

최 종
연구보고서

자생 *Cymbidium*속 식물을 이용한
종간 신품종 육성과 지표인자 개발

연구기관

서울여자대학교 자연과학대학
고려대학교 생명과학부

농림부 도서실



0011087

농 립 부

0.7
239x
1005-139

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “자생 *Cymbidium*속 식물을 이용한 종간 신품종 육성과
지표인자 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 11 월 일

주관연구기관명 : 서울여자대학교

총괄연구책임자 : 이 종 석

세부연구책임자 : 이 종 석

연 구 원 : 홍 정

연 구 원 : 한 승 원

협동연구기관명 : 고려대학교

협동연구책임자 : 신 정 섭

연 구 원 : 강 효 미

요 약 문

I. 제 목

자생 *Cymbidium*속 식물을 이용한 중간 신품종 육성과 지표인자 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

난류의 수입대체와 수출 작물로서의 개발을 위해서는 우수한 형질을 가진 신품종의 개발이 시급한 실정이다. 본 연구는 우리나라의 남부지방에 자생하는 춘란과 제주도에 자생하는 한란 및 죽백란 등 자생 *Cymbidium* 속 식물을 육종 재료로하여 중간 교잡종을 육성, 난의 국제 경쟁력을 제고하고자 하였다. 특히 난의 잡종강세 현상을 이용하여 열성(葉性)이 좋고 개화가 잘되는 우수한 중간 잡종을 선발하여 품종화 하므로써 수입물량의 대부분을 차지하고 있는 관엽성(觀葉性) 난류를 대체하고 브랜드화 하고자 하였다.

한편 동양란 품종간의 유전적 거리를 추정할 수 있는 DNA marker를 개발하고, 이를 적극적으로 활용하여 난 재배농가에서 새로운 동양란 품종의 창성을 위한 교잡육종에 필요한 기초자료를 제공하는 것이다. 그리고 품종 특이적인 DNA marker를 개발·확보하고 이러한 정보들을 축적하여 DB화 시킬 수 있는 방법을 모색함으로써, 앞으로 생산되는 새로운 동양란의 품종을 보호하는 것이 연구개발의 목적이다.

동양란은 품종 및 계통간의 변이가 다양하여 분류화 작업이 제대로 이루어져 있지 않아, 품종의 가계 (pedigree) 정보나 난 genome에 대한 기초연구가 필요하다. 최근에 널리 사용되는 DNA 표식인자들을 고소득 작목인 동양란에 이용하게 되면 품종분류의 체계화가 이루어질 수 있으며 개발된 지표인자들을 이용하여 원연간 교잡을 할 경우 잡종강세와 같은 유용한 형질을 육종프로그

램에 직접 이용할 수 있다. 최근 농림부와 농촌진흥청 종자보급소에서는 OECD 가입의 후속조치 중의 일환으로 종자 산업법을 제정하여 공포 하였다. 신품종을 등록하여 육종가의 배타적인 권리를 보호하기 위해서는 형태적 특성의 분석도 있어야 하지만 세밀화된 구별화가 없으면 보호의 기능을 제대로 할 수가 없다. 본 연구는 DNA 표식인자를 이용하여 단기간 내에 원하는 형질들이 조합된 genotype을 식별할 수 있어 유망한 품종을 개발, 보호하는데 이용할 수 있다. 그리고 동양란류의 새로운 품종개발과 이들의 보증을 위한 DNA 표식인자의 개발이 필요하며 DNA 표식인자를 활용하면 원연의 계통들을 선별할 수 있어 잡종강세를 이용한 우수한 형질을 갖는 동양란의 품종개발에 사용할 수 있기 때문이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- ① 실용화가 가능한 우수한 중간 잡종식물의 개발
- ② 선발된 F1의 성장점 배양을 통한 대량 생산 체계 구축
- ③ 선발된 우수 개체의 품종화(특허 또는 품종등록)
- ④ 선발 개체의 유전적 양상 조사
- ⑤ DNA 표식인자를 이용한 동양란 계통 구별화 작업
- ⑥ 동양란 품종구분을 위한 표식 인자 DB구축

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

없음

SUMMARY

Plant breeders have developed new cultivars via manipulation of genes modifying traits affecting agronomic performance and market values, and every breeding program demands long time and intensive labor. After releasing to farmers, maintenance of the superior genetic characters against unexpected mutations as well as from plagiarism is very important. DNA markers, which are unambiguous, abundant, and physiologically neutral, have successfully been applied to classify families and estimate genetic divergence among and between families tested. Developing DNA markers for genotyping and genetic diversity studies is commonly started with the polymorphisms detected from undefined elements (without DNA sequence information), and RAPD and AFLP are most common methods. Meanwhile, achieving high reproducibility of polymorphic bands and tagging them as specific alleles for DNA fingerprints usually become more difficult as polymorphic band profile complexity is increased due to dominantly scored markers and possible experimental errors. Therefore, identification of a specific cultivar from other closely related cultivars demands not only enough number of informative markers but also high reproducibility of developed markers.

In the study present here, specific primer sets were developed from RAPD, methylation-sensitive-enzyme-restricted genomic DNA clones (active genome semi-library) and URP. And SNP markers were also developed. Our first goal was to develop practical and reliable easy-to-use method to discriminate oriental *Cymbidium* lines. We focused on detail description of the alleles, band sizes of amplified products, the presence and absence of recognized sequences by 4 endonucleases, *AluI*, *HaeIII*, *HinfI*, and *RasI* within the amplified products, and their sizes of cleaved products, in a locus among lines tested. Newly developed cultivars, consequently, could be easily characterized via comparison of defined alleles by specific locus tagging (STS-PCR with the primer sets in DB) followed by allele analysis.

CONTENTS

Chapter 1. Research background

1. Research objectives and goals
2. The need for research and development
 - 1) Technical problems
 - 2) Economical and social aspects
3. Research areas

Chapter 2. Current status of related techniques

Chapter 3. Materials, methods and results

I. Nourishment of New Inter-specific Hybrid on *Cymbidium* species

1. Insure of excellent originated species for new Inter-specific Hybrid
2. New hybrid production of *Cymbidium* species
3. Selection and nourishment of new excellent hybrid species

II. Cultivation of index factor on *Cymbidium* species

1. Materials and methods

- 1) Plant materials
- 2) DNA isolation
- 3) RAPD analysis
- 4) Development of SCAR markers
- 5) Application of SCAR primers
- 6) Development of gene-specific markers (STS-PCR)
- 7) Application of STS-PCR markers
- 8) Development and analysis of CAPS markers
- 9) Application of URP markers
- 10) Development and application of SNP markers

2. Results and discussion

- 1) Development of RAPD markers and phylogenetic study

- 1-1. RAPD markers
 - 1-2. Phylogenetic analysis using RAPD polymorphic band screening
 - 2) Development of SCAR markers
 - 2-1. SCAR markers
 - 2-2. Development of SCAR primer sets from RAPD markers
 - 3) Development of gene-specific markers and phylogenetic study
 - 3-1. Construction of active genome region enriched semi-library and STS-PCR markers
 - 3-2. Development of STS primers using active genome region-enriched semi-library and their application
 - 3-3. Phylogenetic analysis using STS-CAPS
 - 4) Phylogenetic analysis using URP markers
 - 5) Development of SNP markers
 - 6) DB model construction for genotyping of oriental Cymbidium
- Chapter 4. Rate of achieving research goals and contribution to related studies
- 1. Rate of achieving research goals
 - 1) Research goals
 - 2) Achievement of research goals
 - 2. Contribution to related studies
- Chapter 5. Plans for application of research results
- Chapter 6. Acquired scientific informations during research
- Chapter 7. References
- Appendix
- Appendix 1. Binary data of RAPD
 - Appendix 2. Scoring tables of STS and CAPS products
 - Appendix 3. Binary data of URP

목 차

| | | |
|-------|--|----|
| 제 1 장 | 연구개발과제의 개요 | |
| 제 1절 | 연구개발의 목적 | 1 |
| 제 2절 | 연구개발의 필요성 | 2 |
| 제 3절 | 연구개발의 내용 | 4 |
| 제 2 장 | 국내외 기술개발 현황 | 5 |
| 제 3 장 | 연구개발수행 내용 및 결과 | |
| 제 1절 | Cymbidium 속 식물을 이용한 중간 잡종 육성(주관) | |
| 제 1항 | 중간잡종 육성을 위한 우수모본 확보 | 9 |
| 제 2항 | Cymbidium류의 중간잡종 식물체 생산 | 13 |
| 제 3항 | 우수 잡종 식물체의 선발 및 육성 | 27 |
| | 1. 자생 Cymbidium속 교잡종 | |
| | 2. 동양란 교잡종 | |
| | 3. 동·서양란 교잡종 | |
| | 4. 3원교배종 및 기타잡종 | |
| 제 2절 | 지표인자 개발(협약) | |
| 제 1 항 | 연구수행 내용 | 73 |
| | 1. 동양란 연구재료의 선정 | |
| | 2. 동양란 DNA의 추출 | |
| | 3. RAPD 분석 | |
| | 4. SCAR marker의 개발 | |
| | 5. SCAR primer의 적용 | |
| | 6. Gene-specific marker (STS-PCR) 의 개발 | |
| | 7. STS-PCR marker의 적용 | |
| | 8. CAPS marker의 개발과 분석 | |

- 9. URP 표식인자의 적용
- 10. SNP marker의 개발 및 적용

제 2 항 연구수행 결과 82

- 1. RAPD 표식인자개발 및 근연도 추정
- 2. SCAR 표식인자개발
- 3. Gene-specific 표식인자의 개발 및 근연도 추정
- 4. URP 표식인자를 이용한 근연도 분석
- 5. SNP 표식인자의 개발 가능성 검정
- 6. 동양란 품종구분을 위한 표식인자 DB 모형 구축

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 108

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

- 화훼산업을 세계 수준으로 발전시키기 위해 자생 심비디움속 식물을 이용하여 중간 잡종 식물체 선발, 우수한 신품종을 개발함으로써, 국가경쟁력을 제고한다.
- 수입물량의 대부분을 차지하고 있는 관엽성(觀葉性) 난류를 대체할 수 있는 엽성(葉性)이 좋고 개화가 잘되는 중간잡종을 육성한다.
- 신품종 육성을 위해 환경이나 유전적 원인으로 인한 생리적 격리로 인해 임성이 떨어지고, 근연관계가 멀수록 교잡종의 강세현상이 나타나는 난의 유전학적인 기초를 마련한다.
- 동양란 품종간의 유전적 거리를 추정할 수 있는 DNA marker를 개발하고, 이를 적극적으로 활용하여 난 재배농가에서 새로운 동양란 품종의 육성을 위해 교잡육종에 필요한 기초자료를 제공하고자 한다.
- 품종 특이적인 DNA marker를 개발·확보하고 이러한 정보들을 축적하여 DB화 시킬 수 있는 방법을 모색함으로써, 앞으로 생산되는 새로운 동양란의 품종을 보호한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적인 측면

○ 최근 우리나라의 화훼산업은 난과의 식물이 가장 중요한 작물로 취급되어지고 있는데, 다른 식물에 비하여 난과의 식물은 종속간 교잡이 비교적 쉽고, 근연관계가 멀수록 잡종강세 현상이 현저하여 우수한 품종을 얻을 수 있는 장점이 있다.

○ 특히 우리나라의 자생 춘란과 한란, 죽백란 등을 육종재료로 이용하여, 동양란 및 서양란 심비디움과 중간 잡종을 육성하는 경우, 잡종 강세 현상이 뚜렷하여 기내 생산과 유묘의 순화가 잘되고 환경적응성이 크며 생육이 잘 되는 특성이 있으므로, 수입물량의 대부분을 차지하는 관엽성 난류를 대체할 수 있는 염성이 좋고 개화가 잘 되는 중간잡종의 육성이 필요하다.

○ 지나친 원연으로 인한 생식적 격리가 있는 경우 염성이 떨어져 후대를 얻기 힘든 경우가 발생한다. 따라서 교배 시에는 DNA 표식인자의 적용과 같은 정확한 진단방법에 의해 교배 가능한 영역 내에서 유전적으로 원거리인 품종 간에 교배를 시키면 저항성 및 다양한 형질을 가진 새로운 품종들을 생산할 수 있을 것이다. 그러나 난과 식물은 국내외적으로 많은 품종이 재배되고 있음에도 불구하고, 종간의 근연관계에 대한 정보가 거의 확보되어 있지 않으며 이를 기초로 한 체계적인 육종 또한 전혀 이루어지지 않고 있다. 그러므로 품종의 가계에 대한 정보나 난 genome 자체에 대한 기초연구가 반드시 필요한 상황이라고 할 수 있다.

○ 품종으로서의 요건이 충족된 새로운 난 품종이 개발되면 이들의 권리를 법적으로 보호해 주는 장치가 반드시 필요하다. 이러한 법적인 장치가 마련된다면 육종가와 신품종 생산자의 권리가 보호되며 우수품종의 보급이 촉진되어 궁극적으로는 농업생산성과 농민소득의 증대를 도모할 수 있게 된다.

○ 농림부와 농촌진흥청 종자보급소에서는 OECD 가입의 후속조치 중의 일환으로 종자산업법을 제정하여 공포하였고, 이에따라 신품종을 등록하여 육종가의 배타적인 권리를 보호하기 위해서는 형태적인 분석도 있어야하지만 세밀화된 구별화가 없으면 보호의 기능을 제대로 할 수가 없게되므로, DNA 표식인자를 이용하여 단기간 내에 원하는 형질들이 조합된 genotype을 식별할 수 있어 유망한 품종을 개발, 보호하는데 이용할 수 있다.

○ 지금까지는 형태적, 생리적 표지인자를 이용하여 품종을 구분하여 왔는데, 이 경우에는 사용가능한 표지인자의 수가 제한적이며, 적용에도 불분명한 점이 많아 특정 계통이나 변이체를 정확히 구분할 수 없는 경우가 많고 상품성이 확보되는 시기뿐만 아니라 전 생육기에서 언제든지 형질검정이 가능한 표지인자 또한 거의 없는 실정이다. 그러므로 검정 절차가 단순화되어 시간과 경비를 절약할 수 있으며 동시에 검정결과의 일관성이 확보된 DNA 표지인자를 개발한다면 단기간 내에 원하는 형질들이 조합된 genotype을 용이하게 식별할 수 있게 되어 유망한 품종을 개발, 보호하는데 이용할 수 있으리라 생각된다.

2. 경제 · 산업적인 측면

우리나라의 화훼류 수입은 18,820천\$이었으며, 이 중 난류의 수입이 11,083천\$로서 전체 수입액의 약 60%를 차지하였고, 그 중에서도 동양란류의 수입액이 10,445천\$로서 전체 난류 수입의 94%를 차지하고 있다 (이중석, 2002). 그리고 국내 화훼산업 중 동양란 교잡종은, 최근 재배면적이 급격히 증가되고 있으며 부가가치가 높아서 소득면에서 중요한 품목으로 성장하고 있다. 일반 농산물의 수입자유화로 인하여 우리 농가가 위기에 처한 현시점에서 일반 화훼류에 비하여 고수익성인 양란은 2004년말 현재 10,000천\$를 능가하였다. 따라서 국내 수요도 중요하지만 수출에 중점을 두어 수출 유망 품목으로 적극 개발해야 한다. 그러므로 동양란류의 새로운 품종개발과 이들의 보증을 위한 DNA 표지인자의 개발은 난류의 수입대체 효과와 더불어 수입가격의 하락에 크게 기여할 것으로 생각된다. 그 이유는 DNA 표지인자를 활용하면 원연의 계통들을 선별할 수 있어 잡종강세를 이용한 우수한 형질을 동시에 갖는 동양란 품종개발에 사용할 수 있으며, 고소득 작목으로 개발하여 세계화에 능동적으로 대처할 수 있기 때문이다.

제 3 절 연구개발의 범위

- ① 실용화가 가능한 우수 집종식물의 개발
- ② 선발된 F1의 성장점 배양을 통한 대량 생산 체계 구축
- ③ 선발된 우수 개체의 품종화(특허 또는 품종등록)
- ④ 선발 개체의 유전적 양상 조사
- ⑤ DNA 표식인자를 이용한 동양란 계통 구별화 작업
- ⑥ 동양란 품종구분을 위한 표식 인자 DB구축

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 현재 부가가치가 높은 화훼식물로서 난과 식물은 교배과정과 조직배양 기술의 비전문성으로 인해 품종의 개량이 활성화 되지 못한 실정이다.
- 장차 일본, 대만, 태국 등지에서 신품종 도입시 로열티를 지급해야할 현실이므로, 하루빨리 새로운 신품종이 개발야 한다.
- 핵산 표식인자(DNA marker)의 개념이 국내의 소개된 이래, 많은 연구 기관 및 단체들이 DNA 핵산표식기술을 다양한 분야에 적용해오고 있다. 농업적으로는 한 작물의 국내 품종들과 외국 품종들이 보이는 'polymorphism'의 관찰로, 유전자원의 다양성 추정 및 특성 형질(저항성, 큰 형질차이 등) 품종의 표지인자 개발 등에 이용되어 왔다.
- 국내 신품종들을 정확히 구분하고, 더 나아가서 품질의 우수성 및 균일성을 지속적으로 확보하기 위해 DNA 인자를 사용하는 것에 대한 인식이 높지 못했다. 환경 적응종(ecotype)의 특성을 지니는 국내품종간의 polymorphism의 발견이 쉽지 않을 뿐더러, 발견되었다 하더라도 이 정보를 재현성이 보장되는 DNA 표식인자로서의 확립이 쉽지 않고, 표지된 유전자좌(locus) 및 특정 유전자좌 내의 대립유전자들(alleles)의 조성(genotype)을 구체적으로 명시할 수 있는 기법이 제시되지 못했다는 점 등 때문이다. 그 결과, 가시적이며 수치적으로 일관성을 지니는 database의 구축이 불가능했으며 더불어 연구자간 원활한 정보의 공유도 극도로 제한되어 있다.
- 외국의 경우 신품종 심사기술에 DNA 표식인자의 이용이 규정되어 있고, 많은 DNA 표식인자들이 유전자 연관지도에 포함되어져 체계적인 육종계획의 수립 및 육종의 수행에 많은 정보를 제공하고 있다. 국내에서도 다양한 DNA 표식인자 기법들이 생물자원 분석을 위하여 널리 사용되고 있으며, 농업부분에서도 농촌진흥청 뿐만 아니라 각 대학에서의 사용빈도도 급격히 증가하고 있는 상황이지만, DNA 인자를 신품종의 심사기술에 도입하여 정확하게 분별하는 연구는 충분하지 못한 상황이다. 개발된 표식인자에 대하여도 데이터의 정확한 해석을 위한 전문 인력이 부족하여 이용의 한계를 느끼고 있는 실정이다. 조금 더 구체적으로 유전인자 분석 방법들을 품종 판별 및 품종의 균일성 유지 등에 효과적으로 이용할 때 고려해야 할 점들을 살펴보면 다음과 같다.

① 개발된 DNA 표식인자 활용상의 문제점

DNA 표식인자라는 개념이 개발된 후 많은 연구기관 및 단체들에서 개발된 표식인자를 다양한 분야에 적용해 오고 있다. 농업에서는 특정 작물의 국내 품종들과 외국 품종들이 보이는 다형성의 관찰이나 유전자원의 다양성 추정 등을 위한 표지인자 개발 등에 이용되어 왔다. 그러나 국내 품종들을 정확히 구분하고, 더 나아가서 품질의 우수성 및 균일성을 지속적으로 확보하기 위하여 DNA 인자를 사용하는 데에는 인식이 높지 못했다. 그 주된 이유로는, 환경적응종 (ecotype)의 특성을 지니는, 국내 품종간의 다형성의 발견이 쉽지 않을 뿐더러, 발견된다 하더라도 이 정보를 재현성이 보장되는 DNA marker로의 확립이 쉽지 않고, 표지된 유전자좌 (locus) 및 특정 유전자좌 내의 대립 유전자들의 조성 (genotype) 을 구체적으로 명시할 수 있는 기법이 제시되지 못했다는 점 등을 들 수가 있다. 그 결과, 가시적이며 수치적으로 일관성을 지니는 DB의 구축이 불가능했으며 더불어 연구자간 원활한 정보의 공유도 제한적 이라고 할 수 있다.

② 다형성 발견 기법의 효율성과 신뢰에 대한 문제점

유전자 연관지도가 제작된 주요 식량작물인 벼, 보리, 옥수수 등의 경우에는 각각의 염색체 특정부위를 표지하는 염기서열 특이적 primer조합들이 체계적으로 개발되어 있으나, 그 이외의 작물들은 다형성을 확인하기 위해서는 RAPD 방법이나 AFLP 방법처럼 분석되지 않은 DNA의 일부분을 증폭하거나, RLGS 방법으로 전체 염색체를 대상으로 하여 분석을 시도하게 된다. 그러나 RAPD (Williams et al., 1990)는 그 실험 절차가 비교적 간단하지만 모든 증폭 산물들을 안정적으로 반복해서 관찰하기가 어렵다는 단점이 있고, AFLP (Vos et al., 1995) 및 RLGS (Anderson and Anderson, 1979)는 실험 과정상 여러 단계의 처리 절차를 거쳐야 하기 때문에 실험상의 오류가 발생할 수 있으며 숙달된 연구 인력과 특수한 장비가 추가로 요구된다는 단점이 있다.

③ 표식인자 개발 및 활용의 단순·보편화 및 일관성 확보를 위한 기술개발의 추세

한 품종이나 하나의 품종군에서만 확인되는 특이 증폭 산물들을 사용한 primer의 이름과 증폭산물의 크기를 함께 명시하는 방식으로 수치적으로 정보화하여 유전연관 정도를 추정하거나, 특정 형질을 표지하는 DNA 표식인자를 선발해 내는 등의 연구는 이미 시도되어 왔었다. 그러나 DNA marker를 이용하여 품종을 정확히 구분하고, 형질의 변성을 판정하는데 적용하기 위해서는 다형성을 확인하는 작업 이

상으로 정보화된 다형성을 일관되게 재현될 수 있도록 절차를 단순화 및 보편화 시키는 것이 필수적이라고 할 수 있다.

단시일 내에 품종들 사이의 다형성을 확인하는 방법으로 가장 쉽게 적용할 수 있는 것이 RAPD 방법이라고 할 수 있다. RAPD 방법은 대개 10 bp 내외의 적은 primer를 PCR 반응에 이용하기 때문에 2개의 상보적인 염기서열에 의해서 게놈 내의 여러 부위가 증폭된다. RAPD 지표인자들은 특정위치에 작용하는 primer들의 특성상 우성적인 (dominant) 특성을 보이고 실험실내에서의 쉬운 조작으로 인해 mapping이나 원연관계 분석과 같은 실험에 많이 적용되어왔다. 그러나 RAPD는 실험조건 뿐만 아니라, 사용하는 기자재에 따라서도 매우 심한 결과의 변이가 나타난다는 문제점을 가지고 있다.

AFLP 방법의 경우에는 단시간 내에 많은 polymorphism을 확인할 수 있다는 장점이 있지만, 반복적으로 실험을 진행하기에는 실험 절차가 매우 복잡하여 실험 수행과정에서 발생하는 오류가 존재할 수 있으며 숙달된 연구자가 반드시 필요하다는 단점이 있다.

RFLP 방법 역시 많은 다형성의 확보와 높은 신뢰성을 가진다는 장점을 가지고 있지만 번거로운 실험절차를 거친다는 단점을 가지고 있다. 이러한 실험 절차상의 많은 시간과 노력을 요구하는 RFLP 방법을 단순화하기 위해 probe clone들의 말단 염기서열 분석을 실시하고 그 정보를 바탕으로 specific primer 조합을 합성하여 사용하는 STS-PCR 방법이 개발되었다 (Olson, et al., 1989). 그 이후 다형성 확인 절차의 단순화, 보편화 및 일관성의 확보를 STS-PCR 방법으로 추구하려는 것이 세계적인 추세가 되었다. 물론 STS-PCR primer로 전환시키는 데에는 비교적 많은 경비와 시간이 소요되지만, 일단 전환되어서 표식인자로 확립된 후에는 새로이 육성되어지는 품종 및 외국 도입종, 더 나아가서 근연종 및 원연종 모두에 광범위하게 적용되어질 수 있으므로 영구적으로 사용할 수 있다는 장점이 있다. 이를 응용하여 SCAR 표식인자들이 개발되었는데, 이는 RAPD band들을 염기서열 분석을 통해 재현성이 높은 marker로 전환시킨 형태로써 RAPD지표인자의 염기서열분석을 통하여 만들어 지는데, STS-PCR 표식인자에 비하여 비용과 노력을 절감할 수 있다는 장점을 가지고 있기 때문에 현재 많은 연구자들이 적용하는 표식인자이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 Cymbidium 속 식물을 이용한 중간 신품종 육성(주관)

1. 신품종 육성을 위한 우수모본 확보

자생 Cymbidium 속 식물을 이용하여 동양란의 신품종을 육성하기 위한 교배모본 확보 내용은 표 1에 나타난 바와 같다.

1년차에 자생종 5종과 중국과 말레이시아를 직접 방문하여 야생의 Cymbidium 4종, 화훼시장에서 개화된 서양란 Cymbidium 3품종을 수집하였고, 기타 자생란으로써 새우난초류 등 8종류를 확보하였다. 2년차에는 춘란 5종류, 한란 4종류 등 9종류의 우리나라 자생 Cymbidium류와, 중국춘란 7품종을 비롯한 보세란, 대명란, 오지춘란, 일경구화, 적아소심, 옥화란, 일본산 한란 소심(소풍, 풍설) 등 20종류의 동양란류를 수집하였다. 서양란 Cymbidium류는 Pianist를 비롯하여 Flourish 등 24품종을 수집하였고 말레이시아의 Kotakinabalu산을 직접 탐사하여 *Cymbidium dayanum*을 채집하였다. 한편 동·서양란의 잡종인 Miss Taipei, 도화(桃花), 봉황(鳳凰), 도요를 비롯한 6품종을 수집하였고 3원교잡종의 재료로 활용하였다.

Cymbidium속간의 중간잡종 육성을 위해서는 육종방향에 따라 다양한 모본이 필요하고 중간잡종의 경우에는 제 1의 특성이 성질이 강하다는 장점이 연구 결과 발견되었다. 그러므로 짧은 잎과 내한성이 강한 성질의 것은 한국 자생춘란과 중국춘란을 재료로 이용하고, 향기가 좋은 인자를 도입하고자 할 경우에는 제주한란과 중국춘란을 비롯한 건란, 보세란, 옥화란, 대명란, 춘검란, 소심란 등을 모본으로 사용하는 것이 바람직한 것으로 판단되었다. 한편 넓고 풍부한 엽성을 가진 것은 보세란과 대명란 그리고 엽성이 강한 것은 건란과 일경구화였다. 또한 꽃색의 화려함과 다양함 그리고 꽃의 크기를 크게 육성하고자 할 경우에는 서양란 cymbidium의 품종을 이용하는 것이 바람직하다고 판단되었다.

표 1. 신품종 육성을 위한 유전자원 수집현황(1차년도)

| 계통 | 우리말 이름 | 학명 | 원산지 |
|-------------------------|--------------------|---|----------------------------|
| Korean native Cymbidium | 한란 | <i>Cymbidium kanran</i> Makino. | 제주 |
| | 춘란 | <i>Cymbidium goeringii</i> Reichb. | 고창 |
| | 죽백란 | <i>Cymbidium lacifolium</i> Hooker | 제주 |
| | 녹화죽백란 | <i>Cymbidium javanicum</i> var. <i>aspidistrifolium</i> . F.Maekawa | 제주 |
| Oriental Cymbidium | 소란 | <i>Cymbidium koran</i> Makino | 제주, 일본 |
| | 건란 | <i>Cymbidium ensifolium</i> SW. | 중국 |
| | 중국춘란 | <i>Cymbidium forresti</i> Rolfe | 중국 |
| | 보세 | <i>Cymbidium sinense</i> for. <i>hakuran</i> | 중국, 대만 |
| | 소심란 | <i>Cymbidium gyokuchin</i> Makino | 중국 |
| | 일경구화 | <i>Cymbidium faberi</i> Rolf | 중국 |
| | 춘검란 | <i>Cymbidium longibracteatum</i> | 중국, 대만 |
| | 사란 | <i>Cymbidium formosamum</i> | 대만 |
| | 적아소심 | <i>Cymbidium rubrigemmum</i> Hay | 중국 |
| | Oriental Cymbidium | ‘썬더스트’ | <i>Cymbidium</i> ‘Sundust’ |
| ‘피아니스트’ | | <i>Cymbidium</i> ‘Pianist’ | 원예종. |
| ‘크레센트’ | | <i>Cymbidium</i> ‘Crescent’ | 원예종 |
| Native orchids | 새우난초 | <i>Calanthe discolor</i> Lindle | 제주, 안면도 |
| | 금새우란 | <i>Calanthe striata</i> R. Br | 제주 |
| | 여름새우난초 | <i>Calanthe reflexa</i> Max. | 제주 |
| | 사철란 | <i>Goodyera schlechtendaliana</i> Reichb. fil. | 제주 |
| | 털사철란 | <i>Goodyera velutina</i> Max. | 제주 |
| | 붉은사철란 | <i>Goodyera macrantha</i> Max. | 제주 |
| | 자란 | <i>Bletilla striata</i> (Thunb.) Reichb. | 신안 |
| | 개불알꽃 | <i>Cypripedium macranthum</i> Sw | 경기도 |

표 2. 신품중육성을 위한 유전자원 수집현황(2, 3차년도)

| 계 통 | 우리말이름 | 학 명 | 품중명 | 원산지 |
|-----|-------------|---|--|----------|
| 자생란 | 춘란 | <i>Cym. goeringii</i> | 홍화(紅花) 황화(黃花) 소심(素心) 매변(梅弁) 유향춘란(有香春蘭) | 전남북, 제주도 |
| | 한란 | <i>Cym. kanran</i> | 적화(赤花) 청한란(靑寒蘭) 경사(更絲) 대엽(大葉) | 제주도, 완도 |
| 동양란 | 중국춘란 | <i>Cym. forrestii</i> | 서신매(西神梅) 대부귀(大富貴) 장하소(張荷素) 송매(宋梅) 취개(翠蓋) 여호접(余胡蝶) 주순취(朱瞬醉) | 중국 |
| | 보세란 | <i>Cym. sinense</i> | 백묵소(白墨素) 금화산(金華山) 대훈(大勳) | 대만 |
| | 대명란 | <i>Cym. sinense</i> for. <i>hakuran</i> | 천일소(天一素) | |
| | 오지춘란 | <i>Cym. serratum</i> var. <i>bellum</i> | 소설소(素舌素) | 중국 |
| | 일경구화 | <i>Cym. faberi</i> | 대일품(大一品) 극품(極品) | 중국 |
| | 적아소심 | <i>Cym. rubrigemum</i> | 적아일진(赤芽一進) 홍하(紅河) 살마금(薩摩錦) | 대만, 중국 |
| | 옥화란 | <i>Cym. niveo-marginatum</i> | | 중국 |
| 서양란 | 한란 (일본산) | <i>Cym. kanran</i> | 풍설(豐雪) 소풍(素豊) 북살지예(北薩之譽) | 일본 |
| | | <i>Cym. spp</i> | Showgirl 'Husky Honey' Crescent Flourish Lapine Rouge Sinseiki Nobuko Mille Feulle Moon Walk Haruka Orpheus Romeo Waltz Romance | 일본 |

Izumi
 Pianist
 Persy Color
 Lapine Pony
 Lapine Dancer
 Lapine Palace
 Lapine Hat
 Red Wine Color
 Hatsukoi
 Salary Man
 Kenny Wine Color
 Hurricane

| | <i>Cym. dayanum</i> | 말레지아 |
|-----|---------------------|------|
| 교잡종 | 도화(挑花) | 일본 |
| | 도요(東洋) | 일본 |
| | 봉황(鳳凰) | 한국 |
| | 만천홍(萬天紅) | 대만 |
| | 매홍(梅紅) | 대만 |
| | 대국(大國) | 한국 |

2. Cymbidium류의 중간잡종 식물체 생산 및 육성

가. 중간 교잡종자 획득

Cymbidium Cresente에 일경구화(*Cymbidium faberi*), 그리고 춘란(*Cymbidium goeringii*)을 교잡시켜 수정되었고 *Cymbidium* Pianist와 보세란(*Cymbidium sinense*)의 교잡종자를 수확하였다. 또한 서양란 *Cymbidium*과 건란의 교잡종인 '동양'과 무명의 *Cymbidium*을 교잡하여 4원 교잡종을 육성하고자 수분시킨 결과 종자를 맺었고 Flourish를 모본으로 하고 Nobuko를 화분친으로 한 것은 종자가 형성되었다(그림 1~5).

양란 심비디움 품종을 모본으로 하여 우리나라 자생한란(*C. kanran*)과 죽백란(*C. lancifolium*) 그리고 중국원산의 건란(*C. ensifolium*)을 수분시킨 것들은 수정이 이루어지지 않았고 Persy Color와 일본한란인 북살지예(北薩之響), Kenny Wine Color와 건란, Lapine Pony와 한란, 중국춘란(*C. forrestii*), Lapine Palace와 적아소심(赤芽素心, *C. rubrigemmum*) 살마금(薩摩錦), MK-1 샤아와 한란, 백화보세를 수분시킨 것들도 수정이 이루어지지 않았다. 일반적으로 양란 심비디움 중에서 Lapine Pony나 Lapine Palace, Moon Walk, Waltz Romance를 모본으로 하여 동양란류와 양란품종을 수분시켰을 경우에는 수정이 잘 이루어지지 않는 경향이었다(표 3). 이러한 결과는 생리적인 문제나 저온 저장했던 화분의 활성이 떨어진 결과로 보이며 수분작업은 *Cymbidium*의 개화시기에 맞춰 계속적으로 진행할 것이다.

대만보세의 한 품종인 금화산(金華山)을 모본으로 하여 양란 심비디움 품종인 Persy Color, Flourish, Lapine Palace, Pianist 등을 화분친으로 하여 수정을 실시한 결과 ×Persy Color (그림 6)와 ×Flourish(그림 7), ×Pianist(그림 8)가 꼬투리 형성이 이루어졌으며 백화보세(白花報歲)를 모본으로 하여 Lapine Palace, Kenny Wine Color, Persy Color를 화분친으로 하여 수정시킨 결과, ×Lapine Palace(그림 9)와 ×Persy Color(그림 10)가 꼬투리를 형성하였다. 한편 보세(報歲)와 동양란인 관음소심(觀音素心)(그림 11), 그리고 양란인 Lapine Palace(그림 12)를 교잡한 것도 종자 꼬투리가 형성되어 생육 중에 있다.

중국원산의 춘검란(*C. vernulfif*)를 모본으로 하여 양란 심비디움 품종인 Persy Color, Pianist, Moon Walk, Izumi, Waltz Romance, Kenzy, Kenny Wine Color 등을 교잡한 것들 중에서는 ×Moon Walk만이 꼬투리가 형성되었고(그림 13) 나머지는 모

두 수정이 이루어지지 않았다.

Pianist를 모본으로 하여 Showgirl 'Husky Honey'(그림 15), Flourish(그림 16), Kenny Wine Color(그림 17), Lapine Dancer×Moon Walk(그림 18), Showgirl 'Husky Honey'와 Izumi(그림 20)은 수정이 이루어졌으며 특히 Red Wine Color를 모본으로 하여 보세란 '천일소(天一素)'를 화분친으로 한 것도 종자가 형성되었다(그림 19).

표 3. 양란과 동양란 Cymbidium류의 수분 및 수정 현황

| F × M | | 교배일 | 종자수정 여부 |
|--------------------------------|--|-----------|------------|
| 양란 × 동양란 | | | |
| <i>Cym.</i> 'Crescent' | × 일경구화 <i>Cym. faberi</i> | 03. 3. 2 | ○ |
| | × 춘란 <i>Cym. goeringii</i> | 03. 3. 2 | ○ |
| | × 춘검란 <i>Cym. longibracteatum</i> | 03. 3. 4 | × |
| | × 중국춘란 <i>Cym. forresti</i> 'Daebugwie' | 03. 3. 2 | × |
| | × 중국춘란 <i>Cym. forresti</i> 'Soshinmae' | 03. 3. 2 | × |
| | × 보세 <i>Cym. sinense</i> for. <i>hakuran</i> | 03. 3. 4 | × |
| | × 춘란 <i>Cym. goeringii</i> | 03. 3. 2 | × |
| | × 사란 <i>Cym. formosamum</i> | 03. 3. 2 | × |
| <i>Cym.</i> 'Crescent' | × 한란 <i>Cym. kanran</i> | 04. 1. 29 | × |
| | × 죽백란 <i>Cym. lacifolium</i> | 04. 1. 29 | × |
| | × 건란 <i>Cym. ensifolium</i> | 04. 1. 29 | × |
| | × Nobuko | 04. 2. 12 | ○ |
| <i>Cym.</i> 'Kenny Wine Color' | × 건란 <i>Cym. ensifolium</i> | 04. 1. 29 | × |
| <i>Cym.</i> 'Lapine Pony' | × 한란(청한란) <i>Cym. kanran</i> | 04. 2. 3 | × |
| | × 중국춘란 <i>Cym. forresti</i> | 04. 2. 3 | × |
| | × 봉황 | 04. 2. 3 | × |
| <i>Cym.</i> 'Lapine Palace' | × 살마금 <i>Cym. rubrigemmum</i> 'Salmagum' | 04. 1. 30 | × |
| <i>Cym.</i> 'Lapine Dancer' | × Haruka | 04. 2. 12 | × |
| <i>Cym.</i> 'MK-1 샤아' | × 한란(청한란) <i>Cym. kanran</i> | 04. 2. 3 | × |
| | × 백화보세 <i>Cym. sinense</i> | 04. 2. 3 | × |
| <i>Cym.</i> 'Mille Feuille' | × 중국춘란 비보 <i>Cym. forrestii</i> | 04. 2. 3 | × |

| | | | | |
|------------------------------------|---|---|-----------|-----|
| <i>Cym.</i> 'Moon Walk' | × | Sinseiki | 04. 2. 12 | × |
| <i>Cym.</i> 'Persy Color' | × | 북살지예 <i>Cym. kanran</i> 'Buksaljie' | 04. 1. 30 | × |
| <i>Cym.</i> 'Pianist' | × | 보세 <i>Cym. sinense</i> | 03. 3. 4 | ○ |
| | × | 중국춘란 <i>Cym. forrestii</i> 'A' | 03. 3. 11 | × |
| | × | 중국춘란 <i>Cym. forrestii</i> 'B' | 03. 3. 11 | × |
| | × | 중국춘란 <i>Cym. forrestii</i> 'C' | 03. 3. 11 | × |
| | × | 춘검란 <i>Cym. longibracteatum</i> | 03. 3. 4 | × |
| <i>Cym.</i> 'Showgirl Husky Honey' | × | Izumi | 04. 2. 12 | ○ |
| | × | 적아소심 <i>Cym. rukrigennum</i> 'Jeokailjin' | 03. 8. 10 | 진행중 |
| <i>Cym.</i> 'Sundust' | × | 살마금 <i>Cym. rubrigemmum</i> 'Salmagum' | 03. 8. 10 | .. |
| | × | 북살지예 <i>Cym. kanran</i> 'Buksaljie' | 03. 8. 10 | .. |
| | × | 보세 <i>Cym. sinense</i> | 03. 8. 10 | .. |
| <i>Cym.</i> 'Red Wine Color' | × | 천일소 <i>Cym. sinense</i> | 04. 2. 1 | ○ |
| <i>Cym.</i> 'UFO 황단엽' | × | 춘검란 <i>Cym. longibracteatum</i> | 04. 2. 17 | × |
| <i>Cym.</i> 'Waltz Romance' | × | 백화보세 <i>Cym. sinense</i> | 04. 2. 3 | × |

동양란 × 양란

| | | | | |
|--|---|--------------------------------|-----------|-----|
| 보세 <i>Cym. sinense</i> for. 'hakuran' | × | <i>Cym.</i> 'Cresent' | 03. 3. 4 | ○ |
| 적아소심 <i>Cym. rubrigemmum</i> 'Jokailjin' | × | <i>Cym.</i> 'Sundust' | 03. 8. 10 | 진행중 |
| 적아소심 <i>Cym. rubrigemmum</i> 'Salmagum' | × | <i>Cym.</i> 'Sundust' | 03. 8. 10 | .. |
| <i>Cym.</i> 'Daekuk' | × | <i>Cym.</i> 'Cresent' | 03. 3. 18 | × |
| 금화산 <i>Cym. sinense</i> | × | <i>Cym.</i> 'Persy Color' | 04. 1. 30 | ○ |
| | × | <i>Cym.</i> 'Flourish' | 04. 1. 30 | ○ |
| | × | <i>Cym.</i> 'Lapine Palace' | 04. 1. 30 | × |
| | × | <i>Cym.</i> 'Pianist' | 04. 2. 3 | ○ |
| 백화보세 <i>Cym. sinense</i> | × | <i>Cym.</i> 'Lapine Palace' | 04. 1. 30 | ○ |
| | × | <i>Cym.</i> 'Kenny Wine Color' | 04. 1. 30 | × |
| | × | <i>Cym.</i> 'Persy Color' | 04. 1. 30 | ○ |
| 보세 <i>Cym. sinense</i> | × | <i>Cym.</i> 'Lapine Palace' | 04. 1. 30 | ○ |
| 춘검란 <i>Cym. longibracteatum</i> | × | <i>Cym.</i> 'Persy Color' | 04. 3. 11 | × |

| | | | |
|------------------------|----------------------------------|-----------|---|
| | × <i>Cym.</i> 'Pianist' | 04. 3. 11 | × |
| | × <i>Cym.</i> 'Moon Walk' | 04. 2. 17 | ○ |
| | × <i>Cym.</i> 'Waltz Romance' | 04. 3. 11 | × |
| | × <i>Cym.</i> 'Kenzy' | 04. 3. 11 | × |
| | × <i>Cym.</i> 'Kenny Wine Color' | 04. 3. 11 | × |
| <i>Cym.</i> 'Sinseiki' | × <i>Cym.</i> 'Lapine Hat' | 04. 2. 12 | ○ |
| 도화 <i>Cym.</i> | × <i>Cym.</i> 'Lapine Palace' | 04. 2. 3 | × |
| | × <i>Cym.</i> 'Lapine Pony' | 04. 2. 3 | × |

동양란 × 동양란

| | | | |
|------------------------------------|---------------------------------|-----------|---|
| <i>Cym.</i> 'Daekuk' | × <i>Cym. gyokuchin</i> | 03. 4. 1 | ○ |
| 건란 <i>Cym. ensifolium</i> | × 건란 <i>Cym. ensifolium</i> SW. | 03. 1. 16 | × |
| 보세 <i>Cym. sinense</i> 'Baekmukso' | × 건란 <i>Cym. ensifolium</i> SW. | 03. 1. 16 | ○ |
| 춘란 <i>Cym. goeringii</i> | × 한란 <i>Cym. kanran</i> | 03. 8. 10 | ○ |
| 춘검란 <i>Cym. longibracteatum</i> | × <i>Cym.</i> 'Izumi' | 04. 3. 11 | × |
| 봉황 | × 관음소심 | 04. 2. 3 | × |

양란 × 양란

| | | | |
|-----------------------------|---------------------------------------|-----------|---|
| <i>Cym.</i> 'Kenzy' | × <i>Cym.</i> 'Showgirl 'Husky Honey' | 04. 2. 3 | ○ |
| | × <i>Cym.</i> 'Lapine Dancer' | 04. 2. 3 | × |
| <i>Cym.</i> 'Lapine Dancer' | × <i>Cym.</i> 'Moon Walk' | 04. 2. 12 | ○ |
| <i>Cym.</i> 'Lapine Hat' | × <i>Cym.</i> 'Kenny Wine Color' | 04. 2. 12 | × |
| <i>Cym.</i> 'Lapine Palace' | × <i>Cym.</i> 'Flourish' | 04. 2. 3 | × |
| <i>Cym.</i> 'Mille Feuille' | × <i>Cym.</i> 'Kenny Wine Color' | 04. 2. 12 | × |
| <i>Cym.</i> 'Moon Walk' | × <i>Cym.</i> 'Pianist' | 04. 2. 12 | × |
| | × <i>Cym.</i> 'Crescent' | 04. 2. 12 | × |
| | × <i>Cym.</i> 'Waltz Romance' | 04. 2. 12 | × |
| <i>Cym.</i> 'Orpheus' | × <i>Cym.</i> 'Kenny Wine Color' | 04. 2. 12 | × |
| <i>Cym.</i> 'Pianist' | × <i>Cym.</i> 'Showgirl 'Husky Honey' | 04. 2. 5 | ○ |
| | × <i>Cym.</i> 'Lapine Dancer' | 04. 2. 3 | × |
| | × <i>Cym.</i> 'Flourish' | 04. 2. 5 | ○ |

| | | | | |
|-------------------------------------|---|--------------------------------|-----------|---|
| | × | <i>Cym.</i> 'Kenny Wine Color' | 04. 2. 12 | ○ |
| <i>Cym.</i> 'Persy Color' | × | <i>Cym.</i> 'Lapine Dance'r | 04. 2. 3 | × |
| <i>Cym.</i> 'Showgirl 'Husky Honey' | × | <i>Cym.</i> 'Kenny Wine Color' | 04. 2. 3 | × |
| <i>Cym.</i> 'Waltz Romance' | × | <i>Cym.</i> 'Kenzy' | 04. 2. 3 | × |
| | × | <i>Cym.</i> 'Lapine Pony' | 04. 2. 3 | × |



4월



6월



7월



8월

그림 1. *Cymbidium* 'Crescent' × *Cym. faberi*



4월



6월

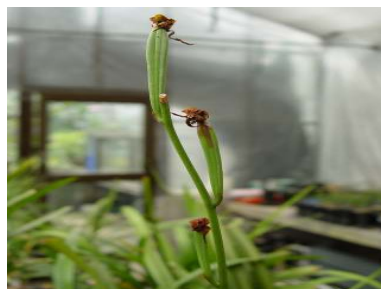


7월



8월

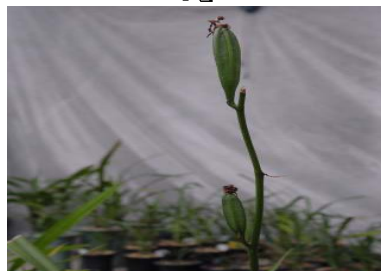
그림 2. *Cymbidium* 'Daekook' × *Cymbidium gyokuchin*



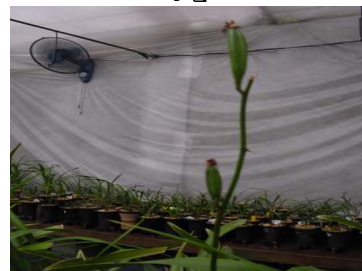
4월



6월



7월



8월

그림 3. *Cymbidium sinense* 'Baekmukso' × *Cymbidium ensifolium*



4월



6월



7월



8월

그림 4. *Cymbidium longibracteatum* × *Cymbidium* 'Crescent'



4월



5월

그림 5. *Cym. goeringii* × *Cym. kanran*



그림 6. 금화산×Persy Color



그림 7. 금화산×Flourish



그림 8. 금화산×Pianist



그림 9. 백화보세×Lapine Palace



그림 10. 백화보세×Persy Color



그림 11. 보세×관음소심



그림 12. 보세×Lapine Palace



그림 13. 춘검란×Moon Walk



그림 14. Flourish×Nobuko



그림 15. Pianist×Showgirl 'Husky Honey'



그림 16. Pianist×Flourish



그림 17. Pianist×Kenny Wine Color



그림 18. Lapine Dancer×Moon Walk



그림 19. Red Wine Color×천일소(天一素)



그림 20. Showgirl 'Husky Honey'×Izumi

3. 우수 잡종 식물체의 선발 및 육성

가. 자생 *Cymbidium*속 교잡종

1) 춘란×한란 교잡종

제주도에 자생하는 유향종(有香種)의 춘란(*Cym. goeringii*)을 모본으로 하고 제주한란(*Cym. kanran*)을 화분친(花粉親)으로 한 중간교잡종으로서 개화기는 12월초부터 1월중순 사이인데 춘란과 한란 개화기의 중간이다. 자생 *Cymbidium*속 식물은 타 식물에 비해 생육 속도가 매우 느린 특성을 가지므로 선행 연구를 통해 중간잡종을 교잡하여 얻은 종자를 무균적으로 파종한 다음, 근경(根莖)을 획득하고 이들로부터 식물체를 생산하여 개화된 것들 중에서 관상가치가 높고 상업화가 가능한 개체를 선발하였다.

잎은 춘란보다 넓고 길며 한란보다는 다소 짧은데 거치는 있긴 있으나 약하여 춘란보다는 다소 밋밋하였다. 잎의 형태는 한란을 많이 닮았는데 진한녹색으로 매우 강건하며 외부환경에 대한 적응성이 높았다. A형(Fig. 26)은 엽성이 반수형이고 원형으로 둥근 편인데 비해 B형(Fig. 28)은 곧추서는 편이며 길이가 길고 넓다. ‘미악(米岳)’과 ‘송악(松岳)’은 잎이 강건하고 윤기가 있으며 직립성에 가까우면서도 잎의 기부로부터 2/3이상의 지점에서 부드러운 곡성을 이루면서 굽어 처지는 형태이며 잎 끝이 타지 않고 저온이나 고온에 대한 적응력이 매우 강한 것으로 관찰되었다. 꽃은 황록색 바탕에 적자색의 선이 7줄이 또렷하게 들어가 있고 형태는 정삼각(正三角)형으로 핀다. 꽃대는 곧추서고 길이가 30cm 정도로서 잎보다 위쪽에 위치하며 1대의 꽃대에서 2~3송이가 달리는데 향기는 매우 강하게 난다. 꽃의 색깔이 A형(그림 21, 22)은 황록색의 바탕색으로서 다소 연한 반면 B형(그림 23, 24)은 적색이 진한 것이 차이점이다. 설변(lip)은 유백색이며 자적색의 반점이 4~5개 있으며 뒤로 말린다(표 4). 이들은 일본산의 춘한란으로 알려진 일조지예(一條之譽)보다 성질이 강하고 엽성도 좋아서 상품성이 있을 것으로 기대된다.

이들의 개화특성을 2년차에 이어 3년차까지 조사 하였던 바 꽃의 크기와 모양,

색상 등에 있어서 차이가 없었고 단지 개화시기가 2차년도(2004년)에는 12월 6일이었던 것에 반해 3차년도(2005년)에는 1월 5일로서 약간의 차이가 있었다. 2년차 결과에 대한 평가 시 실용성에 중점을 두고 상품성 있는 교잡종을 선발토록 보완을 요구받은 바 있었는데 현재까지 개화된 것들 중에서 환경적응성이 가장 우수하고 엽성(葉性)이 좋을 뿐만 아니라 개화가 잘 되며 관상가치와 상업적 가치가 높은 두 종류를 최종 선발하였다. 이 중 A형은 품종명을 ‘미악(米岳)’(그림 25)으로 명명하여 특허 출원(출원번호 10-2005-0045413, 출원일 05년 5월30일)을 하였고 B형은 품종명을 가칭 ‘송악(松岳)’(그림 26)으로 명명하였다.

표 4. 춘란×한란 교잡종의 특성

| | 잎 | | | | | 상악편 | | | | 측악편 | | | |
|---------------|----|-----|----|-----|----|-----|-----|----|----|-----|------|----|----|
| | 길이 | 폭 | 엽수 | 엽색 | 거치 | 길이 | 폭 | 선수 | 선색 | 길이 | 폭 | 선수 | 선색 |
| 춘란×한란 (A형) | 38 | 1.5 | 4 | 진녹색 | 있음 | 3.0 | 0.9 | 7 | 적색 | 3.0 | 0.85 | 7 | 적색 |
| 춘란×한란 (B형) | 53 | 1.9 | 5 | 진녹색 | 중간 | 3.0 | 0.8 | 5 | 적색 | 3.0 | 0.8 | 7 | 적색 |

| 악편간격 | | 바탕색 | 설변 | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| 상×측 | 측×측 | | 길이 | 폭 | 반점수 | 반점색 | 바탕색 | 형태 |
| 5.9 | 5.4 | 황록색 | 1.5 | 0.8 | 5 | 자적색 | 유백색 | 말림 |
| 5.6 | 5.8 | 황록색 | 1.4 | 0.8 | 4 | 자적색 | 유백색 | 말림 |

| 봉심 | | | | | 화경 | | 착화수 | 개화기 | 향기 |
|-----|-----|---|-----|-----|----|-----|-----|------|----|
| 길이 | 폭 | 선 | 선색 | 바탕색 | 길이 | 색 | | | |
| 2.2 | 0.9 | 7 | 진적색 | 황록색 | 30 | 자적색 | 2 | 12월초 | 강함 |
| 2.2 | 0.9 | 7 | 진적색 | 황록색 | 31 | 자적색 | 1 | 1월중순 | 강함 |



그림 21. 춘란×한란(A)



그림 22. 춘란×한란(A) 교잡종의 꽃



그림 23. 춘란×한란(B)



그림 24. 춘란×한란(B) 교잡종의 꽃



그림 25. 자생 춘란과 제주 한란을 교배하여 얻은 중간 잡종 식물체



그림 26. 춘란과 한란의 중간잡종인 '송악'의 꽃과 식물체의 모습

꽃의 모양이나 배열은 ‘미약’이 좋았고 착화수는 2-3송이가 달렸으나 ‘송약’은 착화수가 1-2송이로 적었을 뿐만 아니라 ‘미약’에 비해 꽃대 길이가 짧고 약한 것이 단점이었으며 꽃의 바탕색깔이 자적색(紫赤色)이었고 7줄의 진한 자주색 선이 봉심과 악편에 있다(표 5).

개화 시기는 1월 초순이었는데 한란이 10월-11월에 개화하고 춘란이 3월에 개화하는 것을 고려한다면 중간이었으며 하나의 화경(花莖)에 달리는 꽃송이의 수가 보통 2-3송이였다. 이는 한란의 일경다화성(一莖多花性)인 성질과 춘란의 일경일화성(一莖一花性)의 중간 형태로 나타난 것을 알 수 있었다. 꽃의 향기는 매우 강하게 풍기는데 이는 한란의 향기보다 오히려 더욱 강하였다.

표 5. 한국춘란과 제주한란 중간 교잡종의 잎과 개화특성

| 종류 | 잎 | | | | | 상 악 편 | | | |
|----|------------|------------|-------------|-------|------|------------|------------|-------------|-------|
| | 길이 (cm) | 너비 (cm) | 착엽수 (ea) | 엽색 | 거치 | 길이 (cm) | 너비 (cm) | 선의수 (ea) | 선의색 |
| 미약 | 43.0 | 1.6 | 6 | DG132 | 있음 | 3.2 | 0.9 | 7 | R67 |
| 송약 | 52.0 | 1.9 | 5 | G136 | 약간있음 | 3.1 | 0.9 | 7 | RP58A |

| 측 악 편 | | 악편간격 | | 악편 바탕색 | 봉 심 | | | | | |
|------------|------------|-------------|-------|-------------|-------------|--------|------------|------------|-------------|-------|
| 길이 (cm) | 너비 (cm) | 선의수 (ea) | 선의색 | 상:측 (cm) | 측:측 (cm) | Y | 길이 (cm) | 너비 (cm) | 선의수 (ea) | 선의색 |
| 3.0 | 0.8 | 7 | RP67B | 5.7 | 5.7 | YG150C | 2.4 | 1.0 | 7 | RP67B |
| 3.1 | 0.8 | 7 | RP58A | 5.6 | 5.7 | YG151D | 2.3 | 1.1 | 7 | RP58A |

| 설 변 | | | | 화 경 | | 착화수 | 개화기 | 향기 |
|------------|------------|-------------|-------|------------|-------|-----|-----|------|
| 길이 (cm) | 너비 (cm) | 반점수 (ea) | 바탕색 | 길이 (cm) | 색 | | | |
| 3.0 | 0.8 | 7 | RP67B | 27.0 | RP67B | 2 | 1월초 | 매우강함 |
| 3.1 | 0.8 | 7 | RP58A | 25.0 | RP58A | 2 | 1월초 | 강함 |

우리나라의 자생 춘란은 전 세계에 분포되어 있는 Cymbidium류 중에서 가장 고위도 지역에 자생하고 있기 때문에 생태적으로 저온이나 고온에 대한 적응성이 강한데 특히 저온에 견디는 능력이 탁월한 것으로 정평이 나 있어서 내한성 품종 개량의 유전자원으로서 가치가 매우 높다.

한편 제주 한란의 경우에도 대만이나 중국 한란에 비해 염성이 좋고 윤기가 있으며 잎의 길이가 짧은 것이 특징이며 비교적 추위에 잘 견디는 것으로 알려져 있는데 이들 춘란과 제주한란과의 중간 잡종인 ‘미약’이나 ‘송악’은 겨울철에 1℃정도 되는 저온조건에서도 전혀 피해가 나타나지 않고 월동이 잘 되었다. 따라서 상기한 춘한란 품종, 즉 ‘미약’이나 ‘송악’은 우리나라에서 에너지 절약형 식물로서 100% 국외에서 수입되고 있는 분화용 엽물(葉物)과 화물(花物)로 이용되고 있는 보세란이나 소심난류를 부분적으로 대체할 수 있을 것으로 판단된다.

우수 잡종 식물체로 선발된 ‘미약’과 ‘송악’이외에도 그림 3에서 나타난 바와 같이 중간 교잡종이 개화되었으나 우수개체를 선발할 가치는 없다고 판단되었다.



그림 27. 춘란과 한란 교잡종들의 개화된 모습

2) 한란×춘란 교잡종

우리나라 자생종인 제주한란을 모본으로 하고 춘란을 화분친으로 하여 교잡된 종자를 파종하여 얻은 중간잡종 식물체로서 개화기는 한란의 개화기인 10월보다 약간 늦은 11월~12월이었다. 잎의 형태는 춘란의 특성을 많이 닮아서 등근 곡선을 이루면서 쳐지는 특성이 있었다. 꽃은 황록색으로서 한란과 춘란의 중간형태이며 향기는 있으나 다소 약한편이다. 특히 A형(그림 28, 29)은 춘란의 개화특성인 1경1화(一莖一花)성으로서 꽃대 1개에 1송이가 달리며 B형(그림 30, 31)은 1경다화(一莖多花)성으로서 꽃대 1개에서 2~3송이가 피는데 한란과 춘란의 중간형태의 개화특성을 지니고 있었다. 꽃대는 매우 빈약하고 늘어지며 황록색 또는 연한녹색에 자주색이 섞여 있었는데 기타의 특성은 표 6에서 나타난 바와 같다.

표 6. 한란×춘란 교잡종의 특성

| | 잎 | | | 상악편 | | | | 측악편 | | | | | |
|------------|----|------|----|-----|-------|------|------|-----|-----|-----|------|----|-----|
| | 길이 | 폭 | 엽수 | 엽색 | 거치 | 길이 | 폭 | 선수 | 선색 | 길이 | 폭 | 선수 | 선색 |
| 한란×춘란 (A형) | 42 | 0.79 | 5 | 진녹색 | 있음 | 4.36 | 0.80 | 1 | 자적색 | 4.2 | 0.80 | 1 | 자적색 |
| 한란×춘란 (B형) | 42 | 1.10 | 4 | 진녹색 | 약간 있음 | 3.90 | 0.65 | 7 | 자적색 | 3.8 | 0.65 | 7 | 자적색 |

| 악편간격 | | 바탕색 | | 설번 | | | | | |
|------|-----|-----|--|------|------|-----|-------|-----|----|
| 상×측 | 측×측 | | | 길이 | 폭 | 반점수 | 반점색 | 바탕색 | 형태 |
| 7.5 | 6.4 | 황록색 | | 1.90 | 0.86 | 5 | 적자+분홍 | 유백색 | 말립 |
| 6.6 | 6.7 | 황록색 | | 1.35 | 0.95 | 20 | 적자+분홍 | 유백색 | 말립 |

| 봉심 | | | 화경 | | 착화수 | 개화기 | 향기 | | |
|------|------|---|-----|-----|------|-------|----|------|----|
| 길이 | 폭 | 선 | 선색 | 바탕색 | 길이 | 색 | | | |
| 2.95 | 0.97 | 1 | 적자색 | 황록색 | 23.5 | 황록+적자 | 2 | 11월초 | 약함 |
| 2.70 | 0.80 | 5 | 적자색 | 황록색 | 22.0 | 연록+자색 | 2 | 12월초 | 약함 |



그림 28. 한란×춘란(A형)



그림 29. 한란×춘란(A형) 교잡종의 꽃



그림 30. 한란×춘란(B형)



그림 31. 한란×춘란(B형) 교잡종의 꽃

제주한란을 모본으로 하고 제주자생 춘란을 화분친으로 하여 육성한 것은 2차년도에 보고한 바 있다. 2차년도에 개화한 것 이외에 3차년도에 새로이 개화된 중간 잡종의 경우에도 전년도의 것과 크게 다른 점이 없었다(그림 32, 33).

개화는 한란의 개화시기인 10월~11월에 가까운 12월 중순이었고, 엽성은 연약하고 엽폭은 1cm미만으로 좁았다. 잎의 길이는 32cm정도 되는데 등글게 말리는 권엽(卷葉) 형태였고 거치는 약하게 있었다.

꽃은 한란형태를 많이 닮았고 착화수는 1~2송이, 화경장은 24cm로서 춘란의 유형을 많이 닮았는데 향기는 미약하였지만 한란의 향기가 났다. 꽃대를 비롯하여 식물체는 매우 연약하고 잎이 늘어지는 형태로서 품종으로 선발하기에는 다소 부족한 점이 있었다.



그림 32. 한란×춘란 중간 잡종들의 꽃과 잎의 모습



그림 33. 한란×춘란 중간 잡종들의 꽃과 잎의 모습

교배종의 근경 증식에 알맞은 배지와 식물체의 재분화에 적합한 배지를 구명할 목적으로 한란과 춘란 교배종의 근경 증식에 가장 적합한 배지를 찾고자 실험을 실시하였다. 연구 결과 MS배지의 경우, salt농도는 기본배지가 좋았고 생체중과 shoot의 재분화는 salt의 농도가 2배인 것에서 양호하였지만 shoot의 길이가 짧았고 분화소요일수가 훨씬 많이 소요되어서 종합적으로 고찰해볼 때 기본배지가 좋은 것으로 판단되었다. Hyponex의 첨가량에 따른 성장반응은 4g/l 첨가구에서 shoot의 분화수가 많았고 길이도 길었다. Shoot의 재분화에 소요되는 기간은 첨가농도가 많아질수록 오래 소요되었다(표 7).

MS배지와 hyponex배지를 비교해 볼 때는 MS배지가 hyponex배지보다 좋은 것으로 나타났으며 MS배지에 활성탄을 농도별로 첨가한 결과는 근경의 분지수와 생체중은 첨가농도가 높을수록 감소되는 경향이였다. 한편 shoot의 분화수는 3.0g/l 첨가구에서 가장 많았는데 1개의 근경 당 6개의 shoot가 분화되었으며 길이도 길었을 뿐만아니라 분화소요일수도 가장 짧았다. 일반적으로 활성탄을 첨가함으로써 shoot 분화소요일수가 단축되는 것을 알 수 있었다(표 8).

BA와 kinetin 그리고 2ip의 첨가가 근경생육과 shoot 분화에 미치는 영향을 보면 표 9에서 나타난 바와 같다. 근경의 생체중은 1.0mg/g 첨가구가 좋았으나 shoot의 분화수는 5.0mg/l 첨가시에 많았는데 1.0mg/l의 2개에 비해 5.0mg/l첨가한 것은 12개이었으며 분화 소요일수도 현저하게 단축되었다. Kinetin의 경우에는 1.0mg/l첨가구가 좋았고 2ip는 첨가 농도가 높은 것보다는 낮은 것이 좋았는데 대조구 보다는 근경생육과 shoot분화가 저조함을 알수 있었다. Cytokinin류의 첨가효과를 비교해 볼 때 kinetin의 첨가 효과가 양호하였는데 특히 근경의 생육은 0.1mg/l, shoot의 분화는 1.0mg/l 첨가시에 가장 좋았다. 한편 NAA와 IBA 그리고 IAA 등 auxin류의 농도별 첨가효과를 비교해 볼 때는 표 10에서 나타난 바와 같다. NAA를 첨가했을 경우에는 근경의 생육이 촉진되었는데 특히 1.0mg/l을 첨가했을 때 분지수가 21개로 가장 많았고 생체중도 무거웠으나 shoot의 분화가 거의 이루어지지 않았다.

IBA의 경우에는 0.1mg/l을 첨가하는 것이 근경생장에 좋았고 분지수도 많았을 뿐만 아니라 분화소요 일수도 단축되었다. IAA 경우에는 0.1mg/l 첨가 시에 근경생육이 상대적으로 좋았고 shoot의 분화수는 첨가량에 따른 일관성 있는 경향은 나타나지 않았다. 그런데 auxin 류를 단독 하였을 경우에 근경의 성장촉진에는 NAA 1.0mg/l 첨가하는 것이 효과적이었고 shoot의 분화를 촉진하기 위해서는 IAA의 첨가가 효과적이였다(표 11).

표 7. MS 배지의 농도가 한란과 춘란 교잡종 근경의 생육과 식물체 재분화에 미치는 영향

| 농도 (mg/l) | 근경 | | | 신 | | 소요일수 ^{z)} |
|--------------|-------------|------------|------------|--------------|------------|--------------------|
| | 분지수 (ea) | 생체중 (g) | 길이 (cm) | 재분화수 (ea) | 길이 (cm) | |
| 1/2 | 13 | 5.0 | 5.0 | 3 | 5.1 | 167 |
| 1 | 42 | 10.6 | 6.3 | 5 | 6.6 | 174 |
| 2 | 41 | 17.7 | 4.6 | 6 | 3.5 | 288 |

z) 치상으로부터 재분화까지의 소요일 수

표 8. 하이포넥스 첨가 농도가 한란과 춘란 교잡종 근경의 생육과 식물체 재분화에 미치는 영향

| Conc. (mg/l) | Rhizome | | | Shoot | | Days ^{z)} |
|-----------------|-------------------|---------------------|----------------|---------------------|----------------|--------------------|
| | No.of tip (ea) | Fresh weight (g) | Length (cm) | No.of shoot (ea) | Length (cm) | |
| 2 | 9 | 1.8 | 3.9 | — | — | — |
| 3 | 7 | 1.5 | 4.4 | 2 | 3.3 | 201 |
| 4 | 3 | 0.9 | 6.5 | 4 | 9.5 | 296 |
| 5 | 10 | 2.9 | 5.0 | 1 | 0.6 | 370 |

z) 치상으로부터 재분화까지의 소요일 수.

표 9. MS배지에 활성탄 첨가량이 한란과 춘란 교잡종 근경의 생육과 식물체 재분화에 미치는 영향

| Conc. (mg/l) | Rhizome | | | Shoot | | |
|-----------------|-------------------|------------------------|----------------|------------------------|----------------|--------------------|
| | No.of tip (ea) | Fresh weight (g) | Length (cm) | No.of shoot (ea) | Length (cm) | Days ^{z)} |
| 0 | 11 | 3.9 | 4.4 | 2 | 0.6 | 360 |
| 0.1 | 12 | 4.3 | 7.5 | 3 | 1.3 | 358 |
| 1.0 | 9 | 3.5 | 6.4 | 5 | 2.5 | 297 |
| 3.0 | 7 | 2.0 | 5.4 | 6 | 9.0 | 262 |
| 5.0 | 9 | 3.6 | 7.4 | 2 | 2.4 | 295 |

z) 치상으로부터 재분화까지의 소요일 수.

표 10. MS배지에 cytokinin의 종류와 첨가 농도가 한란×춘란 근경의 생육과 재분화에 미치는 영향.

| | Conc. (mg/l) | Rhizome | | | Shoot | | |
|-------|-----------------|-------------------|------------------------|----------------|------------------------|----------------|--------------------|
| | | No.of tip (ea) | Fresh weight (g) | Length (cm) | No.of shoot (ea) | Length (cm) | Days ^{z)} |
| Cont. | 3 | 11 | 3.9 | 4.4 | 2 | 0.6 | 360 |
| | 0.1 | 3 | 0.7 | 4.9 | — | — | — |
| BA | 1.0 | 12 | 1.7 | 2.5 | 2 | 0.2 | 321 |
| | 5.0 | 4 | 0.3 | 1.5 | 12 | 2.3 | 140 |
| Kin. | 0.1 | 33 | 7.5 | 3.9 | 3 | 4.8 | 226 |
| | 1.0 | 25 | 5.6 | 3.8 | 6 | 2.0 | 239 |
| | 5.0 | 7 | 1.9 | 3.3 | 2 | 0.4 | 338 |
| 2ip | 0.1 | 6 | 1.1 | 3.8 | 5 | 1.6 | 328 |
| | 1.0 | 4 | 0.6 | 3.3 | — | — | — |
| | 5.0 | 7 | 0.9 | 3.5 | 1 | 0.4 | 299 |

z) 치상으로부터 재분화까지의 소요일 수.

표 11. MS배지에 auxin의 종류와 첨가 농도가 한란×춘란 근경의 생육과 재분화에 미치는 영향.

| | Conc. (mg/l) | Rhizome | | | Shoot | | |
|-------|-----------------|-------------------|------------------------|----------------|------------------------|----------------|--------------------|
| | | No.of tip (ea) | Fresh weight (g) | Length (cm) | No.of shoot (ea) | Length (cm) | Days ^{z)} |
| cont. | 3 | 11 | 3.9 | 4.4 | 2 | 0.6 | 340 |
| | 0.1 | 9 | 3.6 | 5.6 | 4 | 3.6 | 108 |
| NAA | 1.0 | 21 | 8.1 | 4.0 | — | — | — |
| | 5.0 | 8 | 2.3 | 3.0 | — | — | — |
| | 0.1 | 9 | 4.7 | 7.5 | 4 | 0.4 | 210 |
| IBA | 1.0 | 7 | 1.6 | 3.1 | 1 | 0.2 | 236 |
| | 5.0 | 2 | 0.4 | 4.7 | 1 | 2.1 | 249 |
| | 0.1 | 11 | 4.0 | 5.2 | 5 | 2.5 | 275 |
| IAA | 1.0 | 4 | 1.4 | 4.3 | 3 | 5.6 | 256 |
| | 5.0 | 5 | 1.9 | 5.8 | 4 | 0.8 | 282 |

z) 치상으로부터 재분화까지의 소요일 수.

나. 동양란 교잡종

1) 죽백란(*Cymbidium lancifolium*) 교잡종

상록성의 넓은 잎을 가졌으며 줄기의 마디모양을 마치 대나무를 닮았고 개화기는 5 ~ 6월에 유백색의 꽃을 피우고 긴 타원형의 단엽(短葉)성으로서 죽백란(*Cymbidium lancifolium*)은 관상가치가 뛰어나다. 이러한 죽백란을 화분친으로하여 한란, 춘란, 건란 등 3종류의 동양란 *Cymbidium*을 모본으로하여 중간잡종 개체를 육성한 결과는 다음과 같다.

(1) 한란 × 죽백란 중간잡종

엽성이 좋고 길며 10월과 11월 사이에 황록색의 꽃을 피우는 유향(有香)성의 한란(*Cymbidium kanran*)을 모본으로 하여 중간 교잡종 근경을 획득하여 증식한 결과는 그림 34과 같다.

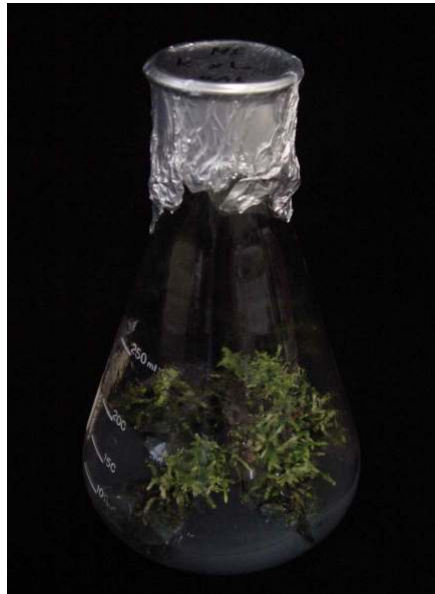


그림 34. 한란과 죽백란 교잡종의 근경이 자라고 있는 모습

개화기는 한란의 개화기인 10월과 11월 사이에 피고 일경다화성으로서 1개의 꽃대에서 4송이가 피는데 향기는 매우 약하게 있다. 꽃색은 청한란의 꽃색을 많이 닮은 황록색인데 악편에는 선이 없고 봉심에 한줄의 적색의 선이 있다. 잎에 거치는 없고 길이는 30cm 정도 되는데 너비는 1cm로서 길이에 비해 폭이 넓어서 죽백란의 엽성과 한란 엽성의 중간형태이지만 한란 쪽을 많이 닮았다. 설변에는 붉은색 반점이 많이 있고 유백색 바탕에 연한녹색이 들어있고 뒤로 말린다. 재배상의 특성은 강한 광선에 약하고 잎끝이 잘 타는 성질이 있으며 꽃대의 길이가 잎의 길이보다 짧아서 관상가치 면에서 다소 떨어지는 편이다(그림 35, 표 12)

표 12. 한란×죽백란 교잡종의 특성

| | 잎 | | | | 상악편 | | | 측악편 | | | 악편간격 | | 바탕색 | |
|--------|----|-----|----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|------|--------|-----|-----|
| | 길이 | 폭 | 엽수 | 엽색 | 거치 | 길이 | 폭 | 선수선색 | 길이 | 폭 | 선수선색 | 상×측측×측 | | |
| 한란×죽백란 | 30 | 1.7 | 3 | 진적색 | 없음 | 3.0 | 0.7 | 1 적색 | 3.0 | 0.6 | 0 | 5.1 | 5.9 | 황록색 |

| 봉심 | | | | 설변 | | | | 화경 | 착화수 | 개화기 | 향기 | | | |
|-----|-----|---|-----|------|-----|-----|-----|-----|-------|-----|----|----|---|-----------|
| 길이 | 폭 | 선 | 간격 | 바탕색 | 길이 | 폭 | 반점수 | 반점색 | 바탕색 | 형태 | 길이 | 색 | | |
| 2.8 | 0.8 | 1 | 1.1 | 연한녹색 | 1.6 | 0.8 | 28 | 적색 | 유백+연녹 | 말림 | 16 | 녹색 | 4 | 10~11월 약함 |



Fig. 30. 한란×죽백란의 꽃

(2) 춘란 × 죽백란 중간잡종

내한성이 강하고 3 ~ 4월경에 황록, 백색의 꽃을 피우는 일경일화(一莖一花)성의 한국자생 춘란(*Cymbidium goeringii*)을 모본으로 하여 중간 교잡종 근경을 획득하여 증식한 결과는 그림 36과 같다.



그림 36. 춘란과 죽백란 교잡종의 근경이 자라고 있는 모습

개화기는 죽백란의 개화기인 6월~7월 사이이고 일경다화성으로서 1개의 꽃대에서 3~5송이가 피는데 향기는 없다. 꽃색은 죽백란의 꽃색을 닮은 유백색인데 죽백란의 꽃보다 훨씬 크다. 악편과 봉심에는 적색의 선이 1줄씩 있으며 설변은 유백색인데 적자색의 반점이 10개 정도 들어있고 형태는 뒤로 말린다(그림 37, 표 13). 잎은 길이가 18cm, 폭 1.2cm로서 1축당 5매의 잎이 착생하는데 진록색으로서 거치는 없다. 전체적인 잎의 모양은 춘란을 많이 닮았으나 엽육이 얇고 형태는 약간 뒤틀리는 성질이 있고(그림 38), 엽성이 매우 강하며 환경 적응성이 강한 것을 관찰할 수 있었다.

표 13. 춘란×죽백란 교잡종의 특성

| | 앞 | | | | 상악편 | | | | 측악편 | | | | |
|--------|----|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|----|-----|
| | 길이 | 폭 | 엽수 | 엽색 | 거치 | 길이 | 폭 | 선수 | 선색 | 길이 | 폭 | 선수 | 선색 |
| 춘란×죽백란 | 18 | 1.2 | 5 | 진녹색 | 없음 | 3.0 | 0.8 | 1 | 적색 | 3.0 | 0.7 | 1 | 적자색 |

| 악편간격 | | 바탕색 | 설변 | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| 상×측 | 측×측 | | 길이 | 폭 | 반점수 | 반점색 | 바탕색 | 형태 |
| 5.0 | 4.5 | 유백색 | 1.3 | 0.7 | 10 | 적자색 | 유백색 | 말립 |

| 봉심 | | | 간격 | 바탕색 | 화경 | | 착화수 | 개화기 | 향기 |
|-----|-----|---|-----|-----|----|-----|-----|------|----|
| 길이 | 폭 | 선 | | | 길이 | 색 | | | |
| 2.3 | 0.8 | 1 | 0.9 | 유백색 | 8 | 연녹색 | 5 | 6~7월 | 없음 |



그림 37. 춘란과 죽백란 교잡종의 개화된 모습



그림 38. 춘란과 죽백란 교잡종의 모습

생육이 더디고, 번식이 어려운 교배종의 대량번식을 위한 적정배지 구명 하고자 실험을 실시한 결과는 표 14과 같다. BA와 2ip와 같은 cytokinin류를 농도별로 단용하였을 경우, 근경의 길이생장은 무처리구에 비해 억제되었으나 분지수는 첨가농도가 증가할수록 점차 증가하였다. BA를 첨가했을 때 근경의 분지수는 5.0mg/L에서 7.0개로서 첨가하지 않은 대조구의 3.0개에 비해 2배 이상 증가되었으나 길이생장은 대조구의 1.9cm에 비해 월등하게 짧아서 0.2cm에 불과하였다. 또한 생체중도 대조구에서는 2.15g인데 비해 1.91g으로 감소함으로써 BA 첨가로 인하여 근경의 길이생장과 생체중이 감소하였다. 2ip를 농도별로 첨가했을 경우에도 길이생장이나 생체중의 감소현상은 BA를 첨가한 경우와 유사한 경행이었으나 근경의 분지수는 첨가농도가 증가할수록 그 수도 증가하여 10.0mg/L에서 11개로서 대조구의 3개보다 월등하게 많았다.

한편 auxin류인 NAA를 농도별로 첨가하였을 경우에 근경의 분지수는 0.1mg/L과 10.0mg/L를 첨가한 것이 대조구의 3개에 비해 각각 12개, 13개로 증가하였고 생체중도 증가하였으나 길이의 생장은 오히려 감소되었다. IBA는 0.1mg/L을 첨가했을 때 근경의 분지수가 16개로 가장 많았고 생체중도 대조구의 2.15g/개에 비해 2.39g/개로 다소 증가되었으나 길이생장은 대조구의 1.9cm에 비해 0.9cm로 부진하였다.

그러나 IBA 처리농도 중에서는 0.1mg/L이 가장 좋은 것으로 나타났다(표 15).
 BA와 NAA를 농도별로 단용 및 혼용처리한 실험결과를 보면 근경의 분지수는 NAA 10.0mg/L에서 가장 많았으나 여기에 BA의 첨가농도가 높아질수록 점차 감소하였으며 근경의 길이는 BA 0.1mg/L과 NAA 5.0mg/L 그리고 BA 1.0mg/L과 NAA 5.0mg/L을 혼합처리했을 때 대조구에서 1.9cm인데 비하여 2.4cm로 증가되었고 생체중도 가장 무거웠다.

표 14. MS 배지에 첨가된 BA와 Zip 농도가 춘란과 죽백란 교잡종의 근경 생육에 미치는 영향

| | Cytokinins | Rhizome | | Fresh weight (g) |
|-----|------------|----------|-------------|------------------|
| | (mg/L) | No. (ea) | Length (cm) | |
| BA | 0.0 | 3.0 | 1.9 | 2.15 |
| | 0.1 | 2.0 | 0.2 | 1.38 |
| | 1.0 | 4.0 | 0.5 | 1.42 |
| | 5.0 | 7.0 | 0.2 | 1.91 |
| | 10.0 | 5.0 | 0.1 | 1.30 |
| Zip | 0.0 | 3.0 | 1.9 | 2.15 |
| | 0.1 | 7.0 | 0.2 | 0.75 |
| | 1.0 | 8.0 | 0.4 | 0.89 |
| | 5.0 | 9.0 | 0.9 | 0.94 |
| | 10.0 | 11.0 | 0.2 | 0.79 |

표 15. MS 배지에 첨가된 NAA와 BA의 농도가 춘란×죽백란 근경의 생육에 미치는 영향

| | Auxins | Rhizome | | Fresh weight (g) |
|-----|--------|----------|-------------|------------------|
| | (mg/L) | No. (ea) | Length (cm) | |
| NAA | 0.0 | 3.0 | 1.9 | 2.15 |
| | 0.1 | 12.0 | 0.7 | 2.06 |
| | 1.0 | 4.0 | 0.6 | 2.37 |
| | 5.0 | 5.0 | 1.0 | 2.95 |
| | 10.0 | 13.0 | 0.3 | 2.66 |
| IBA | 0.0 | 3.0 | 1.9 | 2.15 |
| | 0.1 | 16.0 | 0.9 | 2.39 |
| | 1.0 | 14.0 | 0.7 | 2.35 |
| | 5.0 | 12.0 | 0.6 | 2.32 |
| | 10.0 | 9.0 | 0.7 | 2.22 |

그러므로 근경을 효과적으로 증식시키기 위해서는 BA 0.1 또는 1.0mg/L에 NAA를 5.0mg/L 혼용첨가하는 것이 효과적인 것으로 판단되며 빨리 shoot를 분화시키기 위해서는 NAA보다는 BA의 농도가 높은 수준에서 혼용하는 것이 효과적이라고 판단되었다. 이러한 결과는 표 16에서도 나타난 바와 같이 BA 5.0mg/L과 NAA 0.1mg/L을 혼용했을 경우에 가장 먼저 shoot가 발생되었음을 나타내주고 있으며 한란이나 춘란 등 동양란의 근경배양에 관한 선행 연구결과를 고찰해 볼 경우에도 유사한 경향임을 알 수 있었다.

동양란류의 근경배양 시에는 단순히 근경의 분지수가 많았다거나 생체중이 무거웠다는 결과로서만 성장조절물질의 효과를 판정하는 것보다는 근경의 생육이 잘 되면서도 shoot의 발생이 빨리 이루어지고 건전한 개체가 생산되어야만 기외(器外)로 꺼내어 재배하기가 쉽고 잘 자란다는 사실을 경험적으로 알 수 있었다. 따라서 성장조절물질은 가능한 한 적은양을 첨가하여 튼튼하고 건강한 유묘가 생산되는 최저한계농도를 찾아내야 하는 것이 중요하다.

표 16. BA의 농도가 춘란×죽백란 근경의 생육에 미치는 영향

| Treatment | | Rhizome | | Fresh Weight (g) | Remark |
|-----------|------------|----------|-------------|------------------|--------------------|
| BA (mg/L) | NAA (mg/L) | No. (ea) | Length (cm) | | |
| 0.0 | 0.0 | 3.0 | 1.9 | 2.15 | |
| | 0.1 | 12.0 | 0.7 | 2.06 | |
| | 1.0 | 4.0 | 0.6 | 2.37 | |
| | 5.0 | 5.0 | 1.0 | 2.95 | |
| | 10.0 | 13.0 | 0.3 | 2.66 | |
| 0.1 | 0.0 | 2.0 | 0.2 | 1.38 | |
| | 0.1 | 3.0 | 1.7 | 4.14 | |
| | 1.0 | 5.7 | 1.3 | 4.26 | |
| | 5.0 | 5.0 | 2.4 | 6.90 | |
| | 10.0 | 4.0 | 1.7 | 5.73 | |
| 1.0 | 0.0 | 4.0 | 0.5 | 1.42 | |
| | 0.1 | 5.0 | 1.3 | 4.35 | |
| | 1.0 | 7.0 | 1.9 | 4.47 | |
| | 5.0 | 9.0 | 2.4 | 6.15 | |
| | 10.0 | 10.0 | 1.3 | 5.95 | |
| 5.0 | 0.0 | 7.0 | 0.2 | 1.91 | |
| | 0.1 | 6.0 | 1.2 | 4.41 | shoot regeneration |
| | 1.0 | 9.0 | 1.2 | 4.53 | |
| | 5.0 | 8.0 | 1.3 | 6.21 | |
| | 10.0 | 7.0 | 1.1 | 6.12 | |
| 10.0 | 0.0 | 5.0 | 0.1 | 2.30 | |
| | 0.1 | 4.0 | 0.3 | 1.47 | |
| | 1.0 | 3.0 | 0.2 | 1.51 | |
| | 5.0 | 5.0 | 0.4 | 1.81 | |
| | 10.0 | 3.0 | 0.2 | 1.43 | |

(3) 건란 × 죽백란 중간잡종

1차년도에 생산한 잡종 종자를 2차년도에는 MS 배지에 sucrose 30g/L와 agar 7g/L를 첨가하고 pH를 5.3으로 조정하여 2003년 5월7일 종자를 무균적으로 파종한 결과 건란×죽백란(그림 39)의 종자가 2003년 10월에 발아되기 시작하여 가장 빠르게 그리고 많이 발아되었다.



그림 39. 건란과 죽백란 중간 잡종의
종자가 발아된 모습

2) 보세란(*Cymbidium sinenses*) 교잡종

(1) 춘란 × 보세 중간잡종

심비디움 속간의 중간잡종 육성에는 모본의 성질이 강하다는 결과를 얻었다. 그러므로 짧은 잎과 내한성이 강한 성질의 것으로 한국 자생춘란과 향기가 좋은 인자를 도입하고자 대만과 중국 남부에서 자생하는 잎이 넓고 내한성이 강한 일경다화성의 대명란(*Cymbidium sinense* for. *hakuran*)중에서 소심(素心) 계통을 화분친으로 한 중간교잡종의 근경을 획득하여 증식하였다(그림 40).



그림 40. 춘란과 보세란의 중간잡종
종자가 발아된 모습

한국 자생춘란 중에서 설판에 반점이 없이 순수하게 유백색인 소심(素心)과 대만산 보세란 중에서 소심품종인 백화보세(白花報歲)를 화분친으로 육성한 교잡종의 잎과 꽃의 특성은 표 17 및 그림 41과 같다.

잎의 길이는 40cm, 엽폭은 1.4cm로서 광엽성의 춘란과 비슷하고 꽃은 1~2월에 피는데 보세란의 향이 강하다. 착화수는 하나의 꽃대에 2송이가 달리는 일경이화성(一莖二花性)인데 꽃대가 약하여 구부러지거나 처지는 현상이 나타나서 꽃대를 받쳐서 지지해 주어야 하는 결정적인 단점이 있었다. 연녹황색 악편(sepal)을 자세히 관찰해보면 중간부분에 주황색의 색상이 들어있어서 재배환경에 따라서는 주황화(朱黃花) 또는 주홍화(朱紅花)가 될 가능성이 높았다.

춘란소심과 백화보세의 교잡종은 한국춘란의 엽성을 많이 닮았고 꽃의 모양도 우리나라의 춘란을 닮았으나 일경이화성(一莖二花性)인 것과 보세란의 향이 많이 나는 것은 유전적으로 보세의 성질을 전수 받은 것으로 보이나 형태적인 측면에서는 모성(母性) 유전성이 강하게 발현된 것으로 판단된다.

표 17. 한국춘란(소심)×보세란(소심) 중간 교잡종의 잎과 꽃의 특성

| 잎 | | | | | 상 악 편 | | | |
|------------|------------|-------------|--------|----|------------|------------|-------------|-----|
| 길이 (cm) | 너비 (cm) | 착엽수 (ea) | 엽색 | 거치 | 길이 (cm) | 너비 (cm) | 선의수 (ea) | 선의색 |
| 40.0 | 1.4 | 4 | G 136A | 있음 | 3.2 | 0.9 | - | - |

| 측악편 | | | | 악편간격 | | 악편 바탕색 | 봉 심 | | | |
|------------|------------|-------------|-----|-------------|-------------|-----------|------------|------------|-------------|--------|
| 길이 (cm) | 너비 (cm) | 선의수 (ea) | 선의색 | 상:측 (cm) | 측:측 (cm) | | 길이 (cm) | 너비 (cm) | 선의수 (ea) | 선의색 |
| 3.0 | 0.9 | - | - | 5.8 | 5.4 | YG151A | 2.2 | 0.8 | - | YG151A |

| 설 변 | | | | | 화 경 | | 착화수 | 개화기 | 향기 |
|------------|------------|-------------|-----|----|------------|--------|-----|------|----|
| 길이 (cm) | 너비 (cm) | 반점수 (ea) | 바탕색 | 형태 | 길이 (cm) | 색 | | | |
| 1.5 | 1.0 | - | 유백색 | 권설 | 18.0 | YG151A | 2 | 1~2월 | 강함 |



그림 41. 한국춘란(소심)과 보세란(소심)과의 중간 잡종 꽃과 식물체의 모습

(2) 보세 × 춘란 중간잡종

중국남부와 대만이 원산지인 광엽성의 보세(*Cymbidium sinense*)인 대명란(大明蘭) 중에서 소심 품종인 백묵소(白墨素)를 모본으로 하고 한국자생 춘란을 화분친으로 하여 교잡된 중간잡종의 종자를 파종하여 획득한 근경을 증식 하였다(그림 42). 2년차 연구의 결과 육성된 잡종의 특성을 보면 잎의 길이가 43cm로 우리나라 자생 춘란에 비하면 긴 편이고 너비가 2.2cm로 넓어서 대명란의 특성을 많이 닮았다.

꽃은 1월에 피는데 하나의 꽃대에서 2송이가 달리며 꽃의 형태는 춘란과 대명란의 중간형태로 나타났으며 특징적인 것은 향기가 거의 없고 소심류(素心類)끼리 교잡했음에도 불구하고 설변에 반점이 있었다. 꽃대의 길이는 20cm 정도로서 꽃의 자세나 형태가 상품화하기에는 다소 부족한 점이 있으며 엽성은 강하지만 좁고 긴 편이어서 관상가치와 상업성이 부족한 것으로 판단된다(표 18, 그림 43).

표 18. 대명란 ‘백목소’×한국춘란(소심) 중간 교잡종의 잎과 꽃의 특성

| 잎 | | | | | 상 악 편 | | | |
|------------|------------|-------------|-------|---------|------------|------------|-------------|--------|
| 길이 (cm) | 너비 (cm) | 착엽수 (ea) | 엽색 | 거치 | 길이 (cm) | 너비 (cm) | 선의수 (ea) | 선의색 |
| 43.0 | 2.2 | 3 | G137A | 끝에약간 있음 | 2.4 | 0.6 | 5 | RP 64A |

| 측악편 | | | | 악편간격 | | 악편 | 봉 심 | | | |
|------------|------------|-------------|--------|-------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|------------|
| 길이 (cm) | 너비 (cm) | 선의수 (ea) | 선의색 | 상:측 (cm) | 측:측 (cm) | 바탕색 | 길이 (cm) | 너비 (cm) | 선의수 (ea) | 선의색 |
| 2.6 | 0.6 | 5 | RP 64A | 6.3 | 5.7 | YG 145A | 25.0 | 1.0 | 1 | YG 145A |

| 설 변 | | | 화 경 | | 착화수 | 개화기 | 향기 |
|------------|------------|-------------|-------|----|------------|---------|---------------|
| 길이 (cm) | 너비 (cm) | 반점수 (ea) | 바탕색 | 형태 | 길이 (cm) | 색 | |
| 1.9 | 0.8 | 3 | GY 1B | 권설 | 20.0 | YG 145A | 2 1월 없음 |



그림 42. 보세란과 춘란 교잡종의 근경



그림 43. 대명란 ‘백목소’과 한국 춘란(소심) 중간 잡종의 꽃과 식물체의 모습

(3) 보세란과 제주한란의 교잡종

대만산 보세란(報歲蘭)을 모본으로 하고 제주한란 중에서 자한란(紫寒蘭)을 화분친으로 하여 육성한 중간잡종은 광엽성(廣葉性)의 직립형(直立形)이며 세력이 왕성하였다. 꽃은 12월과 1월 초순사이에 자적색으로 피는데 꽃의 형태와 배열은 한란을 닮았으나 향기는 보세란의 향(香)과 유사하였다.

잎의 길이는 약 50cm, 엽폭은 2cm가 넘는 대형종이며 엽색은 진한 초록색으로서 거치는 없고 꽃대길이는 55cm 정도로서 잎의 길이보다 길며 자적색이다. 꽃은 진적색으로서 7송이가 달리는데 관상가치가 높고 분화용으로 널리 사용되고 있는 보세란의 대용품(代用品)으로서 활용도가 매우 높은 것으로 판단되며 특성은 표 19와 그림 44에서 나타낸 바와 같다.

본 교잡종은 특성검정을 좀 더 진행한 후 새로운 품종으로 선발할 계획이며 생장점 배양을 통해 clone을 확보하고 대량증식체제를 갖출 계획이다.

표 19. 보세란×제주한란 중간 교잡종의 잎과 꽃의 특성

| 잎 | | | | | 상악편 | | | |
|------------|------------|-------------|--------|----|------------|------------|-------------|--------|
| 길이 (cm) | 너비 (cm) | 착엽수 (ea) | 엽색 | 거치 | 길이 (cm) | 너비 (cm) | 선의수 (ea) | 선의색 |
| 50.0 | 2.1 | 3 | G 137A | 없음 | 3.7 | 0.6 | 5 | RP 64A |

| 측악편 | | | | 악편간격 | | 악편 | 봉 심 | | | |
|------------|------------|-------------|-------|-------------|-------------|-------|------------|------------|-------------|----------------|
| 길이 (cm) | 너비 (cm) | 선의수 (ea) | 선의색 | 상:측 (cm) | 측:측 (cm) | 바탕색 | 길이 (cm) | 너비 (cm) | 선의수 (ea) | 선의색 |
| 3.7 | 0.6 | 5 | RP64A | 6.7 | 7.0 | RP64B | 2.8 | 0.7 | 5 | G139C RP64A |

| 설 변 | | | | | 화 경 | | 착화수 | 개화기 | 향기 |
|------------|------------|-------------|-----|----|------------|------------|-----|-------|-------|
| 길이 (cm) | 너비 (cm) | 반점수 (ea) | 바탕색 | 형태 | 길이 (cm) | 색 | | | |
| 1.7 | 0.7 | 10 | 유백색 | 권설 | 55.0 | YG 146C | 7 | 12~1월 | 보세란향기 |



그림 44. 보세란×제주한란 중간 교잡종의 꽃과 식물체의 모습

4) 춘란 × 죽백란 × 건란 중간잡종

한국 자생 춘란과 죽백란의 교잡종에 다시 건란을 수정시킨 3원교배종(그림 45)은 발아개체수가 극히 적었고 발아소요일수도 길어서 거의 1년만에 발아가 이루어졌다.



그림 45. (춘란×죽백란)×건란 의
종자가 발아된 모습

3. 동서양란 교잡종

가. Cym. 'Autum King'과 제주한란의 중간 잡종

최근 들어서 서양란 Cymbidium 품종과 동양란을 교잡하여 육성한 품종중에서 상업화에 성공한 'Sun Dust'나 'Miss Taipei', '桃花' 등이 있다. 본 연구에서는 서양란 Cymbidium의 한 품종인 Autumn King에 제주한란을 교배하여 잡종을 얻었는데 (그림 46) 그 특성은 표 20에 나타난 바와 같다.

잎의 길이는 42cm, 너비는 1.4cm로서 모본에 비해 길이가 짧고 좁았으며 꽃색은 황록색인데 1월에 피고 하나의 꽃대에 6송이 정도 달리는데 아직 어린 개체이기 때문에 개화 및 생육 특성을 정확하게 파악할 수 없었다. 상악편과 측악편은 한란의 형태를 많이 닮았으나 설편은 양란 모본의 형태를 많이 닮았다. 향기는 없으며 상악편과 측악편에는 적자색 선이 거의 없고 흔적만 남아있다. 품종으로 선발하기에는 다소 이른 감이 있으며 생육 및 개화 특성, 관상가치 등을 좀 더 재배해 보면서 관찰해야 할 것으로 판단되었다.



그림 46. 양란 Cym. 'Autumn King'과 제주한란 중간 잡종의 꽃과 식물체의 모습

표 20. 양란 Cym. 'Autumn King'×제주한란 중간 교잡종의 잎과 꽃의 특성

| 잎 | | | | | 상악편 | | | |
|------------|------------|-------------|----|----|------------|------------|-------------|-----|
| 길이 (cm) | 너비 (cm) | 착엽수 (ea) | 엽색 | 거치 | 길이 (cm) | 너비 (cm) | 선의수 (ea) | 선의색 |
| 42.0 | 1.4 | 5 | DG | 없음 | 4.4 | 0.7 | 5 | 혼적 |

| 측악편 | | | | 악편간격 | | 악편 | 봉 심 | | | |
|------------|------------|-------------|-----|-------------|-------------|-----|------------|------------|-------------|-----|
| 길이 (cm) | 너비 (cm) | 선의수 (ea) | 선의색 | 상:측 (cm) | 측:측 (cm) | 바탕색 | 길이 (cm) | 너비 (cm) | 선의수 (ea) | 선의색 |
| 4.3 | 0.7 | 5 | 혼적 | 7.1 | 7.6 | YG | 3.7 | 0.9 | 5 | YG |

| 설 변 | | | | | 화 경 | | 착화수 | 개화기 | 향기 |
|------------|------------|-------------|-----|----|------------|----|-----|-----|----|
| 길이 (cm) | 너비 (cm) | 반점수 (ea) | 바탕색 | 형태 | 길이 (cm) | 색 | | | |
| 2.4 | 1.3 | 5 | YG | 권설 | 45.0 | YG | 6 | 1월 | 없음 |

이외에도 동양란의 한 품종인 금화산(金華山)과 양란 Cymbidium 품종인 Persy Color 그리고 Flourish를 교배한 종자를 무균적으로 배양중에 있으며(그림 47과 48), 보세란에 Persy Color와 Rapin Palace의 교잡종(그림 49와 50) 춘검란에 Moon Walk를 교잡한 잡종(그림 51), 천일소(天一素)에 도화(桃花)를 교잡한 잡종(그림 52)을 배양 중에 있다.

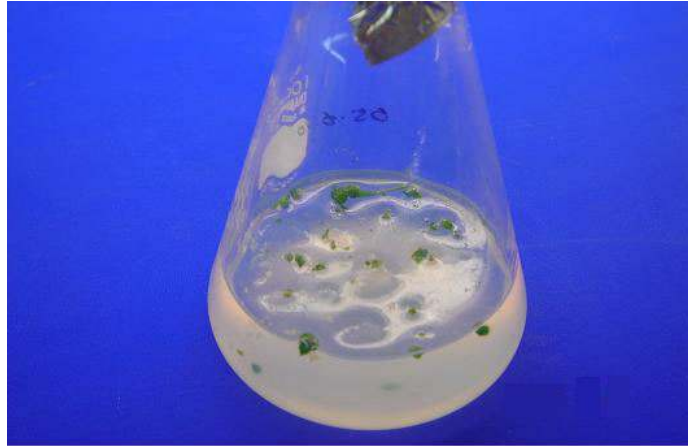


그림 47. 금화산(金華山) × Persy Color

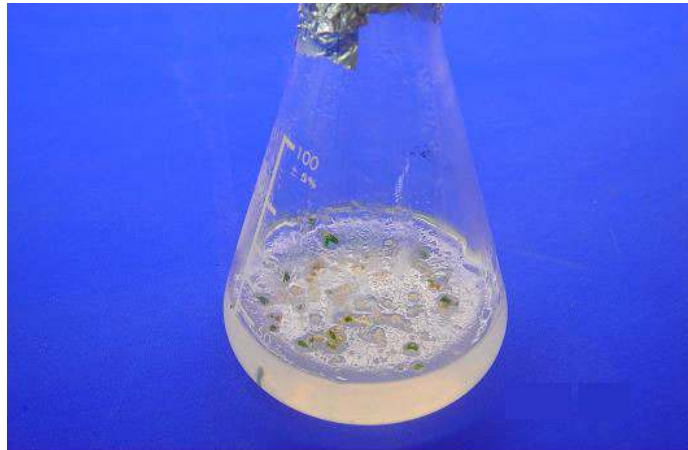


그림 48. 금화산(金華山) × Flourish

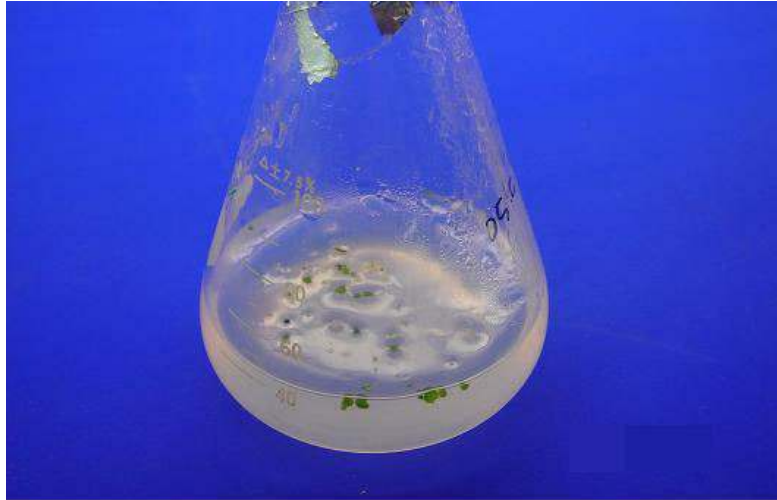


그림 49. 보세란 × Persy Color

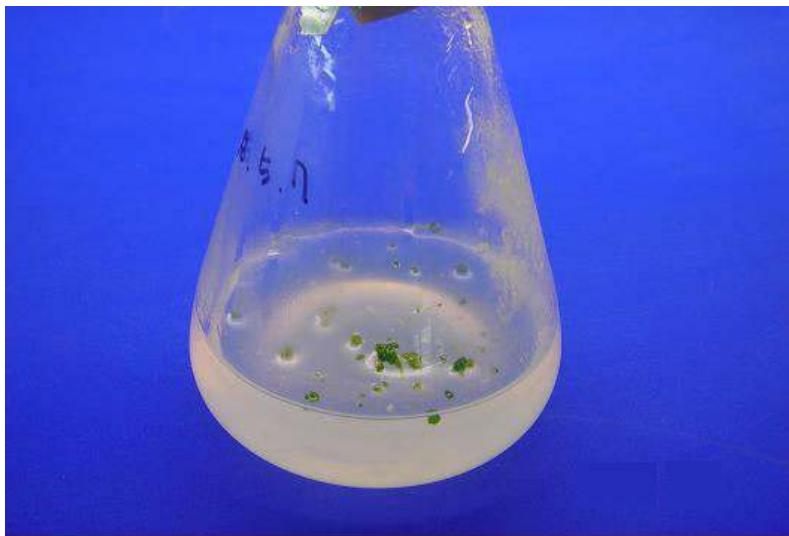


그림 50. 보세란 × Rapin Palace

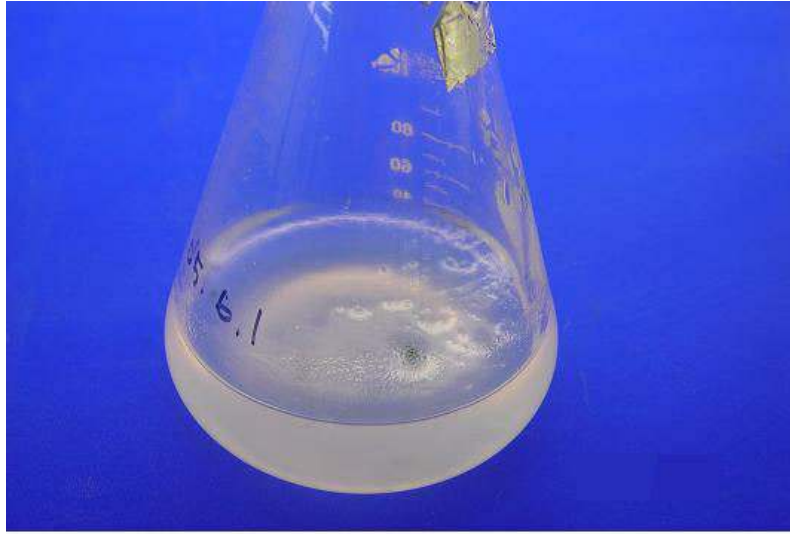


그림 51. 춘검란 × Moon Walk



그림 52. 천일소(天一素) × 도화(桃花)

4. 3원교배종(三元交配種) 및 기타잡종

제주 자생 죽백란에 한국 춘란을 교잡한 중간 잡종에 다시 건란을 교배시켜서 얻은 종자를 2년차에 무균과종하여 근경이 형성된 상태(그림 53)이며 무명의 동양란과 서양란을 교잡하여 얻은 중간잡종(꽃은 양란, 잎은 동양란)에 대명란의 한품종인 천일소(天一素)를 교배시켜서 얻은 종자를 무균적으로 과종하여 근경이 생육중(그림 54)에 있다. 한편 금능변(*Cym. pumilum*)과 양란을 교배하여 육성한 잡종에 한국춘란 소심을 교배하여 얻은 종자를 과종하여 3원교배종의 원괴체(*protocorm*)를 배양하였다(그림 55). 이외에도 건란과 죽백란(그림 56), 춘란과 건란의 교배종(그림 57)을 육성 하였다.



그림 53. 죽백란 × 건란 교잡종의 근경배양



그림 54. 동·서양란 교잡종 × 천일소(3원교잡종) 근경배양



그림 55. (금능변×양란)×춘란(3원교잡종) 근경배양



그림 56. 건란 × 죽백란 근경배양



그림 57. 춘란 × 건란의 근경배양

제 2절 지표인자 개발(협약)

제 1 항 연구수행 내용

가. 동양란 연구재료의 선정

Cymbidium속 식물 중에서 내한성이 강하고 환경적응성이 뛰어난 춘란과 향기가 좋은 한란, 잎이 넓은 반면 길이는 짧은 죽백란, 고온적응성이 강한 건란, 그리고 이들의 교잡종 중 총 15종류의 품종을 DNA 표식인자 개발과 적용을 위하여 선정하였다. 재료식물의 명칭과 교배조합, 그리고 그 특징은 Table 1에 요약하였다.

Table 1. Varietal lines used in this experiment

| No. | Korean name | Scientific name | Characteristics | |
|-----|-------------|--|---------------------|-----------------|
| | | | Blooming season | Flower color |
| 1 | 건란 1 | <i>Cymbidium ensifolium</i> 1 | July ~ August | Greenish yellow |
| 2 | 건란 2 | <i>Cymbidium ensifolium</i> 2 | July ~ August | Greenish yellow |
| 3 | 건란3 | <i>Cymbidium ensifolium</i> 3 | July ~ August | Greenish white |
| 4 | 록화죽백란 | <i>Cymbidium javanicum</i> var. <i>aspidistrifolium</i> | September ~ October | Green |
| 5 | 죽백란 | <i>Cymbidium lancifolium</i> | May ~ June | Milky white |
| 6 | 제주한란 11 | <i>Cymbidium kanran</i> (native to Cheju island) | October ~ December | Purplish red |
| 7 | 제주한란 | <i>Cymbidium kanran</i> (native to Cheju island) | October ~ December | Purplish red |
| 8 | 춘란 (진도) | <i>Cymbidium goeringii</i> | March ~ April | Yellowish green |
| 9 | 춘란 (장성) | <i>Cymbidium goeringii</i> | March ~ April | Yellowish green |
| 10 | 춘란 (완도) | <i>Cymbidium goeringii</i> | March ~ April | Yellowish green |
| 11 | 대만보세 | <i>Cymbidium sinense</i> | January ~ February | Reddish purple |
| 12 | 백화보세 | <i>Cymbidium sinense</i> | January ~ February | Yellowish white |
| 13 | 한죽란 | <i>C. kanran</i> x <i>C. aspidistrifolium</i> | October ~ December | Green |
| 14 | 춘죽란 | <i>C. goeringii</i> x <i>C. lancifolium</i> | May ~ June | Greenish white |
| 15 | 춘한란 | <i>C. goeringii</i> x <i>C. kanran</i> | November ~ January | Yellowish green |

나. 동양란 DNA의 추출

전체 DNA는 CTAB 방법을 변형하여 추출하였다. 적절한 양의 녹체를 액체질소에서 마쇄한 다음, 2 ml tube에 500 μ l 정도를 넣고 extraction buffer 500 μ l와 β -mercaptoethanol 5 μ l를 넣어서 잘 섞어주었다. 그 다음 10% sarcosyl 50 μ l를 넣고 섞은 후 37°C incubator에서 간간히 inverting을 하며 10분간 처리하였다. 5 M의 NaCl 100 μ l와 8.6%의 CTAB 70 μ l를 넣고 잘 섞어준 후 RNaseA 7 μ l (10 μ g/ μ l stock)를 넣고 inverting한 후 65°C water bath에서 가끔씩 꺼내어 inverting 하며 15분간 처리하였다. 700 μ l (2/3 volume)의 phenol/chloroform/isoamyl alcohol을 넣고 충분히 섞어준 후 12°C, 15,000 rpm으로 15분간 원심분리하고 상등액을 새로운 tube에 옮겼다. 700 μ l (2/3 volume)의 chloroform을 넣고 충분히 섞어준 후 12°C, 15,000 rpm으로 15분간 원심분리하고 상등액을 새로운 tube에 옮겼다. 0.1 volume의 NaOAc와 2.5 volume의 EtOH을 넣고 -70°C에서 20분 이상 침전하였다. 70%로 washing한 후 pellet를 30~50 μ l의 D.W로 re-suspension 하였다.

다. RAPD 분석

PCR 반응은 1 μ M의 primer와 20 ng의 genomic DNA를 1X PCR buffer [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂]와 200 M dNTP mix, 그리고 0.5 unit의 rTaq polymerase (Takara, Japan)로 하였다 (14 μ l final). Thermal Cycler 9600 (Perkin Elmer, USA)을 사용하여, 94°C에서 5분간 초기 변성 후, 94°C에서 20초, 35°C에서 20초, 72°C에서 90초로 35회 반복하고, 72°C에서 5분간 반응하였다.

반응이 끝난 시료는 7 μ l 씩 각각 취하여 1.5% agarose gel에서 100 volt로 약 15 cm 전기영동 후 EtBr로 염색하였다. Polymorphic band들은 특이 band의 유무 (dominant marker scoring: present = 1, absent = 0)에 따라 확인하였고, 각 polymorphic marker의 구분은 사용한 primer의 이름과 증폭산물의 크기 (bp)를 함께 표시함으로 나타내었다.

라. SCAR marker의 개발

RAPD에서 확인된 특이 band들을 elution하여 cloning 하였다. 각 특이 band의 크기를 면밀히 검토하여 기록하고 elution함으로써 염기분석 결과를 일관성 있게 축적하였다. RAPD 특이 band는 agarose gel에서 오려내어 glass milk (GeneClean kit, BIO 101, USA)와 침전 상승제인 glycogen (0.1 g/elution, MRC, USA)을 이용하여 회수하였다. Polyacrylamide gel에 전기영동을 한 경우에는 silver-staining된 gel에서 오려내고, 오려진 gel 조각을 50 μ l의 37°C 증류수에서 10분간 처리한 후, 원심분리하여 상등액을 완전히 제거하였다. 여기에 30 μ l TE buffer (pH 8.5)를 첨가하여 37°C에서 8시간 동안 (overnight) 처리하여 DNA가 추출되도록 하였다. 추출된 DNA 용액 3 μ l를 주형으로 RAPD 수행 시 사용하였던 primer를 그대로 적용하여 PCR 재증폭을 실시하였다. 1.5% agarose gel에서 전기영동하고 EtBr 염색하여 target band의 재증폭 여부를 확인하였다.

회수된 RAPD PCR 증폭 산물들은 pGEM-T Easy Vector System (Promega, USA)을 이용하여 T-A cloning하였고, Top 10 competent cell (Invitrogen, USA)에 heat-shock 방법을 이용하여 transformation 하였다. Gene All Plasmid Mini Kit (General Bio, Korea)을 이용하여 plasmid를 추출하였고 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

마. SCAR primer의 적용

Primer 제작을 위한 염기서열 분석에 사용하였던 plasmid를 제작된 primer의 PCR 증폭의 주형으로 사용하였을 때 증폭효율이나 강도에 전혀 문제가 없었던 SCAR primer set을 먼저 적용하였다. 초기에는 SCAR primer set을 검정 품종과 F1 line에 일반적인 PCR 기법을 적용하여 test 하였다 (95°C 5분 처리 후, 95°C 30초, 55°C 30초, 72°C 1분의 순서로 35 cycles; PE 480 grade PCR machine). 그리고 이 결과를 토대로 하여 PCR reaction의 재현성을 극대화시키고, 관찰되는 band를 그 size에 의해 allele로 표지하기 위하여 touch-down PCR 기법 (95°C 5분 처리 후, 95°C 10초, 65°C → 60°C 30초 ; 매 cycle 당 0.5°C 씩 감소, 72°C 30초의 순서로 10회 반응 후, 95°C 10초, 60°C 20초, 72°C 30초의 순서로 추가로 25회 반응을 실시, PE geneAmp 9600 PCR machine 사용)을 적용하여 제작된 SCAR primer set

들을 이용한 PCR 반응을 수행하였다. 5 μ l의 증폭한 DNA를 1% agarose gel과 5% polyacrylamide gel에 전기영동하여 증폭산물을 확인하였다.

바. Gene-specific marker (STS-PCR)의 개발

진핵생물의 functional gene의 upstream에서는 흔히 'CpG island'라는 반복적 염기서열이 존재하며, 'CpG' island는 고도로 methylation되어 있는 것이 보편적이다. Active genome이라고도 불리는 유전자 coding 부위와 그렇지 않은 intergenic DNA region에서의 큰 차이점 중 하나는 methylation 유무라고 보고되고 있다 (Bird et al., 1985; Boyes and Bird, 1991). 반면에 DH5 alpha와 같은 E. coli는 wild type의 Mcr A 및 BC 유전자를 지니고 있는 것들이 있는데, 여기에 genomic DNA 절편을 cloning하여 transformation시켜 줄 경우에는 methylation된 cytosine이 포함된 DNA들은 Mcr A 및 BC protein에 의해 절단되게 되어 clone이 유지되지 못한다. 반면에 active genome은 methylation이 되어 있지 않기 때문에 결국 DH5 alpha에 transformation된 DNA clone은 대부분 active genome region에서 유래된 DNA 절편들을 insert로 지니게 된다.

Cymbidium ebrunum의 genomic DNA를 semi-genomic library 구축에 사용하였다. DNA 1 μ g을 methylation insensitive endonuclease인 MspI (C⁺CGG)으로 절단하였다. 절단 산물을 agarose gel에 전기영동하여 0.2-1 kb 부위를 오려내고, DNA를 glass milk (GeneClean® kit, BIO 101, USA)와 침전 상승제인 glycogen (0.1 μ g/elution, MRC, USA)을 이용하여 회수하였다. pGEM3zf(+) (Promega, USA)를 AccI (HpaII와 절단부위에서 상보적 염기서열)으로 절단하고 전기영동하여 완전히 절단된 plasmid 만을 회수하였다. 위 두 가지 산물을 ligation하고, wild type의 Mcr A 및 BC 유전자를 지니는 E. coli DH5 alpha (Invitrogen, USA)에 transformation하여 'active genome region-enriched semi-genomic DNA library'를 구축하였다. 구축된 semi-genomic DNA library로부터 얻어진 clone들의 염기서열을 분석하고, GenBank database 검색을 통하여 유전자 coding 부위의 염기서열만을 이용하여 primer를 합성하였다.

사. STS-PCR marker의 적용

합성된 각각의 primer 조합을 최적조건으로 적용하기 위해서는, primer annealing 온도의 설정이 중요하다. 그러나 시간적, 인력적 효율을 감안할 때, 양쪽 primer T_m 값의 차이 및 재료 식물의 염색체 조성 특성 등 적정 온도설정 에 영향을 미칠 수 있는 많은 변수를 모두 고려해서 검사대상의 재료가 바뀔 때 마다 primer 조합의 최적 반응조건을 확립하는 것은 매우 비효율적이다. 따라서 모든 PCR 반응의 보편성이 강조되면서도 비특이적 증폭산물 출현 정도가 억제되는 조건을 확립하는데 주력하였다. 첫째, 비특이적 증폭산물의 과도한 출현을 억제하기 위하여, 모든 PCR은 'touch-down'으로 실시하였다. 둘째, 많은 primer 조합 적용에 있어서 보편성과 일관성을 확보하기 위하여 좁은 온도범위를 (55°C~60°C) primer T_m 값으로 적용하였다.

우선 STS-PCR을 위하여 정량된 DNA를 5 ng/ μ l의 양으로 touch-down PCR기법으로 증폭하였다. PCR조건은 T_m 값에 따라 다음과 같이 2가지로 나누어서 실시하였다. 60°C에서 touch-down PCR: 95°C 3분 처리 후, 95°C 10초, 60°C → 55°C 30초 (매 cycle 당 1°C씩 감소), 72°C 1분의 순서로 5 cycle 후, 95°C 10초, 60°C 20초, 72°C 1분의 순서로 추가 25 cycle을 실시하였고, 72°C에서 5분간 처리하였다. 55°C에서 touch-down PCR: 95°C 3분 처리 후, 95°C 10초, 60°C → 55°C 30초 (매 cycle 당 1°C씩 감소), 72°C 1분의 순서로 5 cycle 후, 95°C 10초, 55°C 20초, 72°C 1분의 순서로 추가 25 cycle을 실시하였고, 72°C에서 5분간 처리하였다. PCR 산물들은 5%의 polyacrylamide gel에 전기영동하여 확인하였다.

아. CAPS marker의 개발과 분석

제한효소를 이용하면, polymorphism을 추가로 발견할 수 있다는 점 이외에도, specific primer조합으로 증폭된 산물들에 보다 정교한 정보를 추가할 수 있다는 장점이 있다. 제한효소는 기록의 일관성을 견지하기 위하여 'frequent cutter' 중에서 4가지를 선택하여 사용하였다 (RasI; GT[^]AC, HinfI; G[^]ANTC, HaeIII; GG[^]CC, AluI; AG[^]CT) (Bioneer, Korea). Monomorphic band가 전기영동에서 확인되면, PCR 산물 10 μ l를 5 unit의 각 제한효소를 첨가한 후 [10 μ l of PCR product + 5 μ l of digestion cocktail (1X final digestion buffer supplied from the company, 5

unit of restriction enzyme)], 37°C에서 3시간 처리하였다. 전기영동하고 절단산물의 크기를 100 bp size marker에 의거 측정하여 기록하였다. 제한효소를 적용하기 전에 미리 증폭산물 중 'target band'를 지정하였고, 절단 산물들의 크기의 합이 이 target band와 반드시 일치할 때만 분석하였기 때문에 재현성이 떨어지는 minor band가 절단되어 나타나는 polymorphism을 구분할 수 있었다. 단 몇 개의 line에서 증폭산물이 없으므로 인해 polymorphism (dominantly scored PCR products)이 관찰되는 유전자좌들 역시 제한효소를 처리하여 추가적인 polymorphic allele를 찾아 보고자 시도하였다. 이 경우에는 PCR 증폭산물이 확인되지 않은 line들 ('0'; absent in the loci scored dominantly)을 'null allele'로 처리하여 각 품종의 유전적 유사성 (genetic similarity) 정도를 측정하기 위한 raw data에서 'missing data'로 간주하였다. Polymorphic band들은 특이 band의 유무 (dominant marker scoring: present = 1, absent = 0)에 따라 확인하였고, 각 polymorphic marker의 구분은 사용한 primer의 이름과 증폭산물의 크기 (bp)를 함께 표시함으로 나타내었다. 자료를 binary data로 전환하였고, UPGMA 분석방법을 이용하여 추정된 genetic similarity matrix를 작성하였다.

자. URP 표식인자의 적용

우리나라 재래종 벼인 앵미(잡초성 벼)의 염색체 유전자를 분리, 구조해석 연구를 수행하던 중에 개발되어 동물, 식물 및 미생물을 포함하는 다양한 생물종의 핵산 지문에 모두 적용 가능한 URP (Universal Rice Primer) 표지유전자를 동양란 및 자생난류의 계통 구별화 작업에의 적용가능성을 검증하는 실험을 수행하였다. URP는 서린과학의 UniPrimer kit I을 구입하였다. 이 kit는 20-mer로 이루어진 12개의 primer set로 구성되어있다. 이들 12개의 primer set를 15개의 동양란 및 자생란 (Table 1)에서 추출된 genomic DNA를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 100 ng/ul의 primer와 50 ng의 genomic DNA를 1X PCR buffer [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂]와 200 M dNTP mix, 그리고 1 unit의 rTaq polymerase (Takara, Japan)로 하였다 (14 μ l final). Thermal Cycler 9600 (Perkin Elmer, USA)을 사용하여, 94°C에서 4분간 초기 변성 후, 94°C에서 1분, 45°C에서 1분, 72°C에서 2분으로 37회 반복하고, 72°C에서 7분간 반응하였다. PCR 반응이 끝난 후 각각의 반응액으로부터 5 μ l 씩 취하여 1.2%

agarose gel에서 100 volt로 전기영동한 후 EtBr로 염색하였다. Polymorphic band 들은 특이 band의 유무(dominant marker scoring: present = 1, absent = 0)에 따라 확인하였고, 각 polymorphic marker의 구분은 사용한 primer의 이름과 증폭산물의 크기 (bp)를 함께 표시하였다.

차. SNP marker의 개발 및 적용

보다 품종 특이적인 표식인자의 개발을 위하여 SNP (Single Nucleotide Polymorphism, 단일염기다형성)를 발견하는 실험을 수행하였다. 이를 위하여 연구 책임자로부터 1, 2차년도에서 사용하였던 동양란 및 자생난 일부와 그들의 교배종 및 부모종 등 총 35 품종 (Table 2) 을 새로이 분양 받아 실험을 수행하였다. 35개의 품종 중 제주한란과 녹화죽백란, 그리고 이 둘의 교배종인 한죽란 이렇게 한 그룹과 건란과 대만보세와 이 둘의 교배종인 건보란 이라는 또 다른 그룹을 재료로 선정하였다.

Table 2. *Cymbidium* hybrids using SNP and STS-CAPS

| 번호 | 품종명 | 번호 | 품종명 |
|----|---------|-----|------|
| A | 일조지예(日) | 6 | 춘소추백 |
| B | 송춘(日) | 6F | 춘란소심 |
| | | 6M | 추백소 |
| 1 | 미대(춘한) | 7 | 추백관음 |
| 1F | 유향춘란 | 7F | 추백소 |
| 1M | 대만한란 | 7M | 관음소심 |
| 2 | 한보 | 8 | 건보 |
| 2F | 제주한란 | 8F | 건란 |
| 2M | 대만보세 | 8M | 대만보세 |
| 3 | 죽춘 | 9 | 한춘 |
| 3F | 죽백란 | 9F | 제주한란 |
| 3M | 춘란 | 9M | 춘란 |
| 4 | 한죽 | 10 | 춘청한 |
| 4F | 제주한란 | 10F | 춘란 |
| 4M | 녹화죽백란 | 10M | 청한란 |
| 5 | 춘백 | 11 | 춘소백보 |
| 5F | 춘란 | 11F | 춘란소심 |
| 5M | 백목소 | 11M | 백화보세 |

이들로부터 추출한 DNA로 기능이 알려지지 않은 단백질을 코딩하는 부위를 증폭하는 표식인자로 2차년도에서 개발된 CE005번 primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 DNA 절편은 pGEM-T® Easy Vector System (Promega, USA)을 이용하여 T-A cloning하였고, Top 10 competent cell (Invitrogen, USA)에 transformation하였다. Plasmid Miniprep Kit (General Bio System, Korea)을 이용하여 plasmid를 추출하였고 Macrogen (Korea)에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 분석된 염기서열은 ClustalW multiple sequence alignment (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) program을 이용하여 다중염기서열비교를 수행하였다. SNP를 CAPS로의 적용 가능성을 살펴보기 위하여 BioEdit program을 이용하여 비교된 염기서열간의 차이를 보이는 부위를 절단하는 제한효소의 존재를 검색하였다.

제 2 항 연구수행 결과

가. RAPD 표식인자개발 및 근연도 추정

1) RAPD 표식인자

영양체 증식이 용이한 동양란의 품종개발에서는 잡종강세를 기대할 수 있는 허용되는 범위 내에서의 원연간 교배가 유리하다고 할 수 있다. 이를 위해서는 교배 조합의 양친을 선정하는 것이 가장 중요한데, 양친을 선발하기 위해서는 교배 모본들의 우수 특성에 대한 고찰 및 모본들 사이의 유전적 거리를 추정하는 작업이 선행되어야 한다. 본 장에서는 주요 동양란 원종들 사이의 유전적 거리를 효과적으로 추정하기 위하여 원종들 사이에 존재하는 polymorphism을 RAPD기법을 통해 undefined elements로부터 확인하고 이 정보를 분석에 사용하였으며, 품종특성 중 여러 중요형질 및 형태적 특성을 조사하여 RAPD marker에 의해 도출된 결과에 비교하였다. 더 나아가서, polymorphic RAPD band들을 STS-PCR primer로 전환하여 SCAR marker를 확보하여 재현성이 강조된 보다 정확한 모본들의 genotype을 시도하여 본 실험에서 개발된 DNA 지표인자들의 활용방향을 타진하였다.

2) RAPD polymorphic band screening을 통한 근연도 분석

주요 동양란에 있어서 RAPD기법을 통해 undefined elements로부터 polymorphism을 확인하였다. 공시재료인 동양란 원종 및 교배조합 line들에 대하여 총 20개의 RAPD primer들(UBC #1-399 중에서 GC contents가 비교적 높은 primer들을 선정하여 사용)을 적용하였다.

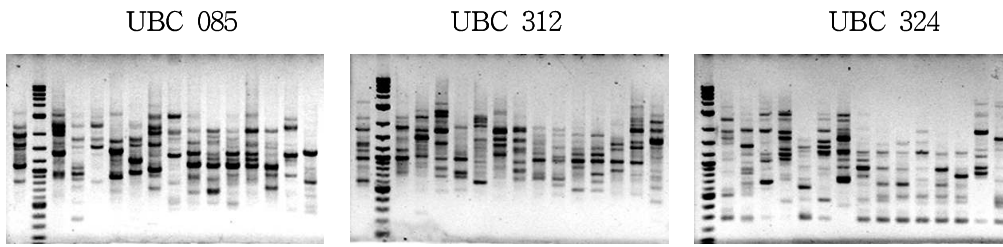


Figure 1. Example of RAPD primer application to detect polymorphism among 15 Cymbidium lines. Detection of polymorphism using RAPD primers #85, #312 and #324.

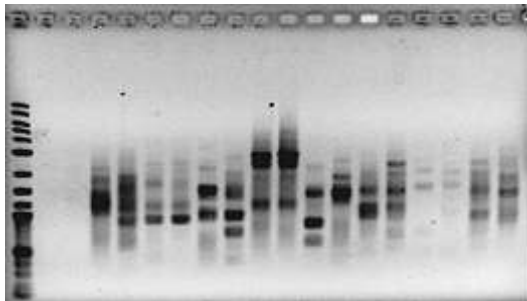


Figure 2. Screening of polymorphic RAPD primers using line#1 and line#10. UBC primer #304, #310, #317, #324, #340, #362, #374, #385 and #396 were applied for this search.

총 20개의 UBC random 10-mer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 중 UBC 85, 312, 324라는 3가지 primer에 의하여 증폭된 DNA 단편들의 전기영동 사진 (Figure 1) 만을 첨가하고, 나머지 17개의 증폭 산물의 전기영동 결과는 모두 표로 나타내었다 (Appendix 1). 증폭산물의 전기영동 결과 상당히 많은 수의 계통별 특이적 증폭 산물이 확인되었다. 그러나 위 Figure 2에서 보듯이 상당히 많은 수의 UBC primer 들이 복잡한 형태로 RAPD를 생성해 내었으며, 이러한 경우에는 무엇보다도 증폭산물이 하나의 유전자좌 (locus) 에서 기인된 것인지를 판단하기가 매우 어려워 증폭에 사용된 primer 이름과 증폭산물의 크기를 이용하여 각 line에 대한 scoring을 시도하는 것에 상당한 어려움이 있다. 그 주된 이유는 agarose gel의 낮은 해상도 때문인데, 수십 bp 차이를 뚜렷이 구분하기 어려워, 전혀 다른 유전자좌들의 대립유전

자들이 각 line에서 서로 비슷한 증폭산물을 생성하는지에 대한 판단이 쉽지 않기 때문이다. 각 line의 증폭산물을 따로 elution하여 염기서열을 분석한 결과, 서로 판이하게 다른 염기서열을 보이는 것으로 이들이 서로 다른 유전자좌에서 증폭된 산물임을 알 수 있었다.

발견되는 polymorphic band 모두를 0 (band가 없는 경우)과 1 (band가 있는 경우)로 구별하여 binary data matrix를 만들었는데, 총 420개의 polymorphic bands를 20개의 UBC primer들로부터 확인 할 수 있었다. 이 특이 band들은 차후 SCAR primer 제작을 위하여 특정 line으로부터 elution을 실시하였다. 그리고 이 matrix를 Nei와 Li (1979)의 공식을 이용하여 계산결과를 similarity matrix로 만들고 (Table 3), 이들의 근연관계를 dendrogram을 이용하여 표현하였다 (Figure 3).

Table 3. Matrix of pairwise genetic distance among 15 Cymbidiums (from RAPD)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| 1 | - | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 0.752 | - | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 0.625 | 0.640 | - | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 0.671 | 0.673 | 0.640 | - | | | | | | | | | | | |
| 5 | 0.657 | 0.654 | 0.560 | 0.601 | - | | | | | | | | | | |
| 6 | 0.705 | 0.721 | 0.660 | 0.635 | 0.659 | - | | | | | | | | | |
| 7 | 0.657 | 0.628 | 0.594 | 0.674 | 0.591 | 0.637 | - | | | | | | | | |
| 8 | 0.676 | 0.688 | 0.613 | 0.645 | 0.664 | 0.707 | 0.655 | - | | | | | | | |
| 9 | 0.666 | 0.702 | 0.577 | 0.597 | 0.726 | 0.659 | 0.633 | 0.721 | - | | | | | | |
| 10 | 0.676 | 0.683 | 0.575 | 0.601 | 0.712 | 0.683 | 0.620 | 0.702 | 0.774 | - | | | | | |
| 11 | 0.683 | 0.671 | 0.565 | 0.613 | 0.681 | 0.657 | 0.637 | 0.690 | 0.757 | 0.743 | - | | | | |
| 12 | 0.700 | 0.721 | 0.603 | 0.649 | 0.664 | 0.669 | 0.613 | 0.717 | 0.764 | 0.760 | 0.791 | - | | | |
| 13 | 0.683 | 0.681 | 0.572 | 0.623 | 0.671 | 0.657 | 0.613 | 0.714 | 0.729 | 0.752 | 0.750 | 0.805 | - | | |
| 14 | 0.685 | 0.669 | 0.608 | 0.649 | 0.645 | 0.683 | 0.674 | 0.697 | 0.654 | 0.659 | 0.623 | 0.664 | 0.676 | - | |
| 15 | 0.693 | 0.678 | 0.643 | 0.647 | 0.681 | 0.681 | 0.637 | 0.729 | 0.685 | 0.661 | 0.654 | 0.695 | 0.712 | 0.690 | - |

Cymbidium 속내 종간, 품종간의 유사도는 Figure 3에서 보는 바와 같이 크게 3 group으로 나뉘어 졌다. 분류군의 전체 유사도는 0.56~0.79로 비교적 높게 나타났다. 1 group은 ensifolium 1, ensifolium 2, kanran 11 (native to Cheju island), C. goeringii x C. lancifolium이 속하고, lancifolium, goeringii (진도), C. goeringii x C. kanran, goeringii (장성), goeringii (완도), sinense (대만보세), sinense (백화보세), C. kanran x C. aspidistrifolium이 포함되며, 3 group은 Cymbidium javanicum var. aspidistrifolium, kanran (native to Cheju island), ensifolium 3이 속한다.

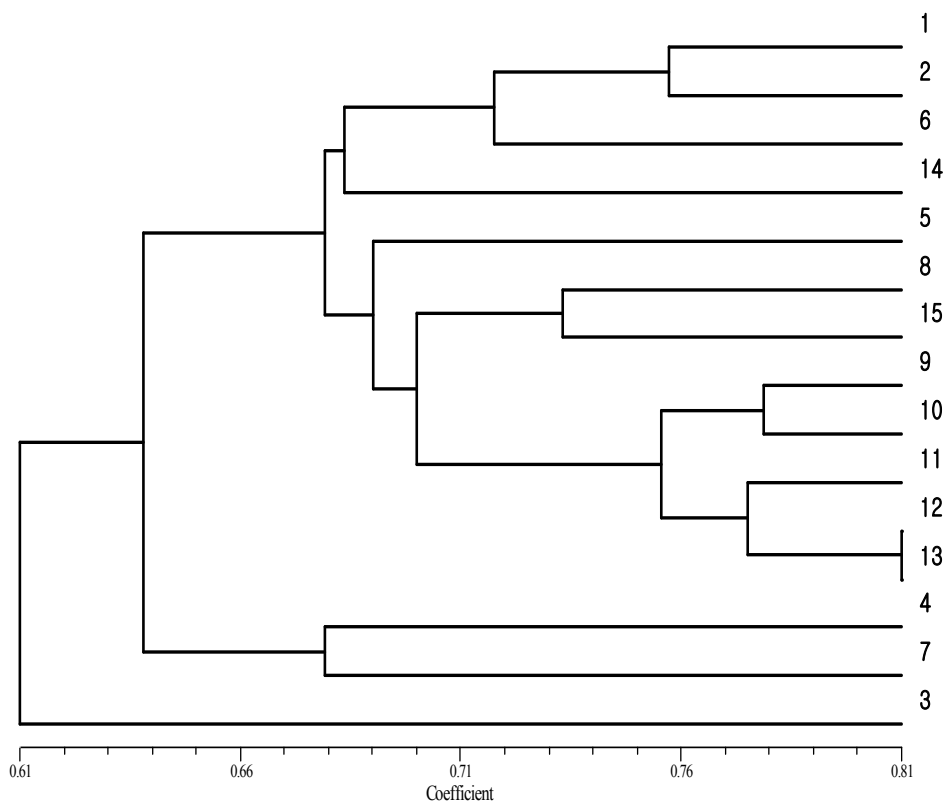


Figure 3. Phenogram of 15 orchid genotypes based on marker difference by UPGMA cluster analysis of the dissimilarity values. Numbers are accession number of 15 genotypes shown in table 1. Values on the baseline indicate the average genetic distances between lines.

RAPD에 이용한 15 종류의 동양란 품종은 이미 생리·형태학적으로 그 근연관계를 알고 있는 reference 품종이다. 이들의 RAPD에 의한 분류를 보면 일부는 근연도가 일치함을 볼 수 있으나 몇몇 품종에서 잘못된 근연도를 나타내고 있음을 알 수 있다. 결과적으로 RAPD에 의하여 도출된 결과는 부정확한 근연도를 보임을 알 수 있었다 (Figure 3). 이와 같은 결과는 RAPD가 가지는 표식인자로서의 가장 큰 단점이라고 할 수 있다. 그 이유는 증폭산물이 하나의 유전자좌 (locus)에서 기인된 것인지를 판단하는 것이 불가능하기 때문이다. 이처럼 하나의 유전자좌에서 증폭되었는지를 알 수 없는 증폭산물의 유무를 scoring하여 계통간의 근연관계를 분석하는 RAPD는 그 결과의 신빙성이 STS-CAPS에 비하여 많이 떨어진다고 할 수 있다. 이들의 신뢰성을 높이기 위하여서는 RAPD를 SCAR와 같은 표식인자로 전환하여야 하는데, 이렇게 되면 RAPD의 장점인 간편성은 없어지지만 정확성을 가지는 STS 표식인자가 되는 것이다. 따라서 본 과제에서 구축하려는 소규모의 계통구분 표식인자 데이터베이스는 STS, STS-CAPS와 SNP결과에서 얻어진 산물로 이루어지는 것이 타당하리라고 생각된다.

다. SCAR 표식인자개발

1) SCAR 표식인자

RAPD는 단시일 내에 어떤 작물의 DNA marker 개발을 위하여 품종들 내의 polymorphism을 확인하는 작업으로 가장 쉽게 적용할 수 있는 기법 중 하나이다. 그러나 짧은 길이의 primer를 이용하여 염기서열 정보가 전혀 존재하는 않는 미지의 염색체부위 (undefined elements)를 무작위로 증폭하고 그 산물들에서 polymorphism을 확인하기 때문에 실험의 재현성이 그리 높지 못하다는 단점이 있다. 그러므로 RAPD 기법은 품종 간 근연도 추정에는 효율적일 수는 있으나, 낮은 수준의 재현성과 우성적으로 scoring되는 (dominantly scored; present and absent) polymorphism의 특성으로 인하여 각각의 품종들을 정확히 판별하기위한 방편으로 적용하기에는 많은 어려움이 따르게 된다. 이러한 사실은 앞서의 항에서 언급된 결과를 통하여 알 수 있었다. 따라서 본 항에서는 undefined elements에서 유래된 polymorphic RAPD들을 실험의 재현성이 높은 SCAR marker로 전환시키고 이들을 품종표지 인자로 활용하는 방안의 제시와 그 과정에서 파생되는 현실적 문제점들에

대하여 언급하려 한다.

2) RAPD marker에서의 SCAR primer set 합성

Undefined elements에서 유래된 polymorphic RAPD들을 실험의 재현성이 높은 SCAR marker로 개발하였다. polymorphic RAPD band들을 STS-PCR primer로 전환하여 SCAR marker를 확보하고 재현성이 강조된 정확한 모본들의 genotype을 분석하는데 있어서 본 실험에서 개발된 DNA 지표인자들의 활용하고자 하였다. Band 강도가 elution 및 cloning에 충분하다고 판단되는 20개의 특이 RAPD band를 agarose gel에서 elution 하여 T-vector에 cloning을 시도하였고 염기서열 분석을 실시하였다. 분석된 염기서열은 보다 정확한 RAPD-derived band size를 제공하였다. 각 line에서 특이적으로 증폭된 band를 cloning하여 분석한 결과, 대부분 동일한 band에서 파생된 plasmid들이 서로 다른 염기서열을 지닌다는 것을 발견할 수 있었고 한 line의 특이 band 염기서열을 기준으로 다른 line들에 대해 제한효소를 적용해 보았을 때 쉽게 관찰되는 'incomplete digestion' 현상으로도 같은 크기의 'heterogeneous PCR products'를 확인할 수 있었다. 이것은 gel에서 elution된 하나의 RAPD band가 여러 부위의 genomic DNA에서 동시에 증폭된 산물임을 의미하는 것으로, AFLP기법의 selective amplification (보통 분석대상의 1/64 만을 선별적으로 증폭함) 절차가 없는 RAPD기법이 지니는 단점이라고 볼 수 있을 것이다. 최종적으로 10개의 RAPD band들이 cloning 및 염기서열 분석이 성공적으로 수행되었다 (Figure 4). SCAR로부터 얻어진 표식인자는 다음 항에서 보여 줄 gene-specific marker인 STS와 함께 scoring 하여 분석을 수행하였다.

Table 4. SCAR primers developed

| No. | Primer Sequences | | Expected size (bp) |
|-----|----------------------|----------------------|--------------------|
| | Forward (5'→3') | Reverse (5'→3') | |
| 1 | GCTGGTACCCCCAACACTCG | GCTGGTACCCCTGTACTGAT | 297 |
| 2 | AGCGGCTAGGGCACGTGGA | AGCGGCTAGGCTTACTTGG | 209 |
| 3 | TGAACACAAGGCAAGTACC | GCCTACAAGCAAAGCATGA | 323 |
| 4 | ACTAGAGCTCCCCCTTTCC | GATCCAAACTTTTGCCCCT | 411 |
| 5 | CATCACAGCAACCATCCTC | GCAAACAGGAGTAAGCGAA | 668 |

다. Gene-specific 표식인자의 개발 및 근연도 추정

1) Active genome region enriched semi-library 구축과 STS-PCR 표식인자

많은 연구자들이 우리나라에서 재배되는 여러 작물의 품종들을 DNA marker를 이용하여 구분하고자 노력하였다. 거의 모든 연구들은 염색체 전체 수준에서 polymorphism을 관찰하는데 주력하였고 (RAPD, AFLP), 최근에는 microsatellite의 copy number에 의거한 품종구분 및 표지를 시도하고 있으나 (Beridze, 1986; Hamann et al., 1995; Georges et al., 1991; Stallings et al., 1991; Winberg et al., 1993; Zhou et al., 1995), 몇 개의 염기차이에 의한 polymorphic allele들을 하나하나 정확히 구분하고 비교하기 위해서는 신중한 판단이 선행되어야 한다. 결과적으로 비교적 polymorphism의 발견이 용이한 타지역종과 국내 종들의 유전적 차이를 강조하는데 그치거나, 국내 품종들의 비교분석 (comparative analysis) 수준 이상의 구체적이며 현실적인 품종구분을 위한 DNA marker의 활용기법을 제시하지는 못하였다.

엄밀한 의미에서의 polymorphism은 하나의 유전자좌에서 여러 개의 상이한 대립유전자들 (heterogeneous alleles)이 존재한다는 것을 의미한다. Polymorphism이 발견되었을 때, 어떤 유전자좌에 속하는 어떤 대립 유전자들로부터 기인되는 것인지에 대한 정확한 해석이 선행되지 않으면, 각 품종이 지니는 특정 대립유전자의 특성을 기술할 수가 없다. 그 동안 많은 DNA marker들이 보고되었음에도 불구하고 품종표지가 어려웠던 것은, 재현성을 확보하기 위한 노력의 부족보다는

polymorphism을 보였던 특정 유전자좌 (locus)를 제대로 관리하지 못하였음에 기인 되었다고 할 수 있겠다.

염색체의 90% 정도를 차지하고 있는 non-coding region (junk DNA)은 point mutation 뿐만 아니라 삽입, 결실, 전좌 등의 염색체이상에도 유전자에 비해 자연선택 (natural selection)로부터 비교적 자유롭다고 할 수 있으나, 이 부위에서 개발된 DNA 표지인자들이 실질적으로 품종의 형질특성을 지배하는 중요 유전자들과 연관 되어있을 경우는 고도의 linkage analysis를 통하지 않고는 규명하기가 어렵다. 그렇기 때문에, 지금까지 사용하여온 RAPD-SCAR 전환을 통한 DNA 표지인자 개발보다는 유전자를 포함하는 염색체부위에서 선택적으로 개발하는 것이 더욱 유리하다고 판단되었다. 주된 이유로는 첫째, 유전자는 non-coding region에 비해서 low copy 혹은 single copy로 존재하기 때문에, PCR조건이 달라진다 하더라도 상당히 안정적인 PCR 산물을 얻을 수 있으며 품종구분의 표지인자로 활용하기에 최적의 재료가 될 수 있다. 둘째, 일단 polymorphism이 발견되면 그 표지인자 자체가 유전자이거나, 유전자와 극도로 가깝게 연관되어있기 때문에 차후 육종과제 실행에서의 DNA 표지인자의 실용성을 극대화 할 수 있기 때문이다.

본 항에서는 SCAR primer set들이 보여주었던 한계를 극복하기 위해서 유전자를 coding 하고 있는 'active chromosome'의 DNA를 선택적으로 STS-PCR primer set들로 전환하여 이를 품종구분에 적용하는 방안에 대하여 논의한다. 과제의 성공적 수행을 위해, 첫째, 각 primer 조합이 특정 유전자좌의 대립유전자를 정확히 표지하여 (specific allele tagging) 증폭산물을 생산하도록 하고 둘째, 모든 가용 방법들로 분석하여 비교하고 셋째 재현성이 강조된 신뢰성 높은 자료의 규합을 통하여 각 품종을 구분할 수 있는 기법을 확립하는데 중점을 두었다.

2) Active genome region-enriched semi-library로 부터 STS primer의 합성 및 적용

1차년도에서 개발된 SCAR와 active genome region library로부터 얻어진 gene-specific marker (STS-PCR) 들을 15종의 동양란 및 자생난류에 적용하여 계통 구별화 작업을 수행하였다. 계통 구별화를 위하여 사용된 STS-PCR primer-set는 총 25개이고, 이 중 18개 primer-set (Table 5)가 성공적인 PCR 증폭 산물을 보여 주었다.

본 연구과제에 사용된 STS-PCR primer-set 중 18개의 primer가 증폭산물을 생산하였고, 이중 7개에서 유용한 polymorphism을 발견할 수 있었으나 나머지 11개의 primer에서는 증폭은 되었으나 band들의 대부분이 같은 크기의 single band로 monomorphism을 나타내었다. 18개의 primer에서 얻어진 총 band 수는 22개였다. 유용한 polymorphism을 보여준 7개의 primer는 다음과 같이 polymorphism의 유형에 따라 두 개의 그룹으로 나눌 수 있었다. (1) 증폭산물을 생산하지 못하는 경우 (CE009, CE014, CE031, CE034, CE054); (2) 다른 크기의 증폭산물을 생산하는 경우 (CE005 and CE012). 이 들에서 얻어진 다형성의 결과는 11개의 monomorphic band 들을 제한효소로 처리하여 절단 양상을 관찰한 STS-CAPS와 함께 scoring하여 품종의 근연도 구분에 적합한가를 검정하여 보았다 (Appendix 2). 그러나 이러한 7개의 primer는 codominant한 특성을 가지는지에 대한 조금 더 심화된 연구가 필요하다. 총 18개의 primer 중 7개 (39%)에서 polymorphism을 발견하였다는 사실로부터 1차년도에서 수행한 active genome region-enriched semi-library의 구축과 여기에서 얻어진 유전자의 염기서열을 이용한 gene-specific marker의 개발은 상당히 효과적인 방법이라고 할 수 있다. 다만 증폭산물의 크기가 다른 경우와 같은 codominant한 형태가 나타나는 문제는 아마도 인트론과 같은 noncoding region이 포함되어 있는 경우로 생각된다. 따라서 3'-UTR로부터 유래된 reverse primer를 사용한다면 증폭산물의 크기가 다른 polymorphism은 발견하지 못하더라도 이 부분에서 발견되는 심한 염기서열의 변이 때문에 dominant한 marker를 개발할 수 있을 것으로 생각된다.

Table 5. Gene description of the gene-specific primers and their sequences

| Name | Putative identity (accession number) | Primer sequence |
|-------|--------------------------------------|---|
| CE005 | Unknown protein (AAK62450) | CATAGCAGACAATGCGGATCG/CAATGGGATCGCTTTGCTTTC |
| CE007 | Ribosomal protein (XP_008899) | GGTGGCAACTAACACGAGGG/GGAGCGGTGAAATGCGTAGAG |
| CE009 | Hypothetical protein (BAB19420) | GGTTGTTTCTGCTGCACGTG/CATCTCCCTCCACTTGCAGTG |
| CE010 | Auxin-induced protein (AAB38965) | CTAGAGTCGGCTTCGGTCAGC/TCACTCCCCATAGGACCTAC |
| CE011 | Unknown protein (NP_288437) | CAATGGTGGCAACTAACACG/GGAGCGGTGAAATGCGTAGAG |
| CE012 | Unknown protein (NP_192000) | GAGCGGGCTCCCATGC/GGACAACTTGACAGACTCATTAG |
| CE014 | ABRE3 (BAB12406) | GGCCAAGGGATAGACATGGAG/GCCTCCATCACATTCTGGTGC |
| CE016 | Sterility protein 1 (AAA32028) | AATGGGGAAGAGGACCGAAAC/GCGGACAGCTAATGCCTTCC |
| CE017 | ATP synthase (AAD50847) | CCTTCACGAGTACGTTACC/GGTCGAGATACTAGTCGGTCAGC |
| CE021 | Hypothetical protein (NP_054982) | CGTCACACTATGGGAGCTGG/CGCCGATGAGCACATTGAAC |
| CE025 | ORF122 (AAG12204) | CCTCTGTCTTACCGCGGC/CGAACGAGAATGGATAAGAGGC |
| CE031 | CG6283 gene product (AAF56652) | TCTGTTTTGGTGATATGAGCCTC/AGCCAATGCACCACTAGC |
| CE034 | Cytosine transferase (AAF68437) | GGAGTTGTCTCTCTCAAAGAAGGG/GGTGCAGCCTTATGATGCC |
| CE036 | Hypothetical protein (NP_084744) | CCTGTACACACCGCCCG/GTAGCTGAGAGCCCTCACAG |
| CE040 | P700 A2 (NP_042465) | GACCTATTGCTCATGCAATTTGGG/GATACTGTGTCCAATCCCGAAG |
| CE042 | Hypothetical protein (NP_178953) | CAGATCATAGCTCCGCCATGC/GTTCGCAAACCTCGACTTGTG |
| CE049 | Hypothetical protein (NP_084748) | GTCAACCTTTCGAACTGGTGC/CACTGCTTGGGAGCTCACG |
| CE054 | Alpha/beta hydrolase (AAG13432) | CGAAGAACCTAACAGAGGAGGC/CGTGGTAGTCTATCCAGGCG |

3) STS-CAPS를 통한 근연도 구분

18개의 STS-PCR primer로 증폭된 모든 증폭산물들을 CAPS marker를 개발하기 위하여 AluI, HinfI, HaeIII, RsaI의 4개의 제한효소로 절단하였다. 이들 중 4개의 STS-PCR 산물은 polymorphism을 보여주지 못하였으나, 나머지 14개에서는 polymorphism을 발견할 수 있었다. 이 중에서 특이적인 2가지의 그림 (CE016, CE019) 만을 아래에 예시하고 관찰된 결과를 아래에 부연 설명을 하였고, 나머지 다른 primer에 의한 결과들은 모두 표로 나타내었다 (Appendix 2).

CE016은 60℃에서 PCR을 실시했으며, 증폭된 band는 440의 진한 band와 190bp의 연한 2가지 band가 나타났다. AluI에서는 모든 품종에서 220X2와 190 bp의 동일한 band들이 나타났으며 HinfI에서는 440 bp의 band들만 digestion처리가 되어졌다. 건란 3종류와 제주한란11과 제주한란, 또한 완도유향춘란, 대만보세, 백화보세, 한죽, 미래에서는 295, 145 bp의 band들이 관찰되었으며, 록화죽백란, 죽백란, 진도춘란, 장성춘란, 춘란에서는 295, 105, 40 bp의 polymorphic band들이 관찰되었다.

HaeIII서는 모든 품종이 205, 195, 40 bp의 동일 band로 구분되었으며 RsaI에서도 310, 130 bp의 동일 band로 구분되어졌다 (Figure 4).

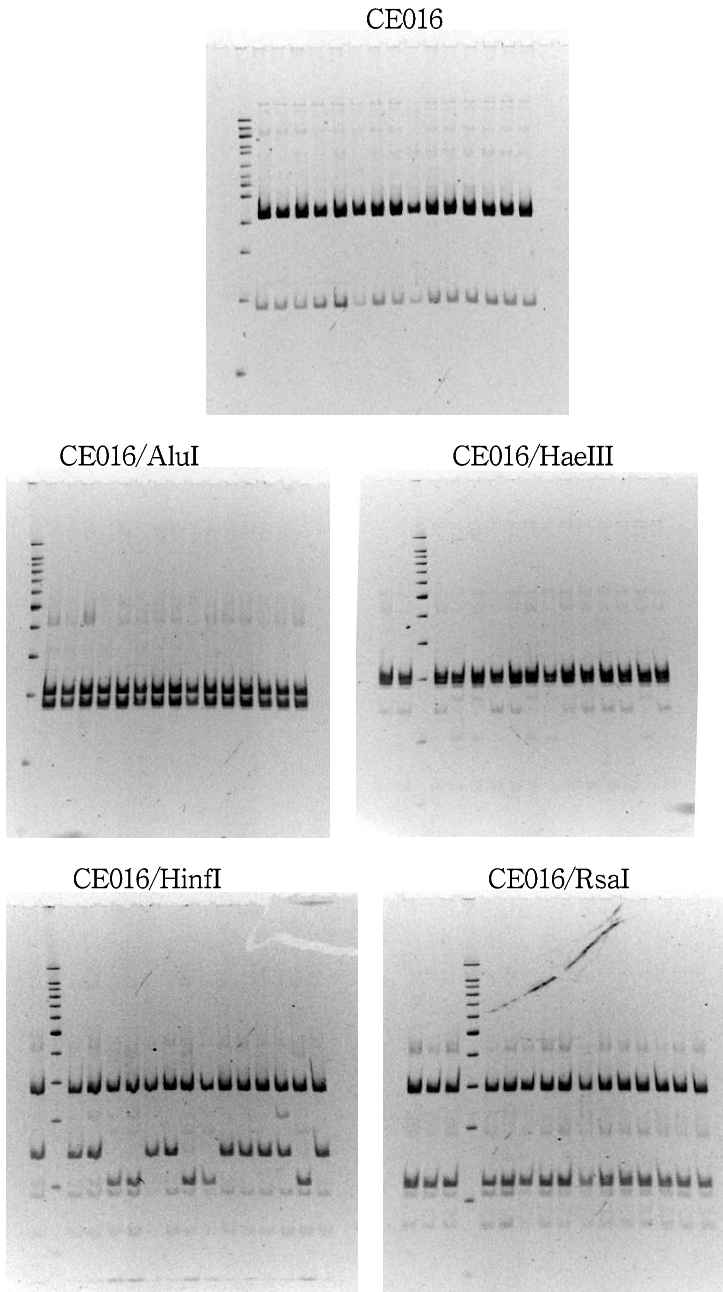


Figure 4. PCR products using CE016 primer-set and their restriction enzyme digested products.

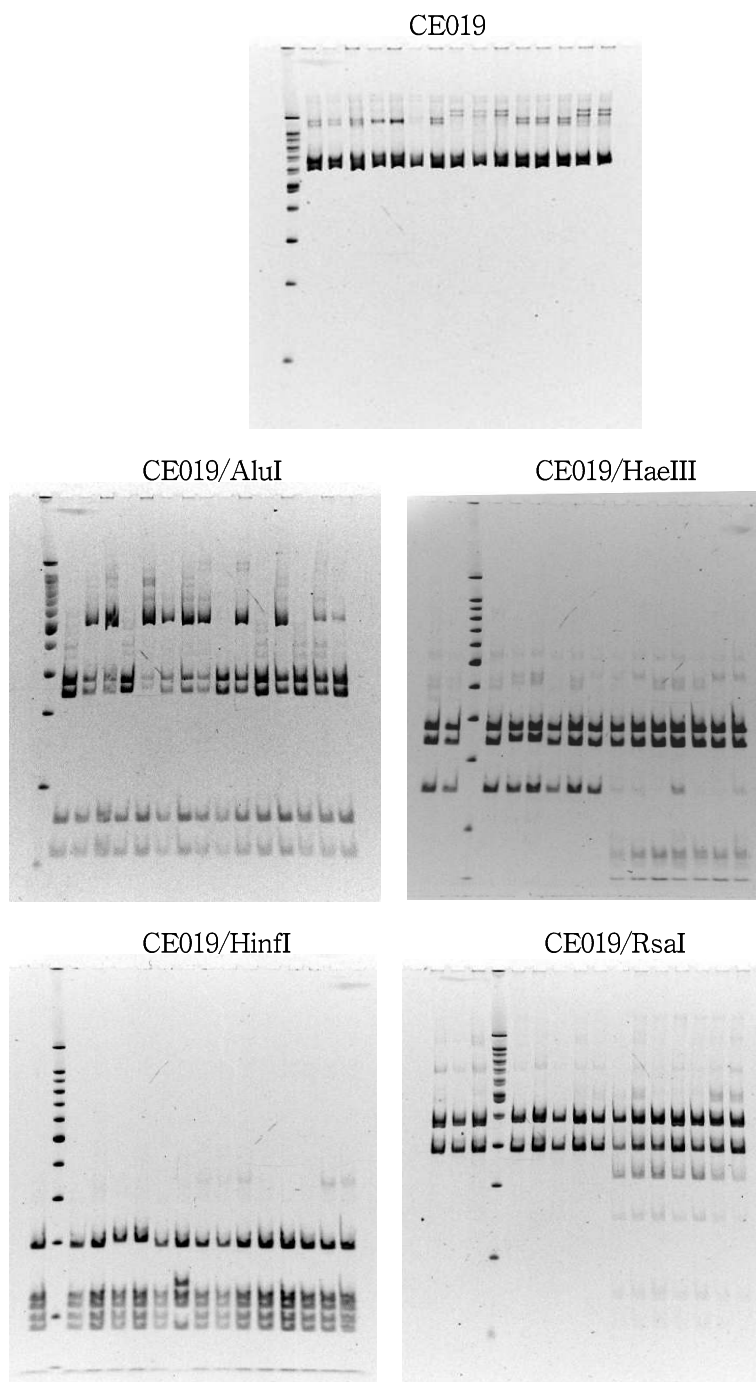


Figure 5. PCR products using CE016 primer-set and their restriction enzyme digested products.

CE019는 60℃에서 PCR을 실시했으며, 증폭된 크기는 록화죽백란, 죽백란은 700 bp이고 나머지 품종들은 690 bp로 나타났다. AluI을 처리하였을 때 죽백란에서는 560, 80, 60 bp로, 건란(이종석), 록화죽백란, 장성춘란, 대만보세, 한죽, 춘죽, 미래에서는 290, 260, 80, 60 bp로 구분되어졌으며 건란(중국), 건란(군산), 제주한란11과 제주한란, 진도춘란, 완도유향춘란, 백화보세에서는 600, 290, 260, 85x2, 60 bp의 polymorphism으로 나타났다. HinfI에서는 제주한란은 200, 150, 130, 120, 90 bp로, 록화죽백란, 죽백란은 210, 130, 120, 100, 90, 50 bp로, 나머지 품종들은 200, 130, 120, 100, 90, 50 bp의 polymorphic band들이 관찰되었다. HaeIII에서는 록화죽백란, 죽백란은 290, 250, 160 bp로, 건란 3종류와 제주한란11과 제주한란, 진도춘란에서는 290, 240, 160 bp로, 장성춘란, 완도유향춘란, 대만보세, 백화보세, 한죽, 춘죽, 미래에서는 290, 240, 70, 50, 40 bp의 polymorphism이 관찰되었다. RsaI에서는 록화죽백란, 죽백란은 405, 295 bp로, 그 나머지 품종에서는 395, 295 bp의 동일한 band들이 나타났다 (Figure 5).

STS-PCR과 CAPS에서 발견되는 polymorphic band 모두를 0 (band가 없는 경우)과 1 (band가 있는 경우)로 구별하여 binary data matrix를 만들었다. 그리고 이 matrix를 Nei와 Li (1979)의 공식을 이용하여 계산결과를 similarity matrix로 만들었다 (Table 6). Similarity value는 춘란 (장성)과 한란 11 (제주도) 에서 0.456으로 가장 낮게 나왔고, 건란 1과 건란 2가 0.981로 가장 높게 나왔다. 이 결과는 전통적인 분류에서의 차이와 일치하는 것을 보여주고 있다. 이 similarity data로 UPGMA clustering을 수행하여 phenogram을 제작하였다.

Table 6. Matrix of pairwise genetic distance among 15 Cymbidiums

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| 1 | - | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 0.981 | - | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 0.800 | 0.816 | - | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 0.494 | 0.515 | 0.578 | - | | | | | | | | | | | |
| 5 | 0.594 | 0.589 | 0.650 | 0.926 | - | | | | | | | | | | |
| 6 | 0.621 | 0.651 | 0.772 | 0.696 | 0.590 | - | | | | | | | | | |
| 7 | 0.675 | 0.706 | 0.791 | 0.631 | 0.669 | 0.863 | - | | | | | | | | |
| 8 | 0.641 | 0.650 | 0.606 | 0.467 | 0.543 | 0.590 | 0.752 | - | | | | | | | |
| 9 | 0.635 | 0.633 | 0.604 | 0.513 | 0.609 | 0.456 | 0.687 | 0.822 | - | | | | | | |
| 10 | 0.683 | 0.669 | 0.716 | 0.494 | 0.594 | 0.621 | 0.775 | 0.743 | 0.864 | - | | | | | |
| 11 | 0.650 | 0.596 | 0.666 | 0.589 | 0.566 | 0.636 | 0.675 | 0.623 | 0.708 | 0.833 | - | | | | |
| 12 | 0.641 | 0.623 | 0.691 | 0.578 | 0.556 | 0.651 | 0.666 | 0.598 | 0.729 | 0.858 | 0.958 | - | | | |
| 13 | 0.692 | 0.698 | 0.606 | 0.608 | 0.601 | 0.621 | 0.632 | 0.606 | 0.729 | 0.811 | 0.846 | 0.854 | - | | |
| 14 | 0.641 | 0.660 | 0.572 | 0.717 | 0.679 | 0.590 | 0.598 | 0.606 | 0.760 | 0.743 | 0.760 | 0.769 | 0.880 | - | |
| 15 | 0.783 | 0.779 | 0.683 | 0.578 | 0.669 | 0.575 | 0.708 | 0.641 | 0.833 | 0.850 | 0.783 | 0.791 | 0.880 | 0.829 | - |

Phenogram을 제작한 결과 (Figure 6), 15개의 동양란은 3개 주요 그룹과 6개의 소그룹으로 나누어 졌다. 건란 1, 2, 3이 제1소그룹, 제주 한란과 제주 한란 11이 제2소그룹, 춘란 진도, 장성, 완도가 제3소그룹, 대만 보세와 백화 보세가 제4소그룹, 한죽란, 춘죽란, 춘한란이 제5소그룹, 록화죽백란과 죽백란이 제6소그룹에 속하였다.

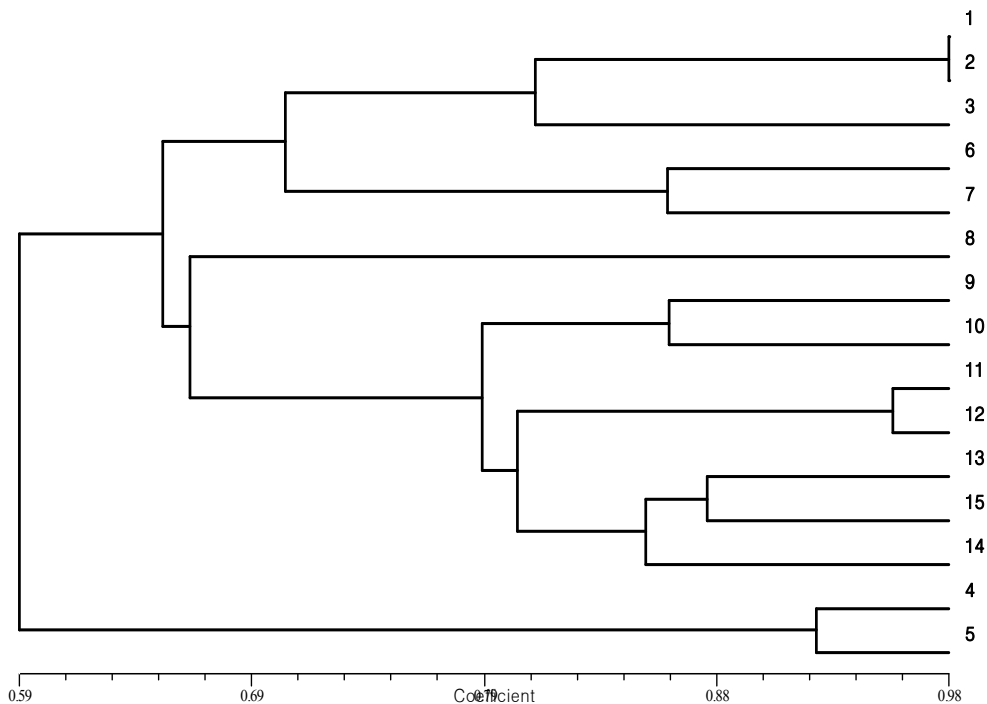


Figure 6. Phenogram of 15 orchid genotypes based on marker difference by UPGMA cluster analysis of the dissimilarity values. Numbers are accession number of 15 genotypes shown in table 1. Values on the baseline indicate the average genetic distances between lines.

이러한 분류는 전통적인 분류법과 완벽하게 일치하는 결과이다. 따라서 본 과제에서 개발된 STS-PCR marker와 CAPS marker와 이 marker들을 개발하기 위한 접근 방법은 동양란의 품종이나 원산지를 구분하는데 최적의 방법이라 생각된다.

라. URP 표식인자를 이용한 근연도 분석

연구 수행 결과 얻어진 7개의 retrotransposon marker와 RAPD marker는 15종의 동양란에서 genotyping을 위한 충분한 polymorphism과 정확성을 보여주지 못하였다. Retrotransposon과 RAPD marker의 불충분한 다형성을 보충하기 위하여 URP marker를 15개의 동양란 reference 품종에 적용하여 보았다. URP는 Universal

Rice Primer라는 것으로 우리나라 재래종 벼인 앵미 (잡초성 벼)의 염색체 유전자를 분리, 구조해석 연구를 수행하던 중에 개발된 것으로 동물, 식물 및 미생물을 포함하는 다양한 생물종의 핵산 지문에 모두 적용 가능한 표지유전자이다. 이를 동양란 및 자생난류의 계통 구별화 작업에의 적용하기위한 실험을 2차년도에 수행하였고, 그 결과를 분석하여 보았다. 총 12개의 URP primer-set를 이용하여 PCR을 수행한 결과 중 URP 4, 9, 10이라는 3가지에 의해 증폭된 DNA의 사진 (Figure 7)만을 첨가하고 나머지 9가지는 모두 표로 나타내었다 (Appendix 3).

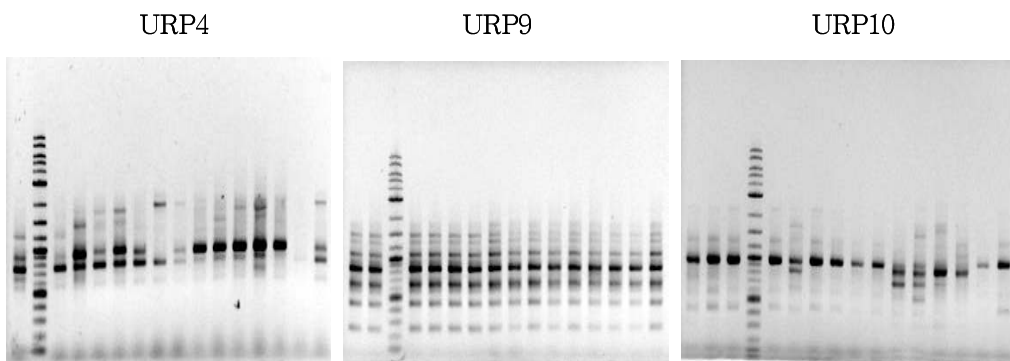


Figure 7. Example of URP primers application to detect polymorphism among 15 Cymbidium lines. Detection of polymorphism using URP primer-sets #4, #9 and #10.

URP에 의하여 충분한 다형성이 검출된다는 것을 2차년도의 결과에서 알 수 있었기 때문에 동양란의 genotyping을 시도하였다. 이것 역시 RAPD와 같은 증폭산물의 유무로 분석을 하였고, 얻어진 근연도는 Table 7 과 Figure 8 에 나타내었다.

Table 7. Matrix of pairwise genetic distance among 15 *Cymbidiums* (from URP)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| 1 | - | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 0.861 | - | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 0.676 | 0.723 | - | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 0.707 | 0.784 | 0.846 | - | | | | | | | | | | | |
| 5 | 0.492 | 0.507 | 0.569 | 0.630 | - | | | | | | | | | | |
| 6 | 0.738 | 0.846 | 0.784 | 0.907 | 0.630 | - | | | | | | | | | |
| 7 | 0.692 | 0.676 | 0.615 | 0.738 | 0.553 | 0.707 | - | | | | | | | | |
| 8 | 0.523 | 0.538 | 0.538 | 0.600 | 0.600 | 0.661 | 0.769 | - | | | | | | | |
| 9 | 0.553 | 0.569 | 0.600 | 0.630 | 0.661 | 0.661 | 0.738 | 0.846 | - | | | | | | |
| 10 | 0.415 | 0.461 | 0.492 | 0.523 | 0.646 | 0.584 | 0.630 | 0.830 | 0.830 | - | | | | | |
| 11 | 0.461 | 0.538 | 0.569 | 0.600 | 0.600 | 0.600 | 0.523 | 0.630 | 0.630 | 0.707 | - | | | | |
| 12 | 0.446 | 0.400 | 0.523 | 0.523 | 0.523 | 0.553 | 0.507 | 0.707 | 0.646 | 0.692 | 0.707 | - | | | |
| 13 | 0.523 | 0.538 | 0.476 | 0.538 | 0.507 | 0.600 | 0.584 | 0.784 | 0.692 | 0.738 | 0.661 | 0.738 | - | | |
| 14 | 0.630 | 0.615 | 0.646 | 0.676 | 0.553 | 0.676 | 0.753 | 0.800 | 0.707 | 0.661 | 0.584 | 0.692 | 0.707 | - | |
| 15 | 0.646 | 0.692 | 0.630 | 0.753 | 0.630 | 0.784 | 0.676 | 0.692 | 0.723 | 0.615 | 0.600 | 0.646 | 0.753 | 0.707 | - |

Phenogram을 제작한 결과 (Figure 8), 15개의 동양란은 3개 주요 그룹과 6개의 소그룹으로 나누어 졌다. 건란 1, 2 가 제1소그룹, 건란 3, 녹화죽백란, 제주 한란11 이 제2소그룹, 제주한란, 춘죽란이 제3소그룹, 춘란 진도, 장성, 완도가 제4소그룹, 한죽란, 춘죽란이 제5소그룹, 대만보세, 백화보세, 죽백란이 제6소그룹에 속하였다.

이러한 분석결과는 RAPD보다 월등히 정확하였으나, 역시 STS-CAPS에 비하여는 부정확함을 알 수 있었다. 그러나 분명히 URP에 의하여 충분한 다형성이 검출된다는 것을 알 수 있었고, 이를 동양란의 genotyping에 이용가능 하다는 사실을 현재까지의 결과로 예측할 수 있었다. 다만, URP를 이용한 genotyping은 조금 더 많은 수의 URP primer를 PCR에 이용한 후에 다시 시행한다면 RAPD의 간결함과 STS, CAPS와 같은 정확함을 갖춘 표식인자가 될 수 있을 것으로 생각된다.

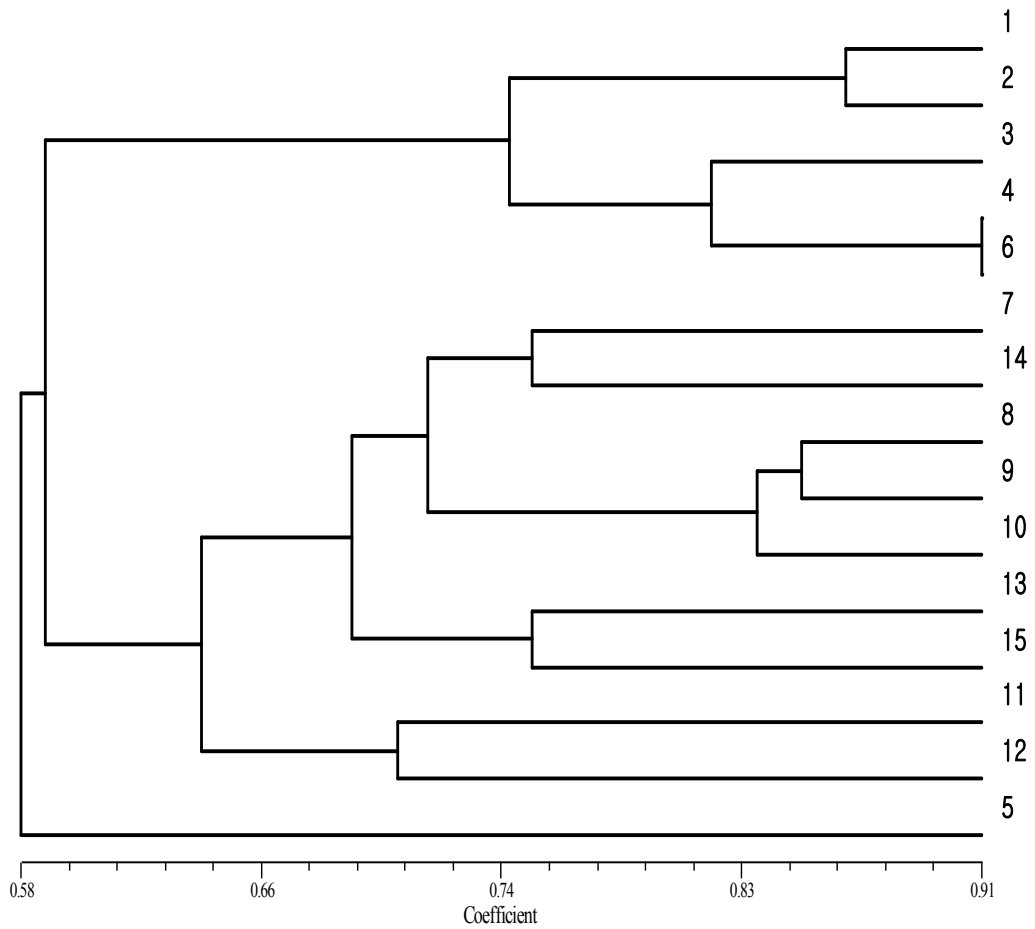


Figure 8. Phenogram of 15 orchid genotypes based on marker difference by UPGMA cluster analysis of the dissimilarity values (from URP).

마. SNP 표식인자의 개발 가능성 검토

2차년도 연구에서 수행된 STS-CAPS에서 무작위로 제한효소를 적용하는 방법을 개선하고, 보다 품종 특이적인 표식인자의 개발을 위하여 SNP (Single Nucleotide Polymorphism, 단일염기다형성)를 탐색하는 실험을 수행하였다.

| | | | | | | |
|---------------------|---|---|--|---|---|---|
| 4 | | M | | - | | 3 |
| GGATCGGGTTTCGAGAGGA | G | GACACCCCAACTTCGTTGGATCCTTCTATTCCAAGACGA | | | | |
| 4 | | M | | - | 2 | 4 |
| GGATCGGGTTTCGAGAGGA | G | GACACCCCAACTTCGTTGGATCCTTCTATTCCAAGACGA | | | | |
| 4 | | | | - | | 5 |
| GGATCGGGTTTCGAGAGGA | G | GACACCCCAACTTCGTTGGATCCTTCTATTCCAAGACGA | | | | |
| 4 | | F | | - | 1 | 3 |
| GGATCGGGTTTCGAGAGGA | G | GACACCCCAACTTCGTTGGATCCTTCTATTCCAAGACGA | | | | |
| 4 | | | | - | 1 | 3 |
| GGATCGGGTTTCGAGAGGA | A | GACACCCCAACTTCGTTGGATCCTTCTATTCCAAGACGA | | | | |
| 4 | | F | | - | 1 | 5 |
| GGATCGGGTTTCGAGAGGA | A | GACACCCCAACTTCGTTGGATCCTTCTATTCCAAGACGA | | | | |

| | | | | | | |
|--|--|---|--|---|---|---|
| 4 | | M | | - | | 3 |
| AGGCCATGGTATATGACATGCACTCTTGATTAAGTGTGAGAAATGCTATATTTATGGTTT | | | | | | |
| 4 | | M | | - | 2 | 4 |
| AGGCCATGGTATATGACATGCACTCTTGATTAAGTGTGAGAAATGCTATATTTATGGTTT | | | | | | |
| 4 | | | | - | | 5 |
| AGGCCATGGTATATGACATGCACTCTTGATTAAGTGTGAGAAATGCTATATTTATGGTTT | | | | | | |
| 4 | | F | | - | 1 | 3 |
| AGGCCATGGTATATGACATGCACTCTTGATTAAGTGTGAGAAATGCTATATTTATGGTTT | | | | | | |
| 4 | | | | - | 1 | 3 |
| AGGCCATGGTATATGACATGCACTCTTGATTAAGTGTGAGAAATGCTATATTTATGGTTT | | | | | | |
| 4 | | F | | - | 1 | 5 |
| AGGCCATGGTATATGACATGCACTCTTGATTAAGTGTGAGAAATGCTATATTTATGGTTT | | | | | | |

| | | | | | | |
|--|--|---|--|---|---|---|
| 4 | | M | | - | | 3 |
| CGTTTGACCTCGGTGCTTGATAGTTTAGTATCATCCCCTTTTCTTTTTTGTGATAAATCA | | | | | | |
| 4 | | M | | - | 2 | 4 |
| CGTTTGACCTCGGTGCTTGATAGTTTAGTATCATCCCCTTTTCTTTTTTGTGATAAATCA | | | | | | |
| 4 | | | | - | | 5 |
| CGTTTGACCTCGGTGCTTGATAGTTTAGTATCATCCCCTTTTCTTTTTTGTGATAAATCA | | | | | | |
| 4 | | F | | - | 1 | 3 |
| CGTTTGACCTCGGTGCTTGATAGTTTAGTATCATCCCCTTTTCTTTTTTGTGATAAATCA | | | | | | |
| 4 | | | | - | 1 | 3 |
| CGTTTGACCTCGGTGCTTGATAGTTTAGTATCATCCCCTTTTCTTTTTTGTGATAAATCA | | | | | | |

CGTTTGACGTCGGTGCTTGATAGTTTAGTATCATCCCCTTTTCTTTTTTGTGATAAAATCA
4 F - 1 5
CGTTTGACGTCGGTGCTTGATAGTTTAGTATCATCCCCTTTTCTTTTTTGTGATAAAATCA

4 M - 3
AGAAGATAGTTTTTGGTGTTAGATTTTTGGAGTAAAGAATGTCTTTAAACGATGATGTT
4 M - 2 4
AGAAGATAGTTTTTGGTGTTAGATTTTTGGAGTAAAGAATGTCTTTAAACGATGATGTT
4 - 5
AGAAGATAGTTTTTGGTGTTAGATTTTTGGAGTAAAGAATGTCTTTAAACGATGATGTT
4 F - 1 3
AGAAGATAGTTTTTGGTGTTAGATTTTTGGAGTAAAGAATGTCTTTAAACGATGATGTT
4 - 1 3
AGAAGATAGTTTTTGGTGTTAGATTTTTGGAGTAAAGAATGTCTTTAAACGATGATGTT
4 F - 1 5
AGAAGATAGTTTTTGGTGTTAGATTTTTGGAGTAAAGAATGTCTTTAAACGATGATGTT

4 M - 3
CTCTTTTGACTTGGTTGACTCGAGGAATGGGTTGATGATTTTGGGCGGATGTGTAGAAAT
4 M - 2 4
CTCTTTTGACTTGGTTGACTCGAGGAATGGGTTGATGATTTTGGGCGGATGTGTAGAAAT
4 - 5
CTCTTTTGACTTGGTTGACTCGAGGAATGGGTTGATGATTTTGGGCGGATGTGTAGAAAT
4 F - 1 3
CTCTTTTGACTTGGTTGACTCGAGGAATGGGTTGATGATTTTGGGCGGATGTGTAGAAAT
4 - 1 3
CTCTTTTGACTTGGTTGACTCGAGGAATGGGTTGATGATTTTGGGCGGATGTGTAGAAAT
4 F - 1 5
CTCTTTTGACTTGGTTGACTCGAGGAATGGGTTGATGATTTTGGGCGGATGTGTAGAAAT

4 M - 3
GGATAGGCTTATGATTATAGCATGCTAAGCTCAATTTTCAAATTTGTGTGAACAGTACTA
4 M - 2 4
GGATAGGCTTATGATTATAGCATGCTAAGCTCAATTTTCAAATTTGTGTGAACAGTACTA
4 - 5
GGATAGGCTTATGATTATAGCATGCTAAGCTCAATTTTCAAATTTGTGTGAACAGTACTA

4 F - 1 3
 GGATAGGCTTATGTTATAGCATGCTAAGCTCAATTTTGAAATTTGTGTGAACAGTACTA
 4 - 1 3
 GGATAGGCTTATGTTATAGCATGCTAAGCTCAATTTTGAAATTTGTGTGAACAGTACTA
 4 F - 1 5
 GGATAGGCTTATGTTATAGCATGCTAAGCTCAATTTTGAAATTTGTGTGAACAGTACTA

4 M - 3
 CCTCATGAGTTCAGTGCATTGAATTTCCGATTGTAGATCCATTAATCAGTAATCACTGAA
 4 M - 2 4
 CCTCATGAGTTCAGTGCATTGAATTTCCGATTGTAGATCCATTAATCAGTAATCACTGAA
 4 - 5
 CCTCATGAGTTCAGTGCATTGAATTTCCGATTGTAGATCCATTAATCAGTAATCACTGAA
 4 F - 1 3
 CCTCATGAGTTCAGTGCATTGAATTTCCGATTGTAGATCCATTAATCAGTAATCACTAAA
 4 - 1 3
 CCTCATGAGTTCAGTGCATTGAATTTCCGATTGTAGATCCATTAATTATTAATCACTAAA
 4 F - 1 5
 CCTCATGAGTTCAGTGCATTGAATTTCCGATTGTAGATCCATTAATTATTAATCACTAAA

***** * ***** **

4 M - 3
 AAGTGATGTTCTTGACTTATTTGCTCTGACTATAAAGGAAATAAACTACGGATAGGCAA
 4 M - 2 4
 AAGTGATGTTCTTGACTTATTTGCTCTGACTATAAAGGAAATAAACTACGGATAGGCAA
 4 - 5
 AAGTGATGTTCTTGACTTATTTGCTCTGACTATAAAGGAAATAAACTACGGATAGGCAA
 4 F - 1 3
 AAGTGATGTTCTTGACTTATTTGCTCTGACTATAAAGGAAATAAACTACGGATAGGCAA
 4 - 1 3
 AAGTGATGTTCTTGACTTATTTATCTCTGACTATAAAGGAAATAAACTACGGATAGGCAA
 4 F - 1 5
 AAGTGATGTTCTTGACTTATTTATCTCTGACTATAAAGGAAATAAACTACGGATAGGCAA

4M_3 TCCTAAATGT
 4M_24 TCCTAAATGT
 4_5 TCCTAAATGT

4F_13 TCCTAAATGT
 4_13 TCCTAAATGT
 4F_15 TCCTAAATGT

Figure 9. 제주한란(F), 록화죽백란(M), 한죽란(FxM)의 단일염기다형성

이를 위하여 연구책임자로부터 1, 2차년도에서 사용하였던 동양란 및 자생난 일부와 그들의 교배종 및 부모종 등 총 35 품종 (Table 2) 을 새로이 분양 받았다. 35개의 품종 중 제주한란과 녹화죽백란, 그리고 이 둘의 교배종인 한죽란 이렇게 한 그룹과 건란과 대만보세와 이 둘의 교배종인 건보란 이라는 또 다른 그룹을 재료로 선정하였다. 이들로부터 추출한 DNA로 기능이 알려지지 않은 단백질을 코딩하는 부위를 증폭하는 표식인자로 2차년도에서 개발된 CE005번 primer set를 사용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 DNA 절편의 염기서열을 분석한 후, 이 염기서열들을 다중서열상동성 검색을 ClustalW를 이용하여 수행하였다. 그 결과 이들 염기서열 사이에 단일염기다형성이 존재함을 알 수 있었다 (Figure 9).

단일염기다형성을 보이는 DNA 염기서열을 이용하여 간단히 phylogenetic tree를 그려 본 결과 부모와 자식의 구별이 가능함을 알 수 있었다 (Figure 10). 그리고 이 단일염기의 차이를 계통구분에 이용할 수 있는지 알아보기 위하여 제한효소 부위가 서로 다른지를 조사하였다. 그 결과 7군데의 단일염기다형성에 부위에 의하여 잘리는 제한효소의 종류가 다름을 발견하였다 (Figure 11, 12).

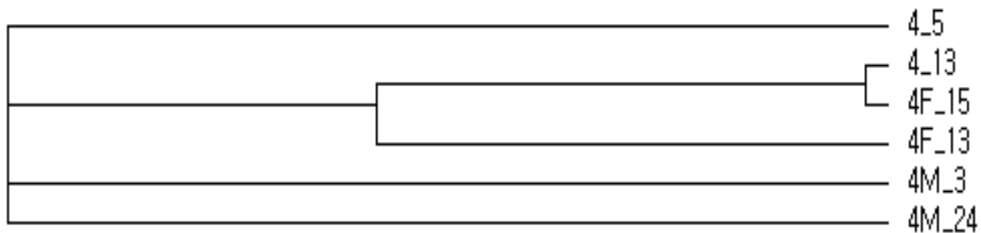


Figure 10. 제주한란(F), 록화죽백란(M), 한죽란(FxM)의 단일염기다형성 부위를 이용한 phylogenetic analysis

따라서 단일염기다형성을 가지는 부위의 동정을 통하여 보다 효과적이고, 직접적으로 계통구분을 가능케 할 수 있음을 알 수 있게 되었다. 기존에 수행하던 STS-CAPS의 경우 다형성 유무를 알기위하여 여러 종류의 제한효소를 처리해봐야 하지만, 본 실험에서 얻어진 결과를 이용하면 손쉽게 표식인자의 선정과 제한효소의 선정이 이루어지므로 실험상의 노력을 줄일 수 있음을 알 수 있다. 게다가 염기서열 정보를 직접적으로 확보하기 때문에 확보된 염기서열 만으로도 충분히 계통의 구분이 가능하다는 장점과 같은 유전자좌 간의 비교이기 때문에 신뢰도 면에서도 RAPD나 URP와 같은 기존의 표식인자에 비하여 월등하다고 할 수 있다.

바. 동양란 품종구분을 위한 표식인자 DB 모형 구축

DNA 표식인자를 이용한 실질적이고 체계적인 품종구분 및 관리체계의 확보를 위하여 개발되어진 표식인자들은 품종간의 구별이나 근연관계의 구별에 이용하기 위하여 데이터베이스화를 수행하고 있는 중이다. 다만 개발되어진 DNA 표식인자들이 한 종류 혹은 몇 종류의 품종들에 대하여만 제한적으로 구분이 가능하기 때문에 이 들을 모든 동양란 품종의 동시 구분을 위하여 통합하기 보다는 관찰된 PCR 증폭산물이나 제한효소 처리에 의한 절단산물들을 품종별로 구분하여 이용하는 것이 타당할 것으로 생각되기 때문에 반복적으로 재확인 된 결과들의 경우 gel image와 분석표들을 web site에 등록하여 공개하기 위한 작업을 수행하였다.

```

1
GGATCGGGTTTCGAGAGGAGGACACCCCAACTTCGTTGGATCCTTCTATTCCAAGACGAAGCCATGGTATATG
ACATG 80
1
CCTAGCCCAAAGCTCTCCTCCTGTGGGGTTGAAGCAACCTAGGAAGATAAGGTTCTGCTTCCGGTACCATATAC
TGTAC 80
MboI MnlII MmeI BseRI BamHI AlwI CviJI FatI
DpnI AlwI AlwI NlaIV HaeIII
BstKTI Hpy188III BstYI BsaJI
MnlII MboI BtgI
TaqI DpnI NcoI
BstKTI StyI
FatI
Hin4I
NlaIII

8
CACTCTTGATTAAGTGTGAGAAATGCTATATTTATGGTTTCGTTTGACCTCGGTGCTTGATAGTTTAGTATCAT
CCCCTT 160
8
GTGAGAACTAATTCACACTCTTACGATATAAATACCAAAGCAAAGTGGAGCCACGAAGTATCAAATCATAGTA
GGGGAA 160
NspI MseI Hin4I BsaJI MnlII BstF5I
NlaIII FokI
HpyCH4V
Hpy188III

```

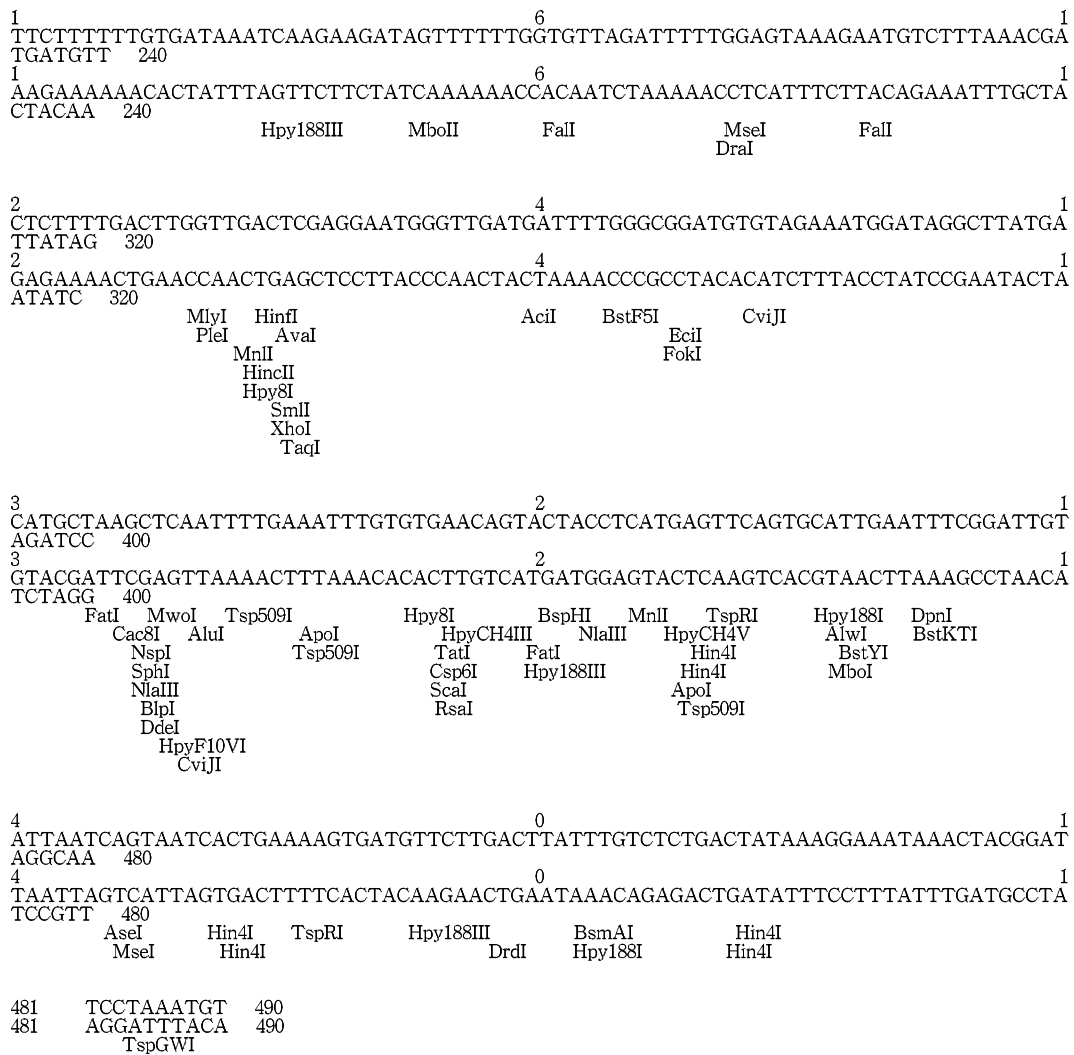


Figure 11. 록화죽백란(M)의 제한효소 부위

```

1      GGATCGGGTTTCGAGAGGAAGACACCCCCAACTTCGTTGGATCCTTCTATTCCAAGACGAAGGCCATGGTATATGACATG
80     CCTAGCCCAAAGCTCTCCTTCGTGGGGGTTGAAGCAACCTAGGAAGATAAGGTTCTGCTCCGGTACCATATACTGTAC
1      80
MboI  MnlI  MmeI  BbsI  MboII  AlwI  NlaIV  AlwI  CviII  FatI
      DpnI  AlwI  Hpy188III  MboII  BamHI  AlwI  HaeIII
      BstKTI  TaqI  BstYI  BsaJI
      MboI  BtgI
      DpnI  NcoI
      BstKTI  StyI
      FatI
      Hin4I
      NlaIII

81     CACTCTTGATTAAGTGTGAGAAATGCTATATTTATGGTTTCGTTTGACGTCGGTGCTTGATAGTTTAGTATCATCCCCTT
160    GTGAGAACTAATTCACACTCTTACGATATAAAATACCAAAGCAAAGTGCAGCCACGAACTATCAAATCATAGTAGGGGAA
81     160
NspI  MseI  Hin4I  BsaHI  FokI  BstF5I
      NlaIII  HpyCH4IV  Zral
      HpyCH4V  AatII
      Hpy188III  Tail
      Hpy99I

161    TTCTTTTGTGATAAAATCAAGAAGATAGTTTGGTGTAGATTTTGGAGTAAAGAATGCTTTAAACGATGATGTT
161    AAGAAAAAACACTATTTAGTCTTCTATCAAAAAACCACAATCTAAAAACCTCATTCTTACAGAAATTTGCTACTACAA
240
      Hpy188III  MboII  Fall  MseI  Fall
      Dral

241    CTCTTTTGACTTGGTTGACTCGAGGAATGGGTTGATGATTTTGGCGGATGTGTAGAAATGGATAGGCTTATGGTTATAG
320    GAGAAAACTGAACCAACTGAGCTCCTTACCCAACACTAAAACCCGCTACACATCTTTACCTATCCGAATACCAATATC
241    320
      MlyI  Hinfi  Acil  BstF5I  CviJI
      PleI  Aval  EciI
      MnlI  FokI
      HincII
      Hpy8I
      SmlI
      XhoI
      TaqI

321    CATGCTAAGCTCAATTTTGAATTTGTGTGAACAGTACTACCTCATGAGTTCAGTGCATTGAATTTGGGATGTAGATCC
400    GTACGATTCGAGTTAAAACCTTAAACACACTGTGCATGATGGAGTACTCAAGTCACGTAACCTAAAAGCCTAACATCTAGG
321    400
FatI  MwoI  Tsp509I  Hpy8I  BspHI  MnlI  TspRI  Hpy188I  DpnI
      Cac8I  AluI  ApoI  HpyCH4III  NlaIII  HpyCH4V  AlwI  BstKTI
      NspI  Tsp509I  TafI  FatI  Hpy188III  Hin4I  BstYI
      SphI  Csp6I  Hpy188III  Hin4I  MboI
      NlaIII  Scal  ApoI
      BfpI  RsaI  Tsp509I
      DdeI
      HpyF10VI
      CviJI

401    ATTAATTATTAATCACTAAAAAGTGATGTTCTTGACTTATTTATCTCTGACTATAAAGGAAAATAAACTACGGATAGGCAA
480    TAATTAATAATTAGTGATTTTCACTACAAGAACTGAATAAATAGAGACTGATATTCCTTTATTTGATGCCTATCCGTT
401    480
AseI  AseI  Hpy188III  Hpy188I  Hin4I
      MseI  MseI  Hin4I
      Tsp509I  Hin4I

481    TCCTAAATGT 490
481    AGGATTTACA 490
      TspGWI

```

Figure 12. 제주한란(F)의 제한효소 부위

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구목표 및 평가착안점에 입각한 목표 달성도

제 1 항 연구목표

우리나라 남부지방에 자생하는 춘란과 제주도에 자생하는 한란, 죽백란 등 자생 Cymbidium 속 식물을 육종재료로 이용하여 중간잡종을 육성하므로써 난의 잡종강세 현상을 활용하고자 한다.

환경적응성이 뛰어나고 엽성이 좋은 중간잡종의 신품종을 품종화하므로써 수입물량의 대부분을 차지하고 있는 관엽성 난류를 본 개발 품종으로 대체하고 브랜드화하고자 한다. 특히 선발된 우수개체는 조직배양을 통하여 대량 생산체계를 구축하는 한편 품종의 보호를 위하여 특허를 획득하고자 한다.

세부과제의 연구목표는 동양란 품종간의 유전적 거리를 추정할 수 있는 DNA marker를 개발하고, 이를 적극적으로 활용하여 난 재배농가에서 새로운 동양란 품종의 육성을 위한 교잡육종에 필요한 기초자료를 제공하는 것이다. 이를 위하여 주로 SCAR 및 CAPS marker, Gene-specific marker, Retrotransposon marker 위주로 약 50개의 DNA 표식인자를 확보하고, 개발된 DNA 표식인자를 이용하여 품종 및 계통의 구별화 및 변이체와 F1 식별 작업에의 적용가능성을 검정한다. 그리고 자생 심비디움 속 및 자생난류의 품종구분에 적용이 가능한 표식인자들을 모아 DB의 모형을 구축한다.

제 2 항 평가의 착안점 및 목표의 달성도

- 실용화가 가능한 우수잡종 식물이 개발되었는가?

: 엽성이 우수하며 꽃이 잘 피는 춘란과 한란의 중간 교잡종 2종류와 한간과 보세의 교잡종 1종류, 춘란소심과 보세란 교잡종 1종류 등이 선발되었으며 동양란과 서양란의 교잡종이 출현될 것으로 보인다.

- 선발된 F1의 성장점 배양을 통한 대량생산 체계가 구축되었는가?
: 춘란과 한란의 교잡종인 '미악'의 성장점 배양을 성공적으로 실시하여 근경을 증식 중이며 재분화 배지는 MS배지에 agar 7g/l, sucrose 30g/l, 활성탄 0.5g/l 과 NAA 0.1g/l 을 첨가한 배지를 적정배지로 선발하였다.
- 선발된 우수개체의 품종화가 이루어 지겠는가?
: 춘한란 '미악(米岳)'을 특허출원(출원번호 10-2005-00415913, 출원일 2005년 5월 30일) 하였으며, 한란과 보세의 교잡종도 특허출원 준비중이다.
- SCAR 및 CAPS marker가 개발되었는가?
: Polymorphic한 marker들을 선별하여 최종적으로 5개의 SCAR, 7개의 STS 그리고 14개의 CAPS marker가 개발되었다.
- Gene-Specific marker의 개발이 수행되었는가?
: 총 18개의 gene-specific marker가 active genome region semi-library로 개발되었다.
- Retrotransposon marker가 개발되었는가?
: Retrotransposon marker를 개발하였으나 동양란에 적용 시켜본 결과 유용하지 못함을 발견하여, URP marker를 적용하여 근연도 구분에 적용할 수 있음을 알 수 있었다.
- DNA 표식인자를 이용하여 품종 및 계통 구별화가 가능하게 되었는가?
: 15개의 동양란 reference 품종을 이용한 결과 STS와 CAPS로 정확히 구별이 가능함을 알 수 있었다.
- DNA 표식인자를 이용하여 동양란 변이체 구별화 작업을 수행하였는가?
: 개발된 모든 표식인자를 이용하여 작업을 수행하였고, STS와 CAPS로 정확히 구별이 가능하다는 것을 알 수 있었다.
- 동양란 품종구분을 위한 표식인자 DB가 구축되었는가?
: Web을 통한 접근이 가능하도록 구축하는 작업을 수행하였고, 최종보고 후 공개할 예정이다.

제 2 절 관련분야의 기술발전의 기여도

재현성이 매우 높은 DNA 인자들이 개발되었기 때문에 동양란의 품종 및 계통, F1과 변이체 등을 손쉽게 구별할 수 있는 기술적 기반을 마련하였으며, 품종개량 연구의 기초자료의 제공이라는 기여를 하였다. 그리고 육종기술적인 면에서 육종연한의 단축으로 새로운 품종의 동양란 생산을 위한 가격을 낮출 수 있다는 기여를 하였다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

동양란 신품종 개발을 위한 교배 수행 시 교배 가능한 영역 내에서 유전적으로 원거리인 품종의 선발에 사용할 계획이다. 그리고 새로이 개발된 동양란 품종의 법적인 권리보호를 위해서는 새 품종의 특성을 구별하여 줄 수 있는 형질검정용 표지인자로 사용할 것이다. 지금까지 사용되던 형태적, 생리적 표지인자를 이용한 불분명한 구분 방법을 대체하여 개발된 DNA 표식인자가 활용될 것이다. 이들을 활용하면 검정 절차가 단순화되어 시간과 경비를 절약할 수 있으며 동시에 검정결과의 일관성이 확보되고, 단기간 내에 원하는 형질들이 조합된 genotype을 용이하게 식별할 수 있게 되어 유망한 품종을 개발, 보호하는데 유용하게 사용될 것이다.

제 6 장 참고문헌

Anderson, N. L., and Anderson, N. G. (1979) Microheterogeneity of serum transferrin, haptoglobin and α 2HS glycoprotein examined by high resolution two-dimensional electrophoresis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 88: 258.

Becker, J., Vos, P., Kuiper, M., Salamini, F., and Heun, M. (1995) Combined

mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Molecular and General Genetics* 249: 65.

Bird, A. (1985) A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, Cp-G rich DNA. *Cell* 40: 91.

Boyes, J. and Bird, A. (1991) DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell* 64: 1123.

Georges, M., Gunawardana, A., Threadgill, D. W., Lathrop, M., Olsaker, I., Mishra, A., Sargeant, L. L., Schoeberlein, A. A., Steele, M. R., Terry, C., Threadgill, D. S., Zhao, X., Holm, T., Fries, R., and Womack, J. E. (1991) Characterization of a set of variable number of tandem repeat markers conserved in Bovidae. *Genomics* 11: 24.

Olson, M., Hood, L., Cantor, C., and Botstein, D. (1989) A common language for physical mapping of the human genome. *Science* 245: 1434.

Stallings, R. A., Ford, A. F., Nelson, D., Torney, D. C., Hildebrand, C. E., and Moyzis, R. K. (1991) Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics* 10: 807.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, A., and Tingey, S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 5631.

Winberg, B. C., Zhou, Z., Dallas, J. F., McIntyre, C. L., and Gustafson, J. P. (1993) Characterization of minisatellite sequences from *Oryza sativa*. *Genome* 36: 978.

Wu, K.K., Burnquist, W., Sorrells, M.E., Tew, T.L., Moore, P.H., and Tanksley, S.D. (1992) The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 294.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407.

Zhou, A. and Gustafson, J. P. (1995) Genetic variation detected by DNA fingerprinting with a rice minisatellite probe in *Oriza sativa*. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 481.

이종석 (2004) 제주한란의 자생환경 특성 및 분포에 관한연구. *한국환경복원녹화기술학회지* 7(1):40-49

이종석 (2003) 한국미기록 제주자생 소란의 특성. *원예과학기술지* 21(4):459-461

현명력, 최지용, 서정남, 소인섭, 이종석. (1999) 제주 자생 새우란, 금새우란, 왕새우란의 원예품종화. *원예과학기술지* 17(3):346-351

이종석, 박병모, 박학봉 (1999) 온시디움 'Aloha'의 개화에 미치는 GA₃, BA, zeatin 및 kinetin의 영향. *원예과학기술지* 17(2):134-135

이효연, 정재성, 이종석 (1998) EMS 처리에 의한 한란의 엽록소 결핍 돌연변이 식물체의 유도. *식물조직배양학회지* 25(3):183-187

이종석. 濟州寒蘭 (1994) 조직배양묘의 생육에 미치는 배양토의 영향. *한국원예학회지* 35(8):651-656

최수정, 이종석, 김지연 (1993) 무균발아법을 이용한 금릉변 '日章' (*Cymbidium pumilum* 'Iljang')의 증식에 관한 연구. *한국화훼연구회지* 2(1):35-42

주 의

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