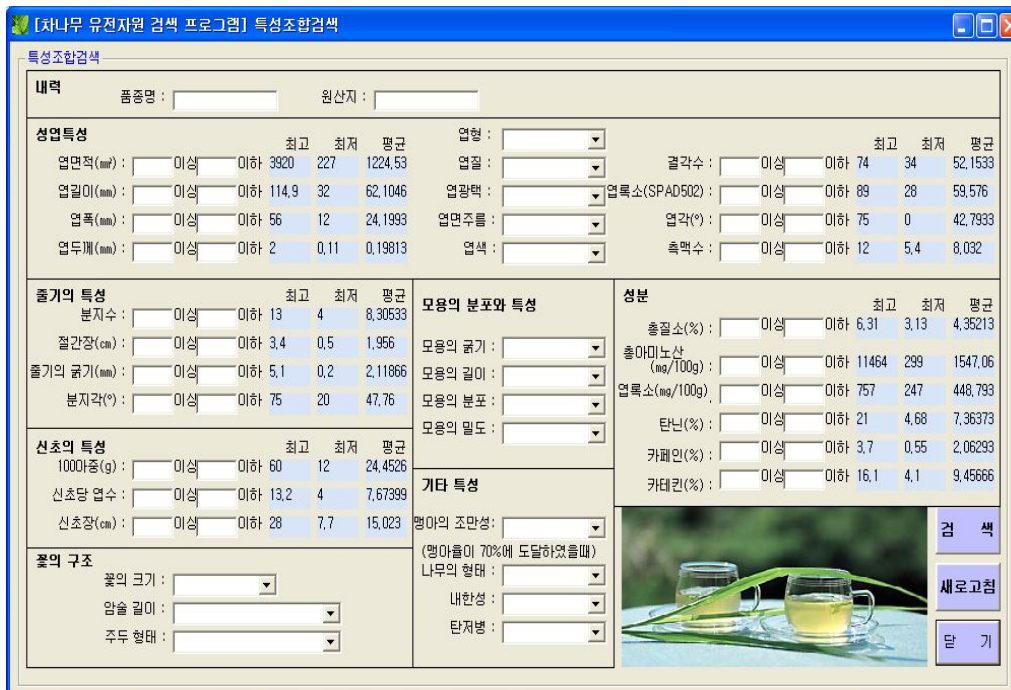


Fig. 1-10. Retrieval window for cross characters



Fig. 1-11. Retrieval window for pictures



Fig. 1-12. Correction and deletion window



Fig. 1-13. Print window

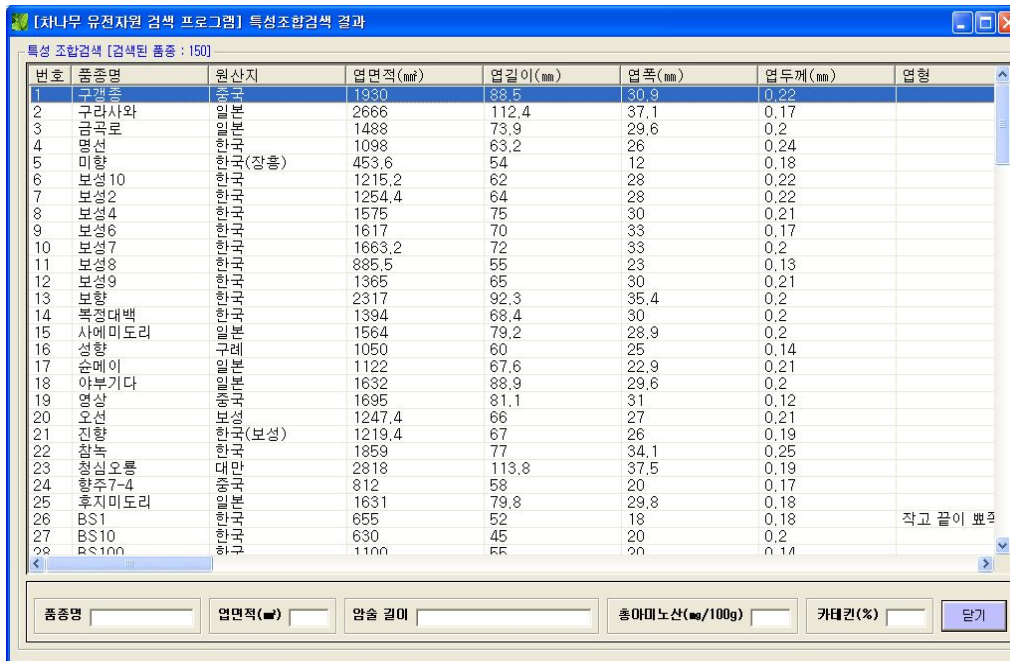


Fig. 1-14. Retrieval output window for cross characters

제 2 절 차나무의 유전분석과 DNA maker 개발

1. 서론

인간이 일상생활에서 차를 이용하고 차가 인간의 정신적, 육체적 건강에 크게 공헌하기 때문에 차와 차나무(*Camellia sinensis*)에 대한 관심이 증대되고 있다. 최근 건강에 대한 관심이 높아지면서 고품질의 차에 대한 수요가 증가되고 있고 이에 따라 우량품종 육성을 위한 차에 대한 연구가 활발히 이뤄지고 있다(김 등, 2002).

차(*Camellia sinensis*)는 차나무과 동백나무(*Camellia*) 속의 아열대성 목본상록식물로서 타식성 작물이다. 남위 38°, 북위 45°, 동경 150°, 서경 60°에 속하는 중국, 한국, 일본을 비롯한 아열대 및 온대지대, 남아프리카 등지에 걸쳐 넓은 지역에 분포되어 있고, 재배적지는 연평균 기온이 13℃ 이상, 연간 강우량이 1,200mm 이상인 온난 다우지로 알려져 있다(김 등, 2000). 우리나라의 차 전래는 김수로왕비인 허왕후가 아미타국에서 가락국으로 건너올 때 차나무를 가져와서 김해 백월산에 심었다는 설이 가장 오래된 것이며, 삼국유사 10권 신라국기편에 기록되어 있어 우리나라의 차의 재배 역사는 1,200~2,000년 정도로 추정된다(박 등, 2001). 현재까지 보향, 명선, 참녹, 선향, 미향, 진향, 오선 등의 품종이 육성되고 있으나 대부분의 지역에서 자생되어 있는 차를 이용하거나(최 등, 1998) 일본, 중국 등에서 육종된 품종을 도입하여 재배하고 있다(김 등, 2000). 자생차의 경우 개체간 형질이 균일치 못하고, 도입품종을 그대로 심게 되면 우리 기후 풍토 및 기호성에 맞지 않은 문제와 우리 고유 야생차 집단의 우수한 유전자가 침식당하는 문제가 야기될 수 있다.

차는 자가불화합성 작물로서 종자를 이용하여 번식하게 되면 변이가 심하여 개체간의 특성이 균일치가 않다. 또한 국내에 자생하고 있는 차나무는 오랜 기간 동안 타가수정에 의한 종자번식을 할 뿐만 아니라 역사적으로 다양한 경로로 여러 계통들이 혼합 식재되어 품종을 구별하기가 힘든 문제점을 가지고 있다(김 등, 2000; Mondal, 2002). 따라서 국내 자생 차나무의 유전자원 활용을 위한 국내 자생 차나무 집단에 대한 형태분류와 분자생물학적 분석에 대한 기초 자료가 필요하다.

지금까지 차의 분류 및 형질의 유전적 분석에 관한 많은 연구가 진행되어 왔다(이 등, 1995; 이 등, 2003; Oh and Hong, 1995; 김 등, 2000; 김 등, 2002). 이 중 국내 수집 차나무 집단을 대상으로 한 연구는 주로 RAPD 방법을 이용하였으며(박 등, 1997, 2000, 2001; 이 등, 1995), 이 방법은 재현성 등 분석적인 어려움을 가지고 있

다(Choi *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000). AFLP방법은 RAPD의 단점을 보완하여 높은 재현성의 장점을 가지고 있는데(김 등, 2004; 이 등, 2003; Vos *et al.*, 1995), AFLP방법을 이용한 국내보고는 소수에 불과하다(이 등, 2003).

본 연구는 RAPD, AFLP 및 SSR의 분자생물학적 분석방법에 기초한 국내 수집 차나무 집단들의 분자유전학적 특성을 밝혀 차나무 품종육종에 필요한 기초 자료를 제공하고자 수행하였다.

2. 연구 방법

가. RAPD를 이용한 유전분석과 DNA marker 개발

1) 식물재료

공시 식물재료는 보성 차시험장에 보존된 한국산 차나무(32계통), 대만(3종), 중국(4종), 일본종(6종)으로 총 45종/계통에서 시료를 채취하였다(표 2-1). 국외종은 영양계 또는 실생이며, 한국종은 각지에서 수집된 종자로부터 번식된 차나무이다.

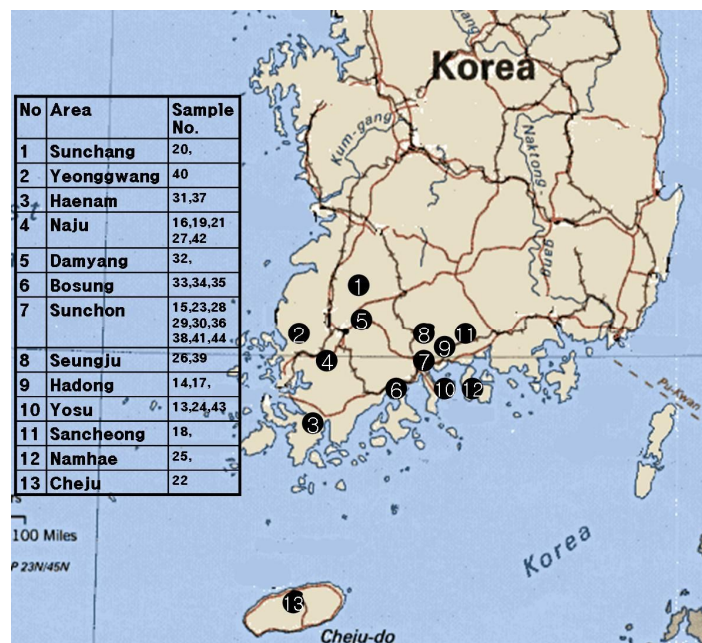


Fig. 2-1. Map showing the location of the Korean abandoned tea populations on this study.

2) RAPD용 DNA 분리·정제

PCR에 적합한 DNA를 추출하기 위하여 GMO Extraction kit(Bioneer 사)를 사용하였다. 각 개체별로 당년에 자란 잎을 채취하여 아이스박스에 넣어 운반하였다. 채취한 깨끗한 성숙엽으로 상처나 손상되지 않는 잎 시료를 미리 액체질소를 첨가한 막자사발에 넣고 액체질소를 첨가하면서 마쇄 하였다. 분말상태의 잎 100mg을 원심분리관에 넣은 후, lysis buffer 400 μ l와 proteinase K 20 μ l(25mg/1.25ml)를 넣어준다. 60 $^{\circ}$ C의 water bath에 10분간 반응시키고 시료를 혼합한 후 binding buffer 400 μ l를 첨가해주고, 다시 60 $^{\circ}$ C waterbath에서 10분간 반응시킨다. 12,000rpm에서 5분간 원심분리, 상층액을 회수한 후 isopropanol 100 μ l를 넣어 잘 섞은 다음 시료를 binding column을 장착한 새 2ml tube로 옮겨준다. 8,000rpm에서 1분간 원심분리 한 후 binding column을 다시 새 2ml tube로 옮겨준다. 여기에 500 μ l washing buffer I을 넣어주고, 다시 8,000rpm에서 1분간 원심분리 후 binding column을 새 2ml tube로 옮겨준다. washing buffer II를 500 μ l 넣어주고, 8,000rpm에서 1분, 13,000rpm에서 1분간 원심분리하고, column을 새 1.5ml tube로 옮겨준다. Elution buffer 100 μ l를 column에 넣어 20분간 상온에 방치한 후 8,000rpm에서 1분간 원심분리, DNA를 회수한다. 회수한 DNA는 1 \times TE용액으로 20배 희석한 뒤 정량하여(Ultrospec 2100 pro, Amersham Pharmacia Biotech.) RAPD 분석에 사용하였다.

3) RAPD분석

가) PCR 조건검토

OPB-01, OPB-13 primer에 대해 아래의 RAPD분석에서와 동일한 조건에서 Template DNA 양을 50, 200 ng, *Taq* polymerase를 1 unit, 3unit으로 달리하여 비교하였다. 또한 PCR반응을 아래와 같이 2단계로 반응한 것과 35cycle 단일 조건(94 $^{\circ}$ C에서 120초, 1 cycle 한 후 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 37 $^{\circ}$ C에서 60초, 72 $^{\circ}$ C에서 2분)으로 하여 비교하였다.

나) RAPD 분석

Operon Technology 사의 10-mer random oligonucleotide primer (A1-20, B1-20, C1-20, D1-20) 80종을 구입하여 사용하였다. 이중 45종의 primer를 1차 선별하였다(표2-2). 반응조건은 10 \times PCR buffer(100mM Tris-HCl완충액 pH8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂), 0.2M dNTP, 50pmol primer, 1 unit *Taq* polymerase, 그리고 50ng의 genomic DNA 넣어주고, total volume은 25 μ l로 반응시켰다. DNA 증폭을 위한 PCR조

건은 94℃에서 120초(pre-denaturation), 1 cycle 한 후 94℃에서 30초(denaturation), 36℃에서 60초(annealing), 72℃에서 2분(extension)으로 하여 15cycle 반복하고, 94℃에서 30초, 45℃에서 1분, 72℃에서 2분으로 하여 25cycle 반복한 후 72℃에서 10분 1cycle 실시한 후 4℃에 저장한다. 증폭단편은 1.2% agarose gel에 전기영동 하였고 ethidium bromide용액(0.5 μ g/ml)에서 10분간 염색하여 UV trans-illuminator 상에서 증폭단편을 관찰하고 polymorphic band를 확인하였다.

4) 유전적 다양성분석

RAPD 결과의 cluster 분석은 재현성이 있는 주요 DNA band의 유무를 binary data로 전환하여 NTSYS complete program으로 처리한 후 Ward 방법으로 처리한 후 dendrogram을 작성하였다.

5) 유전자 크로닝

RAPD결과 특이적인 유전자산물 band를 agarose 전기영동하여 추출한 후 pGEM-T Easy Vestor System(Promega Co, Madison, USA)을 이용하여 cloning 하였다.

Table 2-1. Origin of the 45 tea(*Camellia sinensis*) accessions used on this study.

Code	Accession	Origin	Country
T01	Taicha27	Seed selection cultivated	Taiwan
T02	Taicha29	Seed selection cultivated	Taiwan
T03	Cheongsimoeryong	Seed selection cultivated	Taiwan
C04	Sakyechun	Seed selection cultivated	China
J05	Yabukita	Seed selection cultivated	Japan
J06	Kurasawa	Yabukita seedling	Japan
J07	Fujimidori	Seed selection cultivated	Japan
J08	Keumgok-ro	Seed selection cultivated	Japan
J09	Saemidori	Yabukita × Asatsuyu	Japan
J10	Shunmei	Yutakamidori × NN8	Japan
C11	Youngsang	Seed selection cultivated	China
C12	Kukaengjong	Seed selection cultivated	China
K13	Myung-seon	Seed selection cultivated	Korea
K14	Charm-nok	Seed selection cultivated	Korea
K15	Bo-hyang	Seed selection cultivated	Korea
K16	4-1-12	Seed selection cultivated	Korea
K17	3-25-5	Seed selection cultivated	Korea
K18	3-27-4	Seed selection cultivated	Korea
K19	4-2-3	Seed selection cultivated	Korea
K20	4-4-5	Seed selection cultivated	Korea
K21	4-6-1	Seed selection cultivated	Korea
K22	4-25-12	Seed selection cultivated	Korea
K23	2-8-3	Seed selection cultivated	Korea
K24	4-11-45	Seed selection cultivated	Korea
K25	4-21-1	Seed selection cultivated	Korea
K26	3-7-11	Seed selection cultivated	Korea
K27	2-31-12	Seed selection cultivated	Korea
K28	2-8-20	Seed selection cultivated	Korea
K29	1-26-4	Seed selection cultivated	Korea
K30	2-23-11	Seed selection cultivated	Korea
K31	4-22-8	Seed selection cultivated	Korea
K32	2-12-11	Seed selection cultivated	Korea
K33	2-2-4	Seed selection cultivated	Korea
K34	3-6-14	Seed selection cultivated	Korea
K35	2-24-33	Seed selection cultivated	Korea
K36	3-7-17	Seed selection cultivated	Korea

Table 2-1. Continued.

Code	Accession	Origin	Country
K37	3-22-3	Seed selection cultivated	Korea
K38	3-2-6	Seed selection cultivated	Korea
K39	2-8-13	Seed selection cultivated	Korea
K40	2-9-3	Seed selection cultivated	Korea
K41	2-2-2	Seed selection cultivated	Korea
K42	4-1-10	Seed selection cultivated	Korea
K43	1-4-4	Seed selection cultivated	Korea
K44	3-7-19	Seed selection cultivated	Korea
C45	Bokjeongdaebaek	Seed selection cultivated	China

Table 2-2. Forty five random primer sequences yielded DNA bands in the 45 tea collections.

Code	Sequences	Code	Sequences
OPA-01	CAGGCCCTTC	OPC-02	GTGAGGCGTC
OPA-02	TGCCGAGCTG	OPC-04	CCGCATCTAC
OPA-03	AGTCAGCCAC	OPC-05	GATGACCGCC
OPA-04	AATCGGGCTG	OPC-07	GTCCCCGACGA
OPA-09	GGGTAACGCC	OPC-08	TGGACCGGTG
OPA-11	CAATCGCCGT	OPC-11	AAAGCTGCGG
OPA-13	CAGCACCCAC	OPC-12	TGTCTGGGTG
OPB-01	GTTTCGCTCC	OPC-14	TGCGTGCTTG
OPB-02	TGATCCCTGG	OPC-15	GACGGATCAG
OPB-03	CATCCCCCTG	OPC-16	CACACTCCAG
OPB-04	GGACTGGAGT	OPC-18	TGAGTGGGTG
OPB-05	TGCGCCCTTC	OPC-19	GTTGCCAGCC
OPB-06	TGCTCTGCCC	OPC-20	ACTTCGCCAC
OPB-07	GGTGACGCAG	OPD-02	GGACCCAACC
OPB-08	GTCCACACGG	OPD-03	GTCGCCGTCA
OPB-10	CTGCTGGGAC	OPD-05	TGAGCGGACA
OPB-11	GTAGACCCGT	OPD-06	ACCTGAACGG
OPB-12	CCTTGACGCA	OPD-07	TTGGCACGGG
OPB-13	TTCCCCGCT	OPD-08	GTGTGCCCCA
OPB-14	TCCGCTCTGG	OPD-11	AGCGCCATTG
OPB-18	TTTGCCCGGA	OPD-13	GGGGTGACGA
OPC-01	TTCGAGCCAG	OPD-18	GAGAGCCAAC
		OPD-20	ACCCGTCAC

나. AFLP를 이용한 유전분석과 DNA marker 개발

1) 식물재료

공시 식물재료는 보성 차시험장에 보존된 한국산 차나무(32계통), 대만(3종), 중국(4종), 일본종(6종)으로 총 45종/계통에서 시료를 채취하였다(표 2-1). 국외종은 영양계 또는 실생이며, 한국종은 각지에서 수집된 종자로부터 번식된 차나무이다.

2) AFLP용 DNA 분리·정제

DNA 추출은 CTAB 법(Fang *et al.*, 1992)으로 실시하였다. 먼저 신선한 잎을 막자사발에 넣고 -196°C 의 액체질소를 부어 급속 냉동시킨 후 마쇄하여 분말형태의 재료를 2.0ml centrifuge tube에 1g정도 넣은 다음, 2% CTAB buffer [2% Cetyl trimethyl ammonium bromide, 0.1M Tris-HCl (pH 8.0), 20mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1% Polyvinylpyrrolidone] 900 μl 를 넣고 잘 섞는다. 그리고 65°C 항온수조에서 3분간 반응시킨 다음 추가로 동량의 Cholroform : Iso-amylalcohol(24 : 1)을 넣어 천천히 섞은 뒤 12,000 rpm에서 5분간 원심분리시켰다. 세 층으로 분리된 액의 상층부분을 회수하여, 다시 한번 상층액과 동량의 CI(Cholroform : Iso-amylalcohol) 용액을 넣고 잘 섞어준 후 12,000 rpm에 5분간 원심분리하여 상층액을 튜브에 회수하였다. 여기에 상층액의 1/10량의 10% CTAB buffer(10% CTAB, 0.7M NaCl)를 넣어 섞어준 후 65°C 항온수조에서 3분간 반응시켰다. 추가로 동량의 CI용액을 넣어 천천히 섞은 뒤 12,000 rpm에서 5분간 원심분리시켰다. 상층액을 새 1.5ml 원심용 튜브에 옮겨 상층액의 1~2배 양의 침전용 buffer[1% CTAB, 50mM Tris-HCl(pH8.0), 10mM EDTA]를 넣어 잘 섞은 후 65°C 로 유지되는 항온수조에 2분간 반응시킨 후 12,000 rpm에서 5분간 원심분리시켰다. 상층액을 버리고 침전된 DNA pellet에 50 μl 의 고염 TE [1M NaCl, 10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA]를 넣어주고 1시간동안 상온에서 반응시킨 후 100% 에탄올 400 μl 를 첨가하여, 12,000 rpm(4°C)에 10분간 원심분리하였다. DNA pellet만 회수한 후 다시 70% 에탄올 400 μl 를 첨가하고, 12,000 rpm(4°C)에 10분간 원심분리하여 DNA pellet을 회수하였다. 에탄올 성분이 남지 않도록 잘 건조시킨 후 30 μl 의 TE [10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA]에 DNA pellet을 용해시켰다. DNA 농도측정은 UV/VIS Spectrophotometer(Ultrasp^R 2000, Pharamacia Biotech, UK)를 이용하였으며, 최종농도를 50ng/ μl 로 희석하였다.

3) AFLP분석

가) AFLP분석의 최적 제한효소 조합 검토

보성차시험장에서 개발한 품종인 명선(13번 계통), 참녹(14번 계통), 보향 (15번 계통) 3품종에서 추출한 DNA를 *EcoRI*과 *MseI*을 조합하여 이중절단하고 1차증폭 한 후 각각 20조합으로 Selective-PCR하여 밴드패턴을 비교하여 적정 제한효소 조합을 검토하였다.

나) AFLP 분석

AFLP 분석은 AFLP analysis System kit(Life technologies, USA)의 방법에 따라서 단계별로 실시한다.

먼저 추출한 DNA를 제한효소로 절단하는 과정이다. 제한효소는 6염기를 인식하는 *EcoRI*과 4염기를 인식하는 *MseI*을 조합으로 사용하여 약 500 ng의 genomic DNA의 제한절편을 만든다. 각각 2.5unit의 제한효소로 37℃에서 3시간에서 9시간정도 처리한다. 두번째는 만들어진 제한절편 DNA에 adaptor를 ligation하는 과정이다. 제한절편의 양쪽 말단에 *EcoRI* adapter와 *MseI* adapter를 쌍으로 붙인다. 이 과정은 T4 ligase로 37℃에서 3시간 내지 5시간 동안 반응을 진행한다. 세번째는 PCR을 이용한 DNA의 예비증폭 과정이다. adapter가 부착된 DNA절편을 주형으로 pre-amplification을 위해서 adapter에 상동이며 3'말단에 하나의 염기가 더 부가된 *EcoRI* primer + *MseI* primer를 사용하여 제한절편을 증폭시킨다. PCR을 위한 mixture는 2.5μl adaptor ligation DNA, 20μl pre-amplification primer, 2.5μl PCR buffer, 0.1μl *Taq* polymerase로 하고, PCR조건은 pre-denaturation; 94℃에서 5분, 변성; 94℃에서 30초, annealing; 56℃에서 1분, extension; 72℃에서 1분으로 하여 총 30cycle 실시한다. 네번째 단계는 증폭된 단편을 주형으로 사용하여 3'말단에 세 개의 염기가 부가된 selective primer를 사용하여 그 중의 일부를 선택적으로 증폭시킨다. Selective-PCR한 64개 조합 중에서 polymorphism이 잘 나타나는 10개의 primer 조합을 선택해서 본 AFLP 분석에 사용하였다. PCR을 위한 mixture는 2.5μl template DNA, 0.25μl *EcoRI* primer, 0.25μl *MseI* primer, 1μl PCR buffer, 0.1μl *Taq* polymerase, 3.9μl grade water로 만들었다. PCR조건은 touch-down 13 cycle을 94℃에서 30초, 65℃에서 30초간 한 후 매 사이클 반복할 때 마다 0.7℃씩 온도를 낮춰서 수행하고 72℃에서 60초로 하였다. 그 후 normal 33 cycle을 94℃ 30초, 56℃ 30초, 72℃ 1분으로 하였다. 최종 PCR 결과물을 polyacrylamide Gel 전기영동을 하여

DNA를 분리하였다. DNA 5 μ g을 5% polyacrylamide gel(running gel과 stacking gel)에 주입하고 수직전기영동장치(160mmx160mm plate)에서 4시간 실시하였다. 염색은 silver staining 방법으로 실시하였다. 데이터 분석은 염색 후 나타난 밴드를 토대로 하여 실시하였다.

4) 유전적 다양성분석

AFLP 결과의 cluster 분석은 재현성이 있는 주요 DNA band의 유무를 binary data로 전환하여 NTSYS complete program으로 처리한 후 Ward 방법으로 처리한 후 dendrogram을 작성하였다.

나. SSR을 이용한 유전분석과 DNA marker 개발

1) 식물재료

공시 식물재료는 보성 차시험장에 보존된 한국산 차나무(32계통), 대만(3종), 중국(4종), 일본종(6종)으로 총 45종/계통에서 시료를 채취하였다(표 2-1). 국외종은 영양계 또는 실생이며, 한국종은 각지에서 수집된 종자로부터 번식된 차나무이다.

2) SSR용 DNA 분리·정제

DNA 추출은 CTAB 법(Fang *et al.*, 1992)으로 실시하였다. 먼저 신선한 잎을 막자사발에 넣고 -196 $^{\circ}$ C의 액체질소를 부어 급속 냉동시킨 후 마쇄하여 분말형태의 재료를 2.0ml centrifuge tube에 1g정도 넣은 다음, 2% CTAB buffer [2% Cetyl trimethyl ammonium bromide, 0.1M Tris-HCl (pH 8.0), 20mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1% Polyvinylpyrrolidone] 900 μ l를 넣고 잘 섞는다. 그리고 65 $^{\circ}$ C 항온수조에서 3분간 반응시킨 다음 추가로 동량의 Chloroform : Iso-amylalcohol(24 : 1)을 넣어 천천히 섞은 뒤 12,000 rpm에서 5분간 원심분리시켰다. 세 층으로 분리된 액의 상층부분을 회수하여, 다시 한번 상층액과 동량의 CI(Chloroform : Iso-amylalcohol) 용액을 넣고 잘 섞어준 후 12,000 rpm에 5분간 원심분리하여 상층액을 튜브에 회수하였다. 여기에 상층액의 1/10량의 10% CTAB buffer(10% CTAB, 0.7M NaCl)를 넣어 섞어준 후 65 $^{\circ}$ C 항온수조에서 3분간 반응시켰다. 추가로 동량의 CI용액을 넣어 천천히 섞은 뒤 12,000 rpm에서 5분간 원심분리시켰다. 상층액을 새 1.5ml 원심용 튜브에 옮겨 상층액의 1~2배 양의 침전용 buffer[1% CTAB, 50mM Tris-HCl(pH8.0), 10mM EDTA]

를 넣어 잘 섞은 후 65℃로 유지되는 항온수조에 2분간 반응시킨 후 12,000 rpm에서 5분간 원심분리시켰다. 상층액을 버리고 침전된 DNA pellet에 50 μ l의 고염 TE [1M NaCl, 10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA]를 넣어주고 1시간동안 상온에서 반응시킨 후 100% 에탄올 400 μ l를 첨가하여, 12,000 rpm(4℃)에 10분간 원심분리하였다. DNA pellet만 회수한 후 다시 70% 에탄올 400 μ l를 첨가하고, 12,000 rpm(4℃)에 10분간 원심분리하여 DNA pellet을 회수하였다. 에탄올 성분이 남지 않도록 잘 건조시킨 후 30 μ l의 TE [10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA]에 DNA pellet을 용해시켰다. DNA 농도측정은 UV/VIS Spectrophotometer(Ultaspec^R 2000, Pharmacia Biotech, UK)를 이용하였으며, 최종농도를 50ng/ μ l로 희석하였다.

3) SSR분석

Kaundun and Matsumoto(2002)의 방법을 토대로 SSR분석을 수행하였다. 사용된 microsatellite primer의 sequences와 primer annealing 온도에 대한 정보는 표 3과 같다. 총 반응액은 25 μ l로, 주형 DNA 100ng, primer 50pmol, *Taq* polymerase 1 unit(Takara), dNTP(dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 0.2mM, 10 \times PCR buffer[100mM Tris-HCl(pH8.3), 500mM KCl, 15mM MgCl₂] 혼합하였다. PCR 조건은 GenAmp PCR System 2700(Applied Biosystems, UK)을 이용하여 94℃에서 5분간 초기 변성시킨 후, 94℃에서 30초, 최적의 annealing 온도(Table 2-3)에서 30초, 72℃에서 150초를 35회 반복한 후 최종적으로 72℃에서 7분간 반응시킨 후 반응을 종료하였다.

증폭된 산물은 4℃에 보관하면서 13% polyacrylamide gel에서 반응총량 10 μ l의 증폭용액을 1000V의 전압으로 5시간 30분정도 loading 후 분리된 밴드들은 0.5 μ g/ml EtBr(ethidium bromide)용액에서 30분간 염색한 후 UV trans-illuminator 상에서 확인하여 촬영하였다.

4) 유전적 다양성분석

SSR에서 분석된 DNA 밴드양상은 이진수를 이용하여 밴드가 있으면(1), 없으면(0)으로 data를 입력하였다. SSR의 경우 전기영동으로 분리된 DNA 밴드를 사진 촬영한 후 컴퓨터 프로그램(포토샵 7.0) 상에서 명도/대비를 조절하여 major 밴드 위주로 편집한 후 밴드 수를 조사하였다. 조사된 low data는 통계프로그램에 입력하였고, 분석에 이용된 소프트웨어 통계프로그램은 SPSS 12.0(SPSS Inc., USA)로서 군집분석(clustering analysis), 유전적 유사도지수(genetic similarity), 주성분분석(Factorial correspondence analysis)을 각각 수행하였다.

유전적 유사도지수(genetic similarity): simple matching coefficient에 의한 유사도를 각각 구하였다. 전기영동의 경우와 같이 특정 밴드의 유무에 따라 밴드가 있을 때 1, 없을 때 0로 기입하는 이수형 변수의 경우 개체간 유사도는 아래와 같은 이중 분할표를 작성하여 계산하여 개체간의 유연관계를 나타내는 지표로 활용하였다.

Outcome	individual i		total
	1	0	
individual j	1	0	a+b
	a	b	
	0	d	c+d
	c		
total	a+c	b+d	p = a+ b+ c+ d

$S_{ij} = a+d/a+b+c+d$, a : 복수로 나타난 밴드 수(1과 2), b : 1로 나타난 밴드 수(2는 아님), c : 2로 나타난 밴드수(1은 아님), d : 복수로 나타나지 않은 밴드 수(1과 2 모두 아님)를 나타낸다.

군집분석(cluster analysis): 완전연관법(Complete linkage method)으로 군집분석을 수행하였다.

Table 2-3. Characteristics of nuclear (a) and chloroplast (b) microsatellite loci and SSR primer sequences.

(a) Characteristics of nuclear microsatellite loci			
Code	Locus	Primer sequence (5'-3')	$T_A(^{\circ}\text{C})$
SSR1	<i>MSCjaF25</i>	F: TTAAGCAAAGAAGTCGCG R: CTAATAATCTCCACTCAGCT	50
SSR2	<i>MSCjaH38</i>	F: TATTGCCTACGACCATTTC R: TTTGAGTTCGTTGCCTTCTCT	60
SSR3	<i>MSCjaF37</i>	F: ACTCAACTCAACTGTGCGATC R: ACAGTGAAGAAAAGTAGGGTCG	60
SSR4	<i>MSCjaH46</i>	F: AAGAAGAGCAGAGCAACAAGTG R: CCACACACTTTCCACACTTTTG	60
(b) Characteristics of chloroplast microsatellite loci			
Code	Locus	Primer sequence (5'-3')	$T_A(^{\circ}\text{C})$
ccmp1	<i>trnK intron</i>	F: CAGGTAAACTTCTCAACGGA R: CCGAAGTCAAAAAGAGCGATT	56
ccmp2	<i>5' to trnS</i>	F: GATCCCGGACGTAATCCTG R: ATCGTACCGAGGGTTCGAAT	58
ccmp3	<i>trnG intron</i>	F: CAGACCAAAAGCTGACATAG R: GTTTCATTTCGGCTCCTTTAT	56
ccmp5	<i>3' to rps2</i>	F: TGTTCCAATATCTTCTTGTCATTT R: AGGTTCCATCGGAACAATTAT	58
ccmp6	<i>ORF 77-ORF 82 (intergenic)</i>	F: CGATGCATATGTAGAAAGCC R: CATTACGTGCGACTATCTCC	58
ccmp7	<i>atpB-rbcL (intergenic)</i>	F: CAACATATAACCACTGTCAAG R: ACATCATTATTGTATACTCTTTC	60
ccmp9	<i>ORF 74b-psbB</i>	F: GGATTTGTACATATAGGACA R: CTCAACTCTAAGAAATACTTG	60

3. 연구내용 및 결과

가. RAPD를 이용한 유전분석과 DNA marker 개발

1) 적정 PCR조건

차 45종 식물의 잎에서 RAPD분석용 DNA를 분리·정제하였다. 이미 보고된 차의 PCR 기법의 몇 가지요소를 비교검토 하였다. Template DNA와 *Taq* polymerase 양의 변화에 따른 RAPD band의 변화를 살펴보았다. PCR반응에 적합한 Template DNA 농도는 50ng였고, *Taq* polymerase의 농도는 1unit으로 나타났다(그림2-2A). 즉, 최적의 PCR 반응의 25 μ l의 반응용액 속에 PCR 10 \times buffer(100mM Tris-HCl 완

충액, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂), 0.2M dNTP, 50pmol primer, 1unit *Taq* polymerase, 그리고 50ng의 genomic DNA가 첨가되었을 때 가장 적절한 반응을 보였다.

PCR반응 cycle 형식에 따른 차이를 보기 위하여 35 사이클 단독으로 반응을 진행한 결과(그림 2-2B)에 비하여 2단계 사이클로 반응을 진행한 경우(그림 2-2A) 좋은 결과를 얻었다. 즉, DNA 증폭을 위한 PCR조건은 94℃에서 120초(pre-denaturation), 1 cycle 한 후 94℃에서 30초(denaturation), 36℃에서 60초(annealing), 72℃에서 2분(extension)으로 하여 15cycle 반복하고, 94℃에서 30초, 45℃에서 1분, 72℃에서 2분으로 하여 25cycle 반복한 후 72℃에서 10분 1cycle 실시한 후 4℃에 저장하였다. 따라서 이 조건을 사용하여 RAPD분석 실험을 수행하였다.

2) RAPD 패턴

상기에서 확인한 적정실험조건을 사용하여 PCR을 수행하였다. 80개의 primer를 사용하여 PCR한 결과, 45개의 primer에서 DNA가 증폭되었다(표 2-2). 이중 44%에 해당하는 20개의 primer에서 증폭 DNA 단편이 다형성을 나타냈다(표 2-4, 그림 2-3). 총 48계통의 시료에서 증폭 DNA 단편이 다형성을 나타냈던 20개의 primer에 의해 증폭된 band는 총 114개(평균 5.45개)였으며, 이 중 99개(87.1%)가 다형성을 나타내는 밴드로 확인되었다(표 2-4, 그림 2-3).

3) 유전적 다양성

RAPD에 의한 DNA 단편의 자료를 Ward 방법으로 clustering하였다(그림 2-4). 그 결과 3개의 그룹으로 나누어졌으며(Euclidian distance value 50.0 이하), 또는 5개의 소그룹으로 나눌 수 있었다(Euclidian distance value 45.0 이하). 제 I 군은 1, 2, 12, 3, 5, 6, 13, 14, 10, 11, 15, 7, 제 II 군은 4, 34, 41, 28, 32, 38, 37, 36, 40, 29, 33, 30, 제 III 군은 8, 9, 16, 18, 20, 21, 19, 제 IV 군은 17, 23, 24, 제 V 군은 22, 25, 31, 27, 43, 35, 26, 42, 44, 45, 39계통을 포함하는 것으로 나타났다. 이중 5번과 6번은 야부기타 계통으로 매우 밀접한 군에 속하였다. 그밖에 일본종 10번과 중국종 11번 계통, 국내 수집종인 20번과 21번 계통에서 각각 밀접한 군으로 나타났다. 보성차시험장 육성의 참녹, 명선, 보향은 제 I 군에 속하였다. 명선과 참녹은 일본종 야부기타와 구라사와 종과 가깝게 나타났다. 보향은 순메이(일본종)와 영상(중국종)과 밀접하게 나타났다. 따라서, 보성차시험장 육성종인 참녹, 명선, 보향은 유사한 군으로 판명되었다. 흥미롭게도 공시한 총 외국품종 13종 중 9종이 제 I 군에 속하였다. 보성 차시험장에서

수집하여 유지·육성중인 국내계통들은 대만종인 사계천을 포함하는 제2그룹, 일본종인 금곡로, 사에미도리를 포함하는 제3그룹, 제4그룹, 중국종인 복정대백을 포함하는 제5그룹에 속하였다.

Similarity matrix의 PCO(principle coordinate plot)분석을 이용하여 본 결과에서도 5개 그룹으로 나타났다(그림 2-5). 이 결과는 25계통을 제외하고는 Cluster 분석과 일치하였다.

RAPD 분석을 통해서 보성 차시험장 보유 45개종 차에 대해 유전적 유연관계를 분석하였다. Genetic Distance(GD)는 0.500(17계통과 37계통)에서 0.939(10계통과 11계통)까지 분포하여 각 계통은 높은 유전적 변이를 가지는 것으로 나타났다. 이는 국외 뿐 아니라 국내 수집계통간에도 높은 GD값을 나타내 원연관계의 특성을 나타내었다(표 2-5). 따라서 수집 계통 내 다양한 유전적 변이가 기대된다.

4) RAPD marker 선발

RAPD분석 결과를 토대로 각 계통 특이적이며 재현성 있는 marker에 대한 선발을 진행 중에 있다. OPA-13 primer의 경우 4번 계통에서 특이적인 주요 DNA 단편이 증폭되었다(그림 2-3). OPA-13과 OPC-09 primer 유래의 특이적인 DNA절편을 크로닝하여 염기서열을 결정하였다(그림 2-6, 그림 2-7).

이상의 결과를 요약하면 다음과 같다.

차 45계통을 RAPD 및 유전분석 하여 얻어진 결과를 정리하면 다음과 같다.

(1) RAPD 분석용 시료수집 및 PCR적정조건을 결정하였다. (2) 45종 차에 대하여 80개 primer를 사용하여 RAPD 분석하였으며, 이중 다형성을 보이는 primer 20종을 선발하였다. (3) Clustering 분석과 유전적 거리에 의한 유전적 다양성분석결과 수집 계통들 간에 높은 원연관계를 나타내었으며, 유전적 변이를 많이 포함하고 있을 것으로 평가되었다. (4) RAPD에 기초한 재현성 있는 DNA marker를 선발 중에 있으며, OPA-13 primer 사용시 4번 계통에서 특이밴드가 증폭되었다. (5) 증폭된 특이밴드를 크로닝 하여 염기서열을 결정하였다.

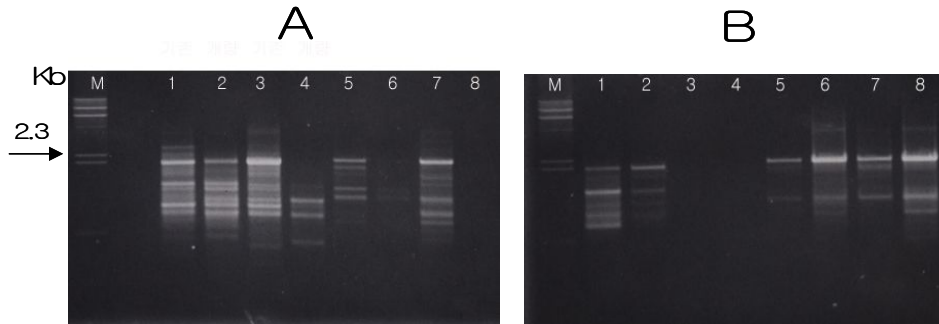


Fig. 2-2. RAPD profiles by PCR conditions. (A): PCR products by amount of template DNA and *Taq* polymerase. Lanes 1, 3, 5 and 7; 50ng DNA and 1 unit *Taq* polymerase, Lanes 2, 4, 6 and 8; 200ng DNA and 3 unit *Taq* polymerase. (B): PCR products after 35 cycle reaction were not clear compared the right side (A). Lines 1, 2, 3 and 4; OPB-01, Lines 5, 6, 7 and 8; OPB-13. Lane M: molecular weight marker (*Hind*III-digested λ DNA).

Table 2-4. Nucleotide sequences, G+C contents and detectable polymorphic bands of primers used.

Primer symbol	Primer	Sequence	G+ C content (%)	Total band	Polymorphism band	Polymorphism rate(%)
A	OPA-01	CAGGCCCTTC	70%	10	8	80
B	OPA-04	AATCGGGCTG	60%	6	4	66.6
C	OPA-09	GGGTAACGCC	70%	3	3	100
D	OPA-11	CAATCGCCGT	60%	4	3	75
E	OPA-13	CAGCACCCAC	70%	2	2	100
F	OPB-03	CATCCCCCTG	70%	8	8	100
G	OPB-05	TGCGCCCTTC	70%	5	4	80
H	OPB-06	TGCTCTGCCC	70%	4	3	75
I	OPB-08	GTCCACACGG	70%	8	7	87.5
J	OPB-10	CTGCTGGGAC	70%	8	7	87.5
K	OPB-12	CCTTGACGCA	60%	5	4	80
L	OPB-18	CCACAGCAGT	60%	6	5	83.3
M	OPC-06	GAACGGACTC	60%	8	8	100
N	OPC-09	CTCACCGTCC	70%	5	5	100
O	OPC-11	AAAGCTGCGG	60%	7	6	85.7
P	OPC-16	CACACTCCAG	60%	5	4	80
Q	OPC-18	TGAGTGGGTG	60%	4	3	75
R	OPD-03	GTCGCCGTCA	70%	7	6	85.7
S	OPD-11	AGCGCCATTG	60%	4	4	100
T	OPD-20	ACCCGGTCAC	70%	5	5	100
Total				114	99	87.06

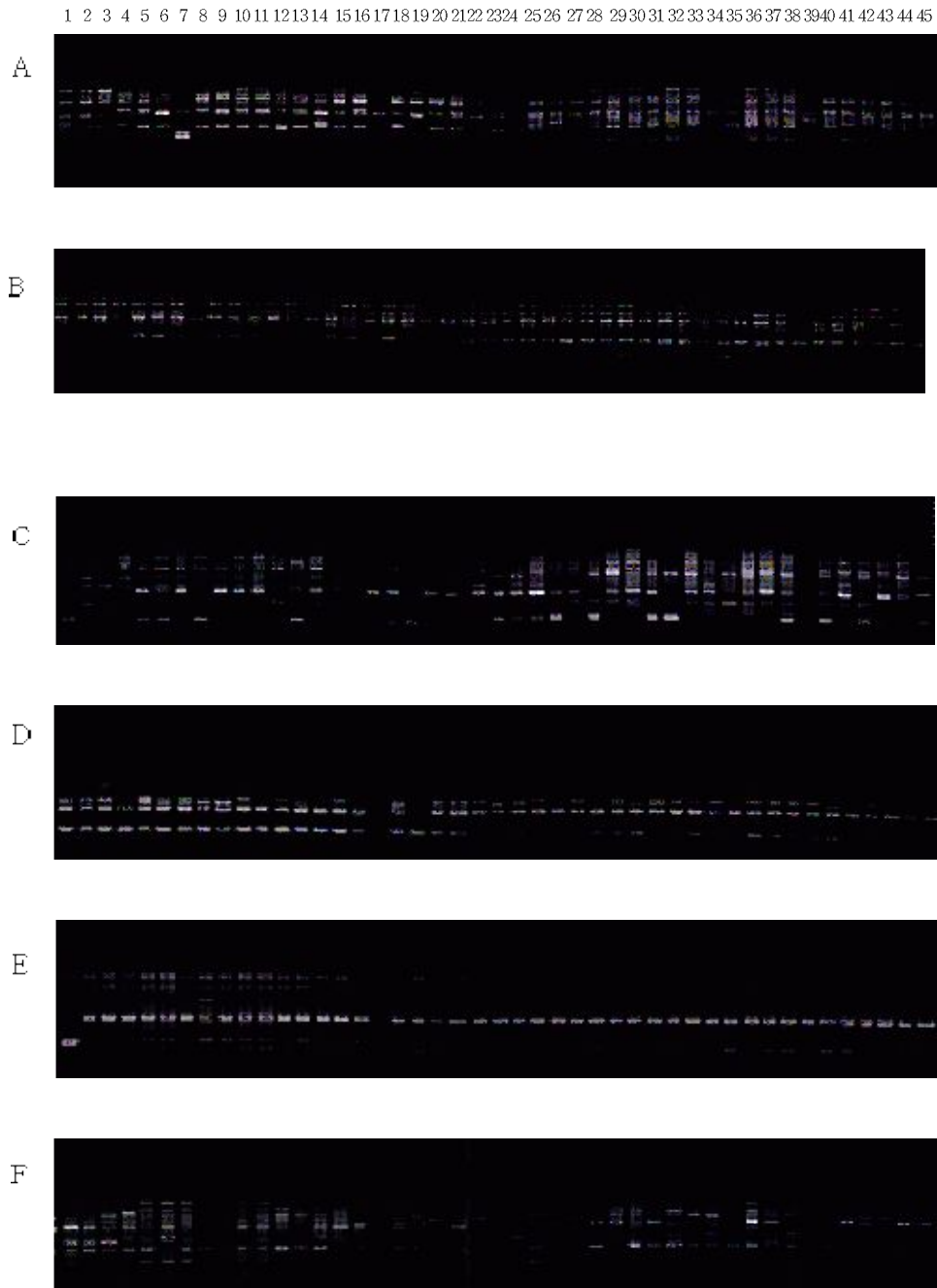


Fig. 2-3. RAPD profiles by various kinds of primers of 48 tea collections shown in Table 2-1. The number of lane indicates the sample number as in Table 2-1. Specific RAPD markers were labeled with alphabet characters. Lane M: molecular weight marker (*Hind*III-digested λ DNA).

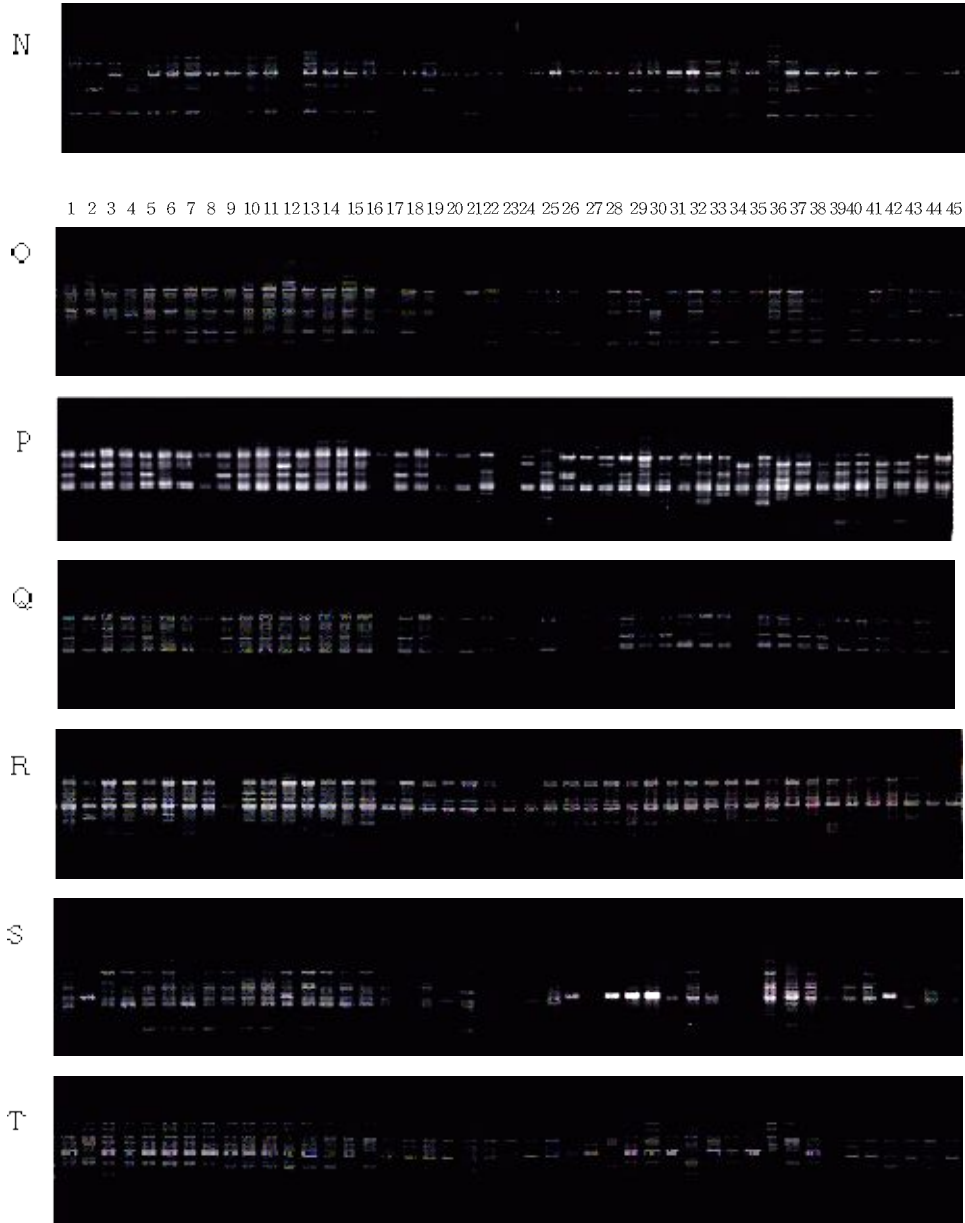
(Fig. 2-3. Continued)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45



(Fig. 2-3. Continued)



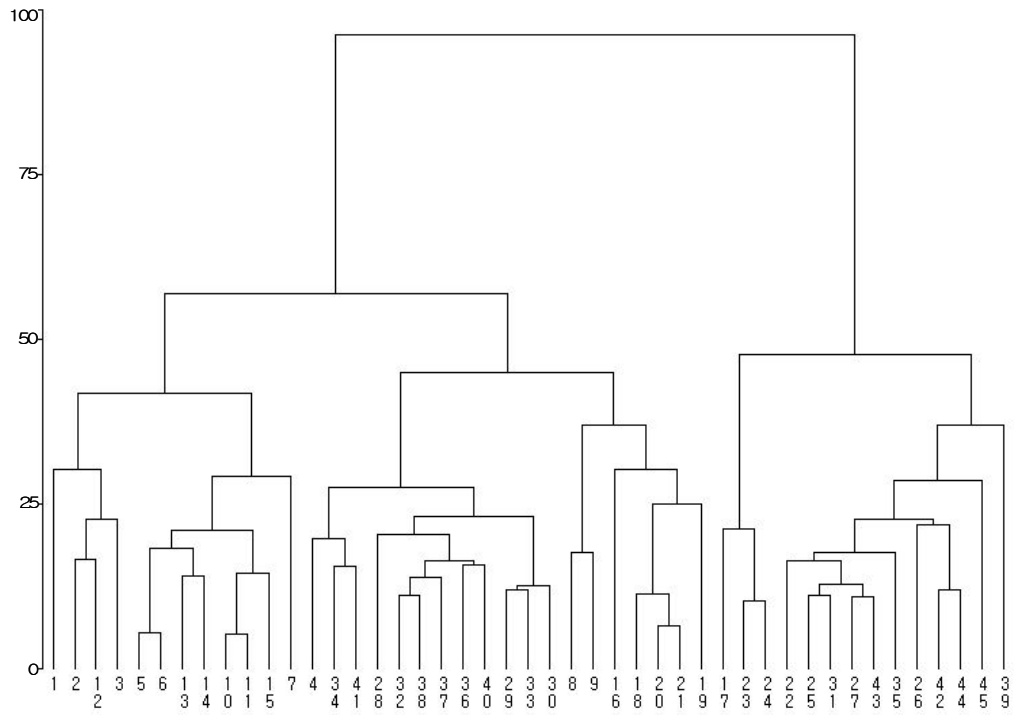


Fig. 2-4. Dendrogram based on the Ward cluster analysis of 45 tea collections of genetic relationship listed in Table 2-1.

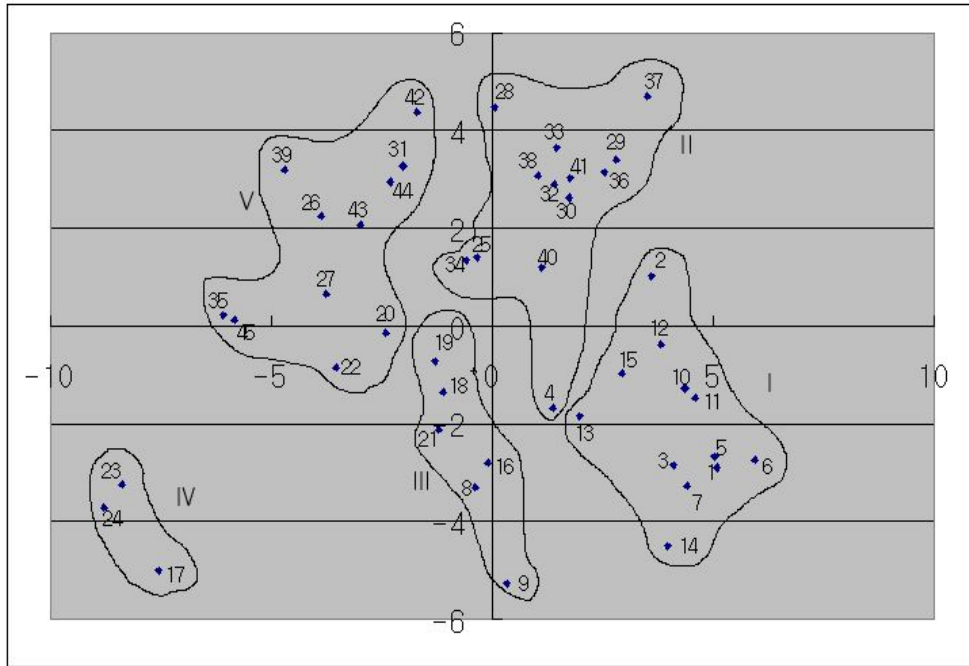


Fig. 2-5. Principle coordinate plot of the 45 tea genotypes shown in Table 2-1.

1 GGCCAGCCAGTCAGCTCCGGCCGCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTCTCACCGTCCCAC
 61 CATAGATCTTCTCCCAGAGGGTTTCTACCTCAAGGTCACCCCTCTGTGTTTCTACACTCG
 121 ACTCATAAGTATAGGTTGAGTAACCATGGTAAACAAAGCTATCAACTCAACAGACTCGCC
 181 AAGATGCAAGTCAAACCTCGCCAATAGCTCCCAACATCTCCCATTCCCGAATGGTAATACT
 241 AGCTACACTGCTAATGGATTTCTACTCAAGGCATCGGTCACAACGTTGGCCTTTCCCGG
 301 ATGATAATGCAATTCAAAGTCATAATCTTCTATAAACTACATCCACCTTCTCTGTTTCAA
 361 ATTCAAGTCTTTCTGTGTAAACAGATATTTTCAGACTCTTGTGATCAAAAAATACTTCAA
 421 ACTTCTCACACACAAATAATGCCTTCAAATTTTCAAGGCAAAAATCACTACTACTAACT
 481 CTAGGTCATCAGTAGGGTGGTTTCGTCTCATGTGTTTTCAACTGCCGTGAGTCATAAGCTA
 541 CTATTTTCCCTTCTTGCATCAAATACAACCCAAACCTCCCCGTAAAGCATCACAATATA
 601 CTAATAGCCCAAATCCCTCTCTGGAATAATTAACACTAGAGCAGTGGTAAGTCTAACCT
 661 TAAGCTTTTGAAATGATTTCTCATAAGTCTCACTCCACACCAACTTAATTCCTTTCTCA
 721 TCAGTCTAGTCAATGATGAAGCTAATCTATAGAAATCTTTCACAAACCGACAGTAATACT
 781 CTGCTAACCCCAAGAACTATGGATCTCATAGGCATTCTTAGATTGTTCCCAATCTTGATAC
 841 CGCTTCTATCTTGGATGAATCTACAATCACTCCTTTTCCAGATACCACATGGCCTAAGAA
 901 CTTAA (905bp)

Fig. 2-6. Nucleotide sequence of line specific RAPD marker among the 45 tea (*Camellia sinensis*) accessions. *sample no. T02, primer #OPC09.

1 GGCCAGCCAGTCAGCTCCGGCCGCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTCTCACCGTCCCAC
 61 CATAGATCTTCTCCCAGAGGGTTTCTACCTCAAGGTCACCCCTCTGTGTTTCTACACTCG
 121 ACTCATAAGTATAGGTTGAGTAACCATGGTAAACAAAGCTATCAACTCAACAGACTCGCC
 181 AAGATGCAAGTCAAACCTCGCCAATAGCTCCCAACATCTCCCATTCCCGAATGGTAATACT
 241 AGCTACACTGCTAATGGATTTCTACTCAAGGCATCGGTCACAACGTTGGCCTTTCCCGG
 301 ATGATAATGCAATTCAAAGTCATAATCTTCTATAAACTACATCCACCTTCTCTGTTTCAA
 361 ATTCAAGTCTTTCTGTGTAAACAGATATTTTCAGACTCTTGTGATCAAAAAATACTTCAA
 421 ACTTCTCACACACAAATAATGCCTTCAAATTTTCAAGGCAAAAATCACTACTACTAACT
 481 CTAGGTCATCAGTAGGGTGGTTTCGTCTCATGTGTTTTCAACTGCCGTGAGTCATAAGCTA
 541 CTATTTTCCCTTCTTGCATCAAATACAACCCAAACCTCCCCGTAAAGCATCACAATATA
 601 CTAATAGCCCAAATCCCTCTCTGGAATAATTAACACTAGAGCAGTGGTAAGTCTAACCT
 661 TAAGCTTTTGAAATGATTTCTCATAAGTCTCACTCCACACCAACTTAATTCCTTTCTCA
 721 TCAGTCTAGTCAATGATGAAGCTAATCTATAGAAATCTTTCACAAACCGACAGTAATACT
 781 CTGCTAACCCCAAGAACTATGGATCTCATAGGCATTCTTAGATTGTTCCCAATCTTGATAC
 841 CGCTTCTATCTTGGATGAATCTACAATCACTCCTTTTCCAGATACCACATGGCCTAAGAA
 901 CTTAA (681bp)

Fig. 2-7. Nucleotide sequence of line specific RAPD marker among the 45 tea (*Camellia sinensis*) accessions. *sample no. T01, primer #OPA13.

나. AFLP를 이용한 유전분석과 DNA marker 개발

1) AFLP분석의 최적 제한효소조합 조건 적정화

차 45종 식물의 잎에서 AFLP분석용 DNA를 분리·정제하였다. AFLP 분석에 적합한 primer를 선택하기 위하여 kit에서 제공하고 있는 *EcoRI*과 *MseI*의 각각 20 primer 조합을 명선, 참녹, 보향의 세 품종에 대하여 분석한 결과, DNA절편이 다수 출현하는 primer 조합을 선발할 수 있었다(표2-6, 그림 2-8). 그러나, 보성차시험장에서 육성한 이외의 품종에서는 다른 증폭양상을 보여 다양한 제한효소 조합을 고려하여 분석을 수행하였다.

2) 차의 AFLP분석

상기에서 확인한 적정 primer 조합을 감안하여 AFLP분석을 수행하였다. 선발된 10개의 primer 조합을 사용하여 PCR을 통하여 얻은 DNA 단편을 polyacrylamide gel 영동한 후 silver staining하여 DNA밴드의 다형성(polymorphism)이 많이 나타나는 1,500bp에서 100bp 사이의 밴드를 조사한 결과, 10개의 primer 조합 모두에서 382개의 DNA단편이 증폭되었고 평균 33.5개였다(표 2-7, 그림 2-8~그림 2-13). 이중 87.7%에 해당하는 335개의 primer에서 증폭 DNA 단편이 다형성을 나타냈다(표 2-7, 그림 2-8~그림 2-13). 조사된 DNA 밴드 출현이 가장 많았던 primer 조합은 *EcoRI*+*ACA*와 *MseI*+*CAG*였다. 이 조합에서 증폭된 band는 평균 60개였고, 이중 58개의 밴드에서 다형성을 나타내었다. 증폭된 DNA밴드수가 가장 낮게 나타난 것은 *EcoRI*+*ACA*와 *MseI*+*CAC*의 조합으로 증폭된 band는 20개였고 19개의 밴드에서 다형성을 나타냈다.

이와같이 AFLP분석으로 최대 60개까지 밴드수가 나타나서 계통 뿐만 아니라 개체수준에서 분석도 가능함이 시사되었다. 1차년도 RAPD 분석결과, primer 당 평균 5.45개로 증폭되는데 비하여 AFLP분석에서는 약 8배정도 많은 밴드수가 관찰되었다. 또한, 직접 비교는 아니지만 다른 수집 차계통 연구와 비교해보면 EtBr 염색을 적용한 경우 DNA밴드의 다형성(polymorphism)은 500bp에서 50bp 사이에서 많이 나타났고, 제한효소 조합 당 평균 27개 밴드를 검출하였다(이 등, 2003). 이에 비해 본 연구에서는 1,500bp에서 100bp 사이에서 밴드가 많았고, 조합 당 평균 밴드수도 훨씬 많은 33.5개였다.

3) 차의 유전적 다양성 분석

가) Cluster 분석

완전연관법(Complete linkage method)으로 덴드로그램을 작성하여 군집분석한 결과(그림 2-14), 유전적 유사도지수(genetic similarity) 0.50에서 총 45 수집계통이 6 그룹으로 나뉘었다. 1그룹의 경우 유사도지수는 0.58~1.00 사이로 나타났으며 15 수집계통(sample no. 10, 12, 4, 13, 5, 8, 6, 17, 18, 16, 20, 23, 14, 22, 32)이 속하였다. 2그룹은 유사도지수가 0.52~0.97 사이였으며 15 수집계통(sample no. 28, 37, 45, 1, 3, 2, 15, 7, 19, 21, 24, 40, 41, 29, 31)이 속하였다. 3그룹은 유사도지수가 0.55~0.93 사이로 나타났으며 9 수집계통(sample no. 26, 30, 36, 27, 34, 39, 42, 38, 44)이 속하였다. 4그룹은 유사도 지수가 0.55였으며 2 수집계통(sample no. 33, 43)이 속하였다. 5그룹은 유사도지수가 0.51로 나타났고 2 수집계통(sample no. 25, 35)이 속하였다. 6그룹은 유사도지수가 0.59로 나타났고 2 수집계통(sample no. 9, 11)이 속하였다. 이들 중 1, 2, 3그룹에 속한 수집계통이 총 86.7%(39수집계통)로 대다수의 수집계통이 포함되어 있다. 1그룹은 대다수(일본품종 6종 중 4종)의 일본품종에 한국 수집계통이 포함되어 있고, 2그룹은 대만품종과 한국 수집계통이 속하였다. 3그룹은 한국 수집계통만이 속하였다. 3그룹에 속한 수집계통의 자생지역을 살펴본 결과 순천 4계통(sample no. 30, 36, 38, 44), 승주 2계통(sample no. 26, 39), 보성 2계통(sample no. 34), 나주 2계통(sample no. 27, 42)으로 나타났다. 한편, 6개 그룹에 있어 한국 수집계통의 분포를 관찰한 결과, 13계통은 대만, 중국, 일본품종과는 독립적인 3, 4, 5그룹으로 나타났다. 9계통은 일본, 중국품종과 같은 1그룹에 속하였다. 10계통은 대만, 중국과 같은 2그룹에 속하였다. 그리고 한국계통이 속하지 않은 6그룹이 나타나서 총 4가지 분포유형을 나타냈다. 이와 같이 수집 한국차 계통은 한반도 주변의 다양한 차집단에 속하면서 유전적 다양성을 갖는 것으로 나타났다. 이 결과는 한국의 야생종과 일본재배종이 2개의 상이한 큰 그룹으로 분리되어 유전적 배경이 다르다는 오(1995)와 박(2001)의 RAPD분석 결과와는 조금 다른 결과로 수집차집단이 다르기 때문인 것으로 판단된다. 이 등(2003)은 37계통의 차 수집계통을 5그룹으로 분류하였으며, 이 중 3그룹은 한국야생수집종과 중국수집종으로 구성되어 한국차수집종이 중국수집종과 밀접한 관련이 있음을 보고하였다. 또한 본 연구에서는 Lyu 등(2003)이 동일한 재료를 이용한 RAPD 분석 결과인 다섯 그룹보다 한 그룹이 많은 6그룹으로 나타났는데, 이는 RAPD 분석의 한 그룹이 AFLP에서는 2개의 그룹으로 세분화되었기 때문이다. 이와같이 AFLP 분석으로 RAPD 분석보다 세분화 된 군집분석이 가능하였다.

나) 유전적 다양성 분석

RAPD 분석을 통해서 보성 차시험장 보유 45개종 차에 대해 유전적 유연관계를 분석하였다. AFLP에서 획득한 총 382개 DNA 밴드 data를 기초로 Simple matching coefficient를 사용하여 유전적 유사도 지수를 분석한 결과(Table 2-8), 총 45 수집계통간의 유전적 유사도지수는 최저 0.05(수집계통 번호 11과 41사이)와 최고 1.00(수집계통 번호 10과 12 사이) 사이였다. 또한 한국 수집계통간의 유전적 유사도지수는 최저 0.1(수집계통 번호 25과 41사이)과 최고 0.95(수집계통 번호 16과 17, 17과 18사이) 사이였다. 대만품종간의 유전적 유사도지수는 최저 0.88(수집계통 번호 2와 3 사이)과 최고 0.97(수집계통 번호 1과 3 사이) 사이였다. 일본품종간의 유전적 유사도지수는 최저 0.10(수집계통 번호 7과 9 사이)과 최고 0.99(수집계통 번호 5와 8 사이) 사이였으나, 수집계통 9번(saemido-ri)을 제외한 다른 일본품종 간에는 0.77~0.99 사이로 매우 높은 유전적 유사도지수를 보였다. 반면 중국품종의 유전적 유사도지수는 최저 0.11(수집계통 번호 11과 45 사이)과 최고 0.95(수집계통 번호 4와 12 사이) 사이로 일본품종간의 유전적 유사도지수와 비슷하지만 수집종 번호 4와 12 사이를 제외한 나머지 중국품종간의 유전적 유사도지수는 0.11~0.62 사이로 나타났다. 위의 전체수집계통간의 유전적 유사도지수는 이 등(2003)이 차 수집계통집단(일본 30품종, 한국 7계통)을 대상으로 유사도 지수를 분석한 결과인 0.55~1.00 보다 더 넓게 분포하였으며, 이는 본 연구에서 사용한 차집단이 높은 유전적 다양성을 가진다는 것을 말해 준다. Balasaravanan 등(2003)의 Assam, China, Cambodia type 49종 차 수집집단을 대상으로 한 유전적 유사도지수 0.00~0.92와 유사한 결과를 나타내었다.

4) AFLP marker 선발

AFLP분석 결과를 토대로 각 계통 특이적이며 재현성 있는 marker에 대한 선발을 하였다(표 2-9). 공시한 45계통 중 10 계통에서 분석한 209개의 밴드 중 22개가 계통 특이적인 밴드로 나타났다. 계통 특이적인 밴드가 가장 많은 효소조합은 *EcoR*+*AA/MseI*+*CAG* 조합으로 5계통에서 8개였다. 반면, 계통 특이적인 밴드가 가장 적은 효소조합은 *EcoR*+*AAC/MseI*+*CAC* 조합으로 2계통에서 2개였다. 특이질편 크기는 약 70bp~800bp사이였다. 이들 특이밴드에 대하여 클로닝을 크로닝 하여 염기서열을 결정하였다(Fig. 2-15).

이상과 같이 차 수집종 집단의 분자유전학적 특성을 검토하기 위하여 한국 수집종 32계통, 대만종 3품종, 중국종 4품종, 일본종 6품종, 총 45 수집계통에 대하여 AFLP를

수행한 결과, 총 382개 DNA 밴드 중 다형밴드수는 335개로 다형성 비율은 87.7%였다. 총 45 수집계통 간의 유사도지수는 0.05~1.00 범위였고, 한국 수집계통간의 유사도지수는 0.10~0.95로 넓게 분포하였다. 이는 총 수집계통뿐만 아니라 한국수집종간에도 높은 유전적 다양성이 있음을 시사해준다. 군집분석 결과 총 45 수집계통이 6개 그룹으로 나뉘었다. 한국수집계통의 분포를 보면 13계통은 대만, 중국, 일본품종과는 독립적인 3, 4, 5그룹으로 나타났다. 9계통은 일본, 중국품종과 같은 1그룹에 속하였다. 10계통은 대만, 중국과 같은 2그룹에 속하였다. 그리고 6그룹은 한국수집계통이 속하지 않고 일본, 중국 품종만으로 구성되었다.

Table 2-6. Primer combination for optimal AFLP analysis in the 45 tea accession.
-Myung-sun (accession number 13)-

<i>EcoRI</i> primer	<i>MseI</i> primer				
	M+ CA	M+ CAG	M+ CTT	M+ CAT	M+ CAC
E+ AA	++	++	++	++	++
E+ AAC	++	++	++	++	++
E+ ACA	++	++	++	++	++
E+ ACG	++	++	++	++	++

-Charm-nok (accession number 14)-

<i>EcoRI</i> primer	<i>MseI</i> primer				
	M+ CA	M+ CAG	M+ CTT	M+ CAT	M+ CAC
E+ AA	++	++	++	++	++
E+ AAC	++	++	++	+	+
E+ ACA	+	+	+	+	+
E+ ACG	+	++	-	+	++

-Bo-hyang (accession number 15)-

<i>EcoRI</i> primer	<i>MseI</i> primer				
	M+ CA	M+ CAG	M+ CTT	M+ CAT	M+ CAC
E+ AA	++	++	++	++	++
E+ AAC	++	++	++	++	++
E+ ACA	+	+	+	+	+
E+ ACG	++	++	++	++	++

++ excellent, + middle, - none amplified.

Table 2-7. Primer combinations, detected bands and polymorphic bands by AFLP analysis in 45 tea accessions.

<i>EcoRI</i> + 3	<i>MseI</i> + 3	Number of detected bands	Number of polymorphic bands	Percentage of polymorphism
ACG	CTT	44	44	100%
AAC	CAC	45	43	95.6%
ACA	CAC	20	19	95%
ACA	CAG	60	58	96.7%
AA	CAG	40	39	97.5%
Total		209	203	97.1%

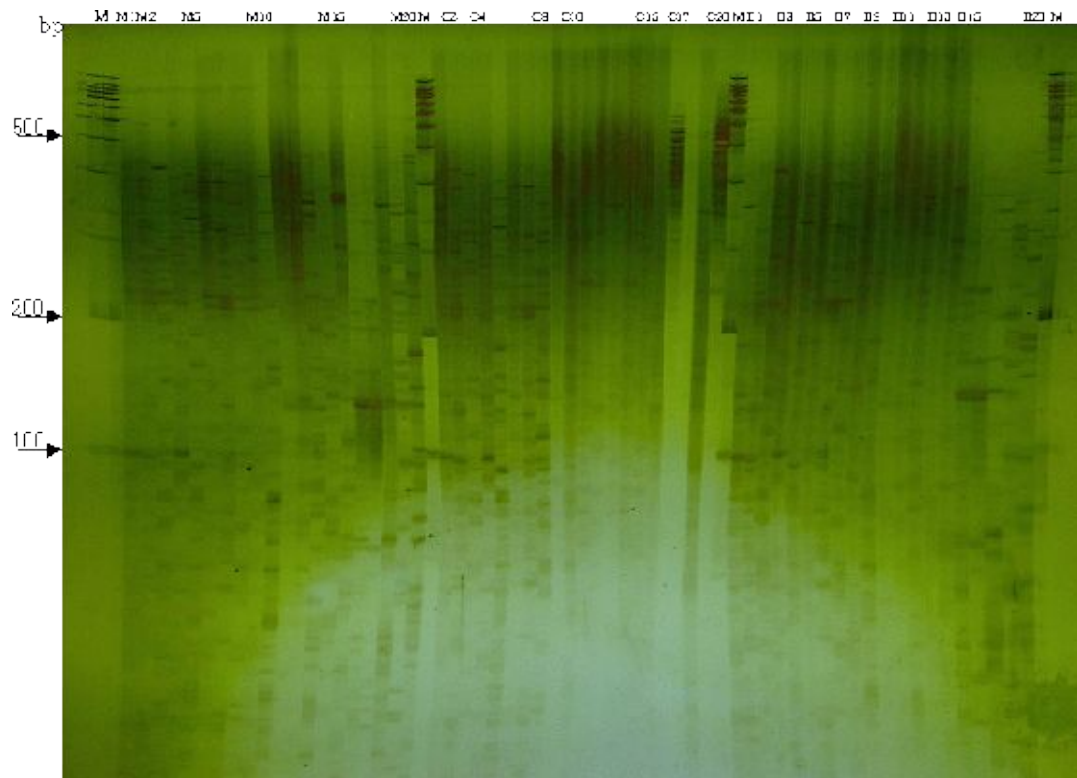


Fig. 2-8. AFLP patterns of each three samples (B; Bo-hyang, C; Charm-nok, M; Myung-seon) detected with 20 primer combination. The left-most lane was DNA size marker.

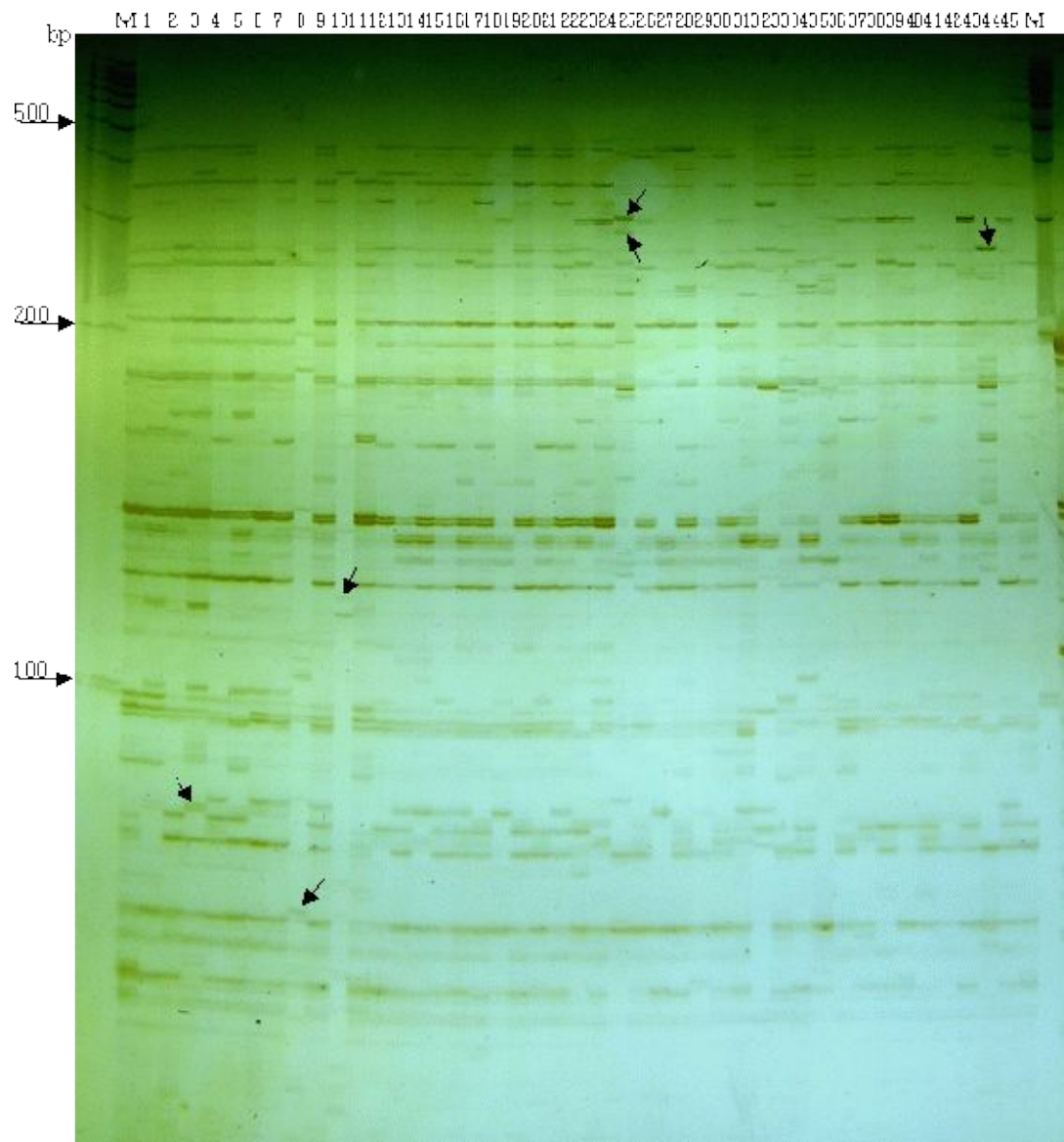


Fig. 2-9. AFLP patterns of the 45 accessions detected with *EcoRI* +ACG / *Mse* I +CTT primer combination. The number of lane indicates the 45 tea accessions shown in Table 2-1. The left-most lane was DNA size marker. Specific AFLP markers were labeled with arrows.

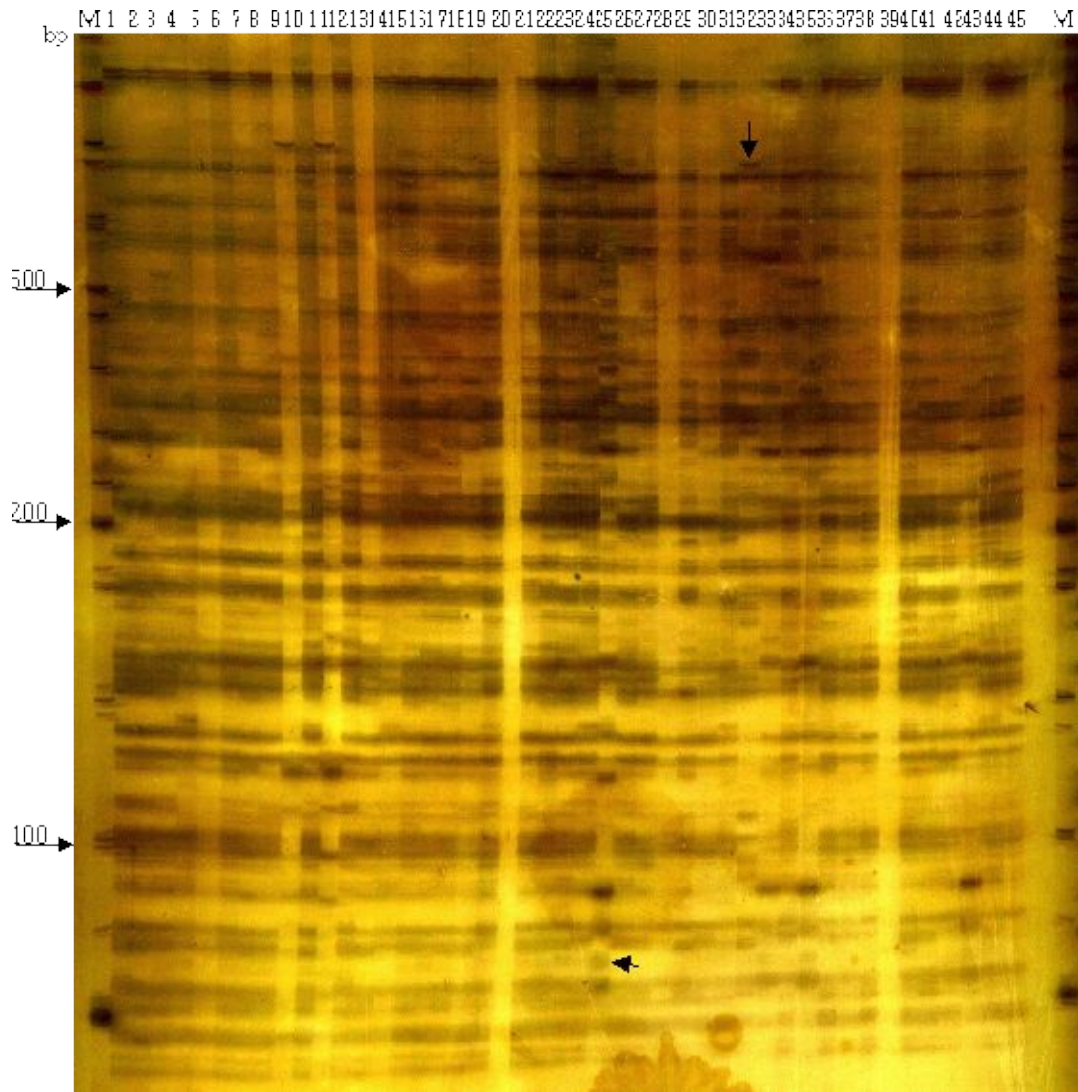


Fig. 2-10. AFLP patterns of the 45 accessions detected with *EcoR* I+ACC / *Mse* I+CAG primer combination. The number of lane indicates the 45 tea accessions shown in Table 2-1. The left-most lane was DNA size marker. Specific AFLP markers were labeled with arrows.

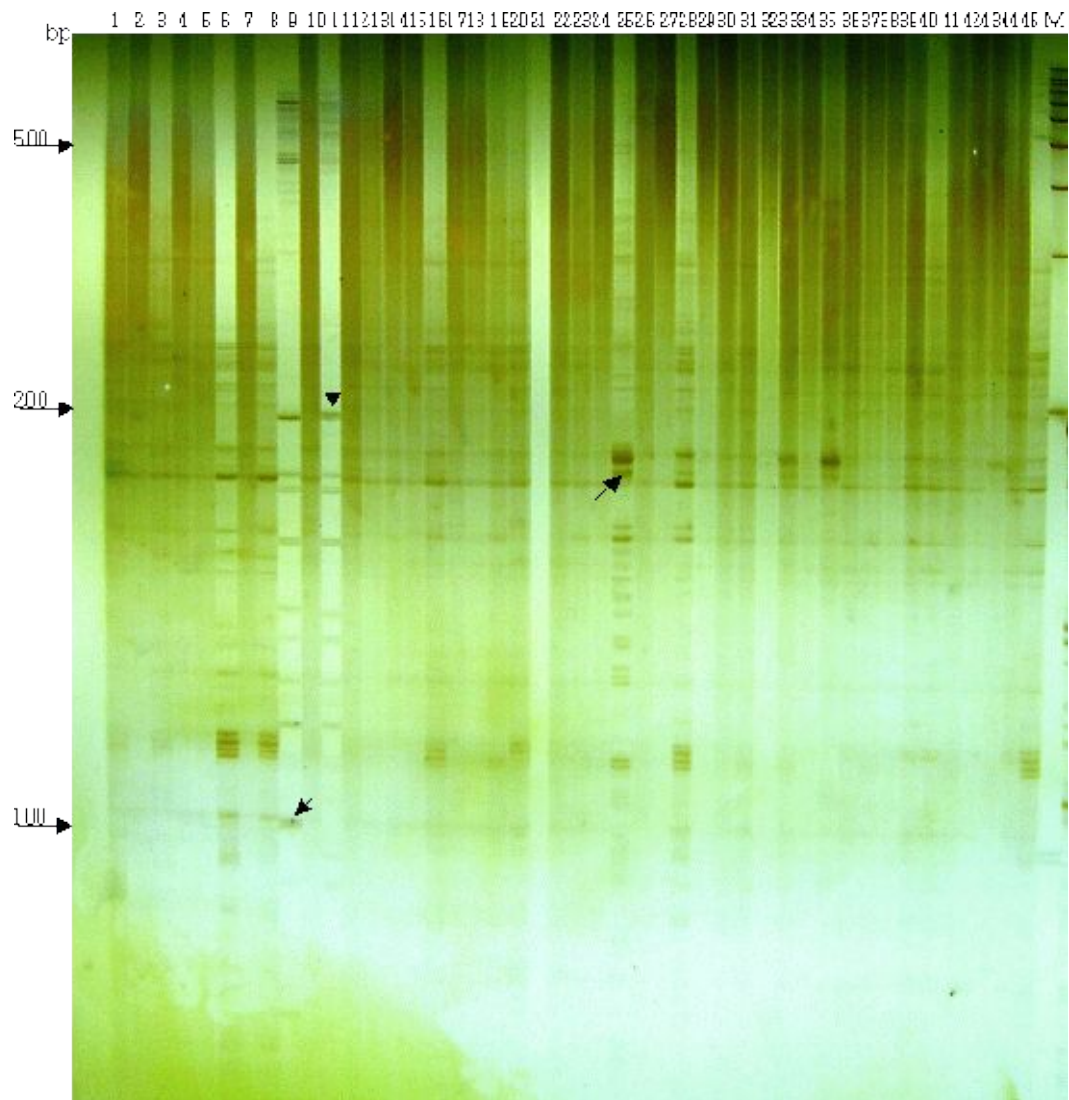


Fig. 2-11. AFLP patterns of the 45 accessions detected with *EcoRI*+ACA / *Mse* I+CAC primer combination. The number of lane indicates the 45 tea accessions shown in Table 2-1. The left-most lane was DNA size marker. Specific AFLP markers were labeled with arrows.

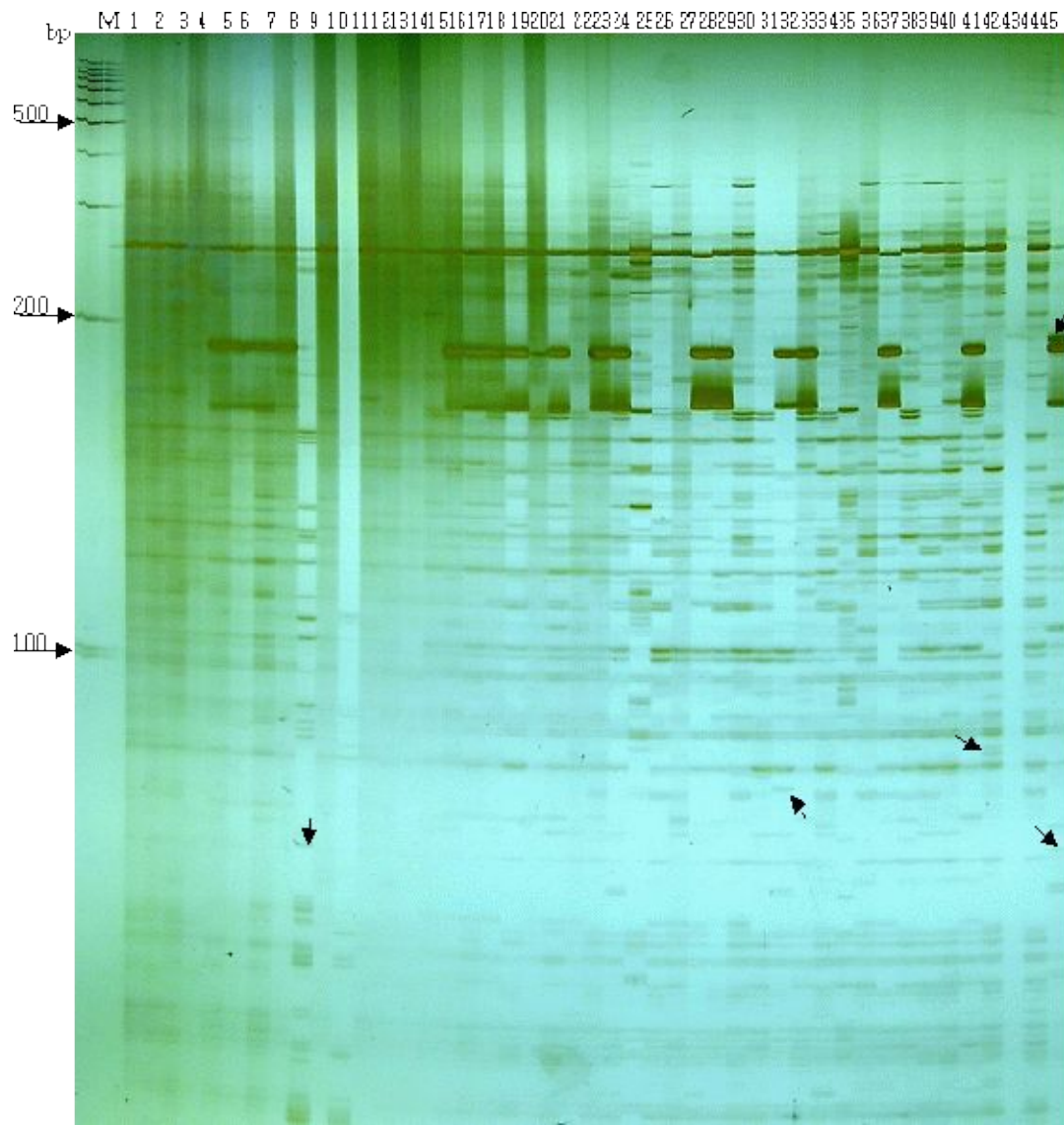


Fig. 2-12. AFLP patterns of the 45 accessions detected with *EcoR* I+ACA / *Mse* I+CAG primer combination. The number of lane indicates the 45 tea accessions shown in Table 2-1. The left-most lane was DNA size marker. Specific AFLP markers were labeled with arrows.

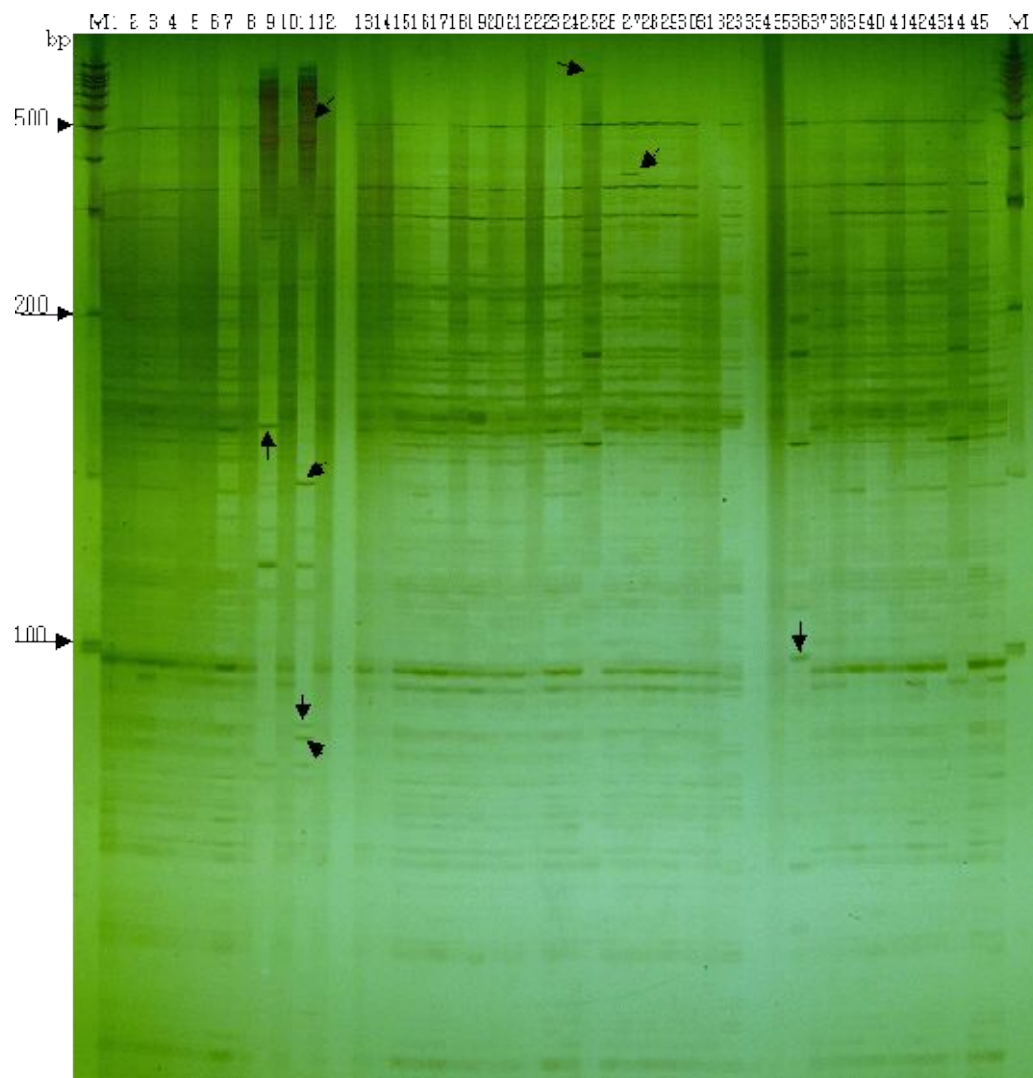


Fig. 2-13. AFLP patterns of the 45 accessions detected with *EcoR* I +AA / *Mse* I +CAG primer combination. The number of lane indicates the 45 tea accessions shown in Table 2-1. The left-most lane was DNA size marker. Specific AFLP markers were labeled with arrows.

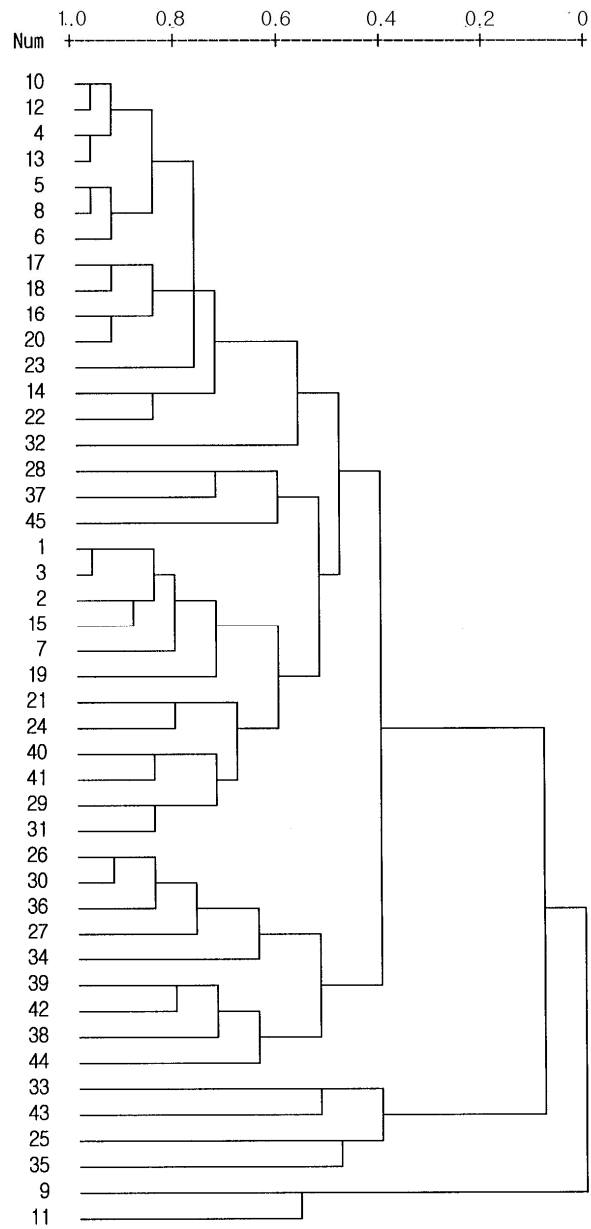


Fig. 2-14. Complete method dendrogram of the 45 tea accessions based on genetic similarity matrix calculated from AFLP markers. Accessions numbers are as indicated Table 2-1.

Table 2-9. Numbers of line specific bands and band sizes detected by using AFLP analysis in 45 tea accessions.

Primer combination	No. of line specific bands	accession no.	Band sizes(bp)
E+ ACG/M+ CTT	1	9	70bp
	1	11	132bp
	2	25	350bp, 372bp
	1	43	322bp
E+ AAC/M+ CAC	1	25	85bp
	1	33	750bp
E+ ACA/M+ CAC	1	9	100bp
	1	11	195bp
	1	25	182bp
E+ ACA/M+ CAG	1	9	86bp
	1	32	91bp
	1	42	93bp
	1	45	198bp
E+ AA/M+ CAG	2	9	260bp, 165bp
	3	11	520bp, 92bp, 94bp
	1	25	800bp
	1	27	340bp
	1	35	100bp
Total	22	10	


```

1 GATGAGTCCTGAGTAACAGATAGCTGACAGATGTGGCTTATAGTGAGTAAAGGTACTIONCAT
61 AATGGTTGTTGGAAGATCATGCCTACAGTTAGGGGATCACTCCCTAATAACTAAGAAAGT
121 GGCAGCTTGCAGAAAGATGCTAGAAAGTTGGAACATGAGTTGACTATGCTTTAGGAGTGG
181 TGCCACCATGTTCTCTTGGGGTAGTTATAGAGCTTAGAGGATAAGTCAAACAATGTATAA
241 GTATTACCCGACTTTAACGGGGAAAGATATGAGAAATCTATTAGTAAGGCACTCTGAGCT
301 CTCTACTGTGAATTGGTACGCAGTC (325bp)

```

Fig. 2-15. Nucleotide sequence of line specific AFLP marker among the 45 tea (*Camellia sinensis*) accessions. *AFLP sample no. 25 - primer combination : E+ACA/M+CAG.

```

1 GACTGCGTACCAATTCAAGAGGGGCGACATCGTAACAATGCACGCTTGGGTCACACGCCAA
61 CGTGGGAATGGCCTGATTGGTGCCCTTCCACACGCGCCCTACTTCCCCTTCCCCAAGGAA
121 GAAAATTTCTGGCTCCTACTTGCAGACTCGGTCTCCAATGATGTATGGATGTTTCAGAAG
181 GTTAACTTCATGGACGAAGCTACGGCTATAATCGCTGCATCGAAAGCAATTCAAGAGTCCG
241 AAGGAAGGGTCTGGGGCTAGCTTGAAGGAGATAAGTTTGGCTGTTACTCAGGACTCATC
(299bp)

```

Fig. 2-16. Nucleotide sequence of line specific AFLP marker among the 45 tea (*Camellia sinensis*) accessions. *AFLP sample no. 33, primer combination : E+ACG/M+CTT.

다. SSR을 이용한 유전분석과 DNA marker 개발

1) 차의 SSR분석

총 45개의 차 수집계통을 11개의 SSR primer로 PCR을 수행한 결과(그림 2-17), 공시한 10개의 SSR primer에서 총 92밴드를 얻었고, 그 중 다형성 밴드는 80개로 87%의 다형성을 나타내었다(표 2-10). 각 primer별 총 밴드수는 최저 2개(ccmp9, SSR2)에서 최고 35개(SSR3)로 다양하게 검출되었고, 한 primer 당 평균 밴드수는 9.2개로 나타났다. 이들의 primer별 다형성 밴드수는 최저 1개(ccmp9, SSR2)에서 최고 34개(SSR3)로 평균 8.0개로 나타났다. 증폭된 밴드의 크기 범위는 50bp에서 1400bp 사이에 있었다. 다형성 비율 87%는 AFLP의 87.7%와 비슷한 비율로 나타났고, 특히 총 80개 밴드 중 계통 특이적인 밴드가 27개(33.8%)로 AFLP에서 검출되지 않은 계통 특이적 밴드가 다수 검출됨을 알 수 있었다(그림 2-17). 검출된 계통 특이적 밴드에 대한 정보는 표 2-11에 나타냈으며 대부분 한국 수집계통에서 검출되어 (sample no. 1, 9, 13, 14, 15, 16, 19, 34, 38) 추후 분자마커로 개발하여 품종 육성에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

Mondal(2002)은 차 25계통을 대상으로 12개의 inter-SSR(ISSR) primer를 공시하

여 분석한 결과, 총 밴드수 130개, 다형성 밴드수 108개로 84%의 다형성을 보여 유사한 다형성 비율을 보였다. 한편 SSR primer ccmp6에서 검출된 수집계통 번호 38(한국)의 계통특이적 밴드는 Kaundun and Matsumoto(2002)의 보고에서는 CK23(중국)에서 나온 밴드와 일치하였다. 이 결과는 38번 계통이 중국에서 유래하였을 가능성을 강하게 시사해 준다.

2) 차의 유전적 다양성 분석

가) Cluster 분석

군집분석(cluster analysis)을 위하여 완전연관법으로 덴드로그램을 작성하여 분석한 결과(그림 18), 유전적 유사도지수(genetic similarity) 0.50에서 총 45 수집계통이 7그룹으로 나뉘었다. 1그룹은 유사도지수는 0.57~1.00 사이로 나타났으며 10 수집계통(sample no. 44, 45, 43, 23, 28, 4, 5, 25, 29, 40)이 속하였고, 2그룹은 유사도지수 0.73~0.80으로 나타났으며 3 수집계통(sample no. 10, 26, 12)이 속하였고, 3그룹은 유사도지수 0.60~0.97 사이로 나타났으며 13 수집계통(sample no. 36, 37, 27, 18, 34, 31, 35, 33, 22, 32, 24, 30, 17)이 속하였고, 4그룹은 유사도지수 0.60~0.93 사이로 나타났으며 8 수집계통(sample no. 2, 3, 1, 6, 7, 8, 11, 9)이 속하였다. 5그룹은 유사도지수 0.63~0.87 사이로 나타났고 3 수집계통(sample no. 20, 21, 14)이 속하였다. 6그룹은 유사도지수 0.77로 나타났고 2 수집계통(sample no. 41, 42)이 속하였다. 7그룹은 유사도지수 0.53으로 나타났고 2 수집계통(sample no. 19, 39)이 속하였다. 그 외 다수의 계통특이적 밴드검출로 인하여 수집계통 번호 13, 15, 38은 다른 그룹에 속한 수집계통과는 유전적으로 원연관계에 있는 것으로 나타났다. 원산지 별로 보면 대만 품종과 대부분의 일본품종은 4그룹에 군집을 형성하였고, 중국품종은 1, 2, 4 그룹에 분포하였다. 한국 수집계통은 4그룹을 제외한 나머지 모든 그룹에 분포하였다. 이 중 3, 5, 6, 7 그룹은 한국 수집계통만으로 구성되었고 21계통이 속하였다. 이와 같이 한국수집계통은 AFLP의 군집분석에서와 같이 다양한 집단에 속하였다.

나) 유전적 다양성 분석

SSR에서 획득한 총 92개 DNA 밴드 data를 기초로 하여 SPSS program(SPSS Inc., USA)을 이용하여 유전적 유사도지수를 구하였다. Simple matching coefficient를 사용하여 유전적 유사도 지수(genetic similarity)를 분석한 결과(표12), 총 45 수집계통 간의 유전적 유사도지수는 최저 0.10(수집계통 번호 12와 13사이, 14와 28사이)과 최고 1.00(수집계통 번호 44와 45사이) 사이의 범위에 있었고, 이중 한국 수집계통

간의 유사도지수는 최저 0.10(수집계통 번호 15과 23사이)와 최고 0.97(수집계통 번호 36과 37사이) 사이였다. 한국 수집 차 집단 간의 유전적 유사도 지수에서 채취지역별 차이를 보면 순천집단(sample no. 15, 23, 28, 29, 30, 36, 38, 41, 44)의 유전적 유사도 지수가 0.10~0.83 사이로 넓게 분포하여 가장 다양성이 높은 것으로 나타났다. 대만 품종간의 유전적 유사도지수는 최저 0.83(수집계통 번호 1과 3사이)과 최대 0.93(수집계통 번호 2와 3사이) 사이였다. 일본품종간의 유전적 유사도 지수는 최저 0.53(수집계통 번호 5와 7사이)과 최대 0.87(수집계통 번호 6과 8사이) 사이였다. 중국품종간의 유전적 유사도지수는 최저 0.33(수집계통 번호 11과 45사이)과 최대 0.80(수집계통 번호 4와 45사이) 사이였다. SSR분석에 의한 유전적 유사도지수는 AFLP분석의 유전적 유사도지수와 일치하는 결과로 대만품종과 일본품종내에서는 각각 높은 유전적 유사도지수를 보인 반면, 한국 수집계통은 이들보다 넓은 유전적 유사도지수를 나타내어 높은 유전적 다양성을 보였다. 이러한 차 수집계통간의 유전적 유사도지수 결과는 차의 Balasaravanan 등(2003)의 AFLP분석에 의한 유전적 유사도지수와 유사한 경향을 보였으며, 백 등(2004)의 SSR분석에 의한 92 보리품종 간의 유연관계분석에서 유전적 다형성지수(genetic diversity) 0.00~0.74 보다 더 넓은 유전적 유사도지수를 보였다. 또한 그림 2-19에서와 같이 계통특이적인 분자마커를 개발하였다.

이상과 같이 차 수집종 집단의 분자유전학적 특성을 검토하기 위하여 한국 수집종 32계통, 대만종 3품종, 중국종 4품종, 일본종 6품종, 총 45 수집계통에 대하여 SSR분석을 수행한 결과, 총 DNA 밴드수 92개 중 87%가 다형성을 나타냈다. 80개의 다형성 DNA 밴드 중 27개가 계통 특이적으로 나타났으며, 이 DNA 밴드는 동정을 통해 차나무 개체식별에 활용될 수 있을 것이다. 총 45 수집계통 간의 유사도지수는 0.10~1.00 범위였고, 한국수집계통간의 유사도지수는 0.10~0.97로 나타났다. 군집분석 결과 총 45 수집계통이 7개 그룹으로 나뉘었다. 한국수집계통은 제4그룹을 제외한 나머지 그룹에 모두 분포하였으며, 이 중 3, 5, 6, 7그룹은 한국 수집종만으로 구성되었다. 이와 같이 SSR 분석을 통하여 본 연구에서 사용된 한국 수집계통은 높은 유전적 다양성을 가지고 있음을 확인할 수 있었으며, 이 수집 차나무집단은 차의 품종육성을 위한 유전자원으로 활용가치가 있을 것으로 기대된다.

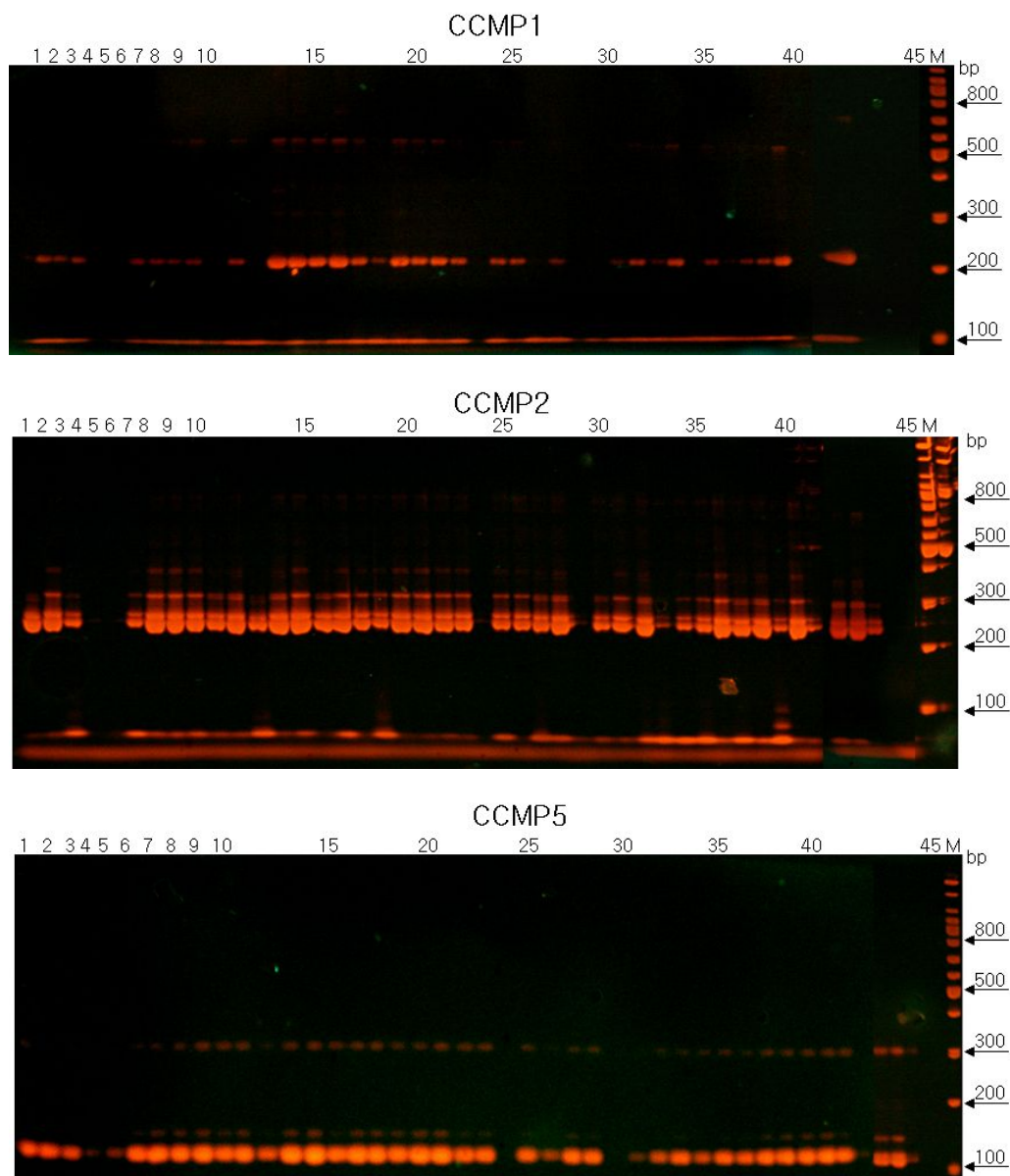


Fig. 2-17. Polyacrylamide gel electrophoresis patterns of SSR-amplified *C. sinensis* DNA. DNA from each of the 3 Taiwanese, 4 Chinese, 6 Japanese and 32 Korean green tea accessions was amplified by using primer information as Table 2-8.

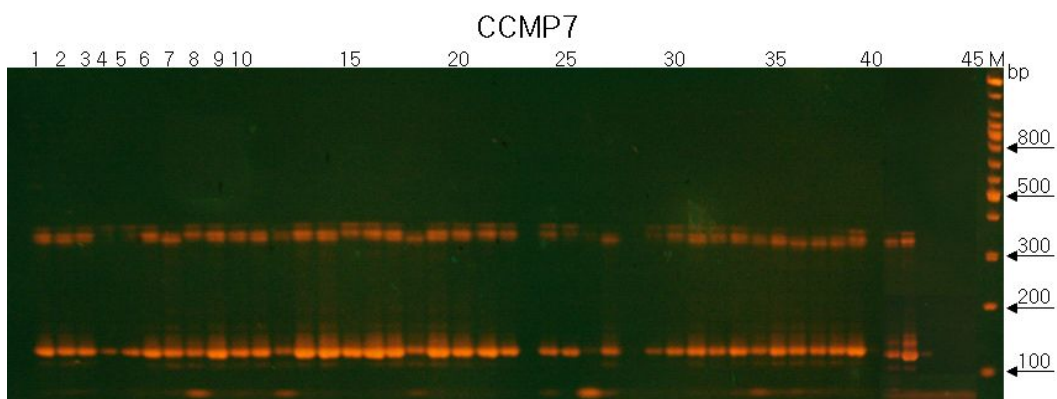
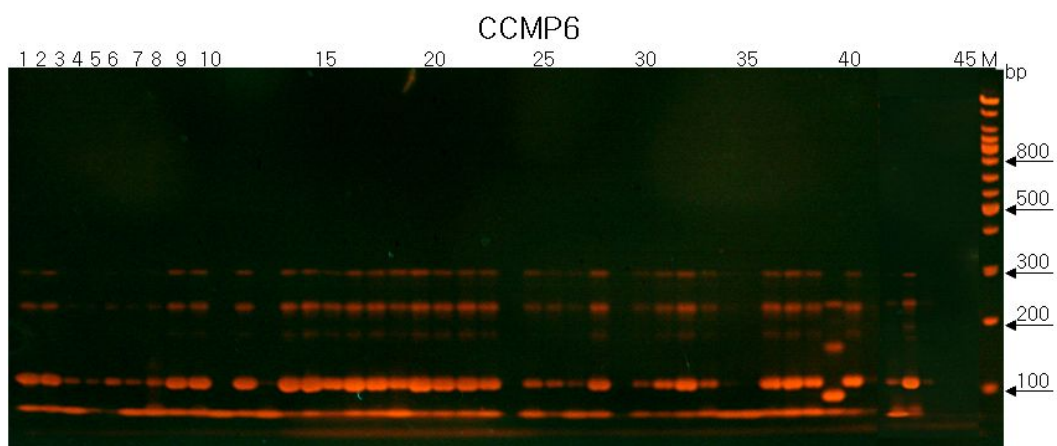
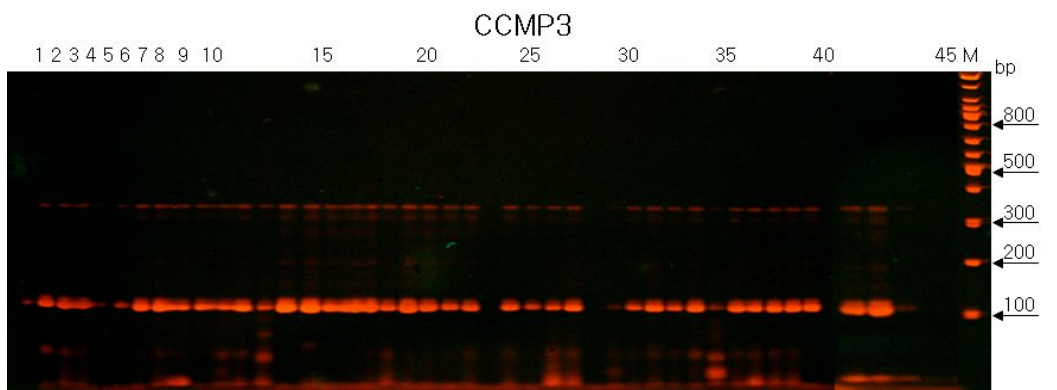


Fig. 2-17. Continued.

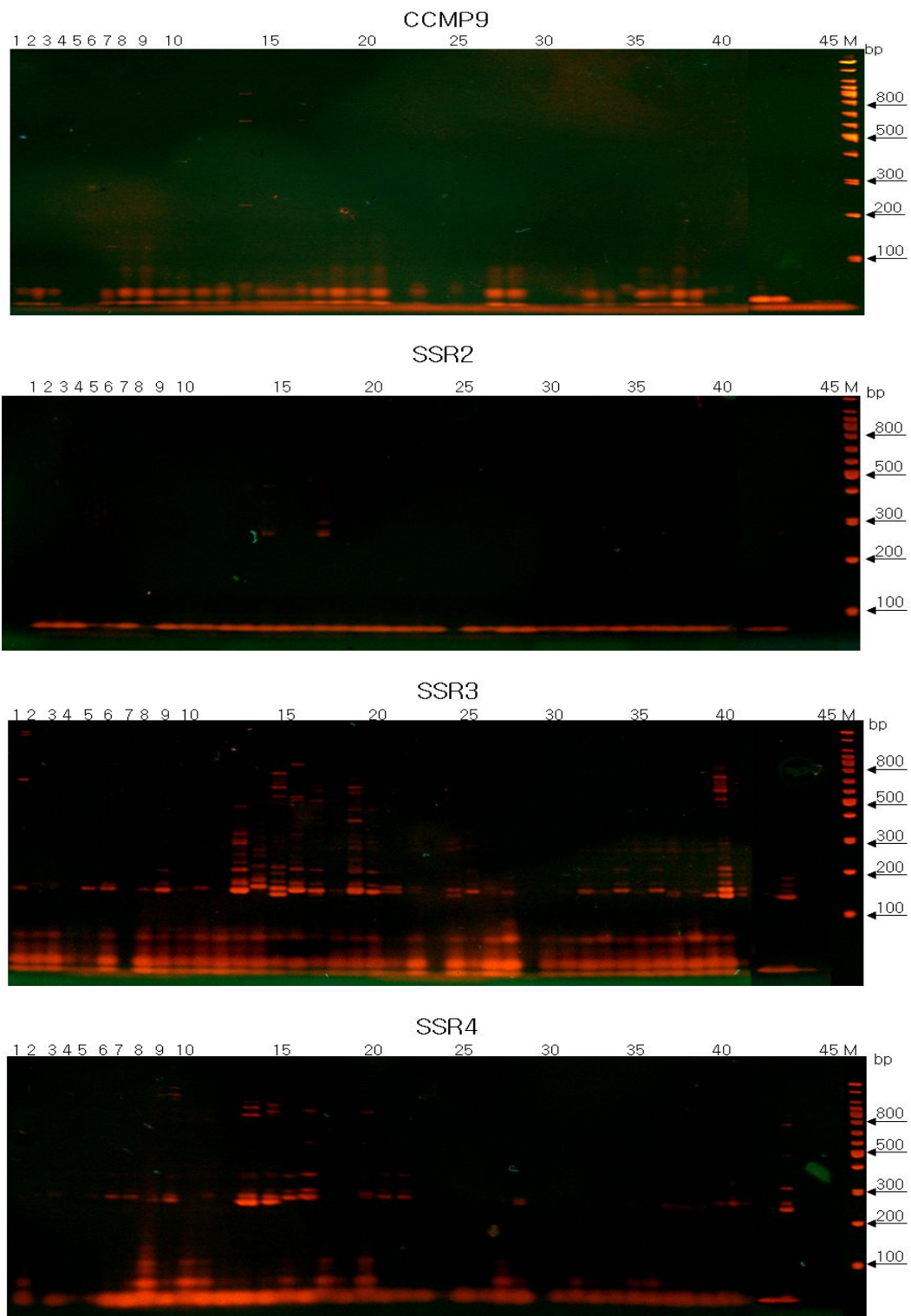


Fig. 2-17. Continued.

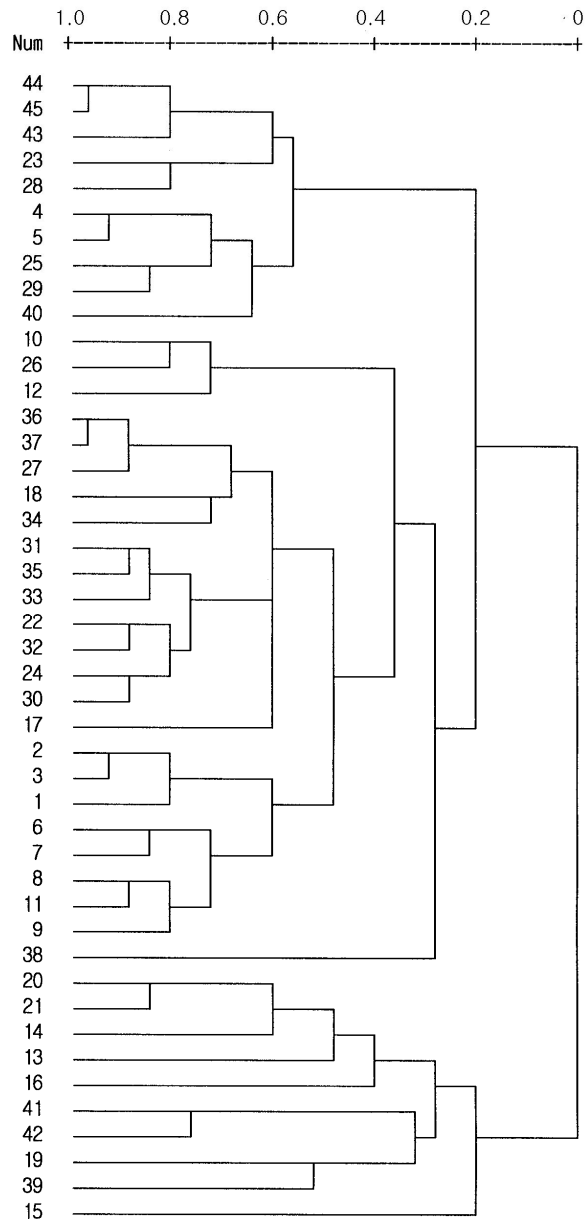


Fig. 2-18. Cluster analysis of 45 tea accessions listed in Table 2-1 by Ward method.

Table 2-10. Detected bands and polymorphism rate by using 10 SSR primers.

Code	Total bands	Polymorphic bands	Polymorphism rate(%)
ccmp1	5	5	100
ccmp2	11	8	72.7
ccmp3	6	5	83.3
ccmp5	3	2	66.7
ccmp6	8	7	87.5
ccmp7	6	4	66.7
ccmp9	2	1	50.0
SSR2	2	1	50.0
SSR3	35	34	97.1
SSR4	14	13	92.9
Total	92	80	87.0

Table 2-11. Numbers of line specific bands and band sizes detected by using 10 SSR primers.

Code	Polymorphic bands	No. of line specific bands	Accessions no.	Band sizes (bp)
ccmp1	5	0	-	-
ccmp2	8	0	-	-
ccmp3	5	1	34	67bp
ccmp5	2	0	-	-
ccmp6	7	3	38	95 ~ 220bp
ccmp7	4	0	-	-
ccmp9	1	0	-	-
SSR2	1	0	-	-
SSR3	34	18	1, 13, 14, 15, 16, 19	140 ~ 1400bp
SSR4	13	5	9, 13, 14	220 ~ 570bp
Total	80	27	9	

1 TGGTGCATATGATACACCCAGAGTGCATCCTATAACTGGAAAAGACTATTGTATCGCTGT
61 AATCACACTCTTGATGGTGGAAATTTTACCCAAAATGGATTTGAGGGCTCAAATGAACAGG
121 GTGTAATGCACCCGTGATGCATAAGATAATTTCTACATACCTTGCTGGGGTCCTCTTCTC
181 CACAGAAACAATTCACCTTTGTGGGCAAACCTTTGATCGGCGTAATTGTGCTTC (232bp)

Fig. 2-19. Nucleotide sequence of line specific SSR marker among the 45 tea (*Camellia sinensis*) accessions. SSR-sample no. 30 primer: 141tt.

제 3 절 차나무 효과적 번식법 개발

1. 서론

차나무는 자가불화합성 식물로 타식율이 높아 자연상태에서 형성된 종자는 대부분 잡종종자이다. 잡종종자에 의한 차밭은 유전적 변이가 다양하여 새순이 자라는 시기의 차이, 품질의 불균형 등으로 균일한 생산과 품질을 가져 올 수 없고 기계화가 어려워 생산비의 절감 효과를 기하기가 어렵다. 그럼에도 불구하고 우리나라 차재배농가는 기업적인 재배지를 제외하고는 종자에 의한 번식에 의존하고 있다. 차나무는 한번 재식하면 30년 가까이 수확하게 되므로 개원시 묘목의 선택이 매우 중요하다. 종묘의 선택에서 재배농가가 종자를 주로 선택하는 원인으로는 영양번식묘의 공급이 원활하지 못한 점과 종자번식이 용이하다는 점 때문이다. 영양번식묘는 주로 삽목에 의해서 육성할 수 있는데 차나무는 폴리페놀물질인 탄닌성분 때문에 삽목에 있어서 상록수중에서도 발근이 비교적 까다로운 식물로 나타나고 있다. 삽목은 일반적으로 신초가 경화되는 시기가 적기라고 할 수 있는데 우리나라는 이 시기에 온도가 높고, 강한 광선과 건조한 날씨로 삽목의 실패율이 높은 것이 문제라고 할 수 있다. 그래서 우리 실정에 맞는 번식 방법을 개발할 필요가 있는 것이다. 삽목묘의 발근율을 높이고 정식에 알맞은 묘목을 육성하기 위해서는 삽목 시기선택, 차광정도, 관수방법, 삽목용토조제, 건묘육성방법 등이 연구되어야 할 과제라고 할 수 있다. 정식에 필요한 건전묘를 조기에 육성하는 방법으로 미생물을 살균한 비료용토의 삽목, 밀폐삽목으로 습도유지와 관수노력 절감, 포트삽목으로 근권의 보호, 유근접목으로 종자근의 직근성 활용 등의 방법으로 다목적 접근이 필요하다. 근래 차나무 삽목에 관한 연구로 적정 상토, 삽목시기(이용호 등, 2004), 치상방법(Nakamura, 2000), 균근균의 처리(오광인 등, 2004), 녹지삽목(오광인 등, 2004)에 관한 보고되어 있으나 보다 실제적인 연구가 필요한 실정이다.

차에 있어서 callus 증식율을 높이기 위한 배양 방법이나 배양 조건에 대한 검토는 주로 일본 학자들에 의해 보고 되고 있다 (Nakamura 1987, 1990; Shibata 1993). 그 중에는 배양 온도, 유리 아미노산 농도, 다당류의 영향 등을 검토한 예가 있으며, 기관별, 부위별 재료 채취 시기별 및 품종별로 callus 유도에 관한 보고도 있다(Kim 1986; Nakamura 1984). 그러나 대부분의 보고는 일본의 육성품종을 대상으로 실시한 것이며, 우리나라의 야생종을 대상으로 보고된 예는 미진한 상태이다. 일반적으로 식물 영

양기관의 분화는 초본성 식물보다 목본성 식물이 더 어려운 것으로 알려져 있다. 목본성 식물에서는 체세포성 조직을 배양하여 재분화계를 확립한 예가 그다지 많지 않으며, 재분화율도 대체로 저조하다. phenol성 물질이 많은 차나무 배양에서도 재분화율이 낮게 나타나고 있다. 엽배양에서 2,4-D 첨가로 부정배 출현과, 줄기 절편 배양에서 부정아 형성을 보고하고 있으나 대량 증식까지는 이르지 못하고 있는 실정이다. 장기적으로는 식물 조직체 배양을 통하여 대량 증식되는 callus로부터 식물체 재분화를 유도하여 안정적인 종묘 생산을 꾀해야겠으나 배양과정중에서 유전적 변이체 출현 등의 문제해결에 시간이 소요된다. 여기에 현실적인 대안으로 배배양이나 영양체 배양을 통하여 다량의 shoot를 형성시켜 종묘를 대량 증식시키는 방법을 생각해 볼 수 있다. 최근 우리나라에서 잎배양(박용구 등, 1997), 신초배양(오미정 등, 2004), 경정배양(김주희 등, 1998), 미성숙 배배양(안인숙 등 1994) 등의 조직배양으로 차나무 증식을 시도하고자 하는 연구가 단편적으로 실시되었다.

2 연구 방법

가. 밀폐삽 삽목법

○ 삽목방법

밀폐삽은 길이 50m× 폭 5m 비닐 하우스내와 포장에 폭 90cm 터널을 만들어 비닐을 덮고, 50% 차광막으로 차광처리한 삽목상에 처리당 90본씩 삽목하였다. 삽목시기는 신초가 신장 후 정지기인 6월, 8월, 10월을 택하여 실시하였다. 대조구인 미스트 삽목은 차광막을 한 하우스내에서 2시간 간격으로 미스트 관수를 실시하였다. 삽목용 토는 삽목용토에 관한 실험외에는 마사토와 퍼라이트를 1:1로 배합하여 사용하였고, 품종은 주품종으로 야부키타를 이용하였으며, 품종비교에서는 Yabukita, Meiryoku, Okumidori, 참록, 명선, 야생차를 사용하였다. 조사는 삽목 후 2개월째 실시하였고, 발근율, 평균발근수, 최장근길이, 뿌리의 생체중, 건물중을 측정하였다.

○ 차나무와 다른 상록수와 삽목 비교

차나무의 발근력을 다른 상록수와 비교하기 위하여, 11월에 아왜나무, 사철나무, 은목서, 치자, 서향, 식나무, 호랑가시, 동백을 30본씩 삽목하였다.

○ 용토별 삽목 비교

삽목 용토별 차이를 알아 보기 위하여 30x50cm 육묘상자에 마사토, 퍼라이트, 버

미큐라이트, 피트모스, 마사토+퍼라이트, 버미큐라이트+퍼라이트, 부엽토+마사토를 넣고, 삼목을 실시하였다.

○ 삼수조건에 따른 삼목

삼수 조건에 따른 삼목을 알아보기 위하여 삼수부위별, 삼수의 잎수별, 삼수의 저장기간부위별 차이를 두고 삼목을 실시하였다. 삼수부위별은 신초를 위에서 첫째마디, 둘째마디, 셋째마디, 넷째마디로 구분하여 삼목하였다. 삼수의 잎수는 1/2엽, 일한 장, 잎 두장, 잎 세장을 부착하도록 삼수를 조제하여 삼목을 실시하였다. 삼수의 저장기간은 2일, 4일, 6일, 8일, 10일로 하고 5℃ 냉장저장 후 삼목을 실시하였다.

○ 비료 및 유기질 처리

삼목용토에 비료와 유기질 거름을 섞었을 때 삼목을 알아 보기 위하여 일반적인 삼목용토인 마사토에 질소질 비료인 요소를 m²당 5g을 넣은 비료구와 유기질 비료를 마사토와 3:1 비율로 섞은 유기질 시비구를 설치하여 밀폐삼과 미스트 삼목을 실시하였다.

○ 식물생장조절제의 효과

식물생장조절제의 발근촉진의 효과를 알아보기 위하여, IBA 10ppm, IBA 50ppm, IBA 100ppm, IAA 100ppm, NAA 100ppm 용액에 삼수를 1시간 침지한 후 삼목을 실시하였다.

○ 온도의 영향

밀폐삼에서 온도의 영향을 알아보기 위하여 밀폐된 상자에 마사토+퍼라이트(1:1)를 용토를 사용하여 6월9일에 처리당 90분씩 1엽1마디로 품종 Yabukita로 삼목을 실시하고 15℃, 25℃, 35℃, 의 growth chamber에 옮겨 광16시간 습도 70%조건 유지하도록 설치하였다. 상온처리는 옥상의 온실에서 관리하였다.

○ 밀폐 방식에 따른 삼목의 영향

폭 90cm 삼목상에 6월 9일에 처리당 90분씩 품종 Yabukita, 보향을 삼목하고 터널을 만들어 비닐을 덮고 밀폐하도록 하였다. 일중터널은 높이 60cm되도록 활대를 설치하고 비닐을 덮고 그 위에 차광막을 두겹을 덮어 50%차광이 되도록 하였다. 이중터널은 30cm 높이의 제1터널과 그 위에 60cm 높이의 제2터널을 설치하고 비닐로 밀폐를 하고 2터널위에 차광막을 두겹으로 덮어 50% 차광이 되도록 하였다.

온도변화는 온도기록계(T&D CO.)를 사용하여 20분 간격으로 측정하였다. 삼목결과조사는 삼목후 50일에 실시하였다.

○ 차광정도가 삼목에 미치는 영향

밀폐삼목에서 차광을 실시하게 되는데 어느 정도가 적당한지를 검토하기 위하여 차광에 차이를 두고 삼목을 실시하였다. 밀폐가 가능한 유리용기에 마사토+피라이트(1:1)를 넣고 6월9일에 삼목을 실시하고 차광막으로 0%, 25%, 50%, 75%가 되도록 하였다. 삼목초기 암흑처리의 영향을 알아보기 위하여 완전 차광, 밀폐된 상자에 삼목한 화분을 옮겨 1일, 2일, 3일, 4일, 5일간 암흑처리를 실시한 후 삼목상에 옮겨 삼목관리를 실시하였다.

나. 포트삼목법

효과적인 포트삼목법을 개발하기 위하여 포트 종류는 연결식 종이포트, 비닐포트(직경 10cm), 지피포트(직경 10cm), 마대포로 개발한 바이오 포트, 공정육묘판 5종류를 이용하였다. 종이포트는 일본(Nippon Beet Sugar MFG. Co.)에서 개발된 포트로서 80개가 한 셋트로 연결되어 있고 하나의 포트는 길이 15cm, 직경 6cm의 6각형으로 되어 있다. 지피포트는 peat moss로 만들어진 것이다. 마대포트는 자체 개발한 포트로서 통기성이 좋은 재질로 길이 14cm 직경 10cm가 되게 만들었다. 공정육묘판은 직경 8cm cell 이 20개 있는 20공구 육묘판을 사용하였다. 삼목은 신초가 신장 후 정지기인 6월과 10월에 실시하였다.

삼목 방법은 각 포트에 마사토를 넣고 처리당 30분씩 삼수를 일 한 장씩 부착하도록 조절하고 삼목을 실시하고 삼목한 포트는 차광막을 설치한 비닐하우스의 미스트실에 옮겨서 2시간 간격으로 미스트 관수하도록 관리하였다. 품종은 야부키타, 메이로쿠, 참록, 명선, 보향, 야생차를 이용하였다. 조사는 삼목 후 60일에 삼수를 채취하여 고사율, 발근율, 삼수당 발근수, 최장근, 뿌리 생체중, 건물중을 측정하였다.

상토별 미생물의 영향을 알아보기 위하여 7종류의 용토 마사토, 피라이트, 질석, 피트모스, 발효, 배양토, 부엽토에 삼목을 실시하고 각 용토내의 미생물은 토양 10g을 채취하여 배양과정을 통하여 미생물을 측정하였으며, 삼수내 미생물은 삼수를 3cm로 절단하여 식물에 부착한 미생물을 조사하였다.

차나무 발근과정을 조직 해부학적으로 분석하기 위하여 6월10일 Yabukita 종을 1엽 부착하여 1마디 5-10cm 길이로 삼수를 조절하여 마사토 미스트삼목상에 200분 삼목 실시하였다. 그리고 5일 간격으로 채취하여 FAA(Formalin:Alcohol:Acetic acid,

1:1:12) 저장액에 보관하면서 microtome으로 10~20um두께로 절편을 만들어 광학현미경으로 근원기 발생 과정을 관찰하였다.

다. 기내 번식법

기내 번식에 주재료로 이용한 야부키타 품종은 순천대학교 포장에서 재배된 것으로 전정후 새로 나온 5엽 개엽기의 신초를 이용하였다. 잎 절편은 생장점 부위로부터 제 1엽, 제 2엽 및 제 3엽을 절취한 후 70% 에탄올 용액에 20초간 침지시켰다. 그 후 3% calcium hypochlorite용액으로 10분간 살균하여 멸균수로 수세하였다. 잎 절편은 무균 샐레 상에서 주맥과 측맥간의 조직을 이용하여 약 7×7 mm의 크기로 조제하였다. 잎 절편의 치상수는 시험관당 1개로 하여 한천 배지상에 치상하였다. 시험관은 직경 25mm, 길이 150mm로 배지량은 15ml을 넣었다.

배양온도는 26℃로 일정하게 하였으며, 광조건은 암상태로 유지하였다. Callus 유도율은 치상후 30, 40 및 50일 후에 조사하였으며, callus 는 크기에 따라 4등분으로 구분하였다. 줄기 절편에 액아를 붙여 채취하는 시기는 5엽 전개기로 신초의 절간을 이용하였다. 생장점 방향으로부터 제 1, 제 2, 제 3 및 제 4 절간별로 나누어 시료의 크기를 1cm길이로 절단하여 치상하였다. 품종은 참록, 보향, 야부키타 품종을 이용하였고 Agar 0.8%, pH 5.8, Sugar 3%의 MS 배지, 하이포넥스 배지에 식물호르몬 IAA, NAA, BA, Kinetin의 비율을 5종류로 달리 첨가하여 배지를 만들고 이 배지에 절편을 치상하고 16시간 일장, 25℃ 온도의 배양실에서 배양하였다. 식물호르몬 조성은 IAA 0.2~2.0mg/l에 BA 1.0mg/l, IAA 0.2~2.0mg/l에 Kinetin 1.0mg/l, NAA 0.2~2.0mg/l 에 BA 1.0mg/l, NAA 0.2~2.0mg/l에 Kinetin 1.0mg/l, IAA 1.0~3.0mg/l에 Kinetin 1.0~2.0mg/l, 그리고 IAA 1.0~3.0mg/l에 BA 1.0~2.0mg/l으로 구성하였다. 조사는 2주일 간격으로 배양한 절편에서 shoot의 분화와 형성을 조사하고 3개월후 shoot 수, 초장, 잎 형성, 생체중, 건물중을 조사하였다.

3. 연구내용 및 결과

가. 밀폐삽 삽목법

○ 차나무와 다른 상록수와 삽목 비교

차나무는 동백과 같은 차나무과 동백속에 속하는 상록수이다. 상록수인 아왜나무,

식나무, 사철나무, 은목서, 호랑가시, 서향과 같이 삽목을 실시한 결과. 아왜나무, 사철나무, 식나무가 삽목율이 매우 높고, 은목서, 동백, 차나무가 저조했다. 서향은 거의 발근되지 않았다(그림 3-1, 3-2). 삽목시기가 11월로 삽목에 적합한 시기가 아닌 점이 실질적인 비교에 어려움이 있으나 차나무를 다른 상록수와 비교할 때 삽목번식이 방법에 따라서는 용이하지 않음을 알 수 있었다.

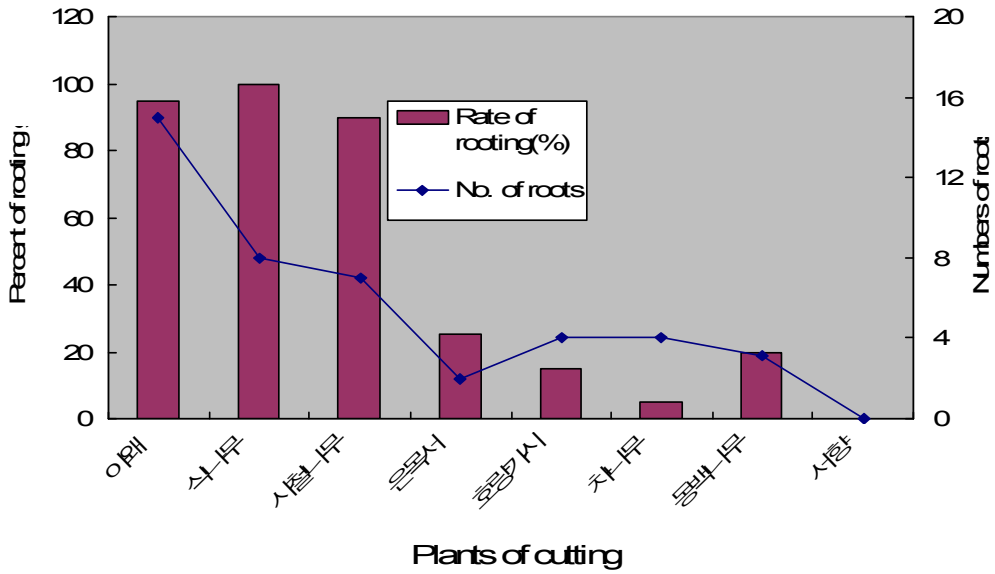


Fig. 3-1. 차나무와 다른 상록수와 삽목 비교(11월중 삽목).



Fig. 3-62. Rooting appearances of evergreen trees including of tea in 3 months after cuttings.

○ 용토별 삽목 비교

삽목용토로 사용한 7가지 삽목용토중에서 마사토와 마사토+퍼라이트 삽목이 가장 양호하여 91.3%, 88.2%에 이르고 삽수당 발근수도 13개, 14개로 많았다. 뿌리길이와 생체중, 건물중에서도 현저하게 양호하였다. 다음은 퍼라이트, 버미큘라이트+퍼라이트 용토였으며 유기질용토와 피트모스에서는 현저하게 삽목율이 감소하는 결과를 얻어왔다(표 3-1, 그림 3-3). 이것은 마사토, 퍼라이트의 배수성이 양호한 결과라고 판단된다.

Table 3-1. The comparison of rootings among different soil mediums in the tea cuttage.

Cutting soil	Rate of rooting(%)	No. of roots	Length of root(cm)	Fresh weight of root(g)	Dry weight of root(g)
Masa soil	91.3	14.8	4.2	0.21	0.037
Masa + Perlite	88.2	13.3	3.9	0.22	0.041
Masa + humus	35.2	6.7	1.9	0.08	0.023
Vermiculite	64.5	8.3	3.2	0.11	0.042
Vermiculite + Perlite	75.1	6.8	2.9	0.12	0.028
Peat moss	45.3	5.7	2.3	0.08	0.013
Perlite	72.7	11.7	3.2	0.17	0.067

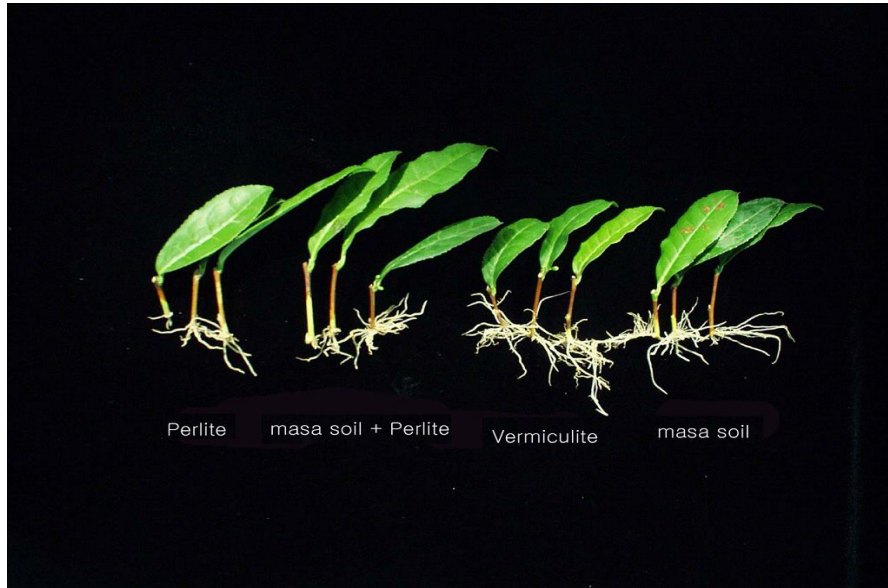


Fig. 3-3. The rooting aspects in different cuttage mediums.

○ 삽수조건에 따른 삽목

차나무는 생육에 따라서 신초의 길이가 달라진다. 생육이 왕성한 가지는 40cm 이상 신장하여 잎이 7-8장 달리는 경우도 있다. 보통은 4-5마디 신장하는데 그중에서 2-3마디의 발근이 좋게 나타났다(그림 3-4).

삽목에서 잎수의 결정은 일면적과 비례한다고 할 수 있다. 차나무는 잎 2장 부착이 가장 높은 발근율을 보이고 있고 다음이 1장 삽수였다. 3장 삽수는 삽목율과 발근수가 감소현상으로 나타났다(그림 3-5, 3-6). 1장과 2장의 차이는 별로 크지 않은 점으로 보아 삽수확보와 삽목면적의 효율성에서는 1장 삽수가 효과적이라고 할 수 있다.

삽수는 채취 후 바로 삽목을 실시하는 것이 가장 바람직하나 작업 사정에 따라서는 채취 후 저장이 필요한 경우도 있을 수 있다. 5℃의 냉장실에 저장했을 경우 6일 부터는 삽목율이 10%정도 감소하고 발근수도 감소하는 결과로 나타났다(그림 3-7).

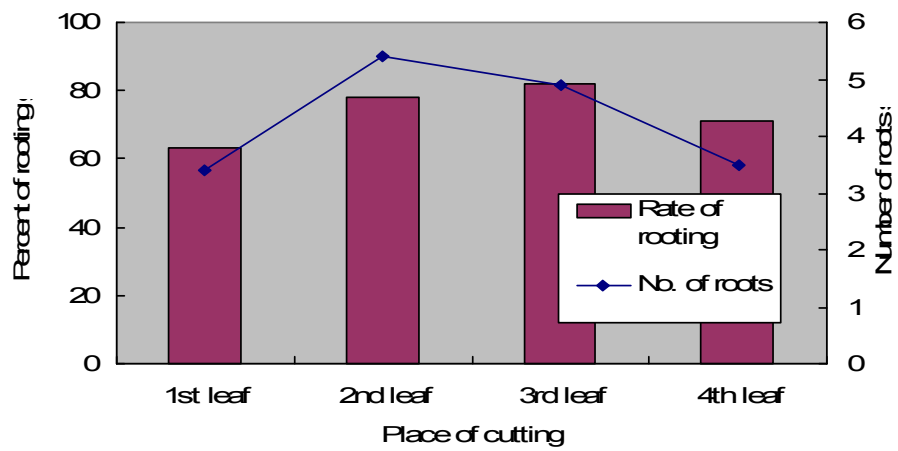


Fig. 3-4. The comparison of rootings among different cutting sites of tea stem in the covering tea cuttage.



Fig. 3-5. The several aspects of cutting in the covering tea cuttage..

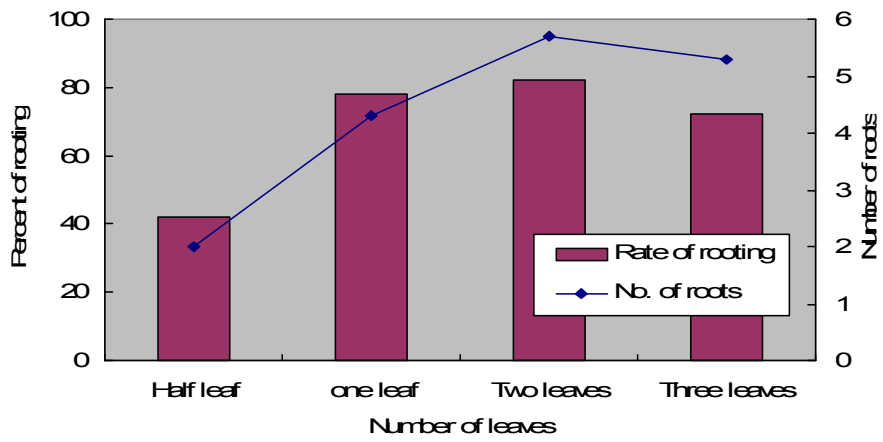


Fig. 3-6. The comparison of rootings among several cuttings with different leaf numbers in the covering tea cuttage.

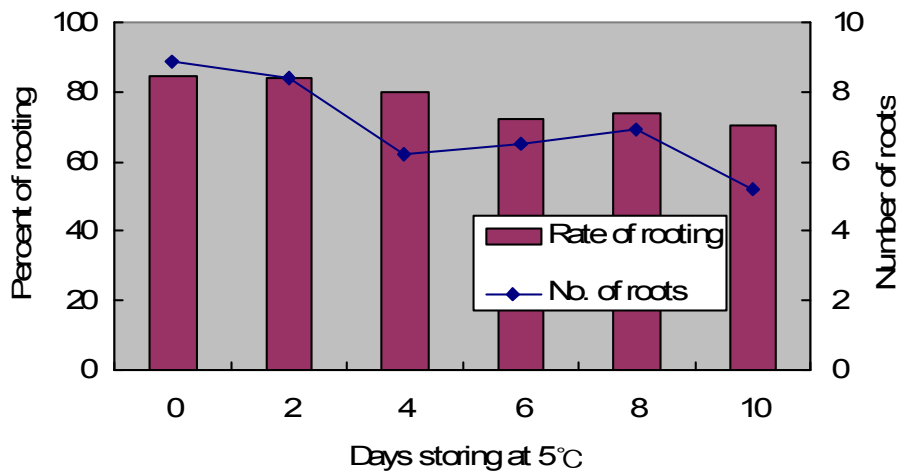


Fig. 3-7. The comparison of rootings among cuttings stored for different days in the covering tea cuttage.

○ 삽목상에 비료 처리

마사토 삽목에서 밀폐삽목이 미스트 삽목과 차이 없이 비료구보다 높은 85.3% 삽목율을 보이고 있다. 그리고 발근수에 있어서는 밀폐삽목이 더 증가하여 삽수당 9.6개가 발근하였다(그림 3-8). 그러나 비료구에서는 밀폐삽에서 66.7%(화학비료), 60.7%(유기질)로 저조했으며 미스트 삽목에서는 73.3%(화학비료), 33.3%(유기질)였다. 비교적 유기질 처리가 비료처리구보다 삽목이 저조한 결과를 보였다. 특히 미스트에서 유기질 처리가 현저하게 삽목율이 저하하는 것은 고사염 발생율이 증가한 결과라고 생각한다. 이것은 유기질 처리가 삽목용토에 미생물의 증가시켜 잎을 썩게 한 원인으로 판단된다. 유기질과 비료구는 삽목율이 다소 저조한 상태이나 발근 후 생육에서는 월등한 활력을 보이고 있었다(표 3-2).

Table 3-2. The comparison of rootings between covering cuttage and mist cuttage in the tea cuttage.

Condition of cuttage	Cutting medium	Rate of rooting(%)	No. of roots	Length of root(cm)	Fresh weight of root(g)	Dry weight of root(g)
Covering cuttage	Masa soil	85.3	9.6	7.2	0.52	0.043
	Fertilized soil	66.7	5.6	6.0	0.38	0.031
	Humus soil	60.2	5.2	7.9	0.47	0.038
Mist cuttage	Masa soil	86.7	7.6	6.9	0.41	0.043
	Fertilized soil	73.3	6.9	7.8	0.44	0.029
	Humus soil	33.3	2.9	7.2	0.47	0.039

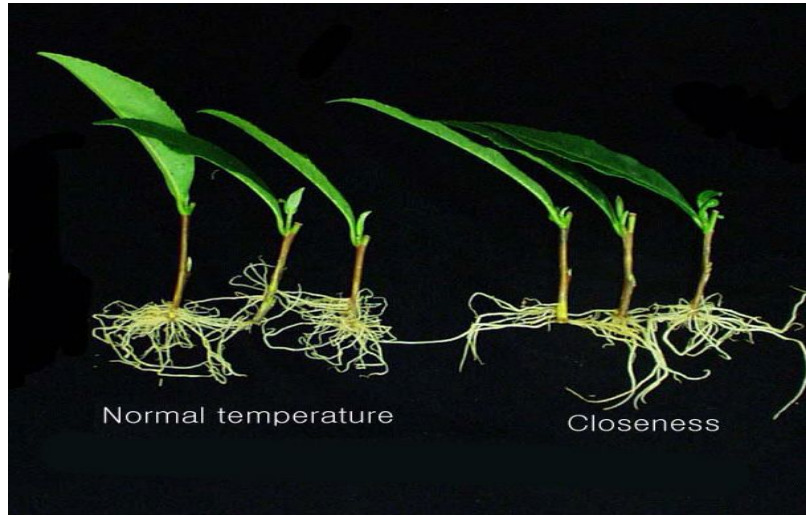


Fig. 3-8. Rooting aspects showed in the different cuttage conditions.

○ 식물생장조절제의 효과

옥신류의 식물호르몬 IBA, IAA, NAA처리에서 IBA의 처리가 효과있는 것으로 나타났다. IBA 100ppm처리가 가장 효과가 있어 92.2% 발근율을 나타내고 있다. IAA나 NAA처리에서는 무처리보다 별로 나은 효과를 기대할 수 없었다(표 3-3).

Table 3-3. Effect of plant regulators on rooting in the covering tea cuttage.

Plant hormone	Rate of rooting(%)	No. of roots	Length of root(cm)	Fresh weight of root(g)	Dry weight of root(g)
Control	82.6	9.2	6.3	0.25	0.018
IBA 10ppm	81.3	12.3	9.2	0.38	0.037
IBA 50ppm	90.7	15.2	12.5	0.51	0.041
IBA 100ppm	92.2	14.9	11.9	0.44	0.037
IAA 100ppm	79.3	8.3	4.9	0.17	0.021
NAA 100ppm	80.2	7.3	5.3	0.21	0.023

○ 온도의 영향

밀폐삼목시 삼목상내 온도가 올라가는 것이 문제가 될 수 있는 점을 고려하여 온도가 발근에 미치는 영향을 알아 보았다. 25℃에서 양호한 발근율을 보인 반면 35℃

에서는 삼수가 완전히 고사하였다. 삼목에서 나타나는 고사현상은 35℃ 이상 고온의 영향임을 알 수 있었다. 15℃ 에서도 장기간의 미발근상태로 고사엽이 46.7%에 이르고 있었다. 실온에서 발근율이 저조한 것은 밀폐상태로 한 낮의 고온의 영향이라고 할 수 있다(표 3-4).

Table 3-4. Effect of temperature on the rooting in the covering tea cuttage.

Temperature	Rate of rooting (%)	Rate of withering (%)	No. of roots	Average Root length (cm)	Longest root Length (cm)	Fresh weight of root(g)	Dry weight of root(g)
Room temperature	20	80	3.0	0.42	0.55	0.003	0.002
15℃	53.3	46.7	12.8	1.0	2.22	0.062	0.043
25℃	80	20	20.3	2.34	4.77	0.142	0.079
35℃	0	100	0	0	0	0	0

○ 밀폐 방식에 따른 삼목의 영향

일중 터널과 2중 터널 방식에 따른 온도변화와 삼목의 결과는 그림 3-9와 표 3-5, 표 3-6과 같았다. 온도변화에 있어서 해뜨는 날 이중터널과 일중터널을 비교하여 보면, 일중터널이 8시부터 오후 7시까지 적어도 1도이상 온도가 높았으며 2시와 3시사이에는 8도까지 차이로 온도가 높았다. 밀폐삼목상의 온도상승을 억제하기 위해서는 2중터널이 효과적임을 보여주는 결과였다.

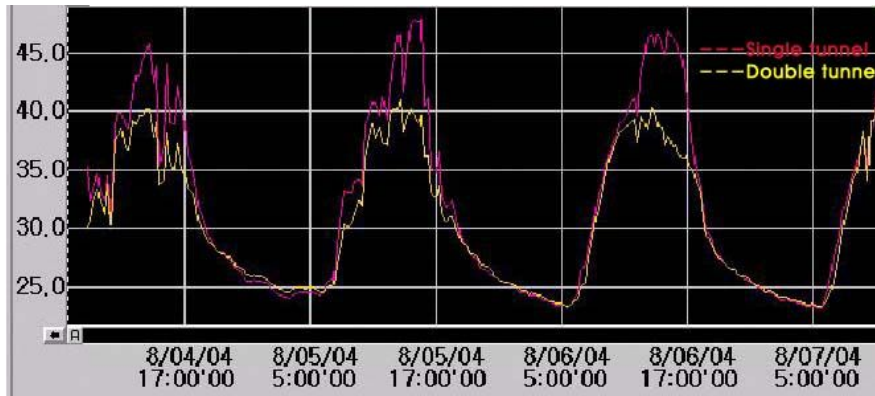


Fig. 3-9. Changes of air temperature in one covering tunnel and double covering tunnel cutting beds.

일중터널과 이중터널의 삼목결과는 표 3-5, 표 3-6과 같다. 발근율이 81%, 83%이고 고사율은 14%, 13%로 2중터널이 다소 성공율이 높은 편이나 뚜렷한 차이라고 볼 수는 없었다. 그러나 발근수와 뿌리길이, 생체중, 건물중에서는 상당한 차이를 나타내고 있다. 이것은 발근기에 자주 오는 강우로 고온의 영향을 덜 받은 결과라고 할 수 있다. 그러나 생육과정에서는 고온의 지장을 받은 결과가 뿌리의 생육에서 나타난 결과라고 할 수 있다.

Table 3-5. Effect of one covering tunnel in the covering tea cuttage.

Tunnel condition	Cutting space	Rate of rooting (%)	Rate of withering (%)	No. of roots	Average Longest		Fresh weight of root(g)	Dry weight of root(g)
					Root length (cm)	root Length (cm)		
Open	1x1cm	52	24	7.50	0.46	0.26	0.031	0.023
	5x5cm	72	8	12.3	1.25	2.62	0.062	0.034
Closed	1x1cm	84	16	16.4	0.95	2.32	0.074	0.042
	5x5cm	92	8	21.6	0.90	2.29	0.171	0.083
Mean		81	14.0	14.4	0.89	1.87	0.084	0.045

Table 3-6. Effect of double covering tunnel on rooting in the covering tea cuttage.

Tunnel condition	Cutting space	Rate of rooting (%)	Rate of withering (%)	No. of roots	Average Root length (cm)	Longest root Length (cm)	Fresh weight of root(g)	Dry weight of root(g)
Open	1x1cm	72	20	12.3	0.78	1.91	0.020	0.007
	5x5cm	84	12	21.9	1.34	2.81	0.083	0.045
Closed	1x1cm	84	12	27.6	0.79	1.90	0.130	0.061
	5x5cm	92	8.	42.9	0.77	2.03	0.162	0.110
Mean		83.0	13.0	26.2	0.92	2.16	0.098	0.055

○ 차광정도가 삼목에 미치는 영향

삼목시 강한 광선에 의한 고사와 증산억제를 위해서 차광을 하게 되는 데, 알맞은 차광정도를 알아보기 위하여 차광정도별로 조건을 주어 삼목한 결과는 표3-7과 같다. 밀폐된 용기에 차광막으로 차광을 실시하고 관수를 하지 못하였기 때문에 일반 삼목보다 발근율이 떨어지는 결과를 보여 주고 있다. 그러나 어느 경향은 나타내고 있는 결과로, 차광정도가 강할수록 발근율이 떨어지는 결과를 초래하고 발근수도 저조해지는 경향을 보고 주고 있다. 차광도가 낮은 25% 차광상태에서 발근율이 높고, 다음이 50% 차광, 75% 차광순으로 발근율이 저조하였다. 암흑처리를 날짜별로 5일간 실시한 결과는 무처리보다 다소 저조한 발근율, 발근수를 보여 주고 있으나 처리일수에 따른 차이는 어떤 경향을 보여 주지는 못하고 있다. 하루처리와 4일간처리와 별 차이가 없는 결과는 실험의 재 반복이 요구되는 결과라고 할 수 있다(표3-8).

Table 3-7. Effect of shading on rooting in the covering tea cuttage.

Shading condition	Rate of rooting (%)	Rate of withering (%)	No. of roots	Average Root length (cm)	Longest root Length (cm)	Fresh weight of root(g)	Dry weight of root(g)
No shading	45	55	13.3	0.82	2.47	0.0530	0.0360
25% shading	50	50	15.1	0.86	2.21	0.0252	0.0205
50% shading	40	60	13.0	0.60	1.35	0.0051	0.0037
75% shading	10	90	5.0	0.30	0.70	0.0030	0.0026

Table 3-8. Effect of dark treatment on rooting in the covering tea cuttage.

Dark treatment	Rate of rooting (%)	Rate of withering (%)	No. of roots	Average Root length (cm)	Longest root Length (cm)	Fresh weight of root(g)	Dry weight of root(g)
Control	46.6	53.3	6.4	1.28	2.84	0.0220	0.0175
1 day	40.0	60.0	3.3	1.18	1.93	0.0130	0.0106
2 days	20.0	80.0	2.3	1.56	2.20	0.0039	0.0036
3 days	33.3	66.6	5.4	0.78	2.86	0.0125	0.0105
4 days	40.0	60.0	4.0	0.60	1.30	0.0054	0.0050
5 days	26.6	73.3	2.2	0.67	1.05	0.0021	0.0018

나. 포트삽목법

1) 포트별 삽목 비교

종이 포트, 지피 포트, 비닐 포트, 바이오 포트, 플러그 육묘 상자에 삽목을 실시한 결과, 종이 포트 삽목의 삽목율이 93.2%로 높게 나타났고 발근수도 37.9개 가장 많았

다(표 3-9, 그림 3-10). 종이포트와 바이오 포트의 통기성이 발근에 효과적으로 작용하고 있음을 알 수 있었다. 일본에서 개발한 연결식 종이포트는 운반의 간편성, 비용의 저렴, 친환경성 등으로 우리나라에서도 응용해서 개량하여 사용할 필요가 있다.

Table 3-9. The comparison of rootings among 5 pots in the tea pot cuttage.

Pot	Rate of rooting(%)	No. of roots	Length of root(cm)	Fresh weight of root(g)	Dry weight of root(g)
Paper pot	93.2	9.3	5.9	0.28	0.043
Jiffy pot	88.5	8.3	6.9	0.31	0.042
Vinyl pot	60.0	6.8	3.9	0.12	0.022
Bio pot	89.1	8.7	6.8	0.38	0.012
Plug tray	35.7	5.9	3.2	0.11	0.008

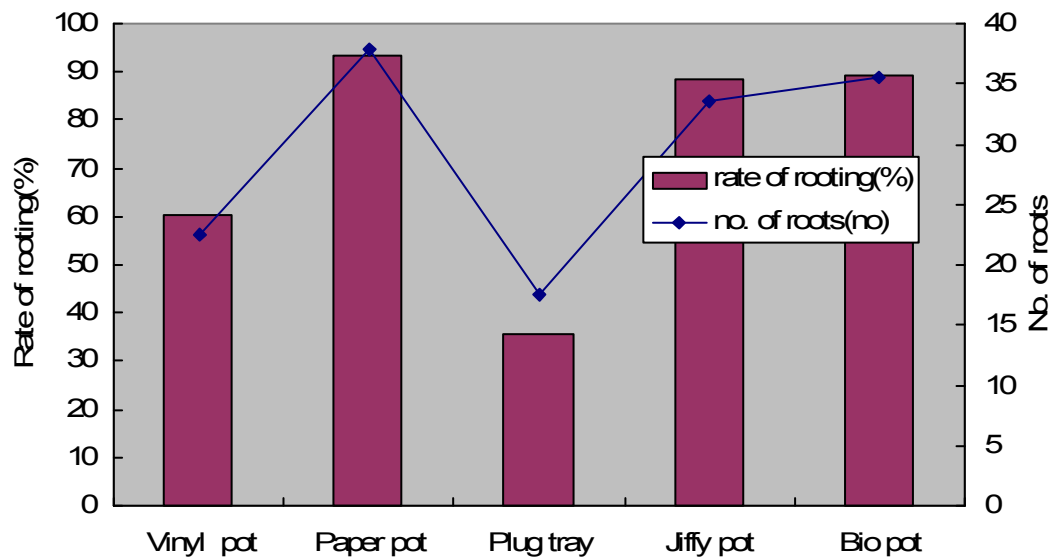


Fig. 3-10. Rooting rates and root numbers in different cuttage mediums.

2) 품종간 풋트 삽목 비교

이식이 용이한 종이풋트를 이용해서 품종별로 삽목을 실시한 결과, 일본 육성종인 Yabukita, Meiryoku 의 발근율이 참록, 명선 보향보다 높게 나타났으며 야생종이 가장 저조한 발근율을 보이고 있다(표 3-10). 최장근, 생체중, 건조중에서도 경향은 비슷한 모습을 보이고 있다. 발근의 모양도 세력이 왕성한 일본종은 줄기 전반에 뿌리가 고루 형성되는 A형이 많았고, 참록 등 국내 개발종은 절단부위에서만 형성되는 B형이 많았으며, 야생종은 발근이 잘 안되고 C형과 같은 켈루스만 형성되는 삽수가 많았다(그림 3-12).

Table 3-10. The comparison of rootings among 6 varieties in the tea pot cuttage.

Varieties of tea	Rate of rooting(%)	No. of roots	Length of root(cm)	Fresh	
				weight of root(g)	Dry weight of root(g)
Yabukita	86.2	9.3	6.8	0.38	0.059
Meiryuku	84.5	11.3	7.3	0.51	0.062
Chamrok	78.6	8.8	6.1	0.32	0.032
Myungseon	80.4	7.7	5.8	0.38	0.042
Bohyang	72.7	6.9	7.0	0.31	0.028
Wild tea	43.3	4.2	4.8	0.19	0.017



Fig. 3-12. Rooting types of the pot tea cutting.
 A type is rooted on both basal area and stem sides of cutting.
 B type is rooted only on basal area of cutting.
 C type is formed with calluses on basal area of cutting.

3) 포트 삽목에서 삽목용토의 영향

종이 포트에 사용하는 삽목용토의 실험에서 종이포트가 93.4%의 발근율로 가장 양호하였으며 다음이 펄라이트로 77.8%였다. 가장 저조한 결과는 발흙을 사용한 포트에서 31.6%였다(그림 3-11). 고사염이 많이 발생한 원인으로 발근율이 낮아졌다. 평균발근수는 마사토가 8.2개 가장 많았다. 다음이 질석으로 7개였다.

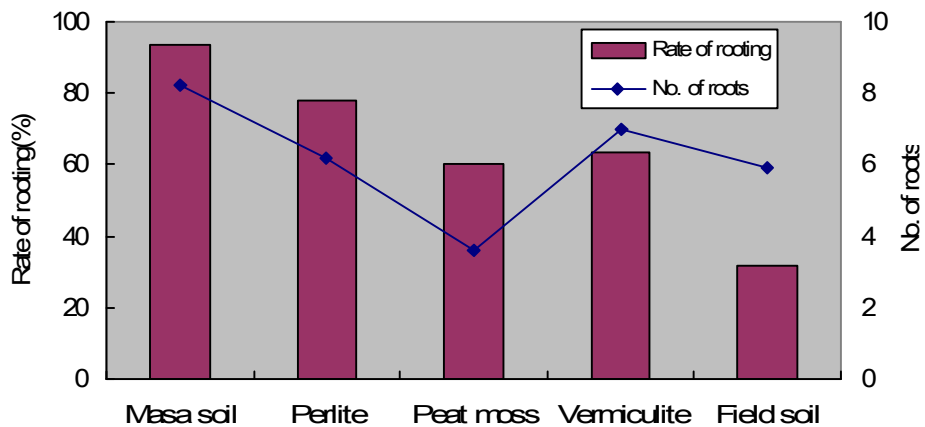


Fig. 3-11. Rooting rates and root numbers in the different cutting conditions.

4) 토양미생물이 삼목에 미치는 영향

7가지 용토내의 미생물을 측정된 결과, 부엽토>상토>발흙>퍼라이트>질석>피트모스>마사토 순으로 미생물 숫자가 많았다. 특히 부엽토의 미생물은 두 번째의 상토보다도 10배이상 많이 검출되었다(그림 3-13, 표 3-11). 발근율은 마사토와 질석에서 가장 높아 95%에 달하였다. 부엽토에서는 삼수가 모두 썩어 고사하는 결과를 갖어 왔다. 발근수는 질석과 상토에서 양호하여 40.7, 38.3개였다. 뿌리길어도 질석과 상토에서 길게 자란 결과를 보여 주고 있다. 미생물이 고사엽을 생성시키는데는 크게 작용하였으나 일단 발근된 식물에서는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

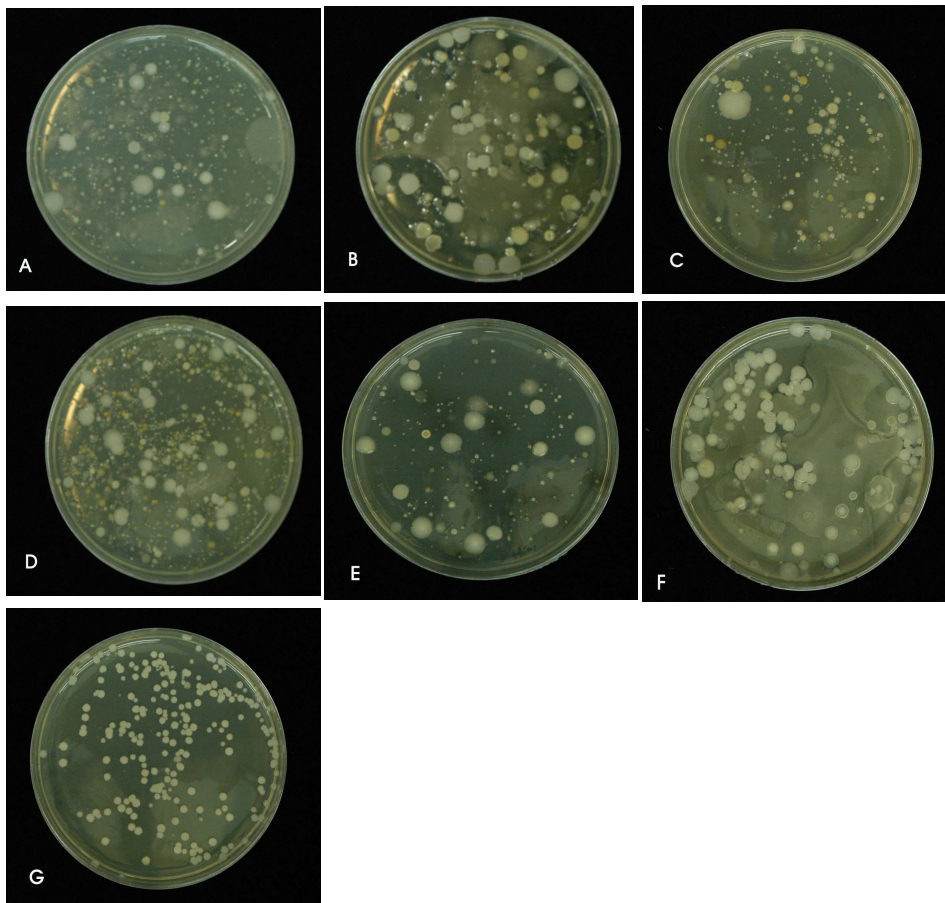


Fig. 3-13. The aspects of microbes formed in the different cuttage mediums.
A; Masasoil, B; Peatmoss, C; Vermiculite, D; Perlite, E; Field soil,
F; Bed soil, G; Leaf mold.

Table 3-11. Microbe numbers formed and tea rooting in several cuttage soils.

Dark treatment	No. of microorg anisms (CFU/g)	Rate of rooting (%)	Rate of withering (%)	No. of roots	Average Root length (cm)	Longest root Length (cm)	Fresh weight of root(g)	Dry weight of root(g)
Masa soil	6.0x10 ⁴	95.0	5.0	23.3	5.7	11.2	1.14	0.175
Peat moss	2.0x10 ⁵	64.3	35.7	15.6	4.7	7.9	0.78	0.082
Vermiculite	3.3x10 ⁵	97.5	2.5	40.7	8.9	13.4	1.22	0.206
Perlite	1.2x10 ⁶	49.0	51.0	10.9	3.4	5.8	0.98	0.105
Field soil	2.1x10 ⁶	75.9	34.1	3.9	4.7	1.30	1.14	0.150
Bed soil	9.2x10 ⁶	75.0	35.0	38.3	6.8	9.8	1.04	0.098
Leaf mold	3.7x10 ⁷	0	100	0	0	0	0	0

5) 발근의 조직 해부학적 분석

차나무의 근원기의 형성은 다른 대부분의 식물들과 마찬가지로 형성층 바깥조직인 체부조직에서 형성되는 모습을 보여 주고 있었는데 삽목 후 15일에 처음 관찰되기 시작하였으며 20일에는 상당히 많은 세포가 증가하고 비대지는 것을 관찰할 수 있었다. 발근의 모습은 삽목 후 25일부터 확인할 수 있었다(그림 3-14).

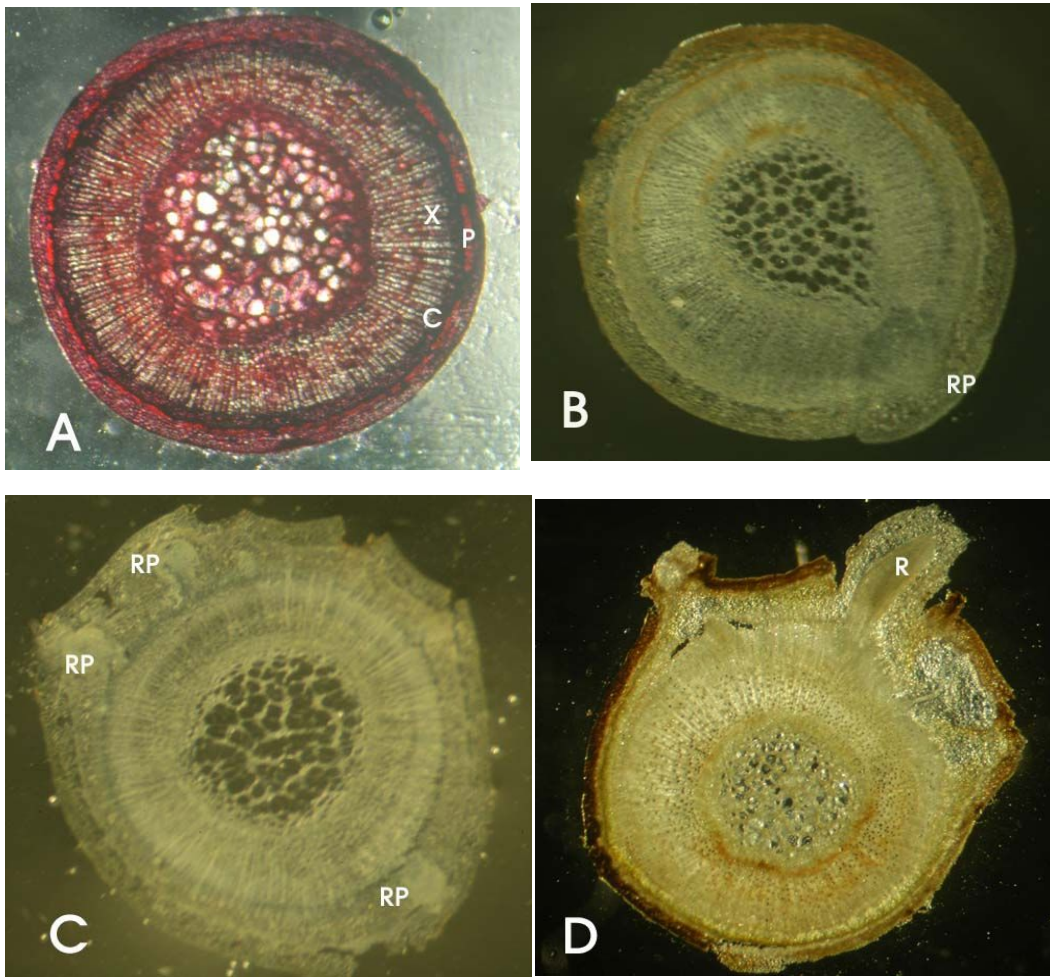


Fig. 3-14. Root primordia and rooting process of tea.

A; Sectional aspect of tea stem at early stage,

B; Root primordia formed at 15days after the cuttage,

C; Three root primordia formed at 20days after the cuttage,

D; Roots appeared from epidermal layer at 25 days
after the cuttage.

X; Xylem, P; Ploem. C; Cambium, RP; Root primodium, R; Root.

다. 기내삼목법

잎 절편에서 Callus 유도는 IAA 2.0mg/l 와 Kinetin 2.0mg/l 일 때 가장 높았으며 Callus 형성은 Kinetin농도가 높을 때 많았고 IAA도 비교적 높은 농도에서 많이 형성되는 경향으로 나타났다(표 3-12). 줄기절편 배양에서 IAA와 Kinetin을 혼합처리에서 IAA 1.0mg/l 와 Kinetin 2.0mg/l 조합에서 신초생장과 잎수의 증가가 가장 양호한 것으로 나타났다. Kinetin은 1.0mg/l 로 동일하게 하고 IAA만 1.0, 2.0, 3.0mg/l 로 변화를 주었을 때는 3.0mg/l 의 배지에서 시기별로 잎수의 변화가 가장 크게 나타났다(그림 3-15). Kinetin 2.0mg/l 의 경우는 IAA 1.0mg/l 에서 많은 잎수로 나타나는 결과를 보여 주고 있다.

Table 3-12. Effect of IAA and Kinetin on the shooting and callus formation in the tea culture.

IAA (mg/l)	Kinetin (mg/l)	shoot length (cm)	No. of leaves	Callus formation (%)	Callus size
1.0	1.0	2.1±0.3	1.8±0.3	50±4	++
	2.0	5.4±0.4	4.2±0.2	75±3	+++
2.0	1.0	1.8±0.3	1.5±0.4	74±3	++
	2.0	3.0±0.4	2.5±0.3	95±2	+++
3.0	1.0	3.6±0.7	3.1±0.8	48±4	++
	2.0	1.7±0.3	2.8±0.7	83±2	++

* Callus size - : no formed + : Callus formed to cover one-third of the segment

++ : callus formed to cover half of the segment

+++ : callus formed to cover two-third of the segment

++++ : callus formed to cover the whole segment

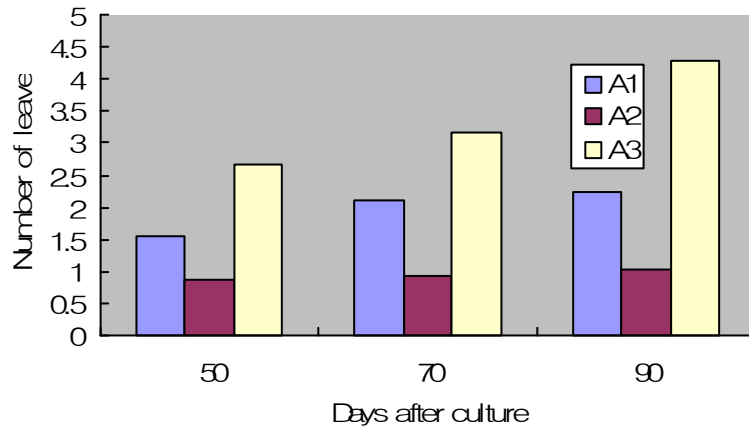


Fig. 3-15. Effect of IAA and Kinetin on the number of leaves in the tea culture. (A1: IAA1mg/l + Kin.1mg/l, A2: IAA2mg/l + Kin.1mg/l, A3: IAA3mg/l+Kin.1mg/l)

IAA와 BA의 혼합에서는 shoot의 신장은 IAA 1.0mg/l, BA 2.0mg/l에서 크게 나타났고, 잎수는 IAA 2.0mg/l, BA 1.0mg/l에서 3.7장으로 많았다. Callus는 IAA 2.0mg/l, BA 2.0mg/l에서 100%형성율을 보였다. BA를 1.0mg/l로 동일하게 하고 IAA만 1.0, 2.0, 3.0mg/l로 변화를 주었을 때는 2.0mg/l의 배지에서 시기별로 잎수의 변화가 가장 크게 나타났다. BA 2.0mg/l의 경우는 IAA 3.0mg/l에서 시기가 경과할수록 많은 잎이 형성되는 결과를 보여주고 있다(표 3-13, 그림 3-16, 3-17). 60일째 줄기절편에서 형성된 잎은 3-4장의 모습을 보여 주고 있다(그림 3-18). 신훈초가 유묘로 형성되는 데는 3-4개월이 걸리고 유묘에서 뿌리형성은 1-2개월이 소요되는 것으로 나타났다(그림 19, 그림 20).

Table 3-13. Effect of IAA and BA on the shooting and callus formation in the tea tissue culture.

IAA (mg/l)	BA (mg/l)	shoot length (mm)	No. of leaves	Callus formation (%)	Callus size
1.0	1.0	2.4±0.3	2.4±0.4	93±2	+++
	2.0	3.5±0.8	2.6±0.3	72±1	++
2.0	1.0	2.9±0.6	3.7±0.3	75±4	+++
	2.0	1.6±0.4	1.8±0.2	100±0	++++
3.0	1.0	2.3±0.2	1.9±0.3	70±4	++
	2.0	3.2±0.3	3.4±0.7	54±3	++

* Callus size - : no formed + : Callus formed to cover one-third of the segment

++ : callus formed to cover half of the segment

+++ : callus formed to cover two-third of the segment

++++ : callus formed to cover the whole segment

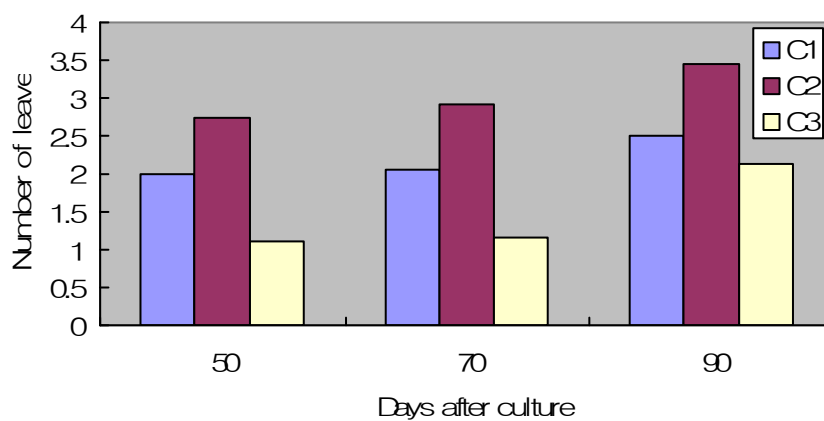


Fig. 3-16. Effect of IAA and BA(1mg/l) on the numbers of leaves in the tea tissue culture. C1: IAA1mg/l + BA1mg/l, C2: IAA 2mg/l+ BA1mg/l, C3: IAA3mg/l+ BA1mg/l.

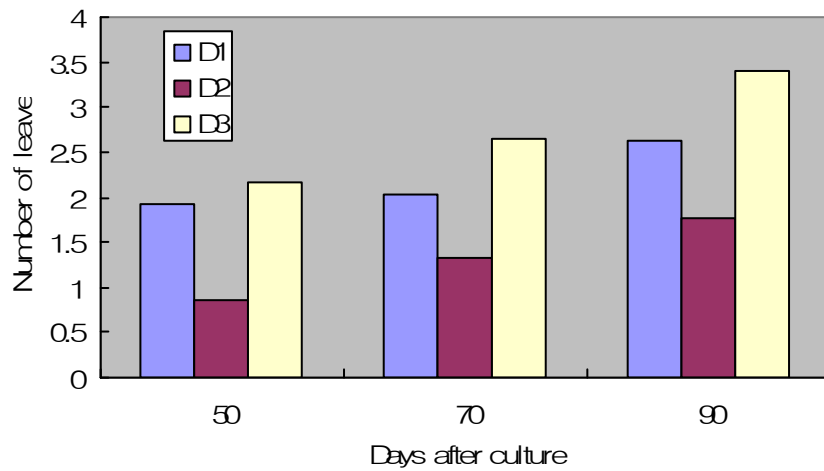


Fig. 3-17. Effect of IAA and BA(2mg/l) on the numbers of leaves in the tissue culture. D1: IAA1mg/l + BA2mg/l, D2: IAA 2mg/l+ BA2mg/l, D3: IAA3mg/l+ BA2mg/l.

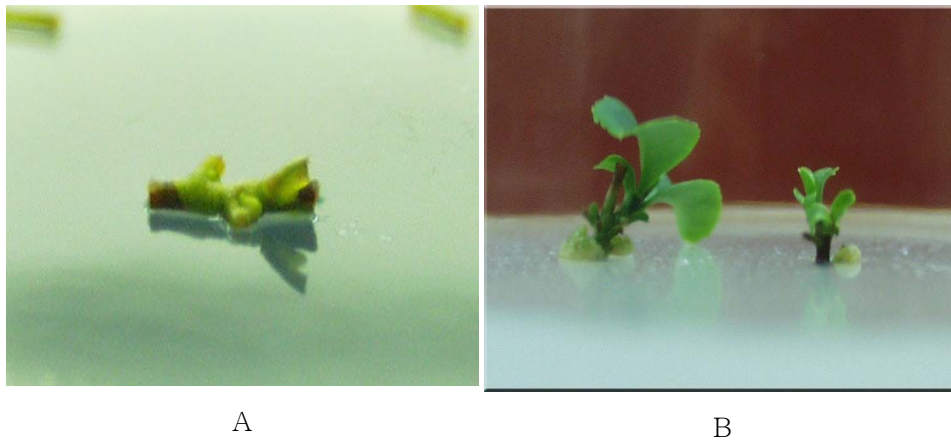


Fig. 3-18. The aspect(B) of leaves formed at 60 days after embedding in the tea tissue culture. A shows stem embeded. the medium is added by D3 combination(IAA3mg/l+BA2mg/l).



Fig. 19. Shoots formed from stem in tea culture.



Fig. 20. Roots formed from shoots in the tea culture.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 차나무 유전자원의 특성조사 및 성분 분석

1. 목표달성도

가. 차나무 유전자원 특성조사 및 성분분석(100% 달성)

차나무는 타가수정작물로 교배에 의한 개체들은 대부분 F1 잡종들이다. 지금까지 영양번식보다는 실생재배가 주로 이루어져 왔으므로 각 유전자원들에 대한 자세한 특성조사와 성분분석 결과를 바탕으로 유전자원을 분류하는 일은 중요한 일이라 할 수 있다. 데이터베이스는 육종과 재배를 위해서 매우 중요하고 필요한 일이지만 전문 프로그램 개발과 시간문제, 예산문제로 지금까지 행해지지 않았으며 특성조사 자료를 사장하는 결과를 초래하기도 하였다. 이에 본 과제를 수행하면서 차시험장에서 보유하고 있는 유망 유전자원의 고유한 특성을 조사 분석하여 데이터베이스화하였다.

본 DB 자료는 차를 연구하는 연구자 뿐만 아니라 농민 등 어느 누구나 사용하기 쉽게 한글로 제작하였다.

언뜻 보기에는 비슷해 보이는 차나무의 잎과 꽃 등의 특성을 수치화하여 각각 비교할 수 있도록 33항목을 자료화 하므로써 우리 나라 기후에 맞는 신품종 육성이 시급한 시점에서 신품종 육성의 기반을 다졌으며 돌파구를 마련하였다.

또한 형태적인 특성 뿐만 아니라 기능성 물질과 기호 식품으로 중요한 항목인 카테킨 등 주요 성분을 분석하여 게재하였다. 성분은 성분육종에 유용하게 사용될 뿐만 아니라 나아가서는 농민들이 재배 품종을 선택할 때도 중요하며 또한 차인들이 차를 음용하며 자신들이 마시는 차의 성분 함량을 이해하는데도 중요한 자료가 될 것이다. 물론 새로운 품종과 자원에 대한 지속적인 DB화도 필요하다 하겠다.

글로 이해하기 힘든 부분을 해결하고자 차나무의 특성을 잘 나타내주는 잎과 꽃의 사진을 첨가하였다.

2. 관련분야에의 기여도

차나무 재배 및 품종육성을 위해서는 그 품종이 지니고 있는 고유 특성에 대한 자료가 기본적으로 필요하며 그동안 특성조사 및 성분분석이 이루어져왔다. 그러나 유전자원을 체계적으로 관리하고 손쉽게 이용할 수 있는 시스템은 갖춰지지 않았다. 따라서 본과제에서는 이러한 당면 문제를 해결하기위해 차나무 유전자원의 데이터베이스 프로그램을 개발하였다. 차나무 유전자원의 DB 프로그램 개발은 급신장하는 차산업발전의 밑받침으로 차나무 육종재배가, 관련 연구기관, 신생 관련 연구기관에 귀중한 자료로 제공될 것이며 재배농가에도 차나무의 특성과 성분 함량을 이해하는 자료가 될 것이다.

제 2 절 차나무의 유전분석과 DNA maker 개발

1. 목표달성도

가. RAPD를 이용한 DNA marker 개발 (100% 달성)

차 45계통을 RAPD 및 유전분석하여 얻어진 결과를 정리하면 다음과 같다.

- (1) RAPD 분석용 시료수집 및 PCR적정조건을 결정하였다.
- (2) 45종 차에 대하여 80개 primer를 사용하여 RAPD 분석하였으며, 이중 다형성을 보이는 primer 20종을 선발하였다.
- (3) Clustering 분석과 유전적 거리에 의한 유전적 다양성분석결과 수집 계통들 간에 높은 원연관계를 나타내었으며, 유전적 변이를 많이 포함하고 있을 것으로 평가되었다.
- (4) RAPD에 기초한 재현성 있는 DNA marker를 선발 중에 있으며, OPA-13 primer 사용시 4번 계통에서 특이밴드가 증폭되었다.
- (5) 증폭된 특이밴드를 크로닝 하여 염기서열을 결정하였다.

나. AFLP를 이용한 DNA marker 개발(100% 달성)

차 45계통을 AFLP 및 유전분석하여 얻어진 결과를 정리하면 다음과 같다.

- (1) AFLP 분석용 시료수집 및 AFLP분석의 적정 제한효소조합을 결정하였다.
- (2) 45종 차에 대하여 선발된 5개 primer를 사용하여 AFLP 분석을 성공적으로 수행하여 높은 다형성을 나타내는 결과를 도출하였다.
- (3) Clustering 분석과 유전적 거리에 의한 유전적 다양성분석결과 수집 계통들 간에 다양한 유연관계를 나타내었으며, 유전적 변이를 많이 포함하고 있을 것으로 평가 되었다.
- (4) AFLP에 기초한 재현성 있는 DNA marker를 선발하였다.
- (5) 증폭된 특이밴드를 크로닝 하여 염기서열을 결정하였다.

다. SSR-PCR에 따른 DNA marker 개발 (100% 달성)

차 45계통을 SSR 및 유전분석하여 얻어진 결과를 정리하면 다음과 같다.

- (1) SSR-PCR분석의 적정 조건을 결정하였다.
- (2) 선발된 10개의 primer를 사용하여 SSR 분석을 성공적으로 수행하여 높은 다형성을 나타내는 결과를 도출하였다.
- (3) Clustering 분석과 유전적 거리에 의한 유전적 다양성분석결과 수집 계통들 간에

다양한 유연관계를 나타내었으며, 유전적 변이를 많이 포함하고 있을 것으로 평가되었다.

- (4) AFLP에 기초한 재현성 있는 DNA marker를 선발하였으며, 현재 계통 특이밴드를 크로닝 중에 있다.
- (5) RAPD, AFLP, SSR의 비교분석을 수행하였다.

2. 관련분야에의 기여도

지금까지 국내에 있어 차의 품종분류를 통한 유연관계 연구는 주로 형태적 특성과 RAPD분석에 의한 유연관계 및 분류를 중심으로 이루어져왔다. 또한 수집집단의 크기에 있어서도 30~35계통 크기로 분석이 이루어진 것은 차로부터 DNA의 분리가 여의치 않은 문제점도 있었기 때문이다. 본 연구를 통하여 45 계통의 비교적 다양한 기원의 국내수집 차 자원을 이용하여 유전적 다양성을 구명함으로써 수집유전자원의 가치를 평가하고, 수집종간의 분자마커를 개발함으로써 차 육종의 기초자료를 확보하게 될 것이다. 또한 차를 대상으로 AFLP 분석과 SSR분석 간의 효율성도 여러 측면에서 고려되어 차의 분자수준에서 연구를 가속시킬 수 있을 것이다.

제 3 절 차나무 효과적 번식법 개발

1. 목표달성도

가. 밀폐삽 삽목법(100% 달성)

- (1) 삽목시 한번 처리로 끝나는 밀폐삽목이 미스트 삽목과 큰 차이없는 발근율을 보이고 있으며 발근수는 오히려 증가하고 있었다. 삽수의 적합한 조건은 잎은 한 장, 절단부위는 둘째나 3째마디, 삽수는 채취 후 바로 이용이 효과적이나 냉장저장시는 일주일정도는 유효하다는 것을 밝혔다.
- (2) 비료 용토와 유기질 용토는 마사토 용토보다 저조한 발근율을 보이고 있으나 발근수는 증가하고 삽수의 생육이 양호하였다.
- (3) 무균처리의 삽목용토가 발근율과 발근수 증가를 보여 미생물의 영향이 크게 작용함을 추정할 수 있었다.
- (4) 삽목에 적당한 온도영역은 25℃ 전후이며, 고사엽은 35℃ 이상의 고온의 영향이었다.

- (5) 밀폐삽목에서 삽목상을 2중터널을 만들어 비닐로 밀폐하고 차광막으로 차광하는 것이 온도상승억제에 효과적이었다.
- (6) 차광정도는 25% 차광이 발근에 유효하고 암흑처리의 효과는 없었다.

나. 포트삽목법(100% 달성)

- (1) 포트종류별 포트삽목에서 종이포트와 마대로 만들어진 바이오포트가 양호한 결과로 나타났다.
- (2) 포트에 사용하는 흙은 마사토 : perlite(1:1) 혼합삽목토가 효과적이었다.
- (3) 포트삽목의 시기는 6월4일에서 6월14일 사이가 적당한 것으로 나타났다.
- (4) 품종별 발근력은 세력이 왕성한 Yabukita나 Meiryoku가 우수한 성적을 보였다.
- (5) 토양의 미생물은 부엽토>상토>밭흙>퍼라이트>질석>피트모스>마사토으로 많이 발생하였고 미생물의 발생은 삽목을 저해하거나 고사율을 증가시키는 결과를 가지고 온다.
- (6) 발근을 근원기(Root primodium)는 삽목 15일경에 형성되기 시작하였고, 체부에서 발생하기 시작하였다. 발근은 25일부터 관찰되었다.

다. 기내 번식법(100% 달성)

- (1) 기내 번식의 잎 절편배양에서 Callus 유도는 IAA 2.0mg/l 와 Kinetin 2.0mg/l 첨가가 가장 많았다.
- (2) 줄기절편 배양에서는 IAA(1.0mg/l)와 Kinetin(2.0mg/l), BA(2.0mg/l)의 혼합으로 줄기신장, 잎형성이 양호하였다.
- (3) shoot의 신장은 IAA 1.0mg/l, BA 2.0mg/l 에서 크게 나타났고, 잎수는 IAA 2.0mg/l, BA 1.0mg/l 에서 많았다.
- (4) BA 2.0mg/l의 경우는 IAA 3.0mg/l에서 시기가 경과할수록 많은 잎이 형성되었다.

2. 관련분야에의 기여도

녹차의 재배면적은 해마다 늘어나고 있는 추세이지만 아직도 종자번식에 의존하고 있는 경우가 태반이다. 이것은 차나무 양묘사업의 부진에서 기인하는 측면이 있

다. 이 연구에서 개발된 번식법을 이용하면 차나무의 번식이 용이하여 차나무의 영양계 번식 모종의 공급이 활발하게 이루어질 것이다. 그리하여 종자번식에 의한 개원을 개선시켜서 다수확, 기계화가 용이한 삼목묘 차밭 육성으로 차산업에 기여할 것이다. 그리고 기내 번식법을 활용하여 새로운 품종을 짧은 시간에 대량으로 번식하여 재배 농가에 빠른 시일안에 보급하여 차재배의 개선에 효과적으로 기여할 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 차나무 유전자원의 특성조사 및 성분 분석

- 차나무 유전자원 DB 프로그램은 가능차 관련기관, 개인 육종가들에게 배포하여 유용하게 활용할 수 있도록 하고 필요로 하는 농가에도 배포하여 품종 선택에 활용할 수 있도록 한다.
- 입력 및 수정이 가능한 프로그램을 차시험장에서 관리하면서 새로운 유전자원에 대해서 계속적으로 보완한다.
- 본 차나무 유전자원 DB 프로그램은 특허출원하고자 한다.

제 2 절 차나무의 유전분석과 DNA maker 개발

- 차의 종내/집단내 분석에 기 분석기법을 적용한다.
- 개발된 분자마커는 개체식별에 활용한다.
- 유전분석 결과는 차육종의 기초자료로 활용한다.

제 3 절 차나무 효과적 번식법 개발

- 농업관련기관중 차연구와 보급에 관심을 가지고 있는 남도지방의 시험장과 기술센터에서 지역에 맞는 번식법 개발에 응용하도록 한다.
- 차생산자 연합회와 협동으로 차농가 교육을 실시하여 삼목묘 개원을 적극적으로 유도한다.
- 전문적인 차나무 양묘 생산자를 육성하여 삼목묘 생산을 확대하도록 한다.
- 기내 번식방법은 새로운 품종의 짧은 기간내 대량증식에 활용하도록 한다.
- 학문적인 성과는 차 전문 학술지에 투고하여 게재하도록 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 차나무 유전자원의 특성조사 및 성분 분석

1. 일본 농업생물자원부의 작물별 유전자원 DB프로그램

(NIAS Genebank)

가. 인터넷 주소 : <http://www.gene.affrc.go.jp/>

나. 주요내용 :

作物檢索

作物檢索から來歴や特性を檢索します。

(1) 來歴情報 :

品種名や原産地など遺伝資源の來歴に関する情報です。

品種名、品種和名、原産地、來歴區分(野生、在來、育成等)を指定して該当する遺伝資源を選び出し、その特性も見ることができます。

(2) 特性情報 :

遺伝資源の特性に関する情報です。檢索したい特性の種類を選び、檢索畫面で該当する特性項目の窓に數値を入力、または、をクリックしてください。

1項目でも、複數項目でも檢索できます。

たとえば、稻で出穂期が8月1日から8月10日(08/01-08/10)、葉いもち病抵抗性が「強」のものなどを指定して、該当する遺伝資源を選びます。

特性情報檢索システム 茶

樹姿: 直立 やや直立 中間 やや開長 開張
[直立(14),やや直立(41),中間(53),やや開長(19),開張(9)]

定植2~3年生の樹姿 (1區:2~3株) 直立:やぶきた,中間:おくみどり、開張:かなやみどり

樹型の大小: 極小 小 やや小 中 やや大 大 極大
[極小(0),小(15),やや小(31),中(40),やや大(36),大(7),極大(1)]

定植後4~5年生の樹型 小:ひめみどり, 中:やぶきた,大:はつもみじ

萌芽の早晚性: 極早 早 やや早 中 やや晩 晩 極晩
[極早(3),早(5),やや早(18),中(44),やや晩(50),晩(44),極晩(7)]

萌芽率70%に達した日 早: ゆたかみどり、中: やぶきた,晩: おくみどり

新葉の色 (緑): 白 黄 緑黄 黄緑 淡緑 緑 やや濃緑 濃緑 緑褐 紫
[白(0),黄(0),緑黄(6),黄緑(38),淡緑(49),緑(59),やや濃緑(19),濃緑(6),緑褐(6),紫(1)]

頂芽の上から第3葉の色 (新葉は一番茶摘採時に調査, 以下同じ) 黄緑: やえほ,
緑: やぶきた, 濃緑: さやまみどり

新葉の色 (アントシアン): 無 少 やや少 中 やや多 多 紅
[無(5),少(22),やや少(58),中(48),やや多(38),多(8),紅(0)]

頂芽の上から第3葉のアントシアンの發現程度 少: はつもみじ, 中: やぶきた, 多: べ
にほまれ

新葉の毛茸の分布: 無 中肋 中肋付近 葉の1/3 葉の半分 葉の2/3 葉の全面
[無(1),中肋(0),中肋付近(9),葉の1/3(1),葉の半分(2),葉の2/3(8),葉の全面(123)]

春芽の新葉で未展開葉の毛茸を觀察 無: タイワンヤマチャ1,中肋: 金A y 19, 中肋付
近: 金A y 93, 葉の半分: Ai1,葉の全面: やぶきた

2. 일본의 식물유전자원특성평가(植物遺傳資源特性評価) 매뉴얼

가. 인터넷 주소 : <http://www.gene.affrc.go.jp/plev/Manual/>

나. 주요내용 : 벼, 맥류, 두류, 서류, 잡곡류, 특용작물, 목초, 사료작물, 과수류, 야채
류, 화훼·녹화식물류, 차, 뽕나무, 열대·아열대식물

다. 차의 주요내용 : 1차, 2차, 3차 특성평가 내용과 필수·선택항목에 대한
설명

제 2 절 차나무의 유전분석과 DNA maker 개발

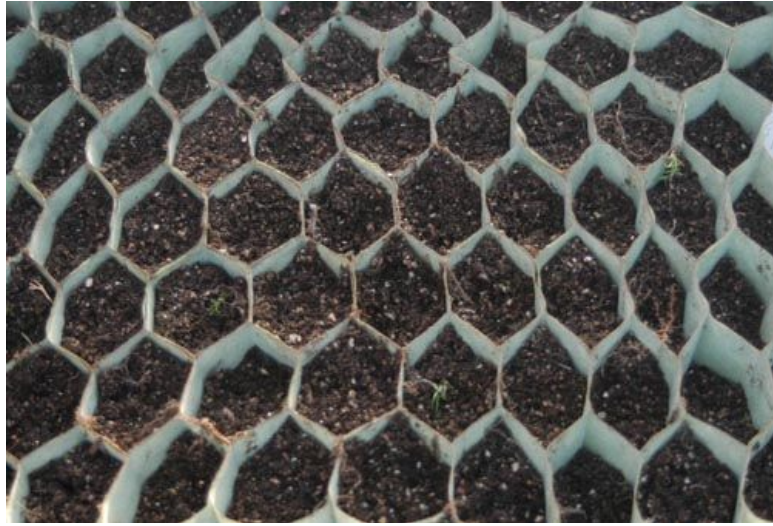
- 차의 종내/집단내 분석에 다양한 분석기법
- 개체특이 분자마커 개발방법

제 3 절 차나무 효과적 번식법 개발

- 일본 Nippon Beet Sugar MFG. Co 의 육묘용 연결 종이 포트 한 세트 80개 포트
한개 포트 길이 15cm, 직경 6cm의 6각형



▲ 80개 포트의 한 세트 : 15 x 54cm



▲ 상토를 넣은 모습 높이 15cm, 직경 6cm의 6각형



▲ 종이꽃트에 차나무 삼목 모습

제 7 장 참고문헌

제 1 절 차나무 유전자원의 특성조사 및 성분 분석

1. 橋本實, 志村喬 1978. 茶樹の起源に關する形態學的研究(5) クラスタ-分析による1元説の提唱. 熱帶農業 21: 93~101
2. 南條文雄, 原征彦 1994. 茶カチキン類の機能と應用. Fragrance J. 7月號. 國際茶Sym. pp. 639~649
3. 大石貞男 1983. 日本茶業發達史. 農山漁村文化協會. 東京 pp. 57~87
4. 大石貞男 1985. 茶栽培全科. 農山漁村文化協會 pp. 50~75
5. 大石貞男 1987. 茶の生育診斷と栽培. 論文協 pp. 15~16
5. 박용구, 김주희, Ikeda N, 신동일 2001. 한국과 일본 야생차나무의 도입경로와 기원에 관한 연구 I. 형태적 및 유전적 변이를 중심으로. 한국차학회지 7(1): 143~161
6. 西條了康, 竹尾忠一 1981. 高速液體 Chromatography による茶葉のカテキン類の分析. 茶業研究報告 53: 101
7. 安間 舜 1988. 新茶業全書. 社團法人靜岡縣茶業議所編 pp.1~32
8. 永田忠博 1982. 茶葉中 カテキン類のGas chromatographyによる定量. 茶業技術研究報告 61: 6~10
9. 吳賞農 1987. 吳賞農選集, 上海技術出版社, 中國茶葉學會編 pp. 376~389
10. 吳振譯 1964. 茶樹新梢毛茸之形態變異及其遺傳的研究. 平鎖茶業試驗所報告 20: 1~23
11. 原征彦 1991. 茶ポリフェノール類の多機能性について. ソフトドリンク 技術資料 NO. 94: 41~68
12. 中林敏郎 1991. 茶葉の化學成分. 「綠茶・紅茶・烏龍茶の 化學と機能」. 弘學出版, 神宗川 pp. 20~31
13. 中川致之, 烏井秀一 1964. 品種による カテキン含量差異. 茶業技術研究 39: 85~97
14. 池田奈實子, 根角厚司 1996. 韓國チャ遺傳資源の毛茸特性. 茶研報告 88(別) 10~11

15. 池田奈實子, 根角厚司, 朴勇球 1999. 韓國チャ遺傳資源の毛茸の特性. 茶研報告 88: 10~11
16. 志村喬 1949. チャ新品種の育種學的研究. 茶試研報 2: 1~111
17. 池ヶ谷賢次郎, 高柳博次, 阿南豊正 1990. 茶の分析法. 茶業研究報告 71: 43~74
18. 차 재배기술과 가공 2004. 전남농업기술원 차시험장 pp. 7~20
19. Amma S 1986. Identification of tea clones (*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze) by pubescence on the under surface of young leaves. Fruit Tree Research Station, I baraki pp. 19~24
20. Eun JB, Rhee CO, Kim DY 1985. Studies on the chemical constituents of the tea shoots in native tea plant in Korea. J. Kor. Agri. Chem. Soc. 28(3): 202~208
21. Hakamata K, Maehara M 1978. Changes in total nitrogen, free-amino acid, caffeine and tannin of tea leaves with special reference to the development of new shoot. Tea Research J. Japan 48: 57~62
22. Hidki H, Mukai T, Goto T 1993. Chemical composition of prized Japanese green tea in national tea competition. Tea Research J. Japan 77: 23~28
23. Ikeda N. 2002. Tea (*Camellia sinensis*) clones having flowers with pinkish filaments in Korean populations and other clones. Tea Research J. 94: 56~59
24. Jeong HY 1995. Studies on antioxidative and antimutagenic mechanisms of epicatechin 3-O-gallate isolated from green tea components. International Symposium on Tea : 65~85
25. Kato M 1996. Somatic embryogenesis from immature leaves of *in vitro* grown tea shoots. Plant Cell Rep. 15:920~923
26. Park IH, Kim RH, Lee SH 1997. Ecology and morphological characteristics of leaves in natural populations of *Camellia sinensis*. J. Kor. Tea. Soc. 3(2): 125~134.
27. Sealy JR 1958. A Revision of Genus *Camellia*. Springer-Verlag, Berlin and NewYork pp. 111~131
28. Takeda Y 2002. Studies on variations in genetic resources of tea in Japan and application to tea breeding. TEA Research J. Japan 1 : 97~180

29. Wickramaratne MRT 1981. Variation in some leaf characteristics in tea(*Camellia sinensis* L.) and their use in the identification of clones. *Tea Quarterly* 50: 183~198

제 2 절 차나무의 유전분석과 DNA maker 개발

1. 김용호, 윤홍태. 2004. AFLP marker를 이용한 콩의 유전적 다양성과 유전분리분석. *Kor J Plant Res* 17(3): 265-271.
2. 김정운,곽수년, 최형국, 신길호, 김주희, 한재석. 2000. 한국 자생차(*Camellia sinensis* L.)의 교잡 임성에 관한 연구. *J Kor Tea Soc* 6(1): 75-83.
3. 김주희, 임근철, 박용구, 김정운, 신기호, 한재석, 최형국. 2002. 차나무 품종선발을 위한 배접 기준 설정. *한국차학회* 8(1): 43-54.
4. 박용구, 김주희, Ikeda Namiko, 신동일. 2001. 한국과 일본 야생차나무의 도입경로와 기원에 관한 연구. *한국차학회* 7(1): 143-161.
5. 박인협, 김례화, 이선하. 1997. 야생차나무 집단의 생태 및 잎의 형태학적 특성. *한국임학회지* 3(2):125-134.
6. 백형진, 윤문섭, 김행훈, 이정란, 박광래, 조양희, 최원열. 2004. Microsatellite를 이용한 한국 보리 유전자원의 유연관계 분석. *한국육종학회* 36(5): 249-259.
7. 오미정, 홍병희. 1995. 한국 자생 차나무의 RAPD-Marker에 의한 유연관계. *한국육종학회지* 27(2) 140-147.
8. 이선하, 노일섭. 1999. Characteristics of chloroplast DNA restriction fragments in *Camellia sinensis*. *한국차학회지* 5: 33-44.
9. Balasaravanan, T., Pius, P.K., Raj Kumar, R., Muraleedharan, N., Shasany, A.K. 2003. Genetic diversity among south Indian tea germplasm (*Camellia sinensis*, *C. assamica* and *C. assamica* spp. *lasiocalyx*) using AFLP markers. *Plant Sci* 165: 365-372.
10. Choi, I.Y., S.H. Lim, D.W. Kim, Y.S. Choi, Y.B. Shin and N.S. Kim. 2000. Classification of diverse soybean germplasm with morphological characters and molecular markers. *Kor J Genetics* 22(2): 87-100.
11. Deragon J.M and B.S., Landry, 1992. RAPD and other PCR-based analysis of plant genomics using DNA extracted from small leaf disks. *PCR Methods*

- Appl 1: 175-180.
12. Fang, G., S., Hammar and R. Grumet. 1992. A quick inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques* 13: 52-55.
 13. Kaundun, S.S. and S., Matsumoto. 2004. PCR-based amplicon length polymorphisms(ALPs) at micro-satellite loci and indels from non-coding DNA regions of cloned genes as a means of authenticating commercial Japanese green teas. *J Sci Food Agric* 84: 895-902.
 14. Kaundun SS, Zhyvoloup A, Park T-G. 2000. Evaluation of the genetic diversity among elite tea(*Camellia sinensis* var. *sinensis*) accessions using RAPD markers. *Euphytica* 115: 7-16.
 15. Kasha K. 1998. Microsatellite in barley. *Cytogenetics and Cereal Biotech of Guelph*. pp. 1-2.
 16. Kim, H.S., S.H. Lee and Y.H. Lee. 2000. A genetic linkage map of soybean with RFLP, RAPD, SSR and morphological markers. *Kor J Crop Sci* 45(2): 123-127.
 17. Lee S, Kim J, Sano J, Ozaki Y, Okubo H. 2003. Phylogenetic relationships among tea cultivars based on AFLP analysis. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.* 47: 289-299.
 18. Lee, S.H. and Nou, I.S. 1995. Identification of Korea wild tea plants and Japanese green tea cultivars using RAPD markers. *J Kor Tea Soc* 1(1): 129-148.
 19. Lee, S.H., Kim J.H., Sano, J.I.C., Ozaki, Y.K. and Okubo, H.R.S. 2003. Phylogenetic relationships among tea cultivars based on AFLP analysis. *J Fac Agr Kyushu Univ* 47(2): 289-299.
 20. Lyu JI, Lee SH, Lim CH, Kim KJ, Yang DC, Bae CH. 2003 Genetic Diversity among Tea (*Camellia sinensis*) Accessions Based on Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Patterns. *Plant Resources* 6(3): 195-204.
 21. Manly BFJ. 1986. *Multivariate statistical analysis: a primer*. pp. 100-113. Chapman and Hall, London.

22. Mondal TK. 2002. Assesment of genetic diversity of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) by inter-simple sequence repeat polymerase chain reaction. *Euphytica* 128: 307-315.
23. Park, Y.G., Shiv, S.K. & Alexander, Z. 2002. Use of the bulked genomic DNA-based RAPD methodology to assess the genetic diversity among abandoned Korean tea plantations. *Genet Res and Crop Evol* 49(2): 159-165.
24. Prakash NS, Combes MC, Somanna N, Lashermes P. 2002. AFLP analysis of introgression in coffee cultivars(*Coffea arabica* L.) derived from a natural interspecific hybrid. *Euphytica* 124: 265-271.
25. Rossetto, M. A. Mclauchlan, F.C.L., Harriss, R.J., Henry, P.R., Baverstock, L.S., Lee, T.L., Maguire, L.J., Edwards. 1999. Abundance and polymorphism of microsatellite markers in the tea tree(*Melaleuca alternifolia*, *Myrtaceae*). *Theor Appl Genet* 98: 1091-1098.
26. Sealy J. 1958. A revision of the genus *Camellia*. Royal Horticultural Society (Ed.), London.
27. Vos P, Horgers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23: 4407-4414.
28. Wachira FN, Waugh R, Hechett CA, Powell. 1995. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD marker. *Genome* 38: 201-210.

제 3 절 차나무 효과적 번식법 개발

1. Ohta K, H.Kazuo. 1996. 차나무에 광과 야온조절로 아미노산 함량의 변화가 가능한가?. *원예학 세계 정기 종합정보지* 1(4):27-27.
2. 기민정. 2005. 보성 녹차의 인지도에 관한 조사 연구. *한국차학회지* 10(3):67-80
3. 최정, 기민정, 임근철, 정육재, 신기호. 2005. 일본인의 한국 녹차 선호도에 관한 조사 연구. *한국차학회지* 10(3):67-80.
4. 김삼식, 이정환.1993. 한국산 차나무과 6종의 계통 분류학적 연구. *한국임학회지*

82(4):431-440.

5. 김윤호, 차환수, 김동만, 박형우, 김상희. 2005. 미주지역 현지인을 대상으로 녹차음료에 대한 기호도 조사. 한국식품저장유통학회지 11(4):569-573.
6. 김정운, 김태석, 신길호, 김주희, 조경숙, 최형국. 1995. 차나무(*Camellia sinensis*)
7. 삼목시 발근율 향상. 한국약용작물학회지 3(3):195-199.
8. 김정운, 신길호, 김영신, 최형국. 1996. 슈크로스 처리가 차나무 동상해 피해
9. 경감에 미치는 영향. 한국차학회지 2(1):111-118.
10. 김정운, 신길호, 최형국, 김주희. 1997. 차나무 기내 배양을 위한 소독 약제 선발. 한국차학회지 3(2):135-139.
11. 김정운, 최형국, 김주희, 한재석, 김선우, 오미정. 1998. 보문: 차나무 경정배양시 성장조정제의 종류 및 농도가 품종간 신초 성장과 발근에 미치는 영향. 한국차학회지 4(1):81-89.
12. 김정운, 최형국, 김주희, 한재석, 김선우, 오미정. 1998. 차나무 경정배양시 성장조정제의 종류 및 농도가 품종간 신초 성장과 발근에 미치는 영향. 한국차학회지 4(1):81-89.
13. 김주희, 임근철, 박용구, 김철. 2002. 차나무 유전 형질 보존을 위한 지표설정. 한국차학회지 8(2):75-84.
14. 김주희, 임근철, 박용구, 신기호, 김정운, 최정, 김길자, 최형국. 2002. 차나무 육종을 위한 선발 기준. 한국차학회지 8(2):61-74.
15. 김주희, 임근철, 박용구, 신기호. 2002. 차나무 품종 선별을 위한 배접 기준 설정. 한국차학회지 8(1):43-54.
16. 김행훈, 조규택, 윤문섭, 조은기. 2003. 이차대사/생화학/대사공학:반하 및 차나무의 기내배양시 발생하는 세균의 동성 결정. 식물생명공학학회지 30(2):189-194.
17. 김현중, 노일섭. 2005. 지중가온 hwoqo에 의한 녹차의 조기생산 체계확립과 적합 품종선발. 한국차학회지 6(1):63-73.
18. 박명근, 이연숙. 2005. 녹차를 중심으로 한 식품 관련 현행 법규의 현실성 고찰. 한국차학회지 10(3):81-90
19. 박용구, 안인숙, 최명석, 신동일. 1995. 조직배양 및 차나무(*Camellia sinensis*)미성숙배로부터 체세포배 발생과 식물체 재분화. 한국육종학회지 90-91.
20. 박용구, 안인숙, Bozhkov Peter. 1997. 차나무 잎과 배 배양에 있어서 식물 생장

- 조절물질이 형태형성에 미치는 영향. 식물조직배양학회지 24(3):129-135.
21. 박인협, 김례화, 이선하. 1997. 야생 차나무 집단의 생태 및 잎의 형태적 특성. 한국임학회지 3(2):125-134.
 22. 박인협, 류석봉, 이선하. 1998. 야생 차나무 집단의 임분구조와 물질현존량. 한국임학회지 87(2):173-178.
 23. 박인협, 류석봉, 이선하. 1998. 야생 차나무 집단의 임분구조와 물질현존량. 한국임학회지 87(2):173-178.
 24. 박장현, 최형국, 김용웅. 1998. 질소 비료 사용량에 따른 컷물차의 수량 및 품질. 한국차학회지 4(1):67-80.
 25. 소성. 2005. 녹차의 생리활성 기능. 한국식품영양학회지 7-18.
 26. 소용영, 선병윤. 1986. 한국산 목본식물(木本植物)에 대한 계통분류학적 연구. 식물학회지 82(4):431-440.
 27. 안인숙, 박용구, 최명석, 신동일. 1994. 육종·산림보호분과: 차나무(*Camellia sinensis* var. *sinensis*)미성숙매로부터 식물체 재분화. 94년도 하계총회 학술발표회 52-53.
 28. 안인숙, 박용구, 최명석, 신동일. 1994. 육종·산림보호분과 : 차나무(*Camellia sinensis* var. *sinensis*) 미성숙매로부터 체세포배발생과 식물체재분화. 94년도 하계총회 학술발표회 52-53.
 29. 오광인, 김길용, 김정오, 박진영, 정세명, 김정운. 2004. 차나무 삽목묘 발근촉진에 있어 VAM과 PGPM의 처리 효과. 2004 학술연구 발표 논문집 234-236.
 30. 오광인, 김정오, 장석기, 김종영, 정세명, 김정운. 2004. 차나무 녹지삽목 번식에 관한 연구 (1) - 호르몬 종류 및 농도, 침적시간, 삽수길이를 중심으로-. 2004 학술연구 발표논문집 231-233.
 31. 오광인, 김정오, 장석기, 김종영, 정세명, 김정운. 2004. 차나무 녹지삽목 번식에 관한 연구(1) - 호르몬 종류 및 농도, 침적시간, 삽수길이. 2004학술연구발표논문집 231-233.
 32. 오미정, 최준영, 형남인. 2004. 차나무의 신초 배양을 통한 미세번식 체계확립. 한국차학회지 10(1):75-84.
 33. 오미정, 홍병희. 1995. 한국 자생 차나무의 (茶) RAPD-Marker에 의한 유연관계. 한국육종학회지 27(2):140-147.

34. 은종방, 이정석, 김동연. 1984. 한국 야생차의 유연성에 관한 연구. 한국임학 회지 66:54-63.
35. 이선하, 노일섭. 1999. 차나무 엽록체 DNA 단편의 특성. 한국차학회지 (10):33-44.
36. 박용구, 김주희, 신동일. 2001. 한국과 일본 야생차나무의 도입경로와 기원에 관한 연구: 1. 형태적 및 유전적변이를 중심으로. 한국차학회지 7(1):143-161.
37. 이선하, 최학순, 김예화, 이효연, 노일섭. 1995. RAPD marker를 이용한 한국 야생 차나무 및 일본 차품종의 동정. 한국차학회지 129-148.
38. 이용호, 손길만, 송근우, 정용모, 이성태. 2004. 차나무 간이 삼목상 적정 상토 및 삼목 시기에 관한 연구. 한국차학회지 10(2):109-116.
39. 이용호, 이성태, 송근우, 이종국. 2004. 산간지 차나무의 적정 시비량. 한국차학회 지 10(2):95-107.
40. 정대수, 최성희, 제순자. 2005. 한, 중, 일 고품질녹차의 향기성분 비교. 대한가정 학회지 43(2):33-40
41. 정중훈, 박근형, 은종방, 기민정. 2005. 국산 녹차의 소비자 행동에 관한 조사. 한 국차학회지 2(1):129-146.
42. 정호권. 2005. 제3회 국제 녹차 심포지움 개최에 즈음하여. 한국식품과학회
43. 한재숙, 변재옥. 2005. 녹차에 대한 인식 및 이용실태에 관한 연구. 한국식생활문 화학회지 19(2):184-192.
44. 大石貞男. 1985. 茶 栽培全科. 農産漁村文化協會 p. 50-75.
45. 大石千八. 1988. 新茶業全書. 静岡縣 茶議會議所 p.38-40.
46. 三原義秋. 1980. 溫室設計の基礎と實際. 養賢堂. p.198-203.
47. 野菜・茶業試驗場資料, 1991. 新品種命名登録候補に 關する 資料. 農林水産 省.p.1-8.
48. 板木利隆. 1983. 施設園藝・裝置と栽培技術. 誠文堂新光社.p.133-153.
49. 築瀬好充, 渡辺明, 武田善行. 1986. 煎茶用新品種めいりよく. 茶試研報. p.22.
50. Barman, T. S, Baruah, U, Sarma, A. K. 1993. Effect of light and shade on diurnal variation of photosynthesis, stomatal conductance and transpiration rate in tea. TEATECH, TEATECH INTERNATIONAL SYMPOSIUM 208-218.
51. Chang Hee Lee, Oh Kwon, Young Jin Kim. 2005. Rooting Characteristics of Stem Tip Cuttings in *Ardisia pusilla* as Influenced by Cutting Stage, Rooting

- Medium, Temperature, and Plant Growth Regulator Pretreatment. J. Kor. Soc.Hort. Sci. 46(3):217-224.
52. Chen, I.-Z, Fong, C-H, Chin-Ko-Shien. 1993 Effects of plant growth substance on tea growth and yield. TEACH, TEATECH INTERNATIONAL SYMPOSIUM 349-356.
 53. Demeke, T., Adams, R.P. and Chibbar, R. 1992. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA(RAPD): a case study in *Brassica*. Theor. Appl. Genet. 84: 990-994.
 54. Elizabeth M. H., Squire, G. R. 1976. Observations on the winter dormancy of tea(*Camellia sinensis* L.) in Malawi. J.hort. sci. 51:267-279.
 55. Fordham, R. 1972. Observatons on the growth of roots and shoots of tea(*Camellia sinensis* L.) in southern Malawi. J.hort. sci.47:221-229.
 56. Hosein Meyghani, Reza Fotouhi Ghazvunu, Yousof Hamidoghli. 2005. Micropropagation from Stem Segments or Salt Tolerant Jojoba Seedlings. J. Kor. Soc.Hort. Sci. 46(3):183-187.
 57. Kato, M. 1985. Regeneration of plantlets from tea stem callus. Journ. J. Breed. 35: 317-322.
 58. Kato. M., N. Haruyama and S.Kako. 1990. Somatic embryogenesis from leaf culture of plants. Japan J. Plant Breed. Letters 40: 4108-109.
 59. Kuranuki, Y. 1978. Effects of sucrose and growth substances concentration of medium on the formation of multicellular pollen grains in anther culture of tea plant. Study of Tea 48: 11-15.
 60. Kuranuki, Y. 1986. Effects of transplantation on division of pollen grains in anther culture of Tea Plant. Study of Tea 64: 7-10.
 61. Kuranuki, Y. and M. Shibata. 1992. Effects of concentrations of plant growth regulators on the shoot apex culture of tea plants. Tea Research Journal 16:1-6.
 62. Laskar, M. A, Das, S. C, Deka, P. C, 1993. Tissue culture of tea : Anther culture for haploid plant production. TEACH, TEATECH INTERNATIONAL SYMPOSIUM 194-201.
 63. Myung-Syun Shim, Wook Oh, Ki Sun Kim. 2005. Effects of Temperature and

- Daylength on Rooting and Growth of Elatior Begonia Cuttings. J. Kor. Soc.Hort. Sci. 46(3):200-203.
64. Nakamura, Y. 1987. Shoot tip culture of tea cultivar Yabukita. Study of Tea 65: 1-7.
65. Nakamura, Y. 1988. Efficient differentiation of adventitious embryos from cotyledone culture of *Camellia sinensis* and other *Camellia* species. Tea Research Journal 67:1-11.
66. Nakamura, Y. 1990. Effects of sugars on the formation of adventitious buds and the growth of axillary buds in tissue cultures of tea. Bull. Shizuoka Tea Exp. Stn. 15: 1-5.
67. Nakamura, Y. and M. Shibata. 1990. Micropropagation of tea plant(*Camellia sinensis*) through *in vitro* cuttings. Tea Research Journal 72: 9-17.
68. Nakamura, Y. K. Ohira, and K. Ojima. 1984. Cultivation and characteristics of tea callus. Study of Tea 60: 7-14.
69. Othieno, C. O, Ng'Etich, W. K. 1993. Studies on the use of shade in tea plantations in Kenya II. Effect on yields and components. TEACH, TEATECH INTERNATIONAL SYMPOSIUM 282-292.
70. Rogers, J.S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. Studies in genetics VII. Univ. Texas Publ. 7213: 145-153.
71. Sharma, V.S, Satyanarayana, N. 1993. Harvesting in tea. TEATECH, TEATECH INTERNATIONAL SYMPOSIUM 242-258.