

최 종
연구보고서

형질전환 기술에 의한 호접란
신품종 육성 및 대량생산 기술 개발
Development of New Transgenic Cultivars
and Mass Propagation technique in *Phalaenopsis*

건국대학교

(원예연구소, (주)KV 바이오 유전육종 연구소)

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “형질전환 기술에 의한 호접란 신품종 육성 및 대량생산 기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 11월 14 일

주관연구기관명 : 건국대학교

총괄연구책임자 : 김 두 환

세부연구책임자 : 김 두 환

연 구 원 : 최 영 열

협동연구기관명 : 원예연구소

협동연구책임자 : 김 재 영

연 구 원 : 김 미 선

연 구 원 : 이 영 란

연 구 원 : 김 숙 자

연 구 원 : 김 수 자

협동연구기관명 : (주) KV바이오

협동연구책임자 : 모 숙 연

연 구 원 : 손 정 희

요 약 문

I. 제 목

형질전환 기술에 의한 호접란 신품종 육성 및 대량생산 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

세계 화훼 시장규모는 400억불이며 교역량은 100억불로 매년 크게 증가 하고 있다. 호접란은 다른 작물에 비하여 고가이면서 물류비용이 저렴하고 잔류농약문제가 없어 통관이 용이하므로 미국, 일본, 유럽 등으로의 수출 전망이 매우 밝다. 호접란의 세계 시장규모는 북미 5억불, 아시아 3억불, 유럽 4억불 정도이며 매년 크게 증가하고 있으며 또한 국내 호접란의 시장규모는 수백억 원으로 최근 크게 증가하고 있다. 그러나 국내 품종의 결여와 우수묘 생산 부족으로 아직 국내묘 보다 대만 등의 외국묘를 더욱 선호하고 있다. 국내 소비와 수출을 위해 대부분의 호접란 묘를 대만, 중국, 일본, 네덜란드 등에서 수입하고 있으며, 높은 수입 의존도에 의한 저품질 묘 사용에 따라 농가 피해가 많다. 그러므로 수입 종묘 사용으로 인한 로얄티 지불로 부가가치가 낮아짐으로써 수출경쟁력이 약화되는 것을 막기 위해서는 우리나라 고유의 신품종 개발이 시급히 요구되고 있다. 그러나 전통적인 교배육종의 방법으로는 품종 육성에 한계가 있으므로 유전공학을 이용하여 내저온성, 내병성, 조기개화, 화색발현 등의 유전자를 도입하여 신품종을 육성함으로써 수출 경쟁력을 크게 증가시킬 수 있으며 육종 효율을 높일 수 있을 것이다. 따라서 본 과제에서는 호접란에 형질전환 방법을 이용하여 유용 유전자인 조기개화 유전자와 화색관련 유전자를 도입하였으며 다른 화색에 비해 대량 번식이 어려운 것으로 알려진 호접란 홍화(dark pink) 품종을 산업화 하기 위한 효율적인 대량생산체계를 구축하였다. 따라서 이러한 고품질 호접란 품종육성 기술 개발은 향후 국가간 화훼교역량이 증가되고 신품종 및 유전자에 대한 보호가 증가하는 WTO, UPOV 체제 하에 수입대체 뿐 아니라 수출경쟁력에 있어 우위를 차지할 수 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 형질전환 기술에 의한 호접란 신품종 육성 및 대량생산 기술 개발이라는 주제 하에 세부적으로 크게 3가지로 첫째, 국내·외 원종 및 우수 유전자원 수집과 선발, 둘째, 호접란 형질전환 체계 구축 및 형질전환체 선발, 셋째 조직배양 방법에 의한 pink color 호접란의 효율적 대량번식법 개발로 나누었다. 이를 위하여 건국대가 주관 연구기관으로 협동연구기관인 원예연구소 및 KV바이오(주)와 협력하였다, 각 세부과제별 연구개발 내용 및 범위는 아래와 같다.

제 1 세부과제인 원종 및 우수 유전자원 수집과 선발의 경우, 국내·외 수집 계통 및 품종의 특성조사 및 DB화하였고 우수 유전자원의 교배조합에 이용하여 품종을 육성하고 우수 계통을 선발하여 대량생산용 모주의 KV 바이오(주)로 분양하였으며 수집 유전자원의 내한성을 검정하였다.

제 2 세부과제인 유용 유전자의 형질전환 기술에 의한 신품종 육성의 경우, *Agrobacterium*과 Gene gun을 이용한 형질전환 조건을 확립하였고, 개화조절 유전자(COG, FLC gene)와 화색관련 유전자(CHS gene)가 GUS, PCR, RT-PCR을 통해서 형질전환 되었음을 확인하였으며, 획득한 형질전환체의 선발 및 대량생산된 pink color 조직배양묘의 온실 테스트를 통해 생육특성을 검사하였다.

제 3 세부과제인 Pink color 호접란의 조직배양에 의한 효율적 대량번식법 개발의 경우, 호접란 대량증식의 재료가 되는 PLB의 효율적 유기 및 증식법과 재분화 체계를 개선하고 대량증식에 적합한 우수 호접란 식물체(모주)를 선발하였으며 호접란 대량생산의 효율적 증가를 위한 여러 가지 방법들을 개발하였으며 이러한 방법으로 획득한 클론묘를 온실 테스트를 통해 생육특성을 검사하고자 하였다.

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

2003년 국내 수집 50계통, 국외 44종, 2004년 국외수집 13품종, 2005년 국내수집 35 품종 등 총 142계통 및 품종 특성조사 및 DB화하여 우수 유전자원의 교배조합에 이용하여 품종을 육성 하였고 그 가운데 우수한 5계통을 선발하여 대량생산용 모주의 KV 바이오(주)로 분양하였으며 수집 유전자원의 내한성을 검정하였다.

*Agrobacterium*을 이용한 형질전환 방법을 이용하여 개화조절 유전자(COG, FLC gene)와 화색관련 유전자(CHS gene)가 삽입된 3개의 형질전환체를 확보하였고 이들은 현재 T1 세대를 얻기 위해 온실에서 재배 중이다. 알려진 대로 호접란의 생육cycle이 길기 때문에 다음 세대를 얻는데 다소 시간이 걸릴 것으로 생각이 되며 차후 T세대 육종을 통해 품종으로 개발, 출원 할 예정이다.

Pink color 호접란의 액아배양 시 소독제 및 항생제에 의한 소독효과를 구명하고 Pink color 호접란의 생육 단계별 최적배지, 페놀 발생 억제 방법, 배양환경, 3차 정식 단계시 재분화 효율 증진, 정식 단계시 계대배양 축소에 의한 배양성 증가에 관하여 구명하였다. 최종적으로 pink color 조직배양묘의 온실 테스트를 통해 생육특성을 검사한 결과 돌연변이 없는 우수한 클론묘임을 알 수 있었다.

SUMMARY

(영문 요약문)

I. Title

Development of New Transgenic Cultivars and Mass Propagation technique in Phalaenopsis

II. Purposes and Needs of Research

World market of flowers is 49 billion dollars and trade is 10 billion dollars. Export of Phalaenopsis to the developed countries such as USA, Japan, European countries, etc. is promising due to the its high price, low transportation cost, and less problem of plant quarantine. Domestic market of Phalaenopsis is tens of billion won and also growing rapidly. However, the imported seedlings from Taiwan and the other countries are more favored than the domestic ones because of the lack of cultivars and seedlings with good quality. Therefore, cultivar development with biotechnological and traditional methods is urgently required. Through this research project, Flowering and flower color related genes were introduced into phalaenopsis by transformation, efficient micropropagation system of dark pink colored phalaenopsis were established.

III. Contents and Scope of Research

The subject of this research project is development of new transgenic cultivars and mass propagation technique in Phalaenopsis. It has three components; 1) collection and selection of domestic and foreign genetic resources, 2) establishment of transformation system and selection of transgenic plants, 3) development of efficient micropropagation system for dark pink colored phalaenopsis. During the first year domestic and foreign genetic resources were collected and characterized.

Transformation condition was established for *Agrobacterium* and gene gun methods. Sterilization methods were established for the dark pink colored phalaenopsis. During the second year selected germplasm was evaluated for cold tolerance. Flowering(COG, FLC) and color(CHS) related gene were transformed and confirmed by GUS, PCR and RT-PCR analyses. Optimum medium and environment for the micropropagation of dark pink colored phalaenopsis was established. During the third year the transgenic and the micropropagated plants were characterized in the greenhouse.

IV. Results and Application

The total number of collected germplasm were 142 lines from domestic and foreign countries for 3years(2003 to 2005). The fifty lines and 35hybrids were collected from domestic in respectively 2003 and 2005. In addition to, 44 species were collected from foreign country in 2004. These were evaluated for the important characteristics and databased. They were utilized as parents for breeding of new hybrids. The selected five excellent lines were sent to the KV Bio corporation for in vitro mass propagation. The five lines were as follows : 03PN04, 03PN13, 03PN15, 03PN20, 03PN37.

The collected germplasm was tested for the cold resistance at 15/10C(day/night) temperature. Highly cold resistant lines were Taisuco Yellow bay, Doritis, Ever Spring Pioneer Champion, Brother spring Dancer, Brother spots, Brother Green Jode, Minhó- Princess, Golden Leopard Cheaters. Moderately cold resistant lines were Taida Salu, Champion Girl, Ever-spring King, Maki Watanabe, Sogo Smith, Sogo Beach, Yupin Giant. In this low temperature, these hybrids were not effected on plant growth although the leaf color of them was changed to light red from green. Very weak lines in this cold temperature were Brother Julius, Nobby's Amy, Little Angel, Brother Success.

Transgenic plants with the flowering(COG, FLC) and color(CHS) related genes are

growing in the greenhouse and will be evaluated for the phenotype. They will go through the T generation to produce the GMO cultivars.

Sterilization methods during bud culture were established for the dark pink colored phalaenopsis. Optimum medium and environment for the micropropagation was established, and Improvement of regeneration and productivity was studied. The micropropagated plants were characterized in the greenhouse and found to be superior without mutation.

CONTENTS

Part I . Introduction of Research Project-----	14-17
Chapter 1. Need for Research and development-----	14
1. Technical Aspects-----	14
2. Economical and industrial Aspects -----	15
Chapter 2. Research Objectives and Scopes -----	15-17
1. Research Objectives-----	15-16
2. Research Scopes-----	16-17
Part II . Present View of Technology in Domestic and Foreign Countries-----	18-19
Part III. Results and Discussion of Research Program-----	20-48
Chapter 1. The collection and Selection of <i>Phalaenopsis</i> Species and Hybrids	
1. Research Methods-----	20
2. Research Results-----	20-48
1) The evaluation of Characteristic about Collected Germplasm-----	20-39
2) The test of Cold Resistant about Collected Germplasm-----	40-48
Chapter 2. Breeding New Cultivars of <i>Phalaenopsis</i> by Transforming with Useful Genes	
1. Research Methods-----	49-51
2. Research Results-----	52-66
1) <i>Agrobacterium</i> mediated Transformation-----	52-56

2) Gene gun mediated Transformation-----	57-58
3) Selection and Regeneration of Transformed Plans-----	59
4) Confirmation of Transformed Plants-----	59-64
5) Analysis of transgene Expression in Transformed Plants-----	64-65
6) Stability Analysis of Transgenic Plants in Green house Conditions---	65-66
 Chapter 3. Development of efficient tissue culture protocols for mass propagation of Pink Colour <i>phalaenopsis</i>	
1. Research Methods-----	67-68
2. Research Results-----	69-92
1) PLB Induction, Multiplication and Improvement of Regeneration-----	69-72
2) Plant selection for the micropropagation-----	72-77
3) Establishment of sterilization for bud culture -----	77-78
4) Optimum medium for the micropropagation-----	79-83
5) Overcoming Inhibitory Effects of Phenolic Compounds-----	83-85
6) Development of optimum environment for micropropagation-----	85-87
7) Improvement of regeneration for tissue culture -----	88-90
8) Increase in productivity by decrease in steps-----	90-91
9) Stability Analysis of Seedlings in Green house Conditions-----	92
 Part IV. Achievement and Contribution Levels of Results-----	
Chapter 1. Achievement Levels of Results-----	93
Chapter 2. Contribution Levels of Results-----	94
 Part V. Application of Results-----	
Chapter 1. Importance of Results and Necessity	95-96

of Follow-up-----	95
Chapter 2. Proposal for Cultivar-----	96
Chapter 3. Application to Other Research Direction-----	96
Part VI. Scientific and Technological Information	
Collection from Foreign Country-----	97
Part VII. Reference-----	98-102

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요-----	14-17
제1절 연구개발의 필요성-----	14
제1항 기술적 측면-----	14
제2항 경제·산업적 측면-----	15
제2절 연구개발 목적과 범위-----	15-17
제1항 연구개발 목적-----	15-16
제2항 연구 범위-----	16-17
제 2 장 국내외 기술개발현황-----	18-19
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과-----	20-92
제1절 세부과제 I :	
원종 및 우수 유전자원의 수집과 선발	
제1항 연구 방법-----	20
제2항 연구 결과-----	20-48
가. 수집 유전자원의 특성평가-----	20-39
나. 수집 유전자원의 내한성 검정-----	40-48
제2절 세부과제 II :	
유용 유전자의 형질전환 기술에 의한 신품종 육성	
제1항 연구 방법-----	49-51
제2항 연구 결과-----	52-66
가. <i>Agrobacterium</i> 에 의한 유용 유전자의 형질전환-----	52-56
나. Gene gun에 의한 유용 유전자의 형질전환-----	57-58
다. 형질전환 식물체의 기내선발 및 재분화-----	59
라. 형질전환 식물체 확인-----	59-64
마. 도입유전자 발현검정-----	64-65

바. 선발 및 증식된 형질전환 조직배양묘 온실 테스트-----	65-66
제3절 세부과제 Ⅲ: Pink color 호접란의 조직배양에 의한 효율적 대량번식법 개발	
제1항 연구 방법-----	67-68
제2항 연구 결과-----	69-92
가. PLB 유기 및 증식법과 재분화 체계 개선-----	69-72
나. 대량증식에 적합한 우수 호접란 식물체 선발-----	72-77
다. 호접란 액아배양시 소독제, 항생제 소독효과 구명-----	77-78
라. 생육단계별 최적배지 개발-----	79-83
마. 페놀 발생 억제 및 제거 방법 개발-----	83-85
바. 배양환경(광질, 광주기, 온도 등) 개발-----	85-87
사. 3차 정식 단계시 재분화 효율 증진-----	88-90
아. 정식 단계시 계대배양 축소에 의한 배양성 증가-----	90-91
자. 선발 및 대량생산된 pink color 조직배양묘-----	92
온실 테스트를 통한 생육특성 검사	

제 4 장 목표달성도 및

관련분야에의 기여도-----	93-94
-----------------	-------

제1절 연구개발목표의 달성도-----	93
----------------------	----

제2절 관련분야의 기술발전예의 기여도-----	94
---------------------------	----

제 5 장 연구개발결과의 활용계획----- 95-96

제1절 본 연구결과의 중요성 및 추가연구의 필요성-----	95
----------------------------------	----

제2절 품종화 추진방안-----	96
-------------------	----

제3절 타연구에의 응용-----	96
-------------------	----

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	97
제 7 장 참고문헌-----	98-102

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구 개발의 필요성

제1항 기술적 측면

호접란은 열대·아열대가 원산지인 우리나라에는 육종을 위한 우수 모본이 현저히 부족한 실정이다. 뿐만 아니라 자체 기술개발 및 품종육성이 매우 부진하여 국내 소비와 수출을 위해 대부분의 품종을 대만, 일본, 네덜란드 등에서 수입하고 있다. 우리나라의 주요 수출 화훼류(장미, 백합, 국화, 선인장, 난 등) 중 접목 선인장을 제외한 대부분이 수입 종묘를 사용함으로써 로얄티 지불 등에 의하여 부가가치가 낮아지며 중급이하의 종묘가 수입되어 수출경쟁이 크게 약화되었다. 최근 농림부 및 지방자치단체에서도 호접란 수출을 적극 지원하고 있으나 우수 품종 결여로 수출신장에 큰 장애가 되고 있다. 우리나라도 세계 화훼시장을 개척하기 위해서는 우리나라 자체의 세계적 신품종 육성이 가장 중요한 과제이다.

국내 호접란 재배에 사용되는 실생묘의 대부분이 대만에서 수입되고 있으며, 일부만이 우리나라 자체에서 생산되고 있으나 낮은 상품성과 불안정한 생산량으로 인한 인건비 가격 폭락, 경매 유찰 등으로 인해 재배자들의 소득증대에 큰 타격을 주고 있다. 따라서 전문육종가를 통한 신품종을 육성함으로써 균일하고 우수한 종묘를 국내농가에 공급하는 것이 매우 시급하다. 그러나 전통적인 교잡육종 방법으로는 한계가 있으므로 유전 공학 방법인 *Agrobacterium*과 gene gun을 이용한 형질전환을 통하여 내저온성, 내병성, 조기개화, 화색발현 등의 유용 유전자를 도입하여 신품종을 육성함으로써 수출 경쟁력을 크게 증가시킬 수 있으며 육종 효율을 높일 수 있을 것이다.

조직배양묘는 화색, 화형, 소화수 등의 형질이 균일하고 우수하여 개화주의 상품화율이 높고 계획적 생산이 가능하므로 최근 그 수요가 급증하고 있다. 그러나 조직배양묘는 일본과 네덜란드의 소수 기업에서만 생산이 가능하고 가격이 실생묘에 비해 3-6배 높으며 또한 최근 값싼 조직배양묘가 동남아에서 수입되거나 돌연변이 문제가 매우 심각하여 농가에 피해가 크다. 따라서 대량생산기술 개발에 의한 우수 조직배양묘 공급 및 대량생산이 호접란 업계에 매우 절실히 요구되고 있다. 세계적으로 품종 및 특

허등록이 산업과 연계되어 점점 중요하게 되므로 우리나라에서도 신품종 등록과 유전자 및 신기술의 특허출원이 더욱 활성화되어야 한다.

제2항 경제·산업적 측면

호접란의 세계 시장규모는 북미 50억불, 일본 3억불, 유럽 4억불 등 총 60억불(7조원) 정도이며 지난 10여년간 연평균 100%에 가까운 성장을 보여 장기적으로 연간 30% 이상의 성장률을 보일 것으로 예상된다. 우리나라 '99년 난류 재배면적은 293.2ha이고 생산액은 918억원으로 전체 화훼 생산액 5,966억과 비교하면 약 15.4%를 차지하고 있으며 전년도 대비 재배면적은 111.3%, 생산액은 103.2% 증가하였다. 현재 국내 호접란 시장규모는 수 백억원대에 이르나 최근 국내 호접란 재배농장이 늘고 생산규모가 증가하여 도매가격이 하락함으로써 분화 수요가 급증하고 있는 중국, 미국, 일본, 유럽 등으로의 수출전망이 좋으나 아직까지 자체품종이 거의 없으며 대만 등 외국에서 묘를 대부분 수입하고 있어 수출 경쟁력이 낮다. 난류의 수출은 '99년 2,925 천달러로 전년도 대비 305%가 증가되어 시장개척이 크게 이루어지고 있으므로 국내에 비하여 호접란 가격이 매우 높은 미국과 일본에 해외시장을 적극적으로 개척한다면 또한 판매시장이 매우 큰 중국의 춘절시기에 수출할 수 있다면 농민들의 수익증대 및 외화 획득에 크게 기여할 것이다. 선진국의 화훼수요가 장미, 백합 등의 절화류에서 양란으로 변화하고 있으며 특히 호접란은 다른 작물에 비하여 고가이면서 물류비용이 저렴하고 잔류농약 문제가 없어 통관이 용이하므로 미국, 일본, 유럽, 중국 등으로의 수출 전망이 매우 밝다. WTO 협약에 의해 농업시장이 개방됨에 따라 우리 농가가 살아남기 위해 쌀 대체 작물로서 고소득을 올릴 수 있는 난과 같은 고부가가치 작물을 육성하는 것이 매우 시급하다.

제2절 연구개발 목적과 범위

제1항 연구개발 목적

본 연구는 유전공학 기법인 형질전환 기술인 *Agrobacterium*과 Gene gun을 이용하여 호접란에 유용유전자인 개화조절 유전자(COG, FLC gene)와 화색관련 유전자(CHS

gene)를 도입하여 신품종을 육성하고 대량생산 기술을 개발하고자 함이다, 대부분의 호접란 묘를 대만, 중국, 일본, 네덜란드 등에서 수입에 의존하고 있는 실정이며, 수입 종묘 사용으로 인한 로얄티 지불로 부가가치가 낮아짐으로써 수출경쟁력이 약화되고 있다. 또한 WTO, UPOV 체제에서 국가간 화훼교역량이 증가되고 신품종 및 유전자에 대한 보호가 증가하므로 우수품종 육성 및 유용유전자개발이 더욱 중요하게 여겨지고 있다. 따라서 유전공학을 이용한 우량 신품종 육성은 부가가치를 높이고 향후 수입대체 뿐 아니라 수출경쟁력에 기여할 것으로 판단되어 먼저 유용유전자를 이용한 신품종을 개발하고 산업화를 위한 호접란 대량생산 기술을 구축하고자 하였다.

제2항 연구 범위

각 세부과제별 연구범위는 아래와 같다.

1. 제1세부과제 원종 및 우수 유전자원의 수집과 선발

가. 수집 유전자원의 특성평가

나. 수집 유전자원의 내한성 검정

2. 제2세부과제 유용 유전자의 형질전환 기술에 의한 신품종 육성

가. *Agrobacterium*에 의한 유용 유전자(조기개화 유전자, 화색관련 유전자)의 형질전환

- 1) 최적의 co-culture 시간과 온도, 항생제 및 광 조건 등 구명
- 2) 형질전환 후 재분화 효율을 증가시키기 위한 최적 배지 및 배양환경 구명
- 3) 식물체로의 유전자 도입

나. Gene gun에 의한 유용 유전자(조기개화 유전자, 화색관련 유전자)의 형질전환

- 1) 최적의 disk 종류, 유전자총과 disk간 거리, 헬륨가스 압력 등을 구명
- 2) 식물체로의 유전자 도입

다. 형질전환 식물체의 기내선발 및 재분화

hygromycin, kanamycin을 이용한 기내선발

라. 형질전환 식물체 확인

- 1) GUS, PCR assay
- 2) RT-PCR 및 Southern blot assay

마. 도입유전자 발현검정

- 1) 형질전환된 T₀ 개체와 대조구 식물체간의 생육특성 및 형태적 특성 비교검토를 통한 형질전환 식물체 선발
- 2) 형질전환된 신품종의 산업화를 위해 T₀ 개체들의 T₁ 으로 증식을 통한 도입유전자의 유실유무 검정

바. 선발 및 증식된 형질전환 조직배양묘 온실 테스트

3. 제3세부과제 Pink color 호접란의 조직배양에 의한 효율적 대량번식법 개발

가. PLB 유기 및 증식법과 재분화 체계 개선

나. 대량증식에 적합한 우수 호접란 식물체(모주)를 선발

- 1) 도입유전자원의 형태적 특성 조사를 통한 모주 선발
- 2) 모주로부터 PLB 유기와 증식
- 3) PLB의 유기율 · 증식율 및 재분화율, 돌연변이율을 기준으로 조직배양 모주 선발

다. Pink color 호접란의 대량생산 효율증가

- 1) 호접란 액아배양시 소독제, 항생제에 의한 소독효과 구명
- 2) 증식 효율을 높이기 위한 생육 단계별 최적배지 개발
- 3) 페놀 발생 억제 및 제거 방법 개발
- 4) 배양환경(광질, 광주기, 온도 등) 개발
- 5) 3차 정식 단계시 재분화 효율 증진
- 6) 정식 단계시 계대배양 축소에 의한 배양성 증가

라. 선발 및 대량생산된 pink color 조직배양묘 온실 테스트를 통한 생육특성(생장율, 병충해에 대한 저항성 등)검사

제 2 장 국내외 기술개발 현황

일본은 호접란의 주원산지가 아님에도 불구하고 오래전부터 기업농에 의해 교배 육종 및 재배가 활성화되어 왔을 뿐 만 아니라 산학연 협동에 의한 고품질 품종육성이 활발하게 이루어져 우수한 품종을 생산하여 왔다. 또한 호접란의 품종육성과 보존을 위하여 조직배양, 동위효소 분석, DNA finger-printing, 형질전환 등의 생명공학적 육종기술을 활용하고 있다. 대만은 호접란 원산지로 유전자원이 풍부하여 이를 재료로 교배육종 및 생명공학기술에 의한 육종이 국립 당연구소와 기업농을 중심으로 활발히 진행되어 왔다. 대만당연구소는 호접란의 품질개량을 위하여 293개의 영양계와 1,215개의 우수한 품종을 포함한 31종의 야생종을 수집하여 이들 품종의 특성과육종을 컴퓨터로 분석하여 육종에 적합한 교배모본을 선발하였다. 그 결과 현재 116개의 교잡종을 선발하여 영국왕립원예학회에 등록하였으며 매년 수백만 개의 유묘를 국내외 시장에 판매하고 있다. 네덜란드의 경우 Floricultura회사도 오래전부터 호접란 육종을 하여 왔으나 최근에는 세계 최고의 조직배양기술과 자동온실시스템에 의하여 고품질 clone 묘를 생산하여 세계 각국에 수출하고 있다.

미국은 호접란 시장이 크게 확대되고 있으며 이에 따라 하와이 대학 등에서 호접란 관련 육종, 조직배양, 생명공학, 재배 등의 연구를 활발히 진행하고 있다. 싱가포르 국립대학 등에서도 형질전환 등의 생명공학기술을 이용한 호접란 연구가 활발하게 진행되고 있다.

최근 각 작물에서 *Agrobacterium*과 gene gun을 이용한 형질전환을 통해 교배육종에 의하여 도입하기 힘든 유용유전자를 각 작물에 도입하여 신품종을 개발하는데 주력하고 있다. 화색 유전자(DFR, AP1, FT, AGL20 등)를 클로닝하여 화훼류에 도입하여 신품종을 개발하고자 시도하고 있으며 특히 *Arabidopsis*에서 클로닝한 초기 개화 유전자인 leafy gene을 juvenility가 긴 aspon(개화에 필요한 기간이 8-20년)과, citrus 속(개화에 필요한 기간이 6-12년)에 형질전환 하여 각각 8개월 후에, 1년 후에 개화하게 하였다. 또한 오이, 딸기 등에 형질전환시 개화시기를 크게 앞당겼다.

호접란은 고온성 작물(최소 20℃ 유지)로서 개화주기가 다른 양란에 비하여 비교적 짧은 편이나 개화주기가 16-20개월이므로 우리나라에서 재배 시 한겨울을 지나야

하므로 재배를 위한 겨울의 난방비는 생산단가에 크게 비중을 차지하고 있다. 이러한 이유로 많은 농가는 고품질(꽃수가 많고, 화폭이 큰 것 등)이면서 개화주기가 빠른 호접란을 원하고 있다. 우리나라는 유전자원의 부족과 육종에 관한 지식 및 기술 부족으로 호접란에 대한 민간 및 공공기관의 육종이 매우 미약하였다. 호접란 조직배양의 경우 화경배양이 대학교와 연구소에서 오랫동안 연구되어왔으나 높은 돌연변이율, 낮은 생산성 등의 이유로 산업화되지 못하였다. 현재 호접란은 화색에 따라 크게 홍화 (pink color), 백화홍심, 백화 및 유색화 (yellow 등)로 나누고 크기에 따라 대륜, 중륜, 소륜(미니종)으로 나눈다. 그 중 우리나라뿐 아니라 중국에서는 대륜 홍화를 가장 선호하나 홍화는 교배육종시 균일한 화색의 품종을 개발하기 위해서는 화색분리가 많아 오랜기간의 육종기간이 필요하며 조직배양에 의한 대량번식이 매우 어려워 수급에 많은 어려움이 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 세부과제 I: 원종 및 우수 유전자원의 수집과 선발

제1항 연구 방법

가. 수집 유전자원의 특성평가

본 실험은 국내외 원종 및 우수유전자원을 수집하여 특성평가 및 DB화 하고자 2003년부터 2005년 3년간에 수행하였다. 국내외 유전자원 수집 및 보존은 국내는 재배 농가 및 취미가에게서 조직배양묘, 유묘, 중묘, 성묘 등을 수집하였다. 국외에서는 일본, 태국, 대만, 미국, 하와이, 네덜란드 등에서 현지 근무하고 있는 국가 공무원이나 기타 출장시 수집하였다. 수집중(계통)의 특성평가 및 계통선발은 원예연구소 화훼과 종합온실에서 유지보존하면서 특성평가하며 우수계통들을 선발하였다. 생육특성으로는 엽장, 엽폭, 엽수 등, 개화특성으로는 화폭, 화고, 화경장, 소화수, 화경경, 향기 등에 대해 조사하였다. 선발된 계통은 화경배양으로 유지하면서 보존하며, 교배 육종 모본으로 이용하였다

나. 수집 유전자원의 내한성 검정

2004년 개화주 Nobby's Amy 등 9품종을 수집하여 원예연구소 화훼과에서 온도 조절이 가능한 성장상에 30/25℃, 25/20, 20/15, 15/10(주/야간)로 50일간 처리하였다. 물관리는 일반관리하였으며 조도는 평균 4,000Lux로 하여 조절하였다.

2005년에도 개화주 Brother Success 등 10품종을 수집하여 같은 온도로 처리하였고 처리기간은 60일간으로 10일정도 더 처리하여 조사하였다.

제2항 연구 결과

가. 수집 유전자원의 특성평가

2003년 수집한 유전자원의 특성은 국내는 03PN01 등 50계통으로 이름이 정확히

알려져 있지 않아 수집번호만 기입하여 생육 및 개화특성조사한 결과를 표1에 나타냈다. 그중 우수계통으로 5계통을 선발하였는데 03PN08, 03PN13, 03PN15, 03PN20, 03PN37 5계통으로 03PN15은 백색에 꽃잎중심으로 핑크색 줄무늬가 있어 귀여우며 소형, 다화성이다. 03PN20 계통은 파스텔톤의 백색바탕에 핑크가 있는 것으로 일본에서 인기가 있는 계통으로 선발하였다. 03PN37계통은 진분홍으로 국내에서 인기가 있으며, 소형, 다화성으로 소화수가 34개로 단분으로 식재하여도 좋은 계통이다.

< 표 1> '03 국내수집계통 생육 및 개화특성

No.	초세*	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	엽수 (개)	꽃대수(개)		꽃대길이 (cm)	꽃대굵기 (cm)
					화경수	곁가지		
03PN01	2	11.6	6.3	5	1	1	27.5	4.3
03PN02	1	16.5	8.8	6	1	1	40.0	3.4
03PN03	2	13.5	8.1	5	1	0	27.0	3.7
03PN04	1	14.5	7.5	6	1	0	30.6	5.5
03PN05	1	20.5	7.0	6	1	0	57.5	4.4
03PN06	3	16.0	7.1	5	1	2	36.0	3.8
03PN07	3	14.0	8.2	6	1	1	39.0	4.6
03PN08	3	13.8	7.8	6	1	3	31.0	6.1
03PN09	2	18.1	7.9	7	1	0	57.0	5.5
03PN10	1	18.4	6.2	6	1	0	57.0	6.0
03PN11	2	13.5	7.0	4	1	2	33.0	6.3
03PN12	1	17.1	8.5	5	1	0	32.5	6.0
03PN13	3	14.1	5.2	5	1	1	35.0	4.2
03PN14	2	19.4	8.2	5	2	2	40.2	4.9
03PN15	2	13.6	4.3	7	1	2	44.0	4.7
03PN16	3	18.2	6.9	5	1	3	35.0	6.9
03PN17	3	20.4	6.7	4	1	3	50.5	5.6
03PN18	2	14.5	7.3	6	1	0	45.8	5.1
03PN19	2	22.2	7.8	6	1	0	66.0	4.6
03PN20	2	19.0	9.1	4	1	0	72.0	5.4
03PN21	2	17.1	7.9	5	1	0	33.0	5.1
03PN22	2	12.0	8.1	5	1	0	47.0	4.4
03PN23	2	19.3	7.1	7	1	0	78.0	6.4
03PN24	3	16.4	5.6	5	1	1	37.0	3.6
03PN25	1	14.8	6.8	4	1	2	38.0	4.4
03PN26	3	20.1	6.3	3	2	0	31.5	3.4
03PN27	3	18.7	8.4	4	3	2	53.6	5.2

<표 1> 계속 *초세 : 1 대각, 2 수평, 3 늘어짐

No.	초세*	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	엽수 (개)	꽃대수(개)		꽃대길이 (cm)	꽃대굵기 (mm)
					화경수	결가지		
03PN28	1	13.6	6.8	8	2	6	34	3.84
03PN29	2	16.5	9.2	7	1	0	56.5	4.48
03PN30	2	17.2	7.4	9	2	2	39.5	4.12
03PN31	2	18.5	8.2	7	1	0	56	4.38
03PN32	2	11.5	6	5	1	3	39.7	4.17
03PN33	2	16.3	8.6	8	1	0	58.4	5.47
03PN34	3	16.7	7.4	8	3	0	29.4	3.41
03PN35	2	16	7.4	5	1	0	50.2	3.97
03PN36	2	17.3	5.7	4	1	2	36	5.04
03PN37	2	17.8	6.7	6	3	3	39.7	5.92
03PN38	3	20.5	6.8	4	1	3	41.5	4.45
03PN39	3	17.8	6.7	6	1	3	51	4.62
03PN40	1	20.6	5.2	5	1	2	53	5.33
03PN41	3	18.5	6.4	4	1	2	49.4	5.85
03PN42	3	19.1	7.5	4	1	2	47	5.88
03PN43	3	15.3	8	3	1	2	48.5	5.73
03PN44	2	13	6.7	3	1	1	37.5	4.93
03PN45	3	21	7.3	4	1	3	35	5.36
03PN46	2	17.8	7.2	6	1	2	51	7.38
03PN47	2	17.2	7.1	8	2	0	46.0	6.19
03PN48	2	21	7.1	6	1	0	41.5	6.74
03PN49	2	10.2	6.3	5	1	0	20.0	3.44
03PN50	3	25	7.5	6	1	0	71.5	5.34

< 표 1> 계속

No	꽃수 (개)	꽃대방향 ¹⁾	꽃색		꽃크기		꽃모양 ²⁾	향기
			꽃잎	실관	(횡)	(종)		
03PN01	10	2	PYPS	R	5.2	4.6	3	무
03PN02	17	3	WPL	DP	6.1	5	3	무
03PN03	8	4	W	WY	8.2	6.8	3	무
03PN04	3	3	WPS	P	6.7	7.4	3	무
03PN05	10	4	P	R	8.4	6.9	3	무
03PN06	23	3	WPL	P	5.6	5.9	3	무
03PN07	20	3	WPL	DP	6	4.8	3	무
03PN08	24	3	P	DP	4.6	4.2	3	무
03PN09	9	4	WP	DP	9.7	8.5	3	무
03PN10	9	3	DP	DP	9.3	7.9	3	무
03PN11	27	3	WPL	P	4.8	4.2	3	무
03PN12	5	2	YBS	WY	6.7	6.6	3	무
03PN13	19	3	WPL	P	5.0	4.7	3	무
03PN14	27	3	WPL	P	5.8	4.8	3	무
03PN15	35	3	WP	DP	3.0	2.5	4	무
03PN16	29	2	WPL	P	5.0	4	3	무
03PN17	33	3	WP	P	5.4	4.2	3	무
03PN18	7	3	W	WY	7.7	7.2	3	무
03PN19	8	4	DP	R	10.2	8.6	3	무
03PN20	9	4	WPL	P	10.1	9.2	3	무
03PN21	5	2	YBS	WY	7.5	6.8	3	무
03PN22	7	2	W	WY	7.6	6.9	3	무
03PN23	10	4	DP	R	9.5	8.3	3	무
03PN24	20	3	WP	DP	4.5	3.8	3	무
03PN25	20	3	WPL	R	5.9	4.5	3	무
03PN26	21	3	W	PW	5.8	4.6	3	무
03PN27	41	2	WP	DP	5.1	4.4	3	무

< 표 1> 계속

No	꽃수 (개)	꽃대방향 ^ㄱ	꽃색 ^ㄴ		꽃크기(cm)		꽃모양 ^ㄹ	향기
			꽃잎	설판	횡	종		
03PN28	40	3	P	P	5.0	4.0	3	약
03PN29	9	2	WPL	WPL	9.1	7.5	3	무
03PN30	27	2	WPL	P	5.0	4.1	3	무
03PN31	17	4	PDPL	DP	7.0	6.1	3	약
03PN32	28	3	WP	P	5.0	4.5	3	무
03PN33	9	2	WPL	WPL	8.0	7.5	3	무
03PN34	21	3	WPL	P	4.9	4.4	3	약
03PN35	17	2	WPL	R	5.0	4.2	3	무
03PN36	17	3	WPL	P	6.7	4.2	3	무
03PN37	34	3	P	R	5.8	5.0	3	무
03PN38	35	3	PW	P	5.3	4.5	3	무
03PN39	35	3	WP	R	4.5	3.7	3	무
03PN40	19	3	P	R	5.1	4.4	3	약
03PN41	19	3	WPL	P	4.9	4.0	3	무
03PN42	19	3	P	R	5.5	4.2	3	무
03PN43	21	3	P	R	5.0	4.7	3	무
03PN44	15	2	WP	DP	5.9	4.9	3	무
03PN45	20	3	PWPS	R	6.1	4.4	3	무
03PN46	12	2	YBS	WY	6.0	5.9	3	무
03PN47	10	2	YBS	WY	6.1	5.9	3	무
03PN48	5	2	YBS	WY	7.6	7.7	3	무
03PN49	5	2	W	WY	6.2	5.8	3	무
03PN50	9	4	P	DP	9.5	8.5	3	무

ㄱ : 1 직립, 2 반직립, 3 반늘어짐, 4 늘어짐

ㄴ : P (Pink), WPL(White Pink Line), PW(Pink White), R(Red), DP(Dark pink)
YBS(Yellow Brown Spot), WY(White Yellow)

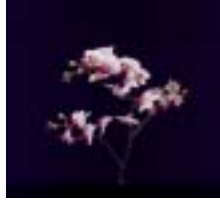
ㄹ : 1 cup, 2 simi-cup, 3 plate, 4 open

□ 우수 수집계통



03PN08

(오렌지, 화색특이)



03PN15

(소형, 다화성)



03PN37

(진분홍, 다화성)

사진 '03 우수계통

< 표 2> '03 국외 수집 품종 생육특성 조사 * 초세 : 1 대각, 2 수평, 3 늘어짐

NO	초세*	엽장(cm)	엽폭(cm)	엽수(cm)
S03PN01	2	21.6	4.9	10.1
S03PN02	3	17.5	6.7	6
S03PN03	2	17.6	6.2	7
S03PN04	2	24.8	7.2	5.7
S03PN05	2	16.4	6.8	7.7
S03PN06	1	23	8.2	6
S03PN07	1	22.8	6.9	7
S03PN08	2	14.5	8.6	7.7
S03PN09	1	18.4	7.8	6.3
S03PN10	1	13.8	6.4	5.3
S03PN11	1	18.1	7.9	8
S03PN12	2	14.5	6.8	8.3
S03PN13	2	19.8	5.4	7.3
S03PN14	3	15.5	8.6	3
S03PN15	2	13.9	7.5	5
S03PN16	2	14.7	6.3	7
S03PN17	1	22.2	8.9	6.3
S03PN18	2	18.6	7.3	7.7
S03PN19	2	16.9	8.2	6
S03PN20	2	15	7.7	8
S03PN21	2	17.9	8.4	5.3
S03PN22	1	7.8	5.6	6.8
S03PN23	1	10.8	7.9	5
S03PN24	1	14.8	8.6	5
S03PN25	1	15.3	6	4.8
S03PN26	1	13.8	5.6	5.8
S03PN27	2	13	6.7	4.7
S03PN28	2	11.6	6.9	5.7

'03년 국외에서 수집한 품종들은 주로 중묘나 유묘로 '03년에는 주로 생육조사를 하였고 개화조사는 '04년에 완료하였다. 수집된 품종중에는 이름이 같았으나 실제 개화된 상태를 살펴보면 대부분 똑같지 않았는데 그 이유는 처음 이름으로 사용된 것이 교배로 해서 새로 나온 증식된 것들도 같은 이름으로 해서 잘못 유통된 것들이 많이 있다고 한다. 따라서 국내에 들어온 것들 중에는 품종명들이 잘못 기재되어 유통되고 있지만 국내에는 큰 문제가 없이 그냥 판매되고 있는 실정이다.

< 표 2> '03년 국외 수집 품종 개화특성 조사

NO	품종명	꽃대수(개)	꽃대길이(cm)	꽃대 굵기(mm)
S03PN01	I-Shin Purple Jewel	1.3	45.6	3.5
S03PN02	King shiang's rose×equestis	1	50.0	4.0
S03PN03	Little Gem Stripes	1	28.4	3.9
S03PN04	Taipei Gold	1	45.1	4.3
S03PN05	Little Gem Stripes	1.3	47.0	5.0
S03PN06	Taipei Gold×Brother migget	1	35.8	4.8
S03PN07	Little Gem Stripes	1	40.6	5.8
S03PN08	Ever spring Light	1	26.7	6.2
S03PN09	Wedding Promanade	1	50.6	5.5
S03PN10	Queen Bear ' Red Sky'	1.6	23.5	3.0
S03PN11	Camela's pixie×P. San Je Diamond	1.6	35.5	4.8
S03PN12	Brother Sandra	1	35.7	4.9
S03PN13	만산홍	1	33.2	3.0
S03PN14	Little Marry	1.5	42.7	3.6
S03PN15	Tropical Lady	1	46.2	6.1
S03PN16	Little Gem Stripes	1	27.0	3.5
S03PN17	Bamboo Nancy×Challifreed	1	77.6	4.3
S03PN18	Little Gem Stripes	1	37.3	3.5
S03PN19	석양홍	1.3	35.5	4.5
S03PN20	Black Sandra	1	47.5	3.0
S03PN21	Kung's Valentine	1	48.8	5.8
S03PN22	P. amabilis	1.3	24.5	3.7
S03PN23	Black Butterfly	1	46.5	3.9
S03PN24	New candy×Mount Beauty	1	34.1	4.3
S03PN25	Sogo Lisa	1	36.0	3.7
S03PN26	신만천홍	1	24.3	2.9
S03PN27	Betris×Mount Lip	1	37.7	3.7
S03PN28	2390	1	31.7	3.4

‘03년 미개화 되었던 수집품종에 대한 개화 특성 조사 결과 핑크계열이 주이며 중소형종이며 다화성 품종이 많았다. 노랑색 계열들은 대부분 비슷한 화형과 화색을 지니고 있었으며 미약하지만 약간의 향기를 지니고 있었다.

<표 2 계속>

No	꽃수 (개)	꽃대방향	꽃색		꽃크기		꽃모양 ¹⁾	향기
			꽃잎	설판	(횡)	(종)		
S03PN01	22.6	1.6	DP	R	4.1	3.4	2.6	무
S03PN02	14.3	3	P	R	6.2	4.8	2.3	무
S03PN03	9.0	2	WPL	R	5.1	4.6	2	무
S03PN04	3.0	1	YPS	WY	6.6	7.1	2	약
S03PN05	9.6	2.6	PL	R	5.9	5.2	2.6	무
S03PN06	6.0	1.6	YBS	WY	6.8	6.7	3	약
S03PN07	8.3	2	PL	R	5.6	5.3	3	무
S03PN08	6.5	2	WPS	O	7.0	6.2	2.5	무
S03PN09	18.0	2	WPL	R	5.7	5.1	3	무
S03PN10	9.3	1.6	DP	DP	5.4	3.9	2	무
S03PN11	11.6	1.6	DP	R	4.9	4.4	2	무
S03PN12	9.0	2	R	DR	5.5	5.0	3	무
S03PN13	22.0	2	PL	R	4.9	5.0	3	무
S03PN14	24	2	PL	R	4.8	3.9	2	무
S03PN15	6.5	2	P	DP	7.9	6.4	2	무
S03PN16	11	2	WPL	DP	4.3	3.9	4	무
S03PN17	6.6	2	GYPL	R	9.0	9.0	3	무
S03PN18	11.6	1.6	PPL	R	5.6	5.4	2.6	무
S03PN19	7.0	1.6	YRL	R	6.9	6.6	3.3	무
S03PN20	18.5	2	DP	R	5.4	4.7	3	무
S03PN21	5.0	2.5	P	R	10.3	9.0	2.5	무
S03PN22	3.6	2.3	W	W	7.6	6.1	2.6	무
S03PN23	7.5	2	DP	DP	5.2	4.2	2.5	무
S03PN24	4.5	2.3	W	R	9.8	8.3	2	무
S03PN25	3	1	YBS	O	7.3	6.7	3	약
S03PN26	4	2	DP	R	6.8	5.5	3	무
S03PN27	5	2	W	P	6.7	6.4	3	무
S03PN28	3	1	W	P	10.0	8.8	3	무

♪ : 1 직립, 2 반직립, 3 반늘어짐, 4 늘어짐

♩ : P (Pink), WPL(White Pink Line), YRL(Yellow Red Line), PL(Pink Line),
R(Red), DP(Dark pink), O(Orange), YBS(Yellow Brown Spot), WY(White
Yellow), YPS(Yellow Pink Spot), WPS(White Pink Spot)

♫ : 1 cup, 2 simi-cup, 3 plate, 4 open

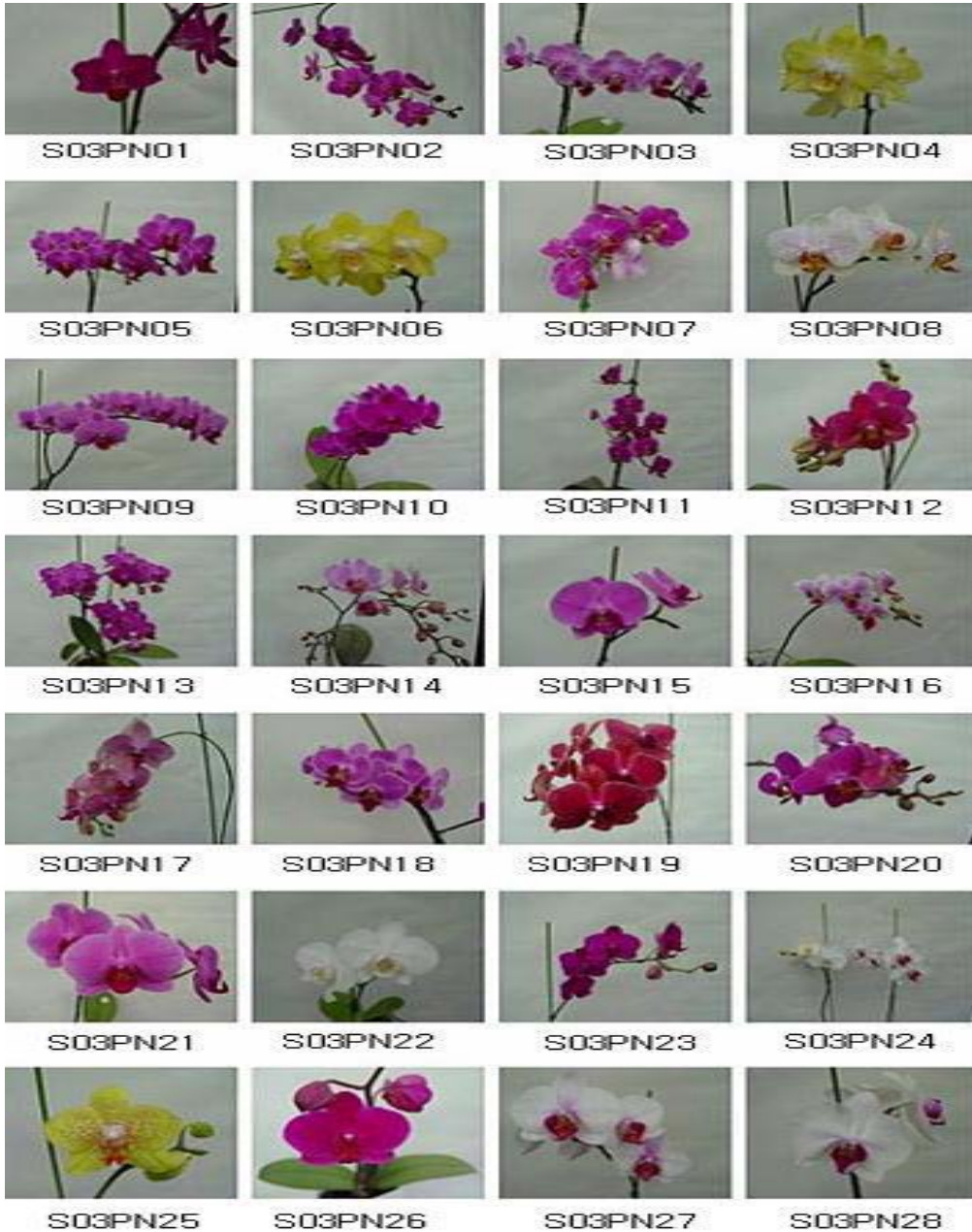


사진 '03 국내 수집 품종들
 < 표 3> 국외수집 원종의 생육 및 개화특성 조사

수집번호	원종명	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	엽수	화색 (꽃잎/설판)	화수	향기	화경장 (cm)	개화기
S03PN35	<i>Phal.amabilis 'formosana'</i>	7.7	5.6	4	W/Y	3	약	14.9	1월상
S03PN36	<i>Phal. aphrodite</i>	9.2	5.9	4	W/Y	2	무	18.5	1월상
S03PN37	<i>Phal. schilleriana</i>	14.1	5.4	6	P/P	7	강	40.7	1월상
S03PN38	<i>Phal. mariae</i>	11.8	5.8	5	R bar/P	1	무	17.0	1월상
S03PN39	<i>Phal. tetrapis'alba'</i>	11.8	4.7	4	W/W	2	무	10.9	2월초
S03PN40	<i>Phal. stuatiana</i>	11.5	6.5	4	W spot/W	3	무	19.0	1월하
S03PN41	<i>Phal. philippinensis</i>	13.2	4.1	4	W/Y	2	무	18.2	1월하
S03PN42	<i>Phal. pulcherimma</i>	12.3	4.6	6	P/P	15	무	26.7	8월상
S03PN43	<i>Phal. hieroglyphica</i>	11.8	4.9	5	W(line) /P	5	무	32.4	2월중
S03PN44	<i>Phal. violacea</i>	24	8	4	Y/P	6	강	50.0	2월, 8월상

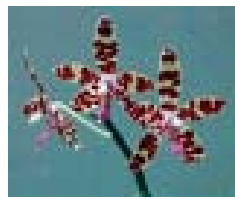
□ 수집 원종



S03PN35



S03PN36



S03PN38



S03PN40



S03PN37



S03PN44



S03PN42

사진. 원종 유전자원

국외 원종들은 주로 미국, 말레이시아, 대만, 태국에서 수집된 *Phal. aphrodite* 등 원종 10계통으로 생육 및 개화특성을 조사한 결과 *Phal. amabilis*은 백색으로 주로 백색의 주요 원종으로 이용되고 있는 중이다. 화형은 대부분 중소형종이었으며 *Phal.*

pulcherimma, 은 가장화형이 작았다.수집 원종중 *Phal. schilleriana*(S03PN37)과 *Phal. violacea*(S03PN44)은 향기가 강해 육종을 위한 모본으로 이용할 수 있으며 특히 *Phal. schilleriana* 은 핑크계열로 다화성을 지니고 있다. 특히 *Phal. violacea*은 한송이만 개화되어도 향기가 강하게 나타나 원종이라도 증식을 하거나 교배 실생으로 판매하여도 좋을 유전자원이라고 생각된다. *Phal. pulcherimma*은 소형이지만 하계에도 개화가 잘 되며 잎이 직립성이 있어 초세를 직립하게 하는데 이용할 수 있는 우수 유전자원이다.

'04년에는 수집한 품종들은 대부분 대만에서 13품종이 수집된 것으로 Brother Utopia(S04PN32) 등 2품종은 향이 강하며 S04PN21 등 4품종은 향기가 미약하게 있어서 교배모본으로 이용중이다. 수집 유전자원에 있어서는 품종의 생육, 개화 특성을 엑셀화하여 저장하였다. 또한 유전자원 유지보존 및 대량증식능력 확인을 위한 화경배양으로 보존하고 있다. 또한 대량증식능력이 우수한 품종들을 확인으로 교배조합에 활용하고자 한다.

< 표 3> '04년 국외 수집 품종 특성조사

No.	품종명	초세 *	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	엽수 (개)	꽃대수 (개)	꽃대길이 (cm)	꽃대굵기 (cm)
S04PN21	Ever spring King	1	16.1	8.8	4	1	48.7	5.0
S04PN22	Taida Pearl	2	15.4	5.8	8	2	36.0	4.1
S04PN23	Champion Girl	2	21.3	6.6	5	1	55.5	4.3
S04PN24	Nobby's Amy	1	16.8	6.3	5	1	45.8	4.4
S04PN25	Sogo Little Angel	1	14.4	6.8	3	1.5	61.0	4.7
S04PN26	Taisuco Yellow Boy	1	22.5	6.7	7	1	66.5	4.8
S04PN27	Brother Julius	2	15.7	6.3	4	1.5	51.0	5.3
S04PN28	Ever spring Pioneer	1	20.9	8.7	5	1	55.1	5.0
S04PN29	Taida Salu	1	15.4	7.7	5	1	53.9	4.0
S04PN30	Brother Girl	1	16.8	8.2	7	1	51.8	5.2
S04PN31	Happy UFO	1	17.5	8.9	3.5	1	44.2	5.0
S04PN32	Brother Utopia	1	16.2	7.3	5	1	58.0	5.6
S04PN33	Caribbeau sunset×(Mambo×cassandra)	1	15.2	9.7	5	1	23.0	4.9

<표 2 계속>

No	꽃수 (개)	꽃대방향 J	꽃색		꽃크기		꽃모양 [♯]	향기
			꽃잎	설판	(횡)	(종)		
S04PN21	8	2.5	WRS	YP	9.0	8.6	4	약
S04PN22	5	2	RW	P	6.9	6.9	4	무
S04PN23	10	3	W	YP	7.8	6.4	3	무
S04PN24	11	3	W	WY	6.7	5.8	3	무
S04PN25	27	2	W	DP	4.5	3.5	3	무
S04PN26	8	4	Y	P	9.3	8.0	3	무
S04PN27	11	3.5	DP	DP	6.7	6.1	3	무
S04PN28	6	2.5	R	O	8.9	7.8	4	약
S04PN29	10	3	YRL	R	7.0	6.4	3.5	약
S04PN30	18	2	GYPL	P	6.3	5.8	3	약
S04PN31	9	3	WPS	YP	7.6	6.8	4	무
S04PN32	7	2	WRS	YP	7.3	6.1	3	유
S04PN33	21	2	BY	B	3.8	3.1	3	유

J : 1 직립, 2 반직립, 3 반늘어짐, 4 늘어짐

♯ : P (Pink), WRS(White Red Spot), YRL(Yellow Red Line), WY(Whitek Yellow),
R(Red), DP(Dark pink), O(Orange), W(White), O(Orange), YP(Yellow Pink)

♯ : 1 cup, 2 simi-cup, 3 plate, 4 open



사진 '04 국외 수집 품종(맨위쪽부터 S04PN21-32)

'05년에는 25품종을 수집하였으며 주로 국내에서 유통되고 있는 것들이다. 과거에는 주로 대형 백색과 분홍색계열이 주를 이루고 있었는데 반해 최근 3년전 부터는 화형도 소형, 중형등으로 다양해졌고 화색도 노랑색, 연핑크, 흑적색, 오렌지 색으로 다양해지고 있는 추세이다. 수집 유전자원의 중 '썬디 다이아몬드' 품종은 소형 다화성으로 화색이 선명하고 진하며 '블랙잭', '사라골드', '브라더골드스톤' 등 품종은 화색이 특이한 유럽 기호색을 가지고 있었다. '블라더 걸' 품종은 국내 육성 품종인 '오렌지드림'과 비슷하고 바탕색이 약간 분홍색을 띠어 화색이 우수한 특성이 있었으며 '아미리'품종은 기존의 노랑색 품종에 비해 화경장이 짧고 화색이 맑은 특성이 있다.

< 표 4> '05년 국내 수집 유전자원 개화특성 조사

No.	품종명	초세 *	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	엽수 (개)	꽃대수 (개)	꽃대길이 (cm)	꽃대굵기 (cm)
05PN01	사라골드	2	16.1	8.8	4	1	48.7	5.0
05PN02	브라더골드스톤	1	13.1	8.9	10	1	19.2	4.6
05PN03	소고벤드	1	14.3	6.0	4	1	52.5	3.9
05PN04	오키드월드	2	20.1	8.0	6	1	24.5	4.9
05PN05	사하라	2	13.5	5.0	4	1	38.5	3.9
05PN06	리틀마리	2	12.3	6.3	4	1	39.5	2.5
05PN07	석양홍(진)	2	15.5	8.1	6	1	51.7	4.2
05PN08	석양홍(연)	2	14.7	7.8	4	1	50.8	4.0
05PN09	팬더(적)	2	17.7	8.8	8	1	48.3	4.0
05PN10	팬더(백)	2	17.0	8.3	6.8	1	60.4	4.4
05PN11	Brother Girl	1	16.5	8.7	8	2	43.8/41.5	5.1/4.6
05PN12	썬디다이아몬드	1	14.3	6.3	11	1	40.5	4.7
05PN13	블랙잭	2	19.4	8.9	7	1	50.3	4.6
05PN14	Taipei Gold	2	19.2	6.3	7	1	44.5	4.8
05PN15	브라더리틀,아마 그레이트	1	14.2	6.3	12	1	38.5	4.3
05PN16	스윗리틀	2	15.9	6.1	9	1	41.5	3.8
05PN17	소고그레이트	1	19.9	9.5	6	2	43.8/22.5	4.9/4.2
05PN18	아미리	1	13.0	5.9	7	2	14.3/15.0	4.7/4.5
05PN19	유투	2	16.7	9.1	5	1	44.5	4.8
05PN20	Taisco'Yellow Boy'	2	15.0	8.8	6	2	43.5/24.0	5.0/3.6
05PN21	쥬얼리	1	9.7	4.4	13	4	39.6/29.2	3.9/2.5
05PN22	White Angel(대)	2	15.1	7.1	8	1	45.2	4.4
05PN23	일심골드	2	24.2	6.9	8	1	56.6	4.5
05PN24	만천홍(킹카)	1	16.0	7.8	4	1	55.3	4.1
05PN25	Spring Dance	2	10.5	6.3	5	1	11.0	3.4

<표 4 계속>

No.	품종명	꽃수 (개)	꽃대 방향 ¹⁾	꽃색		꽃크기		꽃모 양 ²⁾	향기
				꽃잎	설관	(횡)	(종)		
05PN01	사라골드	5	1	YPst	P	5.3	5.0	4	무
05PN02	브라더골드스톤	5	1	Yst	P	6.0	6.1	4	무
05PN03	소고벤드	5	2	Y	YP	9.5	8.2	4	무
05PN04	오키드월드	6	1	YPst	WP	7.0	6.8	4	무
05PN05	사하라	11	3	P	DP	5.9	5.0	4	무
05PN06	리틀마리	12	2	P	P	5.1	4.5	3	무
05PN07	석양홍(진)	13	2	YRSP	R	6.5	5.8	4	무
05PN08	석양홍(연)	12	2	YRSP	P	6.5	5.7	4	무
05PN09	팬더(적)	9	2	WPst	YRst	6.5	6.0	4	무
05PN10	팬더(백)	9	2	WPst	Yst	7.9	5.9	4	무
05PN11	Brother Girl	8	1	YPst	P	6.8	6.1	4	무
05PN12	썬디다이아몬드	15	2	DP	R	4.9	4.7	3	무
05PN13	블랙잭	7	2	PP	PPY	6.7	6.1	4	무
05PN14	Taipei Gold	5	2	WYBst	WY	6.5	6.5	4	무
05PN15	브라더리틀'아마 그레드'	58	1	WP	P	3.7	3.0	4	무
05PN16	스윗리틀	17	1	WYRst	RY	5.9	5.5	4	무
05PN17	소고그레이트	6	2	DP	DP	5.3	5.0	4	무
05PN18	아미리	3/3	2	Y	WY	6.0	5.5	4	무
05PN19	유투	7	2	YPst	P	8.6	8.1	4	무
05PN20	Taisco'Yellow Boy'	12	2	Y	YPst	6.7	6.5	4	무
05PN21	쥬얼리	13	1	DP	DP	3.4	3.1	4	무
05PN22	White Angel(대)	13	2	WPst	WYPst	7.2	6.7	4	무
05PN23	일심골드	14	2	YPst	YP	7.8	6.9	4	무
05PN24	만천홍(킹카)	17	1	DP	DP	4.8	4.0	3	약
05PN25	Spring Dance	16	2	WP	PY	3.0	2.5	4	무

1) : 1 1 직립, 2 반직립, 3 반늘어짐, 4 늘어짐

2) : W(White), Y(Yellow), B(Brown), R(Red), O(Orange), P(Pink), WPL(White Pink Line), YRL(Yellow Red Line), PL(Pink Line), DP(Dark pink), YBS(Yellow Brown Spot), WY(White Yellow), YPS(Yellow Pink Spot), WPS(White Pink Spot), sp:spot, st: Stripe

3) : 1 cup, 2 simi-cup, 3 plate, 4 open

□ 우수 수집계통



썬디 다이아몬드



블랙잭



브라더걸



사라골드



브라더골드스톤



아미리

<표 5> '05년 국외 수집 품종 생육조사

No.	품종명	초세*	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	엽수 (개)
S05PN01	Brother Success	1	12.9	7.4	4.6
S05PN02	Brother spring Dancer	2	14.0	6.9	6.0
S05PN03	Brother spots	1	18.3	6.0	7.6
S05PN04	Brother Green Jode	2	16.8	7.9	5.6
S05PN05	Maki Watamabe	1	16.4	7.6	7.4
S05PN06	Sogo Smith	1	17.2	7.3	6.3
S05PN07	Minho- Princess	1	18.0	6.5	5.3
S05PN08	Sogo Beach	1	17.2	6.9	5.3
S05PN09	Yupin Giant	1	21.9	7.1	6.0
S05PN10	Golden Leopard Cheaters	2	12.0	6.8	6.0

'05년 수집품종들은 대만에서 수입상을 통해 들여온 것으로 모두 미개화주로 생육

조사만 완료된 상태이며 11월 현재 내한성 검정 시험결과 일부 품종에서 개화되어 조사 중에 있다. 3년간의 수집 유전자원은 대부분 품종명이 정확한 것들을 수집하려고 했으며 수집된 품종들은 모두 화경배양으로 유전자원을 보존하고 있다.

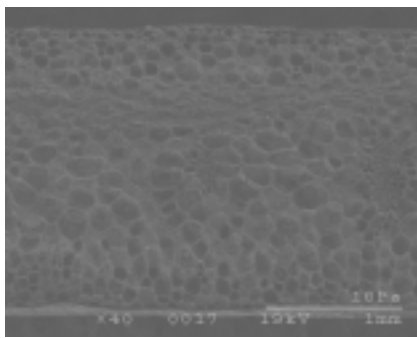
앞서 말했듯이 최근 유통되는 품종들은 소형, 다화성, 혹은 화색이 특이한 것이며 예전에는 대부분 실생계로 유통되는 것들이 묘종 값은 비싸지만 영양계 묘를 구입하는 경향이 강하게 나타나고 있다. 최근 호접란 가격이 많이 떨어졌지만 누가 먼저 새로운 신품종을 판매했느냐에 따라 가격차이가 많이 발생되고 있는 실정이다.

2004. 12월부터 호접란의 품종보호가 실효가 되었다. 앞으로 WTO, UPOV 체제에서 국가간 화훼교역량이 증가되고 신품종 및 유전자에 대한 보호가 증가하므로 우수 품종 육성 및 유용유전자개발이 더욱 중요하게 될 것이다. 따라서 3년간 수집한 품종과 계통들은 신품종 육성에 유용유전자원으로 활용되며 우수품종을 육성하는데 이용될 것이다.

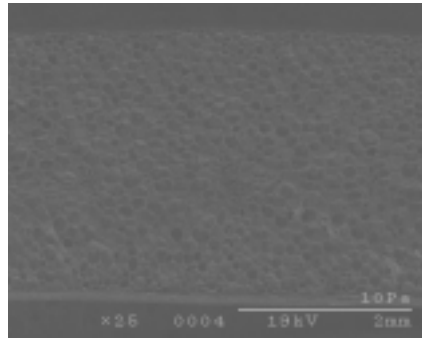
나. 수집 유전자원의 내한성 검증

2004년 개화주 Nobby's Amy 등 9품종을 수집하여 원예연구소 화훼과에서 온도조절이 가능한 성장상에 30/25℃, 25/20, 20/15, 15/10(주/야간)로 50일간 처리하였다. 물 관리는 일반관리하였으며 조도는 평균 4,000Lux로 하여 조절하였다.

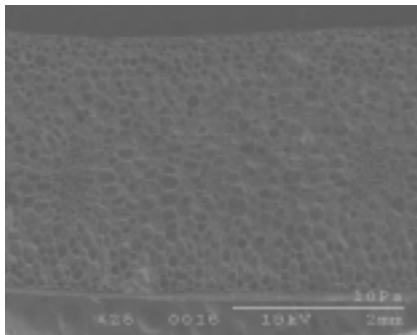
2005년에도 개화주 Brother Success 등 10품종을 수집하여 같은 온도로 처리하였고 처리기간은 60일간으로 10일정도 더 처리하여 조사하였다.



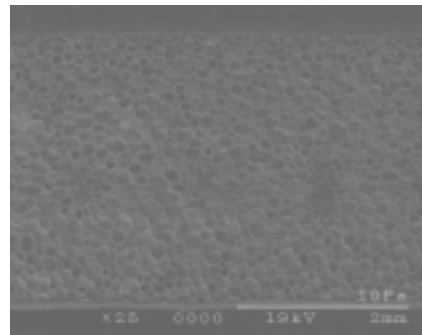
15/10℃



20/15℃



25/20℃



30/25℃

사진 2. 각 온도 처리별 잎 단면도

사진 2는 온도에 따른 잎의 횡단면을 전자주사현미경(SEM)을 이용하여 촬영하였는데 15/10℃에서만 약간잎이 뭉개어져 있어 조직이 손상된 것을 볼 수 있다. 다른 온도처리에서는 별다른 차이를 나타내지 않았다.

<표 6> '04년 수집된 품종별 15/10℃에서의 내한성 검정 결과

품종명	내한성정도	비고	품종명	내한성정도	비고
Nobby's Amy	약중	재검토예정 일부식물체 강건	Ever-spring King	중	잎이 전반적으로 약간 노랗게 됨
Taida Salu	강	잎에 작은 노란반점이 있음	Taisuco Yellow Boy	강	잎에 변화없음
Champion Girl	강중	잎끝이 노랗게 변하기도함	Ever Spring Pioneer Champion	강	잎에 변화없음
Brother Julius	약	잎이 몽크러지거 나 떨어짐	Doritis	강	잎에 변화없음
Sogo Little Angel	약	잎이 몽크러지거 나 떨어짐			

'04년 수집된 품종별 15/10℃에서 조사한 결과 저온에 강한 품종으로는 Taisuco Yellow bay 등 3품종, 저온에 중간 품종으로는 Taida Salu 등 3품종으로 식물체에 약간의 변화는 있었으나 회복이 가능한 정도였다. 저온에 약한 품종으로는 Brother Julius 등 3품종으로 잎의 관상가치 및 잎이 몽크러져 재생 불가능한 상태로 되었다. 기타 온도에서는 기존의 잎은 별 차이가 발생하지 않았고 신초의 신장이 20/15℃온도 일 때 'Ever sping Pioneer' 품종에서 잎이 진적색으로 변화하는 특징을 나타냈다.

<표 7> '05년 수집품종별 15/10℃에서의 내한성 검정 결과

품종명	내한성정도	비고	품종명	내한성정도	비고
Brother Success	약	잎이 몽크러지거 나 떨어짐	Sogo Smith	중	하엽이 노랗게 변함
Brother spring Dancer	강	잎에 변화없음	Minho- Princess	강	잎에 변화없음
Brother spots	강	잎에 변화없음	Sogo Beach	중	하엽이 노랗게 변함
Brother Green Jode	강	잎에 변화없음	Yupin Giant	중	잎끝이 약간 갈색으로 변색
Maki Watamabe	중	잎이 붉게 변함	Golden Leopard Cheaters	강	잎에 변화없음

'05년 수집된 품종별 15/10℃에서 조사한 결과 저온에 강한 품종으로는 Brother spring Dancer 등 5품종, 저온에 중간 품종으로는 Maki Watamabe 등 4품종으로 식물체에 약간의 변화는 있었으나 회복이 가능한 정도였다. 일부종에서는 고사되는 주는 있었으나 식물체의 영양상태에 따라 달라질 수 있다. 저온에 약한 품종으로는 Brother Success 1품종으로 잎의 관상가치 및 잎이 뭉크러져 재생 불가능한 상태로 되었다. 따라서 2년간 조사된 19품종에 대해서 저온에 강한 품종들은 내한성 품종육성을 위한 모본으로 사용하고자 교배조합에 사용하였다.



가장자리부터 변색



잎 일부 뭉클어짐



사진 3. 온도처리에 따른 식물체 변화

<표 8> 품종별, 온도별 화아길이와 화아발생율

품종명	처리온도 (°C)	화아길이 (cm)*	화아발생율 (%)	품종명	처리온도	화아길이 (cm)*	화아발생율 (%)
Nobby's Amy	30/25	0	0	Ever-spring King	30/25	0	0
	25/20	0.4	67		25/20	1.8	100
	20/15	3.0	100		20/15	4.1	100
	15/10	0	0		15/10	0	0
Taida Salu	30/25	0	0	Taisuco Yellow Boy	30/25	0	0
	25/20	0	0		25/20	2.5	100
	20/15	1.0	100		20/15	3.0	100
	15/10	0	0		15/10	0	0
Champion Girl	30/25	0	0	Ever Spring Pioneer Champion	30/25	0	0
	25/20	8.5	100		25/20	6.5	100
	20/15	2.5	100		20/15	1.8	100
	15/10	0	0		15/10	0	0
Brother Julius	30/25	0	0	Dortis	30/25	0	0
	25/20	0.8	67		25/20	2.0	67
	20/15	1.7	67		20/15	0	0
	15/10	0	0		15/10	0	0
Sogo Little Angel	30/25	0	0				
	25/20	0	0				
	20/15	1.0	67				
	15/10	0	0				

*: 처리시작부터 55일 경과후의 길이

각 온도에 대한 화아분화는 25/20°C에서 66.7%, 20/15°C에서 88.9%(Dortis만 제외됨), 두 온도 공통은 55.6%로 나타나 화아분화 적정온도로는 최고 25°C, 최저 15°C며 그 이상, 이하에서는 화아가 발생되지 않았다.

Taida Salu 등 2품종은 20/15°C에서만 꽃대가 유도되는 것으로 보아 저온요구도가 많은 것을 알 수 있고, Nobby's Amy 등 6품종은 25/20°C, 20/15°C에서 개화가 유도되는 것으로 보아 저온요구도에 있어 품종별로 확연한 차이가 있음을 알 수 있었다. Dortis는 25/20°C에서만 화아가 분화됨에 따라 저온요구도가 별로 없다고 할 수 있다. Dortis는 여름에도 개화가 용이함에 따라 내서성 품종육성에 도움이 될 수 있는 특성을 가지고 있다. 표 9에서는 '05년 수집 품종별, 온도별 화아특성 및 엽록소 특성을 조사한 결과 Brother Success 1품종만 20/15°C에서 화아가 유도되었으며, Brother spots 등 5품종은 25/20°C, 20/15°C에서, Brother spring Dancer 등 3품종은 특이하게도

15/10℃를 제외한 모든 온도에서 화아가 유도 되었으나 대부분 Brother spots 품종과 같은 온도 그룹에서 화아가 정상적으로 유도되었다. 그러나 Minho- Princess 품종은 전체 온도그룹과 관계없이 전혀 화아가 유도되지 않았는데 식물체의 크기가 다른 품종들보다 약간 작은 것이 원인인지 저온요구 기간이 더 길어야 하는지에 대해서는 추후 검토 할 예정이다.

식물체 고사는 저온인 15/10℃에서만 품종별로 33.3~100%로 차이가 있었으며 Brother Success 품종은 모두 고사되어 저온에 상당히 약간 품종임을 알 수 있었다. 처리 전 후의 엽록소 측정결과 품종별로 약간의 차이는 있었으나 온도가 높아질수록 엽록소 함량은 감소되었고 저온인 20/15, 15/10℃에서는 대부분 엽록소 함량이 높은 경향을 나타냈다. 엽록소 함량은 온도와 광과도 상당히 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다.

대부분 호접란의 개화유도를 18~25℃로 하고 있으나 본 시험 결과에서도 품종에 따라 저온요구도가 다르며 품종에 따라서는 15℃까지도 내려야 화아가 잘 유도되는 품종이 있기 때문에 처음 재배를 하는 품종에 있어서는 저온에 감응 정도를 살펴보아야 할 것이다.

<표 9> '05년 수집 품종별, 온도별 화아특성 및 엽록소

온도처리 개시 : '05 6.21 , 처리완료 '05. 8.21
* 조사일기준 : 8월 24일

품종명	처리온도 (°C)	화아길이(cm)*	화아 발생율 (%)	고사율 (%)	엽록소(SPDA)	
					6/21	8/24
Brother Success	30/25	0	0	0	47.4	33.1
	25/20	0	0	0	46.5	45.6
	20/15	1.0	33.3	0	48.6	67.1
	15/10	0	0	100	43.0	0
Brother spring Dancer	30/25	7.0	33.3	0	59.5	65.9
	25/20	22.2	66.7	0	58.1	62.3
	20/15	17.8	66.7	0	57.8	60.4
	15/10	0	0	0	49.8	52.8
Brother spots	30/25	0	0	0	51.7	51.4
	25/20	32.3	100	0	49.5	44.2
	20/15	25.1	100		52.9	64.3
	15/10	0	0	33.3	50.6	45.6
Brother Green Jode	30/25	11.5	33.3	0	37.7	36.3
	25/20	6.5	66.7	0	40.1	25.8
	20/15	6.6	66.7	0	42.1	53.8
	15/10	0	0	0	36.3	28.6
Maki Watamab e	30/25	0	0	0	45.1	30.3
	25/20	11.3	66.7	0	43.6	47.0
	20/15	14.5	33.3		42.1	45.3
	15/10	0	0	33.3	36.5	30.5
Sogo Smith	30/25	14.0	66.7	0	52.5	43.4
	25/20	24.3	100	0	48.6	47.9
	20/15	23.3	66.7	0	45.6	49.9
	15/10	0	0	0	52.2	37.5
Minho- Princess	30/25	0	0	0	59.8	54.7
	25/20	0	0	0	62.4	55.6
	20/15	0	0	0	64.0	78.8
	15/10	0	0	0	62.7	54.6
Sogo Beach	30/25	0	0	0	51.7	43.4
	25/20	20.4	100	0	48.6	47.9
	20/15	6.7	66.7	0	51.6	66.1
	15/10	0	0	0	47.2	38.2
Yupin Giant	30/25	0	0	0	54.0	36.8
	25/20	12.3	66.7	0	51.4	47.4
	20/15	6.9	100	0	50.5	66.5
	15/10	0	0	0	50.0	43.8
Golden Leopard Cheaters	30/25	0	0	0	47.0	54.2
	25/20	14.5	33.3	0	46.6	40.2
	20/15	7	33.3	0	43.2	59.1
	15/10	0	0	33.3	53.6	37.5

<표 10> 품종별, 처리온도별, L, a, b 값

품종명	처리온도 (°C)	L		a		b	
		처리전	처리후	처리전	처리후	처리전	처리후
Nobby's Amy	30/25	30.2	32.7	-16.1	-15.3	22.4	22.6
	25/20	30.0	29.1	-10.5	-16.0	15.0	20.0
	20/15	30.9	29.9	-10.6	-7.8	12.7	17.6
	15/10	34.2	46.8	-9.3	-5.0	10.31	27.7
Taida Salu	30/25	32.3	31.2	-9.5	-16.5	12.2	22.9
	25/20	33.9	33.7	-13.2	-18.8	12.91	30.3
	20/15	35.1	31.6	-10.3	-18.4	12.5	29.1
	15/10	34.4	46.1	-9.7	-17.6	11.2	32.3
Champion n Girl	30/25	39.7	36.0	-13.0	-13.2	17.4	28.2
	25/20	37.9	30.8	-12.3	-14.5	16.5	22.0
	20/15	38.4	40.7	-12.0	-12.5	15.8	22.6
	15/10	38.4	44.6	-11.9	-13.1	14.5	24.2
Brother Julius	30/25	39.3	31.7	-13.2	-17.1	18.5	27.4
	25/20	37.3	28.9	-10.5	-14.9	17.2	25.6
	20/15	37.8	34.4	-12.9	-10.9	17.4	21.1
	15/10	37.6	52.5	-11.4	-5.5	13.8	31.9
Sogo Little Angel	30/25	37.1	35.4	-13.3	-21.0	19.1	35.7
	25/20	34.8	40.4	-13.2	-20.3	17.4	36.6
	20/15	35.6	43.8	-12.7	-20.9	16.3	42.1
	15/10	42.5	48.6	-16.5	-8.8	24.3	31.8
Ever-spr ing King	30/25	36.2	31.6	-10.0	-12.8	16.8	18.4
	25/20	37.9	28.8	-12.7	-14.6	17.0	17.6
	20/15	37.7	32.0	-12.7	-4.8	16.0	18.4
	15/10	38.3	46.0	-13.3	-11.7	17.9	28.6
Taisuco Yellow Boy	30/25	32.2	32.6	-15.0	-16.9	17.4	23.6
	25/20	39.5	37.6	-23.1	-20.0	27.4	33.6
	20/15	35.7	36.4	-18.5	-7.5	28.5	23.7
	15/10	32.1	34.9	-13.4	-14.7	21.6	22.9
Ever Spring Pioneer Champion	30/25	33.3	31.0	-13.5	-14.1	23.3	22.3
	25/20	35.9	33.0	-14.3	-11.6	20.2	20.9
	20/15	35.8	29.8	-12.8	7.9	17.5	15.0
	15/10	32.8	35.0	-10.8	-12.3	24.0	20.1
Dortis	30/25	43.9	39.4	-10.6	-12.4	20.6	19.5
	25/20	40.0	40.4	-11.7	-11.9	20.3	19.7
	20/15	42.2	46.0	-13.2	-14.0	21.0	25.2
	15/10	42.3	43.9	-7.6	-12.0	24.0	25.4

품종별, 온도에 대한 L,a,b 값을 조사한 결과 대부분 온도가 올라갈수록 L 값이 적어졌으며 a 값은 저온일수록 높았으며 특히 Ever Spring Pioneer Champion 품종

은 20/15°C에서 + 값을 나타냈으며 잎 전체적으로 붉은색이 많이 나타났다. 저온에 강한 품종일수록 a 값은 높지 않은 경향이였다. 보통 호접란은 온도가 낮아지면 방어기작으로 저온을 견디기 위해 안토시아닌 색소를 많이 생성한다. 따라서 저온에 약한 품종일수록 a 값이 높게 나타난다고 볼 수 있다. b값은 전반적으로 처리전보다 대부분 높은 경향을 나타냈으나 품종에 따라서는 전과 비슷한 경향을 나타내는 품종도 있어 온도에 따른 상관관계를 조사할 필요가 있다고 생각된다.

제2절 세부과제 II: 유용 유전자의 형질전환 기술에 의한 신품종 육성

제1항 연구 방법

가. *Agrobacterium*에 의한 유용 유전자(조기개화 유전자, 화색 관련 유전자)의 형질전환

1) 재료

- ① 식물재료: PLB 증식이 양호하고 돌연변이가 적은 우수한 품종 사용
cv. T101(핑크색), T093(핑크색), 조(백색)
- ② 유용 유전자: COG and FLC gene(개화조절유전자), CHS gene(화색조절유전자)
- ③ *Agrobacterium* line 및 vector: LBA 4404, pCAMBIA2301(CHS gene),
pCAMBIA1300(COG gene) 및 pCAMBIA1390 (FLC gene)
- ④ Selection marker : COG and FLC gene(개화조절유전자) - hygromycin (hpt gene)
CHS gene(화색조절유전자) - kanamycin (NPT II gene)

2) 형질전환 방법

*Agrobacterium*에 의한 형질전환체계를 이용하여 조기 개화유전자 및 화색 관련 유전자를 형질전환 하였다. Recombinant DNA로 형질전환된 *Agrobacterium* LBA4404를 Hygromycin (50mg/L)이 포함된 LB agar plate에 streaking하고 28℃에서 배양하여 형성된 colony를 선택한 후 50ml YEP 액체배지에서 300rpm으로 OD600=0.5가 될 때까지 배양한다. 배양된 배지를 6,000rpm으로 15분간 원심분리한 다음 0.8% NaCl액으로 세척한 후 PLB의 형질전환용으로 준비한다. 형질전환을 위한 PLB는 VW배지에서 2일동안 pre-culture하고 PLB를 *Agrobacterium*과 co-culture한다. co-cultivation 후 3일 정도 암배양 한다. 암배양 후 4주 정도 non-selection 배지에서 PLB를 증식한 후 selection 배지에서 형질전환체를 선발하여 재분화 시켜준다. *Agrobacterium tumefaciens* line은 LBA4404이며 selection marker로 hygromycin, kanamycin를 사용하였으며 reporter gene으로 GUS를 사용하였다.

나. Gene gun에 의한 유용 유전자(조기개화 유전자, 화색 관련 유전자)의 형질전환

1) 재료

- ① 식물 재료: PLB증식력이 우수하고 돌연변이가 적은 T101(핑크색) 품종
- ② 유용 유전자: COG, FLC gene(개화조절 유전자), CHS gene(화색조절 유전자)
- ③ Vector: pCAMBIA2301(CHS1 gene), pCAMBIA1300(COG gene) 및 pCAMBIA1390 (FLC gene)
- ④ Selection marker : COG and FLC gene(개화조절유전자) - hygromycin (hpt gene)
CHS1 gene(화색조절유전자) - kanamycin (NPT II gene)
- ⑤ 사용기기 및 Gene gun 재료 : Biolistic PDS-1000(Bio-rad), 0.6 μ m gold,
유전자총과 disk간 거리 9cm,
헬륨가스 압력 900psi

2) 형질전환 방법

각 품종의 PLB는 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에서와 같이 잎이 0-2개의 뿌리가 나지 않은 것을 사용한다. 형질전환을 위해서 1일정도 pre-culture 해준다. pre-culture 시 PLB를 페트리디쉬의 중앙에 직경2cm 정도로 치상하여 Gene gun 기기 사용 시 한번에 할 수 있도록 한다. 앞선 실험 결과를 통해 나온 조건을 바탕으로 pre-culture된 PLB를 Gene gun에 넣고 0.6 μ m의 gold를 이용하여 헬륨가스 900psi, 유전자총과 disk 간격 9cm로 하여 유전자를 쏜다. 유전자가 분사된 PLB를 non-selection 배지에서 2주정도 안정화시킨 후 선발배지로 옮긴다.

다. 형질전환 식물체의 기내선발 및 재분화

기존에 확립된 재분화 시스템을 바탕으로 항생제 저항성 유전자(hygromycin, kanamycin) 등의 selection marker 유전자를 이용하여 형질전환체를 기내에서 선발 및 재분화 시킨다. 약 100일 동안의 selection 배지에서 소식물체를 선발한 후, cefotaxime이 포함된 재분화 hyponex 배지로 옮겨 식물체로 성장 시킨다.

라. 형질전환 식물체 확인

기내에서 선발된 형질전환 식물체들은 원하는 유용유전자가 삽입이 되었는지를

확인하기 위하여 GUS, PCR, RT PCR 및 Southern bolt analysis을 실시하였다.

1) GUS assay

Hygromycin에 포함된 배지에서 1차 선발된 protocorm을 GUS assay를 통해 2차 선발한다. GUS 유전자의 경우 조직화학적 방법(Jeffersson, 1987)에 따라 고정액에 45분간 처리한 다음 50mM Na-phosphate에 2차 세척한 후 염색액으로 염색하여 50mM Na-phosphate로 2차 세척 하고 95% ethanol로 5분간 처리하여 엽록소를 제거하여 indigo의 발색 정도로 분석한다.

2) PCR assay

벡터에 삽입된 유용유전자의 5'말단과 3'말단 사이를 증폭할 수 있게 고안된 primers(Table 5)를 사용하고, 형질전환 식물체의 genomic DNA를 주형(template)으로 사용하여 PCR로 증폭한 후에, 증폭 산물의 크기로 형질전환 유무를 확인한다.

3) RT PCR assay

형질전환 식물체에서 추출한 RNA를 위의 PCR assay와 같이 PCR로 증폭한 후에, 증폭 산물의 크기로 형질전환 유무를 확인한다.

4) Southern blot analysis

형질전환 식물체에서 추출한 DNA 및 RNA를 nylon membrane에 tranfer하고, chemilumines cent detection system 또는 동위원소를 이용하여 labelling하고 hybridization하여 분석한다.

마. 도입유전자 발현검정

- 1) 형질전환된 T₀ 개체를 crossing시켜 T₁ 개체를 획득한 후 wild type 식물체와 화색 및 조기 개화 유무 조사
- 2) T₁ 세대에서 도입유전자 유무 검정을 위해 PCR 분석 및 항생제 저항성 개체 선발

바. 선발 및 증식된 형질전환 조직배양묘 온실 테스트

생육특성검사(생장율, 병충해에 대한 저항성, 개화 특성 등)를 실시한다.

제2항 연구 결과

가. *Agrobacterium*에 의한 유용 유전자)의 형질전환

1) 최적의 co-culture 시간과 온도, 항생제 및 광 조건 등 구명

가) 항생제(Hygromycin, PPT) 저항성 실험

KV바이오(주)로부터 분양받은 품종 T101 PLB를 이용하여 재분화 배지에 hygromycin을 0, 3, 5, 7, 9mg/L 수준으로 PPT를 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0mg/L 농도로 첨가하여 배양 9주 후 생존율 및 재분화율을 조사하였다. 배양환경은 28℃로 유지하였으며 1,500lux의 조도에서 16시간 일장을 유지하였다.

Hygromycin은 3mg/L 수준에서부터 생육이 저해되기 시작하였으며 9mg/L이상에서는 모든 개체가 고사하여 선발 marker로 hygromycin 5mg/L 수준이 적당한 것으로 나타났다 (Fig. 1. A, Fig. 2. A). 배양 8주후 PPT 농도에 따른 PLB생존율 및 재분화율을 조사한 결과 PLB생존율은 6mg/L 수준에서부터 저하되기 시작하였으며 유식물 재분화는 1.2mg/L 에서부터 영향을 받았다 (Fig. 1. B, Fig. 2. B). PPT는 아미노산 합성을 저해하는 제초제로서 초기에는 그 영향이 미흡하나 배양 3개월 후 조사한 결과 0.4mg/L 이상의 모든 처리에서 PLB의 재분화가 이루어지지 않아 선발농도로 0.5mg/L를 사용하였다.

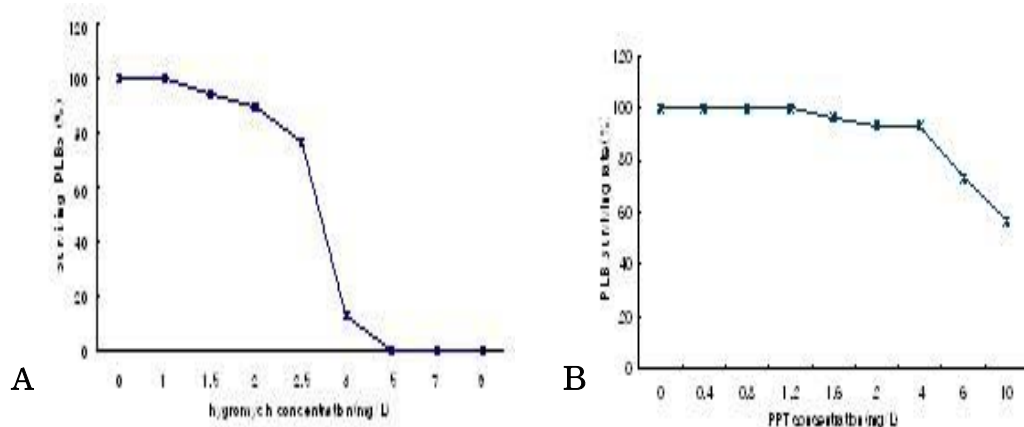


Fig. 1. Effect of antibiotic concentration on PLB of surviving rate of *Phalaenopsis* CV. 'T101'. A: hygromycin B: PPT

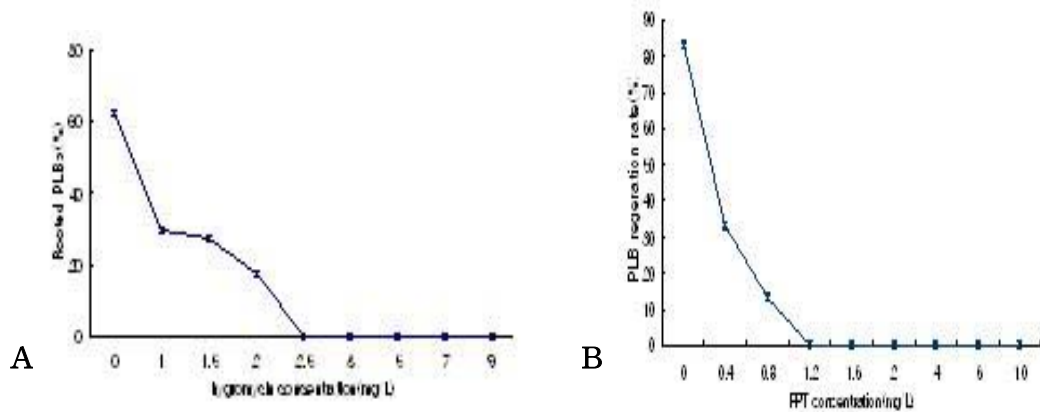


Fig. 2. Effect of antibiotic concentration on PLB of regeneration rate of *Phalaenopsis* CV. 'T101'. A: hygromycin B: PPT

나) 형질전환에서 *Agrobacterium* infection 시간이 미치는 영향

Infection 시간이 형질전환에 미치는 영향에 관한 실험결과 모든 처리에서 PLB의 생존율이나 재분화된 식물체의 수에는 큰 차이를 나타내지 않았다(Table 1). Bacterium suspension culture 시간이 길어질수록 PLB의 생존율이 높아졌으나 재분화된 식물체의 수는 적은 것으로 나타났다. 앞으로 더욱 적당한 bacterium 농도를 찾는 것이 필요할 것으로 생각되었다(Table 2).

Table 1. Effect of infection time on the production efficiency of hygromycin resistant putative transformants (rooted plantlets) on the selection medium after 8 weeks.

Infection time (min)	No. of inoculated PLBs	No. of survived PLBs(%)	No. of rooted PLBs(%)
16	526	488(92.7)	77(15.7)
30	457	457(89.7)	77(18.7)
45	414	391(94.4)	68(17.3)

Table 2. Effect of suspension culture time of *Agrobacterium* on the production efficiency of hygromycin-resistant putative transformants (rooted plantlets) on the selection medium after 8 weeks.

suspension culture time(hr)	No. of inoculated PLBs	No. of survived PLBs(%)	No. of rooted PLBs(%)
26	180	165(91.6)	18(10.9)
47	142	135(95.0)	9(6.6)

다) Cefotaxim과 Timentin의 *Agrobacterium* 성장 억제효과 구명

일반적으로 조직에 *Agrobacterium* infection 후 *Agrobacterium* 성장 억제를 위해 cefotaxim을 사용하나 그 효과에 비해 매우 고가이므로 최근 많이 사용하는 상대적으로 저가이고 *Agrobacterium* 성장 억제효과가 좋다는 timentin의 효과를 구명하고자 실험하였다. 실험결과 300mg/L 의 같은 농도에서 cefotaxim보다 더 오히려 *Agrobacterium* 성장을 억제하였으나 상대적으로 PLB 재분화에 있어 재분화율이 낮아 200mg/L 농도로 처리하였을 때 *Agrobacterium* 성장 억제 및 재분화도 잘되는 것으로 나타났다(Fig. 3).

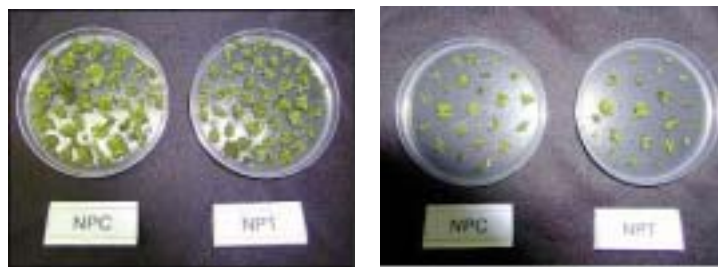


Fig. 3. The effect of 300mg/L cefotaxime(L) and timentine(R) on *Agrobacterium* overgrowth control

2) 형질전환 후 재분화 효율을 증가시키기 위한 최적 배지 및 배양환경 구명

형질전환을 위한 PLBs의 cutting, pre-culture 및 co-cultivation

형질전환을 위하여 PLB를 먼저 충분히 증식(Fig.4.A)시킨 후 잎이 0-2이고 뿌리가 나지 않은 PLB를 사용하였으며 *Agrobacterium* infection을 위해서 황으로 1번 cutting 한 후 2일 정도 pre-culture 해주었다(Fig.4.B). Pre-culture된 PLB를 *Agrobacterium* solution에 15분 동안 shaking 하며 infection 시킨 후 멸균된 filter paper를 이용하여 PLB를 건조

시킨다(Fig.4.C-E). 건조된 PLB를 PLB증식배지(VW배지+100uM acetocyringone)에 치상한 후 *Agrobacterium*의 성장에 따라 1-3일정도 co-cultivation 시킨다(Fig.4.F).

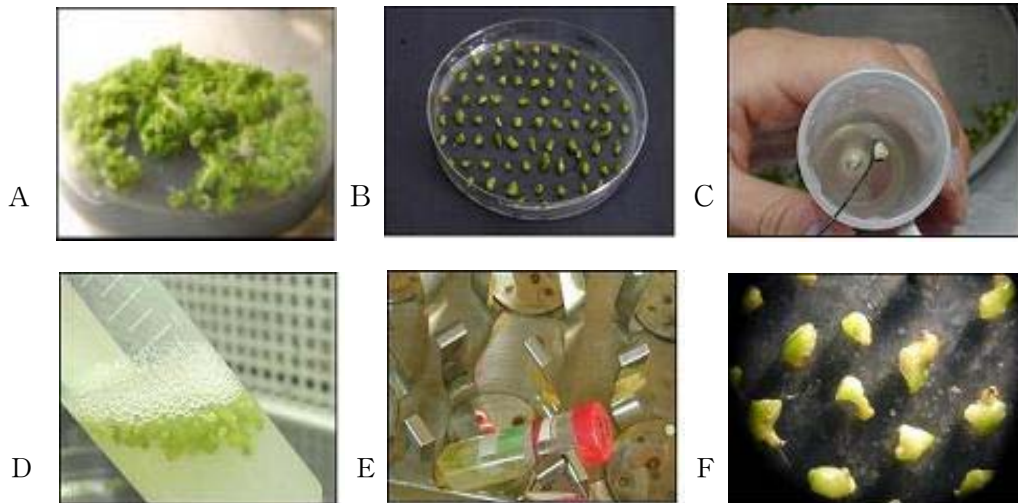


Fig. 4. *Agrobacterium* infection procedure for *Phalaenopsis* PLBs.

A: PLB multiplication B: Fresh and suitable PLBs for preculture

C: Dissolved *Agrobacterium* pellet in LB liquid medium

D: Infection of the pre-cultured PLBs in *Agrobacterium* solution

E: Shaking of the *Agrobacterium* infected PLBs

F: Suitable growing of *Agrobacterium* during co-cultivation

3) 식물체로의 유전자 도입

Transferring of PLBs from co-cultivation to non-selection and selection medium

Co-cultivation을 시킨 후 cefotaxime이 첨가된 VW 액체배지로 4-5번 수세한 후 멸균된 filter-paper를 이용하여 PLB를 충분히 건조시킨 후 non-selection medium(VW배지 + 300mg/L cefotaxime)에 1주일 정도 계대배양하여 스트레스 받은 PLB를 회복한다. (Fig.5.A). 회복된 PLB를 항생제(5mg/L hygromycin or 5mg/L PPT)가 들어있는 selection medium로 계대배양하였다. 계대배양하여 8-10주 후에 형질전환된 PLB를 선발

할 수 있었으며 또 한번 계대배양하여 5-8주 후에 PLB를 재분화 시켰을 때 형질전환체를 선별할 수 있었다. Selection medium으로 계대배양한 후 PLB로부터 페놀화합물의 분출이 심하였고 재분화시에도 같은 현상을 보여 주었다(Fig.5.B). 또한 때에 따라 non-selection medium과 selection medium 상태에서 *Agrobacterium*의 over-growing이 일어났으며 한번 over-growing된 *Agrobacterium*은 제어하기 힘든 것으로 나타났다. 이를 해결하기 위해 멸균된 filter paper를 배지 위에 깔고 PLB를 치상을 하였을 때 *Agrobacterium*의 over-growing이 적게 발생하였으나 완전히 제어하기는 힘든 것으로 나타났다(Fig. 5.C-E).

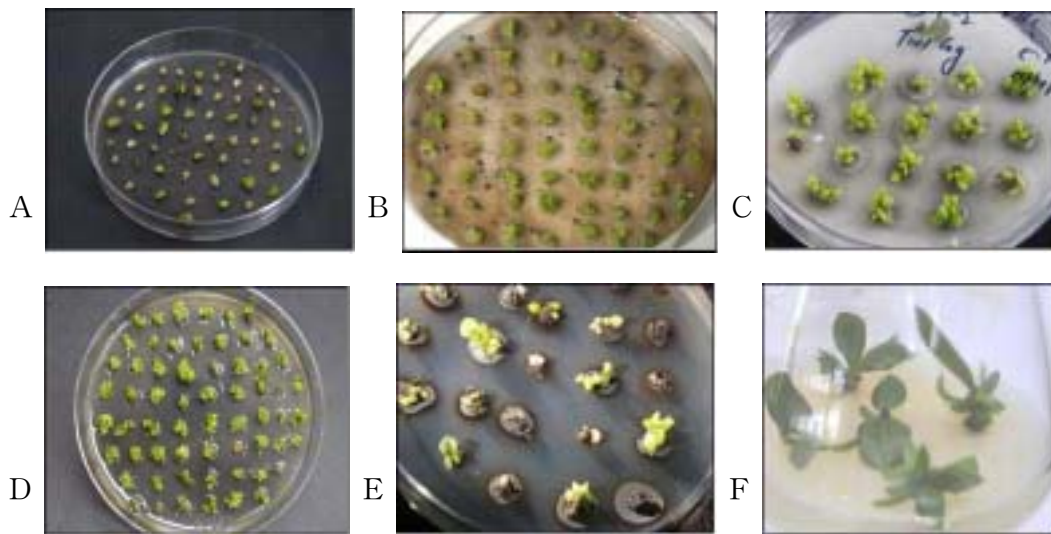


Fig. 5. Transferring of PLBs from co-cultivation to non-selection and selection medium

- A: After co-cultivation, healthy PLBs in non-selection medium
- B: Output of phenol compound of PLBs in selection medium
- C: PLBs with continuously growing *Agrobacterium* in filter paper
- D: Induction and multiplication of PLBs
- E: Selection of transgenic PLBs
- F: Selection of transgenic plantlets

나. Gene gun에 의한 유용 유전자의 형질전환

1) 최적의 disk 종류, 유전자총과 disk간 거리, 헬륨가스 압력 등을 구명

가) 헬륨가스 압력에 따른 형질전환 효율 구명

본 실험을 위하여 FLC gene을 이용하였으며 selection marker는 hygromycin을 사용하였다. Biolistic PDS-1000(Bio-rad)을 사용하여 1 μ m크기의 tungsten을 헬륨압력 900psi와 1,500psi이 형질전환에 미치는 영향을 구명하고자 하였다. 실험 결과 헬륨가스 압력 900psi가 PLB 증식 및 재분화율을 더 높이는 것으로 나타났다(Table 3).

Table 3. Effect of helium pressure on the regeneration of PLBs in the selection medium 8 weeks after bombardment.

Helium pressure (psi)	No. of inoculated PLBs	No. of survived PLBs(%)	No. of rooted PLBs(%)
900	375	324(86.4)	102(31.4)
1500	634	518(81.7)	86(16.6)

나) 최적의 disk 종류에 따른 형질전환 효율 구명

Plasmid를 운반하는 입자의 종류를 gold와 텅스텐을 각각 0.6 μ m, 1 μ m, 1.6 μ m을 사용한 결과 PLB의 스트레스는 입자가 클수록 더 심한 것으로 나타났으나 0.6 μ m와 1 μ m는 큰 차이가 없는 것으로 나타남으로 모두 가능한 것으로 생각되었다. 입자의 종류에 따라 처음 PLB의 스트레스 정도는 비슷한 것으로 나타났으나 재분화 후 변이로 보이는 소식물체가 텅스텐의 경우 더 많은 것으로 나타났다. Gene gun 사용시 재분화율이 *Agrobacterium*에 비하여 많이 떨어지는 것으로 나타났으며 변이도 많은 것으로 나타났다(Fig. 6).

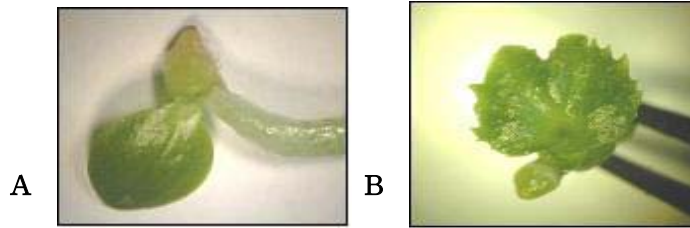


Fig. 6. Transgenic plantlets without(A) and with mutation(B)

다) 유전자총과 disk간 거리에 따른 형질전환 효율 구명

유전자총과 disk간 적합한 거리를 규명하기 위해 6cm, 9cm, 12cm로 하여 실험하였다. 실험결과 6cm의 경우 너무 간격이 적어 총을 쏘았을 때 PLB가 외부로 많이 튀어 나갔으며 PLB가 많이 상해를 입어 대부분의 PLB가 죽었다. 9cm와 12cm의 경우 많은 PLB가 살아 남았으나 selection 배지를 옮겼을 때 12cm 간격으로 쏘았던 PLB가 더 많이 고사되는 것으로 나타났다. 따라서 9cm로 하는 것이 가장 적정 것으로 나타났다.

2) 식물체로의 유전자 도입

형질전환을 위해 각 품종의 PLB를 먼저 충분히 증식시킨 후 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에서와 같이 잎이 0-2개의 뿌리가 나지 않은 것을 사용하였다. 형질전환을 위해서 1일정도 Pre-culture 해주었다. Pre-culture 시 PLB를 페트리디쉬의 중앙에 직경2cm 정도로 치상하여 gene gun 기기 사용시 한번에 할 수 있도록 하였다. pre-culture된 PLB를 gene gun에 넣고 0.6 μ m gold를 이용하여 헬륨가스 900psi, 간격 9cm로 하여 유전자를 쏘았다. 유전자가 분사된 PLBs를 non-selection배지에서 2주정도 안정화시킨 후 바로 selection 배지로 옮겼다. selection 배지의 항생제 농도는 위의 *Agrobacterium*에서와 같이 5mg/L hygromycin 또는 5mg/L PPT를 첨가하였다. 전체적으로 기내에서 선발되는 양상은 *Agrobacterium*과 같았으나 *Agrobacterium*을 통해 형질전환한 것에 비해 기내에서 선발되는 PLB의 숫자는 적었다.

다. 형질전환 식물체의 기내선발 및 재분화

hygromycin, kanamycin을 이용한 기내선발

형질전환 후 non-selection 배지로 옮겨져 안정화된 PLB를 항생제가 첨가된 selection배지에 치상하였다. FLC gene과 COG gene은 hygromycin 5mg/L 첨가된 배지에, CHS gene은 kanamycin 200mg/L를 첨가된 배지에 치상하였다. 형질전환 시킨 PLB은 한 달 후 재분화 되기 시작하였고, 100일 동안 selection 배지에서 기내선발을 하였다. 계대 배양은 2주 마다 실시하였고 이들 selection 배지에서 선발된 소식물체들 중 일부는 분자적 분석을 위해 cefotaxime이 포함된 재분화 hyponex 배지로 옮겨 식물체로 성장시켰다.

라. 형질전환 식물체 확인

1) GUS, PCR assay

가) GUS assay

Kanamycin이 포함된 배지에서 선발된 PLB(Fig.7.A)를 가지고 GUS assay를 실시하였다. 이들 선발된 PLB를 고정액에 45분간 처리한 후 2 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-gluc; Wako, Japan)이 포함된 50mM Na-phosphate에 37°C에서 48시간 동안 incubation 하였고, 엽록소를 제거하기 위해서 5분 동안 95% ethanol 침지하였다. GUS assay를 한 결과, PLB에서 청색으로 염색된 spots을 관찰 할 수 있었다 (Fig.7.B).

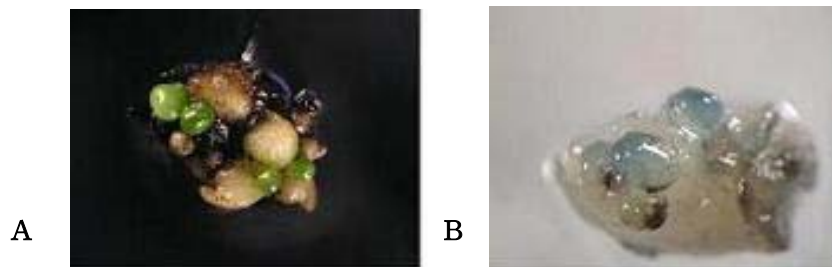


Fig. 7. A: Kanamycin-resistant PLBs formation on selection medium.

B: Stable GUS gene expression of transformed PLBs.

나) PCR analysis

기내에서 선발된 형질전환 식물체로부터 DNA를 추출하여 PCR analysis를 하였다. 추출한 DNA은 primers, dNTPs, MgCl₂, 1.5UTaq DNA polymerase(Takara Biochemicals, Otus, Japan)을 mix한 후, PCR 증폭 실시하였다. PCR condition은 pre-denaturation를 94°C에서 4분 한 후, denaturation 94°C 45초, annealing 60°C 45초, elongation 72°C 2분을 30회 반복하였으며 extension을 72°C에서 5분간 실시하였다.

(1) PCR에 의한 FLC 유전자의 형질전환체 확인

FLC gene 유용 유전자가 삽입된 형질전환 식물체를 기내에서 5 line을 선발하여 PCR analysis를 하였다(Fig.8). FLC gene primers 5'-gctctagaatgggaagaaaaaactagaa-3', 5'-taggtaccctaattaagtagtgggagagt-3'을 가지고 PCR analysis(Fig.8.A)를 실시한 결과 FLC gene과 같은 크기인 610bp의 밴드를 확인할 수 있었고, selection marker인 hpt gene primers 5'-ggacattgttgagccgaaatcc-3', 5'-aaaagtgcagag cgtctccgac-3'을 가지고 PCR analysis(Fig.8.B)실시 하였을 때는 hpt gene과 같은 크기인 564bp의 밴드를 확인할 수 있었다.

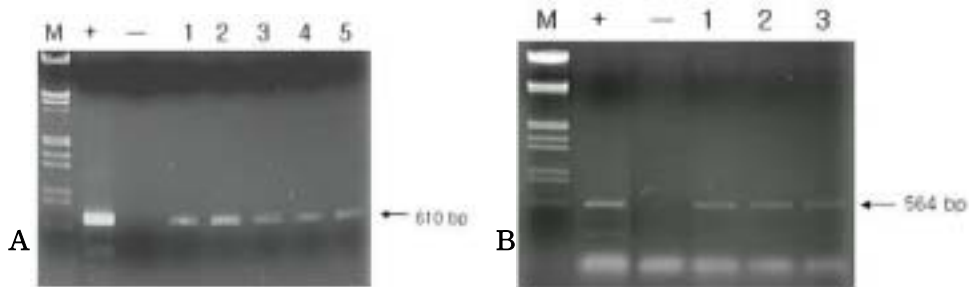


Fig. 8. PCR analysis of transgenic plants for FLC gene(A) and hpt gene(B). (A) PCR of FLC gene in transgenic plants result the 610bp FLC band, M: marker, +:positive control, -:negative control, 1-5:transgenic plants. (B) PCR of hpt gene in transgenic plants result the 564bp hpt band, M: marker, +:positive control, -:negative control, 1-3:transgenic plants.

(2) PCR에 의한 COG 유전자의 형질전환체 확인

COG gene 유용 유전자가 삽입된 형질전환 식물체를 기내에서 5 line을 선발하여 PCR analysis를 실시하였다(Fig. 9). COG gene primers 5'-gctctagaatggcgaccaagat tctcaag-3', 5'-gcggtacctaacaagattga ccatcggtg-3'을 가지고 PCR analysis(Fig.9.A)를 실시한 결과, COG gene과 같은 크기의 544bp의 밴드를 확인할 수 있었고, selection marker인 hpt gene primers 5'-ggacattgttgagccgaatcc-3', 5'-aaaagttcgacagcgtctccg ac-3'을 가지고 PCR analysis(Fig.9.B)를 실시 하였을 때는 hpt gene과 같은 크기의 564bp의 밴드를 확인 할 수 있었다.

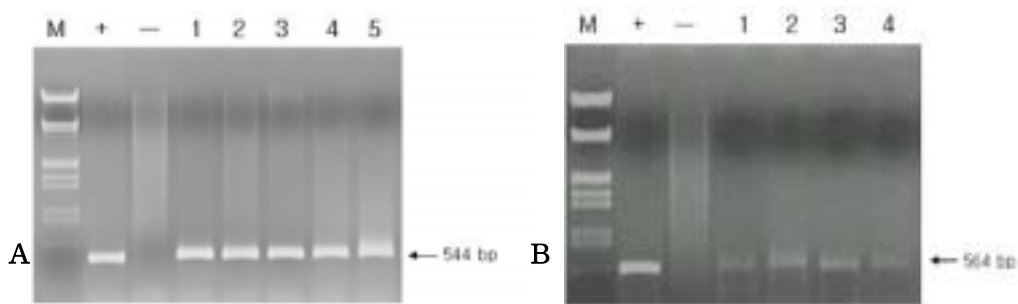


Fig. 9. PCR analysis of transgenic plants for COG gene(A) and hpt gene(B). (A) PCR of COG gene in transgenic plants result the 544bp COG band, M: marker, +:positive control, -:negative control, 1-5:transgenic plants. (B) PCR of hpt gene in transgenic plants result the 564bp hpt band, M: marker, +:positive control, -:negative control, 1-4:transgenic plants.

(3) PCR에 의한 CHS 유전자의 형질전환체 확인

CHS gene 유용 유전자가 삽입된 형질전환 식물체를 기내에서 5 line을 선발하여 PCR analysis를 실시하였다(Fig 6). CHS gene primers 5'-gttctagaatggcgctcctccgttgac atga-3', 5'-gtggtaccttagacggcaaccg tcacggtg-3 '을 가지고 PCR analysis(Fig 6-A)를 실시한 결과 CHS gene과 같은 크기의 1212bp의 밴드를 확인할 수 있었고, selection marker인 NPT II gene primers 5'-gaggctattcgctatgactg-3', 5'-atcgggagcggcgataccgta-3'을 가지고 PCR analysis(Fig 6-B)를 실시 하였을 때 NPT II gene 크기와 같은 700bp의 밴드를 확인 할 수 있었다.

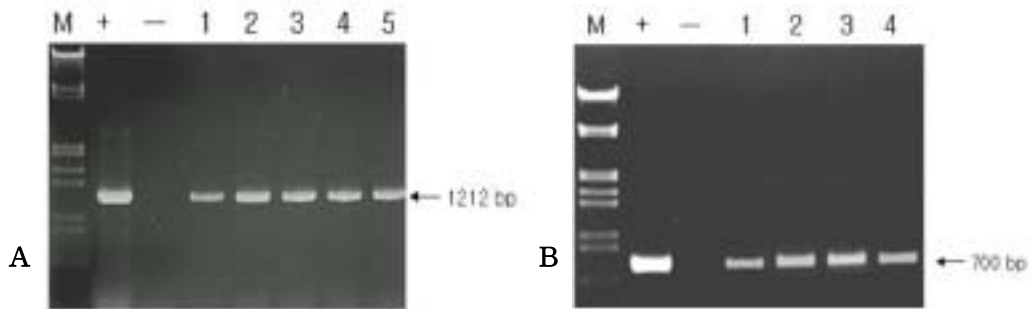


Fig. 10. PCR analysis of transgenic plants for CHS I gene(A) and NPT II gene(B). (A) PCR of CHS I gene in transgenic plants result the 1212bp CHS I band, M: marker, +:positive control, -:negative control, 1-5:transgenic plants. (B) PCR of NPT II gene in transgenic plants result the 700bp NPT II band, M: marker, +:positive control, -:negative control, 1-4:transgenic plants.

2) RT-PCR 및 Southern blot assay

가) RT- PCR analysis

PCR analysis를 통해 유용 유전자가 삽입이 되었음을 확인한 식물체를 가지고 RT PCR analysis를 실시하였다. TRI REAGENT™을 이용하여 RNA를 추출하였으며 RT PCR은 Reverse-iT™ One-Step Kit, ReddyMix™ kit를 사용하여 실시하였다. 추출된 RNA를 kit에 있는 ReddyMix™ RT-PCR master mix with Reverse-iT™ RTase Blend 와 primers 그리고 RNase/Dnase-free water를 mix 한 후 PCR 증폭을 실시하였다. PCR condition은 first stand synthesis를 47℃에서 30분, initial denaturation을 94℃에서 2분 한 후, denaturation 94℃ 20초, annealing 60℃ 30초, extension 72℃ 1분을 30회 반복하였고, final extension을 72℃에서 5분간 실시하였다. FLC 유전자가 삽입된 형질전환체는 FLC gene primers 5'-gctctagaatgggaagaaaaaactagaa-3', 5'-taggtaccctaattaagtagtgggagagt-3'을, COG 유전자가 삽입된 형질전환체는 COG gene primers 5'-gctctagaatggcgaccaagattctcaag-3', 5'-gcggtaccttaacaagattgaccatc ggtg-3'을, CHS 유전자가 삽입된 형질전환체는 CHS gene primers 5'-gttctagaatggcgtcctccgtgacatga- 3', 5'-gtgg taccttagac ggcaaccgt cacggtg-3 '을

사용하였다. RT PCR analysis를 실시한 결과, 각각의 positive control에서 기대한 바와 같이 FLC gene은 610bp(Fig.11.A), COG gene은 544bp(Fig.11.B), CHS gene은 1212bp(Fig.11.C)의 밴드들을 확인할 수 있었다.

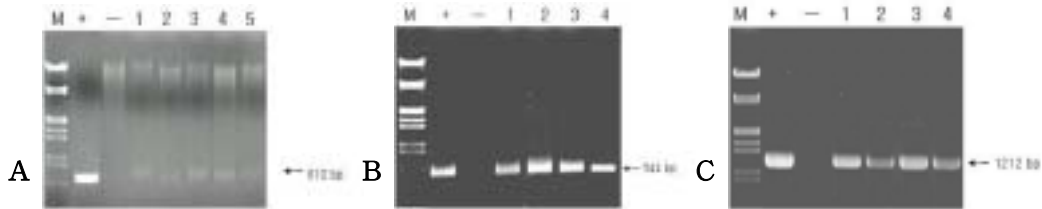


Fig. 11. RT PCR analysis of transgenic plants for FLC gene(A), COG gene(B) and CHS gene(C). (A) RT PCR of FLC gene in transgenic plants result the 610bp FLC band, M: marker, +:positive control, -:negative control, 1-5:transgenic plants. (B) PCR of COG gene in transgenic plants result the 544bp COG band, M: marker, +:positive control, -:negative control, 1-4:transgenic plants. (C) PCR of CHS gene in transgenic plants result the 1212bp CHS band, M: marker, +:positive control, -:negative control, 1-4:transgenic plants.

나) Southern blot analysis

위의 GUS, PCR 및 RT PCR analysis을 통해서 유용 유전자가 삽입이 되었음을 확인 할 수 있었고, 이들 line을 가지고 몇 copy의 transgene이 삽입 되었는지를 알아보기 위해 southern blot analysis 하였다. 형질전환 식물체 중 *Agrobacterium*을 이용해서 얻어진 형질전환 식물체 3개의 line을 선발하였다. 이들 선발된 3개의 line으로 부터 DNA를 추출하였으며 HindIII로 37°C에서 over night digestion하였다. digestion된 DNA는 0.7% agarose gels에 running하여 DNA를 분리하였으며, 분리한 DNA는 nylon membrane에 transfer 하고, DNA DetectorTM Genomic Southern Blotting Kit(KPL, USA)를 이용하여 detection 하였다. 이때 사용한 probe는 Geneclean Turbo (Bio 101)를 사용해 purify한 후, Random Primer DNA Biotinylation Kit(KPL, USA)를 사용하여 biotinylation 하였다. southern blot analysis한 결과, Fig.

12와 같이 각각의 gene에서 형질전환 식물체 3개의 line 모두 1copy씩 transgen이 삽입되었음을 확인 할 수 있었다.

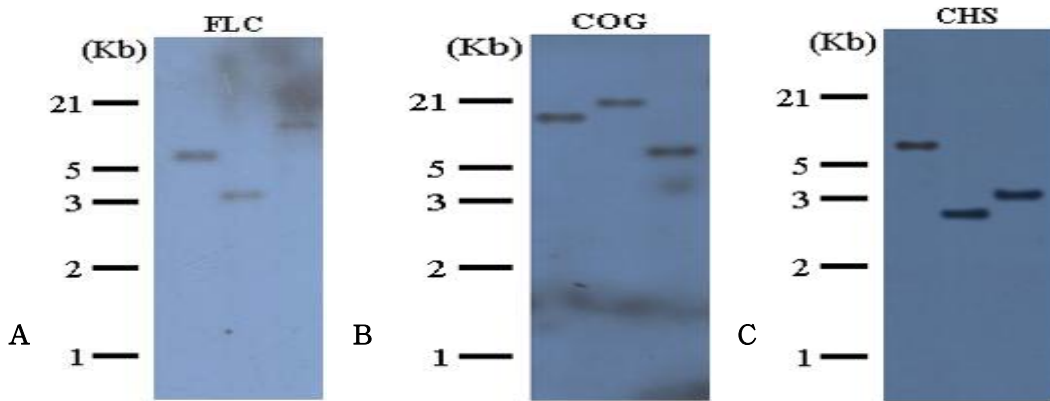


Fig. 12. Southern blot hybridizaion analysis of transgenic plants for FLC gene(A), COG gene(B) and CHS I gene(C).

마. 도입유전자 발현검정

1) 형질전환된 T₀ 개체와 대조구 식물체간의 생육특성 및 형태적 특성 비교검토를 통한 형질전환 식물체 선발

위에서 실시한 GUS, PCR, RT PCR 및 southern analysis 통해서 기내에서 선발된 식물체가 형질전환 식물체임을 분자적 수준에서 확인 할 수 있었고, 생물학적 분석을 하기 위해 pot로 옮겨져 격리온실에서 재배되고 있다(Fig. 13). T₀ 식물체의 경우 일반 호접란 식물체(non-transformed)와 비교했을 때 생육양상이 매우 느리다. 그리고 현재 성묘가 되어 조금씩 꽃대가 올라오고 있는 T₀ 식물체를 대조구 식물체와 비교해 볼 때 형태적 특성에 있어 큰 차이를 발견하기는 어려웠다. 앞으로 화색 관련 유전자인 CHS gene이 도입된 T₀의 경우 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 metabolite의 변화 정도를 확인하기 위해 anthocyanin을 분석할 예정이다. 개화조절 유전자인 FLC gene과 COG gene이 도입된 T₀의 경우 phenotypic analysis은 형질전환 식물체와 대조구 식물체와 비교했을 때 개화 시기 및 화색을 확인할 수 있으나 현재 형질전환된 호접란의 생육이 느

려 phenotypic analysis에 다소 시간이 걸릴 것으로 생각된다.

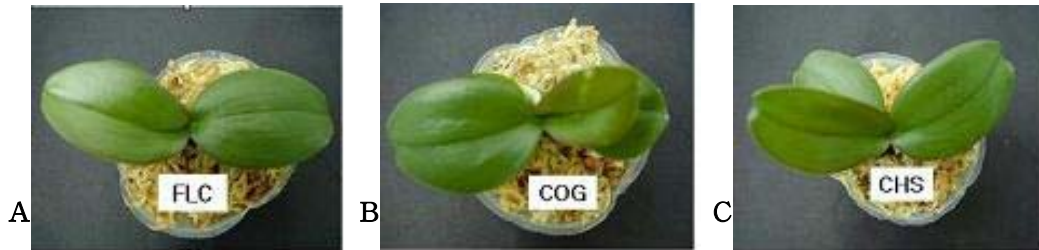


Fig. 13. (A) Transgenic plant with FLC gene. (B) Transgenic plant with COG gene. (C) Transgenic plant with CHS gene.

2) 형질전환된 신품종의 산업화를 위해 T_0 개체들의 T_1 으로 증식을 통한 도입유전자의 유실유무 검정

획득한 T_0 식물체를 온실로 옮긴 후 wild type 식물체와 격리시켜 재배하고 있다. 현재 각 유전자의 T_0 식물체들이 생육이 느리기 때문에 개화에 이르기까지는 많은 시간이 소요될 것으로 보여진다. 앞으로 개화 되는 시점에 이르게 되면 T_0 식물체와 wild type을 이용하여 gene flow에 관한 연구를 수행할 예정이다. 그래서 T_0 식물체와 wild type과의 cross pollination을 통해 T_1 식물체를 얻은 후 PCR analysis을 통해 transgene의 유무를 검정한다. 이는 도입유전자가 wild type으로의 이동을 관찰함으로써 환경위해성을 평가한다.

바. 선발 및 증식된 형질전환 조직배양묘 온실 테스트



Fig. 14. Development stage of seedling in each genes. (A) Transgenic plant with FLC gene. (B) Transgenic plant with COG gene. (C) Transgenic plant with CHS gene.

(1) 성장속도

형질전환체는 일반적으로 비형질전환 호접란(non-transformed)의 재분화시보다 생장이 둔화되고 성장속도가 느려 형질전환체가 wild type보다 성장속도가 느리다는 일반적인 보고와 유사함을 나타내었다. 이는 형질전환으로 인해 외래유전자(DNA)의 도입이 stress로 작용하여 결국 생리적 장애로 인한 생육 저하임으로 생각되었다.

(2) 돌연변이 유무

형질전환된 호접란의 경우 형질전환의 초기단계인 PLB증식시 돌연변이가 많이 나타나는 것으로 알려져 있다. 획득한 형질전환체의 경우 초기 PLB단계에서부터 유묘에 이르기 까지 관찰한 결과, 정상인 대조구 식물체와 비교해 봤을 때 잎이 쭈글쭈글한 돌연변이 증상을 발견하였다. 그러나 (주)KV 바이오가 보유하고 있는 돌연변이 검정 기술에 따르면 초기 생육시 돌연변이 증상이 있더라도 환경적인 요인에 의해 생육을 거듭하면서 사라지는 경우도 있으므로 형질전환체가 완전히 개화에 이르는 성묘에 이르기까지 지속적인 관찰이 요구되는 것으로 보여진다.

제3절 세부과제 III: Pink color 호접란의 조직배양에 의한 효율적 대량번식법 개발

제1항 연구 방법

가. PLB 유기 및 증식법과 재분화 체계 개선

PLB 유기 및 증식률을 높이기 위한 최적 조건을 구명하기 위한 배지종류(hyponex and NP 배지), pH 정도, charcoal의 농도에 따른 실험을 수행하였으며 배지조성 처리는 다음과 같다. 또한 재분화 효율 증가 및 상품성 있는 기내 유묘의 생산을 위해 배지성분(천연산물첨가), agar와 charcoal의 농도, pH 정도에 따른 실험을 수행하였다.

나. 대량증식에 적합한 우수 호접란 식물체(모주) 선발

- 1) 국내 및 국외에서 수집한 유전자원을 형태적 특성 조사를 통해 모주로 선발하였다.
- 2) 선발된 우수 모주로부터 PLB(protocom like body)를 유기하고 대량으로 증식시켰다.
- 3) PLB의 유기율·증식율 및 재분화율, 돌연변이율 등을 기준으로 균일한 조직배양 모주를 선발하였다.

다. Pink color 호접란의 대량생산 효율증가

Pink color 호접란은 국내외로 수요가 가장 많으나 다른 화색에 비해 대량 번식이 어려워 국내 뿐 아니라 국외에서도 조직배양묘의 공급이 매우 부족한 실정이다. 따라서 호접란 홍화(dark pink)품종들의 대량생산 효율증가와 산업화를 위해 대량번식법을 개선하기 위한 실험을 아래와 같이 수행하였다.

1) Pink color 호접란 액아배양시 소독제 및 항생제에 의한 소독효과 구명

호접란에서 PLB를 유기하기 위해서 액아배양 방법을 이용하는데 이 때 액아의 기내

도입 시 발생하는 식물체 오염(박테리아)을 해결하기 위해 항생제와 소독제를 이용한 여러 가지 소독방법을 조사하였다.

2) 증식 효율을 높이기 위한 생육 단계별 최적배지 개발

배지별 종류, sucrose농도, thiamine의 농도별 첨가, 증식에 적합한 PLB상태, 용기내 적정 PLB의 밀도에 관한 실험을 수행하여 대량생산 효율을 높이기 위한 최적 배지를 구명하였다.

3) 페놀 발생 억제 및 제거 방법 개발

항산화제 PVP(Polyvinylpyrrolidone)와 활성탄소에 대한 효과 및 배지 내 항산화제인 PVP와 활성탄소를 PLB를 분할하여 치상한 것과 분할하지 않은 것으로 나누어 처리한 후 PLB의 생체중(fresh weight)증식율(%)을 조사하였다.

4) 배양환경 개발

PLB 증식에 적합한 온도조건과 광조건 및 배양 용기 조건과 PLB 증식에 영향을 미치는 광조건 변화에 따른 PLB의 quality 향상 정도를 조사하였다.

5) 3차 정식 단계시 재분화 효율 증진

PLB 증식후 재분화된 식물체의 순화 전 마지막 배양 단계인 3차 정식배지에 서 호접란 식물체의 생육을 더욱 촉진시키기 위한 적정 배지 조건을 구명하기 위해 재분화에 영향을 미치는 감자와 당 농도 및 배양용기의 기내환경에 영향을 미치는 배양용기의 환기구멍 처리에 관하여 조사하였다.

6) 정식 단계시 계대배양 축소에 의한 배양성 증가

호접란 조직배양에 의한 대량생산 시 PLB 증식후 식물체를 2번(2차 정식→ 3차 정식)에 걸쳐 계대배양을 하게 되는데 다자란 식물체의 크기가 커서 마지막 계대배양 시 오염율이 높고 작업에 많은 시간이 소요되었다. 호접란 조직배양의 효율을 높이고 자 호접란 계대배양 단계를 한단계 축소할때 유묘 순화시 발육차이를 구명하였다.

라. 선발 및 대량생산된 pink color 조직배양묘 온실 테스트를 통한 생육특성 검사

제2항 연구 결과

가. PLB 유기 및 증식법과 재분화 체계 개선

1) 배지종류, pH정도, charcoal 농도에 따른 비교실험에 따른 비교실험

PLB 유기 및 증식률을 높이기 위해 배지종류(NP 증식배지와 Hyponex 정식배지)에 따른 비교실험을 하였다. 실험은 3품종(T101, 168, T091)을 6반복으로 실험하였다. 대조구인 control로 기존의 PLB 증식에 쓰이는 NP 배지에 pH 5.4, charcoal 0.3g을 사용하였다.

PLB의 특성은 cutting 한 후 약 2개월 후 PLB가 충분히 증식되므로 각각의 배지에 재식 후 60일 후 정도 경과되었을 때 각 처리별로 PLB의 유기 및 증식률 정도를 체크하여 배지별 효과를 알아보았다. 그 결과 기본 배지 종류에 따른 실험에서 품종 T101과 168은 Hyponex 정식배지가 NP증식배지보다 증식에 효과적이었으나 오히려 품종T091은 NP증식배지가 증식에 더 효과적임을 알 수 있었다. pH에 따른 실험에서는 세 품종 모두 처리구의 중간인 pH 5.8 또는 6.0이 가장 적절하다고 사료되었으며, charcoal 농도별 실험에서는 세 품종 모두 charcoal 농도 0.1%가 증식에 가장 효과적임을 알 수 있었다.

Table 1. 기본 배지 종류, pH정도, charcoal 농도에 따른 품종별 PLB 증식율(%)

처리 / 품종		T101	168	T091
배지	Hyponex	670	618	495
	NP	460	467	632
pH	5.4	558	418	430
	5.7	680	637	655
	6.5	591	610	533
charcoal농도(g/L)	0.3	435	478	465
	0.5	567	582	521
	1.0	690	627	660
	2.0	422	460	409

2) 배지성분(천연물 첨가), agar와 charcoal의 농도, pH 정도에 따른 실험

가) 배지내 첨가물에 따른 실험

사과추출물과 감자추출물 또는 두 가지를 혼용하여 PLB 증식시 영향을 알아본 결과 품종간 증식율의 차이는 있었으나 사과추출물과 감자추출물을 혼용 첨가한 처리에서 PLB 증식율이 가장 높은 것으로 나타났다. 천연 첨가물의 효과는 기본배지와 생장 단계에 따라 다르다고 알려져 있으나 대부분의 난류에서는 생육촉진을 위해 사과나 감자, 바나나즙과 같은 천연물질을 배지내 첨가하고 있다. 이 결과에서는 사과와 감자의 혼용 첨가로 인하여 각각의 사과와 감자에 함유된 영양물질의 부가적인 효과가 PLB의 증식율을 더욱 상승시켰음을 알 수 있었다. 또한 PLB 증식에 이러한 천연물질의 첨가가 어느 정도 필수적임을 알 수 있었다. 각기 다른 첨가물을 여러 조합으로, 농도별로 배지내 첨가하여 그에 따른 PLB 형성을 차이를 구명하고자 하였다.

그 결과 바나나추출물 배지에 첨가한 경우 각 품종마다 바나나 추출물 15%를 첨가한 경우에 PLB 형성율이 가장 높게 나타났으나 바나나추출물을 첨가한 배지에서 형성된 PLB의 경우 노랗게 과수화한 형태로 나타나 PLB유기에 적당하지 않은 것으로 생각되었다. Yarn 등(1991)은 *Phalaenopsis*의 PLB증식에 coconut water는 촉진적으로 작용하지만 banana는 억제적으로 작용한다고 하였고 Ichihashi(1999)도 여러문헌 조사를 통하여 potato extract, coconut water, apple extract가 여러 가지 난에서 생장에 있어 촉진적으로 작용하고 banana는 억제적으로 작용한다고 하였다.

Table 2. 배지내 첨가물에 따른 품종별 PLB 증식율(%)

품종/첨가물	사과	감자	사과+감자
T101	640	627	692
168	590	555	640
T091	620	568	636

Table 3. 배지내 첨가물 농도에 따른 PLB 형성율(%)

첨가물	농도(%)	PLB 형성율(%)
CW	10	31.6
바나나	15	52.6
	30	42.8
	45	22.2
	60	14.2
바나나+감자	15+15	42.8

나) agar와 charcoal의 농도에 따른 실험

agar와 charcoal을 농도별로 처리한 결과 charcoal의 농도가 높아질수록 PLB 증식율이 높은 것으로 나타났으며, 특히 agar 0.55g/L, charcoal 1.0g/L 처리구에서 가장 높은 것으로 나타났다. 일반적으로 조직배양에서 식물체 또는 식물조직의 생장 또는 발근을 촉진하거나 페놀물질의 흡착을 위해 배지에 charcoal을 첨가하는 것으로 알려져 있는데 본 실험에서 고농도의 charcoal이 PLB의 생육을 촉진시켜 그 결과 생체중(fresh weight)을 증가시켰으리라 생각된다. 결과는 PLB의 생체중(mg)을 통해 관찰하였다.

Table 4. 품종 T101의 배지 내 혼용 첨가된 agar와 charcoal의 농도에 따른 생체중(mg)

Charcoal Agar	0.25g/1	0.5g/1	0.75g/1	1.0g/1
0.4g/1	600	550	500	750
0.45g/1	700	1250	1300	1800
0.5g/1	450	870	950	1200
0.55g/1	350	1000	1500	2100

다) pH 정도에 따른 실험

문헌상 증식에 적합한 것으로 알려진 pH 5.3±0.2보다 다소 높은 pH 6.6에서 가장 좋은 결과가 나타났다. 이는 배양 중에 절편체로부터 phenol 물질이 침출되어 초기의 pH를 높게 조정된 것이 증식율이 높아진 것으로 사료되었다. 그러나 전반적으로 pH 5.1-6.6 사이에서는 pH에 따른 PLB 증식율의 차이가 그다지 크지 않은 것으로 나타났다. 결과는 PLB의 생체중(fresh weight)을 통해 관찰하였다.

Table 5. 품종 T101의 배지 내 pH에 따른 생체중(mg)

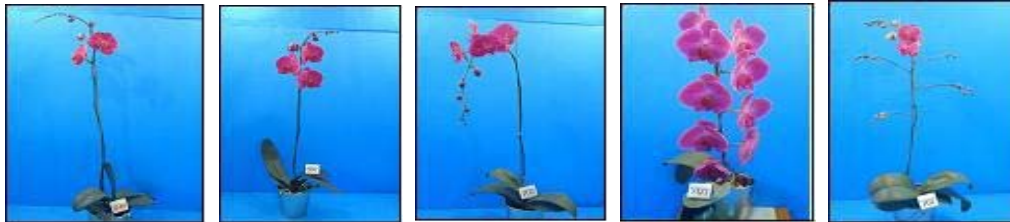
pH	4.6	5.1	5.8	6.1	6.6	7.1
생체중(mg)	200	400	360	410	510	250

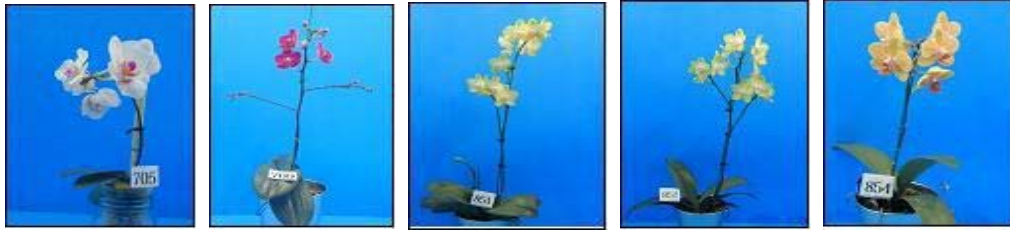
나. 대량증식에 적합한 우수 호접란 식물체(모주) 선발

1) 국내에서 수집한 모주의 형태적 특성 및 사진(56개 품목)

품질, 화형, 배열은 1-5를 기준으로 1이 우수한 것이며 꽃잎두께, 화경두께는 1-3으로 1이 두꺼운 것이다. 또한 꽃수, 엽수는 꽃과 엽의 개수를 말하며 화폭과 화경장의 단위는 cm이다. 화색의 L(large)은 꽃크기를 말하며 DP는 dark pink, P는 pink, MN은 꽃의 크기가 mini(5cm 이하), MD는 꽃의 크기가 midi(5cm-9cm), st와 sp는 꽃에 줄무늬와 점무늬가 있음을 가르키며, Y, W, WR는 화색이 yellow, white, white red(백화 홍심)을 말한다. 꽃수에 있어 ‘;’는 꽃대가 한 개 이상있을 때를 표시한 것이며 ‘+’는 한 꽃대에 여러개의 가지가 있을 때를 가리킨다.

계통	품질	화색	화폭	꽃수	화형	배열	꽃잎두께	화경두께	화경장	엽수
697	2.8	LDP	9.0	9	2.5	2.4	2.2	2.8	45.5	6
698	2.3	LDP	7.8	11	2.8	2.8	2	2.5	52	8
699	2.3	LDP	9.0	7	2.8	2.6	2.2	2.5	54	7
700	2.8	LDP	9.0	10	2.7	2.6	2	2.6	58	7
701	2.3	LDP	8.0	9	3	2.8	2	2.6	46	8
702	2.3	LDP	9.0	11	2.8	2.8	2.2	2.6	61	7
703	2.3	LDP	10.0	10	2.2	2.2	2.3	2.4	49	4
704	2.4	MNP	5.5	10	2.4	2.5	2.4	2.4	23	6
705	2.6	MNW	5.0	6	2.4	2.6	2.5	2.8	23	5
706	2.5	MNW	5.0	6	2.6	2.5	2.5	2.2	22	4
707	2.2	MNDPst	6.5	25	2.4	2.3	2.3	2.2	28	7
708	2.2	MNDPst	4.8	15	2.3	2.2	2.2	2.2	20	7
709	2.3	MNDPst	5.0	18	2.3	2.3	2.2	2.3	16	6
710	2.3	MDWst	6.0	18	2.4	2.2	2.3	2.1	21	7
845	1.6	YRspstMDC	5.5	11, 11+?	2.2	2	1	3	21	6
846	3	YstspMDC	7.6	8	2.2	2.2	1	3	38	5
847	2.5	WRspMDC	8.5	4+5+9	2.8	2.8	1	2	35	5
850	1.8	MDY	5.5	4+1+4+1+6	1.8	2	1.8	1.5	31.5	6
851	2	MDY	6.0	4+1+6	2	2.2	2	1.5	37	7
852	1.8	MDY	5.6	6+3+3	2	2.1	1.8	1.5	25	6
853	1.8	MDYsp	7.5	7+2+2	1.8	1.8	2	2	25	2
854	2	MDYsp	7.7	7	1.8	2	2	2.2	26	3
855	2	MDYsp	7.7	8	2.2	2.2	2	2.2	16	3
856	2	MNPst	4.5	13+6+5+8	1.5	2	2	2	21	6
857	1.8	MNPst	4.5	13+7+5+14	1.5	1.8	1.8	2	26	6
858	2.2	MNPst	4.5	14+7+6+6	2	2.2	2.2	2	20	5





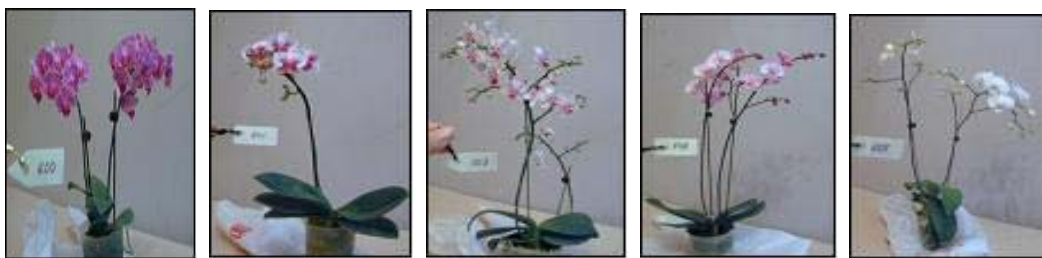
계통	품질	화색	화폭	꽃수	화형	배열	꽃잎두께	화경두께	화경장	엽수
A1	2.7	DPstsp	9.5	6	2.5	2.2	2.5	2.2	46	6
A2	2.3	WRstsp	10.5	7	2.4	2	2.5	2.8	47	4
A3	2.3	MDDP	8.5	4	2.5	2	2.6	2.2	43	4
A4	2.2	DP	9.0	3	2	2	2.3	2.4	32	3
A5	1.6	DP	9.0	9	2	2.4	2	2.5	50	6
A6	3	MNDPstsp	5.0	10+5+5+4+5	2	2.3	2	2.5	34	11
A7	3	W	10.0	8	1.8	2.2	2.2	2.6	60	4
A9	2	WR	12.0	11	2	2.2	2.3	2.3	70	8
A10	2	DPst	10.0	6	2	2	2.5	2	48	6
A11	2	MDDP	7.0	8	2.2	2	2.4	2	37	4
A12	1.8	MDDPst	7.0	11	2.2	2.1	2.4	2.2	42	6
A13	2	MNDP	4.5	8+3+4	2.4	1.8	2	2.3	27	8
A14	2	MNDP	4.5	9+3+4	2.4	2	2	2.5	28	6
A16	1.8	LP	11.3	10	2.4	2	2.3	2.4	49	6
A17	1.8	W	12.0	10	2.8	2.2	2.3	2.4	65	5
A18	1.8	W	11.8	11	2.2	2.2	2	2	59	4
A19	1.6	LP	11.1	9	1.5	2.5	2	2	64	8
A20	1.6	LP	11.9	11	2	1.8	2.3	2.3	65	6
A22	2.2	MNDPst	5.9	2+2+8	2	1.8	2.3	2.3	37	8
A23	2.2	MDYRsp	7.1	2	2	2.2	1.8	2	10	3
A24	2.3	MNRsp	5.3	6+7	2.3	2.5	1.8	2	37	6
A25	2.7	MDYsp	7.6	8	2.3	2.4	1	2.2	43	7
A26	2.6	MDYsp	7.5	9	1.8	2	1	3.5	43.5	7
A27	1.5	MDYsp	7.6	8	1.8	2	2	3.1	38.5	7
A28	1.5	MDYst	6.8	2	2.3	2.2	2.2	3	10.1	5
A29	1.8	LP	11.7	7	2	2.1	1.8	3	51.2	5
A30	2	DP	9.6	15	2	2.1	2	3	46.5	6
A31	2	DP	10.6	9	1.8	2.6	2	2	61	5
A32	2.2	DP	10.1	10	1.5	2.4	2	2.2	61.5	5
A33	2.2	WDP	10.0	8	2.3	2.5	1.8	2.3	52	5

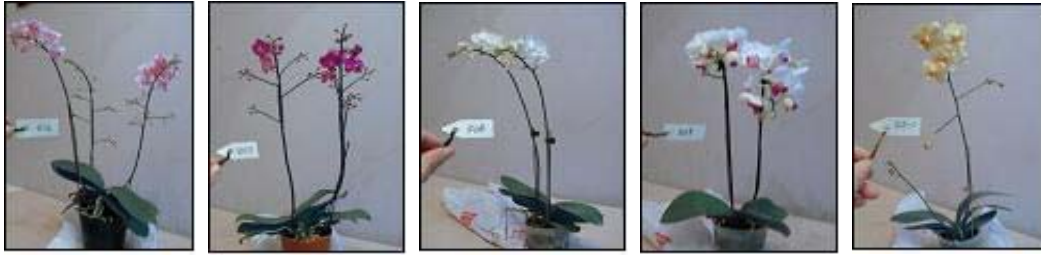




2) 국외에서 수집한 모주의 형태적 특성 및 사진(36개 품목)

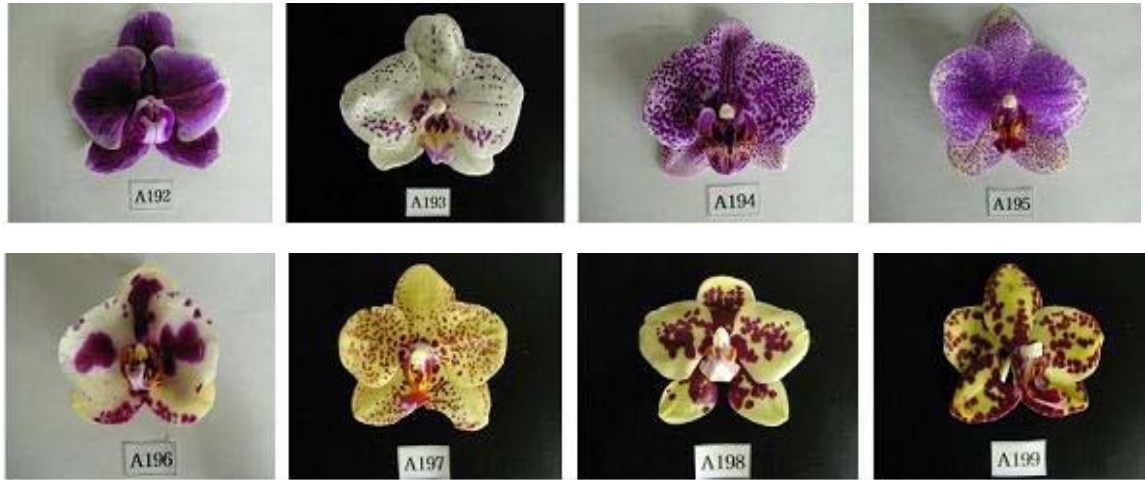
계통	품질	화색	화폭	꽃수	화형	배열	꽃잎두께	화경두께	화경장	엽수
360	1.8	MNPSTC	4.0	4+4+12,2+3+10	2	환형	2	2	16	8
361	2	MNWRSPC	4.3	0+3+12	2	환형	1	2	25	6
362	2	MNWRSPC	4.0	0+10	2	환형	2	3	18	5
363	1.7	MNWRSPC	3.5	8+8+8+18,8+8+14	2.3	환형	2	2	25	5
364	1.7	MNLPC	5.0	3+3+8,0+10	2	1.8	1	3	28	4
365	2	MNWSPC	5.3	3+4+10+4,3+3+4+8	2	2	1	3	27	6
366	1.8	MNLPSPC	4.2	18,5+4+5+4+2+2+14,2+5+4+5+19	2.3	환형	2	2	35	9
367	1.5	MNDPSPC	4.5	3+4+4+5+13,5+5+5+5+14	1.8	환형	1	2	25	10
368	1.8	MNWC	4.5	13,4+13	1.8	2	1	2	35	7
369	2	MDWRSPC	6.0	0+2+2+11,0+2+12	2	환형	2	2	25	6
370	2	MNDPSPC	4.5	3+6+5+2+11,4+4+4+13	2	환형	2	2	19	5
371	2.2	MNDPSPC	5.0	4+4+4+4+4+6,4+4+4+4+10	2.3	2	1	2	29	8
372-1	2.2	MDYYSPC	6.7	3,2+2+6	2	환형	1	2	29	7
372-2	2.2	MDYYSPC	6.7	2+2+7	2	환형	1	2	24	6
373	2.4	MDWRSPC	6.5	3,?	2.4	?	1	3	19	5
374	2.2	MDYRSPC	7.3	5,3	2.4	?	1	2	35	7





계통	품질	화색	화폭	꽃수	화형	배열	꽃잎두께	화경두께	화경장	엽수
A133	1.5	MDY	6.9	4+9	2	환형	2	2	32	5
A150	1.5	DPst	9.5	18	1.8	환형	2	2	58	6
A151	2	MDY	6.6	9+4+3	1.8	1.8	1	2	26	7
A152	1.8	Yst	9.3	9	2.4	2	1	3	31	3
A154	1.8	Wsp	10.2	7	2.4	2	1	3	41	5
A155	2.2	MDYsp	7.7	6,6	2.4	2	2	2	25	7
A161	2.2	MDYst	6.6	5	2.3	1.8	1	3	26	6
A162	2.2	Lst	9	4	2	2	2	3	37	7
A165	1.5	Yst	9.2	4	2	환형	1	2	25	7
A170	1.8	Yst	9.2	7	2	?	1	3	22	6
A190	1.8	MDDP	7.0	3+6+3+1?	2.3	2.4	2	3	27	4
A191	2	DPstsp	9.2	8	2.3	2.4	1	2	28	5
A192	2	DP	9.8	5	1.8	2.2	2	2	27	5
A193	2	Wsp	10.5	9	1.8	2,2	2	3	26	7
A194	2.4	Psp	8.1	9+3	2	2	2	2	22	10
A195	2.4	Wsp	8.7	3+4+4+7	2	2	2	2	29	4
A196	2	Wsp	8.1	2+3+7	2	1.8	1	2	37	6
A197	2	MDYsp	7.8	6	1.8	1.5	2	2	33	6
A198	1.8	MDYsp	7.7	7	2.3	1.5	1	3	25	5
A199	1.5	MDYsp	7.6	6	2	2	2	2	23	7





다. Pink color 호접란의 대량생산 효율증가

1) Pink color 호접란 액아배양시 소독제 및 항생제에 의한 소독효과 구명

가) 포엽 제거 유무, 락스 농도 및 락스 처리후 방법에 따른 소독 효과 규명

기존의 경우 풍풍 세척 후 락스 2%에서 30분 진공으로 소독 후 과산화수소로 닦아준 후 멸균수로 헹구어 주었다. 본 실험은 포엽 제거 유무, 락스 농도(2, 3%), 락스 처리 후 진공처리와 shaking에 대한 실험을 한 결과 박테리아 오염은 포엽 유지, 3% 락스, 진공으로 5분한 것이 오염도 적고 분화 및 유기가 6개가 된 것으로 나타났으며 같은 결과로 포엽제거, 락스 2%, 웨이킹 10분 하였을 때 분화가 6개 된 것으로 나타났다(표 4). PLBs의 돌연변이는 높은 농도의 락스의 경우 발생할 경우가 높으므로 낮은 경우의 것으로 사용하는 것이 적정할 듯 하다. 그러나 모두 PLBs가 분화되고 변이율까지 측정해야 정확한 결과를 얻을 수 있을 것이다.

표 6. 포엽 제거 유무, 락스 농도 및 락스 처리후 방법에 따른 소독 효과

포엽	농도	방법	시간	반복	오염	고사	분화	유기2	합 계
유지	3%	진공	5분	10	2	2	3	3	10
			10분	10	5	1	1	3	10
	10분		10	6	1	2	1	10	
	15분		10	8		1	1	10	
제거	3%	쉐이킹	5분	10		7	1	2	10
			10분	10	3	6		1	10
	10분		10	2	2		6	10	
	15분		10	2	7		1	10	

나) 항생제(Tetracyclin)의 화경 소독 효과 구명

기본 화경소독은 위의 1)과 같으며 tetracycline을 1000ppm을 사용하였으며 일부는 1000ppm에서 화경을 30분간 진공소독하고 일부는 이에 계속하여 락스 0.8%에서 진공으로 30분을 더 소독하였다. 화경의 마디에 따른 경향을 알아보기 위하여 ‘-’을 통해 마디 표시를 하였다. 실험결과 전체적으로 항생제 후 락스를 처리하여 소독한 것이 효과가 좋은 것으로 나타났으며 마디는 미미하지만 제일 위의 마디가 항생제에 대해 효과가 나타나는 것으로 고려된다(표 5).

표 7. 항생제와 마디 위치에 따른 소독 효과

처리번호	생존	반복	오염
T1000V30-1	3	16	13
T1000V30-2	3	16	13
T1000V30-3	1	14	13
TVR0.8V30-1	16	16	16
TVR0.8V30-2	14	16	2
TVR0.8V30-3	10	15	5

2) 증식 효율을 높이기 위한 생육 단계별 최적배지 개발

가) PLB 형성 및 유식물체를 얻기 위한 배지별 종류에 따른 실험 결과 VW배지(20g/ℓ sucrose, 4g/ℓ phytigel, pH 5.3, 121℃에서 15분간 멸균)와 hyponex배지 (N : 20 P : 20 K : 20)에서 PLB 형성율이 40%이상으로 나타났으나 VW배지의 경우 PLB가 노란색이거나 투명하게 변하는 것이 많아 hyponex배지에서 가장 좋은 경향을 나타내었다.

Table 8. 품종 T101의 배지별 종류에 따른 PLB 형성율(%)

Medium	No. of explants	No. of survivals	No. of PLBs	PLB 형성율(%)
MS	20	20	4	20
Vacin & Went	20	18	10	56.5
Hyponex(6.5:6:19)	20	20	0	0
Hyponex(20:20:20)	20	19	12	63.2
Knudson C	20	15	3	20.0
Homma	20	20	7	35.0

나) PLB에서 유식물을 얻기 위하여 품종 T101을 재료로 hyponex 배지를 기본배지로 하여 sucrose 의 농도를 다르게 처리하여 그 결과를 알아보았다. 배지에 포함된 당은 양분으로 제공될 뿐만 아니라 식물의 발달에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. sucrose 무첨가구의 경우 식물체의 재분화율이 매우 낮았고, 대부분의 PLB가 고사하였으며, sucrose 농도가 높아질수록 식물체 재분화율이 높아졌고 잎의 크기와 뿌리의 성장도 좋아졌다. sucrose 4%에서 재분화율이 가장 높았으며 PLB증식에서도 같은 결과를 보여주었다. 그러나 PLB 증식시 5%이상 첨가시에 증식율이 낮아지는 것과 같이 재분화시에도 5% 첨가시 식물체 재분화율은 오히려 낮아졌다. 또한 몇몇 PLB의 상태는 증식하지 않고 PLB가 노란색 또는 투명한 형태를 나타내었다. 이는 고농도의 sucrose가 오히려 PLB증식을 저해시키거나 PLB를 거치지 않고 바로 유식물체로 재분화되어 결과적으로 재분화율을 떨어뜨린 것으로 생각된다.

Table 9. 품종 T101의 sucrose 농도에 따른 PLB의 재분화율(%)

sucrose 농도(%)	No. of PLBs	No. of shoots	재분화율(%)
0	60	5	8.3
1	60	50	43.3
2	60	65	68.3
3	60	80	71.3
4	60	70	76.7
5	60	40	36.7

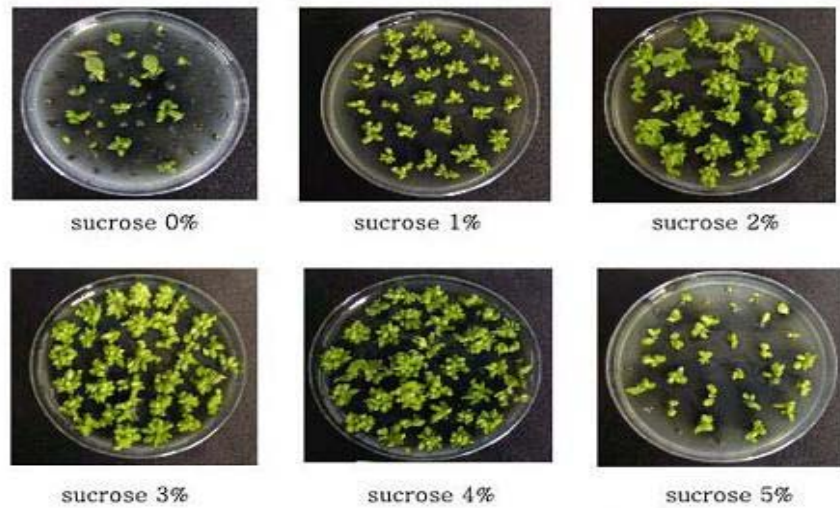


Fig. 1. 품종 T101의 sucrose 농도에 따른 PLB의 재분화

다) 난 배양에서 vitamin은 필수적인 것은 아니지만 nicotinic acid, pyridoxine, thiamine 등이 낮은 농도로 사용된다. hyponex 배지(hyponex 3.0g/l, sucrose 20g/l, agar 10g/l, pH 5.3, 121℃에서 15분간 멸균)에 thiamine을 농도별로 처리하여 PLB 형성에

영향을 미치는 정도를 알아보았다. Thiamine을 첨가한 경우 첨가하지 않은 경우보다 PLB형성율이 높아졌으나 농도가 높아질수록 검게 변하여 죽는 개체가 발생하였다. Koch(1974)에 의하면 callus로부터 PLB를 발달시키기 위해서 0.5mg/L pantothenic acid, thiamine, pyridoxine, nicotinic acid 각 0.2mg/L, 0.5mg/L glycin이 첨가된 배지로 옮겨주는 것이 필요하다고 하였다. Arditti(1967)은 일부 난 종자 발아에 thiamine이 촉진적으로 작용한다고 하였고, Diane(1976)도 같은 결과를 얻을 수 있다고 하였다. 그러므로 저농도의 thiamine 첨가는 어느 정도 PLB형성을 촉진시키는 효과가 있음을 알 수 있었다.

Table 10. 품종 T101의 thiamine 농도에 따른 PLB 형성율(%)

Thiamine (mg/ℓ)	No. of explants	No. of survivals	No. of PLBs	PLB형성율(%)
0	19	19	6	31.2
0.1	19	17	9	53.0
0.5	18	17	10	58.9
1.0	18	15	5	33.3

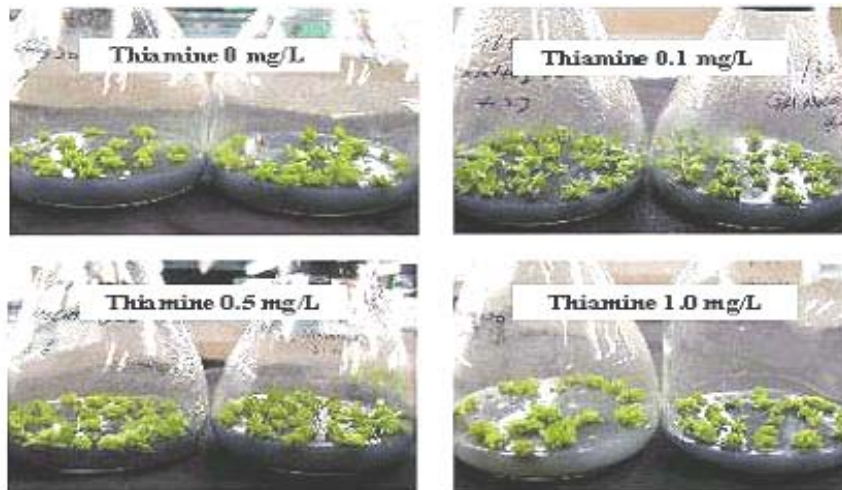


Fig. 2. 품종 T101의 thiamine 농도에 따른 PLB 형성

라) 효율적인 PLB의 재분화를 위해서는 무엇보다도 증식시킬 PLB의 상태가 중요하다. 따라서 재분화에 적합한 최적의 PLB상태를 알아보기 위한 실험을 수행하였다. PLB의 상태를 잎이 유도되기 전의 단계(1단계), PLB에서 잎이 유도된 단계(2단계), PLB에서 하나의 잎이 완전히 전개된 단계(3단계), PLB에서 하나의 잎과 뿌리가 전개된 단계로 나누어 각 단계별 PLB의 재분화율을 조사하였다. 각 단계별 PLB를 잎과 뿌리를 잘라낸 후 0.3mm 크기로 분할하여 flask당 25개씩 치상하여 3반복 하였다. 그 결과 잎이 유도되기 전의 단계(1단계)에서 PLB의 재분화율이 가장 좋았으며 하나의 잎과 뿌리가 전개된 단계(4단계)에서는 PLB의 활력이 현저히 떨어져 분화되지 않고 노란색 이거나 투명하게 변하는 것이 많았다. 실험 결과 배양조직 즉, PLB가 어릴수록 재분화가 용이하다는 기존의 보고와 일치함을 알 수 있었다.

Table 11. 호접란 3개 품종의 PLB 단계별 PLB의 재분화율(%)

품종/ 단계	1단계	2단계	3단계	4단계
T101	68.5	41.4	7.1	1.4
168	55.4	35.7	6.7	1.1
T091	49.7	29.4	5.8	0.4

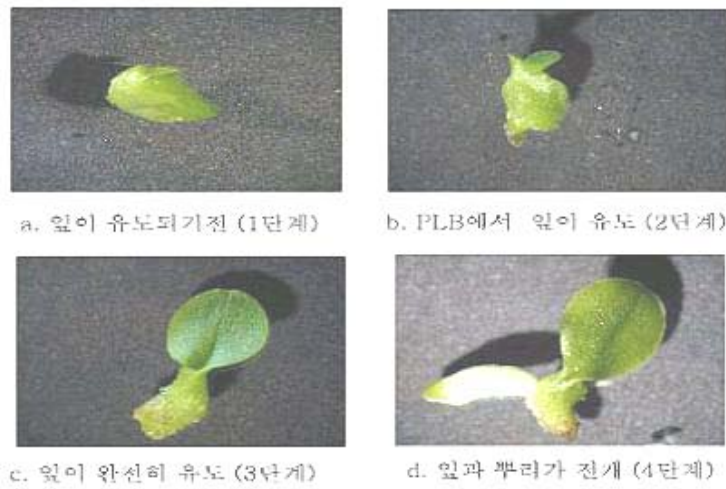


Fig. 3. PLB 단계에 따른 PLB의 재분화

마) PLB 증식을 위한 배양용기내 PLB의 적정밀도를 측정하기 위하여 flask당 10-50개의 PLB 를 치상한 후 PLB 형성율(%)을 조사하였다. 배양용기내 적정 PLB 개체수에 대한 실험결과 PLB를 30개씩 용기에 치상한 처리에서 PLB 형성율이 가장 높았다. 그러나 배양용기나 배지의 양이 영향을 미칠 수 있으므로 이에 대한 요인들이 좀 더 고려된 실험이 수행되어야 할 것으로 생각되었다.

Table 12. 배양용기내 적정 PLB 개체수에 따른 PLB 형성율(%)

PLB개체수	10	20	30	40	50
PLB 형성율(%)	64.5	54.0	78.5	38.0	32.5

3) 페놀 발생 억제 및 제거 방법 개발

가) PLB 유도시 갈변 고사하는 개체가 많이 발생하여 효율을 떨어뜨리는 문제가 되고 있는데 이를 방지하기 위한 항산화제 PVP(Polyvinylpyrrolidone)에 대한 효과를 실험

하였다. hyponex 배지를 기본으로 사용하여 PVP를 농도별로 처리한 결과 PVP 1.5g/ℓ 에서 53.3%로 대조구에 비하여 PLB 형성율이 높았다. 유사한 결과로 문헌 에서 엽편 배양중 다량의 페놀물질이 배지중에 침출되어 PLB 형성을 억제하므로 PVP(분자량 160,000)를 첨가하여 페놀성 물질을 흡수하거나 한천을 6~8g/L 낮은 농도로 사용하여 페놀물질을 밑으로 확산시킴으로써 페놀피해를 줄이는 효과를 보았 다고 밝힌 바 있다.

Table 13. PVP 농도에 따른 PLB 형성율(%)

PVP Conc.(g/ℓ)	No. of explants	No. of survivals	No. of PLB ^나	PLB 형성율(%)
0	30	12	4	33.3
0.5	30	22	4	18.2
1.0	30	20	6	30.0
1.5	30	15	8	53.3
2.0	30	22	11	50.0
2.5	30	20	6	30.0

나) PLB 유도시 갈변고사하는 개체가 많이 발생하여 이를 방지하기 위한 활성탄소에 대한 효과를 실험하였다. hyponex배지에 활성탄소를 농도별로 처리하여 실험한 결과 활성탄소 2.5g/ℓ 를 첨가한 경우 대조구에 비하여 PLB형성율이 증가 되었다.

일반적으로 활성탄은 식물체에서 분비된 유해물질이나 고압멸균시 sucrose에서 형성된 유해물질을 흡착하므로 그 결과 생육이 촉진된다고 알려진 결과와 일치함을 알 수 있었다.

Table 14. Charcoal 농도에 따른 PLB 형성율(%)

charcoal 농도 (g/ℓ)	No. of explants	No. of survivals	No. of PLBs	PLB 형성율(%)
0	30	12	4	33.3
0.5	30	23	10	43.4
1.0	30	11	5	45.4
1.5	30	17	5	29.4
2.0	30	8	3	37.5
2.5	30	10	5	50.0
3.0	30	15	4	26.7

다) 배지 내 항산화제인 PVP(Polyvinylpyrrolidone)와 활성탄소를 PLB를 분할하여 치상한 것과 분할하지 않은 것으로 나누어 처리한 후 PLB의 생체중(fresh weight)증식율(%)을 조사하였다. 그 결과 PLB를 분할하여 치상한 것과 분할하지 않은 것 모두에서 PVP보다 활성탄소를 처리한 것이 보다 높은 증식율을 나타내었다.

Table 15. PLB 상태와 PVP 및 활성탄소에 따른 증식율(%)

PLB 상태 / 처리	Control	PVP	Charcoal
divided PLB	420	471	561
undivided PLB	460	486	583

4) 배양환경 개발

가) PLB 증식효율을 가장 높이고 mutation을 최소화시키는 환경조건을 구명하고자 실험하였다. 먼저 PLB 증식에 적합한 온도조건을 구명하기 위하여 온도를 각각 23, 26, 29, 32℃로 처리한 다음 PLB의 생체중(fresh weight) 증식율(%)을 조사하였다. 실험

결과 온도가 높아질수록 식물체가 왕성 하게 자라 26℃에서 350%로 가장 좋았음이 관찰되었다.

Table 16. 품종 T101의 온도조건에 따른 생체중 증식율(%)

Temp. ℃	23℃	26℃	29℃	32℃
생체중 증식율(%)	320	400	230	170

나) 배양시 광조건의 영향에 따른 증식율을 알아보기 위해 광도별(1000-3000 lux)로 다르게 처리한 후 PLB의 생체중(fresh weight) 증식율(%)을 조사하였다. 그 결과 2000룩스 이상의 광도일 때 전반적으로 증식율이 높았다. PLB를 이용한 증식율 실험에서는 저광도(1000-1500lux)에서 높았던 반면, 유식물체의 경우 왕성한 생육을 위해 PLB단계 보다 강한 광조건을 필요로 함을 알 수 있었다.

Table 17. 품종T101의 광조건에 따른 생체중 증식율(%)

Light intensity (lux)	1000	1500	2000	2500	3000
생체중 증식율(%)	430	450	520	550	400

다) 배양용기 간의 차이를 위하여 배양용기의 커버를 종류별로 다르게 한 후 PLB의 생체중(fresh weight) 증식율(%)을 측정하였다. 배양용기 커버로 고무마개를 사용한 용기에서 300%로 가장 높았으며, filter 마개를 사용한 경우에는 공기의 순환이 비교적 용이하여 배지가 쉽게 건조해져 오히려 증식율이 가장 떨어짐을 알 수 있었다.

Table 18. 품종 T101의 배양 용기 조건에 따른 생체중 증식율(%)

배양용기 커버	filter	Aluminaum foil	Rubber cap	Plastic cap
생체중 증식율(%)	280	350	450	200

라) PLB 증식에 영향을 미치는 광조건에 따른 PLB의 quality 향상 정도를 알아보기 위해 광조건을 조금씩 다르게 처리한 후 PLB 증식율을 조사하였다. 그 결과 명배양과 비교했을 때 암배양에서는 유리화 개체수가 줄어들면서 PLB의 증식율이 높았으나 반면에 PLB의 크기가 작고 가늘어 quality가 떨어지는 양상을 나타내었다. 그러나 15일 암배양 후 명배양 하였을 때, 유리화 현상이 거의 나타나지 않으면서 크기가 크고 비대한 PLB를 관찰할 수 있었다. 그리하여 PLB의 quality 향상을 위해서는 암/명처리를 적절히 사용하는 것이 결과적으로 PLB 증식율에 영향을 미칠 수 있음을 알 수 있었다.

Table 19. 품종 T101의 광조건 처리 변화에 따른 PLB 증식율(%)

Light condition	PLB 증식율(%)	Vitrification(%)	PLB size
Dark	642	0	++
15 days dark to light	670	0	++++
Light	587	31	+++

++++; excellent +++; good ++; moderate



Fig. 4. 품종 T101의 광조건 처리 변화에 따른 PLB 증식

5) 3차 정식 단계시 재분화 효율 증진

가) 배지의 성분에 따른 3차 정식배지에서의 기내생장

증식된 PLB에서 재분화된 호접란 품종 No.276, No.626, No.414의 3차 정식배지에서 당 농도에 따른 생장은 3품종 모두 기존의 2%에서 생장이 좋았다(Table 1). 어린 PLB의 경우 생장에 있어 비교적 높은 농도(3-4%)의 당을 필요로 하나 PLB가 재분화되어 어느 정도 식물체로 자랐을 때 오히려 고농도의 당은 생장을 저해하는 것으로 알려져 있다. 따라서 당 농도는 2%의 농도로 사용하는 것이 가장 적절할 것으로 생각되었다.

Table 20. 당 농도에 따른 팔레놉시스 품종의 생장

당의 농도	No.276	No.626	No.414
0%	+	+	+
1%	++	++	++
2%	+++	+++	+++

* + : 생육상태 나쁨, ++ : 생육상태 양호, +++ : 생육상태 매우 좋음



Fig. 5. A, B, C는 품종 No.276에 각각 Sugar 0%, 1%, 2%첨가.
 D, E, F는 품종 No.626에 각각 Sugar 0%, 1%, 2%첨가.
 G, H, I는 품종 No.414에 각각 Sugar 0%, 1%, 2%첨가.

나) 감자와 전분 첨가에 따른 품종별 생육 양상의 경우 No.276, No.626 품종에서는 감자 같은 것을 첨가한 배지에서 잘 자랐으나 No.414 품종에서는 전분을 첨가한 배지에서 생장이 좋았다. 그 결과 호접란 품종에 따라 특정 배지에 적합한 성장능력이 다른 것으로 생각되었다. 이 부분에 대해서는 좀더 자세한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Table 21. 감자와 전분 첨가에 따른 팔레놉시스 품종의 성장

성 분	No.276	No.626	No.414
Potato(30g)	+++	+++	++
Starch(25g)	++	++	+++
Starch(30g)	++	++	+++



Fig. 6. A, B, C는 품종 No.276에 각각 Starch(30g), Starch(25g), Potato(30g)첨가.
 D, E, F는 품종 No.626에 각각 Starch(30g), Starch(25g), Potato(30g)첨가.
 G, H, I는 품종 No.414에 각각 Starch(30g), Starch(25g), Potato(30g)첨가.

다) 마개의 환기구멍처리를 위해 일반 솜과 3M(쓰리엠) 외과용 테이프 제품 3가지를 사용하였다. 3M 외과용 테이프의 경우 본 실험에서는 마이크로포 (Micropore) 흰색 종이 반창고와 듀라포(Durapore) 면실크 반창고를 사용하였다. 실험결과 모든 품종에서 듀라포(Durapore) 면실크 반창고 > 마이크로포 (Micropore) 반창고 > 솜의 순으로 오염율이 높은 것으로 나타났다. 솜을 이용한 처리구에서는 공기의 흐름이 Micropore

Tape의 경우보다 적어 기내 남아있는 수분의 양이 상대적으로 많은 반면 오염율은 전혀 나타나지 않았다. 그러나 마이크로포 (Micropore) 반창고의 경우 투과성이 양호하다는 장점으로 인해 기내 환기는 좋았으나 소재가 얇아 고압멸균 후 Tape의 소재 손상에 의한 오염이 발생하였다. 듀라포(Durapore) 면실크 반창고의 경우 직조된 멸실크 소재로 마개와의 접착력은 우수하였으나 고압멸균으로 인해 접착력이 현저히 떨어져 오염이 발생했을 것으로 생각되었다.

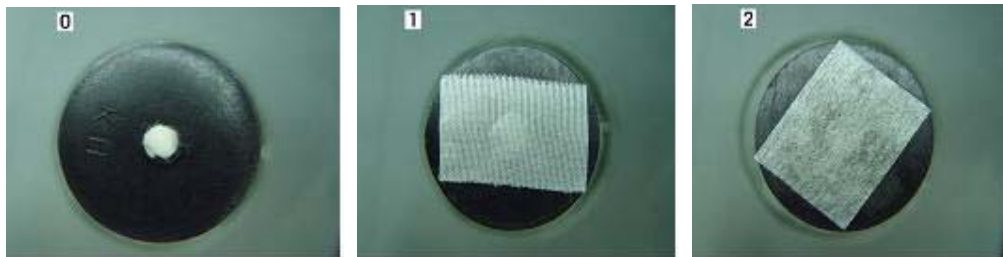


Fig. 7. P0는 습으로 용기의 환기구멍을 처리.

P1는 Micropore Tape으로 환기구멍을 처리.

P2는 Durapore Tape으로 환기구멍을 처리.

6) 정식 단계시 계대배양 축소에 의한 배양성 증가

가) 일반적인 호접란 조직배양 단계에 따라 첫번째 계대배양 시 PLB를 병당 40주로 밀식하여 소식물체로 키워낸 후 2개월이 지나 다시 15주로 나누어 두 번째 계대배양을 실시하여 1개월 후 생육 관찰하였으며 다른 한 처리는 PLB 증식 후 식물체를 한 번 계대배양 시 PLB를 각각 병당 25주와 20주로 나누어 치상한 다음 3개월 후 생육을 관찰하였다.

그 결과 모든 품종에서 한번 계대배양 한 처리구 보다 일반적인 조직배양 방법으로 두 번 계대배양 하여 병당 15주씩 치상한 처리구에서 더욱 생육이 양호하였으나 큰 차이는 보이지 않았다. 한번 계대배양시 2개월 동안 밀식하여 자란 PLB 40주가 두 번째 계대배양으로 15주로 나뉘지면서 새로운 배지환경으로 인해 생육이 촉진된 것으로 생각되었다. 이는 계대배양으로 인해 지속적인 양분공급과 더불어 과도한 밀식에서 벗어나 생육에 필요한 광과 양분의 흡수가 신속히 이루어져 결과적으로 잎과 뿌리의 생

장이 빠르게 촉진되었다. 이는 계대배양으로 인해 지속적인 양분공급과 더불어 과도한 밀식에서 벗어나 생육에 필요한 광과 양분의 흡수가 신속히 이루어져 결과적으로 잎과 뿌리의 생장이 빠르게 촉진된 것으로 사료되었다(Table 20).

나) PLB 증식 후 잎이 나온 PLB를 한번 계대배양 시 병당 주수를 20주로 하였을 때 떡잎이 1개인 식물체와 떡잎이 2개인 식물체를 골라 각각 치상한 다음 3개월 후 생육을 관찰하였다. 그 결과 모든 품종에서 PLB를 한 번 계대배양 시 떡잎이 2개인 식물체를 골라 치상한 처리에서 생육이 더 좋았다. 크기가 큰 식물체를 치상할 경우 두 번 계대배양을 해 주지 않아도 생육에 큰 장애가 되지 않는다. 따라서 떡잎 2개의 식물체를 병당 20주로 치상할 경우 한 번의 계대배양으로도 충분하다는 것을 보여주고 있다. 그러므로 호접란 대량생산시 PLB에서 분화된 식물체의 크기를 고려하여 계대배양 단계 축소 유무를 결정해야 할 것이다(Table 20).

Table 22. 호접란 유묘 계대배양 시 병당 주수 및 떡잎 수에 따른 품종별 생육차이 비교

품종	병당 주수					
	40주→15주 (두번 계대배양)		20주 (한번 계대배양)		25주	
	1잎	2잎	1잎	2잎	1잎	2잎
418	++	+++	+	++	+	+
693	+++	+++	++	++	+	++
815	++	+++	++	+++	+	++
A112	++	+++	++	++	++	+
1116	+	++	++	+++	+	+
130	++	+++	++	++++	+	++

* 생육상태 : + poor, ++ moderate, +++ good, ++++ best

라. 선발 및 대량생산된 pink color 조직배양묘 온실 테스트를 통한 생육특성(생장율)검사



Fig. 8. Transplants of multiplied *Phalaenopsis*

대량 증식 실험을 거친 품종들은 기내에서 꺼내어 서로 뒤엉켜 있는 유묘의 뿌리 부근이 다치지 않게끔 서로 분리하여 배지를 깨끗이 씻어준 후 각각의 크기에 알맞은 포트에 이식하였다. 그 후 온실로 옮겨 균일한 온도조건 하에 특별한 유묘관리를 통해 재배되고 있다. 호접란의 생육특성상 개화에 이르기까지 다소 시간이 소요될 것으로 생각된다, 현재 대량증식된 품종들은 모두 유묘에서 중묘로 성장하여 정상적으로 잘 자라고 있으며 대조구 식물체와 비교해 봤을 때 상품화에 문제가 되는 특별한 돌연변이 증상은 발견되지 않았다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구개발목표의 달성도

세부 과제 및 주요 내용	달성도 (%)
○ 원종 및 우수 유전자원의 수집과 선발	100
-수집 유전자원의 특성평가	100
-수집 유전자원의 내한성 검정	
○ 유용 유전자의 형질전환 기술에 의한 신품종 육성	100
- <i>Agrobacterium</i> 에 의한 유용 유전자의 형질전환	100
-Gene gun에 의한 유용 유전자의 형질전환	100
-형질전환 식물체의 기내선발 및 재분화	100
-형질전환 식물체 확인	100
(GUS, PCR, RT-PCR, Southern)	
-선발 및 증식된 형질전환 조직배양묘 온실 테스트	100
○ Pink color 호접란의 조직배양에 의한 효율적 대량번식법 개발	100
-PLB 유기 및 증식법과 재분화 체계 개선	100
-대량증식에 적합한 우수 호접란 식물체(모주) 선발	100
-Pink color 호접란의 대량생산 효율증가	100
-선발 및 대량생산된 pink color 조직배양묘 온실 테스트를 통한 생육특성 검사	100

제2절 관련분야의 기술발전의 기여도

최근 각 작물에서 *Agrobacterium*과 gene gun을 이용한 형질전환을 통해 교배육종에 의하여 도입하기 힘든 유용유전자를 각 작물에 도입하여 신품종을 개발하는데 주력하고 있다. 특히 호접란의 경우 교배육종시 균일한 화색의 품종을 개발하기 위해서는 화색분리가 많아 장시간의 육종기간이 필요하며 조직배양에 의한 PLB의 대량번식이 매우 어려운 것으로 알려져 있다. 또한 교배육종이 되더라도 돌연변이와 낮은 생산성으로 인해 산업화에 문제가 되고 있다.

특히 호접란은 특성상 고온성 작물로 개화주기가 다른 양란에 비하여 비교적 짧은 편이나 개화주기가 16-20개월이므로 우리나라에서는 농가에서 재배시 겨울 난방비가 생산단가에 큰 비중을 차지하고 있다. 이러한 이유로 많은 농가는 고품질(꽃수가 많고, 화폭이 큰 것 등)이면서 개화주기가 빠른 호접란을 원하고 있다. 본 연구에서는 재배 농가가 실질적으로 필요로 하나 교배육종으로 도입하기 어려운 유용한 형질(조기개화, 화색관련)을 지닌 유전자를 도입하였다.

따라서 본 연구과정에서 *Agrobacterium*과 gene gun을 이용한 형질전환 방법을 구체적으로 체계화하여 확립시킴으로써 이러한 기술을 바탕으로 다른 유용유전자를 도입하여 신품종을 개발할 수 있을 것이다.

뿐만 아니라 국내외에서 우수한 호접란 유전자원을 수집하여 그 특성들을 DB화 함으로써 호접란 대량생산을 위한 기초자료로 효과적으로 이용될 수 있을 것이다. 이를 바탕으로 수요가 많은 pink color 호접란의 조직배양묘를 효율적으로 대량생산하는 방법들을 여러 방면으로 개발하여 생산성이 높고 돌연변이 없는 균일한 묘를 획득함으로써 산업화에 이바지 할 수 있다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제1절 본 연구결과의 중요성 및 추가연구의 필요성

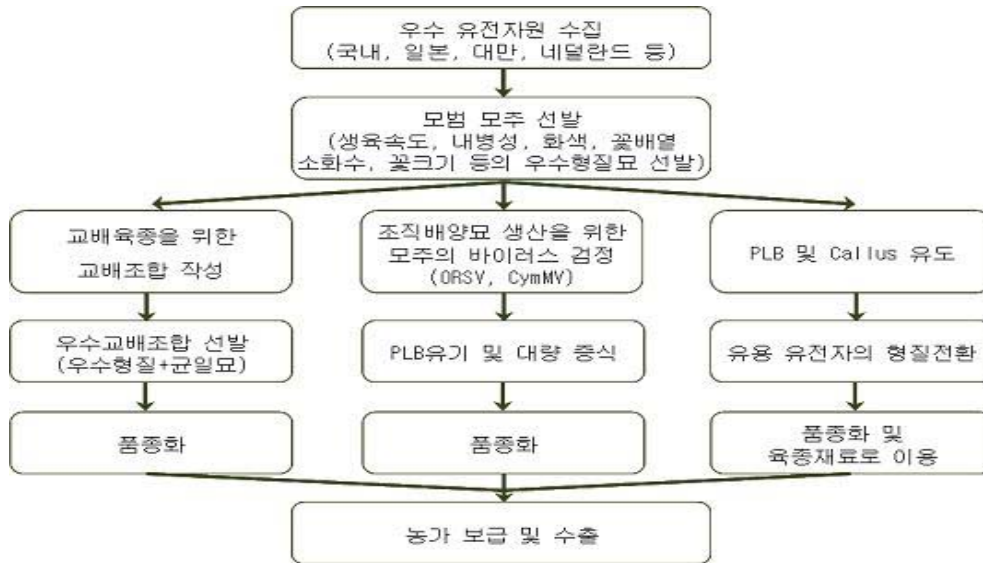


Fig. 1. A Schematic diagram of *Phalaenopsis* research.

호접란은 본 연구를 통해 조기 개화 및 화색 관련 형질전환체로 개발되었으며 연구 과정의 모식도는 위 그림과 같다(Fig. 1). 호접란 유전자원의 수집에서부터 품종화에 이르기 까지 전 과정이 유기적으로 체계화 되어있음을 알 수 있다. 따라서 대학연구소와 기업, 농가 직접 연결된 실제적 산학연 협동이 이루어 지는 것이다.

현재까지 얻어진 결과를 바탕으로 개화조절 및 화색조절 유전자가 성공적으로 호접란 내에 도입되었고 발현되고 있음을 알 수 있었다. 그러나 아직 형질전환체 호접란이 완전히 성장하지 못해 조기 개화 여부 및 화색의 변화양상을 관찰하기는 힘들다. 본 연구진은 형질전환체 호접란에서 나타나는 조기 개화를 예측하기 위하여 개화와 관련된 유전자의 흐름을 확인하고 northern hybridization등을 이용하여 gene expression 패턴을 분석하고자 한다. 또한 화색조절 유전자의 도입에 의한 호접란 화색의 변화 양

상을 예측하기 위해 도입된 유전자에 의해 생합성되는 2차대사산물의 함량 및 전구체의 함량을 HPLC를 이용하여 분석하고자 한다.

제2절 품종화 추진방안

본 과제는 *Agrobacterium*과 Gene gun을 이용한 형질전환을 통해 화색 및 조기개화에 관련된 호접란 형질전환체를 육성하고 pink color 호접란의 대량생산 기술을 개발하는 것이 주 목적이다. 육성된 형질전환체와 대량생산된 호접란묘는 우수 유전자원 수집과 선발로 구축된 데이터베이스를 통해 검증된 우수 모본과 교배하여 우수 품종 육성에 사용될 것이다.



Fig. 2. Clonally mass propagated pink color *Phalaenopsis* in the green house

제3절 타연구에의 응용

호접란 신품종 육성과 개발 기술은 WTO, UPOV 체제에서 국가간 화훼교역량이 증가되고 신품종 및 유전자에 대한 보호가 증가하는 현 시점에 있어 우수 품종 육성 및 유용유전자개발이 더욱 중요하게 여겨지고 있다. 따라서 이러한 안정적인 형질전환 체계와 대량생산 기술을 바탕으로 다른 양란 또는 화훼작물의 고품질 우수 품종의 육성에 활용될 수 있을 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

없음

제 7 장 참고문헌

- Anzai H, Ishii Y, Shichinohe M, Katsumata K, Nojiri C, Morikawa H, Tanaka M. 1996. Transformation of Phalaenopsis by particle bombardment. *Plant Tissue Cult Lett* 13: 265-271
- Arditti, J. and R. Ernst. 1993. *Micropropagation of Orchids*. p. 200, 434, 591, 545, 373~375, 467~520. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- B, Lesobre O, Sangwan RS, Sangwan-Norreel BS. 1993 Factors influencing T-DNA transfer in *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarbeet. *Plant Cell Rep* 12: 621-624
- Belarmino MM, Mii M. 2000. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a phalaenopsis orchid. *Plant Cell Rep* 19: 435-442
- CH, You SJ, Prasad V, Hsiao HH, Lu JC, Yang NS, Chan MT. 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an *Oncidium* orchid. *Plant Cell Rep* 21: 993-998
- Chai ML, Xu CJ, Senthil KK, Kim JY, Kim DH. 2002. Stable transformation of protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Sci Hortic* 96: 213-224
- Chia TF, Chan YS, Chua NH. 1990. Genetic engineering of tolerance to cymbidium cultures of soybean root cells. *Experimental CellResearch*, 50: 151-158

Christenson, E. A. 2001. *Phalaenopsis*, A Monograph. Timber Press, Inc. Portland, Oregon.

Duan, J.X., Yazawa, S. 1995. Floral induction and development in *Phalaenopsis* in vitro. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 43: 71-74

Ernst, R. 1994. Effects of thidiazuron on in vitro propagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* (Orhidaceae). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 39: 273-275

Hamill JD, Rounsley S, Spencer A, Todd G, Rhodes MJC. 1991. The use of the polymerase chain reaction in plant transformation studies. *Plant Cell Rep* 10:221-224

Hinnen, M.G.J, Pierik, R.L.M, Bronsema, F.B.F. 1989. The influence of macronutrients and some other factors on growth of *Phalaenopsis* hybrid seedlings in vitro. *Scientia Hortic.*, 41: 105-116

Ichihashi, S. 1997. Research on micropropagation of *Cymbidium*, *nobile*-type *endrobium*, and *Phalaenopsis* in Japan. In: Arditti, J. and A.M. Pridgeon (Eds.): *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*, VII. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 285-316

Ichihashi, S. and M. O. Islam. 1999. Effect of Complex Organic Additives on Callus Growth in Three Orchid Genera *Phalaenopsis*, and *Neofinetia*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 88(2) : 269-274

Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T. 1996 High efficiency of transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat Biotechnol* 14: 745-750

- Ishii, Y., Takamura, T., Goi, M., Tanaka, M. 1998. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Rep* 17: 446-450
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3907
- Kim, M. S., J.S. Eun, and Y. R. Lee. 2001. Effect of in vitro culture condition and lines on growth pattern of lateral bud from nodal cutting in *Phalaenopsis* flower stalk. *Kor. J. of Plant tissue culture* 28(4): 189-195.
- Kim, M. S., J.S. Eun, and J.Y. Kim. 2001. Effect of culture medium, temperature, and light intensity on PLB propagation of *Phalaenopsis*. 28(4) : 215-219.
- Knapp JE, Kausch AP, Chandlee JM. 2000. Transformation of three genera of orchid using the bar gene as a selectable marker. *Plant Cell Rep* 19: 893-898
- Kuehnle AR, Sugii N. 1992. Transformation of *Dendrobium* orchid using particle gun bombardment of protocorms. *Plant Cell Rep* 11: 484-488
- Kernohan J, Bonham N, Bonham D, Cobb L (eds) *Proceedings of the 13th World Orchid Conference*. World Orchid Conference Trust, Auckland,
- Murthy, H.N., Pyati, A.N. 2001. Micropropagation of *Aerides maculosum* Lindl. (Orchidaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 37: 223-226
- Nan GL, Kuehnle AR, Kado CI. 1998. Transgenic *Dendrobium* orchid through *Agrobacterium*-mediated transformation. *Malay Orchid Rev* 32: 93-96

- Nan GL, Tang CS, Kuehnle AR, Kado CI. 1997. Dendrobium orchids contain an inducer of *Agrobacterium* virulence genes. *Physiol Mol Plant Pathol* 51: 391-399
- Ohta S, Mita S, Hattori T, Nakamura K. 1990. Construction and expression in tobacco of a β -glucuronidase(GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol* 31: 805-813
- Park, S.Y., Murthy, H. N., Paek, K.Y. 2002. Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 38: 168-172
- Park, Y.S., Kakuta, S., Kano, A., Okabe, M. 1996. Efficient propagation of protocorm-like bodies of *Phalaenopsis* in liquid medium. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*,45: 79-85
- Robichon MP, Renou JP, Jalouzot R. 1995. Genetic transformation of *Pelargonium x hortorum*. *Plant Cell Rep* 15: 63-67
- Roy, J., Banerjee, N. 2003. Induction of callus and plant regeneration from shoot-tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. *oculatum* Hk. *F. Scientia Hort.*, 97: 333-340
- Suzuki S, Nakano M (2002) *Agrobacterium*-mediated production of transgenic plants of *Muscari armeniacum* Leichtl. ex Bak. *Plant Cell Rep* 20: 835-841
- Tisserat, B., Jones, D. 1999. Clonal propagation of orchids. In: Hall,R.D. (Ed.): *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology*, 111. Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA, 127-134

Tokuhara K, Mii M. 1993. Micropropagation of Phalaenopsis and Doritaenopsis by culturing shoot tips of flower stalk buds. Plant Cell Rep 13: 7-11

Tokuhara, K., Mii, M. 1993. Micropropagation of Phalaenopsis and Doritaenopsis by culturing shoot tips of flower stalk buds. Plant Cell Rep., 13: 7-11

Yarm. T.W., R. Ernst, J. Arditti, and S. Ichihashi. 1991. The effects of complex additives and 6-(r, r-dimethylallylamino)-purine on the proliferation of *Phalaenopsis* protocoms. Lindleyana 6(1): 24-26

Yu H, Yang SH, Goh CJ (2001) Agrobacterium-mediated transformation of a Dendrobium orchid with the class 1 knox gene DOH1. Plant Cell Rep 20: 301-305

唐澤耕司. 1996. 農業技術大系. 花卉編 (12). ラン/ サボテン/ 多肉植物. p. 257~258.

Sweet, H. 1980. The genus Phalaenopsis. Orchid Digest Inc.

世界蘭業有限公司. 2003. The New Phalaenopsis of Taiwan III, SOGO Team CO., LTD. Taiwan.

深見澂司. 1996. Orchid Catalogue, 成美堂出版株式會社.