

백출의 다수확 고품질 생산기술 개발
Cultivation development on the high-yield and
high-quality of Baek-Chul

백출의 안정 생산기술 개발
Technology development for efficient production in
Atractylodes

삼주속 식물종으로 부터 유용변이체 탐색 및 이용
Valuable Variant Selection from *Atractylodes* Spp.

백출의 역병저항성 증진 기술개발
Improvement of resistance against *Phytophthora* blight in
Atractylodes

연 구 기 관
안 동 대 학 교
작 물 시 험 장
서울여자대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “백출의 다수확 고품질 생산기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 12 월 일

주관연구기관명 : 안동대학교

총괄연구책임자 : 정 규 영

세부연구책임자 : 정 규 영

연 구 원 : 정 형 진

협동연구기관명 : 작물시험장

협동연구책임자 : 성 낙 술

연 구 원 : 박 춘 근

연 구 원 : 박 충 헌

연 구 원 : 박 희 운

연 구 원 : 방 경 환

연 구 원 : 유 홍 섭

연 구 원 : 성 정 숙

협동연구기관명 : 서울여자대학교

협동연구책임자 : 장 매 희

요 약 문

제 1 장 제목

백출의 다수확 고품질 생산기술 개발

제 2 장 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발 목적

백출은 뿌리를 건조하여 사용하는 이용빈도가 매우 높은 생약재이나, 물량이 부족하여 북한과 중국으로부터의 수입에 의존하는 대표적인 수입 우위품목이다. 국내에서 일부 농가에서 재배되고 있으나, 재배시 적정 종근 크기, 재배방법, 병균 감염방제, 수확 시 뿌리의 비대 불균일 및 유효 내용성분 부족 등으로 인한 수량 및 품질 저하가 문제점으로 대두되고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 체계적 재배법 연구를 통한 수량 및 품질의 증가를 유도하기 위한 안정적 생산 기술을 개발 하고자 한다. 또한 자생삼주(*Atractylodes japonica*), 중국 도입삼주(*A. macrocephala*) 집단에서 내병, 내습, 다수성의 유용변이체를 선발하여 우량 계통육성 후 품종화로 삼주(백출)재배의 안전성을 높이며, 재배시 가장 문제가 되는 역병의 저항성 증진 기술을 개발하고자 한다.

2. 연구개발의 필요성

백출은 기원식물의 정확한 근거가 마련되어 있지 않은 상태에서 경북 등지의 농가에서 소득 작목으로 재배하고 있으나, 재배법 등의 연구 미진으로 많은 문제점을 내포하고 있다.

현재 농가에서 재배되는 백출은 중국에서 도입된 *Atractylodes macrocephala* Koidz.로서 국내에는 *Atractylodes japonica* Koidz.(삼주)가 자생하고 있으나 전혀 재배에 이용되지 않고 있다.

백출은 주로 밭을 이용하여 직파 재배를 하거나 1년생 종근을 이식하여 재배하고 있다. 직파 재배의 경우 재배초기에 상당량의 잡초가 발생하여 백출이 완전한 군락을 형성하기까지 잡초방제에 상당한 어려움을 겪고 있으며, 다량의 종자를 파종 후 다시 솟기작업을 해야하는 번거로움이 있고, 결주와 역병 등의 병해로 인한 입모율이 매우 낮아 농가 소득면에서 심각한 문제로 대두되고 있다.

1년생 종근의 이식을 통한 재배는 종근생산을 위한 일련의 재배 체계화가 이루어져 있지 않아 고비용의 종자생산비로 재배되고 있으며, 따라서 현재 일부 한약업장에서 독점으로 농가에 개당 70-120원의 높은 가격으로 판매하고 있다. 이는 표준재배시 10a당 종근값이 70만원으로 2년후 수확시 판매금액의 20%를 차지하는 높은 비율로서 농가 순수익에 큰 문제점으로 대두되고 있다. 뿐만 아니라 적정종근 크기, 파종시기, 적정 재식밀도 및 시비량, 병균 감염방제 등이 문제점으로 대두되고 있으며, 특히 수확 시 뿌리의 비대 정도의 균일성 및 유효 내용성분의 부족 등의 문제점이 대두되고 있다.

특히 국내에서의 백출 재배현황을 보면 역병의 피해가 심각하여 농가 생산재배상의 큰 장애요인이 되고 있다. 경남 농업기술원 함양 약초시험장의 보고에 의하면 백출의 역병이 심하게 발생한 함양과 봉화지방의 18개 농가포장을 대상으로 발병상황을 조사한 결과 최저 6.6%에서 최고 57%의 발병율을 나타냈으며, 함양과 봉화 지역의 평균 발병율은 각각 40.5%와 30%이었다고 한다.

그러므로 저항성 품종을 개발, 확보한 본 연구 결과로 창출되는 고부가가치 기술개발의 축적과 상품화를 통하여 유사 관련 작물 연구의 활성화와 연구효과의 극대화 및 산업적 활성화 효과를 도모할 것으로 사료된다.

제 3 장 연구개발 내용 및 범위

1. 제 1세부과제 : 백출의 안정 생산기술 개발

백출의 안정적 생산 기술을 개발하기 위하여 삼주속 식물의 해부적 특성 파악, 번식방법 구명, 적정 종근 크기와 재식거리 구명, 파종시기에 따른 영향 구명, 적정비료종류 및 수준, 적심 시기와 방법에 따른 수량향상 정도를 구명하고, 각 시험별 백출의 주요 정유성분을 분석하여 품질을 평가하였다.

2. 제 1 협동과제 : 삼주속 식물종으로부터 유용변이체 탐색 및 이용

삼주속 식물종으로부터 유용변이체 탐색 및 이용연구는 국내의 삼주 유전자원을 수집하여 수집집단별 특성 검정 및 유망집단 선발을 연구범위로 하였으며, 돌연변이를 통한 유용 변이체 선발은 종자 채종이 용이한 중국 도입삼주(*A. macrocephala*)를 공시재료로 하여 인공 돌연변이를 유발한 후 유용변이체를 선발하였으며, 중간잡종 육성은 수집유전자원 자생삼주(*A. japonica*), 중국 도입삼주(*A. macrocephala*) 집단 중에서 내병, 내습성이 강한 집단을 선발한 후 자생삼주(*A. japonica*)을 모본, 중국 도입삼주(*A. macrocephala*)을 부본으로 인공교배 후 유망 개체선발 및 선발 개체의 영양증식을 통한 계통육성을 본 협동과제의 연구범위로 하였다.

3. 제 2 협동과제 : 백출의 역병저항성 증진 기술개발

백출의 역병저항성 증진 기술개발 연구는 삼주속 식물의 RAPD 등의 유전학적 방법을 통한 유연관계를 파악하며, 재배종 및 야생종으로부터 역병저항성 개체를 선발하여 특성을 파악하고, 고효율 재분화 방법 및 중간잡종, 유도저항성 개체 육성, 형질전환 가능성 검토, 선발 육성된 계통의 포장 저항성 검토, 역병저항성 품종 개발 효율성 비교 및 조사를 본 협동과제의 연구범위로 하였다.

제 3 장 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 제1세부과제 : 백출의 안정 생산기술 개발

백출의 안정적 생산 기술을 개발하기 위하여 삼주속 식물의 해부적 특성 파악, 번식방법 구명, 적정 종근 크기와 재식거리 구명, 파종시기에 따른 영향 구명, 적정비료종류 및 수준, 적심시기와 방법에 따른 수량향상 정도를 구명하고, 각 시험별 백출의 주요 정유성분을 분석하여 품질을 평가하였다.

*A. japonica*에서는 근경의 유관이 직경 500 μm 이었으며 단위면적당(No./100 μm^2) 14개이었고, *A. macrocephala*는 근경의 유관이 직경 266.7 μm 이었으며 단위면적당(No./100 μm^2) 11개이었다.

1년생 근과 절단하여 이용한 다년생 근의 정식에 따른 입묘율은 각 각 79, 76%로 큰 차가 없었으나, 종자 파종시는 14.2%로 매우 낮았다. 1년생 종근 정식이 다년생 종근 절단에 의한 정식보다는 초장, 분지수, 지상부 생체중 등의 생육이 양호하였다. 특히 종자 파종시의 1년 차 생육상황은 종근 절단에 의한 파종에 비하여 생육상황이 매우 나빴다. 따라서 파종 재배 시는 초기에는 적정수분 및 잡초제거에 따른 노동력의 과다 투입이 요구되어 백출 재배 시에는 현실적으로 불가능한 것으로 생각된다. 1년생 및 다년생 종근 이식 시는 반드시 종자소독이 요구되어지며, 백출 재배는 파종재배 및 다년생 종근 절단 정식에 비하여 1년생 종근 정식은 역병 출현율이 낮아 비배 관리에 용이하여 백출 재배 시에 적극 추천된다.

대와 중간의 종근의 정식에 따른 입묘율, 근경의 건물중 및 수량은 유의차가 없었으나, 중과 소간에는 5% 유의차가 인정되었다. 초장 및 지상부 생체중은 종근 크기간에 유의차를 나타내었다.

재식거리별 입묘율, 초장, 근경의 건물중은 20 x 40 cm와 20 x 30 cm재식 간에는 유의차가 없었으나, 20 x 40 cm과 20 x 30 cm이 20 x 20 cm간에 유의차를 나타내었다. 종근 크기별로는 종근 크기가 큰 것을 이식한 것이, 재식 거리 간에는 밀식 할 수록 수량이 높았다.

종근크기 대(35g 이상) 및 중(15-35g)을 정식 시는 소(15g)에 비하여 beta-caryophyllene, beta-selinene, beta-sesquiphellandrene, valencene, gamma-elemene, atractylone, 1-methoxy-2-benzen 등의 정유성분 함량이 매우 높았다.

입묘율은 종근 파종이 종자 파종에 비하여 매우 높았고, 파종시기별로는 종자 및 종근 공히 4월초가 높았다. 초장, 분지수 및 건물중은 종자 및 종근 파종 공히 파종 시기가 빠를수록 높았다. 종자 파종 시의 수량은 4월 파종 시기 간에 유의차를 나타내었고, 근경 정식 시는 4월 초 중순과 말기 간에 유의차를 나타내었다. 종자파종, 근경정식 둘 다에서 시기가 빠르면 빠를수록 정유성분의 함량이 높았다. 특히 종자 파종시의 atractylone의 함량은 4월초가 5월 초에 비하여 32.3%가, 근경 정식 시는 30.6%가 높았고 4월 초 종자 파종시가 근경 정식 시에 비하여 18.6% 높았다. 백출 재배 시의 종자파종은 잡초 및 초기수분관리가 용이하지 않는 포장에서는 재배가 불가능하며, 수량은 종자 파종 재배 시에 4월 초에, 종근 이식 시는 4월 초 혹은 중순에 이식하는 것이 양호하였다.

손제거와 적심제 처리간의 근경 생체중 및 건물중은 큰 차가 없었다. 무적심에 비

하여 손 제거시의 근경 수량은 발퇴기와 개화초기에 21.7 %, 개화 중기에 11.3 %, 개화 후기에 8.4 % 각각 높았다. 따라서 백출 재배 시는 발퇴기에 손제거 및 적심제 2회 처리가 생육을 양호하게 하는 것으로 나타났다. 정유성분은 무적퇴에 비하여 손제거, potassium salt of maleic hydrazide, fatty alcohol 처리에 의한 적퇴가 bea-caryophyllene, beta-selinene, beta-sesquiphellandrene, valencene, gamma- elemene, atractylone, 1-methoxy-2-benzen 등의 함량이 높았고, 특히 atractylone의 함량은 약 50%정도 높았다. 백출의 안정적 생산 및 내용성분을 증가시키기 위하여서는 발퇴기에 반드시 적퇴하고, 생력을 위하여 적심제 2회 이상 처리가 필요하다.

시비 수준에 따른 초장, 경수, 근경의 생체중 및 건물중의 생육상황은 무비료와 비료 전처리 간에 유의차를 나타내었다. 초장은 복비 20% 증비와 감비 간에, 퇴비, 유박 등의 유기질 비료 시용구와 화학비료 처리 간에 유의차를 나타내었다. 근경의 건물중 및 수량은 화학비료 증비 및 감비 시용 간에 유의차를 나타내지 않았으나, 퇴비, 유박 등의 유기질 비료 시용구와 화학비료 처리 간에 유의차를 나타내었다. 특히 수량은 관행 복비 사용에 비하여 유박+퇴비혼용 시용구는 32.7% 증수를 보였다. 기준량 대비 복합비료 20% 증비 시는 역병 및 뿌리썩음병이 매우 심하였으나 퇴비, 유박, 유박+퇴비 2배량 시용 시는 병 발생 정도가 매우 낮아졌다. 특히 유박+퇴비 2배량 시용 은 기준량 복합비료 단독 시용 시에 비하여 역병은 63%, 뿌리썩음병은 70% 감소되었다. 따라서 백출 재배 시는 복합기준량에 유박 + 퇴비 2배량 시용이 생육 및 병 발생정도가 낮아서 수량 및 품질 증진에 양호할 것으로 생각된다.

종자저장 시는 냉장 후 GA처리가, 1년생 종근저장 시는 냉장보관이 양호하였다.

A. japonica의 조기정식 및 발퇴기와 개화초기에 적심을 할 경우 수량은 A. macrocephala와 차이 없었고, 백출의 주요 정유성분인 atractylone의 함량이 A. macrocephala에 비하여 높고 야생 A. japonica와 비슷한 함량을 유지하고 있어 A. japonica의 재배화가 가능한 것으로 나타났다.

국내 시판 야생 백출이 수입 백출에 비하여 atractylone, b-seliene, valecene 등의 성분이 매우 높았고, 중국 안국에서 수집한 백출의 경우 백출의 주요 성분인 atractylone이 전혀 검출되지 않았다. atractylone의 함량 면에서는 중국재배(연길) 백출이 한국산 야생 백출의 80% 정도 함유되어 있고 나머지 지역 시료들은 한국 야생의 22% 미만으로 매우 낮게 함유되어 있었다.

따라서 백출의 품질의 향상 및 안정적 생산을 위하여 1년 종근을 생산하여 냉장보

관 후 종자소독을 하여, 4월초에 척박한 토양은 10a당 성분량으로 N-P₂O₅-K₂O=8-6-6kg에 유박200kg+퇴비 4,000kg/10a로, 다소 비옥한 토양에서는 N-P₂O₅-K₂O=4-3-3kg에 유박200kg+퇴비 4,000kg/10a로 기비로 하여 시비한 후 멀칭 재배로 20 x 30cm로 정식하고 수량 및 품질을 증진시키기 위하여 발퇴기에 반드시 적심을 행한다.

2. 제 1 협동과제 : 삼주속 식물종으로 부터 유용변이체 탐색 및 이용

국내 자생 삼주인 *A. japonica*는 경기 가평 등 8개 지역에서 야생종을 수집하였으며, *A. macrocephala*는 경북 영주 지역 등에서 수집하였다.

A. macrocephala 유용변이 26개 집단 중 지상부 생육과 역병 이병 고사주율을 조사한 결과 유망집단 AM9902 등 6집단을 선발 하였으며, *A. japonica*는 수집한 8개 지역종 중에서 경수가 많으며, 내병성이 강한 AJ2106 등 3집단을 선발 하였다.

백출 돌연변이에 의한 변이주 선발은 EMS처리 7주, NaN₃처리 5주, γ-ray 처리에서 4주를 선발 하였다.

백출 중간잡종육성은 434개체 F1 식물체에서 F2 유망 영양계 10 계통을 선발 하였으며, 이중 AJM2103 -10, AJM2107-04가 생육이 우수하며 내습성이 강한 특성을 보였다.

3. 제 2 협동과제 : 백출의 역병저항성 증진 기술개발

백출의 역병저항성 증진 기술개발을통하여 재배시 가장 문제가 되는 역병의 감소를 유도하고자 삼주속 식물의 유연관계 분석, 재분화 방법개발, 유도저항성 개체 육성, 형질전환 가능성 검토 등을 실시하였다. *A. macrocephala* 와 *A. japonica* 대상식물의 RAPD를 이용한 유전자 다형성을 분석한 결과, 종간구분이 가능한 다형화 band가 확인되었다. 백출의 조직배양시 캘러스형성 및 뿌리발달은 식물생장조절제 단독처리의 경우에는 IBA 5mg/L 처리가 효과적이었으며, 혼합처리시 잎, 줄기, 자엽의 캘러스 생성율은 NAA 5mg/L와 BA 5mg/L처리가 효과적이었다. 역병저항성 개

체를 육성하기 위하여 CaDRP(*Capsicum annum* Defense Related Protein)유전자를 이용하여 형질전환을 실시하였다. 유도저항성개체를 얻기 위하여 BABA(β -aminobutyric acid)처리를 실시하였으며 역병저항성 유도를 확인하였다.

SUMMARY

Cultivation development on the high-yield and high-quality of Baek-Chul

1. Technology development for efficient production in *Atractylodes*

The final aim of this study is to develop technology for efficient production in *Atractylodes*. For this purpose, the study was conducted to determine the appropriate size and planting density, the appropriate transplanting time, the appropriate levels and kinds of fertilizer, the appropriate time and method of topping by seedling and transplanting of a rhizome in *A. macrocephala* and *A. japonica*. After each experiment, the essential oil compounds in the treatments of the experiment were analyzed to evaluate the quality of *Atractylodes* by GC/MS.

The oil cavities in rhizome of *A. japonica* were 500 μm in diameter and distributed 14 per 100 μm^2 , but those of *A. macrocephala* were 266.7 μm in diameter and distributed 11 per 100 μm^2 .

The emergence ratio of *A. macrocephala* cultivated by transplanting of one year old rhizome and that after cutting of multi year old rhizome had no difference between them such as 76 and 78 percent, respectively but that of *A. macrocephala* cultivated by seedling was very low as 14.2%. The plant height, No. of petiole per stock and fresh weight of shooting per plant of *A. macrocephala* cultivated by one year old rhizome were better than those of that cultivated by seedling. Especially, growth characters cultivated by seed were very worse than those of that cultivated by cutting of multi year old rhizome.

Therefore, the cultivation method of seedling using seed could not be used by reasons that it requires the excess labor for removal of weed and maintenance of appropriate moisture in initial growing stage.

We recommend the transplanting of 1 year old rhizome after seed sterilization for efficient production because the cultivation by 1 year old rhizome was low in the appearance ratio of *phytophthora* blight.

The emergence ratio, dry weight and yield of rhizome on the size of rhizome did not differ significantly at the 5 percent level by Duncan's multiple range test between large and small size of rhizome, but differed significantly between middle and small size. Plant height and fresh weight of shooting per plant had a difference significantly at the 5 percent level by Duncan's multiple range test among sizes of rhizome.

The emergence ratio, plant height and dry weight of rhizome on the planting densities did not differ significantly at the 5 percent level by Duncan's multiple range test between 20 x 40 cm and 20 x 30 cm planting spaces, but differed significantly between 20 x 30 cm and 20 x 20 cm.

The yield of rhizome at the harvesting time was the highest in the transplanting of large size rhizome (above 35g weight per rhizome) and 20 x 20 cm planting space among rhizome sizes and planting densities

The content of essential oil compounds of rhizomes cultivated by the large and middle sizes of rhizome for transplanting was higher than those of small size in beta-caryophyllene, beta-selinene, beta-sesquiphellandrene, valencene, gamma-elemene, atractylone, 1-methoxy-2-benzen.

The emergence ratio on transplanting of the rhizome was much higher than that of seedling, and the emergence ratio of seed and rhizome on the seed time was particularly high in the early of April. The faster seeding time of the seed and the transplanting of rhizome was, the higher plant height, No. of petiole per stock and dry weight was.

In the seedling and in the transplanting of rhizome, yield of rhizome showed similar difference among the all seed times of April and between the early or the middle and the end of April.

In the seedling, the transplanting of rhizome, the faster the time was, the higher a component of an essential oil was.

Especially, content of atractylone in the seedling was higher about 32.3 percent in the early on April than that in the early on May, and higher about 30.6 percent than that in the transplanting of rhizome. Content of Atractylone of rhizome sowed in the early of April was higher about 18.6 percent than that of the transplanting of rhizome.

Therefore, in the cultivation of *Atractylodes*, it is impossible for seedling to be raised in the place in which weeds and maintenance of water is difficult, and it brings increase in yield to sow or transplant the seed in the early of April on the cultivation of seedling certainly and in the early or around the middle of April on the transplanting of rhizome.

Fresh and dry weight of the rhizome had no difference in removal with hand and chemicals. Compared of none-topping, amount of rhizome in removal with hand is higher about 21.7percent in the floral stage and in the early of blooming, about 11.3 percent in the middle of flowering about 8.4 percent in the end of flowering.

Therefore, in the cultivation of *Atractylodes*, it showed that it makes growth good to remove with hand and chemicals in the floral stage.

Compared of none-topping, the content of beta-caryophyllene, beta-selinene, beta-sesquiphellandrene, valencene, gamma-elemene, atractylone, 1-methoxy-2-benzen of the component of an essential oils in floral topping identified with removal with hand, potassium salt of maleic hydrazide and fatty alcohol was high, and specially, the content of atractylone is about 50 percent as high. To produce stably *Atractylodes* and increase the component, it should be topped in the floral stage, and to continue it's life force, it is necessary for it to be treated with more than two times of chemicals.

Plant height, No. of petiole per plant and fresh and dry weight of rhizome showed similar difference in none-fertilizer and many treatments of fertilizers application. Plant height showed similar difference in compost, treatment of organic fertilizer of sesame dregs among 20 percent compound ratio, increase ratio and treatment of chemical fertilizer.

Dry weight and yield of the rhizome didn't showed similar difference in application of increase and decrease ratio on chemical fertilizer, but showed similar difference in treatment of organic fertilizer of sesame dregs and treatment of chemical fertilizer.

Especially, the amount showed higher increase of 32.7 percent in the mixing of the sesame dregs + the compost than that in the use of compound fertilizer.

When being increase of 20 percent in compound fertilizer compared of standards ratio, *phytopbtbora* blight and root rotting disease were prevalent, but the growth of the disease was lowered when using th compost, sesame, the use of two times in sesame dregs + compost.

Especially, the *phytopbtbora* blight decreased about 63 percent and the root rotting disease decreased about 70 percent in the use of two time in sesame dregs + compost, compared of the solo use of standards ratio of compost fertilizer

Therefore, because it makes growth and creation extent of decease low to use amount of two time of sesame dregs + compost in the cultivation of *Atractylodes*, we think that it will be excellent in yield and quality promotion.

Treatment of GA was good in the storage of seed, and refrigeration custody was good in the storage of 1 year old rhizome .

When cultivated in transplanting of the early time and the topping of the floral stage or the early of the flowering, it had no difference with yield of *A. macrocephala*, so the main content of the essential oil in *Atractylodes* was higher than that of *A. macrocephala* and similar in content of wild *A.japonica*, the cultivation of *A.japonica* has made possible.

The content of atractylone, beta-seliene, valecene of the wild *Atractylodes* which are being sold in the interior was much higher than that of the *Atractylodes* which are being imported, the main content of *Atractylodes* which was collected at Ankuk in China was never detected. The content ratio of the wild *Atractylodes* which are be cultivated in Korea was higher about 80 percent than that of *Atractylodes* which are being cultivated at Yungil in China, the

content ratio of the last was much lower about 22 percent less than that of Korean wild *Atractylodes*.

As a result, to promote for efficient production in *Atractylodes*, after producing the 1 year old rhizome and taking refrigeration custody, the rhizome which was sterilized should be planted in the field which applied with 200kg sesame dregs + 4,000kg/10a compost per 10a to N-P₂O₅-K₂O=8-6-6kg to barren soil and in the field which was applied with 200kg sesame dregs + 4,000kg/10a compost to N-P₂O₅-K₂O=4-3-3kg to some fertile soil. To promote amount and quality, certainly trim off sprouts in the floral stage.

2. Valuable Variet Selection from *Atractylodes* Spp.

In order to make a evaluation of *Atractylodes* spp, *A. japonica* indigenous in Korea collected from the eight regions including Gapyung, Gyunggi, while *A. macrocephala* collected from the one restricted site Youngju, Gyungbuk.

Among the field tested 26 lines of *A. macrocephalas*, six promising variants were selected, evaluated by plant growth character and disease resistance to *P drechsleri*. Also three population including AJ2106 were selected from the 10 collected lines by characters with multi branches and disease resistance.

By the mutant inducing treatments, various variant also selected 7 individual from EMS treated, 5 plant from sodium azide originated and 4 plant gamma ray indulgenced in *Atractylodes* spp .

For the purpose of interspecific hybrid development, 10 kinds of promising vegetative F₂ line selected from the 434 F₁ plants, and AJM2103-10 and AJM2107-04 were illustrated best plant growth characteristics and resistance to under the wet moisture condition especially.

3. Improvement of resistance against *Phytophthora* blight in *Atractylodes*

Polymorphic DNA bands were detected for genetic identification of species using RAPD between *A. japonica* and *A. macrocephala*. The formation of callus and the growth of roots was achieved effectively on medium with 5mg/L IBA. The callus formation in mixed treatment was most promoted when the leaf, cotyledon and stem explants were 5mg/L NAA and 5mg/L BA. Explants of *A. macrocephala* were co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 strains containing CaDRP(*Capsicum annuum* Defense Related Protein) gene for transformation. *A. macrocephala* plants sprayed and soil drenched with aqueous solution of BABA(β -aminobutyric acid) showed induced resistance to *Phytophthora* blight infection caused by *Phytophthora drechsleri*.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of project	19
Section 1. Subject of research	19
Section 2. Necessary of research	19
Section 3. Contents and range of research	24
Chapter 2. Status of technology in domestic and abroad	25
Chapter 3. Content and result	29
Section 1. Materials and methods	29
1. Subtitle 1 : Technology development for efficient production in <i>Atractylodes</i>	29
2. Subtitle 2 : Valuable Variet Selection from <i>Atractylodes</i> Spp.	32
3. Subtitle 3 : Improvement of resistance against <i>Phytophthora</i> blight in <i>Atractylodes</i>	34
Section 2. Result and discussion	39
1. Subtitle 1 : Technology development for efficient production in <i>Atractylodes</i>	39
A. Anatomical characteristics of <i>Atractylodes</i>	39
B. Propagation method	40
C. Appropriate size and planting density	42
D. Appropriate transplanting time	49
E. Appropriate time and method of topping	52
F. Appropriate levels and kinds of fertilizer	57
G. Storage method	62
H. Comparison of growing characteristics on <i>A. japonica</i> and <i>A.</i>	

<i>macrocephala</i>	62
I. Comparison of essential oils by collecting site	64
2. Subtitle 2 : Valuable Variant Selection from <i>Atractylodes</i> Spp.	66
A. Collection and evaluation of <i>Atractylodes</i> Spp.	66
B. Selection of promising variants	72
C. Cultivation of valuable variants by mutant inducing treatment	75
D. Interspecific hybrid development	78
3. Subtitle 3 : Improvement of resistance against <i>Phytophthora</i> blight	
in <i>Atractylodes</i>	81
A. Analysis of genetic relationship of <i>Atractylodes</i>	81
B. Selection of resistant <i>Atractylodes</i> against <i>Phytophthora</i> blight	83
C. Characteristics of resistant <i>Atractylodes</i> against <i>Phytophthora</i>	
blight	83
D <i>In vitro</i> propagation of <i>A. macrocephala</i>	84
E. Interspecific hybrid of <i>Atractylodes</i>	94
F. Induction of resistance to <i>Phytophthora</i> blight in <i>A. macrocephala</i>	94
G. Transformation of <i>A. macrocephala</i> using CaDRP gene	95
H. Field test for resistance against <i>Phytophthora</i> blight	95
Section 3. Abstract	96
1. Subtitle 1 : Technology development for efficient production	
in <i>Atractylodes</i>	96
2. Subtitle 2 : Valuable Variant Selection from <i>Atractylodes</i> Spp.	98
3. Subtitle 3 : Improvement of resistance against <i>Phytophthora</i> blight	
in <i>Atractylodes</i>	99
Chapter 4. Achievement or contribution for related field	100
Chapter 5. Application plan for the results	103
Chapter 6. Reference	104

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	19
제1절 연구개발의 목적	19
제2절 연구개발의 필요성	19
제3절 연구개발 내용 및 범위	24
제 2 장 국내외 기술개발 현황	25
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	29
제1절 시험방법	29
1. 제1세부과제 : 백출의 안정생산기술 개발	29
2. 제1협동과제 : 삼주속 식물종으로부터 유용변이체 탐색 및 이용	32
3. 제2협동과제 : 백출의 역병저항성 증진기술 개발	34
제2절 결과 및 고찰	39
1. 제1세부과제 : 백출의 안정생산기술 개발	39
가. 해부학적 특성 파악	39
나. 번식방법 구명	40
다. 종근크기와 적정 재식거리 구명	42
라. 적정 파종시기 구명	49
마. 순자르기 시기 및 방법 구명	52
바. 유기농법에 따른 비대생장 정도와 병 발생 정도 조사	57
사. 저장방법 구명	62
아. <i>A. japonica</i> 의 재배법 개발에 의한 <i>A. macrocephala</i> 와의 생육특성 비교	62
자. 본 시험 재배후 <i>A. macrocephala</i> 와 <i>A. japonica</i> 및 중국 지역별	

백출의 주요 정유성분 분석	64
2. 제1협동과제 : 삼주속 식물종으로부터 유용변이체 탐색 및 이용	66
가. 삼주 수집집단 특성평가	66
나. 유용집단 선발	72
다. 돌연변이 유발에 의한 유용변이체 육성	75
라. 중간잡종 육성	78
3. 제2협동과제 : 백출의 역병저항성 증진기술 개발	81
가. 삼주속 식물의 유연관계 분석	81
나. 재배종과 야생종으로부터 역병저항성 개체 선발	83
다. 내병성 개체의 특성 파악	83
라. 고효율 재분화 방법 개발	84
마. 중간 잡종 육성	94
바. 유도저항성 개체 육성	94
사. 형질전환 가능성 검토	95
아. 선발, 육성된 계통의 포장 저항성 검토	95
제3절 적요	96
1. 제1세부과제 : 백출의 안정생산기술 개발	96
2. 제1협동과제 : 삼주속 식물종으로부터 유용변이체 탐색 및 이용	98
3. 제2협동과제 : 백출의 역병저항성 증진기술 개발	99
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	100
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	103
제 6 장 참고문헌	104

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목적

뿌리를 건조하여 생약재로 사용하고 있는 백출은 위장소화계 계통의 기능감퇴에 따른 식욕부진, 소화불량, 만성하치, 전신권태감, 자간 등에 효능이 있으며, 감초와 더불어 활용범위가 넓은 약재이다. 국내에서 백출생산은 자생 삼주인 *A. japonica*를 야생에서 채취하여 사용하거나 중국산인 *A. macrocephala*를 재배하고 있으나, 물량이 부족하여 북한과 중국으로부터의 수입에 의존하는 실정이다. 국내 백출생산 및 수입현황을 보면 1999년의 경우 전국적으로 약 33ha의 재배 면적에 119 M/T이 생산 되었으며, 수입량은 국내 생산량을 월등히 초과하는 약 600 M/T(1,850×1000 US\$)으로 보고되었다(Seong and Cho, 2000).

이와 같은 수입우월 약재의 국내생산을 통한 농민의 소득증대와 수입대체효과를 기대할 수 있는 백출은 국내에서 재배시 적정 종근 크기, 재배방법, 병균 감염방제, 수확 시 뿌리의 비대 불균일 및 유효 내용성분 부족 등으로 인한 수량 및 품질저하가 문제점으로 대두되고 있다.

이러한 문제점을 해결하기 위하여 체계적 재배법 연구를 통한 수량 및 품질의 증가를 유도하기 위한 안정적 생산 기술을 개발 하고자 한다. 또한 자생삼주(*Atractylodes japonica*), 중국 도입삼주(*A. macrocephala*) 집단에서 내병, 내습, 다수성의 유용변이체를 선발하여 우량 계통육성 후 품종화로 삼주(백출)재배의 안전성을 높이며, 재배시 가장 문제가 되는 역병의 저항성 증진 기술을 개발하고자 한다.

제2절 연구개발의 필요성

식물기원의 생약은 국민들의 소득이 높아짐에 따라 다양한 기능과 종합적 효과 및 향건성 등의 장점이 인정되어, 단순 치료효과와 부작용마저 일으키는 양약 일변도로부터 점차 생약으로의 관심이 높아지면서 수요가 크게 증가하는 추세로 바뀌어 가고 있으며, 필요한 수요를 충족하기 위하여 많은 품목이 중국 등지에서 수입이 되고 있는 실정이다. 뿐만 아니라 우리 나라 생물산업 특히 식물을 대상으로 하는 농업은 최근 불가피하게 밀어닥치는 개방화시대를 맞아 커다란 위기에 봉착하고 있다.

외국으로부터의 수입을 대체하며, 현재 농업이 맞고 있는 위기를 극복하기 위하여 우리 나라에 자생하고 있는 식물들을 활용하여 우리풍토에 알맞는 많은 고유의 약용 식물 개발과 이들의 경쟁력 확보가 무엇보다도 중요한 일이라 할 수 있다.

백출은 뿌리를 건조하여 생약재로 사용하고 있으며, 위장소화계 계통의 기능감퇴에 따른 식욕부진, 소화불량, 만성하치, 전신권태감, 자간 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 이와 혼동되어 사용되는 창출은 소화불량, 식욕부진, 구토, 위장 팽만, 부종, 풍습증, 야맹증, 습진 외에도, 정유성분은 식도 암세포에 대한 억제작용, 강력한 최면작용, 혈당 강하작용, 심장박동을 완화, 혈관 확장, 현저한 나트륨 및 칼륨의 배출작용, 진정작용 등에 효능을 갖는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 창출과 백출이 갖는 효능의 상이함에도 불구하고 한국과 일본 등에서는 양국에 자생하는 *Atractylodes japonica* Koidz.(삼주)의 근경중 살이 짙어 어린 근경에서 코르크층을 벗겨내어 건조한 것을 백출, 여위고 늙은 근경을 건조하여 창출로 사용하고 있으며, 중국에서는 *Atractylodes macrocephala* Koidz. (*Atractylodes ovata* DC.)를 백출로, *Atractylodes chinense* (DC.) Koidz.를 북창출, *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.를 남창출이라 하며 이 두 종을 모두 창출로 이용하고 있다.

이와 같이 기원식물의 정확한 근거가 마련되어 있지 않은 상태에서 경북 등지의 농가에서 소득 작목으로 재배하고 있으나, 재배법 등의 연구 미진으로 많은 문제점을 내포하고 있다.

1. 기술적 측면

백·창출의 기원 종에 관한 연구는 국내외적으로 정(1965), 이창복(1979), 이우철(1996), Kitagawa(1979), Ohwi(1984) 등의 도감이나 식물지, 보고서 등에 기재하는 수준으로, 분류군의 정확한 분류동정은 매우 미진한 실정이다. 이들의 성분 및 효능에 관한 연구로는 Muroi *et al.*(1989), Kimura *et al.*(1991, 1992), Nojima *et al.*(1992), Chiou *et al.*(1992), Mizukami *et al.*(1996), 장 등(1989)이 있으나, 이는 모두 일본 및 중국산 재료의 연구이거나, 기원 종에 대한 분류학적 검토는 전혀 이루어지지 않은 상태이다.

현재 농가에서 재배되는 백출은 중국에서 도입된 *Atractylodes macrocephala* Koidz.로서 국내에는 *Atractylodes japonica* Koidz.(삼주)가 자생하고 있으나 전혀 재배에 이용되지 않고 있다. 과거 안동 및 인근지역에서 채취된 백출을 영 백출이라

하여 최고의 품질로 인정되어진 점에 미루어 *Atractylodes japonica* Koidz.(삼주)에 대한 재배시도가 필요할 것으로 판단된다.

백출은 주로 밭을 이용하여 직파 재배를 하거나 1년생 종근을 이식하여 재배하고 있다. 직파 재배의 경우 재배초기에 상당량의 잡초가 발생하여 백출이 완전한 군락을 형성하기까지 잡초방제에 상당한 어려움을 겪고 있으며, 다량의 종자를 파종 후 다시 솟기작업을 해야하는 번거로움이 있고, 결주와 역병 등의 병해로 인한 입모율이 매우 낮아 농가 소득면에서 심각한 문제로 대두되고 있다.

1년생 종근의 이식을 통한 재배는 적정종근 크기, 파종시기, 적정 재식밀도 및 시비량, 병균 감염방제 등이 문제점으로 대두되고 있으며, 특히 수확 시 뿌리의 비대 정도의 균일성 및 유효 내용성분의 부족 등의 문제점이 대두되고 있다.

특히 국내에서의 백출 재배현황을 보면 역병의 피해가 심각하여 농가 생산재배상의 큰 장애요인이 되고 있다. 경남 농업기술원 함양 약초시험장의 보고에 의하면 백출의 역병이 심하게 발생한 함양과 봉화지방의 18개 농가포장을 대상으로 발병상황을 조사한 결과 최저 6.6%에서 최고 57%의 발병율을 나타냈으며, 함양과 봉화 지역의 평균 발병율은 각각 40.5%와 30%였다고 한다.

타작물의 경우 역병발생이 심한 지역에서 저항성 품종재배의 중요성을 인식한 농민들은 포장에서 저항성 품종재배를 원하나 저항성 품종의 질이 나쁘고 수량이 적어 재배하기를 꺼려하는 농민들도 많다. 이러한 이유 때문에 역병발생이 격심하여 다른 방제법을 이용할 수 없는 재배지역에서만 저항성 품종이용이 국한되어 왔다. 이러한 면을 고려한다면 바람직한 재배학적 특성을 지닌 저항성 품종의 육성이 시급한 상태이며, 이에 따라 종묘회사와 농촌진흥청에서 저항성 품종 육성에 최대의 노력을 경주하고 있다. 본 연구에서는 생명공학을 이용한 저항성 증진 기술개발 시도는 종합 방제기술 못지 않은 효력과 함께 부가가치를 높이고, 향후 국내외적으로 경제성에 매우 큰 기여를 할 것으로 판단된다. 이러한 백출의 역병방제 기술개발과 고품질의 내병성 식물의 육성 보급은 고부가가치 식물 육성차원에서 시급하게 해결해야할 기술과제라 할 것이다.

2. 경제·산업적 측면

한국과 일본, 중국 등지에서 동일 약재 명으로 이용되고 있는 종류들이 증명들이 다름에도 불구하고, 이에 대한 과학적인 분석 없이 최근에 국내 재배가 시도되고 있

으며, 백출생산 및 수입현황을 보면 1999년의 경우 전국적으로 약 33ha의 재배 면적에 119 M/T이 생산 되었으며, 수입량은 국내 생산량을 월등히 초과하는 약 600 M/T(1,850×1000 US\$)으로서 대표적인 수입 우위 생약재로 분류되고 있다. 그러나 국내에서는 중국 종들과 국내 자생 종간의 형태 및 유효 약용성분 종류 및 함량의 차이 등에 근거한 정확한 분류학적 처리 및 이를 기초로 한 재배 화에 관한 연구는 미진한 실정이다.

한편 백출생산성의 문제를 해결하고자 1년생근 이식재배를 행하고 있으나 종근생산을 위한 일련의 재배 체계화가 이루어져 있지 않아 고비용의 종자생산비로 재배되고 있으며, 따라서 현재 일부 한약업상에서 독점으로 농가에 개당 70-120원의 높은 가격으로 판매하고 있다. 이는 표준재배시 10a당 종근값이 70만원으로 2년후 수확시 판매금액의 20%를 차지하는 높은 비율로서 농가 순수익에 큰 문제점으로 대두되고 있다.

따라서 국내의 생약 소비량 급증과 함께 백출의 농가재배보급은 농가소득증대에 중요한 고부가가치 요인으로 인식되고 있으나 백출 역병이 심하게 발생한 함양과 봉화지방의 평균 발병률 40.5%와 30%에 대한 보고는 농가재배의 기피요인으로 작용하고 있는 실정이다.

그러므로 저항성 품종을 개발, 확보해야 한다는 것은 필수적이며, 이런 품종의 종자수급을 유도하는 것이 본 연구개발의 필요성이다. 아울러 본 연구 결과로 창출되는 고부가가치 기술개발의 축적과 상품화를 통하여 유사 관련 작물 연구의 활성화와 연구효과의 극대화 및 산업적 활성화 효과를 도모할 것으로 사료된다.

3. 사회·문화적 측면

기존 재배되고 있는 *Atractylodes macrocephala* Koidz.의 종근 대량생산 체계 및 비대화 뿐만 아니라 *Atractylodes japonica* Koidz.의 재배체계가 확립되어 안정적 생산이 가능하다면 이에 따른 북부지역농민에게 실질 소득원이 될 수 있을 뿐만 아니라 이를 이용한 가공기술 개발을 촉진할 수 있으리라 생각된다.

뿐만 아니라 예로부터 백출은 한약재로 이용되는 이외에도 이른 봄에 형성되는 어린 순을 봄나물로 이용하여 왔다. 그러므로 백출의 안정 대량생산 체계를 확보하여 단경기에 출하하는 고기능성 보건의적 채소 및 쌈채소로서 백출의 이용가치를 부여한다면 농가 소득증대 신품목으로의 가능성 뿐 아니라 국민의 다각적인 소비촉진을 유

도하는 차별화 식품으로 새롭게 창출될 것으로 예상된다. 더욱이 사회적으로 국민 식생활 수준 향상에 따라 영양가가 많은 보건의료, 그리고 항암 및 심장병예방 같은 약리적 고기능성 작물에 대한 요구도가 급상승하고 있으므로 백출은 고기능성, 보건의료적 효능이 탁월한 단경기의 신선한 채소로 부각될 전망이다.

아울러 약용채소 백출의 각종 기능성 효과가 과학적으로 증명되고, 재배기술의 개발로 이를 대량 생산, 기능성 물질 이용을 활성화한다면 궁극적으로는 전국민의 건강 증진에도 크게 기여할 수 있을 것이다. 세계적으로 유명한 한국인의 보신적 건강염려 증후군은 보건의료 고기능성 식물체재의 무분별한 수입이용(년간 12억불(약 1000억원)) 및 현지 방문을 통한 음용을 유도하여 연간 수천만불(동남아 현지 방문 음용은 금액 추정이 안됨)의 외화를 낭비하고 있다. 아울러 욕구충족을 위해 무분별하게 수입된 식물성 각종 약제 또는 식품류는 가격이 매우 비싸며 검증되지 않은 재료가 혼입되어 국민보건을 심하게 위협하는 실정이다.

그러므로 국민의 욕구충족, 건강상의 문제점 해결 그리고 농산물 수출입 역조를 위해 고품질의 생리적 고기능성 작물의 생산연구 및 실용화 연구는 몹시 시급하다. 다행히 국민들의 외제 선호경향이 높지만 농산물만은 근간에 신토불이 사상의 저변확대로 만일 국내에서 보건의료, 생리활성적 고기능성 작물이 생산 공급된다면 소비자의 인기를 제고시킬 뿐만 아니라 충분히 다량 소비될 분위기가 형성되었으며, 진보된 독농가는 새로운 소득 작목의 선택을 위해 보다 적극적이며, 국가의 적극적 농촌지원에 따라 충분한 경쟁적 생산기반을 갖추고 있다. 그러므로 내병성 백출을 대량생산하는 것은 고기능성 보건의료 약용작물 및 새로운 보건의료 채소를 공급할 수 있다는 점에서 소비자의 욕구를 충족시킬 수 있고, 새로운 기술양식과 산물의 고품질화 및 고가화로 농가 영농의식과 소득증대에 크게 기여할 것으로 사료되어 실시되었다.

제3절 연구개발의 내용 및 범위

연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
◎ 제 1 세부과제 백출의 안정 생산기술 개발 (주관기관 : 안동대학교)	0 삼주속 식물의 해부적 특성 파악 0 번식방법 구명 0 적정 종근크기와 채식거리 구명 0 순자르기 방법 및 시기 구명 0 종근의 저장방법 0 유기농법에 따른 비대생장 및 역병방제 정도 구명
◎ 제 1 협동과제 삼주속 식물종으로부터 유용변이체 탐색 및 이용 (협동기관 : 작물시험장)	0 삼주 수집집단 특성평가 0 유용 집단 선발 0 돌연변이 유발에 의한 유용변이체 육성 0 중간잡종 육성
◎ 제 2 협동과제 백출의 역병저항성 증진 기술개발 (협동기관 : 서울여자대학교)	0 삼주속 식물의 유연관계 분석 0 재배종 및 야생종으로부터 역병저항성 개체 선발 0 내병성 개체의 특성 파악 0 고효율 재분화 방법 개발 0 중간잡종 육성 0 유도저항성 개체 육성 0 형질전환 가능성 검토 0 선발, 육성된 계통의 포장 저항성 검토 0 역병저항성 품종개발 효율성 비교 및 조사

제2장 국내외 기술개발 현황

국화와 다년생 식물인 삼주속(*Atractylodes* spp.)에는 *A. macrocephala*, *A. ovata*, *A. japonica*, *A. lancea*, 및 *A. chinensis* 등이 있으며, 한방에서는 출류로 분류된다. 중국에서는 *A. macrocephala*만을 백출로 그 외 *Atractylodes* spp. 식물을 창출로 규정하고 있으며(김 등, 1998), 과거 한국에서는 *A. japonica*를 형태와 가공법에 따라 동일 기원식물을 백출, 창출로 구분하여 이용 하였으며, *A. macrocephala*와 *A. ovata*를 백출로 그 밖의 *Atractylodes* 속 식물을 창출로 규정하는 등 *A. japonica*의 구분에 대한 논란이 많았으나, 현재 국내에서는 *A. macrocephala*, *A. japonica*, 그리고 *A. ovata*의 뿌리줄기(근경) 및 주피를 제거한 것으로 정의하고 있으며, 그 외의 동과 식물인 *A. lancea*와 *A. chinensis* 등을 창출로 규정하고 있다(The Korea Pharmacopeia 7th ed. 2000).

중국에서는 *A. macrocephala*만을 백출로 분류하며, 기타 *A. japonica*(東蒼朮), *A. lancea*(南蒼朮), *A. chinensis*(北蒼朮), 그리고 *A. koreana*(朝鮮蒼朮) 등을 창출로 규정하고 있으나, 한국과 일본에서는 한국 자생 삼주인 *A. japonica*를 백출에 포함시키고 있다(김 등, 1998). 따라서 현재 국내에서는 *A. macrocephala*, *A. japonica*, 그리고 *A. ovata*를 백출로 동과식물인 *A. lancea*와 *A. chinensis*등을 창출로 규정하고 있으며, *A. ovata*는 *A. macrocephala*와 기원식물이 같은 것으로 보고 있다.

일본에서는 *A. japonica*, *A. lancea* (Kawanishi et al., 1994; Kohda et al., 1994; Takeda et al., 1994), 그리고 *A. ovata* (Fukuda et al., 1995, 1997a, and 1997b)를 중심으로 백출과 창출의 재배적 특성, 형태적 특성 및 성분분석에 관한 연구가 수행되었다.

삼주의 형태적 특성을 비교해 보면, *A. macrocephala*와 기원이 같은 *A. ovata*의 지상부 정상부위 잎의 형태는 세엽형, 광엽형 그리고 중간엽형 등으로 다양하며(Fukuda et al., 1997a), 잎과 두상 화서의 크기가 창출에 비해 크다(Fukuda et al., 1995; Kawanishi et al., 1994).

삼주의 형태적 특성을 비교해 보면 *A. macrocephala*와 기원이 같은 *A. ovata*의 지상부 정상부위 잎의 형태는 세엽형, 광엽형 그리고 중간엽형 등으로 다양하며(Fukuda et al., 1997a), 백출의 잎과 두상 화서의 크기가 창출에 비해 크다(Fukuda

et al., 1995; Kawanishi et al., 1994). 백출인 *A. japonica*의 화기는 흰 꽃을 피며 크기가 1.7-2.0cm로 자홍색 꽃을 피는 *A. macrocephala*의 2.5 cm보다는 작으나 창출인 *A. lancea*와 *A. chinensis*보다는 비교적 크다(Takeda et al., 1994). 또한 뿌리의 형태에 있어서 *A. macrocephala*와 *A. ovata*가 주먹형태로 비대되는 반면 *A. japonica*는 근경이 가로로 자라 결절된 형태로 비대된다(Fukuda et al., 1995).

백출 종근은 현재 일부 한약업상에서 농민과 계약재배형식으로 재배하여 농민에게 개당 70원-120원정도로 고가로 판매하고 있는 실정이다. 지금까지 백출재배 연구는 실생 직파에 따른 피복시험, 파종적기, 적정 재식거리 등의 시험을 수행하였을 뿐이며(도 등, 1995; 류 등, 1996; 장 등, 1996; 정과 강, 1996; 최 등, 1996), 종근생산을 위한 실험 뿐만 아니라 국내 자생 종류의 재배화 시도, 중국으로부터 수입되는 것에 대한 경쟁력확보를 위한 비대생장에 관한 재배법은 전혀 시도된 바 없다.

백출의 기원종에 대한 분류학적 검토는 전혀 이루어지지 않은 상태로서 현재 농가에서 재배되는 백출은 중국에서 도입된 *A. macrocephala*로서 주로 밭을 이용하여 직파 재배를 하거나 일부 농가에서 1년생 묘를 이식하여 재배하고 있다. 직파재배의 경우 재배초기에 상당량의 잡초가 발생하여 백출이 완전한 군락을 형성하기까지 잡초방제에 상당한 어려움을 겪고 있으며, 다량의 종자를 파종 후 다시 숙기작업을 해야하는 번거로움이 있고, 결주와 역병 등의 병해로 인한 입모율 정도가 매우 낮아 농가소득면에서 심각한 문제로 대두되고 있다.

1년생묘의 이식을 통한 재배는 적정종근 크기, 수확시기, 병균 감염방제 등이 문제점으로 대두되고 있으며, 특히 수확시 뿌리의 비대여부가 일정하지 못하여 상당한 문제를 초래하고 있다.

백출생산성의 문제를 해결하고자 일부농가에서 1년생근 이식재배를 행하고 있으나 종근 생산을 위한 일련의 재배 체계화가 이루어져 있지 않아 개당 70-120원의 높은 가격으로 구입한 종근을 재배하고 있다. 이는 표준 재배 시 10a당 종근 값이 70만원으로 2년 후 수확 시 판매금액의 20%를 차지하는 높은 비율로서 농가 순수익에 큰 문제점으로 대두되고 있다.

백출의 재배에 문제시되는 역병에 관하여서는 연구된 바 없으나, 고추 등의 일부 작물에서 고품질의 역병저항성 품종 육성과 작물의 역병피해를 최소화하기 위하여 여러가지 방제법을 이용하여 왔다. 작물의 역병 방제전략에 대한 국내, 외 기술현황을 종합한다면 살균제살포, 저항성 이용, 경종적 방제 및 생물적 방제 등을 들 수 있

다. 저항성을 이용한 방제부문에서는 저항성의 유전과 품종 저항성연구, 접종원 농도와 접종방법에 따른 저항성 차이 등이 연구되었고, 식물의 생리적, 유전적 특성과 저항성과의 상관성도 연구되고 있다. 식물은 저항성을 유도하여 식물병원균의 감염에 대해 보호받기도 한다. 동일한 병원균이나 다른 병원균을 미리 접종하거나 동시에 접종하면 식물병원균에 대한 저항성이 식물에 유도된다. 이러한 유도저항성은 일반적으로 비특이적으로 나타나며, 세균, 진균, 바이러스에 의해 야기되며, 국부적으로 나타나거나 전신적으로 발현될 수 있다. 국부적 유도저항성은 많은 식물-병원균시스템에서 비기주 병원균이나 비병원성 균주를 처리하면 관찰된다. 유도 병원균(inducer)을 접종한 위치에서 멀리 떨어져 있는 다른 위치에도 저항성이 유도됨을 여러 가지 기주-병원체조합에서 비슷하게 입증되고 있다.

살균제를 이용한 역병 방제에는 metalaxyl, oxadixyl, propamocarb, copper oxychloride, chlorothalonil, dithianon 등을 토양관주나 엽면살포등으로 처리하며, 이때 식물체의 저항성 수준이 큰 영향을 미친다. 침투성 살균제 metalaxyl은 직접 방제효과 뿐 아니라 phytoalexin 생성을 증진시켜 효과를 발휘한다는 보고도 있으며, 이 metalaxyl은 증산류(transpiration stream)와 함께 뿌리, 줄기, 잎을 통해 상향적 이동(acropetal transport)을 하며, 작용기작으로는 RNA 합성을 억제하여 효과를 발휘한다고 알려져 있다. 그러나 현재 병원균의 살균제에 대한 저항성 발달로 문제가 되고 있다. 메타락실 같은 페닐아마이드(phenylamide)계통의 농약들은 처음 도입될 때만 하더라도 유주자를 형성하는 주요 곰팡이 병원균에 대해서 보호효과, 치료효과, 약효 지속성을 가진 전신성 살균제로서 대환영을 받았었으나 1970년대 유럽에 메타락실이 도입되고 얼마되지 않아서 감자 역병균(*Phytophthora infestans*)에서 비감수성 균주가 발견되었다. 메타락실 비감수성은 *Phytophthora* 종을 비롯하여 노균병 기타 관련 병원균에서 발달하기 시작하였다.

저항성 분리주의 발생에 대한 연구보고는 활발히 진행되고 있으나 저항성에 대한 유전학과 분자생물학적인 기초가 불확실하고 비감수성 유전형의 발달에 대한 연구 또한 시급한 실정이다. 현재까지 *Albugo candida*, *Bremia lactucae*, *P. infestans*, *P. sojae*에서 연구된 바에 따르면 감수성은 반우성 자좌가 결정한다고 알려져 있다. 생화학적 연구에 의해 페닐아마이드는 리보솜 RNA의 합성을 저해하며 *P. megasperma*와 *P. infestans*의 균주에서 발달된 비감수성은 메타락실이 균사 추출물에 덜 결합한다는 사실 정도가 알려져 있을 뿐이다. 이에 따라 보호살균제와 혼합하

여 제형화한 혼합제를 사용함으로써 약제저항성 발생 감소효과와 동시에 살균제의 약효 상가(additive), 상승효과(synergistic effect)를 기대하고 있다. 이는 이들 살균제가 병원균에 대한 생물적 작용 기작에서 서로 상이하게 나타나 상호 보완해 두기 때문인 것 같다.

비기주식물로 윤작(rotation)하는 것이 토양전염병을 효율적으로 방제할 수 있는 방법으로 오랫동안 알려져 왔다. 예를 들어 고추의 경우 참깨나 땅콩을 대체작물로 추천하고 있으나 실제로는 농민들은 고추의 고부가가치가 높아 고추의 연작을 선호하고 있다. 또한 간작도 효과적이거나 한 포장에서 두 작물의 재배관리에 어려움이 있기 때문에 농민들은 간작을 널리 이용하지 않고 있다.

환경오염물질로서 살균제의 부작용에 대한 관심이 증가됨에 따라 최근에 고추재배에서 역병의 생물적 방제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 역병균에 길항효과가 있는 여러 가지 방선균, 세균, 곰팡이가 존재한다. 한편 효과적인 길항균을 실용화 시키려면 kaolin과 pyrophyllite 또는 alginate등을 이용한 제형화가 요구된다. 예로서 *P. cepacia*의 제형화를 위해서는 고분자 탄소원에 길항균을 넣어 수분활성을 높이면서 기타 세균과 곰팡이에 의해 오염되지 않도록 길항균을 보존해야 한다.

따라서 본 연구를 통하여 역병 방제 전략을 체계적으로 수립, 문제점을 해결하고자 한다. 또한 내병성 백출의 육성 보급 연구 또한 전혀 시도되지 않았으므로 백출의 생리·생태에 대한 기초 정보를 체계화하고, 적극 활용하여 본 과제 수행의 목표를 달성하고자 한다. 본 과제는 연구진이 각 분야의 전문가로 구성되어 있어 연구과제의 최종목표인 백출의 다수확 고품질 생산기술 개발을 위해 상호 유기적인 공동연구를 수행, 연구효과의 극대화를 기대할 수 있다.

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 시험방법

1. 제1세부과제 : 백출의 안정 생산기술 개발

본 시험은 *A. macrocephala*의 종자 및 1년생 종근을 공시재료로 하여 해발 200m의 경북 안동시의 시험포장에서 종자를 이용한 실험은 3년간, 1년생 종근을 이용한 시험은 2년간 각각 수행하였다. 공시한 종근은 1년간 육묘한 후 겨울에 포장에서 월동시킨 다음 이듬해 종근으로 사용하였다. *A. japonica* 종근은 경북 안동시 황학산 등지에서 이식 전에 채취하여 처리별로 정식하였다. 전 시험의 수확은 11월 10일경에 실시하였으며, 조사방법은 약용작물조사기준(농촌진흥청 1995)에 준하였다.

가. 식물의 해부적 특성 파악

조직의 해부학적 특성 파악을 위해 완전히 성장한 개체들을 대상으로 근경의 일정 부위를 절취하여 FAA에 고정하였다. 그 후 TBA series를 거쳐 paraffin에 포매하여 10-15 μ m의 두께로 횡단면을 절단한 다음 Safranin-fast green으로 이중염색하였으며, 횡단면의 형태와 조직의 배열양상을 광학현미경(Olympus AX-70, Japan)으로 관찰하였고, 크기는 분류군당 20-30개체씩 Cursor generator(Ver. 2.0 ; Tokyo Electronic Industry Co.)로 측정하였다.

나. 번식방법 구명

종자, 1년생 및 다년생 종근을 4월 15일에 파종 및 정식하였고, 시험구 배치는 난괴법 3반복으로 하였으며, 각 처리 별로 이랑 넓이 90cm, 길이 4m의 이랑 3개에 재식 거리는 조간 30cm, 주간 20cm로 심은 후 종자 및 종근 크기의 3배정도 복토하였다. 시비방법은 10a 당 성분량으로 N-P₂O₅-K₂O= 8-6-6 kg으로, N과 K₂O는 기비:추비를 50:50으로 하여, 추비는 매년 7월 10일과 9월 10일에 2회 분시하였고, 인산과 석회 200kg 퇴비 2,000kg은 전량 기비로 정식 2주전에 사용하여 경운과 정지하였다.

다. 종근크기와 적정 재식밀도 구명

종근의 크기는 대(35g 이상), 중(15-35g), 소(15g)별로 구분하였고, 조간은 20cm에 주간 거리를 20cm, 30cm, 40cm 3처리로 정식하였고, 시험구배치는 분할구배치 3반복으로 2001년 4월 20일에 정식하였고 시비량 및 조사방법은 시험 나와 동일하게 하였다.

라. 적정 파종시기 구명

종자 및 종근의 정식시기는 4월 2일(멸칭재배), 4월 15일(멸칭재배), 4월 30일(멸칭재배), 5월 5일(나지재배)로 구분하여 정식하였고, 시험구 배치는 난괴법 3반복으로 하였으며, 시비량 및 조사방법은 시험 나와 동일하게 하였다.

마. 순자르기 시기 및 방법 구명

시험 나와 동일한 방법으로 시비 및 경운 하여 2002년 4월 15일에 처리별로 1년생 종근을 정식하였다. 적심 시기는 발육기와 개화초기, 개화중기, 개화말기에 무적심, 손제거, 적심제(potassium salt of maleic hydrazide), 적심제(fatty alcohol)를 20일 간격으로 2회 처리하였다. 시험구 배치는 분할구 배치 3반복으로 하였으며, 모든 시비처리는 전량 기비로 정식 3주전에 시용하였다. 추비는 매년 7월 10일과 9월 10일에 2회 분시하였고, 재식 및 조사방법은 시험 나와 동일하게 하였다.

바. 유기농법에 따른 비대생장정도 및 병발생 정도 조사

시비수준은 무시비, 관행재배법인 10a 당 성분량으로 N-P₂O₅-K₂O=8-6-6 kg의 20% 증비(N-P₂O₅-K₂O=9.6-7.2-7.2kg/10a), 관행시비(N-P₂O₅-K₂O=8-6-6kg/10a), 20% 감비시비((N-P₂O₅-K₂O=6.4-4.8-4.8 kg/10a), 퇴비 단독 시용구(8,000kg/10a), 유박 단독시용구 (300kg/10a), 관행시비 반량에 유박 (200kg/10a)+퇴비(4,000kg/10a) 혼용 시용구 7수준으로 정식하였고, 시험구배치는 난괴법 3반복으로 하였으며, 모든 시비처리는 전량 기비로 정식 3주전에 시용하였다. 추비는 매년 7월 10일과 9월 10일에 2회 분시하였고, 재식 및 조사방법은 시험 나와 동일하게 하였다.

사. 종근의 저장방법 구명

발아 및 출아율을 높이기 위하여 종자 및 종근을 11월 10일에 채종하여 실온(20℃), 저온보관(4-7℃), 야외 지하 30cm, 저온처리 후 파종 전 GA 처리에 의하여 발아 및 출아율을 조사하였다. 시험구 배치는 완전임의 배치 5반복으로 배치하였다.

아. *A. japonica* 의 재배법 개발에 의한 *A. macrocephala* 와의 생육특성 비교

A. japonica 를 경북 안동시 학가산에서 3,000주를 채취하여 시험 마와 동일한 포장에서 4월 5일 조기이식 및 발묘초기와 개화초기에 완전히 적심하고, 시험 마와 동일하게 시비 및 정식하여 *A. macrocephala* 와 생육특성을 비교하였다.

자. 본 시험 재배 후 *A. macrocephala* 와 *A. japonica* 및 중국 지역별 백출의 주요 정유성분 비교

A. japonica 시료는 경북 일월산, 황학산 및 학가산 등의 자생지에서 야생을 채취하였고, 재배품은 시험재배에 따른 품질이 우수하였던 처리구의 백출을 이용하였다. *A. macrocephala* 재배시료는 시험구중 품질 및 수량이 높았던 시료를 사용하였고, 중국산 재배종은 1998년에 중국 현지로부터 수집한 시료를 사용하였다.

- 정유성분의 추출 및 정량

시료 2g을 정확히 달아 삼각플라스크에 넣고 에테르 25ml를 가하여 10분간 초음파로 진탕 추출한 후 추출물을 여과하고 잔유물에 에테르 20ml를 가하여 다시 초음파로 진탕 추출한 다음 여과하여 두 여액을 한데 모아 소량의 무수 황산나트륨으로 탈수 시킨 다음 여액을 질소 기류 하에서 농축하여 에테르를 증발시켜 잔유물을 클로로포름에 녹여 5ml로 정용하고, 이 용액 1.0ul를 GC/MS에 주입하였다. 내부표준물질로(I.S.T.D)로 1-Hexadecene을 사용하여 정유성분 물질의 피이크 면적과 주입한 I.S.T.D.물질의 면적 비로 비교하였다.

* GC/MS 분석조건

GC/MSD model : Hewlett Packard 6890/5973

Column : HP-INNOWAX(Crosslinked Polyethylene Glycol) 0.25mmID x 30m capillary

(allele)를 역시 같은 방법으로 “a”, “b” 등으로 표시하였다. 0.01이상의 복수의 대립 유전자가 공존하고 있을 때 “polymorphic”, 그러하지 않을 경우, 즉 0.01을 넘는 것이 한 개밖에 없을 경우 “monomorphic”으로 규정하였다.

자료분석은 유전적 변이를 종 및 집단 수준에서 다음 4가지 측정 기준으로 나타내었다. 즉, 다형현상의 빈도(P, percent polymorphic), 대립 유전자좌위당 평균 유전자의 수(A, mean number of alleles per locus), 대립 유전자좌위당 유효한 유전자의 수(Ae, effective number of alleles per locus), 유전자 다양성(He, gene diversity)이다. 각 다형현상의 대립유전자 빈도에서 하아디-바인베르그 예상값에서 편차가 있는지는 Wright의 고정지수(Wright's fixation index) 분석을 사용하였으며, 하아디-바인베르그 예상값에서 유의성이 있는지는 Li와 Horvitz(1953)의 x^2 분석에 따랐다.

Table 1. Collection of germplasm in *A. japonica*

Regions	No. of germplasm	Regions	No. of germplasm
Gapeng(Kyeonggi)	450	Jecheon(Chungbuk)	256
Ganghoa(Kyeonggi)	223	Paengchang(Kwangwon)	1,520
Euiseong(Gyeongbuk)	1,150	Andong(Gyeongbuk)	258
Hamyang(Gyeongnam)	95	Taebak(Kwangwon)	450

나. 유용집단 선발

백출 유용변이 집단육성은 2001년 9월중순 초장, 엽크기 등 외부형태를 기준으로 하여 변이주를 선발하였으며, 선발 된 개체를 망사 밀봉하여 11월상순에 채종한 종자를 2002년 2월중순경 온실에 육묘 하였다. 공시집단수는 *A. macrocephala* 26집단, *A. japonica* 10집단이며, 육묘한 묘의 포장정식은 4월하순에 재식거리 30 x 15cm로 식재 하였으며, 시험포장의 시비량(N-P₂O₅-K₂O)은 7 - 4 - 3kg/10a을 사용 하였다. 온실조건에서 역병균 인위접종에 의한 발병율을 조사 하였다.

다. 돌연변이 유발에 의한 유용변이체 육성

돌연변이에 의한 유용변이체 선발은 유발원으로 방사선 처리는 γ - ray를 10kr,

20kr, 30kr, 40kr를 조사하였다. 화학약제류는 EMS는 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5% 농도액에 12시간 및 24시간 침지 처리 하였으며, NaN₃는 10mM, 20mM, 30mM 농도액에 12시간 및 24시간 침지 처리하였다. 방사선 처리 및 약제처리별 최적처리농도 구명은 20℃, 암조건에 처리당 50립, 3반복으로 치상한 후 평균 발아율을 검정하였다. 각각의 최적 처리기준 구명 후 포장시험을 위하여 각 처리별 종자 1kg에 돌연변이원별로 재처리를 하였다. 재처리한 종자는 4월하순에 흑색비닐피복 포장에 30×15cm로 이식 하였다.

라. 종간잡종 육성

종간잡종 육성은 2001년 *A. japonica* 수집집단과, *A. macrocephala* 분리집단 중에서 내병성이 강한 집단을 선발한 후 *A. japonica*를 모본, *A. macrocephala* 부분으로 인공교배하여 채종한 종자를 2002년 동계 육묘한 후 포장에 이식하여 434 개체의 F1 식물체를 얻었으며, 2003년 F1 식물체중에서 생육이 우수한 100개체를 영양번식으로 증식하여 100계통의 F2 영양계 계통을 육성한 후 특성조사를 수행 하였다. 특성 조사방법은 초장은 개화기, 경태는 지제부 절간의 중앙부, 절수는 지제부에서 정상화까지 절수, 분지수는 길이 1cm이상 1차분지수, 엽 형태 및 엽 크기는 경 중앙부의 엽 크기를 측정하였다.

3. 제 2 협동과제 : 백출의 역병저항성 증진 기술개발

가. 삼주속 식물의 유연관계 분석

삼주속 식물의 유연관계를 분석하기 위하여 RAPD분석을 실시하였다. *A. macrocephala*와 *A. japonica*, 그리고 이들의 종간잡종 12종을 작물시험장 실험포장에서 수집하여 실험재료로 사용하였다. CTAB(cetyltrimethyl ammonium bromide) 방법으로 식물체의 DNA를 추출하여 RAPD분석을 실시하였다. PCR조건확립을 위하여 MgCl₂농도, DNA농도 및 primer농도 실험을 실시하였고, primer는 URP primer를 사용하였다(Table 2).

Table 2. Primers(SRILS UniPrimer) used for RAPD of *A. macrocephala* and *A. japonica*.

primers No.	sequences(5'-3')	Tm(°C)
1	ATCCAaggTCCgAgACAACC	66.0
2	CCCAGCAACTgATCgCACAC	67.3
3	gTgTgCgATCgTTgCTggg	67.3
4	AggACTCgATAACAggCTCC	66.3
5	ggCAAgCTggTgggAggTAC	71.9
6	ATgTgTgCgATCgTTgCTg	62.7
7	ggTgAACAgTgAgATgAACC	62.0
8	TACATCgCAAgtgACACAgg	62.6
9	AATgTgTggCAAgtgTgg	66.9
10	gATgTGTTCTTggAgCCTgT	63.7
11	ggACAagAAgAggATgTggA	64.3
12	ggTTgTAggCCgATATTgTC	64.3

나. 재배종과 야생종으로부터 역병저항성 개체 선발

역병저항성 개체 선발을 위하여 재배종과 야생종을 국내 및 중국에서 수집하여 30×15cm 재식거리로 식재한 후 발병율과 포장고사율을 조사하여 저항성 정도를 검정하였다. 국내에서는 가평, 강화, 포천, 평창, 태백, 제천, 안동, 의성, 함양, 양주 등지에서 *A. macrocephala*와 *A. japonica*를 수집하였다.

다. 내병성 개체의 특성 파악

유전자원을 수집, 실험포장에 식재하여 저항성을 검정한 후 선발된 저항성 개체의 식물학적 특성을 조사하고자 초장, 엽장, 1차 분지수, 경수 등을 조사하였다.

라. 고효율 재분화 방법 개발

식물체 재료는 작물시험장에서 생산된 백출종자를 분양받아 사용하였다. 백출종자는 상용 시판되는 벤레이트-T를 800배액으로 사용하여 24시간 침종한 후에 흐르는 수돗물에 수세하여 표면소독을 하였다. 다시 상업용 표백제(유한락스: 유효염소 함유량 4%) 용액에 15분 침종한 후 멸균수에 3회 세척한 후 발아용 배지(Murashige and Skoog배지)에

치상하여 2,000 lux, 16시간 명상태, 온도 24±1℃ 조건하에서 무균발아 시켰다. 이후 본엽이 3-4매 전개된 유묘를 조직배양의 재료로 사용하였다. 치상한 식물체 부위는 잎, 줄기, 자엽의 세 부분으로 구분하였다. 그 외에 포자에서 채취한 화퇴부분도 이용하였다. 모든 처리구는 5반복으로 실시하였다. 배지는 Murashige and Skoog(1962) 고체배지(이하 MS 배지라고 함)를 기본으로 하였으며, sucrose 2%, agar 0.8%, pH 5.8로 하여 121℃, 1.2기압(1b)에서 20분간 고압멸균하여 사용하였다. 성장조절제는 IBA, NAA, IAA과 BA, Kinetin, 2iP, Gibberellin등을 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10mg/L으로 처리하였다. 캘러스와 식물체 분화정도는 성장조절제 단독처리구는 치상후 60일을 기준으로 치상한 식물체의 50%이상이 캘러스화 된 것을 대로, 중은 40-50%, 소는 40% 미만일때로 구분하였고, ·는캘러스가 생성되지 않은 것, 그 외는 고사한 것으로 나누어 조사하였다. 2차로 실시한 성장조절제 조합처리구는 식물체를 치상한 후 30일을 기준으로 캘러스 생성율과 재분화율을 조사하였다.

마. 중간잡종 육성

*A. macrocephala*와 *A. japonica*의 개화기에 수분수정을 실시하였다. *A. japonica*를 모본으로 하였고, *A. macrocephala*를 부본으로 하여 중간잡종을 육성하였다.

바. 유도저항성 개체 육성

실험에 사용된 백출은 상토 60%, vermiculite 20%, perlite 20% 혼합한 상토에 종자를 파종한 후 발아하여 3-4주 정도 된 균일한 유묘 개체를 사용하였으며, BABA처리하는 soil drench는 1, 10, 100, 1000 ppm 농도로 각각 10ml 씩 관주 처리하였고, leaf spray는 1, 10, 100, 1000 ppm 으로 하였다. 역병균은 농촌진흥청에서 분양받았으며, *Phytophthora drechsleri*를 10% V8A(V8-juice agar)배지에 옮긴 후 25℃ 암조건에서 5일간 배양하여 접종원으로 이용하였다. 10%V8A배지는 시중에서 판매되고 있는 V8 주스 50ml과 CaCO₃ 0.5g, Agar 8.5g을 증류수 50ml에 녹여 고압 멸균한 후 직경 9cm 멸균 페트리디쉬에 분주하여 사용하였다. *Phytophthora drechsleri*는 10% V8A배지를 멸균수화 함께 균질화하여 상온(25℃) 광조건에서 24시간 방치한 후 15℃에 1시간 배양하여 포자낭을 형성케 하였다가 다시 상온으로 환원하여 유주자를 방출케 hemocytometer 사용해 counting하여 살균 증류수 또는 살균 수돗물 이용해 유주자를 10⁵으로 dilution 후 접종한 균사-유주자 현탁액을 10⁴/ml 밀도로 하여 접종

원으로 이용하였다. 역병균은 처리후 soil 1g 당 유주자(zoospores) 나출시켜 10⁵ 접종으로 하여 3-4일후 처리하였다. 역병의 진단 및 역병 접종에 의한 역병 저항성 검정을 위하여 BABA처리한 백출에 역병균을 접종한 후 하루 2회 관수하여 pot내 토양을 과습상태로 유지하였으며, 병징의 확인은 병평가는 접종 7일 후와 14일 후, 2회에 걸쳐 먼저 육안으로 평가하였는데 접종후 wilting이나 yellowing 등의 초기 병징이 나타나는지를 평가 하였는데 병징이 유묘에서 진전되는 경우 damping off 등의 병징이 나타나게 되므로 육안평가 하였다.

사. 형질전환 가능성 검토

형질전환을 위한 *Agrobacterium* strain으로는 GV3101을 사용하였다. Binary vector로 pBI121에서 GUS부분을 제거하고 *CaDRP* 유전자 (*Capsicum annuum* Defense Related Protein, MADS-box containing gene)가 도입된 것을 사용하였다 (Fig. 1). *Agrobacterium* (GV3101/*CaDRP*)은 kanamycin(Km) 50 mg/L, rifampicin(Rif) 50 mg/L이 첨가된 LB 고체배지에서 28℃에서 2-3일 동안 배양하여 사용하였다.

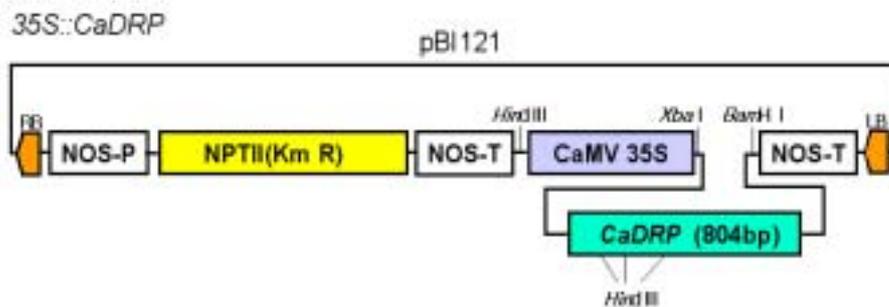


Fig. 1. Binary vector construction of *CaCRP* gene

For transformation of *CaDRP* gene into plants, *CaDRP* gene was inserted next to the CaMV 35S promoter instead of GUS gene in pBI121 binary vector. The constructed vector was transformed *Agrobacterium* strain GV3101 by freeze-thaw method.

형질전환을 위하여 *Agrobacterium*은 LB배지 5ml에 kanamycin 50mg/L +Rifampicin 50mg/L+Tetracycline 37.5mg/L를 첨가한후 24시간 암조건에서 24시간 동안 배양하였다. 형질전환을 위한 식물생장조절제 처리는 callus유기율이 가장 좋은 BA 5mg/L, NAA 5mg/L 혼용배지를 사용하였고, 파종 후 10일된 백출 유묘의 잎 절편을 2일간 배양하였다. 그 후 *Agrobacterium* 100ml에 50mg/L의 Aceto cyllingon 을 넣어 petridish에 분주한 후 pre-culture한 leaf disk를 넣고 잘 저어준 후에 멸균한 filter paper에 옮겼다. 다시 잎 절편을 pre-culture에 사용했던 배지에 옮겨주고 3 일동안 암조건, 28℃로 배양하였다. km10mg/L, cb50mg/L, cf25mg/L, Gentamicin 50mg/L가 첨가된 100ml의 MS액체배지에 3일동안 암상태로 co-culture한 leaf disk 를 넣어 5분씩 3회 washing 작업을 하였다. 다시 30분동안 멸균한 3차 D.W에 같은 방법으로 5분씩 3회 washing 해주었다. washing한 leaf disk를 cb 10g/l, cf 10g/l, km 1ml, genta 1ml가 함유된 BA 5ml/L, NAA 5ml/L 혼용배지에서 배양하였다. 추 후 PCR로 형질전환체를 선별할 예정이다. 즉, 형질전환 유무를 정확하게 알아보기 위하여 재생식물체로부터 genomic DNA를 추출하여 PCR(Polymerase Chain Reaction) 을 수행 하고자 한다. PCR에 사용되는 primer는 다음과 같다.

Foward primer (*Ca35S* promoter specific):5'-ATTTTCAGAAAGAATGCTAAACC ACAG-3'Reverse primer (*CaDRP* gene specific): 5'-TCAAAGCCATCCATC CAGGTAC-3'PCR은 94℃에서 90초, 45초, 72℃에서 90초의 조건으로 35회 반복하여 수행할 예정이며, 재생식물체에서 약 1.6kb의 PCR산물이 나오는지 확인한다.

아. 선발, 육성된 계통의 포장 저항성 검토

*A. japonica*를 모본으로, *A. macrocephala*를 부분으로 하여 육성한 중간잡종 식물체의 저항성을 검토하고자 역병균 접종후의 병징발현을 조사하였다.

제2절 결과 및 고찰

1. 제1세부과제 : 백출의 안정 생산기술 개발

가. 삼주속 식물의 해부적 특성 파악

*A. japonica*와 *A. macrocephala*의 근경 횡단면은 방사조직이 발달되어 있으며, 유관이 불규칙적으로 분포하고 있었다. *A. japonica*에서는 근경의 유관이 직경 $500\ \mu\text{m}$ 이었으며 단위면적당(No./ $100\ \mu\text{m}^2$) 14개이었고, *A. macrocephala*는 근경의 유관이 직경 $266.7\ \mu\text{m}$ 이었으며 단위면적당(No./ $100\ \mu\text{m}^2$) 11개이었다(Fig 2). 이외에도 자방의 구조, 잎의 구조 등에 대하여서도 해부학적 특성을 파악하였다.

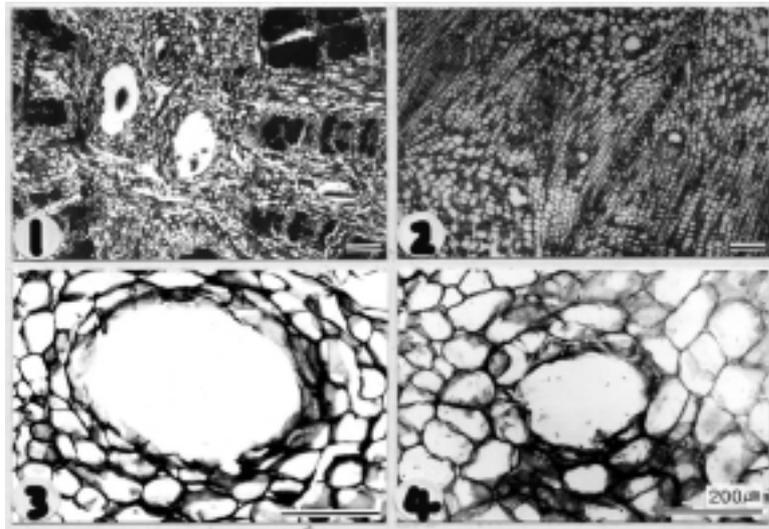


Fig. 2. Comparison of a rhizome between *A. macrocephala* and *A. japonica*.

나. 번식방법 구명

백출의 번식을 종자 혹은 종근 사용 여부에 대한 적정 번식방법 구명을 위한 시험포장의 토성은 사양토이고, pH, 유기물 및 양이온치환 함량은 농가의 약초 재배밭 토양과 비슷한 함량을 가지고 있었고, 1년생 종근과 다년생 종근(Fig. 3)의 다년생 재배에 따른 공시토양의 이화학적 특성의 변화는 없었다(Table 3). 1년생 종근과 다년생근을 절단한 종근의 정식 1년 후 입묘율은 각각 78.9 와 76.3%로 큰 차가 없었으나, 종자 파종 시는 14.2%로 매우 낮았다(Table 4). 수확 시 초장, 분지수, 지상부 생체중은 1년생 종근 정식 및 다년생 종근 절단에 의한 정식 간에는 5% 유의차를 나타내지 않았으나, 종자파종과 종근의 정식 간에는 전 생육상황이 유의차를 나타내었다. 특히 종자 파종시의 1년 차 생육상황은 종근 절단에 의한 파종에 비하여 생육상황이 매우 나빴다. 다년생근의 절단 정식이 1년생 종근의 정식에 비하여 입묘율이 약간 낮은 것은 다년생 근의 절단에 따른 병원균의 종균 침투에 따른 것으로 생각된다.

1년 차 재배에 비하여 2년 차 재배시의 입묘율은 종자 파종시는 10%이하로 매우 낮았으나, 1년생 종근 및 다년생 종근 절단 정식은 62-68%로 높게 나타났다. 특히 다년생 절단 종근 정식이 1년생 종근 정식에 비하여 1년 차 재배에 비하여 입묘율이 낮게 나타났는데 이는 역병 등의 병원균 침투에 의하여 낮게 나타났다. 종자 파종 시는 토양의 수분 보지력에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 종자 파종 시에는 입묘율 향상 방안으로서 초기 발아시 까지 충분한 수분을 유지시켜 주어야하고 성장속도가 매우 낮아 화분과 잡초등과의 경합에서 입묘율이 매우 낮게 나타났다.

따라서 파종 재배 시는 초기에는 적정수분 및 잡초제거에 따른 노동력의 과다 투입이 요구되어 백출 재배 시에는 현실적으로 불가능한 것으로 생각된다. 1년생 및 다년생 종근 정식 시는 반드시 종자소독이 요구되어지며, 백출 재배는 파종재배 및 다년생 종근 절단 사용에 비하여 1년생 종근 정식은 역병 출현율이 낮아 비배 관리에 용이하여 백출 재배 시에 적극 추천된다.

Table 3. Physical and chemical properties of experimental field

Time of Sampling	Textural class	pH (1:5)	O.M (%)	P ₂ O ₅ (ppm)	Ex-cation(me/mg)			SO ₄ (ppm)	Clay (%)
					K	Ca	Mg		
Before	Sandy-loam	6.8	3.6	790	0.18	12.69	4.52	145	11
After	Sandy-loam	6.8	3.5	785	0.17	12.59	4.62	142	11



Fig. 3. Seed for seedling and rhizome for transplanting

Table 4. Growth characters of cultivated plants by seedling of seed and different rhizome

Kinds of planting	Emergence ratio (%)			Plant height (cm)			No. of petiole per stock		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Seed	14.2	9.3b	8.8b	25.7	29.8b	43.5b	1.7	2.5b	4.7b
1 year rhizome	-	78.9a	68.8a	-	36.3a	52.1a	-	3.6a	5.3a
Multi year rhizome	-	76.3a	62.7a	-	37.5a	52.9a	-	3.9a	5.6a

Kinds of planting	Fresh weight (g/plant)						Dry weight (g/plant)						Yield (kg/10a)		
	Shooting			Rhizome			Shooting			Rhizome			Rhizome		
	1 ¹⁾	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Seed	57.4	64.9b ²⁾	86.6b	33.5	36.8b	63.6b	8.8	9.6c	13.9c	7.1	8.7b	17.8b	17	13b	26b
1 year rhizome	-	134.2a	189.6a	-	78.6a	128.9a	-	20.1b	28.6b	-	20.4b	34.2a	-	269a	392a
Multi year rhizome	-	130.9a	188.9a	-	83.4a	143.3a	-	20.6a	30.4a	-	20.7a	36.7a	-	263a	383a

¹⁾ Cultivated period (year)

²⁾ Values followed by the same letter do not differ significantly at the 5 percent level by Duncan's multiple range test

다. 종근크기와 적정 재식밀도 구명

백출재배시의 적정 종근크기 및 재식밀도를 구명을 위한 시험 포장의 토양 이화학 적특성을 조사 해 본 결과(Table 5), 시험 전과 1년 및 2년 차 시험 후의 공시토양의 이화학적특성은 큰 차가 없었고 처리 간 시험포장의 이화학적 특성의 차이는 없었다.

종근의 크기를 대(36g 이상), 중(15-35g), 소(15g 미만)별로 구분하여, 주간 거리를 20cm, 30cm, 40cm의 간격으로 분할구배치법 3반복으로 2001년 4월 20일에 재식하여 재식밀도와 종근크기에 따른 비대정도를 조사 해 본 결과(Table 6, Fig. 4), 정식 종근의 대와 중간에는 입묘율, 근경의 건물중 및 수량은 유의차가 없었으나, 중과 소간에는 5% 유의차가 인정되었다. 초장 및 지상부 생체중은 종근 크기 간에 유의차를

나타내었고, 종근크기별 정식에 따른 년차별 입모율은 1년차 생육시의(전처리 평균) 66.4%에 비하여 약3.4% 감소가 되었다. 특히 후기 생육이 불량하였던 종근 크기가 소일 수록 입모율이 낮았는데, 이는 초기 생육 불량에 따른 역병, 뿌리썩음병, 초기 가뭄등으로 인한 고사율 증가로 기인된 것으로 생각된다. 재식거리별로 입모율, 초장, 근경의 건물중은 20 x 40 cm와 20 x 30 cm재식 간에는 유의차가 없었으나, 20 x 40 cm과 20 x 30 cm 이 20 x 20 cm간에 유의차를 나타내었다. 입모율은 종근 크기가 클수록 높았고, 특히 종근크기가 소일 경우는 재식거리에 따른 입모율의 차가 없었다. 종근 크기별 정식에 따른 초장, 분지수의 생육은 대종근 정식은 중과 소 정식에 비하여 양호하였고, 중과 소간에는 큰 차가 없었다. 주간 재식 거리가 클 수록 초장, 분지수 및 지상부와 지하부 생체중이 높았으나, 주간거리별 재식시의 생육차이는 종근크기 대와 중 정식일 경우는 지상부와 지하부의 생체중에 미치는 영향은 매우 높았으나, 소 파종은 낮았다. 대 정식일 경우의 지하부 근중은 재식거리 20 x 40 cm와 20 x 30 cm재식 간에는 차가 없었으나, 20 x 40 cm와 20 x 20 cm간에는 큰 차를 나타내었다.

입모율을 계상한 10a당 수량을 조사 해 본 결과(Table 5), 근경의 건물중은 종근 크기별 및 재식 밀도별 전 처리 간에 유의차가 인정되었다. 종근 크기별로는 종근크기가 큰 것을 정식한 것이, 재식 거리 간에는 밀식 할수록 수량이 높았다. 년차 간 경향은 2년근에 비하여 3년근이 약 20% 증수되었으나, 년차 별 재식거리 소, 밀식에 따른 증수 비율은 큰 차가 없었다. 종근 크기가 대일 경우는 20 x 30 cm이, 중소일 경우는 20 x 20 cm이 수량이 높았다. 수량면에서는 중·소일 경우 밀식이 유리하였으나, 주당 근중면에서 중의 경우 20 x 20 cm 밀식은 품질의 저하 및 품질저하를 초래함으로써 20 x 30 cm이 유리한 것으로 나타났다.

따라서 종근 대와 중은 재식거리가 20 x 30 cm가, 소는 20 x 20 cm 재식이 수량 및 품질 면에서 유리하였다.

Table 5. Physical and chemical properties of experimental field

Sampling time	Textural class	pH (1:5)	O.M (%)	P ₂ O ₅ (ppm)	Ex-cation(me/mg)			SO ₄ (ppm)	Clay (%)	Remark
					K	Ca	Mg			
Before Experiment	Sandy-loam	6.8	3.6	690	0.18	11.69	4.52	145	11	
After 1 year	Sandy-loam	6.8	3.0	678	0.17	11.07	4.42	147	11	대과중 20x30cm
After 2 year	Sandy-loam	6.7	3.0	671	0.17	11.21	4.43	146	11	



Fig. 4. Size of rhizome for planting

Table 6. Growth characters of *A. macrocephala* on planting size and planting densities of rhizome

Size	Planting density (cm)	Emergence ratio(%)		Plant height (cm)		No. of petiole per stock		Rooting			
								Fresh weight (g)/ plant		Dry weight g/plant	
		2year	3year	2year	3year	2year	3year	2year	3year	2year	3year
L	20×40	72.6	69.3	72.2	72.1	2.8	3.8	118.39	154.3	31.1	40.8
	20×30	71.4	69.1	73.3	72.3	2.6	3.6	103.45	152.5	30.6	39.5
	20×20	67.8	66.2	51.5	53.1	2.5	3.3	82.49	105.4	21.4	25.3
M	20×40	66.8	63.2	58.4	61.3	2.6	3.4	92.33	130.8	29.9	35.3
	20×30	66.9	62.6	54.4	56.8	2.5	3.2	90.73	128.8	29.3	34.5
	20×20	63.1	60.4	48.6	52.1	2.5	3.1	85.76	112.3	22.7	30.3
S	20×40	63.8	59.9	47.8	50.2	2.5	3.3	81.10	115.5	24.3	32.3
	20×30	62.9	58.3	48.9	50.3	2.4	3.1	78.56	114.9	23.9	31.0
	20×20	62.0	58.5	37.3	37.2	2.4	3.1	71.32	113.2	22.9	30.5
mean ¹⁾											
L		70.6a2)	68.2a	65.7a	65.8a	2.6a	3.6a	101.44a	1374a	27.7a	35.2a
M		65.6b	62.1b	53.8b	56.7b	2.5a	3.2b	89.61b	124.0b	27.3a	33.4a
S		62.9b	58.9b	44.7c	45.9c	2.4a	3.2b	76.99c	114.5c	23.7b	31.3b
mean ¹⁾											
	20×40	67.7a	64.1a	59.5a	61.2a	2.6a	3.5a	97.27a	133.5a	28.5a	36.1a
S	20×30	67.1a	63.3a	58.9a	59.8a	2.5a	3.3b	90.91b	132.1a	27.9a	35.0a
	20×20	64.3b	61.7b	45.8b	47.5b	2.5a	3.2b	79.85c	110.3b	22.3b	28.7b

1) Combined over topping time and plant spacing level, respectively.

2) Values followed by the same letter do not differ significantly at the 5 percent level by Duncan's multiple range test

Table 7. Yields of *A. macrocephala* on planting size and densities of rhizome determined at year

Size	Planting density (cm)	Fresh yield (kg/10a)		Dry yield (kg/10a)	
		2year	3year	2year	3year
L	20×40	1610	2004	423	530
	20×30	1846	2633	546	683
	20×20	2164	2617	544	628
M	20×40	1156	1550	374	418
	20×30	1517	2015	489	540
	20×20	2029	2545	538	687
S	20×40	970	1297	291	363
	20×30	1234	1675	376	452
	20×20	1657	2483	531	670
mean ¹⁾					
S		1249a	1612a	336a	409a
L		1045b	1358b	311b	365b
M		858c	1212c	266c	330c
mean ¹⁾					
	20×40	830c	1078c	242c	291c
	20×30	1021b	1405b	313b	372b
	20×20	1300a	1699a	359a	441a

1) Combined over topping time and plant spacing level, respectively.

2) Values followed by the same letter do not differ significantly at the 5 percent level by Duncan's multiple range test



(After planting of large rhizome)

(After planting of small rhizome)

Fig. 5 . Rhizome of *A. macrocephala* before harvesting on planting size and densities of rhizome

종근 크기별 과중에 따른 백출근 내의 주요 정유성분을 분리, 동정 및 함량을 비교 해 본 결과(Fig. 6, 7, Table 8), 종근 크기 및 재식 밀도 처리별 근에서 7가지의 주요 정유성분이 분리 동정되었으며, 종근의 정식이 타 정식 종근 크기에 비하여 동정된 함량이 높았고, 특히 백출의 주요성분으로 알려진 atracylone의 함량은 중 종근 정식이 대 종근 정식에 비하여 117% 높았다. *A. macrocephala*의 전 종근 크기별 정식 에 따른 정유성분 함량은 *A. japonica*에 비하여 낮았다. 종근크기 대(35g 이상) 및 중(15-35g)을 정식 시는 소(15g)에 비하여 beta-caryophyllene, beta-selinene, beta-sesquiphellandrene, valencene, gamma-elemene, atracylone, 1-methoxy-2-benzen 등의 정유성분 함량이 매우 높았다. 대와 중간의 함량은 큰 차가 없었다. 특히 백출내의 주 정유성분으로 알려진 atracylone의 함량은 종근 크기가 중, 대, 소 순으로 함량이 높았고 주간거리가 소식 일 수록 높았다. *A. japonica*에 비하여 20 x 40 cm 정식의 *A. macrocephala* 내의 atracylone 함량은 *A. japonica*에 비하여 대 종근 정식시는 62%가, 중 종근 정식시는 88.1%이었다.

백출내에는 1.5%정도의 정유성분이 함유되어 있으며, 그 중에 atracylone이 주성분으로 알려져 있다. 일반적으로 백출의 주요성분인 atracylone은 쥐의 간세포 배양의 t-BHP에서 유도된 세포독성과 지질산화에 관한 억제효과 메카니즘 중 산화적 스트레스에 대한 보호적 효과로서 항산화 역할을 하는 것으로 보고(Hwng *et. al.*, 1996)되어져 있고, unscheduled DNA합성에 의한 t-BHP유도에 의한 세포독성 감소효과가 있으며, Na, K(+)-ATPase 특이적 억제제로서 E2에서 효소와 상호 작용을 하고 E2-P에서 k.E까지 반응단계를 억제시킨다고 한다(Satoh *et. al.*, 1996). 따라서 대 종근의 과중은 수량 뿐 만 아니라 정유성분의 함량도 증가시켜서 *A. japonica*와 비슷한 수준으로 증가시킬 수 있을 것으로 생각된다.

따라서 중 종근(15-35g)의 정식은 정유성분의 함량을 증가시켜서 근경의 품질을 증가 할 것으로 생각된다.

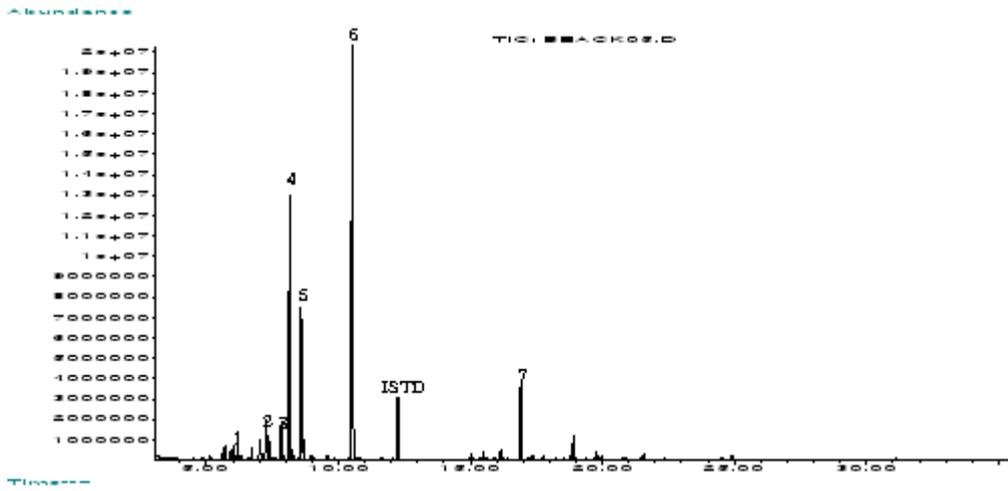


Fig. 6. Chromatogram of essential oil determined from rhizome in *A. macrocephala*

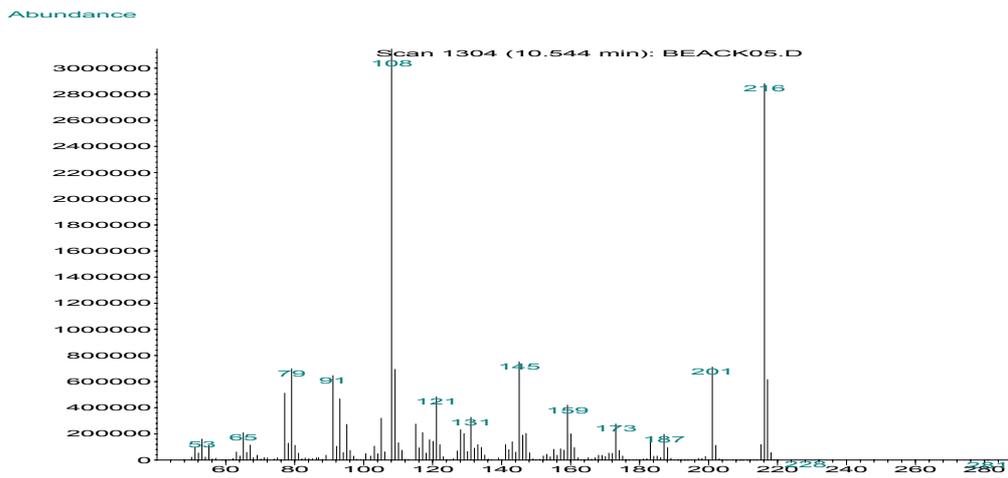


Fig. 7. GC mass spectrum of Atractylone determined from rhizome in *A. macrocephala*

Table 8. The content of essential oil on planting size and planting densities of rhizome in *A. macrocephala* at harvesting time
(peak area / I.S.T.D peak area)

No.	Compounds	<i>A. macrocephala</i>									<i>A. japonica</i>
		L ¹⁾			M			S			wild condition
		20x40 ²⁾	20x30	20x20	20x40	20x30	20x20	20x40	20x30	20x20	
1	Beta-Caryophyllene	0.418	0.325	0.298	0.298	0.289	0.254	0.213	0.196	0.167	0.312
2	Beta-Selinene	0.618	0.514	0.432	0.910	0.836	0.745	0.318	0.228	0.217	1.028
3	Beta-Sesquiphellandrene	0.510	0.502	0.516	0.417	0.439	0.423	0.213	0.244	0.215	0.514
4	Valencene	4.271	3.845	3.765	4.234	3.909	3.518	2.984	2.600	2.113	4.871
5	Gamma-elemene	2.893	2.149	2.201	3.827	2.250	2.245	1.011	0.839	0.672	3.290
6	Attractylone	10.011	9.746	8.926	14.216	11.429	10.027	8.901	6.371	6.239	16.128
7	1-methoxy-2-benzen	0.395	0.484	0.251	0.656	0.654	0.519	0.782	0.774	0.779	0.659

¹⁾ Rhizome size for planting(Large, Middle, Small)

²⁾ Planting density

라. 파종시기에 따른 영향 구명

종자와 종근을 4월 07일(비닐 멀칭 재배), 4월 17일 (비닐 멀칭 재배), 4월 27일 (비닐 멀칭 재배), 5월 5일(나지 재배) 등으로 구분하여 파종 및 정식하여 생육상황을 조사 해 본 결과 (Table 9, Fig. 8), 수확시의 종자 파종 입묘율, 초장, 경수는 4월 파종간에는 유의차가 인정되지 않았으나, 4월 파종과 5월 파종간에는 유의차가 인정되었다. 근경 정식시의 입묘율, 초장, 경수 등은 4월 초 중순과 말기 정식시기 간에 유의차가 인정되었다. 특히 수량은 종자 파종 시는 4월말과 5월초 간에는 유의차를 나타내지 않았으나, 근경 정식 시는 유의차가 인정되었다. 수량은 종자 파종 시는 4월 전 파종 시기간에 유의차를 나타내었고, 근경정식 시는 4월 초 중순과 말기간에 유의차를 나타내었다.

입묘율은 종근 정식이 종자 파종에 비하여 매우 높았고, 파종시기별로는 종자 및 종근 공히 4월초가 높았다. 초장, 분지수 및 건물중은 종자 파종 및 종근 정식 공히 정식 및 파종시기가 빠를수록 높았다.

종자파종에 의한 파종시기별 백출 재배는 수분관리 및 잡초와의 경합으로 인하여 수량이 종근에 비하여 20-25%정도로 매우 낮아서 소득 면에서 문제를 초래한다. 1년종근의 이식은 4월 초와 중순의 이식간에는 큰 차를 나타내지 않았으나, 4월 말 재배와는 수량 및 입묘율에 큰 차를 나타내었다. 따라서 백출 재배 시는 종자파종은 잡초 및 초기수분관리가 용이하지 않는 포장에서는 재배가 불가능하며, 종자 파종 재배 시는 반드시 4월 초에, 종근 이식 시는 4월 초 혹은 중순에 이식하는 것이 수량의 증가를 초래한다.

종자 및 근경의 정식 시기에 따른 수확시 근경의 정유성분 함량을 비교 해 본 결과 (Table 10), 종자파종 및 근경정식 둘 다에서 시기가 빠르면 빠를수록 정유성분의 함량이 높았다. 특히 종자파종시의 atractylone의 함량은 4월초가 5월 초에 비하여 32.3%가, 근경정식 시는 30.6%가 높았다. 4월 초 종자 파종시가 근경 정식 시에 비하여 18.6% 높았다.



Fig. 8. The growth on the experiment of seedling and planting time in *A. macrocephala* (2001. 7. 10)

Table 9. Effect of seedling and planting time on the growth characters of *A. macrocephala* at harvesting time

Kinds of seedling	Time	Emergence ratio(%)			Plant height (cm)			No. of petiole per stock		
		1year	2year	3year	1year	2year	3year	1year	2year	3year
Seed	April. 7	17.5b	10.2b	9.8b	27.9b	31.8c	43.9b	1.54b	2.21bc	3.87b
	April. 17	15.0b	8.7ab	7.6ab	26.4b	30.3bc	39.0b	1.87c	2.26c	3.78b
	April.27	10.0a	6.3a	6.2ab	23.2ab	25.3ab	38.5b	1.33a	2.02ab	3.67b
	May. 5	7.9a	5.2a	5.1a	19.0a	23.4a	29.2a	1.33a	1.87a	2.23a
Rhizome	April. 7	-	91.2c	70.4c	-	36.5b	61.3b	-	2.55bc	3.86c
	April. 17	-	86.5b	64.2b	-	34.8b	56.8b	-	2.69c	3.85bc
	April. 27	-	83.0b	61.3ab	-	30.0a	52.1a	-	2.45b	3.56b
	May. 5	-	78.4a	58.9a	-	27.8a	48.3a	-	2.23a	2.21a
Kinds of seedling	Time	Rhizome yield(kg/10a)								
		1year	2year	3year						
Seed	April. 7	52d	125c	198c						
	April. 17	46c	97b	176bc						
	April.27	39b	76a	167ab						
	May. 5	32a	69a	149a						
Rhizome	April. 7	-	286d	427c						
	April. 17	-	265c	417c						
	April. 27	-	218b	376b						
	May. 5	-	188a	342a						

Table 10. Effect of seedling and planting time on the contents of essential oil of *A. macrocephala* at harvesting time

No	compounds	Seed				Rhizome			
		April. 7	April. 17	April. 27	May. 5	April. 7	April. 17	April. 27	May. 5
1	Beta-Caryophyllene	0.313	0.289	0.283	0.267	0.356	0.341	0.319	0.278
2	Beta-Selinene	0.428	0.399	0.389	0.298	0.532	0.539	0.428	0.311
3	Beta-Sesquiphellandrene	0.349	0.249	0.252	0.198	0.521	0.512	0.498	0.321
4	Valencene	4.012	3.827	3.913	2.992	4.213	3.724	3.894	3.342
5	Gamma-elemene	2.785	2.791	2.698	2.106	2.982	2.899	2.912	1.992
6	Attractylone	8.618	7.917	7.818	6.513	10.219	10.213	9.981	7.821
7	1-methoxy-2-benzen	0.510	0.482	0.479	0.398	0.513	0.510	0.521	0.489

마. 순자르기 방법 및 시기 구명

1년생 종근을 정식하여 1년 및 2년 재배시의 적심시기 및 방법에 따른 생육상황을 조사해 본 결과(Table 11, Fig. 9), 적심 시기간의 초장, 경수, 주당 지상부와 지하부 건물중 및 수량은 발퇴기와 개화중기 및 말기간에 유의차를 나타내었으나, 발퇴기와 개화초기간에는 유의차가 인정되지 않았다.

Table 11. Effect of time and level of topping on the growth characters of *A. macrocephala* at harvesting time

Time	Method	Plant height (cm)		No. of petiole per stock		Dry wt.(g/plant)	
		2year	3year	2year	3year	Shoot	
						2year	3year
E	Non -topping	49.3	63.9	2.8	3.9	89.8	168.8
	Removal with hand	46.8	55.5	3.4	4.2	113.6	204.3
	Potassium salt of maleic hydrazide	45.3	53.4	3.5	4.5	110.7	198.5
	Fatty alcohol	45.1	54.3	3.5	4.3	111.2	195.1
M	Non -topping	53.3	62.6	2.5	3.2	91.0	170.4
	Removal with hand	50.3	57.3	3.1	4.0	102.5	187.0
	Potassium salt of maleic hydrazide	50.1	58.4	3.1	3.9	100.4	185.5
	Fatty alcohol	50.5	58.7	3.1	3.9	102.1	185.8
L	Non -topping	55.8	62.7	2.1	2.9	98.7	169.9
	Removal with hand	53.5	59.7	2.8	3.1	92.1	179.8
	Potassium salt of maleic hydrazide	52.4	59.5	2.7	3.2	93.2	181.0
	Fatty alcohol	52.6	59.3	2.8	3.1	94.3	180.3
mean ¹⁾							
E		46.6b ²⁾	56.8b	3.3a	4.2a	106.3a	191.7a
M		51.1a	59.3a	3.0a	3.8b	99.0b	182.2b
L		53.6a	60.3a	2.6b	3.1b	94.6b	177.8b
mean ¹⁾							
	None	52.8a	63.1a	2.5b	3.3b	93.2b	169.7b
	Hand	50.2b	57.5b	3.1a	3.8a	102.7a	190.4a
	Potassium salt of maleic hydrazide	49.3b	57.1b	3.1a	3.9a	101.4a	188.3a
	Fatty alcohol	49.4b	57.4b	3.1a	3.8a	102.5a	187.1a

Table 11. continued

Time	Method	Dry weight of rhizome (g/plant)		Yield (kg/10a)	
		2year	3year	2year	3year
E	Non -topping	18.2	35.4	197	378
	Removal with hand	25.1	42.8	272	460
	Potassium salt of maleic hydrazide	24.8	42.6	267	458
	Fatty alcohol	23.9	41.8	257	449
M	Non -topping	18.4	36.0	198	380
	Removal with hand	23.4	39.3	252	423
	Potassium salt of maleic hydrazide	23.2	38.9	249	418
	Fatty alcohol	22.9	39.0	246	421
L	Non -topping	18.7	35.8	199	380
	Removal with hand	21.4	38.3	230	412
	Potassium salt of maleic hydrazide	20.5	38.7	220	415
	Fatty alcohol	20.1	38.5	218	412
mean ¹⁾					
E		23.0a	40.7a	248a	436a
M		22.0a	38.3b	236a	411b
L		20.2b	37.8b	217b	405b
mean ¹⁾					
	None	18.4b	35.7b	198b	379b
	Hand	23.3a	40.1a	251a	432a
	Potassium salt of maleic hydrazide	22.8a	40.1a	245a	430a
	Fatty alcohol	22.3a	39.8a	240a	427a

1) Combined over topping time and plant spacing level, respectively.

2) Values followed by the same letter do not differ significantly at the 5 percent level by Duncan's multiple range test

적심 방법 간의 초장, 경수, 주당 지상부와 지하부 건물중 및 수량은 무적심과 손 제거 및 적심제 처리간에 유의차를 나타내었으나, 손제거와 적심제처리 간에는 유의차가 없었다. 적심 시기간에는 적뢰 시는 개화초기 및 말기 적심에 비하여 초장, 분지수, 근경의 생체중 및 건물중이 높았다. 특히 손제거 적뢰는 개화 후기 손제거 적심에 비하여 지하부의 건물중은 약 12% 높았다. 전 처리 중에서 발뢰 초기 손 제거가 분지수 및 건물중이 가장 높았다. 적심제 간에는 초장, 분지수, 지하부 생체중 무게 및 건물중은 큰 차가 없었다. 손제거와 적심제 처리간의 근경 생체중 및 건물중은 큰 차가 없었다. 무적심에 비하여 손 제거시의 근경 수량은 발뢰기와 개화초기에 21.7%, 개화 중기에 11.3%, 개화 후기에 8.4% 각각 높았다. 따라서 백출 재배 시는 발뢰기에 손제거 및 적심제 2회 처리가 생육을 양호하게 하는 것으로 나타났다.

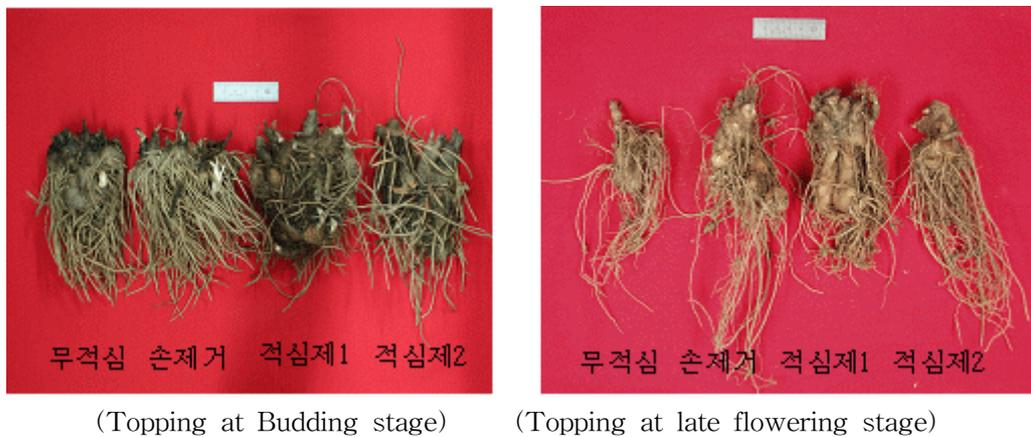


Fig. 9. Photo of rhizome on the time and method of topping in *A. macrocephala* at harvesting time

적심시기별 생육상황이 가장 양호하였던 발뢰기의 적뢰 방법에 따른 rhizome의 정유성분 함량을 년차 별로 비교 해 본 결과(Table 12), 무적뢰에 비하여 손제거, potassium salt of maleic hydrazide 및 fatty alcohol처리에 의한 적뢰가 동정된 정유 성분 중 beta-caryophyllene, beta-selinene, beta-sesquiphellandrene, valencene, gamma-elemene, atractylone, 1-methoxy-2-benzen 등의 함량이 높았고, 특히

atractylone의 함량은 약 50%정도 높았다. 적뢰 방법간의 정유성분 함량은 손제거가 potassium salt of maleic hydrazide 및 fatty alcohol 처리 간에는 비슷하였다. 년 차 간에는 무적뢰에 비하여 적뢰 시가 각 정유성분의 함량 차가 높았다. 적심제 처리시 가 무적심에 비하여 함량이 약간 낮았다. 이는 적심제처리에 따른 완전한 적뢰를 하 지 못한 결과로 사료된다.

년 차간에는 1년차에 비하여 2년차가 재배가 동정된 정유성분의 함량이 높았고 적 심 방법간의 정유성분 함량의 증가 경향은 비슷하였다..

따라서 백출의 안정적 생산 및 내용성분을 증가시키기 위하여서는 발뢰기에 반드시 적뢰하고, 생력을 위하여 적심제 2회 이상 처리가 필요하다.

Table 12. Effect of topping method at the budding stage on the contents of essential oil of *A. macrocephala* at harvesting time
(Peak area / I.S.T.D peak area)

No.	Compounds	Topping method							
		Non-topping		Removal with hand		Potassium salt of maleic hydrazide		Fatty alcohol	
		2year	3year	2year	3year	2year	3year	2year	3year
1	Beta-Caryophyllene	0.032	0.096	0.127	0.289	0.228	0.315	0.238	0.317
2	Beat-Selinene	0.182	0.276	0.328	0.836	0.319	0.724	0.317	0.734
3	Beta-Sesquiphellandrene	0.298	0.444	0.328	0.527	0.318	0.498	0.326	0.512
4	Valencene	0.518	0.989	1.021	1.809	1.089	1.745	1.116	1.815
5	Gamma-elemene	0.921	1.829	1.121	2.260	1.062	2.157	1.112	2.189
6	Atractylone	2.182	6.876	4.182	10.429	4.826	9.746	4.912	10.128
7	1-methoxy-2-benzen	0.216	0.574	0.197	0.438	0.182	0.426	0.201	0.474

바. 유기농법에 따른 비대생장 정도 및 병발생 정도 조사

유기농법에 따른 비대생장 정도 및 병 발생 정도를 조사 해 본 결과(Table 13, 14; Fig. 10, 11, 12), 초장, 경수, 근경의 생체중 및 건물중의 생육상황은 무비료와 비료 전처리간에 유의차를 나타내었다. 초장은 복비 20% 증비와 감비간에, 퇴비, 유박 등의 유기질 비료 시용구와 화학비료 처리간에 유의차를 나타내었다. 근경의 건물 중 및 수량은 화학비료 증 감비 시용간에 유의차를 나타내지 않았으나, 퇴비, 유박 등의 유기질 비료 시용구와 화학비료 처리간에 유의차를 나타내었다. 특히 수량은 관행 복비 사용에 비하여 유박+퇴비혼용 시용구는 32.7% 증수를 보였다. 유박 및 퇴비시용은 실제적인 주당 근중의 증가에서 기인되기 보다는 역병과 뿌리썩음병의 발병 빈도를 낮추어 10a 당 생존 주수의 증가에 기인되었다. 복합비료의 백출 재배 기준량 시비에 비하여 20% 증비시는 초장, 경수, 생체중 및 건중은 차가 없었으나, 역병 등의 병충해 발병율이 높았다. 기준량 대비 20% 감비 시는 생체중은 매우 낮게 나타났으나, 건물중의 차는 없었다. 기준량 대비 유박 시용 시는 초장, 분지수, 생체중이 증가하였고, 특히 유박+퇴비2배량 시용 시는 생체중 및 건물중이 증가하였다.

역병은 화학비료 20%감비와 증비간에, 뿌리썩음병은 화학비료 시비수준간에 유의차를 나타내었다. 유기질비료 시용간에는 역병과 뿌리썩음병 둘다에서 유의차를 나타내지 않았다. 기준량 대비 복합비료 20% 증비시는 역병 및 뿌리썩음병이 매우 심하였으나 퇴비, 유박, 유박+퇴비 2배량 시용 시는 병 발생 정도가 매우 낮아졌다. 특히 유박+퇴비 2배량 시용 시는 기준량 복합비료 단독 시용 시에 비하여 역병은 63%, 뿌리썩음병은 70% 감소되었다.

Table 13. The growth characters on the fertilizer level in *A. macrocephala*

Treatment	Plant height (cm)		No. of petiole per stock		Rhizome					
					Fresh wt. (g/plant)		Dry wt. (g/plant)		Yield (kg/10a)	
	2year	3year	2year	3year	2year	3year	2year	3year	2year	3year
I None-fertilizer	26.3a ¹⁾	43a	2.6a	3.6a	38.2a	68.5a	7.8a	14.4a	88.4a	165.5a
II 20% increase	37.9c	68.8c	3.5b	4.2c	77.2bc	169.8d	17.8bc	35.7bc	177.9b	357.0b
III Standard	34.4c	63.9bc	3.2b	4.0bc	78.8bc	168.8d	17.4bc	35.4bc	188.5bc	383.5b
IV 20% decrease	30.5b	62.7b	3.3b	4.0bc	76.9bc	159.5bc	17.1b	33.5b	205.2c	390.8b
V manure.	29.3b	63.7bc	3.2b	3.8ab	73.9b	154.8b	18.0bc	36.4bc	233.9d	454.9c
VI Expeller cake	30.2b	68.1bc	3.1b	3.9abc	78.4bc	163.8cd	18.2bc	38.8cd	230.5d	491.4cd
VII Expeller cake + manure.	31.8b	69.3c	3.3b	4.0bc	80.2c	171.8d	18.9c	40.2d	245.6d	509.2d

1) Values followed by the same letter do not differ significantly at the 5 percent level by Duncan's multiple range test

Table 14. The appearance of a disease on the fertilizer level in *A. macrocephala*

Treatment	Appearance ratio of disease (%)			
	<i>Phytophthora</i> blight		Root rotting	
	2year	3year	2year	3year
I None-fertilizer	17.1bc ¹⁾	20.0ab	11.2abc	15.5bc
II 20% increase	28.1e	36.1d	15.2c	28.2d
III Standard	23.2d	28.7c	12.8bc	19.8c
IV 20% decrease	20.4cd	22.7bc	11.2abc	12.8ab
V manure.	14.3ab	18.2ab	8.4ab	10.7ab
VI Expeller cake	13.7ab	16.8ab	8.2a	9.6a
VII Expeller cake + manure.	12.8a	15.9a	7.1a	9.8a

1) Values followed by the same letter do not differ significantly at the 5 percent level by Duncan's multiple range test



Fig. 10. Rhizome of *A. macrocephala* on the fertilizer level at the harvesting time

* I -XII refer in Table 12.

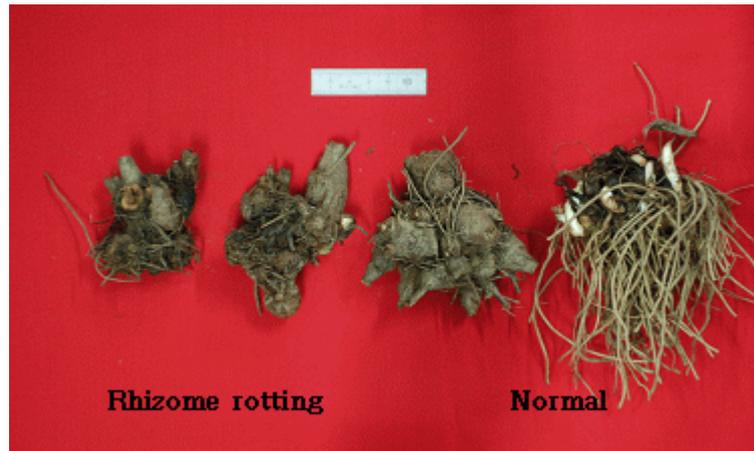


Fig. 11. Photo of rhizome rotting in the cultivation



Fig. 12. Photo of *Phytophthora* blight in the cultivation

따라서 백출 재배 시는 복합기준량에 유박 + 퇴비 2배량 시용이 생육 및 병 발생 정도가 낮아서 수량 및 품질 증진에 양호 할 것을 생각된다.

시비정도에 따른 정유성분의 함량을 비교 해 본 결과(Table 15), 무비에 비하여 복비 및 유기질 비료 시용은 조사된 정유성분중에서 1-methoxy-2-benzen을 제외한

모든 정유성분의 함량이 높았다. 기준량 복합비료 시용에 비하여 20% 증비시 시용에 의한 정유성분 함량은 큰 차가 없었으나, 20% 감비시 시용은 함량이 낮아졌다. 기준량 복합비료 시용에 비하여 유기질비료 중 유박 첨가 시용시는 동정된 beta-caryophyllene, beta-selinene, beta-sesquiphellandrene, valencene, gamma- elemene, atractylone, 1-methoxy-2-benzen 등의 함량이 높았고 특히 본 정유성분들은 유박+퇴비2배량 시용 시에 증가하였다. 백출의 주성분 알려진 atractylone의 함량은 유박+퇴비2배량 시용 시가 복합비료 기준량 시용에 비하여 약 21% 높았다.

백출내의 약 1.5%는 정유성분이고, 주성분은 atractylone으로서 전 정유성분의 약 20%정도로서 간장해 억제작용을 하는 것으로 알려져 있다.

따라서 백출재배시에 유박 및 퇴비시용은 정유성분의 함량을 높게 하여 품질을 양호하게 할 수 있을 것으로 생각된다.

Table 15. The content of essential oil components on fertilizer level in rhizome of *A. macrocephala*

No.Compounds	(peak area / I.S.T.D peak area)													
	Treatment													
	I		II		III		IV		V		VI		VII	
	2year	3year	2year	3year	2year	3year	2year	3year	2year	3year	2year	3year	2year	3year
1 Beta-Caryophyllene	0.037	0.083	0.182	0.289	0.192	0.278	0.128	0.213	0.192	0.225	0.189	0.276	0.213	0.329
2 Beta-Selinene	0.118	0.198	0.412	0.734	0.410	0.728	0.392	0.702	0.297	0.697	0.381	0.703	0.419	0.729
3 Beta-Sesquiphellandrene	0.192	0.364	0.317	0.428	0.328	0.437	0.329	0.427	0.412	0.501	0.426	0.523	0.512	0.634
4 Valencene	0.328	0.678	1.215	1.786	1.118	1.654	1.012	1.378	1.32	1.782	0.329	1.760	1.417	1.914
5 Gamma-elemene	0.221	0.567	2.129	2.222	2.019	2.187	1.823	1.978	2.101	2.178	2.109	2.145	2.189	2.227
6 Atractylone	1.812	3.267	5.123	8.457	5.217	8.469	4.998	7.999	5.217	8.798	5.214	8.778	6.317	10.234
8 1-methoxy-2-benzen	0.327	0.685	0.389	0.501	0.375	0.427	0.369	0.469	0.372	0.434	0.369	0.403	0.316	0.404

* I -XII refer in Table 12.

사. 종근의 저장방법 구명

종자 및 1년생 종근의 저장 방법에 따른 발아(출아)율 및 입모율을 조사 해 본 결과(Table 16), 종자저장은 타 처리에 비하여 냉장 저장 후 GA처리가 45%로 가장 높았다. 1년생 종근의 저장은 실온저장과 노천저장에 비하여 냉장 보관처리와 냉장 후 GA처리가 다소 높게 나타났으나, 냉장 후 GA 처리 효과는 높지 않았다. 입모율은 발아율에 비하여 약 30%, 출아율에 비하여는 약 85%정도 나타났다.

따라서 종자저장시는 냉장 후 GA처리가, 1년생 종근 저장시는 냉장보관이 양호하였다.

Table 16. Germination rate of seed and one year rhizome by storage method

Kinds	Storage method	Germination percent (%)	Budding percent (%)	Emergence ratio(%)
Seed	Room temp.	25±2	-	6±2
	Refrigerator	35±3	-	11±4
	Field	28±2	-	8±2
	GA after low Temp.	45±4	-	15±4
Rhizome	Room temp.	-	65±4	58±3
	Refrigerator	-	78±5	68±4
	Field	-	71±3	62±3
	GA after low Temp.	-	79±4	71±4

아. *A. japonica* 의 재배법 개발에 의한 *A. macrocephala* 와의 생육특성 비교

*A. japonica*의 4월 5일 정식과 발퇴 초기에 적시에 의한 생육특성을 *A. macrocephala*의 동일 재배에 의한 것과 비교한 결과(Table 17, Fig. 13), *A. macrocephala*의 경우 발퇴 및 개화초기 적시에 따른 초장 및 근중의 함량 변화는 11%, 20% 각각 높아졌으나, *A. japonica*의 경우 15.8% 및 29% 각각 높아졌다. 따라

서 *A. japonica* 재배시는 근의 수량 증대를 위하여 반드시 적심을 해 주어야 한다. 한편 *A. japonica*의 조기정식 및 발뢰기와 개화초기에 적심을 할 시에는 *A. macrocephala*의 수량과 차이는 없었고, 시험 아의 결과에서 보고 된 것처럼 백출의 주요 정유성분인 atractylone의 함량이 *A. macrocephala*에 비하여 높고 야생 *A. japonica* 와 비슷한 함량을 유지하고 있어 *A. japonica*의 재배화가 가능한 것으로 나타났다.

Table 17 .The growth characters of plants cultivated by cultivation method such as topping and early transplanting in *A. japonica* and *A. macrocephala*

Species	Method	Plant height		Dry wt.			
		(cm)		Shoot		Rhizome	
		1year	2year	1year	2year	1year	2year
<i>A. japonica</i>	Topping	39.4a	44.1a	98.8bc	192.1b	22.5bc	40.7c
	Non-topping	49.6bc	51.1b	67.3a	158.2a	15.6a	28.9a
<i>A. macrocephala</i>	Topping	46.8b	55.5b	113.6c	204.3b	25.1c	42.8c
	Non-topping	54.6c	62.2c	98.6b	177.8ab	21.4b	34.2b



Fig. 13. The photo of rhizome cultivated by method such as topping and early transplanting in *A. japonica*

자. 한국산 재배 *A. macrocephala* 와 *A. japonica* 및 중국 지역별 수입백출의 주요 정유성분 비교

재배법시험 중 생육, 수량이 좋으면서 외관상 품질이 좋았던 *A. macrocephala*와 *A. japonica*를 중국 지역별 수입백출과 주요 정유성분을 분석한 결과, 백출 내에는 1.5% 정도 정유성분이 함유되어 있고 그 중에서 atractylone, beta-seliene 등의 성분이 주를 이루고 있다. 본 연구팀이 5년전 중국의 지역으로부터 수집한 백출 시료와 한국산 야생 백출 및 현재 재배법 개발에 의한 백출과의 정유성분을 비교한 결과 (Table 18), 국내 시판 야생이 수입 백출에 비하여 atractylone, beta-seliene, valecene 등의 성분이 매우 높았고, 중국 안국에서 수집한 백출의 경우 백출의 주요 성분인 atractylone이 전혀 검출되지 않았다. 중국 안국 수입종은 한국산 백출종이 japonica type인데 비하여 식물종이 다른 종으로 생각된다. atractylone의 함량 면에서는 중국재배(연길) 백출이 한국산 야생 백출의 80% 정도 함유되어 있고 나머지 지역 시료들은 한국 야생의 22% 미만으로 매우 낮게 함유되어 있었다.

일반적으로 백출의 주요성분인 atractylone은 쥐의 간세포 배양의 t-BHP에서 유도된 세포독성과 지질산화에 관한 억제효과 메카니즘 중 산화적 스트레스에 대한 보호적 효과로서 항산화 역할을 하는 것으로 보고(Hwng *et. al.*, 1996)되어져 있고, unshcheduled DNA합성에 의한 t-BHP유도에 의한 세포독성 감소효과가 있으며, Na, K(+)-ATPase 특이적 억제제로서 E2에서 효소와 상호 작용을 하고 E2-P에서 k.E까지 반응단계를 억제시킨다고 한다(Satoh *et. al.*, 1996).

따라서 이러한 주요 작용을 고려한다면, 개발된 재배법에 의하여 재배되어 진다면 국내 재배종이 중국 지역 재배종에 비하여 우수한 품질을 유지한다고 생각되어지고 japonica type과 비슷한 수준의 정유성분을 유지하여 품질 및 약효면에서 우수 할 것으로 생각되어진다.

Table 18. Comparison of content of main essential oil compounds on *A. macrocephala* and *japonica* in Korea and China

Compounds	I	II	III	IV	V	VI	VII
Beta-Selinene	0.729	1.028	0.927	0.939	0.431	0.058	0.381
Valencene	1.914	4.871	3.218	5.616	1.885	4.329	5.488
Atractylone	10.234	14.121	12.348	11.392	0.232	-	0.315

I : *A. macrocephala* (cultivation in Korea), II : *A. japonica* (wild in Korea)

III : *A. japonica* (cultivation in Korea), IV : Cultivation in Yengil of China

V : Cultivation in Yengil of Chona(Gongbaekchul), VI : Cultivation in Ankuk of China, VII

: Cultivation in Gilrim of China

2. 제 1 협동과제 : 삼주속 식물종으로 부터 유용변이체 탐색 및 이용

가. 삼주 수집집단 특성평가

국내 자생삼주(*A. japonica*) 지역수집종에서 유용집단 선발을 위하여 내병성, 생육 특성을 조사한 결과는 Table 19와 같다.

수집당년의 생육을 조사한 결과 초장, 엽수, 엽 크기, 꽃의 크기, 어골상엽수 등 수집종 집단별 표현형에서 다양성을 보였으며 내습성은 가평 수집종, 안동 수집종이 강한 특성을 보였다.

Table 19. Variation of growth characteristics within eight populations of *A. japonica*.

Populations	Plant height(cm)	No.of stem	Diameter of stem(mm)	No. of leaf	Leaf(cm)		
					Length	Width	Ratio(L/W)
GAP	63.6	2.4	2.9	20.0	7.9	3.8	2.08
HAM	50.8	2.8	2.3	15.6	8.0	3.8	2.11
AND	54.0	4.4	2.0	17.0	6.6	3.1	2.12
GAN	55.0	4.4	2.5	17.8	6.6	3.1	2.13
JEC	57.6	3.6	2.8	17.8	7.5	3.3	2.27
TAE	55.4	2.4	2.7	20.0	7.0	3.1	2.26
EUI	55.3	2.5	2.8	21.0	7.2	3.2	2.25
PAE	54.6	3.5	2.5	20.0	7.0	3.0	2.33
Mean	55.8	3.3	2.6	18.7	7.2	3.3	2.19

Table 19. Continued.

Populations	No.of branch	No.of stem	No.of bud	Bud(mm)			Wet resistance (1 - 5)
				Length	Width	Ratio(L/W)	
GAP	8.2	7.6	19.6	15.5	7.9	1.96	2
HAM	5.0	5.4	15.6	14.9	7.1	2.10	4
AND	9.2	5.4	24.6	16.5	7.8	2.12	2
GAN	6.0	8.8	26.8	15.6	8.1	1.93	4
JEC	6.6	13.8	21.6	16.1	8.5	1.89	3
TAE	5.6	5.8	13.0	16.9	9.3	1.82	3
EUI	5.7	9.1	18.6	15.7	9.1	1.73	3
PAE	6.1	8.4	21.1	16.4	9.0	1.82	3
Mean	6.6	8.0	20.1	16.0	8.4	1.92	

이들 수집집단간의 전기영동에 의한 isozyme 분석법으로 집단간 및 종간 다양도와 집단구조에 대한 유전적 다양성을 검정한 결과는 Table 20, 21, Fig. 14와 같다.

진화생물학자들은 식물집단의 유전적 변이가 집단구조와 관련이 있음을 인식하게 되었다. 즉 변이의 상당 부분이 식물종의 life history와 생태적 특성과 관련이 있는데 광범위한 분포, 오래 사는 종, 풍매화, 타가수분 등 이런 요인이 이와는 다른 특성을 지닌 식물집단보다 훨씬 높은 변이를 유지하고 있다는 사실을 밝혀 냈다 (Hamrick and Godt, 1989).

Isozyme은 Hunter와 Markert(1957)의 인지와 Markert와 Moller(1959)의 정의(동일 개체 내 동일 혹은 유사 기능을 나타내는 변이체), Harris(1969)의 사람에 적용, Lewontin과 Hubby (1966)의 집단유전학에서 정량적 적용, Allard (1970)와 Gottlieb (1971)의 식물 집단유전학의 적용을 시발로 유기체와 분자간의 접근에 가장 많이 쓰이는 방법중의 하나로 자리잡게 되었다(Soltis and Soltis, 1989).

Table 20. Summary of allozyme variation within eight populations of *A. japonica*.

Population	N	P	A_P	A	A_E	$H_{OP}(SD)$	$H_{EP}(SD)$
GAN	50	26.67	3.00	1.53	1.14	0.061(0.011)	0.092(0.040)
GAP	36	40.00	2.67	1.67	1.22	0.068(0.011)	0.124(0.050)
EUI	36	40.00	2.50	1.60	1.23	0.077(0.012)	0.136(0.048)
HAM	50	33.33	2.80	1.60	1.23	0.062(0.010)	0.120(0.049)
JEC	50	46.67	2.67	1.87	1.32	0.077(0.012)	0.160(0.061)
AND	40	40.00	2.60	1.67	1.23	0.076(0.012)	0.137(0.050)
PAE	44	33.33	2.43	1.53	1.20	0.067(0.011)	0.116(0.048)
TAE	42	46.67	2.69	1.67	1.22	0.083(0.012)	0.136(0.045)
Mean		38.33	3.00	1.64	1.22	0.071(0.004)	0.128(0.017)
Species		60.00		2.20	-		0.144

Number of individuals examined (N), Percentage of polymorphic loci (P), mean number of alleles per polymorphic population (A_P), mean number of alleles per locus (A), effective number of alleles per locus (A_E), observed heterozygosity (H_{OP}), and genetic diversity (H_{EP}).

Table 21. Estimates of genetic diversity statistics for nine polymorphic loci in eight populations

Locus	H_T	H_S	D_{ST}	D_M	F_{IS}	F_{IT}	G_{ST}
Mdh-2	0.304	0.283	0.021	0.024	0.330	0.376	0.069
Est-1	0.296	0.284	0.011	0.013	0.400	0.423	0.038
Est-2	0.018	0.017	0.002	0.002	0.39	0.394	0.084
Skd	0.565	0.518	0.047	0.054	0.589	0.623	0.084
Per-1	0.102	0.069	0.033	0.038	0.469	0.642	0.326
Per-2	0.209	0.130	0.079	0.091	0.457	0.664	0.380
Idh-1	0.319	0.307	0.012	0.014	0.422	0.444	0.037
Pgd	0.275	0.264	0.011	0.013	0.322	0.350	0.041
Pgi-1	0.066	0.060	0.007	0.008	0.361	0.425	0.099
Mean	0.239	0.215	0.025	0.028	0.410	0.482	0.129

Total genetic diversity (H_T), genetic diversity within populations (H_S), among populations (D_{ST}), absolute population differentiation (D_M), deviations of genotype frequencies from Hardy-Weinberg expectations within individual population (F_{IS}), over all populations (F_{IT}), and proportion of total genetic diversity partitioned among populations (G_{ST}).

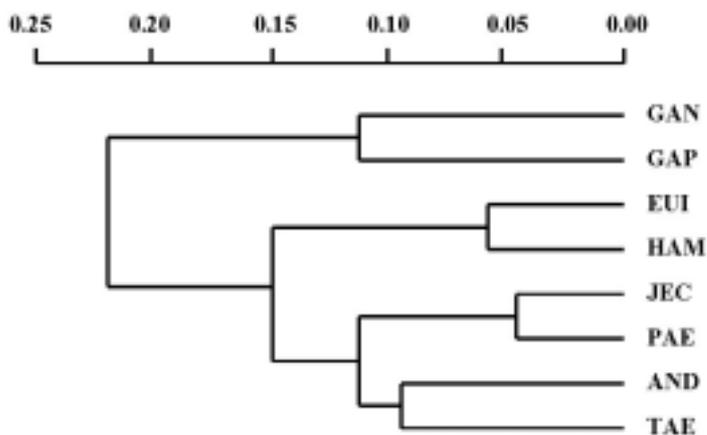


Fig. 14. A dendrogram showing the genetic relationships among eight populations

분석한 15개의 loci 중 9 loci (60.0%)은 적어도 한 집단 이상에서 다형현상 (polymorphism)을 나타내었다. 반면에 나머지 6 loci (*Idh-2*, *Mdh-1*, *Per-3*, *Pgi-2*, *Sod-1* and *Sod-2*)는 monomorphism을 나타내었다.

개체 내에서의 다형성 비율은 26.7%– 46.7%로 평균 38.3%이었다. 다형현상을 나타내는 대립 유전자 좌위는 3개의 allele (*Est-1*, *Idh-1*, *Mdh-2*, *Per-2*와 *Pgd-2*), 2개의 단성잡종 양식을 따르는 loci도 관찰되었다 (*Est-2*와 *Pgi-1*). 유효한 대립유전자의 수는 집단간에는 가장 낮은 집단인 평창집단이 1.53이며, 가장 높은 집단인 제천집단이 1.87로 차이가 있었다

종 수준에서, polymorphic loci의 비율은 85.60%로 높았으며, polymorphic locus당 대립유전자의 수는 2.69, 전체 locus당 대립유전자의 수는 1.64, 전체 locus당 effective allele수는 1.22이었고, 유전적 다양도는 0.128로 다른 초본류에 비해 높게 나타났다. 제천집단은 가장 높은 유전적 다양도를 보였으며 (0.160), 반면 강화집단은 가장 낮은 유전적 다양도를 보였다 (0.092) (Table 1). 집단수준에서, polymorphic loci의 비율은 49.00%이고, 유전적 다양도는 0.129로 종 수준보다 약간 낮게 나타났다.

삼주의 유전적 다양도는 대부분 집단내에 존재하였고 유사한 생활 양식을 가진 다른 식물종에 비해 높았다. 그 이유로는 유성생식, 다년생, 다산 등에 기인한다. 집단간 분화는 약 13%였고 지리적 거리와 유전적 거리의 상관은 높았다 ($r=0.65$, $p < 0.05$). 그럼에도 불구하고 일부 격리된 집단(강화 수집종)은 유효집단크기를 가지지 못하여 이형접합체의 결여가 유의성을 보여 다양도가 높은 집단의 보존이 요망된다.

국내 수집삼주(*A. japonica*)는 종자 채종량이 극히 적어 영양번식법을 증식 수단으로 활용하고 있으나 중국 수집삼주(*A. macrocephala*)는 국내 재배시 2년생의 경우 종자채종이 용이하며 전반적으로 지상부 및 지하부 생육이 국내 수집삼주(*A. japonica*)보다 우수하나 근부병류에는 약한 특성을 보이고 있다(Table 23).

Table 23. Growth characteristics of two years old plants population in *A. macrocephala*.

Plant height (cm)	No.of stem	Diameter of stem(mm)	No. of leaf	Leaf(cm)		
				Length	Width	Ratio(L/W)
45.7	3.0	3.5	15.7	9.7	3.2	3.03

No. of branch	Length of branch(cm)	No. of bud	Bud(cm)			Rhizome weight(g)	Disease incidence rate (%)
			Length	Width	Ratio(L/W)		
9.7	20.7	20.5	4.0	2.0	2.0	36.9	21.2

또한 중국 수집삼주(*A. macrocephala*)는 2년생 집단에서 식물학적 특성에 의한 초형군을 분류한 후 분류군에서 변이주를 선발하여 격리채종 하였다.

초형군 분류는 초장, 엽형을 기준으로 표현형을 Table 24와 같이 구분하였다. 표현형에 있어서 다양한 형태를 보이는 *A. macrocephala*는 잎의 형태, 초장, 분지수, 화기 형태, 개체당 화기 수, 어성포의 형태 및 수 등을 기준으로 초형을 구분할 수 있으나, 본 연구에서는 초장, 잎의 형태를 기준으로 구분이 용이하였다.

특히 지상부 중엽의 형태는 광엽형, 세엽형 및 중간엽형 등으로 다양한데 엽장과 엽폭의 비가 2.2 이하인 광엽형과 3.1 이상인 세엽형은 쉽게 구분되며, 그 외의 것은 중간엽형에 포함된다. 또한 지상부 초장에 있어서 40 cm 이상의 개체들은 장간형에 그리고 35 cm 이하는 단간형에 포함되어 각각 Type I (SW ; 단간 광엽), Type II (SN ; 단간 세엽), Type III (TW ; 장간 광엽), Type IV (TN ; 장간 세엽), 및 Type V (MM ; 중간형태) 등 5가지로 구분되었다(Table 24).

임의로 선발된 500개체를 대상으로 지상부 형태에 따른 초형별 비율을 조사한 결과 중간형태인 Type V가 15 %로 가장 적었으며, Type I, Type II, Type III, 및 Type IV 등은 19% - 23% 범위로 초형별 출현빈도의 차가 적었다.

Table 24. Classification of *A. macrocephala* based on morphological characteristics.

Plant type	Stem (cm)	Leaf length/width ratio	Frequency at field (%)
SW	35cm ≥	2.2 ≥	19
SN	35cm ≥	3.1 ≤	21
TW	40cm ≤	2.2 ≥	23
TN	40cm ≤	3.1 ≤	22
MM	-	-	15

*SW ; Short stem and wide leaves, SN ; Short stem and narrow leaves,
 TW : Tall stem and wide leaves, TN ; Tall stem and narrow leaves.
 MM ; other types of plants

나. 유용 집단선발

A. macrocephala 유용집단선발을 위하여 Table 24의 초형군 분류 후 선발한 개체에서 종자 증식 후 *A. macrocephala* 26집단을 육성하였다. 육성 집단 중에서 근부병류 포장 저항성 검정 결과, 병 발생율이 낮은 AM9902 등 5 집단을 선발하였으며, 선발 5집단 중에서 AM9912는 공시 26개 집단 평균생육보다 초장, 경수, 경경, 1차분지수, 1차분지장, 생근중이 높았으며 특히 근부병 포장 발병율은 집단평균 29.6%에 비하여 17.3%로 병해 저항성이 강한 특성을 보였다(Table 25).

또한 *A. japonica* 국내 8개 지역수집종 중에서 생육이 우수한 3개 집단을 선발하였으며, 선발 3개 집단중에서 AJ2106은 공시 8개 집단 평균생육보다 초장, 경수, 엽수, 1차분지수, 1차분지장, 생근중이 높았으며 특히 근부병 포장 발병율은 집단평균 17.1%에 비하여 8.3%로 병해 저항성이 강한 특성을 보였다(Table 26).

Table 25, 26의 선발 집단은 중간잡종 육성을 위한 교배모본으로 활용 하였다.

Table 25. Growth characteristics of selected line from *A. macrocephala* .

Selected line	Plant height(cm)	No.of stems	Diameter of stem(mm)	No.of leaf	Leaf(cm)		
					Length	Width	Ratio(L/W)
AM9902	38.1	2.1	6.8	14.1	8.7	3.8	1.78
AM9905	40.9	1.3	6.8	14.2	9.5	3.9	2.20
AM9912	35.3	2.0	6.6	14.5	8.4	3.6	2.33
AM9915	36.8	1.8	6.4	13.6	9.3	3.6	2.58
AM9922	40.9	1.2	7.2	15.7	9.0	3.9	2.31
AM9924	34.1	1.2	5.3	14.5	8.5	4.0	2.13
*Mean	35.5	1.6	6.5	14.0	8.4	3.8	2.22

Selected line	No. of branch	Length of branch(cm)	Bud(mm)			Rhizome weight(g)	Disease incidence rate (%)
			Length	Width	Ratio(L/W)		
AM9902	10.0	20.6	34.0	23.6	1.44	32.5	17.3
AM9905	9.1	21.7	33.4	24.7	1.35	37.2	22.0
AM9912	9.0	20.3	33.1	23.9	1.38	36.2	17.3
AM9915	8.3	18.7	32.8	24.0	1.44	35.3	23.6
AM9922	11.6	20.6	34.5	22.7	1.52	30.5	23.7
AM9924	8.9	17.3	32.0	21.6	1.48	29.3	17.8
*Mean	8.9	18.8	32.9	23.3	1.41	28.5	29.6

* mean : 26 populations

Table 26. Growth characteristics of selected line from *A. japonica*.

Selected line	Plant height(cm)	No.of stems	Diameter of stem(mm)	No.of leaf	Leaf(cm)		
					Length	Width	Ratio(L/W)
AJ2102	29.0	8.1	1.3	8.1	4.9	2.1	2.33
AJ2106	35.1	4.8	1.7	18.3	6.2	2.9	2.14
AJ2108	26.8	3.9	2.1	18.5	5.1	2.8	1.82
*mean	20.1	2.8	1.8	14.3	5.9	3.3	1.79

Selected line	No. of branch	Length of branch(cm)	Bud(mm)			Rhizome weight(g)	Disease incidence rate (%)
			Length	Width	Ratio(L/W)		
AJ2102	1.2	3.1	16.7	7.6	2.19	25.6	11.3
AJ2106	1.3	2.4	19.3	10.7	1.80	28.9	8.3
AJ2108	1.1	2.8	17.4	10.1	1.72	31.2	11.8
*mean	0.8	1.5	18.2	8.9	2.04	22.3	17.1

* mean : 8 populations

Table 25, 26의 결과에서 선발된 AM9912, AJ2106은 근부병 포장 발병율이 공시집단보다 강한 집단이며, 백출의 근부병의 주병인은 역병으로 보고 되고 있다.

Table 27은 선발한 AM9912, AJ2106으로 대상으로 온실내에서 역병균을 접종한 후 이병율을 조사한 결과이다.

Table 27. Development of disease incidence of *A. macrocephala* and *A. japonica* inoculated with *P. drechsleri*.

Selected line	1 Week after Inoculation	2 Week after Inoculation
	Disease incidence rate(%)	Disease incidence rate(%)
AM9912	73.0	94.2
AJ2106	33.8	70.9

역병균 접종은 V8A 배지에서 5일간 배양한 *P. drechsleri*를 멸균수와 함께 균질화한 균사 현탁액을 백출 근경에 접종한 결과 약 3일 후 부터 지상부 엽과 줄기의 역병의 병징이 나타나기 시작했으며, 접종 1주일과 2주일 후에는 *A. macrocephala* 및 *A. japonica*의 지상부 잎에 나타난 병징의 차이를 확인할 수 있었으며 접종 1주 후와 2주 후 *A. macrocephala*의 이병율은 73.0%와 94.2%이었으며, 같은 시기 *A. japonica*의 이병율은 33.8%와 70.9%를 보여 중국 도입 삽주인 *A. macrocephala*가 국내수집삽주인 *A. japonica*에 비하여 역병 원인균인 *P. drechsleri*에 대하여 감수성을 보였다.

다. 돌연변이 유발에 의한 유용변이체 육성

중국 도입 삽주인 *A. macrocephala*의 유용변이 창출을 위하여 돌연변이원별 최적처리 수준 검정을 위하여 시험을 수행한 결과는 Table 28, 29, 30과 같다.

최적처리 수준은 각 돌연변이원별 종자처리 후 실내 20℃, 암조건에서 평균 발아율 50%선을 기준으로 하였다.

방사선 v- ray 조사선량별 발아율은 무처리 92.2%에 비하여 10kr에서 57.4%, 15kr 55.2%, 20kr 49.6%, 30kr 36.8%로 조사선량이 증가 할수록 발아율은 점차 감소 되었으며, 최적 조사선량은 20kr이었다(Table 28).

Table 28. Germination of dosage v- ray radiation.

Control	10Kr	15Kr	20Kr	30Kr
92.2	57.4	55.2	49.6	36.8

EMS는 처리농도별 발아율은 무처리 95.3%에 대비하여 24시간 침지 0.1%농도에 서 33.6%, 0.2%농도에서는 67.0%으로 발아율이 급격히 증가한 후 농도가 높을수록 발아율은 점차 감소하는 경향을 보였으며 최적 처리조건인 0.4% 농도에서 발아율은 48.3%였다(Table 29).

Table 29. Germination of concentration and soaking time in EMS.

Soaking time	Concentration (%)	Day after inoculation			
		2 days	4 days	6 days	Mean
24hours	0.1	21.6	11.7	0.3	33.6
	0.2	40.7	25.3	1.0	67.0
	0.3	33.0	16.3	1.0	50.3
	0.4	16.7	28.3	3.3	48.3
	0.5	13.3	8.3	0.7	22.3
Control		68.5	22.5	4.3	95.3

NaN₃ 처리시간 및 처리농도별 발아율은 무처리 95.5%에 대비하여 12시간 침지 10mM 농도에서 59.0%이며 처리농도가 높을수록 발아율은 점차 감소하는 경향을 보였으며 최적 처리조건은 12시간 침지에 농도는 10mM이었다(Table 30).

Table 30. Germination of concentration and soaking time in sodium azide.

Soaking time	Concentration (mM)	Day after Inoculation			
		2 days	4 days	6 days	Mean
12hours	10	16.3	37.0	5.7	59.0
	20	4.7	31.0	6.3	42.0
	30	2.7	17.0	13.6	33.3
Control		68.5	22.5	4.3	95.5

돌연변이 유발에 의한 유용변이체 육성연구는 Table 28, 29, 30의 돌연변이 유발원 별 최적 처리수준을 검정한 후 각 수준별로 *A. macrocephala* 2년생 집단에서 채종한 종자 이용하여 처리원별로 v- ray 선량 20kr, EMS 0.4% 농도액, NaN₃ 10mM 농도액 조건에서 각각 종자 1kg 처리한 후 파종 하였다.

돌연변이원별 생육특성은 무처리를 대비하여 조사한 결과 초장, 엽수, 엽 크기, 1차분지수, 1차분지장 지상부의 전반적인 생육은 무처리에 비하여 저조 하였으나 경수, 경경의 무처리에 비하여 약간 증가한 것으로 조사 되었다(Table 31).

본 연구는 2002년 돌연변이 처리 후 종자가 결실되는 2003년 2년생에서 유용변이주를 선발한 후 주별 격리채종 하였으며 처리원별로 NaN₃ 7주, EMS 5주, v- ray 4주의 유용변이체를 선발 하였다. 선발주의 후대 특성 검정은 사업종료 후에도 계속 수행할 예정이다.

Table 31. Valuable variant selection from mutagen treatment in *A. macrocephala*.

Mutagen	Plant height(cm)	No.of stems	Diameter of stem(mm)	No.of leaf	Leaf(cm)		
					Length	Width	Ratio(L/W)
NaN ₃	32.2	1.6	4.7	13.7	8.8	3.8	2.32
EMS	29.7	1.4	4.0	12.0	4.0	3.2	1.25
v- ray	25.4	1.0	3.8	11.0	4.1	3.2	1.28
Control	20.1	1.2	1.8	15.4	9.1	3.9	2.33

Mutagen	No.of branch	Length of branch(cm)	Bud(mm)			Selected plant
			Length	Width	Ratio(L/W)	
NaN ₃	6.8	15.2	29.5	18.1	1.63	7
EMS	6.2	12.5	30.4	18.2	1.67	5
v- ray	6.4	13.2	30.2	17.4	1.74	4
Control	9.2	18.6	30.1	20.4	1.47	

라. 종간잡종육성

종간잡종 육성을 위한 교배모본은 Table 25, 26에서 선발된 내병성이 강한 *A. japonica*(AJ 2106)을 모본, *A. macrocephala*(AM9912)을 부분으로 하였으며 인공교배 하였다(Table 32).

교배모본으로 공시한 AJ 2106, AM9912는 화색에서 각각 백색, 진홍색이며 개화기는 모본인 AJ2106가 8일 조기개화 되고, 지상부 및 지하부 생육은 모본이 부분보다 생육이 저조하나 역병 저항성은 모본이 부분보다 강한 특성을 보이고 있다(Table 32).

Table 32. Growth characteristics of parent line in *Atractylodes* spp.

Cross combination	Plant height(cm)	No.of stems	Flower color	Flowering period(M,D)	No.of leaf	Leaf(cm)		
						Length	Width	Ratio(L/W)
♀ : AJ 2106	35.1	4.8	White	9.16	18.3	6.2	2.9	2.14
♂ : AM9912	35.3	2.0	Red	9.24	14.5	8.4	3.6	2.33

Cross combination	No.of branch	Length of branch(cm)	Bud(mm)			Rhizome weight(g)	Disease incidence rate (%)
			Length	Width	Ratio(L/W)		
♀ : AJ 2106	1.3	2.4	19.3	10.7	1.80	28.9	8.3
♂ : AM9912	9.0	20.3	33.1	23.9	1.38	36.2	17.3

인공교배 및 F₁ 실생묘 육성 결과는 Table 33과 같이 AJ 2106 × AM9912 교배조합에서 527립의 종자를 채종 하였으며, 채종 이듬해 2월중순 동계육묘 후 434개체의 F₁ 실생묘를 양성 하였다. 이 중에서 생육이 우수한 F₂ 영양계 계통육성을 위하여 생육이 우수한 100개체를 선발 영양 증식하였다. 선발한 F₂ 100계통의 생육은 각 계통별 지상부 및 지하부 생육에서 다양한 변이를 나타내었다(Table 34).

Table 33. Breeding of interspecies hybrid plants.

Cross combination	No. of hybrid seeding	No. of F ₁ plant	Selection of F ₁ plant
AJ 2106 × AM9912	527	434	100 plant

Table 34. Variation of growth character of 100 F₂ line selected from 434 F₁ plants.

Variation	Plant height(cm)	No. of stems	Diameter of stem(mm)	Leaf(cm)		
				Length	Width	Ratio(L/W)
Mean	40.3	4.0	14.7	7.1	4.2	1.90
Max.	82.0	7.2	73.0	10.2	8.0	6.97
Min.	16.3	1.9	6.5	2.4	1.2	0.69

Variation	No. of branch	No. of bud	Bud(mm)			Rhizome weight(g)
			Length	Width	Ratio(L/W)	
Mean	8.1	10.6	24.0	14.6	1.70	52.4
Max.	19.4	23.5	32.6	24.2	2.60	131.5
Min.	2.0	1.0	15.5	7.9	1.08	13.0

Table 35. Growth characteristic of 10 F₂ line selected from 100 F₁ lines.

Line	Flowering period(M,D)	Flower color	Plant height (cm)	No.of stems	No.of branch	No.of bud	Rhizome weight(g)	wet resistance (1 - 5)
AJM2101-21	10.25	Red	38.4	4.5	5.2	5.2	64.1	3
-24	10.15	Red	43.2	3.8	10.6	12.0	89.3	4
-33	10.04	Red	61.2	1.4	14.4	21.2	89.1	3
AJM2102-11	10.15	Red	29.3	4.4	4.9	5.4	59.3	3
-52	10.30	White	34.2	3.2	2.0	11.8	57.6	4
<i>AJM2103-10</i>	<i>10.25</i>	Red	<i>55.8</i>	<i>4.4</i>	<i>10.0</i>	<i>17.4</i>	<i>118.3</i>	3
-12	10.15	Red	48.0	4.4	17.4	21.4	102.4	3
AJM2103-35	9.24	White	40.0	1.4	9.4	3.6	52.8	3
AJM2105-03	10.23	Red	39.4	4.8	9.0	15.4	63.2	3
<i>AJM2107-04</i>	<i>10.20</i>	Red	<i>44.0</i>	<i>5.8</i>	<i>9.4</i>	<i>10.2</i>	<i>131.5</i>	2

Table 35는 F₁ 실생 선발 100개체를 영양증식한 후 이중에서 생육이 우수한 F₂ 영양계 10계통을 선발한 결과로서 선발 10계통중에서 AJM2103-10은 개화기가 10월 25일이며 주당 생근중은 118.3g/주이며, AJM2107-04은 개화기 10월20일, 주당 경수가 많고 생근중이 131.5g/주인 특성이 있다. 이들 선발 10 계통은 본 과제 완료 후 계속 연구를 수행하여 백출 내병 다수성 신품종으로 육성할 계획이다.

3. 제 2 협동과제 : 백출의 역병저항성 증진 기술개발

가. 삼주속 식물의 유연관계 분석

12개의 primer를 이용한 RAPD분석은 유전자 증폭된 DNA 다형화 밴드의 상이성으로 각 식물에 따른 특이한 결과가 관측되었다. 최소 400bp에서 최대 2.5kb 크기에 이르는 밴드가 보였으며, 밴드의 수는 2개(primer #9)에서 12개(primer #9)까지 확인되었다. *A. japonica*는 *A. macrocephala*에 비해 다른 증폭 pattern을 보였는데, 다른 *A. macrocephala*와는 동일한 밴드도 나타나고, 다형화 밴드도 나타남으로써 *A. macrocephala*와 *A. japonica*간의 다형성이 확인되었다. 또한 UPGMA분석을 통한 clustering(grouping)과 similarity(genomic DNA homology)분석을 실시하였다(Fig. 15-17).

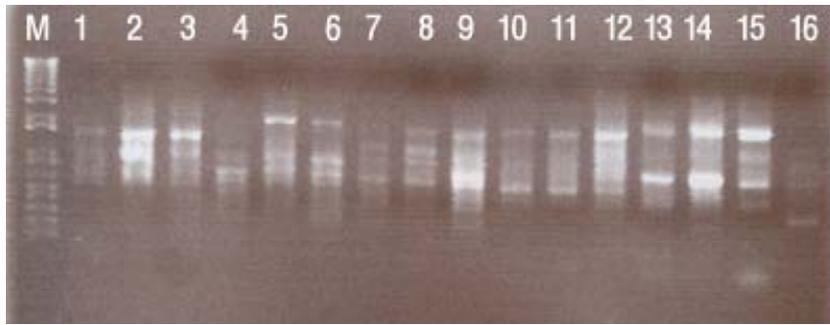


Fig. 15. RAPD patterns of *A. macrocephala*.

M; 1kb DNA size marker, Lane 1; 5ng DNA template with primer #1, 2; 500pg DNA template with primer #1, 3; 50pg DNA template with primer #1, 4; 5ng DNA template with primer #2, 5; 500pg DNA template with primer #2, 6; 50pg DNA template with primer #2, 7; 5ng DNA template with primer #3, 8; 500pg DNA template with primer #3, 9; 50pg DNA template with primer #3, 10; 5ng DNA template with primer #5, 11; 500pg DNA template with primer #5, 12; 50pg DNA template with primer #5, 13; 5ng DNA template with primer #6, 14; 500pg DNA template with primer #6, 15; 50pg DNA template with primer #6, 16; 5ng DNA template with primer #8.

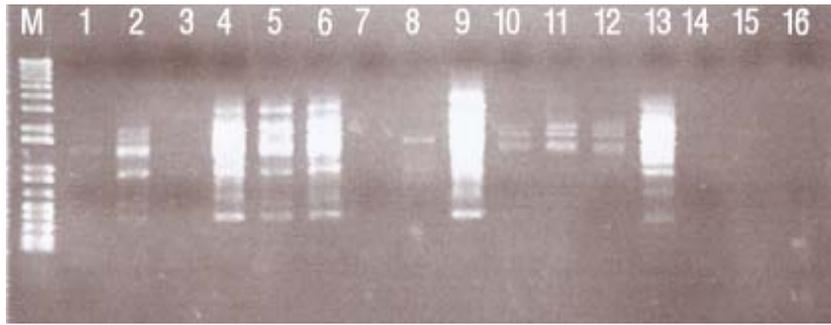


Fig. 16. RAPD patterns of *A. macrocephala* and *A. japonica*(I).
M; 1kb DNA size marker, Lane 1; 1, 2; 2, 3; 3, 4; 4, 5; 5, 6; 6, 7; 7, 8; 8, 9; 9, 10; 10, 11; 11, 12; 14, 13; San, 14; G-4, 15; G-2, 16; E-2.

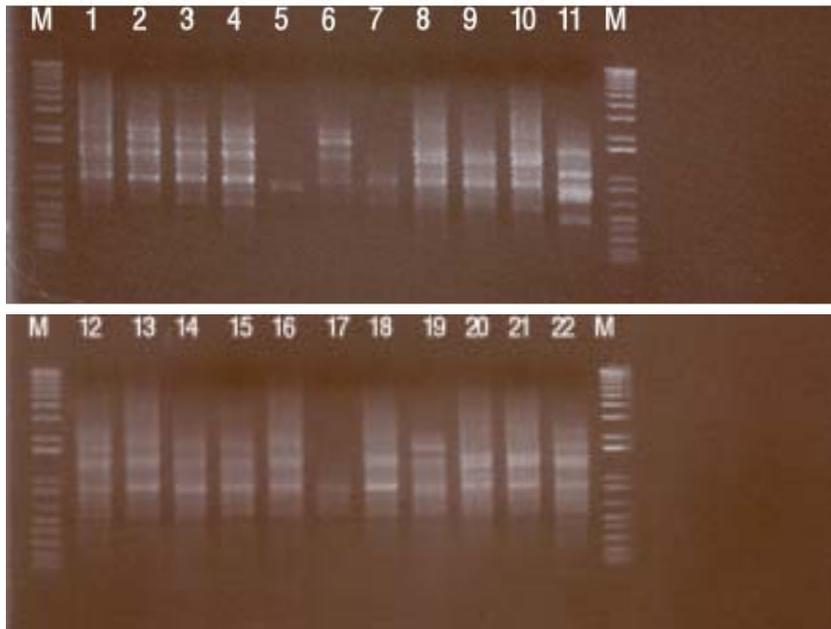


Fig. 17. RAPD patterns of *A. macrocephala* and *A. japonica*(II).
M; 1kb DNA size marker, Lane 1; 1, 2; 2, 3; 6, 4; 7, 5; 8, 6; 10, 7; 14, 8; San, 9; G-4, 10; G-2, 11; E-2, 12; G-7, 13; 21, 14; 18, 15; 17, 16; 23. 17; 15, 18; 16, 19; 22, 20; I-2, 21; Ga-Pyoung, 22; Madoyeon.

나. 재배종 및 야생종으로부터 역병저항성 개체 선발

유전자원 수집은 다음과 같이 10개 지역에서 5,384점을 수집하였다. 가평 450점, 강화 223점, 포천 132점, 평창 1520점, 태백 450점, 제천 256점, 안동 258점, 함양 95점, 의성 1150점, 영주에서 850점을 수집하였다. 4월 상, 중순경에 종별, 지역별로 수집한 재료를 4월 하순에 식재하였으며, 시비는 *A. macrocephala*의 기준량인 7-4-3kg/10a를 사용하였다. 저항성 개체를 조사한 결과 *A. japonica* 1년생은 가평 등 5개 지역 수집종 중 근부병 평균 발병율은 18.76%였으며, 이중 의성 수집종의 발병율이 37.9%로 내병성이 가장 약하였으며, 가평 수집종은 5.5%로 강하였다. *A. japonica* 2년생은 근부병 평균 발병율은 26.6%로 1년생보다 높으며, 수집종 중 가평, 안동 수집종의 발병율이 10%이하로 내병성이 강한 것으로 나타났다. *A. macrocephala*는 근부병 발병율 21.2%로 *A. japonica*에 비하여 중간정도의 내병성을 보였다.

다. 내병성 개체의 특성 파악

1년생 *A. japonica*는 발병율이 가장 낮은 가평 수집종은 초장이 가장 작았고, 1차 분지수는 가장 많았으며, 내습성이 강한 편이었다(Table 36).

Table 36. Characteristics of *A. japonica* and *A. macrocephala* collected in different area.

Plants	Location	Plant height (cm)	No. of branches	No. of 1st branches	Leaf length (cm)	Rate of disease (%)	Tolerance to moisture ^z
<i>A. japonica</i> (one-year-old)	A ^y	17.3	1.3	1.7	5.7	5.5	+++
	B	23.7	1.0	1.2	5.2	9.4	+++
	C	25.8	1.0	1.3	4.7	13.6	+
	D	21.0	1.3	1.3	6.0	27.2	+
	E	18.0	1.0	1.0	5.3	37.9	-
<i>A. japonica</i> (two-year-old)	A	73.0	6.3	16.7	8.3	8.3	+++
	C	49.7	8.7	4.7	8.1	50.0	-
	F	56.3	12.0	8.7	8.0	9.5	+++
	G	58.7	7.7	9.3	9.3	37.5	-
	H	57.3	4.7	5.7	8.0	29.1	+
I	51.3	4.0	3.7	6.7	25.0	+	
<i>A. macrocephala</i> (two-year-old)	-	-	2.3	7.4	12.1	21.2	+

^yA; Ga-Pyoung, B; Pyoung-Chang, C;Ham-Yang, D;Po-Cheon, E;Eui-Sung, F;An-Dong, G;Gang-Hwa, H;Je-Cheon, I;Tae-Back ^z+++;strong, +;medium, -;weak

2년생에서도 가장 발병율이 낮았던 가평 수집종은 1차 분지수는 가장 많았으나 초장은 가장 컸다. 발병율이 21.2%로 높았던 2년생 *A. macrocephala*의 경우 경수는 2년생 *A. japonica*보다 낮았으나 엽장이 12.1cm로 가장 길었다.

라. 고효율 재분화 방법 개발

1) 식물생장조절제 단용처리의 효과

식물체 부위는 잎, 줄기, 자엽의 세 부분으로 하였는데, 잎, 줄기와 자엽에 따라 반응 기간의 차이가 나타났고, 처리농도에 대한 반응도 다르게 나타났다. 전반적으로 잎 절편의 callus생성율이 양호하였다. callus 유기는 모든 생장조절제 처리구에서 나타났으며, 뿌리는 근경형태의 뿌리가 발생하였고, shoot발생은 없었다. 뿌리의 분화는 크게 두 가지 형태로 구분되어 관찰되었는데, 처음부터 굵은 모양의 뿌리가 발생하는 것과 가는 모양의 뿌리털 모양의 뿌리가 발생하는 경우로 구분되었다. 식물체의 엽병을 채취하여 배양한 경우 Kinetin 5ppm처리구에서 shoot의 발생이 관찰되었고, 화뢰를 배양하였을 경우에는 지상부의 분화가 아니라 뿌리의 분화가 바로 관찰되었으며, IBA처리가 효과적이었다. 식물 생장조절제 별로는 Auxin류에 비하여 Cytokinin류 처리구의 효과가 늦게 나타났으며, IBA처리시 2주 경과후 반응이 관찰되었다. IBA, IAA, GA, BA, Zip, Kinetin처리중 IBA처리가 식물체 부위에 상관없이 가장 효과적이었고, 특히 5ppm처리구에서 캘러스 및 식물체 뿌리의 분화율이 가장 좋았다. 줄기의 경우에는 IBA처리구를 제외하고는 전부 고사하였다.

Table 37. Effect of IBA on the regeneration of *A. macrocephala*.

Treatment(mg/L)	Leaf	Stem	Cotyledon
Control	+ ^z	-	·
0.1	+	-	-
1	+	+	+
5	++	+++	+
10	++	++	+

^z -:dried, · :none +:low ++:good, +++:excellent growth.

Table 38. Effect of IAA on the regeneration of *A. macrocephala*.

Treatment(mg/L)	Leaf	Stem	Cotyledon
Control	+ ^z	-	•
0.1	+	-	•
1	+	-	+
5	•	+	•
10	+	-	+

^z See Table 37.

Table 39. Effect of BA on the regeneration of *A. macrocephala*.

Treatment(mg/L)	Leaf	Stem	Cotyledon
Control	+ ^z	-	•
0.1	•	-	•
1	•	-	•
5	•	-	•
10	•	-	•

^z See Table 37.

Table 40. Effect of Zip on the regeneration of *A. macrocephala*.

Treatment(mg/L)	Leaf	Stem	Cotyledon
Control	+ ^z	-	•
0.1	+	•	•
1	•	-	•
5	•	•	•
10	+	-	•

^z See Table 37.

Table 41. Effect of kinetin on the regeneration of *A. macrocephala*.

Treatment(mg/L)	Leaf	Stem	Cotyledon
Control	+ ^z	-	.
0.1	+	-	-
1	.	-	.
5	.	-	.
10	.	-	-

^z See Table 37.

Table 42. Effect of GA on the regeneration of *A. macrocephala*.

Treatment(mg/L)	Leaf	Stem	Cotyledon
Control	+ ^z	-	.
0.1	.	-	.
1	.	-	.
5	+	.	.
10	.	-	.

^z See Table 37.

Table 43. Effect of plant growth regulators on the regeneration of *A. macrocephala*.

Treatment(mg/L)	Leaf	Stem	Cotyledon
IBA	+ ^z	+	+
GA	+	-	.
2iP	+	-	.
BA	+	-	.

^z See Table 37.

Table 44. Effect of plant growth regulators on the regeneration of flower bud in *A. macrocephala*.

Treatment(mg/L)	IBA	IAA	Kinetin	BA	GA
Control	. ^z
0.1	.	.	-	-	.
1	.	.	-	-	.
5	+	+	-	-	.
10	+	+	-	-	.

^z See Table 37.

Table 45. Effect of plant growth regulators on the regeneration of *A. macrocephala*.

Treatment(mg/L)	Leaf	Stem	Cotyledon
IBA	+ ^z	+	+
GA	+	-	.
2iP	+	-	.
BA	+	-	.

^z See Table 37.

Table 46. Effect of plant growth regulators on the regeneration of flower bud in *A. macrocephala*.

Treatment(mg/L)	IBA	IAA	Kinetin	BA	GA
Control	. ^z
0.1	.	.	-	-	.
1	.	.	-	-	.
5	+	+	-	-	.
10	+	+	-	-	.

^z See Table 37.

2) 식물생장조절제 혼용처리의 효과

가) kinetin과 IAA, IBA, NAA의 혼용처리

cytokinin인 kinetin을 2mg/L으로 고정하고, 여기에 auxin으로 IAA, IBA, NAA를 각각 0.1, 0.5, 1mg/L로 처리하여 치상 30일 후 조사한 결과 전체적으로 절편체 자체가 조금 비대해지고(특히 본엽과 엽병), callus가 조금 생성되었다(Table 47). callus 생성은 자엽, 줄기, 잎 모두 NAA처리가 좋았으며 그 다음으로 IBA, IAA순이었다. NAA처리 농도별로 비교해 보면 1, 0.1, 0.5mg/L 순으로 callus 생성이 좋았다. 재분화율은 매우 낮았으며 shoot형성은 거의 일어나지 않았는데, 치상 한 지 약 15-20일 만에 4개의 자엽 예서만 5개의 shoot를 얻을 수 있었다. 이때 auxin의 종류와는 상관없이 골고루 1-2개씩만 shoot가 형성되어 처리간의 큰 차이를 찾아 볼 수 없었다(Table 47, Fig. 18-21).

Table 47. Effect of kinetin and auxin(IAA, IBA, NAA) on the regeneration of *A. macrocephala*.

Treatment (mg/L)	Cotyledon			Leaf			Stem			
	Callus formation (%)	Shooting (%)	No. of shoots	Callus formation (%)	Shooting (%)	No. of shoots	Callus formation (%)	Shooting (%)	No. of shoots	
Control	12	0	0	20	0	0	4	0	0	
IAA 0.1	12	0	0	20	0	0	8	0	0	
IAA 0.5	12	0	0	20	0	0	22	0	0	
IAA 1.0	12	8	3	20	0	0	22	0	0	
Kinetin 2	IBA 0.1	15	0	0	25	0	0	11	0	0
	IBA 0.5	23	4	1	20	0	0	22	0	0
	IBA 1.0	31	0	0	40	0	0	37	0	0
NAA 0.1	8	0	0	6	0	0	22	0	0	
NAA 0.5	54	4	1	87	0	0	41	0	0	
NAA 1.0	58	0	0	73	0	0	44	0	0	

나) IBA와 ZEATIN, BA, KINETIN의 혼용처리

IBA 0.1mg/L 또는 1mg/L로 고정하고, 여기에 cytokinin으로 zeatin, BA, kinetin을 각각 2mg/L 또는 5mg/L 혼용처리하여 치상 한 지 30일 후 조사한 결과, 자엽 본엽 엽병에서 callus 생성 및 재분화율이 BA > zeatin > kinetin 순으로 높았다 (Table 48). BA와 IBA의 농도는 BA 2mg/L와 IBA 0.1mg/L를 조합처리했을 때 보다는 BA 5mg/L와 IBA 1mg/L를 조합처리 했을 때 재분화율이 좋았다. 또 절편체에 따른 callus 생성 및 재분화율은 본엽과 줄기보다는 자엽이 월등하게 높았다.

Table 48. Effect of IBA and cytokinin(zeatin, BA, kinetin) on the regeneration of *A. macrocephala*.

Treatment (mg/L)	Cotyledon			Leaf			Stem		
	Callus formation (%)	Shooting (%)	No. of shoots	Callus formation (%)	Shooting (%)	No. of shoots	Callus formation (%)	Shooting (%)	No. of shoots
Zeatin 2	40	0	0	22	0	0	53	0	0
IBA 0.1 BA 2	55	5	4	33	0	0	53	0	0
Kinetin2	30	5	1	28	0	0	20	0	0
Zeatin 5	55	5	1	22	0	0	53	0	0
IBA 1 BA 5	15	10	5	39	5	1	47	0	0
Kinetin5	45	0	0	17	0	0	33	0	0

Table 49. Effect of IAA and cytokinin(zeatin, BA, kinetin) on the regeneration of *A. macrocephala*.

Treatment (mg/L)	Cotyledon			Leaf			Stem		
	Callus formation (%)	Shooting (%)	No. of shoots	Callus formation (%)	Shooting (%)	No. of shoots	Callus formation (%)	Shooting (%)	No. of shoots
Zeatin 2	-	-	-	10	0	0	60	0	0
IAA 0.1 BA 2	-	-	-	50	0	0	100	0	0
Kinetin2	-	0	0	33	0	0	60	0	0
Zeatin 5	46	8	3	47	0	0	60	0	0
IAA 1.0 BA 5	50	0	0	33	0	0	20	0	0
Kinetin5	38	-	-	10	0	0	20	0	0

다) IAA와 ZEATIN, BA, KINETIN의 혼용처리

자엽을 사용한 경우 IAA 1mg/L와 ZEATIN 5mg/L 처리구에서 shoot가 재분화되었으며, 잎과 줄기의 경우 IAA 0.1mg/L와 BA 2mg/L 처리구의 callus 생성률이 가장 높았다(Table 49).

라) NAA와 ZEATIN, BA, KINETIN의 혼용처리

NAA를 0.1mg/L 또는 1mg/L로 고정하고, 여기에 zeatin, BA, kinetin을 각각 2mg/L 또는 5mg/L 혼용처리하여 치상 30일 후 조사한 결과 자엽 본엽 엽병에서 callus 생성 및 재분화율이 BA처리와 zeatin처리가 kinetin처리보다는 좋았으며, 또 BA처리가 zeatin처리 보다는 약간 더 좋았다(Table 50). BA와 NAA의 혼용처리 농도는 BA 2mg/L와 NAA 0.1mg/L를 조합처리했을 때 보다는 BA 5mg/L와 NAA 1mg/L를 조합처리 했을 때 특히 본엽과 엽병에서 재분화율이 좋았다. 또 절편체에 따른 callus 생성 및 재분화율은 본엽과 엽병보다는 자엽이 월등하게 높았다.

Table 50. Effect of NAA and cytokinin(zeatin, BA, kinetin)on the regeneration of *A. macrocephala*.

Treatment (mg/L)	Cotyledon			Leaf			Stem		
	Callus formation (%)	Shooting (%)	No. of shoots	Callus formation (%)	Shooting (%)	No. of shoots	Callus formation (%)	Shooting (%)	No. of shoots
Zeatin 2.0	65	10	3	4	0	0	47	0	0
NAA 0.1 BA 2.0	80	5	1	52	0	0	80	0	0
Kinetin2.0	35	10	6	30	0	0	40	0	0
Zeatin 5.0	85	10	5	60	0	0	88	5	2
NAA 1.0 BA 5.0	80	0	0	78	10	7	76	5	2
Kinetin5.0	65	0	0	57	0	0	52	0	0

마) BA와 NAA의 혼용처리

BA와NAA를 0, 0.1, 1, 2, 5, 10 ml/l로 혼합처리하여 백출의 재분화율을 알아본 결과 치상 30일 후 절편체 자체가 조금 비대해지고 shooting률은 저조했다(Table 51). callus생성률은 BA1mg/l 농도 이상과 NAA5mg/l 농도의 처리구에서 비교적 좋았으며 rooting은 BA0.1mg/l과 NAA1mg/l 농도의 처리구에서 좋은 결과를 보였다. shooting은 줄기조직에서 발생 하였고, BA의 농도가 낮을수록 재분화율이 높게 나타나는 것으로 생각된다. 잎, 줄기, 자엽의 평균 callus 생성률은 BA 5mg/l와 NAA5mg/l 혼용처리구에서 높게 나타났다. 따라서 본 실험에서는 callus의 생성물에 좋은 반응을 보인 처리구를 골라 백출의 형질전환 실험에 사용 하였다.

Table 51. Effect of BA and NAA on the regeneration of *A. macrocephala*.

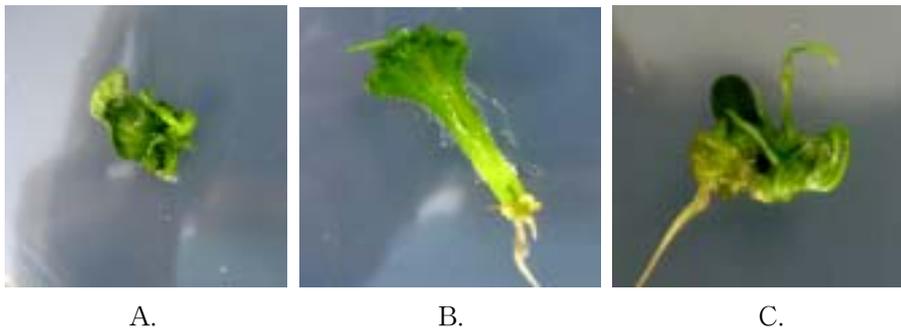
Treatment (mg/L)		Leaf			Stem			Cotyledon		
		Callus formation (%)	Rooting (%)	Shooting (%)	Callus formation (%)	Rooting (%)	Shooting (%)	Callus formation (%)	Rooting (%)	Shooting (%)
BA	NAA									
0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0
	0.1	0	0	0	0	0	0	0	4	0
	1	0	0	0	0	40	4	0	60	0
	2	0	16	0	0	60	0	0	80	0
	5	0	40	0	0	80	0	0	80	0
	10	0	40	0	60	0	4	0	80	0
0.1	0	0	0	0	60	0	0	0	40	0
	0.1	0	8	0	80	40	0	0	60	0
	1	0	80	0	60	40	0	0	80	0
	2	0	60	0	60	60	0	0	80	0
	5	0	60	0	0	100	4	0	20	0
	10	0	80	0	0	80	8	0	80	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.1	0	0	0	8	0	0	0	0	0
	1	40	8	0	40	0	0	20	0	0
	2	60	0	0	60	0	0	20	20	0
	5	40	0	0	60	0	0	0	12	0
	10	0	0	0	100	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.1	0	0	0	40	0	0	0	0	0
	1	60	0	0	40	0	0	0	0	0
	2	40	0	0	80	0	0	20	0	0
	5	80	0	0	40	4	0	40	0	0
	10	60	0	0	8	0	0	20	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.1	0	0	0	80	0	0	0	0	0
	1	0	4	0	20	0	0	0	0	0
	2	60	0	0	80	0	0	40	0	0
	5	60	0	0	80	0	0	40	0	0
	10	40	0	0	40	0	0	0	0	0



Fig. 18. Explant of leaf, cotyledon and stem in *A. macrocephala*.



Fig. 19. Explant of leaf, cotyledon and stem in *A. macrocephala* grown for 30 days.



A.

B.

C.

Fig. 20. Shoots regenerated from explants of leaf(A), cotyledon(B) and stem(C) in *A. macrocephala*.

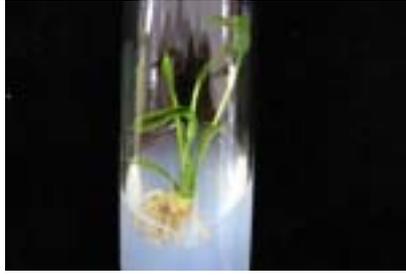


Fig. 21. Rooted plantlet from shoot-regenerated explant subcultured in NAA 0.5mg/L.

마. 종간잡종 육성

A. japonica 와 *A. macrocephala*를 각각 모본과 부분으로 하여 400여개의 종간잡종 식물체를 획득하였다.

바. 유도저항성 개체 육성

재배 1년차에 종근을 확보한 후 이듬해 파종하여 재배 2년 혹은 3년차에 수확하는 기존의 백출재배법의 가장 큰 문제점은 *Phytophthora drechsleri*에 의한 역병피해인데, 일반적으로 포장에서의 역병 증상은 백출 유묘기의 지상부 잎과 줄기의 변색 및 고사로 쉽게 관찰되며, 강우가 집중되는 장마 이후 병징이 심화되고, 그 확산속도가 매우 빨라 종근 파종시 50%이상의 이병주율을 보이는 등 그 피해가 매우 심각하다. 역병 원인균인 *P. drechsleri*는 백출 이외의 수박과 곰취 등에 역병을 일으키는 등 비교적 기주 식물의 범위가 넓은 것으로 알려져 있으며, 5-37℃의 넓은 생육 온도 범위를 보이고, 생육 최적 온도는 25-30℃인 것으로 보고되어, 백출 생육기인 5월 이후의 평균기온이 15℃이상이고, 하절기 강우가 집중되는 우리나라의 기후조건에서는 역병 경감을 위한 재배법의 개발과 함께 역병 저항성 백출 품종 육성이 시급한 상황이므로 본 실험에서는 유도저항성 물질인 BABA처리에 의한 역병 저항성 유도 가능성을 알아보고자 실시한 결과 1000ppm으로 BABA처리한 백출은 과습상태에서도 시들현상을 나타냈으나 다른 농도로 처리한 백출은 별다른 증상이 일어나지 않았으므로 BABA처리에 의한 저항성이 유도된 것으로 생각된다.

사. 형질 전환 가능성 검토

형질전환을 실시한 조직을 항생제가 첨가된 배지에서 배양하고 있으며, 추후 발근 및 신초생장이 일어난 재생식물체를 선발한 후 형질전환의 유무를 더 정확하게 알아보기 위하여 재생식물체로부터 genomic DNA를 추출하여 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 수행 하고자 한다. 재생식물체에서 다음과 같은 약 1.6kb의 PCR산물이 나오는지 확인한다(Fig. 22).

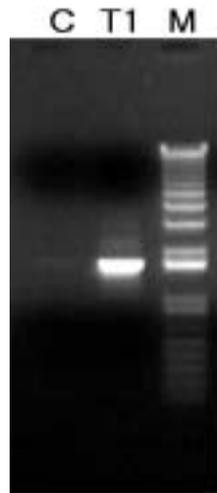


Fig. 22. Agarose gel electrophoresis of the PCR products.

No band was appeared in non-transformed wild type plant (C), whereas about 1.6kb PCR products was appeared in transgenic line (T1). One kb DNA plus ladder (M) was loaded as a size marker.

아. 선발, 육성된 계통의 포장 저항성 검토

백출의 중간잡종육성을 위하여 인공교배를 실시하여 획득한 중간잡종식물체중 선발된 10주는 모본 *A. japonica*과 부분 *A. macrocephala*의 중간특성을 나타내고 있으며 특히 경수가 모본, 부분보다 월등히 많고, 내병성에 강한 특성을 보이고 있다.

제3절 적요

1. 제1세부과제 : 백출의 안정 생산기술 개발

백출의 안정적 생산 기술을 개발하기 위하여 삼주속 식물의 해부적 특성 파악, 종근크기와 적정 재식밀도 구명, 파종시기에 따른 영향 구명, 적정비료종류 및 수준, 적심시기와 방법에 따른 수량향상 정도를 구명하고, 각 시험별 백출의 주요 정유성분을 분석하여 품질을 평가하였다.

*A. japonica*에서는 근경의 유관이 직경 500 μm 이었으며 단위면적당(No./100 μm^2) 14개이었고, *A. macrocephala*는 근경의 유관이 직경 266.7 μm 이었으며 단위면적당(No./100 μm^2) 11개이었다.

1년생근과 절단하여 이용한 다년생근의 정식에 따른 입모율은 각각 76, 78%로 큰 차가 없었으나, 종자 파종시는 14.2%로 매우 낮았다. 1년생 종근 정식이 다년생 종근 절단에 의한 정식보다는 초장, 분지수, 지상부 생체중등의 생육이 양호하였다. 특히 종자 파종시의 1년 차 생육상황은 종근 절단에 의한 파종에 비하여 생육상황이 매우 나빴다. 따라서 파종 재배 시는 초기에는 적정수분 및 잡초제거에 따른 노동력의 과다 투입이 요구되어 백출 재배 시에는 현실적으로 불가능한 것으로 생각된다. 1년생 및 다년생 종근 이식 시는 반드시 종자소독이 요구되어지며, 백출 재배는 파종재배 및 다년생 종근 절단 정식에 비하여 1년생 종근 정식은 역병 출현율이 낮아 비배 관리에 용이하여 백출 재배 시에 적극 추천된다.

대와 중간의 종근의 정식에 따른 입모율, 근경의 건물중 및 수량은 유의차가 없었으나, 중과 소간에는 5% 유의차가 인정되었다. 초장 및 지상부 생체중은 종근 크기간에 유의차를 나타내었다.

재식거리별 입모율, 초장, 근경의 건물중은 20 x 40 cm와 20 x 30 cm재식 간에는 유의 차가 없었으나, 20 x 40 cm과 20 x 30 cm이 20 x 20 cm간에 유의차를 나타내었다. 종근 크기별로는 종근 크기가 큰 것을 이식한 것이, 재식 거리간에는 밀식할수록 수량이 높았다.

종근크기 대(35g 이상) 및 중(15-35g)을 정식 시는 소(15g)에 비하여 beta-caryophyllene, beta-selinene, beta-sesquiphellandrene, valencene, gamma-lemene,

atractylone, 1-methoxy-2-benzen 등의 정유성분 함량이 매우 높았다.

입묘율은 종근 파종이 종자 파종에 비하여 매우 높았고, 파종시기별로는 종자 및 종근 공히 4월초가 높았다. 초장, 분지수 및 건물중은 종자 및 종근 파종 공히 파종 시기가 빠를수록 높았다. 종자 파종 시의 수량은 4월 파종 시기간에 유의차를 나타내었고, 근경정식 시는 4월 초 중순과 말기간에 유의차를 나타내었다. 종자파종 및 근경 정식 둘 다에서 시기가 빠르면 빠를수록 정유성분의 함량이 높았다. 특히 종자 파종시의 atractylone의 함량은 4월초가 5월 초에 비하여 32.3%가, 근경 정식 시는 30.6%가 높았고 4월 초 종자 파종시가 근경 정식 시에 비하여 18.6% 높았다. 백출 재배 시의 종자파종은 잡초 및 초기수분관리가 용이하지 않는 포장에서는 재배가 불가능하며, 수량은 종자 파종 재배 시에 4월 초에, 종근 이식 시는 4월 초 혹은 중순에 이식하는 것이 양호하였다.

손제거와 적심제 처리간의 근경의 생체중 및 건물중은 큰 차가 없었다. 무적심에 비하여 손 제거시의 근경 수량은 발퇴기와 개화초기에 21.7 %, 개화 중기에 11.3 %, 개화 후기에 8.4 % 각각 높았다. 따라서 백출 재배 시는 발퇴기에 손제거 및 적심제 2회 처리가 생육을 양호하게 하는 것으로 나타났다. 정유성분은 무적심에 비하여 손제거, potassium salt of maleic hydrazide 및 fatty alcohol 처리에 의한 적퇴가 beta-caryophyllene, beta-selinene, beta-sesquiphellandrene, valencene, gamma-elemene, atractylone, 1-methoxy-2-benzen 등의 함량이 높았고, 특히 atractylone의 함량은 약 50%정도 높았다. 백출의 안정적 생산 및 내용성분을 증가시키기 위하여서는 발퇴기에 반드시 적퇴하고, 생력을 위하여 적심제 2회 이상 처리가 필요하다.

시비 수준에 따른 초장, 경수, 근경의 생체중 및 건물중의 생육상황은 무비료와 비료 전처리간에 유의차를 나타내었다. 초장은 복비 20% 증비와 감비간에, 퇴비, 유박 등의 유기질 비료 시용구와 화학비료 처리간에 유의차를 나타내었다. 근경의 건물중 및 수량은 화학비료 증 감비 시용간에 유의차를 나타내지 않았으나, 퇴비, 유박 등의 유기질 비료 시용구와 화학비료 처리간에 유의차를 나타내었다. 특히 수량은 관행 복비 사용에 비하여 유박+퇴비혼용 시용구는 32.7% 증수를 보였다. 기준량 대비 복합비료 20% 증비시는 역병 및 뿌리썩음병이 매우 심하였으나 퇴비, 유박, 유박+퇴비 2배량 시용 시는 병 발생 정도가 매우 낮아졌다. 특히 유박+퇴비 2배량 시용은 기준량 복합비료 단독 시용 시에 비하여 역병은 63%, 뿌리썩음병은 70% 감소되었다. 따라서 백출 재배 시는 복합기준량에 유박 + 퇴비 2배량 시용이 생육 및 병 발

생정도가 낮아서 수량 및 품질 증진에 양호 할 것을 생각된다.

종자저장시는 냉장 후 GA처리가, 1년생 종근 저장시는 냉장보관이 양호하였다.

A. *japonica*의 조기정식 및 발퇴기와 개화초기에 적심을 할의 수량은 A. *macrocephala*와 차이 없었고, 백출의 주요 정유성분인 atractylone의 함량이 A. *macrocephala*에 비하여 높고 야생 A. *japonica*와 비슷한 함량을 유지하고 있어 A. *japonica*의 재배화가 가능한 것으로 나타났다.

국내 시판 야생 백출이 수입 백출에 비하여 atractylone, beta-seliene, valecene 등의 성분이 매우 높았고, 중국 안국에서 수집한 백출의 경우 백출의 주요 성분인 atractylone이 전혀 검출되지 않았다. atractylone의 함량 면에서는 중국재배(연길) 백출이 한국산 야생 백출의 80% 정도 함유되어 있고 나머지 지역 시료들은 한국 야생의 22% 미만으로 매우 낮게 함유되어 있었다.

따라서 백출의 품질의 향상 및 안정적 생산을 위하여 1년 종근을 생산하여 냉장보관 후 종자소독을 하여, 4월초에 척박한 토양은 10a당 성분량으로 N-P₂O₅-K₂O=8-6-6kg에 유박200kg+퇴비 4,000kg/10a로, 다소 비옥한 토양에서는 N-P₂O₅-K₂O=4-3-3 kg에 유박200kg+퇴비 4,000kg/10a로 기비로 하여 시비한 후 멀칭 재배로 20 x 30cm로 정식하고 수량 및 품질을 증진시키기 위하여 발퇴기에 반드시 적심을 행한다.

2. 제 1 협동과제 : 삼주속 식물종으로 부터 유용변이체 탐색 및 이용

국내 자생 삼주인 A. *japonica*는 경기 가평 등 8개 지역에서 야생종을 수집하였으며, A. *macrocephala*는 경북 영주 지역 등에서 수집하였다.

A. *macrocephala* 유용변이 26개 집단 중 지상부 생육과 역병 이병 고사주율을 조사한 결과 유망집단 AM9902 등 6집단을 선발 하였으며, A. *japonica*는 수집한 8개 지역종 중에서 경수가 많으며, 내병성이 강한 AJ2106 등 3집단을 선발 하였다.

백출 돌연변이 의한 변이주 선발은 EMS처리 7주, NaN₃처리 5주, v-ray 처리에서 4주를 선발 하였다.

백출 중간잡종육성은 434개체 F₁ 식물체에서 F₂ 유망 영양계 10 계통을 선발 하였으며, 이중 AJM2103-10, AJM2107-04가 생육이 우수하며 내습성이 강한 특성을 보였다.

3. 제 2 협동과제 : 백출의 역병저항성 증진 기술개발

백출의 역병저항성 증진 기술개발을 통하여 재배시 가장 문제가 되는 역병의 감소를 유도하고자 삼주속 식물의 유연관계 분석, 재분화 방법개발, 유도저항성 개체 육성, 형질전환 가능성 검토 등을 실시하였다. *A. macrocephala* 와 *A. japonica* 대상식물의 RAPD를 이용한 유전자 다형성을 분석한 결과, 중간구분이 가능한 다형화 band가 확인되었다. 백출의 조직배양시 캘러스형성 및 뿌리발달은 식물생장조절제 단독처리의 경우에는 IBA 5mg/L 처리가 효과적이었으며, 혼합처리시 잎, 줄기, 자엽의 캘러스 생성율은 NAA 5mg/L와 BA 5mg/L처리가 효과적이었다. 역병저항성 개체를 육성하기 위하여 CaDRP(*Capsicum annum* Defense Related Protein)유전자를 이용하여 형질전환을 실시하였다. 유도저항성개체를 얻기 위하여 BABA(β -aminobutyric acid)처리를 실시하였으며 역병저항성 유도를 확인하였다.

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 제1세부과제 : 백출의 안정 생산기술 개발

현재 농가에서 재배되는 백출은 중국에서 도입된 *Atractylodes macrocephala* Koidz.로서 국내에는 *Atractylodes japonica* Koidz.(삼주)가 자생하고 있으나 전혀 이용되지 않고 있다. 따라서 본 연구를 통하여 국내 자생하는 *Atractylodes japonica* Koidz.(삼주)에 대한 재배시도로 국내 자생자원의 소득원으로서 가능성을 확인하였다..

백출 생산성의 문제를 해결하고자 1년생근 이식재배시 종근생산을 위한 일련의 재배 체계화를 기할 수 있었다.

1년생묘의 이식을 통한 재배에서 적정종근 크기, 수확시기, 평균 감염방제과 수확시 뿌리의 비대여부가 일정하지 못한 점 등의 문제점이 해결될 수 있었다.

종근의 가격이 개당 70-120원의 높은 가격으로 판매되고 있으며, 이는 표준재배시 10a당 종근값이 70만원으로 2년후 수확시 판매금액의 20%를 차지하는 높은 비율로서 농가 순소득에 큰 문제점으로 대두되고 있으나, 우량종근의 생산기술 개발로 인해 해당 농업인 스스로 종근을 생산할 수 있는 여건을 조성함으로써 소득향상을 기할 수 있다.

현재 문제가 되고 있는 중국산에 비해 수량이 떨어지는 부분에 대하여 비대성장 기술개발이 확립됨으로서 수입대체효과를 얻을 수 있다.

2. 제 1 협동과제 : 삼주속 식물종으로 부터 유용변이체 탐색 및 이용

본과제는 삼주속 식물종으로 유용변이체 선발이 목적이며 연구결과 자생종과 도입종 및 중간잡종에서 유용변이체를 선발한 후 *A. japonica* 3계통, *A. macrocephala* 6계통, 중간종 F₂ 영양계 10계통을 육성하여 목표를 초과 달성 하였으며, 육성한 계통의 품종화로 국내 백출 재배의 안정성을 제고하여 농가소득증대 및 수입의존 작물인 백출의 수입대체로 외화 절감이 기대 된다.

3. 제 2 협동과제 : 백출의 역병저항성 증진 기술개발

가. 연구개발목표의 달성도: 다음과 같은 연구목표를 100% 달성함.

- 삼주속 식물의 유연관계 분석
 - RAPD 등의 유전학적 방법
- 재배종 및 야생종으로 부터 역병저항성 개체 선발
 - 역병발병 포장에서의 생존주 선발
- 내병성 개체의 특성 파악
 - 저항성 개체의 식물생리적 특성 분석
- 고효율 재분화 방법 개발
 - 식물생장 조절제 처리 및 배지별 재분화율 조사
- 중간잡종 육성
 - 선발된 역병 저항성 야생종과 재배종의 중간 잡종 육성
- 유도저항성 개체 육성
 - TMV, BABA에 의한 유도 저항성 개체 육성
- 형질전환 가능성 검토
 - RIP에 의한 역병 저항성 형질전환 식물체 개발 가능성
- 선발, 육성된 계통의 포장 저항성 검토
 - 후대검정 및 대량증식법 검토

나. 기여도

역병균은 주로 토양전염이나 수매전염되므로 완전방제는 물론 병발생의 억제 또한 불가능하였으나 내병자원을 탐색하여 품종화하는 방안과 내병성 자원의 교잡육종을 통한 저항성 품종 육종 또는 형질전환을 이용한 새로운 품종의 육성 등 육종적 차원의 연구 개발이 효과적이었다. 유전공학을 이용한 저항성 품종개발은 기존의 종합대책이 추구하는 방제기술개발이 방대하고 포괄적이기 때문에 기술적인 면이나 시간적으로 장기적인 반면 식물형질 전환체를 통한 저항성 품종선발 및 개발이 효율적이다. 그러므로 앞으로 방제대체 기술개발과 함께 형질전환체 개발도 병행해야 하며 농림부에서 주관하는 종합 방제 대책에 삽입되어야 한다. 이러한 저항성 품종개발은 국내시장은 물론 국외 시장의 수확량 안정성, 향상성에 기여하게 될 것이다. 또한 복잡한 방제대책에 사용되는 비용을 절감할 수 있으며, 무병체종지를 감염발생시 마다

확보할 필요가 없어 또한 원가절감을 할 수 있다. 무엇보다도 향후 국제 GM시장을 겨냥한다면 경제적으로 엄청난 시장을 확보하게 된다. 다수확 고품질의 백출재배기술을 체계화하여 보급함으로써 재배농민들의 실질 소득증대에 기여할 것이며, 안정적인 수량확보를 통한 가공기술 개발 등을 유도하여 지역경제의 활성화에 크게 기여할 것이다.

제5장 연구개발결과의 활용계획

1. 제1세부과제 : 백출의 안정 생산기술 개발

- 본 연구가 성공적으로 수행되어 관련기술이 개발되면, 댐 건설 등의 농업환경 변화에 따른 기존 작물 생산에 어려움을 겪고 있는 지역 농업인에게 새로운 소득작목을 보급함으로써 농가 소득증대를 위한 기술지도에 활용.
- 수량확보 등의 문제로 인하여 시도되지 못하고 있는 가공기술 개발에 활성화를 유도하여 재배 농업인들에게 안정적 수량 구입처를 확보케 한다.
- 백출의 안정적 생산을 위한 대농민 교육 자료로 이용 한다.

2. 제 1 협동과제 : 삼주속 식물종으로 부터 유용변이체 탐색 및 이용

- 육성 계통 선발연구를 계속 추진하여 신품종 육성코자 함.

3. 제 2 협동과제 : 백출의 역병저항성 증진 기술개발

- 식물체 근연관계 연구체계 확립
- 고효율 재분화 방법 개발
- 형질전환 시스템 개발
- 유도저항성 개발 체계 확립

제6장 참고문헌

- 김창민 외. 1998, 완역 중약대사전, 도서출판 정담, pp 2215-2228, pp5238-5246 (원서저자 : 강소신의학원, 원서발행처 : 상해과학출판사)
- 농협중앙회. 1998. 국산 외국산 식물약재 비교연구. 농협중앙회 연구보고서.
- 도상학, 안덕균, 성낙술 등. 1995. 주요 수입생약재 품질평가 및 자급생산기술 개발. 현장애로기술개발사업 연차보고서.
- 류태석, 최장수, 맹봉길. 1996. 고랭지 약초 저비용 안전재배 기술체계 확립 연구 : 삼주재배 기술체계 확립시험. 경상북도 농촌진흥원 농사시험보고서 II. 1326-1329.
- 이우철. 1996. 원색 한국기준식물도감. 아카데미서적.
- 이창복. 1979. 대한식물도감. 향문사.
- 장규현, 안동춘, 김동길. 1996. 삼주의 어린순 채취횟수 및 질소분시가 생육과 수량에 미치는 영향. 한국약용작물학회지 4: 241-246.
- 장일무, 전재우, 김제훈, 염정록, Michio Takido. 1989. 창출에 관한 연구(I) : 한국과 일본의 창출과 백출의 생약학적 연구. 생약학회지 20: 88-95.
- 정규영, 정형진, 김건우, 권기석. 1997. 일월산(경북)의 야생 약용식물 분포에 관한 연구. 안동대학교 농업과학기술논문집 4집 : 55-69.
- 정상환, 강광희. 1995. 약용작물 신품종 육성에 관한 연구: 약용작물 우량계통 선발 시험. 경상북도 농촌진흥원 농사시험연구보고서 I: 245-247.
- 정태현. 1965. 한국동식물도감 제 5권 식물편. 문교부
- 지형진. 1998. 국내발생 *Phytophthora* 속균의 형태 및 검색. 식물병과 농업 4(2):30-35.
- 지형진. 1998. *Phytophthora* 속균의 특성 및 분류. 식물병과 농업 4(1):79-89.
- 최장수, 류태석, 황계선. 1996. 고랭지 적응약초 품종개량에 관한 연구: 고랭지 적응 주요약초 유전자원 탐색. 경상북도 농촌진흥원 농사시험보고서 II. 1312-1315.
- 최장수, 류태석, 황계선. 1996. 고랭지 적응약초 품종개량에 관한 연구: 고랭지 적응 주요약초 유전자원 탐색. 경상북도 농촌진흥원 농사시험보고서 II. 1312-1315.
- 황병국, 1995, 고추역병의 생리, 유전, 역학 및 방제전략, 자연자원환경연구

3:139-167.

The Korea Pharmacopeia 7th Edition(대한약전 제7개정) 2000. 한국 메디칼 인텍스사. p773-774, p764-765.

Bowers, J.H. and D.J. Mitchell. 1991. Relationship between inoculum level of *Phytophthora capsici* and mortality of pepper. *Phytopathology* 81:178-184.

Choi, Lih C. and Chang, Chung C. 1992. Antagonism by beta-eudesmol of neostigmine-induced neuromuscular failure in mouse diaphragms. *Eur. J. Pharmacol.* 126: 199-206.

Forster, H., P. Oudemans and M. D. Coffey. 1990. Mitochondrial and nuclear DNA diversity within six species of *Phytophthora*. *Exp. Mycol.* 14:18-31.

Fukuda T., J. Nakajima, I. Yasuda, M. Aragane, M. Yoshizawa, Y. Suzuki, and T. Shimizu . 1995. Studies of cultivation of *Actractylodes ovata* III -Hybridization and the change of morphological characteristics caused by the Hybridization. *Natural Medicines* 49(4):431-437(Japanese).

Fukuda T., J. Nakajima, I. Yasuda, M. Aragane, M. Yoshizawa, Y. Suzuki, and T. Shimizu. 1997. Studies of cultivation of *Actractylodes ovata* IV-Individual variation of external morphology and individual difference of amount of growth and contents of chemical substances. *Natural Medicines* 51(5):420-426(Japanese).

Fukuda T., J. Nakajima, M. Aragane, M. Yoshizawa, Y. Suzuki, and T. Shimizu. 1997. Studies of cultivation of *Actractylodes ovata* V-Effects of bud- and flower-picking upon growth and contents of chemical substances. *Natural Medicines* 51(5):427-430(Japanese).

Halsall, D.M. 1976. Zoospore chemotaxis in Australian isolates of *Phytophthora* species, *Can. J. Microbiol.*, 22:409-422.

Huet, J.C., C. Nespoulous and J.C. Pernollet. 1992. Structures of elicitin isoforms secreted by *Phytophthora drechsleri*. *Phytochemistry* 31:1471-1476.

Hwang, B.K. 1995. Effects of age-related resistance and metalaxyl on capsidiol production in pepper plants infected with *Phytophthora capsici*. In: Handbook of phytoalexin metabolism and action. ed by M. Daniel and R.P. Purkayastha.

- Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 503–523.
- Hwang, B.K., A.W.A.M. de Cock, G. Bahnweg, H.H. Prell and R. Heitefuss. 1991. Restriction fragment length polymorphism of mitochondrial DNA among *Phytophthora capsici* isolates from pepper(*Capsicum annuum*). Systematic Appl. Microbiol. 14:111-116.
- Jee H. J., W. D. Cho, and Y. C. Choi. 1998. Utilization of domestic vegetable juices as a medium for growth and reproduction of *Phytophthora* species. Korean J. Plant Pathol. 14(4):299-302.
- Jeun, Y.C. and B.K. Hwang. 1991. Carbohydrate, amino acid, phenolic and mineral nutrient contents of pepper plants in relation to age-related resistance to *Phytophthora capsici*. J. Phytopathology 131:40-52.
- Kawanishi F., T. Takahashi, T. Omukai, B. G. Zhang, Z. L. Li, and P. G. Xiao. 1994. Comparison of the outer Morphologies, growth and the components in the Rhizomes of *Atractylodes* plants cultivated in Kyoto and Beijing. Natural Medicines 48(1):1-10(Japanese).
- Kim D. K., H. J. Jee and H. K. Kim. 1997. Occurrence of Rhizome rot of *Atractylodes* spp. caused by *Phytophthora drechsleri*. Korean J. of Plant Pathol. 13(6):433-437.
- Kimura, M., Kimura, I., Muroi, M., Tanaka, K., Nojama, H. and Uwano, T. 1992. Different modes of potentiation by beta-eudesmol, a main component from *Atractylodes lancea*, depending on neuromuscular blocking of p-phenylene-polymethylene bis-ammonium derivatives in isolated nerve-diaphragm muscles of normal and alloxan-diabetic mice. Jap. J. Pharmacol. 60: 19-24.
- Kimura, M., Nojima, H., Muroi, M. and Kimura I. 1991. Mechanism of the blocking action of beta-eudesmol on the nicotinic acetylcholine receptor channel in mouse skeletal muscles. Neuropharmacology 30: 835-841.
- Kitagawa, M. 1979. Neo-Lineamenta Flora Manshuricae. J. Cramer.
- Kohda H., K. Gotoh, M. Anetai, and T. Yamagishi. 1994. Studies on the botanical origin of *Atractylodes lancea* "Cang Zhu". Natural Medicines

- 48(1):58-62(Japanese).
- Kwon S. B., H. J. Jee, S. B. Bang, K. K. Lee, and C. K. Hong. 1999. Phytophthora root rot of *Ligularia fishcheri* caused by *P. drechsleri*. Plant Dis. Agric. 5(1):58-60.
- Lucas, J.A., G. Greer, P.V. Oudemans and M. D. Coffey. 1990. Fungicide sensitivity in somatic hybrids of *Phytophthora capsici* obtained by protoplast fusion. Physiol. Mol. Plant Pathol. 36:175-187.
- Michelmore, R.W. and S.H. Hulbert. 1987. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. Ann. Rev. Phytopath. 25:383-404.
- Mizukami, H., Shimizu, R., Kohda, H., Kohjyouma, M., Kawanaishi, F. and Hiraoka, N. 1996. Restriction fragment length polymorphisms of rDNA and variation of essential oil composition in *Atractylodes* plants. Biol. Pharm. Bull. 19: 577-580.
- Muroi, M., Tanaka, K., Kimura I. and Kimura M. 1989. Beta-eudesmol (a main component of *Atractylodes lancea*) -induced potentiation of depolarizing neuromuscular blockade in diaphragm muscles of normal and diabetic mice. Jap. J. Pharmacol. 50: 69-71.
- Nasser, W., M. De Tapia and G. Burkard. 1990. Maize pathogenesis-related proteins: characterization and cellular distribution of β -1,3-glucanase and chitinases induced by brom mosaic virus infection or mercuric chloride treatment. Physiol. Mol. Plant Pathol. 36:1-14.
- Nojima, H., Kimura I. and Kimura, M. 1992. Blocking action of succinylcholine with beta-eudesmol on acetylcholine-activated channel activity at endplates of single muscle cells of adult mice. Brain Res. 575: 337-340.
- Ristaino, J.B. 1991. Influence of rainfall, drip irrigation and inoculum density on the development of Phytophthora root and crown rot epidemics and yield in bell pepper. Phytopathology 81:922-929.
- Seong N. S. and J. H. Cho. 2000. Agricultural background and prospects of oriental medicinal herbs in the Republic of Korea. The Korean Society of Medicinal Crop Science. Korea-China symposium 8(2):26-37.

Takeda Osami, E. Miki, M. Morita, M. Okada, Y. Lu, H. S. He and S. A. He.
1994. Variation of essential oil components of *Atractylodes lancea* growing
in Mt. Maoshan area in Jiangsu province, China. Natural Medicines
48(1):11-17(Japanese).

주 의

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