

약용자원식물 구절초의 고소득화를 위한 번식체계 확립 및 재분화 식물체의 광합성 능력증대 I. 구절초의 기내배양 및 재분화 식물체의 RAPD 분석

김정률, 유창연, 조동하, 성은수, 정재영, 김희규
강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부

Study on the Propagation System and the Photosynthetic Rate of *Chrysanthemum zawadskii* H.

I. *In vitro* Culture of *Chrysanthemum zawadskii* H. and RAPD Analysis of Regenerated Plants

Zheng Lu Kim, Chang Yeon Yu, Dong Ha Cho, Eun Soo Seong, Jae Yeong Jeong and Hee Kyu Kim
Division of Plant Sciences, College of Agriculture and Life Sciences,
Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to establish mass propagation system from the axillary bud culture of *Chrysanthemum zawadskii* H. which was used as material of medicinal plants. Shoot regeneration was better on MS medium with NAA and BA. The optimum concentrations of growth regulator for shoot regeneration differed depending on accessions of *C. zawadskii*. Shoot regeneration in Keungucheolcho was better on MS medium with NAA 0.01mg/l and BA 0.1mg/l while Hyangrobongguchocho was better with NAA 0.1mg/l and BA 0.3mg/l. Addition of NAA into medium was effective for induction of root from shoots regenerated. Shoot multiplication was more effective when 10mg/l spermine was added into medium than when other polyamines were treated into medium. Randomly and specifically amplified polymorphic DAN banding patterns based on polymerase chain reaction(PCR) analysis were used to assess the genetic variation of plants regenerated from *in vitro* culture.

Key words: axillary bud culture, shoot regeneration, RAPD analysis

緒言

구절초(*Chrysanthemum zawadskii* HERB.)는 甘菊(*C. indicum* L.), 山菊[*C. lavendulaefolium*(FISCH.) MAK.]과 더불어 오늘날 栽培菊(*C. morifolium*)의 原種으로 추정되는 식물로서(韓, 1964), 韓國, 中國, 日本, 蒙古, 시베리아에 널리 自生하며 仙母草라고 부르기

도 한다(鄭, 1972; 李, 1982). 구절초는 꽃이 아름다워 花壇用, 切花用, 造景用 등으로 다양하게 이용할 수 있으며 또한 全草가 藥草로 사용되는데 主成分으로 chrysanthemin, 多糖類 등이 포함되어 있어 健胃, 神經痛, 淨血, 食慾促進, 強壯, 補血, 中風, 婦人病 등에 효력이 있다(중국본초도감, 1982). 뿐만 아니라 꽃과 어린순은 식용으로 이용할 수 있으며 유전자원으로도 대단히 소중한 식물이다.

이 논문은 1996년도 교육부 학술연구조성비(지역개발연구)에 의해 연구되었음.

구절초에 대한 연구는 李(1967)가 細胞分類學적 연구를 하였고, 金 등(1989)과 吳(1990)가 自生分布, 形態學적 特性 및 栽培化에 관해 연구한 바 있으나, 번식방법이나 광합성능력증대에 관한 연구 결과는 거의 없다. 구절초는 實生繁殖을 하나 종자 번식시 입모율이 극히 낮다. 현재는 분근에 의한 번식 방법을 이용하고 있으나 역시 번식율이 낮고 시간과 노력이 많이 들기 때문에 대량번식을 위한 적당한 번식체계의 확립이 필요한 실정이다.

조직배양기술은 재래방법으로 번식이 느리거나 어려운 많은 식물종에 널리 이용되고 있다. 조직배양에는 유전자형, 생장조절물질, polyamine, sucrose, 교질재료 등 여러 가지 요인들이 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다. 조직배양을 통해 재분화된 식물체를 대량증식하기 위하여는 변이성이 적은 동일한 개체를 대량번식하여야 하나 육종을 위하여는 변이성이 유용하게 이용될 수 있다. 따라서 조직배양에서 얻어지는 식물체의 변이성 검정을 위하여 동위효소(isoenzyme), 염색체 분석법, RAPD 분석법 등이 이용되어 지고 있으나, RAPD 분석은 증폭에 기초를 둔으로써 목표가 되는 염기서열에 대한 정보가 없어도 인위적으로 합성한 oligonucleotide를 primer로 이용하기 때문에 몇 개의 primer를 이용해도 많은 다형성을 얻을 수 있는 장점이 있다(이 등, 1996).

본 연구는 구절초 기내배양시 식물체 분화 및 생장에 영향을 미치는 요인과 RAPD 분석을 통한 변이성 여부를 검정하고자 실시하였다.

材料 및 方法

江原道內에서 수집한 큰구절초와 향로봉구절초 2가지 種을 供試 材料로 사용하였다. 1996年 6月에 江原大學校 圃場에 栽培中인 구절초를 포트에 이식하여 온실에서 키운 것을 8月初에 腋芽를 채취하여 실험 재료로 사용하였다. 기내배양 全過程에 MS배지를 사용하였으며, PH를 5.7 ~ 5.8로 조절하여 시험관에 10ml씩 주입한 후 121℃, 1.5kg/cm² 압력하에서 15분간 멸균하였다. 치상 후에는 23±2℃, 16시간 광조건하에서 배양하였다.

1. 줄기의 分化 및 生長에 미치는 生長調節物質의 效果

온실에서 배양한 2가지 구절초 種의 줄기를 일정한 크기로 채취하여 잎을 따버리고 표면 소독한 후, 腋芽가 1개씩 볼도록 1cm 정도의 길이로 절단하여 배지에 치상하였다. 표면 소독은 먼저 수도물로 깨끗이 씻고, 70%의 에틸알콜에 30초 정도 담갔다가, Tween 20을 1 ~ 2방울 떨어뜨린 0.5% 차아염소산나트륨액(v/v)으로 10분간 소독한 다음 멸균수로 3회 세척하였다. 生長調節物質은 BA(0.01 ~ 3.0mg/l)를 단독 처리하였거나 또는 NAA(0.01 ~ 1.0mg/l)와 혼합하여 처리하였다. 배양 4주 후 분화된 줄기수, 줄기길이 및 마디수를 조사하였다.

2. 器內 發根에 미치는 옥신 및 계대배양의 效果

1次 腋芽培養에서 분화된 1世代 식물체를 재료로 사용하였다. 腋芽가 1개씩 볼도록 줄기를 1cm 정도로 절단하여 NAA농도(0.5 ~ 2mg/l)를 달리한 배지에 치상하였다. 배양 4주후 뿌리수와 뿌리길이를 조사하였다. 2次 계대배양에서 분화된 2世代 식물체를 재료로 사용하여 再次 발근 배양을 하였다. 위 실험과 동일한 방법으로 NAA농도(0 ~ 2mg/l)를 달리한 배지에 腋芽를 치상하여 배양 4주후의 뿌리수와 발근율을 조사하였다.

3. 줄기의 分化 및 生長에 미치는 sucrose 및 polyamine의 效果

Sucrose 및 polyamine의 효과를 알기 위하여 sucrose 농도를 0 ~ 10%로, polyamines 농도를 0.1 ~ 50mg/l로 달리한 배지에 腋芽를 치상하였다. 배양 4주후, 줄기길이, 마디수, 뿌리수 및 뿌리길이를 조사하였다.

4. 재분화 식물체의 순화

기내에서 分化된 식물체를 수도물로 배지를 깨끗이 씻어낸 후, 상토, 모래:vermiculite (1:1), perlite:vermiculite (1:1), peatmoss:vermiculite (1:1), peatmoss: perlite (1:1) 등 5가지 배양토가 담긴 플러그에 이식하였다. 23±2℃, 80% 습도, 16시간 광조건하에서 3주간 배양한 후, 식물체의 생존율을 조사하였다.

5. 재분화 식물체의 RAPD 분석

구절초 모본과 기내배양 4세대 식물체의 어린잎을 실험재료로 사용하였다. DNA추출은 CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)법을 사용하였고 DNA 정량은 Spectrophotometer (U-2001, Hitach)를 이용하였다. PCR 반응용액은 10ng template DNA, 2.5 μ M의 primer 4 μ l, 1.25mM의 dNTP 4 μ l, 10 \times buffer 2.5 μ l, MgCl₂ 3 μ l, 2.5U Taq polymerase 0.5 μ l(Promega)를 포함하는 반응액 25 μ l를 사용하였다. Primer는 random primer(10-mer) 5개 (Operon kit, OPA-01(CAGGCCCTTC), OPA-02(TGCCGAGCTG), OPA-08(GTGACGTAGG), OPA-14(TCTGTGCTGG), OPB-05(TGCGCCCTTC))를 사용하였다. DNA 증폭은 94 $^{\circ}$ C 5분, 94 $^{\circ}$ C 1분, 35 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 2분(45cycle), 72 $^{\circ}$ C 10분으로 실시하였으며 PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동하여 DNA band를 관찰하였다.

結果 및 考察

1. 줄기의 分化 및 生長에 미치는 生長調節物質의 效果

표 1은 BA와 NAA처리가 큰구절초와 향로봉구절초의 腋芽培養에서 줄기의 분화와 성장에 미치는 영향을 살펴본 결과다. 큰구절초에서는 BA 단독처리보

다는 NAA와의 혼합처리에서 더 좋은 줄기 분화와 성장을 보였으며, 특히 BA 0.1mg/l과 NAA 0.01mg/l 혼합구에서 가장 양호한 결과를 보인 반면, BA가 3mg/l 첨가된 모든 처리구에서는 줄기 분화가 전혀 발생하지 않아, 큰구절초의 腋芽培養에서는 3mg/l 以下の 낮은 농도의 BA가 적절하였다. 향로봉구절초도 큰구절초와 마찬가지로 BA 단독처리보다는 NAA와의 혼합처리가 더 좋은 줄기 분화 효과를 나타냈고 고농도의 BA 처리구에서는 줄기 분화가 저조하였거나 전혀 분화가 이루어지지 않았다. 반면 가장 좋은 처리효과는 큰구절초의 경우보다는 높은 농도인 BA 0.3mg/l과 NAA 0.1mg/l 혼합처리구에서 나타났다. 대량증식의 측면에서 보면, 2가지 구절초 모두 4주일마다 12배의 증식율을 보였다.

沈 등(1992)은 *Betula pendula*의 腋芽培養에서는 저농도의 BA와 NAA가 줄기 분화에 효과적이라고 하였으나, 개나리에서는 고농도(1.0 ~ 2.0mg/l)가 효과적이라 보고하여(1994) 본 실험의 경우와 마찬가지로 수종이나 품종에 따라 성장조절물질의 종류 및 농도에 대한 줄기 분화 능력이 다양할 것으로 사료된다. 또한 Chalupa(1987)는 *Populus*의 腋芽培養에서 BA 0.2mg/l과 NAA 0.01mg/l가 첨가된 배지가 新梢伸張에 가장 효과적이라고 하였고, 沈 등(1992)은 *Betula*

Table 1. Effect of NAA and BA on shoot regeneration and growth from axillary bud culture of *Chrysanthemum zawadskii* H. after 4weeks.

NAA (mg/l)	BA (mg/l)	cv. Keun		cv. Hyangrobong	
		No. of shoot	No. of node	No. of shoot	No. of node
0	0	1 \pm 0.0	5 \pm 0.3	1 \pm 0.0	7 \pm 0.4
	0.01	2 \pm 0.3	8 \pm 1.0	3 \pm 0.5	8 \pm 1.3
	0.1	2 \pm 0.4	4 \pm 0.8	2 \pm 0.3	5 \pm 0.6
	0.3	3 \pm 0.5	9 \pm 2.0	-	-
	1.0	3 \pm 0.3	6 \pm 0.8	-	-
	3.0	-	-	-	-
0.01	0.01	3 \pm 0.3	10 \pm 1.0	4 \pm 0.3	9 \pm 1.0
	0.1	4 \pm 0.3	12 \pm 0.6	1 \pm 0.3	7 \pm 1.0
	0.3	4 \pm 0.0	9 \pm 1.1	2 \pm 0.3	10 \pm 0.5
	1.0	2 \pm 0.0	4 \pm 0.3	2 \pm 0.2	7 \pm 1.4
	3.0	-	-	1 \pm 0.3	4 \pm 0.6
0.1	0.1	3 \pm 0.4	10 \pm 1.5	2 \pm 0.5	7 \pm 1.3
	0.3	4 \pm 0.3	8 \pm 1.0	4 \pm 0.4	12 \pm 1.3
	1.0	4 \pm 0.5	9 \pm 1.2	3 \pm 0.4	11 \pm 1.9
	3.0	2 \pm 0.5	4 \pm 0.8	-	-
	1.0	1 \pm 0.2	4 \pm 0.5	-	-
1.0	1.0	1 \pm 0.2	4 \pm 0.5	-	-
	3.0	-	-	-	-
LSD (5%)		0.9	2.5	0.8	2.6

Note) - : No shoot formation

pendula의 新梢 伸張은 BA 0.5mg/l와 NAA 0.01mg/l 혼합 처리구에서 가장 효과적이라고 보고하여 본 실험의 경우와 비슷하게 BA와 NAA가 효과적이었다.

2. 기내 발근에 미치는 옥신 및 계대배양의 효과

1次 腋芽培養에서 分化된 1世代 식물체를 이용하여 뿌리를 유도하기 위하여 배양을 한 결과는 표2와 같다. 큰구절초가 NAA농도가 낮은 쪽에서 발근이 양호한 반면, 향로봉구절초는 비교적 높은 농도에서 발근이 양호하여 기내 발근에 있어서의 種間의 차이를 보여 주었다. 큰구절초는 발근수는 NAA 0.5mg/l에서, 뿌리길이는 1.0mg/l에서 좋았고, 향로봉구절초는 발근수, 뿌리길이 모두가 NAA 1.0mg/l에서 좋은 것으로 나타났다. Toussaint 등(1992)은 *Eugenia smithii*의 기내발근에서 NAA 1mg/l이 첨가된 1/4 ~ 1/5배지가 가장 좋았다고 보고하여, 옥신의 함유에서 본 실험과 유사한 결과를 보였다. 수선이나 글라디올러스와 같은 식물은 生長調節物質이 없는 배지에서도 발근이 잘 되지만 대부분의 식물은 발근을 유도하기 위해서는 옥신을 첨가해야 하는데, 본 실험의 경우도 마찬가지였다.

줄기의 발근은 외부 옥신에 대한 의존도가 낮아지는 반면, 식물체 自體內의 內生 옥신 함량이 높아지는 것으로 추정된다. 따라서 세대가 경과함에 따라 분화된 식물체의 뿌리분화에는 낮은 농도의 옥신이 요구된다고 사료된다.

3. 줄기의 分化 및 發根에 미치는 sucrose의 效果

표 4와 5는 3차 腋芽培養에서 分化된 2가지 種의 식물체를 이용하여 sucrose 농도가 줄기 분화와 발근에 미치는 효과를 조사한 것인데, sucrose 함량이 줄기 분화와 발근에 상당한 영향을 미치는 것으로 나타났다. 2가지 種 모두가 저농도에서는 저조한 줄기 분화와 발근을 보였고, 다소 높은 농도에서 양호한 결과를 보였다. 큰구절초(표4)는, 4.5% 처리에서 가장 좋은 줄기 분화와 伸張을 보였고, 가장 좋은 발근 결과는 4.5 ~ 6.0% 처리에서 나타났다.

향로봉구절초(표5)의 경우에는 8.0% 처리에서 가장 좋은 줄기 분화와 발근을 보여 sucrose 농도의 효과에서도 2가지 種間의 차이를 관찰할 수가 있었으며, 生長調節物質의 경우와 마찬가지로 sucrose 함량에 대한 요구도도 향로봉구절초가 큰구절초보다 더

Table 2. Effect of NAA on the root initiation of shoots regenerated from axillary bud culture in *C. zawadskii* H. after 4 weeks.

Growth regulator (mg/l)	cv. Keun		cv. Hyangrobong		
	No. of root	Root length(cm)	No. of root	Root length(cm)	
NAA	0.5	8±1.6	1.9±0.4	0	0
	1.0	5±0.6	4.5±0.3	4±0.4	1.0±0.2
	2.0	5±1.0	0.8±0.2	4±0.5	1.7±0.3
LSD(5%)		2.4	1.4	1.4	1.2

표 3은 1次 발근 배양에서 분화된 식물체를 이용하여 再次 발근 배양을 한 결과이다. 2가지 種 모두가 1次 발근 배양시 보다는 NAA에 대한 요구가 0.5mg/l 이하로 낮아져, 世代가 경과함에 따라 계대배양되는

높았다. 그러나 본 실험에서 분화된 식물체를 배지를 바꾸지 않고 장기간 배양한 결과, 낮은 sucrose 농도에서 분화된 식물체가 높은 농도에서 분화된 것보다 더 오래동안 생존하는 것을 볼 수가 있었다. 따라서

Table 3. Effect of NAA on the root initiation of shoots regenerated from axillary bud culture in *C. zawadskii* H. after 4 weeks.

Growth regulator (mg/l)	cv. Keun		cv. Hyangrobong		
	No. of root	% of rooting	No. of root	% of rooting	
NAA	0	3±0.5	100	3±0.3	80
	0.5	3±0.4	100	4±0.3	100
	1.0	0	0	0	0
	2.0	0	0	0	0
LSD (5%)		2.7		1.5	

Table 4. Effect of sucrose concentration on shoot and root growth of axillary bud culture in Keungugelcho after 4 weeks.

Sucrose(%)	No. of node	Shoot height(cm)	No. of root	Root length(cm)
0	3±0.3	2.1±0.2	0	0
1.5	4±0	3.6±0.1	2±0.6	3.1±0.2
3.0	7±0	5.2±0.2	4±0.5	5.7±0.3
4.5	7±0	7.2±0.3	8±0.5	5.4±0.4
6.0	6±0.3	5.3±0.2	6±0.4	6.5±0.2
8.0	6±0	5.9±0.2	5±0.4	6.5±0.4
10.0	4±0.3	3.4±0.2	5±0.3	3.8±0.3
LSD (5%)	0.5	0.5	1.3	0.6

Table 5. Effect of sucrose concentration on shoot and root growth of axillary bud culture in Hyangrobong gugelcho after 4 weeks.

Sucrose(%)	No. of node	Shoot height(cm)	No. of root	Root length(cm)
0	-	0.5±0.1	0	0
1.5	3±0	1.9±0.2	2±0.3	0.8±0.1
3.0	5±0	4.6±0.2	3±0.4	4.3±0.3
4.5	5±0.3	2.4±0.2	3±0.3	3.8±0.3
6.0	5±0	3.4±0.1	5±0.4	6.1±0.4
8.0	7±0.3	7.1±0.2	8±0.4	7.8±0.3
10.0	3±0	1.9±0.2	4±0.4	7.1±0.4
LSD (5%)	0.4	0.5	0.9	0.9

구절초의 腋芽培養에 3 ~ 4.5%의 sucrose 농도가 적합할 것으로 사료된다. 유 등(1997)은 알로에 기내배양시 4.5%의 sucrose가 첨가되었을 때 줄기분화가 촉진되었다고 하였고, Gulsen 등(1991)은 *Cydonia oblonga*의 기내배양에서 3%의 sucrose 농도에서 가장 좋은 줄기 분화와 생장이 이루어졌고, 농도가 증가함에 따라 줄기의 굵기, 길이는 증가하지만 질은 저하한다고 보고하여 본 실험과 비슷한 결과를 보였다.

4. 줄기 분화와 발근에 미치는 Polyamine의 효과

표 6과 7은 3種類 polyamine을 3가지 농도별로 처리하여 줄기 분화와 발근에 미치는 효과를 조사한 것이다. Polyamine은 성장촉진작용을 하며, 세포분열, 세포신장, 발근촉진, 화분관 성장촉진, 배발생 유도, 개화유도 등에 관여하는 것으로 알려졌다 (Beanger-Novat 등, 1994; Hausman 등, 1994; 송 등, 1993). 본 실험에서 큰구절초(표6)의 경우를 보면, 줄기 분화와 신장에는 spermidine이 spermine과 putrescine보다 더 효과적인 것으로 나타났고, 根유기와 신장에는 spermine이 더 효과적인 것으로 나타났는데 적정 농도는 spermidine과 spermine 모두 10mg/l이었다. 그러나 대량증식의 차원에서 보면, 根長에서는 spermine

10mg/l 처리에 비해 저조하지만 뿌리수나 줄기 분화 및 성장에서는 spermine과 같거나 더 좋은 결과를 보여준 spermidine 10mg/l 처리가 큰 구절초의 腋芽培養에 더 적합할 것으로 사료된다.

향로봉구절초(표7)는 줄기 분화와 성장에서는 큰 구절초와 마찬가지로 spermidine 10mg/l에서 가장 좋은 결과를 보였으나, 근유기와 성장에서는 putrescine 10mg/l에서 가장 좋은 결과를 보여, 큰구절초와는 차이가 있는 것으로 나타났다. 그러나 큰구절초와 마찬가지로 대량증식이라는 관점에서 볼 때, 역시 spermidine 10mg/l이 향로봉구절초의 腋芽培養에 적합할 것으로 사료된다. 이러한 결과는 송 등(1993)이 포플러의 잎 배양에서 polyamine을 첨가했을 경우 不定芽의 형성을 증가하였으며 0.2mg/l 처리에서 효과가 가장 좋았다는 결과와 상이하여, 식물종에 따라 polyamine의 효과에 차이가 있는 것으로 판단된다.

5. 재분화 식물체의 순화

표 8은 5가지 배양토에서 2가지 구절초 種의 기내 식물체를 3주간 순화시킨 후 생존율을 조사한 결과다. 5가지 배양토 모두에서 94% 이상의 높은 활착율을 보였으며, 培養土間에는 큰 차이가 없는 것으로

Table 6. Effect of polyamine concentration on shoot and root growth of axillary bud culture in gulgelcho Keun after 4 weeks.

Polyamine (mg/l)		No. of node	Shoot height(cm)	No. of root	Root length(cm)
Control		4±0.3	2.4±0.1	2±0.3	2.0±0.2
Putrescine	0.1	5±0.4	2.6±0.1	2±0	2.1±0.3
	10	5±0.3	3.5±0.2	2±0.3	2.6±0.6
	50	5±0.4	3.0±0.2	2±0.3	2.1±0.4
Spermine	0.1	5±0.3	3.1±0.2	3±0.6	3.6±0.6
	10	5±0.3	2.8±0.3	3±0.3	4.5±0.5
	50	4±0.3	2.1±0.1	2±0.5	1.8±0.3
Spermidine	0.1	5±0.3	3.1±0.2	1±0.3	1.4±0.2
	10	6±0.3	4.4±0.2	3±0.3	2.1±0.4
	50	5±0.3	3.1±0.2	2±0.5	1.5±0.2
LSD (5%)		1.0	0.5	1.0	1.2

Table 7. Effect of polyamine concentration on shoot and root growth of axillary bud culture in gulgelcho Hyangrobong after 4 weeks.

Polyamine (mg/l)		No. of node	Shoot height(cm)	No. of root	Root length(cm)
Control		5±0.3	4.0±0.4	3±0.7	2.3±0.3
Putrescine	0.1	6±0.5	5.3±0.5	2±0.3	2.3±0.3
	10	6±0.3	5.8±0.3	4±0.5	3.6±0.4
	50	5±0.4	5.7±0.2	4±0.3	4.1±0.2
Spermine	0.1	6±0.3	6.1±0.2	2±0.3	3.1±0.2
	10	4±0.4	3.8±0.3	4±0.6	3.3±0.3
	50	6±0.6	3.7±0.3	3±0.5	2.3±0.3
Spermidine	0.1	5±0.3	5.8±0.4	2±0.5	1.0±0.4
	10	7±0.3	7.8±0.3	2±0.3	1.9±0.2
	50	6±0.3	7.0±1.6	3±0.3	2.5±0.1
LSD (5%)		1.2	0.9	1.2	0.8

나타났다. Smith 등(1990)과 Rout 등(1997)은 기내 식물체를 배양토에 이식하기 전의 기내 硬化 過程에 대해 보고한 바 있으며, 기외에 이식하기 전에 액체 배지에서 배양된 식물체는 토양 이식 후에도 높은 생존율을 보였다고 하였다. 본 실험에서는 기내 硬化 過程을 거치지 않았지만 94% 以上の 높은 생존율을 보여, 구절초의 기내 식물체 순화에는 큰 어려움이 없을 것으로 판단된다.

6. 재분화 식물체의 RAPD 분석

큰구절초와 향로봉구절초의 재분화 식물체의 유전적 변이성 여부를 조사하기 위하여 무작위로 두가지 구절초종의 4세대 식물체를 9개체씩 각각 선발하여 RAPD 분석을 수행하였다. 5개의 primer를 사용하여 그 중 band가 형성되지 않은 것과 다형성 band가 형성된 primer를 제외하고 2개의 primer(OPA 2, 14)를

Table 8. Effect of soil condition on plantlet formation from soil transfer of regeneration plant after 3 weeks.

Soils	cv. Keun		cv. Hyangrobong	
	No. of plantlet	Rate of survival(%)	No. of plantlet	Rate of survival(%)
Bed soil	15	100	15	100
Sand+Vermiculite	30	97	30	100
Perlite+Vermiculite	15	94	15	94
Peat moss+Vermiculite	15	100	15	100
Pea tmoos+Perlite	15	100	15	94

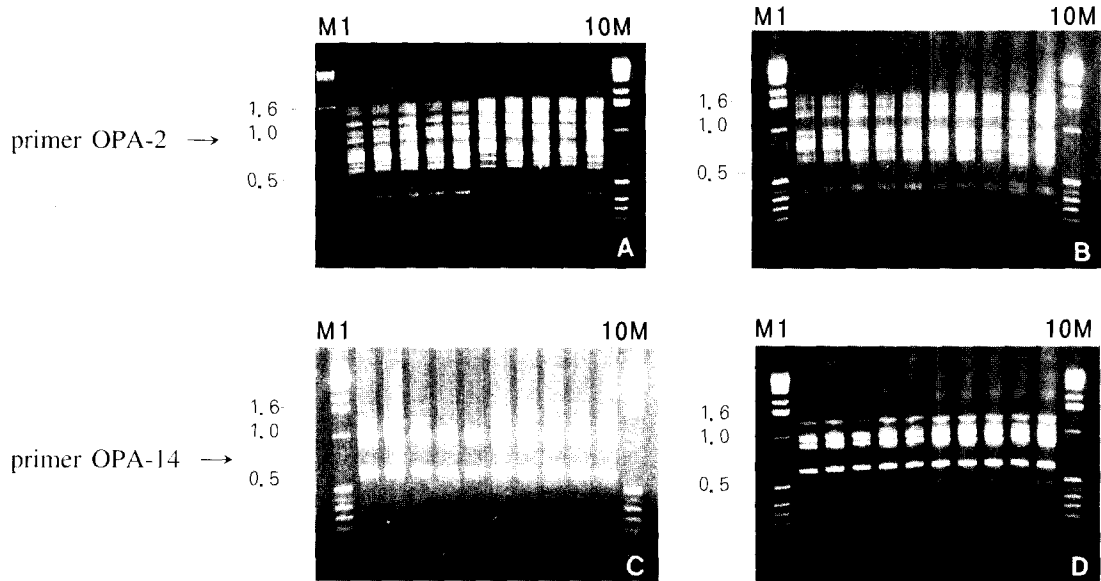


Fig. 1. RAPD analysis of plants regenerated from axillary bud of *Chrysanthemum zawadskii* H. using random primers. M: DNA ladder maker. Lane 1: Mother plant, Lanes 2~10: Regenerated plants, A and C: Keungugelcho, B and D: Hyangrobongugelcho.

선정하여 변이성을 관찰하였다. 각각의 실험은 2반 복으로 실시하였고 major band와 minor band가 형성 되었으며 그 중 재현성의 문제가 되는 minor band는 제외시킨 후 변이성 여부를 조사하였다. Primer OPA 2의 경우, 큰구절초는 모본 식물체와 재분화 식물체 가 같은 band 형태를 보여주었고(그림 1A), 향로봉구 절초는 Lane 9에 모본 식물체에 없는 1.0kb band가 나타났(그림 1B). Primer OPA 14의 경우, 큰구절초와 향로봉구절초 두 가지종 모두 모본 식물체와 재분화 식물체가 같은 band 형태를 나타냈다(그림 1C, D). 두 가지 구절초종 모두 전체 14개의 RAPD marker bands 가 관찰되었으며, 그 중 큰구절초에서는 변이가 관찰 되지 않았고 향로봉구절초에서는 1개의 변이가 관찰 되었다(1 in 14 = 7.14%). 조직배양을 통하여 기내에 서 재분화된 식물체들은 모식물체에서 나타나지 않 던 변이가 흔히 일어난다(Shepard 등, 1980; 손 등, 1996). 특히 기내배양 기간이 길어질수록 그러한 현상은 더 심하다. 따라서 기내에서 유전적으로 동일한 개체를 대량 번식하기 위하여서는 기내배양 기간을 될 수 있는 한 단축시켜 주는 것이 바람직하다.

摘要

MS배지를 기본으로하여 구절초의 腋芽培養에 미치는 生長調節物質, sucrose, polyamine의 효과와 재분화 식물체의 토양활착 및 변이성 여부에 대해 조사하였다.

1. 큰구절초는 BA 0.1mg/l과 NAA 0.01mg/l 혼합처리에서 줄기 분화와 생장이 가장 양호하였고, 향로봉구절초는 BA 0.3mg/l과 NAA 0.1mg/l 혼합처리에서 가장 좋았으며, 2가지 구절초 모두 4주일 마다 12배의 증식율을 보였다.
2. 큰구절초는 NAA 1mg/l에서, 향로봉구절초는 2mg/l에서 발근이 양호하였으며, 世代가 경과함에 따라 발근에서 육신에 대한 요구도가 낮아졌다.
3. 2가지 供試種 모두에서 sucrose는 3~4.5%, Polyamine은 spermidine 10mg/l이 줄기 분화와 발근에 적합하였다.
4. 기내 식물체의 토양 순화에서는 상토 등 5가지 배양토 모두에서 94% 이상의 높은 활착율을 보여 구절초의 토양 순화에는 큰 어려움이 없

을 것으로 판단된다.

5. 재분화 식물체의 RAPD 분석결과 4세대 식물체에서는 변이가 관찰되었다. 따라서 구절초 기내번식시 기내배양 시간을 단축하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

引用文獻

- Beanger-Novat, N., Monin, J., and Martin-Tanguy, J. 1994. Polyamines and their biosynthetic enzymes in dormant embryos of the spindle tree(*Euonymus europaeus* L.) and in dormancy break obtained after treatment with gibberellic acid. *Plant Science*, 102: 139-145.
- 鄭臺鉉. 1972. 韓國植物圖鑑. 草本部. 教育社. pp. 691-694.
- 中國本草圖鑑編輯委員會. 1982. 中國本草圖鑑 2卷. 人民衛生出版社. 雄渾社. pp. 346-347
- Chalupa, V. 1987. European hardwood. In J. M. Bonga and D.J. Durzan(eds). *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Martinus Nijhoff Publishers. 3: 224-246.
- Gulsen, Y. and Dumanoglu, H. 1991. The effect of sucrose, agar and pH on shoot multiplication and quality in *Quince* A. micropropagation. *Acta Hort*. 289: 115-116.
- 韓昶烈. 1964. 栽培菊의 推定原種에 關하여(1). 全北大論集. 6: 239-242.
- Hausman, J.F., Kevers, C. and Gaspar, T. 1994. Involvement of putrescine in the inductive rooting phase of poplar shoots raised *in vitro*. *Physiol. Plant*. 92: 201-203.
- 金在永, 洪永杓, 韓仁松. 1989. 自生菊花에 關한 研究. 1. 九折草(*Chrysanthemum zawadskii*)의 分布, 特性 및 選拔에 關하여. 農試論集. 31(2): 59-66.
- 李昌福. 1982. 大韓植物圖鑑. 鄉文社. pp. 745-755.
- 이연경, 윤용휘, 정일선, 이정순, 임상징, 송인규, 김달용. 1996. RAPD를 이용한 마늘의 유연관계 분석. *한약지*. 28(3): 332-341.
- 李永魯. 1967. 韓國產 九折草의 細胞分類學的 研究. (1) 自然雜種. 韓植誌. 10(1): 31-35.
- 吳日秀. 1990. 韓國產 九折草 (*Chrysanthemum zawadskii* HERB.) 의 特性, 自生地 環境 및 栽培化 에 關한 研究. 國光大 大學院 博士學位 論文. pp. 6-7.
- Rout, G.R., Das, P. 1997. Recent trends in the biotechnology of *Chrysanthemum*: a critical review. *Sci. Hort*. 69: 239-257.
- Shepard J.F. Bidney D, Shalin E. 1980. Potato protoplasts in crop improvement. *Science*. 28: 17-24.
- Shim, K.K, Y.M. Ha. and S.K. Lee. 1992. Mass propagation of *Betula pendula* 'Trost dwarf 3' *in vitro*. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 33(4): 329-336.
- 沈慶九, 河有美. 1994. 新品種 황금일 얼룩 개나리에 關한 研究. II. 組織培養을 利用한 大量繁殖. 韓國誌. 35(3): 279-287.
- Smith, E.F., Roberts, AV., and Mottley, J. 1990. The propagation *in vitro* of *Chrysanthemum* for transplantation to soil. 3. Improved resistance to desiccation conferred by reduced humidity. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 21: 141-145.
- 송재진, 김명원, 이순희, 강번구, 강영희. 1993. 포플러의 극성분화 기작: 내생호르몬 함량과 극성 분화에 대한 NAA와 polyamine의 영향. *식물조직배양학회지*. 20(1): 21-26.
- Toussaint, A.V., Lebrun, A. and Rogemans, J. 1992. Cutting and *in vitro* propagation of *Eugenia smithii* Poir. *Acta Hort*. 314: 77-83.
- 유창원, 김재광, 임정태. 1997. 알로에 생장점 배양시 식물체 재분화에 미치는 Polyamine, 염류농도, 당 및 gelling agent의 효과. *한약지*. 5(3): 147-151.