

발 간 등 록 번 호

11-1543000-000471-01

토속화훼자원의 상품화 및 수출확대를 위한 대량증식과  
고품질 생산 기술 개발

Development of Low-energy Production Technology for  
Exportable Local Floricultural Resources

서 울 대 학 교  
경 상 대 학 교  
경남과학기술대학교

농 립 축 산 식 품 부

# 전 체 목 차

## I. 세부과제

몇 가지 토속화훼식물의 분화 생산과 연중 생산을 위한 재배 기술 개발 ..... 1

## II. 제1협동과제

조직배양을 통한 토속식물의 대량번식기술 개발 ..... 122

## III. 제2협동과제

바위솔, 노루귀의 대량증식 및 고품질 분화 재배기술 개발 ..... 348

제1세부연구기관  
최종보고서

몇 가지 토속화훼식물의 분화 생산과  
연중 생산을 위한 재배 기술 개발

서울대학교

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “토속화훼자원의 상품화 및 수출확대를 위한 대량증식과 고품질 생산 기술 개발에 관한 연구” 과제(제1세부과제 “몇 가지 토속화훼식물의 분화 생산과 연중 생산을 위한 재배 기술 개발”)의 보고서로 제출합니다.

2014년 4월 일

주관연구기관명 : 서울대학교  
주관연구책임자 : 김 기 선  
세부연구기관명 : 서울대학교  
세부연구책임자 : 김 기 선  
선 임 연 구 원 : 이 용 하  
선 임 연 구 원 : 이 승 연  
선 임 연 구 원 : 정 현 환  
선 임 연 구 원 : 류 주 현  
선 임 연 구 원 : 김 윤 진  
연 구 원 : 윤 나 영  
연 구 원 : 여 수 미  
연 구 원 : 박 주 현  
연 구 원 : 박 채 정  
연 구 원 : 강 보 경

# 요 약 문

## I. 제 목 (제1세부과제)

몇 가지 토속화훼식물의 분화 생산과 연중 생산을 위한 재배 기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

작약, 무늬둥굴레, 깽깽이풀과 같은 식물들은 관상가치가 매우 높은 우리나라 토속식물들이다. 작약과 무늬둥굴레의 연중 생산을 기술을 개발하고 깽깽이풀의 번식 및 고품질 분화생산기술을 개발함으로써 국내 소비를 촉진시킬 뿐 만 아니라 더 나아가 해외로 수출하여 우리나라 화훼산업의 국가 경쟁력을 제고하고자 한다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

| 구분<br>(연도)     | 연구개발의 목표                 | 연구개발의 내용   |
|----------------|--------------------------|--|
| 1차년도<br>(2009) | ○ 토속화훼식물의 증식 기술 개발       | (깽깽이풀)<br>○ 종자발아 기술 개발<br>- 이중휴면 생리구명<br>- 온도처리에 의한 휴면 타파<br>- GA에 의한 휴면 타파                                    |
| 2차년도<br>(2010) | ○ 작약과 무늬둥굴레의 축성 및 억제재배   | ○ 조기 휴면 유도<br>- 단일처리<br>- 호르몬 처리<br>○ 화아 분화 단계별 춘화 처리가 이후 개화에 미치는 영향 연구<br>○ 저온 저장 기간 구명 및 재배 후 평가             |
| 3차년도<br>(2011) | ○ 토속화훼식물의 고품질 분화생산 기술 개발 | (깽깽이풀)<br>○ 개화 적정 온도 구명<br>○ 휴면 요인 구명과 회피 기술(온도, 일장)<br>○ 양액재배를 이용한 축성 재배<br>○ 휴면타파 기술 개발<br>- 저온 요구도와 적정 생육온도 |
|                | ○ 작약과 무늬둥굴레의 억제 및 축성재배   | ○ 최적의 휴면타파 조건 구명<br>- 최소 기간 구명<br>- 적정 온도 구명<br>○ 최대 냉장 보관 기간 구명<br>○ 작약의 축성, 억제 재배에 필요한 보완 실험                 |

| 구분<br>(연도)     | 연구개발의 목표                 | 연구개발의 내용   |
|----------------|--------------------------|--|
| 4차년도<br>(2012) | ○ 토속화훼식물의 고품질 분화생산 기술 개발 | (깽깽이풀)<br>○ 양액재배를 이용한 축성 재배<br>○ 휴면타과 기술 개발<br>- 최소 기간과 적정 온도 구명<br>○ 변온 재배<br>- 겨울철 시설재배<br>- 여름철 시설재배<br><br>(무늬 둥글레)<br>○ PGR 처리를 통한 고품질 재배<br>- GA처리 |
| 5차년도<br>(2013) | ○ 토속화훼식물의 고품질 분화생산 기술 개발 | (깽깽이풀)<br>○ PGR 처리를 통한 고품질 재배<br>- GA <sub>3</sub> , GA <sub>4+7</sub> 를 통한 휴면타과   |
|                | ○ 농가 현장 실증 실험 및 문제점 보완   | ○ 1-4년차 실험에서 효과가 있었던 기술을 현장에 적용<br>○ 기 개발된 기술 농가에 이전<br>○ 토속 식물류의 실용적인 축성재배기술 확립 및 경제성 분석  |
|                | ○ 개발된 토속식물 분화 해외 시험 수출   | ○ 개발된 토속식물 분화 일본에 시험 수출<br>○ 일본의 바이어 및 현지에서의 평가  |
|                | ○ 토속 화훼 작물의 매뉴얼 작성       | ○ 각 작물별(작약, 무늬둥글레)로 재배 매뉴얼 작성  |

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### 1. 연구개발의 결과

###### 가. 작약의 연중생산 기술 개발

‘태백’ 작약은 10°C이하의 온도로 자연 저온 시간이 1,224시간이 되는 12월 31일(2009년 기준)이후에 가온이 되는 온실에 입실할 때 2월 말에 개화가 되었다. 또는 11월 초에 노지에 있던 작약을 0°C에서 6주 또는 5°C에서 9주 인공저온처리를 했을 때 2월 중순에 개화를 시킬 수 있다. 이보다 앞선 시기에 개화를 유도하기 위해서는 9, 10월경에 10°C에서 2주간 예냉처리를 하고 이어서 0°C에서 6주 저온처리를 해야 한다. 이때 개화는 1월에 이루어지며 꽃눈이 퇴화되는 현상도 없이 정상 개화 시킬 수 있다. GA처리를 통해서도 축성재배를 할 수 있는데, GA는 휴면 중인 작약의 저온을 완전히 대체하지 못하기 때문에 자연상태에서 어느 정도 저온을 받은 12월 초에 이어서 처리를 해야 꽃눈 퇴화 현상 없이 정상개화를 시킬 수 있다. 이러한 꽃눈 퇴화 현상은 식물내의 ABA의 생합성과 관련된 것으로 GA처리 시 ABA생합성 억제제인

fluridone을 저농도 처리하면 꽃눈 퇴화를 억제하며 개화를 유도 할 수 있다. 또한 작약은 0°C에서 장기저장이 가능하여 7-10월에도 개화를 유도할 수 있다.

#### 나. 무늬동굴레의 연중생산 기술 개발

무늬동굴레는 자연에서 저온을 충분히 받은 1월 7일 이후(2010년 기준) 입실하여 3월 초부터 절엽 수확이 가능하다. 인공저온처리는 무늬동굴레가 휴면에 들어가는 늦가을에 0°C에서 4주 이상 처리해야 하며 이때 절엽은 1-2월에 수확 할 수 있다. 축성재배 이후 일찍 휴면에 들어간 무늬동굴레를 7월초 저온 처리(0°C에서 4주 이상)하게 되면 9-10월에 절엽을 수확 할 수 있다. 또한 2월초에 무늬동굴레를 0°C에서 3-6개월 정도 장기저장이 가능한데, 이를 통해 8-9월에도 절엽을 수확할 수 있다. 무늬동굴레는 휴면중인 눈에 두꺼운 왁스층이 있어 GA가 침투하지 못하는데, 주사기나 면도날을 이용하여 물리적인 상처를 내거나 락스로 화학적으로 표층을 일부제거하여 GA를 처리할 때 무늬동굴레의 휴면을 인위적으로 타파 시킬 수 있다. 무늬동굴레는 15/6°C(주/야간) 이상에서 정상 생육이 가능하며, 시중에 상용화된 어떤 상토(피트모스와 펄라이트가 7:3정도)에서도 잘 자랐다

#### 다. 깽깽이풀의 종자 번식 및 분화생산 기술 개발

깽깽이풀의 종자채종은 5월이지만 긴 휴면을 가지고 있어 8개월이 지난 이듬해 3월이 되어야 발아를 한다. 깽깽이풀은 여름의 고온과 겨울의 저온을 순차적으로 받아야만 발아가 이루어지는 특성을 가지고 있으며 GA통하여 휴면이 타파되지 않은 깊은 휴면을 가지고 있다. 그러나 GA<sub>3</sub> 1000mg/L을 처리하고 15/6°C에 배양하고 8주가 지났을 때 발아가 80%이상 이루어졌다. 또한 휴면이 깨지는 동안 종자내부의 효소의 endo-β-mannanase 활성도가 생기며 GA와 ABA의 비율에 따라 종자의 휴면 여부가 결정됨을 구명했다.

깽깽이풀의 식물체는 50%이상의 차광 그리고 Sonneveld 0.5배액 (전기전도도: 1.2-1.9 dS/m)에서 최적의 성장을 나타냈다. 그리고 종자와 달리 식물체는 GA로 휴면이 타파가 되어 처리 후 2개월 만에 개화를 유도할 수 있다. 휴면에 들어간 식물체는 0°C에서 6주 처리하였을 때 휴면을 타파하여 축성재배를 할 수 있었다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구성과

가. 사업화(1건)

나. 교육지도(5건)

다. 언론홍보(4건)

라. 기타홍보실적-수상(3건)

마. 타연구개발사업에의활용(1건)

바. 특허출원(2건)

사. 논문발표(7편 논문게재 및 발표 14건)

(1) 논문투고 및 출판

(가) SCI급 논문 6편

(나) 비SCI급 논문 1편

(2) 논문발표

(가) 포스터발표(9편)

(나) 구두발표(5편)

## 2. 활용방안

본 연구에서 개발된 작약과 무늬등굴레의 연중생산 기술은 현장에 바로 적용이 가능하며 시험 재배 및 시험 수출도 성공적으로 이루었다. 다만 품종에 따른 특성이 다를 수 있기 때문에 실증실험을 수반하여야 한다. 깽깽이풀의 재배기 단축을 위한 방법도 바로 적용이 가능하지만 연구책임자 또는 농업기술센터 조직을 통해 적용해 보기를 추천한다.



# SUMMARY

(영문요약문)

Development of Pot Production System and Year Round Production for Local Floricultural Resources

## 1. Development of a year-round production system for Peony

*Paeonia lactiflora* 'Taebaek' flowered at the end of February when transferred to a heated greenhouse after December 31 (in 2009) on which the natural cumulative chill hour under 10°C was 1,224 hours. Also, *P. lactiflora* grown in the open field in early November flowered in mid February after chilling treatment at 0°C for 6 weeks or at 5°C 9 weeks. To induce flowering earlier than those period, pre-cooling at 10°C for 2 weeks during September or October followed by low temperature treatment at 0°C for 6 weeks is recommended. Pre-cooled *P. lactiflora* flowered during January normally without any bud abortion. GA 100 ppm can be used as a forcing method. However, GA can not alternate low temperature treatment completely for normal flowering without bud abortion. It should be treated during December after the plants are exposed to natural low temperature. Because bud abortion is related to ABA synthesis, GA treatment with low concentration of fluridone, an inhibitor of ABA synthesis, can induce flowering while inhibiting bud abortion. *P. lactiflora* can be stored at 0°C for a long period to induce flowering from July to October.

## 2. Development of a year-round cut foliage production system of variegated Solomon's seal

Cut foliage of Variegated Solomon's seal can be harvested from early March when the plants were exposed sufficiently to natural low temperature and transferred after January 7 (in 2010). To harvest in January and February, artificial chilling treatment at 0°C for more than 4 weeks is recommended. After forcing culture, the dormant plants with chilling treatment at 0°C for more than 4 weeks can produce cut foliage in September and October. During early February, variegated Solomon's seal also can be harvested in September and October when stored at 0°C for 3-6 months. As GA can not be infiltrated to the dormant buds, which are wrapped with waxed layers, GA can be used for artificial dormancy breaking after the outer wax layers are removed by physical scars with an injector or a razor blade or by chemical treatment with NaOCl. Variegated Solomon's seal grows well under the temperature over 15/6°C and with any commercial substrate containing a 7:3 ratio of peat moss and perlite.

### **3. Development of cultivation period shortening system of *Jeffersonia dubia***

*J. dubia* seeds cannot immediately germinate after dispersal in May. It takes more than 270 days for seeds of *J. dubia* to germinate under field conditions. *J. dubia* seeds have an underdeveloped embryo at seed maturity (dispersal), and this embryo has to grow inside the seed before the seeds can germinate. In the laboratory experiments, incubation at high temperatures (25/15°C) for at least 8 weeks was required to initiate embryo growth, while a transfer to moderate temperatures (20/10°C; 15/6°C) was needed for the completion of embryo growth. At least 8 weeks at 5°C was effective in overcoming the physiological dormancy and germination in seeds after the embryos were fully elongated. Thus, both high and low temperatures were essential to break dormancy. GA<sub>3</sub> treatment was used as a substitute for the high temperature requirement, but not for the low temperature requirement. Although seeds require 9-10 months from seed dispersal to germination in nature, under controlled conditions they required only 3 months after treatment with 1,000 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> followed by incubation at 15/6°C. Moderate light (50% shading) and 0.5 to 1.0 × concentrations of nutrient solution (EC 1.2 to 1.9 dS·m<sup>-1</sup>) is recommended for cultivating *J. dubia* without physiological defects.

# 목 차

|                                      |     |
|--------------------------------------|-----|
| 제 1 장 연구개발과제의 개요 .....               | 9   |
| 제 1 절 연구개발의 목적과 필요성 .....            | 9   |
| 제 2 장 연구개발과제의 개요 .....               | 10  |
| 제 1 절 국외 현황 .....                    | 10  |
| 제 2 절 국내 현황 .....                    | 12  |
| 제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과 .....           | 13  |
| 제 1 절 작약의 연중 생산 기술 개발 .....          | 13  |
| 제 2 절 무너등굴레의 연중 생산 기술 개발 .....       | 41  |
| 제 3 절 깽깽이풀의 생육 기간 단축 기술 .....        | 56  |
| 제 4 절 작약의 농가 실증 실험 및 모의 수출 .....     | 89  |
| 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....       | 98  |
| 제 1 절 목표달성도 .....                    | 98  |
| 제 2 절 관련분야의 기술발전 기여도 .....           | 100 |
| 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....        | 101 |
| 제 1 절 실용화·산업화 계획(기술실시 등) .....       | 101 |
| 제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등 .....     | 102 |
| 제 3 절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보 계획 ..... | 103 |
| (부록) 작약과 무너등굴레의 연중생산 매뉴얼 .....       | 106 |
| 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....    | 120 |
| 제 7 장 참고문헌 .....                     | 121 |

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적과 필요성

국내 뿐 아니라 해외의 화훼 시장은 끊임없이 새롭고 다양한 화훼 유전자원을 발굴하여 상품화 하며 발전하고 있다. 우리나라에도 작약, 무늬동굴레, 깽깽이풀, 노루귀, 바위솔, 섬개야광나무, 번홍화와 같이 관상가치가 높은 토속식물들이 많이 있으나 재배기술의 표준화가 이루어지지 않아 재배자들이 접근하기 어려운 면이 있다. 또한 식물들은 개화기가 정해져 있으며 한정된 기간에 대량으로 생산되어 값이 떨어져 증가소득의 감소 요인이 되기도 한다. 종자 휴면이 길거나 개화기까지의 영양생장 기간이 긴 화훼류는 생산비가 많이 들어 재배농가에 부담이 가중되는 문제점이 있다.

세부1과제인 서울대(서울대학교)에서는 작약과 무늬동굴레의 연중생산 기술을 개발하여 농가의 새로운 소득 창출과 국내 소비 뿐 아니라 해외 수출의 기회를 제공하는 재배 매뉴얼을 개발하고자 한다. 또한 깽깽이풀은 긴 종자 휴면과 영양 생장 기간이 길기 때문에 생육기 단축을 위한 종자휴면타파, 최적 생육을 위한 재배 조건 구명을 목표로 연구를 진행하였다.

협동1과제인 경상대(경상대학교)에서는 과제 대상 화훼류의 대량생산기술을 개발하였다. 영양번식으로는 개체수 확보가 어렵고, 노동력이 많이 소요된다. 하지만 조직 배양기술은 무병주 식물을 대량으로 생산하고 시기에 따라 계획 생산할 수 있는 기술로 재배 농민이 원하면 단시간에 대량의 식물을 확보할 수 있게 한다.

협동2과제인 경남과기대(경남과학기술대학교)에서는 우리나라에 자생하고 있는 노루귀, 바위솔의 다양한 종을 수집하고 소비자의 기호도를 조사하였다. 이후 노루귀와 바위솔의 종자휴면타파, 식물체 재배기술을 개발하여 고부가가치 분화 생산 기술을 개발하였다.

이러한 연구를 바탕으로 몇 가지 식물들을 시험 재배한 후, 일본으로 모의 수출을 수행하였다. 수출 과정 중의 에로사항을 점검하여 수출 가능성을 타진하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국외 현황

#### 1. 작약의 연중생산 기술

작약은 중국에서 3,000년 전부터 재배가 되었다는 기록이 있으며 현재는 미국, 유럽, 일본 등에서 정원 식재용으로 널리 사용되고 있다. 작약은 여러 나라에서 ‘정원의 여왕’이라고 불릴 정도로 관상적인 가치가 뛰어나며 부귀와 영화를 상징하는 꽃으로 명성이 높다(Barzilay et al., 2002). 19세기 때 유럽으로 널리 보급이 되었으며 1850년대부터 미국의 여러 육종가에 의해 다양한 품종이 개발되었다.

작약의 자연 개화 시기는 5-6월에 한정되어 있지만, 자연개화시기 이외의 시기에도 절화작약을 얻고자 하는 시도들은 1980년대에 유럽에서부터 연구가 시작 되었다. 미국, 네덜란드, 뉴질랜드, 일본 등에서 작약의 개화조절과 관련된 연구가 이루어 졌는데, 특히 The Hebrew University of Jerusalem의 A.H. Halevy 교수팀에 의해 작약의 개화 조절 연구가 활발히 이루어졌다. 이러한 연구들은 보통 축성재배를 통해 자연개화시기보다 앞선 시기인 1-2월에 절화를 생산하는데 만 초점을 맞추어져 있었다. 또한 GA(Gibberellic acid)을 처리하여 작약의 휴면을 타파 하려는 연구도 이루어졌다. 하지만 GA처리 이후 식물체가 고사하는 현상이 나타나 현재는 작약의 휴면타파를 위해 GA를 처리 하고 있지 않은 상황이다.

본 연구팀은 여러 자료 조사를 통하여 작약의 축성 재배 기술을 정리하고 기존의 연구의 개념을 확장하여 온도 처리를 통한 작약의 연중생산 시스템을 개발하였다. 또한 GA처리 시 나타나는 식물체 고사 현상의 원인을 구명하고 GA처리 시 식물체 고사 현상 없이 개화를 유도 하는 기술을 개발하였으며, 이는 아직 연구자들에게는 보고가 된 바 없는 새로운 내용이라고 할 수 있다.

#### 2. 무늬등굴레의 연중생산 기술

무늬등굴레는 백합과에 속하는 다년생 숙근초이며 한국, 일본, 중국에 자생한다. 대나무를 닮은 잎은 곱게 호생하며 줄기는 곧게 30-60cm 정도 자라고 윗부분으로 가면서 약간 구부러지는 특성이 있다. 잎에는 세로맥이 있고 싱그러운 녹색에 희거나 노란 무늬가 있는 것이 특징이다. 꽃꽂이와 각종 화훼장식에 연중 소비가 가능한 무늬 등굴레이지만 절엽의 생산 시기가 5-6월 등으로 한정되어 있는 문제가 있다.

대만국립대학에서 무늬등굴레의 축성재배에 대해 연구 된 바가 있으나 저온처리 온도가 0.8-2℃의 좁은 범위에서 연구되었을 뿐이다. 더욱 넓은 범위의 온도 조건 또는 자연 온도 조건에서 무늬등굴레의 휴면타파가 어떻게 나타나는지 연구할 필요가 있다. 또한 장기저온저장이나 GA처리를 통한 무늬등굴레의 휴면타파에 대해서도 아직 연구된 바가 없다,

#### 3. 깽깽이풀의 생육 기간 단축 기술

깽깽이풀은 매자나무과(Berberidaceae)에 속하며 우리나라 전역의 깊은 산에 자생하는 다년

생 초본이다(Hutchinson, 1920). 꽃은 홍자색으로 4-5월에 꽃이 피는데 관상용으로 가치가 높다. 열매는 삭과로 타원형이며 끝이 부리처럼 길고, 종자는 타원형 구형으로 검은색이다. 깽깽이풀의 종자는 꽃이 진 이후에 6월에 결실 후 꼬투리가 터져 땅에 떨어지게 된다(Huang, 1995). 종자는 바로 발아를 하지 않고 여름, 가을, 겨울을 지나 이듬해 봄에 발아를 하게 되는데, 이는 깽깽이풀의 특이적인 종자 휴면이 있기 때문이라고 여겨진다. 깽깽이풀이 개화 가능한 성숙한 개체가 되기까지 종자로부터 약 4-5년의 시간이 소요된다.

*Jeffersonia*속은 전 세계에 2종 밖에 없으며 깽깽이풀(*Jeffersonia dubia*)은 우리나라와 중국 북동지역, 만주지역에 자생하고 있으며 다른 한 종은 *Jeffersonia diphylla*로 미국 북동 지역에 자생하고 있다. *Jeffersonia*속 안에 2개의 종밖에 없는 특성 때문에 이 두 종의 형태, 유전 비교 연구가 이루어졌으며, 생태학적인 특성, 종자 산포 방법 등에 대해서도 미국에서 연구된 바 있다. 하지만 아직 종자 휴면 타파, 축성재배나 생육 촉진을 위한 차광, 양액재배 등 재배기술에 대한 연구는 아직 이루어진 바는 없다.

## 제 2 절 국내 현황

### 1. 작약의 연중생산 기술

작약은 국내에서 한약재로 사용되며 생산과 소비 면에서 가장 중요한 약용작물 중 하나이다. 그런데 큰 화형과 다양한 화색이 아름다워 화훼장식으로 이용가치가 높은 작목이 되었고 최근 고급 웨딩부케 및 꽃꽂이 소재로 활용되며, 작약의 절화 수요가 급격히 증가하고 있다. 국내 작약 재배 방법은 노지 재배에 의존하고 있는데, 판매동향을 보면 자연생산시기인 5-6월에는 한 단, 즉 5송이에 4,000-6,000원정도로 판매되고 있지만 자연생산시기를 제외한 나머지 기간은 전량 수입하기 때문에 16,000원을 호가하는 높은 가격으로 국내에서 유통이 되고 있다. 작약의 연중생산이 가능하게 된다면 재배 농가의 소득 향상, 국내 작약 생산의 안정화, 더 나아가 수출을 기대할 수 있다.

### 2. 무늬등굴레의 연중생산 기술

같은 등굴레속의 다른 종들은 예전부터 국내에서 약재로 사용되었고 요즘에는 차로 개발되어 이용되고 있다. 하지만 무늬등굴레는 관상적인 가치가 재평가되며 최근 절엽소재로 사용되고 있다. 꽃꽂이와 각종 화훼장식에 연중 소비가 가능한 무늬 등굴레이지만 절엽의 생산 시기가 5-8월 등으로 한정되어 있는 문제가 있다. 절엽시점에 맞추어 생산되는 무늬등굴레의 절엽 생산은 생산 농가의 소득을 향상시킬 수 있는 가능성이 매우 높지만 아직 국내에서 이 시기에 생산되는 사례는 매우 적다.

### 3. 깻깻이풀의 생육 기간 단축 기술

깻깻이풀은 청열, 해독, 건위의 효능이 있을 뿐 아니라, 소화불량, 식욕감퇴, 오심, 장염, 이질, 발열건조, 결막염, 편도선염을 치료하는데 사용되어 왔다(Bae, 2000). 그러나 아직 대중적으로 국내 시장에 널리 알려져 있지 않아 식물 자원으로 국내 시장 현황을 파악하기는 어려운 상황이다.

관상적, 약리적인 가치가 뛰어난 깻깻이풀은 최근 무분별한 식물 채취와 토지 개발로 인해 자생지가 훼손되어 개체군이 줄어드는 문제가 있었으며 최근까지 멸종 위기 식물로 분류가 되었다(NIER, 2004).

국내에서 깻깻이풀의 번식 및 분화재배를 위한 기술이 부족한 상태이다. 당해 연도에 휴면 종자를 받아 시키는 기술이 개발 된다면 깻깻이풀의 작기를 1년 단축시킬 수 있을 것이다. 또한 생육 촉진을 위한 재배 기술의 개발이 필요한 상태이다.

# 제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

## 제 1 절 작약의 연중생산 기술

### 1. 자연저온처리를 통한 작약의 축성재배

#### 가. 연구목적

작약은 자연 상태에서 5-6월에 개화하며 이후 지상부는 가을까지 남아 광합성을 하게 된다. 늦가을에 이르게 되면 작약의 지상부는 고사하고 줄기 하부에 있는 눈은 내재적 휴면에 들어가게 되며 생장을 멈추게 된다. 자연 상태에서는 겨울을 지내며 저온을 받아 내재적 휴면이 타파되고 이듬해 봄이 되어 기온이 상승할 때 작약은 다시 생장을 개시하며 개화를 하게 된다 (Fulton et al., 2001).

자연 개화시기보다 앞선 시기에 절화 작약을 수확하기 위한 방법 중의 하나로 자연저온처리 실험을 수행하였다. 자연저온처리는 자연 상태에서 저온의 누적 정도를 계산하여 가온이 되는 온실에 입실하여 개화를 유도하는 방법으로 저온고와 같은 시설이 필요 없는 장점이 있다.

#### 나. 재료 및 방법

식물재료는 우리나라에 자생하는 작약 중 절화 가치가 뛰어나다고 판단이 된 ‘태백’ 작약과 ‘물수레’ 작약을 선정했다. ‘태백’ 작약은 분홍색 계열의 겹꽃으로 미국에서 도입하여 *Paeonia lactiflora* ‘Sorbet’을 육종하고 현재 절화 작약으로 시판되고 있다. ‘물수레’ 작약은 진한 자주색의 겹꽃으로 화형이 크고 색이 선명하여 절화로서의 개발 가치가 뛰어나다고 판단된다(그림 1-1-1).

작약 두 품종은 2009년 10월 30일에 경남 진주시 사봉면 봉곡리에 위치한 작약 농장에서 뿌리(tuber)상태로 굴취하였다. 길이는 한 tuber당 약 24-30cm 정도이며, 꽃눈은 6-10개정도가 붙어 있었다(그림 1-1-2A). 뿌리를 소독하기 위해 배노틸수화제 500mg·L<sup>-1</sup>에 30초-1분간 침지한 후, 입자가 크고 배수성이 뛰어난 TREF 배지(입자가 큰 피트모스)가 담겨있는 구근상자에 작약의 뿌리를 식재했다(그림 1-1-2B). 1박스 당 2개의 뿌리를 정식하였다. 실험은 작약을 자연 상태에서 1년간 양생을 시킨 이후, 2010년 11월부터 경기도 수원에 위치한 서울대학교 농업생명과학대학 부속농장에서 실험을 수행하였다.

자연저온을 통한 작약의 축성재배 방법은 자연저온시간(chill unit)을 추적하여 작약의 휴면이 타파되는 시기를 추정하는 방법이다. 자연저온시간 측정은 겨울동안 저온을 측정하여 0-10°C의 온도를 받는 기간을 시간 단위로 추적하여 계산하였다. 휴면을 타파하기 위한 자연저온시간은 식물 종에 따라 고유의 값을 가지고 있다. ‘태백’ 작약과 ‘물수레’ 작약의 자연 저온시간을 구명하기 위해 2010년 9월 10일부터 2011년 2월 11일까지 2주 간격으로 품종당 6개의 작약을 야간 기온이 15°C이상으로 유지되는 유리온실로 옮겨 재배 하였다. 생육조사 항목은 맹아일, 개화일, 맹아율, 개화율 등을 조사하였다.





그림 1-1-1. 실험에 사용된 ‘태백’ 작약(A), ‘물수레’ 작약(B).



그림 1-1-2. 실험에 이용한 작약 뿌리의 모습(A)과 정식하여 온실에 입실한 모습(B).

#### 다. 결과 및 고찰

##### (1) ‘태백’ 작약

12월 31일까지 노지에서 충분히 저온을 받게 한 후(자연적산저온: 1,224시간) 온실로 옮기게 되면 정상적인 생육 및 개화가 100% 가능하다(표 1-1-1). 하지만 9월 10일 전후(자연적산저온: 0시간)부터 10월 29일 전후(자연적산저온: 45시간)까지 가온 온실에 입실할 때 작약은 전혀 맹아 되지 않는다. 또한 11월 12일(자연적산저온: 185시간)에 입실한 식물에서도 맹아는 되지만 잎과 줄기가 말라 죽는 블라인드 현상과 왜성화가 발견된다(그림 1-1-3). 12월 31일은 실험이 진행된 2010년 중부지방의 기준이므로, 실용화를 위해서는 재배하는 지역의 지온을 모니터링으로 하여 자연적산저온(1,224시간 이상)을 계산하여 입실 하는 것이 필요한 것으로 판단된다.

표 1-1-1. 온실입실시기에 따른 ‘태백’ 작약의 휴면타파.

| Transferring date | Chill unit   | Sprouting date | Flowering date | Sprouting percentage (%) | Flowering percentage (%) |
|-------------------|--------------|----------------|----------------|--------------------------|--------------------------|
| Sep. 10           | 0            |                |                | 0                        | 0                        |
| Sep. 24           | 0            |                |                | 0                        | 0                        |
| Oct. 15           | 0            |                |                | 0                        | 0                        |
| Oct. 29           | 45           |                |                | 0                        | 0                        |
| Nov. 12           | 185          | Jan. 28        | -*             | 50                       | 0                        |
| Nov. 26           | 429          | Jan. 26        | Mar. 1         | 100                      | 37.5                     |
| Dec. 17           | 876          | Jan. 26        | Mar. 12        | 100                      | 50                       |
| <b>Dec. 31</b>    | <b>1,224</b> | <b>Jan. 13</b> | <b>Feb. 24</b> | <b>100</b>               | <b>100</b>               |
| Jan. 14           | 1,558        | Feb. 3         | Mar. 10        | 100                      | 87.5                     |
| Jan. 28           | 1,893        | Feb. 17        | Mar. 23        | 100                      | 100                      |
| Feb. 11           | 2,229        | Feb. 1         | Apr. 2         | 100                      | 100                      |

\*맹아 이후 블라인드 현상으로 인한 식물체 고사



그림 1-1-3. 11월 12일에 입실한 작약(A), 블라인드 현상 확대 사진(B).



그림 1-1-4. 12월 31일에 입실하여 정상 개화한 ‘태백’작약.

(2) '물수레' 작약

10월 15일, 10월 29일, 11월 12일에 온실로 입실한 작약은 개화가 전혀 이루어지지 않았다 (그림 1-1-5). 11월 26일(자연적산저온: 429시간)에 입실했을 때에도 개화가 이루어졌지만 10% 내외로 개화율이 매우 저조했다. 12월 17일(자연적산저온: 876시간)입실 처리에서는 개화율이 약 70%까지 상승했다. 12월 31일(자연적산저온: 1,224시간)에 입실한 개체에서 정상개화율이 75%였다(그림 1-1-5, 1-1-6). 따라서, '물수레' 작약도 '태백' 작약과 비슷하게 12월 31일에 해당하는 1,224시간(자연적산저온) 이후에 온실에 입실하는 것이 정상개화를 유도하는데 필요한 자연 저온 시간임을 알 수 있다.

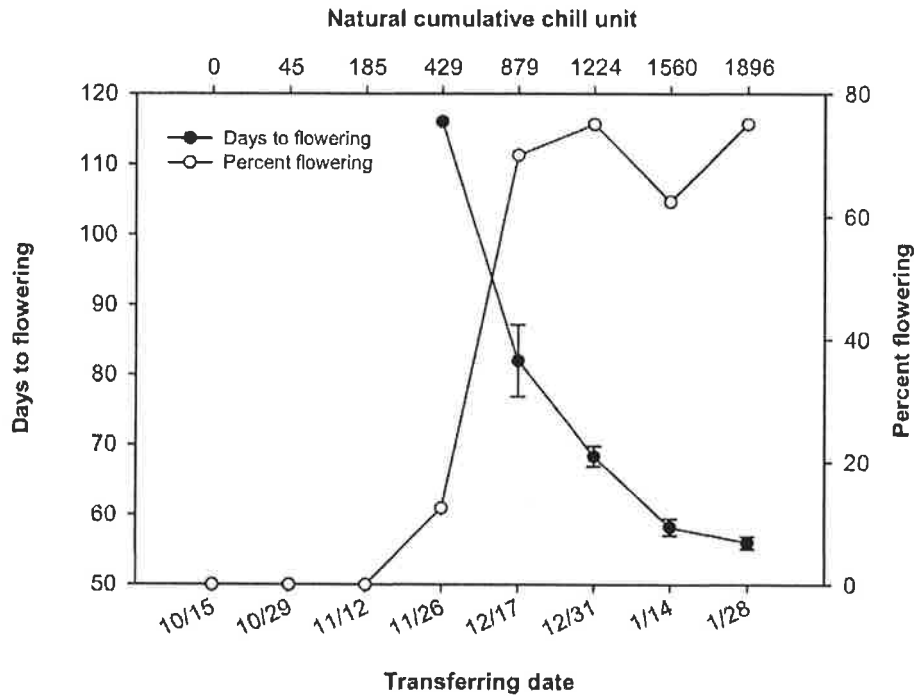


그림 1-1-5. 입실 시기에 따른 '물수레' 작약의 개화 소요일수, 개화율

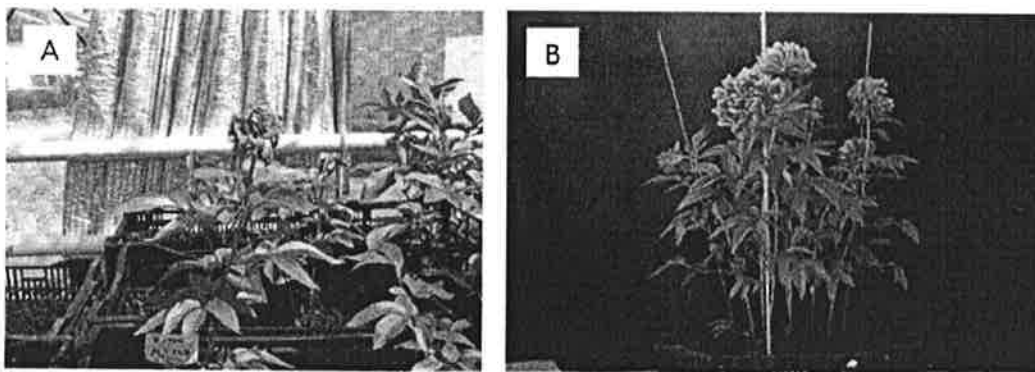


그림 1-1-6. 11월 26일에 입실하여 생육 중 고사된 '물수레' 작약(A), 12월 31일에 입실하여 정상 개화된 모습(B).

## 2. 인공저온처리를 통한 작약의 축성재배

### 가. 연구목적

자연저온처리는 저온고 시설을 필요로 하지 않는 장점이 있지만 작약의 생산 지역과 시기에 따라 자연 적산 시간이 달라지기 때문에 입실 시기 결정에 주의가 필요하다. 한편 자연저온 처리는 처리 기간 동안, 낮 동안의 상승된 기온으로 인해 휴면 타파 효과가 저해되기도 하며 인공 저온 처리에 비해 휴면 타파 효율이 낮다. 따라서 균일하고 자연 저온 처리를 통한 축성 재배 보다 더 이른 시기에 개화를 유도하기 위해서는 인공저온처리 방법이 필요하다.

### 나. 재료 및 방법

2009년 10월 30일에 경남 진주시에서 구입한 '태백', '물수레' 작약을 구근상자에 식재하여 실험에 사용하였다. 2009년 11월 6일 각 품종의 작약을 온도가 0, 5, 10°C로 유지되는 저온저장고에 0, 3, 6, 9, 12주 동안 각각 처리하였다. 저온처리가 끝나면 야간온도가 15°C이상으로 유지되는 유리온실에서 생육을 시켰다(그림 1-2-1). 처리당 6개의 식물체를 사용했으며 생육조사 항목은 맹아소요일수, 개화일, 개화소요일수, 초장, 절화수확소요일수, 고사율 등을 조사하였다.

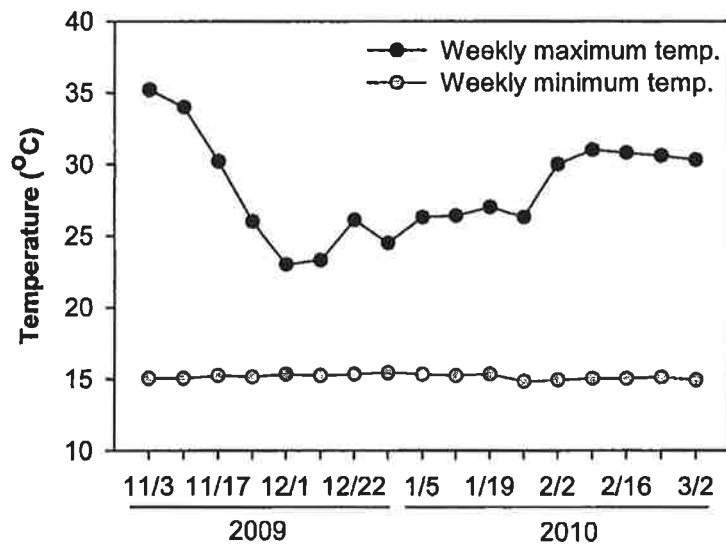


그림 1-2-1. 작약의 축성재배 중 유리 온실내의 온도.

### 다. 결과 및 고찰

저온처리를 하지 않은 작약은 두 품종 모두 실험이 종료되기 까지 맹아 되지 않았다. 반면에 맹아율, 줄기수, 개화수는 저온처리 온도가 낮을수록 그리고 처리기간이 길수록 증가하는 경향을 보였다(표 1-2-1). '태백' 작약은 어느 모든 온도처리에서 6주 이상 저온을 받으면 70% 이상의 맹아율을 보였으나, 물수레 작약은 10°C에서 6, 9주 저온을 받아도 맹아율이 70%를 넘지 못했다. 그런데 줄기수, 개화수, 초장을 보았을 때 0°C에서는 6주, 5°C에서는 9주 정도 처리하였을 때 충분히 휴면타파가 된다는 것을 알 수 있다.

표 1-2-1. 저온 처리 온도, 처리 기간에 따른 ‘태백’, ‘물수레’ 작약의 맹아율, 줄기수, 개화수, 초장에 미치는 영향.

| Duration<br>(weeks)                 | ‘Taebaek’ (chilling temperature (°C)) |           |          | ‘Mulsurae’ (chilling temperature (°C)) |         |              |
|-------------------------------------|---------------------------------------|-----------|----------|--|---------|--------------|
|                                     | 0                                     | 5         | 10       | 0                                      | 5       | 10           |
| Proportion of plants which sprouted |                                       |           |          |  |         |              |
| 3                                   | 0.25 b <sup>z</sup>                   | 0.29 b    | 0.13 b   | 0.38 bc                                | 0.25 b  | 0.25 c       |
| 6                                   | 1.00 a                                | 1.00 a    | 0.75 a   | 1.00 a                                 | 0.88 a  | 0.25 c       |
| 9                                   | 1.00 a                                | 1.00 a    | 1.00 a   | 1.00 a                                 | 1.00 a  | 0.63 ab      |
| 12                                  | 1.00 a                                | 1.00 a    | 1.00 a   | 1.00 a                                 | 1.00 a  | 1.00 a       |
| Mean number of shoots per plant     |                                       |           |          |  |         |              |
| 3                                   | 2.00 ab                               | 1.00 b    | 1.00 b   | 1.00 ab                                | 1.00 ab | 0.00 b       |
| 6                                   | 3.75 a                                | 2.38 ab   | 1.40 b   | 2.38 a                                 | 2.25 a  | 0.00 b       |
| 9                                   | 3.25 a                                | 3.50 a    | 2.50 ab  | 3.00 a                                 | 2.86 a  | 1.00 b       |
| 12                                  | 3.75 a                                | 2.75 ab   | 2.50 ab  | 2.83 a                                 | 2.86 a  | 1.33 ab      |
| Mean number of flowers per plant    |                                       |           |          |  |         |              |
| 3                                   | 2.50 abc                              | 1.00 c    | 1.00 c   | 1.00 ns                                | 1.00 ns | <sup>y</sup> |
| 6                                   | 3.00 ab                               | 2.25 abc  | 1.50 bc  | 1.50 ns                                | 1.00 ns | -            |
| 9                                   | 3.13 ab                               | 3.63 a    | 3.83 a   | -                                      | -       | 1.00 ns      |
| 12                                  | 3.50 a                                | 3.63 a    | 3.50 a   | -                                      | 1.50 ns | 1.50 ns      |
| Height at flowering (cm)            |                                       |           |          |  |         |              |
| 3                                   | 57.5 bcd                              | 55.5 cd   | 50.0 d   | 42.0 ns                                | 56.0 ns | -            |
| 6                                   | 65.2 abc                              | 61.7 abcd | 68.7 abc | 54.0 ns                                | 54.5 ns | -            |
| 9                                   | 73.2 a                                | 73.4 a    | 73.2 a   | -                                      | -       | 56.5 ns      |
| 12                                  | 69.7 abc                              | 67.9 abc  | 71.3 ab  | -                                      | 52.0 ns | 54.0 ns      |

<sup>z</sup>Mean separation within-cultivars by Duncan's test at  $P < 0.05$ .

<sup>y</sup>Terminal flower buds aborted before reaching flowering.

‘태백’ 작약에서 맹아소요일수, 개화소요일수 그래프를 보았을 때 처리 온도가 낮을수록 그리고 처리 기간이 길수록 소요일수가 줄어들어든다는 것을 알 수 있다(그림 1-2-2). 0°C에서 6주, 5°C에서 9주, 10°C에서 9주 처리를 했을 때 충분히 휴면타파가 된다는 것을 알 수 있으며, 그 이상의 기간 동안 저온을 받아도 소요일수가 더 이상 줄어들지 않는다. ‘물수레’ 작약의 맹아소요일수 그래프를 보았을 때 0°C에서 6주, 5°C에서 6주, 10°C에서 12주 이상 저온을 받아야 휴면타파가 됨을 알 수 있다(그림 1-2-3).

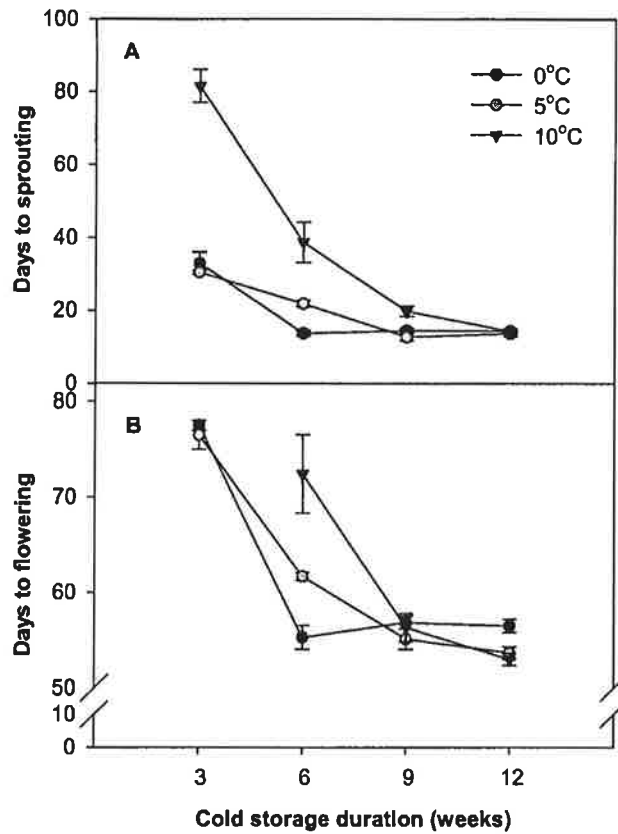


그림 1-2-2. 저온처리에 이후 '태백' 작약의 맹아소요일수(A)와 개화소요일수(B).

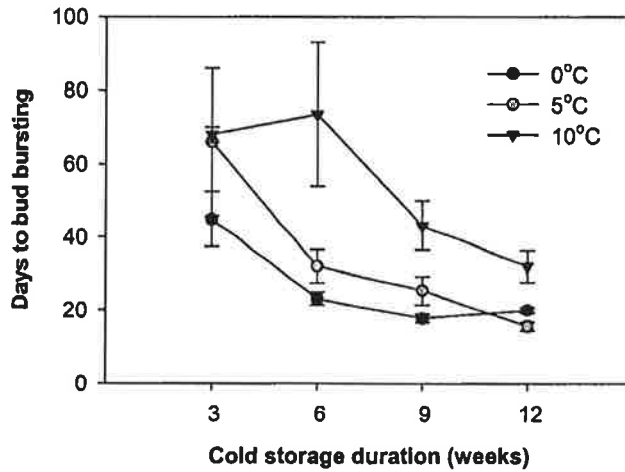


그림 1-2-3. 저온처리에 이후 '물수레' 작약의 맹아소요일수.

저온처리 온도를 0°C 1시간을 받은 것을 저온요구시간 1시간으로 정의하고, 5°C는 0.70시간, 10°C는 0.40시간으로 정의하여 저온요구시간에 따른 맹아율, 줄기수, 개화수의 추세를 그려보았을 때 그림 1-2-4와 같다. 이 그래프를 바탕으로 95%에 도달하는 자연요구시간을 계산하였

을 때 표 1-2-2를 얻을 수 있다. '태백' 작약은 맹아를 위해서는 저온요구시간이 763시간, 줄기수 확보를 위해서는 1,078시간, 개화수를 충분히 확보하기 위해서는 771시간이 필요하다는 것을 알 수 있다. '물수레'작약은 맹아를 위해서는 913시간, 줄기수 확보를 위해서는 1,323시간이 필요하다는 것을 알 수 있다. 1,078시간(태백)은 0°C에서 44일 동안 받는 저온시간이고, 1,323시간(물수레)은 0°C에서 55일 동안 저온을 받아야하는 시간으로 '물수레' 작약이 '태백' 작약에 비해 저온요구도가 상대적으로 높다는 것을 알 수 있다.

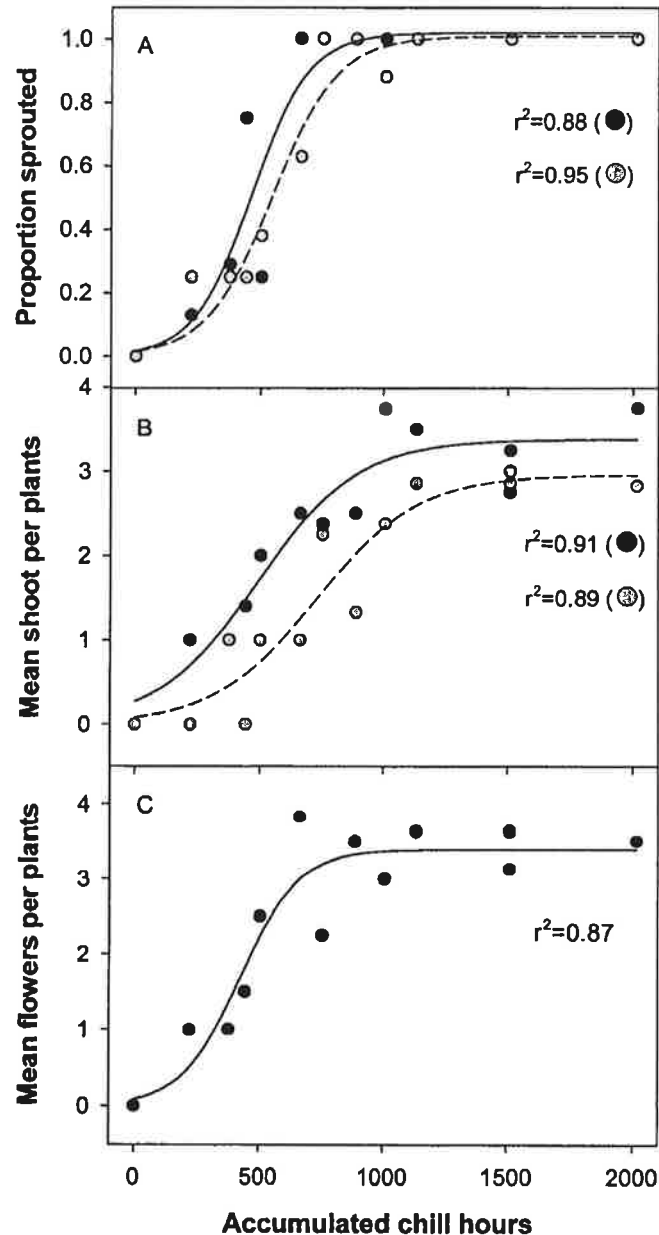


그림 1-2-4. 저온요구시간에 따른 '태백' 작약(●)과 '물수레' 작약(○)의 맹아율(A), 줄기수(B), 개화수(C).

표 1-2-2. ‘태백’, ‘물수레’작약의 맹아, 줄기수, 개화수의 저온요구시간.

| Chill units required to reach 95% of potential | ‘Taebaek’ | ‘Mulsurae’ |
|--|-----------|------------|
| Proportion sprouting                           | 763       | 913        |
| Shoots per plant                               | 1,078     | 1,323      |
| Flowers per plant                              | 771       | -          |



그림 1-2-5. 인공 저온처리를 통한 ‘태백’ 작약(A)과 ‘물수레’ 작약(B)의 개화.

### 3. 11월 이전에 인공 저온 처리(선행연구)

#### 가. 연구목적

앞선 실험에서 작약의 휴면타파를 위한 저온처리 온도와 기간을 구명하였으며, 0°C 6주 처리에서 맹아, 개화율이 높아지며 맹아, 개화 소요일수가 빨라졌다. 2009년의 실험에서는 11월 초에 저온처리를 시작했으며 이때 개화는 이듬해 2월 중순부터 이루어졌다. 개화시기를 더 앞당기기 위해 저온처리 시기를 11월 이전에 처리를 할 때 조기개화가 이루어지는 지 알아보기 위해 실험을 진행하였다.

#### 나. 재료 및 방법

2010년 8월 13일, 9월 10일, 10월 15일, 11월 12일, 12월 17일 경남 진주시 사봉면 봉곡리에 위치한 작약 농장에서 태백 작약의 뿌리를 굴취하였다. 매달 굴취한 뿌리를 소독하기 위해 बे노딜수화제에 30초-1분간 침지한 후, TREF 배지가 담겨있는 구근상자에 작약을 식재하고 0°C 가 유지되는 저온저장고에 각각 6주간 처리 후 상자를 꺼내어 주간 15°C, 야간 10°C로 유지되는 유리온실로 입실하여 생육 상태를 관찰하였다. 생육조사 항목은 맹아소요일수, 맹아일, 개화 소요일수, 개화일, 고사율 등을 조사하였다.

#### 다. 결과 및 고찰

8월 13일, 9월 10일, 10월 15일 0°C에서 6주 저온 처리했을 때 맹아는 이루어지지만 정상개



화율이 낮았다(표 1-3-1). 시험적으로 8월 13일에 0°C에서 6, 10, 14주 별로 저온처리를 했을 때 꽃잎이 어느 정도 벌어진 이후 더 이상 개화를 하지 않고 꽃잎의 끝이 까맣게 타면서 blasting되는 현상을 볼 수 있었다(그림 1-3-1).

그런데 저온처리 시기를 늦게 할수록 blasting율은 줄어들고 정상 개화율이 높아지는 것을 알 수 있으며 11월 12일에 저온처리를 했을 때 개화율이 83%까지 높아졌다(표 1-3-1). 하지만 개화일은 3월 5일로 다소 늦은 편이었다. 따라서 11월 이전에 저온을 처리하면서도 blasting현상을 줄이는 재배 방법의 개발이 필요하여 다음의 실험을 수행하였다.

표 1-3-1. 저온처리(0°C, 6주)시기에 따른 ‘태백’작약의 생육.

| Treatment date | Days to <sup>z</sup> |           | Average flowering date | Flowering percentage |
|----------------|----------------------|-----------|------------------------|----------------------|
|                | sprouting            | flowering |                        |                      |
| Aug. 13        | 24.3 a <sup>y</sup>  | 88.0 a    | Dec. 23                | 16 b                 |
| Sep. 10        | 23.1 a               | 83.3 a    | Jan. 14                | 27 b                 |
| Oct. 15        | 21.8 a               | 77.8 ab   | Feb. 13                | 25 b                 |
| Nov. 12        | 14.6 b               | 71.6 b    | Mar. 5                 | 83 a                 |
| Significance   | **                   | *         |                        | **                   |

<sup>z</sup>The number of days from the date of transfer to the glasshouse.

<sup>y</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $P = 0.05$ .

\*\*Significant at  $P = 0.05$  or  $0.01$ , respectively.

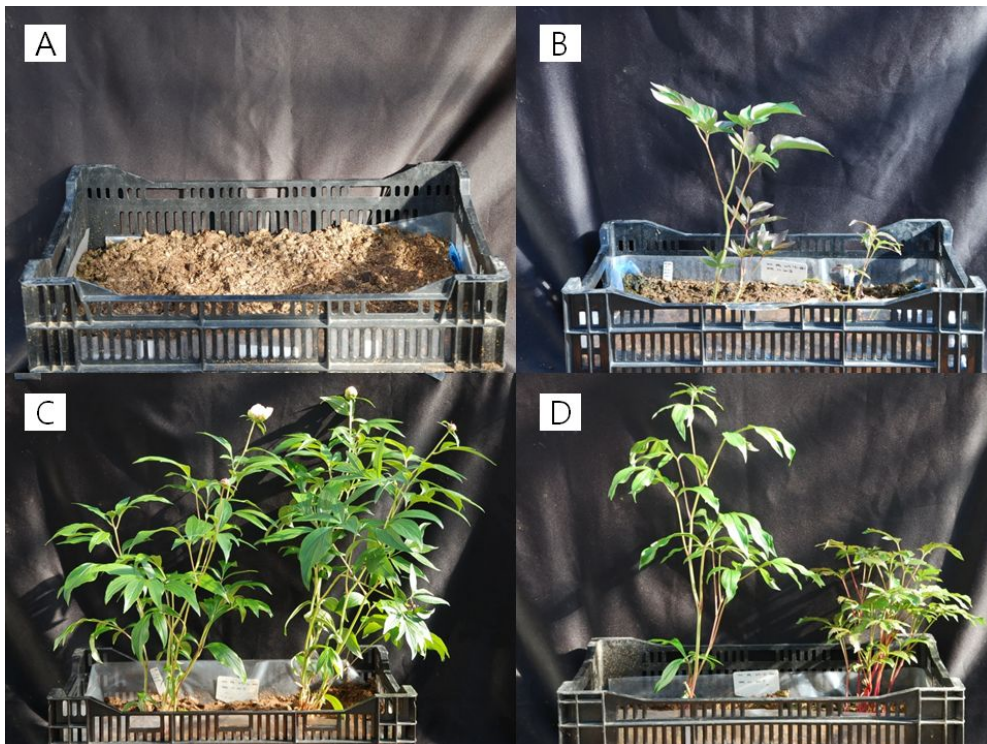


그림 1-3-1. 8월 0°C에서 0주(A), 6주(B), 10주(C), 14주(D)별로 저온을 받고 난 이후의 생육 비교 변화.

#### 4. 예냉 처리를 통한 초촉성 재배와 blasting현상 극복 기술

##### 가. 연구목적

다년생 식물의 개화에 있어서 식물의 성숙도가 중요하며, 온도가 중요한 역할을 한다(Foley et al., 2009). 자연 상태에서 낙엽 후 작약의 화아 분화 과정을 조사하였을 때, 8월 중순에 화아 분화가 시작되며, 11월 말에서 12월 초에 완료되었다. 화아 발달이 충분히 이루어지지 않은 9, 10월에 휴면타파를 위한 저온처리를 하면 blasting 현상에 의해서 정상적인 개화가 어려웠다. 작약의 충분한 화아 발달에 있어서 9, 10월(가을)의 온도가 중요함을 알 수 있었다. Hosoki(1994)의 ‘예냉 처리를 통한 모란의 12월 수확 가능성’ 실험에서 8월에 15°C에서 2주간 예냉 처리한 모란이 가장 높은 개화율을 보였으며, 절화 품질도 가장 우수하였다. 따라서 작약의 초촉성 재배 시, 개화율과 품질 향상을 위한 적정 예냉 처리 온도와 시기를 구명하는 실험을 수행하였다.

##### 나. 재료 및 방법

2009년 11월에 눈이 2, 3개가 있는 ‘태백’ 작약 뿌리를 식재하였으며, 3년간 생육을 시켜 정상적인 개화가 이루어진 식물체를 사용하였다. 2011년 9월 16일, 10월 14일에 아래의 표와 같은 5개의 처리를 하였다. 예냉과 저온 처리 기간 동안 눈의 생장과 화아 분화 정도를 관찰하였다. 그리고 온실에 입실 하여 식물체의 생육 단계별 소요 일수를 측정하였고, 개화율, blasting율(그림 1-4-1)을 조사하였다.

표 1-4-1. 실험 처리 방법.

| Pre-cooling treatments |                                  |   | Chilling         |   | Forcing in glasshouse  |
|------------------------|----------------------------------|---|------------------|---|------------------------|
| C0                     | 0°C (2 weeks)                    | → | 0°C<br>(6 weeks) | → | 30/15°C<br>(day/night) |
| NT                     | field condition (2 weeks)        |   |                  |   |                        |
| P15                    | 15°C (2 weeks)                   |   |                  |   |                        |
| P15→10                 | 15°C (1 week) →<br>10°C (1 week) |   |                  |   |                        |
| P10                    | 10°C (2 weeks)                   |   |                  |   |                        |

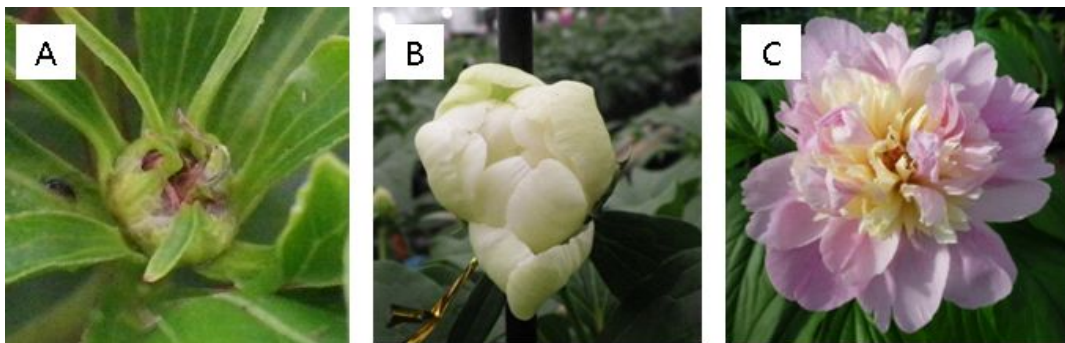


그림 1-4-1. ‘태백’ 작약의 blasting현상 사진. 초기 blasting(A), 후기 blasting(B), 정상 개화(C).

다. 결과 및 고찰

9월에 실험 처리한 작약의 경우 예냉처리를 한 P15, P15→10, P10처리구 에서 2주간의 예냉 처리에서 눈이 성장하였고(그림 1-4-2A), 10월 처리 작약에서도 동일하게 예냉처리구에서 눈이 성장하였다(그림 1-4-2B). 그리고 0℃저온처리가 시작되어서는 눈의 성장 속도가 둔화되었다.

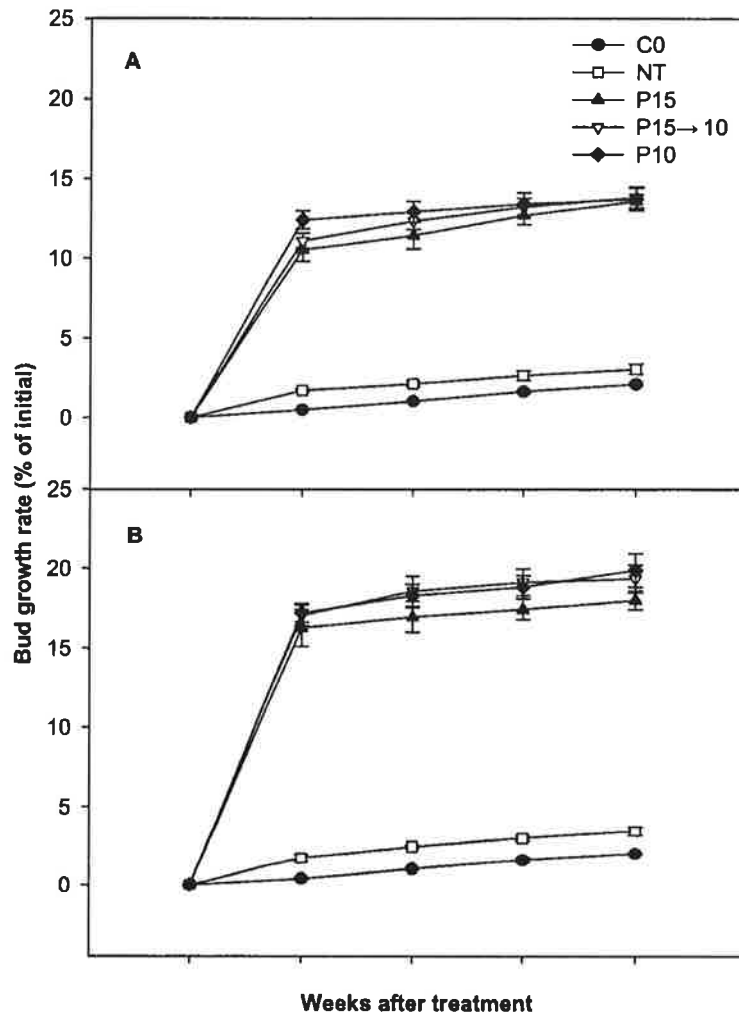


그림 1-4-2. C0, NT, P15→10, P10 처리를 9월(A)과 10월(B)에 하였을때 처리 기간 동안 작약 눈의 상대 성장을.

예냉처리 때의 화아의 발달을 살펴보면, 9월 예냉처리 P10처리구에서 꽃잎의 분화까지 진행 된 반면 나머지 처리에서는 꽃받침까지 진행 되었다(그림 1-4-3). 또한, 10월 처리 작약에서도 P15→10, P10 처리에서 수술의 분화까지 진행 된 것을 관찰할 수 있었다(그림 1-4-4).

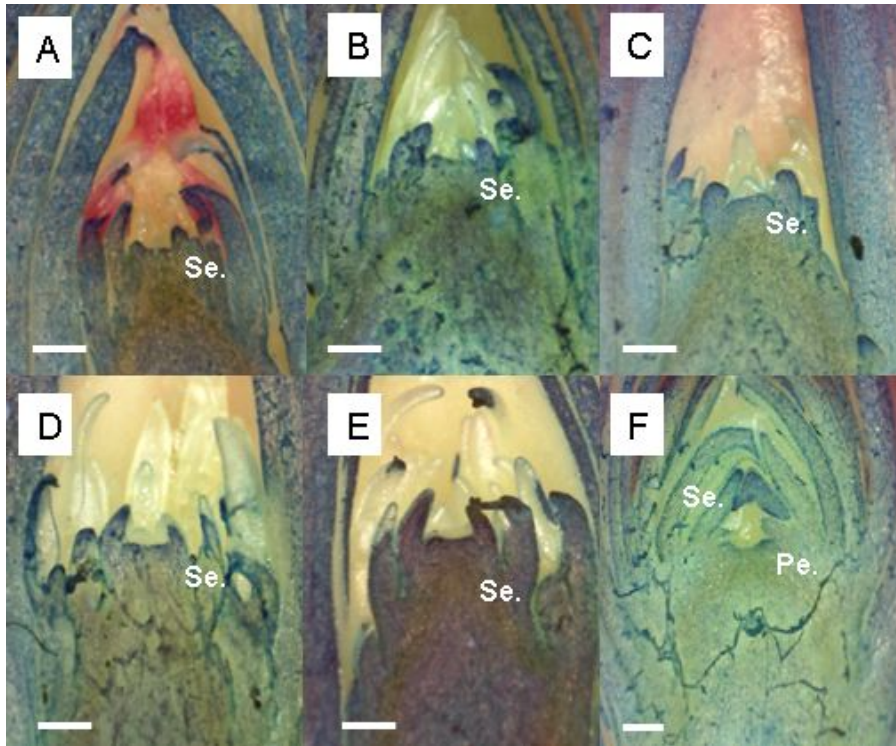


그림 1-4-3. 9월 예냉 처리에 따른 ‘태백’ 작약의 화아 분화(A: C0; B: NT; C: P15; D: P10).  
Se: 꽃받침; Pe: 꽃잎.

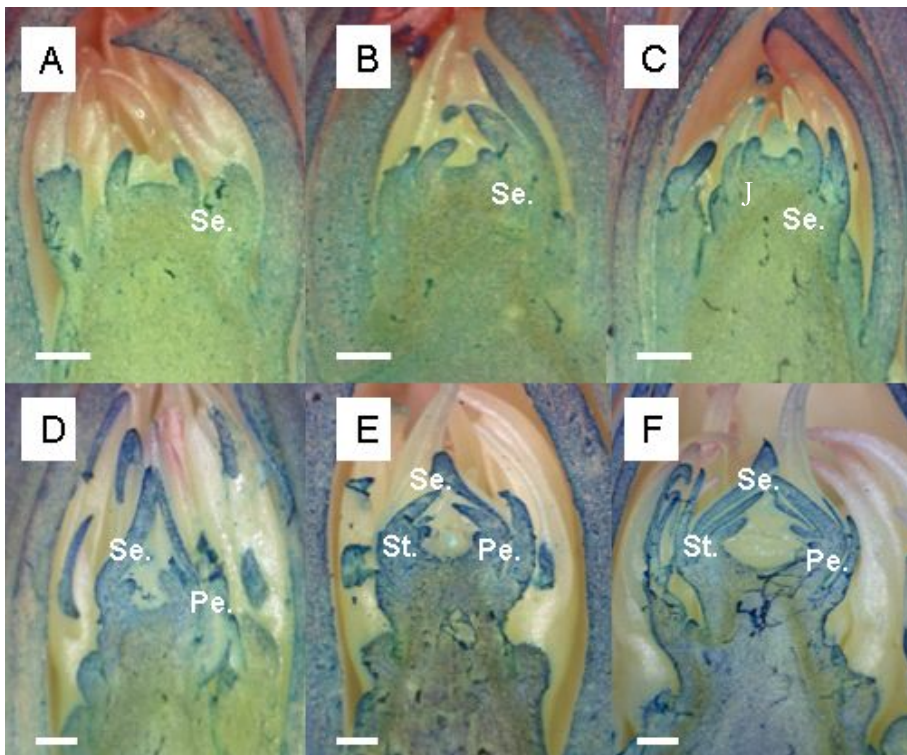


그림 1-4-4. 10월 예냉 처리에 따른 ‘태백’ 작약의 화아 분화(A: C0; B: NT; C: P15; D: P10).  
Se: 꽃받침; Pe: 꽃잎; St: 수술.

작약의 blasting 현상은 발생 시기에 따라 화아발달 초기와 후기 blasting으로 구분 할 수 있는데, 저온과 자연온도 처리에서 blasting으로 인해 약 40%의 낮은 개화율을 보였다(그림 1-4-5). 반면, 예냉 처리구에서는 blasting이 감소하여 개화율이 향상되었으며, 특히 P10처리에서 9월은 80.9%, 10월은 89.6%의 높은 개화율을 보였다.

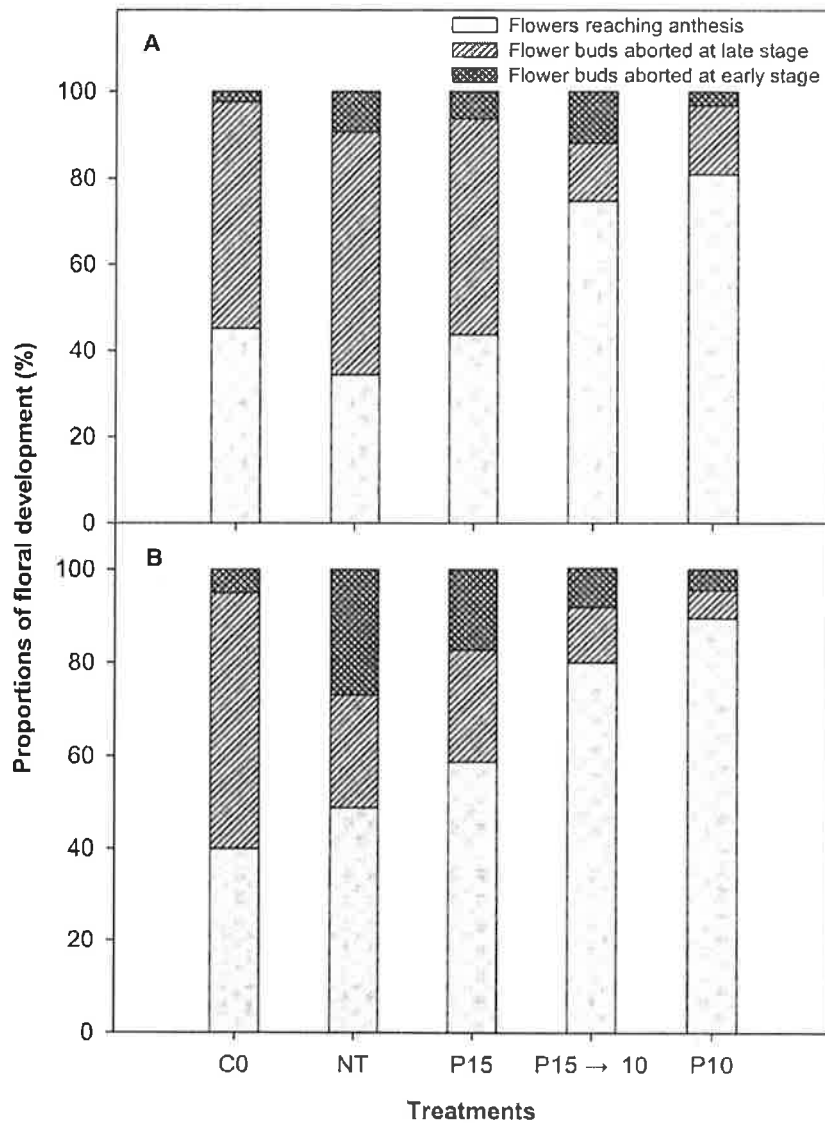


그림 1-4-5. 예냉 처리에 따른 '태백' 작약의 개화율과 blasting율. 9월 처리(A), 10월 처리(B).

수확일을 비교해 보았을 때 예냉 처리구가 저온처리와 자연온도 처리구에 비해서 수확소요 일수가 2-4일 정도 빠른 경향이 보였다(표 1-4-2).

위의 실험 결과를 통해 P10처리가 blasting의 감소에 효과적임을 알 수 있었고, 80% 이상의 개화율로 작약의 안정적인 겨울철 개화가 가능할 것 이라 생각한다.

표 1-4-2. 예냉 처리에 따른 ‘태백’ 작약의 생육 및 개화 소요일수.

| Treatment date        | Treatment | Days to <sup>z</sup> |          |         |           |
|-----------------------|-----------|----------------------|----------|---------|-----------|
|                       |           | sprouting            | bursting | harvest | flowering |
| Sep. 16.              | C0        | 19.6 a <sup>y</sup>  | 27.0 a   | 69.2 a  | 74.3 a    |
|                       | NT        | 16.2 ab              | 25.1 ab  | 68.0 a  | 71.7 ab   |
|                       | P15       | 14.3 b               | 24.0 ab  | 67.6 a  | 65.1 ab   |
|                       | P15→10    | 14.5 b               | 22.8 bc  | 61.8 a  | 63.5 bc   |
|                       | P10       | 12.5 b               | 20.0 cd  | 55.1 ab | 61.1 bc   |
| Oct. 14.              | C0        | 15.5 b               | 19.5 d   | 64.6 a  | 66.8 ab   |
|                       | NT        | 15.2 b               | 19.3 d   | 57.8 ab | 61.8 bc   |
|                       | P15       | 14.5 b               | 19.1 d   | 47.5 b  | 51.8 cd   |
|                       | P15→10    | 12.8 b               | 19.0 d   | 46.6 b  | 51.0 cd   |
|                       | P10       | 12.8 b               | 18.1 d   | 44.3 b  | 48.8 d    |
| Significance          |           |                      |          |         |           |
| Transferring date (A) |           | ns                   | ***      | ***     | ***       |
| Treatment (B)         |           | **                   | *        | **      | *         |
| A×B                   |           | ns                   | ns       | ns      | ns        |

<sup>z</sup>The number of days from the date of transfer to the greenhouse.

<sup>y</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $P = 0.05$

ns, \*\*, \*\*\* Non-significant or significant at  $P = 0.05, 0.01$  or  $0.001$ , respectively.



그림 1-4-6. 9월 예냉 처리. 예냉처리 후 '태백' 작약의 입실 50일 경과 사진 (2012년 1월 28일). C0(A), NT(B), P15(C), P10(D).



그림 1-4-7. 10월 예냉 처리. 예냉처리 후 '태백' 작약의 입실 50일 경과 사진 (2012년 2월 26일). C0(A), NT(B), P15(C), P10(D).

## 5. 재수확을 통한 축성재배

### 가. 연구목적

가을에는 절화 작약의 유통이 거의 이루어지지 않는데, 이는 국내는 물론이고 주요 수입국인 네덜란드와 남미 지역에서도 절화 수확이 불가능하기 때문이다. 따라서 작약의 가을철 개화는 농가 소득 증대에 크게 기여를 할 것이라 기대된다.

### 나. 재료 및 방법

2009년 11월에 눈이 2, 3개가 있는 ‘태백’작약 뿌리를 식재하였으며 3년간 생육 한 후, 12월에 인공 저온처리를 통해 이듬해 3월에 정상적으로 개화한 식물체를 사용하였다. 2012년 7월 7일에 아래의 표와 같은 3개의 처리를 하였다. 식물체의 생육 단계별 소요 일수를 측정하였고, 개화율을 조사하였다.

표 1-5-1. 실험 처리 방법

| Pre-cooling treatments |                              |   | Chilling         |   | Forcing in glasshouse  |
|------------------------|------------------------------|---|------------------|---|------------------------|
| C0                     | 0°C (2 weeks)                | → | 0°C<br>(6 weeks) | → | 30/15°C<br>(day/night) |
| NT                     | field condition<br>(2 weeks) |   |                  |   |                        |
| P10                    | 10°C (2 weeks)               |   |                  |   |                        |

### 다. 결과 및 고찰

맹아와 개엽까지는 세 가지 처리구에서 모두 정상적인 생육 양상을 보였으나(표 1-5-2), C0와 NT처리구에서는 화아 발달 초기의 blasting이 90% 이상의 비율로 나타나 정상적인 개화가 이루어지지 않았다 (그림 1-5-1). 반면, P10처리구에서는 blasting이 현저히 줄어 11월경에 절화 수확이 가능하였다(표 1-5-2, 그림 1-5-2).

표 1-5-2. 예냉 처리에 따른 ‘태백’ 작약의 생육 및 개화 소요일수

| Transferring date | Treatment | Days to <sup>z</sup> |          |                |           |
|-------------------|-----------|----------------------|----------|----------------|-----------|
|                   |           | sprouting            | bursting | harvest        | flowering |
| July. 7.          | C0        | 19.7 a <sup>y</sup>  | 23.7 a   | - <sup>x</sup> | -         |
|                   | NT        | 18.8 a               | 22.7 a   | -              | -         |
|                   | P10       | 12.4 b               | 15.7 b   | 55.5 a         | 67.7 a    |
| Significance      |           | **                   | ***      | ***            | ***       |

<sup>z</sup>The number of days from the date of transfer to the greenhouse.

<sup>y</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $P = 0.05$

\*\* \*\*\* Significant at  $P = 0.01$  or  $0.001$ , respectively.

<sup>x</sup>Not detected (not flowering by abortion).



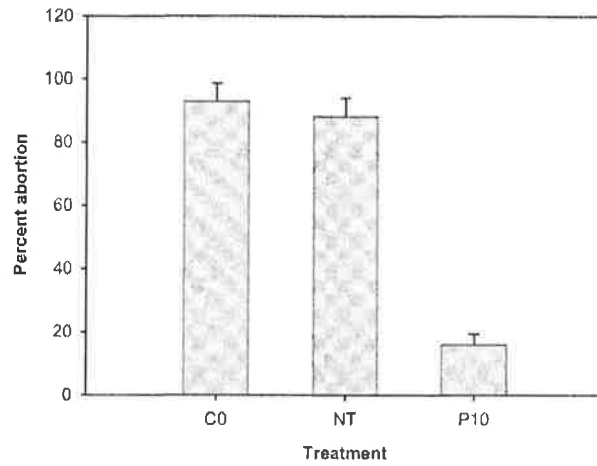


그림 1-5-1. 예냉 처리에 따른 '태백'작약의 화아 퇴화율.

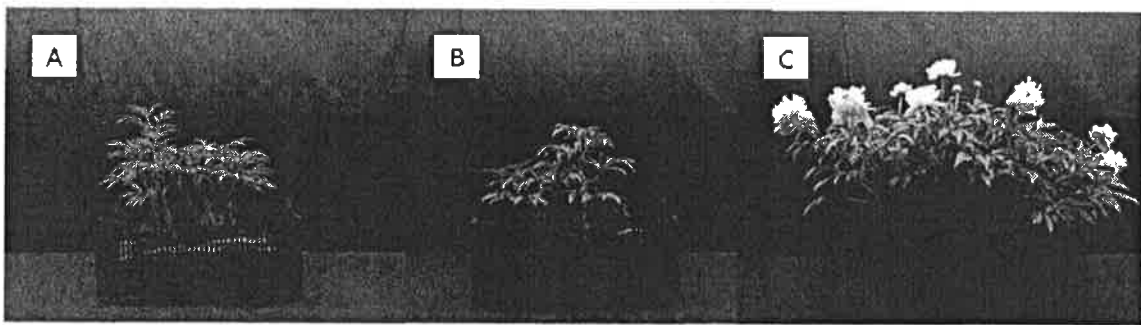


그림 1-5-2. 7월 예냉 처리 '태백' 작약의 입실 68일 경과 사진 (2012년 11월 9일). C0(A), NT(B), P10(C).

작약의 겨울철 개화와 마찬가지로 가을철 개화에서도 예냉 처리가 화아 분화를 촉진하여 개화율이 향상되었을 것이라 예상되며 예냉처리 기간 중에 눈의 생장이 P10 처리구에서 뚜렷이 나타났다(그림 1-5-3).

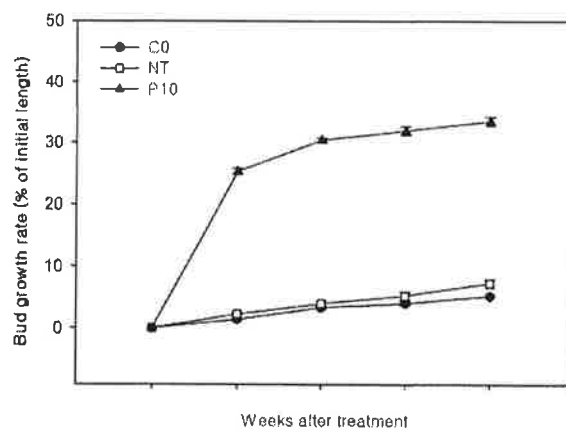


그림 1-5-3. 7월 예냉 처리 '태백' 작약의 눈 생장.

## 6. GA<sub>3</sub>를 이용한 작약 휴면타파

### 가. 연구목적

저온 처리를 하지 않고 GA<sub>3</sub>(gibberellic acid)를 처리 했을 때 휴면중인 작약의 휴면을 타파할 수 있는지 알아보기 위해 실험하였다. 작약의 개화를 위해서 어느 시기에 GA<sub>3</sub>를 처리하는 것이 좋은지 알아보는 실험도 병행하였다.

### 나. 재료 및 방법

경기도 수원시 권선구 서둔동에 위치한 서울대학교 농업생명과학대학 부속농장에서 실험을 수행 하였으며 식물재료는 ‘태백’ 작약을 사용하였는데 구근 박스 당 2개의 작약을 식재하고 2년 동안 양생 시켰다. 실험 수행 기간은 2010년 9월 10일부터 2011년 2월 25일까지였다.

GA<sub>3</sub>를 ethanol에 용해시켜서 0, 100ppm을 만들었으며, 처리 당 식물체 8개(4박스)를 사용하였다. 작약 한 tuber당 300mL를 토양관주(soil drench) 방법으로 주고 생육상태를 관찰 하였다.

호르몬 처리는 매달 중순과 말에 처리를 하였고, 이때 눈을 채취하여 화아의 발달모습을 해부현미경으로 관찰하였다. 기온과 토양 5cm 깊이의 온도를 data logger(Watch dog)를 이용하여 30분 간격으로 2010년 8월 1일부터 2011년 3월 1일까지 측정하였고 chill unit을 적산 계산하였다(그림 1-6-1).

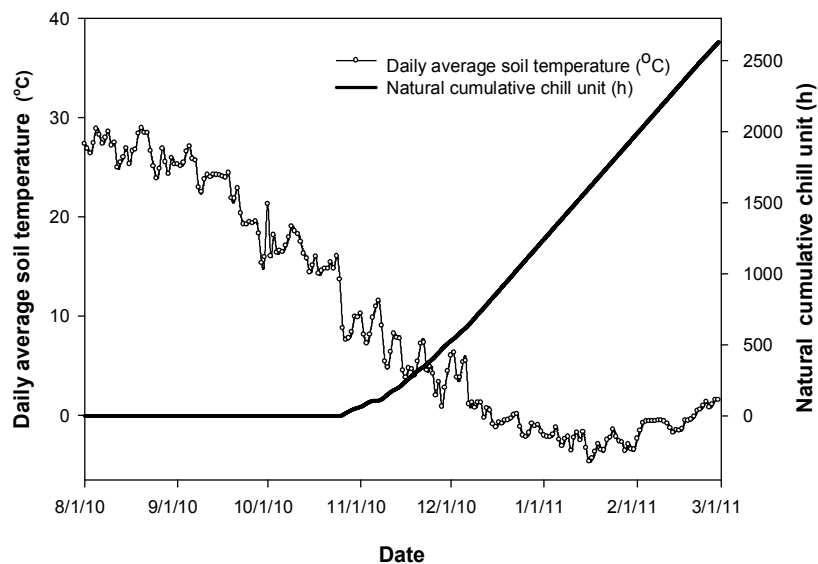


그림 1-6-1. 실험 진행 중의 노지 온도 변화와 자연 저온 시간(Chill unit).

### 다. 결과 및 고찰

2010년 9월부터 1월까지 GA<sub>3</sub> 0ppm(대조구)과 GA<sub>3</sub> 100ppm 처리구를 비교해보면 대조구는 9월부터 11월까지 맹아가 전혀 되지 않은 것을 확인할 수 있었다(그림 1-6-2). 이에 반해서 GA<sub>3</sub> 100ppm 처리구는 9월부터 맹아(sprouting)가 되어 bursting까지 이어진 것을 확인할 수 있었다.

대조구에서는 12월 17일 부터 맹아가 출현하여 bursting까지 진행된 것을 확인 할 수 있었고, 맹아소요일수는 평균 30일로 GA<sub>3</sub> 100ppm처리구에 비해 비교적 15일 정도가 느리다는 것을 확인 할 수 있었다. 그리고 정상 개화율을 높이고 개화품질이 상대적으로 좋았다(표 1-6-2, 그림 1-6-3). 따라서 GA<sub>3</sub>는 휴면타파를 시켜주는 역할 뿐만 아니라 맹아소요일수를 단축시켜 주는 역할을 한다는 것을 확인할 수 있었으므로 작약의 연중생산을 위한 축성재배를 위해서 이용될 수 있다고 판단되어진다.

하지만 9월에 GA<sub>3</sub> 100ppm을 처리한 구에서는 bursting 이후 더 이상 성장을 하지 않고 잎 끝이 까맣게 타면서 100% 고사되는 현상을 확인 할 수 있었다(그림 1-6-4C). 또한 대조구와 잎의 색깔을 비교해 봤을 때, 전체적으로 짙은 녹색이 아니며 잎 주변이 붉은 색으로 변하는 것을 알 수 있었다(그림 1-6-4E).

10월 15일 처리구와 10월 29일 처리구는 blasting율이 100%이 되었지만 11월이 지나면서 blasting율이 현저하게 감소하였다. 따라서 자연저온을 어느 정도 받고 GA<sub>3</sub>을 처리해주었을 때, blasting율을 낮출 수 있음을 알 수 있었다(표 1-6-1, 그림 1-6-4). 이렇게 GA<sub>3</sub>처리시기에 따라서 정상 개화율이 차이가 나는 것은 눈의 성장과 관계가 깊다고 여겨지며 실험 기간 동안 작약 눈의 성장을 관찰 한 결과 9월 이후부터 눈이 상대적으로 더 성장했음을 관찰하였다(그림 1-6-5). 한편 blasting이 보이는 처리구에서는 절화 품질을 나타내는 초장, 줄기직경, 꽃직경이 상대적으로 작음을 알 수 있었다(표 1-6-2).

9월-10월에 GA<sub>3</sub>을 처리했을 때, 고사되는 현상의 원인을 구명하기 위한 다음의 실험을 수행하였다.

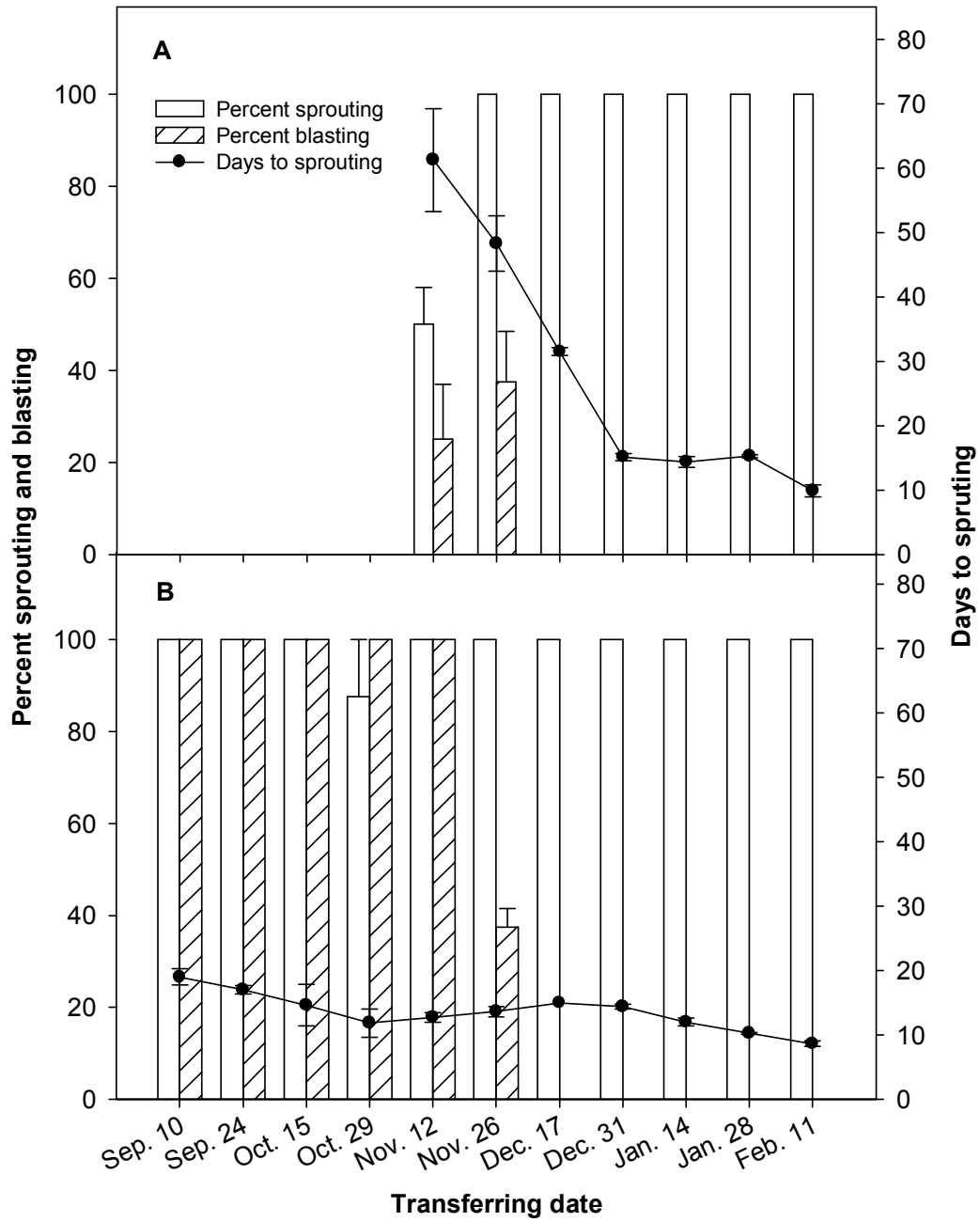


그림 1-6-2. 2010년 9월 10일부터 2011년 2월 11일까지 GA 처리를 하지 않은 control(A)과 GA를 처리한 처리구(B)의 맹아율, blasting율, 맹아소요일수.

표 1-6-1. 입실시기와 GA처리 유무에 따른 작약의 개화소요일수, 개화율에 미치는 영향

| GA <sub>3</sub>       | Transferring date | Natural cumulative chilling unit | Days to harvest      | Days to flowering | Percent flowering |
|-----------------------|-------------------|----------------------------------|----------------------|-------------------|-------------------|
| -                     | Sep. 10           | 0                                | - <sup>z</sup>       | -                 | 0                 |
|                       | Sep. 24           | 0                                | -                    | -                 | 0                 |
|                       | Oct. 15           | 0                                | -                    | -                 | 0                 |
|                       | Oct. 29           | 45                               | -                    | -                 | 0                 |
|                       | Nov. 12           | 185                              | -                    | -                 | 0                 |
|                       | Nov. 26           | 429                              | 67.81 c <sup>y</sup> | 73.45 b           | 37.5              |
|                       | Dec. 17           | 876                              | 54.63 d              | 85.25 a           | 50                |
|                       | <b>Dec. 31</b>    | <b>1,222</b>                     | <b>52.88 de</b>      | <b>67.51 bc</b>   | <b>100</b>        |
|                       | <b>Jan. 14</b>    | <b>1,558</b>                     | <b>41.63 g</b>       | <b>56.57 d</b>    | <b>87.5</b>       |
|                       | <b>Jan. 28</b>    | <b>1,893</b>                     | <b>48.52 e</b>       | <b>56.71 d</b>    | <b>100</b>        |
|                       | <b>Feb. 11</b>    | <b>2,229</b>                     | <b>45.38 f</b>       | <b>48.63 e</b>    | <b>100</b>        |
| +                     | Sep. 10           | 0                                | -                    | -                 | 0                 |
|                       | Sep. 24           | 0                                | -                    | -                 | 0                 |
|                       | Oct. 15           | 0                                | -                    | -                 | 0                 |
|                       | Oct. 29           | 45                               | -                    | -                 | 0                 |
|                       | Nov. 12           | 185                              | -                    | -                 | 0                 |
|                       | Nov. 26           | 429                              | 91.21 a              | 82.14 a           | 62.5              |
|                       | <b>Dec. 17</b>    | <b>876</b>                       | <b>71.83 b</b>       | <b>73.75 b</b>    | <b>100</b>        |
|                       | <b>Dec. 31</b>    | <b>1,222</b>                     | <b>51.88 de</b>      | <b>63.01 c</b>    | <b>100</b>        |
|                       | <b>Jan. 14</b>    | <b>1,558</b>                     | <b>54.25 d</b>       | <b>55.75 cd</b>   | <b>100</b>        |
|                       | <b>Jan. 28</b>    | <b>1,893</b>                     | <b>43.63 f</b>       | <b>53.75 cd</b>   | <b>100</b>        |
|                       | <b>Feb. 11</b>    | <b>2,229</b>                     | <b>45.24 f</b>       | <b>55.02 cd</b>   | <b>100</b>        |
| GA <sub>3</sub> (A)   |                   |                                  | **                   | ns                |                   |
| Transferring date (B) |                   |                                  | ***                  | ***               |                   |
| A x B                 |                   |                                  | ***                  | ns                |                   |

<sup>z</sup>Not detected (remained dormant until the end of the experiment).

<sup>y</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $P = 0.05$  level.

NS,\*,\*\*,\*\*\* nonsignificant or significant at  $P < 0.05$ , 0.01, or 0.001% level, respectively.

표 1-6-2. 입실시기와 GA처리 유무에 따른 작약의 초장, 줄기직경, 꽃직경에 미치는 영향

| GA <sub>3</sub>       | Transferring date | Natural cumulative chilling unit | Plant height (cm)          |                 | Stem diameter <sup>z</sup> (cm) |   | Flower diameter (cm) |    |
|-----------------------|-------------------|----------------------------------|----------------------------|-----------------|---------------------------------|---|----------------------|----|
|                       |                   |                                  | (At harvest <sup>y</sup> ) |                 |                                 |   |                      |    |
| -                     | Sep. 10           | 0                                | -                          | x               | -                               | - | -                    | -  |
|                       | Sep. 24           | 0                                | -                          | -               | -                               | - | -                    | -  |
|                       | Oct. 15           | 0                                | -                          | -               | -                               | - | -                    | -  |
|                       | Oct. 29           | 45                               | -                          | -               | -                               | - | -                    | -  |
|                       | Nov. 12           | 185                              | -                          | -               | -                               | - | -                    | -  |
|                       | Nov. 26           | 429                              | 47.84                      | cd <sup>w</sup> | 0.78                            | a | 7.08                 | c  |
|                       | Dec. 17           | 876                              | 68.33                      | a               | 0.25                            | b | 7.96                 | c  |
|                       | Dec. 31           | 1,222                            | 69.32                      | a               | 0.29                            | b | 12.14                | ab |
|                       | Jan. 14           | 1,558                            | 65.56                      | ab              | 0.36                            | b | 12.04                | ab |
|                       | Jan. 28           | 1,893                            | 71.50                      | a               | 0.42                            | b | 13.36                | a  |
|                       | Feb. 11           | 2,229                            | 69.23                      | a               | 0.36                            | b | 13.41                | a  |
| +                     | Sep. 10           | 0                                | -                          | -               | -                               | - | -                    | -  |
|                       | Sep. 24           | 0                                | -                          | -               | -                               | - | -                    | -  |
|                       | Oct. 15           | 0                                | -                          | -               | -                               | - | -                    | -  |
|                       | Oct. 29           | 45                               | -                          | -               | -                               | - | -                    | -  |
|                       | Nov. 12           | 185                              | -                          | -               | -                               | - | -                    | -  |
|                       | Nov. 26           | 429                              | 51.84                      | cd              | 0.45                            | b | 13.09                | a  |
|                       | Dec. 17           | 876                              | 72.48                      | a               | 0.33                            | b | 12.41                | ab |
|                       | Dec. 31           | 1,222                            | 71.19                      | a               | 0.32                            | b | 10.44                | bc |
|                       | Jan. 14           | 1,558                            | 66.05                      | ab              | 0.39                            | b | 12.38                | ab |
|                       | Jan. 28           | 1,893                            | 62.45                      | a-c             | 0.42                            | b | 13.76                | a  |
|                       | Feb. 11           | 2,229                            | 67.26                      | ab              | 0.39                            | b | 14.02                | a  |
| GA <sub>3</sub> (A)   |                   |                                  | ns                         |                 | ns                              |   | ns                   |    |
| Transferring date (B) |                   |                                  | ***                        |                 | ns                              |   | ns                   |    |
| A × B                 |                   |                                  | ns                         |                 | ns                              |   | **                   |    |

<sup>z</sup>Stem diameter below the flower bud was measured with Vernier calipers when flower buds reached about 25 mm.

<sup>y</sup>The time when the diameter of flower buds reached about 25 mm.

<sup>x</sup>Not detected (remained dormant until the end of the experiment).

<sup>w</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at P = 0.05 level.

<sup>ns, \*, \*\*, \*\*\*</sup>nonsignificant or significant at P = 0.05, 0.01, or 0.001% level, respectively.



그림 1-6-3. 12월 17일 GA처리하지 않았을 때(A)와 GA처리하였을 때(B)의 개화.

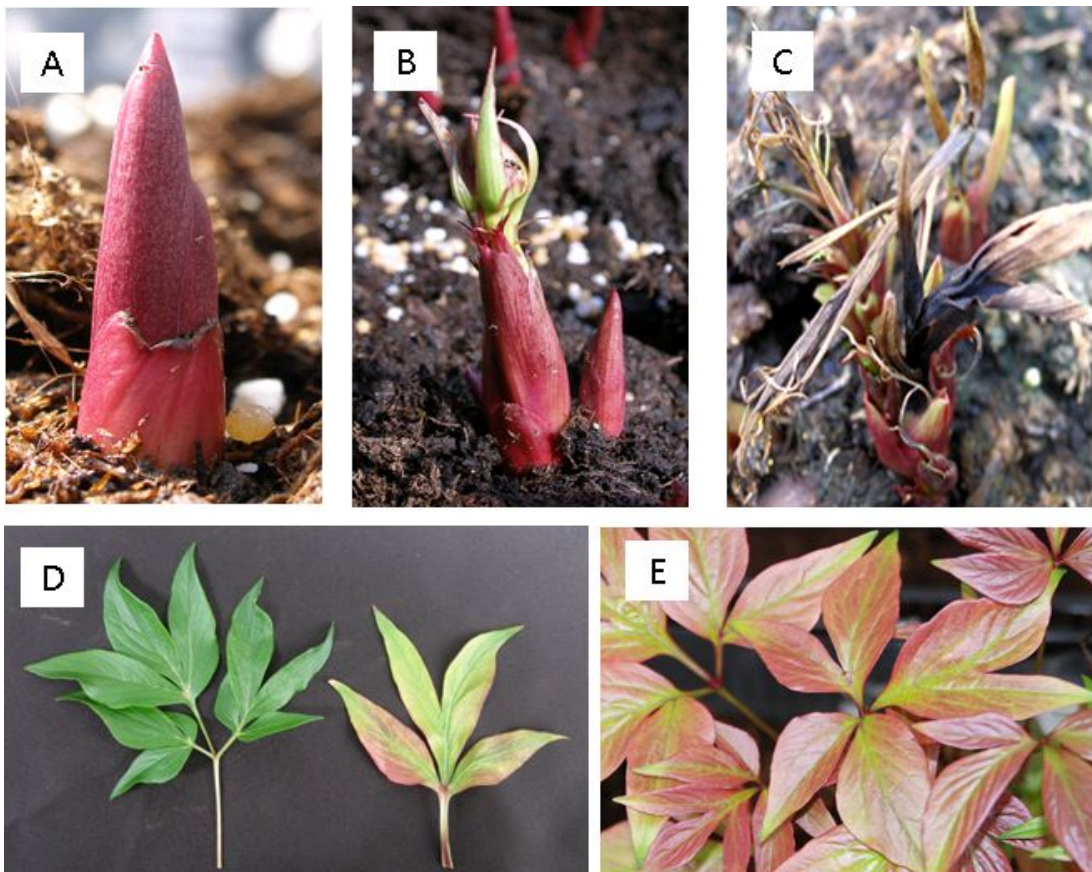


그림 1-6-4. GA처리시 나타나는 다양한 blighting현상. GA를 처리한 일주일 후(A), 맹아할 때(B), 식물체 blighting(C), 정상 잎에 비하여 붉은 색을 띠는 GA를 처리한 잎(D, E).

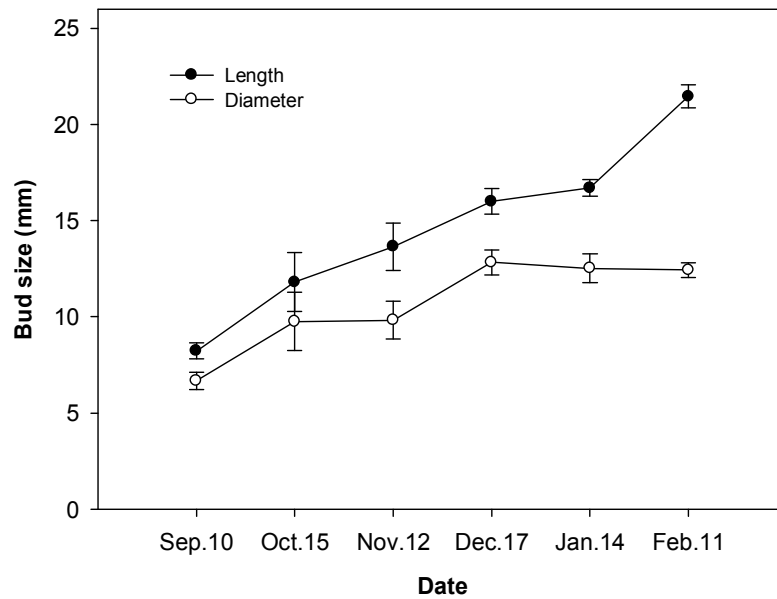


그림 1-6-5. 자연상태에서 시기별 작약 눈의 크기 변화.

## 7. 호르몬을 이용한 blasting현상 극복

### 가. 연구목적

작약의 축성재배 시에 나타나는 새로운 장애 현상 중에 가장 큰 것이 꽃눈과 식물체가 blasting이 되는 현상이다(Halevy et al., 2002). Blasting은 꽃이 발달하는 과정 중에 고사하거나 퇴화가 되는 현상으로 일반적으로는 온실 내 고온, 광도, 일장의 부족 등으로 구근 화훼류에 생긴다(Goi et al., 1974). 하지만 작약에서 생기는 blasting의 현상은 축성재배 시에 두드러지게 나타났으며, 원인이 아직 구명되지 않은 상태이다. 이 blasting 원인이 특히 두 가지 경우에 생기는데, 첫 번째 경우는 GA를 처리했을 때 휴면 중이었던 bud가 휴면을 깨고 나오면서 꽃눈이 발달 중 비교적 초기에 나타나고 또한 식물체 전체가 고사하는 현상으로 나타났다(그림 1-7-1A). 이는 휴면타파 이후에 호르몬의 불균형 등의 문제가 생긴 것으로 보인다. 두 번째 양상은 인공 저온처리를 하였을 때인데, 1차 년도에 11월에 저온처리 실험을 하였을 때에는 blasting이 나타나지 않았다. 그러나 11월 보다 이른 시기인 9, 10월에 처리를 했을 때 blasting이 나타나기 시작하였다(그림 1-7-1B). 이 문제는 식물 호르몬도 관계되어 있겠지만 꽃눈의 분화가 정상적으로 완료가 되지 않은 가운데서 저온처리가 들어간 것이 문제가 되었다고 여겨진다. Blasting 현상을 일으키는 원인이 ABA의 합성과 연관이 깊다는 가정 하에 다음의 실험을 수행하였다.





그림 1-7-1. GA처리 시 나타나는 식물체 blasting(A), 예냉처리 부족시 나타나는 꽃눈 blasting(B).

#### 나. 재료 및 방법

2009년 11월에 눈이 2, 3개가 있는 태백 작약 뿌리를 식재하였으며, 2년간 생육을 시켜 정상적인 개화가 이루어지는 상태의 식물체를 사용하였다. 실험은 11월 지상부가 휴면에 들어간 작약을 사용하였으며 아래와 같은 처리를 하였다.

표 1-7-1. 실험처리 방법

|   | Treatments  |
|---|---|
| 1 | GA <sub>3</sub> 0 ppm (control)   |
| 2 | GA <sub>3</sub> 100 ppm   |
| 3 | GA <sub>3</sub> 500 ppm   |
| 4 | GA <sub>3</sub> 100 ppm + Fluridone 50 ppm                                    |
| 5 | GA <sub>3</sub> 100 ppm + [GA <sub>3</sub> 100 ppm, 2-week interval, 5 times] |

식물체가 휴면 중에 저온을 충분하게 받고 휴면이 타파 되는데, 이때 식물체 내에서는 GA를 합성하는 유전자가 활성화가 되고 반면에 ABA를 합성하는 유전자가 기능을 잃게 된다. 이런 이유로 인해 저온을 받지 않고 GA를 처리하여 인위적으로 휴면을 타파하게 되면 식물체 내에서는 ABA가 계속 합성되고 호르몬의 불균형으로 인한 blasting현상이 일어나는 것으로 보인다. 이런 문제를 해결하고자 처리 4, 5를 추가하여 처리하였다. 처리 4에 나오는 FLU는 fluridone으로 식물체 내에서 ABA의 생합성을 억제하는 carotenoid합성 억제제이다. 그리고 처리 5는 GA처리를 여러번 처리하는 것으로 그 이유는 GA를 생합성하는 유전자의 기능을 대체하기 위함이었다.

#### 다. 결과 및 고찰

GA처리를 하지 않은 작약은 모두 맹아 되지 않았으며 이는 작약이 휴면 상태임을 나타낸다. GA를 처리했을 때 모든 작약이 맹아 되었다. 하지만 그림 1-7-2와 같이 100ppm, 500ppm 처리 시 blasting이 각각 90%, 95% 이상 일어나 식물이 고사하는 현상이 나타났다. 이는 저온을 충분히 받지 않은 상태에서 GA처리를 하게 되면 모두 blasting이 일어난다는 것을 나타낸다. 하지만 ABA합성 억제제인 FLU를 처리하면 blasting이 극복됨을 알 수 있다. FLU처리시

모든 작약이 정상적으로 맹아가 되고 또한 이후에 blasting 현상이 전혀 나타나지 않은 것을 알 수 있다. 또한 GA를 주기적으로 처리하여도 blasting현상을 상당히 억제할 수 있었다. 이는 식물체내에 ABA가 생성되지만 외부의 GA처리는 GA/ABA의 비율을 높게 유지하여 식물이 다시 휴면에 들어가게 되어 blasting이 일어나는 것을 막는 것으로 여겨진다. FLU이 실용적으로 사용하기에 아직 시약이 비싸다는 것, 그리고 엽록소 합성이 저해되는 현상이 있어 바로 실용화하기에 어렵지만 반복적인 GA처리는 일반농민이 직접사용하고 적용하기에 용이하고 비교적 저렴한 방법으로 추천된다.

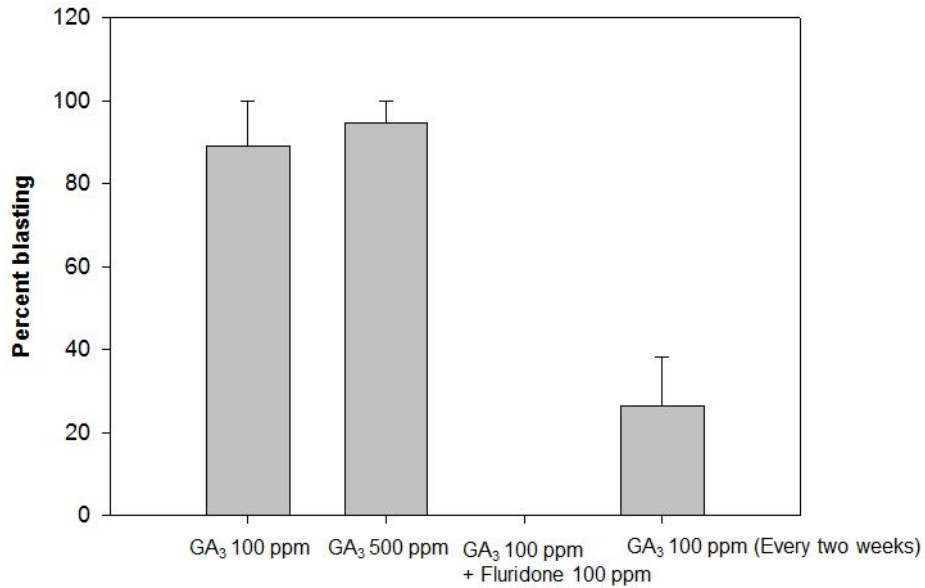


그림 1-7-2. 여러 호르몬 조합에 따른 blasting율.



그림. 1-7-3. 휴면중인 작약에 GA<sub>3</sub> 100ppm처(A), GA<sub>3</sub> 100ppm + Fluridone 100ppm(B), GA<sub>3</sub> 100ppm(spray/2 weeks)(C) 처리 후 생육.

## 8. 억제제배를 위한 최적의 장기저온저장 온도와 기간 구명

### 가. 연구목적

작약의 연중생산을 위해서는 축성제배 뿐 아니라 억제제배 또한 필요하다. 저온 저장을 할 때 장기저장이 가능한지 가능성을 알기 위해 실험을 진행하였다.

### 나. 재료 및 방법

2009년 11월 말에 굴취한 구근 뿌리를 구근 박스에 정식한 이후에 2010년 2월 26일까지 자연 상태에 두어 충분한 저온을 받고 휴면타파가 된 작약을 실험 재료로 사용하였다. 2010년 2월 26일에 작약을 저온  $-5, 0, 5^{\circ}\text{C}$ 에 5개월 저장한 이후에 2010년 8월 5일에 온실로 입실하여 생육을 조사하였다.

### 다. 결과 및 고찰

5개월 저장 이후에 출현율을 보았을 때  $-5^{\circ}\text{C}$  처리에서는 18%밖에 되지 않았지만  $0^{\circ}\text{C}$ 에서는 100% 출현하였다(그림 1-8-1). 하지만  $5^{\circ}\text{C}$ 저장에서는 저장 기간 동안 67%나 출현하였기 때문에(그림 1-8-2B) 저장 온도는  $0^{\circ}\text{C}$ 가 적합하다고 할 수 있다. 그러므로 휴면 타파된 작약을  $0^{\circ}\text{C}$ 에서 5개월까지 저장하여도 생육에는 큰 무리가 없다고 판단된다.

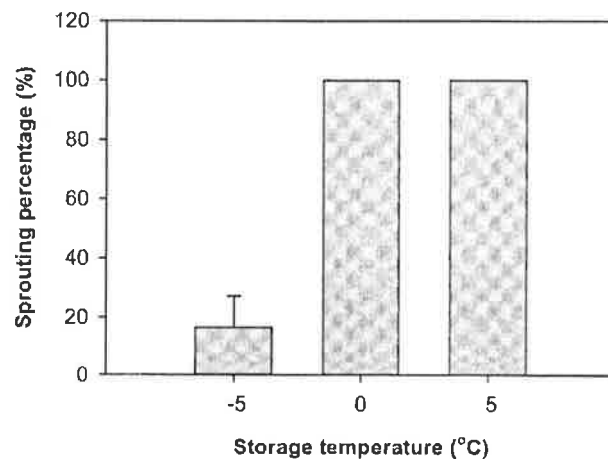


그림 1-8-1. 5개월 저장 이후에 작약의 출현율.

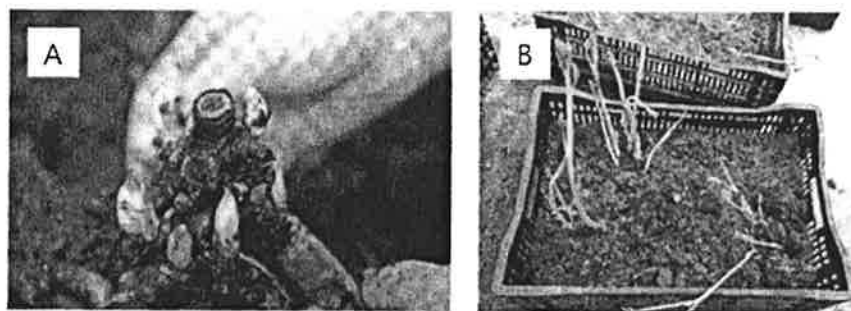


그림 1-8-2.  $0^{\circ}\text{C}$ 저장에서 정상적으로 저장된 모습(A),  $5^{\circ}\text{C}$ 저장 중에 출현한 모습(B).

## 제 2 절 무늬등굴레의 연중생산 기술

### 1. 무늬등굴레 근경의 휴면타파를 위한 저온 요구도 구명

#### 가. 연구목적

무늬등굴레는 백합과에 속하는 다년생 숙근초로써 한국, 일본, 중국에 자생한다(Jeffrey, 1980). 경엽을 절지하여 꽃꽂이 소재로 사용하고 있는 무늬등굴레는 최근 일본에서 근경을 수입하여 일부 농가에서 재배 되고 있다(Armitage, 1989). 그 수요가 증가하고 있는 실정이나, 출하시기가 5-6월로 한정되어 있다. 무늬등굴레는 겨울철에 저온을 어느 정도 받아야지만 휴면이 타파되어 신초가 올라와 생육하게 되는데, 농가에서 재배할 때, 정확한 저온 요구도를 몰라 수확기가 한정되어 있다. 본 실험은 무늬등굴레의 휴면타파를 위한 정확한 저온 요구도를 알기 위해 수행되었다.

#### 나. 재료 및 방법

2009년 10월 7일을 경남 진주시 사봉면에 위치한 무늬등굴레 농장에서 무늬등굴레 근경(7-10cm)을 한 달에 2번, 즉 10월 7일, 22일, 11월 7일, 22일, 12월 7일, 22일, 2010년 1월 7일, 22일 총 8번 굴취 하였다. 소독을 위해 बे노밀수화제에 30초-1분간 처리한 후, 구근상자에 20개체씩 3박스(60반복) 정식하였다. 생육조사항목은 출현소요일수, 출현율, 이전개소요일수, 개화소요일수, 개화율, 낙화소요일수였다. 실험 처리 기간 동안 지온을 측정하였고 자연 저온 시간(chill unit)을 계산하였다(그림 2-1-1).

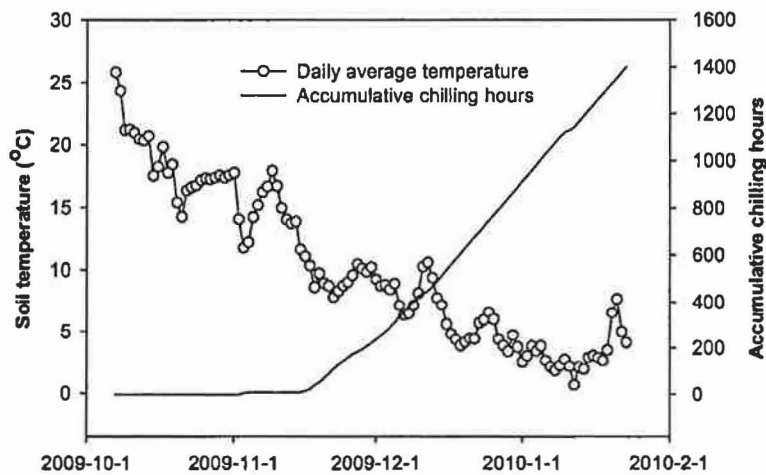


그림 2-1-1. 토양 온도와 자연 저온 시간(chill unit).

#### 다. 결과 및 고찰

2009년 10월 7일부터 11월 22일 굴취한 것까지는 출현된 모습이 관찰되지 않았다. 하지만 12월 7일 온실로 입실 및 정식 된 처리구에서 83.3%의 출현율을 보였고, 12월 22일 이후는 100%의 출현율을 보였다(그림 2-1-1). 출현소요일수는 12월 7일에 온실입실 시킨 실험구에서

정식한 날로부터 40일째 되는 2010년 1월 15일에 첫 출현이 기록되었다. 늦게 입실 할수록 출현소요일수가 줄어드는 경향을 보였으며 1월7일, 22일에 입실한 경우 14일 정도면 100% 출현함을 알 수 있었다.

통계적인 분석에 의하면, 출현소요일수에서 12월 7일 온실입실, 12월 22일 온실입실, 1월 7일 온실입실 각각 평균 44.4일, 28일, 14일을 기록하였고, 유의차도 있는 것으로 나타났다(그림 2-1-2). 또한 입실 이후에 맹아의 균일도를 보았을 때 1월 7일 이후가 가장 좋았다(그림 2-1-3). 따라서, 농가에서 무늬둥굴레 재배 시, 1월 초에 보온을 하는 것이 적당하다고 판단된다. 무늬둥굴레의 개화율과 개화소요일수 또한 출현율, 출현소요일수와 비슷한 경향을 나타낸다(그림 2-1-4). 무늬둥굴레는 절엽으로 사용되기 때문에 개화가 상품의 중요 지표가 될 수 없고 수확하는 시기가 대개 개화하고 2주 후 줄기가 딱딱해지는 시기부터이기 때문에 이를 통해 수확일을 추정할 수 있다.

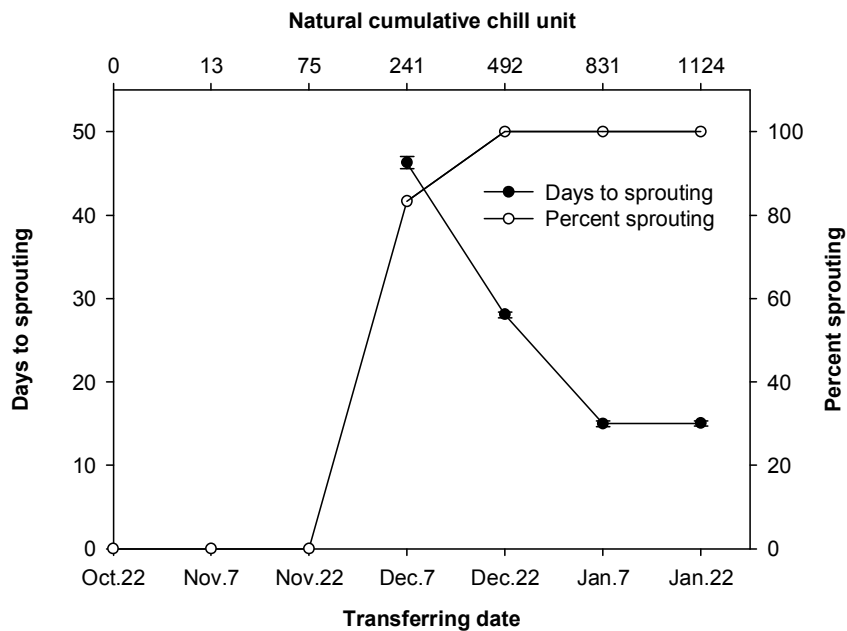


그림 2-1-2. 2009년 10월부터 2010년 1월까지 입실시기에 따른 출현율과 소요일수.

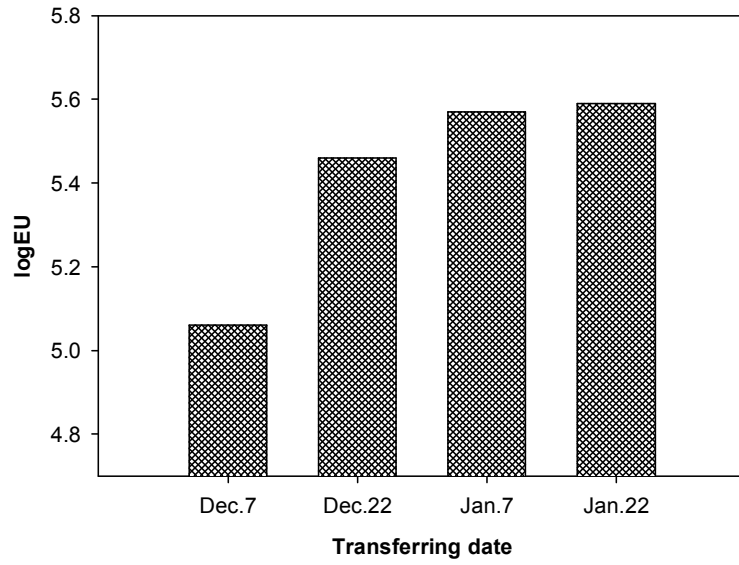


그림 2-1-3. 2009년 10월부터 2010년 1월까지 입실시기에 따른 맹아의 균일도

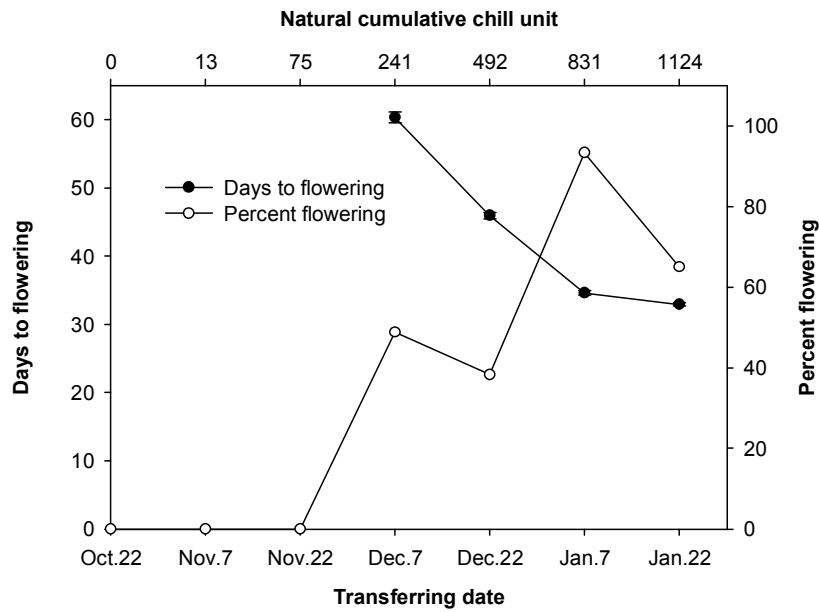


그림 2-1-4. 2009년 10월부터 2010년 1월까지 입실시기에 따른 개화율과 개화소요일수.

표 2-1-1. 입실날짜와 추정되는 수확일

| Transferring date to greenhouse | Sprouting date | Expected harvest date |
|---------------------------------|----------------|-----------------------|
| Dec. 7                          | Jan. 20        | Feb. 28               |
| Dec. 22                         | Jan. 19        | Mar. 2                |
| Jan. 7                          | Jan. 22        | Mar. 5                |
| Jan. 22                         | Feb. 6         | Mar. 20               |

위의 결과를 통해 축성을 위한 온실 입실시기는 1월 7일 이후라고 판단된다. 그리고 1월 7일에 입실하였을 때 예상 수확일은 3월 5일이었다(표 2-1-1).

## 2. 무늬등굴레 근경의 휴면타파를 위한 저온 처리 온도와 기간 구명실험

### 가. 연구목적

경엽을 절지하여 꽃꽂이 소재로 사용하고 있는 무늬등굴레는 최근 일본에서 근경을 수입하여 일부 농가에서 재배 되고 있고, 그 수요가 증가하고 있는 실정이나, 출하시기가 5-6월로 한정되어 있고, 절엽의 연중 생산을 위해 근경의 저장조건 구명이 필요하여 인공 저온처리 시 저온 요구도가 얼마나 되는지 알아보기 위한 실험을 진행하였다.

### 나. 재료 및 방법

2009년 10월 22일 경남 진주시 사봉면에 위치한 무늬등굴레 농장에서 무늬등굴레 근경(7-10cm)을 굴취하였다. 소독을 위해 बे노밀수화제 30초-1분간 침지한 후, 피트모스가 담겨있는 구근상자에 무늬등굴레 근경을 넣고(60주씩 14박스) 0℃와 5℃가 유지되는 저온저장고에 2박스(대조구-온실로 바로 입실)를 제외한 12상자를 6개씩 각각 저장시켰다. 저온저장기간은 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12주였으며, 저온저장고에 입실시킨 날부터 처리별로 상자를 꺼내어, 다른 구근상자에 20개체씩 3상자에 정식하여(60반복), 생육상태를 관찰하였다. 생육조사항목은 실험1과 동일하다.

### 다. 결과 및 고찰

대조구 즉, 저온저장 0주와 저온저장 1주 처리구는 출현하지 않았으며, 따라서 엽전개와 개화도 이루어지지 않았다(그림 2-2-1). 저온저장 0℃ 2주 처리구에서 정식일로 부터 45일이 지난 이후에 시작하였으며, 이때 출현율은 95% 이상이었다. 0℃ 4주 처리에서는 맹아소요일수가 감소하여 약 20일 정도 소요되었으며, 이후 0℃ 6주 처리와 8주 처리에서도 20일을 전후하여 맹아가 이루어졌다. 한편 맹아 균일도를 보았을 때 저온 4주 처리 이상이 되는 것이 좋을 수 있다(그림 2-2-2).

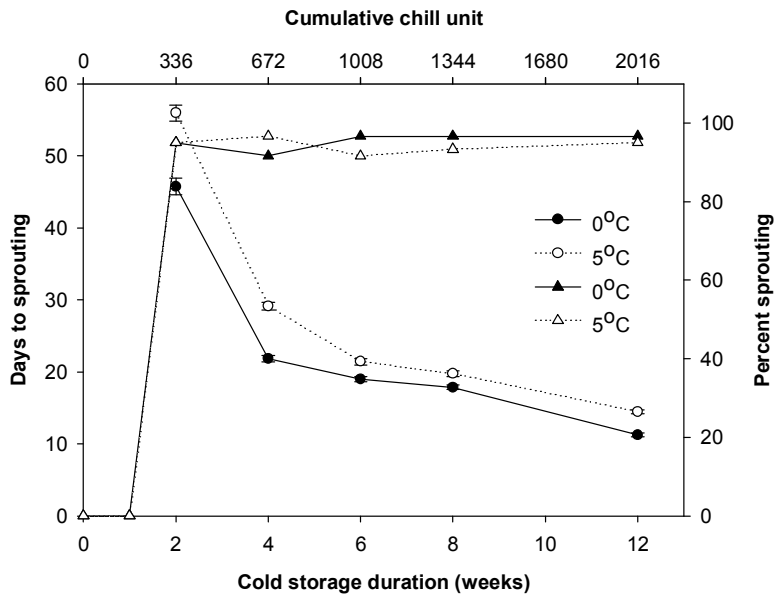


그림 2-2-1. 저온처리에 따른 맹아율과 맹아소요일수.

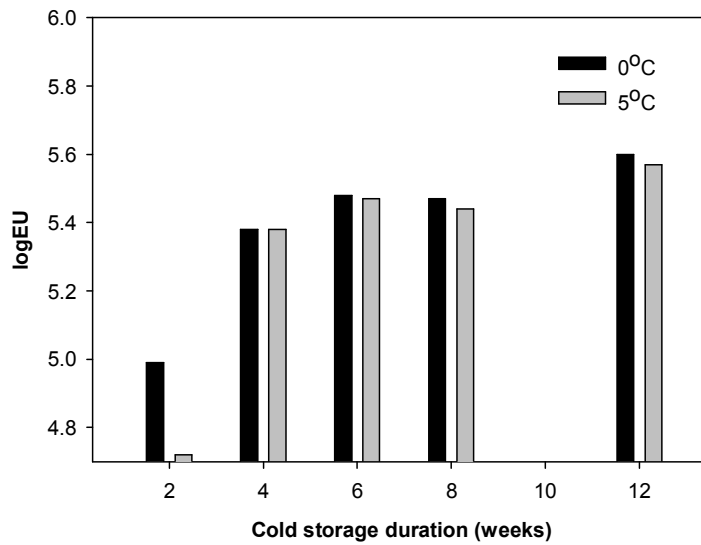


그림 2-2-2. 저온처리에 따른 출현 균일도.



개화 0℃ 2주 처리부터 이루어졌는데 정식 후 60일이 지나야 이루어졌으며, 개화율은 17%에 불과하였다. 5℃처리에서도 0℃와 비슷하게 60일 이상이 되어야 개화가 이루어졌으며 개화율도 낮았다(그림 2-2-3). 저온처리 기간이 4주 이상 되었을 때 개화 소요일수가 현저하게 줄어들었고 개화율도 높아지는 경향을 나타냈다. 따라서 저온처리는 4주 이상처리하는 것이 권장된다. 또한 5℃처리 보다는 0℃처리에서 맹아, 개화에 있어 효과가 더 좋게 나타나는 경향이 있었다. 0℃로 저온 처리를 하였을 때 예상 절엽 수확일은 표 2-1-1과 같다.

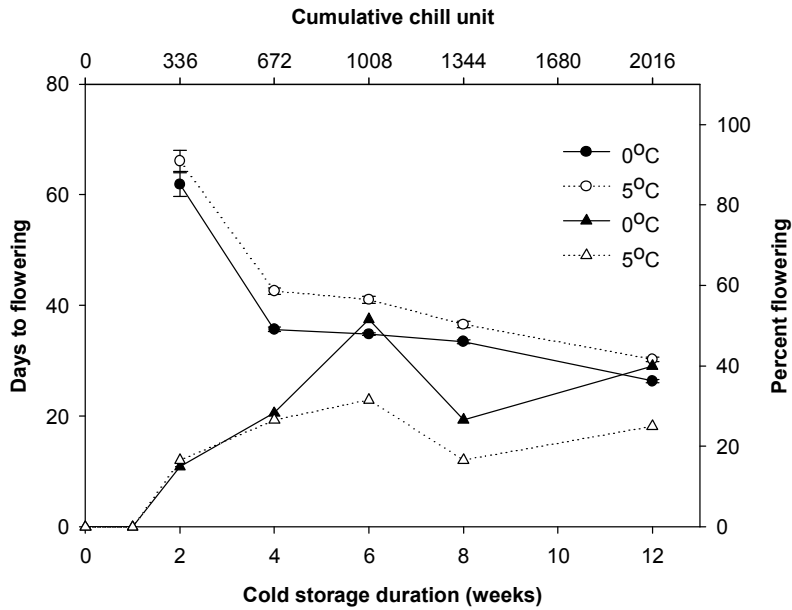


그림 2-2-3. 저온처리에 따른 개화율과 개화소요일수.

표 2-2-1. 저온처리에 따른 예상수확일

| Cold storage duration (weeks, date) | Sprouting date | Expected harvest date |
|-------------------------------------|----------------|-----------------------|
| 2 10/23 – 11/6                      | Dec. 22        | Feb. 2                |
| 4 10/23 – 11/20                     | Dec. 12        | Jan. 23               |
| 6 10/23 – 12/4                      | Dec. 23        | Feb. 2                |
| 8 10/23 – 12/18                     | Jan. 5         | Feb. 11               |
| 12 10/23 – 1/15                     | Jan. 26        | Mar. 5                |

### 3. 억제재배를 위한 최적의 장기저온저장 온도와 기간 구명

#### 가. 연구목적

무늬등굴레의 연중생산을 위해서는 축성재배 뿐 아니라 억제재배 또한 필요하다. 저온 저장을 할 때 장기저장이 가능한지 가능성을 알기 위해 실험을 진행하였다.

#### 나. 재료 및 방법

실험 1, 2와 동일한 무늬등굴레를 사용하였고 바로 저온 0, 5℃에 각각 12주(약 3개월), 24주(약 6개월) 저장한 이후에 온실에 입실하여 생육을 보았다.

#### 다. 결과 및 고찰

12주와 24주 0℃와 5℃에 각각 저장한 결과, 5℃의 저장에서는 저장 중에 망아되었다. 0℃ 저장에서는 망아가 출현하지 않았다. 0℃의 저장에서는 수확일 때까지 걸린 일수에서만 유의성을 보였으며 24주까지 저장하여도 무늬등굴레의 생육에는 큰 무리가 없다고 판단된다(표 2-3-1, 그림 2-3-1).

표 2-3-1. 저온(0℃) 장기 저장에 따른 무늬 등굴레 생육.

| Cold storage duration (week) | Percent sprouting (%) | Days to sprouting  | Percent harvest (%) | Days to harvest | Plant height | No. of leaves |
|------------------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|-----------------|--------------|---------------|
| 12                           | 100                   | 3.6 a <sup>y</sup> | 93.3                | 36.8 a          | 31.5 a       | 7.6 a         |
| 24                           | 93.3                  | 4.2 a              | 80                  | 34.8 b          | 26.7 a       | 6.9 a         |

<sup>y</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $P = 0.05$  level.

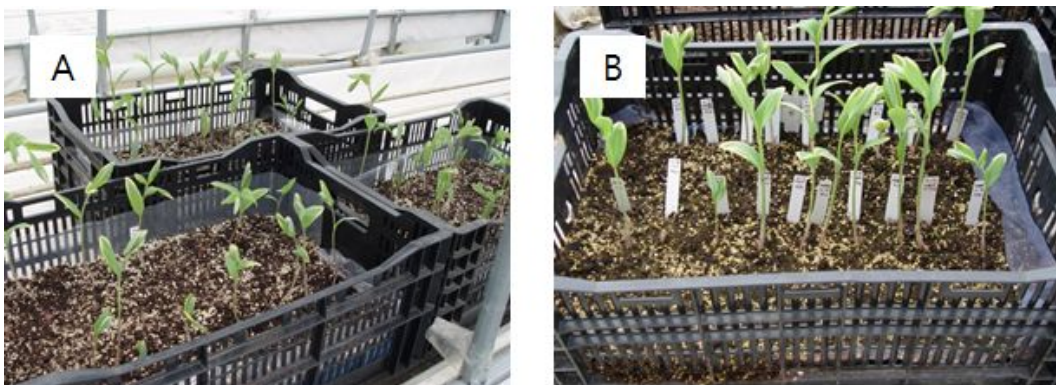


그림 2-3-1. 저온(0℃) 장기 저장에 따른 무늬 등굴레 생육 사진. 12주 저장(A), 24주 저장(B) 이후 21일이 지났을 때 사진.

#### 4. 축성재배시 생육적온 구명 실험

##### 가. 연구목적

무늬등굴레의 축성재배시 생육에 적절한 온도 조건을 알아보고자 실험을 진행하였다. 축성재배시 자연 상태에서 정상적으로 생육하는 것보다 더 낮은 저온에서 성장할 것을 고려하여 온도조건을 설정 하였다.

##### 나. 재료 및 방법

실험 1, 2와 동일한 무늬등굴레를 사용하였고 저온 처리로 완전히 휴면이 타파된 개체를 사용하였다. 주야간 온도가 15/5, 20/10, 25/15, 30/20℃로 조절되는 생육상에서 무늬등굴레의 생육을 조사 하였다.

##### 다. 결과 및 고찰

맹아까지 걸린 소요일수를 보았을 때, 30/20℃의 처리구가 가장 좋았으나(표 2-4-1) 이 처리구에서 도장하는 경향과 엽색이 바래지는 것으로 보아 생육적온은 25/15℃가 가장 적당한 것으로 생각되어진다. 20/10℃ 처리구에서도 25/15℃의 생육과 거의 비슷한 경향을 보이기 때문에(그림 2-4-1), 실제로 농가에서 축성재배를 할 시기인 겨울에 재배를 할 때 난방비를 고려한다면 야간온도 10℃까지도 생육에는 크게 문제가 없다고 여겨진다.

표 2-4-1. 온도에 따른 무늬 등굴레의 생육

| Temperature (day/night) | Percent sprouting (%) | Days to sprouting   | Percent harvest (%) | Days to harvest | Plant height | No. of leaves |
|-------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|-----------------|--------------|---------------|
| 15/5℃                   | 100                   | 22.4 a <sup>y</sup> | 35.7                | 99.5 a          | 29.4 b       | 7.1 a         |
| 20/10℃                  | 100                   | 9.4 b               | 92.9                | 52.8 b          | 41.3 a       | 8.2 a         |
| 25/15℃                  | 100                   | 7.6 bc              | 100                 | 44.3 c          | 42.0 a       | 7.7 a         |
| 30/20℃                  | 100                   | 6.4 c               | 100                 | 43.8 c          | 42.9 a       | 8.2 a         |

<sup>y</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $P = 0.05$  level.



그림 2-4-1. 온도에 따른 무늬 등굴레의 생육 사진. 15/5°C(A), 20/10°C(B), 25/15°C(C), 30/20°C(D).

## 5. 박스재배시 적정 배지 실험

### 가. 연구목적

무늬등굴레의 박스재배 시 생육에 적절한 배지 조건을 알아보고자 실험을 진행하였다.

### 나. 재료 및 방법

실험 1, 2와 동일한 무늬등굴레를 사용하였고 저온 처리로 완전히 휴면이 타파된 개체를 사용하였다. 배지는 시중에 유통되고 있는 상품을 이용하였다. 4가지 배지를 사용했으며 종류로는 썬싸인(mix #1), 바로커, 식물세계, 원예범용(그림 2-5-1)이었다.

### 다. 결과 및 고찰

배지별 맹아출현율, 매아출현소요일수, 수확율, 수확시기, 초장, 엽수에서 유의적인 차이가 없었으며 이는 적어도 이 4가지 배지 중 어떤 것을 사용하여도 무늬 등굴레의 재배에는 적합하다고 할 수 있다(표 2-5-1). 실용적인 면에 있어서는 단위부피당 가격을 고려하면 될 것이다.

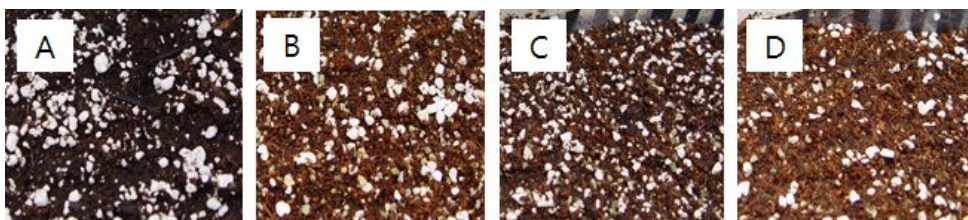


그림 2-5-1. 배지 실험에 사용된 재료 사진 썬싸인(A), 바로커(B), 식물세계(C), 원예범용(D).

표 2-5-1. 온도에 따른 무늬 등굴레의 생육.

| Media name     | Component (Coconut coir: Peat moss: Perlite) | Percent sprouting (%) | Days to sprouting   | Percent harvest (%) | Days to harvest | Plant height | No. of leaves |
|----------------|--|-----------------------|---------------------|---------------------|-----------------|--------------|---------------|
| Sunshine       | 0: 75: 25                                    | 100                   | 17.9 a <sup>y</sup> | 97.5                | 65.0 b          | 24.5 a       | 7.8 a         |
| Barocu         | 70: 15: 15                                   | 100                   | 18.0 a              | 100                 | 65.0 b          | 24.5 a       | 7.7 a         |
| Plantworld     | 50: 30: 20                                   | 97.5                  | 18.9 a              | 100                 | 67.1 a          | 24.7 a       | 7.8 a         |
| Wonyea bumyong | 80: 20: 0                                    | 97.5                  | 18.4 a              | 100                 | 65.7 ab         | 24.3 a       | 7.9 a         |

<sup>y</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $P = 0.05$

## 6. 축성재배 했던 재료를 이용한 억제재배

### 가. 연구목적

무늬 등굴레의 불시재배를 위해서 축성재배에 사용했던 무늬 등굴레를 다시 저온처리하여 휴면을 깨고 이후에 생육 시킬 수 있는지를 알아보기 위해 실험을 진행하였다.

### 나. 재료 및 방법

2009년 10월 22일 경남 진주시 사봉면에 위치한 무늬등굴레 농장에서 무늬등굴레 근경(7-10cm)을 굴취하였다. 0℃에서 4주 동안 저온 처리하여 온실로 옮겨 생육시켰다. 정상적으로 잎이 전개된 개체들(2009년 12월 3일 잎이 출현)이 다시 휴면에 들어가는 2010년 7월 9일에 다시 저온처리를 하였다. 0℃에서 각각 4, 8주 동안 저온처리를 한 이후에 다시 온실로 옮겨와 생육을 조사 하였다.

### 다. 결과 및 고찰

0℃ 4주와 8주 저온 저장한 결과, 출현 소요일수, 수확 소요일수에서 큰 차이가 없었다(그림 2-6-1, 그림 2-6-2). 하지만 출현율과 절엽의 수확율에서는 4주 저장보다 8주 저장이 15% 정도 좋았다. 4주 저온처리도 휴면이 타파되지만 균일한 절엽 생산을 위해서는 8주 처리가 더 안정적인임을 알 수 있다. 저온 4주 처리를 했을 때 수확일은 2009년 9월 15일 정도이며 저온 8주의 경우에는 2009년 10월 20일 정도였다.

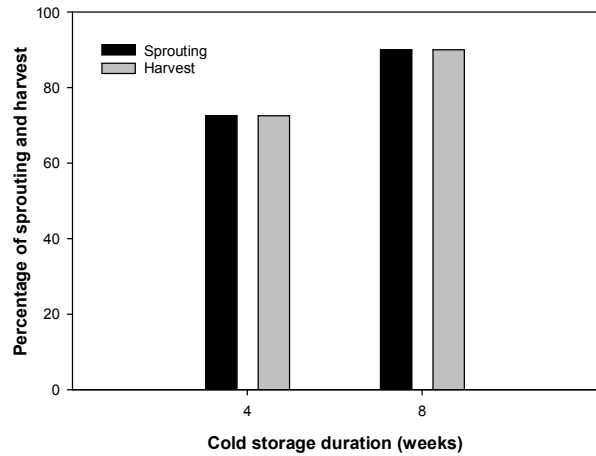
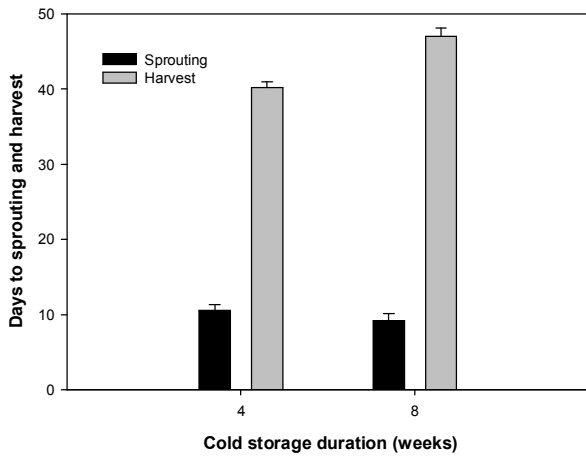


그림 2-6-1. 저온 기간에 따른 출현, 수확 소요일수와 출현, 수확율.

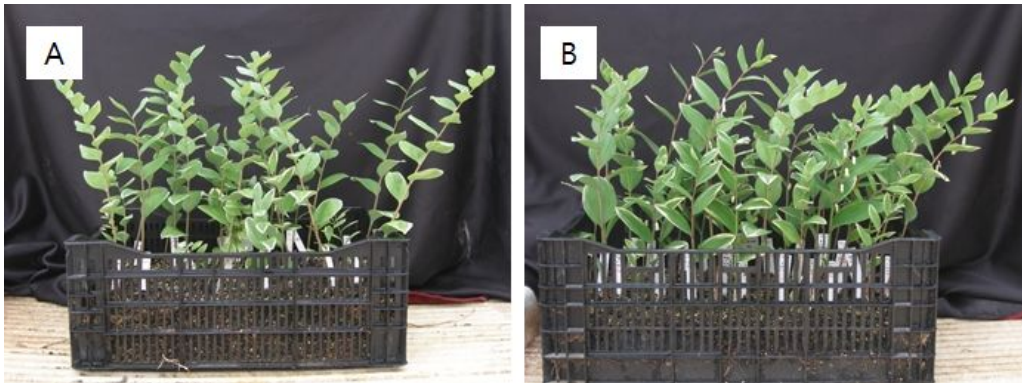


그림 2-6-2. 저온 기간에 따른 생육 사진. 0°C 4주(A), 0°C 8주(B).

## 7. 무늬동굴레 근경의 휴면타파를 위한 GA처리 실험.

### 가. 연구목적

무늬동굴레의 휴면을 타파하는데 저온 처리를 하지 않고 GA<sub>3</sub>(gibberellic acid)로 바로 휴면 타파를 시킬 수 있는지 알아보기 위해 실험을 수행하였다.

### 나. 재료 및 방법

2009년 10월 22일 경남 진주시 사봉면에 위치한 무늬동굴레 농장에서 무늬동굴레 근경(7-10cm)을 굴취하였다. 소독을 위해 बे노밀수화제 30초-1분간 처리한 후, ethanol로 용해시킨 GA<sub>3</sub> 0, 100, 200, 400, 800ppm 에 1시간 침지 후 꺼내어 20개체씩 3상자에 정식하여(60반복), 생육상태를 관찰하였다.

#### 다. 결과 및 고찰

GA<sub>3</sub> 0ppm 처리구에서는 맹아가 되지 않았고, GA<sub>3</sub> 100ppm, 200ppm, 400ppm, 800ppm 처리에서 출현율이 각각 3.3%, 3.3%, 3.3%, 6.6%로 매우 낮은 출현율을 기록했다. 또한 맹아 이후에도 엽전개가 정상적으로 되지 않았다(그림 2-7-1).

무늬등굴레 근경은 wax층으로 덮여있는데 이런 구조적인 이유로 호르몬 투과가 이루어지지 않았음을 가정하여 다음의 실험을 수행하였다.

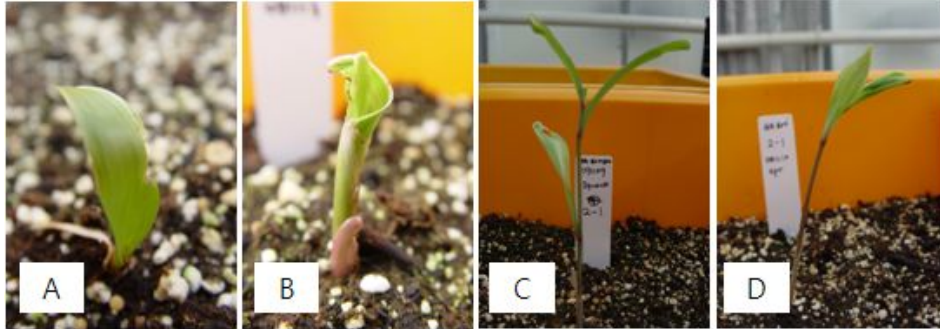


그림 2-7-1. 출현이후 생육모습. GA<sub>3</sub> 100ppm(A), GA<sub>3</sub> 200ppm(B), GA<sub>3</sub> 400ppm(C), GA<sub>3</sub> 800ppm(D).

### 8. 파상처리와 호르몬을 이용한 무늬 등굴레의 조기 휴면 타파

#### 가. 연구목적

절엽의 연중 생산을 위해 자연저온과 인공저온(0℃ 4주)을 통한 휴면타파에는 성공하였으나, 일반적으로 휴면타파에 이용되는 GA처리는 효과가 없었다. 그 이유를 근경의 눈 내부로 GA가 침투하지 못하기 때문이라 판단하여, 효과적인 GA처리 방법을 알아보기 위해 실험을 진행하였다.

#### 나. 재료 및 방법

실험에 사용된 무늬등굴레는 2011년에 정식하여 노지에서 1년 생육을 시킨 것으로 2012년 11월 09일에 실험 처리 하였다. 실험처리는 GA<sub>3</sub> 400ppm의 두상 관주처리, 면도칼로 흠집을 낸 이후에 GA<sub>3</sub> 400ppm를 두상 관주한 처리, GA<sub>3</sub> 400ppm주사처리를 하였다. 또한 무늬등굴레의 표피의 왁스층을 화학적으로 제거하고자 4%의 sodium hypochloride (NaOCl, Yuhanclorox Ltd., Korea)를 솜에 묻혀 무늬등굴레의 눈부위에 접촉 시켜 놓고 각각 6시간, 24시간 처리(그림 2-8-1)한 이후에 솜을 제거하고 증류수로 처리부위에 남아있는 NaOCl을 제거하고 다시 GA<sub>3</sub> 400ppm를 관주하였다.

측정항목은 맹아율, 맹아소요일수, 절엽수확일수를 측정하였고, 실험 시작 이후 5개월이 경과되었을 때(2012년 4월 27일)까지도 초장과 엽수를 측정하였다. 절엽수확일수는 무늬등굴레의 줄기가 단단해 지는 시기로 낙화 된 이후에 10일이 지났을 때로 설정하였다. NaOCl처리를 한 이후에 무늬등굴레의 표면을 전계방출주사전자현미경 (Field-Emission Scanning Electron Microscope: FE-SEM, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 표피 상태를 관찰하였다.

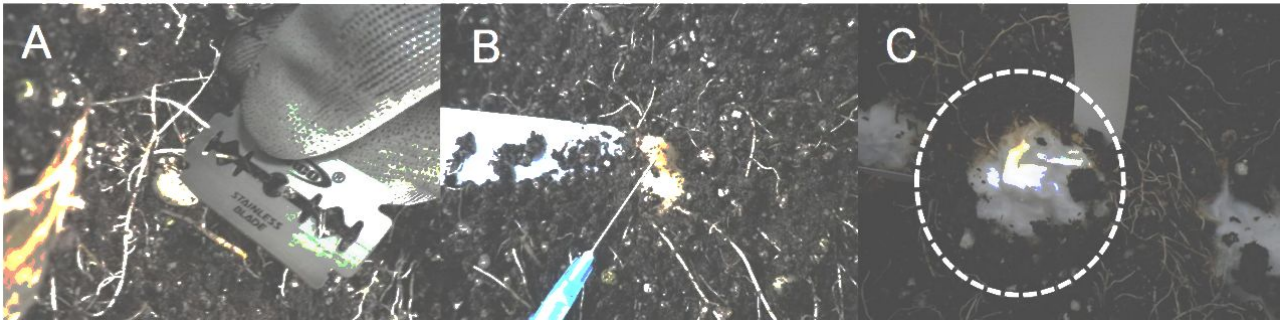


그림 2-8-1. 무늬둥굴레 GA처리 방법. 면도날로 흠집을 내고 GA관주(A), GA 주사처리(B), NaOCl로 파상처리(C).

#### 다. 결과 및 고찰

아무런 처리를 하지 않은 대조구에서는 실험이 종료될 때까지 맹아율이 10%로 매우 낮았으며, GA<sub>3</sub> 400ppm의 지베렐린을 두상 관주한 처리에서는 맹아율이 20%로 역시 낮았다(그림 2-8-2). 하지만 면도날로 흠집을 내고 두상 관주한 처리와 주사처리를 한 것에서는 맹아율이 각각 60, 90%로 높아 휴면타파 효과를 나타냈다.

한편 NaOCl을 6시간 처리하고 지베렐린을 두상 관수하였을 때는 70%가 맹아 하였으며, NaOCl을 24시간 처리하고 지베렐린을 관주했을 때는 86.7% 맹아하였다. 맹아 소요일수, 개화 소요일수, 절엽 수확 소요일수에서는 아무런 처리를 하지 않은 것에 비해 물리적으로나 화학적으로 표면에 처리를 한 실험구에서 30일 정도 앞당겨짐을 보여주었다. 그리고 절엽의 품질과도 관계되어있는 엽수에 있어서도 차이를 보였는데, 아무런 처리를 하지 않은 대조구나 단순한 지베렐린 두상 관주처리에서는 잎이 5, 6장 이었지만 주사 처리나 NaOCl처리 이후 지베렐린을 관주 했을 때는 9, 10장 정도로 훨씬 많았다(표 2-8-1, 그림 2-8-3). 이는 NaOCl처리는 무늬둥굴레 근경의 표피에 존재하는 불투과성 막 일부를 제거하였고 이를 통해 지베렐린이 흡수가 된 것으로 여겨진다. NaOCl을 처리한 이후에 무늬둥굴레 근경의 표면 조직을 FE-SEM으로 관찰해 보았을 때 아무런 처리를 하지 않은 대조구에서는 표면이 매끈하였지만 NaOCl 6시간과 24시간을 처리한 것에서는 표면이 군데군데 파쇄된 모습을 보여주며 NaOCl 적용 시간이 길수록 이러한 현상이 더 많이 관찰되었다(그림 2-8-4).



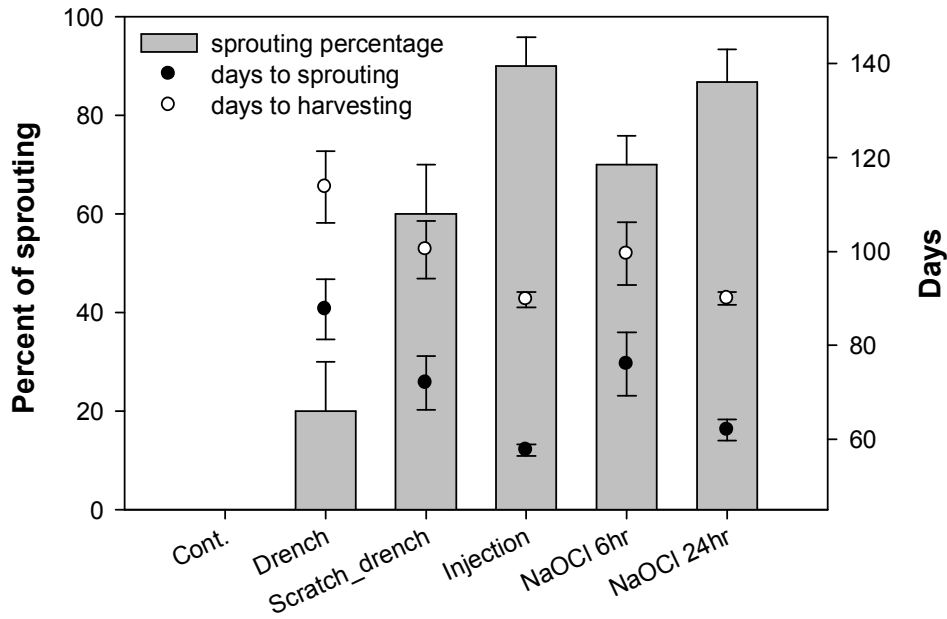


그림 2-8-2. 파상처리와 GA처리에 따른 무늬등굴레의 맹아율.

표 2-8-1. 파상처리와 GA처리가 무늬등굴레의 초장과 엽수에 미치는 영향.

| Treatments        | Plant height (cm)   | No. of leaves / plant |
|-------------------|---------------------|-----------------------|
| Control           | 30.0 b <sup>z</sup> | 5.0 c                 |
| Drench            | 55.5 a              | 6.0 bc                |
| Scratch_drench    | 42.7 ab             | 8.0a abc              |
| Injection         | 57.4 a              | 10.6 a                |
| NaOCl 6hr_drench  | 44.2 ab             | 9.3 ab                |
| NaOCl 24hr_drench | 48.3 ab             | 10.6 a                |
| Significance      | *y                  | ***                   |

<sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $P = 0.05$ .

<sup>y</sup>\*,\*\*\*Significant at  $P = 0.05$  or  $0.001$ , respectively.

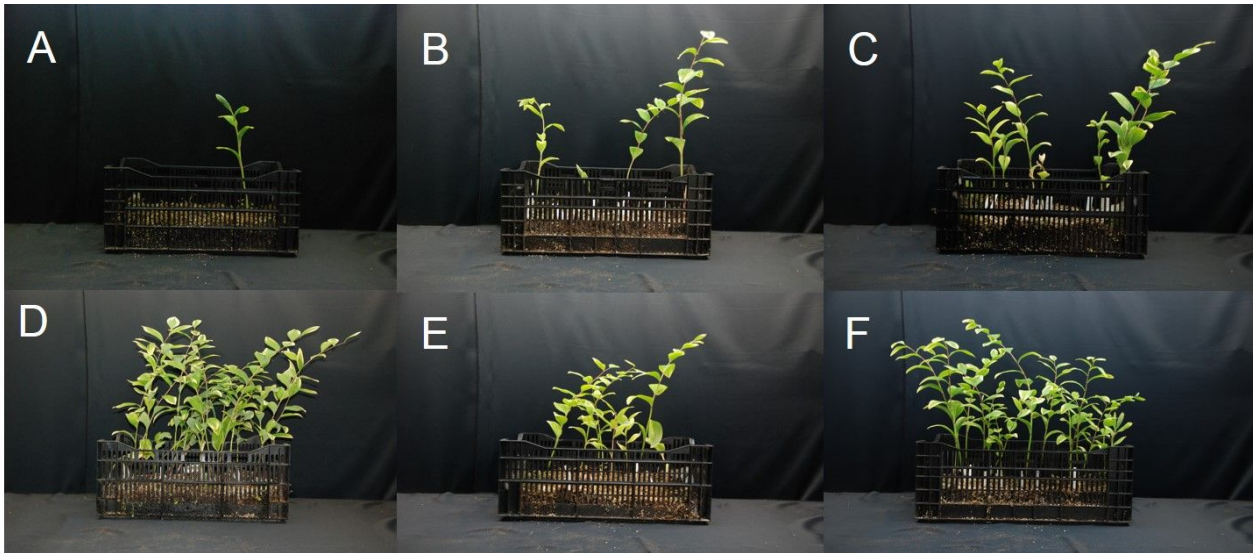


그림. 2-8-3. 파상처리와 GA처리를 한 후 3개월이 지났을 때의 무늬둥굴레 생육. 무처리(A), GA<sub>3</sub> 400ppm 관주(B), 면도날로 흠집을 낸 후 GA관주(C), GA 주사처리(D), NaOCl 6시간처리 후 GA관주(E), NaOCl 24시간처리 후 GA관주(F).

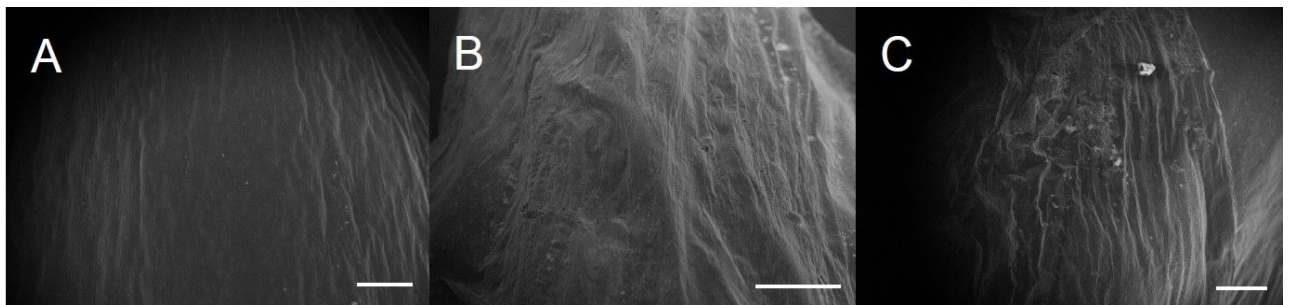


그림. 2-8-4. 파상처리 후 무늬둥굴레의 표면. 무처리(A), NaOCl 6시간처리 (B), NaOCl 24시간처리(C).

## 제 3 절 껌이풀의 생육 기간 단축 기술

### 1. 껌이풀 종자 발아기술 개발

종자 휴면을 분류화하고자 여러 연구자들이 시도하였는데, Nikolaeva(1977)가 종자의 형태적 그리고 생리적 관점을 바탕으로 종자 휴면 체계의 틀을 고안하고, Baskin & Baskin(1998)이 이를 바탕으로 더욱 포괄적인 종자휴면 분류를 체계화시킨 것이 가장 보편적이고 과학적인 방법으로 알려져 있다. 현재는 이러한 분류법을 바탕으로 북미, 유럽에 자생하는 식물의 종자휴면 종류를 구명하는 연구가 활발히 이루어지고 있으며 최근에는 일본의 자생 식물을 대상으로도 연구가 이루어졌다. 하지만 한국에 자생하는 식물들에 대해서는 이와 같은 과학적인 접근을 통한 정확한 휴면 종류를 구명한 연구가 거의 없었다. 따라서 본 연구를 통해 껌이풀의 정확한 종자 휴면을 구명하고 또한 긴 휴면 기간을 단축하는 방법을 고안하고자 한다. 또한 껌이풀 뿐만 아니라 관상 가치가 뛰어나지만 휴면 타파가 어려운 유용 식물의 종자 휴면을 구명하는데 참고 연구가 될 것이다.

#### ※ 종자 채종, 관리, 소독 방법

2009년 5월 29일에 '물향기 수목원'에서 채종한 종자, 2010년 5월 28일에 '한택 식물원'에서 종자, 2011년 5월 22일에 '한택 식물원'에서 채종한 종자, 2012년 5월 22일에 '한택 식물원'에서 채종한 종자를 실험에 사용하였다. 2009, 2010, 2011, 2012년에 채종한 종자는 각각 실험을 시작하기 전(일주일 이내)까지 실온에 보관하였다가 실험에 종자를 사용하기 이전까지 저온(5℃)에 두었다. 종자소독은 실험에 들어가기 전, 그리고 실험 중간에 종자에 곰팡이가 생길 때마다 했으며, '큰나락 수화제'(동부한농화학)를 500ppm의 농도로 1시간 침지하였다.

### 가. 껌이풀 종자의 물리적 휴면(Physical dormancy)의 유무 확인

#### (1) 연구목적

물리휴면(Physical dormancy, PY)은 종자의 과피가 불투과성을 가지고 있어서 물이 종자 내에 흡수가 되는 것을 막아 종자가 발아가 되지 않게 하는 종자 휴면이다(Baskin & Baskin, 1998). 껌이풀이 이러한 종자휴면을 가지고 있는지 알아보기 위해 Imbibition test를 수행하였다.

#### (2) 재료 및 방법

2010년 종자를 사용하였으며 실험은 2010년 6월 2일에 수행하였다. Petridish에 Whatman No.2 filter paper를 2장 깔고 증류수를 주입하였다. 10개의 종자를 치상하였으며 1시간 간격으로 생체중 증가를 측정하였다. 3개의 반복구를 두었으며, 건조를 막기 위해 parafilm으로 봉하였고 필요시 증류수로 보충하였다. 아래의 식을 이용하여 생체중의 증가량을 계산하였다.

$$\%W_s = [(W_i - W_d)/W_d] \times 100$$

$W_s$  = increase in mass of seeds

$W_i$  = mass of seeds after a given interval of imbibition

$W_d$  = initial seeds mass

### (3) 결과 및 고찰

종자는 12시간 만에 초기 무게의 100%까지 증가 하였다. 그 이후에는 수분 증가량이 크게 늘지 않았다. 이는 종자가 수분을 자유롭게 흡수하는 것을 나타내며 물리휴면은 가지고 있지 않음을 알 수 있다(그림 3-1-1).

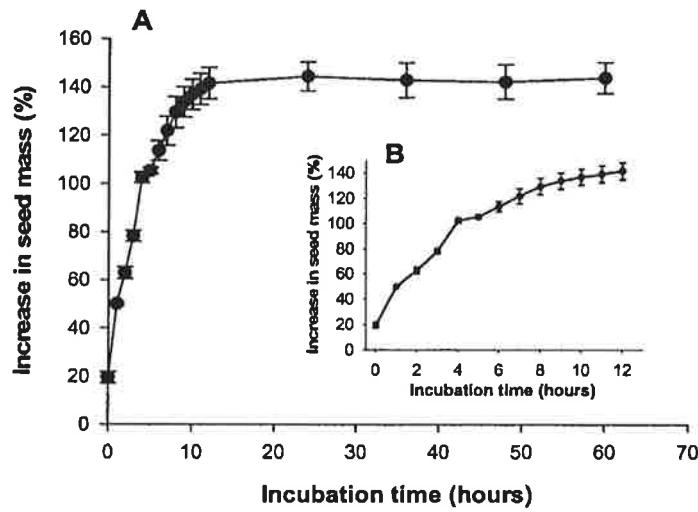


그림 3-1-1. 종자의 수분 흡수 그래프(A), 12시까지 변화 그래프(B).

### 나. 껍질이풀의 형태적 휴면(Morphological dormancy)의 유무 확인

#### (1) 연구목적

형태휴면(Morphological dormancy, MD)은 종자내의 배(embryo)가 미성숙 상태이기 때문에 나타나는 휴면이며 이때 배는 이미 분화가 되어있는 상태인 경우가 많다. MD를 가지고 있는 종자의 배는 어떤 생리적인 휴면을 가지고 있는 것이 아니며 단지 배가 자라는데 시간이 필요할 뿐이다. 따라서 형태적인 휴면을 가지고 있는 종자는 대개 30일을 전후하여 발아가 되는 특성을 가지고 있다. 껍질이풀이 이러한 MD를 가지고 있는지 알아보기 위해 종자의 배를 관찰하고 여러 온도 조건에서 30일 이내에 발아가 되는지 알아보았다.

#### (2) 재료 및 방법

2009년 종자를 사용하였으며, 2009년 6월 5일 실험을 수행하였다. 채종 직후 종자의 단면을 관찰하였다. 또한 30일 이내에 발아가는지 알아보기 위해 주/야간 온도가 25/15℃, 20/10℃, 15/6℃와 항온 5℃의 성장상 내에서 발아율을 매주 측정했으며, 4주 간격으로 배의 길이를 조사 하였다. 배의 길이는 배(embryo)와 배유(endosperm)의 상대적인 비율인 E:S 비율로 계산하여 표시하였다. 이때 광은 형광등을 사용하였으며 광도는 30-40μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>였으며 시간은 주/야간 각각 12시간씩 조사하였다. 20개의 종자를 4반복으로 하여 실험을 수행하였으며, 1년(52

주)동안 종자 발아를 확인하였다.

(3) 결과 및 고찰

채종 당시 종자크기는 4mm정도이며 종자를 횡단으로 잘라 배를 관찰하였을 때 배유가 종자의 대부분을 차지하고 있으며 배는 0.5mm이하로 미성숙배 상태임을 확인할 수 있었다(그림 3-1-2).

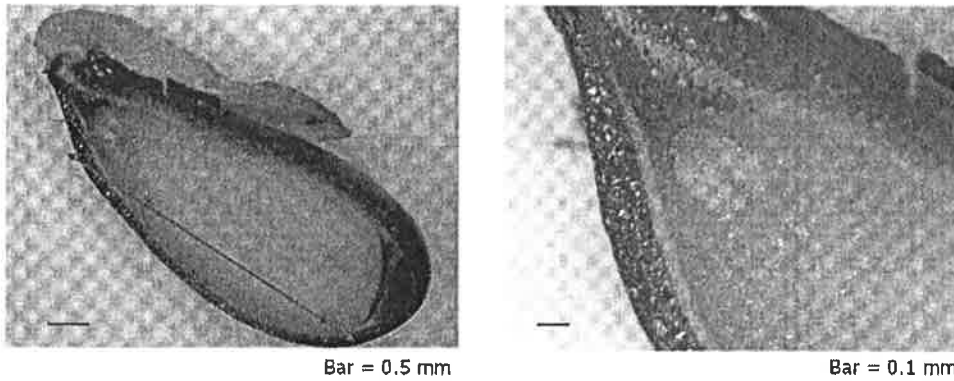


그림 3-1-2. 채종당시 종자 단면.

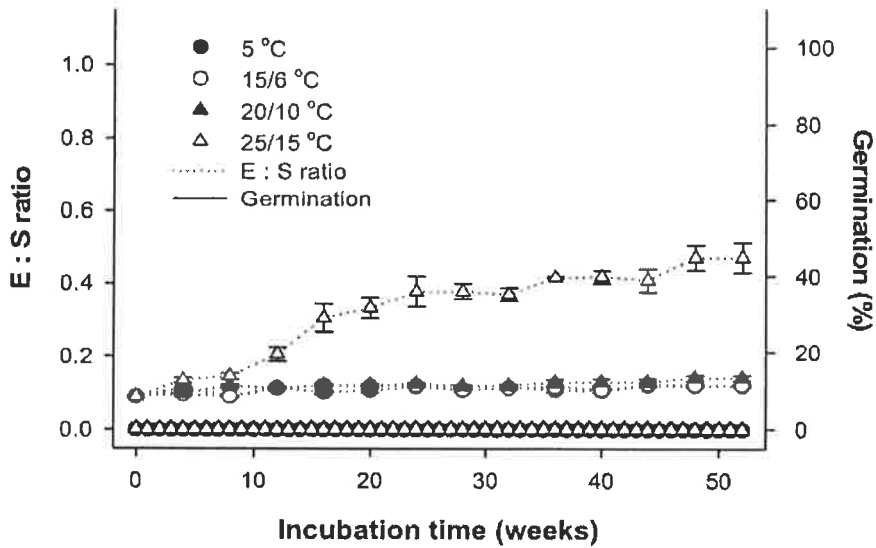


그림 3-1-3. 여러 온도 조건에서 배성장과 발아율.

그리고 종자 휴면이 MD만 가지고 있다면 30일 이내에 발아를 해야 하지만 껌껌이풀은 여러 온도조건(5/15°C, 20/10°C, 15/6°C, 5°C)에서 52주가 지나도 발아가 전혀 이루어지지 않았다 (그림 3-1-3). 배성장도 25/15°C에서만 E:S 비율이 0.4정도로 커졌지 다른 온도 처리에서는 전혀 배가 자라지 않았다. 이는 껌껌이풀이 MD뿐만 아니라 생리휴면(physiological dormancy)을 동시에 가지고 있는 형태생리휴면(morphophysiological dormancy)을 가지고 있음을 알 수 있다.

## 다. 껌껌이풀의 휴면타파를 위한 온도 구명

### (1) 연구목적

형태생리휴면(morphophysiological dormancy, MPD)는 2가지의 type으로 구분된다. Simple type은 종자내의 미성숙배가 상대적 인 중온에서 자라며 complex type은 상대적 인 저온에서 배가 성장하는 특성을 가지고 있다. 이를 알아보기 위해 2가지 실험 방법을 병행하였다. 1) 자연 상태에서 배의 성장과 발아를 관찰하는 종자 휴면의 phenology를 보는 것, 2) 자연의 온도 조건을 인공적인 성장상내에서 구현하여 배의 성장과 발아에 필요한 온도를 구명하는 move-along test를 하였다.

### (2) 재료 및 방법

2010년 종자를 사용하였으며 실험은 2010년 5월 28일에 수행하였다.

#### (가) Phenology 구명

껌껌이풀의 서식지 환경과 비슷한 조건을 맞추고자 채종한 종자를 모래와 섞어 마사토가 담긴 상자 위에 올려놓고 모래로 1cm정도 덮고 낙엽을 5cm 정도 덮어 두어 서울대학교 내에 정원수 아래에 식재하였다. 종자는 15일 간격으로 10개의 종자를 채취하여 배를 잘라 성장한 배의 길이를 재고 Toluidine blue로 염색하여 종자 단면을 촬영했다. 또한 발아여부를 매달 확인하였다. 기온과 토양 3cm 깊이의 온도를 data logger(Watch dog)를 이용하여 30분 간격으로 측정 하였다.

#### (나) Move-along test

Move-along test는 자연상태의 온도 변화를 성장상 내에서 시뮬레이션하는 방법으로 봄: 15/6°C, 여름: 25/15°C, 가을: 20/10°C, 겨울 5°C로 가정하고 봄부터 시작하는 처리인 Move1: 25/15°C -> 20/10°C -> 15/6°C -> 5°C -> 15/6°C -> 20/10°C -> 25/15°C와 Move2: 5°C -> 15/6°C -> 20/10°C -> 25/15°C -> 20/10°C -> 15/6°C -> 5°C를 처리하고 종자가 언제 발아를 하는지 그리고 배의 생장은 언제 일어나는지 알아보아 종자의 휴면 type을 정하는 방법이다(Baskin and Baskin, 2003). 4주 간격으로 종자를 잘라 배성장 상태를 보았고 매주 발아율을 측정하였다.

### (3) 결과 및 고찰

#### (가) Phenology 구명

종자는 자연상태에서 이듬해 3월, 즉 과중 후 9개월이 지나야 발아하기 시작했으며 이때 발아율은 90% 이상이였다(그림3-1-4). 유묘는 발아 이후에 곧 이어서 3월 말부터 시작되었으며 4월 중순이 되면 유묘가 80% 이상 출현했다. 채종당시 배가 전체 배유량의 10% 밖에 차지하고 있지 않았다. 9월 15일까지(약 3개월) 배가 전혀 자라지 않은 것으로 보아 껍질이 종자는 단순한 형태적 휴면 뿐 아니라 생리적 휴면도 함께 가지고 있음을 알 수 있는데 배는 가을 중온기를 거치면서 급속도로 자라 11월 중순에는 배의 생장이 완성되었다. 이는 여름의 고온기를 겪으며 배의 생리적인 휴면이 깨졌음을 나타내며 중온에서 배가 자라는 것으로 보아 simple type의 휴면을 가지고 있다고 판단된다. 배의 생장이 완료되었지만 종자는 바로 발아를 하지 않고 3개월 정도의 저온을 겪어야 발아를 했다. 이는 2차 휴면이 있음을 나타내며 겨울의 저온을 통해 휴면이 깨짐을 알 수 있다. 시기별로 배의 성장된 사진은 그림 3-1-5와 같다.

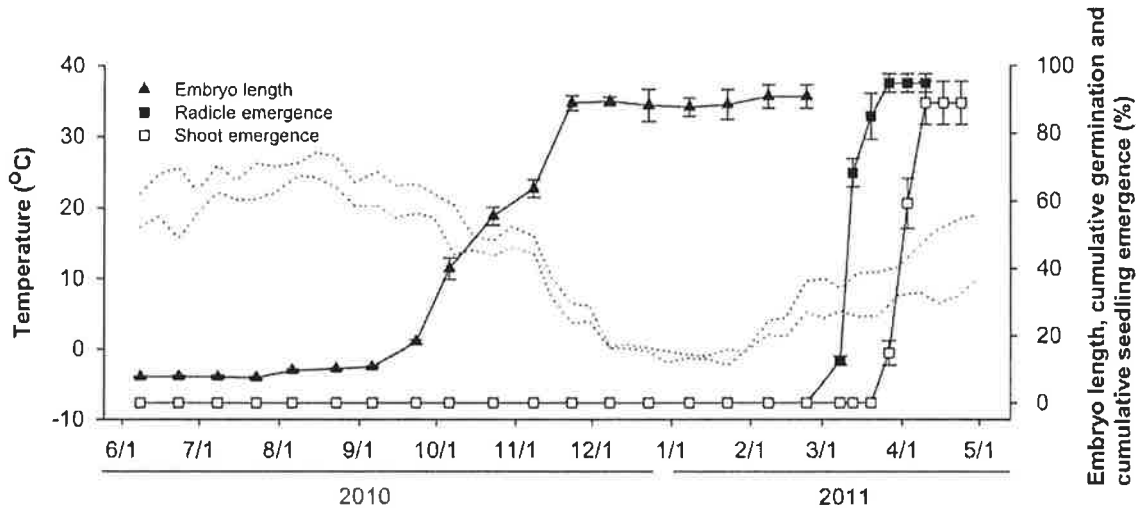


그림 3-1-4. 시기별 온도와 그에 따른 종자 배발달, 발아율

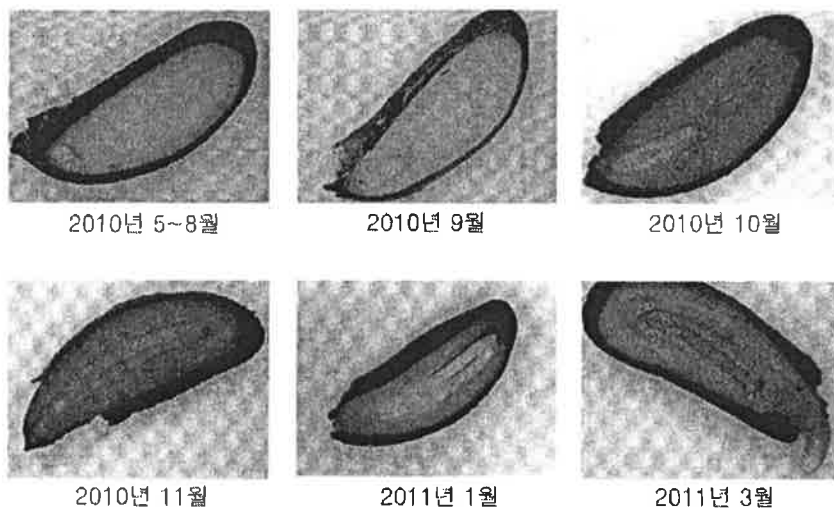


그림 3-1-5. 시기별 종자의 배발달

(나) Move-along test

Move1: 25/15°C → 20/10°C → 15/6°C → 5°C → 15/6°C → 20/10°C → 25/15°C 의 경우 배는 고온(25/15°C)을 통해 배가 신장하기 시작하며 그 이후 중온(20/10, 15/6°C)에서 배의 신장을 완성하게 된다(그림 3-1-6(A)). 그리고 이후 일정기간의 저온(5°C)을 겪으며 휴면을 타파하고 발아를 하는 것을 알 수 있다. 이는 자연상태에서 관찰한 phenology와도 잘 일치하였다. 그리고 Move2: 5°C → 15/6°C → 20/10°C → 25/15°C → 20/10°C → 15/6°C → 5°C 의 경우 24주까지 배가 전혀 자라지 않다가 28주째부터 배가 신장하는 것을 알 수 있는데 이는 고온(25/15°C)가 지난 다음이라는 것을 볼 때 배의 신장에 고온을 반드시 요구한다는 것을 알 수 있다 (그림 3-1-6(B)). 이와 같이 중온에서 배가 자라는 특성은 simple type을 가지는 종자에서 나타나는 현상이다.

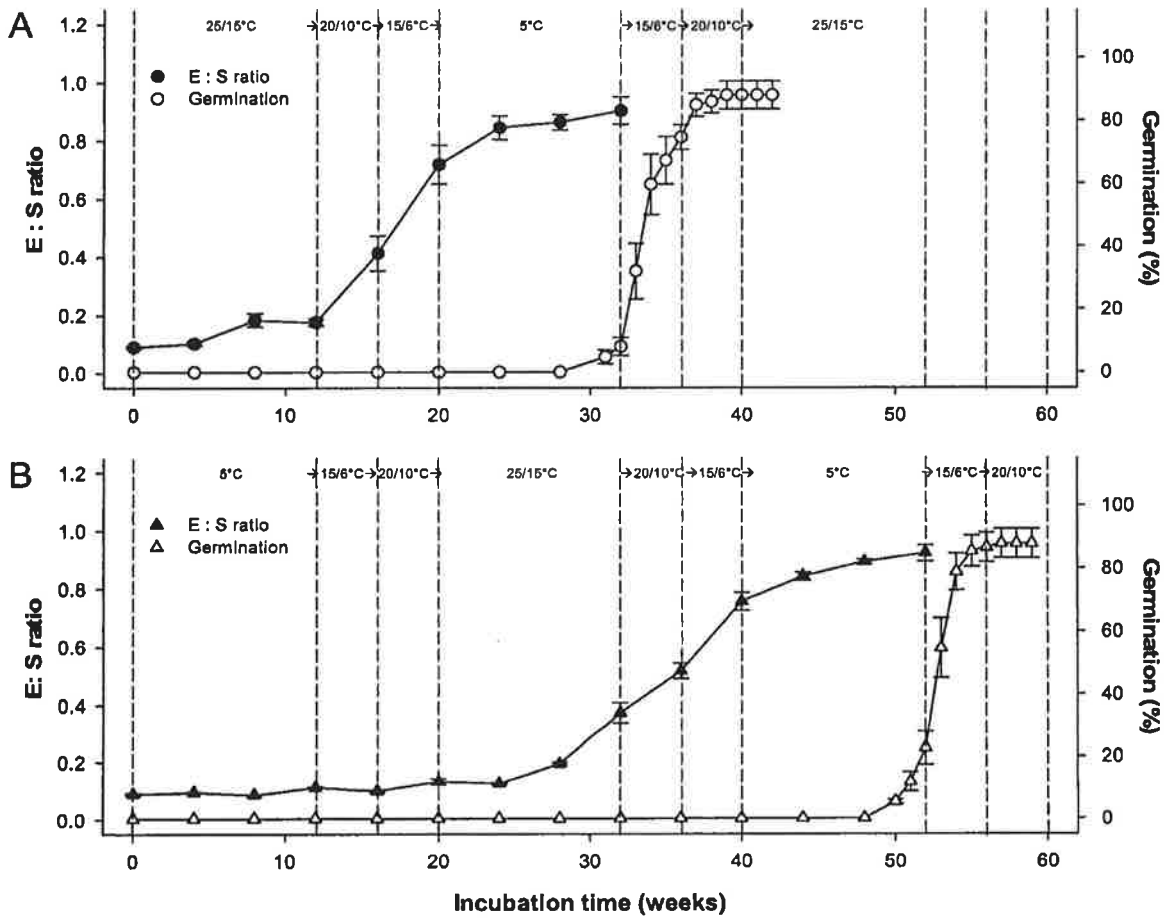


그림 3-1-6. move-along test결과 A, 여름부터 시작하는 sequence; B, 겨울부터 시작하는 sequence



## 라. 껌이풀의 휴면의 level 구명

### (1) 연구목적

앞선 실험의 결과를 통해 껌이풀은 simple MPD에 속함을 알 수 있다. 종자의 휴면의 깊이는 3가지(non-deep, intermediate, deep)로 나눌 수 있다. Non-deep, intermediate은 GA를 통해 휴면이 깨지고 발아를 하지만, deep은 GA으로 휴면이 타파가 되지 않는 깊은 휴면을 가지고 있다. 따라서 본 실험에서는 휴면중인 껌이풀 종자에 지베렐린을 처리하여 휴면이 타파되는지를 알아보고 어떤 level의 휴면 깊이를 가지고 있는지 알아보고자 한다.

### (2) 재료 및 방법

2009년 채종 종자를 사용했으며 2009년 5월 27일에 실험을 수행하였다. 종자 소독 이전에 GA<sub>3</sub> 0, 10, 100, 1000ppm의 각 농도에 종자를 1일 침지하고 이후에 종자소독을 수행하였다. GA처리를 한 이후에는 20℃의 성장상 내에서 배신장과 발아율을 측정하였다.

### (3) 결과 및 고찰

처리 후 10주가 지났을 때 최종 발아율을 조사하였다. GA<sub>3</sub> 0, 10 ppm에서는 전혀 발아가 되지 않았으며 100ppm에서는 6%, 1000ppm에서는 15%까지 발아율이 올라갔다(그림 3-1-7). 시간이 지나도 발아율은 더 이상 증가하지 않았고 GA<sub>3</sub> 1000ppm에서는 종자가 물러지는 현상도 나타났다.

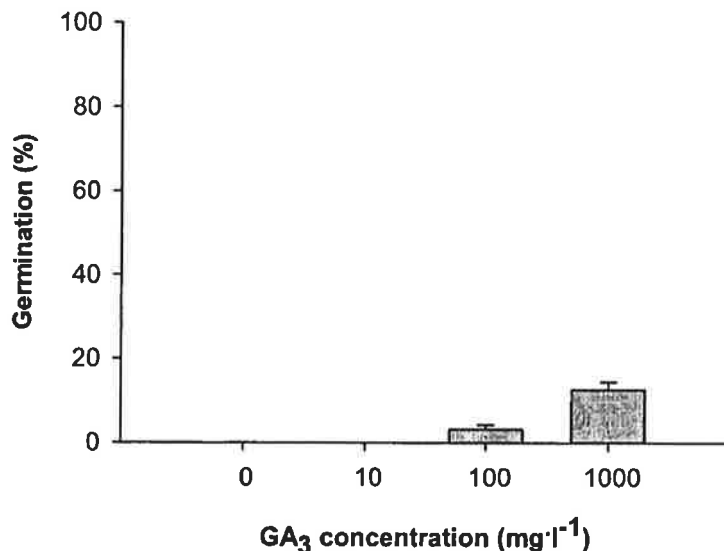


그림 3-1-7. GA 처리시 최종 발아율

GA<sub>3</sub>를 통해 완벽하게 휴면을 타파하여 발아에 성공하지는 못했지만 GA<sub>3</sub> 1000ppm의 경우 1달 만에 대부분의 종자에서 배가 신장한 것으로 보아 GA<sub>3</sub>를 통해 종자의 1차 휴면을 성공적으로 타파하였음을 알 수 있다(그림 3-1-8). 그러나 2차 휴면을 깨지 못하였기 때문에 발아 까지 GA<sub>3</sub>효과가 이어지지 못하였다.

지베렐린 처리를 통해 배의 신장은 이루어졌지만 발아가 되진 않았으므로, 껌이풀의 종자는 지베렐린으로 휴면 타파가 되지 않는 깊은 휴면을 가지고 있는 deep level을 가지고 있다는 것을 알 수 있다.

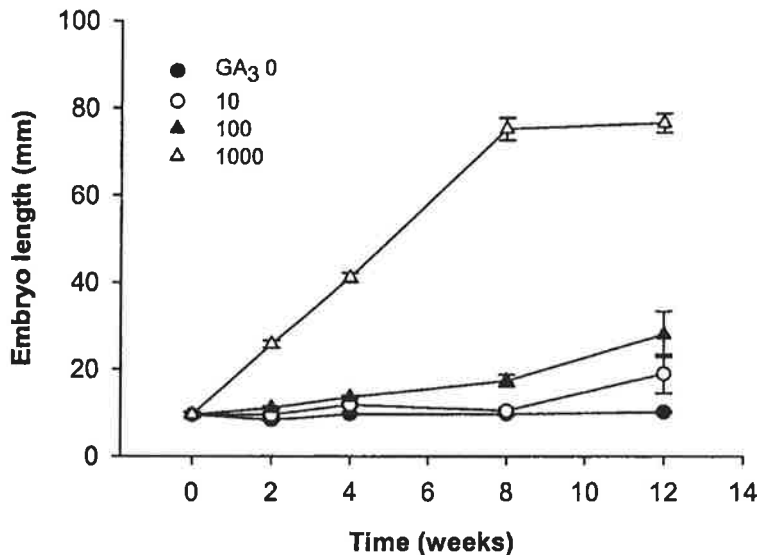


그림 3-1-8. GA 처리 후 배발달

#### (4) 껌이풀의 휴면에 대한 종합 고찰

껌이풀의 배가 처음에 미성숙배이기 때문에 'morphological dormancy(MD)'에 분류되며 배가 성장한 이후에도 발아를 하지 않고 일정 기간의 저온을 받아야 휴면을 깨는 생리적 휴면도 가지고 있다. 이와 같은 결과를 통해 껌이풀은 형태생리휴면인 'morphophysiological dormancy(MPD)'에 속함을 알 수 있다. 그리고 휴면을 깨는데 비교적 긴 시간이 소요되며(4개월 이상), GA처리에 의해 완전한 휴면타파가 이루어지지 않았으므로, 껌이풀의 종자는 'deep' type의 생리적 휴면을 가지고 있으며 배가 성장하는 온도가 저온이 아닌 중온이었으므로 'simple' type에 분류된다. 종합적으로 껌이풀의 종자 휴면은 **Deep Simple MPD**로 분류된다고 할 수 있다. Deep simple MPD에 속하는 식물 종자로는 *Fraxinus excelsior*(구주물푸레나무), *F. nigra*(양물푸레나무), *Jeffersonia diphylla*(twin leaf), *Panax ginseng*(인삼), *P. trifolium*(삼엽삼), *Taxus baccata*(유럽주목)등이 있다.

#### 마. GA와 온도의 혼합처리를 통한 껌이풀의 종자휴면 조기 타파

##### (1) 연구목적

앞선 실험에서 껌이풀의 종자의 휴면을 타파하기 위해 GA<sub>3</sub>를 여러 농도로 처리했을 때 1000ppm에서 일부 발아하였으나 10% 미만으로 휴면타파가 성공적으로 이루어지지 않았다. 껌이풀과 같은 속에 있는 *Jeffersonia diphylla*에 GA<sub>3</sub> 1000ppm 처리하였는데 7% 정도 밖에 발아하지 않은 경향과 비슷하였다(Baskin & Baskin, 1989).

깻깻이풀이 속한 deep simple MPD의 경우 GA<sub>3</sub>가 종자의 휴면은 대체 할 수 있지만 2차 휴면은 대체 못하는 것이 일반적인 현상이며 2차 휴면은 자연상태에서 저온을 받아야 깨는 특성이 있다. 이를 착안하여 GA<sub>3</sub>처리 시 저온을 함께 처리하면 1, 2차 휴면을 동시에 깻 수 있는 가능성이 있어 실험을 수행하였다.

## (2) 재료 및 방법

2011년 5월 22일에 한택식물원에서 채종한 깻깻이풀 종자를 상온에서 2, 3일 건조시킨 이후에 꼬투리와 종자를 분리시키는 정선 작업을 하였다. 정선된 종자는 실험 시작 전까지 5℃에서 저장하였다. 실험은 6월 4일에 시작하였다. 소량의 에탄올을 사용하여 지베렐린을 녹여 GA<sub>3</sub> 0, 10, 100, 1000ppm을 만들고 종자를 1일 상온에서 침지했다. 30개 5반복을 하였으며 지베렐린 처리 이후에는 배노딜 수화제로 30분표면 살균을 하였고 5cm plate에 증류수로 적신 filter paper를 2장 깔고 그 위에 소독된 종자를 치상하였다.

온도처리 전체 4처리로 주야간 25/15℃, 20/10℃, 15/6℃, 그리고 항온 5℃에 두었다. 발아율은 매주 확인하였으며 발아된 종자는 plate에서 제거하였다. 종자의 발아는 유근이 1mm 돌출되었을 때를 기준으로 하였다.

## (3) 결과 및 고찰

증류수만 관주한 처리에서는 어느 온도에서도 발아를 하지 않았다. GA<sub>3</sub>는 1000ppm일 때 발아율이 제일 높았으며 온도처리는 15/6℃에서 78%로 가장 높게 나타났다(그림 3-1-9, 3-1-10). 5℃에서 발아율이 20% 정도로 낮은 이유는 지베렐린으로 1차 휴면이 타파 되었지만 배가 신장하기 위해서는 중온이 필요한데 5℃는 너무 낮은 온도였기 때문으로 사료된다. 15/6℃의 경우는 주간 15℃에서 배가 신장하고 야간의 6℃에서는 2차 휴면을 동시에 깻 수 있었기 때문이라고 여겨진다. 이러한 결과는 비단 깻깻이풀뿐 아니라 우리나라의 동일한 휴면 type을 가진 종자들 (주목, 인삼, 호랑가시나무 등)과 세계의 다양한 종자에서 긴 휴면 기간을 짧은 1, 2달로 단축시키고 발아 시킬 수 있는 의미 있는 결과가 될 수 있다고 여겨진다. 하지만 이런 깻깻이풀에서 나온 결과가 다른 종의 종자에서도 동일하게 반응이 나타나는지는 추가 실험이 필요하다.

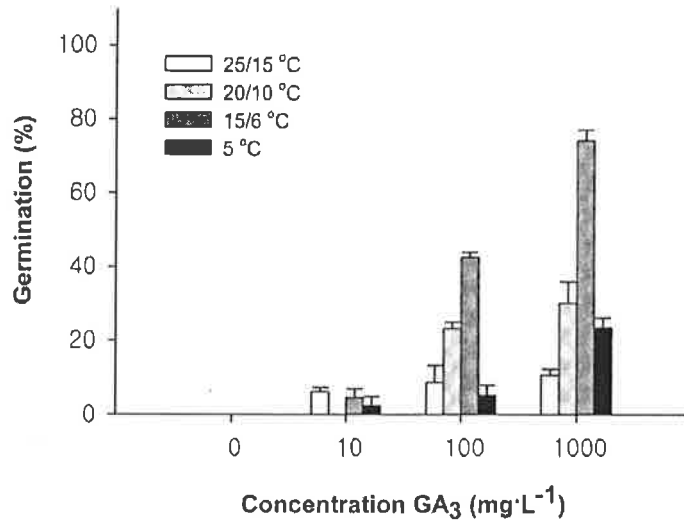


그림. 3-1-9. GA<sub>3</sub>와 온도조합에 따른 깻깻이풀의 종자 발아율.

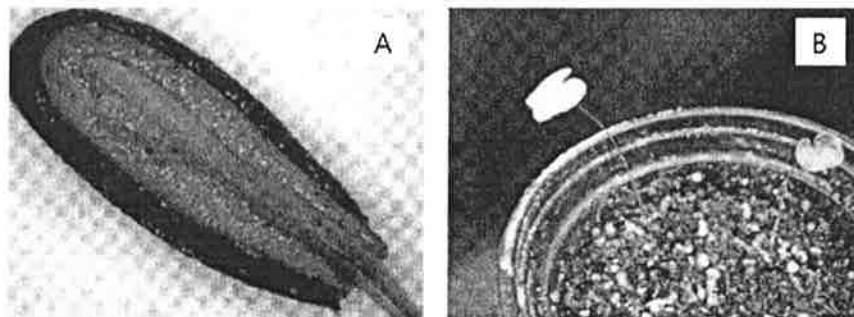


그림. 3-1-10. 지베렐린과 온도의 조합에 의해 정상 발아된 모습.

## 바. 2차 휴면을 타파하기 위한 조건 구명 실험

### (1) 연구목적

배가 다 자란 종자도 일정기간의 저온을 받아야 발아를 할 수 있음을 앞의 실험을 통해 알게 되었는데 저온의 효과가 호르몬으로 대체 할 수 있는지 알아보고 또한 2차 휴면을 유지하는 호르몬이 무엇인지 알아보고자 다음의 실험을 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

2010년 5월 28일에 '물향기 수목원'에서 종자를 채종하였다. 2010년 11월 2일까지 자연상태에 있던 종자를 가져와 종자를 잘라 배가 다 자란 상태인 것을 확인하였다. 이 종자를 다음의

호르몬에 처리하여 20/10℃에서 발아율을 조사하였다. 호르몬 처리는 GA<sub>3</sub> 0, 10, 100, 1000 ppm, GA<sub>3</sub> 1000ppm + fluridone100ppm, Fluridone100 ppm으로 총 6가지의 실험 처리와 수세 처리(leaching)를 함께 하였다. 수세처리는 종자에 발아 억제 물질이 있는 경우 증류수로 씻어 내어 발아가 될 때 억제물질의 존재를 반증하는 것으로 실험처리는 증류수에서 2주일 동안 수세시켰다. 물은 2일 간격으로 새롭게 갈아주었다. 또한 동일한 시기의 종자에 GA합성을 억제하는 Paclobutrazol와 ABA를 흡수시키고 저온 12주를 처리한 종자의 발아율을 조사하였다.

### (3) 결과 및 고찰

2차 휴면에 들어간 종자는 저온을 받지 않은 상태에서 전혀 발아를 하지 않았으며(GA 0ppm), GA의 농도가 높아질수록 발아율이 증가하여 1000ppm에서 70%까지 발아율이 올라가게 되었다(최종 발아율은 처리 이후 10주가 지났을 때의 발아율을 나타낸다). fluridone은 ABA생합성을 억제하는 물질이다. fluridone 100ppm을 처리했을 때 종자는 발아가 100%까지 올라갔다(그림 3-1-11). 그리고 종자 발아한 종자도 정상적이었다(그림 3-1-12). 이는 2차 휴면에 있어 ABA가 중요한 역할을 하여 휴면을 유지하는 것을 나타내며 fluridone이 ABA생합성 억제제이기 때문에 종자휴면은 ABA가 계속 생성되는 ABA에 의한 것임을 나타내며 처리 이전에 축적되어 있는 ABA는 그렇게 큰 영향을 미치지 않았음을 알 수 있다. GA와 fluridone의 혼합 처리구에서도 발아율은 80%이상을 나타냈다. fluridone 단용처리보다 발아율이 낮은 이유는 GA의 처리시 고농도이기 때문에 배가 피해를 받아 물러졌기 때문이라고 추정된다.

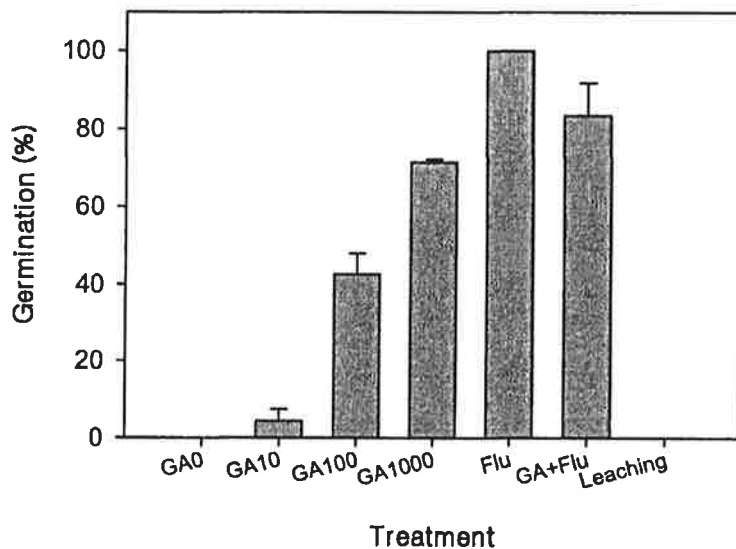


그림 3-1-11. 호르몬을 통한 2차휴면 타파



그림 3-1-12. Fluridone 100ppm에서 발아한 종자

저온을 12주 동안 받은 종자는 발아율이 70% 이상 되었으나 GA합성을 억제하는 paclobutrazol과 ABA를 흡수시키고 저온 12주를 처리한 종자의 경우 발아율이 각각 7, 50% 정도 밖에 되지 않았다(그림 3-1-13). 이는 저온 처리를 통해 휴면 타파가 되는 것은 GA의 합성과 밀접한 영향이 있음을 나타내며 또한 ABA의 양도 발아를 억제하는데 역할을 하는 것을 나타낸다. 최근 연구에 따르면 종자의 휴면을 유지하거나 타파하는 것은 GA/ABA의 상대적인 비율이 중요하게 작용한다는 것이 밝혀졌으며 이와 같은 이유로 GA/ABA의 비율에서 분자 영역을 증가시키는 GA의 생합성 효소의 증가, ABA의 분해 촉진 및 ABA의 합성 효소의 저해가 종자의 발아를 유도하는 것으로 나타내며 분모를 증가시키는 것으로는 GA생합성의 저해, ABA합성 효소의 증가 등이 발아를 억제하고 휴면을 유지시키는 것으로 나타낸다. 이런 이론은 깻쟁이풀의 실험 결과와 일맥상통함을 나타낸다.

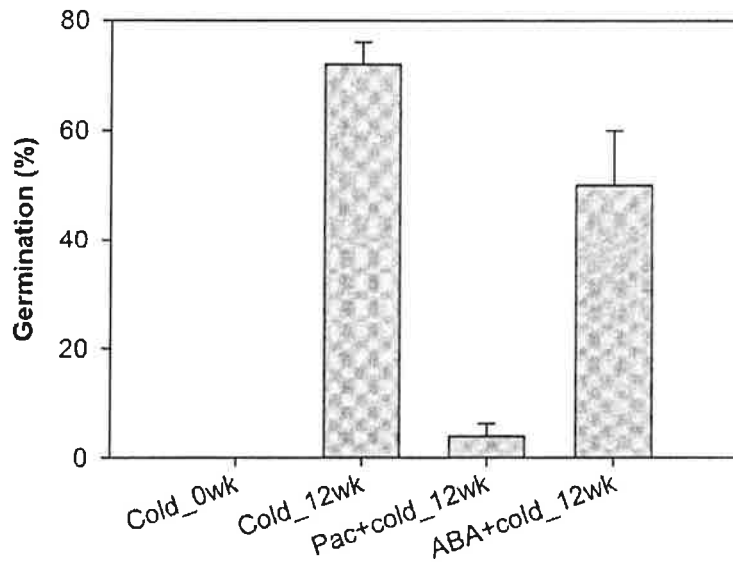


그림 3-1-13. 저온 휴면타파시 호르몬의 영향

## 사. ABA생합성 저해제를 이용한 종자발아

### (1) 연구목적

깻깻이플 종자의 휴면타파를 위해서는 GA 생합성 뿐 아니라 ABA의 분해도 중요하다는 것을 알 수 있다. 따라서 ABA생합성 억제제인 fluridone을 처리했을 때 종자 휴면을 바로 타파시킬 수 있는지 알아보려고 실험을 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

2010년 채종한 종자를 사용하였고 실험처리는 GA<sub>3</sub> 1000ppm, GA<sub>3</sub> 1000ppm + fluridone 10ppm, GA<sub>3</sub> 1000ppm + fluridone 100ppm, GA<sub>3</sub> 1000ppm + fluridone 500ppm, Fluridone 10ppm, Fluridone 100ppm, Fluridone 500ppm으로 총 7가지였다. 처리 이후 20/10℃에서 발아율을 조사하였다.

### (3) 결과 및 고찰

GA<sub>3</sub> 1000ppm처리에서는 처리 후 9주가 지났을 때 20%가까이 발아를 하게 되고 더 이상 발아율이 올라가지 않았다(그림 3-1-14). GA처리와 함께 fluridone을 처리한 GA<sub>3</sub> 1000ppm + fluridone 10ppm은 발아율이 40%까지 상승했다 그러나 fluridone의 농도를 높힌 GA<sub>3</sub> 1000ppm + fluridone 100ppm에서는 발아율이 10%로 떨어졌고 GA<sub>3</sub> 1000ppm + fluridone 500ppm은 아예 발아가 되지 않았다. 반면 fluridone만을 단독처리한 실험구에서는 fluridone 10ppm에서는 75%까지, fluridone 100ppm에서는 84%까지 올라가게 되었다. Fluridone 500ppm에서는 고농도 처리이기 때문인지 발아가 되지 않았다. 이런 결과를 통해 ABA가 종자의 휴면을 유지하는데 중요한 역할을 한다는 것을 알았으며 ABA생합성 억제제인 fluridone을 통하여 종자의 휴면을 조기에 타파시킬 수 있음을 알 수 있었다.

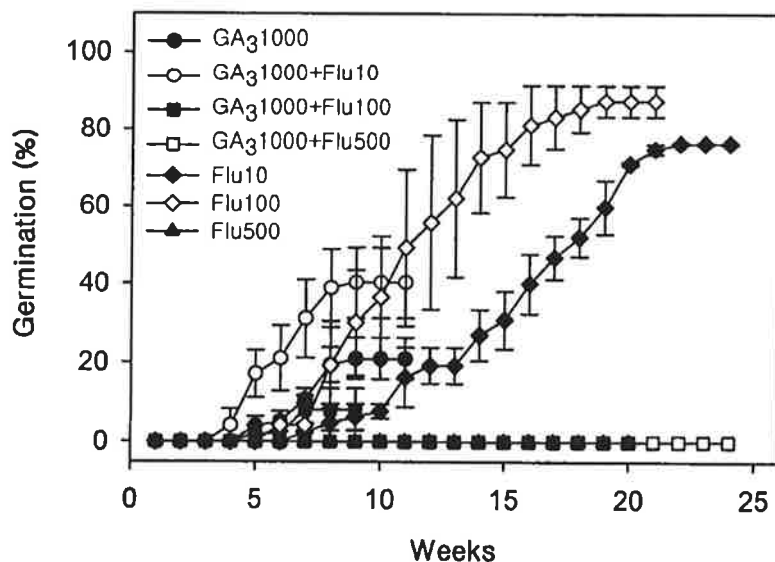


그림 3-1-14. 여러 호르몬 처리에 따른 종자 발아율.

## 아. 세포벽 가수분해 효소와 껍껍이풀 종자의 휴면관계

### (1) 연구목적

껍껍이풀을 종자가 성숙된 이후에 여름의 고온을 겪어 1차적으로 생리적 휴면이 타파되며 종자내에 배가 생육을 시작하며 겨울철 저온을 겪으며 유근 부위에 2차적인 생리적휴면이 타파되어 발아를 하는 특성을 가지고 있으며 GA처리를 통해 휴면이 쉽게 깨지지 않는 특징을 가지고 있으며 이러한 휴면을 가진 종자를 deep simple MPD형태의 휴면을 가지고 있다고 할 수 있다. 껍껍이풀과 같은 휴면을 가진 종자들이 많은데 대표적으로는 인삼, 삼지구엽초, 물푸레나무, 주목 종자가 대표적이라고 할 수 있다. 따라서 껍껍이풀의 성공적인 휴면타파법은 다른 종류의 종자의 휴면타파법으로도 응용 가능한 것이라고 할 수 있다. 휴면의 타파 기간동안 종자 내에서 일어나는 enzyme의 변화 양상에 대해 알아보고 직접적인 종자 발아와 어떠한 연관이 있는지 구명하는 것에 목적을 두고 있다.

### (2) 재료 및 방법

실험재료로 사용된 껍껍이풀 종자는 2012년 5월 한택식물원에서 채종하였다. 채종된 이후 일주일 이내에 서울 관악구에 소재한 서울대학교내의 정원에 모래와 종자를 1:1의 비율로 섞어 지표에서 5cm아래에 심었다. 종자가 발아하는 2013년 3월까지 매달 종자를 굴취하여  $\beta$ -mannanase activity와  $\beta$ -mannanase tissue printing을 수행하였다.

$\beta$ -mannanase activity와  $\beta$ -mannanase tissue printing을 측정하기 위해서는 gel을 만들어야하는데 gel을 만들고 activity를 측정하는 방법은 다음과 같다.

|   |
|---|
| <p>- 1일 (gel 준비)</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1) 수조 60°C setting</li><li>2) pH 0.5의 Buffer (0.1M citric acid + 0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)에 Locust bean gum (0.05% w/v)을 녹인 후 60°C에서 2시간 녹임</li><li>3) 상온에서 12시간 cooling함</li></ol>  |
| <p>- 2일 (gel만들고 접종)</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1) 원심분리(11,000g, 15min, 5°C)함</li><li>2) 분리된 상층액에 Phytigel(0.8% w/v)을 녹임 (전자레인지 이용)</li><li>3) 20mL를 petri dish에 넣고 1시간 이상 식힘<br/>(Tissue printing의 사용될 gel은 5mL를 petri dish에 넣음)</li><li>4) 5mL의 pipette으로 gel을 빨아드려 구멍을 만들<br/>(Tissue printing은 종자를 반으로 자르고 자른면이 gel에 닿게 하고 1h 상온 배양함)</li><li>5) 구멍에 시료를 각각 10 mL넣음 (standard인 0.00697nkat, 0.697nkat도 함께 측정함)</li><li>6) 파라필름으로 두른 이후에 40°C의 chamber에서 16시간(암조건) 배양함</li></ol> |
| <p>- 3일 (염색)</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1) 0.2 M의 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH9.0)를 넣고 30분 gently shaking하고 액을 따라 버림</li><li>2) 염색액(0.2 M의 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>에 Congo Red dye (0.5% w/v)와 NaN<sub>3</sub>(0.05%w/v)를 녹임)을 넣고 15분 동안 gently shaking하고 액을 따라 버림</li><li>3) 96%의 에탄올을 넣고 10분간 shaking하고 액을 따라 버림</li></ol>  |

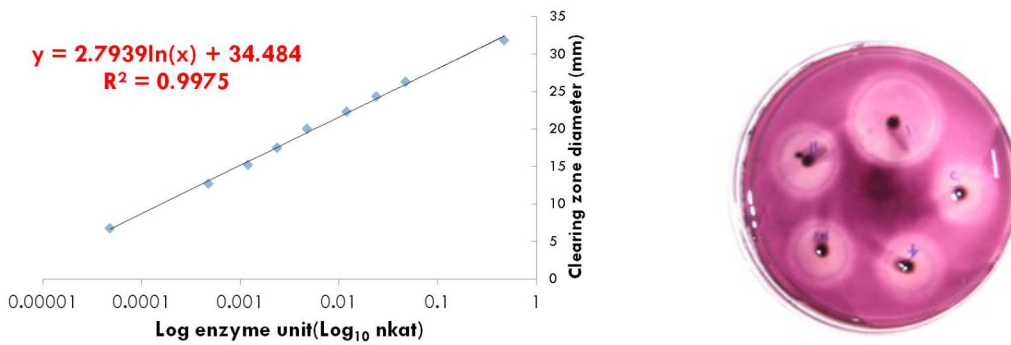


- 4) 1M NaCl을 넣고 투명하게 보일 때까지 shaking함
- 5) 지름을 2방향으로 재고 평균을 냄

### (3) 결과 및 고찰

#### (가) $\beta$ -mannanase activity 측정

먼저  $\beta$ -mannanase activity를 측정하기 위해서는  $\beta$ -mannanase activity standard곡선을 그려야하므로 실험 전에 실험을 수행하였다. 이미 enzyme activity를 알고 있는 시료를 사용하여 측정해 보았는데 아래의 그래프에 나타나듯 R2값이 0.9975로 고도로 유의한 수준의 식을 구할 수 있었으며 오른쪽의 plate안의 circle이 각 enzyme activity에 따른 활성도가 원의 크기로 나타난 것을 보여준다.



아래의 그림은 자연 시기에 따른 종자내부의 배의 성장 상태를 보여주는 사진이다. 채종한 이후 6-8월에서 배가 거의 자라지 않고 있다가 점차 기온이 낮아지는 가을 시기인 9-10월에 배가 급속하게 성장한다. 배가 성장한 이후에 배의 생장은 다시 정지되어 겨울(12월)을 지내게 되고 이듬해 봄인 3월에 종자의 유근이 배유 및 종피를 뚫고 비로써 발아를 하게 된다.

#### *Jeffersonia dubia*



1달 간격으로  $\beta$ -mannanase activity를 측정하였는데 배가 거의 자라지 않았던 6-9월에서의 activity는 낮은 수준으로 유지 되었다가 배가 자라는 10월에 급속하게 activity가 증가하였으며 배가 다시 자라지 않는 12월에서 activity가 다시 낮아지는 양상을 보여주었다(그림 3-1-15). 이후에 발아 직전에 다시 activity가 증가하였고 발아가 이루어졌다.

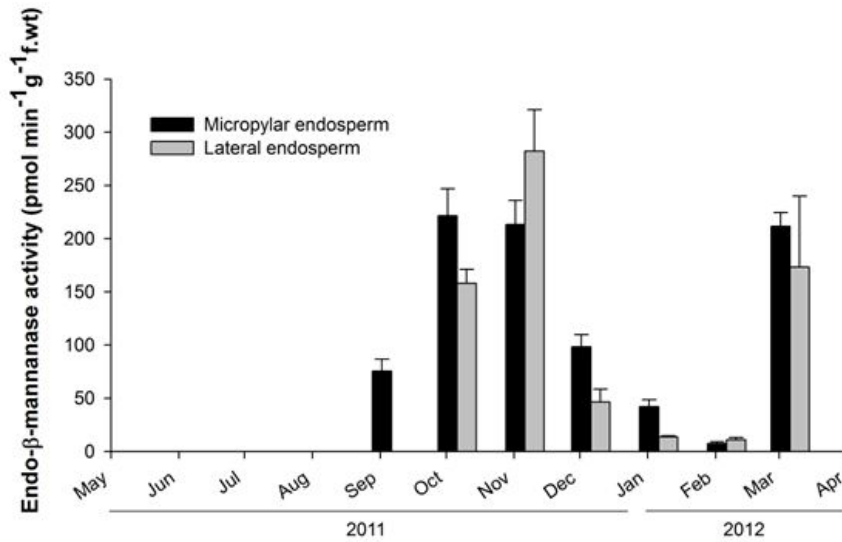


그림 3-1-15. 자연 상태에서 시기에 따른 갯쟁이풀의  $\beta$ -mannanase activity

(나)  $\beta$ -mannanase tissue printing

$\beta$ -mannanase tissue printing은  $\beta$ -mannanase activity가 일어나는 부위를 시각적으로 알 수 있게 하는 실험으로 종자내의 배가 자랄 때에  $\beta$ -mannanase activity가 1차 휴면이 타파되었을 때에는 배가 자라는 방향으로 그리고 2차 휴면이 타파되었을 때에는 그 반대 방향인 유근 쪽에 활성이 많아 질것이라는 가설 하에 실험을 수행하였다. 측정 결과 1차 휴면이 타파되고 배가 자랄 때에 길이 성장하는 방향으로 activity가 커지는 보이는 것을 확인할 수 있었다(그림 3-1-16). 배가 자 자란 12, 1월에 되어서는 activity가 확연히 줄어들은 것을 확인할 수 있다. 겨울 저온을 거치고 발아가 되기 직전인 2월이 되어서는 다시 activity가 생기게 되는 것을 확인할 수 있었다.

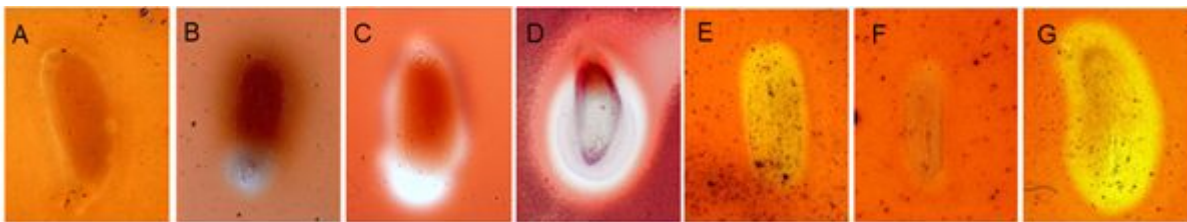


그림 3-1-16. 자연 상태에서 시기에 따른 갯쟁이풀의  $\beta$ -mannanase tissue printing한 모습. 6월(A), 9월(B), 10월(C), 11월(D), 12월(E), 1월(F), 2월(G).

자. 갯쟁이풀의 발아 적정 온도 실험

(1) 연구목적

2차 휴면을 다 깬 종자가 발아하기 위해서 가장 적절한 온도가 무엇인지 알아보기 위해 실험을 진행하였다.

(2) 재료 및 방법

2010년 채종 종자를 사용하였으며, 2010년 5월 28일에 채종 직후 다시 노지에 파종을 하였다가 껍질이 썩은 휴면이 완전히 깨진 2011년 1월 25일에 자연상태에 있던 종자를 가져와 실험에 사용하였다. 이때 종자는 배가 다 자란 상태였다. 또한 겨울동안 저온을 충분히 받은 상태로 휴면이 완전히 타파된 상태의 종자이다.

온도가 조절되는 4개의 실험구 25/15°C, 20/10°C, 15/6°C, 5°C에서 발아 양상을 확인하였다. 발아는 매일 측정하였다.

### (3) 결과 및 고찰

25/15°C, 20/10°C에서 비슷한 시기에 발아하기 시작했으며 15/6°C에서는 그보다 늦게 8일째부터 발아하기 시작했다(그림 3-1-17). 최종 발아율은 3가지 온도 처리구 모두 50% 이상으로 비슷하였다. 5°C에서는 13일가 지나도 발아를 하지 않았다.

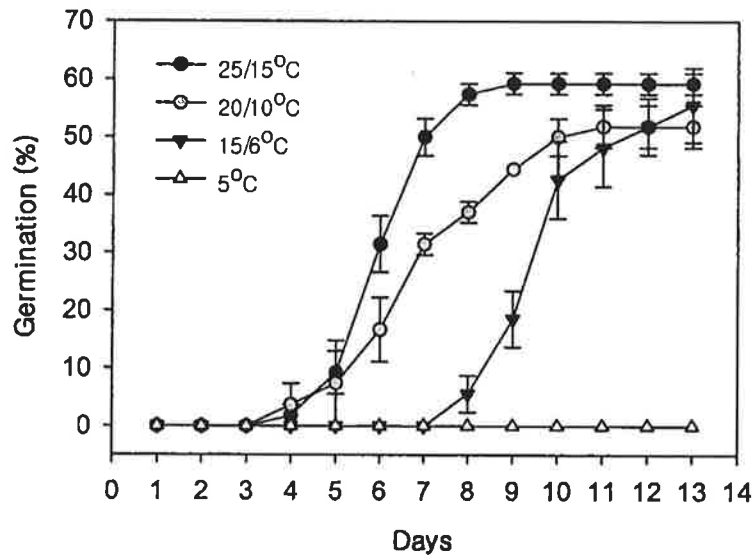


그림 3-1-17. 온도에 따른 발아율

## 2. 깻깻이풀의 고품질 분화 재배 기술

### 가. 깻깻이풀의 적정 차광율

#### (1) 연구목적

깻깻이풀은 이른 봄인 4월에 개화하며 이후에 엽이 전개되어 휴면에 들어가는 늦가을까지 생육을 한다. 활엽수림에서 자생하는 깻깻이풀의 경우 매우 낮은 광도에서 광합성을 하고 음지에 적응이 되어 있다고 할 수 있다. 깻깻이풀이 개화할 수 있는 개화주로 성장하기 까지 적어도 3년 이상의 긴 생육 기간이 필요하다. 이는 깻깻이풀을 원예화하는데 기간과 비용면에서 불리한 요인으로 작용한다. 재배 기간을 단축하기 위해서는 깻깻이풀이 최대한 광합성을 하여 이듬해에 개화 할 수 있는 눈(bud)을 많이 확보하게 하는 재배 기술이 필요하다. 하지만 음지에 적응이 되어있는 깻깻이풀이 고광도 스트레스로 인해 피해를 입을 수 있는바 비교적 고광도에서도 광합성과 관련되어 스트레스를 받지 않으면서도 최대로 광합성을 할 수 있는 적정 차광율을 구명하는 것이 필요하여 다음의 실험을 수행하였다.

#### (2) 재료 및 방법

식물 재료로는 2-3매가 전개된 1년생 깻깻이풀을 사용하였으며 묘는 한국자생식물원(강원도 평창)에서 구입하였다. 실험은 2009년 5월 1일에서 2009년 8월 21일까지 진행하였다.

차광처리는 수원에 소재한 실험 농장내 비닐온실에서 수행하였으며, 무차광, 차광막 50%, 75%, 95%를(총 4가지 처리) 사용하여 차광 처리를 하였다. 온실밖에 광도를 기준하여 실제 차광율은 각각 30%, 65%, 82%, 96%가 되었다. 이렇게 실제 차광율에서 차이가 있는 것은 온실 구조에 의해 일부 빛이 산란되거나 차광이 되었기 때문이라고 여겨진다.



그림 3-2-1. 온실내에서 차광 실험 모습

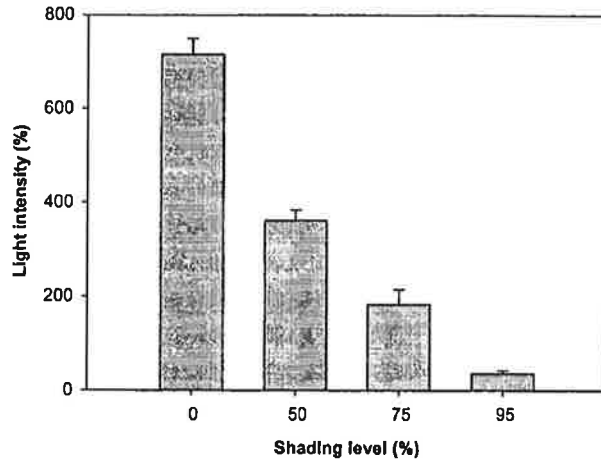


그림 3-2-3. 차광막을 사용시 실제 차광율

### (3) 결과 및 고찰

실험 종료 후 초장, 엽폭, 엽길이, 엽수, 건물중, 지상부대 지하부 건물중비(Shoot:root ratio)를 측정하였다. 엽폭, 엽길이에서는 차광간의 차이가 보이지 않았으며 초장에서 차광율이 95%였을 때 약간 길어졌으나 통계적인 유의성은 없었다(표 3-2-1). 엽수에서는 0, 50%의 차광 처리에서 5-6개로 많았으며 건물중에서도 차광율이 낮은 0, 50%가 가장 좋았다. shoot:root ratio는 차광율이 높을수록 수치가 컸는데 이는 갹갹이풀이 낮은 광도에서 지하부 생육보다는 지상부 생육을 치중했음을 나타낸다.

차광별 갹갹이풀의 생육 사진을 보았을 때 0, 50%의 차광율에서 지상부와 지하부 생육이 모두 좋아 보인다(그림 3-2-4). 하지만 0%차광 처리의 경우 고풍으로 인한 잎의 일소 현상이 보이기도 하였으며(그림 3-2-5), 가장 먼저 휴면으로 들어갔기 때문에 갹갹이풀의 재배에 있어 차광 재배가 반드시 필요하다.

표 3-2-1. 차광에 따른 갹갹이풀의 초장, 엽폭, 엽길이, 엽수, 건물중, 지상부:지하부 건물중비.

| Shading (%)  | Plant height (cm)  | Leaf length (cm) | Leaf width (cm) | No. of leaves | Dry weight (g) |         | Shoot:root ratio |
|--------------|--------------------|------------------|-----------------|---------------|----------------|---------|------------------|
|              |                    |                  |                 |               | Shoot          | Root    |                  |
| 0            | 7.6 b <sup>2</sup> | 1.7 a            | 3.4 a           | 5.5 b         | 0.219 ab       | 0.521 a | 0.42             |
| 50           | 7.7 b              | 1.8 a            | 3.5 a           | 5.6 b         | 0.288 a        | 0.664 a | 0.43             |
| 75           | 9.1 a              | 1.9 a            | 3.4 a           | 3.8 a         | 0.240 a        | 0.309 b | 0.78             |
| 95           | 9.9 a              | 2.0 a            | 3.8 a           | 3.6 a         | 0.154 b        | 0.158 b | 0.97             |
| Significance | ****               | ns               | ns              | ***           | *              | ***     |                  |

<sup>2</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $P = 0.05$ .

<sup>1</sup>ns, \*, \*\*\*Non-significant or significantly different at  $P = 0.05$  or  $0.001$ , respectively.

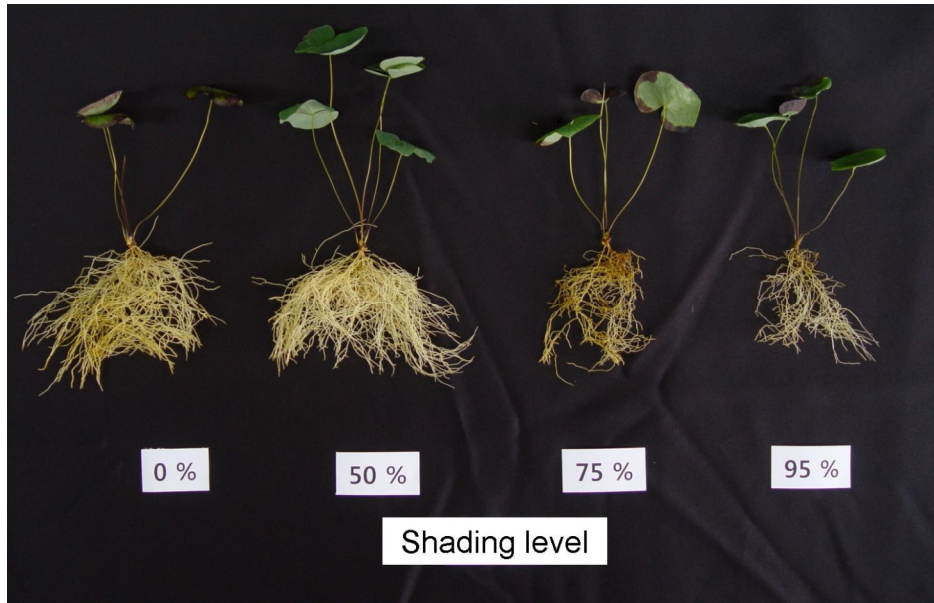


그림 3-2-4. 차광에 따른 갯쟁이풀의 생육 비교 사진



그림 3-2-5. 무차광하에서 보이는 잎의 일소현상 사진

광합성 측정기인 LI-6400을 이용하여 광합성 커브를 구했다. 차광율이 높을수록 즉, 조사 받는 광도가 작을수록 최대 광합성율이 높아지는데 반해 차광율이 작을수록 최대 광합성율이 작았다(그림 3-2-6). 이는 갯쟁이풀이 자생지에서 저광도에 적응이 되어있는 형질을 가지고 있기 때문에 조사받는 광도가 높을수록 갯쟁이풀 잎 내의 광합성 기구에 저해를 주었던 것으로 여겨진다. 하지만 표 3-2-1과 사진의 결과와 같이 차광율이 낮았던 0, 50%에서 갯쟁이풀의 생육이 좋았던 것은 이 광합성율 만으로는 해석하기 불충분하며 각각의 차광 상태에서 갯쟁이풀의 광합성 효율을 조사해야한다. 차광처리에 따른 일중 광도의 변화추이를 보면(그림 3-2-7(A)), 차광율이 높은 75, 95%에서는 갯쟁이풀이 실제로 받는 광도가 낮아서 광도가 가장 높은 정오가 되어야 광도가 광포화점에 이르는 것을 알 수 있다. 차광율이 낮은 0, 50%의 경우 오전부터 조사되는 광도가 광포화점을 넘으면서 광합성의 최대치를 계속 유지했던 것으로 보인다. 따라서 차광율을 높여서 재배 할 때 식물체의 최대 광합성율은 높아지지만 차광막을 투과하여 광합성에 사용되는 광량 자체가 낮아 실제 생육이 저조함을 알 수 있다.

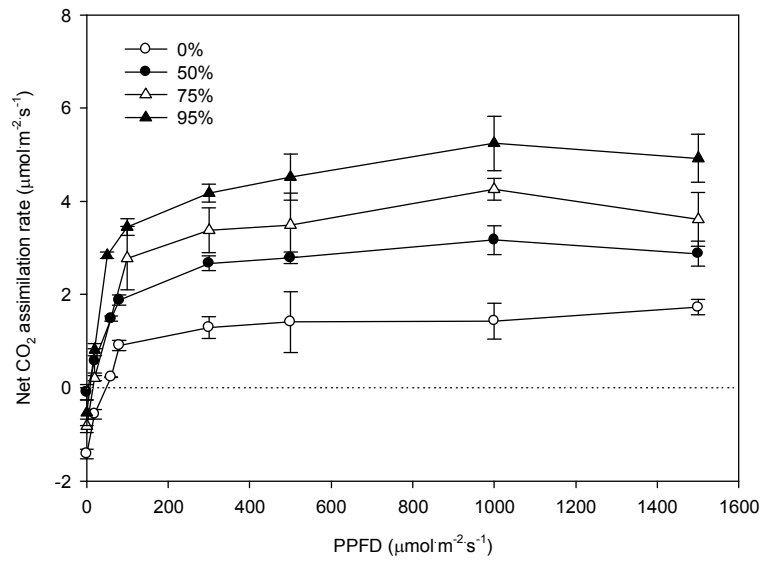


그림 3-2-6. 광합성율 그래프

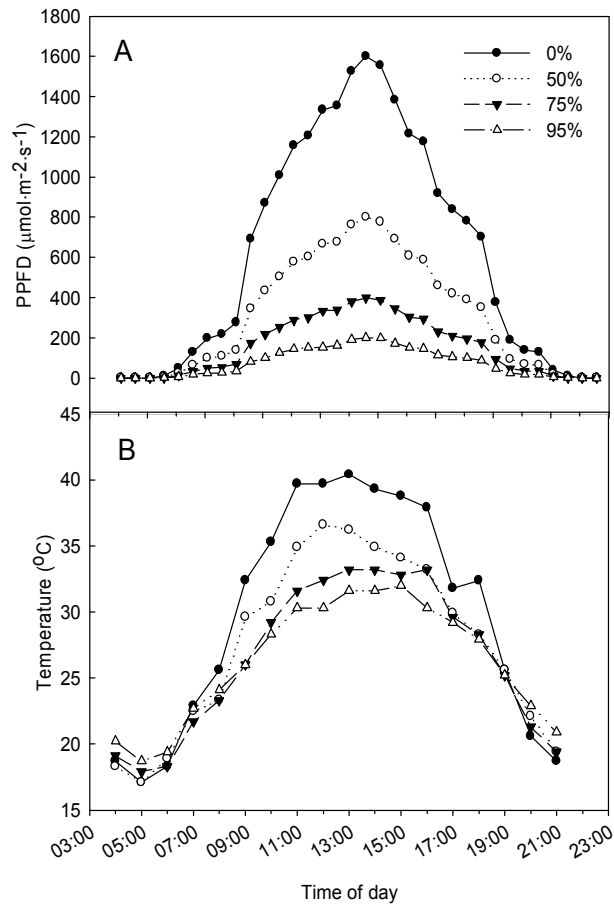


그림 3-2-7. 일별 온실 내 광도(A), 기온 변화(B).

실험 중간인 5월과 6월에 껌이풀의 엽록소 형광값을 각각 측정하였다(그림 3-2-8). 5월의 0, 50, 75, 95% 차광하에서 엽록소 형광값이 큰 차이가 없어 보이나 6월에 지나면서 0%의 엽록소 형광값이 0.7 이하로 급격히 줄어드는 것을 알 수 있는데 이는 고광도로 인한 광합성 전자 전달계의 일부(광계II)가 손상되었음을 나타낸다(Long et al., 1994). 고온은 식물의 생육에 있어 스트레스로 작용하는데 일중 기온 변화 추이를 보면 0% 차광시 기온이 40℃ 가까이 올라갔으며 차광율이 높아질 수록 기온이 떨어지는 것을 알 수 있다(그림 3-2-7(B)). 50%의 차광은 비교적 고광도이지만 엽록소 형광값이 크게 떨어지지 않는 것으로 보아 껌이풀이 어느 정도 고광도에 적응하였음을 나타낸다고 할 수 있다.

이와 같은 실험의 결과를 통해 50%정도 차광하에서 껌이풀을 재배했을 때 고광도로 인한 피해를 최소화 하면서 광합성을 최대로 할 수 있을 것이라고 여겨진다.

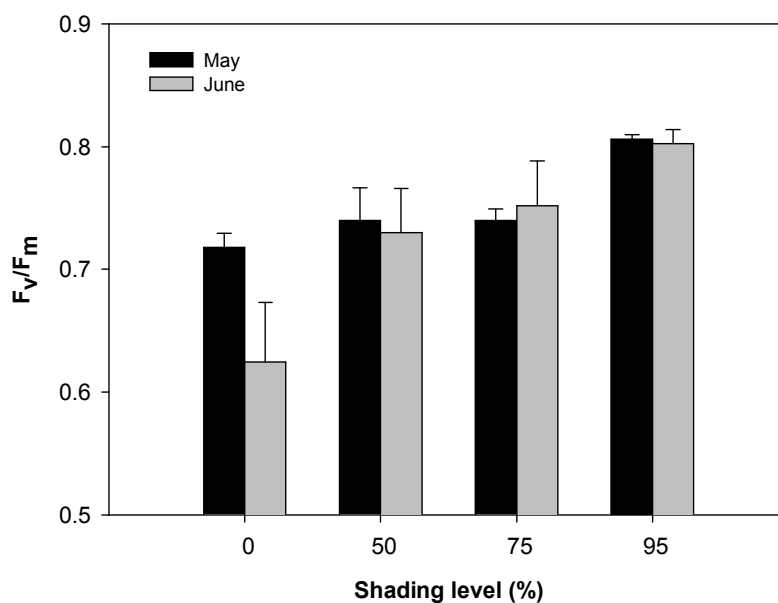


그림 3-2-8. 5, 6월의 껌이풀의 엽록소 형광 측정 결과

## 나. 적정 양액 농도 구명

### (1) 연구목적

껌이풀을 상품성 있는 개화주로 생육시키기 위해서는 발아 후 3-4년의 긴 영양생장 기간을 필요로 한다. 껌이풀의 생육 속도가 느리며 1년 내에서 3-4개월의 긴 휴면기를 가지기 때문이다. 껌이풀의 원예화를 위해서는 시설내에서 생육 속도를 빠르게 하는 것이 필요하며 적정 양액 시비 방법을 구명한다면 껌이풀의 생육기를 단축시키며 고품질의 분화를 생산하는데 중요한 자료가 될 것이다.

### (2) 재료 및 방법

실험재료는 껌이풀 1년생과 2년생을 사용하였다. 1년생은 2011년 5월에 채종된 종자를 토양에 묻어 두었다가 2012년 3월에 발아한 것을 사용한 것이며, 2년생은 2011년에 발아한 개체들로 3, 4년째 해에 개



화를 할 수 있는 개화주이다. 토양은 100% 피트모스와 모래를 4:1로 섞어 사용하였으며 1년생은 10cm pot에 2012년 4월 25일에 2년생은 15cm pot에 2012년 4월 27일에 각각 정식 하였다.

분화용 양액으로 널리 쓰이고 있는 Sonneveld 분화용 양액을 사용하였다. 양액의 농도를 달리하여 실험하였는데 기준 Sonneveld 양액의 배액을  $\times 0$ ,  $\times 0.5$ ,  $\times 1.0$ ,  $\times 2.0$ 로 조성하였다. 원수라고 할 수 있는  $\times 0$ 은 pH가 7.4이며 EC가 0.16mS/cm였다.  $\times 0.5$ 배액은 pH가 6.4이며 EC가 0.95mS/cm였다.  $\times 1.0$ 배액은 pH는 6.1이고 EC가 1.74mS/cm였다.  $\times 2.0$ 배액은 pH가 5.8이며 EC는 2.51mS/cm이었다. 양액은 식물체에 매일 저면관수 하였으며 조성된 배액은 2주에 한번씩 다시 만들어 갱신하였다.

※ Sonneveld 분화용 양액 조성표

○ **Macroelements**

|                                       |             | <b>NO<sub>3</sub></b> | <b>NH<sub>4</sub></b> | <b>P</b>    | <b>K</b>    | <b>Ca</b>   | <b>Mg</b>   | <b>S</b>    |
|---------------------------------------|-------------|-----------------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>mmol/L</b>                         |             | <b>10.60</b>          | <b>1.10</b>           | <b>1.50</b> | <b>5.50</b> | <b>3.00</b> | <b>0.75</b> | <b>1.00</b> |
| <b>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b> | <b>3.00</b> | 6.00                  |                       |             |             | 3.00        |             |             |
| <b>KNO<sub>3</sub></b>                | <b>3.50</b> | 3.50                  |                       | 3.50        |             |             |             |             |
| <b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>   | <b>1.10</b> | 1.10                  | 1.10                  |             |             |             |             |             |
| <b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>   | <b>1.50</b> |                       |                       | 1.50        | 1.50        |             |             |             |
| <b>MgSO<sub>4</sub></b>               | <b>0.75</b> |                       |                       |             |             | 0.75        |             | 0.75        |
| <b>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>    | <b>0.25</b> |                       |                       | 0.50        |             |             |             | 0.25        |

| <b>Chemical</b>                       | <b>mmol/L</b> | <b>M.W.</b>  | <b>mg/L</b>    | <b>Chemical</b>                                       | <b>M.W.</b>  | <b>mg/L</b>  |
|---------------------------------------|---------------|--------------|----------------|---|--------------|--------------|
| <b>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b> | <b>3.00</b>   | <b>164.1</b> | <b>492.300</b> | <b>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O</b> | <b>236.1</b> | <b>708.3</b> |
| <b>KNO<sub>3</sub></b>                | <b>3.50</b>   | <b>101.1</b> | <b>353.850</b> |   |              |              |
| <b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>   | <b>1.10</b>   | <b>80.1</b>  | <b>88.110</b>  |   |              |              |
| <b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>   | <b>1.50</b>   | <b>136.1</b> | <b>204.150</b> |   |              |              |
| <b>MgSO<sub>4</sub></b>               | <b>0.75</b>   | <b>246.5</b> | <b>184.875</b> |   |              |              |
| <b>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>    | <b>0.25</b>   | <b>174.3</b> | <b>43.575</b>  |   |              |              |

○ **Microelements**

|                 |                | <b>Fe</b>               | <b>Mn</b>               | <b>Zn</b>                          | <b>B</b>                | <b>Cu</b>                            | <b>Mo</b>  |
|-----------------|----------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|------------|
| <b>μmol/L</b>   |                | <b>20</b>               | <b>10</b>               | <b>3</b>                           | <b>20</b>               | <b>0.5</b>                           | <b>0.5</b> |
| <b>Chemical</b> | <b>Fe-EDTA</b> | <b>MnSO<sub>4</sub></b> | <b>ZnSO<sub>4</sub></b> | <b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b> | <b>CuSO<sub>4</sub></b> | <b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub></b> |            |
|                 |                | <b>·4H<sub>2</sub>O</b> | <b>·7H<sub>2</sub>O</b> |                                    | <b>·5H<sub>2</sub>O</b> | <b>·2H<sub>2</sub>O</b>              |            |
| <b>M.W.</b>     | <b>382.1</b>   | <b>233.1</b>            | <b>287.6</b>            | <b>61.8</b>                        | <b>249.7</b>            | <b>242.0</b>                         |            |
| <b>μg/L</b>     | <b>7642</b>    | <b>2331</b>             | <b>862.8</b>            | <b>1236</b>                        | <b>124.85</b>           | <b>121</b>                           |            |

식물체의 영양 생장을 알 수 있는 초장, 엽수, 꽃수를 측정하고 휴면에 들어갈 때 생체중과 건물중을 측정하였다. 그리고 이듬해 개화수와 개화율을 조사하였다.

### (3) 결과 및 고찰

1년생의 경우 2012년 7월 6일에 식물체가 휴면에 들어가기 시작하여 생육조사를 실시하였다. 3개월 동안 각각의 양액으로 영양생장을 한 결과를 생체중과 건물중으로 비교해 보았을 때  $\times 0.5$ 가 가장 좋았다(그림 3-2-9, 3-2-11A). 양액의 농도가 높을 경우 특히  $\times 2.0$ 배액에서는 1년생 갯쟁이풀의 생육이 더 좋지 않았다.  $\times 0.5$ 과 비교하였을 때 전체 생체, 건물중은  $\times 2.0$ 은 50% 밖에 되지 않았다.

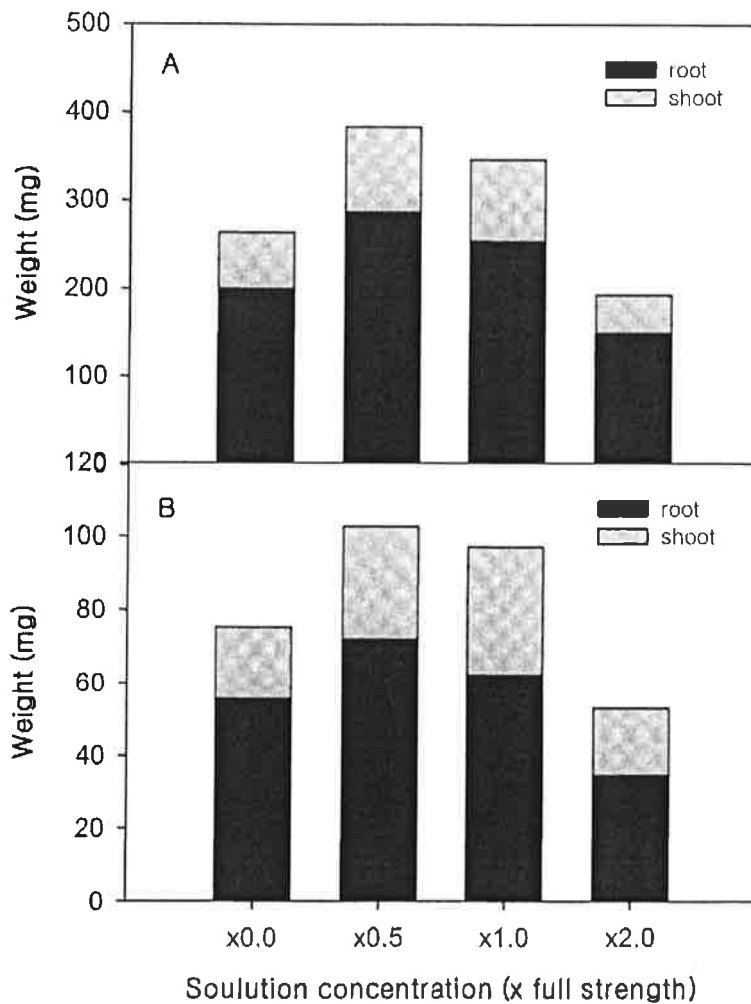


그림 3-2-9. 다양한 양액 조성에 따른 1년생 갯쟁이풀의 생육 양상. 생체중(A), 건물중(B).

3년생의 경우 2012년 7월20일에 휴면에 들어가기 시작하여 생육조사 하였다. 양액배율에 따라 식물의 영양생장은 크게 달랐다. 대체로 양액의 배율이 높아질수록 껭껭이풀의 생육이 좋았는데 가장 높은 처리구인 x2.0에서는 생육이 좋지 않았다(그림 3-2-10, 3-2-11B). x1.0에서 가장 생육이 좋았는데 x0.0에 비해 건물중의 경우 200% 이상 생육이 좋았다. 이는 똑같은 기간 동안 생장을 시켰을 때 양액을 통해 2배의 생육이 진진된 것을 나타내며 양액관리가 껭껭이풀의 개화주를 만들기 위한 긴 소요시간을 단축시킬 수 있다는 가능성을 나타낸다.

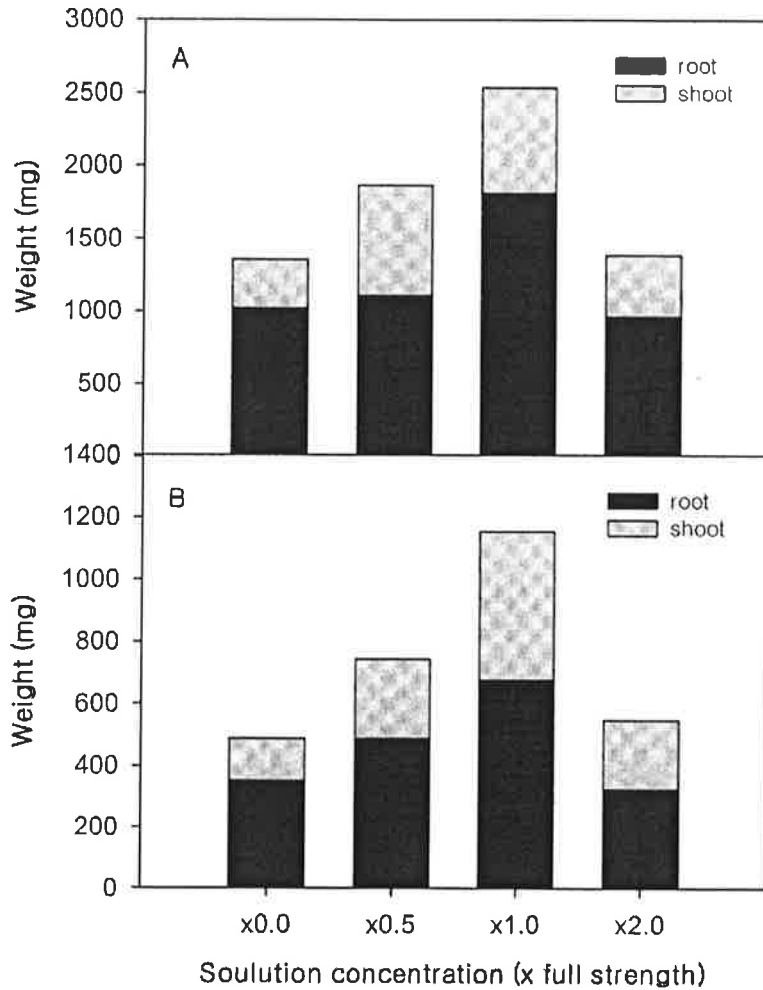


그림 3-2-10. 다양한 양액 조성에 따른 3년생 껭껭이풀의 생육 양상. 생체중(A), 건물중(B).

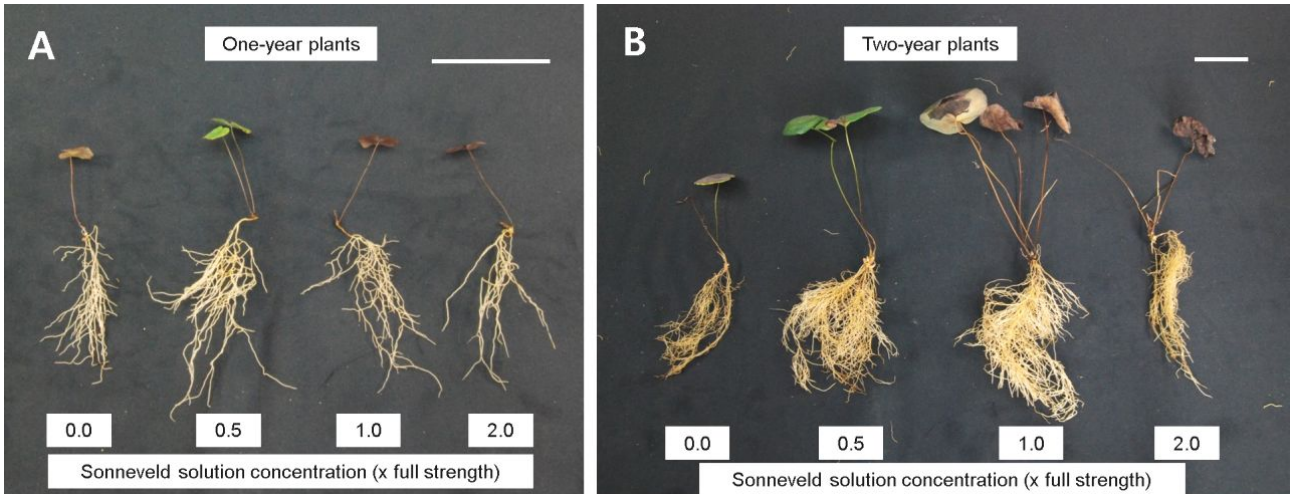


그림 3-2-11. 다양한 양액 농도에 따른 1년생(A), 2년생(B) 콩깻이풀의 생육 사진.

#### 다. 콩깻이풀의 휴면 유기 온도 구명

##### (1) 연구목적

콩깻이풀의 개화를 위한 생육기간(3년 이상)을 줄이기 위해서는 휴면에 속한 기간은 가능한 줄이고 영양생장을 지속하게 하거나 또는 휴면을 회피하는 것이 재배 기간을 줄이는 방법이 될 것이다. 휴면을 회피하거나 지연시키기 위해서는 콩깻이풀의 휴면을 유도하는 환경 요인이 무엇인지를 아는 것이 중요하다. 이러한 사실을 구명하고 콩깻이풀의 휴면 회피가 가능한지를 알아보기 위해 실험을 수행하였다.

##### (2) 재료 및 방법

식물 재료로는 개화이후 잎이 모두 전개된 3년생 콩깻이풀을 사용하였으며, 한국자생식물원(강원도 평창)에서 구입하였다. 실험은 2009년 5월 15일에서 2009년 8월 20일까지 진행하였다.

실험처리는 온도가 조절되는 성장상에서 수행하였다. 온도처리는 32/27℃(주/야), 27/22℃, 22/17℃, 17/12℃의 온도로 하였고 온도의 주기는 주간 12시간, 야간 12시간 설정하였다. 성장상내에서 주간 12시간 동안 광도를  $150 \pm 20 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 로 유지하였다.

##### (3) 결과 및 고찰

모든 온도 처리구에서 식물체가 휴면에 들어갔다. 하지만 휴면에 들어가는 시기는 온도 처리에 따라 다르게 나타났다. 휴면이 들어가는 시기의 기준은 식물체의 모든 잎이 황색으로 변하고 지상부가 고사하는 시기로 정하였다. 휴면이 들어가는 시기는 32/27℃에서 처리 후 90일로 가장 빨랐으며 17/12℃도 비슷한 시기인 처리 시작 후 96일에 휴면에 들어갔다(그림 3-2-12). 반면에 22/17℃에서는 135일에 휴면에 가장 늦게 들어갔다. 따라서 온도를 통하여 휴면을 완전히 회피할 수는 없지만 22/17℃에서 재배하는 것이 식물체가 휴면이 들어가는 것을 최대한 늦춰 최대의 생육을 시키는데 유리함을 알 수 있다.

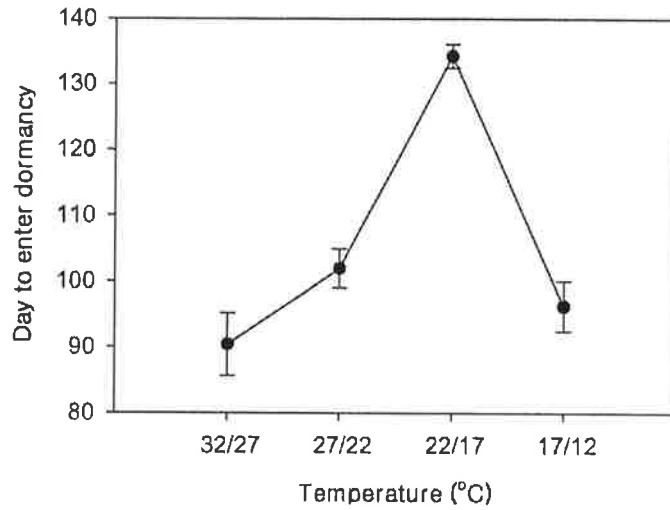


그림 3-2-12. 온도에 따른 갯쟁이풀의 휴면에 들어가는 소요일수

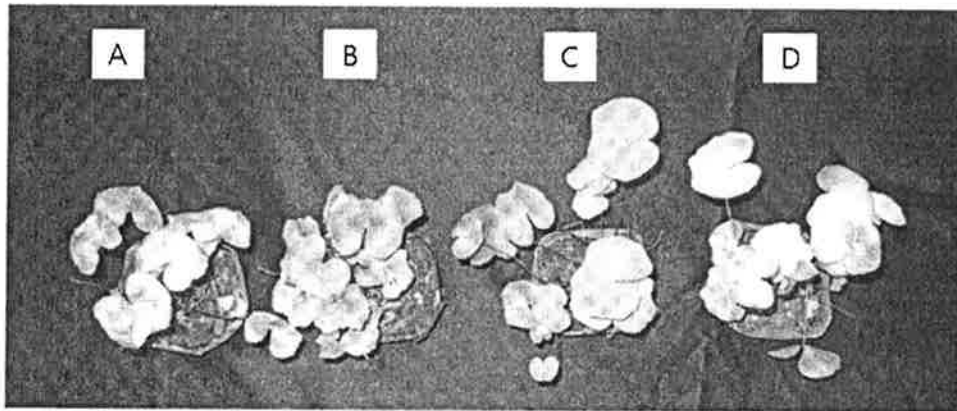


그림 3-2-13. 온도에 따른 갯쟁이풀의 지상부 상태 사진 (처리 후 90일 경과), 32/27°C(A), 27/22°C(B), 22/17°C(C), 17/12°C(D)

앞의 온도 처리구에서 정상적인 휴면이 유도되어 휴면타파가 되는지 알아보는 실험을 별도로 진행하였다. 앞의 실험이 종료되고 모든 개체가 휴면에 들어간 이후에 모든 식물체를 5°C 저온챔버에서 8주간 저장하여 휴면타파를 시켰다. 이후 항온 15°C로 유지가 되는 생육상에 옮겨 생육을 지켜보았다. 17/12°C와 22/17°C의 처리구에서 휴면이 들어간 개체들은 80%의 식물체에서 잎 또는 꽃이 전개되었다(표 3-2-2). 하지만 32/27°C에서 휴면이 들어간 개체에서는 0%, 27/22°C에서는 20% 밖에 생육이 진행되지 않았다. 더군다나 27/22°C에서 출현한 개체들도 생육이 불량하였다. 이 결과를 통해 고온에서 빨리 지상부가 고사되는 것은 정상적으로 휴면에 들어갔던 것이 아니라 고온에 의한 스트레스로 잎이 고사한 것으로 판단된다. 갯쟁이풀의 휴면 요인은 온도 중에서 상대적으로 낮은 기온이며 고온은 갯쟁이풀의 고사를 일으키는 요인으로 판단된다.

표 3-2-2. 휴면 이후 저온처리를 통해 출현율.

|                                       |              |       |       |       |
|---------------------------------------|--------------|-------|-------|-------|
| Dormancy induction temperature (°C)   | 32/27        | 27/22 | 22/17 | 17/12 |
| Chilling treatment                    | 5°C, 8 weeks |       |       |       |
| Sprouting after chilling treatment(%) | 0            | 20    | 80    | 80    |

## 라. 껌이풀의 휴면 유기 일장 구명

### (1) 연구목적

껌이풀의 개화를 위한 생육기간을 줄이기 위해서는 휴면에 속한 기간은 가능한 줄이고 영양생장을 지속하게 하여 개화기까지 전체 재배 기간을 줄이는 방법이 필요하다. 상대적인 낮은 기온이 껌이풀의 휴면을 유기하는 원인이 됨을 앞의 실험을 통하여 알 수 있었다. 일장 조절을 통하여 휴면이 들어가는 것을 지연시킬 수 있는지 알아보기 위해 다음의 실험을 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

식물 재료는 개화이후 잎이 모두 전개된 3년생 껌이풀로 한국자생식물원(강원도 평창)에서 구입하였다. 묘는 2009년 5월에 구입하였으며 구입한 이후엔 수원의 비닐 온실에서 재배하다가 2009년 7월 4일 온도와 일장이 조절되는 생육상에 옮겨 모든 개체가 휴면에 들어간 2009년 9월 15일까지 실험을 진행하였다.

광원은 형광등을 사용하였으며 광도는  $150 \pm 20 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 로 정도였다. 일장처리는 2가지로 단일처리 8시간과 장일처리 16시간으로 하였다. DLI(daily light integrals)는 단일처리가  $4.3 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ 이었으며 장일처리는  $8.6 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$  이었다. 생육상내의 기온은 항상  $15^\circ\text{C}$ 로 유지하였다.

### (3) 결과 및 고찰

장, 단일에서 모든 개체가 휴면에 들어갔으나 휴면에 들어가는 속도에서 차이가 있었다. 장일보다는 상대적으로 단일조건에서 13일 정도 빨리 휴면에 들어갔다(그림 3-2-14, 3-2-15). 모든 개체가 휴면에 들어간 이후에  $5^\circ\text{C}$  저온챔버에서 각각 8주간 휴면타파를 하였고 이후에 항상  $15^\circ\text{C}$ 로 유지가 되는 생육상에서 생육을 보았는데 8, 16시간 처리구 모두에서 80% 이상의 bud bursting을 보여 모든 일장 조건에서 정상적으로 휴면에 들어갔음을 알 수 있었다. 이러한 사실을 미루어 보아 껌이풀은 단일 조건에서 휴면이 촉진됨을 알 수 있고 앞의 온도 실험과 연관하여서 껌이풀의 휴면을 유기하는 요인은 저온, 단일로써 늦가을의 환경 상태임을 알 수 있다. 그리고 껌이풀의 휴면을 연장하기 위해서 장일 처리가 약간의 효과가 있었음을 알 수 있다.

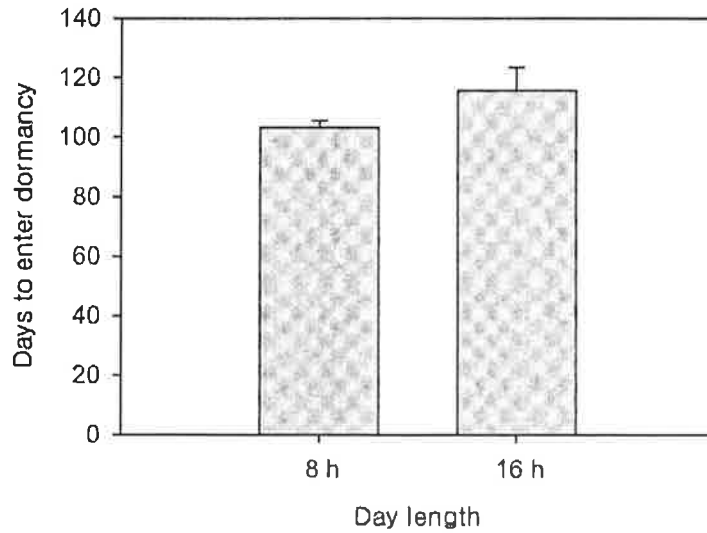


그림 3-2-14. 일장에 따른 껌이풀의 휴면에 들어가는 소요일수

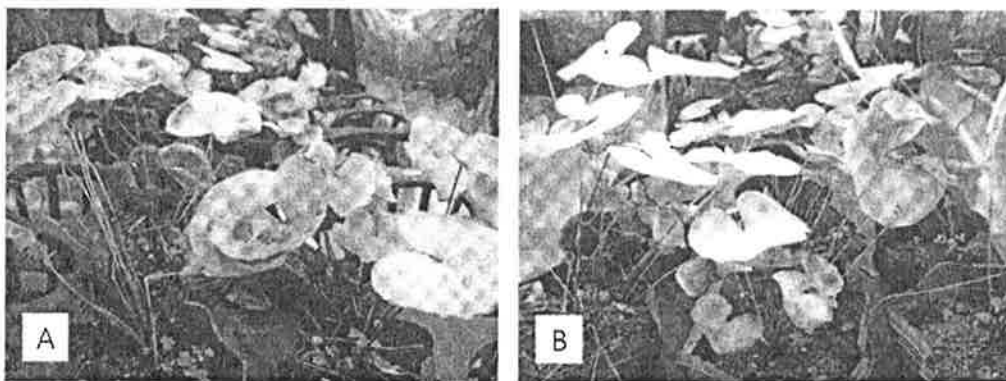


그림 3-2-15 일장처리에 따라 휴면에 들어가는 모습(처리 후 100일). 장일처리(A) 단일처리(B)

#### 마. 껌이풀의 생육 적정 온도 구명

##### (1) 연구목적

껌이풀은 자연 상태에서 봄인 4월에 개화를 하고 가을에 접어들어 휴면에 들어가는 생활사를 가지고 있다. 껌이풀을 축성 재배와 억제 재배를 통해 봄 외의 다른 계절에서도 생육을 시킬 수 있는데, 생육에 필요한 최저 기온이나 생육에 가장 최적화 된 기온을 아는 것은 껌이풀을 재배하는데 있어 필요한 자료가 될 것이다. 아직 다양한 기온 조건에서 껌이풀의 생육에 대한 연구가 이루어진바가 없어 다음의 실험을 수행하였다.

##### (2) 재료 및 방법

식물 재료는 아직 bud bursting이 되지 않은 3년생 껌이풀로 물향기수목원에서 구입하였

다. 실험기간은 2009년 4월 1일에서부터 2009년 6월 10일까지 온도와 광이 조절되는 생육상에서 수행하였다. 실험처리는 4가지 처리로 29/23℃(주/야), 22/16℃, 15/9℃, 8/2℃로 하였다.

### (3) 결과 및 고찰

8/2℃를 제외하고 29/23℃, 22/16℃, 15/9℃처리구에서 정식 후 10-20일 사이 비슷한 시기에 개엽(leaves unfolding)하는 것을 알 수 있었고 기온이 높을수록 성장 속도가 빠름을 알 수 있었다(그림 3-2-16). 8/2℃에서는 정식 후 60일이 되어야 잎이 전개 되었으며 생장이 느림을 알 수 있다(그림 3-2-17). 콩깻이풀의 정상적인 생육을 위해서는 15/9℃이상의 기온이 필요함을 알 수 있다.

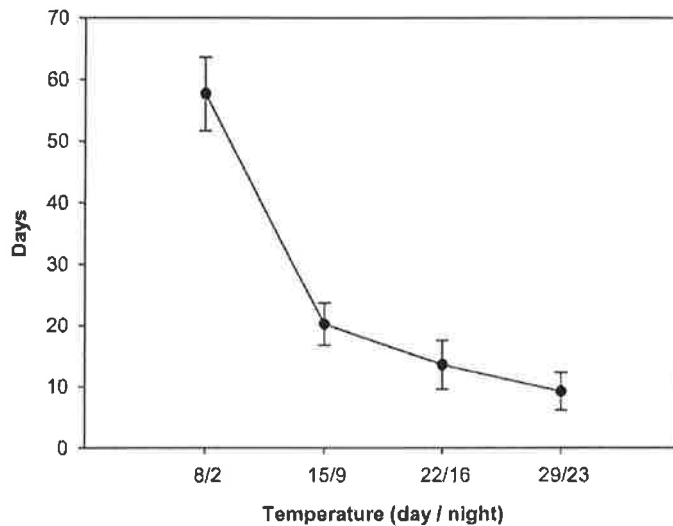


그림 3-2-16. 온도에 따른 콩깻이풀의 개엽(leaves unfolding) 소요일수

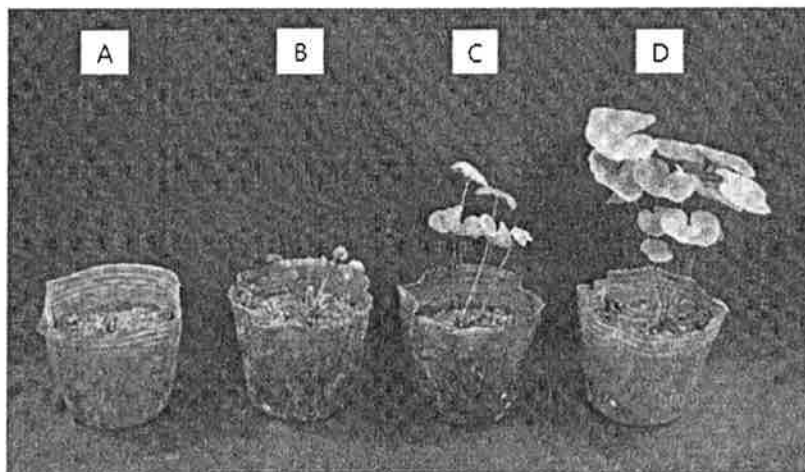


그림 3-2-17. 온도처리에 따른 생육 비교 사진(처리 후 20일). 8/2℃(A), 15/9℃(B), 22/16℃(C), 29/23℃(D).



## 바. GA<sub>3</sub>, GA<sub>4+7</sub>를 이용한 식물체 휴면 타파 및 개화 유도

### (1) 연구목적

호르몬을 이용한 껭껭이풀 식물체 휴면 타파 연구를 수행 하였다. 저온처리도 또 다른 휴면 타파 방법인데 온도처리에 비해 호르몬 처리는 더 짧은 시간에 휴면을 타파시킬 수 있는 것과 온도처리를 위한 기타 시설(저온창고)을 필요로 하지 않는다는 장점이 있다. 하지만 호르몬을 사용 할 때 대상 작물에 따라 기형꽃이 생기거나 웃자라는 등 단점들도 보고되고 있어 사용할 때 주의가 필요하다. 껭껭이풀의 식물체 휴면타파에 호르몬이 적용 가능한지 알아보기 위해 실험을 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

휴면에 들어가고 자연 상태에서 아직 저온을 받지 않은 껭껭이풀 개화주 식물체(3년생)를 사용하였다(그림 3-2-18A). 눈의 분화 상태를 알기위해 눈을 채취하고 면도칼로 잘라 Toluidine blue로 염색하여 관찰하였는데 이미 꽃눈이 분화된 상태였다(그림 3-2-18B). 실험은 2010년 10월 1일에 시작하였다. 식물체는 배지(Sunshine mix#1)가 담긴 10cm pot에 식재하였다. 관수는 배지에 심지를 꽂아 실험기간 내에 식물체에 수분을 충분하게 공급하였다.



그림 3-2-18. 3년생 뿌리모습(A), 실험 처리 전 눈의 분화 상태(B.)

생육조건은 주야간 온도가 17/13℃로 조절이 되는 생장상안에서 진행하였다. 형광등으로 주간 12시간 동안 빛을 조사하였으며 광도는  $200 \pm 50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  정도였다.

호르몬처리는 GA<sub>3</sub>, 10, 100, 1000ppm 그리고 GA<sub>4+7</sub> 10, 100, 1000ppm 그리고 증류수(control)를 식물체에 각각 50mL 관주하였다. 각 처리당 식물체수는 9개이다. 관주한 이후 신초 출현율, 출현 소요일수, 첫 개화소요일수를 측정하였고 개화 시 초장과 개화수를 측정하였다.

### (3) 결과 및 고찰

control에서는 실험이 끝날 때까지 맹아가 되지 않았다. 하지만 GA<sub>3</sub>, GA<sub>4+7</sub>처리에서는 모든 처리구에서 휴면타파가 되어 잎, 꽃 등이 출현됐다. GA<sub>3</sub>에서는 10, 100, 1000ppm 처리시 각각 78, 89, 100%의 높은 출현율을 보였으며 출현 소요 일수는 각 농도별로 처리후 20, 25 18 일이었다(그림 3-2-19). 이때 통계적인 유의차는 없는 것으로 보아 모든 처리 농도에서 휴면타

과는 잘 이루어졌음을 알 수 있으나 출현율을 보았을 때 GA<sub>3</sub> 1000ppm이 가장 좋았음을 알 수 있다. 출현한 엽수는 GA<sub>3</sub> 1000ppm에서 평균 16.6개로 가장 많았으며 초장도 22cm로 가장 길었다(표 3-2-3).

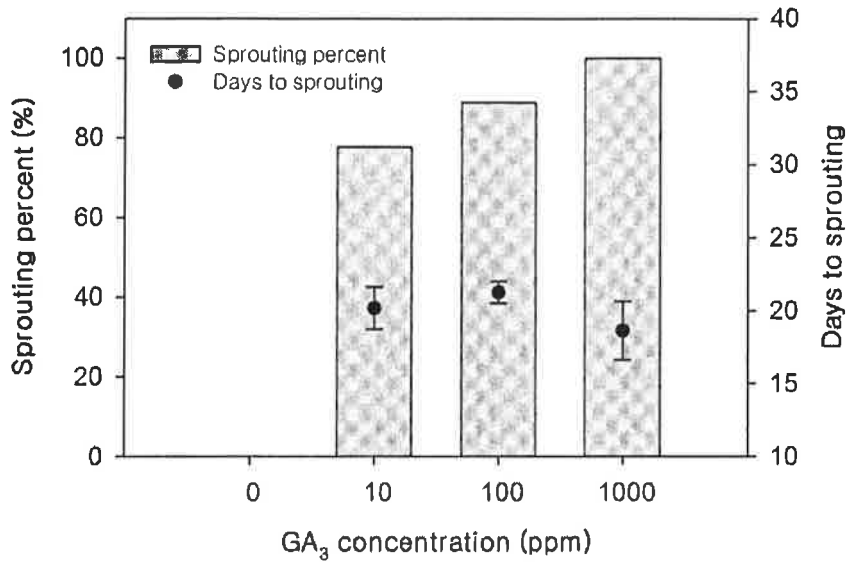


그림. 3-2-19. GA<sub>3</sub> 농도에 따른 갯쟁이풀의 휴면타파율과 싹초 출현 소요일수

표. 3-2-3. 호르몬 처리가 갯쟁이풀의 휴면타파 이후 싹초수와 초장에 미치는 영향.

| GA treatments      | Concentration | No. of shoots      | Plant height |
|--------------------|---------------|--------------------|--------------|
| Control            | 0             | ~ <sup>z</sup>     | -            |
| GA <sub>3</sub>    | 10            | 2.3 c <sup>y</sup> | 8.6 c        |
|                    | 100           | 10.0 b             | 15.1 b       |
|                    | 1000          | 16.6 a             | 22.5 a       |
| GA <sub>4+7</sub>  | 10            | 4.0 b              | 5.5 b        |
|                    | 100           | 14.6 a             | 19.2 a       |
|                    | 1000          | 6.5 b              | 16.5 a       |
| Significance       |               |                    |              |
| GA                 |               | ns <sup>x</sup>    | ns           |
| Concentration      |               | ***                | ***          |
| GA × concentration |               | *                  | **           |

<sup>z</sup>All of the control plants failed to sprout until the end of the experiments.

<sup>y</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $P = 0.05$ .

<sup>x</sup>ns, \*, \*\* Nonsignificant or significant at  $P = 0.05, 0.01, \text{ or } 0.001$ , respectively.

한편 GA4+7에서는 10, 100, 1000ppm 처리시 각각 40, 100, 40%의 출현율을 보였는데 고농도인 1000ppm에서 오히려 출현율이 낮아진 것은 고농도 처리의 장애라고 여겨진다. 출현 소요일수는 각 농도별로 처리 후 26, 24, 46일로 고농도 1000ppm에서 출현속도가 가장 느렸다. GA4+7의 경우 출현율, 소요일수에서 가장 좋은 효과를 보인 100ppm처리가 가장 효과적이었다. 출현 염수에서는 GA4+7 100ppm에서 14.6개로 다른 10, 1000ppm처리보다 높았다. 식물초장은 지베렐린의 처리 농도가 높을수록 길어지는 경향이었는데 GA4+7 1000ppm에서 오히려 감소 하여기도 하였다.

위의 결과를 종합해 볼 때 GA3처리는 1000ppm 그리고 GA4+7 100ppm이 갯쟁이풀의 휴면타파와 신토 유도에 가장 적합한 농도임을 알 수 있다.

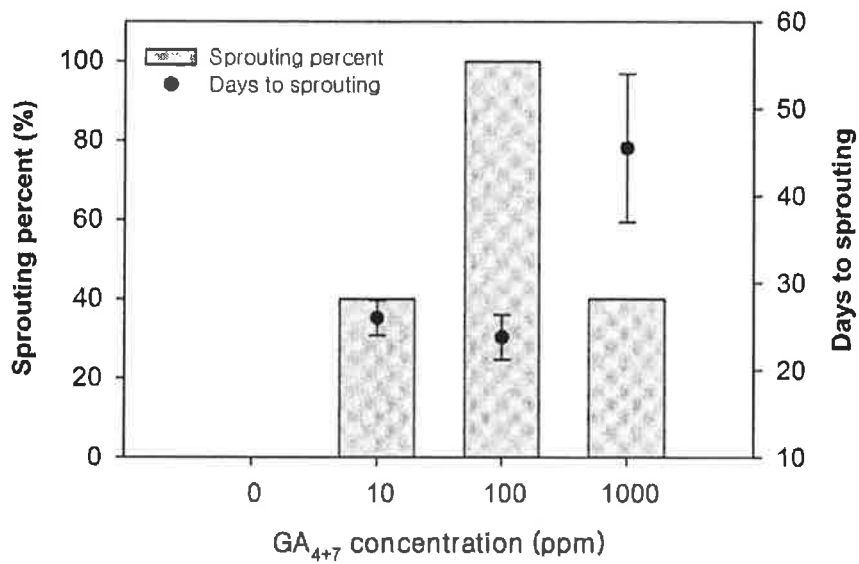


그림. 3-2-20. GA<sub>4+7</sub> 농도에 따른 갯쟁이풀의 휴면타파율과 신토 출현 소요일수

## 제 4 절 작약의 농가 실증 실험 및 모의 수출

### 1. 가을 재배 실증 실험

#### 가. 연구 목적

작약의 연중 생산 기술 중 가을재배는 아직 미국, 유럽 등지에서도 연구된 바 없고 처음으로 개발된 기술이기 때문에 농가 실증 실험이 필요하다. 충청북도 진천에 위치한 ‘월드플라워’와 연계하여 농가 실증 실험을 수행하였다.

#### 나. 수행 방법

서울대에서 양생 중이던 작약을 ‘태백’, ‘물수레’작약을 2012년 12월에 진천으로 이동시켰다. 진천에서는 이후 온실에서 작약을 생육 시키고 2013년 7월에 휴면에 들어간 작약을 10℃에서 2주간 예냉처리를 하였다. 예냉처리가 끝나고 작약을 0℃ 저온고로 옮겨 6주간 휴면 타파를 시킨다. 이후 작약을 노지로 옮겨 2013년 9-11월 동안 개화를 유도한다.

#### 다. 수행 결과

2013년 11월 가을 작약의 수확이 가능하였다. 더욱이 작약의 개화가 유도되는 9-11월은 바깥의 노지 기온이 작약의 생육에 매우 적합하여 절화 품질도 우수하였다. 온실에서 재배시 꽃대가 길지만 약한 단점이 있는데 이러한 문제를 가을 재배는 간단히 해결할 수 있었다.

수확된 작약의 일부를 국내 화훼시장에 판매하였는데 1송이에 4,000원, 1단(5송이)에 15,000원으로 판매할 수 있었으며, 이는 우리나라에서 5-6월에 수확된 노지 작약의 시세가 1단에 4,000원(1송이에 800원 가격)인 것에 비하여 10배 가까이 가격을 높게 받아 시장에서 반응이 매우 좋음을 알 수 있다.



그림. 4-1-1. 개화된 ‘태백’작약(A), ‘물수레’작약(B), 가을에 수확된 작약(C)

## 2. 1차 모의 수출

### 가. 연구목적

연중 생산이 가능하게 된 작약 기술을 바탕으로 해외(일본)에 모의 수출을 수행하였다. 아직 국내에서 해외로 작약을 수출을 한 사례를 찾아볼 수 없었기 때문에 본 모의 수출을 통하여 수출 과정시 생기는 애로사항을 점검하고 현지 바이어들의 반응을 살펴보고 앞으로 작약 수출 시 필요한 정보를 제공하고자 한다.

### 나. 수행 방법

수출을 위한 계획도는 다음과 같았다.

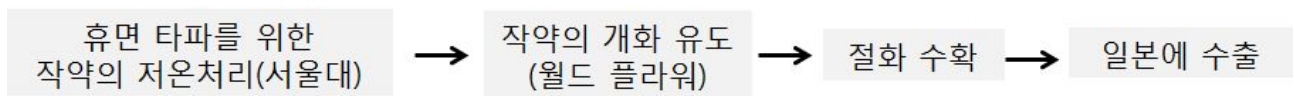


표. 4-2-1. 1차 모의 수출 계획도

식물재료는 서울대에서 양생 중이던 ‘태백’, ‘물수레’ 작약을 사용하였다(그림. 4-2-1A). 노지에서 상자재배하던 작약 100주(품종당 50주)를 2012년 11월 9일에 저온고로 옮겼다. 0℃, 6주간 저온처리를 하여 작약의 휴면을 타파시켰다. 이렇게 휴면타파시킨 작약을 2012년 12월 21일 충북 진천의 ‘월드플라워’로 이동시켰다(그림. 4-2-1B). 월드플라워에서는 작약을 온실에서 재배하여 개화를 유도하고 일본으로의 수출을 담당했다.



그림. 4-2-1. 서울대에서 양생중인 작약(2012년 8월)(A), 휴면 타파 후 진천으로 박스 이동 (2012년 12월 21일)(B)

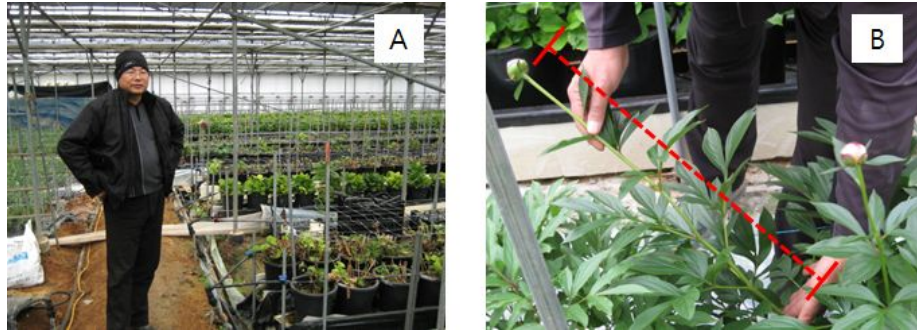


그림. 4-2-2. 진천에서 개화 유도가 된 온실(A), 절화 위치(B)

#### 다. 수행 결과

진천으로 옮겨간 작약은 성공적으로 개화가 유도 되었으며, 개화를 위한 절화장(50 cm이상)도 확보되었다(그림. 4-2-2B). 절화는 수확이 되는 데로 5℃의 저온고에 하였으며 수출은 2013년 4월 3일에 ‘나라원예’를 통하여 하였다. 항공을 이용하였으며 일본 나고야 지방에서 화훼 경매시장에 출품할 계획이었다. 하지만 일본 검역소에서 작약의 꽃 봉우리에 ‘꿀’이 있다는 이유로 전량 폐기되었다(그림. 4-2-3B). 꿀 속에 세균의 감염의 위험이 있을 수 있다는 검역소 직원의 설명이었다.

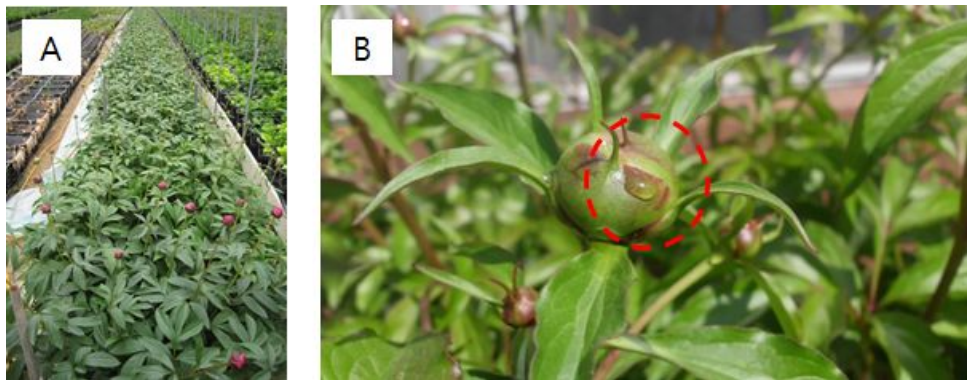


그림. 4-2-3. 절화 수확 시기가 된 작약의 모습(A), 꽃 봉우리에 있는 꿀(B)



그림. 4-2-4. 절화 후 정선 장면(A), 포장 된 작약(B)

작약의 꽃봉우리에 생기는 꿀은 화기 발달시 정상적으로 생기는 것으로, 검역시 문제가 된다는 사실을 이번 기회를 통해 처음으로 알게 되었다. 노지에서 재배하는 작약의 경우 비를 자연스럽게 맞고 꿀이 씻겨 내려가 절화시 꽃봉우리에 꿀이 남아있지 않다. 하지만 온실에서 축성재배를 하였을 때 작약은 비를 맞지 않고 꽃 봉우리의 꿀이 남아있는 것임을 알았다.

### 3. 2차 모의 수출

#### 가. 연구목적

1차 모의 수출에서 나타난 문제는 작약의 꿀이 생겨 세관에서 통과가 되지 않았다는 것이다. 따라서 작약의 절화 이후 꽃 봉우리를 물로 씻고 다시 일본에 수출하기 위해 2차 모의 수출을 계획하였다.

#### 나. 수행 방법

수출을 위한 계획도는 다음과 같았다.

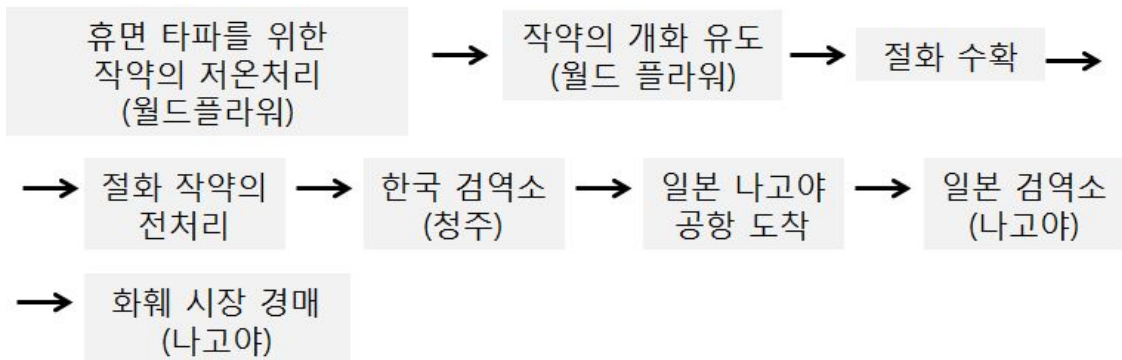


표. 4-3-1. 1차 모의 수출을 위한 계획도

1차 모의 수출과 달리 작약의 저온처리, 작약의 개화 유도 등 전 과정을 ‘월드플라워’에서 할 수 있도록 하였다. 작약은 자연저온처리방법을 이용하여 2014년 1월 노지에 있던 ‘물수레’작약을 온실에 입실하여 개화를 유도하였다. 꽃봉우리 상태로 수확된 작약은 물로 씻어서 일본에서 검역시 문제가 없도록 계획하였다.

#### 다. 수행 결과

개화는 2014년 3월 20일 전후에 이루어졌으며 개화 시기가 약간씩 다르기 때문에 절화 된 작약은 5℃의 저온고에서 보관하였다(그림. 4-3-1B). 수확된 작약의 꿀은 물통에 담긴 물로 씻어 제거하였다. 이 과정에서 꽃봉우리의 꿀 뿐 아니라 잎 뒷면에 있는 곰팡이도 제거 되도록 하였다. 수출업체는 일본 ‘미사토 플라워(미사토 코리아)’와 연계하여 수출을 진행하였다.

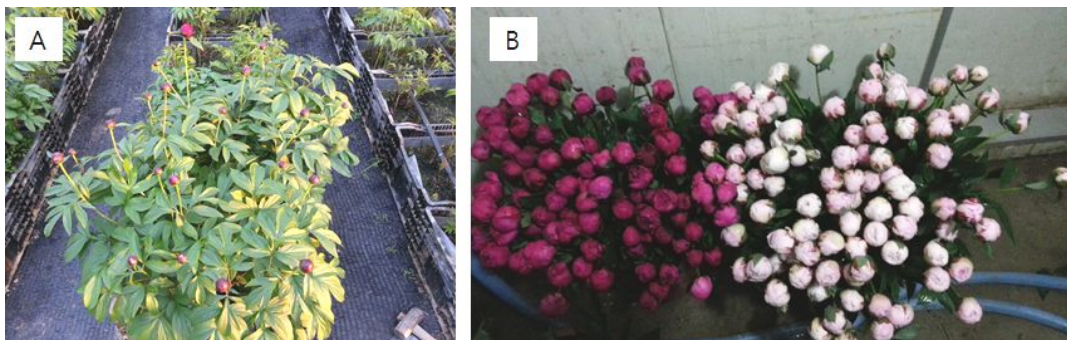


그림. 4-3-1. 온실에서 생육중인 작약(A), 수확 후 5℃ 저온고에 보관중인 모습(B)

2014년 4월 2일에 청주에 있는 국립식물검역소에서 검역 받았다(그림. 4-3-2C). 4월3일에 인천공항에서 나고야로 항공 이송하였으며, 공항에 있는 검역소에서 검역을 받았다(그림. 4-3-3). 꽃봉우리에 꿀이 없었기 때문에 문제없이 통과되었다. 이후 나고야에 있는 경매시장에 출품하고 50송이의 ‘물수레’ 작약에 대한 상장결과(검역증 포함)를 받았다.

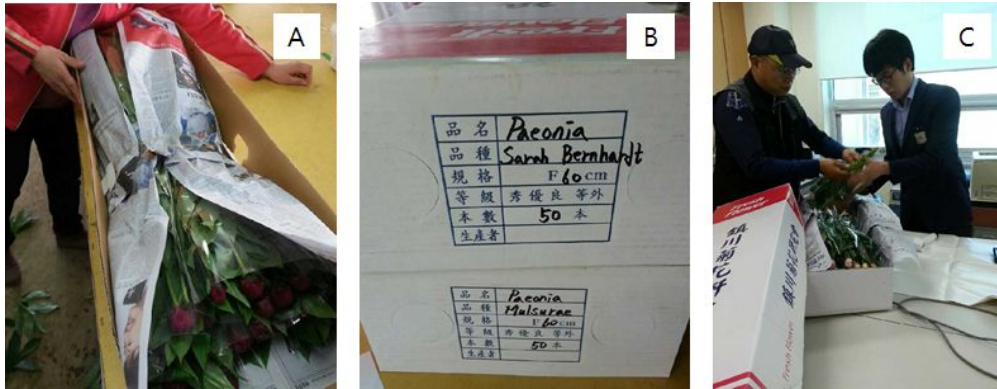


그림. 4-3-2. 절화 작약 포장(A), 1박스에 50송이 적재(B), 청주 검역소에서 검사(C)



그림. 4-3-3. 일본에 도착(A), 나고야 공항(B), 일본 검역소에서 검사(C)

이렇게 1차 모의 수출에서 발견된 검역 문제를 해결하고 모의 수출에 성공할 수 있었다. 그런데 작약의 경매시장 판매 결과는 예상보다 좋지 않았다. 1송이당 650원을 책정 받았는데, 이는 같은 시기 한국에서 1송이당 4,000-5,000원에 경매시장에 팔았다는 것과 비교해 볼 때 값을 매우 적게 받았다고 평가가 된다. 이렇게 시장 가격이 좋지 않았던 이유를 일본 바이어에게 들어보았을 때, 이 시기(4월)는 이미 일본에서 절화 작약이 유통이 되기 시작하는 시기라는 것이다. 실제 경매시장에 ‘물수레’작약과 비슷한 색깔의 작약이 유통되는 것을 확인하였고,(그림 4-3-4C) 꽃 봉우리도 상당히 많이 핀 상태였기 때문에 상대적으로 우리가 모의 수출한 작약의 경쟁력이 떨어졌다는 것이다.





그림. 4-3-4. 나고야 화훼 시장(A), 일본 상인(B), 일본에서 유통 중인 작약(C)

이러한 문제는 다음과 같은 방법으로 통해 해결할 수 있을 것이다.

1) 일본에서 작약이 생산되지 않는 시기에 전략적인 수출이 필요하다. 4월에 수확된 작약은 일본의 남부 지방에서 노지 재배된 것으로 이 시기보다 앞선 시기에 수출을 해야 한다. 연구팀에서 개발한 축성재배 특히 가을 절화 수확은 전 세계에 작약이 유통되지 않는 시기에 절화 작약을 생산하는 기술이다. 이 시기를 겨냥하여 수출해야 한다면 일본 노지에서 재배된 작약에 비해 다소 품질이 좋지 않더라도 유통되는 작약이 없기 때문에 고가로 작약을 판매할 수 있을 것이다.

2) 품질관리도 중요하다. 이번 경우에는 꽃봉우리 상태에서 바로 경매시장에 보냈는데, 앞으로 작약 수출시 꽃봉우리 상태에서 수출하더라도 일본내에서 꽃 봉우리를 더 크게 만든 상태에서 판매하는 것이 가격 흥정에 도움이 될 것이다. 이를 위한 수확 후 작약 처리 기술도 앞으로 필요할 것이다.

#### 4. 경제성 분석

##### 가. 축성생산(1~3월) 작약의 수익성

- 100평 기준, box 500개 비치 가능
- box당 작약 4뿌리 식재

|           | 1년차  | 2년차   | 3년차  |
|-----------|--|---|--|
| 생산비       | (100평 기준)<br><b>12,500,000원</b><br>=500박스 × 25,000원/박스<br><br>1박스당 생산비 산출내역<br>2,500원(박스값)+2,500원(상토<br>값)+20,000원(식물재료<br>값:5,000원/뿌리×4 뿌리) | 저온고(0℃, 2개월)유지비: <b>200,000<br/>원</b><br>난방(3개월): <b>1,000,000원</b><br><br>※저온고 5평에 500박스 저장 기<br>준, 100평 온실 최저 5℃ 유지 | 저온고(0℃, 2개월)유<br>지비: <b>200,000원</b><br>온실유지비(3개월):<br><b>1,000,000원</b> |
| 수익        | 박스에 작약을 식재하고 뿌<br>리 활착을 위해 1년 동안 양<br>생시키고 질화 수확하지 않<br>음  | (100평 기준)<br><b>60,000,000원</b><br>500박스 × 4단/박스 × 30,000원  | (100평 기준)<br><b>75,000,000원</b><br>500박스 × 5단/박스<br>× 30,000원            |
| 당년<br>순수익 | -12,500,000원   | +58,800,000원  | +73,800,000  |
| 누적<br>순이익 | -12,500,000원   | +46,300,000원  | +120,100,000원  |

##### ※ 양재동 화훼공판장

- 5~6월 동안 생산된 작약(자연개화)은 1단(꽃 5개)에 4,000~5,000원에 거래되고 있음
- 자연개화 시기 이외에 뉴질랜드에서 수입된 작약은 1단에 45,000원(꽃 1개에 9,000원) 정도  
에 거래되고 있음

나. 가을생산(10~11월) 작약의 수익성

- 축성생산(1~3월)된 작약과 비교했을 때 가을생산은(10~11월) 겨울철 난방이 필요 없음
- 가을재배는 저온처리 이전에 예냉처리(10℃, 2주)가 반드시 필요함

|           | 1년차  | 2년차   | 3년차   |
|-----------|--|---|---|
| 생산비       | (100평 기준)<br><b>12,500,000원</b><br>=500박스 × 25,000원/박스<br><br>1박스당 생산비 산출내역<br>2,500원(박스값)+2,500원(상<br>토값)+20,000원(식물재료<br>값:5,000원/뿌리×4 뿌리) | 저온고(0℃, 2개월) 유지비:<br><b>200,000원</b><br><br>※저온고 5평에 500박스 저장<br>기준 | 저온고(0℃, 2개월) 유지비:<br><b>200,000원</b>                          |
| 수익        | 박스에 작약을 식재하고 뿌<br>리 활착을 위해 1년 동안<br>양생시키고 절화 수확하지<br>않음  | (100평 기준)<br><b>60,000,000원</b><br>500박스 × 4단/박스 × 30,000원          | (100평 기준)<br><b>75,000,000원</b><br>500박스 × 5단/박스 ×<br>30,000원 |
| 당년<br>순수익 | -12,500,000원   | +59,800,000원  | +74,800,000   |
| 누적<br>순이익 | -12,500,000원   | +47,300,000원  | +122,100,000원   |

다. 육성생산(1~3월) 무늬등굴레의 수익성

- 100평 기준, box 500개 비치 가능
- box당 무늬등굴레 20뿌리 식재

|           | 1년차  | 2년차   | 3년차  |
|-----------|--|---|--|
| 생산비       | (100평 기준)<br><b>4,500,000원</b><br>=500박스 × 9,000원/박스<br><br>1박스당 생산비 산출내역<br>2,500원(박스값)+2,500원(상토<br>값)+4,000원(식물재료값:200원/<br>뿌리×20 뿌리) | 저온고(0℃, 2개월) 유지비:<br><b>200,000원</b><br>난방(3개월): <b>1,000,000원</b><br><br>※저온고 5평에 500박스 저장<br>기준, 100평 온실 최저 5℃ 유<br>지 | 저온고(0℃, 2개월) 유지<br>비: <b>200,000원</b><br>온실 유지비(3개월):<br><b>1,000,000원</b> |
| 수익        | 박스에 무늬등굴레를 식재하<br>고 뿌리 활착을 위해 1년 동<br>안 양생시키고 절엽 수확하지<br>않음  | (100평 기준)<br><b>5,200,000원</b><br>500박스 × 8단/박스 × 1,300원  | (100평 기준)<br><b>6,500,000원</b><br>500박스 × 10단/박스 ×<br>1,300원               |
| 당년<br>순수익 | -4,500,000원  | +4,000,000원   | +5,300,000   |
| 누적<br>순이익 | -4,500,000원  | -500,000원   | +4,800,000원  |

※ 양재동 화훼공판장

- 자연상태에서 5~6월 동안 생산된 무늬등굴레는 1단(절엽 5개)에 500~600원
- 자연개화 시기 이외에 생산된 무늬등굴레는 1단에 1,300원 정도에 거래되고 있음

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 목표달성도

| 구분<br>(연도)     | 연구개발의 목표                 | 달성도<br>(%) | 연구개발의 내용   |
|----------------|--------------------------|------------|--|
| 1차년도<br>(2009) | ○ 토속화훼식물의 증식 기술 개발       | 100        | (깽깽이풀)<br>○ 종자말아 기술 개발<br>- 이중휴면 생리구명<br>- 온도처리에 의한 휴면 타파<br>- GA에 의한 휴면 타파                                    |
| 2차년도<br>(2010) | ○ 작약과 무늬등굴레의 특성 및 억제재배   | 100        | ○ 조기 휴면 유도<br>- 단일처리<br>- 호르몬 처리<br>○ 화아 분화 단계별 춘화 처리가 이후 개화에 미치는 영향 연구<br>○ 저온 저장 기간 구명 및 재배 후 평가             |
| 3차년도<br>(2011) | ○ 토속화훼식물의 고품질 분화생산 기술 개발 | 100        | (깽깽이풀)<br>○ 개화 적정 온도 구명<br>○ 휴면 요인 구명과 회피 기술(온도, 일장)<br>○ 양액재배를 이용한 특성 재배<br>○ 휴면타파 기술 개발<br>- 최소 기간과 적정 온도 구명 |
|                | ○ 작약과 무늬등굴레의 억제 및 특성재배   | 100        | ○ 최적의 휴면타파 조건 구명<br>- 최소 기간 구명<br>- 적정 온도 구명<br>○ 최대 냉장 보관 기간 구명<br>○ 작약의 특성, 억제 재배에 필요한 보완 실험                 |

| 구분<br>(연도)     | 연구개발의 목표                     | 달성도<br>(%) | 연구개발의 내용   |
|----------------|------------------------------|------------|--|
| 4차년도<br>(2012) | ○ 토속화훼식물의 고품질 분화<br>생산 기술 개발 | 100        | (깽깽이풀)<br>○ 양액재배를 이용한 축성 재배<br>○ 휴면타파 기술 개발<br>- 최소 기간과 적정 온도 구명<br>○ 변온 재배<br>- 겨울철 시설재배<br>- 여름철 시설재배<br><br>(무늬 둥글레)<br>○ PGR 처리를 통한 고품질 재배<br>- GA, 파상처리 |
| 5차년도<br>(2013) | ○ 토속화훼식물의 고품질 분화<br>생산 기술 개발 | 100        | (깽깽이풀)<br>○ PGR 처리를 통한 고품질 재배<br>- GA <sub>3</sub> , GA <sub>4+7</sub> 를 통한 휴면타파   |
|                | ○ 농가 현장 실증 실험 및 문<br>제점 보완   | 100        | ○ 1-4년차 실험에서 효과가 있었던 기술을<br>현장에 적용<br>○ 기 개발된 기술 농가에 이전<br>○ 토속 식물류의 실용적인 축성재배기술 확<br>립 및 경제성 분석   |
|                | ○ 개발된 토속식물 분화 해외<br>시험 수출    | 100        | ○ 개발된 토속식물 분화 일본에 시험 수출<br>○ 일본의 바이어 및 현지에서의 평가  |
|                | ○ 토속 화훼 작물의 매뉴얼 작<br>성       | 100        | ○ 각 작물별(작약, 무늬둥글레 토 재배 매뉴얼<br>작성   |

## 제 2 절 관련분야의 기술발전 기여도

### 1. 활용방안

가. 영농 활용 : 무늬등굴레와 작약의 연중생산 및 껍껍이풀의 분화 생산을 통해 화훼 농가 소득 향상

### 2. 기대성과

#### 가. 기술적 측면

- (1) 작약과 무늬등굴레의 연중생산 실현
- (2) 개발된 다양한 휴면 타파법으로 다른 다년생 화훼류에 응용
- (3) 발아가 어려운 종자의 휴면을 분류, 체계화
- (4) 형태, 생리학적 휴면을 가진 종자의 효소학적 이해

#### 나. 경제적·산업적 측면

- (1) 작약과 무늬등굴레의 연중생산으로 판매시기 다양화
- (2) 작약의 연중생산으로 생산된 절화를 해외로 수출
- (3) 껍껍이풀의 재배기간 단축으로 생산비 절감
- (4) 형태, 생리학적 휴면의 조기 휴면 타파로 묘 급속 생산
- (4) 산업화, 실용화를 위한 전략수립 및 마케팅, 수출현지 애로사항 수집, 해결

# 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 제 1 절 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

### 1. 사업화(1건)


가. 사업화명: 초축성 재배를 통한 작약의 고부가가치 절화 생산

나. 사업화 예정 내용: 예냉처리와 인공 저온처리를 통해 작약의 자연 개화 및 절화 수확시기인 5-6월보다 빠른 시기인 겨울, 초봄에 절화를 수확함. 국내 내수는 물론 해외 수출을 통하여 농가소득을 높일 수 있게 됨.

다. 증빙자료

[첨부 2]

### 농림축산식품연구개발과제 사업화실적 확인서

|        |   |   |                  |                             |                      |
|--------|---|---|------------------|-----------------------------|----------------------|
| 과제명    | 토속화원자원의 상용화 및 수출확대를 위한 대량증식과 고품질 생산 기술 개발   |   |                  |                             |                      |
| 주관연구기관 | 서울대학교                                       | 참여기관  | 경상대학교, 경남과학기술대학교 |                             |                      |
| 책임자    | 김기선   |   | 연구기간             | 2009년 04월 - 2014년 04월(총 5년) |                      |
| 정부출연금  | 1,000,000,000 원                             | 기업부담금   | 250,000,000원     | 총계                          | 1,250,000,000원       |
| 기술이전명  | 초축성 재배를 통한 작약의 고부가가치 절화 생산                  |   | 기술실시대상기관         | 월드플라워컴퍼니                    |                      |
| 기술료    | 0   |   | 기술실시일            | 2012.12.1                   |                      |
| 구 분    | 기술실시 업체 경산맥 (단과 백안맥)<br>• 최근연도 경산보고서에 의해 작성 |   | 해당기술을 통한 사업화 실적  |                             |                      |
| 실<br>적 | 자산 총계                                       | 200   | 재용건수             | 1                           |                      |
|        | 자본 총계                                       | 0   |                  |                             |                      |
|        | 부채 총계                                       | 0   | 기술개발성리활용<br>매출액  | 36,000,000원                 |                      |
|        | 매출액 총계                                      | 300   |                  |                             |                      |
| 제품별 실적 |   |   |                  |                             |                      |
| 구<br>분 | 제품명   | 제품사진  | 제품출시일            | 매출액<br>(백만원)                | 해당기술의 매출액<br>기여율 (%) |
| 1      | 초축성 절화 작약                                   |  | 2014.2.28        | 300                         | 12                   |
| 2      |   |   |                  |                             |                      |
| 3      |   |   |                  |                             |                      |

\* 첨부 : 경산보고서 1부 (보고서가 없는 경우, 재무상대표의 포괄손익계산서 첨부)

2014년 2월 12일  
연구책임자 : 김 기 선 (서명 또는 인)



## 제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

### 1. 교육지도(5건)

- 가. 작약의 축성재배법 : 발표자 김기선(2011년 2월)
- 나. 토속 식물의 연중생산 및 종자휴면 타파 방법: 발표자 김기선(2012년 7월)
- 다. 한국 자원 식물의 최근 연구 성과 발표: 발표자 김기선(2013년 1월)
- 라. 작약 예냉처리를 통한 축성 재배 교육: 발표자 김기선(2013년 3월)
- 마. 깽깽이풀 종자발아법과 번식방법: 발표자 김기선(2013년 8월)

### 2. 언론홍보(4건)

- 가. 과학원에 ‘절화용 작약의 축성재배기술’(2011년 8월)
- 나. 과학원에 ‘무늬등굴레의 불시재배’(2011년 8월)
- 다. 농경과 원예‘상자 재배 충분히 가능성이 있다’(2012년 6월)
- 라. 원예산업신문‘작약의 주년생산 기술 개발’(2014년 3월)

### 3. 기타홍보실적-수상(3건)

- 가. 2012 춘계 한국원예학회 우수 포스터 발표상(2012년 5월)
- 나. 2012 추계 한국원예학회 우수 구두 발표상(2012년 10월)
- 다. 2013 춘계 한국원예학회 우수 포스터 발표상(2013년 5월)

### 4. 기타활용-단행본 제작(3건)

- 가. 상자재배 작약의 온도처리를 통한 주년 생산체계 확립(2012년 11월)
- 나. 무늬 등굴레 절엽의 주년 생산 기술(2012년 11월)
- 다. 작약과 무늬등굴레의 연중생산(2014년 4월)

### 5. 타 연구개발사업에의 활용(1건)

- 가. 자생 관상용 춘계단명식물의 대량생산 및 상업화를 위한 재배기술 개발 (IPET, 2012년 1월  
- 2014년 12월, 과제번호: 500-20130229)

# 제 3 절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보 계획

## 1. 특허출원(2건)

| 특허명                     | 출원연도 | 출원인                | 출원국 | 출원번호            |
|-------------------------|------|--------------------|-----|-----------------|
| 재배 상자를 이용한 다년생 식물의 재배방법 | 2013 | 김기선, 이용하, 박주현      | 한국  | 10-2013-0026992 |
| 예냉처리를 이용한 다년생 식물의 재배 방법 | 2013 | 김기선, 이용하, 박주현, 이승연 | 한국  | 10-2013-0036289 |

### 관인생략 출원번호통지서

출원일자 2013.03.14  
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(P13002)  
 출원번호 10-2013-0026992 (접수번호 1-1-2013-0219773-85)  
 출원인명칭 서울대학교산학협력단(1-2007-050924-2)  
 대리인성명 강문호(9-2006-000877-7)  
 발명자성명 김기선 이용하 박주현  
 발명의명칭 재배 상자를 이용한 다년생 식물의 재배방법

### 특 허 청 장

<<안내>>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

### 관인생략 출원번호통지서

출원일자 2013.04.03  
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(P13003)  
 출원번호 10-2013-0036289 (접수번호 1-1-2013-0290051-38)  
 출원인명칭 서울대학교산학협력단(1-2007-050924-2)  
 대리인성명 강문호(9-2006-000877-7)  
 발명자성명 김기선 이용하 박주현 이승연  
 발명의명칭 예냉처리를 이용한 다년생 식물의 재배 방법

### 특 허 청 장

<<안내>>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

## 2. 논문게재

### 가. SCI급 논문(6편)

- (1) Yun, N.Y., Y.H. Rhie, H.H. Jung, and K.S. Kim. 2011. Chilling Requirement for Dormancy Release of Variegated Solomon's Seal. Hort., Environ. Biotechnol. 52:553-558.
- (2) Rhie, Y.H., H.H. Jung, and K.S. Kim 2012. Chilling Requirement for Breaking Dormancy and Flowering in *Paeonia lactiflora* 'Taebaek' and 'Mulsurae'. Hort., Environ. Biotechnol. 53:277-282.
- (3) Yeo, S.M., Rhie, Y.H., S.Y., Lee, H.H. Jung, and K.S. Kim. 2012. Dormancy Release and Flowering of *Paeonia lactiflora* 'Taebaek' by Natural Cumulative Chilling and GA<sub>3</sub> treatment. Hort., Environ. Biotechnol. 53:262-270.
- (4) 이용하, 이승연, 박주현, 김기선. 2014. 파상처리와 지베렐린을 이용한 무늬둥굴레 (*Polygonatum odoratum* var. pluriflorum 'Variegatum')의 휴면타파. Kor. J. Hort. Sci. Technol. (Accepted).
- (5) Rhie, Y.H., S.Y. Lee, H.H. Jung, and K.S. Kim. 2014. Light Intensity Influences Photosynthesis and Crop Characteristics of *Jeffersonia dubia*. Kor. J. Hort. Sci. Technol. (Accepted).
- (6) 류주현, 이효범, 김철민, 김기선. 2014. 옥상 및 벽면녹화용 지피식물류 내한성 비교. Kor. J. Hort. Sci. Technol. (Accepted).

### 나. 비SCI급 논문(1편)

- (1) 이용하, 윤나영, 이승연, 김기선. 2011. 무늬둥굴레 연중생산을 위한 성장 발육에 미치는 온도의 영향. 2013. Flower Res. J. 21:23-26.

## 3. 학회 발표

### 가. 포스터 발표(9건)

- (1) 이용하. 2009. Photosynthesis, Chlorophyll Fluorescence and Growth of *Jeffersonia dubia* Affected by Shading. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 27 (Suppl. II):124-125.
- (2) 이용하. 2010. Effect of Low Temperature on Dormancy Breaking in *Jeffersonia dubia* (Maxim.) Benth. et Hook. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 28 (Suppl. I):126.
- (3) 윤나영. 2010. Effect of Cold Storage Duration and Greenhouse Entering Time on the Dormancy Break of *Polygonatum odoratum* Druce var. pluriflorum ohwi for. variegatum Y.N.Lee. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 28 (Suppl. I):44.
- (4) Rhie, Y.H. 2011. Deep Simple Morphophysiological Dormancy in Seeds of *Jeffersonia Dubia*. 28th International Horticulture Congress.
- (5) 이용하. 2011. Chilling Requirements for Breaking Dormancy in Herbaceous Peonies. Kor.

J. Hort. Sci. Technol. 29 (Suppl. I):159-160.

- (6) 이승연. 2011. Underdeveloped Embryos and Germination of Seeds of *Aquilegia buergeriana* var. *oxysepala* (TRAUT et MEY.). Kor. J. Hort. Sci. Technol. 29 (Suppl. II):154-155.
- (7) 박주현. 2012. Pre-cooling Promotes Flower Bud Development and Flowering of *Paeonia lactiflora*. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 30 (Suppl. I):152.
- (8) 이용하. 2013. The Effect of Phytohormones on Dormancy Breaking of Uncooled Herbaceous Peony. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 31 (Suppl. I):143-144.
- (9) 이용하. 2013. The Effect of Gibberellic Acid on Dormancy Breaking of Variegated Solomon's Seal. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 31 (Suppl. II):146.

#### 나. 구두 발표(5건)

- (1) 이용하. 2010. Seed Dormancy and Germination of *Jeffersonia dubia*. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 28 (Suppl. II):36-37
- (2) 윤나영. 2010. Year-round Cut Foliage Production of Variegated Solomon's Seal. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 28 (Suppl. II)
- (3) 여수미. 2011. Dormancy Breaking and Flowering of *Paeonia lactiflora* by Natural Chilling and GA<sub>3</sub> Treatment for Forcing Culture. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 29 (Suppl. I):54.
- (4) Rhie, Y.H. 2012. Dormancy Breaking and Germination Requirements of *Jeffersonia dubia*. 2012 ASHS Annual Conference—Oral Session Abstracts:95.
- (5) 박주현. 2012. Optimum Pre-cooling Treatment for *Paeonia lactiflora* Forcing Culture. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 30 (Suppl. II):44.

**(부록)**

**작약과 무늬등굴레의 연중생산 매뉴얼**



# 작약과 무늬둥글레의 연중 생산

YEAR ROUND PRODUCTION  
OF PEONY & SOLOMON'S SEAL



서울대학교  
화훼학 및 조경식물학 연구실





YEAR ROUND PRODUCTION OF  
PEONY

작약의 연중재배



## 작약의 연중재배

### 작약 연중재배의 중요성

'꽃이 아름다운 약초'라는 뜻에서 이름이 유래한 작약은 국내에서 사용되는 한약재 중에서 생산과 소비측면에서 가장 중요한 약용작물 중 하나일 뿐 아니라 큰 화형과 다양한 화색이 아름다워 관상용으로도 이용 가치가 높은 작목이다. 예전부터 유럽 등지에서는 작약을 '정원의 여왕'이라고 불릴 정도로 그 관상적인 가치는 뛰어나다고 평가되었다. 최근 우리나라에서도 작약이 고급 웨딩부케 및 꽃꽂이 소재로 활용되어, 절화 수요가 증가하고 있다. 국내 작약의 판매동향을 보면 자연생산시기인 5~6월에는 한 단, 즉 5송이에 4,000~6,000원정도로 판매되고 있지만 자연 생산 시기를 제외한 나머지는 전량 수입하기 때문에 16,000원을 호가하는 높은 가격으로 국내에서 유통이 되고 있다. 작약의 연중생산이 가능하게 된다면 재배 농가의 소득 향상, 국내 작약 생산의 안정화, 더 나아가 수출을 기대할 수 있다.

### 작약의 생활사와 자연개화

작약은 개화와 휴면이 온도에 의해 조절되는 식물로 10월 초순에 포기나누기로 심고, 겨울에 저온을 받아 이듬해 3월 맹아를 하고 5~6월에 개화를 한다. 개화가 끝난 이후에는 지상부의 잎은 가을까지 계속 남아 있는데, 이 기간 동안 작약은 광합성을 충분히 하여 지하부에 있는 꽃눈이 분화하고 발달하는데 필요한 양분을 축적한다. 개화 이후 기부에 새로운 눈이 형성되는데, 이 새로운 눈은 겨울철 긴 휴면기간 동안 저온을 받으며 화기가 분화되고 이듬해 3월에 맹아가 되어 개화한다.





## ❁ 축성재배를 위한 상자재배

작약의 축성재배를 위해서는 노지재배가 아닌 상자재배가 필수적이다. 상자재배는 구근저장 박스(규격 : 56×37×23cm, 가로×세로×높이)에 재배용 상토를 넣고 작약을 식재하여 상자 내에서 재배하는 방법이며 저온 저장을 할 때 식물이 들어있는 채로 저온고에 저장한다. 배지는 피트모스와 펄라이트를 7:3 비율로 섞은 일반 원예용 상토면 가능하다. 저온저장시 식물의 지상부를 제거했기 때문에 상자의 적재가 가능하여 공간, 작업의 효율성이 좋은 장점이 있다. 작약은 옮겨 심을 경우 잔뿌리가 다치게 되며 그로인해 이듬해 개화 품질이 떨어지므로 축성재배를 하는 동안 상자에 식재된 작약을 굴취하여 옮겨 심지 않도록 한다.



그림1. 식재에 사용되는 구근 박스



그림2. 작약이 식재된 모습(뿌리 위에 상토를 덮어야 함)



그림3. 상자재배를 통해 개화한 작약

### ❁ 자연저온을 통한 촉성재배(3~4월 수확)

자연저온을 통한 작약의 촉성재배 방법은 자연·적산·저온(chill unit)을 추적하여 작약의 휴면이 타파되는 시기를 추정하는 방법이다. 겨울동안 저온을 측정하여 0~10℃의 온도를 받는 기간을 시간 단위로 축적하여 계산한다. 휴면을 타파하기 위한 자연·적산·저온은 식물 종에 따라 고유의 값을 가지고 있는데, 이 요구 시간을 채운 이후 야온이 10℃이상으로 가온이 되는 온실로 옮겨 생육을 시켜 개화를 유도한다. '태백' 작약의 경우 노지에 있던 식물을 중부지방 기준으로 12월 31일까지 노지에서 충분히 저온을 받게 한 후(자연·적산·저온 : 1,224시간) 온실로 옮기게 되면 정상적인 생육 및 개화가 100% 가능하다. 하지만 9월 10일 전후(자연·적산·저온 : 0시간)부터 10월 29일 전후(자연·적산·저온 : 45시간)까지 가온 온실에 입실할 때 작약은 전혀 맹아되지 않는다. 또한 11월 12일(자연·적산·저온 : 185시간)에 입실한 식물에서도 맹아는 되지만 잎과 줄기가 고사하는 블리인드 현상과 왜성화가 발견된다. 12월 31일은 실험이 진행된 2010년 중부지방의 기준이므로, 실용화를 위해서는 재배하는 지역의 저온을 모니터링 하여 자연·적산·저온(1,224시간 이상)을 계산하여 입실 하는 것이 필요하다. 작약의 또 다른 품종인 '물수레'의 경우 자연적산저온이 1,323시간, 세계적으로 가장 많이 유통되는 'Sarah Bernhard'의 경우 자연·적산·저온이 1,003시간 이상 충족되어야 한다고 알려져 있다.



# PEONY

표1. 온실입실기시에 따른 '태백' 작약의 휴면타파

| 온실로의 입실 시기 | 저온요구시간  | 맹아일    | 수확일    | 맹아율(%) | 개화율(%) |
|------------|---------|--------|--------|--------|--------|
| 11월 12일    | 185시간   | 1월 28일 | -*     | 50     | 0      |
| 12월 31일    | 1,224시간 | 1월 13일 | 2월 24일 | 100    | 100    |

\* 맹아 이후 블라인드 현상으로 인한 식물체 고사



그림4. 11월 12일에 입실한 작약(좌), 블라인드 현상 확대 사진(우)



그림5. 12월 31일에 입실하여 정상 개화



## ❁ 인공 저온 처리를 통한 촉성재배 (2~3월 수확)

인공 저온 처리 방법은 휴면에 들어간 작약을 저온고에 넣어 인위적으로 저온을 충족시켜 휴면을 타파한 후 개화를 촉진하는 방법이다. 휴면에 들어간 작약을 11월 6일 0℃로 유지되는 저온고에 6주 이상 저온을 처리하거나, 5℃로 유지되는 저온고에 9주 이상 처리한 후 야간 기온이 10℃이상 유지되는 온실로 입실하였을 때, 입실 이후 14일 만에 맹아를 하고 입실이후 55~60일이 지난 이후에 개화가 일어난다. 이때 작약의 개화는 2월 중순부터 시작되며, 꽃대의 길이도 60cm 이상으로 개화 품질에도 문제가 없다. 인공 저온 처리를 통해 자연 개화시기인 5~6월 보다 3개월 앞선 시기인 2월부터 수확이 가능하게 된 것이다. 한편 저온처리기간을 6주보다 길게 10주 이상하고 온실에 입실하면 3~4월에 절화를 수확 할 수 있다.



그림6. 11월 28일에 인공저온처리를 하여 2월 19일에 개화



그림7. 11월 이전에 인공저온처리를 했을 때 꽃눈이 퇴화 되는 현상



## ❁ 억제재배(7~10월 수확)

작약을 저온에서 장기 저장하여 여름부터 가을에 절화를 수확하는 방법이다. 노지에서 재배 중이던 작약을 맹아가 되기 이전인 2월에 0°C의 저장고에서 저장 하다가 원하는 시기에 온실로 입실 시키면 바로 개화를 유도할 수 있다. 예를 들면 4월까지 저온고에 저장하다가 온실로 입실을 하면 7월에 개화가 되며, 7월까지 저온고에 작약을 저장하였다가 온실에 입실하면 10월에 개화를 유도할 수 있다. 그런데 0°C보다 낮은 -5°C에서 작약을 저장하게 되면 맹아율이 떨어지며(18%), 또한 0°C보다 높은 5°C에서 저장하면 저장기간 중에 맹아가 되는 문제가 있다.



그림10. 11월 이전에 인공저온처리를 했을 때 꽃눈이 퇴화 되는 현상

## ❁ 재절화를 이용한 촉성재배(11~12월 수확)

절화를 수확한 이후에 작약을 재사용할 수 있다. 촉성재배를 통해 2~3월에 절화를 수확한 작약을 노지에서 4개월 정도 정상적으로 재배관리하여 식물이 광합성을 충분히 하도록 한다. 이후 7월 정도에 지상부를 제거한 후 저온실에 옮겨 10°C에서 2주간 예냉처리를 한다. 이후 0°C에서 6주간 저온처리를 한 후 온실에서 생육을 시키면 맹아가 일어나고 이어 11~12월에 개화를 한다(개화율 85% 이상). 반면 예냉처리를 하지 않고 바로 저온처리를 하게 되면 화아가 퇴화하는 문제가 있다. 한편 초촉성재배를 통하여 1~2월에 절화를 수확한 경우에도 상기한 식으로 4달 동안의 정상생육(노지에서 생육 가능)과 예냉 및 저온처리를 하면 9~10월에 절화를 수확할 수 있다.

# YEAR ROUND PRODUCTION OF SOLOMON'S SEAL

무늬 등굴레의 연중재배





그림1. 저온 83시간을 받은 무늬동굴레의 생육(3월초에 촬영)

## ● 인공 저온처리를 통한 촉성재배

10월 23일 휴면 상태에 들어간 무늬동굴레 근경을 0℃로 유지되는 저온실에 두면 무늬동굴레의 휴면을 인위적으로 타파 시킬 수 있다. 저온처리 이후에는 야간 15℃로 유지되는 온실에서 생육 시킨다. 저온처리 2주 처리는 맹아가 되기까지 소요기간이 오래 걸리고 맹아 균일도가 불균일하다. 따라서 무늬동굴레의 촉성재배를 위해서는 적어도 4주 이상의 저온 처리(0℃)가 필요하다. 절엽 수확일은 가장 빠르면 1월 23일이며, 저온 처리 기간에 따라 3월까지 다양한 시기에 절엽 수확이 가능하다.

표2. 0℃ 저온 처리 기간에 따른 무늬동굴레의 휴면타파

| 저온(0℃)처리기간 | 맹아 소요일수     | 맹아일 | 절엽 수확일  | 맹아율(%) |     |
|------------|-------------|-----|---------|--------|-----|
| 2주         | 10/23~11/6  | 46  | 12월 22일 | 2월 2일  | 90  |
| 4주         | 10/23~11/20 | 22  | 12월 12일 | 1월 23일 | 100 |
| 6주         | 10/23~12/4  | 19  | 12월 23일 | 2월 2일  | 100 |
| 8주         | 10/23~12/18 | 18  | 1월 5일   | 2월 11일 | 100 |
| 12주        | 10/23~1/5   | 11  | 1월 16일  | 3월 5일  | 100 |



### ● 늦가을에 절엽을 수확하는 방법

가을에 절엽을 수확하는 방법은 두 가지가 있다. 첫 번째는 축성재배된 무늬동굴레를 이용하는 방법으로, 휴면상태에 일찍 들어간 근경을 저온고에서 인위적으로 휴면을 타파 시켜 온실에 입실하는 방법이다. [10월 2월에 무늬동굴레 근경을 구근 박스에 심고 저온처리하여 축성재배한 것을 2월 전후로 절엽을 수확한다. 수확한 무늬중굴레를 다시 온실에 입실하여 맹아, 생육 시키고 지상부가 휴면이 들어간 7월 2일에 각각 4, 8주 동안 0℃ 저온처리 한다.] 이후 무늬동굴레를 온실에 입실할 경우 절엽+수확이 9, 10월 이후에도 가능하며 생육도 정상적이다. 두 번째 방법은 초봄에 무늬동굴레의 맹아가 되기 이전에 저온에 근경을 저장하였다가 원하는 시기에 온실에 입실하여 절엽을 생산하는 방법이다. 5℃ 저장에서는 저장기간 중 저온고에서 모두 맹아가 되어 저장성이 좋지 않지만, 0℃에서는 6개월 저장까지 맹아가 되지 않고 온실 입실 이후에도 맹아율이 90%이상 된다. 이를 통해 저온 저장에 따른 무늬동굴레의 억제재배도 가능함을 알 수 있다.

표3. 축성재배 이후 근경의 저온 처리에 따른 무늬동굴레의 억제재배

| 저온(0℃)처리기간 | 맹아일      | 수확일    | 맹아율(%)  |     |
|------------|----------|--------|---------|-----|
| 4주         | 7/2~7/30 | 8월 10일 | 9월 12일  | 100 |
| 8주         | 7/2~8/27 | 9월 5일  | 10월 14일 | 100 |

표4. 0℃ 장기 저장에 따른 무늬동굴레 생육

| 저온(0℃)처리기간 | 맹아일       | 수확일    | 맹아율(%) |      |
|------------|-----------|--------|--------|------|
| 12주        | 2/26~5/21 | 5월 25일 | 7월 1일  | 100  |
| 24주        | 2/26~8/13 | 8월 17일 | 9월 21일 | 93.3 |

### Acknowledgement

본 연구는 농림수산물기술기획평가원의 지원을 받아 진행하였습니다.



# VARIEGATED SOLOMON'S SEAL

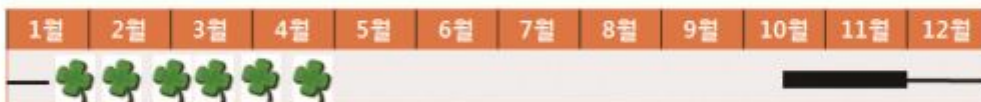


그림2. 0°C 저온처리 4주(좌)와 8주(우)이후 온실에서 40일 경과된 사진

## 관행재배



## 인공저온처리를 통한 축성재배



## 무늬동굴레 재사용을 통한 가을 재배



## 억제재배를 통한 가을 재배



☘ 수확기      — 생육  
 ■ 저온처리      ▨ 0°C에서 저온저장



YEAR ROUND PRODUCTION  
OF PEONY & SOLOMON'S SEAL



서울대학교

화훼학 및 조경식물학 연구실

151-921 서울 관악구 관악로1  
서울대학교 농업생명과학대학 200동 3104호  
Tel. (02)880-4571 / Fax. (02)873-2056  
<http://floriculture.sun.ac.kr>

발행일 : 2014년 4월 / 발행처 : 서울대학교 화훼학

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 초본성 작약과 가까운 관계에 있는 목본성 작약(*Paeonia suffruticosa*)의 경우 일본에서 많은 연구가 진행되어왔다. 화아 형성과 발달의 해부학적 연구(Hosoki et al., 1989), 휴면에 미치는 온도의 영향(Aoki, 1992), 휴면 타파를 위한 화학물 처리(Hosoki et al., 1989), PGR을 이용한 초장조절(Hamada et al., 1990)등이 이루어져 있다.
2. 휴면타파와 화아의 발달을 위해서는 6℃에서 40일간의 저온 처리가 필요하다고 했으며(Halevy et al., 2002), Kamenetsky(2003)에 6℃에서 10주, 2℃에서는 8.6주가 요구된다고 조사하였다. 휴면타파에 GA 처리가 부분적인 효과가 있음이 밝혀졌으며(Haevy et al., 2002), 일장은 저온 처리 기간, 생육 전 기간에 걸쳐 개화에 영향을 주지 못한다고 보고 되어있다. 꽃 수확 이후에 저온 처리를 통해 단, 장기간의 절화 저장이 가능하다.

## 제 7 장 참고문헌

- Armitage, A.M., 1989. Herbaceous perennial plants: A treatise on their identification, culture, and garden attributes. Varsity Press, Athens, Ga.
- Bae KH (2000) The medicinal plants of Korea. Kyohaksa Co Ltd, Seoul, Korea
- Barzilay, A., H. Zemah, R. Kamenetsky, and I. Ran. 2002. Annual life cycle and floral development of 'Sarah Bernhardt' peony in Israel. HortScience 37:300-303.
- Baskin, J.M., Baskin, C.C. (1989) Seed germination ecophysiology of *Jeffersonia diphylla*, a perennial herb of mesic deciduous forests. American Journal of Botany, 76, 1073-1080.
- Baskin, C.C., Baskin, J.M. (1998) Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination Academic Press, San Diego, CA.
- Foley, M.E., J.V. Anderson, and D.P. Horvath. 2009. The effects of temperature, photoperiod, and vernalization on regrowth and flowering competence in *Euphorbia esula* (Euphorbiaceae) crown buds. Botany 87:986-992.
- Fulton, T.A., A.J. Hall, and J.L. Catley. 2001. Chilling requirements of *Paeonia* cultivars. Sci. Hort. 89:237-248.
- Goi, M. 1979. Chilling treatment on ornamental trees for flowering. Abstr. Symposium Jpn Soc. Hort. Sci. Autumn Mtg. 1979. p. 113-112.
- Halevy, A.H., M. Levi, M. Cohen, and V. Naor. 2002. Evaluation of methods for flowering advancement of herbaceous peonies. HortScience 37:885-889.
- Hosoki, T., M. Hamada, and K. Inaba. 1984. Forcing of tree peony for December shipping by pre-chilling and chemical treatments. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 53:187-193.
- Huang M (1995) New ornamental crops in Asia. Acta Hort 397:43-58
- Hutchinson J (1920) *Jeffersonia* and *Plagiorhegma*. Bul. Miscellaneous Info (Royal Botanical Gardens, Kew) p 242-245
- Jeffrey, C. 1980. The genus *Polygonatum* (Liliaceae) in Eastern Asia. Kew Bulletin:435-471.
- Long, S.P. H. Humphries, and P.G. Falkowski. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45:633-662.
- NIER (National Institute of Environmental Research) (2004) The conservation strategy for the endangered and reserved plants based on the ecological and genetic characteristics (IV). Natl Inst Environ Res
- Nikolaeva, M.G. (1977) Factors controlling the seed dormancy pattern. In: Khan A.A. (Ed.), The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination. Elsevier, Amsterdam: 51-74.
- Terabayashi, S. (1981) Studies in the morphology and systematics of berberidaceae. Journal of Plant Research, 94, 141-157.
- Vandelook, F., Van Assche, J. (2009) Temperature conditions control embryo growth and seed germination of *Corydalis solida* (L.) Clairv., a temperate forest spring geophyte. Plant Biology, 11, 899-906.

제1협동연구기관  
최종보고서

# 조직배양을 통한 토속식물의 대량번식기술 개발에 관한 연구

경상대학교

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “토속화훼자원의 상품화 및 수출확대를 위한 대량증식과 고품질 생산 기술 개발에 관한 연구” 과제(제1협동과제 “조직배양을 통한 토속식물의 대량번식기술 개발에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2014년 4월 일

주관연구기관명 : 서울대학교

주관연구책임자 : 김 기 선

협동연구기관명 : 경상대학교

협동연구책임자 : 정 병 룡

연 구 원 : 고 충 호, 박 영 훈,

연 구 원 : 박 유 경, 박 지 은,

연 구 원 : 박 현 로, 손 문 숙,

연 구 원 : 송 주 연, 이 병 화,

연 구 원 : 이 장 평, 임 미 영,

연 구 원 : 정 종 운, 조 은 혜,

연 구 원 : 황 승 재, 황 지 현,

연 구 원 : Sonali Jana,

Iyyakkannu Sivanesan,

Manivannan Abinaya,

Prabhakaran Soundrarajan

# 요 약 문

## I. 제 목: 조직배양을 통한 토속식물의 대량번식기술 개발

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

#### 1. 연구개발의 목적

- 가. 조직배양기술을 이용한 토속화훼식물의 대량증식 기술 개발
- 나. 무병균 생산을 위한 경정배양 기술 개발
- 다. 기내식물 확보를 위한 토속식물의 기내번식
- 라. 절편체, 배양배지, 식물생장조절제에 따른 신초 유도 및 발달 조건 확립
- 마. 발달된 신초 증식 및 발근을 위한 다양한 배양환경 및 식물생장조절제의 효과검증
- 사. 절편체, 배양배지, 식물생장조절제에 따른 체세포배 유도 및 발달 조건 확립
- 아. 선발된 몇 가지 식물의 자동화 배양기술 개발

#### 2. 연구개발의 필요성

##### 가. 작약(*Paeonia lactiflora*)의 대량번식법 및 연중생산 기술 개발

- (1) 작약은 다년생 초본식물로써 그 뿌리는 보혈, 진통, 해열, 통경, 소염, 강장약으로서 냉증, 빈혈, 부인병 등에 약효가 있는 것으로 알려져 한약재로 쓰이며 그 꽃은 아름다워 관상용으로써 그 이용가치가 높다.
- (2) 일반 재배 농가에서의 번식은 주로 뿌리를 이용한 영양번식에 의존하고 있는데 이러한 번식법은 모체가 특정한 병에 이병되게 되면 일시에 많은 피해를 입을 우려가 있고 번식력이 높지 못한 편이다. 또한 자연 상태에서 작약의 종자가 성숙되는데 약 4개월 이상이 소요되며, 이렇게 성숙된 종자라 하더라도 그대로 파종하게 되면 발아기간이 길 뿐만 아니라 발아율도 낮다는 것이 종자 번식의 가장 큰 문제점으로 지적되고 있다.
- (3) 또한 작약은 고소득 작물로써 그 꽃이 아름다워 고급 꽃꽂이 소재로써 사용되고 있다. 하지만 한 포기에서 한 개의 꽃만 개화하고, 개화시기를 조절할 수 없는 단점이 있어 그 진가를 발휘하지 못하고 있다.
- (4) 따라서 이와 같은 문제점을 해결하기 위하여 작약의 기내 대량번식 시스템을 통한 식물체의 확보가 필요하므로 이와 같은 연구가 수행되어야 한다.

##### 나. 둥굴레(*Polygonatum odoratum*)의 대량번식법 및 연중생산 기술 개발

- (1) 백합과에 속하는 다년생식물로써 전국에 자생하고 있는 둥굴레는 어린순을 식용이나 자양강장제로 이용되고, 뿌리역시 약용으로 쓰이기도 한다. 또한 꽃이 희고 종모양으로 아름답고, 줄기와 잎 등이 잘 어우러져 관상용으로 충분한 가치가 있어 꽃꽂이 소재로도 활용되고 있다.
- (2) 현재 둥굴레는 가공원료로 이용되고 있는 지하경을 정식하는 방법으로 재배가 이루어지고 있다. 그러나 지하경의 정식은 과도한 종근 구입비, 정식 당년의 지하경 휴면에서 오는 경제적 손실 등으로 인하여 일반농가로 재배가 확산되지 못하고 있는 실정이다. 따라서 둥굴

례의 가격경쟁력을 증대시키기 위하여 요구되는 대량생산 시스템 확립이 필요하다.

다. 껭껭이풀(*Jeffersonia dubia*)의 조직배양을 통한 대량번식 및 분화 생산기술 개발

- (1) 껭껭이풀은 매자나무과에 속하는 보호식물로 다년생 초본이며, 우리나라 전역의 깊은 산에 자생한다. 꽃은 홍자색으로 4-5월에 1-2개의 꽃대 끝에 1개씩 피는데, 관상용으로도 가치가 높다. 열매는 삭과로 타원형이며 끝이 부리처럼 길고, 종자는 타원형으로 검은색이다.
- (2) 이 식물을 선황련이라고 하며, 청열, 해독, 건위의 효능이 있을 뿐 아니라, 소화불량, 식욕 감퇴, 오심, 장염, 이질, 발열건조, 결막염, 편도선염을 치료하는데 사용되어 왔고, 식중독 미생물에 대해 항균효과가 있는 것으로 밝혀져 있다.
- (3) 따라서 이를 대체하기 위하여 대량번식을 위한 번식체계 개선이나 작기를 단축하는 특성 재배가 가능케 된다면 멸종 위기에 있는 아름다운 꽃인 껭껭이풀을 보호 할 뿐 아니라 일반 대중에게도 인기 있는 분화로 자리 잡을 수 있을 것이다.

라. 섬개야광나무(*Cotoneaster wilsonii* Nakai)의 조직배양을 통한 대량번식법 개발

- (1) 울릉도에 제한된 희귀 및 멸종위기식물로서 야생집단에 대한 현황이 알려져 있지 않은 채 환경부지정 멸종위기야생동식물로 지정되어 있다.
- (2) 바위틈에서 자생하는 식물로 하나의 줄기가 올라와 웃가지는 밑으로 처지며, 잎은 호생하고 털로 덮였으며, 양 끝이 좁고 가장자리가 밋밋하다. 꽃은 양성화로 5-6월에 달려 흰색으로 피며, 열매는 길이 6mm 내외로 가을에 익는 섬개야광나무는 추위에 강하여 원예학적 가치가 인정된다.
- (3) 하지만 멸종위기 식물에도 불구하고 다양한 번식법에 대한 연구가 부족하므로 조직배양을 통한 대량번식을 통해 자생지를 확보하고 종의 멸종을 방지할 수 있다.

마. 번홍화(*Crocus sativus*)의 조직배양을 통한 대량번식법 개발

- (1) 번홍화는 붓꽃과에 속하는 다년생 초본으로서 높이 15cm 정도 자라며 가을에 꽃을 피우는데, 이 꽃의 암술대를 채집하여 말린 것을 번홍화라고도 한다.
- (2) 지름 3cm 가량 되는 납작한 공 모양의 알뿌리(구근)에서 줄모양(선형)의 잎이 모여 나며, 10-11월이 되면 잎 사이에서 꽃줄기가 올라와 끝에 한 송이 보랏빛 꽃이 핀다.
- (3) 암술대는 길이 2.5-4cm이며 붉은 색에 가까운 진한 주황빛으로 위쪽은 세 갈래로 길게 갈라져 있고 밑동은 붙어 있는데 말리면 실고추 비슷하며, 수술은 세 개로 노란색 꽃가루로 덮여있음. 2-3주 후 꽃이 진 다음 잎이 자란다.
- (4) 한 철에 하나의 구근에서 2-9개의 꽃이 피는데 꽃마다 한 개의 암술대가 있으므로, 1g의 번홍화를 얻으려면 500개의 암술을 편셋으로 일일이 채취하여 말려야 하는 수작업이므로 번홍화는 가장 값비싼 향신료로 팔리고 있다.
- (5) 이와 같은 재배적 가치에도 불구하고 현재까지 조직배양에 대한 연구가 거의 없으므로 조직배양을 통한 대량번식법 개발이 필요하다.



Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

| 구분<br>(연도)     | 연구개발의 목표                   | 연구개발의 내용  |
|----------------|----------------------------|---|
| 1차년도<br>(2009) | ○ 토속화훼식물의 대량증식 기술 개발       | ○ 작약, 등굴레, 몇 가지 토속식물 (쌍꺼비풀, 섬개야광나무) 및 번홍화의 번식기술 개발<br>-조직배양을 통한 재분화 연구<br>○ 다양한 소독법을 이용한 무균배양법 확립<br>- NaOCl, CaOCl, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , HgCl <sub>2</sub> , 알코올, 항생제<br>○ 작약, 등굴레 및 토속식물의 기내번식<br>- 계대배양 |
|                | ○ 농가실증실험                   | ○ 농가실증실험  |
| 2차년도<br>(2010) | ○ 마디 및 경정배양을 통한 토속식물의 대량번식 | ○ 환경조건에 따른 토속식물의 마디 및 경정배양 조건 확립<br>- 최적 배양 배지 규명(MS, B5배지)<br>- 식물생장조절제<br>i) 사이토키닌 단용처리<br>ii) 옥신과 사이토키닌과의 혼용처리<br>- 배양환경조건 규명<br>i) 온도(18℃-25℃)<br>ii) 광도(10-60 μmol)<br>iii) 광주기(8-16시간)<br>- 계대배양 횟수를 통한 대량번식    |
|                | ○ 식물의 직·간접적 식물 재분화조건 확립    | ○ 식물체 재분화에 미치는 다양한 요인들의 효과<br>- 절편체(잎, 줄기, 엽병, 상배축, 하배축)<br>- 최적 배양배지 규명(MS, B5배지)<br>- 식물생장조절<br>I) 옥신 및 사이토키닌의 단용처리<br>ii) 옥신과 사이토키닌의 혼용처리<br>- 배양환경<br>I) 온도(18℃-25℃)<br>ii) 광도(0-60 μmol)<br>iii) 광주기(0-16시간)     |
|                | ○ 농가실증실험                   | ○ 농가실증실험  |

| 구분<br>(연도)     | 연구개발의 목표                      | 연구개발의 내용   |
|----------------|-------------------------------|--|
| 3차년도<br>(2011) | ○ 유도된 신초의 생장을 위한 조건 확립        | ○ 식물생장조절제에 의한 신초 생장<br>- 낮은 농도의 사이토키닌<br>- 다양한 농도의 GA <sub>3</sub> 처리  |
|                | ○ 성장한 식물체의 발근을 위한 조건 확립       | ○ 식물체의 기내발근에 미치는 다양한 요인들의 효과<br>- 배양배지(1/2, 1/4, MS배지)<br>- 탄소원(Sucrose, Glucose, Maltose)<br>- 옥신(IAA, IBA, NAA)<br>- 배양환경조건(암상태, 광상태)  |
|                | ○ 체세포배 발생을 이용한 식물체 재분화 시스템 개발 | ○ 체세포배 발생에 미치는 다양한 요인들의 효과<br>- 절편체(잎, 줄기, 엽병, 상배축, 하배축)<br>- 최적 배양배지(MS, B5배지)<br>- 식물생장조절<br>i) 옥신 단용처리<br>ii) 옥신과 사이토키닌의 혼용처리<br>- 배양환경조건 규명<br>i) 온도(18°C-25°C)<br>ii) 광도(0-60 μmol)<br>iii) 광주기(0-16시간) |
|                | ○ 농가실증실험                      | ○ 농가실증실험   |
| 4차년도<br>(2012) | ○ 체세포배의 성숙 및 발아를 위한 조건 확립     | ○ 배 성숙 및 발아조건 확립<br>- ABA, PEG, GA <sub>3</sub><br>- 다양한 Sucrose농도   |
|                | ○ 발근된 식물체의 순화체계 확립            | ○ 기내순화에 미치는 다양한 요인들의 효과<br>- 배양토(토실이상토, 펄라이트, 질석)<br>- 환경조건(광도, 상대습도, 온도)  |
|                | ○ 재분화된 식물체의 형태적 관찰            | ○ 형태학적 관찰<br>- 잎, 줄기, 개화, 종자 등   |
|                | ○ 농가실증실험                      | ○ 농가실증실험   |
| 5차년도<br>(2013) | ○ 선발된 식물의 자동화 배양기술 개발         | ○ 일시적 침지 배양법에 따른 대량번식 시스템 확립<br>- 식물재료<br>i) 체세포배<br>ii) 줄기, 정단<br>- 배양배지<br>- 배지량 규명<br>- 침지 시간 및 횟수<br>- 식물생장 관찰   |
|                | ○ 농가실증실험                      | ○ 농가실증실험   |

#### IV. 연구개발결과

##### 1. 작약(*Paeonia lactiflora*)의 종자 발아와 체세포배 발생

배 발생 16주 후에 발아된 체세포배 부분을 절편체로 사용하였다. 캘러스는 초기에 녹색이었지만 페놀 물질 때문에 점차 갈색으로 변했다. 발아된 체세포배는 캘러스 유도를 위해 절편체로 사용하였다. MS 배지에 다양한 성장조절제를 첨가한 배지에서 조밀한 녹색 캘러스를 획득하였다.

##### 2. 작약(*Paeonia lactiflora*)의 꽃잎 절편체를 이용한 캘러스 발생

6, 9, 10, 11처리에서 캘러스가 성공적으로 유도되었다. 하지만 계대배양을 하는 과정에서 캘러스가 갈색으로 변하였고, 박테리아에 감염되었다. 작약의 꽃봉오리를 절편체로 사용하여 캘러스를 유도하는데 성공하였다. 절편체의 멸균 방법과 배지조성을 구명한다면 캘러스 배양을 최적화 할 수 있을 것이라 판단된다.

##### 3. RAPD 마커를 이용한 국내 작약의 유전적 다양성 분석

1종의 작약을 24개의 random RAPD primer를 이용하여 유전적인 차이를 분석하였다. Primer 10개의 GC함량은 70%이고, 14개의 GC함량은 60%이다. 각각의 primer는 1-11개(primer당 평균 6개)의 DNA조각을 만들었고, 총 142개의 DNA밴드를 나타냈다. DNA조각의 크기는 250-2100 base pairs 사이로 제작되었다. 제작된 142개의 DNA조각 중 87.3%인 124개의 조각이 다형성을 보였고, 나머지 12.7%인 18개의 조각은 11종 모두 동일하게 나타났다. 가장 많은 조각(11개)을 만들어낸 primer는 B05이고, 가장 적은 조각을 만들어낸 primer는 B01이다. 다형성의 비율은 각 primer당 33.38-100% 범위로 나타났고, 모든 primer의 다형성은 table 6에 나타났다. Primer A18, A19, 그리고 A20에서 서로 다른 종의 작약의 유전적 차이를 볼 수 있다. 작약 11종의 유사성은 자카드 계수를 이용하여 확인할 수 있었다. 각 작약들의 유사계수는 2번과 4번 작약 사이의 0.39에서부터 5번과 9번 작약 사이의 0.91까지 다양하게 나왔다. 11종의 작약을 유전적 거리를 기준으로 2 그룹으로 분류한 후 UPGMA 계통도를 만들었다. 1번 그룹은 흰색 작약과 산 작약으로 0.75의 유사성을 보였다. 2번 그룹은 나머지 9개의 작약이 모두 포함되어 그 속에서 다시 유사성을 바탕으로 작은 그룹으로 나누었다. 가장 높은 유사계수인 0.92를 보인 품종은 'Jol Peony'와 'Sagok'이고, 이와 비슷한 0.91의 유사계수를 보인 품종은 'Jol Peony', 'Lilini Warrior', 그리고 'Kansas'이다. 이러한 RAPD marker는 실험에 사용된 작약의 유전적 차이를 나타낸다.

##### 4. 작약(*P. lactiflora* Pall)의 체세포배 발생

종자로부터 적출한 체세포배를 0.1%(v/v) 활성탄과 다양한 조성의 BA와 GA<sub>3</sub>가 첨가된 MS배지에 치상하였다. 체세포배를 유도하기 위해 발아 30일이 경과된 자엽 절편체(길이 0.5mm)를 BA와 2,4D가 첨가된 MS배지에 30일 동안 배양하였다. 그 후 BA, NAA, GA<sub>3</sub>가 첨가된 MS배지에서 계대배양 하였다. 발아율은 1.0 mg·L<sup>-1</sup> BA, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>가 첨가된 MS배지에서 95%로 가장 높았다. 30일된 자엽 절편체를 BA와 2,4D가 첨가된 MS배지에서 배양하였다. 30일 후, 1.0 mg·L<sup>-1</sup> BA와 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D가 첨가된 MS배지에서 성장한 자엽을 BA, GA<sub>3</sub>, NAA가 혼합조성된 다양한 농도의 배지에 이식하였다. 90일 후, 절편체의 표면에 구형의 배가

형성되었다. 체세포배 발생은  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA,  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA,  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>와 0.1%(v/v) 활성탄이 첨가된 배지에서 절편체당 평균 14개의 배가 생성되었다. 또한 같은 배지에서 심장형과 어뢰형의 배가 성숙한 것을 관찰할 수 있었다. 어뢰형의 배를  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA와  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>가 첨가된 MS배지에 이식하면 소식물체로 모두 성장하였지만 성장속도가 매우 느렸다. 작약의 자엽으로부터 개발한 이 프로토콜은 아주 간단하고, 재생가능하고, 효율적인 체세포배 발생 방법이라고 판단된다.

#### 5. 지하경을 이용한 작약(*P. lactiflora* 'Hortensis')의 증식

배지에 지하경을 치상 15일 후 잎이 4-5개가 성장하였다. 치상 30일 후 몇 개의 새로운 신초가 성장하였다. 신초 발생율은  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA와  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>가 첨가된 1/2 MS배지에서 100%로 가장 높았다. 그리고 신초 증식율도 위와 같은 배지에서 절편체당 6.2개로 가장 높았다. 이 배지에  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IAA 첨가하면 신초 발생율이 증가하였다. 기내에서 성장한 신초로부터 마디 절편체를 잘라  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA, 0.3 혹은  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>가 첨가된 1/2 MS배지에 치상하였다. GA<sub>3</sub>를 처리함에 따라 신초 발생율과 증식율이 통계적으로 유의하게 향상되었다. 발근을 유도하기 위해 IBA와 IAA가 첨가된 1/2 MS배지에 이식하였더니 발근수가 많았다. MS배지의 염 농도를 감소시키기 위해 1/2 MS배지를 사용하였는데 이것이 발근에 효과적이었다. 하지만 신초가 급격하게 시들어가고 잎이 노란색으로 변했는데, 이것은 활성탄에 너무 길게 노출되었기 때문(30일)으로 판단된다.  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA와  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IAA를 첨가한 1/2 MS배지에서 발근되었다. 발근율은 작약의 신초를 agar를 넣지 않고  $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA 첨가한 MS배지 배양액에 5일 동안 침지한 후 성장조절제가 첨가되지 않은 1/4 MS배지에 침지하였을 때 15%로 가장 높았다. 또한 POD, IAAO, PPO, 페놀함량은 기내식물체의 발근의 지표로 사용할 수 있을 것이라 판단된다.

#### 6. 작약(*P. lactiflora*) 네 품종의 꽃잎 절편체를 이용한 캘러스 유도

치상 30일 후 삼출물 때문에 절편체가 검은색으로 변하거나 고사하여 배양한 것의 50%를 폐기하였다. 네 품종을 배양하였지만 'Sarah bernhardt' 품종만 긍정적인 반응을 보였고, 나머지 세 품종은 과도한 대사산물 때문에 생존하기 어려웠다. 성장조절제를 사용하지 않은 대조구의 절편체가 모두 고사하였다. 활성탄을 첨가하지 않은 AM배지와 N6배지에 사이토카이닌만 첨가한 배지에서 캘러스가 발생하였다. 이와 유사하게 활성탄을 첨가하지 않은 AM배지와 N6배지에 세 종류의 성장조절제 조성에서 캘러스가 유도되었다. 모든 꽃잎 절편체는 녹색으로 변했다. 계대배양은 30일 간격으로 하였고 절편체 끝 부분에 캘러스가 10% 발생하였다. 배양 3-4개월 동안 꽃잎 절편체는 활성탄을 첨가하지 않은 배지에서 더 많은 캘러스가 발생하였다. 활성탄을 첨가한 배지에서는 캘러스가 생장은 하였지만 갈색으로 변하다가 배양 15일 후 생장을 멈췄다. 이러한 경우 새로운 배지로 교체해도 절편체가 성장하지 않거나 고사하였다. 사이토카이닌을 첨가한 모든 처리에서 캘러스 유도에 있어 긍정적인 영향을 미쳤다. 12가지 성장조절제 조성은 테이블 15에 나타나 있고, 여기서 6가지 조합만 캘러스가 유도되었다. 계대배양 46-60일 후 캘러스 유도는 아주 느려졌다. 캘러스 증식속도는 아주 느렸고, 캘러스 색깔은 녹색이나 녹색을 띤 하얀색이었다. 사이토카이닌과 옥신의 첨가는 캘러스 증식을 향상시켰다. 3달 동안 각각의 배지를 관찰하였지만 캘러스 생장은 유의차가 없었다. 따라서 캘러스 생장은 성장조절제를 첨가한 AM배지가 다른 처리보다 좋았다. 처리 6과 9번을 AM배지에 첨가한 것에서 긍정

적인 결과를 보였다. 현미경으로 관찰한 결과 켈러스 가장자리에서 생장이 일어났으며, 이것이 신초로 성장하였다.

#### 7. 작약(*P. lactiflora*) 네 품종의 자엽 절편체를 이용한 신초 증식

BA, GA<sub>3</sub>, IBA를 첨가한 AM배지에서 다신초가 성장하였다. 액아울과 측아울은 모든 품종에서 0.5 mg·L<sup>-1</sup> BA, 1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>를 첨가한 AM배지에서 100%였다. BA가 0.5 mg·L<sup>-1</sup>까지 증가함에 따라 자엽 밑 부분에 켈러스가 발생되었고 신초 유도는 감소하였다. 신초 증식율은 BA와 GA<sub>3</sub> 농도가 증가함에 따라 감소하였다. 따라서 본 연구에서는 BA농도가 낮을수록 신초의 증식과 생장에 효과적이었다. 신초수는 'P526'의 경우 다른 품종에 비해 6.4개로 더 많았다. 신초장은 모든 품종에서 0.5 mg·L<sup>-1</sup> BA, 1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>, 1.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA를 첨가한 AM배지에서 5cm거나 그 이상이었다. 신초는 처음에는 약했다가 시간이 흐름에 따라 건강해졌다. 60일마다 계대배양 하였다. IAA를 1/2AM배지에 첨가하여 발근을 유도하려 했으나 실패하였다. 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 첨가했을 때 뿌리가 기형으로 성장하였다. 신초 성장을 증가시키기 위해 1.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA가 첨가된 MS배지에 이식하였을 때 발근율이 'Euisseong'과 'P526'은 100%, 'P524'는 20%, 'P513'은 0%였다. 발근수는 'P526'은 14.8개, 최대근장은 'Euisseong'에서 7.7cm로 가장 길었다. 'Euisseong'과 'P526'에서 뿌리는 폐놀 물질과 함께 성장하였다. 배양 60일 후 기내식물체를 순화시키기 전에 뿌리 끝 부분의 agar를 제거하기 위해 수돗물로 세척하였다. 뿌리가 잘 발달된 건강한 식물체를 토질이 상토가 든 10cm 화분에 정식하였다. 1/4 MS배지로 관수하였으며 미스트가 설치된 온실에서 순화시켰다. 순화 30일 후 'Euisseong'의 경우 생존율은 80%였고, 'P526'은 1% 생존하였다. 'P524'는 순화시키는데 실패하였다. 따라서 효율적인 기외 순화방법을 확립하는 것이 중요할 것이라 판단된다. POD 활성은 네 품종 모두 발근하기 전에 높았고, 발근 후 감소하였다. IAAO 활성은 발근 전 높았다가 발근 후 감소하였다. 폐놀 함량은 발근 후 감소하였다. PPO 활성은 'P526'에서는 발근 후 증가하였지만 'Euisseong'과 'P524'는 양의 변화가 없었다.

#### 8. 작약(*P. lactiflora* 'Sarah bernhardt')의 꽃잎 절편체로부터 유도된 켈러스에 항갈변화제의 적용

항산화제 처리 7일 후 갈변화 되기 시작했다. 절편체의 단면이 처음 갈변하기 시작하다가 배지로 점차 퍼져나갔다. 배양 30일 후 침출물 때문에 절편체가 검은색으로 변해 고사하여 50%만 생존하였다. 0.1 g·L<sup>-1</sup> 활성탄 처리시 더 많이 갈변하였지만, 0.3 g·L<sup>-1</sup>까지 농도가 증가함에 따라 갈변화가 억제되었다. PVP 처리 3일 후 켈러스가 갈변하였고, 7일 후 켈러스의 가장자리에 갈색물질이 축적되었다. 1-2 g·L<sup>-1</sup> (w/v) PVP 처리시 갈변화가 완전히 억제되었지만 더 높은 농도에서는 억제되지 않았다. 낮은 농도의 아스코르브산의 사용은 갈변화를 억제시키지 못했지만, 20이나 40 mM에서 완전히 억제되었다. 5, 10 or 20 μM AgNO<sub>3</sub> 사용에 따라 켈러스가 약간 갈변했지만, 40 μM을 사용함에 따라 완전히 억제되었다. 처리 30일 후 켈러스는 녹색으로 아주 잘 성장하였다. 디오황산나트륨은 모든 농도에서 갈변화를 억제시키는데 실패하였고 켈러스가 갈색으로 변하면서 7일 후 고사하였다. 절편체를 주기적으로 계대배양 했을 때 긍정적인 결과를 얻을 수 있었다. 7일 간격으로 계대배양을 했을 경우 갈변화를 완전히 억제하였다. 암배양 15일 했을 경우 갈변이 되지 않았지만 액체배양 15일 후에는 모두 갈변하였다. 총 폐놀함량은 항산화제를 사용하지 않은 배지에서 높았다.

### 9. 무늬 등굴레의 근경을 이용한 미세번식

식물생장조절제가 포함되지 않은 배지에서 3주 동안 배양시 식물체가 피사하기 시작했다.  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2iP가 포함된 배지를 제외하고 식물생장조절제가 포함된 배지에서는 신초가 모두 생성되었다. 2iP의 농도가 높아질수록 신초생성이 잘 되었다. 다양한 농도의 TDZ를 사용한 경우 3주 이내에 신초가 생성되었으며, 신초 생성 2주 후 뿌리가 생성되었다. 신초발생률은  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ가 포함된 배지에서 71%로 가장 높았고, 신초수는 절편체당 3.8개가 발생되었다. 그러나 더 높은 농도의 TDZ에서는 신초발생률과 신초수가 감소하였다. 신초가 생성될 때는 배양 3주 이내에 절편체의 표면에 흑과 같은 구조물이 생성된 후 이 구조물이 신초로 변화하였다. 신초발생률(100%)과 신초수(절편체당 7.6개)는 Anderson 배지에  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D,  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2iP,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ를 넣은 처리에서 가장 높았다.

### 10. 무늬 등굴레의 잎과 꽃눈을 이용한 기내번식

무늬 등굴레의 잎을 이용하여 수행한 결과 처리 2번이 신초발생률 15% 그리고 뿌리발생률 55%로 가장 높았다. 꽃눈을 이용한 실험에서도 처리 2번이 신초발생률 65% 그리고 뿌리발생률 60%로 가장 높았다. 여러 가지 배지, 온도, 그리고 광도를 이용하여 무늬 등굴레의 기내번식을 시도하였다. B5 배지에서 가장 좋은 결과를 나타냈으며, 무늬 등굴레의 생육과 발달에는 낮은 온도와 높은 광도가 좋았다. 엽록소 함량도 B5 배지에서 낮은 온도와 높은 광도를 처리하였을 때 가장 높았다.

### 11. 깽깽이풀(*Jeffersonia dubia*) 자엽 절편체를 이용한 신초 재분화

신초는 2iP, BA, TDZ를 첨가한 MS배지에서 발생하지 않았다. 하지만  $0.5\text{-}2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ를 첨가한 MS배지에서 캘러스가 형성되었다. 신초 발생률(72.1%)과 신초수(10.5개)는  $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ를 첨가한 N6배지에서 가장 높았다. TDZ를 첨가한 N6배지에서 절편체의 단면에서 신초가 직접 발생하였다. 신초 발생률과 신초수는 배지에 첨가된 TDZ농도가 증가할수록 감소하였다.

### 12. 깽깽이풀(*Jeffersonia dubia*) 부정아(shoot bud) 절편체를 이용한 재분화

깽깽이풀을 MS, AM, N6, WPM배지에서 배양하였다. 배지와 사이토키닌 종류가 부정아 절편체의 신초 증식에 미치는 영향을 조사하였다. 신초 증식은 TDZ를 첨가한 N6배지에서 가장 높았다. 신초 증식률(96.2%)과 절편체당 신초수(7.0개)는  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ와  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA가 첨가된 N6배지에서 가장 높았다. 배양 6주 후 TDZ를 단독으로 사용하거나 TDZ와 NAA를 조합한 처리에서는 다신초가 발달하지 않았다. 이러한 문제를 해결하기 위해  $\text{GA}_3$ 가 첨가된 N6배지에 이식하였다. 2-3cm 정도로 재분화한 신초를 옥신이 첨가된 1/2 N6배지에 이식하여 옥신이 뿌리 유도에 미치는 영향에 대해 조사하였다. 배지종류와 농도가 깽깽이풀의 발근에 미치는 영향을 조사하였다. 발근수는  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA를 첨가한 AM, MS, N6, WPM배지에서 배양했을 때 감소하였다. WPM배지가 가장 우수했고, 그 다음으로 N6, AM, MS배지 순이었다. 배양된 소식물체를 순화시키기 위해 순화박스에 옮겨 습도를 높게 하여 관리하였더니 86%가 생존하였다. 3주 후, 소식물체에서 신초가 발달했을 때 토실이상토가 든 화분에 이식하여 온실로 옮겼다. 미세번식된 식물은 정상적으로 성장하였다.

### 13. Temporary immersion system(TIS)을 이용한 껌이풀(*Jeffersonia dubia*) 미세번식의 최적화

모든 처리에서 식물체는 오염이 되지 않았다. 신초 발생율은 침지 시간 20분과 25분 처리에서 100%로 가장 높았다. 절편체당 신초수는 15분간 침지했을 때 13.6개로 가장 많았다. 신초장은 침지 시간이 길어질수록 유의차는 없었지만 증가하였다. 생체중은 모든 침지 처리에서 0.9-1.6g으로 다양했다. TIS를 이용해 배양된 식물체는 성공적으로 발근이 되었고, 순화에도 성공하였다.

### 14. 섬개야광나무의 기내 번식

식물체로부터 신초가 발생한 빈도는 거의 비슷하였다. 줄기와 신초에서 모두 TDZ와 NAA가 포함된 MS 배지를 사용한 결과 신초가 생성되었다. WPM 배지와 B5 배지, SH 배지, 그리고 MS 배지 모두 신초가 생성 되었으며, 15와 20℃ 모두 신초가 생성되었다. 가장 높은 신초의 생성을 보인 처리는 MS 배지에  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ와  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA를 처리한 처리구로 식물체당 34개의 신초가 생성되었다. TDZ를 단독처리한 처리구보다 TDZ와 NAA를 혼용처리한 처리구에서 신초의 증식이 활발하였다. 뿌리의 발생은 IBA를 처리한 결과 100% 생성이 되었다. 1/2 MS 배지에  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA를 처리한 처리구에서 신초당 뿌리수 4.2개, 최대근장 5.6으로 가장 활발한 뿌리의 생성을 볼 수 있었다. 섬개야광나무의 온실에서 순화를 할 경우 98%의 식물체가 살아남았다. 높은 농도의 TDZ와 잦은 계대배양으로 생긴 유리화의 경우 배지에 규소를 추가하여 억제할 수 있었다. 주사전자현미경을 이용한 식물체의 표면 관찰과 energy dispersive X-ray를 이용한 규소의 흡수를 통하여 규소의 첨가가 유리화를 효과적으로 막는다는 것을 알 수 있다.

### 15. TIS를 이용한 섬개야광나무의 기내 번식

모든 처리에서 100% 멸균상태로 배양이 되었고, 배양액을 공급하는 빈도에 따라서 신초의 증식에 대한 연구를 하였다. 신초 발생율은 모든 처리에서 96.4-100%가 생성되었다. 신초수는 20분마다 공급하는 처리로 식물체당 34.8개가 생성되었다. 신초장은 특별히 차이가 없었으며 0.85-1.81cm 범위에서 자랐다. 생체중은 배양액을 자주 공급한 처리에서 낮았고, 배양액의 공급 빈도수가 낮을수록 높았다.

### 16. 규소가 TIS를 이용한 섬개야광나무의 신초증식에 미치는 영향

모든 처리에서 100% 멸균상태로 배양이 되었고, 배양액을 공급하는 빈도에 따라서 신초의 증식에 대한 연구를 하였다. 배양액을 자주 공급하는 처리에서 유리화된 신초와 변형된 잎이 나타났다. 신초 발생율은 10분 처리와 20분 처리에서 모두 100% 생성되었다. 신초수는 10분 처리에서 가장 많았으나 신초장(1.87 cm)은 50분 처리에서 가장 길었다. 신초 생체중은 배양액의 공급 빈도가 낮을수록 증가하였다. 신초 발생율은 모든 처리에서 96.4-100%가 생성되었다. 신초수는 20분마다 공급하는 처리로 식물체당 34.8개가 생성되었다. 신초장은 특별히 차이가 없었으며 0.85-1.81cm 범위에서 자랐다. 생체중은 배양액을 자주 공급한 처리에서 낮았으며, 배양액의 공급 빈도수가 낮을수록 높았다. 수분함량은 30분 처리에서 다른 처리에 비해 높았으며, 엽록소 함량도 30분 처리에서 가장 높았다. 카로티노이드 함량은 50분 처리에서 가장 높았

고, 안토시아닌의 경우 모든 처리구에서 신초보다 높은 잎에서 더 높게 나왔다.

#### 17. 번홍화(*Crocus sativus* L.)의 체세포배 발생

체세포배는  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D와  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ가 첨가된 MS배지에서 절편체당 평균 52개가 유도되었다. 배지종류(SH, B5, N6, AM, MS)와 광도( $0, 45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPF)에 따른 체세포배 발생은 주요 체세포배를 유도하기 위해 수행되었다. 체세포배 발생수는  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPF하에서  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D와  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ가 첨가된 SH배지에서 배양된 처리에서 가장 높았다. 2차 체세포배 발생을 위해 주요 체세포배를 2iP나 BA에 NAA를 조합하여 첨가한 SH배지에서 배양하였다. 배양 45일 후, 2차 체세포배 발생은  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA와  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA를 첨가한 SH배지에서 가장 좋았다. 2차 체세포배는 구형이 88.9% 발생하였고, 심장형은 95.2% 발생하였다. 체세포배의 성숙과 전환은  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>를 처리하였을 때 92.3%였다. 체세포배의 전환은  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>와 6% (w/v) sucrose를 첨가한 SH배지에서 100%로 가장 높았다.

#### 18. 번홍화(*Crocus sativus* L.)의 구근을 이용한 재분화

무균상태에서 표면살균은 100%였다. 구근 절편체는 성장조절제가 첨가되지 않은 SH배지에서는 부정신초가 발생하지 않았다. BA와 NAA 첨가가 구근 절편체로부터 유도된 신초에 미치는 영향을 조사하였다. 세 가지 사이토키닌을 처리한 결과, BA는 신초를 형성하는데 가장 효과적이었다. 신초 발생율은  $4.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Kin가 첨가된 SH배지에서 61.3%로 가장 높았다. 절편체당 신초수는  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA와 BA조합보다  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA와 BA 조합이 더 많았다. 절편체당 신초 발생율은  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA와  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA를 첨가한 SH배지에서 97.2%로 가장 높았다. Microcorm 발생율은 sucrose 함량에 영향을 받았다. Microcorm 발생율은 3.0, 6.0, 12.0% sucrose를 첨가한 SH배지에서 각각 32.7, 70.9, 45.5%였다. 절편체당 microcorm수는  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA와  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA, 6.0% sucrose를 첨가한 SH배지에서 6.1개로 가장 많았다. Microcorm은 기내에서 발달된 daughter corm에서 형성되었다. Microcorm을 배양용기에서 꺼내서 토실이가 든 순화박스에 이식하였다. 순화 30일 후 구근의 85%에서 신초와 뿌리가 발달하였다.

#### 19. 상록성 진달래의 기내 번식과 기내에서 유래된 식물의 유전적 평가

신초 발생율(96%)은 Anderson 배지에  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2iP,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IAA, 그리고  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>를 첨가하였을 때 가장 높았고, 신초수는 절편체당 16개였다. 광도 및 광질에 따른 신초 재분화 실험에서 신초 발생율은 일관성이 없게 나왔으나 절편체당 신초수는 형광등(16.0개)이 blue(14.8개)와 red(12.6개)보다 많이 나왔다. 부정아를 이용한 캘러스 유기 실험에서는 캘러스 생성율이 Anderson 배지에  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ 그리고  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA를 넣은 처리에서 2주 만에 84.2%가 생성되었다. 캘러스에서 신초를 발생시키는 실험에서는  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2iP,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IAA,  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>를 넣은 처리에서 100% 모두 신초가 발생하였고 캘러스당 36.8개의 신초가 발생하였다. 신초로부터 뿌리를 유도하는 실험에서는 1/2 Anderson 배지에  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA를 넣은 처리에서 100% 뿌리가 발생하였으며, 신초당 7.6개의 뿌리가 발생했고, 최대 근장은 4.4cm이었다. 재분화된 식물의 기회순화 성공률은 95%였다. RAPD결과를 보면 재분화된 식물체들이 유전적으로 그들의 모체와 유사하다는 것을 확인할 수 있다.



## 20. TIS를 이용한 상록성 진달래의 신초증식 유도

상록성 진달래의 신초 증식은 식물체가 배양액의 침지 시간에 따라 확인을 하였다. 신초 발생율은 10분 간격으로 배양액을 공급한 처리를 제외하고 모든 처리에서 100% 발생하였다. 신초수는 30분 간격으로 배양액을 공급한 처리에서 식물체당 22.6개가 발생하였다. 신초장은 모든 처리에서 차이가 없이 0.99-1.37cm 범위에서 성장하였다. 생체중과 건물중 역시 큰 차이가 없었다. TIS에 옥신을 처리한 결과 높은 빈도로 뿌리가 발생하였다. 또한 TIS를 이용할 때 유리화가 문제가 되었으나 이러한 문제도 1/2 Anderson 배지로 옮겨주면 해결 되었고 기외순화도 성공적이었다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

### 1. 연구성과

가. 상품화(1건)

나. 정책자료(2건)

다. 기술실시(1건)

라. 교육지도(9건)

마. 언론홍보(2건)

바. 특허출원(1건)

사. 논문발표(10편 논문게재 및 15편 발표)

(1) 논문투고 및 출판

(가) SCI급 논문(7편 출판)

(나) 비SCI급 논문(3편)

(2) 논문발표

(가) 포스터발표(13편)

(나) 구두발표(2편)

## SUMMARY

### (영문요약문)

Tissue culture, as a tool for mass propagation and research, can be efficiently used not only for propagation and conservation of rare and endangered species, but also for genetic transformation and breeding of various ornamental plant species. The techniques can play an important role in the clonal propagation and qualitative improvement of most economically important ornamental plants. Direct adventitious organogenesis or shoot formation is preferred as it enables to retain clonal fidelity, since many ornamental species are propagated for one or more unique features. Clonal propagation through somatic embryogenesis has also become an essential method for mass propagation and improvement of important plants. Direct embryogenesis reduces the time required for plant propagation, which may be beneficial to minimize culture-induced genetic changes. Moreover, secondary somatic embryogenesis is a process whereby new somatic embryos are initiated from the originally-formed primary somatic embryos. It has certain advantages over the primary somatic embryogenesis such as very high multiplication rates, independence from the explant source, and reproducibility. Furthermore, embryogenicity can be maintained for a long period of time by repeated cycles of secondary embryogenesis. It is known that the regeneration of adventitious organs differs depending upon species and a number of endogenous and exogenous factors, among which hormonal balance has a primary role. In particular, the auxin-cytokinin ratio appears to be the most important factor in channeling regeneration responses toward a specific in vitro morphogenic process. We developed efficient protocols for in vitro propagation and genetic transformation of many important ornamental plants including *Paeonia lactiflora* Pall., *Polygonatum odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi f. *variegatum* Y.N. LEE, *Jeffersonia dubia* Benth et. Hook, *Cotoneaster wilsonii* Nakai, *Crocus vernus* (L.) Hill, and *Rhododendron brachycarpum* D. Don.

#### 1. In vitro zygotic embryo germination and somatic embryogenesis through cotyledonary explants of *Paeonia lactiflora* Pall.

A simple and efficient protocol was developed for somatic embryogenesis from the cotyledon explant of *Paeonia lactiflora* Pall. Seeds of peony obtained from field-grown plants were disinfected and zygotic embryos were excised. For germination, excised embryos were cultured on the Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 3% (w/v) sucrose, 0.8% (w/v) agar, and different concentrations of N6 benzyl-adenine (BA) and gibberellic acid (GA<sub>3</sub>). The greatest germination percentage (95%) was observed when embryos were cultured on the MS medium with 1.0 mg·L<sup>-1</sup> BA and 0.5 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>, and maintained at 25 ± 2°C under a 16 h photoperiod. Thirty days old cotyledon explants were cultured on the MS medium supplemented with different concentrations and combinations of plant growth regulators viz., BA, GA<sub>3</sub>, 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid (2,4-D), and

á-naphthalene acetic acid (NAA). After 90 days, the globular embryos were directly formed on the surface of explants. The highest frequency of somatic embryo induction (72.5) was obtained on the MS medium with  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA,  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA,  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>, and 0.1% (w/v) activated charcoal (AC), with a mean number of 14 embryos per explant. Maturation of globular embryos into heart- and torpedo-shape was observed on the same medium. When the torpedo-shaped embryos were transferred onto the same MS medium supplemented with  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA,  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA,  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>, and 0.1% (w/v) AC, secondary somatic embryos were observed on the surface of primary somatic embryos. When the embryos were transferred to the MS medium supplemented with  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  each of BA and GA<sub>3</sub>, all of them converted into plantlets, but their growth was very slow.

## **2. Analysis of genetic variability using RAPD markers in *Paeonia* spp. grown in Korea**

The genetic diversity and phylogenetic relationships of eleven herbaceous peonies grown in Korea were analyzed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). Twenty-four decamer RAPD primers were used in a comparative analysis of these Korean peony species. Of the 142 total RAPD fragments amplified, 124 (87.3%) were found to be polymorphic. The remaining 18 fragments were found to be monomorphic (12.7%) shared by individuals of all 11 peony species. Cluster analysis based on the presence or absence of bands was performed by Jaccard's similarity coefficient, based on Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages. Genetic similarity range was 0.39 to 0.90 with a mean of 0.64. This study offered a rapid and reliable method for the estimation of variability among different peony species which could be utilized by the breeders for further improvement of the local peony species. Also, the results propose that the RAPD marker technique is a useful tool for evaluation of genetic diversity and relationship amongst different peony species.

## **3. Shoot induction, biochemical changes during in vitro rooting in *Paeonia lactiflora* Pall 'Hortensis'**

Peony is an ornamental as well as medicinal plant which is difficult to propagate in vitro. Its major problem during in vitro culture is leaching out of phenols in the medium. It causes hindrance in growth and development. Rooting is a complex process and main step for vegetative propagation. The main objective is to propagate this plant and produce multiple copies and understand rooting phenomenon, which is usually complicated. The underground rhizomatous buds of *Paeonia lactiflora* Pall. 'Hortensis' were selected as the explants. In vitro micropropagation was carried out along with biochemical studies during rooting process. Shoot induction, axillary shoot proliferation, and rooting were established. The best initial medium for 'Hortensis' was the half-strength Murashige and Skoog (MS) medium (double-strength Ca<sup>+2</sup>) supplemented with  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  N6 benzyl-adenine (BA) and  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  gibberellic acid (GA<sub>3</sub>). Shoot induction was 100% with 6.2 shoots per explant.

Rooting was also observed on the half-strength MS medium supplemented with  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  indole-3-butyric acid (IBA) and indole-3-acetic acid (IAA). The highest percentage of rooting (15%) was observed when in vitro shoots were dipped in the full-strength liquid MS medium supplemented with  $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA without agar for five days and then transferred to the quarter strength MS medium without any plant growth regulator (PGR). The cultivar *P. lactiflora* 'Hortensis' is hard to root in vitro. The activities of peroxidase, indole acetic oxidase, polyphenolic oxidase and phenolic content have been estimated prior to and after rooting. These enzyme activities and phenolics have been reported to play a major role in rooting.

#### **4. *In vitro* propagation of *Polygonatum odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi f. *variegatum* Y.N. LEE**

A protocol for *in vitro* propagation of variegated Solomon's seal (*Polygonatum odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi f. *variegatum* Y. N. Lee) was developed. Rhizome explants were cultured on Anderson's basal nutrient (AM) medium supplemented with different concentrations and combinations of plant growth regulators. Adventitious shoots were induced directly on the surface of explants when the culture medium was supplemented with cytokinin alone. The highest frequency of shoot induction (100%) was obtained when the explants were cultured on AM medium supplemented with  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D,  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2iP, and  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ, with a mean number of 7.6 shoots. The greatest frequency of rooting (100%), with maximum mean number of 5.2 roots were obtained on half strength AM medium supplemented with  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA. The survival rate of regenerated plants transferred to the greenhouse was  $80.8 \pm 1.2\%$ . The acclimatized plants grew normally without morphological abnormalities or variations.

#### **5. Direct adventitious shoot regeneration from cotyledonary explants of *Jeffersonia dubia* Benth et. HOOK**

We investigated the effects of culture media [Murashige and Skoog (MS) or Chu (N6)] and cytokinins 2iP, BA or TDZ on adventitious shoot regeneration from cotyledonary explants of *Jeffersonia dubia*. Adventitious shoot regeneration was achieved only on N6 medium. Of the three cytokinins studied, TDZ was the most effective for shoot induction. The mean number of shoots varied among the different concentrations of TDZ studied. The frequency of shoot induction decreased with increasing concentrations of TDZ in the culture medium. The highest frequency of shoot induction (72.1%), with a mean number of 10.5 shoots was obtained on N6 medium supplemented with the lowest concentration of TDZ ( $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Callus formation was observed when the medium was supplemented with the highest concentration of TDZ ( $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

#### **6. Micropropagation of *Cotoneaster wilsonii* Nakai – A rare endemic ornamental plant**

A simple and efficient micropropagation system was developed for *Cotoneaster wilsonii* through node and shoot tip explants obtained from mature field-grown plants. Of the two explants, node explants were found to be the most effective for axillary shoot proliferation. The highest frequency of shoot induction was achieved when nodal explants were incubated on the Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0.5 mg·L<sup>-1</sup> thidiazuron (TDZ) and 0.1 mg·L<sup>-1</sup> naphthalene acetic acid (NAA) with an average of 34 shoots per explant. The microshoots were separated from the multiple shoots and subcultured on MS medium supplemented with 3% (w/v) sucrose and 0.8% (w/v) agar for further shoot growth. Maximum rooting was obtained on the half-strength MS medium supplemented with 0.5 mg·L<sup>-1</sup> indole-3-butyric acid (IBA). The in vitro-grown plantlets were successfully acclimatized in a glasshouse with 98% of survival. High concentrations of TDZ (1.5 - 2.0 mg·L<sup>-1</sup>) and repeated subcultures resulted hyperhydric shoots. Supplementation of the culture medium with silicon significantly reduced the induction of hyperhydric shoots. Increasing silicon concentration significantly decreased malondialdehyde content of the regenerated shoots. Data indicate that addition of silicon to the culture medium can effectively control hyperhydricity.

#### **7. In vitro shoot regeneration and microcorm development in *Crocus vernus* (L.) Hill**

An efficient method has been developed for in vitro regeneration of shoot and microcorm from corm explants of *Crocus vernus*. Corms were cut into 0.5-1.0 cm long segments and cultured on the SH medium supplemented with 0.5, 1.0, 2.0, or 4.0 mg·L<sup>-1</sup> 2-isopentyl adenine (2-iP), N6-benzyladenine (BA), and N6-furfuryladenine (kinetin, Kin) alone or combination with 0.5 or 1.0 mg·L<sup>-1</sup> α-naphthalene acetic acid (NAA) for shoot regeneration. Of the three cytokinins tested, BA was found to be the most effective cytokinin for shoot formation. The number of shoots induced per explant was more when BA was combined with 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA than with 1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA. The greatest percentage of shoot induction (97.2) with the mean number of 11.8 shoots per explant was obtained when the SH medium was supplemented with 2.0 mg·L<sup>-1</sup> BA and 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA. The frequency of microcorm induction was significantly affected by the concentrations of sucrose. The greatest number of 6.1 microcorms per explant was obtained when the SH medium was supplemented with 2.0 mg·L<sup>-1</sup> BA, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA and 6.0% sucrose. The microcorms formed in vitro developed daughter corms when they were cultured on this medium. Microcorms were separated from the culture and planted out in acclimatization boxes containing a commercial medium. About 85% of corms developed shoot and root after 30 days. This protocol could be utilized for genetic transformation and mass clonal propagation of *C. vernus*.

#### **8. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Crocus vernus***

A simple and efficient protocol was developed for somatic embryogenesis from corm explants of *Crocus vernus*. Microcorms obtained from field grown plants were

decontaminated and divided into several parts, cultured on the Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 3% (w/v) sucrose, 0.8% (w/v) agar, and different concentrations and combinations of plant growth regulators. Somatic embryos were induced both light and dark conditions but culturing the explants two weeks in the dark followed by three weeks under light resulted in high frequency of embryo formation. The greatest percentage of embryo induction was achieved when the explants cultured on the MS medium with  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  thidiazuron (TDZ) and  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  naphthalene acetic acid (NAA). Embryo maturation and germination were achieved on a MS medium with  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA and  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>. When the globular embryos were transferred to the MS medium containing 6% (w/v) sucrose,  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA, and  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub> resulted in the highest frequency of plant regeneration and microcorm formation. The microcorms developed new shoots when they were cultured on the half-strength MS medium with  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>.

### 9. Secondary somatic embryogenesis in *Crocus vernus* (L.) HILL

An efficient procedure for secondary somatic embryogenesis of *Crocus vernus* is described. The primary somatic embryos were induced from the corm explant of *C. vernus* on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D and  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ with a mean number of 52 somatic embryos per explant. The effects of medium formulations (Schenk and Hilderbrandt (SH), Gamborg (B5), Chu (N6), Anderson (AM), and MS and 10 and  $45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  photosynthetic photon flux density were studied for primary somatic embryo induction. The greatest number of somatic embryo induction was obtained on the SH medium amended with  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D and  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ under  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPF. The primary somatic embryos were cultured on SH medium amended with 2iP or BA, in combination with NAA for secondary somatic embryo induction. After 45 days, SH medium fortified with  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA and  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA was found to be the best for secondary embryo induction. Secondary somatic embryos were induced on the surface of globular (88.9%) and heart (95.2%) primary somatic embryos. At  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub> 92.3% embryo maturation and conversion were observed. The highest frequency (100%) of somatic embryo conversion was obtained on SH medium supplemented with  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub> and 6% (w/v) sucrose.

### 10. Micropropagation of *Rhododendron keiskei* var. *hypoglaucum* Suto and Suzuki and assessment of clonal fidelity of plantlets by RAPD

An efficient reproducible protocol has been developed for *in vitro* propagation of *Rhododendron keiskei* var. *hypoglaucum*. Nodal explants were cultured on Anderson basal nutrients (AM) medium supplemented with different concentrations and combinations of plant growth regulators for axillary shoot proliferation. The highest percentage of shoot induction (96%) was achieved when nodal explants were cultured on AM medium supplemented with  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2iP,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IAA, and  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub> with a mean of 16 shoots per explant. Individual shoots, which were grown to about 2–3 cm long, were

transferred onto a full or half strength AM medium with 0, 0.5, 1.0, 2.0 or 4.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA or NAA for rooting. The highest percentage of rooting (100%), with maximum number of 7.6 roots per shoot and the greatest root length (4.4 cm) were obtained on the half-strength AM medium supplemented with 0.5 mg·L<sup>-1</sup> IBA. Random amplified polymorphic DNA analysis confirmed that the regenerated plantlets were genetically identical to their donor plant.

# 목 차

|   |     |
|---|-----|
| 제 1 장 연구개발과제의 개요 .....                  | 141 |
| 제 1 절 연구개발의 목적과 필요성 .....               | 141 |
| 제 2 장 연구개발과제의 개요 .....                  | 145 |
| 제 1 절 국내외 기술개발 현황 .....                 | 145 |
| 제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과 .....              | 148 |
| 제 1 절 조직배양을 통한 작약 대량번식기술 개발 .....       | 148 |
| 제 2 절 조직배양을 통한 무늬등굴레의 대량번식기술 개발 .....   | 217 |
| 제 3 절 조직배양을 통한 껌껌이풀의 대량번식기술 개발 .....    | 241 |
| 제 4 절 조직배양을 통한 섬개야광나무의 대량번식기술 개발 .....  | 270 |
| 제 5 절 조직배양을 통한 번홍화의 대량번식기술 개발 .....     | 288 |
| 제 6 절 조직배양을 통한 상록성 진달래의 대량번식기술 개발 ..... | 317 |
| 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....          | 335 |
| 제 1 절 목표달성도 .....                       | 335 |
| 제 2 절 관련분야의 기술발전 기여도 .....              | 337 |
| 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....           | 338 |
| 제 1 절 실용화·산업화 계획(기술실시 등) .....          | 338 |
| 제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등 .....        | 340 |
| 제 3 절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보 계획 .....    | 341 |
| 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....       | 345 |
| 제 7 장 참고문헌 .....                        | 346 |



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적과 필요성

### 가. 귀중한 토속식물의 발굴, 보존 및 보급의 중요성

- (1) 우리나라에서 자생하면서 재배가 가능한 자생 토속식물의 비중이 점점 줄어들고 있다. 특히 과거에 우리 뜰 주변에 자생하던 귀중한 토속식물이 여러 가지 요인에 의해 변질되면서 최근에는 우리나라 토속식물을 구별하기조차 어려워진 실정이다(An et al., 2011).
- (2) 특히 급변하는 농업개방화 시대에 대응하여 우리나라 기후에 적합한 새로운 신소득작목 개발로 틈새시장을 개척하여 농업경쟁력을 높이기 위해 토속식물을 발굴하여 이것을 보존하고 우리나라 환경조건에 걸맞은 상품을 개발하여 보급하는 문제가 시급하다.
- (3) 따라서 발굴된 귀중한 우리의 토속식물을 복원하기 위하여 대량번식법을 개발하고 이를 보존하기 위한 작형 개발 및 작물로의 개발을 통해 토속식물의 가치를 발견할 수 있게 되었다.

### 나. 토속식물에 식물조직배양 이용의 중요성

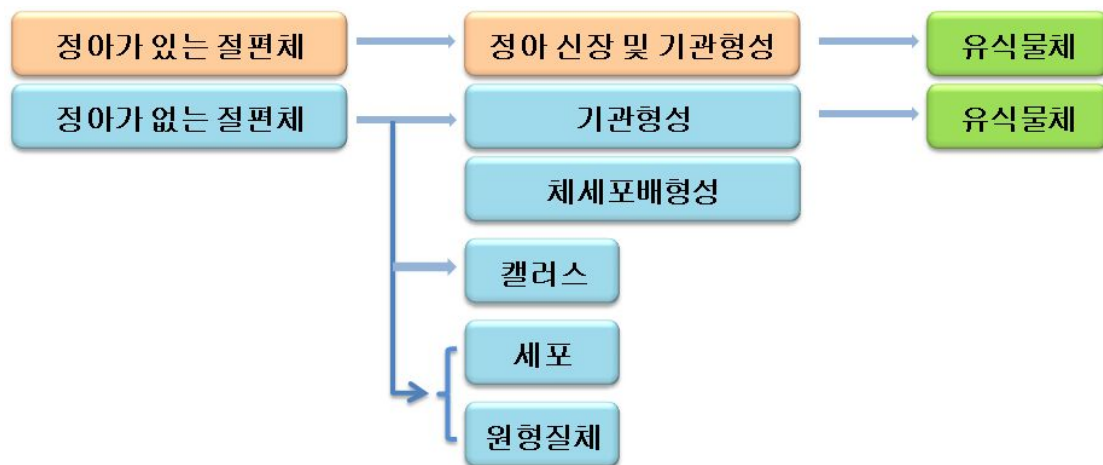
- (1) 식물조직배양은 식물조직의 일부분 또는 세포를 시험관 내에서 무균상태로 배양함으로써 캘러스나 단세포의 집단을 유기하거나 완전한 기능을 가진 식물체로 재생시키는 기술을 말하여 식물의 기내배양(in vitro culture)이라고 불리기도 한다(Carew et al., 1965).
- (2) 특히 영양번식 식물은 삼목, 접목 등의 방법으로 주로 증식하고 있으나, 어떤 종류는 증식 능력이 낮을 뿐만 아니라 시간과 노력의 소모가 많다. 그러므로 조직배양에 의한 증식은 이와 같은 문제점을 개선할 수 있을 뿐만 아니라 유전적으로 균일한 개체를 증식할 수 있는 이점이 있다(Gamborg et al., 1976).
- (3) 조직배양에 사용되는 재료로는 잎, 줄기, 뿌리, 엽병, 화경, 자엽, 그리고 인편 등의 기관이나 조직, 종자의 일부분인 배와 배유, 소포자 및 원형질체 등이 있다. 이와 같은 재료를 사용하여 배양조건에 따라 식물체로부터 적출한 조직이나 캘러스를 이용하여 새로운 기관이나 식물체를 재생시킬 수 있어 다양한 방면에 이용 가능하다(Vasil and Vasil, 1972).

### 다. 토속식물의 식물조직배양을 통한 대량번식

- (1) 조직배양기술이 가장 크게 기여한 분야 중 하나는 영양계 식물의 대량번식이다. 특히 조직배양을 통한 미세증식법은 첫째로 식물체에서 아주 작은 절편을 채취하여 배양하게 되므로 모(母)식물은 손상을 거의 받지 않게 되는 장점이 있으며 둘째로 계절적인 제한을 받지 않고 연속적인 증식이 가능하기 때문에 단시일 내로 속성증식이 가능하다. 이와 같이 시험관에서 얻어진 유식물은 순화과정을 거쳐서 대량번식이 가능하게 된다(Kozai, 1991).
- (2) 또한 식물이 병원균에 감염되면 고사하거나 생산성과 품질이 저하되는데, 바이러스에 감염된 식물을 건전한 식물로 대체하였을 경우에는 그 생산성이 30-300%까지 증가한다고 알려져 있다. 따라서 바이러스에 감염된 식물에서 무병주를 얻는 방법 중 하나는 식물의 절편 조직으로부터 캘러스를 유도하는 배양이다. 캘러스는 세포가 활발히 분열, 증식하고 있는 상태이므로 성장점과 마찬가지로 바이러스의 농도가 낮다. 즉, 이를 여러 번 계대배양한 후

캘러스로부터 식물체를 육성하면 무병주를 생산해 낼 수 있게 된다(Bhojwani et al., 1982).

- (3) 식물조직배양을 통한 대량번식법의 원리는 초대배양중인 절편체(explant) 또는 계대배양중인 영양번식체(propagule)로부터 형태형성을 유도하고 식물체를 재생시키는 것이다. 식물체의 재생은 식물재료로부터 기관형성(organogenic) 또는 체세포배형성적(somatic embryogenic) 형태형성을 통해 가능함. 기관형성에 의한 식물체 재생의 구체적인 방법은 정아신장과 부정아유도의 두 가지 경로로 대별할 수 있다. 어떤 식물은 이상의 세 경로 모두를 적용할 수 있지만, 식물에 따라서는 이 중 한 두 가지만 적용 가능한 것 있으므로 식물에 따른 다방면의 연구를 통한 대량번식법의 확립이 필요하다.



<조직배양을 통한 식물체 재분화 경로>

## 라. 기내 유묘 생산의 자동화 기술 개발

- (1) 일반적인 조직배양 배지는 반고체나 고체배지를 사용하고 있으나, 이와 같은 고체상 배지를 이용한 배양은 용량이 적은 배양용기에서만 가능하고 대규모 배양이 힘들며 경비가 많이 드는 단점이 있다. 이에 반해 액체배지는 균일한 배양액을 사용하고 또한 계속 배양액을 유동시킬 수 있고 정단우성을 줄일 수 있어 많은 싹을 생산할 수 있게 된다. 따라서 기내에서 형성된 신초의 배양을 자동으로 조절하는 시설의 개발과 운영방법의 향상은 조직배양묘의 산업화에 중요한 역할을 할 것으로 예상된다(Etienne and Berthouly, 2002).

## 2. 연구개발대상의 중요성

### 가. 작약(*Paeonia lactiflora*)의 대량번식법 및 연중생산 기술 개발

- (1) 작약은 다년생 초본식물로서 그 뿌리는 보혈, 진통, 해열, 통경, 소염, 강장약으로서 냉증, 빈혈, 부인병 등에 약효가 있는 것으로 알려져 한약재로 쓰이며 그 꽃은 아름다워 관상용으로써 그 이용가치가 높다(Tian et al., 2010).
- (2) 일반 재배 농가에서의 번식은 주로 뿌리를 이용한 영양번식에 의존하고 있는데 이러한 번식법은 모체가 특정한 병에 이병되게 되면 일시에 많은 피해를 입을 우려가 있고 번식력이 높지 못한 편이다. 또한 자연 상태에서 작약의 종자가 성숙되는데 약 4개월 이상이 소요되며, 이렇게 성숙된 종자라 하더라도 그대로 파종하게 되면 발아기간이 길 뿐만 아니라 발아율도 낮다는 것이 종자 번식의 가장 큰 문제점으로 지적되고 있다.

- (3) 또한 작약은 고소득 작물로서 그 꽃이 아름다워 고급 꽃꽂이 소재로써 사용되고 있다. 하지만 한 포기에서 한 개의 꽃만 개화하고, 개화시기를 조절할 수 없는 단점이 있어 그 진가를 발휘하지 못하고 있다.
- (4) 따라서 이와 같은 문제점을 해결하기 위하여 작약의 기내 대량번식 시스템을 통한 식물체의 확보가 필요하므로 이와 같은 연구가 수행되어야 한다.

**나. 등굴레(*Polygonatum odoratum*)의 대량번식법 및 연중생산 기술 개발**

- (1) 백합과에 속하는 다년식물로서 전국에 자생하고 있는 등굴레는 어린순을 식용이나 자양강장제로 이용되고, 뿌리역시 약용으로 쓰이기도 한다. 또한 꽃이 희고 종모양으로 아름답고, 줄기와 잎 등이 잘 어우러져 관상용으로 충분한 가치가 있어 꽃꽂이 소재로도 활용되고 있다(Yoon and Choi, 2002).
- (2) 현재 등굴레는 가공원료로 이용되고 있는 지하경을 정식하는 방법으로 재배가 이루어지고 있다. 그러나 지하경의 정식은 과도한 종근 구입비, 정식 당년의 지하경 휴면에서 오는 경제적 손실 등으로 인하여 일반농가로 재배가 확산되지 못하고 있는 실정이다. 따라서 등굴레의 가격경쟁력을 증대시키기 위하여 요구되는 대량생산 시스템 확립이 필요하다.

**다. 깽깽이풀(*Jeffersonia dubia*)의 조직배양을 통한 대량번식 및 분화 생산기술 개발**

- (1) 깽깽이풀은 매자나무과에 속하는 보호식물로 다년생 초본이며, 우리나라 전역의 깊은 산에 자생한다. 꽃은 홍자색으로 4-5월에 1-2개의 꽃대 끝에 1개씩 피는데, 관상용으로도 가치가 높다. 열매는 삭과로 타원형이며 끝이 부리처럼 길고, 종자는 타원형으로 검은색이다(Sivanesan and Jeong, 2013).
- (2) 이 식물을 선황련이라고 하며, 청열, 해독, 건위의 효능이 있을 뿐 아니라, 소화불량, 식욕감퇴, 오심, 장염, 이질, 발열건조, 결막염, 편도선염을 치료하는데 사용되어 왔고, 식중독 미생물에 대해 항균효과가 있는 것으로 밝혀져 있다.
- (3) 따라서 이를 대체하기 위하여 대량번식을 위한 번식체계 개선이나 작기를 단축하는 축성재배가 가능케 된다면 멸종 위기에 있는 아름다운 꽃인 깽깽이풀을 보호 할 뿐 아니라 일반 대중에게도 인기 있는 분화로 자리 잡을 수 있을 것이다.

**라. 섬개야광나무(*Cotoneaster wilsonii* Nakai)의 조직배양을 통한 대량번식법 개발**

- (1) 울릉도에 제한된 희귀 및 멸종위기식물로서 야생집단에 대한 현황이 알려져 있지 않은 채 환경부지정 멸종위기야생동식물로 지정되어 있다.
- (2) 바위틈에서 자생하는 식물로 하나의 줄기가 올라와 웃가지는 밑으로 처지며, 잎은 호생하고 털로 덮였으며, 양 끝이 좁고 가장자리가 밋밋함. 꽃은 양성화로 5-6월에 달려 흰색으로 피며, 열매는 길이 6 mm 내외로 가을에 익는 섬개야광나무는 추위에 강하여 원예학적 가치가 인정된다(Sivanesan et al., 2011).
- (3) 하지만 멸종위기 식물에도 불구하고 다양한 번식법에 대한 연구가 부족하므로 조직배양을 통한 대량번식을 통해 자생지를 확보하고 종의 멸종을 방지할 수 있다.

**마. 번홍화(*Crocus sativus*)의 조직배양을 통한 대량번식법 개발**

- (1) 번홍화는 붓꽃과에 속하는 다년생 초본으로서 높이 15cm 정도 자라며 가을에 꽃을 피우는

데, 이 꽃의 암술대를 채집하여 말린 것을 번홍화라고도 한다.

- (2) 지름 3cm 가량 되는 납작한 공 모양의 알뿌리(구근)에서 줄모양(선형)의 잎이 모여 나며, 10-11월이 되면 잎 사이에서 꽃줄기가 올라와 끝에 한 송이 보랏빛 꽃이 핀다(Plessner et al., 1990).
- (3) 암술대는 길이 2.5-4cm이며 붉은 색에 가까운 진한 주황빛으로 위쪽은 세 갈래로 길게 갈라져 있고 밑동은 붙어 있는데 말리면 실고추 비슷하며, 수술은 세 개로 노란색 꽃가루로 덮여있음. 2-3주 후 꽃이 진 다음 잎이 자란다.
- (4) 한 철에 하나의 구근에서 2-9개의 꽃이 피는데 꽃마다 한 개의 암술대가 있으므로, 1g의 번홍화를 얻으려면 500개의 암술을 핀셋으로 일일이 채취하여 말려야 하는 수작업이므로 번홍화는 가장 값비싼 향신료로 팔리고 있다.
- (5) 이와 같은 재배적 가치에도 불구하고 현재까지 조직배양에 대한 연구가 거의 없으므로 조직배양을 통한 대량번식법 개발이 필요하다.

## 제 2 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절 국내외 기술개발 현황

#### 1. 국내외 연구현황

##### 가. 국외현황

- (1) 미국에서는 미시간주립대학이 주도가 되어 자생 속근류들에 대하여 원예화 하는 실험이 오랫동안 수행되어 대량번식과 개화조절방법이 일반화되어 상품화되고 있다.
- (2) 초본성 작약과 가까운 관계에 있는 목본성 작약(*Paeonia suffruticosa*)의 경우 일본에서 많은 연구가 진행되어왔다. 화아 형성과 발달의 해부학적 연구(Hosoki et al., 1989), 휴면에 미치는 온도의 영향(Aoki, 1992), 휴면 타파를 위한 화학물 처리(Hosoki et al., 1989), PGR 을 이용한 초장조절(Hamada et al., 1990)등이 이루어져 있다.
- (3) 초본성 작약(*Paeonia lactiflora*)은 번식에 있어 대량 생산을 위한 조직배양이 연구(Habib et al., 2000; Hansen et al., 1995)가 연구되었다고 하지만 아직 현실적으로 활용되지 못하고 있다.
- (4) 휴면타파와 화아의 발달을 위해서는 6℃에서 40일간의 저온 처리가 필요하다고 했으며(Halevy et al., 2002), Kamenetsky는(2003)에 6℃에서 10주, 2℃에서는 8.6주가 요구된다고 조사하였다. 휴면타파에 GA 처리가 부분적인 효과가 있음이 밝혀졌으며(Halevy et al., 2002), 일장은 저온 처리 기간, 생육 전 기간에 걸쳐 개화에 영향을 주지 못한다고 보고 되어있다. 꽃 수확 이후에 저온 처리를 통해 단, 장기간의 절화 저장이 가능하다.

##### 나. 국내현황

- (1) 서울대 화훼학 연구실에서는 과학기술부 산하 자생식물이용기술개발사업의 일환으로 자생 화훼식물의 탐색 및 특성조사 등을 행해왔다. 본 연구에서 산업화하고자 하는 식물들은 지금까지 연구에서 관상가치가 높아 산업화가 유망하다고 판단된 식물들이다.
- (2) 깽깽이풀은 노지에서는 5월에 종자를 채취할 수 있으며 과중상에 바로 직파하면 2-4년이 지났을 때 비로소 개화를 할 수 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 분화로 생산하기 위해서는 2-4년으로 긴 유년기를 단축할 수 있는 기술이 필요하다.
- (3) 작약은 국내에 소개된 축성 재배는 무가운, 가운재배로 나뉘며, 무가운 재배는 4월에 개화하여 수확 할 수 있다. 가운재배는 3월 중순에 절화 수확이 가능하며 뿌리를 캐내어 0℃에서 50-60일 정도 휴면타파를 시킨 후 가운 재배를 하면 2월에도 수확이 가능하다. 역제 재배는 뿌리를 캐고 -2℃에서 냉장 보관하였다가 정식하여 재배를 한다.
- (4) 앞으로 시설을 이용한 축성, 반축성 재배가 이루어질 전망이지만 현재는 대부분 난지노지 재배에 의존하고 있다. 일장이 개화소요일수에는 영향을 주지 않지만 단일 조건에서는 정상 개화율이 낮아지고 꽃잎이 충분히 전개되지 않는 현상이 발견되기도 한다. 휴면타파를 위한 요구 온도 및 기간이 정확하게 명시되어 실제 재배에 활용되고 있지 못하고 있으며 일장에 반응을 하지 않는다고 알려졌지만 단일 조건에서 개화의 상태 및 품질이 좋지 않아 장일 효과의 구명을 통한 기술 보급이 필요하다.

- (5) 등굴레는 곳곳이에 활용되고 있는 무늬등굴레의 재배시에 고풍도가 업색을 흐리게 하여 차광재배를 수행하여 30% 차광망을 사용하였을 때 수량 및 상품성이 좋은 것으로 보고되었다.
- (6) 축성재배를 위해 5°C이하에서 366시간 이상 저온처리를 하였을 때 휴면타파가 이루어 졌으며 GA처리는 큰 효과를 보이지 않는 것으로 나타났다.
- (7) 연중 생산을 위한 축성 재배를 할 때에 저온 최소 요구 기간에 대해 더 구명해야할 필요가 있으며 억제 재배를 위한 저온 저장 기간에 대한 연구가 이루어져야 할 필요가 있다.

## 2. 문제점 및 전망

- 가. 깽깽이풀, 복수초, 갯패랭이, 갯까치수영, 왜성털부처, 번홍화, 섬개야광나무, 노루귀, 바위솔, 천남성, 작약, 등굴레와 같은 토속화훼식물들은 관상가치가 매우 높은 우리나라 토속식물들이다.
- 나. 관상가치가 높은 식물을 산업화하기 위해서는 무엇보다 저비용으로 대량증식이 가능하여야 하고 저에너지(저비용)로 고품질 생산이 가능해져야 하나, 현재 연구대상 식물들은 아직까지 대량증식체계가 확립되어 있지 않고 고품질 생산기술에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.
- 다. 종자번식은 가장 비용이 적게 드는 효율적인 번식 방법이다. 그러나 많은 토속식물들의 종자는 채종후 휴면에 들어가는 경우가 대부분이고, 휴면을 타파하는 데는 짧게는 1개월에서 3개월 이상 저온처리를 필요로 함. 일부 식물들은 파종 2년째에 발아가 되는 등 종자번식이 쉽지 않는 경우가 있다.
- 라. 그러나 본 연구에서 종자 휴면기작이 밝혀지고 휴면타파 기술과 종자번식 기술이 확립된다면 손쉽게 농가들이 재배가 가능해질 것으로 기대된다.
- 마. 한편, 종자번식이 도저히 불가능한 경우는 조직배양 기술을 이용해야 한다. 조직배양기술은 영양계식물의 급속한 대량번식, 무병 식물체 생산에 의한 생산성과 품질향상, 신품종 육성, 유용 2차대사산물의 생산, 그리고 생식질의 보존과 교환을 목적으로 사용되며 현대 농업에 없어서는 안 될 중요한 기술 중의 하나이다.
- 바. 하지만 현재까지 조직배양을 이용한 대량번식 시스템의 개발에 대한 연구는 몇몇 보고를 제외하고 아직도 식물체 재분화 효율 향상, 배발생 켈러스와 비배발생 켈러스, 그리고 켈러스 형태에 대한 연구도 이루어지고 있지 않은 실정이다.
- 사. 따라서 이러한 배양법이 확립된다면 식물의 품질과 생산성 향상에 크게 기여할 뿐만 아니라 균일한 우량묘를 대량으로 생산하고, 더 나아가 품종개량의 재료로써도 사용될 수 있어 무한한 가능성이 있을 것이다.
- 아. 또한 토속화훼식물들은 겨울에 지상부는 마르고 지하부는 휴면에 들어가는 경우가 많다. 이들 식물은 일정 기간 저온을 경과한 후에야 새롭게 생장을 시작하게 되어, 재배기간이 너무 길어서 산업화하는데 장애요인이 된다. 따라서 본 연구결과, 식물체 휴면기작이 밝혀지고 인위적으로 휴면을 타파하거나 휴면을 회피하는 기술이 확립된다면 재배기간을 훨씬 줄일 수 있어 경쟁력이 제고될 것으로 기대된다.
- 자. 또한 키가 너무 커서 분화로써 개발이 어려운 식물을 식물생장억제제를 이용하거나, 재배 기술을 이용하여 관상가치가 높은 분화를 생산할 수 있게 된다면 상당한 수요가 예상된다.
- 차. 따라서 많은 농민들에게 이와 같은 새로운 소득 작물로 환영받게 되고 곧바로 생산체제로

이용될 수 있다. 더구나 이와 같은 식물은 국내 자생식물로 외국에서 종자를 수입하지 않더라도 쉽게 구할 수 있어 농민들은 쉽게 재배가 가능하다.

카. 이러한 이유들로 본 연구결과 얻어진 재배기술과 대량번식법 개발은 반드시 산업화와 직결되어 농민들의 소득향상과 직결될 수 있다고 확신한다.

# 제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

## 제 1 절 조직배양을 통한 작약 대량번식기술 개발

### 1. 작약(*Paeonia lactiflora*) 기내 번식법 개발

#### 가. 작약 배배양을 통한 무균기내 번식 실험

##### (1) 연구목적

작약은 미나리아재비과(Ranunculaceae) 또는 작약과(Paeoniaceae)에 속하는 초본성 식물이다. 오래 전부터 뿌리가 한약재로 널리 이용되면서 생약재로 이용하기 위한 목적으로 많이 재배되었다. 그 주요 성분은 Paeoniflorin이다. 우리나라에서는 관상 화훼용으로 이용하기 위한 육종 연구는 극히 미비한 실정이다. 그래서 현재는 혼계집단 상태로 재배하고 품종의 개념에서 생산관리 되는 부분이 없는 형편이다. 작약의 종묘 번식은 주로 뿌리의 뇌두를 분주하는 방식을 이용하는데 병해충 감염과 선충의 피해가 많고 그 기간이 오래 걸리는 단점이 있다. 또한 실생묘 번식 방법도 경실종자로서 파종하는데 30-40일간 층적처리를 통하여 최아 후 파종을 하지만 발아율이 저조한 형편이다. 따라서 최근 화단용이나 절화용으로 주목받고 있는 작약의 대량생산을 위하여 조직배양 방법을 도입하고자 한다.

성숙배를 이용한 배배양은 많은 작물에서 연구가 이루어지고 있다. 반수체 생산, 육종연한의 단축 등에도 활용이 되지만, 특히 처음 기내로 식물을 도입하는 단계에서는 멸균을 위하여 아주 강하게 소독할 필요성이 있는데 종자의 경우 강한 소독이 가능하고, 종자 안에 존재하는 배의 경우 오염도가 매우 낮으므로 이러한 배를 적출하여 이용하는 배배양은 무균배양 시작단계에서 이용하기에 매우 효과적인 방법이다.

작약의 생활환을 살펴보면 가을부터 겨울동안 지상부가 죽고 뿌리만 겨울을 나는 숙근성 작물이다. 따라서 종자의 배가 성숙하고 성장하기 위해서는 저온이 필요한데 이러한 조건을 충족하기 위하여 배양 온도를 다양하게 처리하고 여러 가지 성장조절제를 처리할 필요성이 있다. 본 실험에서는 작약의 성숙종자의 배를 적출하여 다양한 배양온도와 성장조절제 처리 배지를 이용하여 무균기내 번식을 하였다.

##### (2) 재료 및 방법

###### (가) 실험재료 및 멸균 소독방법

작약 종자는 경남 진주시 사봉면에 위치한 작약농장에서 8월 25일 채취하였다. 작약 꼬투리를 제거하고 종자만 다음과 같은 방법으로 소독하였다. 1차로 70%(v/v) EtOH에 1분 처리하고, 멸균수로 3회 세척하였다. 그리고 Tween 20 1방울을 떨어뜨린 1.5%(v/v) NaOCl을 이용하여 10분간 처리하고 다시 멸균수로 3회 세척하였다. 그리고 2차로 70%(v/v) EtOH에 1분 처리하고, 멸균수로 3회 세척 후 Tween 20 1방울을 떨어뜨린 1.5%(v/v) NaOCl을 이용하여 20분 처리하고 다시 멸균수로 4-5회 세척하여 멸균하였다. 멸균된 종자에서 종피와 배유를 제거하고 성숙된 배만을 적출하여 처리별로 성장조절제가 들어 있는 MS배지에 치상하였다(Fig. 1-1-1).



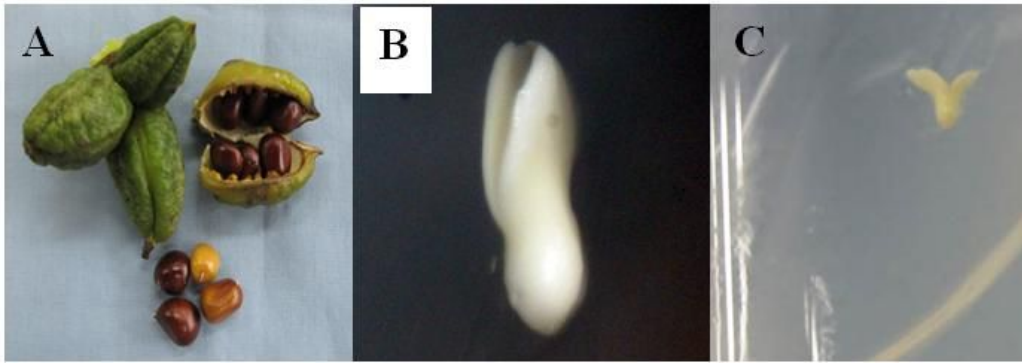


Fig. 1-1-1. A, seeds of *P. lactiflora*; B, excised embryo; and C, embryo inoculated in MS medium supplemented with BA and GA<sub>3</sub> after 7 days.

(나) 배양배지

기본배지는 MS배지를 사용하였고, sucrose 3%(w/v)를 이용하였다. 처리별 성장조절제 조성은 Table 1-1-1과 같다. pH는 5.70-5.80으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121℃에서 15분간 고압멸균 하였다. test tube에 10 mL씩 분주하여 각각의 처리당 3반복으로 실험배지에 배를 치상하였다(Fig. 1-1-2).

Table 1-1-1. Culture conditions tried for the growth of zygotic embryos of *P. lactiflora*.

| Temp. (°C) | PGR (mg·L <sup>-1</sup> ) |     | Treatment no. |
|------------|---------------------------|-----|---------------|
|            | GA <sub>3</sub>           | BAP |               |
| 25         | 0.0                       | 0.0 | 1             |
|            | 0.3                       | 0.0 | 2             |
|            | 0.5                       | 0.0 | 3             |
|            | 0.0                       | 0.5 | 4             |
|            | 0.0                       | 1.0 | 5             |
|            | 0.3                       | 0.5 | 6             |
|            | 0.3                       | 1.0 | 7             |
|            | 0.5                       | 0.5 | 8             |
|            | 0.5                       | 1.0 | 9             |
| 15         | 0.0                       | 0.0 | 10            |
|            | 0.3                       | 0.0 | 11            |
|            | 0.5                       | 0.0 | 12            |
|            | 0.0                       | 0.5 | 13            |
|            | 0.0                       | 1.0 | 14            |
|            | 0.3                       | 0.5 | 15            |
|            | 0.3                       | 1.0 | 16            |
|            | 0.5                       | 0.5 | 17            |
|            | 0.5                       | 1.0 | 18            |



Fig. 1-1-2. Embryo inoculated in MS medium supplemented with BA and GA<sub>3</sub> after 2 days.

(다) 배양환경

배양온도는 25±1℃와 15±1℃로 각각 설정하였고, 상대습도 70-80%인 배양실에서 명기 16시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

(3) 결과 및 고찰

실험결과 모든 처리구에서 오염이 발생되지 않았다. 앞으로 계속 배배양을 위한 멸균방법은 본 실험에서 이용된 멸균방법으로 소독할 것이다. 또한 모든 처리구에서 배의 자엽이 전개되거나 뿌리가 자라는 모습이 관찰되었으므로 전 처리구에서 100% 발아하였다. 따라서 본 실험결과 작약 무균식물체 기내배양을 성공적으로 수행할 수 있었다.

배양 초기 단계에는 BAP 첨가 또는 GA<sub>3</sub>와 BAP 혼용처리에서 자엽이 전개되면서 녹색으로 변하였으나 성장조절제가 첨가되지 않은 무처리 또는 BAP가 첨가되지 않은 GA<sub>3</sub> 단용처리에서는 뿌리의 발달은 진행되었으나 배의 자엽이 녹색으로 변하지 못하고 백색을 띠는 모습이었다(Fig. 1-1-3). 배양 초기에는 배양 온도에 따른 큰 차이는 없었다.

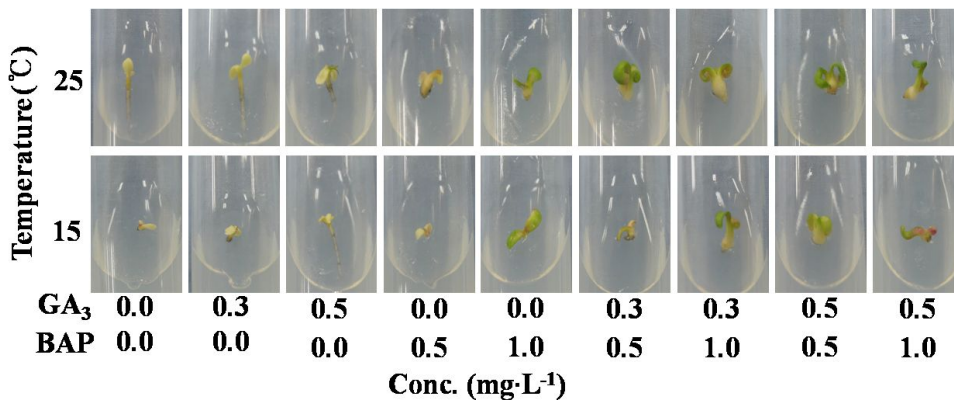


Fig. 1-1-3. Zygotic embryo growth in *P. lactiflora* after 2 weeks on MS medium supplemented with different concentrations of BA and GA<sub>3</sub> under both (25 and 15) temperature conditions.

배배양 16주 후 생육을 조사한 결과 신초의 길이, 뿌리의 길이, 엽수 및 신초수 등 모든 항목에서 배양온도와 성장조절제 처리 간에 유의적인 차이를 보였다(Table 1-1-2).

25℃에서 배양된 BAP 0.5 mg·L<sup>-1</sup>와 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 각각 단용 처리구에서 자엽은 전개되고 뿌

리는 발달 하였지만 신초의 생장이 없었다. 역시 15°C에서는 배양된 BAP 0.5 mg·L<sup>-1</sup>와 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 각각 단용 처리구는 신초의 생장이 8.3 mm와 9.3 mm로 매우 저조하였다. 15°C 배양 온도에서 GA<sub>3</sub> 0.3 mg·L<sup>-1</sup>와 BAP 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 혼합 처리구에서 신초의 길이가 47.6 mm로 가장 길었다. GA<sub>3</sub> 단용 또는 GA<sub>3</sub>와 BAP 혼합 처리구에서 대부분 신초의 길이가 길었고, 특히 15°C 배양온도에서 더욱 생육이 좋은 것으로 나타났다. 25°C 처리구의 경우 노화가 빨리 진행되는 모습을 보였다. 뿌리 길이의 경우 GA<sub>3</sub> 단용처리에서 더 길게 나타났다. 엽수의 경우 GA<sub>3</sub> 0.5 mg·L<sup>-1</sup>와 BAP 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 혼합 처리구에서 6.6개로 가장 많았다(Fig. 1-1-4).

본 실험의 결과 작약의 성숙배를 이용한 기내 번식의 경우 초기 배양온도는 15°C정도 저온으로 유지하고 성장조절제는 GA<sub>3</sub> 0.3 mg·L<sup>-1</sup>와 BAP 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 혼합 처리배지에서 생육하는 것이 좋은 것으로 생각된다.

Table 1-1-2. Growth parameters of the zygotic embryos as recorded after 16 weeks.

| Temp. (°C)<br>(A) | PGR (mg·L <sup>-1</sup> ) (B) |     | Shoot length<br>(mm) | Root length<br>(mm) | No. of<br>leaves | No. of<br>shoots |
|-------------------|-------------------------------|-----|----------------------|---------------------|------------------|------------------|
|                   | GA <sub>3</sub>               | BAP |                      |                     |                  |                  |
| 25                | 0.0                           | 0.0 | 1.6 fg <sup>z</sup>  | 25.6 cde            | 1.0 gh           | 1.0 bc           |
|                   | 0.3                           | 0.0 | 40.0 ab              | 40.0 ab             | 3.6 cdef         | 1.3 ab           |
|                   | 0.5                           | 0.0 | 45.0 a               | 50.0 a              | 2.0 fg           | 1.0 bc           |
|                   | 0.0                           | 0.5 | 0.0 g                | 32.6 bc             | 0.0 h            | 0.0 d            |
|                   | 0.0                           | 1.0 | 0.0 g                | 8.3 f               | 0.0 h            | 0.0 d            |
|                   | 0.3                           | 0.5 | 16.0 cdef            | 27.6 bcd            | 3.0 def          | 1.0 bc           |
|                   | 0.3                           | 1.0 | 13.3 defg            | 14.3 def            | 2.3 efg          | 1.0 bc           |
|                   | 0.5                           | 0.5 | 17.3 cde             | 13.3 ef             | 2.0 fg           | 1.0 bc           |
|                   | 0.5                           | 1.0 | 27.6 bcd             | 10.6 f              | 4.0 cde          | 1.6 a            |
|                   | 15                            | 0.0 | 0.0                  | 4.0 efg             | 36.0 bc          | 1.0 gh           |
| 0.3               |                               | 0.0 | 44.3 a               | 37.3 abc            | 4.3 bcd          | 1.3 ab           |
| 0.5               |                               | 0.0 | 29.0 bc              | 28.6 bc             | 5.0 abc          | 1.0 bc           |
| 0.0               |                               | 0.5 | 8.3 efg              | 9.3 f               | 2.6 defg         | 1.0 bc           |
| 0.0               |                               | 1.0 | 9.3 efg              | 9.3 f               | 1.0 gh           | 0.6 c            |
| 0.3               |                               | 0.5 | 47.6 a               | 10.6 f              | 5.0 abc          | 1.0 bc           |
| 0.3               |                               | 1.0 | 39.3 ab              | 14.0 def            | 6.0 ab           | 1.3 ab           |
| 0.5               |                               | 0.5 | 41.6 ab              | 13.3 ef             | 6.6 a            | 1.0 bc           |
| 0.5               |                               | 1.0 | 38.3 ab              | 9.3 f               | 3.0 def          | 1.0 bc           |
| F-test            |                               | A   |                      | *** <sup>y</sup>    | *                | ***              |
|                   | B                             |     | ***                  | ***                 | ***              | ***              |
|                   | A*B                           |     | **                   | *                   | ***              | **               |

<sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test,  $P \leq 0.05$ .

<sup>y</sup>NS, \*, \*\*, \*\*\* Nonsignificant or significant at  $P=0.05$ , 0.01 or 0.001, respectively.

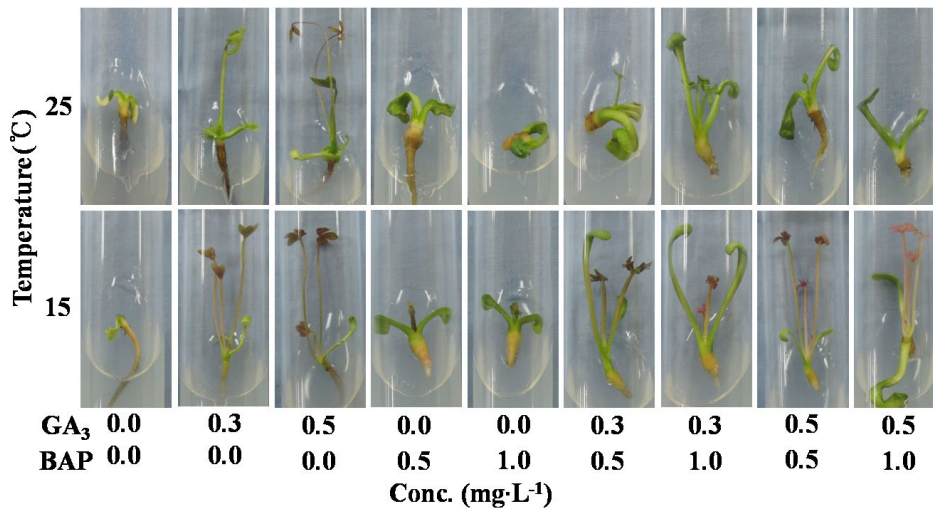


Fig. 1-1-4. Zygotic embryo growth in *P. lactiflora* after 16 weeks on MS medium supplemented with different concentrations of BA and GA<sub>3</sub> under both (25 and 15) temperature conditions.

#### 나. 작약 신초배양을 통한 기내번식 예비실험

##### (1) 연구목적

오래 전부터 우리나라에서도 작약을 재배하였으나 뿌리를 약재로 이용하거나 정원수로 이용을 하였으므로 전문적인 육종은 극히 미비한 실정이었다. 따라서 지금까지는 혼계집단 상태로 재배하고 품종의 개념에서 생산관리 되는 부분이 거의 없었다. 현재 작약을 절화로서 특히 신부 부케로 이용이 많아지면서 흰색의 겹꽃에 대한 수요가 점점 늘고 있으나 작약의 종묘 번식은 주로 뿌리의 뇌두를 분주하는 방식으로 분주에 보통 3-4년의 기간이 소요되므로 좋은 품종을 빨리 번식하는데 그 기간이 오래 걸리는 단점이 있다. 또한 병해충 감염과 선충의 피해가 많았다. 형질이 우수한 좋은 품종을 모본 그대로 빠른 시간에 대량생산 할 수 있는 방법이 필요하므로 조직배양을 통한 기내 번식법을 이용하였다. 따라서 무엇보다도 먼저 선행되어야 할 것은 기외의 식물체를 기내로 도입 하는 문제인데 많은 미생물의 오염원을 완전히 제거한 무균상태의 배양체를 만들고자 다양한 절편체를 이용하였다. 본 실험에서는 새로 생성되는 어린눈, 즉 신초를 이용하여 조직배양을 실시하였다. 신초의 경우 많은 비늘에 싸여 있으므로 처음 기내로 식물을 도입하는 단계에서 멸균을 위하여 강하게 소독을 실시하는데 문제가 없고, 모본과 동일한 영양체를 번식 할 수 있다는 장점이 있다.

작약의 생활환을 살펴보면 가을부터 겨울동안 지상부가 죽고 뿌리만 겨울을 나는 숙근성 식물이다. 따라서 신초가 성숙하고 성장하기 위해서는 저온을 필요로 하는데 이러한 조건을 충족하기 위하여 배양 온도를 다양하게 처리하고 여러 가지 성장조절제를 처리할 필요성이 있다. 따라서 작약의 신초를 멸균하고 정아만 적출하여 다양한 배양온도와 성장조절제를 처리한 배지에서 기내 배양하였다.

##### (2) 재료 및 방법

###### (가) 실험재료 및 멸균 소독방법

작약 신초는 경남 진주시 사봉면에 위치한 작약농장에서 2009년 8월 25일에 채취하였다

(Fig. 1-1-5). 싹을 싸고 있는 비늘을 2-3겹을 제거하고 소독하였다. 1차로 70%(v/v) EtOH에 1분 처리하고, 멸균수로 3회 세척하였다. 그리고 Tween 20 1방울을 떨어뜨린 1.5%(v/v) NaOCl을 이용하여 10분간 처리하고 다시 멸균수로 3회 세척하였다. 싹을 싸고 있는 비늘을 약 2겹 정도 더 제거하고 2차로 70%(v/v) EtOH에 1분 처리하고, 멸균수로 3회 세척 후 Tween 20 1방울을 떨어뜨린 1.5%(v/v) NaOCl을 이용하여 20분 처리하고 다시 멸균수로 4-5회 세척하여 멸균하였다. 멸균된 싹에서 남은 비늘을 모두 제거하고 정아만을 적출하여 처리별로 성장조절제가 들어 있는 MS배지에 치상하였다.

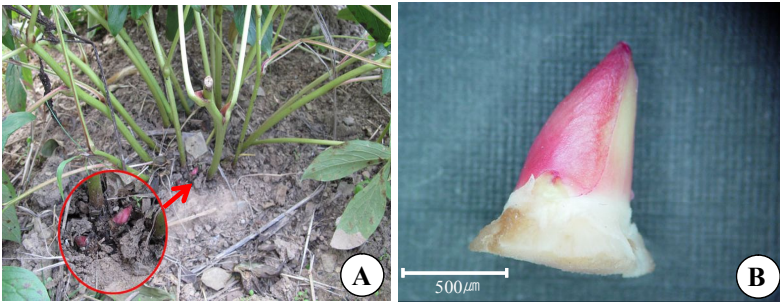


Fig. 1-1-5. Shoots of *P. lactiflora*.

(나) 배양배지

기본배지는 MS배지를 사용하였고, sucrose 3%(w/v)를 이용하였다. 처리별 성장조절제 조성은 Table 1-1-3과 같다. pH는 5.70-5.80으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121℃에서 15분간 고압멸균 하였다. test tube에 각각 10 mL씩 분주하였다.

Table 1-1-3. Temperature and concentrations of plant growth regulators used this experiment.

| Temp. (°C) | PGR (mg·L <sup>-1</sup> ) |     | Treatment no. |
|------------|---------------------------|-----|---------------|
|            | GA <sub>3</sub>           | BAP |               |
| 25         | 0.0                       | 0.0 | 1             |
|            | 0.3                       | 0.0 | 2             |
|            | 0.5                       | 0.0 | 3             |
|            | 0.0                       | 0.5 | 4             |
|            | 0.0                       | 1.0 | 5             |
|            | 0.3                       | 0.5 | 6             |
|            | 0.3                       | 1.0 | 7             |
|            | 0.5                       | 0.5 | 8             |
|            | 0.5                       | 1.0 | 9             |
| 15         | 0.0                       | 0.0 | 10            |
|            | 0.3                       | 0.0 | 11            |
|            | 0.5                       | 0.0 | 12            |
|            | 0.0                       | 0.5 | 13            |
|            | 0.0                       | 1.0 | 14            |
|            | 0.3                       | 0.5 | 15            |
|            | 0.3                       | 1.0 | 16            |
|            | 0.5                       | 0.5 | 17            |
|            | 0.5                       | 1.0 | 18            |

(다) 배양환경

배양온도는 25±1°C와 15±1°C로 각각 설정하였고, 상대습도 70-80%인 배양실에서 명기 16시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

(3) 결과 및 고찰

실험결과 거의 대부분의 처리구에서 오염이 발생되지 않았으나 25°C 배양 온도 처리구에서 오염이 한개 발생하였다. 그리고 25°C 처리구에서는 모든 성장조절제 처리구에 치상한 절편체가 까맣게 변하고 고사하였다. 15°C 배양온도 처리구에서는 각각의 성장조절제 단용처리보다는 GA<sub>3</sub>와 BAP 혼용처리에서 신초가 발생하였다(Fig. 1-1-6). 따라서 본 실험결과 신초를 이용한 작약 무균식물체 배양을 위해서는 멸균 소독방법에 크게 문제가 없음을 알 수 있었고, 배양 온도는 15°C 정도로 설정하고자 한다. 또한 치상된 신초의 정아와 배지 접촉면이 변색되는 것은 작약에서 발생하는 페놀물질로 추정이 되므로 향후 활성탄을 배지에 첨가하는 것이 더 바람직하다고 판단된다.

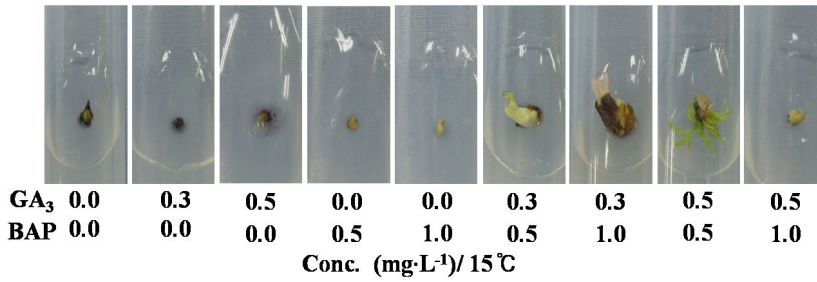


Fig. 1-1-6. Zygotic embryo growth in *P. lactiflora* after 15 weeks on MS medium supplemented with different concentrations of BA and GA<sub>3</sub> under 15°C.

## 다. 작약의 신초배양을 통한 여러 가지 생장조절제 기내번식 실험

### (1) 연구목적

신초배양 예비실험 실시 결과 소독방법과 배양 온도에 대한 대략적인 결과를 알 수 있었으나 신초 채취시기가 여름이었고, 실험의 반복수가 너무 작았으므로 재 실험하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 실험재료 및 멸균 소독방법

2009년 12월 29일에 경남 진주시 사봉면에 위치한 작약농장에서 휴면중인 뇌두를 땅속에서 파내서 신초를 채취하였다. 실험재료는 2가지 흰색 겹꽃을 이용하였다. 품종으로 고정되지 않은 야생종으로 가칭 PS2, PS3으로 명명하였다(Fig. 1-1-7). 신초를 싸고 있는 비늘을 2-3겹 제거하고 소독하였다. 1차로 70%(v/v) EtOH에 1분 처리하고, 멸균수로 3회 세척하였다. 그리고 Tween 20 1방울을 떨어뜨린 1.5%(v/v) NaOCl을 이용하여 10분간 처리하고 다시 멸균수로 3회 세척하였다. 신초를 싸고 있는 비늘을 약 2겹 정도 더 제거하고 2차로 70%(v/v) EtOH에 1분 처리하고, 멸균수로 3회 세척 후 Tween 20 1방울을 떨어뜨린 1.5%(v/v) NaOCl을 이용하여 20분 처리하고 다시 멸균수로 4-5회 세척하여 멸균하였다. 멸균된 신초에서 남은 비늘을 모두 제거하고 정아만을 적출하여 처리별로 생장조절제가 들어 있는 MS배지에 치상하였다(Fig. 1-1-8).

#### (나) 배양배지

기본배지는 MS배지를 사용하였고, sucrose 3%(w/v)를 이용하였다. 처리별 생장조절제 조성은 Table 1-1-4와 같다. pH는 5.70-5.80으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)와 활성탄 0.1%(w/v)를 첨가한 후, 121°C에서 15분간 고압멸균 하였다. 각각 처리별로 test tube에 10 mL씩 분주하였다. 실험은 3반복으로 실험하였다.

#### (다) 배양환경

배양온도는 15±1°C로 설정하였고, 상대습도 70-80%인 배양실에서 명기 16시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형 광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.



Fig. 1-1-7. Underground rhizomatous buds of *P. lactiflora* used this experiment. A, *P. lactiflora* 'PS2' buds at between closed and sprouting stage; B, *P. lactiflora* 'PS2' buds at between closed and sprouting stage.

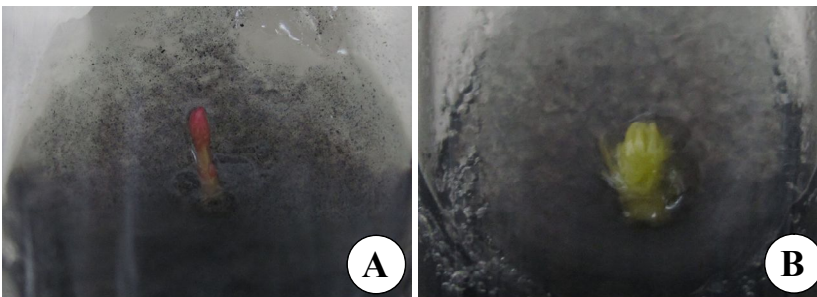


Fig. 1-1-8. Buds inoculated on the culture medium for shoot induction. A, 'PS2' buds; B, 'PS3' buds.

Table 1-1-4. Concentrations of plant growth regulators used this experiment.

| Treatment no. | PGR (mg·L <sup>-1</sup> ) |                 |     |     |     |     |
|---------------|---------------------------|-----------------|-----|-----|-----|-----|
|               | BAP                       | GA <sub>3</sub> | IAA | 2iP | NAA | TDZ |
| 1             | 0                         | 0               | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 2             | 0.5                       | 0.5             | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 3             | 1.0                       | 0.5             | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 4             | 0.5                       | 0               | 0.5 | 0   | 0   | 0   |
| 5             | 1.0                       | 0               | 0.5 | 0   | 0   | 0   |
| 6             | 0                         | 0               | 0   | 1.0 | 0.5 | 0   |
| 7             | 0                         | 0               | 0   | 2.0 | 0.5 | 0   |
| 8             | 0                         | 0               | 0   | 0   | 0.1 | 0.5 |
| 9             | 0                         | 0               | 0   | 0   | 0.1 | 1.0 |

### (3) 결과 및 고찰

실험재료로 이용하는 절편체 동지아의 신초는 겨울에 발생하는 것으로 연구진행이 12월에 진행되었다. 본 실험은 현재 배양실에서 실험이 진행되고 있는데 오염발생이 없었으므로 무균 배양 식물체의 획득에는 문제가 없다. 또한 작약의 생육이 느려서 배양 기간이 오래 걸려도 이미 작약 기내 배양체를 획득하였으므로 2차년도 실험에는 문제가 없다. 본 실험의 최종적인 결과는 향후 더 지켜보아야 할 것이며, 모든 실험 처리구는 현재 배양실에서 생육 중에 있다.

### 라. 하절기 작약 신초의 기내도입을 통한 대량번식 실험



### (1) 연구목적

작약 대량번식 프로토콜을 만들기 위한 제반 실험을 실시하고자 한다면 우선 무엇보다도 실험재료 확보가 가장 우선되어야 한다. 작약 식물재료 확보를 우선 목표로 본 실험을 진행하였다. 절화 작약의 경우 겹꽃이 연구대상인데 이 겹꽃의 안쪽에 있는 수술들은 꽃잎으로 변하는 경우가 많아서 종자를 형성할 수 없다. 따라서 겹꽃의 경우 배배양을 통한 기내도입 방법에 한계가 있으므로 하절기에 발생된 신초를 이용하여 조직배양을 위한 기내도입 실험을 하였다. 신초의 경우 1차년도 멸균소독 방법에서 안정적인 결과를 얻었기 때문에 1차년도와 동일한 방법으로 실험 하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 실험재료 및 멸균 소독방법

작약 신초는 경남 진주시 사봉면에 위치한 작약농장에서 채취하여 2010년 8월 17일에 실시하였다. 신초를 싸고 있는 비늘을 2-3겹을 제거하고 소독하였다. 1차로 70%(v/v) EtOH에 1분 처리하고, 멸균수로 3회 세척하였다. 그리고 Tween 20을 1방울 떨어뜨린 1.5%(v/v) NaOCl을 이용하여 10분간 처리하고 다시 멸균수로 3회 세척하였다. 신초를 싸고 있는 비늘을 약 2겹 정도 더 제거하고 2차로 70%(v/v) EtOH에 1분 처리하고, 멸균수로 3회 세척 후 Tween 20을 1방울 떨어뜨린 1.5%(v/v) NaOCl을 이용하여 20분 처리하고 다시 멸균수로 4-5회 세척하여 멸균하였다. 멸균된 신초에서 남은 비늘을 모두 제거하고 정아와 액아를 적출하여 처리별로 생장 조절제가 들어 있는 MS배지에 치상하였다.

#### (나) 배양배지

기본배지는 MS배지를 사용하였고, sucrose 3%(w/v)를 이용하였다. 처리별 생장조절제 조성은 1차년도 실험 결과  $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ GA}_3 + 0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ BAP}$ 에서 가장 좋은 생육을 보였으므로 동일한 조성의 배지를 이용하였다. pH는 5.80으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)와 활성탄 0.1%(w/v)를 첨가한 후, 121°C에서 15분간 고압멸균 하였다. Test tube에 각각 10 mL씩 분주하였다.

#### (다) 배양환경

배양온도는  $15\pm 1^\circ\text{C}$  설정하였고, 상대습도 70-80%인 배양실에서 명기 16시간 동안  $45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

하절기 신초를 이용한 경우 배양기간이 5개월이 경과하였으나 신초의 신장이 거의 없었다 (Fig. 1-1-9A). 따라서 실험 재료 확보를 위한 기내번식이 제대로 이루어지지 못하는 문제점이 발생하였다. 또한 1차년도 연구와 동일한 방법으로 멸균소독을 하였으나 60% 정도 오염이 발생하는 문제점이 보였다(Fig. 1-1-9B). 이는 1차년도 실험에서 계절적 요인과 재현성에 대한 검증이 미비했던 것으로 판단이 되어 차후 보완된 방법으로 멸균을 실시 하고자 한다.

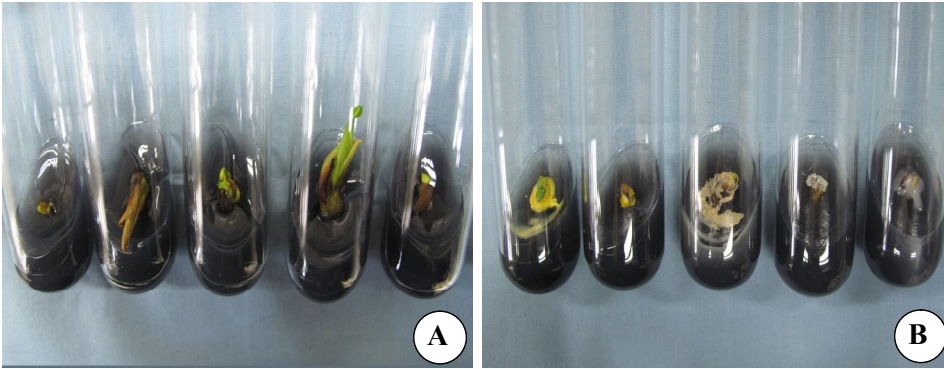


Fig. 1-1-9. Shoot induction experiment. A, shoots after 5 months of treatment; B, contamination after inoculation.

작약의 생활환을 살펴보면 가을부터 겨울동안 지상부가 죽고 뿌리만 겨울을 나는 숙근성 식물이다. 따라서 신초가 성숙하고 성장하기 위해서는 저온을 필요로 하는데 이러한 조건을 충족하기 위하여 동절기에 저온에 충분히 노출된 작약 신초를 노지에서 채취하여 기내 배양하고자 준비하고 있다.

#### 마. 다양한 신초 종류(정아, 액아, 미성숙 신초) 및 성장조절제를 이용한 작약의 기내번식 실험

##### (1) 연구목적

신초배양 예비실험을 수행하면서 3 cm 이상 성숙한 작약의 신초에서는 많은 수의 측아를 발견할 수 있었다. 또한 땅에서 채취된 뇌두에서 성숙된 신초뿐만 아니라 크기가 약 1 cm 정도 되는 미성숙 신초가 발견 되었다. 3 cm 이상 성숙 신초의 정아와 액아, 그리고 1 cm 정도 미성숙 신초를 각각 이용하여 다양한 절편체 종류 및 성장조절제를 이용한 기내번식 실험을 하였다.

##### (2) 재료 및 방법

###### (가) 실험재료 및 멸균 소독방법

2009년 12월 29일에 경남 진주시 사봉면에 위치한 작약농장에서 휴면중인 뇌두를 땅속에서 파내서 신초를 채취하였다. 본 실험에 이용된 작약은 자색 겹꽃을 이용하였다. 품종으로 고정되지 않은 야생종으로 가칭 PS4로 명명하였다.

신초를 싸고 있는 비늘을 2-3겹 제거하고 소독을 실시하였다. 1차로 70%(v/v) EtOH에 1분 처리하고, 멸균수로 3회 세척하였다. 그리고 Tween 20 1방울을 떨어뜨린 1.5%(v/v) NaOCl을 이용하여 10분간 처리하고 다시 멸균수로 3회 세척하였다. 성숙 신초의 경우 신초를 싸고 있는 비늘을 약 2겹 정도 더 제거하고, 미성숙 신초는 그대로 2차 소독하였다. 70%(v/v) EtOH에 1분 처리하고, 멸균수로 3회 세척 후 Tween 20 1방울을 떨어뜨린 1.5%(v/v) NaOCl을 이용하여 20분 처리하고 다시 멸균수로 4-5회 세척하여 멸균하였다. 성숙 신초는 멸균된 신초에서 남은 비늘을 제거하면서 액아를 적출하였고 최종적으로 정아를 적출하였다. 그리고 멸균된 미성숙 신초는 치상할 부분만 다시 재절단 하여 각각의 절편체를 처리별로 성장조절제가 들어 있는 MS배지에 치상하였다(Fig. 1-1-10).

(나) 배양배지

기본배지는 MS배지를 사용하였고, sucrose 3%(w/v)를 이용하였다. 처리별 성장조절제 조성은 Table 1-1-5와 같다. pH는 5.70-5.80으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)와 활성탄 0.1%(w/v)를 첨가한 후, 121℃에서 15분간 고압멸균 하였다. 각각 처리별로 10 mL씩 분주하였다.

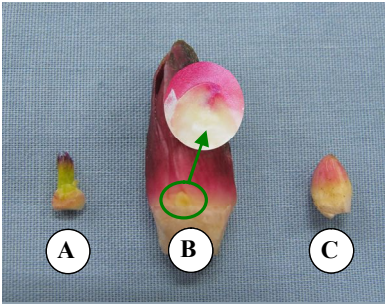


Fig. 1-1-10. Explants used in this experiment.

(다) 배양환경

배양온도는 15±1℃로 설정하였고, 상대습도 70-80%인 배양실에서 명기 16시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

Table 1-1-5. Concentrations of plant growth regulators used this experiment.

| Treatment no. | PGR (mg·L <sup>-1</sup> ) |                 |     |     |     |     |
|---------------|---------------------------|-----------------|-----|-----|-----|-----|
|               | BAP                       | GA <sub>3</sub> | IAA | ZiP | NAA | TDZ |
| 1             | 0                         | 0               | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 2             | 0.5                       | 0.5             | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 3             | 1.0                       | 0.5             | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 4             | 0.5                       | 0               | 0.5 | 0   | 0   | 0   |
| 5             | 1.0                       | 0               | 0.5 | 0   | 0   | 0   |
| 6             | 0                         | 0               | 0   | 1.0 | 0.5 | 0   |
| 7             | 0                         | 0               | 0   | 2.0 | 0.5 | 0   |
| 8             | 0                         | 0               | 0   | 0   | 0.1 | 0.5 |
| 9             | 0                         | 0               | 0   | 0   | 0.1 | 1.0 |

(3) 결과 및 고찰

작약 배배양 기내번식 선행 연구를 살펴보면 배양 기간이 16주정도 아주 오래 걸리는 경향이 있었다. 본 실험에서도 배양 결과를 얻기 위해서는 시간이 많이 소요될 것으로 예상된다. 현재까지 배양체 오염이 발생되지 않았고, 성숙 신초의 정아는 치상 2일 경과 후 조금씩 변화되는 모습을 보이고 있지만 최종적인 결과는 향후 더 지켜보아야 할 것이다(Fig. 1-1-11). 모든 실험 처리구는 현재 배양실에서 생육 중에 있다(Fig. 1-1-12).

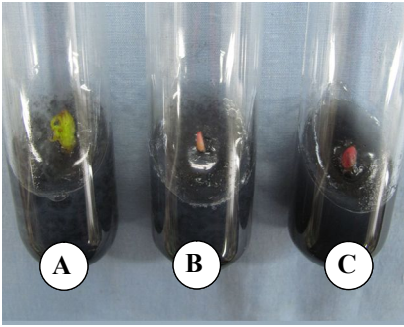


Fig. 1-1-11. Explants after 2 days of inoculation. A, shoot tips matured; B, axillary buds matured; C, shoots immatured.

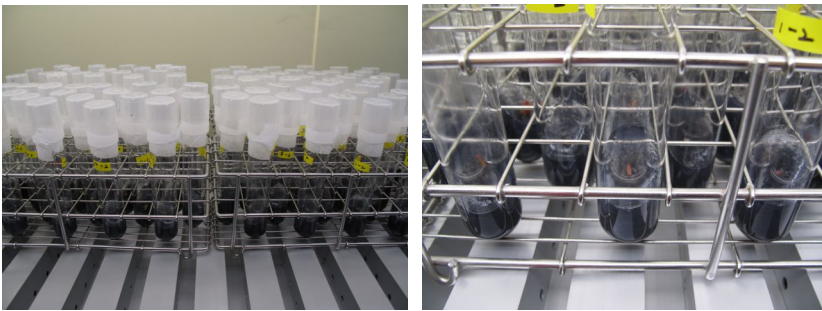


Fig. 1-1-12. Effect of explants and PGRs on regeneration.

## 2. 작약(*Paeonia lactiflora*)의 직·간접적 재분화

### 가. 다양한 종류의 절편체를 이용한 작약 재분화 실험

#### (1) 연구목적

작약은 미나리아재비과(Ranunculaceae) 또는 작약과(Paeoniaceae)에 속하는 초본성 식물이다. 오래 전부터 우리나라에서 뿌리가 한약재로 널리 이용되며 약용으로 많이 재배되었다. 그에 반해 절화작약의 경우 전문적인 육종은 극히 미비한 실정이었다. 따라서 지금까지는 혼계집단 상태로 재배하고 품종의 개념에서 생산관리 되는 부분이 거의 없었다. 현재 작약을 절화로써 특히 신부 부케로 이용이 많아지면서 흰색의 겹꽃에 대한 수요가 점점 늘고 있으나 작약의 종묘 번식은 주로 뿌리의 뇌두를 분주하는 방식으로 보통 3-4년의 기간이 소요되므로 좋은 품종을 빨리 번식하는데 그 기간이 오래 걸리는 단점이 있다. 또한 병해충 감염과 선충의 피해가 많았다. 형질이 우수한 좋은 품종을 모본 그대로 빠른 시간에 대량생산 할 수 있는 방법이 필요하므로 조직배양을 통한 기내번식 방법을 개발하고자 한다.

1차년도 배배양 실험에서 성공적으로 홑꽃 작약의 기내번식을 수행할 수 있었다. 그 실험의 결과 얻어진 작약 무균 기내 배양체를 당해 연도 기내번식을 위한 재분화 조건 확립 실험에 이용하였다. 작약의 자엽, 성엽 및 엽병 세 종류의 절편체를 각각 다양한 성장조절제 처리를 하여 재분화 실험을 하였다.

#### (2) 재료 및 방법

##### (가) 실험재료

1차년도 연구에서 배배양을 통하여 기내에서 발아된 홑꽃 작약 식물체를 본 실험에서 사용하였다. 작약 배양체의 경우 기내에서 생육 기간이 많이 소요되는 문제점이 있었다. 1차년도 배배양의 경우 총 배양기간 약 5개월 동안 배양 하였으나 신초의 초장은 최대 6 cm 정도 자랐다(Fig 1-2-1A). 자엽, 성엽, 엽병 세 종류의 절편체별로 각각 절단하여 성장조절제 처리 배지에 치상하였다(Fig. 1-2-1B).

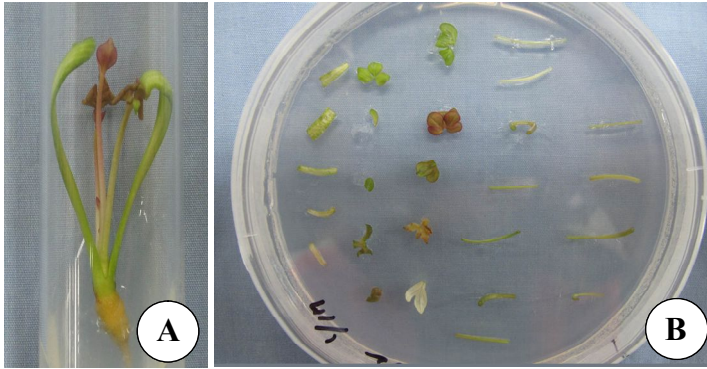


Fig. 1-2-1. On zygotic embryo germination of *P. lactiflora*, the parts were further used as explants and cultured on MS medium supplemented with PGR's to induce callus. A, a seedling grown from an in vitro-germinated embryo and used as a explant source; B, transversal sections of a seedling (cotyledon, leaf and petiole) planted as explants for regeneration.

#### (나) 배양배지

MS 기본배지에 sucrose 3%(w/v)를 이용하였다. 처리별 성장조절제 조성은 Table 1-2-1과 같다. 멸균 전에 pH를 5.80으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121℃에서 15분간 고압멸균 하고 페트리디쉬에 분주하였다. 2010년 1월 20일에 각각의 처리배지에 4반복으로 절편체를 치상하였다. 16일 동안 암상태에서 배양하였고, 2월 6일 광상태로 이동하였다.

Table 1-2-1. Concentrations of plant growth regulators used this experiment.

| Treatment no. | PGR (mg·L <sup>-1</sup> ) |     |     |     |
|---------------|---------------------------|-----|-----|-----|
|               | 2,4-D                     | BA  | TDZ | NAA |
| 1             | 0.5                       | 1.0 | 0.0 | 0.0 |
| 2             | 0.0                       | 0.0 | 1.0 | 0.1 |

#### (다) 배양환경

배양온도는 25±1℃로 설정하였고, 상대습도 70-80%인 배양실에서 명기 16시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 조건하에서 배양하였다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형 광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

실험 결과  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D +  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA 처리구에서는 3가지 절편체 모두 별다른 변화 없이 고사하였다. 특히 엽병 절편체의 경우 스펀지처럼 흰색으로 부풀면서 고사하였다. 그러나  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ +  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA의 경우 일부 처리구에서 갈변하면서 고사하는 경우도 있었지만 녹색의 절편체가 유지되고 일부 발생된 캘러스의 크기가 성장하는 것을 발견할 수 있었다. 특히 다른 절편체보다 엽병의 절단면에서 캘러스 발생이 많았다(Fig. 1-2-2).

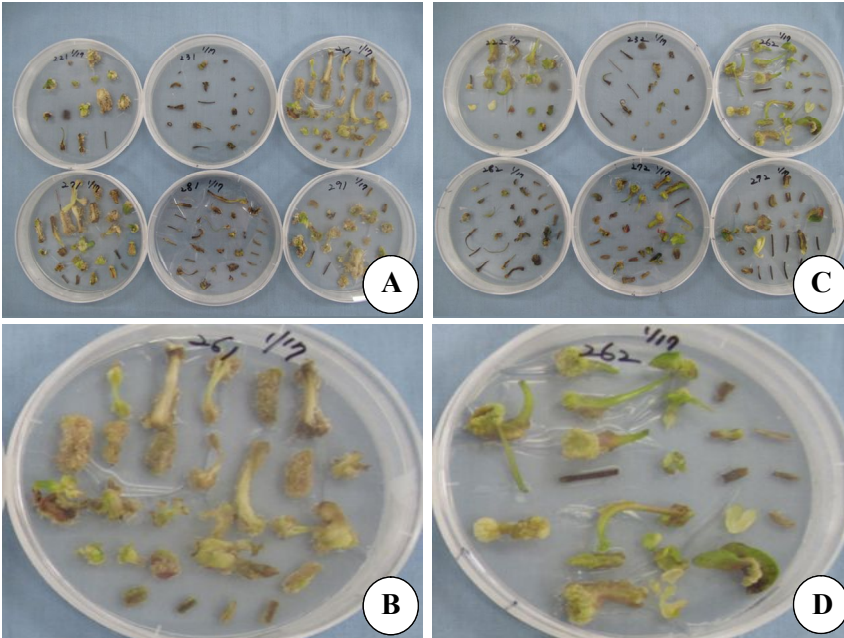


Fig. 1-2-2. Callus induction after 45 days when parts of germinated zygotic embryo of *P. lactiflora* were used as explants. A and B,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D +  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA; C and D,  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ +  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA.

생성된 캘러스는 절편체에서 분리하여 동일한 배지에 캘러스만 계대하였으나 4주 동안 별다른 변화 없이 하얗게 부풀거나 배지와 캘러스가 같이 검게 갈변하면서 모두 고사하였다(Fig. 1-2-3). 1차년도 기내에 도입된 식물체의 개체수를 충분하게 확보하지 못한 상황에서 절편체 재분화 실험을 진행하는 것은 매우 어려운 상황이었다. 현재 기내번식 식물재료를 더 확보하여 재분화 실험을 준비하고 있다.

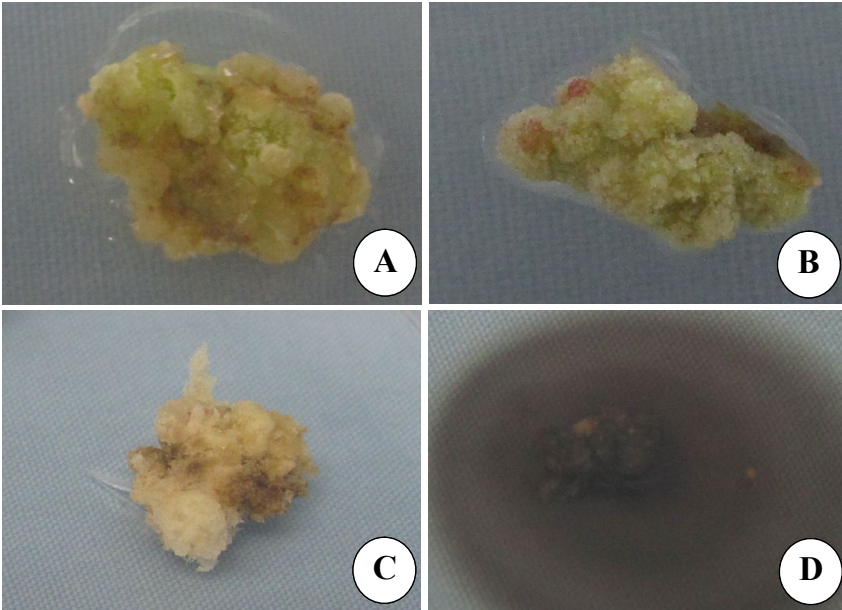


Fig. 1-2-3. Compact green callus of *P. lactiflora* obtained on subculture (A, B); gradually turned brown (C); and dried due to excess phenolic exudates (D).

#### 나. 작약 꽃잎을 이용한 재분화 실험 1차 실험

##### (1) 연구목적

기내 도입된 작약을 이용한 재분화 실험을 수행하기 위해서는 많은 식물 재료가 기내번식을 통해 확보되어야 한다. 배배양을 통한 기내도입 방법을 이용할 경우 배양 기간이 5개월 이상 소요되고, 너두에서 발생된 동지아를 기내에 직접 도입 하는 방법도 11월에서 12월 사이 가능하므로 당해 연구에 한계가 있다. 따라서 오랜 기간을 기다릴 수 없었기 때문에 5월에 개화한 작약의 꽃잎 절편체를 이용한 재분화 실험을 시도 하였다. 본 연구실에서 오랜 기간 국화 꽃잎 재분화 연구를 성공적으로 수행한 노하우를 바탕으로 본 연구를 수행 하였다.

##### (2) 재료 및 방법

###### (가) 실험재료 및 살균

2010년 5월 19일 경상대학교 농장 포장에서 개화한 작약 자색 홑꽃의 꽃잎을 채취하여 멸균수에 1회 행구고 70%(v/v) EtOH에 Tween 20 한 방울을 넣고 30초간 침지 후 멸균수로 2회 세척하였다. 그리고 2% NaOCl에 Tween 20 한 방울을 넣고 10분 동안 침지 한 후 멸균수로 4-5회 세척하여 멸균을 하였다. 멸균 후 실험 배지에 꽃잎을 치상하였다(Fig. 1-2-4).

###### (나) 배양배지

MS 기본배지에 sucrose 3%(w/v)를 이용하였다. 처리별 성장조절제 조성은 Table 1-2-2와 같다. pH는 5.80으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121℃에서 15분간 고압멸균 하고 페트리디쉬에 분주하였다. 처리배지에 4반복으로 4개의 절편체를 치상하였다.



Fig. 1-2-4. Flowering of *P. lactiflora* in the field-grown Gyeongsang National University.

Table 1-2-2. Concentrations of plant growth regulators used this experiment.

| Treatment no. | PGR (mg·L <sup>-1</sup> ) |     |         |     |     |
|---------------|---------------------------|-----|---------|-----|-----|
|               | NAA                       | BAP | Kinetin | 2ip | TDZ |
| 1             | 0.1                       | 0.5 | 0.0     | 0.0 | 0.0 |
| 2             | 0.5                       | 1.0 | 0.0     | 0.0 | 0.0 |
| 3             | 0.1                       | 0.0 | 0.5     | 0.0 | 0.0 |
| 4             | 0.5                       | 0.0 | 1.0     | 0.0 | 0.0 |
| 5             | 0.1                       | 0.0 | 0.0     | 0.5 | 0.0 |
| 6             | 0.5                       | 0.0 | 0.0     | 1.0 | 0.0 |
| 7             | 0.1                       | 0.0 | 0.0     | 0.0 | 0.5 |
| 8             | 0.5                       | 0.0 | 0.0     | 0.0 | 1.0 |

#### (다) 배양환경

배양온도는 25±1℃로 설정하였고, 상대습도 70-80%인 배양실에서 명기 16시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형 광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

실험 처리배지 모두 식물체에서 심한 오염이 발생하였다. 홑꽃의 경우 꽃잎 절편체가 넓기 때문에 꽃잎과 꽃잎이 많이 겹쳐서 절편체 멸균소독이 완전하게 이루어지지 못한 것으로 판단된다. 따라서 꽃잎의 크기가 작은 겹꽃의 안쪽에 있는 꽃잎을 실험 절편체로 이용하여 재실험을 수행하였다.

#### 다. 작약 꽃잎을 이용한 재분화 2차 실험

##### (1) 연구목적

절화 작약의 경우 겹꽃이 연구대상인데 이 겹꽃의 안쪽에 있는 꽃잎들은 수술이 꽃잎으로 변한 것이어서 종자를 형성할 수 없다. 따라서 겹꽃의 경우 배배양을 통한 기내도입 방법에 한계가 있으므로 6월에 개화한 작약의 꽃잎 절편체를 이용한 재분화 실험을 수행 하였다. 작약 겹꽃의 크기가 작은 안쪽에 있는 꽃잎의 절편체를 이용한 식물체 재분화 실험을 수행하였다.



## (2) 재료 및 방법

### (가) 실험재료 및 살균

2010년 6월 3일 작약농장 포장에서 개화한 작약 흰색 겹꽃, 자색 겹꽃, 분홍색 겹꽃의 꽃잎을 채취하여(Fig. 1-2-5) 멸균수에 1회 행구고 70%(v/v) EtOH에 Tween 20 한 방울을 넣고 30초간 침지 후 멸균수로 2회 세척하였다. 그리고 0.1% NaOCl에 Tween 20 한 방울을 넣고 1분 동안 침지 한 후 멸균수로 4-5회 세척하여 멸균을 하였다. 겹꽃의 경우 홑꽃과 다르게 꽃잎이 매우 연약하여 NaOCl의 처리에 민감하게 손상을 많이 입는 것을 관찰 할 수 있었다. 여러 차례 실험을 통하여 최소의 손상범위 안에서 멸균 후 실험 배지에 꽃잎을 치상하였다.



Fig. 1-2-5. Petals of *P. lactiflora* used this experiment.

### (나) 배양배지

MS 기본배지에 sucrose 3%(w/v)를 이용하였다. 처리별 성장조절제 조성은 1차 실험 조성 과 같다(Table 1-2-2). pH는 5.80으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121°C에서 15분 간 고압멸균하고 페트리디쉬에 분주하였다. 처리배지에 4반복으로 8개의 절편체를 치상하였다.

### (다) 배양환경

배양온도는  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 설정하였고, 상대습도 70-80%인 배양실에서 명기 16시간 동안  $45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형 광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

## (3) 결과 및 고찰

작약 겹꽃의 꽃잎 절편체의 경우 1차 실험에서와 같은 심각한 오염은 발생되지 않았으나 꽃잎을 배지에 치상하면 하루 만에 절편체가 갈변하면서 변색되었다(Fig. 1-2-6).

결국 모든 꽃잎 절편체는 심하게 갈변하면서 고사하였다. 작약의 경우 한약재로 널리 이용되는 약용식물로서 2차 대사산물인 페놀화합물의 함량이 매우 높은 것으로 판단된다. 따라서 페놀화합물을 제거하는 실험을 다시 수행하였다.

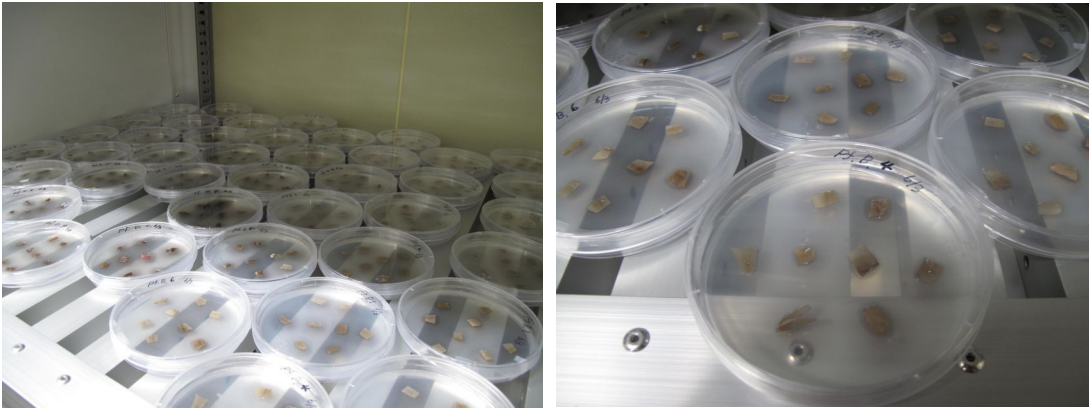


Fig. 1-2-6. Petal explants turned brown in color.

## 라. 작약 꽃잎을 이용한 재분화 3차 실험

### (1) 연구목적

작약 꽃잎 절편체를 이용한 재분화 2차 실험을 수행하면서 페놀화합물 생성에 따른 문제가 발생하여 모든 절편체가 갈변하면서 고사하였다. 이러한 문제점을 극복하고자 본 실험을 하였다. 모든 절편체 멸균시 일반적으로 사용된 멸균수 대신 0.1% polyvinylpyrrolidone 10(PVP 10)을 이용하여 절편체 멸균을 실시하였고, agar 배지의 경우 0.1% 활성탄을 첨가하였다. 또한 페놀화합물 억제를 위하여 액체배양 방법을 이용하는 경우가 많으므로 filter paper를 이용한 액체배양을 시도 하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 실험재료 및 살균

2010년 7월 5일 작약농장 포장에서 개화한 작약 흰색 겹꽃과 분홍색 겹꽃의 꽃잎을 채취하여 멸균수에 1회 행구고 70%(v/v) EtOH에 Tween 20 한 방울을 넣고 30초간 침지 후 0.1% PVP 10으로 2회 세척하였다. 그리고 0.1% NaOCl에 Tween 20 한 방울을 넣고 1분 동안 침지한 후 0.1% PVP 10으로 4-5회 세척하여 멸균을 하였다. 멸균 후 0.1% 활성탄이 첨가된 agar 배지와 filter paper를 이용한 액체배지에 꽃잎을 치상하였다.

#### (나) 배양배지

MS 기본배지에 sucrose 3%(w/v)를 이용하였다. 배지에 따른 처리별 성장조절제 조성은 Table 1-2-3와 같다. pH는 5.80으로 조절하고, 121°C에서 15분간 고압멸균 하고 페트리디쉬에 분주하였다. 처리배지에 4반복으로 4개의 절편체를 치상하였다.

#### (다) 배양환경

배양온도는 25±1°C로 설정하였고, 상대습도 70-80%인 배양실에서 명기 16시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형 광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

Table 1-2-3. Concentrations of plant growth regulators used this experiment.

| Medium       | PGR (mg·L <sup>-1</sup> ) |     |     |     |                 |
|--------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----------------|
|              | IAA                       | NAA | BAP | TDZ | GA <sub>3</sub> |
| Agar         | 0.5                       | 0.5 | 1.0 | 0.0 | 0.0             |
|              | 0.5                       | 0.0 | 1.0 | 0.0 | 0.5             |
|              | 0.0                       | 0.1 | 0.0 | 0.5 | 0.0             |
|              | 0.0                       | 0.5 | 0.0 | 1.0 | 0.0             |
| Filter paper | 0.5                       | 0.5 | 1.0 | 0.0 | 0.0             |
|              | 0.5                       | 0.0 | 1.0 | 0.0 | 0.5             |
|              | 0.0                       | 0.1 | 0.0 | 0.5 | 0.0             |
|              | 0.0                       | 0.5 | 0.0 | 1.0 | 0.0             |

### (3) 결과 및 고찰

본 실험 결과 작약 꽃잎 절편체 꽃잎을 배지에 치상하면 하루 만에 절편체가 갈변하면서 변색되었던 2차 실험과 달리 꽃잎 절편체의 갈변이 천천히 진행되는 경향을 보였으나 결국 모든 절편체가 갈변하면서 고사하였다(fig. 1-2-7). 일반적으로 국화의 경우 꽃잎을 이용한 재분화 시스템이 확립되어 기내대량 번식 또는 형질전환에 많이 이용되고 있으나 작약의 경우 페놀화합물 발생 문제를 극복하지 못하면 꽃잎을 이용한 재분화 실험은 결론적으로 어려울 것으로 판단된다.

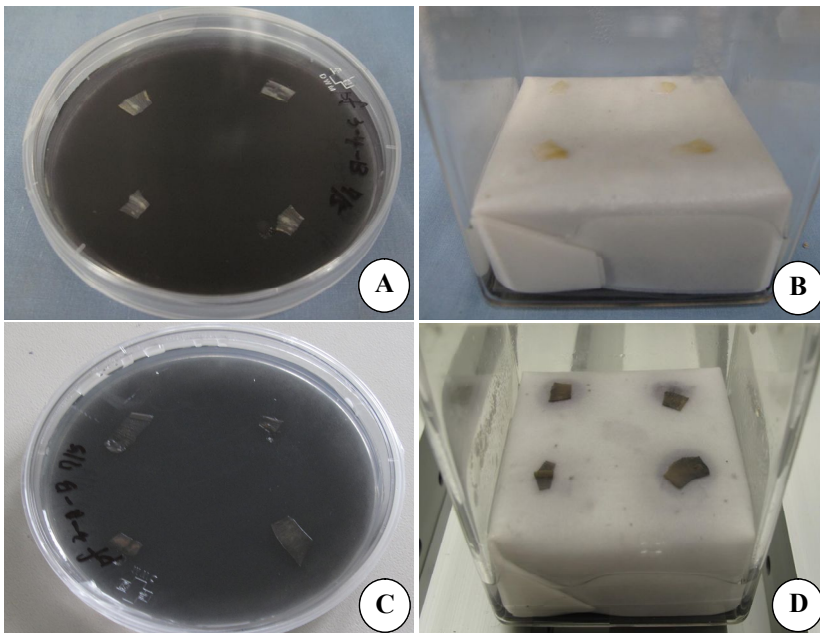


Fig. 1-2-7. Petal explants released exudates and turned brown in color. A, petal explants cultured on agar; B, petal explants cultured on filter paper; C and D, petal explants turned brown in color after 3 weeks.

### 3. 기내 도입된 작약(*Paeonia lactiflora*) 무균식물체를 이용하여 직·간접적 재분화 조건

## 확립

### 가. 작약 꽃봉오리에서 채취한 꽃잎 절편체를 이용한 재분화 실험

#### (1) 연구목적

작약은 미나리아재비과(Ranunculaceae) 또는 작약과(Paeoniaceae)에 속하는 초본성 식물이다. 오래 전부터 우리나라에서 뿌리가 한약재로 널리 이용되며 약용으로 많이 재배되었다. 그에 반해 절화용 작약의 경우 전문적인 육종은 극히 미비한 실정이었다. 지금까지는 혼계집단 상태로 재배하고 품종의 개념에서 생산관리 되는 부분이 거의 없었다. 최근 작약의 절화가 특히 신부 부케로 그 이용이 많아지면서 흰색의 겹꽃에 대한 수요가 점점 늘고 있다. 작약의 종묘번식은 주로 뿌리의 뇌두를 분주하는 방식을 이용하는데 보통 3-4년의 기간이 소요되므로 좋은 품종을 빨리 번식하는데 그 기간이 오래 걸리는 단점이 있다. 또한 병해충 감염과 선충의 피해가 많았다. 형질이 우수한 좋은 품종을 모본 그대로 빠른 시간에 대량생산할 수 있는 방법이 필요하므로 조직배양을 통한 기내번식 방법을 개발하고자 한다.

기내 도입된 작약을 이용한 재분화 실험을 수행하기 위해서는 많은 식물 재료가 기내번식을 통해 확보되어야 한다. 배배양 방법을 이용할 경우 개화 후 종자 수확이 가능한 가을에만 가능하고, 뇌두에서 발생된 동지아를 기내에 직접 도입하는 방법도 11월에서 12월 사이에만 가능하므로 당해 연구에 한계가 아주 많이 있었다. 따라서 시간적 제약을 극복하기 위하여 5월에 개화한 작약의 꽃잎 절편체를 이용한 재분화 실험을 여러 차례 시도하였다. 하지만 완전히 만개한 꽃잎을 이용하여 무균 식물체를 얻기 위하여 기내 도입을 시도하였으나 페놀화합물의 생성이 지나치게 높아서 결국 절편체가 모두 검게 고사하였다. 결국 수차례의 다양한 연구를 시도한 결과 페놀화합물의 경우 성숙하거나 노화가 진행될수록 많이 생성한다는 결론을 바탕으로 더 어린 단계에서 연구가 수행되어야 할 것으로 판단되었다.

따라서 본 연구는 꽃봉오리 단계에서 채취한 꽃잎 절편체를 이용하여 재분화 연구를 수행하였다.

#### (2) 재료 및 방법

##### (가) 실험재료 및 살균

실험에 이용된 식물재료는 Fig 1-3-1과 같이 작약 농장 포장에서 흰색 겹꽃 작약을 꽃봉오리 단계에서 채취하였다. 꽃봉오리를 멸균수에 1회 헹구고 70%(v/v) EtOH에 Tween 20 한 방울을 넣고 2분간 침지 후 멸균수로 2회 세척하였다. 그리고 1.5% NaOCl에 Tween 20 한 방울을 넣고 15분 동안 침지 한 후 멸균수로 4-5회 세척하여 멸균하였다. 멸균된 꽃봉오리의 비늘 2-3개 제거하고, 다시 70%(v/v) EtOH에 1분간 침지 후 멸균수로 3회 세척하고 1.5% NaOCl에 Tween 20 한 방울을 넣고 10분 동안 침지 한 후 멸균수로 4-5회 세척한 후 0.1% HgCl<sub>2</sub>에서 15분간 멸균하고 1% PVP 10 용액에서 3회 세척하여 멸균을 마무리 하였다. 멸균 후 꽃봉오리의 바깥부분의 꽃잎 2-3개를 제거하고 안쪽의 꽃잎을 절편체로 치상하였다(Fig. 1-3-2).

##### (나) 배양배지

MS 기본배지에 sucrose 3%(w/v)를 첨가한 배지를 이용하였다. 처리별 성장조절제 조성은 Table 1-3-1과 같다. pH는 5.80으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121°C에서 15분간

고압멸균 하고 페트리디쉬에 분주하였다.



Fig. 1-3-1. Flower bud of *P. lactiflora* used as the explants.

Table 1-3-1. Concentrations of plant growth regulators used this experiment.

| Treatment no. | PGR ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) |      |      |         |      |                 |      |       |
|---------------|---------------------------------------|------|------|---------|------|-----------------|------|-------|
|               | TDZ                                   | BA   | IAA  | Kinetin | NAA  | GA <sub>3</sub> | 2iP  | 2,4-D |
| 1             | 0.10                                  | 0.00 | 0.00 | 0.00    | 0.00 | 0.00            | 0.00 | 0.00  |
| 2             | 0.50                                  | 0.00 | 0.00 | 0.00    | 0.00 | 0.00            | 0.00 | 0.00  |
| 3             | 1.00                                  | 0.00 | 0.00 | 0.00    | 0.00 | 0.00            | 0.00 | 0.00  |
| 4             | 2.00                                  | 0.00 | 0.00 | 0.00    | 0.00 | 0.00            | 0.00 | 0.00  |
| 5             | 0.00                                  | 1.00 | 1.00 | 0.10    | 0.00 | 0.00            | 0.00 | 0.00  |
| 6             | 0.00                                  | 2.00 | 0.00 | 0.00    | 0.50 | 1.00            | 0.00 | 0.00  |
| 7             | 0.25                                  | 0.00 | 0.00 | 0.00    | 0.00 | 1.00            | 1.00 | 0.00  |
| 8             | 0.00                                  | 0.00 | 0.50 | 0.00    | 0.00 | 1.00            | 2.00 | 0.00  |
| 9             | 0.00                                  | 0.00 | 0.00 | 0.00    | 0.00 | 0.00            | 1.00 | 4.00  |
| 10            | 0.00                                  | 1.00 | 0.00 | 0.00    | 0.00 | 0.00            | 0.00 | 4.00  |
| 11            | 0.50                                  | 0.00 | 0.00 | 0.00    | 0.00 | 0.00            | 0.00 | 4.00  |
| 12            | 0.00                                  | 0.00 | 0.00 | 0.00    | 0.00 | 0.00            | 0.00 | 0.00  |

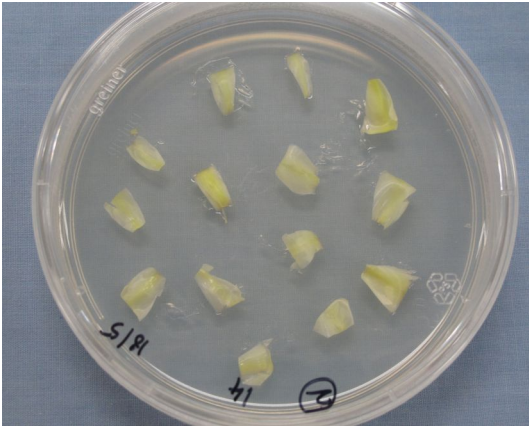


Fig. 1-3-2. Flower bud explants inoculated on the MS supplemented with PGR's.

#### (다) 배양환경

배양온도는  $15 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 설정하였고, 상대습도 70-80%인 배양실에서 1주일 동안 암배양 후 명기 16시간/암기 8시간 광주기로 이동하여 배양하였다. 조도는  $45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  조건이며 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

#### (3) 결과 및 고찰

실험 처리배지 모두 식물체에서 오염이 전혀 발생하지 않고 양호한 상태를 보였다. 특히 전년도 실험에서 완전히 만개한 꽃잎 절편체의 경우 치상 하루 또는 이틀 만에 페놀화합물의 발생과 함께 절편체 전체가 고사하였으나, 금년도 실험의 경우 꽃봉오리 상태에서 채취된 꽃잎 절편체는 시간이 경과하여도 건전한 절편체의 모습을 유지하였다(Fig. 1-3-2). Fig. 1-3-3과 같이 성장조절제 2,4-D가 첨가된 9, 10 및 11번 처리구에서 캘러스 발생률이 75% 또는 그 이상으로 높게 나타나는 결과를 보였다.

특히 주목할 점은 그동안 여러 차례 노력하여도 항상 페놀화합물의 발생이 문제되었으나 전반적으로 페놀화합물의 피해 양상이 적었고 아주 건전한 녹색의 캘러스 형성을 보이는 등 아주 효과적인 연구결과를 얻었다. 그중  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ +  $4.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D 성장조절제가 첨가된 11번 처리구의 꽃잎 절편체의 경우 캘러스 발생률이 89.8%로 가장 높았으며 절편체의 상태도 지속적으로 녹색을 유지하고 있었다(Fig. 1-3-4). 생성된 캘러스는  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA +  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub> 성장조절제가 첨가된 MS 배지로 계대배양 하였다. 향후 유도된 캘러스를 통하여 신초 재분화 결과도 기대된다.

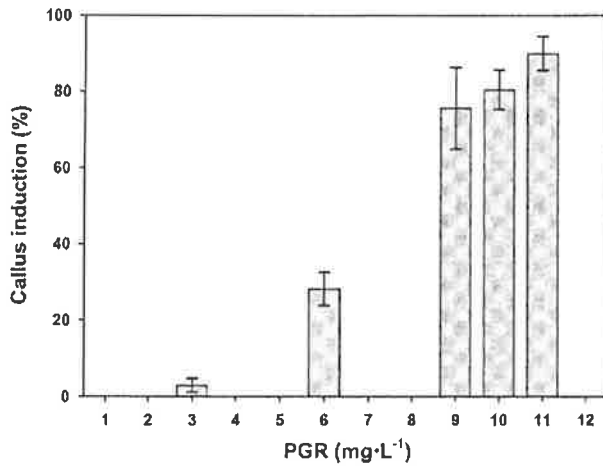


Fig. 1-3-3. Callus induction observed with the PGR treatments tried.

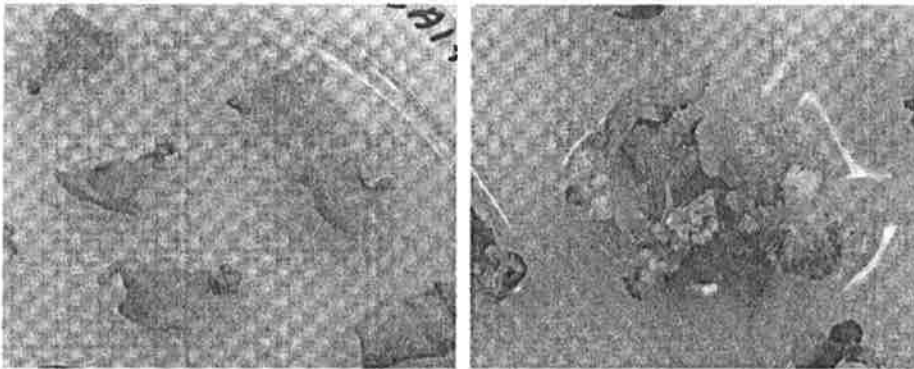


Fig. 1-3-4. Whitish-green callus induction observed on flower bud explants.

#### 나. 작약 배 절편체를 이용한 식물생장조절제 종류와 농도 조건 확립

##### (1) 연구목적

1-2차년도 홑꽃 작약의 종자를 이용한 배 절편체를 이용한 기내번식 실험을 성공적으로 수행할 수 있었다. 그 실험의 결과를 바탕으로 당해 연도에는 기내 번식을 위한 신초 성장에 적합한 식물생장조절제의 종류와 농도 조건을 확립하기 위한 실험을 수행하였다.

##### (2) 재료 및 방법

###### (가) 실험재료 및 멸균/소독 방법

종자 소독은 작약 꼬투리를 제거하고 종자만을 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 1차로는 70%(v/v) EtOH에 1분간 처리하고, 멸균수로 3회 세척하였다. 그리고 Tween 20 1방울을 떨어뜨린 1.5%(v/v) NaOCl을 이용하여 10분간 처리하고 다시 멸균수로 3회 세척하였다. 2차로는 70%(v/v) EtOH에 1분 처리하고, 멸균수로 3회 세척 후 Tween 20 1방울을 떨어뜨린 1.5%(v/v) NaOCl을 이용하여 20분 처리하고 다시 멸균수로 4-5회 세척하였다. 멸균된 종자에

서 종피와 배유를 제거하고 성숙된 배(Fig. 1-3-5)만을 적출하여 처리별로 성장조절제가 들어 있는 MS배지에 치상하였다.

(나) 배양배지

MS배지를 기본배지로 사용하였고, sucrose 3%(w/v)를 이용하였다. 처리별 식물성장조절제는 BA, 2,4-D, NAA, GA<sub>3</sub>, 또는 IAA를 0.1-3.0 mg·L<sup>-1</sup>의 농도 범위에서 이용하였다. pH는 5.80으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)와 활성탄 0.1%(w/v)를 첨가한 후, 121℃에서 15분간 고압 멸균 하였다.

(다) 배양환경

배양온도는 15±1℃ 설정하였고, 상대습도 70-80%인 배양실에서 1일 명기 16시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 광조건 하에서 배양하였다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.



Fig. 1-3-5. Embryo used as the explant.

(3) 결과 및 고찰

작약 종자로부터 적출한 배를 발아시키기 위해 BA와 GA<sub>3</sub>를 혼용 처리하여 발아율을 조사한 결과 낮은 농도의 BA와 GA<sub>3</sub> 처리에서 발아율이 비교적 높았으며, 1.0 mg·L<sup>-1</sup> BA와 0.5 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>에서 95%로 가장 높게 나타났다(Table 1-3-2, Fig. 1-3-6). 특히 BA 단용처리에서는 배가 잘 발아하지 못했지만 GA<sub>3</sub>를 0.3 mg·L<sup>-1</sup>만 추가하여도 배가 발아하였다. 이것은 추가된 GA<sub>3</sub>로 인해 배의 휴면을 타파시키는데 일부 영향을 주어 발아율을 향상시킨 것으로 판단된다.



Table 1-3-2. Concentrations of plant growth regulators tried for embryo germination.

| PGR ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) |                 | No. of replicates | Germination (%) | Observations                           |
|---------------------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|--|
| BA                                    | GA <sub>3</sub> |                   |                 |  |
| 0.5                                   | 0.5             | 7                 | 92 a            | Embryos germinated with two cotyledons |
| 1.0                                   | 0.0             | 7                 | -               | -                                      |
| 1.0                                   | 0.3             | 7                 | 90 a            | Embryo germination                     |
| 1.0                                   | 0.5             | 7                 | 95 a            | Embryo germination                     |
| 1.0                                   | 1.0             | 7                 | 80 b            | Embryo germination                     |
| 2.0                                   | 0.5             | 7                 | 80 b            | Embryo germination                     |

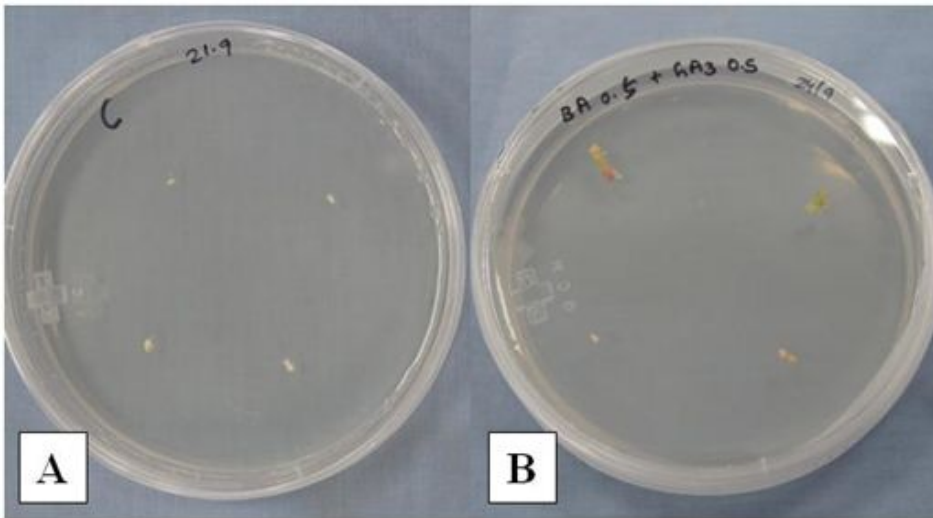


Fig. 1-3-6. Embryos of *P. lactiflora* cultured on different concentrations of BA and GA<sub>3</sub>. (A) embryos excised from seeds and inoculated on the medium with BA and GA<sub>3</sub>, and (B) embryos germinated after 15 days on the medium supplemented with  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA +  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>.

초본성 작물인 작약의 기내 배양 시 페놀화합물이 쉽게 발생한다. 본 연구에서도 배지에 치상한 배가 발아한 후 페놀화합물이 발생하였다. 발아한 배를 활성탄이 첨가된 배지로 옮겨 신초의 생장에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA와  $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>에서 신초가 가장 잘 발달하였다(Fig. 1-3-7).

모든 처리구에서 배 발아의 속도가 아주 더디었으며 배양 30일 후에도 초장이 증가하지 않았다. 따라서 작약 종자의 배 발아 30일 후 발생된 떡잎의 생장과 뿌리의 발달을 위해  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA와  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>가 첨가된 배지로 옮겨주었다(Fig. 1-3-8A). 배양 45일 후 뿌리가 유기되기 시작하였으며 (Fig. 1-3-8B), 60일 후에는 신초와 뿌리가 정상적으로 발달하였다(Fig. 1-3-8C). 특히 추가된 활성탄은 배지를 어둡게 하여 뿌리발달에 큰 영향을 준 것으로 판단된다. 현재 발근된 작약은 차년도 연구범위로서 기내 번식의 마지막 순화단계에 대한 연구 수행을 준비하고자 온실에서 순화실험을 준비하고 있다.

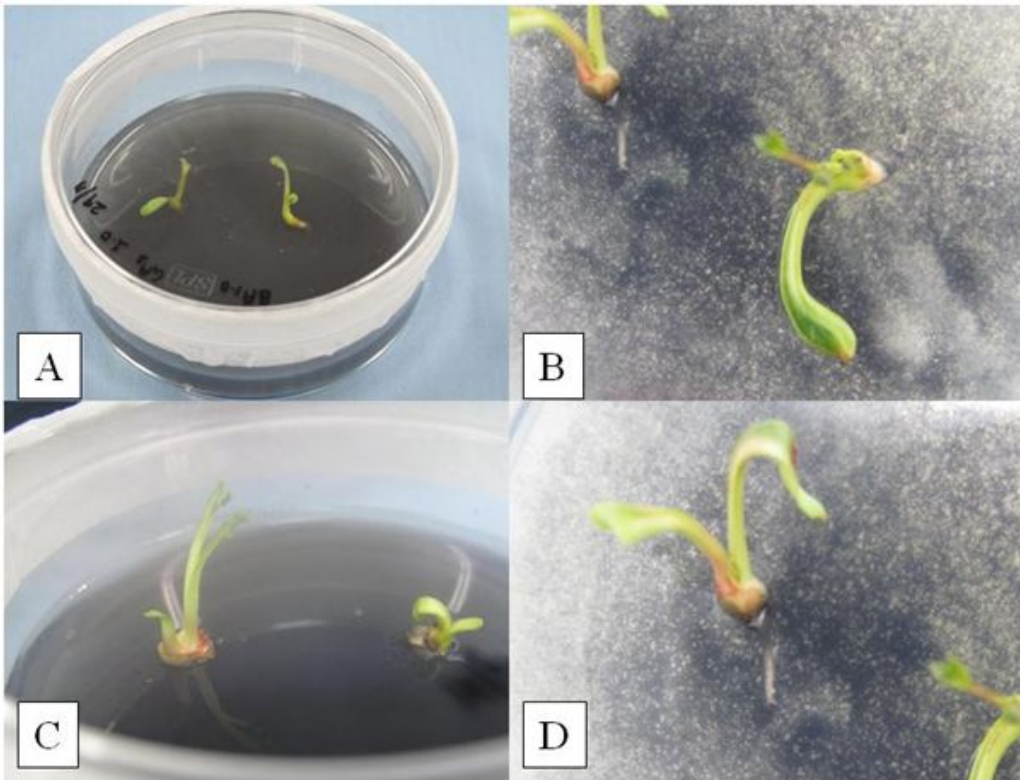


Fig. 1-3-7. Embryos germinated into cotyledonary leaves after 30 days on the MS medium supplemented with (A)  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA +  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>, (B)  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA +  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>, (C)  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA +  $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>, (D) and  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA +  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub> along with 0.1% (w/v) activated charcoal.

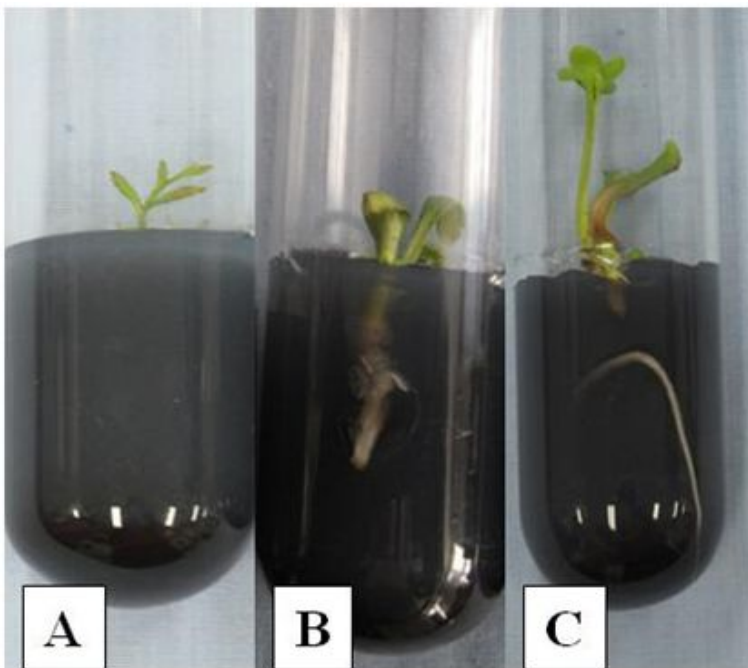


Fig. 1-3-8. Plants after 30 days on the medium supplemented with (A)  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA +  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>, (B) rooting observed on the same concentration after 45 days, (C) and root system developed after 60 days.

종자로부터 적출한 배의 캘러스 발생을 위하여 옥신이 미치는 영향을 조사하였다. 선행연구에서 IAA, NAA, 또는 2,4-D 단용처리 시, 2,4-D에서 캘러스 발생이 가장 활발하였다(데이터 미제시). 이 때 IAA와 NAA 처리에서는 캘러스와 함께 뿌리만 발생하였고, 신초생장을 위한 발아가 되지 않았다. 따라서 옥신의 종류는 2,4-D를 선택하였다. 다양한 농도의 2,4-D 전 처리에서는 캘러스가 100% 발생하였다. 특히  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D에서 캘러스의 형태가 신초 발생에 적합한 초록색으로 나타났다(Table. 1-3-3). 일반적으로 배지에 첨가한 옥신은 절편체에서 캘러스 형성에 도움을 준다. 본 연구에서는 여러 종류의 옥신 중에서도 2,4-D의 첨가가 캘러스 발생에 가장 효과적이었다.

Table 1-3-3. Embryos cultured on the MS medium supplemented with different concentrations of 2,4-D and observed after 30 days<sup>z</sup>.

| 2,4-D ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | Observations                |
|---|-----------------------------|
| 0.5                                     | Swollen cotyledonary leaves |
| 1.0                                     | Swollen cotyledonary leaves |
| 2.0                                     | Swollen cotyledonary leaves |
| 3.0                                     | Green friable callus        |
| 4.0                                     | Callus                      |
| 5.0                                     | Callus                      |

<sup>z</sup>n=3 for each treatment.

추가적으로 2,4-D와 BA 처리가 캘러스의 형성에 미치는 영향을 조사하였다(Table 1-3-4). 그 결과  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA와  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D 처리에서 캘러스의 형성이 아주 활발하였다. 배지에 첨가된 사이토카이닌과 옥신의 비율은 캘러스 형성에 중요한 영향을 미쳤다. 옥신을 단용으로 처리하였을 경우 세포의 생장이 줄어들지만, 추가적으로 첨가된 사이토카이닌은 세포를 팽창시키고 분화시키는 역할을 하였다. 또한  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA와  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D 처리에서 발생한 캘러스가 붉은색을 띠는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1-3-9). 이것은 작약 종자로부터 적출한 배가 발아하면서 발생된 페놀화합물에 의한 것으로 판단된다.

Table 1-3-4. Embryos cultured on the MS medium supplemented with different concentrations of BA and 2,4-D and observed after 30 days<sup>z</sup>.

| BA (mg·L <sup>-1</sup> ) | 2,4-D (mg·L <sup>-1</sup> ) | Observation                |
|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 0.1                      | 0.1                         | Callus                     |
| 0.1                      | 0.5                         | Green-red pigmented callus |
| 0.1                      | 1.0                         | Callus                     |
| 0.1                      | 2.0                         | Green Callus               |
| 0.1                      | 3.0                         | Callus                     |
| 1.0                      | 1.0                         | Green compact callus       |
| 1.0                      | 2.0                         | Green compact callus       |
| 2.0                      | 2.0                         | Green-red pigmented callus |

<sup>z</sup>n=3 for each treatment.

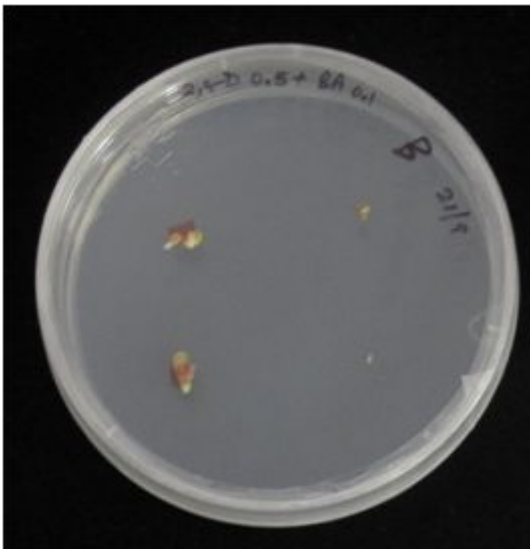


Fig. 1-3-9. Callus induction from the embryo after 30 days on the medium supplemented with 0.1 mg·L<sup>-1</sup> BA and 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D.

30일된 켈러스 계대배양 시 다양한 종류와 농도의 식물생장조절제를 처리하여 켈러스 형성과 싹 및 뿌리 발달에 미치는 영향을 조사하였다(Table 1-3-5). BA와 IAA의 혼용 처리에서는 낮은 농도의 IAA에서만 뿌리가 유도 되었고, IAA의 농도가 높아질수록 켈러스가 발생하였다(Fig. 1-3-10). 이것은 IAA의 농도가 높아질수록 세포가 분화되지 못하고 미분화된 상태의 켈러스의 형태로 발생한 것으로 생각된다. 하지만 BA와 NAA를 첨가하였을 때에는 모든 농도에서 약간의 켈러스와 뿌리가 발생하였다. BA와 2,4-D의 농도에 따른 생장을 비교한 결과 켈러스의 생장이 다른 종류의 옥신보다 더 활발하였다. BA와 GA<sub>3</sub> 혼용 처리와 BA와 kinetin 혼용 처리에서는 모든 농도에서 초록색의 켈러스가 발달되었다. 하지만 BA와 kinetin 처리에서만 미분화된 켈러스가 분열되었다. 이것은 kinetin 처리가 세포분열을 촉진한 것으로 판단되며 이

로 인해 캘러스가 신태 발달의 단계로 빠르게 진행할 것으로 예상된다.

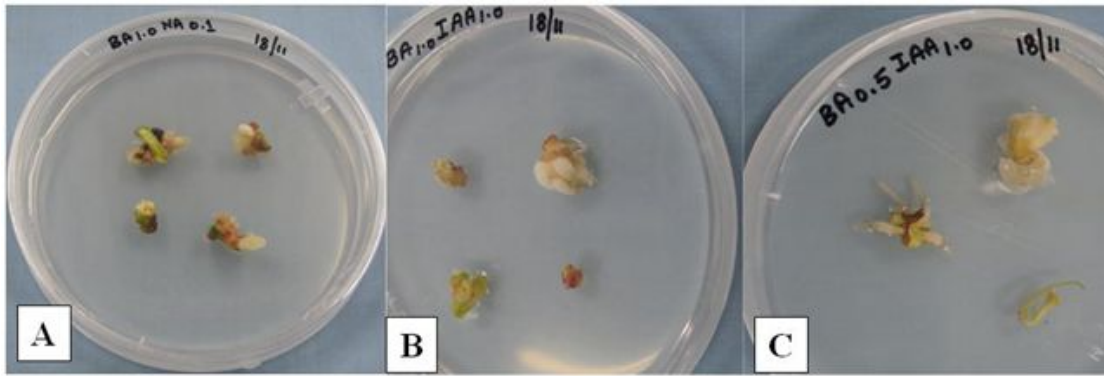


Fig. 1-3-10. Medium supplemented with (A)  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA and  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA resulted in compact white callus, (B) profuse white callusing was recorded with  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA and  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IAA, (C) and rooting was more prominent with  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA and  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IAA supplementation.

Table 1-3-5. Callus subcultured on different plant growth regulators viz. BA, IAA,  $\text{GA}_3$ , kinetin, and NAA ( $0.1\text{-}3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  concentrations).

| BA  | IAA | 2,4-D | $\text{GA}_3$ | Kin | NAA | Observations                         |
|-----|-----|-------|---------------|-----|-----|--------------------------------------|
| 0.5 | 0.1 | -     | -             | -   | -   | Rooting                              |
| 0.5 | 0.5 | -     | -             | -   | -   | Rooting                              |
| 0.5 | 1.0 | -     | -             | -   | -   | Profuse rooting                      |
| 1.0 | 0.5 | -     | -             | -   | -   | Whitish green friable callus rooting |
| 1.0 | 1.0 | -     | -             | -   | -   | Friable white callus rooting         |
| 1.0 | -   | 1.0   | -             | -   | -   | Compact green callus                 |
| 2.0 | -   | 1.0   | -             | -   | -   | Compact green callus                 |
| 2.0 | -   | 2.0   | -             | -   | -   | Green-red pigmented callus           |
| 0.5 | -   | -     | 0.5           | -   | -   | Green callus                         |
| 1.0 | -   | -     | 0.5           | -   | -   | Green callus                         |
| 2.0 | -   | -     | 0.5           | -   | -   | Green callus                         |
| 2.0 | -   | -     | 1.0           | -   | -   | Green callus                         |
| 0.5 | -   | -     | -             | 0.5 | -   | Friable callus                       |
| 1.0 | -   | -     | -             | 1.0 | -   | Friable callus                       |
| 0.5 | -   | -     | -             | 0.5 | -   | Friable callus                       |
| 0.5 | -   | -     | -             | 1.0 | -   | Green callus                         |
| 0.5 | -   | -     | -             | -   | 0.1 | Whitish green friable callus rooting |
| 0.5 | -   | -     | -             | -   | 0.5 | Whitish green friable callus rooting |
| 1.0 | -   | -     | -             | -   | 0.1 | Whitish green friable callus rooting |
| 1.0 | -   | -     | -             | -   | 0.5 | Whitish green friable callus rooting |

BA와 NAA, 그리고 BA와 kinetin을 혼용으로 처리하였을 때 캘러스가 활발하게 발달하였다. 하지만 45일과 60일 후 캘러스가 갈변하는 것을 관찰하였다(Fig. 1-3-11). 이것은 세포로부터 페놀 분비물이 발생하여 세포를 갈변시켰기 때문이다. 일반적으로 갈변은 과다한 페놀화합물에 의해 발생한다. 따라서 활성탄을 배지에 추가하면 페놀화합물을 흡수하고 비정상적인 캘러스 성장을 억제할 수 있을 것이다. 작약의 배로부터 발생한 갈변된 캘러스는 배양배지에 추가된 활성탄에 의해 억제되었다(Fig. 1-3-12A). 또한 활성탄을 첨가한 배지에서 캘러스가 초록색으로 변했을 뿐만 아니라 배를 정상적으로 받아시켜 엽원기에서 성숙한 잎을 가지는 단계로 발달하였다(Fig. 1-3-12A, B). 배양 시 발생하는 페놀화합물은 방향족 고리에 수산기를 가지고 있는 페놀그룹을 말한다. 특히 캘러스 단계에서 발생하는 갈변은 퀴논의 발생으로 식물 세포 성장을 억제하고, 경제적으로 중요한 작물의 생산에 문제가 된다. 따라서 이것을 해결하기 위하여 항산화효소(PVP, 아스코르브산)를 첨가하여 억제할 수 있으나 현재까지도 그 효과가 불분명하다. 하지만 활성탄은 배양된 조직으로부터 분비되는 화합물을 억제하거나 오토클레브에 의해 가수 분해될 수 있는 당을 줄이는 역할을 하므로 페놀화합물을 억제하기 위한 방법으로 널리 사용되고 있다.

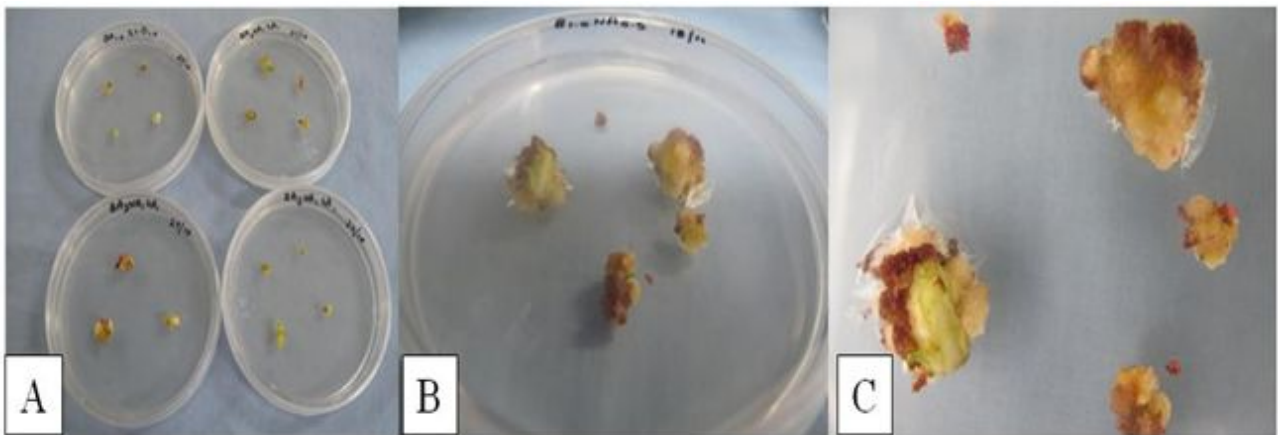


Fig. 1-3-11. Calli observed after 45 days on the medium with different growth regulators (A) at  $1.0 \text{ BA mg}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D, BA, NAA, and  $\text{GA}_3$  combination, (B) calli as observed after 60 days on the medium with  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA and  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA, (C) and closer view of calli shows browning on the edges.

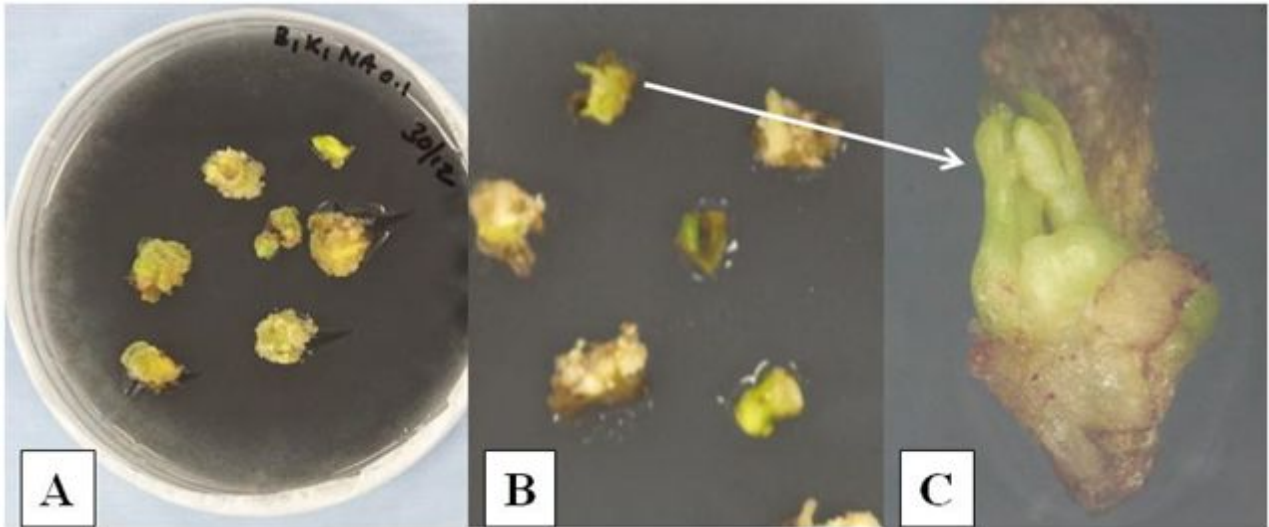


Fig. 1-3-12. Green friable calli obtained on subculture onto the medium (A) with  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA +  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  kinetin +  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA with 0.1% activated charcoal, (B) bud break observed on a cotyledonary leaf-derived callus, (C) and a microscopic view of bud formation.

#### 다. 작약 동지아를 절편체를 이용한 조직배양시 식물생장조절제 종류와 농도 조건 확립

##### (1) 연구목적

작약은 생활환을 살펴보면 가을부터 겨울동안 지상부가 죽고 뿌리만 겨울을 나는 속근성 식물이다. 1-2차년도 동지아 배양 실험에서 성공적으로 기내 번식법을 확립할 수 있었다. 동지아의 경우 많은 비늘에 싸여 있으므로 처음 기내로 식물을 도입하는 단계에서 멸균을 위하여 강하게 소독을 하는데도 문제가 없었고, 모본과 동일한 영양체를 번식할 수 있다는 장점이 있다.

본 실험에서는 선행연구의 실험방법을 이용하여 기내 무균 식물체를 확보하고 겨울 동안 생성되는 어린 눈, 즉 동지아를 절편체로 이용하여 당해 연도 기내 번식을 위한 적정 식물생장 조절제 종류와 농도 조건 확립하였다.

##### (2) 재료 및 방법

###### (가) 실험재료 및 멸균 소독방법

동지아는 1차로 흐르는 수돗물에 Tween 20을 넣고 약 10분간 수세하였고, 2차로 표면의 2개의 비늘을 제거한 후 70%(v/v) EtOH에 5분간 표면 소독한 후, 멸균수로 3회 세척하였고, 5%(v/v) NaOCl을 이용하여 5분간 처리하고 다시 멸균수로 3회 세척하였다. 3차로는 2차의 방법과 동일하게 수행한 후 멸균된 동지아를 절편체로 사용하였다(Fig. 1-3-13).

###### (나) 배양배지

MS배지를 기본배지로 사용하였고, sucrose 3%(w/v)를 이용하였다. 처리별로 식물생장조절제 BA, 2,4-D, NAA, GA<sub>3</sub>, 또는 IAA를  $0.1\text{-}3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 범위로 사용하였다. pH는 5.80으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)와 활성탄 0.1%(w/v)를 첨가한 후, 121°C에서 15분간 고압멸균 하였

다.

(다) 배양환경

배양온도는  $15\pm 1^\circ\text{C}$  설정하였고, 상대습도 70-80%인 배양실에서 1일 명기 16시간 동안  $45\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  광 조건하에서 배양하였다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.



Fig. 1-3-13. Shoot bud used as the explant.

동지아를 절편체로 사용하여 신초의 재분화를 유도하기 위하여 식물생장조절제 BA와  $\text{GA}_3$ 를 혼용처리한 결과 모든 처리구에서 신초가 발생하였다(Table 1-3-6). 하지만 BA 단용처리에서는 신초의 발달이 아주 느렸고,  $\text{GA}_3$ 를 첨가한 처리구에서는 신초의 생장이 빨랐다(Fig. 1-3-14). 이것은  $\text{GA}_3$ 가 휴면을 타파하는데 도움을 주었을 뿐만 아니라 신초 성장에도 영향을 주었기 때문인 것으로 판단된다. 현재 발달된 신초에 뿌리를 발생시키기 위해 IAA가 첨가된 배지에서 배양하고 있으며 뿌리 발생 후 순화에 대한 연구가 추가적으로 진행될 계획이다.

Table 1-3-6. Shoot bud regeneration observed on 15th day with BA and  $\text{GA}_3$  supplementation to the MS medium<sup>z</sup>.

| BA ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | $\text{GA}_3$ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | Observations (On 15 <sup>th</sup> day) |
|--------------------------------------|---|--|
| 0.5                                  | -   | Four-five leaves                       |
| 1.0                                  | -   | Four-five leaves                       |
| 1.0                                  | 0.3   | Four-five leaves                       |
| 1.0                                  | 0.5   | Four-five leaves                       |
| 1.0                                  | 1.0   | Four-five leaves                       |

<sup>z</sup>90% contamination was observed.



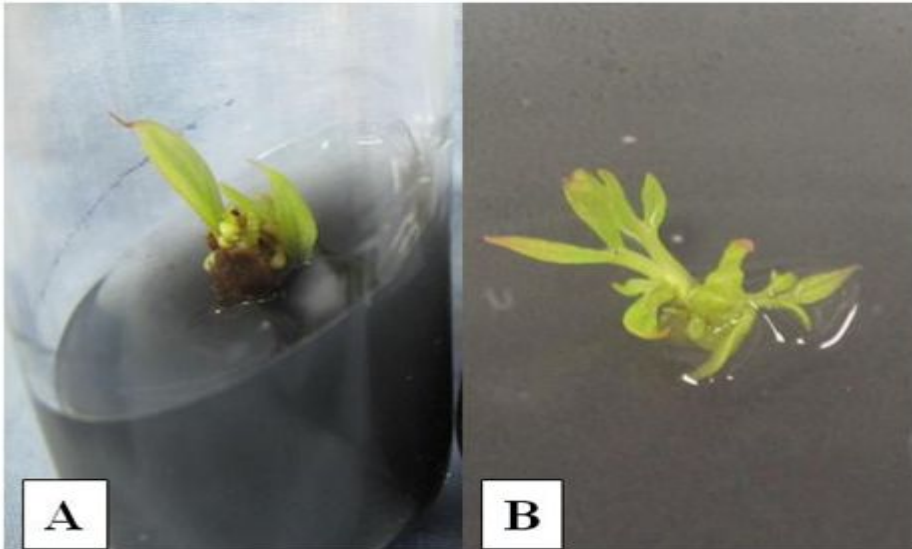


Fig. 1-3-14. Shoot bud sprouted on the medium supplemented with  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA and  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub> after 15 (A) and 30 (B) days.

#### 4. 작약(*Paeonia lactiflora*) 조직배양을 위한 기관 발생 또는 체세포배 발생 프로토콜 선 발 및 조건 확립

##### 가. 4가지 작약 품종의 꽃잎 절편체를 이용한 재분화 실험

##### (1) 연구목적

작약은 미나리아재비과(Ranunculaceae) 또는 작약과(Paeoniaceae)에 속하는 초본성 식물이다. 오래 전부터 우리나라에서 뿌리가 한약재로 널리 이용되며 약용으로 많이 재배되었다. 그에 반해 절화작약의 경우 전문적인 육종은 극히 미비한 실정이었다. 따라서 지금까지는 혼계집단 상태로 재배하고 품종의 개념에서 생산관리 되는 부분이 거의 없었다. 현재 작약을 절화로써, 특히 신부 부케로 이용이 많아지면서 흰색의 겹꽃에 대한 수요가 점점 늘고 있으나 작약의 종묘 번식은 주로 뿌리의 뇌두를 분주하는 방식으로 보통 3-4년의 기간이 소요되므로 좋은 품종을 빨리 번식하는데 그 기간이 오래 걸리는 단점이 있다. 형질이 우수한 좋은 품종을 모본 그대로 빠른 시간에 대량생산 할 수 있는 방법이 필요하므로 조직배양을 통한 기내번식 방법을 개발하고자 한다.

본 실험에서는 4가지 작약 품종의 꽃잎을 절편체로 이용하여 식물생장조절제의 종류와 농도 조건을 확립하기 위한 재분화 실험을 수행하였다.

##### (2) 재료 및 방법

##### (가) 실험재료 및 살균방법

꽃잎 절편체를 70%(v/v) EtOH에 2분간 침지 후 멸균수로 3회 세척하였다. 그리고 1.5%(v/v) NaOCl에 Tween 20 한 방울을 넣고 2분 동안 침지한 후 멸균수로 3회 세척하여 멸균하였다. 멸균된 꽃잎의 비늘을 제거하고 무균배양을 위해 다시 70%(v/v) EtOH에 1분간 침지 후 멸균수로 1회 세척하였다. 그리고 1.5%(v/v) NaOCl을 이용하여 10분 동안 침지한 후 멸

균수로 1회 세척 한 후 0.1%(v/v) HgCl<sub>2</sub>에서 15분간 처리하고 멸균수로 1회 세척하였다. 맨 아래 부분에서 절단한 꽃눈은 70%(v/v) EtOH에 30초간 침지 후, 1.5%(v/v) NaOCl에 5분간 침지한 후 1% PVP 10 용액에서 3회 세척하여 멸균을 마감하였다.

(나) 배양배지

Murashige and Skoog 배지(MS), Anderson's 배지(AM), Schenk and Hilderbrandt 배지 (SH), 그리고 Chu's 배지(N6)에 sucrose 3%(w/v)를 넣고, pH는 5.80으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121℃에서 15분간 고압멸균 하여 사용하였다. 처리별 식물생장조절제 조성은 Table 1-4-1, 1-4-2와 같다.

Table 1-4-1. Cytokinins (TDZ, BA, Kin, and 2iP) tried alone with Murashige and Skoog (MS) medium, Anderson's (AM) medium, Schenk and Hilderbrandt (SH) medium, and Chu's (N6) medium with and without 0.1% activated charcoal (AC).

| PGR (mg·L <sup>-1</sup> ) |     | Conc. (mg·L <sup>-1</sup> ) |     |     |     |     |
|---------------------------|-----|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|
| TDZ                       | 0.0 | 0.1                         | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 0.0 |
| BA                        | 0.0 | 0.5                         | 1.0 | 2.0 | 4.0 | 8.0 |
| Kin                       | 0.0 | 0.5                         | 1.0 | 2.0 | 4.0 | 8.0 |
| 2iP                       | 0.0 | 0.5                         | 1.0 | 2.0 | 4.0 | 8.0 |

Table 1-4-2. Combinations of cytokinins and auxins tried with Murashige and Skoog (MS) medium, Anderson's (AM) medium, Schenk and Hilderbrandt (SH) medium, and Chu's (N6) medium with and without 0.1% activated charcoal (AC).

| Treatment no. | PGR conc. (mg·L <sup>-1</sup> ) |                 |      |      |      |       |      |      |
|---------------|---------------------------------|-----------------|------|------|------|-------|------|------|
|               | BA                              | GA <sub>3</sub> | IAA  | Kin  | TDZ  | 2,4-D | 2iP  | NAA  |
| 1             | 1.00                            | 0.00            | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 4.00  | 0.00 | 0.00 |
| 2             | 1.00                            | 0.00            | 1.00 | 0.10 | 0.00 | 0.00  | 0.00 | 0.00 |
| 3             | 2.00                            | 0.50            | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00  | 0.00 | 0.50 |
| 4             | 2.00                            | 1.00            | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00  | 0.00 | 1.00 |
| 5             | 3.00                            | 1.00            | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00  | 0.00 | 1.00 |
| 6             | 0.00                            | 1.00            | 0.00 | 0.00 | 0.25 | 0.00  | 1.00 | 0.00 |
| 7             | 0.00                            | 1.00            | 0.50 | 0.00 | 0.00 | 0.00  | 2.00 | 0.00 |
| 8             | 1.00                            | 0.50            | 1.00 | 0.10 | 0.00 | 0.00  | 0.00 | 0.00 |
| 9             | 0.10                            | 0.50            | 0.10 | 0.00 | 1.00 | 0.00  | 0.00 | 0.00 |
| 10            | 0.00                            | 0.00            | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 4.00  | 1.00 | 0.00 |
| 11            | 1.00                            | 0.00            | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 4.00  | 0.00 | 0.00 |
| 12            | 0.00                            | 0.00            | 0.00 | 0.00 | 0.50 | 4.00  | 0.00 | 0.00 |

(다) 배양환경

배양온도는  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 로 설정하였고, 상대습도 70-80%인 배양실에서 1일 16시간 동안  $30\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPF의 광 조건하에서 배양하였다. 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프(TL-D 32W/865 RS 1SL, Philips, The Netherlands)를 이용하였다.

(3) 결과 및 고찰

표면살균방법은 85% 무균배양을 생산하였다. 배양 30일 후 배양체 50%는 분비물 때문에 절편체가 갈변하거나 건조되어 폐기하였다. 그 중에서도 'Sarah Bernhardt'는 긍정적인 반응을 나타내었고, 나머지 3개 품종은 페놀물질이 과다하게 분비되어 고사하였다. 대조구 배지에서 자란 절편체는 대부분 검게 변하였고, 페놀물질의 발생 때문에 고사하였다(Fig. 1-4-1). 사이토카이닌의 단용처리와 활성탄이 첨가되지 않은 AM 배지와 N6 배지에서는 켈러스가 발생되었다. 또한 켈러스가 유도된 AM 배지와 N6 배지에서 활성탄이 첨가되지 않은 식물생장조절제 조합에서 관찰되었다(Table 1-4-3). 모든 꽃잎 절편체는 건진한 녹색의 켈러스 형성을 보이는 등 아주 효과적인 연구결과를 얻었다. 계대배양은 30일 간격으로 하였으며, 10%의 켈러스가 발생되었다.

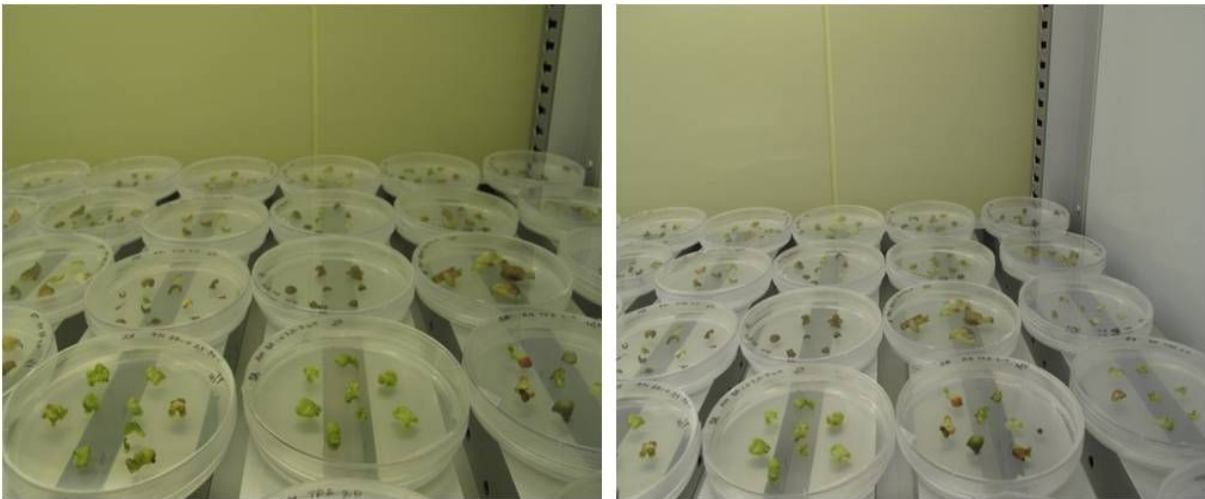


Fig. 1-4-1. All petals subcultured after 30 days onto the same medium turned green in culture with callus on the margins of petals.

Table 1-4-3. Effect of combinations of PGR's with AM medium and N6 medium without 0.1% activated charcoal on petals as explants of peony cultivar 'Sarah Bernhardt'. Observations recorded after 60 days on second subculture. Callus induction (%) was very low i.e. 10%.

| N6 medium | PGR (mg·L <sup>-1</sup> ) |                     | Observation |
|-----------|---------------------------|---------------------|-------------|
| BA 2.0    | NAA 0.5                   | GA <sub>3</sub> 0.5 | Callus      |
| BA 1.0    | IAA 1.0                   | Kin 0.1             | Callus      |
| 2iP 2.0   | IAA 0.5                   | GA <sub>3</sub> 1.0 | Callus      |
| AM medium |                           |                     |             |
| BA 1.0    | Kin 0.1                   | IAA 1.0             | Callus      |
| BA 1.0    | 2,4-D 4.0                 | 0                   | Callus      |
| BA 3.0    | NAA 1.0                   | GA <sub>3</sub> 1.0 | Callus      |

배양 3~4달 후 활성탄이 첨가되지 않은 배지에서 배양한 꽃잎 절편체는 많은 캘러스를 생산하였다. 새로운 배지에 이식하였을 때 캘러스는 계속 자랐으며, 부정아로 발달하는 것은 실패하였다(Fig. 1-4-2). 활성탄이 포함된 배지는 캘러스가 처음엔 잘 자랐는데 갈변하였고, 배양 15일 후에는 생장이 멈추었다. 활성탄이 포함된 새로운 배지에 이식하였을 때 절편체의 형태로 자라는 것은 실패하였고, 결국 고사하였다(Fig. 1-4-3). 따라서 꽃잎 절편체로부터 발생한 갈변된 캘러스는 배양배지에 추가된 활성탄에 의해 억제되었다고 볼 수 있다.

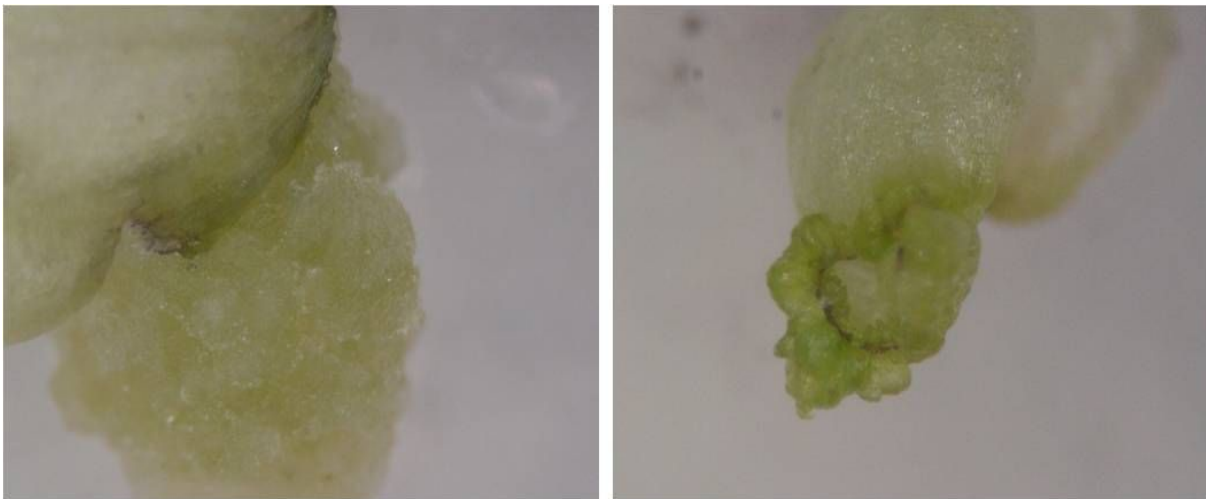


Fig. 1-4-2. Microscopic view of callus on the margins of petal explants.



Fig. 1-4-3. On activated charcoal medium more browning was observed and explants dried with passage of time.

캘러스를 발생하는데 긍정적인 결과로는 다양한 농도의 사이토키닌을 단독으로 처리하였을 때 나타내었다(Table 1-4-4). 12가지 식물생장조절제의 혼용 처리 외에는 Table 1-4-2에 나타난 것으로 6가지 혼용 처리에서 캘러스가 발생하였다(Table 1-4-5). 캘러스 발생은 매우 느렸고, 45~60일 후 계대배양 하였다. 사이토키닌과 옥신의 혼용 처리는 캘러스 확립을 향상시켰고, 세포 수가 증가하였지만 갈변하였다. 이는 세포로부터 배출된 페놀물질이 발생되어 갈변된 것으로 판단된다. 일반적으로 갈변과 괴사의 활성은 페놀물질의 과도한 축적과 관련이 있다고 볼 수 있다.

Table 1-4-4. Effect of cytokinins tried alone with AM medium and N6 medium without 0.1% activated charcoal on petals as explants of peony cultivar 'Sarah Bernhardt'. Observations recorded after 60 days on second subculture.

| PGR (mg·L <sup>-1</sup> ) | Concentrations (mg·L <sup>-1</sup> ) |     |     | Observation  |
|---------------------------|--------------------------------------|-----|-----|--------------|
| TDZ                       | 0.1                                  | 2.0 | -   | Green callus |
| BA                        | 1.0                                  | 4.0 | 8.0 | Green callus |
| Kin                       | 0.5                                  | 1.0 | 2.0 | Green callus |
| 2iP                       | 2.0                                  | 4.0 | -   | Green callus |

옥신의 축적으로 마디 또는 잎 절편체의 절단된 부분에서 캘러스 발생을 향상시켰다. 이러한 이유로 대부분 작약 꽃잎 절편체에서 옥신의 농도가 높아질수록 캘러스가 많이 발생되었음을 알 수 있었다. 배양 3달 후 캘러스 생장은 각 처리배지에서 큰 변화가 없었다. 그러므로 AM 배지는 이전에 연구된 것 외 12가지 혼용 처리와 식물생장조절제를 그에 따른 농도로 첨가하였다(Table 1-4-5). 배양 30일 후 AM 배지에 첨가된 6, 9번 처리구에서는 긍정적인 결과를 보였다. 현미경을 이용한 사진은 캘러스의 가장자리에 나타난 결과를 나타낸 것이다(Fig. 1-4-4). 꽃잎 절편체에서 발생된 캘러스가 신초 눈으로 변하는 것은 하나의 페트리디쉬에서 관찰하였다(Fig. 1-4-5). 신초 발생률은 매우 느렸고, 성장하는데 많은 시간이 걸렸다. 현재 연구

에서 캘러스 유지를 위해 확인된 것은 캘러스 조직이 성장단계에 따라 괴사되거나 갈변화가 된다는 것이다. 이것은 조직의 갈변화가 페놀물질의 과도한 축적과 관련 있다고 볼 수 있다. 비록 캘러스 단계를 통한 간접적인 신초 발생이지만 매우 어렵고 오랜 시간이 걸리며 갈변이 일어나는 동안 캘러스로부터 신초 형성을 억제시키는 중요한 문제라고 판단된다.

Table 1-4-5. Explants and callus were further subcultured on AM medium with the following 12 combinations of PGR's at different concentrations.

| Treatment no. | PGR (mg·L <sup>-1</sup> ) |     |       |                 | Observations         |
|---------------|---------------------------|-----|-------|-----------------|----------------------|
|               | BA                        | IBA | NAA   | GA <sub>3</sub> |                      |
| 1             | 1.0                       | 1.0 | 1.0   | 1.0             | Green callus         |
| 2             | 3.0                       | 1.0 | 1.0   | 1.0             | Green callus         |
|               | Kin                       | IBA | 2,4-D | GA <sub>3</sub> |                      |
| 3             | 1.0                       | 1.0 | 2.0   | 1.0             | Green callus         |
| 4             | 3.0                       | 1.0 | 2.0   | 1.0             | Green callus         |
|               | TDZ                       | NAA | IBA   | GA <sub>3</sub> |                      |
| 5             | 1.0                       | 1.0 | 1.0   | 1.0             | Green callus         |
| 6             | 2.0                       | 1.0 | 1.0   | 1.0             | Green callus         |
|               | TDZ                       | 2iP | 2,4-D | GA <sub>3</sub> |                      |
| 7             | 0.5                       | 2.0 | 2.0   | 5.0             | Green-white callus   |
| 8             | 1.0                       | 1.0 | 2.0   | 5.0             | Green-white callus   |
| 9             | 2.0                       | 0.5 | 2.0   | 5.0             | Shoot buds on callus |
|               | TDZ                       | BA  | 2,4-D | -               |                      |
| 10            | 1.0                       | 1.0 | 1.0   | -               | Green callus         |
| 11            | 1.0                       | 1.0 | 2.0   | -               | Green callus         |
| 12            | 1.0                       | 1.0 | 4.0   | -               | Globular structures  |

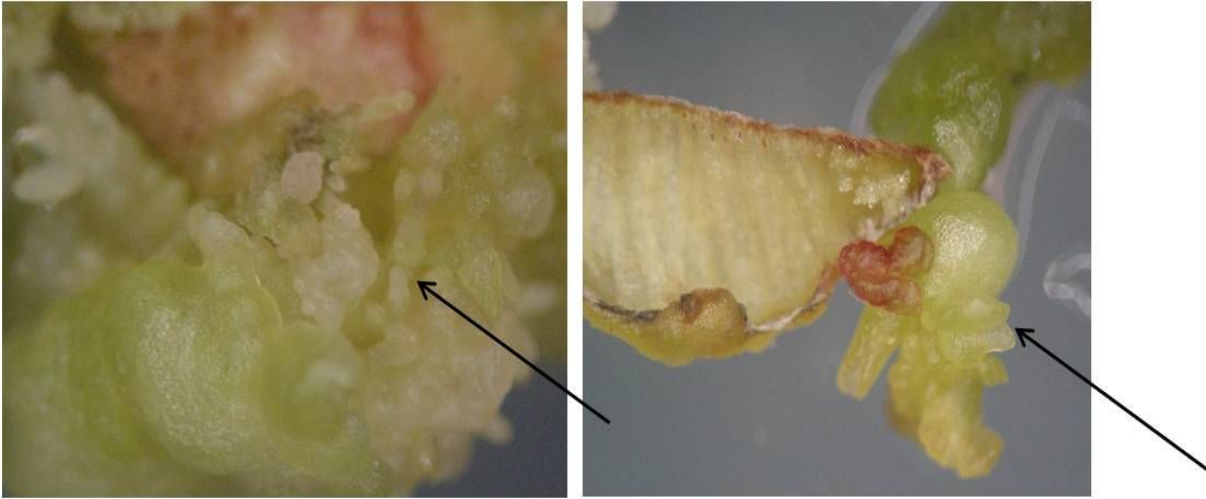


Fig. 1-4-4. Microscopic view of some outgrowths on petal explants.

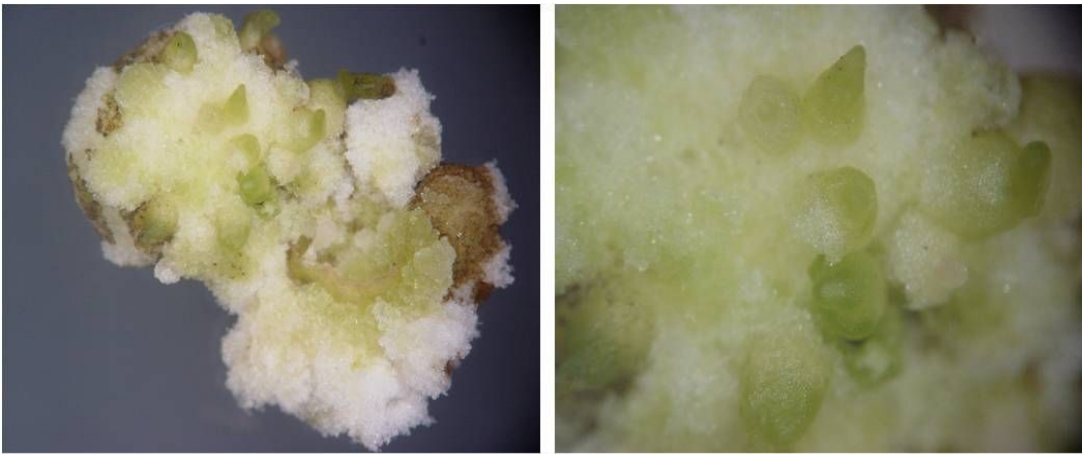


Fig. 1-4-5. Microscopic view of petal callus developing into shoots on the AM supplemented with  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2iP,  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D, and  $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>.

## 나. 작약 동지아를 이용한 식물생장조절제의 적정 농도 조건 확립

### (1) 연구목적

본 실험에서는 선행연구의 실험방법을 이용하여 기내 무균 식물체를 확보하고 겨울 동안 생장되는 어린 눈, 즉 동지아를 절편체로 이용하여 신초 발생과 최적 배양을 위한 식물생장조절제의 적정 농도 조건을 확립하기 위하여 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 실험재료 및 살균방법

동지아를 수돗물에 Tween 20 한 방울을 넣고 10분 동안 세척하였다. 멸균된 눈의 바깥부분의 비늘을 제거하고 70%(v/v) EtOH에 5분간 침지 후 멸균수로 1회 세척하였다. 그리고 1.5%(v/v) NaOCl에 5분 동안 침지한 후 멸균수로 1회 세척하였다. 무균 배양조건하에 바깥쪽의 비늘 3~5개 제거하고, 다시 70%(v/v) EtOH에 5분간 침지 후 멸균수로 3회 세척하였고, 1.5%(v/v) NaOCl을 이용하여 5분간 침지한 후 멸균수로 3회 세척하였다. 멸균된 눈은

0.1%(w/v) 활성탄과 처리별로 식물생장조절제가 들어 있는 1/2 MS 배지에 치상하였다.

(나) 배양배지

1/2배액 MS 배지에  $\text{CaCl}_2$ , sucrose 3%(w/v)를 첨가한 배지를 이용하였다. 처리별 성장조절제 조성은 Table 1-4-6과 같다. pH는 5.80으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121℃에서 15분간 고압멸균 하였다.

(다) 배양환경

배양온도는  $25\pm 2^\circ\text{C}$ 로 설정하였고, 상대습도 70-80%인 배양실에서 1일 명기 16시간 동안  $30\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFd의 광 조건하에서 배양하였다. 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프(TL-D 32W/865 RS 1SL, Philips, The Netherlands)를 이용하였다.

(3) 결과 및 고찰

배양 15일 후 눈은 빨리 자랐고 4~5개의 잎을 얻었다. 눈은 main shoots와 lateral shoots로 발아하였다. 30일 후 각 눈의 주변에서 신초가 발생하였다(Fig. 1-4-6).  $\text{GA}_3$ 는 신장을 촉진시키는데  $\text{GA}_3$ 를 첨가하지 않은 눈에서 신초를 발생시켰지만,  $\text{GA}_3$ 를 처리한 것에 비해서는 적었다. BA와  $\text{GA}_3$ 의 혼용 처리는 결눈의 성장과 형성을 위해 사용되었다. 신초와 줄기 신장을 위한  $\text{GA}_3$ 의 영향은 이미 많은 식물에서 보고된 바 있다.

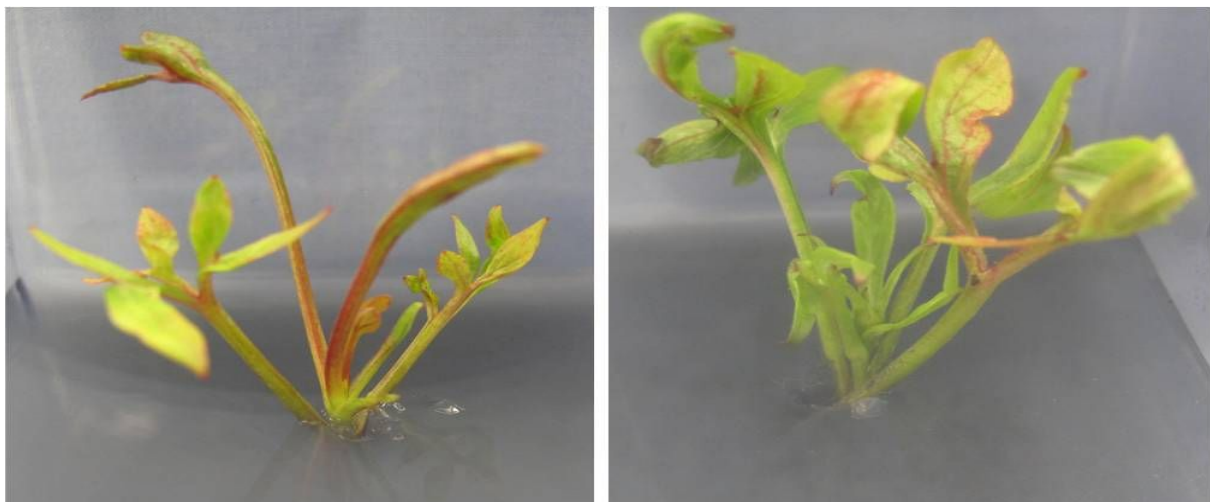


Fig. 1-4-6. Shoot induction and multiplication of underground buds of peony observed after 4 weeks.

가장 높은 신초 발생률(100%)과 절편체당 발생된 신초 6.2개은  $1.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA와  $0.5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{GA}_3$ 가 첨가되었을 때 나타났다. 신장된 신초는 마디부분을 절단하고 축아 증식을 위해 새로운 배지로 이식하였다. 이전 연구에서는 2배액  $\text{CaCl}_2$ 과 1/2배액 MS 배지가 작약의 증식과 성장을 향상시킨다고 보고되었다. 이러한 이유로 1/2배액 MS 배지와 2배액  $\text{CaCl}_2$ 을 사용하였지만, 본 연구에서는 과수성 신초가 발생되지 않았다.

초본성 작약의 조직배양과 대량번식은 증식률을 높일 수 있고, 육종기환을 단축할 수 있으며 생산을 위해 매우 중요하다. 본 연구에서는  $\text{GA}_3$ 가 작약 배양에서 신초 발생에 가장 효과적



이었다고 하였지만 IAA를 첨가하였더니 신초 발생을 향상시켰다(Table 1-4-6). 활성탄을 배지에 첨가하면 페놀화합물을 흡수하여 식물의 생장을 향상시킨다는 보고가 있다. 이러한 이유로 활성탄이 페놀물질의 배출을 억제하여 신초가 발생됨을 알 수 있었다.

Table 1-4-6. Peony rhizome shoots multiplication on the 1/2 strength MS medium and 8.8 g CaCl<sub>2</sub> with 0.1% activated charcoal.

| PGR (mg·L <sup>-1</sup> ) |     |     |                 | Shoot induction (%) | No. of shoots per explant |
|---------------------------|-----|-----|-----------------|---------------------|---------------------------|
| BA                        | Kin | IAA | GA <sub>3</sub> |                     |                           |
| 0.2                       | -   | -   | -               | 50                  | 3.1±0.5 c <sup>z</sup>    |
| 0.5                       | 0.3 | -   | -               | 65                  | 3.5±0.7 c                 |
| 0.2                       | 0.2 | 0.5 | -               | 80                  | 5.2±0.3 b                 |
| 0.2                       | 0.2 | 0.1 | -               | 85                  | 5.5±0.8 b                 |
| 1.0                       | -   | -   | 0.3             | 95                  | 5.8±0.6 b                 |
| 1.0                       | -   | -   | 0.5             | 100                 | 6.2±0.4 a                 |

<sup>z</sup>Means followed by the same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

#### 다. 작약의 기내 증식을 위한 발근단계에 관한 연구

##### (1) 연구목적

작약의 기내 증식 후 신초의 발근을 위하여 실험을 수행하였다.

##### (2) 재료 및 방법

###### (가) 실험재료

식물생장조절제 처리에 따른 선행연구의 결과를 바탕으로 기내에서 무균적으로 배양된 작약의 신초 개체를 획득하였다. 동지아를 통하여 얻은 신초를 본 실험의 재료로 이용하였다.

###### (나) 배양배지

신초는 1.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA(1번 처리)와 IAA(2번 처리)를 각각 첨가하여 배액 CaCl<sub>2</sub>(8.8 gm)과 1/2배액 MS 배지에 sucrose 3%(w/v)를 넣고, pH는 5.80으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121℃에서 15분간 고압멸균 하여 사용하였다. 3번 처리의 신초는 5일 동안 10.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA와 1/2배액 CaCl<sub>2</sub>(4.4 gm)가 첨가된 액체 MS 배지에서 유지하였고 식물생장조절제를 첨가하지 않은 1/4배액 MS 배지로 이식하였다.

###### (다) 배양환경

배양온도는 25±2℃로 설정하였고, 상대습도 70-80%인 배양실에서 1일 명기 16시간 동안 30 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> PPF의 광 조건하에서 배양하였다. 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프(TL-D 32W/865 RS 1SL, Philips, The Netherlands)를 이용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

배양 30일 후 가장 높은 발근율(15.0%)은 3번 처리와 0.1% 활성탄이 포함된 배지에서 관찰되었다(Table 1-4-7). 근장은 3.6cm로 가장 길었는데 신초는 약간 시들었고 잎이 노란색으로 변하였으며, 이는 활성탄에 오래 노출되었기 때문이라고 생각된다(Fig. 1-4-7). 활성탄은 배지에서 해로운 물질을 흡수하는 것으로 알려져 있는데, 신초의 시들음은 신초 발달을 위해 필요한 양분이 흡수된 것으로 판단된다. 높이가 4.0cm 이상인 초장과 3.0cm 근장은 토실이 상토에서 더 강화되었지만 5일 이내 시들거나 고사되어 살아남은 식물은 없었다. 따라서 순화는 차후 연구에서 이를 받아들여야 될 것으로 보인다.

Table 1-4-7. Effect of auxins on root induction on in vitro-raised peony shoots.

| Treatment no. | MS medium strength | CaCl <sub>2</sub> (g) | IBA (mg·L <sup>-1</sup> ) | IAA (mg·L <sup>-1</sup> ) | Rooting (%) | Root length (cm)       |
|---------------|--------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|-------------|------------------------|
| 1             | 1/2                | 8.8                   | 0.5                       | -                         | 2.5         | 3.2±0.8 b <sup>z</sup> |
| 2             | 1/2                | 8.8                   | 1.0                       | -                         | 5.5         | 3.5±0.7 a              |
| 3             | 1/2                | 8.8                   | -                         | 0.5                       | 3.1         | 3.3±0.8 b              |
| 4             | 1/2                | 8.8                   | -                         | 1.0                       | 10.0        | 3.2±0.4 b              |
| 5             | Full               | 4.4                   | 10.0                      | -                         | 15.0        | 3.6±0.6 a              |

<sup>z</sup>Means followed by the same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).



Fig. 1-4-7. Root induction on peony shoots observed after 30 days.

## 라. 작약 떡잎을 이용한 체세포배 발생 프로토콜 확립

### (1) 연구목적

본 연구는 떡잎을 이용하여 체세포배 발생을 통한 재분화 연구를 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 실험재료 및 살균방법

종자는 발에서 다 자란 식물을 수집하여 Tween 20 한 방울을 넣고 30분간 침지 후 멸균수로 세척하였다. 그리고 70%(v/v) EtOH에 5분간 침지 후 1.5%(v/v) NaOCl에 5분간 침지한 후 멸균수로 3~4회 세척하였다. 표면살균을 위해 위의 단계를 클린벤치 하에서 반복하였다.

#### (나) 배양배지

MS 기본배지에 sucrose 3%(w/v)와 agar 0.8%(w/v)가 첨가된 배지를 이용하였다. pH는 5.80으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121°C에서 15분간 고압멸균 하였다. 종자발아를 위해 종자로부터 적출한 접합자배를 0.1%(w/v) 활성탄, BA와 GA<sub>3</sub>를 다른 농도로 조합하여 MS 배지에 치상하였다(Table 1-4-8).

#### (다) 배양환경

배양온도는 25±2°C로 설정하였고, 상대습도 70-80%인 배양실에서 1일 명기 16시간 동안 30 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> PPF의 광 조건하에서 배양하였다. 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프(TL-D 32W/865 RS 1SL, Philips, The Netherlands)를 이용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

가장 높은 발아율(95%)은 배를 1.0 mg·L<sup>-1</sup> BA와 0.5 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>가 첨가된 MS 배지에 배양되었을 때 관찰되었다(Table 1-4-8). 30일된 떡잎 절편체는 BA와 2,4-D가 첨가된 MS 배지에 배양하였다. 0.5~2.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D를 첨가한 MS 배지에서 배양하였을 때 swollen explant는 30일 후 관찰하였다. 같은 배지에서 계대배양을 하였더니, 녹색의 캘러스를 얻었다(Table 1-4-9).

Table 1-4-8. Effect of BA and GA<sub>3</sub> on germination of zygotic embryos of *P. lactiflora*<sup>z</sup>.

| PGR <sup>z</sup> (mg·L <sup>-1</sup> ) |                 | Germination (%) |
|--|-----------------|-----------------|
| BA                                     | GA <sub>3</sub> |                 |
| 0.5                                    | -               | -               |
| 1.0                                    | -               | -               |
| 0.5                                    | 0.5             | 92 a            |
| 1.0                                    | 0.3             | 90 a            |
| 1.0                                    | 0.5             | 95 a            |
| 1.0                                    | 1.0             | 80 b            |
| 2.0                                    | 0.5             | 80 b            |

<sup>z</sup>All media contained 0.1% activated charcoal.

<sup>y</sup>Means followed by same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

Table 1-4-9. Effect of BA and 2,4-D on responses of cotyledon explants of *P. lactiflora*<sup>z</sup>.

| PGR <sup>z</sup> (mg·L <sup>-1</sup> ) |       | Explant response             |                               |
|--|-------|------------------------------|-------------------------------|
| BA                                     | 2,4-D | 30 days<br>after inoculation | 90 days<br>after inoculation  |
| 0.0                                    | 0.5   | Swollen                      | Swollen                       |
| 0.0                                    | 1.0   | Swollen                      | Swollen and callus            |
| 0.0                                    | 2.0   | Swollen                      | Swollen and callus            |
| 0.1                                    | 0.1   | Swollen                      | Greenish-white friable callus |
| 0.1                                    | 0.5   | Swollen                      | Greenish-white friable callus |
| 0.1                                    | 1.0   | Swollen                      | Greenish-white friable callus |
| 0.1                                    | 2.0   | Swollen                      | Green callus                  |
| 1.0                                    | 1.0   | Swollen                      | Green compact callus          |
| 2.0                                    | 2.0   | Callus                       | Compact callus                |

<sup>z</sup>All media contained 0.1% activated charcoal.

낮은 농도의 2,4-D와 0.1 mg·L<sup>-1</sup> BA의 첨가는 30일 후 swollen cotyledons를 발생하였다. Swollen cotyledons는 90일 동안 같은 배지에서 계대배양 하였을 때 greenish-white 컬러스를 관찰하였다. 녹색의 작은 캘러스는 BA와 2,4-D가 균일하게 증가할 때 얻었으며 체세포배는 실험에 사용된 처리로는 관찰되지 않았다.

배양 30일 후 1.0 mg·L<sup>-1</sup> BA와 2,4-D가 각각 첨가된 배지로부터 얻은 swollen 절편체는 BA, GA<sub>3</sub>, 그리고 NAA와 같은 식물생장조절제의 농도가 다양하게 포함되어 있는 배지에 이식하였다. 90일 후 구상배는 절편체의 표면에 직접적으로 형성하였다(Jana et al., 2013). 가장 높은 체세포배 발생률은 3.0 mg·L<sup>-1</sup>의 BA, 1.0 mg·L<sup>-1</sup>의 NAA, 1.0 mg·L<sup>-1</sup>의 GA<sub>3</sub>, 그리고 0.1%(w/v) 활성탄이 포함된 MS 배지에서 얻었다(Table 1-4-10; Fig. 1-4-8A, B). 심장형과 어뢰형에서 구상배의 성숙은 같은 배지에서 관찰되었다(Fig. 1-4-8C, D). 체세포배는 3.0 mg·L<sup>-1</sup>의 BA, 1.0 mg·L<sup>-1</sup>의 NAA, 1.0 mg·L<sup>-1</sup>의 GA<sub>3</sub>가 포함된 MS 배지에서 배양되었을 때 2차 체세포배가 관찰되었다(Fig. 1-4-9, 1-4-10). 어뢰형 배는 각각 1.0 mg·L<sup>-1</sup> BA와 GA<sub>3</sub>가 첨가된 MS 배지에 이식하였을 때, 식물체에서 전환된 모든 배의 생장은 매우 느렸다(Fig. 1-4-11A, B).

Table 1-4-10. Effect of PGRs and their concentrations of on somatic embryo induction in *P. lactiflora* measured at 90 days after inoculation.

| PGR <sup>z</sup> (mg·L <sup>-1</sup> ) |     |                 | No. of somatic embryos induced/explant |
|--|-----|-----------------|--|
| BA                                     | NAA | GA <sub>3</sub> |  |
| 1.0                                    | 0.1 | 1.0             | -                                      |
| 2.0                                    | 0.5 | 1.0             | 0.9 b <sup>y</sup>                     |
| 3.0                                    | 1.0 | 1.0             | 14.0 a                                 |

<sup>z</sup>All media contained 0.1% activated charcoal.

<sup>y</sup>Means followed by same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

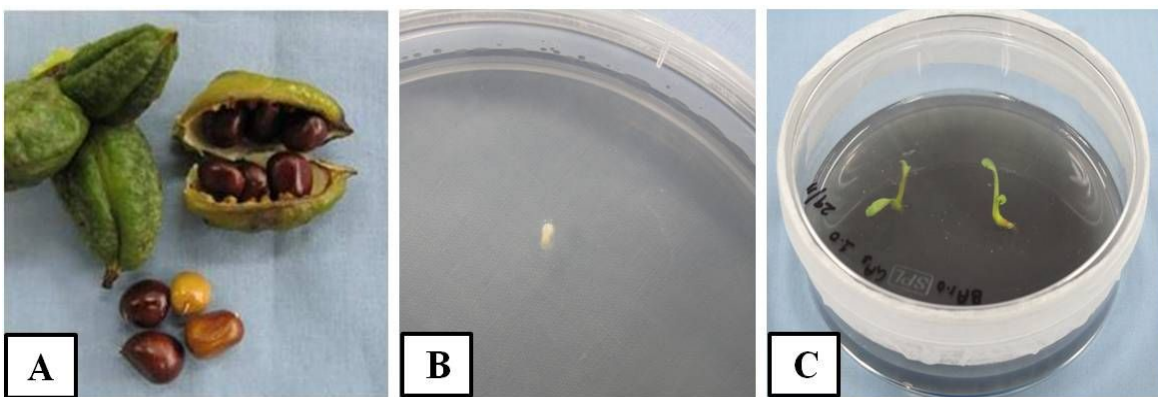


Fig. 1-4-8. (A) Seeds of *P. lactiflora*, (B) an excised zygotic embryo from the seed, and (C) germinated embryos 30 days after inoculation.

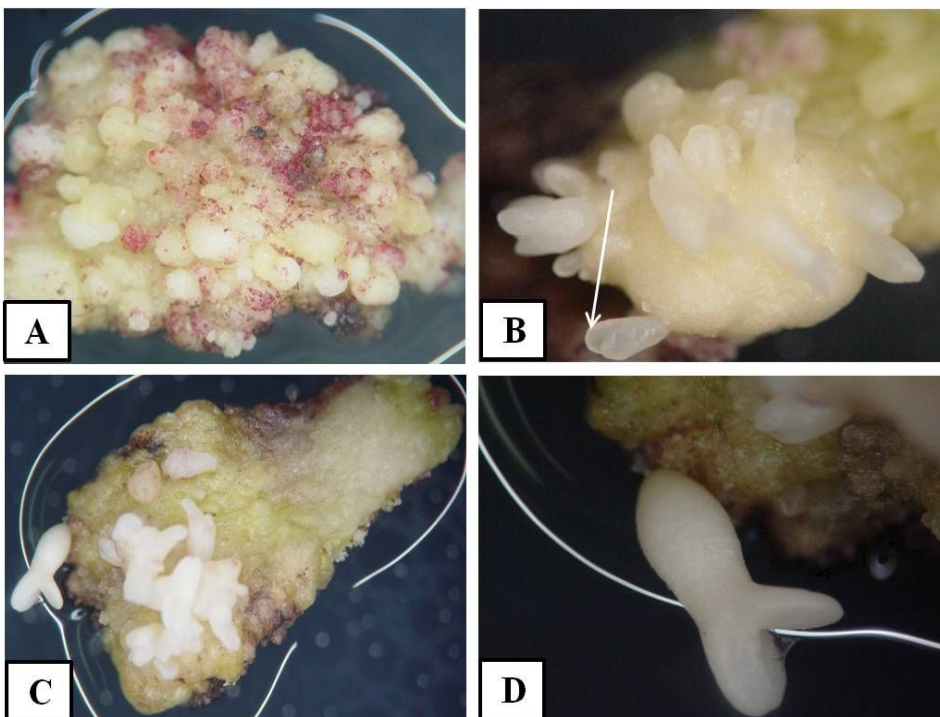


Fig. 1-4-9. Developmental stages of direct somatic embryogenesis in *P. lactiflora*. (A)

Microscopic view of globular somatic embryos, (B) arrow showing heart shaped embryo, (C) torpedo-shaped embryos, and (D) magnified view of a torpedo-shaped embryo on the MS medium supplemented with  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA,  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA, and  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>.



Fig. 1-4-10. When somatic embryo was cultured onto the same MS medium with  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA,  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA, and  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub> secondary somatic embryos were observed on the primary somatic embryos.

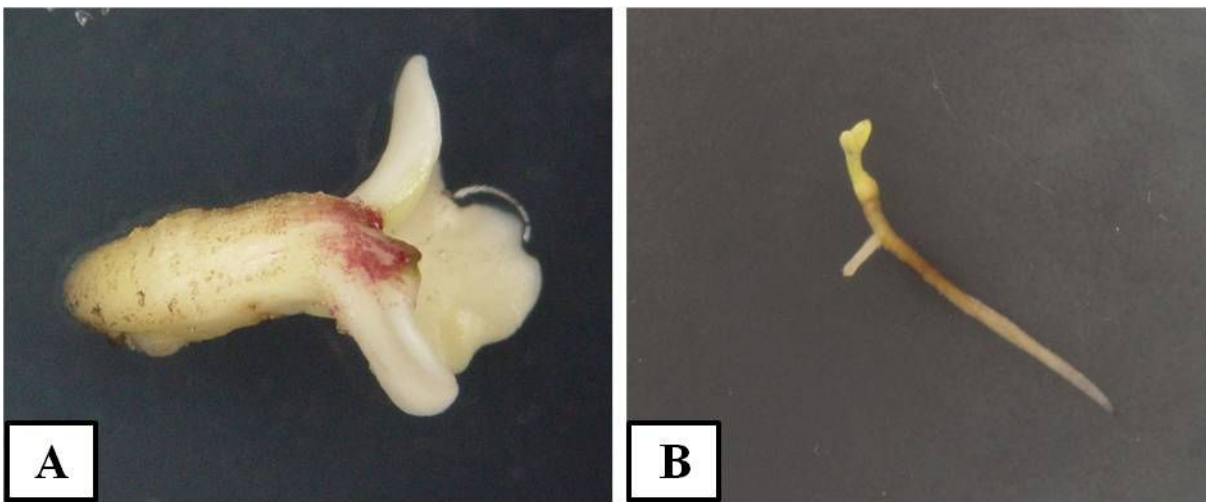


Fig. 1-4-11. Torpedo-shaped embryo was transferred for conversion to the MS medium supplemented with  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA, and  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>. (A) Embryo germination after 10 days and (B) plantlet obtained at 60 days after conversion.

#### 마. 4가지 작약(*P. lactiflora*) 품종의 꽃잎 절편체에서 캘러스 유도

##### (1) 연구목적

작약 ‘Shirley Temple’(백색), ‘Sarah Bernhardt’(연분홍), ‘Kansas’(진분홍), ‘Goldmine’(노란색) 품종의 꽃잎 절편체를 이용해 캘러스를 유도하기 위해 수행하였다.

##### (2) 재료 및 방법

(가) 실험재료 및 멸균 소독방법

꽃봉오리를 70%(v/v) EtOH에 2분간 침지 후 멸균수로 2회 세척하였다. 1.5%(v/v) NaOCl에 Tween 20 한 방울을 넣고 15분간 소독 후 멸균수로 세척하였다. 인편을 제거 후 무균상태에서 70%(v/v) EtOH로 1분간 침지 후 멸균수로 세척하고, 1.5%(v/v) NaOCl에 10분, 0.1%(v/v) HgCl<sub>2</sub>에서 15분간 소독한 후 멸균수로 세척하였다. 꽃봉오리의 밑 부분을 잘라 70%(v/v) EtOH에 30초간 침지한 후 멸균수로 세척한 뒤 1.5%(v/v) NaOCl에 5분간 침지하여 1% PVP 로 소독하였다.

(나) 배양배지

MS, AM, SH, N6배지를 사용하였다. 사이토키닌의 처리별 성장조절제 조성은 다음과 같다(Table 14). 옥신은 IAA, IBA, 2,4-D를 사용하였다. 옥신과 사이토키닌의 조성은 Table 1-4-11과 같다.

Table 1-4-11. Cytokinins (TDZ, BA, Kin, and 2iP) tried alone or supplemented to the Murashige and Skoog (MS) medium, Anderson's medium (AM), Schenk and Hilderbrandt (SH) medium, and Chu's N6 medium with or without 0.1% activated charcoal (AC) on four cultivars of *P. lactiflora*.

| PGR | Conc. (mg·L <sup>-1</sup> ) |     |     |     |     |     |
|-----|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| TDZ | Control (0.0)               | 0.1 | 0.5 | 1.0 | 2.0 | -   |
| BA  | Control (0.0)               | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 4.0 | 8.0 |
| Kin | Control (0.0)               | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 4.0 | 8.0 |
| 2iP | Control (0.0)               | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 4.0 | 8.0 |

Table 1-4-12. Combinations of cytokinins and auxins tried with MS, AM, SH medium, and Chu's N6 medium with or without 0.1% activated charcoal (AC) on the petal explants of *P. lactiflora*.

| Treatment | PGR Conc. (mg·L <sup>-1</sup> ) |                 |     |     |      |       |     |     |
|-----------|---------------------------------|-----------------|-----|-----|------|-------|-----|-----|
|           | BA                              | GA <sub>3</sub> | IAA | Kin | TDZ  | 2,4-D | 2iP | NAA |
| 1         | 1.0                             | 0.0             | 0.0 | 0.0 | 0.0  | 4.0   | 0.0 | 0.0 |
| 2         | 1.0                             | 0.0             | 1.0 | 0.1 | 0.0  | 0.0   | 0.0 | 0.0 |
| 3         | 2.0                             | 0.5             | 0.0 | 0.0 | 0.0  | 0.0   | 0.0 | 0.5 |
| 4         | 2.0                             | 1.0             | 0.0 | 0.0 | 0.0  | 0.0   | 0.0 | 1.0 |
| 5         | 3.0                             | 1.0             | 0.0 | 0.0 | 0.0  | 0.0   | 0.0 | 1.0 |
| 6         | 0.0                             | 1.0             | 0.0 | 0.0 | 0.25 | 0.0   | 1.0 | 0.0 |
| 7         | 0.0                             | 1.0             | 0.5 | 0.0 | 0.0  | 0.0   | 2.0 | 0.0 |
| 8         | 1.0                             | 0.5             | 1.0 | 0.1 | 0.0  | 0.0   | 0.0 | 0.0 |
| 9         | 0.1                             | 0.5             | 0.1 | 0.0 | 1.0  | 0.0   | 0.0 | 0.0 |
| 10        | 0.0                             | 0.0             | 0.0 | 0.0 | 0.0  | 4.0   | 1.0 | 0.0 |
| 11        | 1.0                             | 0.0             | 0.0 | 0.0 | 0.0  | 4.0   | 0.0 | 0.0 |
| 12        | 0.0                             | 0.0             | 0.0 | 0.0 | 0.5  | 4.0   | 0.0 | 0.0 |

### (3) 결과 및 고찰

치상 30일 후 삼출물 때문에 절편체가 검은색으로 변하거나 고사하여 배양한 것의 50%를 폐기하였다. 4 품종의 배양을 시도하였지만 ‘Sarah Bernhardt’ 품종만 긍정적인 반응을 보였고, 나머지 3 품종은 과도한 대사산물 때문에 생존하기 어려웠다. 성장조절제를 사용하지 않은 대조구의 절편체가 모두 고사하였다(Fig. 1-4-12). 활성탄을 첨가하지 않고 사이토카이닌만 첨가한 AM배지와 N6배지에서 켈러스가 발생하였다(Table 1-4-13). 이와 유사하게 활성탄을 첨가하지 않은 AM배지와 N6배지에 세 종류의 성장조절제 조성에서 켈러스가 유도되었다(Table 1-4-14). 모든 꽃잎 절편체는 녹색으로 변했다. 계대배양은 30일 간격으로 하였고 절편체 끝 부분에서 치상한 10%의 절편체에서 켈러스가 발생하였다. 배양 3-4개월 동안 꽃잎 절편체는 활성탄을 첨가하지 않은 배지에서 더 많은 켈러스가 발생하였다. 활성탄을 첨가한 배지에서는 켈러스가 생장은 하였지만 갈색으로 변하다가 배양 15일 후 생장을 멈췄다. 이러한 경우 새로운 배지로 교체해도 절편체가 성장하지 않거나 고사하였다. 사이토카이닌을 첨가시 모든 처리에서 켈러스 유도에 있어 긍정적인 영향을 미쳤다(Table 1-4-15). 12가지 성장조절제 조성은 Table 14-12에 나타나 있고, 여기서 6가지 조합에서만 켈러스가 유도되었다(Table 1-4-16). 계대배양 46-60일 후 켈러스 유도는 아주 느려졌다. 켈러스 증식속도는 아주 느렸고, 켈러스 색 같은 녹색이나 녹색을 띤 하얀색 이었다. 사이토카이닌과 옥신의 첨가는 켈러스 증식을 향상시켰다(Fig. 1-4-13, 14, 15).

3달 동안 각각의 배지를 관찰하였지만 켈러스 생장은 유의차가 없었다. 따라서 켈러스 생장은 성장조절제를 첨가한 AM배지(Table 1-4-17)가 다른 처리보다 좋았다. 처리 6과 9번을 AM 배지에 첨가한 것에서 긍정적인 결과를 보였다. 현미경으로 관찰한 결과 켈러스 가장자리에서 생장이 일어났으며(Fig. 1-4-16), 이것이 신초로 성장하였다(Fig. 1-4-17).



Fig. 1-4-12. When petal explants of *P. lactiflora* ‘Sarah Bernhardt’ were cultured on the MS medium supplemented with activated charcoal (0.1%, w/v), more browning was observed and the explants dried with passage of time.



Table 1-4-13. Effect of cytokinins tried alone with the AM medium and N6 medium without 0.1% activated charcoal on petals as the explants of peony cultivar 'Sarah Bernhardt'. Observations were recorded after 60 days on second subculture.

| PGR | Conc. ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) |     |     | Observation  |
|-----|---|-----|-----|--------------|
| TDZ | 0.1                                     | 2.0 | 0.0 | Green callus |
| BA  | 1.0                                     | 4.0 | 8.0 | Green callus |
| Kin | 0.5                                     | 1.0 | 2.0 | Green callus |
| 2iP | 2.0                                     | 4.0 | 0.0 | Green callus |

Table 1-4-14. Effect of combinations of PGR's with the AM medium and N6 medium without 0.1% activated charcoal on the petals explants of peony 'Sarah Bernhardt'. Observations were recorded after 60 days on second subculture. Callus induction (%) is very low, i.e. 10%.

| PGR ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) |           |                     | Observation |
|---------------------------------------|-----------|---------------------|-------------|
| N6 medium                             |           |                     |             |
| BA 2.0                                | NAA 0.5   | GA <sub>3</sub> 0.5 | Callus      |
| BA 1.0                                | IAA 1.0   | Kin 0.1             | Callus      |
| 2iP 2.0                               | IAA 0.5   | GA <sub>3</sub> 1.0 | Callus      |
| AM medium                             |           |                     |             |
| BA 1.0                                | Kn 0.1    | IAA 1.0             | Callus      |
| BA 1.0                                | 2,4-D 4.0 |                     | Callus      |
| BA 3.0                                | NAA 1.0   | GA <sub>3</sub> 1.0 | Callus      |

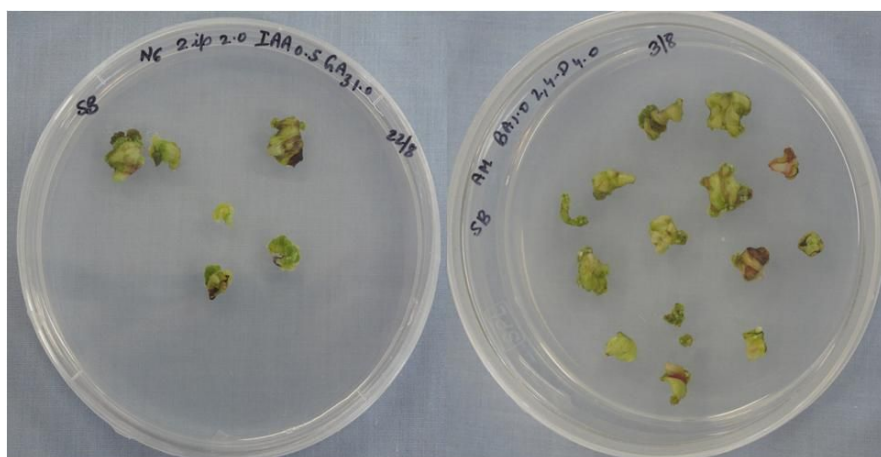


Fig. 1-4-13. Green callus induction on margins of the petal explants of *P. lactiflora* 'Sarah Bernhardt' on the N6 and AM medium.

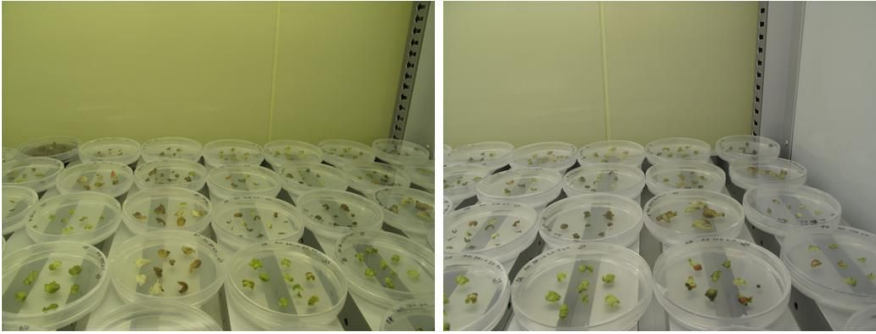


Fig. 1-4-14. Petal explants of *P. lactiflora* subcultured after 30 days onto the same fresh medium turned green with calli on the margins of the explants.

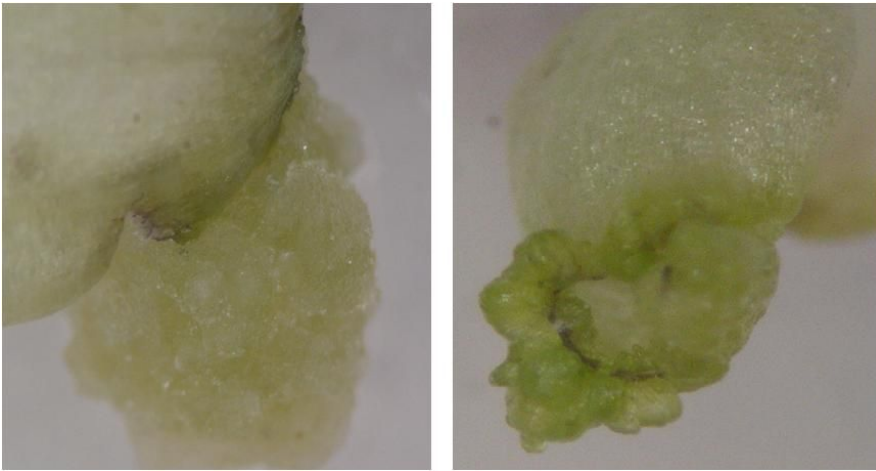


Fig. 1-4-15. Microscopic view of callus on the margins of the petal explants of *P. lactiflora* 'Sarah Bernhardt' cultured on the AM medium with PGR's.

Table 1-4-15. Explants and calli were further subcultured on the AM medium with the following 12 combinations of PGR's at different concentrations.

| Treatment | BA<br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | IBA<br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | NAA<br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | GA <sub>3</sub><br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | Observation          |
|-----------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|--|----------------------|
| 1         | 1.0                         | 1.0                          | 1.0                          | 1.0                                      | Green callus         |
| 2         | 3.0                         | 1.0                          | 1.0                          | 1.0                                      | Green callus         |
| 3         | Kin                         | IBA                          | 2,4-D                        | GA <sub>3</sub>                          | Green callus         |
| 4         | 1.0                         | 1.0                          | 2.0                          | 1.0                                      | Green callus         |
| 5         | 3.0                         | 1.0                          | 2.0                          | 1.0                                      | Green callus         |
| 6         | TDZ                         | NAA                          | IBA                          | GA <sub>3</sub>                          | Green callus         |
| 7         | 1.0                         | 1.0                          | 1.0                          | 1.0                                      | Green callus         |
| 8         | 2.0                         | 1.0                          | 1.0                          | 1.0                                      | Green callus         |
| 9         | TDZ                         | 2iP                          | 2,4-D                        | GA <sub>3</sub>                          | Green-white callus   |
| 10        | 0.5                         | 2.0                          | 2.0                          | 5.0                                      | Green-white callus   |
| 11        | 1.0                         | 1.0                          | 2.0                          | 5.0                                      | Shoot buds on callus |
| 12        | 2.0                         | 0.5                          | 2.0                          | 5.0                                      | Shoot buds on callus |
| 13        | TDZ                         | BA                           | 2,4-D                        |  | Green callus         |
| 14        | 1.0                         | 1.0                          | 1.0                          | 0.0                                      | Green callus         |
| 15        | 1.0                         | 1.0                          | 2.0                          | 0.0                                      | Green callus         |
| 16        | 1.0                         | 1.0                          | 4.0                          | 0.0                                      | Globular structures  |



Fig. 1-4-16. Microscopic view of some outgrowths on the petal explants of *P. lactiflora* 'Sarah Bernhardt' cultured on the AM medium.



Fig. 1-4-17. Microscopic view of petal calli of *P. lactiflora* 'Sarah Bernhardt' turned into

shoot buds on the AM medium supplemented with  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2iP,  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D, and  $35.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>.

#### 바. 4가지 작약(*P. lactiflora*) 품종의 자엽 절편체를 이용한 신초 증식

##### (1) 연구목적

작약 'Euisseong', 'P513', 'P524', 'P526' 품종의 자엽 절편체를 이용해 효율적인 신초 증식 프로토콜을 개발하기 위해 수행하였다.

##### (2) 재료 및 방법

###### (가) 실험재료 및 멸균 소독방법

노지에서 재배한 성숙한 종자를 Tween 20을 한 방울 떨어뜨린 수돗물에서 30분 동안 침지한 후 멸균수로 세척하였다. 종자를 70%(v/v) EtOH에 5분 동안 침지한 후 멸균수로 3-4번 세척한 뒤 1.5%(v/v) NaOCl에 5분 동안 소독하여 멸균수로 3-4번 세척하였다. 표면 살균을 위해 무균상태에서 위와 같은 방법으로 다시 소독하였다.

###### (나) 배양배지

MS 기본배지에 sucrose 3%(w/v)를 첨가한 배지를 이용하였다. 종자발아를 위해서는 BA와 GA<sub>3</sub>를 첨가한 MS배지를 사용하였다. 신초 증식을 위해서는 MS배지와 AM배지를 사용하였으며, 다양한 조합의 BA, IBA, IAA를 사용하여 작약의 신초 유도과 증식에 미치는 영향을 조사하였다. 발근을 위해서는 IBA와 IAA를 이용하여 실험하였다. pH는 5.80으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121°C에서 15분간 고압멸균 하였다.

생장한 신초는  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA와  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IAA가 첨가된 1/2 MS배지에 이식하였다. 발근 후 소식물체를 토실이가 든 순화박스에 이식하여 온실에서 순화시켰다.

###### (다) 배양환경

종자는  $25\pm 1^\circ\text{C}$ 에서 발아시켰고, 신초 증식과 발근은  $15\pm 1^\circ\text{C}$ 로 하였다. 광주기는 명기 16시간/암기 8시간으로 처리하였다. 조도는  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  조건이며 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

###### (라) 조사항목

배양 30일 후 신초 발생율, 절편체당 신초수, 발근율, 발근수를 조사하였다. 발근 후 소식물체의 생화학적 활성을 평가하기 위해 POD, IAAO, PPO를 분석하였다. 45일이나 60일 간격으로 계대배양 하였다.

##### (3) 결과 및 고찰

4 품종 모두 MS배지에 BA나 GA<sub>3</sub>를 단독으로 첨가하였을 때 종자는 발아하지 않았다. 발아율은 4 품종 모두  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA와  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>를 첨가한 MS배지에서 100%로 가장 높았다(Fig. 1-4-18). 또한 발아율은 네 품종 모두 BA가  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 까지 증가함에 따라 감소하였다(Table 1-4-16).

BA, GA<sub>3</sub>, IBA를 첨가한 AM배지에서 다신초가 성장하였다. 액아울과 측아울은 모든 품종에서 0.5 mg·L<sup>-1</sup> BA, 1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>를 첨가한 AM배지에서 100%였다(Table 1-4-17). BA가 0.5 mg·L<sup>-1</sup>까지 증가함에 따라 자엽 밑 부분에 캘러스가 발생되었고 신초 유도는 감소하였다. 신초 증식율은 BA와 GA<sub>3</sub> 농도가 증가함에 따라 감소하였다(Table 1-4-18). 따라서 본 연구에서는 BA농도가 낮을수록 신초의 증식과 성장에 효과적이었다.

절편체당 발생 신초수는 'P526'가 다른 품종에 비해 6.4개로 더 많았다. 신초장은 모든 품종에서 0.5 mg·L<sup>-1</sup> BA, 1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>, 1.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA를 첨가한 AM배지에서 5cm이거나 그 이상이었다(Table 1-4-19). 신초는 처음에는 약했다가 시간이 흐름에 따라 건강해졌다(Fig. 1-4-19). 60일마다 계대배양 하였다(Fig. 1-4-20).

IAA를 1/2AM배지에 첨가하여 발근을 유도하려 했으나 실패하였다. 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 첨가했을 때 뿌리가 기형으로 성장하였다. 신초 성장을 증가시키기 위해 1.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA가 첨가된 MS 배지에 이식하였을 때 발근율이 'Euisseong'과 'P526'은 100%, 'P524'는 20%, 'P513'은 0%였다(Table 1-4-20). 발근수는 'P526'은 14.8개(Fig. 1-4-21A), 최대근장은 'Euisseong'에서 7.7cm(Table 1-4-21)로 가장 길었다. 'Euisseong'과 'P526'에서 뿌리는 페놀 물질과 함께 성장하였다(Fig. 1-4-22).

배양 60일 후 기내 식물체를 순화시키기 전에 뿌리 끝 부분의 agar를 제거하기 위해 수돗물로 세척하였다(Fig. 1-4-23). 뿌리가 잘 발달된 건강한 식물체를 토질이 상토가 든 10cm 화분에 정식하였다. 1/4 MS배지로 관수하였으며 미스트가 설치된 온실에서 순화시켰다. 순화 30일 후 생존율은 'Euisseong'의 경우 80%였고(Fig. 1-4-24), 'P526'은 1%이었다. 'P524'는 순화시키는데 실패하였다. 따라서 효율적인 기외 순화방법을 확립하는 것이 중요할 것이라 판단된다.

POD 활성은 4 품종 모두 발근하기 전에 높았고, 발근 후 감소하였다(Fig. 1-4-25). IAAO 활성은 발근 전 높았고 발근 후 감소하였다(Fig. 1-4-26). 페놀 함량은 발근 후 감소하였다(Fig. 1-4-27). PPO 활성은 'P526'에서는 발근 후 증가하였지만 'Euisseong'과 'P524'는 변화가 없었다(Fig. 1-4-28).

Table 1-4-16. Effects of BA and GA<sub>3</sub> on zygotic embryo germination of four *P. lactiflora* cultivars.

| Treatment | BA (mg·L <sup>-1</sup> ) | GA <sub>3</sub> (mg·L <sup>-1</sup> ) | Germination (%)          |
|-----------|--------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| Control   | 0.0                      | 0.0                                   | 0.0±0.0                  |
| 1         | 0.5                      | 0.3                                   | 94.6±0.54 b <sup>z</sup> |
| 2         | 0.5                      | 0.5                                   | 100.0±0.00 a             |
| 3         | 1.0                      | 0.3                                   | 93.7±0.83 c              |
| 4         | 1.0                      | 0.5                                   | 90.6±0.54 d              |

<sup>z</sup>Means followed by same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

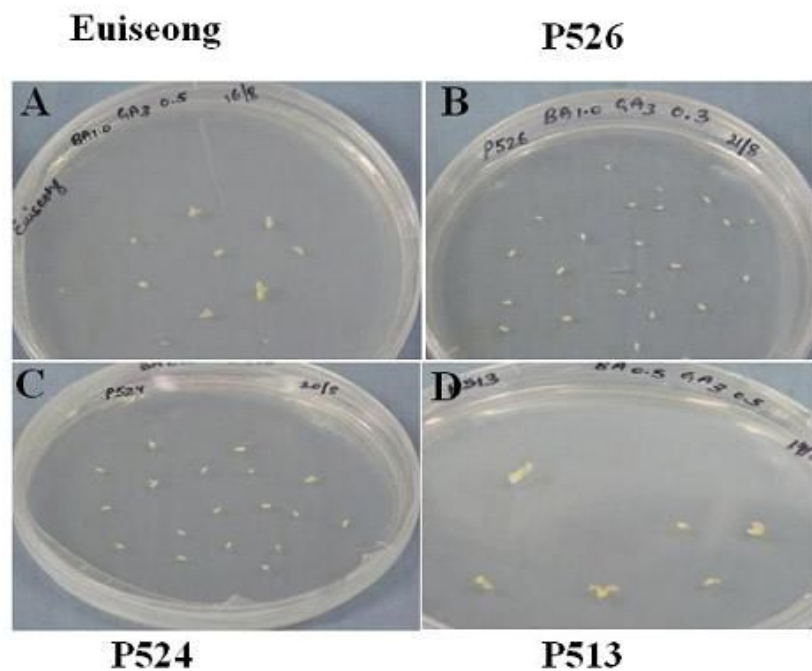


Fig. 1-4-18. Excised embryos of peony cultivars placed for germination on the MS medium supplemented with combinations of BA and GA<sub>3</sub> at 0.3, 0.5, or 1.0 mg·L<sup>-1</sup> ‘Euseiong’ (A); ‘P526’ (B); ‘P524’ (C); and ‘P513’ (D).

Table 1-4-17. Effects of PGR’s supplemented to the AM medium for shoot induction from the bud-eye region of cotyledonary explants of *P. lactiflora*.

| Treatment | BA<br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | IBA<br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | GA <sub>3</sub><br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | Shoot multiplication<br>(%) |
|-----------|-----------------------------|------------------------------|--|-----------------------------|
| Control   | 0.0                         | 0.0                          | 0.0                                      | 0.0 e <sup>z</sup>          |
| 1         | 0.5                         | 0.0                          | 0.0                                      | 0.0 e                       |
| 2         | 1.0                         | 0.0                          | 0.0                                      | 0.0 e                       |
| 3         | 2.0                         | 0.0                          | 0.0                                      | 0.0 e                       |
| 4         | 0.0                         | 0.0                          | 1.0                                      | 0.0 e                       |
| 5         | 0.0                         | 0.0                          | 2.0                                      | 0.0 e                       |
| 6         | 0.5                         | 1.0                          | 1.0                                      | 100.0±0.0 a                 |
| 7         | 1.0                         | 1.0                          | 1.0                                      | 68.2±2.4 b                  |
| 8         | 2.0                         | 1.0                          | 2.0                                      | 40.8±1.09 c                 |
| 9         | 3.0                         | 1.0                          | 2.0                                      | 11.8±2.04 d                 |

<sup>z</sup>Means followed by same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

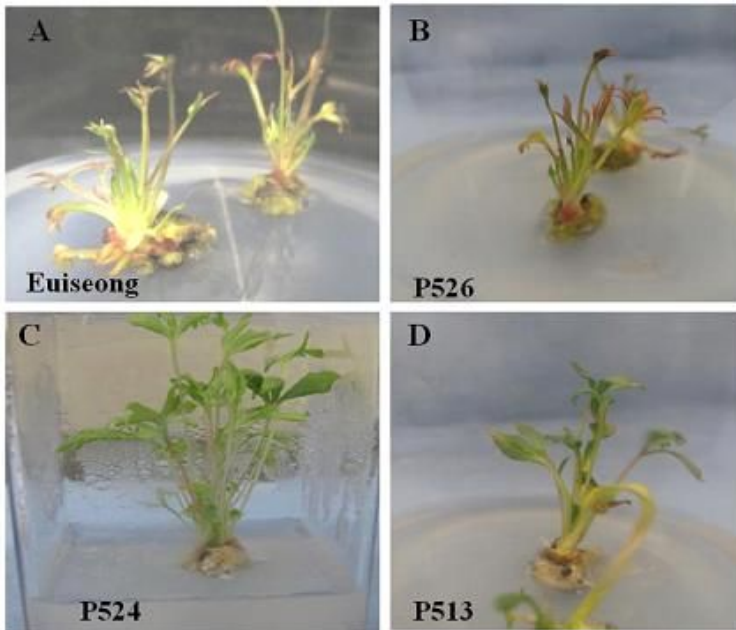


Fig. 1-4-19. Shoot induction and multiplication observed at the bud-eye region of different peony cultivars when the AM medium was supplemented with  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA,  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>, and  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA. Calli were also observed at the base of shoots in 'Euisseong' (A), 'P526' (B), 'P524' (C), and 'P513' (D).

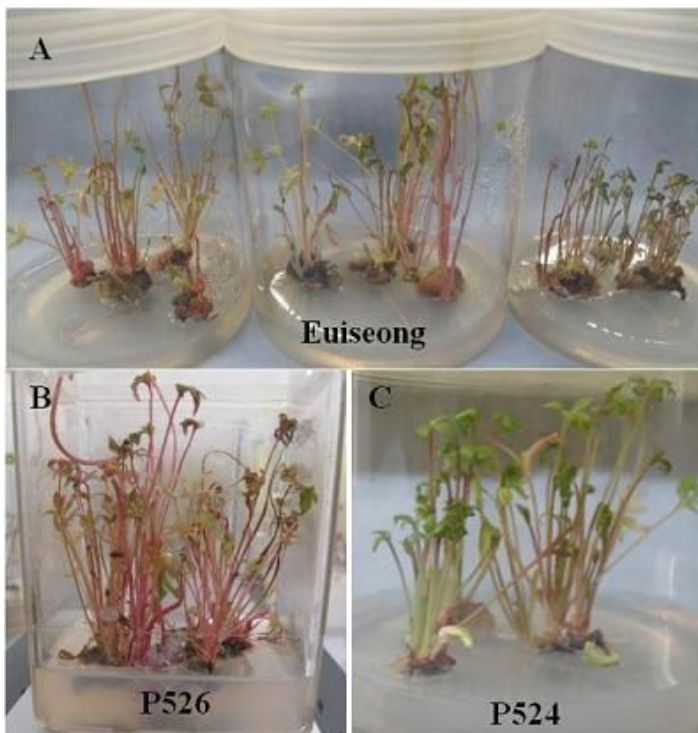


Fig. 1-4-20. High shoot multiplication capacity observed in all cultivars 'Euisseong' (A), 'P526' (B), and 'P524' (C) of peony after three successive subcultures onto the same AM medium supplemented with  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA,  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>, and  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA at an interval of 60 days. The number of lateral shoots and axillary shoots varied between the cultivars.

Table 1-4-18. Number of lateral and axillary shoots, and shoot length observed in the four peony cultivars cultured for 60 days on the AM medium supplemented with 0.5 mg·L<sup>-1</sup> BA, 1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>, and 1.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA.

| Cultivar  | No. of lateral shoots   | No. of axillary shoots | Shoot length (cm) |
|-----------|-------------------------|------------------------|-------------------|
| 'Euseong' | 5.2±0.44 b <sup>z</sup> | 3.4±0.54 a             | 5.36±0.18 a       |
| 'P526'    | 6.4±0.54 a              | 3.2±0.83 a             | 5.12±0.37 a       |
| 'P524'    | 4.8±0.83 c              | 2.8±0.44 ab            | 3.24±0.11 b       |
| 'P513'    | 3.4±0.54 d              | 2.2±0.44 b             | 2.38±0.08 c       |

<sup>z</sup>Means followed by same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

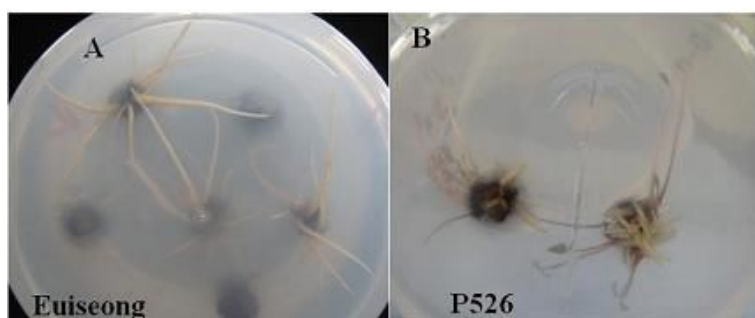


Fig. 1-4-21. Rooting and phenolics observed at the base of shoots when cultured on the half strength MS medium supplemented with 1.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA for peony 'Euseong' (A) and 'P526' (B).

Table 1-4-19. Rooting observed among the four cultivars of peony on the half strength MS medium supplemented with 1.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA.

| Cultivar  | Rooting (%) | No. of roots            | Root length (cm) |
|-----------|-------------|-------------------------|------------------|
| 'Euseong' | 100         | 6.6±0.89 b <sup>z</sup> | 7.7±1.10 a       |
| 'P526'    | 100         | 14.8±0.44 a             | 5.6±0.15 b       |
| 'P524'    | 20          | 3.0±0.70 c              | 7.3±0.74 a       |
| 'P513'    | Nil         | 0.0±0.00 d              | 0.0±0.00 c       |

<sup>z</sup>Means followed by same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).



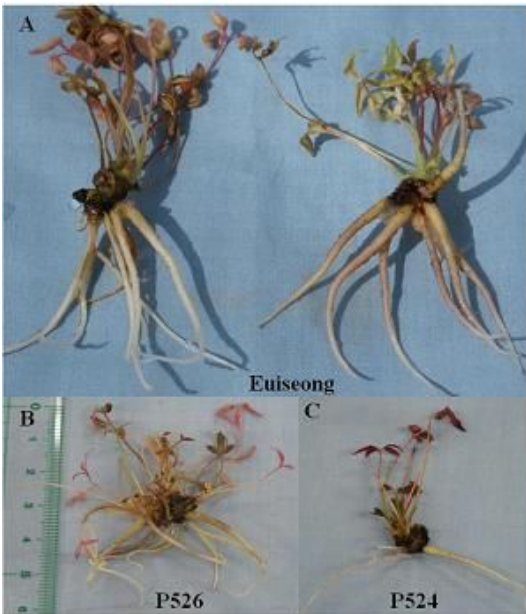


Fig. 1-4-22. Well-rooted plantlets of *P. lactiflora* 'Euseong' (A), 'P526' (B), and 'P524' (C), after 60 days on the half-strength MS medium supplemented with 1.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA.

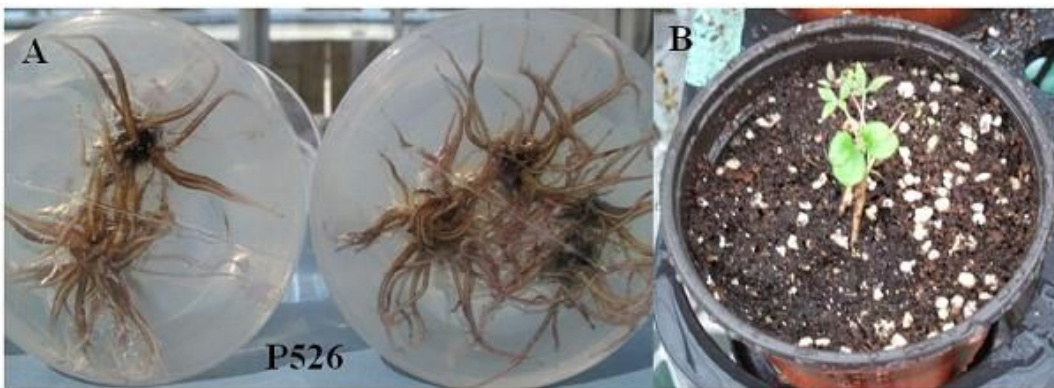


Fig. 1-4-23. Rooting of *P. lactiflora* cultivar 'P526' (A) and the plant acclimatized ex vitro in the glasshouse for 30 days (B).



Fig. 1-4-24. Peony cultivar 'Euseong' plantlets rooted and acclimatized in a glasshouse for 30 days old.

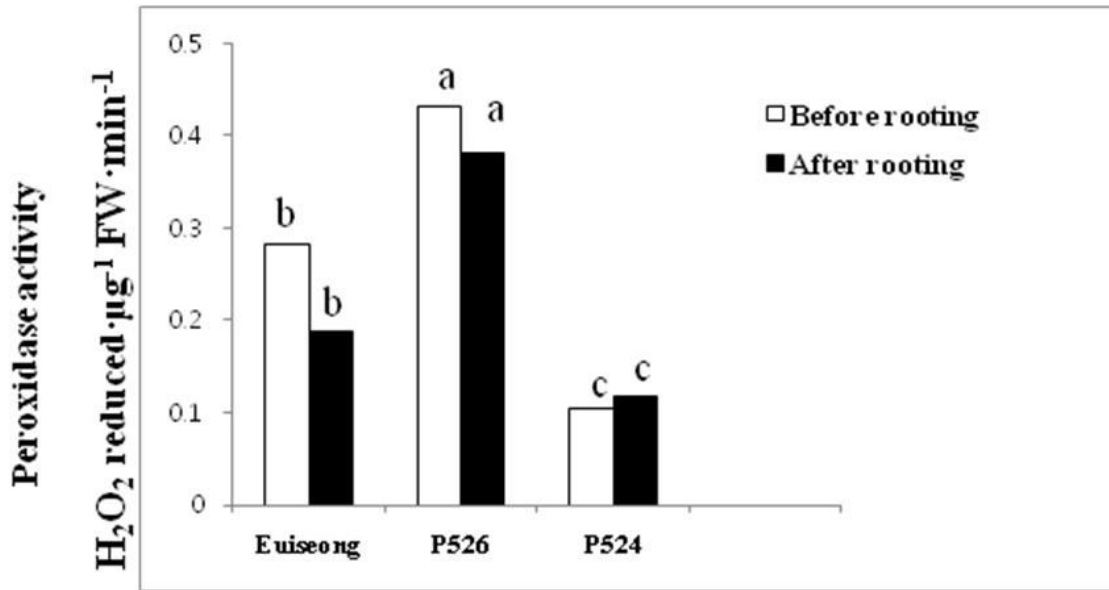


Fig. 1-4-25. Peroxidase activity observed before and after rooting in the three *P. lactiflora* cultivars, 'Euseong', 'P526', and 'P524'.

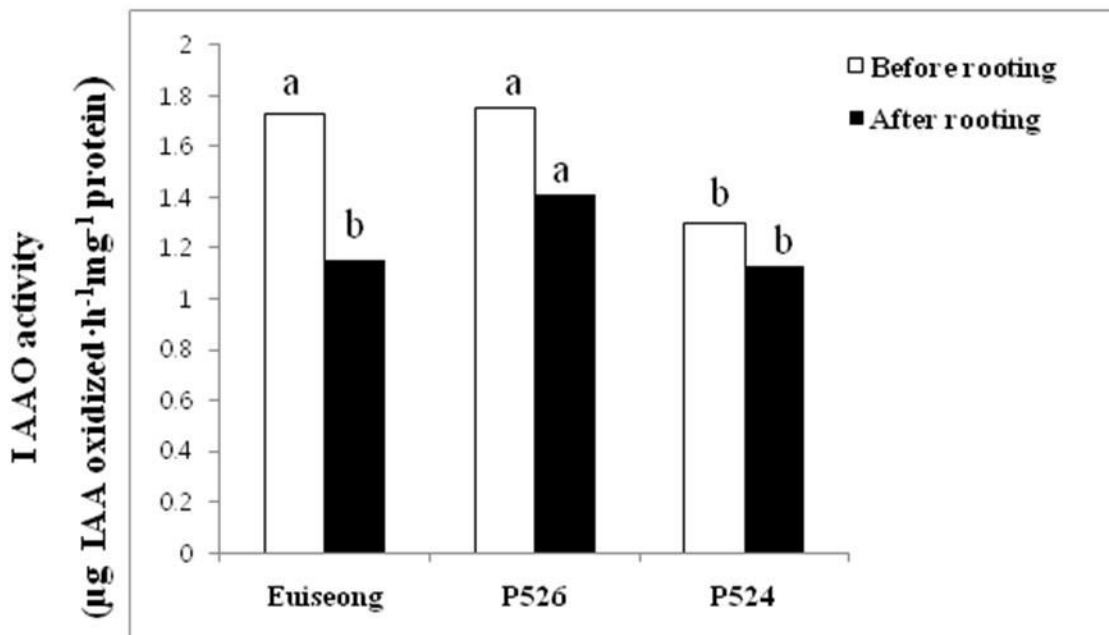


Fig. 1-4-26. The IAAO activity recorded before and after rooting in three *P. lactiflora* cultivars, 'Euseong', 'P526', and 'P524'.

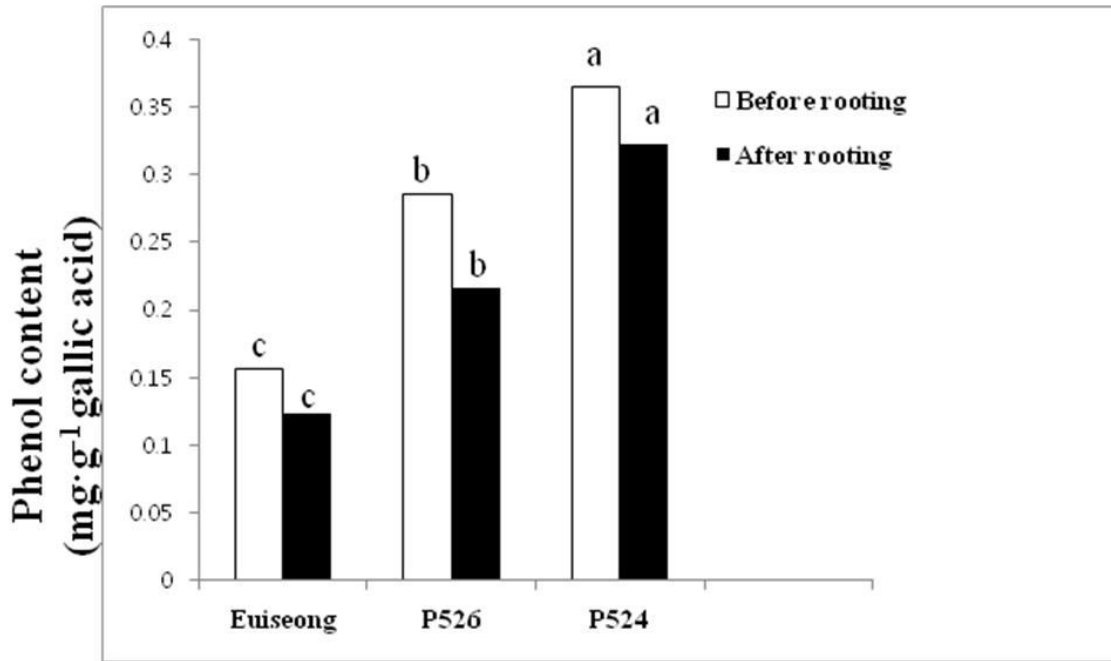


Fig. 1-4-27. Phenol content estimated before and after rooting in three *P. lactiflora* cultivars, 'Euseong', 'P526', and 'P524'.

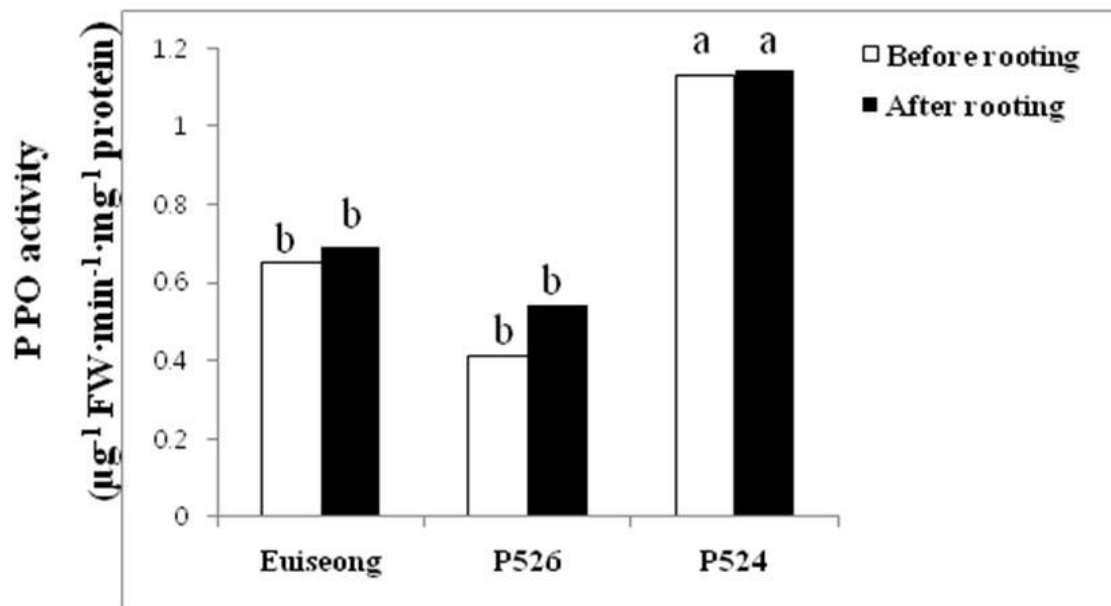


Fig. 1-4-28. Polyphenol oxidase activity recorded before and after rooting in three *P. lactiflora* cultivars, 'Euseong', 'P526', and 'P524'.

## 사. 작약(*P. lactiflora* 'Sarah Bernhardt')의 꽃잎 절편체로부터 유도된 켈러스에 항산화제의 적용

### (1) 연구목적

작약(*P. lactiflora* 'Sarah Bernhardt')의 꽃잎 절편체로부터 유도된 켈러스에 최적의 항산화제를 구명하기 위해 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 실험재료 및 멸균 소독방법

World Flower Company에서 재배한 작약(*P. lactiflora* 'Sarah Bernhardt')의 꽃봉오리를 구입하였다. 꽃봉오리를 70%(v/v) EtOH에 2분 동안 소독한 후 멸균수로 3-4회 세척하였고, Tween 20을 한 방울 떨어뜨린 1.5%(v/v) NaOCl에 15분 동안 침지 후 멸균수로 3-4회 세척하였다. 무균상태에서 인편이나 꽃잎을 제거 후 70%(v/v) EtOH에 1분 소독 후 멸균수로 세척하였고, 1.5%(v/v) NaOCl에 10분 소독 후 멸균수로 세척하였다. 그 후 0.1% HgCl<sub>2</sub>로 15분 동안 소독하였다. 꽃봉오리의 밑 부분을 잘라 70%(v/v) EtOH에 30초간 침지한 후 멸균수로 세척한 뒤 1.5%(v/v) NaOCl에 5분간 침지하여 1% PVP로 소독하였다.

#### (나) 배양배지

AM배지를 기본배지로 사용하였고, sucrose 3%(w/v)를 이용하였다. 성장조절제는 0.5, 1.0, 2.0 or 4.0 mg·L<sup>-1</sup> TDZ와 BA를 첨가하였다(Table 1-4-20). pH는 5.80으로 조절하고 121°C에서 15분간 고압멸균 하였다.

#### (다) 배양환경

배양온도는 15±1°C 설정하였고, 상대습도 70-80%인 배양실에서 1일 명기 16시간 동안 30 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> PPF D 광 조건하에서 배양하였다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

#### (라) 항산화제 처리

AM배지에 1.0 mg·L<sup>-1</sup> TDZ 첨가하여 생성된 켈러스에 항산화제와 흡착제를 처리하였다. 흡착제는 활성탄 0.05, 0.1, 0.3, 또는 0.5 g·L<sup>-1</sup> (w/v), PVP 1, 2, 3, 또는 4 g·L<sup>-1</sup> (w/v), 아스코르브산 5, 10, 20, 40 mM (w/v), AgNO<sub>3</sub> 5, 10, 20, 40 μM (w/v), 디오황산나트륨 10, 20, 40 mM (w/v)을 사용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

항산화제 처리 7일 후 갈변화 되기 시작했다(Fig. 1-4-30). 절편체의 단면이 처음 갈변하기 시작하다가 배지로 점차 퍼져나갔다. 배양 30일 후 침출물 때문에 절편체가 검은색으로 변해 고사하여 50%만 생존하였다. 0.1 g·L<sup>-1</sup> 활성탄 처리시 더 많이 갈변하였지만(Fig. 1-4-31A), 0.3 g·L<sup>-1</sup>까지 농도가 증가함에 따라 갈변화가 억제되었다(Fig. 1-4-31B). PVP 처리 3일 후 켈러스가 갈변하였고, 7일 후 켈러스의 가장자리에 갈색물질이 축적되었다. 1-2 g·L<sup>-1</sup> (w/v) PVP 처리시 갈변화가 완전히 억제되었지만 더 높은 농도에서는 억제되지 않았다. 낮은 농도의

아스코르브산의 사용은 갈변화를 억제하지 못했지만(Fig. 1-4-31C), 20이나 40 mM에서 완전히 억제하였다. 5, 10 또는 20  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  사용에 따라 캘러스가 약간 갈변했지만(Fig. 1-4-31D, E), 40  $\mu\text{M}$ 을 사용함에 따라 완전히 억제되었다(Fig. 1-4-31F). 처리 30일 후 캘러스는 녹색으로 아주 잘 성장하였다.

디오황산나트륨은 모든 농도에서 갈변화를 억제하는데 실패하였고(Table 1-4-21) 캘러스가 갈색으로 변하면서 7일 후 고사하였다. 절편체를 정기적으로 계대배양 했을 때 긍정적인 결과를 얻을 수 있었다. 7일 간격으로 계대배양을 했을 경우 갈변화를 완전히 억제하였다. 암배양 15일 했을 경우 갈변이 되지 않았지만 액체배양 15일 후에는 모두 갈변하였다. 총 페놀함량은 항산화제를 사용하지 않은 배지에서 높았다.

Table 1-4-20. Cytokinins supplemented alone to the AM medium for callus induction from the petal explants of *P. lactiflora*. Callus was observed after 45 days on all the treatments tried.

| PGR | Conc.<br>( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | Callus induction<br>(%)        |
|-----|--|--------------------------------|
| TDZ | 0.5  | 56.4 $\pm$ 1.34 f <sup>z</sup> |
|     | 1.0  | 82.6 $\pm$ 1.51 c              |
|     | 2.0  | 100.0 $\pm$ 0.0 a              |
| BA  | 0.5  | 60.8 $\pm$ 1.09 e              |
|     | 1.0  | 80.8 $\pm$ 0.83 d              |
|     | 2.0  | 85.2 $\pm$ 0.44 b              |

<sup>z</sup>Means followed by same letters within a column are not significantly different ( $P\leq 0.05$ ).

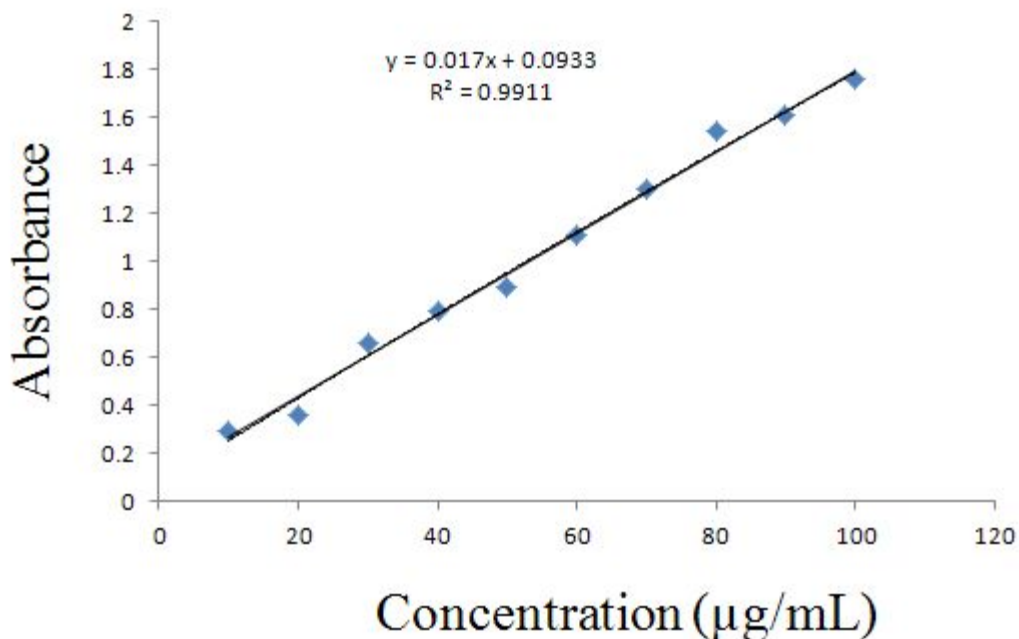


Fig. 1-4-29. Estimation of phenolic content by the gallic acid method.

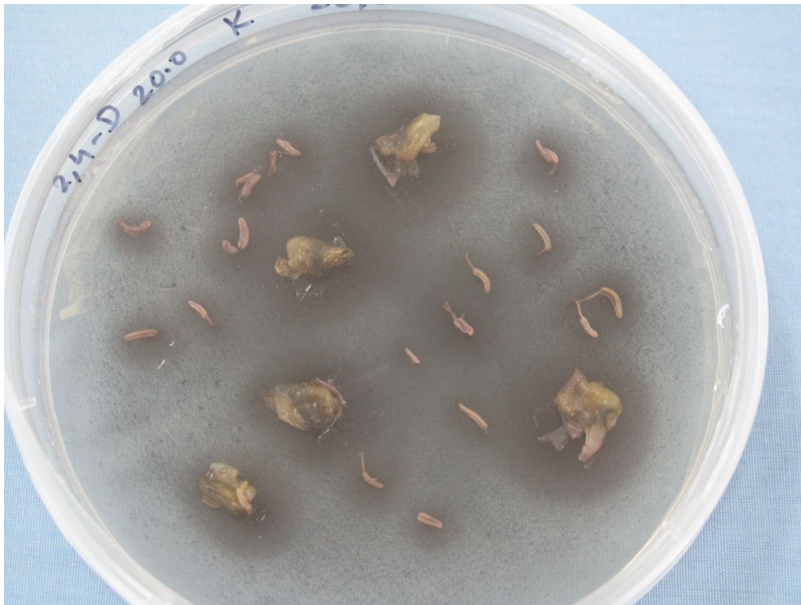


Fig. 1-4-30. Petal and anther explants of *P. lactiflora* 'Sarah Bernhardt' turning brown or black within seven days of culture on the AM medium supplemented with  $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  AC.

Table 1-4-21. Effects of antioxidant and adsorbent on peony callus obtained on the AM medium supplemented with  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ observed on 30 days after plating.

| Group | Treatment           | Conc.                              | Browning (%)             |
|-------|---------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 1     | Activated Charcoal  | $0.05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ | $100\pm 0.0 \text{ a}^z$ |
|       |                     | $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  | $94.4\pm 0.54 \text{ b}$ |
|       |                     | $0.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  | $5.0\pm 0.0 \text{ j}$   |
|       |                     | $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  | $5.0\pm 0.0 \text{ j}$   |
| 2     | PVP                 | $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  | $25.2\pm 1.64 \text{ h}$ |
|       |                     | $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  | $29.2\pm 1.09 \text{ g}$ |
|       |                     | $5.0 \text{ mM}$                   | $100.0\pm 0.0 \text{ a}$ |
| 3     | Ascorbic acid       | $10 \text{ mM}$                    | $50.8\pm 1.09 \text{ e}$ |
|       |                     | $20 \text{ mM}$                    | $24.4\pm 0.54 \text{ h}$ |
|       |                     | $40 \text{ mM}$                    | $6.2\pm 1.30 \text{ j}$  |
|       |                     | $5.0 \mu\text{M}$                  | $85.0\pm 2.12 \text{ c}$ |
| 4     | $\text{AgNO}_3$     | $10 \mu\text{M}$                   | $45.6\pm 1.51 \text{ j}$ |
|       |                     | $20 \mu\text{M}$                   | $20.8\pm 0.83 \text{ i}$ |
|       |                     | $40 \mu\text{M}$                   | $0.0\pm 0.0$             |
|       |                     | $10 \text{ mM}$                    | $100.0\pm 0.0 \text{ a}$ |
| 5     | Sodium thiosulphate | $20 \text{ mM}$                    | $100.0\pm 0.0 \text{ a}$ |
|       |                     | $40 \text{ mM}$                    | $100.0\pm 0.0 \text{ a}$ |
|       |                     | Duration 7 days                    |                          |
| 6     | Subculture          | 14 days                            | $0.0\pm 0.0$             |
|       |                     | 21 days                            | $0.0\pm 0.0$             |
| 7     | Dark culture        | 15 days                            | $0.0\pm 0.0$             |
| 8     | Liquid culture      | 30 days                            | $64.8\pm 1.3 \text{ d}$  |

<sup>z</sup>Means followed by same letters within a column are not significantly different ( $P\leq 0.05$ ).

-, no browning.

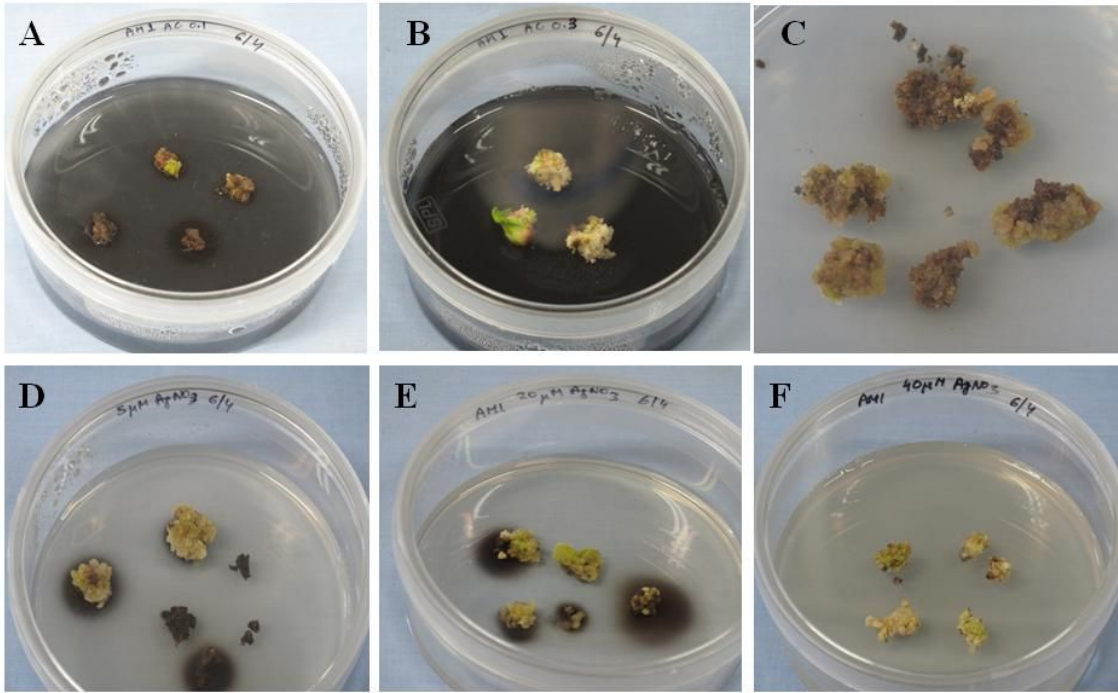


Fig. 1-4-31. Callus cultures of *P. lactiflora* 'Sarah Bernhardt' on the AM medium supplemented with  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ and  $0.1$  (A) or  $0.3$  (B)  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  activated charcoal as the adsorbent;  $10 \text{ mM}$  ascorbic acid as the antioxidant (C); or  $5$  (D),  $20$  (E) or  $40$  (F)  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  as the antioxidant.

## 5. 작약(*Paeonia lactiflora*)의 유연관계 분석

### 가. 국내 작약의 유연관계 분석

#### (1) 연구목적

수집된 유전자원에 대한 평가는 다양한 육종 소재를 확보하고 유전적 변이에 대한 정보를 얻는데 있어 매우 중요하다. *Paeonia lactiflora* 수집 유전자원의 특성을 조사하고 형질간의 상관관계를 조사함으로써 향후 유전연구의 기초자료로 삼고자 한다.

#### (2) 재료 및 방법

##### (가) 실험재료 및 RAPD 분석

작약 농가에 수집된 산작약을 포함한 10종의 작약과 3종의 수입종 및 2종의 목단을 실험재료로 이용하였다(Table 1-5-1). 각 엽샘플로부터 genomic DNA를 Gene-All spin-column kit(General Giotechnology, Korea)를 사용하여 요구된 프로토콜에 의해 분리하여 Nano-drop 분광광도계를 사용하여 농도 및 순도를 검정하였고 RAPD primer의 PCR 테스트와 다형성 분석에 사용하였다. 모든 PCR 반응은 genomic DNA  $20 \text{ ng}$ ,  $0.5 \mu\text{M}$  10-mer primer, 1X PCR buffer,  $0.2 \text{ mM}$  dNTPs, 그리고  $0.6\text{U}$  Taq polymerase(Solgent, Daejeon, Korea)을 함유한  $20 \mu\text{L}$  혼합액을  $95^\circ\text{C}$ 에서 5분간 1 사이클,  $95^\circ\text{C}$ 에서 15초간,  $45^\circ\text{C}$ 에서 30초간,  $72^\circ\text{C}$ 에서 1분간 40 사이클,  $72^\circ\text{C}$ 에서 1분간 35 사이클의 PCR 단계를 거쳐 반응 시켰다. 젤 전기영동은 2.5% agarose gel을 사용하여 TEB buffer 내에서  $80\text{V}$  전압으로 2시간 실시하였고, 분리된 PCR 생

성물은 ethidium bromide를 이용하여 염색한 후 UV하에서 관찰하였다.

(나) 유연관계 분석

PCR에 의해 증폭된 산물을 1.0% agarose gel에서 분리한 후 분자량 확인용 100bp DNA ladder band를 기준으로 하여 각 RAPD 마커의 정확한 band 위치를 확인하였다(Fig. 1-5-1). 특정 분자량의 band가 있는 것을 “1” 없는 것을 “0”으로 하여 data matrix를 작성하여 NTSYS-pc software(version 2.20k)에 의해 유전적 유사도 분석에 이용하였다. 계통간 유전적 유연관계를 보여주는 dendrogram은 Jaccard similarity coefficient에 따른 유전적 거리 값을 기초로 비가중평균결합법(UPGMA)을 사용한 SHAN clustering 방법으로 작성하였다(Nei and Li, 1979).



Table 1-5-1. Peony species used in the evaluation of their genetic diversity.

| Order | Characteristic      | Growth characteristic | Flower color   | Flower shape | Photo   |
|-------|---------------------|-----------------------|----------------|--------------|---|
| 1     | Mountain Peony      | Herbaceous            | Pink           | Single       |    |
| 2     | 'Euisseong'         | Herbaceous            | Red            | Single       |    |
| 3     | 'Moolsoore'         | Herbaceous            | Deep red       | Double       |   |
| 4     | 'Taebaek'           | Herbaceous            | Pink and white | Crown        |  |
| 5     | Pink + White        | Herbaceous            | Pink and white | Crown        |  |
| 6     | White double flower | Herbaceous            | White          | Double       |  |

Table 1-5-1. Continued.




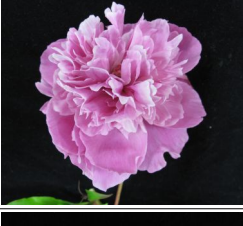



| Order | Characteristic                 | Growth characteristic | Flower color | Flower shape | Photo   |
|-------|--------------------------------|-----------------------|--------------|--------------|---|
| 7     | White double flower            | Herbaceous            | White        | Double       |    |
| 8     | Deep red double flower         | Herbaceous            | Deep red     | Double       |    |
| 9     | Pink double flower             | Herbaceous            | Pink         | Double       |   |
| 10    | Pink double flower             | Herbaceous            | Pink         | Double       |  |
| 11    | White double flower in Germany | Herbaceous            | White        | Double       |  |
| 12    | In Netherlands                 | Herbaceous            | -            | -            |   |
| 13    | In Netherlands                 | Herbaceous            | -            | -            |   |
| 14    | Peony                          | Woody                 | Deep red     | Single       |  |
| 15    | Peony                          | Woody                 | Deep red     | Single       |  |

Table 1-5-2. Total number of amplicons, number of polymorphic fragments, and percent polymorphism assayed by PCR using 24 random decamer primers in peony species.

| Primer ID | Total no. of bands | Polymorphic bands among 1-15 plant samples | Polymorphism ratio among 1-15 plant samples (%) | Polymorphic bands among 2-13 plant samples | Polymorphism ratio among 2-13 plant samples (%) |
|-----------|--------------------|--|---|--|---|
| A01       | 9                  | 9  | 1   | 4  | 0.44  |
| A08       | 16                 | 16   | 1   | 7  | 0.44  |
| A09       | 13                 | 13   | 1   | 7  | 0.54  |
| A13       | 2                  | 2  | 1   | 0  | 0.00  |
| A14       | 7                  | 7  | 1   | 1  | 0.14  |
| A15       | 7                  | 7  | 1   | 0  | 0.00  |
| A16       | 17                 | 17   | 1   | 10   | 0.59  |
| A17       | 16                 | 16   | 1   | 10   | 0.63  |
| A18       | 10                 | 10   | 1   | 3  | 0.30  |
| A19       | 16                 | 16   | 1   | 12   | 0.75  |
| A20       | 10                 | 10   | 1   | 8  | 0.80  |
| B01       | 3                  | 3  | 1   | 0  | 0.00  |
| B02       | 1                  | 1  | 1   | 0  | 0.00  |
| B03       | 11                 | 11   | 1   | 2  | 0.18  |
| B04       | 9                  | 9  | 1   | 2  | 0.22  |
| B05       | 9                  | 9  | 1   | 2  | 0.22  |
| B06       | 9                  | 9  | 1   | 2  | 0.22  |
| B07       | 5                  | 5  | 1   | 1  | 0.20  |
| B08       | 9                  | 9  | 1   | 2  | 0.22  |
| B09       | 9                  | 9  | 1   | 3  | 0.33  |
| B10       | 12                 | 12   | 1   | 4  | 0.33  |
| B11       | 7                  | 7  | 1   | 0  | 0.00  |
| B12       | 2                  | 2  | 1   | 0  | 0.00  |
| B13       | 16                 | 16   | 1   | 11   | 0.69  |
| Total no. | 225                |  |   | 91   | 0.40  |

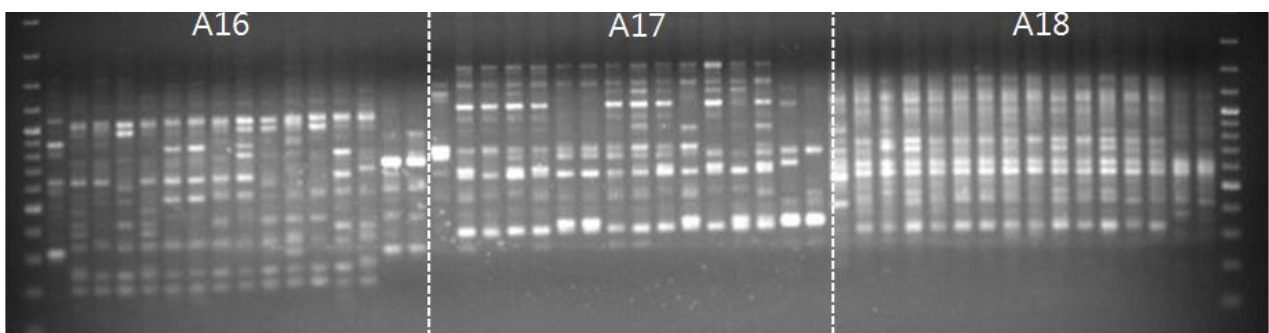


Fig. 1-5-1. RAPD banding pattern of three selected primers. Sample order from the left lane corresponds to peony species 1-15. A, primer A16; B, primer A17; C, and primer A18.

### (3) 결과 및 고찰

총 24개의 random primer를 사용하여 작약 13개체, 목단 2개체, 총 15개체간의 유전적 연관

성을 RAPD방법을 이용하여 분석하였다. 총 225개의 밴드(각 primer 당 평균 9개)를 확인하였으며 각 밴드들 모두 15개 개체간 다형성을 보였다. RAPD primer 중 A16이 16개의 밴드를 증폭시켜 가장 높은 수의 유전자좌 및 다형성률을 관찰할 수 있었다. 증폭된 모든 225개 밴드들로부터 다형성이 관찰되었는데, 이는 테스트된 15개체 중 1번(산작약)과 14, 15번(목단)이 타 국내재배종과 수입종에 비해 유전적으로 매우 상이한 결과로 해석되어지며, 반면에 국내종과 수입종간에는 91개의 유전자좌에서 밴드 유무가 관찰되어 다형성율(40%)이 상대적으로 낮았다.

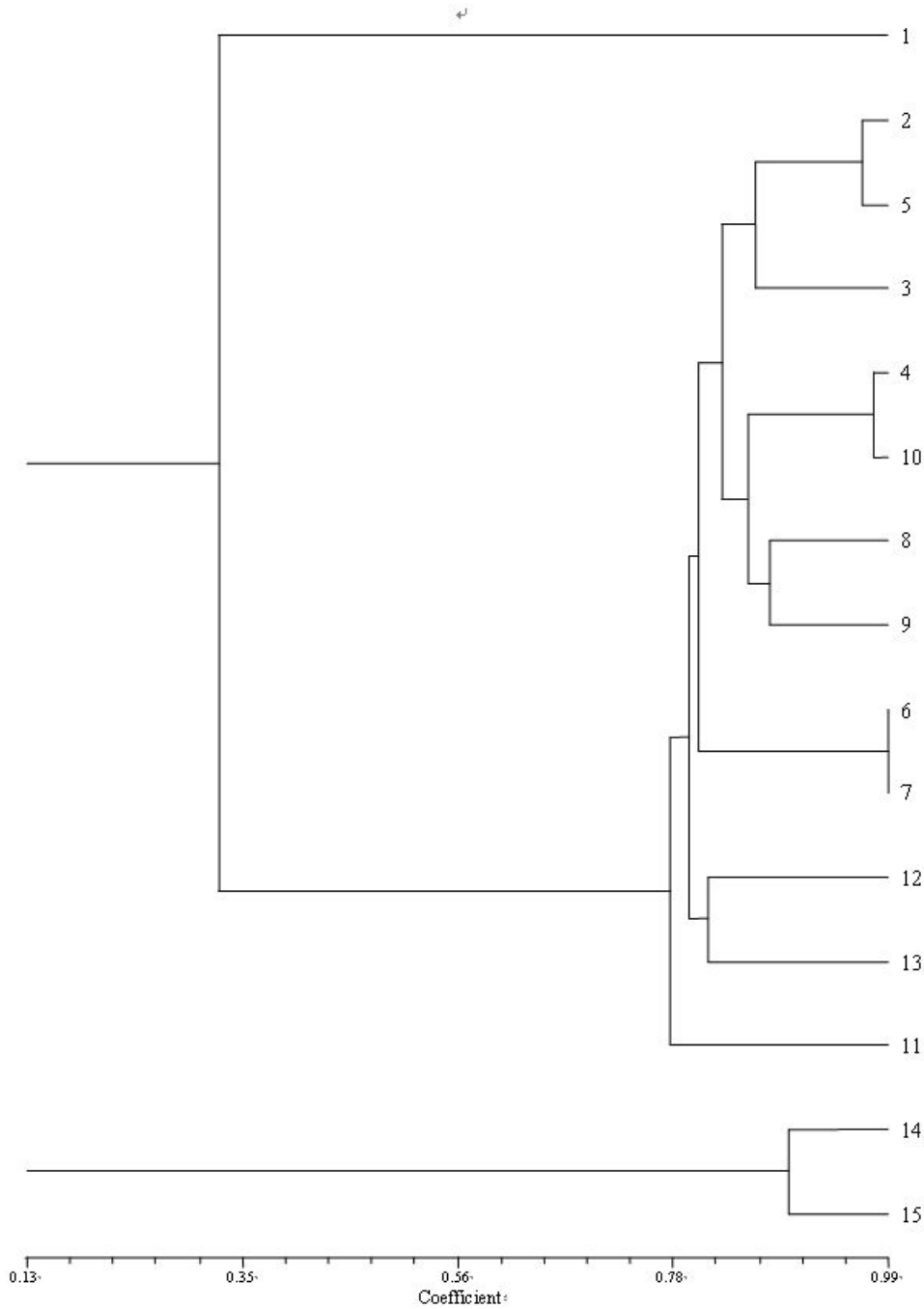


Fig. 1-5-2. Dendrogram (UPGMA) patterns showing genetic relationships.

산작약과 목단을 제외한 국내종과 수입종간의 비교에서 A20 primer가 총 10개 밴드 중 8개의 다형성 밴드를 보여 가장 높은 다형성률 및 개체구분능을 보였다. B02와 B12의 경우에는 각각 1개와 2개의 scoring 가능한 밴드를 증폭시켜 작약의 유전적 다양성 연구에는 부적합한 primer로 판단되었다.

RAPD 마커를 이용한 유연관계분석을 위해 공시개체 간 유사도 값을 구한 결과, 전체 범위는 0.13-0.99였으며, 평균 유사도의 값은 0.69였다. 가장 높은 유사도 값(0.99)을 나타낸 것은 개체번호 6과 7이었고, 가장 낮은 유사도 값(0.13)을 나타낸 것은 14와 4이었다. 6번과 7번의 경우 조사된 형질의 특성에 있어서도 높은 유사성을 보였으며, 분자적 수준에서도 유전적으로 매우 근연인 것으로 확인 되었다.

UPGMA 방식으로 유사도 및 집괴분석을 수행한 결과 15개의 개체들은 크게 2개의 그룹(cluster)으로 나뉘어졌으며, 제 1 cluster는 다시 2개의 subcluster를 형성하였다. 제1 cluster의 경우 원종인 산작약을 제외한 다른 개체들은 가까운 유연관계를 보였고, 외래종과 자생종의 개체간에 차이를 확인 할 수 있었다. 제 2 cluster 그룹인 목단개체군의 경우 작약개체군과 가장 먼 유연관계를 나타냈다. 제 2 subcluster는 6개의 그룹으로 이루어졌다. 이는 형태와 화색, 화형을 기준으로 분류한 개체군과 대체로 일치함을 알 수 있었다. 하지만, 태백에서 수집된 국내계통인 4, 5번은 원산지 및 형태적 특성의 유사성이 있었지만 서로 다른 그룹에 속해 유전적 상이성을 보이는 것으로 관찰되었다. 외국수입종인 12, 13번 계통은 서로 동일한 그룹으로 분류되었고 독일에서 도입된 수입종은 이들 두 수입종과 상이한 유전적 관계를 보여주어 도입된 국가가 다를 것이라 예상되었다.

결론적으로 24개의 RAPD primer를 이용한 DNA 지문법을 통하여 15개 작약 및 목단 계통에 대한 분류가 가능하였다. 목단과 산작약은 유사도 및 집괴분석에서 타 국내재배종과 도입종 작약과 낮은 수준의 유연관계를 보여 형태적 계통분류와 일치하는 결과를 보였으며, 국내재배종과 도입종의 경우 상대적으로 높은 유연관계가 관찰되었지만 태백 유래의 두 개체(4, 5)를 제외하고는 형태적 특성과 상응하게 개체군이 형성되었다고 할 수 있다(Lim et al., 2013). 따라서 본 연구결과 RAPD marker는 작약에 있어 DNA 지문법이나 품종판별용 마커개발을 위한 유용한 마커타입으로 생각된다.

## 제 2 절 조직배양을 통한 무늬둥굴레의 대량번식기술 개발

### 1. 무늬둥굴레 (*P. odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi for. *variegatum* Y.N. Lee)의 기내 번식법 개발

#### 가. 무늬둥굴레 신초를 이용한 기내번식을 위한 멸균방법 실험1

##### (1) 연구목적

무늬 둥굴레는 백합과의 식물로써 높이는 30-60 cm이고, 줄기 길이는 40-45 cm, 마디 사이는 3-4 cm이다. 잎은 타원형이며, 줄기에 하나씩 어긋난다. 대나무 잎과 비슷하고, 끝에서는 비스듬히 아래로 처진다. 잎 끝과 주변에 엷은 무늬가 있다. 잎 길이는 5-10 cm, 넓이는 2-5 cm 정도이고, 잎자루는 없다. 꽃은 줄기 밑 부분의 첫 잎과 둘째 잎 사이에는 피지 않고, 셋째

부터 여덟째 잎 사이의 겨드랑이에 한두 개가 핀다. 빛깔은 흰색이며, 끝에서 둘째와 셋째 잎 사이에도 피지 않는다. 추위에 강한 반면 더위에는 약하다. 15-25℃에서 잘 자란다. 잎 생김새가 시원스러워 관상용으로 심기도 하고, 잘라서 꽃꽂이 재료로도 쓴다. 봄철에 어린잎과 뿌리 줄기는 식용한다. 뿌리와 줄기는 강장·강정에도 효능이 있어 한방에서는 노약자나 허약한 사람의 기운을 돕는 약재로 쓴다.

무늬등굴레를 기내변식을 통한 대량생산 하기 위하여 먼저 기내 도입을 위한 소독방법을 알아보고자 본 실험을 수행하였다.

## (2) 재료 및 방법

### (가) 실험재료 및 멸균처리

등굴레 뿌리에서 발달된 신초를 이용하였다. 소독을 위해 표면의 흙을 흐르는 수돗물로 제거한 후 94%(v/v) EtOH에 1분간 표면 살균한 다음 1%(v/v) NaOCl, 3%(v/v) NaOCl, 5%(v/v) NaOCl 각각의 농도로 처리하고 각 처리구를 sonication 처리와 무처리로 나누어 수행하였다. Sonication 처리구는 sonication을 20분 동안 처리한 후 멸균수로 3회 세척하였다. 멸균된 절편체를 MS배지에 치상하였다.

### (나) 배양배지

배지는 MS배지에 1.0 mg·L<sup>-1</sup> BAP을 첨가하여 사용하였다. pH는 5.70-5.80으로 조절하고, sucrose 3%(w/v), charcoal 2%(w/v)과 agar 0.8%(w/v)을 첨가한 후, 121℃에서 15분간 고압 멸균 하여 사용하였다.

### (다) 배양환경

배양기간 중 온도는 25±1℃, 광도(PPFD) 92.95 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 상대습도 70-80%인 배양실에서 명기 16 h·d<sup>-1</sup>과 암기 8 h·d<sup>-1</sup>의 조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

## (3) 결과 및 고찰

실험 처리를 한 후 일주일간 오염 발생률을 확인 해본 결과 sonication을 한 처리와 하지 않은 처리 간에 오염율의 차이가 2배 이상 발생하였다. 그리고 sonication을 하지 않은 처리구에서는 처리 후 한 달 이내에 모두 오염이 발생하였다. sonication을 처리한 실험구는 일부 오염이 발생하지 않았으나 sonication의 피해 때문인지 신초와 뿌리 모두 자라지 않고 유리화가 되었다(Fig. 2-1-1). 그리고 NaOCl의 농도가 높아질수록 오염율이 떨어지는 경향을 보였다(Table 2-1-1).

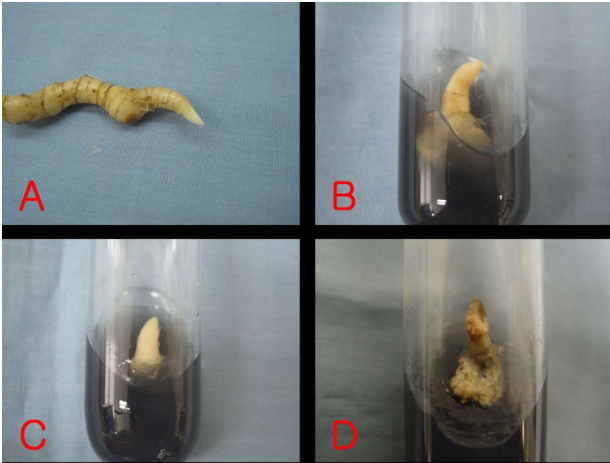


Fig. 2-1-1. Rhizomes used as explants for regeneration.

Table 2-1-1. Effect of sterilization methods on percent contamination.

| Treatment           | Conc. of NaOCl (%) | Contamination (%) |
|---------------------|--------------------|-------------------|
| Sonication          | 1                  | 90                |
| 무처리                 | 3                  | 100               |
|                     | 5                  | 80                |
| Sonication (20 min) | 1                  | 40                |
|                     | 3                  | 40                |
|                     | 5                  | 20                |

## 나. 무늬둥굴레 신초를 이용한 기내번식을 위한 멸균방법 실험2

### (1) 연구목적

실험 1에서 얻은 결과를 바탕으로 무늬둥굴레를 기내에 넣기 위하여 이상적인 sonication 시간을 찾아내기 위한 실험을 실시하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 실험재료 및 멸균 소독방법

무늬둥굴레 뿌리에서 발생된 신초를 소독하기 위하여 흙을 흐르는 수돗물로 제거한 후 94%(v/v) EtOH에 1분간 표면 살균하고, 1%(v/v) NaOCl 용액에서 sonication 5분, 10분, 15분으로 나누어 살균한 후 멸균수로 3회 세척하였다. 소독이 완료된 절편체를 MS배지에 치상하였다.

#### (나) 배양배지

배지로는 MS배지에  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BAP을 사용하였다. 배지에는 sucrose 3%(w/v), agar 0.8%(w/v)을 첨가한 후, pH는 5.70-5.80으로 조절하고, 121°C에서 15분간 고압멸균 하여 사용하였다.

(다) 배양환경

배양기간 중 온도는 25±1℃, 광도(PPFD) 92.95 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 상대습도 70-80%인 배양실에서 명기 16 h·d<sup>-1</sup>과 암기 8 h·d<sup>-1</sup>의 조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

(3) 결과 및 고찰

실험 처리를 한 후 오염 발생률은 30% 미만이었다(Table 2-1-2). 오염 발생이 규칙적이지 않고 산발적으로 발생하여 실험 도중 부주의로 발생한 것으로 추정된다. Sonication의 시간이 길수록 유리화의 빈도가 높아졌다. 하지만 sonication의 시간이 줄어드는 것과 비례하여 유리화의 빈도가 줄어드는 것이 아니고 일정 시간이 지나면 거의 모두 유리화가 일어나는 현상이 나타났다(Fig. 2-1-2). 또한 5분 이내의 처리구에서 한 달이 지난 후 오염이 발생하기 시작하였다. 따라서 처리의 시간을 짧게 하여 오염은 나지 않지만 식물체에 피해를 최소화 할 수 있는 최적의 시간대를 찾아내는 실험이 추가적으로 필요하다.

Table 2-1-2. Effect of sonication time on percent contamination and vitrification.

| Sonication time (min) | Contamination (%) | Vitrification (%) |
|-----------------------|-------------------|-------------------|
| 5                     | 20                | 20                |
| 10                    | 10                | 100               |
| 15                    | 10                | 100               |

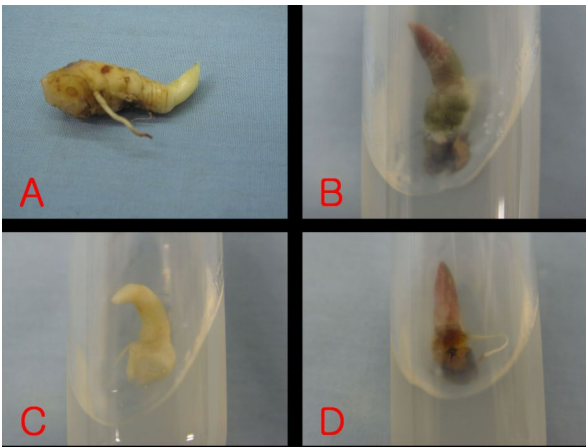


Fig. 2-1-2. Effect of sonication time on sterilization of *P. odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi for. *variegatum* Y.N. Lee.

2. 무늬둥굴레 (*P. odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi for. *variegatum* Y.N. Lee)의 직·간접적 재분화

가. 절편체와 생장조절제 처리에 따른 무늬둥굴레 재분화 실험

(1) 연구목적



무늬 등굴레는 백합과의 식물로써 봄철에 어린잎과 뿌리줄기를 식용한다. 뿌리와 줄기는 강장·강정에도 효능이 있어 한방에서는 사람의 기운을 돕는 약재로 쓰인다. 또한 잎 생김새가 시원스러워 관상용으로 심기도 하고, 줄기를 잘라서 꽃꽂이 재료로도 쓴다. 최근에는 절지로 이용하는 수요가 점점 증가하고 있으나, 출하시기가 5-6월로 한정되어 있기 때문에 연중 생산을 위해서는 저온처리가 필요하다. 보다 효과적인 저온처리를 위한 일환으로 기내번식을 통한 대량생산을 하고자 본 실험을 하였다.

## (2) 재료 및 방법

### (가) 실험재료 및 멸균처리

2010년 4월 2일 경남 진주시 사봉면에 위치한 무늬등굴레 농장에서 무늬등굴레 근경을 굴취하였다(Fig. 2-2-1). 채취된 등굴레 근경과 신초를 흐르는 수돗물로 흙을 제거한 후 70%(v/v) EtOH에 1분간 표면 살균한 다음 멸균수로 3회 헹구고, 1.5%(v/v) NaOCl에 15분 처리한 후 멸균수로 3회 헹구어 filter paper에 건조시키고 소독된 유리용기에 담아서 암상태로 냉장 보관하였다(Fig. 2-2-2A). 1차 소독이 끝난 등굴레의 근경과 신초를 각각 분리 절단하고 2차 소독을 위하여 신초의 비늘을 1-2개 제거하고 70%(v/v) EtOH에 2분간 처리한 다음 멸균수로 3회 헹구고, 1.5%(v/v) NaOCl에 Tween 20 1-2방울을 첨가하여 등굴레 신초를 15분 정도 처리한 후 멸균수로 3회 헹구고 신초의 비늘을 1개 더 제거하였다(Fig. 2-2-2B). 마지막으로 3차 소독을 위하여 등굴레 신초를 다시 70%(v/v) EtOH에 1분간 처리한 다음 멸균수로 3회 헹구고, 1.5%(v/v) NaOCl에 Tween 20 1-2방울을 첨가하여 등굴레 신초를 10분 정도 처리한 후 멸균수로 3회 헹구고 등굴레 신초의 본 잎을 1-2개 제거하고 실험에 절편체로 이용 하였다(Fig. 2-2-2C). 절편체는 Fig. 2-2-3과 같이 잎과 꽃눈을 각각 분리하여 성장조절제 처리별 배지에 치상하여 25℃, 암상태에서 1주일 경과 후 광상태로 이동 하였다(Fig. 2-2-4).



Fig. 2-2-1. *P. odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi for. *variegatum* Y.N. Lee collected on 2 Apr. 2010.



Fig. 2-2-2. Sterilization of *P. odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi for. *variegatum* Y.N. Lee. A, first sterilization; B, second sterilization; C, third sterilization.

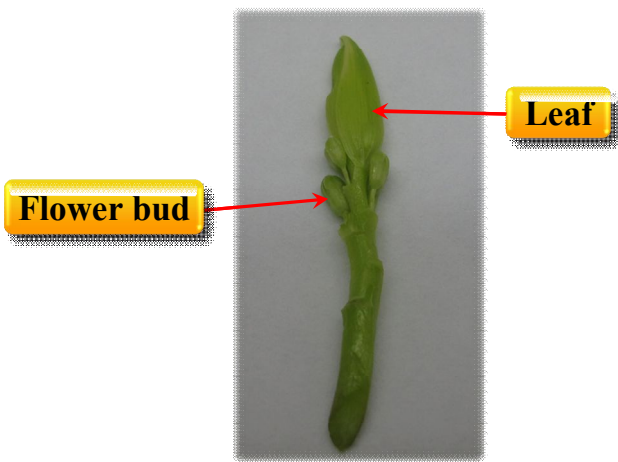


Fig. 2-2-3. Leaf and flower bud used as the explants.

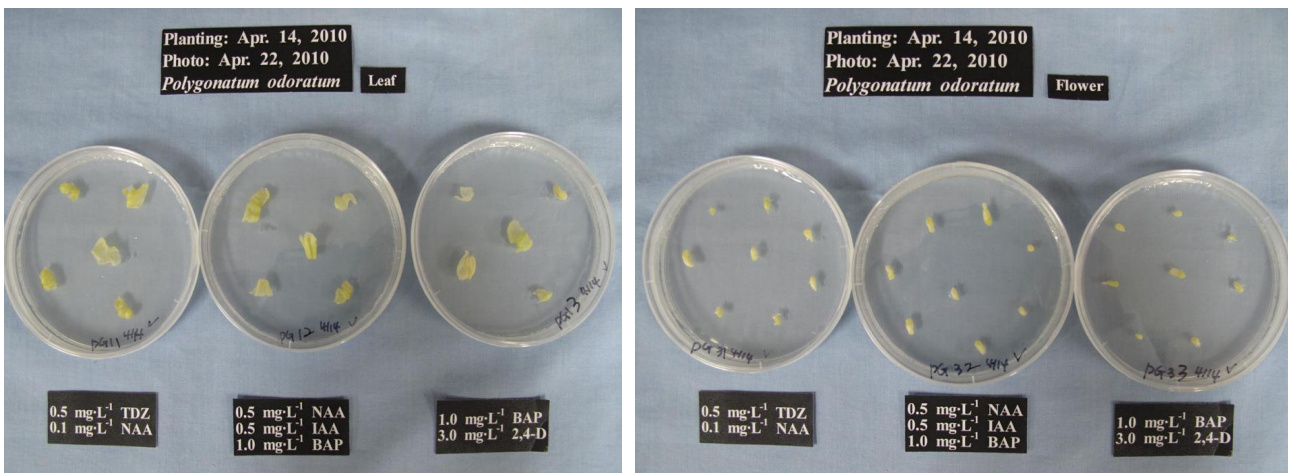


Fig. 2-2-4. Leaf and flower bud explants inoculated on MS medium.

(나) 배양배지

배지는 기본 MS배지에 sucrose 3%(w/v), agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121°C에서 15분간 고압멸균 하여 페트리디쉬에 약 25 mL 씩 분주하여 사용하였다. pH는 5.80으로 하였다. 성장 조절제 조성은 Table 2-2-1과 같다.

Table 2-2-1. Treatments used in the experiment.

| Explant    | Treatment no. | PGR (mg·L <sup>-1</sup> ) |     |     |     |       |
|------------|---------------|---------------------------|-----|-----|-----|-------|
|            |               | TDZ                       | NAA | IAA | BA  | 2,4-D |
| Leaf       | 1             | 0.5                       | 0.1 | 0   | 0   | 0     |
|            | 2             | 0                         | 0.5 | 0.5 | 1.0 | 0     |
|            | 3             | 0                         | 0   | 0   | 1.0 | 3.0   |
| Flower bud | 1             | 0.5                       | 0.1 | 0   | 0   | 0     |
|            | 2             | 0                         | 0.5 | 0.5 | 1.0 | 0     |
|            | 3             | 0                         | 0   | 0   | 1.0 | 3.0   |

(다) 배양환경

배양기간 중 온도는 25±1℃, 광도(PPFD) 40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 상대습도 70-80%인 배양실에서 명기 16 h·d<sup>-1</sup>과 암기 8 h·d<sup>-1</sup>의 조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

(3) 결과 및 고찰

무늬둥굴레는 1차년도 실험 목표였던 기내번식을 위한 무균식물체 획득에 어려움이 많았다. 근경을 포함한 어린 신초를 기내에 도입하고자 시도하면서 지속적인 오염 발생이 야기되었으나 올해 2차년도 본 실험에서 4월에 지상부에 신초가 발생된 후 실험재료로 신초만을 이용하여 연속 3차 멸균 소독을 실시한 결과 오염이 발생되지 않았고 성공적으로 무균 식물체를 획득 할 수 있었다(Fig. 2-2-5). 실험 기간이 경과하면서 배지가 건조하여 2010년 6월 7일 동일한 성장조절제 처리배지로 절편체를 계대하였다.

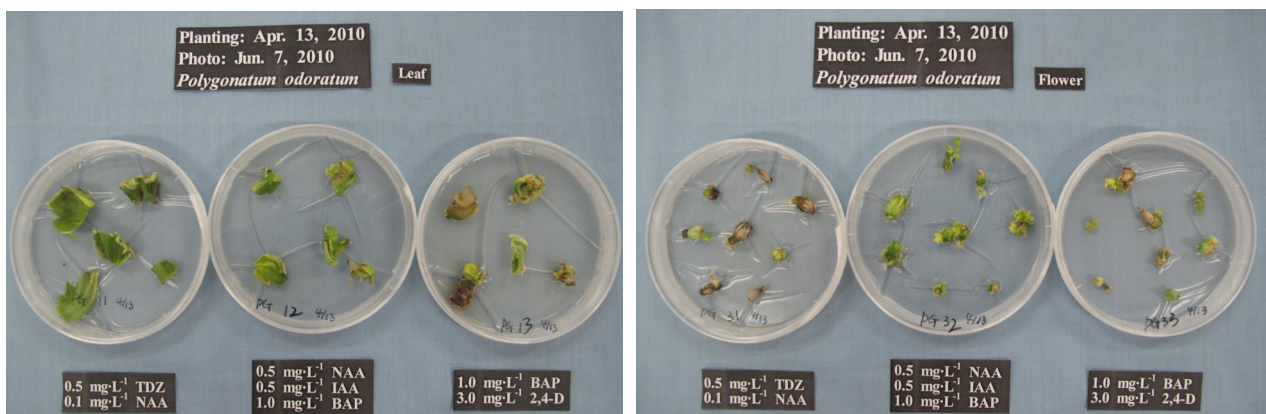


Fig. 2-2-5. Adventitious shoot regeneration from the leaf and flower bud explants of *P. odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi for. *variegatum* Y.N. Lee.

실험결과 Table 2-2-2와 같이 잎 절편체를 이용한 경우보다 꽃눈 절편체를 이용하는 경우 1.0 mg·L<sup>-1</sup> BAP + 3.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D 성장조절제 처리에서 신초 재분화율이 최고 65%로 가장

높게 나타났고, 절편체당 신초수도 4.3개로 많았다. 또한 꽃눈 절편체를 이용한 0.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA 성장조절제 처리구에서 절편체당 신초수가 6.1개로 가장 많았다. 기본 MS 배지를 이용하여 본 실험을 실시한 결과 신초 유도는 TDZ보다 BAP에서 더 효과적인 것을 알 수 있었다. 잎 절편체를 이용한 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> IAA + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> BAP 처리구에서 유일하게 구가 발생하였다(Fig. 2-2-6).

본 실험의 결과 무너동굴레의 재분화 기본 경향을 파악할 수 있었고 향후 재분화 환경조건 확립 및 재분화 프로토콜 확립에 기초자료로 이용하고자 한다.

Table 2-2-2. Effect of explant and PGR on in vitro propagation.

| Explant (A) | Treatment no. (B) | Rooting (%) | Shooting (%) | Bulbing (%) | No. of shoots/plant |
|-------------|-------------------|-------------|--------------|-------------|---------------------|
| Leaf        | 1                 | 55.0 ab     | 0.0 c        | 0.0 b       | 0.0 b               |
|             | 2                 | 55.0 ab     | 15.0 bc      | 15.0 a      | 0.8 b               |
|             | 3                 | 25.0 bc     | 10.0 bc      | 0.0 b       | 0.5 b               |
| Flower bud  | 1                 | 30.0 abc    | 30.0 b       | 0.0 b       | 6.1 a               |
|             | 2                 | 60.0 a      | 25.0 b       | 0.0 b       | 5.3 a               |
|             | 3                 | 20.0 c      | 65.0 a       | 0.0 b       | 4.3 a               |
| A           |                   | NS          | ***          | NS          | ***                 |
| B           |                   | **          | **           | NS          | NS                  |
| A*B         |                   | NS          | *            | NS          | NS                  |

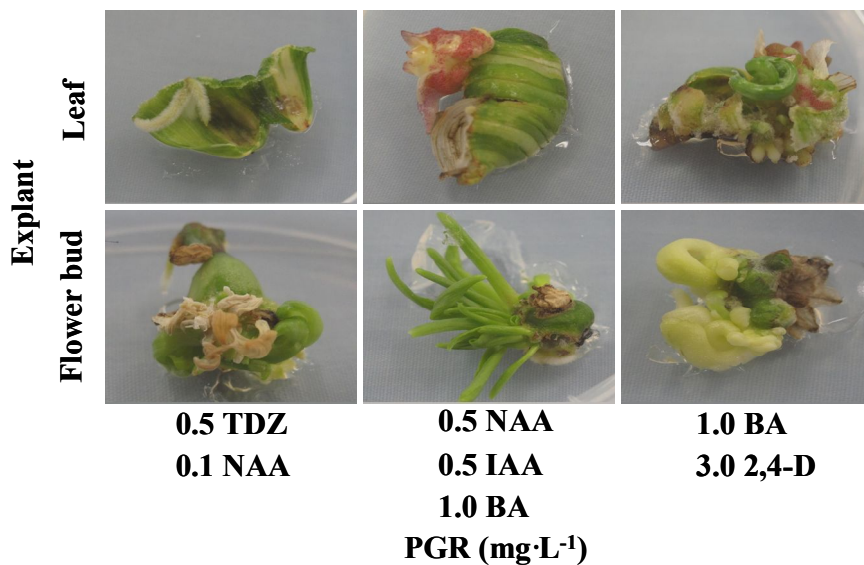


Fig. 2-2-6. Adventitious shoot regeneration from the leaf and flower bud explants.

#### 나. 최적 배양 배지 구명 실험

## (1) 연구목적

1960년대 이후 캘러스의 배양에서 세포배양으로 발전하고, 조직배양기술이 발달함에 따라 다양한 종류의 배지들이 현재 개발되어 이용되고 있다. 이들 배지들의 염류조성에는 많은 차이가 있다. 여러 식물의 조직배양과 번식에 적합한 배지조성을 얻기 위하여 많은 연구가 계속 이루어지고 있다. 따라서 무늬둥굴레 기내 대량번식을 위한 최적 배양 배지를 구명하고자 본 연구를 하였다.

## (2) 재료 및 방법

### (가) 실험재료

앞서 진행된 절편체와 성장조절제 처리에 따른 재분화 연구결과를 바탕으로 기내에서 무균적으로 배양된 무늬둥굴레 재분화 개체를 획득하였다. 2010년 12월 8일 계대배양을 통하여 생장한 신초를 본 실험의 재료로 이용하였다(Fig. 2-2-7A).

### (나) 배양배지

배지 처리구는 MS, B5, N6 및 SH 총 4가지를 기본배지로 설정하였다. 각각의 배지에 sucrose 3%(w/v), agar 0.8%(w/v)을 첨가한 후, pH는 5.80으로 조절하고, 121℃에서 15분간 고압멸균 하여 사용하였다. 배양용기는  $3.7 \times 10^{-4} \text{m}^3$ 의 용기(GA7 Magenta box, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)를 사용하였고 각각 50 mL씩 분주하였다.

### (다) 배양환경

배양기간 중 온도는  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 광도(PPFD)  $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 상대습도 70-80%인 배양실에서 명기  $16 \text{h} \cdot \text{d}^{-1}$ 과 암기  $8 \text{h} \cdot \text{d}^{-1}$ 의 조건하에서 배양되었다(Fig 2-2-7C). 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

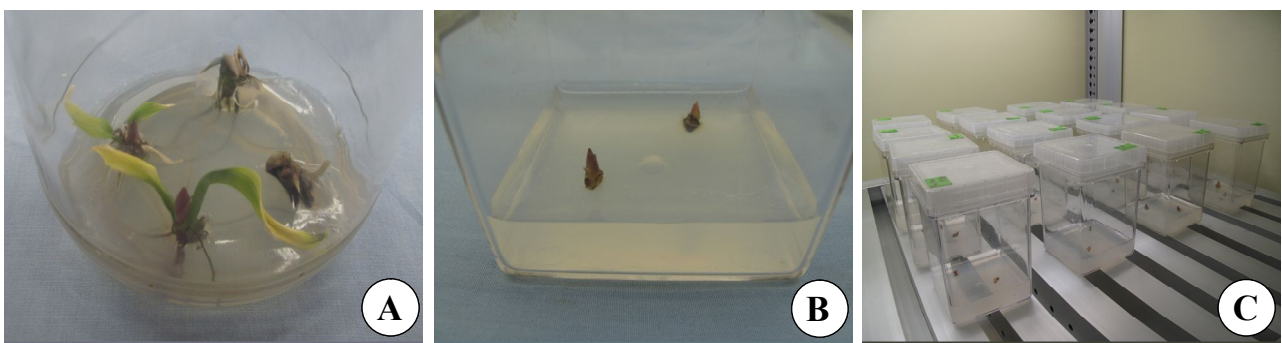


Fig. 2-2-7. Effect of media on regeneration of *P. odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi for. *variegatum* Y.N. Lee. A, shoots subcultured after regeneration; B, explants inoculated on medium; C, *P. odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi for. *variegatum* Y.N. Lee cultured in the growth chamber.

## 다. 결과 및 고찰

실험 처리를 한 후 10주가 경과하였으나 모든 처리구에서 신초의 변화가 거의 없었다(Fig.

2-2-8). 특히 B5, N6 및 SH 배지에서는 뿌리의 발생과 신초의 변화가 보였으나 MS 배지에서는 신초의 변화가 전혀 보이지 않았다. 둥굴레의 경우 기내 도입 초기에는 생육에 문제가 없었으나 계대배양을 반복할수록 신초의 줄기 신장이 느려지는 경향이 관찰되었었다. 적정 배지의 종류를 구명하는 것도 중요하지만 기내조직배양의 경우 배지의 적정 농도도 중요한 요인으로 작용하는 경우가 많다. 신초의 생육이 느려지는 문제점을 극복하고자 향후 각각의 배지별 적정 농도를 추가적으로 설정하여 실험이 진행되어야 할 것으로 판단하여 추가 실험을 준비하고 있다.

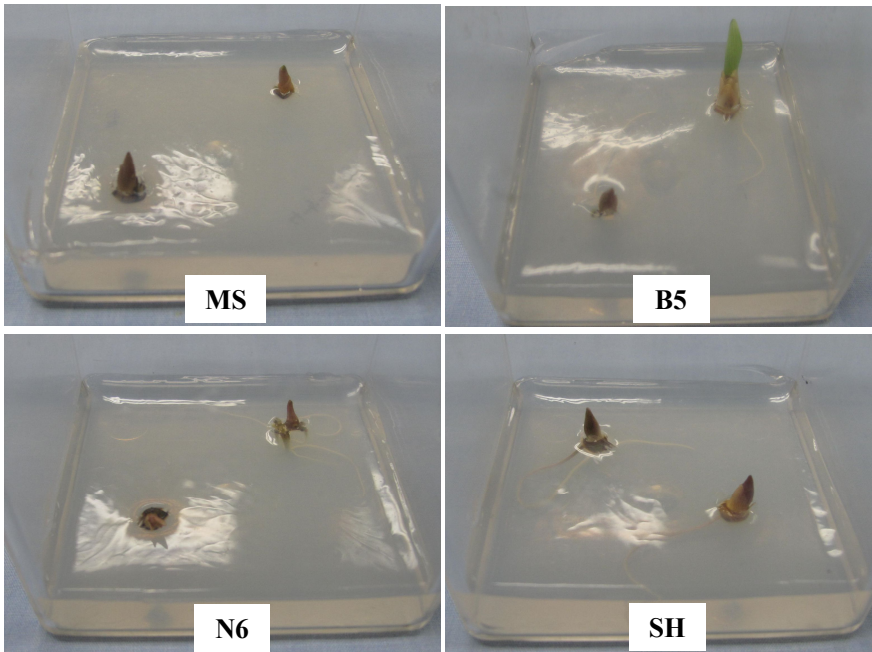


Fig. 2-2-8. Effect of media on regeneration of *P. odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi for. *variegatum* Y.N. Lee.

#### 다. 배양온도 조건 구명

##### (1) 연구목적

무늬둥굴레의 최적 배양조건을 확립하고자 배양온도에 따른 실험을 하였다.

##### (2) 재료 및 방법

###### (가) 실험재료

앞서 진행된 절편체와 성장조절제 처리에 따른 재분화 연구결과를 바탕으로 기내에서 무균적으로 배양된 무늬둥굴레 재분화 개체를 획득하였다. 2010년 12월 8일 계대배양을 통하여 생장한 절편체를 본 실험의 재료로 이용하였다.

###### (나) 배양배지

배지 처리구는 MS 기본배지로 설정하였다. sucrose 3%(w/v), agar 0.8%(w/v), 활성탄 0.1%(w/v)를 첨가한 후, pH는 5.80으로 조절하고, 121℃에서 15분간 고압멸균 하여 사용하였

다. 배양용기는 마요네즈 유리병을 사용하였고 각각 50 mL씩 분주하였다.

#### (다) 배양환경

배양기간 중 온도는 15℃와 25℃ 각각 처리 하였다. 광도(PPFD) 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 상대습도 70-80%인 배양실에서 명기 16  $\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 과 암기 8  $\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 의 조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

실험 처리를 한 후 10주가 경과하였으나 온도에 따른 두 처리구에서 신초의 변화가 거의 없었다(Fig. 2-2-9). 향후 더 시간을 가지고 관찰하고자 하나 현시점에서 25℃ 처리구에서 신초의 발생이 좀 더 빠르고 크기가 굵은 것으로 관찰이 된다. 앞서 실험한 최적배지 구명을 위한 실험과 동일하게 신초의 변화가 거의 보이지 않았다. 둥굴레의 신초 분화 특성을 면밀히 더 연구할 필요성이 있다.

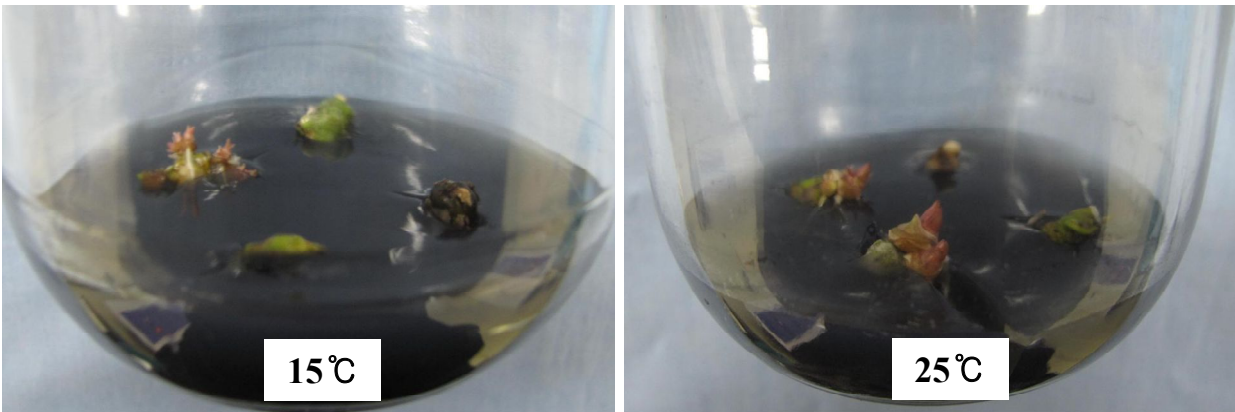


Fig. 2-2-9. Effect of temperature on regeneration of *P. odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi for. *variegatum* Y.N. Lee.

## 3. 무늬둥굴레 (*Polygonatum odoratum*)의 대량번식

### 가. 실험재료 확보를 위한 기내대량 번식

#### (1) 연구목적

무늬둥굴레의 최적 배양조건을 확립하고자 다양한 실험을 수행함에 있어서 무균식물체의 대량 공급이 필요하다. 따라서 기내에 도입된 식물체를 반복적인 계대배양 통하여 실험을 위한 개체수 확보를 하고자 본 실험을 하였다.

#### (2) 재료 및 방법

##### (가) 실험재료 및 살균방법

- 1) 무늬둥굴레 근경과 신초를 흐르는 수돗물로 30분간 수세한 후 1% 살균제에 24시간동안

침지하였다. 멸균수로 3-4회 헹구고, 1%(v/v) NaOCl에 15분간 침지하였다. 다시 멸균수로 2-3회 헹구고, 0.2%(w/v) HgCl<sub>2</sub>에 10분간 침지한 후 멸균수로 3회 헹군다. 그리고 70% EtOH에 1분 동안 소독하였다. 마지막으로 0.1% PVP가 첨가된 멸균수로 헹군다.

(나) 배양배지

배지 처리구는 MS 기본배지로 설정하였다. Sucrose 3%(w/v), agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, pH는 5.80으로 조절하고, 121℃에서 15분간 고압멸균 하여 사용하였다.

(다) 배양환경

배양기간 중 온도는 25±1℃로 하였다. 광도(PPFD) 40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 상대습도 70-80%인 배양실에서 명기 16 h·d<sup>-1</sup>과 암기 8 h·d<sup>-1</sup>의 조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

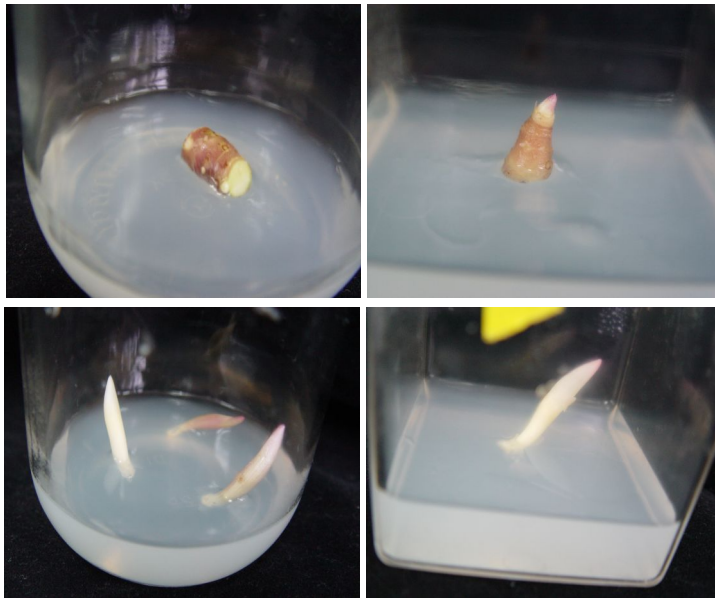


Fig. 2-3-1. Explants of *P. odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi for. *variegatum* Y.N. Lee inoculated on MS medium.

(3) 결과 및 고찰

실험을 진행하면서 무균적으로 기내에 도입된 식물체를 성공적으로 획득 할 수 있었다. 일부 절편체에서 구가 형성되기도 하고 신초를 치상한 경우 빠른 신초의 신장이 관찰되었다(Fig. 2-3-2).





Fig. 2-3-2. Explants of *P. odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi for. *variegatum* Y.N. Lee inoculated on MS medium.

그러나 구에서 발달된 신초를 다시 계대배양 하였을 때 6개월 동안 아주 느린 성장을 보였다(Fig. 2-3-3). 앞서 진행된 최적 배양환경 조건 규명을 위한 배지와 온도 실에서도 계대배양 된 식물체의 생장이 아주 느린 것을 확인 할 수 있었다.

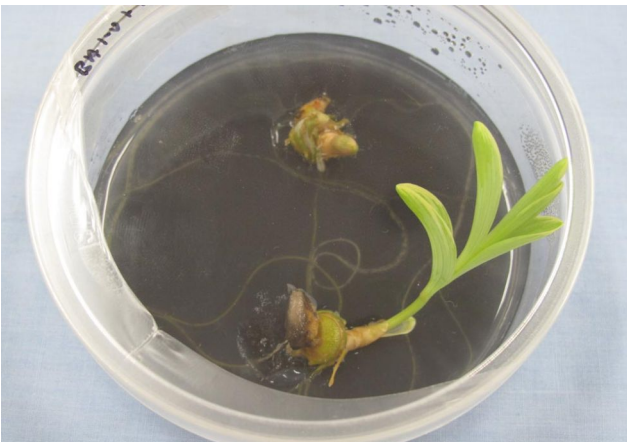


Fig. 2-3-3. *P. odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi for. *variegatum* Y.N. Lee observed after 6 months of subculture.

#### 나. 무늬둥굴레의 신초생장을 위한 배양환경 조건 규명

##### (1) 연구목적

백합과에 속하는 다년생 식물인 무늬둥굴레는 노란색을 포함한 엷을 절지하여 꽃꽂이 소재로 사용되어 일본, 중국, 한국에서 최근 그 수요가 증가하고 있다. 하지만 출하시기가 5-6월로 한정되어 있어 수요에 따른 생산의 어려움이 커 연중생산을 위한 번식체의 확보와 작기 개발을 위한 식물체를 확보하기 위하여 조직배양을 이용한 최적 배양조건을 확립하는 것이 필요하

다. 본 연구는 배양 배지, 온도, 그리고 광도에 따른 신초의 성장과 발달에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

## (2) 재료 및 방법

### (가) 실험재료 및 살균방법

2011년 4월 경남 진주시 사봉면에 위치한 무늬등굴레 농장에서 무늬등굴레 근경을 굴취하였다. 채취된 무늬등굴레 근경과 신초를 흐르는 수돗물로 흙을 제거한 후 70%(v/v) EtOH에 1분간 표면을 살균한 다음 멸균수로 3회 헹구고, 1.5%(v/v) NaOCl에 15분 처리한 후 멸균수로 3회 헹구어 filter paper에 건조시키고 소독된 유리용기에 담아서 암상태로 냉장 보관하였다(Fig. 2-3-4A). 1차 소독이 끝난 근경과 신초를 분리 절단하고 2차 소독을 위하여 신초의 비늘을 1-2개 제거하고 70%(v/v) EtOH에 2분간 처리한 다음 멸균수로 3회 헹구고, 1.5%(v/v) NaOCl에 Tween 20 1-2방울을 첨가하여 신초를 15분 정도 처리한 후 멸균수로 3회 헹구고 신초의 비늘을 1개 더 제거하였다(Fig. 2-3-4B). 마지막으로 3차 소독을 위하여 신초를 다시 70%(v/v) EtOH에 1분간 처리한 다음 멸균수로 3회 헹구고, 1.5%(v/v) NaOCl에 Tween 20 1-2방울을 첨가하여 신초를 10분 정도 처리한 후 멸균수로 3회 헹구고 신초의 본 잎을 1-2개 제거하고 실험에 절편체로 이용하였다(Fig. 2-3-4C).

### (나) 배양배지와 배양환경

배양배지로는 MS), Gamborg(B5), Nitsch(N6) 및 AM(Anderson) 배지의 4가지를 사용하였다(Table 2-3-1). 각각의 배지에 sucrose 3%(w/v), agar 0.8%(w/v)을 첨가한 후, pH는 5.80으로 조절하고, 121°C에서 15분간 고압멸균 후 사용하였다. 배양용기는  $3.7 \times 10^{-4} \text{m}^{-3}$ 의 용기(GA7 Magenta Box, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)를 사용하였고 용기마다 50 mL의 배지를 분주하여 실험에 사용하였다.

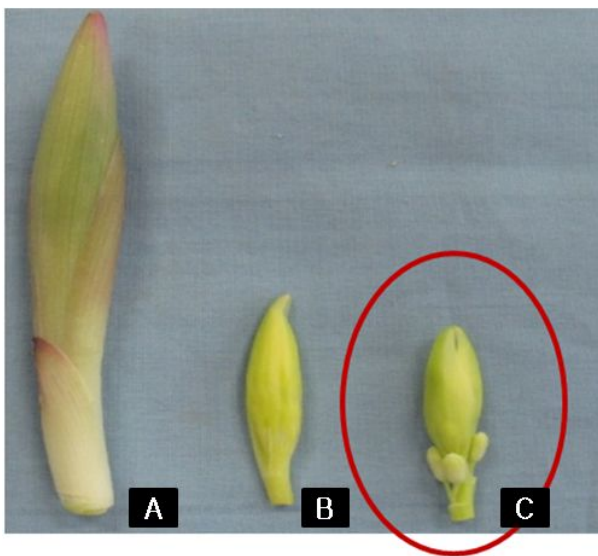


Fig. 2-3-4. Shoot of the plants in the process of preparation for the explant after sterilizations. (A) after first sterilization, (B) after removing 1-2 scale leaves, and (C) final

explant ready to be inoculated.

(다) 배양환경

배양체는 온도 25와 15°C, 광도(PPFD) 40-45와 1-2  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 상대습도 70-80%인 배양실에서 명기 16  $\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 과 암기 8  $\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 의 조건하에서 배양되었다(Table 2-3-1). 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프(모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람)를 이용하였다.

Table 2-3-1. Medium, temperature and light intensity trialed for shoot growth and development of *P. odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi for. *variegatum* Y.N. Lee.

| Medium                   | Temp. (°C) | Light intensity ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) |
|--------------------------|------------|---|
| Murashige and Skoog (MS) | 25         | 40-45   |
|                          |            | 1-2   |
|                          | 15         | 40-45   |
|                          |            | 1-2   |
| Gamborg (B5)             | 25         | 40-45   |
|                          |            | 1-2   |
|                          | 15         | 40-45   |
|                          |            | 1-2   |
| Nitsch (N6)              | 25         | 40-45   |
|                          |            | 1-2   |
|                          | 15         | 40-45   |
|                          |            | 1-2   |
| Anderson (AM)            | 25         | 40-45   |
|                          |            | 1-2   |
|                          | 15         | 40-45   |
|                          |            | 1-2   |

(3) 결과 및 고찰

MS배지에서는 온도와 관계없이 1-2  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 낮은 광도에서 신초 성장률과 엽록소 함량이 높았다(Table 2-3-2). 특히 40-45  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 높은 광도에서 배양한 식물체는 전반적으로 잘 성장하지 못하고 잎이 노랗게 변하거나 과수화 현상이 나타나는 등 형태적·생리적 이상상이 나타났다(Fig. 2-3-5). 따라서 무늬둥굴레의 신초 성장을 위해서 MS배지를 사용할 경우에는 온도와 관계없이 낮은 광도가 적합한 것으로 판단된다.

Table 2-3-2. Effect of light intensity and temperature on frequency of shoot elongation and chlorophyll content of *P. odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi for. *variegatum* Y.N. Lee cultured on the MS medium.

| Temp. (°C) | Light intensity ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) | Frequency of shoot elongation (%) | Chlorophyll content ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ fw) |
|------------|---|-----------------------------------|--|
| 25         | 40-45   | 16.7 b <sup>z</sup>               | 0.08 b   |
|            | 1-2   | 41.7 a                            | 1.33 a   |
| 15         | 40-45   | 16.7 b                            | 0.07 b   |
|            | 1-2   | 41.7 a                            | 1.89 a   |

<sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $P=0.05$ .

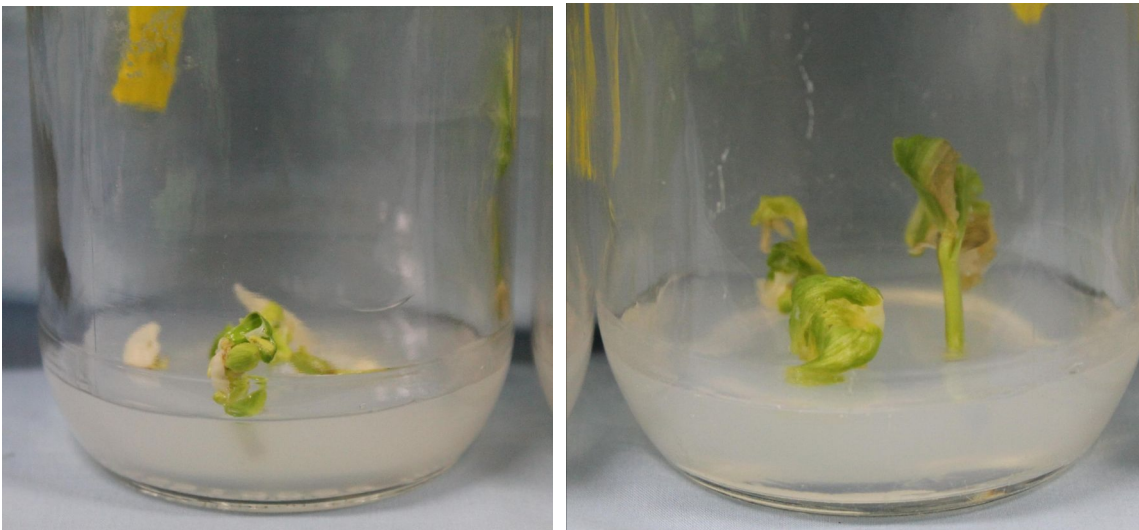


Fig. 2-3-5. Abnormal and hyperhydric shoots observed after 30 days of culture under different light intensities and temperatures cultured on the B5 medium.

B5배지에서 온도와 광도에 따른 무늬등굴레의 신초 성장률과 엽록소 함량은 낮은 온도인 15°C와 40-45  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  광조건에서 각각 91.6%와 7.75  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  fw로 가장 높았다(Table 2-3-3). 특히 이 조건 하에서는 식물이 정상적으로 성장하였으며 과수화 현상이 전혀 나타나지 않았다. 따라서 무늬등굴레의 대량증식을 위한 기내번식의 신초 성장 단계에서 B5배지를 사용할 경우에 온도는 15°C, 광도는 40-45  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 가 가장 적합한 것으로 판단된다.

N6배지에서 온도와 광도에 따른 무늬 등굴레의 신초 성장률과 엽록소 함량은 낮은 온도인 15°C에서 40-45  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  배양 조건에서 각각 75.0%와 3.06  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  fw로 가장 높았다(Table 2-3-4). 또한 B5배지와 마찬가지로 이 조건 하에서는 식물이 정상적으로 성장하였으며 과수화 현상이 전혀 나타나지 않았다. 따라서 무늬등굴레의 신초 성장을 위해서 N6배지를 사용할 경우에는 온도는 15°C와 광도는 40-45  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 가 가장 적합한 것으로 판단된다.

Table 2-3-3. Effect of light intensity and temperature on frequency of shoot elongation and chlorophyll content of *P. odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi for. *variegatum* Y.N. Lee cultured on the B5 medium.

| Temp. (°C) | Light intensity ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) | Frequency of shoot elongation (%) | Chlorophyll content ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ fw) |
|------------|---|-----------------------------------|--|
| 25         | 40-45   | 41.7 c <sup>z</sup>               | 1.84 c   |
|            | 1-2   | 66.7 b                            | 2.27 b   |
| 15         | 40-45   | 91.6 a                            | 7.75 a   |
|            | 1-2   | 41.7 c                            | 1.27 c   |

<sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $P=0.05$ .

Table 2-3-4. Effect of light intensity and temperature on frequency of shoot elongation and chlorophyll content of *P. odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi for. *variegatum* Y.N. Lee cultured on the N6 medium.

| Temp. (°C) | Light intensity ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) | Frequency of shoot elongation (%) | Chlorophyll content ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ fw) |
|------------|---|-----------------------------------|--|
| 25         | 40-45   | 66.7 a <sup>z</sup>               | 2.21 a   |
|            | 1-2   | 16.7 b                            | 0.06 b   |
| 15         | 40-45   | 75.0 a                            | 3.06 a   |
|            | 1-2   | 16.7 b                            | 0.06 b   |

<sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $P=0.05$ .

AM배지에서 온도와 광도에 따른 무늬 등굴레의 신초 성장률과 엽록소 함량은 다른 배지와 반대로 낮은 온도인 15°C에서 40-45  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 에서 각각 16.7%와 0.08  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  fw로 가장 낮았다(Table 2-3-5). 특히 이 조건하에서 배양된 식물체는 거의 다 정상적으로 성장하지 못하고 잎이 노랗게 변하거나 과수화 현상이 나타나는 등 형태적·생리적 이상이 나타났다. 따라서 무늬등굴레의 신초 성장을 위해서 AM배지를 사용할 경우에는 15°C와 40-45  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 는 적합하지 않은 것으로 판단된다.

Table 2-3-5. Effect of light intensity and temperature on frequency of shoot elongation and chlorophyll content of *P. odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi for. *variegatum* Y.N. Lee cultured on the AM medium.

| Temp. (°C) | Light intensity ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) | Frequency of shoot elongation (%) | Chlorophyll content ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ fw) |
|------------|---|-----------------------------------|--|
| 25         | 40-45   | 41.7 a <sup>z</sup>               | 1.86 a   |
|            | 1-2   | 41.7 a                            | 1.55 a   |
| 15         | 40-45   | 16.7 b                            | 0.08 b   |
|            | 1-2   | 41.7 a                            | 1.65 a   |

<sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $P=0.05$ .

이상의 연구결과를 미루어 보면, 무늬둥굴레의 기내 번식시 신초 성장단계에서 각각의 배지 종류에 따른 최적 배양환경 조건이 달랐다. B5배지는 다른 배지들에 비해 신초 성장률과 엽록소 함량이 각각 91.6%와  $7.75 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  fw로 상당히 높았다(Table 2-3-3). 이것은 B5배지가 MS배지에 비하여 암모늄태 질소의 비율이 낮은 특징이 있기 때문에 신초 성장률이 높아진 것으로 생각된다. 배양 배지 종류에 따른 신초 성장률은 B5배지에서 가장 높았고, 그다음은 N6 배지이며 AM배지와 MS배지는 가장 낮았다. 신초 성장률은 온도 처리구는 25°C보다는 다소 낮은 15°C에서 높았고, 광도 처리구는 낮은 광도인 1-2  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 보다는 45-45  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 에서 높았다(Fig. 2-3-6).

결론적으로 무늬둥굴레의 대량증식을 위한 기내 번식시 신초 성장단계에서 배양배지로는 B5배지를 사용하고, 온도는 15°C로 낮게 조절하며, 광도는 40-45  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 로 제공하는 것이 생장에 가장 효과적이었다(Fig. 2-3-6C).



Fig. 2-3-6. Effect of medium and light intensity on shoot growth and development of *P. odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi for. *variegatum* Y.N. Lee under (A) high temperature, and (B) low temperature. (C) Development of shoots on the B5 medium at low temperature under high light intensity.

## 다. 무늬등굴레의 기내 증식을 위한 발근단계에 관한 연구

### (1) 연구목적

지난 3년간 무늬등굴레의 기내 증식 방법을 연구한 결과 식물생장조절제 처리에 따른 재분화 조건을 확립하고 신초 생장에 대한 연구를 성공적으로 수행하였다. 이러한 연구를 수행하는 과정에서 무늬등굴레는 특징적으로 정단부 신초의 성장만 이루어지고 측지가 존재하지 않기 때문에 일정한 시간이 경과하면 더 이상 기내에서 생존하지 못하고 노랗게 황화하면서 지상부가 죽는 심각한 문제점이 발견되었다. 무늬등굴레도 기내 증식 후 발근을 하고 순화의 과정까지 성공하여야 완전한 프로토콜을 완성할 수 있다. 따라서 재분화된 신초의 지속적인 계대배양 방법뿐만 아니라 빠른 발근을 유도하는 방법의 개발 필요성이 대두되었다.

무늬등굴레는 백합과에 속하는 다년생 숙근초이다. 자연환경에서의 생육을 살펴보면 겨울철에 저온을 어느 정도 받아야 휴면이 타파되어 이듬해 봄에 신초가 올라온다. 따라서 재분화된 무늬등굴레 신초에서 발근을 유도하고 순화할 수 있도록 온도처리 실험을 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 실험재료

절편체 종류와 식물생장조절제 처리에 따른 재분화 선행연구의 결과를 바탕으로 기내에서 무균적으로 배양된 무늬등굴레의 재분화 개체를 획득하였다. 2010년 12월 8일 계대배양을 통하여 성장한 절편체를 본 실험의 재료로 이용하였다.

#### (나) 배양배지

MS 기본배지에 sucrose 3%(w/v), agar 0.8%(w/v), 활성탄 0.1%(w/v)를 첨가한 후, pH는 5.80으로 조절하고, 121°C에서 15분간 고압멸균 후 사용하였다. 배양용기는 마요네즈 유리병을 사용하였고 용기당 각각 50 mL씩의 배지를 분주하였다.

#### (다) 배양환경

배양기간 중 온도는 15°C와 25°C로 처리하였다. 광도(PPFD)  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 상대습도 70-80%인 배양실에서 1일 명기  $16 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 과 암기  $8 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 의 조건하에서 배양하였다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

실험 처리를 한 후 10주가 경과하였으나 온도에 따른 두 처리구에서 신초의 변화가 거의 없었다(Fig. 2-3-7). 25°C 처리에서 신초의 발생이 좀 더 빠르고 크기가 굵은 것으로 관찰이 되었으나, 지속적으로 시간이 경과하면서 25°C 처리구의 신초는 더 이상 성장하지 못하면서 생장이 멈추고 결국 고사하였다. 그러나 15°C 처리에서 배양된 무늬등굴레의 경우 아주 천천히 느리게 지상부 신초의 신장이 지속적으로 진행되었다. 특히 약 1년이 경과된 현재 시점에 지하부에 발근하는 모습이 확연하게 관찰되었다. 배지에 첨가된 활성탄 때문에 지하부 발근을 일찍 발견하지 못하여 정확한 발근시점을 확인할 수는 없었다.

신초의 발근 방법을 구명하기 위하여 여러 가지 방법을 시도하였으나 발근을 관찰할 수 없

었다. 하지만 겨울의 저온을 지나면서 춘화처리를 받아야 이듬해 봄에 신초가 올라오는 무늬둥굴레의 생육특성과 같이 지하부 발근 역시 저온처리를 하는 경우 휴면이 타파되는 것으로 생각된다(Fig. 2-3-8). 이로서 3년 동안 수행된 무늬둥굴레의 기내 대량증식 프로토콜이 완성되었다.

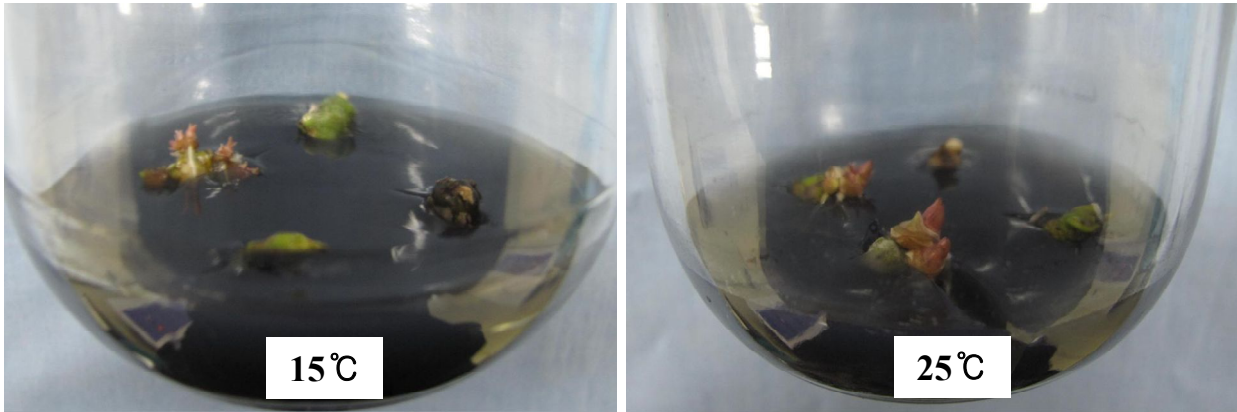


Fig. 2-3-7. Effect of temperature on rooting of *P. odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi for. *variegatum* Y.N. Lee after 10 weeks of inoculation

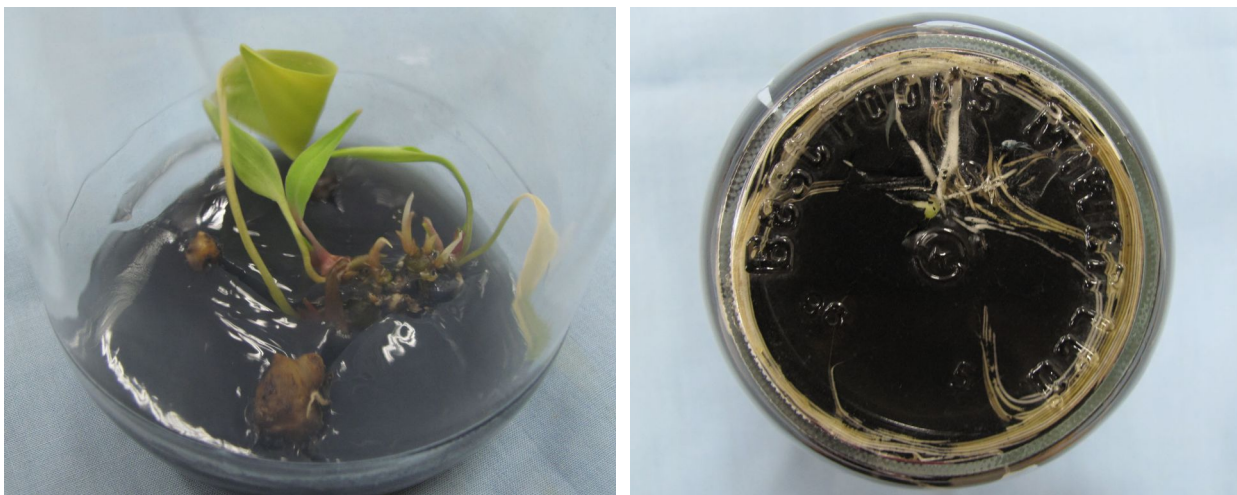


Fig. 2-3-8. Shoot and root induction of *P. odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi for. *variegatum* Y.N. Lee obtained under 15°C on Jan. 2012.

#### 4. 무늬 둥굴레 (*Polygonatum odoratum*)의 기내 증식을 위한 재분화 프로토콜 확립

##### 가. 무늬 둥굴레의 재분화 조건 확립

##### (1) 연구목적

백합과에 속하는 다년생 식물인 무늬둥굴레는 노란색을 포함한 엽을 절지하여 꽃꽂이 소재로 사용되어 일본, 중국, 한국에서 최근 그 수요가 증가하고 있다. 식물은 근경의 분열에 의해 보통 번식되는데 제한된 큰 규모의 재배에서는 증식률이 낮으며 휴면기부터 근경을 통해 식물



의 발달을 유도하는 것은 2년이 소요된다. 본 연구는 무늬둥굴레의 근경을 이용하여 기내 증식을 위한 재분화 프로토콜을 개발하는 것이다.

## (2) 재료 및 방법

### (가) 실험재료 및 살균방법

채취된 무늬둥굴레 근경을 흐르는 수돗물에 30분 동안 세척하였고, 멸균수로 행구었다. 절편체는 70%(v/v) EtOH에 1분간 표면을 살균한 다음 멸균수로 3번 행구고, 3%(v/v) NaOCl에 15분 처리한 후 멸균수로 3회 행구고 0.01%(v/v) HgCl<sub>2</sub>에 20분 세척하였다. 절편체는 멸균된 필터 종이에서 건조하였고 0.5-1.0cm로 절단하여 실험에 이용하였다.

### (나) 배양배지

Anderson's 배지(AM)에 sucrose 3%(w/v)를 넣고, pH는 5.80으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121℃에서 15분간 고압멸균 하여 사용하였다.

### (다) 배양환경

배양온도는 25±1℃로 설정하였고, 명기 16시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> PPFd의 광 조건하에서 배양하였다. 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프[Philips 40 W tubes]를 이용하였다.

## (3) 결과 및 고찰

신초 발생을 위해 근경은 0.0, 0.5, 1.0, 또는 2.0 mg·L<sup>-1</sup>의 2iP와 TDZ 단용 또는 0.5, 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D의 혼용으로 처리하여 AM 배지에 배양하였다. 배양 8주 후 신초 눈에서 발생한 절편체수와 절편체당 신초 눈을 조사하였다. 소독 절차로 인해 72% 무균식물을 얻었다. 배지에 식물생장조절제를 첨가하였을 때 배양 4주 후 부정아가 발생하였다(Table 2-4-1). 2iP를 0.5 mg·L<sup>-1</sup>의 농도로 첨가하였을 때 신초는 발생하지 않았고, 2iP의 농도가 높아질수록 부정아는 직접 형성되었다. 2iP의 농도가 2.0 mg·L<sup>-1</sup>일 때 신초 눈 발생을 위해 가장 좋았으며, 절편체당 2.0개의 신초를 얻었다. 배양 3주 후 TDZ를 다양한 농도로 배양배지에 첨가하였을 때 부정아가 발생되었고, 뿌리형성은 또 다른 배양 2주 후 신초 눈에서 관찰되었다(Fig. 2-4-1A). 절편체당 3.8개의 신초 눈을 발생하는 가장 높은 비율(71%)은 AM 배지에 TDZ의 농도가 1.0 mg·L<sup>-1</sup>일 때 얻었다(Fig. 2-4-1B). 그러나 높은 농도의 TDZ에서 신초 눈 발생률과 절편체당 발생하는 평균 신초수는 감소하였다.

Table 2-4-1. Effect of cytokinin on adventitious shoot induction from the rhizome explants of *P. odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi for. *variegatum* Y.N. Lee.

| Conc. (mg·L <sup>-1</sup> ) | Shoot bud induction (%) |        | No. of shoot buds per explant |       |
|-----------------------------|-------------------------|--------|-------------------------------|-------|
|                             | 2iP                     | TDZ    | 2iP                           | TDZ   |
| 0.0                         | 0.0 c <sup>z</sup>      | 0.0 d  | 0.0 c                         | 0.0 c |
| 0.5                         | 0.0 c                   | 63.0 d | 0.0 c                         | 3.2 a |
| 1.0                         | 32.0 b                  | 71.0 a | 1.2 b                         | 3.8 a |
| 2.0                         | 59.0 a                  | 56.0 c | 2.0 a                         | 1.8 b |

<sup>z</sup>Means followed by the same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

배양 3주 후 절편체의 표면에서 nodular structures가 캘러스 단계를 거치지 않고 형성되었고, 신초 눈 안에서 발달되었다(Fig. 2-4-1C). 2iP 2.0 mg·L<sup>-1</sup>, TDZ 0.5 mg·L<sup>-1</sup>, 및 2,4-D 1.0 mg·L<sup>-1</sup>가 첨가된 AM 배지에서는 부정아 재분화를 위해 가장 적합하였으며 절편체당 7.6개의 신초를 얻었다(Table 2-4-2, Fig. 2-4-1D).

Table 2-4-2. Effect of plant growth regulators (PGRs) on adventitious shoot induction from the rhizome explants of *P. odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi for. *variegatum* Y.N. Lee.

| PGR (mg·L <sup>-1</sup> ) |     |       | Shoot bud induction (%) | No. of shoot buds per explant |
|---------------------------|-----|-------|-------------------------|-------------------------------|
| 2iP                       | TDZ | 2,4-D |                         |                               |
| 2.0                       | 0.5 | 0.5   | 87.0 c <sup>z</sup>     | 2.7 c                         |
| 2.0                       | 0.5 | 1.0   | 100.0 a                 | 7.6 a                         |
| 2.0                       | 1.0 | 0.5   | 96.0 b                  | 5.8 b                         |
| 2.0                       | 1.0 | 1.0   | 98.0 ab                 | 6.2 ab                        |

<sup>z</sup>Means followed by the same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

재분화된 신초 눈은 신초의 신장과 발근을 위해 0.0, 0.5, 1.0, 또는 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D 또는 NAA를 첨가하여 1/2배액 AM 배지에 옮겼다. 6주 후 발근율과 신초당 발생하는 뿌리수를 조사하였다. 신초는 식물생장조절제가 첨가되지 않은 1/2배액 AM 배지에서 뿌리가 발달하였고, 발근율은 34%였다. 1/2배액 AM 배지에 2,4-D 또는 NAA를 첨가하였더니 발근율을 촉진시켰다(Table 2-4-3). 신초당 5.2개의 뿌리를 가진 가장 높은 발근율(100%)은 1/2배액 AM 배지에서 NAA를 1.0 mg·L<sup>-1</sup>의 농도로 첨가하였을 때 얻었다(Fig. 2-4-1E). 하지만 NAA의 농도가 2.0 mg·L<sup>-1</sup>이 되었을 때 발근율에는 영향을 미치지 않았지만 신초당 발생하는 평균 뿌리수를 감소하였다.

Table 2-4-3. Effect of different concentrations of 2,4-D and NAA on root induction.

| Conc. (mg·L <sup>-1</sup> ) | Root induction (%)      |             | No. of roots per shoot |              |
|-----------------------------|-------------------------|-------------|------------------------|--------------|
|                             | 2,4-D                   | NAA         | 2,4-D                  | NAA          |
| 0.0                         | 34 ± 2.6 d <sup>z</sup> | 34 ± 2.6 c  | 1.0 ± 0.2 d            | 1.0 ± 0.2 c  |
| 0.5                         | 61 ± 3.7 c              | 80 ± 1.0 b  | 1.8 ± 0.4 c            | 4.1 ± 0.8 ab |
| 1.0                         | 94 ± 5.2 a              | 100 ± 0.0 a | 3.2 ± 0.6 a            | 5.2 ± 0.5 a  |
| 2.0                         | 86 ± 4.0 b              | 100 ± 0.0 a | 2.8 ± 0.7 b            | 3.0 ± 1.0 b  |

<sup>z</sup>Means followed by the same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

순화를 위해 재분화된 식물체는 코이어, 피트모스, 펄라이트, 그리고 버미큘라이트로 구성된 토실이상토가 채워진 순화박스로 이식하였고, 2일 마다 1/4배액 양액을 관수하였고, 온실에서 유지하였다. 4주 후, 순화된 식물은 토실이상토가 포함된 포트에 이식되었다. 본 연구결과 100% 생존율을 보이며 성공적으로 순화되었다(Fig. 2-4-1F). 이로써 무늬등굴레의 재분화 프로토콜이 확립되었다(Sivanesan and Jeong, 2010).

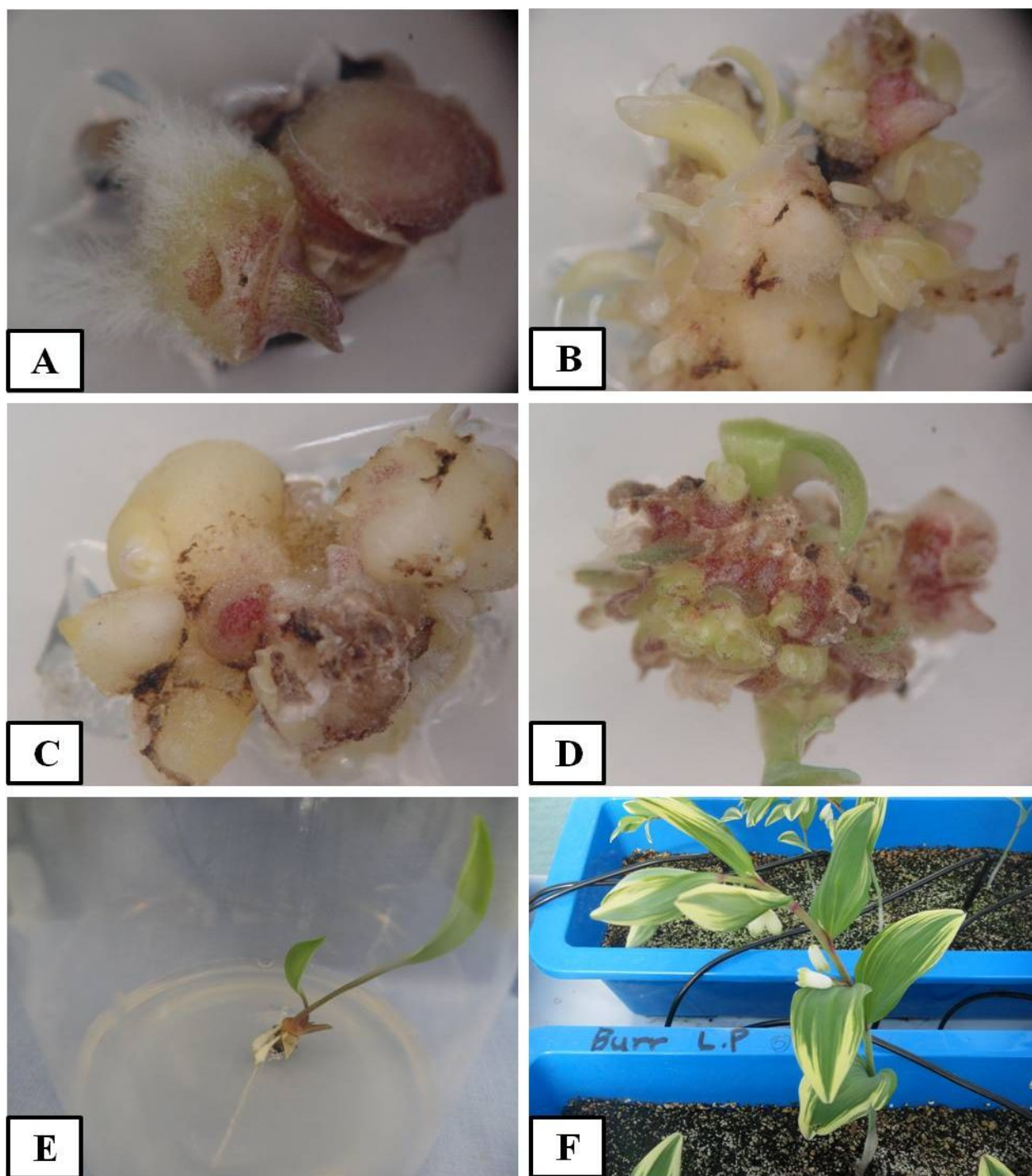


Fig. 2-4-1. In vitro propagation of *P. odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi for. *variegatum* Y.N. Lee. (A) adventitious shoot with roots on the AM medium with  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ after 5 weeks of culture, (B) adventitious shoot regeneration on the AM medium with  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ after 8 weeks of culture, (C) shoot initiation on the AM medium with  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D,  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2iP, and  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ, after 6 weeks of culture, (D) shoot regeneration on the AM medium with  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D,  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2iP, and  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ, after 8 weeks of culture, (E) rooting of in vitro regenerated shoot on the half strength AM medium with  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA after 6 weeks of culture, and (F) acclimatized plants grown in the greenhouse.

## 제 3 절 조직배양을 통한 깽깽이풀의 대량번식기술 개발

### 1. 깽깽이풀(*Jeffersonia dubia*) 기내 번식법 개발

#### 가. 깽깽이풀의 배배양을 통한 기내번식 실험

##### (1) 연구목적

깽깽이풀은 매자나무과(Berberidaceae)에 속하는 다년생 초본식물로서 황련 또는 조황련으로 불리는데 잎의 모양이 연잎을 닮아서 여름에는 잎 자체로도 관상가치가 높다. 근경 및 근을 약용으로 사용하며 주요성분은 berberine과 alkaloid이다. 해독, 건위의 효능 뿐 아니라 소화불량, 오심, 결막염 등 치료에 이용되어 왔다. 꽃은 4-5월에 피고 지름 2 cm 정도로 홍자색이며 1-2개의 화경 끝에 1개씩 피는데 화경이 잎보다 먼저 나온다. 원산지가 한국이며 현재 멸종 위기종으로 지정하여 보호하고 있다. 따라서 멸종위기의 토속식물을 보호하고 대량으로 번식하고자 본 실험하였다.

성숙배를 이용한 배배양은 많은 작물에서 연구가 이루어지고 있다. 특히 처음 기내로 식물을 도입하는 단계에서는 멸균을 위하여 아주 강하게 소독할 필요성이 있는데 종자의 경우 강한 소독이 가능하고, 종자 안에 존재하는 배의 경우 오염도가 매우 낮으므로 이러한 배를 적출하여 이용하는 배배양은 무균배양 시작단계에서 이용하기에 매우 효과적인 방법이다. 본 실험에서는 깽깽이풀의 성숙종자의 배를 적출하여 다양한 성장조절제 처리 배지에서 기내 번식하였다.

##### (2) 재료 및 방법

###### (가) 실험재료 및 멸균 소독방법

깽깽이풀 종자는 2009년 5월 27일 채종하였다. 종자휴면이 아주 강한 작물로서 충분한 휴면타파를 위하여 증적처리를 약 8개월 동안 하였다. 증적처리는 버미큘라이트와 종자를 섞어서 노지에 묻고 낙엽을 5 cm 정도 덮어 두었다. 2010년 1월 20일에 노지에서 파내고 1월 26일에 기내 번식 실험하였다. 1차로 70%(v/v) EtOH에 1분 처리하고, 멸균수로 3회 세척하고, Tween 20 1방울을 떨어뜨린 1.5%(v/v) NaOCl을 이용하여 15분간 처리하고 다시 멸균수로 3회 세척하였다. 1차 소독 후 종자의 종피를 벗기고 2차 소독하였다. 70%(v/v) EtOH에 1분 처리하고, 멸균수로 3회 세척 후 Tween 20 1방울을 떨어뜨린 1.5%(v/v) NaOCl을 이용하여 15분 처리하고 다시 멸균수로 4-5회 세척하여 멸균하였다. 멸균된 종자에서 배유를 제거하고 휴면이 타파된 성숙 배만을 적출하여 처리별로 성장조절제가 들어 있는 MS배지에 치상하였다(Fig. 3-1-1).



Fig. 3-1-1. Seeds of *J. dubia*. A, stratification of seeds; B, embryo excised from seeds.

#### (나) 배양배지

기본배지는 MS배지를 사용하였고, sucrose 3% (w/v)를 이용하였다. 처리별 성장조절제 조성은 Table 3-1-1과 같다. pH는 5.70-5.80으로 조절하고, agar 0.8% (w/v), 활성탄 0.1% (w/v)를 첨가한 후, 121°C에서 15분간 고압멸균 하고 test tube에 10 mL씩 분주하여 각각의 처리 당 4반복으로 실험하였다.

Table 3-1-1. PGRs used this experiments.

| Treatment no. | PGR (mg·L <sup>-1</sup> ) |     |     |     |     |
|---------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|
|               | GA <sub>3</sub>           | BAP | IAA | NAA | TDZ |
| 1             | 0                         | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 2             | 1.0                       | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 3             | 1.0                       | 1.0 | 0.5 | 0   | 0   |
| 4             | 0                         | 0   | 0   | 0.1 | 0.1 |

#### (다) 배양환경

배양온도는 25±1°C로 설정하였고, 상대습도 70-80%인 배양실에서 명기 16시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형 광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

깻쟁이풀 종자의 강한 휴면을 타파하고 성숙한 배를 얻고자 약 8개월의 층적처리 기간이 소요되었다. 따라서 본 실험은 현재 늦게 시작이 되었으나 기내배양 실험 진행에는 문제가 없다. 현재 실험결과 모든 처리구에서 오염이 발생되지 않았다. 곰팡이와 박테리아 오염은 배양 3-4일 만에 나타나는데 현재까지 오염 발생이 전혀 나타나지 않고 있으므로 소독은 성공적으로 이루어진 것으로 판단한다. 앞으로 계속 배배양을 위한 멸균방법은 본 실험에서 이용된 멸균방법으로 소독할 것이다. 또한 배의 자엽과 뿌리가 서서히 전개되고 있는 모습을 관찰할 수 있었다(Fig. 3-1-2). 따라서 본 실험결과 깻쟁이풀 무균식물체 기내배양은 향후 성공적으로 수행할

수 있다고 판단된다.

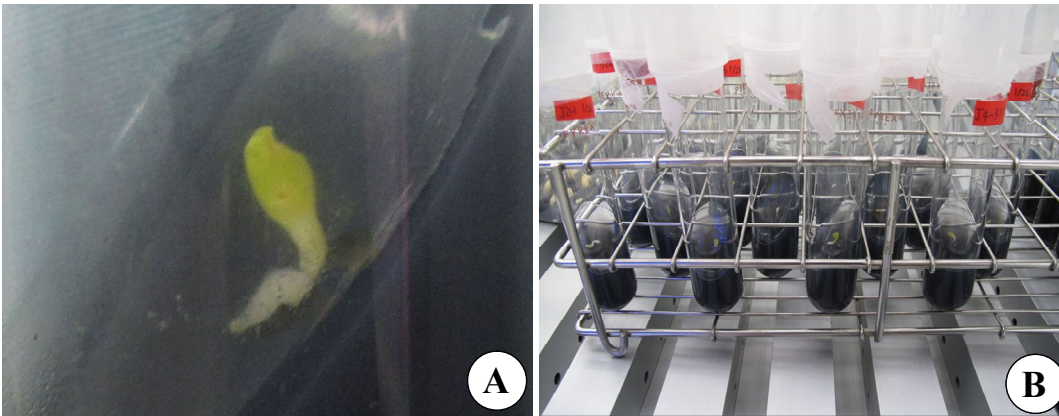


Fig. 3-1-2. Embryos cultured for four days after inoculationL A, cotyledon and root developed; and B, effect of PGRs on embryo culture.

## 나. 갯쟁이풀의 신초배양을 통한 기내 번식 실험

### (1) 연구목적

갯쟁이풀은 매자나무과(Berberidaceae)에 속하는 다년생 초본 식물로서 숙근성식물이다. 원산지가 한국이며 현재 멸종 위기종으로 지정하여 보호하고 있다. 따라서 멸종위기의 토속식물을 보호하고 대량으로 번식하고자 본 실험을 실시하였다.

가을에 낙엽이 지고 뿌리만 남아서 겨울을 나고 이듬해 봄이 오면 새로 신초가 발생하여 이른 봄에 꽃을 피운다. 겨울을 지나고 새로 자라는 동지아의 신초는 많은 비늘이 있기 때문에 처음 기내로 식물을 도입하는 단계에서 멸균을 위하여 아주 강하게 소독을 할 수가 있다. 또한 모본과 동일한 영양번식이 가능하므로 조직배양을 통한 대량번식에 이용하기에 매우 효과적이다. 본 실험에서는 갯쟁이풀의 동지아 신초를 멸균하고 정아만 적출하여 다양한 성장조절제 처리 배지에서 기내 번식하고자 한다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 실험재료 및 멸균 소독방법

갯쟁이풀 신초는 2010년 1월 13일에 채취하였다(Fig. 3-1-3). 신초를 싸고 있는 비늘을 2-3겹 제거하고 소독을 실시하였다. 1차로 70%(v/v) EtOH에 1분 처리하고, 멸균수로 3회 세척하였다. 그리고 Tween 20 1방울을 떨어뜨린 1.5%(v/v) NaOCl을 이용하여 10분간 처리하고 다시 멸균수로 3회 세척하였다. 신초를 싸고 있는 비늘을 약 2겹 정도 더 제거하고 2차로 70%(v/v) EtOH에 1분 처리하고, 멸균수로 3회 세척 후 Tween 20 1방울을 떨어뜨린 1.5%(v/v) NaOCl을 이용하여 20분 처리하고 다시 멸균수로 4-5회 세척하여 멸균 하였다. 멸균된 신초에서 남은 비늘을 모두 제거하고 정아만을 적출하여 처리별로 성장조절제가 들어 있는 MS배지에 치상하였다.

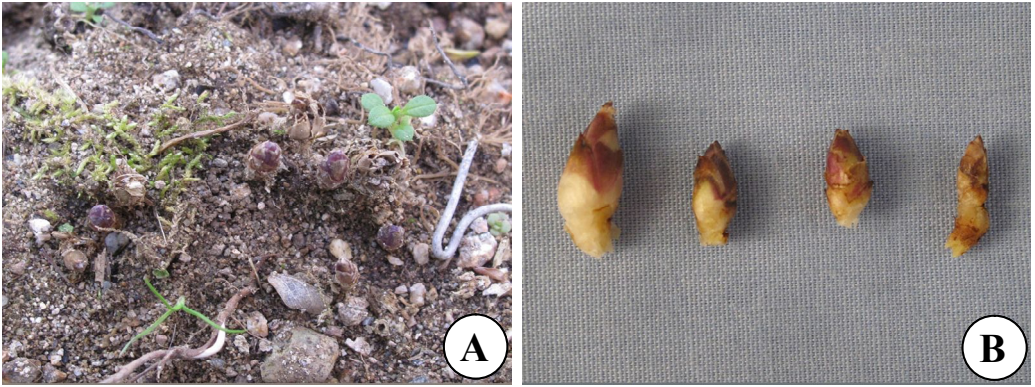


Fig. 3-1-3. Winter sucker of *J. dubia*: A, shoot buds from the field-grown plants; and B, shoot buds prepared for sterilization to be used as the explants.

(나) 배양배지

기본배지는 MS배지를 사용하였고, sucrose 3%(w/v)를 이용하였다. 처리별 성장조절제 조성은 Table 3-1-2와 같다. pH는 5.70-5.80으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)을 첨가한 후, 121℃에서 15분간 고압멸균 하고 test tube에 각각 10 mL씩 분주하여 각각의 처리 당 4반복으로 실험을 실시하였다.

Table 3-1-2. PGRs used this experiments.

| Treatment no. | PGR (mg·L <sup>-1</sup> ) |     |     |     |     |
|---------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|
|               | GA <sub>3</sub>           | BAP | IAA | NAA | TDZ |
| 1             | 0                         | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 2             | 1.0                       | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 3             | 1.0                       | 1.0 | 0.5 | 0   | 0   |
| 4             | 0                         | 0   | 0   | 0.1 | 0.1 |

(다) 배양환경

배양온도는 25±1℃로 설정하였고, 상대습도 70-80%인 배양실에서 명기 16시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형 광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

(3) 결과 및 고찰

깽깽이풀 동지아의 신초를 채취하고자 1월에 신초를 채취하면서 본 실험은 현재 진행이 되었으나 기내 배양 실험 진행에는 문제가 없다. 현재 실험결과 모든 처리구에서 오염이 발생되지 않고 배양식물체가 잘 자라고 있으므로 소독은 성공적으로 이루어진 것으로 판단한다. 앞으로 계속 신초배양을 위한 멸균방법은 본 실험에서 이용된 멸균방법으로 소독할 것이다. 현재 기내에 도입된 신초에서 분얼이 전개되고 있다(Fig. 3-1-4). 따라서 본 실험결과 깽깽이풀 무균식물체 기내배양은 성공적으로 수행되었다.



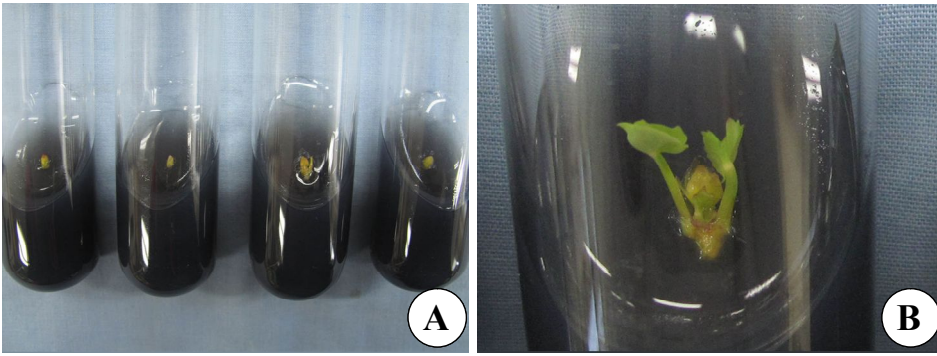


Fig. 3-1-4. Shoot induction of *J. dubia*. A, shoots inoculated on medium; B shoots after 2 weeks of culture.

## 2. 기내 도입된 갯갯이풀(*Jeffersonia dubia*) 무균식물체를 이용한 직·간접적 재분화 조건 확립

### 가. 갯갯이풀 동지아를 이용한 기내 재분화

#### (1) 연구목적

갯갯이풀은 쌍떡잎식물 미나리아재비목 매자나무과의 여러해살이풀로 뿌리가 노란색이어서 황련 또는 조선허련이라고도 한다. 꽃은 홍자색으로 4-5월에 꽃이 피는데 아주 관상용으로 가치가 높은 토속식물이다. 또한 청열, 해독, 건위의 효능이 있을 뿐 아니라 다양한 질병을 치료하는데 사용되는 약용식물로서 이용되므로 부가가치가 높다.

갯갯이풀의 열매는 골돌과이며 8월에 익는다. 넓은 타원형이고 끝이 부리처럼 생겼으며, 종자는 꽃이 진 이후에 6월에 결실 후 꼬투리가 터져 땅에 떨어지는데 타원형이고 검은빛이며 광택이 난다. 이 종자는 바로 발아를 하지 않고 여름, 가을, 겨울을 지나 다음해 봄에 발아를 한다. 이는 갯갯이풀 종자의 형태적 휴면 때문이라고 본 연구과제의 제1세부과제에서 연구결과 확인하였다. 또한 갯갯이풀은 로제트형태로서 겨드랑이 눈이 없고 이른 가을 지상부가 전부 고사하고 뿌리만 겨울을 나는 숙근성 토속식물이다. 이러한 특이한 생육 특성 때문에 연구 수행을 위한 실험재료 확보에 지속적인 어려움을 해마다 겪었다. 따라서 종자 휴면타파의 어려움과 실험재료 확보에 시기적인 제한을 극복하기 위해서는 다양한 종류의 절편체를 이용한 기내 재분화 조건 확립 연구의 필요성이 대두되었다. 가을에 지상부의 잎이 모두 낙엽지고 지하부만 남아서 겨울을 나는 동안 새로운 신초가 땅 밑에서 생성된다. 전년도 연구에서 겨울 동안 생성되는 신초 즉, 동지아를 절편체로 이용하여 기내도입을 위한 무균 식물체를 획득 할 수 있었다.

본 실험에서는 갯갯이풀의 동지아를 채취하여 전년도 연구 방법을 바탕으로 멸균, 소독 후 기내에 도입하여 무균식물체를 확보하고, 동지아를 이용한 신초 재분화 조건을 구명하고자 하였다.

#### (2) 재료 및 방법

##### (가) 실험재료 및 멸균 소독방법

깻잎은 멸종위기식물로 보호를 받고 있으므로 식물재료의 확보가 매우 어렵다. 멸종위기식물의 서식지외 보전기관으로 활동하고 있는 기청산식물원에 공식적으로 깻잎을 2011년 1월 7일 구매하여 경상대학교 부속온실에서 유지 재배하였다. 무균식물체를 획득하기 위하여 깻잎의 동지아를 채취하여 수돗물에 20분 동안 세척하고 멸균수를 이용하여 2-3회 헹구고 무균배양을 위해 70%(v/v) EtOH에 2분간 침지 후 멸균수로 3회 세척하였다. 그리고 1.5% NaOCl에 Tween 20을 한 방울 넣고 15분 동안 침지 한 후 멸균수로 3회 세척하여 멸균하고 겨울눈의 껍질 2겹을 벗겨냈다. 다시 70%(v/v) EtOH에 2분간 침지 후 멸균수로 3회 세척하였다. 그리고 1.5% NaOCl에 Tween 20을 한 방울 넣고 15분 동안 침지 한 후 멸균수로 3회 세척한 후 남아 있는 2-3겹의 껍질을 제거한 다음 2iP, BA, Thidiazuron(TDZ)가 여러 가지 농도로 들어 있는 배지에 치상하여 배양하였다.

#### (나) 배양배지

Anderson's 배지(AM), Murashige and Skoog 배지(MS), Chu's 배지(N6), 그리고 Woody Plant 배지(WPM)와 같은 여러 가지 배지에 sucrose 3% (w/v)를 넣고, pH는 5.70으로 조절하고, agar 0.8% (w/v)를 첨가한 후 121℃에서 15분간 고압멸균을 하여 사용하였다. TDZ는 filtering 후 고압멸균을 실시한 배지에 첨가하였다. 다른 식물생장조절제는 pH를 조절하기 전에 배지에 첨가하였다.

#### (다) 배양환경

배양온도는  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 설정하였고, 명기 16시간 동안  $45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프[Philips 40 W tubes]를 이용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

깻잎의 신초 재분화를 위해서 Anderson's 배지(AM), Murashige and Skoog 배지(MS), Chu's 배지(N6), 및 Woody Plant 배지(WPM)에 2iP, BA, 그리고 TDZ를 각각 0, 0.25, 0.50, 1.0 및  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 농도로 처리 후 멸균된 깻잎의 동지아를 치상하였다. 4주 후 각 처리 배지에서 신초 발생율과 절편체당 신초 발생수를 조사하였다(Table 3-2-1). 신초 발생율과 절편체당 발생된 신초수를 조사한 결과 사용한 모든 배지 중 N6 배지에서 가장 높았고, MS배지에서 가장 낮았다. 식물생장조절제 종류별로 살펴보면 TDZ, BA, 2iP 순으로 높게 나타났고, 농도가 높을수록 신초 발생율과 절편체당 발생된 신초수가 높게 나왔다. 하지만 TDZ를  $2.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 로 처리한 처리구에서는 신초 발생율과 절편체당 발생된 신초수가 줄어든 것을 볼 수 있었는데, 이러한 결과는 TDZ의 독성 때문에 나타난 것으로 판단된다. 결론적으로 깻잎의 동지아를 절편체로 이용하는 경우 신초 재분화를 위한 배지는 N6배지에 TDZ를  $1.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 으로 처리한 것이 가장 좋게 나타남을 본 연구를 통해 알 수 있었다.

Table 3-2-1. Influences of medium and cytokinin on shoot multiplication from the shoot bud explant of *J. dubia*.

| Conc.<br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | Shoot induction (%) |                     |         | No. of shoots per explant |       |        |        |
|--------------------------------|---------------------|---------------------|---------|---------------------------|-------|--------|--------|
|                                | 2iP                 | BA                  | TDZ     | 2iP                       | BA    | TDZ    |        |
| AM                             | 0.00                | 13.2 d <sup>z</sup> | 13.2 e  | 13.2 d                    | 1.0 a | 1.0 b  | 1.0 c  |
|                                | 0.25                | 15.7 cd             | 24.4 d  | 42.6 c                    | 1.0 a | 1.0 b  | 1.0 c  |
|                                | 0.50                | 18.0 c              | 30.0 c  | 56.2 b                    | 1.0 a | 1.0 b  | 1.8 ab |
|                                | 1.00                | 40.2 b              | 47.7 b  | 60.3 ab                   | 1.0 a | 1.0 b  | 2.0 a  |
|                                | 2.00                | 46.8 a              | 59.0 a  | 62.4 a                    | 1.2 a | 1.6 a  | 1.4 b  |
| MS                             | 0.00                | 9.8 d               | 9.8 c   | 9.8 e                     | 1.0 a | 1.0 a  | 1.0 c  |
|                                | 0.25                | 10.7 d              | 14.4 bc | 27.6 d                    | 1.0 a | 1.0 a  | 1.0 c  |
|                                | 0.50                | 16.2 c              | 19.2 b  | 53.2 a                    | 1.0 a | 1.0 a  | 1.2 b  |
|                                | 1.00                | 26.8 b              | 23.7 a  | 41.0 b                    | 1.0 a | 1.0 a  | 1.8 a  |
|                                | 2.00                | 33.0 a              | 25.2 a  | 38.0 c                    | 1.0 a | 1.2 a  | 1.6 ab |
| N6                             | 0.00                | 24.4 e              | 24.4 e  | 24.4 e                    | 1.0 b | 1.0 c  | 1.0 c  |
|                                | 0.25                | 36.2 d              | 27.0 d  | 49.7 d                    | 1.0 b | 1.0 c  | 2.2 b  |
|                                | 0.50                | 40.0 c              | 32.4 c  | 66.3 c                    | 1.0 b | 1.0 c  | 3.8 a  |
|                                | 1.00                | 48.7 b              | 54.6 b  | 78.0 a                    | 1.2 b | 1.6 b  | 3.6 a  |
|                                | 2.00                | 63.2 a              | 70.8 a  | 73.0 b                    | 1.5 a | 2.0 a  | 2.7 b  |
| WPM                            | 0.00                | 11.0 e              | 11.0 d  | 11.0 d                    | 1.0 a | 1.0 b  | 1.0 b  |
|                                | 0.25                | 16.7 d              | 19.4 c  | 24.2 c                    | 1.0 a | 1.0 b  | 1.0 b  |
|                                | 0.50                | 21.3 c              | 33.2 b  | 60.4 a                    | 1.0 a | 1.0 b  | 1.6 a  |
|                                | 1.00                | 27.8 b              | 51.6 a  | 49.4 b                    | 1.2 a | 1.2 ab | 1.3 ab |
|                                | 2.00                | 39.4 a              | 53.0 a  | 0.0 f                     | 1.3 a | 1.4 a  | 0.0 d  |

<sup>z</sup>Means followed by same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

깽깽이풀의 동지아 절편체를 이용하여 재분화된 신초를 대량으로 증식하고자 실험을 하였다. 실험 배지는 N6배지에 TDZ를 0.25, 0.50, 1.0, 2.0 mg·L<sup>-1</sup>의 농도로 넣은 후 각 배지에 0.1 mg·L<sup>-1</sup>의 NAA를 첨가 하여 배양하였다. 치상하고 4주 후 신초 발생율과 절편체당 발생된 신초수를 조사하였다. TDZ의 농도가 0.50 일 때 가장 높은 신초 발생률(96.2%)과 절편체당 발생된 신초수(7.3개)가 가장 높게 나타났고, 농도가 더 높아질수록 감소하는 경향을 보였다(Table 3-2-2, Fig. 3-2-1). 그 이유는 역시 TDZ의 독성 때문이라고 생각된다.

Table 3-2-2. Effect of concentration of TDZ plus  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA on multiple shoot induction from the shoot bud explant of *J. dubia* cultured on the N6 medium.

| TDZ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | Shoot induction (%) | No. of shoots per explant |
|---------------------------------------|---------------------|---------------------------|
| 0.25                                  | 61.4 d <sup>z</sup> | 3.9 c                     |
| 0.50                                  | 96.2 a              | 7.3 a                     |
| 1.00                                  | 90.0 b              | 5.7 b                     |
| 2.00                                  | 88.7 c              | 2.6 d                     |

<sup>z</sup>Means followed by same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

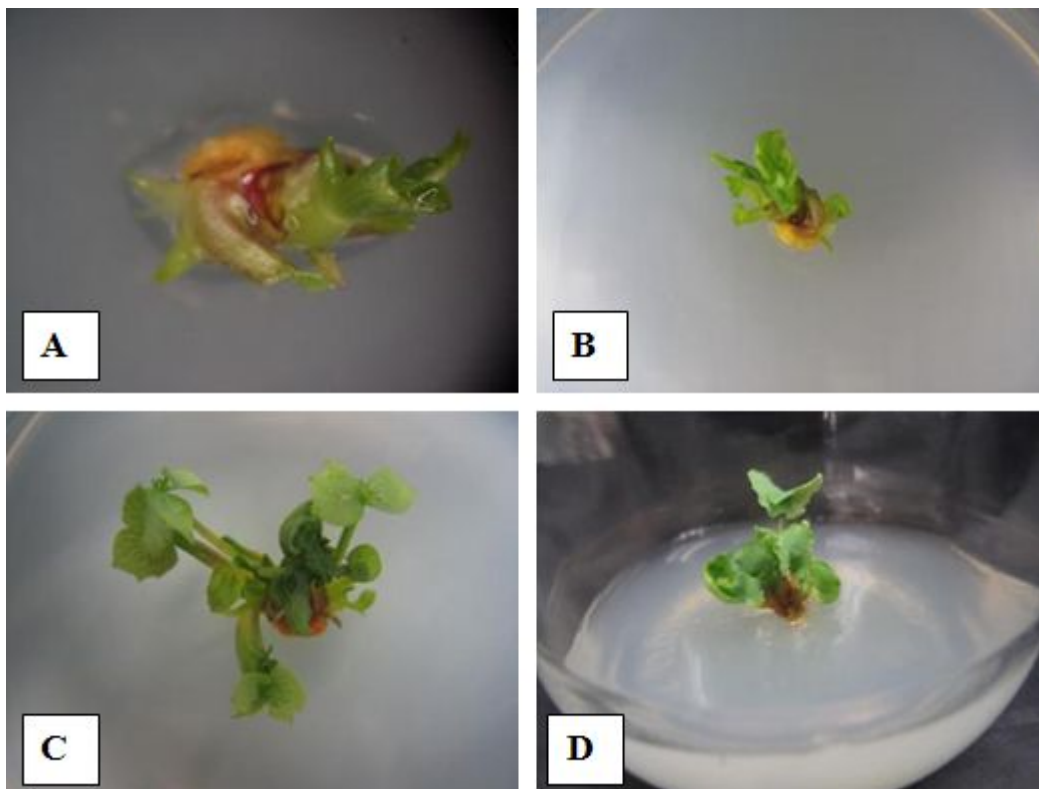


Fig. 3-2-1. Shoot bud explants cultured on the N6 medium supplemented with  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ and  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA. (A) after 7 days, (B) after 14 days, (C) after 28 days, and (D) shoot elongation.

## 나. 종자에서 발아된 깻깻이풀의 떡잎, 신초 및 잎자루 절편체를 이용한 기내 재분화

### (1) 연구목적

올해 선행연구를 통하여 깻깻이풀 동지아를 절편체로 이용하여 신초 재분화에 성공하였으나 동지아의 경우 식물재료 확보가 겨울 짧은 기간에 한시적이라는 제약이 따른다. 이러한 실험 수행의 어려움을 극복하기 위하여 깻깻이풀의 종자를 이용하고자 전년도 연구에서 많은 노력을 기울였고, 그 또한 성공 가능성을 확인할 수 있었다. 깻깻이풀 종자는 꽃이 진 이후에 6월에 결실 후 꼬투리가 터져 땅에 떨어지는데 바로 발아를 하지 않고 여름, 가을, 겨울을 지나 다음해 봄에 발아를 한다. 이는 깻깻이풀 종자의 형태적 휴면 때문이라고 본 연구과제의 제1세 부과제 연구결과로 확인하였다. 그 결과 깻깻이풀 종자 휴면타파 방법을 개발하는데 성공하였고 그 기술을 실용적으로 이용하는 등 연구에 많은 성과가 있었다.

따라서 본 연구는 성공한 선행연구를 바탕으로 하여 휴면이 타파된 종자에서 발아한 식물체의 떡잎, 신초 및 잎자루 등 다양한 절편체 종류를 이용하여 기내 재분화 효율을 높이는 실험을 하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 실험재료 및 멸균 소독방법

제1세부과제 서울대학교에서 개발한 휴면타파 방법으로 채종한 종자를 저온상태에서 GA<sub>3</sub>로 처리하였다. 처리된 깻깻이풀 종자를 10월 27일에 인수받았다. 증류수에 Tween 20을 한 방울 넣고 15분 동안 세척하고 70%(v/v) EtOH에 1분간 침지 후 멸균수로 3회 세척하였다. 그리고 1.5% NaOCl에 15분 동안 침지 한 후 0.01%(w/v) HgCl<sub>2</sub>에 15분 동안 담근다. 그 후 종피를 제거하고 70%(v/v) EtOH에 1분간 침지한 다음 배를 채취해서 MS배지에 치상했다. 1주 후 떡잎을 채취하고, 2주 후 신초와 잎자루를 채취하여 실험을 수행하였다.

#### (나) 배양배지

선행연구를 통하여 선발된 Chu's(N6) 배지에 sucrose 3% (w/v)를 넣고, pH는 5.70으로 조절하고, agar 0.8% (w/v)를 첨가한 후, 121°C에서 15분간 고압멸균을 하여 사용하였다. TDZ는 filtering 후 고압멸균을 실시한 배지에 첨가 하였다.

#### (다) 배양환경

배양온도는 25±1°C로 설정하였고, 명기 16시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프(Philips 40 W tubes)를 이용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

기내에서 멸균된 종자를 파종하여 무균식물체를 얻었다. 휴면이 타파되어 발아된 깻깻이풀의 떡잎, 신초 및 잎자루 등 다양한 종류의 절편체로부터 직접적인 부정아 발생을 유도하고자 하였다. 실험에 이용된 처리구는 0.25, 0.50, 1.0, 2.0 mg·L<sup>-1</sup>의 TDZ를 첨가한 N6배지였다. 절편체를 25±1°C 온도조건에서 암 배양 14일 후 명기 16시간/암기 8시간 광주기로 이동하였다. 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>의 조도에서 배양하였다. 치상하고 5주일이 지난 후 신초 발생률과 절편체당 발생

된 신초수를 조사하였다(Table 3-2-3).

그 결과 TDZ가 첨가되지 않은 배지에서는 신초가 전혀 발생하지 않았고, 떡잎을 제외한 신초와, 잎자루를 절편체로 사용했을 때는 신초가 아닌 캘러스만 형성되었다. 또한 떡잎을 절편체로 사용한 경우 TDZ의 농도가 0.25 mg·L<sup>-1</sup>일 때 신초의 발생률(72.1%)과 절편체당 발생된 신초수(10.5개)가 가장 높았고 TDZ의 농도가 높아질수록 신초의 발생률이 낮아졌다. TDZ의 농도가 2.00 mg·L<sup>-1</sup>일 때는 신초가 아닌 캘러스가 형성되었다.

본 연구결과 깽깽이풀의 종자에서 획득한 떡잎을 이용하여 부정아를 유도하기 위한 배지의 경우는 N6배지에 TDZ를 0.25 mg·L<sup>-1</sup>의 농도로 첨가하여 사용하는 것이 가장 적당함을 알 수 있었다. 다만 TDZ의 독성 때문에 TDZ의 농도를 높게 할수록 신초 재분화율이 낮아지는 것으로 판단되므로 적정농도를 사용하는 것이 좋다(Fig. 3-2-2).

Table 3-2-3. Effect of concentration of TDZ on adventitious shoot regeneration from cotyledon, leaf and petiole explants of *J. dubia* cultured on the N6 medium.

| TDZ (mg·L <sup>-1</sup> ) | Shoot induction (%) |        |         | No. of shoots per explant |        |         |
|---------------------------|---------------------|--------|---------|---------------------------|--------|---------|
|                           | Cotyledon           | Leaf   | Petiole | Cotyledon                 | Leaf   | Petiole |
| 0.00                      | 0.0 d <sup>z</sup>  | -      | -       | 0.0 d                     | -      | -       |
| 0.25                      | 72.1 a              | Callus | Callus  | 10.5 a                    | Callus | Callus  |
| 0.50                      | 66.3 b              | Callus | Callus  | 8.0 b                     | Callus | Callus  |
| 1.00                      | 60.0 c              | Callus | Callus  | 5.6 c                     | Callus | Callus  |
| 2.00                      | Callus              | Callus | Callus  | Callus                    | Callus | Callus  |

<sup>z</sup>Means followed by same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).



Fig. 3-2-2. Different stages of adventitious shoot regeneration from the cotyledonary explant cultured on the N6 medium supplemented with  $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ. (A) after 14, (B) after 21, (C) after 28, and (D) after 35 days.

### 3. 깽깽이풀(*Jeffersonia dubia*)의 유도된 신초의 생장 및 발근을 위한 조건 확립

#### 가. 깽깽이풀의 떡잎을 이용한 직접적 부정아 재분화 조건 확립

##### (1) 연구목적

깽깽이풀은 쌍떡잎식물 미나리아재비목 매자나무과(Berberidaceae)의 여러해살이풀로 뿌리가 노란색이어서 황련 또는 조선허련이라고도 한다. 꽃은 홍자색으로 4-5월에 꽃이 피는데 아주 관상용으로 가치가 높은 토속식물이다. 또한 청열, 해독, 건위의 효능이 있을 뿐 아니라 다양한 질병을 치료하는데 사용되는 약용식물로서 이용되므로 부가가치가 높다.

깽깽이풀은 한국과 동남아시아가 원산지이며 현재 멸종 위기식물로 지정하여 보호하고 있다. 서식지 보호를 통하여 멸종을 예방하는 한편 멸종위기의 토속식물을 인공적으로 번식하는 것은 매우 중요한 일이다. 인공증식을 통한 종의 보존을 지속하고자 조직배양 방법을 이용한다. 멸종위기식물은 무분별하게 채취, 반출, 유통이 금지되어 있으므로 식물재료 자체를 공급받기 매우 어려운 상황이었다. 특히 지상부 생육기간이 약 4개월 정도 매우 짧기 때문에 더더욱 식물재료를 확보하는데 많은 어려움이 따랐다. 깽깽이풀은 종자나 근경의 분열에 의해 일반적으로 번식되는데 영양 번식률은 매우 느리며 자연 서식지에서 종자발아 또한 형태생리학적인 휴면 때문에 매우 부족하다. 그러므로 효율적인 번식 방법은 희귀한 관상용 식물을 보존하기 위해서 필요하다고 본다. 최근 기내배양에서는 희귀한 식물의 보존을 위해 대안 책으로 떠올랐

다. 몇몇 보고는 매자나무과의 기내번식에 관해서 이용 가능하지만 껌껌이풀의 기내번식에 관해서는 아직 연구가 이루어지지 않았다.

본 실험에서는 전년도 연구 방법을 바탕으로 멸균, 소독 후 기내에 도입하여 무균식물체를 확보하고 떡잎을 이용한 부정아 재분화에 관해 사이토키닌과 배양배지의 대한 영향을 알아보고자 한다.

## (2) 재료 및 방법

### (가) 실험재료 및 멸균 소독방법

껌껌이풀은 멸종위기식물로 보호를 받고 있으므로 식물재료의 확보가 매우 어렵다. 껌껌이풀의 종자는 경기도 한택식물원에서 중습성의 조건에서 자란 온전한 식물체로부터 2011년 5월 22일에 수집하였다. 종자는 껍질을 제거하고, 3일 동안 실온( $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ )에 건조하였으며 2주간  $5^{\circ}\text{C}$ 에 저장하였다. 형태생리학적인 휴면을 타파하기 위해, 종자는 24시간 동안 실온에서  $1000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>에 침지한 후 실온에 건조하였다. 종자를 암배양 30일 동안  $15/6^{\circ}\text{C}$  온도조건에서 명기 12시간/암기 12시간 광주기로 하여 유지하였고, 그 후 90일 동안  $5^{\circ}\text{C}$ 에 두었다. 처리된 종자는 70%(v/v) EtOH에 1분간 표면 살균한 다음 멸균수로 3회 세척하였다. 그리고 1.5%(v/v) NaOCl에 Tween 20 1-2방울을 첨가하여 15분 동안 침지 후 0.01%(w/v) HgCl<sub>2</sub>에 10분 동안 침지하고 멸균수로 3회 세척하였다. 집합자배는 종자로부터 적출하여 2iP, BA, 및 TDZ가 여러 가지 농도로 들어 있는 배지에 치상하여 배양하였다.

### (나) 배양배지

Murashige and Skoog 배지(MS)와 Chu's 배지(N6)에 2iP, BA, 그리고 TDZ를 각각 0, 0.25, 0.50, 1.0 또는  $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 농도로 처리 후 sucrose 3%(w/v)를 넣고, pH는 5.70으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후  $121^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 고압멸균을 하여 사용하였다. TDZ는 filtering 후 고압멸균을 실시한 배지에 첨가하였다. 다른 식물생장조절제는 pH를 조절하기 전에 배지에 첨가하였다.

### (다) 배양환경

배양온도는  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 설정하였고, 상대습도 70-80%인 배양실에서 명기 12시간 동안  $45\ \mu\text{ mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD의 광 조건하에서 배양하였다. 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

## (3) 결과 및 고찰

기내에서 멸균된 종자를 파종하여 100% 무균식물체를 얻었다. 배양 5주 후 각 처리배지에서 신초 발생률과 절편체당 발생된 신초수를 조사하였다. 그 결과 MS 배지에서는  $0.5\text{--}2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 TDZ가 첨가되었을 때 신초가 아닌 캘러스만 형성되었다. N6 배지에서는 TDZ의 농도가  $0.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 일 때 신초 발생률(72.1%)과 절편체당 발생된 신초수(10.5개)가 가장 높았고 TDZ의 농도가 높아질수록 신초의 발생률이 낮아졌다(Table 3-3-1, Fig. 3-3-1). 부정아 발생은 N6 배지에서 성공하였는데 이는 적은 양분과 질소 함량 때문인 것으로 판단된다. 또한 기본으로 첨가되는 양분의 형태가 MS와 N6 배지에서 다르긴 하지만 이에 관한 결정적인 요인은 암모늄과 질산이온의 비율이라고 볼 수 있다. MS와 N6 배지에 관한 질산태질소와 암모늄



태질소의 비율은 각각 66:34, 80:20이었다. 결론적으로 콩깍이풀의 떡잎을 이용하여 부정아를 유도하기 위한 배지의 경우는 N6 배지에 TDZ를 0.25 mg·L<sup>-1</sup>의 농도로 처리한 것이 가장 좋게 나타났음을 본 연구를 통해 알 수 있었다(Sivanesan and Jeong, 2013a).

Table 3-3-1. Effects of culture media and TDZ on direct adventitious shoot regeneration from cotyledonary explants of *J. dubia*.

| TDZ (mg·L <sup>-1</sup> ) | Shoot induction (%) |                         | No. of shoots induced per explant |            |
|---------------------------|---------------------|-------------------------|-----------------------------------|------------|
|                           | MS                  | N6                      | MS                                | N6         |
| 0.00                      | -                   | -                       | -                                 | -          |
| 0.25                      | -                   | 72.1±3.8 a <sup>z</sup> | -                                 | 10.5±1.6 a |
| 0.50                      | Callus              | 66.3±2.6 b              | Callus                            | 8.0±1.0 b  |
| 1.00                      | Callus              | 60.0±3.0 c              | Callus                            | 5.6±1.4 c  |
| 2.00                      | Callus              | Callus                  | Callus                            | Callus     |

<sup>z</sup>Means±SE within a column followed by the same letters are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

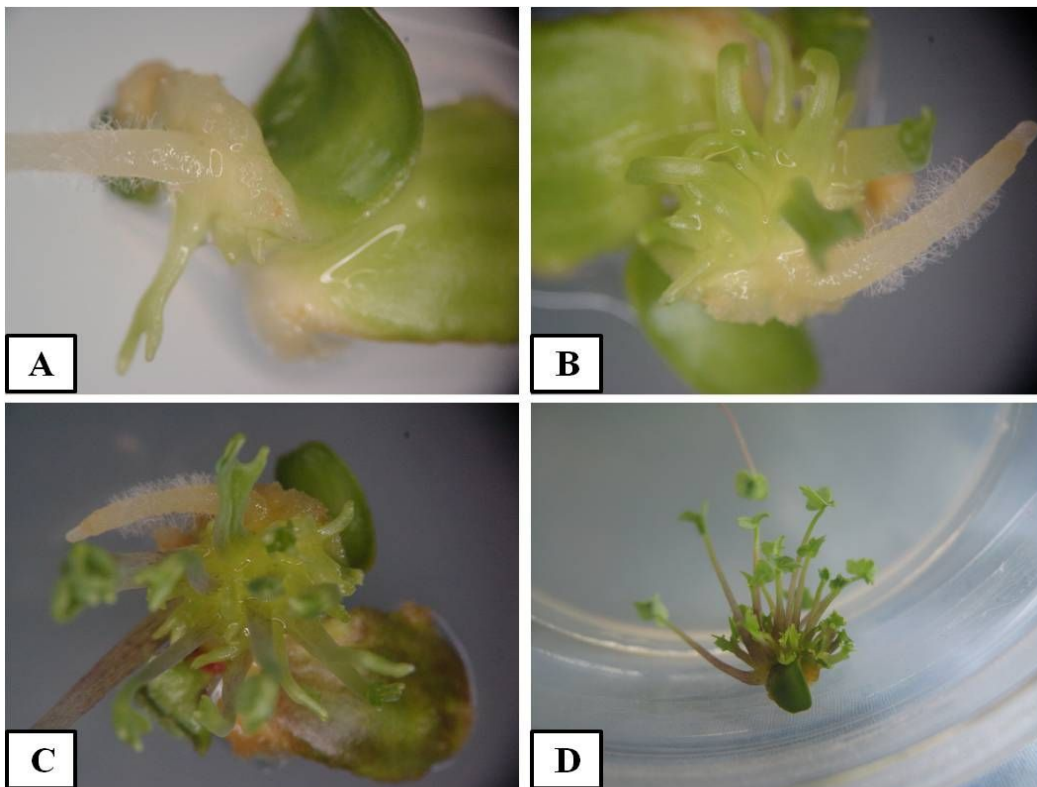


Fig. 3-3-1. Different stages of adventitious shoot regeneration from cotyledonary explants of *J. dubia* cultured on the N6 medium supplemented with 0.25 mg·L<sup>-1</sup> TDZ. (A) after 2 weeks, (B) after 3 weeks, (C) after 4 weeks, and (D) after 5 weeks.

## 나. GA<sub>3</sub>가 재분화된 껌껌이풀의 신초 신장에 미치는 영향 구명

### (1) 연구목적

GA<sub>3</sub>가 재분화된 껌껌이풀의 신초 신장에 미치는 영향에 대한 실험을 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 배양배지

0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 또는 4.0 mg·L<sup>-1</sup>의 GA<sub>3</sub>가 첨가된 Chu's 배지(N6)에 sucrose 3%(w/v)를 넣고, pH는 5.80으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121°C에서 15분간 고압멸균하여 사용하였다.

#### (나) 배양환경

배양온도는 25±1°C로 설정하였고, 명기 16시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> PPF의 광 조건하에서 배양하였다. 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프[Philips 40 W tubes]를 이용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

GA<sub>3</sub>가 재분화된 껌껌이풀의 신초 신장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 또는 4.0 mg·L<sup>-1</sup>의 GA<sub>3</sub>가 첨가된 N6 배지에 치상하였다. 배양 6주 후 절편체로부터 발생된 multiple shoot는 TDZ 단용 또는 TDZ와 NAA의 혼용 처리에서 신초를 신장하는데 실패하였다. GA<sub>3</sub>의 농도가 0.1-2.0 mg·L<sup>-1</sup>으로 높아질수록 초장은 증가하였고, 4.0 mg·L<sup>-1</sup>일 경우 초장은 감소하였다(Table 3-3-2). 신초 신장은 GA<sub>3</sub>의 농도가 2.0 mg·L<sup>-1</sup>일 때 가장 효과적이었다(Fig. 3-3-2). 초장은 N6 배지에 GA<sub>3</sub>를 0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 또는 4.0 mg·L<sup>-1</sup> 농도로 첨가하였을 때 각각 2.6, 2.8, 3.4, 4.0, 5.3 및 3.3이었다(Fig. 3-3-2A, B).

Table 3-3-2. Effect of GA<sub>3</sub> on shoot elongation of *J. dubia*.

| GA <sub>3</sub> (mg·L <sup>-1</sup> ) | Shoot length (cm)  |
|---------------------------------------|--------------------|
| 0.0                                   | 2.6 d <sup>z</sup> |
| 0.1                                   | 2.8 cd             |
| 0.5                                   | 3.4 c              |
| 1.0                                   | 4.0 b              |
| 2.0                                   | 5.3 a              |
| 4.0                                   | 3.6 bc             |

<sup>z</sup>Means followed by the same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

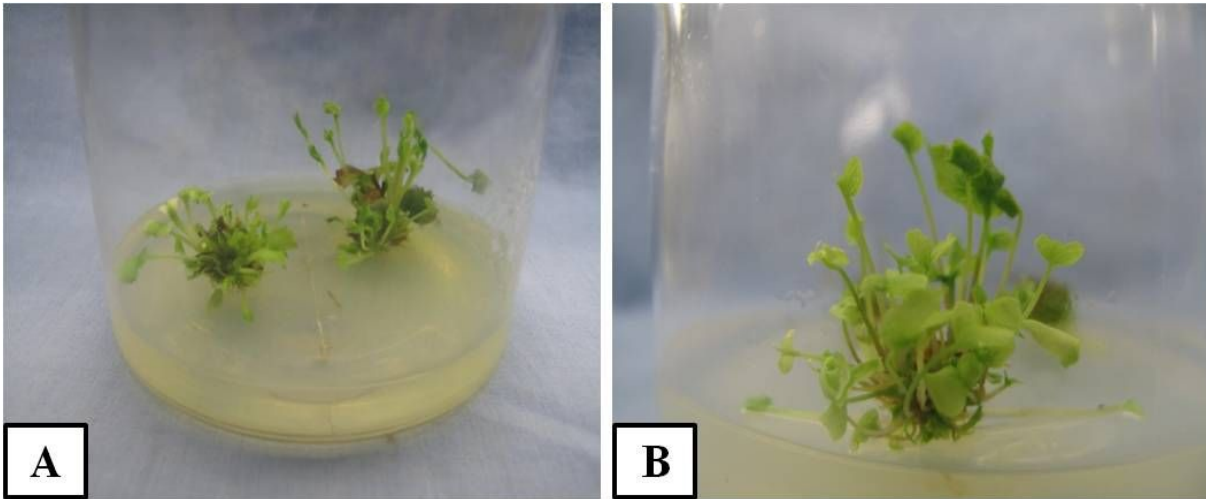


Fig. 3-3-2. Effect of  $GA_3$  on shoot elongation of *J. dubia*. Shoot cultured on the N6 medium supplemented with  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $GA_3$  (A)  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $GA_3$  and (B) after 4 weeks of culture.

#### 다. 옥신이 깽깽이풀의 기내발근에 미치는 영향 구명

##### (1) 연구목적

옥신이 깽깽이풀의 기내발근에 미치는 영향에 대한 실험을 수행하였다.

##### (2) 재료 및 방법

###### (가) 배양배지

$0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0,$  및  $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 IAA, IBA, 및 NAA를 첨가한 Anderson's 배지(AM)에 sucrose 3%(w/v)를 넣고, pH는 5.80으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후,  $121^\circ\text{C}$ 에서 15분간 고압멸균 하여 사용하였다.

###### (나) 배양환경

배양온도는  $25\pm 1^\circ\text{C}$ 로 설정하였고, 명기 16시간 동안  $45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFd의 광 조건하에서 배양하였다. 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프[Philips 40 W tubes]를 이용하였다.

##### (3) 결과 및 고찰

옥신이 깽깽이풀의 기내발근에 미치는 영향을 조사하기 위하여 재분화된 신초가 2-3cm 정도 되었을 때 1/2배액 N6 배지에 다양한 농도의 옥신을 처리 후 치상하였다(Table 3-3-3). 배양 6주 후 각 처리별 발근된 신초 발생률, 신초당 발생된 뿌리수 및 근장을 조사하였다. 옥신이 첨가되지 않은 배지에서는 신초가 발생되지 않았고, 뿌리는 옥신이 첨가된 발근 배지에 이식하여 2주 후 신초 끝부분에서 발생하였으며 발근율은 다양한 옥신의 농도에 따라 달랐다. 낮은 농도인 IAA 또는 IBA가 높은 농도에서는 뿌리를 발생시키지 않았다. 신초의 약 83%는 N6 배지에 IBA를  $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 농도로 첨가하였을 때 뿌리를 발생시켰다. NAA의 농도가  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 일 때 발근율(100%), 신초당 발생된 뿌리수(5.8개) 및 근장(6.3cm)은 가장 높았고(Fig.

3-3-3A, B), NAA의 농도가 높아질수록 신초당 발생된 뿌리수는 감소하였으며 캘러스가 형성되었다. 또한 NAA를  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 농도로 첨가하였을 때 많은 뿌리를 얻었다.

Table 3-3-3. Effect of auxins on in vitro rooting of *J. dubia*.

| Conc.<br>( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | Root induction (%)  |        |         | No. of roots per shoot |       |        | Mean root length (cm) |       |        |
|--|---------------------|--------|---------|------------------------|-------|--------|-----------------------|-------|--------|
|  | IAA                 | IBA    | NAA     | IAA                    | IBA   | NAA    | IAA                   | IBA   | NAA    |
| 0.0  | -                   | -      | -       | -                      | -     | -      | -                     | -     | -      |
| 0.1  | -                   | -      | 92.4 b  | -                      | -     | 4.0 b  | -                     | -     | 2.8 b  |
| 0.5  | -                   | -      | 100.0 a | -                      | -     | 5.8 a  | -                     | -     | 6.3 a  |
| 1.0  | -                   | -      | Callus  | -                      | -     | Callus | -                     | -     | Callus |
| 5.0  | 38.4 b <sup>z</sup> | 78.6 b | Callus  | 2.3 b                  | 3.7 b | Callus | 1.6 b                 | 3.2 b | Callus |
| 10.0                                       | 52.2 a              | 83.0 a | Callus  | 3.0 a                  | 4.3 a | Callus | 4.0 a                 | 4.8 a | Callus |

- no response.

<sup>z</sup>Means followed by the same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

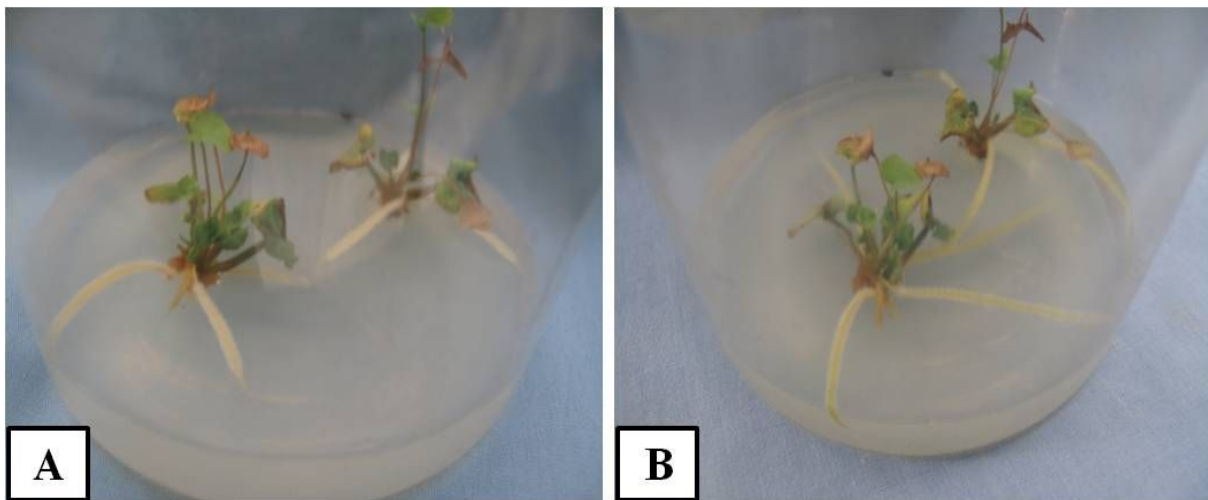


Fig. 3-3-3. In vitro rooting of *J. dubia* on the half strength N6 medium supplemented with  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA. (A) after 4 weeks and (B) 6 weeks of culture.

## 라. 배양배지가 껌껌이풀의 기내발근에 미치는 영향 구명

### (1) 연구목적

배양배지가 껌껌이풀의 기내발근에 미치는 영향에 대한 실험을 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 배양배지

재분화된 신초는 NAA  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 를 첨가한 1배액과 1/2배액 Anderson's 배지(AM),

Murashige and Skoog 배지(MS), Chu's 배지(N6), 그리고 WPM 배지에 sucrose 3%(w/v)를 넣고, pH는 5.80으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121 °C에서 15분간 고압멸균 하여 사용하였다.

(나) 배양환경

배양온도는 25±1 °C로 설정하였고, 명기 16시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> PPF의 광 조건하에서 배양하였다. 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프[Philips 40 W tubes]를 이용하였다.

(3) 결과 및 고찰

재분화된 신초가 2~3cm 정도 되었을 때 1배액과 1/2배액 AM, MS, N6, 그리고 WPM 배지에 NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>의 농도로 처리 후 치상하였다. 배양 6주 후 각 처리배지에서 발근된 신초를, 신초당 발생된 뿌리수 및 근장을 조사하였다(Table 3-3-4). 뿌리수는 1배액 AM, MS, N6, 그리고 WPM 배지에 NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>의 농도로 첨가하였을 때 감소하였다. WPM 배지는 N6, AM, 및 MS 순서로 가장 좋았다. 가장 높은 발근율(100%)은 신초가 1/2배액 N6 배지와 WPM 배지에서 배양하였을 때 얻었다. 6주 후 1/2배액 N6 배지에서 신초당 발생된 뿌리수(5.8 개)와 근장(6.3cm)이 가장 높았다. 따라서 갯쟁이풀의 기내발근을 위해서는 낮은 농도의 식물 성장조절제가 필요하다고 생각된다.

Table 3-3-4. Effect of culture medium strength on in vitro rooting of *J. dubia*.

| Culture medium | Root induction (%)  |          | No. of roots per shoot |          | Mean root length (cm) |          |
|----------------|---------------------|----------|------------------------|----------|-----------------------|----------|
|                | Full                | Half     | Full                   | Half     | Full                  | Half     |
|                | strength            | strength | strength               | strength | strength              | strength |
| AM             | 61.0 c <sup>z</sup> | 87.2 c   | 2.6 ab                 | 5.4 ab   | 1.8 c                 | 4.8 bc   |
| N6             | 68.4 b              | 100.0 a  | 3.0 a                  | 5.8 a    | 2.7 b                 | 6.3 a    |
| MS             | 27.2 d              | 66.4 b   | 2.4 b                  | 4.0 c    | 3.0 ab                | 3.9 c    |
| WPM            | 80.4 a              | 100.0 a  | 1.8 c                  | 5.2 b    | 3.6 a                 | 5.2 b    |

<sup>z</sup>Means followed by the same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

마. 기내에서 발근된 갯쟁이풀의 기외 순화체계 확립

(1) 연구목적

기내에서 발근된 갯쟁이풀의 기외 순화체계를 확립하고자 위의 실험을 수행하였다.

(2) 재료 및 방법

(가) 실험재료

식물체의 기외 순화를 위해서 재분화된 식물체의 뿌리 부분을 멸균수로 세척하여 agar를 완

전히 제거하였다. 식물체는 높은 상대습도를 요하는 순화박스에 코이어, 피트모스, 펄라이트와 버미큘라이트로 구성된 토실이상토를 채워 이식하였다. 2일에 한번씩 1/4배액 양액을 공급하였고, 온실에서 유지하였다. 4주 후 순화된 식물은 토실이상토를 채운 포트에 옮겨왔다.

### (3) 결과 및 고찰

기내에서 발근된 식물체의 기외 순화체계를 확립하고자 실험을 수행하였다. 4주 후 식물체는 86%의 생존율을 보이며 성공적으로 순화하였다(Fig. 3-3-4). 3주 후 식물체는 새로운 잎이 발생하였고, 토실이상토가 채워진 포트에 옮겨 온실에서 순화하였다. 미세번식된 식물은 형태적과 성장 특성에 문제없이 잘 자랐다.



Fig. 3-3-4. Acclimatization ex vitro of *J. dubia*.

### 바. 깽깽이풀(*Jeffersonia dubia*) 부정아(shoot bud) 절편체를 이용한 재분화

#### (1) 연구목적

배지와 사이토키닌이 부정아 절편체를 이용한 신초 재분화에 미치는 영향을 조사하기 위해 이 연구를 수행하였다.

#### (2) 재료 및 방법

##### (가) 실험재료 및 멸균 소독방법

깽깽이풀의 부정아를 흐르는 수돗물에 20분 세척하고 증류수로 2-3회 세척하였다. 그 후 70%(v/v) EtOH에 2분간 침지 후 멸균수로 3회 세척하였다. 그리고 1.5% NaOCl에 Tween 20을 한 방울 넣고 15분 동안 침지 한 후 멸균수로 3회 세척하였다.

##### (나) 배양배지

EtOH와 NaOCl로 1차 멸균 후 동지아부터 인편을 제거하고 2차 멸균 후 남아 있는 2-3개의 인편을 제거하여 0, 0.25, 0.50, 1.0, 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 2iP, BA, TDZ를 첨가한 AM, MS, N6, WPM배지에 치상하였다. 그리고 신초 증식율, 부정아 절편체율을 높이기 위해 0.25, 0.50, 1.0,

2.0 mg·L<sup>-1</sup> TDZ에 0.1mg·L<sup>-1</sup> NAA를 첨가한 N6배지에서 배양하였다. TDZ는 필터를 이용하여 멸균한 후 고압 멸균된 배지에 첨가하였다. 배지의 pH는 5.80으로 조절하고, agar 0.8% (w/v)를 첨가한 후, 121℃에서 15분간 고압멸균을 하여 사용하였다.

(다) 배양환경

배양온도는 25±1℃로 설정하였고, 명기 16시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> PPFD 조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프(Philips 40 W tubes)를 이용하였다.

(라) 조사항목 및 실험설계

신초가 발생한 절편체 수, 절편체 당 신초수를 배양 4주 후에 측정하였다.

**(3) 결과 및 고찰**

깁끼이풀을 MS, AM, N6, WPM배지에서 배양하였다. 배지와 사이토카이닌 종류가 부정부 절편체의 신초 증식에 미치는 영향을 조사하였다. 신초 증식은 TDZ를 첨가한 N6배지에서 가장 높았다(Table 3-3-5). 신초 증식율(96.2%)과 절편체당 신초수(7.0개)는 0.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ와 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA가 첨가된 N6배지에서 가장 높았다(Table 3-3-6, Fig. 3-3-5A, B, C).

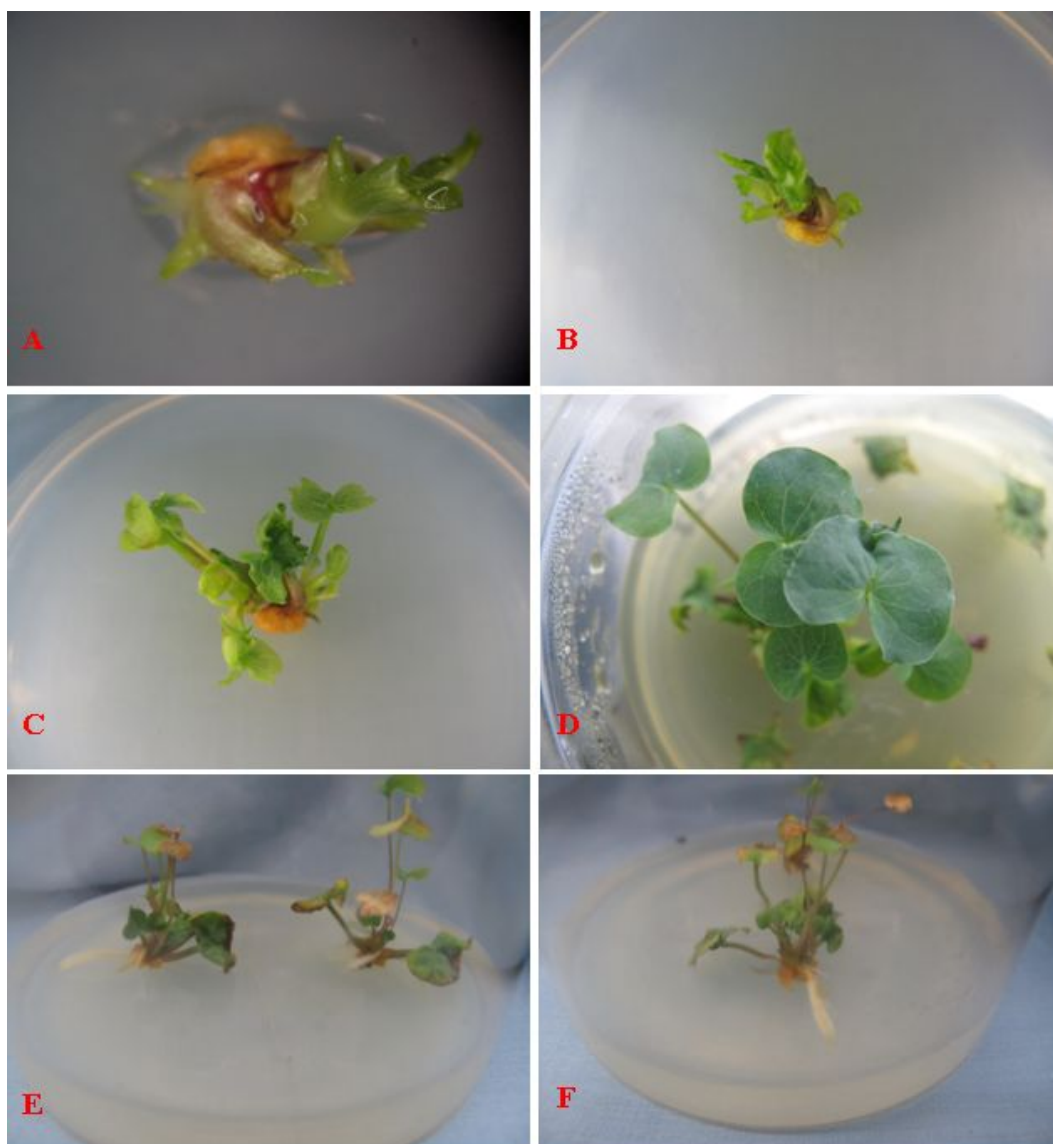


Fig. 3-3-5. Shoot bud explants cultured on the N6 medium supplemented with  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ and  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA, after 7 (A); 14 (B); and 28 days (C); shoot elongation (D); and rooting of in vitro-regenerated shoots (E, & F).



Table 3-3-5. Influence of medium and cytokinin on shoot multiplication from the shoot bud explants of *J. dubia*.

| Conc.<br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | Shoot induction (%) |         |         | No. of shoots per explant |        |        |
|--------------------------------|---------------------|---------|---------|---------------------------|--------|--------|
|                                | ZiP                 | BA      | TDZ     | ZiP                       | BA     | TDZ    |
| 0.00 (AM)                      | 13.2 d <sup>z</sup> | 13.2 e  | 13.2 d  | 1.0 a                     | 1.0 b  | 1.0 c  |
| 0.25                           | 15.7 cd             | 24.4 d  | 42.6 c  | 1.0 a                     | 1.0 b  | 1.0 c  |
| 0.50                           | 18.0 c              | 30.0 c  | 56.2 b  | 1.0 a                     | 1.0 b  | 1.8 ab |
| 1.00                           | 40.2 b              | 47.7 b  | 60.3 ab | 1.0 a                     | 1.0 b  | 2.0 a  |
| 2.00                           | 46.8 a              | 59.0 a  | 62.4 a  | 1.2 a                     | 1.6 a  | 1.4 b  |
| 0.00 (MS)                      | 9.8 d               | 9.8 c   | 9.8 e   | 1.0 a                     | 1.0 a  | 1.0 c  |
| 0.25                           | 10.7 d              | 14.4b c | 27.6 d  | 1.0 a                     | 1.0 a  | 1.0 c  |
| 0.50                           | 16.2 c              | 19.2 b  | 53.2 a  | 1.0 a                     | 1.0 a  | 1.2 b  |
| 1.00                           | 26.8 b              | 23.7 a  | 41.0 b  | 1.0 a                     | 1.0 a  | 1.8 a  |
| 2.00                           | 33.0 a              | 25.2 a  | 38.0 c  | 1.0 a                     | 1.2 a  | 1.6 ab |
| 0.00 (N6)                      | 24.4 e              | 24.4 e  | 24.4 e  | 1.0 b                     | 1.0 c  | 1.0 c  |
| 0.25                           | 36.2 d              | 27.0 d  | 49.7 d  | 1.0 b                     | 1.0 c  | 2.2 b  |
| 0.50                           | 40.0 c              | 32.4 c  | 66.3 c  | 1.0 b                     | 1.0 c  | 3.8 a  |
| 1.00                           | 48.7 b              | 54.6 b  | 78.0 a  | 1.2 b                     | 1.6 b  | 3.6 a  |
| 2.00                           | 63.2 a              | 70.8 a  | 73.0 b  | 1.5 a                     | 2.0 a  | 2.7 b  |
| 0.00 (WPM)                     | 11.0 e              | 11.0 d  | 11.0 d  | 1.0 a                     | 1.0 b  | 1.0 b  |
| 0.25                           | 16.7 d              | 19.4 c  | 24.2 c  | 1.0 a                     | 1.0 b  | 1.0 b  |
| 0.50                           | 21.3 c              | 33.2 b  | 60.4 a  | 1.0 a                     | 1.0 b  | 1.6 a  |
| 1.00                           | 27.8 b              | 51.6 a  | 49.4 b  | 1.2 a                     | 1.2 ab | 1.3 ab |
| 2.00                           | 39.4 a              | 53.0 a  | 00.0 e  | 1.3 a                     | 1.4 a  | 0.0 c  |

<sup>z</sup>Means followed by same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

Table 3-3-6. Effect of concentration of TDZ plus 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA on multiple shoot induction from the shoot bud explants of *J. dubia* cultured on the N6 medium.

| TDZ (mg·L <sup>-1</sup> ) | Shoot induction (%) | No. of shoots per explant |
|---------------------------|---------------------|---------------------------|
| 0.25                      | 61.4 d <sup>z</sup> | 3.9 c                     |
| 0.50                      | 96.2 a              | 7.3 a                     |
| 1.00                      | 90.0 b              | 5.7 b                     |
| 2.00                      | 88.7 c              | 2.6 d                     |

<sup>z</sup>Means followed by same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

배양 6주 후 TDZ를 단독으로 사용하거나 TDZ와 NAA를 조합한 처리에서는 다신초가 발달하지 않았다. 이러한 문제를 해결하기 위해 GA<sub>3</sub>가 첨가된 N6배지에 이식하였다(Table 3-3-7, Fig. 3-3-6).

Table 3-3-7. Effect of GA<sub>3</sub> on shoot elongation of *J. dubia*.

| GA <sub>3</sub> (mg·L <sup>-1</sup> ) | Mean shoot length (cm) |
|---------------------------------------|------------------------|
| 0.0                                   | 2.6 d <sup>z</sup>     |
| 0.1                                   | 2.8 cd                 |
| 0.5                                   | 3.4 c                  |
| 1.0                                   | 4.0 b                  |
| 2.0                                   | 5.3 a                  |
| 4.0                                   | 3.6 bc                 |

<sup>z</sup>Means within a column followed by the same letters are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

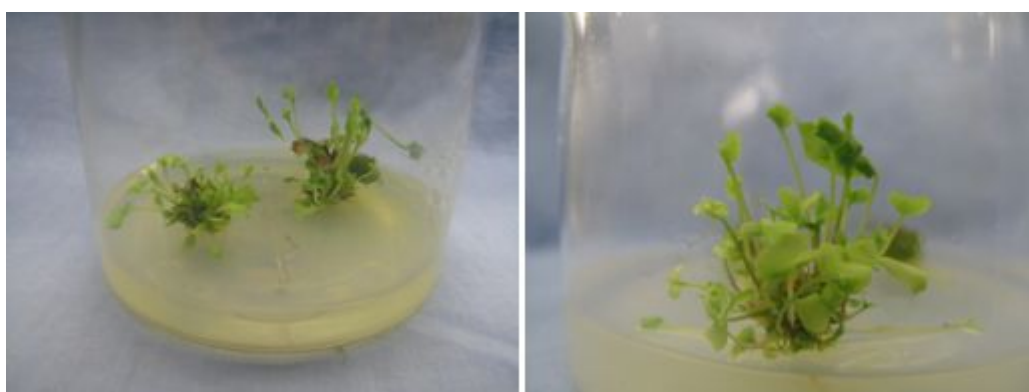


Fig. 3-3-6. Effect of GA<sub>3</sub> on shoot elongation of *J. dubia*. Shoots cultured on the N6 medium supplemented with 1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> and 2.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> after 4 weeks of culture.

2-3cm정도로 재분화한 싹초를 옥신이 첨가된 1/2N6배지에 이식하여 옥신이 뿌리 유도에 미치는 영향에 대해 조사하였다(Table 3-3-8, Fig. 3-3-7).

Table 3-3-8. Effect of auxin on *in vitro* rooting of *J. dubia*.

| Conc.<br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | Root induction (%)  |        |        | No. of roots per shoot |       |        | Mean root length (cm) |       |        |
|--------------------------------|---------------------|--------|--------|------------------------|-------|--------|-----------------------|-------|--------|
|                                | IAA                 | IBA    | NAA    | IAA                    | IBA   | NAA    | IAA                   | IBA   | NAA    |
| 0.0                            | -                   | -      | 00.0   | -                      | -     | -      | -                     | -     | -      |
| 0.1                            | -                   | -      | 92.4 b | -                      | -     | 4.0 b  | -                     | -     | 2.8 b  |
| 0.5                            | -                   | -      | 100 a  | -                      | -     | 5.8 a  | -                     | -     | 6.3 a  |
| 1.0                            | -                   | -      | Callus | -                      | -     | Callus | -                     | -     | Callus |
| 5.0                            | 38.4 b <sup>z</sup> | 78.6 b | Callus | 2.3 b                  | 3.7 b | Callus | 1.6 b                 | 3.2 b | Callus |
| 10.0                           | 52.2 a              | 83.0 a | Callus | 3.0 a                  | 4.3 a | Callus | 4.0 a                 | 4.8 a | Callus |

- no response.

<sup>z</sup>Means within a column followed by the same letters are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

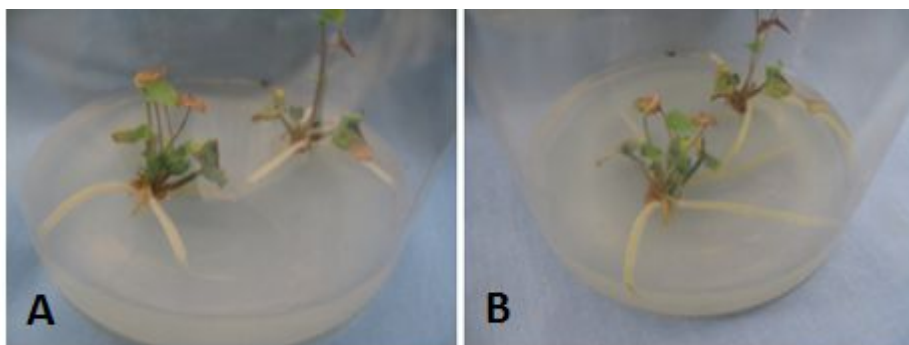


Fig. 3-3-7. In vitro rooting of *J. dubia* on the half strength N6 medium supplemented with 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA after 4 (A) and 6 (B) weeks of culture.

배지종류와 농도가 껭껭이풀의 발근에 미치는 영향을 조사하였다. 발근수는 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA를 첨가한 AM, MS, N6, WPM배지에서 배양했을 때 감소하였다(Table 3-3-9). WPM배지가 가장 우수했고, 그 다음으로 N6, AM, MS배지 순이었다.

Table 3-3-9. Effect of culture medium strength on in vitro rooting of *J. dubia*.

| Culture medium | Root induction (%)  |               | No. of roots per shoot |               | Mean root length (cm) |               |
|----------------|---------------------|---------------|------------------------|---------------|-----------------------|---------------|
|                | Full strength       | Half strength | Full strength          | Half strength | Full strength         | Half strength |
| AM             | 61.0 c <sup>z</sup> | 87.2 c        | 2.6 ab                 | 5.4 ab        | 1.8 c                 | 4.8 bc        |
| N6             | 68.4 b              | 100.0 a       | 3.0 a                  | 5.8 a         | 2.7 b                 | 6.3 a         |
| MS             | 27.2 d              | 66.4 b        | 2.4 b                  | 4.0 c         | 3.0 ab                | 3.9 c         |
| WPM            | 80.4 a              | 100.0 a       | 1.8 c                  | 5.2 b         | 3.6 a                 | 5.2 b         |

<sup>z</sup>Means within a column followed by the same letters are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

배양된 소식물체를 순화시키기 위해 순화박스에 옮겨 습도를 높게 하여 관리하였더니 86%가 생존하였다(Fig. 3-3-8A, B). 3주 후, 소식물체에서 신초가 발달했을 때 토질이상토가 든 화분에 이식하여 온실로 옮겼다. 미세번식된 식물은 정상적으로 성장하였다.



Fig. 3-3-8. Acclimatization ex vitro of *J. dubia*.

#### 4. 깽깽이풀(*Jeffersonia dubia*)의 대량번식

##### 가. 깽깽이풀 종자를 이용한 기내번식

###### (1) 연구목적

깽깽이풀 꽃은 홍자색으로 4-5월에 꽃이 피는데 관상용으로 가치가 높다. 또한 청열, 해독, 건위의 효능이 있을 뿐 아니라 다양한 질병을 치료하는데 사용되는 약용식물로서 이용되고 있다.

깽깽이풀의 종자는 꽃이 진 이후에 6월에 결실 후 꼬투리가 터져 땅에 떨어지는데 이 종자는 바로 발아를 하지 않고 여름, 가을, 겨울을 지나 다음해 봄에 발아를 한다. 이는 깽깽이풀 종자의 형태적 휴면 때문이라고 본 연구의 제1세부과제 연구결과 확인하였다. 깽깽이풀 종자는 인삼과 같은 개갑종자에 속하는 것으로 발아를 위해서 휴면타파 조건이 충족되어야만 된다.

본 실험에서는 제1세부과제에서 휴면타파를 위한 처리 과정을 15주 이상 경과한 종자를 인수받아 그 종자를 멸균 소독하여 무균식물체를 획득하고 기내번식에 이용하고자 하였다.

###### (2) 재료 및 방법

###### (가) 실험재료 및 멸균 소독방법

깽깽이풀 종자는 2010년 5월 28일 서울대에서 채종하였다. 15주 동안 5℃에서 층적처리 하였고 멸균을 위한 소독을 실시하였다. 종자를 멸균수에 1회 행구고 70%(v/v) EtOH에 1분간 침지 후 멸균수로 2회 세척하였다. 그리고 1.5% NaOCl에 Tween 20을 한 방울 넣고 15분 동안 침지 한 후 멸균수로 4-5회 세척하여 멸균 하고 깽깽이풀 종자의 종피를 벗겨냈다. 다시 70%(v/v) EtOH에 1분간 침지 후 멸균수로 2회 세척하였다. 그리고 1.5% NaOCl에 Tween 20을 한 방울 넣고 15분 동안 침지 한 후 멸균수로 4-5회 세척한 후 1,000 ppm GA<sub>3</sub>에 4시간 동안 침지하였다. 마지막으로 70%(v/v) EtOH에 10초 침지 후 멸균수로 2회 세척하고 1.5% NaOCl에 1분 동안 침지 한 후 멸균수로 4-5회 세척하여 멸균을 마무리하였다. 준비된 배지에 종자를 파종하고 암상태로 배양하였다(Fig. 3-4-1)

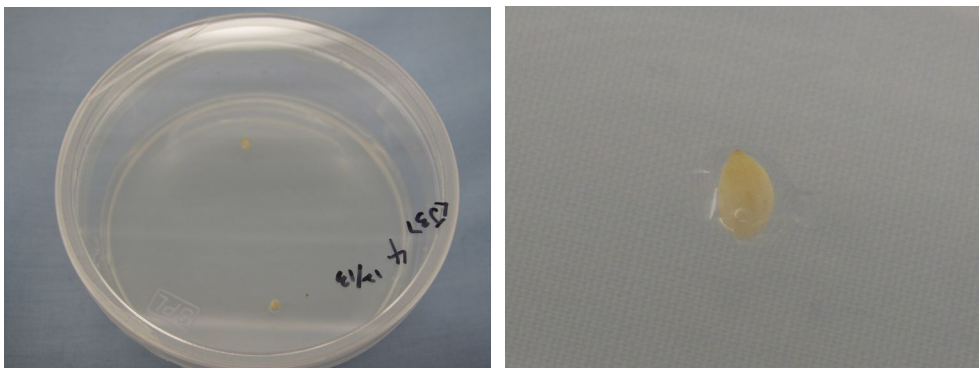


Fig. 3-4-1. Seeds of *J. dubia* inoculated on the MS medium after sterilization.

###### (나) 배양배지

기본배지는 MS배지를 사용하였고, sucrose 3% (w/v)를 이용하였다. pH는 5.80으로 조절하고, agar 0.8% (w/v)를 첨가한 후, 121℃에서 15분간 고압멸균 하고 페트리디쉬에 50 mL씩 분주하여 각각의 처리 당 4반복으로 실험하였다.

#### (다) 배양환경

배양온도는  $15\pm 1^\circ\text{C}$ 로 설정하였고, 상대습도 70-80%인 배양실에서 암상태 이후 명기 16시간 동안  $45\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

깻깻이풀 종자를 파종한 초기에는 오염이 전혀 보이지 않았었다. 파종 후 3주가 경과하면서 일부 종자의 발근이 시작되었으나 발근과 함께 오염이 동시에 발생되었다. 오염 발생율은 43.7%였다. 휴면타파를 위하여 증적처리를 통한 저온처리를 15주 처리하였고, 1,000 ppm GA<sub>3</sub>에 종자를 처리하였음에도 불구하고 현재 8주 정도 경과하면서 총 발아율은 6.2%로 매우 저조하였다(Fig. 3-4-2). 깻깻이풀 종자를 직접 기내에 파종하는 기내번식 방법은 종자에 내재된 오염원에 의한 높은 오염율도 문제가 되고, 발아율도 매우 저조하여 바람직하지 않다고 판단이 된다.

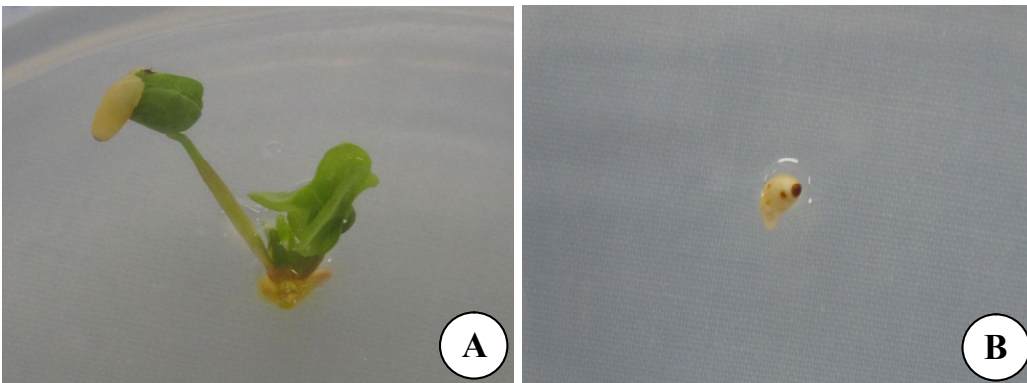


Fig. 3-4-2. Seeds of *J. dubia* at 8 weeks after sowing: A, leaf growth after germination; and B, seed with no change after sowing.

#### 나. 신초를 이용한 성장조절제 및 배양온도 처리에 따른 기내 번식

##### (1) 연구목적

연구를 수행하기 위하여 멸종위기식물의 서식지외 보전기관으로 활동하고 있는 기청산식물원에 공식적으로 깻깻이풀 식물체를 구매 하였다. 본 실험에서는 깻깻이풀의 신초를 멸균 소독하여 무균식물체를 획득하고 성장조절제 및 배양온도 처리에 따른 기내번식 조건을 확립하고자 하였다.

##### (2) 재료 및 방법

###### (가) 실험재료 및 멸균 소독방법

멸종위기식물의 서식지의 보전기관으로 활동하고 있는 기청산식물원에 공식적으로 껌껌이풀을 2011년 1월 7일 구매하였다. 껌껌이풀 동지아를 흐르는 수돗물에 20분 이상 수세하고, 멸균수로 2-3회 행구었다. 1차로 70%(v/v) EtOH에 2분 처리하고, 멸균수로 3회 세척하고, Tween 20 1방울을 떨어뜨린 1.5%(v/v) NaOCl을 이용하여 15분간 처리하고 다시 멸균수로 3회 세척하였다. 1차 소독 후 동지아의 비늘을 2-3개 벗기고 2차 소독하였다. 70%(v/v) EtOH에 1분 처리하고, 멸균수로 3회 세척 후 Tween 20 1방울을 떨어뜨린 1.5%(v/v) NaOCl을 이용하여 15분 처리하고 다시 멸균수로 4-5회 세척하여 멸균하였다. 남은 비늘을 2-3개 제거하고 신초만 성장조절제가 첨가된 MS배지에 치상하였다.

(나) 배양배지

기본배지는 MS배지를 사용하였고, sucrose 3%(w/v)를 이용하였다. 처리별 성장조절제 조성은 Table 3-4-1과 같다. pH는 5.80으로 조절하고, agar 0.8%(w/v), 활성탄 0.1%(w/v)를 첨가한 후, 121℃에서 15분간 고압멸균 하고 test tube에 10 mL씩 분주하여 각각의 처리 당 8반복으로 실험하였다.

Table 3-4-1. Temperature and PGRs used in this experiment.

| Temp. (°C) | PGR (mg·L <sup>-1</sup> )                                   |
|------------|---|
| 15         | 0.0   |
|            | 1.0 GA <sub>3</sub>   |
|            | 1.0 GA <sub>3</sub> + 1.0 BA + 0.5 IAA<br>0.1 NAA + 0.5 TDZ |
| 25         | 0.0   |
|            | 1.0 GA <sub>3</sub>   |
|            | 1.0 GA <sub>3</sub> + 1.0 BA + 0.5 IAA<br>0.1 NAA + 0.5 TDZ |

(다) 배양환경

배양온도는 15℃와 25℃로 각각 설정하였고, 상대습도 70-80%인 배양실에서 명기 16시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

(3) 결과 및 고찰

멸종위기식물로 지정되어 보호하고 있는 껌껌이풀은 식물재료 확보에서부터 많은 어려움이 있었다. 따라서 본 실험은 늦게 시작이 되었으나 무균적으로 기내도입에 성공하였다. 특히 25℃ 배양조건, 1.0 mg·mL<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> + 1.0 mg·mL<sup>-1</sup> BA + 0.5 mg·mL<sup>-1</sup> IAA 성장조절제 처리구에서 빠른 성장을 보이고 있다. 본 연구 기내배양 실험 진행을 통해 확보된 무균식물체를 식물재료로 직·간접적 재분화 조건 확립을 위한 연구를 수행하고 준비하고 있다(Fig. 3-4-3).

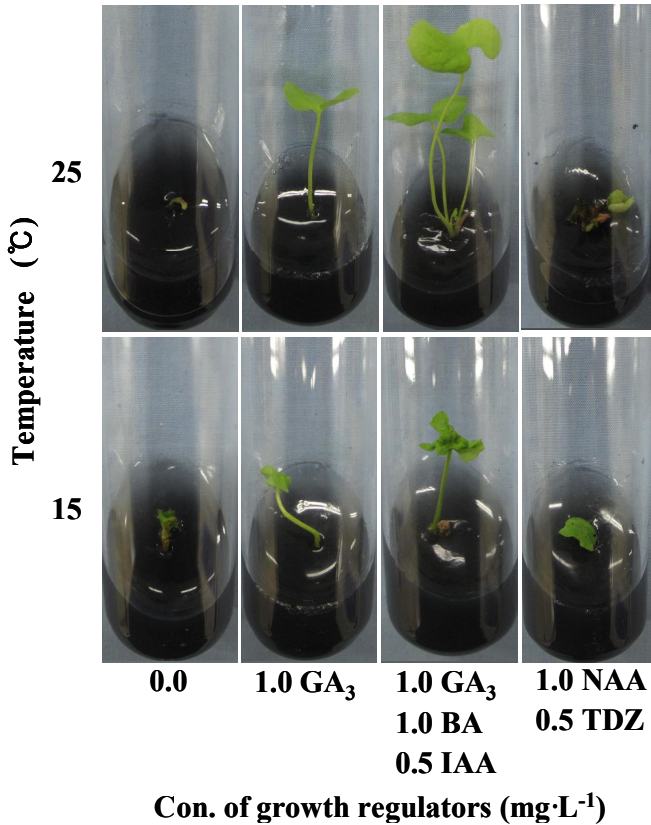


Fig. 3-4-3. Effect of PGRs on *J. dubia* Benth. et Hook.

#### 다. 껌껌이풀(*Jeffersonia dubia*) 미세번식을 위한 temporary immersion system(TIS)의 최적화

##### (1) 연구목적

껌껌이풀의 신초 증식을 위한 TIS시스템의 적정 침지 시간을 구명하기 위해 수행하였다.

##### (2) 재료 및 방법

0.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ와 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA를 첨가한 N6배지를 각 용기에 400 mL 채웠다. 용기는 식물체를 배양할 수 있는 윗부분과 배양액을 넣을 수 있는 아랫부분으로 나뉘어져 있다. 압력을 주면 아랫부분의 배양액이 식물체가 있는 윗부분으로 올라가게 된다. 소식물체를 가능한 길게 배양액에 침지할 수 있도록 해야한다. 침지하는 동안 배양액에 공기가 유입되면 버블이 생성되어 식물체를 부드럽게 자극하게 된다. 침지 시간은 압력에 의해 5, 10, 15, 20, 25분을 처리하였다. 배양 5주 후, 신초장, 증식율, 신초의 생체중과 건물중을 측정하였다.

배지의 pH는 5.80으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121°C에서 20분간 고압멸균을 하여 사용하였다. 배양온도는 25±1°C로 설정하였고, 명기 12시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> PPFD 조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프(Philips 40 W tubes)를 이용하였다.

##### (3) 결과 및 고찰

모든 처리에서 식물체는 오염이 되지 않았다. 신초 발생율은 침지 시간 20분과 25분 처리에서 100%로 가장 높았다. 절편체 당 신초수는 15분간 침지했을 때 13.6개로 가장 많았다(Table 3-4-2). 신초장은 침지 시간이 길어질수록 유의차는 없었지만 증가하였다. 모든 침지 처리에서 생체중이 0.9-1.6g으로 다양했다. 침지 시간에 따른 신초 증식율은 Fig. 3-4-4에 나타나 있다. TIS를 이용해 배양된 식물체는 성공적으로 발근이 되었고, 순화에도 성공하였다(Fig. 3-4-4A, B).

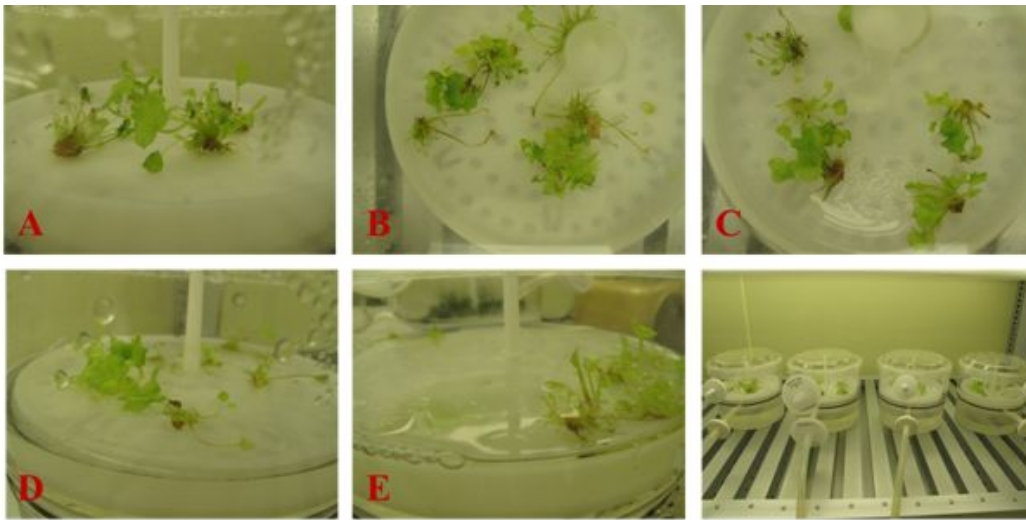


Fig. 3-4-4. Effect of immersion frequency at a 5 (A), 10 (B), 15 (C), 20 (D), or 25 (E) minutes interval on shoot multiplication of *J. dubia*.

Table 3-4-2. Effect of immersion frequency on axillary shoot multiplication from the nodal explants of *J. dubia* cultured in the TIS.

| Immersion frequency (min) | Shoot induction (%)     | No. of shoots induced/explant | Shoot length (cm) | Fresh weight (g) |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------|------------------|
| 5                         | 65.4±3.0 b <sup>z</sup> | 4.2±1.0 e                     | 3.22±0.52 c       | 0.96±0.02 c      |
| 10                        | 96.4±1.6 a              | 10.2±1.5 a                    | 3.31±0.23 c       | 1.04±0.05 c      |
| 15                        | 98.2±1.0 a              | 13.6±2.4 b                    | 3.65±0.65 b       | 1.35±0.05 b      |
| 20                        | 100.0±0.0 a             | 7.8±1.6 c                     | 4.48±0.97 ab      | 1.44±0.03 ab     |
| 25                        | 100.0±0.0 a             | 5.8±1.4 d                     | 5.01±0.59 a       | 1.63±0.06 a      |

<sup>z</sup>Means within a column followed by the same letters are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).





Fig. 3-4-5. Effect of immersion frequency, 10 (A), 15 (B), 20 (C), or 25 (D) min, on shoot multiplication of *J. dubia*.

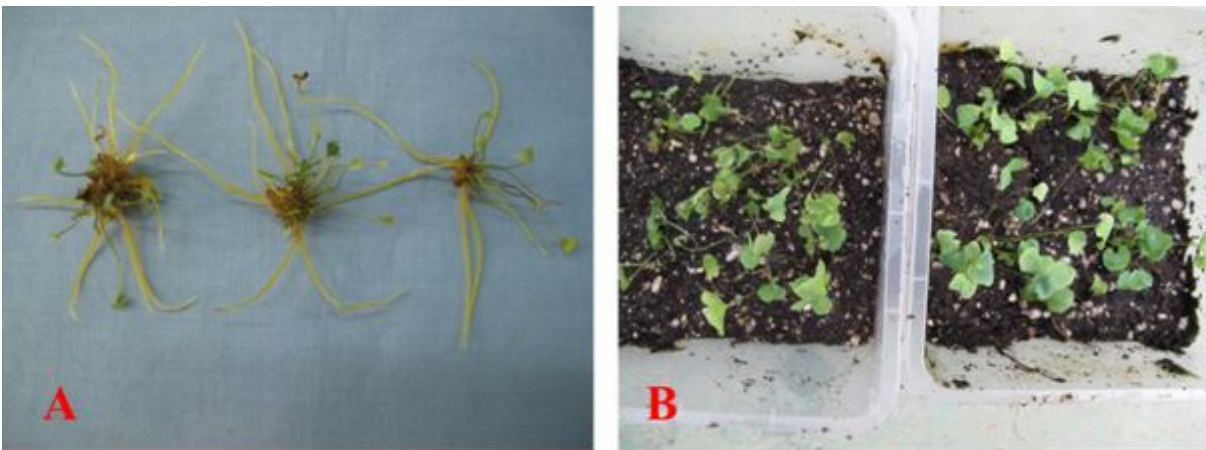


Fig. 3-4-6. Rooting (A) and acclimatization (B) ex vitro of *J. dubia*.

순화 45일 후, 초장, 엽수, 엽록소 함량을 측정하였다(Table 3-4-3).

Table 3-4-3. Growth traits measured after 45 days of greenhouse cultivation of *J. dubia*.

| Plant height (cm) | No. of leaves per plant | Chlorophyll (SPAD) |
|-------------------|-------------------------|--------------------|
| 6.0±1.8           | 12.2±1.29               | 35.2±4.8           |

Values represent mean ± standard deviation.

## 제 4 절 조직배양을 통한 섬개야광나무의 대량번식기술 개발

### 1. 섬개야광나무 (*Cotoneaster wilsonii* Nakai)의 기내 번식법 개발

#### 가. 연구목적

섬개야광나무는 장미목 장미과의 낙엽관목으로써 울릉도에서 자라는 멸종위기종이며 표고 500 m 까지 분포하고 높이가 1.5 m 내외에 달한다. 나무껍질은 다소 잿빛이며 어린 가지에 털이 있다. 잎은 어긋나는 달걀 모양이며 양끝이 좁고 가장자리가 밋밋하다. 잎자루는 길이가 2.5 mm 정도이고 턱잎이 있다. 꽃은 5-6월에 피고 백색이다. 우리나라에 1속 1종이 있으며 천연기념물로 지정되어 보호받고 있다. 대부분의 자생지는 바위 같은 암석지대 주변이며 추위에 강하다. 꽃은 양성화이며 가을에 맺히는 열매가 아름다워 조경수로 사용된다.

이러한 우리나라의 토속 식물인 섬개야광나무를 조직배양을 통하여 번식속도를 높이고 무균 식물을 대량 번식할 수 있는 방법을 확립하기 위하여 실험을 실시하였다.

#### 나. 재료 및 방법

##### (1) 실험재료 및 멸균방법

실험에 사용된 절편체는 섬개야광나무의 막 짝이 튼 신초의 줄기마디와 정아를 가지고 실험하였다. 먼저 예비소독을 위하여 흐르는 수돗물로 30분 동안 표면을 세척한 후 Teepol solution(0.1%, v/v)으로 5분 동안 소독을 실시하였다. 소독이 끝난 후 멸균수를 이용하여 3회 세척하였다. 예비소독이 끝난 줄기마디와 정아를 3가지 방법으로 멸균 소독하였다. 70%(v/v) ethanol solution 60초 처리, 5% (v/v) sodium hypochlorite 15분 처리, 0.1%(w/v) HgCl<sub>2</sub> 10분 처리로 소독하였다. 그리고 모든 처리는 멸균수로 3-4회 세척하였다.

##### (2) 배양배지

기본배지는 MS배지에 3%(w/v) sucrose, 0.8%(w/v) agar를 넣고 121°C에서 15분 동안 고압멸균을 한 후 사용하였다. Thidiazuron(TDZ)의 경우 filter를 이용하여 멸균하고 고압멸균을 끝낸 배지에 넣어 주었다. 성장조절제 처리로는 2iP, BAP, 그리고 TDZ (0-2.0 mg·L<sup>-1</sup>)를 각각 단독처리를 하거나 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA를 함께 넣어 주었다. 배양 후기에는 많이 분화된 신초들로부터 각각 작은 신초를 분리한 후 신초의 신장을 위하여 성장조절제가 없는 기본 MS배지에 식물체를 옮겨주었다. 각각의 신초가 2-3 cm가 되었을 때 발근을 위해서 신초를 IAA, IBA 또는 NAA가 여러 농도로 들어있는 1/2 MS배지에 옮겨 주었다.

#### 다. 결과 및 고찰

생장조절제가 없는 MS배지에서는 신초가 자라지 않았다. 줄기마디와 정아를 여러 가지 생장조절제가 들어있는 MS배지에서 배양한 결과 액아가 발달하여 새로운 신초를 얻을 수 있었다(Fig. 4-1-1). TDZ는 액아 발달을 촉진시킨다. 정아우세성을 약화시키고 액아의 발달이 촉진되는 것은 TDZ의 농도에 의존적이기 때문에 배양배지에 첨가된 TDZ의 농도에 따라 신초의 발달이 조절된다(Sivanesan et al., 2011). TDZ와 NAA의 적절한 혼합이 신초의 성장을 촉진한다.

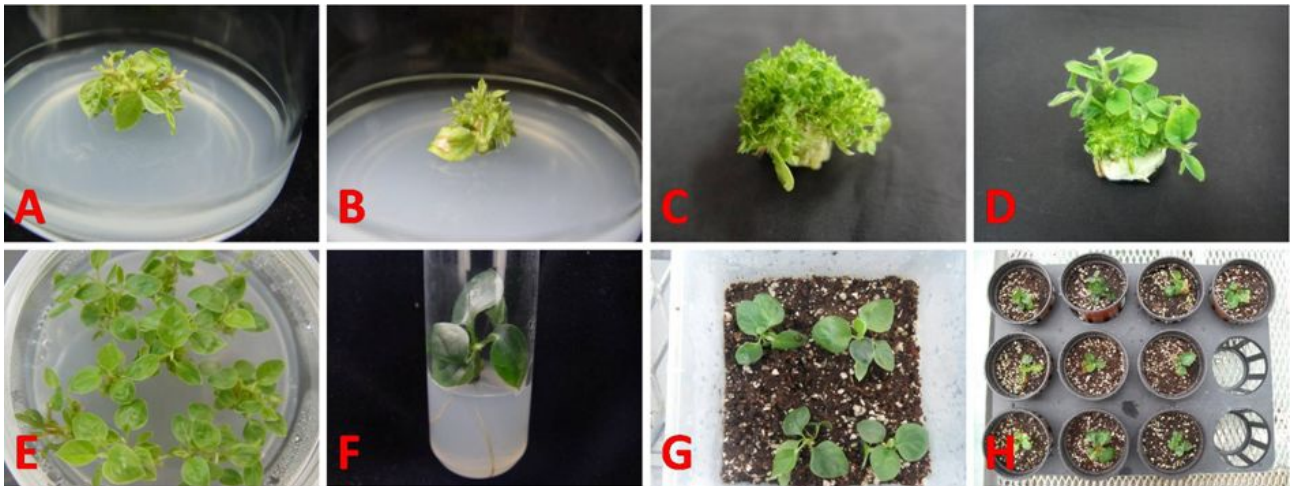


Fig. 4-1-1. Micropropagation of *C. wilsonii*. A, Nodal explants cultured on the MS medium with TDZ; B, shoot tip explants cultured on the MS medium with TDZ; C and D, MS medium with TDZ and NAA; E, shoot elongation; F, rooting; and G and H, acclimatization.

가장 높은 비율로 신초가 생성된 처리구는  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ와  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA를 함께 처리한 것으로 식물체당 평균 34개의 신초가 자라났다(Fig. 4-1-2). 발근에 가장 적절한 배지는 1/2 MS배지였고 뿌리의 발생률을 높이기 위해서 옥신을 첨가해 주었다. IAA에 의한 뿌리 촉진 효과는 없었지만  $0.1\text{-}1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA에서 가장 많은 뿌리를 볼 수 있었다. 하지만 신초당 뿌리 개수와 가장 긴 뿌리 길이는  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA를 처리한 처리구에서 가장 많았다. 그러나 IBA의 농도가  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 를 넘어가면 오히려 뿌리의 생성이 억제되고 켈러스가 형성되었다(Fig. 4-1-3).

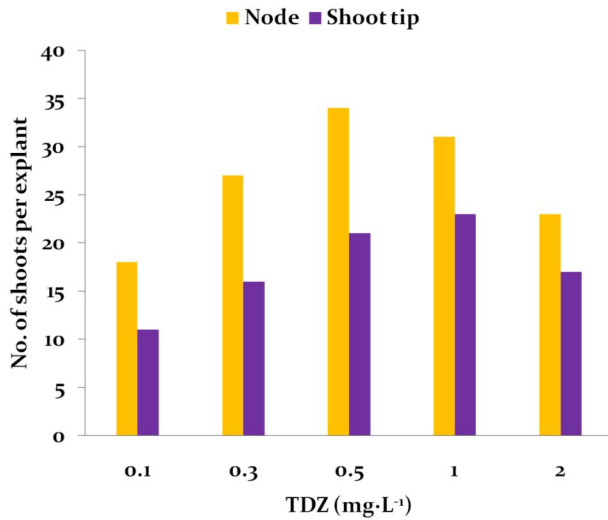


Fig. 4-1-2. Effect of different concentrations of TDZ on multiple shoot induction.

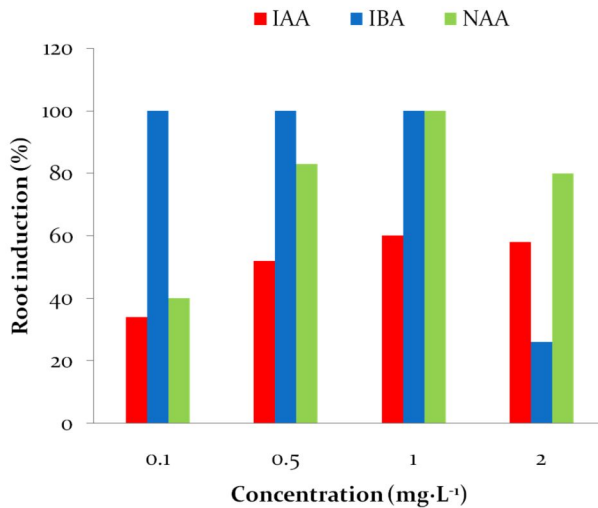


Fig. 4-1-3. Effect of concentration of auxins on root induction.

결과를 요약하면 줄기마디와 정아를 이용하여 기내 번식을 할 때는 0.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ와 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA를 함께 처리한 MS배지가 가장 효율적이었다. 신초가 생성된 후 발근을 위해서는 1/2MS배지에 0.5 mg·L<sup>-1</sup> IBA를 첨가한 배지를 이용하는 것이 좋았다. 본 실험 결과 섬개야광나무의 줄기마디와 정아를 이용하여 무균 식물체를 획득하고 기내 배양에 성공하였다. 따라서 향후 2년차 실험에서는 배양실 내부의 식물체를 온실로 순화하는 방법과 재분화를 통한 대량번식 연구가 수행되어야 할 것이다.

## 2. 섬개야광나무(*Cotoneaster wilsonii* Nakai)의 직·간접적 재분화

### 가. Murashige and Skoog Medium(MS) 배지에서 온도에 따른 재분화 조건 확립

### (1) 연구목적

목본식물인 섬개야광나무는 크기가 0.2-20 m에 이를 만큼 다양하며, 전 세계적으로는 약 300여종의 식물이 주로 유럽의 전지역, 남아프리카, 그리고 일본을 제외한 아시아의 온난한 지역 등에서 재배되고 있다. 일반적인 개야광나무속 식물들은 윤이 나는 초록색 잎, 풍부하고 아담다운 꽃, 매력적인 열매 등과 같은 형태로 관상적으로 인기가 많다. 이 중 울릉도에서만 자라는 희귀종인 섬개야광나무(*C. wilsonii* Nakai)는 크기가 약 1.5 m 정도로 낙엽성, 아치형 관목으로 잣빛껍질, 옅고 복슬복슬한 털의 가진 어린가지, 달걀모양의 호생엽, 그리고 길이가 2.5 mm 정도의 잎자루를 가지고 있다. 또한 꽃은 6월에 피고, 빛나는 붉은색 이상과인 열매는 9-10월에 익는다. 하지만 최근 조사에 따르면 울릉도에서 자생하는 섬개야광나무는 약 150 개체만이 자생하고 있고, 이 개체도 불법적인 채집, 산림 벌채, 그리고 자연적인 천이의 이유로 그 수가 줄어들고 있다. 뿐만 아니라 섬개야광나무는 환경부에서 지정된 멸종위기식물 1급으로, 멸종 방지를 위한 다양한 연구가 진행되고 있고, 그 중 개체수가 줄어드는 것을 막기 위해 조직배양기술을 이용한 대량생산법의 개발에 대한 연구가 필요하다.

조직배양기술이 발달함에 따라 다양한 종류의 배지들이 개발되었다. 그 중 1962년에 개발된 MS배지는 담배의 켈러스 증식용 배지로 개발되었고, 그 외 다양한 배지(B5와 White배지 등)들의 기본으로 사용되어 오고 있다. 특히 MS배지는 가격이 싸고 다양한 종류의 식물배양에도 우수한 효과를 나타내는 이점이 있어 현재 식물의 조직배양에 널리 쓰이고 있다. 따라서 본 연구는 섬개야광나무의 최적화된 대량번식법을 개발하기 위하여 MS배지에서 온도 차이가 식물체 재분화에 미치는 영향에 대하여 알아보기 위하여 실시하였다.

### (2) 재료 및 방법

1차년도에 기내에 도입한 섬개야광나무의 마디와 신초를 절편체로 이용하여 식물체 재분화 연구를 수행하였다. 실험에 사용된 모든 배지는 MS배지에 3%(w/v) sucrose와 0.8%(w/v) agar를 첨가한 후, pH를 NaOH와 HCl을 이용하여 5.70으로 조정하고, 121℃에서 15분간 고압 멸균 하여 사용하였다. 온도가 식물체 재분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 절편체를 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA와 filtering한 1.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ가 첨가된 배지에 치상한 후 15와 25℃로 각각 나누어 배양하였다. 이때 실험은 3반복으로 처리당 개체수는 25개였고, 식물체 재분화 관찰은 배양시작 6주 후부터 하였다. 배양기간 중 광도는 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>였고, 1일 16시간 동안 조명하면서 배양하였고, 배양실의 광원으로는 cool-white 형광램프[FL 40EX-W, (주)승산오스람]를, 그리고 배양용기로는 3.7×10<sup>-4</sup>m<sup>3</sup>의 용기(GA<sub>7</sub> Magenta box, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)를 사용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

MS배지에서 온도에 따른 섬개야광나무의 재분화를 관찰한 결과 25℃에 비해 15℃에서 절편체당 신초수가 많았다. 하지만 섬개야광나무의 경우 식물체가 절편체로부터 재분화되면서 식물체 과수화(hyperhydricity)현상이 보였는데, 이런 현상은 특히 15℃에서 더 높게 나타났다(Table 4-2-1).

Table 4-2-1. Effect of temperature on shoot induction of *C. wilsonii* Nakai inoculated the on MS medium.

| Temp. (°C) | No. of shoots/explant | Hyperhydric shoot induction (%) |
|------------|-----------------------|---------------------------------|
| 15         | 21.0                  | 78.4                            |
| 25         | 16.2                  | 63.0                            |

Fig. 4-2-1은 MS배지에서 온도에 따라 식물체가 재분화 되는 모습을 나타낸 것으로 절편체로부터 신초의 발생수도 적었을 뿐만 아니라, 두 온도 모두에서 대부분의 신초가 과수화현상이 나타나거나 신초가 갈변하는 형태적·생리적 이상 현상이 나타났다.

섬개야광나무를 MS배지에서 광합성 능력을 최대한으로 증대시키고 식물체의 고사율을 저하시키기 위해 여러 온도에서 식물체를 배양한 결과 과수화 현상은 완화시키는 데는 크게 효과적이지는 못하였다. 특히 재분화과정 중 과수화현상은 엽록소의 결여와 도관발달의 미비로 자급영양체가 될 수 없어 결국은 배양을 실패하는 원인이 될 수 있으므로 이것을 해결하기 위한 방법이 차후 연구 되어야 할 것이다.

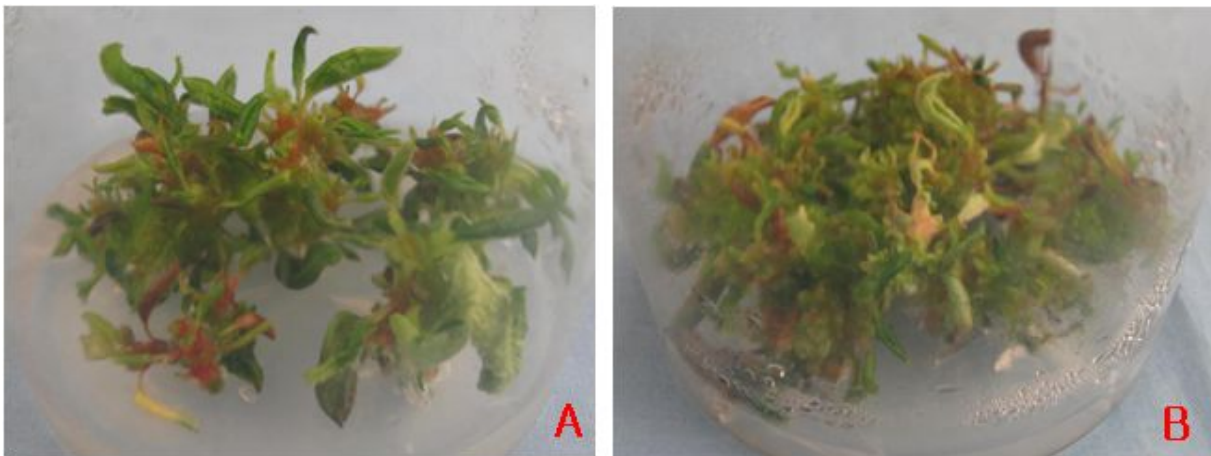


Fig. 4-2-1. Effect of temperature (A, 15°C; and B, 25°C) on regeneration of *C. wilsonii* Nakai inoculated on the MS medium.

#### 나. 1/2 MS배지에서 온도에 따른 재분화 조건 확립

##### (1) 연구목적

본 연구는 섬개야광나무의 최적화된 대량번식법을 개발하기 위하여 염이 다소 많은 MS배지의 단점을 개선하고 절편체의 발근과 생존율을 높이는 장점이 있는 1/2 MS배지에서 온도 차이가 식물체 재분화에 미치는 영향에 대하여 알아보기 위하여 실시하였다.

##### (2) 재료 및 방법

1차년도에 기내에 도입한 섬개야광나무의 마디와 신초를 절편체로 이용하여 식물체 재분화 연구를 수행하였다. 실험에 사용된 모든 배지는 1/2 MS배지에 3%(w/v) sucrose와 0.8%(w/v)

agar를 첨가한 후, pH를 NaOH와 HCl을 이용하여 5.70으로 조정하고, 121℃에서 15분간 고압 멸균 하여 사용하였다. 온도가 식물체 재분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 절편체를 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA와 filtering한 1.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ가 첨가된 배지에 치상한 후 15와 25℃로 각각 나누어 배양하였다. 이때 실험은 3반복으로 처리당 개체수는 25개였고, 식물체 재분화 관찰은 배양시작 6주 후부터 하였다. 배양기간 중 광도는 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>였고, 1일 16시간 동안 조명하면서 배양하였고, 배양실의 광원으로는 cool-white 형광램프[FL 40EX-W, (주)승산오스람]를, 그리고 배양용기로는 3.7×10<sup>-4</sup>m<sup>-3</sup>의 용기(GA7 Magenta box, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)를 사용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

1/2 MS배지에서 온도에 따른 섬개야광나무의 재분화를 관찰한 결과 모든 온도에서 재분화가 발생하지 않은 것을 볼 수 있다(Table 4-2-2). 이것은 MS배지와 비교해보면 부족한 배지의 영양소에 의한 결핍증상으로 생각된다. Fig. 4-2-2는 1/2 MS배지에서 온도에 따라 식물체가 재분화 되는 모습을 나타낸 것으로 절편체로부터 신초의 발생도 제대로 이루어지지 않았고, 대부분의 비정상적으로 발생한 신초가 과수화현상이 나타나거나 신초가 갈변하는 형태적·생리적 이상 현상이 나타났다. 따라서 본 연구에서는 1/2 MS 배지는 식물체 재분화 효율을 증대시키는데 큰 영향을 미치지 못했다.

Table 4-2-2. Effect of temperature on shoot induction of *C. wilsonii* Nakai inoculated on the 1/2 MS medium.

| Temp. (°C) | No. of shoots/explant | Hyperhydric shoot induction (%) |
|------------|-----------------------|---------------------------------|
| 15         | nd <sup>z</sup>       | -                               |
| 25         | nd                    | -                               |

nd<sup>z</sup>, not determined.

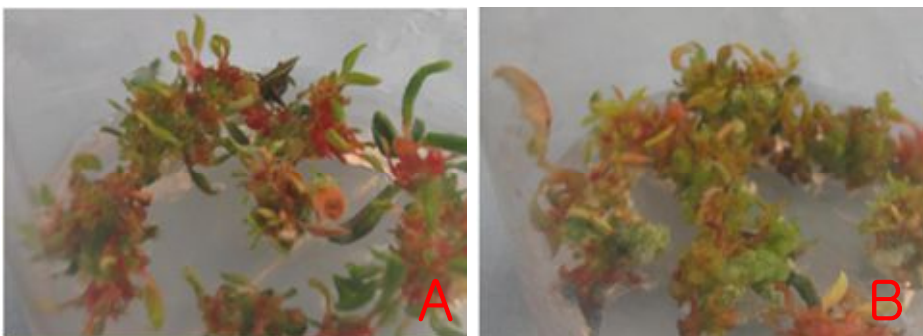


Fig. 4-2-2. Effect of temperature (A, 15°C; and B, 25°C) on regeneration of *C. wilsonii* Nakai inoculated on the 1/2 MS medium.

### 다. Gamborg(B5) 배지에서 온도에 따른 재분화 조건 확립

#### (1) 연구목적

B5배지는 원형질체 배양에 있어서 기본 배지로 이용되는 배지로서 MS배지에 비해서 암모늄태 질소의 비율이 낮은 특징을 가지고 있다. 따라서 본 연구는 섬개야광나무의 최적화된 대량번식법을 개발하기 위하여 B5배지에서 온도 차이가 식물체 재분화에 미치는 영향에 대하여 알아보자 하였다.

## (2) 재료 및 방법

1차년도에 기내에 도입한 섬개야광나무의 마디와 신초를 절편체로 이용하여 식물체 재분화 연구를 수행하였다. 실험에 사용된 모든 배지는 B5배지에 3%(w/v) sucrose와 0.8%(w/v) agar를 첨가한 후, pH를 NaOH와 HCl을 이용하여 5.70으로 조정하고, 121°C에서 15분간 고압멸균하여 사용하였다. 온도가 식물체 재분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 절편체를 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA와 filtering한 1.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ가 첨가된 배지에 치상한 후 15와 25°C로 각각 나누어 배양하였다. 이때 실험은 3반복으로 처리당 개체수는 25개였고, 식물체 재분화 관찰은 배양시작 6주 후부터 하였다. 배양기간 중 광도는 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>였고, 1일 16시간 동안 조명하면서 배양하였고, 배양실의 광원으로는 cool-white 형광램프[FL 40EX-W, (주)승산오스람]를, 그리고 배양용기로는 3.7×10<sup>-4</sup>m<sup>-3</sup>의 용기(GA7 Magenta box, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)를 사용하였다.

## (3) 결과 및 고찰

B5배지에서 온도에 따른 섬개야광나무의 재분화를 관찰한 결과 두 온도에서 다른 절편체당 신초수가 낮았다. 또한 재분화 되면서 식물체 과수화 현상이 아주 높게 나타났는데, 이런 현상은 특히 15°C에서 더 높게 나타났다(Table 4-2-3).

Fig. 4-2-3은 B5배지에서 온도에 따라 식물체가 재분화 되는 모습을 나타낸 것으로 대부분의 신초가 과수화현상이 나타나거나 신초가 갈변하는 형태적·생리적 이상 현상이 나타났다. B5배지는 콩의 세포 현탁배양에서 개발한 것이지만 현재까지 많은 배양에도 좋은 결과를 나타냈다. 하지만 본 연구에서는 식물체 재분화 효율을 증대시키는 데는 큰 영향을 미치지 못했다.

Table 4-2-3. Effect of temperature on shoot induction of *C. wilsonii* Nakai inoculated on the B5 medium.

| Temp. (°C) | No. of shoots/explant | Hyperhydric shoot induction (%) |
|------------|-----------------------|---------------------------------|
| 15         | 16.4                  | 96.2                            |
| 25         | 13.4                  | 86.0                            |



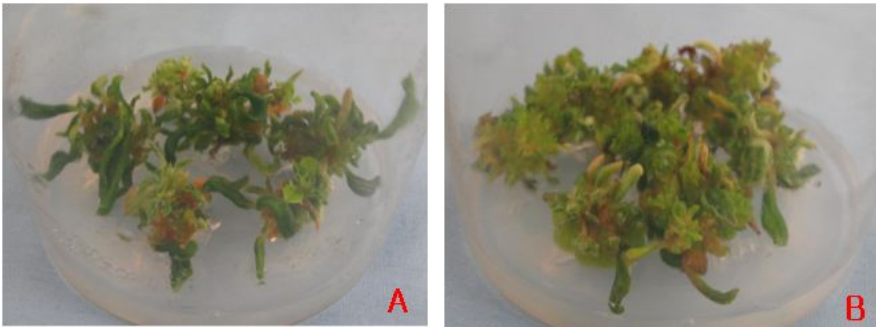


Fig. 4-2-3. Effect of temperature (A, 15°C; and B, 25°C) on regeneration of *C. wilsonii* Nakai inoculated on the B5 medium.

#### 라. Schenk and Hilderbrandt(SH) 배지에서 온도에 따른 재분화 조건 확립

##### (1) 연구목적

SH배지는 단자엽식물과 쌍자엽식물 모두에서 캘러스를 유도하기 위해서 개발한 배지이다. 이와 같은 캘러스 유도는 식물체 재분화에 도움이 될 것이라 예상하여 섬개야광나무의 최적화된 대량번식법을 개발하기 위하여 SH배지에서 온도 차이가 식물체 재분화에 미치는 영향에 대하여 조사하였다.

##### (2) 재료 및 방법

1차년도에 기내에 도입한 섬개야광나무의 마디와 신초를 절편체로 이용하여 식물체 재분화 연구를 수행하였다. 실험에 사용된 모든 배지는 SH배지에 3%(w/v) sucrose와 0.8%(w/v) agar를 첨가한 후, pH를 NaOH와 HCl을 이용하여 5.70으로 조정하고, 121°C에서 15분간 고압 멸균 하여 사용하였다. 온도가 식물체 재분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 절편체를  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA와 filtering한  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  TDZ가 첨가된 배지에 치상한 후 15와 25°C로 각각 나누어 배양하였다. 이때 실험은 3반복으로 처리당 개체수는 25개였고, 식물체 재분화 관찰은 배양시작 6주 후부터 하였다. 배양기간 중 광도는  $45 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 였고, 1일 16시간 동안 조명하면서 배양하였고, 배양실의 광원으로는 cool-white 형광램프[FL 40EX-W, (주)승산오스람]를, 그리고 배양용기로는  $3.7 \times 10^{-4} \text{ m}^3$ 의 용기(GA<sub>7</sub> Magenta box, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)를 사용하였다.

##### (3) 결과 및 고찰

SH배지에서 온도에 따른 섬개야광나무의 재분화를 관찰한 결과 모든 온도에서 절편체당 신초수가 낮은 것을 볼 수 있었다. 하지만 식물체의 과수화 현상은 위의 다른 배지에 비해 낮았고, 특히 15°C에서 더 낮게 나타났다(Table 4-2-4).

Table 4-2-4. Effect of temperature on shoot induction of *C. wilsonii* Nakai inoculated on the 1/2 MS medium.

| Temp. (°C) | No. of shoots/explant | Hyperhydric shoot induction (%) |
|------------|-----------------------|---------------------------------|
| 15         | 11.4                  | 40.2                            |
| 25         | 9.2                   | 62.4                            |

Fig. 4-2-4는 SH배지에서 온도에 따라 식물체가 재분화 되는 모습을 나타낸 것으로 절편체로부터 신초의 발생수도 적었을 뿐만 아니라, 두 온도 모두에서 대부분의 신초가 과수화현상이 나타났다.

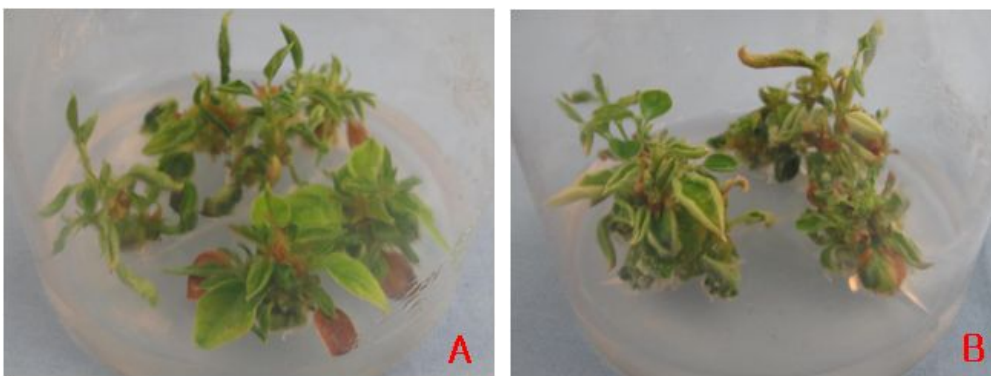


Fig. 4-2-4. Effect of temperature (A, 15°C; and B, 25°C) on regeneration of *C. wilsonii* Nakai inoculated on MS medium.

이때 발생된 과수화된 개체의 특징은 다른 배지와 같이 엽록소가 결여되고, 잎이 돌돌 말려 정상적인 광합성을 하기 힘든 형태로 발전하였다. 따라서 SH배지가 식물체 재분화 효율을 증대 시키는 것에 큰 영향을 미치지 못했다.

#### 마. Woody plant(WP) 배지에서 온도에 따른 재분화 조건 확립

##### (1) 연구목적

WP배지는 관상용 관목과 나무의 상업적 기내번식에 이용하는 배지로 섬개야광나무의 최적화된 대량번식법개발을 위한 재분화에 도움이 될 것이라고 기대되어 본 연구를 실시하였다.

##### (2) 재료 및 방법

1차년도에 기내에 도입한 섬개야광나무의 마디와 신초를 절편체로 이용하여 식물체 재분화 연구를 수행하였다. 실험에 사용된 모든 배지는 B5배지에 3%(w/v) sucrose와 0.8%(w/v) agar를 첨가한 후, pH를 NaOH와 HCl을 이용하여 5.70으로 조정하고, 121°C에서 15분간 고압멸균하여 사용하였다. 온도가 식물체 재분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 절편체를 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA와 filtering한 1.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ가 첨가된 배지에 치상한 후 15와 25°C로 각각 나누어 배양하였다. 이때 실험은 3반복으로 처리당 개체수는 25개였고, 식물체 재분화 관찰은 배

양시작 6주 후부터 하였다. 배양기간 중 광도는  $45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 였고, 1일 16시간 동안 조명하면서 배양하였고, 배양실의 광원으로는 cool-white 형광램프[FL 40EX-W, (주)승산오스람]를, 그리고 배양용기로는  $3.7\times 10^{-4}\text{m}^3$ 의 용기(GA<sub>7</sub> Magenta box, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)를 사용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

WP배지에서 온도에 따른 섬개야광나무의 재분화를 관찰한 결과 두 온도에서 다른 절편체당 신초수가 낮았다. 또한 재분화되면서 식물체 과수화 현상이 아주 높게 나타났는데, 이런 현상은 특히 25°C에서 87.6%로 다소 높게 나타났다(Table 4-2-5).

Table 4-2-5. Effect of temperature on shoot induction of *C. wilsonii* Nakai inoculated on the 1/2 MS medium.

| Temp. (°C) | No. of shoots/explant | Hyperhydric shoot induction (%) |
|------------|-----------------------|---------------------------------|
| 15         | 8.2                   | 58.2                            |
| 25         | 14.0                  | 87.6                            |

Fig. 4-2-5는 WP배지에서 온도에 따라 식물체가 재분화하다 모습을 나타낸 것으로 절편체로부터 절편체당 신초수가 작고, 형성된 신초도 다른 배지와 비슷한 경향으로 과수화현상이 나타나는 현상이 나타났다. 따라서 WP배지는 섬개야광나무의 식물체 재분화 효율을 효과적으로 증대시키지 못하였다.

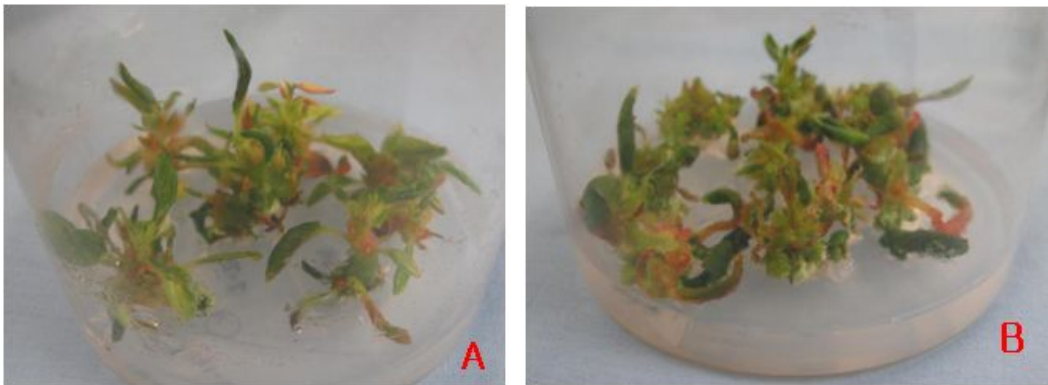


Fig. 4-2-5. Effect of temperature (A, 15°C; and B, 25°C) on regeneration of *C. wilsonii* Nakai inoculated on MS medium.

본 실험은 섬개야광나무의 효율적인 재분화에 적합한 배지의 종류를 구명하기 위하여 MS, 1/2 MS, B5, SH, WP배지 다른 재분화율을 조사한 결과 MS배지를 제외한 모든 배지는 식물체 재분화에 효과적이지 못하였다(Fig. 4-2-6). 특히 절편체당 신초수가 적고, 발생된 신초의 색이 변하여 정상적인 생육이 어려운 상태가 되는 경우가 많았다.

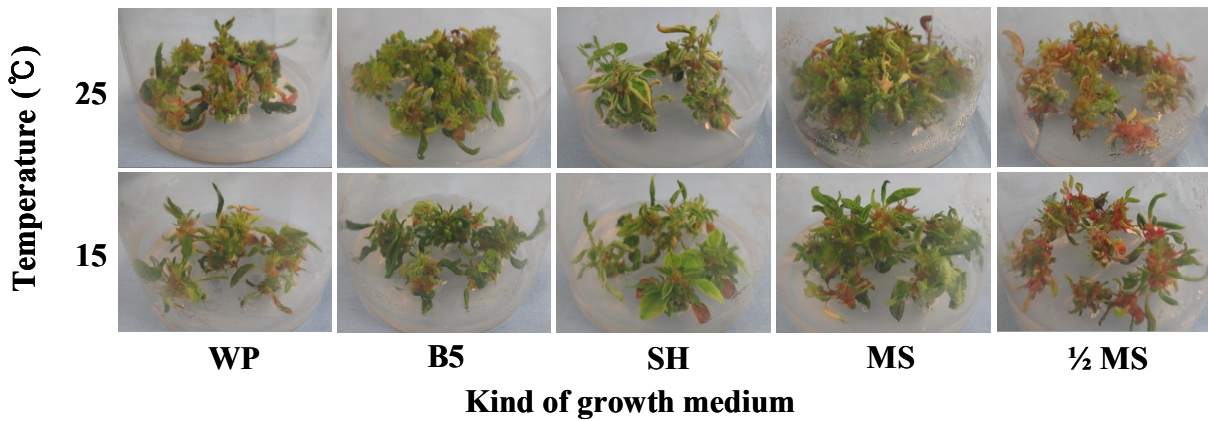


Fig. 4-2-6. Shoot regeneration on different media.

Fig. 4-2-7은 재분화과정 중 과수화현상이 발생한 모습으로, 일반적으로 과수화현상의 원인은 수동적 현상과 능동적 현상으로 나눌 수 있다. 수동적 현상은 이미 그렇게 된 곳에 물이 침투해 들어간 것이고, 능동적 현상은 생화학적 상호작용의 결과로 나타나는 것을 말하는데, 어느 것이든 과수화현상은 증식률이 떨어지고 새로운 배지에 옮기면 쉽게 시들고, 기공의 기능도 비정상적으로 만든다. 하지만 몇몇 연구에 따르면 배지에 규소를 첨가하였을 때 많은 부분의 과수화현상을 완화시킨다는 보고가 있으므로 이와 같은 과수화현상을 줄이기 위한 다양한 연구가 차후 진행되어야 한다.

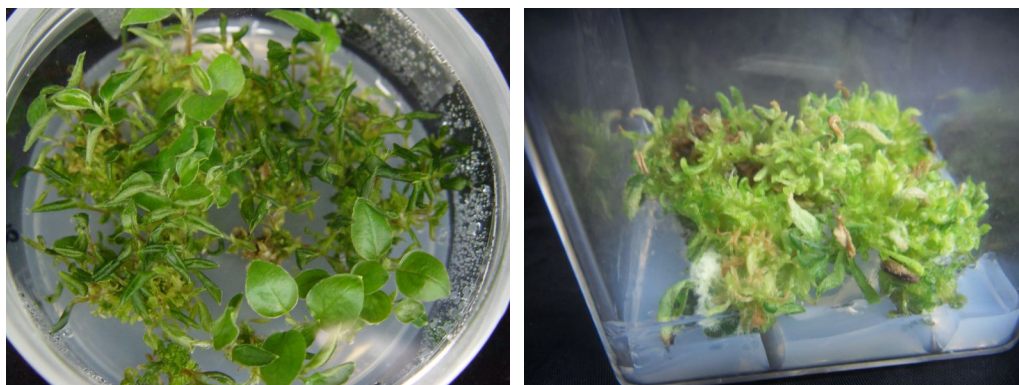


Fig. 4-2-7. Hyperhydricity observed on the medium.

### 3. 섬개야광나무 (*Cotoneaster wilsonii* Nakai)의 기내번식

#### 가. 실험재료 확보를 위한 기내대량 번식

##### (1) 연구목적

식물조직배양을 통한 대량번식법 중 계대배양을 통한 영양번식체(propagule)의 번식은 식물체의 대량번식법 확립에 아주 중요한 역할을 한다. 따라서 본 연구는 섬개야광나무의 대량번식법 확립을 위하여 계대배양을 통한 식물체 대량번식을 시도하기 위해 수행되었다.

##### (2) 재료 및 방법

1차년도에 기내에 도입한 섬개야광나무의 마디와 신초를 절편체로 이용하여 식물체 재분화 연구를 수행하였다. 실험에 사용된 모든 배지는 MS배지에 3%(w/v) sucrose와 0.8%(w/v) agar를 첨가한 후, pH를 NaOH와 HCl을 이용하여 5.70으로 조정하고, 121℃에서 15분간 고압 멸균 하여 사용하였다. 절편체를 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA와 filtering한 1.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ가 첨가된 배지에 치상한 후 15와 25℃로 각각 나누어 배양하였다. 이때 실험은 3반복으로 처리당 개체수는 25개였고, 식물체 재분화 관찰은 배양시작 6주 후부터 하였다. 배양기간 중 광도는 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>였고, 1일 16시간 동안 조명하면서 배양하였고, 배양실의 광원으로는 cool-white 형광램프[FL 40EX-W, (주)승산오스람]를, 그리고 배양용기로는 3.7×10<sup>-4</sup>m<sup>3</sup>의 용기(GA7 Magenta box, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)를 사용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

Fig. 4-3-1은 섬개야광나무의 대량증식 과정을 나타낸 것으로 마디부분과 신초부분을 절편체로 사용하여 1.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ와 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA가 첨가된 MS배지에 치상하였다. 4주후 발생한 식물체를 1차 계대배양하였다. 계대배양된 식물체를 MS배지에서 성장시킨 후, 4주 발근을 유도하고, 2차 계대배양을 시도하였다. 그 후 여러 번의 계대배양을 통해 대량번식 체계를 확립 시켰다.

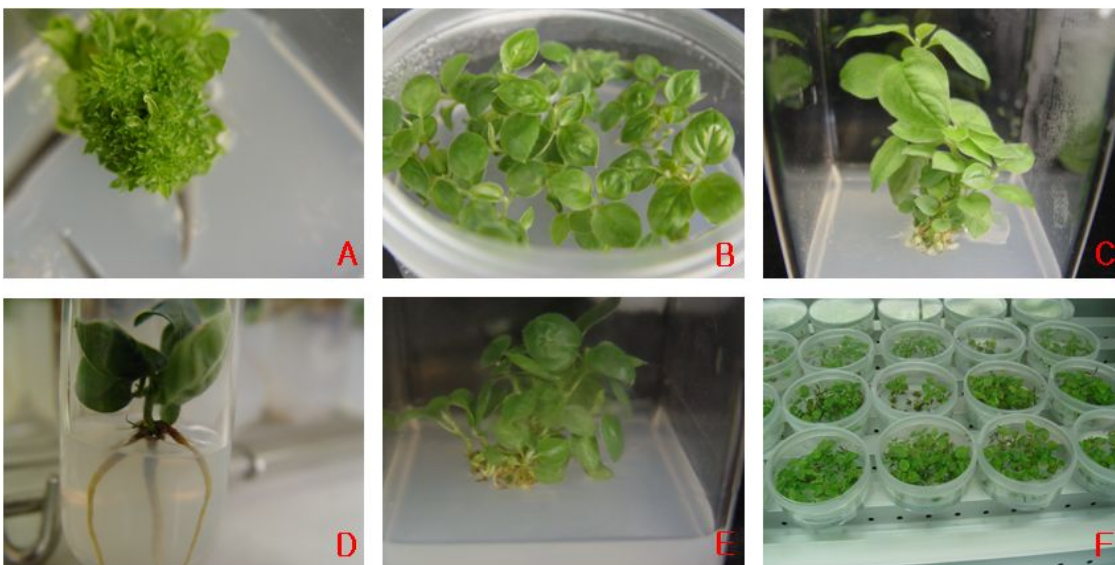


Fig. 4-3-1. Micropropagation of *C. wilsonii*. A, Nodal explants cultured on the MS medium; B and C, shoot elongation; D, rooting; E, second subculture; and F, mass propagation.

## 4. 섬개야광나무(*Cotoneaster wilsonii* Nakai)의 대량번식

### 가. TIS를 이용한 섬개야광나무의 기내번식

#### (1) 연구목적

TIS를 이용하여 섬개야광나무의 효과적인 기내번식 방법을 확립하기 위해 본 연구를 수행하였다.

## (2) 재료 및 방법

### (가) 실험재료 및 멸균 소독방법

실험에 사용된 식물체는 시내에 도입되어있는 식물을 사용하였다. TIS를 사용하여 실험을 하였고, TIS 용기는 배지를 넣은 상태로 고압멸균을 하여 사용하였다.

### (나) 배양배지

기본배지는 MS 배지를 사용하였고, sucrose 3%(w/v)를 이용하였다. pH는 5.70-5.80으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, TIS용기에 400 mL씩 담아서 121°C에서 15분간 고압멸균 하였다. 성장조절제는 0.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ와 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA를 사용하였다. 배양액의 공급은 10, 20, 30, 40, 혹은 50분마다 공급하였다.

### (다) 배양환경

배양온도는 25±1°C로 설정하였고, 상대습도 70-80%인 배양실에서 명기 12시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> PPFD 조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

## (3) 결과 및 고찰

모든 처리에서 100% 멸균상태로 배양이 되었고, 배양액을 공급하는 빈도에 따라서 신초의 증식에 대한 연구를 하였다(Fig. 4-4-1). 모든 처리에서 96.4-100%의 확률로 신초가 생성되었다(Table 4-4-1). 가장 많은 신초가 발생된 처리는 20분마다 공급하는 처리로 식물체당 34.8개의 신초가 생성되었다. 신초의 길이는 특별히 차이가 없었으며 0.85-1.81cm 범위에서 자랐다(Table 4-4-1). 생체중은 배양액을 자주 공급한 처리에서 낮게 나왔으며, 배양액의 공급 빈도 수가 낮을수록 생체중이 높게 나타났다.

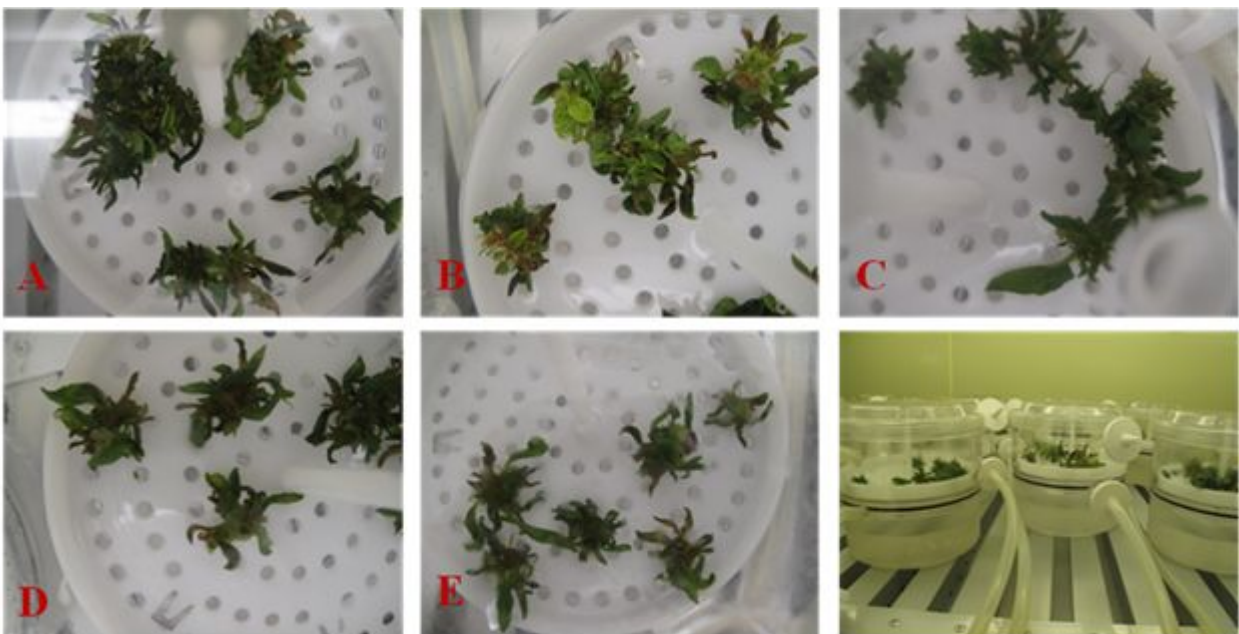


Fig. 4-4-1. Effect of immersion frequency, 10 (A); 20 (B); 30 (C); 40 (D); and 50 (F) min.

, on axillary shoot multiplication from the nodal explants of *C. wilsonii*.

Table 4-4-1. Effect of immersion frequency on axillary shoot multiplication from the nodal explants of *C. wilsonii* cultured in the TIS.

| Immersion frequency (min) | Shoot induction (%)    | No. of shoots induced per explant | Shoot length (cm) | Fresh weight (g) |
|---------------------------|------------------------|-----------------------------------|-------------------|------------------|
| 10                        | 100±0.0 a <sup>z</sup> | 17.2±3.6 cd                       | 1.59±0.02 c       | 0.882±0.08 a     |
| 20                        | 100±0.0 a              | 34.8±1.6 a                        | 1.81±0.03 b       | 0.517±0.12 c     |
| 30                        | 100±0.0 a              | 27.4±2.0 b                        | 2.24±0.05 a       | 0.655±0.10 b     |
| 40                        | 96.4±1.6 a             | 21.6±4.4 c                        | 1.20±0.02 d       | 0.354±0.14 d     |
| 50                        | 97.2±1.6 a             | 12.6±1.4 d                        | 0.85±0.06 e       | 0.358±0.12 d     |

<sup>z</sup>Means ± SD within a column followed by the same letters are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

TIS를 이용한 결과 뿌리의 생성과 기외순화도 성공적으로 이루어졌다(Fig. 4-4-2). 기외순화를 시작 45일 후 식물체의 초장은 4.5-5cm, 그리고 엽록소 함량은 34.6으로 나타났다(Table 4-4-2).



Fig. 4-4-2. TIS-raised *C. wilsonii* plantlets: Rooting (A); and acclimatization (B & C).

Table. 4-4-2. Growth traits measured after 45 days of greenhouse cultivation of *C. wilsonii*.

| Plant height (cm) | Stem diameter (mm) | Number of nodes/plant | Internode length (cm) | Chlorophyll (SPAD) |
|-------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| 4.5±0.07          | 2.3±0.56           | 5.0±1.87              | 0.17±0.57             | 34.6±5.73          |

Values represent mean ± standard deviation.

## 나. 규소가 TIS를 이용한 섬개야광나무의 신초증식에 미치는 영향

### (1) 연구목적

TIS를 이용하여 섬개야광나무의 신초증식에 규소가 미치는 영향을 알아보기 위하여 본 연구를 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 실험재료 및 멸균 소독방법

실험에 사용된 식물체는 시내에 도입되어있는 식물을 사용하였다. TIS를 사용하여 실험을 하였고, TIS 용기는 배지를 넣은 상태로 고압멸균 하여 사용하였다.

#### (나) 배양배지

기본배지는 MS 배지를 사용하였고, sucrose 3%(w/v)를 이용하였다. pH는 5.70-5.80으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, TIS용기에 400mL씩 담아서 121°C에서 15분간 고압멸균 하였다. 성장조절제는  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ와  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA를 사용하였고,  $\text{K}_2\text{SiO}_3$ 를 이용하여 규소를  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 농도로 공급하였다. 이때 추가로 들어가는 칼륨의 경우  $\text{KNO}_3$ 에서 제거 하였으며, 이때 제거된  $\text{NO}_3$ 의 경우 질산을 이용하여 보충하였다. 배양액의 공급은 10, 20, 30, 40, 혹은 50분마다 공급하였다.

#### (다) 배양환경

배양온도는  $25\pm 1^\circ\text{C}$ 로 설정하였고, 상대습도 70-80%인 배양실에서 명기 12시간 동안  $45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD 조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

모든 처리에서 100% 멸균상태로 배양이 되었고, 배양액을 공급하는 빈도에 따라서 신초의 증식에 대한 연구를 하였다(Fig. 4-4-3). 배양액을 자주 공급하는 처리에서 유리화된 신초와 변형된 잎이 나타났다(Fig 4-4-4). 신초의 생성은 10분 처리와 20분 처리에서 모두 100% 생성 되었다. 신초의 생성 개수는 10분 처리에서 가장 많았으나 신초의 길이(1.87cm)는 50분 처리에서 가장 길었다(Table 4-4-3). 신초의 생체중은 배양액의 공급 빈도가 낮을수록 증가하였다.

모든 처리에서 96.4-100%의 확률로 신초가 생성되었다(Table 4-4-3). 가장 많은 신초가 발생된 처리는 20분마다 공급하는 처리로 식물체당 34.8개의 신초가 생성되었다. 신초의 길이는 특별히 차이가 없었으며 0.85-1.81cm 범위에서 자랐다(Table 4-4-3). 생체중은 배양액을 자주 공급한 처리에서 낮게 나왔으며, 배양액의 공급 빈도수가 낮을수록 생체중이 높게 나타났다. 수분함량의 경우 30분 처리에서 다른 처리에 비해 높게 나왔으며(Fig. 4-4-5), 엽록소 함량도 30분 처리에서 가장 높게 나왔다(Fig. 4-4-6). 카로티노이드 함량은 50분 처리에서 가장 높게 나왔으며(Fig. 4-4-7), 안토시아닌의 경우 모든 처리구에서 신초보다는 늙은 잎에서 더 높게 나왔다(Fig. 4-4-8).



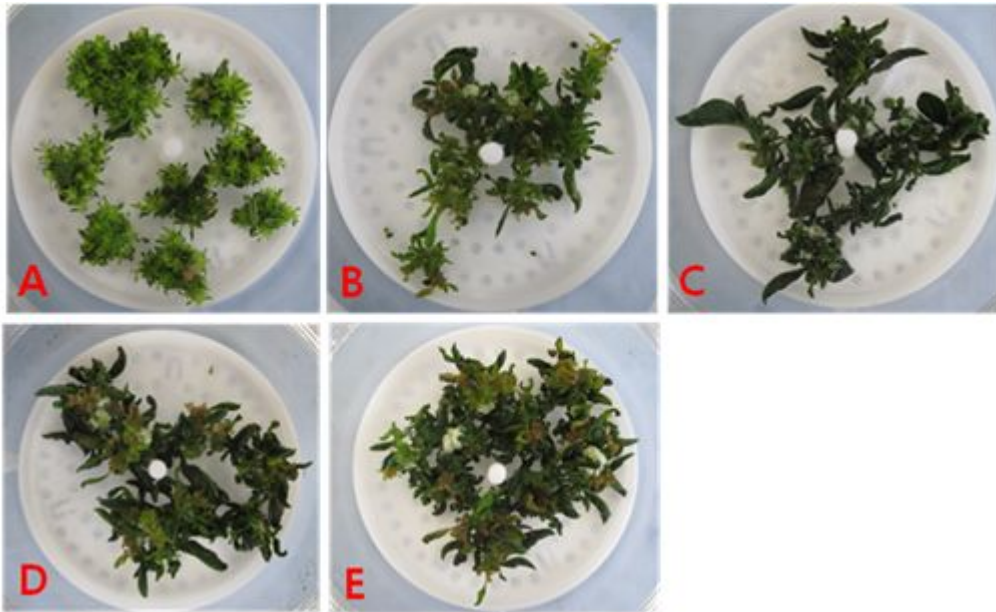


Fig. 4-4-3. Effect of immersion frequency on shoot multiplication of *C. wilsonii*: 10 (A); 20 (B); 30 (C); 40 (D); and 50 (E) min.

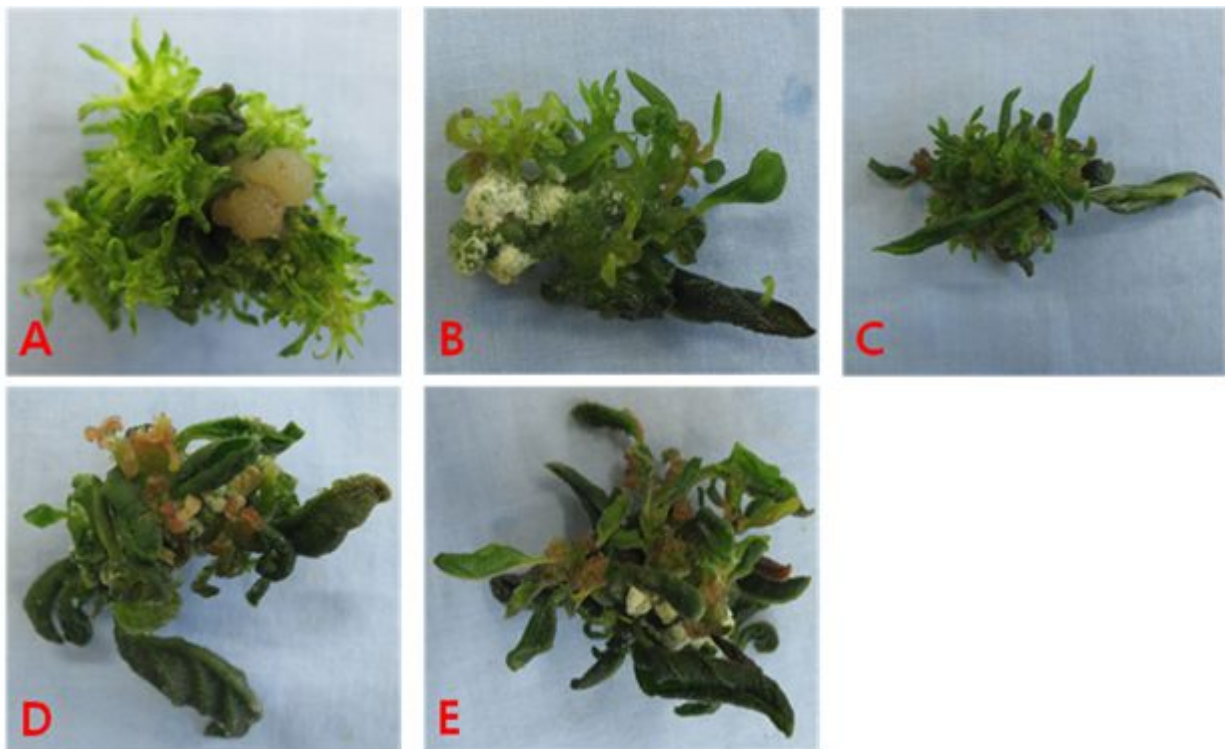


Fig. 4-4-4. Effect of immersion frequency on shoot and callus formation of *C. wilsonii*: 10 (A); 20 (B); 30 (C); 40 (D); and 50 (E) min.

Table 4-4-3. Effect of immersion frequency on shoot multiplication of *C. wilsonii*.

| Immersion frequency (min) | Shoot induction (%)     | No. of shoots induced per explant | Shoot length (cm) | Fresh wt. (g) | Dry wt. (g) |
|---------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-------------------|---------------|-------------|
| 10                        | 100±0.00 a <sup>z</sup> | 12.67±1.15 a                      | 0.840±0.06 d      | 2.98±0.35 c   | 0.23±0.02 c |
| 20                        | 100±0.00 a              | 10.00±1.00 b                      | 0.933±0.15 d      | 2.63±0.13 c   | 0.13±0.01 c |
| 30                        | 90±0.01 b               | 7.67±1.15 b                       | 1.270±0.15 c      | 5.73±0.36 b   | 0.33±0.03 b |
| 40                        | 80±0.01 cb              | 9.00±0.00 b                       | 1.540±0.12 b      | 7.19±0.53 a   | 0.42±0.07 a |
| 50                        | 80±0.01 cb              | 9.34±0.57 c                       | 1.870±0.06 a      | 7.69±0.59 a   | 0.45±0.05 a |
| F-test                    | ***                     | *                                 | ***               | **            | **          |

<sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $P \leq 0.05$ . Values are mean  $\pm$  standard deviation from ten replicates.

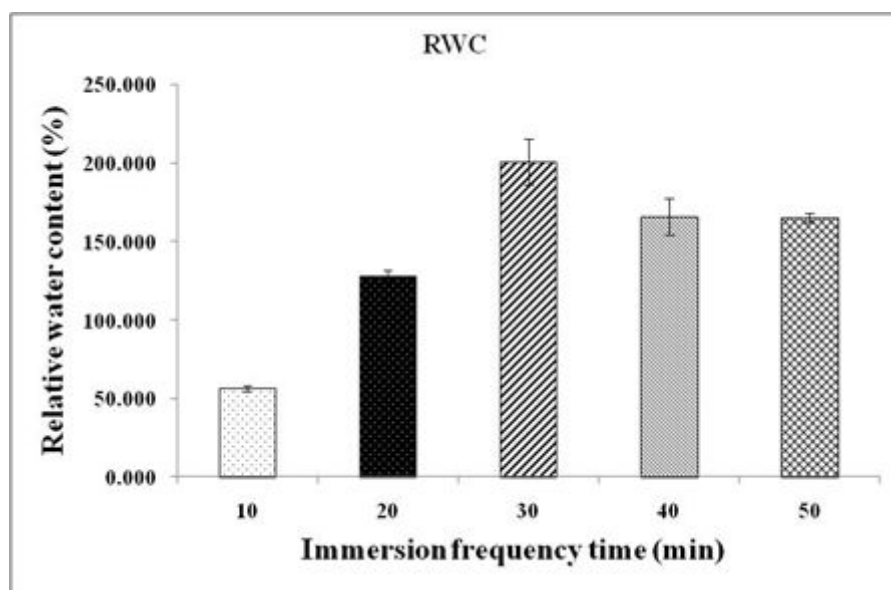


Fig. 4-4-5. Effect of immersion frequency on relative water content of *C. wilsonii*. Values are mean  $\pm$  standard deviation from ten replicates.

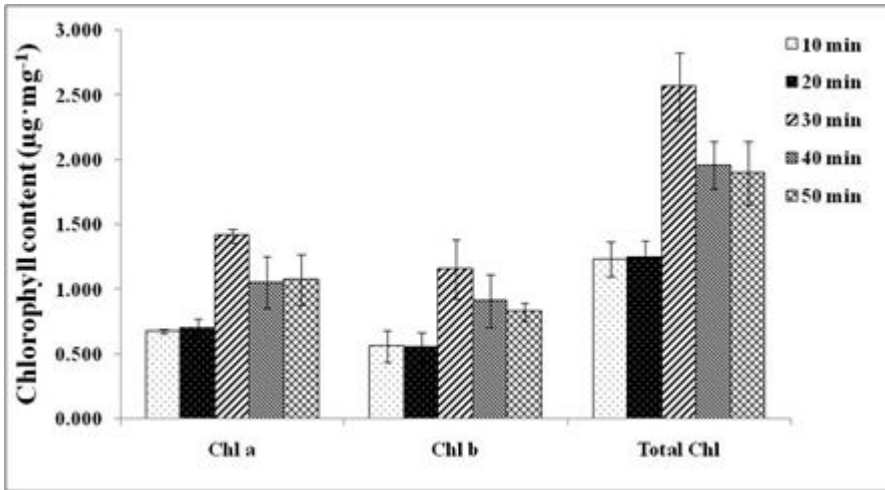


Fig. 4-4-6. Effect of immersion frequency on chlorophyll content of *C. wilsonii*. Values are mean  $\pm$  standard deviation from ten replicates.

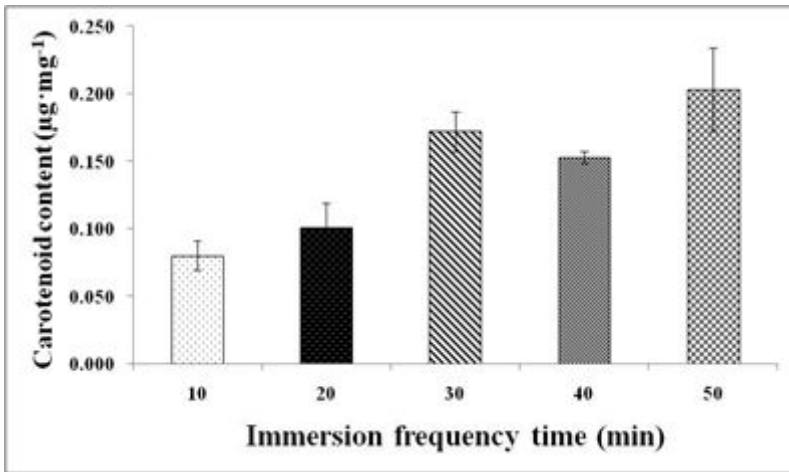


Fig. 4-4-7. Effect of immersion frequency on carotenoid content of *C. wilsonii*. Values are mean  $\pm$  standard deviation from ten replicates.

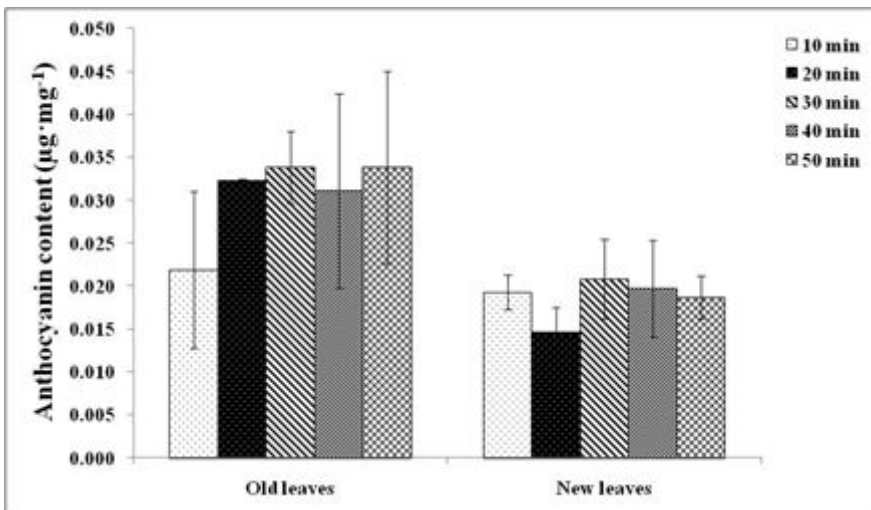


Fig. 4-4-8. Effect of immersion frequency on anthocyanin content of *C. wilsonii*. Values are mean  $\pm$  standard deviation from ten replicates.

## 제 5 절 조직배양을 통한 번홍화의 대량번식기술 개발

### 1. 번홍화(*Crocus sativus* L.)의 기내 번식법 개발

#### 가. 번홍화 기내 도입을 위한 멸균방법 실험1

##### (1) 연구목적

붓꽃과에 속하는 번홍화는 다년생 구근식물로서 키가 10~15 cm 정도 자라며, 한번 심으면 10~15년 꽃을 피운다. 구근은 지름이 3 cm 내외이고, 마늘처럼 여러 조각들이 들어 있다. 9월에 심으면 10~11월에 10~15 cm 정도로 긴 실 같은 잎이 여러 개 나온다. 꽃은 알뿌리 하나에 2~3송이씩 피는데, 수술은 노란색이고 암술은 한 개이나 3갈래로 갈라져 있는 붉은색이며 향기가 독특하다. 암술은 따서 그늘에 말렸다가 염료나 약용, 음식 재료, 차 등의 향과 색상으로 사용할 수 있다. 이러한 번홍화를 고품질로 생산하는 기술을 개발함으로써 국내 소비를 촉진하고 토속식물의 대량 번식 시스템 개발을 통해 농가의 생산비 절감에 기여할 것이라 기대된다.

따라서 번홍화를 기내 번식하기 위하여 멸균을 위한 소독방법에 대한 실험을 하였다.

##### (2) 재료 및 방법

###### (가) 실험재료 및 멸균 소독방법

식물재료는 아침고요수목원에서 구입해 얻은 번홍화 구근을 이용하였다(Fig. 5-1-1). 구근 표면의 오염을 줄이기 위해 살균제가 포함된 물에 하루 담군 뒤, 핀셋으로 껍질을 벗겼다. 그리고 흐르는 수돗물에서 세척하였다. 껍질이 깨끗이 제거된 구근을 멸균수로 행군 뒤, 클린벤치 안에서 70%(v/v) EtOH로 30초간 소독하였다. 그런 다음, NaOCl을 1, 3, 5%(v/v)로 각각 처리하여 sonication을 10분간 실시하였다. NaOCl의 소독이 끝나면 클린벤치 안에서 멸균수로 각각 5분, 3분, 1분으로 2번씩 세척하였다. 소독이 완료된 구근을 신초 부분만 절단하여 배지에 치상하였다(Fig. 5-1-2).



Fig. 5-1-1. Bulbs used in this experiment.

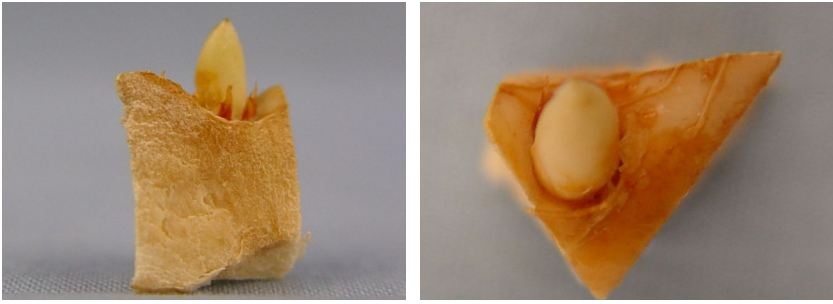


Fig. 5-1-2. Shoot explants inoculated after sterilization.

(나) 배양배지

배지는 MS배지를 기본으로 sucrose 2%(w/v), BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>을 넣은 뒤 pH는 5.79-5.81로 조절하였다. Charcoal 0.1%, agar 0.8%(w/v)을 첨가한 후, test tube에 분주하고 121℃, 1.2기압에서 15분간 고압 멸균하여 사용하였다.

(다) 배양환경

배양기간 중 온도는 25±1℃, 상대습도 70~80%인 배양실에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

(3) 결과 및 고찰

모든 처리구에서 치상 일주일 후부터 오염이 발생하고 결국 전부 곰팡이 오염이 발생하여 죽었다(Fig. 5-1-3).

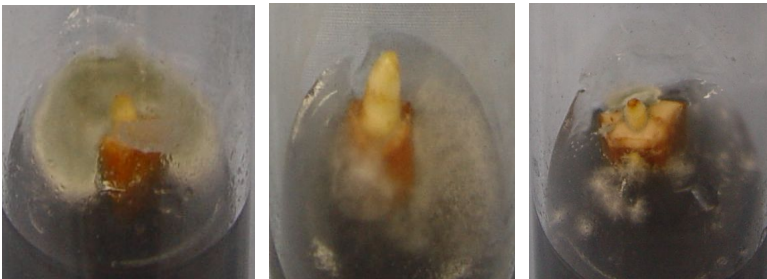


Fig. 5-1-3. Contamination observed on the medium.

나. 변홍화 기내 도입을 위한 멸균방법 실험2

(1) 연구목적

변홍화의 구근을 이용한 실험에서 오염 발생이 심하여 구근을 제외하고 신초만을 이용하여 기내에 도입하는 실험을 진행하였다.

(2) 재료 및 방법

(가) 실험재료 및 멸균 소독방법

변홍화 구근을 소독하기 위하여 흐르는 수돗물에 30분 동안 세척하였다. 구근의 껍질을 벗기고, 다시 흐르는 수돗물에 세척하였다. 1차로 70%(v/v) EtOH을 40초 동안 소독하고 멸균수로 3회 세척하였다. Tween 20 1방울과 3% NaOCl을 넣고 15분 동안 소독하였다. 멸균수로 4-5회 세척하였다. 페트리디시에 소독한 구근을 놓고, 신초가 있는 부분만 잘라내었다. 신초의 가장 바깥쪽 외피를 한 겹 벗겨 내었다. 그리고 2차 소독을 실시하였다. 70%(v/v) EtOH을 20분 동안 소독하고, 멸균수로 3회 세척하였다. Tween 20 1방울과 3% NaOCl을 넣고 5분 동안 소독하고 멸균수로 4-5회 세척하고 신초만 배지에 치상하였다(Fig. 5-1-4).

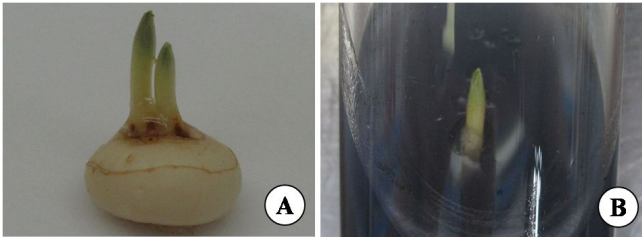


Fig. 5-1-4 Bulbs used in this experiment: A, bulbs and shoots; and B, shoot inoculated onto the medium.

#### (나) 배양배지

기본배지는 MS배지를 이용하였다. sucrose 2%(w/v), BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>을 넣은 뒤 pH는 5.79-5.81로 조절하였다. Charcoal 0.1%, agar 0.8%(w/v)을 첨가한 후, 121℃에서 15분간 고압 멸균 하여 사용하였다.

#### (다) 배양환경

배양기간 중 온도는 25±1℃, 상대습도 70~80%인 배양실에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

오염원을 최소화하기 위하여 구근을 제외하고 신초만을 분리하여 실험을 실시하였다. 치상 후 약 25일이 지났을 때 모든 처리구에서 오염이 발생하였다. 따라서 다른 소독방법을 사용해야 할 것으로 판단된다(Fig. 5-1-5).

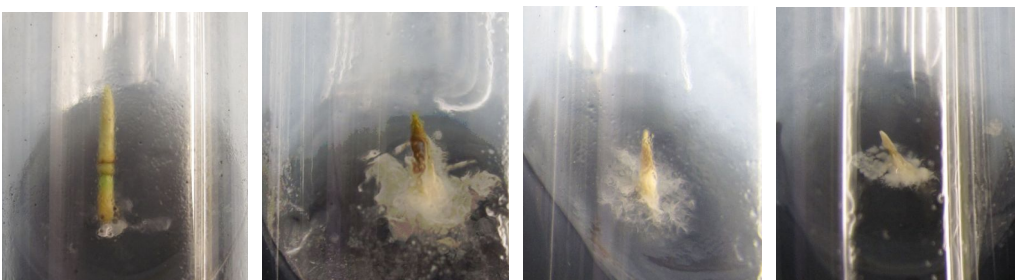


Fig. 5-1-5 Contamination of *C. sativus* observed after 25 days.

변홍화 기내 번식을 위한 멸균 소독방법 실험1과 실험2에서 변홍화를 안정적으로 기내에 놓기 위한 멸균 소독방법에 대한 실험 결과 모두 오염 발생률이 매우 높았다. 향후 다른 소독방법을 이용하여 식물체에 피해가 가장 적으면서 오염 발생률도 낮은 소독 방법을 찾아내고 더 나아가 기내에서 식물체가 더 빠르게 성장할 수 있는 환경을 찾아내는 실험을 수행하여야 할 것이다.

## 다. 변홍화 기내 도입을 위한 멸균방법과 생장조절제 처리 실험

### (1) 연구목적

생장조절제를 이용하여 기내 번식을 통한 변홍화의 대량번식기술 개발에 관한 연구를 실시하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 실험재료 및 멸균 소독방법

변홍화 구근 소독을 위해 흐르는 수돗물에 30분 동안 세척하였다. Tween 20 1방울을 떨어뜨린 후 세척하였다. 1.5%(v/v) NaOCl을 넣고 15분간 소독하고, 멸균수로 2회 세척하였다. 6%(v/v) NaOCl을 10분간 소독하고, 멸균수로 2번 세척하였다. 그리고 70%(v/v) EtOH에 1분 동안 소독하였다. 0.1% HgCl<sub>2</sub>를 넣고 15분간 살균한 후, 멸균수로 3~4회 세척하였다. 소독이 완료된 구근을 생장조절제가 들어 있는 MS배지에 치상하였다(Fig. 5-1-6).

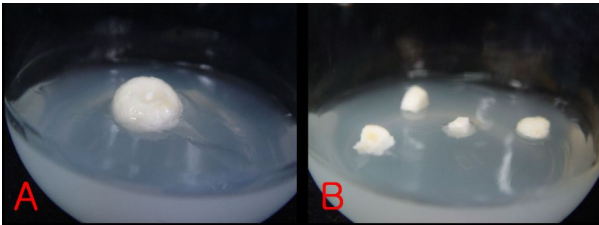


Fig. 5-1-6. Bulbs of *C. sativus* inoculated onto the MS medium supplemented PGRs: A, 3.0 mg·L<sup>-1</sup> BA + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA; and B, 3.0 mg·L<sup>-1</sup> BA + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> IAA.

#### (나) 배양배지

배지로는 MS배지를 사용하였고, 첨가된 생장조절제 처리구는 Table 5-1-1과 같다. sucrose 3%(w/v)와 agar 0.8%(w/v)을 첨가한 후, pH는 5.70~5.80으로 조절하고, 121℃에서 15분간 고압멸균 하여 사용하였다.

Table 5-1-1. PGR concentrations used this experiment.

| Treatment no. | PGR (mg·L <sup>-1</sup> ) |     |     |     |
|---------------|---------------------------|-----|-----|-----|
|               | BAP                       | IAA | TDZ | NAA |
| 1             | 1.0                       | 1.0 | 0   | 0   |
| 2             | 2.0                       | 0.5 | 0   | 0   |
| 3             | 0                         | 0   | 0.5 | 0.1 |
| 4             | 0                         | 0   | 1.0 | 0.1 |
| 5             | 0                         | 0   | 1.5 | 0.6 |
| 6             | 0                         | 0   | 2.0 | 1.5 |

(다) 배양환경

배양기간 중 온도는 25±1℃, 상대습도 70~80%인 배양실에서 광도(PPFD) 명기 16시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 조건하에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

(3) 결과 및 고찰

대부분의 처리구에서 오염이 발생되지 않았다. MS 배지에 BAP 2.0 mg·L<sup>-1</sup> sucrose 6%(w/v)를 넣은 처리구에서는 상태가 좋지 않았고, TDZ 0.5mg·L<sup>-1</sup>와 NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>를 첨가한 MS배지에서는 배가 발생되었다(Table 5-1-2).

Table 5-1-2. Effect of PGRs on number of shoots.

| Conc.(mg·L <sup>-1</sup> ) | No. of shoot buds/explant | No. of bulbs/explant |
|----------------------------|---------------------------|----------------------|
| BAP 1.0 + IAA 1.0          | 1.3 c <sup>z</sup>        | -                    |
| BAP 2.0 + IAA 0.5          | 1.8 bc                    | 4.3 c                |
| TDZ 0.5 + NAA 0.1          | 2.0 b                     | 6.0 a                |
| TDZ 1.0 + NAA 0.1          | 2.3 b                     | 5.5 b                |
| TDZ 1.5 + NAA 0.6          | 3.0 a                     | 4.7 bc               |
| TDZ 2.0 + NAA 1.5          | 1.0 d                     | -                    |

<sup>z</sup>Means followed by same letter(s) within a column are not significantly different ( $P<0.05$ ).

TDZ 1.5 mg·L<sup>-1</sup>와 NAA 0.6 mg·L<sup>-1</sup>를 첨가한 MS배지에서 3개의 작은 싹이 발생하였다 (Fig. 5-1-7). 싹이 발생한 개체는 BAP 0.5 mg·L<sup>-1</sup>을 넣은 MS배지에서 계대배양하여(Fig. 5-1-8) 성공적으로 무균 식물체를 획득 하였고, 차년도 실험을 위하여 배양실에서 배양하고 있다(Fig. 5-1-9).



Fig. 5-1-7. Shoots developed on MS medium.





Fig. 5-1-8. *C. sativus* subcultured on MS medium containing  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA.

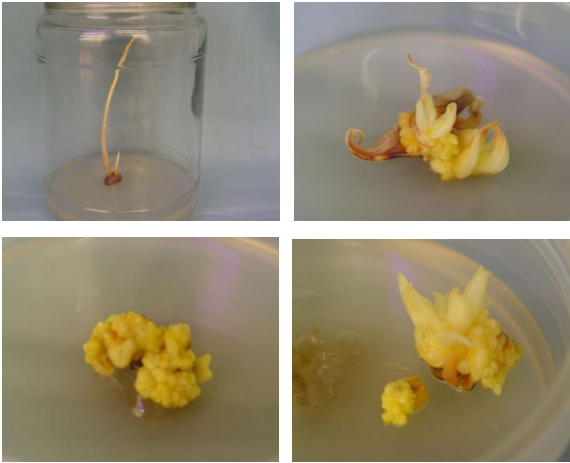


Fig. 5-1-9. *C. sativus* cultured on the MS medium.

## 2. 번홍화(*Crocus sativus* L.)의 직간접적 재분화 조건 확립

### 가. 번홍화 구경과 신초를 이용한 간접적 재분화조건 확립

#### (1) 연구목적

추운 겨울을 이겨내고 입동과 함께 아름다운 꽃을 피우는 번홍화는 다년생 초본성 식물로 관상용과 의학용으로 중요한 식물로 여겨서 현재까지 인기가 계속 이어지고 있다. 분포지역은 아시아의 온난한 지역, 남아프리카, 그리고 유럽지역으로 전 세계적으로 약 85종이 존재한다. 번홍화의 번식은 주로 구경을 이용하지만 노지재배를 할 경우 자구 형성율이 낮기 때문에 대량번식이 어렵다.

조직배양을 이용한 대량번식 기술은 균일한 묘의 대량번식에 중요한 역할을 하며 식물이 병원균에 감염되어 고사하거나 생산성과 품질을 저하시키는 것을 막고 건전한 식물로 대체하여 생산성을 증가시킬 수 있다. 따라서 본 연구는 번홍화의 최적화된 대량번식법을 개발하기 위하여 사이토카이닌(BA와 TDZ)과 옥신의 처리가 식물체 재분화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시하였다.

#### (2) 재료 및 방법

1차년도에 기내에 도입한 번홍화의 대량번식을 위해 기내에서 배양되고 있는 구경을 MS배지에 3% (w/v) sucrose와 0.8% (w/v) agar를 첨가한 후 BA 0.5, 1.0, 2.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 단용과

BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>과 NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 그리고 BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>과 NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>를 혼용으로 각각 처리하였다. 또한 TDZ의 효과를 알아보려고 기내에서 배양되고 있는 구경과 신초를 3% (w/v) sucrose와 0.8% (w/v) agar를 첨가하고, NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>와 TDZ를 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg·L<sup>-1</sup>를 혼용으로 처리하였다. 배지의 pH는 5.70으로 조정하고, 121℃에서 15분간 고압멸균하여 사용하였다. 이때 실험은 3반복으로 처리당 개체수는 25개였고, 배양시작 2달 후부터 번홍화의 재분화를 관찰하였다. 배양기간 중 광도는 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>였고, 1일 16시간 동안 조명하면서 배양하였고, 배양실의 광원으로는 cool-white 형광램프[FL 40EX-W, (주)승산오스람]를, 그리고 배양용기로는 3.7×10<sup>-4</sup>m<sup>3</sup>의 용기(GA7 Magenta box, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)를 사용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

번홍화의 미세번식을 위해 다양한 사이토카이닌과 옥신의 단용 및 혼용처리에 다른 식물체 재분화에 미치는 영향을 관찰한 결과 식물체가 부정신초를 발생하기 보다는 대부분이 체세포 배를 발생하는 경향을 보였다. 먼저 번홍화의 구경에서 BA단용과 BA와 NAA의 혼용처리에서 식물체 재분화는 BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>와 NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>를 혼용으로 처리하였을 때 신초발생율과 절편체당 신초발생수가 높게 나타났다(Table 5-2-1).

Table 5-2-1. Effect of plant growth regulators (PGR) on shoot bud induction from corm explants of *C. vernus*.

| PGR (mg·L <sup>-1</sup> ) |     | Shoot induction (%) | No. of shoots/explant |
|---------------------------|-----|---------------------|-----------------------|
| BA                        | NAA |                     |                       |
| 0                         | 0   | 0                   | 0                     |
| 0.5                       | 0   | 72.8 e              | 1.3 d                 |
| 1.0                       | 0   | 80.3 d              | 1.8 cd                |
| 2.0                       | 0   | 86.0 c              | 2.0 c                 |
| 1.0                       | 0.5 | 91.0 b              | 3.0 b                 |
| 2.0                       | 0.5 | 94.2 a              | 4.3 a                 |

Means followed by same letter(s) within a column are not significantly different ( $P < 0.05$ ).

두 번째로 TDZ와 NAA의 혼용처리에서는 구경과 신초 모두 체세포배가 정상적으로 발달하였고, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ와 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA에서 발생율이 구경이 97.0% 신초가 100%로 가장 높았다(Table 5-2-2). TDZ는 목본류 및 초본류에서 강력한 사이토카이닌의 효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며 낮은 농도에서도 분열조직의 형성 및 신초증식을 촉진시키는 효과가 있다.

본 연구에서도 비교적 낮은 농도인 0.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ의 처리 시 가장 왕성하게 체세포배가 발생하는 것으로 나타났다.

Table 5-2-2. Effect of combination of TDZ and NAA on somatic embryo induction from corm and shoot tip explants of *C. vernus*.

| TDZ (mg·L <sup>-1</sup> ) | Somatic embryo induction (%) |           |
|---------------------------|------------------------------|-----------|
|                           | Corm                         | Shoot bud |
| 0.1                       | 78.2 d                       | 92.0 c    |
| 0.5                       | 97.0 a                       | 100.0 a   |
| 1.0                       | 90.3 b                       | 96.4 b    |
| 2.0                       | 88.9 c                       | 89.0 d    |

Means followed by same letter(s) within a column are not significantly different ( $P < 0.05$ ).

Fig. 5-2-1은 구경과 신초로부터 발생된 체세포배 발생의 모습으로 체세포배는 자엽단계를 거쳐 정상적으로 소식물체로 발달하였다(Sivanesan et al., 2011). 이와 같은 체세포배로부터 많은 신초를 유도한다면 대량증식이 가능하므로 대량의 체세포배발달에 적합한 배지를 구명하는 연구가 필요하다.

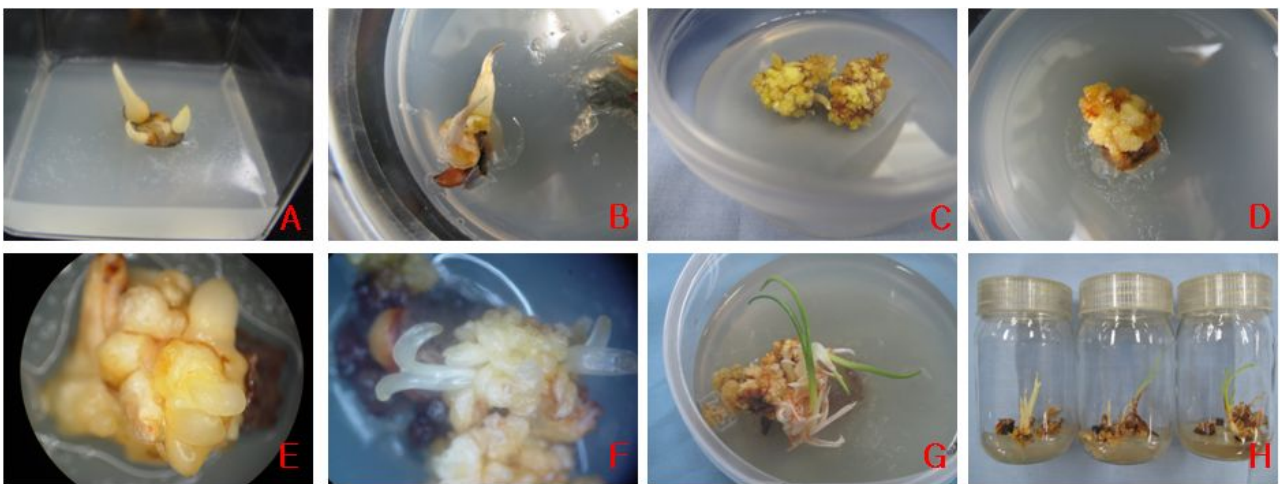


Fig. 5-2-1. Direct shoot regeneration and somatic embryogenesis of *C. vernus*. A, shoot regeneration from corm explants; B and C, somatic embryo formation from shoot tip explants of *C. vernus* after 45 days of culture; D and E, somatic embryo formation from corm explants of *C. vernus*; F, cotyledonary stage; and G and H, somatic embryos germinated.

#### 나. Murashige and Skoog(MS) 배지에서 온도에 따른 재분화 조건 확립

##### (1) 연구목적

번홍화 재분화에 최적화된 조건을 찾기 위하여 여러 가지 배지 중 조직배양에서 가장 널리 쓰이는 MS배지에서 온도 차이가 식물체 재분화에 미치는 영향에 대해 조사하였다.

##### (2) 재료 및 방법

기내에 도입된 변홍화의 체세포배를 이용하여 식물체 재분화 연구를 수행하였다. 실험에 사용된 모든 배지는 MS배지에 3%(w/v) sucrose와 0.8%(w/v) agar를 첨가한 후, pH를 NaOH와 HCl을 이용하여 5.70으로 조정하고, 121℃에서 15분간 고압멸균 하여 사용하였다. 온도가 식물체 재분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 절편체를 2.0 mg·L<sup>-1</sup> BA, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 그리고 1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>가 첨가된 배지에 치상한 후 15와 25℃로 각각 나누어 배양하였다. 이때 처리당 개체수는 25개였고, 배양시작 2달 후부터 변홍화의 재분화를 관찰하였다. 배양기간 중 광도는 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>였고, 1일 16시간 동안 조명하면서 배양하고, 배양실의 광원으로는 cool-white 형광램프[FL 40EX-W, (주)승산오스람]를, 그리고 배양용기로는 3.7×10<sup>-4</sup> m<sup>3</sup>의 용기(GA7 Magenta box, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)를 사용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

MS배지에서 온도에 따른 체세포배 발생율의 영향을 살펴보기 위해 기내에서 발생된 체세포배를 15와 25℃ 체세포배 발생배지(2.0 mg·L<sup>-1</sup> BA, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 그리고 1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>)에서 조사한 결과 15℃의 낮은 온도에서 신초의 발생율이 25℃보다 높은 것을 볼 수 있었다. 하지만 신초에서의 발근은 모든 온도에서 발생되지 않았다(Table 5-2-3).

Table 5-2-3. Effect of temperature on shoot and root induction from somatic embryos of *C. vernus* germinated on the MS medium.

| Temp. (°C) | Shoot induction    | Root induction |
|------------|--------------------|----------------|
| 15         | +++++ <sup>z</sup> | -              |
| 25         | +++                | -              |

<sup>z</sup>+++++, very good; +++, medium; and -, absent.

Fig. 5-2-2은 MS배지에서 온도에 따른 체세포배의 모습으로 15℃에서 발생된 체세포배가 정상적으로 발달하여 신초를 발생하였지만, 25℃에서는 발생된 신초의 생장이 느리고, 몇몇은 고사되는 현상을 볼 수 있었다. 따라서 MS배지에서 변홍화의 체세포배를 발생시키고 성장시키기 위해서는 25℃보다는 15℃와 같은 낮은 온도가 더 적절한 것으로 생각된다.

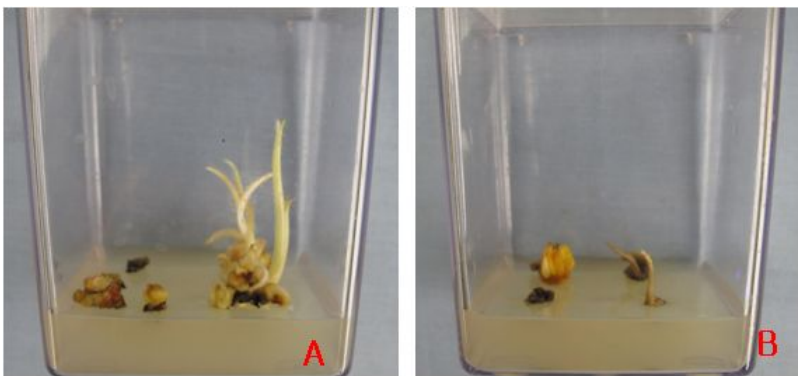


Fig. 5-2-2. Somatic embryos of *C. vernus* developed at 15°C (A) and 25°C (B).

## 다. Gamborg(B5) 배지에서 온도에 따른 재분화 조건 확립

### (1) 연구목적

번홍화 재분화에 최적화된 조건을 찾기 위하여 B5배지에서 온도 차이가 식물체 재분화에 미치는 영향에 대해 조사하였다.

### (2) 재료 및 방법

기내에 도입된 번홍화의 체세포배를 이용하여 식물체 재분화 연구를 수행하였다. 실험에 사용된 모든 배지는 B5배지에 3%(w/v) sucrose와 0.8%(w/v) agar를 첨가한 후, pH를 NaOH와 HCl을 이용하여 5.70으로 조정하고, 121℃에서 15분간 고압멸균 하여 사용하였다. 온도가 식물체 재분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 절편체를  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA, 그리고  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>가 첨가된 배지에 치상한 후 15와 25℃로 각각 나누어 배양하였다. 이때 처리당 개체수는 25개였고, 배양시작 2달 후부터 번홍화의 재분화를 관찰하였다. 배양기간 중 광도는  $45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 였고, 1일 16시간 동안 조명하면서 배양하고, 배양실의 광원으로는 cool-white 형광램프[FL 40EX-W, (주)승산오스람]를, 그리고 배양용기로는  $3.7\times 10^{-4} \text{ m}^3$ 의 용기(GA<sub>7</sub> Magenta box, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)를 사용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

B5배지에서 온도에 따른 체세포배 발생율의 영향을 살펴보기 위해 기내에서 발생된 체세포배를 15와 25℃ 체세포배 발생배지( $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA, 그리고  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>)에서 조사한 결과 15℃가 25℃보다 신초는 작게 발생하였지만, 15℃에서는 발생된 신초가 정상적으로 발생하여 완전한 식물체의 모습으로 발달하였다. 또한 신초로부터의 뿌리도 15℃에서는 발생하지만 25℃에서는 발생되지 않았다(Table 5-2-4).

Table 5-2-4. Effect of temperature on shoot and root induction from somatic embryos of *C. vernus* germinated on the B5 medium.

| Temp. (°C) | Shoot induction  | Root induction |
|------------|------------------|----------------|
| 15         | +++ <sup>z</sup> | +              |
| 25         | ++++             | -              |

<sup>z</sup>++++, good; +++, medium; +, present; and -, absent.

Fig. 5-2-3은 B5배지에서 온도에 따른 체세포배의 모습으로 15℃에서 발생된 체세포배가 정상적으로 발달하여 빠르게 신초를 발생하였지만, 25℃에서는 발생된 신초의 생장이 느리고, 몇몇은 고사되는 현상을 볼 수 있었다. 따라서 B5배지에서 번홍화의 체세포배를 발생시키고 성장시키기 위해서는 25℃보다는 15도와 같은 낮은 온도가 더 적절한 것으로 생각된다.

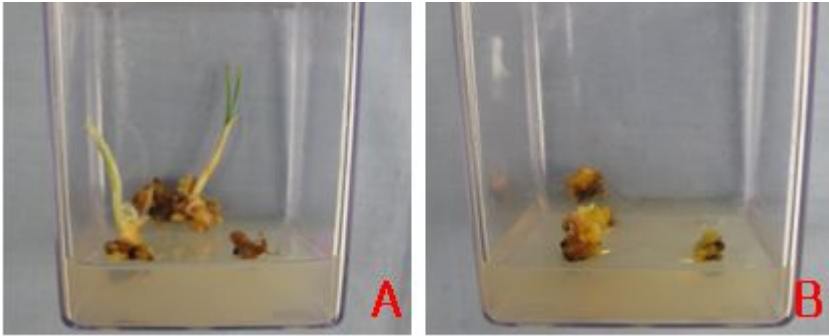


Fig. 5-2-3. Somatic embryos of *C. vernus* developed at 15°C (A) and 25°C (B).

#### 라. Schenk and Hilderbrandt(SH) 배지에서 온도에 따른 재분화 조건 확립

##### (1) 연구목적

번홍화 재분화에 최적화된 조건을 찾기 위하여 SH배지에서 온도 차이가 식물체 재분화에 미치는 영향에 대해 조사하였다.

##### (2) 재료 및 방법

기내에 도입된 번홍화의 체세포배를 이용하여 식물체 재분화 연구를 수행하였다. 실험에 사용된 모든 배지는 SH배지에 3%(w/v) sucrose와 0.8%(w/v) agar를 첨가한 후, pH를 NaOH와 HCl을 이용하여 5.70으로 조정하고, 121°C에서 15분간 고압멸균 하여 사용하였다. 온도가 식물체 재분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 질핀체를  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA, 그리고  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>가 첨가된 배지에 치상한 후 15와 25°C로 각각 나누어 배양하였다. 이때 처리당 개체수는 25개였고, 배양시작 2달 후부터 번홍화의 재분화를 관찰하였다. 배양기간 중 광도는  $45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 였고, 1일 16시간 동안 조명하면서 배양하고, 배양실의 광원으로는 cool-white 형광램프[FL 40EX-W, (주)승산오스람]를, 그리고 배양용기로는  $3.7\times 10^{-4}\text{m}^3$ 의 용기(GA7 Magenta box, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)를 사용하였다.

##### (3) 결과 및 고찰

SH배지에서 온도에 따른 체세포배 발생율의 영향을 살펴보기 위해 기내에서 발생된 체세포배를 15와 25°C 체세포배 발생배지( $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA, 그리고  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>)에서 조사한 결과 앞의 MS배지와 마찬가지로 15°C의 낮은 온도에서 신초의 발생율이 25°C보다 높은 것을 볼 수 있었다. 하지만 앞의 두 MS와 B5배지의 신초 발생 수보다는 다소 낮은 신초발생수를 보였으며 신초로부터의 뿌리도 15°C에서는 발생하지만 25°C에서는 발생되지 않았다(Table 5-2-5).

Table 5-2-5. Effect of temperature on shoot and root induction from somatic embryos of *C. vernus* germinated on the B5 medium.

| Temp. (°C) | Shoot induction | Root induction |
|------------|-----------------|----------------|
| 15         | ++ <sup>z</sup> | +              |
| 25         | +               | -              |

<sup>z</sup>++, poor; +, present; and -, absent.

SH배지에서 온도에 따른 체세포배의 모습으로 15°C에서 발생된 체세포배가 정상적으로 발달하여 빠르게 신초를 발생하였지만, 25°C에서는 발생된 신초의 생장이 느리고, 몇몇은 고사되는 현상을 볼 수 있었다(Fig. 5-2-4).

따라서 SH배지에서 번홍화의 체세포배를 발생시키고 성장시키기 위해서는 25°C보다는 15도와 같은 낮은 온도가 더 적절한 것으로 생각된다.

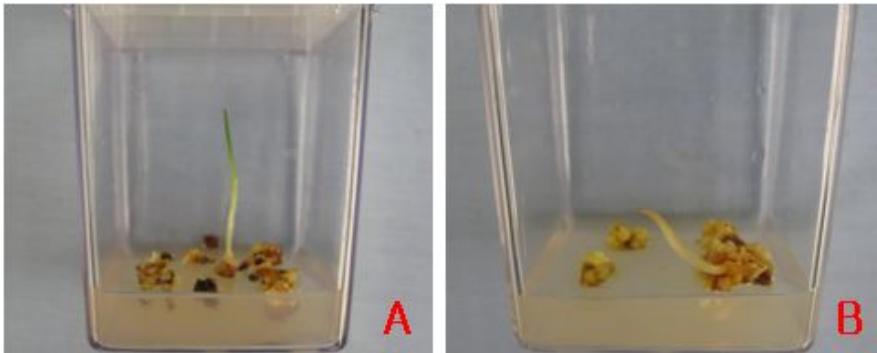


Fig. 5-2-4. Somatic embryos of *C. vernus* developed at 15°C (A) and 25°C (B).

#### 마. Anderson's(AM) 배지에서 온도에 따른 재분화 조건 확립

##### (1) 연구목적

Anderson배지는 진달래과 조직배양에 이용되는 배지로, 앞서 사용한 MS배지보다 이온의 농도가 낮은 것이 특징이다. 따라서 기내에 들어간 번홍화의 절편체의 생존율이 높아질 것으로 기대하고, 최적화된 재분화 조건을 찾기 위하여 AM배지에서 온도 차이가 식물체 재분화에 미치는 영향에 대해 조사하였다.

##### (2) 재료 및 방법

기내에 도입된 번홍화의 체세포배를 이용하여 식물체 재분화 연구를 수행하였다. 실험에 사용된 모든 배지는 AM배지에 3%(w/v) sucrose와 0.8%(w/v) agar를 첨가한 후, pH를 NaOH와 HCl을 이용하여 5.70으로 조정하고, 121°C에서 15분간 고압멸균 하여 사용하였다. 온도가 식물체 재분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 절편체를 2.0 mg·L<sup>-1</sup> BA, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 그리고 1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>가 첨가된 배지에 치상한 후 15와 25°C로 각각 나누어 배양하였다. 이때 처리당 개체수는 25개였고, 배양시작 2달 후부터 번홍화의 재분화를 관찰하였다. 배양기간 중 광

도는  $45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 였고, 1일 16시간 동안 조명하면서 배양하고, 배양실의 광원으로는 cool-white 형광램프[FL 40EX-W, (주)승산오스람]를, 그리고 배양용기로는  $3.7\times 10^{-4}\text{m}^3$ 의 용기 (GA7 Magenta box, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)를 사용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

AM배지에서 온도에 따른 체세포배 발생율의 영향을 살펴보기 위해 기내에서 발생된 체세포배 15와 25°C 체세포배 발생배지( $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA, 그리고  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>)에서 조사한 결과 앞의 MS배지와 마찬가지로 15°C의 낮은 온도에서 신초의 발생율이 25°C보다 높은 것을 볼 수 있었다. 하지만 앞의 두 MS와 B5배지보다는 다소 낮은 신초발생수를 보였고, 신초에서의 발근은 모든 온도에서 발생되지 않았다(Table 5-2-6).

Table 5-2-6. Effect of temperature on shoot and root induction from somatic embryos of *C. vernus* germinated on the B5 medium.

| Temp. (°C) | Shoot induction | Root induction |
|------------|-----------------|----------------|
| 15         | ++ <sup>z</sup> | -              |
| 25         | -               | -              |

<sup>z</sup>++, poor; and -, absent.

Fig. 5-2-5는 AM배지에서 온도에 따른 체세포배의 모습으로 15와 25°C모두에서 낮은 체세포배 발생을 나타내었고, 그중 25°C에서는 체세포배가 전혀 발생되지 못하고 고사하는 것을 볼 수 있었다. 따라서 SH배지에서 번홍화의 체세포배를 발생시키고 성장시키기 위해서는 25°C보다는 15도와 같은 낮은 온도가 더 적절한 것으로 생각된다.

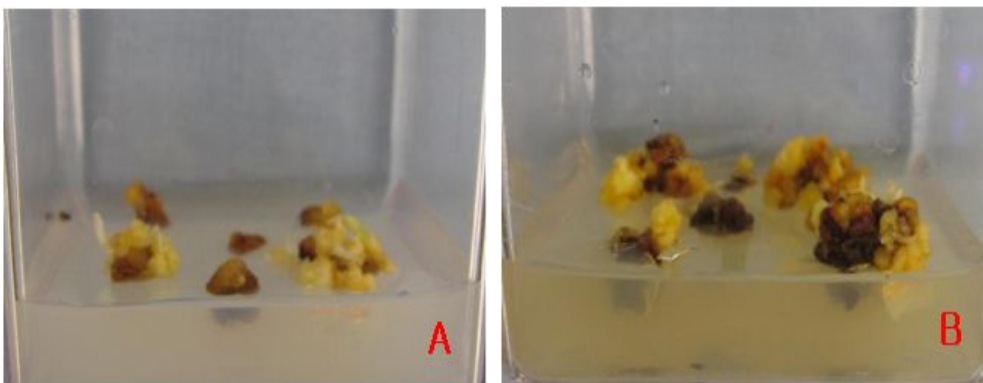


Fig. 5-2-5. Somatic embryos of *C. vernus* developed at 15°C (A) and 25°C (B).

## 사. Chu medium(N6) 배지에서 온도에 따른 재분화 조건 확립

### (1) 연구목적

N6배지는 배의 약으로부터 캘러스를 형성하기 위하여 만들어진 배지로 재분화효율이 매우 높다고 알려져 있다. 따라서 기내에 들어간 번홍화의 절편체의 생존율이 높아질 것으로 기대하



고, 최적화된 재분화 조건을 찾기 위하여 N6배지에서 온도 차이가 식물체 재분화에 미치는 영향에 대해 조사하였다.

### (2) 재료 및 방법

기내에 도입된 번홍화의 체세포배를 이용하여 식물체 재분화 연구를 수행하였다. 실험에 사용된 모든 배지는 N6배지에 3%(w/v) sucrose와 0.8%(w/v) agar를 첨가한 후, pH를 NaOH와 HCl을 이용하여 5.70으로 조정하고, 121°C에서 15분간 고압멸균 하여 사용하였다. 온도가 식물체 재분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 절편체를  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA, 그리고  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>가 첨가된 배지에 치상한 후 15와 25°C로 각각 나누어 배양하였다. 이때 처리당 개체수는 25개였고, 배양시작 2달 후부터 번홍화의 재분화를 관찰하였다. 배양기간 중 광도는  $45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 였고, 1일 16시간 동안 조명하면서 배양하고, 배양실의 광원으로는 cool-white 형광램프[FL 40EX-W, (주)승산오스람]를, 그리고 배양용기로는  $3.7\times 10^{-4}\text{m}^3$ 의 용기(GA7 Magenta box, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)를 사용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

N6배지에서 온도에 따른 체세포배 발생율의 영향을 살펴보기 위해 기내에서 발생된 체세포배를 15와 25°C 체세포배 발생배지( $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA, 그리고  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>)에서 조사한 결과 앞의 N6배지와 마찬가지로 15°C의 낮은 온도에서 싹의 발생율이 25°C보다 높은 것을 볼 수 있었다. 하지만 앞의 두 N6와 B5배지보다는 다소 낮은 싹발생수를 보였고, 싹에서의 발근은 모든 온도에서 발생되지 않았다(Table 5-2-7).

Table 5-2-7. Effect of temperature on shoot and root induction from somatic embryos of *C. vernus* germinated on the B5 medium.

| Temp. (°C) | Shoot induction | Root induction |
|------------|-----------------|----------------|
| 15         | ++ <sup>z</sup> | -              |
| 25         | +               | -              |

<sup>z</sup>++, poor; +, present; and -, absent.

Fig. 5-2-6은 N6배지에서 온도에 따른 체세포배의 모습으로 15와 25°C모두에서 낮은 체세포배 발생을 나타내었고, 그중 25°C에서는 체세포배가 전혀 발생되지 못하고 고사하는 것을 볼 수 있었다. 따라서 SH배지에서 번홍화의 체세포배를 발생시키고 성장시키기 위해서는 25°C보다는 15°C와 같은 낮은 온도가 더 적절한 것으로 생각된다.

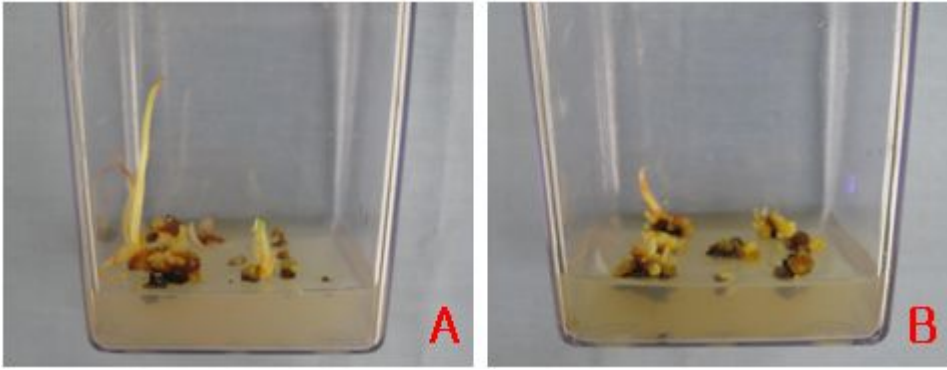


Fig. 5-2-6. Somatic embryos of *C. vernus* developed at 15°C (A) and 25°C (B).

Fig. 5-2-7은 배지에 절편체를 치상한 4달 후 각 배지에서 발생된 번홍화의 체세포배 발생 모습으로 15°C에 비해 25°C에서 배지의 색이 검정색으로 변하는 현상을 발견할 수 있었다. 많은 식물은 삼출물에 의해서 자가 독성을 나타낸다는 사실이 잘 알려져 있다. 특히 삼출물은 배지의 변색의 원인이 되고 이것은 절편체에 피해를 주는 것으로 볼 수 있다. 배지속의 삼출물 속에는 페놀성 화합물, 아미노산, 단백질, 탄수화물, 유기산 및 알칼로이드가 있는데 이중 페놀성 물질로는 탄닌, 플라보노이드, 그리고 유리페놀이 있다. 이중에서 절편에 피해를 입히는 것은 유리페놀보다 플라보노이드의 작용이 크다. 이와 같이 식물체의 생장을 억제하여 최종적으로는 식물체를 왜성으로 하거나 죽게 할 수 있는 배지의 변색이 25°C에서 일어나는 현상에 대해서 좀 더 연구가 진행되어야 하겠다.

또한 15°C가 25°C에 비해 체세포배 형성이 활발하게 나타나는 것을 볼 수 있는데, 특히 MS 배지에서는 15°C에서는 발생된 신초로부터 신초가 활발히 성장하는 반면에 25°C에서는 아주 작은 체세포배만이 형성되고 신초로 자라는데 아주 오랜 시간이 소요되었다. B5배지도 15°C에서는 신초로부터 뿌리의 발생이 잘 이루어 졌지만, 25°C에서는 상태는 좋지만 비교적 작은 체세포배가 발달되었다. SH배지에서도 15°C에서 신초와 체세포배의 형성 및 뿌리발생이 동시에 활발하게 일어났지만, 25°C에서는 발생된 체세포배의 수는 많았지만 성장속도가 아주 느렸다. AM배지에서도 15°C에서 아주 작은 체세포배가 발생하였고, 체세포배로부터 몇몇 신초만 정상적으로 성장할 뿐 나머지는 과수화 현상이 나타났고, 25°C에서는 체세포배만 발달하고 생장이 아주 느렸다. N6배지에서도 15°C에서 다른 배지와 다르게 발생된 체세포배의 색이 초록색으로 변하는 것을 관찰 할 수 있었는데 이와 같은 현상의 원인파악에 대한 연구가 차후 필요할 것으로 생각된다. 또한 25°C는 체세포배와 신초가 함께 발생하였지만 다른 25°C의 배지와 같이 성장속도가 아주 느렸다. 따라서 본 연구에서는 번홍화의 체세포배 발생에 가장 최적화된 배지는 MS배지로 나타났고, 앞으로 다양한 식물생장조절제를 사용하여 체세포배 발달 및 성장을 위한 더 다양한 연구가 진행되어야 한다고 생각한다.

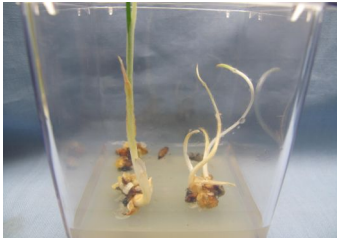
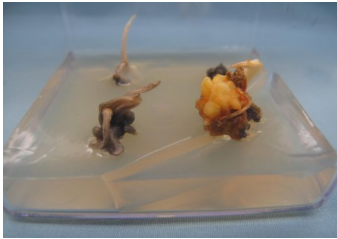




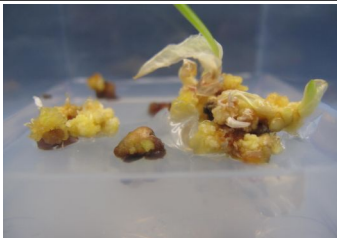
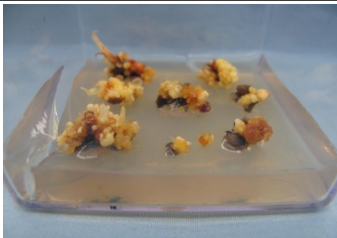
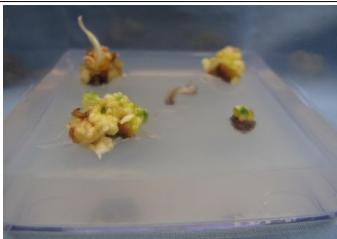
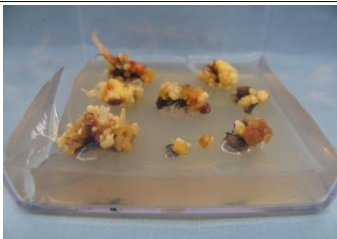
| Medium | Temp. (°C)  |  |
|--------|---|--|
|        | 15  | 25   |
| MS     |    |    |
| B5     |    |    |
| SH     |    |    |
| AM     |  |  |
| N6     |  |  |

Fig. 5-2-7. Somatic embryos of *C. vernus* developed on the MS, B5, SH, AM, and N6 media after 4 months of culture at 15 and 25°C.

### 3. 번홍화(*Crocus sativus* L.) 체세포배 발생을 이용한 식물체 재분화 시스템 개발

#### 가. 번홍화의 체세포배 발생을 위한 적정 식물생장조절제 종류와 농도 구명

##### (1) 연구목적

번홍화는 다년생 초본성 식물로 꽃을 감상하는 관상용과 진정제, 지혈제 등으로 쓰이는 의학용으로도 활용되는 식물로 현재까지 인기가 계속 이어지고 있다. 분포지역은 아시아의 온난한 지역, 남아프리카 및 유럽지역 등이고, 전 세계적으로 약 85종이 존재하며, 온난하고 비가

적은 곳에서 잘 자란다. 번홍화의 번식에는 주로 구경이 이용되지만 노지재배를 할 경우 자구 형성율이 낮기 때문에 대량번식이 어렵다.

번홍화를 대량생산하기 위한 방법으로 체세포배 발생을 유도한 후 체세포배로부터 2차 체세포배를 얻고 이들을 받아시켜 성숙한 식물체를 얻는 방법이 있다. 이와 같은 방법은 우량묘의 대량생산으로 이어지기 때문에 생산성을 증가시킬 수 있다. 하지만 이러한 방법은 아직 연구가 이루어지지 않았기 때문에 체세포배 유도방법과 2차 체세포배 발생 조건, 그리고 체세포배의 발아조건을 알아보기 위하여 먼저 적정 식물생장조절제의 종류와 농도에 대한 실험을 수행하였다.

## (2) 재료 및 방법

### (가) 실험재료 및 멸균 소독방법

온실에서 재배되고 있는 번홍화의 구경을 채취해서 수돗물로 30분 동안 세척하고, 증류수로 헹군 후 70%(v/v) EtOH에 1분간 침지한 다음 멸균수를 이용하여 3회 세척하였다. 그 후 2.0% NaOCl에 넣고 10분 동안 침지하고, 0.01%(w/v) HgCl<sub>2</sub>에 15분 동안 침지한 후 멸균수를 이용하여 3-4회 세척한 후 실험에 사용하였다.

### (나) 배양배지

Anderson's(AM) 배지, B5 배지, MS 배지, 그리고 Chu's(N6) 배지와 같은 여러 가지 배지에 sucrose 3%(w/v)를 넣고, pH는 5.70으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121°C에서 15분간 고압멸균 하여 사용하였다. TDZ는 filtering 후 고압멸균한 배지에 첨가하였다. 다른 식물생장조절제들은 pH를 조절하기 전에 배지에 첨가하였다.

### (다) 배양환경

배양온도는 25±1°C로 설정하였고, 1일 명기 16시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 조건 하에서 배양하였다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프[Philips 40 W tubes]를 이용하였다.

## (3) 결과 및 고찰

번홍화의 구경에서 체세포배를 유도하기 위하여 멸균을 한 구경을 0.5-1cm 크기로 자른 후 MS배지에 0.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ를 기본으로 0.25, 0.5, 1.0 또는 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 농도의 2,4-D를 처리한 배지에 치상하여 배양하였다. 암상태로 14일 동안 배양한 후 명기 16시간/암기 8시간 광주기로 옮겨주었다. 45일 후 각 처리별 체세포배 발생률과 절편체당 체세포배 발생수를 측정하였다 (Table 5-3-1). 2,4-D의 농도가 1.0 mg·L<sup>-1</sup>일 때 체세포배 발생률(74.6%)과 절편체당 체세포배 발생수(52.0)가 가장 높게 나왔다. 특히 절편체당 체세포배 발생수는 다른 처리구에 비해 월등히 높은 수치가 나왔다. 하지만 2,4-D의 농도가 2.0 mg·L<sup>-1</sup>가 되면 체세포배 발생률과 절편체당 체세포배 발생수가 감소했다.

Table 5-3-1. Effect of concentration of 2,4-D plus 0.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ on somatic embryogenesis from the corm explant of *C. vernus* cultured on the MS medium.

| 2,4-D (mg·L <sup>-1</sup> ) | Somatic embryo induction (%) | No. of somatic embryos per explant |
|-----------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| 0.25                        | 49.2 d <sup>z</sup>          | 18.7 c                             |
| 0.50                        | 60.8 c                       | 30.4 b                             |
| 1.00                        | 74.6 a                       | 52.0 a                             |
| 2.00                        | 69.4 b                       | 10.2 d                             |

<sup>z</sup>Means followed by the same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

## 나. 번홍화의 체세포배 발생에 배지의 종류와 광도가 미치는 영향 구명

### (1) 연구목적

배지의 종류와 광도가 번홍화의 체세포배 발생에 미치는 영향에 대한 실험을 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 배양배지

Anderson's(AM) 배지, B5 배지, MS 배지, 그리고 Chu's(N6) 배지에 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ를 첨가하였다. sucrose 3%(w/v)를 넣고, pH는 5.70으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121℃에서 15분간 고압멸균 하여 사용하였다.

#### (나) 배양환경

14일 동안 25±1℃, 암상태로 유지한 후 25±1℃, 1일 명기 16시간 동안 각각 10 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 와 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 광도 조건 하에서 배양하였다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프[Philips 40 W tubes]를 이용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

배지의 종류와 광도가 번홍화의 체세포배 발생에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험을 수행하였다. 배양 45일 후 각 처리별 체세포배 발생률과 절편체당 체세포배 발생수를 측정된 결과 SH배지에서 체세포배 발생률(100%)과 절편체당 체세포배 발생수(124.7개)가 가장 높게 나타났다(Table 5-3-2). 모든 배지에서 10 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 광도 처리구가 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 광도 처리구보다 체세포배 발생률과 절편체당 체세포배 발생수 모두 높은 수치를 보였다(Fig. 5-3-1).

Table 5-3-2. Influence of the medium and light intensity on somatic embryogenesis.

| Culture medium | Somatic embryo induction (%)                              |   | No. of somatic embryos per explant                        |   |
|----------------|---|---|---|---|
|                | Under 10  | Under 45  | Under 10  | Under 45  |
|                | $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ light | $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ light | $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ light | $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ light |
| AM             | 87.4 c <sup>z</sup>                                       | 60.2 c  | 94.7 b  | 66.2 b  |
| B5             | 96.4 a  | 72.2 ab   | 75.3 d  | 41.4 d  |
| MS             | 98.2 a  | 74.6 a  | 82.4 c  | 52.0 c  |
| N6             | 91.8 b  | 59.6 c  | 86.0 c  | 63.7 b  |
| SH             | 100.0 a   | 68.0 b  | 124.7 a   | 73.4 a  |

<sup>z</sup>Means followed by the same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

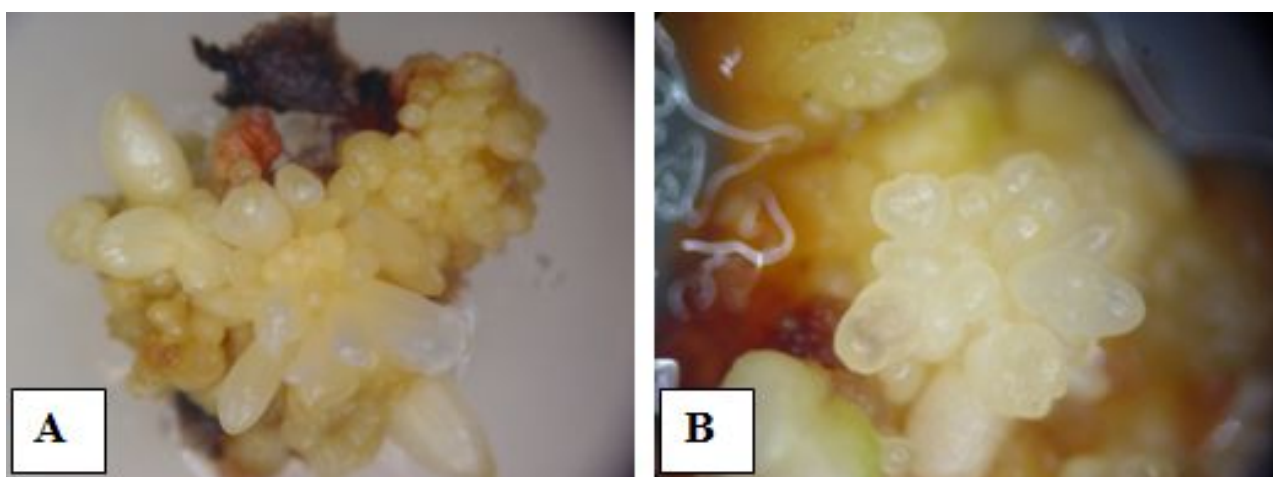


Fig. 5-3-1. Somatic embryos developed from the corm explant on the SH medium containing  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D and  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ after 45 days of culture; (A) under  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD, and (B)  $45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD.

## 다. 변홍화의 2차 체세포배 발생에 미치는 식물생장조절제 종류와 농도 구명

### (1) 연구목적

식물생장조절제가 변홍화의 2차 체세포배 발생에 미치는 영향을 알아보기 위하여 앞선 실험에서 얻은 체세포배를 발생 단계별로 구형, 심장형, 그리고 어뢰형으로 나누어 식물생장조절제 종류와 농도에 대한 실험을 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 배양배지

1.0 혹은 2.0 mg·L<sup>-1</sup>의 2iP, 1.0 혹은 2.0 mg·L<sup>-1</sup>의 BA, 그리고 0.1 혹은 0.5 mg·L<sup>-1</sup>의 NAA를 첨가한 SH 배지에 sucrose 3%(w/v)를 첨가하고, pH는 5.70으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121℃에서 15분간 고압멸균 하여 사용하였다.

#### (나) 배양환경

배양온도는 25±1℃로 설정하였고, 1일 명기 16시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>의 광조건 하에서 배양하였다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프(Philips 40 W tubes)를 이용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

식물생장조절제가 변홍화의 2차 체세포배 발생에 미치는 영향을 알아보기 위하여 앞선 실험에서 얻은 체세포배를 발생 단계별로 구형, 심장형, 그리고 어뢰형으로 나누어 1.0 혹은 2.0 mg·L<sup>-1</sup>의 2iP, 1.0 혹은 2.0 mg·L<sup>-1</sup>의 BA, 그리고 0.1 혹은 0.5 mg·L<sup>-1</sup>의 NAA를 첨가한 배지에 치상하였다. 배양 45일 후 각 처리별 2차 체세포배 발생률과 체세포배당 2차 체세포배 발생수를 측정하였다(Table 5-3-3). 그 결과 BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>와 NAA를 처리한 처리구에서 2차 체세포배 발생률(구형 88.9%; 심장형 95.2%; 어뢰형 55.6%)과 체세포배당 2차 체세포배 발생수(구형 28.0개; 심장형 14.6개; 어뢰형 7.2개)가 가장 높았다(Sivanesan et al., 2012). 전체적으로 2iP를 처리한 구보다 BA를 처리한 구에서 더 높은 수치를 얻었다(Fig. 5-3-2).

Table 5-3-3. Effect of plant growth regulators (PGRs) on secondary somatic embryogenesis (SSE) from primary somatic embryos of *C. vernus* after 45 days of culture on the SH medium.

| PGR (mg·L <sup>-1</sup> ) |     |     | SSE induction (%)  |        |         | No. of secondary somatic embryos induced per primary embryo |         |         |
|---------------------------|-----|-----|--------------------|--------|---------|---|---------|---------|
| ZiP                       | BA  | NAA | Globular           | Heart  | Torpedo | Globular  | Heart   | Torpedo |
| 1.0                       | 0.0 | 0.1 | 0.0 g <sup>z</sup> | 0.0 f  | 0.0 e   | 0.0 f   | 0.0 e   | 0.0 e   |
| 2.0                       | 0.0 | 0.1 | 0.0 g              | 0.0 f  | 0.0 e   | 0.0 f   | 0.0 e   | 0.0 e   |
| 1.0                       | 0.0 | 0.5 | 32.7 f             | 37.5 e | 28.6 d  | 5.7 e   | 4.3 d   | 2.3 c   |
| 2.0                       | 0.0 | 0.5 | 40.4 e             | 62.5 d | 42.9 b  | 9.7 d   | 7.0 c   | 3.6 b   |
| 0.0                       | 1.0 | 0.1 | 52.3 d             | 60.0 d | 38.1 c  | 11.4 c  | 6.2 c   | 1.0 d   |
| 0.0                       | 2.0 | 0.1 | 70.4 b             | 81.2 b | 43.8 b  | 11.0 c  | 9.0 b   | 1.2 d   |
| 0.0                       | 1.0 | 0.5 | 67.5 c             | 75.0 c | 40.7 bc | 18.4 b  | 12.4 ab | 4.0 b   |
| 0.0                       | 2.0 | 0.5 | 88.9 a             | 95.2 a | 55.6 a  | 28.0 a  | 14.6 a  | 7.2 a   |

<sup>z</sup>Means followed by the same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).



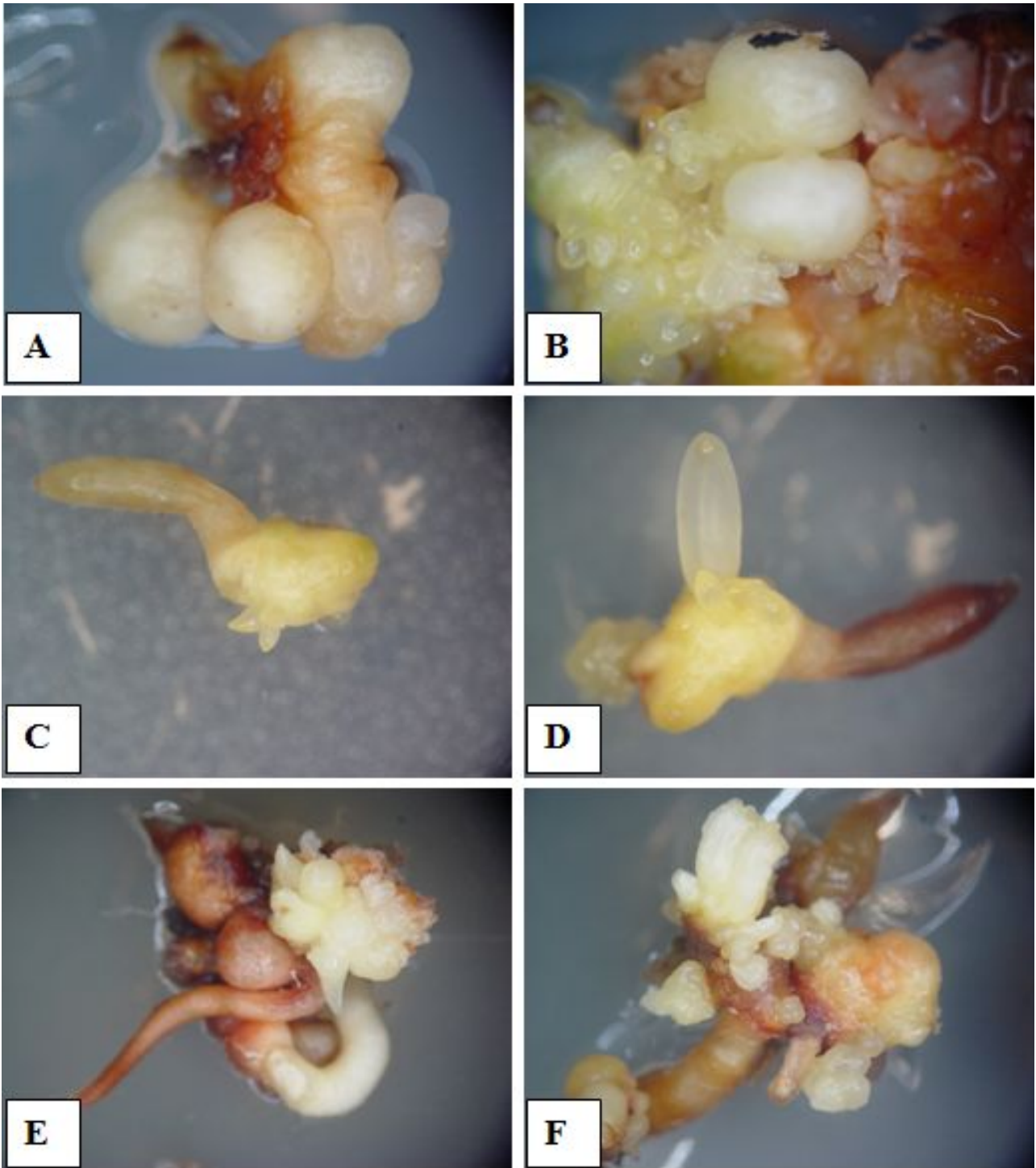


Fig. 5-3-2. Formation of secondary somatic embryos from primary embryos cultured on the SH medium supplemented with  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA and  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA. (A) Primary somatic embryos, (B) secondary embryogenesis from primary somatic embryos, (C and D) induction and development of secondary embryo from torpedo stage embryo, and (E and F) induction and development of secondary embryos from the cotyledonary stage embryo.

## 라. GA<sub>3</sub>가 체세포배의 성숙과 발아에 미치는 영향 구명

### (1) 연구목적

GA<sub>3</sub>가 체세포배의 성숙과 발아에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험을 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 배양배지

0, 0.5, 1.0, 2.0 또는 4.0 mg·L<sup>-1</sup>의 GA<sub>3</sub>가 첨가된 SH 배지에 활성탄 0.3%(w/v)와 sucrose 3%(w/v)를 넣고, pH는 5.70으로 조절하고, agar 0.8% (w/v)를 첨가한 후, 121℃에서 15분간 고압멸균 하여 사용하였다.

#### (나) 배양환경

배양온도는 25±1℃로 설정하였고, 명기 16시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>의 광조건 하에서 배양하였다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프(Philips 40 W tubes)를 이용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

GA<sub>3</sub>가 체세포배의 성숙과 발아에 미치는 영향을 알아보기 위하여 2차 체세포배를 0, 0.5, 1.0, 2.0 또는 4.0 mg·L<sup>-1</sup>의 GA<sub>3</sub>가 들어 있는 SH배지에 치상하였다. 3주일+ 간격으로 계대배양을 하였고, 체세포배의 발아율은 (발아된 체세포배의 수/ 전체 체세포배의 수) x 100으로 계산하였다(Table 5-3-4). GA<sub>3</sub>의 농도가 높아질수록 전환율(발아율)이 증가하다가 1.0 mg·L<sup>-1</sup>에서 가장 높은 전환율(92.3%)을 보였고, 2.0 mg·L<sup>-1</sup>부터 감소하여 4.0 mg·L<sup>-1</sup>에서 전환율(21.0%)이 가장 낮아 대조구보다도 더 낮았다.

Table 5-3-4. Effect of concentration of GA<sub>3</sub> on embryo maturation and conversion.

| GA <sub>3</sub> (mg·L <sup>-1</sup> ) | Conversion (%)      |
|---------------------------------------|---------------------|
| 0.0                                   | 47.1 d <sup>z</sup> |
| 0.5                                   | 66.4 c              |
| 1.0                                   | 92.3 a              |
| 2.0                                   | 83.3 b              |
| 4.0                                   | 21.0 e              |

<sup>z</sup>Means followed by the same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

## 마. 당의 농도가 번홍화 체세포배의 전환(발아)에 미치는 영향 구명

### (1) 연구목적

당의 농도가 번홍화 체세포배의 전환(발아)에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험을 하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 배양배지

SH 배지에 활성탄 0.3%(w/v)와 GA<sub>3</sub> 1.0 mg·L<sup>-1</sup>을 기본으로 0, 15, 30, 60 또는 120 g·L<sup>-1</sup>의 당을 첨가하였다. pH는 5.70으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121℃에서 15분간 고압멸균 하였다.

#### (나) 배양환경

배양온도는 25±1℃로 설정하였고, 1일 명기 16시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>의 광 조건하에서 배양하였다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프(Philips 40 W tubes)를 이용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

당의 농도가 번홍화 체세포배의 전환(발아)에 미치는 영향을 알아보기 위하여 2차 체세포배를 0, 15, 30, 60 또는 120 g·L<sup>-1</sup>의 당이 들어 있는 SH 배지에 치상 후 배양하였다. 체세포배의 전환율(발아된 체세포배의 수/치상한 전체 체세포배의 수) × 100으로 계산하였다(Table 5-3-5). 전환율은 60 g·L<sup>-1</sup>의 당이 들어간 배지에서 가장 높게 나타났고(100%), 당이 들어가지 않은 배지에서는 전혀 전환하지 않았다. 번홍화의 2차 체세포배를 발생시킨 후 전환을 유도하기 위한 배지로 GA<sub>3</sub> 1.0 mg·L<sup>-1</sup>와 60 g·L<sup>-1</sup>의 당이 들어간 SH 배지가 가장 적당했다(Fig. 5-3-3).

Table 5-3-5. Effect of concentration of sucrose on embryo maturation and conversion.

| Sucrose (g·L <sup>-1</sup> ) | Conversion (%)     |
|------------------------------|--------------------|
| 0                            | 0.0 e <sup>z</sup> |
| 15                           | 70.5 c             |
| 30                           | 92.3 b             |
| 60                           | 100.0 a            |
| 120                          | 27.3 d             |

<sup>z</sup>Means followed by the same letters within a column are not significantly different ( $P \leq$

0.05).

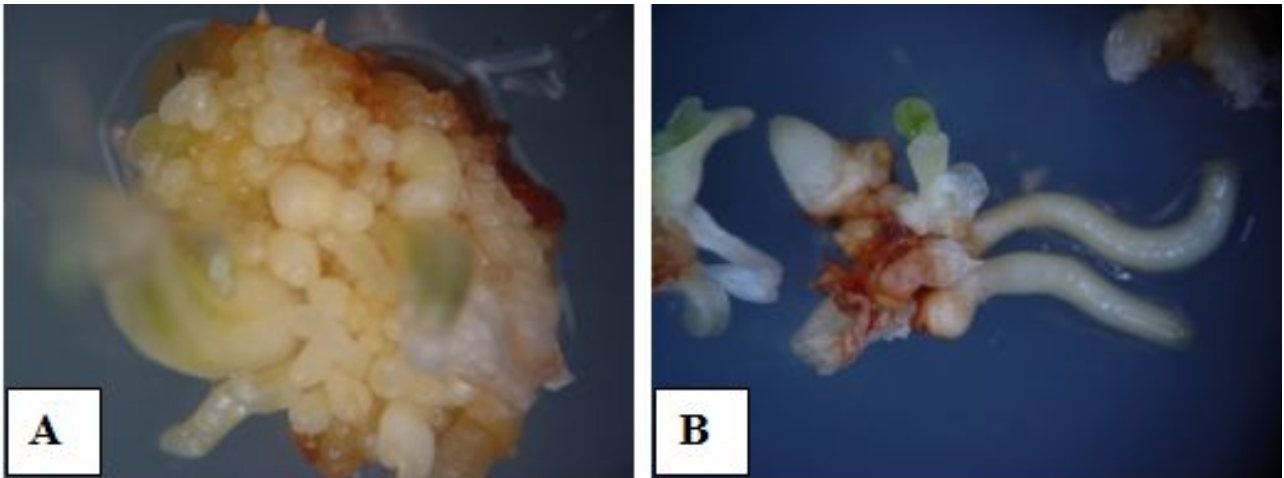


Fig. 5-3-3. Maturation and conversion of somatic embryos on the SH medium supplemented with  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{GA}_3$  and 6% (w/v) sucrose: (A) germination of somatic embryos after 4 weeks of culture and (B) embryo-derived plantlets.

#### 4. 번홍화(*Crocus sativus* L.)의 대량번식

##### 가. 실험재료 확보를 위한 기내대량 번식

##### (1) 연구목적

본 연구는 번홍화의 대량번식법 확립을 위하여 계대배양을 통한 식물체 대량 번식을 시도하기 위해 수행되었다.

##### (2) 재료 및 방법

1차년도에 기내에 도입한 번홍화의 대량번식을 위해 기내에서 배양되고 있는 구경을 MS배지에 3% (w/v) sucrose와 0.8% (w/v) agar를 첨가한 후 절편체는  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA,  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{GA}_3$ 와  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA가 첨가된 배지에 치상한 후 2주 간격으로 식물체를 관찰하였다. 배지의 pH는 5.0으로 조정하고,  $121^\circ\text{C}$ 에서 15분간 고압멸균 하여 사용하고, 2달 간격으로 식물체를 관찰하였다. 배양기간 중 광도는  $45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 였고, 1일 16시간 동안 조명하면서 배양하였고, 배양실의 광원으로는 cool-white 형광램프[FL 40EX-W, (주)승산오스람]를, 그리고 배양 용기로는  $3.7\times 10^{-4}\text{m}^3$ 의 용기(GA7 Magenta box, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)를 사용하였다.

##### (3) 결과 및 고찰

현재까지 발생된 번홍화의 구경을 이용하여 현재 대량번식법 개발을 위해 배양중이다(Fig. 5-4-1). 하지만 성장 속도가 느리고 뿌리가 완전한 식물체로 형성되고 난후 발생하였으므로 대량번식 속도가 느리다. 따라서 저온처리 및 다양한 식물생장조절제를 처리한 대량번식법 개발에 관한 연구가 현재 진행 중이다.

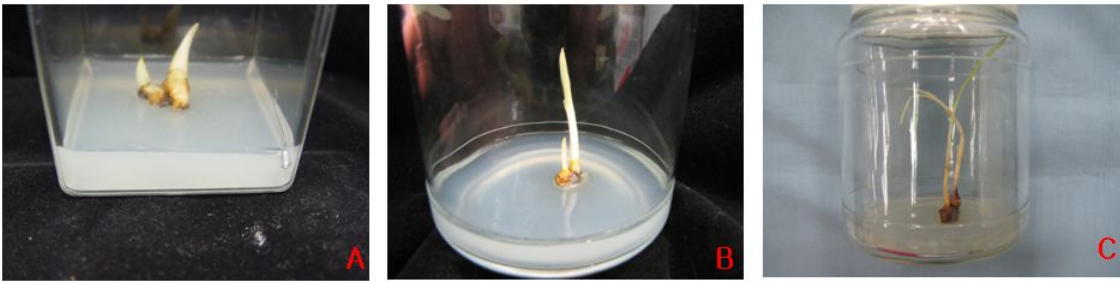


Fig. 5-4-1. *C. sativus* cultured for mass propagation.

## 나. 번홍화(*Crocus sativus* L.)의 구근을 이용한 재분화

### (1) 연구목적

번홍화의 구근 절편체를 이용한 효율적인 재분화 프로토콜을 개발하기 위해 본 연구를 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 실험재료 및 멸균 소독방법

식물재료는 3년생 구근을 구입하여 흐르는 수돗물에 30분 동안 세척한 후 0.1%(v/v) Teepol 로 5분 동안 침지한 후 증류수로 3회 세척하였다. 그 후 무균상태에서 70%(v/v) EtOH에 60초 침지한 후 멸균수로 세척하고 2%(v/v) NaOCl에 10분 동안 소독하여 멸균수로 3회 세척하였다. 그 후 0.01%(w/v) 염화 수은제로 15분 동안 침지한 후 멸균수로 4회 세척하였다.

#### (나) 배양배지

SH배지를 기본배지에 0.3%(w/v) 활성탄, 3%(w/v) sucrose와 0.8%(w/v) agar가 첨가하였다. 성장조절제는 0.25, 0.5, 1.0 or 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D와 0.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ를 조합하여 사용하였다. 배지의 pH는 5.80로 조절하고 121°C, 1.2기압에서 15분간 고압 멸균하였다.

#### (다) 배양환경

배양기간 중 온도는 25±1°C, 상대습도 70-80%인 배양실에서 배양되었다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]를 이용하였다.

#### (라) 성장조절제가 신초 유도에 미치는 영향

0.5-1.0cm의 구근 절편체를 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ가 첨가된 AM, N6, B5, MS, SH배지에 치상하였다. 광도는 10과 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> PPFD로 처리하였다. 체세포배 형성율은 배양 45일 후 배양된 절편체의 총 수로부터 생성된 체세포배를 측정하였다.

#### (마) Sucrose 농도가 microcorm 유도에 미치는 영향

0.5-1.0cm의 구근 절편체를 2.0 mg·L<sup>-1</sup> BA와 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA가 첨가하고 0, 1.5, 3.0, 6.0

12.0%(w/v) sucrose를 첨가하여 SH배지에 치상하였다. Microcorm 유도율은 배양 60일 후 배양된 절편체에서 형성된 구근수를 측정하였다. 절편체당 구근수를 측정하였다.

(바) 순화

배양용기에서 microcorm을 분리하여 멸균수로 남아있는 영양분과 agar를 세척하여 토실이상토가 담긴 순화박스에 이식하였다. 1/4 SH배양액을 매일 관수하였고 온실에서 재배하였다. 순화 4주 후에 발아율을 측정하였다.

(3) 결과 및 고찰

무균상태에서 표면살균은 100%였다. 구근 절편체는 성장조절제가 첨가되지 않은 SH배지에서는 부정신초가 발생하지 않았다. BA와 NAA 첨가가 구근 절편체로부터 유도된 신초에 미치는 영향을 조사하였다(Table 5-4-1). TDZ 농도가 구근과 경정 절편체로부터 유도된 체세포배 발생에 미치는 영향을 Table 5-4-2과 Fig. 5-4-2에 나타나 있다. 세 가지 사이토키닌을 처리한 결과, BA는 신초를 형성하는데 가장 효과적이었다. 신초 유도율은 4.0 mg·L<sup>-1</sup> Kin가 첨가된 SH배지에서 61.3%로 가장 높았다(Table 5-4-3). 절편체당 신초수는 1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA와 BA조합보다 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA와 BA 조합이 더 많았다. 절편체당 신초 유도율은 2.0 mg·L<sup>-1</sup> BA와 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA를 첨가한 SH배지에서 97.2%로 가장 높았다(Table 5-4-4, Fig. 5-4-3A). Microcorm 유도율은 sucrose 함량에 영향을 받았다. Microcorm 유도율은 3.0, 6.0 또는 12.0% sucrose를 첨가한 SH배지에서 각각 32.7, 70.9, 45.5%였다(Table 5-4-5). 절편체 당 microcorm수는 2.0 mg·L<sup>-1</sup> BA와 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 6.0% sucrose를 첨가한 SH배지에서 6.1개로 가장 많았다(Fig. 5-4-4B, C, D). Microcorm은 기내에서 발달된 daughter corm에서 형성되었다(Fig. 5-4-4E). Microcorm을 배양용기에서 꺼내서 토실이가 든 순화박스에 이식하였다. 순화 30일 후 구근의 85%에서 신초와 뿌리가 발달하였다(Fig. 5-4-4F).

Table 5-4-1. Effect of PGR's on shoot bud induction from the corm explants of *C. vernus*.

| Conc. (mg·L <sup>-1</sup> ) |     | Shoot induction (%) | No. of shoots per explant |
|-----------------------------|-----|---------------------|---------------------------|
| BA                          | NAA |                     |                           |
| 0.0                         | 0.0 | 0.0 f <sup>z</sup>  | 0.0                       |
| 0.5                         | 0.0 | 72.8 e              | 1.3 d                     |
| 1.0                         | 0.0 | 80.3 d              | 1.8 cd                    |
| 2.0                         | 0.0 | 86.0 c              | 2.0 c                     |
| 1.0                         | 0.5 | 91.0 b              | 3.0 b                     |
| 2.0                         | 0.5 | 94.2 a              | 4.3 a                     |

<sup>z</sup>Means followed by same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

Table 5-4-2. Effect of concentration of TDZ plus 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA on somatic embryo induction from the corm and shoot tip explants of *C. vernus*.

| Conc. (mg·L <sup>-1</sup> ) | Somatic embryo induction (%) |           |
|-----------------------------|------------------------------|-----------|
|                             | Corm                         | Shoot bud |
| 0.1                         | 78.2 d <sup>z</sup>          | 92.0 c    |
| 0.5                         | 97.0 a                       | 100.0 a   |
| 1.0                         | 90.3 b                       | 96.4 b    |
| 2.0                         | 88.7 c                       | 89.0 d    |

<sup>z</sup>Means followed by same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

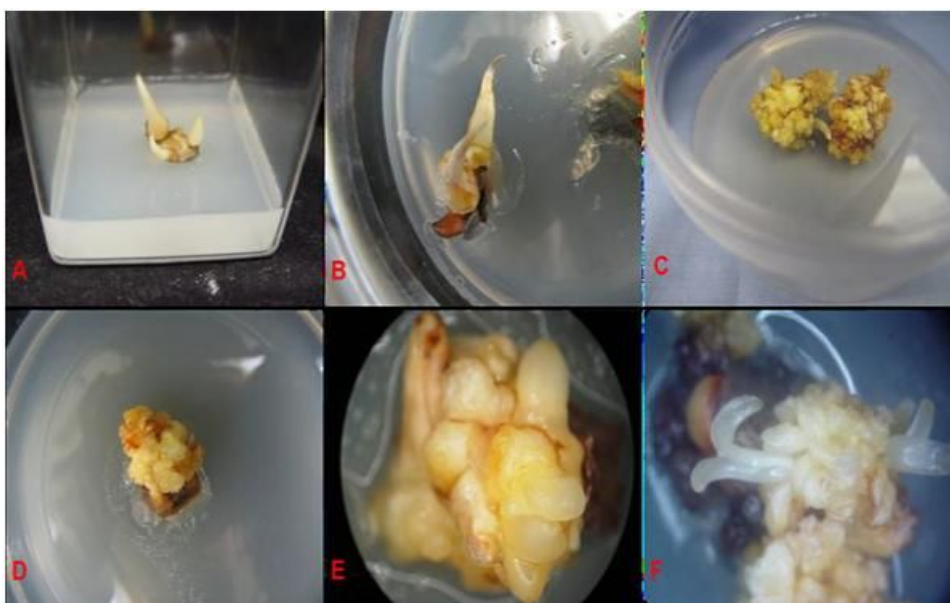


Fig. 5-4-2. Direct shoot regeneration and somatic embryogenesis of *C. vernus*. Shoot regeneration from the corm explants after 45 days of culture (A); somatic embryo formation from the shoot tip explants after 45 days of culture (B, C); somatic embryo formation from the corm explants after 45 days (D, E); and cotyledonary stage embryos (F).

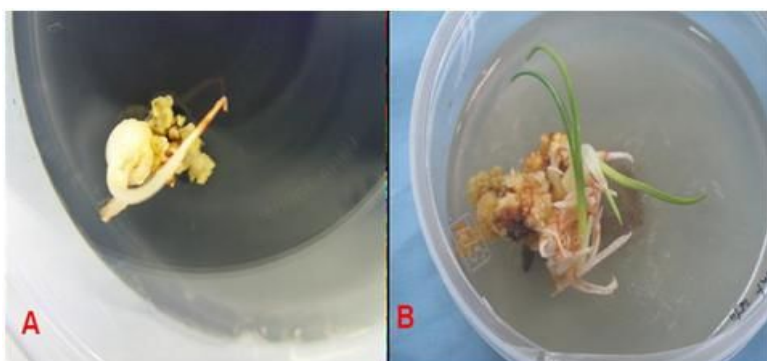


Fig. 5-4-3. Effect of BA and GA<sub>3</sub> on microcorm induction and plant regeneration of *C. vernus*: Microcorm induction (A); and somatic embryos germinated on the MS medium

containing 6% (w/v) sucrose, 2.0 mg·L<sup>-1</sup> BA, and 1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> (B).

Table 5-4-3. Effect of cytokinin on shoot induction from the corm explants of *C. vernus* after 45 days of culture.

| Conc.<br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | Shoot induction (%)    |            |            | No. of shoots per explant |           |            |
|--------------------------------|------------------------|------------|------------|---------------------------|-----------|------------|
|                                | ZiP                    | BA         | Kin        | ZiP                       | BA        | Kin        |
| 0.0                            | 0.0±0.0 e <sup>z</sup> | 0.0±0.0 e  | 0.0±0.0 e  | 0.0±0.0 c                 | 0.0±0.0 d | 0.0±0.0 c  |
| 0.5                            | 44.3±3.2 d             | 65.2±2.4 d | 34.2±2.8 d | 1.1±0.1 b                 | 2.1±0.9 c | 1.1±0.3 b  |
| 1.0                            | 55.5±2.1 c             | 84.0±3.0 b | 41.8±2.2 c | 1.7±0.8 ab                | 3.6±1.7 b | 1.5±0.7 b  |
| 2.0                            | 72.2±2.5 a             | 93.0±2.0 a | 54.8±2.3 b | 2.0±0.7 a                 | 5.8±1.0 a | 2.1±0.6 ab |
| 4.0                            | 62.7±3.8 b             | 72.8±2.5 c | 61.3±2.5 a | 1.4±0.5 b                 | 2.4±0.5 c | 2.8±0.6 a  |

<sup>z</sup>Means followed by same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

Table 5-4-4. Effect of concentration and combination of BA and NAA on shoot induction from the corm explants of *C. vernus* after 45 days of culture.

| PGR (mg·L <sup>-1</sup> ) |     | Shoot induction (%)     | No. of shoots per explant |
|---------------------------|-----|-------------------------|---------------------------|
| BA                        | NAA |                         |                           |
| 1.0                       | 0.5 | 93.1±2.3 b <sup>z</sup> | 7.4±1.5 b                 |
| 2.0                       | 0.5 | 97.2±1.3 a              | 11.8±2.0 a                |
| 1.0                       | 1.0 | 90.2±1.8 c              | 5.1±0.9 c                 |
| 2.0                       | 1.0 | 95.2±1.5 ab             | 6.6±1.4b c                |

<sup>z</sup>Means followed by same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

Table 5-4-5. Effect of concentration of sucrose on microcorm induction from the corm explants of *C. vernus* after 60 days of culture.

| Sucrose (%) | Microcorm induction (%) | No. of corms per explant |
|-------------|-------------------------|--------------------------|
| 0.0         | 0.0±0.0 d <sup>z</sup>  | 0.0±0.0 d                |
| 1.5         | 0.0±0.0 d               | 0.0±0.0 d                |
| 3.0         | 32.7±5.1 c              | 3.3±1.1 c                |
| 6.0         | 70.9±2.6 a              | 6.1±1.7 a                |
| 12.0        | 45.5±3.7 b              | 4.2±1.5 b                |

<sup>z</sup>Means followed by same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).



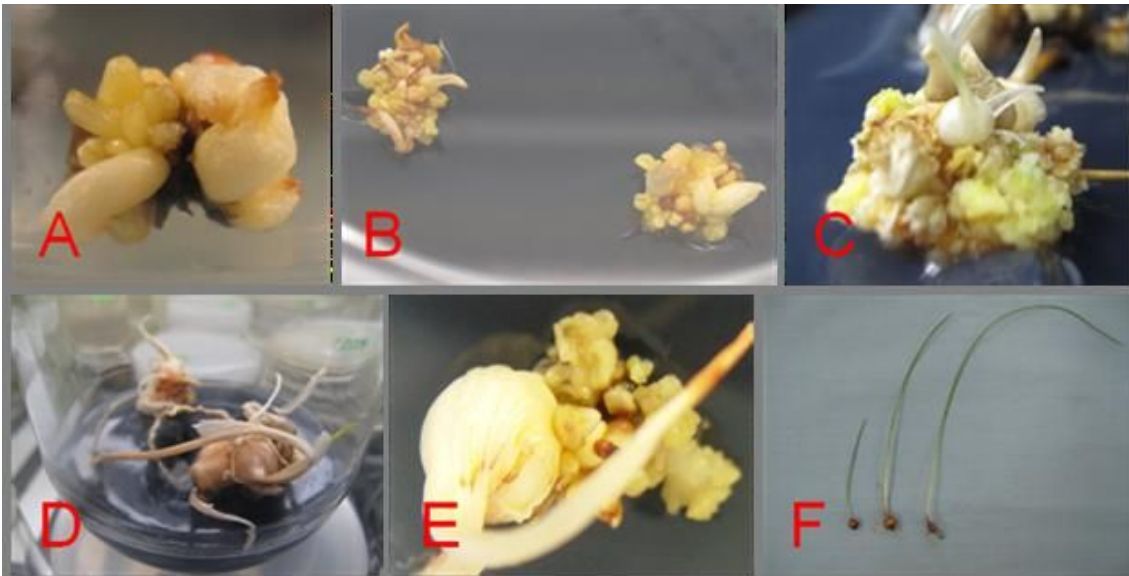


Fig. 5-4-4. Shoot regeneration and microcorm development in *C. vernus*: Adventitious shoot regeneration from the corm explants cultured on the SH medium with  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA and  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA (A); induction and development of microcorms from corm explants cultured on the SH medium with  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA and 6.0% sucrose (B-D); daughter corm formation from in vitro derived microcorms cultured on the SH medium with  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA and 6.0% sucrose (E); and germinated microcorms at different stages (F).

## 제 6 절 조직배양을 통한 상록성 진달래의 대량번식기술 개발

### 1. 상록성 진달래(*Rhododendron brachycarpum* D. Don)의 대량증식

#### 가. 상록성 진달래 신초를 이용한 미세번식 프로토콜 확립

##### (1) 연구목적

상록성 진달래(*Rhododendron brachycarpum*)는 한국의 지리산, 울릉도에 자생하는 상록수로 옛날부터 정원수로 이용되었다. 엽의 길이는 8-20 cm, 너비는 2-5 cm의 크기로 가장자리는 밋밋하며 뒤로 말린다. 꽃은 6-7월에 피고 10-20개씩 가지 끝에 총상꽃차례로 달린다. 화관은 깔때기 모양으로 흰색 또는 연한 노란색이고 안쪽 윗면에 녹색 반점이 있으며 5갈래로 갈라진다.

고부가가치의 다양한 종류의 희귀종을 보존하고, 관상가치가 높은 새로운 종을 대량으로 증식하기 위하여 삽목이나 직파 번식법을 도입하고자 노력하였으나 목본성 상록성 진달래의 경우 일반적으로 성장속도가 매우 느리며 개화소요 기간이 2-3년 정도 필요한 특징이 있기 때문에 기존의 방법으로는 번식이 매우 어려운 토속식물이다. 또한 약용식물과 관상식물로서 두 가지의 가치가 모두 높은 상록성 진달래의 미세번식에 대한 선행연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구실이 보유하고 있는 숙련된 조직배양기술을 이용하여, 토속식물로서의 상업적 가치가 커서 번식 수요가 매우 크지만 아주 어려운, 상록성 진달래의 기내 대량증식과 관련된 연구와 개발을 하게 되었다. 특히 토속식물 재배농가의 상록성 진달래 대량증식에 대한 강한 요

청으로 인해서 필요성이 더욱 대두되었으므로 본 연구를 추가로 수행하였다.

본 연구에서 식물 성장 조절제와 광질이 조직배양을 통한 상록성 진달래의 신초 대량증식에 미치는 영향을 알아보았다.

## (2) 재료 및 방법

### (가) 실험재료 및 멸균/소독방법

본 실험은 초장이 작은 희귀한 왜성종의 신초를 자연 서식지에서 일부 채취하여 번식 재료로 사용하였다. 신초를 수돗물에 30분 동안 세척하고 멸균수를 이용하여 2-3회 헹구고 70%(v/v) EtOH에 1분간 침지 후 멸균수로 3회 세척하였다. 그리고 5% NaOCl에 15분 동안 침지 한 후 멸균수로 3회 세척하여 멸균하여 실험에 사용하였다.

### (나) 배양배지

Anderson's 배지(AM)에 sucrose 3%(w/v)를 넣고, pH는 5.70으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121°C에서 15분간 고압멸균 하여 사용하였다. 2iP, IAA, GA<sub>3</sub>를 서로 다른 농도로 조합하여 사용하였다.

### (다) 배양환경

배양온도는 25±1°C로 설정하였고, 명기 16시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 조건하에서 배양하였다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프(Philips 40 W tubes)를 이용하였다.

## (3) 결과 및 고찰

상록성 진달래 기내배양 시 도입된 신초의 오염이 일부 있었지만 무균 식물개체를 획득하였다. 신초를 증식하기 위해서 2iP, IAA, GA<sub>3</sub>를 여러 가지 농도로 조합하여 AM에 넣은 후 식물체를 치상하고, 6주 후 각 처리별 신초 발생율과 절편체당 신초의 발생수를 조사하였다(Table 6-1-1). 신초 발생율과 절편체당 신초의 발생수를 조사한 결과 2iP 2.0 mg·L<sup>-1</sup>, IAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>, GA<sub>3</sub> 1.0 mg·L<sup>-1</sup>을 처리한 처리구에서 신초 발생률(92.4%)과 절편체당 신초의 발생수(16.0개)가 가장 높게 나타났다. 또한 식물성장조절제가 첨가되지 않은 기본 배지에서는 6주 동안 신초가 전혀 나오지 않았지만 2iP를 처리한 결과 2주 만에 신초가 발생되었다. 하지만 2iP 4.0 mg·L<sup>-1</sup> 처리에서는 오히려 신초 발생율과 절편체당 신초의 발생수가 줄어들었다. 그 이유는 너무 높은 농도의 식물 성장 조절제는 독성으로 작용하기 때문으로 판단된다.

Table 6-1-1. Effect of plant growth regulators on multiple shoot formation from the nodal explant of *R. keiskei* var. *hypoglaucum*.

| Conc. ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) |     |                 | Shoot induction (%) | No. of shoots induced per explant |
|---|-----|-----------------|---------------------|-----------------------------------|
| 2iP                                     | IAA | GA <sub>3</sub> |                     |                                   |
| 0.0                                     | 0.0 | 0.0             | 0.0 i <sup>z</sup>  | 0.0 f                             |
| 0.5                                     | 0.0 | 0.0             | 43.6 h              | 1.6 e                             |
| 1.0                                     | 0.0 | 0.0             | 49.4 g              | 2.0 e                             |
| 2.0                                     | 0.0 | 0.0             | 63.0 e              | 3.6 d                             |
| 4.0                                     | 0.0 | 0.0             | 57.0 f              | 3.4 d                             |
| 1.0                                     | 0.1 | 0.0             | 76.4 d              | 6.7 c                             |
| 2.0                                     | 0.1 | 0.0             | 83.0 c              | 9.8 b                             |
| 1.0                                     | 0.5 | 0.0             | 87.4 d              | 8.6 b                             |
| 2.0                                     | 0.5 | 0.0             | 92.4 a              | 12.3 a                            |
| 2.0                                     | 0.5 | 1.0             | 92.4 a              | 16.0 a                            |

<sup>z</sup>Means followed by the same letters within a column are not significantly different ( $P<0.05$ ).

기내에서 증식된 상록성 진달래 신초의 발근을 위하여 신초의 크기가 2-3 cm 정도 되었을 때 full strength 와 1/2 strength Anderson's 배지(AM)에 옮겨서 배양하였다. 이때 IBA를 여러 농도로 처리하여 발근율과 신초당 발생하는 뿌리수를 측정하였다(Table 6-1-2). IBA를 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 농도로 처리한 결과 full strength Anderson's 배지(AM)에서는 뿌리가 전혀 발생하지 않았다. 1/2 strength Anderson's 배지(AM)에서는 IBA가 없을 때 63.8%의 발근율을 보였고, 신초당 2.3개의 뿌리가 발생되었다. IBA를 처리해 주면 100% 뿌리가 발생되었고, IBA가 없을 때 보다 신초의 발근율이 높았다. 1/2 strength Anderson's 배지(AM)에 IBA 0.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 를 처리했을 때 발근율(100%)과 신초당 발생하는 뿌리수(7.6개)가 가장 높았다. IBA의 농도가 0.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 보다 높을 경우 신초당 발생하는 뿌리수가 줄어들었고, 2.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 보다 높을 경우 뿌리와 함께 캘러스가 형성되었다.

식물체의 기외 순화를 위해서 멸균수로 뿌리 부분을 세척하여 agar를 완전하게 제거하고, 토실이상토를 채운 200구 트레이에 옮겨 심은 후 온실에 차광막 아래서 순화시켰다. 2일에 한 번씩 1/4 strength MS배지를 액체 상태로 공급하였다(Fig. 6-1-1). 본 연구결과 100% 생존율을 보이며 성공적으로 순화되었고 식물체들은 현재 온실에서 재배되고 있다.

Table 6-1-2. Effect of IBA concentration on root induction.

| IBA (mg·L <sup>-1</sup> ) | Root induction (%)  | No. of roots per shoot |
|---------------------------|---------------------|------------------------|
| 0                         | 63.8 b <sup>z</sup> | 2.3 c                  |
| 0.5                       | 100.0 a             | 7.6 a                  |
| 1.0                       | 100.0 a             | 5.0 b                  |
| 2.0                       | 100.0 a             | Callus + Root          |
| 4.0                       | 100.0 a             | Callus + Root          |

<sup>z</sup>Means followed by the same letters within a column are not significantly different ( $P < 0.05$ ).

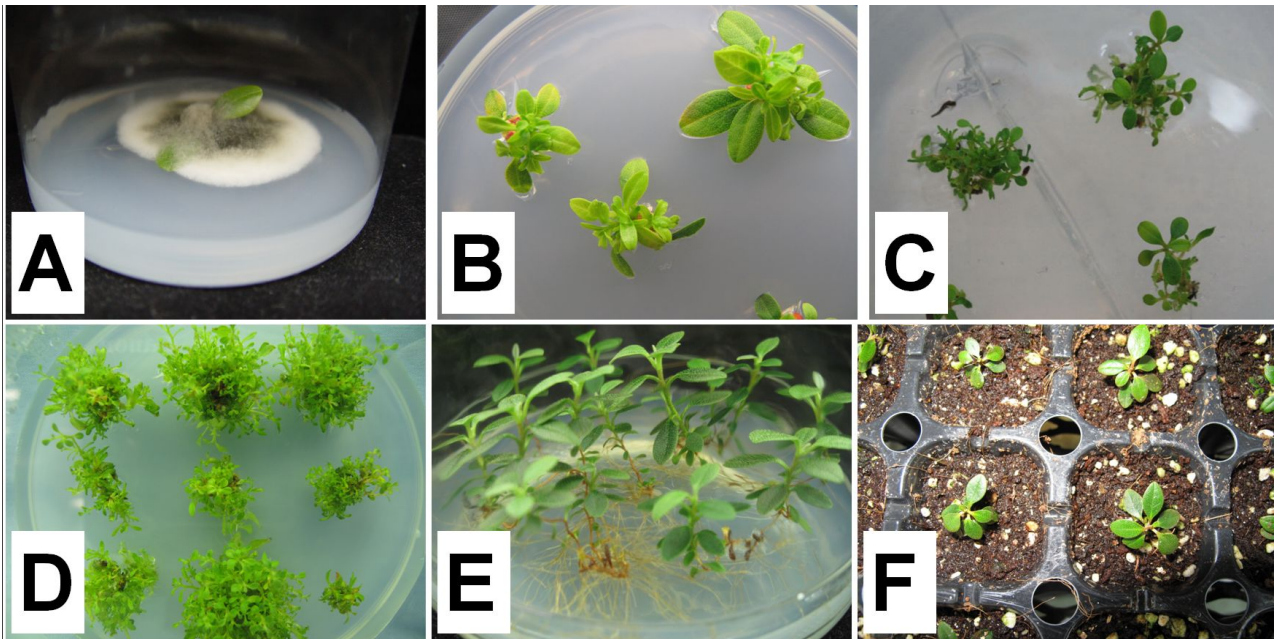


Fig. 6-1-1. Micropropagation of *R. keiskei* var. *hypoglaucum*. (A) The nodal explant contaminated with a fungal pathogen after 2 weeks of culture; (B) the nodal explant cultured on the Anderson's medium with 2iP for 4 weeks; (C and D) multiple shoot induction on the Anderson's medium with 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 2iP and 0.5 mg·L<sup>-1</sup> IAA (C), and with 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 2iP, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> IAA and 1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> (D) after 6 weeks of culture; (E) rooting and (F) acclimatization.

상록성 진달래의 기내배양 시 신초의 발생과 증식에 광질이 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해서 청색광, 적색광, 백색광으로 나누어 배양하였다(Fig. 6-1-2). 결과적으로 여러 파장의 빛이 혼합된 백색광에서 신초의 발생과 증식이 가장 활발하였다. 청색광과 적색광에서도 신초가 발생 하였지만 잎이 노란색으로 변하는 현상이 나타났고 백색광에 비하여 잎의 발달이 느리고 발생된 잎의 개수도 적었다. 이러한 결과로 상록성 진달래의 신초가 발생하는데 있어서 청색광 혹은 적색광 이외의 추가적인 광이 필요하다고 판단된다.

이와 같이 다양한 연구결과를 바탕으로 상록성 진달래의 기내증식 프로토콜을 성공적으로 확립하였다. 향후 본 연구결과는 출원 또는 기술이전과 같은 다양한 방법으로 활용하고자 준비 중이다.

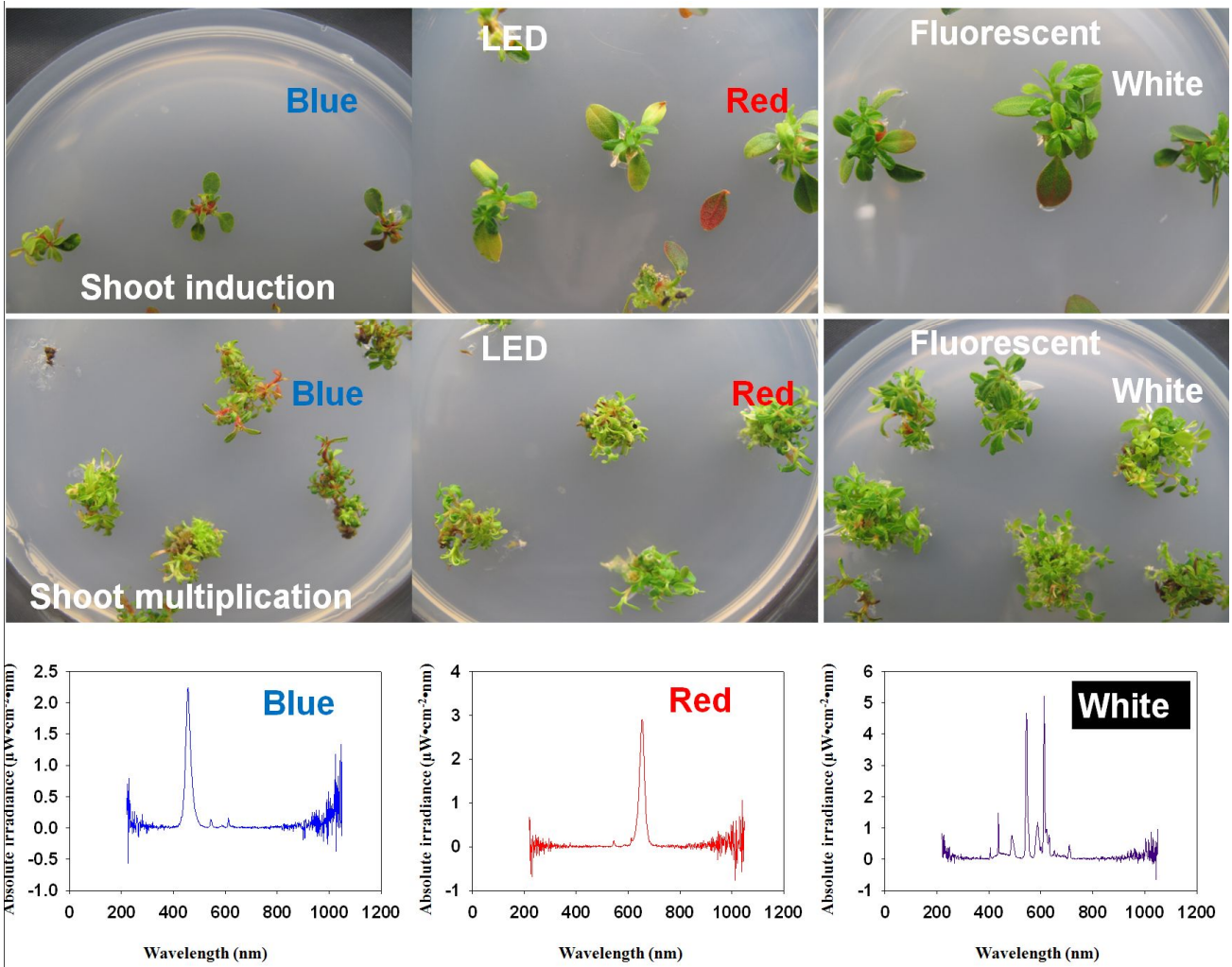


Fig. 6-1-2. Effect of light quality on shoot induction and multiplication of *R. keiskei* var. *hypoglaucum*.

#### 나. 상록성 진달래의 신초 재분화 확립을 위한 식물생장조절제의 영향 구명

##### (1) 연구목적

진달래 속은 가장 중요한 조경수목에 속한다. 약 1,200종으로 구성되어있는 진달래 속(철쭉과)은 동북아시아, 유라시아, 서유럽 및 북미에 분포되어 있다. 엽의 길이는 8-20 cm, 너비는 2-5 cm의 크기로 가장자리는 밋밋하며 뒤로 말린다. 꽃은 6-7월에 피고 10-20개씩 가지 끝에 총상꽃차례로 달린다. 화관은 깔때기 모양으로 흰색 또는 연한 노란색이고 안쪽 윗면에 녹색 반점이 있으며 5갈래로 갈라진다. 상록성 진달래 중 Suto와 Suzuki는 키가 작은 소형 관목으로 열은 노란색 또는 담황색 꽃을 피우며, 일본이 원산지이다. 이 두 품종은 혼슈의 칸토지구에만 남아있는 희귀종이다. 이러한 희귀종을 여수의 대삼부도에 있는 층암절벽에서 발견하여 대량증식을 하기 위해 연구를 수행하였다.

진달래 속은 전통적으로 삼목 혹은 종자를 통해 번식한다. 그러나 영양번식과 종자번식 모두 매우 성공확률이 낮기 때문에 번식에 어려움을 겪고 있다. 이러한 어려움은 조직배양기술을 이용하여 극복할 수 있다. 조직배양기술은 특히 희귀식물이나 멸종 위기에 처한 식물의 개체수를 복원하는 확실한 방안으로 주목받고 있다. 조직배양기술 중 기내번식은 무성번식 식물의 생산을 위해 사용될 수 있으며, 이는 유전적 형질전환 또는 체세포영양계 변이에 의한 종의 유전적 변이나 육종의 기초가 된다. 지금까지 진달래속의 기내번식에 대한 연구는 수행되어 왔지만 상록성 진달래(*R. keiskei* var. *hypoglaucum*)의 절편체를 이용한 재분화 연구는 이루어지지 않았다. 절편체의 분화, 성장, 그리고 형태형성은 절편체의 나이, 위치, 유전자형, 배지의 구성, 식물생장조절제, 배양용기의 크기, 광도, 광질, 그리고 광주기와 같은 여러 가지 요인에 의해 영향을 받는다. 진달래속의 기내 형태형성은 주로 배지에 포함된 식물생장조절제에 의해 영향을 받는다.

대량으로 기내번식 시 생산된 식물의 유전적 동일성은 매우 중요하다. 일반적으로 측아를 이용한 기내번식은 유전적 형질이 그대로 유지되지만 낮은 빈도로 변이가 발생하기도 한다. 체세포영양계변이는 일반적으로 점 돌연변이, 염색체 재배치, DNA 메틸화, 그리고 유전자 내부의 유동 가능한 인자에 의해 발생된다. 이러한 체세포영양계변이의 유무는 표현형 식별, 세포 분석, 단백질 분석, DNA 함량 분석, 그리고 이차대사산물 분석 등 여러 가지 분자 분석 방법을 통하여 알아볼 수 있다. 이러한 분자 분석방법들은 기내번식 식물의 유전적 동일성을 확인하는데 널리 쓰이고 있으며, 특히 random amplified polymorphic DNA(RAPD)방법은 기내에서 유도된 상록성 진달래의 유전적 변이를 찾아내는 등 유전적 변이 탐색에 성공적으로 이용되고 있다.

본 연구에서는 상록성 진달래(*R. keiskei* var. *hypoglaucum*)의 절편체를 이용한 재분화 방법을 확립하고, RAPD방법을 이용하여 기내 증식 식물의 유전적 동일성을 측정하였다.

## (2) 재료 및 방법

### (가) 실험재료 및 멸균/소독방법

희귀한 왜성종의 식물체를 자연 서식지인 여수에 있는 대삼부도의 층암절벽에서 일부 채취하여 경상대학교 부속온실에서 유지 재배하였다. 신훈은 온실에서 재배된 식물로부터 분리하여 실험 재료로 사용하였다. 절편체를 흐르는 물에 30분 동안 세척하고 멸균수를 이용하여 2-3회 헹구고 0.1%(v/v) Teepol solution에 5분 동안 침지한 후 멸균수로 3회 세척하였다. 그 후 절편체를 70%(v/v) EtOH에 1분간 침지 후 멸균수로 3회 세척하였다. 그리고 5.0%(v/v) NaOCl에 넣고 15분 동안 침지하고 멸균수로 5회 세척한 후 마디부분을 0.5-1.0cm 절단하여 실험에 사용하였다.

### (나) 배양배지

Anderson's 배지(AM)에 sucrose 3%(w/v)를 넣고, pH는 5.70으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121°C에서 15분간 고압멸균 하여 사용하였다. GA<sub>3</sub>는 필터살균 후 고압멸균한 배지에 첨가하였다.

### (다) 배양환경

배양온도는 25±1°C로 설정하였고, 명기 16시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> PPFD의 광 조건하에서

배양하였다. 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프(Philips 40 W tubes)를 이용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

기내에서 증식된 상록성 진달래의 마디 절편체는 신초 눈 발생을 위해 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 또는 4.0 mg·L<sup>-1</sup>의 2iP가 첨가된 AM 배지에 옮겨 배양하였다. 신초 확립을 위해서는 1.0 또는 2.0 mg·L<sup>-1</sup>의 2iP, 1.0 또는 2.0 mg·L<sup>-1</sup>의 IAA, 그리고 1.0 mg·L<sup>-1</sup>의 GA<sub>3</sub>가 첨가된 AM 배지에 옮겨 배양하였다. 배양 8주 후 각 처리별 신초눈이 발생된 절편체수와 절편체당 평균 신초눈의 수를 조사하였다. 기내에서 멸균된 절편체를 치상하여 76%의 무균 식물개체를 얻었다. 마디 절편체는 배양 8주 후 식물생장조절제가 첨가된 배지에서 신초가 발생되지 않았다. 배양 2주 후 multiple shoot는 AM 배지에 다양한 농도의 2iP가 첨가되었을 때 정아 우세로부터 결눈이 출현되면서 발생하였다. 2iP의 농도가 0.5~2.0 mg·L<sup>-1</sup>일 때 신초 발생률을 향상시켰고, 그 이상의 농도에서는 감소하였다. 가장 높은 신초 발생률(63%)과 절편체당 발생하는 신초수(3.6개)는 AM 배지에 2iP를 2.0 mg·L<sup>-1</sup>의 농도로 첨가하였을 때 얻었다(Table 6-1-3). 2iP와 IAA의 혼용은 2iP 단독처리보다 신초 발생률과 절편체당 신초 발생수를 향상시켰다. 측아 확립을 위해서는 AM 배지에 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 2iP와 0.5 mg·L<sup>-1</sup> IAA가 첨가하였을 때 가장 좋았으며, 절편체 92.4%가 반응하였고, 절편체당 12.3개의 신초가 발생하였다(Table 6-1-3). 신초 확립 배지인 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 2iP와 0.5 mg·L<sup>-1</sup> IAA에서 1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>의 첨가는 신초 발생률(95%)과 절편체당 발생하는 신초수(16.0개)를 향상시켰다(Table 6-1-3, Fig. 6-1-3A, B).

Table 6-1-3. Effect of PGRs on multiple shoot formation from the nodal explants of *R. keiskei* var. *hypoglaucum*.

| PGR (mg·L <sup>-1</sup> ) |     |                 | Shoot induction (%) | No. of shoots induced per explant |
|---------------------------|-----|-----------------|---------------------|-----------------------------------|
| 2iP                       | IAA | GA <sub>3</sub> |                     |                                   |
| 0.0                       | 0.0 | 0.0             | 0.0 i <sup>z</sup>  | 0.0 f                             |
| 0.5                       | 0.0 | 0.0             | 43.6 h              | 1.6 e                             |
| 1.0                       | 0.0 | 0.0             | 49.4 g              | 2.0 e                             |
| 2.0                       | 0.0 | 0.0             | 63.0 e              | 3.6 d                             |
| 4.0                       | 0.0 | 0.0             | 57.0 f              | 3.4 d                             |
| 1.0                       | 0.1 | 0.0             | 76.4 d              | 6.7 c                             |
| 2.0                       | 0.1 | 0.0             | 83.0 c              | 9.8 b                             |
| 1.0                       | 0.5 | 0.0             | 87.4 d              | 8.6 b                             |
| 2.0                       | 0.5 | 0.0             | 92.4 a              | 12.3 a                            |
| 2.0                       | 0.5 | 1.0             | 92.4 a              | 16.0 a                            |

<sup>z</sup>Means followed by the same letters within a column are not significantly different ( $P \leq$

0.05).

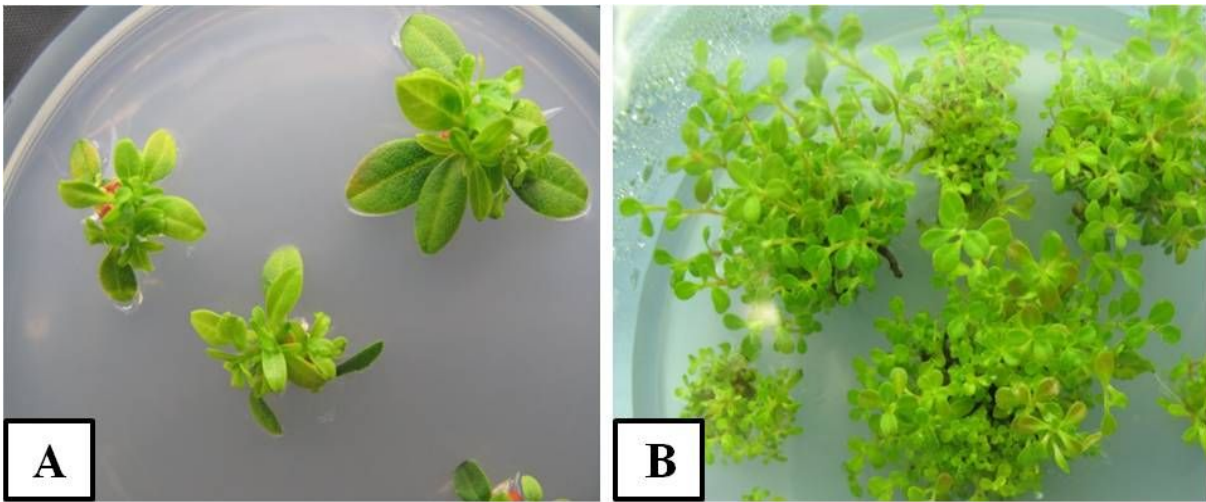


Fig. 6-1-3. Shoot regeneration from nodal explants of *R. keiskei* var. *hypoglaucum* cultured on the AM medium supplemented with  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2iP,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IAA, and  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>. (A) After 4 and (B) 8 weeks of culture.

#### 다. 재분화된 신초의 배양환경 조건 규명

##### (1) 연구목적

광질과 광도가 재분화된 신초에 미치는 영향에 대한 실험을 수행하였다.

##### (2) 재료 및 방법

###### (가) 실험재료

식물생장조절제 처리에 따른 재분화 선행연구의 결과를 바탕으로 기내에서 무균적으로 배양된 상록성 진달래의 재분화 개체를 획득하여 본 실험의 재료로 이용하였다.

###### (나) 배양배지

선행연구를 통하여 선발된 Anderson's 배지(AM)에  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 2iP,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 IAA, 그리고  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 GA<sub>3</sub>를 첨가하고 sucrose 3%(w/v)를 넣고, pH는 5.70으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121°C에서 15분간 고압멸균 하여 사용하였다. GA<sub>3</sub>는 필터살균 후 고압멸균한 배지에 첨가하였다.

###### (다) 배양환경

배양체는 온도 25°C, 광도(PPFD) 40, 45, 50, 또는  $55 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD, 상대습도 70-80%인 배양실에서 명기  $16 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 과 암기  $8 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 의 광 조건하에서 배양되었다. 광원으로는 발열량이 적은 3과장 cool-white 형광램프[모델 FL 40EX-W, (주)승산오스람]와 발광 다이오드 청색광 또는 적색광(LED)을 이용하였다.

##### (3) 결과 및 고찰



상록성 진달래의 기내배양 시 신초의 발생에 광질과 광도가 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해서 청색광, 적색광, 백색광으로 나누어 배양하였다. 배양 8주 후 백색광(16.0개)에 의해 절편체당 발생된 신초수는 적색광(14.8개)과 청색광(12.6개) 보다 높았다(Table 6-1-4). 낮은 PPF 대신 높은 PPF에서 절편체당 발생된 신초수는 감소하였고, 옅은 적색으로 변하였다. 캘러스 형성은 청색광이 아닌 적색 또는 백색광의 마디 절편체에서 관찰되었다(Fig. 6-1-4). 광질과 조도는 진달래 속 식물의 발달과 형태형성에 서로 다른 영향을 미쳤다.

Table 6-1-4. Effect of light quality on multiple shoot formation from the nodal explants of *R. keiskei* var. *hypoglaucum*.

| PPFD<br>( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) | Shoot induction (%) |        |         | No. of shoots per explant |         |        |
|---|---------------------|--------|---------|---------------------------|---------|--------|
|   | B                   | R      | WF      | B                         | R       | WF     |
| 40  | 89.4 a <sup>z</sup> | 98.4 a | 97.2 a  | 12.6 a                    | 13.0 ab | 15.6 a |
| 45  | 78.6 b              | 99.0 a | 96.0 ab | 12.4 a                    | 14.8 a  | 16.0 a |
| 50  | 72.0 c              | 97.6 a | 94.4 b  | 8.6 b                     | 14.6 a  | 13.2 b |
| 55  | 61.7 d              | 92.0 b | 94.2 b  | 5.2 c                     | 10.4 b  | 7.4 c  |

<sup>z</sup>Means followed by the same letters within a column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

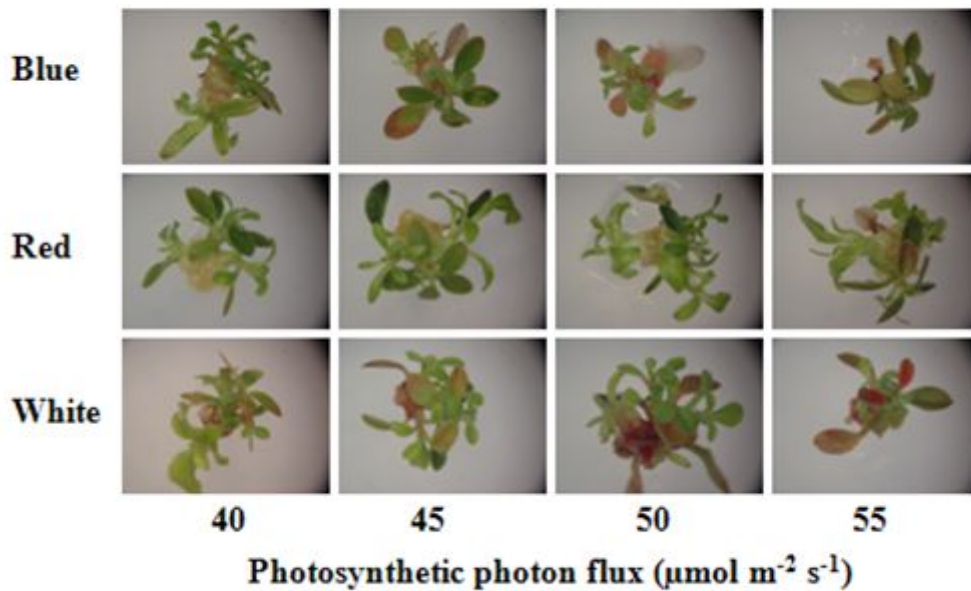


Fig. 6-1-4. Effects of light quality and intensity on shoot regeneration from the nodal explants of *R. keiskei* var. *hypoglaucum* cultured on the AM medium supplemented with  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2iP,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IAA and  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub> after 4 weeks.

## 라. 상록성 진달래의 기내 재분화 방법 확립

### (1) 연구목적

상록성 진달래의 기내 재분화 연구를 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 배양배지

캘러스 발생을 위해 기내에서 자란 신초로부터 얻은 줄기 절편체(0.5-1.0cm)는 선행연구를 통하여 선발된 Anderson's 배지(AM)에  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 TDZ,  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 NAA를 첨가하고 sucrose 3%(w/v)를 넣고, pH는 5.70으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후,  $121^\circ\text{C}$ 에서 15분간 고압멸균을 하여 사용하였다.

#### (나) 배양환경

배양온도는  $25\pm 1^\circ\text{C}$ 로 설정하였고, 명기 16시간 동안  $45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFd의 광 조건하에서 배양하였다. 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프(Philips 40 W tubes)를 이용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

배양 2주 후 줄기 절편체의 끝부분에서  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 TDZ와  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 NAA가 첨가된 AM 배지에서 캘러스가 84.2% 발생하였다. 배양 4주 후  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 2iP,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 IAA, 그리고  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 GA<sub>3</sub>가 첨가된 AM 배지에서 신초가 형성되었고(Fig. 6-1-5A), 캘러스당 발생된 36.8개의 신초와 가장 높은 신초 발생률(100%)을 얻었다(데이터 미제시).

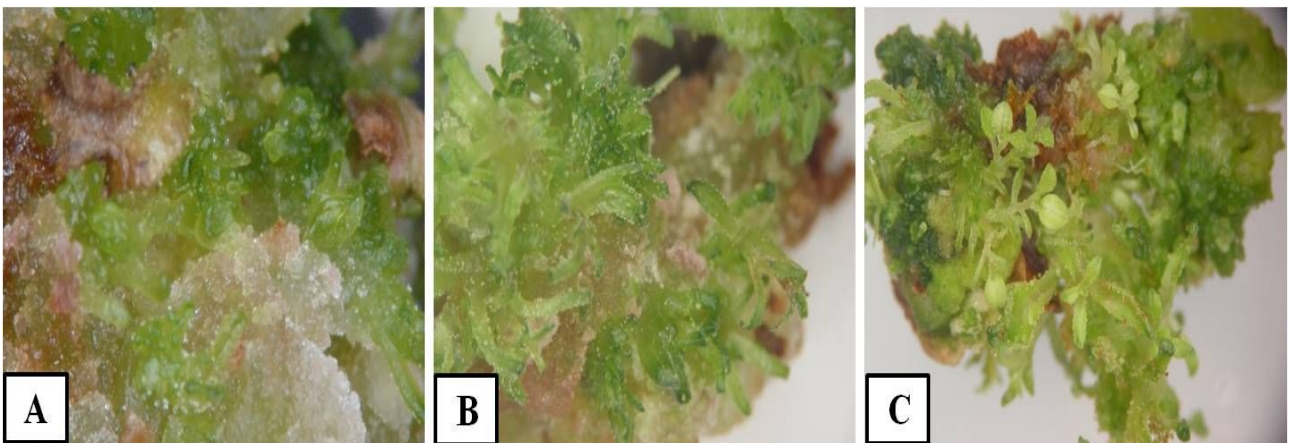


Fig. 6-1-5. Different stages of adventitious shoot regeneration from callus cultures of *R. keiskei* var. *hypoglaucum*. (A) After 4, (B) 6, and (C) 8 weeks of culture.

## 마. 상록성 진달래의 기내발근과 기외 순화체계 확립

### (1) 연구목적

상록성 진달래의 기내발근과 기외 순화체계를 확립하고자 위의 실험을 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 배양배지

약 2~3cm로 자란 각 신초를 발근을 위해 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 그리고 4.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA 혹은 NAA가 첨가된 1배액과 1/2배액 Anderson's 배지(AM)에 sucrose 3%(w/v)를 넣고, pH는 5.70으로 조절하고, agar 0.8%(w/v)를 첨가한 후, 121℃에서 15분간 고압멸균을 하여 사용하였다.

#### (나) 배양환경

배양온도는 25±1℃로 설정하였고, 명기 16시간 동안 45 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> PPF의 조건 하에서 배양하였다. 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프(Philips 40 W tubes)를 이용하였다.

### (3) 결과 및 고찰

재분화된 신초는 발근을 위해 1배액과 1/2배액 AM 배지로 옮겨 배양하였다. 배양 7주 후 발근율, 신초당 발생된 뿌리수, 그리고 근장을 조사하였다. 신초는 1/2배액 AM 배지에서 뿌리가 발생되었고 뿌리 발생률은 63.8%였으며 차후 발근 실험을 위해 사용되었다. 또한 0.5 mg·L<sup>-1</sup> IBA 또는 NAA의 첨가하였더니 발근을 향상시켰다(Table 6-1-5). 1/2배액 AM 배지에 0.5 mg·L<sup>-1</sup> IBA를 첨가하였을 때 신초당 발생하는 신초수(7.6개), 가장 높은 발근율(100%), 그리고 최대 근장(4.4cm)을 얻었다(Fig. 6-1-6A). IBA가 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 이상으로 증가하면 근장을 감소하고 캘러스 발생을 향상시켰다(Fig. 6-1-6B).

Table 6-1-5. Effect of different concentrations of auxins on root induction.

| Conc.<br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | Root induction (%)  |        | No. of roots per shoot |        | Root length (cm) |        |
|--------------------------------|---------------------|--------|------------------------|--------|------------------|--------|
|                                | IBA                 | NAA    | IBA                    | NAA    | IBA              | NAA    |
| 0.0                            | 63.8 b <sup>z</sup> | 63.8 c | 2.3 c                  | 2.3 b  | 1.6 c            | 1.6 b  |
| 0.5                            | 100.0 a             | 91.2 b | 7.6 a                  | 5.8 a  | 4.4 a            | 3.0 a  |
| 1.0                            | 100.0 a             | Callus | 5.0 b                  | Callus | 2.7 b            | Callus |
| 2.0                            | Callus              | Callus | Callus                 | Callus | Callus           | Callus |
| 4.0                            | Callus              | Callus | Callus                 | Callus | Callus           | Callus |

<sup>z</sup>Means followed by the same letters within a column are not significantly different ( $P < 0.05$ ).

뿌리가 잘 발달된 식물체는 agar를 깨끗이 제거하고 멸균수로 세척한 뒤 토실이상토가 포함된 120구 트레이에 옮겨 심은 후 온실에서 순화시켰다. 2일에 한번씩 1/4배액 양액을 매주 관수하였고, 온실에서 유지하였다. 높은 상대습도에 식물체를 유지하기 위해 플라스틱 뚜껑으로

뺀고, 2주 후 제거하였다. 4주 후 95%의 생존율을 보이며 형태적인 기형이나 변이 없이 성공적으로 순화하였다(Fig. 6-1-6C, D, E, F).

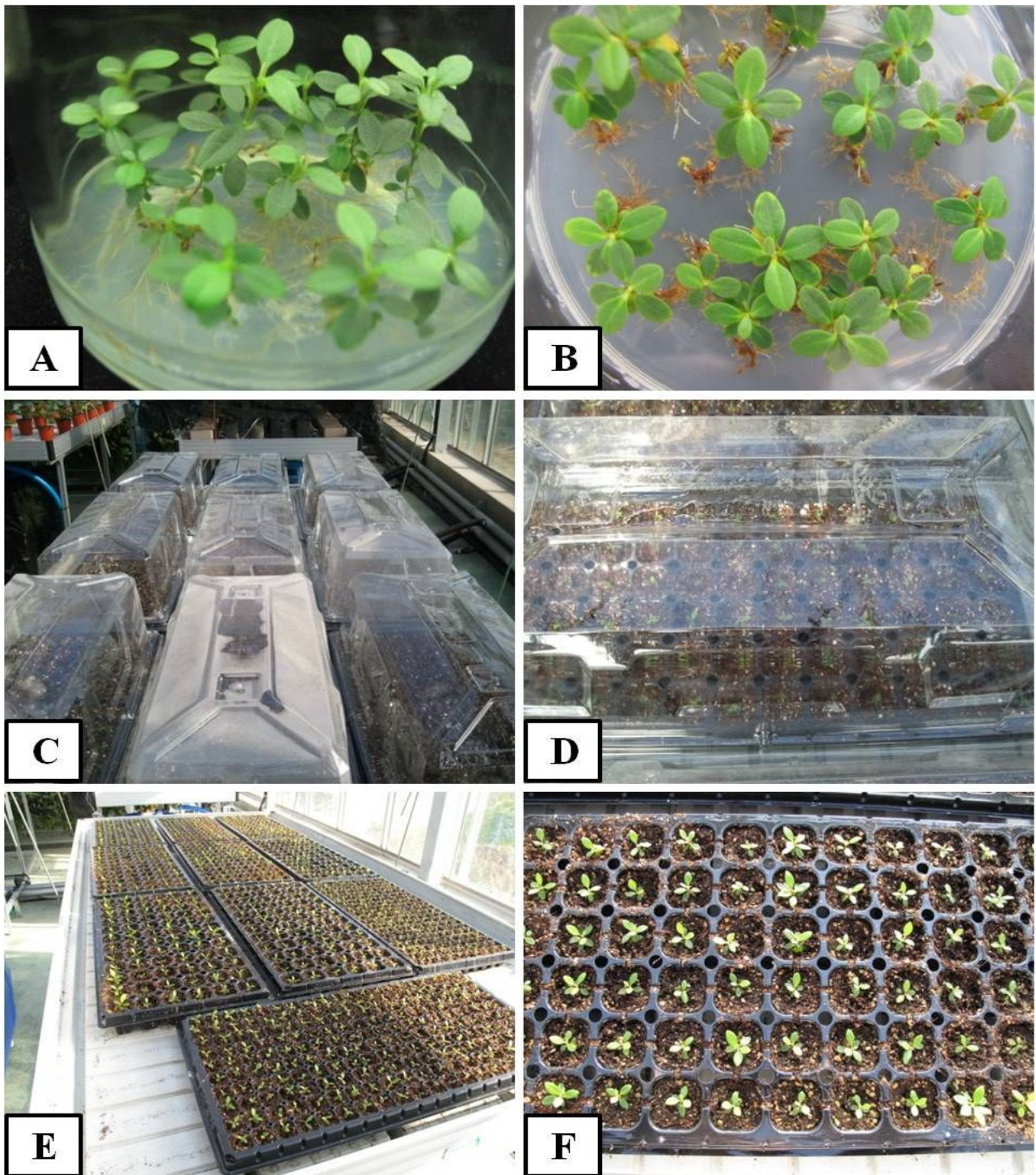


Fig. 6-1-6. Rooting and acclimatization of *R. keiskei* var. *hypoglaucum* on the half-strength AM medium containing (A) 0.5 mg·L<sup>-1</sup> IBA, (B) 1.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA, and (C-F) acclimatization.

## 마. RAPD를 이용한 기내 번식 식물의 분자분석

### (1) 연구목적

기내 번식한 상록성 진달래의 RAPD를 이용한 분자분석을 하고자 위의 실험을 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 실험재료 및 RAPD 분석

기내에서 번식된 식물의 유전적 동일성을 측정하기 위하여 번식 후 순화된 식물의 절편체와 모주의 절편체를 채취하여 비교하였다. DNA추출 키트를 이용하여 모주와 기내에서 번식된 식물의 신초에서 genomic DNA를 추출하여 260-280nm의 파장대의 광으로 흡광도를 측정 후 표준 DNA와 비교하여 DNA의 농도와 질을 계산하였다. 초기 검사를 위해 64개의 RAPD primer를 이용하였고, PCR을 이용하여 DNA를 증폭하였다. PCR을 이용하기 위한 시료로 0.5 $\mu$ M의 primer, 40ng의 추출된 DNA, 200 $\mu$ M의 dNTP, 1.5 mM의 MgCl<sub>2</sub>, 그리고 1유닛의 DNA 중합 효소를 넣었다. PCR은 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 45 $^{\circ}$ C에서 30초, 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 1분의 조건으로 40회 반복하였다. 증폭된 DNA는 전기영동을 하여 분석하였다.

Table 6-1-6. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers utilized to verify *R. keiskei* var. *hypoglaucom* clones.

| Primers | 5'-3'motif | No. of scorable bands | Range of amplification (bP) |
|---------|------------|-----------------------|-----------------------------|
| OPA-12  | TCGGCGATAG | 3                     | 350-1000                    |
| OPA-13  | CAGCACCCAC | 3                     | 200-500                     |
| OPA-17  | GACCGCTTGT | 5                     | 100-1500                    |
| OPA-18  | AGGTGACCGT | 3                     | 200-500                     |
| OPB-01  | GTTTCGCTCC | 5                     | 100-700                     |
| OPB-03  | CATCCCCCTG | 4                     | 200-600                     |
| OPB-05  | TGCGCCCTTC | 4                     | 300-1200                    |
| OPC-01  | TTCGAGCCAG | 3                     | 300-1000                    |
| OPC-04  | CCGCATCTAC | 5                     | 100-500                     |
| OPD-03  | GTCGCCGTCA | 5                     | 300-1200                    |
| OPD-06  | ACCTGAACGG | 2                     | 600-1000                    |
| OPE-03  | CCAGATGCAC | 3                     | 500-1000                    |
| OPE-07  | AGATGCAGCC | 7                     | 200->1500                   |
| OPG-02  | GGCACTGAGG | 2                     | 200-700                     |
| OPG-03  | GAGCCCTCCA | 2                     | 500-1100                    |
| OPJ-01  | CCCGGCATAA | 6                     | 200->1500                   |
| OPJ-06  | TCGTTCCGCA | 9                     | 200->1500                   |

### (3) 결과 및 고찰

많은 식물체에서 정상적인 표현형임에도 불구하고 유전적 변이가 일어날 수 있다는 보고가 있다. 그렇기 때문에 체세포를 이용한 기내번식과 유전자원 보존에 있어서 유전적 동일성의 분석은 꼭 필요한 기술이다. 기내 번식된 식물의 유전적 동일성을 확인하기 위하여 모주와 기내 번식된 식물체를 무작위로 8개를 골라서 RAPD 분석을 실시하였다. RAPD 분석방법은 여러 식물에서 미세번식 식물체와 모주의 유전적 동일성을 판단하는 기술이다. 64개의 RAPD primer를 이용하여 측정된 결과 17개의 확실하고 개수를 셀 수 있는 band를 얻었다. Band를 확인할 수 있는 primer는 Table 6-1-6에 나와 있는 2번(OPA-11)부터 9번(OPA-6)까지이다.

17개의 RAPD primer를 이용하여 200에서 1500bp 범위의 총 71개의 뚜렷한 band를 얻었고, 평균적으로 primer 한 개당 4.18개의 band를 얻었다. Fig. 6-1-7에서 보는 것처럼 기내에서 번식된 식물체와 모주의 유전자가 동일하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. *Camellia sinensis*, *Dioscorea prazeri*, 그리고 *Swertia chirata* 등 많은 식물에서 기내번식 시 RAPD를 이용하여 유전적 동일성을 확인한 연구가 있다. 위의 결과를 바탕으로 본 연구에서 사용된 상록성 진달래(*R. keiskei* var. *hypoglaucum*)의 기내 번식 방법을 대량기내 번식에 적용해도 된다는 결론을 얻을 수 있다(Sivanesan and Jeong, 2013b).

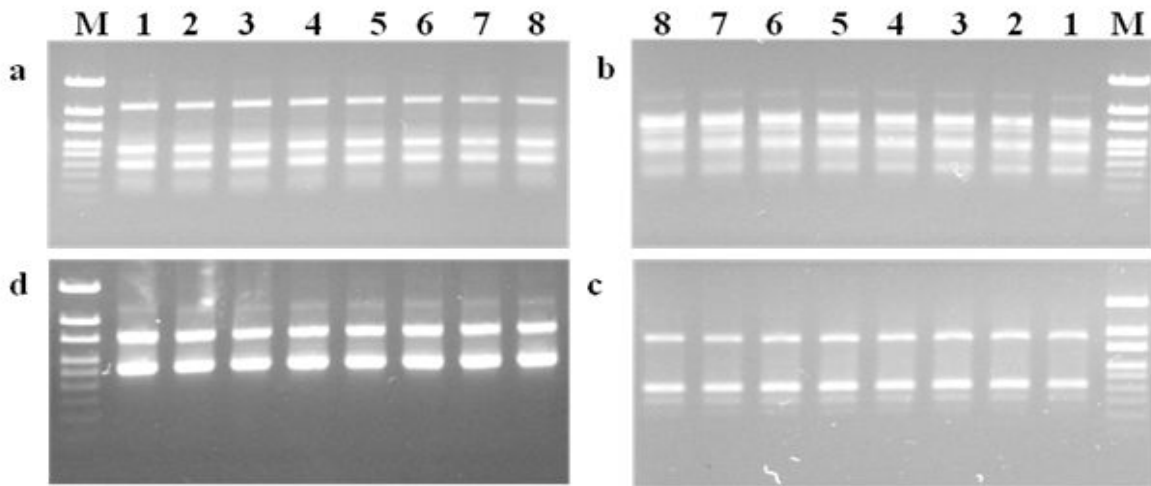


Fig. 6-1-7. Polymerase chain reaction (PCR) amplification products obtained with random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers (A) OPA 12, (B) OPB 05, (C) OPC 01, and (D) OPD 06. The M represents 100 bp-1,500 bp ladder, 1 represents mother plant, lanes 2 to 8 represent in vitro-raised clones of *R. keiskei* var. *hypoglaucum*.

#### 사. Temporary immersion system(TIS)를 이용한 상록성 진달래의 신초증식 유도

##### (1) 연구목적

TIS를 이용한 상록성 진달래의 효과적인 신초증식 방법을 개발하기 위해 본 연구를 수행하였다.

##### (2) 재료 및 방법

###### (가) 실험재료 및 멸균 소독방법

실험식물은 여수의 대삼부도의 절벽에서 채취하여 온실에서 유지하였고, 본 실험에서는 기내에 도입된 식물체를 사용하였다. TIS 용기는 위쪽과 아래쪽으로 나누어지는데 위쪽에는 식물체가 놓이게 되고 아래쪽은 배양액이 채워지게 된다. 이때 아래쪽에 압력이 가해지면 위쪽으로 배양액이 올라가서 식물체가 배양액에 잠기도록 설계되어 있다. 식물체가 배양액에 잠기는 동안 공기방울이 올라와서 식물체를 부드럽게 흔들고 압력이 사라지면 용기 밖으로 빠져나간다.

#### (나) 배양배지

기본배지는 Anderson 배지를 사용하였고, sucrose 3%(w/v)를 이용하였다. pH는 5.70-5.80으로 조절하고, 0.8%(w/v) agar를 첨가한 후, 121℃에서 20분간 고압멸균 하였다. 각각의 TIS 용기에 Anderson배지에  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2iP,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IAA, 그리고  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>를 넣은 배양액을 400 mL씩 넣었다.

#### (다) 배양환경

배양온도는  $25\pm 1^\circ\text{C}$ 로 설정하였고, 배양실에서 명기 12시간 동안  $45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  조건하에서 배양하였다. 배양실의 광원으로는 발열량이 적은 3파장 cool-white 형광램프, blue, 혹은 red light emitting diode(LED)를 이용하였다. TIS 용기에 10, 20, 30, 40, 혹은 50분마다의 빈도로 압력을 가했고, 이때마다 식물체가 배양액에 잠겼다.

### (3) 결과 및 고찰

상록성 진달래의 신초 증식은 식물체가 배양액에 잠기는 빈도에 따라 확인을 하였다(Fig. 6-1-8). 10분 간격으로 배양액을 공급한 처리를 제외하고 모든 처리에서 100% 신초가 발생하였다. 가장 많은 신초가 발생한 처리는 30분 간격으로 배양액을 공급한 처리로 식물체당 22.6개의 신초가 발생하였다(Table 6-1-7). 모든 처리에서 신초의 길이는 차이가 없이 0.99-1.37cm 범위에서 성장하였다. 생체중과 건물중 역시 큰 차이가 없었다. TIS에 옥신을 처리한 결과 높은 빈도로 뿌리가 발생하였다(Table 6-1-8). 또한 TIS를 이용할 때 유리화가 문제가 되었으나 이러한 문제도 1/2 Anderson배지로 옮겨주면 해결되었고(Fig. 6-1-9) 기외순화도 성공적이었다(Fig. 6-1-10).

Table 6-1-7. Effect of immersion frequency on shoot multiplication of *R. keiskei* var. *hypoglaucum*.

| Immersion frequency (min) | Shoot induction (%)     | No. of shoots induced per explant | Shoot length (cm) | Fresh wt. (g) | Dry wt. (g)  |
|---------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-------------------|---------------|--------------|
| 10                        | 98.5±0.5 b <sup>z</sup> | 17.6±6.7 b                        | 1.04±0.2 b        | 1.44±0.5 a    | 0.12±0.0 ab  |
| 20                        | 100±0.0 a               | 13.6±3.4 b                        | 0.99±0.2          | 1.92±0.7 a    | 0.15±0.06 a  |
| 30                        | 100±0.0 a               | 22.6±5.6 a                        | 1.37±0.4 a        | 1.77±0.7 a    | 0.10±0.0 b   |
| 40                        | 100±0.0 a               | 15.7±3.8 b                        | 1.21±0.4 ab       | 1.53±0.5 a    | 0.12±0.0 ab  |
| 50                        | 100±0.0 a               | 16.6±4.5 b                        | 1.05±0.3 b        | 1.51±0.4 a    | 0.012±0.0 ab |
| F-test                    | NS                      | **                                | NS                | NS            | NS           |

<sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $P \leq 0.05$ . Values are mean  $\pm$  standard deviation from ten replicates.

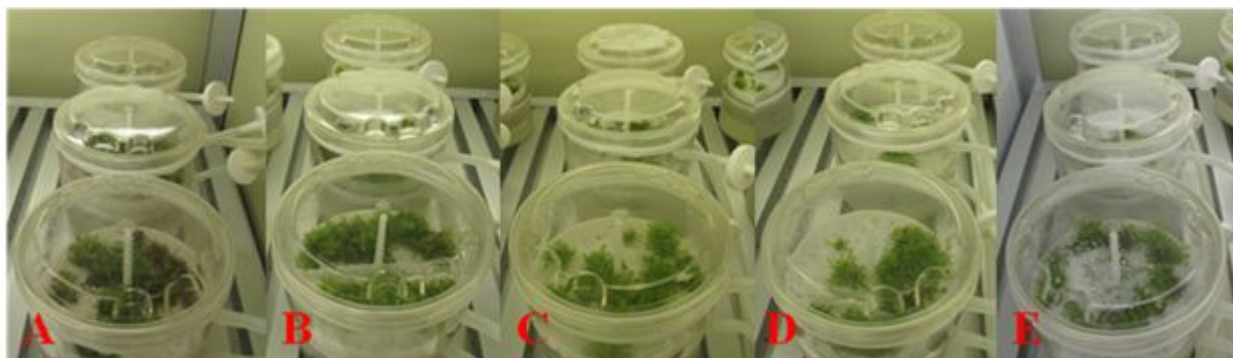


Fig. 6-1-8. Temporary immersion system containing *R. keiskei* var. *hypoglaucum*. The immersion frequencies used were 10 (A); 20 (B); 30 (C); 40 (D); and 50 min (E).



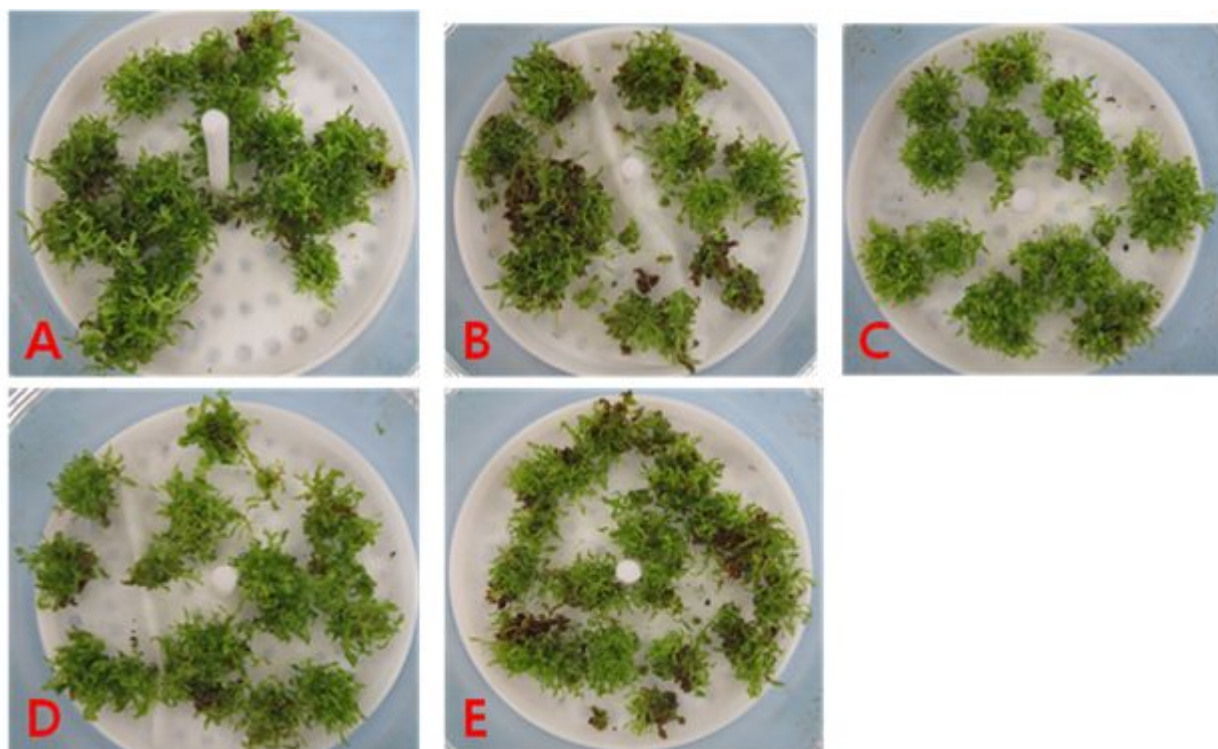


Fig. 6-1-9. Effect of immersion frequency on shoot multiplication of *R. keiskei* var. *hypoglaucum*. The immersion frequencies used were 10 (A); 20 (B); 30 (C); 40 (D); and 50 min (E).

Table 6-1-8. Effect of concentration of auxins on root induction on the shoot multiplied from the temporary immersion system of *R. keiskei* var. *hypoglaucum*.

| Conc.<br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | Root induction (%)  |        | No. of roots per shoot |       | Root length (cm) |       |
|--------------------------------|---------------------|--------|------------------------|-------|------------------|-------|
|                                | IBA                 | NAA    | IBA                    | NAA   | IBA              | NAA   |
| 0                              | 43.3 b <sup>z</sup> | 43.3 b | 2.2 c                  | 2.2 b | 0.8 c            | 0.8 b |
| 0.5                            | 70.0 a              | 51.2 a | 4.4 a                  | 3.8 a | 3.9 a            | 3.8 a |
| 1.0                            | 67.0 a              | 47.5 a | 3.8 a                  | -     | 1.7 b            | -     |
| 2.0                            | -                   | -      | -                      | -     | -                | -     |
| 4.0                            | -                   | -      | -                      | -     | -                | -     |

- Callus formation.

<sup>z</sup>Means within a column followed by the same letters are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

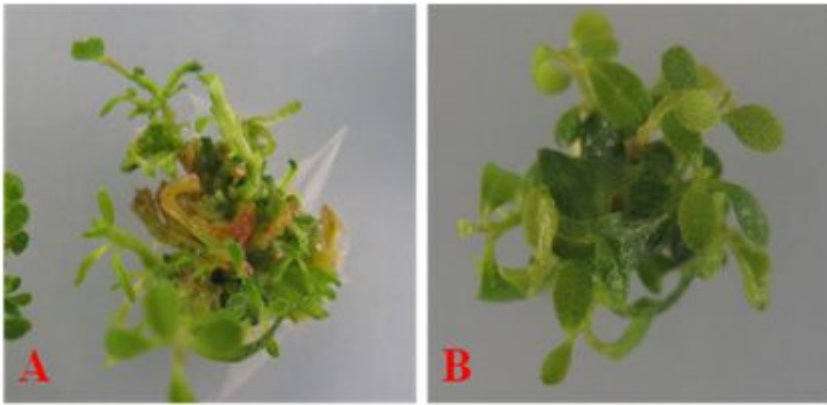


Fig. 6-1-10. Recovery from hyperhydricity on the half-strength AM medium (A, B).



Fig. 6-1-11. Rooting on the half-strength AM medium containing  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA (A, B); and acclimatization (C) of *R. keiskei* var. *hypoglaucum*.

Table 6-1-9. Growth traits measured after 45 days of greenhouse cultivation of *R. keiskei* var. *hypoglaucum*.

| Plant height (cm) | Stem diameter (mm) | Number of nodes/plant | Internode length (cm) | Chlorophyll (SPAD) |
|-------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| 2.01±0.8          | 1.7±0.29           | 7.0±1.1               | 0.09±0.03             | 12.7±2.62          |

Values are mean ± standard deviation from ten replicates.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 목표달성도

| 구분<br>(연도)     | 연구개발의 목표                   | 달성도<br>(%) | 연구개발의 내용  |
|----------------|----------------------------|------------|---|
| 1차년도<br>(2009) | ○ 토속화훼식물의 대량증식 기술 개발       | 100        | ○ 작약, 등굴레, 몇 가지 토속식물 (쌍꺼비풀, 섬개야광나무) 및 번홍화의 번식기술 개발<br>-조직배양을 통한 재분화 연구<br>○ 다양한 소독법을 이용한 무균배양법 확립<br>- NaOCl, CaOCl, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , HgCl <sub>2</sub> , 알코올, 항생제<br>○ 작약, 등굴레 및 토속식물의 기내번식<br>- 계대배양 |
|                | ○ 농가실증실험                   | 100        | ○ 농가실증실험  |
| 2차년도<br>(2010) | ○ 마디 및 경정배양을 통한 토속식물의 대량번식 | 100        | ○ 환경조건에 따른 토속식물의 마디 및 경정배양 조건 확립<br>- 최적 배양 배지 규명(MS, B5배지)<br>- 식물생장조절제<br>i) 사이토키닌 단용처리<br>ii) 옥신과 사이토키닌과의 혼용처리<br>- 배양환경조건 규명<br>i) 온도(18℃-25℃)<br>ii) 광도(10-60 μmol)<br>iii) 광주기(8-16시간)<br>- 계대배양 횟수를 통한 대량번식    |
|                | ○ 식물의 직·간접적 식물 재분화조건 확립    | 100        | ○ 식물체 재분화에 미치는 다양한 요인들의 효과<br>- 절편체(잎, 줄기, 엽병, 상배축, 하배축)<br>- 최적 배양배지 규명(MS, B5배지)<br>- 식물생장조절<br>I) 옥신 및 사이토키닌의 단용처리<br>ii) 옥신과 사이토키닌의 혼용처리<br>- 배양환경<br>I) 온도(18℃-25℃)<br>ii) 광도(0-60 μmol)<br>iii) 광주기(0-16시간)     |
|                | ○ 농가실증실험                   | 100        | ○ 농가실증실험  |

| 구분<br>(연도)     | 연구개발의 목표                      | 달성도<br>(%) | 연구개발의 내용   |
|----------------|-------------------------------|------------|--|
| 3차년도<br>(2011) | ○ 유도된 신초의 성장을 위한 조건 확립        | 100        | ○ 식물생장조절제에 의한 신초 성장<br>- 낮은 농도의 사이토키닌<br>- 다양한 농도의 GA <sub>3</sub> 처리  |
|                | ○ 성장한 식물체의 발근을 위한 조건 확립       | 100        | ○ 식물체의 기내발근에 미치는 다양한 요인들의 효과<br>- 배양배지(1/2, 1/4, MS배지)<br>- 탄소원(Sucrose, Glucose, Maltose)<br>- 옥신(IAA, IBA, NAA)<br>- 배양환경조건(암상태, 광상태)  |
|                | ○ 체세포배 발생을 이용한 식물체 재분화 시스템 개발 | 100        | ○ 체세포배 발생에 미치는 다양한 요인들의 효과<br>- 절편체(잎, 줄기, 엽병, 상배축, 하배축)<br>- 최적 배양배지(MS, B5배지)<br>- 식물생장조절<br>i) 옥신 단용처리<br>ii) 옥신과 사이토키닌의 혼용처리<br>- 배양환경조건 규명<br>i) 온도(18°C-25°C)<br>ii) 광도(0-60 μmol)<br>iii) 광주기(0-16시간) |
|                | ○ 농가실증실험                      | 100        | ○ 농가실증실험   |
| 4차년도<br>(2012) | ○ 체세포배의 성숙 및 발아를 위한 조건 확립     | 100        | ○ 배 성숙 및 발아조건 확립<br>- ABA, PEG, GA <sub>3</sub><br>- 다양한 Sucrose농도   |
|                | ○ 발근된 식물체의 순화체계 확립            | 100        | ○ 기내순화에 미치는 다양한 요인들의 효과<br>- 배양토(토질이상토, 펄라이트, 질석)<br>- 환경조건(광도, 상대습도, 온도)  |
|                | ○ 재분화된 식물체의 형태적 관찰            | 100        | ○ 형태학적 관찰<br>- 잎, 줄기, 개화, 종자 등   |
|                | ○ 농가실증실험                      | 100        | ○ 농가실증실험   |
| 5차년도<br>(2013) | ○ 선발된 식물의 자동화 배양 기술 개발        | 80         | ○ 일시적 침지 배양 방법에 따른 대량번식 시스템 확립<br>- 식물재료<br>i) 체세포배<br>ii) 줄기, 정단<br>- 배양배지<br>- 배지량 규명<br>- 침지 시간 및 횟수<br>- 식물생장 관찰   |
|                | ○ 농가실증실험                      | 80         | ○ 농가실증실험   |

## 제 2 절 관련분야의 기술발전 기여도

### 1. 활용방안

가. 영농 활용 : 조직배양으로 번식된 토속식물을 대량 생산이 가능케 됨

### 2. 기대성과

#### 가. 기술적 측면

- (1) 토속식물의 번식을 통해 다양한 유전자 풀(gene pool)을 보존할 수 있음
- (2) 조직배양을 통한 변이체 발견이 가능하므로 작물 육종에 원천으로써 사용가능해짐
- (3) 개발된 식물체 재분화 시스템을 이용하여 유전자 변형을 이용한 작물 육종이 가능해짐
- (4) 조직배양을 통한 토속식물체의 대량번식이 가능해짐

#### 나. 경제적·산업적 측면

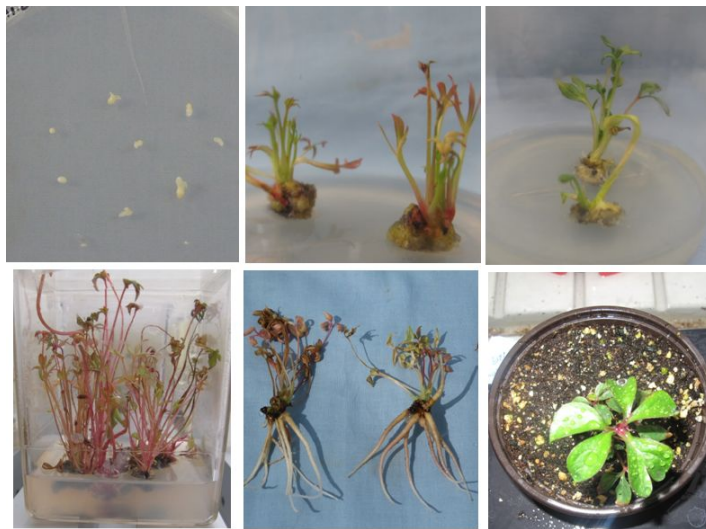
- (1) 대량번식 시스템 개발을 통해 식물 생산비 절감
- (2) 개발된 번식법은 대량번식을 요하는 조직배양 회사나 육묘장에 전수할 수 있음
- (3) 토종식물의 분화상품화로 국제 경쟁력 제고
- (4) 산업화·실용화를 위한 전략수립 및 마케팅, 수출현지 애로사항 수집, 해결

# 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 제 1 절 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

### 1. 상품화(1건)

가. 작약의 조직배양묘를 월드플라워를 통하여 판매



[첨부 2]

#### 농림축산식품연구개발과제 사업화실적 확인서

| 과제명    |  | 조직배양을 통한 토속식물의 대량번식기술 개발에 관한 연구 |                             |           |                   |
|--------|--|---------------------------------|-----------------------------|-----------|-------------------|
| 주관연구기관 | 경상대학교  | 참여기관                            | 서울대학교, 경남과학기술대학교            |           |                   |
| 책임자    | 정병룡  | 연구기간                            | 2009년 04월 ~ 2014년 04월(총 5년) |           |                   |
| 정부출연금  | 1,000,000,000원                               | 기업부담금                           | 250,000,000원                |           |                   |
| 기술이전명  | 작약 조직배양묘                                     | 기술실시대상기관                        | 월드플라워컴퍼니                    |           |                   |
| 기술료    | 0  | 기술실시일                           | 2014년 7월(예정)                |           |                   |
| 구분     | 기술실시 업체 경산맥 (단위 백만원)<br>• 최근연도 경산맥보고서에 의해 작성 | 해당기술을 통한 사업화 실적                 |                             |           |                   |
| 자산 총계  | 200  | 제품건수                            | 1                           |           |                   |
| 자본 총계  | 0  | 기술개발사업용 매출액                     | 한정하지 않음                     |           |                   |
| 부채 총계  | 0  |                                 |                             |           |                   |
| 매출액 총계 | -  |                                 |                             |           |                   |
| 제품별 실적 |  |                                 |                             |           |                   |
| 구분     | 제품명  | 제품사진                            | 제품출시 일                      | 매출액 (백만원) | 해당기술의 매출액 기여율 (%) |
| 1      | 작약 조직배양묘                                     |                                 | -                           | -         | -                 |

\* 첨부 : 경산맥보고서 1부 (보고서가 없는 경우, 재무상태표와 포괄손익계산서 첨부)

2014년 5월 20일

연구책임자 : 정 병 룡 (서인주인)

### 2. 정책자료(2건)

가. 섬개야광나무의 유리화 문제를 절감시키기 위한 조직배양 배지 내 규소 첨가 제안

- (1) 규소 종류:  $K_2SiO_3$
- (2) 규소 농도:  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$
- (3) 일자: 2013 년 7 월
- (4) 장소: 경상남도농업기술원

나. 야생화 스터디

- (1) 일자: 2014 년 3 월 25 일
- (2) 장소: 경상남도농업기술원
- (3) 발표자: 정병룡

3. 기술실시(1건)

가. 관상용 토속식물 대량번식기술

[별지 37]

실시(참여)기업 의견서

|   |   |        |              |
|---|---|--------|--------------|
| 실시기업  | 농원생약원   | 대표자    | 김원윤          |
| 사업자등록번호   | 6022 9017898  | 주민등록번호 |              |
| 기업유형  | <input type="checkbox"/> 대기업<br><input type="checkbox"/> 중소기업<br><input checked="" type="checkbox"/> 동업인(단체)<br><input type="checkbox"/> 기타 | 업태     | 번식, 판매       |
| 창업연차  | 2008. 1. 25 조직 및 인원   | 총복     | 장미           |
| 사업장주소   | 경남 김해시 진례면 삼인리 684  | 담당자    | 김원윤          |
|   |   | 연락처/팩스 | 018-566-4567 |
| 작성금액  | 1,000백만원  | 연관매출액  | 350백만원       |
| 주생산제품   | 장미 번식묘, 진화장비  |        |              |
| 이전희망기술  | 관상용 토속식물 대량번식기술   |        |              |
| 기술요점<br>감면사유  | 실시기업은 동업인으로 오랜 시간 농업에 종사하여 지역 농업발전에 기여한 바가 크기 때문에 기술료 감면을 요청함   |        |              |
| 이전기술<br>완용계획  | 현재의 주작목인 장미 뿐만 아니라 정육성 진달래 등 관상용 토속식물의 번식으로 사업을 확장한 계획임   |        |              |
| <p>귀 기관에서 수행한 과제의 기술에 대해 기술료 감면을 통한 기술이전을 받고자 상기와 같이 의견을 제출합니다.</p> <p>참 무 1. 사업자등록증 사본 1부<br/>                 2. 중소기업임을 증명할 수 있는 서류 1부.<br/>                 3. 추가감면에 따른 증빙서류(필요 시 제출) 1부, 등.</p> <p style="text-align: center;">2014년 4월 24일</p> <p style="text-align: right;">실시기업의 대표자 : 김원윤</p> |   |        |              |
| <p>주관연구기관장 귀하</p>   |   |        |              |



## 제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

### 1. 교육지도(9건)

- 가. 야생화 스터디[야생화(토속식물)와 그 이용]: 발표자 정병룡(2011년 5월)
- 나. APCBEES(Micropropagation of ornamental and medicinal plants): 발표자 정병룡(2011년 7월)
- 다. 야생화 스터디[야생화(토속식물) 번식 기술]: 발표자 정병룡(2011년 8월)
- 라. 야생화 스터디: 발표자 정병룡(2012년 5월)
- 마. APCBEES(Tissue culture as an efficient tool for mass propagation and research of ornamental germplasm): 발표자 정병룡(2012년 12월)
- 바. 야생화 스터디: 발표자 정병룡(2012년 12월)
- 사. 야생화스터디(조직배양을 통한 토속식물의 대량증식 기술): 발표자 정병룡(2013년 7월)
- 아. APCBEES(Tissue culture as an efficient tool for mass propagation and research of ornamental germplasm): 발표자 정병룡(2013년 7월)
- 자. 농심 초청 강연(고부가가치 약용식물의 식물공장 재배기술): 발표자 정병룡(2013년 10월)

### 2. 언론홍보(2건)

- 가. NewsRX 'New Botany Study Findings Have Been Reported by Scientists at Gyeongsang National University': 섬개야광나무 대량증식을 위한 신초 재분화 방법(2011년 4월)
- 나. 월간원에 '토속화훼식물 대량증식 기술 개발'(2014년 2월)



# 제 3 절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보 계획

## 1. 특허출원(1건)

| 특허명                       | 출원연도 | 출원인            | 출원국 | 출원번호            |
|---------------------------|------|----------------|-----|-----------------|
| 상록성 진달래의 조직배양에 의한 대량 증식방법 | 2012 | 이야칸누 시바네산, 정병룡 | 한국  | 10-2012-0091399 |

관인생략

## 출원번호통지서

출원일자 2012.08.21  
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(KP12060)  
 출원번호 10-2012-0091399 (접수번호 1-1-2012-0671252-55)  
 출원인명칭 경상대학교산학협력단(2-2004-010719-4)  
 대리인성명 김종석(9-2009-003900-9)  
 발명자성명 이야칸누시바네산 정병룡  
 발명의명칭 상록성 진달래의 조직배양에 의한 대량 증식방법

## 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
 \* 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
 \* 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
 \* 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
 \* 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
 \* 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
 \* 특허출원 10-2010-00000000, 상표등록출원 40-2010-00000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

## 2. 논문게재

### 가. SCI급 논문(7편)

- (1) Sivanesan, I., J.Y. Song, S.J. Hwang, and B.R. Jeong. 2011. Micropropagation of *C. wilsonii* Nakai - A rare endemic ornamental plant. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 105:55-63.
- (2) Sivanesan, I., M.S. Son, S. Jana, and B.R. Jeong. 2012. Secondary somatic embryogenesis in *Crocus vernus* (L.) Hill. *Propagation of Ornamental Plants* 12:163-170.
- (3) Sivanesan, I. and B.R. Jeong. 2012. In vitro propagation of *Polygonatum odoratum* Druce var. *pluriflorum* Ohwi F. *variegatum* Y.N. Lee. *Propagation of Ornamental Plants* 12:215-219.
- (4) Lim, M.Y., S. Jana, I. Sivanesan, H.R. Park, J.H. Hwang, Y.H. Park, and B.R. Jeong. 2013. Analysis of genetic variability using RAPD markers in *Paeonia* spp. grown in Korea. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 31:322-327.
- (5) Sivanesan, I. and B.R. Jeong. 2013. Direct adventitious shoot regeneration from cotyledonary explants of *Jeffersonia dubia* benth et. Hook. *Propagation of Ornamental Plants* 13:46-48.
- (6) Sivanesan, I. and B.R. Jeong. 2013. Micropropagation of *Rhododendron keiskei* var. *hypoglaucom* Suto and Suzuki and assessment of clonal fidelity of plantlets by RAPD. *Propagation of Ornamental Plants* 13:123-129.
- (7) Sivanesan, I., S. Jana, and B.R. Jeong. 2014. In vitro shoot regeneration and microcorm development in *Crocus vernus* (L.) Hill. *Pakistan J. Bot.* 46:693-697.

### 나. 비SCI급 논문(3편)

- (1) Sivanesan, I., M.Y. Lim, E.H. Jo, and B.R. Jeong. 2011. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Crocus vernus*. 2011 2nd International Conference on Environmental Science and Development 4:199-201.
- (2) Jana, S., I. Sivanesan, M.Y. Lim, and B.R. Jeong. 2013. In vitro zygotic embryo germination and somatic embryogenesis through cotyledonary explants of *Paeonia lactiflora* Pall. *Flower Res. J.* 21:17-22.
- (3) Jana, S. and B.R. Jeong. 2014. Multiple shoot induction in *Paeonia lactiflora* 'Hortensis' and rooting and antioxidant enzyme analysis for rhizogenesis. *Sci. Internal.* (Accepted)

## 3. 논문발표

### 가. 포스터 발표(13건)

- (1) Sivanesan, I. and B.R. Jeong. 2010. In Vitro Axillary Shoot multiplication through nodal explants of *Rhododendron brachycarpum* D. Don. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 28 (Suppl.

I):151-152.

- (2) Sivanesan, I., M.Y. Lim, E.H. Jo, and B.R. Jeong. 2010. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Crocus vernus*. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 28 (Suppl. II):152.
- (3) Lim, M.Y., I. Sivanesan, and B.R. Jeong. 2010. In vitro propagation of *Polygonatum odoratum*. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 28 (Suppl. II):132.
- (4) Sivanesan, I., J.Y. Song, and B.R. Jeong. 2010. Micropropagation of *Cotoneaster wilsonii* Nakai - a rare endemic ornamental plant. The 28th International Horticultural Congress 443.
- (5) Lim, M.Y., I. Sivanesan, and B.R. Jeong. 2010. Influence of plant growth regulators and temperature on embryo germination and seedlings growth of *Paeonia lactiflora*. The 28th International Horticultural Congress 442.
- (6) Lim, M.Y., I. Sivanesan, and B.R. Jeong. 2011. In vitro propagation of *Jeffersonia dubia* Benth et. Hook. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 29 (Suppl. I):190-191.
- (7) Sivanesan, I. and B.R. Jeong. 2011. Micropropagation of *Rhododendron brachycarpum* D. Don. First International Symposium on Medicinal, aromatic and nutraceutical plants from mountainous areas p. 116.
- (8) Jana, S., I. Sivanesan, M.Y. Lim, and B.R. Jeong. 2012. Somatic embryogenesis in *Paeonia lactiflora* Pall. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 30 (Suppl. II):161.
- (9) Sivanesan, I., C.H. Ko, and B.R. Jeong. 2012. Direct adventitious shoot regeneration from cotyledonary explants of *Jeffersonia dubia* Benth et. Hook. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 30 (Suppl. II):161.
- (10) Lee, J.P., I. Sivanesan, M.Y. Lim, and B.R. Jeong. 2012. Influences of medium and cytokinins on shoot multiplication from the shoot bud explant of *Jeffersonia dubia* Benth et. Hook, an important ornamental plant. International Conference for Germplasm of Ornamentals, Beijing, China. 117.
- (11) Sivanesan, I. and B.R. Jeong. 2012. Micropropagation of *Rhododendron brachycarpum* D. Don. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 30 (Suppl. II):208.
- (12) Sivanesan, I. and B.R. Jeong. 2012. Effect of light quality and cytokinin on shoot regeneration from nodal explant of *Rhododendron brachycarpum* D. Don. 7th International Symposium on Light in Horticultural Systems 191.
- (13) Sivanesan, I., J.Y. Song, and B.R. Jeong. 2012. Tissue culture as an efficient tool for mass propagation and research of ornamental germplasm. International Conference for Germplasm of Ornamentals, Beijing, China.

#### 나. 구두 발표(2건)

- (1) Sivanesan, I., S. Jana, and B.R. Jeong. 2013. In vitro shoot regeneration % microcorm development in *Crocus vernus* (L.) Hill. 2<sup>nd</sup> International Symposium on Plant

Cryopreservation 104.

- (2) Jana, S., I. Sivanesan, Y.G. Park, and B.R. Jeong. 2013. Multiple shoot induction from rhizomatous buds and rooting in *Paeonia lactiflora* Pall 'Hortensis'. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 30 (Suppl. II):44.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 미국에서는 미시간주립대학이 주도가 되어 자생숙근류들에 대하여 원예화 하는 실험이 오랫동안 수행되어 대량번식과 개화조절방법이 일반화되어 상품화되고 있다.
2. 초본성 작약과 가까운 관계에 있는 목본성 작약(*Paeonia suffruticosa*)의 경우 일본에서 많은 연구가 진행되어왔다. 화아 형성과 발달의 해부학적 연구(Hosoki et al., 1989), 휴면에 미치는 온도의 영향(Aoki, 1992), 휴면 타파를 위한 화학물 처리(Hosoki et al., 1989), PGR을 이용한 초장조절(Hamada et al., 1990)등이 이루어져 있다.
3. 초본성 작약(*Paeonia lactiflora*)은 번식에 있어 대량 생산을 위한 조직배양이 연구(Habib et al., 2000; Hansen et al., 1995)가 연구되었다고 하지만 아직 현실적으로 활용되지 못하고 있다.
4. 휴면타파와 화아의 발달을 위해서는 6℃에서 40일간의 저온 처리가 필요하다고 했으며(Halevy et al., 2002), Kamenetsky(2003)에 6℃에서 10주, 2℃에서는 8.6주가 요구된다고 조사하였다. 휴면타파에 GA 처리가 부분적인 효과가 있음이 밝혀졌으며(Haevy et al., 2002), 일장은 저온 처리 기간, 생육 전 기간에 걸쳐 개화에 영향을 주지 못한다고 보고 되어있다. 꽃 수확 이후에 저온 처리를 통해 단, 장기간의 절화 저장이 가능하다.

## 제 7 장 참고문헌

- An, W.S., M.O. Park, S.K. Kim, Y.M. Han, C.H. An, H.K.S. Kim, M.S. Yoon, D.Y. Hyun, and H.J. Baek. 2011. Genetic Resources Collection of Crop Landrace at Kanghwa, Ulreung and Jeju Islands in Korea. *Kor. J. Plant Res.* 24:650-658.
- Aoki, N. 1992. Effects of pre-chilling and pre-and post-budbreak temperature on the subsequent growth and cut-flower quality of forced tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.). *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 61.
- Bhojwani, S.S., D. Cohen, and P.R. Fry. 1982. Production of virus-free garlic and field performance of micropropagated plants. *Sci. Hort.* 18:39-43.
- Carew, D.P. and E.J. Staba. 1965. Plant tissue culture; its fundamentals, application and relationship to medicinal plant studies. *Lloydia* 28:1-26.
- Etienne, H. and M. Berthouly. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 69:215-231.
- Gamborg, O.L., T. Murashige, T.A. Thorpe, and I.K. Vasil. 1976. Plant tissue culture media. In *Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 12:473-478.
- Habib, A., L. D'Aoust, and D. Donnelly. 2000. 319 Micropropagation of Herbaceous Peony. *HortScience* 35:447-447.
- Halevy, A. H., M. Levi, M. Cohen, and V. Naor. 2002. Evaluation of methods for flowering advancement of herbaceous peonies. *HortScience* 37:885-889.
- Hamada, M., T. Hosoki, and T. Maeda. 1990. Shoot length control of tree peony (*Paeonia suffruticosa*) with uniconazole and paclobutrazol. *HortScience.* 25:198-200.
- Hansen, C., L. Stephens, and H. Zhang. 1995. In vitro propagation of fern-leaf peony. *Am. Peony Soc. Bull.* 296:7-10.
- Hosoki, T., M. Ando, T. Kubara, M. Hamada, and M. Itami. 1989. In vitro propagation of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by a longitudinal shoot-split method. *Plant cell reports.* 8:243-246.
- Kamenetsky, R., A. Barzilay, A. Erez, and A.H. Halevy. 2003. Temperature requirements for floral development of herbaceous peony cv. 'Sarah Bernhardt'. *Sci. Hort.* 97:309-320.
- Kozai, T. 1991. Acclimatization of micropropagated plants. In *High-Tech and Micropropagation I* (pp. 127-141). Springer Berlin Heidelberg.
- Lim, M.Y., S. Jana, I. Sivanesan, H.R. Park, J.H. Hwang, Y.H. Park, and B.R. Jeong. 2013. Analysis of genetic variability using RAPD markers in *Paeonia* spp. grown in Korea. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 31:322-327.
- Plessner, O., M. Ziv, and M. Negbi. 1990. In vitro corm production in the saffron crocus (*Crocus sativus* L.). *Plant cell, tissue and organ culture*, 20:89-94.
- Sivanesan, I. and B.R. Jeong. 2013a. Direct adventitious shoot regeneration from cotyledonary explants of *Jeffersonia Dubia* Benth et. Hook. *Propagation of Ornamental Plants.* 13:46-48.
- Sivanesan, I. and B.R. Jeong. 2012. In vitro propagation of *Polygonatum odoratum* Druce var. pluriflorum Ohwi F. variegatum Y.N. Lee. *Propagation of Ornamental Plants* 12:215-219.
- Sivanesan, I. and B.R. Jeong. 2013b. Micropropagation of *Rhododendron keiskei* var. hypoglucum Suto and Suzuki and assessment of clonal fidelity of plantlets by RAPD. *Propagation of*

Ornamental Plants 13:123-129.

- Sivanesan, I., J.Y. Song, S.J. Hwang, and B.R. Jeong. 2011. Micropropagation of *Cotoneaster wilsonii* Nakai rare endemic ornamental plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 105:5-63.
- Sivanesan, I., M.S. Son, S. Jana, and B.R. Jeong. 2012. Secondary somatic embryogenesis in *Crocus vernus* (L.) Hill. *Propagation of Ornamental Plants* 12:163-170.
- Tian, D., K.M. Tilt, F. Dane, F.M. Woods, and J.L. Sibley. 2010. Comparison of shoot induction ability of different explants in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.). *Sci. Hort.* 123:385-389.
- Vasil, I. K. and V. Vasil. 1972. Totipotency and embryogenesis in plant cell and tissue cultures. In *Vitro* 8:117-125.
- Yoon, E.S. and Y.E. Choi. 2002. Micropropagation and mass production of adventitious roots of *Polygonatum odoratum* via the culture of seedling explant. *J. Plant Biotechnol.* 4:33-37.

제2협동연구기관  
최종보고서

# 바위솔, 노루귀의 대량증식 및 고품질 분화 재배기술 개발

경남과학기술대학교



# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “토속화훼자원의 상품화 및 수출확대를 위한 대량증식과 고품질 생산 기술 개발” 과제(제2협동과제 “바위솔, 노루귀의 대량증식 및 고품질 분화 재배기술 개발”)의 보고서로 제출합니다.

2014년 4월 일

주관연구기관명 : 서울대학교  
주관연구책임자 : 김 기 선  
협동연구기관명 : 경남과학기술대학교  
협동연구책임자 : 윤 재 길  
선 임 연구 원 : 천 영 신  
선 임 연구 원 : 정 경 진  
연구 원 : 하 수 현, 이 영 철,  
최 재 섭

# 요 약 문

## I. 제 목 (제2협동과제)

바위솔, 노루귀의 대량증식 및 고품질 분화 재배기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발 목적

- 가. 바위솔과 노루귀의 종자 발아생리 구명으로 대량증식 기술 개발
- 나. 바위솔과 노루귀의 분화 생산을 위한 적정 환경 조건 구명
- 다. 바위솔과 노루귀의 개화생리 구명에 의한 개화 조절 기술 개발
- 마. 바위솔과 노루귀의 개화생리 구명 및 개화조절
- 바. 국산 바위솔의 대 일본 시험 수출 및 시장 조사
- 사. 일장 조절이 가능한 장식장 개발

### 2. 연구개발 필요성

- 가. 노루귀의 대량증식 및 고품질 분화 생산 기술 개발
  - o 노루귀(*Hepatica asiatica* Nakai)는 우리 나라 자생식물로서 어린 잎이 노루귀를 닮았다고 해서 노루귀라고 불리고 있음
  - o 우리나라에는 노루귀(*Hepatica asiatica* Nakai) 새끼노루귀(*H. insularis* Nakai), 섬노루귀(*H. Maxima* Nakai) 3종이 있음
  - o 노루귀는 잎이 나오기 전인 3-4월에 꽃이 먼저 피며 흰색, 연분홍색, 자주색 화색을 지니고 있는 것이 큰 특징으로 꽃 모양이 예쁘고 아름다움
- (1) 노루귀 종자 발아 생리 구명
  - o 그동안 상업화되지 못한 가장 큰 이유는 파종후 발아까지 1년이나 걸리며, 개화까지는 3년 이상이나 걸린다는 점임.
  - o 그러므로, 종자의 휴면과 발아 생리를 구명하여 조기에 발아시키는 기술 개발이 절실함
- (2) 조직배양기술에 의한 급속대량 증식 기술 개발
  - o 노루귀 종자는 매우 복잡한 휴면 기작을 가지고 있어 종자에 의한 번식에는 한계가 있음
  - o 조직배양 기술을 이용하여 급속 대량증식이 가능하다면 획기적인 기술이 될 수 있음
  - o 더욱이 교배를 통해 고부가가치의 변이종이 발생하는 경우, 이의 형질을 지속시키기 위해서는 조직배양 기술을 통한 대량증식 기술이 필요하게 됨

필요시 조직배양을 통한 급속대량증식 기술 개발이 절실함

(3) 노루귀의 분화 생산을 위한 적정 환경조건 구명

- 노루귀를 분식물로 개발하기 위해서는 먼저 적정 환경조건, 즉, 광도, 용토, 시비 수준등이 구명되어야 함

나. 바위솔의 대량증식 및 고품질 분화 생산 기술 개발

- 바위솔은 돌나물과(Crassulaceae) 바위솔속(*Orostachys*)에 속하며 우리나라에는 애기바위솔(*Orostachys filifera*), 연화바위솔(*O. iwarenge*), 바위솔(*O. japonicus* A. Berger), 둥근바위솔(*O. malacopyllus* F.), 난쟁이바위솔(*O. sikokianus*) 등 총 8종이 보고되었음
- 바위솔은 지역에 따라 다양한 종들이 자생하며, 자연 교잡에 의한 다양한 변이체가 발생하여 같은 종내에서도 엽색과 엽형이 다양한 개체가 발생되어 관상가치가 충분함
- 바위솔은 8월부터 추대가 시작되어 가을에 수상화서에 많은 소화가 아름답게 꽃이 피며 개화기간이 1개월 이상이 되기 때문에 관상가치가 높다. 특히 연화바위솔은 엽색이 부드럽고 꽃도 아름다워 일본사람들이 매우 좋아하는 성질을 가지고 있기 때문에 분화로 개발될 경우 대 일본 수출 가능성이 매우 높음.

(1) 바위솔 종자 발아 생리 구명

- 바위솔을 분화로 개발하기 위해서는 먼저, 대량증식 기술이 확립되어야 함.
- 종자 발아 및 휴면생리를 구명하여 필요시 언제든지 번식할 수 있는 체제가 필요함

(2) 바위솔 분화 생산을 위한 적정 환경 조건 구명

- 노루귀를 분식물로 개발하기 위해서는 먼저 적정 환경조건, 즉, 광도, 용토, 시비 수준 등이 구명되어야 함

다. 바위솔과 노루귀의 개화 생리구명으로 개화 시기 조절

- 바위솔은 개화가 되면 모체가 죽는 일년생 식물임
- 따라서 관상 기간을 연장하기 위해서는 개화를 억제할 필요가 있음
- 일장 조절에 의한 개화 조절이 가능한
- 노루귀는 파종후 3년째에 개화하게 됨
- 개화생리를 파악하여 조기에 개화시킴으로써 육종 연한을 줄일수 있음

라. 일본 시장 조사와 시험 수출

- 토속 바위솔과 노루귀의 해외 수출을 위한 일본 분화 시장 조사 필요
- 시험 수출을 통한 일본 시장의 반응을 조사

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

| 구분   | 연도   | 연구개발의 목표                          | 연구개발의 내용  |
|------|------|-----------------------------------|---|
| 1차년도 | 2009 | ○ 자생 바위솔과 노루귀의 종류별 수집 및 특성조사      | ○ 야생종 및 재배종 수집<br>○ 자생지 및 회사, 연구소 등으로부터 수집                                    |
|      |      | ○ 상기 식물들 중 우수 형질 식물 선발            | ○ 관상가치가 높은 수종 선발<br>- 화색이 선명하고 특이한 종<br>- 엽색이 선명하고 병충해에 강한 종<br>- 대량증식이 용이한 종 |
| 2차년도 | 2010 | ○ 바위솔종자의 발아생리 구명 및 대량증식 기술 개발     | ○ 바위솔의 종자형태 관찰<br>○ 바위솔 종자의 휴면여부 조사 및 휴면 타파기술 개발                              |
|      |      | ○ 노루귀 종자의 발아생리 구명 및 대량증식 기술개발     | ○ 노루귀의 종자형태 관찰<br>○ 노루귀 종자의 휴면여부 조사 및 휴면 타파기술 개발                              |
|      |      | ○ 노루귀 대량증식을 위한 영양변식 기술 개발         | ○ 고효율 근삼기술 개발   |
|      |      | ○ 일본 야생화 생산농가 및 시장조사              | ○ 노루귀 전문 재배농가 견학<br>○ 야생화 유통시장 조사   |
| 3차년도 | 2011 | ○ 바위솔과 노루귀의 생육 적정 광도 구명           | ○ 차광망을 이용하여 4단계로 광도를 달리하여 재배<br>○ 4-6개월 재배후 식물의 생육 및 품질을 조사                   |
|      |      | ○ 바위솔과 노루귀의 적정 분 용토 선발            | ○ 일반 상토 및 인공용토를 단용 또는 혼용하여 식물 재배<br>○ 4-6개월 후 식물의 생육 및 품질을 조사                 |
|      |      | ○ 바위솔과 노루귀의 생육에 적합한 시비량 및 시비횟수 구명 | ○ 액비를 제조하여 시비량과 시비횟수를 달리하여 식물을 재배<br>○ 4-6개월 후 식물의 생육 및 품질을 조사                |

|      |      |   |   |
|------|------|---|---|
| 4차년도 | 2012 | ○ 일장을 이용한 개화억제 및 휴면 회피 기술 개발                                      | ○ 선발된 토속바위솔의 일장반응 구명.<br>- 일장반응에 따른 토속 바위솔 분류<br>○ 바위솔 휴면 기작에 관여하는 일장조건 구명<br>○ 일장조절을 통한 개화 및 휴면 회피 기술 개발     |
|      |      | ○ 조직배양기술에 의한 노루귀 대량증식 기술개발  | ○ 다양한 소독법을 이용한 식물절편체의 무균배양법 확립<br>○ 최적 배양배지 구명<br>○ 신초 및 뿌리를 유도하는 생장조절제 조건 확립<br>○ 최적 배양환경 구명<br>- 적정 배양온도 구명 |
|      |      | <실험설계 외 추가실험><br>○ 토속 바위솔에 대한 소비자 선호도 조사<br>(바위솔 상품화를 위한 기초자료 수집) | ○ 토속 바위솔을 분에 심어 상품화<br>○ 다양한 연령대를 대상으로 선호도 조사<br>○ 연령대별로 선호도 분석   |
| 5차년도 | 2013 | ○ 일장과 온도 조절이 가능한 개화조절용 장식용 상자개발                                   | ○ 일장을 조절하여 개화시기를 조절할 수 있는 전용 상자 개발<br>○ 온도를 조절하여 상록식물화 가능한 상자 개발  |
|      |      | ○ 농가 현장 실증 실험 및 문제점 보완  | ○ 개화억제 기술 농가 실증실험<br>○ 바위솔 종자번식 방법 농가에 이전<br>○ 종자발아 및 재배기술 매뉴얼 작성   |
|      |      | ○ 개발된 토속식물 분화 해외 시험 수출  | ○ 포천바위솔 및 지리산 바위솔등 일본 시험 수출   |

#### IV. 연구개발 결과

##### [ 1차년도 ]

##### 1. 자생 바위솔 종류별 수집 및 특성조사

바위솔, 둥근바위솔, 난쟁이바위솔, 연화바위솔, 줄바위솔 등 총 19종의 바위솔을 전국에서 수집하여 특성조사를 행했다. 잎의 형태적 특징과 엽색 그리고 크기 등을 조사하여 분류하였으며, 개화시기에 따라 분류하였다. 또한 꽃의 크기와 색, 총포, 꽃받침수, 꽃잎수 등 화기 특성을 조사하여 관상가치가 높은 바위솔을 선발하였다. 둥근바위솔, 제주연화바위솔, 진주바위솔, 줄바위솔 등이 관상가치가 높은 바위솔로 선발되었다.

##### 2. 자생 노루귀 종류별 수집 및 특성조사

노루귀 (*Hepatica asiatica* Nakai), 섬노루귀 (*H. maxima*), 새끼노루귀 (*H. insularis*)를 수집하여 특성조사하였다. 노루귀는 전국에 걸쳐 분포하나 섬노루귀는 경상북도 울릉도에 자생하고 새끼노루귀는 남해안과 제주도와 같이 남쪽에 주로 분포하는 것으로 조사되었다. 식물체 크기는 섬

노루귀, 노루귀, 새끼노루귀 순이었으며, 꽃의 크기도 식물체 크기순이었다. 꽃은 홑꽃으로 꽃잎은 6-9장이었으며, 화색은 흰색에서 붉은 보라색이었다.

### 3. 토속 바위솔중 관상가치 높은 종 선발

#### 가. 바위솔 소비자 선호도 조사

토속바위솔과 외래종 바위솔들에 대한 선호도를 조사하기 위해 작은 토분에 심어 경남과기대 원예학과에서 개최하는 봄꽃축제에 참여하는 모든 사람들을 대상으로 선호도를 조사하였다. 선호도는 응답자 연령대에 따라 달라졌는데, 20대에서 가장 선호하는 바위솔은 거미줄바위솔이었으며 다음으로 태백동근바위솔과 강원상동연화바위솔이었다. 30대에서 가장 좋아하는 바위솔은 태백동근바위솔, 그리고 자질연화바위솔 줌바위솔 순이었으며, 40대에서 가장 좋아하는 바위솔은 자질연화바위솔이었으며, 다음이 줌바위솔, 태백동근바위솔순이었다.

단품식재와 모듬식재에 대한 선호도는 20대에서는 단품식재를 좋아하였으나, 30대와 40대는 모듬식재를 더 선호하는 것으로 나타났다. 가격대에 대한 선호도는 20대는 2,000원대가 가장 높고, 30대는 3,000원대가 더 높았으나 40대는 다시 2,000원대를 더 선호하는 것으로 나타났다.

## [ 2차년도 ]

### 4. 바위솔 종자의 형태와 발아촉진 기술 개발

#### 가. 바위솔 종자의 형태적 특성

바위솔 종자들은 육안으로 구별할 수 없을 정도로 작은 크기로 (0.3~0.8mm), 미세종자로 분류되었다. 형태는 쌀알모양이며 색은 갈색이 대부분이었다. 대부분의 종류는 10-11월에 종자가 성숙된 후 휴면에 들어가 발아를 위해서는 저온이 필요한 것으로 나타났다.

#### 나. GA 처리가 바위솔 종자의 발아에 미치는 영향

삼척바위솔의 경우 GA 200~400mg·L<sup>-1</sup> 용액에 24시간 침지 처리함으로써 발아세와 발아율이 획기적으로 향상되었으며, 발아적정 온도는 15℃로 90% 이상 발아되었다. 그러나 10℃와 20℃에서는 50% 이하로 발아율이 떨어져 온도에 민감한 종인 것을 알 수 있었다. 그러나 태백바위솔은 GA 용액(200~400mg·L<sup>-1</sup>) 처리 후 20℃에 치상하였을 때 40% 정도 발아되었으나, 10, 15℃에서는 발아율이 20% 이하로 낮게 나타나, 바위솔 종류에 따라 GA에 대한 반응이 다르다는 것을 알 수 있었다.

### 5. 노루귀 종자의 발아생리 구명 및 대량증식 기술개발

#### 가. 노루귀 종자의 형태적 및 생태적 특징

노루귀 종자는 개화 후 5-6월경에 맺히며 형태적으로 미숙배를 가지고 있다는 것을 알 수 있었다. 미숙배가 성숙하기 위해서는 어느 정도의 고온이 필요하며, 성숙이 완료된 배는 가을(10~11월)에 유근으로 발달하며 발아하는 것을 관찰할 수 있었다. 온도가 더 떨어지는 겨울에는 유근이 휴면에 들어가고 휴면을 타파하기 위해서는 일정 기간의 저온을 필요로 한다는 것을 알 수 있었다.

#### 나. 종자 휴면타파를 위한 온도 및 GA 처리

5월에 채종한 종자에 여러 가지 항온 및 변온 처리를 한 결과, 15℃ 항온처리에서 발아율이

50%로 가장 높았으며 이보다 높은 향은 및 변온처리에서는 발아율이 오히려 낮아졌다. GA 200~500mg·L<sup>-1</sup> 용액에 24시간 침지처리 했을 때, 대조구보다 발아가 1개월 정도 일찍 시작되었으나, 최종 발아율은 40~50%로 그다지 높지는 않았다.

## 6. 노루귀 대량증식을 위한 뿌리를 이용한 삼목 번식

뿌리를 이용한 대량증식 가능성을 확인하기 위해, 뿌리의 길이를 달리하거나 BA를 농도별(50~500mg·L<sup>-1</sup>)로 처리, 또는 삼목용토를 달리하여 실험을 수행하였으나, 어떤 처리에서도 발근이 되거나 발아가 된 것은 나타나지 않았다. 노루귀의 근삽은 불가능하다고 판단되었다.

## 7. 일본 야생화 생산 능가 및 야생화 시장 조사

### 가. 일본 노루귀 전문농가 방문 및 연수 (니카타 현)

일본에서 노루귀를 가장 오래 재배하고 육종도 활발하게 하는 것으로 알려진 니이가타현의 Sasanuma(笹沼) 園藝 센터와 Chuechu (中越) 식물원을 방문하였다. 재배시설들을 견학하고 파종에서 개화주를 얻기까지의 재배기술, 계절별 관리요령, 환경관리 요령 등을 연수하였고, 채종에서부터 수분 수정에 이르기까지의 육종 기술 등을 연수하였다.

### 나. 일본 야생화 시장 조사

도쿄의 홈센터와 오사카와 같은 대도시의 원예가든, 꽃집 등, 다양한 화훼유통기관들을 방문하여 일본에서의 야생화 시장 여건을 견학 조사하였다. 도쿄와 같은 대도시에서는 대형 홈센터에 가든 센터를 설치하여 각종 초화류와 원예자재를 판매하고 있었다. 여기에 각종 야생화가 전시되어 판매되고 있었다. 특히, 노루귀가 다양한 색으로 육종되어 소비자의 손길을 기다리고 있었으며, 바위솔 종류는 크게 눈에 띄지 않았다. 그러나 복수초, 금낭화, 비비추와 같이 우리나라에 자생하고 있는 야생화도 많이 판매되고 있었으며 생산체계가 확립되어 있는 것을 알 수 있었다.

## [ 3차년도 ]

### 8. 바위솔의 생육 적정광도 및 내음성 구명

능유바위솔과 자질연화바위솔 및 태백바위솔의 적정 광도와 내음성을 알아보기 위해 자연광을 52, 82, 90, 97%로 차광하고 재배한 후 생육조사를 하였다. 세 종류의 바위솔 모두 52% 차광에서 생육이 가장 좋은 것으로 나타났다. 그러나 능유바위솔은 82% 차광하에서도 생존율이 95% 이상이나 되어 내음성이 매우 뛰어난 식물임을 알 수 있었다. 자질연화바위솔과 태백바위솔도 82% 차광하에서 생육은 느리나 생존에는 지장이 없는 것으로 나타나, 내음성이 우수한 것으로 판단되었다.

### 9. 토속 바위솔의 적정 분용토 및 시비 수준 구명

능유바위솔과 자질연화바위솔 및 태백바위솔의 적정 분용토와 시비수준을 구명하기 위한 실험을 수행하였다. 능유바위솔과 자질연화바위솔은 마사토 : 유기상토 : 강모래 (6:2:2, v/v/v) 혼합 용토에서 생육이 가장 우수한 것으로 나타났다. 반대로 유기상토 함유율이 높을수록 생육과 생존율이 떨어졌다. 한편, 태백등근바위솔은 모든 용토에서 생육이 비슷하게 나타나 토양 적응성이 뛰어난 것으로 나타났다.

적정 시비수준을 구명하기 위하여 하이포넥스 액비를 1,000배액과 2,000배액을 이용하여 주 1회 또는 2주 1회 관주처리하였다. 능유바위솔과 자질연화바위솔의 경우 시비 수준이 높을수록 생육이 좋게 나타났다. 1,000배액과 2,000배액을 주 1회 처리하였을 때 대조구보다 2배 이상의 생육을 보였다. 태백등근바위솔에서도 시비수준이 가장 높은 1,000배액을 주 1회 처리했을 때 생육이 가장 뛰어났다.

## 10. 노루귀와 섬노루귀의 고품질 분화 생산을 위한 적정 환경 조건 구명

### 가. 노루귀와 섬노루귀의 생육 적정 광도 구명

차광율이 52, 82, 90, 97%가 되도록 재배환경을 만들어 노루귀와 섬노루귀를 4개월간 재배하고 생육을 조사하였다. 두 가지 중 모두 차광이 높을수록 잎이 살아 남아있었고, 차광율이 낮을수록 잎이 말라 죽었다. 차광율 52%에서 노루귀는 35%, 섬노루귀는 70%가 지상부가 말라 죽어, 노루귀의 잎을 여름까지 지속시키기 위해서는 차광율이 80%를 넘어야 한다고 판단되었다. 다른 특성에서는 뚜렷한 차이가 보이지 않았다.

### 나. 노루귀의 적정 분용토 구명

마사토, 유비상토, 녹소토, 모래 등을 단용 또는 혼용하여 노루귀를 식재하고 10주간 재배한 후 생육 상태를 조사하였다. 생존율은 마사토:유비상토:녹소토 (6:1:3, v/v/v)와 모래:유비상토:녹소토 (5:2:3, v/v/v)에서 85% 이상으로 높았으며, 유비상토가 많이 들어간 모래:유비상토:녹소토 (5:3:2, v/v/v)에서는 46%로 가장 낮았다. 발효이 많이 들어간 발효:모래 (4:6, v/v)에서도 생존율이 60%로 낮아 노루귀에는 적합하지 않았다.

### 다. 노루귀와 섬노루귀의 생육 적정 시비 수준 구명

하이포넥스 액비를 1,000배, 2,000배로 희석하고 주 1회 또는 2주 1회 관주처리한 후 생육조사를 하였다. 10주간 재배한 후 노루귀의 생존율, 엽수 및 초장 등 모든 생육지표에서 유의적인 차이가 보이지 않았다. 섬노루귀에도 마찬가지로 생존율, 엽수, 초장 등의 지표에서 처리간 유의적인 차이가 보이지 않았다. 따라서 노루귀와 섬노루귀는 생육이 늦은 성질로, 시비는 매우 낮은 수준에서 생육이 가능하다고 판단되었다.

## 11. 노루귀와 섬노루귀의 축성재배를 위한 저온처리 효과 구명

휴면중인 노루귀를 11월부터 15일 간격으로 가온 하우스에 넣어 맹아 속도와 정도를 조사하였다. 11월 15일에 입실한 노루귀는 35일이 지나서 맹아하기 시작하였고 최종적으로 70%의 식물이 맹아하였다. 그러므로 자연상태에서 11월 15일이면 이미 휴면타파가 끝나는 시기인 것으로 판단해도 좋을 것으로 생각된다. 한편 입실시기가 늦어질수록 (저온처리기간이 길수록) 맹아 시작일은 짧아졌으며, 12월 30일에 입실한 노루귀는 입실 후 12일만에 맹아가 시작되었다. 섬노루귀도 비슷한 경향을 보였다. 11월 21일 입실한 섬노루귀는 입실 후 33일째에 맹아되기 시작하였으며, 최종 맹아율은 약 70%에 달했다. 입실 일이 늦어질수록 맹아개시일은 짧아졌으며 12월 21일에 입실시킨 섬노루귀는 3.3일만에 맹아가 이루어졌으며, 최종 맹아율은 90%에 달했다.



## [ 4차년도 ]

### 12. 일장을 이용한 바위솔의 개화억제 및 휴면 타파 기술 개발

#### 가. 태백바위솔(*O. malacophyllus* from Taeback)의 일장 반응

일장조절실에 일장을 8, 10, 12, 14, 15, 16시간으로 설정하고 태백바위솔을 넣어 약 50일간 재배한 후 추대신장 및 개화를 조사하였다. 일장조절실에 입실하고 1주일 지났을 때, 모든 처리구에서 화아가 확인되었다. 그러나 그 후 화서의 신장(추대)은 14h 이하의 일장에서만 관찰되었다. 더욱이 소화가 개화되는 일장은 12h 이하에서만 관찰되었다. 따라서 추대를 위한 일장과 소화의 개화를 위한 한계일장이 다르다는 것을 알 수 있었다.

#### 나. 가지바위솔(*O. ramosus*)의 일장 반응

태백바위솔과 동일한 일장 조건에서 가지 바위솔을 50일간 재배한 후, 개화와 생육을 조사하였다. 태백바위솔과는 다르게 어떤 일장하에서도 개화는 보이지 않았다. 생육은 일장이 길수록 좋아, 잎의 길이와 폭이 일장이 짧은 환경의 식물체보다 길고 커졌다. 10시간 이하의 일장에서는 생육이 느리긴 하지만, 정상적으로 생육하고 있는 것으로 관찰되었다. 따라서 가지바위솔은 일장을 10시간 이하로 조절한다면, 아담한 상태로 지속시킬 수 있을 것으로 보였다.

#### 다. 자질연화바위솔(*O. iwarenge*)의 일장반응

태백바위솔과 동일한 일장 조건에서 가지 바위솔을 50일간 재배한 후, 개화와 생육을 조사하였다. 자질연화바위솔은 가지바위솔과 비슷한 반응을 보였다. 즉, 어떤 일장하에서도 개화는 보이지 않았으며 일장이 길수록 생육이 좋아, 잎의 길이와 폭이 일장이 짧은 환경의 식물체보다 길고 커졌다. 10시간 이하의 일장에서는 생육이 느리긴 하지만, 정상적으로 생육하고 있는 것으로 관찰되었다. 따라서 가지바위솔은 일장을 10시간 이하로 조절한다면, 아담한 상태로 지속시킬 수 있을 것으로 보였다.

### 13. 노루귀 및 섬노루귀의 대량증식을 위한 조직배양 기술 개발

#### 가. 조직배양 조직(잎) 살균 조건 구명

노루귀 잎은 털이 많아 살균이 매우 어렵다. 따라서 NaOCl를 농도별로 처리하는 것은 물론, 에틸렌 처리, 감압살균, 초음파세척기를 이용하는 등 다양한 살균 방법을 검토하였다. 살균조건을 세게 할수록 살균효과는 높아지나 고사율도 높아지는 문제가 발생하였다. 특히 노루귀는 섬노루귀보다 살균하기가 더 힘들었다. 가장 중요한 요인은 무엇보다도 잎의 건강 상태가 중요한 것으로 밝혀졌다. 잎이 나온지 얼마되지 않은 건강한 잎은 살균이 잘되고 생존율도 높으며, 노화된 잎은 살균도 어렵고 재분화율도 크게 떨어지는 것으로 조사되었다.

#### 나. 재분화를 위한 최적 배지 조건 구명

배지 종류(MS, B5, SH, WP배지 등)와 pH를 달리하여 노루귀 잎을 배양하고 재분화 정도를 조사하였다. MS 배지와 pH 6에서 캘루스와 신초발생에서 가장 좋은 결과를 얻었다. 엽편으로 부처 신초 발생을 위한 적정 호르몬 농도를 구명하기 위해 NAA ( $0.1 \sim 1 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )와 BA ( $1 \sim 5 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 또는 Kinetin ( $1 \sim 2 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )를 조합처리하고 엽편을 치상하였다. NAA  $1 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  와 BA  $1 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  에서 캘루스 형성율과 신초분화율이 가장 높게 나타났으나, 신초 기관이 발생하기 시작한 것은 배양 3~4개월이 필요했으며, 신초가 잎조직으로 성장하는데 까지는 6개월 이상이

소요되었다. 또한 재분화가 잘되는 조건은 호르몬 조건보다도 치상재료 (잎)의 상태가 더 중요한 요인인 것을 알게 되었다. 즉, 잎이 어리고 건강하면 재분화도 잘되고 잎이 노화되면 소독도 어렵고 재분화도 어려웠다. 노루귀보다는 섬노루귀 잎에서 신초의 발생이 용이하였다.

## [ 5차년도]

### 14. 일장과 조명색 및 광도 조절이 가능한 장식장 개발

바위솔은 2년째 가을에 꽃이 피고나면 모식물이 말라죽는 일년생 식물이다. 밤에 조명을 해주면 개화를 억제시킬 수 있어 식물을 생식생장으로 전환시키지 않고 영양생장을 지속시킬 수 있다. 디지털로 일장과 조명색을 조절할 수 있는 장식장을 개발하였다. 장식용 상자에 바위솔과 다른 다육식물을 모두 심기하고 실내 공간에 장식하면 오랫동안 바위솔을 감상할 수 있게 된다. 동시에 조명색을 마음대로 조절할 수 있고 광도를 조절함으로써 실내 식물 장식장이 완성되었다.

### 15. 개발된 토속 바위솔 해외 시험 수출

우리나라 토속 바위솔인 ‘제주연화바위솔’, ‘가지바위솔’, ‘포천바위솔’, ‘진주바위솔’ 4종을 수출업자를 통하여 시험수출을 시도하였다. 주근을 1.5cm 정도만 남기고 지하부를 깨끗하게 정리하여 인천공항 식물 검역소에서 검역을 마치고 일본 바이어 농장에서 화분에 심겨졌다. 일본 바이어로부터 매우 좋은 평가를 얻었으며, 가격은 얼마까지 가능하며 이 식물들을 지속적으로 재배해서 수출해 줄 수 있는 농가가 있는지 물어왔다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구성과

가. 상품화 : 1건

나. 기술실시 : 2건

다. 교육지도: 10건

라. 논문발표

o 논문게재

- SCI 급 : 1편

- 비 SCI 급 : 2편

o 투고 후 심사중 : 4편

마. 학회 발표

o 포스터 발표 8건

바. 인력양성

o 학사학위 : 11명

o 석사학위 : 1명

## SUMMARY

### 1. Collection and characteristic investigation of *Orostachys* native in Korea.

Total 19 *Orostachys* plants including *O. malacophyllus*, *O. iwarenge*, *O. iwarenge* for. *magna*, *O. margaritifolius*, *O. latiellipticus*, and *O. margaritifolius* were collected and their morphological characteristics were investigated. Leaf size and leaf color, and morphological characteristics were evaluated, and flowering date were investigated. Flower size, flower color, number of petal and sepal and morphological characteristics were investigated. *Orostachys* plants with high ornamental value, including *O. iwarenge* for. *magna*, *O. margaritifolius*, and *O. margaritifolius* were selected.

### 2. Collection and characteristic investigation of *Hepatica* plants native in Korea.

*Hepatica asiatica* Nakai, *H. maxima*, and *H. insularis* were collected and investigated in their characteristics. *Hepatica asiatica* Nakai are located at all areas in Korea, *H. maxima* located at Ulleung island of Gyeongbuk province, and *H. insularis* located at south area including Jeju island in Korea. Size of the plants and their flowers were in order of *Hepatica asiatica* Nakai, *H. maxima*, and *H. insularis*. Flower has a single valve and 6-9 sepals, and their color are from white to soft purple.

### 3. Selection of *Orostachys* with high ornamental value among collected *Orostachys* plants

Consumer preference survey about potted *Orostachys* plants were conducted for visitors in 'Flower festival' of Gyeongnam national university. Preference about *Orostachys* plants varied between the generation of visitors. The 20s' preferred in order of *Sempervivum arachnoideum* and *O. malacophyllus* from Taebak. The 30s' preferred in order of *O. malacophyllus* from Taebak and preferred *O. iwarenge* and *O. minutus*, in order. The 40s' preferred in order of *O. iwarenge*, *O. minutus* and *O. malacophyllus* from Taebak. The 20s' preferred a single plant, and the 30s' and 40s' preferred mixed plants.

### 4. Development of promoting technology for seed germination of *Orostachys* plants.

The seeds of *Orostachys* plants were very small size (0.3~0.8mm) and classified as minute seeds. All seeds have wrinkled surface and oblong shape. Seed size ranged 0.77-1.00/0.25-0.37 mm (length/width). Most of *Orostachys* seeds ripen during October and November and then enter dormancy. Low temperature is needed to break the dormancy of seeds. When 'Samchuck Bawisol' seeds were dipped in GA 200~400mg·L<sup>-1</sup> for 24h, germination speed and germination ratio improved dramatically. Proper temperature for seed germination was 15°C and showed seed germination above 90%. At 10°C and 20°C the seeds showed below 50% in germination. *O. malacophyllus* from Taebak showed 40% in seed germination when dipped in GA 200~400mg·L<sup>-1</sup> for 24h, and below 20% at 10°C and 15°C.

### 5. Germination physiology of seed germination and mass propagation in *Hepatica* seeds

*Hepatica asiatica* and *H. maxima* plants bear seeds at May~Jun after flowering, and have immature embryo. It was clarified that warm temperature is needed for immature embryo to mature, and matured embryo develop as a radicle at autumn (Oct. ~ Nov.) The radicles entered into dormancy during winter and needed low temperature to break seed dormancy.

When *H.* seeds were treated with various temperature conditions (constant temp. or alternating temp.). High temperature (30~40°C) during 15~45 days inhibited seed germination of *H. asiatica*, showing 0~3% germination in 15°C chamber. Non treatment showed 33% germination although seed germination started at 70 days after seeding. GA<sub>3</sub> of 200 or 500mg·L<sup>-1</sup> did not improve final germination rate, but shortened its T50. The temperature of seeding chamber affected dramatically the seed germination. The highest germination rate (32~43%) were obtained at 15°C, but less than 5% were at 10 or 20°C, suggesting that 15°C is the most proper temperature for germination of *H. asiatica* seeds.

## **6. Root cutting for mass propagation of *Hepatica* plants**

To clarify the possibility of mass propagation using root, root cutting was conducted. Root length, BA concentration (50~500mg·L<sup>-1</sup>), and cutting soil were tested. There was no rooting or shooting at any treatments. It was thought that root cutting is not available in *H.* plant.

## **7. Study trip to Japanese farm and market for wild flowers**

We visited several Japanese farms located in Nigata of Japan in which *Hepatica* plants had been cultured and bred during 25~30 years. Sasanuma garden center and Chuechu botanical garden are the most famous farms culturing and breeding *Hepatica* plants. We studied new technology for high quality production, management, environmental control for *Hepatica* plants, and also we studied breeding technology for *Hepatica* plants.

We also visited Home center in Kyoto and garden center in Osaka and Kyoto, and flower shops in Nagoya and Tokyo, and investigated market situation of wild flowers. Various wild flower plants were displayed in the markets. Production system of wild flower plants were built in Japan.

## **8. Proper light intensity for potted *Orostachys* plants**

'Neungru Bawisol' and *Orostachys iwarenge*, and *O. malacophyllus* were cultured under different light condition intensity (52, 82, 90, and 97% shading). The best growth in 3 *Orostachys* plants was shown under 52% shading condition. Under 82% shading condition, the plants showed over 90% of survival rate indicating that *Orostachys* plants are shade tolerance.

## **9. Proper pot soil and fertilization level for *Orostachys* plants**

'Neungru Bawisol' and *Orostachys iwarenge*, and *O. malacophyllus* were cultured in different pot soil and fertilization level. 'Neungru Bawisol' and *Orostachys iwarenge* showed the best growth in decomposed granite (DG) : fertilizer-amended media (FAM) : river sand (RS) (60:20:20, v/v/v). There is no significant difference among the media, indicating that *O. malacophyllus* from Taebaek has a very high adaptability to the kinds of media. At the experiment for selection of proper

fertilization level, the plants were grown under 5 levels of fertilization; control(tap water), once drenching at 1 week or 2 weeks intervals with Hyponex solution diluted by 1,000 or 2,000 times. Once drenching per 1 week with 1,000 folds solution brought the highest results in fresh weight, plant height and plant width. However, other fertilization levels showed no difference from control.

#### **10. Proper environmental conditions for production of potted *Hepatica* plants with high quality**

*Hepatica asiatica* and *H. maxima* were grown under various light intensities (shading rate, 52, 82, 90, 97%). Plants grown under a high light intensity (52%) showed low survival rate (65%). But, survival rate increased as shading rate increased, resulting in over 80% at above 90% shading. Growth indexes such as fresh weight and leaf number did not show any significant difference among different shading rate.

Plants grown in a soil mixture of decomposed granite : fertilizer-amended media : kanumatsuchi (60:10:30, v/v/v) or river sand : fertilizer-amended media : bark (50:20:30) showed over 85% in survival rate. However, plants grown in a soil mixture of river sand : fertilizer-amended media : kanumatsuchi (50:30:20) or upland : river sand (40:60) showed very low survival rate below 60%. To select a proper fertilization level for *H. asiatica*, hyponex solution diluted at 1,000 or 2,000 times were applied weekly or biweekly. The survival rate was lowest at weekly application with 1,000 fold solution, and no significant difference was observed between other treatments. In conclusion, *H. asiatica* is a plant which has very strong resistance to very low light intensity and prefer to soil with air permeability, and is adaptable to broad range of fertilization level.

#### **11. Low temperature treatment for forced culture of *Hepatica asiatica* and *H. maxima***

*Hepatica asiatica* and *H. maxima* in field were entered in a plastic house at 15 days intervals from November. Sprouting speed and degree were investigated. The plants started sprouting 36days after entering in a plastic house (the lowest temperature is 10°C) and resulting in 70% sprouting rate. Sprouting date was shortened as entering date was delayed, *H. asiatica* entered in a plastic house at 30th Dec. sprouted at 12 days after transplanting. *H. maxima* showed similar results with *H. asiatica*.

#### **12. Control of flowering and breaking dormancy of *Orostachys* using day length**

##### **Response to day length of *O. malacophyllus* from Taeback**

*Orostachys malacophyllus* from Taeback were exposed to various daylengths (8, 10, 12, 14, 15, 16h) and with various numbers of photoinductive cycles when the plants attained maturity with flower primordia. Flowering occurred in day length of 8, 10 and 12h. Plants were bolting form in 14h photoperiod and vegetative form with no spike in 15 and 16h photoperiods. There was no significant difference in length of inflorescence between 8 and 12h daylengths. A 12h daylength significantly increased the number of flowers per flowering stem compared to those of 8 and 10 h daylengths. *O. malacophyllus* from Taeback is an absolute short day plant (SDP), since it did not flower in the daylengths longer than critical daylength (12h). Plant formed bolting and flowered in photoperiod of 8-12h but not with 14h or longer. The critical daylength is 14h for bolting and 12h

for flowering.

### **Response to day length of *O. ramosus* and *O. iwarenge***

*Orostachys iwarenge* and *Orostachys ramosus* plants were grown under various daylengths (8, 10, 12, 14, 15, 16h) to investigate growth response of the plants to daylength. The younger plants exposed to photoperiods of 8, 10, 12, 14, 15 or 16h did not emerge flowers at all even after 50~60 photoinductive cycles, but showed increase in the number of branches per plant with increasing daylength. In *O. iwarenge*, plant width and the number and length of runner increased to their maximum at the photoperiods of 12h daylength or more. Hence the critical daylength promoting vegetative growth must be photoperiod of 12h light. Leaf color was significantly different between various photoperiods in *O. iwarenge* but not in *O. ramosus*. For leaf of *O. ramosus* plant, yellow and green decreased significantly with increasing photoperiod. Vegetative growth in younger plants of *O. iwarenge* and *O. ramosus* can be controlled by adjusting photoperiod, but flower emergence and development cannot. The acquired knowledge on significant effect of photoperiod in vegetative growth may be used to produce potted plants with marketable quality

## **13. Development of tissue culture for mass propagation of *Hepatica asiatica* and *H. maxima*.**

### **A. Sterilization of explant (leaf) for tissue culture**

Sterilization of *Hepatica* plants leaf is very difficult because the plants have a lot of trichomes in their leaves. Various methods for sterilization including NaOCl concentration, ethylene, and decompression sterilization were tested. As sterilization condition becomes strong, survival rate decreased although effectiveness of sterilization increased. Lots of experiments showed that the most important fact is the condition of leaf. Young and strong leaves brought a high sterilization rate and a good result, but old and weak leaves died easily.

### **B. Proper medium for regeneration of *Hepatica asiatica* and *H. maxima***

Several kinds of medium (MS, B5, SH, and WP) were tested for regeneration from leaf of *H. asiatica*. The best result was obtained from MS medium adjusted with pH 6. To clarify proper concentration of plant hormones for regeneration from leaf tissue, NAA ( $0.1 \sim 1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), BA ( $1 \sim 5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), and Kinetin ( $1 \sim 2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) were added into culture medium. Callus and shooting occurred at MS medium supplemented with  $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA and  $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA. Shoot organ could be observed after 3-4months after leaf transplanting and leaf occurrence after 6 months.

## **14. Development of decoration chamber controllable day length and light color**

*Orostachys* plants are monocarpic and short day plant. Long day length above 13h inhibit flowering, and keep vegetative growth in *Orostachys* plants. A decoration chamber which can be controlled in day length, light intensity, and light color was developed. *Orostachys* plants transplanted into the decoration chamber could be kept in vegetative growth without changing reproductive growth for several years. The decoration chamber can be used for indoor lighting because they can be controlled in light color and light intensity.

### **15. Test export of *Orostachys* plant to Japan**

'Jejuyeonhwa bawisol' (*Orostachys iwarenge*), 'Gazi bawisol' (*O. ramosus*), 'Pocheon bawisol' (*O. latillicus*) were exported to Japan as a test. Under ground part of the plants were washed clearly with tap water, remaining 5cm main root in length. After the plants were quarantined at Incheon International Airport, transported to Japan and planted into a plastic house in Japan. Japan buyer had a big interesting and asked if Korean farm could supply continuously those plants.

# 목 차

|   |     |
|---|-----|
| 제 1 장 연구개발과제의 개요 .....                      | 364 |
| 제 1 절 연구개발의 목적과 필요성 .....                   | 364 |
| 제 2 장 연구개발과제의 개요 .....                      | 366 |
| 제 1 절 국외 현황 .....                           | 366 |
| 제 2 절 국내 현황 .....                           | 366 |
| 제 3 절 앞으로의 전망과 기술개발의 타당성 .....              | 366 |
| 제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과 .....                  | 368 |
| 제 1 절 토속 바위솔과 노루귀 수집 및 특성 .....             | 368 |
| 제 2 절 바위솔과 노루귀의 대량증식 체계 확립 .....            | 383 |
| 제 3 절 바위솔과 노루귀의 고품질 분화 재배 기술 개발 .....       | 407 |
| 제 4 절 바위솔과 노루귀의 개화생리 구명 및 개화 조절 기술 개발 ..... | 477 |
| 제 5 절 일장 조절용 장식장 개발 및 해외 시험 수출 .....        | 509 |
| 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....              | 529 |
| 제 1 절 목표달성도 .....                           | 529 |
| 제 2 절 관련분야의 기술발전 기여도 .....                  | 531 |
| 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....               | 532 |
| 제 1 절 실용화·산업화 계획(기술실시 등) .....              | 532 |
| 제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등 .....            | 535 |
| 제 3 절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보 계획 .....        | 538 |
| 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....           | 540 |
| 제 7 장 참고문헌 .....                            | 542 |



# 제 1 장 연구 개발 과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적과 필요성

현재 우리나라의 화훼재배 농가에 있어 가장 큰 고민거리는 ‘앞으로 어떤 작물을 재배할 것인가?’라는데 있다. 즉, 현재 거의 대부분의 화훼작물은 이미 생산 과잉 상태로 가격이 좋지 않아 농민들이 고뇌하고 있는 상태이다. 이런 이유로 농민들은 연구자들에게 새로운 소득작물을 개발해 줄 것을 절실히 요구하고 있는 실정이다. 또한 최근의 소비시장에서의 흐름은 새로운 종을 요구하고 있다. 따라서 관상가치가 높은 토속식물을 분화로 개발하는 일은 국내소비와 해외로의 수출을 겨냥해서 중요한 과제임에 틀림없다.

바위솔은 돌나물과(Crassulaceae) 바위솔속(*Orostachys*)에 속하며 우리나라에는 애기바위솔(*Orostachys filifera*), 연화바위솔(*O. iwarenge*), 바위솔(*O. japonicus* A. Berger), 둥근바위솔(*O. malacopyllus*), 난쟁이바위솔(*O. sikokianus*) 등 총 8종이 보고되었다(오, 1985).

여름까지 잎만 있다가 8월부터 추대가 시작되어 수상화서에 많은 소화가 아름답게 핀다. 바위솔은 꽃이 피기전에도 충분히 관상가치가 있어 분화로 개발할 필요가 있다. 특히 연화바위솔은 엽색이 부드럽고 꽃도 아름다워 일본사람들이 매우 좋아하는 성질을 가지고 있기 때문에 분화로 개발될 경우 대 일본 수출 가능성이 매우 높다.

1990년대에 바위솔이 항암효과가 있다는 것이 알려지면서 약용식물로서의 이용에 관한 연구가 제법 이루어졌었지만(Kang et al., 2005ab; Lee et al, 2007, 2008), 관상식물로서의 개발에 관한 연구는 전무한 상태이다. 그러나 아래 Fig. 1, 2, 3.과 같이 바위솔은 꽃이 없는 상태로도 관상가치가 충분히 있고, 더욱이 꽃이 피었을 때는 더욱 아름다워 분화로 개발해도 전혀 손색이 없는 자생수종이라고 볼 수 있다(Fig. 1-3).



Fig. 1. 'Jirisan bawisol'

Fig. 2. 'Jirisan bawisol' in habitat

Fig. 3. 'Dungeun bawisol'

본 연구팀에서는 지리산 바위솔 종자의 발아생리를 구명하고 GA를 이용하여 종자의 휴면을 타파하고 발아율을 80%이상으로 향상시킬 수 있는 기술을 개발하였다. 따라서, 야생 바위솔을 분화로 개발하기 위해서는 종류별로 종자번식 방법을 개발하고 분화 생산을 위한 재배조건이나 환경조건을 확립할 필요가 있다.

우리나라 산야에 자생하고 있는 노루귀는 잎이 나오기 전인 3-4월에 꽃이 먼저 피며 흰색, 연분홍색, 자주색, 붉은색 등 다양한 화색을 지니고 있는 것이 큰 특징으로 꽃 모양이 예쁘고

아름답다(Fig. 4-6). 이렇게 다양한 화색과 아름다운 꽃이 있음에도 그동안 상업화되지 못한 이유 중의 하나가 번식이 쉽지 않고, 가을부터 겨울까지는 잎이 없는 상태가 되고 이른 봄에 꽃만 피는 생리적 특징을 가지고 있기 때문이다.

그러나 적당한 온도가 주어지면, 잎이 떨어지지 않고 겨울내내 건강하게 푸른 잎이 유지되며, 봄에는 잎이 있는 상태에서도 꽃을 피울 수 있기 때문에 이른 봄화초로 개발 가능성이 매우 높다. 따라서 대량번식 방법을 개발하고 겨울에 잎이 달린 상태로 관리하여, 다년생초로 키울 수 있는 재배기술을 개발할 필요가 있다.



Fig. 4. Hepatica with white flower    Fig. 5. Hepatica with blue flower    Fig. 6. Hepatica with pink flower

이러한 이유로 이들 식물을 넣어서 재배하는 상자에 온도와 일장을 조절할 수 있는 전용상자(장식장)를 개발한다면, 이들 식물뿐 아니라 많은 자생식물의 상록화 및 겨울철용 분화로의 개발이 가능해질 것이다. 여기에 조명색 및 조명세기를 조절할 수 있는 기술을 도입한다면, 목표로 하는 식물 장식장을 만들 수 있을 것으로 보인다.

## 제2장 국내외 기술 개발 현황

### 제 1절 국내 현황

- 바위솔은 돌나물과(Crassulaceae) 바위솔속(*Orostachys*)에 속하며 우리나라에는 애기바위솔(*Orostachys filifera*), 연화바위솔(*O. iwarenge*), 바위솔(*O. japonicus* A. Berger), 둥근바위솔(*O. malacopyllus* F.), 난쟁이바위솔(*O. sikokianus*) 등 총 8종이 보고되었음(오, 1985).
- 1990년대에 바위솔이 항암효과가 있다는 것이 알려지면서 약용식물로서의 이용에 관한 연구가 제법 이루어졌었지만(Kang, 2005ab; Lee et al, 2007,2008), 관상식물로의 개발에 관한 연구는 전무한 상태임.
- 지금까지 노루귀에 대해서는 자생지 환경(Lim and Sang, 1990), 약리적 효과 (Park et al., 1998), 식물학적 분류(Kim and Lee, 1994)와 재배화를 위한 등이 있을 뿐, 분화 재배를 위한 연구는 없는 실정이다.
- 다른 자생식물의 산업화에 대한 연구는 꾸준히 이루어져 왔다. Lee et al.(2007)은 몇 가지 자생식물의 광도차에 따른 생육반응을 조사하였고, Son and Yeom(1988)은 관엽식물 적정광도를 조사하였다. Lee et al.(2013)은 자생 복주머니란의 순화재배를 위한 용토를 선발하고자 실험을 수행하였으며, Son and Chae(2003) 타래난의 분화품질을 향상시키기 위해 광도, 식재 용토 및 생장 억제제 사용에 관한 실험을 수행하였다. 이외에도 분화용 자생 양치식물(Lee, et al., 2003), 앵초, 비비추 및 노루오줌(Jeong and Park, 2003)에서도 적정광도를 위한 실험을 수행하였다.
- 그러나 노루귀와 바위솔의 산업화에 대한 번식 및 재배기술에 관한 연구는 전무한 상태이다.

### 제 2절 국외 기술 개발 현황

- 노루귀의 육종연한을 단축하기 위해 종자의 발아과정에 대한 연구가 있었다 (Martin, 1946)
- 노루귀 종자의 발아생리에 관한 연구가 여러 가지 품종에서 이루어져 왔다. *H. americana* (Martin, 1946), *H. acutiloba* (Baskin and Baskin, 1985), and *H. nobilis* Schreb. (Engell, 1995) 등과 같다.
- 노루귀 종자가 미숙배를 가지고 있다는 사실도 보고된바 있다.
- 노루귀는 주로 일본에서 많이 육종 재배되고 있어 일본을 제외한 다른 나라에서의 연구 결과는 거의 없다.

### 제 3절 앞으로의 전망과 기술 개발의 타당성

- 우리나라 산야에 자생하고 있는 노루귀는 잎이 나오기 전인 3-4월에 꽃이 먼저 피며 흰색, 연분홍색, 자주색, 붉은색 등 다양한 화색을 지니고 있는 것이 큰 특징으로 꽃 모양이 예쁘고 아름다움(그림 1,2,3).
- 이렇게 다양한 화색과 아름다운 꽃이 있음에도 그동안 상업화되지 못한 이유 중의 하나가 번식이 쉽지 않고, 가을부터 겨울까지는 잎이 없는 상태가 되고 이른 봄에 꽃만 피는 생리

적 특징을 가지고 있기 때문임.

- 그러나 적당한 온도가 주어지면, 잎이 떨어지지 않고 겨울내내 건강하게 푸른 잎이 유지되며, 봄에는 잎이 있는 상태에서도 꽃을 피울 수 있기 때문에 이른 분화초로 개발 가능성이 매우 높음.
- 따라서 대량번식 방법을 개발하고 겨울에 잎이 달린 상태로 관리하여, 다년생초로 키울 수 있는 재배기술을 개발할 필요가 있음.
- 여름까지 잎만 있다가 8월부터 추대가 시작되어 수상화서에 많은 소화가 아름답게 폼. 바위솔은 꽃이 피기전에도 충분히 관상가치가 있어 분화로 개발할 필요가 있음. ○ 특히 연화바위솔은 엽색이 부드럽고 꽃도 아름다워 일본사람들이 매우 좋아하는 성질을 가지고 있기 때문에 분화로 개발될 경우 대 일본 수출 가능성이 매우 높음.
- 1990년대에 바위솔이 항암효과가 있다는 것이 알려지면서 약용식물로써의 이용에 관한 연구가 제법 이루어졌었지만(Kang, 2005ab; Lee et al, 2007,2008), 관상식물로의 개발에 관한 연구는 전무한 상태임. 그러나 아래 그림과 같이 바위솔은 꽃이 없는 상태로도 관상가치가 충분히 있고, 더욱이 꽃이 피었을 때는 더욱 아름다워 분화로 개발해도 전혀 손색이 없는 자생수종이라고 볼 수 있음

### 제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

#### 제 1 절 토속 바위솔과 노루귀 수집 및 특성조사

##### 1. 바위솔 종류별 수집 및 특성조사

###### 가. 자생 바위솔 종류별 수집

바위솔 속(*Orostachs*)식물은 약 13~18여 종으로, 우리나라를 포함하여 몽고, 카자흐스탄, 중국, 일본, 러시아의 산악 지역에 분포한다고 알려져 있다. 최근 (2005년) 까지의 연구에 의하면 우리나라에는 총 7종이 분포하는 것을 알려져 있으며, 남한에는 바위솔(*Orostachys japonicus*), 좁바위솔(*O. minutus*), 둥근바위솔(*O. malacophyllus*), 연화 바위솔(*O. iwarenge*)등 4종이 자생하고 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 본 연구에 의하면 Table.1-1-1과 같이 다양한 종류의 바위솔이 여러 가지 이름으로 불리고 있다는 사실을 알게 되었다. 현재 본 연구팀에서는 총 14종의 바위솔을 약 1,500분 정도 수집하여 보유하고 있다.

Table 1-1-1. Korean name and Scientific name of various *Orostachys* species native to Korea

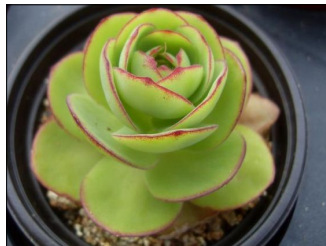
| Name    | Scientific name                      | Different name            | Possession |
|---------|--------------------------------------|---------------------------|------------|
| 바위솔     | <i>O. japonicus</i> A. BERGER        | 지붕직이, 오송, 와송<br>넓은잎바위솔(북) | Yes        |
| 둥근바위솔   | <i>O. malacophyllus</i>              | 응달바위솔                     | Yes        |
| 난쟁이바위솔  | <i>Meterostachys sikokiana</i>       | -                         | Yes        |
| 연화바위솔   | <i>O. iwarenge</i>                   | 바위연꽃                      | Yes        |
| 울릉연화바위솔 | <i>O. iwarenge</i> for. <i>magna</i> | -                         | Yes        |
| 좁바위솔    | <i>O. minutus</i>                    | 바위솔                       | Yes        |
| 흰좁바위솔   | <i>O. minutus</i>                    | -                         | Yes        |
| 봉화좁바위솔  | <i>O. malacophyllus</i> from Woolsan | -                         | Yes        |
| 포천바위솔   | <i>O. latiellipticus</i>             | -                         | Yes        |
| 애기바위솔   | <i>O. filifera</i>                   | -                         | Yes        |
| 갈미바위솔   | <i>O. kanboensis</i>                 | -                         | No         |
| 모란바위솔   | <i>O. saxatilis</i>                  | -                         | No         |

|       |  |           |     |
|-------|--|-----------|-----|
| 가지바위솔 | <i>O. ramosus</i>                                      | -         | Yes |
| 정선바위솔 | <i>O. chongsunensis</i>                                | -         | Yes |
| 진주바위솔 | <i>O. margaritifolius</i>                              | -         | Yes |
| 영동바위솔 | <i>O. fimbriatus</i>                                   | -         | Yes |
| 다북바위솔 | <i>O. japonica</i> for. <i>polycephala</i><br>(Makino) | -         | No  |
| 앞새바위솔 | <i>O. spinosus</i>                                     | 누른꽃바위솔(중) | No  |

바위솔들은 아래 사진들과 같이 잎의 형태나 색상에서도 매우 다양한 변화를 보인다(Fig. 1-1-1). 종류에 따라 잎이 원통형으로 긴 것, 가늘고 긴 것, 넓고 끝이 가는 것, 둥근 것 등, 다양한 형태를 가지고 있다. 엽색도 단순한 녹색과 진한 갈색 또는 이들이 혼합된 색 등 다양하다. 이들 중에는 엽색이 부드럽고 엽형도 둥글고 부드러운 모습의 제주연화바위솔이 상품성이 매우 높은 것으로 판단되었다. 지리산 바위솔은 지리산 속 바위틈 또는 하천 절벽 바위틈에 자생하고 있는 바위솔로 가을이 되면 잎가가 붉게 단풍이 들어 매우 아름다운 바위솔 중의 하나이다.



바위솔(와송)



둥근바위솔



난쟁이바위솔



연화바위솔



자질연화바위솔



제주연화바위솔



정선바위솔



가지바위솔



포천바위솔



좁바위솔



흰좁바위솔



봉화좁바위솔



진주바위솔



영동바위솔



태백바위솔

Fig 1-1-1. Morphology of various *Orostachys* species native to Korea

## 나. 자생바위솔의 형태적 특성

### (1) 잎과 줄기 형태

바위솔의 가장 중요한 부분은 잎과 줄기이다. 줄기는 대부분이 로세트형으로 마디가 매우 짧으며 잎은 짧은 줄기로부터 나온다. 대부분의 바위솔 잎은 녹색에서 자주색을 띠며, 종류에 따라서는 연한 녹색, 자주색 바탕에 녹색이 혼재되는 경우도 있다. 잎의 모양은 피침형, 주걱형, 도란형 등이 대부분이다. 잎의 크기는 작은 것은 3cm에서 큰 것은 10cm에 이르며 잎의 형태는 끝이 둥근 것, 바늘모양으로 돌기가 있는 것, 잎 끝이 가시처럼 뾰족하고 가장자리가 희고 연한 것들이 있다(Table 1-1-2).

Table 1-1-2. Morphological characteristics of leaf in various *Orostachys* species

| Species | Leaf color    | Shape | Size   | Characteristics            |
|---------|---------------|-------|--------|----------------------------|
| 바위솔     | 녹색(자주색 또는 흰색) | 피침형   | -      | 근생엽은 로세트모양으로 잎이 나고, 끝이 뾰족함 |
| 둥근바위솔   | 연한녹색          | 주걱형   | 3~7cm  | 둥글고 넓직한 근생엽                |
| 난쟁이바위솔  | 녹색            | 선형    | 7~12cm | 잎끝이 바늘모양의 소돌기가 있음          |
| 연화바위솔   | 백록색           | 주걱형   | 3~6cm  | 잎끝이 둥글                     |
| 울릉연화바위솔 | 백록색           | 주걱형   | -      | 잎끝이 둥글다.                   |
| 좁바위솔    | 녹색, 가장자리 자주색  | 피침형   | -      | 잎끝이 뾰족함                    |
| 흰좁바위솔   | 녹색, 가장자리 자주색  | 피침형   | -      | 잎끝이 뾰족함                    |

|       |               |         |         |                             |
|-------|---------------|---------|---------|-----------------------------|
| 애기바위솔 | 녹색바탕에 자주색     | 선, 피침형  | 8~10mm  | 포복경 끝에 잎이 로제트 모양으로 남        |
| 갈미바위솔 | 자주색땀 녹색       | -       | 1~2cm   | 잎끝이 가시처럼 뾰족하고, 가장자리는 희고 연함  |
| 모란바위솔 | 녹색, 가장자리 흰색   | -       | 3~6cm   | 잎끝에 뾰족한 부속지가 있고 흰색의 테두리가 있음 |
| 가지바위솔 | 녹색, 자주색을 띤 녹색 | 주걱, 도란형 | 1.5~7cm | 잎 끝이 뾰족함                    |
| 정선바위솔 | 분녹색에 자주색무늬    | 주걱형     | 1.5~3cm | 잎이 둥글고 끝은 뾰족함               |
| 포천바위솔 | -             | 도란, 피침형 | -       | -                           |
| 진주바위솔 | 녹색, 가장자리는 자주색 | 주걱형     | 1~4cm   | 잎 끝이 뾰족함                    |
| 다북바위솔 | -             | 피침형     | -       | 근생엽으로 로제트 모양                |
| 잎새바위솔 | -             | -       | 1~3cm   | 잎 끝부분에 반달모양의 백색 연한 부속물이 있음  |

## (2) 꽃의 형태적 특성

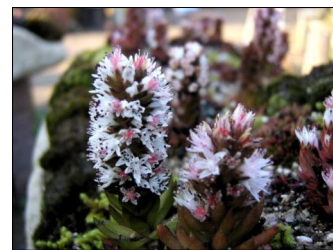
대부분의 바위솔 속 식물은 2년생이며 단일식물로 8월에 추대하기 시작하여, 9월에 6~15cm의 수상화서에 황색 또는 백색 다량의 소화꽃 형성한 후 10월에 개화하고 종자의 성숙과 함께 고사하였다. 화색은 대부분 흰색이나 적색을 띤 흰색이었으며, 그중에는 노란색이나 옅은 노란색의 꽃도 있었다. 가을이 되면 잎 주변부부터 붉은 색으로 단풍이 드는 경우가 많았다(Fig. 1-1-2, Table 1-1-3)



정선바위솔



난쟁이바위솔



봉화좀바위솔



좀바위솔



포천바위솔



울산방어진바위솔

Fig. 1-1-2. Inflorescence of various *Orostachys* species native to Korea.



Table 1-1-3. Morphological characteristics of flowers in various *Orostachys* species native to Korea.

| Species | Flower color    | Inflorescence | Length of Inflorescence | No. of petal | No. of sepal | No. of anther |
|---------|-----------------|---------------|-------------------------|--------------|--------------|---------------|
| 바위솔     | 흰색              | 총상화서          | 6~18cm                  | 5            | 5            | 10            |
| 등근바위솔   | 흰색              | 수상화서          | 5~20cm                  | 5            | 5            | 10            |
| 난쟁이바위솔  | 적색 띠 흰색         | 취산화서          | 3~5cm                   | 5            | 5            | 10            |
| 연화바위솔   | -               | -             | 5~20cm                  | -            | -            | 10            |
| 울릉연화바위솔 | -               | -             | 5~20cm                  | -            | -            | -             |
| 좁바위솔    | 홍자색             | 수상화서          | 3~5cm                   | 5            | -            | 10            |
| 흰좁바위솔   | 흰색              | 수상화서          | 3~5cm                   | 5            | -            | 10            |
| 애기바위솔   | 노란색             | 취산형           | -                       | 5            | 5            | 5             |
| 갈미바위솔   | 적색을 띤 흰색,<br>흰색 | -             | 5~10cm                  | 5            | -            | -             |
| 모란바위솔   | -               | -             | -                       | -            | -            | -             |
| 가지바위솔   | 유백색, 연록색        | -             | 3~20                    | 5            | 5            | 10            |
| 정선바위솔   | 연한 노란색          | -             | 5~20cm                  | -            | 5            | 10            |
| 포천바위솔   | 유백색             | -             | 5~20cm                  | -            | -            | -             |
| 진주바위솔   | 유백색             | -             | 5~20cm                  | 5            | 5            | 10            |
| 다북바위솔   | -               | 수상화서          | 6~15cm                  | 5            | 5            | -             |
| 잎새바위솔   | 황색을 띤 녹색        | 수상화서          | -                       | 5            | 5            | 10            |

### (3) 바위솔 종자의 형태와 특성

바위솔종자는 육안으로는 먼지로 보일 정도로 크기가 작았다. 현미경으로 확대해서 관찰하자 정상적인 종자는 쌀알 모양이었으며 배유가 통통하게 관찰되었다. 그러나 배유가 없이 빈껍데기만 있는 경우도 매우 많아 전체적으로 임실율이 낮은 것으로 판단되었다. 육안으로는 종자와 꼬투리가 구분이 되지 않기 때문에 종자라고 생각하고 파종을 했을 경우, 발아율이 매우 낮을 수 있을 것으로 생각되었다. 농가에서 바위솔의 종자가 발아율이 낮다고 생각하는 것은 이런 이유 때문으로 생각되었다. 다른 많은 다육식물들이 임실율이 매우 낮아 종자번식이 곤란한 종류도 적지 않다고 한다. 종자의 크기는 0.3~0.8mm의 크기로 미세종자에 속했다(Table 1-1-4).

Table 1-1-4. Morphological characteristics and size of seeds in *Orostachys* species native to Korea.

| Plant name   | Seed shape | Color (gloss)          | Size (Width/Length) |
|--|------------|------------------------|---------------------|
| 영동바위솔<br><i>Orostachys japonicus</i>               | 쌀알 모양      | brown (no-shiny)       | 0.4/0.8mm           |
| 울산방어진 바위솔<br><i>Orostachys malacophyllus</i>       | 쌀알 모양      | black-brown (no-shiny) | 0.3/0.7mm           |
| 제주연화바위솔<br><i>Orostachys iwarenge</i>              | 쌀알 모양      | black-brown (no-shiny) | 0.4/1.0mm           |
| 지리산 바위솔<br><i>Orostachys japonicus</i>             | 쌀알 모양      | yellow-brown (shiny)   | 0.3/0.8mm           |
| 가지바위솔<br><i>Orostachys ramosus</i> Y.N.Lee         | 쌀알 모양      | yellow-brown (shiny)   | 0.2/0.8mm           |
| 와송<br><i>Orostachys spinosus</i>                   | 쌀알 모양      | black-brown (no-shiny) | 0.2/0.6mm           |
| 진주바위솔<br><i>Orostachys margaritifolius</i> Y.N.Lee | 쌀알 모양      | brown (shiny)          | 0.4/1.0mm           |

#### 다. 바위솔의 생태적 특성

자생바위솔들의 자생지는 전국적으로 분포하나 바위솔이름에 지명이 붙은 종류들은 그 지역에 주로 자생하고 있는 종류들이다. 예를 들어 제주연화 바위솔은 연화바위솔에 속하나 제주도에 자생하고 있는 바위솔은 일반 바위솔보다는 엽색이 더 부드럽고 질감도 더 부드럽다. 울릉도연화바위솔과 마찬가지로 울릉도에 주로 분포한다. 그런가 하면 등근바위솔과 쯤바위솔, 가지바위솔과 정선바위솔은 전국적으로 분포하였다. 진주바위솔은 진주나 지리산에 분포하고 있는 바위솔로 보통 지리산 바위솔이라고 불리기도 한다. 지리산 바위솔은 가을이 되면 엽주변부가 붉게 단풍이 들어 매우 아름다웠다. 자생지에서의 개화기는 보통 9~10월에 걸쳐 있었으며, 결실기는 11월~12월이었다(Table 1-1-5).

Table 1-1-5. Ecological and physiological characteristics according to various *Orostachys* species native to Korea.

| Species  | Plant height(cm) | Habitat  | Years | Flowering time(month) | Fruiting time(month) |
|----------|------------------|----------|-------|-----------------------|----------------------|
| 바위솔      | 30               | 전국       | 다년생   | 9                     | 10                   |
| 둥근바위솔    | 10~30            | 전국       | 다년생   | 9                     | 10                   |
| 난쟁이바위솔   | 10               | 강원이남     | 다년생   | 8~9                   | 10~11                |
| 연화바위솔    | -                | 강원도, 제주도 | 다년생   | 9~10                  | 11~12                |
| 울릉도연화바위솔 | -                | 울릉도      | 다년생   | 9~10                  | 11~12                |
| 좁바위솔     | 15               | 전국       | 다년생   | 8~9                   | 10~11                |
| 흰좁바위솔    | 15~30            | 전국       | 다년생   | 8~9                   | 10~11                |
| 애기바위솔    | -                | 제주도      | 다년생   | 5~6                   | 6~7                  |
| 갈미바위솔    | -                | 함경북도     | 다년생   | -                     | -                    |
| 모란바위솔    | 30               | 북부지방     | 다년생   | -                     | -                    |
| 가지바위솔    | 15~30            | 전국       | 다년생   | -                     | -                    |
| 정선바위솔    | 10               | -        | 다년생   | -                     | -                    |
| 포천바위솔    | -                | 한탄강 주위   | 다년생   | -                     | -                    |
| 진주바위솔    | 5~6              | 진주 지리산   | 다년생   | -                     | -                    |
| 다북바위솔    | 30               | 전남 흑산도   | 다년생   | -                     | -                    |
| 앞새바위솔    | 5~25             | 북부지방     | 이년생   | 7~8                   | 9~10                 |

### (1) 바위솔의 월동

2년생 바위솔들은 여름에 화아가 분화되고 발달하여 가을에 꽃을 피우고 겨울에 종자를 맺었다. 종자가 익어가면 식물체는 녹아내리듯 모체는 말라죽었다. 그러나 당년에 발아하여 자란 바위솔들은 화아분화가 일어나지 않고 겨울이되면 가운데 쪽의 잎들이 안으로 말려들어가면서 둥글게 구형을 이루었다(Fig. 1-1-3). 시간이 지남에 따라 주변부의 잎들은 서서히 말라서 떨어지고 한 겨울이 되면 가운데 잎들이 말린 둥근 모양만 남아 있었다. 이들 월동주는 겨울 내내 꿈쩍도 않고 있다가 따뜻한 봄이되어서야 생육을 재개하였다.

최하온도 13℃ 비닐온실에서 바위솔을 관리했을 때, 대부분의 1년생 바위솔들은 가운데 잎이 말려들면서 휴면에 들어갔으나 연화바위솔 종류만큼은 휴면에 들어가지 않고 성장을 계속하였

다.



봉화좀바위솔



영동바위솔



울산방어진바위솔

Fig. 1-1-3. Morphology of One-year plant of some *Orostachys* species during winter. Leaves shapes rolled into inside of the plant.

### 라. 도입종 바위솔

도입종 바위솔은 다음 표와 같이 다양한 품종이 시장에 유통되고 있다. 이름이 한국이름이라서 한국 자생바위솔이라고 착각하는 경우가 많으나, 아래 Table 1-1-6에 올라와 있는 바위솔들은 외국에서 들어온 도입종들이다. 이들에게 한국이름이 있는 이유는 식물체의 모양에서 나오는 특징들을 따서 이름을 붙힌 것 같다. 예를 들어 호랑이 발톱바위솔은 잎끝 쪽이 가늘며 가시를 지니고 있는데, 그 가시가 매우 힘이 있어 보여 호랑이발톱바위솔이라고 이름이 붙혀 졌다고 한다(Table 1-1-7).

Table 1-1-6. Invasive species of *Orostachys* in the domestic area of Korea.

| Name     | Scientific name  | Possession |
|----------|--|------------|
| 거미바위솔    | <i>Sempervivum arachnoideum</i>                        | Yes        |
| 솔방울바위솔   | <i>Sulcorebutia rauschii</i>                           | Yes        |
| 솜털바위솔    | <i>Sempervivum arachnoideum</i> ssp. <i>tomentosum</i> | Yes        |
| 호랑이발톱바위솔 | <i>Sempervivum tectorum</i>                            | Yes        |
| 블랙탑바위솔   | -  | Yes        |
| 국화바위솔    | <i>Rosularia chrysantha</i>                            | Yes        |
| 장미바위솔    | -  | Yes        |
| 능유바위솔    | -  | Yes        |
| 구슬바위솔    | -  | Yes        |
| 다람쥐꼬리바위솔 | <i>Lycopodium Chinese L</i>                            | No         |
| 매화바위솔    | <i>Rosularia sedoides</i>                              | Yes        |

Table 1-1-7. Morphological characteristics of invasive species of *Orostachys*.

| Species   | Charateristics  | Species  | Charateristics  |
|---|---|--|---|
| <p>거미바위솔</p>       | <p>연녹색의 띠 잎에 거미줄이 쳐져 있음. 2년에1번 한번 꽃이 피고 꽃이 핀 후, 수명을 다함.</p>         | <p>솔방울바위솔</p>    | <p>연녹색의 띠 잎은 햇빛이 강하면 붉은 색 띠</p>                         |
| <p>숨털바위솔</p>       | <p>잎끝에 숨털이 있음 햇빛이 강하면 붉은잎 색을 띰.</p>                                 | <p>붉은잎숨털바위솔</p>  | <p>숨털바위솔과 유사함 잎색이 붉음</p>                                |
| <p>호랑이발톱바위솔</p>   | <p>잎가가 거칠고 작은가지가 있음 꽃을 핀 후, 수명을 다함.</p>                             | <p>블랙답바위솔</p>   | <p>엽육은 딱딱하고, 끝부분이 뾰족함. 가장자리가 붉음.</p>                    |
| <p>국화바위솔</p>     | <p>잎모양이 피침형임 모양이 국화꽃을 연상시킴</p>                                      | <p>장미바위솔</p>   | <p>잎이 둥글고, 끝부분이 뾰족하함. 장미꽃을 연상시키는 모양임</p>                |
| <p>능유바위솔</p>     | <p>매우 딱딱하고 잎끝이 뾰족함 크기가 크고 추위에도 무척 강하여 영하 5도 정도에서 상록 월동 함.</p>       | <p>구슬바위솔</p>   | <p>짧고 통통한 잎이 모여, 둥글둥글한 구슬모양 같음 꽃이 바위솔과 달리 매화꽃과 비슷함.</p> |
| <p>다람쥐꼬리바위솔</p>  | <p>짧고 통통한 잎이 총생하여 위로 자람. 햇빛강도에 따라 잎색이 붉게 변함. 꽃대 하나당 1-2개의 꽃이 뿜.</p> | <p>매화바위솔</p>   | <p>잎은 피침형이고, 털이 있음 꽃이 일반 바위솔과 달리 매화꽃과 비슷한 꽃이 뿜.</p>     |

마. 관상가치가 높은 종 선발

본 연구팀에서는 관상가치가 매우 우수하고 상품성이 있으며, 금후 해외로의 수출도 가능하다고 판단되는 종류를 다음과 같이 선발하였다(Fig. 1-1-4).

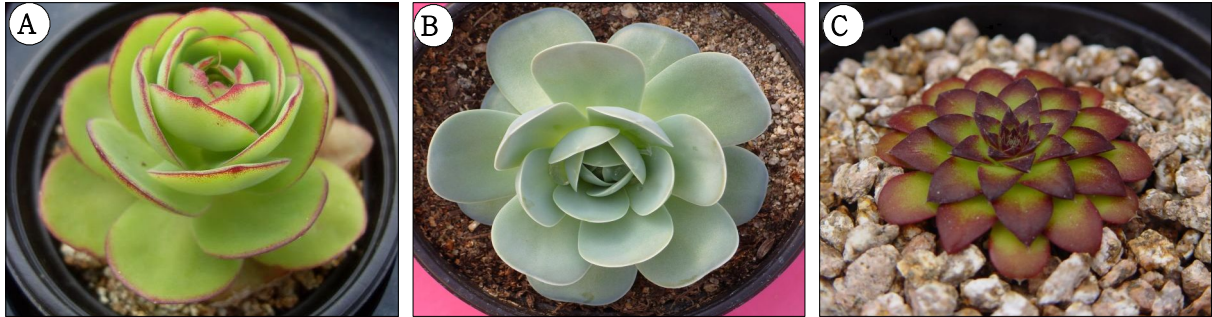


Fig. 1-1-4. A; *Orostachys malacophyllus*, B; *Orostachys iwarenge*, C; *Orostachys margaritifolius*

2. 노루귀 종류별 수집 및 특성조사

가. 우리나라 자생 노루귀종류 및 생태적 특징

우리나라에 자생하는 노루귀는 *Hepatica* 속 식물로 다음 표와 같이 크게 3종류밖에 없다(Table 1-2-1). 이들 중 세끼 노루귀가 가장 크기가 작았으며, 섬노루귀가 10~30cm 로 가장 컸다 (Table 1-2-2). 노루귀는 꽃대나 잎이 나는 모양이 ‘노루의 귀’를 닮았다 하여 붙여진 이름이다.

Table 1-2-1. *Hepatica* species native to Korea.

| Name  | Scientific name                 | Different name | Possession |
|-------|---------------------------------|----------------|------------|
| 노루귀   | <i>Hepatica asiatica</i> Nakai  | -              | Yes        |
| 섬노루귀  | <i>Hepatica maxima</i> Nakai    | 큰노루귀, 왕노루귀     | Yes        |
| 새끼노루귀 | <i>Hepatica insularis</i> Nakai | 애기노루귀          | Yes        |

Table 1-2-2. Ecological characteristics of *Hepatica* species native to Korea.

| Name  | Plant height | Habitat    | Years | Charateristics       |
|-------|--------------|------------|-------|----------------------|
| 노루귀   | 8~20cm       | 전국         | 다년생초본 | -                    |
| 섬노루귀  | 10~30cm      | 경상북도 울릉도   | 다년생초본 | 노루귀 중에서 강하며, 재배하기 쉬움 |
| 새끼노루귀 | 5~15cm       | 남해안 섬, 제주도 | 다년생초본 | 다른 노루귀에 비해 크기가 작음    |

분포지는 노루귀는 전국에 걸쳐 분포하나 섬노루귀는 경상북도 울릉도에 자생하고 새끼노루귀는 남해안과 제주도와 같이 남쪽에 주로 분포하고 있었다.

## 나. 노루귀의 형태적 특징

### (1) 각 기관의 특징

노루귀의 구조는 크게 지상부와 지하부로 나누어지는데, 지상부는 단축경으로 매우 짧은 줄기가 기부에 발달되어 있다. 여기에 잎눈이 있어 노루귀를 닮은 잎이 나며 꽃눈은 기부에서 발달한다. 화기 구조는 가장 바깥쪽에 총포가 꽃을 보호하고 있으며 그 안쪽으로 여러장의 꽃잎 구조를 한 꽃받침이 있다. 노루귀의 큰 특징중의 하나는 실제로 꽃잎이 없는 ‘무화피화’라고 불리고 있는데, 꽃잎의 역할을 하고 있는 것을 ‘총포엽’이라고 부른다. 그 안쪽으로는 수술과 암술이 있다(Fig. 1-2-1).

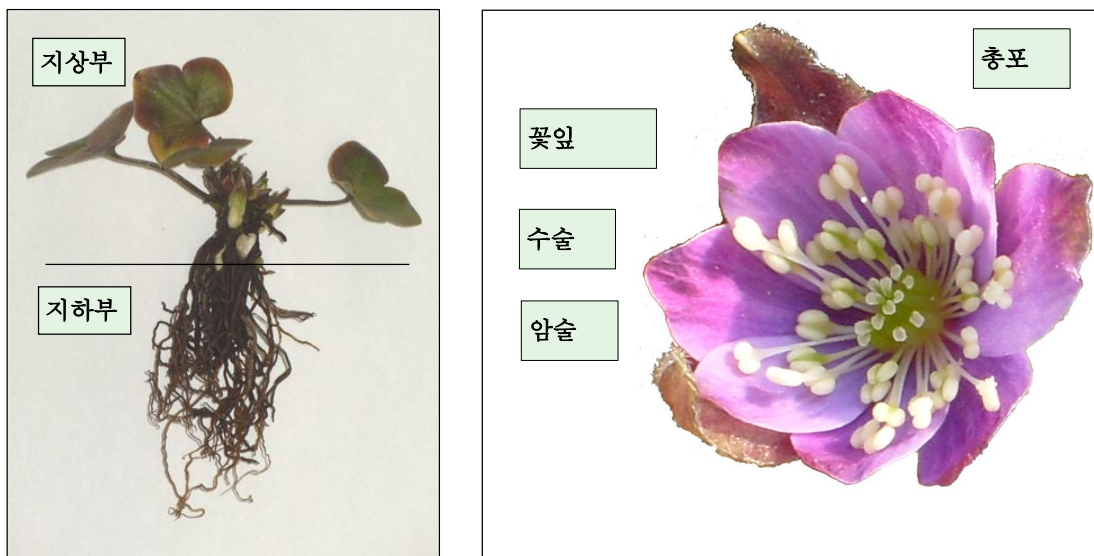





Fig 1-2-1. Shoot, root (left) and flower structure (right) of *Hepatica asiatica* plant.

### (2) 잎의 형태적 특성

노루귀의 잎은 모든 종류에서 3갈래로 갈라진 심장형으로 크기는 새끼노루귀가 2~3cm 노루귀는 4~6cm 그리고 섬노루귀는 5~9cm 정도로 작은 편이다. 한 개체당 엽수는 보통 3~6장이고, 엽색은 녹색이 대부분이나 새끼노루귀의 경우 짙은 녹색에 흰색무늬가 들어있다. 새끼노루귀는 잎 양면에 털이 있다(Table 1-2-3).

Table 1-2-4. Morphological characteristics of flower and seed in *Hepatica* species native to Korea.

|                        | 노루귀   | 섬노루귀   | 새끼노루귀   |
|------------------------|---|--|---|
| <b>Species</b>         |  |  |  |
| <b>Flower size</b>     | 1~1.5cm   | 1.3~1.6cm  | 0.8~1cm   |
| <b>Flower color</b>    | 흰색, 분홍색, 보라색  | 흰색, 분홍색  | 흰색, 붉은보라  |
| <b>Flower stem</b>     | 6~12cm  | 5~20cm   | 7cm   |
| <b>Bract</b>           | 3장  | 3장   | 3장  |
| <b>Sepal</b>           | 6~9장  | 6~8장   | 6~8장  |
| <b>Fruit</b>           | 수과  | 수과   | 수과  |
| <b>Characteristics</b> | 꽃줄기에 털이 있음.   | 총포에 비해 꽃이 작음.  | 노루귀와 섬노루귀에 비해 꽃과 초장이 작다.  |




### (3) 꽃과 열매의 형태적 특징

노루귀의 꽃은 대체적으로 1.5cm 이하로 작은 편인데, 특히 새끼노루귀는 1cm 이하로 가장 작았다. 노루귀가 1.5cm 까지 커서 가장 큰 것으로 나타났다. 화색은 노루귀가 가장 밝은 색으로 흰색에 가까웠으며, 새끼노루귀가 보라색이 가장 진했다. 섬노루귀는 그 중간 정도로 연분홍색에 가까웠다. 총포는 모두 3장이었으며, 꽃잎으로 보이는 꽃받침은 6~8장 정도로 홑꽃이었다. 외국에서 도입된 원예종은 겹꽃이 많고 꽃도 매우 화려한데 비해 자생 노루귀는 홑꽃이며 화색도 화려하지 못해 있는 그 자체로는 상품성에서 많이 떨어진다고 판단되었다.

따라서 금후 국내 자생 바위솔이 상품성을 가지고 경쟁력을 갖게 하기 위해서는 도입종과 교배를 통한 형질개량을 하지 않으면 안되겠다고 판단되었다(Table 1-2-4).



Table 1-2-3. Morphological characteristics of leaf in *Hepatica* species native to Korea.

|                    | 노루귀   | 섬노루귀   | 세끼노루귀   |
|--------------------|---|--|---|
| Species            |  |  |  |
| Plant height (cm)  | 4~6   | 5~8  | 2~3   |
| Leaf shape         | 3갈래로 갈라진 심장형  | 3갈래로 갈라진 심장형   | 3갈래로 갈라진 심장형  |
| No. of leaf        | 3~6장  | 3~6장   | 3~6장  |
| Petiole length(cm) | 8~20cm  | 14~30cm  | 5~15cm  |
| Leaf color         | 녹색  | 짙은 녹색  | 짙은 녹색에 흰색무늬   |
| Charateristics     | 처음에는 털이 많으나 자라면서 없어짐.   | 잎이 두꺼우면 폭이 크고, 가장자리에 털이 있음   | 잎 양면에 털이 있음   |

#### (4) 세계 원예종 노루귀

국내 자생 바위솔의 상품성과 경쟁력을 높이기 위해서는 해외로부터 우량 형질의 노루귀를 도입하여 교배를 통한 품종개량이 우선되어야겠다고 판단되었다. 따라서 국내에 도입되어 있는 외래종을 찾아서 수집하고 분류하였다. 도입종 노루귀는 다음 표와 같다. 현재 국내에 도입되어 있는 원예종은 그 대부분이 일본으로부터 도입된 것들이다. 그러나 원래 이런 종류들이 일본에서 육성된 것이 전부가 아니고, 유럽에서 개량된 것이 일본으로 들어와서 재배되다가 한국으로 도입된 것으로 알려져 있다. 일본의 노루귀는 서양의 노빌리스(*H. nobilis*) 품종의 교배종이다. 실제로 일본에서 재배되고 이용되고 있는 종류는 수없이 그 종류가 많았고, 화색이 화려하고 꽃도 겹꽃 내지는 2단꽃 등이 있어 매우 화려하고 아름다웠다. 아래 Table 1-2-5, 6에 있는 전 세계에 있는 여러 종류들 중 그 일부를 소개한 것으로 일본에서 도입된 일부 품종은 수집하여 교배를 목적으로 보존하고 있다(Fig 1-2-2).

Table 1-2-5. Morphological characteristics of various *Hepatica* species distributed in the world.

| Species  | Characteristics   | Species   | Characteristics                            |
|--|---|---|--|
| 미스미초<br>    | 노빌리스의 변종.<br>앞끝이 뾰족한 삼각형.   | 노빌리스<br>    | 일본노루귀의 모종.                                 |
| 스하마초<br>    | 잎이 얇고 작은 소형이<br>며, 끝이 뾰족한<br>삼각형.                                     | 트란실바니카<br>  | 화색은 청색이고,<br>표면에 솜털이 있음.                   |
| 오오미스미초<br> | 재배가 쉽고 강하며,<br>개체변이가 많아,<br>육종재배에 유용함.                                | 아틱로바<br>   | 반낙엽성이며,<br>잎 끝부분이 뾰족함.<br>화색은 백색임          |
| 케스하마초<br> | 앞끝이 둥근 주병형.<br>털이 적은 것도 있음<br>자방이 적고, 종자결실<br>기 기간이 길어 재배가<br>어렵고, 약함 | 아메리카나<br> | 잎 끝부분이 둥글며,<br>화색은 옅은 보라색,<br>옅은 복숭아색, 백색. |
| 야마즈타이<br> | 화색은 백색이며, 4<br>배임   | 헨리<br>    | 화색은 백색이며,<br>4배체임                          |

Table 1-2-6. *Hepatica* species distributed in the world.

| Name   | Scientific name  | Habitat             | Possession |
|--------|--|---------------------|------------|
| 미스미초   | <i>H. nobilis</i> var. <i>japonica</i> f. <i>japonica</i>  | 일본(큐슈북부)            | Yes        |
| 스하마초   | <i>H. nobilis</i> var. <i>japonica</i> f. <i>variegata</i> | 일본                  | Yes        |
| 오오미스미초 | <i>H. nobilis</i> var. <i>japonica</i> f. <i>magna</i>     | 일본                  | Yes        |
| 케스하마초  | <i>H. nobilis</i> var. <i>pubescens</i>                    | 일본                  | Yes        |
| 야마츠타이  | <i>H. yamatutai</i>  | 중국                  | No         |
| 헨리     | <i>H. henryi</i>   | 중국                  | No         |
| 노빌리스   | <i>H. nobilis</i>  | 유럽                  | No         |
| 트란실바니카 | <i>H. transsilvanica</i>                                   | 루마니아<br>(트란실바니카 지방) | No         |
| 아틱로바   | <i>H. acutiloba</i>  | 북미동부                | No         |
| 아메리카나  | <i>H. americana</i>  | 북미동부                | No         |



Fig 1-2-2. Morphology and colour of flowers in various *Hepatica* species distributed in the world.

## 제 2 절 바위솔과 노루귀의 대량증식 체계 확립

### 1. 노루귀 종자의 발아생리 구명 및 대량증식 기술개발

노루귀는 매우 낮은 광도에서 잘 생육하고 이른 봄에 아름다운 꽃을 피우기 때문에 관상 가치가 대단히 높은 야생화종의 하나이다. 그러나 노루귀 종자는 봄에 파종하면 가을에 뿌리가 내리고 겨울을 지나고 봄이 되어야 떡잎이 나온다. 봄에 떡잎이 나온 노루귀는 다음해 봄이 되어야 본엽이 2-3장 나오고, 다시 1년을 보내야 3년째에 꽃을 볼 수 있다. 이런 이유 때문에 농가에서 노루귀를 재배하기를 꺼려하고 소비자들도 크게 선호하지 않고 있다. 따라서 노루귀 종자의 발아생리를 구명하여 발아속도를 높이고 발아율을 향상시킬 필요가 있다. 이렇게 되면 농가들에게 크게 도움을 줄 수 있을 것이며, 노루귀의 소비도 크게 확대될 것으로 여겨진다.

#### 가. 종자 휴면 타파를 위한 온도처리

##### (1) 연구목적

2년이 된 바위솔은 가을에 꽃을 피우고 종자를 맺게 되는데, 종류에 따라 휴면에 들어가는 종과 휴면이 없는 종이 있다. 휴면에 들어가는 종류는 어떤 환경에 두어도 발아되지 않기 때문에 휴면을 타파시켜야 한다. 또한 발아적정 온도에 관한 연구보고도 전무한 상태이기 때문에 발아적정온도 구명과 휴면 유무 등을 구명하고 휴면타파기술과 발아율 향상 기술을 개발할 필요가 있다.

##### (2) 재료 및 방법

2009년에 3월에 구매한 노루귀를 경남과학기술대학교내 무가온 비닐온실에서 재배하고, 2010년 4~5월에 종자를 채종하여 실험에 사용하였다(Fig. 2-1-1). 채종한 종자 중 충실한 종자만 선별하여, 직경 90mm 유리 petri dish에 멸균한 강모래를 깔고, 증류수로 적셔준 다음 파종하였다. 파종한 노루귀 종자는 30, 35, 40℃의 항온에 암상태로 고온처리하였다. 고온처리한 종자는 종자가 건조해지지 않도록 수분을 수시로 공급해 주었다. 처리를 한 종자를 15, 30, 45일 간격으로 꺼내, 70% ethanol에 2분간 침지한 후, tween 20 첨가된 3% NaOCl에 15분간 150rpm 흔들어서 다음, 살균제 BENCIDE LX 150(kathon wt, Rohm and Haas) 600mg·L<sup>-1</sup>으로 3번 수세하여 소독하였다. 소독한 종자는 발아과정을 육안으로 확인하기 위해 용토 대신에 0.9% agar와 살균제 BENCIDE LX 150 600mg·L<sup>-1</sup>이 첨가된 배지에 치상하여, 15℃ 항온상태에 두었다. 대조구는 고온처리를 하지 않고, 소독을 한 후, 배지에 치상하여, 15℃ 항온에 두었다. 치상한 노루귀 종자는 3일 간격으로 발아를 조사하였다. 처리한 종자수는 처리당 15립 3반복하였고, 발아의 기준은 유근이 3mm 이상 되었을 때를 발아된 것으로 인정하였다. 발아기간이 너무 길어지거나, 배지 및 종자의 오염이 있을 경우, 새로운 배지로 계대배양 해 주었다. 발아율 조사가 끝난 후, 종자의 활력도를 검사하기 위하여, TZ 테스트하였다. TZ 테스트는 종자를 증류수에 하룻밤 침지시킨 후, 1% TZ(2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride, sigma-aldrich, U.S.A) 용액에 35℃, 4시간 침지한다. TZ 용액에 침지처리가 끝난 종자는 증류수로 2~3회 수세한 다음, 메스를 이용하여, 반으로 절단한 후 실체현미경하에서 염색정도로 배발달력과 종자발아력을 조사하였다.

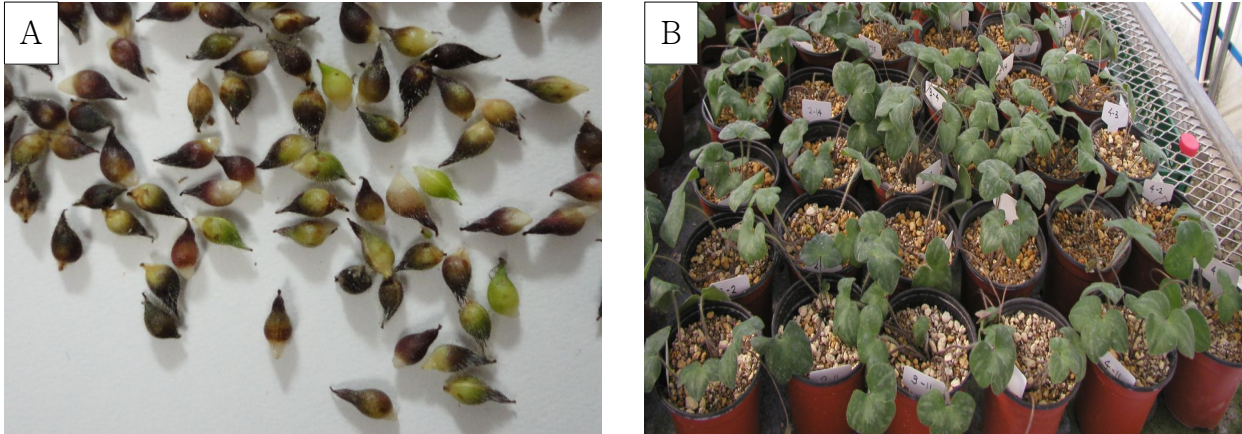


Fig. 2-1-1. Seeds harvested (A) from potted *H. asiatica* plant which was cultivated in non-heated vinyl house (B).

### (3) 결과 및 고찰

노루귀 종자는 자연상태에서 여름나고 가을이 되어야 발아되는 것으로 알려져 있다. 즉, 어느 정도 고온기를 거쳐야 배가 성숙하거나 휴면이 타파되었다가 다시 시원해졌을 때, 유근이 자라는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 종자를 인위적으로 고온 처리하여 종자발아 유무를 관찰하였다. 노루귀 종자는 파종 후 70일 이후에나 발아하기 시작하여 발아시간이 무척 긴 종자인 것으로 판단되었다(Fig. 2-1-2). 온도처리를 하지 않은 대조구는 최종발아율이 33% 정도로 나타났다. 그러나 다른 모든 고온처리구에서는 전혀 발아하지 않거나 발아해도, 5% 이하의 발아율을 보였다(Fig. 2-1-3). 이는 고온처리에 의해 오히려 발아력이 감소한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 예상과는 크게 다른 결과였는데, 노루귀 종자가 발아가 되기 위해서는 고온을 필요로 하지 않는다는 새로운 사실을 알 수 있었다.

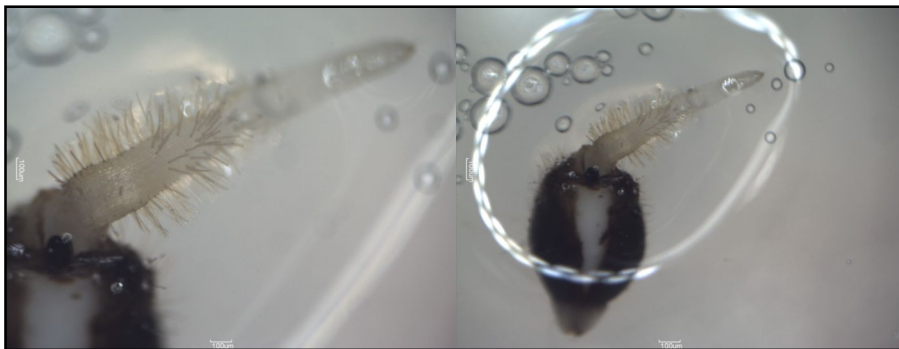


Fig. 2-1-2. Radicle protruded from seed of *H. asiatica* on plain agar plate (dormancy for root was first released in *H. asiatica* seeds).

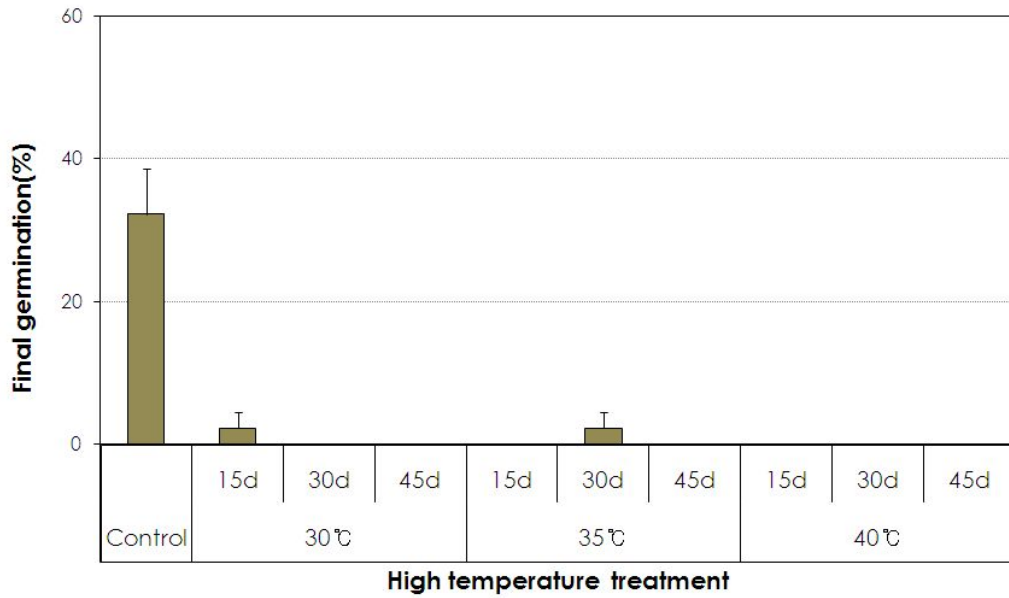


Fig. 2-1-3. Effect of treatment of high warm temperature followed by incubation at 15°C on germination of *H. asiatica* seeds.

파종 후 7개월이 지나서 발근하지 않은 종자들을 TZ (tetrazolium) 테스트를 하여 종자의 발아력을 평가함과 동시에 처리에 따른 배 발달 정도를 관찰하였다(Fig. 2-1-4). 발아율 결과와 비슷한 경향으로 비록 발아는 하지 않았지만 대조구 종자의 활력과 배 발달 정도가 가장 높았다. 그리고 고온처리 기간이 길어질수록 종자의 활력과 배 발달 정도가 낮아지는 것을 알 수 있었다(Fig. 2-1-5). 이는 고온에 의해 노루귀 종자는 활력을 잃는 것으로 보인다.

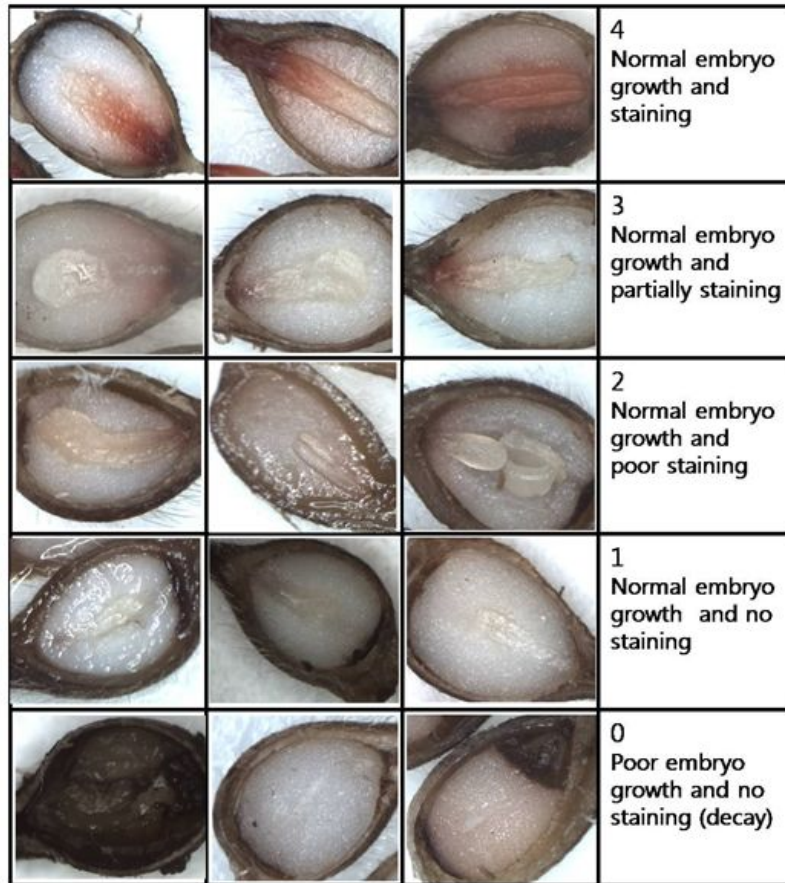


Fig. 2-1-4. Viability and growth level of seeds classified by tetrazolium chloride staining test and morphology of embryo in *H. asiatica*.

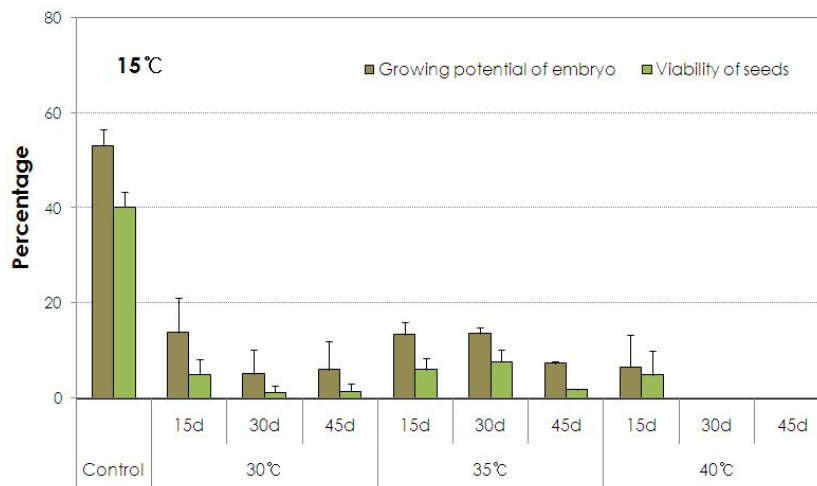


Fig. 2-1-5. Effect of treatment of high warm temperature followed by incubation at 15°C on embryo growth and viability of *H. asiatica* seeds.

## 나. GA<sub>3</sub>처리가 노루귀 종자의 발아에 미치는 영향

### (1) 연구목적

Gibberellin(GA), cytokinin, kinetim 등은 배의 휴면과 그 외의 원인에 의한 종자의 휴면을 타파하고 발아를 촉진하는데 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 특히 GA<sub>3</sub>의 경우, 많은 종류의 종자 휴면을 타파하거나 저온처리 효과를 대체하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서도 노루귀종자의 휴면을 타파하고 종자발아를 촉진시킬 목적으로 GA<sub>3</sub>를 처리하였다.

### (2) 재료 및 방법

교내포장에서 재배중인 노루귀의 종자를 2010년 4~5월에 채종하였다. 채종한 종자 중 충실한 종자만 선별하였다. 대조구인 증류수 와 처리구인 GA<sub>3</sub> 200, 500mg·L<sup>-1</sup> 준비하였다. 준비된 처리액은 10ml 씩 넣은 15ml tube에 노루귀 종자 45립을 넣고, 2분간 흔들어 준 후 24시간 암상태로 침지하였다. 침지가 끝난 종자는 상기에 언급한 방법으로 소독을 한 후, 살균배지에 petri dish당 15립씩 3반복하여 치상한다. 조사방법은 3일 간격으로 발아를 조사하고, TZ 테스트를 통해 배발달력과 종자발아력을 조사하였다.

### (3) 결과 및 고찰

대조구에서는 파종후 75일째부터 발아하기 시작하여 150일째에 최종 발아율 40%를 나타냈다. GA<sub>3</sub>처리구에서는 발아개시일은 비슷하였으나, GA<sub>3</sub>처리에 의해 발아속도가 빠르게 나타났으며 최종발아율은 대조구와 비슷하게 나타났다. GA<sub>3</sub>처리 농도에 따른 발아율 차이는 보이지 않았다(Fig. 2-1-6).

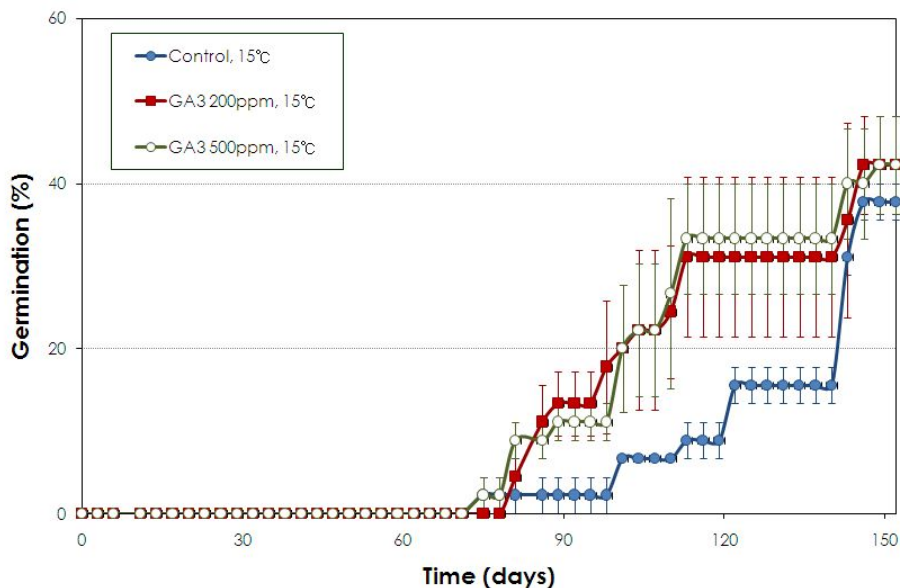


Fig 2-1-6. Cumulative germination of *H. asiatica* seeds treated with different concentrations of GA<sub>3</sub> followed by incubation at 15°C.

종자발아 적온을 구명하기 위해 파종 후, 몇 가지 온도의 발아상에 넣어서 발아율을 조사한 결과, 10°C와 20°C에서는 5% 이하의 발아율을 보인 반면, 15°C에서만 40% 전후의 발아율을 보



였다(Fig. 2-1-7). 노루귀 종자가 온도에 매우 민감한 종류임을 보여 주었다. GA<sub>3</sub>처리에 의한 영향은 농도에 상관없이 43% 정도의 발아율을 보여 대조구에 비해 약 12% 정도 발아율이 향상되었다.

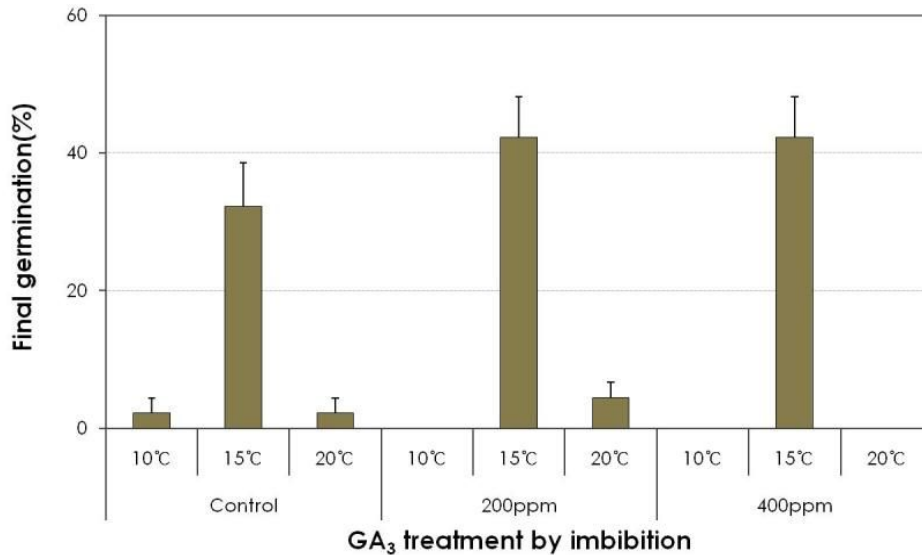


Fig. 2-1-7. Effect of GA<sub>3</sub> treatment on germination of *H. asiatica* seeds incubated at different incubation temperature.

발아율 조사를 끝내고 발아하지 않은 종자의 활력을 알아보기 위해 TZ 테스트를 수행하였다. 배발달력은 발아상 온도에 따라 차이가 나타났는데, 10°C에서 가장 높고 20°C에서 가장 낮게 나타났다(Fig. 2-1-8). GA<sub>3</sub> 농도에 따른 배 발달력 차이는 보이지 않았다. 종자활력도 온도에 의해 차이가 보였는데, 15°C에서 가장 높게 나타났고, 다음은 10°C 그리고 20°C 순이었다. GA<sub>3</sub> 처리에 따른 영향은 유의적인 차이는 보이지 않았으나, GA<sub>3</sub> 농도가 높을수록 활성은 낮아지는 경향이 보였다.

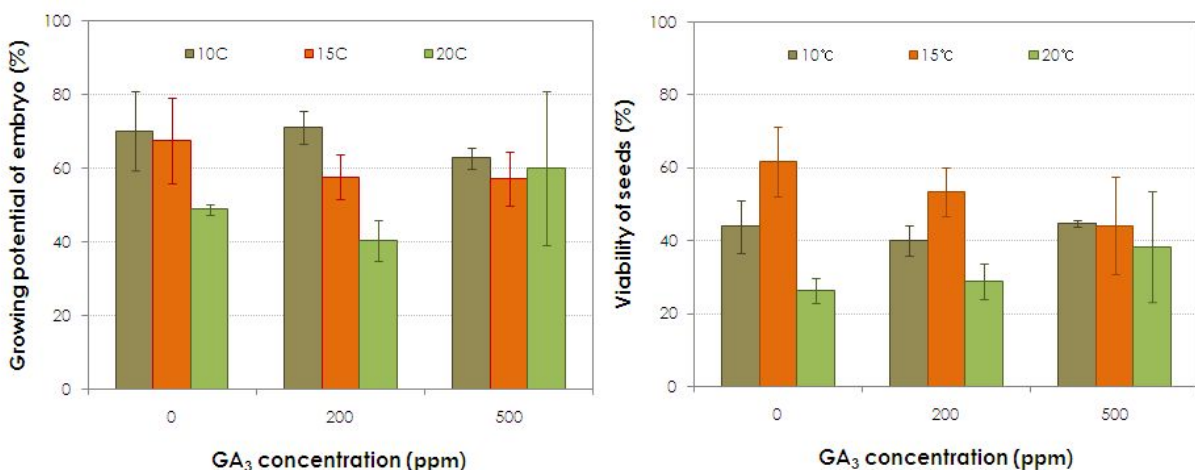


Fig. 2-1-8. Effect of GA<sub>3</sub> treatment on embryo growth and viability of *H. asiatica* seeds incubated at 15°C.

다. 배지에 처리한 GA<sub>3</sub>가 노루귀 종자 발아에 미치는 영향

(1) 연구목적

종자 발아에 효과적인 GA<sub>3</sub>를 지속적으로 공급할 목적으로 GA<sub>3</sub>를 5~50mg·L<sup>-1</sup>의 저농도로 배지에 넣어 주고 노루귀 종자를 파종한 후 발아율을 조사하였다.

(2) 재료 및 방법

교내포장에서 재배중인 노루귀의 종자를 2010년 4~5월에 채종하였다. 채종한 종자 중 충실한 종자만 선별하여 실험에 사용하였다. 앞서 기술한 방법으로 종자를 소독한 다음, 살균제와 GA<sub>3</sub> 5, 10, 20, 50mg·L<sup>-1</sup> 첨가된 고체배지에 13립/petri dish 3반복으로 치상하였다. 치상한 노루귀 종자는 15°C 암상태로 배양한다. 상기와 같은 방법으로 발아와 배발달력과 종자발아력을 조사하였다.

(3) 결과 및 고찰

GA<sub>3</sub> 농도에 상관없이 발아가 전혀 이루어지지 않았다(Fig. 2-1-10). TZ 테스트로 배 발달력과 종자활성을 조사한 결과, 종자에 침지 처리시에는 농도가 높아질수록 배 발달력과 종자활성이 낮아지는 경향이 보였다. 발아가 전혀 보이지 않은 배지 첨가구에서도 모든 종자가 활성을 잃은 것으로 나타났다. 이는 지속적인 GA<sub>3</sub>공급이 노루귀의 종자 발아를 억제시킬 뿐만 아니라 종자활성도 잃게 하는 것으로 보인다. 추후 이에 대한 검토가 필요하다고 판단되었다.

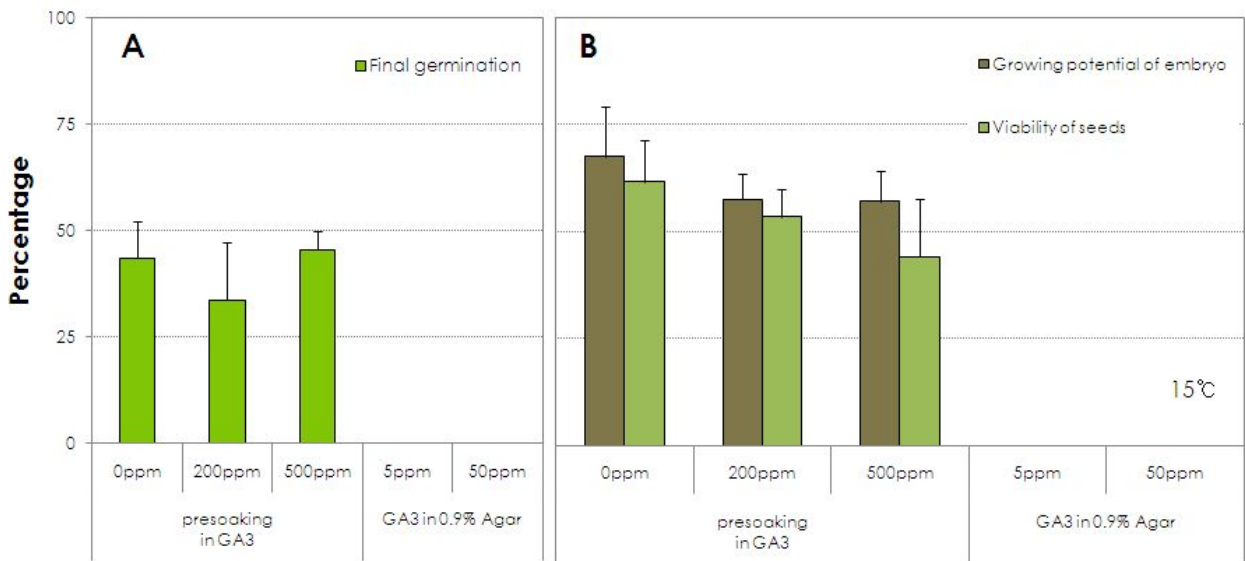


Fig. 2-1-9. Effect of GA<sub>3</sub> treatment on embryo growth and viability of *H. asiatica* seeds incubated at 15°C.

라. 노루귀 종자 종피를 제거 유무가 종자발아에 미치는 영향

(1) 연구목적

경실종자의 휴면을 타파하는 방법 중 하나로, 종피파상 기술을 사용하기도 한다. 종자에 따라서 종피에 발아억제 물질을 가지고 있어, 이런 기술을 이용하여, 종피를 제거함으로써, 발아

억제 물질을 제거할 수 있다. 종피를 제거함으로써 노루귀 종자의 발아를 촉진할 수 있는 지 알아 보기 위해 종피를 벗기고 기내에서 파종하였다.

### (2) 재료 및 방법

채종하여 보관중인 노루귀 종자중 종피가 부패한 종자의 종피를 벗겨, 상기와 같은 종자소독 방법으로 종자를 소독하였다(Fig. 2-1-10). 소독한 종자는 물기를 제거한 다음, 살균제가 첨가된 고체배지에 차상하여, 15와 20℃ 에 암상태로 배양하였다. 배양된 종자는 3일 간격으로 발아와 배 발달력과 발아력을 조사하였다.

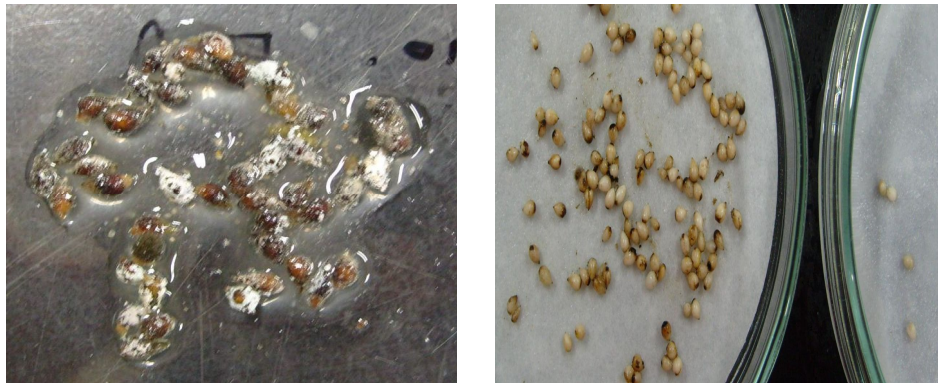


Fig. 2-1-10. Endocarp (or seed coat) degradation (left) and removed endocarp (right).

### (3) 결과 및 고찰

종피를 벗기지 않은 대조구에서는 45% 이상의 발아율을 보였으나, 종피 제거구에서는 발아 상 온도와 상관없이 발아가 전혀 이루어지지 않았다(Fig. 2-1-11). TZ테스트에 의한 배 발달력과 종자활성 검사에서도 종피 제거구에서 0으로 나타나, 종피제거가 오히려 종자활성을 떨어뜨리고 발아도 억제시키는 것으로 판단되었다. 이러한 결과는 노루귀종자는 배가 성숙하는데 종피가 필요할지 모른다는 추측을 갖게 하였다.

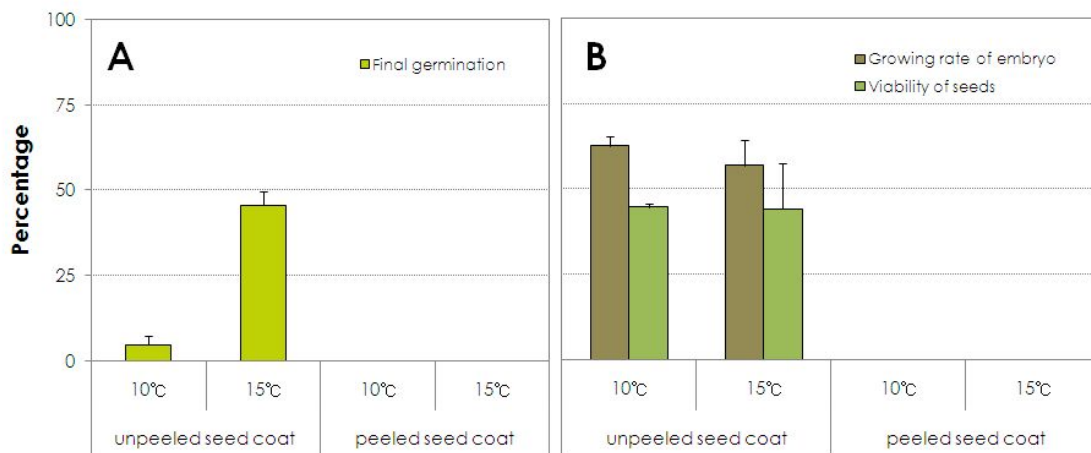


Fig. 2-1-11. Endocarp (seed coat) affecting germination (A), embryo growth and viability (B) of *H. asiatica* seeds

### 마. 노루귀 종자 발아실험 결과 요약

노루귀 종자는 발아(유근 발생)하는데 70일 이상 필요로 하는 것으로 밝혀졌다. GA<sub>3</sub>처리에 의해 발아율이 향상되지는 않으나, 발아속도가 높아지는 것으로 나타났다. 고온처리(30, 35, 40℃)는 노루귀 종자 발아를 오히려 억제시키는 것으로 나타나, 금후 더 낮은 온도와 변온처리 등의 실험을 할 필요성을 느꼈다.

## 2. 노루귀 대량증식을 위한 영양번식 기술 개발

### 가. 근삽시 적정 뿌리 길이 및 삽목시기 구명

#### (1) 연구목적

노루귀를 재배하는 중, 아래 Fig. 2-2-1과 같이 뿌리에서 신초가 자라는 경우를 관찰할 수 있었다. 따라서 뿌리를 이용한 삽목번식의 가능성을 타진하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다.



Fig. 2-2-1. Shoot grown from root of *H. asiatica* plant.

#### (2) 재료 및 방법

교내에서 재배 중인 노루귀의 뿌리를 채취하여, 2, 3, 4cm로 절단한 다음, 6-benzylaminopurine(BA) 500mg·L<sup>-1</sup>에 1시간 동안 침지하여, 모래(5) : 질석(5) 배합토에 근삽하였다. 2010년 4, 6, 8, 10월 총 4차례의 근삽을 실시하였고, 한 처리당 30개의 뿌리삽수를 이용하였다(Fig. 2-2-2).



Fig. 2-2-2. Experiment of root cutting of *H. asiatica* plant to investigate effect of root cutting position on rooting and shooting.

### (3) 결과 및 고찰

2010년 4월에 뿌리의 길이를 달리하여 삼목하고 10개월이 지난 금년(2011) 2월에 발아 및 생육조사를 수행하였다. 그 결과 현재까지 어떤 신초도 올라오지 않았다(Fig. 2-2-3B). 위의 흙을 걷어내고 뿌리들을 살펴본 결과, 단 하나의 신초도 확인할 수 없었다(Fig. 2-2-3C). 절반 정도의 뿌리들은 말라버리거나 부패되어 있었다. 그러나 나머지 절반은 아직도 뿌리가 살아있는 것을 육안으로 확인할 수 있었다(Fig. 2-2-3D)



Fig. 2-2-3. Different root cutting position used in root cutting experiment (A); no rooting and shooting 10 months after root cutting(B and C); rotten roots(left) and viable roots(right).

### 나. 근삽시 BA(6-BENZYLAMINOPURINE)가 발아에 미치는 영향

#### (1) 연구목적

뿌리의 일부를 잘라 삼목하는 방법으로 부정아와 부정근을 발생시켜 개체를 양성하는 방법으로 종자번식을 통한 대량증식이 어려운 노루귀에 사용하고자 하였다.

#### (2) 재료 및 방법

교내에서 재배 중인 노루귀 뿌리를 4cm 잘라 대조구는 수돗물에, 처리구는 6-benzylaminopurine (BA) 50, 100, 200, 500mg·L<sup>-1</sup>에 1시간동안 침지하고, 모래(5):질석(5) 배합토에 근삽하였다. 한 처리당 30개의 뿌리삽수를 이용하였다(Fig. 2-2-4).

#### (3) 결과 및 고찰

BA는 조직배양에서 신초를 발생시키기 위해 많이 사용한다. 본 실험에서는 노루귀 뿌리에 BA의 농도를 달리하여 50~500mg·L<sup>-1</sup> 처리하고 그 결과를 조사하였다. 무처리구와 모든 BA 농도 처리구에서 신초발생은 보이지 않았다.

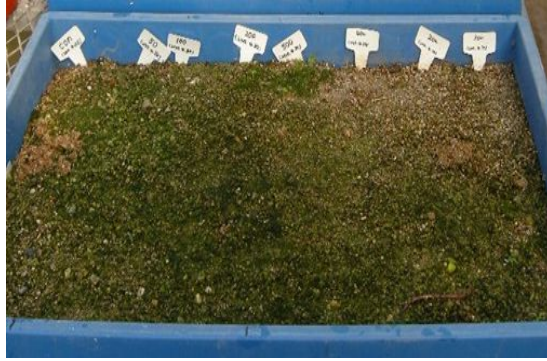


Fig. 2-2-4. Effect of imbibition of cutting root in various BA solution between 50 and 500 mg·L<sup>-1</sup> on rooting and shooting of *H. asiatica*.

#### 다. 근삽시 삽목용토가 삽수의 발아에 미치는 영향

##### (1) 연구목적

배양토에 따라 삽목 후 삽수의 생육에 영향을 미친다. 노루귀의 근삽에서는 어떤 용토에서 가장 좋은 발근 및 발아력을 보이는지 알아보고 위해 실험을 수행하였다.

##### (2) 재료 및 방법

교내에서 재배 중인 노루귀의 뿌리를 4cm 잘라 BA 500mg·L<sup>-1</sup> 에 1시간동안 침지하고, 모래(5):난석(3):상토(2), 모래(5):난석(3):질석(2), 모래(5):질석(3):바크(2), 모래(5):질석(5)의 배합토에 근삽하였다. 한 처리당 30개의 뿌리삽수를 이용하였다.

##### (3) 결과 및 고찰

적정 삽목 용토를 선별하기 위해 난석, 질석, 모래 그리고 바크 등의 용토를 단용 또는 혼용하여 뿌리를 삽목하고 그 결과를 조사하였다. 그러나 10개월인 지난 현재까지 신초발생은 보이지 않았다(Fig. 2-2-5).



Fig. 2-2-5. Effect of media on rooting and shooting from cutting root of *H. asiatica*.

## 라. 노루귀의 대량증식을 위한 조직배양 기술 개발

### (1) 연구목적

조직배양은 식물체의 일부분을 적출해 내어 무균상태로 배양하여, 빠른 시간에 무균의 상태로 식물체를 대량증식 할 수 있는 효율적인 방법이다. 노루귀의 잎이나 기관들로부터 조직배양의 가능성을 알아보고자 실험을 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 식물재료 및 소독방법

교내 온실에서 노루귀의 잎을 채취한 후, 수돗물로 3~4회 수세한 후, 중성세제( $2\text{ml}\cdot\text{L}^{-1}$ )와 락스( $4\text{ml}\cdot\text{L}^{-1}$ )가 첨가된 용액에 5분간, 150rpm으로 세척하였다. 수돗물로 다시 수세를 하고, 70% ethanol에 30초간 세척하였다. 수돗물로 1~2회 수세 후, 1% sodium hypochlorite solution에 100mL당 tween 20# 한 방울을 첨가한 용액에 170rpm에서 15분간 소독하였다. 멸균수로 4회 수세한 다음 엽절편체를 배지에 치상하였다.

#### (나) 배양배지

3% sucrose가 첨가된 MS(Murashige and Skoog)기본 배지에 thidiazuron(TDZ) 1, 2,  $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  와 6-benzylaminopurine(BA) 0.05, 0.1,  $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  을 조합처리 하여 넣고, pH를 5.7~5.8로 맞춘 다음 0.8% agar 첨가였다. agar를 녹인 후 유리시험관( $\text{Ø}30\times 200\text{mm}$ )에 12mℓ분주한 다음,  $121^{\circ}\text{C}$ ,  $1.1\text{kgf}/\text{cm}^2$ 에서 15분간 고온고압 멸균하였다.

#### (다) 배양환경

주기 16시간/일 광주기로 온도  $21^{\circ}\text{C}$ , 상대습도 60%의 배양실에서 배양하였다. 광도는  $84\pm 13\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 이었고, 사용된 광원은 형광등(FL 40EX-D, Osram, korea)이고, 광도계(HD 9021, Delta OHM, Italy)를 사용하여 측정하였다.

### (3) 결과 및 고찰

조직배양기술을 이용한 대량증식 가능성을 확인하기 위해 MS 기본배지에 TDZ와 IBA를 조합처리하고 노루귀 잎을 치상한 결과는 Table 2-2-1와 같다. TDZ  $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 과 BA  $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  처리구에서만 16% 정도의 캘루스 발생을 보였고(Fig. 2-2-6), 다른 처리구에서는 캘루스 발생을 볼 수 없었다. 현재 캘루스에서 신초가 나와 새로운 식물체가 자라고는 있으나, 생육이 매우 느렸다.

Table 2-2-1. Effect of plant hormones on the callus formation of *Hepatica asiatica*.

| Growth regulators (mg·L <sup>-1</sup> ) |      | Callus formation (%) |
|---|------|----------------------|
| TDZ                                     | BA   |                      |
| 1                                       | 0.05 | 0.00 a               |
|   | 0.1  | 0.00 a               |
|   | 0.5  | 0.00 a               |
| 2                                       | 0.05 | 0.00 a               |
|   | 0.1  | 0.00 a               |
|   | 0.5  | 16.67 a              |
| 5                                       | 0.05 | 0.00 a               |
|   | 0.1  | 0.00 a               |
|   | 0.5  | 0.00 a               |

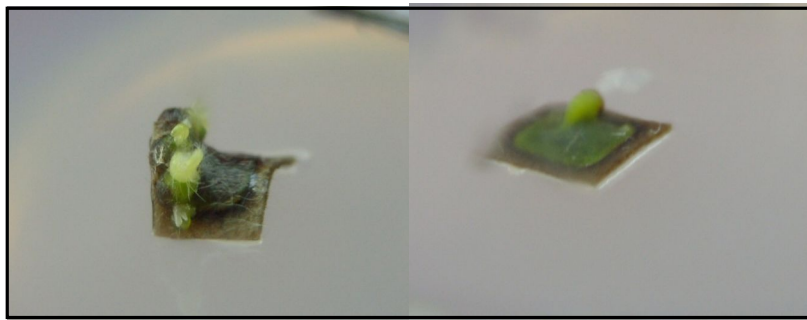


Fig. 2-2-6. Callus from explant of leaf in *H. asiatica* plant.

#### 마. 노루귀 대량증식을 위한 영양번식 기술 개발 실험 결과 요약

뿌리를 이용한 삽목번식 실험을 수행한 결과 단 하나의 신초도 없을수 없어, 노루귀는 근삽이 불가능한 것으로 판단되었다. 그러나 굵은 뿌리만을 이용하거나, 뿌리에 눈이 있는 경우는 근삽도 가능하리라 추론되었다. 조직배양에 의한 번식 기술은 가능하기는 하나 생육이 너무 느려 지금 당장은 실용성이 없어 보였다.

### 3. 바위솔종자의 발아생리 구명 및 대량증식 기술 개발

#### 가. 현미경을 이용한 바위솔의 종자형태 관찰

대량증식을 위한 토속바위솔로 선발된 바위솔들은 Fig. 2-3-1 및 Table 2-3-1과 같다. 이들 바위솔들은 1차년도 자생바위솔 유전자원 수집 및 특성조사에서 구입하여 본교 비닐하우스 안에서 관리해 오던 종류이다. 이들은 모두 관상가치가 높았으나, 특히 태백바위솔과 경북봉화진주 바위솔은 관상가치가 뛰어나 상품성이 높은 것으로 나타났다. 현미경으로 종자를 관찰한 결과 Fig. 19 및 21과 같이, 종자의 크기 1mm 이하의 매우 작은 미세 종자임을 확인할 수 있었다.



품종 간 종자크기에는 큰 차이가 보이지 않았다.



Fig. 2-3-1. Plant materials and their seeds used for mass propagation of *Orostachys* species native to Korea(observed with 30 times magnification).

Table 2-3-1. *Orostachys* species native to Korea selected for mass propagation of potted *Orostachys*.

| Plant name                        | Korean name | Seed collecting time | Seed collecting location | The number of seeds collected EA/3 pots | Viability by TZ test % |
|-----------------------------------|-------------|----------------------|--------------------------|---|------------------------|
| <i>Orostachys chongsunensis</i>   | 강원동면정선바위솔   | 2010. 12. 20         | 경남과기대 캠퍼스 내 온실           | 25                                      | 100                    |
| <i>Orostachys iwarenge</i>        | 강원 영월연화바위솔  | 2010. 12. 20         | 경남과기대 캠퍼스 내 온실           | 33                                      | 100                    |
| <i>Orostachys margaritifolius</i> | 경북봉화진주바위솔   | 2010. 12. 20         | 경남과기대 캠퍼스 내 온실           | 85                                      | 20                     |
| <i>Orostachys iwarenge</i>        | 강원상동연화바위솔   | 2010. 12. 20         | 경남과기대 캠퍼스 내 온실           | 95                                      | 100                    |
| <i>Orostachys malacophyllus</i>   | 삼척동근바위솔     | 2010. 12. 20         | 경남과기대 캠퍼스 내 온실           | 145                                     | 100                    |
| <i>Orostachys spp.</i>            | 태백바위솔       | 2010. 12. 20         | 경남과기대 캠퍼스 내 온실           | >1000                                   | 40                     |

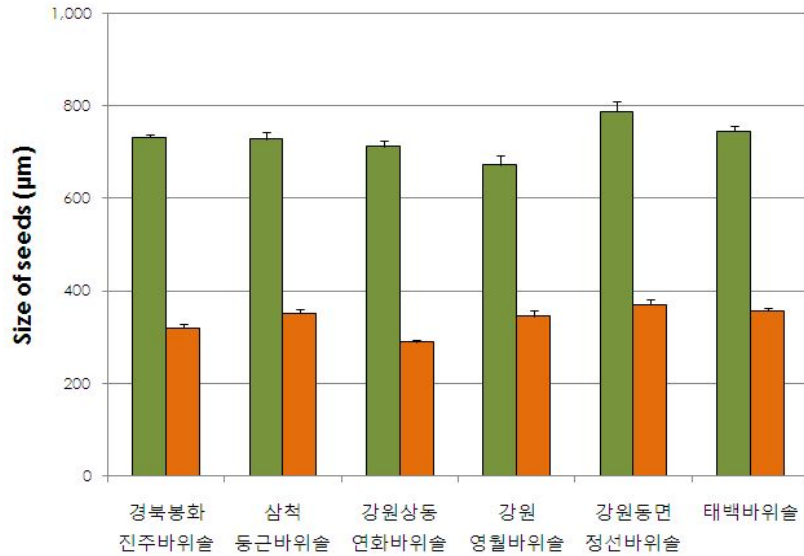


Fig. 2-3-2. Seed size of the selected *Orostachys* species (green bar, seed length; orange bar, seed width).

#### 나. 저온처리가 바위솔 종자의 발아에 미치는 영향

##### (1) 연구목적

휴면타파에 효과가 있는 저온처리를 바위솔 종자에 처리함으로써, 바위솔 종자의 휴면타파 여부를 조사하고, 만약 휴면상태에 있다면, 어떤 저온처리에서 바위솔 종자의 발아율과 발아력이 좋은지를 조사하였다.

##### (2) 재료 및 방법

종자의 휴면 여부를 구명하기 위해 4℃냉장고에 종자를 넣고 15일 간격으로 바위솔 꺼내서 직경 90mm 유리 petri-dish에 filter paper 2장 깔고, 증류수로 수분을 충분히 공급해 준 다음, 파종하고 발아정도를 관찰하였다.

##### (3) 결과 및 고찰

본 실험은 파종 후 종자관리 미숙으로 종자가 부패되거나 지나치게 건조되어 정확한 데이터를 얻을 수 없었다. 금후 다시 실험을 수행할 예정임

#### 다. GA<sub>3</sub> 처리가 바위솔 종자의 발아에 미치는 영향

##### (1) 연구목적

발아온도와 종자내 호르몬의 종류 및 농도가 발아에 영향을 미치는 것으로 알려져 있고, 특히 호르몬 중에서도 GA<sub>3</sub>가 효과적으로 발아율을 향상시키는 것으로 알려져있다. 우리는 발아에 효과적인 GA<sub>3</sub>가 바위솔 종자에도 발아율을 향상시키는 지 알아보기 위해, GA<sub>3</sub>를 농도별로 처리하였으며, 바위솔별 발아적온을 알아보기 위해

##### (2) 재료 및 방법

삼척바위솔종자를 400mg·L<sup>-1</sup>의 GA<sub>3</sub>용액에 24시간 침지하였고, 태백바위솔 종자는 GA<sub>3</sub> 0,

200, 400mg·L<sup>-1</sup> 용액에 12시간 침지처리하였다. 침지 처리한 후 직경 90mm 유리 petri-dish에 filter paper 2장 깔고, 증류수로 수분을 충분히 공급해 준 다음 바위솔 종자를 파종하여 암상태의 10, 15, 20℃의 발아상에 넣어 두고 발아유무를 조사하였다.

### (3) 결과 및 고찰

#### (가) GA<sub>3</sub>처리가 삼척바위솔종자의 발아에 미치는 영향

무처리구에서는 발아가 전혀 이루어지지 않았으나, GA<sub>3</sub>처리에 의해 발아율이 크게 향상되었다. 발아상온도도 크게 작용하여 15℃에서는 90% 이상의 발아율을 보였으나, 10℃와 20℃에서는 60% 이하의 발아율을 나타내었다(Fig. 2-3-3).

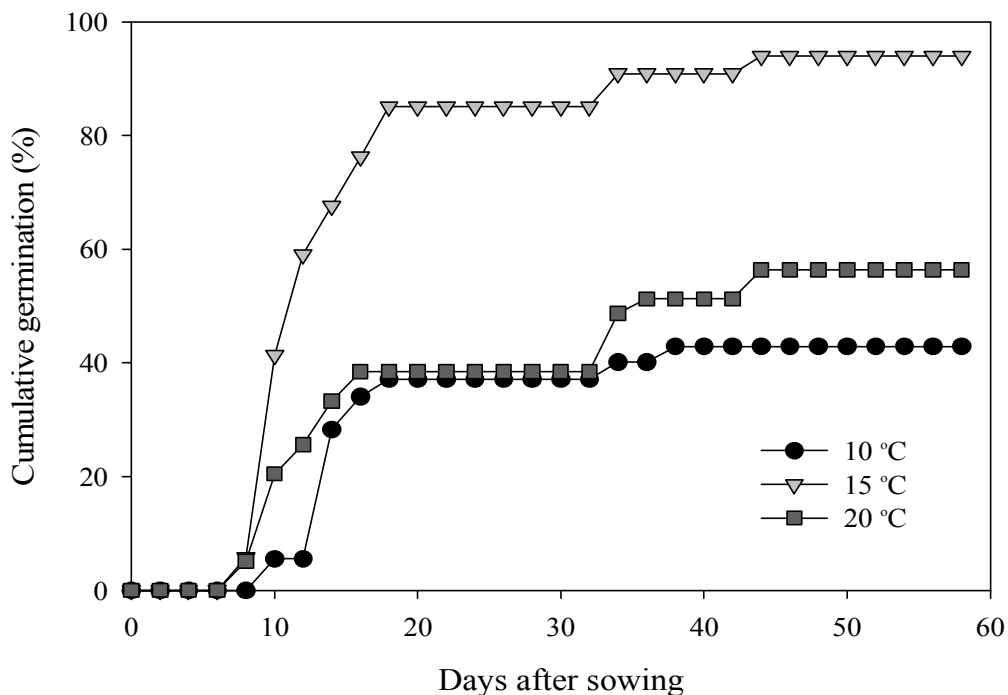


Fig. 2-3-3. Effect of GA<sub>3</sub> and incubation temperature on germination of seeds of *Orostachys malacophyllus* from Samcheok.

#### (나) GA<sub>3</sub>처리가 태백바위솔종자의 발아에 미치는 영향

GA<sub>3</sub>를 처리하지 않은 대조구에서는 발아가 전혀 되지 않거나(10, 15℃), 7%이하의 발아율을 보였다(20℃). 그러나 GA<sub>3</sub>를 처리함으로써 발아율이 크게 향상되었는데, 특히 20℃에서 GA<sub>3</sub>의 농도에 상관없이 약 40%의 발아율을 보였다(Fig. 2-3-4).

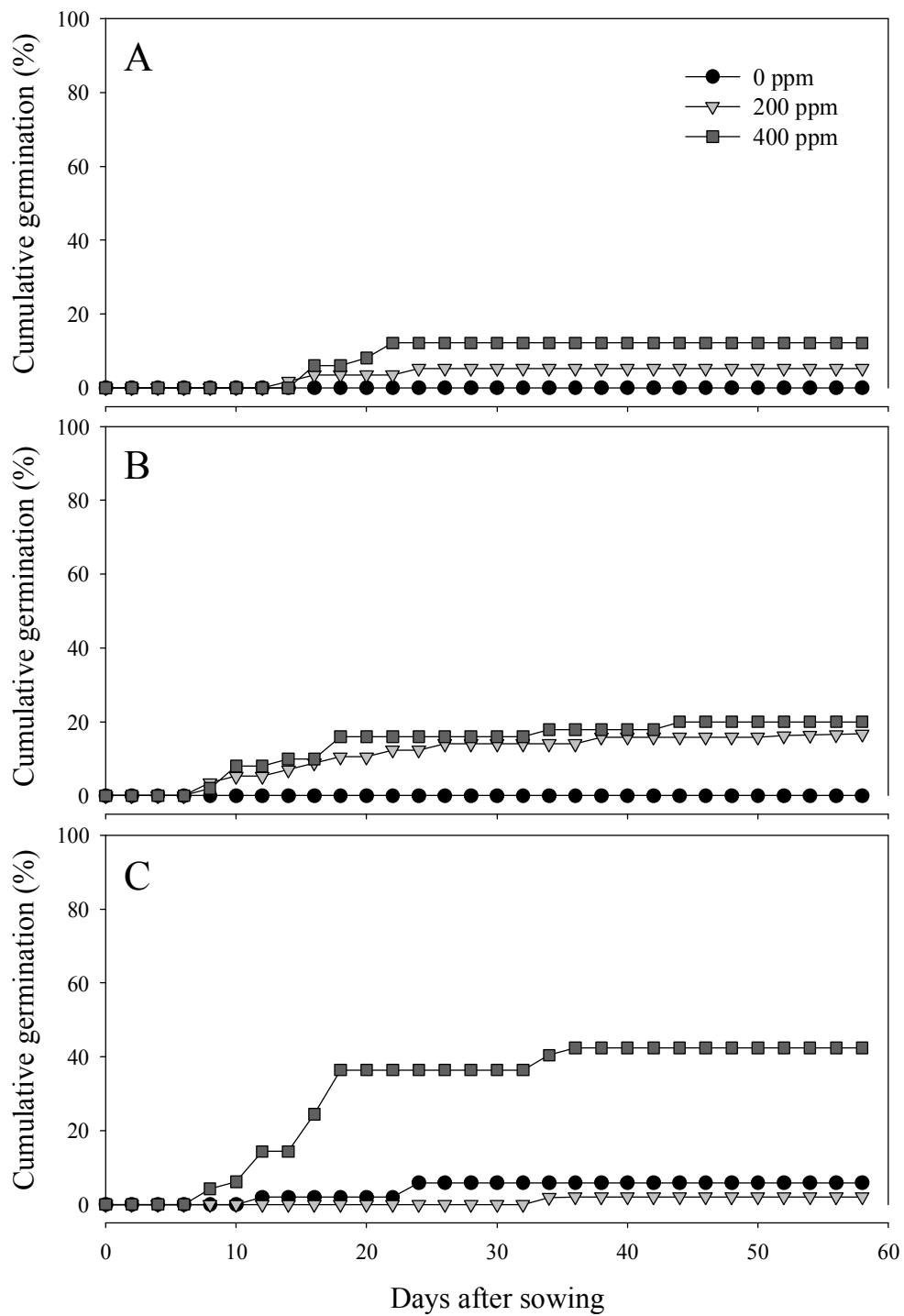


Fig. 2-3-4. Effect of GA<sub>3</sub> and incubation temperature on germination of seeds of *Orostachys malacophyllus* from Taebaek.: 10 (A), 15 (B) and 20 °C (C).

#### 4. 일본 야생화 생산농가 견학 및 야생화 시장조사

##### 가. 일본 노루귀 전문 재배농가 견학

니가타현에 있는 노루귀 재배 및 육종 전문 농가를 방문하여 노루귀 재배방법 및 육종방법 그리고 노루귀의 시장성 등에 대해 공부를 하였다.

##### (1) Sasanuma(笹沼) 園藝 센터

- o 주소 : 니가타현 秋葉區 新律(니이츠)東町 5-19,
- o 전화 : 0250-24-0187, 아들(전무)휴대폰 090-4068-5831, Fax : 0250-24-8741
- o 회사 규모  
: 가족 4명(Sasanuma 부, 모, 큰 아들<전무>, 동생)과 그 외 종업원 4명이 함께 일하고 있다(Fig. 2-4-1~4)
- o 연혁 : 노루귀 재배 경력 25~30년으로 일본에서 노루귀 생산의 가장 중요한 농가이며 육종농가임
- o 주품목 : 노루귀(600종) 그 외 변이종 야생화  
· 가격 : 노루귀 300엔~7만엔으로 매우 희귀한 변이종이 발생하면 가격이 높아짐(Fig. 2-4-5)
- o 시설 : 전시장(40평, Fig. 2-4-6), 상품진열 온실(40평), 재배온실(600평, Fig. 2-4-4)



Fig. 2-4-1. Sasanuma president and his son.



Fig. 2-4-2. Mr Sasanuma's wife and his son.



Fig. 2-4-3. Room for useful new variety.



Fig. 2-4-4. Plastic house for selection of useful line.



Fig. 2-4-5. Hepatica with new color leaf (¥60,000)



Fig. 2-4-6. Exhibition room for new variety (600 varieties are exhibited at every March)

## (2) Chuechu (中越) 식물원

- o 주소 : 니가타현 見附市(미쓰게시) 上新田町 502-1
  - o 전화 : 0250-66-7570 Fax : 0250-24-7733
  - o 회사 규모
    - 가족 4명(渡辺 大介(와파나베 다이스케)부, 모, 아들 2명, Fig. 2-4- 7)
    - 그 외 종업원 4-5명 정도
  - o 역사 : 30년, 일본에서 가장 오래되고 대표적인 노루귀 육종가
  - o 주품목 : 노루귀 그 외 다양한 변이종 야생화 (Fig. 2-4-8)
  - o 시설 : 전시장(1000평), 재배 온실(300평 4개), 노지 (500평)
- 30년이 넘도록 노루귀를 재배하고 육종하여 신품종을 만들어 내고 있었다. 수도 없이 많은

교배를 하고 라벨링을 해 두고 끊임없이 선발을 해 나가는 모습을 볼 수 있었다 (Fig. 2-4-9, 10)



Fig. 2-4-7. Watanabe president of Chuechu garden. Fig. 2-4-8. Plastic house for *Hepatica* plant.

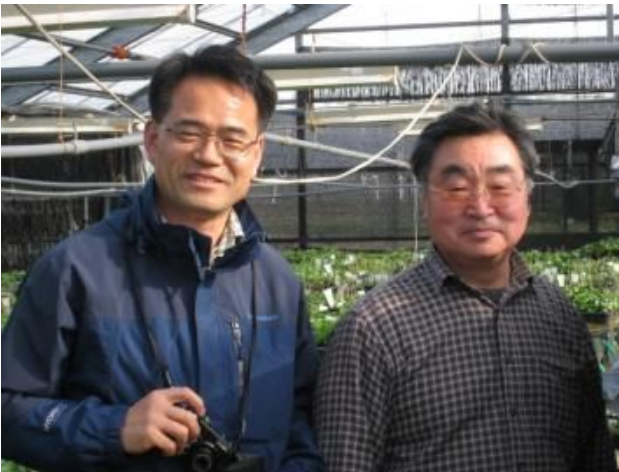


Fig. 2-4-9. Study of breeding method from Watanabe president.

Fig. 2-4-10. Lots of combination and selection.

## 나. 일본에서의 연수한 노루귀 재배 및 육종기술 정리

### (1) 전체 재배과정

- o 당해년 5-6월에 파종한다 (Fig. 2-4-11).
- o 당해년 10월이면 발근된다
- o 차년 2-3월에 떡잎이 발생한다 (Fig. 2-4-12).
  - \* 이 때, 일부는 본엽도 발생
- o 차차년 (2년째)에 본엽이 발생한다 (Fig. 2-4-13).
  - \* 전년도에 본엽이 발생한 개체들은 개화 가능하다.
- o 차차차년 (3년째)에 정상적으로 개화한다 (Fig. 2-4-14).



Fig. 2-4-11. Seeds sown on Kanuma soil.



Fig. 2-4-12. Cotyledon opened at 1 year after seeding.



Fig. 2-4-13. Foliage leaf opened at 2 years after seeding.



Fig. 2-4-14. Flower bloomed at 3 years after seeding.

## (2) 파종방법

- o 토양은 카누마 토양(80%) : 경석(10) : 수피칩(10)을 사용한다.
- o 파종시기는 채종즉시 파종한다 (5-6월, Fig. 2-4-11).
  - 개화 후 35 - 45일 후면 종자가 완숙됨
- o 복토는 해도되고 안해도 될 정도이므로 살짝 해준다.
- o 관리는 성숙한 노루귀와 같이 관리한다.
  - 항상 축축하게 젖은 상태로 약광하에서 시원하게 관리해준다
- o 발아과정
  - 5-6월에 파종한 종자의 과육이 여름에 물러지면 속에 있는 단단한 종자만 남게 된다.
  - 가을(10월)에 발근하기 시작한다.
  - 다음해 2-3월에 떡잎이 발생한다(Fig. 2-4-12)



### (3) 환경관리

o 광 조건 : 빛 관리가 가장 중요하다. (자생지 상태를 유지)

- 10월부터 4월까지의 개방해 준다 (산에서 큰 나무들이 낙엽된 상태)
- 5월이 되면 50% 차광망 한겹을 씌워준다 (나무들이 잎을 내기시작하는 상태)
- 6월이 되면 50% 차광망으로 한겹 추가해 준다.

이때는 약 80% 차광이 필요하다 (숲이 울창한 상태)

#### \* 주의 사항

- 절대 직사광선을 피해야 한다.
- 직사광선을 받게 되면 엽색이 퇴색한다.
- 바로 낙엽되는 일은 없으나 가을에 2차 생육시기가 오면 낙엽된다.

그렇게 되면 품질이 현저하게 떨어진다.

o 온도는 자연상태로 유지한다(하우스 안에서 무난방)

- 니가타현의 온도는 겨울최저온도 -2 ~ -3℃, 여름 최고 온도는 30℃ 정도이다.
- 여름 고온 다습시 잿빛곰팡이 및 탄저병이 발생하기 쉬우므로 통기가 잘되게 한다.
- 차광과 환기가 중요하다. 측창 차광망이 바람이 잘 통하도록 특별히 제작되어 있다

(Fig. 2-4-15).

o 공기 습도는 항상 다습하게 관리한다. 다만, 잿빛곰팡이 발생에 주의 한다.

o 토양 수분은 윗 흙이 말랐을 때 미스트 장치로 충분히 관수해 준다.

즉, 토양이 항상 젖어 있을 정도로만 유지한다.



Fig. 2-4-15. Shading net for lateral direction (The net was cut into small pieces for ventilation)

o 토양은 지역 특산 흙을 주재료로 사용한다 (가누마, 16L 300엔). 한국에서는 일본에서 수입한 녹소토와 매우 비슷하다.

o 가누마 (70-80%)에 경석 (10-20%)과 수피 칩(10%)을 섞어서 사용한다.

#### (4) 개화기 촉진(촉성) 기술

- 4년째에 개화하는 것을 3년째에 개화시키는 기술로서, 전에는 식물호르몬(GA)을 이용하였으나 최근에는 이용하지 않는다. 호르몬을 이용하면 뒤에 생육이 일정하지 않기 때문이다.
- 요즘에는 비배관리(액비사용)를 잘해서 식물의 생육을 촉진시키고 개화를 촉진시킨다. 즉, 비배관리를 잘해서 2년째에 본엽이 나오게 한다.
- 그러므로 충실한 종자를 얻기 위한 노력이 필요하다. 충실한 종자로 파종하면 모주의 상태가 좋아지고 수분 수정이 잘 되면, 생육을 촉진할 수 있다.

#### (5) 채종 및 육종 기술

##### (가) 수분 수정

- 꽃이 약간 벌어진 상태(주두가 준비되어 있을 때)에서 붓 또는 귀청소 도구로 꽃가루를 문혀준다.
- 원하는 꽃가루를 이용하고자 할 때는 화분을 미리 채취해 두었다가 핀셋으로 암술 머리에 문혀준다.
  - 필요시 수술을 채취해서 냉장고에 보관하면 오랫동안 보관이 가능하다.
- 날씨가 추우면 수분 수정이 잘 이루어지지 않는다.
- 올해는 날씨가 추워서 수분 수정이 충분하지 않아 종자가 적다.

##### (나) 채종

- 수분 후 완숙까지 30-40일이 걸린다 (수분 후, 40일 정도가 채종시기)
- 종피색이 녹색에서 약간 탈색될 때가 적기이다.
- 일반적으로 손가락으로 눌러서 채종하나, 생력화하기 위한 도구를 사용하기도 한다.
- 특히 육종을 할 때는 수분 후 굴망 또는 스타킹 같은 것으로 감싸주어 종자가 떨어지는 것을 방지하기도 한다.

#### (6) 번식 방법

##### (가). 종자번식

- 가장 일반적인 방법이나 문제는 시간이 오래 걸리는 부분이다. 즉, 개화까지 4년이나 걸린다.
- 개화시기를 단축시키는 기술이 필요하다. 현재는 환경과 비료로 개화를 촉진시킨다.

##### (나) 조직배양

- 10여년 전에 인근 농업기술센터에서 조직배양을 연구하였다. 그러나 좋은 결과를 얻지 못해 실용화되지 못하였다.
- 종(품종)에 따라 배지를 달리해야 한다거나 조직배양묘는 뒤에 생육이 떨어지는 문제가 있었다. 그래서 현재 전혀 사용하고 있지 않다.

##### (다) 근삼과 분주

- 과거에 해 본적이 있으나, 굵은 뿌리(주근)의 경우에만 가능할 뿐, 가는 뿌리에서는 불가능할 것으로 생각된다.

- o 육종한 경우 종자가 생기지 않는 경우도 많고 종자가 나오더라도 변이가 많이 발생하게 된다. 그런 경우에는 분주를 통해 번식을 하게 되고 시기는 가을 (9-10월)에 하는 것이 좋다.

#### 다. 일본의 야생화 시장 조사

대도시(도쿄)의 경우는 홈센터를 방문하였고, 일반 도시는 가든센터나 대형 꽃집을 방문하여 일본에서의 야생화 판매와 유통에 관해 조사를 행하였다. 3월초였음에도 불구하고 일본에는 다양한 야생화가 상용화되어 시장에 나와 있는 것을 볼수 있었다(Fig. 2-4-16). 그 중에는 우리나라 야생화이기도 한 할미꽃이나 금낭화, 노루귀, 복수초, 개불알란, 메발톱꽃 등 많은 종류도 있었다(Fig. 2-4-17,18).

노루귀는 일본에서 “설할초”라는 이름으로 판매되고 있었는데, 가든에는 상당히 많은 량이 전시되어 있었다 (Fig. 2-4-18). 우리나라에는 없는 종류들도 산업화되어 재배 생산되고 있었는데, 그 종류로는 고양이꼬리, 크리스마스 로즈와 같은 식물들이 있었다.



Fig. 2-4-16. Various wild flowers displayed on horticultural garden.



Fig. 2-4-17. *Cypripedium macranthum* native to Korea.



Fig. 2-4-18. *Aquilegia buergeriana*, *Adonis amurensis*, and *Hepatica* plants native to Korea.

### 제 3 절 바위솔과 노루귀의 고품질 분화 재배 기술 개발

#### 1. 토속 바위솔(*Orostachys*)의 수집 및 대량번식 기술개발

##### 가. 토속 바위솔 수집 및 상품성 있는 바위솔 선발 (2년차 계속)

###### (1) 연구목적

바위솔은 들나물과(*Crassulaceae*) 바위솔속(*Orostachys*) 에 속하는 식물로 우리나라에는 총 7종이 분포하는 것으로 알려져 있으며, 남한에는 바위솔 (*Orostachys japonicus*), 쯤바위솔 (*Orostachys minutes*), 둥근바위솔(*Orostachys malacophyllus*), 연화바위솔(*Orostachys iwarenge*) 등 4종이 자생하고 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 우리나라에는 현재까지 알려져 있는 종 외에 각 지역에서 다양한 형태와 엽색의 바위솔 속 식물들이 발견되고 있으나, 단지 지역명으로만 불릴 뿐 식물분류학적 연구가 이루어지지 않은 상태에 있다. 본 연구에서는 우선 토속 바위솔들을 수집하고, 수집한 식물체들로부터 다양한 상품성을 가진 우수한 개체를 선발하고, 실생묘를 통해 우수한 변이종을 대량증식 하고자 하였다.

###### (2) 재료 및 방법

우리나라에 자생하는 바위솔들은 자생식물원을 통해서 구입하거나 자생지에서 채집하는 방법을 통해 수집되었다.

###### (3) 결과 및 고찰

연화바위솔(*O. iwarenge*) 4종, 바위솔 (*O. japonicus*) 2종, 둥근바위솔 (*O. malacophyllus*) 4종, 진주바위솔 (*O. margaritifolius*) 2종, 정선바위솔 (*O. chongsunensis*) 1종, 가지바위솔 (*O. ramosus*) 1종, 쯤 바위솔(*O. minutes*) 1종, 포천바위솔(*O. latiellipticus*) 1종 및 아직 명명되지 않은 1종(진도에서 수집, *O. japonicus*에 임의로 분류시킴) 등 총 17종의 바위솔속 식물이 수집되었다. 수집된 토속 바위솔들은 기존의 국가표준식물목록 분류체계를 이용하여 분류시켰다 (Table 3-1-1). 수집된 바위솔들은 온실에서 1년 이상 재배하면서 재배 기간 중 엽형, 엽색 등의 다양한 변화를 시기적으로 관찰, 조사하였다. 그 중 분화 및 정원용이나 조경용 식물소재로서 상품성을 가진 바위솔들을 다음과 같이 선발하였다: 강원상동 연화바위솔, 울릉 연화바위솔, 태백둥근바위솔, 지리산 진주바위솔, 경북봉화 진주바위솔, 쯤바위솔, 포천바위솔 (Fig. 3-1-1). 그 중 경북봉화 진주바위솔 및 강원상동 연화바위솔 등은 상품성은 있으나, 실생묘에서 엽형, 엽색, 엽내에 붉은색 점과 붉은 테두리가 생기는 등 다양한 변이종이 발생하여, 균일한 개체를 안정적으로 얻기 힘들었다. 그 중 상품가치가 있어 보이는 우수 품종으로 개발 가능한 개체들도 몇몇 관찰되었다 (Fig. 3-1-2).

###### (4) 금후계획

실생묘를 통해 균일한 품종으로 안정되지 않고, 다양한 변이종들 나타났다. 그 가운데 분화나 조경용으로 상품성을 보이는 식물체들을 선발해서 종자번식이 아닌 엽삽이나 조직배양을 통해 대량번식을 시도해 볼 계획이다.

Table 3-1-1. Classification of 17 species collected among *Orostachys* species in synonymic list of vascular plant in Korea.

| 국명<br>(Korean name) | 수집원<br>바위솔                        | 학명전체<br>(Full Name)                                 | 수집원 바위솔 사진  |  |   |  |
|---------------------|-----------------------------------|---|---|--|---|--|
| 1<br>연화바위솔          | ▶제주연화<br>▶강원상동<br>▶강원영월           | <i>Orostachys iwarenge</i> (Makino) Hara            |    |    |    |   |
|                     |                                   |   | 제주바위솔   | 강원상동   | 강원영월  |  |
|                     | ▶울릉연화                             | <i>Orostachys iwarenge</i> f. <i>magnus</i> Y.N.Lee |    |  |   |  |
|                     |                                   |   | 울릉연화  |  |   |  |
| 2<br>바위솔            | ▶와송<br>▶영동바위솔<br>▶능유바위솔           | <i>Orostachys japonica</i> (Maxim.) A. Berger       |    |    |    |   |
|                     |                                   |   | 와송  | 영동바위솔  |   | 능유바위솔 <sup>2</sup>   |
| 3<br>동근바위솔          | ▶울신(방어진)<br>▶삼척<br>▶백두산<br>▶태백바위솔 | <i>Orostachys malacophyllus</i> (Pall.) Fisch.      |   |   |   |  |
|                     |                                   |   | 울신바위솔   | 삼척동근   | 백두산   | 태백   |
| 4<br>진주바위솔          | ▶진주바위솔(지리바위솔)<br>▶경북봉화            | <i>Orostachys margaritifolius</i> Y.N.Lee           |  |  |  |  |
|                     |                                   |   | 지리산바위솔  |  | 백두산   |  |
| 5<br>정선바위솔          | ▶강원동면                             | <i>Orostachys chongsinensis</i> Y.N.Lee             |  |  |   |  |
|                     |                                   |   | 강원동면  |  |   |  |
| 6<br>가지바위솔          | ▶가지바위솔                            | <i>Orostachys ramosus</i> Y.N.Lee                   |  |  |   |  |
|                     |                                   |   | 가지바위솔   |  |   |  |
| 7<br>좀바위솔(애기바위솔)    | ▶좀바위솔                             | <i>Orostachys mimita</i> (Kom.) A. Berger           |  |  |  |  |
|                     |                                   |   | 좀바위솔  |  |   |  |
| 8<br>포천바위솔          | ▶포천바위솔                            | <i>Orostachys latiellipticus</i> Y.N.Lee            |  |  |   |  |
|                     |                                   |   | 포천바위솔   |  |   |  |

z명명되지 않았으나 진도에서 수집된 바위솔속 (*Orostachys*) 식물로 보통 ‘능유바위솔’이라 불리는 품종. 본 연구에서는 *Orostachys japonicus*에 임의로 분류시킴

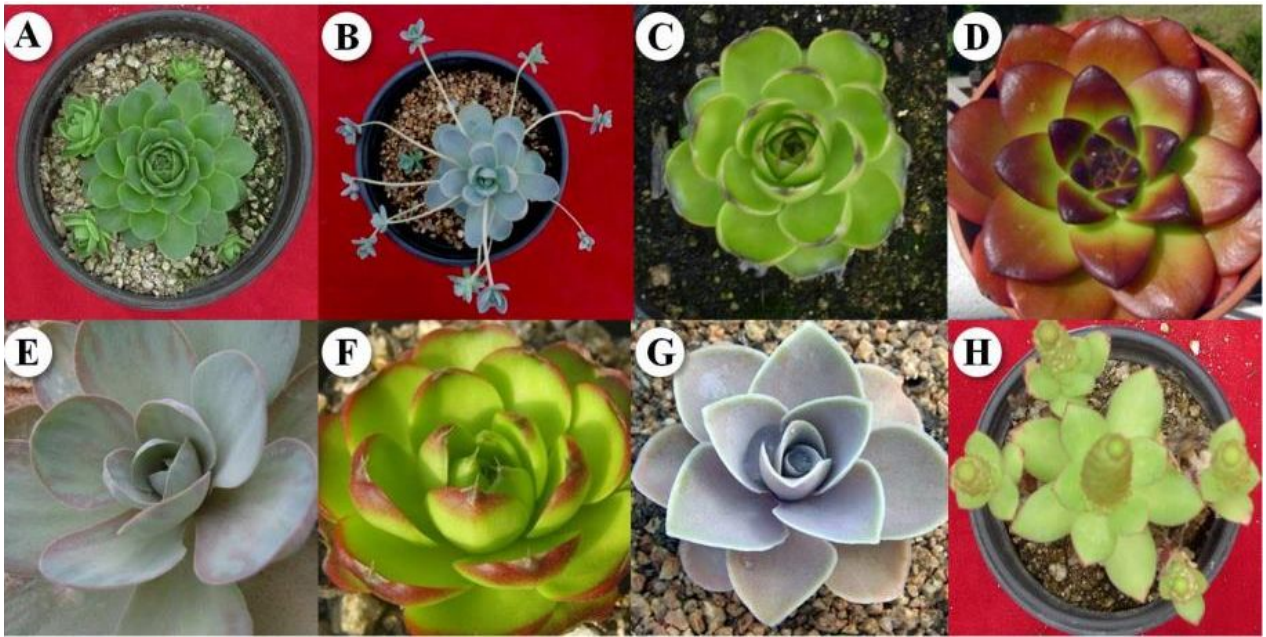


Fig. 3-1-1. *Orostachys* species showing commercial value of potted plant and landscape use of ground covers among the collected species; (A) *Orostachys japonicus*, 'Nungyu bawisol' , (B) *O. iwarenge* for. magnus, (C) *O. malacophyllus* from Taebaek , (D)*O. margaritifolius* from Jirisan, (E) *O. iwarenge* from Kanwon Sangdong, (F)*O. latiellipticus*, (G) *O. margaritifolius* from Gyeongbuk Bongwha, (H) *O. malacophyllus* from Samcheok.



Fig. 3-1-2. A;*O. iwarenge* from Kanwon Sangdong, B;*O. margaritifolius* plants obtained by seed propagation.

## 나. 식물호르몬을 이용한 엽삽 번식기술 개발

### (1) 연구목적

우리나라에 자생하는 바위솔속(*Orostachys*)식물은 CAM식물로서 일반 외래종 다육보다 환경에 대한 적응이 대단히 강하여 비옥도가 낮은 곳에서 자생하며, 내건성, 내한성, 내병성이 강하고 번식이 잘된다. 또한 바위솔속 식물의 특징은 지형, 토양조건과 같은 자생지의 환경조건에 의한 생태적 차이 때문에 종간 뿐만 아니라 간은 종내에서도 엽형, 엽색, 엽내에 붉은 색의 점과 붉은색의 테두리가 생기는 자생지마다 다양한 변이를 가지고 있다. 종자로 번식하는 경우 다양한 변이종이 발생하며 형질을 고정시키기 어려운 자생바위솔도 있다. Fig. 3-1-2에서 처럼 강원상동 연화바위솔이나 경북봉화 진주바위솔 등은 다양한 변이가 나타났다. 또한, 대부분의 자생바위솔은 봄 또는 가을에 추대를 시작한 후 다량의 소화를 형성하며, 종자의 성숙과 함께 고사하는 일립성(monocarpic) 식물이다. 장점을 많이 가지고 있음에도 불구하고 바위솔은 개화 후에 바로 고사하기 때문에 수확 및 관상용으로 이용 기간이 극히 짧은 결점을 지니고 있어서 이를 개선할 수 있는 번식방법 및 재배방법을 확립할 필요가 있다. 관상분화용, 정원용 및 조경용으로 이용하기 위해서는 대량의 균일한 화훼작물 생산이 필요하며 이를 위해서는 번식에 있어서 종자번식이 아닌 엽삽을 통한 균일한 개체를 만들어 내는 번식법이 더 유리하다고 볼 수 있다. 본 연구에서는 선발된 토속바위솔들 중 능유바위솔(*Orostachys sp.*)과 자질연화바위솔(*Orostachys iwarenge*)의 번식에 있어서 엽삽 시 적정 호르몬 종류 및 농도를 구명함으로써 균일한 상품으로서의 개체를 만들 수 있는 대량번식방법을 알아보기 위한 일련의 기초자료를 얻고자 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

본 실험은 충북 충주시에 위치한 'S 자생식물원'에서 구매한 능유바위솔(*Orostachys sp.* 'Nungyu bawisol'), 자질연화바위솔(*O. iwarenge* for. *magnus*)의 엽을 분리하여, 엽장이 약 3cm되는 건전한 엽만 선발하여 이용하였다. 선발된 엽은 7일간 말린 뒤, 엽의 기저부분을 처리용액에 3초간 침지하였다. 마사 : 유비상토 : 모래(6:2:2, v/v/v) 배합토 담긴 트레이(44cm×43cm)위에 처리된 엽을 올려 놓았다(Fig. 3-1-3 A와 B). 한 처리당 30엽씩 처리하였고, 사용된 처리용액은 6-Benzylaminopurine(BA or BAP, 합성 사이토키닌) 0, 500, 1000, 2000mg·L<sup>-1</sup> 와 1-Naphthylacetic acid(NAA, 합성옥신) 0, 500, 1000, 2000mg·L<sup>-1</sup>을 조합처리 하였다. 6월 24일부터 8월 13일까지 약 50일 동안 연동온실(경남과기대 캠퍼스내)에 두고, 5일 간격으로 결주율, 신초(Fig. 3-1-3C)및 발근(Fig. 3-1-3D)이 발생한 엽수를 조사하였다.



Fig. 3-1-3. Leaf cutting put on media of *Orostachys japonicus*, 'Nungyu bawisol' and *O. iwarenge* for. magnus treated with different concentrations of BA and NAA(A) and shooting (C) and rooting (D) after 2 week incubation on media in greenhouse.

### (3) 결과 및 고찰

능유바위솔과 자질연화바위솔 성장조절제 처리와 함께 엽삽 시 자질연화바위솔은 능유바위솔에 비해 엽의 피사율이 높았으며 많게는 50%까지 이르렀다(Fig. 3-1-4B). 또한 자질연화바위솔은 발근율이나 신초발생률이 20% 수준에서 그친데 반해, 능유바위솔은 80~90%에 이르는 높은 발근율을 보였다(Fig. 3-1-4A). 신초발생률은 두 바위솔에서 10% 이내로 낮은 빈도를 나타냈다. 특히, 1000과 2000 mg·L<sup>-1</sup> NAA의 처리에 의해 90%에 달하는 발근율을 보였다. 2000 mg·L<sup>-1</sup>에서 발근속도가 제일 빨랐다. 이러한 높은 발근율은 BA의 농도를 높임에 따라 발근이 점차로 억제되는 경향을 보였다(Fig. 3-1-2-3). 결론적으로(Table 3-1-2), 능유바위솔과 자질연화바위솔의 엽삽에 의한 신초발생률은 식물성장조절제 처리효과가 없는 것으로 나타났다. 발근율은 이 둘다에서 호르몬처리 효과가 나타났으며, 특히, 능유바위솔의 NAA처리(500~2000mg·L<sup>-1</sup>)에서 전체적으로 우수한 결과를 보였는데, 이는 엽삽에 의한 대량증식의 가능성을 시사한다. 그러나, 자질연화바위솔에서는 엽삽에 의한 번식은 효율적인 측면에서 추천할 만한 번식방법은 아닌 것으로 나타났다.

### (4) 금후계획

제주연화바위솔, 지리산 진주바위솔, 경북봉화 진주바위솔, 강원상동 연화바위솔, 태백등근바위솔, 포천바위솔 등 다양한 선발된 토속바위솔들을 종자번식 외에 엽삽에 의한 대량번식의 가능성들을 타진해보고 그것들을 상품성 있는 분화로 까지 성장시키는 기술을 확보하고자 한다.



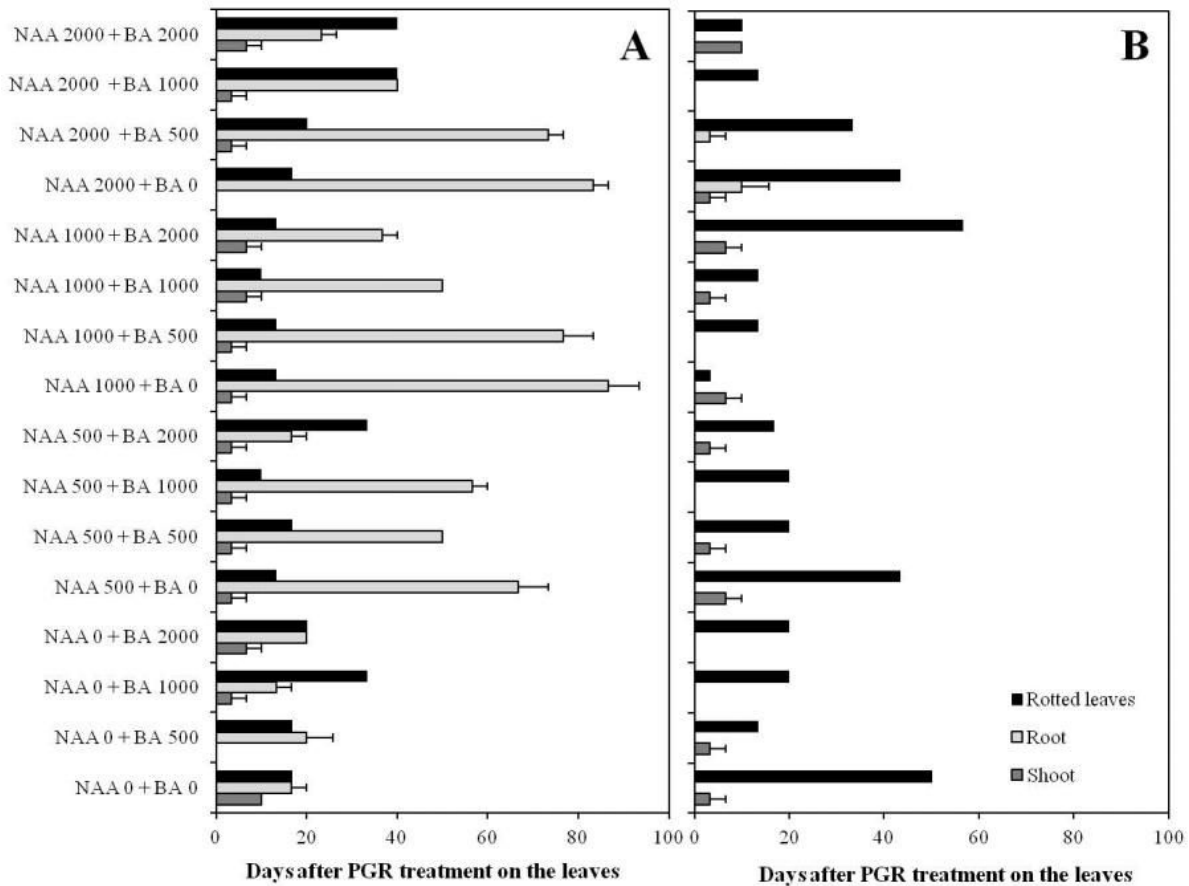


Fig. 3-1-4. Effect of plant growth regulators (NAA and BA) on shooting and rooting in leaf cutting of *Orostachys japonicus*, 'Nungyu bawisol' (A) and *O. iwarenge* for. magnus(B).

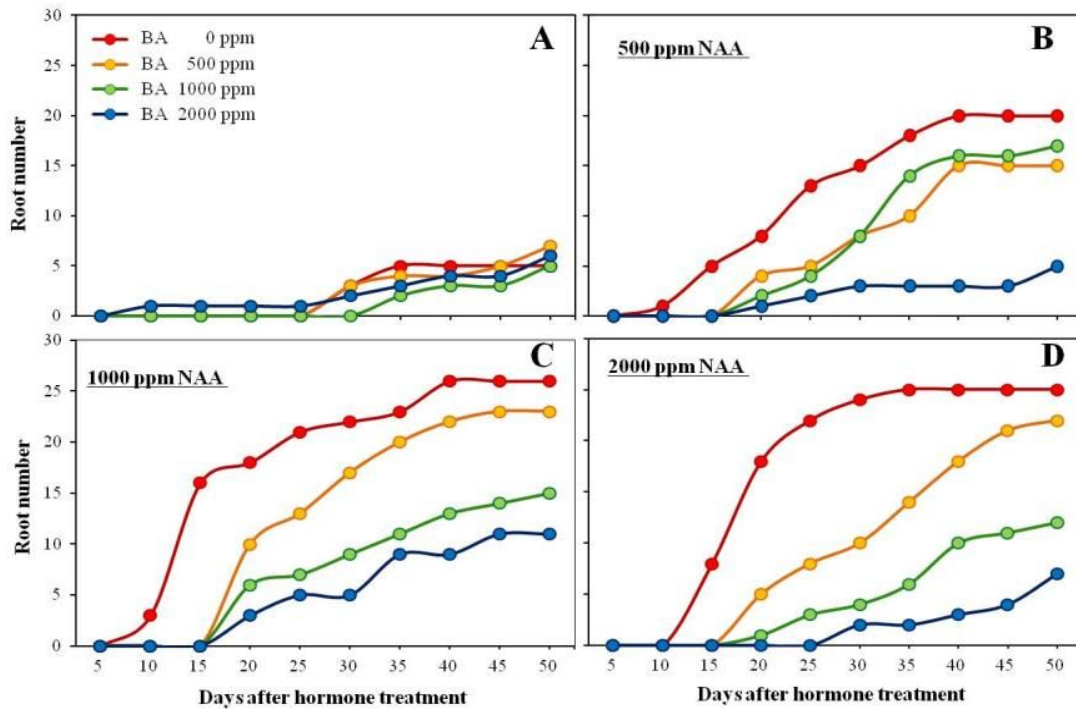


Fig. 3-1-5. Effect of plant growth regulators (NAA and BA) on rooting in leaf cutting of *Orostachys japonicus*, 'Nungyu bawisol'.

Table 3-1-2. Effect of plant growth regulators (NAA and BA) on shooting and rooting in leaf cutting of *Orostachys japonicus*, 'Nungyu bawisol' and *O. iwarenge* for. magnus.

| PGR Treatment Concentration (mg·L <sup>-1</sup> ) |      | <i>Orostachys japonicus</i><br>'Nungyu bawisol' |                  | <i>O. iwarenge</i> for. magnus |                  |
|---|------|---|------------------|--------------------------------|------------------|
| NAA   | BA   | Shooting rate (%)                               | Rooting rate (%) | Shooting rate (%)              | Rooting rate (%) |
| 0   | 0    | 10.00 a   | 16.67 h          | 3.33 ab                        | 0.00 b           |
|   | 500  | 0.00 a  | 20.00 h          | 3.33 ab                        | 0.00 b           |
|   | 1000 | 3.33 a  | 13.33 h          | 0.00 b                         | 0.00 b           |
|   | 2000 | 6.67 a  | 20.00 h          | 0.00 b                         | 0.00 b           |
| 500   | 0    | 3.33 a  | 66.67 cd         | 6.67 ab                        | 0.00 b           |
|   | 500  | 3.33 a  | 50.00 ef         | 3.33 ab                        | 0.00 b           |
|   | 1000 | 3.33 a  | 56.67 de         | 0.00 b                         | 0.00 b           |
|   | 2000 | 3.33 a  | 16.67 h          | 3.33 ab                        | 0.00 b           |
| 1000  | 0    | 3.33 a  | 86.67 a          | 6.67 ab                        | 0.00 b           |
|   | 500  | 3.33 a  | 76.67 abc        | 0.00 b                         | 0.00 b           |
|   | 1000 | 6.67 a  | 50.00 ef         | 3.33 ab                        | 0.00 b           |
|   | 2000 | 6.67 a  | 36.67 g          | 6.67 ab                        | 0.00 b           |
| 2000  | 0    | 0.00 a  | 83.33 abc        | 3.33 ab                        | 10.00 a          |
|   | 500  | 3.33 a  | 73.33 bc         | 0.00 b                         | 3.33 b           |
|   | 1000 | 3.33 a  | 40.00 fg         | 0.00 b                         | 0.00 b           |
|   | 2000 | 6.67 a  | 23.33 h          | 10.00 a                        | 0.00 b           |
| F-test  |      | 0.729   | 0.000            | 0.151                          | 0.018            |

## 2. 토속바위솔 (*Orostachys* sp.) 의 분화생산을 위한 재배기술 개발

### 가. 선발된 토속바위솔의 생육적정광도 구명 실험

#### (1) 연구목적

토속 바위솔들은 강광하에서도 잘 적응하는 편이나, 실내와 같이 광이 부족한 환경에도 외래 다육과는 달리 잘 적응할 수 있어 실내 조경 식물로도 개발 가능성이 높은 것으로 알려져 있다(Son과 Yeam, 1988). 능유바위솔, 자질연화바위솔 및 태백동근바위솔은 다른 토속바위솔과 마찬가지로 폭 넓은 광도에 적응하기 때문에 옥상녹화에 적합할 뿐 아니라, 광도가 낮은 실내 조경에서도 사용하기 좋고 분에 심어 실내에서 즐기기에 적합할 것으로 기대되고 있다. 이들 토속바위솔을 실내에서 분화로 이용하기 위해서는 먼저, 이 식물이 어느 정도의 낮은 광도까지

적응이 되는지에 대한 기초데이터를 바탕으로 한 정확한 정보가 있어야 한다. 토속 바위솔류를 분화로 개발하기 위한 기초자료를 제공할 목적으로 차광 및 광도가 토속 바위솔의 생육과 분화품질에 미치는 영향을 조사하였다.

## (2) 재료 및 방법

### (가) 식물재료

능유바위솔(*Orostachys* 'Nungyu bawisol'), 자질연화바위솔 (*O. iwarenge* for. *magnus*)은 충북 충주시에 위치한 'S 자생식물원'에서 구매하여 실험에 이용하였고, 태백등근바위솔(*O. malacophyllus* from Taeback )은 2011년 3월에 파종하여 교내 단동온실에서 재배한 식물체를 본 실험에 이용하였다 (Fig. 3-2-1).



Fig. 3-2-1. *Orostachys japonicus*, 'Nungyu bawisol' (A) and *O. iwarenge* for. *magnus* (B) used in the experiment for determination of optimum cultivation condition in greenhouse and propagation by seedling (C).

### (나) 실험방법

능유바위솔과 자질연화바위솔은 4월 9일, 태백등근바위솔은 7월 15일 마사 : 유기상토 : 모래 (6:2:2, v/v/v) 배합에 고품비료(하나로 완효성비료, KG케미칼㈜)를 포트당 0.8g 섞어 직경 11cm 포트에 정식하였다. 한 포트당 100mL, 주 1회 두상관수하였다. 능유바위솔과 자질연화바위솔은 한 처리당 24 포트씩, 태백등근바위솔은 한 처리당 25 포트씩 공시하여 차광율 50% 차광막 1겹이 외부에 덮여있는 교내 단동 비닐온실에서 수행되었다. 차광처리는 대조구로는 무차광구(비닐 외부에 50% 차광막 한겹)와 내부에 30% 차광막 1겹, 30% 차광막 2겹, 90% 차광막 1겹인 실험구를 두었다(Fig. 3-2-2). 실제 광도는 무차광의 차광율은 52±8%, 30% 차광막 1겹은 평균 틈에 2±5%, 30% 차광막 2겹은 평균 90.2±4% 그리고 90% 차광막은 평균 97.1±3%의 차광율을 보였다. 광도측정은 5일 간격으로 오후 2시에 측정된 값을 광도계(HD 9021, Delta OHM, Italy)를 사용하여 측정하였고, 유바위간 중에 얻어진 평균조도를 사용해서 차광율을 계산했다.



Fig. 3-2-2. Potted *Orostachys* species (B) cultivated under shading net for light intensity control in greenhouse (A).

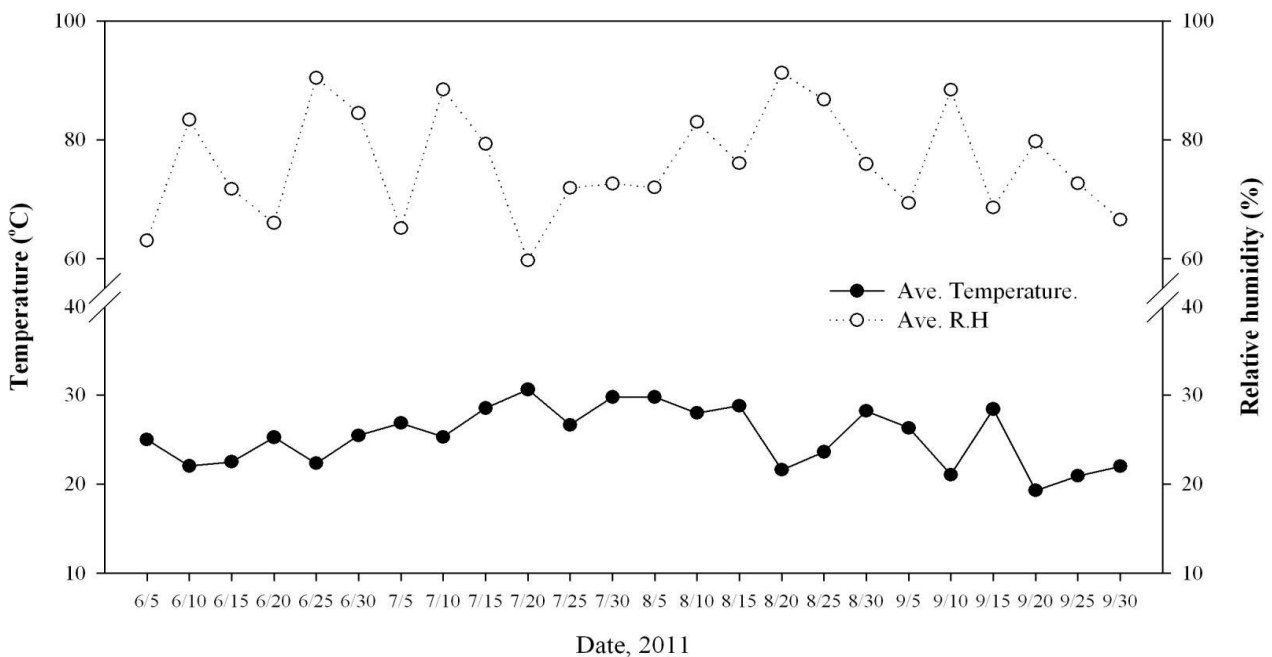


Fig. 3-2-3. Daily mean temperature and relative humidity (R.H.) of greenhouse during the experiment.

능유바위솔과 자질연화바위솔의 생육조사는 총 2차례에 걸쳐 수행하였다. 6월 16일 조사는 결주율, 초장, 초폭, 엽색을 조사하였고, 8월 2일 조사는 결주율, 엽수, 초장, 초폭, 1차 분지수, 엽색, 지상부 및 지하부 생체중을 조사하였다. 태백등근바위솔은 9월 30일 한차례 생육조사를 수행하였다. 조사는 결주율, 초장, 초폭, 지상부 및 지하부생체중, 지상부 및 지상부 건물중, 엽색을 조사하였다. 엽색은 색차계(CR-400, Konica Minolta sensing, Inc. Japan)를 사용하여 측정하였다. 실험기간 동안 재배환경 조건은 온습도 기록계(RHT20, Extech Instruments Co., USA)를 사용하여 측정하였고, 재배기간 중 실험이 이루어진 단동 온실의 온습도환경변화는 Fig. 3-2-3과 같다.

### (3) 결과 및 고찰

(가) 능유바위솔의 생육적정 광도와 내음성

자연광을 52~97%로 차광하고 5월부터 9주 정도 경과한 후 생육조사를 실시한 결과, 초장과 초폭에서 차광처리에 의한 효과가 나타나기 시작했다(Table 3-2-1). 그 후 3개월간 더 재배한 후, 생육조사를 수행한 결과는 Fig.3-2-4과 Table 3-2-2에 나타났다. 가장 중요한 생육지표인 지상부 생체중을보면, 52% 차광에서 11.5g으로 가장 높게 나왔고, 차광율이 높아질수록 생체중이 낮아졌다. 82% 차광에서는 생체중이 4g으로 52% 차광의 50% 이하로 낮아졌고 그 이상의 차광에서는 처리간 유의성이 보이지 않았다. 이런 경향은 지하부 생체중에서도 매우 비슷하게 나타났는데, 52% 차광에서 1.8g으로 가장 높았으며, 그 이상의 차광에서는 1g 이하로 매우 낮게 나타났다(Fig. 3-2-4A). 또한 90% 이상의 차광에서는 생육이 충분하지 못한 것으로 보였으며 잎이 치밀하지 못하고 위로 서는 잎이 많았다(Fig. 3-2-4B). 재배기간 3개월 후의 생존율을 보면, 82% 차광까지는 90% 이상으로 높게 나타났으나 그 이상의 차광율(90%와 97%)에서는 생존율이 70% 이하로 매우 낮게 나타났다(Table 3-2-2). 초장과 초폭도 52% 차광에서 가장 높았으며 그 이상의 차광에서는 낮았는데 처리간 유의성이 인정되지 않았다. 엽색에서 차광 정도가 높을수록 색이 옅어지는 경향이 뚜렷하였는데, 97% 차광에서는 특히 엽색이 옅어져 관상가치가 떨어지는 것으로 나타났다.

Table 3-2-1. Effect of shading rate on growth and leaf color of *Orostachys japonicus*, 'Nungyu bawisol'(9 weeks after shading treatment).

| Shading rate              | Survival rate (%) | N  | Plant height (cm) | Plant width (cm) | Leaf color |        |        |
|---------------------------|-------------------|----|-------------------|------------------|------------|--------|--------|
|                           |                   |    |                   |                  | L*         | a*     | b*     |
| 52%, control <sup>z</sup> | 92.0              | 23 | 1.2a              | 3.9a             | 13.58a     | -5.25a | 9.10b  |
| 82%                       | 100.0             | 24 | 0.8b              | 3.5ab            | 14.22a     | -6.03a | 9.03b  |
| 90%                       | 100.0             | 24 | 0.8b              | 2.8b             | 13.90a     | -5.56a | 9.26b  |
| 97%                       | 86.5              | 21 | 0.8b              | 3.4ab            | 14.76a     | -6.74a | 10.65a |
| F-test                    |                   |    | 0.001             | 0.004            | 0.580      | 0.172  | 0.017  |

<sup>z</sup>Outersurface of greenhouse was covered with the existing net of 35% shading rate.

Table 3-2-2. Effect of shading rate on growth and leaf color of *Orostachys japonicus*, 'Nungyu bawisol'(15 weeks after shading treatment).

| Shading rate              | Survival rate (%) | Plant height (cm) | Plant width (cm) | Leaf color |        |        |
|---------------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------|--------|--------|
|                           |                   |                   |                  | L*         | a*     | b*     |
| 52%, control <sup>z</sup> | 87.5              | 2.5a              | 5.2a             | 9.62c      | -6.55a | 8.41b  |
| 82%                       | 95.8              | 1.7b              | 3.8b             | 11.91b     | -6.30a | 8.91b  |
| 90%                       | 62.5              | 1.8b              | 3.6b             | 12.15b     | -6.35a | 8.83b  |
| 97%                       | 68.0              | 1.8b              | 3.7b             | 16.05a     | -7.72b | 11.48a |
| F-test                    |                   | 0.000             | 0.000            | 0.000      | 0.000  | 0.000  |

<sup>2</sup>Outersurface of greenhouse was covered with the existing net of 35% shading rate.

이와 같은 결과는 능유바위솔은 82% 정도의 차광에서는 52% 차광에서보다 생육이 감소하기는 하지만 고사되거나 도장하여 상품성이 크게 떨어지는 일이 없기 때문에 실내 식물로서 충분히 활용될 수 있을 것으로 사료되었다.

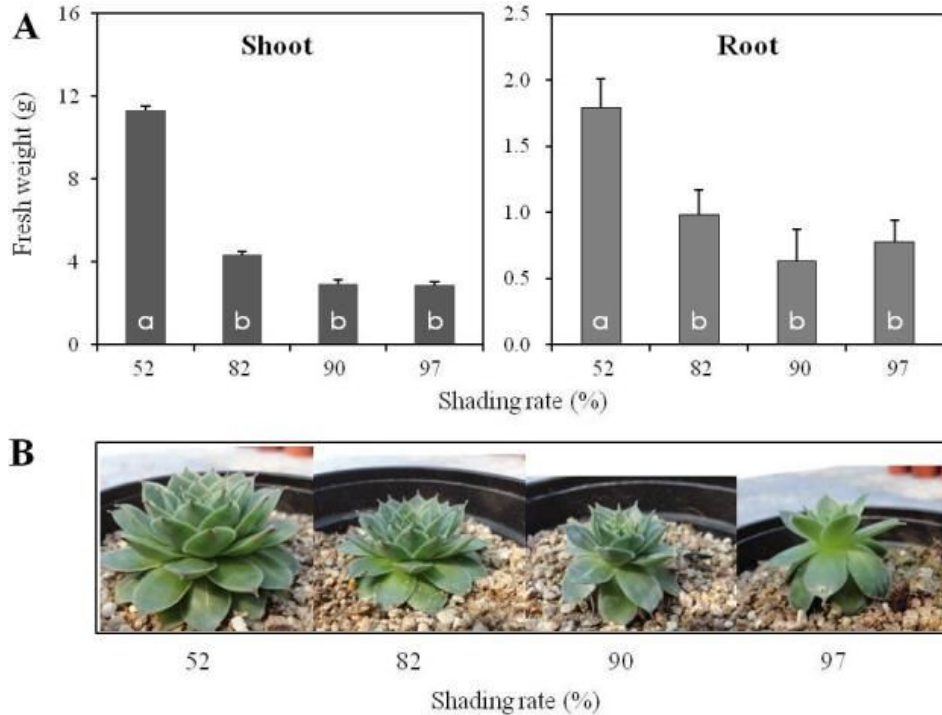


Fig. 3-2-4. Fresh weight of shoot and root (A) of *Orostachys japonicus* 'Nungyu bawisol' grown in soil mixture of 60 : 20 : 20 (DG : FAM : RS, v/v/v) and slow-release granule fertilizer for 15 weeks after commencing shading treatment. The growth and quality of the pot plants under the different shading rate (B).

#### (나) 자질연화바위솔의 생육적정 광도와 내음성

자연광을 52~97%로 차광하고 4월부터 재배, 5주와 15주 후에 각각 생육조사를 수행한 결과는 Table 3-2-3, Fig. 3-2-5와 같다. 차광을 달리하여 5주간 재배하였을 때 엽폭, 런너수, 엽색에 차이가 나타났고, 생존율도 82%이상의 차광에서 약 75% 정도로 떨어졌다. 15주 경과한 후, 가장 중요한 생육지표인 지상부 생체중을 보면, 52% 차광에서 15g으로 가장 높게 나왔고, 차광율이 높아질수록 생체중이 낮아졌다(Fig. 3-2-5A). 이런 경향은 지하부 생체중에서도 비슷하게 나타났는데, 52% 차광에서 0.5g으로 가장 높았으며, 그 이상의 차광에서는 0.4g 이하로 나타났다(Fig. 3-2-5A). 또한 90% 이상의 차광에서는 생육이 충분하지 못한 것으로 보였으며 런너도 거의 발생하지 않았다. 생존율을 보면, 97% 차광에서는 식물체가 모두 고사되었다(Table 3-2-3). 런너수가 차광에 가장 민감하게 반응하였으며, 52% 차광에서 20개로 가장 높았으며, 82%, 90%에서는 각각 7개, 2개로 매우 낮은 런너수를 보였다. 이와 같은 결과는 자질연화바위솔은 능유바위솔에 비해 내음성이 떨어지긴 하지만, 80% 정도의 차광에서는 52% 차광에서보다 생육이

감소하기는 하지만, 여전히 관상가치가 있는 것으로 판단되어 실내 분화식물로서 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

Table 3-2-3. The effect of shading rate on the growth and quality of potted *Orostachys iwarenge* for. *magnus* (15 weeks after shading treatment).

| Shading rate              | Survival rate (%) | N  | Plant height (cm) | Plant width (cm) | Branch No. | Leaf color |        |       |
|---------------------------|-------------------|----|-------------------|------------------|------------|------------|--------|-------|
|                           |                   |    |                   |                  |            | L*         | a*     | b*    |
| 52%, control <sup>z</sup> | 65.2              | 15 | 5.9a              | 6.1a             | 20.2a      | 18.23a     | -1.58a | 2.50b |
| 82%                       | 50.0              | 12 | 5.6a              | 5.3b             | 7.5b       | 12.25b     | -3.82b | 3.79a |
| 90%                       | 45.8              | 11 | 5.8a              | 4.5b             | 2.5c       | 15.27ab    | -4.14b | 3.63a |
| 97%                       | 0.0               | 0  | -                 | -                | -          | -          | -      | -     |
| F-test                    |                   |    | 0.900             | 0.001            | 0.000      | 0.010      | 0.000  | 0.017 |

<sup>z</sup>Outersurface of greenhouse was covered with the existing net of 35% shading rate.

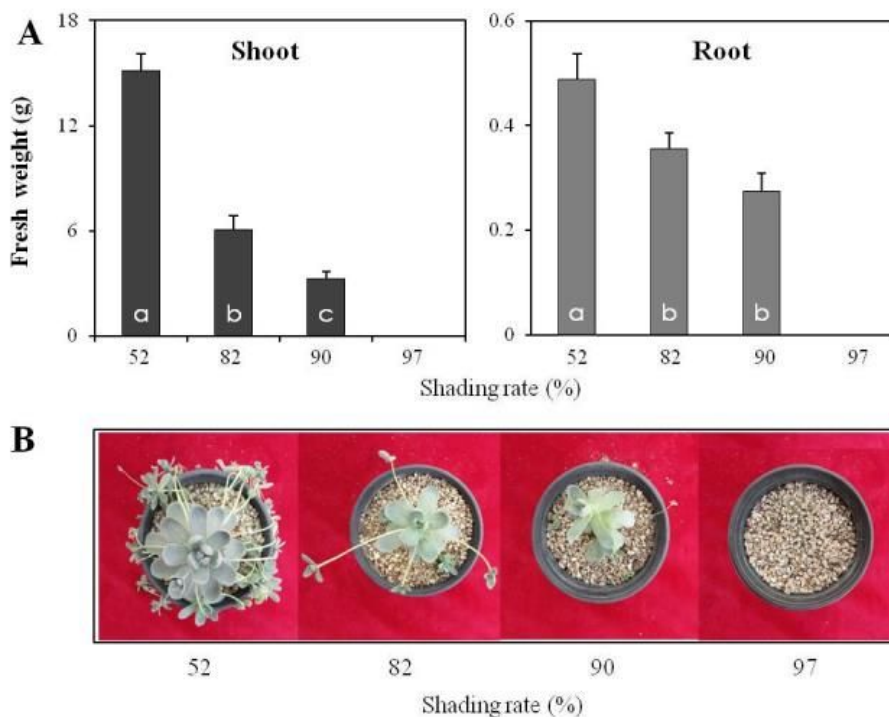


Fig. 3-2-5. Fresh weight of shoot and root (A) and pictures (B) of *O. iwarenge* for. *magnus* grown under different shading conditions for 15 weeks. The plants were grown in pots supplemented with mixed soils of DG:FAM:RS (60:20:20, v/v/v).

(다) 태백동근바위솔의 생육적정 광도와 내음성

자연광을 52~97%로 차광하고 7월 중순부터 10주간 재배한 후, 생육조사를 수행한 결과는

Fig. 3-2-6, Table 3-2-4과 같다. 가장 중요한 생육지표인 지상부 생체중을보면, 52% 차광에서 20g으로 가장 높게 나왔고, 차광율이 높아질수록 생체중이 낮아졌다. 82% 차광에서는 생체중이 10g으로 52% 차광의 50% 이하로 낮아졌다. 이런 경향은 지하부 생체중에서도 매우 비슷하게 나타났는데, 52% 차광에서 1.5g으로 가장 높았으며, 그 이상의 차광에서는 0.5g 이하로 매우 낮게 나타났다(Fig. 3-2-6A). 재배기간 15주 후의 생존율에는 차광율의 차이에 따른 커다란 차이를 보이지 않았다. 초장과 초폭도 52% 차광에서 가장 높았으며 차광율이 높아질수록 낮아졌다. 엽색에서 차광 정도가 높을수록 색이 옅어지는 경향이 뚜렷하였는데, 82% 정도의 차광까지는 52% 차광에서보다 생육이 감소하기는 하지만 도장하여 관상가치가 떨어지는 현상은 나타나지 않았다(Fig. 3-2-6B). 최소한 자연광이 10000lux 정도 들어오는 베란다에서는 충분히 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

Table 3-2-4. The effects of shading rate on the growth and quality of potted *Orostachys malacophyllus* from Taebaek (10 weeks after shading treatment).

| Shading net, layers | Shading rate <sup>z</sup> (%) | Plant height (cm) | Plant width (cm) | Leaf color, Hunter value |        |         |        |
|---------------------|-------------------------------|-------------------|------------------|--------------------------|--------|---------|--------|
|                     |                               |                   |                  | L*                       | a*     | b*      |        |
| Control, no net     | 52                            | 6.3a <sup>y</sup> | 8.7a             | 16.80a                   | -8.66a | 19.07a  |        |
| 30% net             | 1                             | 82                | 5.7b             | 7.2b                     | 17.28a | -9.34a  | 18.19a |
|                     | 2                             | 92                | 2.6c             | 5.1c                     | 17.21a | -10.29b | 18.63a |
| 90% net             | 1                             | 97                | 2.1d             | 4.3d                     | 18.14a | -10.72b | 18.96a |
| F-test              |                               | 0.000             | 0.000            | 0.615                    | 0.000  | 0.635   |        |

<sup>z</sup>After the shading treatment for 10 weeks, survival rate was calculated from survived pots of 25 pots.



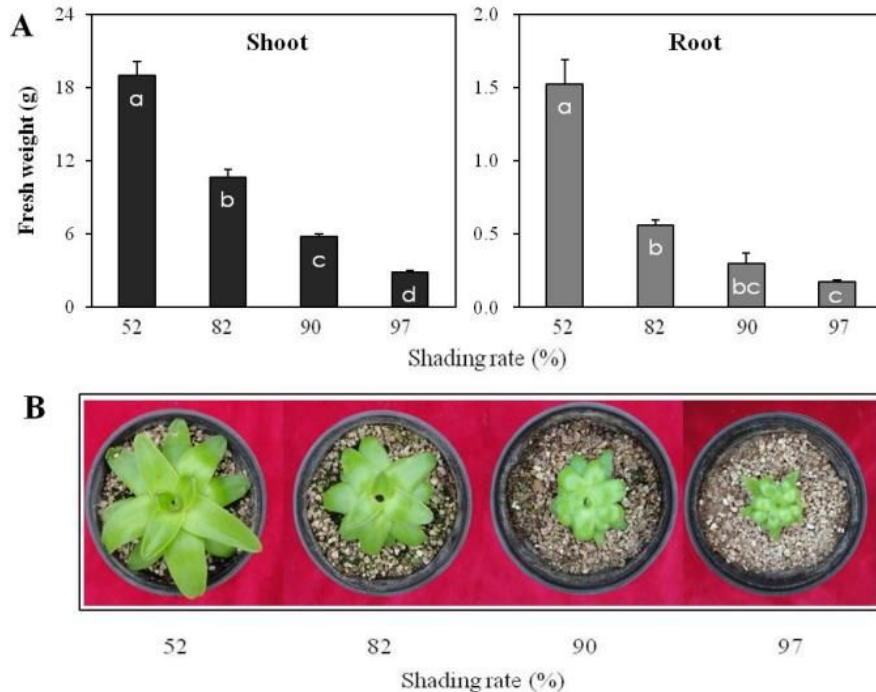


Fig. 3-2-6. Fresh weight of shoot and root (A) and pictures (B) of *O. malacophyllus* from Taebaek grown under different shading conditions for 10 weeks. The plants were grown in pots supplemented with mixed soils of DG : FAM : RS (60:20:20, v/v/v).

## 나. 토속바위솔 (*Orostachys*) 의 적정 분용토 선발 실험

### (1) 연구목적

토속 바위솔의 분화 및 조경용으로 상품화 하기 위해서는 균일한 분화생산이 우선되어야 한다. 따라서, 본 연구에서는 선발된 바위솔 중 상품성을 가진 분화로 개발하기 위한 기초자료를 제공할 목적으로 적정광도에 이어 적정분용토를 선발하기 위해 혼합배양토의 비율을 달리하여 능유 바위솔, 울릉 연화바위솔 및 태백동근바위솔의 생육과 품질에 미치는 영향을 조사하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 식물재료

상기한 생육적정광도 구명 실험의 식물재료와 동일한 조건의 식물재료를 사용하였다.

#### (나) 실험방법

능유바위솔과 자질연화바위솔은 한 처리당 30 포트 씩, 태백동근바위솔은 한 처리당 25 포트 씩 총 4처리구를 수정된 난괴법을 이용하여 배치하였다. 처리용토는 마사토 : 유비상토(8:2, v/v), 마사토 : 유비상토(6:4, v/v), 유비상토 : 모래(2:8, v/v), 마사토 : 유비상토 : 모래(6:2:2, v/v/v) 배합에 고품비료(하나로 완효성비료, KG케미칼)를 포트당 0.8g 섞어 직경 11cm 포트에 정식하였다. 능유바위솔과 자질연화바위솔은 4월 9일부터 7월 11일까지 약 90일(약 12주) 동안, 태백동근바위솔은 7월 15일부터 9월 30일 까지 약 75일(약 10주) 동안 교내 연동온실에서 재배

하였다(Fig. 3-2-8). 능유바위솔과 자질연화바위솔, 태백동근바위솔의 온실 재배환경은 온습도 기록계(RHT20, Extech Instruments Co. USA)를 사용하여 측정하였고, 재배기간 중 온습도 환경은 Fig. 3-2-7과 같다. 능유바위솔과 자질연화바위솔의 평균 광도는  $374\pm 43 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 였고, 태백동근바위솔의 평균 광도는  $458\pm 46 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 였다. 광도측정은 광도계(HD 9021, Delta OHM, Italy)를 사용하였다.

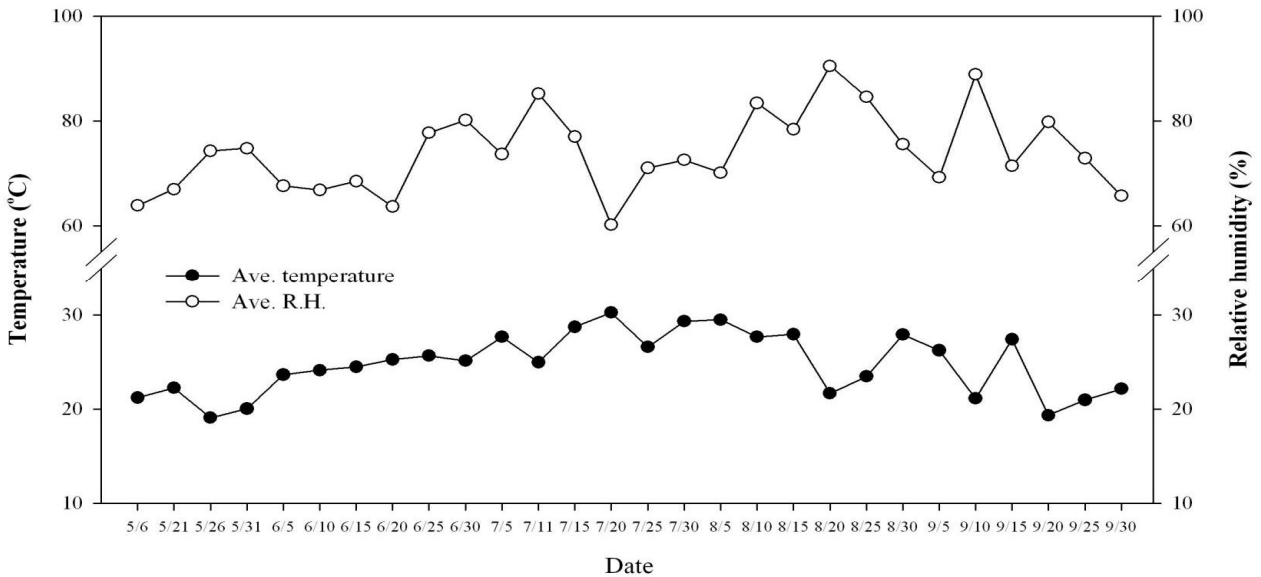


Fig. 3-2-7. Change of temperature and relative humidity (R.H.) in a green house during this experiment.

능유바위솔과 자질연화바위솔의 생육조사는 5월 19일과 7월 8일 두 차례에 걸쳐 실시하였다. 1차 생육조사에는 결주율, 초폭, 초장, 엽색을 측정하였고, 2차 생육조사에는 결주율, 초폭, 초장, 엽색, 분지수, 지상부 및 지하부의 생체중을 측정하였다. 태백동근바위솔은 9월 30일 1회 실시하였고 조사항목과 측정방법은 상기한 태백동근바위솔의 생육적정광도 구명 실험과 동일하게 수행하였다.

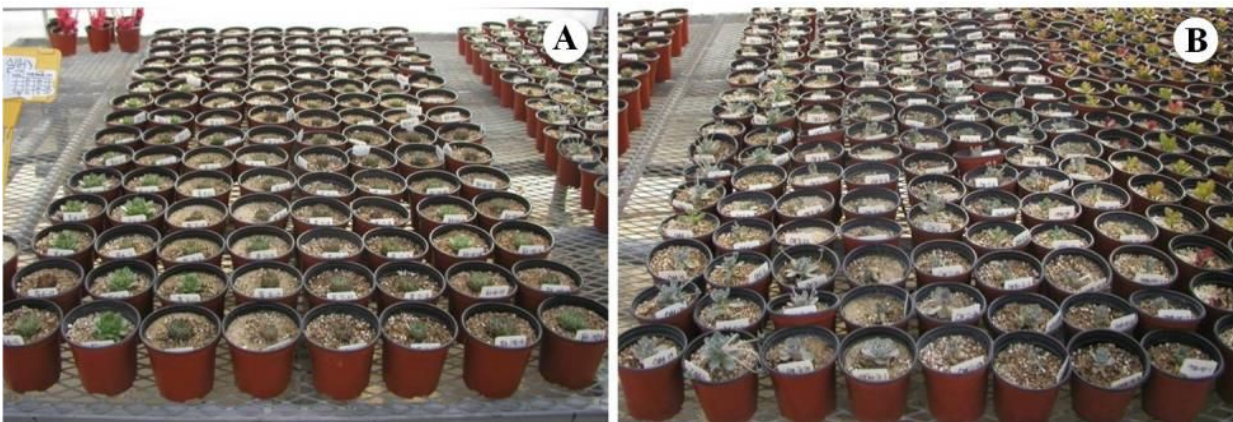


Fig. 3-2-8. *Orostachys japonicus*, 'Nungyu bawisol' (A) and *O. izarrengae* for. *magnus* (B) used in the experiment for determination of optimum pot medium.

### (3) 결과 및 고찰

#### (가) 능유바위솔의 적정 분용토 선발

적정 분용토를 선발하기 위해 마사토, 유비상토, 강모래를 4가지 비율로 조합하여 사용하고 생육을 조사한 결과는 Fig. 3-2-9, Table 3-2-5, Table 3-2-6와 같다. 지상부 생체중을 보면, 마사토 : 유비상토 : 강모래(6:2:2, v/v/v)에서 15g으로 가장 높게 나타났으며, 그 다음은 마사토 : 유비상토(8:2, v/v)와 유비상토 : 강모래(2:8, v/v)구에서 8g 정도로 나타났다. 뿌리 생체중에서도 마사토 : 유비상토 : 강모래(6:2:2, v/v/v)에서 2.5g으로 가장 높았으며, 다른 용토에서는 1.8g 전후로 나타났는데, 처리 간 유의성은 인정되지 않았다. 육안으로 보아도 마사토 : 유비상토 : 강모래(6:2:2, v/v/v)에서 식물체가 가장 크고 건강해 보였다. 초장과 초폭에서도 생체중과 비슷한 경향을 보였는데, 마사토 : 유비상토 : 강모래(6:2:2, v/v/v)에서 가장 높았으며, 다음이 마사토 : 유비상토(8:2, v/v)와 유비상토 : 강모래(2:8, v/v), 그리고 마지막은 마사토 : 유비상토(6:4, v/v)에서 가장 낮게 나타났다. 런너의 발생도 마사토 : 유비상토 : 강모래(6:2:2, v/v/v)에서 가장 많았다. 생존율은 모든 처리구에서 93% 이상으로 처리 간 유의적인 차이가 보이지 않았다. 엽색의 변화는 육안관찰로는 거의 보이지 않았으나, 색차계로 조사한 결과 생육이 가장 좋았던 마사토 : 유비상토 : 강모래(6:2:2, v/v/v)에서 녹색이 짙어지는 경향이 뚜렷하게 나타났다.

Table 3-2-5. The effect of various soil mixture on the growth and quality of potted *Orostachys Nungyu bawisol* (cultivated for 5 weeks after transplantation).

| Nursery potting mixture (DG: FAM: RS <sup>z</sup> , v/v/v) | N <sup>y</sup> | Survival rate (%) | Plant height (cm) | Plant width (cm) | Leaf color |        |        |
|--|----------------|-------------------|-------------------|------------------|------------|--------|--------|
|  |                |                   |                   |                  | L*         | a*     | b*     |
| 80 : 20 : 0  | 30             | 100.0             | 1.1a              | 3.7b             | 13.56ab    | -4.23a | 8.59b  |
| 60 : 40 : 0  | 30             | 100.0             | 1.1a              | 3.1c             | 14.76a     | -4.25a | 8.76b  |
| 0 : 20 : 80  | 30             | 100.0             | 1.2a              | 3.2c             | 13.91ab    | -4.05a | 9.07b  |
| 60 : 20 : 20   | 29             | 96.7              | 1.2a              | 4.2a             | 11.81b     | -6.20b | 10.11a |
| F-test   |                |                   | 0.253             | 0.000            | 0.016      | 0.000  | 0.001  |

<sup>z</sup>DG, decomposed granite; FAM, fertilizer-amended media; RS, river sand

<sup>y</sup>the number of pots used for statistical analysis

본 실험 결과, 능유바위솔은 마사토 : 유비상토(6:4, v/v)에서 생육이 가장 불량한 것으로 나타났는데, 이는 유비상토의 주재료가 피트모스로 배양토의 통기성을 불량하게 하고 여름 고온기에 근권부의 온도를 높여주기 때문이었을 것으로 사료된다. 반면, 유비상토를 20%로 줄이고 강모래를 20% 더 첨가한 마사토 : 유비상토 : 강모래(6:2:2, v/v/v)구에서 생육이 가장 양호한 것으로 나타나, 강모래를 첨가함으로써 배수성과 통기성이 증가되고 여름 고온기에 근권부 온도가 높아지는 것을 막을 수 있었기 때문인 것으로 사료된다.

Table 3-2-6. The effect of various soil mixture on the growth and quality of potted *Orostachys japonicus* 'Nungyu bawisol' (cultivated for 12 weeks after transplantation).

| Nursery potting mixture<br>(DG: FAM: RSz, v/v/v) | N <sup>y</sup> | Survival<br>rate<br>(%) | Plant<br>height<br>(cm) | Plant<br>width<br>(cm) | No. of<br>runner | Fresh weight<br>(g) |       | Leaf color |         |        |
|--|----------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------|---------------------|-------|------------|---------|--------|
|  |                |                         |                         |                        |                  | Shoot               | Root  | L*         | a*      | b*     |
| 80 : 20 : 0                                      | 28             | 93.3                    | 1.2bc                   | 4.0b                   | 0.1b             | 8.11b               | 2.10a | 12.12a     | -6.05b  | 9.28a  |
| 60 : 40 : 0                                      | 28             | 93.3                    | 1.0c                    | 3.0c                   | 0.0b             | 3.77c               | 1.89a | 11.60a     | -4.56a  | 7.98b  |
| 0 : 20 : 80                                      | 30             | 100.0                   | 1.5ab                   | 4.3b                   | 0.1b             | 7.79b               | 1.73a | 12.39a     | -6.32bc | 9.77a  |
| 60 : 20 : 20                                     | 29             | 96.7                    | 1.6a                    | 5.6a                   | 0.8a             | 15.93a              | 3.94a | 11.34a     | -7.26c  | 10.08a |
| F-test   |                |                         | 0.000                   | 0.000                  | 0.004            | 0.000               | 0.102 | 0.462      | 0.000   | 0.000  |

<sup>z</sup>DG, decomposed granite; FAM, fertilizer-amended media; RS, river sand

<sup>y</sup>the number of pots used for statistical analysis

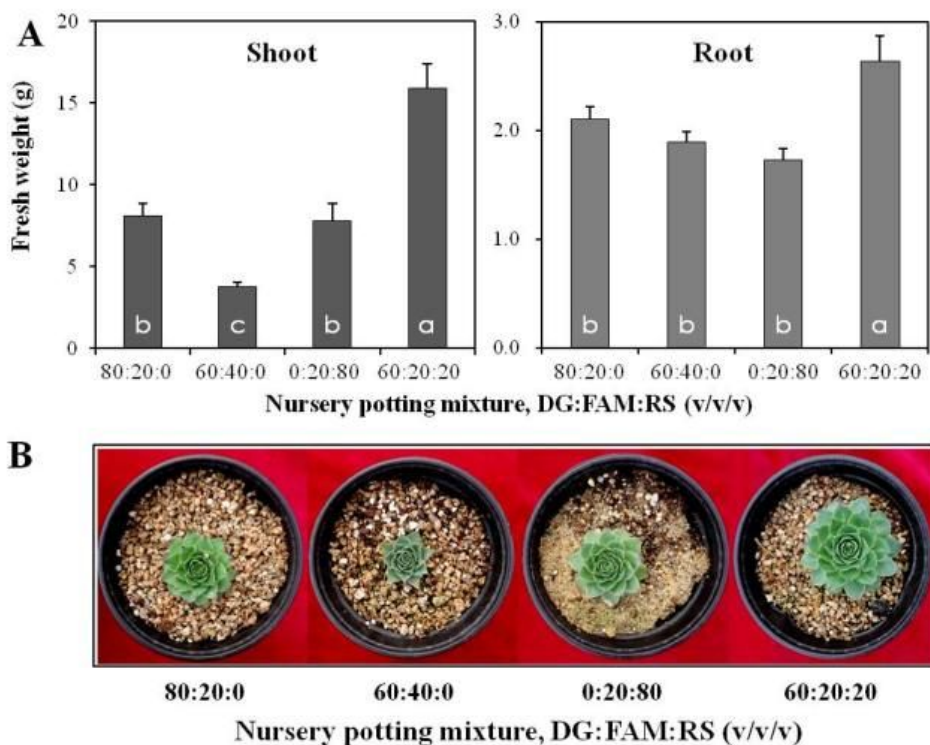


Fig. 3-2-9. Fresh weight of shoot and root (A) of *Orostachys japonicus* 'Nungyu bawisol' grown in four different soil mixtures and their pictures (B). Plants were grown under the shading rate of 70% for 12 weeks after transplanting to pots (on 9 April 2011).

(나) 자질연화바위솔의 적정 분용토 선발

자질연화바위솔은 재배 5주째에 초폭, 런너수, 엽색에 있어서 분용토의 차이에 따른 효과를 나타내기 시작했다(Table 3-2-7). 15주 경과시에는 초폭을 제외하고 분용토 조건에 더욱 더 민감한 생육반응을 나타냈다(Table 3-2-8). 지상부 생체중을 보면, 마사토 :유비상토 : 강모래(6:2:2, v/v/v)에서 15g으로 가장 높게 나타났으며, 그 다음은 유비상토 : 강모래(2:8, v/v), 마사토 : 유비상토(8:2, v/v)구로 각각 8.7g, 8.0g 정도로, 마사토 : 유비상토(6:4, v/v)구에서 5.5g으로 가장 낮게 나타났다(Fig. 3-2-10A). 처리 간 유의성은 인정되지 않았다. 뿌리 생체중에서도 마사토 : 유비상토(6:4, v/v)에서 가장 낮게 나타났으며(Fig. 3-2-10A), 다른 분용토와 유의적인 차이를 나타냈다. 15주간 재배 후의 생존율은 모든 처리구에서 46~64% 로 모든 분용토에서 전체적으로 높지 않았다. 런너의 발생도 마사토 : 유비상토 : 강모래(6:2:2, v/v/v)에서 가장 많았다(Table 3-2-8).

Table 3-2-7. The effect of various soil mixtures on the growth and quality of potted *O. iwarenge* for. *magnus* (cultivated for 5 weeks after transplantation).

| Nursery potting mixture (DG: FAM: RS <sup>z</sup> , v/v/v) | N <sup>y</sup> | Survival rate (%) | Plant height (cm) | Plant width (cm) | No. of runner | Leaf color |        |       |
|--|----------------|-------------------|-------------------|------------------|---------------|------------|--------|-------|
|  |                |                   |                   |                  |               | L*         | a*     | b*    |
| 80 : 20 : 0  | 33             | 84.6              | 1.6a              | 2.7b             | 0.8b          | 18.07b     | -2.55a | 2.20b |
| 60 : 40 : 0  | 35             | 94.6              | 1.6a              | 3.1b             | 1.2b          | 19.27ab    | -2.72a | 2.44b |
| 0 : 20 : 80  | 35             | 92.1              | 1.8a              | 3.0b             | 1.0b          | 17.87b     | -2.73a | 2.09b |
| 60 : 20 : 20   | 35             | 100.0             | 1.8a              | 4.0a             | 3.5a          | 21.17a     | -4.02b | 3.32a |
| F-test   |                |                   | 0.358             | 0.000            | 0.0000        | 0.005      | 0.000  | 0.000 |

<sup>z</sup>DG, decomposed granite; FAM, fertilizer-amended media; RS, river sand

<sup>y</sup>The number of pots used for statistical analysis

Table 3-2-8. The effect of various soil mixtures on the growth and quality of potted *O. iwarenge* for. *magnus* (cultivated for 15 weeks after transplantation).

| Nursery potting mixture (DG: FAM: RS <sup>z</sup> , v/v/v) | N <sup>y</sup> | Survival rate (%) | Plant height (cm) | Plant width (cm) | No. of runner | Fresh weight (g) |       | Leaf color |         |       |
|--|----------------|-------------------|-------------------|------------------|---------------|------------------|-------|------------|---------|-------|
|  |                |                   |                   |                  |               | Shoot            | Root  | L*         | a*      | b*    |
| 80 : 20 : 0  | 25             | 64.1              | 3.4ab             | 5.2ab            | 8.2b          | 8.0b             | 0.4ab | 20.00a     | -4.31b  | 4.80a |
| 60 : 40 : 0  | 20             | 55.6              | 2.9b              | 4.6b             | 5.3b          | 5.5b             | 0.3b  | 18.47ab    | -3.68ab | 3.64b |
| 0 : 20 : 80  | 18             | 47.4              | 4.0a              | 5.4ab            | 4.9b          | 8.7b             | 0.4a  | 15.52b     | -3.39a  | 3.21b |
| 60 : 20 : 20   | 19             | 45.7              | 4.2a              | 5.6a             | 12.7a         | 15.1a            | 0.5a  | 17.86ab    | -3.56ab | 3.57b |
| F-test   |                |                   | 0.010             | 0.065            | 0.000         | 0.000            | 0.010 | 0.020      | 0.042   | 0.000 |

<sup>z</sup>DG, decomposed granite; FAM, fertilizer-amended media; RS, river sand

<sup>y</sup>The number of pots used for statistical analysis

본 실험 결과, 능유바위솔과 마찬가지로 자질연화바위솔도 마사토 : 유비상토(6:4, v/v)에서 생육이 가장 불량한 것으로 나타났고, 유비상토를 20%로 줄이고 강모래를 20% 더 첨가한 마사토 : 유비상토 : 강모래(6:2:2, v/v/v) 구에서 생육이 가장 양호한 것으로 나타났다. 하지만 50% 정도까지 생존율이 낮아진 것으로 미루어 보건대, 마사토, 유비상토, 모래의 조합이 아닌 다른 상토의 조합을 고안해볼 필요가 있다고 사료된다.

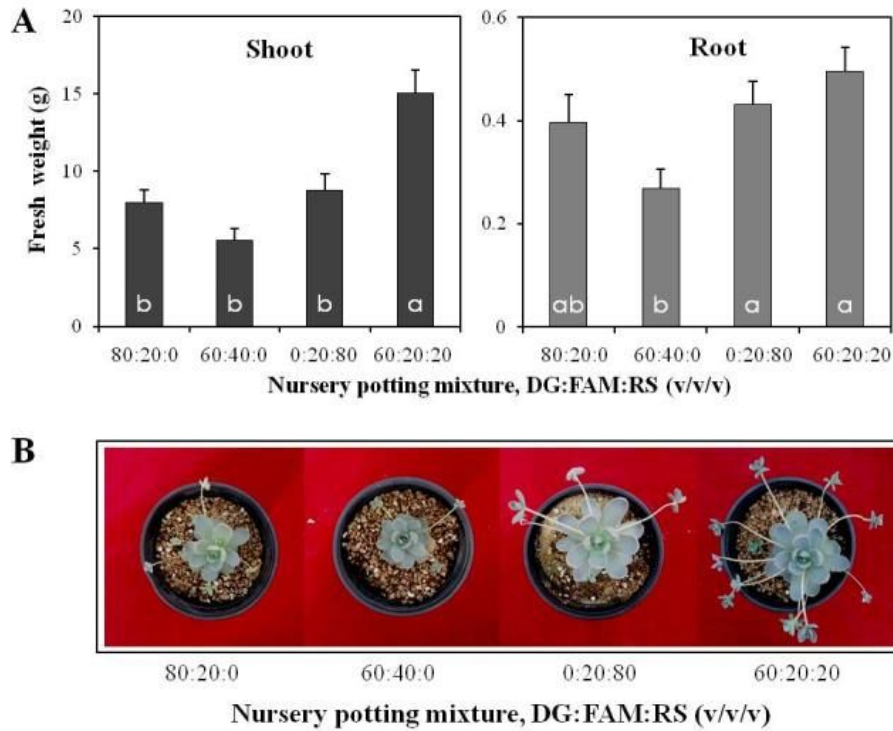


Fig. 3-2-10. Fresh weight of shoot and root (A) and pictures (B) of *O. iwarenge* for. *magnus* grown in pots supplemented with different soil mixtures for 15 weeks. DG, decomposed granite; FAM, fertilizer-amended media; RS, river sand.

(다) 태백동근바위솔의 적정 분용토 선발

태백동근바위솔은 앞의 두 토속바위솔과는 달리, 분용토에 따라 지상부 생체중이 민감하게 반응하지 않았다. 지상부 생체중은 모든 분용토구에서 20g 정도로 처리 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 오히려, 능유바위솔이나 자질연화바위솔에서 가장 좋았던 마사토 : 유비상토 : 강모래(6:2:2, v/v/v) 에서 다른 분용토구에 비해 낮게 나타났다(Fig. 3-2-11). 초장과 초폭에서 오히려 다른 두 바위솔에서 가장 낮게 나타났던 마사토 : 유비상토(6:4, v/v)에서 가장 높게 나타났다(Table 3-2-9). 그러나, 다른 두 종류의 바위솔과는 다르게 처리 간에 현저한 차이를 나타내지도 않았으며, 분용토 간의 차이에 따라서 생존율에 영향을 미치지 않았으며, 모든 분용토에서 100% 생존율을 나타냈다. 태백동근바위솔은 다른 바위솔과는 달리 민감하게 분용토의 영향을 받지 않는 생육특성을 나타냈다.

Table 3-2-9. The effect of various pot media on the growth and quality of potted *Orostachys malacophyllus* from Taebaek (cultivated for 10 weeks after transplantation).

| Nursery potting mixture<br>(DG: FAM: RS <sup>z</sup> ,<br>v/v/v) | Survival rate<br>(%) | Plant             |            | Leaf color, Hunter value |         |         |
|--|----------------------|-------------------|------------|--------------------------|---------|---------|
|  |                      | height (cm)       | width (cm) | L*                       | a*      | b*      |
| 80 : 20 : 00   | 100                  | 6.8a <sup>y</sup> | 8.2b       | 13.88b                   | -8.27a  | 17.54b  |
| 60 : 40 : 00   | 100                  | 6.4a              | 9.0a       | 18.50a                   | -9.17b  | 21.31a  |
| 0 : 20 : 80  | 100                  | 6.5a              | 9.0a       | 16.71ab                  | -9.11ab | 19.51ab |
| 60 : 20 : 20   | 100                  | 5.9ab             | 8.7ab      | 16.97ab                  | -9.13ab | 19.59ab |
| F-test   |                      | 0.000             | 0.028      | 0.024                    | 0.053   | 0.017   |

<sup>z</sup>DG, decomposed granite; FAM, fertilizer-amended media; RS, river sand

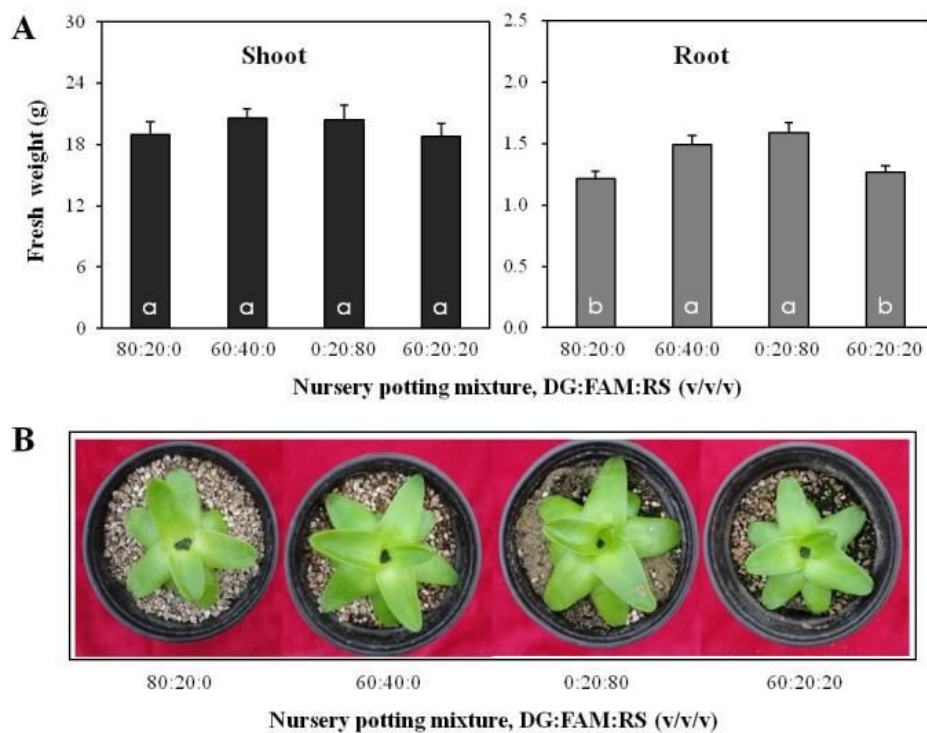


Fig. 3-2-11. Fresh weight of shoot and root (A) and pictures (B) of *O. malacophyllus* from Taebaek grown in pots supplemented with different soil mixtures for 10 weeks.

## 다. 토속바위솔의 적정시비량 및 시비횟수 구명 실험

### (1) 연구목적

본 연구에서는 토속 바위솔을 온실에서 분화 및 조경용으로 개발하기 위한 기초자료를 제공할 목적으로 광도, 분용토와 함께 적정한 시비조건을 알아보기 위해 원예용 액비를 농도와 횟수를 달리한 시비수준이 토속 바위솔의 생육과 품질에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 식물재료

상기한 생육적정광도 구명 실험의 식물재료와 동일한 조건의 식물재료를 사용하였다.

#### (나) 실험방법

능유바위솔과 자질연화바위솔은 4월 9일, 태백동근바위솔은 7월 15일, 직경 11cm 포트에 마사토 : 유비상토 : 모래(6:2:2, v/v/v) 배합토로 정식하였다. 능유바위솔과 자질연화바위솔은 한 처리당 30 포트씩, 태백동근바위솔은 한 처리 당 25 포트씩 총 5처리구를 수정된 난피법을 이용하여 배치하였다. 능유바위솔과 자질연화바위솔은 약 70일간(10주간), 태백동근바위솔은 약 75일간(약 10주간) 교내 연동온실에서 재배하였다(Fig. 3-2-12). 대조구는 수돗물을 주 1회 처리하였고, 처리구는 하이포넥스(Hyponex, Japan)  $1\text{ml}\cdot\text{L}^{-1}$ (1000배 희석),  $0.5\text{ml}\cdot\text{L}^{-1}$  (2000배 희석) 농도와 1주 1회, 2주 1회를 조합하여 처리하였다. 능유바위솔과 자질연화바위솔은 4월 9일부터 5월 27일까지, 태백동근바위솔은 7월 15일부터 8월 18일까지 육묘용 하이포넥스(N:P:K, 15:30:15)를, 능유바위솔과 자질연화바위솔은 5월 28일부터 6월 16일까지, 태백동근바위솔은 8월 19일부터 9월 30일까지 생장용 하이포넥스(N:P:K, 20:20:20)를 포트 당 100mL씩 처리하였다. 재배기간 중 능유바위솔과 자질연화바위솔의 광도는  $374\pm 43\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 이었고, 태백동근바위솔의 광도는  $458\pm 46\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 이었다. 광도측정은 광도계(HD 9021, Delta OHM, Italy)를 사용하였다. 온실내의 평균온도와 습도는 Fig. 2-2-1과 같으며 온습도 기록계(RHT20, Extech Instruments Co. USA)를 사용하여 측정하였다. 능유바위솔과 자질연화바위솔의 생육조사는 5월 19일과 6월 16일에 걸쳐 2회 실시 하였고, 태백동근바위솔은 9월 30일 1회 실시하였다. 조사항목과 측정방법은 상기한 토속바위솔의 적정 분용토 실험과 동일하게 수행하였다.

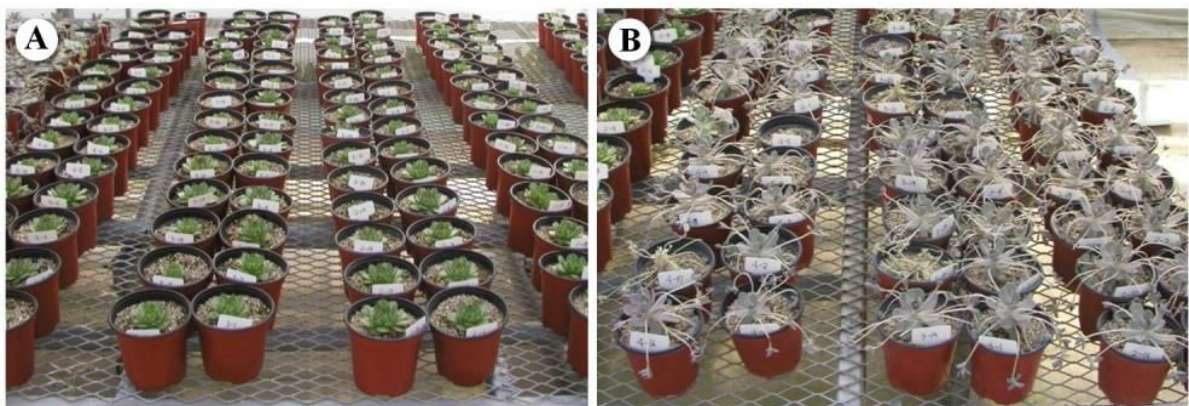


Fig. 3-2-12. *Orostachys japonicus*, 'Nungyu bawisol' (A) and *O. iwarenge* for. magnus (B) used in the experiment for determination of optimum fertilization level.



### (3) 결과 및 고찰

#### (가) 능유바위솔의 적정시비 조건 구명

적정시비량을 알아보기 위해 하이포넥스 양액을 1,000배 또는 2,000배액으로 희석하여 주 1회 또는 2주 1회 관주처리 하였다. 그 결과는 Fig. 3-2-13, Table 3-2-10(5주후 생육), Table 3-2-11(12주후 생육)에 나타내었다. 먼저 지상부 생체중에서 농도에 상관없이 2주에 1회 처리보다 1주에 1회 처리하는 것이 가장 높게 나타났다 (Fig. 3-2-13A). 다음으로 농도에 상관없이 2주 1회 처리한 것으로 나타났다. 무처리구에서는 생체중이 17g 정도로 가장 낮게 나타났는데, 하이포넥스를 1,000배 또는 2,000배액으로 주 1회 처리했을 때는 30g으로 무처리구에 비해 2배 정도나 높아졌다. 그러나 뿌리의 생체중에서는 처리 간 유의한 차이는 보이지 않았다. 초장과 초폭에서 수치상 큰 차이는 없었으나 액비를 처리한 모든 구에서 대조구보다 높게 나타났다. 그러나 런너 발생수는 대조구와 처리구간에 유의적인 차이가 보이지 않았다. 생존율도 모든 처리구에서 97% 이상으로 유의적인 차이가 보이지 않았다. 엽색에서는 액비 농도가 높고 처리횟수가 많을수록 엽색이 진해지는 경향이 뚜렷하게 나타났다(Table 3-2-11). 결과적으로 본 실험에서는 액비농도가 높고 처리횟수가 많을수록 생육이 촉진되는 것으로 나타났다.

Table 3-2-10. Effect of fertilization level on the growth and quality in potted *Orostachys japonicus* 'Nungyu bawisol' (cultivated for 5 weeks under the different fertilization level after transplantation).

| Nutrient application      |                      | N <sup>z</sup> | Survival rate (%) | Plant height (cm)   | Plant width (cm) | No. of runner | Leaf color |         |         |
|---------------------------|----------------------|----------------|-------------------|---------------------|------------------|---------------|------------|---------|---------|
| Interval                  | Distilled rate, fold |                |                   |                     |                  |               | L*         | a*      | b*      |
| No fertilization, Control |                      | 30             | 100.0             | 11.3ab <sup>y</sup> | 5.1a             | 0.1a          | 13.31a     | -8.47ab | 13.10ab |
| 1 week                    | 1000                 | 29             | 96.7              | 11.6a               | 5.7a             | 0.1a          | 11.19b     | -8.38a  | 11.74b  |
|                           | 2000                 | 30             | 100.0             | 11.4ab              | 5.6a             | 0.1a          | 13.41a     | -8.71ab | 13.07ab |
| 2 weeks                   | 1000                 | 30             | 100.0             | 11.3ab              | 5.4a             | 0.0a          | 13.37a     | -8.92ab | 13.66a  |
|                           | 2000                 | 30             | 100.0             | 11.0b               | 5.1a             | 0.0a          | 13.65a     | -9.30b  | 13.97a  |
| F-test                    |                      |                |                   | 0.008               | 0.090            | 0.397         | 0.019      | 0.058   | 0.014   |

<sup>z</sup>The number of pots used for statistical analysis

이상의 결과들을 종합하면, 능유바위솔의 생육에 적합한 광도는 자연광을 50% 정도 차광해 주는 것이 가장 좋고, 내음성도 뛰어나 실내식물로서 이용이 가능할 것으로 판단되었다. 적정 분용토로는 마사토 : 유비상토 : 강모래(6:2:2, v/v/v)가 가장 적당하며, 시비조건은 하이포넥스 액비를 1,000배로 희석하여 1회/주 시비하는 것이 생육을 가장 촉진하는 것으로 나타났다. 97%까지 차광율이 높아지면 급격한 황색이동이 일어나며, 분용토에 따라서 황색/청색 축으로 변화폭이 커지며, 생육이 가장 나쁜 용토와 비교했을 때 녹색 및 황색이동을 나타냈다. 시비수준에 따라서는 x, y축이 동시에 같은 수준으로 이동하는 엽색변화를 가져온다(Fig. 3-2-14).

Table 3-2-11. Effect of fertilization level on the growth and quality in potted *Orostachys japonicus* 'Nungyu bawisol' (cultivated for 12 weeks under the different fertilization level after transplantation)

| Nutrient application      |                       | N <sup>z</sup> | Survival rate (%) | Plant height (cm)  | Plant width (cm) | No. of runner | Fresh weight (g) |       | Leaf color |         |        |
|---------------------------|-----------------------|----------------|-------------------|--------------------|------------------|---------------|------------------|-------|------------|---------|--------|
| Interval                  | Distilled rate, times |                |                   |                    |                  |               | Shoot            | Root  | L*         | a*      | b*     |
| No fertilization, Control |                       | 29             | 96.7              | 11.0b <sup>y</sup> | 5.6c             | 5.3ab         | 16.1c            | 2.4a  | 12.07a     | -6.77a  | 10.28a |
| 1 week                    | 1000                  | 29             | 96.7              | 11.0b              | 7.0a             | 7.0ab         | 29.2a            | 2.4a  | 10.48bc    | -7.98c  | 10.30a |
|                           | 2000                  | 30             | 100.0             | 11.4a              | 6.9ab            | 8.0a          | 29.1a            | 2.6a  | 9.22c      | -7.24ab | 8.94b  |
| 2 weeks                   | 1000                  | 30             | 100.0             | 11.5a              | 6.4ab            | 6.4ab         | 24.2ab           | 2.6a  | 10.78ab    | -8.14c  | 10.87a |
|                           | 2000                  | 30             | 100.0             | 11.3a              | 6.3b             | 4.4b          | 21.2bc           | 2.1a  | 11.49ab    | -7.83bc | 10.49a |
| F-test                    |                       |                |                   | 0.000              | 0.000            | 0.015         | 0.000            | 0.319 | 0.000      | 0.000   | 0.003  |

<sup>z</sup>The number of pots used for statistical analysis

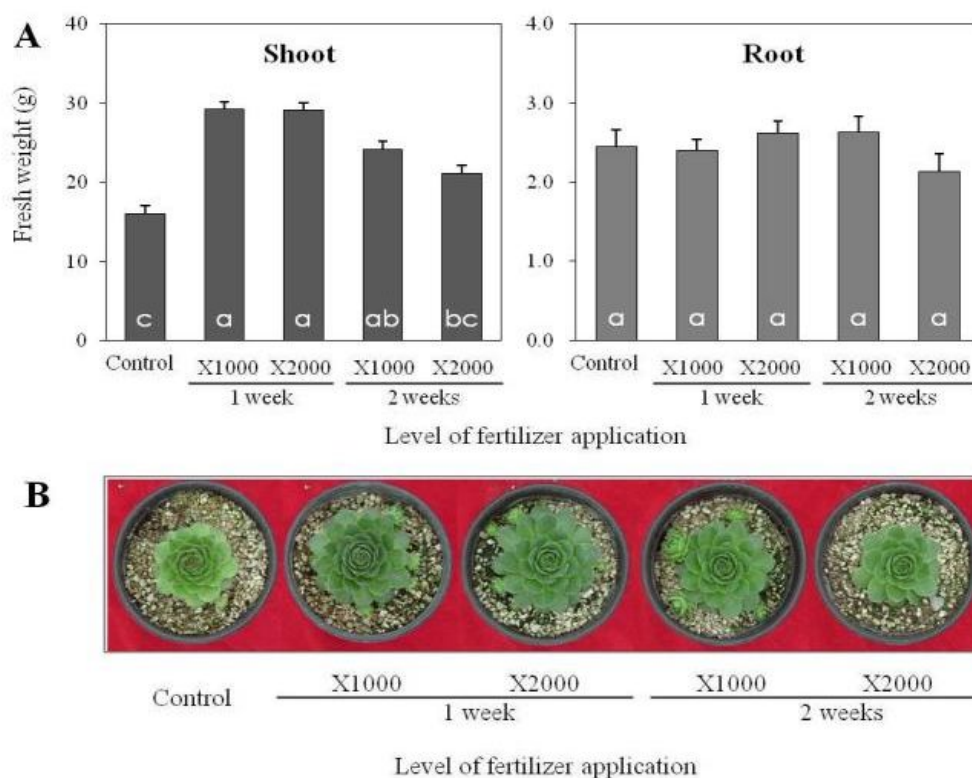


Fig. 3-2-13. Fresh weight of shoot and root (A) of *Orostachys japonicus* 'Nungyu bawisol' grown with each different fertilization levels and their photograph (B). Plants were grown in the soil mixture ratio 60 : 20 : 20 (DG : FAM : RS, v/v/v) under the shading rate of 70% for 12 weeks.

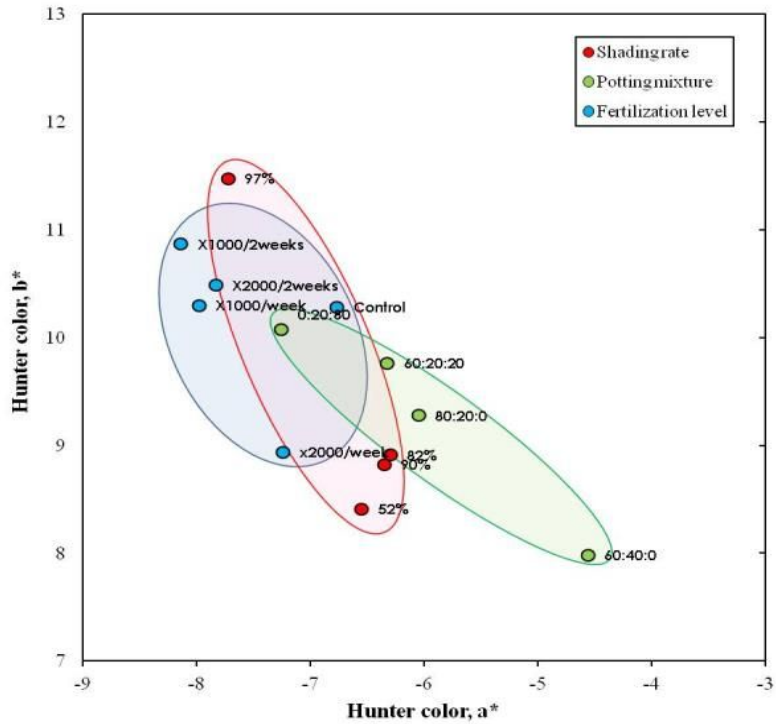


Fig. 3-2-14. Changes of leaf color by shading rate, pot medium and fertilization level in *Orostachys japonicus* 'Nungyu bawisol'.

(나) 자질연화바위솔의 적정시비 조건 구명

자질연화바위솔의 적정시비량에 대한 결과는 Fig. 3-2-15, Table 3-2-12, Table 3-2-13에 나타내었다. 시비처리 후 5주가 경과한 후 초장 및 초폭에서 무처리구와의 차이를 나타냈다 (Table 3-2-12). 9주가 경과한 후에는 거의 모든 생육지표에서 처리효과가 나타났다(Table 3-2-13). 먼저 지상부 생체중에서 시비처리구가 무처리구 (20g)에 비해 높게 나타났으며, 하이포넥스 1000배액을 1주에 1회 처리하는 것이 가장 높게 나타났다(Fig. 3-2-15A, 35g). 그러나 뿌리의 생체중은 시비처리에 의해 증가하지는 않았다. 오히려, 1000배액을 1주에 1회 또는 2주에 1회에 처리한 구에서 무처리구 1g에 비해 생체중이 0.75g 정도로 감소하는 유의적인 차이를 나타냈다(Fig. 3-2-15). 모든 생육지표가 액비를 처리한 모든 구에서 대조구보다 높게 나타났으며, 1000배액을 1주에 1회 처리한 구에서 가장 높게 나타났다. 생존율은 1주에 1회 2000배액의 처리구에서 100%로 나타났다(Table 3-2-13).

Table 3-2-12. Effect of fertilization level on the growth and quality of potted *O. iwarenge* for. *magnus* (cultivated for 5 weeks under the different fertilization level after transplantation).

| Nutrient application      |                      | N  | Survival rate (%) | Plant height (cm)  | Plant width (cm) | No. of runner | Leaf color |        |       |
|---------------------------|----------------------|----|-------------------|--------------------|------------------|---------------|------------|--------|-------|
| Interval                  | Distilled rate, fold |    |                   |                    |                  |               | L*         | a*     | b*    |
| No fertilization, Control |                      | 27 | 90.0              | 12.4b <sup>z</sup> | 4.8c             | 14.2a         | 16.19ab    | -0.44a | 2.28a |
| 1 week                    | 1000                 | 27 | 90.0              | 12.8ab             | 6.2a             | 15.2a         | 16.19ab    | -1.76b | 2.31a |
|                           | 2000                 | 30 | 100.0             | 13.4a              | 5.6b             | 15.6a         | 14.60b     | -1.24b | 1.99a |
| 2 weeks                   | 1000                 | 24 | 80.0              | 13.1a              | 5.9ab            | 15.4a         | 15.96ab    | -1.72b | 2.27a |
|                           | 2000                 | 25 | 83.3              | 12.9ab             | 5.4b             | 14.4a         | 17.18a     | -1.23b | 2.11a |
| F-test                    |                      |    |                   | 0.002              | 0.000            | 0.169         | 0.082      | 0.000  | 0.371 |

<sup>z</sup>Mean separation within columns by Tukey's multiple range test,  $P=0.1$

이상의 결과들을 종합하면, 자질연화바위솔의 생육에 적합한 광도는 자연광을 50% 정도 차광해 주는 것이 가장 좋고, 능유바위솔보다 내음성이 떨어지기는 하지만 역시 실내식물로서 이용이 가능할 것으로 판단되었다. 이 바위솔은 차광에 민감하게 반응하는 유형으로 80%이상의 차광으로 녹색성분의 급격한 증가를 나타냈다(Fig. 3-2-14). 적정 분용토로는 마사토 : 유기상토 : 강모래(6:2:2, v/v/v)가 가장 적합하며, 시비조건은 하이포넥스 액비를 1,000배로 희석하여 1회/주 시비하는 것이 생육을 가장 촉진시키는 것으로 나타났다. 분용토와 시비조건은 차광을 만큼 급격한 변화를 가져오지 않았다.

Table 3-2-13. Effect of fertilization level on the growth and quality of potted *O. iwarenge* for. *magnus* (cultivated for 9 weeks under the different fertilization level after transplantation).

| Nutrient application      |                      | N  | Survival rate (%) | Plant height (cm)  | Plant width (cm) | No. of runner | Fresh weight (g) |       | Leaf color |         |        |
|---------------------------|----------------------|----|-------------------|--------------------|------------------|---------------|------------------|-------|------------|---------|--------|
| Interval                  | Distilled rate, fold |    |                   |                    |                  |               | Shoot            | Root  | L*         | a*      | b*     |
| No fertilization, Control |                      | 25 | 83.3              | 12.2b <sup>z</sup> | 5.0d             | 15.3c         | 18.5c            | 1.0a  | 18.25ab    | -0.32a  | 2.35a  |
| 1 week                    | 1000                 | 22 | 73.3              | 14.1a              | 7.2a             | 21.4a         | 34.6a            | 0.7b  | 17.04ab    | -1.35b  | 2.17ab |
|                           | 2000                 | 30 | 100.0             | 14.0a              | 6.5b             | 19.7ab        | 25.5b            | 1.1a  | 16.38b     | -0.80ab | 2.07ab |
| 2 weeks                   | 1000                 | 22 | 73.3              | 13.5a              | 6.1bc            | 18.5b         | 29.2b            | 0.7b  | 16.83ab    | -1.18b  | 2.03ab |
|                           | 2000                 | 21 | 70.0              | 12.6b              | 5.9c             | 18.2b         | 26.3b            | 1.2a  | 19.12a     | -0.27a  | 1.64b  |
| F-test                    |                      |    |                   | 0.000              | 0.000            | 0.000         | 0.000            | 0.000 | 0.083      | 0.000   | 0.033  |

<sup>z</sup>Mean separation within columns by Tukey's multiple range test,  $P=0.1$



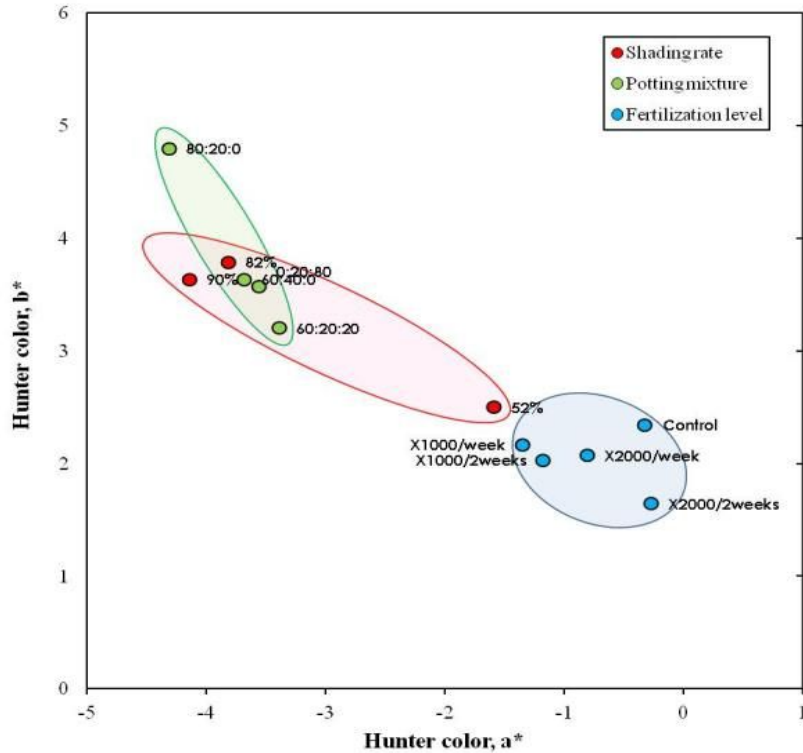


Fig. 3-2-16. Changes of leaf color by shading rate, pot medium and fertilization level in *O. iwarenge* for. *magnus*.

(다) 태백동근바위솔의 적정시비 조건 구명

재배시기가 2-3개월 늦춰져 재배 도중 일장 길이가 짧아져 휴면에 들어가기 시작한 것이 원인이 될 수도 있다고 사료되긴 하나, 태백동근바위솔은 시비처리에 의한 민감한 생육반응을 나타내지 않았다(Table 3-2-14, Fig. 3-2-17). 엽색을 포함해 모든 생육지표에 있어서 시비처리효과를 나타내지 않았다. 그러나, 지상부 생체중은 하이포넥스 1000배액을 1주에 1회 처리하는 것이 대조구 18g보다 증가하여 25g으로 가장 높게 나타났다. 지하부 생체중은 대조구에 비해 약간 증가한 것으로 나타났지만 유의적인 차이가 있지는 않았다. 2000배액을 1주에 1회 처리한 구에서는 오히려 지하부 생체중이 대조구에 비해 감소한 것으로 나타났다(Fig. 3-2-17). 결과적으로 본 실험에서는 액비처리에 의해 두드러진 생육촉진은 초래되지 않는 것으로 나타났다.

Table 3-2-14. Effect of fertilization level on the growth and quality of potted *O. malacophyllus* from Taebaek (cultivated for 10 weeks under the different fertilization level after transplantation).

| Nutrient application      |                      | Plant              |            | Leaf color, Hunter value |        |        |
|---------------------------|----------------------|--------------------|------------|--------------------------|--------|--------|
| Interval                  | Distilled rate, fold | height (cm)        | width (cm) | L*                       | a*     | b*     |
| Control, no fertilization |                      | 5.78a <sup>z</sup> | 8.27b      | 16.12a                   | -9.19a | 19.35a |
| 1 week                    | 1000                 | 6.19a              | 9.45a      | 15.81a                   | -9.25a | 19.60a |
|                           | 2000                 | 5.76a              | 8.51ab     | 14.94a                   | -8.58a | 18.39a |
| 2 weeks                   | 1000                 | 5.77a              | 8.69ab     | 16.49a                   | -9.27a | 19.44a |
|                           | 2000                 | 5.84a              | 8.80ab     | 14.47a                   | -9.16a | 18.88a |
| F-test                    |                      | 0.183              | 0.070      | 0.384                    | 0.366  | 0.768  |

Mean separation within columns by Tukey's multiple range test,  $P = 0.1$

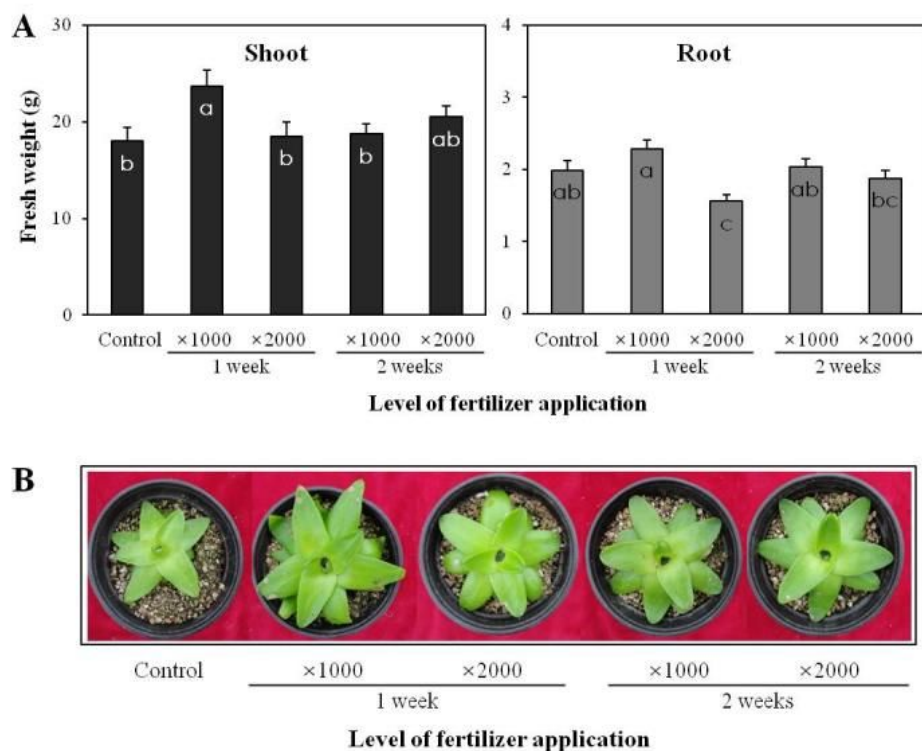


Fig. 3-2-17. Fresh weight of shoot and root (A) and pictures (B) of *O. malacophyllus* from Taebaek grown under different fertilization levels. The plants were grown for 10 weeks in pots supplemented with mixed soils of DG : FAM : RS (60 : 20 : 20, v/v/v).

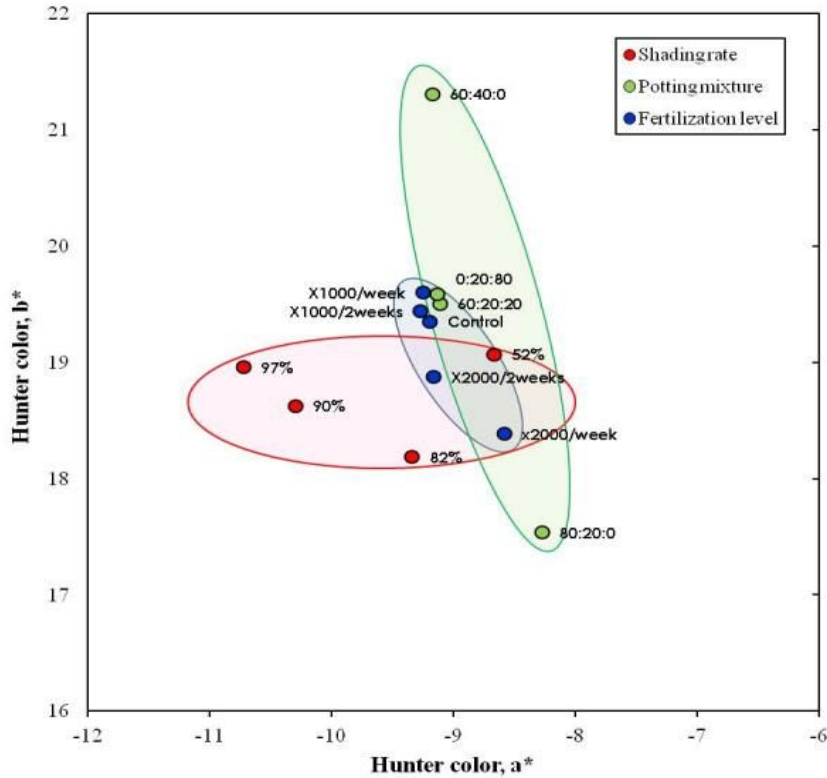


Fig. 3-2-18. Changes of leaf color by shading rate, pot medium and fertilization level in *O. malacophyllus* from Taebaek.

이상의 결과들을 종합하면, 태백등근바위솔의 생육에 적합한 광도는 자연광을 50% 정도 차광해 주는 것이 가장 좋고, 80% 정도까지의 차광은 분화로서 관상가치를 유지시킬 수 있으므로 실내식물로서 이용이 가능할 것으로 판단되었다. 생육이 왕성한 재배시기를 벗어나긴 했지만, 분용토 및 시비처리에 의해 민감하게 생육이 반응하는 유형의 바위솔은 아닌 것으로 판단된다. 시비조건을 달리하여 처리하였을 경우와 달리 차광율과 분용토의 각기 다른 처리에 따라 현저한 엽색변화를 나타냈다. 차광이 증가할수록 엽색의 변화는 급격한 x축 이동(적색/녹색 계열)이 일어났으며, 녹색성분이 증가하는 것으로 나타났다. 분용토를 달리함에 따라 엽색의 민감한 반응을 보이며, y축 상에서 급격한 이동이 일어났다. 반면, 시비조건을 달리하게 되면 엽색에 있어 앞의 두 조건의 변화와는 달리 둔감한 반응을 나타냈다(Fig. 3-2-18).

### 3. 노루귀의 대량증식 체계확립을 위한 재배기술 개발

#### 가. 노루귀 및 섬노루귀의 종자발아 생리 구명.

##### (1) 연구목적

최근 들어 노루귀가 "Yukiwariso"라는 품목으로 인기를 얻고 있다. 이 노루귀는 *Hepatica nobilis* Schreber var. *japonica* Nakai 로 일본이 원산지며 화색은 흰색, 분홍색, 자주색이고 홑꽃 또는 겹꽃의 모양을 가진다. 한편, 우리나라에 자생하는 토속 노루귀로는 Fig. 3-3-1에 보이는 *Hepatica asiatica* Nakai (노루귀), 그리고 *Hepatica maxima* Nakai(섬노루귀), *Hepatica insularis*



Nakai (새끼노루귀) 3종류밖에 없다. 노루귀는 서식지의 자연환경이 변화와 함께 무분별한 채집으로 노루귀 야생종의 수가 급격히 감소하고 있다. 이 상황을 극복하기 위하여 자생식물의 손실을 막음과 동시에 원예적인 측면에서 대량 생산의 필요성도 요구되고 있다. 노루귀는 보통 씨앗이나 분주 방식으로 번식을 한다. 재배가들은 주로 씨앗을 이용하여 번식시키는데, 이는 무성적으로 하는 분주 방식이 너무 느리기 때문이다. 하지만 씨앗으로 번식하는 경우 유전적으로 분리한다는 단점 외에 씨앗에서 판매 가능한 상품으로 재배하는 데에 4-5년이 걸린다는 단점이 있다. 때문에 재배가들은 유묘기 성장을 줄일 수 있는 방법을 오랫동안 기다려 왔다. 하지만 지금까지 과종부터 발아 단계까지 체계적으로 연구한 경우는 *H. americana*, *H. acutiloba*, *H. nobilis* Schreber를 제외하고는 없다. 또한, 노루귀와 섬노루귀는 풍부한 종자생산이 어렵고 생산된 종자가 발아하는데 2년이 걸리는 종자자원 자체가 매우 귀한 토속화훼자원이다. 이렇게 수득률이 낮은 노루귀와 섬노루귀 종자의 발아생리를 구명하여, 종자휴면 요인 구명과 종자휴면을 타파하는 기술을 개발, 발아촉진 기술로까지 발전시켜 이를 이용하여 노루귀와 섬노루귀의 대량증식기술을 개발시키고자 한다.

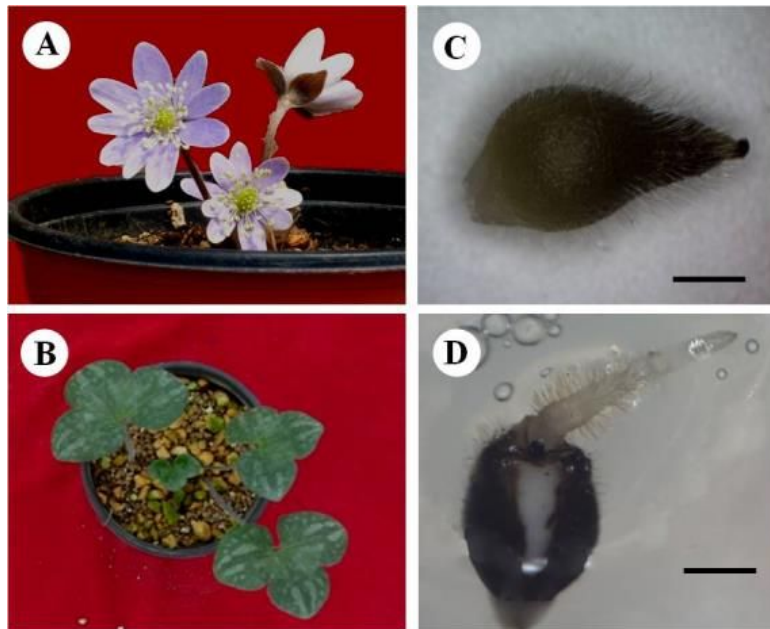


Fig. 3-3-1. Inflorescence (A), fruit (B) and dispersed seed (C) of *H. asiatica* plant and protruded radicle from the seed (D). Bar = 1 mm.

## (2) 재료 및 방법

2011년 3월경에 충북 충주시에 위치한 'S 자생식물원'에서 구매한 노루귀 및 섬노루귀를 교내 단동온실에서 재배하였다. 2011년 5월 24일 첫 채종을 시작으로 약 1주일간 채종을 한 종자를 본 실험에 이용하였다.

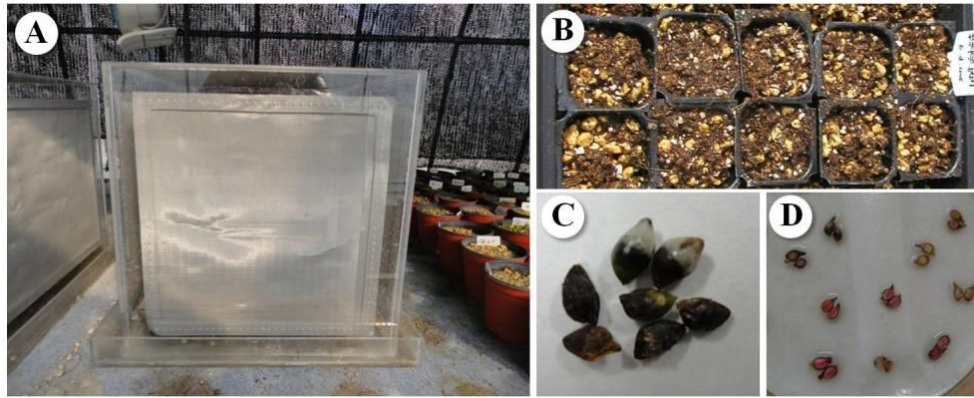


Fig. 3-3-2. Outdoor experiments to investigate phenology of *H. asiatica* and *H. maxima* seeds in non-heated vinyl house (A and B). seeds 4 weeks after sowing (C) and viability test by tetrazolium staining (D).

수확한 종자 중 충실한 종자를 선발하여, 녹소토 : 일반상토 (7 : 3, v/v)을 혼합한 배양토를 이용하여, 노루귀는 6월 3일, 섬노루귀는 6월 22일 각각 tray pot(5cm×5cm, 75공)에 파종하였다(Fig. 3-3-2B). 파종 후 실험은 교내 단동온실에서 이루어 졌으며, 민달팽이와 같은 해충에 의한 종자의 유실을 막기 위해 실험기간 중 아크릴케이지를 씌워 놓았다(Fig. 3-3-2A). 재배환경은 평균 광도  $45.45\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 이고. 실험기간 중 평균온도와 상대습도의 변화는 Fig. 3-3-3와 같다. 광도 측정은 광도계(HD 9021, Delta OHM, Italy)를 사용하였고, 평균온도와 상대습도는 온습도 기록계(RHT20, Extech Instruments Co. USA)를 사용하여 측정하였다.

노루귀와 섬노루귀는 한 식물체로부터 얻을 수 있는 종자 수득률이 낮기 때문에 통상 종자실험에서 행해지는 종자수를 적용하여 실험하는 것이 불가능 하다. 위에서 같은 이유로 다량의 종자확보에 어려움이 있어, 노루귀 종자 5립, 섬노루귀 종자 7립을 1달 간격으로 8개월간 종자의 발달과정을 조사하였다. 는 노루귀 종자의 종자의 배발달 및 발근 및 배발달 조사는 Tetrazolium staining 검사를 통하여 배 발달 정도를 확인하였고, 검사과정은 1% 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (Sigma, USA)에 종자를 침지 시킨 상태에서, 35℃ 에서 2시간 incubation 시킨 후 증류수로 수세한 다음, 실체 현미경(SMZ-168, Motic, USA)을 사용하여 종자의 절단면을 관찰하였다(Fig. 3-3-2D).

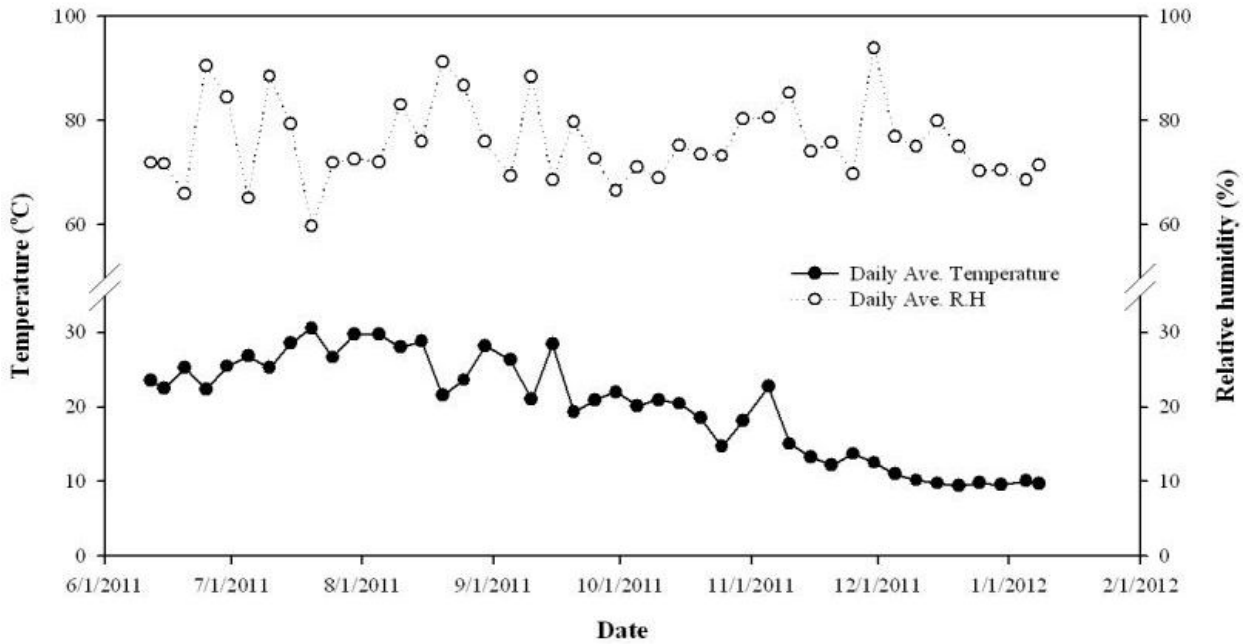


Fig. 3-3-3. Line plots showing changes of daily mean temperature and relative humidity(R.H.) during the outdoor experiment of *H. asiatica* and *H. maxima* seeds.

### (3) 결과 및 고찰

노루귀 및 섬노루귀의 발아생리를 구명하기 위해 채종한 종자를 2주안에 배합토에 과중해 자연상태에서 두고 배발달율을 살펴보았다. 노루귀와 섬노루귀는 부모식물에서 씨앗으로 떨어져 나올 경우 미성숙 배를 가지고 있으며 Fig.3-3-4(노루귀 종자, A; 섬노루귀종자, B)에서 보여지는 것처럼 심한 형태적·생리적 휴면(MPD)을 가진 종자로 판단된다. 기상청 자료를 참고로 하여 진주지역(35°09'N 128°02'E) 노지의 10일 평균 최고·최저 온도변화를 Fig. 3-3-4에 나타냈다. 미성숙 배를 자지고 있는 노루귀와 섬노루귀 종자는 이러한 외부조건에 적응하여 고온기에 배가 발달한 것으로 보이며, 성숙한 배를 가진 종자는 1차 휴면에서 깨어나 가을에 유근(radicles)이 나오게 된다. 자엽이 자라기엔 적합하지 않은 저온인 외부환경조건에 재차 2차 휴면에 들어가게 되는 종자의 생리적 특성을 가지게 되었다고 생각해 볼 수 있다. 유근까지만 자란 노루귀는 다음 해 늦겨울이나 이른 봄에 자엽(cotyledons)으로 발달하게 되는 생리를 가지고 있다. 노루귀의 명에 재발아 생리를 구명하고자 Fig. 3-3-4에 보여지는 과정을 실제로 조사했다. 비가온 -3에 보행해진 자연 상태에 과중된 노루귀 및 섬노루귀 종자는 10월말까지 지속적으로 샘플링하여, 염색을 통한 현미경 관찰을 통해 배발달을 조사하였다. 그 결과는 Fig. 3-3-4과 같다. 노루귀 종자는 자연 상태에서 배 발달이 정상으로 이루어지지 않았다(Fig. 3-3-4). 종자의 부패율 또한 35% 높았으며, 과중 후 27주가 경과하여 유근이 나오기 시작하였으나, 약 33%정도의 발아율에 그쳤다. 한편, 섬노루귀 종자는 4개월간의 고온기간을 통해 배발달이 정상적으로 이루어져서 20주(과중 후 5개월 후, 10월 말)에 cotyledon stage까지 배발달이 이루어졌다(Fig. 3-3-4). 이것은 Fig. 3-3-3의 종자발아 과정과 일치한다.

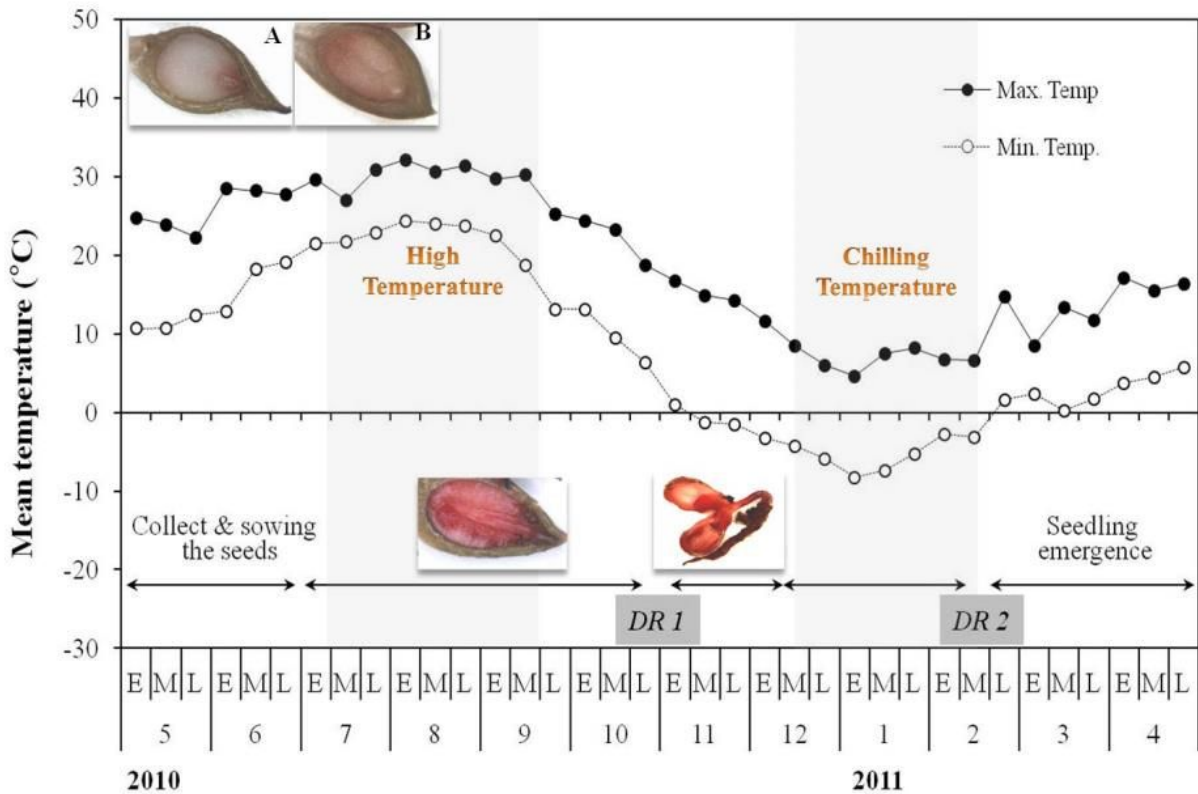


Fig. 3-3-4. Changes of average ten-daily maximum and minimum temperature in outdoor during the period between 2010 and 2011. Embryos grow between summer and autumn, and radicles emerge in late autumn from seeds dispersed from plant of *H. asiatica* and *H. maxima*. Shoots (cotyledon) emerge from emerged radicles in next early spring.

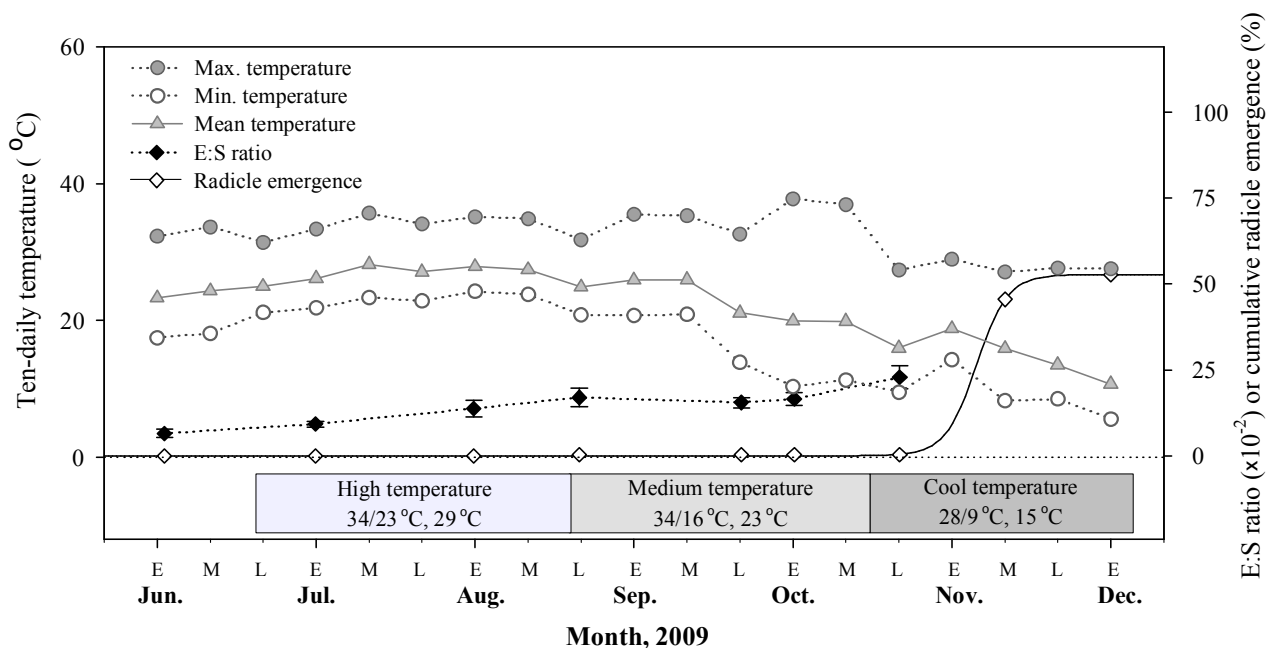


Fig. 3-3-5. Phenology of embryo growth (closed diamonds; mean  $\pm$  SE, n = 10) and radicle emergence of *H. asiatica* seed (open diamonds, cumulative percentage from total 300 seeds).

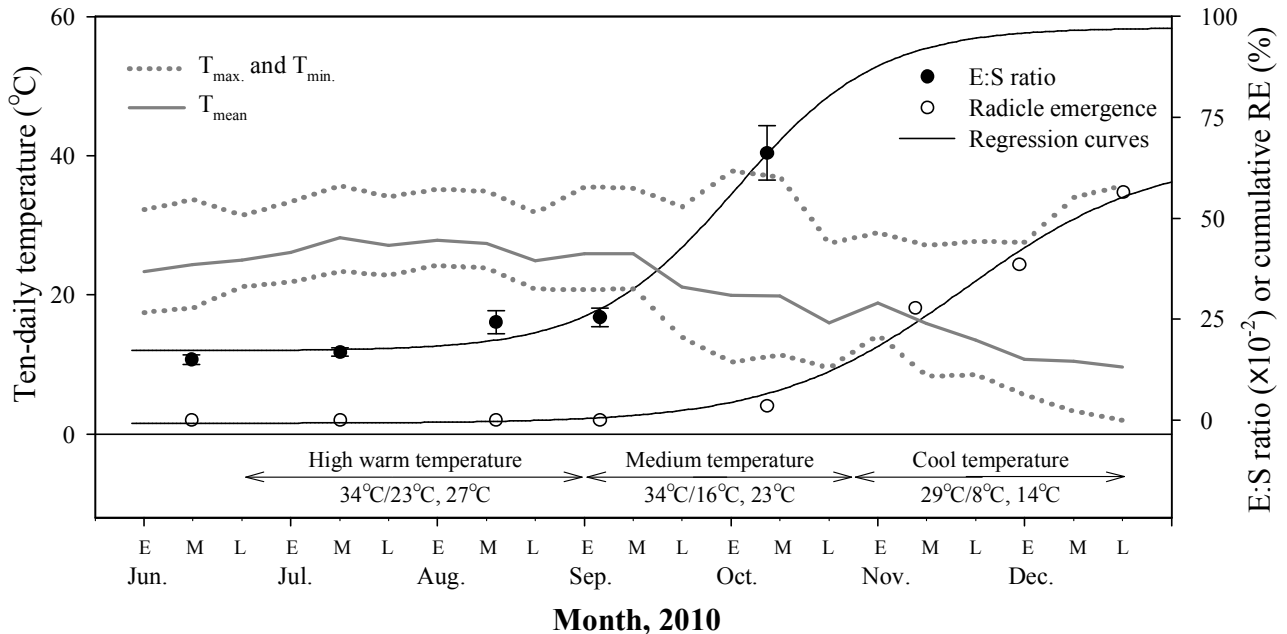


Fig. 3-3-6. Ten-daily maximum, minimum, and mean temperatures and phenology of embryo growth (E:S ratio, mean  $\pm$  SE, n= 9-15) and radicle emergence in seeds of *H. maxima* in a non-heated plastic house.

## 나. 노루귀 및 섬노루귀의 종자휴면 타파를 위한 성장조절제 처리효과 구명

### (1) 연구목적

노루귀와 섬노루귀에서 떨어져나간 종자는 자연 상태에서 발아하는 데까지 10개월 정도 소요되기 때문에 종자 발아를 앞당기는 기술이 필요하며 Gibberellic acid(GA<sub>3</sub>)와 같은 식물성장조절제 처리를 통하여 발아를 촉진시킬 수 있는지 실험을 수행하고자 했다. 단일 GA<sub>3</sub>처리 외에도 발아율을 높일 수 있는 방법을 모색하고자 하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 식물재료

채종지가 다른 두 종류의 종자, 노루귀 및 섬노루귀의 종자발아 생리 구명실험의 재료 및 방법에서 기술된 동일한 조건의 노루귀와 섬노루귀 종자 (교내온실에서 채종)와 2011년 7월 초 울릉도 섬노루귀 군락지에서 채종한 종자들을 분리시켜 각각의 실험에 사용하였다.

#### (나) 실험방법

노루귀 종자는 대조구인 증류수, 처리구인 GA<sub>3</sub> 400, 800mg·L<sup>-1</sup>에 섬노루귀 종자는 대조구인 증류수, 처리구인 GA<sub>3</sub> 400, 800mg·L<sup>-1</sup>, Fluridone 100mg·L<sup>-1</sup>에 24시간 각각에 침지하였다. 건조된

모래는 살균제 BENCIDE LX 150 (㈜원양기업)  $600\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  을 넣어 충분히 적셨다. 처리 용액에 침지한 노루귀종자 5립, 섬노루귀 종자 7립을 각각 살균제를 첨가한 모래와 섞어 15ml tube에 약 8ml까지 채우고,  $15^{\circ}\text{C}$ 의 항온기에 넣었다. 노루귀 종자는 6월 3일, 섬노루귀는 6월 22일 처리하였고, 15일 간격으로 5개월간(20주, 총 10회) 종자의 배발육과 발아율을 조사하였다. 종자 조사는 상기한 종자휴면 생리 구명실험과 동일하게 수행하였다.

2011년 7월 19일 선발한 충실한 섬노루귀 종자를 대조구는 증류수, 처리구는 Fluridone  $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , Fluridone  $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  +  $\text{GA}_3$   $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 에 24h 침지하였다. 건조된 모래에 살균제 BENCIDE LX 150 (㈜원양기업)  $600\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  을 넣어 충분히 적신 후, 처리용액에 침지 한 섬노루귀 종자 10립과 섞어 15mL tube에 약 8mL까지 채우고  $15^{\circ}\text{C}$ 의 항온기에 넣었다. 약 70일 후 (10주), 종자의 배발육과 발아율을 조사하였다. 총 3처리 3반복으로 실험을 수행 하였고, 종자 배발달 조사는 상기한 종자휴면 생리 구명실험과 동일하게 수행하였다.  $\text{GA}_3$ 가 섬노루귀종자에 미치는 영향을 알아보기 위한 또 다른 방법의 실험이 수행되었다. 선발된 섬노루귀 종자는 70% ethanol에 2분, 3% Sodiom hypochlorite solution에 15분, 살균제 BENCIDE LX 150 (㈜원양기업)  $600\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 에 3회 수세한 후, 멸균수로 3회 세척하였다. 소독한 종자는 살균제 BENCIDE LX 150(㈜원양기업)  $600\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , sucrose  $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  그리고 agar  $9\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 조성을 가진 대조구 배지와  $\text{GA}_3$ 가  $50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  첨가된 배지에 각각 10립씩 치상하였다. 치상한 종자는  $15^{\circ}\text{C}$ 의 항온기에 2달간 둔 후, 15일 간격으로 3개월간(총 6회) 종자의 배발육과 발아율을 조사하였다. 종자조사는 상기한 종자휴면 생리 구명실험과 동일하게 수행하였다.

### (3) 결과 및 고찰

#### (가) 노루귀

2010년에 이어 2011년에 재실험으로 이루어졌던 노루귀 발아 실험은 종자의 불량으로 정상적인 배 발달이 일어나지 않았으며, 실험 도중 활성을 잃은 종자가 많아 제대로 된 의미있는 분석을 하기가 어려웠다. 2010년에 이루어졌던  $\text{GA}_3$  처리시 노루귀 종자발아에 미쳤던 결과를 Table 3-3-1에 요약하였다. 종자 과중시  $\text{GA}_3$  사전 처리가 노루귀 종자의 최종 발아율에 영향을 미치지 않는 않았다. 또한, 최종발아까지 소요되는 시간에도 별다른 영향을 끼치지 못했다. 그러나  $\text{GA}_3$  처리에 의해, 농도( $200\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  과  $500\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  사이의 범위 안에서)와 상관없이 평균발아 시간이 짧아졌다. 이것은 무처리구와 유의적인 차이를 보였다. 이러한 결과는 15립의 종자로 한 실험의 3반복으로 하여 얻어졌다.

이 실험은 발아적정온도인  $15^{\circ}\text{C}$ 에서 행해졌으며 자연 상태에서의 종자 발아율보다 썩은 종자를 배제하고 계산하였을 때 약 2배 정도 높았다. 하지만 이렇게 향상된 발아율은 종자의  $\text{GA}_3$  침지 처리에 의해서 좀 더 향상되지는 않았다.

Table 3-3-1. Effect of GA<sub>3</sub> on the procedure of seed germination in *Heapatica asiatica* Nakai.

| Pre-soaking treatment                         | Germination (%)    | Corrected germination <sup>z</sup> (%) | Germination time <sup>y</sup> (weeks) | Mean germination time (weeks) | Coefficient of germination rate (%) |
|---|--------------------|--|---------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| Natural condition <sup>x</sup>                | 33.3 <sup>w</sup>  |  | 27                                    |                               |                                     |
| GA <sub>3</sub> conc. 0 (mg·L <sup>-1</sup> ) | 37.8a <sup>v</sup> | 66.4a                                  | 21                                    | 18.4a                         | 5.0b                                |
| 200   | 42.2a              | 54.5a                                  | 21                                    | 15.9b                         | 6.0a                                |
| 500   | 42.2a              | 63.5a                                  | 21                                    | 15.5b                         | 6.0a                                |

<sup>z</sup>Germination that rotted seeds were excluded from total seeds sown.

<sup>y</sup>Duration time to reach final germination percentage

<sup>x</sup>Condition during the period of mid-May to mid-November, 2011 under non-heated polyethylene house.

<sup>w</sup>The proportion of germinated seeds examined on 14 November 2011 to total 300 seeds sown on 12 May 2011.

<sup>v</sup>Mean values calculated from the seeds under 15°C in the period of mid-May to mid-October, 2010 after pre-soaking treatment with GA<sub>3</sub>; means followed by the same letter within a concentration level of GA<sub>3</sub> are not significantly different at the  $P < 0.05$  level (Duncan's multiple comparison test).

#### (나) 섬노루귀

본교 온실에서 섬노루귀 재배 후 결실된 종자를 수집하여 실험에 사용하였으며, 그 종자들은 실험실내에서든 포장에서든 시간에 따른 정상적인 배 신장 및 발달을 보였다(Fig. 3-3-7). 섬노루귀(4.15 mm) 종자는 노루귀 종자(3.65mm)에 비해 크며 종피도 두껍다. 노루귀 종자와 외관상으로도 다른 섬노루귀 종자를 GA<sub>3</sub> 및 fluridone 을 단독 또는 조합해서 침지 처리하고, 21주간 15°C 배양상에서 종자의 배를 관찰 Fig. 3-3-7과 같은 5단계의 배 발달과정이 관측되었다. 5단계 중 단면절단의 기술적인 문제로 heart-shaped embryo(HSE)와 torpedo-shaped embryo(TSE)단계는 구분하기 어려운 경우가 발생, 함께 분류시켰다. 이러한 방법에 의해 배 발달을 지켜보았을 때, Fig. 3-3-8과 같은 반응이 결과가 보여졌다. 1차 휴면(MPD)에 들어간 섬노루귀 종자는 15°C에서 15주가 지나면 배가 자엽모양의 배(CSE)까지 발달이 일어났지만 유근(radicle)까지는 발생하지 않았다(Fig. 3-3-8A). 400mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>에서는 오히려 무처리의 대조구보다 배 발달 단계의 지연이 보여졌고 21주까지 CSE단계가 관측되지 않았다(Fig. 3-3-9A). 한편, 800mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>는 CSE단계까지 배 발달이 이루어졌고, 그것은 발아까지 이어졌다(Fig. 3-2-2C). 하지만 부패율이 50%이상 빈번하게 나타나는 것으로 보아, 고농도의 GA<sub>3</sub> 처리시 배가 피해를 받아 물러졌기 때문이라고 추정된다. 100mg·L<sup>-1</sup>농도의 fluridone의 처리는 CSE단계로 배 발달이 진행되었고 그와 함께 15주에 발아가 처음으로 관찰되었고 21주까지 지속적으로 발생, 높은 발아율을 보였다. 종자 부패도 빈번하게 발생하지 않았다(Fig. 3-3-8D). fluridone은 ABA생합성을 억제하는 물질이다. 이는 1차 휴면에 있어 ABA가 중요한 역할을 하여 휴면을 유지하는 것을 의미한다. Fig. 3-2-3A에서 보여지는 것처럼 800mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>와 100mg·L<sup>-1</sup> fluridone은 발아를 촉진시키는 효과가 있는 것으로 나타났다. 특히, 100mg·L<sup>-1</sup> fluridone은 발아를 촉진과 더불어 높은 발아율을 보였으며, 파종 전 이러한 종자의 이러한 전처리는 발아를 약 2달 정도 앞당길 수 있을 것으로 기대된다.

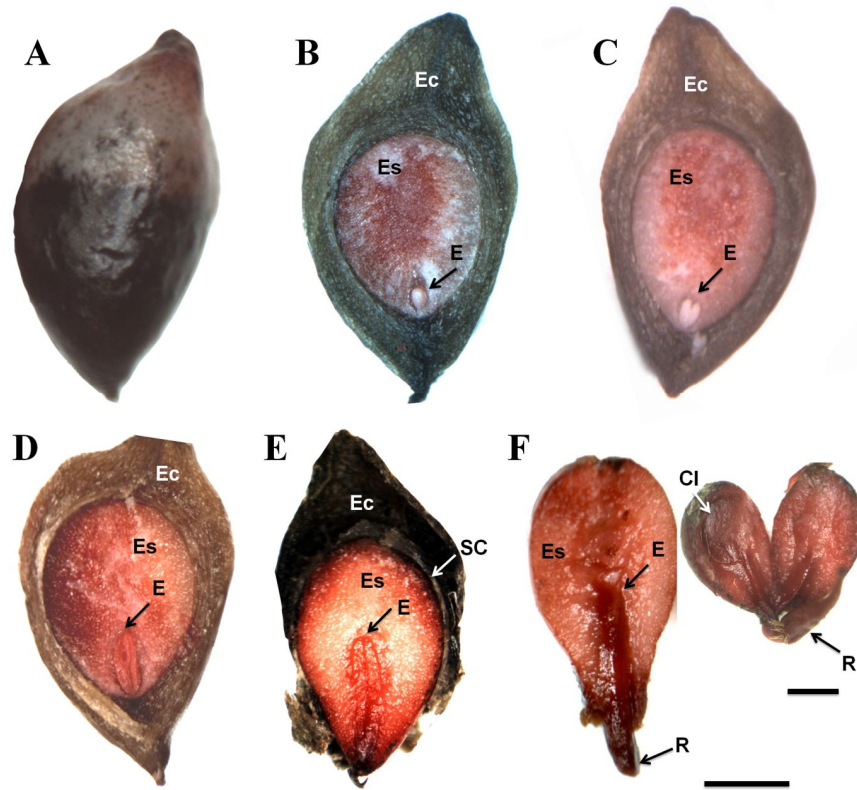


Fig. 3-3-7. *Hepatica maxima* seeds showing gradual embryo growth during incubation as follows: rotten seed showing no stain (RS, A), a globular embryo (GE, B), a heart-shaped embryo (HSE, C), a torpedo-shaped embryo (TSE, D), a cotyledon-shaped embryo (CSE, E), and radicle emergence (RE, F). R, protruded radicle; E, embryo, Ec, endocarp; Es, endosperm; SC, seed coat; Cl, cotyledon. Bar = 1.5 mm.



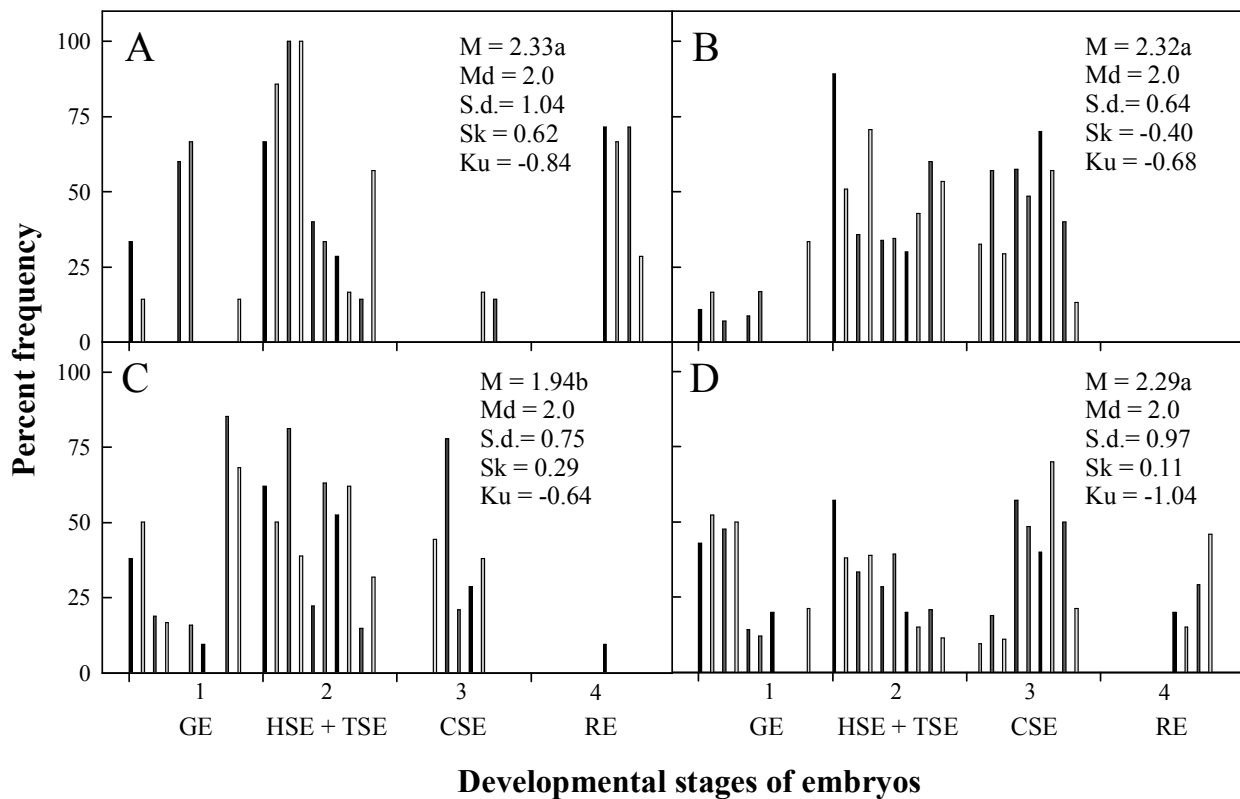


Fig. 3-3-8. Percentage frequency distribution of developmental stages of embryos in *H. maxima* seeds incubated for 21 weeks at 15°C without imbibition (A) or following imbibition in distilled water (B), 400mg·L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub> (C) or 100 mg·L<sup>-1</sup> of Flu (D). Frequency analysis for distribution was conducted for 150 seeds/case. Mean(M) median(Md), standard deviation(S.d.) skewness(Sk), and kurtosis(Ku). Letters after mean values indicate significant differences between incubation temperatures.

수집원이 다른 섬노루귀 종자(자생지에서 수집)를 이용, fluridone(100mg·L<sup>-1</sup>)의 단독 및 GA<sub>3</sub>(100mg·L<sup>-1</sup>)와 fluridone(100mg·L<sup>-1</sup>)의 혼합처리하였을 경우, Fig. 3-3-9B와 같은 결과가 얻어졌다. 전체적인 RS(rotted seeds) 종자 발생율로 보면 그렇게 상태가 좋은 종자는 아닌 것으로 판단된다. 혼합처리구에서는 fluridone 단독처리보다 CSE단계가 축적되어 있고, 발아율이 감소한 이유는 GA/ABA의 상대적인 비율이 섬노루귀 종자의 1차 휴면타파에 중요하게 작용한다고 생각해 볼 수 있다. 최근 연구에 따르면 종자의 휴면을 유지하거나 타파하는 것은 GA/ABA의 상대적인 비율이 중요하게 작용한다는 것이 밝혀졌다.

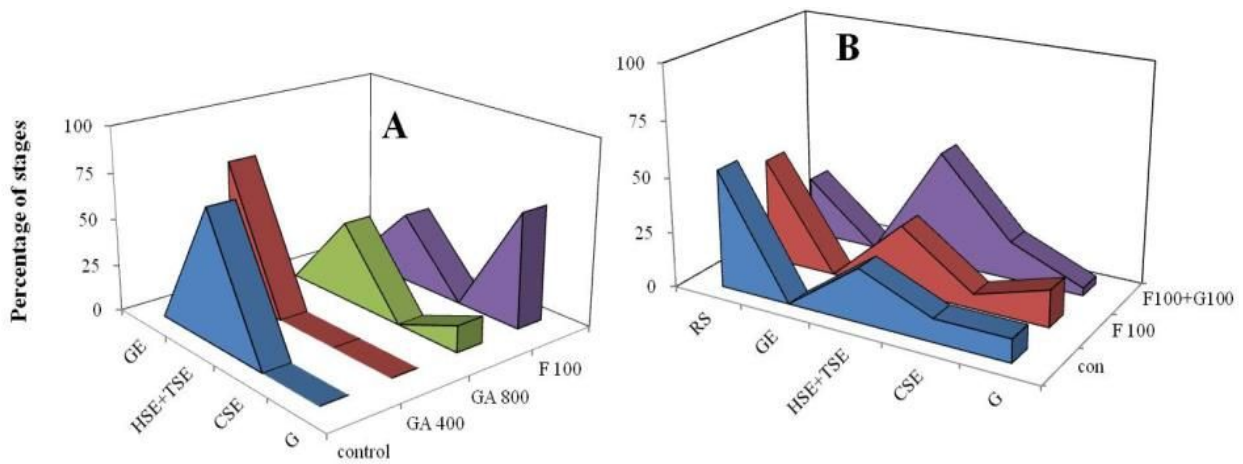


Fig. 3-3-9. Percentage frequency distribution of developmental stages of embryos in *H. maxima* seeds imbibed in plant growth regulators (GA<sub>3</sub> or fluridone) followed by incubation for 19 weeks at 15°C.

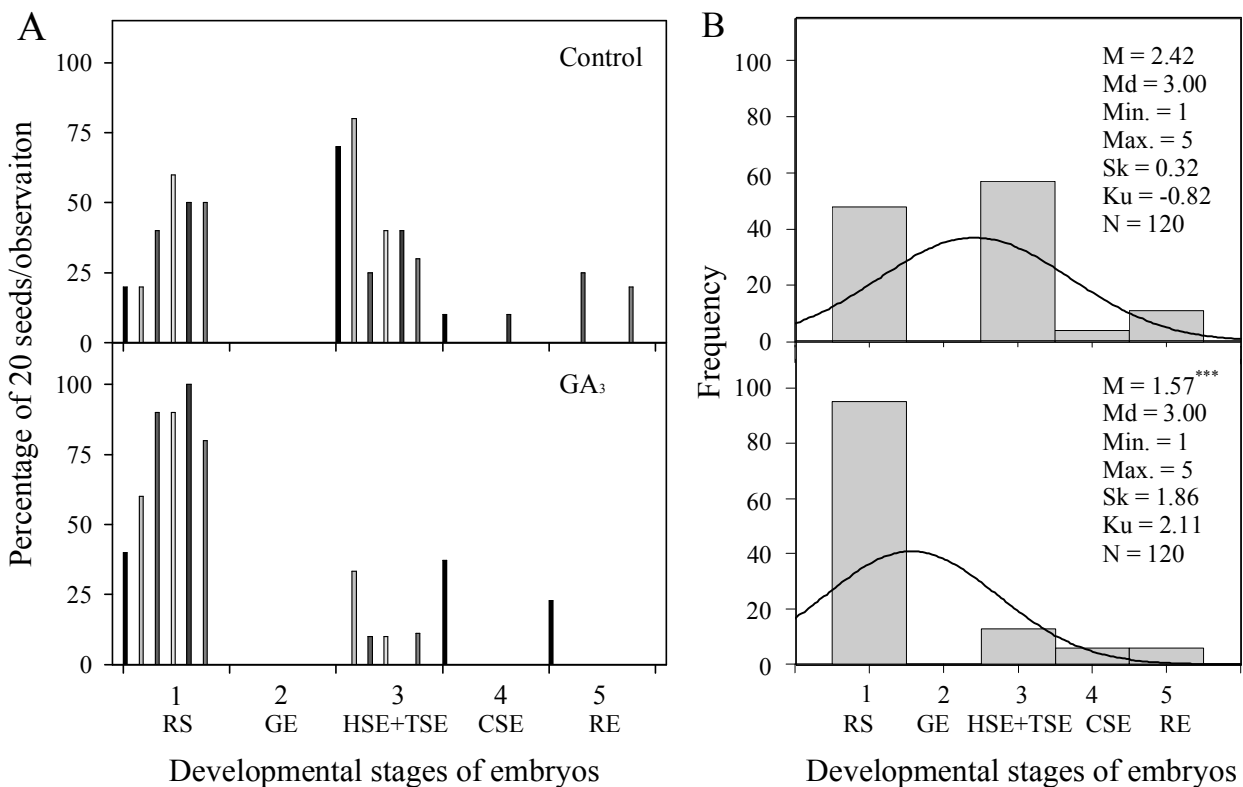


Fig. 3-3-10. Percent frequency of developmental stages of embryos observed every 2 weeks between 9 and 19 weeks of incubation at 15 °C as supplied gradually with or without GA<sub>3</sub> to *H. maxima* seeds (A) and histogram overlaid with normal curve of frequency distribution analysed from the frequency data (B). Mean value followed by \*\*\* is significantly different from that of control by

independent samples T-test ( $P < 0.0001$ ).

자생지에서 수집한 섬노루귀 종자를 생장조절제에 침지시키지 않고 다른 방법을 사용하여 처리하였다.  $GA_3$ 가  $50mg \cdot L^{-1}$  첨가된 배지에 종자를 치상하는 지속적인 처리방법을 사용하였다. 치상한 종자는  $15^\circ C$ 의 항온기에 19주간 일정한 온도를 유지시키면서, 15일 간격으로 종자의 배 발달과 발아율을 조사, Fig. 3-3-10와 같은 결과를 얻었다. 가장 눈에 띄는 현상은 RS종자 발아율이 무처리구 및 처리구에서 13주부터 급격히 RS종자 발생률이 증가하는 양상을 보였다. 이것은 종자가 발아하기 위해서 필요한 수분, 산소 등과 같은 조건이 맞지 않았다고 추정해볼 수 있다. 수분의 문제라기보다는 산소공급이 원활히 일어나지 않았을 가능성이 높다고 생각할 수 있다. 이러한 똑같은 조건 하에서 생장조절제 처리구에서는 무처리구에 비해 2배 이상 지속적으로 RS종자가 발생했다. 이것은 종자에 지속적인  $GA_3$ 처리가 원인이었을 것으로 생각해 볼 수 있다. 침지방법에 의한 고농도의  $GA_3$  처리시도 이와 비슷한 결과를 낳았다. 지속적인  $GA_3$  공급은 고농도의 침지와 종자에 같은 효과를 나타낸다고 볼 수 있겠다.

#### 다. 노루귀 및 섬노루귀의 온도처리에 의한 휴면타파

온도처리에 의해 휴면이 타파되어 노루귀와 섬노루귀의 발아소요일과 종자발아율을 높일 수 있는지 알아보려고 하였다. 배가 발달하여 성숙된 종자가 발아하기 위해서 가장 적절한 온도가 무엇인지 알아보기 위해 실험을 진행하였다.

##### (1) 연구목적

자연 상태에서의 종자 발아와 배 발달 상태로부터 종자휴면타파에 필요한 온도조건을 유추할 수 있지만 더 명확한 온도 요구도를 알아보기 위해 항온기에서의 실험을 통해 여러 가지 온도 처리가 필요하다. 또한, 온도처리에 의해 휴면이 타파되어 노루귀와 섬노루귀의 발아소요일과 종자발아율을 높일 수 있는지 알아보려고 하였다. 동시에, 휴면이 타파된 종자의 발아적정온도를 구명하고, 발아적온을 통해서 발아율을 높이고자 하였다.

##### (2) 재료 및 방법

###### (가) 식물재료

2011년 3월경에 'S 자생식물원'에서 구매한 노루귀와 섬노루귀를 교내 단동(비닐)온실에서 재배하였고, 노루귀 종자는 2011년 5월 24일 첫 채종을 시작하였고, 섬노루귀는 6월 13일에 첫 채종하였다. 첫 채종 후 약 1주일간 수집한 종자 중 충실한 종자를 선별하여 본 실험에 이용하였다. 2011년 7월 초 울릉도 섬노루귀 군락지에서 채종한 섬노루귀 종자들 중 충실한 종자를 분리하여  $4^\circ C$ 와  $15^\circ C$ 의 온도처리에 이용하였다.

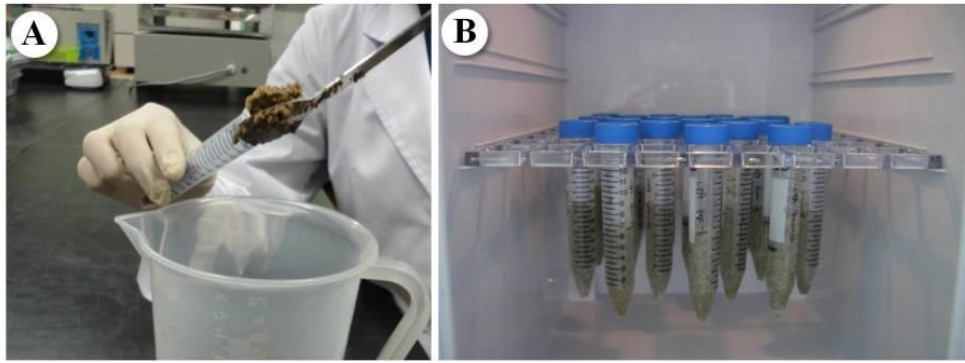


Fig. 3-3-11. After imbibition and surface-sterilizing processing, 150 seeds were placed in 15-ml-volume plastic tubes including moistened sand mixed with germicide and incubated at respective temperature.

### (나) 실험방법

건조된 모래에 살균제 BENCIDE LX 150 (㈜원양기업)  $600\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 을 넣어 충분히 적신 후, 노루귀종자 5립, 섬노루귀 종자 7립을 섞어 15mL tube에 약 8ml까지 채우고 항온기에 넣었다 (Fig.3-3-11). 노루귀 종자는 6월 3일, 섬노루귀는 6월 22일 처리하였고, 처리온도는  $15^{\circ}\text{C}$ ,  $20^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}/15^{\circ}\text{C}(12/12\text{h})$ 로 15일 간격으로 총 10회 종자의 배발달과 발아율을 조사하였다. 종자 조사는 앞에서 기술한 종자휴면 생리 구명실험과 동일하게 수행하였다. 선발된 종자는 2011년 7월 19일 건조된 모래에 살균제 BENCIDE LX 150 (㈜원양기업)  $600\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 을 넣어 충분히 적신 후, 선발된 종자 10립을 섞어 15mL tube에 약 8mL까지 채우고,  $4^{\circ}\text{C}$ 와  $15^{\circ}\text{C}$ 의 항온기에 각각 종자 넣고 2달간 시간이 경과한 후, 15일 간격으로 3개월간(총 6회) 종자의 배 발육과 발아율을 조사하였다. 종자의 배 발달 조사는 앞에서 기술한 동일한 방법으로 수행하였다.

### (3) 결과 및 고찰

#### (가) 노루귀

최종 배 발달율과 활력도는  $10^{\circ}\text{C}$ 와  $15^{\circ}\text{C}$ 에서 모두 유의적인 차이 없이 비슷하였다.  $20^{\circ}\text{C}$ 에서는 배 발달율은 앞의 두 온도와 유의적인 차이를 보이지 않았다. 한편, 활력도에 있어서는 유의적인 감소를 보였다 3가지 온도에서 유의적인 차이가 없는 모두 비슷한 배 발달율을 보였으나, 최종 발아율에서는 온도효과가 분명하게 드러나는 결과를 보였다(Fig.3-3-12A). 미성숙된 노루귀 종자는 3가지 온도에서 비슷한 정도의 배 발달을 가져오지만, 배 발달이 완성되었다고 해서 발아하기 위한 휴면이 타파되는 것은 아니라는 것을 시사한다. 온도에 의해 조절되는 종자 내의 생리적인 작용이 휴면타파를 위한 중요한 요인이 된다고 생각해 볼 수 있겠다. Fig.3-3-12에서 보는 것처럼 각각의 데이터들의 회귀곡선을 통해 얻어진 온도요인과의 관계를 통해서, 최종 발아율의 온도에 대한 반응패턴은 배 발달률보다는 종자활력이 온도에 대해서 가지는 패턴과 유사하다는 것을 알 수 있다. 종자의 발아를 유도하는 물질을 종자의 활력과도 관계가 있다고 볼 수 있다. 노루귀 종자가 발아하기 위해서는 성숙한 배 발달도 필요하지만, 발아하기에 적합한 생리적인 조건인 온도가 무엇보다도 중요하다는 것을 결론적으로 말할 수 있다.

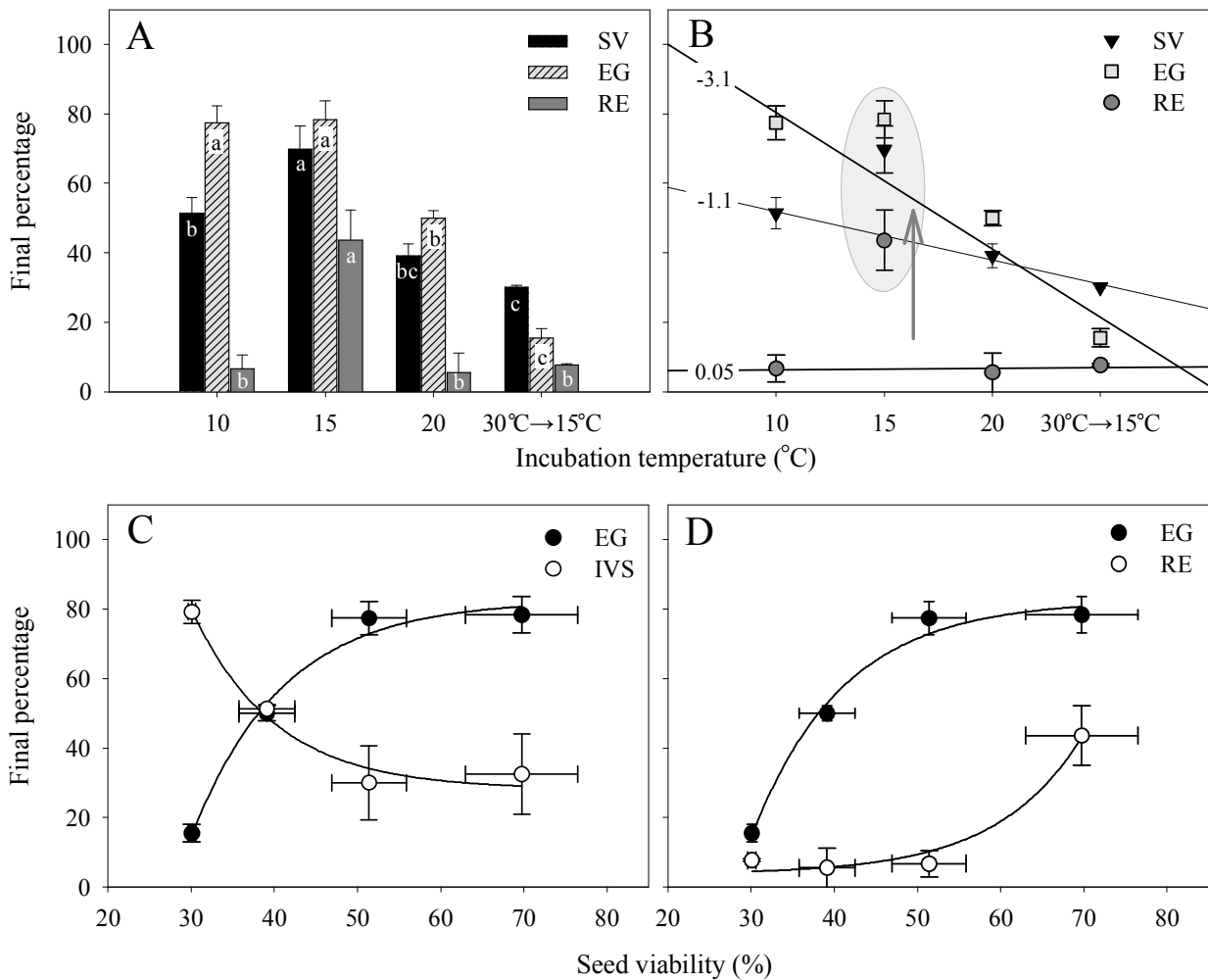


Fig. 3-3-12. (A) Seed viability (SV), embryo growth (EG) and radicle emergence (RE) determined by tetrazolium chloride staining after 26 weeks at various temperatures (of total seeds). Means followed by same letters on histograms are not significantly different at the  $P > 0.05$  (mean±S.E, Duncan's multiple comparison test); (B) relationship between exposure temperature and seed viability, embryo growth or radicle emergence. Each value presents slope for linear regression tests performed excluding data at 15°C (grey-coloured area); (C) and (D) nonlinear relationship between seed viability and embryo growth (EG), radicle emergence (RE) or inviable seeds (IVS) ( $r^2 > 0.98$  in nonlinear regression test,  $P < 0.001$ ).

최종발아율, 배발달률, 그리고 종자활력도가 생장조절제 처리 및 온도변화 요인에 의한 처리 효과 및 이 두 요인의 상호작용 효과를 알아보기 위해 Two-way ANOVA를 통해 데이터를 해석했다(Table 3-3-2). 그 결과, 최종발아율과 종자활력도는 온도요인(10°C ~ 20°C)에 의한 효과가 있는 것으로 나타났으나( $p < 0.05$ ), 배 발달은 이 온도 범위에서는 처리효과가 없는 것으로 나타났다( $p > 0.05$ ). 노루귀의 배가 성장하는 데 있어서 온도요인은 그렇게 결정적인 요인은 아니라고 말할 수 있다. 또한 3가지 모두 온도와 생장조절제 처리의 상호작용 효과는 없는 것으로 나타났다( $p > 0.5$ ).

Table 3-3-2. Two-way ANOVA table for germination capacity, embryo growth potential and viability of *H. asiatica* seeds exposed constant temperature (10, 15 and 20°C) and different GA<sub>3</sub> concentrations (0, 200 and 500 mg·L<sup>-1</sup> )

| Source of variation                     | d.f. | Mean square | F     | Sig.  |
|---|------|-------------|-------|-------|
| <b>a. Germination</b>                   |      |             |       |       |
| Temperature                             | 2    | 3426.8      | 27.07 | 0.000 |
| GA <sub>3</sub> treatment               | 2    | 23.3        | 0.18  | 0.833 |
| Temperature × GA <sub>3</sub> treatment | 4    | 70.3        | 0.56  | 0.698 |
| <b>b. Embryo Growth potential</b>       |      |             |       |       |
| Temperature                             | 2    | 762.8       | 2.75  | 0.091 |
| GA <sub>3</sub> treatment               | 2    | 76.0        | 0.27  | 0.763 |
| Temperature × GA <sub>3</sub> treatment | 4    | 192.7       | 0.70  | 0.605 |
| <b>c. Viability</b>                     |      |             |       |       |
| Temperature                             | 2    | 1081.8      | 4.98  | 0.019 |
| GA <sub>3</sub> treatment               | 2    | 22.3        | 0.10  | 0.903 |
| Temperature × GA <sub>3</sub> treatment | 4    | 172.8       | 0.79  | 0.544 |

(나) 섬노루귀

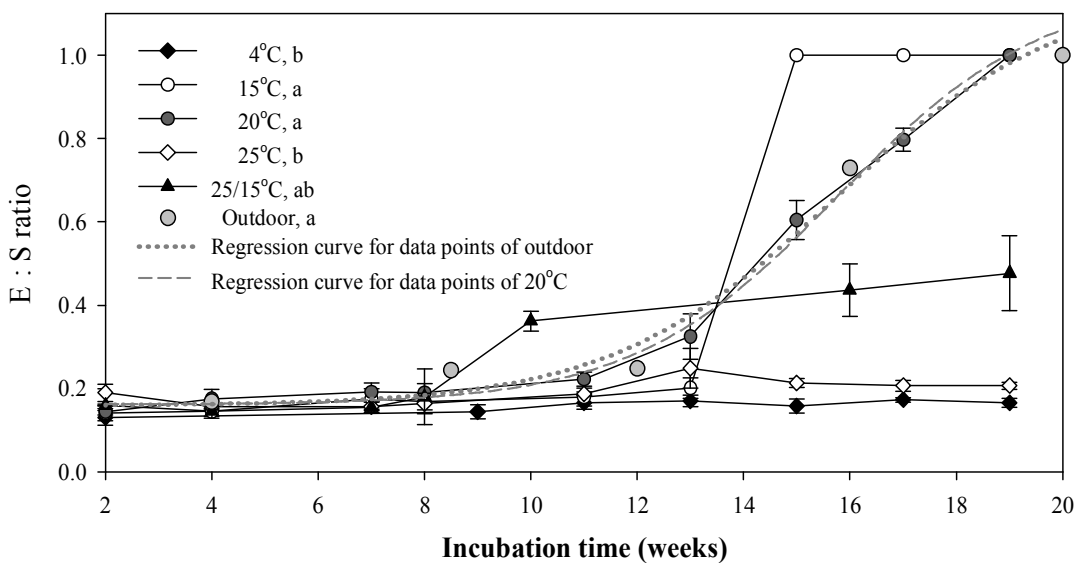


Fig. 3-3-13. E:S ratio (mean±SE, n= 7-15) of *H. maxima* seeds incubated at five different temperatures with regression curves for E:S ratio at 15°C and non-heated plastic house.

4, 15, 20, 25, 25°C/15°C의 각기 다른 온도의 배양상에 종자를 넣어놓고 주기적으로 염색한 종자의 단면으로부터 종자길이(Seed length)와 배길이(embryo length)를 측정하여 얻어진 값을 Fig. 3-3-13에 나타냈다. 앞에서 노루귀 종자의 배 발달은 10°C와 20°C사이의 온도에서 차이를 보이지 않았다.

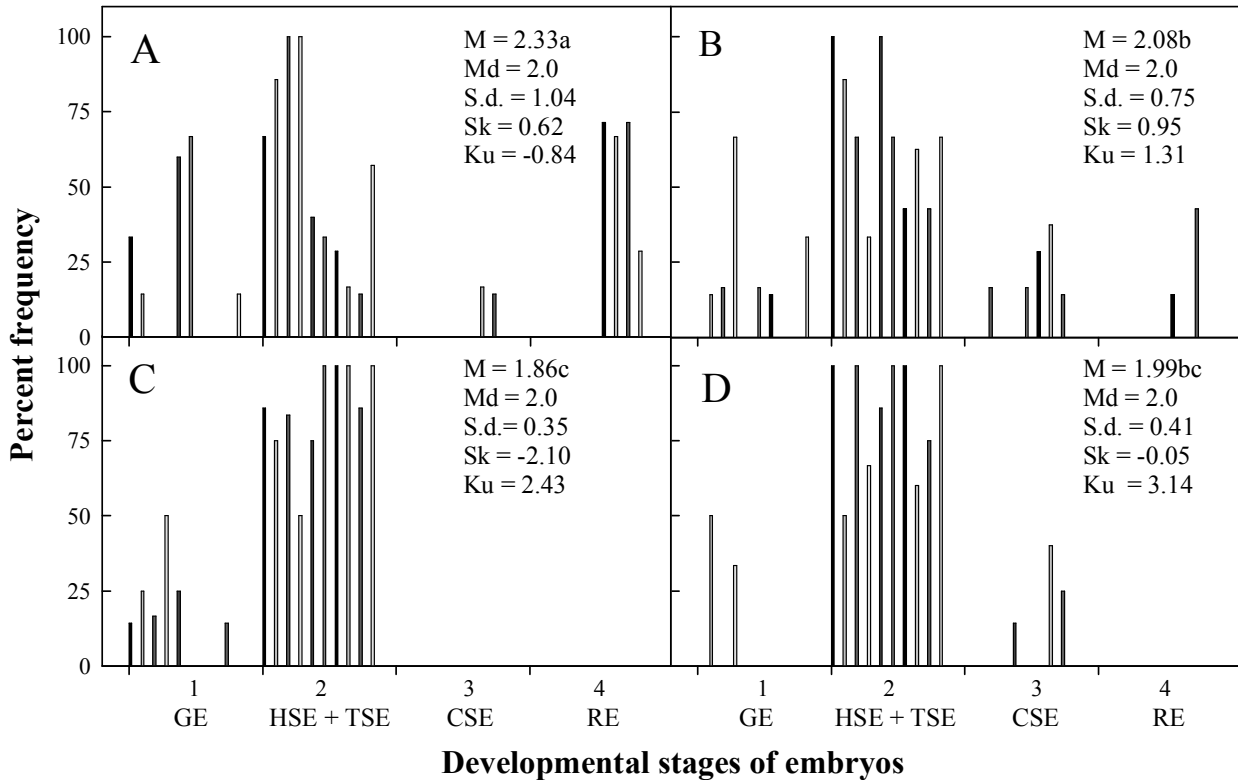


Fig. 3-3-14. Percentage frequency distribution of developmental stages of embryos in *H. maxima* seeds incubated for 21 weeks at different constant temperatures of 15 (A), 20 (B) and 25°C (C) and at alternating temperature of 25/15°C (D). Frequency analysis for distribution was conducted for 150seeds/case.

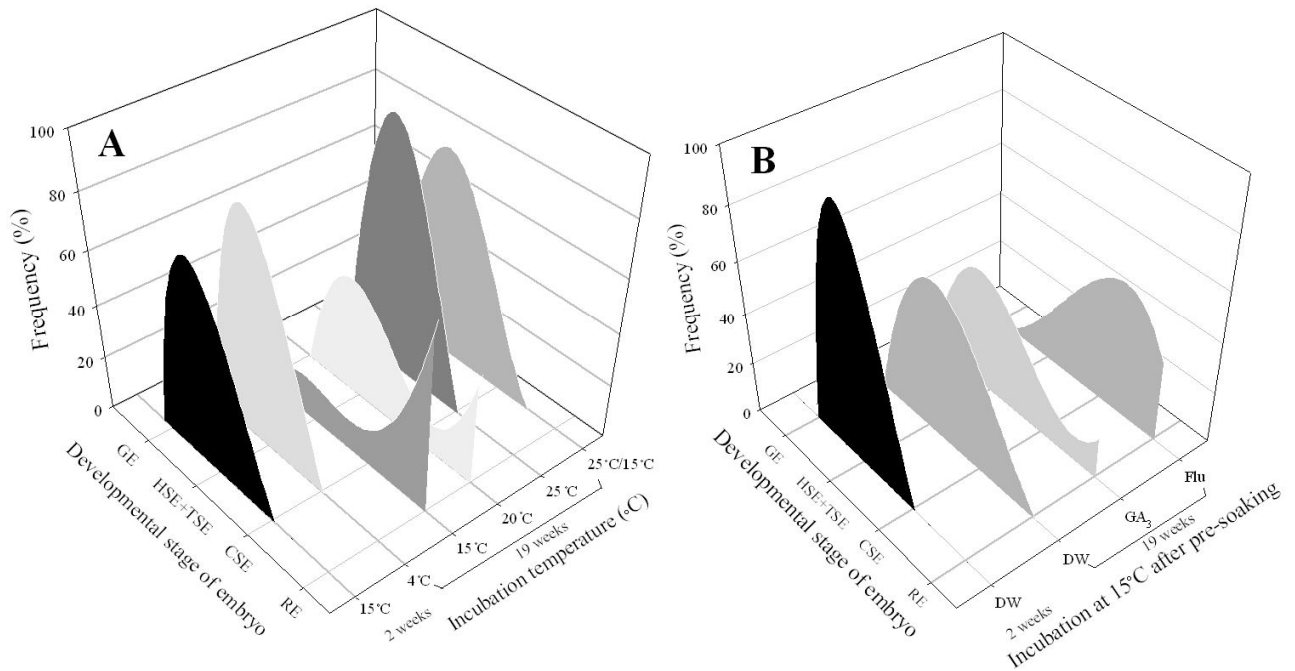


Fig. 3-3-15. Embryo growth and radicle emergence after 19weeks of incubation at different temperature and at 15°C following plant growth regulator, GA<sub>3</sub> and fluridone (Flu).

섬노루귀의 경우, 실험한 온도의 폭이 넓어졌으며 따라서 노루귀의 경우와는 다른 결과를 보였다. 실선의 회귀선(자연 상태의 배신장)을 기준으로 15°C와 20°C는 자연 상태보다 빠른 배신장을 보였다. 그러나 25°C와 25°C/15°C는 초반에는 빠른 신장을 보이다가 10주가 지나고 나서는 더 이상이 배 신장이 일어나지 않는 것으로 보인다. 4°C는 초기 배 발달단계에서 멈추어버린 양상을 보였다(Fig. 3-3-14).

각각의 배발달 단계별 발생빈도를 보면 4°C와 25°C는 CSE단계와 G단계가 나타나지 않았다(Fig. 3-3-15). 두 온도에서 4°C는 RS종자 발생율이 낮았고, 25°C는 높았다는 것이 차이점으로 나타났다. 15°C와 20°C(Fig. 3-3-15)는 각각의 단계가 다 나타나 있었으며, 발아까지 이어졌다. 그러나 15°C가 가장 먼저 17주에 발아가 일어났고, 발생 빈도도 높았다. Fig. 3-3-15A에서 보여지는 것처럼 20°C와 25°C/15°C는 ‘HSE+TSE’단계와 CSE단계의 발생빈도가 높고, 이단계에서 지연되어 있는 양상을 보였으며, 25°C는 ‘HSE+TSE’단계에서 지연된 양상을 보였다.

#### (4) 금후계획

노루귀와 섬노루귀 종자는 다형 생리학적 휴면(multiple types of physiological dormancy)을 가지고 있다. 앞의 실험을 통해서 1차 휴면이 깨지고 배가 다 자라서 유근(radicles)이 나온 종자도 일정기간의 저온을 받아야 자엽(cotyledons)으로 발달하게 되는 생리적 특성이 있다. 수득율이 낮은 종자이기 때문에 재현성을 보기 위한 반복 실험이 요구되어진다. 공시 종자수와 반복 수를 늘려서 1차 휴면 타파하여 발아소요일수 및 발아율을 높이는 방법으로 가장 가능성 있는 fluridone의 최적의 처리농도를 알아내고, 변온방법에 의한 발아적정온도를 알아보고자 한다.



## 라. 2차 휴면을 타파하기 위한 조건 구명 실험

### (1) 연구목적

Fig. 3-1-3에서 볼 수 있는 것처럼, 노루귀와 섬노루귀 종자는 다형 생리학적 휴면(multiple types of physiological dormancy)을 가지고 있다. 앞의 실험을 통해서 1차휴면이 깨지고 배가 다 자라서 유근(radicles)이 나온 종자도 일정기간의 저온을 받아야 자엽(cotyledons)으로 발달하게 되는 생리적 특성을 알게 되었다. 배가 다 자라 유근이 발생한 상태에서 자엽발달이 정지된 2차 휴면을 타파하는데 필요한 요인이 무엇인지 저온의 효과와 함께 호르몬처리로 완전한 발아를 이루어낼 수 있는지 알아보려고 다음의 실험을 수행했다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 식물재료

2011년 3월경에 'S 자생식물원'에서 구매한 노루귀 및 섬노루귀를 교내 단동(비닐)온실에서 재배하였다. 노루귀 종자는 2011년 5월 24일 첫 채종을 시작하였고, 섬노루귀는 6월 13일에 첫 채종하였다. 첫 채종 후 약 1주일간 채종을 한 종자 중 충실한 종자를 선발하여 녹소토 : 일반상토 (7:3, v/v)을 혼합한 배양토를 이용하여, 트레이(27cm×27cm)에 노루귀는 6월 3일, 섬노루귀는 6월 22일 각각 파종하였다. 재배기간 동안 온습도 기록계(RHT20, Extech Instruments Co. USA)를 사용하여 측정하였고, 일평균 온도와 습도는 Fig. 3-1-2에서 보여진다. 광도계(HD 9021, Delta OHM, Italy)를 사용하여 측정된 평균광도는  $40.61\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 였다.

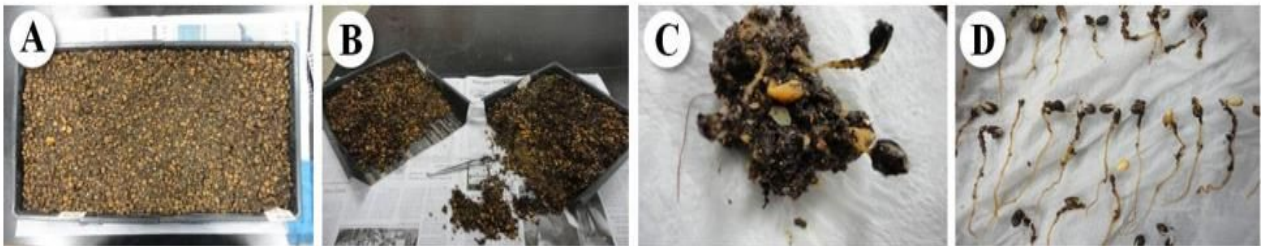


Fig. 3-3-16. Sowing of *H. maxima* seeds (A) and emerged radicles observed 23 weeks after sowing (B, C and D).

#### (나) 실험방법

저온처리를 이용한 노루귀 및 섬노루귀의 2차 휴면타파 효과 구명

Fig. 3-3-4-1에서 보여지는 것처럼 11월 15일 발근된 종자를 채집하여, 멸균한 녹소토 : 일반상토 (8:2, v/v) 배양토를 이용하여 배양병에 노루귀 종자 10립, 섬노루귀 종자 28립을 각각 이식했다. 이식한 종자는 4°C 향온기에 넣고 15, 30, 45, 60, 75, 90일 간격으로 저온을 처리한 다음, 사각포트(13cm×8cm)에 멸균한 녹소토 : 일반상토 (8:2, v/v) 배양토로 정식했다(Fig. 3-3-16). 정식 후 15°C, 60%,  $39.68\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 14/10(h/h) 조건의 향온기에 넣고 관찰 중이다(Fig. 3-3-17).



Fig. 3-3-17. Cold stratification at 4°C (A) of emerged radicles (Fig. 3-3-15) of *H. asiatica* and *H. maxima* and followed by incubation at 15° (B and C).

생장조절제 처리를 이용한 노루귀 및 섬노루귀의 2차 휴면타파 효과 구명

11월 15일 발근된 종자를 채집하여, 대조구인 수돗물, 처리구인 Gibberellic acid ( $GA_3$ )  $400mg \cdot L^{-1}$ ,  $GA_3$   $800mg \cdot L^{-1}$ ,  $GA_3$   $400mg \cdot L^{-1}$ + Fluridone  $100mg \cdot L^{-1}$ 에 5분간 침지한다. 침지 후, 사각 포트( $13cm \times 8cm$ )에 멸균된 녹소토 : 일반상토 (7:3, v/v) 배양토를 이용하여 정식하였다. 정식 후, 처리용액을 각 발근종자의 정단 부분에 1ml 씩 관주하고, 교내 연동온실의 차광망 안에 넣고 관찰 중에 있다(Fig. 3-3-18). 온도와 습도는 온습도 기록계(RHT20, Extech Instruments Co. USA)를 사용하여 측정하였고, 광도계(HD 9021, Delta OHM, Italy)를 사용하여 측정한 평균광도는  $40.61 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ 였다.



Fig. 3-3-18. Incubation in vinyl house (B) of emerged radicle treated with  $GA_3$  (A).

### (3) 결과 및 고찰

현재 실험 진행 중에 있으며 발근종자를 저온처리 및  $GA_3$ 처리를 통해 발아가 일어나는지 15°C에서 지켜보고 있다. 약 7주 정도 저온처리한 발근종자가 2주 경과해서 발아가기 시작했다. 계속 실험을 진행시키면 발아가 시작될 것이라고 여겨진다.

#### 4. 노루귀의 고품질 분화생산을 위한 환경조건 구명 및 축성재배기술 개발

##### 가. 노루귀 및 섬노루귀의 생육적정 광도 구명 실험

###### (1) 연구목적

노루귀와 섬노루귀는 이른 봄인 3-4월에 개화하며 이 후에 잎이 전개되고 여름이 되면 잎은 고사하고 꽃눈만 남아있고 늦가을이 되면 휴면에 들어간다. 자생지의 광도는 매우 낮아서, 노루귀와 섬노루귀는 음지에 적응이 되어 있다고 할 수 있다. 따라서 고품질의 분화를 생산하기 위해서는 적정광도를 구명할 필요가 있다. 또한 노루귀가 종자에서부터 개화할 수 있는 개화주로 성장하기까지 적어도 4년의 긴 생육기간이 필요하다. 노루귀를 분화 및 조경용으로 이용되는 원예작물로 만드는 데는 재배기간을 단축시킬 필요가 있다. 본 연구에서는 생육에 적합한 적정광도를 구명할 목적으로 실험을 수행하였다.

###### (2) 재료 및 방법

2011년 3월경에 'S 자생식물원'에서 구매한 노루귀 및 섬노루귀를 본 실험에 이용하였다. 마사 : 유기상토 : 녹소토(6:1:3, v/v/v) 배합토를 이용해 노루귀는 직경 11cm 플라스틱 포트에 5월 20일에 정식하였고, 섬노루귀는 4월 9일 직경12cm 포트에 정식하였다. 주 1회 하이포넥스(Hyponex, Japan) 1mL·L<sup>-1</sup>를 노루귀는 100mL/pot, 섬노루귀는 120mL/pot 처리하였다. 노루귀는 한 처리당 15포트씩 5처리구(배드밀 포함)를, 섬노루귀는 한처리당 26포트씩 총 4처리구를 수정된 난괴법을 이용하여 배치하였다. 광도를 조절하기 위해 차광율 35% 차광망 한겹이 외부에 덮여있는 교내 단동 비닐하우스에 차광망을 달리하여 광도를 달리하였다(Fig. 3-4-1). 대조구로는 무차광구, 30% 차광막 1겹, 30% 차광막 2겹, 90% 차광막 1겹인 실험구를 두었다. 그리고 노루귀는 그늘진 배드 밀을 추가로 두었다. 실제 차광율은 무차광 52±8%, 30% 차광막 1겹은 82.2±3.5%, 30% 차광막 2겹은 90.24%, 90% 차광막은 97.1±2.3%, 그리고 차광을 하지 않은 배드 밀은 98±0.1%로 온실 밖의 광도를 기준으로 하여 계산되었다. 광도측정은 광도계(HD 9021, Delta OHM, Italy)를 사용하여 측정하였다. 재배기간 동안 시설 내 온습도는 온습도 기록계(RHT20, Extech Instruments Co. USA)를 사용하여 측정하였다. 재배기간 중 일평균 온습도 변화는 Fig. 3-3-3과 같다.

섬노루귀는 총 2차례 생육조사를 수행하였다. 6월 16일 조사는 생존율, 엽수, 초장(실제로는 최장엽병 길이), 엽색을 조사하였고, 7월 13, 14일 조사는 생존율, 엽수, 초장, 초폭, 엽색, 지상부 및 지하부 생체중을 조사하였다. 노루귀는 6월 16일, 8월 2일~4일 총 2차례에 걸쳐 이루어졌고 조사항목은 섬노루귀와 동일하다. 엽색은 색차계(CR-400, Konica Minolta Sensing, Inc. Japan)을 사용하여 측정하였다.



Fig. 3-4-1. Shading setting using the layering of net (A) for determination of optimum shading rate to produce potted *H. asiatica* (B) and *H. maxima* plants (C).

### (3) 결과 및 고찰

#### (가) 차광정도가 노루귀의 생육과 품질에 미치는 영향

차광정도를 달리하여 노루귀를 4주간 재배한 후의 생육특성은 Table 3-4-1과 같다. 실험중 일부 노루귀가 아직 정확히 파악되진 않았지만 탄저병과 같은 병증이 생기면서 고사체가 발생하였다. 이러한 고사체는 차광율이 낮을수록 높게 나타나, 대조구(52% 차광)에서는 26.3%가 되었다. 90% 이상의 차광구에서는 고사율이 10%미만으로 생존율이 90%를 넘었다. 초장은 차광율이 높아질수록 길어지는 경향이 보였다 (Fig. 3-4-2). 기타 다른 생육특성 즉, 엽수, 엽색 등에서는 처리간 뚜렷한 경향이 보이지 않았다. 이러한 결과는 노루귀의 봄철 (5월-6월) 적정광도가 차광율 90% 이상이 되어야 한다는 것을 시사해 주었다.

차광정도를 달리하고 노루귀를 14주간 재배한 후 생육특성을 보면 Table 3-4-2와 같다. 생존율은 차광율이 높을수록 높고, 차광율이 낮아질수록 낮아지는 경향이 뚜렷하였다. 90% 이상의 차광율에서 80% 이상의 생존율을 나타내었다. 초장도 이와 비슷한 경향으로 차광율이 높을수록 초장이 길어지는 경향이 보였다. 엽수에서는 통계적인 유의성은 보이지 않았으나, 52%까지는 차광율이 낮을수록 엽수가 많아지는 경향이 보였다. 그러나 초폭과 엽색에서는 뚜렷한 경향이 보이지 않았다(Fig. 3-4-3).

Table 3-4-1. Effect of shading rate on the growth characteristics of *Hepatica asiatica* Nakai during the vegetative and reproductive stages (4 weeks after shading treatment May-July 2011).

| Shading net<br>(%, layers) | Shading rate<br>(%) | Survival rate <sup>z</sup><br>(%) | N  | No.<br>of leaves   | Plant height<br>(cm) | Leaf color, Hunter value |         |         |
|----------------------------|---------------------|-----------------------------------|----|--------------------|----------------------|--------------------------|---------|---------|
|                            |                     |                                   |    |                    |                      | L*                       | a*      | b*      |
| Control<br>(35% outside)   | 52                  | 73.7                              | 14 | 3.79a <sup>y</sup> | 5.31b                | 19.86a                   | -8.67b  | 12.01a  |
| 30                         | 1                   | 82                                | 12 | 2.83ab             | 4.76b                | 15.16b                   | -7.15a  | 9.44bc  |
|                            | 2                   | 90                                | 14 | 2.64b              | 5.69ab               | 19.60a                   | -7.32ab | 8.40c   |
| 90                         | 1                   | 97                                | 15 | 3.67a              | 7.41a                | 20.17a                   | -8.27ab | 10.50ab |
| Under the bed              |                     | 100                               | 19 | 2.89ab             | 5.51b                | 16.63ab                  | -8.26ab | 10.56ab |
| F-test                     |                     |                                   |    | 0.011              | 0.005                | 0.002                    | 0.041   | 0.000   |

<sup>z</sup>After the shading treatment for 4 weeks, survival rate was calculated from survived pots out of 15 ~ 19 pots.

<sup>y</sup>Data shown are means ±SE (n=12 to 19). Mean separation within columns by Tukey's multiple range,  $P = 0.1$

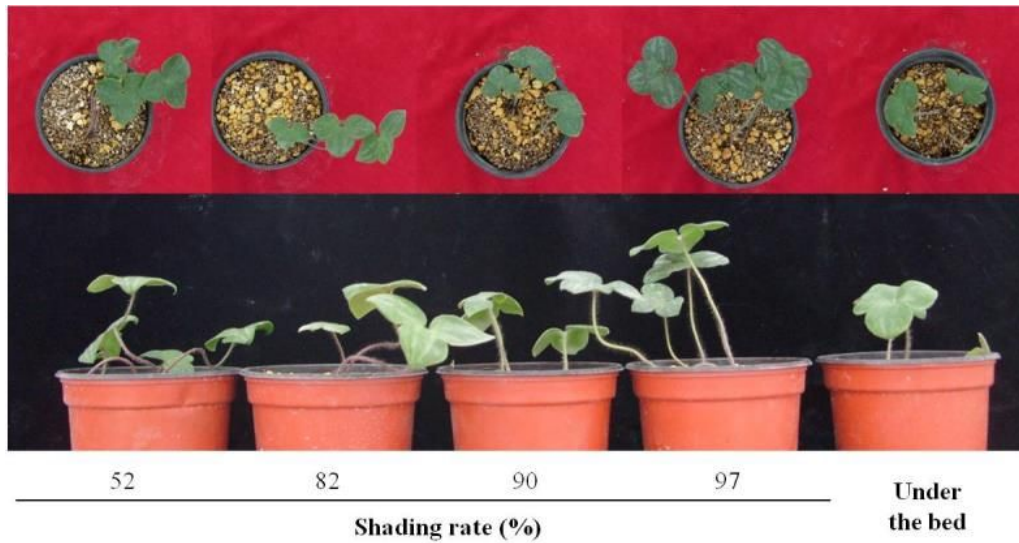


Fig. 3-4-2. Morphology of *H. asiatica* plant cultivated for 4 weeks under different shading rate.

Table 3-4-2. Effect of shading rate on the growth characteristics of *Hepatica asiatica* Nakai during the vegetative and reproductive stages (14 weeks after shading treatment).

| Shading net,<br>(%, layers) | Shading<br>rate<br>(%) | Survival<br>rate <sup>z</sup><br>(%) | N  | No. of<br>leaves   | Plant<br>height<br>(cm) | Plant<br>width<br>(cm) | Leaf color, Hunter value |         |        | Fresh weight<br>(g) |       |
|-----------------------------|------------------------|--------------------------------------|----|--------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|---------|--------|---------------------|-------|
|                             |                        |                                      |    |                    |                         |                        | L*                       | a*      | b*     | shoot               | root  |
| Control<br>(35% outside)    | 52                     | 65.0                                 | 12 | 3.08a <sup>y</sup> | 5.94b                   | 12.66a                 | 16.90a                   | -6.77ab | 9.64a  | 1.18a               | 4.32a |
| 30                          | 1                      | 82                                   | 11 | 2.64a              | 5.67b                   | 10.56a                 | 16.17a                   | -7.10b  | 8.87ab | 0.87a               | 2.94b |
|                             | 2                      | 90                                   | 13 | 2.62a              | 5.73b                   | 11.86a                 | 14.04a                   | -6.02a  | 6.54c  | 0.94a               | 2.17b |
| 90                          | 1                      | 97                                   | 12 | 3.25a              | 8.01a                   | 11.33a                 | 16.45a                   | -6.72ab | 8.14b  | 1.04a               | 2.30b |
| Under the bed               |                        | 89.5                                 | 17 | 2.41a              | 6.99ab                  | 10.00a                 | 14.59a                   | -6.74ab | 7.59bc | 0.75a               | 1.91b |
| F-test                      |                        |                                      |    | 0.344              | 0.011                   | 0.377                  | 0.286                    | 0.095   | 0.000  | 0.240               | 0.000 |

<sup>z</sup>After the shading treatment for 12 weeks, survival rate was calculated from survived pots of respective 15~19 pots.

<sup>y</sup>Data shown are means±SE (n=11 to 17). Mean separation within columns by Tukey's multiple range,  $P = 0.1$

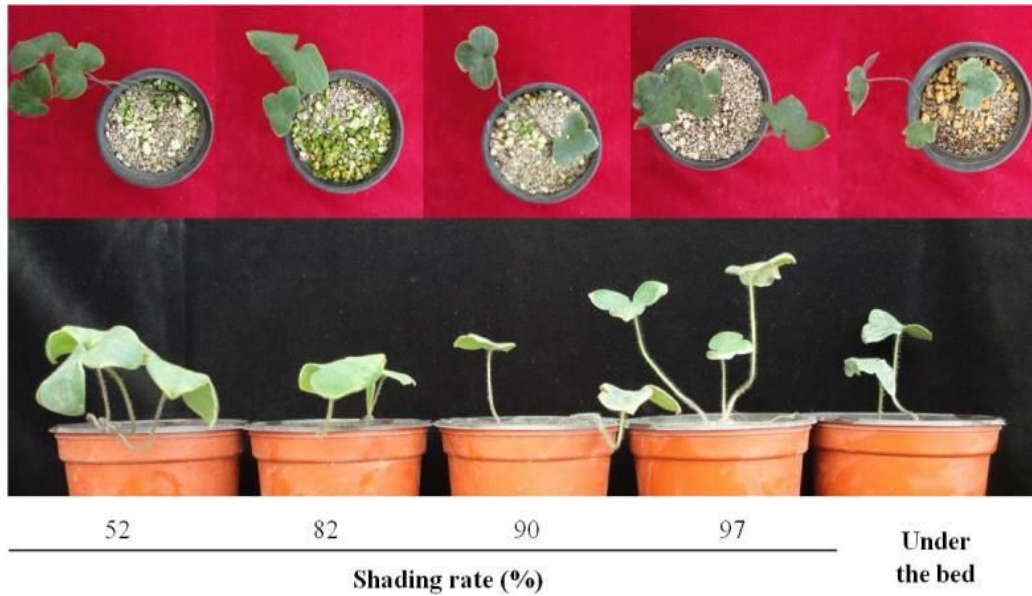


Fig. 3-4-3. Morphology of *H. asiatica* plant cultivated for 14 weeks under different shading rate.

(나) 차광정도가 섬노루귀의 생육과 품질에 미치는 영향

차광정도를 달리하고 섬노루귀를 9주간 재배한 후 생육특성은 Table 3-4-3와 같다. 생존율은 차광정도가 낮을수록 낮고 차광정도가 높을수록 생존율 또한 높아졌다. 대조구 (실제 차광율 52%)에서는 생존율이 52%까지 떨어졌으며 차광율 82%와 90%에서는 각각 90%와 85.7%를 나타내었다. 엽수와 초장 및 엽색에서는 처리간 유의적인 차이가 보이지 않았다(Fig. 3-4-4).

Table 3-4-3. Effect of shading rate on the growth characteristics of *Hepatica maxima* during the vegetative and reproductive stages (9 weeks after shading treatment).

| Shading net<br>(%, layers) | Shading<br>rate<br>(%) | Survival<br>rate <sup>z</sup><br>(%) | N  | No. of<br>leaves   | Plant<br>height<br>(cm) | Leaf color, Hunter value |         |        |
|----------------------------|------------------------|--------------------------------------|----|--------------------|-------------------------|--------------------------|---------|--------|
|                            |                        |                                      |    |                    |                         | L*                       | a*      | b*     |
| Control<br>(35% outside)   | 52                     | 53.8                                 | 14 | 1.86a <sup>y</sup> | 8.27a                   | 24.65a                   | -7.94a  | 13.30a |
| 30                         | 1                      | 82                                   | 27 | 2.00a              | 8.06a                   | 22.70a                   | -8.50ab | 12.13a |
|                            | 2                      | 90                                   | 24 | 1.92a              | 7.75a                   | 22.48a                   | -7.81ab | 11.41a |
| 90                         | 1                      | 97                                   | 21 | 1.76a              | 8.23a                   | 22.66a                   | -7.89b  | 11.05a |
| F-test                     |                        |                                      |    | 0.801              | 0.922                   | 0.578                    | 0.363   | 0.077  |

<sup>z</sup>After the shading treatment for 9 weeks, survival rate was calculated from survived pots of respective 26~30 pots.

<sup>y</sup>Data shown are means  $\pm$ SE (n=14 to 21). Mean separation within columns by Tukey's multiple range,  $P = 0.1$ .

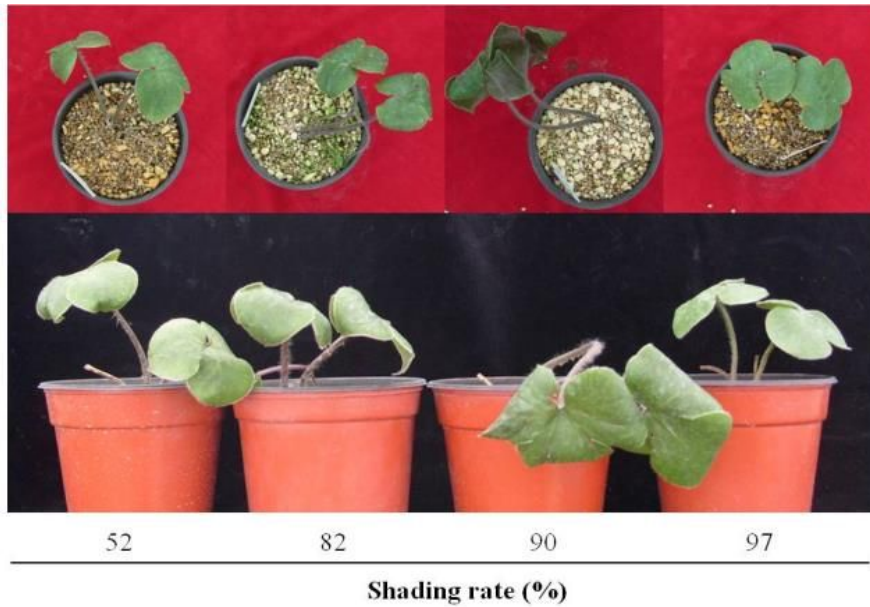


Fig. 3-4-4. Morphology of *H. maxima* plant cultivated for 9 weeks under different shading rate.

섬노루귀를 차광정도가 다른 조건하에서 12주간 재배한 후의 생육특성은 Table 3-4-4와 같다. 재배기간이 길어질수록 생존율은 크게 떨어졌으며, 차광율이 가장 낮은 대조구 (실제 차광율 52%)에서 생존율이 23%로 가장 낮았다. 82% 차광구에서는 생존율이 60%로 가장 높게 나타났으며, 52% 차광구에서 23% 가장 낮게 나타났다. 생체중, 엽수, 초장 그리고 초폭 등 조사한 생육특성에서 처리가 유의한 차이는 보이지 않았다. 엽색 또한 처리간 유의한 경향이 보이지 않았다(Fig. 3-4-5과 3-4-6)

Table 3-4-4. Effect of shading rate on the growth characteristics of *Hepatica maxima* during the vegetative and reproductive stages (12 weeks after shading treatment).

| Shading net<br>(%, layers) | Shading<br>rate<br>(%) | Survival<br>rate <sup>z</sup><br>(%) | N  | No. of<br>leaves   | Plant<br>height<br>(cm) | Plant<br>width<br>(cm) | Leaf color, Hunter value |         |         | Fresh weight (g) |       |
|----------------------------|------------------------|--------------------------------------|----|--------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|---------|---------|------------------|-------|
|                            |                        |                                      |    |                    |                         |                        | L*                       | a*      | b*      | shoot            | root  |
| Control<br>(35% outside)   | 52                     | 23.1                                 | 6  | 2.50a <sup>y</sup> | 8.35a                   | 13.83a                 | 19.50bc                  | -6.86ab | 12.87ab | 3.41a            | 2.65a |
| 30                         | 1                      | 82                                   | 18 | 1.89ab             | 7.60a                   | 13.13a                 | 24.69a                   | -8.93c  | 14.06a  | 2.82a            | 1.85a |
|                            | 2                      | 90                                   | 12 | 1.58b              | 8.46a                   | 13.19a                 | 18.63c                   | -6.40a  | 10.09c  | 2.57a            | 1.79a |
| 90                         | 1                      | 97                                   | 10 | 2.30ab             | 8.92a                   | 12.40a                 | 24.28ab                  | -8.45bc | 10.84bc | 3.38a            | 2.45a |
| F-test                     |                        |                                      |    | 0.058              | 0.464                   | 0.858                  | 0.003                    | 0.001   | 0.000   | 0.412            | 0.278 |

<sup>z</sup>After the shading treatment for 13 weeks, survival rate was calculated from survived pots of respective 26~30 pots.

<sup>y</sup>Data shown are means  $\pm$ SE (n=6 to 18). Mean separation within columns by Tukey's multiple range,  $P = 0.1$ .

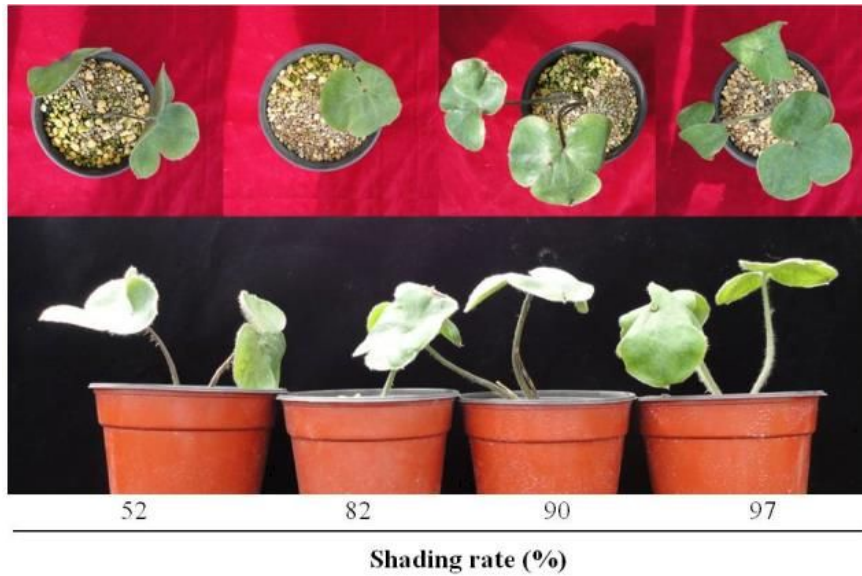


Fig. 3-4-5. Morphology of *H. maxima* plant cultivated for 12 weeks under different shading rate.

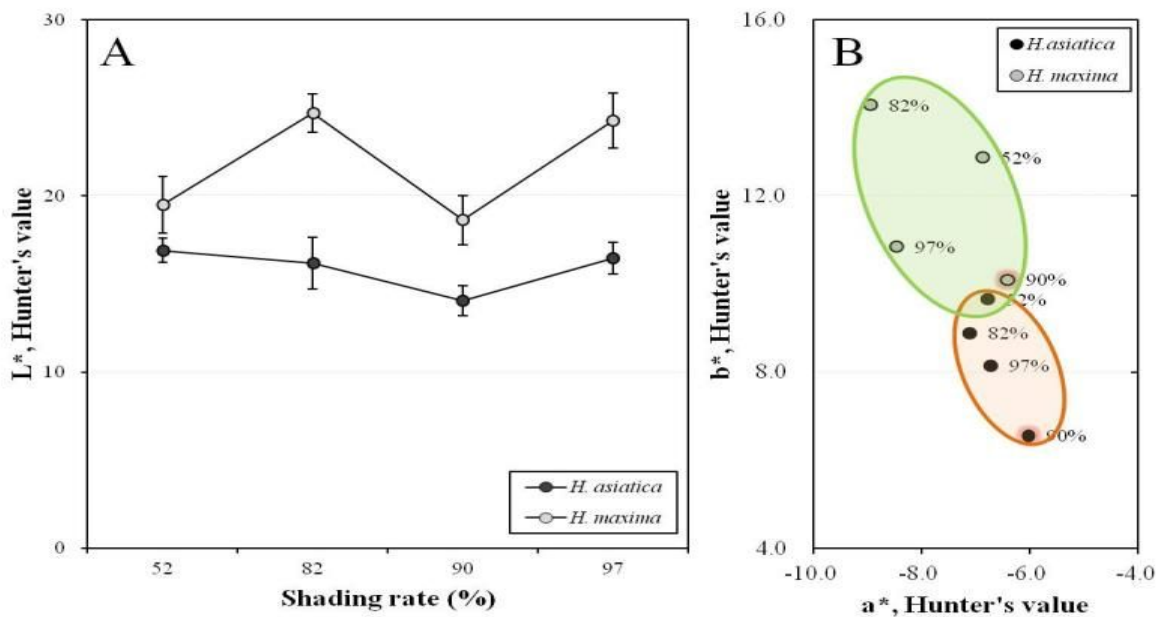


Fig. 3-4-6. Changes in leaf color of *H. asiatica* and *H. maxima* plants cultivated under different shading rate.

#### 나. 노루귀 및 섬노루귀의 적정 분용토 선발 실험.

##### (1) 연구목적

노루귀와 섬노루귀를 분화로 상품화하기 위해서는 적정 분용토를 선발할 필요가 있다. 노루귀의 뿌리 생육에는 통기성이 매우 중요한 것으로 알려져 있다. 일본의 노루귀 생산농가에서는 화산토의 일종인 녹소토를 주 재료로 하고 20% 정도만 비료분이 있는 다른 용토를 사용한다고 한다. 본 연구에서는 통기성과 투수성이 좋고 가격이 저렴한 마사토를 중심으로 녹소토와 모래 그리고 유비상토를 몇 가지 조합으로 혼용하여 실험을 수행하였다.



## (2) 재료 및 방법

2011년 3월경에 'S 자생식물원'에서 구매한 노루귀 및 섬노루귀를 본 실험에 이용하였다. 처리용토는 마사토 : 유비상토 : 녹소토(6:1:3, v/v/v), 모래 : 유비상토 : 녹소토 (5:3:2, v/v/v), 모래 : 유비상토 : 바크(5:2:3, v/v/v), 밝흙 : 모래(4:6, v/v/v) 배합으로 노루귀는 직경 11cm 비닐포트에 4월 20일에, 섬노루귀는 4월 10일 직경 12cm 포트에 정식하였다(Fig. 3-4-7). 한 처리당 20 포트 씩 총 4처리구로 수정된 난괴법을 이용하여 교내 단동(비닐)하우스에 배치하였다. 재배기간의 시설내 광도의 변화는 광도계(HD 9021, Delta OHM, Italy)를 사용하여 측정하였는데, 평균 광도는  $43.71\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 이었으며, 일평균 온도변화는 Fig. 3-3-3과 같다. 노루귀의 생육조사는 6월 16일과 8월 1~4일 두 차례에 걸쳐 실시하였다. 1차 생육조사는 생존율, 엽수, 초장, 엽색을 조사하였고, 2차 생육조사 생존율, 엽수, 초장, 초폭, 엽색, 지상부 및 지하부 생체중을 조사하였다. 섬노루귀는 실험도중 고사하여 생육조사를 수행할 수 없었다(Fig. 3-4-7C).



Fig. 3-4-7. Experiment to investigate effect of various potting mixture on the growth characteristics of *H. asiatica* (A) and *H. maxima* (B) plants; *H. maxima* plants withered by disease during the experiment (C).

## (3) 결과 및 고찰

### (가) 분용토가 노루귀의 생육에 미치는 영향

분용토를 달리하여 노루귀를 4주간 재배했을 때의 생존율은 모든 처리구에서 100%로 높게 나타났다 (Table 3-4-5). 엽수나 초장, 그리고 엽색에서도 처리간 유의한 차이가 보이지 않았다 (Fig. 3-4-8). 그러나 시간이 더 지나 10주 후에는 고사주가 발생하였으며, 처리간 생존율에서 차이가 많이 났다 (Table 3-4-6). 강모래 : 유비상토 : 바크(5:2:3, v/v/v)에서 93%로 생존율이 가장 높았으며, 마사토 : 유비상토 : 녹소토 (6:1:3)에서 88%로 그 다음으로 높았다. 그러나 강모래 : 유비상토 : 녹소토(5:3:2)에서는 46%로 생존율이 현저하게 떨어졌다. 엽수와 초폭에서는 마사토 : 유비상토 : 녹소토 (6:1:3)구에서 3.4장과 12.7cm로 가장 높게 나타났다. 생체중에서도 마사토 : 유비상토 : 녹소토 (6:1:3)구에서 1.2g으로 가장 높게 나타나, 노루귀의 생육에는 마사토 : 유비상토 : 녹소토 (6:1:3)구가 가장 적합토 : 녹소판단되었다. 엽색에서는 분용토간 유의한 차이가 보이지 않았다 (Fig. 3-4-9).

Table 3-4-5. Effect of potting mixture on the growth characteristics of *Hepatica asiatica* Nakai during the vegetative and reproductive stages (4 week cultivation after transplanting).

| Nursery potting mixture<br>(v/v/v or v/v) | Survival rate <sup>y</sup><br>(%) | N  | No. of leaves      | Plant height<br>(cm) | Leaf color, Hunter's value |        |       |
|---|-----------------------------------|----|--------------------|----------------------|----------------------------|--------|-------|
|   |                                   |    |                    |                      | L*                         | a*     | b*    |
| DG : FAM : KT<br>60 : 10 : 30             | 100                               | 15 | 3.67a <sup>x</sup> | 6.71a                | 14.25b                     | -7.72a | 9.35a |
| RS : FAM : KT<br>50 : 30 : 20             | 100                               | 13 | 3.15a              | 6.09a                | 12.71b                     | -7.65a | 9.01a |
| RS : FAM : BK<br>50 : 20 : 30             | 100                               | 15 | 3.07a              | 6.11a                | 13.19ab                    | -7.66a | 8.88a |
| UP : RS<br>40 : 60                        | 100                               | 15 | 3.80a              | 6.66a                | 17.54a                     | -7.73a | 9.49a |
| F-test                                    |                                   |    | 0.202              | 0.618                | 0.013                      | 0.998  | 0.856 |

<sup>z</sup>DG, decomposed granite; FAM, fertilizer-amended media; RS, river sand; KT, kanumatsuchi; BK, bark; UP, upland soil.

<sup>y</sup>After the growth for 4 weeks in various potting soil mixtures, survival rate was calculated from survived pots of respective 13~15 pots.

<sup>x</sup>Data shown are means±SE (n=13 to 15). Mean separation within columns by Tukey's multiple range, P = 0.1.

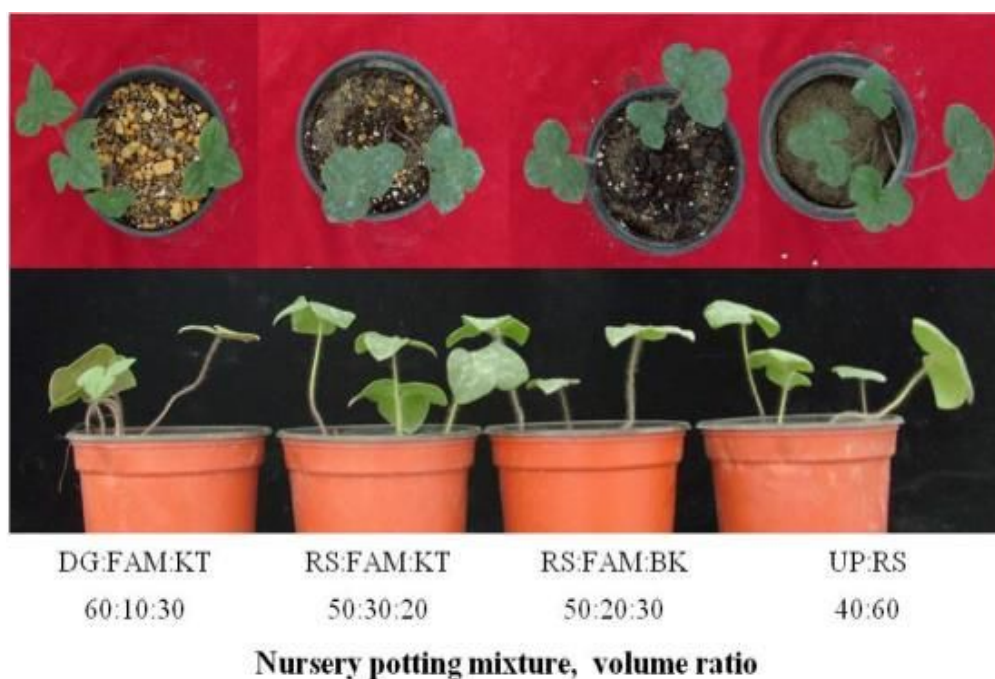


Fig. 3-4-8. Morphology of *H. asiatica* plant cultivated for 4 weeks after transplanting into various potting mixture.

Table 3-4-6. Effect of potting mixture on the growth characteristics of *Hepatica asiatica* Nakai during the vegetative and reproductive stages (10 week cultivation after transplanting into various potting mixture).

| Nursery potting mixture<br>(v/v/v or v/v) | Survival rate <sup>y</sup><br>(%) | N  | No. of leaves                  | Plant height<br>(cm) | Plant width<br>(cm) | Leaf color, Hunter value |        |       | Fresh weight (g) |       |
|---|-----------------------------------|----|--------------------------------|----------------------|---------------------|--------------------------|--------|-------|------------------|-------|
|   |                                   |    |                                |                      |                     | L*                       | a*     | b*    | shoot            | root  |
| DG : FAM : KT<br>60 : 10 : 30             | 86.7                              | 13 | 3.38 <sup>a</sup> <sup>x</sup> | 9.45a                | 12.72a              | 15.78a                   | -7.39a | 8.39a | 1.22a            | 0.38a |
| RS : FAM : KT<br>50 : 30 : 20             | 46.2                              | 6  | 2.17 <sup>bc</sup>             | 7.30ab               | 9.28 <sup>ab</sup>  | 10.88a                   | -6.48a | 7.14a | 0.65b            | 0.35a |
| RS : FAM : BK<br>50 : 20 : 30             | 93.3                              | 14 | 2.43ab                         | 6.98b                | 11.16ab             | 14.38a                   | -6.38a | 6.82a | 0.87ab           | 0.35a |
| UP : RS<br>40 : 60                        | 60.0                              | 9  | 1.22c                          | 9.52a                | 6.76b               | 13.54a                   | -6.79a | 7.81a | 0.50b            | 0.34a |
| F-test                                    |                                   |    | 0.000                          | 0.008                | 0.040               | 0.203                    | 0.246  | 0.164 | 0.015            | 0.932 |

<sup>z</sup>DG, decomposed granite; FAM, fertilizer-amended media; RS, river sand; KT, kanumatsuchi; BK, bark; UP, upland soil.

<sup>y</sup>After the growth for 4 weeks in various potting soil mixtures, survival rate was calculated from survived pots of respective 6~14 pots.

<sup>x</sup>Data shown are means±SE (n=6 to 14). Mean separation within columns by Tukey's multiple range,  $P = 0.1$ .

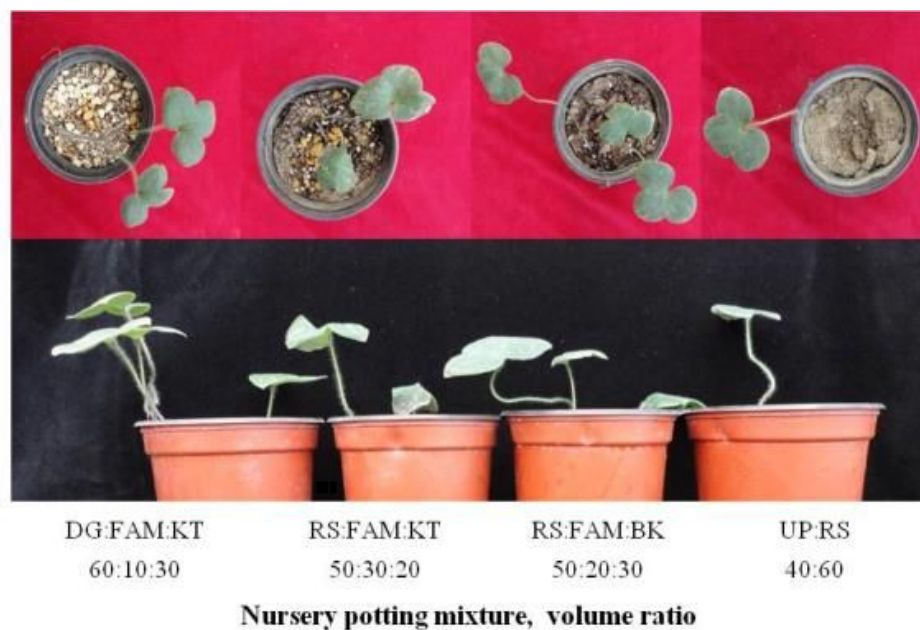


Fig. 3-4-9. Morphology of *H. asiatica* plant cultivated for 10 weeks after transplanting into various potting mixture.

(나) 분용토에 따른 섬노루귀의 생육특성 변화

본 실험은 재배 과정에서 생육조사 전에 식물체 모두가 병에 감염되어 고사됨으로써 생육조사를 수행할 수 없었다(Fig. 3-4-10).

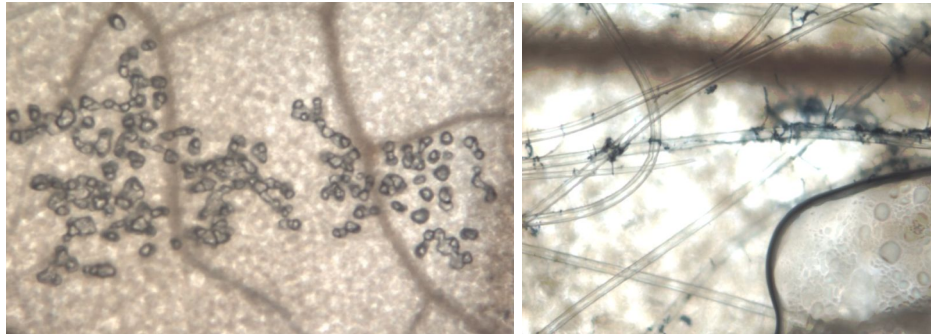


Fig. 3-4-10. Spores on leaf lesion of *H. maxima* plant observed under the microscope.

## 다. 노루귀 및 섬노루귀의 생육에 적합한 적정시비량 및 시비횟수 구명

### (1) 연구목적

노루귀와 섬노루귀를 분화로 생산하기 위해서는 재배기간을 단축시킬 필요가 있다. 이를 위해서는 효율적인 시비설계가 되어야 한다. 본 연구에서는 노루귀와 섬노루귀의 생육에 적절한 시비조건을 알아보고자 실험을 진행하였다.

### (2) 재료 및 방법

2011년 3월경에 'S 자생식물원'에서 구매한 노루귀 및 섬노루귀를 본 실험에 이용하였다. 마사 : 유비상토 : 녹소토 (6:1:3, v/v/v) 배합토를 이용하여 노루귀는 직경 11cm 플라스틱 포트에, 섬노루귀는 직경15cm 플라스틱 포트에 4월 10일에 정식하였다. 한 처리당 노루귀는 20포트씩, 섬노루귀는 24포트씩 총 5처리를 수정된 난피법을 이용하여 교내 단동 비닐온실에 배치하였다 (Fig. 4-3-1). 대조구는 수돗물을 주 1회 처리 하였고, 처리구는 1, 0.5ml·L<sup>-1</sup>의 하이포넥스 (Hyponex, Japan) 농도와 1주 1회, 2주 1회를 조합하여 처리하였다. 시비량은 노루귀는 100mL/pot, 섬노루귀는 250mL/pot 처리하였다. 4월 10일부터 5월 27일까지는 하이포넥스 육묘용 (N:P:K, 15:30:15)을 사용하였고, 5월 28일부터 실험종료일까지는 하이포넥스 생장용 (N:P:K, 20:20:20)을 처리하였다. 실험기간 동안 온실의 평균광도는 31.37 $\mu$ mol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>로 광도계(HD 9021, Delta OHM, Italy)를 사용하여 측정하였다. 시설내의 온습도변화는 앞의 재배실험과 동일하다.

노루귀와 섬노루귀는 총 3 차례 생육조사가 이루어졌다. 노루귀는 엽수, 결실된 종자수, 엽색을 5월 19일 1차 생육조사하였고, 6월 16일의 2차 생육조사는 생존율, 엽수, 초장, 엽색을 조사하였다. 9월 7~8일 마지막 생육조사는 생존율, 엽수, 초장, 초폭, 엽색, 지상부 및 지하부 생체중을 조사하였다. 섬노루귀는 노루귀의 1차, 2차 생육조사일과 조사항목이 같았다. 섬노루귀의 마지막 생육조사는 7월 22~26일 생존율, 엽수, 초장, 초폭, 엽색, 지상부 및 지하부 생체중을 조사하였다.

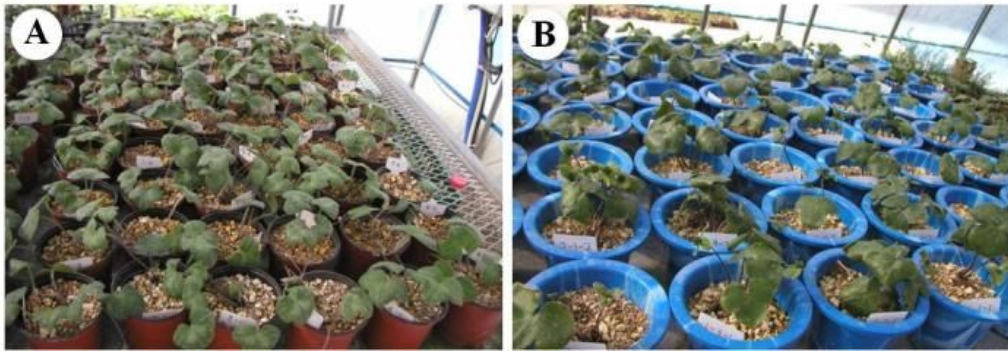


Fig. 3-4-11. Experiments to determine optimum application of nutrient during the cultivation of *H. asiatica* (A) and *H. maxima* (B) plants.

### (3) 결과 및 고찰

(가) 시비조건이 노루귀(*H. asiatica*)의 생육과 품질에 미치는 영향

실험개시 5주째의 생육조사에서는 생존율, 엽수 및 엽색에서 처리간 유의한 차이가 보이지 않았다 (Table 3-4-7, Fig. 3-4-12).

Table 3-4-7. Effect of nutrient application on the growth characteristics of *Hepatica asiatica* Nakai during the vegetative and reproductive stages (as applied differently with nutrients for 5 weeks).

| Nutrient application       |                        | Survival rate <sup>z</sup><br>(%) | No. of<br>leaves   | Leaf color, Hunter value |         |        |
|----------------------------|------------------------|-----------------------------------|--------------------|--------------------------|---------|--------|
| Interval                   | Diluted ratio,<br>fold |                                   |                    | L*                       | a*      | b*     |
| Control (no fertilization) |                        | 100                               | 4.80a <sup>y</sup> | 19.68a                   | -10.61a | 14.60a |
| 1 week                     | 1000                   | 90                                | 5.39a              | 20.83a                   | -10.36a | 13.54a |
|                            | 2000                   | 100                               | 5.40a              | 21.33a                   | -10.54a | 14.39a |
| 2 weeks                    | 1000                   | 95                                | 6.21a              | 22.64a                   | -10.52a | 14.03a |
|                            | 2000                   | 100                               | 4.85a              | 22.32a                   | -11.06a | 15.17a |
| F-test                     |                        |                                   | 0.258              | 0.400                    | 0.480   | 0.235  |

<sup>z</sup>After the growth for 6 weeks in various level of fertilization, survival rate was calculated from pots survived of respective 20 pots.

<sup>y</sup>Data shown are means±SE (n=19 to 20). Mean separation within columns by Tukey's multiple range,  $P = 0.1$

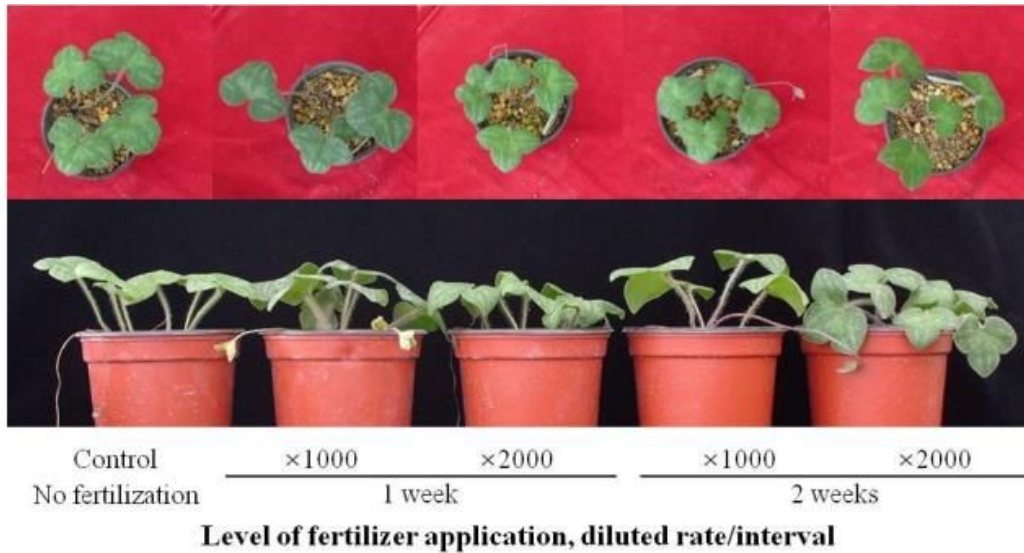


Fig. 3-4-12. Morphology of *H. asiatica* plant as applied differently with nutrients for 5 weeks.

실험개시 10주후 생육을 조사한 결과는 Table 3-4-8와 같다. 생존율은 모두 95%를 넘어 처리가 차이가 없었으며, 엽색에서 대조구에 비해 시비처리구에서 황색이 줄어든 특징외에는 엽수와 초장 등 다른 생육 및 품질 특성에서 처리간 차이가 보이지 않았다 (Fig. 3-4-13).

Table 3-4-8. Effect of nutrient application on the growth characteristics of *Hepatica asiatica* Nakai during the vegetative and reproductive stages (as applied differently with nutrients for 10 weeks).

| Nutrient application      |                       | Survival rate <sup>z</sup><br>(%) | No. of<br>leaves   | Plant height<br>(cm) | Leaf color, Hunter's value |         |        |
|---------------------------|-----------------------|-----------------------------------|--------------------|----------------------|----------------------------|---------|--------|
| Interval                  | Diluted rate,<br>fold |                                   |                    |                      | L*                         | a*      | b*     |
| Control, no fertilization |                       | 95                                | 4.32a <sup>y</sup> | 6.96a                | 15.56b                     | -7.92b  | 21.61a |
| 1 week                    | 1000                  | 95                                | 4.53a              | 7.28a                | 12.08c                     | -6.58a  | 6.80c  |
|                           | 2000                  | 100                               | 4.80a              | 6.89a                | 16.33b                     | -7.27ab | 8.03bc |
| 2 weeks                   | 1000                  | 95                                | 4.95a              | 6.61a                | 16.06b                     | -7.19ab | 7.86bc |
|                           | 2000                  | 100                               | 4.15a              | 7.07a                | 19.02a                     | -8.03b  | 9.13b  |
| F-test                    |                       |                                   | 0.543              | 0.799                | 0.000                      | 0.000   | 0.000  |

<sup>z</sup>After the growth for 10 weeks in various level of fertilization, survival rate was calculated from pots survived of respective 20 pots.

<sup>y</sup>Data shown are means±SE (n=19 to 20). Mean separation within columns by Tukey's multiple range, *P* = 0.1

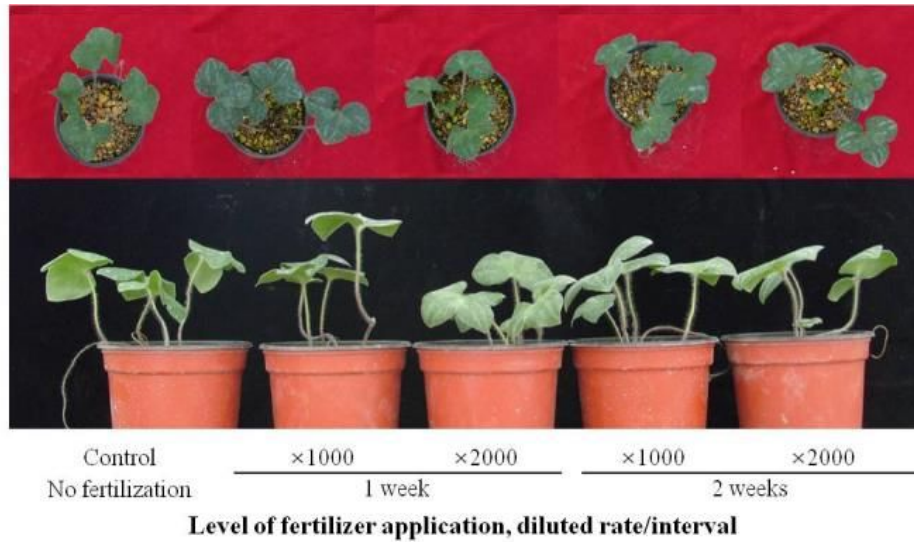


Fig. 3-4-13. Morphology of *H. asiatica* plant as applied differently with nutrients for 10 weeks.

다시, 실험개시 22주후에 생육을 조사한 결과는 Table 3-4-9 그리고 Fig. 3-4-14와 같다. 생존율에서는 대조구에서 95%로 높게 나타났고, 다른 시비처리구에서도 85% 이상으로 높게 나타났으나, 1,000배액 주 1회 처리에서만 65%로 생존율이 낮게 나타났는데, 이는 재배상의 문제였던 것으로 판단된다. 엽수, 초장, 초폭 등에서 처리간 유의한 차이는 보이지 않았다. 엽색에서는 실험개시 5주째까지는 변화가 없었으나, 시간이 지남에 따라 액비의 농도가 높고 처리횟수가 많음에 따라 엽색이 짙어지는 경향이 보였다(Fig. 3-4-14, 3-4-15).

Table 3-4-9. Effect of nutrient application on the growth characteristics of *Hepatica asiatica* Nakai during the vegetative and reproductive stages (as applied differently with nutrients for 22 weeks).

| Nutrient application |                     | Survival rate <sup>z</sup> (%) | No. of leaves      | Plant height (cm) | Plant width (cm) | Leaf color, Hunter's value |         |        | Fresh weight (g) |       |
|----------------------|---------------------|--------------------------------|--------------------|-------------------|------------------|----------------------------|---------|--------|------------------|-------|
| Interval             | Diluted rate (fold) |                                |                    |                   |                  | L*                         | a*      | b*     | Shoot            | Root  |
| Control,             | no fertilization    | 95                             | 4.21a <sup>y</sup> | 8.22a             | 15.00a           | 16.21a                     | -7.28c  | 7.99a  | 2.52a            | 6.64a |
| 1 week               | 1000                | 65                             | 4.62a              | 7.60a             | 15.38a           | 13.46bc                    | -5.42a  | 5.45c  | 2.71a            | 6.93a |
|                      | 2000                | 90                             | 4.44a              | 7.57a             | 13.00a           | 11.56c                     | -5.59ab | 5.65bc | 2.24a            | 5.88a |
| 2 weeks              | 1000                | 90                             | 4.72a              | 8.04a             | 14.54a           | 13.14bc                    | -5.74ab | 5.98bc | 2.60a            | 6.78a |
|                      | 2000                | 85                             | 4.24a              | 7.21a             | 14.56a           | 14.59ab                    | -6.31b  | 6.84ab | 2.61a            | 6.18a |
| F-test               |                     |                                | 0.834              | 0.409             | 0.401            | 0.000                      | 0.000   | 0.000  | 0.780            | 0.799 |

<sup>z</sup>After the growth for 23 weeks in various level of fertilization, survival rate was calculated from pots survived of respective 20 pots.

<sup>y</sup>Data shown are means ±SE (n=13 to19). Mean separation within columns by Tukey's multiple range, *P* = 0.1.

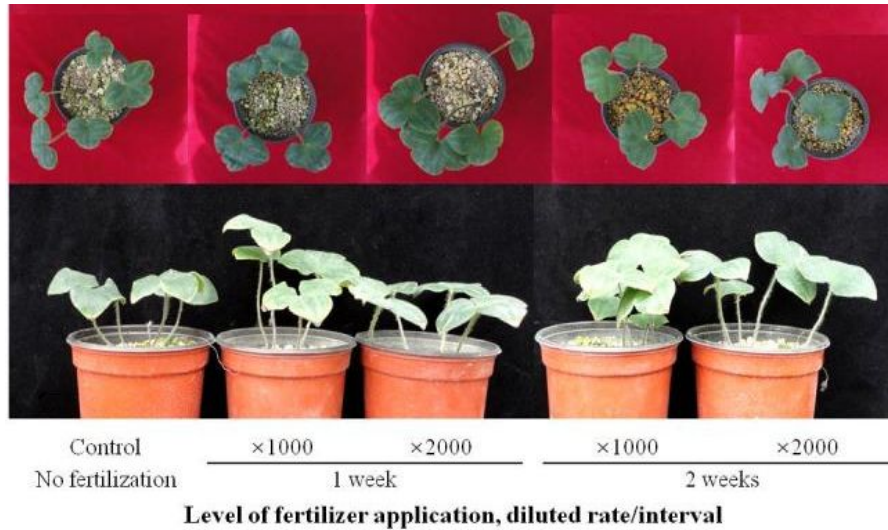


Fig. 3-4-14. Morphology of *H. asiatica* plant as applied differently with nutrients for 22 weeks.

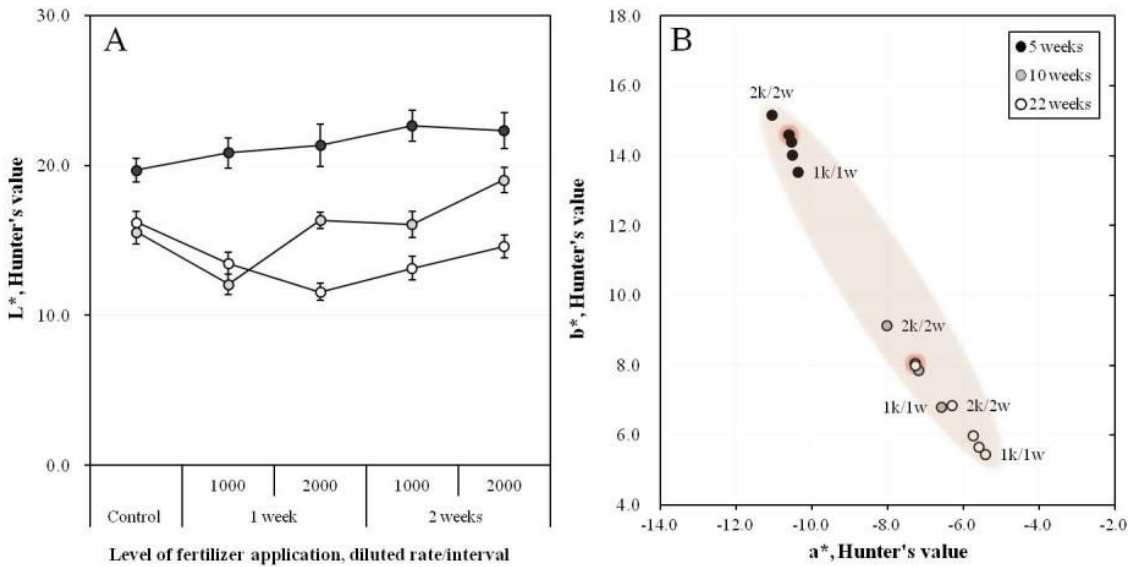


Fig. 3-4-15. Effect of different application of nutrient on leaf colour of *Hepatica asiatica* plants during the vegetative and reproductive stages.

(나) 시비 조건이 섬노루귀(*H. maxima*)의 생육과 분화품질에 미치는 영향

시비 조건을 달리하여 섬노루귀를 5주간 재배했을 때 그 결과는 Table 3-4-10과 같다. 생존율은 대조구에서 89%로 다소 낮았으며 시비처리구에서는 모두 90% 이상으로 높게 나타났다. 엽수에서는 처리간 차이가 없었고 화색도 처리간 뚜렷한 경향이 보이지 않았다 (Fig. 3-4-16). 실험개시 후 10주 지나서 생육을 조사한 결과는 Table 3-4-11와 같다. 생존율에서 모든 처리구에서 80±9%로 처리간 차이가 보이지 않았고, 엽수와 엽색에서도 유의적인 차이가 보이지 않았다 (Fig. 3-4-17). 실험 개시 15주 후의 생육특성은 Table 3-4-3-5와 같다. 생존율은 실험개시 10주 때의 결과와 비슷하게 나타났고 엽수, 초장, 초폭 등에서도 처리간 유의한 차이는 보이지 않았다 (Fig. 3-4-18). 엽색에서는 5주째에는 시비처리에 의해 엽색이 짙어지는 경향이 보였으나, 10



주 15주째에는 엽색의 차이가 보이지 않았다 (Fig. 3-4-19). 노루귀와 섬노루귀의 엽색 변화를 비교해 보면 시비농도와 시비횟수에 따라 엽색이 짙어지는 경향은 노루귀에서 더 현저하게 나타났고, 섬노루귀에서는 뚜렷한 변화가 보이지 않았다(Fig. 3-4-20). 이러한 결과로 볼 때, 섬노루귀는 시비의 많고 적음에 크게 영향을 받지 않는 식물인 것으로 보인다.

Table 3-4-10. Effect of different application of nutrient on the growth characteristics of *Hepatica maxima* during the vegetative and reproductive stages (as applied with nutrient for 5 weeks).

| Nutrient application       |                        | Survival rate <sup>z</sup><br>(%) | No. of leaves      | Leaf color, Hunter's value |         |         |
|----------------------------|------------------------|-----------------------------------|--------------------|----------------------------|---------|---------|
| Interval                   | Diluted rate<br>(fold) |                                   |                    | L*                         | a*      | b*      |
| Control (no fertilization) |                        | 87.5                              | 4.10a <sup>y</sup> | 25.36a                     | -9.40b  | 11.96a  |
| 1 week                     | 1000                   | 91.7                              | 4.09a              | 23.74ab                    | -8.94b  | 10.85ab |
|                            | 2000                   | 91.7                              | 4.95a              | 16.39c                     | -8.01ab | 10.03b  |
| 2 weeks                    | 1000                   | 95.8                              | 4.26a              | 19.12c                     | -7.88a  | 9.66b   |
|                            | 2000                   | 100.0                             | 4.08a              | 20.01bc                    | -8.58a  | 10.93ab |
| F-test                     |                        |                                   | 0.152              | 0.000                      | 0.000   | 0.001   |

<sup>z</sup>After the growth for 5 weeks in various level of fertilization, survival rate was calculated from pots survived of respective 24 pots.

<sup>y</sup>Data shown are means ±SE (n=21 to 24). Mean separation within columns by Tukey's multiple range,  $P = 0.1$

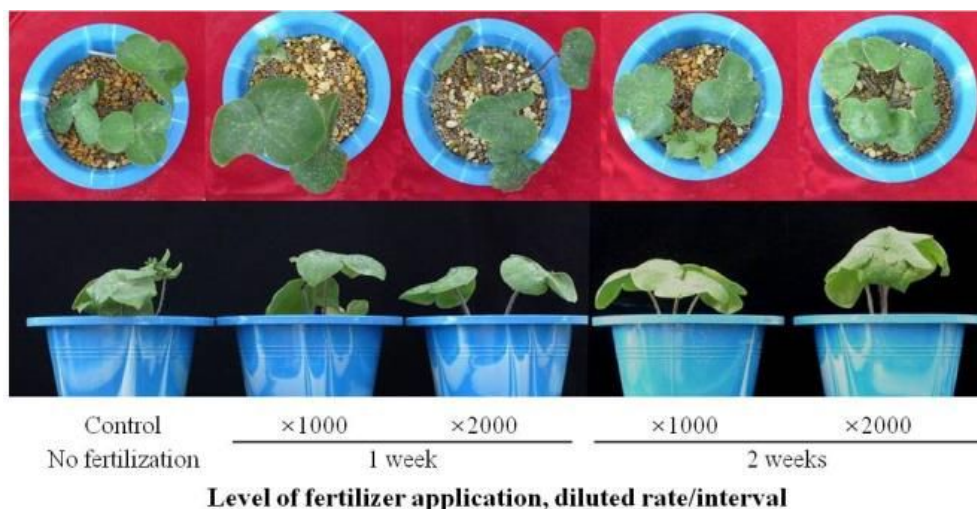


Fig. 3-4-16. Morphology of *H. maxima* plant as applied differently with nutrients for 5 weeks.

Table 3-4-11. Effect of different application of nutrient on the growth characteristics of *Hepatica maxima* plant during the vegetative and reproductive stages (as applied with nutrient for 10 weeks).

| Nutrient application      |                        | Survival rate <sup>z</sup><br>(%) | No. of leaves      | Plant height<br>(cm) | Leaf color, Hunter's value |         |        |
|---------------------------|------------------------|-----------------------------------|--------------------|----------------------|----------------------------|---------|--------|
| Interval                  | Diluted rate<br>(fold) |                                   |                    |                      | L*                         | a*      | b*     |
| Control, no fertilization |                        | 79.2                              | 2.21a <sup>y</sup> | 9.06a                | 14.54a                     | -7.34ab | 8.56ab |
| 1 week                    | 1000                   | 79.2                              | 2.47a              | 9.91a                | 14.95a                     | -6.87a  | 7.75b  |
|                           | 2000                   | 75.0                              | 2.50a              | 9.50a                | 14.87a                     | -7.13ab | 8.37ab |
| 2 weeks                   | 1000                   | 87.5                              | 1.95a              | 8.60a                | 17.56a                     | -7.14ab | 8.30ab |
|                           | 2000                   | 79.2                              | 2.32a              | 9.23a                | 16.66a                     | -7.77b  | 8.94a  |
| F-test                    |                        |                                   | 0.524              | 0.414                | 0.254                      | 0.045   | 0.105  |

<sup>z</sup>After the growth for 10 weeks in various level of fertilization, survival rate was calculated from pots survived of respective 24 pots.

<sup>y</sup>Data shown are means  $\pm$ SE (n=19 to 21). Mean separation within columns by Tukey's multiple range,  $P = 0.1$

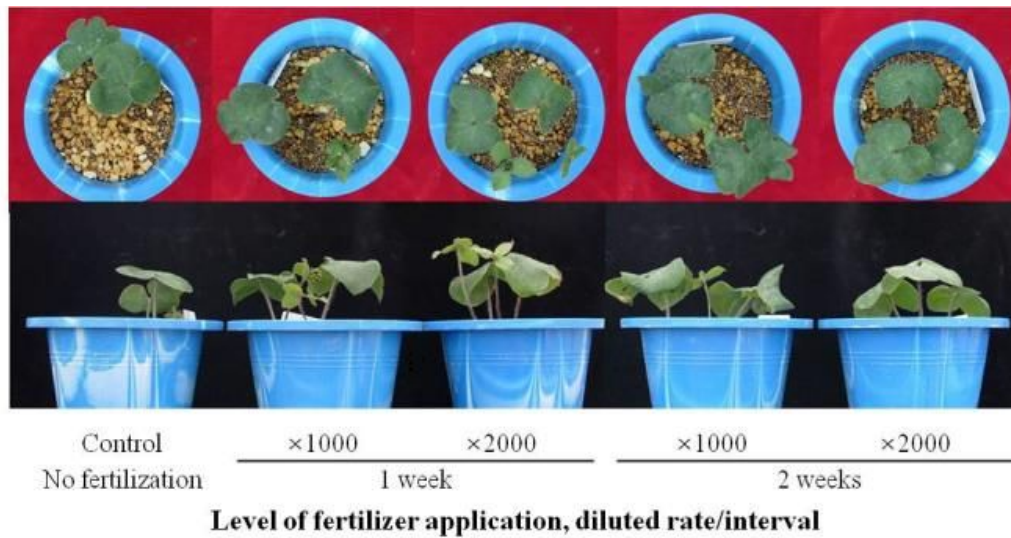


Fig. 3-4-17. Morphology of *H. maxima* plant as applied differently with nutrients for 10 weeks.

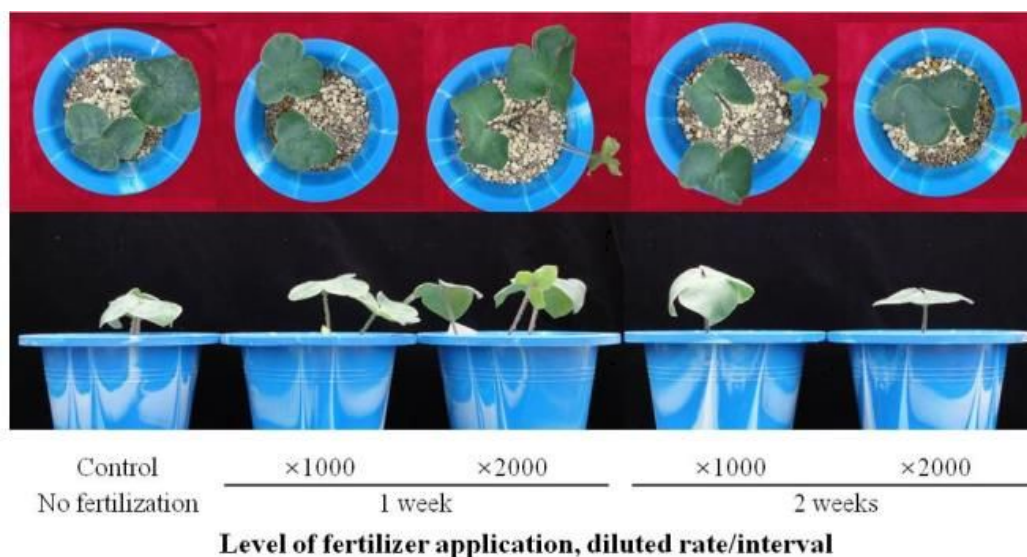


Fig. 3-4-18. Morphology of *H. maxima* plant as applied differently with nutrients for 15 weeks.

Table 3-4-12. Effect of different application of nutrient on the growth characteristics of *Hepatica maxima* during the vegetative and reproductive stages (as applied with various levels of nutrient for 15 weeks).

| Nutrient application      |                     | Survival rate <sup>z</sup> (%) | No. of leaves | Plant height (cm) | Plant width (cm) | Leaf color, Hunter's value |         |        | Fresh weight (g) |        |
|---------------------------|---------------------|--------------------------------|---------------|-------------------|------------------|----------------------------|---------|--------|------------------|--------|
| Interval                  | Diluted rate (fold) |                                |               |                   |                  | L*                         | a*      | b*     | Shoot            | Root   |
| Control, no fertilization |                     | 79.2                           | 2.26a         | 9.24a             | 15.06ab          | 17.94a                     | -7.52c  | 8.89a  | 5.01a            | 9.92a  |
| 1 week                    | 1000                | 75.0                           | 2.44a         | 9.76a             | 16.39a           | 15.87ab                    | -5.81a  | 6.39c  | 6.00a            | 10.76a |
|                           | 2000                | 78.3                           | 2.56a         | 10.13a            | 15.74ab          | 16.26ab                    | -6.41ab | 6.96bc | 5.99a            | 9.33a  |
| 2 weeks                   | 1000                | 87.5                           | 2.00a         | 9.54a             | 12.72b           | 14.47b                     | -6.19ab | 6.77bc | 4.67a            | 9.25a  |
|                           | 2000                | 79.2                           | 2.42a         | 9.65a             | 13.99ab          | 15.14ab                    | -6.66b  | 7.51b  | 5.06a            | 10.10a |
| F-test                    |                     |                                | 0.573         | 0.809             | 0.082            | 0.038                      | 0.000   | 0.000  | 0.276            | 0.534  |

<sup>z</sup>After the growth for 15 weeks in various level of fertilization, survival rate was calculated from pots survived of respective 24 pots.

<sup>y</sup>Data shown are means  $\pm$ SE (n=18 to 21). Mean separation within columns by Tukey's multiple range,  $P = 0.1$ .

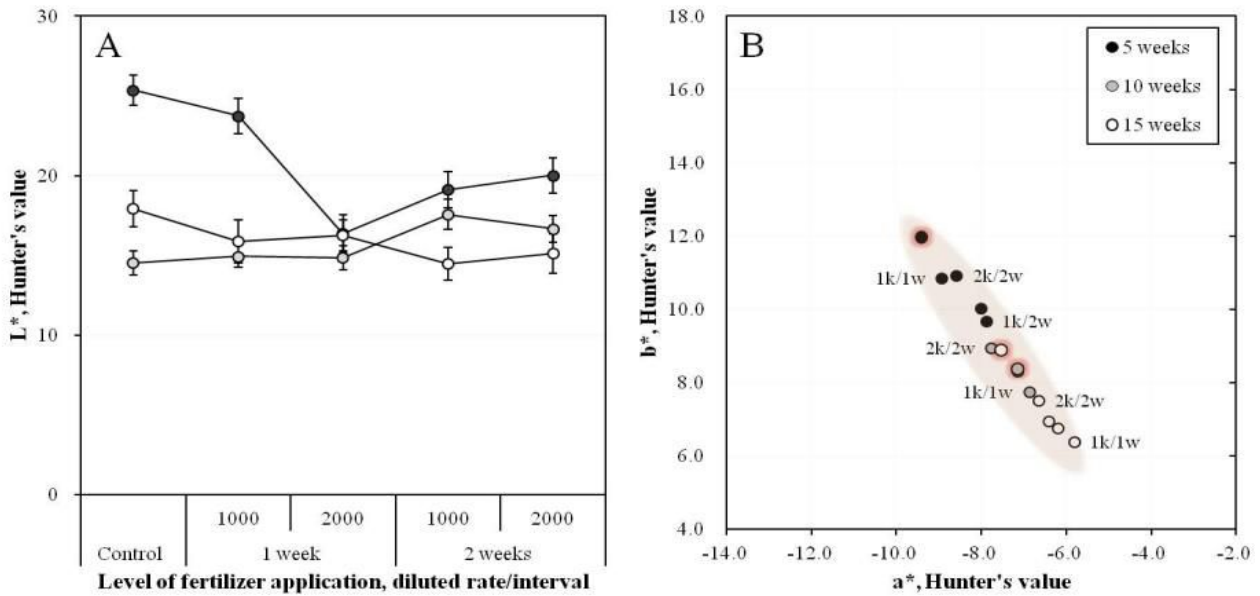


Fig. 3-4-19. Effect of different application of nutrient on leaf colour of *Hepatica maxima* plants during the vegetative and reproductive stages.

#### (4) 결과 요약 및 금후 계획

이상의 결과들로부터 노루귀와 섬노루귀 모두 광도에 매우 민감한 종류임을 알 수 있었다. 5월부터 여름을 지날 때까지는 80% 이상 차광을 해주어야 고사체가 나오지 않고 건강하게 생육할 수 있음을 알 수 있었다. 분용토로는 노루귀의 경우 마사토 : 유기상토 : 녹소토(6:1:3, v/v/v)에서 생존율과 생체중이 가장 높게 나와, 가장 적합한 용토인 것으로 판단되었다. 적정 시비 조건에 대해서는 노루귀와 섬노루귀 모두에서 모든 시비처리구에서 대조구와 유의적인 차이가 보이지 않아, 이 식물들은 시비에 대해서는 매우 둔감한 종류임을 알 수 있었다.

본 연구를 진행하는 과정에서 노루귀의 경우 병에 의해 고사되는 일이 적지 않게 발생하였는데, 금 후 이 병이 어떤 병인지 파악하고 이 병이 발생하지 않는 환경조건을 구명하는 일을 할 필요가 있다고 사료된다. 또한 실험을 수행할 때, 한 포트에 식물체 한 주씩만 사용했는데, 금후 실험시에는 2주씩 식재하여 실험을 수행할 필요가 있다고 판단되었다.

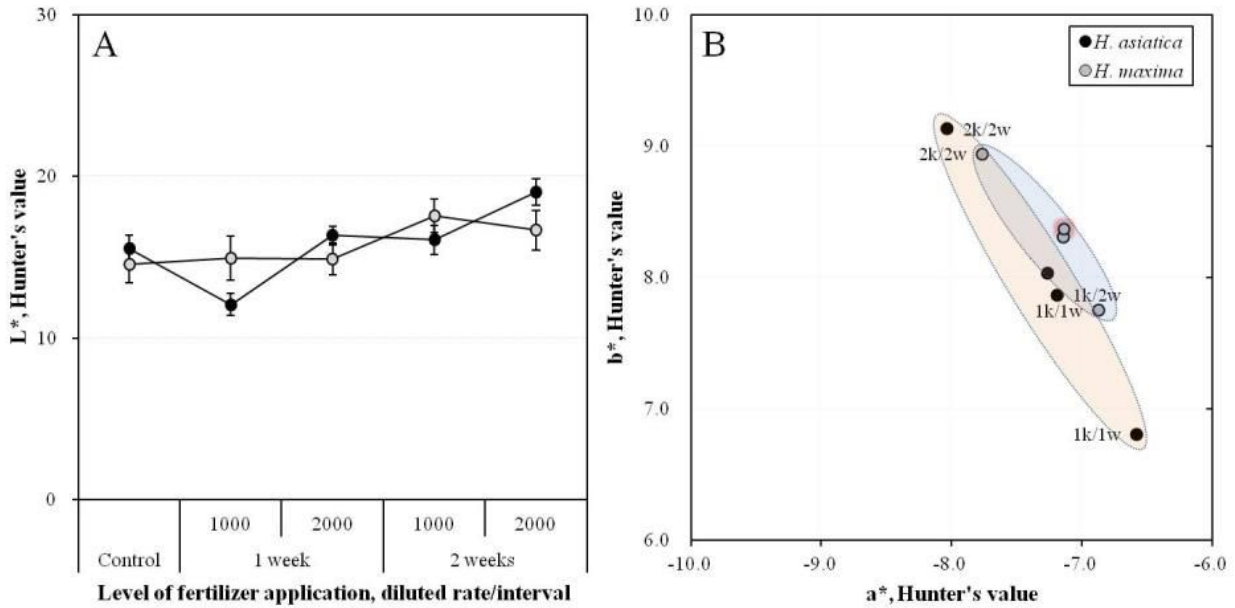


Fig. 3-4-20. Changes in leaf colour of *H. asiatica* and *H. maxima* plants during the vegetative and reproductive stages as applied nutrient for 10 weeks .

## 라. 노루귀와 섬노루귀 축성재배를 위한 저온처리 효과 구명실험

### (1) 연구목적

토속 노루귀와 섬노루귀의 분화를 연중출하하기 위해서는 휴면기작을 파악하고 휴면을 인위적으로 타파할 수 있는 기술을 개발할 필요가 있다. 본 실험에서는 휴면타파에 필요한 저온조건이 어떻게 되는지를 알아보기 위해 실험을 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

비가운 단동 비닐온실에서 마사토 : 유기상토 : 녹소토(6:1:3, v/v/v)의 배합토로 재배된 노루귀와 섬노루귀는 5℃ 항온기에 입실시기를 달리하여 저온처리를 하였다. 실험은 2011년 11월 15일 저온처리를 시작하여 , 자연상태, 저온처리 없이 온실에 입실한 처리구, 15일, 30일 45일 저온처리 후 가온 연동 비닐온실에 입실시켰다(5처리, 10포트/처리). 섬노루귀는 2011년 11월 21일 시작하여 자연상태, 저온처리 없이 온실에 입실한 처리구, 15일, 30일 45일 저온처리 후 가온 연동 비닐온실에 입실시켰다(5처리, 12포트/처리). 저온처리를 위한 항온기의 온도는 5±1℃, 습도는 70±2%로 유지되었다. 입실시켜 재배한 시설환경은 최저 온도13℃, 습도71%, 광도는 25.14 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>이다. 관수는 1주에 한번 두상관수 하였다. 각 저온처리구별로 맹아일과 맹아소요일수를 조사하였다.

교내 단동(비닐)온실에서 재배하였다(Fig. 3-4-21). 7월 14일 재배한 섬노루귀의 엽을 제거하고, 증류수로 적신 paper로 뿌리를 감싼 뒤, 항온기에 넣고, 1.3℃ 약 150일간 저온처리하였다. 12월 5일 맹아된 섬노루귀를 직경 12cm 포트에 마사토 : 유기상토 : 녹소토(6:1:3, v/v/v) 배합토를 이용하여 정식하였다. 정식한 섬노루귀는 교내 연동온실의 차광망 안에 수정된 난괴법으로 배치하였다. 대조구는 수돗물을, 처리구는 50, 100mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> 을 각각 10mL씩 점적 두상 관

수하여 처리하였다. 처리 1주일 후, 하이포넥스  $1.5\text{ml}\cdot\text{L}^{-1}$ 를 처리하였고, 12월 12일 엽이 나오기 시작할 때, 관수대신 하이포넥스  $0.7\text{ml}\cdot\text{L}^{-1}$ 를 시비하였다. 시비는 15일에 1회 두상 관수하였다.

### (3) 결과 및 고찰

자연 저온처리기간이 길어질수록 맹아소요 일수는 짧아졌다. 11월 15일 입실한 노루귀가 맹아하는데는 36일 정도 걸렸으나 12월 30일 입실한 노루귀는 12일 정도 걸렸다(Table 3-4-13). 맹아율도 저온처리기간이 길수록 높아지는 경향이 보였다(Fig. 3-4-23). 섬노루귀도 비슷한 경향을 보였는데, 자연 저온처리기간이 길수록 맹아소요일수는 짧아졌다(Fig. 3-4-23). 11월 21일 입실한 섬노루귀의 맹아소요일수는 33일이었으나 다음해 1월 5일 입실한 섬노루귀는 맹아하는데 4일밖에 걸리지 않았다(Table 3-4-14). 맹아율도 자연 저온처리기간이 길수록 높아지는 경향이 나타났다. 맹아되는 모습은 Fig. 3-4-22과 같다.

화아분화되기 전에 저온처리해 두었던 섬노루귀 묘에  $\text{GA}_3$ 를 처리하여 맹아소요일수와 맹아율을 조사한 결과는 Table 3-4-1과 같다. 처리된 노루귀를 가온 하우스에 옮겨놓자 7일 이내에 모든 처리구에서 맹아가 이루어졌으며 맹아율은  $\text{GA}_3$  농도가 높아질수록 떨어지는 경향이 나타났다 (Fig. 3-4-4-3).  $\text{GA}_3$ 에 의해 맹아가 억제되는지에 대해서는 금후 추가실험이 필요하다고 판단되었다.

Table 3-4-13. Effect of chilling days at  $4^\circ\text{C}$  on bud germination of *H. asiatica* plants.

| Date into greenhouse | Period of chilling treatment (days) | Days to sprouting <sup>z</sup>  | Sprouting percentage |
|----------------------|-------------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| Control <sup>y</sup> | 0                                   | -                               | 0                    |
| Nov. 15              | 0                                   | $35.7\pm 1.7^x$ (Dec. 21, 2011) | 70                   |
| Nov. 30              | 15                                  | $25.6\pm 5.0$ (Dec. 26, 2011)   | 80                   |
| Dec. 15              | 30                                  | $13.5\pm 4.0$ (Dec. 29, 2011)   | 80                   |
| Dec. 30              | 45                                  | $12.4\pm 0.7$ (Jan. 11, 2012)   | 50                   |

<sup>z</sup>Days to sprouting after translocating into greenhouse.

<sup>y</sup>Kept staying in nonheated plastic-house

<sup>x</sup>Mean $\pm$ SE

Table 3-4-14. Effect of chilling days at  $4^\circ\text{C}$  on bud germination of *H. maxima* plants.

| Date into greenhouse | Period of chilling treatment (days) | Days to sprouting <sup>z</sup> | Sprouting percentage |
|----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|----------------------|
| Control <sup>y</sup> | 0                                   | 32.3±0.7y(Dec. 23)             | 83                   |
| Nov. 21              | 0                                   | 33.3±0.8 (Dec. 24)             | 67                   |
| Dec. 06              | 15                                  | 21.0±1.5 (Dec. 27)             | 83                   |
| Dec. 21              | 30                                  | 3.3±0.6 (Dec. 24)              | 90                   |
| Jan. 05              | 45                                  | 4.0±0.0( Jan. 9)               | 71                   |

<sup>z</sup>Days to sprouting after translocating into greenhouse.

<sup>y</sup>Kept staying in nonheated vinyl-house

<sup>x</sup>Mean±SE



Fig. 3-4-21. Sprouting form *H. asiatica* (A) and *H. maxima* (B) plants.

Table 3-4-15. Effect of GA<sub>3</sub> treatment on bud germination in *H. maxima* plants with chilling days before flower bud differentiation

| GA <sub>3</sub> treatment             | Days to sprouting <sup>z</sup>  | Sprouting percentage |
|---------------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| Control <sup>y</sup>                  | 6.0±0.79 <sup>x</sup> (Dec. 15) | 80                   |
| GA <sub>3</sub> 50mg·L <sup>-1</sup>  | 6.3±1.01(Dec. 15)               | 60                   |
| GA <sub>3</sub> 100mg·L <sup>-1</sup> | 7.0±1.75(Dec. 16)               | 40                   |

<sup>z</sup>Days to sprouting after translocating into greenhouse.

<sup>y</sup>Kept staying in nonheated vinyl-house.

<sup>x</sup>Mean±SE.

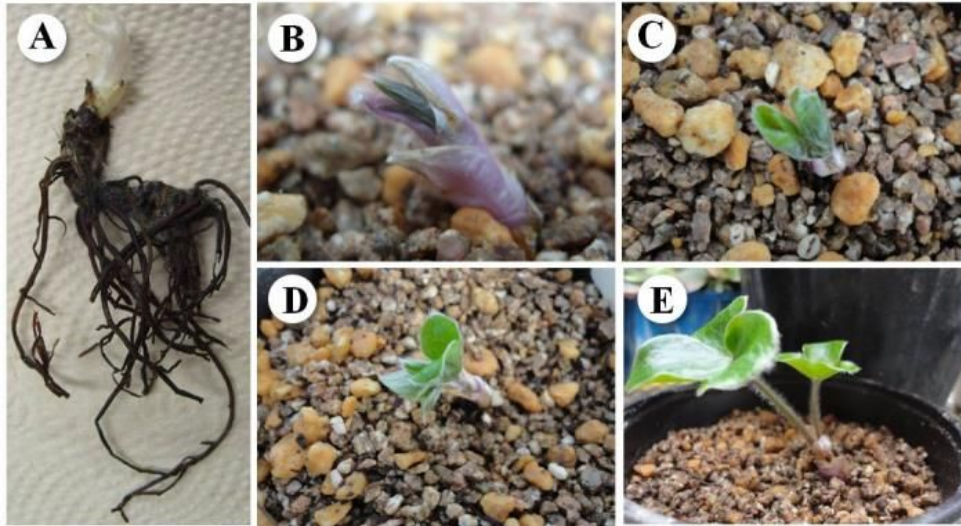


Fig. 3-4-22. 화아가 미분화된 섬노루귀 저온처리 12주 후 (A), 가온 온실로 옮긴 후 엽발생(B, C) 및 전개(D, E) 모습.

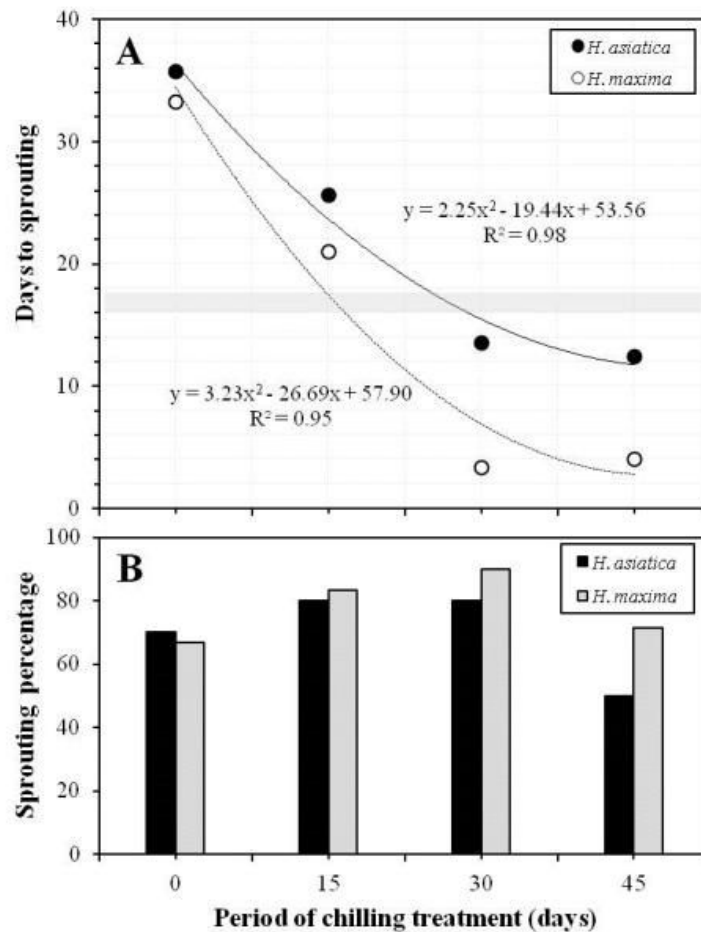


Fig. 3-4-23. Bud germination (sprouting) for floral initiation affected by chilling treatment in *H. asiatica* and *H. maxima* plants.

#### (4) 결과요약 및 금후계획



자연저온 처리기간을 달리하여 노루귀와 섬노루귀의 맹아소요일수와 맹아율을 조사한 결과, 저온처리기간이 길수록 맹아소요일수가 짧아지고 맹아율은 높아지는 것을 알 수 있었다. 그러나 본 실험은 11월 중순에 시작되어 너무 늦게 시작되었다는 문제점을 안고 있다. 금후 여름 8월부터 저온처리를 행하여 가을에 노루귀를 개화시켜 출하가 가능한지에 대해 실험을 할 필요가 있다고 사료되었다. 축성재배와 함께 8월부터 12월에 걸친 저온처리 적정기간을 조사하고, 분화로서 출하가 가능한 시기를 넓혀보고자 한다.

## 제 4 절 바위솔과 노루귀의 개화생리 구명 및 개화 조절 기술 개발

### 1. 일장을 이용한 개화억제 및 휴면 회피 기술 개발

#### 가. 선발된 토속 바위솔의 일장반응 구명

##### (1) 연구목적

광처리 기간은 광주기 식물의 생육과 개화를 조절한다. Table 1. 4-1-1에 요약된 것처럼 밤 길이에 따라서 개화반응을 이끌어내는 식물은 크게 장일식물 (Long-day plant) 과 단일식물 (short-day plant)로 분류된다. 자연광이 아니더라도 백열등이나 형광등과 같은 광원이 광주기 식물에서 개화촉진이나 억제를 유도하는기술로 사용되기도 한다. 바위솔도 이런 광주기 식물 중 하나로, 그 종류에 따라 장일에 꽃을 피우기도 하고, 단일에 꽃을 피우기도 한다. 그러나 대부분의 자생 바위솔은 영양생장이 억제되었을 때 미니분화에 재식되거나 모듬재식으로 상품가치를 높일 수 있지만, 영양생장이 활발하여 너무 커진다거나, 또는 추대하고 다량의 소화의 개화가 일어나면 식물체가 고사해버리는 일임성 식물로 분화상품으로서 가치를 상실하게 된다. 본 연구에서는 일장조절을 통한 생육억제 및 개화억제를 통해 상품성 있는 자생분화로 육성하고, 분화로서 출하를 지연하고자 하는 데 목적이 있다. 자생바위솔을 대상으로 광주기 특성과악과 그것을 이용해 생육 및 개화억제기술을 개발하고자 하였다.

Table. 4-1-1. Flowering response to length of light/darkness

| 0  | 12 (hr)  | 24 | Long-day plant | Short-day plant |
|----|----------|----|----------------|-----------------|
| NL | Darkness |    | ○              | ×               |
| NL | Darkness |    | ×              | ○               |
| NL | W        |    | ○              | ×               |

NL : Natural light; W : incandescent light

##### (2) 재료 및 방법

본 연구는 2012년 5월부터 7월에 걸쳐서 일장조절기에서 포트실험으로 행해졌다. 실험에 사용된 재료는 자생바위솔의 기호도 조사에서 얻어진 결과를 바탕으로 어느 정도 성장한 태백바위솔 (*Orostachys malacophyllus* from Taeback), 가지바위솔 (*O. ramosus*), 자질연화바위솔 (*O. iwarenge* for. *magnus*) 을 사용하였다. 경남과학기술대학교 내 비닐온실에서 파종하여 얻은 싹생묘를 태백등근바위솔, 자질연화바위솔, 등근가지바위솔을 11, 10, 10 cm 포트에 16, 14, 14 개체를 각각 이식하였다. 태백등근바위솔의 분용토로 마사토(6) 및 유비상토(4)가 사용되었으며, 울릉연화바위솔과 가지바위솔은 마사토(6), 유비상토 (2) 및 모래 (2) 가 사용되었다. 시비는 생장용 하이포넥스 1000배를 포트에 두상관주하였다.

광처리기간은 장일 8, 10, 12, 14, 15, 16h으로 여섯 처리를 하였다 (Fig. 4-1-1). 형광등으로 광처리를 하였으며, 각각의 챔버 내의 광도는 Table 4-1-2에 요약되어 있다. 온실내에서 측정된

자연광에 비해 광도가 8배 정도 낮은 광환경과 일장조절기 외부의 온도는 21 °C로 조절되었으며, 각각의 처리에 따른 조절기 안의 온도 및 상대습도 에이터는 30분 간격으로 측정되어 한 달에 한번 수집되었다. 처리기간 동안 각각의 조절기내의 온도변화는 Fig. 4-1-2와 같다. 조절기들 간의 온도 및 습도차이는 각각 2-3°C, 5% 내외 안에서 조절되었다. 일장조절기 안에서의 생육 및 개화 상태를 40-60 광주기후에 생육특성 (초장, 분지수, 엽길이, 엽폭, 엽수, 엽색 등) 및 개화특성(화서길이, 꽃수, 44-40 광주기동안 추대율 및 개화율의 변화)을 조사하였다. 추대 (A) 및 소화개화(B) 기준은 Fig. 4-1-3에 근거하여 추대율 및 개화율이 조사되었다.

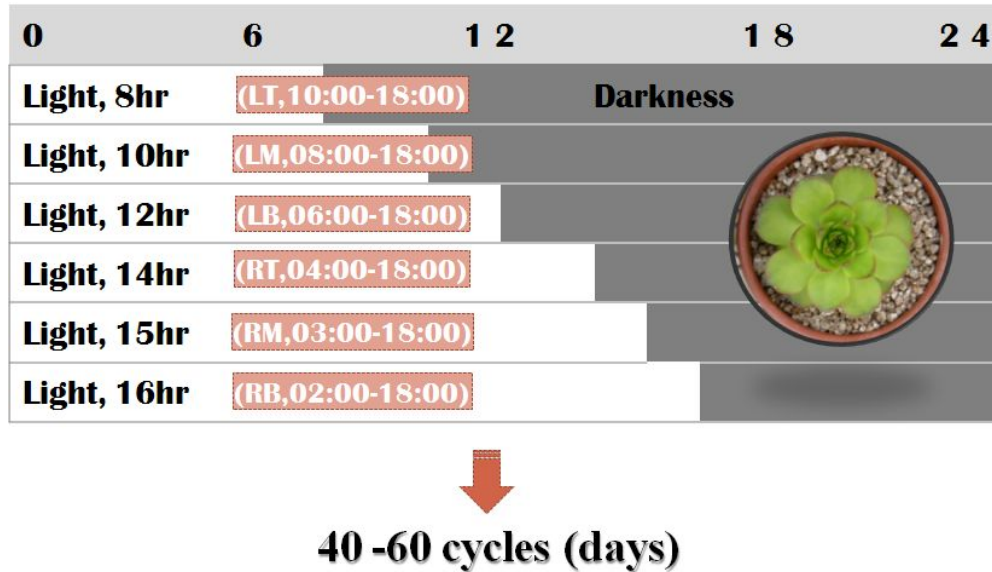


Fig. 4-1-1. Treatments with different photoperiods (8, 10, 12, 14, 15 and 16 h) to determine critical day-length and the number of photoinductive cycles, which were conducted from 40 to 60 cycles.

Table 4-1-2. Light intensities in day-length controller regulated differently in photoperiod.

| Photoperiod                             | Greenhouse | Day-length (hr) |      |      |      |      |     |
|---|------------|-----------------|------|------|------|------|-----|
|   |            | 8               | 10   | 12   | 14   | 15   | 16  |
| Light intensity<br>( $\times 10^3$ Lux) | 55.2       | 7.72            | 7.75 | 5.69 | 7.12 | 6.77 | 6.5 |

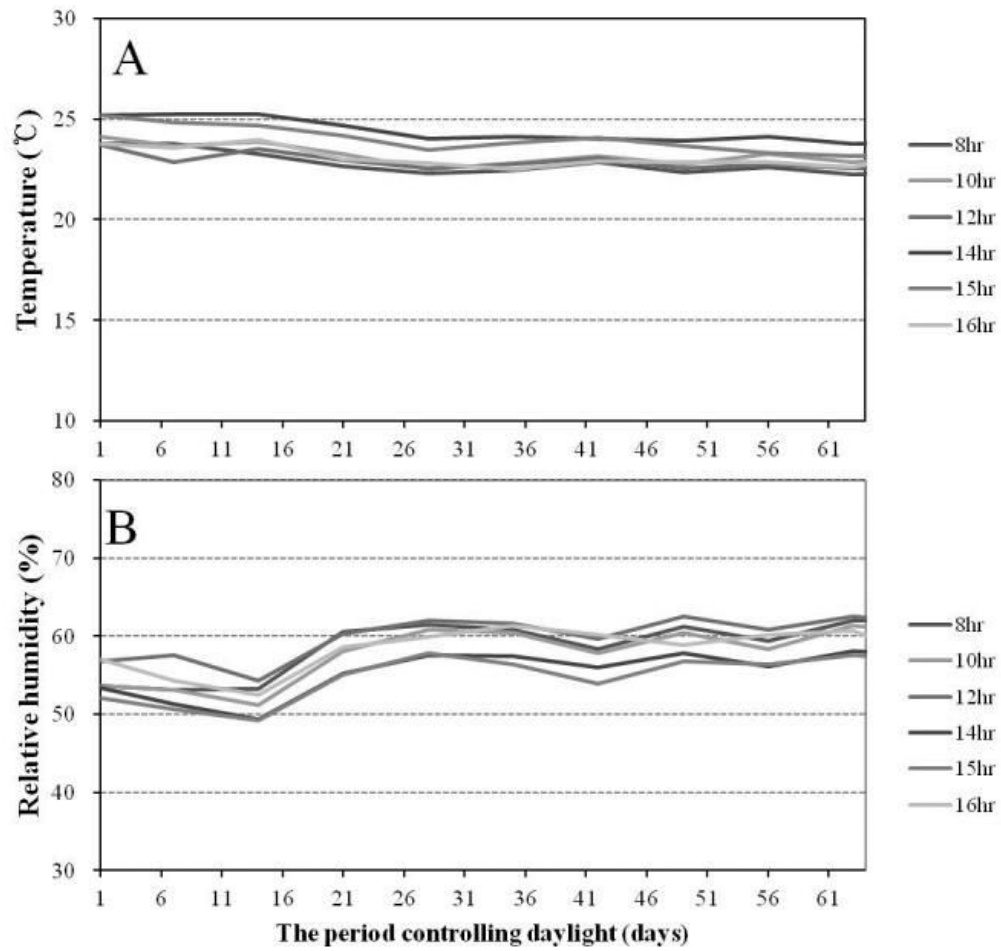


Fig. 4-1-2. Changes of temperature and relative humidity in each day-length controller with different photoperiod.

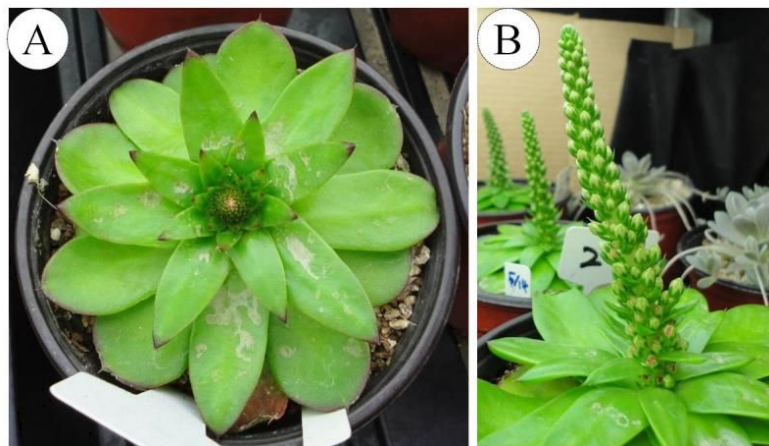


Fig. 4-1-3. Bolting (A) and flowering status (B) of pot plants exposed to different photoperiods.

### (3) 결과 및 고찰

#### (가) 태백등근 바위솔(*O. malacophyllus* from Taeback)

영양생장에서 생식생장으로 넘어가기 직전의 태백 등근바위솔은 광처리 기간 조절에 의해 영양생장은 멈추고, 개화조절이 이루어지는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 4-1-4). 일장조절에 따른 태백등근 바위솔은 일장처리 후 20 광주기(photoinductive cycles, day)부터 추대가 이루어졌으며, 일장이 증가함에 따라 점점 추대가 억제되어, 14/10 h 일장처리부터 추대가 완전히 억제되었다. 40 광주기를 거치면서 식물체가 소화형성과 함께 개화되었다. 일장이 가장 짧은 8/16 h 처리에서 소화형성과 함께 개화가 가장 빨랐으며, 일장이 증가할수록 소화형성 감소와 함께 개화도 지연되는 것으로 조사되었다. 그러다가 14/10 h 일장처리에서는 추대만 되고 개화가 일어나지 않았다. 15/9 h 및 16/8 h 일장처리에서는 추대 및 개화가 모두 억제되었다 (Fig. 4-1-4). 또한, 일장에 따른 태백 바위솔의 소화형성에 미치는 효과에 대해 Fig. 4-1-4와 함께 Table 4-1-3에서 보여진다. Table 4-1-3은 44광주기 (photoinductive cycles) 후에 일장에 따른 식물체당 화서길이 및 소화개수가 조사되었다. 그 결과, 12/12 h 광처리까지는 모두 소화가 형성되었고, 처리 간에 유의적인 차이도 화서길이 및 소화수에서 보이지 않았다. 12 시간 이상의 일장에서는 소화형성이 억제되는 것으로 나타났다. 따라서, 소화 개화를 유도하기 위해 필요로 되는 한계일장은 12시간이며, 태백 등근바위솔은 단일식물이라고 할 수 있다.

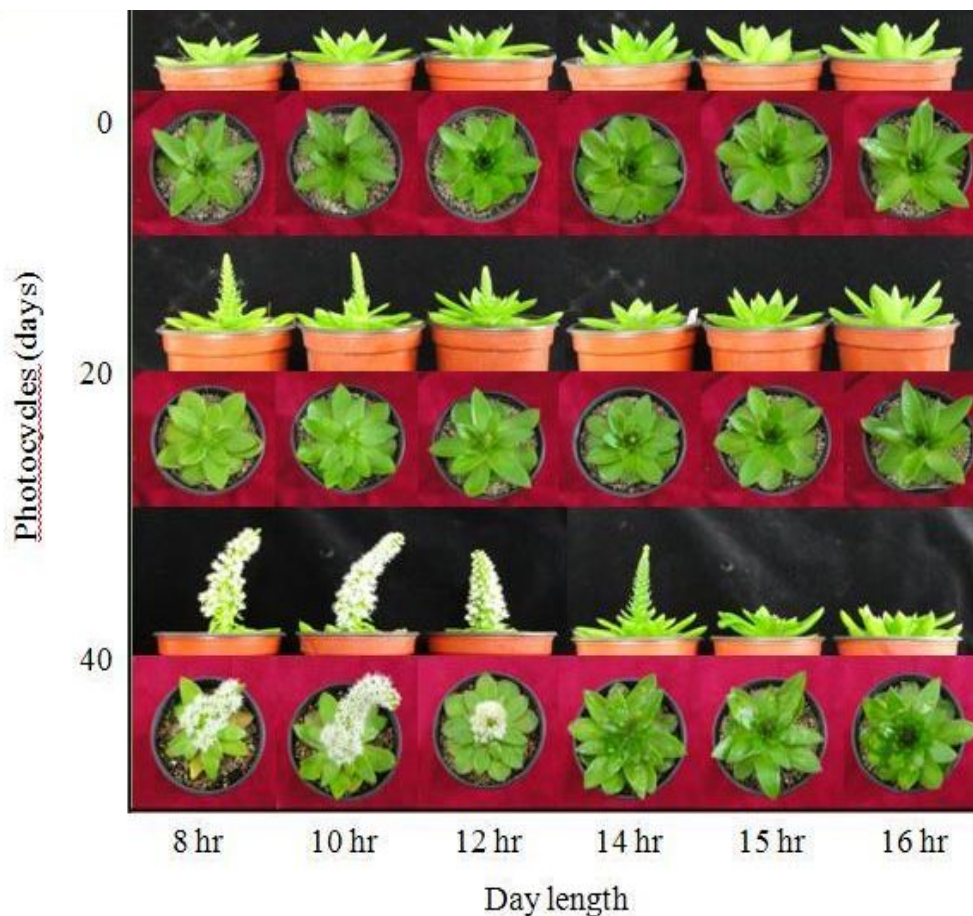


Fig. 4-1-4. Effect of different day-length on bolting and flowering of *O. malacophyllus* from Taeback. Flowers were exposed to 8, 10 and 12 h day-lengths, respectively. The pot plants of 14 h day-length were in bolting status; the pot plants of 15 or 16 h day-length were in still vegetative status.

5월 4일 이후 49광주기 동안 추대율의 변화는 Table 4-1-4와 같다. 일장조절이 이루어지면서 광주기에 따른 일장처리효과가 4광주기(photoinductive cycles) 부터 나타나기 시작하여, 주기를 거듭할수록 추대율이 증가하며, 일장이 가장 긴 16/8 h 처리에서도 추대가 일어났다. 이는 실험에 사용한 식물체가 일장조절실에 넣기 전부터 내부적으로 추대가 시작되었던 것으로 생각되었다. Table 4-1-5은 태백 둥근바위솔의 소화형성 (개화)을 유도하기 위해 일장처리에 따라 요구되는 광주기 변화를 보여준다. 10/14 h 일장처리에서 개화를 유도하는데 요구되는 광주기는 31-41 일인 반면에, 8/16 h 일장처리에서는 31-44일, 12/12 h 일장처리에서는 31-43일로 더 길어진다. 따라서, 소화 개화의 한계광주기(critical photoinductive cycles)는 31일의 광주기라고 볼 수 있다.

Table 4-1-3. Effect of different day-length on flowering of *O. malacophyllus* from Taeback for 44 photoinductive cycles.

| Day-length (hr) | No. of plants | Inflorescence length/plant | No. of flower/plant |
|-----------------|---------------|----------------------------|---------------------|
| 8               | 15            | 9.8a <sup>z</sup>          | 68.8a               |
| 10              | 15            | 10.8a                      | 76.9a               |
| 12              | 15            | 8.9a                       | 82.2a               |
| 14              | 15            | -                          | -                   |
| 15              | 15            | -                          | -                   |
| 16              | 15            | -                          | -                   |

<sup>z</sup>Means followed by the same letter in columns is not significantly different according to the Duncan's multiple range test (P ≤ 0.05)

Table 4-1-4. Effects of different number of photoinductive cycles and day-length on bolting of *O. malacophyllus* from Taeback

| Day-length (hr) | Photoinductive cycles |    |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----------------|-----------------------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                 | 2                     | 4  | 6  | 8  | 10  | 12  | 15  | 19  | 20  | 22  | 24  | 31  | 33  | 36  | 40  | 42  | 46  | 47  | 49  |
| 8               | 0                     | 0  | 27 | 47 | 93  | 93  | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 10              | 0                     | 0  | 20 | 60 | 93  | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 12              | 0                     | 13 | 31 | 75 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 14              | 0                     | 0  | 0  | 25 | 44  | 75  | 81  | 88  | 94  | 94  | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 15              | 0                     | 0  | 0  | 0  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 3   | 25  | 50  | 56  | 56  | 63  | 63  | 69  | 75  | 81  |
| 16              | 0                     | 0  | 0  | 0  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 25  | 38  | 44  | 50  | 50  | 56  | 56  | 63  | 75  |

Percentages of flowering plants (%) were obtained from 15-16 plants for respective day-length

Table 4-1-5. Effects of different number of photoinductive cycles and day-length on flowering of *O. malacophyllus* from Taeback.

| Day-length<br>(hr) | Photoinductive cycles |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |     |
|--------------------|-----------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|
|                    | 29                    | 30 | 31 | 33 | 35 | 36 | 37 | 39 | 40 | 41  | 42  | 43  | 44  |
| 8                  | 0                     | 0  | 7  | 53 | 67 | 73 | 80 | 93 | 93 | 93  | 93  | 93  | 100 |
| 10                 | 0                     | 0  | 13 | 67 | 73 | 80 | 93 | 93 | 93 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 12                 | 0                     | 6  | 19 | 44 | 56 | 63 | 69 | 69 | 75 | 88  | 94  | 100 | 100 |
| 14                 | 0                     | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 15                 | 0                     | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 16                 | 0                     | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0   | 0   | 0   | 0   |

Percentages of flowering plants (%) were obtained from 15-16 plants for respective day-length

(나) 가지바위솔(*O. ramosus*)



Fig. 4-1-5. Effect of different day-length on vegetative growth of *O. ramosus*. In early vegetative growth of *O. ramosus*, flowers were not promoted by any photoperiods.

생육초기단계에 일장조절기에 입실시킨 가지바위솔은 50일간의 실험기간동안 어떤 처리구에서도 개화가 이루어지지 않았다 (Fig. 4-1-5). 50일간의 광주기 동안, 가지바위솔은 영양생장을 계속했다. 이는 실험에 사용된 가지바위솔이 종자유래의 1년차 식물로 아직 생식생장을 할 수 없는 상태였기 때문인 것으로 사료되었다. 개화는 유도되지 않았지만, 일장처리에 의해 생육에

차이가 확연하게 나타났다. 5월 11일 이후 50일의 광주기 동안 일장조절에 따른 가지바위솔의 초장, 분지수, 엽길이, 엽폭, 엽수 및 엽색을 조사한 결과 (Table 4-1-6), 초장과 분지수 엽길이 및 엽수는 일장이 길어지면서 증가하는 것으로 나타났다. 일장이 가장 긴 16/8 h 처리에서 엽장 및 엽수가 가장 많이 증가하였고, 다른 일장처리에서 조사된 값들과 유의적인 차이를 보여주었다. 엽색이나 엽폭에서는 일장처리간 뚜렷한 차이가 나타나지 않았다. 상품성 분화로서는 생장이 빨리 일어나 너무 커져버린 바위솔보다 8/16 h 과 10/14 h 일장처리에서 재배된 가지바위솔이 더 소비자의 기호에 적합한 상품성 분화라고 할 수 있겠다. 생육초기단계의 식물체는 일장에 의해 소화개화가 유도되지 않았지만, 추대 및 개화가 일어나지 않으면서 식물체를 소형화할 수 있는 방법으로 사용될 수 있는 가능성을 시사한다.

Table 4-1-6. Effects of different day-length on growth parameters of *O. ramosus* after 50 photoinductive cycles.

| Day-length<br>(hr) | Plant<br>height    | No. of<br>branch | Leaf<br>length | Leaf<br>width | No. of<br>leaf | Leaf color |        |        |
|--------------------|--------------------|------------------|----------------|---------------|----------------|------------|--------|--------|
|                    |                    |                  |                |               |                | L*         | a*     | b*     |
| 8                  | 8.48c <sup>z</sup> | -                | 5.15c          | 1.55b         | 21.83bc        | 24.87bc    | -9.17a | 11.67a |
| 10                 | 9.25c              | -                | 5.26c          | 1.99a         | 21.14c         | 27.14ab    | -9.32a | 11.64a |
| 12                 | 9.47c              | -                | 6.35c          | 1.95ab        | 23.2bc         | 21.26c     | -9.21a | 11.41a |
| 14                 | 11.95b             | -                | 8.97b          | 1.96a         | 28.3a          | 30.91a     | -9.67a | 12.64a |
| 15                 | 13.03b             | 1.00a            | 8.83b          | 1.86ab        | 26.4ab         | 29.53ab    | -8.61a | 12.31a |
| 16                 | 14.71a             | 0.62ab           | 10.75a         | 2.08a         | 28.46a         | 31.55a     | -9.82a | 13.18a |

<sup>z</sup>Means followed by the same letter in columns is not significantly different according to the Duncan's multiple range test ( $P \leq 0.05$ )

(다) 자질연화바위솔(*O. iwarenge*)

생육초기단계에 있는 자질연화바위솔은 일장조절기에 입실시킨 후 일장처리 이후 60일 간의 광주기를 거친 후(Fig. 4-1-6), 초장, 분지수, 런너길이, 런너폭, 엽수 및 엽색이 조사되었다 (Table 4-1-7). 가지바위솔과 마찬가지로 일장조절에 의해 개화가 조절되는 효과는 볼 수 없었으나, 생육특성은 일장처리 간 유의적인 차이를 나타냈다. 초장을 포함해 분지수, 런너수, 런너폭은 일장이 가장 짧은 8/16 h 처리에서 가장 짧았다. 일장이 증가할수록 대부분의 생육특성을 나타내는 값이 증가하는 것으로 조사되었다. 가지바위솔과는 달리 일장처리에 따른 엽색의 변화가 두드러지게 나타났다. 일장이 가장 짧은 처리는 다른 처리에 비해 황색 및 녹색 계열의 수치가 증가하였고, 일장이 가장 긴 처리는 반대로 가장 많이 감소하는 것으로 나타났다. 일장을 12h 이하로 짧게 하는 것이 소비자 기호에 맞는 소형분화에는 적합한 식물체로 육성할 수 있을 것으로 사료된다.



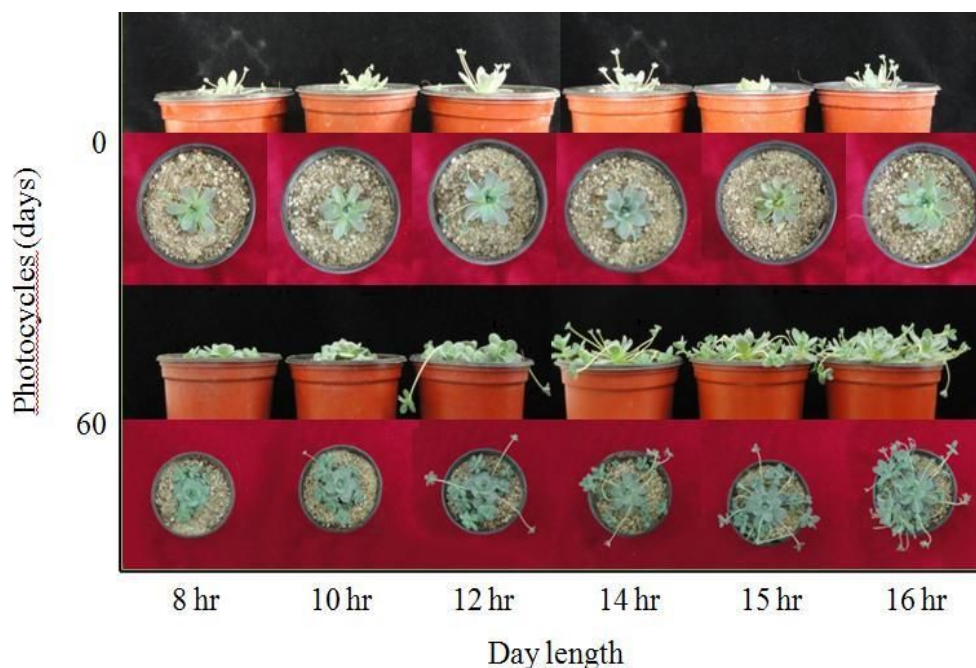


Fig. 4-1-6. Effect of different day-length on vegetative growth of *O. ivaenge*. In early vegetative growth, flowers were not promoted by any photoperiods.

Table 4-1-7. Effects of different day-length on growth parameters of *O. ivaenge*. after 60 photoinductive cycles.

| Day-length (hr) | Plant width        | No. of branch-1 | No. of branch-3 | Runner length | Runner width, $\geq 2\text{cm}$ | Runner width, $\geq 2.5\text{cm}$ | No. of leaves                   | Leaf color |         |        |
|-----------------|--------------------|-----------------|-----------------|---------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|------------|---------|--------|
|                 |                    |                 |                 |               |                                 |                                   |                                 | L*         | a*      | b*     |
| 8               | 4.17b <sup>z</sup> | 7.0d            | 7.8d            | 4.21b         | 3.58c                           | 0.83c                             | 21.3 <sup>ab</sup> <sub>c</sub> | 31.94bc    | -6.18c  | 4.73a  |
| 10              | 4.48ab             | 9.8cd           | 12.3bc          | 5.13b         | 6.00bc                          | 0.30c                             | 19.6c                           | 36.92a     | -5.63bc | 4.84a  |
| 12              | 5.08a              | 11.0bc          | 11.0cd          | 7.64a         | 8.75ab                          | 1.25bc                            | 20.3bc                          | 35.85ab    | -4.71ab | 3.84ab |
| 14              | 5.02a              | 14.3b           | 15.5b           | 9.09a         | 9.30a                           | 3.10ab                            | 22.8ab                          | 33.91abc   | -5.28bc | 3.80ab |
| 15              | 5.07a              | 13.1bc          | 13.1bc          | 7.87a         | 7.55ab                          | 3.91a                             | 22.5 <sup>ab</sup> <sub>c</sub> | 35.28abc   | -4.02a  | 2.57bc |
| 16              | 5.18a              | 18.9a           | 20.3a           | 8.92a         | 10.1 <sub>1</sub> a             | 3.44ab                            | 24.4a                           | 31.23c     | -3.59a  | 1.86c  |

<sup>z</sup>Means followed by the same letter in columns is not significantly different according to the Duncan's multiple range test ( $P \leq 0.05$ )

#### (4) 금후계획

본 실험에서 태백바위솔은 일장에 따른 개화반응이 뚜렷이 나타났으나, 가지바위솔과 자질연화 바위솔에서는 개화 반응을 보지 못하고 영양생장의 변화만 볼수 있었다. 이는 가지바위솔과 자질연화바위솔의 경우 종자번식후 2년차 식물이 아니고 1년차 식물이었기 때문에 개화 반응이 없었던 것으로 사료되었다. 금후 가지바위솔과 자질연화바위솔 및 좀바위솔을 종자번식 2년차 식물을 준비하여 일장반응에 대한 실험을 반복할 예정이다. 야과 효과 (night break)에 의해 개화조절이 가능한지도 실험을 할 계획이다. 또한, 고온 건조에서 잘 자라는 바위솔들 중 기온이 내려가게 되면 휴면에 들어가는 바위솔을 대상으로 일장조절에 의해 휴면 타파가 가능한지 시도해 볼 계획이다.

## 2. 조직배양기술에 의한 노루귀 대량증식 기술개발

노루귀(*Hepatica asiatica* Nakai)와 섬노루귀(*Hepatica maxima* Nakai)는 초봄인 3~4월에 꽃이 핀 후, 잎이 나는 초화류로 우리나라 산지에 자생하는 초화류이다. 종자번식으로 온전한 노루귀 식물체를 얻기까지는 최소 2년이 걸리고, 개화하는데는 3-4년이 걸린다. 때문에 판매농가에서는 포기나누기 통한 번식을 하고 있는 실정이다. 일본에서는 변이종을 이용한 육종이 활발하게 이루어져 다양한 품종이 소개되고 있으며, 시장규모 또한 큰 편이다. 그러나, 노루귀를 교배를 통해 육종을 하는 경우, 개화하고 종자를 얻기까지 3-3년이 걸리기 때문에 육종기간이 너무 많이 걸려서 문제가 된다. 또한 교배육종을 통해 얻어진 우수한 형질의 노루귀들은 고가로 판매되고 있지만, 대부분 임성이 상실되어 종자로 증식이 불가능한 경우가 많다.

급속대량증식 체계를 확립하기 위해서는 무엇보다 무균배양법 확립이 선행되어야 한다. 또한 기관 형성에 적합한 배지 종류와 pH, 식물호르몬 조성 등이 확립되어야 한다.

### 가. 노루귀 식물절편체의 소독 방법 확립

#### (1) 연구목적

포장에서 재배되고 있는 노루귀의 잎은 표면에 털이 많고 엽육도 두껍지 않아, 식물체 표면 살균에 많은 어려움이 따른다. 높은 농도의 살균제제를 사용하였을 경우, 절편체가 괴사하기 쉽고, 너무 낮은 농도의 살균제제를 사용할 경우, 오염율이 높아 실험을 수행 할 수 없다.

따라서 본 연구에서는 여러 가지 살균법을 이용하고 살균제의 농도도 달리하여 노루귀 절편체 소독에 적합한 방법을 찾고자 실험을 수행하였다.

#### (2) 재료 및 방법

##### (가) 식물재료 및 살균방법

##### ① Vacuum을 이용한 살균방법

2011년 산유화자생식물원에서 구매한 노루귀와 섬노루귀를 교내 비닐하우스에서 재배하였고, 재배중인 노루귀의 잎을 채취하여 실험재료로 사용하였다(Fig. 4-2-1). 채취한 노루귀 잎을 수돗물로 3~4회 수세 하였다. 중성세제(2ml/L)와 락스(4ml/L)가 첨가된 용액에 5분간, 150rpm으로 세척 한 후, 다시 수돗물로 수세를 하고, 70% ethanol에 30초, 60초간 세척하였다. 수돗물로 1~2회 수세 후 0.5% NaOCl(sodium hypochlorite solution) 100ml당 tween 20 한 방울을 첨가한 용액

에 잎을 넣고, Vacuum(DOA-P704-AA, GAST, USA) 40kPa 에서 15분간 감압하였다 (Fig. 4-2-2, A). 멸균수로 4회 수세 한 다음 0.5~1cm×0.5~1cm 엽절편을 배지에 치상하였다.

② NaOCl (sodium hypochlorite solution)의 적정 농도 확립

재배중인 노루귀와 섬노루귀의 잎을 채취하여 실험재료로 사용하였다. 채취한 노루귀 잎을 수돗물로 3~4회 수세 한 뒤, 중성세제(2ml/L)와 락스(4ml/L)가 첨가된 용액에 5분간, 150rpm으로 세척 한 후, 다시 수돗물로 수세를 하고, 70% ethanol에 30초, 60초간 세척하였다. 수돗물로 1~2회 수세 후 1, 2% NaOCl(sodium hypochlorite solution) 100ml당 tween 20# 한 방울을 첨가한 용액에 170rpm에서 15분간 소독하였다 (Fig. 4-2-2, B). 멸균수로 4회 수세 한 다음 0.5~1cm×0.5~1cm 크기의 엽절편을 배지에 치상하였다.

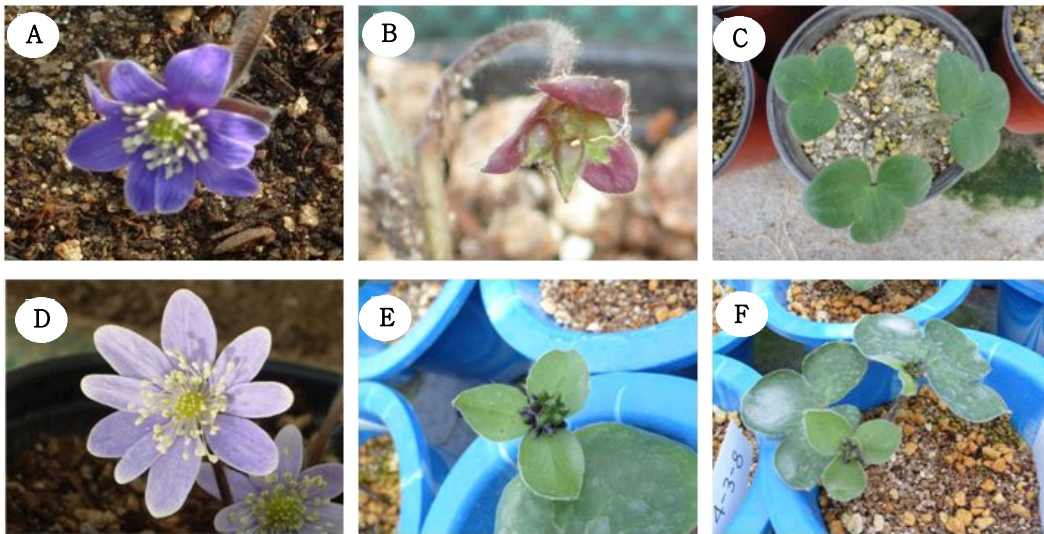


Fig. 4-2-1. Flower, seeds, and leaf of *Hepatica asiatica* (A,B, and C) and *Hepatica maxima* (D,E, and F).

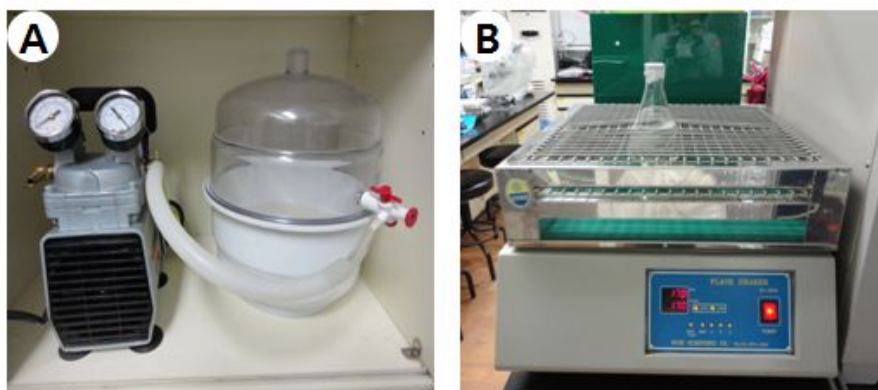


Fig. 4-2-2. Sterilization using vacuum (A) and shaking (B)

③ 살균제제(Kathon)를 이용한 살균방법

재배중인 노루귀와 섬노루귀의 잎을 채취하여 실험재료로 사용하였다. 채취한 노루귀 잎을 수돗물로 3~4회 수세하였다. 중성세제(2ml/L)와 락스(4ml/L)가 첨가된 용액에 5분간, 150rpm으로 세척 한 후, 다시 수돗물로 수세를 하고, 70% ethanol에 30초, 60초간 세척하였다. 수돗물로 1~2회 수세 후 1, 2% NaOCl(sodium hypochlorite solution) 100ml당 tween 20# 한 방울을 첨가한

용액에 170rpm과 220rpm에서 15분간 소독하였다.  $600\text{ul} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 BENCIDE LX 150(kathon wt, Rohm and Haas)으로 3분간 살균한 후, 멸균수로 4회 수세 한 다음  $0.5 \sim 1\text{cm} \times 0.5 \sim 1\text{cm}$  크기의 엽절편을 배지에 치상하였다.

#### (나) 배지 조건

3% sucrose가 첨가된 MS(Murashige and Skoog)기본 배지에 BA(6-benzylaminopurine)  $1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 과 NAA( $\alpha$ -naphthaleneacetic acid)  $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 을 넣고, pH를 5.7~5.8로 맞춘 다음 0.8% agar 첨가하였다. agar를 녹인 후 유리시험관( $\text{O}30 \times 200\text{mm}$ )에 12mL분주한 다음,  $121^\circ\text{C}$ ,  $1.1\text{kgf}/\text{cm}^2$ 에서 15분간 고온고압 멸균하였다.

#### (다) 배양환경

16시간/일 광주기로 온도  $21^\circ\text{C}$ , 상대습도 60%의 배양실에서 배양하였다. 광도는  $84 \pm 13\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 이었고, 사용된 광원은 형광등(FL 40EX-D, Osram, Korea)이고, 광도계(HD 9021, Delta OHM, Italy)를 사용하여 측정하였다. 오염율조사는 치상 10일과 2달 뒤에 육안으로 조사하였다.

### (3) 결과 및 고찰

#### (가) Vacuum을 이용한 살균방법

노루귀에서 감압을 이용한 살균방법은 NaOCl의 농도가 0.5와 1%처리 했을 때, 잎 표면이 제대로 살균되지 않아 곰팡이 오염이 거의 100%에 가까웠다 (Table 4-2-1). 그리고, NaOCl을 2%를 처리했을 때, 잎이 침윤이 되는 현상을 보여, 치상 초기(10일째)에 54.2%의 높은 고사율을 보였다. 섬노루귀의 경우도 노루귀와 같은 경향을 보였다 (Table 4-2-2). NaOCl의 농도가 1% 처리할 경우, 곰팡이와 박테리아 오염이 높고, 2%를 처리할 경우는 치상 후 초기 오염율은 낮았지만, 시간이 갈수록 고사율이 높아졌다. shaking과 같은 농도의 NaOCl을 처리하더라도, 엽표면 살균이 효과가 낮아, 상대적으로 더 높은 오염율을 보였다.

#### (나) NaOCl(sodium hypochlorite solution)을 이용한 살균방법

노루귀의 최종 생존율을 보았을때, NaOCl 1%에서 170rpm 으로 shaking 한 처리구가 41.2%로 가장 높았다(Table 4-2-1). 그리고 220rpm 으로 shaking 한 경우는 오염이 더 높아지거나, 고사율이 높아 최종 생존율이 170rpm 처리구 보다 낮았다. 섬노루귀의 경우, 최종 생존율이 87.5%와 62.5%로 170rpm으로 shaking 한 것보다 220rpm으로 shaking한 처리구가 더 높았다(Table 4-2-2). 이는 75%의 높은 고사율을 보인 노루귀 보다 4.2%의 낮은 고사율 때문으로 생각된다.

#### (다) 살균제제를 이용한 살균방법

노루귀에서는 초기의 조사에서 생존율이 8.3%과 91.7%로 큰 차이를 보였지만, 2달 뒤 조사에서는 엽절편이 모두 죽었다 (Table 4-2-1). 그러나, 섬노루귀는 초기의 조사에서는 생존율이 83.3%와 87.5%로 높았고, 2달 뒤 조사에 16.7%와 41.7%로 고사율이 높아져서 비록 생존율이 58.3%와 45.8%로 낮아졌지만, 노루귀 보다는 높은 생존율을 보였다(Table 4-2-2).

결론적으로 노루귀는 강한 살균방법을 선택할 경우, 초기의 살균효과는 좋을지라도 고사율이 높아져 최종 생존율이 낮아지는 경향을 보였다. 노루귀의 경우는 1% NaOCl의 처리가 가장 효

울적인 살균방법이고, 섬노루귀의 경우는 잎이 노루귀 보다 더 두껍고, 육질이 단단하기 때문에 노루귀 보다 높은 농도의 NaOCl를 처리 하는 것이 살균에 더 효율적이었다. 그러나 초기 (치상 10일후)의 오염율을 조사한 후, 곰팡이와 박테리아의 오염이 계속 되는 것은 식물체의 표면살균의 문제가 아니라 내생균의 문제인 것으로 생각되었다 (Fig. 4-2-3). 또한 오염율은 실험시기, 즉, 계절별로 크게 다르게 나타나, 4-5월에는 오염율이 낮고, 여름이후에는 오염율이 현저하게 높아졌다. 이는 봄에는 절편체(잎)가 매우 건강한 상태이고 여름이후에는 절편체 자체가 약해져 있어 곰팡이에 쉽게 감염되는 것으로 생각되었다. 따라서, 노루귀와 섬노루귀의 기내 대량증식을 위해서는 건강한 식물체 육성이 중요하다는 결론을 얻을 수 있었다.

Table 4-2-1. Effect of various sterilization methods on disinfection rate for *Hepatica asiatica* Nakai

| Sterilization method                             | NaOCl concen. (%) | After 10 days |                    |          |               | After 2 months |                    |          |               |
|--|-------------------|---------------|--------------------|----------|---------------|----------------|--------------------|----------|---------------|
|  |                   | Wilting rate  | Contamination rate |          | Survival rate | Wilting rate   | Contamination rate |          | Survival rate |
|  |                   |               | Fungus             | Bacteria |               |                | Fungus             | Bacteria |               |
| Decompression (40kPa)                            | 0.5               | 0             | 100                | 0        | 0             | -              | -                  | -        | -             |
|  | 1                 | 0             | 95.8               | 4.2      | 0             | -              | -                  | -        | -             |
|  | 2                 | 54.2          | 0                  | 33.3     | 12.5          | 54.2           | 0                  | 33.3     | 12.5          |
| Shaking (170rpm)                                 | 1                 | 0             | 8.9                | 4.4      | 86.7          | 32             | 6.3                | 3.2      | 41.2          |
|  | 1.5               | 0             | 45.0               | 40.0     | 15.0          | 0              | 45.0               | 40.0     | 15.0          |
| Shaking (220rpm)                                 | 1                 | 0             | 100                | 0        | 0             | -              | -                  | -        | -             |
|  | 2                 | 0             | 4.2                | 0        | 95.8          | 75             | 0                  | 0        | 20.8          |
| Shaking (220rpm) + BENCIDE 600mg·L <sup>-1</sup> | 1                 | 0             | 0                  | 91.7     | 8.3           | 8.3            | 0                  | 0        | 0             |
|  | 2                 | 0             | 0                  | 8.3      | 91.7          | 70.9           | 8.3                | 12.5     | 0             |

Data are averages of 30 replicative explants

Table 4-2-2. Effect of various sterilization method on disinfection rate for *Hepatica maxima* Nakai

| Sterilization method                            | NaOCl concn . (%) | After 10 days |                    |          |               | After 2 months |                    |          |               |
|---|-------------------|---------------|--------------------|----------|---------------|----------------|--------------------|----------|---------------|
|   |                   | wilting rate  | contamination rate |          | survival rate | wilting rate   | contamination rate |          | survival rate |
|   |                   |               | fungus             | bacteria |               |                | fungus             | bacteria |               |
| Decompression (40kPa)                           | 1                 | 0             | 87.5               | 12.5     | 0             | -              | -                  | -        | -             |
|   | 2                 | 0             | 4.2                | 25       | 70.8          | 18.7           | 6.3                | 0        | 45.8          |
| Shaking (170rpm)                                | 1                 | 0             | 2.1                | 6.3      | 91.6          | 37.4           | 0                  | 0        | 54.2          |
| Shaking (220rpm)                                | 1                 | 0             | 4.2                | 4.2      | 91.7          | 4.2            | 0                  | 0        | 87.5          |
|   | 2                 | 0             | 25                 | 8.3      | 66.7          | 4.2            | 0                  | 0        | 62.5          |
| Shaking (220rpm)+ BENCIDE 600mg·L <sup>-1</sup> | 1                 | 0             | 0                  | 16.7     | 83.3          | 16.7           | 8.3                | 0        | 58.3          |
|   | 2                 | 0             | 8.3                | 4.2      | 87.5          | 41.7           | 0                  | 0        | 45.8          |

Data are averages of 30 replicatie explants



Fig. 4-2-3. Fungi induced on leaf explant after 1 month of transplanting.

## 나. 식물 절편체 부위별에 따른 노루귀 및 섬노루귀의 재분화 효율

### (1) 연구목적

식물 절편체 부위별에 따라 캘루스 형성과 기관 형성에 큰 차이가 있다. 노루귀의 효율적인 재분화 조건을 찾기 위해, 잎, 엽병, 꽃잎 등, 부위별 재분화 효율 실험을 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 식물재료 및 소독방법

교내 온실에서 노루귀의 꽃과 잎을 채취한 후, 수돗물로 3~4회 수세한 후, 중성세제(2ml/L)

와 락스(4ml/L)가 첨가된 용액에 5분간, 150rpm으로 세척하였다. 수돗물로 다시 수세를 하고, 70% ethanol에 30초간 세척하였다. 수돗물로 1~2회 수세 후 꽃은 0.5% , 잎 등 다른 조직은 1% sodium hypochlorite solution에 100mL당 tween 20# 한 방울을 첨가한 용액에 170rpm에서 15분간 소독하였다. 멸균수로 4회 수세 한 다음 꽃잎, 꽃받침, 수술, 화경, 잎 그리고 엽경 절편체를 배지에 치상하였다 (Fig. 4-2-4).

(나) 배양배지

3% sucrose가 첨가된 MS(Murashige and Skoog)기본 배지에 BA 1mg · L<sup>-1</sup> 와 NAA 0.1, 1mg · L<sup>-1</sup> 조합처리 하여 넣고, pH를 5.7~5.8로 맞춘 다음 0.8% agar 첨가였다. agar를 녹인 후 유리 시험관(Ø30×200mm)에 12mL분주한 다음, 121℃, 1.1kgf/cm<sup>2</sup>에서 15분간 고온고압 멸균하였다.

(다) 배양환경

주기 16시간/일 광주기로 온도 21℃, 상대습도 60%의 배양실에서 배양하였다. 광도는 84±13μ mol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>이었고, 사용된 광원은 형광등(FL 40EX-D, Osram, korea)이고, 광도계(HD 9021, Delta OHM, Italy)를 사용하여 측정하였다.

(3) 결과 및 고찰

치상 후, 3개월이 지났을 때, 캘러스와 기관의 형성을 조사였다. Table 4-2-3과 Fig 4-2-5에 나타난 바와 같이 꽃받침과 잎은 100%의 캘러스 형성을 보였고, 기관 형성율도 25%와 21%로 비슷한 수치를 나타냈다. 그러나 꽃잎과 수술은 모두 고사하였다. 화경과 엽경은 캘러스가 형성이 되기는 하지만, 기관으로 분화하는 것을 볼 수 없었다. 이런 결과로부터 노루귀의 조직 배양을 위해서는 꽃받침과 잎이 적합한 절편체라고 판단되었다.

Table 4-2-3. Callus and organ formation according to explant kinds of *Hepatica maxima* Nakai.

| Formation rate(%) | Explants |       |          |        |      |         |
|-------------------|----------|-------|----------|--------|------|---------|
|                   | Petal    | Calyx | Peduncle | Stamen | Leaf | Petiole |
| Callus            | 0        | 100   | 18.2     | 0      | 100  | 50      |
| Organ             | 0        | 25    | 0        | 0      | 21   | 0       |

Data are averages of 30 replicative explants

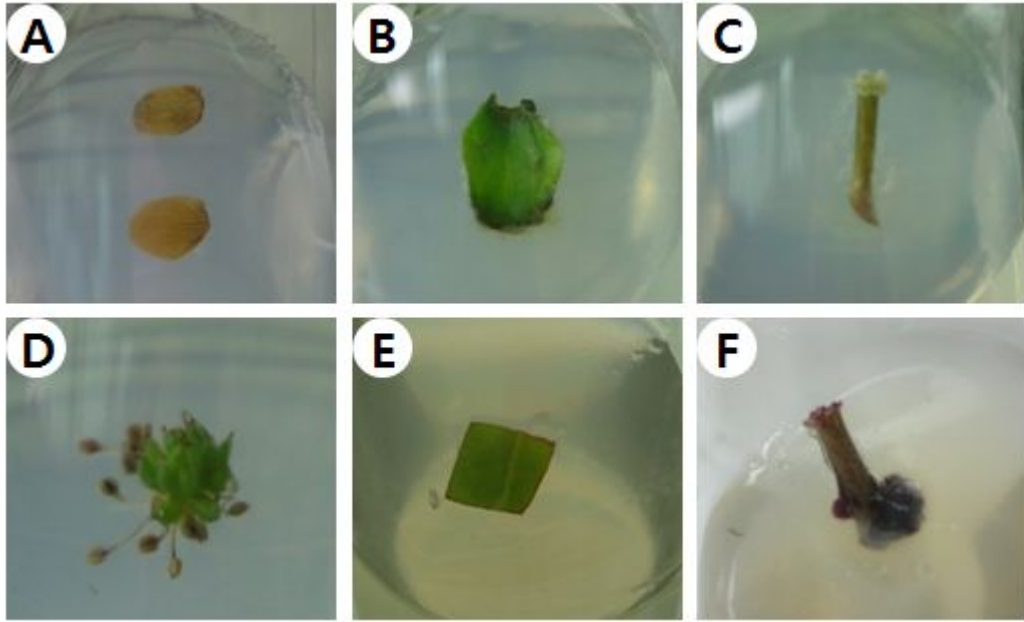


Fig. 4-2-4. Explants of *Hepatica maxima* Nakai used in this experiment. (A) petal, (B) calyx, (C) peduncle, (D) stamen, (E) leaf, and (F) petiole

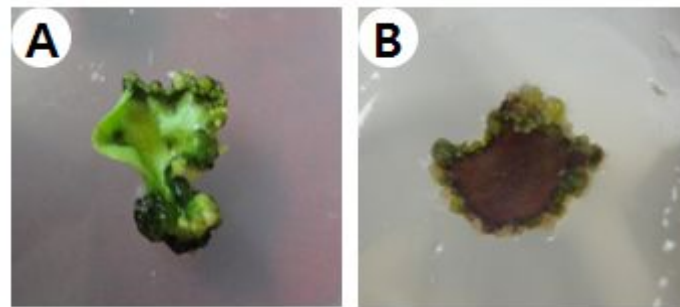


Fig. 4-2-5. Callus induced on calyx (A) and leaf (B) 3 months after transplanting.

#### 다. 배지종류에 따른 노루귀와 섬노루귀의 재분화 효율

##### (1) 연구목적

배지의 구성성분인 무기염류와 유기염류는 식물에 따라 또는 식물체의 부위에 따라 요구되는 종류와 양이 다르다. 일반적으로 가장 널리 이용되는 MS(Murashige and Skoog)배지 외에도 여러 선행된 연구를 통해, 식물에 맞는 다양한 배지들이 개발되었다. 그러나 아직 노루귀의 재분화 체계에 관한 선행 연구가 없는 실정이고, 앞서 MS배지를 이용한 재분화 실험에서도 높은 재분화율의 결과를 얻지 못했다. 본 연구에서는 노루귀에 적합한 배지를 선발하여 좀 더 효율적인 재분화율을 얻기 위해 실험을 수행하였다.

##### (2) 재료 및 방법

###### (가) 식물재료

Fig. 4-2-6과 같이 휴면중인 노루귀를 저온처리하여 휴면을 인위적으로 타파하고 눈을 틔운 다음 깨끗한 성장상 안에서 관리하면서 사용하였다. 또한 휴면타파된 맹아를 소독하여 기내에 넣어서 배양함으로써 무균상태의 식물재료를 확보할 수 있었다.





Fig 4-2-6. Diagram for explant acquisition by chilling treatment and in vitro culture in *Hepatica maxima*

#### (나) 소독방법

실험실 성장상에서 재배 중인 노루귀 잎을 채취한 후, 수돗물로 3~4회 수세 하였다. 중성세제(2ml/L)와 락스(4ml/L)가 첨가된 용액에 5분간, 150rpm으로 세척 한 후, 다시 수돗물로 수세를 하고, 70% ethanol에 30초간 세척하였다. 수돗물로 1~2회 수세 후 1% NaOCl(sodium hypochlorite solution) 100mL당 tween 20# 한 방울을 첨가한 용액에 잎을 넣고, 170rpm에서 15분간 소독하였다. 멸균수로 4회 수세 한 다음 0.5~1cm×0.5~1cm 엽절편을 배지에 치상하였다.

#### (다) 배양배지

MS(Murashige and Skoog), B5(Gamborg·Miller 및 Ojima), SH(Schenk and Hildebrandt) 그리고 WP(woody plant)배지에 3% sucrose를 첨가하였다. 그리고, BA  $2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  과 NAA  $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 을 넣고, pH를 5.7~5.8로 맞춘 다음 0.8% agar 첨가였다. agar를 녹인 후 유리시험관(Ø30×200mm)에 12mL분주한 다음,  $121^\circ\text{C}$ ,  $1.1\text{kgf/cm}^2$ 에서 15분간 고온고압 멸균하였다.

#### (라) 배양환경

주기 16시간/일 광주기로 온도  $21^\circ\text{C}$ , 상대습도 60%의 배양실에서 배양하였다. 광도는  $84 \pm 13 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 이었고, 사용된 광원은 형광등(FL 40EX-D, Osram, Korea)이고, 광도계(HD 9021, Delta OHM, Italy)를 사용하여 측정하였다.

### (3) 결과 및 고찰

치상 후 10일 경에 오염율을 확인한 결과 Table 4-2-4와 같이 거의 모든 처리구에서 100%의 생존율을 보였다. 맹아를 이용하여 조직배양을 한 경우라, 교내 온실에서 재배중인 노루귀를 사용할 때 보다 오염율이 현저히 낮아지는 것을 알 수 있었다. Fig. 4-2-7과 같이 아직 치상 후 2달이 되지 않아, 캘러스 형성은 되지 않았다.

Table 4-2-4. Contamination and wilting rate according to culture media (after 10 days)

| Medium         | Wilting rate | Contamination rate (%) |          | Survival rate |
|----------------|--------------|------------------------|----------|---------------|
|                |              | fungus                 | bacteria |               |
| B <sub>5</sub> | 0            | 0                      | 0        | 100           |
| MS             | 0            | 0                      | 0        | 100           |
| SH             | 0            | 2.2                    | 0        | 97.8          |
| WP             | 0            | 0                      | 0        | 100           |

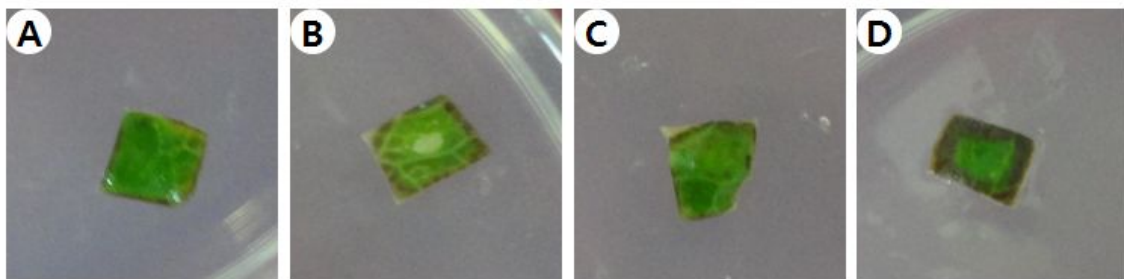


Fig 4-2-7. Leaf explants on various media (after 10 days). A: B<sub>5</sub>, B: MS, C: SH, D: WP

#### 라. 배지의 pH에 따른 노루귀와 섬노루귀의 재분화 효율

##### (1) 연구목적

초기의 배지 pH가 식물 절편체의 생존율과 성장에 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다. 사용 중인 재분화 배지의 pH농도는 5.7~5.8로 초기의 엽절편체의 생존율이 낮고, 약산성 토양에서 자생하는 노루귀의 특성상 pH의 농도가 절편체 생존과 재분화 효율에 영향을 미치지 않을까 하는 생각에서 실험을 수행 하였다.

##### (2) 재료 및 방법

###### (가) 식물재료 및 소독방법

교내 비닐하우스에서 재배 중인 노루귀와 섬노루귀 잎을 채취한 후, 수돗물로 3~4회 수세 하였다. 중성세제(2ml/L)와 락스(4ml/L)가 첨가된 용액에 5분간, 150rpm으로 세척 한 후, 다시 수돗물로 수세를 하고, 70% ethanol에 30초간 세척하였다. 수돗물로 1~2회 수세 후 1% NaOCl(sodium hypochlorite solution) 100mL당 tween 20# 한 방울을 첨가한 용액에 잎을 넣고, 170rpm에서 15분간 소독하였다. 멸균수로 4회 수세 한 다음 0.5~1cm×0.5~1cm 엽절편을 배지에 치상하였다.

###### (나) 배양배지

3% sucrose가 첨가된 MS(Murashige and Skoog)기본 배지에 BA 1mg · L<sup>-1</sup> 과 NAA 0.1mg · L<sup>-1</sup>

을 넣고, pH를 5.0, 5.5, 6.0, 7.0로 맞춘 다음 0.8% agar 첨가였다. agar를 녹인 후 유리시험관 (Ø30×200mm)에 12mL분주한 다음, 121℃, 1.1kgf/cm<sup>2</sup>에서 15분간 고온고압 멸균하였다.

(다) 배양환경

주기 16시간/일 광주기로 온도 21℃, 상대습도 60%의 배양실에서 배양하였다. 광도는 84±13μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>이었고, 사용된 광원은 형광등(FL 40EX-D, Osram, Korea)이고, 광도계(HD 9021, Delta OHM, Italy)를 사용하여 측정하였다.

(라) 조사방법

치상 2달 후, 캘러스 형성율과 발생정도를 육안으로 조사하였다. 캘러스 발생정도는 Fig. 4-2-8 과 같이 캘러스가 발생된 정도를 0점부터 4점 점수를 매겼다. 치상 3달 후에 기관형성율과 발생정도를 실체현미경을 이용하여 조사하였다. 기관발생정도는 Fig. 4-2-9과 같이 기관발생수를 세어 0개는 0점, 1~5개는 1점, 6~10개는 2점, 11~15개는 3점, 16개 이상은 4점의 점수를 주었다.

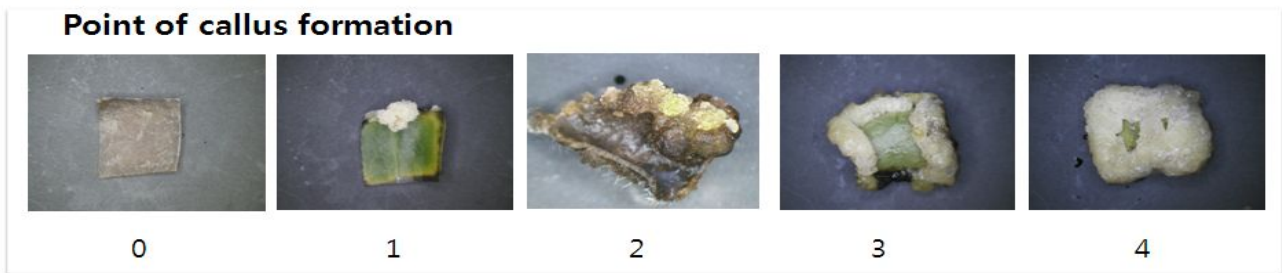


Fig. 4-2-8. Valuation criteria for callus formation in *Hepaticia asiatica*.

| Point of organ formation |   |     |      |       |      |
|--------------------------|---|-----|------|-------|------|
| point                    | 0 | 1   | 2    | 3     | 4    |
|                          | 0 | 1~5 | 6~10 | 11~15 | 16 ≤ |
| organ No.                |   |     |      |       |      |

Fig. 4-2-9. Valuation criteria for organ formation in *Hepaticia asiatica*.

(3) 결과 및 고찰

노루귀는 모든 pH에서 100%의 캘러스 형성율을 보였고, 캘러스 발생정도 비슷한 결과를 보였다 (Table 4-2-5). 그러나 기관형성에 있어서는 큰 차이를 보였다. pH 6 일때, 57.1로 가장 높

은 기관 형성율을 보였고, 기관발생정도도 가장 높은 1.3 이었다 (Fig. 4-2-10). 섬노루귀는 노루귀와 다른 결과를 보였다. pH 5에서 57.1%로 가장 좋은 캘러스 형성율을 보였고, pH 5.5, 6, 7에는 비슷한 결과를 얻었다 (Table 4-2-6). 섬노루귀 기관형성율과 기관발생정도는 실험이 진행 중 결과를 얻지 못했다. 향후 결과에 따라 적합한 pH 농도를 선발할 수 있을 것이다.

Table 4-2-5. Effect of medium pH on the callus and organ formation of *Hepatica asiatica*.

| pH  | Callus induction (%) | Point of callus formation | Organ formation (%) | Point of organ formation |
|-----|----------------------|---------------------------|---------------------|--------------------------|
| 5   | 100                  | 1.3                       | 25.0                | 1.0                      |
| 5.5 | 100                  | 1.5                       | 0.0                 | 0.0                      |
| 6   | 100                  | 1.7                       | 57.1                | 1.3                      |
| 7   | 100                  | 1.5                       | 16.7                | 1.0                      |

Table 4-2-6. Effect of medium pH on the callus and organ formation of *Hepatica maxima*.

| pH  | concen. | Callus induction (%) | Point of callus formation | Organ formation (%) | Point of organ formation |
|-----|---------|----------------------|---------------------------|---------------------|--------------------------|
| 5   |         | 57.1                 | 1.0                       | -                   | -                        |
| 5.5 |         | 12.5                 | 2.0                       | -                   | -                        |
| 6   |         | 11.1                 | 2.0                       | -                   | -                        |
| 7   |         | 12.5                 | 1.0                       | -                   | -                        |

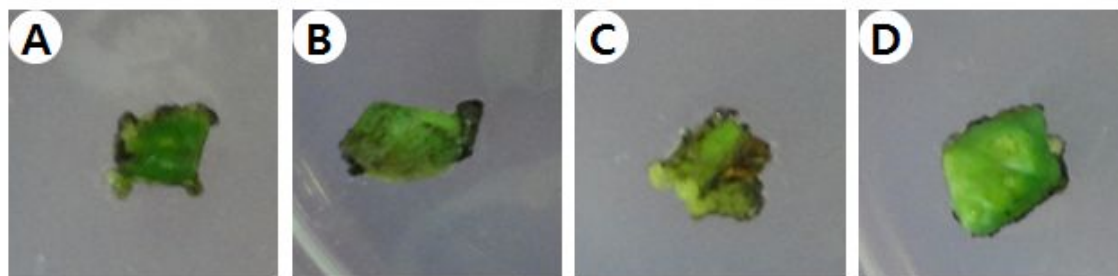


Fig. 4-2-10. Regeneration of *Hepatica asiatica* leaf according to pH. (A) pH 5, (B) pH 5.5, (C) pH 6, (D) pH 7,

## 마. 생장조절물질의 조성에 따른 노루귀와 섬노루귀의 재분화 효율

### (1) 연구목적

기관형성에 가장 크게 작용하는 것은 생장조절물질이다. 생장조절물질 중에서도 켈러스 및 기관형성은 배지의 첨가된 시토키닌과 옥신의 비율에 따라 달라진다. 그리고, 배지에 첨가되는 이들 물질의 종류와 농도, 첨가시기에 따라서도 기관형성에 큰 영향을 미치는 것으로 연구되었다. 따라서, 본 연구에서는 노루귀와 섬노루귀의 시토키닌과 옥신의 종류와 적정 비율 및 농도를 밝혀 재분화율을 높이고자 실험을 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 식물재료 및 소독방법

교내 비닐하우스에서 재배 중인 섬노루귀 잎을 채취한 후, 수돗물로 3~4회 수세 하였다. 중성세제(2ml/L)와 락스(4ml/L)가 첨가된 용액에 5분간, 150rpm으로 세척 한 후, 다시 수돗물로 수세를 하고, 70% ethanol에 30초간 세척하였다. 수돗물로 1~2회 수세 후 1% NaOCl(sodium hypochlorite solution) 100ml당 tween 20# 한 방울을 첨가한 용액에 잎을 넣고, 170rpm에서 15분간 소독하였다. 멸균수로 4회 수세 한 다음 0.5~1cm×0.5~1cm 엽절편을 배지에 치상하였다.

#### (나) 배양배지

3% sucrose가 첨가된 MS(Murashige and Skoog)기본 배지에 BA  $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  과 NAA  $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  을 조합처리하고, Kinetin  $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  과 NAA  $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  을 조합처리하였다. pH를 5.7~5.8로 맞추는 다음 0.8% agar 첨가였다. agar를 녹인 후 유리시험관( $\text{Ø}30\times 200\text{mm}$ )에 12mL분주한 다음,  $121^{\circ}\text{C}$ ,  $1.1\text{kgf}/\text{cm}^2$ 에서 15분간 고온고압 멸균하였다.

#### (다) 배양환경

주기 16시간/일 광주기로 온도  $21^{\circ}\text{C}$ , 상대습도 60%의 배양실에서 배양하였다. 광도는  $84\pm 13\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 이었고, 사용된 광원은 형광등(FL 40EX-D, Osram, korea)이고, 광도계(HD 9021, Delta OHM, Italy)를 사용하여 측정하였다.

#### (라) 조사방법

상기의 4) 배지의 pH에 따른 노루귀와 섬노루귀의 재분화 효율에서는 조사방법과 동일하게 수하였다. .

### (3) 결과 및 고찰

노루귀의 경우, BA와 NAA의 조합처리에서는 BA농도가  $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 과  $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 일때는 NAA 농도가 낮을수록 34.6% 38.5%의 상대적으로 높은 켈러스 형성율을 보였다 (Table 4-2-7). 반대로 켈러스 형성정도에서는 BA 농도가  $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 과  $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 일때는 NAA 농도가 높을수록 3.4, 3.0으로 더 나은 켈러스 발생정도가 나타났다. 기관형성율도 켈러스 형성율과 비슷한 경향을 보였다. BA농도가  $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 과  $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 일 때는 NAA 농도가 낮을수록 34.6%의 상대적으로 높은 기관 형성율을 보였다. 그러나 기관발생정도에는 처리구간의 큰 차이가 없었다. 그리고 BA  $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 조합처리에서는 NAA 농도에 관계없이 비슷한 경향을 보였다(Fig. 4-2-11)

섬노루귀의 경우, Kinetin과 NAA의 조합처리도 앞선 BA와 NAA의 조합처리와 같은 경향을 보였다. Kinetin이 1과 2mg·L<sup>-1</sup>으로 동일할 때, NAA 농도가 낮을수록 100%의 캘러스의 형성율을 보였고, 반대로 캘러스 발생정도에서는 Kinetin 농도가 1mg·L<sup>-1</sup>과 2mg·L<sup>-1</sup> 동일할 때 NAA 농도가 높을수록 상대적으로 높은 캘러스 발생정도를 보였다.

아직 치상 3달이 되지 않아서 Kinetin과 NAA의 조합처리에서의 기관형성에 관한 결과를 얻지 못했지만, 지금 얻어진 결과로 봤을 때, 비록 Kinetin이 100%의 캘러스 형성율을 보였지만, 캘러스 발생정도에서 BA보다 낮은 결과를 얻었다. 결론적으로, 섬노루귀의 재분화효율에 적합한 성장조절물질의 조합은 시토키닌은 BA이고, 옥신의 농도는 낮을수록 더 높은 재분화 결과를 얻을 것으로 생각된다.

Table 4-2-7. Effect of plant hormones on the callus and organ formation of *Hepatica asiatica*

| Growth regulator (mg·L <sup>-1</sup> ) |     | Callus induction (%) | Degree of callus formation | Organ formation (%) | Degree of organ formation |
|--|-----|----------------------|----------------------------|---------------------|---------------------------|
| BA                                     | NAA |                      |                            |                     |                           |
| 1                                      | 0.1 | 34.6                 | 2.9                        | 34.6                | 2.1                       |
|  | 0.5 | 29.6                 | 3.4                        | 18.5                | 2.4                       |
| 2                                      | 0.1 | 38.5                 | 2.6                        | 34.6                | 2.2                       |
|  | 0.5 | 33.3                 | 3.0                        | 18.5                | 2.4                       |
| 5                                      | 0.1 | 32.3                 | 3.1                        | 25.8                | 2.6                       |
|  | 0.5 | 33.3                 | 3.0                        | 25.9                | 2.1                       |

Table 4-2-8. Effect of plant hormones on the callus and organ formation of *Hepatica maxima*

| Growth regulator(mg·L <sup>-1</sup> ) |     | Callus induction (%) | Degree of callus formation | Organ formation (%) | Degree of organ formation |
|---------------------------------------|-----|----------------------|----------------------------|---------------------|---------------------------|
| Kinetin                               | NAA |                      |                            |                     |                           |
| 1                                     | 0.1 | 100                  | 1                          | -                   | -                         |
|                                       | 0.5 | 100                  | 1.3                        | -                   | -                         |
|                                       | 1   | 80                   | 1.5                        | -                   | -                         |
| 2                                     | 0.1 | 100                  | 1                          | -                   | -                         |
|                                       | 0.5 | 100                  | 1.9                        | -                   | -                         |
|                                       | 1   | 75                   | 2.3                        | -                   | -                         |

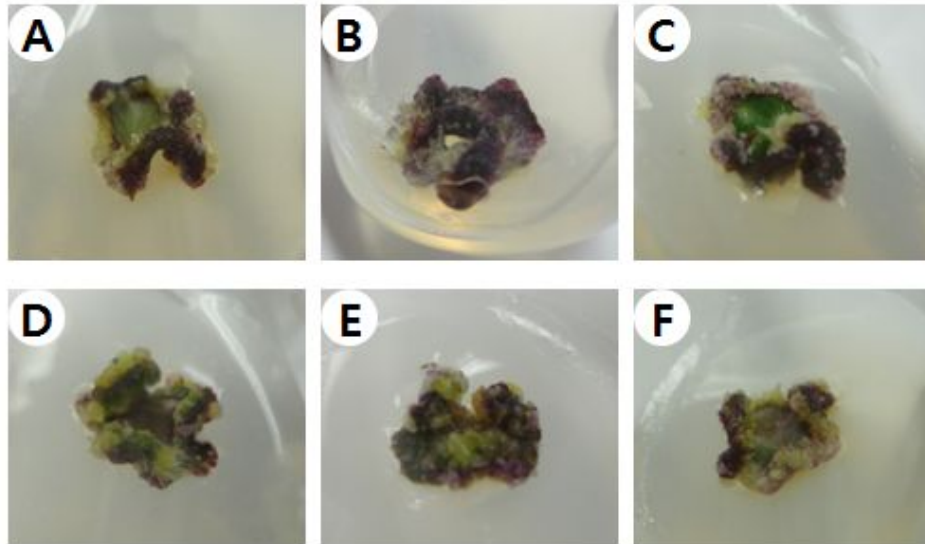


Fig. 4-2-11. Callus and organ formation on the media containing plant hormones (3 months after transplanting). (A) BA  $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + NAA  $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , (B) BA  $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + NAA  $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , (C) BA  $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + NAA  $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , (D) BA  $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + NAA  $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , (E) BA  $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + NAA  $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , (F) BA  $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + NAA  $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

## 바. 배양 환경(온도, 광)에 따른 섬노루귀의 재분화 효율

### (1) 연구목적

식물에 따라 최적의 배양온도가 다르며, 배양 단계별로도 요구하는 온도가 다르다. 섬노루귀의 경우, 산지에서 자생하는 식물로, 일반적인 배양온도 보다 낮은 온도가 노루귀의 배양에 적합할 것으로 생각되어졌다. 따라서, 섬노루귀의 최적의 배양 온도 조건을 찾기 위해 실험을 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 식물재료 및 소독방법

교내 비닐하우스에서 재배 중인 섬노루귀 잎을 채취한 후, 수돗물로 3~4회 수세 하였다. 중성세제( $2\text{ml}/\text{L}$ )와 락스( $4\text{ml}/\text{L}$ )가 첨가된 용액에 5분간,  $150\text{rpm}$ 으로 세척 한 후, 다시 수돗물로 수세를 하고, 70% ethanol에 30초간 세척하였다. 수돗물로 1~2회 수세 후 1% NaOCl(sodium hypochlorite solution)  $100\text{ml}$ 당 tween 20# 한 방울을 첨가한 용액에 잎을 넣고,  $170\text{rpm}$ 에서 15분간 소독하였다. 멸균수로 4회 수세 한 다음  $0.5\sim 1\text{cm}\times 0.5\sim 1\text{cm}$  엽절편을 배지에 치상하였다.

#### (나) 배양배지

3% sucrose가 첨가된 MS(Murashige and Skoog)기본 배지에 BA  $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  과 NAA  $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  을 넣고, pH를 5.7~5.8로 맞춘 다음 0.8% agar 첨가였다. agar를 녹인 후 유리시험관 ( $\text{Ø}30\times 200\text{mm}$ )에  $12\text{mL}$ 분주한 다음,  $121^\circ\text{C}$ ,  $1.1\text{kgf}/\text{cm}^2$ 에서 15분간 고온고압 멸균하였다.

#### (다) 배양환경

광주기와 온도는 21℃의 암상태 와 21, 25℃에서 광주기 16시간/일을 처리하였고, 상대습도 60%로 Growth Chamber(Vision scientific. co., LTD.)에서 배양하였다. 광도는  $74\pm 7.2\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 이었고, 사용된 광원은 형광등(FL 40EX-D, Osram, korea)이고, 광도계(HD 9021, Delta OHM, Italy)를 사용하여 측정하였다.

(라) 조사방법

상기의 4) 배지의 pH에 따른 노루귀와 섬노루귀의 재분화 효율에서는 조사방법과 동일하게 수행하였다.

(3) 결과 및 고찰

모든 환경에서 100%의 높은 캘러스 형성율을 보였지만, 캘러스 발생정도는 21℃의 암상태에서 3.5로 가장 높은 캘러스 발생정도를 보였다 (Table 4-2-9). 선행된 연구에서 처럼, 캘러스 발생정도에서는 광 처리를 하였을 때 보다 암 처리를 하였을 때, 높은 캘러스 형성정도를 보였다. 그러나 기관형성율과 기관발생정도에서는 암처리가 54.2%의 기관형성율과 1.8의 발생정도에서는 보다 광을 16시간/일 처리 하였을 때, 100%의 기관형성율과 2.7의 기관발생정도를 보였다(Fig. 4-2-12).

Table 4-2-9. Effect of temperature and light on the callus and organ formation of *Hepatica maxima*

| Culture environment | Callus induction (%) | Degree of callus formation | Organ formation (%) | Degree of organ formation |
|---------------------|----------------------|----------------------------|---------------------|---------------------------|
| 21℃,dark            | 100                  | 3.5                        | 54.2                | 1.8                       |
| 25/15℃, 16/8hr      | 100                  | 2.9                        | 100.0               | 2.5                       |
| 21℃,16/18hr         | 100                  | 2.0                        | 100.0               | 2.7                       |

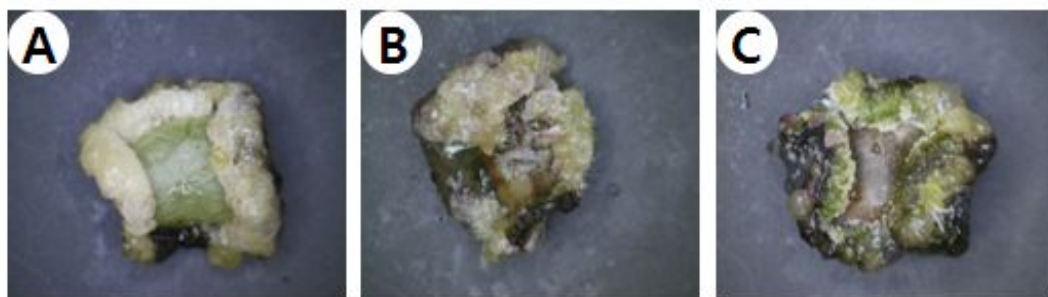


Fig. 4-2-12. Regeneration according to culture condition in *Hepatica maxima* (2 months after transplanting). (A) 21℃ (dark), (B) 25/15℃ (16/8hr), (C) 21℃ (16/18hr).

결론적으로, 캘러스가 형성될 때 가지는 암처리를 하고, 그 후 광처리를 하여 기관형성율과 발생정도를 높이므로써, 재분화 효율을 높일 수 있을 것으로 생각되었다.



## 사. 치상방법에 따른 노루귀와 섬노루귀의 재분화 효율

### (1) 연구목적

절편체를 어떤 방법으로 치상하는지에 따라서도 캘러스의 형성율과 발생정도에 영향을 미친다. 잎의 주맥과 측맥에 따라 혹은 잎의 윗면과 뒷면에 따라서도 절편체의 캘러스 형성에 영향을 미칠 것으로 생각되어져, 이를 조합하여 처리하고, 효율적인 재분화 치상방법 조건을 찾기 위해 실험을 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 식물재료 및 소독방법

교내 비닐하우스에서 재배 중인 섬노루귀 잎을 채취한 후, 수돗물로 3~4회 수세 하였다. 중성세제(2ml/L)와 락스(4ml/L)가 첨가된 용액에 5분간, 150rpm으로 세척 한 후, 다시 수돗물로 수세를 하고, 70% ethanol에 30초간 세척하였다. 수돗물로 1~2회 수세 후 1% NaOCl(sodium hypochlorite solution) 100ml당 tween 20# 한 방울을 첨가한 용액에 잎을 넣고, 170rpm에서 15분간 소독하였다. 멸균수로 4회 수세 한 다음, 주맥과 측맥으로 나누어 0.5~1cm×0.5~1cm 엽절편 자른다. 자른 엽절편을 윗면과 뒷면 방향으로 배지에 치상하였다.

#### (나) 배양배지

3% sucrose가 첨가된 MS(Murashige and Skoog)기본 배지에 BA  $1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  과 NAA  $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  을 넣고, pH를 5.7~5.8로 맞춘 다음 0.8% agar 첨가였다. agar를 녹인 후 유리시험관 ( $\text{O}30 \times 200\text{mm}$ )에 12ml분주한 다음,  $121^\circ\text{C}$ ,  $1.1\text{kgf}/\text{cm}^2$ 에서 15분간 고온고압 멸균하였다.

#### (다) 배양환경

주기 16시간/일 광주기로 온도  $21^\circ\text{C}$ , 상대습도 60%의 배양실에서 배양하였다. 광도는  $84 \pm 13 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 이었고, 사용된 광원은 형광등(FL 40EX-D, Osram, korea)이고, 광도계(HD 9021, Delta OHM, Italy)를 사용하여 측정하였다.

#### (라) 조사방법

상기의 4) 배지의 pH에 따른 노루귀와 섬노루귀의 재분화 효율에서는 조사방법과 동일하게 수하행였다.

### (3) 결과 및 고찰

모든 처리구에서 100%의 캘러스 형성율을 보였으나, 캘러스 발생정도에서는 측맥보다는 주맥에서 3.5 (윗면)과 3.1(뒷면)로 더 높게 나타났다 (Table 4-2-10, Fig. 4-2-13,14). 그러나 기관발생에 있어서는 주맥보다는 측맥에서 88.2와 100%로 더 높게 나타났고, 기관발생정도에서는 윗면을 치상하는 것 보다 잎의 뒷면을 치상하는 것이 3.1과 2.8로 더 높게 나타났다.

Table 4-2-10. Effect of kinds of vein and part of leaf placed on culture medium on the callus and organ formation of *Hepatica maxima*

| Leaf    |       | Callus induction (%) | Degree of callus formation | Organ formation (%) | Degree of organ formation |
|---------|-------|----------------------|----------------------------|---------------------|---------------------------|
| vein    | side  |                      |                            |                     |                           |
| main    | upper | 100                  | 3.5                        | 63.6                | 1.9                       |
|         | lower | 100                  | 3.1                        | 58.3                | 3.1                       |
| lateral | upper | 100                  | 2.8                        | 88.2                | 1.7                       |
|         | lower | 100                  | 2.9                        | 100.0               | 2.8                       |

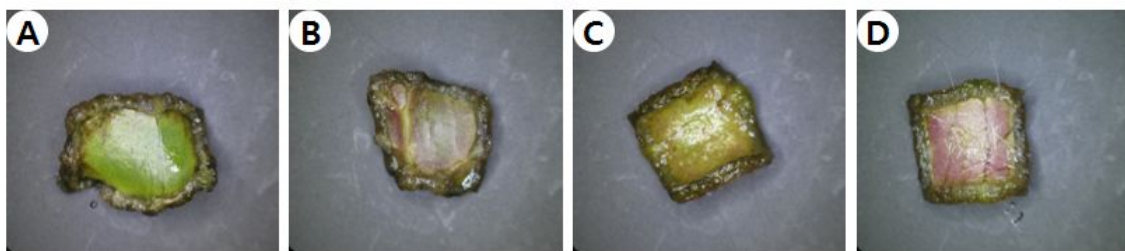


Fig. 4-2-13. Callus formation according to vein kinds and leaf part putting on medium (2 months after transplanting). (A) main/upper, (B) main/lower, (C) lateral/upper, (D) lateral/lower.

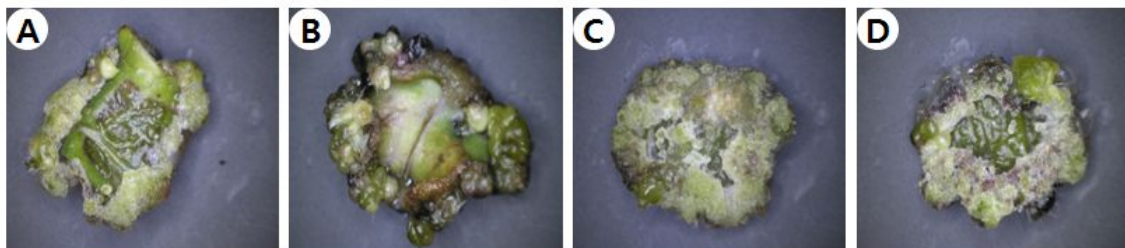


Fig. 4-2-14. Callus formation according to vein kinds and leaf part putting on medium (4 months after transplanting). (A) main/upper, (B) main/lower, (C)lateral/upper, (D) lateral/lower.

## 아. 활성탄(charcoal) 첨가에 따른 섬노루귀의 재분화 효율

### (1) 연구목적

활성탄은 배지의 sucrose의 가수분해에 의한 독성물질 흡수 하거나, 조직에서 나온 페놀 및 카르복실 화합물과 에틸렌 가스를 흡수하여 조직에 해가 없도록 하는 역할을 한다. 앞서 노루귀의 재분화 실험을 수행하면서, 절편체로 부터 페놀 물질이 나오는 것을 확인하였다. 그래서, 활성탄을 첨가하여 좀 더 효율적인 재분화 배지조성을 찾고자 실험을 수행하였다.

### (2) 재료 및 방법

#### (가) 식물재료 및 소독방법

교내 비닐하우스에서 재배 중인 섬노루귀 잎을 채취한 후, 수돗물로 3~4회 수세 하였다. 중

성세제(2ml/L)와 락스(4ml/L)가 첨가된 용액에 5분간, 150rpm으로 세척 한 후, 다시 수돗물로 수세를 하고, 70% ethanol에 30초간 세척하였다. 수돗물로 1~2회 수세 후 1% NaOCl(sodium hypochlorite solution) 100ml당 tween 20# 한 방울을 첨가한 용액에 잎을 넣고, 170rpm에서 15분간 소독하였다. 멸균수로 4회 수세 한 다음 0.5~1cm×0.5~1cm 엽절편을 배지에 치상하였다.

(나) 배양배지

3% sucrose가 첨가된 MS(Murashige and Skoog)기본 배지에 BA  $1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  과 NAA  $1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 을 넣고, charcoal 0.05%를 첨가한다. pH를 5.7~5.8로 맞춘 다음 0.8% agar 첨가였다. agar를 녹인 후 유리시험관(Ø30×200mm)에 12mL분주한 다음, 121°C, 1.1kgf/cm<sup>2</sup>에서 15분간 고온고압 멸균하였다.

(다) 배양환경

주기 16시간/일 광주기로 온도 21°C, 상대습도 60%의 배양실에서 배양하였다. 광도는  $84 \pm 13 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 이었고, 사용된 광원은 형광등(FL 40EX-D, Osram, Korea)이고, 광도계(HD 9021, Delta OHM, Italy)를 사용하여 측정하였다.

(라) 조사방법

상기의 4) 배지의 pH에 따른 노루귀와 섬노루귀의 재분화 효율에서는 조사방법과 동일하게 수행하였다.

**(3) 결과 및 고찰**

무처리구에서 100%의 높은 캘러스 형성율과 3의 캘러스 발생정도를 보였다 (Table 4-2-11). 그리고, 기관형성율과 발생정도는 79.6%과 2.3으로 나타났다 (Fig. 4-2-15). 그러나 charcoal을 처리한 실험구에서는 25%의 낮은 캘러스 형성율과 1의 캘러스 발생정도를 보였고, 기관형성율과 발생정도는 0으로 나타났다. 이는 charcoal 이 식물체에 해로운 페놀물질만 흡수한 것이 아니라, 성장조절물질까지 흡수함으로써, 식물체가 이용할 수 있는 성장조절물질이 줄어들어 이런 결과가 나온 것으로 생각된다. 그러므로 섬노루귀에서는 charcoal 을 사용하지 않는 것이 좋겠다는 판단을 했다.

Table 4-2-11. Effect of plant hormones on the callus and organ formation of *Hepatica maxima*

| Charcoal<br>0.05% | Callus induction<br>(%) | Degree of callus<br>formation | Organ formation<br>(%) | Degree of organ<br>formation |
|-------------------|-------------------------|-------------------------------|------------------------|------------------------------|
| -                 | 100.0                   | 3.0                           | 79.6                   | 2.3                          |
| +                 | 25.0                    | 1.0                           | 0.0                    | 0.0                          |

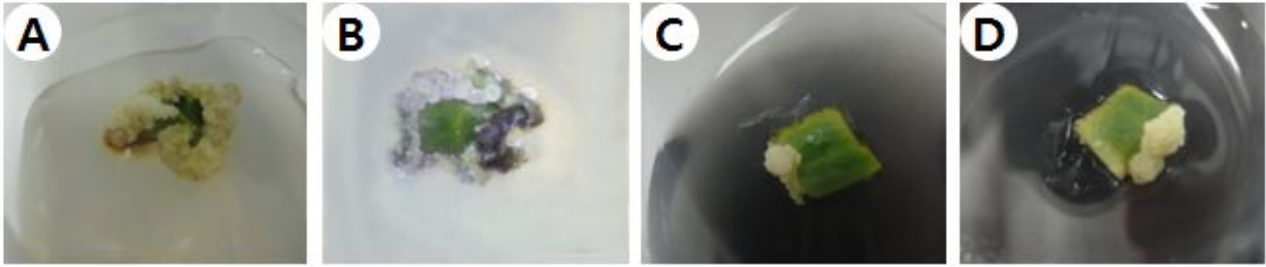


Fig 4-2-15. Effect of plant hormones on the callus and organ formation of *Hepatica maxima* . (A) -charcoal(2 months after transplanting), (B) -charcoal(3 months), (C) +charcoal(2 months), (D) +charcoal(3 months).

#### IV. 종합 고찰 및 금후계획

노루귀와 섬노루귀의 잎을 기내 배양한 결과, 1개월 이상의 시간이 걸리긴 했지만, 대부분의 치상체에서 캘루스가 발생되었다 (Fig. 4-2-16). 그러나 배양조건에 따라서는 캘루스와 함께 싹, 뿌리 또는 꽃눈이 발생하는 경우도 관찰되었다. 그러나 생육이 타 식물보다 느려서 하나의 식물체를 얻기까지는 4-6개월이 소요되었다. 또한 오염율이 높아 실험을 수행하는데 어려움이 많았다. 오염율은 실험시기 (계절)에 따라 크게 차이가 났는데, 이는 식물체의 활력이 크게 작용하는 것으로 생각되었다.

따라서, 향후 실험에서는 노루귀와 섬노루귀의 잎이 전개된 시점으로부터 노화되기까지의 잎의 활력을 검정하고, 이에 따른 재분화 효율을 조사해 봄으로써 재분화 효율이 높은 시기를 결정하는 실험을 추가로 할 계획이다. 그리고 앞서 연구된 실험에서 재분화에 적합한 조건들을 조합하여 재분화 효율 높일 생각이다.

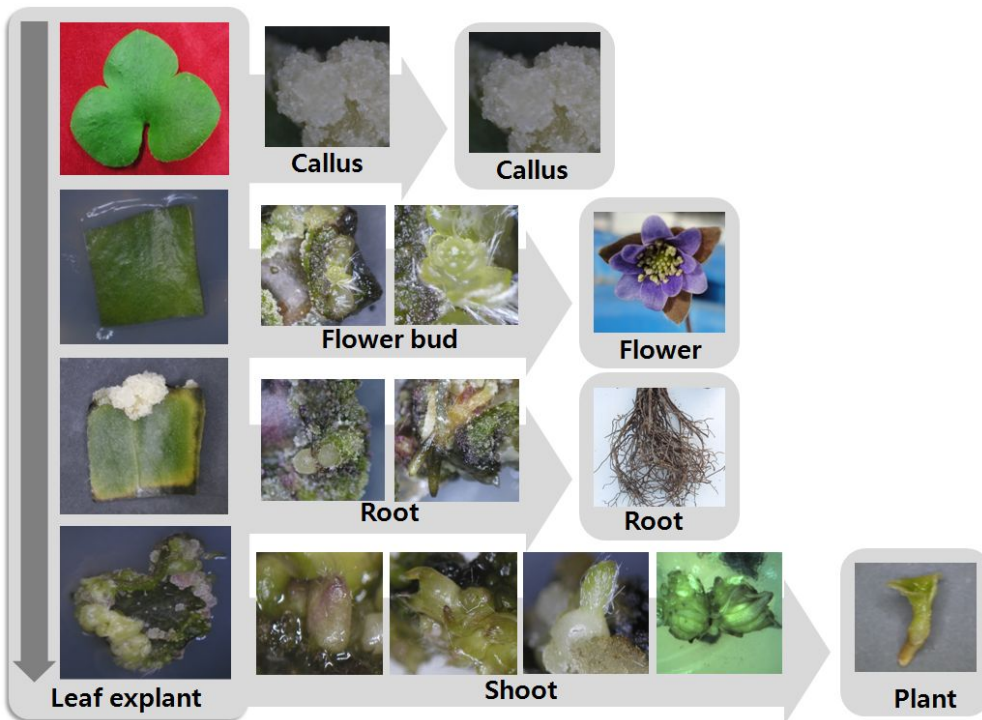


Fig. 4-2-16. Diagram of organ formation (callus, shoot, flower bud, and root) in *Hepatica maxima*

### 3. 토속 바위솔에 대한 소비자 선호도 조사.

#### 가. 연구목적

지금까지 연구에서 수집, 선발되었던 우수한 상품성을 가진 다양한 바위솔 개체들을 대상으로 소비자의 토속바위솔 및 외래종 바위솔에 대한 소비자 기호도를 조사하고자 했다. 그리고 분화상품으로 개발될 경우, 상품특성, 즉 사이즈, 식재방법 및 가격 등에 대한 소비자의 기호를 알아보고자 연구를 수행하였다.

#### 나. 재료 및 방법

경남과학기술대학내 비닐온실에서 번식 재배 생산된 자생 및 외래종 바위솔 10종 (Fig. 4-3-2) 을 선택하여 분크기와 식재방식을 달리하여 설문대상에 이용될 상품을 준비하였다.

##### (1) 조사대상

경남과학기술대학교 원예학과 학생들이 주관해서 이루어진 ‘봄꽃축제’ 행사에 방문한 일반인과 학생들 (참여자 486명).

(2) 표집 방법: 층화랜덤표본추출.

(3) 조사 방법 : 참여한 연령대별로 색깔을 달리 설문응답란에 스티커 붙이기(Fig. 4-3-1).

빨간색스티커 20대, 노란색스티커 30대, 푸른색스티커 40대

(4) 조사 기간 :

2012년 4월 4일~4월 6일(3일간)

(5) 스티커 설문조사내용

- 가장 선호하는 바위솔은 ?  
3개의 다중선택 (Fig. 4-3-2)
- 분화바위솔을 구매한다면 분사이즈는 ?  
대(115×100cm, 직경x깊이), 중(90×70cm), 소(65×60cm) (Fig. 4-2-3A)
- 분화바위솔을 구매한다면 식재방식은 ?  
단일식재, 모듬식재(Fig. 4-2-3B)
- 분화바위솔을 구매한다면 얼마를 지불할 수 있나 ?  
2000원대, 300원대, 4000원대

(6) 설문조사로 수집된 데이터를 연령별로 층화한 범주에 대한 빈도데이터로 코딩, 빈도분석을 이용해서 분석(SPSS ver. 10.0).



Fig. 4-3-1. (A) A pamphlet of 'spring flower festival' held by students of Dept. of Gyeongnam National University for Science and Technology. (B) Preference survey conducted by question investigation



Fig. 4-3-2. Native *Orostachys* and introduced species used for preference questions. (A) Nungyu bawisol, (B) Zom bawisol, (C) Gangwonsangdong bawisol, (D) Jesu yeonhwa bawisol, (E) Jajil yeonhwa bawisol, (F) Taebak dunggun bawisol, (G) Monggol bawisol, (H) Jirisan jinju bawisol, (I) Gaji bawisol, (J) Geomizul bawisol. (K) Pot plants displayed for customer preference questions

#### 다. 결과 및 고찰

가장 선호하는 바위솔에 대한 조사는 다중선택으로 이루어졌다. 설문지로 행해진 조사가 아니기 때문에 스티커 하나하나에 대한 정보를 정확하게 기술하는 것은 불가능하다. 그래서 다중응답으로 수집된 데이터를 단순히 연령수준에 빈도데이터로 변환시켜 빈도분석을 행하였다. 다른 설문도 연령수준에 대한 빈도데이터로 변환하여 빈도분석을 행하였다.

- 가장 선호하는 바위솔은 ?

응답자의 특성은 Fig. 4-3-4A와 같다. 20대가 73%, 30대가 13%, 40대 이상이 14%가 질문에 답하였다. 나이에 관계없이 전체적인 응답반응은 자생바위솔인 자질연화바위솔이 가장 많은 빈도로 응답되었다.

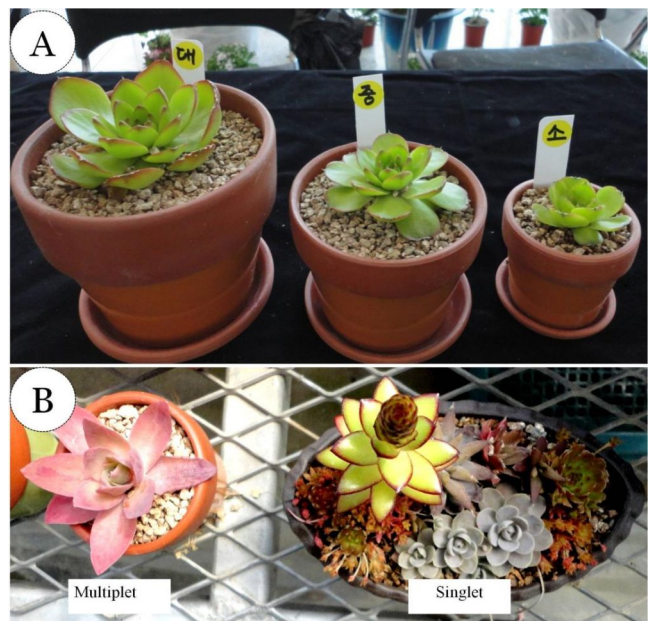


Fig. 4-3-3. (A) Sizes of pot plant, (B) Single plant pot and mixed plants pot

그 다음으로 외래종인 거미줄 바위솔 (상대적인 %빈도, 84%), 자생바위솔인 태백바위솔(81%)로 응답되었다 (Fig. 4-3-4B). 연령대별로 분석한 결과 (Fig. 4-3-5), 20대는 선호하는 바위솔로 거미줄바위솔이 높았고 (17%), 능유바위솔 (12%), 강원상동연화 및 태백바위솔 (11%) 순이었다. 30대는 쯤바위솔이 높았고 (15%), 태백 등근바위솔 (14%), 자질연화 및 능유바위솔 (13%) 순으로, 균등한 빈도의 선호도를 보였다. 40대 이상은 자질연화바위솔이 제일 높았고 (19%), 쯤바위솔 (14%) 이 그 다음 순으로 나타났다. 소비자의 연령 간에 바위솔에 대한 기호도에 있어 차이가 크게 나타났다. 젊은 층은 외래종의 바위솔을 더 선호하였고, 30대 이상에서는 자생바위솔에 대한 선호도가 더 큰 것으로 나타났다.

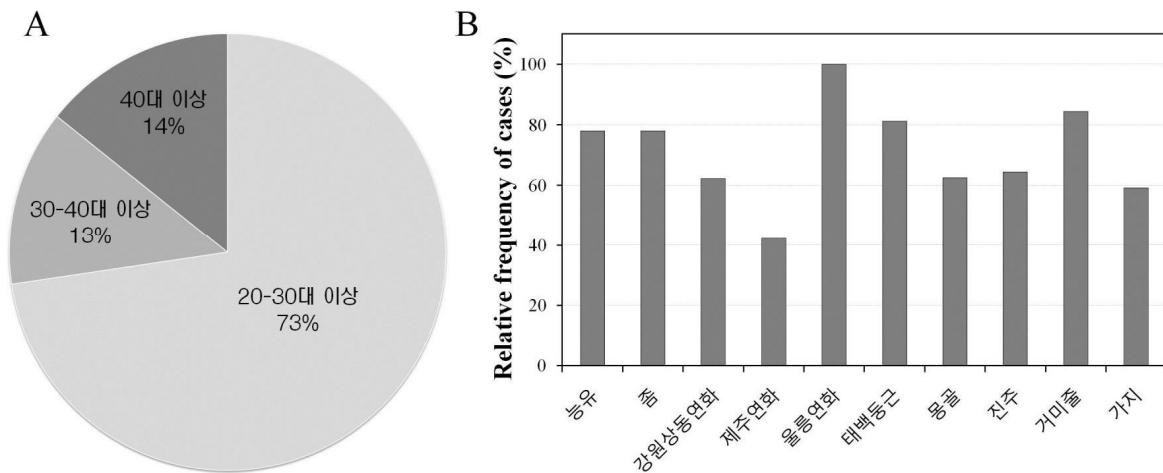


Fig. 4-3-4. Preference survey for *Orotachys* plants. (A) Ages of respondents to questions. (B) Relative frequency for 10 kinds of *Orotachys* plants

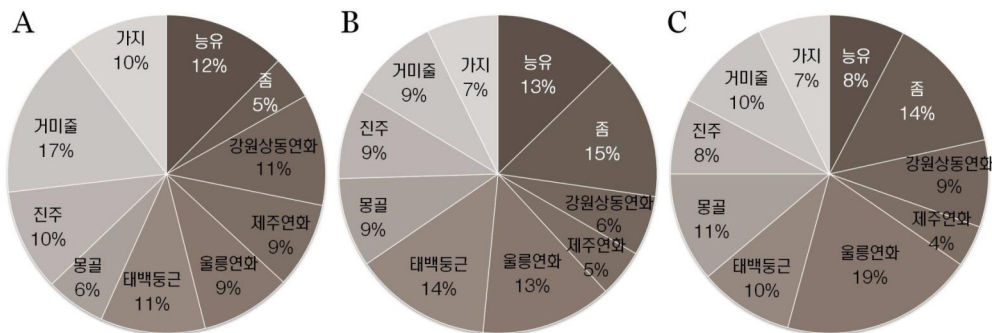


Fig 4-3-5. Responses of respondents according to age group for a question 'What would you like ?' (A) 20s (B) 30s (C) above 40

- 분화바위솔을 구매한다면 분사이즈는 ?

응답자 중 20대와 30대가 각각 45%, 61% 빈도로 중간사이즈의 분화 (90×70 cm)로 분화바위솔 구매기호를 나타냈다. 반면에, 40대 이상은 분 크기에 대해 특별한 기호를 나타내지 않고, 30-36% 로 균등하게 빈도가 분포되어 있는 것으로 응답결과 나타났다 (Fig. 4-3-6).

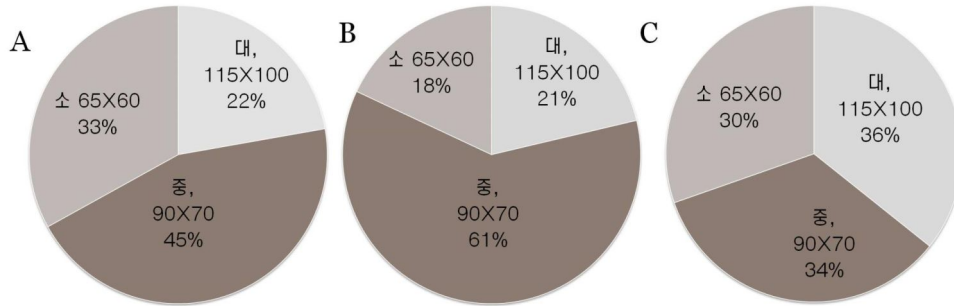


Fig. 4-3-6. Responses of respondents according to age group for a question 'What size would you like ?' (A) 20s (B) 30s (C) above 40

• 분화바위솔을 구매한다면 식재방식은 ? 단일식재, 모듬식재 (Fig. 4-3-7)

응답자 중 20대가 단일 단독 식재를 더 선호하였고 (67%), 30대 (57%)와 40대 이상 (60%)은 비슷한 수준으로 모듬식재를 더 선호하는 것으로 나타났다 (Fig. 4-2-7).

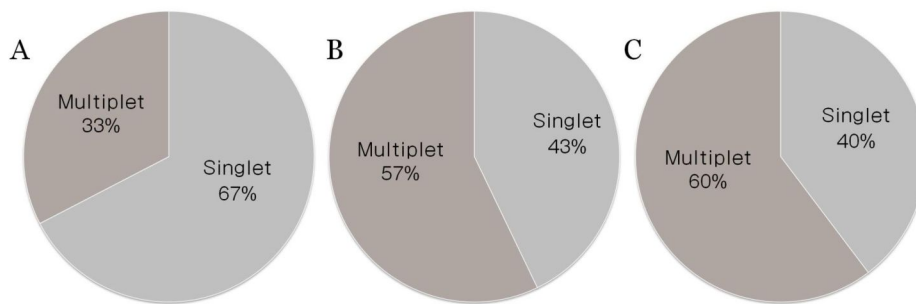


Fig 4-3-7. Responses of respondents according to age group for a question 'Which type would you like, silge plant or mixed plant ?' (A) 20s (B) 30s (C) above 40

• 분화바위솔을 구매한다면 얼마를 지불할 수 있나 ? 2000원대, 3000원대, 4000원대

응답자 중 20대 (45%) 와 40대 이상(49%)이 가장 낮은 가격인 2000원대에 높은 빈도의 반응을 보였다. 30대는 3000원대의 가격에 44% 반응빈도를 나타냈다 (Fig. 4-3-8).

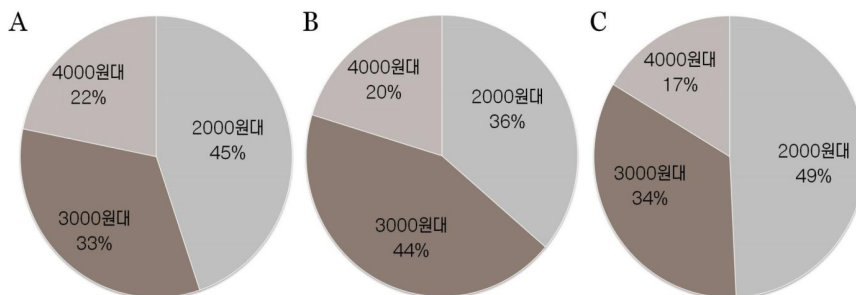


Fig 4-3-7. Responses of respondents according to age group for a question 'Which price would you like, 2,000won, 3,000won or 4,000won ?' (A) 20s (B) 30s (C) above 40



#### 라. 금후계획

설문조사에서 얻어진 분화바위솔에 대한 연령별 기호특성조사 결과를 바탕으로 샘플상품을 제작, 모의 판매나 전시회를 통해서 좀 더 실제적인 소비자의 바위솔에 대한 구매특성과 기호를 파악할 계획이다

## 제 5 절 일장 조절용 장식장 개발 및 해외 시험 수출

### 1. 일장, 조명색과 밝기 조절이 가능한 개화조절용 식물 장식장 개발

#### 가. 식물 장식장의 기능과 디자인 개발

##### (1) 연구목적

토속바위솔은 선행연구에서 밝혀진대로, 파종 후 1년차 겨울에는 휴면이 들어가고, 2년차에 가을에는 개화한 후 식물체가 죽는 임성식물이다. 그래서 이런 생리적 특성 때문에 사시사철 아름다운 모습으로 자라는 것을 보기를 원하는 일반가정에서 분화로서 토속바위솔을 키우는 데 많은 한계가 있다. 그러나 지난 4년간의 선행연구를 통해, 우리는 토속바위솔의 재배환경을 조절로 함으로써, 가을철 개화와 겨울철 휴면을 회피할 수 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 바위솔을 포함한 다육식물은 야간에 산소를 공급해주는 장점도 있다는 것을 알고 있다. 따라서 우리는 인위적으로 일장을 조절하고 조명등의 밝기와 색을 조절할 수 있는 장식장을 개발하여, 개화와 휴면을 회피하여 사시사철 다육식물을 즐길 수 있게 하였다.

##### (2) 식물 장식장의 주요 특징

- ① 일장제어가 가능하다. 필요시 타이머를 통해 일장을 조절하여 바위솔과 같은 단일식물의 개화를 억제하여 관상기간을 연장할 수 있을 것으로 생각된다(Fig. 5-1-1A).
- ② 조명색과 밝기를 조절할 수 있다. LED 3색등을 설치하고 단독 또는 혼용하여 여러 가지 색을 연출할 수 있게 하여 실내의 조명등 역할을 할 수 있게 하였다 (Fig. 5-1-1B). 또한 조명등의 밝기를 조절할 수 있게 하여 실내 공간에 맞추어 밝기를 조절할 수 있도록 하였다.
- ③ 저면관수 시스템으로 한다. 관수는 하단부에 저면관수용 셀을 넣고 토양 부분과는 심지로 연결하여 모세관 현상에 의해 적당한 수분만 공급될 수 있도록 하였다 (Fig. 5-1-1C).

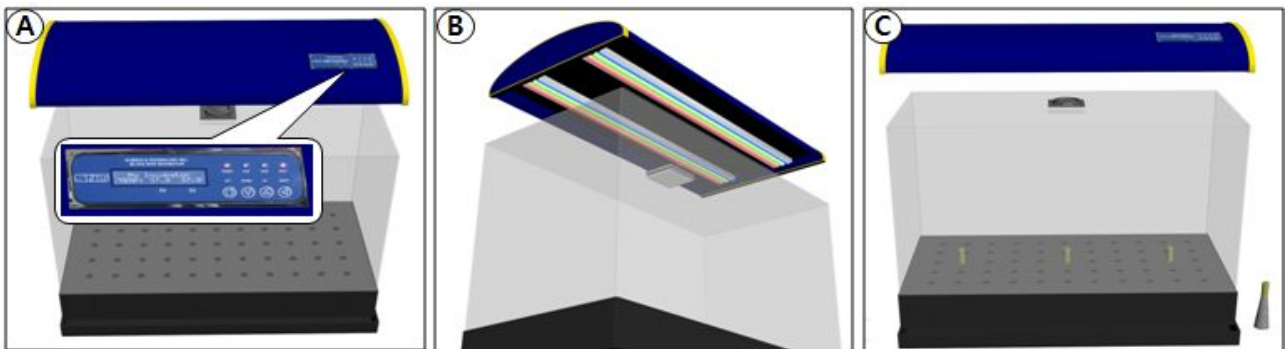


Fig. 5-1-3. Special functions of this decoration box. A: Day length control panel, B: LED lights of 3 colors, C: Sub-irrigation system

##### (3) 식물 장식장 디자인

###### (가) 형태별 디자인

상부에는 조명등과 조절장치를 설치하고 하부에는 저면관수가 가능한 시설이 들어가면서 식물을 식재하여 즐길 수 있는 장식장을 여러 형태로 디자인해 보았다 (Fig. 5-1-2). 정사각형, 직사각형, 원통형 등을 생각할 수 있었고, 우리나라 고전 지붕을 기본으로 한 디자인도 시도해 보았다.

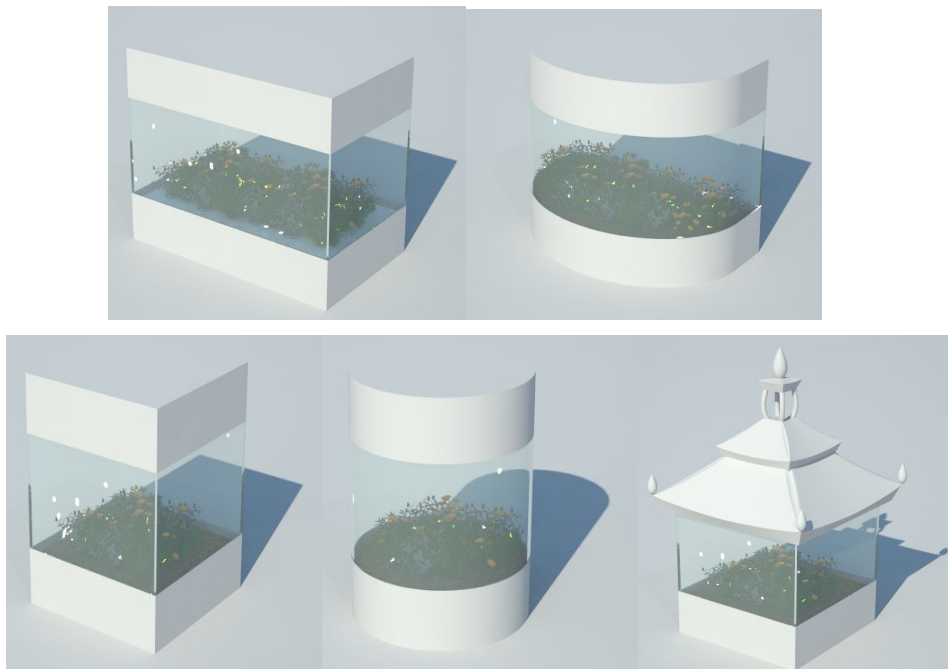


Fig. 5-1-2. Various types of decoration chamber designed for this project

(나) 설치 공간에 따른 디자인

실내의 어떤 장소에서 설치하느냐에 따른 공감개념으로 접근해 보았다. 아늑한 분위기가 필요한 침실용, 가족 구성원 모두가 활동하는 거실용, 그리고 대부분의 시간을 직장에서 보내는 직장인을 위한 사무용으로 나누어 디자인해 보았다.

① 침실용

<원추형>

침실에 흔히 사용하는 침실 스텐드에 식물을 심어 즐길 수 있는 장식장으로, 아늑한 분위기를 연출함과 동시에 조명색과 세기를 조절할 수 있다 (Fig. 5-1-4). 서랍식으로 급수대를 분리할 수 있어, 수분공급하기 용이한 제품이다. 침실에서 사용하기 때문에 청결이 중요한 요인이 되는데, 저면관수 설비로 항상 청결하게 관리할 수 있다.

침실의 분위기에 따라 좋아하는 조명색으로 조절이 가능하다 (Fig. 5-1-5). 또한 광의 세기를 조절할 수 있기 때문에 필요에 따라 광의 세기를 조절한다. 식재 식물은 바위솔과 같은 다육식물을 위주로 하기 때문에 물관리하기가 편리하고, 다육식물은 밤에 산소를 배출하는 성질이 있으므로 밤에만 사용하는 침실에 산소를 공급할 수 있어 기능성면에서도 매우 좋다 (Fig. 5-1-6).

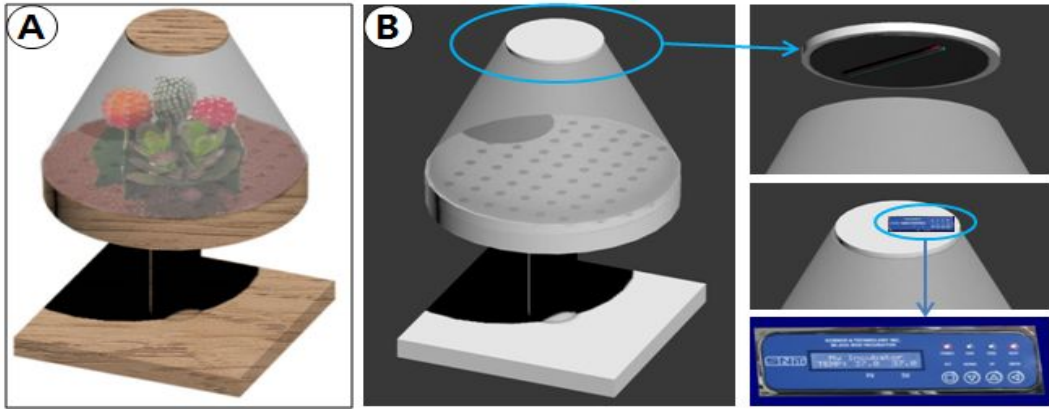


Fig. 5-1-4. Plant lighting box for bed room (Cone type) A: Lighting box with plants, B: Controlling part



Fig. 5-1-5. Different light color from plant lighting box for bed room



Fig. 5-1-6. Plant lighting box decorated in a bed room

<원통형>

상기한 원추형과 기능은 똑 같다. 외형만 원통형으로 디자인하였다 (Fig. 5-1-7). 일장과 광도 그리고 조명색을 조절할 수 있어 식물을 오랫동안 감상할 수 있으며, 침실의 분위기를 살릴 수 있다. 관수는 완전 아래 부분에 관수용 서랍을 설치하는 것과 중간 부위에 관수 서랍을 설치하는 2가지 타입이 있다.

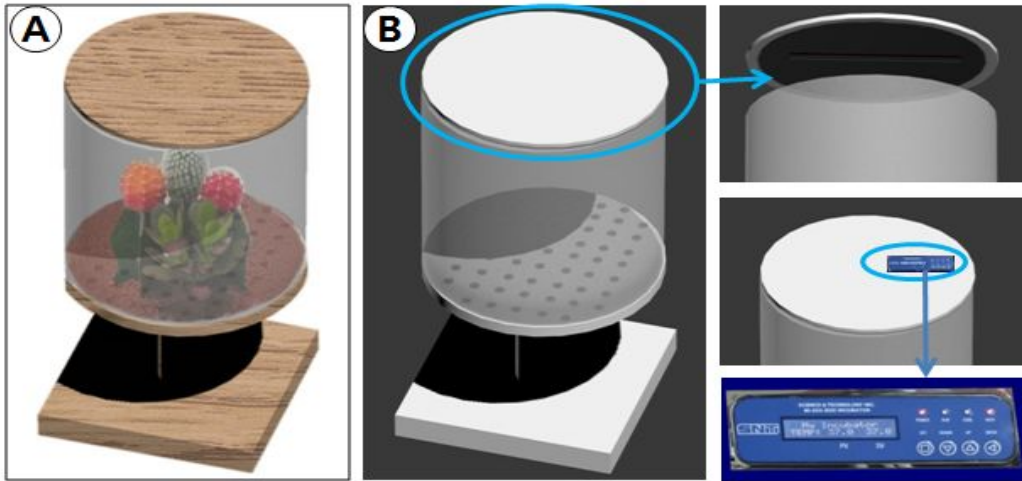


Fig. 5-1-7. Plant lighting box for bed room (Cylindric type). A: Plant lighting box decorated plants, B: Control part

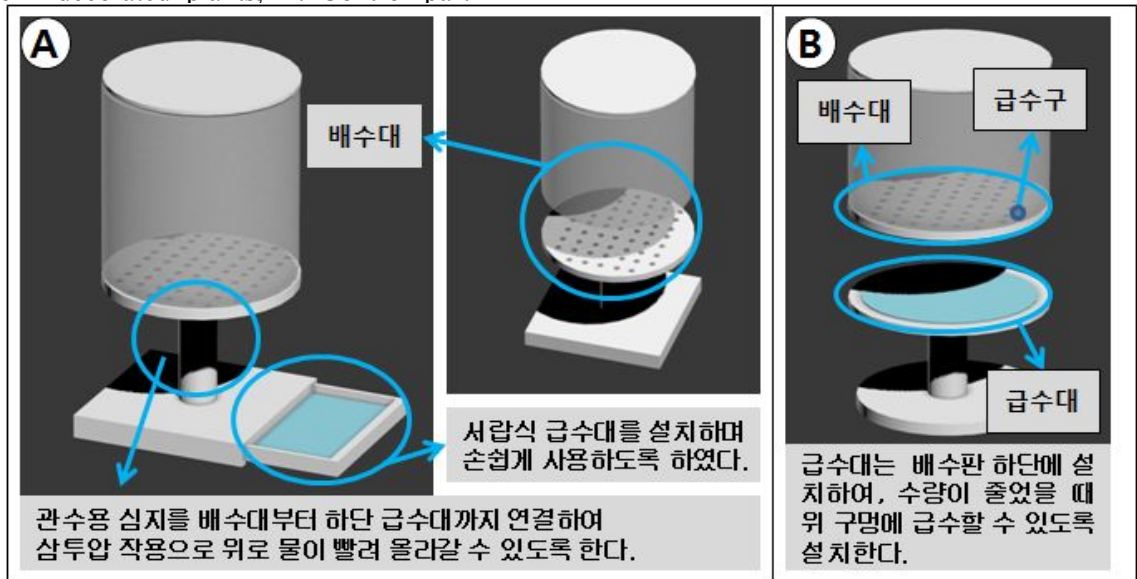


Fig. 5-1-8. Sub-irrigation system using water drawer and wick

## ② 거실용

테이블 일체형 디자인이다. 거실에서 사용하는 테이블의 다리 대신에 장식장을 넣은 디자인이다 (Fig. 5-1-9). 독서를 하거나 차 한잔의 여유를 즐기면서, 식물의 싱그러움도 함께 즐길 수 있는 디자인이다. 기능은 위의 침실용과 같다. 기본적으로 일장조절이 가능하고, 조명색과 조명세기 그리고 저면 관수 장치가 되어 있다 (Fig. 5-1-10).

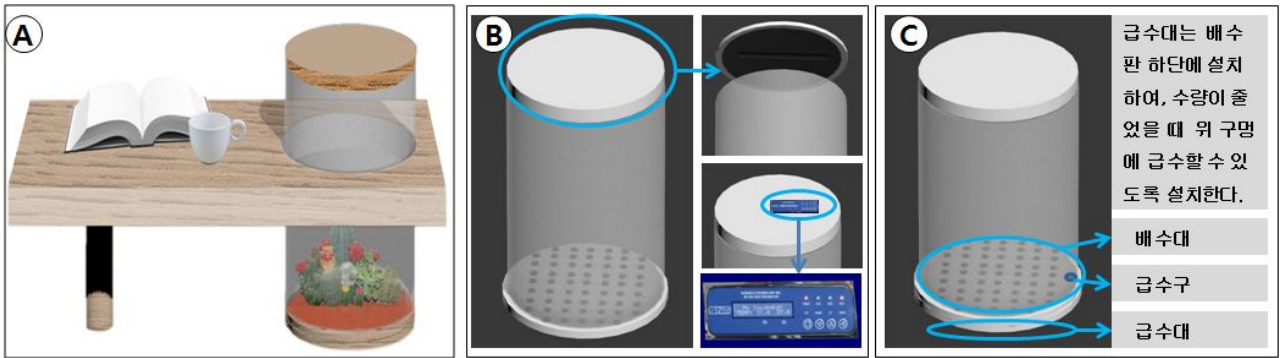


Fig. 5-1-9. Plant lighting box assembled with a table (A). B: Control panel, C: Sub-irrigation part

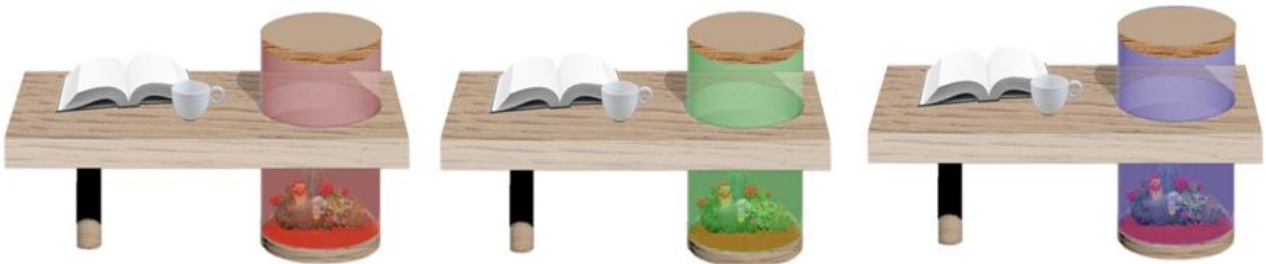


Fig. 5-1-10. Plant lighting box assembled with a table showing different lighting color.

(다) 의자용

사무실이나 거실에서 인테리어겸 의자로 활용할 수 있는 디자인이다 (Fig. 5-1-10). 식물장식장 상부에는 일반의자에서 사용하는 쿠션을 넣어서 앉았을 때 불편하지 않도록 디자인되었다. 모든 기능은 상기한 침실형과 동일하며 조명색을 바꾸었을 때는 아래 그림과 같이 다양한 색을 연출할 수 있다. 사무실이나 거실공간에서 잠시 앉아서 휴식을 취할 때, 식물을 즐길 수 있게 디자인되었다 (Fig. 5-1-11)



Fig. 5-1-10. Plant lighting box having facility as a stool. (A). B: Showing different colors



Fig. 5-1-11. Plant lighting box displayed at a living room, showing different colors.

#### 나. 식물 장식장 시제품 제작

상기한 다양한 디자인을 참고하여 직접 식물 장식장 시제품을 제작하였다. 식물 장식장의 기능은 앞서 연구한 기능들을 장식장에 접목하였다. 팬을 이용한 장식장 내의 공기순화, 심지를 이용한 삼투압 방식의 급수기능, 일장조절이 가능한 타이머 그리고, 다양한 조명색을 연출할 수 있도록 LED 등을 이용한 식물 장식장을 설계하였다 (Fig 5-1-12).

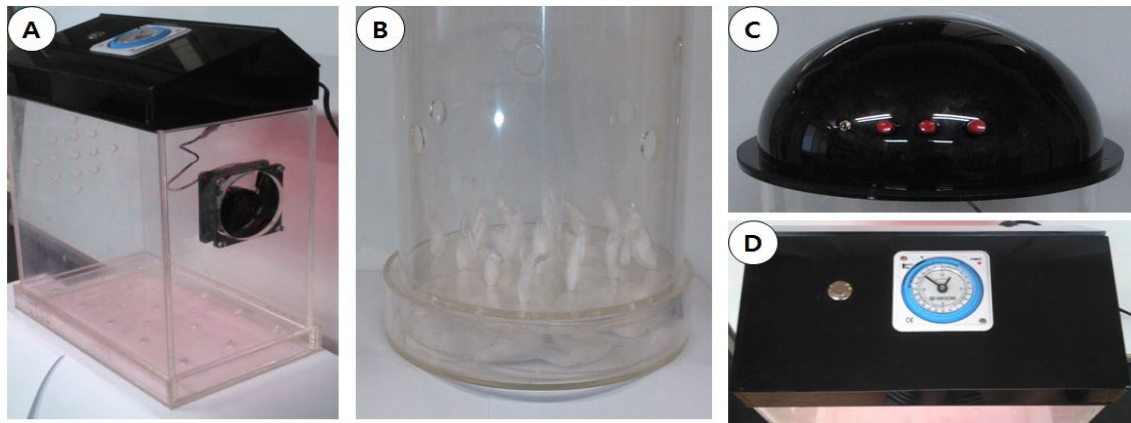


Fig. 5-1-12. Appearance of trial product using acrylic panel (A), wick for sub-irrigation (B), button for different light color (C), and timer for control day-length.

시제품은 사각형과 원통형 두 모델로 제작하였다(Fig. 5-1-22). 사각형 모델은 직사각형의 모양의 장식장으로, 가장 일반적인 형태이다. 일장조절, 조명색과 조명세기 등을 조절할 수 있게 설계되어 있고 저면급수가 가능하도록 제작되었다 (Fig. 5-1-13). 조명색은 하나의 버튼을 누를 때마다 조명색이 바뀌도록 설계되어 있다 (Fig. 5-1-14). 일장 조절을 위한 타이머는 현재는 일반 타이머를 사용하여 소음이 있고 모양도 세련되지 못하나, 상품을 만들 때는 디지털로 제어가 될 수 있도록 할 계획이다.

원통형 모델은 바디 부분이 원통형으로 사각형 보다 부드러움을 주며 다양한 각도에서도 편안하게 아름다운 식물을 감상할 수 있다. 상부에 있는 조명 버튼을 이용하면 총 7가지 조명색을 연출할 수 있다 (Fig. 5-1-13, 15).

시제품을 수작업으로 만들다 보니, 상상했던 상품이 잘 나오지 않아 어려움이 있었다. 앞으로 대량생산을 하게 된다면 제품소재를 아크릴판이 아닌 플라스틱으로 해야 할 것이다. 그렇게 되면 생산비가 절감 될 것이며 가벼워서 다루기도 편해질 것이다. 상부 뚜껑 부분과 하부 급수장치, 그리고 토양이 들어가는 부위는 부위별로 다른 색을 칠해서 고급스러운 이미지를 줄 필요

가 있다. 조명이나 일장조절 장치는 디지털 판넬을 이용해서 고급스런 이미지로 바꾸어야 할 것이다. 이상과 같이 다양한 기능을 가진 식물 장식장을 위에 소개한 디자인을 이용해서 상품을 만든다면, 많은 소비가 있을 것으로 판단되며 그에 따라 다육식물의 소비도 증대될 것으로 생각된다.

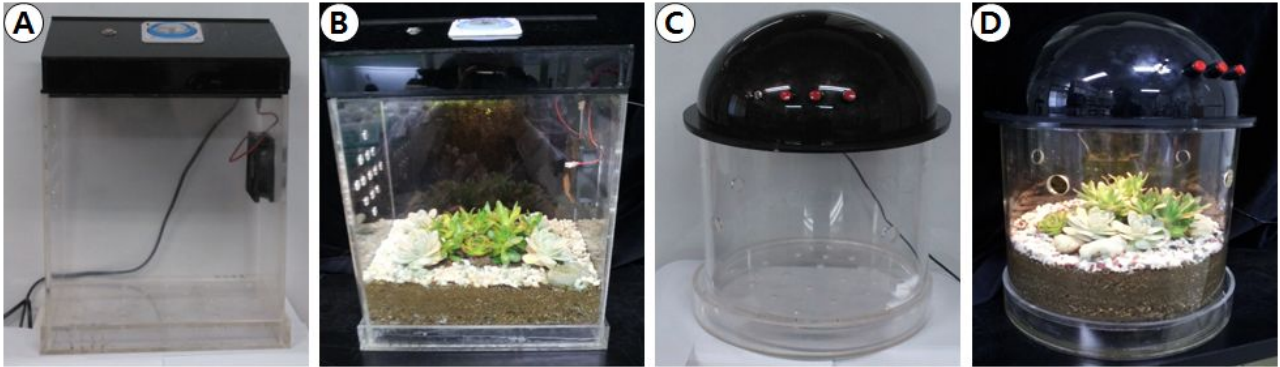


Fig. 5-1-13. Trial product of plant lighting box of 2 types. Rectangular type (A, B), cylindrical type (C, D)



Fig. 5-1-14. Rectangular plant lighting box showing various light colors.



Fig. 5-1-15. Cylindrical plant lighting box showing various light colors.

## 2. 농가 현장 실증 실험 및 문제점 보완

### 가. GA<sub>3</sub>가 바위솔 휴면타파에 미치는 영향

#### (1) 연구목적



현재 연화 바위솔의 연구로는 개화억제 및 시비수준에 관한 연구는 많이 이루어져 있으나 휴면타파에 관한 연구는 미흡하다. GA<sub>3</sub>는 많은 식물의 휴면 타파를 촉진시켜 주는 역할을 하며, 적정 GA<sub>3</sub> 농도는 식물의 종류에 따라 달라진다. 본 연구에서는 GA<sub>3</sub>처리가 토속바위솔의 휴면 타파에 어떻게 영향을 끼치는 알아보고자 실험을 수행하였다.

## (2) 재료 및 방법

### (가) 실험재료

식물재료는 2012년에 가을에 채종한 종자를 2013년 2월에 파종하여 교내 비닐온실에서 재배하였다. 재배된 영동바위솔(*Orostachys japonicus*) 묘는 4월경에 마사토(6), 유기상토(2) 및 강모래(2)로 혼합한 분용토를 이용하여 직경 9cm 비닐포트에 이식하였다. 정식은 6월에 4월에 이식한 용토배합과 같은 배합토를 직경 11cm 비닐포트에 심었다. 정식 후 약 6개월 후에 영동바위솔은 휴면에 들어갔고, 휴면에 들어간 영동바위솔을 실험에 이용하였다.

### (나) 실험방법

교내 비닐 하우스에서 휴면에 들어간 바위솔에 GA<sub>3</sub> 농도 20, 100, 500mg·L<sup>-1</sup>을 엽면시비하였다. 비닐하우스내 재배온도는 주간 20℃, 야간 15℃로 조절하였고, 18/6시간의 광주기를 주었다(Fig. 5-2-1). GA<sub>3</sub>처리 후 바위솔의 휴면타파 여부 및 생육변화를 10일 간격으로 80일 동안 조사하였다. 휴면타파 조사기준은 영동바위솔이 타파되는 과정인 Fig. 5-2-2에서 D 단계에 이르렀을 때를 휴면이 타파되었다고 보았다. 그리고 추대는 Fig 5-2-3의 A처럼 육안으로 추대가 확인 가능한 시점을 추대가 되었다고 보았다. 분지발생은 Fig 5-2-3의 B, C 처럼 분지가 발생했을 때, 분지 길이가 1cm 이상 되는 것만 분지로 보았다. 그리고 처리당 10포트를 실험에 사용하였다.

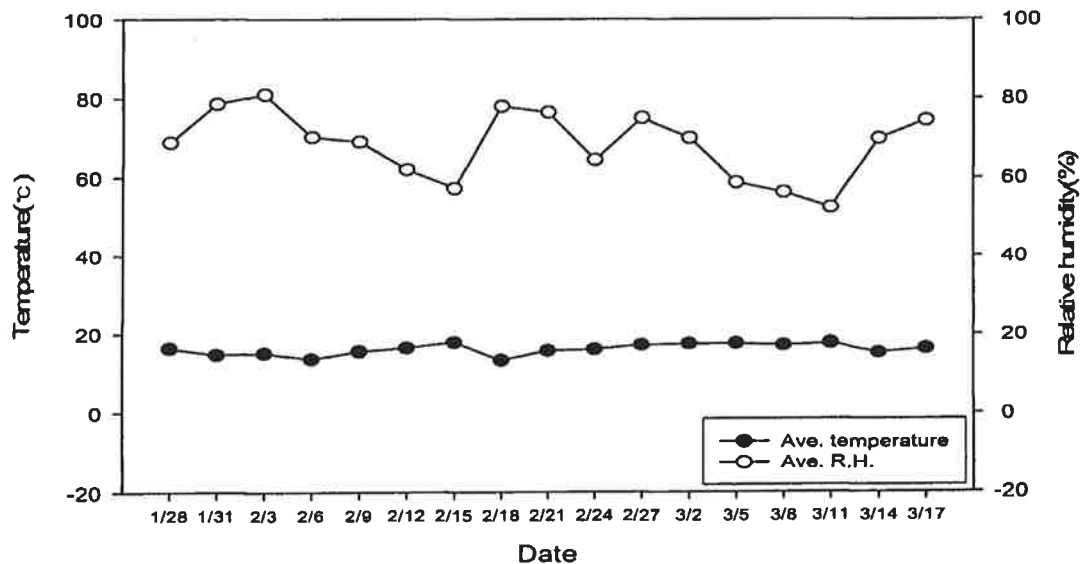


Fig. 5-2-1. Changes of temperature and relative humidity in a plastic house during this experiment.

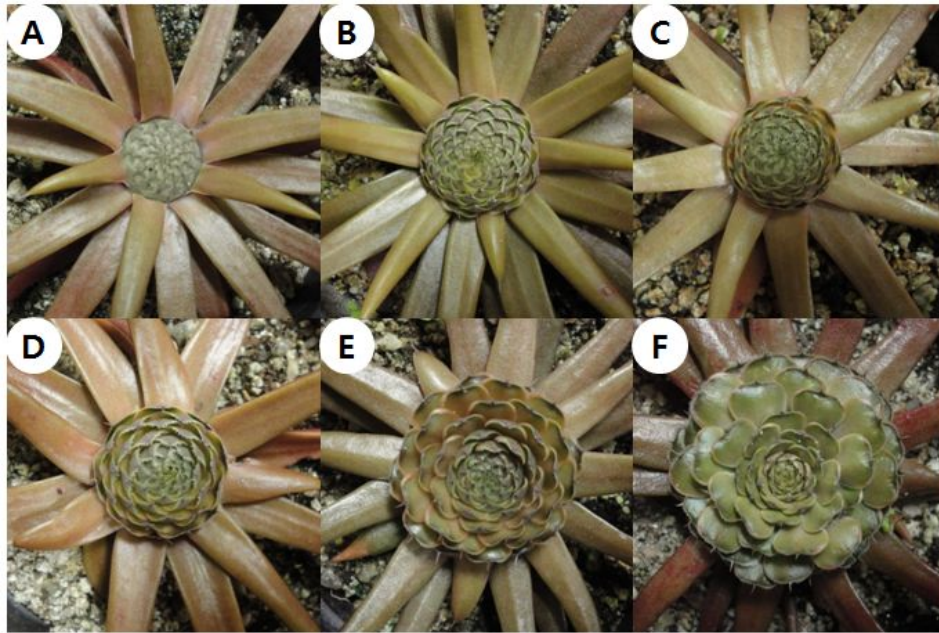


Fig. 5-2-2. Procedure breaking dormancy of *Orostachys japonicus*.

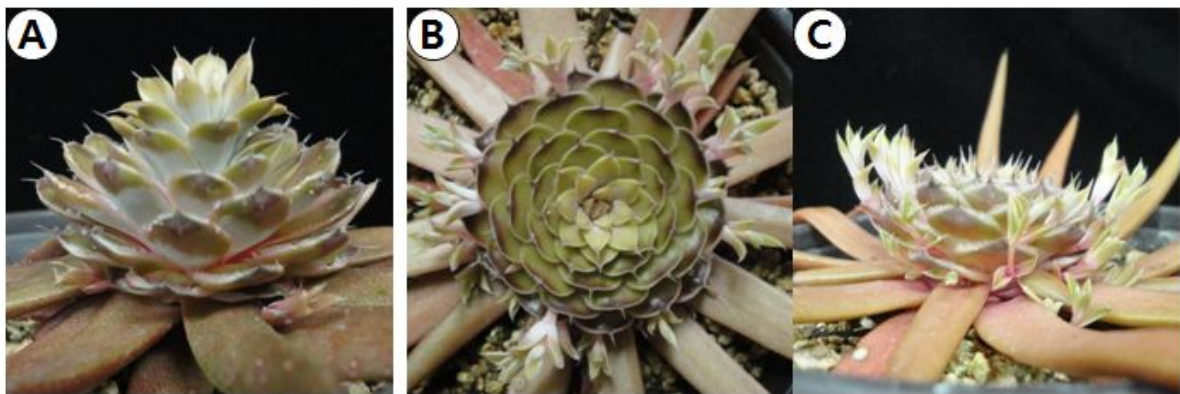


Fig. 5-2-3. Bolting (A) and branching development (B, C) in *Orostachys japonicus*

### (3) 결과 및 고찰

GA<sub>3</sub>를 처리하고 20일이 경과한 후부터 휴면이 타파되기 시작하였다. Fig. 5-2-4과 같이 대조구를 제외한 모든 실험구에서 휴면타파가 시작되었고, 40일이 경과한 시점에서는 농도에 상관없이 모든 GA<sub>3</sub> 처리구에서 100%로의 휴면 타파율을 보였다. 이에 반해 대조구는 휴면타파 시작일도 처리구 비해 20일 정도 늦고, 최종 휴면타파율도 처리 60일이 지난 시점에서 60% 밖에 되지 않았다. 이는 GA<sub>3</sub> 처리가 휴면타파에 영향을 미치는 것을 알 수 있었고, GA<sub>3</sub> 농도에 무관하게 휴면타파가 일어나는 것으로 생각된다.

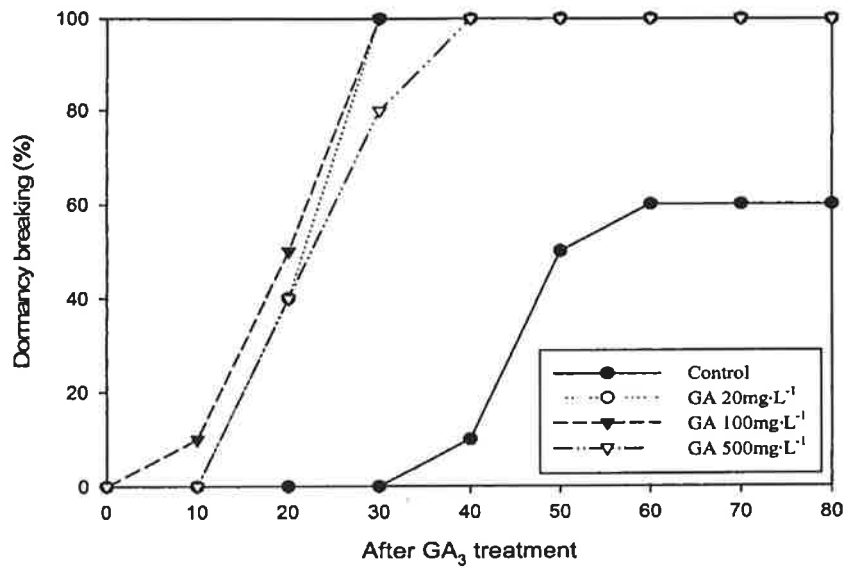


Fig. 5-2-4. Effect of GA treatment on dormancy breaking of *Orostachys japonicus*.

그리고 GA<sub>3</sub> 처리로 인한 생육적인 변화도 볼 수 있었다. 대조구에 비해 모든 처리구에서 높은 분지발생율과 추대율을 볼 수 있었다. 분지발생율은 대조구가 30% 밖에 안되는 것에 반해, 처리구는 90~100%의 높은 분지발생율을 보였다(Table 5-2-1).

Table 5-2-1. Effect of GA on the occurrence and number of lateral branch

| Treatment                | Lateral branch (%) | No. of branch (ea/plant) |
|--------------------------|--------------------|--------------------------|
| Control                  | 30                 | 7.6                      |
| GA 20mg·L <sup>-1</sup>  | 90                 | 3.2                      |
| GA 100mg·L <sup>-1</sup> | 100                | 6.6                      |
| GA 500mg·L <sup>-1</sup> | 100                | 5                        |

추대는 GA<sub>3</sub> 처리 40일부터 시작하여, 처리 80일이 경과했을 때 90~100%의 추대율을 보인 반면, 대조구에서는 처리 80일부터 추대하였고 약 10%의 추대율만을 보였다 (Fig. 5-2-5). 이러한 결과는 GA<sub>3</sub>가 바위솔의 분지발생과 추대를 촉진하는 효과가 있는 것으로 판단되었다.

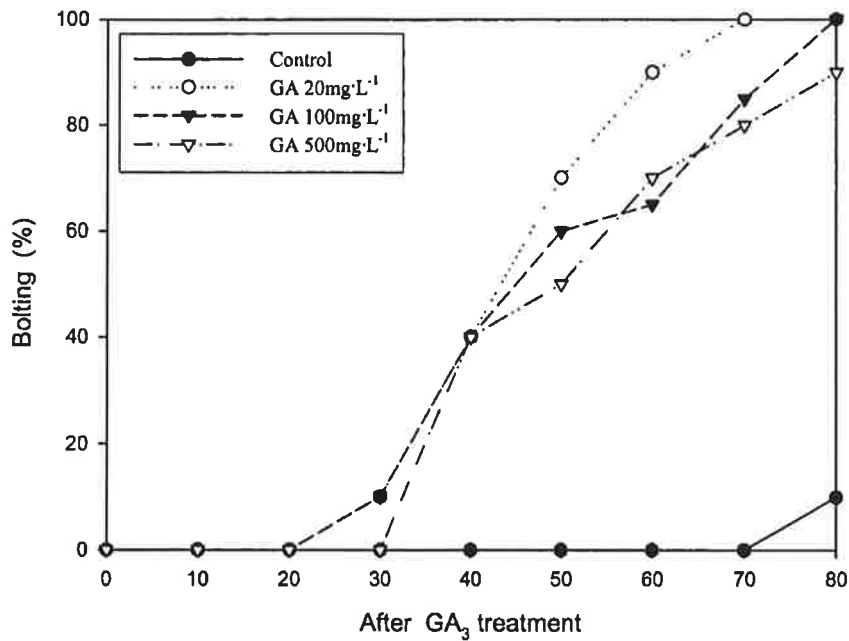


Fig. 5-2-5. Effect of GA on bolting in *Orostachys japonicus*.

#### 나. 저온처리가 영동바위솔의 휴면타파에 미치는 영향

##### (1) 연구목적

저온처리는 여러 식물에서 휴면타파를 촉진시켜주는 역할을 하며, 필요한 저온처리 기간은 식물의 조에 따라 차이를 보이는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 휴면에 들어간 영동바위솔에 저온처리를 하여 어느 정도의 저온처리에 의해 휴면타파가 일어나는지의 여부를 확인하고자 실험을 수행하였다.

##### (2) 재료 및 방법

###### (가) 실험재료

실험재료는 앞서 'GA<sub>3</sub>가 바위솔 휴면타파에 미치는 영향' 실험에서 사용한 식물재료와 동일한 휴면에 들어간 영동바위솔(*Orostachys japonicus*)을 사용하였다.

###### (나) 실험방법

휴면에 들어간 바위솔을 주간온도 15℃(14시간), 야간온도 5℃(10시간), 상대습도는 20~60%로 조절된 식물성장조절기(JSPC-420C, JS research inc., Korea)에 넣어 놓고 사용하였다. 저온처리 중인 바위솔은 15일 간격으로 교내 비닐온실로 옮겨 휴면타파 여부를 관찰하고 생육변화를 10일 간격으로 80일 동안 조사하였다. 한 처리구당 10포트를 사용하였고, 저온처리 기간은 15, 30 그리고 45일로 총 3 처리하였다. 조사기준은 앞서 GA<sub>3</sub>처리 실험과 동일한 기준으로 측정하였다.

### (3) 결과 및 고찰

저온처리를 45일까지 수행했었지만, 영동바위솔의 휴면타파에 미치는 영향은 인정되지 않았다 (Fig. 5-2-6). 오히려, 대조구에서 최종 타파율이 60%로 다른 GA<sub>3</sub> 처리구보다 높게 나타났다. 이러한 결과는 예측과는 다른 것으로 아직까지 그 원인을 파악할 수 없다. 저온에 의한 생육적인 변화는 처리 간에 약간의 차이가 있었다 (Table 5-2-2). 대조구에서 30% 분지 발생율과, 7.6 개의 분지수를 타나냈고, 반면, 저온처리를 한 처리구에서는 저온처리 기간이 길어질수록 분지 발생율이 낮았고, 분지수도 저온처리 45일에는 하나도 나타나지 않았다. 결과적으로 영동바위솔의 휴면을 타파하기 위해서는 저온처리보다는 GA<sub>3</sub>처리가 더 효과적임을 알 수 있었다.

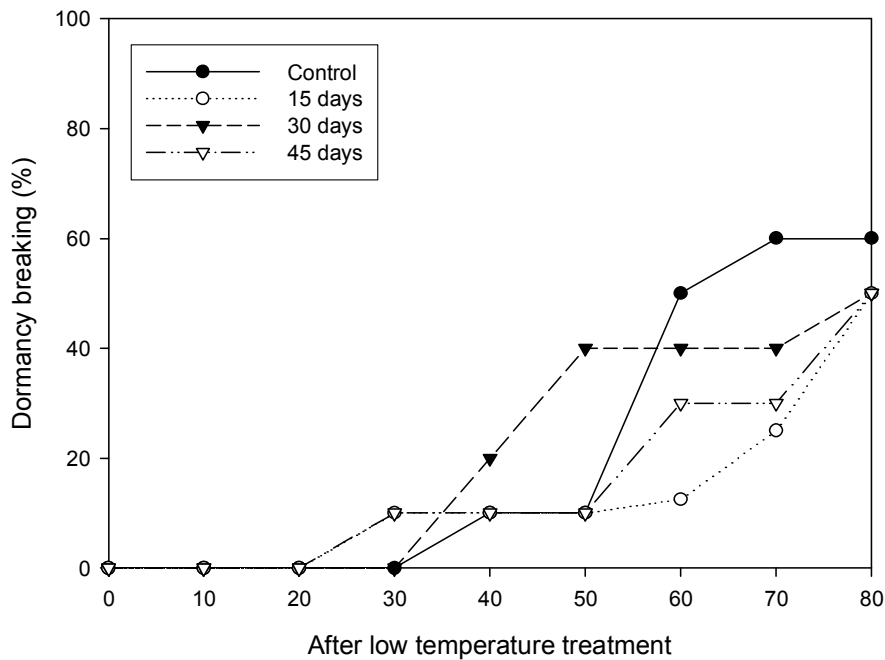


Fig. 5-2-6. Effect of low temperature on dormancy breaking in *Orostachys japonicus*

Table 5-2-2 Effect of low temperature on development and number of lateral branch in *Orostachys japonicus*

| Treatment                 |        | Lateral branch (%) | No. of branch (ea/plant) |
|---------------------------|--------|--------------------|--------------------------|
| Control                   |        | 30                 | 7.6                      |
| Low temperature treatment | 15days | 25                 | 6.5                      |
|                           | 30days | 10                 | 7                        |
|                           | 45days | 0                  | 0                        |

다. GA<sub>3</sub>처리가 휴면타파에 미치는 실험(농가실증 실험)

(1) 연구목적

지금까지의 연구결과를 보면 GA<sub>3</sub>처리가 바위솔의 휴면을 타파하는 효과가 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과가 바위솔농가에서도 동일하게 나타나는지를 알아보기 위해 바위솔 전문 농가에서 실증실험을 수행하였다.

(2) 재료 및 방법

경상남도 진주시 초전동에 위치한 가람약용식물원에서 재배중인 와송바위솔을 실험재료로 사용하였다. 재배농가에서 휴면에 들어간 와송(*Orostachys japonicus*)중 크기가 균일한 것만 선발하여, GA<sub>3</sub>를 농도별로 처리하였다. GA<sub>3</sub> 농도는 10, 25, 50, 100mg·L<sup>-1</sup>로 처리당 150mL를 엽면시비하였다. 대조구는 동량을 수돗물로 처리하였다. 한 처리구당 30개의 바위솔을 실험에 사용하였다. 무가온 비닐하우스의 생육온도를 알기 위해, 온습도 기록계(RHT20, Extech Instruments Co. USA)를 사용하여 측정하였다. 재배기간 중 온습도 환경은 Fig. 5-2-7과 같다. 휴면타파 기준은 Fig. 5-2-8과 같은 정도로 잎이 벌어진 상태를 휴면 타파가 되었다고 보았다.

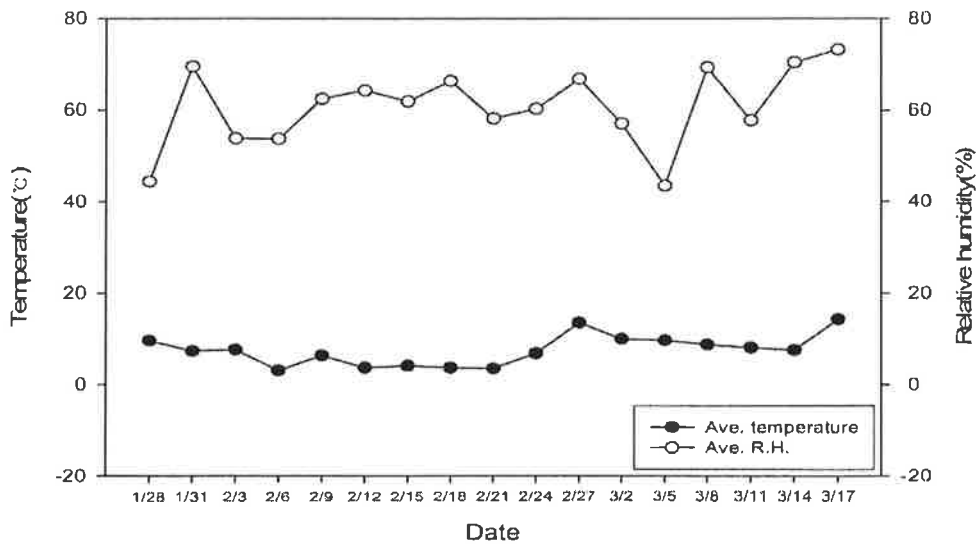


Fig. 5-2-7. Changes of temperature and relative humidity in a plastic house during this experiment.



Fig. 5-2-8. *Orostachys japonicus* breaking dormancy.

### (3) 결과 및 고찰

GA<sub>3</sub>를 처리하고 휴면타파 정도를 지속적으로 관찰했다. 그러나 GA<sub>3</sub>를 처리했음에도 불구하고 무처리구와 차이를 보이지 않았다. 최종적으로 무처리구를 포함한 모든 처리구에서 90~100%의 타파율을 보였다. 다만 휴면 타파 속도에서는 대조구에 비해 처리구가 빠름을 알 수 있었다 (Fig. 5-2-9). 이러한 지금까지의 실험결과와는 다른 것으로, 실험 개시일이 너무 늦었기 때문에 실험에 사용한 모든 식물이 이미 휴면이 타파된 상태였기 때문이었을 것으로 생각되었다. 또 다른 가설로서는 교내의 온실과 농가에서의 온실 온도가 달랐기 때문이라고 생각되고 있다. 교내 온실의 온도는 10~20℃ 사이를 유지한 반면(Fig. 5-2-1), 농가서는 가온이 되지 않는 비닐온실의 온도는 0~10℃ 범위였기 때문에, 내생적으로 휴면이 타파되었다 하더라도 식물이 생육을 시작하기에는 기온이 너무 낮았기 때문이었을 것으로 생각하고 있다. 차후 GA<sub>3</sub>를 처리하고 최저온도를 10℃로 설정한 온실에서 바위솔을 재배하면 휴면이 타파되어 생육이 시작되는 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

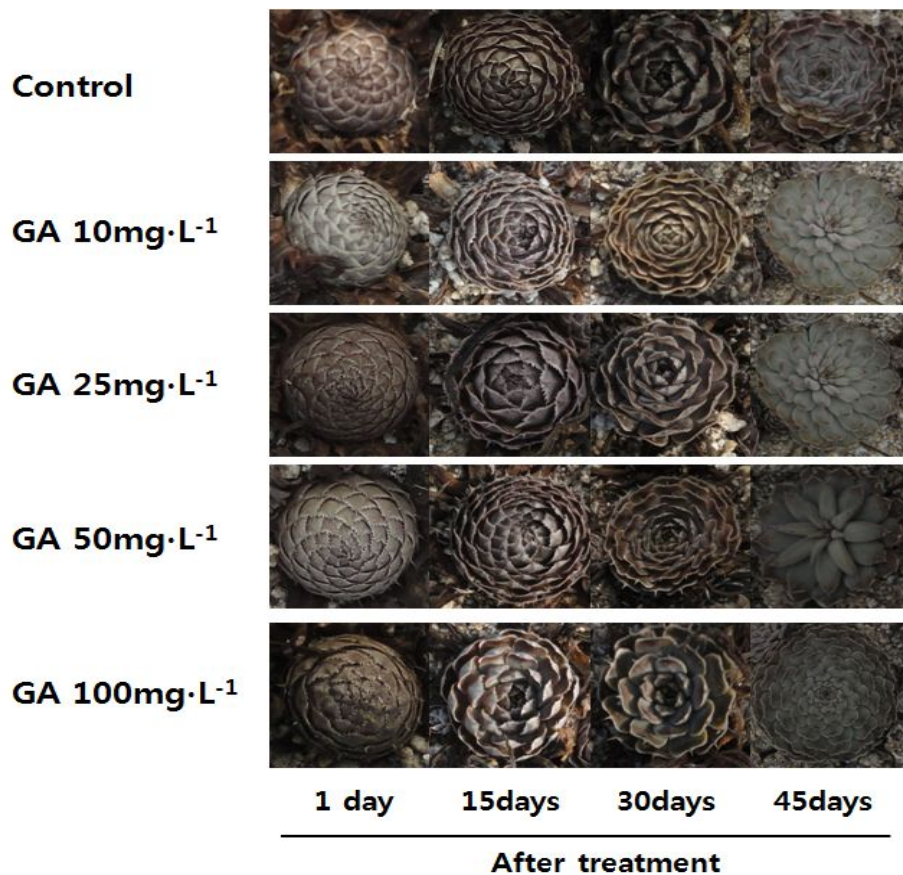


Fig. 5-2-9. Effect of GA<sub>3</sub> on dormancy breaking in *Orostachys japonicus*

Table 5-2-3. Effect of GA<sub>3</sub> concentration on dormancy breaking in *Orostachys japonicus*

| Treatment | Dormancy breaking (%) |        |        |        |
|-----------|-----------------------|--------|--------|--------|
|           | 1day                  | 15days | 30days | 45days |
| Control   | 0                     | 0      | 20     | 90     |
| GA        | 10mg·L <sup>-1</sup>  | 0      | 7      | 47     |
|           | 25mg·L <sup>-1</sup>  | 0      | 7      | 40     |
|           | 50mg·L <sup>-1</sup>  | 0      | 7      | 60     |
|           | 100mg·L <sup>-1</sup> | 0      | 3      | 63     |


마. 바위솔 종자발아 및 재배기술 매뉴얼 작성

바위솔 종자발아 및 재배기술 매뉴얼을 다음과 같이 작성했다.

### 바위솔


■ 바위솔이란?

- 명명 : houseleek, sengreen
- 학명 : *Orostachys japonicus*
- 과명·속명 : 돌나물과 바위솔속
- 분포지역 : 한국·일본 등지
- 서식장소·생장지 : 산지의 바위 곁
- 식물체 크기 : 높이 30cm 정도



바위솔은 여러해살이 풀이시만 꽃이 피고 열매를 맺으면 죽는 일년생 식물이다. 뿌리에서 나온 잎은 방석처럼 퍼지고 끝이 굳어져서 가지같이 된다. 원줄기에 달린 잎과 잎자루가 없고 바소꼴로 자주색 또는 흰색 등 다양한 색을 낸다. 꽃은 흰색으로 9월에 피고 수상꽃차례에 백백이 난다. 포는 바소꼴이고 끝이 날카로우며 꽃잎과 꽃받침조각은 각각 5개씩이다. 수술은 10개이고, 씨방은 5개이며, 꽃밥은 붉은색이지만 점차 검은색으로 된다. 송자는 10월 익는다. 관상용으로 가지가 있으며, 암암효과가 있는 것으로 알려져 있다.

■ 여러가지의 바위솔종류



바위솔(와송)    영동바위솔    제주연화바위솔    기지바위솔  
 좀바위솔    진주(지리산)바위솔    포천동근바위솔    동근바위솔

■ 품종에 따른 잎의 형태적 특성

| 품종    | 색              | 모양      | 크기      | 특징                         |
|-------|----------------|---------|---------|----------------------------|
| 바위솔   | 녹색(자주색 또는 흰색)  | 피침형     | -       | 근생엽은 로제트모양으로 잎이 나고, 끝이 뾰족함 |
| 동근바위솔 | 연한녹색           | 주걱형     | 3~7cm   | 등근고 넓적한 근생엽                |
| 연화바위솔 | 백록색            | 주걱형     | 3~6cm   | 잎끝이 둥글                     |
| 좀바위솔  | 녹색, 가장자리 자주색   | 피침형     | -       | 잎끝이 뾰족함                    |
| 가지바위솔 | 녹색, 자주색을 띠는 녹색 | 주걱, 도란형 | 1.5~7cm | 잎 끝이 뾰족함                   |
| 포천바위솔 | -              | 도란, 피침형 | -       | -                          |
| 진주바위솔 | 녹색, 가장자리는 자주색  | 주걱형     | 1~4cm   | 잎 끝이 뾰족함                   |

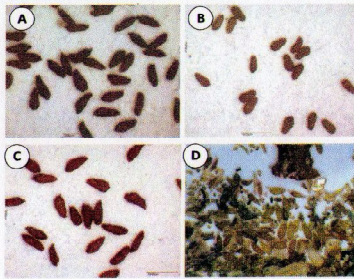
■ 품종별 꽃과 열매의 형태적 특성

| 품종    | 꽃색       | 화서   | 화서길이   | 꽃잎 | 꽃받침 | 수술개수 |
|-------|----------|------|--------|----|-----|------|
| 바위솔   | 흰색       | 총상화서 | 6~18cm | 5  | 5   | 10   |
| 동근바위솔 | 흰색       | 수상화서 | 5~20cm | 5  | 5   | 10   |
| 연화바위솔 | -        | -    | 5~20cm | -  | -   | 10   |
| 좀바위솔  | 홍자색      | 수상화서 | 3~5cm  | 5  | -   | 10   |
| 가지바위솔 | 유백색, 연록색 | -    | 3~20cm | 5  | 5   | 10   |
| 포천바위솔 | 유백색      | -    | 5~20cm | -  | -   | -    |
| 진주바위솔 | 유백색      | -    | 5      | 5  | 5   | 10   |



■ 종자의 형태적 특징

| 품종  | 형태    | 색깔                      | 크기        |
|---|-------|-------------------------|-----------|
| 영동바위솔<br><i>Orostachys japonicus</i>                  | 쌀알 모양 | brown<br>no-shiny       | 0.4~0.8mm |
| 울산방어진 바위솔<br><i>Orostachys malacophyllus</i>          | 쌀알 모양 | black-brown<br>no-shiny | 0.3~0.7mm |
| 제주연화바위솔<br><i>Orostachys iwawenge</i>                 | 쌀알 모양 | black-brown<br>no-shiny | 0.4~1.0mm |
| 지리산 바위솔<br><i>Orostachys japonicus</i>                | 쌀알 모양 | yellow-brown<br>shiny   | 0.3~0.8mm |
| 가지바위솔<br><i>Orostachys ramosus</i> Y.N.Lee            | 쌀알 모양 | yellow-brown<br>shiny   | 0.2~0.8mm |
| 와송<br><i>Orostachys spinosus</i>                      | 쌀알 모양 | black-brown<br>no-shiny | 0.2~0.6mm |
| 진주바위솔<br><i>Orostachys margaritifolius</i><br>Y.N.Lee | 쌀알 모양 | brown<br>shiny          | 0.4~1.0mm |



A : 영동바위솔  
B : 울산방어진바위솔  
C : 제주연화바위솔  
D : 지리산바위솔

■ 품종별 생태적 특성

| 품종    | 크기(cm) | 분포지      | 형태  | 개화기(월) | 결실기(월) |
|-------|--------|----------|-----|--------|--------|
| 바위솔   | 30     | 전국       | 다년생 | 9      | 10     |
| 동근바위솔 | 10~30  | 전국       | 다년생 | 9      | 10     |
| 연화바위솔 | -      | 강원도, 제주도 | 다년생 | 9~10   | 11~12  |
| 중바위솔  | 15     | 전국       | 다년생 | 8~9    | 10~11  |
| 가지바위솔 | 15~30  | 전국       | 다년생 | -      | -      |
| 포천바위솔 | -      | 한탄강 주위   | 다년생 | -      | -      |
| 진주바위솔 | 5~6    | 진주 지리산   | 다년생 | -      | -      |

■ 재배방법

|      |  |
|------|--|
| 번식   | ○ 종자번식   |
| 파종방법 | ○ 흩뿌리기(미세종자)   |
| 파종시기 | ○ 3월이 파종적기   |
| 용토   | ○ 마사토 : 유기상토 : 감모래 (6:2:2, v/v/v) 혼합 용토                            |
| 비료   | ○ 하이포넥스 액비를 1,000배액주 1회 관주처리<br>○ 시비수준이 높을수록 생육 좋음                 |
| 관수   | ○ 파종 및 초기생육 : 일주일에 한번<br>○ 생육기 : 일주일에 2~3회<br>○ 휴면기 및 율동기 : 한달에 2번 |
| 광도   | ○ 여름철에도 차광이 필요하지 않음.<br>○ 광이 좋을수록 색깔이 붉어지고 상품가치가 높아짐               |
| 일장   | ○ 상대적 단일식물   |

■ 발아촉진 기술

- 대부분 바위솔의 발아율이 높음
- 10~11월에 종자가 휴면 - 종자휴면타파를 위해서 저온이 필요
- 발아가 잘되지 않는 품종은 GA처리
- GA처리 방법 : 50~200mg·L<sup>-1</sup> 에서 24시간 침지후 파종
- 적정 GA 농도는 품종별로 다름
- 발아적온에서 파종할 경우, 발아율이 좋아짐
- \* 참고 : 페이지 7~10, 품종별 발아실험 참고

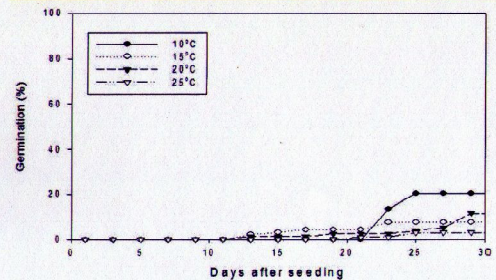
■ 일장을 이용한 바위솔의 개화억제 기술

1. 태백바위솔(*O. malacophyllus* from Taebak)의 일장 반응
  - 화석신장은 일장 14시간 이하
  - 소화개화는 일장 12시간 이하
  - 추대를 위한 일장과 소화의 개화를 위한 한계일장이 다름
  - 태백바위솔을 개화 억제를 위해서는 15시간 이상의 일장이 필요
2. 가지바위솔(*O. ramosus*)의 일장 반응
  - 10시간 이하의 일장에서는 생육이 느림
  - 일장을 10시간 이하로 조절한다면, 이만한 상태로 지속하여 상품가치가 높아짐

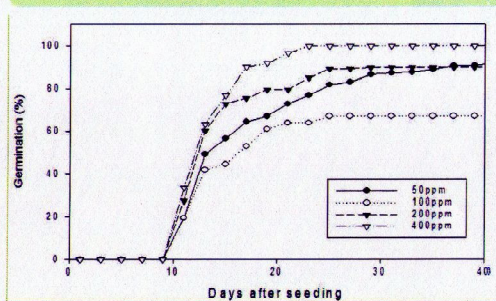
■ GA처리를 이용한 휴면타파 기술

- GA를 20~100mg·L<sup>-1</sup> 농도로 스프레이를 이용한 엽면관주
- 개체수 하나당 2~3ml 정도 GA 엽면관주함
- 온도의 영향이 있으므로, 최저 10°C 이상 유지

*Orostachys margaritifolius* Y.N.Lee (지리산 바위솔)



온도별 종자발아(무처리)



GA<sub>3</sub> 용액 침지효과(3시간)



### 3. 개발된 토속식물 분화 해외 시험 수출

#### 가. 토속 바위솔 4종의 일본 시험 수출

##### (1) 연구목적

지난 4년 동안의 연구결과 및 소비자 선호도 조사를 통해, 우리는 우리나라 자생바위솔의 상품성과 시장성 있다고 생각하였다. 바위솔 농가의 안정적인 수입원을 찾고자, 토속 바위솔의 일본수출가능성을 타진하고자 시험 수출을 수행하였다.

##### (2) 식물 재료 선발 및 준비

바위솔의 일본 시험 수출을 위해 제주연화바위솔, ‘가지바위솔’, ‘포천바위솔’, ‘진주바위솔’ 총 4품종의 바위솔을 선발하였다. 이들 품종은 앞선 선호도 조사 및 일본사람의 취향을 고려하여, 선발하였다. 선발된 품종은 2014년 1월경에 충청남도 논산에 위치한 토속바위솔 농가인 ‘바위솔사랑’에서 구매하였다(Fig. 5-3-1). 구매한 바위솔은 교내 비닐온실에서 수출하기 전까지 재배하였다(Fig. 5-3-2)



Fig. 5-3-1. Native *Orostachys* plants native to Korea, which were selected for trial export.

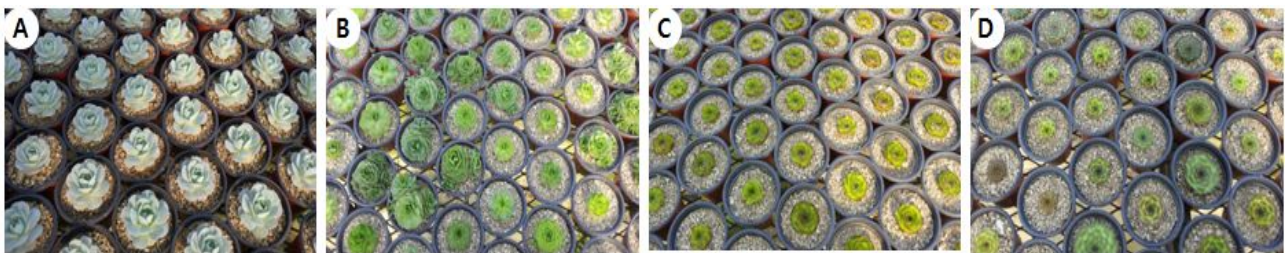


Fig. 5-3-2. Native *Orostachys* plants growing in plastic pots.

##### (3) 식물 포장 및 식물 검역

식물재료를 비행기를 이용 수화물로 가지고 가기로 했다. 식물 검역과 운반의 편의를 위해 재배한 바위솔은 상토를 제거 한 후, 뿌리 부분을 수돗물로 씻어 토양을 완전히 제거하였다. 깨끗이 수세한 바위솔은 주근을 1.5cm 정도만 남긴채 잔뿌리를 완전히 제거한 후, paper towel 위에서 말렸다. 3~4시간 말린 바위솔은 흡습지로 개별 포장을 한 후 준비된 두꺼운 상장에 담아 포장하였다 (Fig. 5-3-3).



Fig. 5-3-3. *Orostachys* plants packing in boxes to get quarantine.

수출식물 검역절차는 Fig. 5-3-4와 같다. 준비된 바위솔은 2014년 4월 1일 인천공항 식물검역소에서 검역을 받고 안전하다는 판정을 받았다 (Fig. 5-3-5). 검역을 마친 바위솔은 2014년 4월 3일 일본으로 비행기편으로 수송되었고, 일본 바이어 농장에 식재되어 활착을 기다리고 있다. 토속 바위솔을 본 일본 바이어는 이런 식물을 일본에서 수입하려고 하면 한국에서 공급해 줄 수 있는 농가가 있는지 물어 왔고, 또한 가격대가 얼마까지 되는지 물어온 상태이다.

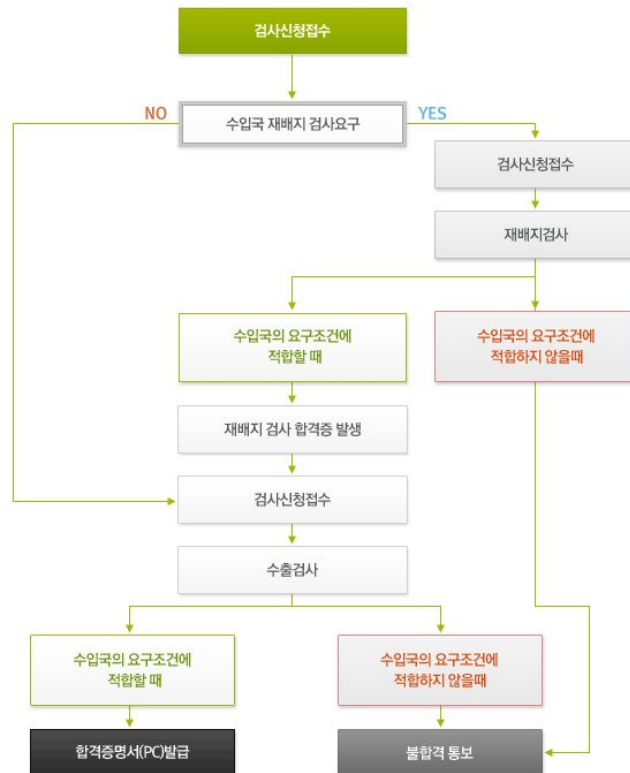


Fig 5-3-4. Export plant quarantine process



Fig. 5-3-5. A doctor quarantining the plants in Incheon National Airport.

#### 4. 바위솔 생산 농가 및 생산량

국내 바위솔은 크게 관상용과 식용으로 구분되어 생산되고 있으며, 관상용으로 재배되고 있는 바위솔은 현재 극히 소규모로 생산되고 있어 어디에도 통계를 찾아 볼 수 없다. 식용 바위솔에 대한 통계도 공식적으로는 전무한 상황이나 최근에 재배 농가가 급격히 증가하면서 바위솔 협동조합과 협회가 생겨나고 있는 실정이다. 여기에는 한국바위솔(와송) 협동조합에서 식약청에 제출한 자료(2013년 10월)를 토대로 정리를 하였다.

- 전국재배 농가수 : 422농가
- 면적 : 약 132만 m<sup>2</sup> (약 40만평)
- 생산량 : 8,800ton /년
- 시장규모 : 2,400억원/년

이상과 같이 식용 바위솔의 생산량은 최근에 급속히 증가하는 추세이며 바위솔 협동조합에서는 금년(2014년)에는 생산량이 적어도 20% 이상은 증가할 것으로 예상하고 있었다.

본 연구팀에서 개발된 여러 가지 재배기술과 휴면 및 휴면 타파 기술은 관상용 바위솔에는 물론 식용바위솔에도 적용이 가능하기 때문에 본 연구팀에서 개발된 기술들이 매우 유용하게 적용될 수 있을 것으로 기대하고 있다.

## 제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 목표달성도

| 구분   | 연도   | 연구개발의 목표                          | 달성도 (%) | 연구개발의 내용  |
|------|------|-----------------------------------|---------|---|
| 1차년도 | 2009 | ○ 자생 바위솔과 노루귀의 종류별 수집 및 특성조사      | 100     | ○ 야생종 및 재배종 수집<br>○ 자생지 및 회사, 연구소 등으로부터 수집                                    |
|      |      | ○ 상기 식물들 중 우수 형질 식물 선발            | 100     | ○ 관상가치가 높은 수종 선발<br>- 화색이 선명하고 특이한 종<br>- 엽색이 선명하고 병충해에 강한 종<br>- 대량증식이 용이한 종 |
| 2차년도 | 2010 | ○ 바위솔종자의 발아생리 구명 및 대량증식 기술 개발     | 100     | ○ 바위솔의 종자형태 관찰<br>○ 바위솔 종자의 휴면여부 조사 및 휴면 타파기술 개발                              |
|      |      | ○ 노루귀 종자의 발아생리 구명 및 대량증식 기술개발     | 100     | ○ 노루귀의 종자형태 관찰<br>○ 노루귀 종자의 휴면여부 조사 및 휴면 타파기술 개발                              |
|      |      | ○ 노루귀 대량증식을 위한 영양변식 기술 개발         | 100     | ○ 고효율 근삼기술 개발   |
|      |      | ○ 일본 야생화 생산농가 및 시장조사              | 100     | ○ 노루귀 전문 재배농가 견학<br>○ 야생화 유통시장 조사   |
| 3차년도 | 2011 | ○ 바위솔과 노루귀의 생육적정 광도 구명            | 100     | ○ 차광망을 이용하여 4단계로 광도를 달리하여 재배<br>○ 4-6개월 재배후 식물의 생육 및 품질을 조사                   |
|      |      | ○ 바위솔과 노루귀의 적정 분 용토 선발            | 100     | ○ 일반 상토 및 인공용토를 단용 또는 혼용하여 식물 재배<br>○ 4-6개월 후 식물의 생육 및 품질을 조사                 |
|      |      | ○ 바위솔과 노루귀의 생육에 적합한 시비량 및 시비횟수 구명 | 100     | ○ 액비를 제조하여 시비량과 시비횟수를 달리하여 식물을 재배<br>○ 4-6개월 후 식물의 생육 및 품질을 조사                |

|      |      |  |     |   |
|------|------|--|-----|---|
| 4차년도 | 2012 | ○ 일장을 이용한 개화억제 및 휴면 회피 기술 개발                                   | 100 | ○ 선발된 토속바위솔의 일장반응 구명.<br>- 일장반응에 따른 토속 바위솔 분류<br>○ 바위솔 휴면 기작에 관여하는 일장조건 구명<br>○ 일장조절을 통한 개화 및 휴면 회피 기술 개발     |
|      |      | ○ 조직배양기술에 의한 노루귀 대량증식 기술 개발                                    | 100 | ○ 다양한 소독법을 이용한 식물절편체의 무균배양법 확립<br>○ 최적 배양배지 구명<br>○ 신초 및 뿌리를 유도하는 생장조절제 조건 확립<br>○ 최적 배양환경 구명<br>- 적정 배양온도 구명 |
|      |      | <실험설계 외 추가실험><br>○ 토속 바위솔에 대한 소비자 선호도 조사 (바위솔 상품화를 위한 기초자료 수집) | 100 | ○ 토속 바위솔을 분에 심어 상품화<br>○ 다양한 연령대를 대상으로 선호도 조사<br>○ 연령대별로 선호도 분석   |
| 5차년도 | 2013 | ○ 일장과 온도 조절이 가능한 개화조절용 장식용 상자개발                                | 100 | ○ 일장을 조절하여 개화시기를 조절할 수 있는 장식장 개발<br>○ 조명색과 조도를 맘대로 조절할 수 있는 장식장 개발  |
|      |      | ○ 농가 현장 실증 실험 및 문제점 보완   | 90  | ○ 개화억제 기술 농가 실증실험<br>○ 바위솔 종자번식 방법 농가에 이전<br>○ 종자밭아 및 재배기술 매뉴얼 작성   |
|      |      | ○ 개발된 토속식물 분화 해외 시험 수출   | 100 | ○ 포천바위솔 및 지리산 바위솔 등 일본 시험 수출  |

## 제 2 절 관련분야의 기술발전 기여도

### 1. 학술적 성과

- 바위솔 및 노루귀의 종자발아 생리 구명
- 바위솔 및 노루귀의 종자 휴면 타파 기술 확립
- 바위솔 및 노루귀의 개화생리 구명
- 바위솔과 노루귀의 개화 촉진 및 회피 가능

### 2. 경제적 성과

- 자생식물의 분화개발로 신소득 작물 창출로 농가소득 증대에 기여
- 노루귀의 종자발아 생리 구명으로 재배기간 단축
- 다육식물 전문 장식장 개발로 화훼류 소비 촉진
- 토종식물의 분화상품화로 국제 경쟁력 제고





## 제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 실용화 · 산업화 계획(기술실시 등)

#### 1. 상품화 (2건)

가. 일장과 조명색 및 조명세기 조절이 가능한 식물 장식장 개발

### 2014년도 농림축산식품연구개발과제 사업화실적 확인서

| 과제명                     | 바위솔, 노루귀의 대량증식 및 고품질 분화 재배기술 개발              |   |                             |                    |                      |
|-------------------------|--|---|-----------------------------|--------------------|----------------------|
| 주관연구기관                  | 경남과학기술대학교                                    | 참여기관  |                             |                    |                      |
| 책임자                     | 윤 재 길  | 연구기간  | 0000년 00월 ~ 0000년 00월(총 0년) |                    |                      |
| 정부출연금                   | 250,000,000                                  | 기업부담금   | 0                           | 총계                 | 250,000,000          |
| 기술이전명                   | 식물 장식장                                       | 기술실시대상기관  | 진테크                         |                    |                      |
| 기술료                     | 0  | 기술실시일   | 2014년 3월                    |                    |                      |
| 구 분                     | 기술실시 업제 결산액 (단위: 백만원)<br>* 최근연도 결산보고서에 의해 작성 |   | 해당기술을 통한 사업화 실적             |                    |                      |
| 실<br>적                  | 자산 총계  | -   | 제품건수                        | 2                  |                      |
|                         | 자본 총계  | -   |                             |                    |                      |
|                         | 부채 총계  | -   | 개발제품(기술)<br>총 매출액           | -                  |                      |
|                         | 매출액<br>총계                                    | -   |                             |                    |                      |
| 제품별 실적                  |  |   |                             |                    |                      |
| 구분                      | 제품명  | 제품사진  | 제품출시일<br>(시제품개발포함)          | 2014년 매출액<br>(백만원) | 해당기술의 매출액<br>기여율 (%) |
| 1                       | 스마트 식물<br>장식장                                |  | 2014년 3월                    |                    |                      |
| 2                       | 카멜레온<br>식물장식장                                |  | 2014년 3월                    |                    |                      |
| 매출액 합계 (개발제품(기술) 총 매출액) |  |   |                             | -                  |                      |

\* 제품 종류가 많은 경우 칸을 만들어서 작성

\* 첨부 : 결산보고서 1부 (보고서가 없는 경우, 재무상대표와 포괄손익계산서 첨부)

2014년 3월 14일

연구책임자 : 윤 재 길 (서명 또는 인)



## 2. 기술이전 실시(2건)

### 가. 일장조절에 의한 바위솔의 휴면 및 개화조절

#### (1) 가람약용식물원

[별지 37]

#### 실시(참여)기업 의견서

|  |  |        |              |
|--|--|--------|--------------|
| 실시기업   | 가람약용식물원  | 대표자    | 원효원          |
| 사업자등록번호  | 613-91-68046   | 주민등록번호 |              |
| 기업유형   | <input type="checkbox"/> 대기기업 <input type="checkbox"/> 중소기업<br><input checked="" type="checkbox"/> 농업인(단체)<br><input type="checkbox"/> 기타( ) | 업태     | 농림경영         |
|  |  | 종류     | 바위솔 및 약용식물   |
| 창업일시   | 2002년    조직 및 인원   | 상근 3명  |              |
| 사업장주소  | 경남 진주시 초전동 309-3   | 담당자    | 원효원          |
|  |  | 연락처/팩스 | 055-759-6284 |
| 자본금  | 200백만원    연간매출액  | 150백만원 |              |
| 주생산제품  | 바위솔 및 약용식물   |        |              |
| 이전희망기술   | 일장조절에 의한 휴면 및 개화조절   |        |              |
| 기술요감면사유  | 연구과제에 성실히 참여한 기업으로 기업유형은 중소기업이기 때문에 기술료 감면율 요청함  |        |              |
| 이전기술할용계획   | 인장을 조절하여, 휴면 및 개화를 조절함으로써, 주로 여름철에만 판매되던 바위솔을 주년생산이 가능하게 한다. 이로 인해, 농가의 소득도 증대될 것으로 예상된다.  |        |              |
| <p>귀 기관에서 수행한 과제의 기술에 대해 기술료 감면을 통한 기술이전을 받고자 상기와 같이 의견서를 제출합니다.</p> <p>첨부 1. 사업자등록증 사본 1부<br/>           2. 중소기업임을 증명할 수 있는 서류 1부.<br/>           3. 추가감면에 따른 증빙서류(필요 시 제출) 1부, 끝.</p> <p style="text-align: right;">2014년    월    일</p> <p style="text-align: right;">실시기업의 대표자 :                      원효원</p> |  |        |              |
| <p><b>세부연구기관장 귀하</b></p>   |  |        |              |

## 노하우 이전 계약서

계약명 : 노하우 이전 계약

2014년    월    일

|   |  |
|---|--|
| <b>甲</b><br>주소: 경남 진주시 중앙동 33<br>기관: 경남과학기술대학교 산학협력단<br>대표: 단장 이치 | <b>乙</b><br>주소: 경남 진주시 대신로 614-39<br>상호: 가람약용식물원<br>대표: 대표 원효원 |
| <b>연구책임자</b><br>소속: 경남과학기술대학교 원예학과<br>성명: 윤재길                     |  |
| <b>담당자</b><br>부서: 산학협력단 연구진흥팀<br>성명: 강문승<br>연락처: 055)751-3860     | <b>담당자</b><br>부서:<br>성명:<br>연락처:                               |

## (2) 바위솔사랑

[별지 37]

### 실시(참여)기업 의견서

|   |   |         |        |        |
|---|---|---------|--------|--------|
| 실시기업  | 바위솔사랑   |         | 대표자    | 김수권    |
| 사업자등록번호   | 307-07-21278  |         | 주민등록번호 |        |
| 기업유형  | <input type="checkbox"/> 대기업 <input type="checkbox"/> 중소기업<br><input checked="" type="checkbox"/> 농업인(단체) |         | 업태     | 농업경영   |
|   | <input type="checkbox"/> 기타( )  |         | 종목     | 자생 바위솔 |
| 창업일시  | 2000년   | 조직 및 인원 | 상근 2명  |        |
| 사업장주소   | 충남 공주시 이인면 주봉리 680-1번지  |         | 담당자    | 김수권    |
|   |   |         | 연락처/팩스 |        |
| 자본금   | 200백만원  | 연간매출액   | 150백만원 |        |
| 주생산제품   | 자생 바위솔  |         |        |        |
| 이전희망기술  | 일강조절에 의한 휴면 및 개화조절  |         |        |        |
| 기술료 감면사유  | 연구과제에 성실히 참여한 기업으로 기업유형은 중소기업이기 때문에 기술료 감면을 요청함   |         |        |        |
| 이전기술 활용계획   | 일강을 조절하여, 바위솔의 휴면과 개화를 조절함으로써, 주로 여름철에만 판매되던 바위솔을 주년생산이 가능하게 할 수 있다. 이 기술로 인해, 농가의 소득도 증대될 것으로 예상된다       |         |        |        |
| 귀 기관에서 수행한 과제의 기술에 대해 기술료 감면을 통한 기술이전을 받고자 상기와 같이 의견서를 제출합니다.                       |   |         |        |        |
| 첨부 1. 사업자등록증 사본 1부<br>2. 중소기업임을 증명할 수 있는 서류 1부.<br>3. 추가감면에 따른 증빙서류(필요 시 제출) 1부. 끝. |   |         |        |        |
| 20    년    월    일<br>실시기업의 대표자 : 김 수 권  |   |         |        |        |
| 세무연구기관장 귀하  |   |         |        |        |

## 노하우 이전 계약서

계약명 : 노하우 이전 계약

2014년    월    일

|                       |                        |
|-----------------------|------------------------|
| 甲                     | 乙                      |
| 주소: 경남 진주시 칠암동 동진로 33 | 주소: 충청남도 논산시 노성면 노리리 1 |
| 기관: 경남과학기술대학교 산학협력단   | 상호: 바위솔사랑 식물원          |
| 대표: 단장 이 처            | 대표: 대표 김 수 권           |
| 연구책임자                 |                        |
| 소속: 경남과학기술대학교 원예학과    |                        |
| 성명: 윤 재 김             |                        |
| 담당자                   |                        |
| 부 서: 산학협력단 연구진흥팀      | 부 서:                   |
| 성 명: 강 문 승            | 성 명:                   |
| 연락처: 055/751-3860     | 연락처:                   |

## 제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

### 1. 교육지도 (10건)

|   |      |                                      |
|---|------|--------------------------------------|
| 1 | 교육명  | 노루귀 및 자생화 생리특성 및 관리요령                |
|   | 발표자  | 윤 재 길                                |
|   | 참석대상 | 솔가람 농원직원                             |
|   | 교육기간 | 2010년 7월 14일 (1일)                    |
|   | 장소   | 충북 청원군 남이면 사동리 200번지 김정태             |
| 2 | 교육명  | 바위솔 및 노루귀 재배생리 및 관리방법                |
|   | 발표자  | 윤 재 길                                |
|   | 참석대상 | 바위솔 및 화훼분화 재배농가                      |
|   | 교육기간 | 2013년 7월 12일(1일)                     |
|   | 장소   | 경남 밀양시 삼랑진읍 삼랑진로 1268-50 부산대학교 밀양캠퍼스 |
| 3 | 교육명  | 바위솔 및 노루귀 재배생리 및 관리방법                |
|   | 발표자  | 윤 재 길                                |
|   | 참석대상 | 바위솔 및 노루귀 농가 및 판매자                   |
|   | 교육기간 | 2013년 8월 31일(1일)                     |
|   | 장소   | 경상남도농업기술원 화훼연구소                      |
| 4 | 교육명  | 바위솔 재배생리 및 관리방법                      |
|   | 발표자  | 윤 재 길                                |
|   | 참석대상 | 바위솔 재배농가                             |
|   | 교육기간 | 2014년 1월 22일(1일)                     |
|   | 장소   | 경기도 안성시 보개면 구사리 84-7 보나농원            |
| 5 | 교육명  | 바위솔 재배생리 및 관리방법                      |
|   | 발표자  | 윤 재 길                                |
|   | 참석대상 | 바위솔 재배농가                             |
|   | 교육기간 | 2014년 1월 22일(1일)                     |
|   | 장소   | 경상남도 진주시 명석면 용산리 160 바위솔와송농장         |

|    |      |                                  |
|----|------|----------------------------------|
| 6  | 교육명  | 바위솔 재배생리 및 관리방법                  |
|    | 발표자  | 윤 재 길                            |
|    | 참석대상 | 바위솔 재배농가                         |
|    | 교육기간 | 2014년 1월 22일(1일)                 |
|    | 장소   | 경남 진주시 초전동 309-3 약용식물원 가람        |
| 7  | 교육명  | 바위솔 재배생리 및 관리방법                  |
|    | 발표자  | 윤 재 길                            |
|    | 참석대상 | 바위솔 재배농가                         |
|    | 교육기간 | 2014년 1월 29일(1일)                 |
|    | 장소   | 충청남도 논산시 노성면 노티리                 |
| 8  | 교육명  | 바위솔 재배생리 및 관리방법                  |
|    | 발표자  | 윤 재 길                            |
|    | 참석대상 | 바위솔 재배농가                         |
|    | 교육기간 | 2014년 2월 26일 (수요일) 15:00 ~ 18:00 |
|    | 장소   | 전라북도 익산시 여산면 제남리 622-50          |
| 9  | 교육명  | 바위솔 재배생리 및 관리방법                  |
|    | 발표자  | 윤 재 길                            |
|    | 참석대상 | 바위솔 재배농가                         |
|    | 교육기간 | 2014년 2월 28일 (금요일) 14:00 ~ 16:00 |
|    | 장소   | 경상남도사천시사천읍용당리166-1               |
| 10 | 교육명  | 바위솔 재배생리 및 관리방법                  |
|    | 교재명  | 2009~2013년 연차실적보고서               |
|    | 참석대상 | 바위솔 재배농가                         |
|    | 교육기간 | 2014년 3월 8일 (토요일) 14:00 ~ 16:00  |
|    | 장소   | 경상남도고성군영형면연화리63-1                |

## 2. 인력양성

| 학사학위 | 석사학위 | 총인원 |
|------|------|-----|
| 11 명 | 1 명  | 12명 |

|   |        |  |
|---|--------|--|
| 1 | 인력양성명  | 야생바위솔의 종자 형태 및 발아생리 구명_학사학위                    |
|   | 인력양성년도 | 2009년  |
|   | 인력명    | 백선숙, 정상교, 윤희찬                                  |
| 2 | 인력양성명  | 고은과 GA처리가 노루귀 종자발아에 미치는 영향_학사학위                |
|   | 인력양성년도 | 2011년  |
|   | 인력명    | 김종숙, 전가영                                       |
| 3 | 인력양성명  | 태백바위솔의 분화재배시 차광, 분용토, 시비수준에 따른 생육과 품질의 변화_학사학위 |
|   | 인력양성년도 | 2012년  |
|   | 인력명    | 김미혜, 성다애, 정효윤                                  |
| 4 | 인력양성명  | 일장이 태백동근바위솔의 개화와 자질연화바위솔의 생육에 미치는 영향_학사학위      |
|   | 인력양성년도 | 2013년  |
|   | 인력명    | 고혜린, 신초롱, 이영은                                  |
| 5 | 인력양성명  | 네가지 자생바위솔 종자의 형태적 특성 및 발아생리_석사학위               |
|   | 인력양성년도 | 2010년  |
|   | 인력명    | 강정희  |

### 제 3 절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보 계획

#### 1. 논문게제

##### 가. SCI급 논문(1편)

- (1) Jeong, K.J., Y.S. Chon, K.O. Choi, S.H. Ha, and J.G. Yun. 2012. Proper Light Intensity, Potting Media, and Fertilization Level for Potted *Orostachys iwarenge* for. magnus. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 30: 357-362.

##### 나. 비SCI급 논문(2편)

- (1) Chon, Y.S., S.W. Lee, K.J. Jeong, S.H. Ha, J.H. Bae, and J.G. Yun. 2011. Growth and Quality Affected by Light Intensity, Potting Media and Fertilization Level in Potted *Orostachys* 'Nungyu bawisol'. J. Bio-Environment Control 20: 357-364.
- (2) Jeong, K.J., Y.S. Chon, S.H. Ha, and J.G. Yun. 2013. Optimum Light Intensity, Media and Fertilization for Potted *Orostachys malacophyllus* from Taebaek. Flower. Res. J. 21: 46-51.

#### 2. 학술발표

##### 가. 포스터 발표(8건)

- (1) Germination Characteristics of Seed in *Hepatica asiatica* Native to Korea. Kyeong Jin Jeong Young Shin Chon Su Hyeon Ha Sang Woo Lee Jae Gill Yun (원예과학기술지, Vol.29 No.S1(초록), [2011])
- (2) 연화바위솔의 분화생산을 위한 적정 시비농도 및 분용토 선발. 정경진(Kyeong Jin Jeong) 천영신(Young Shin Chon) 채윤석(Yun Seok Chae) 이상우(Sang Woo Lee) 하수현(Soo Hyeon Ha) 윤재길(Jae Gill Yun) (원예과학기술지, Vol.29 No.S2, [2011])
- (3) 둥근바위솔의 분화생산을 위한 적정 시비농도 및 분용토 선발. 천영신(Young Shin Chon) 최경옥(Kyeong Ok Choi) 안상열(Sang Yeol An) 정경진(Keong Jin Jeong) 하수현(Su Hyeon Ha) 윤재길(Jae Gill Yun) (원예과학기술지, Vol.29 No.S2, [2011])
- (4) Embryo Development and Germination of *Hepatica maxima* Seeds as Affected by Temperature after Sowing and Application of Growth Regulators. Young Shin Chon Kyeong Jin Jeong Su Hyeon Ha Sang Woo Lee Jae Gill Yun (원예과학기술지, Vol.30 No.S1, [2012])
- (5) The Effects of Shading, Potting Soil Mixture, and Fertilization Levels on the Growth and Quality of Potted *O. malacophyllus* from Taebaek. 정경진 채윤석 하수현 천영신 윤재길 (원예과학기술지, Vol.30 No.S1, [2012])
- (6) Growth Response of *Orostachys iwarenge* for. magnus and *Orostachys ramosus* Affected by Day Length. 정경진(Kyeong Jin Jeong) 천영신(Young Shin Chon) 최경옥(Kyeong Ok Choi) 윤재길(Jae Gill Yun) (원예과학기술지, Vol.30 No.S2, [2012])

- (7) Flowering Response of *Orostachys malacophyllus* from Taeback Affected by Day Length. 정경진(Kyeong Jin Jeong) 천영신(Young Shin Chon) 채윤석(Yun Seok Chae) 이상우(Sang Woo Lee) 윤재길(Jae Gill Yun) (원예과학기술지, Vol.31 No.S1, [2013])
- (8) 차광, 분용토 및 시비수준에 따른 분화 노루귀의 생장반응. 천영신(Young Shin Chon) 정경진(Kyeong Jin Jeong) 하수현(Su Hyeon Ha) 윤재길(Jae Gill Yun) (원예과학기술지, Vol.31 No.S1, [2013])



## 제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 1. 일본 노루귀 전문 농장으로부터 노루귀 재배기술 및 육종 방법

#### 가. 파종방법

- 토양은 카누마 토양(80%) : 경석(10) : 수피칩(10)을 사용한다.
- 파종시기는 채종즉시 파종한다 (5-6월).
  - 개화 후 35 - 45일 후면 종자가 완숙됨
- 복토는 해도되고 안해도 될 정도이므로 살짝 해준다.
- 관리는 성숙한 노루귀와 같이 관리한다.
  - 항상 축축하게 젖은 상태로 약광하에서 시원하게 관리해준다
- 발아과정
  - 5-6월에 파종한 종자의 파육이 여름에 물러지면 속에 있는 단단한 종자만 남게 된다.
  - 가을(10월)에 발근하기 시작한다.
  - 다음해 2-3월에 떡잎이 발생한다.

#### 나. 환경관리

- 광 조건 : 빛 관리가 가장 중요하다. (자생지 상태를 유지)
  - 10월부터 4월까지의 개방해 준다 (산에서 큰 나무들이 낙엽된 상태)
  - 5월이 되면 50% 차광망 한겹을 씌워준다 (나무들이 잎을 내기시작하는 상태)
  - 6월이 되면 50% 차광망으로 한겹 추가해 준다.
    - 이때는 약 80% 차광이 필요하다 (숲이 울창한 상태)
- \* 주의 사항
  - 절대 직사광선을 피해야 한다.
  - 직사광선을 받게 되면 엽색이 퇴색한다.
  - 바로 낙엽되는 일은 없으나 가을에 2차 생육시기가 오면 낙엽된다.
    - 그렇게 되면 품질이 현저하게 떨어진다.
- 온도는 자연상태로 유지한다(하우스 안에서 무난방)
  - 니가타현의 온도는 겨울최저온도 -2 ~ -3℃, 여름 최고 온도는 30℃ 정도이다.
  - 여름 고온 다습시 잿빛곰팡이 및 탄저병이 발생하기 쉬우므로 통기가 잘되게 한다.
  - 차광과 환기가 중요하다. 측창 차광망이 바람이 잘 통하도록 특별히 제작되어 있다
- 공기 습도는 항상 다습하게 관리한다. 다만, 잿빛곰팡이 발생에 주의 한다.
- 토양 수분은 윗 흙이 말랐을 때 미스트 장치로 충분히 관수해 준다.
  - 즉, 토양이 항상 젖어 있을 정도로만 유지한다.
- 토양은 지역 특산 흙을 주재료로 사용한다 (가누마, 16L 300엔). 한국에서는 일본에서 수입한 녹소토와 매우 비슷하다.
- 가누마 (70-80%)에 경석 (10-20%)과 수피 칩(10%)을 섞어서 사용한다.

#### 다. 개화기 촉진(촉성) 기술

- 4년째에 개화하는 것을 3년째에 개화시키는 기술로서, 전에는 식물호르몬(GA)을 이용하였

- 으나 최근에는 이용하지 않는다. 호르몬을 이용하면 뒤에 생육이 일정하지 않기 때문이다.
- 요즘에는 비배관리(액비사용)를 잘해서 식물의 생육을 촉진시키고 개화를 촉진시킨다. 즉, 비배관리를 잘해서 2년째에 본엽이 나오게 한다.
  - 그러므로 충실한 종자를 얻기 위한 노력이 필요하다. 충실한 종자로 파종하면 모주의 상태가 좋아지고 수분 수정이 잘 되면, 생육을 촉진할 수 있다.

## 라. 채종 및 육종 기술

### (1) 수분 수정

- 꽃이 약간 벌어진 상태(주두가 준비되어 있을 때)에서 붓 또는 귀청소 도구로 꽃가루를 문혀준다.
- 원하는 꽃가루를 이용하고자 할 때는 화분을 미리 채취해 두었다가 핀셋으로 암술 머리에 문혀준다.
  - 필요시 수술을 채취해서 냉장고에 보관하면 오랫동안 보관이 가능하다.
- 날씨가 추우면 수분 수정이 잘 이루어지지 않는다.
- 올해는 날씨가 추워서 수분 수정이 충분하지 않아 종자가 적다.

### (2) 채종

- 수분 후 완숙까지 30-40일이 걸린다 (수분 후, 40일 정도가 채종시기)
- 종피색이 녹색에서 약간 탈색될 때가 적기이다.
- 일반적으로 손가락으로 눌러서 채종하나, 생력화하기 위한 도구를 사용하기도 한다.
- 특히 육종을 할 때는 수분 후 굴망 또는 스타킹 같은 것으로 감싸주어 종자가 떨어지는 것을 방지하기도 한다.

## 제 7 장. 참고문헌

- Anderson, N., Byrne, D.H., 2007. Methods for *Rosa* germination. *Acta Hort.* 751, 503-507.
- Atwater, B.R., 1980. Germination, dormancy and morphology of the seeds of herbaceous ornamental plants. *Seed Sci. Technol.* 8, 523-573.
- Baskin, J.M., Baskin, C.C., 1985. Epicotyl dormancy in seeds of *Cimicifuga racemosa* and *Hepatica acutiloba*. *Bull. Torrey Bot. Club* 112, 253-257.
- Bewley, J.D., 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9, 1055-1066.
- Bewley, J.D., Black, M., 1985. *Seeds: Physiology of development and germination*. Plenum Press, New York.
- Bewley, J.D., Black, M., 1994. *Seeds. Physiology of development and germination*. Plenum Press, New York and London.
- Brown, L.B., 1996. *Applied principles of horticultural science*. Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Chen, S.Y., Kuo, S.R., Chien, C.T., 2008. Roles of gibberellins and abscisic acid in dormancy and germination of red bayberry (*Myrica rubra*) seeds. *Tree Physiol* 28, 1431-1439.
- Chi, H.J., Lee, S.Y., 1981. Phytochemical survey of higher plants in Korea. *Kor. J. Pharmacogn.* 12, 75-76.
- Chon, Y.S., S.W. Lee, K.J. Jeong, S.H. Ha, J.H. Bae, and J.G. Yun. 2011. Growth and quality affected by light intensity, potting media and fertilization level in potted *Orostachys* 'Nungyu bawisol'. *J. of Bio-Environment Control.* 20:357-364
- da Silva, E.A., Toorop, P.E., Nijse, J., Bewley, J.D., Hilhorst, H.W., 2005. Exogenous gibberellins inhibit coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination and cause cell death in the embryo. *J. Exp. Bot.* 56, 1029-1038.
- da Silva, E.A.A., Toorop, P.E., van Aelst, A.C., Hilhorst, H.W.M., 2004. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. *Planta* 220, 251-261.
- Ellis, R.H., Roberts, E.H., 1982. Desiccation, rehydration, germination, imbibition injury and longevity of peaseeds (*Pisum sativum* L.). *Seed Sci. Technol.* 10, 501-508.
- Engell, K., 1995. Embryo morphology of the Ranunculaceae. *Plant Syst. Evol. Suppl.* 9, 207-216.
- Furtado, J.A., Yang, J., Ambrose, S.J., Cutler, A.J., Abrams, S.R., Kermod, A.R., 2007. Disrupting abscisic acid homeostasis in western white pine (*Pinus monticola* Dougl. Ex D. Don) seeds induces dormancy termination and changes in abscisic acid catabolites. *J. Plant Growth Regul.* 26, 46-54.
- Frost-Christensen, H., 1974. Embryo development in ripe seeds of *Eranthis hiemalis* and its relation to gibberellic acid. *Physiol. Plant.* 30, 200-205.
- Gianinetti, A., Vernieri, P., 2007. On the role of abscisic acid in seed dormancy of red rice. *J. Exp. Bot.* 58, 3449-3462.
- Hara, H., 1952. *Hepatica nobilis* Schreb var. asiatica (Nakai) Hara. *J. Fac. Sci. Uni. Tokyo* 3, 51.
- Hara, H., Kurosawa, S., 1958. Differentiation within *Anemone hepatica* L. of Japan. *J. Jpn. Bot.* 33, 9-18.
- Heins, R.D. 1982. The influence of light on lily (*Lilium longiflorum* Thunb.). I. Influence of light

- intensity on plant development. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107:330-335
- Hong, J.U., 1995. Physiological and ecological study of *Hepatica asiatica* N. ( I ) Comm. Dev. Res. 4, 1-8.
- Jacobsen, J.V., Pressman, E., Pyliotis, N.A., 1976. Gibberellin-induced separation of cells in isolated endosperm of celery seed. *Planta* 129, 113-122.
- Jeon, S.H., D.O. Hong , C.H. Lee, H.Y. Kim, S.C. Shin, and J.H. Kang. 2006. Growth and flowering of *Orostachys japonicus* A. Berger by transplanted seedling size. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* 14:153-157
- Jeong K.J., Y.S. Chon, K.O. Choi, S.H. Ha, and J.G. Yun. 2012. Proper light intensity, potting media and fertilization levels for potted *Orostachys iwarenge* for. *magnus* 30:357-362.
- Jeong, K.J., Y.S. Chon, Y.S. Chae, S.W. Lee, S.H. Ha, and J.G. Yun. 2011. Selection of pot medium and nutrient concentration for pot plant production of *Orostachys boehmeri*. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 29(Suppl. II) 159.
- Jeong, J.H. and S.Y. Park. 2003. Responses of growth and flowering to degree of shading in *Primula sieboldi*, *Hosata longipes* and *Astilbe chinesis* var. *dauidi*. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 29(Suppl. I). 82.
- Kang, J.H., J.S. Park, and J.W. Kim. 1995. Effect of long-day and night break treatments on growth and anthesis of *Orostachys japonicus* A. Berger. *Kor. J. Crop Sci.* 40:600-607.
- Kang, J.H., S.H. Jeon, S.Y. Yoon, D.O. Hong, 2005. Growth and flowering of *Orostachys Japonicus* A. Berger by controlling daylengths. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* 13:114-117.
- Kang, J.H., Y.S. Ryu, and B.G. Cho. 1996. Effect of night break period on growth and anthesis of *Orostachys japonicas*. *Kor. J. Crop Sci.* 41:236-242.
- Kang, J.H., Y.S. Ryu, S.Y. Kang, Y.D. Shim, and K.I. Kim. 1997. Effect of night break timing on growth, bolting and anthesis of *Orostachys japonicas*. *Kor. J. Crop Sci.* 42:597-603.
- Karssen, C.M., Zagorski, S., Kepczynski, J., Groot, S.P.C., 1989. Key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination. *Ann. Bot.* 63, 71-80.
- Kim, H.D. and K.R. Park. 2005. Genetic variation in five species of Korean *Orostachys* (Crassulaceae). *Kor. J. Plant Taxonomy* 35:295-311.
- Kim, J.H. and N.S. Lee. 1994. Allozyme variation in *Hepatica asiatica* and *H. insularis*. *Kor. J. Plant Taxon.* 24:79-93.
- Kim, S.K., H.H. Kim, and C.H. Lee. 2000. Effect of media on growth and leaf color in *Orostachys* spp. *Kor. J. Soc. Hor. Sci. and Tech.* 18:715.
- Kim, S.K., B.Y. Ryu, and C.H. Lee. 2003. Effect of shading on growth characteristics of several *Orostachys* species native to Korea. *J. Kor. Soc. Landscape Arch.* 5:1-9.
- Kim, T.J. 1996. Korean resources of plants. Seoul National University Publishing Department, Seoul. Pp. 67-68
- Kim, T.J., J.L. choi, K.S. Shin, and K.Y. Paek. 2000. Effect of different photosynthetic photon flux density (PPFD) and temperatures on photosynthesis and carbohydrate content in *Doritaenopsis* ‘Happy valentine’. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 41:221-225.
- Kucera, B., Cohn, M.A., Leubner-Metzger, G., 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci. Res.* 15, 281-307.
- Larson, L.A., 1968. The effect soaking pea seeds with or without seedcoats has on seedling growth.

- Plant Physiol. 43, 255-259.
- Lee, C.B., 1982. An illustrated guide to Korean flora.
- Lee, C.B. 1987. Plant taxonomy. Sin-Go Hyangmoonsa. Korea. P. 223-224.
- Lee, C.W., S.H. Jeon, H.Y. Kim, S.C Shin, and J.H. Kang. 2007b. Growth and flowering of *Orostachys japonicus* A. Berger as affected by nitrogen fertilization. Kor. J. Medicinal Crop Sci. 15:429-433.
- Lee, C.W., H.Y. Kim, S.H. Jeon, S.C. Shin, and J.H. Kang. 2008. Growth and flowering of *Orostachys japonicus* A. Berger as affected by phosphorus and potassium fertilization. Kor. J. Medicinal Crop Sci. 16:144-149.
- Lee, H.D., Y.S. Huh, S.D. Kim, K.Y. Lee, S.D. Kim, and T.J. Kim. 2013. Effects of mixture on the new bud and shoot growth of native ladys slipper orchid (*Cypripedium macranthum* Sw.) for horticultural cultivation. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 29 (Suppl. II). 153.
- Lee, J.S. and K.J. Bang. 1998. Effect of day length and light intensity on the growth and flowering of *Orostachys iwarege*. Kor. J. Soc. Hor. Sci. 39:83-85.
- Lee, J.S., S.W. Han, and H.J. Kim. 2007. Effects of different light intensities on the growth of floricultural plants native to korea. J. Kor. Env. Res. & Reveg. Tech. 10:16-22.
- Lee, M.J., Lee, K.H., Chae, K.S., 2005. Differentiation and development of flower bud in *Hepatica asiatica* Nakai. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 23, 451-454.
- Lee, M.Y., L.S. So, J.K. Kim, Y.J. Kim, and C.H. Lee. 2003. Effect of light intensity on growth of Korean native pteridophyta eligible for pot ferns. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 29 (Suppl. I). 82.
- Lee, S.Y., J.H. Ahn, and H.J. Kim. 2004. Characteristics of growth and flowering by nitrogen levels in *Sedum sarmentosum*. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 22:426-430.
- Lee, Y.N., 1976. Illustrated flora & fauna of Korea, plant (seasonal plant). Ministry of Education, Science and Technology, Seoul, pp. 202-203.
- Lim, J.H. 1989. A study on the growth conditions of *Hepatica asiatica* Nakai for the cultivation as a floricultural crops in the habitats. Master thesis. Hyosung Women's University.
- Lim, J.H. and C.K. Sang. 1990. Growth conditions of *Hepatica asiatica* Nakai in the habitats for the cultivation as floricultural crop. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 31:81-89.
- Mamo, N., Mihretu, M., Fekadu, M., Tigabu, M., Teketay, D., 2006. Variation in seed and germination characteristics among *Juniperus procera* populations in Ethiopia. For. Ecol. Manage. 225, 320-327.
- Martin, A.C., 1946. The comparative internal morphology of seeds. Am. Midl. Nat. 36, 513-660.
- Moon, J.H., K.J. Kim, S.J. Jeong, J.W. Lee, and S.M. Lee. 2011. The effect of light intensity on the growth of five kinds of native plants. Kor. J. Hort. Technol. 29 (Suppl. 2):159.
- Müller, K., Tintelnot, S., Leubner-Metzger, G., 2006. Endosperm-limited brassicaceae seed germination: abscisic acid inhibits embryo-induced endosperm weakening of *Lepidium sativum* (cress) and endosperm rupture of cress and *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 47, 864-877.
- Nakai, T., 1937. Japanese Hepatica J. Jpn. Bot. 13, 227-243.
- Negm, F.B., Smith, O.E., Kumamoto, J., 1972. Interaction of carbon dioxide and ethylene in overcoming thermodormancy of lettuce seeds. Plant Physiology 49, 869-872.

- Nomizu, T., Niimi, Y., Watanabe, E., 2004. Embryo development and seed germination of *Hepatica nobilis* Schreber var. japonica as affected by temperature after sowing. *Scientia Horticulturae* 99, 345-352.
- Nomizu, T., Niimi, Y., Watanabe, E., 2004. Embryo development and seed germination of *Hepatica nobilis* Schreber var. japonica as affected by temperature after sowing. *Scientia Horticulturae* 99, 345-352.
- Park, J.H., S.Y. Park, and M. Mikage. 1998. Pharmacognostical studies on the "No Ru Gui". *Kor. J. Pharmacogn.* 29:396-401.
- Powell, A.A., Matthews, S., 1978. The damaging effect of water on dry pea embryos during imbibition. *Exp. Bot.* 29, 1215-1229.
- Rebeiro, H.M., A.M. Romero, H.Pereira, P. Borges, F. Cabral, and E. Vaconcelos. 2007. Evaluation of a compost obtained from forestry wastes and solid phase of pig slurry and a substrate for seedlings production. *Bioresour. Technol.* 98:3294-4397.
- Son, K.H. and D.Y. Yeom. 1988. Effects of light intensities in various indoor sites on leaf area and mesophyll cells of foliage plants. *Hort. Environ. Biotechnol.* 29:30-37.
- Rowland, G.G., Gusta, L.V., 1977. Effects of soaking, seed moisture content, temperature and seed leakage on germination of faba beans (*Vicia faba*) and peas (*Pisum sativum*). *Can. J. Plant Sci.* 57, 401-406.
- Schopfer, P., Plachy, C., 1985. Control of seed germination by abscisic acid. III. Effect on embryo growth potential (minimum turgor pressure) and growth coefficient (cell wall extensibility) in *Brassica napus* L. *Plant Physiol.* 77, 676-686.
- Song, J.S., Chang, Y.D., Chung, H.H., Bang, C.S., Kim, J.Y., 2003. Floral initiation and flowering response of potted *Hepatica asiatica* to low temperature and GA<sub>3</sub>. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 44, 928-930.
- Taiz, I., E. Zeiger. 1991. The control of flowering. P. 513-531. In L. Taiz, and E. Zeiger (ed.). *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Co., Redwood City, California, USA.
- Tamura, M., 1993. Ranunculaceae, In: Kubitzki, K., Rohwer, J.G., Bittrich, V. (Eds.), *The families and genera of vascular plants II. Flowering plants - dicotyledons*. Springer, Berlin, pp. 563-583.
- Vidaver, W., Hsiao, A., 1975. Actions of gibberellic acid and phytochrome on the germination of grand rapids lettuce seeds. *Plant Physiology* 53, 266-268.
- Watkins, J.T., Cantliffe, J.D., Huber, D.J., Nell, T.A., 1985. Gibberellic acid stimulated degradation of endosperm in pepper. *J. of ASHS* 110, 61-65.
- Zimmer, K. 1985. *Sedum*. P. 305. In A.H. Halevy (ed). *CRC Handbook of flowering*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.