

은행나무 아조변이를 이용한 신품종 육성에 관한 연구

오기홍 · 정양균

(전주농림고등학교)

A study on the new yellow band Variegated Cultivar of Ginkgo biloba

Oh, Ki-Hong · Jeoung, Yang-Gun

Chon-ju ariculture high school.

적 요

아조변이를 통하여 아름다운 줄무늬 잎을 가진 은행나무를 대량 번식하기 위하여 아조변이를 일으킨 은행나무 가지 접붙이기를 실시하였다. 그 결과, 70%의 활착율을 얻었으며 줄무늬 모양에 차이는 있었으나 변이를 그대로 보였다. 잎 무늬의 차이는 대목을 옮겨 심은 후의 생육상황이 불완전했는지 혹은 유전적 특성인지는 보다 세밀한 번식 실험을 통하여 구명해야 할 과제다. 따라서 각 가지마다 정확하고 세밀한 접붙이거나 꺾꽂이 실험이 보장되어야 할 것으로 생각된다.

새 눈을 이용한 캘러스 유기에 적합한 배지는 MT 배지였으며 빛의 조사는 16시간 조명과 8시간 암 조건에서 생장속도가 빨랐고, 생장조절제는 NAA 1.0mg/l 과 zeatin 2.0mg/l 이 가장 효과적이었다. 세포배양을 위한 탄소원으로는 sucrose 3%가, 지지재로서는 agar 11 g/l 가 적당하였다. 또한 EST, PX, PCI 3가지의 동위효소로 전기영동을 해본 결과, 일반나무와 유전적 특성이 뚜렷하여 새로운 품종으로서 가치가 있으며 대사작용이 활발하여 대목으로 이용 시 결실 연한을 단축할 수 있을 것으로 사료된다.

I. 서론

1. 연구의 필요성

본 실험은 1996년부터 연구자의 고향인 전북 완주군 소양면 신원리에서 일반 은행나무(*Ginkgo biloba* L.) 잎에 여러 개의 노란 줄무늬가 들어있는 가지(사진 1) 하나를 발견하고 몇 년을 관찰한 결과, 해마다 그 가지에서는 같은 무늬를 지닌 잎이 지속적으로 발생하고 있어 아조변이임을 인식하고 형태적 특성을 조사하고 새로운 품종으로 육성하기 위한 방법을 모색하였다.

아조변이를 이용한 신품종의 육성은 과수를 비롯

하여 몇몇 목본에서 수행되기도 하지만 흔치 않은 일이다. 최근에 개나리 아조변이를 이용한 신품종 황금잎 얼룩 개나리에 관한 연구가⁵⁾ 수행되었으나 은행나무의 경우에는 본인이 조사한 바로는 아직 보고된 적이 없는 실정이다.

일반 은행나무의 경우 가을이 되어야 노란색으로 단풍드는데 비하여 이 아조변이 가지에서 나온 잎은 봄에 잎이 전개된 후, 1개월 후부터 서서히 잎에 여러 개의 노란 줄무늬를 보여 관상 가치가 매우 클 것으로 기대된다.

하지만 아조변이로 발견된 가지가 한 개 뿐이므로 무성번식을 위한 재료로는 부족한 실정이며 암수의 구별이 현재로서는 어려워 씨앗을 통한 번식도 불가능한 형편이고 종자번식을 통한 유전적 균일성도 단

정하기가 어려운 실정이다.

은행나무는 은행나무과(*Gingko aceae*)에 속하는 현존하는 유일한 식물이며 지구상에서 발견되는 목본 중 가장 오래된 나무이다.^{1, 2, 4, 5)} 은행나무는 공해에 강하고 잎이 아름다우며 수형이 수려하여 오래전부터 가로수를 비롯한 학교, 공원 등의 조경수목으로 이용되어 왔다. 또한 한방에서는 그 열매를 진해거담, 소화촉진, 진정 등의 목적으로 사용하고 있으며 잎에서는 주성분인 flavonoid가 혈액순환을 촉진시킨다고 발표하였다.⁴⁾ 최근까지의 연구에 의하면 은행잎 추출물은 말초혈액순환 장애에서 비롯되는 버거씨증, 노인성난시, 난청 및 보행장애, 사지냉감등과 뇌혈관 순환장애로 인한 뇌졸중, 노막현상, 사지마비, 그리고 혈관경화와 이로 인한 순환계 질환에 효과가 있는 것으로 보고되었^{2, 6)} 암치료시의 radiosensitizer로서의 사용가능성에 대한 보고도¹¹⁾ 있다.

은행잎 추출물에 의한 혈액 순환 개선제의 생산은 전적으로 은행잎으로부터의 추출에 의존하고 있다. 이 방법은 은행잎의 수확시기가 연중 단 1회로 제한되어 있고 공급량도 한정되어 있어 외부환경 조건의 변화에 비교적 민감하게 영향을 받으므로 이러한 단점을 극복하기 위한 방법으로 은행나무의 세포배양을 수행할 필요성이 대두되고 있다.

따라서 유전적으로 동일한 개체를 단기간에 대량 번식시킬 수 있는 방법으로는 접붙이기와 환경조절이 유리한 기내삽목을 들 수 있고 무병주를 연중 생산할 수 있는 조직배양의 기술적용도 한 방법이라 생각된다.

수목의 대량번식을 위한 액아배양에 관한 연구는 여러 연구자들에^{3, 7, 17)} 의해 보고되었으며 *Betula*,

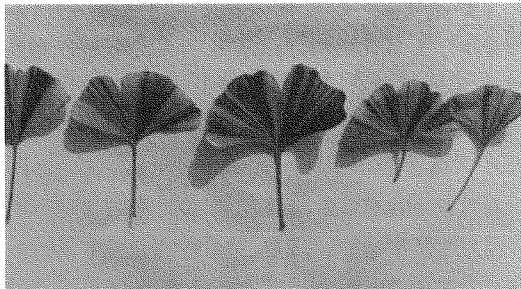


사진 1. 변이를 보이고 있는 잎

Syringa, *Rosa*, *Amwlanchier spp* 등은 상업적 목적으로 1년에 1~2만주씩 대량생산되고 있다. 또한 새로운 품종으로 인정을 받기 위해서는 기존의 것과 유전적 특성이 다른 것을 확인해야 하기 때문에 동위효소를 이용한 전기영동 방법이 이용되고 있지만 은행나무에 관한 연구는 세포배양을 통한 2차대사산물 획득을 위하여 세포배양에 관한 것이 대부분이며^{7, 3, 4)} 품종 개량이나 변종에 관한 보고는 미미한 실정이다.

2. 연구의 목적

새로운 품종을 가로수 및 학교, 공원 등의 조경에 이용할 목적으로 변이체의 발견 후 지속적으로 형태적 특성을 조사하고 접붙이기를 통한 번식 가능성을 관찰하여 2차대사산물의 안정적 확보에 필수적인 세포배양의 기초실험으로 Callus유기에 적절한 배지의 선정, 가장 적절한 탄소원과 성장조절제의 종류 및 농도를 구명하고 동위효소를 이용한 전기영동을 실시하여 신품종으로 확인하고자 수행되었다.

II. 재료 및 방법

1. 연구의 내용

형태적 특성을 조사하기 위하여 몇 년 동안 육안으로 변이의 유전적 특성이 유지되는 가를 관찰하였으며 접붙이기를 이용한 증식방법으로 한 개의 가지로 10개의 접수를 만들고 1998년부터 접붙이기를 시도하였다.

Callus유기를 통한 세포배양으로 2차대사산물의 안정적 확보를 위하여 본 연구에서는 일차적으로 callus유기에 가장 적절한 배지의 선정실험과 증식에 필요한 여러 가지 성장조절물질의 첨가와 agar의 농도 등이 캘러스 유기와 세포성장에 미치는 영향 실험으로 한하였으며 개체로의 증식은 다음 연구에서 하기로 하였다.

약효성분을 조사하기 위하여 잎의 성분을 조사하였으며 이와 기존의 은행잎과의 차이를 알아보려고 하였다. 또한 엽록소 a와 b의 비율을 알아보았으며

유전적 특성을 조사하기 위하여 몇 가지의 동위효소를 이용한 전기영동을 실시하였다.

2. 연구의 방법

가) 형태적특성

변이체의 확보를 위하여 변이 가지를 제외하고 전정을 실시하여 변이가지의 성장을 유도하면서 줄무늬의 형태적 특성을 1996년부터 육안으로 관찰하였고 2001년 봄에 전주농고 과수원에서 10개를 접붙이기하여 잎 색의 변화를 관찰하였다.

나) Callus유기

본 실험에 이용한 은행나무는 전북 완주군 소양면

신원리에서 자라고 있는 은행나무를 이용하였으며 callus유기를 위한 조직배양은 같은 은행나무 보통줄기와 변이줄기의 가지를 이용하였다. 이른봄 새눈이 트었을 때 엽맥을 포함하여 가로 세로 각각 3mm 크기로 절단하여 배양기에 치상하였다. 오염 제거를 위하여 채취한 줄기를 삼각 플라스크에 넣어 95% ethanol에 10초간 침지하고 수돗물로 세척한 다음 Laminar air flow hood에서 70% ethanol에 30초간 침지하고 NaClO 2% 용액에 10분간 침지 후 멸균수로 3회 이상 세척하였다.

Callus유기를 위하여 MS, B5, White, MT(표 1) 배지를 이용하였으며 광 조건실험은 형광등을 이용하여 3000Lux 수준에서 하루동안, 16시간, 8시간 암조건으로 실시하였다. 지지재료로 한천을 5, 8, 11, 15,

표 1. 중요한 배지의 무기성분²(mg/L)

Nutrient element	MS	White	B ₅	MT
NH ₄ NO ₃	1650	0	0	1650
KNO ₃	1900	80	2500	1900
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	0	150	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	720	250	370
KH ₂ PO ₄	170	0	0	170
(NH ₄) ₂ SO ₄	0	0	134	0
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0	16.5	150	0
KI	0.83	0	0.75	0.83
H ₃ BO ₃	6.2	1.5	3.0	6.2
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3	7	0	22.3
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6	3	2.0	8.6
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	0	0.25	0.25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	0	0.025	0.025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	0	0.025	0.025
Na ₂ · EDTA	37.23	0	37.23	37.23
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.95	0	27.95	27.95
MnSO ₄ · H ₂ O	0	0	10.0	0
Inositol	100	100	100	100
Nicotinic acid	0.5	0.5	1.0	5.0
Pyridoxine - HCl	0.5	0.1	0	10.0
Thiamine - HCl	0.1	0.1	10.0	10.0
Glycine	2.0	0	0	2.0

MS (Murashige and Skoog, 1962)¹⁷⁾

White(1963)²⁰⁾

B₅ (Gamborg, 1968)¹⁰⁾

MT(Murashige and Tucker,1968)¹⁸⁾

20g/l 을 혼합 처리하였으며 Carbon source가 세포 성장에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 sucrose, glucose, fructose, sorbitol, manitol을 30g/l 씩 처리하였다. 또한 생장조절제는 Zeatin을 0 및 1.0, 2.0, 3.0 mg/l 수준으로 하였고 NAA, IBA, 2,4-D를 0.1, 1.0, 2.0mg/l 로 준비 후 pH5.7로 조절하여 Autoclave에서 121C로 15분간 살균 후 치상하였다. 배양은 전주농고 조직배양실에서 실시하였으며 배양조건은 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였고 치상 90일간 배양하여 캐러스 유기와 세포 성장 정도를 조사하였다. 또한 배지제조에 사용하는 대부분의 시약은 Sigma Chemical Co.의 것을 이용하였고 고체배지에 사용한 agar는 Difco Laboratories제품을 사용하였으며 그 외의 시약도 특급시약을 사용하였다.

세포의 생장을 알기 위하여 세포의 무게를 측정하였는데 fresh weight(g)는 배양된 세포를 filtration [Whatman NO. 2]하여 측정하였다.

다) 동위효소 분석

1) 효소추출

동위효소분석은 수원농촌진흥청에서 실시하였으며 동위효소로 조사할 시료는 유엽 2.5g을 유발에서 충분히 마쇄하여 3차 증류수 1ml를 첨가하여 진탕한 후 12,000rpm으로 30분간 원심분리하여 상등추출물을 전기영동 시료로 사용하였다. 동위효소로는 Esterase(EST), Peroxidase(PX), Phospho isomerase (PGI) 3가지를 이용하였다. 성분분석을 위하여 변이가 나타난 잎과 캘러스로 유기된 것을 원광대학교 약학대학 생리실험실과 우석대학교에 의뢰하였다.

2) 등전점 전기영동법

전기영동법(isoelectric focusing : PAGIF)으로 Arulsekhar와 Parfitt방법을 변형하여 이용하였다. Gel의 제조는 polyacrylamide에 pH carrier로서 Pharmalyte를 1.5~2% 첨가하여 pH범위를 3~10으로 조절하였다. 1회 분석에 많은 시료를 분석할 수 있도록 수평형전기영동법을 이용하여 22cm×7cm×0.75mm slab gel에 electrode strip을 사용하여 음극에는 과포화 된

Ca(OH)₂ 용액, 양극에는 0.1% phosphoric acid 용액을 전극 buffer로 하였으며 음극으로부터 약 1cm 떨어진 곳에 electrode strip조각을 일렬로 놓은 다음 15μl의 효소 용액을 주입하여 처음 30분 동안은 100v에서 전기영동시킨 후 200~300volt에서 약 3시간 전기영동시켰다.

3) 동위효소 염색법

Esterase의 염색은 a-naphthyl acetate 40mg을 기질로 하여 phosphate buffer(0.2mol, pH7.0 250ml에 fast blue RR salt 100mg을 녹여 만든 용액에 gel을 넣어 37°C에서 약 30분간 염색하였다.

Peroxidase와 Phospho isomerase의 염색은 3-Amino-9-ethylcarbazol 100mg을 Dimethyl -formide 5ml에 녹여 Na-acetate buffer(1mol, pH 4.5) 30ml와 Calciumchloride(0.1mol) 4ml, H₂O₂ 150μl, 증류수 140ml와 혼합하여 상온에서 10분간 염색하였다. 염색이 끝난 후 gel을 5% acetic acid에 고정, 탈색한 후 band특성을 조사하였다

III. 결과 및 고찰

1. 형태적 특성

1996년 우연히 은행나무에서 노란 줄무늬가 생긴 아조변이 가지를 발견하게 되었다. 약 15년생 은행나무 중간 부근에 20cm 가량의 가지의 앞에서 사진(1)에서 보는 바와 같이 노란 줄무늬를 발견했다. 보통 잎과 비교하여 노란 줄무늬가 여러 개 들어 있었는데 줄무늬 수의 많고 적음에 차이가 있었으며 잎이 넓은 것은 갈라져 있는 것도 있었다. 봄에 잎이 전개할 때부터 노란 줄무늬는 변화가 없었으며 잎이 커질수록 더욱 선명하게 나타났고 다른 가지에 비하여 생장속도는 느린 편이었다.

많은 결가지 발생을 위하여 96년 여름에 나무의 상단부를 절단하여 생장을 촉진시키려 하였지만 다른 곳에서의 맹아만 강하게 자랄 뿐 큰 생장을 보이지 않았다(사진 2). 접목을 통한 번식을 도모하였으나 변이가지가 적어 1998년 전주농고 과수원에 10개를

접목하여 6개의 활착을 보였다. 그러나 영농학생들의 제초제 살포로 1개만이 성공하여(사진 3) 생존하였으나 토양이 좋지 않고 대목이 부실하여 성장률이 매우 저조하였지만 변이종이 나타나는 특성은 그대로 유지되고 있음을 알 수 있었다. 1999년 같은 장소에 10개를 다시 접붙이기를 시도하였으나 전부 실패하였으며 2000년에도 10개를 접목하였다. 아직까지 확실한 결과는 알 수 없지만 변이의 특성은 유지되는 것으로 사료되나 성장률이 저조한 원인을 파악할 수 없는 실정이지만 분재용으로는 가치가 있을 것으로 생각된다.

2. 2차 대사산물 생산을 위한 캘러스 유기 및 세포성장 조사

은행나무 잎에서 생산되는 유용성분은 은행잎을 1년에 한번밖에 채취할 수 없어서 재료의 안정적인 확보가 제한적인 반면에 세포배양을 통한 2차대사산



사진 2. 변이가 나타난 가지

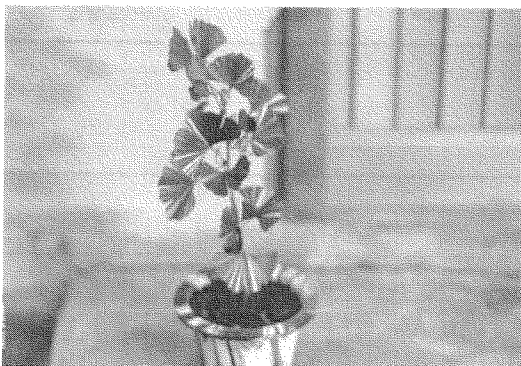


사진 3. 은행나무를 접붙이기한 모습

물의 생산은 이러한 단점을 해결할수 있는 적절한 방법으로써 현재 많이 이용되고 있다. 그러한 대안으로 조직배양방법을 이용할 수가 있는데 그 성공여부는 우선 많은 callus의 유기와 유기된 callus로부터 단기간에 대량의 세포를 번식해야 하는 바 배지 및 첨가하는 여러 가지 성장조절물질의 종류와 농도가 많은 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다. 따라서 본 실험에서는 callus 유기에 최적한 배지와 성장조절물질의 종류와 농도를 가지고 callus 유기와 세포성장에 미치는 영향을 조사하였다.

일반적으로 대부분의 경우 배지는 MS 배지를 이용하고 있는데 본 실험에서는 표 1에서 보는 바와 같이 전반적으로 MS와 MT 배지에서 다른 배지에 비하여 비교적 양호하게 callus가 유기되는 것을 관찰할 수 있었다(사진 4). 일반 잎이나 변이 종의 차이는 별로 없었지만 MT배지가 약간 변이 종에 우수한 것으로 관찰되었지만 그 차이는 미미한 편이었다. MT 배지는 다른 종류의 배지보다 표 1에서 보는 것과 같이 니코틴산, 피리독신, 티아민, 글리신이 2배에서 100배까지 많아 이것이 은행잎으로부터 캘러스 유기에 영향을 미치는 것이 아닌가 생각되며 할미꽃 배양시 MT배지가 가장 적합하다는 보고와도¹⁸⁾ 일치하는 경향이였다.

일반적으로 기내배양에서 중요한 문제는 explant의 오염방지인데 특히 목본 수종의 경우 대부분 옥외에서 explant를 취하게 되므로 오염을 줄이기 위한 노력이 크게 요구된다. 본 연구에서도 실험용 explant의 부족과 오염으로 인하여 충분한 시료의 확보가 어려웠다. 따라서 온실이나 오염을 줄일 수 있는 곳에서

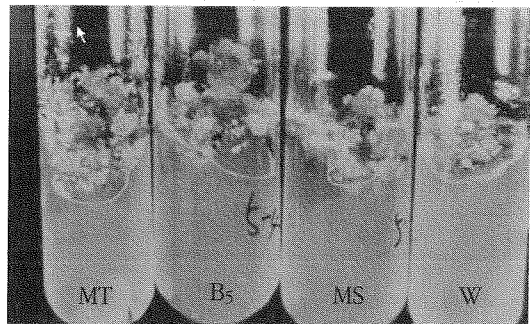


사진 4. 배지에서 캘러스 유기 상태 M

의 접붙이기한 묘목을 분에 심어 재배하면서 explant를 채취하는 방법과 또한 옥의 삽목의 어려움을 해결할 수 있는 기내 삽목 실험이 요구된다.

또한 *Ginkgo biloba*의 callus를 조기에 성장을 촉진시키기 위하여 하루종일 빛을 조사한 조건과, 16시간은 빛을 조사하고 8시간은 암 조건과 8시간 빛을 조사하고 16시간은 암 조건, 그리고 24시간 빛이 전혀 없는 조건(dark)으로 하고, 지지제로 이용하는 한천은 agar을 5, 8, 11, 15g의 4수준으로 하여 callus를 MT배지에서 배양하면서 세포의 성장을 관찰하였다.

표 2 에서와 같이 16시간 조명이 가장 callus 성장 효과에 좋았으며 그 다음으로 24시간 조명과 8시간 조명 순이었고 암 조건에서는 대부분 callus 성장이 되지 않았다. 16시간 조명 구에서 callus 성장이 양호하였으며 24시간 조명조건에서는 처음에는 빠른 성장을 보이는 듯 하였으나 시간이 흐를수록 느린 경향이었고 dark 조건에서는 성장하는 속도가 매우 느려서 육안 관찰이 어려운 정도였다. 변이체와 일반 은행잎의 차이는 일반 은행잎이 변이체보다 세포성장이 좋았는데 이것은 변이체가 가지고 있는 유전적 특성이 다른 것으로 판단되며 변이체에 맞는 방법이 모색되어야 할 것으로 생각된다.

이러한 실험에 있어서 callus 성장이 빛에 의해서 촉진된다는 보고와³⁾ 동일한 결과를 설명하고 있다.

세포배양에서 적절한 성장조절제의 종류와 농도를 알아보기 위하여 성장조절제를 Cytokinin류로서 zeatin 0, 0.1, 1.0, 2.0mg/l 과 Auxin류로서 NAA, IBA, 2,4-D를 각각 0.1, 1.0, 2.0mg/l 을 혼합 처리한 결과, zeatin의 경우 처리를 하지 않았을 때에는 NAA 2.0mg/l 에서만 저조한 성장을 보였을 뿐 전혀 생장이 되지 않았고, 1.0mg/l 에서 가장 효과가 좋았으며 2.0mg/l 와 같이 나 농도가 높아지면 오히려 생장이 억제되었다(표 4).

Auxin의 경우 NAA가 IBA나 2,4-D보다 효과가 좋은 것으로 관찰되었고 IBA나 2,4-D는 별 차이가 없었으며 그 효과도 미비하였다. 따라서 본 실험의 결과 세포성장을 위해서는 zeatin 1.0mg/l 에 NAA 2.0mg/l 의 혼합처리가 가장 효과가 있는 것으로 조사되었다.

Chalupa는⁷⁾ *Populus Tremula*에서 NAA가 매우 효과적이라 하였고 *Ginkgo biloba* callus에 적합한 photohormone을 결정한 이 등의⁶⁾ 보고에서는 Kinetin을 사용하지 않고 NAA만을 사용하는 것이 callus성장에 유리하다고 하였는데 이런 결과는 NAA를 이용한 본 실험과도 일치하지만 zeatin과 NAA를 혼합처리하였을 경우 효과가 더 좋았던 결과와는 다른 결과를 보였는데 Kinetin과 zeatin의 차이에서 오는 것이 아닌가 생각되며 좀더 다양한 혼합과의 실험이

표 2. 캘러스 유기에 미치는 배지의 영향.

culture	media	MS	B ₅	White	MT
callus induction	control	+++	++	++	+++
	mutant	++	+	+	+++

+++ : good ++ : moderate + : poor

표 3. 세포성장에 미치는 광과 한천 농도의 영향

Illumination conditions (ours/day)	24				16				8				dark				
	5	8	11	15	5	8	11	15	5	8	11	15	5	8	11	15	
Agar(g/l)																	
callus growth	control	+	++	++	+	+	+	+++	+	+	++	+	-	+	-	-	-
	mutant	+	+	+		+	++	+++	+	+	++	+		-	-	-	-

+++ : good ++ : moderate + : none

요구된다. 한편 성장조절제 처리에 따른 일반종과 변이종 사이의 성장 차이는 나타나지 않았다.

Carbon source 종류가 세포성장에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 sucrose, glucose, fructose, sorbitol, manitol을 30g/l 씩 처리하였던 결과(표 5) sucrose가 가장 우수하였고 다음이 glucose, fructose로 비슷하였으나 sorbitol 과 manitol의 경우 세포성장을 저해하였다(표 5). 또한 sucrose, glucose, fructose를 첨가한 배

지에서 자란 세포는 연두빛으로 성장하는데 비해 sorbitol, manitol에서 자란 세포는 갈색으로 변하는 것을 볼 수 있었다. 이 실험 결과 sucrose가 세포성장에 가장 적합한 carbon source로 생각된다.

세포성장에 미치는 sucrose 농도의 영향에서 탄소원으로서 sucrose는 세포배양 배지 성분 중 가장 중요한 성분의 하나이다. 탄소원의 초기농도가 세포성장에 미치는 영향에 대하여 알아보기 위하여 다양한 농도의 sucrose를 넣어준 MT배지에 은행나무 세포를 배양하여 배양 30일 후 시료를 채취하여 분석하였던 결과(표 6) sucrose농도가 3%일 경우가 세포성장이 가장 좋은 것으로 밝혀졌으며 6%정도까지는 어느 정도 세포성장을 하였지만 그 이상 농도가 높을수록 세포성장이 저해되는 것으로 나타났다. 일반적으로 당 농도를 높여주는 것이 이차대사 산물생산에 도움이 된다고 보고한바^{9, 10)} 있다. 이는 당 농도의 영향이라기 보다는 배지내의 고농도의 당이 삼투활성을 높이는 물질로 작용하기 때문으로 생각된다. 이 등은⁴⁾ sugar농도에 의해 배양세포의 fresh weight와 dry

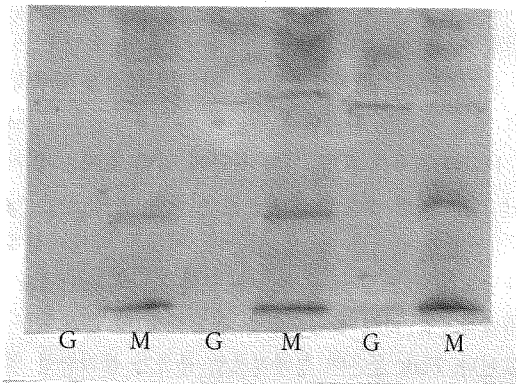


사진 5. Diagram of gels for esterase

표 4. 캘러스 성장에 미치는 성장조절제의 영향

zeatin(mg/l)		NAA(mg/l)			IBA(mg/l)			2,4-D(mg/l)		
		0.1	1.1	2.0	0.1	1.1	2.0	0.1	1.1	2.0
0	control	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	mutant	-	-	+	-	-	-	-	-	-
0.1	control	+	+	+	-	-	+	-	+	+
	mutant	+	+	+	-	+	+	-	-	-
1.0	control	++	++	+++	+	+	+	+	+	+
	mutant	++	++	+++	+	+	+	+	+	+
2.0	control	+	++	+	-	+	+	-	+	+
	mutant	+	++	+	-	+	-	-	+	+

+++ : good ++ : moderate + : none

표 5. 탄소원의 종류가 캘러스 성장에 미치는 영향(생체중 g).

Explant	Carbon source				
	sucrose	glucose	fructose	sorbitol	manitol
control	9.4	7.8	7.6	3.3	2.8
mutant	8.7	7.7	7.7	3.2	2.7

weight의 비가 변화함을 보여주었고, *Phytolacca* 배양에서 sucrose 농도 증가에 따라 세포수가 증가하고 세포 크기가 감소하는 현상이 관찰되었다고 하였는데 본 실험에서도 은행나무 세포배양에서 배지의 sucrose 농도가 증가할수록 cell size 또는 cell aggregation size가 감소하는 것으로 관찰되어 같은 결과가 아닌가 생각된다.

3. 식물체의 동위효소 분석

7월에 전개된 잎을 가지고 경기도 수원에 있는 농

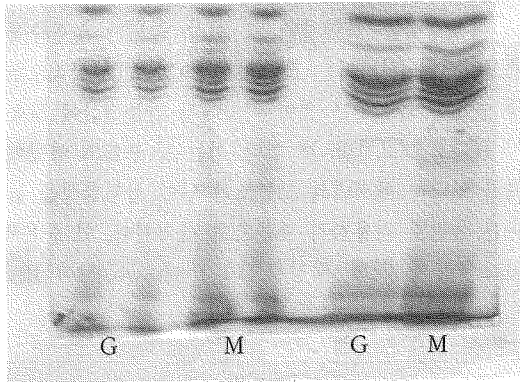


사진 6. Diagram of gels for peroxidase

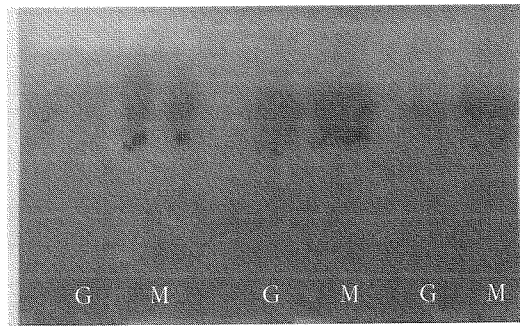


사진 7. Diagram of gels for pospophisomeras

업과학기술원에서 Esterase(EST), Peroxidase(PX), Pospophisomerase(PGI) 동위효소를 이용하여 동위효소 분석을 해본 결과, EST banding pattern을 보면 일반 잎은 밴드가 보이지 않으나 변이체에서는 Rm 0.2~0.3과 1.0 및 3.0 부근에서 3개의 분명한 밴드를 볼 수 있는바 물질대사작용의 촉매 역할을 하는 것으로 뿌리와 열매의 대사작용을 촉진할 것으로 사료된다. PX의 경우 잎 부분에 위치는 비슷하지만 일반 잎보다는 매우 굵고 진한 밴드를 볼 수 있다. 이것은 산화와 환원효소로 역시 물질대사작용이 활발할 것으로 사료되어 대목으로 이용 시 결실현령을 단축할 수 있을 것으로 사료된다.

PGI의 경우에는 중 상위 부근에 일반 잎에는 없거나 매우 약한 밴드가 보이는데 비하여 변이체는 매우 선명한 밴드를 볼 수 있는바, 이것은 해당과정에 해당되는 것으로 글루코스와 프락토스의 feed back 촉매작용을 하여 물질순환을 원활하게 할 것으로 사료된다. Park 등은¹⁹⁾ 형태적으로 분류가 불가능한 영지버섯을 대상으로 동위효소를 관찰하여 분류 및 유전적 특성을 밝힌바 있으며 특히 균사의 esterase 동위효소 pattern은 영지버섯 균주분류에 매우 적합하다고 하였다. 또한 본인의 경우에도 할미꽃의 약에서 유기된 반수체와 2배체의 전기영동 결과 단백질에 뚜렷한 차이를 관찰할 수 있었으며, Clements는⁸⁾ 감귤 과실에서 단백질을 전기영동하여 품종구별에 이용할 수 있다고 하는 등의 기존 발표들을 볼 때 이 은행나무에서도 동위효소들의 banding pattern이 일반은행나무와 상이하므로 유효약용성분이나 함량이 다를 것으로 생각되며 이러한 결과를 토대로 새로운 품종으로 육성할 수 있을 것으로 사료되어 현재 품종등록을 진행중 이나 우리나라의 품종등록이 곡물과 채소류에 국한되어 있어 조경수들은 아직 시간이 필요할 것 같다.

표 6. 켈러스 성장에 미치는 sucrose 농도의 영향(생체중, g)

sucrose/concentration(%)		0	3	6	9	12	15	18
fresh weight(g)	control	1.3	12.1	8.5	4.4	3.8	1.5	0.7
	mutant	1.1	11.0	8.6	4.3	3.7	1.2	0.5

IV. 결론

본 연구는 은행나무의 아조변이인 노란 줄무늬 잎 은행나무의 형태적 특성을 관찰하고 은행잎으로부터 2차대사산물을 안정적으로 확보하기 위한 수단으로 잎으로부터 callus 유기 및 세포배양을 하였으며, 품종 등록을 위한 유전적 특성을 알기 위하여 동위효소로 전기영동을 시행하던 바 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

가. 변이종 은행은 잎이 전개되면서부터 서서히 잎에 줄무늬가 생겨 가을까지 잎에 줄무늬가 계속되므로 조경용과 가로수, 분재용으로 관상 가치가 매우 클 것이다.

나. 2차 대사산물 생산을 위한 세포증식에서 callus 유기는 MT배지가 다른 배지에 비하여 우수하였으며 빛의 조사는 16시간 조명과 8시간 암 조건에서 생장 속도가 빨랐고, 생장조절제는 NAA 1.0mg/l 와 zeatin 2.0mg/l 가 가장 효과적이었다.

다. 세포배양을 위한 탄소원으로는 sucrose 3%가 적당하였고 지지재로서는 agar11g/l 가 적당하였다

라. EST, PX, PGI 3가지의 동위효소로 전기영동을 해본 결과 일반 은행 나무와는 유전적 특성이 뚜렷하여 새로운 품종으로서 가치가 인정된다.

마. 또한 대사작용이 활발하여 대목으로 이용 시 결실 연한을 단축할 수 있을 것으로 사료된다.

인용 문헌

1. 대한민국 특허청, (KR) 특허 공보(B1) 제129 호
2. 배삼권, 김주선, 곽예종, 김기협, 「은행잎의 Flabonoid 성분에 관한 연구」 생약학회지, 21(2), 111~120
3. 이봉춘 이석구, 김재현 (1987), 환배롱나무의 기내배양에 의한 大量増殖, 임육연보 23: 128~131
4. 이원규, 유연우, 변상요, 정현관(1993), 「*Ginkgo biloba* 세포 배양에서 배지 및 배양조건이 세포 성장 및 Flavonol glucosides 생합성에 미치는 영향」, 한국 생물 공학회지, 8(1): 55~61

5. 조동범(1989), 수리적 분석에 의한 개나리속 식물의 분류학적 연구, 서울대학교 박사 학위 논문 52p
6. Auguet, M., De Feudis, F. V., Clostre, F.(1982)m "Effects of *Ginkgo biloba* on arthropod smooth muscle responses to vasoactive stimuli", *Gen pharmac.*, 13, 169~171
7. Chalupa, V.(1981), 1981 Clonalpropagation of broad-leaved forest trees in vitro, *Comm. INS. for. Cech.* 12, 255~271
8. Clments, R. L.(1996), Disc electrophoresis of citrus fruit proteeins, *Phytochemistry.* 5: 243~249.
9. DIRR, M.A.(1990), The reference manual of woody plant propagation. Stipes Publishing company, p. 125
10. Gamborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima (1968), Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells, *Exp. Cell.* 50: 151~158.
11. Ha, S. W., Yi, C. J., Seo, E. H., Park, C. L.(1994) "Radiosensitization effect of *Ginkgo biloba* extract —A new radiosensitizer" '94 Annual Meeting of the Cancer Research Center and 3rd CRD Cancer Symposium on Transmembrane Signal Transduction 99~102
12. Jones Jr. S. B., Luchsinger, A. E., "Plant Systematics" 2nd edn, 281~283
13. Kyte, L. (1990), Plants from Test tubes: An introduction to micropropagation, Revised ed. Timber Press, Portland Oregon, p. 145
14. Kreuzaler F. and K. Hahlblock(1973), *Phytochemistry*, 12, 1149~1152
15. Mantell, S. H. and H. Smith (1983), *Plant Biotechnology*(S. H. mantell and H.Smith, eds) p. 75, Cambridge University Press, Cambridge.
16. McCown, B. H. (1989), The biotechnology of urban trees *J. Arboriculture* 15(4) : 77~83
17. Murashige, T. and F. Skong.(1962), A revised

- medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures, *Physiol. Plant.* 15: 473~496
18. Murashige, T. and D. P. H. Tucker(1969), Growth factor requirement of citrus tissue culture, *Proc. 1st. Int. Citrus Symp.*, 3: 1155.
19. Park, W. M., Y. S. Lee., S. H. Kim and Y. H. Park(1986), Characterization of isolater or *Gonogerma lucidum* by electrophoretic of enzymes, *Kor. J. Mycolo.* 14: 93~99.
20. White, P. R, The cultivation of animal and plant cells, The Ronald Press, New York. p. 228.