

GOVP1199801666

633.72  
L2932  
v.2

최 종  
연구보고서

# 차나무의 품종화 및 우량품종의 보급을 위한 세포 및 분자적 연구

Molecular and tissue culture method for breeding and  
distribution of varieties of *Camellia sinensis*

연구기관  
순천대학교

농림부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “차나무의 품종화 및 우량품종의 보급을 위한 세포 및 분자적 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1997. 11. 30

주관연구기관명 : 순천대학교

총괄연구책임자 : 이 선 하

연 구 원 : 박 인 협

연 구 원 : 노 일 섭

협동연구기관명 : 보성차시험장

협동연구책임자 : 최 형 국

# 여 백

# 요 약 문

## I. 제 목

차나무의 품종화 및 우량품종의 보급을 위한 세포 및 분자적 연구

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

차의 기호성과 성분의 우수한 기능성 때문에 차 수요가 증가하는 추세인데 차문화의 오랜 전통과 재배에도 불구하고 우리 고유의 차나무 품종 하나없이 재래종 형태로 재배되고 있다. 국산 차는 일본이나 다른나라(유럽, 인도, 중국 등)의 것에 비해 맛이 우월하다는 평판을 얻고 있다. 그러나 일반성은 인정되고 있지 않으며 외국인의 입맛에 맞는 차를 다방면으로 개발하여 수출 증대를 도모할 필요가 있다. 특히 기온이 온화한 남부지방에서는 단위 면적당 농가소득이 다른 작물보다 높은 편이며, 고령 노동자도 동참할 수 있는 장점이 있어 차 재배를 보급 시킴과 동시에 우량 품종을 보급하면 농가 소득이 향상될 것이다.

차나무는 초본류와 달라 1년에 한 번의 life cycle밖에 구할 수 없어 새로운 품종 육성에 많은 시간이 소요되어 생명공학적인 육종 방법의 도입이 요구된다. 차의 육종은 교배육종이 중심이고, 보조적으로 분리육종이 행하여 지고 있다. 따라서 자가불화합성 연구에 의해 교잡친화성을 검토한 후, 제형질에 대하여 우열성을 결정, 선발하여야 한다.

전통적인 기호음료인 차의 소비를 확대하고 농가의 소득을 향상시키기 위하여는 형질이 우수한 우리 고유의 차 품종을 빠른 시일에 육성하여 보급하는 방법이다. 그러기 위해서는 많은 유전자원을 확보하고, 생명공학 기법을 육종에 도입하여 우수한

형질을 도입과 품종개발 기한의 단축을 도모하며, 육성된 품종을 빠른 시일에 보급하기 위한 대량증식 방법을 확립하는 것이다. 이 연구는 이런 문제의 핵심에 접근하기 위하여 구체적인 목적을 다음과 같이 두고 있다.

1. 야생 차 집단의 환경 적응 생태와 물질생산의 지역적 차이를 비교하여 차재배에 적합한 자연 환경을 모색한다.
2. 국내외에서 서로 다른 야생종이나 품종을 다수 수집하여 유전자원으로 이용할 수 있도록 하고 형태적 특성, 화학적 성분을 비교 분석하여 특성을 밝혀 낸다.
3. 야생 집단종 내지 품종간의 유연관계를 DNA 수준에서 규명하는 방법을 모색하고, 기능성 유전자를 cloning하여 분자적 육종에 이용할 수 있도록 한다.
4. 차나무에 대한 조직배양 기술을 습득, 발전시켜, 육종연한의 단축, 종묘의 대량증식, 신속한 보급에 이용하도록 한다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

이 연구는 차나무가 관목성 수목임을 고려하여 야생지의 생태적 특성과 물질생산을 비교 조사, 국내외 유전자원을 수집과 특성조사, 분자수준의 분석과 DNA cloning, 그리고 조직배양을 통한 대량 증식 방법 확립으로 장기간 소요되는 우수한 품종 육성의 자료를 확보하고자 하였다. 이 연구에서 수행한 구체적 내용은 다음과 같다.

1. 전국 야생차 집단중에서 12곳을 선정하여 생태 및 잎의 형태적 특성, 토양 특성, 임분구조와 물질생산의 현황을 비교 조사하여 차 재배에 적합한 자연 환경을 알아 본다.
2. 차나무 국내 야생종과 외국에서 육성된 품종 수집하여 육종에 이용될 유전자원을 확보하고 형태적 특성 조사, 성분 분석 등을 실시하여 수집종의 특성을 구분짓는다.
3. 육종에 생명공학 기법을 이용하고자 분자적 수준의 접근방법으로 RAPD marker

를 이용한 차 품종의 동정, 차나무의 엽록체 DNA library 작성, 그리고 차나무의 광합성 반응계 관련 유전자 *psb A*의 cloning 및 구조해석을 한다.

4. 종묘의 대량증식과 신속한 보급을 위해서 조직배양에 관한 연구로 야생차의 잎과 줄기 절편으로 callus 유도 배양과 배배양 및 multishoot 유도 배양을 실시한다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### 1. 주요 연구개발 결과

- 가. 야생 차나무 집단의 생육환경, 임분구조, 잎의 형태적 특성 등을 파악하기 위하여 지역, 위도 등을 고려하여 12개 야생 차나무 집단을 선정하여 조사 분석한 결과, 차나무 집단은 일반적으로 산 하부 남향 사면의 비옥도가 비교적 높은 미사질 양토에 주로 분포하고 있었다. 잎의 특성에 의하여 cluster 분석한 결과, 조사된 12개 집단은 엽장과 엽면적에 의하여 3개의 군으로 구분되었으며, 엽장과 엽면적이 중간 크기인 군은 거치수와 엽맥수에 의하여 다시 2개의 군으로 구분되었다. 야생 차나무 집단의 토양특성, 임분구조, 현존량을 조사한 결과, 근원직경은 집단별 평균 수령과 유의적인 상관관계가 있었고 표본목은 근원직경이 증가함에 따라 줄기와 가지, 뿌리의 건중량은 지수함수적으로 증가하였으며, 1년생 잎과 소지의 건중량은 직선적으로 증가하였다. 그리고 뿌리의 건중량이 증가하는 것은 근주당 줄기의 수가 증가하기 보다는 줄기의 평균 직경과 수고가 증가하기 때문이었다. 차나무 집단의 임목 전체 현존량은 1,162~11,474kg/ha, 이용 부위인 1년생 잎의 현존량은 165~1,341kg/ha로서 집단간 큰 차이가 있었으며, T/R 율은 1.5~2.8의 범위를 보였다. 1년생 잎의 현존량 구성비는 토양특성 중 전질소함량, 습도지수가 증가함에 따라 감소하는 유의적인 부의 상관관계를 보였다. 단위면적당 차나무 잎의 생산성에 대한 영향 인자는 근원단면적, 밀도, 전질소함량, 토양수분 등이었다.

나. 국내 차나무는 전남북과 경남지역을 중심으로 46개 지역에서 야생종을 수집하였고 외국종은 일본에서 24개 품종을 수집하였다. 수집종의 잎의 특성과 성분을 조사하였다. 한국 야생차와 일본의 차품종간의 화학성분을 비교한 결과, 차의 감칠 맛에 가장 영향을 주는 Theanine 함량은 선암사(1.220%) 집단이 높았다. Arginine 함량은 0.013~0.266% 범위로 선암사 집단이 일본 품종보다 약 21배가 높은 함량 차이를 보였다. 전 flavonol류 함량은 일본 품종보다 국내 야생집단이 적었다. 유리당의 평균 함량은 선암사(1.56%) 집단이 많았다. Ascorbic acid와 Tocopherol 함량은 범왕리와 다솔사 집단이 높았고, 백양사 집단이 가장 낮았다.

다. RAPD marker를 차품종의 동정에 이용하고자 실시한 국내 야생종과 일본 품종간 RAPD 분석 결과, Random primer 20종을 이용하여 총 212개의 DNA 단편을 검출하였으며, 증폭된 단편의 크기는 약 250bp에서 3000bp사이에 나타났다. 한국의 개체 및 일본 품종에서 검출된 특이적 RAPD marker는 18.9%(40/212)를 차지하였다. Cluster 분석한 결과는 48개 표본은 Euclidian값 45이하에서 5군으로 나누어져 있고, 한국 야생차 집단과 일본 품종간에는 긴밀한 유전적 관계를 나타내며 한국 집단이 일본종보다 유전적 배경의 폭이 크게 나타났다.

차나무 잎에서 엽록체 DNA를 추출하여 제한효소로 절단한 단편을 분석한 결과, 엽록체 DNA의 제한효소 pattern으로 판단하면 차나무의 엽록체 DNA 크기는 약 133.96 Kbp이었다. 신엽으로 부터 엽록체 DNA를 추출하여 *Sau3AI*으로 부분 절단하고 엽록체 DNA library를 얻었다. 또한 시금치 및 비의 엽록체 DNA의 clone bank로부터 적당한 clone을 probe로 이용하여 plaque hybridization을 행함으로써 positive한 clone을 다수 선발하였다. Insert DNA단편의 크기는 100-4,000bp정도가 많았다.

분자 육종에 유용한 광합성 반응계 II 관련 유전자 *psb A*를 cloning하고 그 구조를 해석을 한 결과, *psb A* contig 영역은 ATG부터 stop codon TAA까지 1062bp을 갖는 유전자로써 353개의 아미노산으로 구성되어 있었고 담배, 시금치,

며 등과의 상동성은 DNA염기배열에서는 90~95%이었으며, 아미노산 Level로 볼 때 97%으로 매우 높은 상동성을 보였다. 또한 차의 *psb A* 유전자는 단자엽식물보다 쌍자엽식물과 높은 상동성을 나타냈다.

라. 차나무의 잎과 줄기 등 영양체에서 callus 유도를 위한 배양 결과, 잎 절편은 줄기 절편에 비하여 갈변화율이 높았고(32.8%), 잎 절편의 callus 유도율은 45.2%(제1엽)였으며, 줄기 절편은 58.4%(제1마디)였다. 제2, 3절간으로 부터의 표피조직의 callus유도율은 완전한 줄기 절편의 60%정도를 나타냈다. 잎과 줄기 절편에 있어서 callus화율을 높이기 위해서는 2-4 mg/L 범위의 IBA와 BA 조합이 필요하였으며 이것은 2,4-D와 NAA 조합보다 유리하였다.

차나무의 배배양에서 callus형성율은 평균 45.8%였고, shoot형성율은 11.4%였다. 호르몬 첨가에서 callus 유도에는 2,4-D가 효과적으로 작용하고 shoot 형성에는 고농도의 BA가 효과적이었다. shoot 형성에 효과적인 호르몬 조합은 BA(2mg/L)와 IBA(1mg/L)로 평균 3.32개 형성율을 보였다. shoot 신장에는 GA 5mg/L가 적당한 것으로 나타났다.

## 2. 활용에 대한 건의

가. 앞으로 차 재배지 선정은 차 수확, 관리의 기계화에 대비하고 고품질 생산 가능성을 고려하여야 한다. 그러기 위해서는 차 재배의 적지로서 급 경사지는 피하고 비옥도가 비교적 높은 미사질 양토를 고르고 한해를 피하기 위하여 남향 사면이 적당하다. 재배에 있어서는 근근의 충실성을 기하도록 한다.

나. 우리나라 고유의 품종을 육성하기 위해서는 더 많은 유전자원을 확보해야 되고 외국 품종의 수집에도 계획적인 노력을 기울여야 한다. 우리나라 야생종에서는 내병성, 내한성과 맛에 관여하는 Theanine, Arginine 고함량과 flavonol류 저함량인자를 도입하도록 하고 일본품종에서는 다수확성을 도입할 필요가 있다. 그리고 세계적으로 홍차 소비가 많은 점을 고려하여 홍차 품종 개발을 위한 장기



적 계획도 필요하다.

다. 세계적인 무역자유화의 추세에 따라 외국산 차 상품이 국내산과 구별없이 소비 시장을 침투하는데 대비하여 품종 구분의 방법으로 RAPD 분석기법을 도입하도록 한다. 그리고 육종년한을 단축하기 위해서는 유용 유전자 cloning, 형질전환 등의 분자유종 방법을 활용하도록 한다.

라. 차나무가 타식성 식물로서 자연 교잡에 의한 종자생산은 품종 고유 특성의 유지가 곤란하므로 현재 종자번식으로 종묘를 생산하고 있는 방법을 지양하고, 조직 배양을 통하여 균일화된 우수 품종의 대량증식과 보급에 노력을 기울여야 한다.

# CONTENTS

SUMMARY .....	3
Chapter 1. Introduction	
1-1 Research Needs .....	21
1-2 Objectives of research .....	23
1-3 Scopes and Contents of research .....	23
Chapter 2. Ecological characteristics in wild populations of <i>Camellia sinensis</i>	
2-1 Introduction .....	25
2-2 Materials and Methods .....	25
2-3 Results and Discussion .....	28
Chapter 3. Stand structure and biomass in wild populations of <i>Camellia sinensis</i>	
3-1 Introduction .....	37
3-2 Materials and Methods .....	37
3-3 Results and Discussion .....	39
Chapter 4. Collection of wild varieties and cultivars of tea from home and abroad	
4-1 Introduction .....	47
4-2 Materials and Methods .....	48
4-3 Results and Discussion .....	49

Chapter 5. Comparison of chemical components among wild tea plants from Korea and Japanese tea cultivar	
5-1 Introduction .....	55
5-2 Materials and Methods .....	56
5-3 Results and Discussion .....	58
Chapter 6. Identification of Korean wild tea plants and Japanese tea cultivars using RAPD markers	
6-1 Introduction .....	63
6-2 Materials and Methods .....	64
6-3 Results and Discussion .....	66
Chapter 7. Construction of chloroplast DNA library in tea plant	
7-1 Introduction .....	77
7-2 Materials and Methods .....	78
7-3 Results and Discussion .....	81
Chapter 8. Cloning and interpretation of <i>psb A</i> related to photosynthesis in <i>Camellia sinensis</i>	
8-1 Introduction .....	89
8-2 Materials and Methods .....	90
8-3 Results and Discussion .....	94
Chapter 9. Callus induction of tea plants by leaf and stem culture	
9-1 Introduction .....	97
9-2 Materials and Methods .....	98

9-3 Results and Discussion .....	100
Chapter 10. Multishoot induction of tea plants by embryo culture	
10-1 Introduction .....	111
10-2 Materials and Methods .....	111
10-3 Results and Discussion .....	112
Chapter 11. Summary and Conclusions	
11-1 Summary of research project .....	117
11-2 Expected effects of research results .....	122
11-3 Application of research results .....	123
References .....	125

## SUMMARY

Koreans have enjoyed drinking tea for a long time, and the consumption of tea is rapidly increasing recently. It is necessary to develop our own tea cultivars to meet with the increasing demand. However, no tea cultivars have been bred in Korea while many cultivars have been developed in Japan. Breeding tea plants takes long time because of the nature of the plant, therefore, it is desirable to use biotechnological approach to shorten the time required.

The aim of this research project was to provide useful techniques for the development of new Korean tea cultivars which has good taste and is suitable for cultivation. This research project included the following fields, 1) ecological characteristics, stand structure and biomass in wild populations of *Camellia sinensis* 2) morphological characteristics and chemical components of tea plants collected 3) molecular analysis of varieties and cloning of gene related to photosynthesis in tea, 4) mass propagation of tea plants by tissue culture.

The results are summarized as follows,

1. Ecological characteristics, stand structure and biomass in wild populations of *Camellia sinensis*

Twelve natural *Camellia sinensis* populations were selected according to their location and their ecological characteristics and biomass distribution were studied in relation to soil characteristic and stand structure. Most *Camellia sinensis* populations were located at the southern slope of mountains below 300m in elevation on relatively fertile silt loam soil. *Camellia sinensis* was distributed as a population under the tree stratum dominated by *Phyllostachys bambusoides*,

*Torreya nucifera*, *Robinia pseudo-acacia*, *Quercus variabilis*, *Styrax japonica*, *Celtis choseniana* and *Acer pseudo-sieboldianum*. Density of *Camellia sinensis* ranged from 4,800 to 40,300 trees/ha.

In the study of stand structure biomass in wild tea populations, mean root collar diameter increased with increasing mean age of the population, while mean height, density and root collar area had no correlation with the age. The range of total biomass was 1,162~11,474kg/ha and the range of current leaf biomass was 165~1,341kg/ha. The biomass of current leaves and twigs correlated well with root collar area and density of the population. The distribution ratio of current leaf biomass to total biomass was negatively correlated with total N content and moisture content of the soil.

## 2. Morphological characteristics and chemical components of tea plants collected

Significant differences in leaf length, leaf width, number of serrations, number of veins, petiole length and leaf area were observed among populations and among individuals within populations. Good positive correlations were found between leaf length and leaf area and between number of serrations and number of veins.

The average content of theanine, the major amino acid of tea responsible for the taste, was highest in Seonamsa population(1.220%) among tea plants collected. Arginine contents were in the range from 0.013% to 0.226%, and the arginine content of Seonamsa population was 21 times higher than that of Japanese cultivar 'Meiyoku'. Total flavonol content of Meiyoku(23.58mg/g) were higher than those of Korean tea populations. Total polysaccharide contents varied depending on developmental stage of leaves and manufacturing process. Contents of ascorbic acid

and tocopherol in Beomwangri and Dasolsa were higher than those of other tea collections.

### 3. Molecular analysis of varieties and cloning of gene related to photosynthesis in tea

In RAPD analysis of Korean wild tea clones and Japanese cultivars, a total of 212 bands was generated by 20 different random primers. The size of the amplified fragment ranged from about 250 bp to 3000 bp. Korean clone- and Japanese cultivar-specific RAPD markers comprised 18.9% (40 fragments) of the total fragments generated (212 fragments). A total of 48 samples could be divided into 5 groups with Euclidian distance value of less than 45 by several methods of cluster analysis. Korean clones and Japanese cultivars showed close genetic relationship with each other.

The chloroplast DNA of tea was found to be 133.96 kb in size by restriction enzyme analysis. The positive clones were conducted by plaque hybridization using rice and spinach probes. The DNA fragments of 100~4000 bp were inserted into the vector plasmid.

A gene which is known to affect photosynthesis system in plants, *psb A*, was cloned with the purpose of using it in the breeding of herbicide-resistant tea cultivars. The cloned gene was 1062 bp in size and coded for 353 amino acids.

### 4. Mass propagation of tea plants by tissue culture

During the callus induction culture of tea plant, the stem segments were more heavily contaminated than the leaf segments, however, the survival rate of the callus induced from stem segments was higher than those from leaf segments.

The callus induction rate was 42.2% from the 1st leaf segment. The callus induction rates from stem segment were higher in younger stems than in older ones. The callus induction rates from the epidermal layer were less than 60% of those from the intact stems. Callus was more effectively induced when MS medium was supplemented with a combination of IBA and BA than with 2,4-D and NAA.

In embryo culture, the average rate of callus formation was while that of shooting was 11.4%. Supplement of 2,4-D was effective for the callus formation while BA was effective for shooting. High shooting rate (3.32) was observed in culture a medium supplemented with BA(2mg/l) and IBA(2mg/l). Gibberrelin(5mg/l) was effective for the growth of shoots.



여 백

# 목 차

요 약 문 .....	3
SUMMARY .....	12
제 1 장 서 론	
제1절 연구의 필요성 .....	21
제2절 연구의 목적 .....	23
제3절 연구의 범위와 내용 .....	23
제 2 장 차나무 집단의 생태적 특성	
제1절 서 언 .....	25
제2절 연구방법 .....	25
제3절 연구결과 및 고찰 .....	28
제 3 장 차나무 집단의 임분구조 및 물질현존량	
제1절 서 언 .....	37
제2절 연구방법 .....	37
제3절 연구결과 및 고찰 .....	39
제 4 장 차나무 국내외 수집종의 특성조사	
제1절 서 언 .....	47
제2절 연구방법 .....	48
제3절 연구결과 및 고찰 .....	49

제 5 장 한국 야생차와 일본 차품종간의 화학성분 비교	
제1절 서 언 .....	55
제2절 연구방법 .....	56
제3절 연구결과 및 고찰 .....	58
제 6 장 RAPD marker를 이용한 한국 야생차 및 일본 차품종의 동정	
제1절 서 언 .....	63
제2절 연구방법 .....	64
제3절 연구결과 및 고찰 .....	66
제 7 장 차나무의 엽록체 DNA library 작성	
제1절 서 언 .....	77
제2절 연구방법 .....	78
제3절 연구결과 및 고찰 .....	81
제 8 장 차나무의 광합성 반응계 관련 유전자 <i>psb A</i> 의 cloning 및 구조해석	
제1절 서 언 .....	89
제2절 연구방법 .....	90
제3절 연구결과 및 고찰 .....	94
제 9 장 야생차의 잎과 줄기 절편 배양에 따른 callus 유도	
제1절 서 언 .....	97
제2절 연구방법 .....	98
제3절 연구결과 및 고찰 .....	100

제 10 장 차나무의 배배양 및 multishoot 유도 배양	
제1절 서 언 .....	111
제2절 연구방법 .....	111
제3절 연구결과 및 고찰 .....	112
제 11 장 요약 및 결론	
제1절 연구의 주요 결과 .....	117
제2절 연구결과의 기대효과 .....	122
제3절 연구개발사업 결과의 활용방안 .....	123
참 고 문 헌 .....	125

# 여 백

# 제 1 장 서 론

## 제1절 연구의 필요성

차나무과(Theaceae), 동백속(*Camellia*)에 속하는 차나무(*Camellia sinensis*)는 중국이 원산으로 아시아 동남부 아열대지대에 자생 분포하고 있다(Sealy, 1958, Heywood, 1978). 경제적인 재배지역은 중국, 인도, 스리랑카, 일본, 한국을 비롯한 아시아지역과 아프리카, 러시아, 남미, 호주 등 전세계 온대지역에 확대되어 40여개국에 이르고 있다. 우리나라에서는 신라 흥덕왕(AD 828년)때 중국에서 전래되어 사찰을 중심으로 야생상태로 재배되어 왔으며 현재 제주도, 전라남도, 경상남도 등 남부지역에서 녹차생산을 위한 경제적 재배가 이루지고 있다(김명배, 1989).

차가 잎에 함유되어 있는 카페인 성분의 흥분, 강심, 이뇨 효과 등 기능성 때문에 기호음료로 이용되기 시작한 역사는 중국에서 2300년전부터 이르고 있는 데 최근 차에 대한 약리적인 기능성 효능에 대한 연구가 활발히 진행되어 차 성분중 polyphenol 성 화합물인 catechin이 항산화작용, 합암작용, 항혈전, 혈압강화작용, 콜레스테롤 재흡수 억제, 충치예방에 효과가 있는 것으로 밝혀지고 있다(Ikeda, 1992, Matsuzaki, 1985, Xu, 1992). 우리나라에서도 소득 향상에 따라 건강에 대한 관심이 높아지면서 차 음용 인구가 증가하고 이에 따라 차 소비도 빠른 속도로 증가하고 있어 녹차시장 규모가 650억원(1997년)에 이르고 있다.

세계적인 차 재배면적은 2,262천ha에 생산량은 2,623천ton으로 추정되는데 우리나라는 재배면적 667ha에 생산량 835ton(1995년)으로 0.03%에 불과하다. 농산물의 개방화와 더불어 중국으로부터는 값싼 차의 수입, 일본으로부터는 고품질의 차가 수입될 가능성이 있다. 차 재배 농가의 존립에 위협을 줄 UR 타결에 대처하기 위한 방법은 차품종을 다양화시켜 다방면의 차음료를 개발하여야 하고, 전통차를 개발하여 선진국에 수출할 준비를 하여야 하는 실정이다. 그리하여 다음과 같은 측면에서 이 연구의

필요성이 강조되고 있다.

가. 기술적 측면

생명 공학 기술의 이용은 장래 예상되는 식량 부족에 대처하기 위한 기본기술로 부각될 것으로 기대 되고 있다. 차나무와 같이 자가불화합성이 강하고 타가수정을 하는 식물의 특징은 유전적 특성이 후대에 그대로 전해지지 않으며 교잡이 거듭됨에 따라 유전적 변이폭이 점점 확대되고 있다. 따라서, 형태적인 분류와 분자수준의 분류가 병행되어 정확하게 분류 체계가 확립되지 않으면 안 된다. 그리하여 지방 우량종을 비롯하여 다양한 근연종을 수집 개량하여 품종화 시킬 필요성이 있으며 야생종의 생태적 유전적 특성을 파악하여 교배육종에 필요한 양친을 작출하여 F1을 합성할 필요가 있다. 또한 외국 우량품종(중국종, 일본종, 앳쌈종)도 도입시켜 지역특성에 맞는 품종으로 개량할 필요성이 있다.

나. 경제적 측면

국내산의 차는 일본이나 다른나라(유럽, 인도, 중국 등)의 것에 비해 맛이 우월하다는 평판을 얻고 있다. 그러나 일반성은 인정되고 있지 않으며 외국인의 입맛에 맞는 차를 다방면으로 개발하여 수출 증대를 도모할 필요가 있다. 특히 기온이 온화한 남부지방에서는 단위 면적당 농가소득이 다른 작물보다 높은 편이며, 고령 노동자도 동참할 수 있는 장점이 있어 차 재배를 보급시킴과 동시에 우량 품종의 보급으로 농가 소득이 향상될 것이다.

다. 사회적인 측면

다양한 차품종의 개발로 차음료를 즐기는 인구가 증대되어 국민건강에 일익을 담당할 것이다. 또한 차문화의 사회적 확대는 우리의 전통을 되살리는 효과를 가져오며 국민정서 함양에 도움이 될 것이다.

## 제2절 연구의 목적

전통적인 기호음료인 차의 소비를 확대하고 농가의 소득을 향상시키기 위하여는 형질이 우수한 우리 고유의 차 품종을 빠른 시일에 육성하는 방법이다. 차의 육종은 교배육종이 중심이고, 보조적으로 분리육종이 행하여 지고 있다. 따라서 자가불화합성 연구에 의해 교잡친화성을 검토한 후, 제형질에 대하여 우열성을 결정, 선발하여야 한다. 그러기 위해서는 많은 유전자원을 확보하고, 생명공학 기법을 육종이 도입하고, 그리고 대량의 증식방법이 확립되어야 한다. 이 연구는 이런 문제의 핵심에 접근하기 위한 구체적인 목적을 다음과 같이 두고 있다.

1. 야생 차 집단의 환경 적응 생태와 물질생산의 지역적 차이를 비교하여 차재배에 적합한 자연 환경을 모색한다.
2. 국내외에서 서로 다른 야생종이나 품종을 다수 수집하여 유전자원으로 이용할 수 있도록 하고 형태적 특성, 화학적 성분을 비교 분석하여 특성을 밝혀 낸다.
3. 야생 집단종내지 품종간의 유연관계를 DNA 수준에서 규명하는 방법을 모색하고, 기능성 유전자를 cloning하여 분자적 육종에 이용할 수 있도록 한다.
4. 차나무에 대한 조직배양 기술을 습득, 발전시켜, 육종연한의 단축, 종묘의 대량증식, 신속한 보급에 이용하도록 한다.

## 제3절 연구의 범위와 내용

이 연구는 차나무가 관목성 수목임을 고려하여 야생지의 생태적 특성과 물질생산을 비교 조사, 국내외 유전자원을 수집 특성조사, 분자수준의 DNA 분석과 cloning, 그리고 조직배양을 통한 대량 증식 방법 확립으로 장기간 소요되는 우수한 품종 육성의 자료를 확보하고자 하였다. 이 연구에서 수행한 구체적 내용은 다음과 같다.

가. 차나무 집단의 생태적 특성



- 나. 차나무 집단의 임분구조 및 물질생산
- 다. 차나무 국내외 야생종 및 품종 수집 및 특성조사
- 라. 한국 야생차와 일본의 차품종간의 화학성분 비교
- 마. RAPD marker를 이용한 한국 야생차 및 일본 차품종의 동정
- 바. 차나무의 엽록체 DNA library 작성
- 사. 차나무의 광합성 반응계 관련 유전자 *psb A*의 cloning 및 구조해석
- 아. 야생차의 잎과 줄기 절편 배양에 따른 callus 유도
- 자. 차나무의 배배양 및 multishoot 유도 배양

## 제 2 장 차나무 집단의 생태적 특성

### 제1절 서 언

수목은 수종에 따라 생육환경이 다르며 동일한 수종일지라도 집단간, 개체간 형질의 변이가 심하기 때문에 가치가 높은 수종을 개발 이용하기 위해서는 대상 수종의 생태와 형태적 특성에 관한 연구가 선행되어야 한다. 현존하고 있는 자연식생은 물리적인 환경과의 상호작용 결과라고 할 수 있으며 수종에 따라 환경조건에 대한 적응 범위가 다르기 때문에 수종간 경쟁에 의하여 자연분포 지역이 제한되고 있다. 그러나 수목은 환경조건에 대한 적응 범위가 넓어서 비교적 다양한 환경에서 분포하고 있으며 이러한 환경의 다양성은 결과적으로 수종내의 형질 변이를 유발하게 된다. 따라서 어떠한 수종이 요구하는 생육환경과 형질변이에 관한 정보는 집단을 이루고 있는 자연분포지역들을 대상으로 토양 등의 물리적 환경, 임분구조, 주요 형질의 형태적 특성 등을 종합 분석함으로써 얻어질 수 있다.

한국에서 야생 차나무는 전라도와 경상도 지방에 주로 분포하고 있으며, 오랜 전파의 역사를 통하여 수 세대가 지속됨으로써 지역에 따라 다른 기후, 토양 등 환경조건에 적응한 야생 집단을 이루고 있다. 본 연구는 야생하고 있는 차나무 집단을 대상으로 지형, 토양 특성 등의 물리적 환경, 임분구조 및 잎의 형태적 특성을 조사 비교함으로써 차나무의 생육환경과 주요 형질변이에 관한 정보를 제공하는데 목적이 있다.

### 제2절 연구방법

#### 1. 조사지 선정 및 조사구 설치

본 연구는 차나무가 하층식생으로 집단을 이루고 있으며 최근 수년간 벌채, 산화

등 교란의 흔적이 없는 야생 차나무 집단을 대상으로 실시하였다. 조사지는 위도, 지역 등을 고려하여 전북 지역 3개 집단, 전남 지역 7개 집단, 경남 지역 2개 집단으로 총 12개 집단을 선정하였다(표2-1).

표본추출법으로는 임연효과를 배제하기 위하여 각 조사지의 중앙부에 10m×10m의 조사구를 설치하여 조사하였다.

## 2. 생육환경 조사

조사지의 환경요인으로는 해발고, 방위, 경사도 및 토양 특성 등을 조사분석하였다. 토양 특성은 각 조사지내에 설치한 조사구의 대각선상의 상, 중, 하부에서 각각 50cm 깊이의 토양을 채취하여 토성, 수분지수, 산도, 전질소함량, 유효인산함량, 치환성염기량 등을 분석하였다. 토양채취 시기는 1986년 7~8월이었으며, 조사구별 3개 토양시료의 평균치를 각 조사지의 토양 특성으로 하였다.

표 2-1. 차나무 조사 집단의 위치

Table 2-1. Location of the studied populations

Population	Location	Latitude
1	Chonbuk Iksan Ungpo-myon Ipjom-ri	35° 03' 44"
2	Chonbuk Kimje Keumsan-myon Keumsan-ri	35° 43' 24"
3	Chonbuk Kochang Asan-myon Samin-ri	35° 29' 57"
4	Chonnam Changsong Bukha-myon Sangung-ri	35° 26' 22"
5	Chonnam Kurye Kwangeui-myon Bangkwang-ri	35° 16' 22"
6	Chonnam Changheung Iuchi-myon Bongdok-ri	34° 48' 24"
7	Chonnam Suncheon Songkwang-myon Sinpyeong-ri	35° 00' 00"
8	Chonnam Suncheon Chuam-myon Boksa-ri	35° 03' 14"
9	Chonnam Suncheon Seokhyeon-dong	34° 58' 10"
10	Chonnam Suncheon Sangsa-myon Dongbaek-ri	34° 56' 52"
11	Kyongnam Hadong Hwagae-myon Unsu-ri	35° 15' 41"
12	Kyungnam Namhae Sangju-myon Sangju-ri	34° 45' 06"

### 3. 임분구조 조사

식생층은 대나무류를 포함한 목본 식물을 대상으로 흉고직경 1cm 이상은 교목층, 1cm 미만은 관목층으로 구분하여 조사하였다(Brower, 1977). 교목층은 각 조사구내 수종, 수고, 흉고직경 등, 관목층은 수종, 수고, 피도 등을 조사하였다. 식생조사 결과 얻어진 자료에 의하여 식생층별 각 수종의 중요도를 나타내는 척도로서 중요치 (Importance value)를 산출하였다. 중요치는 조사구별 출현 수종의 상대밀도와 상대피도의 합을 2로 나눈 값으로 하였으며, 교목층의 경우 상대흉고단면적을 상대피도로 하였다(Causton, 1988).

### 4. 잎의 형태적 특성 조사

식생조사 결과를 토대로 각 조사구별로 수관폭이 고르게 배치되도록 조사구별 10주씩 총 120주(12조사구×10주)의 차나무 표본목을 선정하였다. 표본목당 50엽씩 총 6,000엽(12조사구×10주×50엽)을 채취하여 엽장, 엽폭, 엽면적, 거치수, 엽맥수, 엽병장

등을 측정하였다. 엽면적은 엽면적측정기를 사용하여 측정하였으며, 거치수와 엽맥수는 잎의 좌측편에서만 측정하였다. 잎의 채취 부위는 각 표본목의 수관 상, 중, 하부 및 방위별로 고르게 채취하였으며, 채취시기는 1996년 8월이었다. 측정된 자료에 의하여 nested design에 의한 분산분석과 Duncan의 다중검정, flexible-beta법에 의한 cluster 분석을 하였다(SAS, 1988).

### 제3절 연구결과 및 고찰

#### 1. 생육환경

각 조사지의 해발고, 방위, 경사도 등의 지형적 특성은 표 2-2와 같다. 차나무 집단은 집단 12를 제외한 11개 집단의 경우 해발 350m 이하의 산 하부에 분포하고 있었다. 방위는 주로 남향에 위치하고 있었으며, 경사도는 5~30° 이었다. 조사지별 분포면적은 0.04~0.45ha이었다.

표 2-2. 조사 집단의 지형 구성

Table 2-2. Site description of the studied populations

Population	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Altitude(m)	120	170	60	340	220	120	240	100	50	60	220	590
Aspect	SW	S	S	W	S	S	S	S	W	S	S	S
Slope(°)	5	20	15	25	10	20	30	15	5	5	5	10
Area(ha)	0.12	0.15	0.3	0.2	0.15	0.45	0.05	2.8	0.05	0.1	0.6	0.04

표 2-3에서 보이듯이 국제토양학회법(진현오 등, 1996)에 의한 토성은 12개 조사지 중 10개 조사지가 미사질양토이었으며 전체 조사지의 모래, 미사, 점토의 구성비는 각각 23.3~66.0, 32.0~74.7, 2.0~4.0%의 범위를 보였다. 비교적 잘 보전되어 있는 백

운산지역 활엽수혼효림의 모래, 미사, 점토의 구성비 각각 40.0~54.2, 33.4~43.7, 12.4~16.3%(박인협, 1986)와 비교하면, 차나무 집단의 토양은 점토의 구성비가 전반적으로 낮으며 모래와 미사의 구성비는 집단간 차이가 심한 것으로 나타났다. 토양산도는 강한 산성인 3.8~5.3으로서 한국 산림토양의 평균치인 5.5(이수욱, 1981) 보다 낮았다. 전질소함량의 범위는 0.35~1.44%이었으며 전체 조사지의 평균치는 0.83%로서 일반적으로 토양조건이 불량한 소나무림 0.23%(임행진 등, 1988)과 토양조건이 양호한 극상림인 서어나무림 0.49%(박인협, 1986) 보다 높았다. 이러한 이유는 대부분의 차나무 집단의 경우 질소 비료를 간헐적으로 시비해주기 때문이라고 추정된다. 보비력과 비옥

표 2-3. 조사 집단의 토양 특성

Table 2-3. Soil characteristics of the studied populations

Popu- lation	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)	Tex- -ture ·	Mois- -ture factor**	pH (1:5)	Total -N (%)	C/N ratio	Av. P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (ppm)	CEC (me/ 100g)	Exchangeable bases(me/100g)				Base satu- ration (%)
											Ca**	Mg**	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	
1	42.3	54.2	3.5	SiL	1.072	3.8	0.65	5.65	25.1	16.6	0.81	0.25	0.04	0.98	12.5
2	32.5	65.5	2.0	SiL	1.049	4.3	0.68	6.55	21.4	21.5	3.12	1.65	0.10	0.99	27.3
3	23.3	74.7	2.0	SiL	1.058	4.4	0.79	7.02	59.8	21.3	2.83	1.47	0.13	1.11	26.0
4	32.6	63.4	4.0	SiL	1.049	5.1	0.92	5.29	24.3	20.4	4.25	1.41	0.07	0.15	28.8
5	66.0	32.0	2.0	SL	1.026	5.3	0.60	5.79	17.5	18.0	3.97	1.13	0.08	0.95	34.1
6	25.4	71.9	2.7	SiL	1.060	4.5	0.86	7.53	38.7	19.9	2.21	1.07	0.09	0.84	21.2
7	61.4	36.3	2.3	L	1.048	4.9	0.35	7.43	16.7	16.9	1.58	0.83	0.02	0.99	20.2
8	51.6	46.4	2.0	SiL	1.070	4.6	0.81	6.21	32.5	19.5	1.54	0.45	0.11	1.36	17.7
9	35.7	60.3	4.0	SiL	1.108	4.4	0.98	8.36	58.8	23.5	4.03	1.13	0.09	1.02	26.7
10	45.0	53.0	2.0	SiL	1.131	4.7	1.00	7.17	23.3	24.6	5.08	1.56	0.08	1.47	33.3
11	27.7	69.3	3.0	SiL	1.119	4.3	0.85	6.95	60.2	19.7	1.07	0.37	0.06	1.17	13.6
12	28.3	69.7	2.0	SiL	1.084	4.6	1.44	8.26	42.0	21.5	0.85	0.39	0.11	1.37	12.7
Mean	39.3	58.1	2.6	SiL	1.073	4.6	0.83	6.85	34.9	20.3	2.60	0.98	0.08	1.03	22.8

\* SiL=Silt loam, SL=Sandy loam, L=Loam, \*\* air-dry weight / oven-dry weight

도의 지표라고 할 수 있는 양이온치환용량과 염기포화도의 전체 조사지 평균치는 각각 20.3, 22.8%로서 소나무림 각각 16.9, 8.6%(임행진 등, 1988), 활엽수혼효림 각각 17.6, 16.2%(박인협, 1986)에 비하여 높았다.

이상을 종합하면 차나무 집단은 일반적으로 산 하부 남향 사면의 비옥도가 비교적 높은 미사질양토에 주로 분포하는 것으로 나타났다. 또한 차나무는 산성토양에 대한 내성이 강한 수종이라고 할 수 있으나, 질소비료 시비에 의한 토양 산성화가 추정됨으로써 이에 대한 대책이 필요한 것으로 나타났다.

## 2. 임분구조

조사지별 임분개황 및 수종별 중요치는 표 2-4, 2-5와 같다. 관목층에서 집단을 이루고 있는 차나무의 밀도는 6,100~37,100주/ha로써 집단간 큰 차이를 보였다. Day와 Monk(1974)는 교목층의 피도가 높을수록 관목층의 광조건 등이 나빠지기 때문에 관목층의 밀도는 감소한다고 하였는데, 본 조사인 차나무 집단의 경우 교목층의 피도와 대치할 수 있는 교목층의 흉고단면적과 관목층 전체 또는 차나무 밀도간에 일정한 경향을 보이지 않는 것으로 나타났다. 이것은 차나무 집단의 경우 인위적인 교란의 정도가 비교적 심하다는 것을 시사하고 있다.

차나무의 상층식생인 교목층의 우점종은 12개 집단 중 집단 5, 7, 8, 10, 11 등 5개 집단이 왕대이었으며, 집단 4, 6 등 2개 집단이 비자나무이었다. 집단 1, 6, 9, 12에서는 각각 아까시나무, 비자나무, 굴참나무, 때죽나무가 교목층의 우점종이었다. 집단 2에서는 때죽나무, 당단풍 등, 집단 3에서는 검쟁나무, 굴참나무, 당단풍 등, 집단 4에서는 비자나무, 당단풍 등이 교목층의 우점종이었다. 관목층에서 차나무의 중요치는 12개 집단 중 집단 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 등 8개 집단에서 85% 이상으로 군락을 이루고 있었다. 집단 2에서는 조릿대 등, 집단 7에서는 느티나무 유령목, 싸리 등, 집단 11에서는 누리장나무, 개울나무 등, 집단 12에서는 싸리, 누리장나무, 산딸기 등과 혼효하고 있었다.

표 2-4. 야생차 집단의 임분 구조

Table 2-4. Stand description of the studied populations

Population	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tree stratum												
Canopy cover(%)	70	80	60	85	60	65	85	75	75	90	60	30
Canopy height(m)	15.5	12.5	17.0	13.0	12.5	15.0	11.0	12.0	14.0	12.5	11.5	8.0
Density(trees/ha)	2100	900	400	1500	5300	800	7900	7500	800	10100	4200	300
Mean DBH(cm)	11.1	19.8	33.6	20.0	6.0	24.3	2.6	2.8	16.5	3.3	3.6	7.3
Basal area(m <sup>2</sup> /ha)	26.8	41.9	39.9	83.9	26.3	51.9	5.7	5.9	26.3	9.7	4.6	1.0
Shrub stratum												
Cover(%)	90	85	70	70	80	80	70	90	90	85	85	80
Height(m)	2.8	2.0	1.7	1.3	1.5	1.6	2.5	1.4	2.5	3.3	1.8	2.4
Density(trees/ha)	10900	25200	21400	15700	18700	42400	14700	31100	6700	10800	13100	7800
	(9800)*	(15300)	(21000)	(15500)	(17800)	(37100)	(6200)	(28300)	(6700)	(10400)	(7500)	(6100)

\* Number of *Camellia sinensis*

### 3. 잎의 형태적 특성

차나무 잎의 형태적 특성 측정치의 집단별 평균치, Duncan의 다중검정 및 분산분석 결과는 표 2-6과 같다. 엽장, 엽폭, 거치수, 엽맥수, 엽면적 등 잎의 형태적 특성은 분산분석 결과, 모두 집단간, 집단내 개체간 고도의 유의적인 차이를 보임으로써 분포 지역과 동일 분포지내 개체간 변이가 심한 것으로 나타났다. 이것은 참나무류(김지문 등, 1985), 동백나무(김용식, 1986), 호랑가시나무(임경빈, 1979)와 일치하는 경향이었으며, 차나무를 보급하고자 할 때 집단 뿐만 아니라 개체 선발의 필요성도 시사하고 있다. 엽장, 엽폭, 엽면적 측, 잎의 크기가 가장 큰 집단은 집단 10이었으며, 가장 작은 집단은 집단 11이었다.

표 2-7에서 보이듯이 엽폭, 거치수, 엽맥수, 엽병장은 엽장과 유의적인 상관관계가 없는 것으로 나타남으로써 서로 독립적인 성장특성을 보였다. 엽면적은 엽장과 고도의 상관관계를 보였으나 엽폭과는 유의적인 상관관계가 없었으므로 엽면적의 지표는 엽장인 것을 알 수 있었다. 엽장을 독립변수로 하는 엽면적 회귀식은  $y=3.7747x-12.575$



표. 2-5. 야생차 집단에서 각 수종의 중요치

Table 2-5. Importance values(%) of the woody and bamboo species in populations

Population	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tree stratum												
<i>Phyllostachys bambusoides</i>					40.1		89.5	100	19.5	100	100	
<i>Quercus variabilis</i>			23.9	15.1	7.8				61.3			
<i>Acer pseudo-sieboldianum</i>		21.5	20.8	20.9		16.3						
<i>Celtis choseniana</i>		16.1	39.3		2.2				10.5			
<i>Torreya nucifera</i>				33.3		65.1						
<i>Camellia japonica</i>			16.0									
<i>Castanea crenata</i>	7.7				17.5							
<i>Albizia julibrissin</i>				4.9			10.5					
<i>Prunus sargentii</i>		19.8										
<i>Quercus dentata</i>		12.0										
<i>Robinia pseudo-acacia</i>	86.2											
<i>Styrax japonica</i>		30.6										100
Other species	6.1		8.7	25.8	32.4	18.6			8.7			
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Shrub stratum												
<i>Camellia sinensis</i>	86.9	54.3	97.0	95.8	96.5	94.8	47.7	91.6	97.5	95.4	61.4	64.6
<i>Quercus variabilis</i>		1.0					5.5					
<i>Quercus aliena</i>	0.5					0.4	6.7		1.5			
<i>Zelkova serrata</i>			1.8			1.0	16.0					
<i>Rosa multiflora</i>	6.2									0.9		
<i>Lespedeza bicolor</i>							8.2		0.5		7.8	
<i>Clerodendron trichotomum</i>											22.8	7.5
<i>Rhus tricocarpa</i>											7.6	
<i>Rubus crataegifolius</i>												6.3
<i>Sasa borealis</i>		39.2					4.6	2.9				
Other species	6.4	5.5	1.2	4.2	3.5	3.8	11.3	5.5	1.0	3.2	8.2	13.8
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

표 2-6. 야생차 조사 집단에서 차나무 잎의 특성

Table 2-6. Mean of various leaf characteristics with Duncan test and significance of ANOVA

Population	Length(cm)	Width(cm)	No. of serrations*	No. of veins*	Petiole length(cm)	Area(cm <sup>2</sup> )
1	8.47 c	2.76 j	26.2 e	8.5 c	0.42 a	19.40 c
2	7.09 g	2.92 i	27.3 d	8.1 de	0.33 cd	14.26 g
3	8.03 d	3.34 ed	25.4 f	7.9 e	0.41 a	18.79 de
4	8.06 d	3.29 ef	27.6 cd	8.2 d	0.36 bc	17.79 e
5	8.16 d	3.44 bc	26.3 e	7.6 f	0.31 d	18.84 cd
6	8.07 d	3.04 h	26.0 ef	7.6 f	0.36 bc	16.26 f
7	7.67 e	3.48 b	31.8 a	8.7 b	0.32 cd	14.45 g
8	8.22 d	3.23 f	31.7 a	9.1 a	0.39 ab	17.84 e
9	8.81 b	3.40 cd	28.1 c	7.2 g	0.33 c	20.75 b
10	9.16 a	3.66 a	29.6 b	8.5 c	0.40 ab	22.98 a
11	6.48 h	2.88 k	23.3 g	7.5 f	0.33 c	12.78 h
12	7.48 f	3.18 g	29.5 b	8.6 c	0.39 ab	16.20 f
F-significance						
Populations	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Individuals within populations	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

\* Number of serrations and veins on the left side of the leaves, respectively.

표 2-7. 야생차 조사 집단에서 잎 특성의 상관관계

Table 2-7. Correlation coefficients among the leaf characteristics

	Length	Width	No. of serrations	No. of veins	Petiole length
Width	0.422				
No. of serrations	0.060	0.420			
No. of veins	-0.075	-0.038	0.638*		
Petiole length	0.416	-0.228	-0.134	0.442	
Area	0.944**	0.415	-0.101	-0.127	0.458

\* and \*\* are significant at the 5% and 1% levels, respectively.

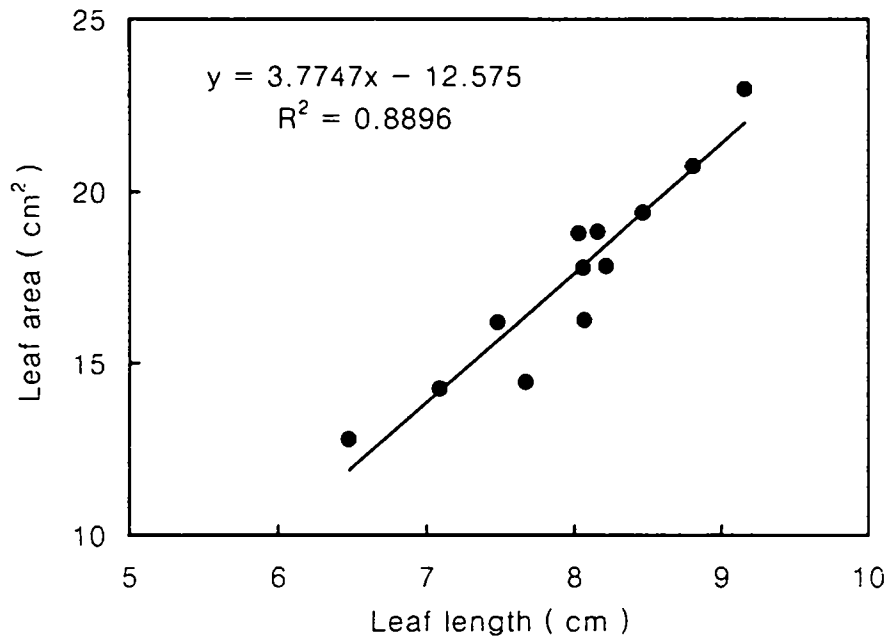


그림 2-1. 차나무 잎길기와 잎면적간의 상관관계

Fig. 2-1. Relationship of mean leaf area to mean leaf length of *Camellia sinensis* populations.

로 유도되었다(그림 2-1). 한편, 엽맥수와 거치수간에는 유의적인 상관관계가 있었다.

집단별 엽장, 엽폭, 거치수, 엽맥수, 엽병장, 엽면적 등 잎의 형태적 특성에 의한 12개 집단의 cluster 분석 결과는 그림 2-2와 같다. 잎의 형태적 특성 측정치의 집단별 평균치(표 2-6)와 cluster 분석결과를 종합하면 차나무 10개 집단은 엽장과 엽면적이 작은 집단 11, 큰 집단 9, 10, 중간인 집단 1, 3, 5, 4, 2, 6, 7, 8, 12로 3개의 군으로 구분되었다. 그리고 엽장과 엽면적이 중간인 군에 속하는 9개 집단은 거치수와 엽맥수가 적은 집단 1, 3, 5, 4, 2, 6과 많은 집단 7, 8, 12로 다시 구분되었다. Wright(1976)는 동일 수종일지라도 분포지의 기후, 토양 등의 환경조건에 대한 적응 결과 집단간 형질

변이가 나타나며, 위도, 해발고, 방위 등의 종합적인 환경변화를 초래하는 복합적인 환경구배와 형질변이간에 일정한 경향이 있을 때 이것을 경사변이라고 하였다. 본 조사에서 엽장과 엽면적에 의하여 구분되는 3개 군의 위도(표 2-1), 해발고(표 2-2) 등을 비교해보면 일정한 방향의 경사변이를 보이지는 않는 것 알 수 있다. 이러한 이유는 한국산 야생 차나무의 원산지와 품종이 동일하지 않다는 은 등(1984)의 보고를 고려할 때 차나무 잎의 형태적 특성에 영향을 미치는 인자는 분포지의 환경 차이 보다 유전적인 차이가 더 크기 때문이라고 할 수 있다.

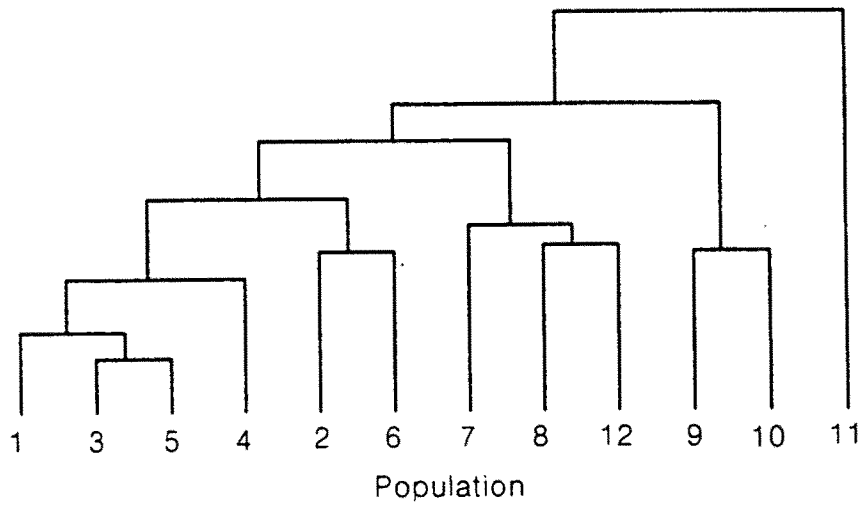


그림 2-2. 잎의 특성에 따른 차나무 집단의 유연관계

Fig. 2-2. Dendrogram of cluster analysis based on the leaf characteristics of *Camellia sinensis*

# 여 백

# 제 3 장 차나무 집단의 임분구조 및 물질현존량

## 제1절 서 언

차의 생산성을 높이기 위한 차나무의 효율적인 관리에 필요한 물질생산에 관한 정보가 요구되고 있다. 삼림의 생산성은 환경과 식생의 상호작용에 의하여 성립된 삼림내 구성종들의 성장현상의 종합적인 결과이며, 식물의 생장은 동화기관인 잎에서 동화된 동화물질의 이용 및 축적의 결과이다. 따라서, 차나무 집단의 성장특성, 생산구조, 생산성 등의 종합적인 생산생태학적 정보를 파악하기 위해서는 토양특성, 임분구조 등에 따른 줄기와 가지, 잎, 뿌리 등 각 부위 및 집단 전체의 현존량에 관한 연구가 이루어져야 한다. 차나무에 관한 연구로는 증식방법(김재생, 1986), 내한성(김재생, 1981), 유연관계(은종방 등, 1984), 차잎의 성분(김동연 등, 1979) 등에 관한 연구가 이루어져 있으나 토양특성, 임분구조에 따른 현존량에 관한 연구는 이루어지지 않고 있다.

이 연구는 야생 차나무 집단을 대상으로 토양특성, 임분구조와 현존량의 관계를 파악함으로써 차나무의 효율적인 관리에 필요한 생산생태학적 정보를 제공하는데 목적이 있다.

## 제2절 연구방법

### 1. 조사지 개황

이 연구는 차나무가 하층식생으로 집단을 이루고 있으며 최근 수년간 잎 채취, 벌

채, 산화 등 교란의 흔적이 없는 야생 차나무 집단을 대상으로 실시하였다. 조사지는 위도, 지역 등을 고려하여 전북지역 3개 집단, 전남지역 7개 집단, 경남지역 2개 집단으로 총 12개 집단을 선정하였다(표 3-1). 선정된 조사지는 주로 남향사면에 위치하고 있었으며 차나무 분포 면적은 0.04~2.8ha이었다. 차나무의 상층식생인 교목층은 집단 7, 8, 10, 11에서 왕대, 집단 4, 6에서 비자나무, 집단 1, 9, 12에서 각각 아까시나무, 굴참나무, 때죽나무가 우점종을 이루고 있었다. 집단 2에서는 때죽나무, 당단풍, 집단 3에서는 검팽나무, 굴참나무, 당단풍, 집단 5에서는 왕대, 밤나무 등이 혼효하고 있었다. 차나무가 집단을 이루고 있는 관목층에서는 교목층 수종의 유령목과 개웃나무, 싸리류 등이 드물게 출현하고 있었다.

표 3-1. 야생차 조사 집단의 위치와 지형

Table 3-1. Location and site description of the studied *Camellia sinensis* populations

Pop.	Location	Latitude	Altitude (m)	Aspect	Slope (°)	Area (ha)
1	Chonbuk Iksan Ungpo-myon Ipjom-ri	35° 03' 44"	120	SW	5	0.12
2	Chonbuk Kimje Keumsan-myon Keumsan-ri	35° 43' 24"	170	S	20	0.15
3	Chonbuk Kochang Asan-myon Samin-ri	35° 29' 57"	60	S	15	0.3
4	Chonnam Changsong Bukha-myon Sangung-ri	35° 26' 22"	340	W	25	0.2
5	Chonnam Kurye Kwangeui-myon Bangkwang-ri	35° 16' 22"	220	S	10	0.15
6	Chonnam Changheung Iuchi-myon Bongdok-ri	34° 48' 24"	120	S	20	0.45
7	Chonnam Suncheon Songkwang-myon Sinpyeong-ri	35° 00' 00"	240	S	30	0.05
8	Chonnam Suncheon Chuam-myon Boksa-ri	35° 03' 14"	100	S	15	2.8
9	Chonnam Suncheon Seokhyeon-dong	34° 58' 10"	50	W	5	0.05
10	Chonnam Suncheon Sangsa-myon Dongbaek-ri	34° 56' 52"	60	S	5	0.1
11	Kyongnam Hadong Hwagae-myon Unsu-ri	35° 15' 41"	220	S	5	0.6
12	Kyungnam Namhae Sangju-myon Sangju-ri	34° 45' 06"	590	S	10	0.04

## 2. 토양 및 식생 조사

조사지별 차나무 집단의 내부에 10m×10m 조사구 3개씩을 무작위로 설치하였다. 토양조사는 각 조사구의 중앙부에서 50cm 깊이의 토양을 채취하여 토성, 습도지수, 토양산도, 전질소함량, 유효인산함량, 양이온치환용량, 염기포화도 등을 분석하였다. 식생 조사는 각 조사구내 교목층의 임관고, 수종, 흉고직경 등을 조사하고 관목층에서 집단을 이루고 있는 차나무의 피도, 수고, 근원직경 등을 조사하였다.

## 3. 현존량 조사

관목류의 현존량 조사시 일반적으로 사용하고 있는 적절한 면적의 조사구를 설치한 후 조사구내 임목 전체를 벌채 측정하는 전벌법(Whittaker, 1995)에 의하여 차나무 집단의 현존량을 다음과 같이 조사하였다. 식생조사시 설치한 각 조사구의 중앙부에 2m×2m 소조사구를 설치하였다. 따라서, 조사지별 소조사구의 면적은 16m<sup>2</sup>(3소조사구×4m<sup>2</sup>)가 된다. 각 소조사구내 차나무를 모두 벌채하고 줄기와 가지, 1년생 소지, 1년생 잎, 2년생 이상 잎 등의 부위별로 구분하여 생중량을 측정하였다. 뿌리는 각 소조사구 내부의 뿌리를 굴취 세척한 후 생중량을 측정하였다. 건중량은 소조사구별, 부위별 1,000g 정도씩의 시료를 취하여 생중량을 측정하고 85℃에서 7일간 건조시켜 건중량을 측정한 후 시료의 건중량대 생중량비에 의하여 환산하였다. 한편, 개체목의 상대성장관계를 파악하기 위하여 조사지별 3개 소조사구에서 근원직경급이 고르게 분포하도록 6주씩의 표본목을 선정하여 각 표본목의 부위별 생중량을 별도로 측정하고 건중량을 환산하였다. 또한, 근원부에서 원판을 채취하여 직경, 연륜수 등을 측정하였다.

# 제3절 연구결과 및 고찰

## 1. 토양특성 및 입분구조

토양조사 결과 국제토양학회법(진현오, 1996)에 의한 토성은 12개 조사지 중 10개 조사지가 미사질 양토이었으며, 흡습수의 상대적인 값인 습도지수는 1.026~1.131의 범



위를 보였다(표 3-2). 토양산도는 3.8~5.3으로써 강한 산성이었으며, 전질소 함량의 범위는 0.35~1.44%이었다. 보비력과 비옥도의 지표라고 할 수 있는 양이온치환용량과 염기포화도는 각각 16.6~24.6me/100g, 12.5~34.1%이었다.

식생조사 결과에 의하여 산출한 차나무 집단의 임분개황은 표 3-3과 같다. 차나무 집단의 상층을 이루고 있는 교목층의 밀도, 평균 흉고직경, 흉고단면적은 조사지간 큰 차이를 보였다. 그 이유는 집단 7, 8, 10, 11은 흉고직경이 작고 밀도가 높은 왕대가 우점종이며, 집단 12의 경우 우점종인 매죽나무의 크기가 작고 밀도가 낮기 때문이었다. 관목층에서 집단을 이루고 있는 차나무의 집단별 평균 수령은 21.4~56.0년이었다.

표 3-2. 야생차 집단의 토양 특성

Table 3-2. Soil characteristics of *Camellia sinensis* populations

Pop.	Tex-ture*	Mois-ture factor**	pH (1:5)	Total-N (%)	Av. P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (ppm)	CEC (me/100g)	Exchangeable bases(me/100g)				Base saturation(%)
							Ca <sup>**</sup>	Mg <sup>**</sup>	Na <sup>*</sup>	K <sup>*</sup>	
1	SiL	1.072	3.8	0.65	25.1	16.6	0.81	0.25	0.04	0.98	12.5
2	SiL	1.049	4.3	0.68	21.4	21.5	3.12	1.65	0.10	0.99	27.3
3	SiL	1.058	4.4	0.79	59.8	21.3	2.83	1.47	0.13	1.11	26.0
4	SiL	1.049	5.1	0.92	24.3	20.4	4.25	1.41	0.07	0.15	28.8
5	SL	1.026	5.3	0.60	17.5	18.0	3.97	1.13	0.08	0.95	34.1
6	SiL	1.060	4.5	0.86	38.7	19.9	2.21	1.07	0.09	0.84	21.2
7	L	1.048	4.9	0.35	16.7	16.9	1.58	0.83	0.02	0.99	20.2
8	SiL	1.070	4.6	0.81	32.5	19.5	1.54	0.45	0.11	1.36	17.7
9	SiL	1.108	4.4	0.98	58.8	23.5	4.03	1.13	0.09	1.02	26.7
10	SiL	1.131	4.7	1.00	23.3	24.6	5.08	1.56	0.08	1.47	33.3
11	SiL	1.119	4.3	0.85	60.2	19.7	1.07	0.37	0.06	1.17	13.6
12	SiL	1.084	4.6	1.44	42.0	21.5	0.85	0.39	0.11	1.37	12.7

\* SiL=Silt loam, SL=Sandy loam, L=Loam

\*\* air-dry weight / oven-dry weight

표 3-3. 야생차 집단의 수목 구조

Table 3-3. Stand structure of *Camellia sinensis* populations

Pop.	Over story				<i>Camellia sinensis</i> population				
	Canopy height (m)	Density (Trees/ha)	Mean DBH (cm)	Basal area (m <sup>2</sup> /ha) <sup>a</sup>	Mean age (yr) <sup>b</sup>	Mean root collar diameter (cm) <sup>c</sup>	Mean height t (m) <sup>d</sup>	Density (trees/ha) <sup>e</sup>	Root collar area (m <sup>2</sup> /ha) <sup>f</sup>
1	15.5	2,100	11.1	26.8	34.2	2.5	1.54	9,800	4.6
2	12.5	900	19.8	41.9	23.1	1.6	0.72	15,300	2.9
3	17.0	400	33.6	39.9	35.8	2.6	0.93	2,100	11.0
4	13.0	1,500	20.0	83.9	32.4	2.5	0.98	15,500	7.5
5	12.5	5,300	6.0	26.3	21.4	1.8	1.03	17,800	4.4
6	15.0	800	24.3	51.9	33.8	2.4	1.10	37,100	17.5
7	11.0	7,900	2.6	5.7	37.3	2.2	0.98	6,200	2.3
8	12.0	7,500	2.8	5.9	31.0	2.0	0.89	28,300	8.5
9	14.0	800	16.5	26.3	38.3	3.5	1.64	6,700	6.3
10	12.5	10,100	3.3	9.7	40.3	2.7	1.98	10,400	6.0
11	11.5	4,200	3.6	4.6	36.0	2.2	0.91	7,500	3.0
12	8.0	300	7.3	1.0	56.0	3.6	1.53	6,100	6.3

Correlation coefficients between <sup>a</sup> and <sup>e</sup>, <sup>a</sup> and <sup>f</sup>, <sup>b</sup> and <sup>c</sup>, <sup>b</sup> and <sup>d</sup>, <sup>b</sup> and <sup>e</sup>, <sup>b</sup> and <sup>f</sup> are 0.401(ns), -0.408(ns), 0.856(\*\*), 0.569(ns), 0.408(ns) and 0.075(ns), respectively. (\*\*) is significant at 1% level and (ns) is not significant at 5% level.

집단별 평균 근원직경은 집단별 평균 수령과 고도의 유의적인 상관관계가 있었으나, 집단별 평균 수고, 밀도, 근원단면적은 집단별 평균 수령과 유의적인 상관관계가 없었다. Day와 Monk(1974)는 교목층의 피도가 높을수록 관목층의 광조건 등 환경조건이 나빠지기 때문에 관목층의 밀도는 감소한다고 하였는데, 본 조사의 경우 교목층의 피도와 대체할 수 있는 교목층의 흉고단면적과 관목층인 차나무의 밀도 또는 근원단면적간에 유의적인 상관관계가 없었다. 이것은 차나무가 과거에 조성 관리된 후 자연 상태로 방치된 기간이 천연갱신 등에 의한 자연적인 밀도 조절이 이루어질 만큼 경과하

지 않았음을 시사하고 있다. 한편, 교목층의 흉고단면적과 차나무 집단의 밀도 또는 흉고단면적간에 상관관계가 없는 것은 흉고단면적이 적으나 지하경이 밀집하는 생장 특성을 갖는 왕대가 교목층의 우점종인 집단 7, 8, 10, 11이 포함되었기 때문이라고 생각할 수도 있으나, 그 집단들을 제외하더라도 일정한 경향이 없는 것을 알 수 있다.

## 2. 현존량

집단별 6주씩의 차나무 표본목 측정치에 의한 집단별 표본목의 평균 근원직경과 부위별 건중량의 상대생장관계는 그림 3-1과 같다. 근원직경이 증가함에 따라 줄기와 가지, 뿌리의 건중량은 지수함수적으로 증가하였으며, 1년생 잎과 소지의 건중량은 직선적으로 증가하는 경향을 보였다. 2년생 이상 잎 건중량의 경우 근원직경과 상관관계가 없는 것으로 나타났다. 2년생 이상 잎의 경우 상관관계가 없는 것은 집단에 따라 낙엽량의 차이가 있음을 시사하고 있다. 근원직경이 증가함에 따라 줄기와 가지의 건중량이 증가하는 것은 근주당 줄기의 수가 증가하기 보다는 줄기의 평균 직경과 수고가 증가하기 때문이었다(표 3-4). 한편 교목류의 흉고직경과 부위별 건중량의 상대생장관계(박인협, 1990)와 비교하면 차나무의 상대생장관계가 비교적 낮은 것으로 나타났다. 이것은 관목류의 경우 분기가 심하기 때문에 근원직경과 건중량의 상대생장관계가 낮다는 Whittaker(1962)의 보고에 의하여 설명할 수 있다.

차나무의 상대생장관계가 비교적 낮은 점을 고려하여 전벌법(Whittaker, 1975)에 의하여 추정된 집단별, 부위별 현존량은 표 3-5와 같다. 뿌리를 포함한 전체 부위의 현존량은 1,162~11,474kg/ha로서 집단간에 큰 차이를 보였으며, T/R 율은 1.5~2.8로 산출된다. 백운산지역 활엽수 혼효림의 하층식생으로서 생강나무, 노린재나무, 철쭉 등이 혼효하고 있는 관목층의 현존량 2,187kg/ha, T/R 율 2.4(박인협, 1986)와 비교하면 차나무 집단은 평균적으로 볼 때 활엽수 혼효림의 관목층에 비하여 현존량이 많고 T/R 율이 낮았다. 이러한 이유는 관목류의 경우 일반적으로 상록성, 난대성 수종일수록 현존량이 많으나 T/R이 낮다는 Whittaker(1962)의 보고에 의하여 설명할 수 있다.

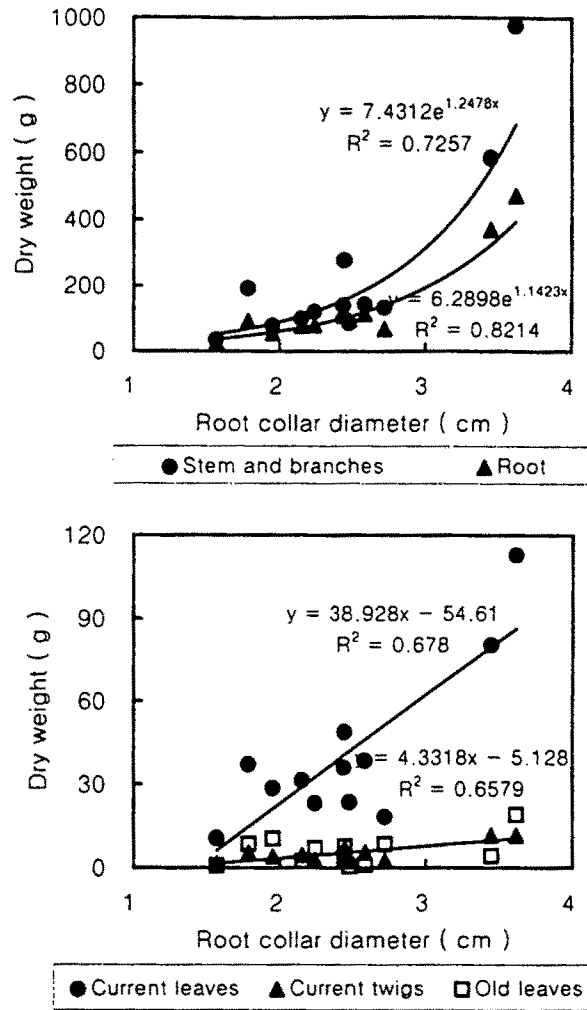


그림 3-1 차나무 근원경과 건물중과의 상관관계

Fig. 3-1. Relationship of mean collar diameter and mean dry weight of the sample trees in *Camellia sinensis* populations

그림 3-4. 차나무 줄기와 뿌리 직경과의 상관관계

Table 3-4. Correlation coefficients between root collar diameter and stems per root-stock of *Camellia sinensis*

	Mean stem diameter	Mean stem height	No. of stems	Stem area
Root collar diameter	0.794**	0.699**	0.197 <sup>ns</sup>	0.773**

\*\* significant at 1% level, <sup>ns</sup> not significant at 5% level

축적 기관인 줄기와 가지, 뿌리의 현존량은 평균 수령, 평균 근원직경, 밀도와는 독립적이었으나 근원직경과 밀도의 종합적인 표현이라고 할 수 있는 근원단면적과 유의적인 상관관계를 보였다(표 3-4). 이러한 이유는 수령이 증가함에 따라 평균 근원직경은 증가하나, 밀도가 일정한 경향을 보이지 않기 때문이라고 할 수 있다(표 3-3).

주 이용 대상인 1년생 잎의 현존량은 165~1,341kg/ha로서 집단간 큰 차이를 보였다. 1년생 잎과 소지는 평균 수령, 평균 근원직경과는 독립적이었으며 근원단면적, 밀도와는 유의적인 상관관계를 보였다. 생산기관인 1년생 잎과 소지의 현존량은 축적기관인 줄기와 가지, 뿌리의 현존량과 독립적인 밀도와도 유의적인 상관관계를 보임으로써 밀도가 높아짐에 따라 1년생 잎과 소지의 현존량 구성비가 높아지는 것을 시사하고 있다. 한편, 1년생 잎과 소지의 구성비는 토양 특성 중 중요한 요인인 전질소 함량, 습도지수와 유의적인 부의 상관관계를 보였다(표 3-7). 이러한 이유는 동일 수종의 경우 광조건, 토양조건 등 환경조건이 나빠질수록 그에 대한 적응 결과 생산기관인 잎의 현존량 구성비가 증가한다는 Whittaker와 Marks(1975)의 보고에 의하여 설명할 수 있다. 한편, 한국에 분포하는 야생 차나무의 원산지와 품종이 동일하지 않으며 잎의 크기가 다르다는 은종방 등(1984)의 보고를 고려할 때 1년생 잎의 현존량 및 현존량 구성비의 차이가 품종의 차이 때문이라고 생각할 수도 있으나, 본 조사와 동일한 집단을 대상으로 잎의 형태적 특성을 조사한 박인협 등(1997)의 조사결과에 제시된 집단별 잎

표 3-5. 야생차 집단의 물질생산(kg/ha)

Table 3-5. Biomass(kg/ha) of the *Camellia sinensis* populations

Pop.	stems and branches	Current twigs	Current leaves	Old leaves	Root	Total
1	2,730(60.2)	69(1.5)	479(10.6)	76(1.7)	1,176(26.0)	4,530(100%)
2	545(46.9)	24(2.1)	165(14.2)	13(1.1)	415(35.7)	1,162(100)
3	3,032(47.6)	117(1.8)	810(12.7)	23(0.4)	2,386(37.5)	6,368(100)
4	1,363(48.1)	53(1.9)	367(12.9)	9(0.3)	1,045(36.8)	2,837(100)
5	3,435(57.4)	96(1.6)	662(11.1)	152(2.5)	1,642(27.4)	5,987(100)
6	5,215(45.5)	194(1.7)	1,341(11.7)	136(1.2)	4,588(39.9)	11,474(100)
7	627(46.4)	28(2.1)	196(14.5)	15(1.1)	486(35.9)	1,352(100)
8	2,230(44.5)	117(2.3)	810(16.1)	298(5.9)	1,564(31.2)	5,029(100)
9	3,909(55.6)	78(1.1)	539(7.7)	29(0.4)	2,473(35.2)	7,028(100)
10	1,397(57.9)	28(1.1)	191(7.9)	89(3.7)	711(29.4)	2,416(100)
11	912(51.8)	22(1.2)	175(9.9)	53(3.0)	602(34.1)	1,764(100)
12	5,951(61.4)	71(0.7)	689(7.1)	116(1.2)	2,873(29.6)	9,700(100)

표 3-6. 야생차 집단에서 근원경과 물질생산과의 상관관계

Table 3-6. Correlation coefficients between tree dimension and biomass of *Camellia sinensis* populations

	Biomass					
	Stem and branches	Current twigs	Current leaves	Old leaves	Root	Total
Mean age	0.369 <sup>ns</sup>	-0.083 <sup>ns</sup>	0.045 <sup>ns</sup>	0.004 <sup>ns</sup>	0.209 <sup>ns</sup>	0.281 <sup>ns</sup>
Mean root collar diameter	0.532 <sup>ns</sup>	0.074 <sup>ns</sup>	0.169 <sup>ns</sup>	-0.159 <sup>ns</sup>	0.460 <sup>ns</sup>	0.517 <sup>ns</sup>
Root collar area	0.579 <sup>*</sup>	0.893 <sup>**</sup>	0.880 <sup>**</sup>	0.301 <sup>ns</sup>	0.864 <sup>**</sup>	0.748 <sup>**</sup>
Tree density	0.267 <sup>ns</sup>	0.835 <sup>**</sup>	0.780 <sup>**</sup>	0.534 <sup>ns</sup>	0.567 <sup>ns</sup>	0.468 <sup>**</sup>

\* significant at 5% level, \*\* significant at 1% level, <sup>ns</sup> not significant at 5% level

의 크기와 본 조사의 잎의 현존량 및 현존량 구성비와는 일정한 경향을 보이지 않는 것으로 나타났다.

이상을 종합하면 야생 차나무 집단의 근원직경은 수령과 유의적인 정의 상관관계가 있었으나, 밀도가 수령과 독립적이기 때문에 근원단면적과 현존량이 수령과 일정한 관계가 없는 것으로 나타났다. 주 이용 대상인 1년생 잎의 경우 근원단면적, 밀도가 증가함에 따라 현존량이 증가하며, 토양특성 중 전질소함량, 습도지수가 증가함에 따라 현존량 구성비가 높아지는 것으로 나타남으로써 단위면적당 차나무 잎의 생산량에 대한 영향 인자는 근원단면적, 밀도, 전질소함량, 토양수분 등인 것을 알 수 있었다.

표 3-7. 야생차 집단에서 토양특성과 잎, 신초 물질생산과의 상관관계

Table 3-7. Correlation coefficients between soil characteristics and biomass distribution ratio of current leaves and twigs to total biomass in the *Camellia sinensis* populations

Biomass distribution ratio	Soil characteristics					
	Moisture factor	pH	Total-N	Available P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	CEC	Base saturation
Current leaves	-0.642*	0.143 <sup>ns</sup>	-0.651*	-0.360 <sup>ns</sup>	-0.481 <sup>ns</sup>	0.017 <sup>ns</sup>
Current twigs	-0.641*	0.150 <sup>ns</sup>	-0.706*	-0.399 <sup>ns</sup>	-0.442 <sup>ns</sup>	0.136 <sup>ns</sup>

\* significant at 5% level, <sup>ns</sup> not significant at 5% level

## 제 4 장 차나무 국내외 수집종의 특성조사

### 제1절 서 언

현재 농가에서 재배하고 있는 차나무의 재래종은 주로 산기슭이나 사찰부근에서 야생하는 차나무로부터 종자를 파종한 실생에서 보급된 것이다. 또한, 차나무는 강한 자가불화합성을 나타내어 실생번식으로는 순계유지가 불가능한 까닭으로 농가의 차나무를 순계로 갱신하여야 한다.

실생에서 번식시킨 재배농가의 차밭에서 다양한 변이(수고, 엽형, 냉해, 조만성, 내병충성 등)가 유발되고 있다. 즉, 유전적 조성이 많이 혼합되어 있어 우량형질의 균일성이 없는 실정이다. 차나무의 형태적 분석은 주로 화기구조를 관찰하는 것이 이상적이다. 화기(암술, 수술)는 재배 환경의 변화에 대하여 타기관보다 안정하다. 일본에서는 암술과 수술의 상대적 높이, 암술의 분지점 위치, 엽모의 특성 등으로 품종을 분류한 예가 있다.

차의 품질은 가장 중요한 육종 목표이다. 품종의 육성에 있어서 양질, 다수의 품종을 선발하여 조합시키는 것은 물론이지만, 품질은 좋고 타의 특성이 떨어지는 품종에 대해서는, 그 특성이 우수한 품종과 조합시켜 품질을 개선시키는 조합이 행하여지고 있다. 홍차용 품종 특성에 있어서 앳쌈종의 이용은 빼놓을 수 없다. 앳쌈종에 일본종이나 중국종의 내한성을 도입하면 좋은 품종의 육성이 예상된다. 최근, 타작물에서는 isozyme 등의 생화학적 수법을 이용한 품종분류나 동정은 식물체의 형태에 기초를 두고 행하고 있다. 武田 등은 화기 형체에 주목하여 품종을 9-12군으로 분류했다. 그러나 그중에서도 생육단계에 의한 변이가 보이고 있다.

일본에는 44품종이 등록되어 있으며 각 지역 특성에 맞는 차나무의 품종을 차연구소에서 분양, 보급하고 있다. 그리고 세계 각지에서 야생 및 재배 차나무를 수집하여



많은 유전자원을 확보하고 있다.

우리나라에서는 중국에서 전래된 이래 오랜 세월 차나무가 야생 상태로 식생을 이루어 왔다. 이 과정에서 환경에 적응하면서 유전적인 변이를 이르게 이 지역 고유의 특성을 간직해 온 것으로 생각된다. 이들 야생집단의 차나무를 체계적으로 수집하고 분석하여 유전자원으로 활용할 필요성이 강조된다. 그리고 외국에서 육성된 품종도 계획적인 수집을 실시하여 새로운 품종 육성에 이용해야 한다.

## 제2절 연구방법

### 1. 야생종과 품종 수집

국내 야생종은 사찰을 중심으로 오랜 세월 야생상태로 방치되어 온 집단에서 비교적 건실할 개체를 이식하거나 삼수를 채취하여 번식하였고 외국종은 일본을 중심으로 차시험장에서 품종을 삼수 상태로 분양받아 번식하였다.

### 2. 잎의 형태적 특성조사

전남 지방을 중심으로 분포되어 있는 25개소 집단의 야생차 특성을 조사하였다. 차나무 잎이 충분히 전개한 시기인 8월, 9월에 잎의 특성으로 엽장, 엽폭, 엽형지수, 측맥수, 거치수, 기공수를 조사하였고, 생체중을 측정하였다.

### 3. 수집종의 성분분석

수집종중 29개 지역의 차나무 잎을 첫물차 시기인 5월에 채취하여 전질소, tannin, caffeine, 유리아미노산, chlorophyll, 비타민 C 함량을 측정하였다. 전질소량은 비색법(Indophenol-blue법)에 따라 흡광도 665nm에서 정량하여  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 정량하였다. Tannin은 주석산 비색법에 따라 흡광도 540nm에서 정량하여 Ethyl-gallate로 정량하였다. Caffeine은 AOAC법에 의해 추출하여 HPLC법을 사용하여 UV detector(model

875-UV)를 사용하였으며, column은 Finepak SIL C<sub>18</sub>(4.6×150nm)를 사용하였다. 이동상은 ethanol-H<sub>2</sub>O(30:70, V/V)로, 측정과장은 260nm, flow rate는 1.0ml/min, 온도는 상온에서 측정하였다. 유리아미노산량은 비색정량법에 따라 570nm 흡광도(Milton Roy Spectronic 3000)에서 측정하였고, Glutamic acid로 정량하였다. chlorophyll양은 흡광도로 측정하고 비타민 C는 池ヶ谷 등의 차 분석법에 의해 분석하였다.

### 제3절 연구결과 및 고찰

#### 1. 국내 야생지 차 수집과 외국 차 품종 수집

일본에서 Yabukita를 비롯하여 24품종(표 4-1)을 수집하고 국내 백양사 야생지를 포함하여 46지역의 야생차를 수집하였다. 수집종은 삼목상에서 번식하여 증식하고 발근된 식물은 pot에 이식하거나 포장에 재식하여 특성조사에 이용하도록 하였다.

#### 2. 야생차 집단외의 형태적 특성 조사

우리나라 야생차 집단에서 수집한 차나무 잎의 형태적 특성은 표 4-2와 같다. 엽장과 엽폭은 양지와 음지에 따라 그 차이가 심한데 양지에서 자생되고 있는 순천 송광사, 장흥 찻등, 화순, 쌍봉사 등은 엽장이 7.7~8.6cm, 엽폭이 3.0~3.6cm 정도의 소엽에 해당되고 음지(16개소)인 대나무 숲에서 자생하고 있는 차나무는 엽장이 길고 엽폭이 넓은 것이 대부분이었다. 엽장의 크기별로 지역을 구분하여 보면 엽장 7.1~9.0cm의 소엽이 야생하고 있는 지역은 순천 송광사를 비롯한 8개 지역이었고, 9.1~11.0cm에 해당되는 지역은 순천 낙안을 비롯하여 13개소로 전지역의 52%를 차지하고 있으며, 11.1~13.0cm의 대엽에 해당되는 지역은 강진 무위사를 비롯하여 4개소였다.

엽폭의 크기별로 야생지를 구분해 보면 우리나라 야생차 엽의 특성은 중국 소엽종에 속하나 야생지의 환경에 따라 변하여 온 다른 생태형을 형성하고 있다고 볼 수 있다. 중국 소엽종의 엽맥수는 6~8개로 보고되어 있으나 본 조사에서는 주엽맥과 부

표 4-1. 일본 수집종의 출처

Table 4-1. Origins of 25 Japanese green tea cultivars collected.

Sample No.	Location and cultivar	collected address and source
24	Yabukita	selected from seedlings of Shizuoka native species
25	Kanayamidori	S6 x Yabukita
26	Okumusasi-I	Sayamamidori x Yamatomidori
27	Yamakai	selected from natural seedlings of Yabukita
28	Hukumidori	Yabukita x 23F1-107(Sayamamidori)
29	Okuyutaka-II	Yutakamitori x F1 NN8(Tamamitori x S6)
30	Karabeni	selected from seedlings of China species(Gohokusyou)
31	Hatumomizi	Ai2 x NKa05
32	Kuritawase	selected from Shizuoka native species
33	Benihikari	Benikaori x Cn1
34	Natumidori	selected from seedlings of Shizuoka native species
35	Izumi	selected from seedlings of Benihomare
36	Toyoka	Sayamamitori x Yabukita
37	Benihomare	selected from India seedlings
38	Yutakamidori	selected from seedlings of Asatuyu
39	Indo(131)	selected from seedlings of India hybrids
40	Benihuzi	Benihomare x C19
41	Ooiwase	Yaeho x Yabukita
42	Tamamidori	selected from seedlings of Uji species
43	Kurasawa	selected from natural seedlings of Yabukita
44	Yamatomidori	selected from seedlings of Nara native species
45	Asagiri	selected from seedlings of Kyotoku native species
46	Sayamakaori	selected from natural seedlings of Yabukita
47	Asatuyu	selected from seedlings of Uji species
48	Yaeho	selected from Yaeho-machi of Sizuoka native species

\*Ai: native species from Assam region in India, Nka: collected from Japanese species of Kakosima prefecture, C: introduced from china. S: strain.

표 4-2. 야생차 집단 차나무 잎의 형태적 특성

Table 4-2. Leaf characteristics of wild tea plants in 25 populations.

Locations	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Leaf width length (%)	Lateral Vein no.	Crenate number	Leaf leaf area (cm <sup>2</sup> )	Fresh leaf weight
Nagan	10.2	4.0	39	11	27	27.5	43
Seunamsa	10.0	4.2	42	14	22	21.5	36
Hyangrimsa	8.8	3.8	43	15	28	24.0	43
Songgwangsa	7.7	3.0	39	13	28	16.4	31
Muwisa	11.8	4.7	40	17	31	34.0	54
Baegryeonsa	11.1	4.7	42	17	40	29.5	46
Dasanchodang	10.3	4.1	40	17	35	26.0	43
geumgogsa	9.7	3.5	36	17	34	22.8	44
Yongsan Bangchon	12.5	4.9	39	17	28	33.0	58
Yongsan Chadeung	8.7	3.3	38	17	38	19.0	42
Borimsa	8.2	3.0	37	13	27	17.4	28
Bong Hwang Gagdong	10.6	3.9	37	17	34	24.5	40
Unheungsa	9.3	3.5	38	13	21	22.1	47
Bulhoesa	8.1	3.5	43	15	28	21.0	41
Beolgyo Weondeung	9.7	3.7	38	10	34	30.8	56
Daeweonsa	8.1	3.6	44	17	25	16.1	40
Bulamsa	10.3	3.9	38	14	32	26.8	47
Ssangbong	8.6	3.6	42	15	34	20.8	43
Geumseong Nocheondong	11.6	4.5	39	17	35	33.1	51
Geumseong Binaedong	10.9	4.1	38	16	35	27.1	44
Baegyangsa	10.4	4.0	39	15	31	25.3	38
Bulgabsa	9.1	3.2	35	16	35	17.6	36
Bubcheonsa	9.1	4.3	47	16	37	22.3	42
Weolya eunam	10.3	4.3	42	16	32	29.0	49
Daeheungsa	8.0	3.3	41	13	29	16.4	39

엽맥을 합친 총 엽맥수는 10~17개로 많은 엽맥을 가지고 있는 것으로 나타났다.

잎의 한쪽 거치수는 27~40개로 거치수가 적은 차잎은 거치 길이가 길고 간격이 길었으며 거치수가 많은 차잎은 거치 길이가 짧고 간격도 좁아 밀생되었다. 야생지에 따른 생엽중(100엽중)을 조사한 결과 장흥 보림사가 28g으로 가장 가볍고, 순천 송광사가 31g으로 가벼웠으나 기타지역은 40g 이상으로 대차 없어 야생지간 생엽중 차이는 크지 않았다.

### 3. 수집종의 성분분석

우리나라 야생지 29개소의 성분을 조사한 결과 표 4-3에서 보는바와 같이 5월에 수확한 첫물차의 탄닌함량은 12.5~18.3%의 범위였으며, 함평군 월야면 용암리와 영광군 백수읍 천마리 야생차가 12.7~12.5%로 가장 적었고, 구례 천은사 야생종이 18.3%로 가장 높았다. 이러한 탄닌 함량이 다량함유 되면 감칠맛이 적고, 쓰고 떫은 맛이 강해 풍미가 떨어지므로(中川, 1981), 탄닌 함량이 적은 계통은 선발하는 것이 바람직하다.

우리나라 야생차의 카페인 함량은 평균 2.53%이며 담양군 담양읍 양각리, 여수시 돌산면 우두리, 구례 화엄사 야생종이 2.2%로 가장 낮고 재배차인 무등산 삼애다원, 강진 장원산업에서 높았다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 다엽의 카페인 함량은 품종간에 2.33~4.75%차가 있다는 보고(大石, 1988)와 비교해 볼 때 우리나라 야생차는 비교적 카페인 함량이 적은 종으로 추정되며 일본의 1번차 다엽에서 2.41~3.02%라는 보고(袴田, 1978)와 유사한 경향을 나타내고 있다.

비타민 C는 야생차보다 재배차에서 함량이 높았으며 장성 북일면 오산리, 영광군 백수읍 천마리, 김해시 당상동 은혜사, 담양군 담양읍 양각리, 강진군 도암면 백련사 자생차가 200mg/100g이하로 가장 적었고, 순천시 주암면 장천리 야생종이 269.5mg/100g로 가장 높았는데 대체로 양지에 야생되고 있는 차가 비타민 C가 높고 죽림등 차광하에서 자란 야생종은 낮은 경향이었는데 이는 차광하면 비타민 C 함량이

감소한다는 보고와 일치하는 경향이었다(高柳, 1977).

총아미노산은 차의 감칠맛을 내는 성분으로 녹차의 아미노산 함량이 많고 탄닌 함량이 많지 않는 차가 가장 좋은 맛을 낸다고 한다. 총아미노산도 자생차에 비해 재배차가 함량이 높았으며 야생종 아미노산 함량이 가장 높은 지역은 보성군 문덕면 대원사, 순천시 주암면 장천리, 하동군 쌍계사로서 2240mg/100g 이상으로 이곳의 야생종은 양질의 녹차를 생산할수 있다고 할수 있겠다. 이러한 결과는 신(1984)의 보고와 비슷한 경향이며 일본산 녹차의 상급에 속하는 값과 비슷했다(村松, 1991).

전질소 함량은 녹차의 품질 및 다엽의 속도와 밀접한 관계가 있는데(김종태, 1996) 야생종의 T-N함량 평균은 4.29%로 야생차보다 재배차의 함량이 높았다. 이는 재배차에서 N시비량이 많은 까닭이며 Torii 등(1950)이 보고한 품종간 생육환경에 따라 차이가 난다는 보고와 연관이 있는 것을 보인다.

표 4-3. 야생차 집단의 화학적 성분 함량

Table 4-3. Contents of tannin, caffeine, Vitamin C, chlorophyll and total amino acid in tea leaves.

Locations	Components						Amino acid (mg/100g)
	Tannin (%)	Caffeine (%)	Vit. C (mg/100g)	Chlorophyll(mg/100g)			
				a	b	Total	
Daewonsa	14.3	2.73	240.5	184.7	61.3	246.0	2490
Ssangbongsa	15.3	2.45	258.5	185.3	63.9	249.2	2405
Baekryonsa	16.7	2.61	195.9	183.3	65.4	248.7	2245
Daehungsa	15.7	2.51	241.3	168.6	58.1	226.7	2106
Shongkwangsa	14.0	2.25	185.6	200.0	74.1	274.1	1888
Shunamsa	15.6	2.62	204.7	177.9	61.4	239.3	2244
Changchong-ri	13.1	2.87	269.5	181.2	62.5	243.7	2424
Dasa-ri	13.0	2.56	246.4	201.4	69.4	270.8	2301
Udu-ri	12.8	2.23	240.4	166.0	57.3	223.3	2026
Yanggak-ri	13.1	2.21	192.3	179.1	61.7	240.8	2018
Baekyangsa	14.7	2.43	253.9	177.3	61.2	238.5	2348
Oshanri	14.4	2.81	167.9	188.6	67.4	256.0	2321
Kaktong-ri	15.1	2.24	218.7	157.9	54.5	212.4	2199
Bulhoisa	16.4	2.32	197.1	247.4	85.3	332.7	1960
Oaun-ri	14.8	2.49	214.9	197.0	67.9	264.9	2000
Yongam-ri	12.7	2.33	211.6	205.3	70.8	276.1	2106
Chonma-ri	12.5	2.79	185.8	177.6	60.9	237.5	1914
Teansa	14.5	2.43	213.2	151.9	52.4	204.3	2065
Hwaomsa	15.5	2.23	219.5	198.6	73.6	272.2	2263
Chonunsa	18.3	2.52	230.5	184.6	65.9	250.6	2265
Naejangsa	16.1	2.56	221.1	184.9	66.1	251.0	2217
Gumshansa	13.6	2.65	225.2	182.9	63.1	246.0	2302
Unhyoisa	13.9	2.31	189.7	148.8	51.3	200.1	2283
Banchon	15.0	2.50	200.3	148.3	49.4	197.7	2173
Tongdosa	14.1	2.38	204.8	143.9	48.0	191.9	2207
Ssanggyesa	13.0	2.64	263.7	183.4	61.1	244.5	2420
Boriam	13.6	2.69	247.2	188.5	67.3	255.8	2407
Shamae Jangwon	13.3	3.11	291.5	140.5	46.9	187.4	2329
	14.8	2.94	271.8	181.5	60.1	241.6	2500
Mean	14.5	2.53	224.3	180.0	62.0	242.0	2222
Range	12.5~	2.21~	167.9~	140.5~	46.9~	187.4~	1888~
	18.3	3.11	271.8	247.4	85.3	332.7	2500

## 제 5 장 한국 야생차와 일본 차품종간의 화학성분 비교

### 제1절 서 언

녹차품종의 육종에 있어서 품질은 선발대상종에서 가장 중요한 형질의 하나이다. 제차품질은 품종에 따라 그 특징이 나타나지만, 품종에 따른 맛의 차이는 다양한 성분함량의 다소, 혹은 상대적인 성분함량의 비에 의한다고 생각된다. 녹차성분중 단맛은 아미노산에 좌우되고 쓴맛이나 떫은 맛은 탄닌성분에 의해 좌우되는 것으로 알려져 있다. 차품종에 따른 화학 성분의 차이에 관해서는 여러 가지 보고가 있다(Anan . 1991. Goto. 1994, Ikeda, 1993). 품종간에 화학성분 함량의 차이가 있어서 녹차용 품종은 아미노산 함량이 많고 탄닌 함량이 적으며, 홍차용 품종은 아미노산 함량이 적고 탄닌 함량이 많은 경향이 보고되어 있다(Horie, 1993. Ikeda, 1993). 그러나 이러한 보고는 일본의 녹차품종이나 계통간의 분석 예거나 홍차품종의 예가 대부분이다.

차의 화학성분중, 전유리아미노산은 녹차의 맛과 깊은 관계가 있는 것으로 알려져 있으며, 테아닌이나 아루기닌과 같은 특정의 아미노산은 품질에 크게 영향을 미치며 가격과 상관이 있다. 따라서 전유리아미노산 함량과 품질과의 관계뿐만 아니라 개개의 아미노산 함량과 품질과의 관계를 검토함에 의해 화학성분 함량에 의한 선발을 보다 효율적으로 행할수 있다고 생각되어진다. 근년 차의 보건 기능성이 주목되어 이에 관한 연구도 활발히 진행되고 있다. 또한 차 자체를 식용으로 하는 제품도 판매되고 있다. 차에는 여러 가지 기능성, 즉 항산화성, 항균작용, 콜레스트롤 개선효과, 혈압상승 억제효과, 발암억제효과, 항혈전효과 등 여러 가지 생리작용이 보고되고 있지만 대부분이 카테친에 관한 것이다(Ikegaya. 1990, Saijo, 1980). 일본산 녹차의 화학성분에



관하여는 많은 분석이 되어있다. 이들의 분석치는 그 시기의 녹차 화학성분의 개요를 알수 있지만, 반드시 충분한 수의 시료를 계통적으로 모아서 분석하지 않으면 안된다. 또한 차 옆의 부위, 적채의 시기, 품종간 등에 의한 화학성분의 차이도 보고되어 있지만 이들의 데이터를 제품의 품질과 직접적으로 연결하는 것은 어렵다. 한편 근년의 소비자의 기호, 요구의 변화중에서 차의 고급화, 다양화가 진전됨에 따라 품질에 관한 객관적인 데이터가 필요하게 되었다.

우리나라는 차에 품종화가 되어있지 않은 상황이므로 우선적으로 차 야생집단의 이용성, 유전자원의 우열성을 판단하지 않으면 안된다. 그 일환으로 한국 차 야생집단의 각종 화학 성분의 특징과 일본 유명 녹차품종 "Meiryoku(Yanase, 1986)" 와의 차이를 분명히 하여 육종상의 차종 적응성의 판정이나 선발의 지표에 이용하고자, 차의 주요 성분인 전유리아미노산, 카테킨, 비타민류, 유리당의 특징을 비교하였다.

## 제2절 연구방법

### 1. 식물재료

국내 자생차 공시집단은 다솔사, 송광사, 선암사, 백양사, 범왕리(지리산 기슭) 등의 5곳이며, 비교 재료로 공시된 일본의 녹차품종은 1986년 6월에 차농림 35호로 등록된 "Meiryoku"이다. "Meiryoku"의 성엽크기는 "Yabukita"와 비슷하고, 수세는 약간직립, 분지수는 약간 많은 중생종이며, 특히 탄저병 및 윤반병에 강한 다수성의 품종이다. 시료는 1996년 5월 초순 1번차기에 1심 2엽을 채취하여 micro과를 이용하여 살정한 후, 상법에 준하여 건조, 분쇄하였다.

### 2. 유리 아미노산 측정

분말 100mg을 100ml 메스플라스크에 넣고 70ml의 끓는물을 첨가한 후, 80°C 항온 수조내에서 30분간 방치, 냉각하고 표준시약 1ml을 첨가하여 100ml로 하였다. 시료는

No.2여지로 여과한 후, .45um membrane filter로 여과시켜 HPLC의 분석에 이용하였다. Develosil ODS-HG-(4.6x150mm) column을 이용하였으며, 형광검출기(Ex 340nm, Em 450nm)로 검출하였다.

### 3. Catechin의 측정

분말 250mg을 25ml의 메스플라스크에 넣고 80% methanol로 채워서 하루밤 방치하였다. 다음날 No.2로 여과하여 여액 3ml을 원심농축기로 농축한 후, 20% acetonitoyl 3ml을 첨가하여 각반하였다. 0.22um membrane filter로 자동주입용의 병에 여과 후 HPLC분석에 이용하였다. TSKgel ODS-80Ts(4.6x250mm) column을 이용하였고, 자외선검출기(UV 280nm)로 검출하였다.

### 4. 유리당의 측정

분말 500mg을 25ml 메스플라스크에 넣고 20ml의 끓는물을 첨가한 후, 100°C 항온 수조내에서 15분간 방치, 냉각하고 25ml로 하였다. 시료는 No.2여지로 여과한 후, 0.22um membrane filter로 여과시켜 HPLC의 분석에 이용하였다. YMC-Pack-PA3(4.6x250mm) column을 이용하였으며, 시차굴절계 RI  $16 \times 10^{-6}$  RIU/FS로 검출하였다.

### 5. 비타민류의 측정

분말 2.5g을 25ml 메스플라스크에 넣고 BHT 100mg/L를 포함하는 hexan으로 채워 5분간 각반하고 No.5여과지로 여과하였다. 여액 10ml을 Sep Pak Plus minicolumn에 통과시켜 5% isoprophylalchol/hexan 5ml을 흘려 최초의 1.5ml을 버리고 다음의 3.5ml을 정량용 시험관에 넣은 후, 5% isoprophylalchol/hexan 용액을 넣어 전체를 5ml로 하여 HPLC검액으로 하였다. Asahipak ODP-50(4.6x150mm) column을 이용하였으며, 자외검출기(UV 259nm)로 검출하였다.

### 제3절 연구결과 및 고찰

공시한 품종 및 자생집단의 각 아미노산 분석 결과를 표 5-1에 나타냈다. Asparaginic acid 함량은 0.096-0.220%의 범위로 선암사와 범왕리 집단이 Meiryoku보다 많았다. Glutamic acid 함량은 선암사 집단이 가장 많았으며, 그 다음이 범왕리 집단이었다. Asparagine 함량은 Meiryoku 보다 모든 집단이 많았으며, 특히 범왕리 집단은 약 3.5배 많았다. Serine 함량도 범왕리 집단이 가장 높았으며, 나머지 집단 및 품종간에는 근소한 차이를 보였다. Glutamine 함량은 범왕리 집단이 0.146%로 가장 높았고, meiryoku가 0.028%로 약 5.2배 낮았다. Arginine 함량은 0.013-0.266% 범위로 선암사 집단이 Meiryoku 보다 약 21배 높아 가장 많은 함량차를 보였다. Threonine 함량은 한국 야생 집단보다 Meiryoku가 월등히 높았고, 송광사 집단에 비하면 약 62배 높았다. 차의 감칠맛에 가장 영향하는 Theanin 함량은 선암사(1.220%)>범왕리(1.085%)>Meiryoku(0.943%)>백양사(0.335%)>송광사(0.314%)>다솔사(0.238%) 순이었으며, 전 아미노산 함량중 가장 많은 비율로 나타났다. 그밖에 Alanine, Methionine, Phenylalanine, Leucine 함량은 범왕리 집단, Tyrosine 함량은 다솔사 집단, Valine 함량은 선암사 집단, Lysine 함량은 백양사 집단이 가장 높게 나타났다.

각종 Flavanol류 함량의 결과를 표 5-2에 나타냈다. 차 엽조직에는 6종의 catechin과 caffeine이 함유되어 있으며, (+)-Gallocatechin 및 (+)-Catechin은 모든 시료에서 검출할 수 없었다. 또한, (-)-Epigallocatechin 3-O-(3'-O-methyl) gallate는 Meiryoku 및 다솔사 집단에서는 검출할 수 없었으며, (-)-Epicatechin 3-O-(3'-O-methyl) gallate는 Meiryoku에서만 검출되지 않았다. (-)-Epigallocatechin 함량은 meiryoku가 약 55mg/g으로 가장 높았으며, 다솔사 및 범왕리 집단은 meiryoku의 1/3 정도로 낮은 함량이 검출되었다. (-)-Epicatechin 함량은 범왕리 집단이 가장 낮았고 (약 7.7 mg/g), 백양사 집단이 가장 높았다. (-)-Epigallocatechin 3-O-gallate 함량은 51.8-100.1 mg/g 범위에서 검출되었으며, 6종의 catechin류중에서 가장 많이 검출

표 5-1. 일본차 “Meiryoku”와 한국 야생차의 유리 아미노산 함량 비교

Table 5-1. Free amino acid contents of Japanese “Meiryoku” and Korean wild tea plants.

Free amino acids (%)	Meiryoku	Dasolsa	Songgwangsa	Seonamsa	Baekyangsa	Beomwangri
Asp	0.138	0.123	0.096	0.175	0.113	0.220
Glu	0.206	0.230	0.157	0.326	0.158	0.293
Asn	0.013	0.028	0.014	0.023	0.023	0.046
Ser	0.035	0.037	0.028	0.038	0.039	0.076
Gla	0.028	0.050	0.039	0.102	0.034	0.146
Arg	0.013	0.123	0.154	0.266	0.120	0.164
Thr	0.613	0.014	9.95 <sup>-3</sup>	0.019	0.015	0.036
Thea	0.943	0.238	0.314	1.220	0.335	1.085
Ala	0.011	0.013	0.013	0.019	0.013	0.024
Tyr	1.36 <sup>-4</sup>	0.019	9.95 <sup>-3</sup>	0.018	0.012	6.63 <sup>-3</sup>
Met	1.09 <sup>-3</sup>	3.69 <sup>-3</sup>	3.33 <sup>-3</sup>	4.72 <sup>-3</sup>	5.92 <sup>-3</sup>	0.013
Val	4.69 <sup>-3</sup>	4.63 <sup>-3</sup>	3.94 <sup>-3</sup>	5.38 <sup>-3</sup>	3.58 <sup>-3</sup>	5.36 <sup>-3</sup>
Phe	3.63 <sup>-3</sup>	5.87 <sup>-3</sup>	6.65 <sup>-3</sup>	6.89 <sup>-3</sup>	6.08 <sup>-3</sup>	8.95 <sup>-3</sup>
Ile	5.30 <sup>-3</sup>	9.30 <sup>-3</sup>	9.23 <sup>-3</sup>	1.61 <sup>-3</sup>	9.46 <sup>-3</sup>	1.97 <sup>-3</sup>
Leu	2.75 <sup>-3</sup>	3.32 <sup>-3</sup>	2.44 <sup>-3</sup>	4.03 <sup>-3</sup>	3.26 <sup>-3</sup>	0.012
Lys	0.133	3.43 <sup>-3</sup>	3.14 <sup>-3</sup>	4.50 <sup>-3</sup>	0.028	0.137

되었다. 특히 모든 한국집단은 Meiryoku보다 낮게 검출되었다. Meiryoku 및 다솔사 집단에서 검출되지 않은 (-)-Epigallocatechin 3-O-(3'-O-methyl) gallate 함량은 범왕리 집단이 약 6.6 mg/g으로써 가장 낮았다. (-)-Epicatechin 3-O-gallate 함량은 20.7-37.8 mg/g 범위에서 검출되었고, 한국집단보다 Meiryoku가 낮게 검출되었다. 한국 집단중에서 (-)-Epicatechin 3-O-(3'-O-methyl) gallate의 함량은 다솔사 집단이 가장 낮았으며, 백양사 집단이 가장 높게 검출되었다. Caffeine 함량은 Meiryoku가 가장 높았고(약 25.6 mg/g) 송광사 집단이 가장 낮게 검출되었다. 1 품종 및 5 집단에 있어서 전 flavanol류의 평균 검출 함량은 (-)-Epigallocatechin 3-O-gallate(73.8 mg/g) > (-)-Epigallocatechin(29.0 mg/g) > (-)-Epicatechin 3-O-gallate(28.7 mg/g) > Caffeine(17.8 mg/g) > (-)-Epicatechin(10.9 mg/g) > (-)-Epigallocatechin 3-O-(3'-O-methyl) gallate(6.2 mg/g) > (-)-Epicatechin 3-O-(3'-O-methyl) gallate(2.7 mg/g) > (+)-Gallocatechin(0 mg/g) = (+)-Catechin(0 mg/g)순이었다. 전 flavanol류에 있어서 품종 및 집단간의 평균 검출 함량은 Meiryoku(23.58 mg/g) > 백양사(22.06 mg/g) > 범왕리(19.72 mg/g) > 선암사(16.90 mg/g) > 다솔사(15.34 mg/g) > 송광사(15.13 mg/g)순으로, 국내 자생집단은 적은 flavanol류의 함량이 요구되는 녹차용 품종용 유전자원으로써의 이용성이 높을 것으로 생각되었다.

4종의 유리당 함량을 조사한 결과(표 4), 이당류인 Sucrose 함량은 다솔사(3.860%), 송광사(3.889%) 및 선암사(3.963%) 집단이 높았고, 범왕리 집단(1.826%)이 가장 낮았으며, 다른 3종의 유리당보다 다량 검출되었다. 단당류인 Glucose 및 Fructose의 함량은 Meiryoku와 백양사 집단이 높았으며, 범왕리 집단이 가장 낮았다. 그러나 ArabinoInositol의 함량은 다솔사와 선암사 집단이 높은 경향을 나타냈다. 4종의 유리당에 있어서 품종 및 집단간의 평균 검출함량은 선암사(1.56%) > 다솔사(1.50%) > 송광사(1.45%) > Meiryoku(1.34%) > 백양사(1.29%) > 범왕리(0.81%)순으로 높았으며, 제조법 및 엽의 속도에 따라 함량변화가 심한 것으로 알려져 있어 심(芯) 및 엽위(葉位)별로 분석하지 않으면 안된다고 생각되었다.

표 5-2. 일본차 “Meiryoku”와 한국 야생차의 카테친과 카페인 함량 비교

Table 5-2. Catechin and caffeine contents of Japanese “Meiryoku” and Korean wild tea plants.

Flavanols (mg/g)	Meiryoku	Dasolsa	Songgwangsa	Seonamsa	Baekyangsa	Beomwangri
+GC	0	0	0	0	0	0
EGC	54.839683	19.139088	23.523898	27.494748	29.216028	19.661071
+C	0	0	0	0	0	0
Caffeine	25.559485	14.143482	11.953724	16.278933	19.856069	19.014156
EC	10.954644	10.432709	12.173250	10.057420	14.305603	7.6962173
EGCg	100.14164	61.305766	51.783094	60.982527	81.136122	87.724092
EGC	0	0	8.4510711	10.543829	11.413106	6.5839802
ECG	20.749177	31.835116	25.090046	23.895503	37.810394	32.661583
EC	0	1.1830380	3.1611017	2.8615207	4.7630105	4.1328473

+GC: (+)-Gallocatechin, EGC: (-)-Epigallocatechin, +C: (+)-Catechin, EC: (-)-Epicatechin, EGCg: (-)-Epigallocatechin 3-O-gallate, EGC(3'OMg): (-)-Epigallocatechin 3-O-(3'-O-methyl) gallate, ECG: (-)-Epicatechin 3-O-gallate, EC(3'OMg): (-)-Epicatechin 3-O-(3'-O-methyl) gallate

표 5-3. 일본차 “Meiryoku”와 한국 야생차의 유리당 함량 비교

Table 5-3. Free sugar contents of Japanese “Meiryoku” and Korean wild tea plants.

Free sugars(%)	Meiryoku	Dasolsa	Songgwangsa	Seonamsa	Baekyangsa	Beomwangri
Sucrose	2.792	3.860	3.889	3.963	2.894	1.826
Glucose	0.515	0.187	0.104	0.151	0.243	0.098
Fructose	0.742	0.516	0.437	0.683	0.788	0.332
ArabinoInositol	1.306	1.449	1.387	1.457	1.243	1.003

환원형 Vitamin C인 Ascobic acid 및 Tocoperol(Vitamin E)함량의 분석 결과를 표 5-4에 나타냈다. Ascobic acid 및 Tocoperol함량 공히 범왕리와 다솔사 집단이 높았으며, 백양사 집단이 가장 낮았다. 또한, 품종 및 전 집단에 있어서 Ascobic acid(평균 2.95 mg/g)는 Tocoperol(0.15 mg/g)함량보다 약 20배 높게 검출되었다.

표 5-4. 일본차 “Meiryoku”와 한국 야생차의 비타민 C 함량 비교

Table 5-4. Vitamin contents of Japanese “Meiryoku” and Korean wild tea plants.

Vitamins (mg/g)	Meiryoku	Dasolsa	Songgwangsa	Seonamsa	Baekyangsa	Beomwangri
Ascobic acid	2.6511594	3.2279108	2.6890182	3.0513143	2.4504439	3.6423586
Tocoperol	0.1356489	0.1547895	0.1322657	0.1534529	0.1222487	0.1761874

## 제 6 장 RAPD marker를 이용한 한국 야생차 및 일본 차품종의 동정

### 제1절 서 언

우리나라에는 녹차의 품종이 등록되어 있지 않으며, 육종사업을 위한 정보도 미진하다. 차나무는 강한 자가불화합성을 가지고 있으며 복대립유전자에 의하여 제어되고 있다는 것으로 알려져 있기 때문에 유전적 다양성이 심할 것으로 생각된다. 또한 자연계에는 헤테로상태로 존재하면서 타식에 의하여 번식을 할 것이다. 그러나 농가에서는 균일한 묘가 필수적이어야 하며 신속히 증식 시켜야만 하기 때문에 일반적으로 삽목에 의해 증식, 보급한다.

이러한 상황에서 우리나라 남부지방에 야생하는 차나무의 유전적 배경을 정확히 파악하여 실제 품종 동정 등의 육종사업에 이용하고자 유전적 marker를 탐색하고자 한다. 형태적 특징 등의 전통적 품종동정만으로는 불분명한 상태를 해명할 수가 없다.(Wrigley, 1987).

분자 marker에 의한 품종동정은 최근 20년간 행하여지고 있으며, 그 중 단배질, isozyme분석은 tomato, potato, rice, maize, celery 및 brassica 등에서 보고되었다(Tanksely, 1983). 이러한 기술의 주된 한계성은 개체간 또는 우연관계가 긴밀한 종간의 불충분한 marker수와 상이한 환경조건하에서 성장한 종간의 구분이 뚜렷하지 않은 점이다.

Restriction fragment length polymorphism(RFLP) 및 Random amplified polymorphic DNA(RAPD)는 보다 더 정확한 polymorphism을 검출할 수 있는 기술이긴하나, RFLP는 노동력과 비용이 많이 드는 단점이 있다. 상대적으로 Williams 등



(1990)에 의하여 고안된 RAPD 기술은 신속하고, 비용이 적게들뿐 아니라 적은량의 DNA로 실험이 가능한 장점이 있다.(Welsh, 1990). RAPD marker 에 의한 품종동정은 wheat(Devos, 1992), brassica(Demeke, 1992), celery(Yang, 1993), 등에서 보고되었다.

이 실험에서는 RAPD marker에 의하여 한국 야생차 및 일본 녹차품종의 특이적 지표를 탐색하고, 이들간의 유연관계를 파악하였다.

## 제2절 연구방법

### 1. 식물 재료

우리나라 야생차나무 23종과 일본 녹차품종 25종을 공시하였다(표 6-1, 2). 국내 야생차는 사찰주변에서 채취하였으며, 일본 품종은 일본 국립 야채, 차업시험장(시즈오카)으로부터 분양받았다.

### 2. 게놈 DNA 추출 및 정제

차나무의 성숙한 식물체로부터 어린 엽조직을 절단하여 주맥과 엽맥을 분리한 후 남은 조직을 작은 조각으로 자른 후 액체 질소로 냉각시켜 보관하여 둔다. 약 1g의 엽조직과 적은 양의 액체질소를 유발에 넣은 후 백색의 분말이 될 때까지 마쇄한다. DNA의 추출과정은 Dellapirta (1983)의 방법을 변형하여 사용하였다.

### 3. DNA 증폭

Williams(1990)등의 방법을 약간 변형하여 10-mer용 primer(Operon Technologies, U.S.A.) 및 12-mer용 primer(Takara, Japan) 20개를 PCR반응에 사용하였다. 반응 조건은 25ng의 template DNA, 2uM의 primer, 각 150uM의 dNTP, 2mM의 MgCl<sub>2</sub>, 10mM의 Tris-HCl(pH 8.0), 50mM의 KCl, 0.001%의 gelatin, 0.5U의 *Taq* DNA polymerase를 포함하는 25ul의 반응액에서 실시하였다. 증폭은 94℃, 2분; 94℃, 30초,

표 6-1. RAPD 분석에 이용된 국내 23 야생종과 25 일본 품종

Table 6-1. Origins of 23 Korean wild tea plants and 25 Japanese green tea cultivars used in this study

Sample No.	Location and cultivar	Collected address and source
1	Baegyangsa (K)	Jeollanam-do, Jangseong-gun, Bugha-myeon, Yagsu-ri
2	Cheoneunsa (K)	Jeollanam-do, Gure-gun, Gwangig-myeon, Banggwang-ri
3	Boseongchasi-I (K)	Jeollanam-do, Boseong-up Youngmun-ri
4	Songgwangsa (K)	Jeollanam-do, Seungju-gun, Songgwang-myeon, Sinpyeong-ri
5	Bulgabsa (K)	Jeollanam-do, Yeonggwang-gun, Bulgab-myeon, Moag-ri
6	Seonunsa (K)	Jeollabuk-do, Gochang-gun, Asan-myeon, Sangin-ri
7	Hwaeomsa (K)	Jeollanam-do, Gure-gun, Masang-myeon, Hwangjeon-ri
8	Geumsansa (K)	Jeollabuk-do, Gimge-gun, Geumsan-myeon, Geumsan-ri
9	Daeheungsa (K)	Jeollanam-do, Heanam-gun, Samsan-myeon, Gurim-ri
10	Borimsa (K)	Jeollabuk-do, Jangheunggun, Yuchi-myeon, Bongdeog-ri
11	Cheongsimmureung (K)	Jeollanam-do, Boseong-up Youngmun-ri
12	Boseongchasi-II (K)	Jeollanam-do, Boseong-up Youngmun-ri
13	Sanjangsikpum (K)	Jeollanam-do, Boseong-gun Hoicheon-myeon Hoiryeng-ri
14	Gwangyangdaab (K)	Jeollanam-do, Gwangyang-gun, Baab-myeon, Gosa-ri
15	Dongyangdaweon (K)	Jeollanam-do, Boseong-gun, Boseong-up, Bongsan-ri
16	Seonamsa (K)	Jeollanam-do, Suncheon-si, Ssangam-myeon, Jughak-ri
17	Daeweonsa (K)	Jeollanam-do, Boseong-gun, Mundeog-myeon, Jugsan-ri
18	Ssanggyesa (K)	Gyeongsangnam-do, Hadong-gun, Hwagae-myeon, Unsu-ri
19	Ggoddongsan (K)	Jeollanam-do, Boseong-gun, Hoecheon-myeon, Yeonggweon-ri
20	Mannyeonsa (K)	Jeollanam-do, Hwasun-gun, Hwasun-up, Donggu-ri
21	Jeungsimsa (K)	Jeollanam-do, Gwangju-si, Dong-gu, Ullim-dong
22	Hyangrimsa (K)	Jeollanam-do, Suncheon-si, Seoghyeon-dong
23	Geumgogsa (K)	Jeollanam-do, Gangjin-gun Gundong-myeon Geumgog-ri
24	Yabukita (J)	selected from seedlings of Shizuoka native species
25	Kanayamidori (J)	S6 x Yabukita
26	Okumusasi-I (J)	Sayamamidori x Yamatomidori
27	Yamakai (J)	selected from natural seedlings of Yabukita
28	Hukumidori (J)	Yabukita x 23F1-107(Sayamamidori)
29	Okuyutaka-II (J)	Yutakamitori x F1 NN8(Tamamitori x S6)
30	Karabeni (J)	selected from seedlings of China species(Gohokusyou)
31	Hatumomizi (J)	Ai2 x NKa05
32	Kuritawase (J)	selected from Shizuoka native species
33	Benihikari (J)	Benikaori x Cn1
34	Natumidori (J)	selected from seedlings of Shizuoka native species
35	Izumi (J)	selected from seedlings of Benihomare
36	Toyoka (J)	Sayamamitori x Yabukita
37	Benihomare (J)	selected from India seedlings
38	Yutakamidori (J)	selected from seedlings of Asatuyu
39	Indo(131) (J)	selected from seedlings of India hybrids
40	Benihuzi (J)	Benihomare x C19
41	Ooiwase (J)	Yaeho x Yabukita
42	Tamamidori (J)	selected from seedlings of Uji species
43	Kurasawa (J)	selected from natural seedlings of Yabukita
44	Yatomidori (J)	selected from seedlings of Nara native species
45	Asagiri (J)	selected from seedlings of Kyotohu native species
46	Sayamakaori (J)	selected from natural seedlings of Yabukita
47	Asatuyu (J)	selected from seedlings of Uji species
48	Yaeho (J)	selected from Yaeho-machi of Sizuoka native species

\*Ai: native species from Assam region in India, Nka:collected from Japanese species of Kakosima prefecture, C: introduced from china. S: strain. (K):Korean individual plants, (J): Japanese cultivar.

36℃, 30초, 72℃, 2분이상 2회; 94℃, 20초, 36℃, 15초, 45℃, 15초, 72℃, 1분 30초이상 20회; 94℃, 20초, 36℃, 15초, 45℃, 15초, 72℃, 2분이상 19회; 72℃, 10분 실시하였으며, 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동한 후 (4V/cm), ethidium bromide(0.5g/ml)로 염색 후, UV하에서 촬영하였다(Hoefler Co. U.S.A.).

#### 4. Data 분석

Primer 집단으로부터 무작위로 선발된 20종의 random primer(표 6-2)에서 증폭된 총 70개의 band를 유(+), 무(-)로 표기하여 binary data matrix에 입력하였다. cluster 분석은 UPGMA(unweighted pair group method for arithmetic averages)를 이용하였으며, 품종간의 계통도 및 pairwise difference를 계산하기 위하여 Swofford사의 PAUP(Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 2.4) program을 이용하였다.

### 제3절 연구결과 및 고찰

#### 1. 차에 있어서 최적의 증폭조건

최적의 template DNA, *Taq* DNA polymerase,  $Mg^{2+}$  농도와 annealing 온도를 결정하기 위해서 총 81조합을 denaturing 94℃, annealing 36℃ 또는 45℃, extension 7 2℃(이상 45회전)에서 수행하였다. 모든 실험은 3반복하였으며 가능한한 DNA농도에 영향을 받지 않도록 충실히 수행하였다. DNA양이 50ng/25ul일 때는 100nM의 primer에서 다른 band pattern을 나타내었다. 25ng일때는 다양한 패턴을 나타냈으며 100ng일때는 비특이적인 band 또는 smear 한 band pattern을 나타내었다. (A). *Taq* DNA polymerase의 농도가 증가함에 따라 band수가 증가하였으며, 결과적으로 비특이적인 band로 검출되었다. 이 실험에서는 0.25U와 0.5U/25ul에서 가장 간단하고 확실한 band pattern을 나타내었다.  $MgCl_2$ 의 경우 최종 농도가 1.5mM, 2.0mM과 2.5mM로

표 6-2. 차나무 DNA 증폭에 이용된 random primer

Table 6-2. Nucleotide sequences of random primers OPB kit(Operon), TAA and TAC kits(Takara) for amplification of genomic DNA in tea plants

Primer symbol	Nucleotide sequence	GC content (%)	No. of fragments amplified	Source
A	5'-GTTTCGCTCC-3'	60	11	OPB-01
B	5'-TGCGCCCTTC-3'	70	14	03
C	5'-TGCTCTGCCC-3'	70	10	06
D	5'-GGTGACGCAG-3'	70	9	07
E	5'-GTCCACACGG-3'	70	15	08
F	5'-CTGCTGGGAC-3'	70	11	10
G	5'-GTAGACCCGT-3'	60	8	11
H	5'-CCTTGACGCA-3'	60	7	12
I	5'-GGAGGGTGTT-3'	60	9	15
J	5'-GCCTGCCTCACG-3'	75	10	TAA2-02
K	5'-ACTGACCTAGTT-3'	42	16	03
L	5'-AGAATTGGACGA-3'	42	16	01
M	5'-CTCCTGCTGTTG-3'	58	11	04
N	5'-CTCAGCGATACG-3'	58	10	05
O	5'-ATCGCGGAATAT-3'	42	12	07
P	5'-GACCTGCGATCT-3'	58	9	10
Q	5'-AAGGCGGAACG-3'	67	15	11
R	5'-TTGCCGGGACCA-3'	67	5	12
S	5'-AGGGCTCTAGGC-3'	67	8	TAC4-62
T	5'-GAGGAGAAACGG-3'	58	8	TAC1-04
Total			212	

실험한 결과 단지 2.0mM에서만 특이적인 band pattern을 얻을 수 있었으며 1.5mM에서는 비특이적인 band pattern을 나타내었다(B). Annealing 온도가 36℃일 때는 다양한 band pattern을 나타내었으며, 45℃에서도 지속적으로 적당한 band pattern을 나타내었다. 가장 좋은 결과는 annealing 36℃, 15 cycles과 45℃, 25 cycles일 때 나타났

## 2. RAPD 다형성 및 특이적인 marker 동정

이 실험에 사용한 primer는 OPB kit(12 primer), TAA kit(12 primers), TAC1 kit(12 primers)와 TAC4 kit(12 primers)중 증폭이 잘된 20개를 선발하였으며 이 중에는 10mer가 9개, 12mer가 11개 포함되어 있었다. 20개의 primer로 부터 총 212개의 band를 검출하였으며(그림 6-1, 표 6-3), 각 primer당 band수는 다양하였으며 가장 적은 것은 primer R일 때 5개, 가장 많은 것은 primer K, L일 때 16개였으며, primer 1개당 평균 10.6개의 band가 검출되었다. 증폭된 단편의 크기는 약 250bp(primer D, I, K, M)에서 3000bp(primer J)이었다. 증폭된 단편의 크기와 GC함량을 비교한 결과, 이 실험에서는 차이를 볼 수 없었다.

20개의 primer를 이용하여 한국 야생 차나무와 일본 재배 품종의 특이적인 marker를 동정하였다. 이 중 시료 No. 5, 6, 10, 20, 28은 특이적인 marker가 검출되지 않았으나, 나머지 시료들은 특이적인 marker로써 구분이 가능하였다. 총 212개의 band중 유용한 maker는 18.9%(40fragments)이었다. 특히, 시료 No. 15(Dongyang daweon)와 No. 43(Kurosawa)은 11개의 특이적인 marker가 검출되었다. 특이적인 marker A-a는 한국 개체인 시료 No. 1, 4, 12와 일본 품종인 No. 34에서 검출되었다. 그러나 Q-a marker는 일본 품종인 시료 No. 31, 32, 40, 43과 한국 개체 No. 15에서만 검출되었다.

이런 결과로 볼 때 일본 재배 품종과 한국 개체간에는 유전적 연관이 큰 것으로 생각된다. primer L의 경우 12개의 특이적인 band를 검출할 수 있었으나, primer F의 경우는 특이적인 band가 검출되지 않았다(표 6-3).

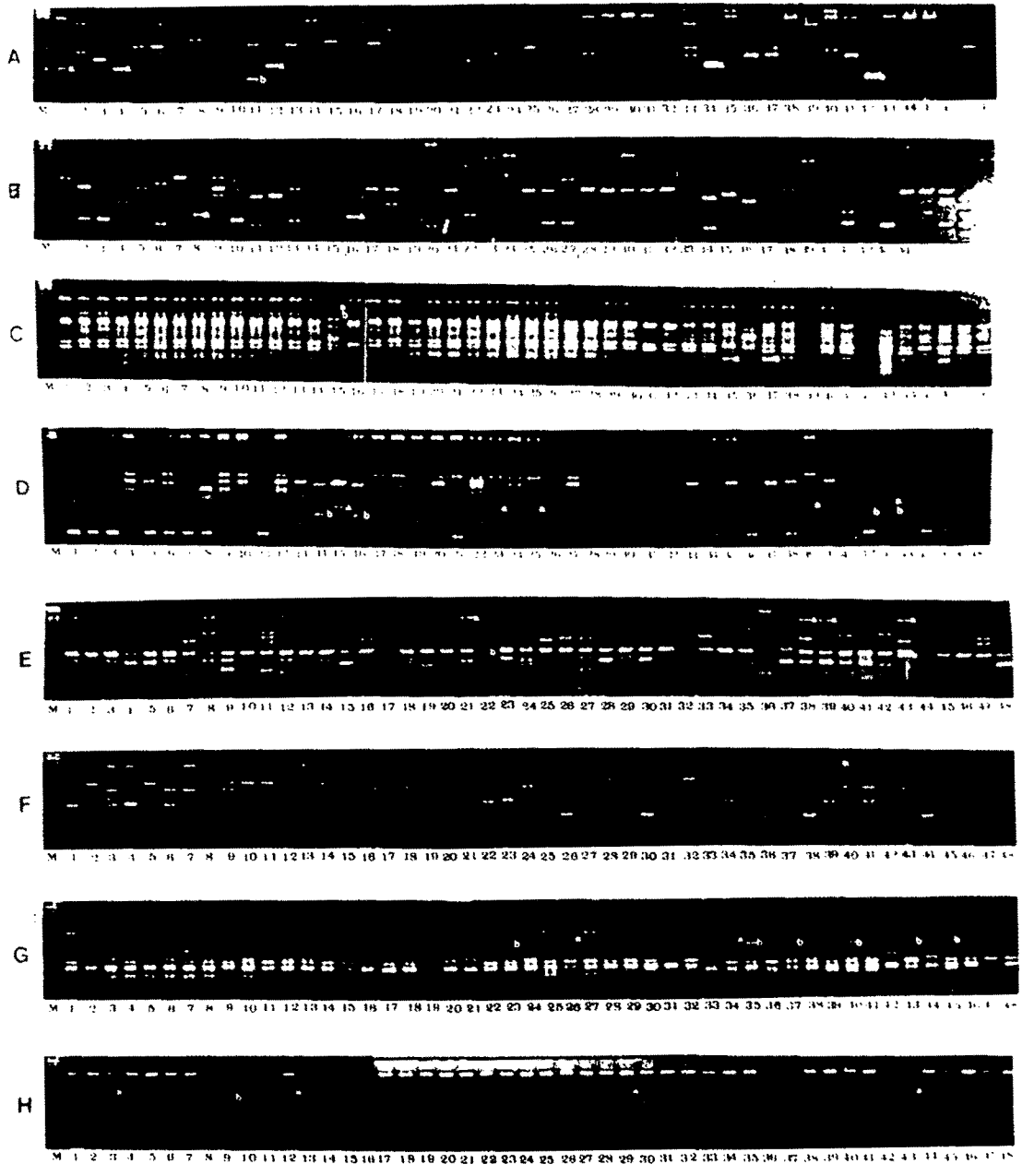


그림 6-1. RAPD 분석을 위한 차나무 DNA의 agarose 전기영동 band pattern(A-H primer)

Fig. 6-1. Agarose gel of RAPD-amplified *C. sinensis* DNA(A-H primer)

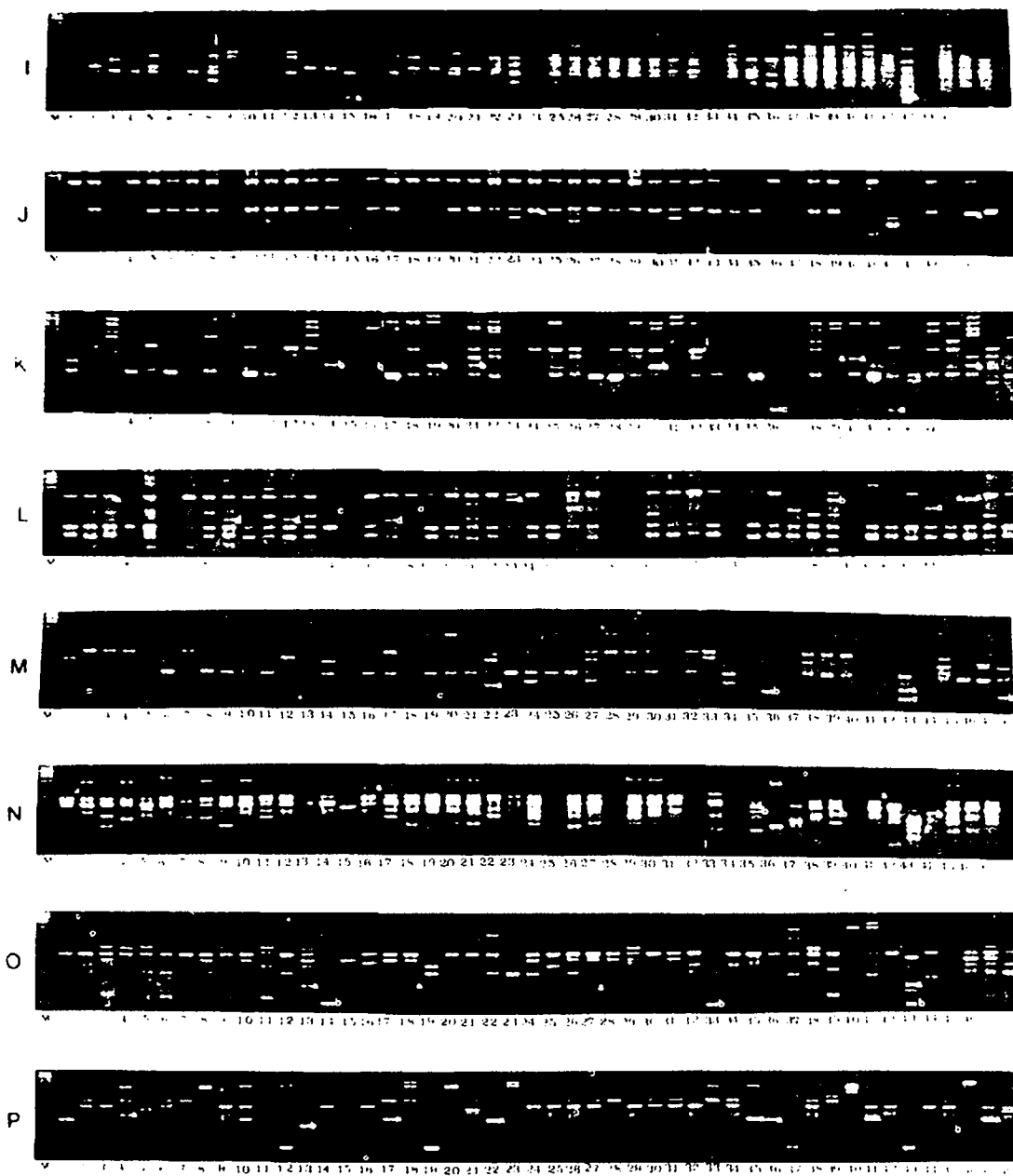


그림 6-1. RAPD 분석을 위한 차나무 DNA의 agarose 전기영동 band pattern(I-P primer).

Fig. 6-1. Agarose gel of RAPD-amplified *C. sinensis* DNA(L-P primer)

표 6-3. 한국 야생차와 일본 차 품종의 RAPD 특이적 marker

Table 6-3. Specific RAPD markers amplified with 20 primers from Korean wild teas and Japanese cultivars.

Sample No.	Individuals and Cultivar	Specific marker(Primer-band)
1	Baegyangsa	A-a, N-a
2	Cheoneunsa	n.d
3	Boseongchasi-I	H-a, L-a
4	Songgwangsa	P-a, A-a
5	Bulgabsa	n.d
6	Seonunsa	n.d
7	Hwaeomsa	Q-b, R-a, R-b
8	Geumsansa	B-a
9	Daeheungsa	H-b, L-d
10	Borimsa	n.d
11	Cheongsimmureung	A-b, S-a
12	Boseongchasi-II	A-a, H-a, L-d
13	Sanjangsikpum	O-a, P-b, Q-c
14	Gwangyangdaab	D-b, K-b, L-c, O-b
15	Dongyangdaweon	C-a,b D-a, I-a, Q-a,c R-a R-b, S-a, T-a,b
16	Seonamsa	B-a, D-b, K-b, N-a
17	Daeweonsa	L-d, P-a
18	Ssanggyesa	L-c, O-a
19	Ggoddongsan	K-b, M-c, S-a
20	Mannyeonsa	n.d
21	Jeungsimsa	E-a, K-b
22	Hyangrimsa	E-b, M-a, P-a
23	Geumgogsa	D-a, G-b, L-a
24	Yabukita	J-a,
25	Kanayamidori	D-a
26	Okumusasi I	G-a, L-c
27	Yamakai	O-a
28	Hukumidori	n.d
29	Okuyutaka	H-a, R-b
30	Karabeni	K-b, Q-c
31	Hatumomizi	Q-a, b
32	Kuritawase	Q-a, b
33	Benihikari	O-b
34	Natumidori	A-a, G-a
35	Izumi	C-c, G-b, N-b, P-a
36	Toyoka	K-c, M-b, P-a
37	Benihomare	C-c, G-b
38	Yutakamidori	E-a
39	Indo(131)	D-a, E-a, K-a, L-b, N-b
40	Benihuzi	G-b, K-a, Q-a, b
41	Ooiwase	N-a, P-a
42	Tamamidori	A-b, D-b, K-c
43	Kurasawa	D-a, D-b, E-a, b, G-b H-a I-a, M-a, b, O-a, b
44	Yamatomidori	L-c, N-b
45	Asagiri	G-b, L-a, P-b
46	Sayamakaori	J-a, K-b, L-a
47	Asatuyu	P-a
48	Yaeho	M-b

\*n.d: not detected.



### 3. 한국 야생 차나무와 일본 품종간의 유전적 관계

한국 야생 차나무와 일본 품종을 포함한 48개에서 검출된 band의 유무를 이용해서 모든 시료간의 유전적 거리를 산출하였다. 유전적 거리의 수치는 Euclidian 값을 이용해서 산출하였으며, 우선 23개 한국 야생 차나무를 비교하였고, 다음으로 일본 품종을 포함한 48개의 시료간에도 비교 분석하였다. 한국 야생 차나무간에는 sample No. 4(Songgwangsa)와 No. 9(Daeheungsa)에서 Euclidian값 14.0으로 가장 낮았으며, 반면 sample No. 1(Baegyangsa)과 No. 2(Cheoneunsa)에서 Euclidian값이 46.5로 가장 높았다. 그리고 48개의 시료를 모두 분석하였을 경우는 일본 품종인 sample No. 24(Baegyangsa)와 No. 48(Yaeho )에서 가장 낮았다(13.0).

한국 야생 차나무인 sample No. 1(Baegyangsa)와 No. 8(Geumsansa)에서 78.8로 가장 높았다. Euclidian값을 비교 분석한 결과 한국 야생 차나무보다 일본 품종의 유전적 배경이 더 좁은 것으로 나타났다. 한국 야생 차나무와 일본 품종의 유전적 거리를 기초로하여 Ward method를 통해 cluster분석한 결과(그림 6-1), 48개의 시료는 Euclidian값이 약 45이하에서 5군(1군, sample No 1, 32, 19, 26, 23, 4, 9, 15, 13, 5, 7, 22, 27; II군, sample No. 2, 11, 17, 12, 28, 24, 48, 29, 20, 18, 45, 3, 6, 38; III군, sample No. 8, 36, 10, 42; IV군, sample No. 39, 35, 41, 40, 33, 34; V군, sample No. 16, 30, 43, 44, 37, 21, 31, 25, 46, 47)으로 나눌 수 있었다. 한국 야생 차나무의 약 78%(18/23plants)는 I II군에 포함되어 있었으며, 일본 품종의 경우는 대부분 III, IV, V군에 포함되었다. 특히 홍차용 Assam계인 시료 No. 31(Hatumomizi), 37(Benihomare), 39(Indo 131)와 40(Benihuzi)는 IV, V군에 포함되어 있었는데, 이것이 일본으로 부터 도입된 것인지, 또는 일본 품종과 교잡을 한 것인지는 분명하지 않다.

### 4. F<sub>1</sub>의 RAPD marker분석

유전적 지표로써의 RAPD marker 효용성을 검토하기 위하여 3개의 유전자형을 12개의 random primer에 의하여 분석되었다(표 6-4, 그림 6-2). 부모형(Yaeho and

Yabukita)에서 44개의 단편이 검출되었다. 그 중 74.5%(31/44 fragments)는 F<sub>1</sub>(Ooiwase)에 유전되었다. 그리고 대부분의 단편들은 F<sub>1</sub>에 독립적으로 유전되었다. primer E와 M에 의하여 검출된 모친의 일부 단편들은 F<sub>1</sub>에서 검출되지 않았다. 반면 J 및 P primer를 이용하였을 때 부모에서 검출되지 않은 단편이 F<sub>1</sub>에서 검출되었다.

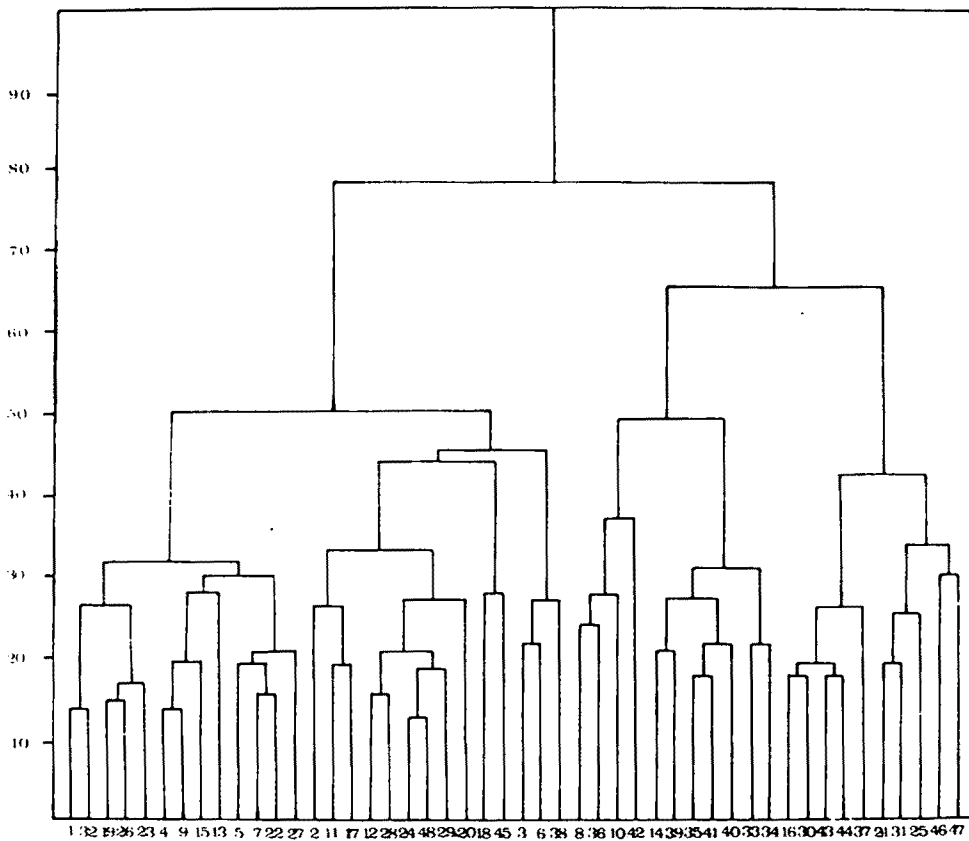


그림 6-2. RAPD 분석에 의한 23 한국 야생차 집단과 일본 차 품종간의 유연관계  
 Fig. 6-2 Dendrogram constructed from matrix of RAPD-based genetic distances between 23 Korean wild teas and 25 Japanese tea cultivars.

표 6-4. 12 random primer에 의한 양친과 분리와 F<sub>1</sub> 단편의 패턴

Table 6-4. The segregation of the parents and its F<sub>1</sub> fragment patterns for 12 random primers

Primer symbol	Sample No.		
	48(♀, Yaeho)	41(F <sub>1</sub> , Ooiwase)	24(♂, Yabukita)
C	+	+	+
	+	+	+
	+	+	+
	+	+	+
D	+	+	+
	-	+	+
	+	+	+
E	+	n.d	-
	+	n.d	+
	+	+	+
	+	n.d	+
	+	+	+
F	+	+	+
	+	+	+
I	+	+	+
	+	+	+
	+	+	+
L	-	-	+
	+	+	+
	+	+	+
J	+	+	+
	+	+	+
	+	-	+
	-	+(HS)	-
	+	+	+
K	-	-	+
	+	+	+
M	-	-	+
	+	+	+
	+	n.d	+
	+	+	+
	+	+	+
O	+	+	+
	+	+	-
P	+	-	+
	-	-	+
	+	+	+
	-	+(HS)	-
V	+	+	+
	-	+	+
	+	+	+
	+	+	+
	+	+	+

+: Intensely staining fragment, -: no visible fragment, HS; F<sub>1</sub> hybrid specific fragment, n.d: Maternal have a fragment but did not inherited in F<sub>1</sub>. Primer

V: 5'-AGGCTCTAGGC-3', the other primer symbol were agreed with Table 6-2.

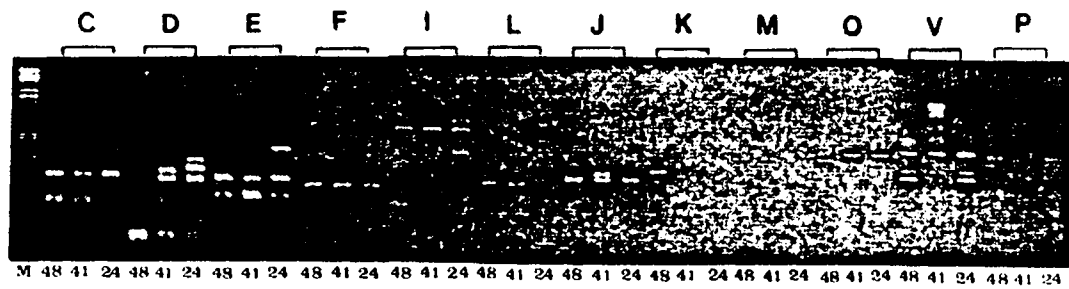


그림 6-3. 차나무 양친과 F<sub>1</sub> 잡종의 RAPD 패턴

Fig. 6-3. RAPD analysis of parents and its F<sub>1</sub> hybrids in *C. sinensis*.

# 여 백

## 제 7 장 차나무의 엽록체 DNA library 작성

### 제1절 서 언

국내 자생종 차의 품종화를 위한 일환으로써 보다 정밀한 분자적 동정의 정보가 필요하다고 생각되어 우선적으로 게놈 크기가 작은 엽록체 DNA의 분석에 착안하였다. 일본은 1992년도까지 약 44품종이 등록되어 다양한 차를 생산하고 있다. 이러한 품종 육성은 주로 교배육종 후 형질선발의 과정으로 개량된 것이며, 금후 고품질의 경쟁력 있는 품종을 육성 하려면 보다 적극적인 유전 공학적 기법의 도입이 필요하다.

엽록체 DNA는 그 유전 양식이 모성 유전을 하기 때문에 DNA 조환은 일어나지 않고 모친의 엽록체 DNA만이 자손에 전달된다. 즉, 엽록체 DNA는 지금까지의 육종방법에서는 손을 대지 않은 부분이라고 말할 수 있다. 또한 게놈 크기가 작기 때문에 DNA의 구조나 발현, 엽록체 DNA 상에 code되어 있는 단백질의 역할 등, 게놈이 어떻게 움직이고 있는가 등을 조사하는데 상당히 유리하다. 특히, 광합성에 관여하는 유전자를 엽록체 DNA 분자당 1개이기 때문에 더욱 유리한 대변 영역이라고 생각된다. 엽록체에 DNA를 도입한 보고는 Ti Plasmid을 사용한 방법(Block, 1985)과 세포 융합방법(Medgyesy, 1985) 및 Microprojectiles법(Boynton, 1988, Blowers, 1989,) 등이 있다.

고등식물의 세포중에는 10-200개의 엽록체가 존재하며, 엽록체 1개당 copy수는 십여 개에서 부터 수백개 정도까지 존재한다고 알려져 있다(石田, 1987). 또한, 엽록체의 수는 식물 종, 생육시기 및 광 등에 의해서도 크게 좌우되므로 엽록체 DNA를 대변하는 경우 copy수가 적은 시기에 DNA를 도입 할 필요가 있다.

본 연구에서는 국내 야생차 엽록체 게놈에 어떠한 유전자가 code 되어 있는가를 해석하고, 유용유전자를 cloning 하기 위한 일환으로써 엽록체 게놈 library를 작성하였다.

## 제2절 연구방법

### 1 실험 재료

본 연구에 이용된 식물 재료는 향림사(전남 순천시 소재)에 재식중인 국내 야생종 *C. sinensis*를 이용했다. 엽록체 DNA 추출에 이용한 잎은 제1번 차기의 제 2 및 제 3 엽을 이용하였다.

### 2 방법

#### 가. 엽록체 DNA의 추출

500ml용의 blender cup에 50g의 엽을 넣고, 액체질소를 넣어 3-4회 10,000rpm에서 거칠게 파쇄 시킨 후, 6초간 3회, 18,000rpm으로 분쇄 시켰다. 이것을 엽 50g당 250mL의 KA + BS buffer(50mL Tris-HCl pH 8.0, 0.1% BSA, 5mM 2-mercaptoethanol)로 추출하고, gauze 및 miracloth로 여과하여 10,000 x g로 10분 원심한 후, 상청을 버리고 침전물은 엽 50g당 2.5ml의 KA + S buffer(50mL Tris-HCl pH 8.0, 0.35M sucrose, 7mM EDTA pH 8.0, 5mM 2-mercaptoethanol)에 용해 시켰다. 이 용액을 5ml씩 sucrose gradient에 상층하고 2,200 x g, 30분간 원심하였다. 45-60%의 계면 부근에 생긴 엽록체의 band를 pipette로 취한 뒤 3 배량의 KB buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20mM EDTA pH 8.0)를 첨가하여 6,000 x g, 10분간 원심하였다. 다시금, 침전물을 엽 200g당 1mL의 멸균 KB buffer로 녹인 후 nurse flask에 옮겨, sodium N-lauroyl sarco-sinate을 이용하여 실온 15분, proteinase k로 37°C, O/N 보온하였다. 다음에 phenol/chloroform(1/1, v/v)로 2회씩 추출, EtOH 침전하여 70% EtOH로 3회 수세 후, 진공 건조하여 200mL의 TE buffer에 용해시켰다.

#### 나. 엽록체 DNA library의 작제

엽록체 DNA를 cloning 하기 위하여 Zabarovsky등(1986)의 방법에 따라 λFix

vector를 이용하여 cloning하였다.  $\lambda$ Fix DNA를 제한요소 *XhoI*으로 완전 분해하고, 절단한 부위의 돌출 부분을 Klenow효소로 제거하였다. 한편, insert DNA는 *Sau* 3AI으로 부분 절단하여 절단한 부위의 돌출 부분을 제거하였다. 이렇게 처리한 vector와 insert DNA를 연결 반응하면 vector와 insert DNA는 결합하지만 insert DNA를 크기별로 분획할 필요가 없고 이 단계의 DNA손실을 적게 할 수 있었다. 우선, cloning하고 싶은 엽록체 DNA를 *Sau*3AI로 부분절단 하였다. 이 때 9-22kb의 DNA 단편이 가장 많이 생성되는 조건을 조사하기 위하여 예비실험을 행하여 엽록체 DNA 18.3 $\mu$ g당 5units의 *Sau*3AI으로 37 $^{\circ}$ C, 5분간 열처리하여 효소를 실패시키고, phenol처리 후 EtOH침전시켜 진공건조 후 20 $\mu$ l의 TE buffer로 용해하였다. 이것을 부분적인 환원반응을 시키기 위하여 eppendorf tube속에서 반응시킨 후 50 $\mu$ l의 1 $\times$ SET buffer(100mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM EDTA)을 첨가, 다시금 22.5 $\mu$ l의 10 $\times$ SET buffer를 첨가시켰다. phenol/chloroform처리로 2회 추출, ETDH침전시켜 진공건조후 20 $\mu$ l의 TE buffer로 용해시켰다. 이와 같이 조제된 Insert DNA를 Takara사( Japan )의 ligation Kit를 이용하여  $\lambda$ Fix vector와 ligation 시켰다. 다음에 Stratagene사 (America)의 Gigapack Gold kit를 이용하여 packaging반응을 하여 엽록체 DNA library로 하고, 최종적으로 이 phage액을 500 $\mu$ l의 SM buffer(0.1M NaCl, 8mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 0.01% gelatin)과 20 $\mu$ l의 chlorform을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

#### 다. 엽록체 DNA의 plasmid vector에 cloning

Phage vector를 이용한 cloning에서 cover할 수 없었던 엽록체 DNA 단편을 cloning하기 위하여 plasmid vector를 이용해서 엽록체 DNA를 cloning하였다. plasmid vector에는 가급적 큰 DNA단편이 cloning되도록 pBR 322를 사용했다. 우선 엽록체 DNA를 *Bam*HI으로 완전히 절단하고, 이것을 phenol추출하고 EtOH 침전했다. vector 및 Insert DNA를 혼합 후, Takara사의 DNA ligation kit를 이용해서 ligation반응을 하였다. 반응 후, *E. coil*(HB 101)에 형질전환하고 조환체 plasmid를 선별하였다. 이 조환체 plasmid



중 목적의 DNA 단편을 갖는 plasmid를 선별하기 위하여 Southern hybridization을 하였다.

#### 라. probe작제 및 Southern blot분석

벼 및 시금치 엽록체 DNA의 clone으로 부터의 probe는 Boehringer Mannheim사 (Germany)의 Non-radioactive DNA labeling and detection kit를 이용해서 이하와 같이 작제하였다. probe로 하고 싶은 DNA 단편을 포함하는 plasmid를 적당한 제한효소로 절단한 후 저융점 agarose gel전기영동을 하여 목적의 DNA 단편을 절출하였다.

agarose조각을 열로 용해시켜 phenol처리한 후 DNA를 추출하고 250ng씩 정량하였다. 이 DNA를 100°C에서 5분간 열변성시켜서 얼음물속에서 냉각 시킨 후 Digoxigenin이 표식된 dUTP를 포함하는 dNTP labeling mixture와 Hexanucleotide mixture를 첨가하여 이것에 klenow enzyme(2 units)를 넣어 37°C, 2시간 이상 보온했다. 반응 후 EtOH 침전시켜 70% EtOH로 수세후 진공 건조하여 50 $\mu$ l의 TE buffer에 용해했다. 이 probe를 사용할 때는 사용 직전에 다시 한번 열처리한 후 급냉하여 사용하였다.

cloning된 Insert DNA를 제한효소로 절단한 후 0.8% agarose gel 전기영동후, gel의 사진을 촬영하였다. 그리고 이 gel과 2xSSC에 침적해둔 nylon membrane을 pharmacia LKB의 Vacugene에 set하고 진공시켜 gel을 고정하였다. depurine액(0.25N HCl), 중화액(0.5M Tris-HCl pH 7.0, 3M NaCl)로 10분간씩 처리후, 20xSSC로 60분간 처리하였다. membrane을 잘 풍건시킨 후 UV( $\lambda = 302\text{nm}$ )를 5분간 조사하여 DNA를 membrane에 결합시켰다. membrane을 20mL hybridization용액(5xSSC, 0.5%(w/v) blocking reagent, 0.1%(w/v)sodium N-lauroly sarcosinate, 0.02%(w/v) SDS)를 넣은 hybri-bag에 밀봉하고 65°C에서 2시간이상 prehybridization을 하였다. 용액을 버리고 열처리한 probe 5 $\mu$ l를 포함하는 hybridization용액 2.5ml을 넣어서 65°C에 O/N보온하였다. 50ml의 수세액 A(2xSSC, 0.1%(w/v)SDS)로 5분 2회, 50ml의 수세액 B(0.1xSSC, 0.1% SDS)로 65°C, 15분, 2회, buffer 1(100mM Tris-HCL pH7.5, 150mM NaCl)로 실온

1분간 수세한 후 100ml의 butter 2(0.5% blocking reagent in buffer 1)로 30분간 실온에서 진탕하였다. 다시금 buffer 1로 1분간 수세하고 20ml의 buffer 1 과 4 $\mu$ l의 항체결합 시약을 넣어 30분간 실온에서 진탕한 후, 100ml의 buffer 1로 15분간 2회 수세하였다. 그리고 20ml의 buffer 3(100mM Tris-HCl pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM Mgcl<sub>2</sub>)로 2분간 진탕한후 10ml의 발생용액(NBT 및 X-phosphate solution in buffer 3) 을 넣은 비닐봉지에 membrane을 밀봉하고 암실에서 O/N 방치하였다. 발색된 membrane은 수세후 풍건시켜 보존하였다. 또한 형광 발색의 기질인 LumigenPPD를 이용하여 X-ray film상에 검출하였다.

### 제3절 연구결과 및 고찰

#### 1 엽록체 DNA의 제한효소 절단 pattern 해석

추출된 엽록체 DNA를 *Bam*HI(B), *Eco*RV(E), *Hind*III(H), *Xho*I(X), B + E, B + H, B + X, E + H, E + X, H + X등의 제한효소로 절단한 후 agarose gel 전기영동을 하였다. 그림 7-1에 엽록체 DNA의 제한효소 pattern, 표 7-1에 단편의 크기를 나타냈다. *C. sinensis* 엽록체 DNA 크기는 약 133.96 Kbp 이었다. 그러나 agarose 전기영동으로는 해석 불가능한 작은 DNA단편이 있을 것이므로 이 크기 보다는 약간 클 것으로 생각된다. 또한 DNA량이 다소 적었던 *Bam*HI, *Hind*III, *Xho*I 에서는 다소 검출되지 않은 단편이 있을 것이다. 단일 제한효소 절단에서는 *Bam*HI이 28개의 단편으로 가장 그 수가 많았으며 가장 큰 단편은 20Kb 전후였다. 엽록체 DNA의 구조는 조류, 수태 및 유관속 식물에 있어서 상당히 보존되어 있다(Palmer, 1987). 엽록체 DNA의 보존성은 liverwort, tobacco 및 rice 등의 전 계놈의 DNA염기배열에 의하여 확인되었다(Ohyama, 1986). 따라서 염기 배열 내에서의 적극적인 변화 즉, 반복 배열의 역위, 결실, 삽입, 전이 등은 식물분화의 과정 중에서 크게 일어나지 않는다(Palmer, 1988).

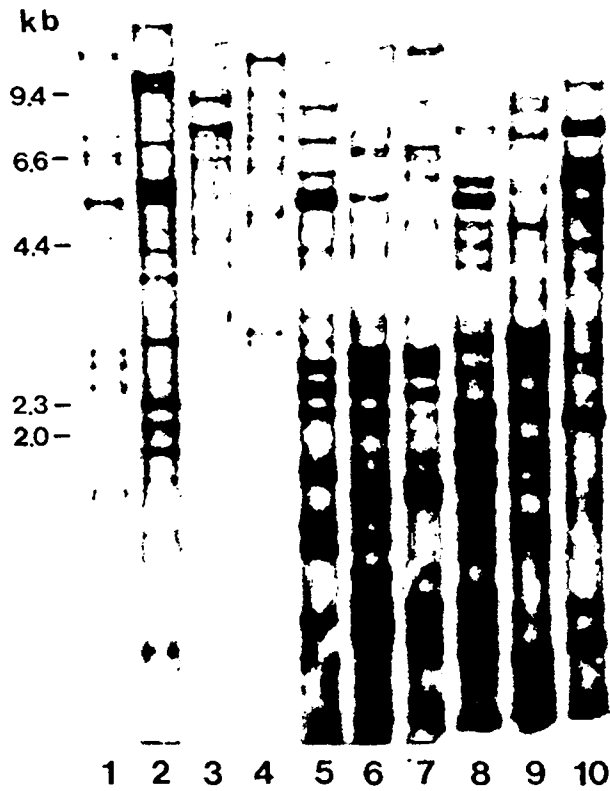


그림 7-1. 제한 효소로 처리한 차나무 엽록체 DNA의 단편

Fig. 7-1. Restriction fragment patterns of the *Camellia sinensis* chloroplast DNA. Electrophoresis was performed in 0.8% agarose gels. 1: *Bam*HI, 2: *Eco*RV, 3: *Hind*III, 4: *Xho*I, 5: B+E, 6: B+H, 7: B+X, 8: E+H, 9: E+X, 10: H+X. The numbers on the left indicate the sizes(Kbp) of marker fragment.

표 7-1. 제한효소로 절단된 차나무 엽록체 DNA의 단편 크기와 수

Table 7-1. Restriction fragment size and number of chloroplast DNA in *Camellia sinensis*.

No	BamH1	EcoRV	HindIII	Xho I	BamH I +	BamH I +	EcoRV +	EcoRV +	HindIII +
					EcoRV	Xho I	HindIII	Xho I	Xho I
1	19.0	20.0	16.8	20.5	10.5(2)	14.2(2)	10.5	20.2	10.5(2)
2	16.8	14.2(2)	14.2	18.0	8.5(2)	7.5	8.0(2)	14.2	8.4
3	10.5	12.0	12.0	14.2(2)	7.1	7.1(2)	6.4(2)	9.5(2)	8.0(2)
4	8.9	9.5	10.1	11.2	6.4	6.4	5.9(2)	8.0(2)	7.1
5	6.6(2)	7.5	9.5(2)	9.5	6.2(2)	5.3	5.7	6.2	6.4
6	5.9	7.1	8.9	8.4	5.9	5.0	5.3	5.3(2)	6.2(2)
7	5.5	5.9	8.0	7.1(2)	5.1	4.1(2)	5.1	4.8	5.7
8	5.1	5.3	5.5	5.9	4.8	4.3	4.6(2)	4.4(2)	5.3
9	4.4	5.0	5.0	4.3	4.4	4.0	4.3(2)	4.0	4.8
10	4.1	4.8(2)	4.6	4.0	4.0(2)	3.4(2)	3.7(2)	3.5(2)	4.4(2)
11	3.7(2)	3.8	3.8(2)	3.7(2)	3.6	3.2(2)	3.4	3.3	4.0
12	3.4(2)	2.9(2)	3.4	3.3	3.2(2)	2.9(2)	3.2	3.1	3.8
13	3.2	2.8(2)	2.9	1.3	3.0(2)	2.7	2.7(2)	2.7(2)	3.7
14	2.8	2.4(2)	2.7		2.7(2)	2.5	2.5	2.3(2)	3.2(2)
15	2.5	1.9	2.1		2.3(2)	2.3	2.3(2)	1.8	2.7
16	2.4	1.3	1.9		1.9(2)	2.2(2)	2.2(2)	1.3(2)	2.6(2)
17	2.3	1.1	1.7(2)		1.8(2)	2.1(2)	1.8	1.2	2.5
18	2.2		1.6		1.5(2)	1.7	1.7	1.1(2)	1.9
19	2.0		1.5		1.3(2)	1.6(2)	1.6(2)		1.6(2)
20	1.9		1.4(2)		1.1	1.3	1.5		1.4
21	1.7		1.3		1.0	1.3	1.3(2)		
22	1.6(2)				0.8	1.2(2)	1.2		
23	1.5(2)				0.7	0.9	0.8(2)		
24					0.6	0.8(2)	0.7		
25						0.7(2)	0.6		
26						0.6			
Total	134.7	134.6	135.3	136.4	135.4	132.9	131.0	134.8	130.7
Mean value	133.94								

모든 피자식물의 엽록체 DNA는 원형이며 120-217Kb 사이의 크기를 갖고 있다. 이 DNA 구조의 특성은 크고 작은 단일 copy 영역에 의해 구분된 반복배열(IR)의 존재이다(Kolodner, 1979, Koller, 1980, Chu, 1982). 피자식물에 있어서 IR의 크기는 부분에 있어서 약 25Kb이며 이보다 아주 크거나 작은 종은 극히 드물다. 또한, 쌍자엽 식물과 단자엽 식물의 엽록체 DNA 크기는 20Kb 정도의 차이가 있는 것으로 알려져 있으나 그렇지 않은 종도 있어 더욱 많은 연구의 성과가 기대 된다.

## 2. 엽록체 DNA의 cloning과 그 구조 해석

엽록체 DNA를 보다 상세하게 해석하기 위하여  $\lambda$  phage vector 및 plasmid vector를 이용해서 cloning 할 필요가 있다고 생각 했다. 신엽으로 부터 엽록체 DNA library를 추출하여 Sau3AI으로 부분 절단하고 엽록체 DNA library를 얻었다. 또한 시금치 및 벼의 엽록체 DNA의 clone bank로 부터 적당한 clone을 선발하여 이것을 probe로 이용하여 plaque hybridization을 행함으로써 positive한 clone을 다수 선발하였다. 각 clone의 DNA를 추출하여 제한효소로 절단한 후, agarose gel전기영동, Southern hybridization에 의해 이들 clone군은 차나무 제한효소 지도 작성에 이용될 수 있을 것이다.

다음은 엽록체 DNA를 plasmid cloning 하기 위하여 우선 엽록체 DNA를 BamHI으로 완전 분해한 pBR322에 cloning하여 차 엽록체 DNA의 plasmid library를 적제하고, 다수의 colony를 얻었다. 각 colony로 부터 plasmid DNA를 추출한 후 Insert DNA를 BamHI으로 절단한 후 0.8% agarose gel상에 분획 하였다. Insert DNA단편의 크기는 100-4,000bp정도 사이에 다수 존재 하였으며 기대의 큰 단편(약 10Kb)은 좀처럼 얻기가 어려웠다(그림 7-2). 다음은 이들 단편중 가급적 큰 단편을 대상으로 엽록체 DNA 전 clone을 DIG labeling후 probe로 이용하여 Southern blot분석을 행하였다. 그림 3a에서의 A 및 B의 위치의 단편이 그림 3b의 동일 위치에 반응하지 않았다. 그 이유로는 1) cpDNA가 아니고 nDNA 혹은 mtDNA 단편일 가능성, 2) cpDNA 이긴하

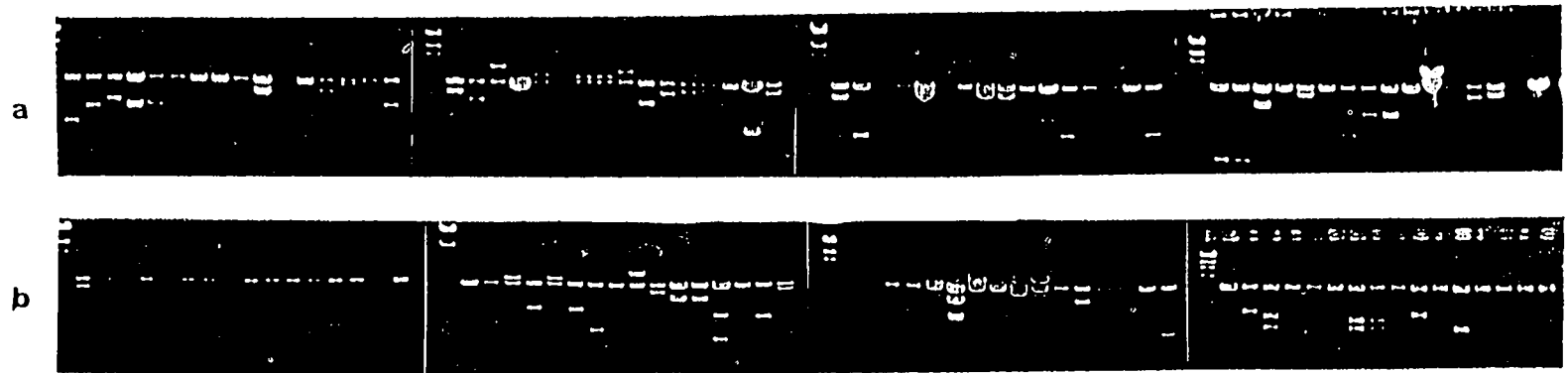


그림 7-2. 제한효소 *Bam*HI으로 절단한 차나무 엽록체 DNA의 clone  
Fig. 7-2. Clone bank of *C. sinensis* cpDNA. *Bam*HI clones(1-108) and the cpDNA(lane furthest right) were digested with *Bam*HI and separated on a 0.8% agarose gel.

나 시금치 엽록체 DNA상에 존재하지 않는 단편일 가능성 등을 열거 할 수 있다. 이러한 절차를 통하여 최종적으로 74단편을 선별하여 크기 순으로 나열한 것이 그림 7-3이다. 약 10Kb이상의 단편이 3개뿐이며 대부분 작은 단편이 삽입 되었고, double copy가 포함 된 것도 있었다(36, 53, 59, 62 Lane). 이들 단편이 차 엽록체 DNA의 전 clone을 cover하는 가를 차후 검토할 필요가 있다. 그림 7-4에서 이용한 probe는 단자 엽식물인 벼 유래의 P7 clone으로 차나무가 쌍자엽식물임에도 불구하고 상동성을 보이고 있는 DNA 단편이 다수 나타났다.

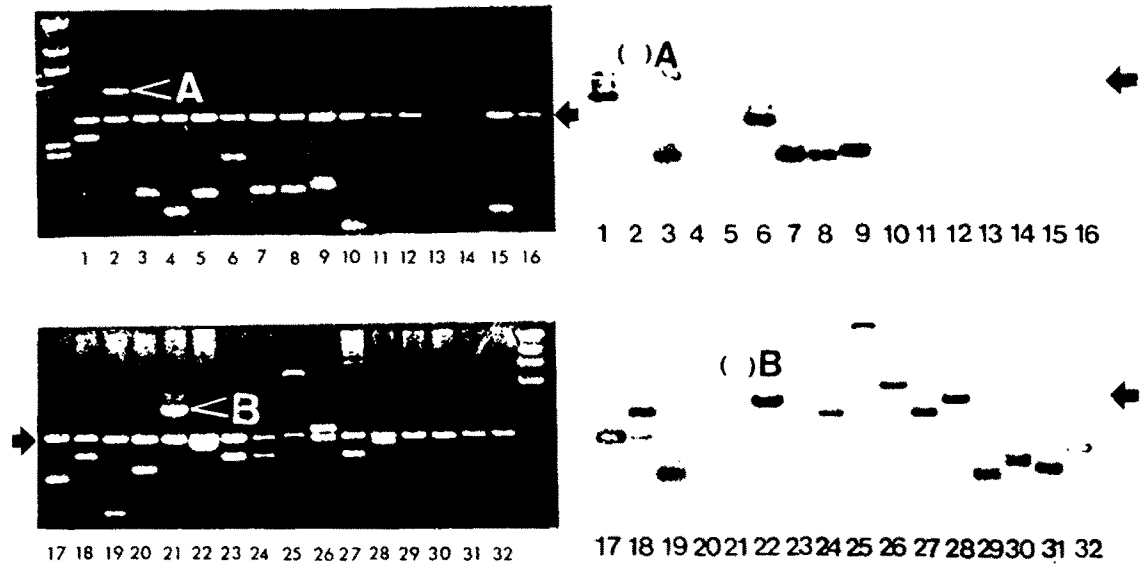


그림 7-3. 차나무 엽록체 DNA와 시금치 probe와의 상동성

Fig. 7-3. Southern hybridization patterns of *C. sinensis* cpDNA. Probe: spinach total clone.

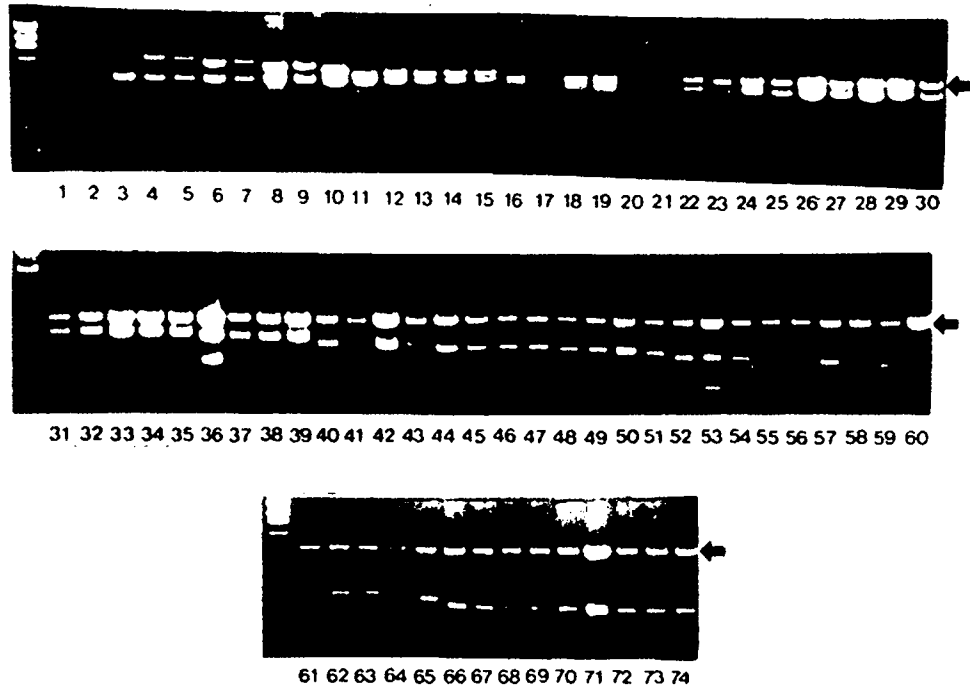


그림 7-4. 크기별로 배열한 차나무 엽록체 DNA의 plasmid clone

Fig. 7-4. Plasmid Clones of *C. sinensis* cpDNA. The clones(1-74) digested with BamH<sub>I</sub> are lined according to their size. Arrow indicates the vector(pBR322).



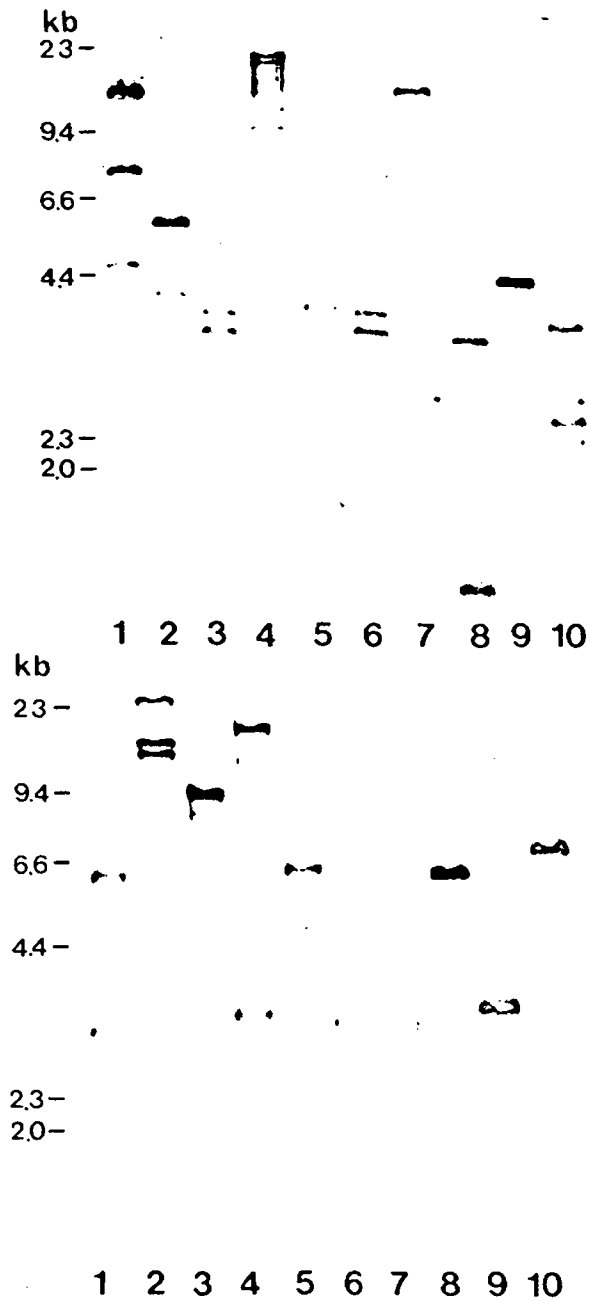


그림 7-5. 차나무 엽록체 DNA의 벼 probe와의 상동성

Fig. 7-5. Southern hybridization patterns of *C. sinensis* cpDNA  
 Probe: B8(upper), P7(lower) clone from rice.

## 제 8 장 차나무의 광합성 반응계관련 유전자 *psb A*의 cloning 및 구조해석

### 제1절 서 언

엽록체 DNA의 제한효소 지도 및 전 염기배열이 결정된 예는 *Marchantia polymorpha*(Ohyama, 1986) 와 *Nicotiana tabacum*(Fluhr, 1981)등이 있다. *M. polymorpha*의 엽록체 DNA는 121,024bp 이며, 23S, 16S, 5S, 4.5S rRNA와 32종의 tRNA를 포함하는 128개의 유전자가 동정되었다. 한편 *N. tabacum* 의 엽록체 DNA는 155,844 bp이며 상기 4종의 rRNA와 30종의 tRNA를 포함하는 145개의 유전자가 동정되었다(Shinozaki, 1986).

이 엽록체 DNA상에 code되어 있는 유전자는 rRNA, tRNA이외에 광합성계 I , II 복합체의 subunit, ATPase의 subunit, 엽록체 RNA polymerase의 subunit, 엽록체 ribosome 단백질의 일부 등이 동정되었다. 또한 엽록체 DNA의 유전자발현에 있어서 1개의 단백질을 code 하고 있는 유전자가 2개에 분단되어 존재하여 그것들이 제각기 발현한 후 결합하여 1개의 mRNA가 된다고 하는 Trans-splicing이라고 하는 현상이 있는 것도 알려져 있다(Hirai, 1985, Katayama, 1991).

이와같이 엽록체 DNA는 식물종간에 진화정도의 폭이 크며, 특히 차나무에 있어서 국내재래종, 외국도입종간에는 많은 변이가 초래된 것이 예상되므로 시금치, 담배, 벼 등의 clone을 표식인자로 하여 품종간의 분자적 특성을 규명한 후, 육종 program에 이용할 필요가 있다고 생각된다. 이러한 엽록체 DNA상에 code되어 있는 유전자는 평균 130여개 존재하지만 그중 광합성계 I,II 복합체의 subunit는 물질생산에 있어 매우 중요한 요인으로써 *psb A-D* 에 의하여 encode 된다. *psb A* 는 광합성계 II의 반응중심을 구성하는 단백질의 하나인 32 kDa 단백질을 code화하는 유전자로, 이 반

응중심에서 여기된 전자를 프라스토키논에 전달하는 Qb 단백질로 생각되어진다. 또한 이 유전자중에서도 상당히 발현량이 많은 유전자로서 알려져 있다.

더욱 중요한 사항은 32 kDa의 산물은 제조제인 아트라진(atragine)이 표적으로 하는 단백질로 아트라진이 이 단백질에 결합함으로써 광합성이 저하된다. 돌연변이에 의하여 아트라진에 내성이 된 식물의 *psb A* 유전자를 해석한 결과, 264번째의 아미노산 1개만이 치환되었다고 하는 보고가 *Amaranthus hybrids*, *Solanum nigra* 등을 비롯하여 다수의 식물종에서 보고 되고있다(Hirschberg, 1983). *psb A* 유전자는 식물종간에 상동성이 높은 유전자인 것을 예상하면 차나무에서도 264번째의 아미노산 1개를 치환함으로써 아트라진 내성품종을 개량할 수 있을 것이 기대된다. 그리하여 *psb A* 특이적 primer를 합성하여 PCR산물을 cloning하였고, 염기배열을 결정하여 분자구조를 해석하였다.

## 제2절 연구방법

### 1. DNA 추출 및 정제

엽조직 신선중 1g을 액체질소로 동결하여 유발과 유봉으로 마쇄한 후 15ml의 추출 buffer(100 mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM EDTA pH 8.0, 500mM NaCl, 10mM 2-mercaptoethanol)를 넣어 완전히 용해 시켰다. 용해물을 원심관에 옮겨 1ml의 10%(w/v) SDS를 첨가하여 잘 섞은 후 5ml의 5M Potassium acetate를 넣어 혼합하여 얼음물에 20분간 방치하였다. 이것을 14,000rpm으로 20분간 원심하고 상청액을 Miracloth로 여과하여 새로운 원심관에 옮긴 후 동량의 Phenol을 넣어 5분정도 섞어 준 다음 3,000rpm으로 10분간 원심하여 얻은 상청액에 Phenol : Chloroform : Isoamylalchoal(25 : 24 : 1)추출 1회, Chloroform : Isoamylalchoal(24 : 1)추출 2회 실시하여 새로이 얻어진 상청액에 10ml의 Isoprophyl alchoal을 첨가해 -20℃에서 30분간 방치 후 14,000rpm으로 15분간 원심하고 침전물을 가볍게 건조시켰다. 침전물을

1ml의 1xTE buffer(50mM Tris-HCL pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0)에 잘 녹인 후 Eppendorf tube로 옮겨 75 $\mu$ l의 3M Sodium acetate와 500 $\mu$ l의 Isopropyl alcohol로 침전 후, 5분간 원심하여 침전물을 70% ethanol로 씻은 후 건조시켜 300 $\mu$ l의 1xTE buffer(10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0)로 녹인 다음 RNase(1mg/ml, DNase-free) 2 $\mu$ l를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시켜 30ml의 3M NaOAc와 600 $\mu$ l의 100% Ethanol을 넣어 -20 $^{\circ}$ C에서 1시간이상 방치한 후 14,000rpm으로 10분간 원심, DNA침전물을 80% ethanol로 씻어 건조, 500 $\mu$ l 의 1xTE에 녹여 사용하였다.

## 2. 염색체 DNA추출

염색체 DNA는 Saltz와 Beckman(1981)의 방법에 따라 다음과 같이 추출하였다. 50g의 잎과 액체질소를 유발에 넣고 잘게 마쇄한 후 0.1% Bovine serum albumin을 포함한 250ml의 Kool's buffer A (50mM Tris-HCl, pH 8.0 : 0.35M sucrose : 7mM EDTA : 5mM 2- mercaptoethanol)을 넣어 섞었다. 이것을 4겹의 거즈와 2겹의 Miracloth로 여과한 후 10,000rpm에서 10분간 원심하여 상층액을 취하고 침전물에 2.5ml의 Kool's buffer A를 가하여 다시 원심 후 상층액을 전의 상층액과 섞었다. 위의 상층액을 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.3M Sorbitol, 7mM EDTA에 20-45-60% Sucrose로 각각 중층하고 상층액을 load 하여 18,000rpm으로 30분간 원심하였다. 20%와 45%사이의 녹색부분을 취하여 새로운 원심관에 넣고 1 : 3의 비율로 Kool's buffer B를 2ml 넣어 섞은후 3% Sodium dodecylsarcosinate를 첨가하고 1/20 volume의 10mg/ml Proteinase E를 넣어 섞은 후 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 이상 방치시킨 후, Phenol 추출 1회, Phenol : Chloroform(1:1)추출 2회 처리하여 얻은 DNA는 0.1배의 3M Sodium acetate와 2.5배의 Ethanol로 침전시켰다. 침전물을 70% Ethanol로 두 번 닦아주고 500 $\mu$ l의 멸균수로 녹여 사용하였다.

## 3. Primer 합성 및 PCR

① *E. coli*(JM109)의 competent cell 조제

CaCl<sub>2</sub> 처리에 의해 1x10<sup>7</sup>colonies/ug pUC118의 형질전환이 가능한 Comp. cell을 조제하였다.

② PCR에 의한 *psb A* 단편의 증폭

*psb A* 유전자의 염기배열을 결정하기 위하여 2개의 oligonucleotide primer을 합성하였다. Primer디자인은 1990년 Lowe등에 의해 보고된 Computer program을 사용하였다. PCR증폭에 사용할 Forward primer 및 Reverse primer는 기존 담배, 벼, 시금치, 우산이끼, 옥수수, 콩 등에서 보고되어진 개시 codon과 정지codon이 포함된 conserve region을 대상으로 7개 아미노산에 code되어 있는 염기를 합성하였다. PCR증폭을 위한 주형 DNA는 차나무의 성숙한 잎으로부터의 엽록체 DNA, Total genomic DNA를 각각 사용하여 *psb A* contig영역만을 증폭시켰다.

*psb A* specific primers:

Forward primer, 5' -ATGACTGCAATTTTAGAGAGA-3'

Reverse primer, 5' -TTATCCATTAAGAGATGGAAC-3'

③ 증폭된 *psb A* 유전자 단편의 recovery, cloning 및 sequencing

증폭된 DNA단편은 agarose gel에 분획한 후 BIO 101사의 GeneClean II kit 및 BM사의 agarase kit를 이용하여 회수하였다. 회수된 DNA는 Novagen사의 T-vector kit에 cloning하였다. Cloning 산물을 sequencing하기 위하여 deletion clone을 작제하였으며, DNA sequencer(373A DNA sequencer, Applied Biosystems USA)에 의하여 염기배열을 결정하였다.

④ Plasmid의 transformation

10 x KCM과 30% PEG 처리에 의해 Heatshock법 보다 형질전환율이 높은 방법을 이용하였다.

4. Plasmid DNA 추출 및 Probe조제

1xLB broth에 clonig된 *E. coli*를 37°C에서 배양하였으며 약 1.5ml의 배양액을 3,000rpm, 2분 30초 원심하여 상등액을 버리고 균체에 Solution I(50mM glucose, 25mM Tris(pH 8.0), 10mM EDTA(pH 8.0))을 100 $\mu$ l씩 처리후 vortex하여 상온에서 3분동안 방치한 후 solution II (0.2N NaOH, 1% SDS) 200 $\mu$ l씩 첨가 후 얼음속에 10분동안 방치하였다. Solution III (5M potassium acetate 60ml, glacial acetic acid 11.5ml, D. W. 28.5ml)를 150 $\mu$ l씩 첨가하여 얼음속에 5분 동안 방치한 후 16,000rpm으로 5분간 원심하여 생긴 상등액을 새로운 원심관으로 옮기고 RNase를 처리하여 37°C에 30분간 방치하였다. 이후 Phenol : Chloroform : Isoamylalchol (25 : 24 : 1)을 500 $\mu$ l넣고 흔들어 준 후 16,000rpm으로 3분간 원심, 상등액을 새로운 원심관에 옮기고 전체량의 2배의 100% Ethanol을 첨가하여 15,000rpm에서 18분간 원심하였다. 침전물을 70% Ethanol로 닦아주고 원심한 후, 침전물을 TE로 녹여 사용하였다.

#### 5. Southern blot 분석

DNA를 제한효소로 자른 후 0.8% 겔상에서 전기영동으로 분획시켰고, 이를 Nylon membrane에 전사시켰다. Membrane을 heat-sealable bag에 넣고 prehybridization buffer로 3시간 동안 처리하여 비특이적 DNA결합을 방지한 다음, 새로운 prehybridization buffer에 DIG로 표지된 probe와 membrane을 넣어 65°C에서 16시간 동안 hybridization 반응을 진행시켰다. Hybridization반응 후 membrane을 2xSSC, 0.1% SDS로 상온에서 30분간 흔들어 주고, 다시 0.5xSSC, 0.1% SDS로 65°C에서 세척하였다. Hybridezation 및 digdUTP의 immunological detection은 non radioactive method인 Boehringer-Mannheim사의 Dig-Kit를 이용하여 제조 회사의 권장 방법에 따라 실시하였다.

#### 6. *psb A* 유전자의 염기배열 결정

DNA염기배열은 Sequences 2.0 kit를 사용하여 dideoxy chain termination 법과

Taq. Dye primer cycle sequencing kit(Applied Biosystem USA)을 사용하여 model 373A DNA sequencer에 의해 결정하였다. Computer 분석하고 UNIX version PAUP 3.0등을 이용하여 실시하였다.

#### 7. 염기배열을 결정하기 위한 deletion clone작성

차나무의 *psb A* 유전자를 갖고 있는 plasmid vector pJ1111의 DNA를 5-10 $\mu$ g취하여 *Bam*HI/*Pst*I으로 소화하였다. 이것을 TE포화 Phenol과 Chloroform/isoamylalchol(24 : 1, v/v)으로 1회씩 추출하고 Ethanol침전 후 건조 pellet을 100 $\mu$ l의 분해 buffer로 용해하여 25 $^{\circ}$ C수조에 옮겨 1 $\mu$ l Exonuclease III(180units)를 가하여 잘 섞어준 후 보온하였다. 30초마다 20 $\mu$ l씩, 반응정지하기 위해 얼음속에 방치해 놓은 100 $\mu$ l MB Nuclease buffer에 순서대로 떠서 넣고, 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 보온하여 Exonuclease III를 실패시켰다. 37 $^{\circ}$ C의 수조로 옮겨 2 $\mu$ l의 Mung Bean nuclease(50units)을 가해 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 정도 보온하였다. TE포화 phenol과 Chloroform/isoamyl alcohol(24 : 1)로 1회 추출하여, Ethanol 침전후 건조 pellet을 50 $\mu$ l의 Klenow buffer에 용해하였다. 37 $^{\circ}$ C의 수조에 옮겨 보온하고 1 $\mu$ l의 Klenow buffer에 용해하여 얻어진 DNA용액중 10 $\mu$ l에 100 $\mu$ l의 ligation solution A와 12 $\mu$ l의 ligation solution B을 가하여 잘 혼합한 후, 16 $^{\circ}$ C에서 하루밤 가온하였다. 이중 20 $\mu$ l을 사용하여 *E. coli* JM109에 형질전환하여 colony을 형성시켰고, Plasmid 단리를 통해 염기배열의 결정을 위한 clone을 선발하였다.

### 제3절 연구결과 및 고찰

#### 1. PCR 조건에 따른 증폭산물의 크기

전 DNA 및 엽록체 DNA를 주형으로 사용하여 predenature 94 $^{\circ}$ C, 3 min, Denature 94 $^{\circ}$ C, 1 min, annealing 50 $^{\circ}$ C, 2 min; extention 72 $^{\circ}$ C, 3 min; postextention

72°C, 5 min; 35 cycle조건으로 증폭한 결과, 약 1 kb의 PCR산물이 검출되었다. 검출된 산물을 직접 T-vector에 삽입하여 *E. coli*에 형질전환 한 후, 형질전환체를 선발하였다. 선발된 형질전환체로부터 plasmid DNA를 추출하여 제한효소 처리에 의하여 삽입 DNA를 분리하였다. 분리된 삽입 DNA는 Southern blot 분석을 위한 probe로 이용하기 위하여 DIG-labeling 하였다.

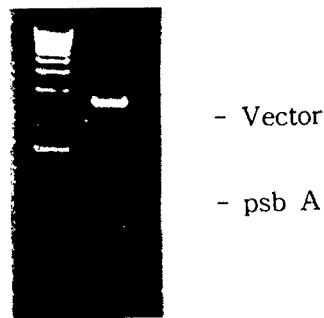


그림 8-1. 차나무 엽록체로부터 clone한 유전자 *psb A*

Fig. 8-1. Cloned *psb A* gene from tea plant

## 2. *psb A* 유전자의 DNA염기배열

각각의 clone들로부터 plasmid추출정제한 것으로부터 dideoxy chain termination 법 또는 dye primer 법에 의해 *psbA* 유전자의 염기배열을 각각 2회 반복하여 결정하였다. 그림 2은 *psbA* 염기배열과 각각 예상되는 아미노산 배열을 나타낸 것이다. *psbA* contig 영역은 ATG부터 stop codon TAA까지 1062bp을 갖은 유전자로써 353개의 아미노산으로 구성되어 있었다. 차 *psb A* 유전자와 담배, 시금치, 벼 등과의 상동성을 비교해볼 때 DNA염기배열에서는 90%~95%이었으며, 아미노산 LEVEL으로 볼 때 97%으로 매우 높은 상동성을 보였다. 또한 차의 *psb A* 유전자는 단자엽식물보다는 쌍자엽식물과 높은 상동성을 나타냈다.



### 3. Southern blot 분석에 의한 *psb A*의 변이 및 copy수

*psb A*의 변이 및 copy수를 조사하기 위하여 국내의 자생차나무 및 일본의 우량품종 "Saemidiri"로부터 전 DNA를 추출하여 제한효소 처리하였다. *Hind*III로 소화한 결과 단일 단편이 검출되었다.

```

ATG ACC GCA ATT ATA GAG AGA CGC GAA AGC GCA AAT TTA TGG AGT CGC TTC TGC GAC TGG 60
met ile ala ile leu glu arg arg glu ser ala asn leu trp gly arg phe cys asn trp
ATC ACT AGC ACT GAA AAC CGT CTT TAC ATT GGA TGG TTC GGT GTC TTG ATG ATC CCT ACC 120
ile thr ser thr glu asn arf leu thr ile gly trp phe gly val leu met ile pro thr
CAT TTG ACC GCA ACC TCT GTA TTC ATT ATT GCC TTC ATC GCA GCT CCT CCA GTA GAT ATT 180
leu leu thr ala thr ser val phe ile ile ala phe ile ala ala pro pro val asp ile
GAT GGT ATT CGT GAA CCT GTT TGT GGT TCT CTT CTT TAT GGA AAC AAT ATT ATC TCC GGT 240
asp gly ile arg glu pro val ser gly ser leu leu tyr gly asn asn ile ile ser gly
GCC ATT ATT CCT ACC TCT GCA GCT ATC GGA TTG CAC TTC TAC CCC ATC TGG GAA GCA GCT 300
ala ile ile pro thr ser ala ala ile gly leu his phe tyr pro ile trp glu ala ala
TCC GTC GAT GAG TGG CTA TAC AAC GGG GGT CCT TAC GAG CTA ATC GTT CTA CAC TTC CTA 360
ser val asp glu trp leu tyr asn gly gly pro tyr glu leu ile val leu his phe leu
CTT GGT GTA GCT TGC TAT ATG GGT CGT GAG TGG GAG CTT AGC TTC CGT CTG GGT ATG CGT 420
liu gly val ala cys tyr met gly arg glu trp glu leu ser phe arg leu gly met arg
CCT TGG ATT GCT GTT GCA TAC TCA GCT CCT GTT GCA GCT GCT ACT GCC GTT TTC TTG ATC 480
pro trp ile ala val ala tyr ser ala pro val ala ala ala thr ala val phe leu ile
TAC CCT ATT GGT CAA GGA AGC TTC TCT GAC GGT ATG CCT TTA GGA ATC TCT GGT ACT TTC 540
tyr pro ile giv gln gly ser phe ser asp gly met pro leu gly leu thr phe
AAT TTC ATG ATT GTA TTC CAG GCT GAG CAC AAT ATC CTT ATG CAT CCA TTC CAC ATG TTG 620
asn phe met ile val phe gln ala glu his asn ile leu met his pro phe met leu
GGT GTA GCT GGC GTA TTC GGC TCC CTA TTC AGT GCT ATG CAT GGT TCC TTG GTA ACT 680
gly val ala giv phe gly gly ser leu phe ser ala met his gly ser leu val thr
TCC AGT TTG ATC AGG GAA ACT ACT GAG AAT CAG TCC GCA AAT GCA GGT TAC AGA TTT GGT 740
ser ser leu ile arg glu thr thr glu asn gln ser ala asn ala gly tyr arg phe gly
CAA GAG GAA GAA ACT TAC AAT ATT GTG GCT GCT CAC GGT TAT TTT GGC CGA TTG ACT TTC 800
gln glu glu glu thr tyr asn ile val ala ala his gly tyr phe gly arg leu ile phe
CAA TAT GCT AGT TTT AAC AAC TCC CGT TCT TTA CAT TTC TTC TTA GCT GCT TGG CCC GTA 860
gln tyr ala ser phe asn asn ser arg ser leu his phe phe leu ala ala trp pro val
CTA GGT ATT TGG TTT ACC GCT CTA GGC ATT AGC ACT ATG GCT TTC AAC CTA AAT GGA TTC 920
ara gly ile trp phe thr ala leu gly ile ser thr met ala phe asn leu asn gly phe
AAT TTC AAC CAA TCT GTA GTT GAC AGC CAA GGT CGT GTT ATT AAC ACT TGG GCT GAT ATC 980
asn phe asn gln ser val val asp ser gln gly arg val ile asn thr trp ala asp ile
ATT AAT CGT GCT AAC CTT GGT ATG GAA GTT ATG CAC GAA CGT AAT GCT CAC AAC TTT CCT 1040
ile asn arg ala asn leu glu met glu val met his glu arg asn ala his asn phe pro
CTA GAC CTA GCT GCT CTT GAA TTT CCA TCT ATA AAT GGA TAA 1082
leu asp leu ala ala leu glu ser ile ser leu asn gly ***

```

그림 8-2. 차나무 유전자 *psb A*의 아미노산 염기배열

Fig. 8-2. Nucleotide and derived amino acid sequences of *psb A* gene from tea plant.

## 제 9 장 야생차의 잎과 줄기 절편 배양에 따른 callus 유도

### 제1절 서 언

식물 유전공학의 활용은 그 기술의 급속한 진전에 따라 농작물의 종묘 생산에 큰 공헌을 하고 있다. 현재 조직 배양을 통하여 상업적으로 종묘 생산이 되고 있는 작물은 100종을 넘고 있다. 특히 채소류(감자, 딸기, 마늘 등) 및 화훼류(안개꽃, 카네이션, 미니 장미, 심비디움 등)에 있어서 무균병주 생산 및 번식용도로도 조직배양의 기술이 활용되고 있다.

조직배양을 이용해서 종묘를 생산하는 경우에 있어서 그 목적은 크게 2가지로 분류된다. 즉, Callus나 체세포로부터 부정아나 액아 등을 소재로 하여 clone을 증식하는 측면과, 무병주묘의 육성 및 유전 자원을 보호하는 측면으로 대별된다. 이러한 방법의 체계화는 유전적 변이의 확대, 육종 기간의 단축, 2차산물의 생산 등에도 불가결한 기술로써 중요한 의미를 갖는다.

차에 있어서 callus 증식율을 높이기 위한 배양 방법이나 배양 조건에 대한 검토는 주로 일본 학자들에 의해 보고 되고 있다 (Doi 1981; Kato et al. 1990; Kuranuki, 1992; Nakamura 1987, 1990; Shibata 1993). 그 중에는 배양 온도, 유리 아미노산 농도, 다당류의 영향 등을 검토한 예가 있으며, 기관별, 부위별 재료 채취 시기별 및 품종별로 callus 유도에 관한 보고도 있다(Kim 1986; Nakamura 1984). 그러나 대부분의 보고는 일본의 육성품종을 대상으로 실시한 것이며, 우리나라의 야생종을 대상으로 보고된 예는 미진한 상태이다.

본 연구에서는 국내 야생종을 재료로 이용하여 배지 조건에 따른 기관과 부위별 callus 유도율을 검토하고자 하였다.

## 제2절 연구방법

### 1. 잎 절편의 배양

1995년 6월 1~10일 사이에 전남 강진군에 소재하는 (주)장원산업에서 재배중인 국내의 야생종으로부터 전정후 새로 나온 5엽 개엽기의 신초를 이용하였다. 성장점 부위로부터 제 1엽, 제 2엽 및 제 3엽을 절취한 후 70% 에탄올 용액에 20초간 각반 하면서 침지시켰다. 그 후 3% calcium hypochlorite 용액으로 10분간 살균하여 멸균수로 수세하였다.

잎 절편은 무균 샐레 상에서 주맥과 측맥간의 조직을 이용하여 약 7×7 mm의 크기로 조제하였다. 잎 절편의 치상수는 시험관당 1개로 하여 한천 배지상에 치상하였다. 시험관은 직경 25mm, 길이 150mm로 배지량은 15ml을 넣었다.

한천 배지는 MS 배지 (Murashige and Skoog 1962)를 기본으로 하였으며, 한천농도 0.75%, pH 5.8, sugar농도 3%, 식물생장 호르몬 조건을 5가지로 하였다(A: 1 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L BA, B: 10mg/L NAA + 10 mg/L BA, C: 2 mg/L IBA + 4 mg/L BA, D:  $10^{-4}$  mg /L NAA +  $10^{-4}$  mg /L Kinetin, E: 4 mg/L IBA + 2 mg/L BA).

배양온도는 26°C로 일정하게 하였으며, 광조건은 암상태로 유지하였다. Callus 유도율은 치상후 30, 40 및 50일 후에 조사하였으며, callus 는 크기에 따라 4등분으로 구분하였다(그림 9-1: G<sub>0</sub>: callus없이 생존해 있는 절편, G<sub>1</sub>: 절편의 일부를 덮은 callus, G<sub>2</sub>: 절편의 상측 전 표면을 덮은 callus, G<sub>3</sub>: G<sub>2</sub> 보다 큰 callus).

### 2. 줄기 절편의 배양

잎 절편의 채취와 동일한 시기인 5엽 전개기의 신초로부터의 절간을 이용하였다. 성장점 방향으로부터 제 1, 제 2, 제 3 및 제 4 절간별로 나누었으며, 제 2 및 제 3 절간으로부터는 유관속을 제외한 표피조직만을 분리하여 시료로 이용하였다. 시료의 크기는 3~4 mm로 절단하여 치상하였다.

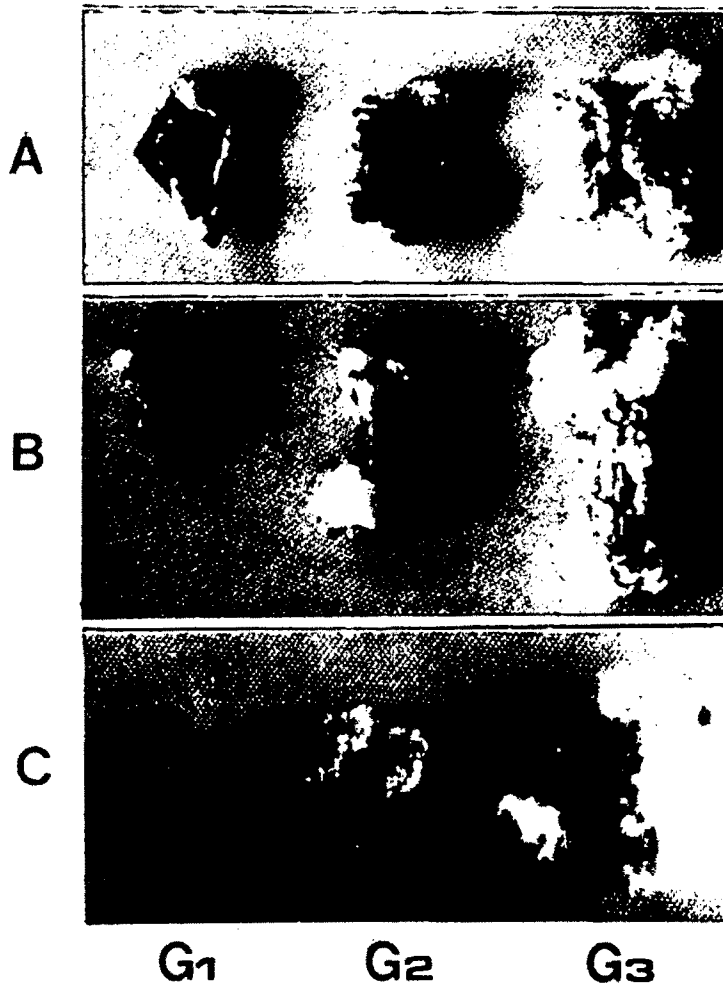


그림 9-1. 차나무 잎, 줄기, 줄기 표피층으로부터 형성된 callus

Fig. 9-1. Callus induced from leaf(A), stem(B), and epidermal layer(C) of stem at 50 days after culture. G1, G2, G3 were according to their sizes.

멸균방법, 시험관 크기, 배지량, 배지의 종류, 배양조건 및 측정방법은 앞 절편의 배양과 동일하였다. 또한 앞과 줄기 절편 다 같이 배지당 시험관 시료수는 50본이었다.

### 제3절 연구결과 및 고찰

#### 1. 신초의 기관과 부위별 callus 유도

호르몬조성에 따른 기관별 callus 유도율을 종합한 결과는 표 9-1과 같다. 잎 절편 및 줄기 절편에서 다 같이 갈변화된 조직과 오염된 조직이 다수 나타났다. 잎 절편에서는 오염율(19.6%)보다 갈변화(32.8%)되는 경향이 높았으며, 줄기 절편에서는 오염율(30.96%)이 대단히 높았다. 특히 제 2 및 제 3 절간의 표피조직은 callus유도 없이 생존하여 있는 절편을 관찰할 수 없었다.

잎 절편에 있어서 갈변화의 경향이 높은 원인은 분명하지는 않지만 살균제의 종류, 농도 및 시간 등이 요인이므로 이 요인들의 적정화로 갈변율을 낮출 수 있다고 생각되었으며, 시료 채취가 1번차기에 가까울수록 갈변화율은 높아질 것으로 생각되었다.

초기의 차 조직배양에 있어서 어려웠던 점은 오염율이 타 식물에 비교하여 높았던 것이었다. 살균농도에 있어서도 calcium hypochlorite 3~10% 범위에서 실험자에 따라 그 폭이 넓은 것을 알 수 있으며 (Kuranuki, 1993, Nakamura 1991), 살균 시간과의 조합에 있어서 최적조건을 잡기가 어려운 것은 시료 채취시기, 절편의 생육단계, 기관 및 부위별로 조직의 생육이 각각 다르기 때문이라고 생각되었다.

#### 2. 치상후 경과일수에 따른 기관별 callus 유도

치상 후 30일째의 관찰에서 제 2, 3엽보다 제 1 엽의 callus 유도율이 높았으며 치상 후 30, 40 및 50일째에 있어서 유도율은 제 1 엽(L1) > 제 2 엽(L2) > 제 3 엽(L3) 순이었다(그림 9-2). 제 3 엽에 있어서 30일째 보다 40일째에서 유도율이 감소한 것은 오염이 원인이었다. 치상후 50일째의 줄기 절편에 있어서 제 1 절간이 58.4%로 가장 높은 유

표 9-1. 야생차 잎, 줄기 절편 배양에서 오염율과 callus 유도

Table 9-1. Contamination and callus induction from leaf and stem segment of Korean wild tea.

Organ	Phyto-hormone condition	Callus size				Living without callus	Dead in browning	Contamination	Total number of inoculation
		G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	G <sub>3</sub>	Total				
L1*	A	4	6	3	13	4	23	10	50
	B	6	6	6	18	12	18	2	50
	C	16	8	4	28	2	9	11	50
	D	17	9	2	28	7	6	9	50
	E	12	8	6	26	2	8	14	50
L2	A	4	2	4	10	4	12	24	50
	B	6	4	1	11	0	23	16	50
	C	10	5	5	20	8	10	12	50
	D	7	6	10	23	7	10	10	50
	E	4	10	10	24	4	18	4	50
L3	A	6	1	1	8	4	18	20	50
	B	5	2	2	9	4	28	9	50
	C	4	5	4	13	3	31	3	50
	D	8	7	7	22	3	15	10	50
	E	4	6	13	23	7	17	3	50
S1	A	10	4	8	22	5	17	6	50
	B	14	4	8	26	0	12	12	50
	C	8	11	16	35	0	3	12	50
	D	13	8	7	28	0	7	15	50
	E	7	7	21	35	2	2	11	50
S2	A	14	5	2	21	3	4	22	50
	B	10	12	4	26	8	6	10	50
	C	10	13	10	33	2	2	13	50
	D	6	14	6	26	9	4	11	50
	E	4	10	20	34	3	3	10	50
S3	A	6	3	9	18	4	10	18	50
	B	15	2	3	20	14	4	12	50
	C	10	12	9	31	2	4	13	50
	D	9	5	9	23	4	5	18	50
	E	4	17	12	33	3	7	7	50
S4	A	2	2	10	14	7	5	24	50
	B	12	4	2	18	3	2	27	50
	C	8	5	16	29	1	9	11	50
	D	6	3	13	22	5	5	18	50
	E	9	8	13	30	4	6	10	50
EL	A	2	2	3	7	0	14	29	50
	B	3	4	0	7	0	24	19	50
	C	4	5	15	24	0	9	17	50
	D	1	6	7	14	0	14	22	50
	E	6	8	9	23	0	7	20	50

\*L1: first leaf, L2: second leaf, L3: third leaf, S1: first stem, S2: second stem, S3: third stem, S4: fourth stem, EL: epidermal layer from S2 and S3, A: MS + 1 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L BA, B: MS + 10 mg/L NAA + 10 mg/L BA, C: MS + 2 mg/L IBA + 4 mg/L BA, D: MS + 10<sup>-4</sup> mg/L NAA + 10<sup>-6</sup> mg/L Kinetin, E: MS + 4 mg/L IBA + 2 mg/L BA

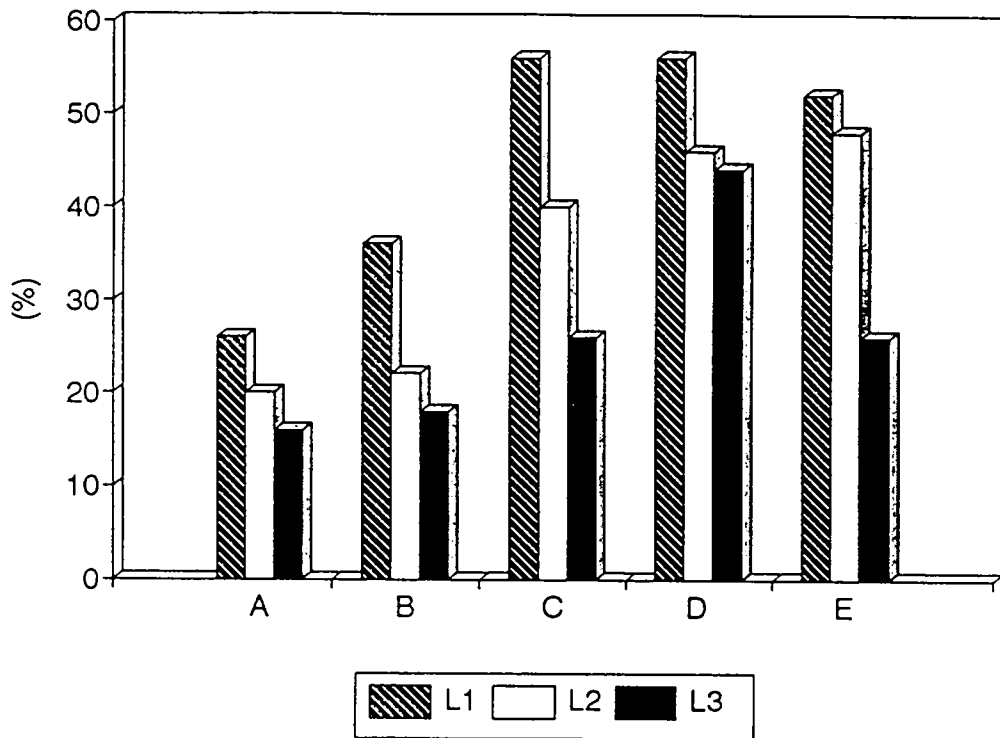


그림 9-2. 차나무 잎 절편 부위별 callus 형성을

Fig. 9-2. Effect of callus induction from leaf segment of Korean wild tea according to days after culture on MS medium(L1: 1st leaf, L2: 2nd leaf, L3: 3rd leaf).

도율을 나타냈으며 제 1 절간(S1) > 제 2 절간(S2) > 제 3 절간(S3) > 제 4 절간(S4) > 제 2, 3 절간의 표피조직(EL)의 순이었다(그림 9-3, 4).

제 1 줄기 절편에서는 30일째와 40일째 사이에 높은 유도율을 나타냈으며, 30일째와 50일째사이에는 약 20%의 증가율을 나타냈다. 제 2 줄기 절편에서는 치상후 경과일수에 따라 점진적으로 증가하는 경향을 보였다(그림 9-3). 줄기 절편으로부터의 표피조직의 callus 유도율은 완전한 줄기 절편의 60%정도를 나타냈다(그림 9-4). 이러한 결과는 세포조직이 많은 손상을 입었기 때문으로 판단되었으며, 치상후 경과일수에 따라 점진적으로 유도율은 증가하는 경향을 보였고, 치상후 50일째는 약 30%의 분화율을 나타냈다(그림 9-4). Nakamura(1985a)는 배양 65일 후의 조사에 있어서 callus화율은 제 2 절간이 91.6%로써 가장 높았고, 그 다음이 제 5 절간(89.5%) > 제 3 절간(88.6%) > 제 4 절간(85.3%) > 제 1 절간(58.1%)의 순이었다고 보고하였다. 본 연구의 다른 결과의 원인은 시료 채취시기에 기인 되었다고 생각된다. 그는 1 번차기의 신초를 사용하였으며(4 월말), 본 실험의 채취시기는 3번차기 후의 전정후 도장지를 이용하였기 때문에 제 1 절간의 생육단계가 진전되어 1 번차기의 제 2, 3 절간과 유사한 생장 및 발육정도를 갖는 시기일 것으로 생각할 수 있었다. 잎 절편의 경우는 줄기 절편에 비하여 callus유도율이 낮았다(50일째, 잎 절편 : 줄기 절편 = 45.2% : 56.0%). 이것은 줄기 절편에 비하여 잎 절편은 세포 분열능이 낮은 것으로 해석되며 Toi(1983)의 보고와도 일치하였다.

### 3. 호르몬조성에 따른 callus의 크기

시료 및 호르몬조성별로 callus 크기의 관찰결과를 표 9-1에 나타냈다. 제 1 잎 절편에 있어서 C, D 및 E 호르몬조성은 A 및 B 호르몬조성에 비교하여 G<sub>1</sub> 크기의 callus가 많이 유도 되었으며, 제 2 및 제 3 잎 절편일수록 호르몬조성별의 효과가 없어졌다. 그러나 전반적으로 잎 절편에서는 G<sub>1</sub> 이 G<sub>2</sub> 및 G<sub>3</sub> 보다 많았다. 줄기 절편에서는 C 및 E 호르몬조성이 60~70% 정도의 callus유도율을 보였으며, G<sub>3</sub> callus는 C 호르몬조성에서 많이 나타났다(그림 9-5)



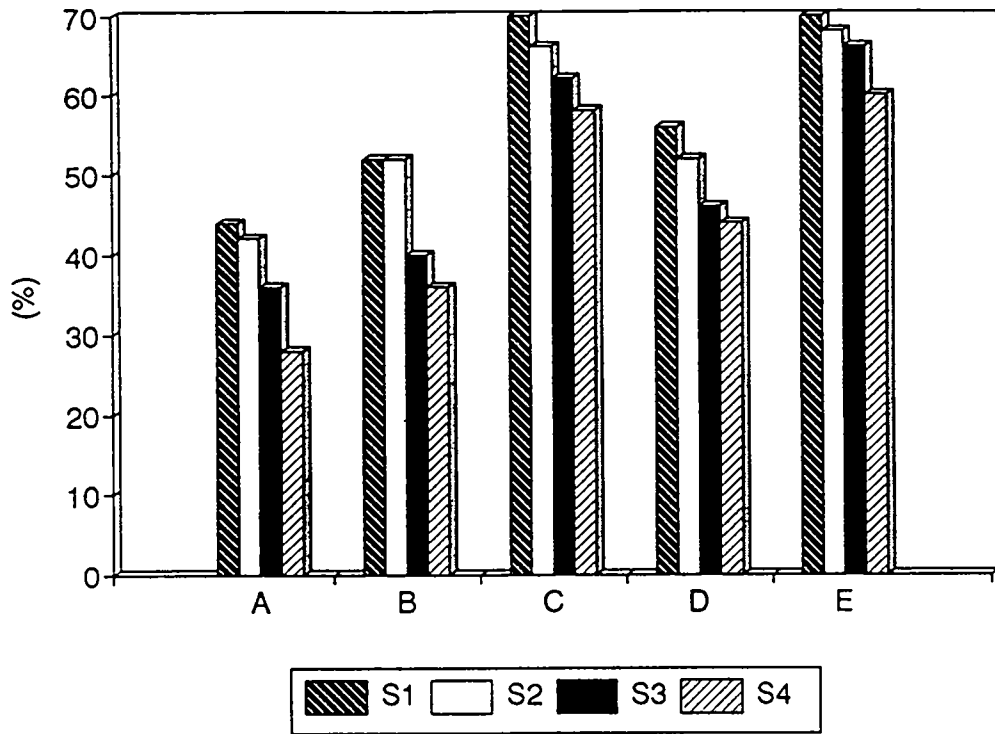


그림 9-3. 차나무 줄기 절편 부위별 callus 형성을

Fig. 9-3. Effect of callus induction from stem segment of Korean wild tea according to days after culture on MS medium(S1: 1st stem, S2: 2nd stem, S3: 3rd stem, S4: 4th stem).

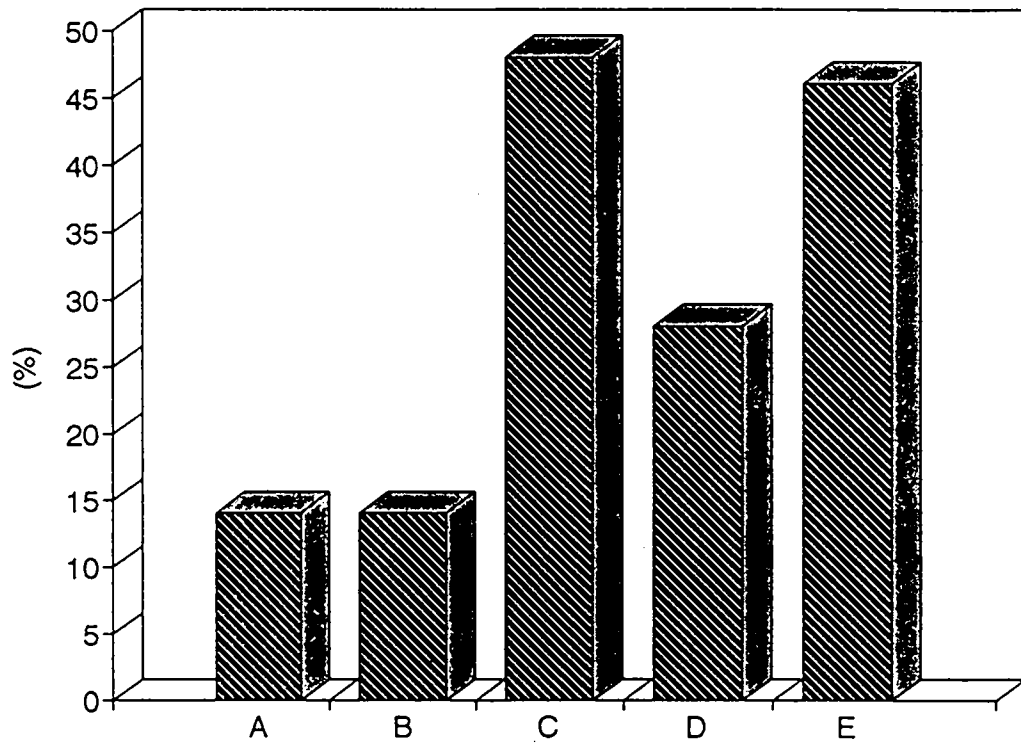


그림 9-4. 차나무 줄기 표피조직의 callus 유도율

Fig. 9-4. Effect of callus induction from stem epidermal layer of Korean wild tea according to days after culture on MS medium.

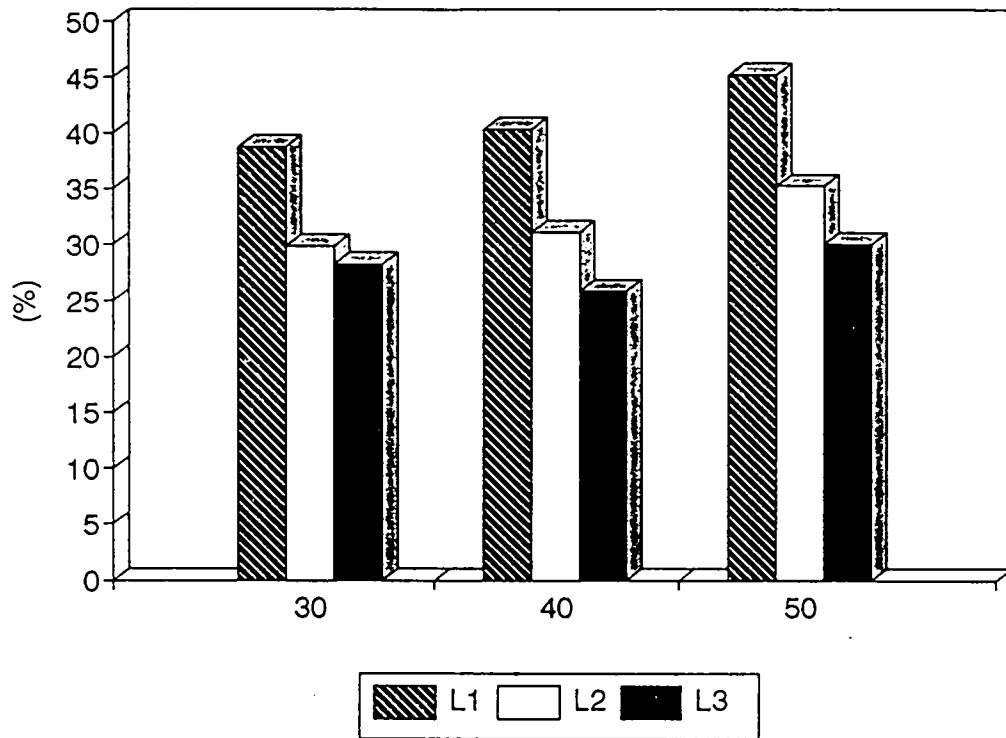


그림 9-5. 차나무 잎 절편 배양에서 호르몬 조성에 따른 callus 유도율의 차이

Fig. 9-5. Effect of growth regulators on callus induction from leaf segment of Korean wild tea at 50 days after culture(L1: 1st leaf, L2: 2nd leaf, L3 3rd leaf). A: MS + 1 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L BA, B: MS + 10 mg/L NAA + 10mg/L BA, C: MS + 2 mg/L BA + 4 mg/L BA, D: MS +  $10^{-4}$  mg/L NAA +  $10^{-6}$  mg/L Kinetin, E: MS + 4 mg/L IBA + 2 mg/L BA

줄기 절편에 있어서 callus의 크기는 제 1 절로부터 제 4 절로 갈수록 약간씩 커지는 경향을 알 수 있었다(그림 9-6). 특히 줄기 절편의 표피조직에 있어서 C호르몬조성은 다른 조성보다 3-4배의 G<sub>3</sub> callus를 유도하였다(그림 9-7). 즉 호르몬 종류 및 조성에 있어서 신속한 callus증식을 유도하기 위해서는 2-4 mg/L사이의 IBA와 BA가 적당하였으며, 차나무의 callus유도에 있어서 IBA와 BA의 조합이 2,4-D 나 NAA 조합보다 유리하다고 판단되었다.

#### 4. 호르몬조성에 따른 기관별 callus 유도

앞과 줄기 절편의 배양에서 전반적으로 C 및 E 호르몬조성은 각각 A 및 B 호르몬조성에 비교하여 약 3배의 유도율을 나타냈으며, BA를 포함한 한천배지는 callus 증식에 대하여 유효하지 않다고 보고한 Nakamura등(1984)의 결과와는 상반되었다. 그러나 B A농도가 높을 수록 증식율이 저하하는 경향은 일치하였으며 호르몬간의 길항작용(특히 BA 와 2,4-D 및 NAA간)이 나타나는 것이 그 원인으로 생각되었다.

잎 절편에 있어서 호르몬조성별 callus 유도율을 그림 9-7에 나타냈다. 앞에서 기술한 바와 같이 각 호르몬조성에서 다 같이 L1 > L2 > L3의 순으로 callus 분화율이 높았으며 C > E > D > B > A의 호르몬조성 순으로 callus분화율이 높게 나타나, 차나무에 있어서 줄기 절편을 이용하여 callus 유도를 얻기 위한 효과적인 호르몬 조성은 IBA (2mg/L)와 BA(4mg/L)임을 알 수 있었다. 잎 절편에서도 비슷한 결과를 보이니 NAA와 Kinetin조합에서도 높은 유도율을 나타내고 있었다. Toi(1983a)의 보고에서도 엽조직에 있어서는 NAA농도를 10<sup>-4</sup>M로 할 경우 Kinetin 농도를 10<sup>-4</sup> 및 10<sup>-5</sup>M 조건에서 callus유도율이 가장 높았다고 하였다. 또한 약배양의 callus유도율에 있어서도 10<sup>-5</sup>M NAA + 10<sup>-5</sup>M Kinetin 조합이 가장 높은 결과를 나타냈다고 보고하였다(Toi, 1983b).

줄기 절편에 있어서 호르몬조성별 callus유도율을 그림 9-6에 나타냈다. 줄기 절편 전체에 있어서는 E > C > D > B > A의 호르몬조성순으로 callus화율이 높았으며, 절간별에 있어서 S1 및 S4는 C > E > D > B > A의 순, S2 및 S3에서는 각각 E > C >

B > D > A 및 E > C > D > B > A의 순으로 callus화율이 높았다. 어느 절편에서도 A 호르몬조성이 가장 낮은 callus화율을 나타냈다. 필자 등의 견해로서는 제 1 절편은 너무 어린 생육단계이며, 제4 절편은 경화 정도가 높기 때문에 조직의 분화능이 낮은 것으로 추정되었으며, 제 2 및 제 3 절간이 최적의 분화능을 갖고 있기 때문이라고 생각한다.

Nakamura(1988, 1989)는 가을에 채취한 야부기따의 신초로부터 줄기 절편간의 callus 유도율을 조사하였다. 그의 보고에 의하면 callus화율은 제 2~5 절간의 경우 85~95%로 높았지만, 제 1 절간에서는 낮았다고 하였다.

줄기 절편의 표피조직에 있어서 호르몬조성별 callus 유도율을 그림 9-7에 나타냈다. C 및 E 호르몬조성은 약 45%이상의 callus화율을 나타냈으며, A 및 B 호르몬조성보다 약 3배 높았다. 이 결과는 Kato(1985)가 보고한 바와 같이 동일한 조건의 43.6%와 거의 일치하였으며, 완전한 줄기 절편의 4%에 비교하여 부정아 형성율이 22.2%로 약 5.5배 높은 것으로 보고되었다. 표피조직만의 배양의 경우 callus 분화율은 낮으나 부정아 형성율이 높은 원인은 분명히 밝혀지고 있지 않지만, *Torenia fournieri*(Chlyah, 1974)에서도 보고된 바가 있다.

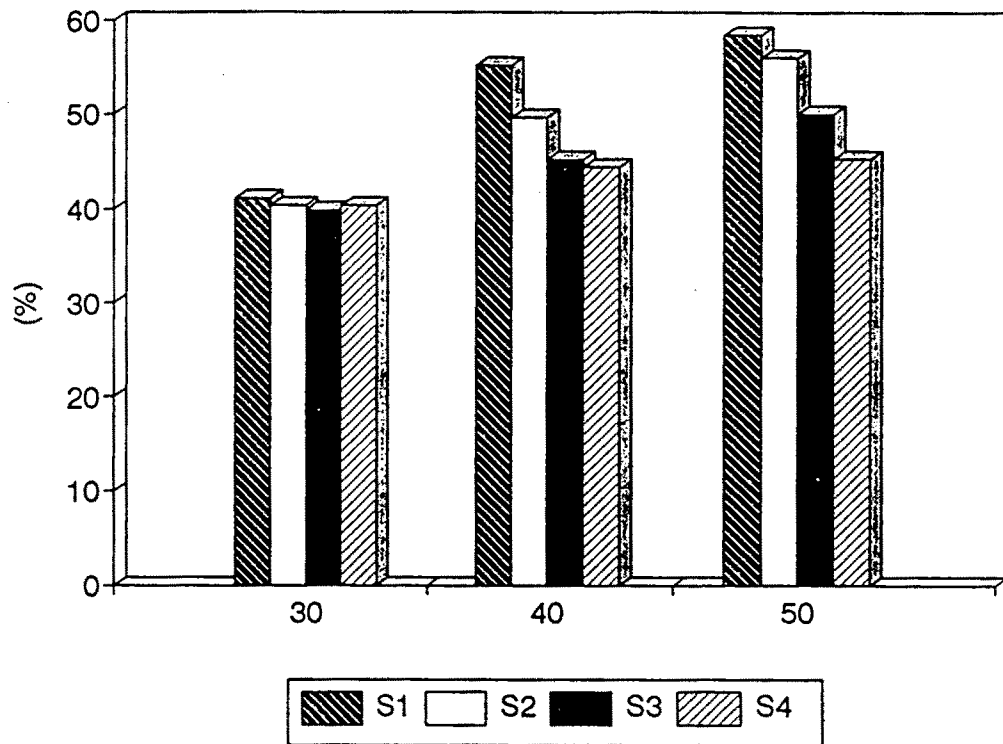


그림 9-6. 차나무 줄기 절편 배양에서 callus 형성에 미치는 호르몬의 영향

Fig. 9-6. Effect of growth regulators on callus induction from stem segment of Korean wild tea at 50days after culture(S1: 1st stem, S2: 2nd stem S3: 3rd stem, S4: 4th stem).

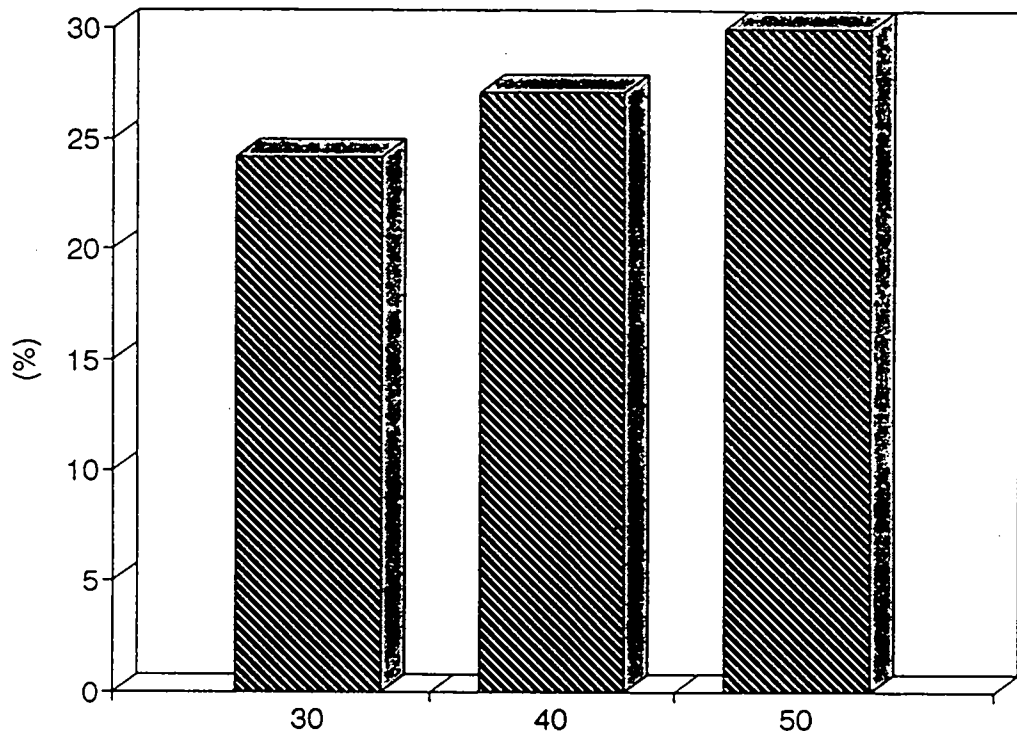


그림 9-7. 차나무 줄기 표피조직 배양에서 callus 형성에 미치는 호르몬의 영향  
 Fig. 9-7. Effect of growth regulators on callus induction from stem epidermal layer of Korean wild tea at 50 days after culture.

## 제 10 장 차나무의 배배양 및 multishoot 유도 배양

### 제1절 서 언

일반적으로 식물 영양기관의 분화는 초본성 식물보다 목본성 식물이 더 어려운 것으로 알려져 있다. 목본성 식물에서는 체세포성 조직을 배양하여 재분화계를 확립한 예가 그다지 많지 않으며, 재분화율도 대체로 저조하다. phenol성 물질이 많은 차나무 배양에서도 재분화율이 낮게 나타나고 있다. Koto 등이 엽배양에서 2,4-D 첨가로 부정배 출현과, 줄기 절편 배양에서 부정아 형성을 보고하고 있으나 대량 증식까지는 이르지 못하고 있는 실정이다. 장기적으로는 식물 조직체 배양을 통하여 대량 증식되는 callus로부터 식물체 재분화를 유도하여 안정적인 종묘 생산을 꾀해야겠으나 배양과정중에서 유전적 변이체 출현 등의 문제해결에 시간이 소요된다. 여기에 현실적인 대안으로 배배양이나 영양체 배양을 통하여 다량의 shoot를 형성시켜 종묘를 대량 증식시키는 방법을 생각해 볼 수 있다.

배는 난세포가 응핵과 수정한 접합자에서 발달하여 유아, 유근, 배축을 갖는 유식물체가 일반적이고 식물에 따라서는 무성배가 형성되기도 한다. 배배양은 식물의 결정체를 배양하는 것으로 종자를 번식하는 것과 같은 효과와 더불어 다량의 shoot를 발생시킴으로써 대량 번식도 가능하다. 그리고 속간, 종간 등 원연 결합으로 인하여 종자까지 이르지 못하는 미숙배를 배양하여 성숙한 종속간 식물을 얻기도 한다.

### 제2절 연구방법

배배양에 이용할 종자는 전남 순천시 향림사 차밭에서 10월에 채취한 종자를 노천매장법으로 저장한 후 이듬해 2월에 수거하여 이용하였다. 종자를 70% 에탄올 용액에 30



초간 각반 하면서 침지시켰다. 그 후 3% calcium hypochlorite 용액으로 10분간 살균하여 멸균수로 수세하였다. 배의 적출은 무균 상태에서 실시하였다. 치상수는 시험관당 1개로 하여 한천 배지상에 치상하였다. 시험관은 직경 25mm, 길이 150mm로 배지량은 15ml을 넣었다.

한천 배지는 MS 배지를 기본으로 하였으며, 한천농도 0.8%, pH 5.8, sugar농도 3%, 식물생장 호르몬 조건은 배배양을 위한 배지는 BA와 2,4-D의 서로 다른 조합으로 12처리(a~l)를 하였으며 multishoot 형성을 위한 배지는 BA와 IBA, NAA, IAA, 2,4-D의 조합으로 6처리와 BA와 IBA, NAA, GA 조합의 5처리를 하였다.

배양온도는 26℃로 일정하게 하였으며, 광조건은 callus 유도에서는 암상태 그외는 16시간 형광등 조명을 하였다. 조사는 치상 후 30, 40, 50일 후에 조사하였다.

### 제3절 연구결과 및 고찰

#### 1. 배배양으로 callus 및 부정아 유도

전체적으로 callus 형성률은 평균 45.8%였다. shoot 형성율은 11.4%였다. 같은 고사율이 32.5%로 높은 편이었다. 식물생장조절제별 callus 형성율에 있어서 처리간의 차이는 그다지 크지 않았으나 2,4-D의 함량이 BA보다 상대적으로 많은 경우에 높게 나타나는 경향이였다. 가장 callus 형성이 많았던 처리는 2,4-D 단독 처리로 60%에 달하였다. shoot 형성은 BA가 고농도(2mg/l) 함량에서 20%이상 형성되는 결과를 보였다. 그러나 2,4-D가 높은 농도(2mg/l)에서는 억제되는 형상으로 보였다. 일단 형성된 shoot의 신장은 빨리 진행되어 조사 50일에 평균 4.4cm에 달하였다. 이 결과는 배배양에 있어서 callus 유도에는 2,4-D가 효과적으로 작용하고 shoot 형성에는 BA 고농도가 효과적임을 시사하고 있다( 표 10-1).

표 10-1. 차나무 배배양에서 callus 형성과 신초형성에 미치는 호르몬의 영향

Table 10-1. Effects of growth regulators on callus formation and shooting in embryo culture of *Camellia sinensis*.

Treatment No.	Growth regulators(mg/ℓ)		Rate of callus ( % )	Rate of shooting ( % )	Length of shoot (cm)	Rate of Dead ( % )	Rate of Contamin. ( % )
	BA	2.4D					
a	0	0.5	53.3	3.7	4.6	30.0	10.0
b	0	1	46.7	0	3.8	46.7	6.7
c	0	2	60.0	0	4.1	26.7	13.3
d	0.5	0.5	50.0	13.3	2.7	33.3	10.0
e	0.5	1	53.3	13.3	3.8	26.7	6.7
f	0.5	2	33.3	16.7	4.1	36.7	13.3
g	1	0.5	40.0	10.0	4.5	36.7	10
h	1	1	40.0	20.0	5.1	33.3	3.3
i	1	2	50.0	13.3	4.4	26.7	10
j	2	0.5	43.3	23.3	5.2	26.7	6.7
k	2	1	36.6	20.0	5.0	36.7	6.7
l	2	2	43.3	3.3	5.8	30.0	20.0

## 2. multishoot 유도 배양

shoot형성에 있어서 식물생장조절제의 처리는 BA와 IBA, NAA, IAA, 2,4-D와의 조합에서 BA와 IBA의 조합이 가장 높은 shoot 형성율을 보였다. BA 2mg/l, IBA 1mg/l 첨가에서 평균 3.32개 였으며 shoot길이는 2.36cm였다. 잎수는 10.46개이고 잎 길이도 1.81cm로 왕성한 생장을 보였다. 다음으로 효과적인 생장호르몬의 조성은 IAA와의 조합으로 shoot 수가 2.36개였다. 2,4-D(0.1mg/l)와의 조합에서는 거의 callus만 형성되는 결과를 보여, shoot 형성에서 2,4-D가 억제적으로 작용함을 보여 주고 있다. 2,4-D와 BA 첨가가 어느 조직의 배양에서나 callus 형성에 효과적임을 보여 주는 결과라고 할 수 있다(표 10-2).

Gibberellin 첨가에 따른 shoot 분화와 신장에 대한 결과는 표 10-3, 그림 10-1에 나타냈다. shoot 수와 생장은 BA(1mg/l), IBA(0.1mg/l), GA(5mg/l)의 첨가에서 가장 효과적으로 나타나서 shoot 수가 4.11개, shoot 길이가 4.06cm 잎수는 11.22개의 성장상태를 보였다. IBA대신 NAA 첨가는 shoot의 분화나 성장에서 각각 1.71개, 1.08cm에 머물러 많은 차이의 열세현상을 보였다. 이 실험에서 GA를 제거한 배지에서 shoot 분화나 생장이 GA 첨가 배지의 각각 27%, 30%에 못미치고 있으나 또한 GA 10mg/l의 첨가도 분화와 생장을 지연시키는 결과로 나타나 차나무의 shoot 신장을 위한 배지에서 GA 첨가량은 5gm/l가 적정량으로 판단되었다.

표 10-2. 차나무 줄기 배양에서 신초올에 미치는 호르몬의 영향

Table 10-2. Effects of growth regulators on shooting in stem culture of *Camellia sinensis*.

Treat-ment	Growth regulators(mg/ℓ)					No. of callus form.	No. of shoot	Lenth of shoot	No. of leaf	length of leaf	Width of leaf
	BA	IBA	NAA	1AA	2,4-D						
1	0.5	1				0	2.67	2.40	11.30	1.86	0.92
2	1	1				0	2.70	1.57	12.29	1.57	0.72
3	1		1			19	1.0	0.41	3.33	0.61	0.31
4	1			1		0	2.36	1.74	10.0	1.32	0.59
5	1				0.1	27	0.15	0.02	1.82	0.30	0.11
6	2	1				0	3.32	2.36	10.46	1.81	0.89

표 10-3. 차나무 신초 배양에서 신초의 생장에 미치는 호르몬의 영향

Table 10-3. Effects of growth regulators on elongation of plant in shoot culture of *Camellia sinensis*.

Treat-ment	Growth regulators(mg/ℓ)					No. of callus from.	No. of shoot	length of leave	No. of leaf	length of leaf	width of leaf
	BA	IBA	NAA	IAA	GA						
A	1	0.1			5	0	3.82	2.86	11.16	0.87	0.7
B	1	0.01			5	0	4.11	4.06	11.22	1.42	0.7
C	1		0.1		10	0	1.71	1.08	3.94	0.97	0.46
D	1	0.1			0	0	1.03	0.85	8.78	1.61	0.68
E	1	0.1			5	0	1.18	0.93	5.28	1.09	0.53



그림 10-1. 차나무 배양에서 형성된 multishoot 와 gibberellin의 효과

Fig. 10-1. Multishoot of tea elongated in MS medium supplemented by  
BA(1mg/l), IBA(0.1mg/l), GA(5mg/l).

## 제 11 장 요약 및 결론

### 제1절 연구의 주요 결과

#### 1. 차나무 집단의 생태적 특성

야생 차나무 집단의 생육환경, 토양특성, 임분구조 등을 파악하기 위하여 지역, 위도 등을 고려하여 12개 야생 차나무 집단을 선정하여 조사 분석한 결과는 다음과 같다.

가. 차나무 집단은 일반적으로 산 하부 남향사면의 비옥도가 비교적 높은 미사질 양토에 주로 분포하고 있었다.

나. 차나무는 왕대, 비자나무, 아까시나무, 굴참나무, 때죽나무, 검팽나무, 당단풍 등이 상층의 우점종을 이루는 관목층에서 군락을 이루거나 조릿대, 싸리, 누리장나무, 개웃나무 등과 혼효하고 있었다.

다. 차나무의 밀도는 4,800~40,300주/ha로써 집단간 큰 차이를 보였다.

라. 엽장, 엽폭, 거치수, 엽맥수, 엽병장, 엽면적 등 잎의 형태적 특성은 집단간, 집단내 개체간 모두 고도의 유의적인 차이를 보임으로써 변이가 심한 것으로 나타났다. 엽면적은 엽장과는 고도의 유의적인 상관관계가 있었으나, 엽폭과는 유의적인 상관관계가 없었다.

마. 잎의 특성에 의하여 cluster 분석한 결과 조사된 12개 집단은 엽장과 엽면적에 의하여 3개의 군으로 구분되었으며, 엽장과 엽면적이 중간 크기인 군은 거치수와 엽맥수에 의하여 다시 2개의 군으로 구분되었다.

#### 2. 차나무 집단의 임분구조와 물질현존량

상기 12개 야생 차나무 집단을 선정하여 토양특성, 임분구조, 현존량을 조사한 결과는 다음과 같다.

- 가. 차나무 집단별 평균 근원직경은 집단별 평균 수령과 유의적인 상관관계가 있었으나, 집단별 평균 수고, 밀도, 근원단면적은 집단별 평균 수령과 유의적인 상관관계가 없었다. 관목층인 차나무 집단의 밀도와 근원단면적은 교목층의 흉고 단면적과 유의적인 상관관계가 없었다.
- 나. 차나무의 표본목 측정 결과 근원직경이 증가함에 따라 줄기와 가지, 뿌리의 건조량은 지수함수적으로 증가하였으며, 1년생 잎과 소지의 건조량은 직선적으로 증가하였다. 2년생 이상 잎 건조량의 경우 근원직경과 상관관계가 없었다. 근원직경이 증가함에 따라 줄기와 가지, 뿌리의 건조량이 증가하는 것은 근주당 줄기의 수가 증가하기 보다는 줄기의 평균 직경과 수고가 증가하기 때문이었다.
- 다. 차나무 집단의 임목 전체 현존량은 1,162~11,474kg/ha, 주 이용 대상인 1년생 잎의 현존량은 165~1,341kg/ha로서 집단간 큰 차이가 있었으며, T/R 율은 1.5~2.8의 범위를 보였다.
- 라. 1년생 잎의 현존량 구성비는 토양특성 중 전질소함량, 습도지수가 증가함에 따라 감소하는 유의적인 부의 상관관계를 보였다. 단위면적당 차나무 잎의 생산성에 대한 영향 인자는 근원단면적, 밀도, 전질소함량, 토양수분 등이었다.

### 3. 차나무 국내외 수집종의 특성조사

차나무 국내외 수집종의 특성조사와 한국 야생차와 일본의 차품종간의 화학성분을 비교한 결과, 차의 감칠 맛에 가장 영향을 주는 Theanine 함량은 선암사(1.220%) 집단이 높았다. Arginine 함량은 0.013~0.266% 범위로 선암사 집단이 일본 품종보다 약 21배가 높은 함량 차이를 보였다. 전 flavonol류 함량은 일본 품종보다 국내 야생집단이 적었다. 유리당의 평균 함량은 선암사(1.56%) 집단이 많았다. Ascorbic acid와 Tocopherol 함량은 범왕리와 다솔사 집단이 높았고, 백양사 집단이 가장 낮았다.

### 4. 한국 야생차와 일본의 차품종간의 화학성분 비교

육종상에 있어서 차종 적응성의 판정이나 선발의 지표에 이용하고자, 국내 차나무 자생집단과 일본 품종간의 각종 화학성분의 특징을 분석, 비교한 결과는 다음과 같다.

가. 차의 감칠 맛에 가장 영향을 주는 Theanine 함량은 선암사(1.220%)>범왕리(1.085%)>Meiryoku(0.943%)>백양사(0.335%)>다솔사(0.238%)순이었으며, 전 아미노산 함량중 가장 많은 비율로 나타났다.

나. Arginine 함량은 0.013~0.266%범위로 선암사집단이 Meiryoku보다 약 21배가 높은 함량 차이를 보였다.

다. 전 flavonol류의 평균 함량은 Meiryoku(23.58mg/g) >백양사(22.06mg/g) >범왕리(19.72mg/g)>선암사(16.90mg/g)>다솔사(15.34mg/g)순으로, 국내 야생집단은 적은 양의 flavonol류가 요구되는 녹차 품종의 육성에 이용성이 높은 것으로 생각되었다.

라. 유리당의 평균 함량은 선암사(1.56%)>다솔사(1.50%)>송광사(1.45%)>Meiryoku(1.34%)>백양사(1.29%)>범왕리(0.81%)순으로 높았으나 잎의 속도에 따라 함량의 변화가 많았다.

마. Ascorbic acid와 Tocopherol함량은 범왕리와 다솔사 집단이 높았고, 백양사 집단이 가장 낮았다.

##### 5. RAPD marker를 이용한 한국 야생차 및 일본 차품종의 동정

한국 야생차의 지역간 유연성을 밝히고 일본 재배 품종간의 유전적 차이를 규명하고자 RAPD분석한 결과는 다음과 같다.

가. 차나무 잎에서 추출한 DNA의 증폭은 50ng의 template DNA, 0.5U의 *Taq* polymerase, 2mM의 Mg가 가장 최적의 조건이었으며, annealing 온도는 36/4 5°C의 2단계 활용이 가장 신뢰성있는 DNA 단편을 검출할 수 있었다.

나. Random primer 20종을 이용하여 총 212개의 DNA 단편을 검출하였으며, 증폭



된 단편의 크기는 약 250bp에서 3000bp사이에 나타났다. 한국의 개체 및 일본 품종에서 검출된 특이적 RAPD marker는 18.9%(40/212)를 차지하였다.

다. Euclidian값에 의한 유전적 거리를 계산한 결과 한국 집단내에서는 송광사와 대홍사 집단사이에서 최소값(14.0)이 나타났으며, 백양사집단과 천은사집단사이에서 최대값(46.5)이 나타났다. 또한 일본 품종을 포함한 전 표본의 결과로부터는 Yabukita와 Yaeho사이에서 최소값(13.0)이 나타났으며, 백양사와 금산사 집단에서 최대값(78.8)이 나타났다.

라. Cluster 분석한 결과 48개 표본은 Euclidian값 45이하에서 5군으로 나누어져 있고, 한국 야생차 집단과 일본 품종간에는 긴밀한 유전적 관계를 나타내며 한국 집단이 일본종보다 유전적 배경의 폭이 크게 나타났다.

마. RAPD marker를 유전적 marker로써의 평가에 있어서 증폭된 전 단편의 77.3%(34/44 밴드)가 F<sub>1</sub>에 유전되는 결과를 보이고 있다.

## 6. 차나무의 엽록체 DNA library 작성

차나무 잎에서 엽록체 DNA를 추출하여 제한효소로 절단한 단편을 분석한 결과는 다음과 같다.

가. 엽록체 DNA의 제한효소 pattern으로 판단하면 차나무의 엽록체 DNA 크기는 약 133.96 Kbp 이었다. 단일 제한효소 절단에서는 *Bam*HI이 28개의 단편으로 가장 그 수가 많았으며 가장 큰 단편은 20Kb 전후였다.

나. 엽록체 DNA를 보다 상세하게 해석하기 위하여  $\lambda$  phage vector 및 plasmid vector를 이용해서 cloning할 필요가 있다고 생각했다. 신엽으로 부터 엽록체 DNA library를 추출하여 *Sau*3AI으로 부분 절단하고 엽록체 DNA library를 얻었다. 또한 시금치 및 벼의 엽록체 DNA의 clone bank로 부터 적당한 clone을 선발하여 이것을 probe로 이용하여 plaque hybridization을 행함으로써 positive한 clone을 다수 선발하였다.

다. 엽록체 DNA를 plasmid cloning 하기 위하여 우선 엽록체 DNA를 *Bam*HI으로

완전 분해한 pBR322에 cloning하여 차 엽록체 DNA의 plasmid library를 적제 하고, 다수의 colony를 얻었다.

라. Insert DNA 단편의 크기는 100-4,000bp정도 사이에 다수 존재 하였으며 기대의 큰 단편(약 10Kb)은 좀처럼 얻기가 어려웠다. 최종적으로 74단편중 약 10Kb이 상의 단편이 3개뿐이며 대부분 작은 단편이 삽입 되었고, double copy가 포함 된 것도 있었다.

#### 7. 차나무의 광합성 반응계 관련 유전자 *psb A*의 cloning 및 구조해석

합성계 II의 반응중심을 구성하는 단백질의 하나인 32 kDa 단백질을 code화 하는 유전자인 *psb A*를 특이적 primer를 합성하여 PCR산물을 cloning하여 염기배열을 결정하는 과정과 분자구조를 해석한 결과는 다음과 같다.

가. 전 DNA 및 엽록체 DNA를 주형으로 사용하여 predenature 94°C, 3 min, Denature 94°C, 1 min, annealing 50°C, 2 min; extention 72°C, 3 min; postextention 72°C, 5 min; 35 cycle조건으로 증폭한 결과, 약 1 kb의 PCR산물이 검출되었다.

나. 검출된 산물을 직접 T-vector에 삽입하여 *E. coli*에 형질전환 한 후, 형질전환체를 선발하였고, 선발된 형질전환체로부터 plasmid DNA를 추출하여 제한효소 처리에 의하여 삽입 DNA를 분리하였다.

다. *psbA* contig 영역은 ATG부터 stop codon TAA까지 1062bp을 갖은 유전자로써 353개의 아미노산으로 구성되어 있었다.

라. 차 *psb A* 유전자와 담배, 시금치, 벼 등과의 상동성을 비교해볼 때 DNA염기배열에서는 90%~95%이었으며, 아미노산 LEVEL으로 볼 때 97%으로 매우 높은 상동성을 보였다. 또한 차의 *psb A* 유전자는 단자엽식물보다는 쌍자엽식물과 높은 상동성을 나타냈다.

#### 8. 야생차의 잎과 줄기 절편 배양에 따른 callus 유도

국내 자생차를 이용하여 기관별, 부위별 및 호르몬조성별로 callus유도율을 검토한 결과는 다음과 같다.

가. 잎 절편은 줄기 절편에 비하여 갈변화율이 높았으며(32.8%), 줄기 절편은 잎 절편에 비하여 오염율이 높았다(30.96%).

나. 치상후 경과일수별 잎 절편의 callus유도율은 L1(45.2%) > L2(35.2%) > L3(30.0%)의 순이었다.

다. 치상후 50일째의 줄기 절편에있어서 callus화율은 S1(58.4%) > S2(56.0%) > S3(50.0%) > S4(45.2%) > EL(30.0%)의 순이었다.

라. 제 2, 3절간으로 부터의 표피조직의 callus유도율은 완전한 줄기 절편의 60%정도를 나타냈다.

마. 잎과 및 줄기 절편에 있어서 callus화율을 높이기 위해서는 2-4 mg/L 범위의 IBA 와 BA 조합이 필요하였으며 이것은 2,4-D와 NAA 조합보다 유리하였다.

#### 9. 차나무의 배배양 및 multishoot 유도 배양으로 대량증식

차나무의 배배양에서 callus형성율은 평균 45.8%였고, shoot 형성율은 11.4%였다. 호르몬 첨가에서 callus 유도에는 2,4-D가 효과적으로 작용하고 shoot 형성에는 고농도의 BA가 효과적이었다. shoot 형성에 효과적인 호르몬 조합은 BA(2mg/l)와 IBA(1mg/l)로 평균 3.32개 형성율을 보였다. shoot 신장에는 GA 5mg/l가 적당한 것으로 나타났다.

## 제2절 연구결과의 기대효과

### 1. 기술적 측면

가. 야생차 중에서 형질이 우수한 우량 개체를 선발하여 우리 고유의 차나무 품종으로 육성한다.

- 나. 분자 수준에서 종과 품종을 구분하고 특이적 DNA marker를 탐색, cloning하여 차나무의 분자 육종 체계가 확립된다. 그리하여 새로운 품종 육성의 신속한 system이 개발된다.
- 다. 우수한 차나무 품종을 개발하면 개체조직배양으로 급속한 대량 증식체계가 확립되어 균일한 형질을 갖는 품종의 묘목을 단시일에 대량 생산하여 농가에 보급할 수 있다.

## 2. 경제·산업적 측면

- 가. 우량 품종의 개발로 차재배 면적을 확대시켜 농가소득을 향상시키는 계기가 될 것이다.
- 나. DNA marker에 의한 동정 방법은 외국의 유전자원의 혼입을 막는 지표가 된다.
- 다. 육종 방법의 첨단화로 육종 program을 용이하게 조합할 수 있다.
- 라. 기호에 맞는 다양한 품종의 개발로 차음료의 수요를 증가시킬 수 있다.

## 제3절 연구개발사업 결과의 활용방안

- 가. 수집된 우량계통과 외래 품종을 새로운 차발 조성에 활용하고 신품종 육성에 활용한다.
- 나. 형질전환계의 data는 외래유전자의 도입 방법에 활용한다.
- 다. RAPD DNA marker는 종 구분에 활용한다.
- 라. 염기 배열이 결정된 clone은 probe로 활용하고 유전공학 실험의 소재로 활용한다.
- 마. 확립된 조직배양 체계는 우량종의 대량증식, 순계유지 등에 활용한다.

# 여 백

## 참 고 문 헌

### 제 1 장

- 김명배. 1989. 六大 茶類에 대하여(제3보 조선시대). 한국식문화학회지.4(3): 221-227
- 김명배. 1997. 勝雪 金正禧의 茶道 研究. 한국차학회지, 3(1):1-35.
- Hara, Y., Matsuzaki, T. and Suzuki, T. 1987. Angiotensin converting enzyme inhibiting activity of tea components, Nippon Nogeikagaku Kaishi, 61, 803.
- Heywood, V.H. 1978. Flowering plants of the world. Oxford. Univ. Press
- Ikedo, I., Imasato, Y., Sasaki, E., N마묘름, M., Nagao, H., T마대, T., Yayabe, T. and Sugano, M., 1992, Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats, Biochem, Biophys, Acta, 1127, 141.
- Kakiuchi, N., Kusumoto, I. T., Hattoro, M., Namba, T., Hatano, T. and Okuda, T. 1991, Effect of condensed tannins and related compounds on reverse transcriptase. Phytother, Res., 5, 271.
- Matsuzaki, T. and Hara, Y. 1985. Antioxidative activity of tea leaf catechins, Nippon Nogeikagaku Kaishi, 59, 129.
- Nakane, H. and Ono, K. 1990. Differential inhibitory effects of some catechin derivatives on the activities of human immunodeficiency virus reverse transcriptase and cellular deoxyribonucleic and ribonucleic polymerases. Biochemistry, 29, 2841.
- Sealy, J.R. 1958. A revision of the genus *Camellia*. Royal Hort. Soc. London. 239pp.
- Xu, Y., Ho, C.T., Amin, S.G., Han, C. and Chung, F. L. 1992. Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants, Cancer Res, 52, 3875.

## 제 2 장

- 김용식. 1986. 우리나라 동백나무 집단의 형태적 특성 및 유전변이에 관한 연구, 서울대 박사학위논문. 42pp.
- 김지문, 권기원, 문홍규. 참나무 천연집단의 유전변이. 한국임학회지 71: 82-89.
- 박인협. 1986. 백운산지역 천연림생태계의 산림구조 및 물질생산에 관한 연구. 서울대 박사학위논문. 48pp.
- 이수옥. 1981. 한국의 산림토양에 관한 연구. 한국임학회지 54: 25-35.
- 이상철. 1990. 노각나무의 생태와 형태적 특성에 관한 연구. 원광대 박사학위논문. 68pp.
- 임경빈. 1979. *Ilex*속 수목의 유전변이의 분석과 조경학적 이용가치의 조사연구. 한국임학회지 42: 1-35.
- 임행진, 박인협, 이상철. 1988. 봉화산공원의 자연환경과 이용객 실태 및 보전대책. 순천시청 보고서. 158pp.
- Brower, J. E. and J. H. Zar. 1977. Field and laboratory methods for general ecology. Wm. C. Brown Co. Pub., Iowa. 194pp.
- Causton, D. R. 1988. Introduction vegetation analysis. Uniwin Hyman Ltd., London. 342pp.
- Day, F. P. and C. D. Monk. 1974. Vegetation patterns on a southern Appalachian watershed. Ecology 55(5): 1064-1074.
- SAS. 1988. SAS/STAT user's guide. SAS Inst. Inc., NC USA. 1028pp.
- Wright, J. W. 1976. Introduction to forest genetics. Academic Press, New York. 463pp.

### 제 3 장

- 김동연, 정지석, 김권, 이종욱, 박근형. 1979. 한국산 차엽의 특수성분에 관한 연구. 한국농화학회지 22: 97-100.
- 김재생. 1986. 조직배양에 의한 국산차(차수)의 증식에 관한 연구. 한국임학회지 75: 25-31.
- 박인협. 1986. 백운산지역 천연림생태계의 삼림구조 및 물질생산에 관한 연구. 서울대 박사학위 논문. 48pp.
- 박인협, 김례화, 이선하. 1997. 야생 차나무 집단의 생태 및 잎의 형태적 특성. 한국차학회지 3. (인쇄중).
- 박인협, 이석면. 1990. 한국산 4개 지역형 소나무 천연림의 물질생산에 관한 연구. 한국임학회지 79(2): 196-204.
- 은종방, 이정석, 김동연. 1984. 한국 야생차의 유연성에 관한 연구. 한국임학회지 66: 54-63.
- 진현오, 이명중, 신영오, 김정제, 전상근. 1996. 삼림토양학. 향문사, 서울. 325pp.
- Day, F. P. and c. D. Monk. 1974. Vegetation patterns on a southern Appalachian watershed. Ecology 55(5): 1064-1074.
- Whittaker, R. H. 1962. Net production relations of shrubs in the Great Smoky Mountains. Ecology 43(3): 357-377.
- Whittaker, R. H. and P. L. Marks. 1975. Methods of assessing terrestrial productivity. Pages in H. Lieth and R. H. Whittaker, ed. Primary Productivity of the Biosphere. Springer-Verlag, New York.

### 제 4 장

- 신미경. 1984. Studies on the quality of Korean liquid green tea.



한양대대학교 대학원 학위논문 p.3-4.

김동연, 정지훈, 김관, 이종욱, 박근형. 1972. 한국산 녹차의 특수성분에 관한 연구. 한국농화학회지 22(2) : 97.

김종태. 1996. 차의 과학과 문화. 보림사 p. 15-66.

大石貞男. 1985. 茶 栽培全科. 農産漁村文化協會 p. 50-75

大石千八. 1988. 新茶業全書. 静岡縣 茶議會議所 p. 38-40, 471-508.

後藤哲久, 堀江秀樹, 向井俊傳. 1993. Analysis of major amino acid in green tea by High-Performance Liquid Chromatography coupled with OPA Precolumn derivatization. 茶研報 77:29-33.

袴田勝弘, 前原三利. 1978. Changes in total nitrogen, free-amino acid, caffeine and tannin of tea leaves with special reference to the development of new shoots. 茶業研究報告 48:57-62.

高柳博次. 1977. Relation between the contents of manganese and vitamin C in the leaves of shading tea field. 茶業技術研究 52:50-51.

池ヶ谷賢次郎, 高柳博次, 阿南豊正. 1990. 茶の分析法. 茶研報 71:43-74.

村松敬一郎. 1991. 茶の科學. 朝倉書店(日本) p. 32-40, 85-188.

中川致之, 阿南豊正, 石間紀男. 1981. 綠茶の 呈味成分の 綜合分析. 茶業試驗場研究 17:70.

小原哲二郎, 岩尾裕之. 1977. 食品工學 Hand book. 建泉社(東京) p.393.

Chun Ming Tsai, Iou Zen Chen. 1991. Effects of stem maturity on the cutting survival rate of "chin-shin Oolong" and "TTES NO. 12" tea plants. Taiwan tearesearch bulletin NO. 10:15~12.

## 제 5 장

Anan T. 1991. Clarification of changes in chemical components during development

- of tea shoots and manufacture of green tea. *Study of Tea*. 74: 25-30.
- Goto T., Hideyuki H., Ozeki Y., Masuda H. and Warashina J. 1994. Chemical composition of Japanese green teas on market. *Study of Tea* 80: 23-28.
- Horie H., Mukai T. and Goto T. 1993. Chemical composition of prized Japanese green tea in national tea competition. 2. Total nitrogen, free amino acids, tannin, caffeine and ascorbic acid in ordinary sen-cha, fukamushi sen-cha, mushisei tamaryoku-cha and kamairisei tamaryoku-cha. *Study of Tea* 77: 23-28.
- Ikeda N., Horie H., Mukai T., Goto T. 1993. Varietal difference of chemical constituents in the first and autumn flushes of tea plants. *Study of Tea* 77: 13-21.
- Ikegaya K., Takayanagi H. and Anan T. 1990. Quantitative analysis of tea constituents. *Study of Tea* 71: 43-74.
- Nagata T. and Sakai S. 1984. Differences in caffeine, flavanols and amino acids contents in leaves of cultivated species of *Camellia*. *Japan J. Breed.* 34: 459-467.
- Saijo R. 1980. Effect shade treatment on biosynthesis of catechins in tea plants. *Plant and Cell Physiol.* 21: 989-998.
- Yanase Y., Watanabe A. and Takeda Y. 1986. New registered tea cultivar "Meiryoku". *Bulletin of the National Research Institute of Tea* 22: 1-17.

## 제 6 장

- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- Chang, H.T. and Bartholomew, B. 1984. *Camellias*. B.T. Batsford, London.

- Demeke, T., Adams, R.P. and Chibbar, R. 1992. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA(RAPD): a case study in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 84: 990-994.
- Devos, K.M. and Gale, M.D. 1992. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 84: 567-572.
- Koller, B., Lehmann, A., McDermott, J.M. and Gessler, C. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 85: 901-904.
- Manly, B.F.J. 1986. *Multivariate statistical analysis: a primer*. Chapman and Hall, London, pp. 100-113.
- Mori, M., Hosaka, K., Umemura, Y. and Kaneda, C. 1993. Rapid identification of Japanese potato cultivars by RAPDs. *Jpn. J. Genet.* 68: 167-174.
- Rogers, J.S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. *Studies in genetics VII. Univ. Texas Publ.* 7213: 145-153.
- Stiles, J.I., Lemme, C., Sondur, S., Morshidi, M.B. and Manshardt, R. 1993. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 85: 697-701.
- Susan, E.W., Peter, G.I. and Robert, J.S. 1993. Random amplified polymorphic DNA(RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theor. Appl. Genet.* 86: 497-504.
- Tanksley, S.D. and Orton, T.J. 1983. *Isozymes in plant genetics and breeding*. Elsevier, Amsterdam.
- Welsh, J. and McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic

- markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Wrigley, C.W., Batey, I.L. and Skerritt, J.H. 1987. Complementing traditional methods of identifying cereal varieties with novel procedures. *Seed Sci. Technol.* 15: 679-688.
- Yang, X. and Quiros, C. 1993. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 86: 205-212.

## 제 7 장

- Blocks, A. D., J. Schell and M. V. Montagu (1985) Chloroplast transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.* 4: 1367-1372.
- Boynton, J. E., N. W. Gillham, E. H. Harris, J. P. Hosler, A. M. Johnson, A. R. Jones, B. L. R. Anderson, D. Robertson, T. M. Klein, K. B. Shark, J. C. Sanford (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240: 1534-1538.
- Chu, N. M., K. K. Tewari (1982) *Mol. Gen. Genet.* 208: 335-341.
- Koller, B., H. Delius (1980) *Mol. Gen. Genet.* 178: 261-269.
- Kolodner, R., K. K. Tewari (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 41-45.
- Medgyesy, P., Fejes, E. and Maliga, P. (1985) Interspecific chloroplast re-combination in a *Nicotiana* somatic hybrid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6960-6964.
- Ohyama, K., H. Fukuzawa, T. Koouchi, H. Shirai, S. Sano, K. Umesono, Y. Shiki, M. Takeuchi, Z. Chang, S. Aota, H. Inokuchi, H. Ozeju (1986) Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322: 572-574.
- Palmer, J. D. (1987) Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. *Am. Nat.* 130: S6-S29.

- Palmer, J. D., R. K. Jansen, H. J. Michaels, M. W. Chase, J. R. Manhart (1988)  
Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.*  
75: 1180-1206.
- 石田政弘 (1987) 「葉緑體の分子生物學」 東京大學出版會 pp. 25-26, 57-62.

## 제 8 장

- Erickson, J. M., M. Rahire and J. D. Rochaix. 1985. Herbicide resistnace and cross-resistance : changes at three distinct sites in the herbicide-binding protein. *Science* 228 : 204-207.
- Fluhr, R. and M. Edelman. 1981. Physical mapping of *Nicotiana tabaccum* chloroplast DNA. *Mol. Gen. Genet.* 181 : 484 - 490.
- Goloubinoff, P. and M. Edelman, R. B. Hallick. 1984. Chloroplast-coaded atrazine resistant in *Solanum nigrum* : *psbA* loci from susceptible and resistant biotypes are isogenic except for a single codon change. *Nucl. Acids Res.* 12: 117- 122.
- Hirai, A., T. Ishibashi, A. Morikami, N. Iwatuki, K. Shinozaki and M. Sugiura. 1985. Rice chloroplast DNA : a physical map amd the location of the genes for the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase and 32KD photosystem II reaction center protein. *Theor. Appl. Genet.* 70 :117- 122.
- Hirschberg, J. and L. McIntosh. 1983. Molecular basis of herbicide resistance in *Amaranthus hybridus*. *Science* 222 : 1346 - 1349.
- Katayama, K., T. Sasakuma and Y. Ogihara. 1991. Physical map of chloroplst DNA of the onion *Allium cepa* L., showing the location of photosynthesis-related genes. *Jpn. J. Genet.* 66 : 421 - 431.
- Ohyama, K., H. Fukuzawa, T. Kohchi, H. Shirai, T. Sano, K. Umesono, Y. Shiki,

- M. Takeuchi, Z. Chang, S. Aota, H. Inokuchi and H. Ozeki. 1986. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. Nature 322 : 572 - 574.
- Shinozaki, K., M. Ohme, M. Tanaka, T. Wakasugi, N. Hayashida, T. Natsubayshi, N. Zaita, J. Chunwonges, J. Obokata, K. Kamogashira, K. Yamada, J. Kusuda, F. Takaiwa, A. Kato, N. Tohdoh, H. Shimada and M. Sugiura 1986. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome : its gene organization and expression. EMBO J. 5 : 2043 - 2049.
- Spielamn, A., W. Ortiz and E. Stutz. 1983. The soybean chloroplast genome : construction of a circular restriction site map and location of DNA regions encoding the genes for rRNAs, the large subunit of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and the 32KD protein of the photosystem II reaction center. Mol. Gen. Genet. 190 : 5 - 12.

## 제 9 장

- Chlyah, H. (1974) Inter-tissue correlation in organ fragments. Organogenetic capacity of tissue excised from stem segments of *Torenia fournieri* Lind cultured seperately *in vitro*. Plant Physiol. 54: 341-348.
- Doi, Y.(1983a) Callus induction and root differentiation in stem and leaf segment cultures of tea plant . Study of Tea 57: 7-11.
- Doi, Y. (1983b) Varietal differences of callus induction rate and root differentiation rate in anther culture of tea. Study of Tea 57: 13-17.
- Kim, J. S. (1986) Studies on popagation of korean tea plant by tissue culture. Jour. Korean For. Soc. 75, 25-31.
- Kuranuki, Y. and M. Shibata (1992) Effects of concentrations of plant growth regula

- tors on the shoot apex culture of tea plants. Tea Research Journal 16: 1-6.
- Kuranuki, Y. and M. Shibata (1993) Improvement of medium components for *in vitro* cutting of tea plant, (2) Optimum concentration of plant growth regulator. Tea Research Journal 77: 47-55.
- Murashige, T and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco culture. Physiol. Plant 15, 473-497.
- Nakamura, Y. (1991) *In vitro* propagation techniques of tea plant. Tea Research Journal 74: 31-38.
- Nakamura, Y. K. Ohira, and K. Ojima (1984) Cultivation and characteristics of tea callus. Study of Tea 60: 7-14.
- Shibata, M. and Y. Kuranuki (1993) Improvement of medium components for *in vitro* cuttings of tea plant. (1) Effects of concentrations of some components of MS medium and comparison between MS medium and woody plant medium. Tea Research Journal 77: 39-45.

## 제 10 장

- Kato, M. 1985. Regeneration of plantlets from tea stem callus. Journ. J. Breed. 35: 317-322.
- Kato, M., N. Haruyama and S.Kako (1990) Somatic embryogenesis from leaf culture of plants. Japan J. Plant Breed. Letters 40: 4108-109.
- Kuranuki, Y. (1978) Effects of sucrose and growth substances concentration of medium on the formation of multicellular pollen grains in anther culture of tea plant. Study of Tea 48: 11-15.
- Kuranuki, Y. (1986) Effects of transplantation on division of pollen grains in anther culture of Tea Plant. Study of Tea 64: 7-10.

- Kuranuki, Y. and M. Shibata (1992) Effects of concentrations of plant growth regulators on the shoot apex culture of tea plants. *Tea Research Journal* 16: 1-6.
- Nakamura, Y. (1987) Shoot tip culture of tea cultivar Yabukita. *Study of Tea* 65: 1-7.
- Nakamura, Y. (1988) Efficient differentiation of adventitious embryos from cotyledone culture of *Camellia sinensis* and other *Camellia* species. *Tea Research Journal* 67:1-11.
- Nakamura, Y. (1990) Effects of sugars on the formation of adventitious buds and the growth of axillary buds in tissue cultures of tea. *Bull. Shizuoka Tea Exp. Stn.* 15: 1-5.
- Nakamura, Y. K. Ohira, and K. Ojima (1984) Cultivation and characteristics of tea callus. *Study of Tea* 60: 7-14.
- Nakamura, Y. and M. Shibata (1990) Micropropagation of tea plant(*Camellia sinensis*) through *in vitro* cuttings. *Tea Research Journal* 72: 9-17.