

최 종
연구보고서

자생붓꽃속 식물의 유전자원 수집 및
대량번식체계확립

Collection of Genetic Resources and
Development of Mass-propagation System in *Iris*.

연구기관
대구가톨릭대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “ 자생붓꽃속 식물의 유전자원 수집 및 대량번식체계 확립” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002년 11월 05일

주관연구기관명 : 대구 가톨릭 대학교

총괄연구책임자 : 고 재 철

협동연구책임자 : 상 채 규

연 구 원 : 홍 성 피

연 구 원 : 이 경 희

연 구 원 : 이 은 주

연 구 원 : 윤 인 경

연 구 원 : 이 지 명

요 약 문

I. 제 목

자생붓꽃속 식물 유전자원수집 및 대량번식 체계 확립

II. 연구개발의 목적 및 중요성

꽃전시회와 꽃박람회, 최근 생활수준의 향상에 따라 꽃전시회는 매년 크게 늘어나고 있다. 1인당 국민소득이 590달러 수준이었던 1975년 당시의 “꽃”이란 단어는 사치스런 일이었다고 1인당 꽃 소비액도 연간 190원 정도였었다. 25년이 지난 2001년의 1인당 국민소득은 9,800달러로 16배로 성장하였는데 꽃소비는 12000원 수준으로 63배로 급속하게 성장하고 있다. 꽃소비는 대중화되고 있으며 꽃은 이제 국민의 생활 필수품으로 정착되고 있다. 꽃 수요의 폭발적인 증가로 인하여 꽃은 우리나라 농산물 중에서도 가장 우수한 성장 품목으로 대두되고 있으며 내수 시장 뿐만 아니라 수출시장마저 더욱 확대되고 수출유망작목으로 정착되고 있다. 정부에서도 농가의 유망한 전략 산업으로 화훼산업을 내세우고 품질향상과 유통개선을 위하여 많은 자금지원과 다양한 지원시책을 펴고 있다.

소득향상에 따른 소비 증가와 화훼 품질향상을 위한 화훼농가와 정부의 노력에 힘입어 화훼산업은 다른 농업 부문의 침체 현상과는 달리 비약적인 발전을 거듭하고 있다. 도시의 거리마다 흔하게 보여지는 꽃전문점과 연중 수시로 개최되는 꽃전시회, 꽃연구회는 화훼산업 발전을 배경으로 하고 있다. 그러나 우리가 재배하고 소비하는 꽃은 우리꽃이 아닌 관엽, 장미, 백합, 난 등 외국꽃이 대부분을 차지하고 있다. 꽃소비가 늘어갈수록 수입종자나 수입 묘목값이 크게 늘고 있는 실정이다.

주요 선진국들은 일찍부터 종자, 종묘산업의 중요성을 인식하고 종합적인 농업유전체계를 구축하여 전세계적으로 광범위하게 식물유전자원을 수집하고 평가하면서 육종기술과 생물공학기법을 개발 활용하여 GMO등, 고품질의 품종을 육성하여 품종보호

권을 취득하고 대규모 자본과 선진경영기법으로 정비된 다국적 종자기업체를 중심으로 세계종자 시장을 장악하고 있다. 이들 기업은 세계각국에 산재해 있는 동식물의 개량종, 재래종, 근연종, 야생종, 미생물 및 DNA까지 확대 수집하여 조사하고 전산 자료화하여 품종육성의 개발 자료로 활용하고 있으며 육성된 품종은 신품종 육성자 권리보호제도를 통해 품종육성 비용 회수를 보장함으로써 민간의 품종개발 참여와 우량품종 개발에 전력을 투구하고 있는 실정이다.

우리나라는 농산물 유통자유화와 외국 기업의 국내 종자업체 인수합병으로 유용한 유전자원의 유출이 예상되고 있다. 정부나 민간에서는 국내 자생식물을 이용한 화훼와 관련된 품종육성에 대한 관심도가 높은 실정이나 국제 경쟁력이 있는 신품종 육성을 위한 연구는 외국 주요 화훼 선진국에 비해 화훼 육종의 경험과 기술에서 비교가 될 수 없는 미약한 실정이다. 화훼산업이 계속적으로 성장하여 당당한 수출산업으로 발전하기 위해서는 화훼산업의 기반이 단단하여야 하나 현상태에서는 너무나 기반이 취약하다. 국내 꽃 수요도 행사용 위주에서 벗어나 일상생활의 일부분으로 정착되어야 하며 절화, 분화, 심지어 취미재배 화훼류도 수입되는 구근과 종자 등으로 외국 꽃에 지나치게 의존되고 있다. 우리도 우리꽃의 품질개량과 신품종 육성으로 해외 수요를 자극할 수 있는 한국적인 꽃을 육성 개발 하여야겠다. 우리나라 전역에 분포되어 자생되고 있는 붓꽃, 꽃창포 등 붓꽃속 식물을 활용하여 분화, 절화 뿐만 아니라 붓꽃, 창포원을 대면적으로 조성하여 관광산업으로 추진할 필요가 있다. 우리나라에서 적응이 잘 되고 있는 자생 붓꽃 식물에 대한 수집, 선발과 대량번식 체계를 수립하여 신품종 육성에 관련된 기초연구를 수행 함은 아직 미 개발된 붓꽃 식물의 화훼화를 위한 첨단연구가 될 것이며 우량 신품종의 육성은 외국화종의 수입대체 상품으로의 계기가 될 것이다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 자생붓꽃속 식물의 유전자원 수집 및 특성조사

붓꽃속 식물 자생종은 96년부터 전국 각 지역의 산야지로부터 붓꽃, 꽃창포, 타래 붓꽃, 각시붓꽃, 노랑붓꽃, 금붓꽃, 노랑무늬붓꽃, 부채붓꽃, 대청부채 등 국내자생종과 노랑꽃창포 등 도입된 종들을 식물체나 종자로 수집하여 종별로 유지하고 있으

며 외국종은 외국종자회사를 통하여 식물체나 종자로 구입하여 계통별로 포장에서 재배되고 있으며 이들 재료에서 내한성이 강하고 품질이 우수한 개체를 선발하여 순계분리에 의해 새로운 품종의 육성이 가능할 것으로 예견되고 있으며 교배모본으로 활용하여 신품종을 육성코자하겠다.

국외로부터 수집된 종자는 파종 후 육묘하여 본답에 재배되고 있으며 식물체는 수집지역 및 종별로 구분하여 제 특성을 조사하고 교배는 지역별 고유형질을 유지코자 자가수정을 실시하고 선발된 계통별로 중간 교배를 실시하면 이들 조합에서 신품종의 출현이 기대되고 있다. 수집자원들의 특성조사는 수집지역별로 엽초장, 개화기, 화색, 내 외화피장, 삭과 무게 등을 조사하여 분석의 지표로 하였으며 요구에 따라 농민, 농가에 분양하여 농가 소득 증대에 이바지 할 수 있다.

2. RAPD를 이용한 유연관계 분석

붓꽃속 식물의 외부 형태적인 특성에 의한 분류, 이들 특성을 수리학적방법으로 분석된 결과는 종, 속간 교잡의 중요한 자료가 되고 있다. 종속간의 유전적 근연성의 분석은 분자유전학적 방법에서 DNA를 이용한 분석방법으로 접근할 수 있었다. RAPD에 의해 밝혀진 DNA maker들은 유전자원 자료로 종의 유출 방지와 활용에 이용될 것으로 판단된다.

3. 안정적 생산을 위한 발아율 증진

자생붓꽃은 4-5월에 개화하여 여름부터 가을에 걸쳐 완숙되나 외관상 이상이 없는 충실한 종자도 일반적으로 발아력이 극히 낮으며 채종 직후 파종해도 년내에 일부가 발아하나 대부분 다음해 발아하는 관계로 발아가 완료되는 기간은 수년이 소요된다. 더구나 발아후 실생개체가 성숙하여 개화결실까지는 2-3년 이상이 소요되고 있어 붓꽃 개량에 큰 장애가 되고 있다. 효율적인 생산과 육종을 수행하기 위해서는 발아율과 발아세를 향상시켜 둘 필요가 있으며 종자의 발아율을 촉진시키는 방법으로 온도, 광, 종피제거, 화학약품처리 등을 실시하여 시험을 수행하였으며 발아율 향상 방법의 개선으로 연내 발아율을 높일 수 있다.

4. 배수체 작성

자생붓꽃 속 식물은 국내에 13종이 분포하고 있으며 2배체로 생육되고 있다. 이들의 염색체를 배가시켜 배수체를 만들어 2배체의 단점을 보완하고 배수체의 장점을 살려 관상가치가 높은 우량한 신품종의 육성이 가능하며 배수체를 작성시키는 antimitotic agent로 colchicine이 가장 보편적으로 사용되고 있으나 독성이 강하여 인체에 유해하고 작물에서 비정상적인 생장을 보인 경우가 있어 최근에는 제초제 계통의 oryzalin과 caffein등이 배수체 작성 물질로 이용되고 있다. 본연구는 매우 낮은 농도에서도 높은 효과를 나타내고 있는 이들 약제와 colchicine을 사용하여 배수체 식물 획득 방법을 구명하고자 한다.

5. r선 처리 적정 선량 구명

자연돌연변이에 의한 유용한 변이체 선발이 과수, 화훼 등에서 이용되고 있으나 변이율이 극히 낮은 관계로 인위적인 방법에 의한 수단으로 방사선, 화학약품 등을 사용하고 있다. 돌연변이율의 선량반응은 처리 1세대 (M_1)의 생존율이나 종자임성과 관계가 깊고 돌연변이 육종의 실제에서는 M_1 세대의 모든 장애 정도로부터 돌연변이율의 상한을 추정해 두는 것이 중요하다. 화훼류의 화색 돌연변이는 선량에 비례해서 돌연변이율이 증대하므로 M_1 세대 및 그 이후 세대에서 방사선 감수성에 미치는 영향과 돌연변이체 선발을 위해 r선을 붓꽃 식물 종자(붓꽃, 꽃창포, 타래붓꽃, 부채붓꽃)에 처리하여 M_1 세대 발아율과 고사율 등을 조사하고 M_1 세대 이후 유망개체를 선발코자 수행하였다.

6. 꽃창포 대량 번식기술 개발

꽃창포는 다년생 속근초로 분주에 의한 번식과 종자번식이 가능하다. F1 선발 개체와 개량된 꽃창포의 유전형질은 hetero 상태이므로 종자번식에서는 원래의 형질과 동일한 개체의 출현이 되지 않고 있어 동일 개체의 증식에는 자연적인 방법으로는 분주법이 유효하다. 그러나 분주에 의한 번식은 1년에 2-3개의 액아가 출현하므로 대량번식에는 다른 방법이 제시되어야한다. 조직배양은 기내에서 부정아와 캘러스를

통해서 대량증식이 가능하다.

7. 붓꽃 대량번식 기술개발

붓꽃종도 속근초로서 꽃창포와 같은 종자번식과 분주에 의한 번식이 가능하나 종자 번식에서는 동일개체의 출현이 되지 않고 있어 분주번식에 의존하고 있다. 특히 희귀종이나 F_1 의 경우에는 기내 조직배양으로 대량 증식 방법을 구명하여야 하며 본연구에서 치상조직, 절편체, 배지종류, 성장조절물질 종류 및 농도를 규명하여 대량증식에 최적조건을 제시하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 자생붓꽃 속 식물의 유전자원 수집 및 특성 조사

우리나라에서 자생하고 있는 붓꽃 속 식물 13종을 수집할 수 있었다. 이들은 붓꽃, 꽃창포, 부채붓꽃, 각시붓꽃, 금붓꽃, 노랑붓꽃, 노랑무늬붓꽃, 난장이붓꽃, 솔붓꽃, 타래붓꽃, 대청부채, 흰각시붓꽃, 넓은잎 각시붓꽃 등 이었으며 우리나라의 산야에 자연상태로 생육하고 있었다. 이전에는 산야에 자생하고 있는 것으로 알려진 제비붓꽃, 연미붓꽃은 더 탐색해 볼 필요가 있으며 재배종으로는 제비붓꽃, 연미붓꽃, 노랑꽃창포가 정착되고 있었다. 수집된 유전자원은 재배포장에서 유지보존되고 있어 유전자원으로서의 활용이 기대되고 있다. 이들 국내 수집 붓꽃들의 지역 수집종 중간 교잡 F_1 에서 단경이면서 화경이 크고 화색이 선명한 계통을 선발할 수 있었으며 교잡에 의해 우량계통을 선발할 수 있는 모본의 확보가 되고 있어 지속적인 품종육성이 손쉽게 이루어 질 수 있으며 연구자 및 생산자에게도 필요한 종의 분양이 쉽게 이루어 질 수 있다.

2. RAPD를 이용한 유연관계 분석

8개의 random primer를 이용하여 PCR을 한 결과 증폭된 band는 총 108개로 107개의 polymorphic band와 1개의 monomorphic band를 얻었다. 수집된 붓꽃의 dissimilarity coefficient는 평균 0.252로 나타났고 0.095에서 0.699사이의 다양한 dissimilarity coefficient를 보여 붓꽃의 유연관계 분석을 가능케 하였다. 유연관계는 phentree의 nearest neighbor 통계프로그램을 이용하여 3개의 군으로 분류되었다. I군은 *I. tectorum*, II군은 *I. odaesanensis* 가 속해 있었으며, III군은 *I. ensata*, *I. rossii*, *I. sanguinea*, *I. minatoaurea*가 속해 있었다. RAPD에 의해 밝혀진 DNA maker 등은 유전자원 자료로 이용되고 종의 유출 방지에 이용될 수 있다.

3. 안정적 생산을 위한 발아율 증진

붓꽃종자의 발아적온은 25°C이며 명, 암 조건에 큰 영향을 받지 않고 발아하며 저온이나 고온에서는 낮은 발아율을 나타내었다. 붓꽃 종자의 종피를 제거하거나 발아공 부분을 절제하여 발아시킨 결과 종피제거+발아공 절제 처리의 경우 발아율도 높았고 발아속도에서도 빠르게 나타났으며 파종후 20일째 86%의 발아율을 나타내었다. 붓꽃 종자 발아율 향상을 위해 NaOCl, H₂SO₄, KOH, HNO₃, Xylene, Kinetin 을 여러 농도로 처리한 결과 NaOCl 5% 5분 HNO₃ 0.5N 18시간 처리로 발아율이 증가하였으며 그 중에서 Xylene 처리 한 후 파종한 것으로 파종후 20일째 평균 83%의 높은 발아율을 나타내어 발아의 문제점을 해결할 수 있게 되었다. 발아율 향상 방법의 개선으로 F₁ 육종에서 단기간내 많은 개체를 확보할 수 있으며, 교배육종에서 미발아 개체의 수를 줄일 수 있어 육종 효율을 높일 수 있다.

4. 배수체 작성

Iris속 식물에서 인위적으로 염색체를 배가시키기 위해 배수체 작성 물질로 알려진 colchicine, oryzalin, caffein을 처리하여 얻은 결과는 다음과 같다. colchicine 처리에 의한 염색체 배가 효과를 구명하기 위해 부채붓꽃, 꽃창포, 붓꽃의 유묘에 100-1000ppm의 농도로 12-120시간 처리한 경우 부채붓꽃은 100ppm 농도로 12시간 처

리, 꽃창포는 500ppm 농도에서 48시간 처리, 붓꽃은 100ppm 농도로 72시간 처리시 4배체 획득 효율이 가장 높게 나타났고, 처리방법에 따른 염색체 배가 효과를 비교한 결과 0.7% 한천이 포함된 colchicine 고체배지에 처리했을 경우보다 colchicine 용액에 진탕처리 하였을 경우 효과적이었다. 저농도인 100-1000ppm에서 12-120시간 처리와 고농도인 1000-5000ppm에서 3-9시간 처리한 경우 colchicine의 배가효과는 고농도 단시간 처리에서 4배체 획득효율이 높게 나타났으며 신근의 형성과 발육도 양호하였다. oryzalin과 caffen처리에 의한 염색체 배가 효과는 붓꽃 종자 유도처리에서 oryzalin 농도 10-50ppm에서 농도 3~24시간, caffen 농도 1,000-10,000ppm에서 24~72 시간 처리한 결과 oryzalin의 경우 500ppm 농도에서 24시간 처리, caffen 300ppm 농도에서 48시간 처리에서 4배체 획득 효율이 가장 높았다. 근단세포 염색체를 조사한 결과 부채붓꽃은 2X=38, 4X=76, 붓꽃은 2X=28, 4X=56, 꽃창포는 2X=24인 것을 확인할수 있었다. 배수체, 이수체 개발로 인하여 신품종의 선발이 기대된다.

5. r선 처리 적정선량 구명

적량의 감마선을 붓꽃, 타래붓꽃, 꽃창포, 부채붓꽃의 건조종자에 0, 5, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 600Gy로 20시간 조사하여 발아율과 생존율을 조사하여 방사선 적정 처리 선량을 구명하였다. 공시된 붓꽃, 타래붓꽃, 꽃창포, 부채붓꽃의 r선 조사 적정량은 25-50Gy로 판단되었다. 변이체의 출현율이 낮은 붓꽃에서 적량의 r선 처리로 변이체 선발의 기초자료를 제공하며 다양한 특성의 변이체 선발이 기대된다.

6. 꽃창포 대량 번식체계 확립

Iris속 식물인 꽃창포의 번식 특성에서 종자의 잡종성과 연간 2-3개의 분얼로 인한 분주 번식의 어려움을 해결하고 고유한 품종의 특성을 유지하기 위해서는 조직배양을 통한 대량 번식의 체계가 필요하므로 Iris 속 식물의 화기부위 별 절편체를 이용하여 기내 번식에 의한 대량 증식방법을 정립하고자 본 실험을 수행하였다. 자생꽃창포의 화피기부조직, 자방, 소화경, 화경을 치상하여 기내배양환경에 적절한 환경을 구명하고자 조도 2000Lux에서 일장(0~24시간), 온도(10~30℃), sucrose(1~9%)

의 조건에서 배양하였다. 자생꽃창포의 화기 절편체로부터 유식물체 재분화에 적합한 일장은 16시간의 장일조건이, 온도 조건은 25℃에서, sucrose 농도는 3%에서 가장 적합한 것으로 나타났으며 특히 화기 부위 중 화피 기부조직과 지방 배양에서 높은 신초 형성을 보였다. 화기조직 치상절편체로부터 부정근의 분화는 암상태에서 촉진되어지고 sucrose는 6%에서 뿌리를 성장시키며, 10℃, 15℃의 저온에서는 신초, 뿌리의 분화가 저조하였다. 따라서 농가에서도 분주번식의 문제점을 손쉽게 조직배양으로 시도하여 단기간에 대량 생산할 수 있도록 하였다.

7. 붓꽃의 대량번식 체계 확립

붓꽃(*Iris sanguinea*)의 기내 번식에 의한 대량 증식 방법을 구명하고자 성장점을 재료로 하여 식물체 분화에 알맞은 NAA 0, 0.5, 1.0, 2.0 mg · L⁻¹, BA 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg · L⁻¹, 2,4-D 1.0, 3.0, 5.0 mg · L⁻¹로 혼용하여 MS배지를 기본 배지로 하여 실험을 수행하였다.

붓꽃의 성장점을 치상한 조직배양에서 조직으로부터 직접적인 부정아의 형성은 나타나지 않았으며 callus로부터 부정배의 유도, 재분화 식물체의 방법이 효과적이었으며 callus 유도에는 2,4-D 3 mg · L⁻¹ + BA 5 mg · L⁻¹의 조합에서 callus 형성이 90%이상 나타났으며 callus로부터 식물체 재분화에는 BA 1.0 mg · L⁻¹의 단용이 효과적이었다. 따라서 붓꽃속 식물에서 붓꽃의 대량증식을 위해서는 callus 유도에 의한 증식이 유용한 것으로 판단되어 농가에서 대량증식 할 수 있는 방법을 제시 할 수 있었다.

SUMMARY

1. Collection and Characteristics of Genetic Resources of *Iris* spp.

This study were carried out to develop wild native *Iris* spp. in Korea to an flowering plant. Native *Iris* spp. was located of all area in Korea, and it was collected thirteen species at 60 local area.

Thirteen species was *Iris sanguinea*, *I. minutoaruea*, *I. Koreana*, *I. odaesanensis*, *I. rossii*, *I. setosa*, *I. ensata*, *I. lactea*, *I. ruthenica*, *I. uniflora*, *I. dichotoma*, *I. tectorum*, *I. laevigata*, Foreign wild type species collected at 21 species from German Jellito seed company. F₁ hybrid were selected at crossing some lines at native *Iris sanguinea*, F₁ lines have been characters of loading resistance, dwarf, large flower diameter, clearness flower color were selected.

2. Analysis of Genetic Relationships by RAPD.

The period of flowering was very different patterns among 9 species of *Iris* from April 22th to May 17th. The flower stalk was fluctuated 9.0cm (*I. rossii*) to 104.0cm (*I. ensata*). *I. ensata* has the largest flower size and followed by *I. laevigata*, *I. tectorum*, *I. sanguinea*, *I. pseudacorus*, *I. lactea*, *I. rossii*, *I. minutoaurea*, *I. odaesanensis*.

Among the 108 amplified bands by PCR with 8 random primers, 107 showed polymorphism and only one showed monomorphism among 9 species of *Iris*. The average dissimilarity coefficient among 9 species of *Iris* was 0.252. The range of dissimilarity coefficient was shown as from 0.095

to 0.699. From the analysis of nearest neighbor program among 9 species of *Iris*. They were divided into three group. The first group was *I. tectorum* and the second group was *I. lactea*, *I. laevigata*, *I. pseudacorus*, *I. odaesanensis*, *I. ensata*, *I. rossii*, *I. sanguinea*, *I. minutoaurea* were belong to group three.

3. Improvement of seed Germination

The optimum temperature for seed germination of *Iris sanguinea* was 25°C regardless of light and dark condition. Removing testa and excising micropyle resulted in apparent promotion in germination by 86% at 20 days after sowing. KOH, H₂SO₄ and Kinetin enhanced germination a little but NaOCl 5% for 5 minutes and HNO₃ 0.5N for 18 hours treatments improved the seed germination. Xylene treatment was most effective for germination than any other chemical treatment. The effect of treatment with xylene showed the same degree as the testa removing treatment. The most powerful treatment was 5 minutes washing by xylene which brought about germination rate 83% days after sowing.

4. Chromosome Doubling in *Iris* spp.

To clarify the effect of colchicine, from 100 to 1000mg · L⁻¹ of colchicine was treated on the seedling of *I. setosa*, *I. ensata* and *I. sanguinea* for 12 to 120hours. In *I. setosa*, doubling of somatic chromosome was enhanced by 100mg · L⁻¹ of colchicine for 12hours, 500 mg · L⁻¹ for 48hours in *I. ensata*, and 100mg · L⁻¹ for 72hours in *I. sanguinea*. The doubling was enhanced on the shaking treated with colchicine solution than by the colchicine media containing 0.7% agar.

High concentration(1,000~5,000mg · L⁻¹) and short treatment period(3~9hours) was more effective on tetraploid plant rate than low concentration(100~1,000mg · L⁻¹) and long treatment period(12~120hours), and also more effective on new root formation and growth. To clarify the effect of oryzalin and caffeine, from 10 to 500mg · L⁻¹ of oryzalin, and 3000 to 10000mg · L⁻¹ of caffeine was treated on the seedling of *I. sanguinea* for 3 to 24hours and 24 to 72hours. The oryzalin was effective at 500mg · L⁻¹ and 24hours treatment and at 3000 mg · L⁻¹ and 48hours in caffeine. The cytogenetic examination of root tip cells of the showed that *I. setosa* revealed somatic chromosome number of 2x=38, 4x=76, *I. sanguinea* revealed somatic chromosome number of 2x=28, 4x=56 and *I. ensata* revealed somatic chromosome number of 2x=24.

5. Mutation Induced by Seed Radiation with Gamma-rays.

This study was conducted to determine the effect of low dose Gamma-rays irradiation in *Iris sanguinea*, *I. lactea*, *I. ensata*, *I. setosa*. The germination rate, plant height were observed from plants grown with *Iris* spp. Seeds irradiation with various low dose of Gamma-rays, *Iris sanguinea* germination rate of Gamma irradiation 5, 25, 50Gy was 77%, 67%, 69% much heigher than 63% of the control but survival rate much lower than that of the control, In case of *I. lactea*, *I. ensata*, *I. setosa* was some aspect on the germination and survival rate, however those radiated with 100~600Gy died thereafter germination.

The result suggested that a gamma radiation dose of 25~50Gy to *Iris*

spp. seed was effective enough to survival rate.

6. Techniacal Development for Mass propagation of *Iris ensata*.

Explants of perianth, ovary, pedicel and peduncle of *Iris ensata* were cultured at different light time(from 0 to 24h), different temperatures(from 10 to 30°C) and sucrose concentrations(from 1 to 9%) in MS medium.

Formation of adventitious roots from explants of *Iris ensata* was effective in the dark, while that of shoots was effective in the light. The optimum time of day length in young plant regeneration was 16h. The optimum concentrations of sucrose for shoots and roots formation *Iris ensata* explants were 3 and 6% respectively. The optimum temperature of for shoots formation of *Iris ensata* explants were 25°C, while the formations at 10 and 25°C were ineffective.

In the *Iris ensata* treated with 1~3 mg · L⁻¹ BA/5 mg · L⁻¹ NAA complex the shoot formation through explants, and the multiple shoots in perianth and pedicel showed At 0.1 mg · L⁻¹ BA and 1~5 mg · L⁻¹ NAA, formation of adventitious roots in *Iris ensata* was effective.

7. Technical Development for Mass propagation of *Iris sanguinea*

This studies were carried out to investigate the suitable media, Kinds and concentration of plants growth regulators for establishing mass propagation system using *in virto* culture of rare wild plant, *Iris sanguinea* by shoot-apex explant.

Induce of shoot were cultured on MS media contaning NAA 0.5, 1.0, 2.0 mg · L⁻¹, BA 0.1, 0.3, 0.5 mg · L⁻¹. Induce of callus were cultured on MS

media containing 2,4-D 1.0, 3.0, 5.0 mg · L⁻¹, and BA 1.0, 3.0, 5.0 mg · L⁻¹. Multiple shoots and leaves were induced 2.0 ± 0.9ea. on NAA 1mg · L⁻¹, BA 1mg · L⁻¹, calli were combinations of 2,4-D 5mg · L⁻¹, BA 3mg · L⁻¹. The best formation of shoot from callus in *Iris sanguinea* showed low concentration of BA 1.0 mg · L⁻¹, the regeneration of explant from the callus was ineffective,

CONTENTS

Heading / 1

Summary in Korean / 2

Summary in English / 10

Contents / 17

Text / 19

Chapter 1. Introduction / 19

section 1. Background of Research / 19

Section 2. Research Objective and importance / 20

Section 3. Research content and category / 22

Chapter 2. Collection and Charecteristics of Genetic Resource of

Iris spp. / 25

section 1. Introduction / 25

section 2. Meterial and Methods / 26

section 3. Results and Discussion / 27

section 4. conclusion / 35

Chapter 3. Anarysis of Gentic Relationships by RAPD / 41

section 1. Introduction / 41

section 2. Meterial and Methods / 42

section 3. Results and Discussion / 44

section 4. conclusion / 55

Chapter 4. Improvement of Seed Germimation / 56

section 1. Introduction / 56

section 2. Meterial and Methods / 56

section 3. Results and Discussion / 59

section 4. conclusion / 71

Chapter 5. Chromosome Doubling in *Iris spp.* / 76

section 1. Introduction / 76

section 2. Material and Methods / 77

section 3. Results and Discussion / 80

section 4. conclusion / 100

**Chapter 6. Mutation Induced by Seed Radiation with
Gamma-rays / 102**

section 1. Introduction / 102

section 2. Material and Methods / 103

section 3. Results and Discussion / 103

section 4. conclusion / 106

**Chapter 7. Technical Development for Mass propagation of *Iris
ensata* / 107**

section 1. Introduction / 107

section 2. Material and Methods / 108

section 3. Results and Discussion / 109

section 4. conclusion / 123

**Chapter 8. Technical Development for Mass propagation of *Iris
sanguinea* / 124**

section 1. Introduction / 124

section 2. Material and Methods / 124

section 3. Results and Discussion / 125

section 4. conclusion / 132

References / 133

목 차

제출문 / 1

요약문 / 2

영문요약문 / 10

목차 / 17

본문 / 19

제 1 장 서론 / 19

제1절 연구배경 / 19

제2절 연구개발의 목적 및 중요성 / 20

제3절 연구개발의 내용 및 범위 / 22

제 2 장 자생붓꽃속 식물의 유전자원 탐색, 수집 및 특성조사 / 25

제1절 서론 / 25

제2절 재료 및 방법 / 26

제3절 결과 및 고찰 / 27

제4절 결론 / 35

제 3 장 RAPD분석 / 41

제1절 서론 / 41

제2절 재료 및 방법 / 42

제3절 결과 및 고찰 / 44

제4절 결론 / 55

제 4 장 종자 발아율 증진 연구 / 56

제1절 서론 / 56

제2절 재료 및 방법 / 56

제3절 결과 및 고찰 / 59

제4절 결론 / 71

제 5 장 배수체 작성 / 76

제1절 서론 / 76

제2절 재료 및 방법 / 77

제3절 결과 및 고찰 / 80

제4절 결론 / 100

제 6 장 r선 처리 적정 선량 구명 / 102

제1절 서론 / 102

제2절 재료 및 방법 / 103

제3절 결과 및 고찰 / 103

제4절 결론 / 106

제 7 장 꽃창포 대량번식 기술개발 / 107

제1절 서론 / 107

제2절 재료 및 방법 / 108

제3절 결과 및 고찰 / 109

제4절 결론 / 123

제 8 장 자생붓꽃 대량번식 기술개발 / 124

제1절 서론 / 124

제2절 재료 및 방법 / 124

제3절 결과 및 고찰 / 125

제4절 결론 / 132

참고문헌 / 133

제 1 장 서 론

제 1절 연구 배경

WTO 체제에서 모든 농산물의 수입이 자유화 되면서 국내 농업 생산은 크게 감소 되었고 농업분야로 새로운 투자가 유치되는 장점이 크게 감소되어 가고 있다. 그러나 국가와 사회에 필요한 농업을 유지 발전 시키기 위해서는 지금까지 이룩해 놓은 농업분야의 선진화된 기술 자원을 적재적소에 활용하여야 할 것이다. 선진국은 농업분야에서도 부가가치가 높은 분야로 다양하게 다방면으로 기술개발이 이루어져 오고 있다. 세계의 주요 선진국들은 축적된 농업 기술과 최근의 정보를 기반으로 유전자원의 중요성을 인식하고 전세계의 식물 유전자원뿐만 아니라 미생물까지 수집하여 조사와 평가를 실시하고 전산자료화 하여 현재와 미래 산업을 대비하고 있는 실정이다. 특히 다국적 종자 기업은 이들 유전자원의 특성을 활용하여 육종기술과 생명공학 기법을 적극 개발하고 있으며 GMO 등을 육성개발하여 품종 보호권리제도를 정착시키고 아울러 신품종 육성자 권리보호 제도를 정착시키고 이같은 신품종 육성자 권리보호 제도를 통해 품종육성 비용회수를 보장 함으로써 다국적 기업과 민간의 품종 개발 참여로 신품종 개발에 전력을 집중하고 있다.

우리나라는 현재 농산물 유통자유화와 외국기업의 국내종자업체 인수 합병으로 유전자원의 유출이 예상되고 있으며, 국내 자생식물을 이용한 화훼와 관련된 품종육성에 대한 관심도는 높은 편이나 국제 경쟁력이 있는 신품종 육성을 위한 연구는 외국 주요 화훼 선진국에 비해 화훼육종의 경험과 기술에서 비교가 될 수 없는 미약한 실정이다. 붓꽃(IRIS)식물은 속근초로써 우리나라 전역에 붓꽃, 창포, 꽃창포 등으로 13종이 자생하고 있으며, 꽃창포는 예로부터 약용, 화훼용으로 이용하여 왔으며, 한국 특산 식물로는 노랑붓꽃(*Iris koreana*), 노랑무늬붓꽃(*Iris odaesanensis*), 흰각시붓꽃(*Iris rossii*), 넓은잎 각시붓꽃(*Iris rossi* var. *latifolia*) 등이 있으며 그 분포지역이 한정되어 있고, 자생개체수가 적고 채취가 금지되어 있어 보급을 위해서는 번식체계가 필요하다. (심.1988)

붓꽃의 뿌리는 한방에서 약용으로 사용되어 왔으며, 꽃은 절화로, 잎은 녹색의 직립형으로 관상 가치가 높아 이들 종들은 도로, 공원, 정원 등의 조경용으로 활용 가치가 우수하다. 야생하는 꽃창포는 습지나 건조지, 평지나 산간지 등 재배지역이 광범위하며 절화나 분화용으로 이용되고 있어 연구 가치가 매우 높은 자생종이다.

붓꽃식물은 원예적 가치가 우수하여 세계적으로도 개발이 활발하여 저먼 아이리스는 속근초로 유럽 및 미국의 정원, 공원에 재식되어 5월 개화하여 화려한 꽃색은 도시공간을 아름답게 하며, 재배역사는 길지만 본격적인 개량은 19세기 이후부터 시작되었다. (레몬 1940: 마이겔 포스타 1830-1907) 일본지역에서 자생하는 붓꽃은 우리나라 자생종과 유사하나 그들은 일찍부터 야생의 꽃창포를 관상용으로 재배하였으며 야생종을 개량하여 분화, 절화용으로 활용하고 있으며 관상을 목적으로 한 꽃창포원은 전국각지에 다양하게 대면적으로 조성하여 관광산업으로 활용하고 있다. (1984. 조일 원예백과) 우리나라에서도 붓꽃에 대한 연구는 자생지 분포, 분류에 관한 연구(심, 1988) 등이 보고된 바 있으나 자생식물을 이용한 수집선발, 대량번식체계 및 신품종 육성에 관한 연구는 없는 실정이다. 따라서 자생종에 대한 수집선발 및 신품종 육성에 대한 기초 연구는 미개발된 자생붓꽃식물의 화훼화를 위한 첨단연구가 될 것이다.

제 2절 연구개발의 목적 및 중요성

꽃전시회와 꽃박람회, 최근 생활수준의 향상에 따라 꽃전시회는 매년 크게 늘어나고 있다. 1인당 국민소득이 590달러 수준이었던 1975년 당시의 “꽃”이란 단어는 사치스런 일이었고 2001년의 1인당 국민소득은 9,800달러로 16배로 성장하였는데 꽃소비는 12000원 수준으로 63배로 급속하게 성장하고 있다. 꽃소비는 대중화되고 있으며 꽃은 이제 국민의 생활 필수품으로 정착되고 있다. 꽃 수요의 폭발적인 증가로 인하여 꽃은 우리나라 농산물 중에서도 가장 우수한 성장 품목으로 대두되고 있으며 내수 시장 뿐만 아니라 수출시장마저 더욱 확대되고 수출유망작목으로 정착되고 있다. 정부에서도 농가의 유망한 전략 산업으로 화훼산업을 내세우고 품질향상과 유통개선을 위하여 많은 자금지원과 다양한 지원시책을 펴고 있다.

소득향상에 따른 소비 증가와 화훼 품질향상을 위한 화훼농가와 정부의 노력에 힘

입어 화훼산업은 다른 농업 부문의 침체 현상과는 달리 비약적인 발전을 거듭하고 있다. 도시의 거리마다 흔하게 보여지는 꽃전문점과 연중 수시로 개최되는 꽃전시회, 꽃연구회는 화훼산업 발전을 배경으로 하고 있다. 그러나 우리가 재배하고 소비하는 꽃은 우리꽃이 아닌 관엽, 장미, 백합, 난 등 외국꽃이 대부분을 차지하고 있다. 꽃소비가 늘어갈수록 수입종자나 수입 묘목값이 크게 늘고 있는 실정이다.

주요 선진국들은 일찍부터 종자, 종묘산업의 중요성을 인식하고 종합적인 농업유전체계를 구축하여 전세계적으로 광범위하게 식물유전자원을 수집하고 평가하면서 육종기술과 생물공학기법을 개발 활용하여 GMO등, 고품질의 품종을 육성하여 품종보호권을 취득하고 대규모 자본과 선진경영기법으로 정비된 다국적 종자기업체를 중심으로 세계종자 시장을 장악하고 있다. 이들 기업은 세계각국에 산재해 있는 동식물의 개량종, 재래종, 근연종, 야생종, 미생물 및 DNA까지 확대 수집하여 조사하고 전산자료화하여 품종육성의 개발 자료로 활용하고 있으며 육성된 품종은 신품종 육성자 권리보호제도를 통해 품종육성 비용 회수를 보장함으로써 민간의 품종개발 참여와 우량품종 개발에 전력을 투구하고 있는 실정이다.

우리나라는 농산물 유통자유화와 외국 기업의 국내 종자업체 인수합병으로 유용한 유전자원의 유출이 예상되고 있다. 정부나 민간에서는 국내 자생식물을 이용한 화훼와 관련된 품종육성에 대한 관심도가 높은 실정이나 국제 경쟁력이 있는 신품종 육성을 위한 연구는 외국 주요 화훼 선진국에 비해 화훼 육종의 경험과 기술에서 비교가 될 수 없는 미약한 실정이다. 화훼산업이 계속적으로 성장하여 당당한 수출산업으로 발전하기 위해서는 화훼산업의 기반이 단단하여야 하나 현상태에서는 너무나 기반이 취약하다. 국내 꽃 수요도 행사용 위주에서 벗어나 일상생활의 일부분으로 정착되어야 하며 절화, 분화, 심지어 취미재배 화훼류도 수입되는 구근과 종자 등으로 외국 꽃에 지나치게 의존되고 있다. 우리도 우리꽃의 품질개량과 신품종 육성으로 해외 수요를 자극할 수 있는 한국적인 꽃을 육성 개발 하여야겠다. 우리나라 전역에 분포되어 자생되고 있는 붓꽃, 꽃창포 등 붓꽃속 식물을 활용하여 분화, 절화뿐만 아니라 붓꽃, 창포원을 대면적으로 조성하여 관광산업으로 추진할 필요가 있다. 우리나라에서 적응이 잘 되고 있는 자생 붓꽃 식물에 대한 수집, 선발과 대량번식 체계를 수립하여 신품종 육성에 관련된 기초연구를 수행 함은 아직 미 개발된 붓꽃 식물의 화훼화를 위한 첨단연구가 될 것이며 우량 신품종의 육성은 외국화종의

수입대체 상품으로의 계기가 될 것이다.

제 3절 연구개발의 내용 및 범위

1. 자생붓꽃속 식물의 유전자원 수집 및 특성조사

붓꽃속 식물 자생종은 96년부터 전국 각 지역의 산야지로부터 붓꽃, 꽃창포, 타래 붓꽃, 각시붓꽃, 노랑붓꽃, 금붓꽃, 노랑무늬붓꽃, 부채붓꽃, 대청부채 등 국내자생 종과 노랑꽃창포 등 도입된 종들을 식물체나 종자로 수집하여 종별로 유지하고 있으며 외국종은 외국종자회사를 통하여 식물체나 종자로 구입하여 계통별로 포장에서 재배되고 있으며 이들 재료에서 내한성이 강하고 품질이 우수한 개체를 선발하여 순계분리에 의해 새로운 품종의 육성이 가능할 것으로 예견되고 있으며 교배모본으로 활용하여 신품종을 육성코자하겠다.

국외로부터 수집된 종자는 파종 후 육묘하여 본답에 재배되고 있으며 식물체는 수집지역 및 종별로 구분하여 제 특성을 조사하고 교배는 지역별 고유형질을 유지코자 자가수정을 실시하고 선발된 계통별로 중간 교배를 실시하면 이들 조합에서 신육성종의 출현이 기대되고 있다. 수집자원들의 특성조사는 수집지역별로 엽초장, 개화기, 화색, 내외화피장, 삭과 무게 등을 조사하여 분석의 지표로 하였으며 요구에 따라 농민, 농가에 분양하여 농가 소득 증대에 이바지 할 수 있다.

2. RAPD를 이용한 유연관계 분석

붓꽃속 식물의 외부 형태적인 특성에 의한 분류, 이들 특성을 수리학적방법으로 분석된 결과는 종, 속간 교잡의 중요한 자료가 되고 있다. 종속간의 유전적 근연성의 분석은 분자유전학적 방법에서 DNA를 이용한 분석방법으로 접근할 수 있었다. RAPD에 의해 밝혀진 DNA maker들은 유전자원 자료로 종의 유출 방지와 활용에 이용될 것으로 판단된다.

3. 안정적 생산을 위한 발아율 증진

자생붓꽃은 4-5월에 개화하여 여름부터 가을에 걸쳐 완숙되나 외관상 이상이 없는 충실한 종자도 일반적으로 발아력이 극히 낮으며 채종 직후 파종해도 년내에 일부가 발아하나 대부분 다음해 발아하는 관계로 발아가 완료되는 기간은 수년이 소요된다. 더구나 발아후 실생개체가 성숙하여 개화결실까지는 2-3년 이상이 소요되고 있어 붓꽃 개량에 큰 장애가 되고 있다. 효율적인 생산과 육종을 수행하기 위해서는 발아율과 발아세를 향상시켜 둘 필요가 있으며 종자의 발아율을 촉진시키는 방법으로 온도, 광, 종피제거, 화학약품처리 등을 실시하여 시험을 수행하였으며 발아율 향상 방법의 개선으로 단기간내 발아율을 높일 수 있다.

4. 배수체 작성

자생붓꽃속 식물은 국내에 13종이 분포하고 있으며 2배체로 생육되고 있다. 이들의 염색체를 배가시켜 배수체를 만들어 2배체의 단점을 보완하고 배수체의 장점을 살려 관상가치가 높은 우량한 신품종의 육성이 가능하며 배수체를 작성시키는 antimitotic agent로 colchicine이 가장 보편적으로 사용되고 있으나 독성이 강하여 인체에 유해하고 작물에서 비정상적인 생장을 보인 경우가 있어 최근에는 제초제 계통의 oryzalin과 caffein등이 배수체 작성 물질로 이용되고 있다. 본연구는 매우 낮은 농도에서도 높은 효과를 나타내고 있는 이들 약제와 colchicine을 사용하여 배수체 식물 획득 방법을 구명하고자 한다.

5. r선 처리 적정 선량 구명

자연돌연변이에 의한 유용한 변이체 선발이 과수, 화훼 등에서 이용되고 있으나 변이율이 극히 낮은 관계로 인위적인 방법에 의한 수단으로 방사선, 화공약품 등을 사용하고 있다. 돌연변이율의 선량반응은 처리 1세대 (M_1)의 생존율이나 종자임성과 관계가 깊고 돌연변이 육종의 실체에서는 M_1 세대의 모든 장해 정도로부터 돌연변이율의 상한을 추정해 두는 것이 중요하다. 화훼류의 화색 돌연변이는 선량에 비례해서 돌연변이율이 증대하므로 M_1 세대 및 그 이후 세대에서 방사선 감수성에 미치는

영향과 돌연변이체 선발을 위해 r선을 붓꽃 식물 종자(붓꽃, 꽃창포, 타래붓꽃, 부채붓꽃)에 처리하여 M₁세대 발아율과 고사율 등을 조사하고 M₁세대 이후 유망개체를 선발코자 수행하였다.

6. 꽃창포 대량 번식기술 개발

꽃창포는 다년생 속근초로 분주에 의한 번식과 종자번식이 가능하다. F₁ 선발개체나 개량된 꽃창포의 유전형질은 hetero 상태이므로 종자번식에서는 원래의 형질과 동일한 개체의 출현이 되지 않고 있어 동일 개체의 증식에는 자연적인 방법으로는 분주법이 유효하다. 그러나 분주에 의한 번식은 1년에 2-3개의 액아가 출현하므로 대량번식에는 다른 방법이 제시되어야한다. 조직배양은 기내에서 부정아와 캘러스를 통해서 대량증식이 가능하다.

7. 붓꽃 대량번식 기술개발

붓꽃종도 속근초로서 꽃창포와 같은 종자번식과 분주에 의한 번식이 가능하나 종자 번식에서는 동일개체의 출현이 되지 않고 있어 분주번식에 의존하고 있다. 특히 희귀종이나 F₁의 경우에는 기내 조직배양으로 대량 증식 방법을 구명하여야 하며 본연구에서 치상조직, 절편체, 배지종류, 생장조절물질 종류 및 농도를 규명하여 대량증식에 최적조건을 제시하였다.

제 2 장 자생붓꽃속 식물의 유전자원 수집 및 특성조사

제1절 서 론

국제화시대 주요선진국들은 종자의 중요성을 인식하고 식물유전자원 수집에 대규모 자본을 투여하고 있으며 수집된 유전자원은 특성조사와 평가를 통하여 우수 품종개발에 정부 민간 기업이 적극 참여하고 있다. 개발된 신품종이나 유전자는 신품종 육성자 권리보호제도를 통해 법적보호를 받고 있으며, 한편 자국내의 유전자원은 수집 보존하면서 유용한 유전자는 특허화하며 종의 유출을 방지하고 있다. 우리나라는 4계절이 뚜렷하고 남북으로 길게 위치하며 대륙과 해안에 접하고 있어 식물자원의 유입이 유리하여 매우 많은 자생식물이 분포되고 있다. 최근에는 우리기후 풍토에 장기간 적응해 온 자생식물의 중요성을 인식하고 자생식물을 이용한 절화, 분화 조경용 식물의 요구가 높아지고 있어 자생식물의 수집과 더불어 자생식물의 개발이 시급한 문제로 대두되고 있으나 이에 대한 연구는 극히 미미한 실정이므로 더 많은 연구와 투자가 선행되어야 할 것이다.

우리나라에 분포되고 있는 많은 자생식물 중 붓꽃속 식물 (*Iris spp*)은 북반구의 온대 지역을 중심으로 자라고 있으며 우리나라에는 13종이 자생되고 있다.(Sim, 1998, 李 1977) 붓꽃(*Iris sanguinea*)은 한국, 일본, 시베리아 동부, 만주가 원산지이며 우리나라에서는 전국각지의 평지와 산간지에 분포한다. (李, 1980, 高 1991) 붓꽃은 산성토양에서 잘 자라며 양지 바르고 건조하지 않은 곳에서 자생하고 있다. 약간 습하게만 해주면 전국 어디서나 기르기가 쉽다. 붓꽃은 관상용, 약용으로 이용되는데 민간에서는 뿌리 줄기를 인후염, 안태, 주독 등의 약용으로 쓰이기도 한다. 꽃창포(*Iris ensata*)는 북반구 온대, 한국, 중국, 일본, 시베리아 원산지로 우리나라는 전국 각지에 분포하고 있으며 온도가 서늘한 중산간지에서 습기가 많은 습지에서 잘 자라고 관수를 알맞게 해주고 보수력이 있는 토양에서 좋은 생육을 한다(Chung

등 1993). 타래붓꽃은 한국, 중국이 원산지인 우리나라는 전국각지에 분포하고 있으며 평지에서 생육이 잘되며 뿌리는 직근으로 한발에 극히 강하며 절토지의 산사태가 우려되는 조경지피 식물 개발에 유효하다. 종자는 약재로 마린자로 불리며 인후염, 상처, 주독에 쓰이며 민간에서 뿌리 줄기를 열내림약, 만성위염, 황달 약으로도 쓰인다. 부채붓꽃은 한국, 일본, 중국에 분포하며 특히 우리나라 북부의 비교적 높은 산지의 습한 땅에서 잘 자라며 내한성과 내습성이 강하여 습지 조경식물로 유망하다. 뿌리줄기는 민간에서 설사약으로도 쓰이고 있다. 제비붓꽃은 한국, 중국, 러시아 일본이 원산지이며 우리나라는 산지나 들판의 습지에 생육이 잘 되고 있다. 그 외 우리나라에 자생하고있는 붓꽃속 식물은 등심붓꽃, 솔붓꽃, 난장이 붓꽃, 금붓꽃, 각시붓꽃, 노랑무늬 붓꽃, 노랑붓꽃 등이 있다. 본연구는 국내에 분포하고 있는 붓꽃속 식물을 지역별로 수집하여 재배하면서 각각의 형태적 특성 및 생육특성을 조사하여 유용유전자원으로 활용하여 종간, 종·속간 교잡, 배수체 작성, 변이체 선발 등의 방법을 적용하여 붓꽃속 식물 신품종을 육성하고자 한다..

제 2절 재료 및 방법

1. 국내의 붓꽃속 식물 유전자원 수집

붓꽃속 식물의 유전자원 탐색과 수집은 1995년도부터 시작하였으며 전국을 직접 답사하여 식물체와 종자를 수집하였다. 국내자생의 붓꽃속 식물은 지리산, 팔공산, 태백산, 주왕산, 변산반도, 남해안, 대청도 등지에서 수집하여 대구가톨릭대학교 실습포장에 이식재배한 다음 엽, 꽃, 종자에 대하여 개화가 된 종을 10개체씩 측정하여 형태적 특성을 조사하였다.

2. 국외 유전자원 수집

국외유전자원은 일본, 종자은행을 중심으로 주로 식물체와 종자로 수집하였다. 종자수집은 외국종자회사 jelitto를 통하여 수집하였으며 식물체는 일본에서 재배되고 있는 꽃창포 원예종을 수집하였고 몽골, 중국으로부터는 단간조생종과 조생 *sibirica*계통을 수집하였다.

3. 수집 자생붓꽃 교잡 F₁의 작성 및 생육 특성

국내에서 수집된 붓꽃종들을 화색, 초장 등으로 구분하였으며 봉화×김천의 수집종 교잡등 14 조합의 F₁ 종자를 확보하여 F₁을 재배하고 엽장, 개화기, 꽃의 크기, 삭과장, 종자 100립중 등을 조사하여 우량 개체 선발에 이용하였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. 국내수집 붓꽃속 식물의 분포 및 특성

국내 자생 붓꽃속 식물의 분포는 표1-1에서 보는 바와같이 붓꽃 (*Iris sanguinea*) 등 13종이 자생하고 있었으며 노랑꽃창포, 제비붓꽃, 연미붓꽃 등은 도입된 종으로 국내에 정착, 재배되고 있는 것으로 나타났다. 특히 한국특산 식물인 노랑꽃창포는 변산반도 주위에 집단으로 군락을 이루고 있으면서 보호 식물로 지정되어 생육되고 있었으며, 노랑무늬 붓꽃은 청송이북으로 태백산맥을 따라 반그늘 시원한 지역에 군락을 이루며 자생되고 있었다. 이전부터 도입품종으로 재배되고 있는 제비붓꽃, 노랑꽃창포, 연미붓꽃은 평지에서 재배종으로 재배되고 있는 것을 수집하였으며 산야에서 야생의 형태로는 발견되지 않았다. 국내에서 자생되고 있는 붓꽃속 식물은 표1-2에서와 같이 전국에서 수집되었으며 붓꽃은 우리나라 전역에서 표고가 낮은 평지에서 700-1,000m (강원도)의 산정에 까지 분포되어 생육하고 있었으며 주로 햇볕이 잘 들고 물빠짐이 좋은 개울가 주변의 사질토양에서 자생되고 있었으며 다년생 수림이 번무한 산림지에서는 대부분 생육이 빈약하고 개화가 불량하며 군락지가 보이지 않고 있으며 개체수가 소멸되어 가고 있었다. 자생꽃창포의 분포는 표고가 높은 산의 산정부근의 저습지나 중간 부위의 초원, 습지대에서 주로 자생되고 있었으며 산림하의 햇볕이 잘 드는 곳에서 분포하고 있었다. 특히 자생꽃창포는 한국, 일본, 중국 동북부 및 시베리아 지방의 산야의 초원이나 습지에서 잘 자란다고 보고하였으며 한국의 자생지는 제주도, 전남북, 경남북, 충남북, 강원 이북에서 백두산 일원의 습한 지역에 분포되어 있는 것으로 보고하였다.(심, 1988) 본 조사에서도 자생지의 환경은 표고가 높은 산정으로 햇볕이 잘 들고 습한 지대인 것으로 나타났으며 읍지에서는 발견이 되지 않은 것으로 보아 내습성과 내한성이 강한 양지식물로 판단되었다. 정(1993)은 꽃창포 자생지 환경 조사에서 토성은 pH 5.31 로 산성이며

유기물 함량은 평균 6.97%로 보통 보다 높고 P205은 80ppm, SiO2는 평균 102ppm 전 질소함량 0.41%인 토양에서 햇볕이 잘 드는 습지로 보고한 바있다.

표1-1. 국내자생붓꽃속 식물의 분포

Scientific Name	Korean Name	Locality of collection
Genus Iris		
Subsect Apogon		
Series Sibiricae		
<i>I. sanguinea</i> Donn ex. Horn	붓꽃	전국
<i>I. sibirica</i> L.	시베리아 붓꽃**	경기도
Series Laevigata		
<i>I. laevigata</i> Fish ex Turcz	제비붓꽃	도입
<i>I. pseudacorus</i> L.	노랑꽃창포**	전국(도입)
Series chinensis		
<i>I. minutoaurea</i> Makino	금붓꽃	전국
<i>I. koreana</i> Nakai	노랑붓꽃	변산반도
<i>I. odaesanesis</i> Y. Lee	노랑무늬붓꽃	충부지방
<i>I. rossii</i> Baker	각시붓꽃	전국
<i>I. rossii</i> Baker f. alba Y. Lee	흰각시붓꽃	남부지방
<i>I. rossii</i> Baker var. latifolia j. sim	넓은잎 각시붓꽃	전북
Series Tripetale		
<i>I. setosa</i> pall ex Link	부채붓꽃	삼척
Series Ensata		
<i>I. ensata</i> Thunb	꽃창포	전국
<i>I. lactea</i> Pall var. chinensis	타래붓꽃	전국
Series Ruthenicae		
<i>I. ruthenica</i> ker-Gawl	솔붓꽃	경기도
<i>I. uniflora</i> pall ex Link	난장이붓꽃	설악산
Subsect. evansia		
<i>I. tectorum</i> Maxim	연미붓꽃	도입
Subsect. pardanthopsis		
<i>I. dichotoma</i> pall	대청부채	대청도

(한국자생종, **국내재배종)

타래붓꽃의 자생지 분포는 우리나라 동서, 남해안 지대 및 내륙에서 자생되고 있으며 배수가 양호한 척박한 토양에서도 생육이 잘 되고 있다. 근년 수림아래의 음지에서 생육이 불량한 상태에 직면하고 있다. 부채붓꽃은 강원도 삼척에서 발견되어 자생되고 있음이 밝혀졌으며 습지에서 야생되면서 내한성이 극히 강하여 습지 재배식물로 이용에 효과가 있다. 대청부채는 우리나라 대청도에 자생하며 한국, 중국, 몽고, 시베리아가 원산지이다. 다년생으로 내한성이 강하며 척박한 토양에서 생육이 잘 되고 있다. 제비붓꽃, 노랑꽃창포, 연미붓꽃은 도입되어 국내 환경에 적응이 잘 되고 있으며 1950년 이전에는 제비붓꽃과 연미붓꽃은 자생되고 있는 것으로 기록되었으나. 최근에는 산야에서 발견의 유무를 확인할 수 없었다. 단간조생종으로 노랑무늬 붓꽃, 난장이 붓꽃, 금붓꽃, 노랑붓꽃, 각시 붓꽃, 슬붓꽃이 4-5월에 개화하고 있으며 유전자원으로서의 활용가치가 높은 것으로 생각되며 이식과 번식 및 생태적 특성을 조사하여 둘 필요가 있다.

자생꽃창포의 초장은 수집 지역에 따라 평균 70-82cm의 크기로 나타났으며 개화는 6월 초순에 피기 시작하여 7월 초순까지 개화하였으며 꽃은 외화피가 8-11cm의 크기로 타원형이며 중앙기부에 황색이 있는 적자색이고 내화피는 4-5cm 크기로 직립이며 종자 100 립중은 2-4g으로 나타났다.

2. 국외 유전자원 수집종의 생육특성

국외 종자회사로부터 수집된 붓꽃속 17종의 생육특성은 표 1-3 에서와 같다. 수집종은 독일붓꽃종, 노랑꽃창포, 붓꽃, 부채붓꽃, 꽃창포 등이었다. 엽초장은 32-120cm 로 나타났으며 부채붓꽃, 시비리카 계통은 내한성이 강한 단간 계통으로 나타났으며 꽃창포와 노랑꽃창포는 엽의 길이가 길게 나타났다. 화경장의 크기 분포는 평균 43-79cm 였으며 크기순으로는 노랑꽃창포 > 꽃창포 > 시비리카 > 부채붓꽃 > Suprica 구분되었다. 꽃이 피는 시기는 4월 23일 시작하여 6 월중순까지 계속되었으며 대부분 5월 초.중순에 개화기를 맞이 하였다. 화색은 보라, 진보라, 노랑, 청색 등으로 나타났으며 생육특성을 고려하여 교배모본으로 활용코자 한다.

3. 수집 자생붓꽃 교잡 F₁의 생육 특성

표 1-4은 붓꽃 교배종 14조합 교잡 F₁의 초장, 개화시기, 개화기간, 꽃의 크기, 삭과장, 등을 조사한 결과이다. 수집지역종간의 교잡 F₁의 초장은 조합에 따라 평균 52-73cm로 나타났으며 김천종×화령종 간의 F₁의 초장은 52cm로 가장 짧은 반면 봉화종×가야산 종의 F₁ 초장은 73cm로 가장 크게 나타났다. 특히 김천×화령 교잡 F₁은 단간이면서 엽이 직립으로 생육하였고 꽃의 직경이 크고 화색이 선명하여 화단용으로 유망시 되었다. 교잡 F₁의 꽃들은 타원형으로 크기가 비교적 큰 것으로 나타났으며 화색이 선명하여 F₁의 강세현상이 나타난 것으로 판단되었으며 세밀한 검토가 지속되어 년차간 지역간에서도 우수성을 조사코자 한다.

표1-2. 붓꽃속 식물 유전자원 국내외 수집

구분	수집지역
붓꽃 <i>Iris sanguinea</i> Donn ex Horn	지리산, 남덕유산, 청옥산(봉화), 속리산, 가야산, 비슬산(가창), 경주, 금원산, 병천(충남), 계룡산, 춘천, 지리산 백무동, 지리산 대성골, 지리산 칠불사, 성주, 영주(부석사), 치악산, 상주, 화령, 문경, 단양 <21>
꽃창포 <i>Iris ensata</i> Thunb.	청옥산(봉화), 태백산(고한), 지리산(벽소령), 예천상리, 내원산, 화왕산, 지리산(만복대), 팔공산, 주출산(문경), 천마산(경기), 채정산, 계룡산, 문암산(의성), 지리산(성삼재), 석시보(봉화), 수도산(무주), 소백산(서벽), 경기2(한택), 러시아2(종자은행), 기타2 <23>
타래붓꽃 <i>Iris pallasii</i> Fisch. var. chinensis	밀양, 영덕, 속리산, 칠곡, 거문도, 몽고, (종자은행) <6>
부채붓꽃 <i>Iris satosa</i> pall. ex Link	삼척, 러시아(종자은행) <2>
대청부채 <i>Iris dichotoma</i> pall	대청도, 몽고(종자은행), 대련 <3>
제비붓꽃 <i>Iris laevigata</i> Fish ex Turcz	도입종 <1>
노랑꽃창포 <i>Iris pseudacorus</i> L.	국내재배종 <3>
노랑무늬 붓꽃 <i>Iris odaesannensis</i> Y. Lee	노귀제 (청송), 팔공산, 천마산, 치악산 <4>
난장이붓꽃 <i>Iris uniflora</i> Pall	대덕산 (대구), 속리산, 설악산 <3>
금붓꽃 <i>Iris minutoaurea</i> Makino	비슬산, 속리산 <2>
연미붓꽃 <i>Iris tectorum</i> Maxim	재배종 <1>
노랑붓꽃 <i>Iris Koreana</i> Nakai.	변산반도 <1>
각시붓꽃 <i>Iris rossii</i> Baker	채정산, 서벽(봉화), 금성산(의성), 전국<5>
솔붓꽃(?) <i>Iris ruthenica</i> Ker-Gawl.	산정호수 <1>
도입종 및 기타	시베리아 6(종자은행), 도입꽃창포 원예종(다수), 외국도입종(jelitto 회사로부터 종자수입 25종), 몽골 도입 4종 (미상) <소계 25>

표 1-3. 자생붓꽃속 식물 수집종의 형태적 특성

2001

구 분	초장 (cm)	엽폭 (cm)	개화시 (월·일)	개화 기간 (일)	화색	외화피장 (cm)	삭과장 (cm)	100립중 (g)
붓꽃(지리산)	68.6±7.8	1.9±0.1	5.10	14	연보라	5.5±0.3	4.3±0.6	1.24
붓꽃(봉화)	68.1±4.7	1.9±0.3	5.10	14	연보라	5.9±0.3	4.7±0.3	1.61
붓꽃(속리산)	62.5±5.2	1.9±0.2	5.7	17	보라	5.8±0.2	4.5±0.3	1.55
붓꽃(화령)	76.7±4.2	2.2±0.1	5.6	13	보라	5.9±0.3	5.0±0.5	1.64
붓꽃(가창)	66.0±4.8	1.9±0.3	5.6	13	백	5.8±0.2	4.3±0.3	1.35
붓꽃(경주)	54.8±5.4	2.0±0.2	5.7	17	보라	6.1±0.3	4.2±0.3	1.43
붓꽃(김천)	51.6±6.3	2.2±0.3	5.10	16	백	5.8±0.3	4.8±0.5	1.32
붓꽃(덕유산)	70.3±10.5	1.4±0.3	5.11	20	보라	5.7±0.3	4.7±0.5	1.90
노랑꽃창포 (재배종)	86.0±2.4	2.2±0.3	5.13	17	노랑	6.5±0.4	5.5±0.6	3.72
타래붓꽃 (영덕)	80.9±12.6	1.0±0.2	4.25	24	연보라	7.0±0.2	7.8±0.3	3.96
붓꽃 (농업기술원)	51.9±5.9	1.1±0.1	5.11	17	보라	2.3±0.1	5.3±0.4	1.55
제비붓꽃 (도입종)	51.2±7.5	2.2±0.2	5.8	17	진보라	9.9±0.4	6.3±0.8	4.01
부채붓꽃 (삼척)	48.6±7.2	2.0±0.1	5.2	26	연보라	9.7±0.3	2.8±0.3	1.57
꽃창포(봉화)	77.6±14.8	1.3±0.3	6.9	20	적자	9.2±0.1	3.2±0.3	1.89
꽃창포(태백)	82.0±8.6	1.7±0.1	6.8	21	적자	8.3±0.2	3.3±0.5	3.76
꽃창포 (벽소령)	76.1±10.5	1.3±0.2	6.5	29	적자	8.9±0.7	3.0±0.4	3.77
꽃창포 (화왕산)	72.1±10.0	1.2±0.3	6.18	15	적자	10.7±0.6	3.2±0.4	2.95
꽃창포 (경주산내)	69.7±8.9	1.0±0.2	6.19	14	적자	9.0±0.9	3.7±0.4	2.05
노랑무늬붓꽃 (청송)	28.6±8.4	5.2±0.4	4.22	13	백	7.3±0.2	3.1±0.3	
타래붓꽃 (밀양)	61.4±10.2	0.9±0.2	5.17	18	연보라	6.0±0.2	5.8±0.5	3.75
난장이붓꽃 (속리산)	30.2±6.5	0.7±0.2	4.24	8	보라	5.7±0.2	0.6±0.2	
각시붓꽃 (경산)	28.0±3.2	0.5±0.1	4.22	12	보라	4.5±0.2	0.6±0.2	
금붓꽃 (속리산)	40.1±7.2	1.0±0.1	4.22	8	노랑	3.1±0.1	2.6±0.3	

표 1-4. 도입종의 생육특성

2001

구분	초장 (cm)	엽폭 (cm)	화경장 (cm)	개화시 (월·일)	개화 기간 (일)	화색	외화피장 (cm)	내화피 장 (cm)
<i>Iris barta</i> 'Germanica'	42.4±2.9	6.2±2.5	59.2	5. 2	23	진남	10.6±0.4	
<i>I. pseudacorus</i>	120.7±7.8	3.6±3.1	68.2	5. 4	19	노랑	7.3±0.5	1.4±0.1
<i>I. pseudacorus</i> 'alba'	64.4±6.9	2.8±6.4	75.7	5. 4	22	백	7.1±0.2	1.4±0.1
<i>I. pseudacorus</i> 'New Cultivers'	48.6±4.4	2.2±2.0	42.9	5.10	20	연노랑	5.8±0.1	1.1±0.1
<i>I. pseudocauca</i> -sica	86.8±3.8	4.8±1.5	79.2	5.15	17	노란보라	6.5±1.5	1.3±0.2
<i>I. sanguinea</i> 'Snow Qween'	52.0±3.8	1.8±0.9	53.2	5.10	15	연노랑	6.4±1.2	1.2±0.1
<i>I. setosa</i>	38.6±4.5	1.7±1.1	44.9	5. 5	11	진자주	7.1±0.8	1.0±0.5
<i>I. setosa</i> spp. <i>Cabadebsis</i>	43.3±3.5	2.7±1.2	48.4	5.12	19	자주	6.6±0.8	1.4±0.3
<i>I. sibirica</i>	41.4±2.1	0.9±0.1	75.3	5. 4	16	보라	3.6±0.4	0.7±0.1
<i>I. sibirica</i> 'New Hybrids'	38.2±2.9	1.2±0.5	79.2	4.29	16	진보라	7.0±0.5	1.3±0.2
<i>I. spuria</i>	66.0±2.5	1.8±0.8	77.1	5. 8	19	연보라	7.0±0.2	1.1±0.1
<i>I. spuria</i> 'Hybrids'	32.0±1.0	1.0±1.0	35.2	5.26	15	연미	5.4±0.3	1.0±0.1
<i>I. verisicolor</i>	61.6±3.6	2.6±1.1	63.6	5.12	17	진보라	6.2±0.3	1.4±0.5
<i>I. verisicolor</i> 'Kermesina'	42.8±2.5	0.9±0.1	59.2	5.12	16	붉은보라	5.9±0.8	2.1±0.5
<i>I. sanguinea</i> Rusia I	75.2±3.6	1.6±1.2	60.2	5.10	15	군청	6.4±0.7	1.3±0.2
<i>I. sanguinea</i> Rusia II	91.9±8.8	2.4±1.1	68.0	5. 9	11	연군청	6.3±0.6	
<i>I. sanguinea</i> Rusia III	85.8±7.1	1.5±2.1	72.0	4.23	8	군청	4.5±0.5	1.2±0.1

표 1-5. 붓꽃 종간교배 F1의 생육특성

2001

교배조합	초장 (cm)	엽폭 (cm)	개화시 (월·일)	개화 기간 (일)	외화피장 (cm)	내화피 장 (cm)	삭과장 (cm)	100립 중 (g)
붓꽃 봉화/ 흰붓꽃 김천	69.5±2.1	1.8±0.1	5. 9	17	5.7±0.1	4.5±0.2	5.2±0.5	1.68
붓꽃 봉화/ 흰붓꽃 가창	65.9±1.0	1.9±0.2	5. 2	24	5.4±0.4	4.6±0.7	5.6±0.4	2.08
붓꽃 봉화/ 붓꽃 가야산	72.9±7.8	1.9±0.2	5. 6	15	5.9±0.2	5.1±0.2	5.1±0.2	1.64
흰붓꽃 상주/ 붓꽃 화령	63.6±3.2	1.9±0.1	5. 6	19	5.8±0.4	5.2±0.4	5.4±0.5	2.16
흰붓꽃 김천/ 붓꽃 화령	51.6±3.6	1.5±0.3	5. 6	18	5.7±0.3	4.6±0.3	3.2±0.3	1.33
흰붓꽃 김천/ 흰붓꽃 가창	58.1±3.5	1.9±0.1	5. 4	17	5.1±0.2	4.4±0.5	3.7±0.4	1.54
흰붓꽃 김천/ 붓꽃 가야산	54.9±2.8	1.5±0.1	5.11	13	5.9±0.2	4.8±0.5	4.1±0.6	1.35
붓꽃 화양동/ 붓꽃 속리산	53.9±7.9	1.7±0.3	5.12	13	5.8±0.3	4.9±0.3	4.2±0.3	1.38
붓꽃 화양동/ 붓꽃 가창	58.4±4.7	1.8±0.3	5. 6	18	5.7±0.3	5.1±0.4	3.4±0.3	1.40
붓꽃 화양동/ 붓꽃 가야산	54.8±3.4	1.9±0.1	5. 7	16	6.0±0.4	5.3±0.3	4.4±0.3	1.53
붓꽃 속리산/ 흰붓꽃 가창	51.6±1.2	1.7±0.1	5. 4	20	5.8±0.2	5.2±0.3	4.0±0.4	1.72
붓꽃 속리산/ 붓꽃 가야산	55.6±6.6	1.7±0.1	5. 6	15	5.8±0.3	5.1±0.3	4.2±0.3	1.61
흰붓꽃 가창/ 붓꽃 가야산	61.0±6.7	1.6±0.1	5. 2	18	5.9±0.3	5.4±0.3	4.2±0.4	1.30
붓꽃 가야산/ 붓꽃 화양동	62.2±6.7	2.2±0.3	5. 4	17	5.9±0.2	5.2±0.3	4.1±0.3	1.55
흰붓꽃 김천	59.4±4.2	1.7±0.2	5.10	13	5.7±0.2	4.9±0.2	2.4±0.3	1.12
붓꽃 가야산	61.3±2.9	2.4±0.2	5.10	13	5.9±0.2	5.1±0.2	3.9±0.1	1.66

제 4절 결 론

붓꽃속 식물을 花卉로 육성하기 위하여 우리나라에 자생하고 있는 식물을 수집하여 형태적 특성을 조사한 결과는 다음과 같다. 우리나라에 자생하고 있는 붓꽃속 식물 13종을 전국 60여 지역에서 수집할 수 있었으며 붓꽃, 꽃창포, 부채붓꽃, 각시붓꽃, 금붓꽃, 노랑붓꽃, 노랑무늬붓꽃, 난장이붓꽃, 솔붓꽃, 타래붓꽃, 대청부채, 흰각시붓꽃, 넓은잎각시붓꽃은 한국내에서 산야에 자연상태로 생육하고 있었다. 1950년 이전에는 자생하고 있는 것으로 알려진 제비붓꽃은 더 조사해 볼 필요가 있으며 도입종인 노랑꽃창포, 연미붓꽃은 재배종으로 정착되고 있었다. 국외수집 붓꽃 유전자원은 내한성, 내습성 자원으로 유망시되며 신육성종을 개량하기 위한 유전자원으로 활용가치가 높을것으로 나타났다. 붓꽃 국내 수집지역 중간 교잡 F1에서 단간이면서 화경이 크고 화색이 선명한 계통을 선발하였으며 이들은 화단용 등으로 유망시되었으며 장간계통은 절화용으로 계속 검토코저 한다.

그림 1-1 국내 자생 붓꽃 수집종



흰 붓꽃 (경주, 상주)

Iris sanguinea Donn ex. Horn



제비붓꽃 (도입종)

Iris laevigata Fish ex Turcz



꽃창포 (전국)

Iris ensata Thunb



붓꽃 (전국)

Iris sanguinea Donn ex. Horn



부채붓꽃 (강원, 삼척)

Iris setosa pall ex Link



타래붓꽃 (경북, 영덕)

Iris lactea pall var. *chinensi*

그림 1-2 국내자생 붓꽃 수집종



금붓꽃 (대구, 비슬산)
Iris minutoaurea Makio



노랑무늬붓꽃 (경북, 청송)
Iris odaesanensis Y.Lee



노랑무늬붓꽃 (변산반도)
Iris koreana Nakai



각시붓꽃 (전국)
Iris rossii Baker



난장이붓꽃 (속리산)
Iris uniflora pall ex. Link



흰각시붓꽃 (의성)
Iris rossii Baker

그림 1-3 국내야생 붓꽃 수집종



노랑꽃창포 (경북, 재배종)
Iris pseudacorus L.



범부채 (지리산)
Belamcanda chinensis LEMAN



노랑꽃창포변이종 흰색 선발
<2002. 06, 경기>



대청부채 (대청도)
Iris dichotoma pall



부채붓꽃 (강원, 삼척)
Iris setosa pall ex Link



연미붓꽃 (경북, 재배종)
Iris tectorum Maxim

그림 1-4 수집 붓꽃식물 F₁



붓꽃 : 교잡 F₁



붓꽃 : 교잡 F₁



붓꽃 : 수집종 교잡



붓꽃 : 수집지역별 재배



꽃창포 : 교배후대계통분리



붓꽃 : r선 처리 M₁ 세대
타래붓꽃 : r선처리M₁

그림1-5 외국 도입종



도입종(교배모본)



도입종 개화기 4월4일



도입종: 독일붓꽃



도입종(교배모본)



도입종 :단간 (교배모본)



도입종 :3花 (교배모본)

제 3 장 RAPD를 이용한 유연관계 분석

제 1절 서론

붓꽃속 식물에 관한 연구는 형태적 특성(심, 1988) 붓꽃속 식물의 조직배양에 의한 증식(河賴, 1990) 기내배양을 통한 고품질 처리된 배의 복이배체 유발(Tsutomu 등 1985) 등에 대한 연구가 수행된 바 있다. 외국에선 조직배양을 통하여 대량생산으로 증식이 이루어지고 있으나, 자연 교잡에서는 종속간 교잡이 잘 되지 않는 것으로 나타났다으며, 종간의 유전적인 근연성에 대한 기초자료가 없으므로 인공교잡에 의한 종자의 채취에서 큰 어려움을 겪고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 분자유전학적 수준에서 붓꽃의 유전적 유연관계를 밝힐 수 있는 방법으로 최근 Polymerase Chain Reaction(PCR)법을 이용한 Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD)법이 적용되고 있다.

이는 인위적 무작위 primer와 열 저항성 DNA 중합효소를 처리하고 DNA의 denaturation, primer의 annealing과 중합 과정을 반복적으로 실시하여 염색체 내의 DNA의 특정 염기 부위를 증폭시키는 방법이다(Welsh 등 1990, Williams 등 1990). 증폭된 DNA 단편들의 다양성(Polymorphism)은 종의 분류와 유연관계(Karihaloo 1995) 유전자원평가, 외래유전자 도입확인(Welsh 등 1990) 집단유전학의 양적 형질 분석(Willoams 등 1990) 유용 유전형질을 탐지할 수 있는 표지인자 개발(Rowland 1994) 그리고 유전자 연관지도 작성(Chaparro 1994) 등에 이용되고 있다. RAPD법은 종간 또는 종내 분류에 있어서 각각의 종에서 보여지는 상동성과 재현성에 관한 문제점을 가지고는 있지만 적은 양의 염색체 DNA를 가지고도 많은 양의 DNA를 얻어낼 수 있고 시간이 적게 들며 경제적이라는 장점을 가지고 있다(Demere 1993) William(1990)등이 PCR법으로 DNA를 증폭했을 때 생성된 생성물들이 다양한 패턴을 보인다고 보고한 것을 시작으로 RAPD를 이용한 식물의 유연관계에 관한 연구가 국내에서도 오(1995) 등은 한국 자생 차나무의 RAPD-Maker 에 의한 유연관계를 분석하였고, 박(1996) 등은 RAPD방법을 이용한 구기자의 분류 및 동정을 연구하였으며,

1996년 이(1996) 등은 RAPD분석에 의한 무궁화 품종간의 유연관계 및 유전적 변이의 연구 등이 활발히 진행되고 있으나 화훼류, 특히 다년초에 관한 국내연구는 잘 찾아볼 수 없었다.

본 실험은 국내에서 자생되고 있는 붓꽃속 식물을 수집하여 형질적인 생육 특성을 조사하고 유전적인 다양성은 PCR법을 이용해서 밝히고 RAPD분석을 통하여 유전적인 근연성을 분류하여 새로운 품종을 육성하기 위한 기초자료로 활용하고자 수행되었다.

제 2절. 재료 및 방법

1. 공시재료

공시재료는 산야나 평지에서 자생되고 있는 붓꽃속 식물을 15개 장소에서 1996년, 1997년 수집하여 교내포장에서 재배하였다. 각 수집종의 형태적 생육 특성 조사는 4월부터 8월까지 1주일 간격으로 수행하였다. PCR에 사용된 DNA 추출 재료는 재식된 수집종에서 채취한 종자를 샐리에 파종하여 25℃ 항온기 내에서 발아된 유업을 사용하였다.

2. 붓꽃 DNA 분리

붓꽃의 DNA 분리는 Brunel 등의 방법을 변형하여 이용하였다. 유엽 1g을 채취하여 1.5ml microcentrifuge tube에 넣은 후 액체질소를 넣고 완전히 마쇄한 후 Extraction buffer(100mM Tris-HCl, PH 8.0, 50mM NaCl, 10mM β -mercaptoethanol) 450 μ l를 첨가하여 플라스틱 병으로 잘 분쇄하였다. 여기에 20% SDS 40 μ l를 넣은 후 65℃에서 10분간 반응 시킨 후 5M Potassium acetate 200 μ l를 넣고, -20℃에서 20분간 방치한 후 12,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취했다. RNA와 단백질 제거를 위해 RNase H 30unit를 원심분리한 상층액에 넣고 37℃에 20분간 반응시켜 식물세포의 RNA를 분해시킨 다음 phenol 3회, chloroform/isoamylalcohol(24:1,v/v)에 1회 정제하여 맑은층을 취한 후 isopropylalcohol을 첨가하여 DNA 침전을 유도하여 -20℃에서 30분이상 방치하였다. 12000rpm에 10분간 원심분리하여 pellet화된 DNA를 얻어 70% ethylalcohol에 1회 세척하고 상온에서 vacuum dry기로 건조시킨 후

이를 TE(10mM T-ris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA)에 녹여 PCR방법의 sample로 사용하였다.

3. PCR 방법을 이용한 DNA의 증폭

PCR 반응의 반응용액은 붓꽃의 total genomic DNA 2 μ l(500ng), primer 5 μ l, 2.5mM dntp 4 μ l, 10 \times PCR buffer 5 μ l, 2unit Taq polymerase 1 μ l(Promega Co. Ltd.)와 나머지는 살균수로 최종 Volume을 50 μ l가 되게 맞추었다. PCR 반응은 Perkim Elimer DNA thermal cycler 2400을 사용하였고, RAPD를 위한 최적의 PCR반응 조건은 pre-denaturation 94 $^{\circ}$ C 5분, 1 cycle 후, denaturarion 94 $^{\circ}$ C 1분, anealing 35 $^{\circ}$ C 2분, extension 72 $^{\circ}$ C 2분 30초로 40 cycle을 시행하였으며 post-extension은 72 $^{\circ}$ C 10분 조건으로 수행하였다. 증폭된 DNA는 EtBr 존재하에 1.2% Agarose gel에서 전기영동 한 후 반응물은 UV광선하에서 사진촬영을 하여 분석에 사용하였다.

4. Primer의 선발

PCR을 위하여 한국생공과 Operon Technoligise Inc.로부터 구입한 random primer decamer를 사용하였다. Primer selection (94 $^{\circ}$ C 5분 pre-denaturation, 94 $^{\circ}$ C 1분 denaturation, 35 $^{\circ}$ C 2분 anealing, 72 $^{\circ}$ C 2분 30초 extension 그리고 72 $^{\circ}$ C 10분 postextension)에 의하여 총 20개의 Primer들 중 polymorphism이 나타나지 않는 primer를 제외한 8종류의 Primer를 선발하였으며 각 Primer의 번호와 염기서열은 표 2-1와 같다.

5. RAPD 분석

RAPD 분석은 모든 붓꽃 수집종에 대하여 존재하는 band(positive)와 존재하지 않는 band(negative)로 구분하여 계산하였다. 수집종간의 dissimilarity(1-S_J)는 Jaccard coefficient [S_J=w/(w+x+y)] 를 기초로 하여, 두 수집종간(A,B)에 모두 Positive한 것을 W, A만 positive하고 B는 negative한 것을 x, A는 negative하고 B만 positive한 것을 y로 하였다. Dendrogram 작성을 위한 통계적 분석은 Dissimilarity matrix법에 기초한 Phentree의 nearest neighbor program을 사용하여 분석하였다.

Table 2-1. Random primers used in this experiment.

No. code	Sequence	T _m value (°C)	No. code	Sequence	T _m value (°C)
ope-01	CCCAAGGTCC	34	ope-11	GAGTCTCACG	32
ope-02	GGTGCGGGAA	34	ope-12	TTATCGCCCC	32
ope-03	CCAGATGCAC	32	ope-13	CCCATTCCGG	34
ope-04	GTGACATGCC	32	ope-14	TGCGGCTGAG	34
ope-05	TCAGGGAGGT	32	ope-15	ACGCACAACC	32
ope-06	AAGACCCCTC	32	ope-16	GGTGA CTGTG	32
ope-07	AGATGCAGCC	32	ope-17	CTACTGCAGA	32
ope-08	TCACCACGGT	32	ope-18	GGACTGCAGA	32
ope-09	CTTCACCCGA	32	ope-19	ACGGCGTATG	32
ope-10	CACCAGGTGA	32	ope-20	AACGGTGACC	32

제 3절 결과 및 고찰

1. 형태적 생육 특성

교내포장에 재배된 자생 붓꽃 수집종 중에서 꽃창포와 붓꽃 등 9종을 공시재료로 하여 개화일, 화경, 초폭, 엽장·폭, 삭과장·폭, 외화피와 내화피 장·폭, 화색에 대하여 조사하였다. 표 2-2에 나타난 바와 같이 개화시기는 *I. odaesanensis*(노랑무늬붓꽃)과 *I. minutoaurea*(금붓꽃)이 4월 22일 처음 개화하기 시작하였으며, 타래붓꽃은 5월 17일 개화하였다. 개화시기가 4월로 빠른 *I. odaesanensis*(노랑무늬붓꽃), *I. rossii*(각시붓꽃)과 *I. minutoaurea*(금붓꽃)은 다른종들에 비해 화경, 초폭, 엽장·폭, 삭과장·폭이 낮은 수치를 보였다. *I. easata*(꽃창포)의 경우 화경이 104.0cm로 가장 컸으며 화경 길이가 가장 작은 각시붓꽃 9.0cm와 매우 큰 차이를 보였다. 같은 종이라도 *I. easata*(꽃창포)의 자생지가 다른 태백산과 봉화 수집종의 생육 특성은 서로 달라 생육면에서도 차이를 보였다. 꽃의 형태는 외화피 3장과 내화피 3장으로 구분되며 꽃의 크기는 꽃창포가 가장 컸으며 제비붓꽃, 연미붓꽃, 붓꽃, 노랑꽃창

포, 타래붓꽃, 각시붓꽃, 금붓꽃, 노랑무늬붓꽃 순으로 나타났다. 형태적 생육특성을 분석한 결과 붓꽃속 식물은 대개 그 초형의 크기에 따라 꽃의 크기도 비례한다는 것을 알 수 있다.

2. RAPD 분석에 사용된 붓꽃 DNA와 Primer

수집된 붓꽃 16개의 total genomic DNA를 추출하여 전기영동으로 확인 후(그림 2-1) Primer의 종류별로 통일 조건하에서 PCR을 수행하여(그림 2-2) band의 다양성(polymorphism)을 나타내는 primer만을 선발하여 RAPD 분석에 사용하였다. 16종류의 사용된 붓꽃의 total genomic DNA 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 13과 15를 사용하였고(그림 2-1), Primer는 1~20중 2, 3, 4, 6, 7, 11, 12와 14를 선발하여 PCR 분석에 사용하였다. (그림 2-2) 본 실험에 사용된 8개의 다양성을 나타내는 Primer들의 평균 T_m 값은 32.5°C이었다.

PCR 방법을 이용한 DNA 단편의 증폭 과정 중에서 G+C의 함량이 DNA 증폭의 재리성을 높일 수 있는 결과를 가져올 수 있다고 알려져 있다(Fritsch 1993). 본 실험의 결과, 8종류에 대한 Primer의 G+C 함량은 모두 60%이상으로 비교적 높은 G+C 값을 나타내었다(표2-3)

Table 2-2. Morphological Characteristics of *Iris* spp.

Scientific name	Flowering (data)	Flower stalk (cm)	Plant width (cm)	Leaf		Capsule	
				length (cm)	width (cm)	length (cm)	width (cm)
<i>I. laevigata</i>	5.26	79.0	19.0	54.8	1.2	3.05	0.93
<i>I. ensata</i>	5.27	90.0	14.0	68.5	1.5	4.06	1.17
<i>I. tectorum</i>	5.26	75.0	27.0	43.0	1.1	3.61	0.80
<i>I. pseudacorus</i>	5.18	74.0	38.0	82.3	2.7	5.38	1.88
<i>I. ensata</i>	5.25	104.0	27.0	93.5	1.6	3.02	1.16
<i>I. lactea</i>	5.17	38.0	12.0	61.4	0.9	5.81	0.68
<i>I. sanguinea</i>	5.22	82.0	14.0	52.8	0.5	4.55	1.32
<i>I. odaesanensis</i>	4.22	9.3	5.0	28.6	1.3	1.32	0.94
<i>I. rossii</i>	4.24	9.0	6.0	30.2	1.2	0.54	0.21
<i>I. minutoaurisa</i>	4.22	10.0	6.0	40.1	1.0	2.63	0.85

Scientific name	Outer perianth		Inner perianth		Stigma length (cm)	Flower color
	length (cm)	width (cm)	length (cm)	width (cm)		
<i>I. laevigata</i>	7.32	3.52	5.04	2.13	4.12	Pale blue purple
<i>I. ensata</i>	9.12	4.23	5.42	0.66	5.06	Pale red purple
<i>I. tectorum</i>	6.87	3.55	5.77	2.27	4.58	White
<i>I. pseudacorus</i>	6.22	3.05	2.33	0.45	3.56	Yellow
<i>I. ensata</i>	8.75	3.87	5.12	0.58	4.37	Pale red purple
<i>I. lactea</i>	6.04	1.15	5.63	0.95	4.26	Pale blue purple
<i>I. sanguinea</i>	6.64	3.45	5.69	2.21	4.42	Pale blue purple
<i>I. odaesanensis</i>	2.63	1.25	1.74	0.92	1.42	White
<i>I. rossii</i>	5.73	1.06	6.03	0.55	4.43	purple
<i>I. minutoaurisa</i>	3.12	1.34	2.51	0.72	2.15	Yellow

Table 2-3. Random primers used in this experiment.

No. code	Sequence	T _m value (°C)	GC content (°C)
ope-02	GGTGCGGGAA	34	70
ope-03	CCAGATGCAC	32	60
ope-04	GTGACATGCC	32	60
ope-06	AAGACCCCTC	32	60
ope-07	AGATGCAGCC	32	60
ope-11	GAGTCTCAGG	32	60
ope-12	TTATCGCCCC	32	60
ope-14	TGCGGCTGAG	34	70

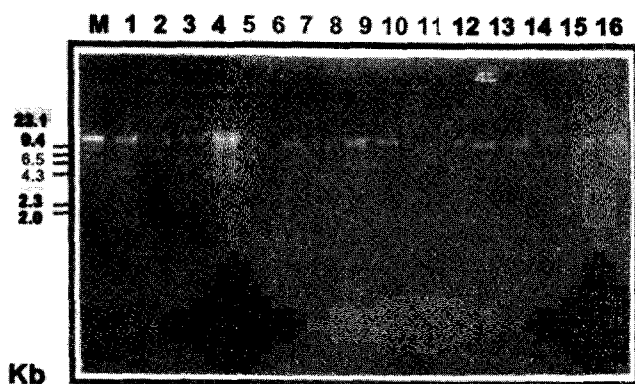


Fig 2-1. Total Genomic DNAs of 16 Species of Iris.

Line M indicates λ *Hind* III size marker. Lines 2 to 17 show total genomic DNAs of different 16 Iris species: line 1: *Iris laevigata*, lines 2, 5 and 12: *I. ensata*, line 3: *I. tectorum*, line 4: *I. pseudacorus*, lines 6 and 10: *I. lactea*, lines 7 and 9: *I. sanguinea*, line 8: *I. tectorum*, line 11: *I. odaesanensis*, lines 13, 14 and 16: *I. rossii*, line 15: *I. minutoaurea*

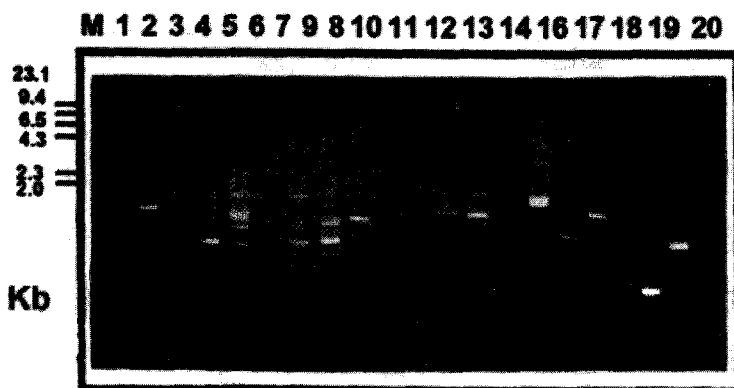


Fig 2-2. Selection of PCR Primers on RAPD Analysis.

Line M indicates λ *Hind* III size marker.
Lines 1 to 20 show each primer number from ope-01 to 20

3. RAPD 및 자료 분석

선발된 붓꽃 10종과 8종류의 Primer를 이용하여 PCR한 결과 증폭된 총 밴드수는 108개가 관찰되었다. 각 Primer마다 증폭된 bands수는 11개에서 17개까지 나타났으며 Primer당 나타난 평균 bands수는 13.5개였다.

총 band수 108개중 107개가 종간의 다양성(polymorphism)을 나타내었고, Primer 4로 PCR을 수행한 경우 오직 1개만이 모든 종간에 단일한 band양상을 보였다. 이와 같은 결과는 RAPD를 이용한 마늘의 유연관계분석(이 등 1996)과 PCR기술을 이용한 산마늘의 종내변이(김 등 1997)와 RAPD법을 이용한 수박의 유전변이 탐색(신 등 1996), 증폭된 DNA 다변성에 의한 삼지구엽초의 종내변이유 등 1997)에서 나타난 polymorphism bands와 monomorphism band를 비교해 볼 때 monomorphism band수가 매우 낮음을 보여준다. 이러한 차이는 종간 분석과 속간 분석의 차이로 해석되며 본 실험에서 나타난 종간 분석의 경우는 RAPD를 이용한 마늘의 유연관계분석과 RAPD방법을 이용한 구기자의 분류 및 동정(박 등 1996)에서 나타난 속간 분석의 band 양상보다 훨씬 다양함을 알 수 있다. Primer 8종류로 10개의 total genomic 붓꽃 DNA를 PCR로 증폭하여 얻어진 bands의 다양한 패턴에서(그림 2-3, 2-4) Panel A는 1과3, 11과15에서 유사한 band 패턴을 볼 수 있었고, Panel B는 6과 15, Panel C는 1과3, Panel D는 1과3, Panel E는 3과7, Panel F는 2와4, Panel H는 1과3, 2와4, 11과15에서 유사한 band가 2개이상 2.0kilo base이하에서 다양하게 나타났다. 유사한 band의 유무와 형질적인 생육 특성을 함께 고려해보았을 때, Panel A, C, D, H 에서는 붓꽃 1, 3(*I. ensata*, *I. tectorum*)간의 개화일의 일치를 발견할 수 있었다. Primer 2, 4, 6, 14에서 증폭된 DNA 단편이 개화일수를 결정하는 Marker로 사용될 가능성이 시사되었으나, 이러한 가능성은 이들 식물체와 정상적인 식물체를 교배시켜 얻어진 다음세대의 식물체에서 나타날 개화일수와 이 Marker와의 정확한 연관 관계를 결정한 후 확실한 추정이 가능하리라 생각된다. 그림 2-3, 2-4에서 보는 바와 같이 증폭된 DNA 단편의 size는 대부분 2.0kb이하로써 작게 나타났다. polymorphism은 agarose gel상의 band의 유무로 판정하였으며 유연관계를 구명하기 위하여 Jaccard coefficient(S_j)에 의해 dissimilarity coefficient($1-S_j$)를 구하였다. $1-S_j$ 에 의한 RAPD 분석은 polymorphism을 보이는 108개 band를 자료로 사용하였으며, 각 수집종

간에 유연관계를 비교하기 위한 dissimilarity coefficient를 표 2-5에 나타내었다.

표 2-5는 Phentree의 Nearest Neighbor Program에 의한 집단화 자료 분석을 위한 자료로 사용하였다. 평균적인 비류사정도(dissimilarity coefficient)는 0.252로 나타났으며 각 수집종의 비류사정도(dissimilarity coefficient)는 0.095에서 0.699로 다양하게 나타났다. 가장 낮은 비류사정도(dissimilarity coefficient)는 *I. pseudacorus*(노랑꽃창포)와 *I. odaesanesis*(노랑무늬붓꽃)간의 0.095이고, 가장 높은 비류사정도(dissimilarity coefficient)는 *I. tectorum*(연미붓꽃)과 *I. laevigata*(제비붓꽃)간의 0.699로 나타났다.

비류사정도(dissimilarity coefficient)로 Phentree통계 program의 nearest neighbor에 의하여 수집종간의 상관도를 그림 5와 같이 dendrogram을 작성하여 분석하였다.

수집된 붓꽃속 식물은 크게 I군에는 *I. tectorum*(연미붓꽃), II군에는 *I. lactea*(타래붓꽃), *I. laevigata*(제비붓꽃) *I. pseudacorus*(노랑꽃창포), *I. odaesanesis*(노랑무늬붓꽃)이 속하였고, III군에는 *I. ensata*(꽃창포), *I. rossii*(각시붓꽃), *I. sanguinea*(붓꽃), *I. minutoaurea*(금붓꽃)로 나타났다.

Dendrogram에 나타난 유육관계에서 같은군에 속하는 붓꽃의 형질적인 생육 특성은 일치하지 않음을 알 수 있었다. 이상의 RAPD분석의 결과로 수집된 붓꽃의 유전적 유육 관계(genetic relationship)를 규정지을 수 있었다.

본 실험의 수행으로 종속간 교잡에 있어 종자를 채취하지 못하는 시행착오를 줄일 수 있는 즉 같은 군에 속하는 붓꽃간 교잡으로 원하는 종자의 획득이 가능해 질 수 있는 기초자료를 제시해 줄 것이며, 이것은 또한 붓꽃의 교잡 육성에 영향을 주리라 판단되었다. 또한 본 실험을 기초로 종속간 교잡의 결과 F1식물에서 나타나는 유전적 변이 양상의 연구가 행해진다면 모본과 부분의 유전적 특성을 가지는 새로운 표지인자를 찾을 수가 있으며 그 밖의 붓꽃 Hetero식물의 유전적 근원을 찾아 갈 수 있으리라고 생각되었다.

Tabel 2-4. Dissimilarity coefficient matrix with 10 species of Iris.

	1	2	3	4	5	6	7	11	13	15
1	-									
2	0.248	-								
3	0.699	0.328	-							
4	0.174	0.483	0.236	-						
5	0.209	0.341	0.236	0.342	-					
6	0.228	0.303	0.311	0.213	0.285	-				
7	0.347	0.149	0.411	0.140	0.237	0.287	-			
11	0.196	0.160	0.252	0.095	0.172	0.217	0.167	-		
13	0.277	0.132	0.272	0.241	0.100	0.233	0.242	0.301	-	
15	0.191	0.180	0.219	0.158	0.281	0.222	0.241	0.406	0.159	-

1: *I. sanguinea*, 2: *I. easata*, 3: *I. tectorum* 4: *I. pseudacorus*
5. *I. easata* 6: *I. lactea*, 7: *I. sanguinea* 11. *I. odaesanesis*,
13: *I. rossii*, 15: *I. minutoaurea*

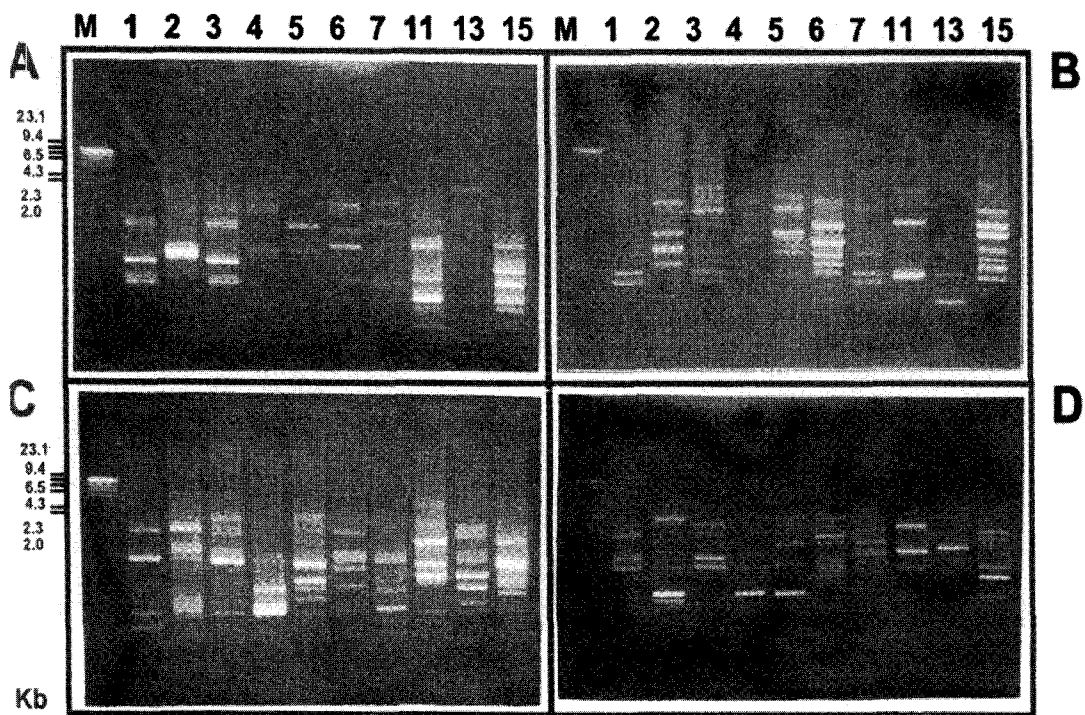


Fig 2-3. RAPD Polymorphism of 10 Species of Iris with 4 Different Primers.

Panel A: Primer1, Panel B: Primer3, Panel C: Primer4, Panel D: Primer5

Line M indicates λ Hind III size marker. Lines 2 to 11 show each Iris species; line 2: *Iris laevigata*, lines 3, and 6 : *I. ensata*, line 4: *I. tectorum*, line 5: *I. pseudacorus* line 7: *I. lactea*, line 8: *I. sanguinea*, line 9: *I. odaesanensis*, line 10: *I. rossii*, line 11: *I. minutoaurea*

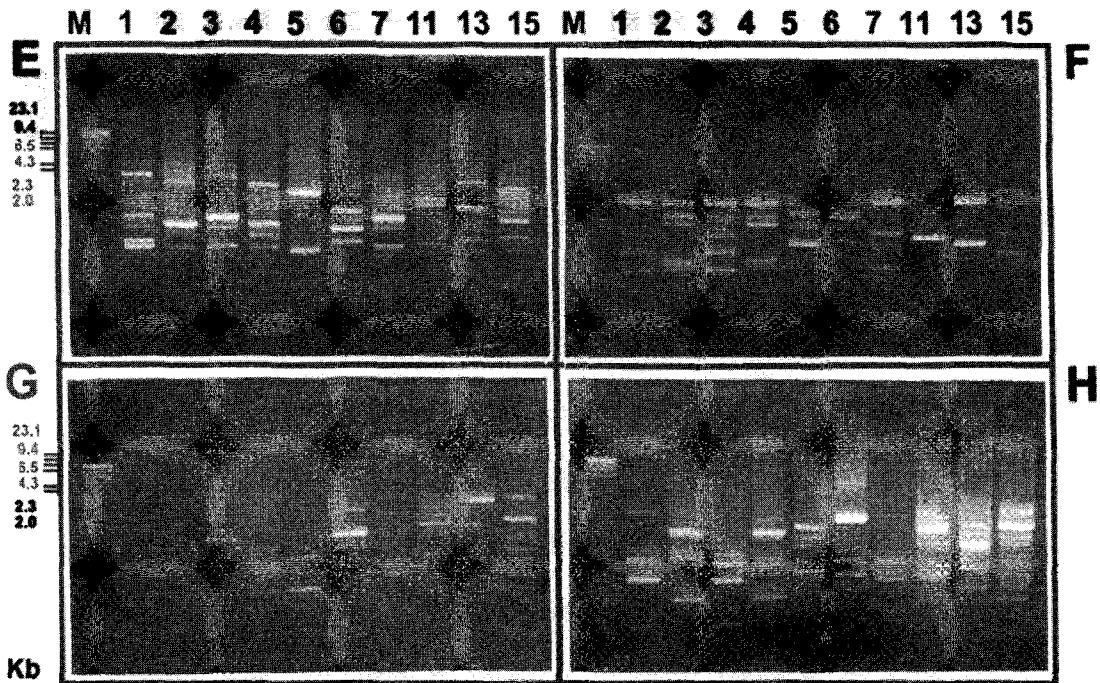


Fig 2-4. RAPD Polymorphism of 10 Species of Iris with Different Primers.

Panel E: Primer, Panel F: Primer11, Panel G: Primer12, Panel H: Primer14

Line M indicates λ Hind III size marker. Lines 2 to 11 show each *Iris* species; line 2: *Iris laevigata*, lines 3, and 6 : *I. ensata*, line 4: *I. tectorum*, line 5: *I. pseudacorus* line 7: *I. lactea*, line 8: *I. sanguinea*, line 9: *I. odaesanensis*, line 10: *I. rossii*, line 11: *I. minutoaurea*

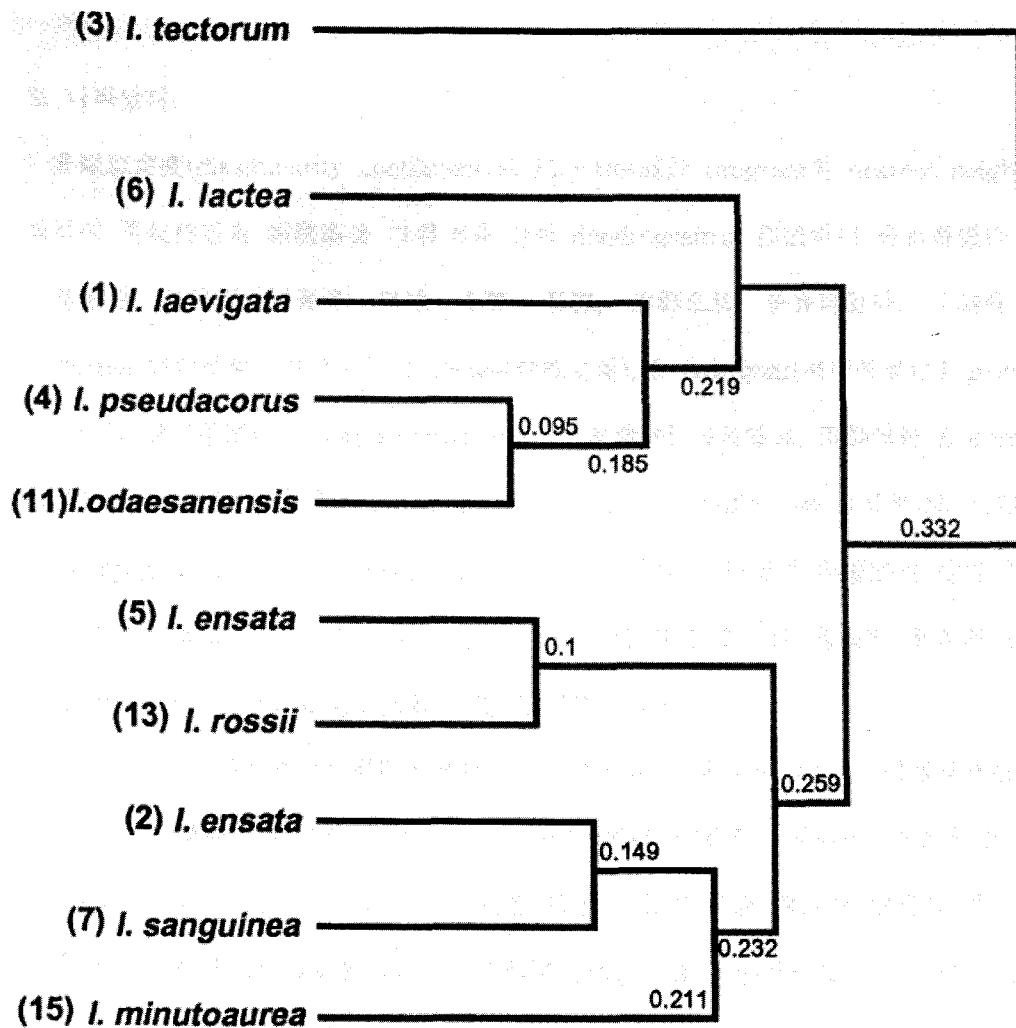


Fig. 2-5. Genetic Relationship among 10 Different Species of Iris

제 4절 결 론

본 연구는 붓꽃속 식물의 형질적 생육 특성 조사와 RAPD 분석을 통해 유전적 변이와 근록성을 밝히고 종간 교잡을 통해 신종육성을 위한 기초적인 자료를 얻기 위하여 실시하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

자생 붓꽃 식물의 개화는 종에 따라 빠른 것은 4월 22일, 늦은 것은 5월 17일부터 시작하며 화경은 *I. rossii*(각시붓꽃), 9.0cm에서 *I. ensata*(꽃창포) 104.0cm로 다양하였다.

꽃의 크기는 *I. ensata*(꽃창포), *I. laevigata*(제비붓꽃), *I. tectorum*(연미붓꽃), *I. sanguinea*(붓꽃), *I. pseudacorus*(노랑꽃창포), *I. lactea*(타래붓꽃), *I. rossii*(각시꽃), *I. minutoaurea*(금붓꽃), *I. odesanensis*(노랑무늬붓꽃) 순으로 나타났다.

8개의 random primer를 이용하여 PCR한 결과 증폭된 band는 총 108개로 107개 polymorphic band와 1개의 monomorphic band를 얻었다.

수집된 붓꽃의 dissimilarity coefficient는 평균 0.252로 나타났고, 0.095에서 0.699사이의 다양한 dissimilarity coefficient를 보여 붓꽃의 유연관계 분석을 가능하게 하였다.

유연관계는 Phentree의 nearest neighbor 통계 프로그램을 이용하여 3개의 군으로 분류되었다. I군은 *I. tectorum*(연미붓꽃), II군은 *I. lactea*(타래붓꽃), *I. laevigata*(제비붓꽃), *I. pseudacorus*(노랑꽃창포), *I. odesanensis*(노랑무늬붓꽃)가 속해 있었으며, III군은 *I. ensata*(꽃창포), *I. rossii*(각시붓꽃), *I. sanguinea*(붓꽃), *I. minutoaurea*(금붓꽃)가 속해 있었다.

제 4 장 종자발아 증진 연구

제 1절 서론

자생 붓꽃은 4-5월의 이른 봄에 개화하며 꽃은 아름답고 꽃색은 자색이 주로 많으며 초장은 50-70cm, 잎은 좁은 직립형으로 특히 내한성, 내습성, 내건성이 강하여 화훼자원으로 유용하게 이용되며 용도는 화단 및 절화용으로 활용 가치가 높다(Sim, 1988). 붓꽃 종자는 보통 여름부터 가을에 걸쳐 완숙되나 외관상 이상이 없는 충실한 종자도 일반적으로 발아력이 지극히 낮고 채종 직후 파종해도 년 내에 발아하는 종자가 적으며 대부분 다음해에 발아하고 발아가 완료되는 기간이 수년 소요된다. 더구나 발아 후 실생 개체가 개화 결실하기까지는 2-3년이 필요하여 붓꽃 개량에 큰 장애가 되고 있다. 효율적인 육종을 수행하기 위해서는 먼저 발아율과 발아세를 향상시켜 발아력을 높이고 실생 개체의 세대 축진을 시도하여 육종 연한 단축과 동시에 육종조작의 수단을 정립해야 할 필요가 있다.

따라서 본 연구는 먼저 붓꽃 종자의 발아를 촉진시키는 방법을 알기 위해 온도, 광처리 및 종피 제거, 배유의 일부 절제, xylene 처리 및 화학약품처리 등을 실시하였던 바 그 결과를 보고하는 바이다.

제 2절 재료 및 방법

1. 실험재료 및 발아조건

실험재료는 경북 봉화군 청옥산 일대 자생지에서 1996년 채취하여 대구가톨릭 대학교 화훼학과 실험포장에서 재배하여 온 붓꽃(*Iris sanguinea* Donn ex Horn)성숙 종자를 9월 4일에 채취하여 실온에 8주간 건조 저장한 것을 사용하였다.

발아조건은 온도와 광처리 실험을 제외한 모든 처리는 25°C, 3000lux정도로 백색 형광등을 24시간 照射한 명조건에 두었다. 각 처리는 충실한 종자를 선별하여 직

경 9cm Petri dish에 Filter paper(Toyo NO.2) 2매를 깔고 100粒씩 치상하였으며, 유근이 2mm정도 나온 것을 발아라 하였다. 발아조사는 2일마다 실시하였다. 발아율은 발아한 개체수의 백분율을 3반복 평균하여 표시하였다.

2. 실험방법

1) 온도와 명암조건이 발아에 미치는 영향

온도에 따른 발아율 비교는 15, 25, 30℃의 온도조건으로 구분하였으며, 명조건은 백색형광등을 3000lux 정도로 24시간 照射하였고, 암조건은 알루미늄 호일로 싸 암상태를 유지하였다.

2) 종피제거처리실험

무처리(A) 발아공절제(B) 양쪽외종피 일부절제(C), 외종피제거(D), 외종피 및 발아공절제(E)로 나누어 실험하였다. 발아공절제는(B)에서 보는 것과 같이 종자가 배병에 붙어 있는 臍(hilum)아래 발아공 부분을 메스를 이용하여 하나씩 제거 하여 배유를 노출시켰으며, 외종피 양쪽 일부 절제(C)는 발아공이 절제된 종자의 발아공 반대편에 해당되는 외종피 일부를 절제하였다. 외종피 제거는 종자 300립당 sea sand(15~20 mesh) 8g을 넣어 막자사발을 이용하여 제거하였다. 외종피 및 발아공절제는 외종피가 제거된 종자를 다시 메스를 이용하여 발아공부분을 절제하였다. (Fig. 3-1)

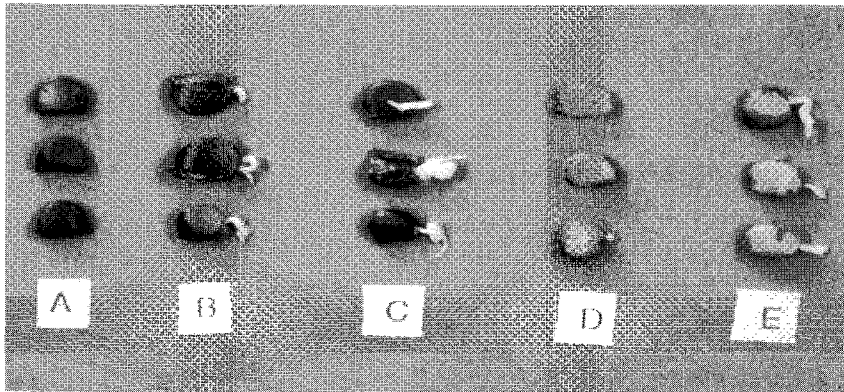


Fig. 3-1. Seed coat treatment of *I. sanguinea*.

A. Control B. Excising of microphyle C. Both sides excising of testa D. Removing of testa E. Removing of testa + Excising of microphyle

3) 화학제 처리

가) Sodium Hypochlorites Solution

NaOCl은 0, 1, 3, 5, 10%의 용액 50ml에 종자 300립을 넣어 5, 20분간 침지 처리 후 24시간 동안 흐르는 물에 수세 하여 치상하였다.

나) KOH 처리

KOH는 0, 5, 10, 20, 30%의 용액 50ml에 종자 300립을 넣어 10, 30, 60분간 침지처리 후 24시간 흐르는 물로 수세 후 치상하였다.

다) 황산 처리

황산처리는 95% 황산용액 50ml에 종자 300립을 넣은 후 0, 30, 60, 90, 120, 150분간 침지 처리 후 24시간 동안 흐르는 물로 수세 후 치상하였다.

라) HNO₃ 처리

HNO₃은 0, 0.1, 0.5, 1.0N의 농도로 비이커에 50ml씩 분주 후 종자 300립을 넣어 6, 18, 24, 48시간 침지 처리 후 24시간 동안 흐르는 물로 수세 후 치상

하였다.

마) Xylene 처리

95% Xylene을 비이커에 50ml씩 분주 후 종자 300립을 넣고 0, 5, 10, 20, 30 분간 침지처리 후 묻어있는 용액을 휘발시킨 후 파종하였다.

바) Kinetin 처리

Kinetin은 0, 1, 10, 100ppm으로 50ml 분주 후 종자 300립 넣고 24시간 침지 처리 후 24시간 동안 흐르는 물로 수세 후 파종하였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. 온도와 명암조건이 발아에 미치는 영향

온도와 명암조건에 따른 발아율은 그림3-2에서 보는 바와 같다. 25℃는 파종 후 20일째 명암에서 각각 31.3%, 32.3% 30일째는 48.7% 45.0%, 40일째는 53.0%, 48.3% 발아하였다. 그러나 15℃의 경우 파종후 20일까지 명, 암조건 모두 0%의 발아율을 나타내었으며, 30일째 명조건이 0% 암조건이 2%의 발아율을 나타내었다. 30℃는 명조건이 10.3%, 암조건이 14.3%로 저조한 발아율을 나타내었다. 25℃에서는 명조건이나 암조건 모두 양호한 발아율을 나타내었다. 이상의 결과로 보아 붓꽃 종자의 발아적온은 25℃라고 생각된다.

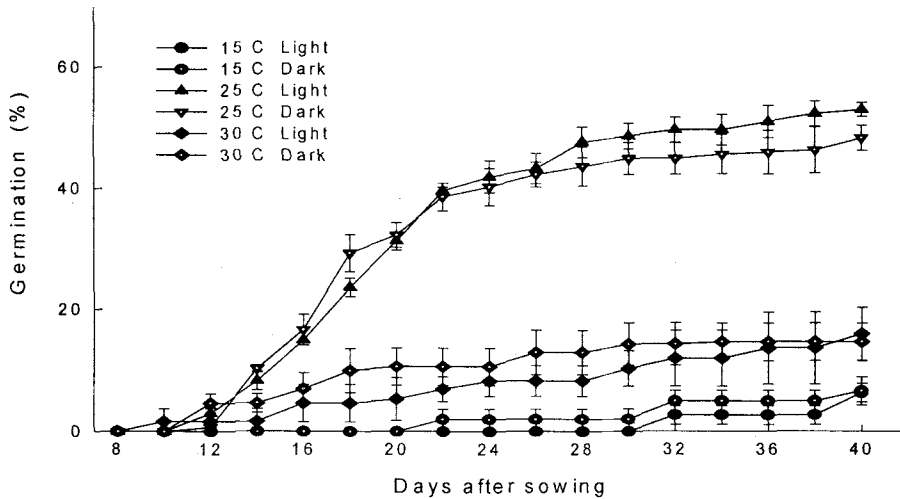


Fig. 3-2. Effect of temperature and light on seed germination of *Iris sanguinea*.

일반적으로 발아적온은 식물의 종류나 품종, 생육장소, 그리고 수확후 기간 등에 따라 다르게 나타나며, 또 온대지방 원산의 종자는 열대지방 원산의 종자보다 더 낮은 온도를 필요로 하고, 야생식물의 종자는 오랫동안 순화된 재배 종의 종자보다 낮은 온도를 필요로 한다(Kim 등, 1987)는 사실에 비추어 볼 때 붓꽃은 온대 종의 야생식물이지만, 발아적온이 매우 높은 것이라 생각된다.

명암조건별 온도에 따른 발아를 보면, 발아적온보다 온도가 낮거나 높아져도 명암 조건에 관계없이 저조한 발아율을 보였다.

온도조건에 따라 종자 발아에 미치는 광의 영향에 관한 연구로 Sang 등(1993)은 할미꽃 종자의 발아적온은 25°C로 적온 하에서는 명암에 영향을 받지 않는다고 하였으며, Park(1995)등은 한국자생 범부채의 발아적온은 25°C이며 암조건보다 명조건에서 발아율이 높은 명발아 종자로 보고하였다. 본 실험의 결과 붓꽃 종자의 발아적온인 25°C에서 명, 암조건에 관계없이 발아하였지만 파종 30일 이후 명조건의 발아율이 암조건 보다 약간 상승하였다.

2. 종피 처리효과

종피 처리에 따른 발아율은 그림3-3에서 보는바와 같이 종피 처리는 무처리와 달리 파종 후 2일째부터 발아하기 시작하여 시일이 경과함에 따라 현저한 발아율 차이를 나타내었다. 파종 후 10일째 무처리의 0.7%에 비하여 발아공을 절제한 것은 36.7%, 외종피 양쪽을 제거한 것은 51.0%, 외종피를 제거한 것은 55.3%, 외종피 및 발아공을 제거한 것은 평균 63%의 높은 발아율을 나타냈으며, 20일째는 무처리 38.7%비해 각각 56.7%, 72.3%, 79.3%, 86.0% 발아하였다.

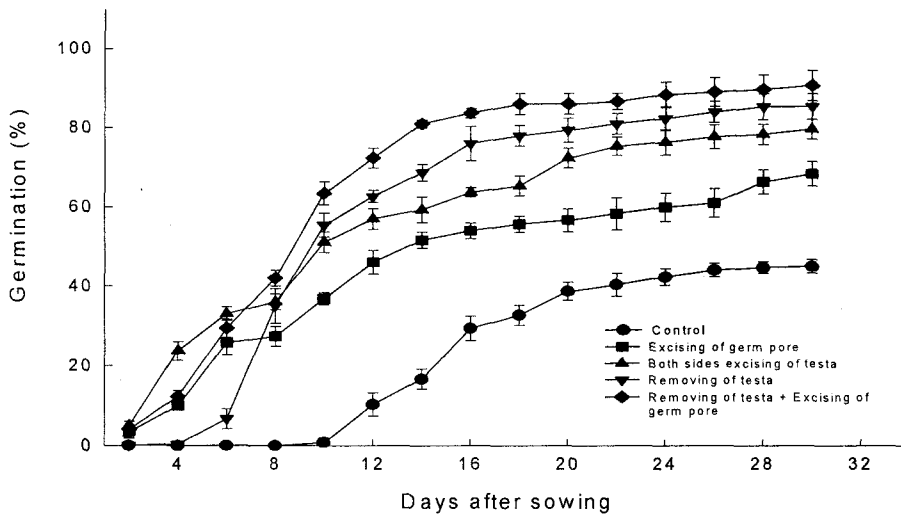


Fig. 3-3. Effect of various seed preparations on germination of *Iris sanguinea*.

여기에서 본 실험에 사용하였던 붓꽃 종자의 종피구조를 보면 외종피는 흑갈색으로 약간 두텁고, 배유와 외종피 사이에는 油脂물질로 피막이 형성되어 있다. 특히 외종피제거 및 발아공 절제 처리구 에서 높은 발아율을 나타내었는데 이것은 배가 발아되는 발아공 부분의 견고한 종피 부분을 절제해 줌으로써 수분 및 공기의

투수성을 원활하게 하였고, Sea sand를 이용 종피부분을 제거하므로 유지상 피막이 일부 제거되어 발아율 향상에 효과가 있는 것으로 생각된다. Thompson등(1979)은 알스트로메리아의 종자발아율을 높이는 방법으로 종피일부를 잘라 배유를 노출시켜 발아율 향상을 보고하였고, Chiang 과 Park(1994)은 속갓종자에서, Catalan 등 (1991)은 *Prosopis flesuasa*종자에서 종피 일부 제거로 발아율 향상을 보고한 것은 본 실험의 결과와 유사하였다. 그러나 종피제거 및 발아공 부분을 절제하는 것이 발아율 향상에 효과는 있지만 Sea sand나 메스를 이용하여 종피 및 발아공 부분을 제거할 경우 조작 미숙으로 인해 배에 피해를 줄 수도 있어 박피 과정에서도 외종피 제거를 위해 신중히 해야하는 어려움이 있어 실용화하기는 곤란한 점이 있다.

3. 화학제 처리효과

1) Sodium hypochlorites 처리

그림 3-4는 NaOCl 처리효과를 나타낸 것이다. NaOCl 0, 1, 3, 5, 10%로 5분간 침지처리 한 것은 파종후 10일째부터 발아하기 시작하여 16일째 무처리의 21.3%에 비해 NaOCl 처리는 각각 30.0%, 32.7%, 48.7%, 44.7%의 발아율을 나타냈으며, 20일째 무처리의 35.3%에 비해 5% 5분간 처리한 것은 평균 60.3%로 무처리와 비교하여 볼 때 발아율 향상효과가 인정되었다. Belcher 과 Miller (1974)의 발아속도 산정의 기준이 되고 발아율 50%에 달하는데 소요되는 일수가 NaOCl 5%는 17일로 가장 빨랐으며, NaOCl 10%는 22일 정도를 나타내었다. 그러나 NaOCl 처리농도가 5%보다 높은 10%의 경우 초기 발아율은 양호하였지만, 파종 16일 이후 5%에 비해 발아율 향상효과는 인정되지 않았다. Fieldhouse등 (1975)은 pepper 종자에서, Hsiaso(1981)는 Witciweed 종자에서, Hurly 와 Van standen(1989)는 Guayule종자에서, Kim과 Yu (1998)는 미선나무 종자에서 Ku와 Won(1986)는 잔디 종자에 NaOCl처리로 발아율 향상을 보고하였다. NaOCl는 일반적으로 살균작용과 표백효과를 나타내며 공기 중에서 쉽게 분해된다. 종자에 NaOCl 처리는 종피 처리 효과로 인한 수분과 산소의 투과성을 증대시킬 뿐만 아니라 발아 억제물질의 산화와 제거의 역할을 하여 발아를 촉진시킨다고 알려져 있다. 붓꽃 종자 발아에 있어 NaOCl처리는 이러한 작

용으로 발아율이 향상된 것으로 생각된다. 본 실험의 결과 붓꽃종자발아에 있어 NaOCl처리의 경우 5%에 5분간 침지 처리후 파종하는 것이 효과적이다.

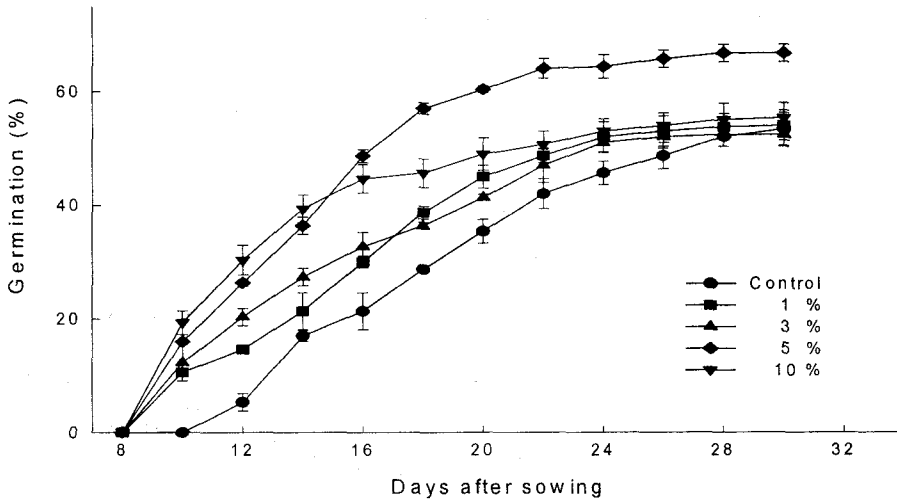


Fig. 3-4. Effect of NaOCl treatment on germination of *Iris sanguinea*. (Treated 5min.)

2) KOH 처리

KOH처리(그림 3-5) 다른 화학제에 비해 처리효과는 인정되지 않았다. 그러나 KOH 20%에 10분, 30분, 60분간 침지 처리한 것은 파종 후 8일째부터 발아하기 시작하여 파종 후 16일째 무처리 26.7%에 비해 각각 17.7%, 21.3%, 33.0%의 발아율을 나타냈다. KOH처리 중 발아율이 비교적 양호한 20% 60분 처리를 보면 파종 후 20일째 무처리의 32%에 비해 39.3%, 30일째 무처리 34.7%에 비해 49%의 발아율을 나타내었다. KOH 10, 30분 처리는 파종 후 30일까지 무처리 보다 낮은 발아율을 나타내었다. 그림3-5에선 나타내지 않았지만, 부표 2를 보면 20% 보다 처리 농도가 낮은 5%, 10%, 20%보다 높은 30%에서도 발아율 향상효과는 인정되지 않았다. Yu등 (1974)은 잔디종자에서 KOH처리는 발아율 향상을 보

고하였고, Chiang 과 Park(1994)은 싹갓종자에서 KOH처리로 발아율 향상을 보고하였다. KOH 처리에 의해 cuticle층의 기계적인 보호기능을 완화하여 수분 및 가스의 투수성을 증가시켜 발아율을 향상시키거나, KOH가 과피내에 침투하여 과피내에 함유되어 있는 발아억제 물질에 작용하여 이를 분해 또는 변성시켜 억제물질 함량에 변화를 가져와 발아를 향상시킨다고 하였다. 하지만 붓꽃 종자에 있어 KOH 처리 효과는 인정되지 않았다.

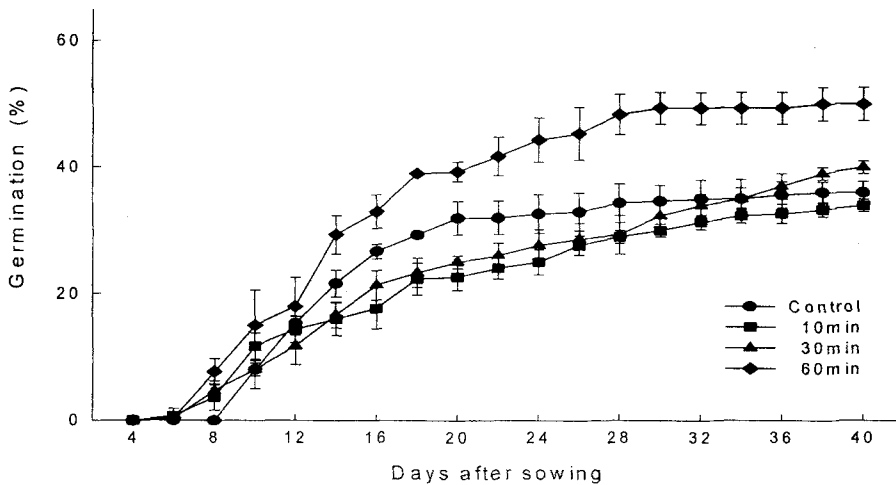


Fig. 3-5. Effect of KOH treatment on germination of *Iris sanguinea*. (Treated KOH 20%)

3) 황산 처리

붓꽃 종자 발아에 있어 황산처리는 그림 3-6에 나타낸 것과 같이, 파종 후 2일째 부터 발아하기 시작하여, 150분간 침지 처리한 것은 파종 후 4일째 평균 29.7%의 높은 발아율을 나타내었다. 파종 후 20일째 무처리의 30.3%에 비해 30분 처리한 것은 35.5%, 60분 43.7%, 150분 41.0%가 발아하였다. 황산처리의

경우 모든 처리에서 파종직후부터 발아하기 시작하여 초기발아율은 양호하였지만 발아기간이 20일 정도 경과할수록 부패하는 종자가 많이 발생하였다. 특히 황산 처리시간이 가장 긴 150분 침지처리는 파종직후 월등히 높은 발아율을 나타냈지만, 10일째부터 부패하는 종자가 발생하기 시작하여 후기 발아율은 불량하였다. Duran 과 Tortosa (1985)는 Charlock종자에 79% 황산처리로 발아율 향상을 보고하였다. Yu등(1974)은 잔디 종자에서 황산을 이용하여 종피 처리 후 현미경으로 관찰한 결과 배 및 배유만 남았으며, 박피과정 중 화학적인 피해를 입은 것으로 보고하였다. 붓꽃 종자에 있어서 황산 처리는 종피박피의 효과로 초기 발아율 향상효과는 있었지만 고농도 황산으로 인한 배, 배유에 피해를 입혀 부패하므로써 발아가 불량하게 된 것으로 생각된다. 본 실험에서 황산이 고농도로 사용되어 저조한 발아율을 보였기 때문에 농도와 침지시간에 대한 재검토가 필요하다고 생각된다.

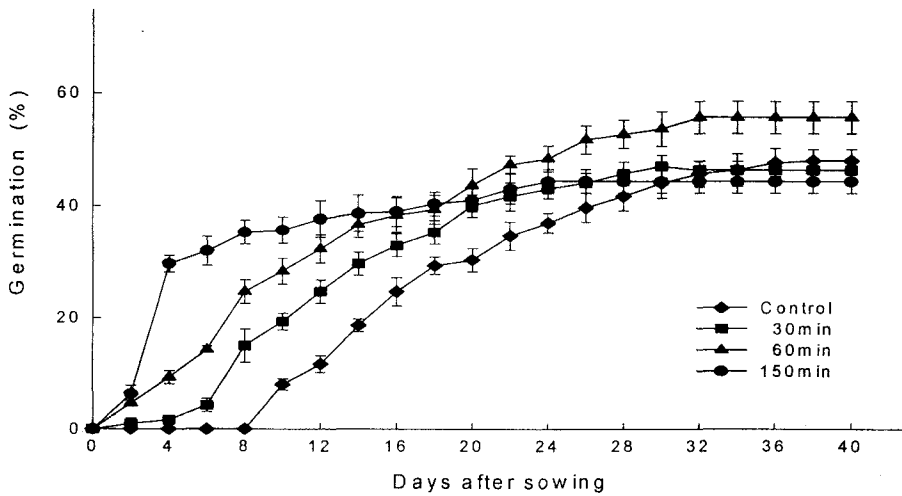


Fig. 3-6. Effect of H₂SO₄ treatment on germination of *Iris anguinea*. (Treated H₂SO₄ 95%)

4) HNO₃ 처리

붓꽃 종자 발아촉진을 위한 HNO_3 처리는 그림 3-7에서 보는 바와 같이 파종 후 16일째 발아율을 보면 무처리의 30.8%에 비해 0.5N에 18시간 처리한 것은 파종 후 10일째부터 발아하기 시작하여 파종 후 16일째 평균 56.7%, 0.1N 49.3%, 1.0N은 34.7%가 발아하여 무처리 보다 높은 발아율을 나타내었다. 파종 후 20일째를 보면 각각 37.0%, 72.0%, 57.3%, 50.0%의 발아율을 나타내었다. Belcher과 Miller(1974)에 의한 발아속도를 보면 0.5N은 16일정도, 0.1N은 17일 정도, 1.0N은 20일 정도를 나타내었다. 0.5N보다 처리농도가 낮은 0.1N 및 농도가 높은 1.0N에서도 무처리에 비해 발아율 향상되었지만, 붓꽃종자발아에 HNO_3 처리는 0.5N에 18시간 침지처리 후 파종한 것이 가장 효과적이었다.

Udin과 Soejadi(1991)는 IR 64 rice종자에 HNO_3 침지처리 후 파종한 것은 종자가 모두 발아하지 않았다고 보고하였다. 그러나 붓꽃 종자에 있어 HNO_3 처리는 발아율 향상효과가 인정되었다. 그리고 Tomer과 Singh(1993)는 KOH, NaOH, HCl, HNO_3 , H_2SO_4 와 같은 강산, 강염기를 이용하여 종피처리한 것은 두꺼운 종피에 의한 가스 교환과 수분 흡수불량 그리고 배의 생육이 억제되는 경우에 있어서 휴면타파에 효과적이라고 보고하였다.

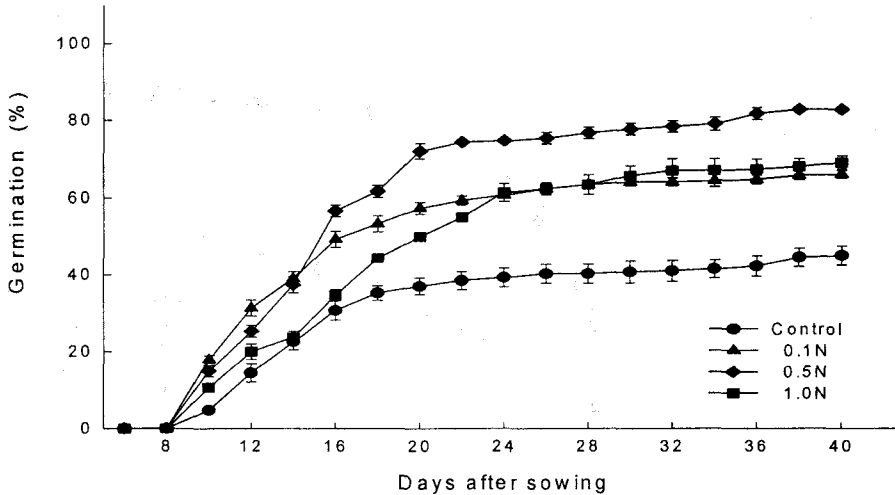


Fig. 3-7. Effect of HNO_3 treatment on germination of *Iris sanguinea*.
(Treated HNO_3 18 hours)

5) Xylene 처리

유기용매인 Xylene처리는 그림8에 나타내었다. Xylene에 침지처리 후 파종한 것은 치상후 8일째부터 발아하기 시작하였으며, 처리시간이 30분인 경우 파종 후 12일 째 40.7%로 무처리 5.7%보다 월등한 발아율 향상효과를 나타내었다. 14일째 무처리 의 17%에 비해 처리시간에 관계없이 평균 56%, 파종 후 20일째 무처리 53.7%, Xylene은 평균 81%정도의 높은 발아율을 나타내어 다른 화학제 처리보다 발아율 향상 효과가 인정되었다.

Kariuki 와 Buell(1988)은 *Brachystegia spiciformis*에 Xylene 16분 처리로 발아율 향상을 보고하였으며, Park등(1996)은 개상사화에서 Hiroshi등(1980)은 노랑꽃창포에서 외종피를 제거하고 Xylene에 침지 처리한 결과 현저한 발아율 향상효과를 보고하였다. Xylene처리에 의한 발아 촉진효과는 주로 내종피의 유지상 물질의 용탈과 배의 일부분의 통기의 개선으로 인해 발아율이 향상된다는 것을 지적하였다.

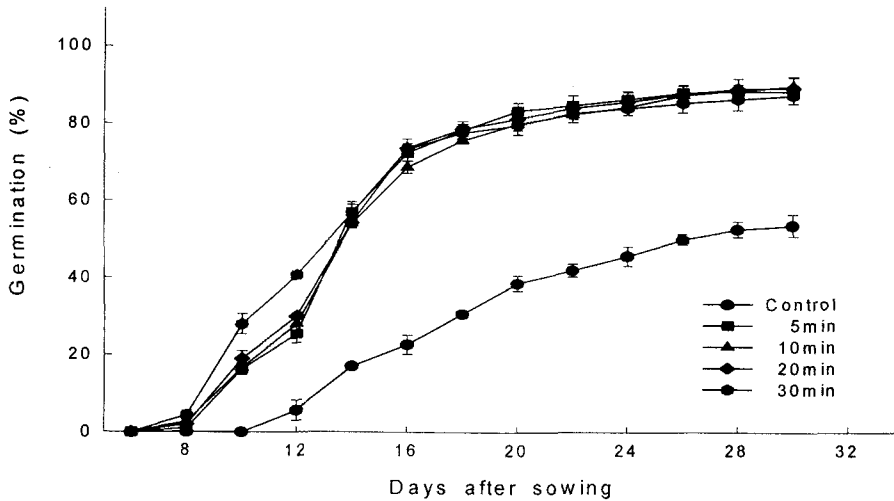


Fig. 3-8. Effect of Xylene treatment on germination of *Iris sanguinea*. (Treated Xylene 95%)

유기용매에 종자를 침지 처리 후 파종한 경우, Baldwin(1932)는 picea의 종자를 알콜로 처리한 경우 발아율 향상을 보고하였고, 또한 岩波등에(1974)의해 행하여진 종자의 유기용매 처리에 관한 연구에서 사탕무우, 무 종자를 에틸알콜 및 아세톤에 침지처리한 경우 발아율 향상을 보고하였으며, 이들 종자를 xylene에 침지 처리 후 파종하였을 때 대조구보다 높은 발아율을 나타내었다. xylene이 다수의 유기용매 중에서 가장 좋다고 말하기는 어렵지만, 붓꽃종자 발아에 있어서 xylene처리의 효과는 높게 나타났다.

6) Kinetin 처리

종자발아 촉진을 위하여 Kinetin을 처리한 결과는 그림 3-9에서 보는 바와 같이, Kinetin처리는 파종 후 8일째부터 발아하기 시작하여 파종 후 20일째가 되면 무처리의 29.7%, 1ppm은 34.3%, 10ppm 36.3%, 100ppm은 32.3%로 처리농도에 관계없이 평균 34%정도의 발아율을 나타내었으며, 파종 후 26일째가 되면 각각

37%, 45.0%, 53.7 %, 48.3%의 발아율을 나타내었다. 10ppm보다 처리농도 높은 100ppm 및 처리농도가 낮은 1ppm에서도 무처리 비해 발아율은 향상되었지만, 붓꽃 종자 발아에 있어 Kinetin 처리는 10ppm이 가장 효과적 이었다. Ahn등 (1984)은 GA 및 Kinetin을 다래종자에 처리한 결과 발아에 매우 효과적이었다고 보고 하였으며, Park등(1995)은 붓꽃과 비교적 근연속인 범부채 종자에 비교적 낮은 농도인 10 ppm에서 발아율 향상효과를 보고하였다. 또한 Cytokinin은 예냉을 요하는 식물 종자에 있어서 휴면타파, 광을 요하는 상추, 셀러리 종자의 휴면을 타파한다는 보고도 있다(崔 등, 1991). 그러나 붓꽃종자에 있어서 Kinetin 처리는 발아율 향상에 큰 효과가 나타나지 않는 것으로 생각된다.

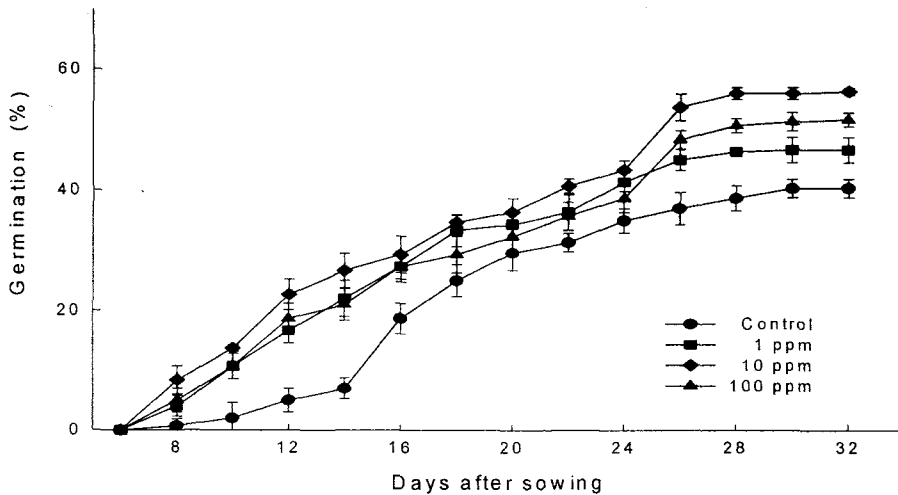


Fig.3-9. Effect of Kinetin treatment on germination of *Iris sanguinea*. (Treated Kinetin 24 hours)

Table 3-1. Effect of various treatment on germination and days to 50% of germination percentage of *Iris sanguinea*.

Treatment	T_{50}^z (Days)	Days after sowing germination(%)		
		20	30	40
Control	32.6	31.3f	46.0d	50.3f ^y
Removing of testa+excising of germ pore	10.0	86.0a	90.7a	90.7a
NaOCl 5% 5min.	17.3	60.3c	66.7bc	70.0c
KOH 20% 60min.	36.0	39.3e	49.3d	50.0f
H ₂ SO ₄ 95% 60min.	23.0	43.7d	53.3d	58.7e
HNO ₃ 0.5N 18hrs.	16.0	72.0b	77.7ab	82.7b
Xylene 95% 5min.	14.0	83.3a	89.0a	90.0a
Kinetin 10ppm 24hrs.	26.0	6.3e	56.0cd	64.3d

z : Days to 50% of germination rate.

y : Mean separation in column by Duncan's multiple range test 5% level.

붓꽃 종자 발아에 있어서 종피 제거, 화학제 처리 중 가장 발아촉진효과가 큰 처리에 있어 Belcher 과 Miller(1974)의 발아속도 측정의 기준이 되는 발아율 50%에 달하는 소요일수 및 파종 후 발아율을 비교한 결과는 Table 3-1과 같다. 발아 속도(T_{50})를 보면 무처리에 32.6일에 비해 종피 제거 및 발아공 절제 처리의 경우 10일로 무처리에 비해 22.6일이 빨랐으며, 파종 후 20일째 발아율을 보면 무처리 31.3%에 비해 86.0%로 월등한 발아율 향상효과를 보였으며, 파종 후 30일째 90.7%의 발아율을 보였다. 이와 같이 종피 제거 및 발아공 절제 처리의 경우 발아율 및 발아속도 향상효과는 인정되지만 조작의 어려움 등 실용화 하기는 어려운점이 있다.

화학제 처리에 의한 발아율과 발아속도는 화학제의 종류 및 농도에 따라 큰 차이를 나타내었다. KOH 처리를 제외한 모든 화학제 처리에서 무처리에 비해 발아속도 및 발아율 향상 효과가 인정되었다. 발아속도(T_{50})를 보면 NaOCl 5% 5분간 침지 처리 한 것은 17.3일, HNO₃ 0.5N 18시간 처리한 것은 16일로 나타났

으며, 파종 후 20일째 발아율을 보면 60.3%, 72.0%, 파종 후 40일째는 각각 70.3%와 82.7%의 발아율을 나타내어 무처리에 비해 발아속도(T_{50}) 및 발아율도 향상되었다. 화학제 처리 중 특히 Xylene처리의 경우 발아속도(T_{50})는 14일, 파종 후 20일째 발아율이 83.3% 파종 후 30일째 발아율은 89% 정도로 종피 처리와 거의 동일한 발아율 향상 효과가 나타내었다. 이상의 결과로 보아 붓꽃 종자발아에 있어 Xylene처리는 가장 손쉽게 종자처리 할 수 있으며, 발아율 향상 효과도 인정된다.

제 4절 결론

붓꽃 종자 발아를 위한 기초연구로서, 종자발아에 적당한 온도, 광조건과 발아율 향상을 위한 종피제거 및 화학제 처리를 실시한 결과는 다음과 같다.

붓꽃 종자의 발아적온은 25°C 이며 명, 암조건에 큰 영향은 받지 않았으며, 저온이나 고온에서는 명암조건에 관계없이 낮은 발아율을 나타내었다.

붓꽃 종자에 종피처리 한 결과 종피 및 발아공 절제처리가 발아율 및 발아속도향상에 효과가 있었으며, 파종 후 20일째 86%의 높은 발아율을 나타내었다.

붓꽃 종자 발아율 향상을 위해 NaOCl, H_2SO_4 , KOH, HNO_3 , Xylene, Kinetin을 여러 농도로 처리한 결과 NaOCl 5% 5분, HNO_3 0.5N 18시간 처리로 발아율이 증가하였으며, 그중에서 Xylene처리가 가장 효과적 이었다. 가장 효과적인 처리 농도는 95% Xylene에 5분간 침지처리 후 파종한 것으로, 파종 후 20일째 평균 83%의 높은 발아율을 나타내었다.

Appendix I. Effect of NaOCl soaking on the germination rate of *Iris sanguinea*.

Soaking duration (min.)	NaOCl concentration (%)	Germination rate(%) after							
		8	10	12	14	16	18	20	22
Control		0.0	0.0e ^c	5.3	17.0	21.3	31.7	35.3e	42.0
5	1.0	0.0	10.7bcd	14.7	21.3	30.0	38.7	45.0cd	48.7
	3.0	0.0	12.3bc	20.3	27.3	32.7	36.3	41.3d	47.0
	5.0	0.0	16.0ab	26.3	36.3	48.7	57.0	60.3a	64.0
	10.0	0.0	19.3a	30.3	39.3	44.7	45.7	49.0b	50.7
20	1.0	0.0	4.7de	12.0	15.0	33.7	40.3	44.7cd	50.7
	3.0	0.0	7.3cd	11.7	15.7	34.7	38.0	44.0cd	49.0
	5.0	0.0	9.0cd	19.0	30.0	35.0	43.3	48.0bc	49.7
	10.0	0.0	16.0ab	21.3	27.3	39.0	43.0	47.3bc	50.0

⁷Mean separation in column by Duncan's multiple range test 5% level.

(Continue)

Soaking duration (min.)	NaOCl Concentration (N)	Germination rate(%) after								
		24	26	28	30	32	34	36	38	40
Control		45.7	48.7	52.0	53.3b ^c	54.3	54.3	55.0	55.0	55.7b
5	1.0	52.0	53.0	53.7	54.0b	54.0	54.0	56.0	57.0	57.0b
	3.0	51.0	52.0	52.3	52.3b	52.9	53.3	54.0	55.0	55.0b
	5.0	64.3	65.7	66.7	66.7a	67.7	69.3	69.3	70.0	70.0a
	10.0	53.0	54.0	55.0	55.3b	55.7	56.1	56.7	56.3	57.3b
20	1.0	52.0	53.0	54.0	54.0b	54.3	54.7	55.3	55.3	55.3b
	3.0	49.0	49.3	52.7	52.7c	52.7	53.3	54.7	54.7	55.3b
	5.0	51.3	52.7	52.7	52.7b	58.3	58.3	59.7	59.7	59.7b
	10.0	51.0	51.0	53.7	53.7b	54.7	55.7	55.7	56.3	56.7b

^zMean separation in column by Duncan's multiple range test 5% level.

Appendix II. Effect of KOH soaking on the germination rate of *Iris sanguine*.

KOH Concentration (%)	Soaking duration (min.)	Days after sowing									
		6	8	10	12	14	16	18	20	22	
Control		0.0	0.0	8.0bc ^z	15.3	21.7	26.7	29.3	32.0b	32.7	
5	10	0.0	0.7	5.7c	10.0	14.3	18.7	23.3	25.0bcd	27.3	
	30	0.3	5.0	6.7c	15.0	18.0	18.7	23.7	24.7bcd	25.3	
	60	2.0	9.0	13.0ab	17.0	24.7	26.0	26.3	27.3bcd	27.7	
10	10	0.3	3.7	7.3bc	14.7	15.0	16.7	17.7	20.0d	20.3	
	30	0.7	4.3	10.3abc	14.3	18.0	19.3	24.3	26.0bcd	28.3	
	60	0.3	3.7	10.0abc	14.3	23.7	24.7	26.7	28.0bc	29.7	
20	10	0.7	3.7	11.7abc	14.3	16.0	17.7	22.3	22.7cd	24.0	
	30	0.3	4.7	8.0bc	11.7	16.7	21.3	23.3	25.0bcd	26.0	
	60	0.3	7.7	15.0a	18.0	29.3	33.0	39.0	39.3a	41.7	
30	10	0.3	3.7	13.7ab	16.3	23.3	27.0	28.7	28.7bc	31.0	
	30	0.0	4.0	6.7c	8.3	13.7	16.0	21.7	24.3bcd	26.7	
	60	0.7	3.0	8.0bc	9.3	14.7	16.7	19.3	20.3d	25.7	

^zMean separation in column by Duncan's multiple range test 5% level.

(Continue)

KOH Concentration (%)	Soaking duration (min.)	Days after sowing								
		24	26	28	30	32	34	36	38	40
Control		32.7	33.0	34.3	34.7bc ^z	35.0	35.0	35.7	36.0	36.0bc
5	10	27.7	29.7	30.0	31.3bcd	31.3	31.7	32.7	33.3	33.7bc
	30	25.7	26.0	26.7	28.0cd	29.7	29.7	30.0	30.3	30.7c
	60	28.3	29.3	30.3	31.0bcd	31.7	32.7	33.3	34.3	34.3bc
10	10	22.0	23.0	25.0	25.7d	27.3	27.3	29.7	30.7	32.3c
	30	29.0	29.7	30.7	32.3bcd	33.3	34.3	35.3	35.7	37.0bc
	60	30.3	31.3	32.3	35.0b	35.7	36.7	38.3	39.3	39.7b
20	10	25.0	27.7	29.0	30.0bcd	31.3	32.3	32.7	33.3	34.0bc
	30	27.7	28.7	29.3	32.3bcd	34.0	35.0	37.0	39.0	40.0b
	60	44.3	45.3	48.3	49.3a	49.3	49.3	49.3	50.0	50.0a
30	10	32.0	32.0	32.7	32.7bc	32.7	33.0	33.0	33.0	33.0bc
	30	29.7	30.7	32.0	32.0bcd	33.3	33.7	34.3	35.0	35.3bc
	60	28.7	29.0	30.7	32.0bcd	33.7	35.0	35.0	36.7	37.0bc

^zMean separation in column by Duncan's multiple range test 5% level.

제 5 장 배수체 작성

제 1절 서론

붓꽃속은 붓꽃과에 속하는 다년생 식물로 주로 북반구 온대지역에 분포하고 있으며 개화는 초봄에서부터 여름에 개화는 種으로 다양하며 종에 따라 개화시기가 상이하 여 자연상태에서는 종간 교잡이 이루어지지 않고 있다. 또한 종간 교잡에서도 교잡배의 퇴화로 인하여 종자 형성이 극히 어려워 인공적인 배 배양에 의해서 식물체 유도가 가능하다. 자생 붓꽃속 식물의 花卉化를 위한 육종에서 변이체를 유기하고자 염색체 증감에 의한 이수체 배수체의 작성과 방사선 처리에 의한 돌연변이체 선발에 주안점을 두었다.

일반적으로 배수체는 생육이 왕성해 줄기가 굵어지고 잎이 두터워지거나 꽃이 커지며 향기가 짙어지는 등 관상가치가 높아지고, 3배체 중에는 우수한 꽃이 많아 육종 수단으로 많이 이용되고 있다. (Chen과 Goeden-Kallemeyn, 1979; Grisebach, 1981). 그러나 자연발생적인 식물의 배수화는 발생하기 힘들며(Harlan과 De Wet, 1975) 보통 인위적인 처리에 의해 얻어지는데, 식물의 배수화를 위한 antimitotic agents로 colchicine이 가장 보편적으로 사용되고 있다(Chen과 Goeden-kallemeyn, 1979; Grisebach, 1981; Wan 등, 1989; Anderson 등, 1991). 특히 난류는 다른 작물에 비해 배수체 유기가 용이하고 배수성의 특징이 꽃과 식물체에 나타나기 때문에 배수성 이용에 의한 육종이 실용적으로 이용되고 있는 것이 많고(Wimber 등, 1987), Macleod(1947) 등이 교잡된 난에 colchicine을 처리하여 얻은 배수체는 꽃의 크기가 커지고 화색이 선명해지며 꽃수가 증가되었다는 결과를 보고한 이래 많은 연구가 수행되었다(Moore, 1947; Rotor, 1958; Nakasone와 Kamemoto, 1961). colchicine ($C_{22}H_{25}NO_6$)은 식물의 체세포분열과정에서 tubulin과 결합하여 방추사의 형성을 억제시키고, 세포분열 중기단계에서 염색체의 양극이동과 microtubules의 형성을 방해함으로써 염색체 배수화를 유도하는 것으로 알려져 있으나(Hadlaczky 등, 1983) 인체에 매우 해롭고 많은 작물에서 비정상적인 생장을 보이는 등 독성이 보고되고 있어

(Wan 등, 1989) 최근에는 제초제 계통의 oryzalin(Ramulu 등, 1991; Chalak와 Legave, 1996)과 caffeine(Thomas, 1997) 등이 새로운 antimitotic agents로 이용되고 있다. oryzalin(3,5-dinitro -N⁴)은 식물의 tubulin과 강한 결합력을 가지며 매우 낮은 농도(colchicine의 1/100)에서도 높은 활성을 나타내고(Morejohn 등, 1987) colchicine에 비해 효과적인 것으로 보고되었으며(Ramulu 등, 1991; Chalak와 Legave, 1996), caffeine(C₈H₁₀N₄O₂)은 다른 antimitotic agents와는 달리 핵분열 과정에서 세포판의 형성을 억제함으로써 식물의 체세포 염색체를 배가시키는 것으로 알려져(Kihlman과 Levan, 1949; Thomas 등, 1997) colchicine의 단점을 보완할 수 있는 대체물질로 제안되었다.

*Iris*屬 식물에 있어서도 기내배양을 통해 colchicine 처리된 배의 복이배체 유발(Tsutomu, 1985)에 대한 연구가 보고된 바 있지만 아직까지는 미흡한 실정이다. 이와 같은 문제점을 보완하여 *Iris*屬 식물의 육종을 위한 기초자료를 얻기 위해 본 연구는 colchicine, oryzalin, caffeine 처리를 통한 배수체 식물 획득 방법을 구명하고자 수행되었다.

제 2절 재료 및 방법

1. 실험재료 및 실험방법

1) colchicine 처리에 의한 염색체 배가 효과

가) 처리농도와 시간이 생존율과 배가율에 미치는 영향

식물재료는 대구가톨릭대학교 실험포장에서 재배되고 있는 부채붓꽃(*I. setosa*), 꽃창포(*I. ensata*), 붓꽃(*I. sanguinea*)의 종자를 2001년 9월 채종하여, 실온에서 발아시켜 신초가 1cm 정도 자란 것을 사용하였다.

Colchicine은 100, 500, 1000ppm 농도로 각각 12, 24, 48, 72, 120h 처리하였으며 100ml 삼각플라스크에 colchicine 용액과 seedling을 넣고 25℃ shaking, (100rpm) 조건으로 수행하였다. 각 처리별로 충실하고 균일하게 발아된 종자 40 개체씩을 선별하여 2반복으로 처리하였으며 처리직 후 식물체는 흐르는 물에 24h 세척하고 rockwool에 치상하여 25±1℃, 1500Lux의 지속적인 조명아래에서 재배하였다.

나) 처리방법이 생존율과 배가울에 미치는 영향

식물재료는 가)와 동일한 방법으로 사용하였다.

같은 농도와 시간에서 처리방법에 따른 생존율과 배가울을 비교해보기 위해 colchicine은 500ppm 농도로 12, 24, 48, 72, 120h 처리하였고, 각각 shaking 처리(Fig. 4-1A)와 agar 배지 처리(Fig. 4-1B)로 나누어 수행되었다. agar 배지는 500ppm colchicine 용액에 agar 0.7%를 첨가하여 조제하였고, 페트리디쉬에 분주하여 굳힌 후 식물체의 뿌리가 배지 표면에 닿지 않도록 성장점 부위까지만 배지내에 거꾸로 치상 하였다. colchicine 처리 후에는 각각 가)의 실험방법과 동일하게 재배하였다.

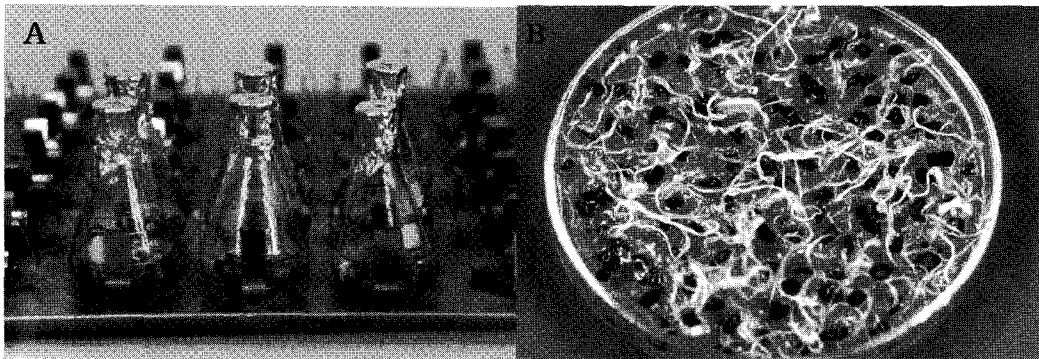


Fig.4-1. Treatment methods of colchicine.

A. *I. sanguinea* seedling shaking treated with colchicine solution.

B. *I. sanguinea* seedling treated with colchicine medium contained agar(0.7%).

다) 저농도와 고농도에서 처리 시간별 배가 효과

식물재료는 붓꽃을 가)에서와 동일한 방법으로 사용하였다.

배가에 더 효과적인 농도와 시간을 찾기 위해 저농도·장시간 처리와 고농도·단시간 처리로 나누어 100, 500, 1,000ppm 농도에서는 12, 24, 48, 72, 120h으로 처리시간을 길게 하였고 1,000, 3,000, 5,000ppm 농도에서는 3, 6, 9h으로 단시간 처리하였으며 25℃, shaking(100rpm) 조건으로 수행하였다. 처리 후에는

각각 가)의 실험방법과 동일하게 재배하였다.

2) oryzalin, caffeine 처리에 의한 염색체 배가 효과

식물재료는 붓꽃을 1)에서와 동일한 방법으로 사용하였고, oryzalin은 10, 50, 100, 500ppm 농도로 3, 6, 9, 24h, caffeine은 1000, 3000, 5000, 10000ppm 농도로 24, 48, 72h 처리하였다. caffeine은 수용성이므로 증류수로 녹이고, oryzalin은 DMSO 용매제에 녹인 후 증류수를 이용 적정농도로 조제하고 25°C, shaking (100rpm) 조건으로 수행하였다. 처리 후 각각 실험 1의 실험방법과 동일하게 재배하였다.

2. 조사항목

1) 생존율

처리 후 15일 간격으로 60일간 생존율을 조사하였다.

2) ploidy level 측정

처리 60일 후 생존개체를 대상으로 측정하였다. 배수화 정도를 알아보기 위해 각 처리구의 뿌리를 1cm 정도 채취하여 예리한 면도칼로 잘게 잘라 1회용 페트리 디쉬에서 0.5ml Nuclei Extraction Buffer를 첨가하여 현탁 시료를 만들었다. 이 현탁용액을 필터가 부착된 튜브에 걸러 2ml Staining Buffer로 염색한 후 배수성 판정기로 분석하였다. 배수성 판정기는 독일에서 생산된 partec PA를 사용하였다.

3) 근단 세포 염색체 조사

이른 아침 재배중인 식물체의 근단 부분을 0.5cm 정도 길이로 채취하여 0.002M 8-hydroxyquinoline 용액에 담구어 상온에서 5-6시간 둔 다음 증류수로 충분히 행구고 고정용액(ethanol : acetic acid = 3:1)에 2시간 정도 처리하였다. 고정된 근단은 증류수로 2번 정도 행군 다음 60°C 1N HCl에서 1분간 처리하여 조직을 연화시켰다. 연화된 시료는 증류수로 조심스럽게 행군 후 뿌리 끝 분열부위만 슬라이드 위에 옮겨 잘게 부수고 45% acetic acid로 현탁, 1% 아세트오르세인 용액으로 염색한 후 cover glass를 덮어 filter paper 등으로 눌러 여액을 제거하고

광학현미경 아래에서 염색체를 관찰하였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. colchicine 처리에 의한 염색체 배가 효과

먼저 seedling의 생존에 적절한 colchicine 농도를 알아보기 위해 꽃창포에 100, 300, 500, 1000, 3000, 5000ppm의 저농도부터 고농도까지 6가지 다른 농도의 colchicine을 24시간 처리하고, 2주 간격으로 8주간 생존율을 조사하였다(Fig. 4-2). 생존율은 colchicine 처리 이후 시간이 경과함에 따라 낮아지는 경향을 보였으며 처리농도가 낮은 100, 300ppm에서는 8주 후 생존율이 66.3%, 61.1%로 높았으며 500ppm에서는 42.8%로 나타났고 고농도인 1000, 3000, 5000ppm에서는 각각 24.4%, 8.9%, 4.4%로 생존율이 매우 낮게 나타났다.

따라서 본 실험에서는 colchicine 처리 후 50% 수준의 생존율을 나타내는 농도를 설정하여 100, 500ppm 농도와 약간 높은 농도인 1000ppm 농도를 사용하였고, 1000ppm을 기준으로 저농도와 고농도로 나누어 1000, 3000, 5000ppm의 고농도에서는 처리시간을 줄여 수행하였다.

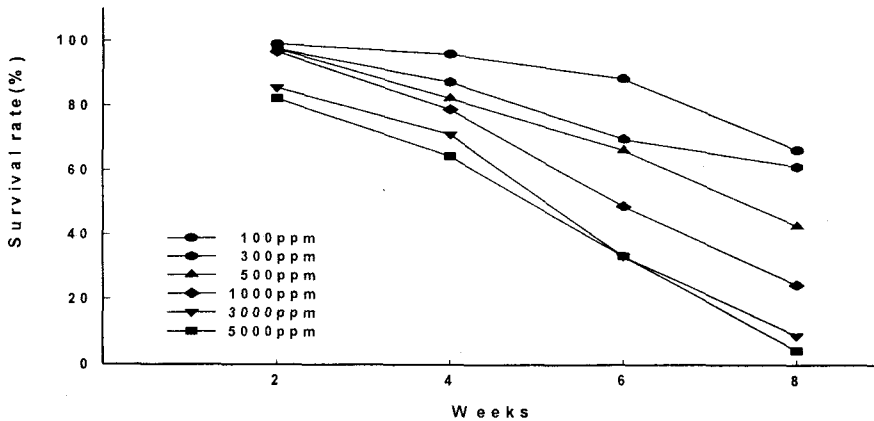


Fig. 4-2. Investigation of colchicine adequate amount on the survival rate of seedling in the *I. ensata*.

1) 처리농도와 시간이 생존율과 배가율에 미치는 영향

Colchicine의 처리농도와 시간을 달리하여 부채붓꽃, 꽃창포, 붓꽃의 seedling에 처리했을 때 배수체 획득에 미치는 영향을 보면 Table 4-1, 2, 3과 같다. 부채붓꽃의 경우(Table. 4-1) 100ppm의 농도에서 12시간 처리시 생존율이 93.5%로 높았고 120시간 처리시 38.5%로 낮아져 처리시간이 길어질수록 생존율이 낮아지는 경향이었으나 4배체 출현빈도는 처리시간에 관계없이 82~95%로 높게 나타났다. 생존율에 대한 4배체 출현빈도를 백분율로 나타낸 4배체 획득효율은 100ppm농도로 12시간 처리시 84.2로 가장 높게 나타났으며 24시간 처리시 53.3, 48시간 처리시 38.0, 72시간 처리시 35.0, 120시간 처리시 34.9로 처리시간이 길어질수록 낮게 나타났다. 500ppm과 1000ppm 농도로 처리했을 때 생존율은 12시간 처리시 41.3%와 40.3%, 24시간 처리시 33.8%와 30.8%, 72시간 처리시 17.5%와 13.8%, 120시간 처리시에는 5.0%와 9.0%로 100ppm 농도로 처리했을 때와 같이 처리시간이 길어질수록 낮아졌다. 생존율은 처리농도 100ppm에 비해 농도를 5배 높인 500ppm과 10배 높인 1000ppm에서 거의 1/2 이하로 낮아져 처리농도에 따른 차이를 나타내었다. 4배체 출현빈도는 500ppm 농도로 처리했을 때 72시간 처리를 제외한 모든 처리에서 50~70%, 1000ppm 농도로 처리했을 때 24시간 처리를 제외한 모든 처리에서 60~70%로 100ppm농도로 처리했을 때 보다 낮게 나타났으며, 혼수체(2×+4×)는 100ppm 농도로 48시간 처리시와 500ppm 농도로 12시간 처리시 각각 5.0%, 6.1%였다. 한편 500ppm 농도로 72시간 처리했을 때와 1000ppm 농도로 24시간 처리했을 때 4배체 출현 빈도가 100%였으나 생존율이 상대적으로 낮아 4배체 획득효율은 각각 17.5 와 30.0로 저조했다. 이상의 결과를 볼 때 생존율은 처리농도가 높아지고, 처리시간이 길어질수록 낮아지는 경향을 보였고, 4배체의 출현빈도는 뚜렷한 경향 없이 전반적으로 50%이상의 높은 결과를 보였으나 4배체 획득효율은 생존율 에서와 같은 경향을 보여 100ppm 농도로 12시간 처리했을 때 4배체 획득효율이 84.2로 가장 높았다.

Table 4-1. Effect of combinations of colchicine concentration and treatment duration on survival rate and ploidy level of seedling in the *I. setosa* after 60days.

Concentration (ppm)	Treatment (h)	Survival (%)	Ploidy level(%)			Efficiency ^z
			2×	4×	2×+4×	
100	12	93.5	10.0	90.0	0	84.2
	24	65.0	18.0	82.0	0	53.3
	48	40.0	0	95.0	5.0	38.0
	72	40.0	12.5	87.5	0	35.0
	120	38.8	10.0	90.0	0	34.9
500	12	41.3	42.4	51.5	6.1	21.3
	24	33.8	30.0	70.0	0	23.7
	48	31.3	33.3	66.7	0	20.9
	72	17.5	0	100.0	0	17.5
	120	5.0	50.0	50.0	0	2.5
1,000	12	40.3	35.7	64.3	0	25.9
	24	30.0	0	100.0	0	30.0
	48	23.8	30.0	70.0	0	16.7
	72	13.8	38.9	61.1	0	8.4
	120	9.0	38.5	61.5	0	5.5

z : Survival rate ×Tetraploid plant rate /100

꽃창포의 경우(Table 4-2) 생존율은 100ppm 농도로 12시간 처리시 81.3%에서 1000ppm 농도로 120시간 처리시 11.3%로 낮아져 전반적으로 부채붓꽃의 경우와 같은 경향을 보였으나, 4배체 출현 빈도는 100ppm 농도로 120시간 처리했을 때와 500ppm 농도로 48시간, 1000ppm 농도로 12시간 처리했을 경우에만 각각 8.3%, 9.1%, 6.7%로 나타나 매우 저조하였다. 한편 처리농도가 낮고 처리시간이 짧은 100ppm 12시간 처리와 상대적으로 처리농도가 높고 처리시간이 긴 500, 1000ppm 농도의 72시간 이상의 처리를 제외한 전 처리에서 혼수체의 출현 빈도가 10~60% 수준으로 높게 나타났다. 이상의 결과 500ppm의 농도로 48시간 처리했을 때 4배체 획득효율이 4.3으로 가장 높았다.

Table 4-2. Effect of combinations of colchicine concentration and treatment duration on survival rate and ploidy level of seedling in the *I. ensata* after 60days.

Concentration (ppm)	Treatment (h)	Survival (%)	Ploidy level(%)			Efficiency ^z
			2×	4×	2×+4×	
100	12	81.3	100.0	0	0	0
	24	66.3	75.0	0	25.0	0
	48	50.0	53.3	0	46.7	0
	72	46.1	84.2	0	15.8	0
	120	39.7	58.4	8.3	33.3	3.3
500	12	70.0	40.0	0	60.0	0
	24	54.4	80.0	0	20.0	0
	48	47.5	72.7	9.1	18.2	4.3
	72	26.3	100.0	0	0	0
	120	10.0	100.0	0	0	0
1,000	12	56.3	53.3	6.7	40.0	3.8
	24	50.0	88.9	0	11.1	0
	48	22.5	71.4	0	28.6	0
	72	20.0	100.0	0	0	0
	120	11.3	100.0	0	0	0

z : Survival rate × Tetraploid plant rate /100

붓꽃의 경우(Table 4-3)도 생존율은 부채붓꽃과 같은 경향이였다. 100ppm 농도로 처리했을 때 48시간 이상의 처리에서 4배체 출현빈도가 20~28% 수준이였고 72시간 처리시 28.0%로 가장 높았으며 모든 처리에서 혼수체의 출현이 있었다. 500ppm 처리시 4배체의 출현은 48시간보다 낮은 처리시간에서 보였고, 24시간 처리에서 28.6%로 가장 높았으며 상대적으로 처리시간이 긴 72, 120시간 처리에서는 전혀 볼 수 없었으나 72시간 처리시 혼수체의 출현 빈도는 100%였다. 1000ppm의 농도로 처리했을 때는 생존율이 급격히 낮아져 72, 120시간 처리에서는 0%였으며, 4배체의 출현빈도는 12시간 처리에서만 23.1%로 나타났다. 이상의 결과를 볼 때 붓꽃에 colchicine을 처리하여 배수체를 얻기 위해서는 100ppm 농

도에서는 48~72시간, 500ppm 농도에서는 12~24시간, 1000ppm 농도에서는 12시간으로 처리농도가 높아질수록 상대적으로 처리시간은 짧게 하는 것이 효과적이었으며 100ppm 농도로 72시간 처리했을 때 4배체 획득효율이 16.1로 가장 적합하였다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 colchicine 처리로 배수체를 얻기 위해서는 부채붓꽃의 경우 100ppm으로 12시간, 꽃창포의 경우 500ppm으로 48시간, 붓꽃의 경우는 100ppm으로 72시간 처리시 가장 효과적이었다.

Table 4-3. Effect of combinations of colchicine concentration and treatment duration on survival rate and ploidy level of seedling in the *I. sanguinea* after 60days.

Concentration (ppm)	Treatment (h)	Survival (%)	Ploidy level(%)			Efficiency ^z
			2×	4×	2×+4×	
100	12	96.1	91.7	0	8.3	0
	24	71.3	59.4	0	40.6	0
	48	62.5	51.6	22.6	25.8	14.1
	72	57.5	52.0	28.0	20.0	16.1
	120	38.5	16.7	20.0	63.3	7.7
500	12	77.3	51.7	13.8	34.5	10.7
	24	55.0	35.7	28.6	35.7	15.7
	48	31.3	41.7	8.3	50.0	2.6
	72	13.8	0	0	100.0	0
	120	7.5	80.0	0	20.0	0
1,000	12	53.8	53.8	23.1	23.1	12.4
	24	28.8	60.0	0	40.0	0
	48	10.0	100.0	0	0	0
	72	0	-	-	-	0
	120	0	-	-	-	0

z : Survival rate ×Tetraploid plant rate /100

*Iris*屬 식물에서 인위적 배수화는 Tsutomu(1985년)에 의해 종간잡종의 임성회복을 시키고자 잡종배에 사용된 예가 있으나 구체적인 처리부위나 처리방법 및 처리농도와 처리시간에 관한 비교 결과는 미흡한 실정이다. 본 실험(Table 4-1, 2, 3)에서는 *Iris*屬 식물의 효과적인 염색체 배가를 위해 부채붓꽃, 꽃창포, 붓꽃을 이용하여 colchicine을 다양한 농도와 시간별로 처리하였다. 부채붓꽃, 꽃창포, 붓꽃 모두 처리농도와 처리시간이 증가할수록 생존율이 낮아져 생존율에는 처리농도와 처리시간이 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 심비디움 등 많은 작물에서 colchicine 처리시 처리농도와 처리시간을 증가시킬수록 식물의 고사상태가 심해져 생존율이 낮아지는 것으로 보고되어(Kim 등, 1998; Blakeslee 등, 1938; Heinz와 Grace, 1970; Hermsen 등, 1970; Davidson, 1983; Jang등, 2000) 본 실험에서와 일치하는 결과를 보였다. 배가울에 있어서는 처리간의 뚜렷한 경향이 없었으나 종간의 차이는 뚜렷하게 나타나 부채붓꽃의 경우 전처리에서 배가울이 상당히 높았고 낮은 농도에서 짧은 시간 처리했을 때 효과적이었던 반면 꽃창포와 붓꽃은 상대적으로 저조하여 꽃창포의 경우 대부분의 처리에서 배가울이 0%였고, 붓꽃은 낮은 농도에서는 처리시간을 길게, 높은 농도에서는 처리시간을 짧게 하는 것이 배수체를 얻는데 효과적인 것으로 나타났다. 이런 현상은 colchicine에 대한 감응정도가 작물에 따라 다르기 때문인 것으로 보여진다(Chung, 2002). colchicine은 발암물질로 인체에도 독성이 강하지만 식물체에 처리했을 경우에도 많은 작물에서 비정상적인 성장과 형태를 보이는 등 독성이 보고되었는데(Wan 등, 1989), 본 실험에서도 처리농도와 시간이 증가됨에 따라 처리 직후 식물체의 발육이 지연되며 정단분열조직 부위가 불룩하게 융기되고 뿌리의 발육도 현저히 떨어지는 것을 볼 수 있었고(Fig. 4-3, 4), 이런 결과는 벼의 종자와 seedling 그리고 코스모스 종자에 colchicine을 처리한 경우에서도 보고되어진바 있다(Kang, 1988; Blakeslee와 Avery, 1938). Fig. 4-3은 colchicine 500ppm 농도로 120시간 처리한 붓꽃의 처리 후 20일 째 모습으로 정단분열조직 부위가 불룩하게 융기되어 지상부의 발육이 지연되고 있는 것을 볼 수 있고, Fig. 4-4는 100ppm 농도로 처리된 부채붓꽃의 처리 한달 후 지상부와 지하부 생육모습을 처리시간별로 비교한 것으로 처리시간이 길어질수록 지상부의 생육이 느리고 신근 형성이 더딘 것을 볼 수 있다.

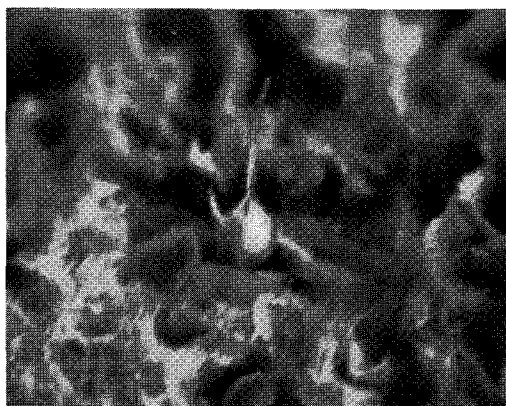


Fig. 4-3. Meristem bulged of *I. sanguinea* seedling treated with colchicine (500ppm, 120h)

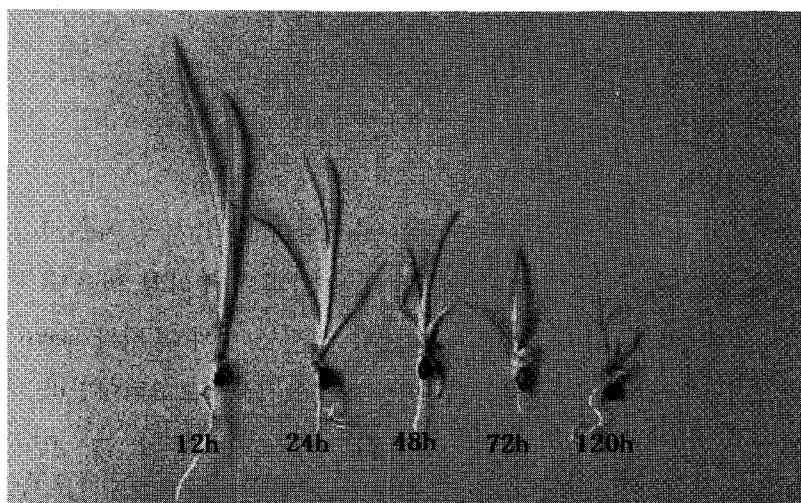
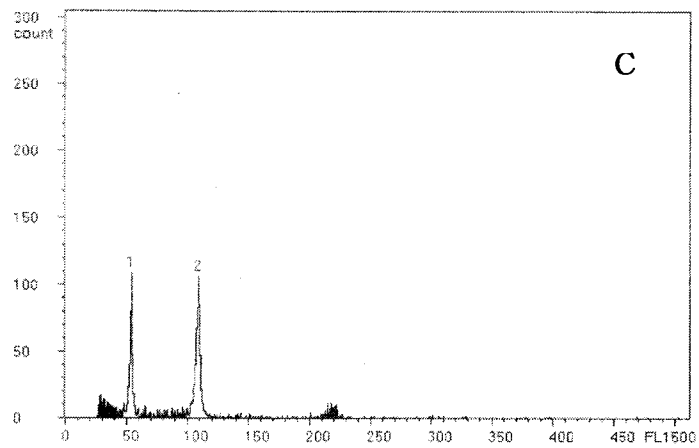
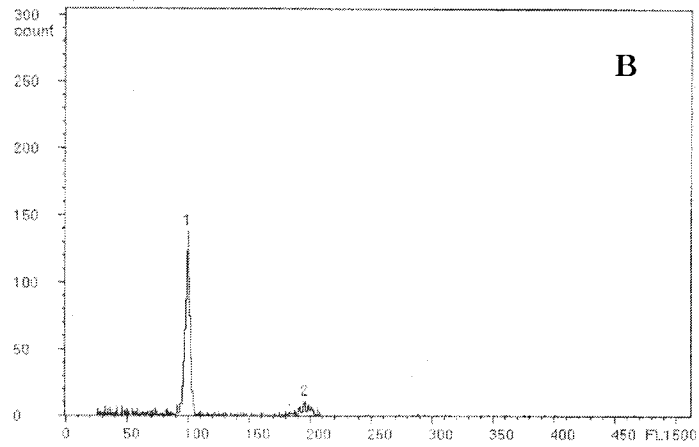
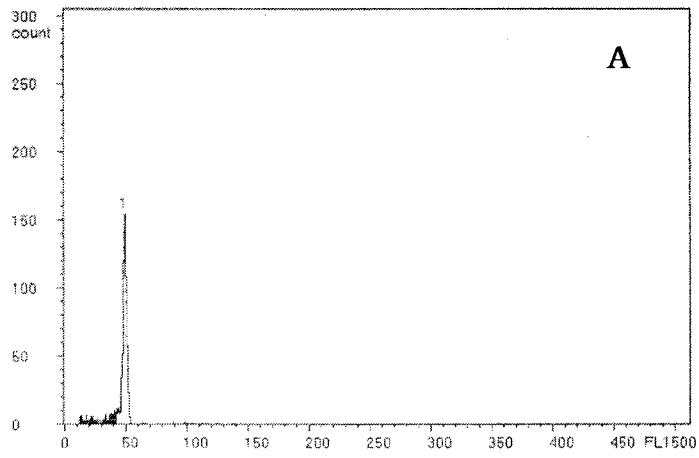


Fig. 4-4. Growth form a month after *I. setosa* seedling treated with colchicine. (100ppm)

배수성 확인 방법은 근단세포의 염색체 수를 확인하는 것이 가장 확실하고 일반적이며, 이 외에도 기공의 크기나 수(Han 등, 1999), 화분립의 크기(Tan과 Dunn, 1973), 공변세포의 엽록체 수(Chaudhari와 Barrow, 1975)등을 조사해 확인할 수 있지만, 최근에는 빠르고 간편하게 확인하는 방법으로 배수성 판정기를 이용하는 방법이 보편적으로 사용되고 있다(Chen과 Armstrong, 1994; Chalak과 Legave, 1996; Sliwinska와 Jansen, 1997; Chung, 2002). 따라서 본 실험에서는 배수성 판정기를 사용해 ploidy level을 확인하고(Fig. 4-5), 2배체(Fig. 4-5A)와 4배체(Fig. 4-5B)로 확인된 식물체의 근단 세포 염색체를 조사하였다(Fig. 4-6). 배수성 판정 결과 동일한 처리 내에서도 세포내의 염색체 숫자가 다른 혼수체(Fig. 4-5 C, D, E)의 출현이 보였는데, 이런 현상은 colchicine 처리를 받은 분열조직의 분열 과정에서 야기되는 것으로 추측되며, 성장과정에서 다양한 변화를 일으켜 혼수체 melon은 2배체로(Adelberg 등, 1993), 혼수체 나리는 ploidy level이 우세한 방향으로(Van Tuyl 등, 1992), 혼수체 Haplopappus는 4배체로(Fujishige 등, 1996) 전환되는 것으로 알려져 있다. Kang(1988년)의 보고에 따르면 한 식물체의 뿌리에 있는 근단 분열 세포의 염색체가 배가되었다고 해서 그 식물체의 화원기 세포 염색체까지도 반드시 배가되었을 것이라 단정할 수 없으며 colchicine 처리를 통해 배가된 것으로 확인 된 벼의 다음 세대에서는 40%만이 4배체인 것으로 나타나 성장 과정 중 배수체의 반복검정이 필요한 것으로 생각되어진다. 근단 세포 염색체를 조사한 결과는 Fig. 6에서 볼 수 있으며 부채붓꽃은 $2\times=38$ (A), $4\times=76$ (B), 붓꽃은 $2\times=28$ (C), $4\times=56$ (D), 꽃창포는 $2\times=24$ (E)였고, 꽃창포의 경우 배가율이 저조한 관계로 신선한 근단의 채취가 쉽지 않아 $4\times$ 의 조사가 어려웠다.

Number of nuclei



Relative DNA amount per nucleus

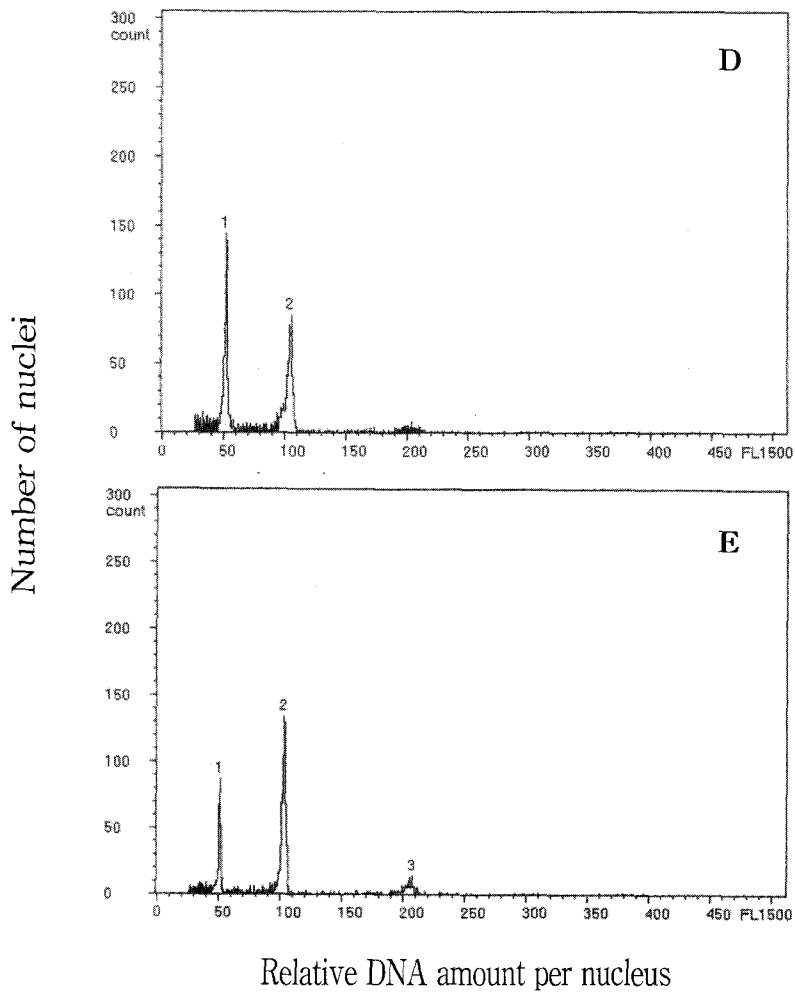


Fig. 4-5. Flow cytometric histograms of diploid, tetraploid and mixoploid of *I. sanguinea* of which somatic chromosomes were doubled by colchicine treatment.

A: diploid(2×)

B: tetraploid(4×)

C, D, E: mixoploid(2×+4×)

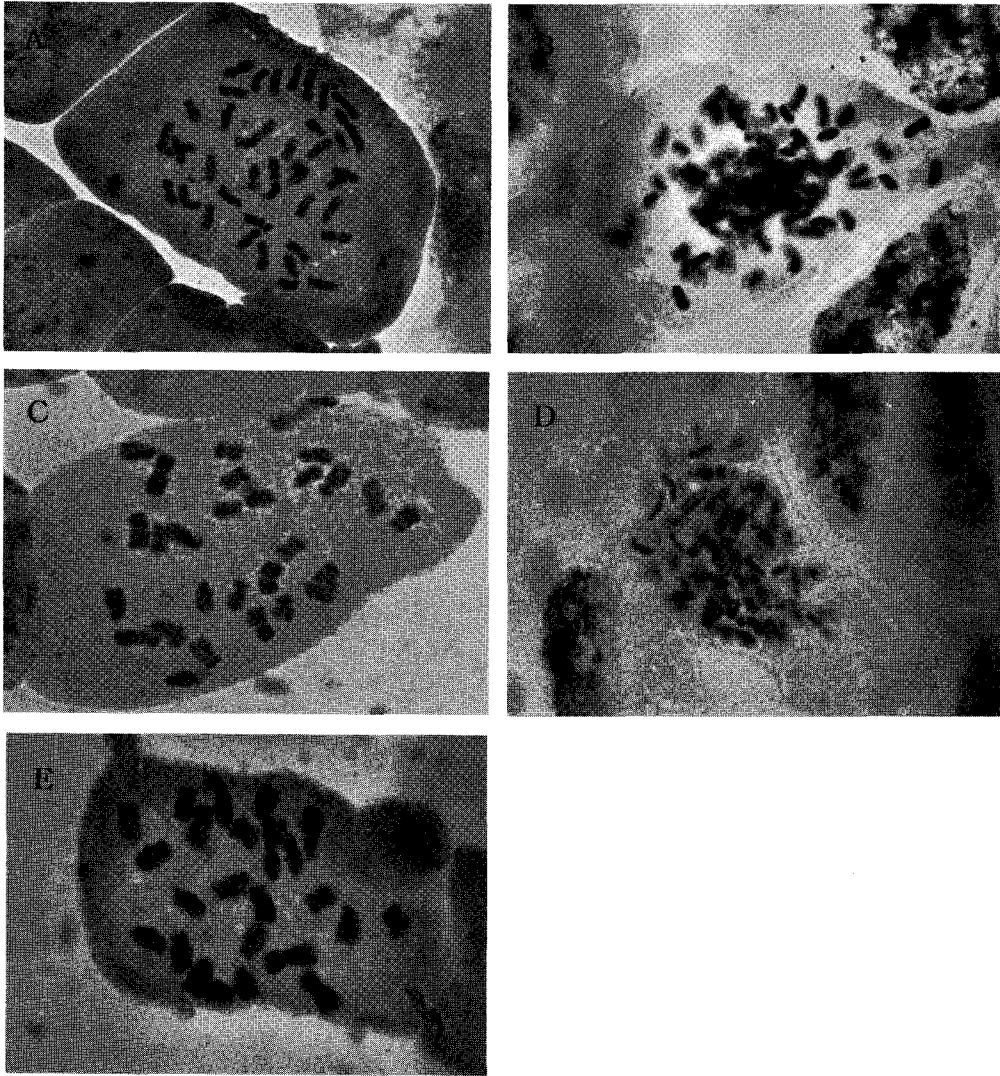


Fig. 4-6. Somatic chromosomes in root tip cells of *I. setosa*, *I. sanguinea* and *I. ensata*.

A: *I. setosa*(2×=38)

B: *I. setosa*(4×=76)

C: *I. sanguinea*(2×=28)

D: *I. sanguinea*(4×=56)

E: *I. ensata*(2×=24)

2) 처리방법이 생존율과 배가율에 미치는 영향

Table 4-4, 5, 6은 같은 농도에서 처리방법을 달리하여 부채붓꽃, 꽃창포, 붓꽃의 seedling에 colchicine을 처리한 결과로, 부채붓꽃의 경우(Table 4-4) 120시간 처리를 제외한 모든 처리에서 shaking 처리시 생존율이 높았고, 4배체 출현빈도는 50~100% 수준으로 처리방법에 따른 차이 없이 전반적으로 높게 나타났다. shaking 처리시 72시간 처리에서, agar 배지 처리시에는 120시간 처리에서 4배체의 출현빈도가 100%였으나 생존율이 각각 17.5%, 11.3%로 상대적으로 낮게 나타났고 4배체 획득효율은 shaking 처리시에는 24시간 처리, agar 배지 처리시에는 48시간 처리가 각각 23.7%, 17.3%로 가장 높았다. 이상의 결과로 볼 때 shaking 처리시 4배체 획득효율이 전반적으로 높게 나타나 효과적이었다.

Table 4-4. Effect of colchicine treatment methods on the survival rate and ploidy level of seedling in the *I. setosa* after 60days.

Treatment method	Concentration (ppm)	Treatment (h)	Survival (%)	Ploidy level (%)			Efficiency ^z
				2×	4×	2×+4×	
Solution shaking	500	12	41.3	42.4	51.5	6.1	21.3
		24	33.8	30.0	70.0	0	23.7
		48	31.3	33.3	66.7	0	20.9
		72	17.5	0	100.0	0	17.5
		120	5.0	50.0	50.0	0	2.5
Agar medium	500	12	38.8	55.2	41.4	3.4	16.1
		24	22.5	33.3	66.7	0	15.0
		48	20.0	13.3	86.7	0	17.3
		72	10.0	50.0	50.0	0	5.0
		120	11.3	0	100.0	0	11.3

z : Survival rate × Tetraploid plant rate /100

꽃창포의 경우에는(Table 5) 12시간 처리를 제외한 모든 처리에서 생존율이 agar 배지에 처리했을 때 높았으나 4배체의 출현은 전혀 볼 수 없었고, shaking 처리시에도 48시간 처리에서만 9.1%로 나타났다. shaking 처리와 agar 배지 처리 모

두 48시간 보다 낮은 처리에서 혼수체의 출현이 높았고 상대적으로 처리시간이 긴 72, 120시간 처리시에는 2배체의 출현율이 100%였다. 이상의 결과 shaking 처리시에만 48시간 처리에서 4배체 획득효율이 4.3로 나타나 비교적 효과적이었다.

Table 4-5. Effect of colchicine treatment methods on the survival rate and ploidy level of seedling in the *I. ensata* after 60days.

Treatment method	Concentration (ppm)	Treatment (h)	Survival (%)	Ploidy level(%)			Efficiency ^z
				2×	4×	2×+4×	
Solution shaking	500	12	70.0	40.0	0	60.0	0
		24	54.4	80.0	0	20.0	0
		48	47.5	72.7	9.1	18.2	4.3
		72	26.3	100.0	0	0	0
		120	10.0	100.0	0	0	0
Agar medium	500	12	66.3	63.2	0	36.8	0
		24	60.0	60.0	0	40.0	0
		48	48.8	70.0	0	30.0	0
		72	43.0	100.0	0	0	0
		120	30.8	100.0	0	0	0

z : Survival rate × Tetraploid plant rate /100

붓꽃의 경우(Table 4-6) 생존율은 꽃창포에서와 같이 agar 배지에 처리했을 때 높았고 4배체의 출현빈도는 shaking 처리시 12, 24, 48시간 처리에서 각각 13.8%, 28.6%, 8.3%였고, agar 배지 처리시에는 24시간 처리시 12.5%, 48시간 처리시 10.0%였다. 혼수체의 출현빈도는 shaking 처리시 높았으며 agar 배지 처리시에는 2배체의 출현빈도가 높게 나타났다. 이상의 결과로 볼 때 전반적으로 shaking 처리시 4배체 획득효율이 높게 나타나 효과적이었다.

Table 4-6. Effect of colchicine treatment methods on the survival rate and ploidy level of seedling in the *I. sanguinea* after 60days.

Treatment method	Concentration (ppm)	Treatment (h)	Survival (%)	Ploidy level(%)			Efficiency ^z
				2×	4×	2×+4×	
Solution shaking	500	12	77.3	51.7	13.8	34.5	10.7
		24	55.0	35.7	28.6	35.7	15.7
		48	31.3	41.7	8.3	50.0	2.6
		72	13.8	0	0	100.0	0
		120	7.5	80.0	0	20.0	0
Agar medium	500	12	93.9	75.0	0	25.0	0
		24	76.3	75.0	12.5	12.5	9.5
		48	63.8	71.4	0	28.6	0
		72	37.5	50.0	10.0	40.0	3.8
		120	36.0	80.0	0	20.0	0

z : Survival rate × Tetraploid plant rate /100

이상의 결과를 종합해보면 생존율은 부채붓꽃을 제외한 꽃창포와 붓꽃에서 agar 배지 처리시 높았던 반면 4배체의 획득율은 부채붓꽃, 꽃창포, 붓꽃 모두 shaking 처리시 상대적으로 높게 나타나 colchicine 처리로 배수체를 얻기 위한 방법으로는 shaking 처리가 효과적인 것으로 나타났다.

Colchicine을 식물체에 처리하는 방법으로는 종자를 colchicine 용액에 침종시키는 방법, seedling 상태의 식물체를 colchicine 용액에 담그는 방법, colchicine용액 주사법, dropping 등이 알려져 있으나, 주사법이나 dropping과 같이 colchicine 용액을 식물체 내로 직접 침투시키는 방법은 제2엽이나 제3엽을 벗겨내거나 줄기를 자르고 주입해야 하므로 번거롭고 정확한 처리가 어려우며 약해진 식물체가 질병에 쉽게 감염되어 고사하거나 일시적인 수분 손실로 말라 죽게될 우려가 있어 바람직하지 못한 것으로 보고되었다(Kang, 1988). 반면 식물체의 정단분열 조직 부위에만 colchicine을 처리하면 염색체 배가 효과를 높일 수

있고(Blakeslee와 Avery, 1938; Shinha, 1987) 특히 seedling 상태의 식물체에 처리하면 효과가 좋다는 보고가 있으며(Kang, 1988) 본 실험에서 seedling 상태의 식물체를 shaking 처리하였을 때 colchicine 용액에 장시간 침지 되어 있던 뿌리가 해를 입어 뿌리 발육이 현저하게 떨어지고 수분을 흡수하지 못해 식물체가 마르는 현상을 보여, 이런 단점을 보완하기 위한 방법으로 agar가 포함된 colchicine 고체배지에 seedling 상태의 식물체를 뿌리가 닿지 않도록 거꾸로 치상하는 방법을 사용하였다. 결과 생존율에 있어서는 agar 배지에 처리했을 때 효과적이었으나 배가율은 상대적으로 저조하였는데, 이것은 agar 배지 처리시에 colchicine의 조직내 침투력이 떨어져 colchicine이 조직내로 충분히 스며들 수 없었기 때문인 것으로 보여진다.

3) 저농도와 고농도에서 처리 시간별 배가 효과

배수체 식물 획득에 더 효과적인 농도와 시간을 알기 위해 저농도 colchicine 용액에서 장시간 처리했을 경우와 고농도 colchicine 용액에서 단시간 처리했을 경우 4배체 획득효율을 비교해 보았다(Fig. 4-7, 8). Fig. 4-7은 100, 500, 1000ppm의 저농도 colchicine에 12~120시간의 장시간 처리시 4배체 획득효율을 보여주고 있다. 100ppm 농도에서는 48~72시간 처리시, 500ppm 농도에서는 12~24시간 처리시, 1000ppm 농도에서는 12시간 처리시 4배체 획득효율이 높았으며 100ppm 농도로 12~24시간 처리시와 500ppm 농도로 72~120시간 처리시, 1000ppm 농도로 24~120시간 처리시는 0로 나타나 전반적으로 0~15 수준의 4배체 획득효율을 보였다. 처리농도가 낮을 경우는 처리시간을 길게, 처리농도가 높을 경우는 처리시간을 짧게 하는 것이 배수체 획득에 효과적이었다.

Fig. 4-8은 1000, 3000, 5000ppm의 고농도 colchicine에 3, 6, 9시간의 단시간 처리시 4배체 획득효율을 나타낸 결과로 1000ppm 농도에서는 6~9시간, 3000ppm 농도에서는 3~9시간, 5000ppm 농도에서는 3~6시간 처리시 4배체 획득효율이 높았으며, 3000ppm 농도로 처리했을 때 20~30% 수준으로 가장 효과적이었고, 1000ppm 농도로 3시간 처리했을 때와 5000ppm 농도로 9시간 처리했을 때 10% 수준으로 상대적으로 저조하여 전반적으로 10~30 수준의 4배체 획득효율을 보였다.

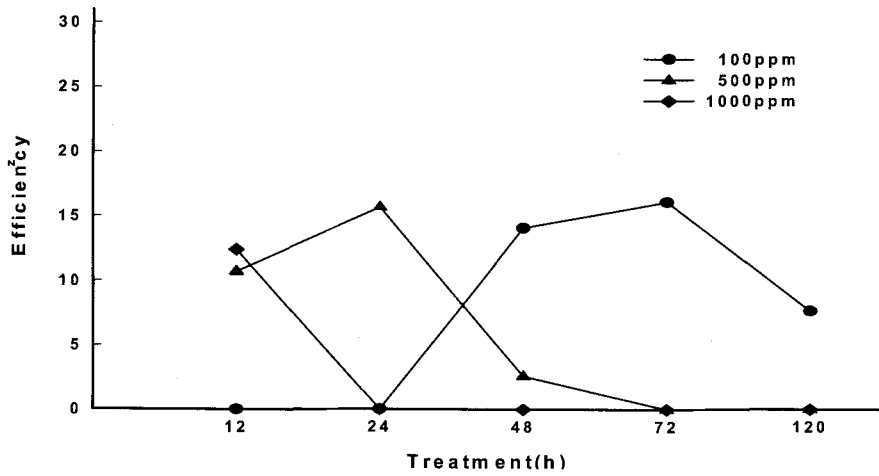


Fig. 4-7. Gainable tetraploid plant rate of *I. sanguinea* seedlings treated with lower concentrations during long hours of colchicine.

(z : Survival rate × Tetraploid plant rate /100)

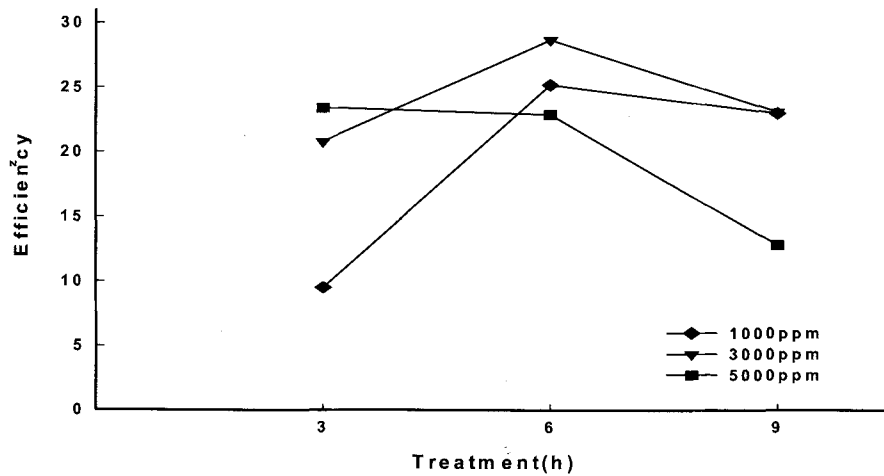


Fig. 4-8. Gainable tetraploid plant rate of *I. sanguinea* seedlings treated with higher concentrations during short times of colchicine.

(z : Survival rate × Tetraploid plant rate /100)

이상의 결과를 종합해 볼 때 저농도·장시간 처리시 4배체 획득효율이 0~15 수준에 머물렀던 반면 고농도·단시간 처리시 10~30 수준으로 높게 나타나 colchicine은 낮은 농도에서 오랜 시간 처리하는 것 보다 높은 농도에서 짧은 시간 처리하는 것이 배수체 획득에 효과적이었다.

보고에 따르면 colchicine이 세포 분열시 방추사의 형성과 tubulin의 형성을 방해하므로 식물 자체가 고농도 colchicine에 장시간 처리를 받으면 죽게 되고 (Blakeslee 등, 1938; Heinz와 Grace, 1970; Hermsen 등, 1970; Davidson 등, 1983), 식물체를 colchicine에 침지하는 시간이 길수록 생존율이 낮아진다고 하였는데(Yun 등, 1998), 본 실험에서도 colchicine에 장시간 처리된 식물체에서 공통적으로 뿌리의 발육이 현저히 떨어져 죽는 것을 발견할 수 있었다. 하지만 고농도에서도 12시간 미만의 단시간으로 처리하였을 때는 뿌리의 발육뿐만 아니라 지상부의 상태도 훨씬 양호하였다(Fig. 9).

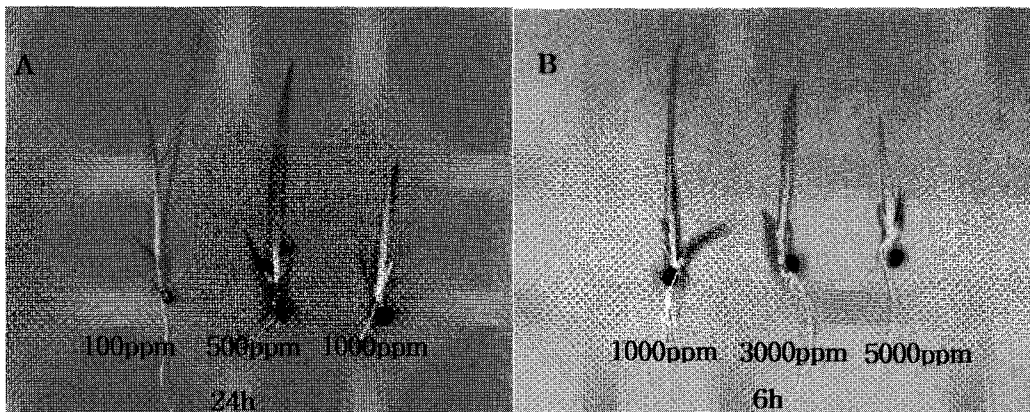


Fig.4-9. Growth form of a month after *I. sanguinea* seedlings treated with colchicine.

A: Lower concentrations during long hours.

B: High concentrations during short times.

2. oryzalin, caffeine 처리에 의한 염색체 배가 효과

Colchicine으로 식물의 염색체를 배가시킨 실험들의 결과에서 볼 때 colchicine을 처리하여 효과적으로 염색체 배가를 유도할 수 있지만, colchicine은 인체 뿐 아니라 식물체에서도 그 독성이 강하고 비용 면에서도 부담이 큰 단점을 가지고 있어 최근 oryzalin, APM, phosphoric amide, caffeine 등이 대체 물질로 사용되고 있다. 따라서 본 실험에서는 oryzalin과 caffeine을 농도 및 시간별로 붓꽃의 seedling에 처리했을 때 배수체 획득에 미치는 효과를 살펴보았다.

Table 4-7. Effect of combinations of oryzalin concentration and treatment duration on survival rate and ploidy level of seedling in the *I. sanguinea* after 60days.

Concentration (ppm)	Treatment (h)	Survival (%)	Ploidy level(%)			Efficiency ^z
			2×	4×	2×+4×	
10	3	100.0	100.0	0	0	0
	6	100.0	100.0	0	0	0
	9	100.0	100.0	0	0	0
	24	100.0	50.0	0	50.0	0
50	3	100.0	100.0	0	0	0
	6	100.0	100.0	0	0	0
	9	100.0	100.0	0	0	0
	24	100.0	50.0	16.7	33.3	16.7
100	3	100.0	100.0	0	0	0
	6	100.0	100.0	0	0	0
	9	100.0	66.7	0	33.3	0
	24	96.6	63.6	18.2	18.2	17.6
500	3	100.0	100.0	0	0	0
	6	98.3	83.3	0	16.7	0
	9	95.0	60.0	20.0	20.0	19.0
	24	91.4	26.7	40.0	33.3	36.6

z : Survival rate×Tetraploid plant rate /100

oryzalin의 경우(Table 4-7) 10ppm의 농도로 처리했을 때 생존율은 100%였으나 4배체 출현은 전혀 볼 수 없었고 혼수체의 출현도 24시간 처리시에만 50%였다. 50ppm 농도로 처리했을 때도 생존율은 100%였으며 3~9시간 처리시 4배체와 혼수체의 출현이 없었고 24시간 처리시 4배체 출현빈도가 16.7%, 혼수체 출현빈도가 33.3%였다. 100ppm 농도로 처리했을 때는 3~9시간 처리시 생존율이 100%였으나 24시간 처리시에 96.6%로 낮아졌고 4배체의 출현은 24시간 처리시에만 18.2%였다. 혼수체의 출현빈도는 9시간 처리와 24시간 처리에서 각각 33.3%, 18.2%로 나타났다. 500ppm 농도로 처리했을 때 생존율은 3시간 처리시 100%였으나 24시간 처리시 91.4%로 처리시간이 길어짐에 따라 감소하는 경향을 보였고, 9시간 처리와 24시간 처리에서 각각 20.0%, 40.0%의 4배체 출현이 있었다. 혼수체의 출현빈도는 6시간 처리시 16.7%, 9시간 처리시 20.0%, 24시간 처리시 33.3%였다. 이상의 결과로 볼 때 500ppm의 농도로 24시간 처리했을 때 4배체 획득효율이 36.6으로 가장 높았다.

Caffeine의 경우(Table 4-8) 1000ppm 농도로 처리했을 때 24시간 처리시 생존율은 100%였으나 4배체의 출현이 없었고, 48, 72시간 처리시에 95.8%로 생존율은 다소 낮아졌으나 4배체의 출현빈도는 각각 10.0%, 12.5%였으며 혼수체의 출현빈도는 20~50% 수준이었다. 3000ppm 농도로 처리했을 때는 24시간 처리시 100%의 생존율을 보였으나 48시간 처리시 88.0%, 72시간 처리시 32.0%로 처리 시간이 길어짐에 따라 생존율이 급격하게 감소하는 경향이였다. 4배체 출현빈도는 24시간 처리시 25.0%, 48시간 처리시 70.0%, 72시간 처리시 60.0%로 높았고 혼수체의 출현빈도는 24시간 처리시 62.5%, 72시간 처리시 40.0%로 나타나 72시간 처리시 2배체의 출현은 없었다. 5000ppm 농도로 처리했을 때 역시 24시간 처리시 100%의 생존율을 보였으나 48시간 처리시 36.0%로 낮아졌고, 72시간 처리에서는 생존 개체가 없어 처리 시간이 길어짐에 따라 감소하는 경향을 보였다. 4배체 출현빈도는 40% 수준이었으며 혼수체의 출현빈도는 40~60% 수준으로 24시간 처리시 2배체의 출현은 없었다. 10000ppm 농도로 처리했을 때는 24시간 처리시에만 생존율이 76.0%였고, 48시간, 72시간 처리시에는 생존 개체가 없었으며 4배체 출현빈도는 23.1%, 혼수체 출현빈도는 76.9%였다. 이상의 결과를 볼 때 3000ppm 농도로 48시간 처리시에 4배체 획득효율이 61.6으로 가장 높았다.

Table 4-8. Effect of combinations of caffeine concentration and treatment seedling in the *I. sanguinea* after 60days.

Concentration (ppm)	Treatment (h)	Survival (%)	Ploidy level(%)			Efficiency ^z
			2×	4×	2×+4×	
1,000	24	100.0	57.1	0	42.9	0
	48	95.8	70.0	10.0	20.0	9.6
	72	95.8	37.5	12.5	50.0	12.0
3,000	24	100.0	12.5	25.0	62.5	25.0
	48	88.0	30.0	70.0	0	61.6
	72	32.0	0	60.0	40.0	19.2
5,000	24	100.0	0	42.9	57.1	42.9
	48	36.0	20.0	40.0	40.0	14.4
	72	0	-	-	-	-
10,000	24	76.0	0	23.1	76.9	17.6
	48	0	-	-	-	-
	72	0	-	-	-	-

z : Survival rate×Tetraploid plant rate /100

이상의 결과를 종합해 보면 붓꽃의 배수체 식물을 획득하기 위해 oryzalin은 500ppm 농도로 24시간, caffeine은 3000ppm 농도로 48시간 처리했을 때 4배체 획득 효율이 가장 높아 효과적이었다.

Oryzalin은 감자 등 많은 작물에서 colchicine 보다 독성이 약하고, 염색체 배가에 효과적이며(Rumulu 등, 1991; Wan 등, 1991; Bouvier 등, 1994) 매우 낮은 농도 (colchicine의 1/100) 에서도 높은 활성을 나타낸다고 보고되고 있는데 (Morejohn 등, 1987) 본 실험에서 붓꽃의 경우에도 대부분의 처리에서 생존율이 100%로 매우 양호하였고 colchicine 처리농도 보다 낮은 농도에서부터 배가 효과가 나타나 동일한 결과를 나타내었다. 하지만 처리농도와 시간이 증가됨에 따라 배가율이 증가하는 경향을 보이고 있어 더 효과적인 처리농도와 시간을 밝히기 위해 처리농도와 시간을 증가시켜 사용해 볼 필요성이 있는 것으로 생각된다. 배수

체를 얻기 위해 caffeine이 사용된 경우로는 Thomas 등(1997년)에 의해 불임성 반수체 밑에 이용된 예가 있으며, 이 실험 결과 caffeine은 식물에 대한 독성이 매우 적고, 배가효과도 매우 우수한 것으로 보고되었다. 한편 나리의 인편에 caffeine을 처리하였을 경우 colchicine 처리에 비해 혼수체의 출현이 적었던 반면 4배체 형성율은 높았다는 보고가 있는데(Chung, 2002), Thomas(1996)의 보고에 따르면 이것은 대부분의 antimitotic agents는 생육과정 중 발육초기단계를 포함한 광범위한 발달단계에서 배수화가 일어나지만 caffeine의 경우는 발육단계의 특정시점에서 배수화가 일어나기 때문이며 따라서 일단 처리를 받은 세포는 colchicine에 비해 혼수체의 출현이 낮고 배가율은 높아지게 된다는 것이다. 하지만 본 실험에서는 혼수체의 출현이 비교적 높게 나타나 이와 상이한 결과를 보였으며, 배가효과는 colchicine보다 10배 정도 높은 농도에서 나타났다.

제 4절 결론

본 연구는 *Iris*屬 식물의 육종을 위한 기초 자료를 얻고자 실시되었으며, 종속간 교잡시 발생하는 F1 불임성을 극복하기 위해 colchicine, oryzalin, caffeine을 처리하여 인위적인 염색체 배수화로 배수체 식물을 획득하고자 수행되었다.

Colchicine 처리에 의한 염색체 배가 효과를 구명하기 위해 부채붓꽃(*I. setosa*), 꽃창포(*I. ensata*), 붓꽃(*I. sanguinea*)의 seedling에 100~1000ppm 농도로 12~120시간 colchicine을 처리한 결과 부채붓꽃은 100ppm 농도로 12시간 처리, 꽃창포는 500ppm 농도로 48시간 처리, 붓꽃은 100ppm 농도로 72시간 처리시 4배체 획득효율이 가장 높게 나타났고, 처리방법에 따른 염색체 배가 효과를 비교한 결과 0.7% agar가 포함된 colchicine 고체배지에 처리했을 경우보다 colchicine 용액에 shaking 처리했을 경우 효과적으로 나타났다. 저농도(100~1000ppm)·장시간(12~120h) 처리와 고농도(1000~5000ppm)·단시간(3~9h) 처리시 colchicine의 배가 효과를 비교한 결과 고농도·단시간 처리에서 4배체 획득효율이 전반적으로 높게 나타났고, 신근의 형성과 발육도 양호하였다.

Oryzalin과 caffeine 처리에 의한 염색체 배가 효과를 구명하기 위해 붓꽃의 seedling에 oryzalin은 10~500ppm 농도로 3~24시간, caffeine은 1000~10000ppm

농도로 24~72시간 처리한 결과 oryzalin의 경우 500ppm 농도로 24시간 처리시, caffeine의 경우 3000ppm 농도로 48시간 처리시 4배체 획득효율이 가장 높았다. 근단 세포 염색체를 조사한 결과 부채붓꽃은 $2\times=38$, $4\times=76$, 붓꽃은 $2\times=28$, $4\times=56$, 꽃창포는 $2\times=24$ 인 것을 확인할 수 있었다.

제 6 장 r선 처리에 의한 변이체 선발

제 1절 서론

자연돌연변이는 그 출현 빈도가 매우 낮아서 방사선, 화학약품 등을 활용하여 인위적으로 돌연변이의 유발율을 높일 수 있다 (Gustafsson, 1963, Hagberg 1969) 우리나라에서는 1959년 원자로가 건설되면서 방사선을 이용코자 1965년 방사선 농학 연구소가 설립되어 적극적인 돌연변이 연구가 수행되어 오고 있다. 돌연변이 선발에서 돌연변이 유발방법의 연구는 종자에 대한 적정조사 선량을 조사하여 방사선 감수성의 품종간 차이를 밝혀두는 연구가 우선 되어야 한다 (Sprarrow 등 1971, Matsumura 등 1960, Ukai 1968, a. b 1970, 高木 1974, 山下 1974 등). 돌연변이의 선량 반응은 M_1 세대의 생존율이나 종자임성과 관계가 깊고 돌연변이율의 실제에서는 M_1 세대의 모든 장해 정도로부터 돌연변이 율의 상한을 추정해 두는 것이 중요하다. Conger 등 (1966)은 돌연변이 상한을 높이는데 전처리 등의 요인은 그다지 유효하지 않고 통상의 건조 종자의 선량효과와 비슷하다고 하였으며 山下(1974)는 종자조사와 생체 조사에서 조사가능 선량과 단위 선량당 엽록소 돌연변이를 여러 작물에서 비교한바 r선 생체조사가 종자 조사의 3배에 달하는 것으로 보고하였다. 따라서 r선 조사에서 재료의 변경 요인은 작물에 따라 효과가 다르게 나타나고 있다.

Yamagata(1965)등은 벼 종자에 x선을 조사한 바 나타난 돌연변이는 열성인자에 의해 지배된다고 가정하였다. 식물에 있어서 돌연변이 유발연구는 그 성과도 커서 이들을 이용한 기초 또는 실용화 연구가 계속 되고 있는 실정이다.

자생붓꽃속 식물종자에 r선 조사 선량을 달리 했을 때 M_1 세대에서의 방사선 감수성 등에 미치는 영향을 구명하므로써 붓꽃속 식물의 돌연변이체 선발을 위한 기초자료를 얻고자 수행하였다.

제 2절 재료 및 방법

공시재료는 국내자생지에서 수집되어 교내 포장에 재배되고 있는 붓꽃, 꽃창포, 부채붓꽃과 도입종인 꽃창포원예종에서 성숙 종자를 채취하여 사용하였다.

방사선 조사는 한국 원자력 연구소에 보유중인 저준위 조사시설(^{60}C)을 이용하여 품종당 정선했한 건조종자에 r선 0, 5, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 600Gy로 20시간 동안 조사한 종자를 막대사발을 이용하여 종피 일부를 제거하고 충실한 종자 300립씩 선발한 후 95% Xylene에서 5분간 처리 후 휘발시켜 직경 11cm의 petridish에 filter paper를 2매 깔고 증류수를 가하고 50립씩 4반복으로 파종하여 25℃의 배양실에 두고 발아율을 조사하였다.

발아조사는 치상후 2일 간격으로 하였으며 유근이 종피를 뚫고 1.0mm 이상 신장한 것을 발아한 것으로 하였다.

제 3절 결과 및 고찰

붓꽃, 타래붓꽃, 꽃창포, 꽃창포원예종, 부채붓꽃의 종자를 저선량의 감마선 8단계 수준으로 조사한 후 파종 70일까지 발아율과 발아한 개체를 트레이에 치상하여 조사한 결과를 표 5-1에 나타내었다.

붓꽃에서는 파종후 70일에서의 발아율과 생존율은 발아율에서 무처리 63%를 보였으나 r선 5, 25, 50Gy의 극히 저선량 처리에서는 무처리보다 높은 77%, 67%, 69%의 높은 발아율을 나타내었다. 100, 200, 300 Gy 조사에서 55, 48, 53%의 발아율을 보여 발아율로서는 50% 이상의 결과를 나타내었다. 600Gy 처리에서도 29%가 발아하였다. 발아율은 높은경향이나 발아된 개체를 트레이에 이식하여 생존개체를 조사한 결과 5Gy 처리는 40% 생존 25Gy 처리에서는 11% 50Gy 처리에서는 6% 생존율을 나타내었으며 100Gy 이상의 처리 선량에서는 발아후 이식한 개체들이 모두 고사하였다.

붓꽃의 r선처리 적정선량을 구명하기 위한 종자발아율과 생존율을 기준으로 볼 때 적정 처리선량은 25-50Gy가 적절한 것으로 생각되었다.

타래붓꽃에서는 파종후 70일까지의 종자발아율은 무처리 49%이며 5Gy에서 38% 25Gy

처리에서 26%, 50Gy처리 선량에서 13%, 100Gy처리구에서 1%, 200Gy에서 0.6%의 발아율을 나타내었으며 300Gy이상에서는 전혀 발아하지 않았다. 타래붓꽃에서는 극히 저선량에서도 발아율이 낮게 나타났으며 생존율에서는 더 낮은 경향을 보여 5Gy 처리 선량에서 16%, 25Gy에서는 13%, 50Gy에서는 8%, 100Gy이상에서는 0%의 생존율을 나타내었다. 타래붓꽃 종자에 대한 적정 r선 처리 선량은 발아율과 생존율에서 판단하면 25~50Gy가 적당한 것으로 판단되었다.

꽃창포자생종에서의 무처리 발아율은 48%에 비해 r선 처리 발아율은 5Gy 선량에서도 48%로 무처리와 같았으며 25Gy처리 선량에서는 38%, 50Gy에서도 38%였으며 100~400Gy에서는 무처리보다 높은 54~63%의 발아율을 나타내었으나 유근이 발아공을 통과하여 신장이 정지되고 이식 이후 고사하는 결과를 나타내었다. 꽃창포자생종의 r선 처리 적정선량도 25~50Gy인 것으로 볼 수 있었다.

꽃창포원예종과 부채붓꽃의 r선 처리에서도 적정선량은 25~50Gy 인 것으로 나타났 다.

표 5-1 r선 처리에 의한 붓꽃속 식물종자의 치상 70일 후 발아율 및 생존율

r선 처리 Gy	공시 종자립수	종자발아율 및 생존율(%)				
		붓꽃	타래붓꽃	꽃창포	꽃창포 원예종	부채붓꽃
0	200	63(63)	49(49)	48(48)	51(51)	71(71)
5	200	77(40)	38(16)	48(10)	49(11)	41(16)
25	200	67(11)	26(13)	38(8)	47(19)	39(10)
50	200	69(6)	13(8)	38(6)	48(8)	63(9)
100	200	55(0)	1(0)	60(0)	26(0)	23(0)
200	200	48(0)	0.6(0)	54(0)	29(0)	25(0)
300	200	53(0)	0(0)	63(0)	32(0)	0(0)
400	200	45(0)	0(0)	59(0)	27(0)	0(0)
600	200	29(0)	0(0)	29(0)	22(0)	0(0)

()는 r선 처리후 발아개체들을 트레이 이식 후 생존율(%)

붓꽃의 초장 생장율에서 이식 후 10일째 무처리가 8.2cm로 생장한 반면 5Gy 선량 처리에서는 10일째 발아가 지연되어 이식초기 1cm내외 인 것이 20일째 에서는 무처리와 거의 같은 10cm정도이었으나 30일 이후부터는 무처리 12cm보다 더 생육이 빨라 14.5cm로 성장하였다. 저선량 처리에서 자극을 받아 생장이 촉진된 것으로 생각되었으며 25~50Gy 처리선량에서는 무처리에 비해 생육이 억제되었다.(그림 5-1)

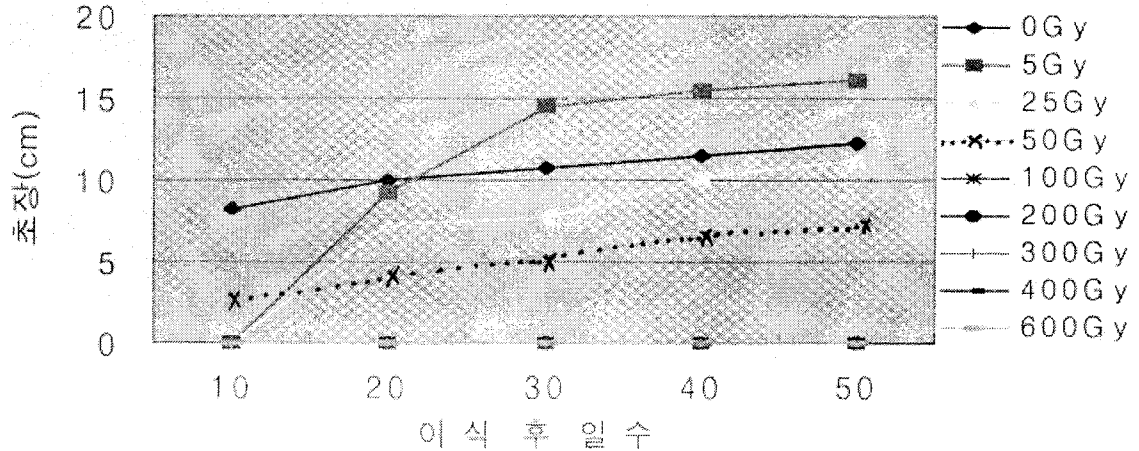


그림 5-1 r선 처리 후 붓꽃 종자 유묘의 초장생장
선량 100-600Gy 처리는 발아이후 고사하였음

방사선 감수성에 대한 연구는 지표로 되는 치사효과로 나타난다고 한 Osborn과 Lunder(1961)가 얻은 결과를 Sparrow 등 (1971)이 정리한 결과에서 식물종에 따라 LD₅₀이 다르게 나타난 것으로 보고한 바 있으며, Matsumura 등 (1960)이 재배식물의 건조종자에 ⁶⁰Co의 r선을 조사한 발아율에서보면 분명한 차이가 보이지 않는 경우에도 본엽 2-3엽기의 생존율에서 보면 선량의 증가와 함께 생존율이 크게 저하하는 경우도 있다고 하였다. 본 연구의 결과에서도 같은 양상을 나타내었으며 종자 조사에 의한 감수성의 비교는 발아율 보다도 유묘기의 생존율을 지표로 조사하는 것이 타당할 것으로 생각된 것은 같은 결과를 얻은 것이다. 붓꽃속은 다년생 식물이므로 장기간에 걸쳐 조사해 보아야 할 것이다.

제 4절 결론

붓꽃속 식물의 건조 종자에 저선량의 감마선을 각선량별로 직접 조사하여 나타나는 효과를 알아보기 위한 실험에서 붓꽃에서는 r선 5, 25, 50Gy 3처리에서 발아율은 무처리 63%보다 높게 나타났으며 생존율은 낮게 나타나 생존율로 본 적정처리 선량은 25-50Gy인 것으로 판단되었다. 타래붓꽃, 꽃창포, 부채붓꽃의 r선 처리 종자 발아양상을 무처리에 비해 저선량의 5, 25, 50Gy 방사선 조사구에서 발아율이 점점 낮게 나타났으며 100Gy 이상에서는 발아는 되었으나 이식과 동시에 고사하여 생존이 되지 않았으며 r선 적정처리 선량은 생존율에서 볼 때 25-50Gy가 적당한 것으로 생각되었다.

제 7 장 자생꽃창포 대량번식체계 확립

제 1절 서 론

Iris 屬은 60屬, 800種을 포함하고 있는 붓꽃科의 중심으로 약 230여 종이 있으며 대부분 다년생 속근초이고, 북위 20도 부터 65도 사이에 넓게 분포하고 있다 (Goldblatt, 1981; Cronquist, 1981). 우리나라에는 붓꽃 屬(*Iris*), 범부채 屬 (*Belamcanda*), 등심붓꽃 屬(*Sisyrinchium*)의 3속(Chung 등, 1949)과 13종 4변종이 있으며, 붓꽃 屬(*Iris*)의 한국 특산식물로는 노랑붓꽃(*Iris koreana*), 노랑무늬붓꽃 (*Iris odaesanensis*), 흰각시붓꽃(*Iris rossii* f. *alba*), 넓은잎각시붓꽃(*Iris rossii* var. *latifolia*)등 2종 1변종 1품종이 자생하고 있다(Sim, 1988).

Iris 屬 식물은 種에 따라 건조지나 습지에 생육이 잘되며, 이른 봄 부터 초여름에 걸쳐서 개화하고, 線形인 잎과 3변이 직립인 내화피와 3변이 하수인 외화피편을 가진 꽃은 관상가치가 높은 장점을 가지고 있고, 꽃창포는 자색을 기본으로 많은 원에 품종이 육성되어 세계각지에 재배되고 있으며 다양한 화색을 가진 품종이 개발되고 있다(Kohlein, 1981).

Iris 屬 식물의 개발은 주로 종간 교잡, 종속간 교잡, 배수체 작성 등에 의해 육성 되어 왔으며, 자연상태에서 자가수정이 가능한 작물이지만 암술머리 뒤에 수술이 위치하는 꽃의 구조적 특성상 자가수정이 어렵고, 타가수분을 하게 되므로 자생 붓꽃 류는 대부분이 이형 접합체이다(Jehan 등, 1994). 이들 이형 접합체를 유성번식에 의해 번식시키면 모주의 품종특성이 소실되는 반면, 영양번식은 체세포의 유사분열에 의하기 때문에 모주의 품종특성, 즉 표현형과 유전자형을 유지증식 시킬 수 있다. *Iris* 屬 식물의 번식은 지금까지 주로 근경에 의한 분주 번식을 이용하여 왔으나 *Iris* 屬 식물의 근경은 분얼이 1년에 한 두개 밖에 생기지 않고 세대가 경과함에

따라 근경의 퇴화가 일어나므로 번식의 속도가 매우 느리다(Yabuya 등, 1991). 또한 분주와 같은 영양번식법은 번식시 상처가 나기 마련이고, 상처부위를 통한 바이러스와 세균성 병원균의 침입을 피할 수 없다. 이로 인해 영양 번식성 작물은 시간이 경과함에 따라 품종고유의 특성을 발휘하지 못할 뿐만 아니라 수확량과 품질이 현저히 저하되고 있다. 이를 개선하기 위하여 지하경과 정단 분열조직을 이용한 增殖을 시도하였으나 量的增殖에는 분주에 비해 어느 정도 效果가 있지만, 지하조직의 채취 어려움과 오염 발생 등이 문제가 되고 있다(Jung 등, 1995). 그러므로 *Iris* 屬 식물의 번식의 어려움을 해결하고 고유한 품종의 유지 증식을 위해서 여러 기관을 통한 조직배양의 시도가 필요하다고 생각되어진다. Fujino(1972)와 Hussey(1976)는 *Iris hollandica*의 경정, 화경으로 부터 캘러스 유기와 식물체 증식, Meyer 등(1975)은 속근 *Irises*(*horticultural varieties*)의 경정, 화경으로 부터의 캘러스 배양을 시도하였다. Gozu 등(1993)은 *I. pallida*의 잎을 가지고 번식 시켰고, Jehan 등(1994)은 *Iris pallita* Lam., *Iris germanica* L.의 잎, 경정, 화사를 통해 체세포배를 배양하였다.

따라서, 본 실험에서는 앞에서 언급한 *Iris* 屬 식물의 번식의 어려움을 해결하기 위해 화기부위, 성장점들을 배양재료로 하여 우선 적정배양 환경을 구명하고, 절편체로부터의 식물체 분화에 알맞은 생장조절물질의 농도를 구명하고 *Iris* 屬 식물의 대량증식법을 정립하기 위하여 실험을 수행하였다.

제 2절 재료 및 방법

1. 자생꽃창포(*Iris ensata*)의 기내 배양환경

식물재료는 대구가톨릭대학교 실험포장에서 재배되고 있는 자생꽃창포(*Iris ensata*)의 개화 5일전의 화기부위를 채취하여 화피기부조직(perianth), 자방(ovary), 소화경(pedicel), 화경(peduncle) 조직을 사용하였다. 식물재료의 殺菌은

화기가 엷으로 싸여진 상태에서 3% sodium hypochlorite solution에 5분간 浸漬시킨 다음, 70% ethanol 용액에 3분간 浸漬하였으며, 그 후 멸균수로 3회 水洗하였다. 살균한 재료는 clean bench 內에서 조제 치상 하였고, 이때 사용된 치상 재료는 화피기부조직은 화사가 포함되지 않은 조직을 치상하였으며, 지방은 세로로 2등분하여 절단면이 배지에 닿게 치상 하였고 소화경과 화경은 0.5cm크기의 disc모양으로 잘라서 치상 하였다.

자생꽃창포의 기내배양환경에 적합한 환경을 구명하기 위해 MS(Murashige & Skoog, 1962) 기본배지에 NAA $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 에 BA $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 첨가하고 광은 0, 8, 16, 24시간으로 온도는 10, 15, 25, 30°C 로 sucrose의 농도는 1, 3, 6, 9%로 구분 처리하였다. 각 처리별로 pH 5.7로 조정하고 121°C 에서 20분간 고압 살균하였다. 각 절편체를 Tube($2 \times 10\text{cm}$)에 1개씩 치상하여 20반복으로 하였으며 배양 8주 후에 조사하였다. 배양은 처리요인을 제외한 나머지요인을 일정하게 조절한 chamber 內에서 배양하였다.

2. 자생꽃창포(*Iris ensata*)의 기내번식

식물재료는 실험1에서와 동일한 방법으로 사용하였다. 자생꽃창포의 기내증식에 알맞은 생장조절물질을 구명하기 위해 NAA (α -naphthaleneacetic acid), BA (6-benzyle andenine)를 각각 0.1, 1.0, 3.0, $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 로 혼용 처리하여 각 절편체 별로 16처리 20반복으로 하였다.

각 처리별로 실험1의 결과에 따라 sucrose 3%, Agar 7g, pH 5.7로 조정하여 온도 25°C , 일장 16시간에서 배양하였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. 자생꽃창포(*Iris ensata*)의 기내배양환경

일반적으로 조직배양은 밀폐된 용기나 가스의 교환이 제한적으로 이루어지는 환경 조건 하에서 식물체를 배양하기 때문에 자연상태에서 식물체를 재배하는 것과는 큰 차이가 있다. 특히, 자연상태에서 광합성 작용에 의해서 탄수화물을 공급받는 대신에 인위적으로 배지내 탄소원을 첨가하기 때문에, 광합성은 상당히 제한된 범위 내에서만 이루어질 뿐만 아니라 균일한 온도와 높은 상대습도는 물질이나 에너

지의 유입율이 낮을 수밖에 없는 특수한 환경을 가지고 있다(Jung 등, 1995).

기내배양환경의 많은 요인들은 배양중인 식물체의 생장과, 형태형성에 영향을 미친다(Hughes, 1981). 즉, 배양환경이 부적절한 경우 식물체는 생리적, 형태적 장애를 일으키게 된다(Debergh 와 Maene, 1984). 따라서 배양환경을 조절함으로써 균일하고 건전한 식물체를 생산할 수 있고, 발근과 신초의 생장을 동시에 유도할 수 있다면 생산비를 효율적으로 절감 할 수 있다. 또한 배양과정 중에 환경을 조절해 줌으로써 식물체가 기외로 이식된 후 더 빠르고 강한 세력으로 자랄 수 있도록 도와 줄 수 있다.

1) 일장

자생꽃창포(*Iris ensata*)의 기내배양에 있어서 기관형성에 미치는 일장 효과를 관찰하였다. 화피기부조직의 치상은 전체적으로 기관의 형성이 양호하였고, 특히 16시간 일장下에서는 신초형성, 뿌리형성이 촉진되어 신초수 4.9개, 뿌리수 1.9개의 형성을 나타내었다(Table 6-1). 또한 기관형성일수도 단일보다는 16시간 이상의 장일구에서 다소 촉진되는 경향이었는데 단일下에서는 신초의 백화현상이 관찰되었다.

자방(ovary)을 치상한 경우는 일장 16시간에서 기관의 형성이 양호하여 신초수 3.7개, 뿌리수 5.3개의 형성을 보였고, 24시간의 장일 상태보다 8시간의 단일에서 기관의 형성이 양호하였다. 소화경(pedicel)조직의 치상에서도 16시간의 일장에서 신초의 형성과 뿌리의 형성이 양호하였으며 생체중도 가장 무거웠다. 그러나 8시간에서는 뿌리의 형성만 나타나고 부정근의 분화는 전혀 나타나지 않았다(Table 6-3). 화경(peduncle)조직에서는 모든 일장처리에서 신초의 형성이 매우 저조하였고, 8시간의 일장에서 기관분화가 전혀 이루어지지 않음을 관찰할 수 있었다. 그러나 16시간 일장에서 뿌리의 형성은 매우 양호하였다(Table 6-4). 일반적으로 16시간 일장에서 발근의 유도가 촉진되어지지만, 화피기부조직, 자방, 소화경 모두 16시간의 일장에서 신초와 뿌리의 형성이 양호하게 나타난 것은 16시간 일장일 때 식물의 성장상태가 가장 좋아서 생육이 왕성하기 때문이라 생각한다. Hasegawa 등(1973)은 *Asparagus*의 배양에서 신초수의 증식은 일장이 길어짐에 따라 증가하며 그 원인은 배양조직의 광합성의 증가에 기인한다고 보고하

였고, Han 등(1994)도 *Alstroemeria*의 배양에서 연속조명, 16시간 明, 暗 순으로 신초수, 생체중, 지하경의 분지가 감소하였는데 이는 식물체의 광합성이 감소하여 식물생장이 저하된 것으로 생각된다고 보고하였으며, Simonsen Hildebrant (1971)의 글라디올러스의 연구에서도 일장 16시간 下에서 기관 분화율이 높다고 보고하여 본 실험에서와 같은 경향을 보였다.

이상에서 자생꽃창포(*Iris ensata*)의 절편체로부터 유식물체의 재분화를 위해서는 16시간의 일장이 가장 효과적이라고 판단된다.

Table 6-1. Effect of day length on organ formation from perianth of *Iris ensata*.

Day length(h)	Shoot number(ea.)	Shoot length(cm)	Root number(ea.)	Root length(cm)	Fresh weight(mg)
0	3.30 b ²	0.94 b	2.10 a	1.25 b	9.20
8	3.30 b	1.28 b	0.70 b	0.13 d	9.84
16	4.90 a	1.86 a	1.90 a	1.58 a	10.91
24	4.90 a	1.09 b	1.50 a	0.94 c	10.87

²Mean separation in columns by Duncan's multiple range test at $P=0.05$.

Table 6-2. Effect of day length on organ formation from ovary of *Iris ensata*.

Day length(h)	Shoot number(ea.)	Shoot length(cm)	Root number(ea.)	Root length(cm)	Fresh weight(mg)
0	3.10 ab ²	0.70 b	3.50 bc	1.14 a	10.79
8	2.70 b	0.83 ab	4.40 ab	1.19 a	14.28
16	3.70 a	1.12 a	5.30 a	1.30 a	14.68
24	2.40 b	0.78 b	2.40 c	1.05 a	13.79

²Mean separation in columns by Duncan's multiple range test at $P=0.05$.

Table 6-3. Effect of day length on organ formation from pedicel of *Iris ensata*.

Day length(h)	Shoot number(ea.)	Shoot length(cm)	Root number(ea.)	Root length(cm)	Fresh weight(mg)
0	0	0	2.60 b	0.75b	2.93
8	0.83 b ^z	1.46 a	2.70 b	0.94b	3.94
16	1.90 a	1.11 a	4.40 a	1.50a	8.18
24	0.10 c	0.06 b	1.80 b	0.94b	4.66

^zMean separation in columns by Duncan's multiple range test at $P=0.05$.

Table 6-4. Effect of day length on organ formation from peduncle of *Iris ensata*.

Day length(h)	Shoot number(ea.)	Shoot length(cm)	Root number(ea.)	Root length(cm)	Fresh weight(mg)
0	0.20 a ^z	0.25 a	5.90 a	1.98 a	6.21
8	0	0	0	0	2.46
16	0	0	1.70 b	0.90 b	4.16
24	0.10 a	0.45 a	1.70 b	1.05 b	4.95

^zMean separation in columns by Duncan's multiple range test at $P=0.05$.

2) Sucrose

기내 배양에서 탄소원과 에너지원으로 쓰이는 sucrose의 적정농도를 구명하기 위해 sucrose농도를 3%, 6%, 9%로 나누어 처리 실험하였다. 화피기부조직치상에서는 3%, 6%에서 기관의 형성이 양호하였고, 1%의 저농도에서는 저조함을 나타내었으며, 9%의 고농도에서는 신초의 형성은 양호한데 비해 뿌리의 형성이 저조하였다. 3%에서는 신초의 형성수가 8.9개로 가장 많았고, 뿌리의 형성은 6%에서 가장 많았다(Table 6-5). 자방은 3%에서 신초형성이 촉진적인데 비해 뿌리의 형성은 6%에서 촉진적이었고, 1%의 저농도에서는 신초, 뿌리형성이 모두 저조하였다(Table 6-6). 소화경은 배지내 sucrose 3%첨가에서 기관분화가 이루어져 신초수 7.9개, 뿌리수 8.4개의 형성을 보였다. sucrose 1%에서는 극히 일부

에서 신초의 형성을 보였으며, 6%, 9%에서는 전혀 기관의 분화가 이루어지지 않았다. 따라서 소화경 조직을 사용한 배지에서의 기관분화에는 sucrose 3%가 적당한 것으로 생각되었다(Table 6-7). 화경조직은 모든 농도에서 기관의 분화가 이루어지지 않았는데, 이것은 화경이 다른 조직보다 경화 정도가 심한 것으로 판단되었으며, 화경을 이용한 기관분화기에는 화경이 신장되는 초기에 채취하는 것이 유리할 것으로 생각되었다(Table 6-8).

이상의 처리에서 각 치상 절편체 별로 약간의 다른 경향을 나타내었지만, 신초의 분화에는 sucrose 3%, 뿌리의 분화에는 sucrose 9%가 적당하다고 생각되어진다.

감자 조직배양시 배양재료로써 잎의 부착된 단일마디를 3% 당을 첨가한 것과 첨가하지 않은 MS배지에 탄산가스 농도를 조절한 용기에 3일동안 배양한 후 잎의 건물 중 당 전체 동화율을 측정해 보면 당이 첨가된 배지보다 무첨가 배지에서 8~10배 증가하였다(Nakayama 등, 1991). 장미(Capellades, 1989; Capellades 등, 1991), 스파트필름(Watanabe 등, 1990) 및 국화(Tanaka 등, 1990)의 조직배양시에도 배지에 당 농도를 증가시키면 전체 광합성율은 감소한다. 그리고 배지내 당농도를 증가시키면 배양한 식물체의 잎 조직내 전분함량은 증가하는데 이는 총광합성율의 저하와 관련이 있다고 보고하였다(Capellades, 1989). Yabuya 등(1991)의 *Iris ensata*의 실험에서 sucrose농도에 따른 신초의 형성수를 관찰한 결과 'Okichidori', 'Miyukisusae', 'Meiji-1' 모두 sucrose농도 3, 6, 9%로 조절하였으나 별 다른 차이를 보이지 않았다. 그러나 본 실험에서는 sucrose 농도 3%에서는 신초수, 6%는 뿌리의 수가 양호하게 나타났다. Schnapp와 Preece(1986)는 tomato와 carnation의 배양에서 carnation은 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, tomato는 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose첨가 배지가 식물체의 발육에 가장 적합하였으며, 배지내의 sucrose 농도를 감소시키면 캘러스의 발생과 발근이 억제된다고 보고하였다.

따라서 식물에 따라 또는 배양목적에 따라 적정 sucrose의 농도는 많은 차이를 나타내는 것으로 생각된다.

Table 6-5. Effect of sucrose concentration on organ formation from perianth of *Iris ensata*.

Conc. (%)	Shoot number(ea.)	Shoot length(cm)	Root number(ea.)	Root length(cm)	Fresh weight(mg)
1.0	1.10 c ²	0.43 b	0.50 c	0.04 c	3.88
3.0	8.90 a	1.14 a	2.10 b	1.08 a	8.41
6.0	4.40 b	0.85 a	4.50 a	1.14 a	15.16
9.0	4.70 b	1.11 a	0.80 bc	0.68 b	9.11

²Mean separation in columns by Duncan's multiple range test at $P=0.05$.

Table 6-6. Effect of sucrose concentration on organ formation from ovary of *Iris ensata*.

Conc. (%)	Shoot number(ea.)	Shoot length(cm)	Root number(ea.)	Root length(cm)	Fresh weight(mg)
1.0	0.90 b ²	0.38 b	0.80 d	0.38 d	5.42
3.0	5.40 a	1.08 a	5.80 b	2.12 b	14.69
6.0	1.20 b	0.28 b	8.40 a	3.76 a	34.26
9.0	0.60 b	0.13 b	3.60 c	1.56 c	15.79

²Mean separation in columns by Duncan's multiple range test at $P=0.05$.

Table 6-7. Effect of sucrose concentration on organ formation from pedicel of *Iris ensata*.

Conc. (%)	Shoot number(ea.)	Shoot length(cm)	Root number(ea.)	Root length(cm)	Fresh weight(mg)
1.0	0.30 b ²	0.08 b	0	0	2.51
3.0	7.90 a	1.58 a	8.40 a	1.63 a	4.75
6.0	0	0	0	0	3.15
9.0	0	0	0	0	3.31

²Mean separation in columns by Duncan's multiple range test at $P=0.05$.

Table 6-8. Effect of sucrose concentration on organ formation from peduncle of *Iris ensata*.

Conc. (%)	Shoot number(ea.)	Shoot length(cm)	Root number(ea.)	Root length(cm)	Fresh weight(mg)
1.0	0	0	0	0	2.18
3.0	0	0	0	0	2.11
6.0	0	0	0	0	3.18
9.0	0	0	0	0	2.23

3) 온도

배양온도에 따른 각 절편체의 기관형성을 보면 10, 15℃의 저온에서는 기관의 형성이 저조하였으나 25, 30℃의 온도에서는 신초와 뿌리의 형성이 양호하였다.

화피기부조직을 치상한 10℃에서는 신초발생이 이루어지지 않았고, 일부개체에서 부정근의 형성만 관찰되었다. 25℃이상의 온도에서는 신초의 형성이 양호하였으며, 신초형성이 6.7개로 가장 많고, 30℃에서는 신초 5.6개, 뿌리수 2.6개로 나타났으며, 생체중은 25℃에서 가장 무겁게 나타났다(Table 6-9).

자방, 소화경은 10, 15℃에서 신초 발생은 이루어지지 않고, 뿌리발생만 양호하였고, 특히 자방을 치상한 25℃에서 신초형성이 8.4개로 가장 양호함을 나타내었다(Table 6-10, 11). 화경은 모든 온도처리에서 기관의 형성이 거의 이루어지지 않았고 25℃, 30℃의 일부개체에서 뿌리의 형성을 관찰할 수 있었다(Table 6-12). 이상에서 자생꽃창포는 저온에서 기관의 분화가 저조하고 25℃이상의 온도에서 기관형성이 양호함을 알 수 있었고, 자생꽃창포의 식물체 재분화에 알맞은 온도는 25℃가 가장 적합한 것으로 나타났다.

대부분의 조직배양실은 주야간 온도 변화 없이 25±1℃를 유지하고 있는 것이 일반적인 관례로 되어 있다. 그러나 광합성에 의한 탄수화물의 자가공급과 배지에 첨가된 당을 동시에 식물체가 이용하는 경우 明期동안 광합성 작용에 의해 고정된 탄수화물이 높은 암 호흡에 의해서 현저히 소모되기 때문에 생장이 억제될 수 있다(Kozai, 1991a). 일반적으로 암 호흡은 저온에서 감소되는데 이는 탄

산가스 흡수가 감소되기 때문이다(Kozai, 1991b).

Table 6-9. Effect of temperature on organ formation from perianth of *Iris ensata*.

Temperature (°C)	Shoot number(ea.)	Shoot length(cm)	Root number(ea.)	Root length(cm)	Fresh weight(mg)
10	0	0	0.20 c ^z	0.14 c	3.57
15	3.60 b	1.05 b	0.10 c	0.11 c	6.14
25	6.70 a	1.20 b	1.20 b	1.52 a	12.59
30	5.60 a	2.15 a	2.60 a	1.23 b	9.35

^zMean separation in columns by Duncan's multiple range test at $P=0.05$.

Table 6-10. Effect of temperature on organ formation from ovary of *Iris ensata*.

Temperature (°C)	Shoot number(ea.)	Shoot length(cm)	Root number(ea.)	Root length(cm)	Fresh weight(mg)
10	0	0	2.30 b ^z	1.50 a	6.47
15	0	0	6.80 b	1.32 a	14.8
25	8.40 a	0.92 b	1.80 a	1.06 b	15.0
30	4.50 b	1.28 a	1.80 b	1.23 b	9.97

^zMean separation in columns by Duncan's multiple range test at $P=0.05$.

Table 6-11. Effect of temperature on organ formation from pedicel of *Iris ensata*.

Temperature (°C)	Shoot number(ea.)	Shoot length(cm)	Root number(ea.)	Root length(cm)	Fresh weight(mg)
10	0	0	1.50 c ²	0.66 b	3.54
15	0	0	2.60 ab	1.36 a	3.27
25	5.70 a	1.01 b	2.80 a	1.10 a	3.95
30	2.40 b	1.20 a	1.70 bc	1.17 a	3.82

²Mean separation in columns by Duncan's multiple range test at P=0.05.

Table 6-12. Effect of temperature on organ formation from peduncle of *Iris ensata*.

Temperature (°C)	Shoot number(ea.)	Shoot length(cm)	Root number(ea.)	Root length(cm)	Fresh weight(mg)
10	0	0	0	0	1.83
15	0	0	0	0	2.21
25	0	0	0.30 b ²	0.24 b	3.2
30	0	0	1.70 a	0.86 a	4.85

²Mean separation in columns by Duncan's multiple range test at P=0.05.

2. 자생꽃창포(*Iris ensata*)의 기내번식

1) 신초 형성 및 뿌리 형성

자생꽃창포(*Iris ensata*)의 화기절편체로부터 신초를 유도하기 위한 성장조절제 NAA와 BA의 혼용처리효과는 Fig 6-1, 2이다. 화피기부조직의 신초형성은 BA 1 mg · L⁻¹+NAA 5 mg · L⁻¹처리구에서 가장 유의성 있게 나타났으며, BA 1 mg · L⁻¹+NAA 1 mg · L⁻¹ > BA 1 mg · L⁻¹+NAA 3 mg · L⁻¹ > BA 5 mg · L⁻¹+NAA 3 mg · L⁻¹ 순으로 신초의 형성수가 많이 나타났다. 뿌리의 형성은 BA 0.1 mg · L⁻¹+NAA 1 mg · L⁻¹, BA 0.1mg · L⁻¹+NAA 3 mg · L⁻¹, BA 0.1 mg · L⁻¹+NAA 5 mg · L⁻¹처리구에서 가장 유의성 있게 나타났고, BA 3 mg · L⁻¹이상의 처리구에서는 뿌리의 분화가 전혀 나타나지 않았다(Fig. 6-1).

자방의 경우 신초형성은 BA 3 mg · L⁻¹+NAA 1 mg · L⁻¹, BA 3 mg · L⁻¹+NAA 3 mg ·

L^{-1} , BA $3 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ +NAA $5 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 처리구에서 신초가 많이 형성되어 고도의 유의성을 나타내었으며 BA $1 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ +NAA $3 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 처리와 BA $5 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ +NAA $3 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 처리에서도 신초가 많이 형성되어 유의성을 나타내었다. 뿌리의 형성은 BA $0.1 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ +NAA $1 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 처리와 BA $1 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ +NAA $1 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 처리에서 뿌리가 가장 많이 형성되었고, BA $0.1 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ +NAA $3 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 처리와 BA $0.1 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ +NAA $5 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 처리에서도 뿌리가 많이 형성되어 유의성을 나타내었다.

소화경을 치상한 경우에서도 BA $3 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ +NAA $5 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 처리에서 신초가 가장 많이 형성되어 고도의 유의성을 나타내었으며, BA $3 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ +NAA $3 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 처리에서도 유의성을 나타내었다. BA 농도가 낮은 $0.1 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 첨가에서는 신초의 형성 및 생육은 저조하였지만 뿌리의 생육은 양호하여 BA $0.1 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ +NAA $3 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 처리와 BA $0.1 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ +NAA $5 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 처리에서 뿌리 형성이 양호하게 나타났다. 그러나 NAA 저농도인 $0.1 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 첨가에서는 신초형성과 뿌리 형성이 모두 저조하였다.

이와 같은 경향은 화피기부조직, 자방, 소화경에서도 나타났는데 BA $3 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ +NAA $5 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 의 처리구에서 공통적으로 신초의 형성이 양호하였으며, BA $0.1 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ +NAA $3 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 의 처리구에서 뿌리의 형성 및 생장이 양호하여 사이토카이닌인 BA 저농도와 옥신인 NAA의 고농도 조합에서 뿌리의 형성이 양호함을 나타내었다. 따라서, 자생꽃창포의 절편체로부터의 신초 재생에 적합한 성장조절제는 NAA농도가 높고 BA농도가 낮을 때 양호한 결과를 나타내었다. Lee 등(1999)의 국화연구에서도 엽절편체로부터 신초재생에 적합한 성장조절제는 NAA농도가 높을수록 BA농도가 낮을수록 양호한 결과를 나타내어 NAA $2 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ +BA $0.5 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 처리가 가장 효과적이었다고 보고하였고, Lu 등(1990)도 국화 'Royal Purple'에서 NAA $1.0 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ +BA $0.5 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 가 좋았다고 보고하여 본 실험의 결과와 일치한다. 이러한 경향은 Skoog 와 Miller (1957)의보고에서처럼 조직배양에서 식물체의 기관분화는 배지내 옥신과 사이토카이닌의 상대적인 비율에 따라 좌우된다고 판단된다.

BA에 대한 효과를 보면 BA $0.1 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 의 저농도는 NAA의 어떤 조합처리구에서도 신초의 형성이 저조하고 BA $3.0 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 이상의 농도에서 신초의 형성을 보여, BA의 농도가 증가할수록 신초의 형성이 양호함을 보였다. Asokan 등(1984)

은 감자의 엽절편체를 기내배양할 때 BA $6\sim 8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 고농도에서 신초의 발달이 最適이었다고 보고하여 본 실험의 결과와 유사하였다. Jang(1984)은 고구마의 액배양시 BA의 농도가 증가 할 수록 생장억제작용이 나타난다고 함으로써 고농도의 BA가 기관분화억제 작용을 나타내었다고 하여 본 실험의 결과와 다른 보고를 하였다. 이런 경향을 볼 때 작물에 따라 기내배양시 기관분화에 미치는 생장조절물질의 농도가 민감하게 관계되며, 식물체내의 내생 호르몬의 수준이 다르므로 작물마다 다른 경향을 나타내는 것으로 생각된다.

다른 식물의 배양에서 適合한 농도를 살펴보면, 고추냉이의 잎조직을 연구한 Meyer와 Milbrath(1977)는 LS(Linsmaier-Skoog) 기본배지에 NAA $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 kinetin $0.1\sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 배합하여 처리하였을 때 증식효과가 탁월하다고 보고 하였고, Lee 등(1985)의 broccoli 잎배양에서는 MS배지에 kinetin $4\sim 6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +IAA $8\sim 9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 처리에서 신초와 뿌리가 형성되었다고 보고된 것으로 보아 식물에 따라 적합한 생장조절물질의 농도와 종류가 다른 것을 알 수 있다.

화경조직을 치상한 경우에는 다른 조직 절편체에 비해서 신초형성이 거의 되지 않았으나 BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 처리 구와 BA $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 처리 구에서 약간의 신초형성을 관찰할 수 있었다. 뿌리 형성은 BA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $1\sim 5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 처리 구에서 관찰할 수 있었으며, NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 혼용 처리 구에서는 전혀 뿌리의 형성을 관찰할 수 없었다. 본 실험에서 화피기부조직, 지방, 소화경의 재생력과 화경의 재생력이 차이를 나타냈다. 이것은 화피기부조직, 지방, 소화경은 배양재료로 유조직을 사용하였으므로 직접 분화율이 높고 신초와 뿌리의 형성이 잘 되지만, 화경은 성숙조직을 사용하였으므로 신초 분화가 어렵고 발근도 어려웠던 것으로 판단된다. 본 실험에서 화경조직의 조직 성숙도 차이에 따른 효과를 좀 더 알아보기 위해 화경을 2cm에서부터 20cm까지 disc모양으로 잘라서 배양하였으나, 오염율이 높아서 5%만이 생육하여 최장 3.2cm인 평균 1.1개의 뿌리를 얻었다. 앞으로 화경에 대한 오염문제의 해결과 실험이 보충되어 유조직과 성숙조직의 차이가 구명되어져야겠다. 배양 절편체로부터 기관이 분화되는 양상은 식물재료의 부위에 따라서 차이가 있는 것으로 알려져 있는데 *Lilium speciosum*(Robb, 1975)과 *Lilium longiflorum*의 인경 배양시

(Stimart and Ascher, 1978) 그리고 백합의 엽배양시(Niimi 와 Onozawa, 1979) 부위에 따라서 분화능력에 차이가 있어 기부로 갈수록 재분화가 잘 된다고 보고하였고, Kim & Park(1988)은 고추냉이(horseradish)의 잎, 화병, 뿌리, 화경배양에서 모두 45%이상의 식물체 분화율과 50%이상의 신초형성율을 보였는데, 화경에서는 19.5%의 분화율을 보였다고 보고하였다.

자생꽃창포의 화피기부조직, 자방, 소화경, 화경의 배양에서 직접적으로 신초와 뿌리가 분화하는 경우가 대부분이었고, 캘러스는 기관분화가 제대로 이루어지지 않는 처리 구에서 약간 발생하였는데, 이와 같은 직접분화는 변이가 발현될 가능성이 적으므로 조직배양에 있어서 바람직한 현상이라 판단된다.

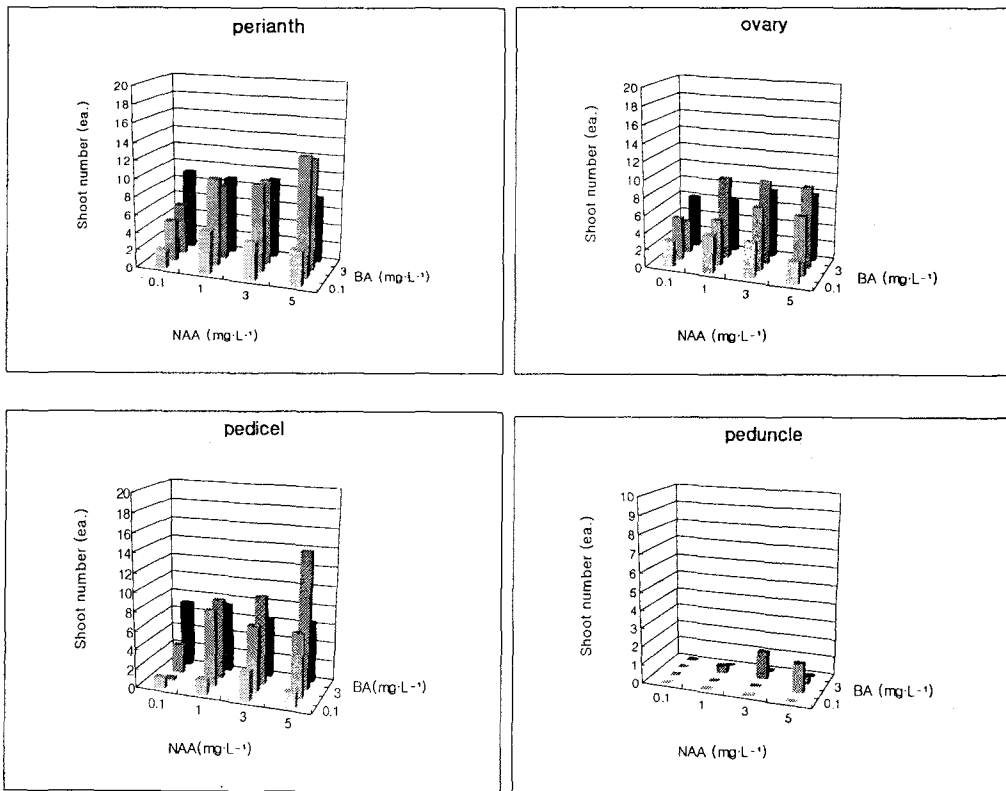


Fig. 6-1. Effect of shoot formation from perianth, ovary, pedicel, and peduncle explants from floral organs in *Iris ensata* cultured on MS media containing different concentrations of NAA/BA complex in vitro culture.

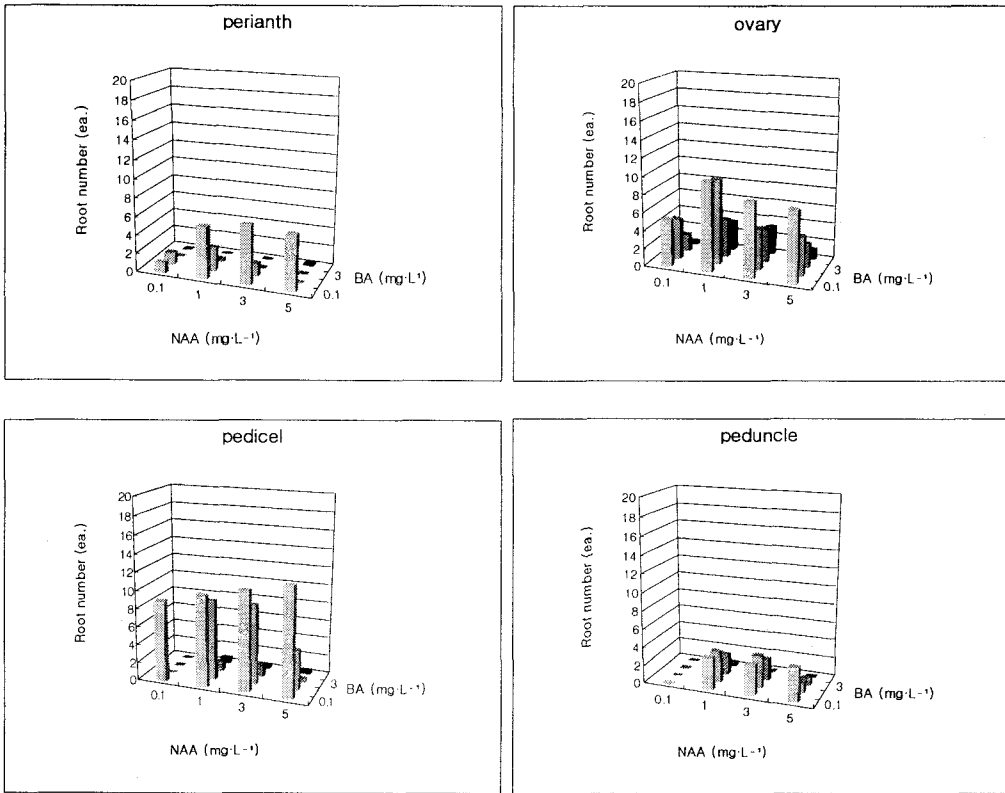


Fig. 6-2. Effect of root formation from perianth, ovary, pedicel, peduncle explants from floral organs in *Iris ensata* cultured on MS media containing different concentrations of NAA/BA complex in culture.

제 4절 결론

Iris 屬 식물의 번식의 어려움을 해결하고 고유한 품종의 유지 증식을 위해서 조직 배양을 통한 대량 번식의 구멍이 필요하므로 *Iris* 屬 식물의 화기부위와 성장점 등 여러 절편체를 이용하여 기내 번식에 의한 대량 증식방법을 정립하고자 본 실험을 수행하였다.

자생꽃창포(*Iris ensata*)의 화피기부조직, 자방, 소화경, 화경을 치상하여 기내배양환경에 적절한 환경을 구명하고자 조도 2000Lux에서 일장(0~24시간), 온도(10~30℃), sucrose(1~9%)의 조건에서 배양하였다. 자생꽃창포(*Iris ensata*)의 절편체로부터 식물체 분화는 광선, 온도에 의해서 촉진되어지고, 유식물체 재분화를 위해서는 일장은 16시간의 장일조건이, sucrose 농도는 3%에서, 온도 조건은 25℃가 가장 적합한 것으로 나타났다. 화기조직 치상절편체로부터 부정근의 분화는 暗상태에서 촉진되어지고 sucrose는 6%가 뿌리를 성장시키며 10℃, 15℃의 저온에서는 싹, 뿌리 모두 기관 분화가 저조하였다.

자생꽃창포(*Iris ensata*)의 절편체에서 싹형성이 양호한 농도는 BA 1~3 mg · L⁻¹+NAA 5 mg · L⁻¹이며, 화피 기부조직과 소화경에서 10개 이상의 multiple shoot가 형성된 것으로 보아 여러 절편체 중에서 화피기부조직과 소화경이 싹분화에 적당한 것으로 나타났으며, 자생꽃창포(*Iris ensata*)의 각 절편체의 뿌리 형성에는 BA저농도와 NAA 고농도 혼용처리가 효과적이며 BA 0.1 mg · L⁻¹+NAA 1~5 mg · L⁻¹의 혼용처리가 부정근 형성에 적합한 것으로 보였다.

제 8 장 붓꽃 대량번식기술개발

제 1절 서 론

우리나라 자생붓꽃(*Iris sanguinea*)은 다년생 속근초로 지하경을 가지고 있으면서 고산 및 평야지대의 건조지 및 습지에서 생육이 잘되는 특성을 가지고 있는 양지식물이다. 붓꽃종 *Sibirica* 계통은 관상가치가 높아 다양한 화색의 품종이 개발되고 있다(McEwen, 1996). 새 품종의 번식은 주로 지하경의 분주에 의해서 증식되어 왔으며 노지재배에서 2-3년마다 개화이후 화경을 중심으로 새싹을 1-2개 붙여 분주로 증식되었다. 실생에 의한 종자 파종으로 번식이 용이하나 붓꽃 신품종의 대부분은 교잡에 의한 새로운 화색과 화형의 선발로 유전적으로 이형 접합체이므로 종자번식에서 후대의 개체는 원품종과 비슷한 것이 일부 출현되고 있지만 유용한 형질은 대부분 변형된 것이 나타나므로 원품종과 동일한 것으로 나타나지 않는 실정이다(Jehan 등 1994).

따라서 원품종과 형질이 동일한 개체를 증식하기 위해서는 분주법이 적용되고 있었으나 대량생산에는 수년의 기간이 소요되고 있다(Meyer 등 1975). 급속 대량증식을 위해서는 조직배양법이 제시되고 있으며 붓꽃의 자방 절편체로부터 기내배양에서 shoot 분화가 보고되었다(Ichihashi 등 1986).

본 실험에서는 붓꽃의 분주번식의 단점을 해결하기 위해 신아의 경정 부위를 배양 재료로 하여 기내배양의 적정 환경을 규명하여 증식법의 체계를 세우고자 수행하였다.

제 2절 재료 및 방법

식물재료는 개화 후 근경에서 새롭게 맹아된 新芽를 0.5~1.0mm의 크기로 엽원기를 2~3매 부착하여 치상 하였다. 殺菌은 근경을 채취하여 흐르는 물에 수세한 후 3% sodium hypochlorite solution에 5분간 浸漬한 다음, 70% ethanol 용액에 3분

간 浸漬하고 멸균수로 3회 水洗하였다. 살균한 재료는 clean bench 內에서 조제 치상하였다.

붓꽃의 기내증식에 적합한 성장조절물질의 농도구명을 위해 MS(Murashige & Skoog, 1962) 기본배지에 NAA 0, 0.5, 1.0, 2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, BA 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 1.0, 3.0, 5.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 로 혼용 첨가하였다. 각 처리별로 sucrose 3%, Agar 7g, pH 5.7로 조정하여 온도 25℃, 일장 16시간으로 8주간 배양하였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. 캘러스 형성

붓꽃(*Iris sanguinea*)의 성장점 조직을 치상하여 식물체 재분화에 알맞은 NAA, BA 및 2,4-D의 혼용처리 결과는 Fig 7-1, 7-2 이다. Fig 7-1, 7-2에서 보는 바와 같이 NAA와 BA의 혼용처리, 2,4-D와 BA의 혼용처리 모두 신초의 형성이 저조하여 절편체당 신초수가 1~2개정도 밖에 형성되지 않았다. 그러나 자생꽃창포(*Iris ensata*)의 여러 절편체에서는 NAA, BA의 혼용 처리시 신초의 형성이 양호하게 나타나 같은 성장조절제의 혼용처리에서도 품종에 따라 기관분화율이 다르게 나타나 품종간의 차이를 보였다. 이러한 결과는 Yabuya 등(1991)이 *Iris ensata*의 23 품종의 소화경을 NAA 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, BA 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 에서 배양하여 캘러스, 신초, 뿌리를 유도하였는데, 기관의 형성정도가 품종에 따라 매우 다양하게 나타났다고 보고하였으며, Tsay 등(1982)의 고구마 연구에서도 괴근의 캘러스로부터 기관분화를 유도할 때 식물호르몬의 조합비보다는 품종간 차이에서 더 영향을 받는다고 보고하였다. 이러한 경향은 기관분화에 관여하는 유전자조성의 차이와 내생호르몬의 품종간 차이에 의한 것으로 판단된다.

BA, 2,4-D의 혼용처리에 따른 캘러스 형성을 나타낸 것은 Fig 7-3이다. BA 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +2,4-D 3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 혼용처리에서 캘러스 형성율이 90% 이상으로 나타났고, BA 3~5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +2,4-D 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 처리에서도 캘러스 형성율이 높게 나타나서 BA 3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 BA 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 고농도 혼용 구에서는 60%이상의 캘러스 형성율을 보였다. 이와 같이 BA농도가 높은 배지에서는 기부에 캘러스 형성이 촉진되어

지고, 신초유도 및 신장을 억제한다는 것은 많은 연구자들에 의해서 보고되어 있다(Saito 와 Ide, 1985; Shim 등, 1994). Kim 과 Park(1987)의 고구마 연구에서도 캘러스의 생장은 BA가 첨가되지 않은 IAA단용 처리나 무처리 구에서는 캘러스가 생성되지 않거나 생장이 미약하였지만 BA의 농도가 증가할수록 캘러스 생장이 증가 하였다고 보고하였고, Jang(1984) 역시 BA의 농도가 증가할수록 캘러스 형성이 양호하고 신초의 생장이 억제된다고 보고하여 본 실험의 결과와 일치한다. 그러나 Kim 등(1981)의 감자배양에서는 BA농도와 캘러스의 생장과는 무관하다고 보고하였고, Han 등(1991)의 *Caladium* 액아배양에서 kinetin 2.0~5.0 mg · L⁻¹와 BA 0.5~3.0 mg · L⁻¹ 첨가배지에서 많은 부정아를 가지고 있는 캘러스가 발생하였으나 kinetin 0.5~1.0 mg · L⁻¹와 BA 5 mg · L⁻¹ 첨가배지에서는 캘러스 증식이 매우 저조 하였다고 보고하여 본 실험의 결과와 相異하였다.

Fig. 7-1과 Fig. 7-2를 비교해보면 NAA, BA의 혼용처리에서는 캘러스가 형성되지 않았지만, 2,4-D, BA의 혼용처리에서는 캘러스 형성이 양호한 것으로 보아 2,4-D가 캘러스 형성에 효과가 있는 것으로 판단된다. 이와 유사한 결과는 Bae 등(2001)의 들잔디 연구에서 2,4-D 2 mg · L⁻¹와 BAP 0.2 mg · L⁻¹의 처리 구에서 캘러스 형성율이 양호하였고, 2,4-D가 포함되지 않은 배지에서는 캘러스가 형성되지 않았고, 또한 4 mg · L⁻¹이상의 고농도의 2,4-D와 BAP가 첨가된 처리 구에서는 캘러스의 유도가 관찰되었으나 시간이 경과할수록 갈변된 캘러스가 관찰되었다고 보고하였으며 잔디(Ke 와 Lee, 1996)와 옥수수(Carvalho 등, 1997)의 연구에서도 2,4-D가 포함된 배지에서 캘러스 형성이 양호하였다고 보고하였다. 따라서 본 실험에서 사이토카이닌인 BA와 옥신인 NAA, 2,4-D와의 조합에 따른 캘러스 형성을 비교한 결과 BA와 NAA의 조합에서는 캘러스 형성이 저조하였으나 BA와 2,4-D의 조합에서는 캘러스 형성이 양호하게 나타난 것으로 보아 2,4-D가 붓꽃의 캘러스 형성이 양호하게 작용하며 사이토카이닌과 옥신의 농도비율보다 옥신의 종류 및 농도가 효과적으로 작용하는 것으로 판단된다. Kim 등(1988)의 글라디올러스 木子외식체로부터의 캘러스 형성에서 2,4-D 10ppm첨가 구에서 63.6%, NAA 10ppm 첨가 구에서 50%의 캘러스 형성율을 보여 옥신 농도가 높을수록 캘러스 형성이 촉진된다고 보고하였고 Hussey(1975)는 글라디올러스 구경으로부터 캘러스 유도에 미치는 옥신 종류별 효과를 검토한 결과 IAA효과가 없었으나 NAA와 2,4-D는

효과적이었다고 보고하여 본 실험의 결과와 유사하였다.

대체로 배지내의 사이토키닌과 옥신의 비율에 따라 식물체의 분화가 달라져 사이토키닌 농도가 옥신 농도보다 높으면 신초의 분화와 생장이 촉진된다고 하였으며 반대로 옥신의 농도가 높고 사이토키닌의 농도가 낮아지면 캘러스 형성 및 뿌리 분화가 왕성하다고(Earle 와 Langhans, 1974) 하였는데, Chun 등(1993)의 *Anthurium* 연구에서는 이와 반대로 옥신보다는 사이토키닌이 캘러스 형성이 더욱 효과적이라고 보고 하여 본 실험의 결과와 상반된다.

또한, 캘러스는 성장조절제의 종류 및 농도에 따라서 캘러스 유형이 다르게 나타나고, 그 유형에 따라 신초 재분화에 영향을 준다는 보고(Ke 와 Lee, 1996 ;Carvalho 등, 1997)가 있으므로 그에 대한 연구가 수행되어야 할 것 같다.

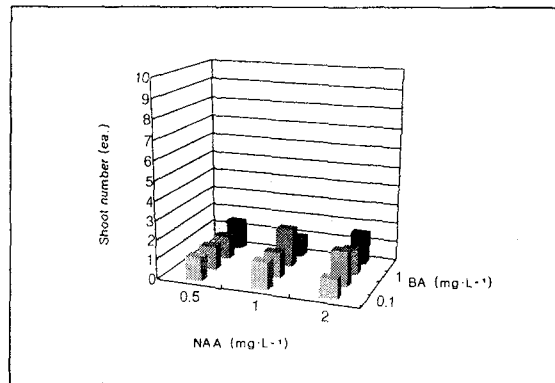


Fig. 7-1. Effect NAA/BA complex on the shoot formation from shoot-apex culture of *Iris sanguinea* after 8 weeks in vitro culture.

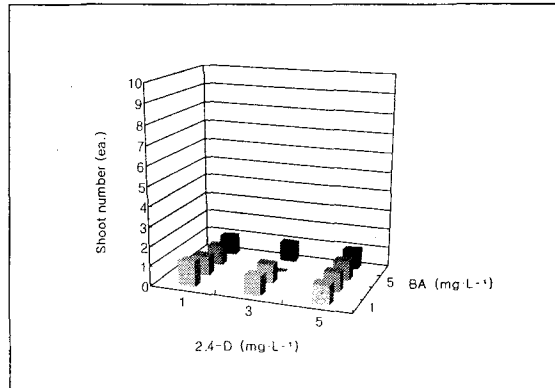


Fig. 7-2. Effect of 2,4-D/BA complex on the shoot formation from shoot-apex culture of *Iris sanguinea* after 8 weeks in vitro culture.

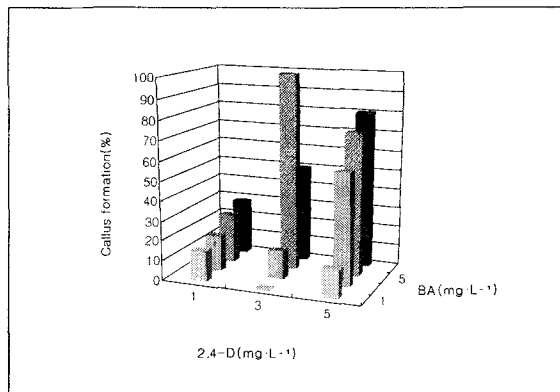


Fig. 7-3. Effect of 2,4-D/BA complex on the callus formation from shoot-apex culture of *Iris sanguinea* after 8 weeks in vitro culture.

2. 캘러스에서의 신초분화

붓꽃(*Iris sanguinea*)의 생장점 조직에서 유도된 캘러스에서의 식물체 재분화에 알맞은 생장조절물질의 농도 구명을 위해 NAA, BA의 혼용처리 결과는 Fig 7-4과 같다. BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 단용 처리에서 다발성신초(multiple shoot)가 형성되어 캘러스로부터 신초재분화에 가장 효과적인 것으로 나타났고, BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 처리 구에서도 신초가 많이 형성되었으나 BA $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 고농도 처리 구와 NAA단용 처리 구에서는 신초의 형성이 매우 저조하였다. BA $0.1 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 단용 처리에서는 신초의 생장은 양호하였지만 신초가 1개정도 밖에 분화되지 않았고, BA $0.1 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.5 \sim 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 혼용처리에서는 신초수는 많았지만 신초의 생장이 불량하였다. 이상에서 캘러스로부터 신초 재분화에는 사이토카이닌(BA)이 효과적이지만, 고농도의 사이토카이닌을 요구하지는 않는 것으로 판단되며, 사이토카이닌 단용처리구에서 다발성신초의 형성이 가장 많이 형성된 것으로 보아 캘러스 재분화에 필요한 内生옥신이 충분히 존재하는 것으로 판단된다. 이와 같은 결과는 Kim 등(1998)의 연구에서 글라디올러스 캘러스로부터의 기관 재분화를 위해서는 外生사이토카이닌이 필수적이기는 하지만, 고농도를 필요로 하지는 않는다고 보고한 결과와 일치하며, Bae 등(2001)의 *Zoyzia japonica*의 연구에서도 캘러스로부터 신초 재분화에 BAP $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 가 포함된 배지에서 신초의 수 및 신장이 가장 좋았다고 보고하여 본 실험의 결과와 유사하다. 사이토카이닌이나 옥신을 배지내에 첨가하여 캘러스로부터 직접 부정아나 뿌리 등을 유도시키는 방법은 많은 식물에서 보고되어 있다(Cheah 와 Sagawa, 1978). *Caladium*(Sahavacharin, 1982)에서도 kinetin $2.0 \sim 5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 첨가배지와 BA $0.5 \sim 3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 첨가배지에서, 마치 洋蘭의 protocorm-like body(PLB)와 같은 많은 부정아를 가진 캘러스가 발생하였다. 이들 캘러스 조직을 다시 분리하여 사이토카이닌과 옥신이 혼용으로 첨가된 배지에서 再培養한 결과 많은 부정아를 발생시킬 수 있었으며 동시에 많은 부정아를 가진 캘러스도 증식시킬 수 있었다. 또한 신초의 기부에서 많은 뿌리가 발생하여 발달과정을 거치지 않고도 *caladium*의 온실재식이 가능하였으며, 증식된 캘러스는 6주후에 6~8개로 나누어 再增殖시킬 수 있어 6주마다 6~8배의 증식이 가능하였다. Sahavachrin(1982)은

kinetin $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 2,4-D $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 가 첨가된 배지에서 *caladium*의 유조직을 배양하여 캘러스를 유도하였으며, 유도된 캘러스를 15%의 coconut milk가 첨가된 배지에서 배양하여 많은 부정아를 가진 캘러스를 증식시켜, 이를 다시 BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 가 첨가된 배지에서 배양하여 뿌리가 발생한 신초를 생산할 수 있었다고 보고하였다.

캘러스로부터 식물체 재분화를 위해서는 변이개체의 발생정도와 완전한 식물체가 되었는지 확인할 필요가 있다. 캘러스로부터 식물체를 재분화시킬 경우 변이의 발생빈도가 높고 특히, 장기간 계대배양된 캘러스의 경우는 변이의 빈도가 더욱 증가된다. 따라서, 변이식물체의 분화를 억제시키기 위하여 배지의 종류, 생장조절제 및 무기이온 등이 검토되어 왔으며(Jung 등, 1995), Bae 등(2001)의 연구에서 캘러스의 형태적 분류를 통해 변이 식물체의 발생빈도를 억제 할 수 있고, 캘러스의 형태에 따라 식물체 재분화정도가 다르다고 보고하였다. 그러므로 어떤 조직으로부터 캘러스를 유도한 후 식물체를 재분화 시킬 경우 캘러스를 형태별로 분리하여 이용하는 등의 보다 효율적인 연구가 요구되어진다.

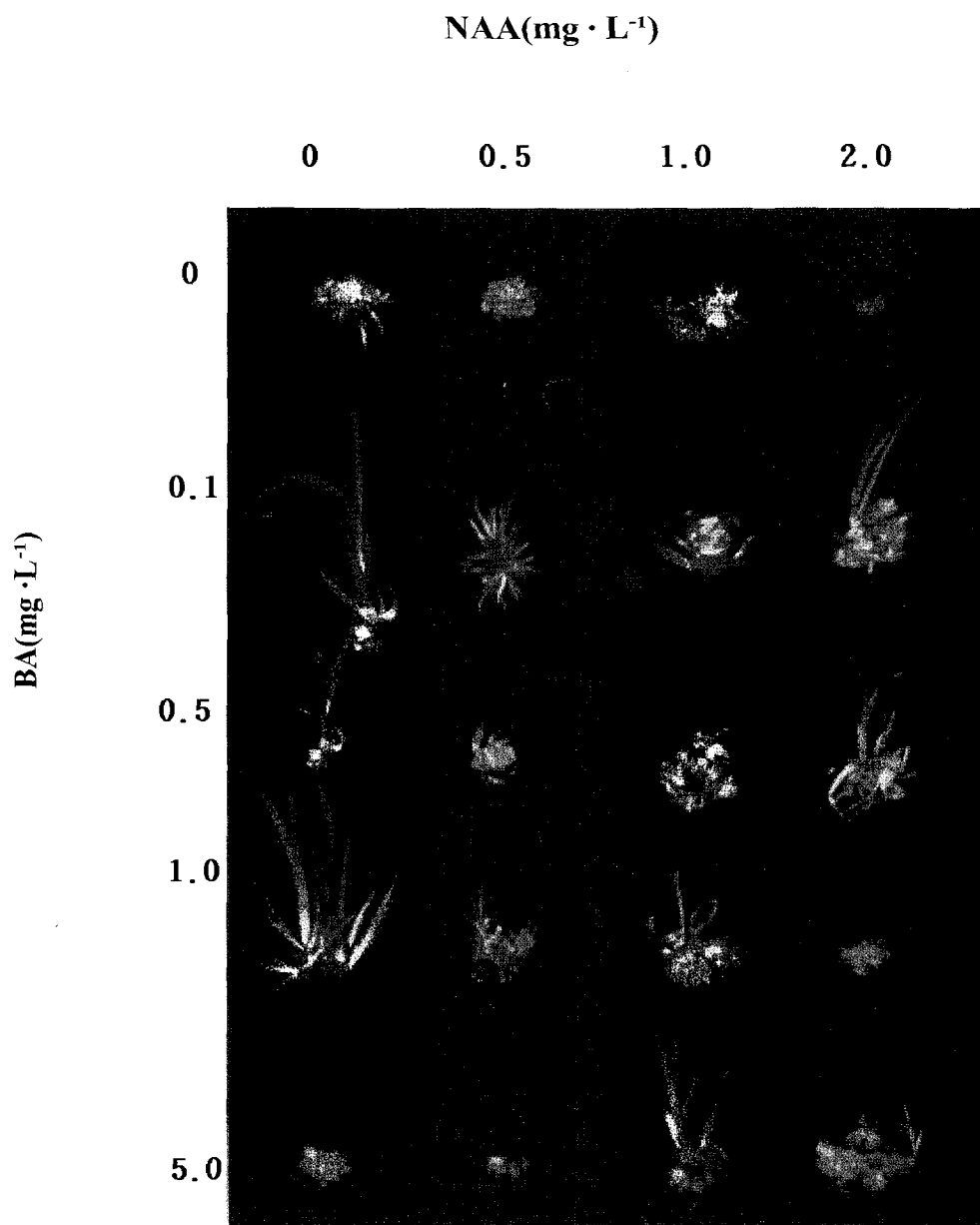


Fig. 7-4. Effect of NAA/BA complex on the shoot formation from callus of *Iris sanguinea* after 8 weeks in vitro culture.

제 4절 결론

붓꽃(*Iris sanguinea*)의 생장점을 치상한 조직배양에서는 캘러스를 유도하고, 캘러스에서의 식물체 재분화가 효과적이라고 판단된다. 캘러스 유도에는 $2,4\text{-D } 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{BA } 5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 에서 캘러스 형성율이 90%이상이므로 캘러스형성에 적합하다고 판단된다. 붓꽃(*Iris sanguinea*)의 생장점조직에서 유도된 캘러스에서의 식물체 재분화에는 BA의 저농도와 고농도에서는 재분화능력이 불량하고 BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 단용이 적당하게 나타났다.

참 고 문 헌

제 2장

Sim, J. K. 1988 A taxonoimic study on Iridaceae in korea, korea University. pp.1-57.

Chung, B .K. , E. H. Park, S. O. Yoo, Y. J. Park, C. H. Bae, 1993. A study on the growth environment, Characteristics of *Iris ensata* Thunb, var.spontanea Nakai native to korea. J. Kor. Flower Res. Soc. 2(2):45-54.

趙愛敬, 1984. 한국산 붓꽃속 식물의 분류학적 연구. 이화여자대학 석사학위논문.

李昌福, 1980. 대한식물도감 P.228-230. 향문사.

高庚式, 金潤植. 1991. 원색한국식물도감. P.458. 아카데미서적.

Lee, Y. N. 1988. Flower of Korea P.951-956. 교학사.

李相泰, 1998. 한국식물검색집 P.126-128 아카데미서적.

Koh, J. C. 1988. Classification of Native Iris plant by principal component analysis. Research bullentin of catholic university of Taegu-Hyosung 57:161-169.

제 3장

沈正己, 1988. 韓國産 붓꽃科(Iridaceac)의 分類學的 研究. 高麗大學校 大學 院 生物學科. 博士學位論文.

오미정, 홍병희, 1995. 韓國 自生 茶나무의 RAPD-Maker에 의한 類錄關係. 韓國育種學會誌 27(2):140-147.

박상용, 김혁, 이봉춘, 임용표. 1996. RAPD 방법을 이용한 구기자의 분류 및 동정. 韓國育種學會誌 28(3):221-226.

李瑩京, 尹用輝, 鄭鎰仙, 林尙種, 宋仁圭, 金達雄. 1996. RAPD를 이용한 마늘의 유연관계분석. 韓國育種學會誌 28(3):332-341.

李善河, 金致賢, 宋源燮, 盧一燮. 1996. RAPD 분석에 의한 無窮花 品種間의 유연관계 및 遺傳的 變異. 韓國育種學會誌 28(4):445-456.

유기억, 이우철, 김남수, 김중화, 임학태, 1996. RAPD 방법에 의한 금강초롱꽃(H-anabusaya asiatica)과 근연분류군의 비교연구. 韓國育種學會誌 37(2):324-328.

申正燮, 李承再, 朴權, 1996. RAPD 法을 利用한 수박의 遺傳變異 探索. 韓國育種學會誌 27(1):94-107.

유기억, 안상득, 유창연, 박경열, 임학태. 1997. 증폭된 DNA 다변성에 의한 삼지구엽초(Epimeidium koreanum)의 종내면이, 韓國育種學會誌 38(2):183-187

김원배, 유기억, 류승열, 서중택, 엄영현, 임학태. 1997. PCR 기술을 이용한 산마늘(*Allium victorialis* var. *platyphium*)의 종내변이. 韓國育種學會誌 38(2):129-132.

河瀬晃四郎, 水谷博, 吉岡麻理, 福田園子. 1990. アイリス屬植物の組織培養による増殖. (第1報). 花莖の培養によるキシヨウフ(*I. pseudacorus* L.)の増殖. 園學雜誌. 59別2 「花き」 pp.644-645.

Tsutomu, Yabuya. 1985. Amphidiploids between *Iris laevigata* Fisch. and *I. ensata* Thunb. Induced through *in vitro* Culture of Embryos Treated with Colchicine Japan. J. Breed 35:136-144.

Welsh J. McClelland M. 1990. Fingerpring genomes using PCR with arbitrary primer. Nucl. Acids Res. 18:7213-7218

Williams J.C.K, Kubdlic A.R, Livak KJ, RafalskiJA, Tingey sv. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic makers. Nucl. Acids Res. 18:6531-6535.

Karihaloo J.L. Brauner S, Gottlieb L.D. 1995. Random amplified polymorphic DNA variation in the eggplant, *Solanum melongrna* L. (Solanaceae). Theor. Appl. Genet. 90:767-770

Michelmore R.W. Paran I, Kessli R.V. 1991. Identification of markers linked to diseaseresis-tance genes by bulked segregant analysis. A rapid method to detect markers in specificg-enomic region bring segregation populations, Proc. Nat'l Acad. Sci.USA. 88:9828-9832.

Rowland L.J., Levi A. 1994. RAPD-based genetic linkage map of blue berry derived from a cross between

Chaparo J.X. Werner D.J, Mallery D.O., Sederoff RR. 1994. Targeted mapping linkage analysis of morphological, isozyme, and RAPD makers in peach. Theor Appl. Genet. 87:805-815.

제 4장

Ahn, H.K., S.K. Kim, and J.H. Oh. 1984. Seed germination of *Actinidia arguta* as affected by chilling, Gibberdlin, Kinetin, and light. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 25:290-195.

Belcher, E.W. and L. Miller. 1974. Influence of substrate moisture level on germination of sweet gum and sand pine seed. Proceedings of the Association of Official Seed Analysts. 65:88-89.

Catalan, L.A. and M.R. Edgardo. 1991. Improving germination in *Prosopis flesuosa* D.C. and *Prosopis Alba* Griseb. with hot water treatments and scarification. Seed Sci & Technol. 19:253-262.

Chiang, M.H. and K.W. Park. 1994. Effects of temperature, light and mechanical treatment on the seed germination of *Chrysanthemum coronarium* L. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 35:534-539.

Chiang, M.H. and K.W. Park. 1994. Effects of KOH on the seed structure and the Physiology of seed germination in *Chrysanthemum coronarium* L. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 35:540-546.

Choi, B.H., B.H. Hong., K.H. Kang., J.K. Kim., and S.H. Ki 1991. Seed Science Hyangmunsa. p. 180-224.

McEwen, c., 1996. The siberian Iris. Timver press.

- Duran, J.H. and M.E. Tortosa. 1985. The effect of mechanical and chemical scarification on germination of Charlock (*Sinapis arvensis* L.) seeds. *Seed Sci. & Technol.* 13:155-163.
- Fieldhouse, D.J. and M. Sasser, 1975. Stimulation of pepper seed germination by NaOCl treatment. *Hortscience* 10:622-624.
- Hsiaso, A.I., A.D. Worshom, and D.E. Moreland. 1981. Effect of sodium hypochlorite and certain plant growth regulators on germination of witch weed (*Striga asiatica*) seed. *Weed Science* 29:98-100.
- Hurly, R.F., S.J. Van and M.T. Smith. 1989. Guayule (*Parthenium argentatum* Gray) seed germination. The effect of water soaks, sodium hypochlorite, gibberellic acid and gibberellic applied as seed pretreatments. *Seed Sci. & Technol.* 17:223-233.
- Iwanami, Y. and K. Akizawa. 1974. Studies on storage of seed in organic solvent. I. Some fundamental tests to establish the method for the storage of seed in organic solvent. *Japan. J. Breed.* vol. 24(2):59-64.
- Kariuki, E.M. and G.R. Powell. 1988. Pre-treatment and germination of seeds of three leguminous tree species indigenous to Kenya. *Seed Sci. & Technol.* 16:477-487.
- Kim, K.S. and Y.K. Yoo. 1998. Effect of some pretreatments on seed germination of White Forsythia (*Abeliophyllum distichum*). *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 39:86-91.
- Kim, I.S., J.L. Hwang., K.P. Han, and K.E. Lee. 1987. Studies on the germination of seeds in native *Actinidia* species. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 28:335-342.
- Ku, J.H. and D.C. Won. 1986. Stimulation of Zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud) seed germination by sodium hypochlorites treatment(2). *Kor. J. Hort. Sci. & Technol.* 4:96-97.
- Nakamura, J.I. 1985. The elements of seed science. Yokendo, 66-82.

Park, Y.J., S.O. Yoo., G.W. Choi, and Y.O. Chung. 1995. Studies on the seed germination on Blackberry Lily (*Belamacanda chinensis* L. DC.) Native to Korea. J. Kor. Flower. Res. Soc. 4(1):35-40.

Park, Y.J. and Y.O. Chung. 1996. Effect of chemicals, decoating and low temperature treatments on seed germination in *Lycoris aurea*. K. J. Medical Crop. Sci. 4(2):172-177.

Sang, C.K., E.H. Kim, and H.Y. Kim. 1993. Germination and life span of *Pulsatilla cernua* Seed. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 34:207-212.

Sim, J.K. 1988. A taxonomic study on Iridaceae in Korea. Korea University.

Tomer, R.P.S. and K. Singh. 1993. Hard seed studies in rice bean (*Vigna umbellata*). Seed Sci. & Technol. 21:679-683.

Thompson, P.A. and P. Newman. 1979. Germination of Alstromerias. Garden. 104(2):75-76.

Udin, S.N. and Soejadi. 1991. Predrying and soaking of IR 64 rice seeds as an effective method for overcoming dormancy. Seed Sci. Technol. 19:207-213.

Yu, T.Y., D.Y. Yeom, and Y.I. Kim. 1974. Germination-promoting effect with seed coat scarifications in Korean lawn grass (*Zoysia japonica* STEUD) seeds. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 15:187-191.

제 5장

Adelberg, J.W., B.B. Rhodes, and H.T. Skorupska. 1993. Generating tetraploid melons in tissue culture. Acta Horticulture 336: 373-380.

Ahn, J.S., Y.M. Lee, and K.S. Min. 2000. Plant breeding. Chonnam National University. pp. 326.

Anderson, J.A., N.L. Taylor, and E.G. Williams. 1991. Cytology and fertility of the interspecific hybrid *Trifolium ambiguum* × *T. repens* and backcross

populations. *crop science* 31:683-687.

Asano, Y. 1982. Chromosome association and pollen fertility in some interspecific hybrids of *Lilium*. *Euphytica* 31: 121-128.

Blakeslee, A.F. and A.G. Avery. 1937. Methods of inducing of chromosomes in plants by treatment with colchicine. *J. Hered.* 28: 393-411.

Chalak, L. and J.M. Legave. 1996. Oryzalin combined with adventitious regeneration for an efficient chromosome doubling of trihaploid kiwifruit. *Plant Cell Reports* 16: 67-100.

Chaudhari, H.K. and J.R. Barrow. 1975. Identification of cotton haploids by stomatal chloroplast count technique. *Crop Sci.* 15: 760-762.

Chen, C.H. and Y.C. Goeden-Kallemeyn. 1979. In vitro induction of tetraploid plant from colchicine treated diploid daylily callus. *Euphytica* 28: 705-709.

Chen, Q. and K.C. Armstrong. 1994. Genomic in situ hybridization in *Avena sativa*. *Genome* 37: 607-612.

Chung, M.Y. 2002. Progeny production by fertility restoration and chromosomal recombination via genomic *in situ* hybridization(GISH) in interspecific hybrids between Oriental and Asiatic Lily. Kyungpook National University.

Chung, T.H., B.S. To., and H.J. Sim. 1949. *Nomina Plantarum Koreanum I*. Chosen Biology Society.

Chunsheng, L. and M.P. Bridgen. 1997. Chromosome doubling and fertility of *Alstroemeria aurea* × *A. caryophyllaea*. *Euphytica* 94: 75-81.

Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia Univ. Press, New York.

Davidson, D., E. Pertens, and J.P. Zhao. 1983. Chromosome distribution between two restitution nuclei in a cell following colchicine treatment, *Can. J. Genet. Cytol.* 25: 437-445.

Fujishige, I., R. Tanaka, and K. Taniguchi. 1996. Efficient isolation of non chimeric tetraploids artificially induced in a stable culture of *Haplopappus gracili*. *Theor. Appl. Genet.* 92: 157-162.

Goldblatt, P. 1981. Systematics, phylogeny and evolution of *Diets* (Iridaceae). *Ann. Missou. Bot. Gard.* 68:132-153.

Grisebach, B.A. 1981. Colchicine induced polyploidy in phalaenopsis orchids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1: 103-107.

Hadlaczky, G., G. Bistray, T. Parznovszky, and D. Dudits. 1983. Mass isolation of plant chromosomes and nuclei. *Planta* 157: 278-385.

Han, D.S., Y. Niimi, and M. Nakano. 1999. Production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther derived haploid calli in the Asiatic hybrid lily 'Connecticut King'. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 68(5): 979-983.

Harlan, J.R. and J.M.J. De Wet. 1975. On Winge and a prayer: The origins of polyploidy *Bot. Rev.* 41: 361-390.

Heinz, D.J. and W.P.M. Grace. 1970. Colchicine induced polyploids from cell suspension cultures of sugarcane. *Crop Science*, 10: 696-699.

Hermesen, J.G.TH., M. Wagenvoort, and M.S. Ramanna. 1970. Aneuploids from natural and colchicine induced auto tetraploids of *Solanum*. *Can. J. Genet. Cytel.* 12: 601-613.

Jang, Y.S., Y.B. Oh, I.H. Choi, Y.S. Song, and J.H. Park. 2000. Effect of the concentration and treatment period of colchicine on polyploid formation in suspension culture of callus derived from shoot apex of Garlic (*Allium sativum* L.). *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 41(2): 157-160.

Kang, S.G. 1988. Chromosome doubling of diploid rice (*Oryza setiva* L.) by colchicine treatment and cytogenetical studies of colchiploid rice. Yeungnam University.

Kihlman, B. and A. Levan. 1949. The cytological effect of caffeine. *Hereditas* 35: 109-111.

Kim, M.S., J.Y. Won, Y.R. Lee, J.Y. Kim, B.H. Kim, and J.S. Eun. 1998. Induction of ployploidy in vitro of *Cymbidium* by colchicine treatment. *Kor. J. Hort. Sci & Tech.* 16(1): 115.

Kohlein, F. 1981. IRIS. Timber Press, Inc.

Macleod, R.A. 1947. Some effects of colchicine on orchids. Amer. Orchid Soc. Bull. 16: 336-337.

Moore, E.T. 1947. The use of colchicine in orchids. Amer. Orchids Soc. Bull. 16: 512-513.

Morejohn, L.C., T.E. Bureau, J. Mole-Bajer, A.S. Bajer, and D.E. Fosket. 1987. Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibitors microtubule polymerization in vitro. Planta 172: 252-264.

Nakasone, H.Y. and H. Kamemoto. 1961. Artificial induction of polyploidy in orchids by the use of colchicine. Hawaii Agri. Exp. Station Tech. Bull. No.42

Ramulu, S., K. Verhoeven, H.A., and P. Dojkhuis. 1991. Mitotic blocking, micronucleation and chromosome doubling by Oryzalin, Amiprophosmethyl, and colchicine in potato. Protoplasma 160(2/3): 65-71.

Rotor, G. 1958. Colchicine as a tool in orchid hybridization. Proc. 2nd World Orchid Cof. mass. pp. 159-170.

Shinha, A.R.P. 1987. Colchiploidy in *Lindernia crustacea*(L.) F. Muell. Cytologia 52: 151-155.

Sim, J.K. 1988. A taxonomic study on Iridaceae in Korea. Korea University.

Sliwinska, E. and R. Jansen. 1997. Estimation of the share of components of different ploidy in anisoploid sugar-beet (*Beta vulgaris*. L.) populations by flow cytometry. J. Appl. Genet. 38(2): 151-160.

Tan, G.Y. and G.M. Dunn. 1973. Relationship of stomatal length and frequency and pollen grain diameter to ploidy level in *Bromus inermis* Leyss. *Crop Sci.* 13: 332-334.

Thomas, J., Q. Chen, and N. Howes. 1997. Chromosome doubling of haploids of common wheat with caffeine. *Genome* 40: 552-558.

Tsutomu, Y. 1985. Amphidiploids between *Iris laevigata* Fisch. and *Iris ensata* Thumb. Induced through in vitro culture of embryos treated with colchicine. *Japen. J. Breed* 35: 136-144.

Van Tuyl, J.M., B. Meijer, and M.P. van Dien. 1992. The use of oryzalin as an alternative for colchicine in vitro chromosome doubling of *Lilium* and *Nerine*. *Acta Horticulturae* 325: 625-630.

Wan, Y., D.R. Duncan, A.L. Rayburn, J.E. Petolino, and J.M. Widholm. 1991. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. *Theor. Appl. Genet.* 81(2): 205-211.

Wan, Y., J.F. Petolino, and J.M. Widholm. 1989. Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther derived maize callus. *Theor. Appl. Genet.* 77: 889-892.

Wimber, D.E., S. Watrous, and A. Mollahan. 1987. Colchicine induced polyploidy in Orchid. *Proc. 25th World Orchid Conf.* pp. 65-69.

Yun, J.S., S.K. Shin, H.H. Kim, C.H. Lee, K.S. Choi, S.Y. Park, and K.Y. Paek. 1999. Tetraploid induction from diploid *Bletilla striata* by *in vitro* colchicine treatment. *Kor. J. Hort. Sci & Tech.* 17(5): 691.

제 6장

Gustafsson, A. 1963. Recent plant Breeding Research. svalof 1946-1961. John wiley and son, New York:89.

Hagberg A. 1969. Induced Mutations in plants. IAEA. Vienna:647.

Sparrow, A. H. S. S. Schwemmer and P. J. Bottino, 1971. Radiation Boyany 11:85.

Matsumura, S., T. Fuji and S. Kondo. 1960. Large radiation sources in industry. IAEA, Vienna, 2:179.

Ukai, Y. 1968 a japan. J. Breed 18:221.

Ukai, Y. 1968 b japan. J. Breed 18:226.

Ukai, Y. 1970, japan. J. Gemet 45:35.

高木胖, 1974. 放育場研報 3:45

山下淳, 1974. 育種雜, 24 別策 1:92.

Conger, B. V., R. A. Nilam, C. F. Konzak and S. Metterm 1966. Radiation Botany 6:129.

Yamagata, H, K Silyakudo , T Furukawa. 1965. studies on the utility of artificial mutations on plants breeding.

V. Mutagenic effect of several chemicals on rice, Jap. J. Breed 15:263-270.

제 7장

Capellades, M.Q. 1989. Histological and ecophysical study of the changes occurring during the acclimatization of in vitro culture. Dissertation. Gent University. Belgium. 98.

Capellades, M., Lemeur, R. and Debergh, P. 1991 Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured in vitro. Plant Cell Tissue Organ Culture. 25:21-26.

Chung, T.H., B.S. To. and H.J. Sim. 1949. Nomina Plantarum Koreanum I. Chosen Biology Society.

Debergh, P.C. and L.J. Maene, 1984 Pathological and physiological problems related to the in vitro culture of plants, Parasitica. 40:69-75.

Fujino, M., T. Fujimura and K. Hamada. 1972. Multiplication of Dutch iris(*Iris hollandica*) by organ culture. I. Effect of growth regulators, culture media, pH, peptone, and agar on the growth and differentiation of excised lateral buds. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 41:66-71.

Goldblatt, P. 1981. Sydtematics, phylogeny and evolution of *Diates(Iridaceae)*. Ann. Missou. Bot. Gard. 68:132-153.

Gozu, Y., M. Yokoyama., M. Nakamara., R. Namba., K. Yomogida., M. Yanagi., and S. Nakamura. 1993. *In vitro* propagation of *Iris pallida*. Plant Cell Reports.

13:12-16.

Han, B.H., Y.J Kim, J.G. Choi. 1994. Micropropagation of *Alstroemeria* spp. through Rhizome Tip Culture. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 35(2):172-177.

Hasegawa, P.M., T. Murashige, and F.H. Taketori. 1973. Propagation of *asparagus* through shoot apex culture. II. Light and temperature requirements, transplantability of plant and cytological characteristics. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 98:143-148.

Hughes, K.W. 1981. In vitro ecology: Exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture system. Environ. Exper. Botany. 21:281-288.

Hussey, G. 1975. Totipotency in tissue explants and callus of some members of the *Liliaceae*, *Iridaceae*, and *Amaryllidaceae*. J. Exp. Bot. 26(91):253-262.

Jehan, H., D. Courtois., C. Ehret., K. Lerch., and V. Petiard. 1994. Plant regeneration of *Iris pallida* Lam. and *Iris germanica* L. via somatic embryogenesis from leaves, apices and young flowers. Plant Cell Reports. 13:671-675.

Jung, J.D. 1995. Plant Biotechnology. KyungPook National University.

Ke, S. and C. W. Lee. 1996. plant regeneration in kentucky bluegrass(*Poa pratensis* L.) Plant Cell Report. 15:882-887.

Kim, J.H., and K.W. Park. 1988. Effect of NAA and BA on the organ differentiation *Horseradish*(*Armoracia rusticana*) Cultured in vitro. J. Kor.

Soc. Hort. Sci. 29(4):272-282.

Kozai, T. 1991a Controlled environment in conventional and automated micropropagation. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 8(ed. Vasil, I.), Academic Press. Inc. 213-230.

Kozai, T. 1991b Autotrophic micropropagation, In: Biotechnology in culture and forestry, Vol. 17, High Tech and Micropropagation I (ed. Bajaj, Y. P. S.). Springer Verlag. Berlin. 312-343.

Kohlein, F. 1981. IRIS. Timber Press, Inc.

Lee, S.S., J.Y. Yoon, D.G. Oh, J.G. Oh, and J.G. Woo. 1985. Effects of phytohormone, temperature, nitrogen concentration vs. potassium and light quality on formation of callus and organs in tissue culture of Chinese cabbage. J. Kor. Hort. Sci. 26:34-38.

Lee, Y.K., K.Y. Joo, K.M. Lee, and N.I. Hyung. 1999. Plant regeneration from leaf segment cultures of *Crysanthemum*(*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). Korean J. Plant Tissue Culture. 26(1):59-63.

Lu, C.G. Nugent, T. Wardley. 1990. Efficient, direct plant regeneration from stem segments of *chrysanthemum*(*Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. Royal Purple). Plant Cell Rep. 8:733-736.

Meyer, M.M, and G.M. Milbrath. 1977. In vitro propagation of *horseradish* with leaf pieces. Hort. Science. 12:544-545.

Murashige, T, and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and

bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

Nakayama, M., T. Kozai, and K. Watanabe, 1991 Effect of the presence/absence of the sugar in the medium and natural/forced ventilation on the net photosynthetic rates of potato explants in vitro. *Plant Tissue Culture Letters.* 8:105-109.

Niimi, Y, and T. Onozawa. 1979. In vitro bulblet formation from leaf segments of lilius, especially *Lilium rubellum* Baker. *Sci. Hort.* 11:379-389.

Robb, S.M. 1975. The cultured of excised tissue from bulb scales of *Lilium speciosum* Thunb. *J. Exp. Bot.* 8:384-352.

Schnapp, S.R. and J.E. Preece. 1986. In vitro growth reduction of tomato and carnation microplants. *Plant Cell Tissue & Organ Culture.* 6:3-8.

Sim, J.K. 1998. A taxonomic study on *Iridace* in Korea. Korea University.

Simonsen, J, and A.C. Hildebrandt. 1971. In vitro growth and differentiation of *Gladiolus* plants from cultures. *Can. J. Bot.* 49:1817-1819.

Skoog, F, and C.O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation. *Sym. Soc. Exp. Biol.* 11:118-131.

Stimart, D.P and P.D. Ascher. 1978. Tissue culture of bulb scale section for asexual propagation of *Lilium longiflorum* Thunb. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 103:182-184.

Tanaka, F., Y. Watanabe, and N. Shimada, 1990 Effect of O₂ concentrations on photorespiration in *Chrysanthemum morifolium* plantlets in plant tissue culture. *Plant Tissue Culture Letters*. 7:85-91.

Watanabe, K., Y. Watanabe, and N. Shimada, 1990 Effect of sucrose concentration in the medium on growth apparent photosynthesis and ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase of *Spathyphyllum* plantles in aeration culture. *Plant Tissue Culture Letter*. 7:74-79.

Yabuya, T., Y. Ikeda, and T. Adachi. 1991. *In vitro* propagation of Japanese garden iris, *Iris ensata* Thunb. *Euphytica*. Kluwer Academic Publishers. 57:77-81.

제 8장

Bae, C.H., K. Tohyama, S.C. Lee, Y.C. Lim, H.I. Kim, P.S. Song, and H.Y. Lee. 2001. Efficient plant regeneration using mature seed derived callus in *Zoysiagrass*(*Zoysia japonica* Steud.). *Korean J. Plant Tissue Culture*. 28(2):61-67.

Charvalho, H.S., N. Bohorova., P.N. Bordallo., L.L. Abreu. F.H. valicente., W. Bressan, and E. Paiva. 1997. Type II callus production and plant regeneradion in tropical maize genotypes. *Plant Cell Report*. 17:73-76.

Cheah, K.T. and Y. Sagawa. 1978. *In vitro* propagation of *Aranda wendy* Scott and *Aranthera james* Storei. *Hort Science*. 13:661-662.

Chun, I.H., B.H. Min., and H.J. Chung. 1993. Callus induction and shoot differentiation by *in vitro* culture in *Anthurium* spp. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.*

34(5):384-393.

Earle, E.D. and R.W. Langhans. 1974. Propagation of *Crysanthum* in vitro. I. Multiple plantlets from shoot tips and the establishment of tissue cultures. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 99:128-132.

Han, B.H., J.S. Kim, S.L. Choi and K.Y. Paek. 1991. In vitro masspropagation of *Begonia rex* Putz. and *Caladium bicolor* vent. Korean J. Plant Tissue Culture. 18(2):95-101.

Hussey, G. 1975. Totipotency in tissue explants and callus of some members of the *Liliaceae*, *Iridaceae*, and *Amaryllidaceae*. J. Exp. Bot. 26(91):253-262.

Jehan, H., D. Courtois., C. Ehret., K. Lerch., and V. Petiard. 1994. Plant regeneration of *Iris pallida* Lam. and *Iris germanica* L. via somatic embryogenesis from leaves, apices and young flowers. Plant Cell Reports. 13:671-675.

Jung, J.D. 1995. Plant Biotechnology. KyungPook National University.

Ke, S. and C. W. Lee. 1996. plant regeneradion in kentucky bluegrass(*Poa pratensis* L.) Plant Cell Report. 15:882-887.

Kim, C.S., J.S. Jo, and C.Y. Choi. 1981. Effect of the phytohormones on the organ differentiation and the callus induction from the meristem tip and the segments of the leaf and stem of Potato by in vitro culture. K. J. Crop. Sci. 26(4):344-349.

Kim, J.H., and K.W. Park. 1988. Effect of NAA and BA on the organ differentiation *Horseradish*(*Armoracia rusticana*) Cultured in vitro. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 29(4):272-282.

Kim, K.W., J.B. Choi., and K.Y. Kwon. 1988. Rapid multiplication of *Gladiolus* plants through callus culture. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 29(4):312-318.

Mayer, J.R., M.M., L.H. Fuchigami, and A.N. Roberts. 1975. Propagation of tall bearded irises by tissue culture. Hort. Science. 10:479-480.

McEwen C. 1996. The siberican Iris. Timber press. pp 81-150.

Murashige, T, and F. Skoog. 1962. A revised midium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.

Sahavacharin O. 1982. Rapid propagation of *Caladium* through tissue culture. In A Fujiwara, ed, plant Tissue Culture. Maruzen Co, Tokyo. 699-700.

Saito, A, and Y. Ide. 1985. In vitro plantlet regeneration from adventitious buds on induced cuttings of peeled twings of Japanese white birch. J. Jpn. For. Foc. 67:282-284.

Shim, K.K., Y.M. Ha, and S.G. Lee. 1994. A study on the new yellow variegated cultivar of Korea Forsythia. II. Mass propagation through tissue culture. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 35(3):279-287.

Tsay, H.S., P.C. L, and L.J. Chen. 1982. Organ differentiation from callus derived from anther, stem and tuber of sweet potato. J. Agric. Res. China.

31:191-198.

Yabuya, T., Y. Ikeda, and T. Adachi. 1991. *In vitro* propagation of Japanese garden iris, *Iris ensata* Thunb. *Euphytica*. Kluwer Academic Publishers. 57:77-81.