

최      중  
연구보고서

작약(*Paeonia lactiflora*)과 마(*Dioscorea opposita*)  
유전자원의 초저온 동결보존방법 확립  
Development of cryopreservation system in peony(*Paeonia  
lactiflora*) and yam(*Dioscorea opposita*) germplasm

주 관 연 구 기 관  
경 북 대 학 교

협 동 연 구 기 관  
경북농업기술원 생물자원연구소

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “작약(*Paeonia lactiflora*)과 마(*Dioscorea spp.*) 유전자원의 초저온 동결보존방법 확립에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 11 월 일

주관연구기관명 : 경북대학교  
총괄연구책임자 : 손 재 근  
세부연구책임자 : 손 재 근  
연 구 원 : 김 현 미  
연 구 원 : 서 미 진  
협동연구기관명 : 경북농업기술원  
생물자원연구소  
협동연구책임자 : 신 중 희  
선 임 연구원 : 이 봉 호  
연 구 원 : 강 동 균

# 요 약 문

## I. 제 목

### 작약(*Paeonia lactiflora*)과 마(*Dioscorea spp.*) 유전자원의 초저온 동결보존방법 확립

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 지구상의 인구의 증가와 산업화, 경작지 확대를 위한 산림의 개발, 산업화와 공업화에 따른 환경오염 등과 같은 인위적인 요인에 의한 식물 생태계의 파손으로 다양한 유전자원의 소멸이 가속화되고, 지속적인 신품종의 확대 보급으로 과거에 재배되었던 재래종과 육성종들 또한 소멸되고 있는 실정이다. 식물의 유전자원을 장기적이고 효과적인 활용이라는 측면에서 유전자원을 어떠한 상태로 보존하느냐 하는 것이 중요한데 영양번식작물의 경우는 보존대상이 영양기관이기 때문에 일반 종자와 같은 저온 건조저장이 불가능하여 대부분 포장재배에 의해 그들의 유전자원이 보존되고 있다. 따라서 인적, 물적 자원이 많이 소요될 뿐만 아니라 재배기간 동안의 유전적 퇴화와 병충해 발생 등과 같은 여러 가지 문제점이 야기되고 있다. 최근 초저온 동결보존은 기존의 유전자원 보존의 한계점을 극복하는 차원에서 다양한 작물을 대상으로 시도되고 있다.  $-196^{\circ}\text{C}$ 의 초저온에서는 모든 세포 분열과 대사과정이 중단되어 영구적으로 유전적인 변이 없이 자원을 보존할 수 있으며, 저장되는 재료의 부피가 적고, 각종 오염으로부터 안정하며, 유지비용과 노력이 적게 드는 장점이 있다. 동결보존된 자원은 품종을 개선하는데 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 무병조직을 보존함으로써 자원의 품질을 향상 시키는 기능도 하기 때문에 식물 뿐만 아니라 동물, 미생물에 이르기 까지 더 많은 자원에서 초저온 동결보존의 성공사례가 보고되고 있다(Helliot et al., 2002). 그러나 대부분의 경우는 아직도 동결보존에 필요한 재료의 선택, 동결전처리 효과, 동결보호제 처리와 동결방법, 저장과 해빙 방법, 식물체 재생 등에 대한 기초 연구가 수행 중에 있어서 이 방법이 유전자원 보존법으로 실용화되기 위해서는 앞으로 해결되어야 할 부분이 많은 실정이다.

작약(*Paeonia lactiflora*)과 마 (*Dioscorea spp.*)는 영양번식성 작물로 지하부를 수확 건조하여 한약제로 쓰는 대표적인 약용작물이다. 작약의 경우 타식을 주로하는 다년생 초본

식물로 4~6년을 주기로 영양체 분리재배를 통하여 증식한다. 노두 부분만을 번식수단으로 이용하므로 3~5배 정도의 증식체를 확보하기 위해서 최소한 3년 이상의 시간이 필요하다는 단점이 있으며, 개체 당 포장 소요면적을 많이 필요로 하는 특징이 있어 한정된 포장 면적과 노동력으로 인해 작약의 모든 유전자원을 유지하는데 어려움이 있다. 마의 경우 작약과 마찬가지로 한약재로 이용될 뿐만 아니라 말리지 않는 괴경을 생식하는 건강식품으로서 최근 인기가 높아지고 있는 작목으로 단위 면적당 소득이 높은 작물에 속한다. 지하부에서 발달된 괴경과 지상부 덩굴의 액아부위에 착생하는 영여자(주아)를 번식체로 이용하는 마는 다년생으로 노지에서 유지가 가능한 작물이기는 하지만 우리나라의 대부분지역에서 겨울을 견디지 못하기 때문에 해마다 10월 하순경부터 수확하여 이듬해 봄 파종까지 종서가 얼지 않도록 저장해 주어야 하는 번거로움이 있다. 안전한 저장을 위해서 4℃로 유지되는 저장고를 이용하기도 하는데 이는 설치비용과 유지비용이 많이 소요되는 단점이 있다. 또한 기후가 다른 지역으로부터 도입된 유전자원의 경우 기후의 변동에 민감하여 도입 후 극기온 하에서 일괄 도태될 위험성도 가지고 있다. 이러한 이유들로 작약이나 마와 같은 작물의 유전자원을 유지·저장하는데 어려움이 있는 영양 번식성 식물의 경우 유전자원의 보다 안정적인 보존방법의 개발이 필요한 실정이다.

따라서 한약재로 널리 이용되고 있는 작약과 마의 유전자원을 안정적으로 보존할 수 있는 초저온 동결 보존법이 확립된다면 이 결과는 작약이나 마의 유전자원 보존뿐만 아니라 이와 유사한 영양번식 작물의 유전자원 안전 보존에 광범위하게 활용될 수 있을 것이다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 작약(*Paeonia lactiflora*)과 마(*Dioscorea* spp.) 유전자원의 초저온 동결보존방법 확립에 관한 연구로 세부과제로 구성되어 있으며, 3년 동안 수행된 주요 연구 개발 내용과 범위를 과제별로 요약하면 다음과 같다.

#### 세부과제 : 작약의 초저온 동결보존 방법 확립

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1 차 년 도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◇ 초저온 동결보존에 필요한 식물재료의 획득</li> <li>◇ 식물재료의 건조· 동결 저항성 조사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o. 작약 조직배양 재료의 확보</li> <li>o. 작약의 약, 화사 및 자엽 조직배양에서 embryogenesis의 genotype간 차이 구명</li> <li>o. 작약의 캘러스와 체세포배 유도</li> <li>o. 건조 저항성 측정 ; 실리카겔 및 자연건조</li> <li>o. 동결 저항성 ; desiccation , vitrification법</li> </ul>
2 차 년 도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◇ 조직배양체계 확립</li> <li>◇ 초저온 동결보존 방법 선발</li> <li>◇ 동결보존 방법에 따른 적정 조건구명</li> <li>◇ 초저온 동결보존 효율의 genotype간 차이 비교</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o. 집합자 배의 동결처리 후 발아율 향상</li> <li>o. 체세포배 발생효율 향상</li> <li>o. 동아(winter bud) 배양 효율 향상</li> <li>o. 작약의 동결보존방법 선정</li> <li>o. 동결전처리와 동결보호제의 조성</li> <li>o. 저장과 해빙방법</li> <li>o. 생존력 검정 및 식물체 재분화</li> <li>o. 작약의 genotype간 초저온 동결보존 효율 비교</li> </ul>
3 차 년 도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◇ 동결과정을 통한 재분화 식물체의 체세포변이 조사</li> <li>◇ 작약의 안전 초저온 동결보존 방법 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o. 재생식물의 형태적 및 세포유전학적 특성 조사</li> <li>o. 작약의 동결보존방법 확립</li> </ul>

협동과제 : 마의 초저온 동결보존 방법 확립

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1 차 년 도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◇ 초저온 동결보존에 필요한 식물재료의 획득</li> <li>◇ 식물재료의 건조·동결 저항성 조사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o. 조직배양을 통한 마의 동결보존 재료육성</li> <li>o. Genotype별 식물재료 획득</li> <li>o. 건조 저항성 측정</li> <li>o. 동결 저항성 측정 ; Encapsulation - dehydration, vitrification법</li> </ul>
2 차 년 도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◇ 동결보존 단계별 적정 조건 구명</li> <li>◇ 초저온 동결보존 효율의 genotype 간 차이 비교</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o. 동결전처리 방법과 동결보호제의 조성 구명</li> <li>o. 저장과 해빙방법</li> <li>o. 동결방법별 생존력 조사</li> <li>o. 마의 genotype 및 보존방법별 동결보존 효율 비교</li> </ul>
3 차 년 도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◇ 동결과정을 통해 재분화된 식물체의 체세포변이 조사</li> <li>◇ 마의 안전 초저온 동결보존 방법 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o. 형태적 특성 분석</li> <li>o. 세포 유전학적 특성</li> <li>o. 기외 적응 및 식물체 특성조사</li> <li>o. 마의 동결보존방법 확립</li> </ul>

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 제 1 절. 연구개발 결과

본 연구과제는 작약(*Paeonia lactiflora*)과 마(*Dioscorea* spp.) 유전자원의 초저온 동결보존 방법 확립을 위하여 1개의 세부과제와 1개의 협동과제로 수행하였다.

#### 1. 세부과제 : 작약 (*Paeonia lactiflora* Pall.)의 초저온 동결보존법 확립

한국에서 자생 또는 재배되고 있는 작약의 유전자원을 초저온에 안전하게 동결보존 시킬 수 있는 방법을 개발 하고자 이에 관여하는 여러 가지 요인에 대한 연구를 수행하여 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

가. 작약의 종자로부터 분리된 집합자배를 0.3 mg/L의 GA<sub>3</sub> 가 첨가된 MS배지 배양했을 때 상배축의 신장이 64%로 높아지는 경향이였다. ABA가 첨가된 배지에서 작약의 자엽조직을 배양할 경우 캘러스발생과정을 거치지 않고 직접 체세포배가 발생되며 1 mg/L의 ABA가 첨가된 MS 배지에서 61.0%의 높은 체세포배 발생율을 나타내었다.

나. pH 4.0과 7.0 완충용액에 48시간 침지처리된 작약종자를 발아시켜 얻어진 자엽조직을 배양했을때 체세포배 발생율이 각각 84, 85%높았고 배양된 조직 100개당 얻어지는 체세포배의 수도 가장 많았다.

다. 작약종자의 다배발생비율은 4%로 대부분 한 종자 내에 2개의 배를 포함하는 쌍배이였으나, 낮은 빈도 (0.2%)이지만 한 종자에 3개 혹은 4개의 배가 존재하는 것도 발견되었다. 대부분의 다배종자의 배 (94%)는 2개의 자엽을 가지는 정상적인 형태이였으나, 두 배중 어느 한 배가 1개나 혹은 3개의 자엽을 가지는 경우도 있었다. 다배종자의 배 발아율은 90%로 정상종자 (97%)에서 보다 낮았다. 다배종자 배의 배수성은 대

부분 고유의 염색체 수를 가진  $2n=10$ 이었으나,  $2n=8$ 인 경우와 3배성 종자에서 세 개의 배가 각각  $2n=10, 15, 20$ 인 경우도 있었다.

라. 작약의 조직부위별 캘러스 유도과 이들 캘러스로부터 체세포배 획득을 위한 실험 결과, 자엽조직의 경우 2,4-D가 2mg/L 첨가되거나 2,4-D (1mg/L)와 BA(0.5mg/L) 가 혼용 배지에서 캘러스 발생이 각각 71%와 88%로 높게 나타났다. 작약의 하배축, 뿌리, 자엽조직의 경우는 2,4-D(1~2mg/L)가 첨가된 MS배지에서 높은 캘러스 형성률을 나타내었으나 이들 캘러스로부터 체세포배는 형성되지 않았다. 작약의 자엽조직도 다양한 농도의 2,4-D 조건에서 캘러스는 형성되었지만 embryogenesis는 일어나지 않았다. 그러나 식물생장조절제가 첨가되지 않은 배지에 배양된 자엽조직에서는 6.9%의 배형성률을 나타내었다

바. 작약 genotype에 따른 약배양 효율을 검토하고자 '의성작약' 외 20계통에 대한 약배양을 실시한 결과, '의성작약'의 배발생률은 20~31.2%로 높았으나 그 외 계통의 배발생률은 3%이하로 낮았다. 4℃에 5일간 저온처리된 작약화뢰로부터 약을 절취하여 성장조절제가 첨가되지 않은 MS배지에 배양했을 때 배형성률이 31.2%로 가장 높게 나타났다.

사. 작약종자에서 절취한 접합자배를 sodium alginate로 encapsulation하고 5시간 건조시켜 동결보존하였을 때 생존률이 85%로 가장 높았고, 건조 (1시간)만 시키거나 vitrification 된 배의 생존률은 각각 71%, 65%로 낮은 경향이었다. 동결보존된 접합자배를 40℃의 water bath에서 해동시켰을 때 생존률이 68%로 55℃의 40%보다 높았다. 1시간 자연건조시킨 접합자배를 액체질소에 30일간 보존하면서 생존률을 조사한 바, 동결보존기간에 따른 생존률의 차이는 인정되지 않았다.

아. 체세포배의 크기에 따른 동결보존 후의 생존률을 조사한 바, 배의 크기가 2~3mm인 것이 다른 것에 비해 생존률이 높게 나타났으며, 체세포배의 경우도 접합자 배에서와 동일하게 1시간 자연 건조시켰을 때 동결 후의 생존률이 66%로 가장 높게 나타났다.



- 자. 11월 중순경에 지상부가 고사한 작약의 지하부 너두에서 동아를 채취하여 5시간 건조시킨 다음 동결하였을 때 생존률이 69.2%로 높게 높았다.
- 차. 동아의 채취시기별 동결보존 후의 생존률을 조사한 바, 11월에서 2월(월동 전)사이에 채취된 동아의 생존률은 70% 가까이 높게 나타나는 반면에 3월(월동 후)에 채취한 동아에서는 생존개체가 없었다.
- 카. 동아를 재료로한 동결보존법은 desiccation(5시간 자연건조), vitrification (PVS2 30분), encapsulation-dehydration(3% sodium alginate)법 모두 60% 이상의 생존률을 보였으나 encapsulation-dehydration법에서 88.1%의 가장 높은 생존률을 나타내었다.
- 타. 보존용기의 크기(cryovial size)가 동아의 동결보존에 미치는 영향 조사한결과, 1ml, 2ml, 5ml의 cryovial을 사용한 것에서 80% 가까운 높은 생존률을 보였으나 15ml cryovial 이용에서는 58.1%의 낮은 생존률을 보였다.
- 파. 작약의 genotype(태백, 미강, 사곡, 의성, 거풍 작약)에 따른 동아의 동결보존효율을 조사한 결과 미강작약에서 74.9%의 높은 생존률을 나타내었다. 동결한 동아를 해빙시켜 GA<sub>3</sub>(0.1mg/L)와 BAP(0.5mg/L)가 혼용된 배지에 배양했을때 shoot가 분화되었고 이들 shoot를 0.1 mg/L의 NAA가 첨가된 1/4MS 배지에 이식하여 뿌리를 분화 시켰다(20%).
- 하. 동결과정을 통한 재분화 식물체의 변이를 조사하기위해서 동결 전에 동아에서 얻은 포엽과 동결 후 정아를 RAPD 분석법을 이용하여 분석한 결과, 대부분의 major band 들이 일치하였다.

## 2. 협동과제 : 마(*Dioscorea spp.*)의 초저온 동결보존법 개발

한국에서 자생 또는 재배되고 있는 마의 유전자원을 초저온에 안전하게 동결보존 시킬 수 있는 방법을 개발 하고자 이에 관여하는 여러 가지 요인에 대한 연구를 수행하여 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

가. 마의 기내 배양묘에서 절취한 액아의 신초조직을 재료로 encapsulation-dehydration 법에 의해 초저온에 성공적으로 동결보존 시킬 수 있었다. Encapsulation-dehydration 법을 이용한 마 신초조직의 초저온 동결보존은 재료의 발육환경, 신초크기, 전배양 배지내 삼투압 조절물질의 종류와 농도, 건조시간, 동결 및 해동 방법에 따라 그 효율이 다르게 나타났다.

나. 16시간/8시간 일장조건에서 배양된 기내 식물체에서 액아 착생 부위에 상관없이 1 mm 크기의 신초조직을 절취하여 재료로 이용하였다. 절취된 신초조직을 0.3M의 sucrose나 sorbitol이 첨가된 MS 배지에서 16~24 시간 전배양한 후 3%의 Na-alginate로 직경 4~5 mm의 bead를 만들어 2M glycerol과 0.5M sucrose가 첨가된 MS 액체배지에서 1시간 동안 진탕배양하고, 3.5~4 시간정도 무균상에서 자연 건조한 재료를 동결보존시켰을 때 식물체 재생률이 40~45%로 높게 나타났다.

다. 건조된 재료를 별도의 저온처리 없이 바로 액체질소(-196℃)에 저장하고 40℃의 항온 수조에서 3~5분간 해동하는 것이 효과적이었다. 해동된 신초조직을 0.2 mg/L BAP와 0.2 mg/L kinetin이 혼용된 배지에 배양하였을 때 캘러스 발생 없이 정상적인 신초로 발달하였다.

라. 이상에서 확립된 재료와 방법을 적용할 경우 등근마는 40%의 식물체 생존률을 나타내는 반면, 단마의 경우는 29%로 다소 낮은 생존을 보였으며, 야생종인 세장방추형 마에서는 동결보존 후 정상적인 식물체를 획득할 수 없었다

마. 액아 채취된 재료의 stress 내성 확보를 위해 ABA나 자스몬산 계열의 호르몬을 일정

기간 동안 처리해 주는 것이 재료의 동결저항성을 높이는데 유리한 것으로 나타났다.

바. 또한 해동된 신초조직을 0.3M의 sorbitol에 첨가된 배지에 배양하여 1~3일 정도 암상태에서 배양하여 세포의 급격한 삼투 stress를 경감시킨 후 0.2 mg/L BAP와 0.2 mg/L kinetin이 혼용된 배지에 옮겨 배양할 경우 동결보존효율이 유의적으로 높아지는 경향을 보였다.

사. 동결보존하여 재생된 식물체를 대상으로 동결보존전의 모주와의 유전적 변이 유무를 RAPD법으로 분석한 결과 PCR 산물의 밴드 패턴상에 변화가 없는 것으로 나타났다.

아. 동결보존후 재생주를 대상으로 IC-RT-PCR을 이용하여 YMV-K 이병률을 조사한 결과 90%가 바이러스 무병주로 나타났다. 이는 동결보존재료로 액아를 절취하는 과정에서 재료의 40%가 무병주가 되고 동결보존을 거치면서 무병주율이 90%로 증가하는 것으로 나타났다.

자. *D. batatas* 야생종과 *D. nipponica* (부채마)의 접합자 배를 절취하여 동결보존을 실시한 결과, 배를 30분간 자연 건조한 후 초저온에 보존하는 경우 96.6%의 높은 보존률을 나타내었다. 액아를 재료로한 동결보존에 효과적이었던 encapsulation-dehydration법은 상대적으로 낮은 효율(62%)을 나타내었다. 30분간 배를 건조한 후 동결보존 할 경우, *D. batatas* 야생종과 *D. nipponica* 각각 96.6%와 90%의 재생률을 나타내었다.

차. *D. batatas* 야생종의 접합자배를 재료로한 실험에서 배 성숙정도별로 동결보존 효율이 다르게 나타났는데, 개화 후 35일 경과한 배의 경우 동결보존후 재생률이 23%인데 비해 50일 정도 성숙된 배에서는 경우 79%의 높은 재생률을 나타내었다. 이러한 배성숙 정도에 따른 동결보존 효율의 차이는 각각의 재료를 30분간 자연 건조처리 과정을 통해 재생률과 발아율을 향상 시킬 수 있었다.

카. 보존 후에 재생된 자원의 기내 대량증식을 위한 배양재료와 배지조건에 관한 연구에서 마디절편 배양의 경우 식물생장조절제를 첨가하지 않거나 0.1 mg/L NAA, 0.5

mg/L BA 또는 kinetin이 첨가된 배지에서 신초의 발육이 좋았고 등근마의 경우 0.5 mg/L kinetin 처리구에서 평균 7.5개의 마디를 포함하는 가장 높은 신초신장을 보였다. GA<sub>3</sub> 처리는 신초 신장을 억제 하였다.

타. 기내에서 얻어진 소피경은 4℃에서 2개월 이상 저온처리로 휴면을 타파할 수 있었는데 3개월 이상의 저온처리로 맹아율을 높이고 맹아일수를 단축시킬 수 있었다. 소피경의 적정 맹아온도는 26~30℃ 정도였으며, genotype과 소피경 크기별 맹아율 차이는 나타나지 않았다.

## 제 1 절. 활용에 대한 건의

1. 본 연구에서 개발된 작약과 마의 초저온 동결보존 방법은 유전자원의 보존기술로서 field genebank의 대체방법으로 활용될 것임.
2. 작약과 마의 유전자원보존에 있어서 성공적인 초저온 동결보존 방법이 확립되면, 이들 과정과 특이적 처리방법에 대한 특허출원이 가능할 것임.
3. 다양한 약용작물 유전자원 초저온 동결보존을 위한 기초자료로서의 이용가치도 매우 높을 것임.
4. 지금까지 확립된 작약과 마의 초저온 동결보존법에 대한 효율성을 분석하여 육종현장에서 이용될 수 있는 실용화 방안 제시
5. 『영양체유전자원 초저온 동결보존법 확립』 경상북도 주요사업으로 채택(2003-2005, 경북농업기술원)
6. 실험에서 얻어진 마의 virus-free 개체를 이용하여 무병주 대량생산과 보급에 활용.

## SUMMARY

### I . Development of cryopreservation system in peony(*Paeonia lactiflora* Pall.)

This study was carried out to establish a suitable cryopreservation method using the zygotic, somatic embryos and shoot-apices of winter buds in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall).

#### 1. Establishment of tissue culture method of peony

To develop an efficient tissue culture protocol for several peony tissues, such as cotyledons, roots, leaves, and anthers etc., various plant growth regulators were applied on tissue culture medium. Effect of pretreatment for somatic embryogenesis from tissues and callus was also checked on peony.

The experiments were carried out to determine the optimum conditions for the direct embryogenesis from the cotyledon culture of *Paeonia lactiflora* Pall. Different peony tissues derived from zygotic embryos were cultured on MS medium with and without 2,4-D. Somatic embryos were formed from cotyledons cultured on the medium without 2,4-D. The maximum frequency (61%) of embryo formation was obtained from the cotyledons cultured on MS medium containing 1.0 mg/L of ABA. Shoot and roots of somatic embryos were elongated by the supplement of 0.3 mg/L GA<sub>3</sub> in the medium or the pretreatment for 8 weeks at 4°C. The anthers of a herbaceous peony were cultured on MS medium with PAA, IAA, TDZ, BA, AC. The MS medium with or without 2 mg/L PAA was superior to a medium containing IAA, TDZ, BA, and AC in enhancing of direct embryogenesis and producing of normal embryo with two cotyledons from the cultured anthers.

The polyembryonic rate was approximately 4% among 4,114 seeds harvested at peony field. Most of polyembryony were twin-embryo seeds, while three or four-embryo seeds

appeared at low frequency (0.2%). About 94% of twin embryos were normal embryos with two cotyledons, but 6% of those were abnormal embryos with one or three cotyledons. The germination rate of polyembryos was 90% in MS medium containing 0.3mg/L GA<sub>3</sub>, whereas that of normal embryos was 97%. Almost all of polyembryonic seedlings had a diploid chromosome complement (2n=10), but aneuploid (2n=8) and/or 2n-3n-4n triplet were observed by karyotype determination using root-tip staining.

## **2. Cryopreservation of zygotic embryos in peony**

A simplified technique which cryoprotects zygotic embryos was developed for the germplasm conservation of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.). Cryopreservation efficiency was higher in mature embryos than that of immature embryos. The highest survival rate (85%) was obtained from the embryos treated by encapsulation-dehydration, followed by desiccation (71%), and then vitrification (65%). The plant recovery from encapsulated embryos after cryopreservation was enhanced by desiccation for 5h in a laminar air-flow system. Cryopreservation methods did not affect survival - whether they were rapid or slow cryopreservation. The thawing in a water bath at 40°C for 5 min produced much higher survival of cryopreserved embryos than thawing in a water bath at 55°C. The cryostorage durations in liquid nitrogen did not affect the survival of embryos cryopreserved in the range from 1 h to 30 days.

## **3. Cryopreservation of somatic embryos in peony**

Somatic embryos induced from cotyledon tissues and anthers were tested for their ability to survive cryopreservation. The rate of somatic embryogenesis was a maximum (61%) from the cotyledons culture on a MS medium [15] supplemented with 1.0 mg/L of abscisic acid (ABA). Embryos were also obtained from anthers directly on a MS medium with and without 2.0 mg/L of phenylacetic acid (PAA). Embryos were dried under a stream of air and frozen by immersion in liquid nitrogen. Thawed axes were

grown in vitro on a medium containing 0.3 mg/L of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>). The survival rate of the cryopreserved somatic embryos changed according to their size and desiccation time which ranged from 0 h to 2 h. When the somatic embryos were desiccated for 1h, the survival rate was above 66%. The survival rate of the cryopreserved somatic embryos from anthers and cotyledon tissues was generally high when they were 2~3 mm in size. Desiccation may be a suitable method for the cryopreservation of somatic embryos in a herbaceous peony.

#### **4. Cryopreservation of winter buds in peony**

A simplified technique which cryoprotects dormant shoot tips was developed for the germplasm conservation of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.). Cryopreservation efficiency was higher in air-dried dormant shoot tips than that of silica gel. No differences in survival to cooling were obtained between the cold-acclimated (79%) and non-acclimated (77%) plant dormant shoot tips of herbaceous peony. The survival of *P. lactiflora*. var. 'Mikang' was the highest (74.9 %) among five genotypes tested.

The highest survival rate (88.1 %) was obtained from the dormant shoot tips treated by encapsulation-dehydration, followed by desiccation (79%), and then vitrification (60%). The highest survival rate (88.1%) was recorded with 28.6% water content after 5 h of dehydration, any further dehydration reduced survival rate. The survival rate (80%) of cryopreserved shoot tips in 1, 2, 5 ml of cryovials produced much higher than that (59%) of 15 ml of cryovial. The survival rate of the cryopreserved dormant shoot tips excised from November to February was attained about 70%. The survival rate of the cryopreserved dormant shoot tips excised from March, however, was 0%. Frequency of shoot formation and subsequent shoot growth in cryopreserved dormant shoot tips culture were promoted in the MS medium containing 1 mg/L of GA<sub>3</sub>, 0.5 mg/L BAP. The elongated shoot were rooted on the 1/4 MS medium containing 0.1 mg/L of NAA. This cryopreservation method appears to be a promising technique for germplasm cryopreservation of a herbaceous peony.

## II. Development of cryopreservation system in yam(*Dioscorea* spp.)

### 1. Factors affecting cryopreservation using shoot apices in *Dioscorea* spp.

**Plantlet initiation from shoot-apices** : The effects of plant growth regulators and inorganic salt strength of a culture medium on bud induction and shoot growth from shoot-apices were examined. The combinations of 0.2 mg/L of BAP + 0.2 mg/L of kinetin, 0.01 mg/L of NAA + 0.2 mg/L of kinetin and a single treatment of 0.2 mg/L of BAP were equally effective for bud and shoot formation from the apices in the three cultivars. Auxin (2,4-D, NAA) treatment enhanced callus formation.

**Cryopreservation using shoot-apices** : *In vitro* grown shoot-apices of the *Dioscorea batatas* were successfully cryopreserved by encapsulation-dehydration. Encapsulated apices were precultured in a MS medium supplemented with 0.3M of sucrose for one day. Following preculturing, encapsulated apices were dehydrated prior to direct immersion in liquid nitrogen for 1 h. After thawing, the cryopreserved shoot-apices were post-cultured on a post-culture medium (MS medium containing 0.2 mg/L of BAP plus 0.2 mg/L of kinetin) for survival. When cryopreserved apices were post-cultured on the post-culture medium (MS), supplemented with 0.2 mg/L of BAP and 0.2 mg/L of kinetin, they showed direct shooting without callusing. Optimal survival of cryopreserved shoot-apices was achieved when encapsulated apices were dehydrated to 40% water content. The thawing method markedly affected the survival of cryopreserved apices, and thawing at 40°C for 3 min was determined as providing the best results. With these optimized parameters, survival rates of 29 and 40% for cryopreserved apices were obtained for the 'Ma1' and 'Db037', respectively. Virus-free plantlets were obtained from the cryopreserved apices of *D. batatas* cv. 'Db037' at high frequency of up to 90%. At this temperature, all cellular divisions and metabolic processes



are stopped. The plant material can thus be stored without alteration or genetical modification for an unlimited period of time.

## **2. Development of cryopreservation system using zygotic embryos in wild yam species.**

The maximum survival of a zygotic embryo (96.6%) could be achieved when the embryos were cryopreserved by the desiccation method, whereas, the encapsulation-dehydration method showed poor results with a low frequency (below 62%) on regrowth from control (*LN-*) and cryopreserved (*LN+*) embryos. The survival frequencies of the cryopreserved zygotic embryos was above 90% for the two wild species of *Dioscorea* (*D. batatas* wild type and *D. nipponica*).

## **3. Production of yam mosaic virus(YMV-K) free plants from the cryopreserved yam apices.**

In this study, we were able to produce virus-free plant form cryopreserved apices derived from a virus infected plant. The frequency of the virus infected plantlet was reduced to 60% when they were grown from the excised apex and that further reduced to 10% in recovered apices after cryopreserving. Virus-free plantlets were obtained from the cryopreserved shoot-apices of *D. batatas* cv. 'Db037' at a high frequency of up to 90% for the total number of indexed plants.

## **4. In vitro propagation and micro tuber formation by the tissue culturing**

**In vitro propagation through nodal segment culture of yam** : The medium with 0.1

mg/L of NAA, 0.5 mg/L of BAP, 0.5 mg/L of kinetin and without using a growth regulator were suitable for shoot production from the nodal segment of two yam cultivars 'Ma1' and 'Db037'. 0.5 mg/L of 2,4-D also provided good results for shoot formation in 'Db037'. Plant growth regulators also affected shoot elongation. The node numbers of shoots varied with the plant growth regulators used especially in 'Db037'. The addition of 0.2 mg/L of kinetin provided good results in shoot elongation. The shoots of 'Db037' grown on a medium containing 0.5 mg/L of kinetin had average 7.5 nodes. The addition of GA<sub>3</sub> to the culture medium suppressed shoot induction and growth, while it increased microtuber formation.

**In vitro microtuber induction and their sprouting :** Microtubers were either directly formed at the axil of the explant or at the leaf axils of the developed plantlet. The *in vitro* microtubers that were chilled (4°C) for three months could be successfully sprouted with *in vivo* conditions. The best results in the tuber-sprouting were obtained from incubating the chilled microtuber at 30°C. There was no significance difference in terms of an genotypic microtuber sprouting.

Yam *in vitro* culturing contributes to the safe guarding of the biodiversity of the genus *Dioscorea*. An application of the results obtained showed that cryopreservation to more species should allow a transfer of technology. The use of current techniques, on the one hand, for pathogene eradication, in addition to the existent ones, and in the other hand, for plants resistant to some viruses (transformation), should guarantee the yam a virus-free plant state and allow for international exchanges. In the long term, the cultivars that are distributed to the farmer will be free of viruses. We should not forget, however, as previously said by Hanson (1986), that, for better security of germplasm conservation, different conservation methods have to be combined (*in situ* -field genebanks , *ex situ* - seed genebanks, *in vitro* genebanks).

## CONTENTS

	page
<b>Chapter 1. Outline of research project</b>	
Section 1. Objective and necessity of the study .....	22
Section 2. Content and scope of the study .....	24
<b>Chapter 2. Current status of research area</b>	
Section 1. Context for technology development in home and abroad .....	27
Section 2. Prospect in future and propriety of technology introduction .....	29
<b>Chapter 3. Contents and result of the research</b>	
Section 1. Development of cryopreservation system in peony ( <i>Paeonia lactiflora</i> Pall.) .....	30
1. Establishment of tissue culture method of peony .....	30
2. Cryopreservation of zygotic embryos in peony .....	45
3. Cryopreservation of somatic embryos in peony .....	54
4. Cryopreservation of winter buds in peony .....	59
Section 2. Development of cryopreservation system in yam ( <i>Dioscorea</i> spp.) .....	69
1. Factors affecting cryopreservation using shoot apices in <i>Dioscorea</i> spp. ....	69
2. Development of cryopreservation system using zygotic embryos in wild yam species. ....	95
3. Production of yam mosaic virus(YMV-K) free plants from the cryopreserved yam apices .....	100
4. In vitro propagation and micro tuber formation by the tissue culturing .....	102

	page
<b>Chapter 4. Achivement and contribution for related field</b>	
Section 1. General plans .....	107
Section 2. Accomplishment of the research development .....	108
Section 3. Contribution for related fields .....	110
 <b>Chapter 5. Application plan of the results</b>	
Section 1. Achievements of research development .....	111
Section 2. Plan for practical application .....	115
 <b>Chapter 6. Foreign scientific information related the project .....</b>	
	116
 <b>Chapter 7. Reference .....</b>	
	118

# 목 차

	페이지
제 출 문 .....	1
요 약 문 .....	2
<b>SUMMARY</b> .....	12
<b>CONTENTS</b> .....	18
목 차 .....	20
<b>제 1 장 연구개발과제의 개요</b>	
제 1 절. 연구개발의 목적 및 필요성 .....	22
제 2 절. 연구개발의 내용 및 범위 .....	24
<b>제 2 장 국내외 기술개발 현황</b>	
제 1 절. 국내·외 기술 개발의 현황 .....	27
제 2 절. 앞으로의 전망과 기술도입의 타당성 .....	29
<b>제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과</b>	
제 1 절. 작약( <i>Paeonia lactiflora</i> Pall.)의 초저온 동결보존 방법 확립	
1. 작약의 조직배양법 확립 .....	30
2. 접합자배를 이용한 작약의 초저온 동결보존 .....	45
3. 체세포배를 이용한 작약의 초저온 동결보존 .....	54
4. 동아를 이용한 작약의 초저온 동결보존 .....	59
제 2 절. 마( <i>Dioscorea</i> spp.)의 초저온 동결보존 방법 확립	
1. 마 액아조직을 이용한 초저온 동결보존 .....	69
2. 접합자배를 이용한 야생마 유전자원의 초저온 동결보존 .....	95
3. 초저온 동결 처리를 통한 Yam mosaic virus (YMV-K) 무병 마 생산.....	100
4. 조직배양기술을 이용한 동결보존 식물체의 증식법 개발 .....	102

<b>제 4 장</b>	<b>목표달성도 및 관련분야에의 기여도</b>	
제 1 절	총괄 추진 계획표 .....	107
제 2 절	연구개발 목표의 달성도 .....	108
제 3 절	관련분야에의 발전에 기여도 .....	110
<b>제 5 장</b>	<b>연구개발결과의 활용계획</b>	
제 1 절	연구개발 성과 .....	111
제 2 절	연구개발의 활용 계획 .....	115
<b>제 6 장</b>	<b>연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보</b> .....	116
<b>제 7 장</b>	<b>참고문헌</b> .....	118

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

식물의 제반특성은 유전인자에 의해 발현되며 이들 유전인자는 개체단위로 보존되고 유전되어 후대에 유지되고 있어서 이러한 유전인자를 갖는 개체 즉 유전자원을 보존하지 않으면 쉽게 멸종되게 마련이며, 없어진 자원은 재생이 불가능하다. 최근 지구상의 인구의 증가와 산업화, 경작지 확대를 위한 산림의 개발, 산업화와 공업화에 따른 환경오염 등과 같은 인위적인 요인에 의한 식물 생태계의 파손으로 다양한 유전자원의 소멸이 가속화되고, 지속적인 신품종의 확대 보급으로 과거에 재배되었던 재래종과 육성종들 또한 소멸되고 있는 실정이다. 식물의 유전자원을 장기적이고 효과적인 활용이라는 측면에서 유전자원을 어떠한 상태로 보존하느냐 하는 것이 중요한데 종자로 번식되는 식물은 저장에 필요한 온도와 습도가 조절되는 시설만 갖춘다면 비교적 적은 면적에 많은 종류의 식물종자를 오랫동안 보존할 수 있다. 그러나 영양변식작물의 경우는 보존대상이 영양기관이기 때문에 일반 종자와 같은 저온 건조저장이 불가능하여 대부분 포장재배에 의해 그들의 유전자원이 보존되고 있다. 따라서 인적, 물적 자원이 많이 소요될 뿐만 아니라 재배기간 동안의 유전적 퇴화와 병충해 발생 등과 같은 여러 가지 문제점이 야기되고 있다. 이러한 영양변식작물의 유전자원 보존법으로 기내 배양된 식물조직이나 세포를 액체질소내의 초저온(-196℃)에 동결하여, 세포나 조직을 불활성 상태로 장기간 보존하였다가 필요할 때 해빙 과정을 거친 후 식물체로 재분화시켜 이용하는 초저온동결 보존법이 1970년대 중반부터 연구가 시작되어 최근 *Citrus*를 포함한 일부식물에서는 큰 연구성과를 얻고 있다. 그러나 대부분의 경우는 아직도 동결보존에 필요한 재료의 선택, 동결전처리 효과, 동결보호제 처리와 동결방법, 저장과 해빙 방법, 식물체 재생 등에 대한 기초 연구가 수행 중에 있어서 이 방법이 유전자원 보존법으로 실용화되기 위해서는 앞으로 해결되어야 할 부분이 많은 실정이다 (Reed et al. 2001).

우리나라에서 작물육종은 식량 및 원예작물 위주로 이루어져 오고 있는데, 최근 소득수준 향상에 따른 국민 건강에 대한 관심이 높아지면서 약용식물 연구의 중요성도 과거 어느 때보다 강조되고 있다. 1990년대에 와서는 약용식물 특산지를 중심으로 약용식물을 연구하는 특화 시험장이 설립되면서 품종개량과 재배법에 대한 연구가 수행되고 있지만 그 동안

체계적인 유전자원의 수집활동이 전개되지 못하였을 뿐만 아니라 그 보존 실적도 저조한 것 등이 이들 작물의 연구에 가장 큰 문제점이 되고 있다.

작약(*Paeonia lactiflora*)과 마 (*Dioscorea* spp.)는 영양번식성 작물로 지하부를 수확 건조하여 한약제로 쓰는 대표적인 약용작물이다. 십전대보탕, 사물탕등의 재료로 사용되는 작약의 경우 타식을 주로하는 다년생 초본식물로 4~6년을 주기로 영양체 분리재배를 통하여 증식한다. 노지상태에서 월동이 가능한 특성 때문에 따로 저장시설이 필요하지는 않지만 노두 부분만을 번식수단으로 이용하므로 3~5배 정도의 증식체를 확보하기 위해서 최소한 3년 이상의 시간이 필요하다는 단점이 있으며, 연작장애로 인한 피해를 줄이기 위한 돌려짓기가 필요하며 개체 당 포장 소요면적을 많이 필요로 하는 특징이 있어 한정된 포장 면적과 노동력으로 인해 작약의 모든 유전자원을 유지하는데 어려움이 있다. 마의 경우 작약과 마찬가지로 한약제로 이용될 뿐만 아니라 말리지 않는 괴경을 생식하는 건강식품으로서 최근 인기가 높아지고 있는 작목으로 단위 면적당 소득이 높은 작물에 속한다. 다년생의 덩굴성 초본식물인 마의 경우는 자웅이주 식물이며 타식으로 종자를 형성하고 지하부에서 발달된 괴경과 지상부 덩굴의 액아부위에 착생하는 영여자(주아)를 번식체로 이용한다. 마는 다년생으로 노지에서 유지가 가능한 작물이기는 하지만 열대성 작물의 특징을 가지고 있어 우리나라의 대부분지역에서 겨울을 견디지 못하기 때문에 해마다 10월 하순경부터 수확하여 이듬해 봄 과종까지 종서가 얼지 않도록 저장해 주어야 하는 번거로움이 있다. 저장에 필요한 종서의 부피가 큰 마의 저장법으로 소규모 재배농가에서는 움 저장으로 관리하기도 하지만 저장량이 많거나 안전한 저장을 위해서 4℃가 유지되는 저장고를 이용하기도 하는데 이는 설치비용과 유지비용이 많이 소요되는 단점이 있다. 또한 기후가 다른 지역으로부터 도입된 유전자원의 경우 기후의 변동에 민감하여 도입 후 극기온 하에서 일괄 도태될 위험성을 가지고 있다. 이러한 이유들로 작약이나 마와 같은 유지·저장에 어려움이 있는 영양 번식성 약용작물의 경우 이들 유전자원의 보다 안정적인 보존방법의 개발이 필요한 실정이다.

따라서 한약제로 널리 이용되고 있는 작약과 마의 유전자원을 안정적으로 보존할 수 있는 초저온 동결 보존법이 확립되어진다면 이 결과는 작약이나 마의 유전자원 보존뿐만 아니라 이와 유사한 영양번식 작물의 유전자원 안전 보존에 큰 혁신을 가져오게 될 것이다.



## 제 2 절 연구개발의 내용 및 범위

본 연구 개발은 대표적인 영양번식성 작물인 작약과 마 유전자원의 초저온 동결보존에 관한 내용으로 ‘작약의 초저온 동결보존 방법 확립’이라는 세부과제 하에 작약의 조직배양 방법 확립, 체세포배와 캘러스의 초저온 동결보존 방법 구명, 초저온 동결보존된 조직으로부터 식물체 분화, 동결보존후의 체세포 변이 분석 등을 수행하였으며, ‘마의 초저온 동결보존 방법 확립’이라는 협동과제로 genotype별 성장점 배양 효율 비교와 배양방법 확립, 마 조직 부위별 동결 내성과 동결보존 방법 구명, 초저온 동결보존법 의해 재분화된 개체의 체세포변이 분석, 동결조직으로부터의 식물체 재분화 등에 관한 연구를 수행하였다. 수행한 주요 연구내용과 범위를 요약하면 다음과 같다.

### 세부과제 : 작약의 초저온 동결보존 방법 확립

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1 차 년 도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◇ 초저온 동결보존에 필요한 식물재료의 획득</li> <li>◇ 식물재료의 건조·동결 저항성 조사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o. 작약 조직배양 재료의 확보               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 재료확보 : 경북농업기술원 신물질 연구소</li> <li>- 공시재료 : <i>Paeonia lactiflora</i>의 화퇴 및 종자</li> </ul> </li> <li>o. 작약의 약, 화사 및 자엽 조직배양에서 embryogenesis의 genotype간 차이 구명               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 배양재료 : 지름 1.5~2cm되는 화퇴의 약 및 화사조직 성숙중자의 배</li> <li>- 실험내용 : genotype별 약 및 화사배양 효율 검토, 접합자배의 자엽조직으로부터 체세포배 유도</li> </ul> </li> <li>o. 작약의 캘러스와 체세포배 유도               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 약, 화사, 자엽조직으로부터 캘러스와 체세포배 유도</li> </ul> </li> <li>o. 건조 저항성 측정 ; 실리카겔 및 자연건조               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 건조 시간 : 0~1개월(재생률 0%까지 건조)</li> </ul> </li> <li>o. 동결 저항성 ; desiccation , vitrification법               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1시간 액체질소에 동결, 해동후 재생률 조사</li> </ul> </li> </ul>

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
2 차 년 도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◇ 조직배양체계 확립</li> <li>◇ 초저온 동결보존 방법 선발</li> <li>◇ 동결보존 방법에 따른 적정 조건구 명</li> <li>◇ 초저온 동결보존 효율의 genotype간 차이 비교</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o. 접합자 배의 동결처리 후 발아율 향상</li> <li>o. 체세포배 발생효율 향상 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 자엽 및 화사 조직</li> </ul> </li> <li>o. 동아(winter bud) 배양 효율 향상</li> <li>o. 작약의 동결보존방법 선정 ; <ul style="list-style-type: none"> <li>- 공시계통 : 의성작약</li> <li>- 공시재료 : 약 및 화사조직배양에서 얻어진 캘러스 및 체세포배</li> <li>- 동결보존방법 : Desiccation, Encapsulation- dehydration, Vitrification, Encapsulation - vitrification</li> </ul> </li> <li>o. 동결전처리와 동결보호제의 조성 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 동결전처리 효과 : 전배양과정, 건조시간, encapsulation 유무 등</li> <li>- 동결보호제 조성 : PVS 종류별</li> </ul> </li> <li>o. 저장과 해빙방법 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 동결방법 : 단계적인 동결과 급속동결, cryogenic vial의 종류 등</li> <li>- 해빙방법 : 해빙온도와 시간</li> </ul> </li> <li>o. 생존력 검정 및 식물체 재분화 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 재분화 배지 배양후 생존률 및 배양반응 조사</li> </ul> </li> <li>o. 작약의 genotype간 초저온 동결보존 효율 비교 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 공시재료 : 조직배양으로 재료확보가 가능한 계통의 캘러스나 체세포배 조직</li> <li>- 내용 : 상기 동결보존 방법에 대한 genotype간 보존 효율 비교</li> </ul> </li> </ul>
3 차 년 도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◇ 동결과정을 통한 재분화 식물체의 체세포변이 조사</li> <li>◇ 작약의 안전 초저온 동결보존 방법 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o. 재생식물의 형태적 및 세포유전학적 특성 조사 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 형태적 특성조사</li> <li>조사대상 : 약 및 화사배양에서 얻어진 체세포배</li> <li>조사내용 : 비정상 체세포배 발생빈도, 변이 분포</li> <li>비정상배가 많이 발생하는 조건</li> </ul> </li> <li>- 세포 유전학적 특성 <ul style="list-style-type: none"> <li>조사대상 : 약배양에서 얻어진 분화 식물체,</li> <li>조사내용 : 식물체의 배수성 분포</li> </ul> </li> <li>- 분화 식물체 특성조사 <ul style="list-style-type: none"> <li>: 화색, 초형, 수량, RAPD 밴드패턴 분석 등</li> <li>(순화 재배 4~5년경과 후 조사가능)</li> </ul> </li> <li>o. 작약의 동결보존방법 확립 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 동결후 생존률이 높을 고, 변이 없는 재생 식물체 획득이 가능한 방법 구명</li> </ul> </li> </ul>

협동과제 : 마의 초저온 동결보존 방법 확립

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1 차 년 도 (2002)	<p>◇ 초저온 동결보존에 필요한 식물재료의 획득</p> <p>◇ 식물재료의 건조·동결 저항성 조사</p>	<p>o. 조직배양을 통한 마의 동결보존 재료육성</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 재료확보 : 경북농업기술원 생물자원연구소 마 유전자원포</li> <li>- 배양재료 : 지상부 액아부위 생장점</li> <li>- 배양배지 : 1/2MS 혹은 MS + BAP, Kinetin ↓ 26±1℃, 1500 Lux 1/2MS, 계대 배양 ↓ 마디 배양, 개체수 확보</li> </ul> <p>o. Genotype별 식물재료 획득</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 공시계통 : <i>Dioscorea opposita</i>(등근마, 장마, 단마)</li> <li>- 재료확보 : 상기 방법과 동일함</li> </ul> <p>o. 건조 저항성 측정 ; 실리카겔 및 자연건조</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 건조 시간 : 0~24시간(재생률 0%까지 건조)</li> </ul> <p>o. 동결 저항성 측정 ; Encapsulation-dehydration, vitrification법</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1시간 액체질소에 동결, 해동후 재생률 조사</li> </ul>
2 차 년 도 (2003)	<p>◇ 동결보존 단계별 적정 조건 구명</p> <p>◇ 초저온 동결보존 효율의 genotype간 차이 비교</p>	<p>o. 동결전처리 방법과 동결보호제의 조성 구명</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 동결전처리 효과 : 전배양배지 조성, 전배양시간, 건조시간, encapsulation 유무 등</li> <li>- 동결보호제 조성 : PVS 종류별</li> </ul> <p>o. 저장과 해빙방법</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 동결방법 : 단계적인 동결과 급속동결 등</li> <li>- 해빙방법 : 해빙온도와 시간</li> </ul> <p>o. 동결방법별 생존력 조사</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 재분화 배지 배양후 생존률 및 배양반응 조사</li> </ul> <p>o. 마의 genotype 및 보존방법별 동결보존 효율 비교</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Desiccation, Encapsulation-dehydration, virification, Encapsulation-virification법 이용</li> <li>- 동결후 재생 배지에서의 생존률 및 배양반응 조사</li> </ul>
3 차 년 도 (2004)	<p>◇ 동결과정을 통해 재분화된 식물체의 체세포변이 조사</p> <p>◇ 마의 안전 초저온 동결보존 방법 확립</p>	<p>o. 형태적 특성 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 계대배양, 동결보존 후 얻어진 식물체의 형태적 특성 (잎의 형태, 기내소괴경 발생 등)</li> </ul> <p>o. 세포 유전학적 특성</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 대상 : 계대배양 과정중 발생하는 변이조사 동결보존 과정중 발생하는 변이조사</li> <li>- 방법 : RAPD 밴드 패턴 분석</li> </ul> <p>o. 기외 적응 식물체 특성조사</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 순화방법 : 기내 소괴경 생산 → 휴면타과(저온처리) → Pot 파종 → 출아 신장</li> <li>- 모 식물체와의 형태적 특성과 세포유전학적 특성 비교</li> </ul> <p>o. 마의 동결보존방법 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 변이가 없고 생존률이 높은 동결보존법의 확립</li> </ul>

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내·외 기술 개발의 현황

#### 1. 국내·외 관련분야의 환경변화

- 가. 유전자원보존에 대한 인식이 국·내외적으로 꾸준히 높아지고 있는 실정임.
- 나. 약용식물에 대한 선호도가 높아지면서 국내 여러 연구기관에서 이에 대한 연구가 다양하게 이루어지고 있으나 영양변식에 의존하고 있는 약용 식물들의 유전자원은 포장 재배로 보존 되고 있는 실정임.
- 다. 마의 경우 재배농가의 소득이 증가하는 추세이며, 이들 유전자원 보존에 여전히 많은 노력을 투입하고 있음.
- 라. 국내에서는 제1회 생물자원 초저온 동결보존에 관한 국제심포지엄이 농촌진흥청의 주관으로 개최(2003년 6월 3~5일)되는 등 국내의 식물유전자원 초저온 동결보존을 위한 연구에 조직적인 기틀이 마련되고 있음

#### 2. 국외 기술개발 현황

작약의 액아배양을 통한 식물체 대량증식과 캘러스 배양에 의한 체세포배 유도에 대한 실험이 이루어지고 있고, 마의 경우는 일본에서 생장점배양을 통한 무병종서 생산, 기내대량증식, 이차대사산물의 생산을 위해 다양한 연구가 이루어졌다. 인도의 NBPGR에서는 마 속 식물의 초저온동결을 위한 과정으로 encapsulation- dehydration 기법의 성공적인 사용에 대해 보고한 바 있으며, 나이지리아, 유고슬라비아, 러시아 등에서도 마 (*Dioscorea deltoidea*, *D. sausalica*, *D. alata*)의 초저온동결보존에 대한 연구가 수행 중에 있다.

#### 3. 국내 기술개발 현황

일부 농진청 소속의 연구소와 대학에서 벼, 국화, 마늘 등을 재료로 초저온 동결보존에

대한 연구를 수행중에 있으나, 외국과는 달리 아직도 초저온 동결보존을 통한 유전자원 관리 체계가 미확립된 실정이다. 2005년 농촌진흥청의 유전자원 보존센터의 설립을 시작으로 국내에서 동결보존 방법이 확립된 일부 자원을 위주로 하여 초저온 동결보존 계획을 수립하고 이를 실용화시켜 나갈 예정이다. 본 연구실에서는 작약의 품종개량을 위하여 경북농업기술원과 공동으로 작약의 유전자원 수집과 특성을 조사하면서 약배양에 의한 반수체 생산, 배배양, somatic embryogenesis 등에 대한 연구를 수행해 오고 있다. 경상북도 농업기술원 생물자원연구소에서는 마의 유전자원 수집과 품종개량을 위해 수집종의 특성조사와 조직배양에 대한 연구를 수행해오고 있다. 그러나 작약이나 마의 초저온 동결 보존에 대한 국내의 연구 성과는 전무하다.

#### 4. 문제점

식물의 조직이나 기관을 이용한 초저온 동결보존체계를 확립하고 이를 실용화하기 위해서는 우선 각각의 식물에 대한 세포 및 조직배양방법이 구명되고 그효율성이 제고되어야 한다. 작약은 다른 작물에 비해 조직배양 반응이 느리고 체세포배를 얻을 수 있는 재료도 한정되어 있을 뿐만 아니라 품종에 따른 배양효율의 차이 또한 비교적 크므로 초저온 동결보존에 앞서 재료의 선택에 신중을 기해야 할 것이며 genotype별 기내배양체계의 확립도 동시에 요구된다. 마는 genotype과 조직부위에 따라 동결 보존효율이 다른 것으로 보고되고 있어서 우리나라에 자생 또는 재배되는 종의 동결보존을 위해서는 이에 맞는 별도의 연구가 이루어져야 할 것이다. 따라서 다소 증식정도가 낮은 계통이나 품종의 증식체계가 확립되고 이들의 초저온 동결보존 조건이 밝혀진다면 이들 영양 번식성 약용작물의 유전자원 유지와 보존 효율을 극대화시킬 수 있을 것이다.

## 제 2 절 앞으로의 전망과 기술도입의 타당성

### 1. 앞으로의 전망

본 연구에서 작약과 마의 유전자원을 초저온에 안전하게 동결보존 시킬 수 있는 방법을 확립하였다. 이방법은 앞으로 이용가치가 높은 영양변식성 작물의 유전자원 보존 기술로 활용될 수 있을 것이다. 그리고 영양변식 식물의 유전자원 보존에 초저온 동결보존법을 이용하게 육종재료의 유지·관리에 소요되는 인력과 경비도 크게 줄일 수 있다. 식물의 무병조직인 생장점을 이용한 초저온 동결보존법은 유전자원의 안전저장 뿐만 아니라 무병주의 대량급속증식도 가능하여 영양변식계의 생산성향상에는 크게 기여하게 될 것이다. 앞으로 따라서 영양변식 식물의 유전자원 보존 및 이용에 광범위하게 이용될것으로 전망된다.

### 2. 기술도입의 타당성

우리나라에 자생하면서 영양계로 번식되는 자원식물의 유전자원 보존에 적합한 방법이 미확립 되어 있어서 이들 식물의 유전자원은 모두 포장재배에 의해 그 특성이 유지·보존되고 있는 실정이다. 포장재배에 의한 유전자원 보존은 취급 자원의 수가 많을수록 노동력과 비용이 크게 소요되고, 보존과정에서의 유전적인 퇴화나 유전자원의 소실의 우려도 매우 크므로 보다 안전하고 장기적으로 보존할 수 있는 초저온 동결 보존법의 확립이 시급히 요구되고 있다. 마는 열대지방의 주요작물로 열대마 종류에 대한 초저온 동결보존에 대한 연구가 활발히 진행되어 효과적인 방법이 발표되고 있으나 이들 방법들은 genotype 별로 효율에 상당한 차이를 보이므로 우리나라에 자생하는 마에 대한 별도의 검토가 필요하며, 작약의 초저온 동결보존에 대해서는 도입하거나 참고할 기술은 거의 없는 실정이다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 작약(*Paeonia lactiflora* Pall.)의 초저온 동결보존 방법 확립

#### 1. 작약의 조직배양법 확립

##### 가. 연구개발수행 내용

1) 접합자 배배양과 자엽조직으로부터 체세포배 유도 : 작약의 성숙종자에서 배를 절취하여 MS배지에 치상한후 26±1℃로 유지되는 항온실에서 30일간 배양하여 자란 자엽조직을 가로, 세로 0.5cm되도록 잘라 체세포 배 획득을 위한 배양 재료로 이용하였다. 배의 전처리 조건에 따른 체세포 발생정도를 조사하기 위해 종피를 제거한 작약종자를 1~2일정도 pH buffer solution (YAKURI pure chemical사 제품)에 침적처리 하고 70% 에탄올과 2% NaOCl에 소독한 후 배를 절취하여 MS 기본배지에 30일간 배양후 배 발달 정도를 조사하였으며, 여기에서 얻어진 자엽조직을 ABA가 1.0mg/L 첨가된 MS배지에 치상하여 90일간 암상태에서 배양한 후 이들로부터 체세포 배발생정도를 조사하였다. 작약 종자의 배 배양 과정 중에 발견된 다배 현상의 발생 빈도와 유전적인 차이 등을 조사하기 위하여, 한 개의 종자가 가지는 배의 수, 배의 형태적 차이와 염색체 수, 발아 양상 등을 조사하였다.

2) 작약의 뿌리, 잎, 자엽조직배양을 통한 캘러스와 배형성 유도 : 작약 싹묘로부터 절취한 자엽, 하배축, 뿌리 조직과 생육이 왕성한 작약묘로부터 절취한 엽육조직을 2,4-D(0.0~2.0mg/L)단용 혹은 2,4-D(1.0mg/L)와 BAP(0.5mg/L)를 혼용한 MS배지에 60일간 배양한 후 캘러스 형성정도와 배형성률을 관찰하였다. 각 조직에서 발생한 캘러스는 성장조절제가 첨가되지 않은 MS배지에 배양하여 배발생정도를 조사하였다.

##### 3) 약, 화사조직으로부터 캘러스 및 체세포배 유도

약배양: 조직 배양 효율의 genotype 간 차이를 조사하기 위하여, 경북농업기술원 신물질연구소(의성)에서 보존중인 작약계통을 1년차에는 P064, P079, P123과 의성작약의 화뢰를 2년차에는 의성작약의 17계통의 화뢰를 채취하여 70% 에탄올로 표면소독하고 약을 절취하여 MS

기본배지에 배양하였다. '의성작약' 화뢰를 4℃의 암상태에서 5~15일간 저온처리한 다음 약 배양을 실시하여 저온처리 기간별 배양효율을 비교해보았다. 또한 PAA가 계통별 소포자 유래의 배발생에 미치는 영향을 조사하고자 2mg/L의 PAA가 첨가된 MS배지에 '의성작약'을 포함한 홑꽃 6계통의 약을 배양하였다. 활성탄의 첨가효과를 조사하고자 성장조절제와 활성탄이 첨가된 배지에 '의성작약'의 약을 배양하였다.

화사조직으로부터 캘러스 및 체세포배 유도 : 4℃에서 5~15일간 저온처리한 '의성작약' 외 1차년도의 3계통과 2차년도의 17계통의 화뢰로부터 절취한 화사조직을 2mg/L의 2,4-D가 첨가된 MS배지에 배양한 뒤 캘러스 형성율을 조사하였고, 형성된 캘러스는 ABA가 0~2mg/L 첨가된 MS배지에 배양하여 체세포배를 유도하였다.

## 나. 연구개발 결과

### 1) 종자의 배배양과 자엽조직으로부터 체세포배 유도

#### 가) 종자의 배배양

작약의 종자로부터 배를 절취하여 GA<sub>3</sub>가 0.3 mg/L 첨가된 MS 배지에 배양하여 GA<sub>3</sub>가 배 발아에 미치는 영향을 조사한 결과(표 1), 배의 뿌리 발육은 처리별로 차이를 나타내지 않았으나 0.3 mg/L의 GA<sub>3</sub> 첨가구에서 상배축의 신장이 64%로 높아지는 경향이였다.

Table 1. Effect of GA<sub>3</sub> on zygotic embryo germination in *P. lactiflora* Pall.

GA <sub>3</sub> (mg/L)	No. of cultured embryos	Rate (%) of	
		Rooting (%)	Epicotyl elongation (%)
0.0	70	95.0	7.2
0.3	100	97.0	64.0



pH 4.0, 7.0, 10.0의 완충용액(YAKURI pure chemical사)에 종피가 제거된 종자를 24~48시간 침지 처리한 후 배를 절취하여 MS 기본배지에서 발아시킨 결과 증류수에 처리된 종자에 비해 뿌리 발생이나 신초 발생율이 크게 낮아졌다(표 2). 그러나 완충액에 처리되지 않은 배에서는 자엽 및 뿌리 발생이 정상적인 반면에 pH 7.0 완충액에 48시간 처리된 배에서는 뿌리 신장은 되지 않고 자엽만 전개되는 비정상적인 생육을 나타내었다(그림 1).

Table 2. Effect of buffer solution (pH 4.0, 7.0, 10.0) on zygotic embryo germination in *P. lactiflora* Pall

Buffer sol. (pH)	Soaking duration (h)	No. of cultured embryos	Rooting (%)	Epicotyl elongation (%)
Control(D.W)	24	70	95.0	7.2
4.0	24	75	37.3	5.3
	48	85	8.2	0.0
7.0	24	69	62.3	4.3
	48	76	10.5	0.0
10.0	24	76	30.3	6.6

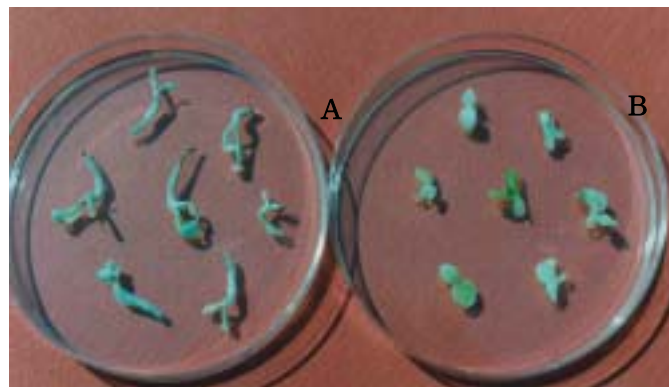


Fig. 1. Germinated seedlings from zygotic embryos non-treated(A) and treated with pH buffer solution (B)

나) 자엽조직으로부터 체세포배 유도

ABA가 첨가된 배지에서 작약의 자엽조직을 배양할 경우 캘러스발생을 거치지 않고 자엽조직에서 직접 체세포배가 발생하게 되는데 자엽조직 배양 배지에 ABA를 0, 1.0, 2.0 mg/L 첨가하여 ABA농도별 체세포배 발생율을 조사한 바(그림 2, 3), ABA가 1 mg/L 첨가된 MS 배지에서 61.0%의 높은 체세포배 발생율을 나타내었다.

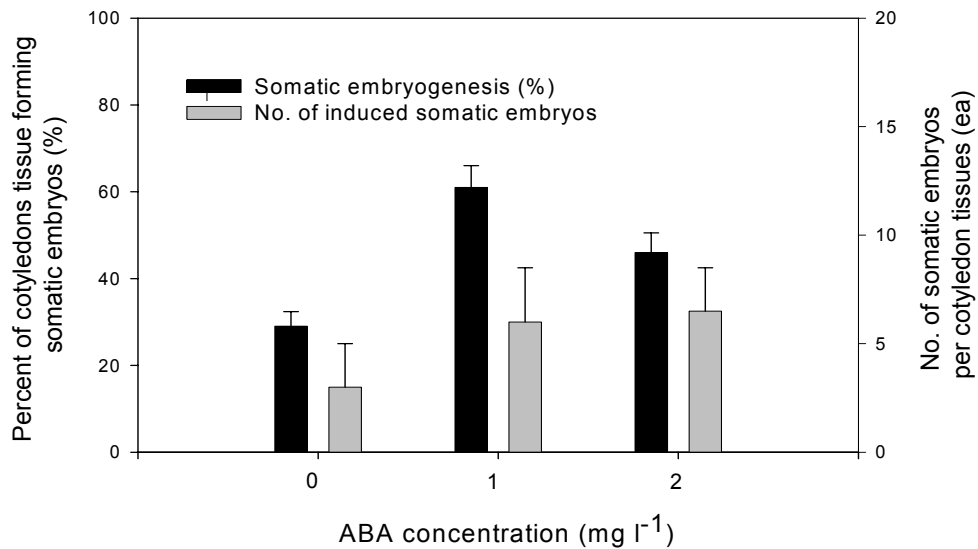


Fig. 2. Effects of ABA concentration on somatic embryogenesis from cotyledon tissue of *P. lactiflora* Pall. In each ABA concentration, more than 100 cotyledon tissues were cultured with three replicates per treatments. Bars represent standard error (mean  $\pm$  SE).

완충용액에서 침적 처리된 작약종자의 배를 받아시켜 얻어진 자엽조직을 ABA가 1.0 mg/L 첨가된 MS배지에 배양하여 체세포배 발생정도를 조사한 결과(표 3), pH 4.0과 7.0 완충용액에서 48시간 침지처리한 구에서 체세포배 발생율이 각각 84, 85%로 높게 나타났고 배양된 조직 100개당 얻어지는 체세포배의 수도 232개와 280개로 가장 많았다.

Table 3. Effects of pH buffer solution on somatic embryogenesis from cotyledon tissue of *P. lactiflora* Pall.

Buffer sol. (pH)	Soaking duration (h)	Cotyledons forming somatic embryos (%)	No. of somatic embryos per 100 cotyledons
Control(D.W)	24	65	148
4	24	60	185
	48	84	232
7	24	70	190
	48	85	280
10	24	65	140

\* Zygotic embryo culture medium : MS + 30g/L sucrose + 2g/L gelrite

\* Cotyledon culture medium(somatic embryo inducing medium) : MS + 30g/L sucrose + 2g/L gelrite + 1mg/L ABA

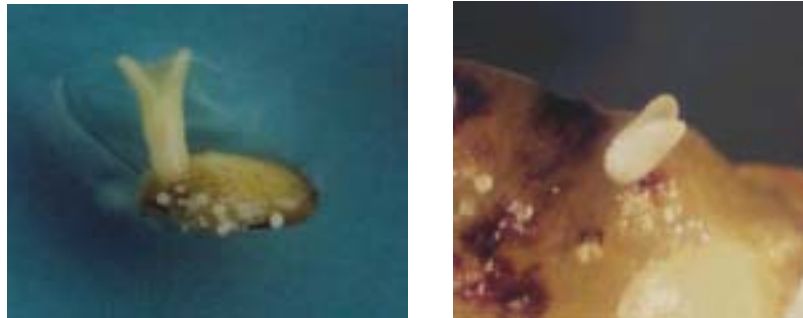


Fig. 3. Direct somatic embryogenesis from cotyledon tissue of *P. lactiflora* Pall.

#### 다) 다배종자의 분포

작약 종자에서 다배종자의 발생비율을 조사한 결과, 4,114개의 종자중에서 정상배를 가진 종자는 96%였으며, 2개 이상의 배를 포함하고 있는 다배종자의 비율은 총 4%로 나타났다. 다배종자의 대부분은 배가 두 개씩 있는 쌍배종자이었으나, 3개 혹은 4개의 배가 존재하는 종자도 발견되었다 (표 4). 다배현상은 자연계에서 드물게 일어나는 현상으로 식물의 종이나 품종에 따라서도 그 발생빈도가 크게 다른 것으로 알려져 있는데, 벼의 경우 쌍배종자의 발

생비율이 0.01%라는 보고 (Choi & Chung 1961)가 있고, 밀에서는 쌍배종자의 발생율이 0.03%였다고 보고된 바 있다 (Wilson & Ross 1961). 본 연구에서 조사된 작약종자의 다배종자 발생빈도는 4%로 다른 식물에 비해서 상당히 높은 빈도를 나타내었다. 쌍배의 발생양상에서는 배의 위치로 보아 정상적인 수정에 의해 형성된 배가 발육 도중에 분할 (그림 4-A)된 경우가 대부분이었으나 종자의 양쪽에 각각 1개씩의 배가 위치한 경우도 있었는데, 이 경우는 난세포외에 반쪽세포와의 접합에 의해 형성된 쌍배로 보여지고 앞으로 이에 대해서는 깊이 있는 연구가 있어야 될 것으로 생각된다.

Table 4. Polyembryonic rate in seeds of *P. lactiflora* Pall.

No. of investigated seed	Variance of embryo numbers in a seed (%)			
	one(normal)	twin	triplet	quadruplet
4,114	3,938(95.72)	169(4.11)	6(0.15)	1(0.02)

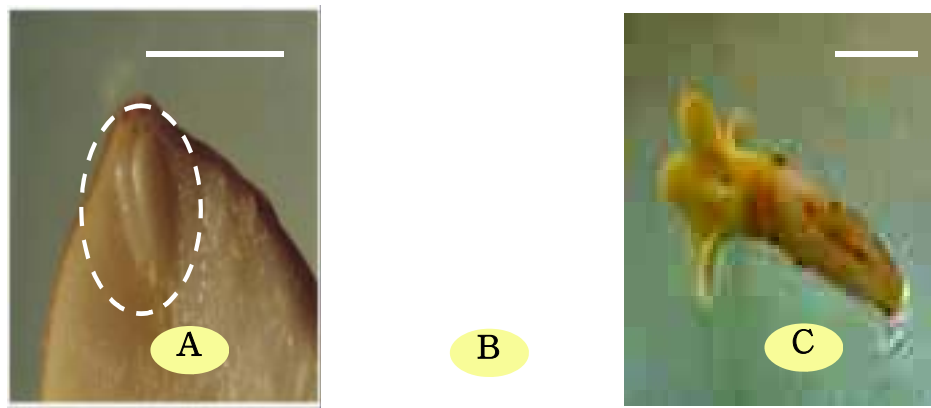
종자를 크기별로 나누어서 다배현상을 관찰한 바, 큰 종자 (>10mm)에서는 정상배를 가진 종자가 945개로 97%를 차지하였고, 배가 2개인 쌍배종자는 22개로 2.2%, 배가 3개인 종자는 4개로 0.4%로 조사되었다. 반면 크기가 상대적으로 작은 종자 (<5mm)에서는 정상배를 가진 종자가 937개로 95%를 차지하였고, 쌍배종자는 48개 (5.0%), 3개의 배를 가진 종자는 4개 (0.4%)로 조사되어 다배종자의 발생비율은 큰 종자에 비하여 약간 높게 나타났으나, 종자 크기만으로 다배종자의 구분은 불가능할 것으로 추정되었다 (표 5).

Table 5. Rate of polyembryonic seeds according to seed size in *P. lactiflora* Pall.

Seed size(mm)	Normal seeds(%)	Polyembryonic seeds(%)
Large(>10mm)	97	3
Small(<5mm)	95	5

조사된 작약종자 중 다배현상의 가장 많은 발생비율을 차지하는 쌍배 (그림 4-A)의 형태적

인 특성을 조사하기 위하여 배 배양을 실시하였다. 배양된 쌍배 64개중에서 대부분의 배 (94%)가 2개의 자엽을 가지는 정상적인 형태의 배 구조 (그림 4-B)를 보였으나, 전체의 약 6%는 두개의 배 중에서 어느 하나가 1개 혹은 3개의 자엽을 가지는 경우도 있었으며, 두 배의 배축이 붙은 삼쌍둥이 형태의 배 (그림 4-C)도 관찰되었다. 약배양에서 형성된 배에서도 다배종자에서 발견된 것과 같이 1개나 3개의 자엽을 가지는 배가 발견되었으나, 이것은 발아율이 낮고 정상식물체로 발달하는 비율이 10%이하로 현저히 떨어진다고 보고된 바 있다 (Sohn *et al.* 1995). 배 배양에서 정상적인 두 개의 자엽을 가진 개체들은 4°C의 암상태에서 8주간 저온처리를 하여 정상적인 개체로 성장시킬 수 있었다.



**Fig. 4.** Germination of twin embryos in *P. lactiflora* Pall.

A: Twin embryos in a seed, B: Germination of twin embryos cultured on MS medium containing 0.3mg/L GA<sub>3</sub>, C: Abnormal seedling derived from twin embryos. Bar marks 5mm.

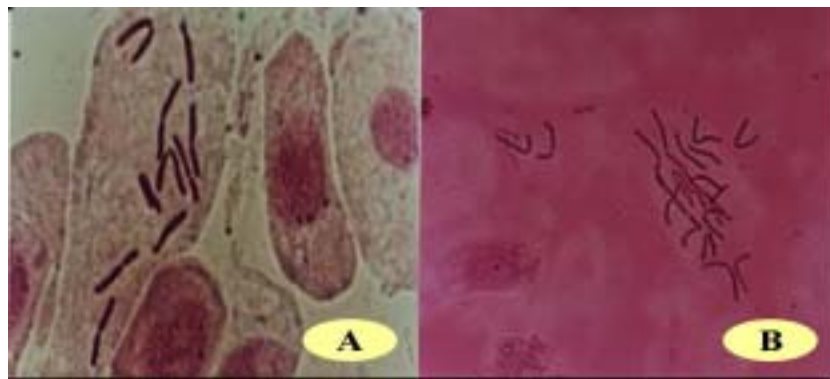
배를 하나만 보유하는 정상적인 종자와 다배현상을 보이는 종자의 배를 0.3mg/L GA<sub>3</sub>가 첨가된 MS배지에 배양하고 26°C의 명조건 하에서 배의 발아율을 조사한 바, 정상종자의 발아율이 97%로 다배종자 (90%)에서 보다 높았다 (표 6). 정상종자에 비해 다배의 발아율이 다소 낮은 것은 다배종자에서 자엽이 1개 혹은 3개인 비정상적인 배가 포함되어 있었기 때문인 것으로 추정되어 진다.

**Table 6.** Comparison of germination ratio between normal embryos and polyembryos in *P. lactiflora* Pall.

Embryos	No. of embryos cultured <sup>a)</sup>	Germination rate(%)
Normal embryos	100	97
Polyembryos	157	90

<sup>a)</sup>MS basal medium containing 0.3mg/L GA<sub>3</sub>, 30g/L sucrose and 2g/L gelrite.

한 종자 내에 포함된 다배의 배수성을 조사한 결과, 쌍배 종자 45개 중에서 단 한 개를 제외한 모든 쌍배가 고유의 염색체 쌍인  $2n=10$ 으로 조사되었고, 한 개의 종자에서  $2n=8$ 인 이수체가 발견되었다. 배를 세 개씩 가진 다배 종자 9개 중, 8개의 종자에서 3개의 배가 모두  $2n=10$ 으로 조사되었으나 1개의 종자에서 3개의 배가 각각  $2n=10$ , 15, 20 으로 나타났다 (그림 5). 아몬드와 같은 경우에서 정상적인 생육양상을 보이는 다배로부터 유래한 유묘에 root tip의 핵형은 2배체 ( $2n=16$ )이고, 왜성유묘의 경우에 이수체 ( $2n-1=15$ )도 관찰되었다고 보고 된 바 있다 (Martínez-Gómez & Gradziel 2003).



**Fig. 5.** Root tip cells from polyembryonic seedlings showing a diploid chromosome complement [ $2n=10$ ] (A) and a double-diploid chromosome complement [ $2n=20$ ] (B) in *P. lactiflora* Pall.

라) 작약의 뿌리, 잎, 자엽조직배양을 통한 켈러스 유도

작약의 조직부위별 켈러스 유도와 이들 켈러스로부터 체세포배 획득을 위한 실험 결과(표 7), 자엽조직의 경우 2,4-D가 2mg/L 첨가되거나 2,4-D (1mg/L)와 BA(0.5mg/L) 가 첨가된 배지에서 켈러스 발생이 각각 71%와 88%로 높게 나타났고 다른 조직부위에 비해 켈러스 성장도 양호하였다. 뿌리의 경우에는 BA를 혼용처리한 경우 보다 2,4-D 단용에서 켈러스 형성률이 높게 나타났으며 특히 2,4-D가 1 mg/L 첨가된 배지에서 켈러스 성장상태가 좋은 것으로 나타났다. 하배축의 경우도 2,4-D 첨가구에서 높은 켈러스 형성률을 나타내었지만, 생육이 왕성한 시기에 채취한 잎조직 배양에서는 첨가된 식물생장조절제의 조성 및 농도에 관계없이 켈러스가 발생되지 않았다. 위와 같이 작약의 하배축, 뿌리, 자엽조직의 경우는 2,4-D(1~2mg/L)가 첨가된 MS배지에서 높은 켈러스 형성률을 나타내었으나 이들 켈러스로부터 체세포배는 형성되지 않았고 포장상태에서 절취한 잎 배양한 경우에는 배양초기부터 배양체 주위에 발생하는 폐놀성 물질 때문에 모든 생장조절제 처리에서 기관형성이나 탈분화 현상을 관찰할 수 없었다. 작약의 자엽조직도 다양한 농도의 2,4-D 조건에서 켈러스는 형성되었지만 켈러스로부터 체세포배는 유도되지 않았다. 그러나 식물생장조절제가 첨가되지 않은 배지에 배양된 자엽조직에서는 6.9%의 배형성률을 나타내었다(그림 6).

마) 약, 화사조직 배양을 통한 켈러스 및 체세포배 유도

작약 genotype에 따른 약배양 효율을 검토하고자 1차년도에 '의성작약' 외 3계통에 대한 약배양을 실시한 결과(표 8), '의성작약'의 배발생률은 20%로 높았으나 그 외 계통의 배발생률은 3%이하로 낮았다. 2년차 실험에서도 '의성작약' 외 17계통에 대한 약배양을 실시하여 genotype별 열개 약의 비율과 배형성정도를 조사하였다. 그 결과 의성작약의 배발생률이 31.2%로 다른 품종에 비해 다소 높은 배발생률을 나타내었다.

화뢰의 저온처리 기간별 약배양 효율을 조사한 바(표 9), 1차년도 실험에서는 4℃에 15일간 저온처리된 약에서 배형성률이 20%로 가장 높았으나 2년차 실험에서는 5일간 저온처리 한 약의 배형성률이 31.2%로 가장 높게 나타나 년차간 차이를 보였다.

Table 7. Effect of plant growth regulators and their concentration on callus and somatic embryo formation from different tissues of *P. lactiflora* Pall.

Tissues	Conc. of plant growth regulators (mg/L)	Callus formation			Somatic embryogenesis	
		No. of cultured tissues	Forming rate (%)	Growth degree (+~+++) <sup>a</sup>	No. of calli cultured	Forming rate (%)
Cotyledon	control	116	0	-	-	6.9
	2,4-D 0.5	120	36	+	50	-
	2,4-D 1	122	50	++	50	-
	2,4-D 2	98	71	+++	50	-
	2,4-D 1 + BA 0.5	65	88	+++	50	-
Hypocotyl	control	45	2	+	-	-
	2,4-D 1	26	100	++	50	-
	2,4-D 2	27	100	+++	50	-
Root	control	62	0	-	-	-
	2,4-D 0.5	39	95	+	50	-
	2,4-D 1	63	100	++	50	-
	2,4-D 2	40	73	+	50	-
	2,4-D 1 + BA 0.5	66	20	+	50	-
Leaf	control	100	0	-	-	-
	2,4-D 0.5	100	0	-	-	-
	2,4-D 1	100	0	-	-	-
	2,4-D 2	100	0	-	-	-
	2,4-D 1 + BA 0.5	100	0	-	-	-

\*<sup>a</sup> Degree : - none, + rare, ++ moderate, +++ good



Fig. 6. Callus (A) and somatic embryo(A) formed from cotyledon tissues of *P. lactiflora* Pall..

A: Callus forming on MS medium containing 1mg/L of 2,4-D

B: Direct somatic embryogenesis on hormone-free MS medium



Table 8. Variated difference of embryogenesis in anther cultured of 21 cultivars of *P. lactiflora* Pall.

Cultivars	No. of cultured anthers	Rate of ruptured anthers (%)	Embryo forming rate (%)	
			2004(Year)	2003(Year)
P013	160	0.7	0.0	-
P015	120	0.8	0.0	-
P016	336	3.5	0.0	-
P024	200	4.5	0.0	-
P036	40	2.5	12.5	-
P040	140	7.8	0.0	-
P041	300	0.0	0.0	-
P046	340	0.9	0.0	-
P064	200	6.5	-	2.5
P079	180	3.0	-	0.0
P110	137	0.0	0.0	-
P112	240	0.0	0.0	-
P119	360	8.0	8.3	-
P120	360	1.9	0.0	-
P123	170	5.4	-	3.0
P128	320	5.4	0.0	-
P136	120	0.4	0.0	-
P143	180	17.8	0.0	-
92-1-1	320	11.6	0.0	-
94-6-1	280	3.2	0.0	-
Uisung zakyak	380	77.2	31.2	20.0

\* Anther culture medium : MS medium containing 30g/L of sucrose and 2 g/L of gelrite

Table 9. Effect of low temperature treatment on embryogenesis from anther cultures of *P. lactiflora* Pall.

Low temperature treatment (4°C, day)	Embryo forming rate (%)	
	2004(Year)	2003(Year)
5	31.2	3.0
10	12.7	5.0
15	5.0	20.0

\* Variety : Uisungzakyak

\* Anther culture medium: MS medium containing 30g/L sucrose and 2 g/L gelrite

작약의 약배양에서 PAA첨가효과를 알아보기 위하여 2mg/L의 PAA가 첨가된 MS배지에 '의성작약'외 5계통의 약을 배양한 결과(표 10), PAA가 첨가된 배지에서 열개된 약의 비율이 성장조절제가 없는 MS배지에서보다 다소 높게 나타났으나, 배형성을 면에서는 PAA가 첨가되지 않은 배지에서 다소 높게 나타났다.

Table 10. Effect of PAA on embryogenesis from anther cultures of *P. lactiflora* Pall.

Cultivars	Conc. of PAA (mg/L)	No. of cultured anthers	Rate of ruptured anthers (%)	Embryo forming rate (%)
P016	0	126	11.9	0.0
	2	130	19.2	0.0
P046	0	124	1.6	0.0
	2	180	18.8	0.0
P119	0	120	10.0	8.3
	2	100	11.0	0.0
P120	0	220	0.9	0.0
	2	170	0.0	0.0
92-1-1	0	160	1.3	0.0
	2	140	2.9	0.0
Uisungzakyak	0	380	77.2	31.2
	2	360	88.7	18.8

IAA, BA, TDZ 등이 단용 또는 혼용되거나 활성탄이 첨가된 배지에 저온 처리된 약을 배양한 결과(표 11), 0.3 mg/L의 IAA와 0.4 mg/L의 BAP가 혼용된 배지에서 약 열개율이 33.1%로 다소 높게 나타났으며, 배형성을 면에서는 0.3 mg/L의 IAA, 0.4 mg/L의 TDZ와 3 mg/L의 활성탄이 첨가된 배지에서 배형성율이 18%로 가장 높게 나타났다.

Table 11. Effect of plant growth regulators on embryogenesis from anther cultures of *P. lactiflora* Pall.

Conc. of plant growth regulators and activated charcoal(AC)				No. of cultured anthers	Rate of ruptured anthers (%)	Embryo forming rate (%)
IAA (mg/L)	BA (mg/L)	TDZ (mg/L)	AC (mg/L)			
0.3	0.2		3	220	16.4	4.5
0.3	0.2			260	20.0	0.0
0.3	0.4		3	220	19.1	13.0
0.3	0.4			160	33.1	0.0
0.3		0.2	3	240	15.0	0.0
0.3		0.2		220	15.0	0.0
0.3		0.4	3	200	12.5	18.0
0.3		0.4		240	11.3	0.0
0.6	0.2		3	220	4.1	0.0
0.6	0.2			220	10.5	7.3
0.6	0.4		3	240	20.8	0.0
0.6	0.4			220	25.9	0.0
0.6		0.2	3	300	4.0	0.0
0.6		0.2		360	8.3	0.0
0.6		0.4	3	260	13.8	0.0
0.6		0.4		180	15.0	2.3

2,4-D가 화사조직으로부터 캘러스 형성에 미치는 영향을 조사한 결과(표 12), 1 mg/L의 2,4-D가 첨가된 배지에서 캘러스 형성률이 51.5%로 높게 나타났다. 화사조직으로부터 유도된 캘러스를 0 ~ 2mg/L의 ABA가 첨가된 MS배지에 배양하여 배형성을 유도한 결과(표 13, 그림 7), 1.5mg/L의 ABA가 첨가된 배지에서 배형성률이 6%로 가장 높았다.

Table 12. Effect of 2,4-D on callus formation from anther filament tissues of *P. lactiflora* Pall.

Conc. of 2,4-D (mg/L)	No. of cultured filaments	Callus forming rate (%)
0	270	0.0
1	480	51.5
2	310	37.4

\* Variety : Uisungzakyak

Table 13. Effect of ABA on somatic embryogenesis form filament callus of *P. lactiflora* Pall.

Conc. of ABA (mg/L)	No. of calli transferred	Embryo forming rate (%)
Control	534	4.3
1.5	200	6.0
2.0	192	2.0

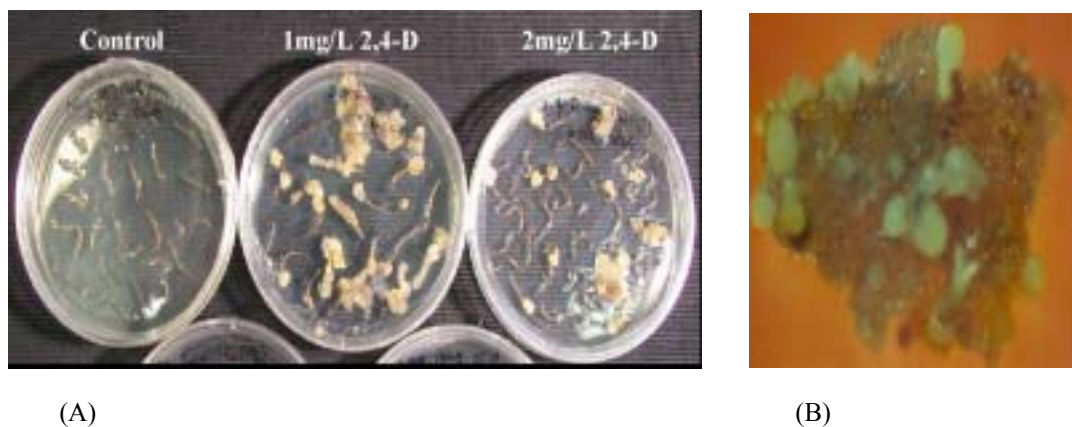


Fig. 7. Callus formed from anther filaments on callus induction medium containing different 2,4-D concentration(A) and somatic embryo formed from filament callus

작약 genotype별 화사 배양 효율을 비교하기 위하여 4℃에서 5일간 전처리한 '의성작약' 외 1차 년도의 3계통과 2차년도의 17계통의 화뢰로부터 절취한 화사조직을 1mg/L의 2,4-D가 첨가된 MS 배지에 배양하여 캘러스 형성 정도를 조사한 바(표 14), '의성작약'에서 캘러스 형성률이 51.2%로 가장 높게 나타났다.

Table 14. Genotypic difference in callus formation from anther filament tissues of 21 cultivars in *P. lactiflora* Pall.

Cultivars	No. of cultured filaments	Callus forming rate (%)	
		2004(Year)	2003(Year)
P013	300	0.0	-
P015	280	0.0	-
P016	160	0.0	-
P024	210	0.0	-
P036	120	3.3	-
P040	140	0.0	-
P041	320	0.0	-
P046	280	0.0	-
P064	190	-	15.3
P079	180	-	19.6
P110	330	0.0	-
P112	240	0.0	-
P119	360	24.4	-
P120	360	0.0	-
P123	170	-	13.2
P128	320	10.0	-
P143	180	0.0	-
P1312	80	3.5	
92-1-1	320	19.3	-
94-6-1	280	9.6	-
Uisungzakyak	380	51.2	51.5

\* Filament tissue culture medium : MS medium containing 30g/L of sucrose, 2g/L of gelrite and 1mg/L of 2,4-D.

화뢰 저온처리 기간에 따른 화사배양 효율을 검토하고자 4℃에서 5~15일간 처리한 화뢰로부터 화사조직을 절취하여 2,4-D가 2mg/L 첨가된 MS 배지에 배양하여 캘러스 형성률을 조사한 바(표 15), 배양 60일 정도에는 처리간 뚜렷한 차이를 보이지 않다가 90일 경과 후에는 4℃에서 5일간 처리된 화뢰에서 절취한 화사에서 63.3%의 가장 높은 캘러스 형성률을 보였다.

Table 15. Effect of low temperature treatment duration on callus formation from filament tissues of *P. lactiflora* Pall.

Storage duration of flower buds (4℃, days)	Callus forming rate (%)
5	63.3
10	28.3
15	38.6

## 2. 접합자 배를 이용한 작약의 초저온 동결보존

### 가. 연구개발수행 내용

#### 1) 접합자배의 초저온 동결보존

접합자 배의 건조시간에 따른 생존률 : 작약 종자에서 절취한 배를 GA<sub>3</sub> (0.3 mg/L) 첨가된 MS 배지에서 0~5일 동안 전배양한 후 무균상에서 여과지를 칸 샐리에 배열하여 1,200 lux 정도의 조명 하에 0~5시간 건조하여 전배양 기간 및 건조 시간별 동결보존후의 생존률을 조사하였다. 또한 전배양 배지내 삼투압 조절물질의 농도(sucrose; 0.088M~0.6M)가 동결보존에 미치는 영향을 조사하였다. 작약의 미숙종자(수정 후 50일에 채종)와 완숙종자에서 절취한 배를 각각 여과지를 칸 샐리에 배열하여 1,200 lux 정도의 조명하에 두고 무균상의 air-flow system을 이용하여 건조시간별 수분함량과 동결보존후의 생존률을 조사하였다. 동결처리 방법은 건조된 재료를 2ml들이 cryovial에 넣어 밀봉 후 -196℃의 액체질소에 급속 냉동하였다. 1시간 이상 냉동보

존시킨 재료를 40℃ water bath에서 5분간 해동시킨 다음 재배양배지로 이식하여 26±1℃의 항온실에서 배양하면서 재생률을 조사하였다. 재생률 조사에 사용된 배지는 0.3mg/의 GA<sub>3</sub>가 첨가된 MS 배지를 사용하였다. 수분함량은 무균상에서 건조시간마다 배의 무게를 측정하고, 이들을 110℃의 건조기에서 24시간 건조시킨 다음 각각의 생체중에 근거하여 측정하였다.

**접합자배의 동결보존 방법별 생존률 비교:** Encapsulation에 따른 접합자배의 건조 및 동결저항성을 알아보기 위해 1일간 전배양된 접합자배를 3% sodium alginate로 bead화하여 0~7시간동안 상기의 조건과 동일한 방법으로 건조하여 bead의 건조시간별 배 발아율과 동결후의 재생률을 조사하였다. Vitrification 방법의 적용을 검토하고자 접합자배를 PVS2에 30분간(26℃) 처리하여 동결·해빙 후 배양하여 생존률을 조사하였다.

**급속 및 완만동결에 따른 생존률 조사:** 접합자배를 4℃, -20℃, -80℃에서 각각 30분씩 처리한 후 액체질소에 담그는 완만동결법과 액체질소에 직접 담그는 급속동결법간의 생존률을 비교하였다.

**해빙온도 및 동결보존기간에 따른 생존률 조사:** 동결처리된 배를 20, 40, 55℃에서 각각 5분간 해빙시킨 후 재생배지에 배양하여 각 처리별 생존률을 조사하였다. 동결보존기간이 생존률에 미치는 영향을 조사하고자 접합자배를 -196℃의 액체질소에 1시간, 1일, 7일, 30일간 동결보존한 다음 재생배지에 배양하였다. 재생배지에서 분화된 식물체는 4℃의 암상태에서 8주간 저온처리하고 분엽과 뿌리가 충분히 분화된 후에 pot에 이식하였다.

## 2) 캘러스를 이용한 초저온 동결보존

자엽이나 뿌리 조직에서 형성된 캘러스는 무균상에서 접합자배와 동일한 방법으로 건조시켜 건조시간별로 캘러스의 재생정도와 동결후의 재생률을 조사하였다. 재생배지로는 2,4-D가 1mg/L 첨가된 MS배지를 사용하였으며, 항온실내 암조건에서 15일간 배양하였다. 약과 화사로부터 얻어진 캘러스도 동일한 방법으로 0~4일간 건조시켜서 재생배지에 배양하여 건조시간별 재생률을 조사하는 동시에 각각의 건조단계별로 동결후의 배양반응도 비교하였다

## 나. 연구개발 결과

### 1) 접합자배를 이용한 초저온 동결보존

미숙종자(수정 후 50일에 채종한 종자)와 완숙종자에서 절취한 배의 건조처리에 따른 동결 후의 생존률을 비교한 결과(그림 8), 완숙종자의 경우에는 1시간 자연건조(수분함량 26%)된 배에서

79.3%의 높은 생존률을 나타내었으나 미숙종자에서 절취된 배의 생존률은 대체로 완숙종자에 비해서 낮게 나타났다. 완숙종자에서 분리된 접합자배의 수분함량은 건조1시간 이후부터 거의 일정하게 유지되는 경향이였다(그림 9).

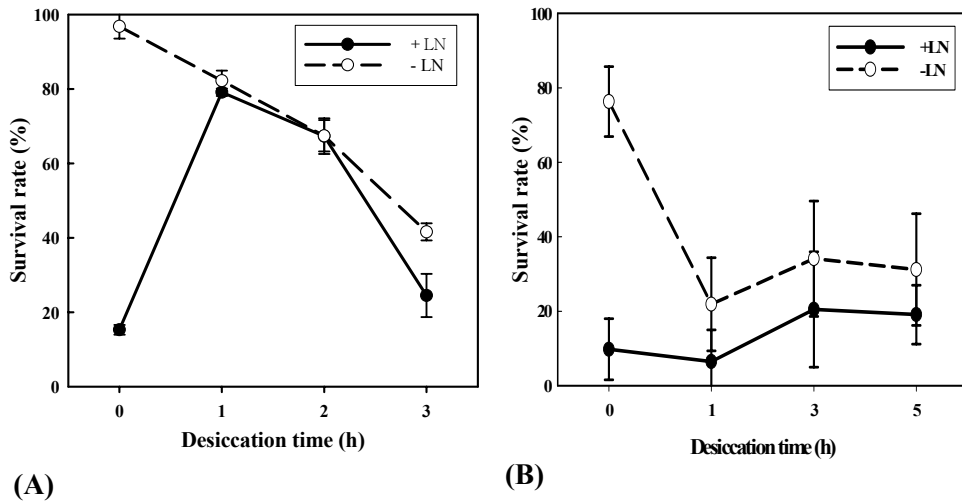


Fig. 8. Effect of desiccation times on cryopreservation of zygotic embryos from mature (A) and immature seeds (B) of *P. lactiflora* Pall. Bars represent standard error.

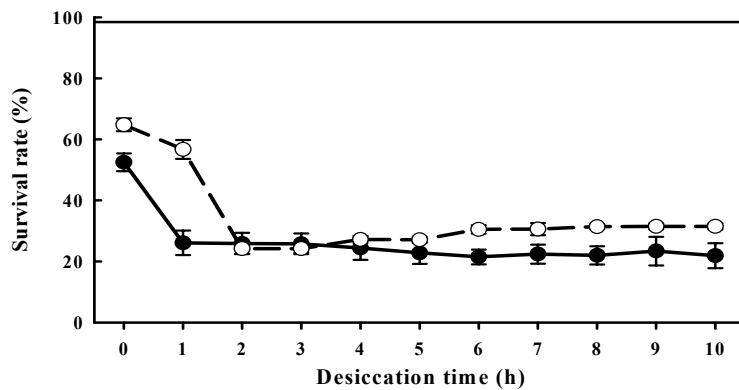


Fig. 9. Changes in the water content of the zygotic embryos excised from mature (—●—) and immature (—○—) seeds during desiccation by air drying. Bars represent standard error.



종자에서 절취한 배의 전배양기간과 건조처리에 따른 동결 후의 생존률을 조사한 결과(표 16), 1~3일 정도 전배양한 배를 1~2시간 정도 건조처리 후 동결보존할 경우 생존률이 71.5~80.0%로 높게 나타났으며, 전배양하지 않은 배의 경우도 1시간의 건조 처리로 동결 후의 생존률을 79%로 높일 수 있었다.

Table 16. Effect of preculture, desiccation time on cryopreservation of zygotic embryos of *P. lactiflora* Pall

Preculture (GA <sub>3</sub> 0.3mg/L, days)	Desiccation (h)	LN (-, +)	Survival rate (%)	Preculture (GA <sub>3</sub> 0.3mg/L, days)	Desiccation (h)	LN (-, +)	Survival rate (%)			
0	0	-	97.0	3	0	-	97.0			
		+	15.2			+	64.7			
	1	1	-		82.0	1	1	-	75.2	
			+		79.3			+	74.9	
		2	-		67.3		2	2	-	72.4
			+		67.0				+	71.5
1	0	-	97.0	5	0	-	97.0			
		+	53.3			+	39.2			
	1	1	-		97.0	1	1	-	60.0	
			+		80.0			+	43.3	
		2	-		73.3		2	2	-	56.7
			+		73.3				+	40.0

전배양 배지내 삼투압 조절물질의 농도가 접합자배의 동결보존에 미치는 영향을 조사한 결과, sucrose 농도가 0.3M 첨가된 배지에 배양된 액아에서 동결후의 생존률이 다소 높게 나타났다(그림 10).

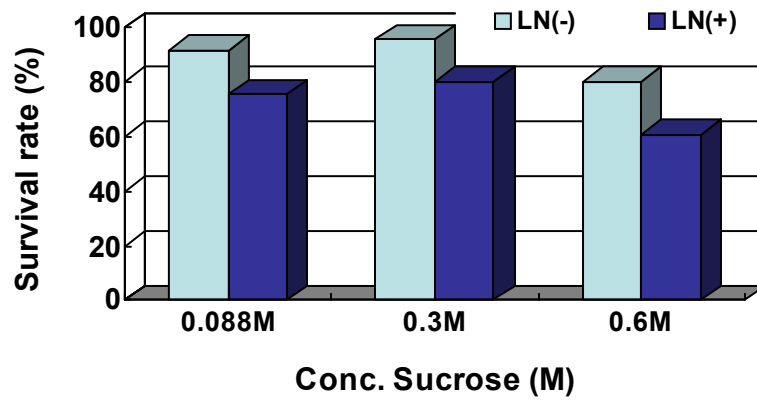


Fig. 10. Effect of sucrose concentration contained in preculture medium on cryopreservation of zygotic embryos of *P. lactiflora* Pall.

접합자배의 동결보존 방법별 생존률을 조사하기 위하여 1일간 전배양된 배를 각각 desiccation(1시간 자연건조), PVS2 처리(26°C, 30분), 3%의 sodium alginate로 encapsulation 시켜 5시간 건조처리한 것 등을 동결보존시킨 다음 각각의 생존률을 조사한 결과(그림 11), 건조만으로도 높은 생존률(71%)을 얻을 수 있었으며 encapsulation-desiccation시킨 것에서 85%의 가장 높은 생존률을 나타내었다.

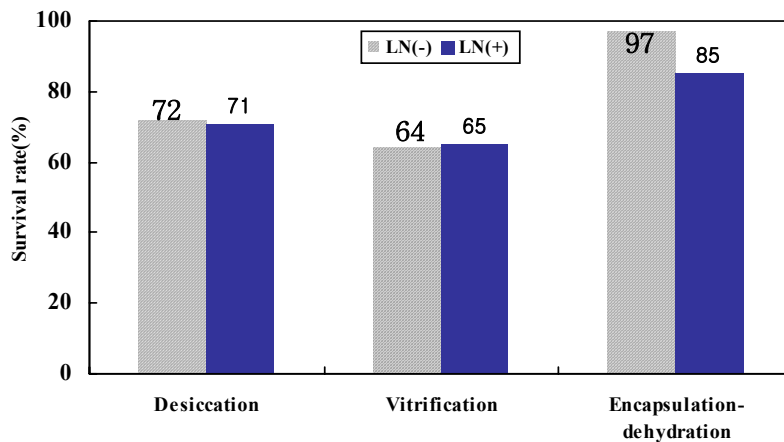


Fig. 11. Effect of desiccation, vitrification, and encapsulation-dehydration on survival of non-cryopreserved (-LN) and cryopreserved (+LN) zygotic embryos of *P. lactiflora* Pall.

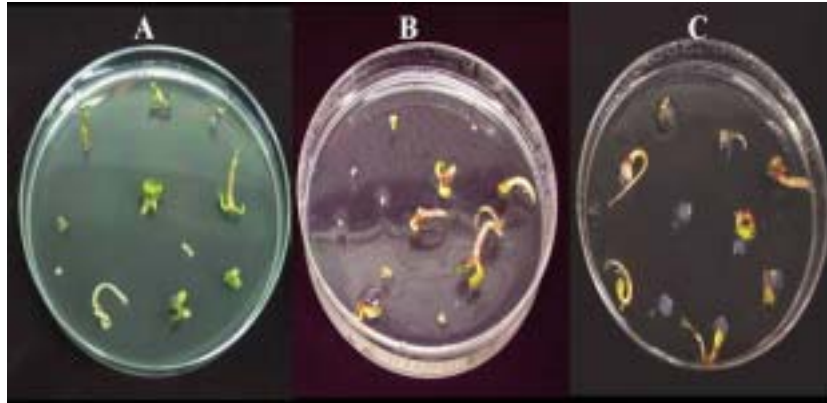


Fig. 12. Germination of cryopreserved embryos by desiccation (A), vitrification (B), and encapsulation-dehydration (C) on MS medium containing 0.3 mg/L  $GA_3$ .

Encapsulation-desiccation법에 의한 동결보존에 알맞은 desiccation시간을 구명하고자 3%의 sodium alginate로 bead화한 배를 무균상에서 0~7시간 동안 건조시키고 이들을 동결한 다음 생존률을 비교한 바(그림 13), 건조하지 않은 것의 동결 후 생존률은 2.0%인데 비해 5시간 건조한 bead의 생존률은 66.7%로 높게 나타났다. 그리고 동결방법별 배의 재생률을 비교한 바(표 17), 급속동결과 완만 동결 두 방법간에 통계적인 유의성이 인정되지 않았다.

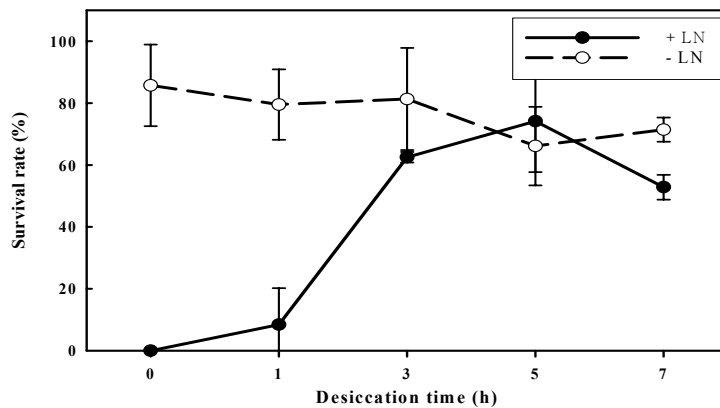


Fig. 13. Effect of desiccation on survival of encapsulated embryos of *P. lactiflora* Pall. Bars represent standard error.

Table 17. Effect of cryopreservation methods on survival of cryopreserved embryos of *P. lactiflora* Pall

Cryopreservation methods		No. of embryos cultured <sup>a</sup>	Survival rate (%) <sup>b</sup>
Rapid cryopreservation	LN(+)	50	58.8±6.5
Slow cryopreservation	4°C→LN(+)	50	57.1±10.7
	4°C→-20°C→LN(+)	50	61.1±7.3
	4°C→-20°C→-80°C→LN(+)	50	51.4±8.9

<sup>a</sup>MS + 0.3 mg/L GA<sub>3</sub>.

<sup>b</sup>Mean ± standard error.

해빙온도에 따른 접합자배의 생존률을 조사한 결과(표 18), 20°C와 40°C에서 해빙된 것의 생존률이 각각 67.2%, 68.4%로 높게 나타났는데 비해 상대적으로 높은 온도인 55°C에서 해빙된 배의 생존률이 40%로 크게 낮아졌다.

Table 18. Effect of thawing temperature on survival of cryopreserved zygotic embryos of *P. lactiflora* Pall

Thawing temperature (°C)	No. of embryos cultured <sup>a</sup>	Survival rate (%) <sup>b</sup>
20	90	67.2±5.5
40	90	68.4±3.2
55	90	40.0±7.0

<sup>a</sup>MS + 0.3 mg/L GA<sub>3</sub>.

<sup>b</sup>Mean ± standard error.

작약 접합자배의 동결보존 기간(1시간~30일)에 따른 생존률을 비교한 결과(그림 14), 동결보존 기간의 경과에 따른 해빙 후의 생존률은 76~78%로 동일한 경향이였다.

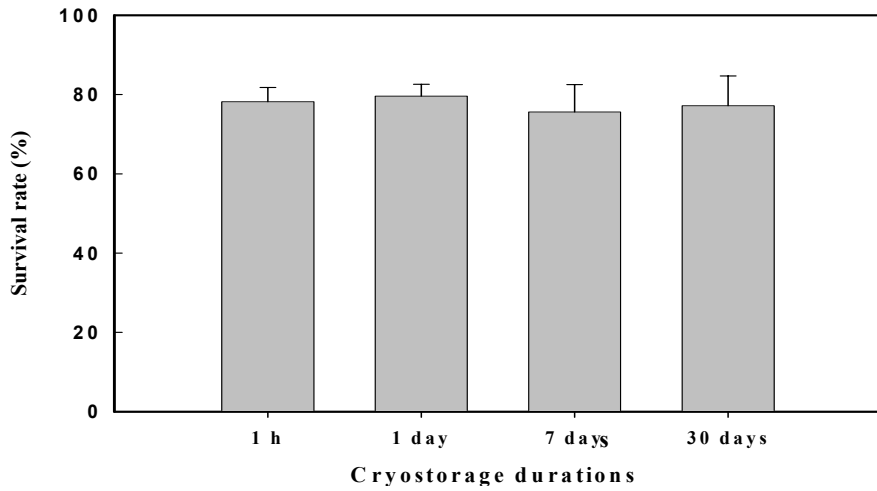


Fig. 14. Changes in survival rate of cryopreserved embryos according to the periods of cryopreservation in LN. Bars represent standard error.

동결 보존된 접합자배를 받아시켜 얻어진 어린 식물을 별도의 처리 과정없이 온실내 pot에 직접 이식할 경우 대부분 고사하여 생존개체를 확보할 수 없었으나, 4℃의 암상태에서 8주 동안 저온 처리시켰 후 이식할 경우 상배축이 신장되고 본엽이 전개된 정상적인 식물체로 발달되었다(그림 15). 지난 3년간 연구된 결과를 근거로하여 작약의 접합자배를 이용한 초저온 동결보존과정을 요약하면 그림 16과 같다.

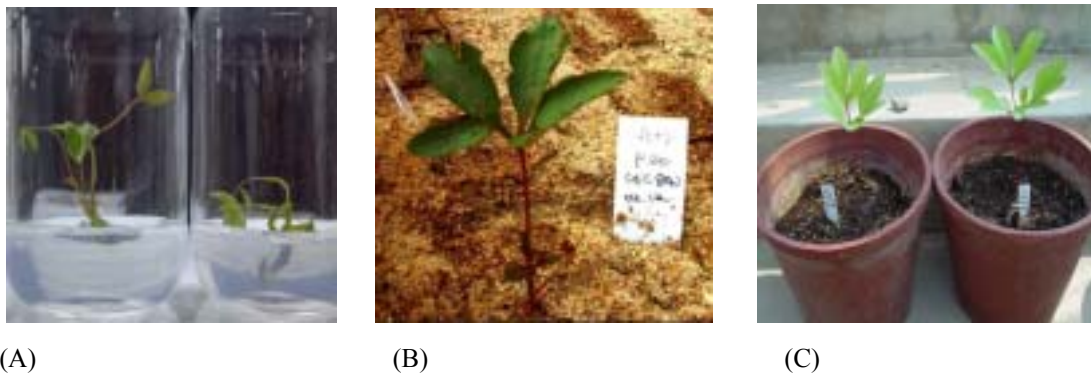


Fig. 15. Plants recovered from cryopreserved embryos at 50 days after culture (A), transplanted in potting soil (B) and grown for 1 year after transplanting(C).

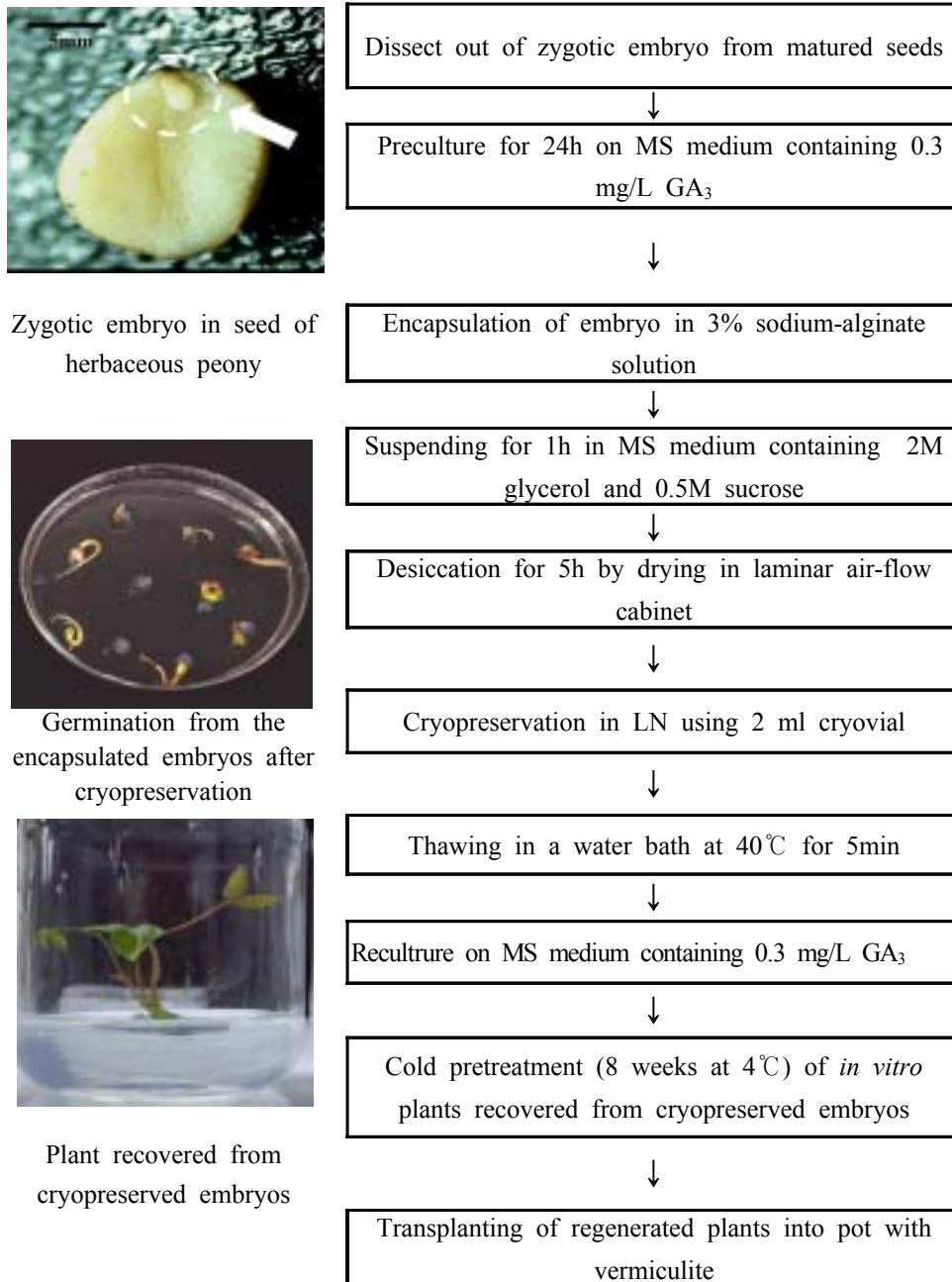


Fig. 16. Cryopreservation procedure of herbaceous peony using zygotic embryos.

## 2) 캘러스를 이용한 초저온 동결보존

작약의 자엽, 뿌리, 하배축 조직에서 얻어진 캘러스와 약 및 화사에서 얻어진 캘러스의 건조시간에 따른 동결보존 후의 생존률을 조사한 바(그림 17), 건조하지 않은 캘러스의 생존률은 비교적 높았으나 건조시간이 경과함에 따라 생존률이 크게 감소하였다. 캘러스를 동결보존 재료로 이용할 경우 동결된 캘러스를 해빙하고 이들 캘러스로부터 배형성을 유도하여야 한다. 그러나 약과 화사 조직배양에서 형성된 캘러스에서는 배가 형성되었으나 그 외 체세포 조직으로부터 얻어진 캘러스에서는 배가 형성되지 않았다.

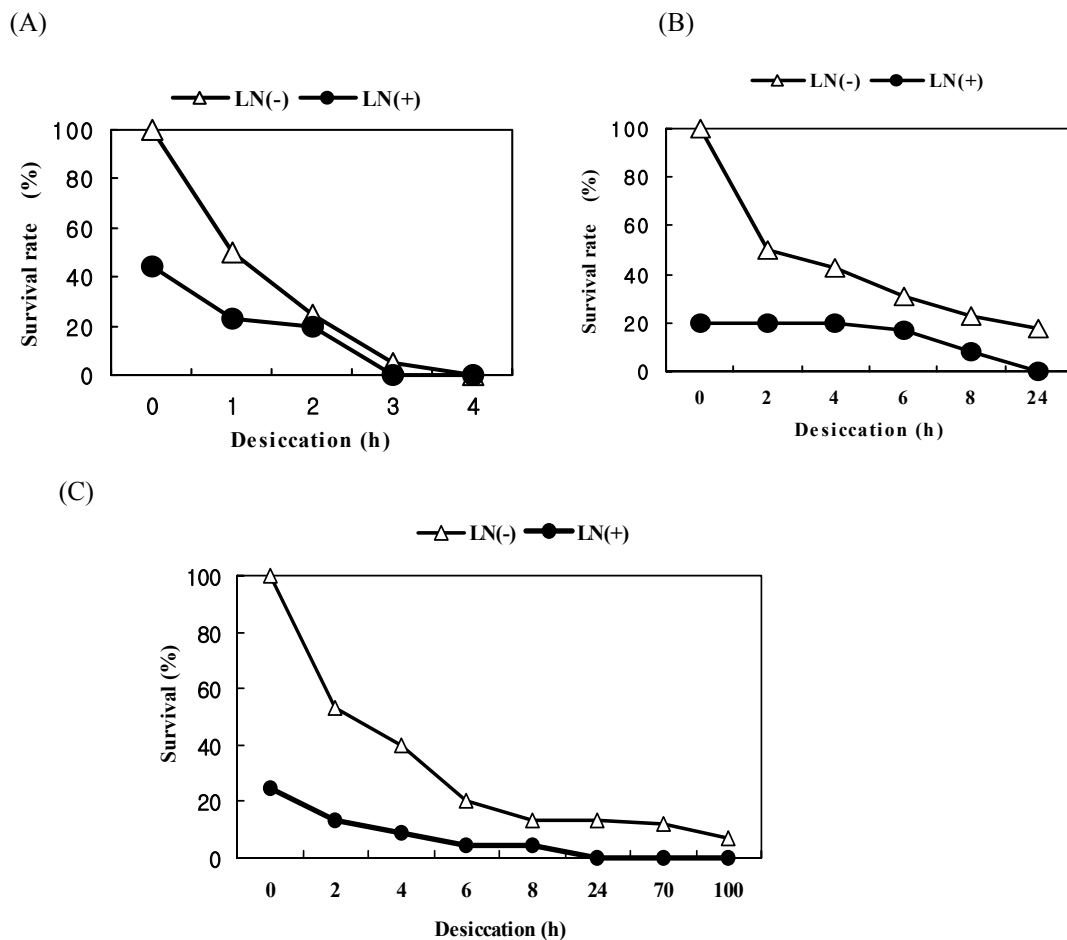


Fig. 17. Survival rate of cryopreserved callus formed from cotyledon, root, hypocotyl tissues (A), anther filament(B) and anther(C)

### 3. 체세포배를 이용한 작약의 초저온 동결보존

#### 가. 연구개발수행 내용

작약의 약과 자엽조직배양에서 형성된 배를 무균상에서 0~2시간 자연건조시킨 다음 -196℃의 액체질소에 1시간 이상 동결보존하고, 40℃에서 5분간 해빙한 후 재생률을 조사하였다. 또한 체세포배의 크기별로 동결보존 후의 생존률도 조사하였다. 체세포배의 크기별 동결보존후 생존률을 조사하기 위하여 자엽조직과 약조직에서 유래한 배를 크기별로 (1~2mm, 2~3mm, 3~5mm) 나누어 접합자배와 같이 동일한 방법으로 실험하여 생존률을 조사하였다. 체세포 배의 재생배지와 배양조건도 접합자배의 경우와 동일하게 실시하였다.

#### 나. 연구개발 결과

자엽조직과 약으로부터 캘러스를 거치지 않고 발생한 배(그림 18)를 크기별로 구분하고 동결보존 후의 생존률을 조사한 결과(그림 19), 자엽조직으로부터 발생한 배의 경우는 배의 크기가 작을수록 생존률이 높은 경향이였다. 그러나 약에서 발생한 배의 경우는 그 크기가 2~3mm 일 때 87.5%의 가장 높은 생존률을 나타내었다. 비교적 자엽에서 발생한 배의 경우 약조직으로부터 유래된 배에 비해 높은 동결보존율을 보이는데 이는 이들 체세포배의 염색체 배수성의 차이에 기인한 것으로 생각되어진다. 자엽에서 유도된 체세포배의 경우 모든 개체가 접합자배와 동일한  $2n=10$ 의 염색체 쌍을 가지는 반면 약에서 유도된 배의 경우는 haploid (55.8%), diploid (31.2%), triploid (1.3%), tetraploid (5.2%) and aneuploid (6.5%)의 다양한 염색체를 포함하고 있다

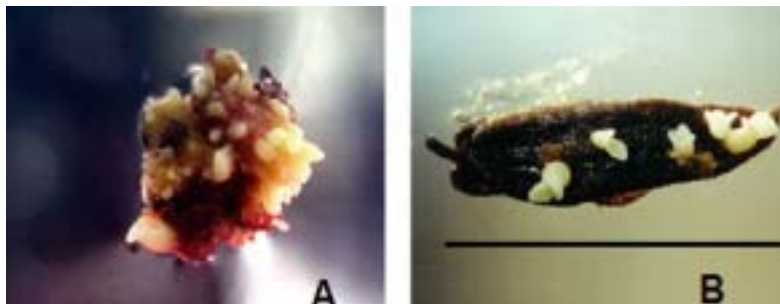


Fig. 18. Somatic embryos formed from cotyledon tissue (A) and anthers (B) of *P. lactiflora* Pall.

Scale bar = 10 mm.



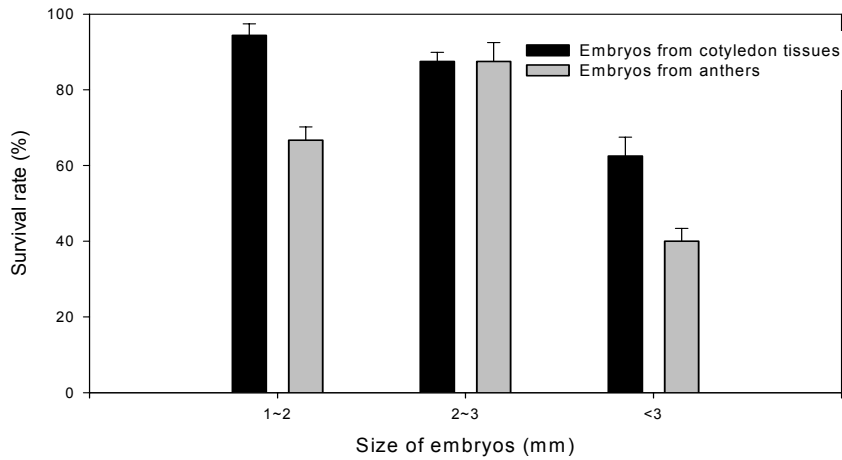


Fig. 19. Effect of embryo size derived from cotyledon tissue and anthers on the cryopreservation of somatic embryos of *P. lactiflora* Pall. In each size of embryos, 30 embryos were tested with three replicates. Bars represent standard error (mean  $\pm$  SE).

2,4-D 1mg/L를 첨가한 MS배지에서 형성된 약유래 캘러스를 MS기본배지에 이식하여 체세포배를 유도하였다. 약캘러스에서 유래한 체세포배를 무균상에서 건조시간별 동결보존 후의 생존률을 조사한 바(그림 20), 1시간 건조된 배에서 65%의 높은 생존률을 나타내었다.

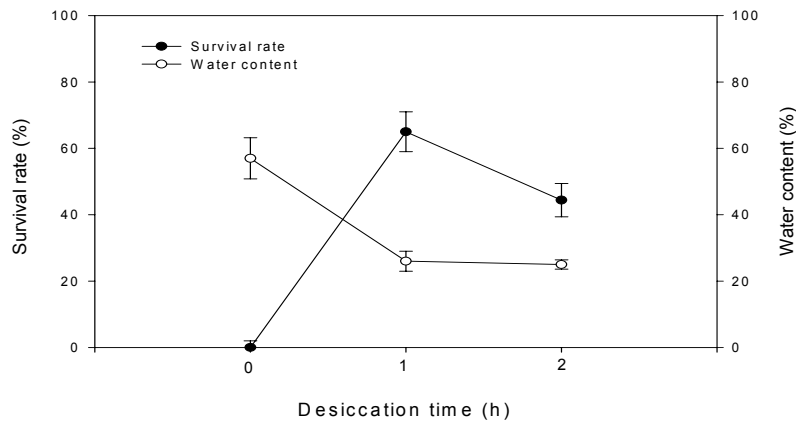


Fig. 20. Changes in the water content and survival rate of cryopreserved somatic embryos of *Paeonia lactiflora* Pall. during desiccation. The somatic embryos (3~5mm) derived from cotyledon tissues were used for cryopreservation. In each treatment, 60 embryos were tested with three replicates. Bars represent standard error (mean  $\pm$  SE).

체세포배의 동결보존 방법별 생존률을 조사하기 위하여 1일간 전배양된 배를 각각 desiccation(1시간 자연건조), PVS2 처리(26°C, 30분), 3%의 sodium alginate로 encapsulation 시켜 5시간 건조처리한 것 등을 동결보존시킨 다음 각각의 생존률을 조사한 결과(그림 21), 건조만으로도 높은 생존률(62%)을 얻을 수 있었으며 encapsulation-desiccation시킨 것에서 80%의 가장 높은 생존률을 나타내었다.

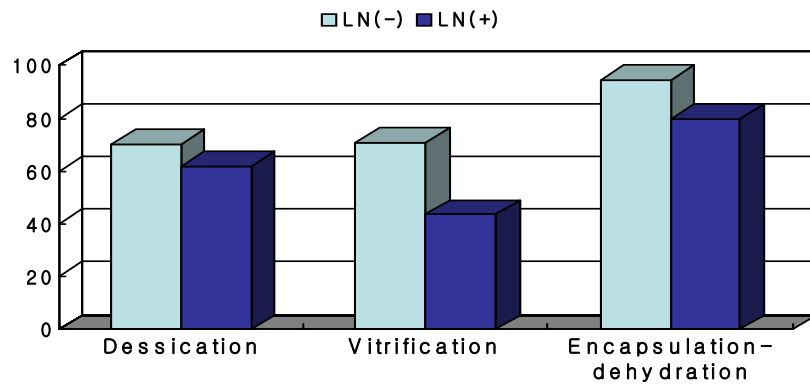


Fig. 21. Effect of desiccation, vitrification, encapsulation-dehydration on survival of non-cryopreserved (-LN) and cryopreserved (+LN) somatic embryos of *P. lactiflora* Pall.

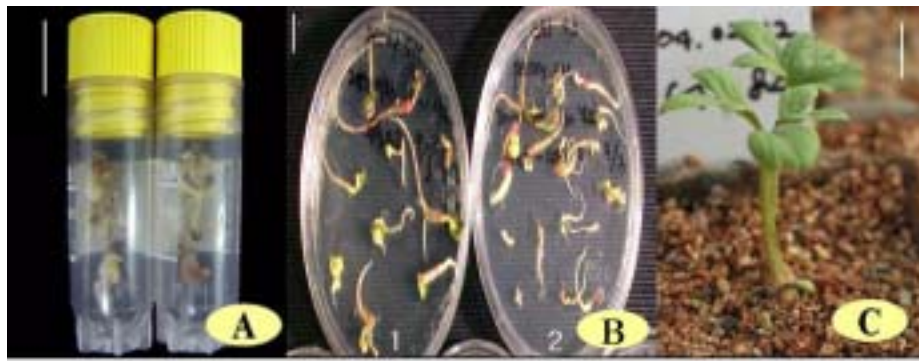


Fig. 22. Plant regeneration from the cryopreserved somatic embryos of *P. lactiflora* Pall. A: Somatic embryos in cryovial, B: Plant regeneration from the non-cryopreserved (B-1) and cryopreserved (B-2) somatic embryos 30 d after transfer to MS medium with 0.3 mg/L of GA<sub>3</sub>, C: A well developed peony plant 2 months after transplanting into pot. Scale bars =10 mm.

작약의 자엽조직이나 약배양에서 형성된 배를 이용한 초저온 동결보존과정을 요약하면 그림 23와 같다. 앞으로 작약의 genotype별 배발생정도, 체세포배의 동결보존방법별 보존효율 등에 관한 실험을 수행하여 체세포배를 이용한 동결보존 방법을 확립하고자 한다.

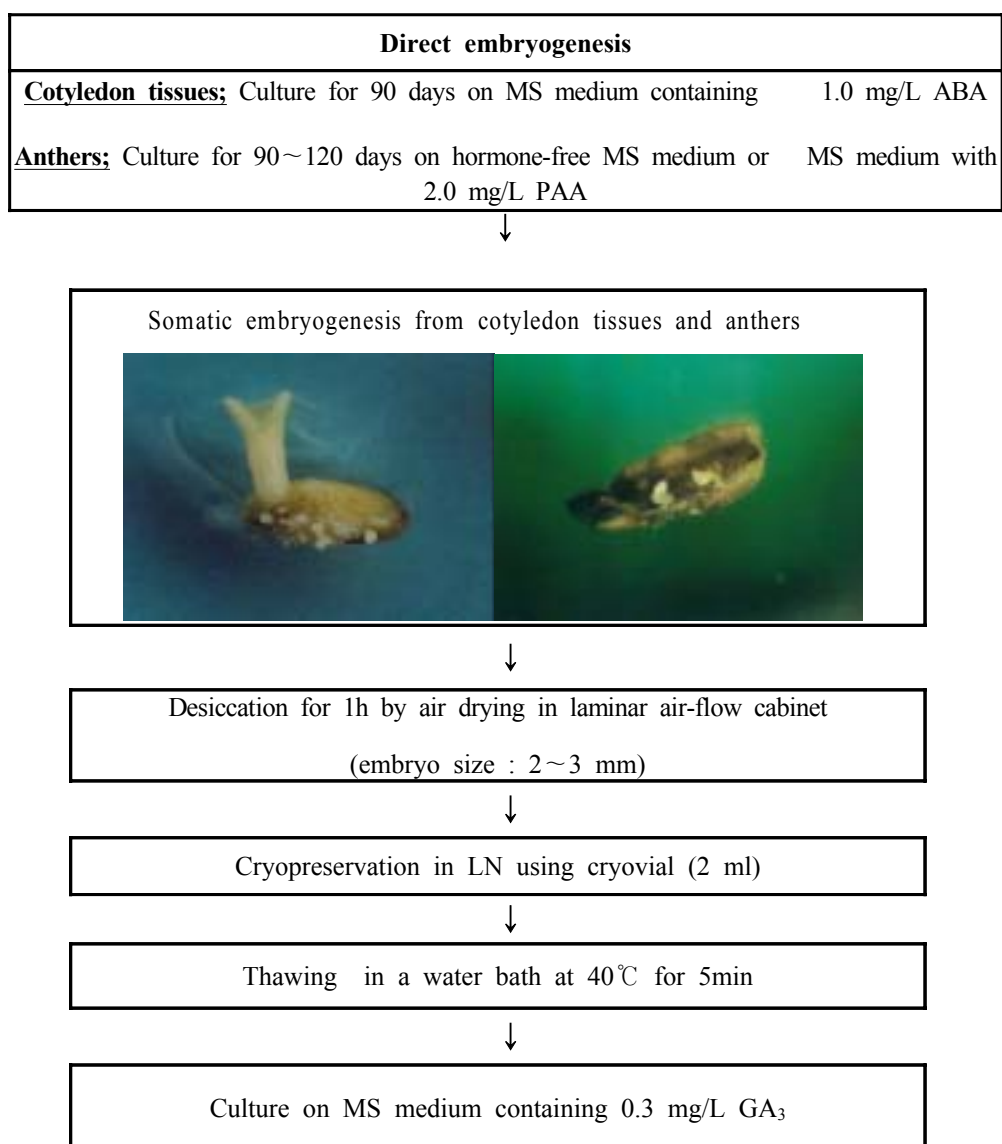


Fig. 23. Cryopreservation procedure of herbaceous peony using somatic embryos.

#### 4. 동아(winter buds)를 이용한 작약의 초저온 동결보존

##### 가. 연구개발수행 내용

작약의 동아를 건조 및 전처리 방법에 따른 동결보존 후의 생존률을 조사하기 위하여 무균상태에서 0~7시간 자연건조하거나 silica gel을 이용하여 건조한 다음 액체질소에 넣어 보존하고 해빙 후 생존률을 비교하였다. 월동전인 11월중순과 월동후인 3월경에 지하부의 동아를 채취하여 채취시기별 동결보존 효율을 비교하였다. 그리고 cryovial size가 동아 동결보존에 미치는 영향을 알아보기 위해서 capsulation된 동아를 1, 2, 5, 15ml의 cryovial을 이용하여 동결보존후 생존율을 조사하였다. 또한 PVS2를 이용한 vitrification방법 과 3% sodium alginate로 encapsulation 시킨 동아를 5시간 건조시켜서 동결보존 후의 생존률을 조사하였으며, 전처리(4℃, 16일)의 유무가 동결보존에 미치는 영향도 조사하였다. 수분함량은 무균상에서 건조시간 경과에 따라 capsulation된 동아의 무게를 측정하고, 이들을 110℃의 건조기에서 24시간 건조시킨 다음 각각의 생체중에 근거하여 측정하였다. 품종별 동아의 동결보존 효율 비교를 위해서 ‘태백, 미강, 사곡, 의성, 거풍’의 5품종의 동아를 5시간 자연건조한 다음 액체질소에 보존하고 해빙 후 생존률을 비교하였다. 동결처리된 동아의 재생을 위해 1.0 mg/L의 GA<sub>3</sub>와 0.5 mg/L의 BAP가 첨가된 MS배지에 배양하였다. 동아의 뿌리형성을 위해서 동결후 4주간 배양한 신초 조직을 다양한 농도(0.01~0.2M)의 NAA가 첨가된 1/4MS, MS배지에 배양하고 신초로부터 뿌리 발생 정도를 조사하였다. 동결보존 후 재생된 개체의 유전적 변이유무를 분석하기 위하여 RAPD 방법을 이용하였는데 동결전후의 동아 조직에서 추출한 genomic DNA를 Primer OPB 13, 14, 15, 16, 17, 19를 이용하여 PCR 하고 이들 산물을 전기 영동하여 밴드 패턴변화를 관찰 하였다. 동결 전 시료로는 동아의 포엽을 사용하였고 동결 후에는 재분화한 식물체를 이용하였다.

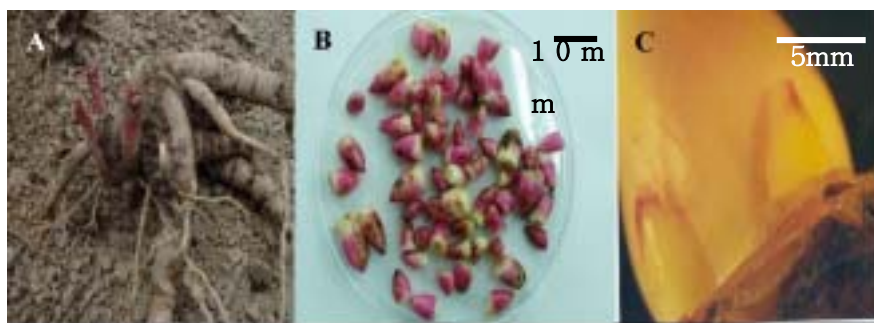


Fig. 24. Crown root(A), winter buds(B) and axillary buds(c) in bracts of winter bud of *P. lactiflora* Pall.

## 나. 연구개발 결과

경북농업기술원 신물질연구소(의성)의 포장에서 11월 중순경에 지상부가 고사한 작약의 지하부 뇌두에서 동아를 채취한 후 무균상에서 5시간 자연건조 한 다음 동결 후의 생존률을 조사한 결과, 건조를 하지 않고 동결한 동아의 경우에는 생존률이 30%이었으나 5시간 건조된 것의 동결 후 생존률이 69.2%로 높게 높았다. 그리고 silica gel을 이용하여 건조하였을 경우에는 자연건조에 비해서 생존률이 낮게 나타났다.(그림 25)

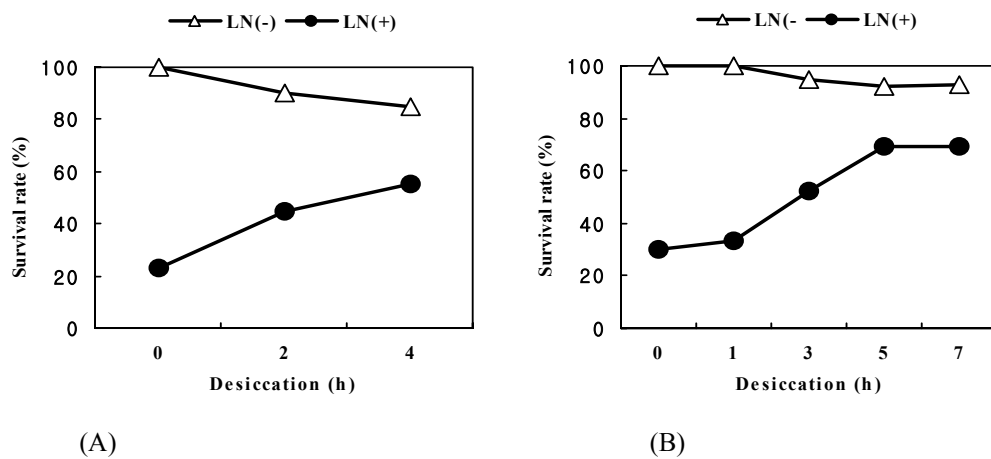


Fig. 25 The survival rate (%) of shoot apices dissected from winter bud by desiccation time with different desiccation methods ; silica gel- drying(A) and air- drying(B).

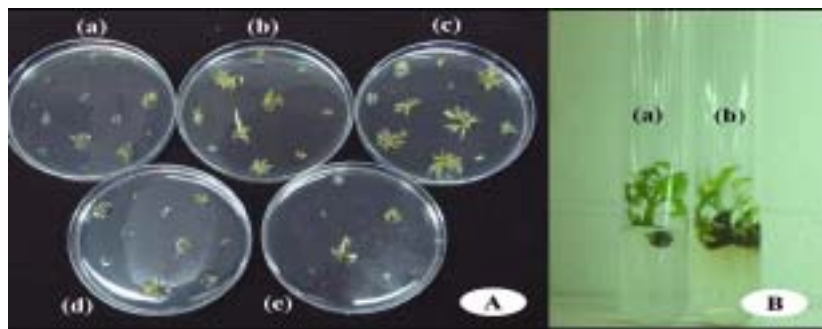


Fig. 26. Growth of cryopreserved shoot-apices by desiccation time(A) and their shoot growth(B)  
 A: Recoverd shoot from air-dried apices during 0(a), 3(b), 5 h(c) and silica gel-dried apice during 2(d), 4 h (e) .  
 B: Shoot growing from non-cryoperserved(a) and cryopreserved apices (b).

채취시기별 동아의 동결보존 후의 생존률을 조사하기 위하여 11월 중순경부터 3월중순경 까지 작약의 지하부로 부터 동아를 채취하여 무균상에서 5시간 건조 후 동결·해동된 개체의 생존률을 조사한 바 (그림 27), 11월에서 2월(월동 전)까지 동아의 생존률이 70% 가까이 높게 나타나는 반면에 3월(월동 후)에 채취한 동아에서는 생존개체가 없었다.

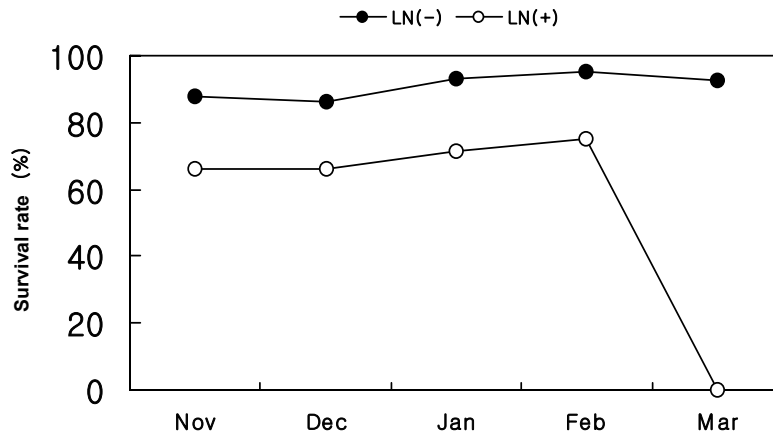


Fig. 27. Seasonal variation of survival rate (%) of cryopreserved shoot-apices in *P. lactiflora* Pall. with different collection periods.

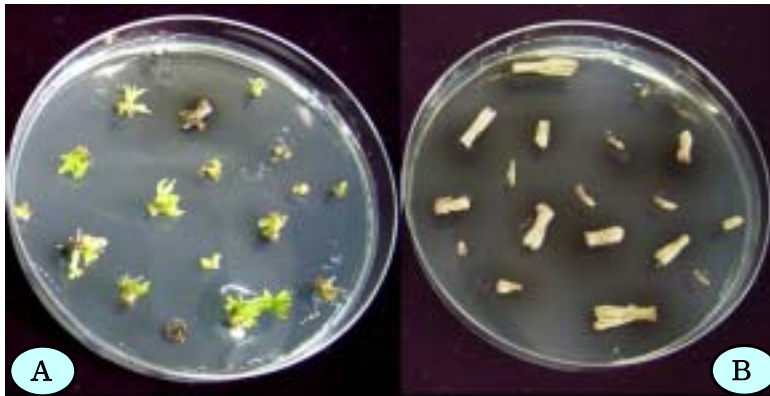


Fig. 28. Comparison of regrowth after cryopreservation of shoot apices excised from November(A) and March(B).

동결보존방법에 따른 동아의 동결보존 후 생존률을 비교해 보기 위해 desiccation(5시간 자연건조), vitrification (PVS2 30분), Encapsulation-dehydration(3% sodium alginate)법으로 동결보존을 수행한 결과 (그림 29) Encapsulation-dehydration법에서 88.1%의 높은 생존률을 보였다.

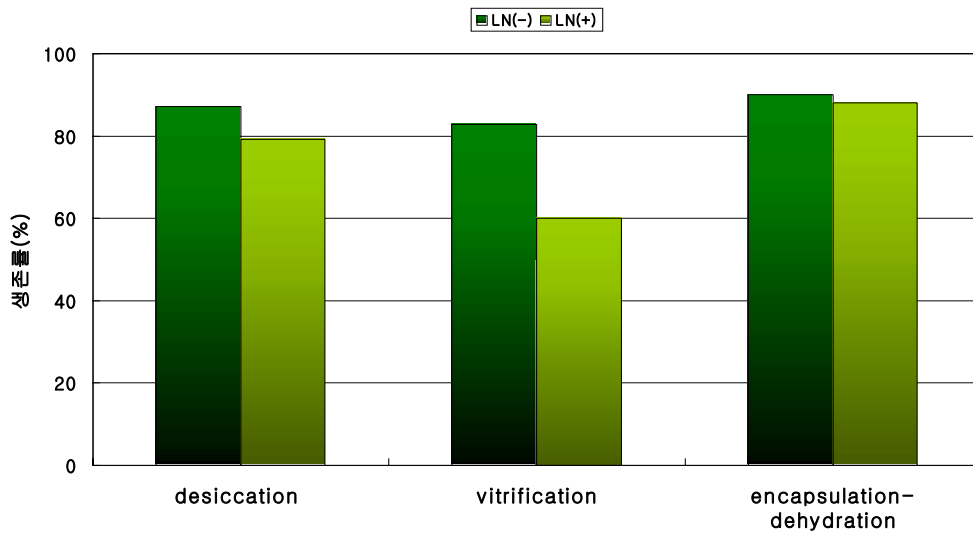


Fig. 29. Effect of desiccation, vitrification, encapsulation-dehydration on survival of non-cryopreserved (-LN) and cryopreserved (+LN) shoot-apices in *P. lactiflora* Pall.

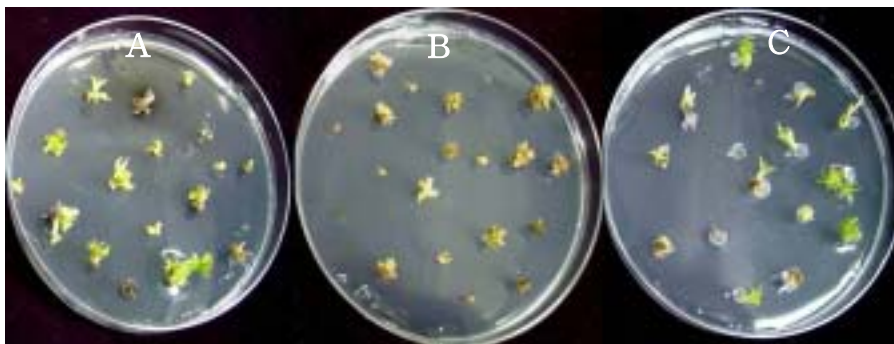


Fig. 30. Shoot growth after cryopreservation of shoot apices pretreated by desiccation(A), vitrification(B), encapsulation-dehydration(C)

Encapsulation-dehydration법을 이용한 동아의 동결보존법에 적정 bead 건조시간 설정을 위하여 3% sodium alginate로 bead화된 동아를 0~7시간 동안 건조시키고 이들을 동결한 다음 생존률을 조사하였다(그림 31). 5시간동안 건조한 bead의 생존률이 86.3%로 가장 높게 나타났다. 3% sodium alginate bead를 이용하여 건조시간이 경과함에 따른 수분함량 변화를 조사한 결과(그림 32), 수분함량이 감소하기 시작해서 가장 높은 동결저항성을 갖는 5시간에서의 수분함량은 28.6%로 나타났다.

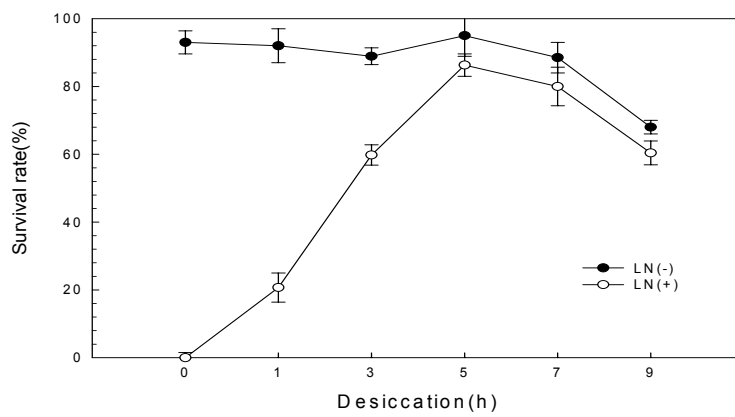


Fig. 31. Effect of desiccation time on survival of encapsulated shoot-apices in *P. lactiflora* Pall. Bars represent standard error.

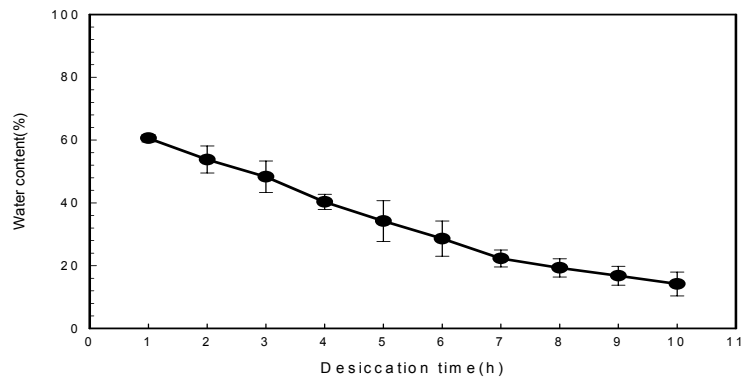


Fig. 32. Changes in water content of the encapsulated shoot-apices from winter buds during desiccation by air drying. Bars represent standard error.



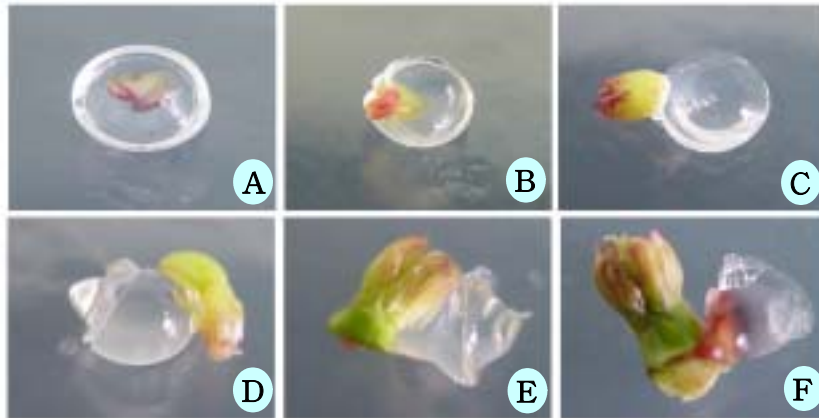


Fig. 33. Shoot growth from cryopreserved apices at 0(A), 5(B), 10(C), D(15), E(20) and 30(F) days after thawing.

동결보존용기의 크기(cryovial size)가 동아 동결보존에 미치는 영향을 알아보기 위해서 capsule화된 동아를 1ml, 2ml, 5ml, 15ml의 cryovial에 넣어 동결보존 후 해동후 생존률을 조사한 결과(그림 34), 1ml, 2ml, 5ml의 cryovial을 사용하여 동결 보존한 동아는 80% 가까운 높은 생존률을 보였으나 15ml cryovial을 이용하여 동결시킨 동아는 58.1%의 다소 낮은 생존률을 보였다.

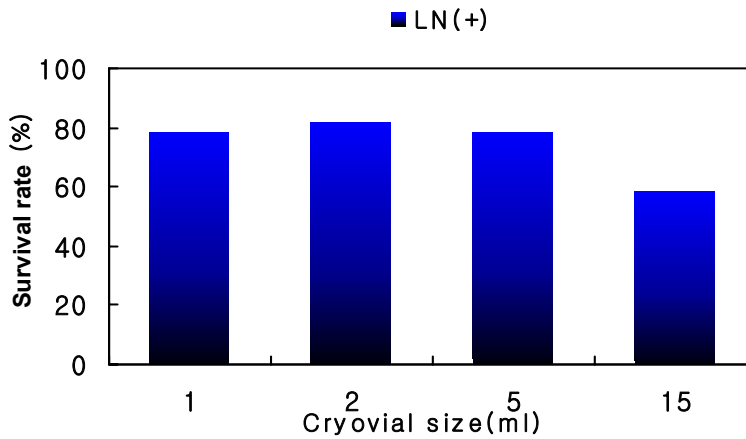


Fig. 34. Effect of cryovial size on survival of cryopreserved shoot-apices of in *P. lactiflora* Pall.

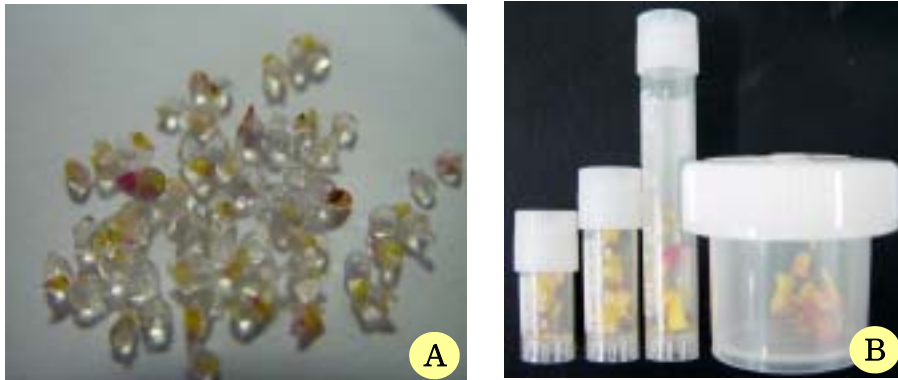


Fig. 35. Capsulated apices of peony(A) and apices in cryovials(B)

경북농업기술원 신물질연구소(의성)의 포장에서 보존되고 있는 태백, 미강, 사곡, 의성, 거풍 작약을 채취하여 5시간 자연건조 후 동결처리하여 genotype간 동결보존 효율을 조사한 결과(표 19), genotype에 따라 동결후의 생존률이 유사하였으나, 미강작약의 경우 다른 품종보다 다소 높은 74.9%의 생존률을 나타내었다(그림 36).

Table 19. Genotypic difference of survival rate of shoot apices cryopreserved at  $-196^{\circ}\text{C}$  by desiccation

Genotype	Survival rate(%)	
	LN(-)	LN(+)
Taebaek	81.8±4.5	53.7±2.6
Mikang	88.1±5.0	74.9±4.7
Sagok	91.9±3.3	55.7±8.4
Uisuong	74.4±6.5	64.2±2.5
Geopung	94.0±7.3	62.4±6.0

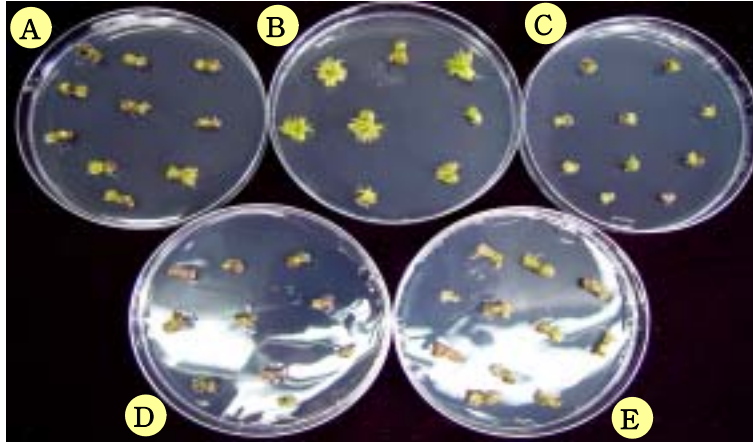


Fig. 36 Comparison of survival of cryopreserved shoot-apices in five cultivars of *P. lactiflora* Pall. (A:Taebaek, B:Mikang, C:Sagok, D:Uisung, E:Geopung-zacyak)

동결한 동아를 해빙시켜  $GA_3(1.0mg/L)$ 와  $BAP(0.5mg/L)$ 가 혼용된 배지에 배양했을 때 shoot 분화가 용이 하였으며, 뿌리분화를 위해서 다양한 농도의 NAA를 첨가한 배지에 재생된 신초를 배양하였다. 그 결과 0.1 mg/L의 NAA가 첨가된 1/4MS 배지에서 20%의 뿌리 분화률을 나타내었다(표 20, 그림 37).

Table 20. Effect of NAA concentration on root formation from cryopreseved shoot-apices of in *P. lactiflora* Pall.

NAA concentration(mg/L)	Root formation(%)
1/4 MS+NAA 0.01	0
1/4 MS+NAA 0.1	20
1/4 MS+NAA 0.2	0
MS+NAA 0.1	0
MS+NAA 0.2	0

\* Root forming medium : 1/4MS medium containing 30g/L of sucrose, 2g/L of gelrite

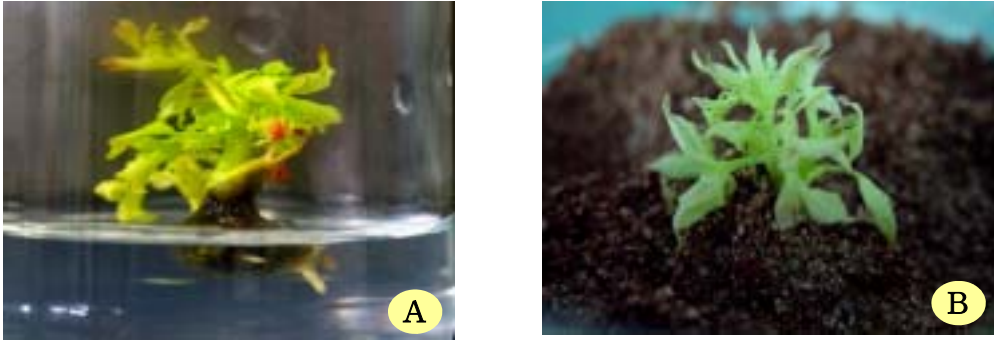


Fig. 37. Root formation from the cryopreserved apices(A) and peony plant(B) developed after transplanting into pots.

동결과정을 통한 재분화 식물체의 변이 조사를 조사하기 위해서 동결 전에 동아에서 얻은 포엽과 동결 후 정아를 RAPD 분석법을 이용하여 분석 하였다. Primer는 OPB 13, 14, 15, 16, 17, 19를 이용하여 비교한 결과(그림 38), 대부분의 major band 들이 일치하였다. 이와 같이 동결 후 재생된 개체는 동결 전과 동일함을 알 수 있다.

Primer : OPB13    OPB14    OPB15    OPB16    OPB17    OPB19

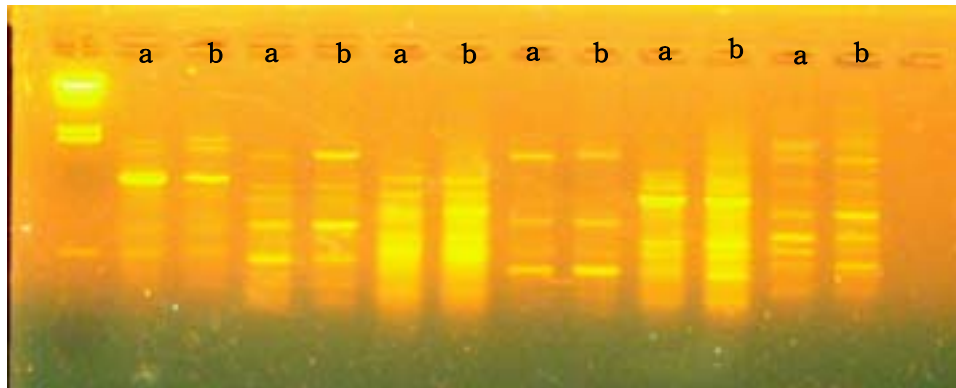


Fig 38. Analyze of genetic variation between non-cryopreserved(a) and cryopreserved shoot-apices(b) of peony using RAPD marker.

작약의 동아를 이용한 초저온 동결보존과정을 요약하면 그림 39와 같다.

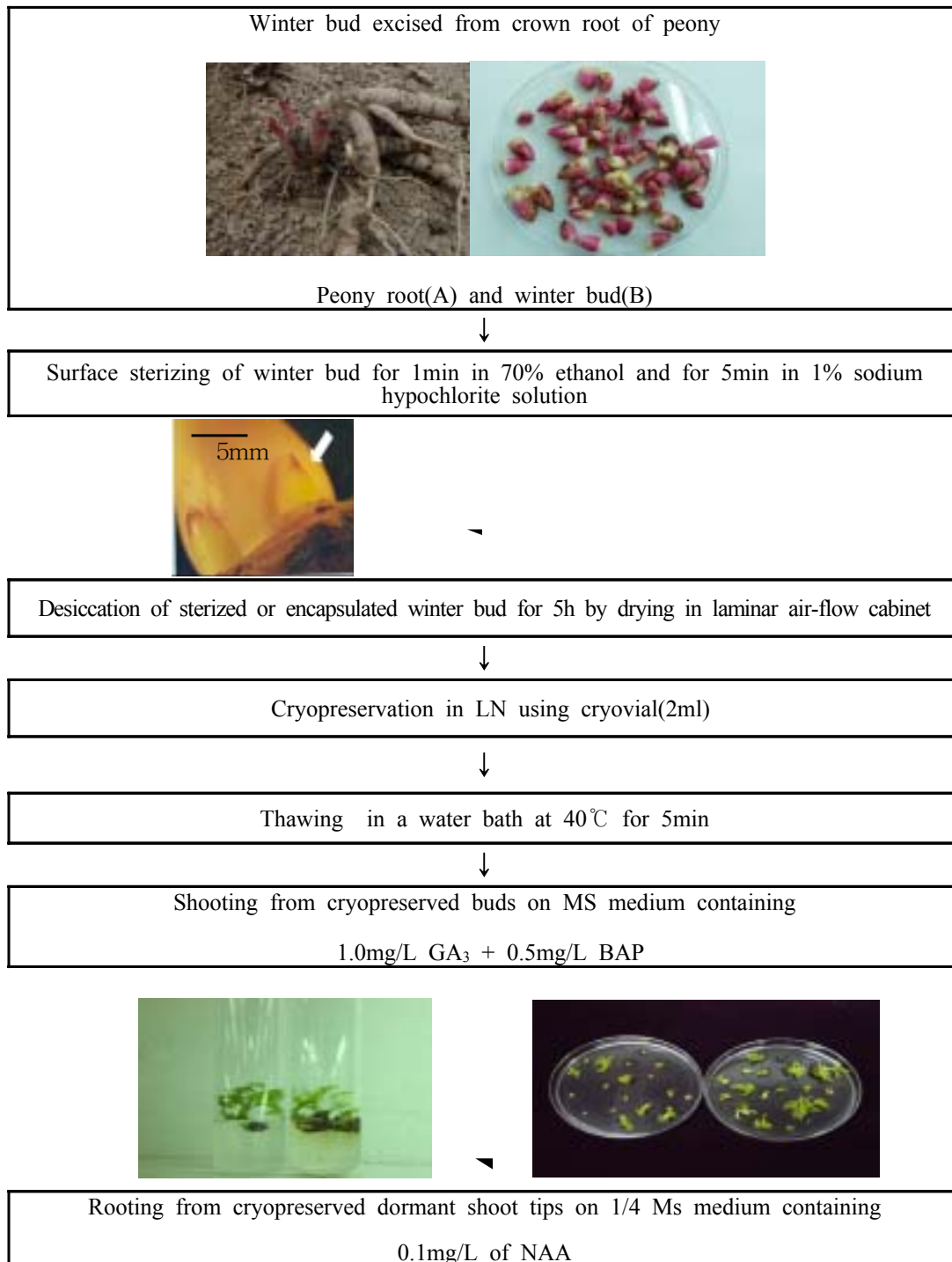


Fig. 39. Cryopreservation procedure of herbaceous peony using apices of winter buds.

## 제 2 절 마(*Dioscorea* spp.)의 초저온 동결보존 방법 확립

### 1. 마 액아조직을 이용한 초저온 동결보존

#### 가. 연구개발수행 내용

1) 마 액아 분열조직배양을 통한 기내배양묘 육성 : 경북농업기술원 생물자원연구소의 마 유전자원 포장에서 유지·보존중인 마(*Dioscorea* spp.)자원 중 괴경의 형태가 긴 장마, 곧봉형태인 단마, 둥근형태의 둥근마를 재료로 이용하였다. 7월 상순에서 8월 중순까지 공시품종의 지상부 액아 분열조직을 절취하여 BAP, kinetin가 단용 혹은 혼용 처리된 MS 배지에 배양하여 26±1℃가 유지되는 항온실에서 명배양(1200 lux)하였다.

보존에 사용할 재료의 적정크기를 설정하기 위한 실험에서 액아크기에 따른 배양반응을 조사하였는데, 둥근마의 기내배양묘로부터 크기가 1mm이하 되는 액아와 1~3mm크기의 액아를 이들 재료가 묘에서 차지하는 위치별로 상부, 중부, 하부로 구분하여 kinetin (0.5mg/L)이 함유된 MS 배지에 배양하여 위의 실험과 동일한 조건에서 40일간 배양하면서 신초 및 뿌리의 형성률과 배양재료별 배양경과에 따른 신초 신장 정도를 조사하였다. 액아배양에서 분화된 유묘의 마디조직을 배양하여 개체수를 기내 증식하고 이들 기내 배양묘로부터 크기가 1mm이하 되는 액아만을 절취하여 동결보존 재료로 이용하였다.

2) 재료의 건조 및 동결저항성 조사 : 재료의 종류별로 건조시간경과에 따른 생존률을 조사하기 위하여 포장상태에서 자란 장마, 단마, 둥근마의 지상부로부터 절취한 액아와 이들 마 종류별로 기내에서 배양된 묘의 액아를 각각 여과지를 깔 샤레 위에 배열하여 무균상에서 수분간 air-dry하면서 건조시간별로 생존률을 조사하였다. 건조 처리된 재료를 BAP와 kinetin이 각각 0.5mg/L씩 첨가된 MS 배지에 60일간 배양하면서 각 처리별 재생률을 비교하였다. 이들 재료는 동시에 액체질소에 1시간 이상 보존후 40℃에서 5분간해동 배양후 생존률을 조사하였다.

3) 초저온 동결보존 방법 선발 : 마 기내배양 묘의 액아조직을 재료로 preculture- dehydration, encapsulation-desiccation, vitrification, encapsulation-vitrification 법으로 동결보존을 수행하였다.

**Preculture dehydration** 법 : Sucrose의 농도가 0.3~0.6 M인 MS 기본배지에서 0~48시간 전배양

후 -196℃의 액체질소에 급속 동결하고 1시간 후 40℃ 수조에 5분간 해빙 후 kinetin (0.2 mg/L)과 BAP (0.2 mg/L)가 첨가된 MS배지에 명상태로 배양 (26±1℃)하면서 정상적인 성장여부를 조사하였다.

**Encapsulation-desiccation 법** : 액아조직을 MS 배지에서 1일간 전배양후 3% sodium alginate를 이용하여 직경 5 mm 미만의 bead로 만들어 0.5 M의 sucrose와 2M의 glycerol이 포함된 액체 배지에 1시간 200 rpm의 속도로 loading 하고 무균상에서 0~8시간 건조, 동결보존 후 재생 정도를 조사하였다. 액체 질소 내 저장 기간과 해빙후의 처리는 preculture-dehydration과 동일한 방법으로 수행하였다.

**Vitrification 법** : 0.3M의 sucrose가 함유된 MS 기본 고체배지에서 1일 전배양된 재료를 상온에서 동결보존용액(PVS I, II, III, IV)에 30분간 처리하고 동결 보존하였다. 해빙과 동시에 20분 정도 1.2 M의 sucrose 용액에 loading하여 vitrification 용액을 제거하고 kinetin (0.2mg/L)과 BAP (0.2mg/L)가 첨가된 MS기본배지에서 정상적인 성장여부를 조사하였다.

**Encapsulation-vitrification 법** : Encapsulation-dehydration 법과 vitrification법을 동시에 사용하는 방법으로 캡슐화된 액아를 3.5시간 건조 후 PVS2용액에 처리하여 동결보존 하였다.

#### 4) 동결보존 과정 중 각 단계별 조건 구명

이상의 실험에서 선발된 동결보존법인 encapsulation-desiccation method을 기본으로 동결조직의 생존률을 높이기 위하여 전 배양단계에서 배지내 삼투압 조절물질의 농도(sucrose와 sorbitol; 0.3~0.6M), 전배양 기간 및 일장조건(16hr, 24hr), 전배양 배지내 stress 호르몬의 처리 등이 동결보존에 미치는 영향을 조사하였다. 보존재료(apices size), bead의 건조시간, 동결방법(rapid, slow freezing) 및 해빙조건(25~40℃)에 따른 동결보존 후의 생존률도 비교하였다. 해빙후 재생과정에서는 재생배지내의 조절물질의 처리(sorbitol 0.3M), 기간(1~4일) 및 광조건등이 동결후 생존에 미치는 영향을 조사하였으며, 또한 동결보존 기간(0~3개월)에 따른 생존률 변화 여부도 조사하였다. 액체질소에 보관되었던 재료는 40℃의 water bath에서 3~5분간 해동하고 0.2 mg/L의 BAP와 0.2 mg/L kinetin 이 첨가된 MS 배지에 배양하였다. 동결 처리후 생존률은 배양 60일 경과 후 처리된 개체중 shoot를 형성한 개체를 조사한 수치로 나타내었으며 26℃의 실온에서 완만 해동(9분)하거나 40, 50℃에서 3분정도 해빙하여 동결후 생존률을 조사하였다. 캘러스, 부정아 혹은 신초발생등의 특성은 모든개체를 대상으로 조사하였으며 시험처리는 완전임의 배치로 처리당 5반복으로 실시하여 얻어진 결과를 Duncan's test로 분석하였다. 동결보존된 재료의 생존률 또한 모든 처리 개체를 대상으로 조사하였다. 또한 동근마를 재료로 동결보존

유무에 따른 유전적 변이를 RAPD법을 이용하여 분석하였는데, 동결 전후의 재료 genomic DNA를 SRILS사의 UniPrimerKit II 12(20 mer)종을 사용하여 증폭하였으며 PCR 조건은 94℃에서 4분간 유지 후 94℃ 1분, 55℃ 1분 72℃ 2분을 반복하여 35 cycle 수행하고 72℃에서 7분간 안정화 시킨 후 4℃로 cooling 시켰다. PCR 증폭산물은 1.2%의 agarose gel에 전개하여 동결유무에 따른 밴드 패턴 변화를 조사하였다.

#### 5) 마의 genotype별 동결보존 방법에 따른 효율 비교

경북농업기술원 생물자원 연구소의 포장에서 유지보존되고 있는 다양한 마(둥근마, 단마, 세장방추형 야생마, 일본중마; *D. japonica*)의 경정조직 배양을 통해 식물체를 획득하고 이들 식물체의 마디부위를 일정주기로 계대 배양하여 개체수를 확보하였다. 이들 개체의 액아분열조직 부위를 절취하여 위 실험에서 선발된 동결보존방법으로 보존한 후 genotype간 효율을 비교하였다. 생장점 배양과 마디배양 효율이 낮고, 자연상태에서 종자 형성이 가능한 두 종류의 야생마(*Dioscorea nipponica* ; 부채마, *D. opposita* 중 세장방추형의 야생마)에 대해서는 접합자배의 동결보존 재료로서의 이용가능성을 알아보기 위하여 접합자 초저온 초저온 동결보존에 적합한 조건을 구명하였다.

### 나. 연구개발 결과

#### 1) 동결보존에 필요한 식물재료의 획득

마 액아 분열조직배양을 통한 기내배양묘 육성 : 서로 다른 괴경 형태를 보이는 *D. batatas*의 세 유전자원의 지상부에서 절취한 액아 분열조직을 다양한 생장조절제의 조성으로 이루어진 배지에 배양한 결과(표 1), 단마와 장마의 경우 거의 동일한 배양반응을 보였으며, BAP가 단용되거나 BAP와 2,4-D 혹은 BAP와 kinetin이 혼용 처리된 배지에서 부정아나 신초의 발생율이 높았으며, 낮은 농도의 NAA와 kinetin이 함께 처리된 배지에서도 부정아와 신초발생이 높게 나타났다. 둥근마의 경우도 장마, 단마에서와 같이 BAP가 단용 처리되거나 BAP가 2,4-D 혹은 kinetin과 혼용처리된 구에서 부정아와 신초발생이 현저하였으며, 낮은 농도의 NAA, kinetin 혼용처리구 역시 효과적인 것으로 나타났다. 둥근마의 경우는 NAA와 BAP 혼용 처리구에서도 부정아 발생이 두드러졌다.



Table 1, Effect of growth regulators on organ formation from shoot apices on three yam genotypes

Genotype	Growth regulators (mg/L)	Callus formation		Bud formation		Shoot growth	
		%	degree (+~+++)	%	degree (+~+++)	%	shoot length (cm)
Db004 (Jang-ma)	Control	-	-	-	-	-	-
	BAP 0.2	-	-	94	+	55	0.5
	kinetin 0.2	-	-	20	+	30	1.4
	BAP 0.2, kinetin 0.2	16	+	88	++	50	0.4
	2,4-D 0.2, BAP 0.2	50	+++	85	++	45	0.5
	2,4-D 0.5, BAP 0.5	66	++	68	+	-	-
	2,4-D 0.2, kinetin 0.2	92	+++ (NE)	45	+	20	1.2
	2,4-D 0.5, kinetin 0.5	70	++	-	-	-	-
	NAA0.01, kinetin 0.2	56	++	78	++	52	0.9
	NAA 0.05, kinetin 0.5	100	+	55	+	-	-
	NAA 0.05, BAP 0.5	74	+	24	+	-	-
	NAA 0.05, BAP 1	34	+	20	+	-	-
	NAA 0.1, BAP 0.5	89	+	13	+	5	0.4
	NAA 0.1, BAP 1	64	+	4	+	-	-
	NAA0.05, BAP0.5, kinetin0.5	92	+	3	+	4	1.2
	2,4-D0.5, BAP 0.5, kinetin 0.5	86	+	15	+	-	-
Mal (Dan-ma)	Control	-	-	-	-	-	-
	BAP 0.2	-	-	98	+	60	0.5
	kinetin 0.2	-	-	22	+	28	1.4
	BAP 0.2, kinetin 0.2	18	+	96	++	40	0.3
	2,4-D 0.2, BAP 0.2	66	+++	84	++	40	0.3
	2,4-D 0.5, BAP 0.5	70	++	73	+	-	-
	2,4-D 0.2, kinetin 0.2	90	+++ (NE)	54	+	14	1.1
	2,4-D 0.5, kinetin 0.5	70	++	-	-	-	-
	NAA0.01, kinetin 0.2	50	++	77	++	50	0.9
	NAA 0.05, kinetin 0.5	100	+	50	+	-	-
	NAA0.05, BAP 0.5	77	+	24	+	-	-
	NAA 0.05, BAP 1	40	+	15	+	-	-
	NAA 0.1, BAP 0.5	93	+	10	+	3	0.4
	NAA 0.1, BAP 1	68	+	5	+	-	-
	NAA0.05, BAP0.5, kinetin0.5	90	+	3	+	3	1.0
	2,4-D0.5, BAP 0.5, kinetin 0.5	80	+	20	+	-	-

continued table 1.

Genotype	Growth regulators (mg/L)	Callus formation		Bud formation		Shoot growth	
		%	degree (+~+++)	%	degree (+~+++)	%	shoot length (cm)
Db037 (Dunggun- ma)	Control	-	-	90	-	-	-
	BAP 0.2	2.6	+	100	+	80	0.5
	kinetin 0.2	-	-	100	+	-	-
	BAP 0.2, kinetin 0.2	0	-	90	++	85	0.6
	2,4-D 0.2, BAP 0.2	73	++	87	++	10	0.7
	2,4-D 0.5, BAP 0.5	70	++	56	+++	-	-
	2,4-D 0.2, kinetin 0.2	98	+++	18	+	0	-
	2,4-D 0.5, kinetin 0.5	100	+++	-	-	-	-
	NAA 0.01, kinetin 0.2	50	+	98	++	5	1.3
	NAA 0.05, kinetin 0.5	100	++	70	+	-	-
	NAA 0.05, BAP 0.5	73	+	60	+++	-	-
	NAA 0.05, BAP 1	46	+	77	+++	-	-
	NAA 0.1, BAP 0.5	77	+	47	+	23	1.2
	NAA 0.1, BAP 1	77	+	33	+++	-	-
	NAA0.05, BAP0.5, kinetin0.5	80	+	65	+++	-	-
2,4-D0.5, BAP 0.5, kinetin 0.5	77	+	53	+	-	-	

\*<sup>a</sup> Degree : - none, + rare, ++ moderate, +++ good

마의 정단 분열조직은 옥신과 사이토키닌이 함유된 배지에서 배양 40일 후 신초, 부정아 혹은 캘러스를 형성하였는데(그림 1) 0.2 mg/L의 kinetin 첨가구에서는 신초가(1-A), 0.5 mg/L의 2,4-D 혹은 0.05 mg/L의 NAA 등 옥신이 첨가된 배지에서는 캘러스 혹은 캘러스와 신초가 동시에 형성되었다(1-B). 둥근마(Db037)의 경우 비교적 낮은 농도의 옥신과 사이토키닌으로 구성된 배지에서 다수의 부정아와 신초들로 구성된 번식체를 형성하였다(1-C). 경정조직으로부터 다수의 부정아를 유도하는 기내 대량번식 방법은 마(*D. batatas*)의 주요한 번식 방법이 될 수 있을 것이다.

경정 조직배양은 바이러스 무병종서 생산 목적 외에 대량번식의 수단으로서 유용하게 사용되어 질수 있는데 마에서의 조직배양법은 수년간 유전적인 변이 없이 개체를 번식시키는 수단으로 사용되어져 왔으며 배양된 신초 자체만으로 유전자원의 보존이나 유전자원의 안정적인 교환의 실물로 사용되어질 수 있다는 장점을 가지고 있다.



Fig. 1. Shoot (A), callus and shoot (B) and multi-propagules (C) formed 40 days after the shoot-apex culture of a yam cultivar 'Db037'.

기내에서 배양의 효율은 배양배지내 첨가되는 조성물의 차이에도 많은 영향을 받지만 배양 재료나, 배양 환경 등의 영향 또한 크게 받는다. 동근마 기내배양묘의 마디로부터 크기가 1mm이하되는 액아와 1~3mm 크기의 액아로 나누어 절취 배양한 결과(그림 2), 모든 배양체에서 100%의 신초형성을 보였는데, 배양속도는 배양체의 크기와 채취부위에 따라 다소 차이를 보였다. 신초의 신장 속도는 배양체의 채취부위 보다 배양 재료의 크기에 따른 차이가 두드러졌다. 하지만 이들 재료로 동결보존 할 경우(by encapsulation-dehydration method) 1m 이상의 큰 재료의 동결보존 효율이 비교적 작은 크기의 재료에 비해 급격히 낮아지는 경향을 보였다(그림 3).

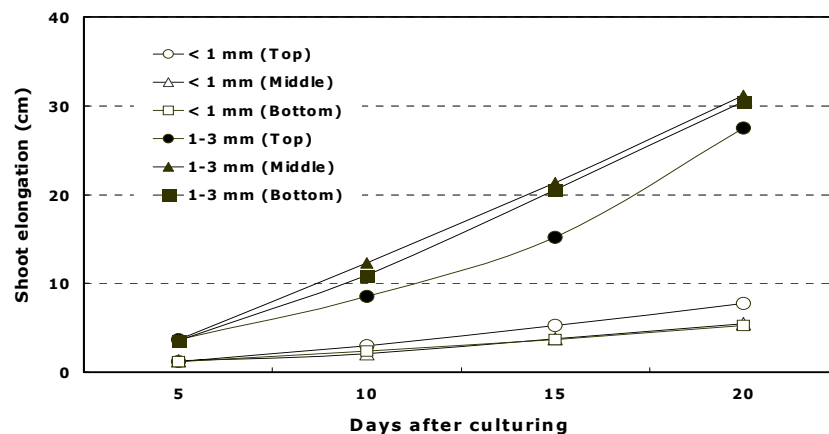
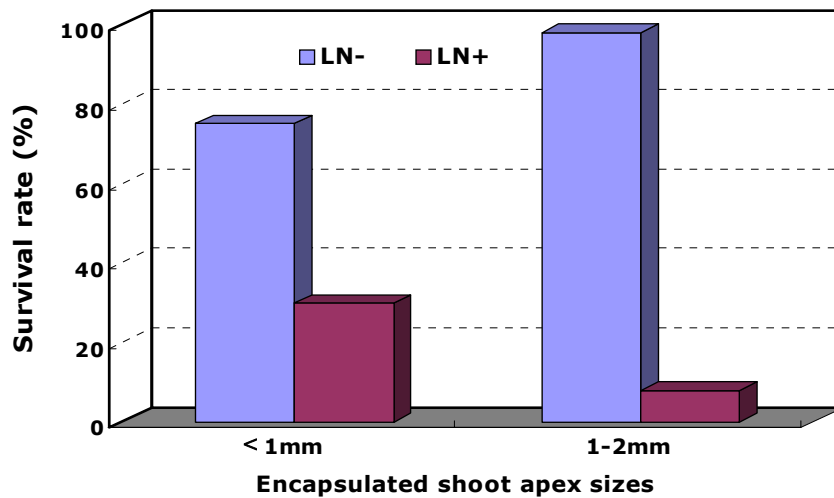


Fig. 2. Effect of apex size and location on shoot elongation of *D. batatas* cv. 'Db037'.



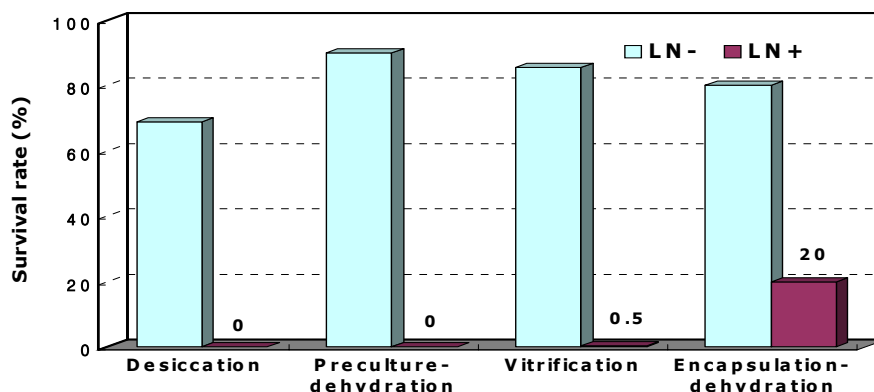
**Fig. 3.** Effect of shoot-apex sizes on the survival of the control (-LN) and cryopreserved (+LN) apices of *D. batatas* by encapsulation-dehydration. Encapsulated shoot-apices preconditioned with 0.3M of sucrose were encapsulated with 3% Na-alginate. The precultured beads were dehydrated by air drying in a laminar flow cabinet for 4 h at room temperature.

## 2) 초저온 동결보존 방법 선발

마의 성공적인 초저온 동결보존을 위하여 air-dry를 이용한 재료의 건조(desiccation), 삼투 조절물질 처리(preculture-dehydration), 동결보존물질 처리(vitrification), 3% Na-alginate로 캡슐화하여 건조(encapsulation-dehydration)등의 방법을 활용하여 동결건조 방법별 효율을 조사한 결과(그림 4), 캡슐화 건조법으로 처리한 재료에서 20%의 생존률을 보였으며 동결보존물질인 PVS2용액을 처리한구에서 0.5%의 낮은 생존률을 보일뿐 나머지 처리에서는 동결후 생존 개체를 확인할 수 없었다.

**건조처리를 이용한 마 액아의 동결보존(Desiccation techniques) :** 재료의 동결에대한 내성은 재료의 genotype, 생육환경, 생육단계 배양부위, 배양부위의 크기 등 다양한 요인들에 의해 차이를 보이는데 마의 종류별로 기내와 기외의 서로 다른 생육환경에서 절취한 재료의 건조 후 재생률을 조사한 결과(그림 5), 기내에서 자란 신초조직이 기외에서 절취한 조직에 비해 건조 후 재생률이 높게 나타났다. 포장에서 채취된 액아의 건조 저항성을 조사하고자 경북농업기술원 생물자원연구소의 마 유

전자원포에서 유지·보존 중인 마 유전자원 중 장마, 단마, 둥근마의 지상부를 채취하여 표면 소독 후 액아부위를 절취하여 액아 분열조직을 둘러싼 몇 겹의 포엽을 제거하고 건조한 후 저항성 조사 재료로 이용하였다. 액아 건조시간 경과에 따른 생존률과 배양반응을 조사한 결과 장마는 40분, 단마의 경우는 50분 건조에서 각각 재생률이 0%에 이른 반면, 둥근마의 액아는 50분 건조에서도 30%의 비교적 높은 생존률을 보였다. 기내 배양된 묘에서 채취된 액아의 건조 저항성은 포장 재료에서 보다 건조 경과에 따른 저항성이 높게 나타났는데 단마의 액아는 90분 건조에서 재생률이 8% 까지 낮아졌으며, 둥근마의 경우는 90분간의 건조에도 23%의 높은 생존률을 나타내었다. 기내 재료는 기외 재료보다 비교적 동일한 조건에서 재료를 확보할수 있으므로 크기나 구성물질 등의 면에서 동일한 상태의 재료를 대향확보 할수 있다는 장점을 가지므로 동결보존의 재료로 적합한 것으로 판단 되어 진다.



**Fig. 4.** Survival rate (%) of apices of *D. batatas* cv. 'Db037' cryopreserved at  $-196^{\circ}\text{C}$  by four different cryopreservation techniques.

**Desiccation techniques:** Shoot apices excised from *in vitro* grown plantlets were dried in the air stream of a laminar flow cabinet for 40 min before being plunged into LN.

**Preculture-dehydration techniques:** Shoot apices precultured in a MS medium containing 0.3M of sucrose for one day before being plunged into LN.

**Vitrification techniques:** Precultured apices were treated in PVS2 for 30 min before being plunged into LN.

**Encapsulation-dehydration techniques:** Shoot apices were precultured on a solidified MS medium with 0.3M of sucrose for one day. The encapsulated shoot-apices were dehydrated by air drying in a laminar flow cabinet at room temperature for 4 h before being plunged into LN.

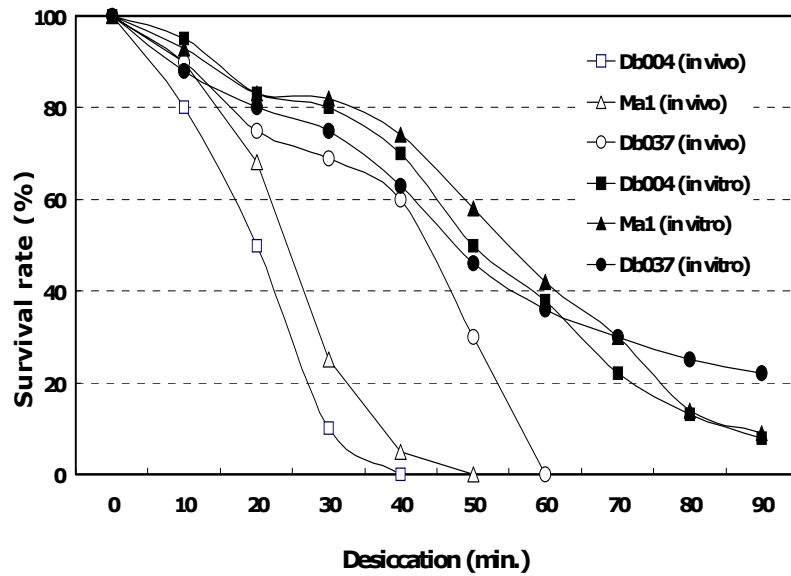


Fig. 5. Survival rate of dried apices excised from *in vitro* or *in vivo* grown plantlets in three different genotypes of yam.

상기의 건조 처리된 액아를 액체질소에서 동결, 해동 후 재생배지에 배양한 경우 genotype 이나 생육환경별 전 재료에서 생존개체가 나타나지 않아(자료 미제시) 마를 재료로한 동결보존 은 건조 이외의 처리가 가해져야 할 것으로 생각된다.

**삼투조절물질 처리를 통한 마의 초저온 동결보존(Preculture-dehydration technique) :** Sucrose의 농도가 0.6M인 MS 기본배지에서 0~48시간 전배양 후 0.2mg/L의 kinetin과 0.2 mg/L의 BAP가 첨가된 MS배지에 배양하여 30일 후 정상적인 성장여부를 조사한 결과, 2~4시간 정도 짧게 전배양한 재료의 생존률이 전배양하지 않거나 6시간 이상 전배양한 액아의 생존률에 비해 낮게 나타났다(그림 6-A). 재생된 개체의 신초 길이는 6시간 까지 전배양 시간이 길어질수록 짧아졌으나 24시간 이상 전배양한 경우 다시 길어지는 경향이었으며, 24시간 전배양한 액아에서 신초형성률이 80%로 가장 높게 나타났다(그림 6 -B).

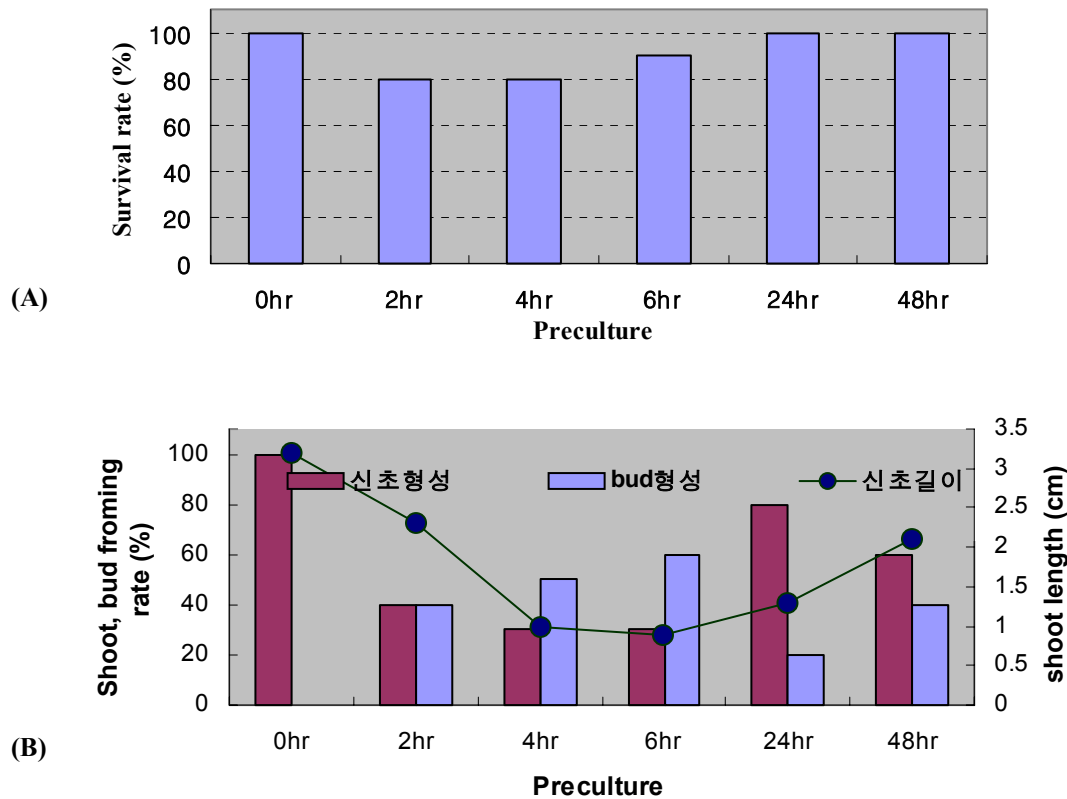


Fig. 6. Effect of preculture duration on 0.6 M of sucrose for survival(A), organ formation and shoot growth (B) of shoot apices of *D. batatas* Db037

식물재료의 세포내에 포함된 다량의 수분은 동결보존에서 동결저항성을 획득에 있어서 negative 요인으로 작용하므로 동결과정에서 발생하는 세포내의 수분에 의한 세포결빙 현상을 막기 위해 건조(desiccation)나 삼투압 조절물질 처리등의 인위적인 처리가 필요하다(Meryman et al., 1977; Mazur, 1984).. 전배양 배지내 sucrose농도와 전배양 기간이 마 액아조직의 생장과 동결 후 생존에 미치는 영향을 조사하기 위하여 등근마와 장마의 기내 액아조직을 0.3M과 0.6M의 sucrose가 첨가된 MS 배지에 1~3일 간 전배양하고 동결보존 전후의 생존률을 조사한 결과(표 2), 장마의 액아조직을 0.6M의 sucrose가 첨가된 배지에 전배양한 경우를 제외한 모든 처리구에서 90% 이상의 높은 생존률을 나타내었다. 그러나 이들 모든 재료에

서 동결보존 후 생존된 개체는 획득할 수 없었다(자료 미제시). 이 실험 결과에서 위의 건조 처리 (desiccation)에서와 동일하게 preculture-dehydration 처리 만으로는 마의 초저온 동결보존이 불가능한 것으로 판단되었다.

**Table 2.** Effect of sucrose concentration in a preculture medium on the growth of yam apices

Genotype	Sucrose concentration (M)	Preculture duration (days)	Survival rate (%)
Db037	0.3	1	90
		2	94
		3	95
	0.6	1	100
		2	100
		3	95
Db004	0.3	1	100
		2	91
		3	100
	0.6	1	60
		2	55
		3	71

**동결보호제 처리를 통한 마의 초저온 동결보존(Vitrification technique)** : 유리화 기법 (vitrification technique)은 다양한 식물종의 초저온 동결보존법으로 활용되고 있으며(Sakai, 1995), 1990년 Sakai 등에 의해 탈수 과정동안 세포질내에 침투되지 않으면서도 저독성인 glycerol을 기본으로 한 PVS2 용액을 보고한 후 유리화 기법(vitrification technique)은 더욱 다양한 식물체의 동결보존에 적용되어 높은 체생율을 나타낸다는 보고가 이어지고 있다. 하지만 마를 이용한 본 실험에서는 0.3M의 sucrose가 첨가된 MS 배지에서 1일간 전배양된 재료를 동결보존용액(PVS1, 2, 3, 4)에 30분간 상온에서 처리하여 동결 후 생존률을 조사한 결과 (표 3, 그림 7), PVS2 30분 처리구에서 0.5%의 생존을 보인 경우를 제외하고 모든 처리구에서 동결 후 생존개체를 얻을 수 없었으며, PVS3 처리구에서는 동결하지 않은 경우에도 생존률이 53.4%로 낮아지는 경향을 보였다.



**Table 3.** Effect of the cryoprotectant solutions (PVS1, 2, 3 and 4) on the survival of cryopreserved shoot-apex of *D. batatas* cv. 'Db037

Cryoprotectant solution	Survival rate (%)	
	LN(-)	LN(+)
Control	90.0 a	0.0
PVS1	89.2 a	0.0
PVS2	85.6 a	0.5
PVS3	53.4 b	0.0
PVS4	87.4 a	0.0

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test,  $P \leq 0.05$ .

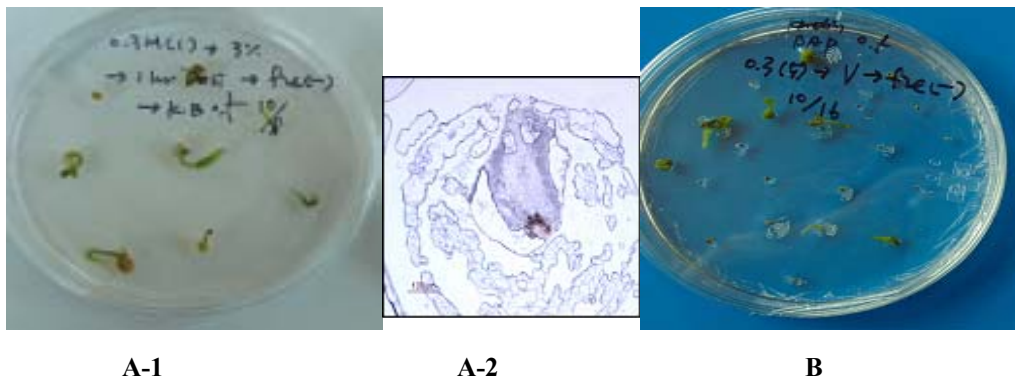


fig. 7. Shoot growth form encapsulated(A-1) and vitrified apices (B)  
(A-2 : Encapsulated apices with 3% Sodium - alginate)

**캡슐화 건조기법(Encapsulation-dehydration technique)을 이용한 마의 초저온 동결보존 :** 액아부위를 3% sodium alginate로 capsulation 하고 건조시간에 따른 생존률과 동결후 생존률을 조사한 결과(그림 8), 4시간 건조 후 배양한 액아에서 20%의 가장 높은 생존 반응을 나타내었다.

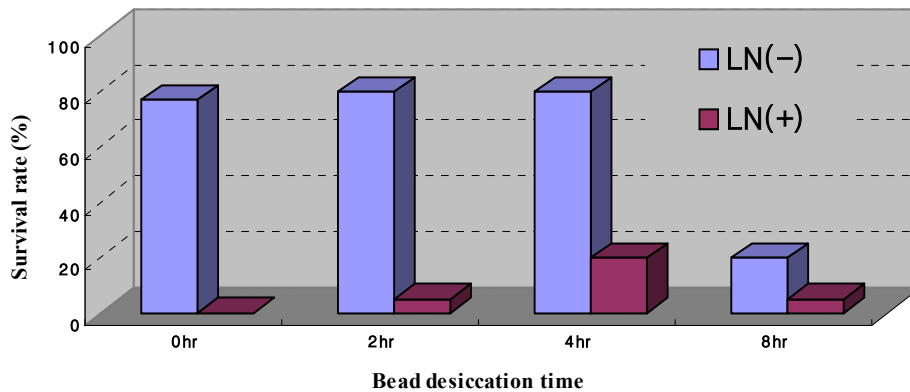


Fig. 8. Effect of bead desiccation on the survival of control (-LN) and cryopreserved (+LN) apices of *D. batatas*.

**캡슐-유리화법(Encapsulation-vitrification technique)을 이용한 마의 초저온 동결보존** : 마의 액 아조직을 재료로한 동결보존법 중 encapsulation-vitrification법은 encapsulation- dehydration법에 비해 동결보존 효율이 낮지만 encapsulation- vitrification 처리에서 capsule에 동결보호 용액 (PVS)를 처리하기전 3.5시간정도 건조할 경우 동결보존후 생존율이 20%로 높아졌다(그림 9).

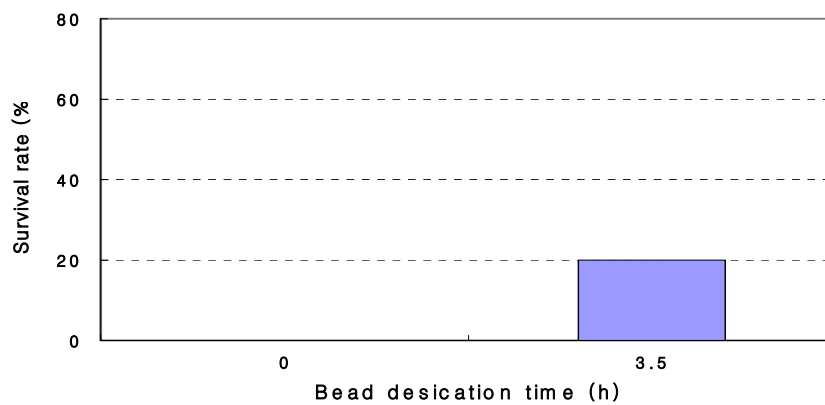
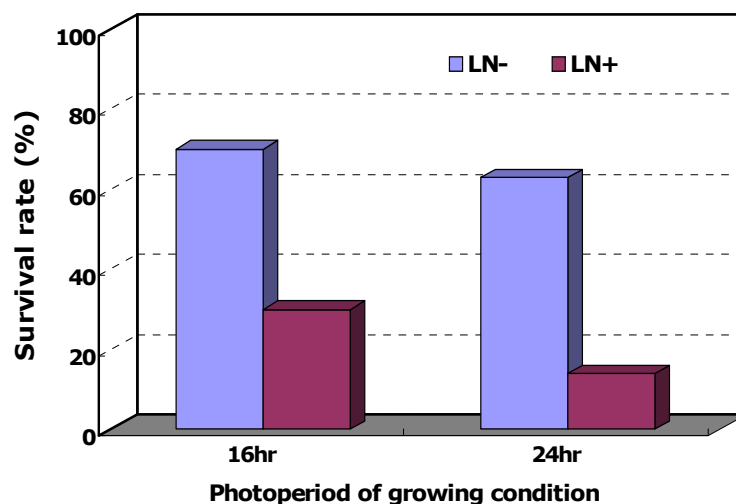


Fig. 9. Effect of bead desiccation on survival rate of cryopreserved yam apices by encapsulation-vitrification

### 3) Encapsulation-dehydration 법을 이용한 동결보존 과정 중 각 적정 단계별 조건 구명

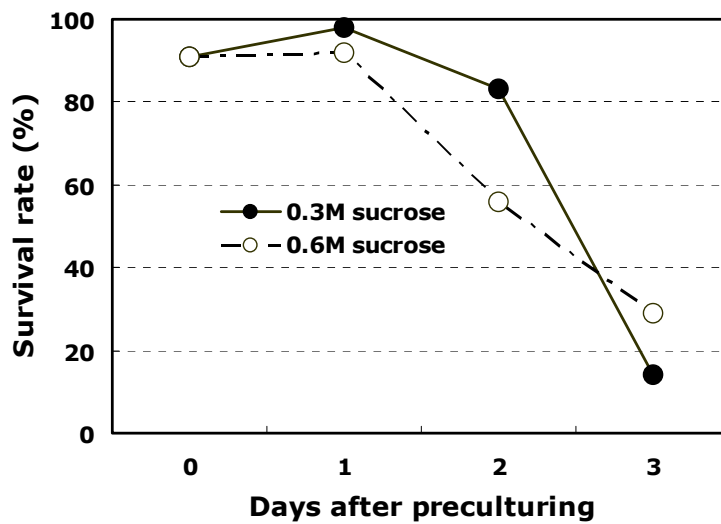
이상의 실험에서 선발된 동결보존법(encapsulation-desiccation method)을 기본으로 동결조직의 생존률을 높이기 위하여 전배양 단계에서 배지내 삼투압 조절물질의 종류, 농도(Sucrose, sorbitol 0.3, 0.6M) 및 일장조건(16hr, 24hr)이 동결보존에 미치는 영향을 조사하였으며, bead의 건조시간, 동결방법(rapid, slow freezing) 및 해동방법(25~40℃)에 따른 동결보존 후 생존률도 조사하였다.

재료 증식을 위한 배양 환경(일장)이 액아의 초저온 동결보존 효율에 미치는 영향을 조사한 결과(그림 10), 16시간 일장에서 성장한 식물체로부터 절취한 액아를 재료로 동결보존 할 경우 연속적인 명조건에서 배양된 재료에서 절취한 액아에 비해 동결보존 후의 생존률이 30%로 높게 나타났다.



**Fig. 10.** Survival rate (%) of control (-LN) and cryopreserved (+LN) yam shoot-apices excised from plantlets grown under 16~24 h photoperiod conditions. Encapsulated shoot-apices preconditioned with 0.3M of sucrose were encapsulated with 3% Na-alginate. The precultured beads were dehydrated by air drying in a laminar flow cabinet for 4 h at room temperature.

다양한 식물자원에서 선행된 초저온 동결보존 실험에서 sucrose는 그 자체만으로 충분히 동결 후 재생률을 확보할 수 있도록 해주는 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. Sucrose가 0.3M, 0.6M 첨가된 MS 배지에 액아를 1~3일간 전배양하고 3% sodium-alginate로 캡슐화하여 4시간 건조 시킨 후 kinetin (0.2mg/L)과 BAP (0.2 mg/L)가 첨가된 MS 배지에 배양한 후 생존률을 조사한 결과(그림 11), 0.3M 또는 0.6M의 sucrose가 첨가된 배지에서 하루 정도 전배양한 액아를 capsulation 한 경우에 가장 높은 생존률을 나타내었다.



**Fig. 11.** Survival rate (%) of encapsulated, desiccated apices that were precultured with 0.3 and 0.6M of sucrose for different duration times.

Sorbitol 0.3M이 첨가된 전배양 배지내 배양기간이 capsule화 된 액아의 동결후 생존률에 미치는 영향을 조사한 결과(그림 12 ) 1일간 전배양 처리에서 가장 높은 생존률을 나타내었으며 전배양 기간이 2일 이상 길어질 경우 동결후 생존률이 낮아지는 경향을 보였다.

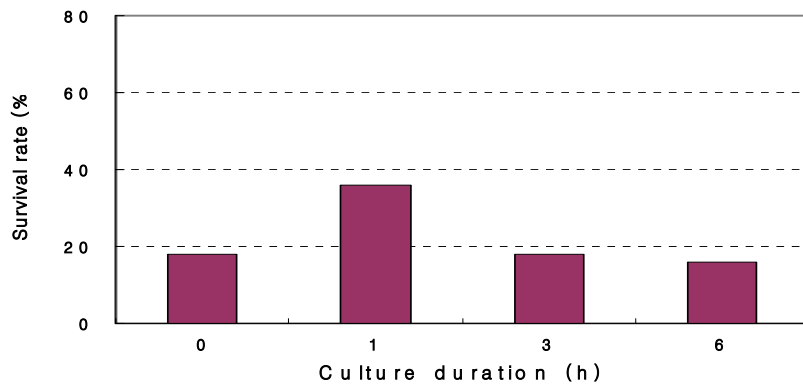


Fig. 12. Effect of preculture duration on 0.3M sorbitol for survival of cryopreserved yam apices

전배양 배지내 삼투압 조절물질의 종류와 농도가 캡슐화된 액아의 동결보존에 미치는 영향을 조사한 결과(그림 13), sucrose나 sorbitol이 0.3M 첨가된 배지에 배양된 액아에서 동결후의 생존률이 높게 나타났으며, sorbitol과 sucrose간에는 통계적인 유의성이 인정되지 않았다.

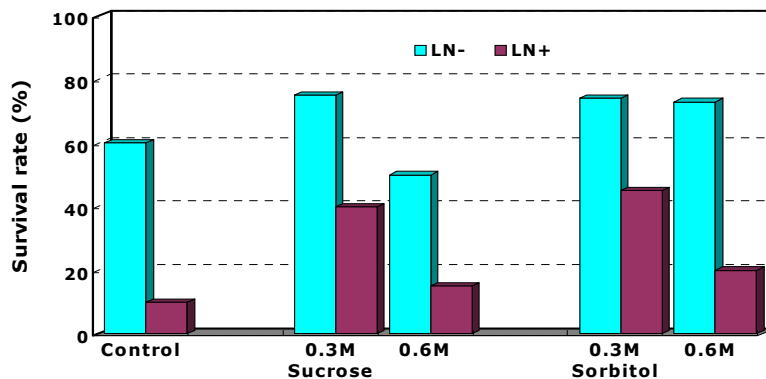
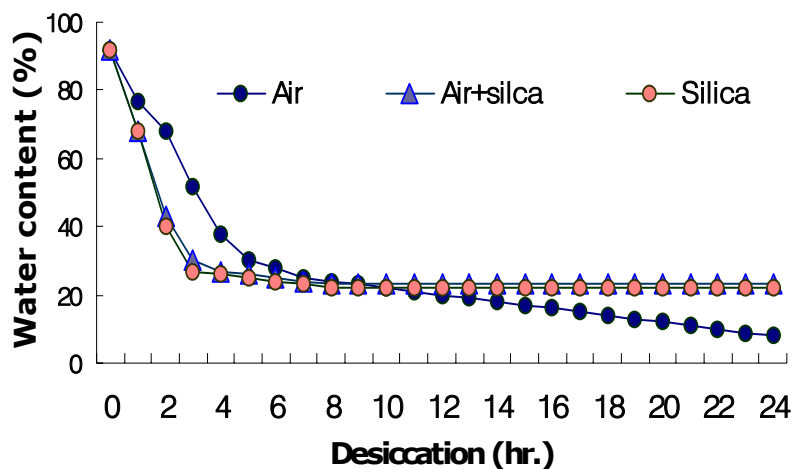


Fig. 13. Effect of sucrose and sorbitol amounts in a precultured medium for the survival of the control (-LN) and cryopreserved (+LN) yam apices. Encapsulated apices precultured with 0, 0.3, 0.6M of sucrose and sorbitol were placed on sterilized filter paper in 9-cm petri-dishes and dehydrated by air drying in a laminar flow cabinet for 4 h at room temperature and then directly immersed in LN for 1 h. Shoot-apices immersed in LN were thawed in 40°C water-bath for 3 min. Control and cryopreserved apices were post-cultured on a solidified MS medium containing 30 g/L of sucrose, 0.2 mg/L of BAP and 0.2 mg/L of kinetin, under light conditions for survival assessment.

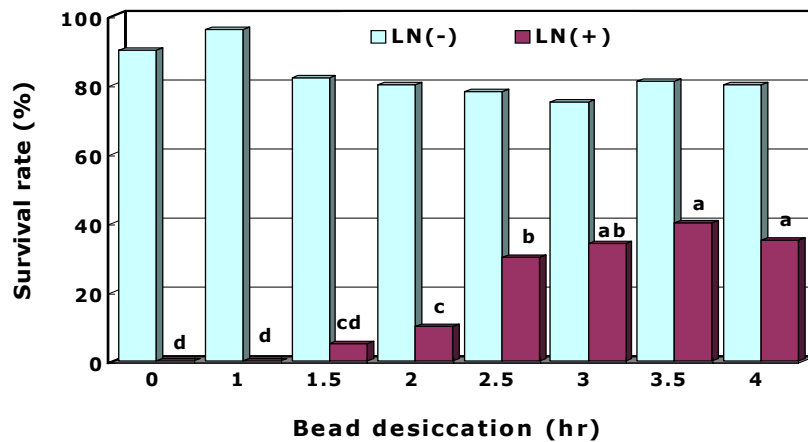
대부분의 식물세포나 조직은 세포내에 액포를 다량 함유하고 있어서 동결보존중 세포내 결빙으로 인한 세포파괴가 발생한다. 그러므로 동결보존된 경정조직의 생존률을 높이기 위해서는 세포내의 수분을 생존에 영향을 미치지 않는 한 최대한 줄여야 한다. Hitmi 등 (1999) 국화의 싹초를 이용한 동결보존에서 건조를 통하여 동결저항성을 높였으며, Santarius (1973)와 Crowe 등 (1987)은 sucrose를 처리함으로써 세포막 표면의 적정수분을 유지하여 plasma mebrane 본체를 유지하면서 건조와 동결조건에서 protain을 안정화 시킨다고 보고한 바 있다.

3% sodium alginate bead를 이용하여 건조 방법과 건조 시간 경과에 따른 수분함량 변화를 조사한 결과(그림 14), 실리카겔을 사용한 건조 방법에서는 짧은 시간내 급격한 수분함량의 감소를 보여, 3시간 이후에는 수분 함량 변화가 거의 없었다. 이는 실리카겔이 빠른 시간내에 bead의 외부면을 탈수시켜 내부의 수분이 건조되는 것을 방해하기 때문인 것으로 생각되며 air dry법을 통한 bead 건조는 5시간까지는 급격한 수분감소를 보이고 그 이후에도 완만하고 꾸준한 건조 양상을 보였다.



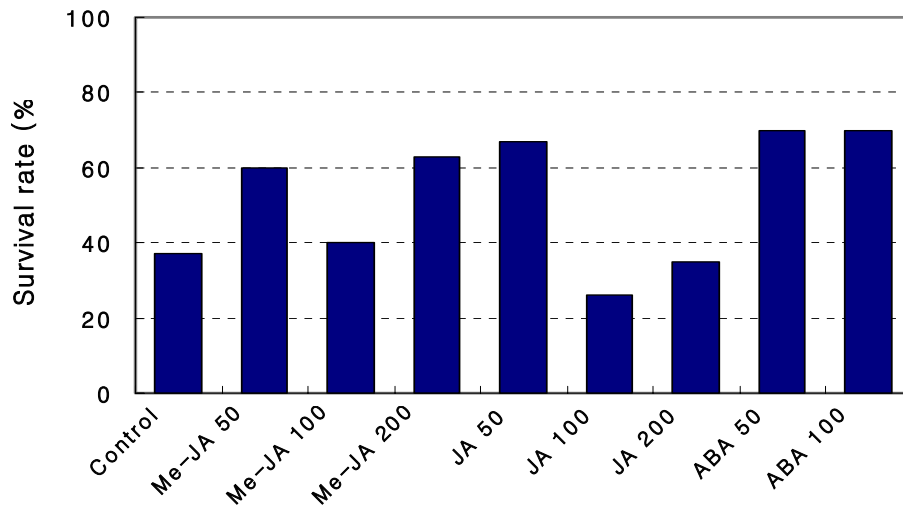
**Fig. 14.** Changes in the water content of precultured beads during desiccation. Encapsulated shoot-apices were loaded on to a liquid MS medium containing 2M of glycerol and 0.5 M of sucrose for 1 h. The precultured beads were then placed on sterilized filter paper in 9-cm petri-dishes and dehydrated by air-drying in a laminar flow cabinet at room temperature.

0.3M sucrose가 첨가된 배지에서 1일간 전배양한 액아를 3% sodium alginate로 capsulation 하고 건조시간에 따른 동결 후의 생존률을 조사한 결과(그림 15), 3.5시간 건조 후 배양한 액아에서 40%의 가장 높은 생존 반응을 나타내었으며, 3~4시간 처리 간에는 유의한 차이가 나타나지 않았다.



**Fig. 15.** Effect of bead desiccation on the survival of control (-LN) and cryopreserved (+LN) apices of *D. batatas*. Encapsulated apices, precultured with 0.3M of sucrose were placed on sterilized filter paper in 9-cm petri-dishes and dehydrated by air-drying in a laminar flow cabinet for 0~4 h at room temperature and then directly immersed in LN for 1 h. Shoot-apices immersed in LN were thawed in 40°C water-bath for 3 min. Control and cryopreserved apices were post-cultured on a solidified MS medium containing 30 g/L of sucrose, 0.2 mg/L of BAP and 0.2 mg/L of kinetin under light conditions for survival assessment.

동결보존을 위한 capsule화 전 재료식물체 증식배양 배지내에 스트레스 관련 호르몬인 ABA와 자스몬산을 처리하여 동결 자극에 대한 내성을 높인 후 액아를 채취하여 encapsulation-dehydration 법으로 동결보존 하였다. 동결보존 후 생존률은 스트레스 호르몬을 첨가하지 않은 처리구에 비해서 고농도의 메틸 자스몬산 (200 ppm) 과 비교적 저농도의 자스몬 산(50 ppm) 처리구에서 높은 생존률을 보였으며 ABA 처리의 경우 50, 100ppm 처리구 모두에서 70%의 가장 높은 생존률을 나타내었다(그림 16).



**Fig. 16.** Survival rate (%) of control (-LN) and cryopreserved (+LN) yam shoot apices excised from plantlets grown on 0~200 ppm of methyl-jasmonate, Jasmonate and 0~100 ppm of ABA.

동결방법이 생존률에 미치는 영향을 조사하기 위하여 encapsulation- desiccation된 액아를 액체질소에 급속 동결하거나 4℃, -20℃에 각각 30분씩 처리를 한 다음 액체질소에 동결하는 과정으로 나누어 실험한 결과(표 4), 점차적인 동결과정을 거치지 않고 액체질소에 바로 급속 동결할 경우 해동 후 생존률이 40%로 가장 높게 나타났다.

**Table 4.** Effect of freezing methods on survival of cryopreserved shoot-apices of *D. batatas*

Freezing method	Procedure	Survival rate (%)	
		LN(-)	LN(+)
Rapid	Control (-196℃, LN <sub>2</sub> )	75	40
Slow	4℃→LN <sub>2</sub> (-196℃)	56	4
	4℃→-20℃→LN <sub>2</sub> (-196℃)	20	0

\* sample remained for 30 min for each step.

Encapsulated apices, precultured with 0.3M of sucrose, were dehydrated by air-drying in a laminar flow cabinet for 3.5 h at room temperature and then slowly frozen or directly immersed in LN.



동결 후 해동방법 또한 동결된 재료의 생존률에 영향을 미치는데(표 5), 액체질소에서 꺼낸 재료를 실온(26℃)에서 완전히 녹을 때까지 방치(9분) 하거나 30℃, 40℃의 항온수조에서 3분간 해빙시킬 재료를 재생배지에 이식하여 30일 경과 후 생존률을 조사하였다. 실온에서 9분간 해빙 할 경우 17.8%의 생존률을 보였으며 30℃와 40℃에서 3분간 해빙했을 경우 각각 26.5%와 39%의 생존률을 나타내었다. 50℃의 다소 높은 온도에서 해빙할 경우는 동결 처리된 재료의 생존률이 4.2%로 급격히 낮아졌다. Niino와 Sakai (1992), Bhojwani와 Razdan (1996)는 37~40℃에서 1~3분간 빠르게 해동할 경우 느리게 해동할 때 발생하는 세포내 결빙으로 인한 피해를 줄일수 있다고 보고한 바 있으며 열대마인 white poplar (*Populus alba* L.)를 재료로 실시한 유사한 연구에서도 Lambadi 등(2000)은 완만 해빙보다 30~50℃에서 빠르게 해빙하는 것이 유리하다고 보고한바 있다. 이보고와 는 달리 한국의 *D. batatas*를 재료로 실시한 이번 실험결과는 50℃ 정도의 고온은 오히려 효율이 낮게 나타난 점에서 차이를 보이며 Plessis 등 (1991, 1991)이 *Vitis vinifera* 으로 실험한 선행 보고에서 실온에서 15분정도 해빙할 경우 급속해동의 경우와 차이를 보이지 않으며 생존에 영향을 미치는 요인은 해빙 속도가 아니라 해빙 정도에 달려있다고 보고한 내용과도 다소 차이를 보였다.

**Table 5.** Effect of thawing methods on the survival of cryopreserved shoot- apices of *D. batatas*

Thawing method	Survival rate (%)
Slow thawing	
room temp., 9 min	17.8
30℃, 3 min	26.5
Rapid thawing	
40℃, 3 min	39.0
50℃, 3 min	4.2

Encapsulated apices, precultured with 0.3M of sucrose, were dehydrated by air- drying in a laminar flow cabinet for 3.5 h at room temperature and then directly immersed in LN for 1 h. Shoot-apices immersed in LN thawed at room temperature for 9 min or in a water bath at 30, 40 or 50℃ for 3 min.

해빙후 재생배지내 삼투압 조절물질 처리와 암배양이 encapsulation-dehydration 법을 이용하여 동결·해빙한 재료의 생존에 미치는 영향을 조사한 결과(그림 16), 해동 후 sorbitol 0.3M 정도 처리된 배지에서 3일간 배양하거나 이시기에 암처리를 동시에 처리하는 경우 생존률이 60% 이상으로 무처리에 비해 높게 나타났다.

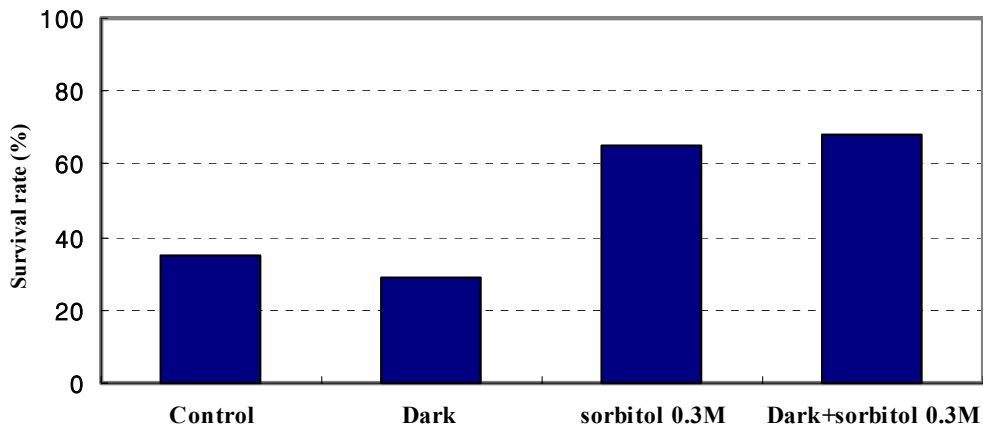
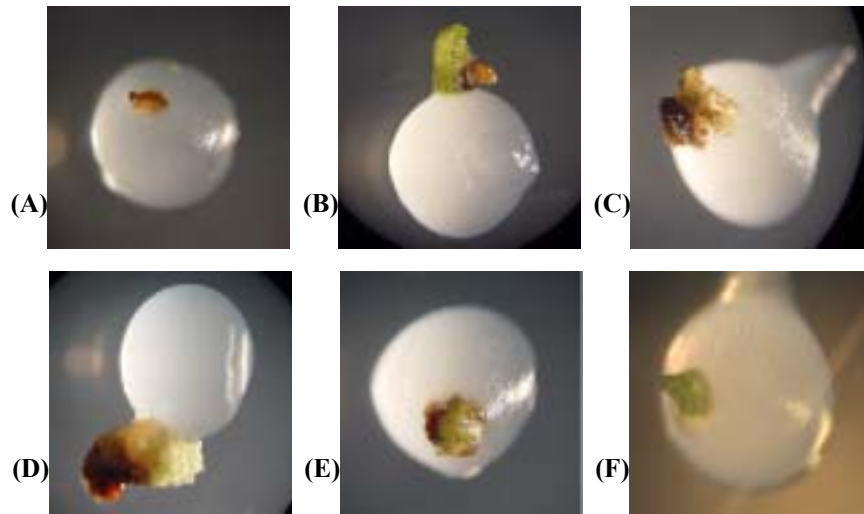


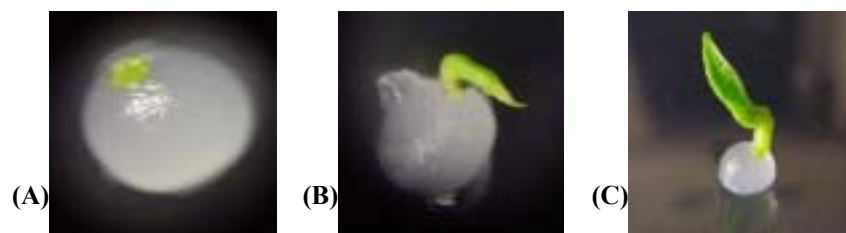
Fig. 16. Effect of 0.3M of sorbitol on post culture medium and dark condition for survival of cryopreserved yam apices.

Encapsulation-dehydration 법으로 동결보존된 재료의 재생과정을 현미경하에서 관찰한 결과 재료의 동결피해 면적이 재생된 개체의 성장에 영향을 미치는 것으로 나타났다(그림 17). 전체적으로 손상된 재료로부터는 식물체 분화를 관찰할수 없었으며(그림 17-A,B), 성장점 부위를 손상 받거나 전체적인 손상부위가 큰 경우는 정상적인 발달이 불가능하거나 캘러스를 형성하였고(그림 17-C,D), 재료의 손상이 없거나 포엽부위에 한하여 손상 받은 경우에는 정상적인 식물체로의 발달이 가능하였다(그림 17-E,F, Fig. 18).



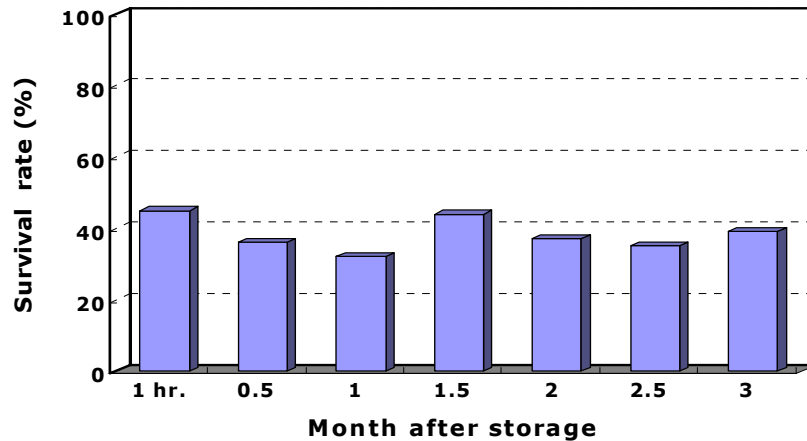
**Fig. 17.** Morphological patterns of thawed apices. Damaged (A), partially damaged (B-E) and non-damaged apices (F) of *D. batatas* cv. Db037 after cooling and thawing.

Harding과 Benson(1994), Mabdal 등(1996)의 감자의 신초를 재료로한 선행된 연구에서 캘러스형성을 거친 신초의 분화는 캡슐화 소재와 배지에 첨가된 생장조절제의 영향에 기인한 것이기도 하지만 배양체의 손상정도에 따라 캘러스를 형성하기도 한다고 보고하고 있는데, 때문에 동결보존과정 중 재료의 손상을 최소화 할수 있는 조건을 구명하는 것이 동결보존의 성공여부에 중요한 관건으로 보여 진다.



**Fig. 18.** Shoot growth from cryopreserved apices at 5(A), 30(B) and 40(C) days after thawing.

동결보존 기간(0~3개월)에 따른 생존률 변화를 조사한 결과(그림 19), 액체질소 내에서 보존기간의 경과에 따른 생존률 변화는 나타나지 않았다.



**Fig. 19.** Effect of storage duration on the survival rate (%) of shoot-apices of *D. batatas* cv. 'Db037', cryopreserved at  $-196^{\circ}\text{C}$  by encapsulation- dehydration. Encapsulated apices, precultured with 0.3M of sucrose, were dehydrated by air-drying in a laminar flow cabinet for 3.5 h at room temperature and then directly immersed in LN for a period between 1 h and 3 months. Shoot-apices immersed in LN were thawed in  $40^{\circ}\text{C}$  water-bath for 3 min.

#### 4) Genotype별 동결보존 방법에 따른 효율 비교

경북농업기술원 생물자원연구소 포장에서 보존되고 있는 마(그림 20)를 대상으로 경정조직 배양을 통해 식물체를 획득하고 이들 식물체의 마디부위를 일정주기로 계대 배양하여 개체수를 확보하였다. 이들 개체의 액아 부위를 절취하여 위 실험에서 선발된 encapsulation-desiccation법으로 보존한 후 genotype간 동결보존 효율을 조사한 결과(표 6), genotype에 따라 동결후의 생존률이 0~40%로 큰 차이를 보였으며 동근마(*D. batatas* cv. Db037)의 경우 40%의 가장높은 생존률을 보인 반면 같은 종에 속해있는 단마계통 'MA1'은 29%, 야생마의 경우는 0%의 생존률을 나타내었다. 이들 genotype 간의 동결보존 효율 차이는 각각의 형질 차이에 기인한 것으로 사료 되며 마 유전자원의 성공적인 초저온 동결보존 체계를 확립하기 위해서 각각의 재료를 대상으로 적합한 동결보존법을 확립해 주어야 할 것이다.

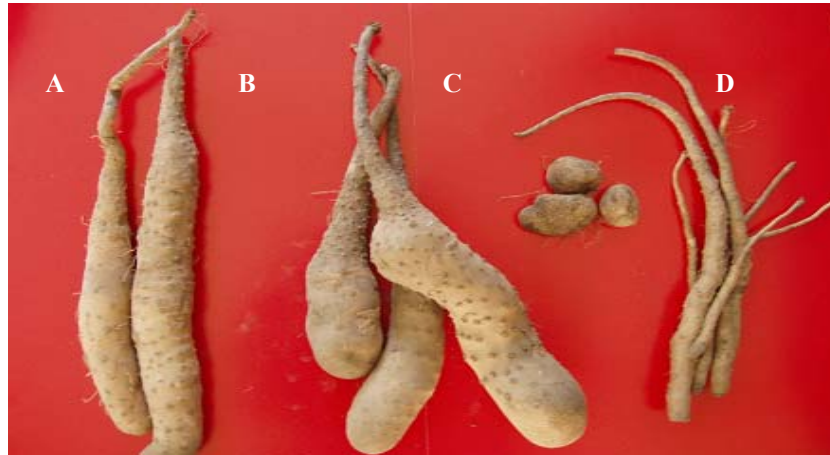


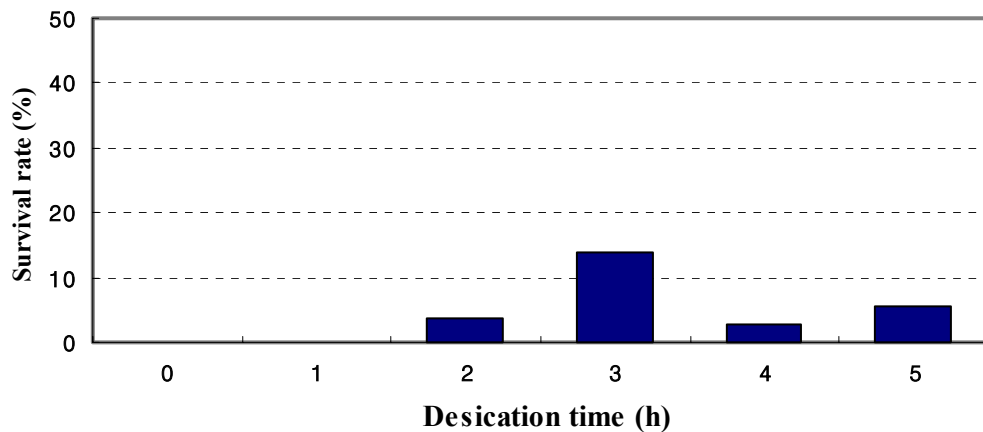
Fig. 20. Tuber shape of yam germplasms  
(A: Db004, B: Ma1, C: Db037, D: wild type)

**Table 6.** Survival rate (%) of apices of three yam genotypes cryopreserved at - 196°C by encapsulation-dehydration

Genotype	Desiccation (h)	Survival rate (%)	
		LN(-)	LN(+)
Db037	0	91	0
	3.5	75	40
Ma1	0	90	0
	3.5	86	29
wild type	0	87	0
	3.5	16	0

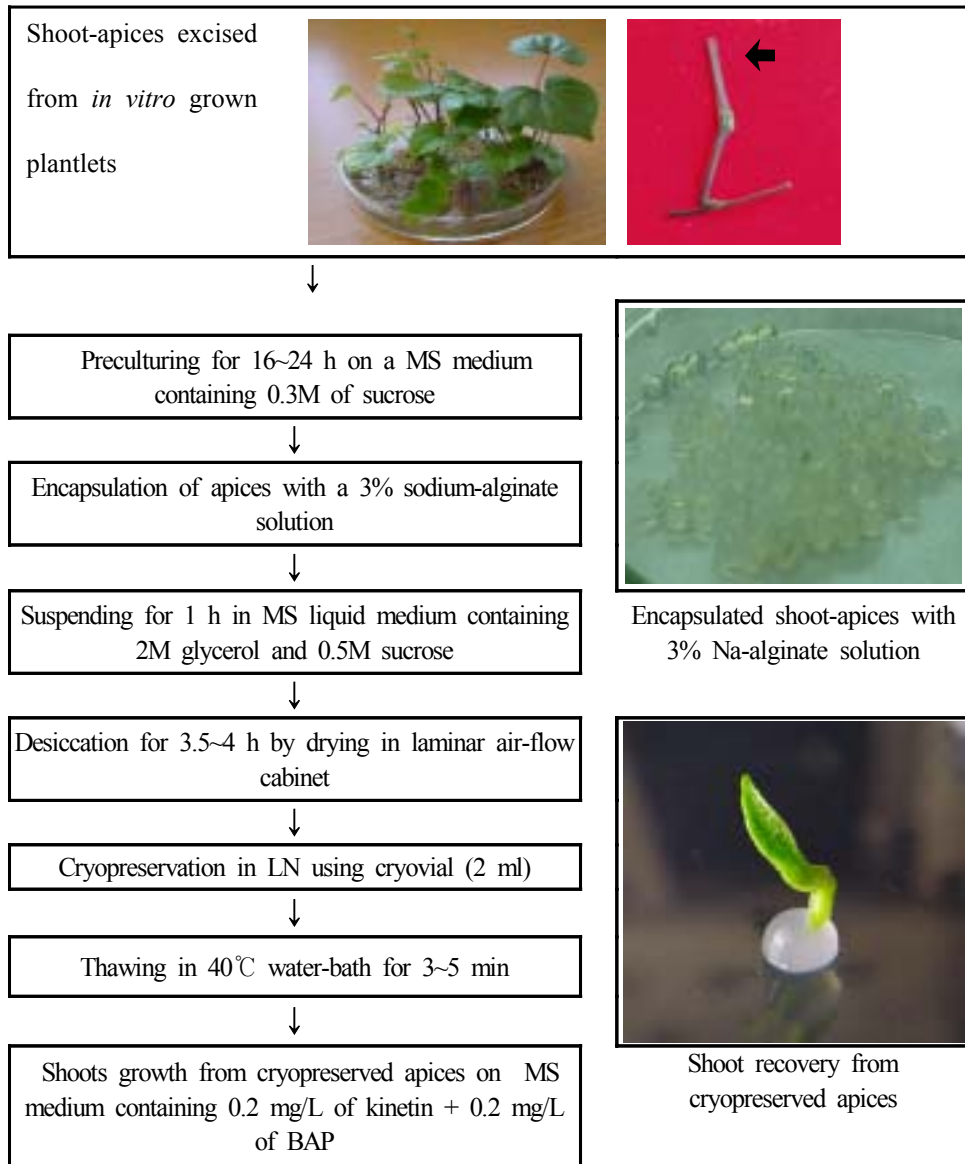
Encapsulated apices, precultured with 0.3M of sucrose, were dehydrated by air-drying in a laminar flow cabinet for 3.5 h at room temperature and then directly immersed in LN. Shoot-apices immersed in LN were thawed in 40°C water-bath for 3 min.

국내 재배마인 *D. batatas* 이외에 *D. japonica*(일본증마)의 액아 싹초 조직을 Encapsulation-dehydration 법을 이용하여 초저온 동결보존 하였다. bead 건조 시간에 따른 동결후 생존률을 조사한 결과(그림 21), *D. batatas*를 재료로 한 실험에서와 같이 3시간 건조에서 13.9%로 가장 높은 생존률을 나타내었으며 동결후 생존률은 *D. batatas* cv Db037에 비하여 다소 낮게 나타났다.



**Fig. 21.** Effect of bead desiccation on the survival of cryopreserved apices of *D.japonica*.

마의 액아조직을 재료로 캡슐화 기법을 이용한 초저온 동결보존체계를 정리하면 다음과 같다 (그림 22). 0.3M의 sucrose 나 solbitol이 첨가된 MS배지에 1일간 전배양된 1m 정도의 액아조직을 3% Na-alginate 용액으로 캡슐화 하고 3.5~4간정도 무균상태에서 건조하였다. 건조된 bead를 -19 6℃의 액체질소에 급속동결하고 40℃의 water bath에서 3~5분 동안 해빙 후 0.2 mg/L의 BAP와 0.2 mg/L의 kinetin이 첨가된 재생배지에 배양하여 동결된 재료로부터 유전자원을 재생시킨다. 이때 재료는 16시간일장조건에서 자란 묘에서 채취하는 것이 유리하며 재료 채취전 50~100 ppm 정도의 ABA나 적정 농도의 자스몬산을 일정기간 처리 해 주는 것이 효과적이다. 해동된 재료는 0.3M의 sorbitol이 첨가된 배지에서 1~3일정도 배양 후 재생배지로 옮겨주는 것이 재료의 손상을 줄여 동결 보존 효율을 높일수 있었다. 하지만 이러한 방법은 일부 마 유전자원을 제외한 다양한 genotype에 동시에 적용하기에는 다소 부족한점이 있으므로 자원별 적정 동결보존 체계를 확립해 줄 필요가 있다.



**Fig. 22.** Cryopreservation of shoot apices in *Dioscorea batatas* by encapsulation-dehydration.

동결과정을 통한 재분화 식물체의 변이 조사를 조사하기위해서 동결 전 재료와 동결보존 후 재생된 개체의 특성을 조사한 결과 형태적인 차이를 확인 할수 없었으며, genomic DNA 를 추출하여 RAPD 분석법을 이용하여 유전변이를 분석 하였다. Primer는 SRILS사의 UniPrimerKit II 12(20 mer)종을 사용하였으며 분석결과 (그림 23), 대부분의 major band 들이 일치하여 동결보존에 의한 유전적변이는 나타나지 않은 것으로 판단 되었다.

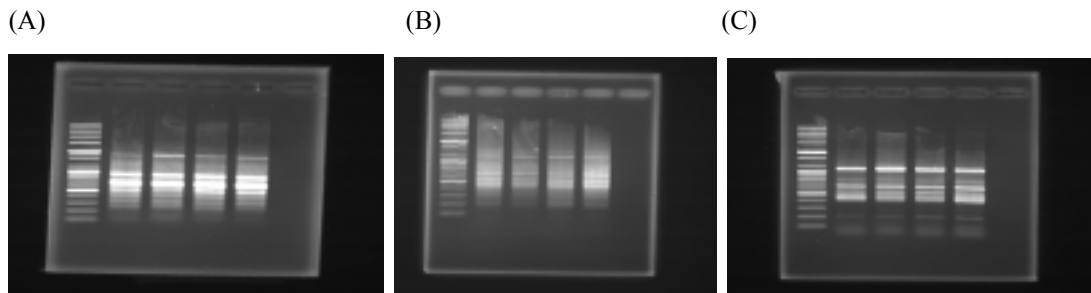


Fig. 23. Analyze of genetic variation between non-cryopreserved(a) and cryopreserved apices(b) of *D. batatas* cv. Db037 by RAPD using SRILS UniPrimer kit II-#2(A), SRILS UniPrimer kit II-#3(B) , SRILS UniPrimer kit II-#4(C). lane 1 : Marker, lane 2 : non-cryopreserved mother plant, lane 3-5 : cryopreserved plant(R1-R3)

## 2. 접합자배를 이용한 야생마 유전자원의 초저온 동결보존

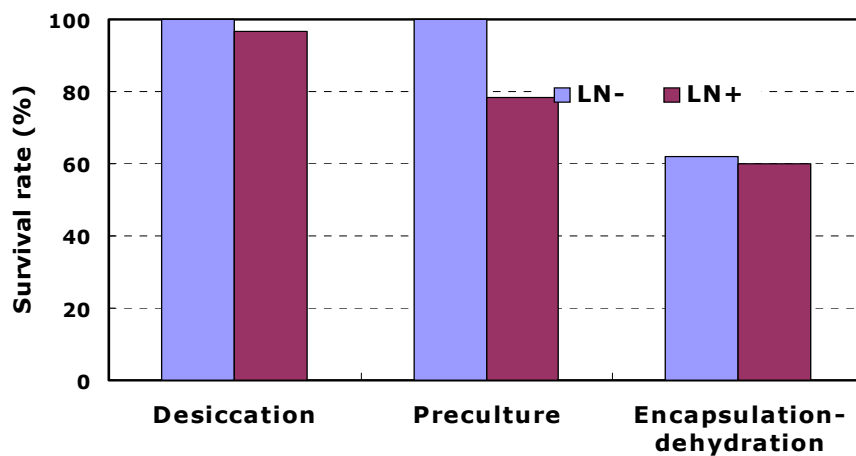
### 가. 연구개발수행 내용

한국의 산지에서 야생상태 존재하는 *D. batatas* (wild type, slender tuber)와 *D. nipponica*의 미성숙 혹은 성숙종자의 배를 철취하여 30g/L의 sucrose, 2 g/L의 gelrite와 0.3 mg/L of GA<sub>3</sub>가 첨가된 MS배지에 1일간 전배양후 9cm 샐레에 샐레당 30개의 배를 얻어 무균상의 air-stream으로 0~30 분간 건조처리 하였다. 건조시간별 동결보존 후 생존률과 배 발아율을 조사하였으며, 이때 동결·해동후 배배양 배지는 전배양배지와 동일한 농도의 GA<sub>3</sub>가 첨가된 배지에 배양하여 생존률을 조사하였다. 접합자배의 초저온 동결보존법 선발을 위해 배를 건조하거나(desiccation technique), 캡슐화 후 건조처리(encapsulation-dehydration technique), 별도의 건조처리 없이 삼투압조절물질이 첨가된 배지에 일정기간 전배양(Preculture-dehydration)처리하여 동결·해빙 후 재료의 생존률을 조사하였다.



## 나. 연구개발 결과

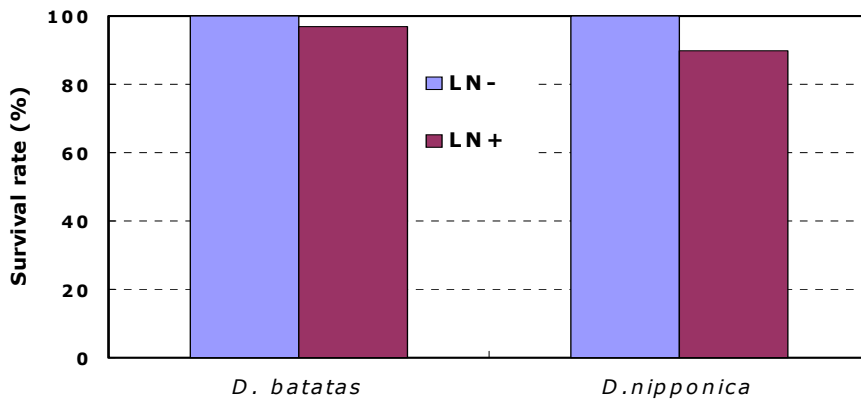
접합자배의 초저온 동결보존법 선발을 위해 배를 건조하거나(desiccation technique), 캡슐화 후 건조처리(encapsulation-dehydration technique), 별도의 건조처리 없이 삼투압조절물질이 첨가된 배지에 일정기간 전배양(preculture-dehydration)하여 동결·해빙 후 재료의 생존률을 조사한 결과(그림 24), 30분의 단순건조처리에서 96.6%의 가장 높은 생존률을 나타내었으며, 캡슐화 건조법의 경우는 동결 유무에 관련 없이 62% 이하의 낮은 생존률을 나타내었다.



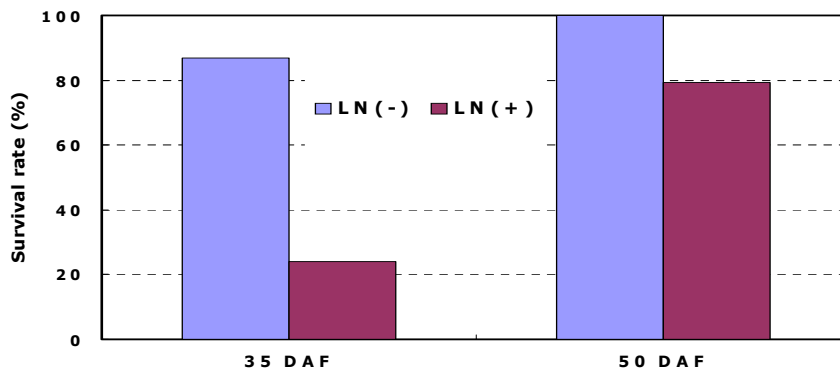
**Fig. 24.** Survival (%) of wild yam zygotic embryos (*D. batatas*) cryopreserved at  $-196^{\circ}\text{C}$  by three different techniques. **Desiccation techniques:** Embryos excised from seeds were dried in the air stream of a laminar flow cabinet for 30 min. **Preculture techniques:** Zygotic embryos precultured on MS medium containing 0.3 mg/L of  $\text{GA}_3$  for a day. **Encapsulation-dehydration techniques:** Encapsulated embryos were dehydrated by air-drying in a laminar flow cabinet at room temperature for 4 h.

종자배의 동결보존에 효과적인 desiccation 법을 이용할 경우 실험에 사용한 두 종류의 야생마(*D. batatas* wild type and *D. nipponica*) 모두에서 90% 이상의 생존률을 기대할 수 있었으므로(그림 25) desiccation 법은 마의 접합자 배를 이용한 동결보존에 적합한 동결보존법으로 생각되어진다. *D. batatas* 야생종의 미성숙종자(개화후 35일 경과종자)와 완숙종자(50일 경과종자)를 재료로 별도의 처리 없이 동결보존 한 경우 성숙정도에 따른 동결보존 효율이 현저한 차이를 보였는데(그림 26), 절취한 배를 동결 처리전 30분간의 자연건조 함으로써 미

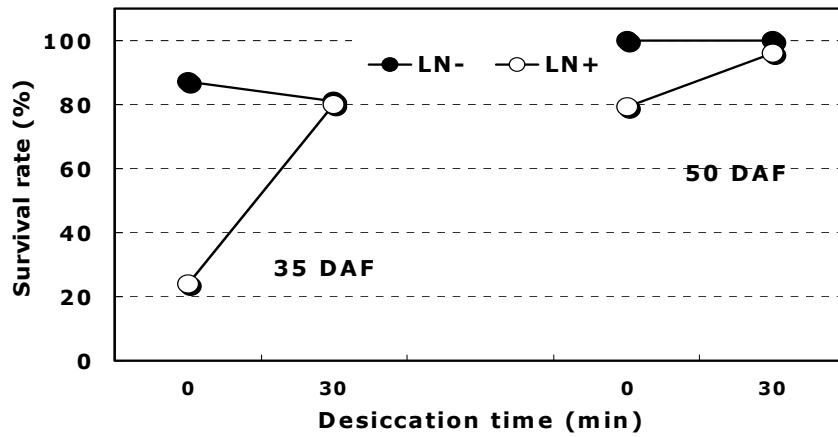
숙종자의 동결 후 생존률을 80% 이상으로 높일 수 있었다(그림 27). 동결전 30분간의 건조 처리는 동결 후 배의 발아에도 영향을 미쳤는데, 특히 미숙종자의 경우 생존한 배의 발아율이 급격히 증가하는 것을 알 수 있었다(그림 28).



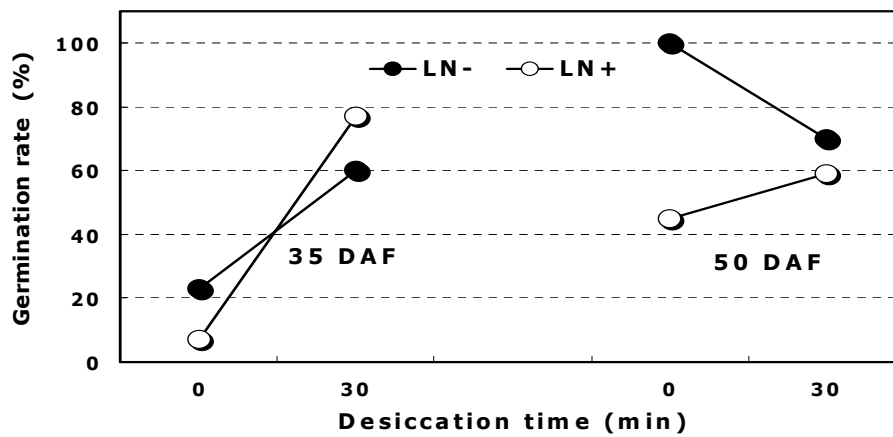
**Fig. 25.** Survival rate (%) of zygotic embryos of two wild yam species cryopreserved at  $-196^{\circ}\text{C}$  by desiccation method. Embryos that were excised from the seeds matured for 50 DAF (days after flowering), were dried in the air stream of a laminar flow cabinet for 30 min at room temperature and then directly immersed in LN. Zygotic embryos immersed in LN were thawed in  $40^{\circ}\text{C}$  water-bath for 3 min.



**Fig. 26.** Survival rate (%) of mature and immature zygotic embryos of *D. batatas* (wild type) cryopreserved at  $-196^{\circ}\text{C}$ . Excised embryos were directly immersed in LN. Zygotic embryos immersed in LN were thawed in  $40^{\circ}\text{C}$  water-bath for 3 min. Embryos were dissected from the seed matured for 50 DAF (days after flowering) and 35 DAF seeds.

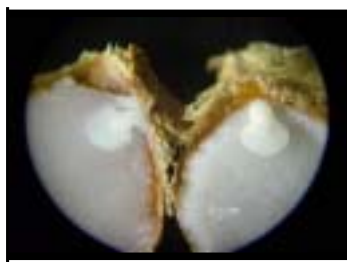


**Fig. 27.** Survival rate (%) of mature and immature zygotic embryos of *D. batatas* (wild type) cryopreserved at  $-196^{\circ}\text{C}$  by desiccation method. Excised embryos were dried in the air stream of a laminar flow cabinet for 0 and 30 min at room temperature and then directly immersed in LN. Zygotic embryos immersed in LN were thawed in  $40^{\circ}\text{C}$  water-bath for 3 min. Embryos were dissected from the seed matured for 50 DAF (days after flowering) and 35 DAF seeds.



**Fig. 28.** Germination rate (%) of mature and immature zygotic embryos of *D. batatas* (wild type) cryopreserved at  $-196^{\circ}\text{C}$  by desiccation method. Embryos were dissected from the seed matured for 50 DAF (days after flowering) and 35 DAF seeds.

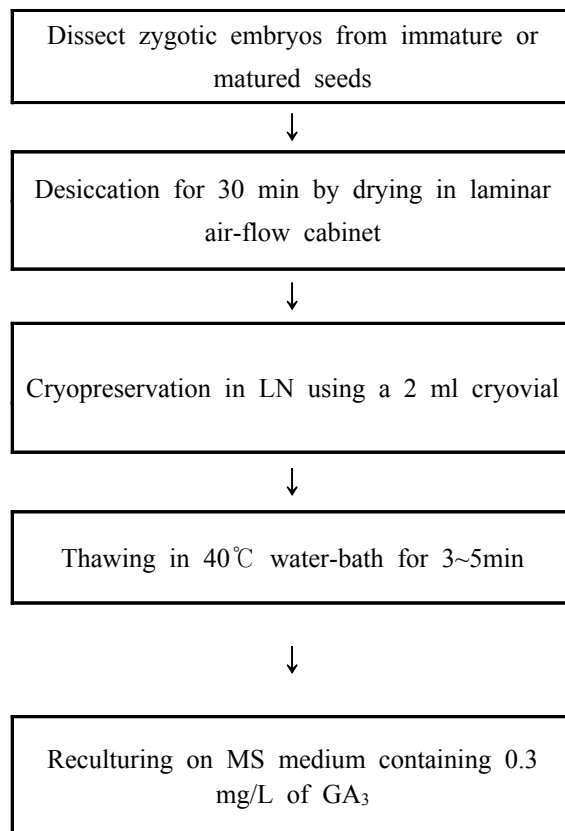
액아 채취가 곤란 하거나, 액아를 이용한 동결보존 효율이 낮은 야생마의 경우 자연상태에서 형성되는 접합자배를 재료로 동결보존이 가능 하였다. 자연상태에서 성숙 혹은 미성숙 종자를 채취하여 절취한 배를 무균상에서 30분간 자연건조하고 -196℃의 액체질소에 보존한다. 보존된 재료를 재생 시킬 때에는 액아를 이용한 동결보존에서와 동일한 조건에서 해빙하여 GA<sub>3</sub>가 0.3 mg/L 첨가된 MS 배지에 배양하여 배발아를 유도 할수 있었다(그림 29).



Zygotic embryo in the seed of a wild yam (left: *D. nipponica*, right: *D. batatas*)



Germination from the cryopreserved embryos after thawing.



**Fig. 29.** Cryopreservation of zygotic embryos in *Dioscorea* spp. by desiccation method.

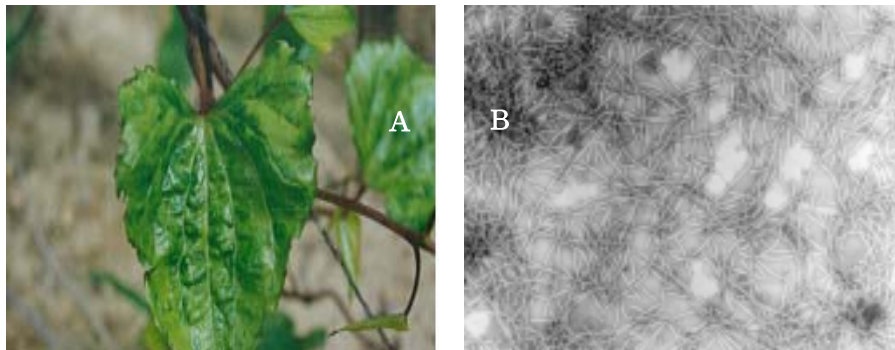
### 3. 초저온 동결 처리를 통한 Yam mosaic virus(YMV-K) 무병 마 생산

#### 가. 연구개발수행 내용

등근 마를 재료로 모주(母株)와 모주에서 절취한 액아를 동결보존한 후 재생시킨 묘를 대상으로 모자익바이러스(YMV-K) 감염여부를 조사하였다. 바이러스 진단법 중 가장 감도가 우수한 것으로 알려진 IC-RT-PCR을 이용하여 이병유무를 조사하였는데, 사용한 항혈청은 Immuno Pure IgG Purification kt(Pierce)로 정제한 것을 이용하였다. 바이러스 진단에는 Kameya-Iwaki 등(1999)이 개발한 primer set를 이용하였다.

#### 나. 연구개발 결과

등근 마를 재료로 모주와 모주로부터 채취한 액아를 동결보존 후 재생된 묘를 대상으로 등근마에 주로 나타나는(포장상태에서 감염주율 100%) 모자익바이러스(YMV-K) 감염여부를 조사하였다. 그림 30은 포장 상태에서 등근마의 YMV-K 감염 증상과 바이러스 입자를 전자현미경으로 관찰한 것이다



**Fig. 30.** Symptoms of *Dioscorea batatas* cv. Db037 infected with YMV-K (A) and YMV-K particles (B) purified from yam leaves.

IC-RT-PCR법으로 바이러스 감염을 확인한 모주의 액아를 동결보존 후 재생된 개체를 대상으로 바이러스 이병정도를 조사하였다. 동결 후 재생된 개체는 모주와는 달리 바이러스 이병율이 감소하여 이병정도를 분석한 결과 90% 정도가 바이러스 무병주로 나타났다(그림 31, 32). 동결보존 단계별로 이병유무를 검사한 결과 보존재료로 사용할 1mm 정도의 액아조직 채취 과정에서 이병주율이 60%로 감소하고 이들을 재료로 동결보존 할 경우 동결보존후 생존체체의 10%만이 이병주로 나타나 기내 조작과정과 동결과정에서 바이러스가 제거되는 것으로 나타났다. 앞으로 등근마 이외에 다른 마 종류에 감염되어 있는 바이러스 종에 대한 바이러스 제거효과도 검토해볼 필요가 있을 것으로 생각되며, 이러한 특징은 자원의 동결보존 과정에서 별도의 바이러스 제거를 위한 화학적이나 물리적 처리를 요하지 않는다는 장점이 있다.



**Fig. 31.** Virus (YMV-K) detection from plantlets derived from control (-LN) and cryopreserved (+LN) apices of *D.batatas* cv. 'Db037'. Control (1~3 lane) and cryopreserved apices (4~5 lane) were derived from a single plantlet.



**Fig. 32.** Virus (YMV-K) detection from leaf tissue of yam plantlets derived from cryopreserved shoot-apices.

마에 피해를 주는 병해에는 곰팡이, 바이러스 선충 등이 있는데 기내배양에 유지되는 개체는 바이러스를 제외한 모든 병에 대해 안전한 상태이다. 바이러스의 경우도 성장점을 배양하거나 바이러스 제거를 위한 별도의 화학적처리나 열처리 등을 통하여 바이러스 무병주를 생산할 수 있다. 한국에 자생 또는 재배되는 마 종류에 가해하여 수량과 품질에 영향을 미치는 바이러스는 Chinese yam necrotic mosaic virus (ChYNMV) 와 Japanese yam mosaic virus (YMV-K) 가 대표적이다. 이들 바이러스나 다른 열대지역 마 종류에 가해하는 바이러스를 대상으로 성장점 배양을 통해 바이러스 무병종서를 획득하였다는 선행된 연구결과가 보고되고 있지만 -196℃의 초저온 처리로 바이러스를 제거한 연구결과는 보고된 바 없다.

#### 4. 조직배양기술을 이용한 동결보존 식물체의 증식법 개발

##### 가. 연구개발수행 내용

###### 1) 동결보존 후 재생개체의 기내 증식

단마(MA1)와 둥근마(Db037) 기내에서 성장한 묘의 마디조직을 성장조절제가 첨가되지 않거나 0.5 mg/L의 2,4-D, BAP, kinetin, GA<sub>3</sub> 혹은 0.1 mg/L의 NAA가 각각 첨가되고 30 g/L의 sucrose와 2g/L의 gelrite가 함유된 1/2MS 배지에 배양하여 60일 배양후 마디로부터 신초의 신장과 증식 정도를 조사하였다. 생육특성은 배양된 모든 개체를 대상으로 조사하였으며 완전임의배치 5반복으로 실시하여 얻어진 결과를 Duncan's test로 분석 하였다.

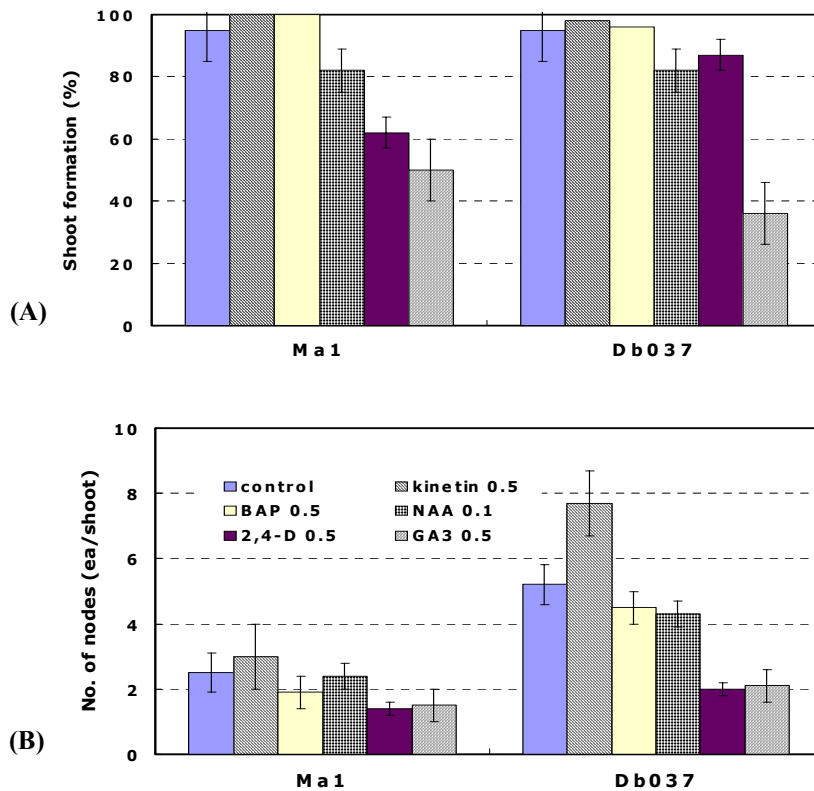
###### 2)기내 소피경형성 및 맹아

둥근마의 20일 정도 자란 기내묘에 1.0 mg/L의 GA<sub>3</sub>를 처리하여 소피경을 생산하였다. 생산된 소피경은 4℃에서 5개월간 저장하면서 저장기간의 경과에 따른 소피경 맹아정도를 관찰하였는데 이때 저온 저장된 소피경은 소독된 상토에 배양하여 26℃에서 2개월 후 지상부로 5mm정도 맹아한 개체를 대상으로 조사하였다. 마의 genotype (장마, 단마, 둥근마) 및 소피경의 크기(2-3, 3-4, 5-6, 5mm이상)에 따른 맹아율 차이도 검토했는데 3개월간 4℃에서 저온저장된 소피경을 사용하여 맹아조건은 저장기간별 실험과 동일하게 수행하였다.

## 나. 연구개발 결과

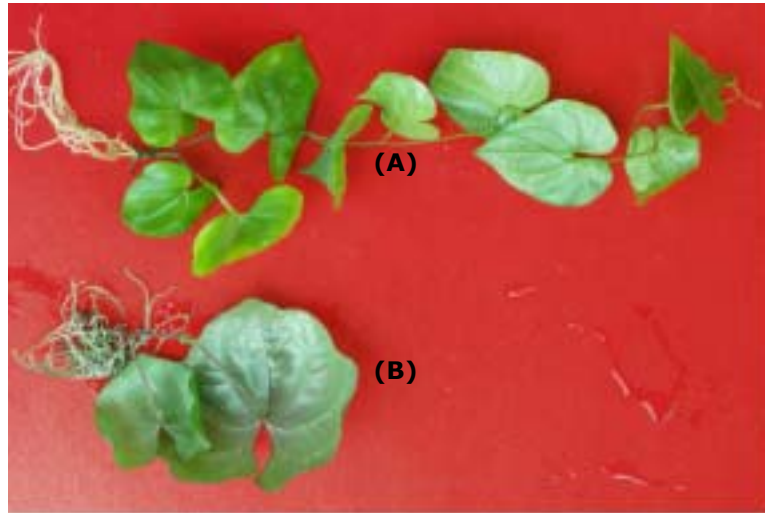
### 1) 동결보존 후 재생개체의 기내 증식

단마(MA1)와 둥근마(Db037)의 마디조직은 GA<sub>3</sub>와 2,4-D 첨가구를 제외한 나머지 처리에서 80% 이상의 개체에서 신초를 형성하였으며, 둥근마의 경우 2,4-D가 0.5 mg/L 첨가된 배지에서도 신초형성이 양호하였으며 GA<sub>3</sub>는 신초의 발생과 신장을 억제하는 것으로 나타났다(그림 33). 특히 둥근 마디배양의 경우 식물생장조절제는 신초 형성뿐만 아니라 신초의 신장에도 영향을 미쳤는데 0.2 mg/L의 kinetin이 첨가된 배지에서 신초신장이 양호하여 평균 묘당 7.5개의 마디를 형성하였다(그림 33-B, 그림 34).



**Fig. 33.** Effect of plant growth regulators on the shoot formation (A) and the average node numbers per shoots (B) induced from nodal segment of *D. batatas*.





**Fig. 34.** Shoot elongation from nodal pieces of two cultivars 'Db037' (A) and 'Ma1' (B) of *D. batatas*.

## 2) 기내 소괴경형성 및 맹아

기내에서 형성된 등근마의 소괴경을 4℃에서 5개월간 저장하면서 저장기간별 맹아 정도를 조사한 결과(그림 35), 4℃에서 3개월 이상 저장할 경우 100%에 가까운 맹아율을 나타내었는데, 저온처리기간이 2개월로 짧을 경우 맹아가 늦어지고 저온저장하지 않거나 1개월정도 저장된 소괴경의 경우 파종 후 100일 경과한 시점에서도 10% 내외의 낮은 맹아를 보였다.

기내에서 형성된 소괴경을 4℃에서 3개월 정도 저장하여 26-30℃에서 맹아 시킬 경우 맹아율은 genotype 이나 소괴경의 크기에 관계없이 90%이상의 맹아율을 나타내었다(표 7, 그림 36).

**Table 7.** Genotypic difference of *in vitro* microtuber sprouting of *D. batatas*

Cultivar	Sprouting (%)	Days required for	
		First sprouting	Sprouting by 80%
Db004	97	10	45
Ma1	94	10	45
Db037	93	12	42

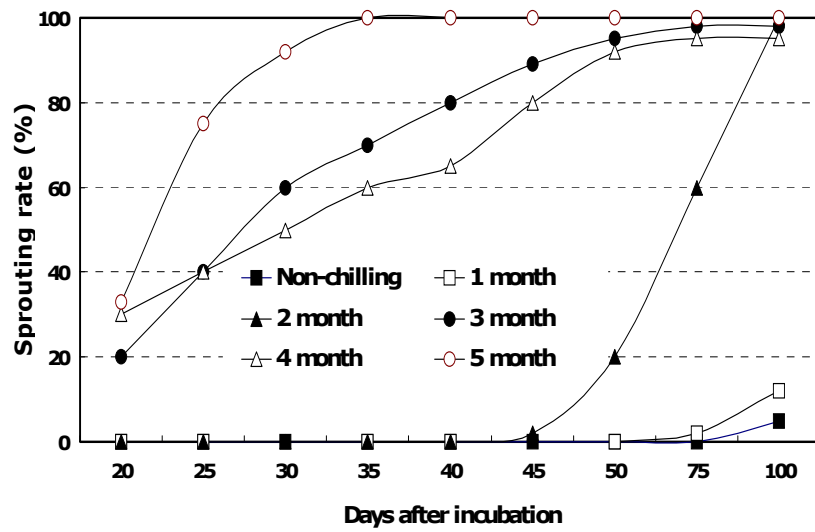


Fig. 35. Effect of low temperature (4°C) treatment on *in vitro* microtuber sprouting in *D. batatas*.

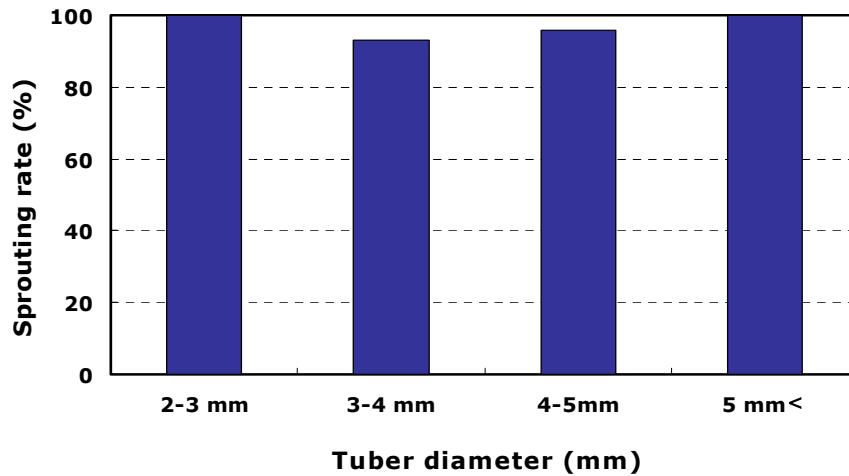
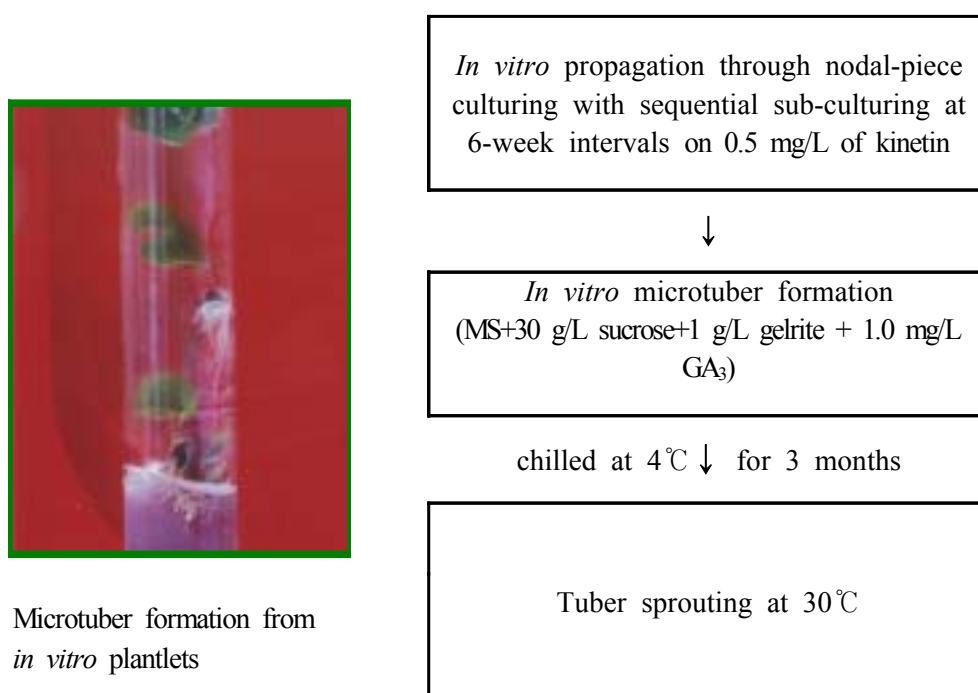


Fig. 36. Sprouting with regard to different sizes of *in vitro* microtubers of *D. batatas*.

위의 결과를 종합하여 정리하면 동결보존 상태에서 재생시킨 마 유전자원은 기내에서 kinetin이 0.5 mg/L 첨가된 배지에서 마디배양을 통해 개체수를 증식하고, 증식된 묘에 1.0 mg/L의 GA<sub>3</sub>를 첨가하여 소괴경을 형성시킨다. 이들 소괴경은 4℃의 저온에서 3개월이상 저온 저장하고 26-30℃의 상토에 파종하여 맹아시켜 성공적인 기외식물체로 성장할 수 있다(그림 37).



Microtuber formation from  
*in vitro* plantlets

**Fig. 37.** The procedure of *in vitro* propagation and microtuber formation by the tissue culturing of *D. batatas*.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 총괄 추진 계획표

세부과제 및 주요내용	연 도			가중치	진도 (%)
	2002년 (1차년도)	2003년 (2차년도)	2004년 (3차년도)		
<b>(1) 세부과제 : 작약 초저온 동결보존 방법 확립</b>					
o. 동결보존에 필요한 식물재료 선택 - 작약의 약, 화사, 자엽조직 배양				20	100
o. 초저온 동결방법 선별 및 적정 조건구명 - 동결전처리와 동결보호제 조성 - 저장 및 해빙방법 구명				30	100
o. 식물체재분화와 분화개체의 주요특성 조사 - 보존 방법별 식물체 재생률 비교 - 형태 및 세포유전학적 비교				10	100
<b>(2) 협동과제 : 마의 초저온 동결보존 방법 확립</b>					
o. 조직배양을 통한 보존 재료 육성 - 액아배양				10	100
o. 적정 초저온 동결보호 방법 선별 - 동결전처리 및 동결 보호제의 조성 등				20	100
o. 동결과정을 통해 재분화된 식물체의 변이분석 - 형태적 특성 및 염색체의 수적 이상				10	100
사업진도(%)	30	65	100	100	
소요인원(명)	11	11	11	33	
소요예산(천원)	30,000	30,000	30,000	90,000	
주요 연구결과	○ 3장 참고	○ 3장 참고	○ 3장 참고		

## 제 2 절 연구개발 목표의 달성도

### 1. 세부과제 : 작약 (*Paeonia lactiflora* Pall.)의 초저온 동결보존 방법 확립

가. 작약의 약, 화사, 자엽조직 및 동아(冬芽)배양에 적합한 조건과 체세포배나 조직의 동결보존에 관여하는 요인을 구명하였다.

나. 자연상태에서 작약종자의 4% 정도는 다배를 형성하였고, 이들 다배의 형태적, 염색체 수적특성 및 발아특성을 조사하였다

다. 작약의 약 및 화사조직배양에서 배양효율의 genotype 간 차이를 조사하여 약배양에서 배형성률이 높고 화사 조직배양에서 캘러스 형성이 양호한 ‘의성작약’을 선발하였다.

라. 작약의 접합자 배와 체세포 배의 경우 1~2시간의 간단한 건조 처리로 동결내성이 비교적 높게 유지됨을 알 수 있었고, 3% alginate bead로 encapsulation 시킨 것에서 동결 후의 생존률이 가장 높게 나타났다.

마. 작약의 접합자 배와 체세포 배 및 약과 화사에서 형성된 캘러스의 동결 보존 조건에 대한 실험을 수행하여 배의 경우 1시간의 건조처리만으로도 동결 후의 생존률이 80%로 높게 유지되었고, 캘러스의 경우는 건조 처리하지 않고 동결 보존하는 것이 유리한 것으로 나타났다.

바. 작약 접합자배의 동결보존에 영향을 미치는 여러 가지 요인에 대한 실험을 수행하여 동결보존방법별 보존효율을 비교분석하여 동결보존 후의 생존률을 80%이상 유지할 수 있는 encapsulation-desiccation 법을 확립하였다.

사. 작약의 체세포배의 초저온 동결보존에 효과적인 보존재료의 크기와 desiccation에 의한 동결건조 법을 확립 하였다.

아. 동아를 재료로한 초저온 동결법으로 desiccation 법과 encapsulation-dehydration법을 확립 하였으며, 성공적인 동결보존을 위한 재료 채취시기를 구명하고 genotype별 동결보존

효율 등을 비교 하였다.

자. 접합자배, 체세포배 및 동아를 재료로 동결보존된 유전자원의 해동 후 재생 조건과 포트 활착 조건을 검토한 결과, 각자의 재료를 이용하여 기내 묘 생산부터 기외 적응에 이르기까지 전반적인 초저온 동결보존 체계를 확립 할 수 있었다.

차. 동결과정을 통한 재분화 식물체의 변이를 조사하기위해서 동결 전에 동아에서 얻은 포엽과 동결 후 정아를 RAPD 분석법을 이용하여 분석한 결과, 대부분의 major band 들이 일치하여 동결 후 재생된 개체는 동결 전과 유전적으로 동일함을 알 수 있다.

## 2. 협동과제 : 마(*Dioscorea spp.*)의 초저온 동결보존법 확립

가. 마의 경우도 genotype별, 조직부위별 배양조건을 구명하였으며, 보존재료의 크기 및 상태와 이들의 건조 및 동결저항성을 조사하여 액아의 건조 및 encapsulation 처리에서 동결저항성이 비교적 높게 유지됨을 확인하였다.

나. 마의 초저온 동결보존 재료 확보를 위해 유전자원별 조직배양 조건을 구명하여 실험에 필요한 충분한 개체 수를 얻었으며, 재료의 genotype별, 부위별 건조 및 동결저항성을 측정하는 동시에 sodium alginate로 bead화 한 재료의 건조, 동결저항성도 조사하였다.

다. 마 액아조직을 이용한 초저온 동결법으로 encapsulation-dehydration 법을 확립하였는데 유전적 변이로부터 안정된 보존방법으로 판단되며, 재료의 육성에서 포장 적응에 이르기까지 각 단계별 적정 조건을 구명하였다.

라. 동결보존후 재생주를 대상으로 IC-RT-PCR을 이용하여 YMV-K 이병률을 조사한 결과 90%의 바이러스 무병주를 확보 하였으며, 유전자원보존 이외의 viurs 무병주 생산법으로 씨의 초저온 처리의 이용을 검토해볼 계획이다.

마. 액아조직 이용이 불가능한 야생마를 대상으로 접합자 배를 이용한 초저온 동결법으로 desiccation 법을 구명하였다.

### 제 3 절 관련분야의 발전에의 기여도

개발된 기술들은 작약과 마의 유전자원 보존 기술로 직접 활용될 수 있을 것이고, 나아가서 다양한 약용식물의 유전자원을 초저온에 안전하게 보존하기 위한 기술개발에도 이용될 수 있을 것이다. 또한 유전자원을 포장에서 유지·보존하는데 소요되었던 비용과 노력이 대폭 절감될 것이며, 성장점의 초저온동결보존 기술은 저장되었던 성장점의 기내증식 조건 구명으로 무병의 종묘를 대량으로 획득할 수 있게 되어 농가의 소득증대에도 기여하게 될 것이다.

1. 작약과 마의 초저온 동결보존 관련 제반 조건에 대한 연구를 통해 개발된 기술들은 기타 여러 유용 영양 변식성 작물의 중·장기적 저장 기술로 활용이 가능할 뿐만 아니라, 다양한 약용작물 유전자원의 초저온 동결보존을 위한 기초 자료로서의 이용가치도 매우 높을 것이다. 또한 성장점을 이용한 초저온 동결 보존법은 무병조직을 저장하기 때문에 약용식물의 수량 및 약리성분을 개선하는데 크게 기여하게 될 것이다. 그리고 영양변식 작물의 안전한 유전자원 관리기술이 확립되어진다면 품종개량에서 다양한 유전자원을 안정적으로 활용할 수 있어서 품종개량의 성과가 크게 향상될 것이다.

2. 초저온 동결보존 방법 체계가 확립되어 작약과 마의 유전자원을 안전하게 유지하고 보존하는데 이를 활용한다면 기존의 포장재배에 소요되었던 비용과 노력이 대폭 절감될 것이다. 또한 성장점의 초저온 보존 기술은 성장점 배양을 통한 무병종묘의 안정적인 생산과 보급이 가능하다는 점에서 농가의 소득이 증대될 것이다. 그리고 유용성분의 함량이 개량된 약용식물이 개발·보급 및 생산됨으로서 농가소득 향상과 신약품 개발에도 큰 기여를 하게 될 것이다.

3. 다양한 약용식물의 유전자원을 거의 영구적으로 안전하게 보급할 수 있는 초저온 동결보존법이 확립되고 품종개량이나 재배법 연구에 체계적으로 이용한다면 우리 국민들의 체질에 맞는 신선한 생약제의 생산·보급이 가능하여 국민 건강향상에도 크게 기여하게 될 것이다.

# 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

## 제 1 절 연구개발 성과

### 1. 특허출원 : 1건 (출원번호 : 10-2005-0057611)

#### 【발명의 명칭】

재배마 및 야생마의 초저온 동결보존 및 재생을 통한 YMV-K 바이러스가 없는 마 식물체의 생산방법 (Method for Producing YMV-K Free Yam Plants Using the Cryopreserving-Regenerating of Cultivated Yam and Wild Yam)

#### 【요약】

본 발명은 재배마 및 야생마의 초저온 동결보존 및 재생을 통한 YMV-K 바이러스가 없는 마 식물체의 생산방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 재배마 및 야생마의 싌초 또는 접합자 배를 이용하여 효율적으로 동결보존 및 재생하고, 이를 이용하여 YMV-K 바이러스가 없는 마 식물체를 효율적으로 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 초저온 동결보존·재생 방법을 통하여 재배마 및 야생마를 유전적인 변이 없이 효율적으로 장기 저장할 수 있고, 초저온동결 처리 과정 후 재생된 식물체는 YMV-K 바이러스가 제거된다. 또한 본 발명에 따르면 이를 유전자원으로 효율적으로 보급할 수 있는 효과가 있다.





## 2. 대중 매체를 이용한 기술 홍보 : 1건

제 목 : 토종식물 유전자원 보존 성공: 경북대, 작약·마 씨앗 초저온 동결보존법 개발  
(경북일보, 2004년 11월 22일 월요일)

# 토종식물 유전자원 보존 성공

## 경북대, 작약·마 씨앗 초저온 동결보존법 개발

택에서 식물자원을 보존하는 것. 이 온도에서는 모든 대사과정과 세포분열이 멈추기 때문에 비교적 안전한 저장이 가능하다. 초저온 동결보존법은 세계적으로 1970년대 중반부터 연구되기 시작해 최근 감귤류, 감자, 포도 등을 포함한 일부 영양번식식물에서

토종 식물의 유전자원 보존이 갈수록 중요해지고 있는 가운데 토종 영양번식 작물의 유전자원 보존방법이 경북대에 의해 개발돼 학계의 관심을 끌고 있다.

경북대 농업생명과학대학 작물육종학 실험실(손재근 교수)과 경북농업기술원 신물질 연구소(이봉호 소장)는 지난 2년 동안 농림기술센터의 연구비 지원을 받아 비교적 간단한 처리로 영양식물을 '잠기지장할 수 있는' 기술을 개발, 이같은 고민을 완전히 해결했다.

손 교수는 초저온 동결보존법을 이용, 우선 작약과 마에 대한 유전자원 안전저장 기술개발에 대한 연구를 수행했다.

초저온 동결보존이란 액체질소의 온도인 -196의 초저온 상

큰 연구성과를 얻고 있으나 국내에서는 아직 이 연구가 시작 단계에 머물러 있다.

손교수팀은 작약(사전)과 마의 조직을 시험관에 배양하고 이를 액체질소에 보존하면서 필요할 때 식물체를 분화시키는 기술과 함께 동결보존된 재료를 이용해서 짧은 기간에 대량 번식시킬 수 있는 방법을 동시에 개발했다.

손 교수는 "우리고유의 농작물은 우리 스스로의 기술로 안전저장할 수 있어야 지적재산권을 확보할 수 있다"며 "적절한 유전자원 보존방법이 없는 상태에서 토종작물이 농촌에서 경제성이 없는 작물이 될 경우 순식간에 이 땅의 토종 자원은 멸종되고 만다"고 말했다.

### 3. 논문발표 및 게재

#### 가. 논문게재 : 5건

- 1) 작약(*Paeonia lactiflora* Pall)종자의 다배현상, 한국육종학회지 (2004. 36권 5호 게재)
- 2) Cryopreservation of zygotic embryos of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by Encapsulation-Dehydration, 한국작물학회지 (2004. 49권 2호)
- 3) Factors affecting the production of *in vitro* plants from the nodal pieces of a Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb.), 한국식물생명공학회지 (2004. 6권 2호)
- 4) The effects of growth regulators and medium strength on the shoot and bud formation from the shoot apex of a Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb), 한국식물생명공학회지 (2004. 6권 2호)
- 5) Cryopreservation of somatic embryos of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by Air Drying, (2005) Cryobiology (in press)

#### 나. 학회논문 발표 : 10건

- 1) Cryopreservation using somatic embryos of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.), 2004년 춘계 한국식물생명공학회 발표
- 2) Cryopreservation of winter buds of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by desiccation, 2004년 춘계 한국식물생명공학회 발표
- 3) Effect of encapsulation-dehydration on cryopreservation of zygotic embryos of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) 2004년 춘계 한국작물학회 발표
- 4) Cryopreservation of zygotic embryos of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by air desiccation 2004년 춘계 한국작물학회 발표

- 5) The factors affecting the production of *in vitro* plants from the nodal pieces of a Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb.), 2004년 춘계 한국식물생명공학회 발표
- 6) The effects of medium strength and growth regulators on the shoot and bud formation from the shoot apex of a Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb), 2004년 춘계 한국식물생명공학회 발표
- 7) Establishment of cryopreservation method using somatic embryos in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) 2004년 추계 한국식물생명공학회 발표
- 8) Cryopreservation of winter buds of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by encapsulation-dehydration 2005년 춘계 한국작물학회 발표
- 9) Cryopreservation of shoot-apices on *Dioscorea* spp. by encapsulation-dehydration. 2005년도 춘계 한국식물생명공학회 발표
- 10) Cryopreservation of *in vitro* grown shoot-apices of yam (*Dioscorea batatas*) by encapsulation-dehydration. 2005년 추계 한국식물생명공학회 발표

#### 4. 인 력 양 성

학위명	성명	일자	논 문 제 목
박 사	신중희	2005. 2월	○ Development of Cryopreservation System using Shoot Apex in <i>Dioscorea</i> spp.
석 사	김현미	"	○ Cryopreservation of herbaceous peony( <i>Paeonia lactiflora</i> Pall.) using Zygotic Embryos and Somatic Embryos
	서미진	2006. 2월	○ Cryopreservation of Herbaceous Peony ( <i>Paeonia lactiflora</i> Pall.) by Encapsulation- dehydration of dormant shoot tips
계	3명		

## 제 2 절 연구개발결과의 활용 계획

### 1. 추가 연구의 필요성

- 가. 작약 유전자원 초저온 동결보존의 가장 이상적인 재료인 동아의 경우 동결·해동 후 재생된 싹으로부터 뿌리 발생에 어려움이 있어(0.11 mg/L NAA가 첨가된 1/4MS 배지에서 20%) 추후 동아의 싹 조직으로부터 뿌리 발생에 효과적인 조건구명이 요구된다.
- 나. 마의 경우도 본 연구에 사용된 유전자원 외의 자원에 대한 조직배양 조건과 동결보존 조건을 구명할 필요가 있으며, YMV-K(Yammosaic virus -K)를 제외한 마생육에 피해를 주는 바이러스 중의 동결 후 감염정도를 검정할 계획이다.
- 라. 전배양 과정의 stress 관련 호르몬의 활용에 대한 연구가 더 상세히 이루어진다면 작약과 마의 동결보존 효율을 더욱 향상시킬 수 있을 것이다.

### 2. 타 연구에의 응용방안

- 가. 본 연구에서 개발된 작약과 마의 초저온 동결보존 방법은 유전자원의 보존기술로서 field genebank의 대체방법으로 활용될 것이다
- 나. 다양한 약용작물 유전자원 초저온 동결보존을 위한 기초자료로서의 이용가치도 매우 높을 것이다.
- 다. 지금까지 확립된 작약과 마의 초저온 동결보존법에 대한 효율성을 분석하여 육종 현장에서 이용될 수 있는 실용화 방안 제시할수 있다.
- 라. 실험에서 얻어진 마의 virus-free 개체를 이용하여 무병주 대량생산과 보급에 활용 가능할 것이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 1. 유전자원의 중장기적, 안정적 보존을 위한 초저온 동결보존 기법의 도입

식물유전자원의 초저온 동결보존 기술개발은 기존의 유전자원 보존체계가 가지는 한계점을 넘을 수 있어서 광범위한 연구가 시도되고 있다(Helliot *et al.*, 2003).  $-196^{\circ}\text{C}$ 의 초저온에서는 모든 세포 분열과 대사과정이 중단되므로 이론적으로는 영구적으로 유전적인 변이 없이 자원을 안전하게 보존할수 있다. 여기에 더하여 저장되는 재료의 부패가 적고, 각종 오염으로부터 안전하며, 유지비용과 노력이 적게 드는 장점도 있다(Hirai & Sakai, 1998; Wang *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2002). 동결보존된 자원은 품종을 개량하는데 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 무병조직을 보존함으로써 자원의 품질을 향상시키는 기능도 하기 때문에 식물 뿐만 아니라 동물, 미생물에 이르기 까지 더 많은 자원에서 초저온 동결보존의 성공사례가 보고되고 있다(Helliot *et al.*, 2002).

### 2. 접합자배와 체세포배를 이용한 초저온 동결보존 기술개발

접합자배는 완전한 식물체로 발전할 수 있는 매우 작은 기관으로 접합자배를 이용한 초저온 동결보존 법의 개발은 보존된 자원의 이용 효율향상이나 신품종개량 및 화훼산업(floricultural industry) 등에서 매우 중요한 의미를 가진다(Ishikawa *et al.*, 1997). 접합자배를 재료로한 초저온 동결보존법의 가장 큰 단점은, 타식성 작물의 경우 종자가 잡종상태로 형성되므로 접합자배를 보존하게 되면 모주의 특성과는 다른 자원을 보존하게 된다는 것이다. 체세포배를 이용한 경우 접합자 배가 가지는 이러한 단점들을 극복할수 있다. 그러나 체세포배를 이용하기 위해서는 고효율의 조직배양체계가 확립되어져야하며 배양과정에서 발생하는 체세포변이도 해결되어야 한다고 Touchell 등 (2002)이 지적한 바 있다. 배를 이용한 성공적인 초저온 동결보존에 대한 논문들이 최근 많은 식물에서 보고되고 있는데, Ishikawa 등(1997)은 japanese terrestrial orchid의 접합자배에서 60%, Abdelnour-Esquivel 등(1992)은 커피의 성숙종자배를 대상으로, Jekkel 등

(1998)은 horse-chestnut 체세포배를 재료로 46%, Tremblay (2000)는 두종의 *Picea species*. 의 체세포배에서 66.7%의 생존개체를 얻었다고 보고한 바 있다.

### 3. 마의 초저온 동결보존 기술개발

Mandal 등(1996) 과 Malaurie 등(1998)은 열대마 종의 기내 신초조직을 이용하여 동결보존에 관여하는 요인들에 대하여 연구한바 있는데 이 두 보고에서는 모든 종에서 동결보존 후 식물 재생이 불균일하고 특히 대부분의 재료가 캘러스 형성을 통하여 식물체로 재생되는 문제점이 있었다. 마에서 조직배양을 통한 기내증식에 대한 연구 보고는 Uduebo ( 1971), Grewal 등 (1977), Mantell 등(1978) Chaturvedi와 Sinha (1979), Ammirato(1984) Sylvia 등 (1995)에 의해 보고된바 있는데 이들 보고에 의하면 *Dioscorea* 속 식물은 그들의 배양체, genotype에 따라 배양시 첨가되는 식물생장조절제에 다른 반응을 보인다고 했다.

### 4. 기내 소피경 형성 과 유전자원 교환 및 전파에서의 중요성

1989년 이래 마 유전자원의 안정적인 교환을 위한 FAO/IBPGR technical guidelines 으로 기내배양체 상태로 자원을 교환하고 전파하는 것을 추천하고 있다. 이러한 면에서 기내 소피경은 마의 유전자원 교환 수단으로 유용하게 이용되어 질수 있으며 (Alizadeh et al., 1998) 포장에서 바로 식물체로 분화될 수 있다는 점에서 더 유리한 자원으로 판단된다(Ng, 1988; John et al., 1993; Malaurie et al.,1993; Mantell, 1993; Ng and Mantell, 1997).

## 제 7 장 참고문헌

1. Abdelnour-Esquivel A, Villalobos V, Engelmann F (1992) Cryopreservation of zygotic embryos of *Coffea* spp, *Cryo-Letters* 13 : 297 - 302.
2. Akira K, Watanabe K, Ueno S, Mitsuda H (1989) Inhibitory effect of ammonium ion on recovery of cryopreserved rice cells, *Plant Science*, 64 : 231-235.
3. Alizadeh S, Mantell SH, Mariaviana A (1998) *In vitro* shoot culture and microtuber induction in the steroid yam *Dioscorea composita* Hemsl. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53: 2. 107-112.
4. Ammirato PV (1984) Yams. *In: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y (eds.), Handbook of Plant Cell Culture, Macmillan, New York, Vol 3: 337-354*
5. Amirato PV (1989) Recent progress in somatic embryogenesis, *Newsletter, International Association for Plant Tissue Culture* 57 : 2 - 16.
6. Asemoto HN, Wellington M, Odutuga AA, Ahmad MH (1992) Effect of short-term storage on phenolic content, *o*-diphenolase and peroxidase activities of cut yam tubers (*Dioscorea* sp). *J Sci Food Agric* 60: 309-312.
7. Asiedu RS., Ng YC, Terauchi R, Hahn SK, Thottapilly G, Monti LM (1992) Analysis of the need for biotechnology research on cassava, yam and plantain, *Biotechnology : enhancing research on tropical crops in Africa* : 27-32.
8. Assy-Bah B, Engelmann F (1992) Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) and subsequent regeneration of plantlets. *Cryo Lett* 13: 117-126
9. Bachiri Y, Gazeau C, Hansz J, Morisset C, Dereuddre J (1995) Successful cryopreservation of suspension cells by encapsulation-dehydration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43: 241-248.
10. Bagniol S, Engelmann F (1991) Effects of pregrowth and freezing conditions on the resistance of meristems of date palm (*Phoenix dactylifera* L var. Bou sthammi Noir) to freezing in liquid nitrogen. *Cryo lett* 12: 279-286.
11. Bajaj YSP (1995) Cryopreservation of plant germplasm I, *Biotechnology in Agriculture and Forestry* No.32.
12. Bomal C, Tremblay FM (2000) Dried cryopreserved somatic embryos of two *Picea* species provide suitable material for direct plantlet regeneration and germplasm storage, *Annals of Botany* 86 : 177 - 183.

13. Bouafia S, Jelti N, Lairy G, Blanc A, Bonnel E, Dereuddre J (1996) Cryopreservation of potato shoot tips by encapsulation-dehydration, *Potato research* 39 : 69 - 78.
14. Brent Loy J (1977) Hormonal regulation of cell division in the primary elongation meristems of shoots, *In: Rost TL, Gifford Jr EM (eds.), Mechanisms and control of cell division.* Dowden, Hutchinson and Ross Inc, Stroudsburg, pp. 92-110.
15. Chang KJ, Shiwachi H, Hayashi M (1995) Ecophysiological studies on growth and enlargement of tubers in yam (*Dioscorea* spp.). II Detection of effect of plant growth regulators on growth and enlargement of microtubers of yam. *Japanese Journal of Tropical Agriculture* 39: 2,69-75.
16. Chaturvedi HC, Sinha M (1979) Mass propagation of *Dioscorea floribunda* by tissue culture. *Extn, Bull, NBRI, Lucknow.*
17. Chaturvedi HC, Sinha M, Sharma AK (1997) Clonal propagation of *Dioscorea deltoidea* Wall. through *in vitro* culture of shoot-apices and single-node leafy cutting. *In: Atal CK, Kapur BM (eds.), Cultivation and Utilization of Medicinal and Aromatic Plants.* Regional Research Laboratory, Jammu-Tawi, India, pp 500-505.
18. Cho EG (2001) Factors affecting cryopreservation in genetic resources of *Citrus madurensis*. Doctoral Thesis of the Kyungpook National University, Department of Agronomy, Korea.
19. 최영철, 류근섭, 방혜선 (2000) 건조 및 초저온 처리에 의한 뽕나무 종자의 장기보존, *Korean J Seric. Sci* 42(1) : 1-5.
20. Chung JD, Harn JS, Sohn JK (1995) Somatic embryogenesis from filament-derived callus of *Paeonia lactiflora* Pall. *Korean J Plant Tissue Culture* 22 : 47-51.
21. Chung JD, Harn JS, Jee SO (1995) In vitro propagation of *Paeonia lactiflora* Pall. Through shoot-tip culture of winter buds, *Korean J. Plant Tissue Culture* 22 : 101 - 104.
22. Dereuddre J, Scottez C, Arnaud Y, Duron M (1990) Resistance of alginate coated axillary shoot tips of pear tree (*Pyrus communis* L. cv. Beurre Hardy) *in vitro* plantlets to dehydration and subsequent freezing in liquid nitrogen: effects of previous cold hardening. *Comptes Rendus de l' Academie des Sciences Paris*, 310 Ser 111: 317-323.
23. Dumet D, Engelmann F, Chabrillange N, Duval Y (1992) Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a desiccation step, *Plant Cell Rep* 12: 352-355.
24. Dumet D, Engelmann F, Chabrillange N, Dussert S, Duval Y (2000) Cryopreservation of oil



- palm polyembryonic cultures. *In*: Engelmann F, Takagi H (eds.), Cryopreservation of tropical plant germplasm. current research progress and application, Japan International Research Center for Agricultural Tsukuba, Japan/International Plant Genetic resources Institute, Rome, Italy, pp 172-177.
25. Dumet D, Engelmann F, Chabrillange N, Richaug F, Beale T, Durand-Gassellin T, Dural Y (1993) Development of cryopreservation for oil palm somatic embryos using an improved process. *Oleagineuy* 48: 273-278.
  26. Dussert S, Chabrillange N, Engelmann F, Anthony F, Vasquez N, Hamon S (2002) Cryopreservation of *Coffea* (Coffee). In : Cryopreservation of Plant Germplasm II, L. E. Towill and Y. P. S. Bajaj (eds), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 50, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 220 -233.
  27. Engelmann F (1997) Importance of desiccation for cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated apices. *Plant Genetic Resources Newsletter* 112: 9-18
  28. Engelmann F (1997) *In vitro* conservation methods. *In*: Callow JA, Ford-Lloyd, Newbury HJ (eds.), *Biotechnology and Plant Genetic Resources*. CAB International, Oxford pp. 119-161.
  29. Escobar R, Mafla G, Roca WM (1997) A methodology for recovering cassava plant from shoot tips maintained in liquid nitrogen. *Plant Cell Rep* 16: 474-478.
  30. Ewing EE (1987) The role of hormones in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization. *In*: Davies PJ (ed.), *Plant hormones and their role in plant growth and development*. Martinus Nijhoff Publishers, Boston, pp 515-538.
  31. Fabre J, Dereiddre J (1990) Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. *Cryo-Lett* 11: 413-426.
  32. FAO/IBPGR (1989) Technical guidelines for the safe movement of yam germplasm. Brunt AA, Jackson GVH, Frison EA (eds.), Rome, pp. 1-20.
  33. Fedorovskii DN, Popov AS (1992) Plasmalemma injuries in different strains of *Dioscorea deltoidea* during cryopreservation, *Soviet Plant Physiology*, 39(3) : 381-385.
  34. Fedorovskii DN and Popov AS (1992) Injuries to the plasmalemma in different strains of *Dioscorea deltoidea* following cryopreservation, *Fiziologiya Rastanii* 39(3) : 592-598.
  35. Find JI, Kristensen MMH, Norgaard JV, Krogstrup P (1998) Effect of culture period and cell density on regrowth following cryopreservation of embryogenic suspension cultures of Norway

- spruce and Sitka spruce, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53 : 27-33.
36. Florin B, Tessereau H, Lecouteux C, Didier C, Pétiard V (1993) Long-term preservation of somatic embryos. In : K. Redenbaugh (ed), *Synseeds. Application of synthetic seeds to crop improvement*, London, CRC Press, pp. 131 - 161.
  37. Ford CS, Jones NB, Staden Jv (2000) Cryopreservation and plant regeneration from somatic embryos of *Pinus patula*, *Plant Cell Report* 19 : 610 - 615.
  38. Forsline PL, Towill LE, Waddell W, Stushnoff C, Lamboy WF, McFerson JR (1998) Recovery and longevity of cryopreserved dormant apple buds, *J Am Soc Hortic Sci* 123 : 365 - 370.
  39. Gonzalez Arnao MT, Engelmann F, Huet F, Urrea C (1993) Cryopreservation of encapsulated apices of sugarcane: effect of freezing procedure and histology. *Cryo-lett* 14: 303-308.
  40. Grewal S, Kaul S, Sachdeva U, Atal CK (1977) Regeneration of plants of *Dioscorea deltoidea* Wall. by apical meristem culture. *Indian J Exp Biol* 15: 201-203.
  41. Harding K, Benson EE (1994) A study of growth, flowering and tuberization in plants derived from cryopreserved potato shoot-tips: Implications for *in vitro* germplasm collections. *Cryo-Lett* 15: 59-66.
  42. Helliot B, Panis B, Poumay Y, Swennen R, Lepoivre P, Frison E (2002) Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana(*Musa* spp.), *Plant Cell Rep* 20:1117-1122.
  43. Helliot B, Swennen R, Poumay Y, Frison E, Lepoivre P, Panis B (2003) Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (*Musa* spp.) highly proliferation meristems, *Plant Cell Report* 21 : 690 - 698.
  44. Hirai D, Sakai A (1998) Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) by encapsulation-vitrification, *Plant Cell Report* 19 : 150 - 155.
  45. Hirai D, Shirai K, Shirai S, Sakai A (1998) Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) by encapsulation-vitrification. *Euphytica* 101: 109-115.
  46. Hirata K, Mukai M, Goda S, Kinugasa MI, Yoshida K, Sakai A, Miyamoto K (2002) Cryopreservation of hairy root cultures of *Vinca minor*(L.) by encapsulation-dehydration, *Biotechnology Letters* 24 : 371-376.

47. Hitmi A, Barthomeuf C, Sallanon H (1999) Cryopreservation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* shoot-tips: Effects of pretreatment conditions and retention of biosynthetic capacity. *Cryo-Lett* 20: 109-120.
48. Hoekstra FA, Golovina EA, Tetteroo FAA, Wolkers WF (2001) Induction of desiccation tolerance in plant somatic embryos: How exclusive is the protective role of sugars?, *Cryobiology* 43 : 140 - 150.
49. Hosoki T, Ando M, Kubara T, Hamada M, Itami M (1989) In vitro propagation of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall) by a longitudinal shoot-split method. *Plant Cell Rep.* 8 : 243 - 246.
50. Ishikawa K, Harata K, Mii M, Sakai M, Yoshimatsu K, Shimomura K (1997) Cryopreservation of zygotic embryos of a japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification, *Plant Cell Report* 16 : 754 - 757.
51. Jean M, Cappadocia M (1992) Effects of some growth regulators on *in vitro* tuberization in *Dioscorea alata* L. 'Brazo fuerte' and *D. abyssinica* Hoch. *Plant Cell Rep.* 11: 34-38.
52. Jekkel Zs, Gyulai G, Kiss J, Kiss E, Heszky LE (1998) Cryopreservation of horse-chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) somatic embryos using three different freezing methods, *Plant Cell, Tiss. Org. Culture* 52 : 193 - 197.
53. John JL, Courtney WH, Decoteau DR (1993) The influence of plant growth regulators and light on microtuber induction and formation in *Dioscorea alata* L. culture *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 34: 245-252.
54. Joshi A, Teng WL (2000) Cryopreservation of *Panax ginseng* cell, *Plant Cell Reports* 19 : 971-977.
55. Kameya-Iwaki M, Yamaguchi K, Hara T, Ito S, Fuji S, Kajihara H, Tanaka S (1999) Detection of japanese yam mosaic virus from chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb. cv ichoimo) by immunocapture PCR and differentiation of virulent and attenuated isolates by PCR-RFLP analysis, *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 65 : 494-497.
56. Kartha KK, Engelmann F (1994) Cryopreservation and germplasm storage *In: Vasil IK, Thorpe TA* (eds.), *Plant cell and tissue culture*, Kluwer, Dordrecht, pp. 195-230.
57. 김원석, 정원중, 민성란, 배경숙, 유장렬 (1995) 한국 벼 품종 배발생 현탁배양 세포의 초저온 보존과 식물체 재분화, *Korean J Plant Tissue Culture* 22(2) : 115-119.

58. Koda Y, Okazawa Y (1983) Influence of environmental, hormonal and nutritional factors on potato tuberisation *in vitro*. Japanese Journal of Crop Science 52: 582-591.
59. Koster KL (1991) Glass formation and desiccation tolerance in seeds. Plant Physiol 96 : 302-304.
60. Kyesmu PM, Takagi H, Yashima S (1997) Cryopreservation of white yam (*Dioscorea rotundata*) shoot-apices by vitrification. In: Proceedings of Annual Meeting of Japan Molecular Biology, 20-12 July 1997, Kumamoto, Japan p. 162.
61. Lambardi M, Fabbri A, Caccavale A (2000) Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of *in vitro* grown shoot-tips. Plant Cell Rep 19: 213-218.
62. Latta R (1971) Preservation of suspension cultures of plant cells by freezing. Canadian Journal of Botany 49: 1253-1254.
63. Linsmaier EM, Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18 : 100 - 127.
64. Lynch PT, Harris WC, Chartier-Hollis JM (1996) The cryopreservation of shoot-tips of *Rosa multiflora*. Plant Growth Reg. 20: 43-45
65. Malaurie B, Pungu O, Dumont R , Trouslot MF (1993) The creation of an *in vitro* germplasm collection of yam (*Dioscorea* spp.) for genetic resources preservation. Euphytica 65: 113-122. Corrigendum, 66: 243.
66. Malaurie B, Trouslot MF, Engelmann F, Chabrillange N (1998) Effect of pretreatment conditions on the cryopreservation of *in vitro* culture of yam (*Dioscorea alata* 'Brazo Fuerte' and *D. bulbifera* 'Noumea Imboro') shoot-apices by encapsulation- dehydration. Cryo-Lett. 19: 15-26.
67. Mallet F, Oriol G, Mary C, Verrier B, Mandrand B (1995) Continuous RT-PCR using AMV-RT and Taq DNA polymerase: characterization and comparison to uncoupled procedure. Biotechniques 18: 678-687.
68. Mandal BB, Chandel KPS, Diwvedi S (1996) Cryopreservation of yam (*Dioscorea* spp) shoot-apices by encapsulation-dehydration. Cryo-Lett. 17: 165-174.
69. Mandal BB, Dixit S (2000) Cryopreservation of shoot-tips of *Dioscorea deltoidea* Wall, an endangered medicinal plant, IPGRI Newsletter for Asia, the Pacific and Oceania, 33, 23.
70. Mandal BB, Malik SK, Chandel KPS (1996) Cryopreservation of encapsulated apices of yams (*Dioscorea* spp.) ultra structural studies on recovery growth. SLTB Annu; Meeting, Dundee,

- Scotland. Selected Abstracts, Cryo-Lett. 18: 73.
71. Mantell SH (1993) Integrated use of micropropagation and conventional propagation techniques for production of certified seed tubers of tropical yams (*Dioscorea* spp.). Adapted propagation techniques for commercial crops of the tropics, IFS, Vietnam, 02/1993. *In: Proceedings of the Southeast Asian Regional Workshop on Propagation Techniques for Commercial Crops of the Tropics* pp. 66-93.
  72. Mantell SH, Haque SQ, Whitehall AP (1978) Clonal multiplication of *Dioscorea alata* L. and *Dioscorea rotundata* Poir. yams by tissue culture. *J Hort Sci* 53: 95-98.
  73. Mantell SH, Hugo SA (1989) Effect of photoperiod, mineral medium strength, inorganic ammonium, sucrose and cytokinin on root, shoot and microtuber development in shoot cultures of *Dioscorea alata* L. and *Dioscorea bulbifera* L. yams. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 16: 23-27.
  74. Matsumoto T, Mochida K, Itamura H, Sakai A (2001) Cryopreservation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) by vitrification of dormant shoot tips, *Plant Cell Reports* 20 : 398-402.
  75. Matsumoto T, Sakai A, Takahashi C, Yamada K (1995) Cryopreservation of *in vitro* grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method. *Cryo-Lett.* 16: 189-196.
  76. Matsumoto T, Sakai A (1995) An approach to enhance dehydration tolerance of alginate-coated dried meristems cooled to -196°C. *Cryo-Letters* 16: 299-306.
  77. Martinez MT, Ballester A, Vieitez AM (2003) Cryopreservation of embryogenic cultures of *Quercus robur* using desiccation and vitrification procedures. *Cryobiology* 46 : 182 - 189.
  78. Mazur P (1984) Freezing of living cells: mechanisms and applications. *American Journal of physiology* 247. *Cell Physiology* 16: 125-142.
  79. Meryman HT, Williams RJ, Douglas MSJ (1977) Freezing injury from solution effects and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology* 14: 287-302.
  80. Meyer MM (1976) Culture of *Paeonia* embryos by *in vitro* techniques. *Am. Peony Soc. Bull.* 217 : 32 - 35.
  81. Mitchell SA, Asnani V, Coke L (1989) The role of tissue culture and minitubers in yam propagation: Experience with Yampie (*Dioscorea trifida*) and Yellow Yam (*D. cayenensis*). *In:*

- Proceedings of Third Annual National conference on Science and Technology : Agricultural Development for the 21st Century. Scientific Research Council, Hope Road Jamaica pp. 79-92.
82. Mitchell SA, McLaughlin W (1992) The use of tissue culture as a rapid multiplication method for Jamaican cultivars of *D. cayenensis* and *D. trifida* In: Proceedings of Second Biotechnology Network Conference, Jamaica UNDP/UNESCO/RLA/87/024, pp 27-37.
  83. Mitchell SA, Redway F (1991) Yam, *Dioscorea cayenensis* cv. RLYY - The tissue culture approach to improved production of planting material. In: Proceedings of OAC/SRC Biotechnology Conference: Tissue culture technology for improved farm production. Scientific Research Council, Hope Road, Jamaica pp 16-24.
  84. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497.
  85. Muzac-Tucker I, Asemota HM, Ahmad MH (1993) Biochemical composition and storage of Jamaican yams (*Dioscorea* sp). *J Sci Food Agric* 62(3): 219-224.
  86. Nagasawa, Finer JJ (1989) Plant regeneration from embryogenic suspension culture of Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) *Plant Sci* 60: 263-271.
  87. Ng SYC (1988) *In vitro* tuberization in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 14: 121-128.
  88. Ng SYC (1992) Micropropagation of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) In: Bajaj YPS (ed.), *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol 19: 135-159 Springer Berlin Heidelberg, New York .
  89. Ng SYC, Mantell SH (1997) Technologies for germplasm conservation and distribution of pathogene-free *Dioscorea* yams to National Root Crop Research Programmes. ODA Project R4886 (H) Final Report. Wye College University of London, UK, 12p.
  90. Niino T, Sakai A (1992) Cryopreservation of alginate coated *in vitro* grown shoot tips of apple, pear and mulberry. *Plant Sci* 87: 199-206.
  91. Niino T, Tashiro K, Suzuki M, Ohuchi S, Magoshi J, Akihama T (1997) Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of cherry and sweet cherry by one-step vitrification. *Sci Hortic* 70: 155-163.
  92. Okazawa Y (1960) Studies on the relation between the tuber formation of potato plant and natural gibberellin content. *Proceedings of Crop Science Society of Japan* 29: 121-124.

93. Panis, B (1995) Cryopreservation of banana germplasm. Ph. D. thesis. No.207. Catholic University, Leuven, Belgium.
94. Park WD (1990) Molecular approaches to tuberization in potato. *In*: Vayda ME, Park WD (eds.), *The Molecular and Cellular Biology of the Potato*. C.A.B. International, Wallingford CT, pp. 43-56.
95. Paul H, Daigny G, Sangwan-Norreel BS (2000) Cryopreservation of apple (*Malus × domestica* Borkh.) shoot tips following encapsulation-dehydration or encapsulation-vitrification, *Plant Cell Report* 19 : 768 - 774.
96. Paulet F, Engelmann F, Glaszmann JC (1993) Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp. hybrids) using encapsulation-dehydration. *Cryo-lett* 12: 525-529.
97. Pence VC (1990) Cryostorage of embryo axes of several large-seeded temperate tree species, *Cryobiology* 27 : 212 - 218.
98. Pence VC (1992) Desiccation and the survival of *Aesculus*, *Castanea*, and *Quercus* embryo axes through cryopreservation, *Cryobiology* 29 : 391 - 399.
99. Pence VC (1995) Cryopreservation of recalcitrant seeds, *In*: Bajaj YPS (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 32. *Cryopreservation of Plant Germplasm I*, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 29-50.
100. Plessis P, Leddet C, Dereuddre J (1991) Resistance to dehydration and to freezing in liquid nitrogen of alginate coated shoot tips of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay). *C. R. Acad. Sci. Paris. Serie III*. 313: 373-380.
101. Plessis P, Leddet C, Collas A, Dereuddre J (1993) Cryopreservation of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay shoot tips by encapsulation-dehydration: effect of pretreatment, cooling and postculture conditions. *Cryo-lett* 14: 309-320.
102. Popov AS, Fedorovskii DN (1992) Damage to the plasmalemma of *in vitro* cultured cells of *Dioscorea* during cryopreservation, *Fiziologiya Rastanii* 39(2) : 335-343.
103. Qiaochun W, Edna T, Amir A, Ron G (2000) Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of grapevine by encapsulation-dehydration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 41-46.
104. Rajora OP, Mosseler A (2001) Challenges and opportunities for conservation of forest genetic resources, *Euphytica* 118 : 197-212.
105. Reed BM, Chang Y (1997) Medium and long-term storage of *in vitro* cultures of temperate

- fruit and nut crops. *In*: Razdan MK, Cocking EC (eds.), Conservation of plant genetic resources *in vitro*. Vol I. science Publishers, Enfield.
106. Reed B, Dumet D, Denoma JM, Benson EE (2001) Validation of cryopreservation protocols for plant germplasm conservation ; a pilot study using *Ribes L.*, Biodiversity and Conservation 10 : 939-949.
107. Rida AS, Smith MAL, Shatnawi MA (1999) Pigment recovery from encapsulated-dehydrated *Vaccinium pahalae*(ohelo) cryopreserved cells, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 55 : 119-123.
108. Ryyänen LA, Haggman HM (2001) Recovery of cryopreserved silver birch shoot tips is affected by the pre-freezing age of the cultures and ammonium substitution, Plant Cell Reports 20 : 354-360.
109. Sakai A (1956) Survival of plant tissue of super-low temperature. Contrib. Inst. Low Temp. Sci. Hokkaido Univ. Ser. B: 14-17.
110. Sakai A (1985) Cryopreservation of shoot tips of fruit trees and herbaceous plants. *In*: Kartha KK (ed.), Cryopreservation of Plant cells and Organs. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 135-158.
111. Sakai A (1997) Potentially valuable cryogenic procedures for cryopreservation of cultured plant meristems. *In*: Razan MK, Cocking EC (eds.), Conservation of Plant Genetic Resources *In Vitro*. Volume 1: General Aspects. Science Publishers Inc. Enfield. USA. pp. 53-66.
112. Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1990) Cryopreservation of mucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. 'brasiliensis Tanaka') by vitrification. Plant Cell Reports 9 : 30-33.
113. Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1991) Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Obs. var. brasiliensis Tanaka) cooled to -196°C. Journal of Plant Physiology 137: 465-470.
114. Sakai A, Matsumoto T, Hirai D, Niino T (2000) Newly developed encapsulation- dehydration protocol for plant cryopreservation. Cryo-lett 21: 53-62.
115. Saleil V, Degras L, Jonard R (1990) Obtention de plantes indemnes du virus de la mosaïque de l'igname (YMV) par culture *in vitro* des apex chez l'igname américaine *Dioscorea trifida* L Agronome 10: 605-615.
116. Sanz MJ, Mingo-Castel A, van Lammeren AAM, Vreugdenhil D (1996) Changes in the



- microtubular cytoskeleton precede *in vitro* tuber formation in potato. *Protoplasma* 191: 46-54.
117. Sawada E, Yakuwa T, Imakawa S (1958) Studies on the formation of aerial tubers in Chinese yam. (II) on the aerial tuber formation in sterile culture of vine segments. *J Hort Assoc Jap* 27: 241-244.
118. Schafer-Menuhr A (1996) Refinement of cryopreservation techniques for potato, Final Report for the Period Sept 1991-1993 Aug 1996. International Plant Genetic Resources Institute. Rome.
119. Shannon J, Kamp (1959) Trials of various possible propagation methods of herbaceous peonies. III. *State Florists. Assoc. Bull.* 197 : 4 - 7.
120. Shibaoka H (1993) Regulation by gibberellins of the orientation of cortical microtubules in plant cells. *Aust J Plant Physiol* 20:461-470
121. Shibli RA, Haagenson DM, Cunningham SM, Berg WA, Volence JJ (2001) Cryopreservation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cells by encapsulation-dehydration, *Plant Cell Report* 20 : 445 - 450.
122. Shin JH, Sohn JK, Kim JC, Park SD (1996) Effect of GA<sub>3</sub> on seed germination of peony (*Paeonia latiflora* Pall.). *Korean J Plant Tissue Culture* 23 : 231-234.
123. Shin JH, Shon JK, Kim KM, Kim KJ, Kim JC (1998) Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis from cotyledon of herbaceous Peony(*Paeonia lactiflora* Pall.), *Korean J. Plant Tissue Culture* 25(2) : 115-118.
124. Shin JH, Sohn JK, Park SD, Kim KM (1997) Plant regeneration through somatic embryogenesis from cotyledon of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall). *Korean J Plant Tissue Culture* 24 : 291-294.
125. Sohn JK, Kim KS, Kim KM (1994) Development pollen-derived embryos and ploidy level of their regenerated plants in *Paeonia lactiflora* Pall. *Korean J Plant Tissue Culture* 21 : 215-219.
126. Sohn JK, Kwon YS, Kim KM (1995) Effect of embryo morphology on plant development in anther cultures of *Paeonia lactiflora* Pall. *Korean J Plant Tissue Culture* 22 : 165-168.
127. Sohn JK, Kwon YS, Shin YA (2002) Effect of phenylacetic acid (PAA) on formation in anther and microspore culture of *Paeonia lactiflora*, *Korean J. Plant Biotechnology* 29 : 193 - 198.

128. Sohn JK, Kim YH (1993) Effect of plant growth regulators on callus and embryoformation in anther culture of *Paeonia lactiflora* Pall., Korean J. Plant Tissue Culture 20 : 255 - 259.
129. Steponkus PL, Langis R, Fujikawa S (1992) Cryopreservation of plant tissues by vitrification *In*: Steponkus PL (ed.), Advances in low temperature biology. JAI Press, London, pp 1-61.
130. 성낙술, 박충현, 박춘근, 이승택, 박상일 (1996) 마(*Dioscorea batatas* Decne.) 우량종묘 생산을 위한 생장점 배양 및 순화조건. *Korean J. Breed* 28(2) : 134-141.
131. Sylvia AM, Helen NA, Mohammad HA (1995) Factors affecting the *in vitro* establishment of Jamaican yams (*Dioscorea* spp) from nodal pieces. *J Sci Food Agric* 67: 541-550.
132. Takagi H, Thinh MT, Islam OM, Senboku T, Sakai A (1997) Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification. 1. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. *Plant Cell Reports* 16 : 594-599.
133. Tannoury M, Ralambosoa J, Kaminski M, Dereuddre J (1991) Cryopreservation by vitrification of alginate coated carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot tips of *in vitro* plantlets. *C R Acad Sci Paris*, t. 313, III: 633-638.
134. Tessereau H, Florin B, Meschine C, Thierry C, Petiard V (1994) Cryopreservation of somatic embryos: a tool for germplasm storage and commercial delivery of selected plants. *Ann Bot* 74: 547-555.
135. Tizio RM (1971) Action et role probable de certaines gibberellines (A1, A3, A4, A5, A7, A9 et A 13) sur la croissnce de stolons et la tuberisation de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) *Potato Research* 14: 193-204.
136. Touchell DH (1995) Principles of cryobiology for conservation of threatened Australian plants. Doctoral Thesis of the University of Western Australia, Botany Division, Australia.
137. Touchell DH, Dixon KW (1996) Cryopreservation for conservation of Australian endangered plants. *In*: Normah MN, Narimah MK, Clyde MM (eds.), *In Vitro* Conservation of Plant Genetic Resources. Plant Biotechnology Laboratory, Faculty of Life Sciences, University Kebansaan, Malaysia, pp. 169-180.
138. Touchell DH, Chiang VL, Tsai CJ (2002) Cryopreservation of embryogenic cultures of *Picea mariana* (black spruce) using vitrification, *Plant Cell Report* 21 : 118 - 224.
139. Towill LE (2002) Cryopreservation of plant germplasm: introduction and some observations.

- In : Cryopreservation of Plant Germplasm II, Towill LE and YPS Bajaj (eds), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 50, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 3 - 21.
140. Towill LE (2002) Cryopreservation of *Mentha* (Mint). In : Cryopreservation of Plant Germplasm II, Towill LE and YPS. Bajaj (eds), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 50, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 151 - 163.
  141. Twyford CD, Mantell SH (1996) Production of somatic embryos and plantlets from root cells of the greater yam. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 46: 17-26.
  142. Uragami A, Sakai A, Nagai M (1990) Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. *in vitro*. *Plant Cell Reports* 9: 328-331.
  143. Vandebussche B, Weyens G, Proft MD (2000) Cryopreservation of *in vitro* sugar beet (*Beta vulgaris* L.) shoot tips by a vitrification technique, *Plant Cell Reports* 19 : 1064-1068.
  144. Vreugdenhil D, Struik PC (1989) An integrated view of the hormonal regulation of tuber formation in potato (*Solanum tuberosum*). *Physiol Plant* 75: 525-531.
  145. Wang JH, Ge JG, Liu F, Bian HW, Huang CN (1998) Cryopreservation of seeds and protocorms of *Dendrobium candidum*. *Cryo-Lett* 19: 123-128.
  146. Wang JH, Huang CN (2002) Cryopreservation of Hordeum (Barley). In: Towill, L. E., and Y. P. S. Bajaj (eds) Biotechnology in Agriculture and Forestry 50: Cryopreservation of Plant Germplasm II (119 ~ 135), Springer, Berlin..
  147. Wang QC, Bathman O, Li P, Joseph MB, Gafny R (2002) Cryopreservation of invitro-grown shoot tips of 'Troyer' citrange [*Poncirus trifoliata*(L.) Raf. × *Citrus sinensis*(L.) Osbeck] by encapsulation-dehydration, *Plant Cell Reports* 20 : 901-906.
  148. Wang Q, Tanne E, Arav A, Gafny R (2000) Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tip of grapevine by encapsulation-dehydration, *Plant Cell, Tiss. Org. Culture* 63 : 41 - 46.
  149. Wang Q, Gafny R, Sahar N, Ilan Sela, Nawassi M, Tanne E, Perl A (2002) Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-dehydration and subsequent plant regeneration, *Plant Science* 162 : 551 - 558.
  150. Wellington MA, Ahmad MH (1993) Glutathione and  $\beta$ -amylase, peroxidase and *o*-diphenolase activities during sprouting of miniset yams (*Dioscorea* sp). *J Sci Food Agric* 62: 225-228 .

151. Withers LA, Engelmann F (1997) *In vitro* conservation of plant genetic resources. *In*: Altman A (ed.), *Biotechnology in Agriculture*. Marcel Dekker, New York.
152. Withers LA, Engelmann F (1998) *In vitro* conservation of plant genetic resources. *In*: Altman A (ed.), *Agricultural Biotechnology*, Marcel Dekker, New York, pp. 57-88.
153. Wu Y, Engelmann F, Zhao Y, Zhou M, Chen S (1999) Cryopreservation of apple shoot tips: importance of cryopreservation technique and of conditioning of donor plants. *Cryo-lett* 20: 121-130.
154. Zhao Y, Wu Y, Engelmann F, Zhou M, Zhang D, Chen S (1999) Cryopreservation of apple shoot tips by encapsulation-dehydration: effect of preculture, dehydration and freezing procedure on shoot regeneration. *Cryo-lett* 20: 103-108.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.