

발 간 등 록 번 호

11-1543000-001951-01

개화 수명이 긴 수출전략용 호접란 신품종 육성 및 분자 표지 개발 최종보고서

2017. 12. 15.

주관연구기관 / 경북대학교
협동연구기관 / 강산농원

농림축산식품부

개화 수명이 긴 수출전략용
호접란 신품종 육성 및 분자 표지 개발

R&D Report

발간등록번호

11-1543000-001951-01

개화수명이 긴 수출전략용 호접란 신품종 육성 및 분자표지 개발

(Breeding long-lasting *Phalaenopsis* and molecular marker
development aiming for strategic export)

경북대학교

농림축산식품부

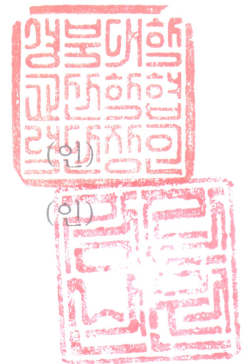
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “개화수명이 긴 수출전략용 호접란 신품종 육성 및 분자표지 개발” (개발기간 : 2013. 8. ~ 2017 . 8.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 12. 15.

주관연구기관명 : 경북대학교 산학협력단 (대표자) 최제용
협동연구기관명 : 강산난원 (대표자) 서재환



주관연구책임자 : 임기병

협동연구책임자 : 서재환

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	313009-4	해당 단계 연구 기간	2013.08.26 ~ 2017.08 .25.	단계 구분	4단계/ 4단계
연구 사업명	중 사업명	수출전략기술개발사업			
	세부 사업명	원예작물 신품종육성사업			
연구 과제명	대 과제명	개화수명이 긴 수출전략용 호접란 신품종 육성 및 분자표지 개발			
	세부 과제명	제1세부 : 개화수명이 긴 호접란 유전분석 및 마커개발 제1협동 : 개화수명이 긴 호접란 신품종 육성			
연구 책임자	임기병	해당단계 참여 연구원 수	총: 16명 내부: 3명 외부: 13명	해당단계 연구 개발비	정부:250,000천원 민간: 83,400천원 계:333,400천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 27명 내부: 3명 외부: 24명	총 연구개발비	정부:1,000,000천원 민간: 333,600천원 계:1,333,600천원
연구기관명 및 소속 부서명	경북대학교 산학협력단		참여기업명 강산난원		
요약				보고서 면수 : 213페이지	
<p>본 연구는 개화수명이 긴 호접란의 수출전략용 호접란 신품종 육성 및 분자표지 개발유전양식을 구명할 목적으로 실시하여 다음과 같은 결과를 달성하였다. ①우수 유전자원의 DB화 및 집단작성과 개화수명 유전양식의 특성 구명을 통한 개화수명이 긴 신품종 육성을 위한 기반조성 ②호접란의 엽록체 및 유전체 해독과 염색체정보 DB화, 개화수명 연관 분자표지 개발 ③우수 호접란 배수성 검정 및 FISH 핵형분석 ④우수 호접란의 변이체를 최소화 할 수 있는 기내 대량 증식방법 개발 ⑤개화수명이 긴 호접란 3품종 등록 및 2품종 출원 ⑥신품종 국내외 시장개척</p>					

국문 요약문

	코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구목적 - 개화수명이 긴 수출전략용 호접란 신품종 육성 및 분자표지 개발 ○ 연구내용 - 우량 신품종 육성을 위한 집단의 유전분석을 통한 유전양식 구명 - 우량 신품종의 핵형분석과 염색체 분자표지 개발 - 우량 신품종의 유전체 분석을 통한 품종식별 및 개화수명 관련 분자표지 개발 - 우량 신품종 전용 증식배지 및 메리클론 생산 기술개발 - 우량 신품종 육성 및 브랜드화를 통한 국내외시장 개척 프로토콜 개발 				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> - 우수 유전자원 278개체 특성의 DB화 및 집단 작성 - 개화수명이 긴 우량계통의 배수성과 화분임성과의 관계 분석 - 개화수명과 관련된 주요 형질의 상관관계 및 주성분 분석 - 호접란 KS Little Gem(4배체, 약 4.9 Gb)의 유전체 시퀀싱과 2.9 Gb 크기의 스캐폴드 서열로 조립, 해독 - 호접란 종·품종 간 다형성 구간 발굴과 엽록체 마커 6종, SSR 마커 221종 및 COS 유전자 마커 133종 개발 - 엽록체 <i>rp116</i> 유전자 마커와 COS 유전자 마커 3종은 호접란의 종·품종 구분 마커로 선발 - 호접란의 개화수명과 관련된 에틸렌 호르몬의 생합성과 신호전달 경로의 유전자를 KS Little Gem 유전체로부터 발굴 - 호접란 염색체 분석을 위한 최적의 처리조건 구명 - 강산난원 및 국내수집 우수 호접란 유전자원의 염색체 배수성 검정 - KS Little Gem의 FISH 핵형분석 - 배양단계별 배지종류, 배양방법, 선발조건 등 배양묘 균일화 조건 구명 - 메리클론묘 기내변이 최소화 기술확립 - 개화수명이 우수 원종, 품종 등과 교배하여 다양한 교배집단 양성 - 개화수명 우수 3품종 등록 및 2품종 출원과 신품종의 브랜드화를 위하여 국내의 호접란 재배농장에 시험재배 및 릴레이생산 - 미국 수출이 가능한 대만과의 릴레이생산으로 미국 수출 시도 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개화수명이 긴 고부가가치 신품종 호접란 국내외 판매 ○ 고부가 신품종 개발과 고품질 난 생산수출로 국산 호접란 브랜드가치 상승 ○ 지속적인 호접란 신품종육성 시스템 확립 ○ 국제적인 호접란 육종 및 수출기업 육성 ○ 우수 호접란 유전자원의 마커개발을 통한 육종효율증대 ○ 신품종 개발에 따른 농가소득향상과 수입대체효과 및 수출촉진 - 국내육종기반 확립 및 수입대체로 종묘대와 로열티 절감효과 - 생산농가 국산종묘 이용율 향상 - 생산농가의 수출기반 구축 및 국제경쟁력 강화 - 우량종묘 및 개화주 수출확대로 생산농가 소득 향상 				
중심어 (5개 이내)	호접란	개화수명	분자표지	MAB	신품종

〈SUMMARY〉

		CODE NUMBER	D-01
Purpose and content of the research	<ul style="list-style-type: none"> ○ Purpose of research - Breeding long-lasting <i>Phalaenopsis</i> and molecular marker development aiming for strategic export ○ Research content - For new cultivar genetic formation survey through genetic analysis of population for cultivating new cultivar - Genomics study through genetic analysis of population for cultivating new cultivar - Karyotype analysis and development of chromosome marker - Development of the varieties identification and flowering longevity by genome analysis of new excellent varieties - Development the Mary Clone production technology and growth medium for new excellent varieties. - Development of new protocols for domestic and overseas market by cultivating new varieties and trademark. 		
R & D Output	<ul style="list-style-type: none"> - Excellent Genetic Resource 278 Database of individual characteristics and group composition - Analysis of relationship between pollen germination and ploidy analysis of long-lasting system - Correlation and principal component analysis of major characteristics related to flowering longevity - DNA sequencing of <i>Phalaenopsis</i> KS Little Gem (tetraploid, about 4.9 Gb) and assembly and decryption with 2.9 Gb scaffold sequence - Development of polymorphic regions between <i>Phalaenopsis</i> species and cultivar, development of 6 chloroplast markers, 221 SSR markers and 133 COS gene markers - Chloroplast rpl16 gene markers and three COS gene markers were selected as species markers of <i>Phalaenopsis</i> species. - Biosynthesis of ethylene hormone and signaling pathway genes related to flowering life of <i>Phalaenopsis</i> are extracted from KS Little Gem genome - Optimal treatment conditions for <i>Phalaenopsis</i> analysis - Chromosomal polymorphism of genetic resources of Gangsan-ri and Yeonpyeon - FISH karyotype analysis of KS Little Gem - Development various types of medium, method of tissue culture, suitable conditions for tissue culture - Establishment of technology to minimize mutation in Mary clone - Breeding the species containing significant flower longevity to develop new varieties - Patent applications for 2 cultivars and patent registrations for 3 cultivars and test cultivation and relay production of new cultivars, which has a long flowering life for introducing new varieties in domestic and international market - Attempt to export to USA with relay production with Taiwan which can export to USA 		
R & D applicable plan (Impact)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Marketing of high value-added new variety <i>Phalaenopsis</i>, which has a long flowering life, at domestic and international level ○ Development of high value-added new varieties and production of high-quality <i>Phalaenopsis</i> 		

	<ul style="list-style-type: none"> ○ Establishment of a system to cultivate a new variety of <i>Phalaenopsis</i> ○ Development of international <i>Phalaenopsis</i> breeding and export marketing mechanism ○ Improvement in breeding efficiency through development of markers of <i>Phalaenopsis</i> genome ○ Improvement of farm income, import substitution effect and promotion of export by new varieties development <ul style="list-style-type: none"> - Establishment of internal breeding and effect of seedling substitution and royalty - Improve utilization rate of internal seedling production - Establish the basic export and improvement international competitiveness - Increase production income fee 				
Key word	<i>Phalaenopsis</i>	Flowering longevity	Molecular marker	MAB	New cultivar

CONTENTS

1. Project Contents	15
1-1 Purpose of research and development	15
1-2 Importance of research and development	15
a. Significance and value of <i>Phalaenopsis</i> industry	15
1-3 Scope of research and development	19
a. Part 1: Kyungpook University	19
(1) Characteristics investigation and genetic analysis for new <i>Phalaenopsis</i> with remarkable flowering longevity	19
(2) Varieties identification and molecular markers development related to flowering longevity by genetic analysis of long-lasting <i>Phalaenopsis</i>	20
(3) Development of chromosome marker by karyotypic FISH analysis for long-lasting <i>Phalaenopsis</i>	20
(4) Utilization and production of Mary Clone production technology and growth medium for new valuable varieties.	20
b. Research collaboration by Kangsan	20
(1) Development of a new market mechanism for domestic and external market by branding and breeding new varieties with long flowering longevity	20
2. Current technique development trend in internal and external	21
2-1 Status of internal <i>Phalaenopsis</i> breeding program and techniques	21
2-2 Status of external <i>Phalaenopsis</i> breeding program and techniques	21
3. Contents and results of research	25
3-1 Population cultivation and genetic analysis of <i>Phalaenopsis</i> genetic resources with flowering longevity	25
a. Population cultivation for genetic analysis of <i>Phalaenopsis</i> with long flowering longevity	25
(1) Crossbreeding and grouping of <i>Phalaenopsis</i> long flowering longevity	25
(2) Analysis of crossing combination of <i>Phalaenopsis</i> system with long flowering longevity	25
(a) Phenotypic analysis between Parents (KSLG, 1747) and their reciprocal F ₁ hybrids	26
(b) Phenotypic analysis between parents (KSLG, 425-3) and their reciprocal F ₁ hybrids	30
(c) Phenotypic analysis between parents (KSLG, 752-1) and their reciprocal F ₁ hybrids	34
(d) Phenotypic analysis between parents (KSLG, KA 11) and their reciprocal F ₁ hybrids	39
(e) Phenotypic analysis between parents (KSLG, 215-1) and their reciprocal F ₁ hybrids	43
b. Genetic characteristics analysis of reciprocal F ₁ hybrids by ploidy and pollen morphology investion	46
(1) Ploidy analysis of long-lasting individual and excellence cultivar	46
(a) Ploidy analysis of excellence cultivar	46
(b) Ploidy analysis and DNA content of lines with long flowering duration	48
(2) Correlation analysis between pollen fertility and ploidy performance	51
c. Analysis of flowering duration-related genetic patterns by population analysis	52

(1) Correlation analysis between flowering longevity and F ₁ 's phenotypic in reciprocal hybrid	52
(a) Correlation analysis between flowering longevity and F ₁ 's phenotypic characteristics in KSLG & 1747 reciprocal hybrid	52
(b) Correlation analysis between flowering longevity and F ₁ 's phenotypic characteristics in KSLG & 752-1 reciprocal hybrid	54
(c) Correlation analysis between flowering longevity and F ₁ 's phenotypic characteristics in KSLG & 423-5 reciprocal hybrid	56
(d) Correlation analysis between flowering longevity and F ₁ 's phenotypic characteristics in KSLG & KA11 reciprocal hybrid	58
(e) Correlation analysis between flowering longevity and F ₁ 's phenotypic characteristics in KSLG & 215-1 reciprocal hybrid	60
(2) Principal component analysis of flowering longevity and F ₁ 's reciprocal hybrid	61
3-2 Genome analysis of <i>Phalaenopsis</i> cultivar with long flowering duration	64
a. Genome Analysis of <i>Phalaenopsis</i> KSLG	64
(a) Production NGS data for dielectric assembly	64
(b) Estimation of dielectric size of <i>Phalaenopsis</i> KSLG genome	66
(c) Assembly and analysis of <i>Phalaenopsis</i> KSLG genome	67
b. Development of molecular markers for excellent flowering duration	71
(a) Assembly of chloroplast dielectrics and development of molecular markers	71
(b) Development of molecular marker based on COS gene	80
(c) Development SSR marker	80
(d) <i>Phalaenopsis</i> KSLG discriminatory marker	82
c. Identification of longevity flowering related genes of <i>Phalaenopsis</i> KSLG I : analysis of ethylene biosynthesis and signaling pathway	82
(a) Relation analysis between the longevity flowering with ethylene pathway of <i>Phalaenopsis</i> KSLG	83
d. Identification of genes related to longevity flowering of <i>Phalaenopsis</i> KSLG II: transcriptome analysis	87
(a) Specific transcriptome expression analysis	88
(b) Expression analysis of ethylene biosynthesis / signal pathway genes	94
e. Development of early selection system and markers relatent longevity flowering	97
(a) Ethylene biosynthesis / signal pathway gene marker	97
(b) Analysis the relation of longevity flowering and application molecular marker to breeding group	102
3-3 Karyotype analysis and chromosome marker development of long-lasting <i>Phalaenopsis</i>	108
a. Development of chromosome detection method	108
(a) Sample collection	108
(b) Individuals	109
(c) Result of chromosome analysis of KS Little Gem	109
b. Ploidy analysis for excellence <i>Phalaenopsis</i>	110
c. Ploidy analysis for excellence <i>Phalaenopsis</i> in Kangsan	111
d. Ploidy analysis for excellence collected <i>Phalaenopsis</i>	112
e. KS Little Gem Karyotype FISH analysis	113

3-4 Development of a new culture medium for long-lasting <i>Phalaenopsis</i>	
and development the mutation avoidance technology in vitro	114
a. Development the equalizing condition for in vitro individual	114
b. Development ideal condition in vitro	120
c. Morphological genetic variation and clone seedling stability analysis	125
(a) Incidence and occurrence of mutation according to subculture	
and seedling culture in cabbage culture	125
(b) Anatomical pattern of occurrence of mutation in tissue culture seedlings	127
(c) Genetic analysis of mutation occurrence in tissue culture seedlings	128
(d) Minimization of mutation occurrence in tissue culture seedlings	131
d. Design and practical training of tissue culture technology program	131
3-5 Breeding new species of long-lasting <i>Phalaenopsis</i>	140
a. Genetic analysis of long-lasting plant based on the <i>Phalaenopsis</i> genetic resources	140
(a) Characteristic investigation and database of breeding population for selection	140
(b) Characteristics of high quality individuals	155
(c) Preservation and maintenance of the collected species	158
(d) Flowering characteristic investigation of excellence cultivar	158
b. Crossing genetic resources related to flowering life	159
(a) Crossbreeding between excellent individuals	159
c. Establishment of selection method for individuals, in vitro selection, seedlings	161
(1) Development the ideal conditions for culture seedling <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	
cultivation seedlings	161
(2) Establishment the excellent individuals selection method, actual seedling production	162
(a) Characteristics measure for the excellence F1 hybrids	162
(b) Analysis of physiological characteristics during growing	
(improvement of light condition, temperature condition, fertilizer condition)	163
d. Research on temperature adaptive physiology and adaptability to	
low/high temperature cultivation	166
(1) Experiment method	166
(2) Growth analysis result	167
(3) Sugar analysis result by HPLC	169
(4) Starch analysis result	171
e. Breeding long-lasting new <i>Phalaenopsis</i> variety	172
(1) The registered varieties of Kangsan	172
(2) Application varieties of Kangsan	180
f. Development of the adaptability and market development protocol	
of developed new varieties	184
(1) Orchid market and distribution analysis in Korea	184
(a) Market status and sales strategy in Korea	184
(b) Production and sales status of orchid farms in Korea	185
(2) Exploitation external market	185
(a) Status of America market	185
(b) Establishment of external production base and export to USA	187

g. The <i>Phalaenopsis</i> specialist invitation for the excellence cultivar selection	190
(1) 1 st specialist invitation for the excellence cultivar selection	191
(2) 2 rd specialist invitation for the excellence cultivar selection	191
h. Domestic Awards	195
i. Attendance the domestic and external <i>Phalaenopsis</i> exhibition	196
4. Purpose achievement and level contribution related field	198
4-1 Purpose achievement	198
4-2 The contribution to relevant field	201
a. Development of inheritance patterns based on the characteristics investigation and genetic analysis of long-lasting <i>Phalaenopsis</i>	201
b. Genome sequencing of unique <i>Phalaenopsis</i> species	201
c. Establishment of molecular marker support system for breeding utilization and identification of <i>Phalaenopsis</i>	201
d. Ploidy analysis of excellence <i>Phalaenopsis</i>	202
e. Establishment of in vitro micropropagation method of long-lasting KS Little Gem	202
f. Breeding new species of long-lasting <i>Phalaenopsis</i>	203
g. Development protocol based on the domestic and external market and branding the new variety	203
5. Output and applicable plan	204
6. External science technique information collected in research	206
7. Security level for results of research	206
8. Current condition research facility and equipment registered in the NTIS	206
9. Results of safety action of laboratory	206
10. Representative results of research	209
11. Considerations	210
12. References	211

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	15
1-1 연구개발의 목적	15
1-2 연구개발의 필요성	15
가. 호접란 산업의 중요성	15
1-3 연구개발 범위	19
가. 제1세부 : 경북대학교	19
(1) 개화수명이 긴 호접란 신품종 육성을 위한 특성조사 및 집단 유전분석을 통한 유전양식 구명	19
(2) 개화수명이 긴 호접란 유전체 분석을 통한 품종식별 및 개화수명 관련 분자표지 개발	20
(3) 개화수명이 긴 호접란의 핵형분석을 통한 염색체 분자표지 개발	20
(4) 개화수명이 긴 호접란 신품종 전용 메리클론 생산 및 기내변이 회피 기술 개발	20
나. 제1협동 : 강산난원	20
(1) 개화수명이 긴 신품종 육성 및 브랜드화를 통한 국내외 시장개척 프로토콜 개발	20
 2. 국내외 기술개발 현황	 21
2-1 국내 난 육종기술의 현황	21
2-2 국외 난 육종기술의 현황	21
 3. 연구수행 내용 및 결과	 25
3-1 개화수명이 긴 호접란 유전자원의 집단양성 및 유전분석	25
가. 개화수명이 긴 호접란 유전분석을 위한 집단양성	25
(1) 개화수명이 긴 호접란의 교배조합 및 집단양성	25
(2) 개화수명이 긴 호접란 계통의 교배조합 분석	25
(가) KSLG와 1747의 정역교배 F ₁ 의 특성분석	26
(나) KSLG와 425-3의 정역교배 F ₁ 의 특성분석	30
(다) KSLG 와 752-1의 정역교배 F ₁ 의 특성분석	34
(라) KSLG와 KA11의 정역교배 F ₁ 의 특성분석	39
(마) KSLG와 215-1의 정역교배 F ₁ 의 특성분석	43
나. 배수성 및 화분임성 조사를 통한 교배 후대의 유전학적 특성 구명	46
(1) 우량계통 및 개화기간이 긴 개체의 배수성 검정	46

(가) 우량계통의 배수성 검정	46
(나) 개화수명이 긴 계통의 배수성 검정 및 DNA함량	48
(2) 화분임성 조사 및 배수성과의 연관성 검정	51
다. 집단분석을 통한 개화수명 관련 유전양식 구명	52
(1) 개화수명이 긴 호접란의 정역교배 후대특성과 개화수명과의 상관관계 분석	52
(가) KSLG와 1747의 정역교배 후대특성과 개화수명과의 상관관계 분석	52
(나) KSLG와 752-1의 정역교배 후대특성과 개화수명과의 상관관계 분석	54
(다) KSLG와 425-3의 정역교배 후대특성과 개화수명과의 상관관계 분석	56
(라) KSLG와 KA11의 정역교배 후대특성과 개화수명과의 상관관계 분석	58
(마) KSLG와 215-1의 정역교배 후대특성과 개화수명과의 상관관계 분석	60
(2) 개화수명이 긴 정역교배 후대특성과 개화수명과의 주성분분석	61
3-2 개화수명이 긴 호접란 품종의 유전체 분석	64
가. 호접란 KSLG의 유전체 분석	64
(1) 유전체 조립을 위한 NGS 데이터 생산	64
(2) 호접란 KSLG 유전체의 유전체 크기 추정	66
(3) 호접란 KSLG 유전체의 조립 및 정보 분석	67
나. 개화수명 우수 품종 판별을 위한 분자마커의 개발	71
(1) 엽록체 유전체의 조립 및 분자 마커의 개발	71
(2) COS 유전자 기반 분자마커 개발	75
(3) SSR 마커 개발	80
(4) 호접란 KSLG 판별 분자표지	82
다. 호접란 KSLG의 개화수명관련 유전자의 발굴 I :	
에틸렌 생합성 및 신호전달 경로의 분석	82
(1) 호접란 KSLG의 개화수명과 에틸렌 경로와의 연관성	83
라. 호접란 KSLG의 개화수명관련 유전자의 발굴 II: 전사체 분석	87
(1) 조직별 전사체 분석	88
(2) 에틸렌 생합성/신호전달 경로 유전자의 발현 분석	94
마. 개화수명 관련 마커 개발 및 조기 선발 시스템 개발	97
(1) 에틸렌 생합성/신호전달 경로 유전자 마커	97
(2) 분자 마커의 교배집단 적용 및 개화수명 연관 분석	102
3-3 개화수명이 긴 호접란의 핵형분석과 염색체 분자표지 개발	108
가. 염색체 검경 방법 개발	108
(1) 시료의 채취	108
(2) 전처리제 사용방법 및 처리 효과	109
(3) KS Little Gem의 염색체 검경 결과	109

나. 우수 호접란 배수성 검정	110
다. 강산난원 육성 우수 호접란의 배수성 검정	111
라. 수집된 우수 호접란 배수성 검정	112
마. KS Little Gem FISH 핵형분석	113
3-4 개화수명이 긴 호접란 신품종 전용 배지개발 및 기내변이 회피기술 개발	114
가. 배양단계별 배양묘 균일화 조건 구명	114
나. 기내 배양묘 강건화 조건 구명	120
다. 기내배양 클론묘의 형태적 유전적 변이 검정 및 클론묘 안정성 검정	125
(1) 기내배양 시 계대배양 및 유묘유래에 따른 변이발생 빈도 및 발생형태	125
(2) 조직배양묘의 변이발생의 해부학적인 형태	127
(3) 조직배양묘의 변이발생의 유전적 검정	128
(4) 조직배양묘의 변이발생의 최소화 방법	131
라. 조직배양기술 프로그램 설계 및 실용화 교육	131
3-5 개화수명이 긴 호접란 신품종 육성	140
가. 수집된 호접란 유전자원으로부터 개화기간이 긴 유전자원 탐색	140
(1) 우량품종 선발을 위한 교배집단의 특성조사와 DB화	140
(2) 국외 수집 우량개체의 특성	155
(3) 수집종의 보존 및 유지	158
(4) 우수 품종의 개화특성 조사	158
나. 개화수명과 관련된 유전자원의 교배	159
(1) 우수개체 간 교배	159
다. 기내선발, 실생묘 생산, 우량개체 선발방법 확립	161
(1) 기내외 배양묘 강건화 조건 구명	161
(2) 실생묘 생산, 우량개체 선발방법 확립	162
(가) 우량 교배 후대의 생육 특성 조사	162
(나) 생장 중 생리특성 파악분석(광조건, 온도조건, 비료조건 개선)	163
라. 온도 적응생리 연구 및 저온/고온 적응 재배 가능성 탐구	166
(1) 실험방법	166
(2) 생장분석결과	167
(3) HPLC에 의한 당분석 결과	169
(4) 전분분석 결과	171
마. 개화기간이 긴 호접란 신품종 육성	172
(1) 강산난원 등록품종	172
(2) 강산난원 출원 품종	180
바. 개발된 신품종의 국내외 적응력 및 시장개척 프로토콜 개발	184

(1) 국내 난 시장 및 유통분석	184
(가) 국내 난 시장 현황 및 판매전략	184
(나) 국내 난 농장 연계 생산 및 판매현황	185
(2) 해외시장 개척	185
(가) 미국시장 현황	185
(나) 해외 생산기지 조성 및 미국수출	187
사. 호접란 전문가 초청 우량계통 선발	190
(1) 1차 전문가 초청 우량계통 선발	191
(2) 2차 전문가 초청 우량계통 선발	191
아. 국내 수상 실적	195
자. 국내외 호접란 전시회 참관	196
4. 목표달성도 및 관련분야 기여도	198
4-1 목표달성도	198
4-2 관련분야 기여도	201
가. 개화수명이 긴 호접란 특성조사 및 유전분석을 통한 유전양식 구명	201
나. 호접란 고유 품종의 유전체 해독	201
다. 호접란 고유 품종 판별과 육종 활용을 위한 분자마커 지원 체계 수립	201
라. 우수 호접란의 배수성 검정	202
마. 개화수명이 긴 호접란 신품종 KS Little Gem의 기내 대량증식 방법 확립	202
바. 개화수명이 긴 호접란 신품종 육성	203
사. 우량 신품종의 브랜드화와 국내외시장 개척 프로토콜 개발	203
5. 연구결과의 활용계획	204
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	206
7. 연구개발결과의 보안등급	206
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황	206
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	206
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	209
11. 기타사항	210
12. 참고문헌	211

1. 연구개발과제의 개요

1-1 연구개발의 목적

- 우리나라의 호접란 육종 역사는 짧으며, 국립원예특작과학원과 각도의 농업기술원 그리고 강산난원 등의 개인육종가에 의해서 이루어지고 있으나 시장성을 가진 품종은 소수에 불과하다.
- 일본, 대만 네덜란드 등의 호접란 육종 선진국은 지난 수십년의 육종 경험과 방대한 데이터, 수많은 육종 전문가 그리고 그동안 수집한 유전자원 및 중간모본들을 보유하고 시장을 선점하고 있다. 이러한 상황에서 모든 면에서 약세인 우리나라가 이들 선진국과의 격차를 뛰어 넘어서 새로운 신품종을 육성해 내기 위해서는 새로운 기술의 개발과 과감한 지원이 필요하다.
- 그러나 이들 세계적인 호접란 육종회사의 주요 목표는 주로 화색, 형태, 화수, 개화기 등의 꽃의 형질이다.
- 호접란의 경우 유통 및 판매 그리고 소비가 주로 가을~겨울에 이루어지고 이때 급격한 환경변화에 따라서 화아의 고사, 개화수명의 단축 등이 문제가 되고 있으나, 이와 관련된 품종은 아직 개발되지 않고 있다.
- 본 연구는 국제적인 호접란 육종회사들과 경쟁하기 위해서 꽃의 형질은 물론이고 강건하며 환경변화에도 잘 견디는 개화수명이 긴 호접란의 육성을 목적으로 수행하였다.
- 또한 개화수명 관련 유전자 분자표지 개발로 지속적이고 효율적인 품종개발이 가능하기 때문에 세계 호접란 시장을 개척, 리드해 나가는 발판이 될 것으로 기대된다.

1-2 연구개발의 필요성

가. 호접란 산업의 중요성

- 난류의 생산액은 2006년도 1,115억원으로 분화류 중 생산액 가장 많고, 화훼부문 전체에서도 1위로 매우 높다(표 1). 그 후 경기침체와 2016년 부정청탁 및 금품수수의 금지에 관한 법률 시행으로 생산과 소비가 감소하고 있지만 난은 여전히 분화류 전체생산액의 28%(2015)를 차지하지는 중요 작목이다.

표 1. 연도별 난류의 재배 및 생산현황.

연도	2006	2007	2008	2009	2010	2014	2015
재배면적(ha)	310	287	267	252	227	163	164
생산액(억원)	1,115	1,037	1,035	1,075	848	643	619

- 또한 2014년, 2015년 난의 경우 재배농가와 재배면적은 분화류 전체의 약 18% 정도 차지하지만 생산액은 약 28%로 다른 분화류에 비해 재배면적당 생산액이 높은 작목임을 알 수 있다(표 2).

표 2. 분화류와 난의 재배 및 생산현황.

연도	2014			2015		
	농가수	면적	생산액	농가수	면적	생산액
분화류	2,680	922	226,733	2,598	905	221,491
난	486	163	6,4281	487	164	6,1859
난/분화류(%)	18.1	17.7	28.4	18.7	18.2	27.9

- 2015년 분화류 재배면적, 판매량, 판매금액 현황을 보면 표 3과 같다. 호접란의 재배면적은 심비디움, 국화, 선인장에 이어 4위, 판매량은 선인장, 국화에 이어 3위를 차지하였다.
- 그러나 판매금액은 21,878백만원으로 전체 분화류 중에서 1위를 차지하였다. 이는 호접란이 분화류 중에서 단위면적당 그리고 화분당 판매금액이 높고 결과적으로 부가가치가 높은 작목임을 알 수 있다.

표 3. 2015년 분화류 재배면적, 판매량, 판매금액 현황.

구 분	2015			
	면적(ha)	판매량(백만분)	판매금액(백만원)	
합 계	905	150	221,491	
선 인 장	52	20	11,228	
천 쪽	26	2	3,241	
국 화	58	8	9,424	
야 생 화	42	6	2,035	
야 자 류	19	1	3,926	
고 무 나 무 류	25	2	7,391	
임 파 첸 스	6	2	1,731	
아 이 비	12	3	2,742	
산 호 수	9	1	1,265	
스 파 티 필 림	7	1	1,248	
포 인 세 티 아	5	1	1,163	
기 타 분 화 류	480	83	114,238	
계	164	20	61,859	
서양 난류 란	소 계	140	14	48,487
	심비디움	64	3	16,802
	호 접 란	43	7	21,878
	덴 파 레	7	1	2,216
	온시디움	1	0	293
	기 타	25	3	7,298
	동 양 란	15	2	10,353
풍 란 류	9	4	3,019	

○ 이와 같이 호접란은 적은 면적에 대규모 자본, 기술, 시설 집약적인 산업이다. 즉 3.3m² 당 가장 많은 수익을 창출할 수 있는 고부가가치 품목으로 농업분야에서 부가가치가 가장 높고 경쟁력이 있는 작목이다.

○ 현재 호접란은 우리나라 화훼류를 견인하는 4대 주요 작물중의 하나지만, 대부분 외국품종에 의존해 생산하고 있으며 로열티부담으로 인하여 우리나라 농민들의 채산성이 떨어지고 있는 현실이다.

- 세계 난시장 규모는 2억 5천만불 이상으로 매년 10% 정도로 확대되고 있다.
- 또한 유럽의 호접란 시장도 약 10년 전부터 활기를 띠기 시작하여, 2011년 분화류 중에서 호접란이 가장 인기 있는 품목으로 자리 잡고 있으며, 앞으로 호접란의 수요는 지속적으로 증가할 것으로 전망되고 있다.
- 한국 화훼 수출 변화 추이 및 난 수출 현황
 - 난은 화훼 수출액부문 부문 1위로 화훼 총 수출액의 20%를 점유하고 있으며 지속적 증가할 것으로 예상되고 있다(표 4).
 - 난 수출은 기복은 있으나 한국화훼 수출의 리더로 꾸준한 성장세를 유지하고 있다.
 - 수출액은 2000년 4,422천불에서 2007년 25,057천불로 567%나 증가하였다.
 - 주요 수출국은 중국으로 수출액의 약 90%를 차지하며 그다음이 미국이다.
 - 주요 수출 품목은 심비디움(중국), 호접란(중국, 미국, 일본), 기타 동양란 순이다.
 - 2007년 화훼 수출부문 20백만불 첫 돌파 후 1위 자리를 3년간 유지하였다.
 - 2011년에는 양난수출 1,334천불을 돌파하였다.
- 따라서 호접란의 국산 신제품 육성으로 국내 생산농가의 로열티 부담을 경감시키고, 국제적인 경쟁력을 강화하기 위한 지원이 대단히 필요한 실정이다.

표 4. 난류 수출 현황 (단위 : 천 kg, 천\$).

구 분	2008		2009		2010		2011	
	물량	금액	물량	금액	물량	금액	물량	금액
국가전체	857	970	919	1,075	834	985	1389	1,334
중 국	652	300	540	308	400	250	100	199
미 국	15	386	80	163	-	-	-	-
일 본	98	177	353	553	416	682	1243	1,005
러시아	-	-	17	48	18	53	45	128

- 수출품종 중심으로 로열티 지급 급증
 - 2006년 12월 품종보호대상작물 지정 이후 로열티 지불이 가시화되고 있다.

2006년 수출 증가로 로열티 지불 분쟁이 일본 ‘무꼬야마’ 에이전트와 국내 재배단체 간에 발생하였다.

- 기호도의 변화가 빨라 새로운 품종의 요구도가 높음
호접란은 적색, 황색계 대형 위주에서 핑크, 파스텔색, 소형 등으로 수요가 변화하면서 증가하고 있다.
- 현재 수출하고 있는 호접란의 대부분이 외국품종으로 한국난 이미지와 브랜드 가치를 높이기 위해서 우리 고유의 품종육성이 필요한 실정이다.
- 호접란 산업의 국제경쟁력 강화 및 종묘의 자립화를 위해 민간과 정부가 유기적 협력 체계를 구축하여 집중적인 신품종개발이 시급하다.

1-3 연구개발 범위

가. 제1세부 : 경북대학교

(1) 개화수명이 긴 호접란 신품종 육성을 위한 특성조사 및 집단 유전분석을 통한 유전양식 구명

- 국내외 우수 호접란 탐색 및 수집(10종 이상)
- 수집된 유전자원의 특성조사 DB화 및 집단작성
- 배수성 및 화분임성 조사를 통한 교배 후대집단의 유전분석(교배후대 6 집단 이상)
- 개화수명이 긴 호접란 계통 간 교잡검정 및 후대분석을 통한 개화기간 관련 유전양식 구명
- 개화수명이 긴 호접란 우수개체 선발방법 개발
- 개화수명이 긴 호접란 계통선발 및 형질 간 연관분석

(2) 개화수명이 긴 호접란 유전체 분석을 통한 품종식별 및 개화수명 관련 분자표지 개발

- 개화수명이 긴 품종의 유전체 분석(우수계통 1)
- 개화수명 형질의 조기 선발을 위한 유전체 재분석(원종 1)
- 유전체 정보 기반 STS 분자마커 개발
- 개화수명 관련 유전자 분리 및 동정
- 단자엽 COS 마커의 개발 및 품종 식별 적용

(3) 개화수명이 긴 호접란의 핵형분석을 통한 염색체 분자표지 개발

- 국내외 우수 호접란의 염색체 표본 제작기술 확립

- 국내외 우수 호접란의 배수성 검정
- 국내외 우수 호접란의 핵형분석
- 개화수명이 긴 호접란 품종의 핵형분석을 통한 분자표지 방법 개발
- 개화수명이 긴 호접란 원종 염색체에서 repetitive DNA 분포 조사

(4) 개화수명이 긴 호접란 신품종 전용 메리클론 생산 및 기내변이 회피 기술 개발

- 개화기간이 긴 신품종 전용배지 개발
- 메리클론묘 증식 방법별 기내변이 최소화 기술 확립
- 조직배양기술 프로그램 설계 및 실용화 교육

나. 제1협동 : 강산난원

(1) 개화수명이 긴 신품종 육성 및 브랜드화를 통한 국내외 시장개척 프로토콜 개발

- 기 확보 우량 모본 및 교배집단에 대한 교배효율 개선
- 교배종자의 기내외 선발 방법 개선
- 기내 신속 성장방법 개발로 육종연한 단축
- 개화수명이 긴 호접란 5 신품종 육성(3품종 등록, 2품종 출원)
- 우량 신품종의 브랜드화와 국내외시장 개척 프로토콜 확립

2. 국내외 기술개발 현황

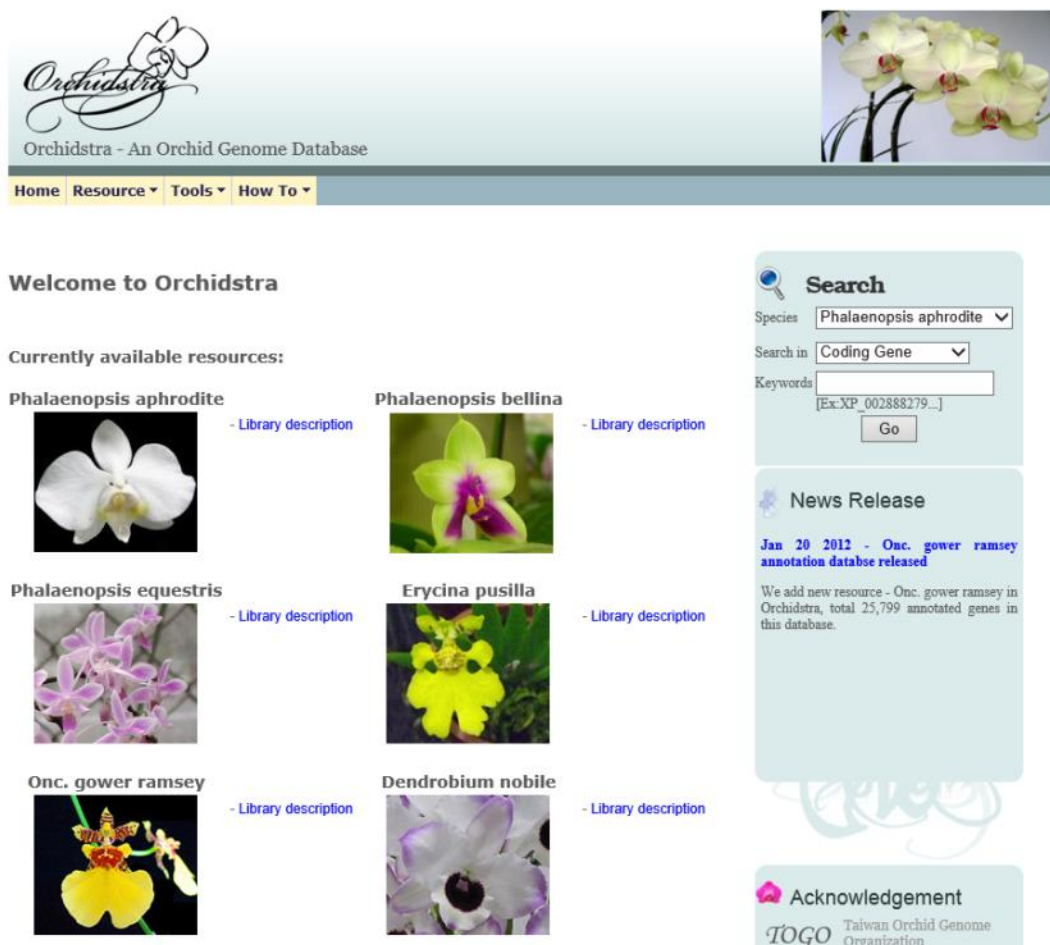
2-1 국내 난 육종기술의 현황

- 호접란 육종은 10년 이상 장기간 소요되며 지속적인 투자가 요구되기 때문에 정부 연구기관에서 주도적으로 이루어지고 있으며 민간에서는 일부 조직배양을 겸한 업체(농가)에서 미미하게 이루어지고 있다.
- 현재 호접란 육종은 국립원예특작과학원과 각 도의 농업기술원 그리고 일부 개인 육종가들에 의해서 수행되고 있으나 산업화하기까지 많은 과제를 안고 있다.
- 특히 호접란의 민간육종가들의 수가 일본, 대만, 미국, 유럽 등과 비교하여 현저히 적으며 난육종연구는 장기간이 소요되고 자본이 많이 들기 때문에 민간육종회사들이 관심을 가지다가도 포기하는 사례가 많다.
- 국가연구기관에 의해 육성된 난이 20여 품종이 있으나 대부분 화종에서 다양성은 아직은 부족하며 실제 생산되고 있는 품종은 거의 없는 실정이다.
- 또한 육종 목표도 화색과 화형위주로 선발하는 초기 육종수준에 머물러 있으며 생산성 및 시장성 등에 대한 심도 있는 검증 육종시스템이 확립되지 않은 상태이다.
- 최근 야생종 등을 이용한 종속 간 교배가 이루어지고 있으며 γ 선을 이용한 돌연변이 유기와 콜히친 처리에 의한 염색체 배가 등의 기술이 시도되고 있다. 또한 호접란에서는 형질전환에 의한 신품종 육종도 시도되고 있으나 실용화나 품종화에 이르기 위해서는 많은 시간과 노력이 소요되리라 판단된다.
- 국내에서 긴 개화수명, 다화성 등을 위해 육종에 이용되는 호접란은 3배체($2n=3x=57$) 또는 4배체($2n=4x=76$)로 추정되나 명확한 연구결과가 없는 실정이다.
- 국내에 보급되거나 수입되어 생산·판매되고 있는 호접란 품종의 정확한 염색체 유전정보도 전무한 실정이다.

2-2 국외 난 육종기술의 현황







- 호접란은 대만에서 육종을 시작하였다. 50여년 동안 대만 정부의 적극적인 지원 아래 많은 유전학적 육종연구가 진행되어 왔다. TOP(Taiwan Orchid Plantation)이라는 100헥타르의 거대한 면적에 중대형 세계적 육종회사 10여개와 개인 육종가들 200여명이 활동하면서 시너지 효과를 올리고 있다. 매년 3월에는 국제적인 난 전시회와 심포지엄을 개최하면서 종합적인 마케팅을 펼치고 있다.
- 대만 당연구소(Taiwan Sugar Research Institute)는 호접란 육종 및 연구 주요기관으로서 오늘날 대만 호접란의 메카역할을 한 연구소이다. 현재에도 대만 호접란 육종의 중요한 부분을 차지하고 있으며 대만 난 업계의 중심적인 역할을 하고 있다.
- 대만은 세포유전학적 정보를 바탕으로 한 연구가 활발히 이루어지고 있으며 체세포 및 생식세포에서의 염색체 분석기법이 수준급으로 발달되어 있다. 몇몇 호접란 야생원종에 대한 배수성, 염색체 정보, 지놈연구를 위한 유전체의 크기 등에 대한 연구가 진행되고 있다. 이를 기반으로 신품종 육성이 빠르게 진행되고 있다.
- 호접란 야생원종은 9개의 section에 약 45종을 포함하고 있으며 대부분의 배수성은 2배체 ($2n=2x=38$)로 염색체의 길이는 1.5~3.5um로 알려져 있다.
- 명확한 유전체 크기의 구명은 육종프로그램과 genetic marker 개발에 있어서 기초적인 정보이며 종이 갖는 nuclear DNA 양의 비교는 세포분류학과 진화적 연구에 있어서 매우 유용하게 이용될 수 있다. 호접란 nuclear DNA content는 2.74~14.50pg/2C(2,668~4,174 Mbp)로 보고된 바 있으나 정확도에는 큰 편차가 있다.
- 대만은 호접란 산업 육성을 위해 대규모 연구기금을 조성하여 범국가적으로 이 사업을 추진하여 온 결과 현재 전세계 호접란 시장의 60%을 대만이 장악하고 있다.
- 우리나라에서 재배되고 있는 계통(품종)의 대부분은 대만산이며 연간 수십여 계통 및 품종들이 도입되고 있다.
- 대만은 약 28개의 야생종과 662개의 우수한 변이종을 이용하여 육종 추진하고 있으며 연간 300여 조합을 교배 육종하여 우수 계통을 100여 계통 이상 선발하고 있다.
- 이들 육성품종은 국가 기관 (Taiwan Seed Improvement and Propagation Station)과 연계하여 대규모로 생산하여 미국, 유럽, 일본 등 전 세계로 수출되고 있다.

- 신품종 개발과 육종 효율을 높이기 위하여 기존의 관행 육종을 보완할 수 있는 효과적인 품종 선발 기술이 확립되어야 한다. 이를 위해 분자표지를 이용한 marker assisted selection(MAS) 체계를 구축해야 한다.
- MAS 체계를 구축하기 위해서는 목표 작물의 유전체 분석이 선행되어야 하고, 유전체 정보로부터 품종 구분과 목표 형질 관련 분자표지의 대량 발굴이 이루어져야 한다.
- 우리나라의 경우 호접란의 유전학 연구뿐만 아니라 유전체 연구도 거의 이루어져 있지 않은 실정이지만 대만은 이미 국가적 지원을 받아 호접란 3 원종(*P. aphrodite*, *P. bellina*, *P. equestris*)을 포함하여 난 품종 6종의 유전체 연구를 광범위하게 진행하고 있으며, 이들의 유전체 정보의 데이터베이스를 구축하고 있다(<http://orchidstra.abrc.sinica.edu.tw/>).



Welcome to Orchidstra

Currently available resources:

<p>Phalaenopsis aphrodite - Library description</p> 	<p>Phalaenopsis bellina - Library description</p> 
<p>Phalaenopsis equestris - Library description</p> 	<p>Erycina pusilla - Library description</p> 
<p>Onc. gower ramsey - Library description</p> 	<p>Dendrobium nobile - Library description</p> 

Search

Species: **Phalaenopsis aphrodite** ▼

Search in: **Coding Gene** ▼

Keywords:

[Ex:XP_002888279...]

News Release

Jan 20 2012 - Onc. gower ramsey annotation database released

We add new resource - Onc. gower ramsey in Orchidstra, total 25,799 annotated genes in this database.

Acknowledgement

TOGO Taiwan Orchid Genome Organization

대만의 난 유전체 정보 웹 페이지

- 일본은 다양한 취미난육종가들이 활동하고 있으며 동시에 일본은 대형 난육종 회사들이 많으며 대표적인 호접란 육종회사로는 일본 무꼬야마, 모리타 양란원 등이 있다. 이들 양란 육종회사에서는 매년 우수한 신품종을 육성하고 있다.
- 미국은 취미난육종가들의 저변이 크며 ZUMA ORCHIDS 등 몇몇 육종회사들이 있으나 최근 대만 육종업체에 밀려 호접란 품종개발이 미흡하다.
- 네덜란드에서는 양란육종회사가 소수에 그쳤으나, 최근 유럽양란시장이 비약적으로 발전하자 Anthura bv, Floricultura bv 등 대형 종묘회사들이 적극적으로 참여하고 있다. 특히 대만과 연계한 사업 비즈니스 모델을 개발하면서 유연하게 대처하고 있다.
- 중국, 말레이시아, 태국, 베트남, 인도네시아 등은 난생산국이면서도 육종기술이 낙후되고 육종에 관한 관심도가 적어 본격적인 우수한 품종 육성에는 상당히 시간이 걸릴 것으로 판단된다.

표 5. 국가 간 신품종 육성 분야 비교 분석.

구분	한국	일본	대만
민간육종	미활성	수준급	활성화(수준급)
등록품종수	5품종/년	20여 품종/년	100여 품종/년
균일도	70%	80~90%	80%
품종	수입의존(80%)	수입(50%)	수출산업정착 (미국, 유럽, 한국 등)

3. 연구수행 내용 및 결과

3-1 개화수명이 긴 호접란 유전자원의 집단양성 및 유전분석

가. 개화수명이 긴 호접란 유전분석을 위한 집단양성

(1) 개화수명이 긴 호접란의 교배조합 및 집단양성

- 개화수명이 긴 KS Little Gem(이하 KSLG)을 모본과 부분으로 교배한 조합 중 우수 11조합 총 278개체의 집단을 양성하였다.

표 1. 개화수명이 긴 우수개체간 정역교배를 통한 집단양성.

No.	Parent (♀ x ♂)	F ₁	No. of F ₁
1	KSLG x 1747	1059	34
2	1747 x KSLG	1076	63
3	KSLG x 425-3	1125	11
4	425-3 x KSLG	1136	8
5	KSLG x 752-1	1020	12
6	752-1 x KSLG	1032	13
7	KSLG x KA11	1184	35
8	KA11 x KSLG	1193	36
9	KSLG x 215-1	1527	15
10	215-1 x KSLG	1532	15
11	2451 x KSLG	1183	36
Total			278

(2) 개화수명이 긴 호접란 계통의 교배조합 분석

- 개화수명이 긴 호접란과의 정역교배 후대 278개체 및 모부분 90개체에 대해서 아래와 같이 UPOV 특성조사기준에 따라 97항목의 조사를 실시하였다.
- 식물체 : 크기, 꽃대의 수
- 잎 : 잎 길이, 너비, 모양, 가장 넓은 부분의 위치, 끝부분의 모양, 끝부분의 대칭, 자세,

무늬, 윗면의 반점, 윗면의 주요색, 윗면의 안토시아닌 색.

- 꽃차례: 꽃차례 형태, 꽃차례의 길이, 꽃수, 화경 길이, 화경 굵기, 안토시아닌 색.
- 꽃 : 측면의 모양, 정면에서의 길이, 정면에서의 너비, 꽃잎의 배열, 향기, 윗 꽃받침, 측면 꽃받침과 꽃잎, 끝열편 (너비, 길이, 모양, 세로축의 휘어짐, 가장 넓은 부분의 위치, 뒤틀림, 가장자리 물결정도, 윗면의 바탕색, 2차색, 반점의 수, 반점의 크기, 반점의 색, 줄무늬의 수, 줄무늬의 색, 물모양의 밀도, 그물모양의 색), 순판 (끝열편의 길, 너비, 모양, 수염, 수염 길이, 끝열편의 돌기 및 융기, 측열편의 모양, 측열편의 휘어짐) 특징 총 97항목.
- 생태적 특징 : 첫 소화의 개화일, 첫 소화의 폐화일, 개화수명(첫 소화의 폐화일 - 첫 소화의 개화일).

개화수명이 긴 우수개체 간 정역교배를 통한 교배조합의 특성분석의 결과는 다음과 같다.

(가) KSLG와 1747의 정역교배 F₁의 특성분석

① 양적특성분석

- 정역교배 후대와 양친의 잎 형질에 대한 유사성 분석은 표 2와 같다. 엽수의 경우 1076은 6.7장으로 모본 1747 6.0장, 부분 5.9장과 통계적으로 차이가 없었으나 1059는 8.0장으로 양친보다 유의하게 증가하였다. 따라서 엽수는 1059가 모부분 보다 더 많아진 것으로 나타났다으며 초우성으로 판단된다.
- Kwak(2000)은 인디카와 동일벼를 교배하여 F₁의 잡종성과 Sink/Source와 관련된 특성의 상관관계분석결과 주당수수, 수당영화수, 천립중, 엽면적 지수, 엽신중 비율 및 단위 엽건중 당 엽면적에서는 우성정도가 부분우성, 완전우성 및 초우성으로 다양하게 나타난다고 하였다. 또한 Chung et al. (2003)은 맥주보리의 양적질형질에 대한 F₁세대의 유선분석을 한 결과 간장·수장·망장·곡립장·1수립수 등은 초우성으로 유전되었다고 하였다. 이와 같이 작물에 따라 F₁의 초우성 형질의 발현은 다를 것으로 생각되었다.
- 잎의 길이와 폭은 1059, 1076 모두 KSLG 보다 크게 증가하였고, 반면 1747보다는 약간 감소하였지만 수치적인 차이는 크지 않았다. 반대로 잎 두께의 경우 F₁ 모두 1747보다 증가하였으나 1059는 모본인 KSLG 과 유의차가 없었다. 이와 같이 잎 길이, 잎 너비, 잎 두께의 경우는 모부분 보다 커지지 않고 모부분의 중간으로 부분우성이라 할 수 있다.
- Oh et al. (2005)은 가지 F₁의 잡종강세를 조사하여 엽장은 모든 조합이 정의 강세를 보여 F₁세대가 초우성으로, 엽폭은 춘령과 수집 재래종의 조합을 제외한 모든 조합이 엽폭이 넓은 양친보다 더 넓은 F₁의 강세성을 보여 초우성을 나타내었다고 하였다. Song(2002)은 펜지 F₁의 생체중, 엽장, 엽폭, 분지수 등에서 상가적, 비상가적효과가 나타난다고 하였고, 본 실험에 있어서 정역교배후대 잎 형태의 경우는 열성이 나타나지 않았음을 알 수 있다. 따라서 식물종류에 따라서 F₁의 잎 길이와 폭은 우성 발현정도가 다른 것으로 판단되었다.

또한 KSLG 가 모본인 1059의 잎 형질이 KSLG 가 부분인 1076보다 우세하게 나타난 것으로 보인다. 이와 같이 정역교배 후대의 잎의 특성은 엽수를 제외하고 양친의 우세형질과 유사한 것으로 나타났다.

표 2. 정역교배 후대와 양친과의 잎형질 유사성 분석.

Cultivar	No. of leaves	Leaf		
		Length (cm)	Width (cm)	Thickness (mm)
KSLG (A)	5.9 b ^z	12.5 d	4.9 c	1.9 a
1747 (B)	6.0 b	19.4 a	7.5 a	1.7 c
1059 (A x B)	8.0 a	18.5 b	7.1 b	1.9 a
1076 (B x A)	6.7 b	16.8 c	7.2 b	1.8 b

^z Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test, p<0.05.

- 정역교잡 후대와 양친의 화서 및 소화형질에 대한 유사성 분석결과는 표 3과 같다. 화서가 길고 꽃수가 많은 것은 KSLG의 대표적인 특징이다(표 3). 화서의 길이는 교잡후대 1059, 1076 모두 모부분의 중간을 나타내었다. 소화수, 소화경장, 소화경 직경, 소화장 및 소화폭도 화서와 마찬가지로 모부분의 중간으로 나타났다.
- 교잡친의 우세형질을 받은 잎 형질의 경우와는 달리 화서장, 소화수, 소화경장, 소화경 직경, 소화장, 소화폭 모두 교배후대는 양친의 중간을 나타내었다(표 3).
- 본 실험결과로부터 화서 및 소화의 표현형질은 부분우성인 것으로 볼 수 있다. Bang et al. (2000)은 페튜니아의 경우 화경이 큰 계통 × 작은 계통 또는 작은 계통 × 큰 계통의 F₁ 조합은 모두 화경이 컸으며 초우성을 나타내었다.

표 3. 정역교배 후대와 양친과의 화서 및 꽃 형질 유사성 분석.

Cultivar	Inflorescence length (cm)	No. of florets	Pedicel	
			Length (cm)	Thickness (mm)
KSLG (A)	50.8 a ^z	21.0 a	3.3 c	3.4 c
1747 (B)	18.5 c	5.9 c	3.7 a	3.9 a
1059 (A x B)	31.8 b	11.4 b	3.5 b	3.7 b
1076 (B x A)	30.7 b	12.0 b	3.5 b	3.6 bc

^z Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test, p<0.05.

- 정역교잡 후대와 양친의 꽃받침, 꽃잎 길이와 너비에 대한 유사성 분석결과는 표 3과 같다. 꽃받침의 경우 후대와 교배친 간에 약간의 차이는 있으나 길이는 3cm 정도, 폭은 2cm

정도로 나타났다. 또한 모든 품종이 길이에 비해 너비가 짧은 타원형이었으며 그 비율도 1.5 이상이었다.

- 꽃잎의 경우 길이는 꽃받침과 비슷한 3cm 정도였으나, 폭은 2cm 이상으로 꽃받침에 비해 컸으며 그 결과 그 비율도 꽃받침에 비해 감소하여 전반적으로 둥근 모양을 나타내는 것을 알 수 있었다(표 3, 그림 1). 또한 1059, 1076 모두 꽃잎의 길이는 3cm 내외로 수치상 큰 차이는 없었지만 폭은 1747의 1.34에 비해 증가하였다. 그 결과 길이/폭 비율이 1747을 비해서 1059, 1076, KSLG 는 각각 1.25과 1.16, 1.11로 낮게 나타났다. 또한 1747의 꽃잎은 뒤로 젖혀서 각이진 모양을 나타내지만 1059와 1079은 둥근 타원형으로 KSLG 와 유사한 것을 알 수 있다(그림 1).

표 3. 계속.

Cultivar	Flower		Petal	
	Length (cm)	Width (cm)	Length (cm)	Width (cm)
KSLG (A)	5.9 a ²	6.0 a	3.0 b	2.7 a
1747 (B)	5.6 bc	5.5 b	3.1 a	2.3 c
1059 (A x B)	5.4 c	5.6 b	3.0 b	2.4 bc
1076 (B x A)	5.6 b	5.8 a	2.9 bc	2.5 b

² Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test, p<0.05.



KS LG (A)



1747(B)



1059(A x B)



1076(B x A)

그림 1. 정역교배 후대와 양친의 개화시의 사진.

- 이와 같이 정역교잡 후대의 꽃잎 형질은 대부분에 관계없이 KSLG의 형질과 유사한 것으로 나타났다. 만약 꽃잎이 등근 것이 우성형질이라면 잎 형질과 마찬가지로 꽃잎의 형질도 대부분이 관계없이 우세형질이 유전되는 것으로 생각되었다. 실제로 교배친으로 사용되는 호접란의 경우 꽃잎의 형태가 장타원형에서 원형까지 다양하지만 대부분의 품종은 길이와 폭이 비슷한 원형인 것으로 보아 등근 형질이 우성형질일 가능성이 크다고 판단된다.
- 정역교잡 후대와 양친의 개화특성에 대한 유사성 분석 결과는 표 4와 같다. 개화일의 경우 1059는 1월 8일로 모본인 KSLG의 1월 6일과 거의 같은 시기에 개화하였으나 1076은 2월 25일로 1747과 KSLG의 중간을 나타내었다. 폐화일의 경우 1059는 5월 10일로 KSLG와 유사하였으며 1076은 4월 9일로 모본보다 빨랐다. 폐화일에서 개화일을 뺀 개화수명의 경우 1059는 109.8일로 개화수명이 가장 긴 모본 KSLG의 123일보다는 약간 짧았지만 1076의 경우 53.5일로 개화수명이 짧은 모본 1747의 51.8일과 통계적으로 유의차가 없었다.
- 본 실험의 경우 잡종성이 강한 후대는 다양한 개체로 1059의 경우 개화수명이 짧은 것부터 긴 것까지 다양하다. 긴 것만 선발하여 육종 모본으로 사용하면 보다 수명이 긴 개체의 육성이 가능할 것으로 판단된다.
- 개화수명은 화형, 화색 등과 함께 호접란의 관상 가치를 결정짓는 중요한 요소이다. 정역교배 후대와 양친의 개화특성 분석 결과 개화시기와 수명은 모본의 형질과 관련이 깊은 것으로 판단된다.

표 4. 정역교배 후대와 양친과의 개화수명 유사성 분석.

Cultivar	Flowering date (yy/mm/dd)	Senescence date (yy/mm/dd)	Longevity of flowering (days)
KSLG (A)	2014/01/08	2014/05/10	123.1 a ^z
1747 (B)	2014/04/05	2014/05/25	51.8 c
1059 (A x B)	2014/01/08	2014/05/10	109.8 b
1076 (B x A)	2014/02/25	2014/04/09	53.5 c

^z Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test, p<0.05.

② 질적특성분석

- 호접란의 정역교배 하여 F₁와 양친의 화색에 대하여 분석결과는 표 5와 같다. 단색인 KSLG와 1747을 정역 교배하여 육성한 F₁ 개체들의 화색이 다양하게 나타났다. 모든 F₁ 개체에서 KSLG과 상관없이 1747의 Greyed-purple이 더 강하게 나타났다. 또한 순환 색의

경우에 모부분에서 나타나지 않은 화색들이 F₁ 에서 다양하게 나타났다. 이와 같은 결과는 모부분 자체의 유전적 조성이 헤테로하기 때문인 것으로 생각되었다.

표 5. 정역교배 후대와 양친과의 화색 유사성 분석.

Cultivar	Petal ground color	Petal second color	Lip ground color	Lip second color
KSLG (A)	Purple 100%	Purple 100%	Red-purple 100%	Red-purple 100%
1747 (B)	Greyed-purple 30.8%	Greyed-purple 38.5%	Purple 69.2%	Red-purple 30.8%
1059 (A x B)	Greyed-purple 32.4%	Greyed-purple 58.8%	Red-purple 61.8%	Red-purple 44.1%
	Yellow 32.4%	Purple 17.6%	Orange-red 14.7%	Purple 32.4%
	Purple 23.5%	Red-purple 11.8%	Purple 14.7%	Orange-red 8.8%
	Red-purple 5.9%	Green-yellow 5.9%	Greyed-purple 5.9%	Purple-violet 8.8%
	Greyed-yellow 2.9%	White 2.9%	Orange 2.9%	Purple-violet 2.9%
	Greyed-orange 2.9%	Yellow 2.9%	-	Yellow 2.9%
	Greyed-purple 39.7%	Greyed-purple 49.2%	Red-purple 63.5%	Purple 49.2%
1076 (B x A)	Purple 20.6%	Red-Purple 23.8%	Orange-red 20.6%	Red-purple 28.6%
	Yellow 17.5%	Yellow 12.7%	Red 9.5%	Orange-red 17.5%
	Red-Purple 14.3%	Purple 6.3%	Greyed-purple 3.2%	Orange 3.2%
	Greyed-orange 7.9%	Greyed-yellow 4.8%	Yellow-orange 1.6%	Yellow 1.6%
	Greyed-red 4.8%	White 1.6%	Orange 1.6%	-
	Greyed-yellow 4.8%	Greyed-red 1.6%	-	-

(나) KSLG와 425-3의 정역교배 F₁의 특성분석

① 양적특성분석

- 모부분과 정역교배한 후대집단 잎의 특성형질의 유사성을 분석한 결과는 표 6과 같다. 엽수는 KSLG가 가장 많은 것으로 나타났다. 엽수와 엽장은 모본과 유사한 경향이 보이며 엽폭은 KSLG와 상관없이 425-3과 유사하고 잎 두께는 양친보다 두꺼운 것으로 나타났다.

엽장과 엽폭은 KSLG 보다 우성 형질의 발현으로 나타났다. 엽두께는 모부분 보다 더 두꺼워진 것으로 나타났으며 초우성으로 판단되며 1136이 가장 두꺼운 것으로 나타났다.

표 6. 정역교배 후대와 양친과의 잎형질 유사성 분석.

Cultivar	No. of leaves	Leaf		
		Length (cm)	Width (cm)	Thickness (mm)
KSLG (A)	14 a	13.99 c ^z	6.07 b	1.89 c
425-3 (B)	6 c	23.00 a	7.60 a	1.70 c
1125 (A x B)	8 b	19.27 b	8.03 a	2.27 b
1136 (B x A)	6 c	20.92 a	7.88 a	2.60 a

^z Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test, p<0.05.

- 양친과 정역교배한 후대집단 화서 및 소화형질에 대한 유사성 분석 결과는 표 7과 같다. 화서길이는 모든 F₁ 개체들이 화서길이가 긴 KSLG와 비슷하며 유사성이 있는 것으로 나타났으며, 화수는 모부분보다 많은 것으로 초우성 형질의 발현한 것으로 판단된다.
- 소화경길이와 화경두께는 425-3이 모본인 1136이 초우성으로 나타났다. 소화경길이는 KSLG와 상관없이 425-3이 모본인 1136이 가장 길었으나, 모본과 유의성이 없는 것으로 나타났다. 이와 같이 정역교배 후대의 화서는 KSLG와 소화형질은 425-3과 유사한 경향이 있는 것으로 판단된다.

표 7. 정역교배 후대와 양친과의 화서 및 꽃 형질의 유사성 분석.

Cultivar	Inflorescence length (cm)	No. of florets	Pedicel	
			Length (cm)	Thickness (mm)
KSLG (A)	23.8 a ^z	36.3 b	4.6 c	5.2 b
425-3 (B)	11.6 b	34.3 b	5.8 ab	5.7 ab
1125 (A x B)	21.7 a	41.1 a	5.5 b	5.5 ab
1136 (B x A)	21.3 a	42.2 a	5.9 a	5.9 a

^z Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test, p<0.05.

- 꽃 길이는 KSLG의 꽃 크기가 유의하게 작았지만 큰 차이는 나지 않았다. 꽃 너비, 꽃잎 길이와 꽃잎 너비는 KSLG가 가장 작은 것으로 나타났으며 모든 F₁은 KSLG와 상관없이

425-3과 유사한 것으로 나타났다. 꽃 형질은 425-3과 F₁ 모두 KSLG 보다 큰 것으로 나타났다 (표 7, 그림 2).

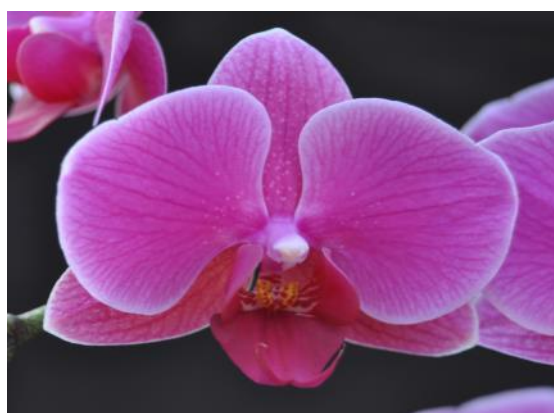
표 7. 계속.

Cultivar	Flower		Petal	
	Length (cm)	Width (cm)	Length (cm)	Width (cm)
KSLG (A)	5.7 b ^z	5.7 b	2.9. b	3.0. b
425-3 (B)	6.7 a	6.8 a	3.2 ab	3.8 a
1125 (A x B)	6.7 a	6.7 a	3.3 a	3.7 a
1136 (B x A)	6.9 a	6.9 a	3.2 ab	3.6 a

^z Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test, p<0.05.



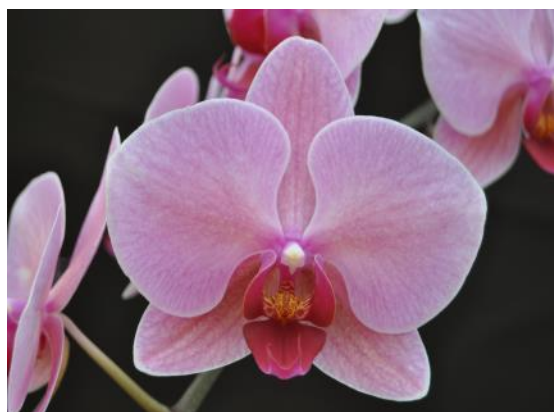
KS LG (A)



425-3 (B)



1125 (A x B)



1136 (B x A)

그림 2. 정역교배 후대와 양친의 꽃 사진

- 양친과 정역교배한 후대집단 개화수명에 대한 상관관계 결과는 표 8과 같다. 개화일은 1125의 경우 개화가 빨랐고 425-3이 가장 늦었다. 1125, 1136의 폐화일은 교배조합인 부분과 모본보다 빨랐다. 개화수명은 KSLG가 123일로 평균개화가 4개월 이상으로 가장 길었다. 1125와 1136은 각각 100일과 96일로 425-3의 99일과 유사하게 나타났다.

표 8. 정역교배 후대와 양친과의 개화수명 유사성 분석.

Cultivar	Flowering date	Senescence date	Flowering duration (days)
KSLG (A)	2015.01.08	2015.05.10	123.0 a ^z
425-3 (B)	2015.03.08	2015.06.27	99.2 b
1125 (A x B)	2014.12.07	2015.03.05	100.4 b
1136 (B x A)	2015.01.03	2015.03.21	96.1 b

^z Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test, p<0.05.

- KSLG와 425-1의 정역교배 F1 개체간의 특성분석의 결과 엽수를 제외한 엽장, 엽수와 엽장은 모본과 유사한 경향을 보이며 엽폭은 KSLG와 상관없이 425-3과 유사하였다. 잎 두께는 양친보다 두꺼운 것으로 나타났다.
- 이와 같이 정역교배 후대의 꽃 크기와 소화형질은 부분과 유사한 경향이 있는 것으로 판단된다. 개화수명은 KSLG 보다 짧은 것으로 나타났음에도 불구하고 KSLG가 모본으로 들어간 1125가 100일 이상으로 개화해서 모본이 약간 영향을 미친 것으로 판단할 수 있다.

② 질적특성분석

- 호접란의 정역교배 하여 F₁ 과 양친의 화색에 대하여 분석결과는 표 9와 같다. F₁에서 양친보다 화색이 더 진하게 나타났으며 purple을 나타내는 양친과 같은 그룹 색깔도 동시에 나타났다. KSLG가 부분으로 들어간 F₁ 은 양친과 더 유사한 개체가 많이 나타났다. 표 9 경우에 양친 모두 단색이라 그런지 정역교배의 F₁ 개체들도 1125의 부분 White를 제외하고 거의 단색으로 나타났다.

표 9. 정역교배 후대와 양친과의 꽃 질적 형질 분석.

Cultivar	Petal ground color	Petal second color	Lip ground color	Lip second color
KSLG (A)	Purple 100%	Purple 100%	Red-purple 100%	Red-purple 100%
425-3 (B)	Purple 100%	Purple 100%	Red-purple 100%	Red-purple 100%
1125 (A x B)	Red-purple 71.4% Purple 28.6%	White 100%	Red-purple 100%	Red-purple 100%
1136 (B x A)	Red-purple 50% Purple 50%	Red-purple 50% Purple 50%	Red-purple 100%	Red-purple 100%

(다) KSLG 와 752-1의 정역교배 F₁ 의 특성분석

① 양적특성분석

- 정역교잡 후대와 양친의 잎 형질에 대한 유사성 분석결과는 표 10과 같다. 엽수는 1020, 1032 모두 752-1과 유사하게 나타났다. 엽장과 엽폭은 모부분 보다 더 커진 것으로 나타났다으며 초우성으로 판단된다. 엽 두께는 1020이 모부분 보다 더 두꺼워진 것으로 나타났으며 초우성으로 판단되고, 1032는 모본인 752-1과 유사하게 나타났다.
- 본 실험에서 F₁ 잎의 특성은 일정한 경향이 없는 것으로 판단된다. Song(2002)의 팬지에 대한 연구결과는 F₁ 의 생체중, 엽장, 엽폭, 분지수 등에서 상가적, 비상가적효과가 나타난다고 하였고, 본 실험이 있어서 정역교배후대 잎 형태의 경우는 열성이 나타나지 않았음을 알 수 있다. 그리고 KSLG가 모본으로 들어간 후대가 752-1이 모본으로 들어간 후대보다 엽두께가 더 두껍게 나타난 것으로 보인다.
- 이와 같이 정역교배 후대 잎의 특성은 엽수와 1032의 엽두께를 제외하고 양친 보다 더 양호하게 나타났으며 초우성으로 판단된다.

표 10. 정역교배 후대와 양친과의 잎 형질 유사성 분석.

Cultivar	No. of leaves	Leaf		
		Length (cm)	Width (cm)	Thickness (mm)
KSLG (A)	13.8 a ^z	14.0 c	6.1 b	1.9 b
752-1 (B)	6.0 b	15.1 b	5.7 b	1.6 c
1020 (A x B)	7.4 b	17.7 a	7.4 a	2.2 a
1032 (B x A)	7.8 b	16.5 a	7.1 a	1.6 c

^z Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test, p<0.05.

- 정역교잡 후대와 양친의 화서 및 소화형질에 대한 유사성 분석결과는 표 11과 같다. 꽃수가 많고, 화서가 긴 것은 KSLG의 대표적 특징으로 KSLG가 꽃수, 화서길이, 꽃 너비의 경우에 752-1과 교잡후대보다 훨씬 뛰어난 것을 알 수 있다.
- 양친으로 조합을 작성할 때는 F₁ 에서 화수의 증대를 보일 수 있다. 마찬가지로 화경길이와 소화경 길이는 모부분의 중간으로 나타났으며, 이는 부분우성인 것으로 볼 수 있다. 소화경 굵기 같은 경우 모든 후대는 KSLG와 유사하였다.
- 정역교배 후대의 꽃 크기는 꽃의 길이의 경우 수치로 볼 때 양친과 후대집단의 큰 차이가 없었으나, KSLG가 약간 더 크게 나타났다. KSLG가 모본으로 들어간 1020과 KSLG가 부분으로 들어간 1032는 부분과 유사하게 나타났다. 꽃 너비의 경우 1020은 모부분의 중간으로 나타났으며, 이는 부분우성인 것으로 볼 수 있다 (그림 3). 그러나 KSLG가 부분으로 들어간 1032는 부분과 유사하게 나타났다. 꽃잎 길이는 교배조합 1020과 1032 모두 부분과 모본의 중간으로 나타나 부분우성인 것으로 볼 수 있다. 정역교배 후대의 꽃잎 너비는 부분과 유사성을 나타냈다.
- 따라서 꽃잎이 커질 경우 꽃 크기도 커진 것으로 판단된다. 이와 같이 정역교배 후대의 꽃 크기와 소화형질은 부분과 유사한 경향이 있는 것으로 판단된다.

표 11. 정역교배 후대와 양친과의 화서 및 꽃 형질 유사성 분석.

Cultivar	Inflorescence length (cm)	No. of florets	Pedicel	
			Length (cm)	Thickness (mm)
KSLG (A)	32.9 a ^z	23.8 a	3.7 a	4.6 a
752-1 (B)	8.6 c	16.6 b	1.9 c	3.8 b
1020 (A x B)	17.8 b	19.7 ab	2.9 b	4.4 a
1032 (B x A)	17.5 b	18.2 ab	2.7 b	4.4 a

^z Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test, p<0.05.

표 11. 계속.

Cultivar	Flower		Petal	
	Length (cm)	Width (cm)	Length (cm)	Width (cm)
KSLG (A)	5.2 a ^z	5.6 a	2.9 a	3.0 a
752-1 (B)	5.0 ab	5.2 c	2.4 c	2.5 b
1020 (A x B)	4.8 b	5.4 b	2.6 b	2.5 b
1032 (B x A)	4.9 a	5.6 a	2.7 b	2.7 a

^z Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test, p<0.05.



KS LG



752-1



1020(A x B)



1032 (B x A)

그림 3. KSLG와 751-1과의 정역교배의 F₁

- 양친과 정역교배한 후대집단 개화수명에 대한 상관관계 결과는 표 12와 같다. 개화일은 1020의 경우 모본(KSLG)과 비슷하게 나타났고 1032의 경우 모본(752-1)과 부분(KSLG)의

중간성을 띄어 부분우성으로 볼 수 있다. 1020, 1032의 폐화일은 교배조합인 부분과 모본보다 빨랐다.

- 따라서 개화수명의 경우 교배조합인 모본, 부분보다 짧았다. KSLG가 모본으로 들어간 정역교배 후대의 경우 개화 기간은 다 모부분보다 짧지만 그래도 KSLG가 모본으로 들어간 1020이 부분으로 들어간 1032보다 길었다.
- 이러한 결과는 개화수명이 긴 개체를 육성하기 위해서는 개화수명이 긴 개체를 모본으로 사용하는 것이 유리하다는 것을 나타낸다. 호접란은 개화수명이 다른 분화류 보다 길지만 개화수명이 긴 개체의 육성은 관상을 목표로 한 호접란에선 중요하다. 특히 KSLG는 평균 개화가 4개월 이상으로 보통 호접란 보다 길다. 따라서 앞으로 수명이 긴 호접란을 개발하기 위해서는 KSLG와 같은 수명이 긴 개체를 모본으로 사용하는 것이 개화수명이 긴 호접란을 만들 수 있는 것으로 판단된다.

표 12. 정역교배 후대와 양친과의 개화수명 유사성 분석.

Cultivar	Flowering date (yy.mm.dd)	Senescence date (yy.mm.dd)	Flowering duration (days)
KSLG (A)	2015.01.08	2015.05.10	123.0 a ²
752-1 (B)	2015.03.08	2015.06.27	92.2 b
1020 (A x B)	2014.12.07	2015.03.05	82.5 c
1032 (B x A)	2015.01.03	2015.03.21	71.4 d

² Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test, p<0.05.

- KSLG와 752-1의 정역교배 F1의 특성분석 결과 엽수를 제외 엽장과 엽폭은 모부분보다 우세하게 나타났으며 엽 두께는 모본과 유사한 결과가 나타났다. 화서장, 소화 수, 화경, 화경 굵기는 KSLG 보다 열성을 보였으나 화서장, 소화수, 소화경장은 모부분의 중간으로 부분우성이라 할 수 있다. 꽃 형질은 모본과 유사한 경향을 보였다. 개화수명은 KSLG가 모본으로 들어간 정역교배 후대의 경우 개화 기간은 다 모부분보다 짧아 졌으나 그래도 KSLG가 모본으로 들어간 1020이 부분으로 들어간 1032보다 더 길었다. 개화수명이 긴 개체를 육성하기 위해서는 개화수명이 긴 개체를 모본으로 사용하는 것이 유리할 것으로 판단된다.

② 질적특성분석

- KSLG와 751-1과의 정역교배 F₁ 과 양친의 화색에 대하여 분석결과는 표 13과 같다. 모든 F₁ 의 화색은 정역교배와 상관없이 752-1(Yellow)에 더 강한 영향을 받는 것으로 나타났다. 그 외에 다른 화색도 F₁ 에서 나타났다. 그러므로 호접란의 경우 후대의 색깔은 정역교배와 상관없이 다양하게 나타나는 것으로 판단이 되었다.

표 13. 정역교배 후대와 양친과의 꽃 질적 형질 분석.

Cultivar	Petal ground color	Petal second color	Lip ground color	Lip second color
KSLG (A)	Purple 100%	Purple 100%	Red-purple 100%	Red-purple 100%
752-1 (B)	Green yellow 100%	Green yellow 100%	White 100%	Red-purple 100%
	Yellow 91%	Red-purple 57.1%	Red-purple 60%	Yellow-orange 20%
	Purple 9%	Red 28.6%	Purple 30%	Red-purple 20%
1020 (A x B)	-	Purple 14.3%	White 10 %	White 20%
	-	-	-	Greyed-orange 20%
	-	-	-	Purple 20%
	Yellow 63.6%	Red-purple 50%	Red-purple 83.3%	Greyed-purple 20%
	Greyed-purple 9.1%	Yellow 12.5%	Greyed-orange 16.7%	Orange-red 20%
1032 (B x A)	Green-yellow 9.1%	Greyed-purple 12.5%		Grey-orange 20%
	Red-purple 9.1%	Purple 12.5%		Red-purple 20%
	Purple 9.1%	Greyed-red 12.5%		Purple 20%

(라) KSLG와 KA11의 정역교배 F₁의 특성분석

① 양적특성분석

- 정역교배 후대와 양친의 잎 형질에 대한 유사성 분석은 표 14와 같다. 엽수, 엽장, 엽폭은 KA11이 가장 크게 나타났으며 KSLG가 가장 낮은 수치를 나타냈다. F₁의 잎 형질은 부분과 모본의 변경에 따른 유전적 영향의 차이는 없는 것으로 판단된다. 잎 두께는 KSLG와 1184는 차이가 없었으나 1193의 경우 1.8로 약간 감소하였다.

표 14. 정역교배 후대와 양친과의 잎 형질 유사성 분석.

Cultivar	No. of leaves	Leaf		
		Length	Width	Thickness
KSLG (A)	6.01 b ²	9.87 c	4.90 c	1.90 a
KA11 (B)	8.00 a	21.52 a	8.00 a	1.90 a
1184 (A x B)	6.72 b	15.02 b	7.24 b	1.89 a
1193 (B x A)	7.83 a	15.17 b	6.78 b	1.80 b

² Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test at 5%

- 정역교배의 모부본과 후대의 화서 및 꽃 형질 분석한 결과는 표 15와 같다. 화서길이는 KSLG에 비해 F₁ 개체들이 더 길고 또한 F₁ 개체들 간의 수치는 비슷하였다. KSLG와 F₁ 개체들간의 줄기의 길이가 차이가 있는 것으로 보아 F₁ 개체들의 형질은 부분과 모본의 중간형을 띄었거나 KA11의 영향을 크게 받은 것으로 판단된다. 그리고 F₁ 개체들 간의 수치가 비슷한 것으로 보아 부분과 모본의 변경에 따른 유전적 영향의 차이는 크지 않은 것으로 판단된다.
- 꽃대의 수는 KSLG의 수가 F₁ 개체들의 수 보다 훨씬 많이 측정되었는데, 이는 꽃차례의 수가 KSLG가 2개인데 비해 F₁ 개체들은 1개이기 때문이다. 하지만 꽃대의 수/꽃차례의 수 즉 꽃이 조밀하게 피는 정도를 계산해 보면 F₁ 개체들이 KSLG보다 오히려 더 조밀하게 피는 것을 알 수 있다.
- 따라서 F₁ 개체들은 분화용 호접란의 관상 가치를 좌우하는 꽃이 조밀하게 피는 정도에는 문제가 없다. 화경의 길이는 KSLG에 비해 F₁ 개체들이 짧고 F₁ 개체들 간의 수치가 비슷하다. 따라서 두 F₁의 형질은 KSLG와 KA11의 중간형을 나타내었거나 KA11의 영향을 크게 받은 것으로 판단된다. 그리고 F₁ 개체들 간의 수치가 비슷한 것으로 보아 부분과 모

본의 변경에 따른 유전적 영향의 차이는 크게 없는 것으로 판단된다.

- 화경의 굵기는 KSLG에 비해 F₁ 개체들이 더 두껍고 F₁ 개체들 간의 수치가 비슷하다. 이를 통해 형질은 두 부모의 중간형을 띠었거나 KA11의 영향을 크게 받은 것으로 판단되고 F₁ 개체들 간의 수치가 비슷한 것으로 보아 부분과 모본의 변경에 따른 유전적 영향의 차이는 크게 없는 것으로 판단된다.

표 15. 정역교배 후대와 양친과의 화서 및 꽃 형질 유사성 분석.

Cultivar	Inflorescence length	No. of florets	Pedicel	
			Length (cm)	Thickness (mm)
KSLG (A)	50.80 b ^z	21.02 a	3.40 a	3.3 b
KA11 (B)	55.50 a	11.00 c	3.36 a	3.9 a
1184 (A x B)	54.02 a	12.16 b	2.92 b	3.5 a
1193 (B x A)	54.09 a	13.66 b	2.88 b	3.5 a

^z Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test at 5%.

- 꽃의 길이는 양친과 유의성이 없었으나 KSLG와 F₁ 개체들이 유사하였다. 따라서 F₁의 꽃의 길이는 KSLG의 영향을 크게 받은 것을 알 수 있고 KSLG가 부분으로 쓰이든 모본으로 쓰이든 똑같이 영향을 주는 것으로 생각되었다.
- 꽃의 넓이는 KSLG에 비해 F₁ 개체들이 훨씬 넓으며 F₁ 개체들간의 수치가 비슷하였다. 따라서 꽃의 넓이는 두 부모 개체의 중간형을 띠었거나 KA11의 영향을 크게 받은 것으로 판단된다(그림 4). 그리고 F₁ 개체들간의 수치가 비슷한 것으로 보아 부분과 모본의 변경에 따른 유전적 영향의 차이는 크게 없는 것으로 판단된다.
- 꽃잎의 길이는 KSLG가 가장 짧고 두 F₁ 중 1193이 1184보다 짧다. 이를 통해 KSLG가 부분으로 사용되었을 때가 모본으로 사용되었을 때 보다 꽃잎의 길이에 더 큰 영향을 주는 것으로 판단된다. 꽃잎의 넓이는 KSLG에 비해 두 F₁이 더 넓고 두 F₁의 수치가 비슷하다. 따라서 F₁의 꽃잎의 넓이는 KSLG와 KA11의 중간형을 띠었거나 KA11의 영향을 크게 받은 것으로 판단된다. 그리고 두 F₁의 수치가 비슷한 것으로 보아 부분과 모본의 변경에 따른 유전적 영향의 차이는 크게 없는 것으로 판단된다.

표 15. 계속.

Cultivar	Flower		Petal	
	Length (cm)	Width (cm)	Length (cm)	Width (cm)
KSLG (A)	5.6 a ^z	5.5 b	2.9 b	2.7 b
KA11 (B)	5.7 a	6.8 a	3.5 a	3.9 a
1184 (A x B)	5.6 a	6.2 a	3.1 a	3.4 a
1193 (B x A)	5.5 a	6.3 a	3.1 a	3.4 a

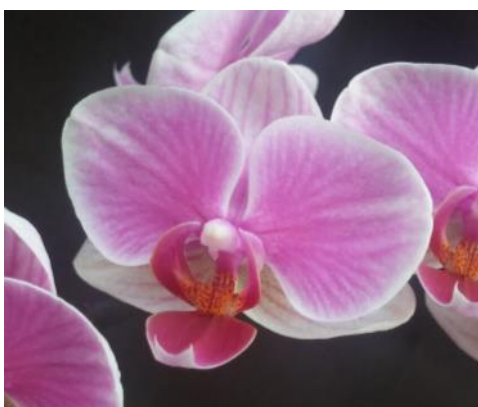
^z Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test at 5%



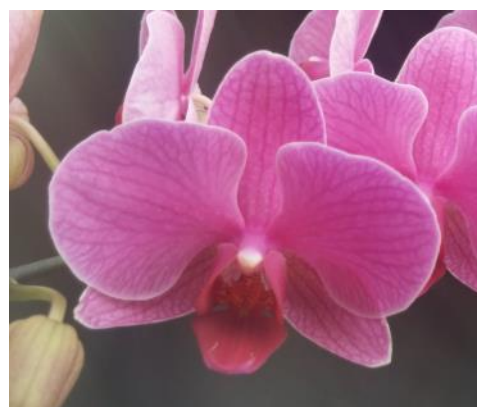
1184-9



1193-2



1184-66



1193-7

그림 4. 정역교배 후대와 양친과의 꽃 사진.

- 정역교배의 모부본과 후대의 화서 및 꽃 형질을 분석한 결과는 표 16과 같다. 호접란 육종에 있어서 가장 중요한 형질 중 하나인 개화수명은 1184가 134일로 가장 높게 나타났다. 이는 기존에 긴 개화수명으로 인정받은 KSLG보다도 높은 수치로 이번 조사의 중요한

결과이다.

표 16. 정역교배 후대와 양친과의 개화수명 유사성 분석.

Cultivar	Flowering date (yy.mm.dd)	Senescence date (yy.mm.dd)	Flowering duration (days)
KSLG (A)	2016.01.08	2016.05.10	123.0 b ²
KA11 (B)	2016.01.09	2016.04.28	110.2 c
1184 (A x B)	2015.10.15	2016.02.25	134.1 a
1193 (B x A)	2015.10.09	2016.02.10	125.2 ab

² Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test, p<0.05.

- KSLG와 KA11의 정역교배 F₁의 특성분석의 결과 엽수는 모본과 유사하며 엽장, 엽폭, 화수, 화경장은 모부본의 중간으로 나타나서 부분우성이라 할 수 있다. 화서장과 화경굽기는 KSLG와 상관없이 KA11과 유사하게 나타났다. 꽃 형질은 꽃길이를 제외하고 모두 KSLG보다 우세하고 KA11과 유사한 것으로 나타났다. 개화수명은 모부본보다 길었으며 KSLG가 모본으로 들어간 개체가 부분으로 들어간 개체보다 개화수명이 긴 것으로 나타났다.

② 질적특성분석

- 호접란 정역교배 후대와 양친과의 화색 질적 분석결과는 표 17과 같다. 양친 모두 단색으로 F₁ 개체들도 purple 화색의 양친과 같은 화색이 동시하게 나타났다. 순판의 경우에도 부분과 모본과 같은 red-purple인 F₁ 개체가 80%이상 나왔으며 모부본에는 없는 화색도 다양하게 나타났다.

표 17. 호접란 정역교배 후대와 양친과의 화색 질적 형질 분석.

Cultivar	Petal ground color	Petal second color	Lip ground color	Lip second color
KSLG (A)	Purple 100%	Purple 100%	Red-purple 100%	Red-purple 100%
KA11 (B)	Purple 100%	White 100%	Red-purple 100%	Greyed-yellow 100%
1184 (A x B)	Purple 58.8%	Purple 61.8%	Red-purple 85.7%	Red-purple 80.0%

	White 17.6%	White 17.6%	Purple 11.4%	Purple 8.6%
	Purple-violet 11.8%	Red-purple 14.7%	Greyed-orange 2.9%	Greyed-orange 8.6%
	Red-purple 8.8%	Purple-violet 2.9%		White 2.8%
	Greyed-orange 3.0%	N/A 2.9%		
	Purple 50%	Purple 58.3%	Red-purple 86.1%	Red-purple 66.7%
	Purple-violet 27.8%	Purple-violet 16.7%	Purple 8.3%	Red-purple 16.7%
	Red-purple 8.3%	White 13.9%	Greyed-red 2.8%	Purple 8.3%
1193 (B x A)	White 8.3%	Red-purple 5.6%	Yellow-Orange 2.8%	Purple-violet 2.8%
	Yellow 5.6%	Greyed-orange 5.6%		Greyed-orange 2.8%
				Yellow-Orange 2.8%

(마) KSLG와 215-1의 정역교배 F₁의 특성분석

① 양적특성분석

- 양친과 정역교배한 후대집단 잎의 특성형질의 유사성을 분석한 결과는 표 18과 같다. 엽수는 215-1이 14.4개로 F₁보다 3배 KSLG 보다 2배 정도 많은 것으로 나타났다. 그러나 엽장, 엽폭의 경우 KSLG는 각각 12.6cm, 5.7cm로 가장 큰 것으로 나타났으며, 215-1과 F₁ 개체들 간에는 유사성이 없는 것으로 나타났다. F₁의 엽수와 엽장은 모부본보다 열성형질 발현이라 판단된다. 그러나 엽두께는 1532가 가장 두꺼웠으며 초우성이라고 판단된다. 잎특징의 경우 엽수와 엽장은 F₁에서 열성이라 판단되었으며, 엽폭은 모부본의 중간으로 부분우성이라 할 수 있었다.

표 18. 정역교배 후대와 양친과의 잎 형질 유사성 분석.

Cultivar	No. of leaves	Leaf		
		Length (cm)	Width (cm)	Thickness (mm)
KSLG (A)	7.9 b ^z	12.6 a	5.7 a	1.9 b
215-1 (B)	14.4 a	11.1 b	4.4 c	1.6 b
1527 (A x B)	5.5 c	9.2 c	4.9 b	1.9 b
1532 (B x A)	5.1 c	9.5 c	4.6 bc	2.2 b

^z Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test, p<0.05.

- 양친과 정역교배한 후대집단의 화서 및 소화형질에 대한 유사성 분석 결과는 표 19와 같다. 화서길이는 KSLG가 가장 긴 것으로 나타났으며, 215-1과 정역후대 간에는 유의성이 없는 것으로 나타났다. 화수는 모부본보다 적은 것으로 나타났으므로 F₁에서 열성이라 할 수 있다. 화경길이는 1527, 1532가 모부본에 중간으로 부분우성이라 판단된다. 화경굵기는 1532가 모부본과 유사성을 냈으며 215-1가 부분인 1527은 부분과 유사한 것으로 나타났다.

표 19. 정역교배 후대와 양친과의 화서 및 꽃 형질 유사성 분석.

Cultivar	Inflorescence length (cm)	No. of florets	Pedicel	
			Length (cm)	Thickness (mm)
KSLG (A)	44.6 a ^z	16.6 a	3.2 a	3.0 a
215-1 (B)	25.7 b	16.1 a	2.8 b	2.5 b
1527 (A x B)	24.2 b	5.3 b	3.0 ab	2.6 b
1532 (B x A)	25.8 b	5.8 b	3.0 ab	2.7 ab

^z Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test, p<0.05.

- 꽃 길이와 꽃 너비는 215-1과 상관없이 모든 F₁이 KSLG와 유사한 것으로 나타났다. 꽃잎 길이와 너비 경우 KSLG가 부분으로 교배된 1532가 가장 좋게 나타났으며 215-1과 상관없이 KSLG와 유사한 것으로 판단된다. 이와 같이 정역교배 후대의 꽃 크기와 소화형질은 KSLG와 유사한 경향이 있는 것으로 판단된다.

표 19. 계속.

Cultivar	Flower		Petal	
	Length (cm)	Width (cm)	Length (cm)	Width (cm)
KSLG (A)	5.8 a ^z	5.8 a	2.9 b	2.9 b
215-1 (B)	4.8 b	4.7 b	2.4 c	2.6 c
1527 (A x B)	5.9 a	5.9 a	2.9 b	3.1 b
1532 (B x A)	6.8 a	6.1 a	3.1 a	3.2 a

^z Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test, p<0.05.



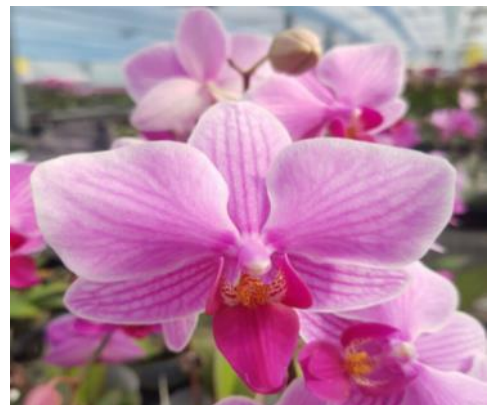
KS LG



215-1



1527 (A x B)



1532 (B x A)

그림 5. 정역교배 후대와 양친의 꽃 사진

- 양친과 정역교배한 후대집단 개화수명에 대한 상관관계 결과는 표 20과 같다. 개화일은 KSLG가 모본인 1527의 경우 개화가 빨랐으며 215-1이 가장 늦게 개화하여, 가장 늦게 폐화 하였다. 개화수명은 1527이 모부본과 중간으로 나타났으나 개화수명이 100일을 넘어서 일반 호접란보다 개화수명이 길었으며 모본인 KSLG의 영향을 받은 것으로 판단된다. 1532는 모본 (215-1)과 유사하게 나타났다. 이와 같이 개화수명은 모본의 영향을 크게 받는 것으로 판단된다.

표 20. 정역교배 후대와 양친과의 개화수명 유사성 분석.

Cultivar	Flowering date(yy.mm.dd)	Senescence date(yy.mm.dd)	Flowering duration (days)
KSLG (A)	2017.01.08	2017.05.10	123.0 a ^z
215-1 (B)	2017.03.08	2017.06.27	51.8 c
1527 (A x B)	2017.12.07	2017.03.05	109.8 b
1532 (B x A)	2017.01.03	2017.03.21	53.5 c

^z Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test, p<0.05.

- KSLG와 215-1의 정역교배 F₁의 특성분석은 엽수와 엽장, 화수는 모부분보다 열성이라 판단되었다. 화서장은 화서장이 긴 KSLG와 상관없이 215-1과 유사하게 나타났다. 그러나 꽃 길이, 꽃 너비는 KSLG와 유사한 것으로 나타났으나 KSLG가 부분으로 들어간 F₁은 우수한 꽃 형질을 가진 것으로 나타났다. 개화수명은 모본의 영향이 큰 것으로 판단되었다.

② 질적특성분석

- 호접란 정역교배 후대와 양친과의 화색 질적 분석결과는 표 21과 같다. 양친은 purple를 가진 KSLG와 red-purple를 가진 215-1를 정역교배 한 후 F₁에서 215-1이 모본으로 들어간 1532의 경우 KSLG과 닮아 100% purple로 표현하였으며, 215-1이 부분으로 들어간 1527의 경우 71.4% purple 나타났고 남은 부분이 모본과 유사한 결과를 나타냈다. 이와 같이 정역교배의 F₁ 화색은 모부분과 상관없이 KSLG와 유사성을 보였다. 순환의 경우에도 부분과 모본이 같은 red-purple group인 F₁에서 모두 다 100% red-purple group로 나왔다. 이 정역교배에서 화색은 모본과 부분의 화색 그룹과 유사하였으나 밝음도 달랐을 뿐인 것으로 보였다. 모부분의 화색은 밝음만 다르고 같은 그룹이면 정역교배 F₁에서 화색도 많이 다양하지 않게 나타났으며 해태로 심하게 표현하지 않은 것으로 나타났다.

표 21. 정역교배 후대와 양친과의 꽃 질적 형질 분석.

Cultivar	Petal ground color	Petal second color	Lip ground color	Lip second color
KSLG (A)	Purple 100%	Purple 100%	Red-purple 100%	Red-purple 100%
215-1 (B)	Red-purple 100%	Red-purple 100%	Red-purple 100%	Red-purple 100%
1527 (A x B)	Purple 71.4% Red-purple 28.6%	White 100%	Red-purple 100%	Red-purple 100%
1532 (B x A)	Purple 100%	White 100%	Red-purple 100%	Red-purple 100%

나. 배수성 및 화분임성 조사를 통한 교배 후대의 유전학적 특성 구명

(1) 우량계통 및 개화기간이 긴 개체의 배수성 검정

(가) 우량계통의 배수성 검정

- Flow cytometry를 이용하여 잎과 근단의 배수성을 확인한 결과는 다음과 같다. 배수성은

기존에 배수성이 확인된 *Raphanus Sativus* (WK 39)를 이용하여 계산하였다. 4배체 품종은 KS Little Gem(KSLG)을 비롯하여 1059-14, 1059-19, 1135-10, 1136-19, 1136-6, 215-1, 만천홍 등 이었다. 그 외는 2배체로 나타났다.

- 또한 대부분의 품종의 잎과 근단의 배수성은 동일하였으나 930, 2142, 1003-4, 1747-6, Coffee 등 일부 품종의 경우 근단은 2배체였지만 잎은 4배체로 나타났다. 이와 같은 결과는 호접란 잎의 경우 체세포다배수성이 존재하기 때문으로 판단되었다.
- 따라서 Flow cytometry로 호접란의 배수성을 확인하고자 할 경우에는 근단을 사용하는 것이 바람직하다고 생각된다.

표 22. 우량계통의 배수성 검정.

No.	Cultivar name	Tissue	Mean value	pg (1C)	Mbp	Ploidy
1	<i>Raphanus sativus</i> (WK 39: control)	Leaf	12.00	1.2	1173.60	2n
2	<i>Phal. equestris</i>	Leaf	26.43	2.6	2584.85	2n
3	<i>Phal. equestris</i> 'Orange'	Leaf	36.62	3.7	3581.44	2n
4	601	Leaf	29.7	3.0	2904.66	2n
5	930	Root tip	28.67	2.9	2803.93	2n
6	930	Leaf	58.69	5.9	5739.88	4n
7	932	Leaf	28.24	2.8	2761.87	2n
8	2102	Root tip	32.43	3.2	3171.65	2n
9	2102	Leaf	34.31	3.4	3355.52	2n
10	2113	Root tip	32.05	3.2	3134.49	2n
11	2113	Leaf	33.01	3.3	3228.38	2n
12	2142	Leaf	69.82	7.0	6828.40	4n
13	2142	Root tip	35.57	3.6	3478.75	2n
14	1003-4	Leaf	64.8	6.5	6337.44	4n
15	1003-4	Root tip	36.35	3.6	3555.03	2n
16	1003-9	Leaf	33.44	3.3	3270.43	2n
17	1003-9	Root tip	35.14	3.5	3436.69	2n
18	1020-15	Leaf	24.32	2.4	2378.50	2n
19	1031-13	Leaf	35.07	3.5	3429.85	2n
20	1032-1	Leaf	23.76	2.4	2323.73	2n
21	103-6	Root tip	33.32	3.3	3258.70	2n
22	1059-14	Leaf	62.24	6.2	6087.07	4n
23	1059-14	Root tip	61.26	6.1	5991.23	4n
24	1059-19	Leaf	54.83	5.5	5362.37	4n
25	1059-19	Root	58.85	5.9	5755.53	4n
26	1076-57	Leaf	32.06	3.2	3135.47	2n
27	1076-57	Root tip	35.57	3.6	3478.75	2n
28	1125-11	Leaf	33.64	3.4	3289.99	2n
29	1125-16	Leaf	35.61	3.6	3482.66	2n
30	1125-18	Leaf	30.21	3.0	2954.54	2n
31	1125-3	Leaf	29.18	2.9	2853.80	2n
32	1135-10	Leaf	53.15	5.3	5198.07	4n
33	1135-10	Root tip	55.23	5.5	5401.49	4n

34	1136-12	Leaf	32.04	3.2	3133.51	2n
35	1136-17	Leaf	31.35	3.1	3066.03	2n
36	1136-19	Leaf	58.41	5.8	5712.50	4n
37	1136-6	Leaf	60.67	6.1	5933.53	4n
38	1138-8	Leaf	30.47	3.0	2979.97	2n
39	1144-5	Leaf	27.21	2.7	2661.14	2n
40	1146-12	Leaf	30.27	3.0	2960.41	2n
41	1159-9	Leaf	31.75	3.2	3105.15	2n
42	1165-1	Leaf	33.32	3.3	3258.70	2n
43	1747-16	Leaf	81.45	8.1	7965.81	4n
44	1747-16	Root tip	39.52	4.0	3865.06	2n
45	178-10	Root tip	36.4	3.6	3559.92	2n
46	178-10	Leaf	32.52	3.3	3180.46	2n
47	215-1	Leaf	50.27	5.0	4916.41	4n
48	215-1	Root tip	51.19	5.1	5006.38	4n
49	684-7	Leaf	29	2.9	2836.20	2n
50	752-1	Leaf	36.25	3.6	3545.25	2n
51	CK-1	Leaf	28.16	2.8	2754.05	2n
53	Coffee	Leaf	63.61	6.4	6221.06	4n
54	Coffee	Root tip	34.56	3.5	3379.97	2n
55	SYCI	Leaf	33.3	3.3	3256.74	2n
56	SYCI	Root tip	34.38	3.4	3362.36	2n
57	Lan Lan	Leaf	30.72	3.1	3004.42	2n
58	Lan Lan	Root tip	32.31	3.2	3159.92	2n
59	Lin Lin	Root tip	35.19	3.5	3441.58	2n
60	Lin Lin	Leaf	32.13	3.2	3142.31	2n
61	Man Cheon Hong	Root tip	60.24	6.0	5891.47	4n
62	Man Cheon Hong	Leaf	58.38	5.8	5709.56	4n
63	KSLG	Root tip	50.29	5.0	4918.36	4n
64	KSLG	Leaf	49.89	4.98	4879.24	4n

(나) 개화수명이 긴 계통의 배수성 검정 및 DNA함량

- Flow cytometry를 이용하여 개화수명이 긴 계통과 짧은 계통의 잎과 근단의 배수성과 DNA함량을 분석한 결과는 표 23과 같다.
- 배수성은 기존에 배수성이 확인된 *Raphanus sativus* (WK 39)를 이용하여 계산하였다. 호접란 원종들(*Phal. mannii*, *Phal. cornu-cervi*, *Phal. equestris*, *Phal. equestris* Orange', *Phal. pantherian*, *Phal. pulchra*, *Phal. hieroglyphica*)은 모두 2배체로 확인 되었다. KS Little Gem(KSLG)과 KA11의 정역교배 후대 중 개화수명이 긴 개체 1184(-52, -53, -55, -58, -61, -63, -66, -68, -69, -72, -73, -77), 1193(-54, -56, -66, -67, -68)와 개화수명이 짧은 개체 1184(-80, -74, -75, -65, -60), 1193(-61, -58, -79, -59, -64, -63)의 배수성을 비교한 결과 모두 4배체로 확인 되었다.
- 또한 개화수명이 짧은 개체들과 개화수명이 긴 개체들의 DNA함량에도 큰 차이가 없는 것

으로 나타났다. 대부분의 품종의 잎과 근단의 배수성은 동일하였으나 일부 개체에서 잎의 DNA함량은 근단의 DNA함량보다 더 높게 나타났다. 이와 같은 결과는 상기의 실험결과와 마찬가지로 호접란 잎의 경우 체세포다배수성이 존재하기 때문으로 판단되었다.

- 모부본과 F₁의 DNA함량의 조사결과인 표 22에 따라 개화수명이 제일 짧은 1184-74(77일), 1184-75(77일), 1193-58(79일), 1193-79(82일) 등의 DNA함량은 각각 5981.4, 5634.3, 5648.0, 5648.0 mbp로 나타났다. 개화수명이 제일 긴 1183-61(157일), 1183-59(156일), 1184-52(142일), 1193-73(126일), 1193-68(123일)의 DNA함량은 각각 5478.8, 5054.3, 5391.7, 5286.1, 5093.4 mbp로 나타났으며 큰 차이가 없다고 판단된다. 이와 같은 결과로부터 배수성과 DNA함량은 개화수명과 상관이 없다고 판단되었다.

표 23. 개화수명이 긴 계통의 배수성 검정 및 모·부본과 F₁과의 DNA함량 조사.

	Cultivar name	Tissue	Mean value	Putative genome		Putative ploidy	Flowering duration (days)
				pg(2C)	Mbp		
Control	<i>Raphanus sativus</i> (WK 39)	Leaf	12.00	1.2	1173.6	2n	-
Species	<i>Phal. mannii</i>	Root	27.63	2.8	2702.2	2n	-
	<i>Phal. mannii</i>	Leaf	27.35	2.7	2674.8	2n	-
	<i>Phal. cornu-cervi</i>	Root	27.1	2.7	2650.4	2n	-
	<i>Phal. cornu-cervi</i>	Leaf	27.41	2.7	2680.7	2n	-
	<i>Phal. equestris</i>	Leaf	26.43	2.6	2584.9	2n	-
	<i>Phal. equestris</i> 'Orange'	Leaf	36.62	3.7	3581.4	2n	-
	<i>Phal. pantherian</i>	Root	26.83	2.7	2624.0	2n	-
	<i>Phal. pantherian</i>	Leaf	27.61	2.8	2700.3	2n	-
	<i>Phal. pulchra</i>	Roof	27.09	2.7	2649.4	2n	-
	<i>Phal. pulchra</i>	Leaf	27.26	2.7	2666.0	2n	-
	<i>Phal. hieroglyphica</i>	Root	18.30	1.8	1789.7	2n	-
<i>Phal. hieroglyphica</i>	Leaf	18.61	1.9	1820.0	2n	-	
Mother & father	KSLG	Leaf	50.29	5.0	4918.4	4n	123
	KSLG	Root	49.89	5.0	4879.2	4n	123
	KA11	Root	26.60	5.3	5203.0	4n	120
	KA11	Leaf	26.80	5.3	5203.0	4n	120
Long lasting flowering F ₁	1184-53	Root	58.05	5.8	5677.3	4n	105
	1184-53	Leaf	61.34	6.1	5999.1	4n	105
	1193-67	Root	58.79	5.9	5749.7	4n	106
	1193-67	Leaf	60.33	6.0	5900.3	4n	106
	1184-55	Root	50.67	5.1	4955.5	4n	107
	1184-55	Leaf	53.12	5.3	5195.1	4n	107
	1184-63	Root	45.73	4.6	4472.4	4n	107

	1184-63	Leaf	56.08	5.6	5484.6	4n	107
	1193-54	Root	53.02	5.3	5185.4	4n	111
	1193-54	Leaf	55.66	5.6	5443.5	4n	111
	1193-56	Root	55.37	5.5	5415.2	4n	113
	1193-56	Leaf	56.28	5.6	5504.2	4n	113
	1884-77	Root	50.68	5.1	4956.5	4n	115
	1884-77	Leaf	58.79	5.9	5749.7	4n	115
	1184-58	Root	55.06	5.5	5384.9	4n	123
	1184-58	Leaf	57.42	5.7	5615.7	4n	123
	1193-68	Root	52.08	5.2	5093.4	4n	123
	1193-68	Leaf	54.40	5.4	5320.3	4n	123
	1184-68	Root	53.12	5.3	5195.1	4n	124
	1184-68	Leaf	61.74	6.2	6038.2	4n	124
	1184-66	Root	56.79	5.7	5554.1	4n	125
	1184-66	Leaf	57.10	5.7	5584.4	4n	125
	1184-69	Root	58.09	5.8	5681.2	4n	125
	1184-69	Leaf	58.72	5.9	5742.8	4n	125
	1184-72	Root	45.47	4.5	4447.0	4n	125
	1184-72	Leaf	54.22	5.4	5302.7	4n	125
	1193-75	Root	54.05	5.4	5286.1	4n	126
	1193-75	Leaf	57.37	5.7	5610.8	4n	126
	1193-66	Root	59.18	5.9	5787.8	4n	128
	1193-66	Leaf	58.54	5.9	5725.2	4n	128
	1184-61	Root	56.68	5.7	5543.3	4n	130
	1184-61	Leaf	59.45	5.9	5814.2	4n	130
	1184-73	Root	49.12	4.9	4803.9	4n	134
	1184-73	Leaf	57.03	5.7	5577.5	4n	134
	1184-79	Root	56.29	5.6	5505.2	4n	135
	1184-79	Leaf	59.31	5.9	5800.5	4n	135
	1184-52	Root	55.13	5.5	5391.7	4n	142
	1184-52	Leaf	56.41	5.6	5516.9	4n	142
Short lasting flowering F ₁	1193-61	Root	54.00	5.4	5281.2	4n	68
	1193-61	Leaf	55.21	5.5	5399.5	4n	68
	1184-80	Root	53.74	5.4	5255.8	4n	72
	1184-80	Leaf	54.03	5.4	5284.1	4n	72
	1184-74	Root	52.23	5.2	5108.1	4n	77
	1184-74	Leaf	61.16	6.1	5981.4	4n	77
	1184-75	Root	46.16	4.6	4514.4	4n	77
	1184-75	Leaf	57.61	5.8	5634.3	4n	77

	1193-58	Root	57.75	5.8	5648.0	4n	79
	1193-58	Leaf	59.78	6.0	5846.5	4n	79
	1193-79	Root	47.97	4.8	4691.5	4n	82
	1193-79	Leaf	59.43	5.9	5812.3	4n	82
	1184-65	Root	52.45	5.2	5129.6	4n	85
	1184-65	Leaf	53.60	5.4	5242.1	4n	85
	1193-59	Root	55.75	5.6	5452.4	4n	89
	1193-59	Leaf	59.28	5.9	5797.9	4n	89
	1193-64	Root	61.41	6.1	6005.9	4n	89
	1193-64	Leaf	61.39	6.1	6003.9	4n	89

(2) 화분임성 조사 및 배수성과의 연관성 검정

- 화분의 활성 테스트는 Alexander solution을 처리하여 염색이 되지 않은 화분수를 현미경 Olympus BX 61 1000배로 확인하였다. 화분을 채취하여 나이프(Blade #10)로 3등분하여 슬라이드에 화분을 올려 놓고 Alexander solution을 처리하여 15분간 침투시킨 다음 현미경을 이용하여 염색이 되지 않은 화분수를 조사하였다. 관찰한 총 화분수를 조사한 다음 이를 분모로 미염색 화분율을 계산하였다.
- 화분의 활력과 배수성과의 관계는 표 24와 같다. 조사 결과 CK-1의 미염색화분율이 4.2%로 가장 높았으나 대부분이 3% 미만으로 나타났으며 배수성에 관계없이 화분의 활력은 95% 이상으로 이었다. 이와 같은 결과로부터 화분의 활력과 배수성과의 관계는 관련이 없는 것으로 나타났다.

표 24. 우량계통의 화분 활력 테스트.

No.	Cultivar name	No. of undying pollens			Average	Undying pollen rate (%)	Fertility rate (%)	Ploidy
		1 st	2 rd	3 rd				
1	1076-57	18	20	22	20 ± 1.2	2.5	97.5	2n
2	2113	9	8	10	9.0 ± 0.6	1.1	98.9	2n
3	Coffee	3	3	3	3.0 ± 0.0	0.4	99.6	2n
4	752-1	13	8	8	9.7 ± 1.7	1.2	98.8	2n
5	SYCI	7	7	7	7.0 ± 0.0	0.9	99.1	2n
6	Lan Lan	10	10	10	10.0 ± 0.0	1.3	98.7	2n

7	Lin Lin	17	13	13	14.3 ± 1.3	1.8	98.2	2n
8	<i>Phal. equestris</i> 'Orange'	13	14	14	13.7 ± 0.3	1.7	98.3	2n
9	<i>Phal. amabili</i> 'Philippin'	3	3	3	3.0 ± 0.0	0.4	99.6	2n
10	178-10	17	19	21	19.0 ± 1.2	2.4	97.6	2n
11	<i>Phal. equestris</i>	10	15	15	13.3 ± 1.7	1.7	98.3	2n
12	932	8	11	11	10.0 ± 1.0	1.3	98.7	2n
13	KS LG	5	6	6	5.7 ± 0.3	2.5	97.5	4n
14	1059-14	3	3	3	3.0 ± 0.0	0.4	99.6	4n
15	1059-24 (bub)	16	16	16	16.0 ± 0.0	2.0	98.0	4n
16	1747-16	15	15	15	15.0 ± 0.0	1.9	98.1	4n
17	CK-1	30	35	36	33.7 ± 1.9	4.2	95.8	4n
18	215-1	23	21	22	22.0 ± 0.6	2.8	97.2	4n
19	930	20	19	20	19.7 ± 0.3	2.5	97.5	4n

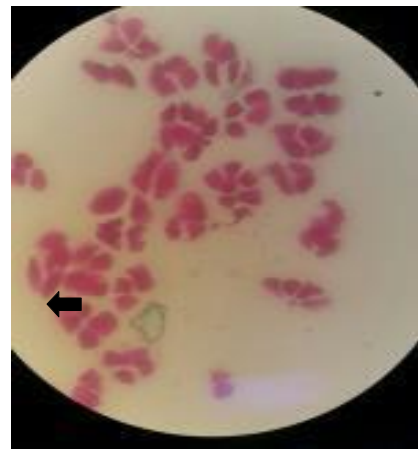
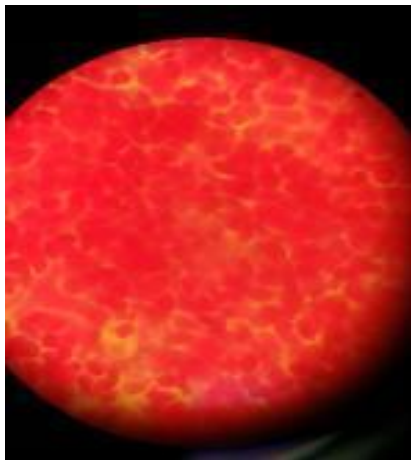


그림 6. Alexander Solution으로 염색하여 1000배로 촬영한 호접란 화분사진 :
화살표가 미염색 화분임.

다. 집단분석을 통한 개화수명 관련 유전양식 구명

(1) 개화수명이 긴 호접란의 정역교배 후대 특성과 개화수명과의 상관관계 분석

(가) KSLG와 1747의 정역교배 후대 특성과 개화수명과의 상관관계 분석

- 양친과 정역교배한 후대집단에 대한 잎의 특성과 개화수명의 상관관계분석 결과는 표 25와 같다. 엽수, 엽장, 엽폭, 엽록소는 개화수명과 상관관계가 없었으나 잎두께는 개화수명과 0.05% 수준의 정의 상관관계로 잎두께가 두꺼울수록 개화수명이 길어지는 것으로 나타났다. 엽장과 엽폭도 정의 상관관계를 가지고 있어 엽장이 길수록 엽폭은 넓어지는 것으로 나타났다.

표 25. 정역교배 후대 1059(A x B), 1076(B X A)와 양친 KSLG(A), 1747(B)과의 개화수명과 잎 형질의 상관관계 분석.

Factor	No. of leaves	Leaf length	Leaf width	Leaf thickness	Chlorophyll
Flower longevity	0.266	-0.605	-0.759	0.909*	0.617
No. of leaves	-	0.434	0.381	0.459	-0.571
Leaf length		-	0.954*	-0.588	-0.746
Leaf width			-	-0.639	-0.882
Leaf thickness				-	0.321

*P < 0.05, **P < 0.01

- 양친과 정역교배한 후대집단에 대한 화서의 형질 및 개화수명의 상관관계분석 결과는 표 26과 같다. 개화수명은 화서와 관련된 모든 요인과 상관관계가 없었다. 소화의 수는 화서 길이와 정의 상관관계를 보여 화서에 달리는 꽃의 수가 많을수록 화서길이를 길어진다는 결과를 나타내었다. 소화수와 화서장은 소화경길이, 소화경굵기와 부의 상관관계를 나타냈다.
- 따라서 소화경길이가 길어질수록, 소화경굵기가 두꺼울수록 소화가 적어지고 화서장은 짧아지는 것으로 나타났다. 소화경의 길이는 소화경의 굵기와 정의 상관관계를 나타냈다.

표 26. 정역교배 후대 1059(A x B), 1076(B X A)와 양친 KSLG(A), 1747(B)과의 개화수명과 화서 형질의 상관관계 분석.

Factor	Stalk length	No. of florets	Inflorescence length	Pedicle length	Pedicle diameter
Flower longevity	0.846	0.769	0.809	-0.732	-0.652
Stalk length		0.843	0.864	-0.882	-0.848
No. of florets			0.998**	-0.989**	-0.974*
Inflorescence length				-0.985**	-0.963*
Pedicle length					0.994**

*P < 0.05, **P < 0.01

- 양친과 정역교배한 후대집단에 대한 꽃의 특성과 개화수명의 상관관계 결과는 표 27과 같다. 개화수명은 꽃너비, 꽃길이, 꽃받침 길이, 꽃잎 길이, 꽃잎 너비와 상관관계가 없었다. 꽃받침 너비는 개화수명과 부의 상관관계를 보여 꽃받침너비가 좁아질수록 개화수명이 길어지는 것으로 나타났다.
- 프리플라의 이면교배에 의한 연구에서 Song (2005)은 개화수는 개화소요일수와는 부의 상관관계를, 나머지 형질들과는 정의 상관관계 보였다고 보고하였다. 꽃길이는 꽃받침길이 및 꽃잎길리와 정의 상관관계로 꽃길이가 길수록 꽃받침길이 및 꽃잎길이가 길어지는 것을 알 수 있었다. 꽃너비는 꽃잎너비와 부의 상관관계가 나타났으며, 꽃너비가 넓을수록 꽃잎너비가 좁아진 것으로 나타났다.
- Raghava 등(1992)은 국화 17계통의 형질간 상관관계를 산출한 결과, 개체당 꽃 수량과 초장, 개화 소요일수, 꽃의 크기, 개체당 화수와 정의 상관관계가 있다 한다. 그리고 개체당 꽃 수량에 대하여 개화소요일수와 개체당 화수는 직접효과를 나타내었으며, 개화소요일수는 개체당 화수의 간접효과에 의해 수량에 영향을 주고, 초장과 꽃의 크기는 개체당 화수와 초장의 간접효과에 의해 꽃의 수량에 영향을 미쳤다고 하였다. 난의 경우, MA Al-Faruque 등(2015)은 방글라데시의 난을 평가하기 위하여 23개 지역 난초의 변동성, 상관관계 및 형태학적 특성에 대해 연구하였다. 그 결과를 살펴보면 꽃형질이 화경길이, 화경수, 각 화경 소화수, 꽃의 크기, 개화수명, 색깔, 꽃의 기원, 꽃받침 모양, 꽃잎 모양 등과 상관관계가 있다고 보고 하였다.

표 27. 정역교배 후대 1059(A x B), 1076(B X A)와 양친 KSLG(A), 1747(B)과의 개화수명과 화서 형질의 상관관계 분석.

Factor	Flower length	Flower width	Sepal length	Sepal width	Petal length	Petal width
Flower longevity	-0.254	-0.498	-0.438	-0.908*	-0.381	0.720
Flower length		0.805	0.981*	0.540	0.993**	-0.688
Flower width			0.879	0.814	0.845	-0.957*
Sepal length				0.693	0.997**	-0.808
Sepal width					0.635	-0.945
Petal length						-0.758

*P < 0.05, **P < 0.01

(나) KSLG와 752-1의 정역교배 후대특성과 개화수명과의 상관관계 분석

- 양친과 정역교배한 후대집단 잎의 특성과 개화수명에 대한 상관관계 결과는 표 28과 같다. 잎의 길이와 개화수명은 모든 요인과 관계가 없었으며, 잎의 수도 모든 요인과 관계가 없었다. 이와 반대로 잎의 두께는 잎의 너비와 관계가 있는데, 잎 두께가 두꺼워질수록 잎 너비가 좁아지므로 잎 두께와 잎 너비는 부와 상관관계가 있었다. 꽃의 수명과 엽수는 정의 상관관계로 나타났으나 유의차는 없었다.

표 28. 정역교배 후대 1020(A x B), 1032(B x A)와 양친 KSLG(A), 752-1(B)과의 개화수명과 잎 형질의 상관관계 분석.

Factor	Leaf length	Leaf width	Leaf thickness	No. of leaves
Flowering longevity	-0.605	-0.352	0.125	0.896
Leaf length		0.891	-0.718	-0.628
Leaf width			-0.955*	-0.240
Leaf thickness				-0.050

*P < 0.05, **P < 0.01

- 양친과 정역교배한 후대집단 소화의 형태에 대한 상관관계 결과는 표 29와 같다. 꽃의 너비와 개화수명은 모든 요인과 관계가 없었다. 반대로 꽃잎의 길이가 길어질수록 꽃의 길이도 길어지며, 꽃잎의 너비가 넓어질수록 꽃의 길이가 길어진다는 결과가 나왔다. 꽃 수명과 소화의 형태는 큰 상관관계를 나타내는 요인이 없었지만 소화의 길이는 꽃잎의 길이와 정의 상관관계를 나타내었다. 특히 꽃잎의 길이가 길어질수록 소화의 길이와 크기도 길어지는 것을 알 수 있다. 따라서 높은 정의 상관관계를 나타냈으나 유의차는 없었다.

표 29. 정역교배 후대 1020(A x B), 1032(B x A)와 양친 KSLG(A), 752-1(B)과의 개화수명과 꽃 형질의 상관관계 분석.

Factor	Flower length	Flower width	Petal length	Petal width
Flowering longevity	0.701	0.450	0.758	0.681
Flower length		0.932*	0.981*	0.974*
Flower width			0.906	0.859
Petal length				0.924

*P < 0.05, **P < 0.01

- 양친과 정역교배한 후대집단 화서의 수와 꽃 수명에 대한 상관관계 결과는 표 30과 같다. 소화경의 길이와 화서장 그리고 소화수는 정의 상관관계가 있었으며 소화경이 길어질수록 화서의 길이가 길어지고 꽃의 수도 많아진다는 결과가 나왔다. 대부분 높은 정의 상관관계를 나타냈지만 유의차는 없었다. 그리고 개화수명은 소화수와 정의 상관관계가 나타났다. 소화수가 많으면 많을수록 개화수명이 길어진 것으로 나타났다. 이 특징은 개화수명이 긴 KSLG와 동일하였다.

표 30. 정역교배 후대 1020(A x B), 1032(B x A)와 양친 KSLG(A), 752-1(B)과의 개화수명과 화서 형질의 상관관계 분석.

Factor	No. of inflorescences	Inflorescence length	No. of florets	Pedicle length	Pedicle thickness
Flowering longevity	-0.322	0.840	0.918*	0.797	0.467
No. of inflorescences		-0.640	-0.622	-0.787	-0.893
Inflorescence length			0.980*	0.973*	0.853
No. of florets				0.969*	0.780
Pedicle length					0.904

*P < 0.05, **P < 0.01

(다) KSLG와 425-3의 정역교배 후대특성과 개화수명과의 상관관계 분석

- 양친과 정역교배한 후대집단에 대한 잎의 특성과 개화수명의 상관관계분석 결과는 표 31과 같다. 엽수, 엽장, 엽 두께는 개화수명과 상관관계가 없었으나 잎 두께는 개화수명과 0.05% 수준의 정의 상관관계가 있으며 잎 두께가 두꺼울수록 개화수명이 길어지는 것으로

나타났다. 엽장과 엽수는 반비례 상관관계를 가지고 있어 엽장이 길수록 엽수는 적어지는 것으로 나타났다.

표 31. 정역교배 후대 1125(A x B), 1136(B X A)와 양친 KSLG(A), 425-3(B)과의 개화수명과 잎 형질의 상관관계 분석.

Factor	No. of leaves	Leaf length	Leaf width	Leaf thickness
Flower longevity	-0.908	-0.892	0.987*	-0.140
No. of leaves	-	-0.986*	-0.893	-0.109
Leaf length		-	0.851	-0.060
Leaf width			-	0.296
Leaf thickness				-

*P < 0.05, **P < 0.01

- 양친과 정역교배한 후대집단에 대한 화서의 형질 및 개화수명과 상관관계분석 결과는 표 32와 같다. 개화수명은 화서와 관련된 모든 요인과 상관관계가 없었을 뿐만 아니라 화서 요인간에 상관관계를 보이지 않은 것으로 나타났다.

표 32. 정역교배 후대 1125(A x B), 1136(B X A)와 양친 KSLG(A), 425-3(B)과의 개화수명과 화서 형질의 상관관계 분석.

Factor	No. of inflorescences	No. of florets	Inflorescence length	Pedicle length	Pedicle diameter
Flower longevity	0.902	0.468	0.831	-0.406	-0.903
No. of inflorescences	-	0.069	0.540	-0.663	-0.699
No. of florets		-	0.877	0.572	-0.530
Inflorescence length			-	0.159	-0.790
Pedicle length				-	0.386

*P < 0.05, **P < 0.01

- 양친과 정역교배한 후대집단에 대한 꽃의 특성과 개화수명의 상관관계 결과는 표 33과 같다. 개화수명은 꽃 길이를 제외하고 꽃 너비, 꽃잎 길이, 꽃잎 너비와 부의 상관관계를 보였다. 꽃 너비, 꽃잎 너비는 개화수명과 부의 상관관계를 보여 좁아질수록 개화수명이 길어지는 것으로 나타났으며 꽃잎 길이가 작아질수록 개화수명이 길어진 것으로 나타났다. 그리고 꽃 너비는 꽃잎너비와 정의 상관관계가 나타났으며, 꽃 너비가 넓을수록 꽃잎너비가 커진 것으로 나타났다.

표 33. 정역교배 후대 1125(A x B), 1136(B X A)와 양친 KSLG(A), 425-3(B)과의 개화수명과 꽃 형질의 상관관계 분석.

Factor	Flower length	Flower width	Petal length	Petal width
Flower longevity	-0.737	-0.971*	-0.984*	-0.984*
Flower length	-	0.876	0.645	0.719
Flower width		-	0.924	0.957*
Petal length			-	0.946

*P < 0.05, **P < 0.01

(라) KSLG와 KA11의 정역교배 후대특성과 개화수명과의 상관관계 분석

- 양친과 정역교배한 후대집단에 대한 잎의 특성과 개화수명과의 상관관계분석 결과는 표 34와 같다. 엽수, 엽장, 엽폭, 엽 두께는 개화수명과 상관관계가 없었으며 잎과 관련된 모든 요인 간에도 상관관계가 없는 것으로 나타났다.

표 34. 정역교배 후대 1184(A x B), 1193(B x A)와 양친 KSLG(A), KA11(B)과의 개화수명과 잎 형질의 상관관계 분석.

Factor	No. of leaves	Leaf length	Leaf width	Leaf thickness
Flowering longevity	0.320	-0.883	-0.523	-0.391
Leaf length	-	-0.677	-0.939	-0.165
Leaf width		-	0.855	0.562
Leaf thickness			-	0.469

*P < 0.05, **P < 0.01

- 양친과 정역교배한 후대집단 화서의 형태에 대한 상관관계 결과는 표 35와 같다. 화서는 개화수명과 상관관계가 없었다. 반대로 화서 수는 화서길이와 부의 상관관계를 보였으며 소화수와 화경 굵기와 정의 상관관계가 나타났다. 화서길이는 소화수와 정의 상관관계를 보여서 화서가 길어질수록 소화수가 많아지는 것으로 나타났다.

표 34. 정역교배 후대 1184(A x B), 1193(B x A)와 양친 KSLG(A), KA11(B)과의 개화수명과 화서 형질의 상관관계 분석.

Factor	No. of inflorescences	Inflorescence length	No. of florets	Pedicel length	Pedicel thickness
Flowering longevity	0.117	-0.163	0.202	-0.934	-0.125
No. of inflorescences	-	-0.998**	0.992**	-0.098	0.952*
Inflorescence length		-	0.990*	0.124	-0.948
No. of florets			-	-0.210	0.907
Pedicel length				-	0.196

*P < 0.05, **P < 0.01

- 양친과 정역교배한 후대집단 꽃형질과 개화수명에 대한 상관관계 결과는 표 36과 같다. 개화수명과 다른 요인과의 상관관계는 보이지 않았다. 꽃 너비는 꽃 길이와 꽃잎너비와의 상관관계를 보였다. 꽃너비는 길어질수록 꽃길이가 길어지면서 꽃잎너비가 넓어진 것으로 나타났다.

표 36. 정역교배 후대 1184(A x B), 1193(B x A)와 양친 KSLG(A), KA11(B)과의 개화수명과 꽃 형질의 상관관계 분석.

Factor	Flower length	Flower width	Petal length	Petal width
Flowering longevity	-0.431	-0.606	-0.769	-0.724
Flower length	-	0.979*	0.850	0.927
Flower width		-	0.925	0.982*
Petal length			-	0.978*

*P < 0.05, **P < 0.01

- 이와 같이 정역교배 후대특성과 개화수명과의 상관관계의 실험결과를 종합적으로 분석한 결과는 다음과 같다. 호접란의 정역교잡 후대의 표현형질에 대한 양친과의 유사성 분석결과 정역교배 후대의 형태적 표현형질은 모부분의 중간으로 나타났으나, 개화수명은 모본과 유사한 것으로 나타났다. 또한 모본인 KSLG 는 개화수명이 길 뿐만 아니라 잎이 두껍고 꽃받침, 꽃잎너비가 좁은 특성을 가지고 있다.
- 이상의 결과로부터 개화수명은 꽃받침, 꽃잎 너비, 잎두께와 상관관계가 매우 높으며, 개화수명이 긴 호접란을 육성하기 위해서는 개화수명이 긴 개체를 모본으로 사용하고 후대

개체의 잎두께와 꽃받침, 꽃잎 너비를 관찰하면 개화수명이 긴 개체를 선발할 수 있을 것으로 판단된다.

(마) KSLG와 215-1의 정역교배 특성의 상관관계 분석

- 양친과 정역교배한 후대집단에 대한 잎의 특성과 개화수명의 상관관계분석 결과는 표 37과 같다. 개화수명은 잎과 관련된 모든 요인과 상관관계가 없었을 뿐 아니라 잎 요인 간에 상관관계를 보이지 않은 것으로 나타났다.

표 37. 정역교배 후대 1527 (A x B), 1532 (B x A)와 양친 KSLG(A), 215-1(B)과의 개화수명과 잎 형질의 상관관계 분석.

Factor	No. of leaves	Leaf length	Leaf width	Leaf thickness
Flower longevity	-0.384	0.351	0.906	-0.452
No. of leaves	-	0.439	-0.403	-0.603
Leaf length		-	0.575	-0.475
Leaf width			-	-0.235

*P < 0.05, **P < 0.01

- 양친과 정역교배한 후대집단에 대한 화서의 형질 및 개화수명의 상관관계분석 결과는 표 38과 같다. 개화수명은 모든 화서 형질과 상관관계가 없는 것으로 나타났다. 화서 형질 간에 유의하게 화서길이는 소화수와 정의 상관관계를 나타냈으며 화서의 길이가 길어질수록 꽃의 수가 많아진다는 결과가 나왔다.

표 38. 정역교배 후대 1527 (A x B), 1532 (B x A)와 양친 KSLG(A), 215-1(B)과의 개화수명과 화서 형질의 상관관계 분석

Factor	No. of inflorescences	No. of florets	Inflorescence length	Pedicel length	Pedicel diameter
Flower longevity	0.031	0.100	0.656	0.600	0.698
No. of inflorescences	-	0.997**	0.527	0.438	0.841
No. of florets		-	0.590	-0.467	0.063
Inflorescence length			-	0.438	0.841
Pedicel length				-	0.852

*P < 0.05, **P < 0.01

- 양친과 정역교배한 후대집단에 대한 꽃의 특성과 개화수명의 상관관계 결과는 표 39와 같다. 개화수명은 꽃 형질과 관련된 모든 요인과 상관관계가 없었다. 꽃 너비, 꽃잎 길이는 꽃 길이와 정의 상관관계를 보여 꽃 너비가 커질수록 꽃잎 길이가 길어질수록 꽃 길이가 길어진 것으로 나타났다. 꽃 너비는 꽃잎 길이, 꽃잎 너비와 정의 상관관계가 나타났으며, 꽃 너비가 넓을수록 꽃잎 길이, 꽃잎너비가 커진 것으로 나타났다. 그리고 꽃잎 길이는 꽃 너비와 정의 상관관계를 나타냈으며 꽃 너비가 넓어질수록 꽃잎 길이가 길어진 것으로 결과가 나왔다.

표 39. 정역교배 후대 1527 (A x B), 1532 (B x A)와 양친 KSLG(A), 215-1(B)과의 개화수명과 꽃 형질의 상관관계 분석.

Factor	Flower length	Flower width	Petal length	Petal width
Flower longevity	0.380	0.384	0.229	0.120
Flower length	-	0.979*	0.970*	0.913
Flower width		-	0.986*	0.957*
Petal length			-	0.985*

*P < 0.05, **P < 0.01

(2) 개화수명이 긴 정역교배 후대 특성과 개화수명과의 주성분분석

- 정역교배 후대의 주요 특성에 대한 주성분분석(PCA, Primary Components Analysis) 결과는 그림 7, 8, 9와 같다. 그림 7은 품종별로 조사한 특성간의 상관관계를 나타내며 적색이 진할수록 특성 간의 상관관계가 높다는 것을 나타낸다. 모든 품종에서 꽃형질 간에 상간관계가 높은 것으로 나타났다.
- 그림 8은 품종간의 상간관계와 모든 특성간의 상관관계를 나타낸다. 품종간의 상관관계를 보면 적색표시인 KSLG가 다른 개체보다 맨 위에 위치하였으며 우수형질로 나타났다. KSLG와 1747의 정역교배로 후대인 1059와 1076은 모본과 부분 사이에 위치하며 중간으로 나타났다. 모부분과 정역교배 후대의 전체 특성 간의 상관관계를 PCA로 분석한 결과 개화수명은 잎 두께와 정의 상관관계가, 꽃잎 너비와 부의 상관관계가 나타났다. 전체적으로 보면 F₁인 1059, 1076은 1747과 유사한 경향이 보였으나(그림 9) 각 요인 간에 상관관계를 분석해 보면 개화수명은 KSLG가 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다(그림 8).
- 주성분분석 결과에 따라 개화수명은 화수, 화서 길이, 화경 굵기, 화경 길이, 끝열편 너비, 꽃잎 너비, 꽃받침, 화경 굵기, 화경 길이와 정의 상관관계를 나타냈다. 또는 잎 두께, 화경굵기와 부의 상관관계를 보인 것으로 나타났다.
- 이와 같이 전체형질간의 상관관계를 PCA로 분석해 본 결과 개화수명은 잎 두께 및 꽃받

침길이와 정의 상관관계를 나타냈으며 꽃잎너비와 부의 상관관계가 있음을 확인하였다(그림 8(b)). 이와 같이 모부분과 정역교배 후대집단의 발현형질의 상관관계분석과 PCA분석결과 꽃수명과 관련된 잎 두께, 꽃받침 너비 형질간의 분석결과가 일치한 것으로 나타났다. 정역 교배 간에 형질 분석 시 SPSS, PCA를 같이 분석하면 더 정확한 결과를 확인할 수 있는 것으로 판단되었다.

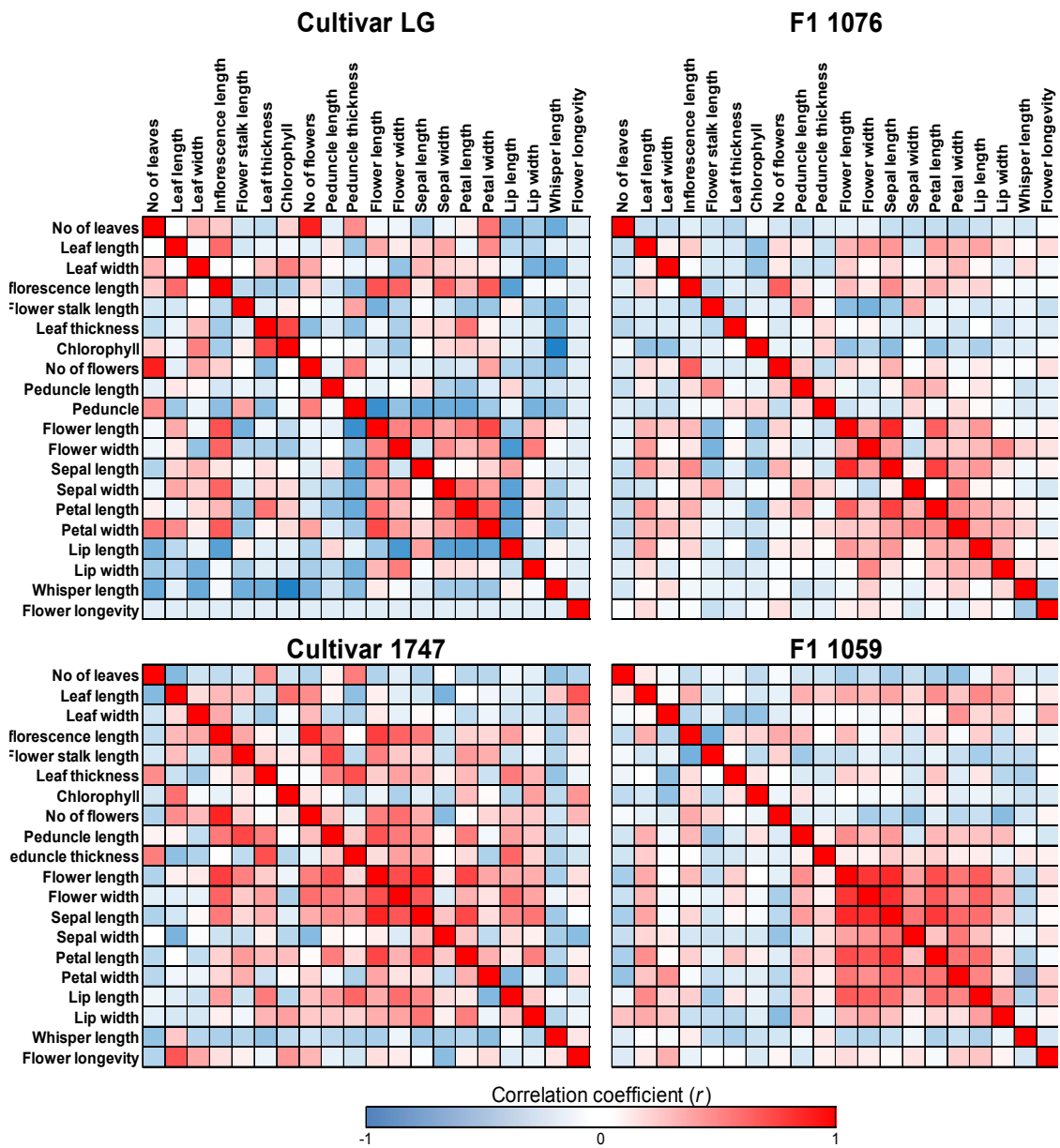


그림 7. 호접란 양친과 정역교배한 후대집단 특성에 대한 피어슨 상관관계 수행률(r).

별표 (*, **, *** 또는 ****)는 각각 $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$ 또는 $P < 0.0001$ 에서 통계적으로 상관관계를 분석하였다.

(A)

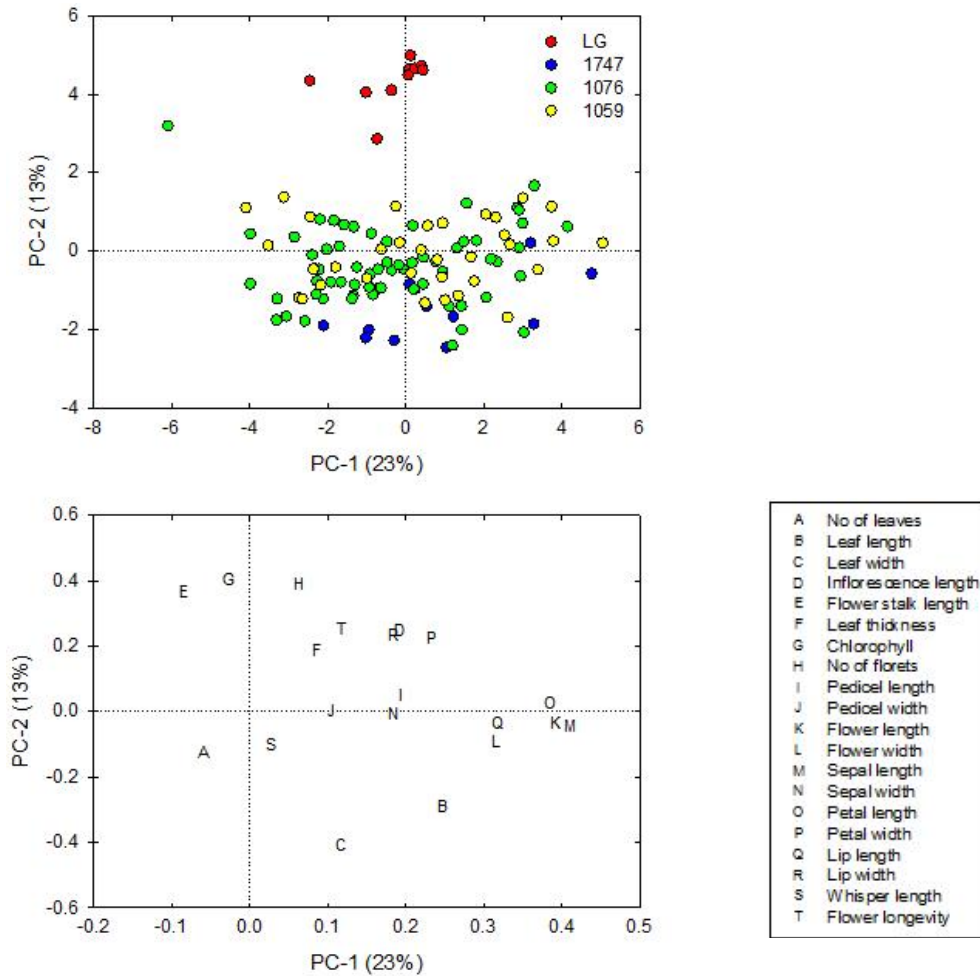


그림 8. 각 양친과 정역교배한 후대집단의 특성을 주성분 분석 (PCA) 로딩 플롯 (a) 및 특성간에 상관관계분석 결과 (b).

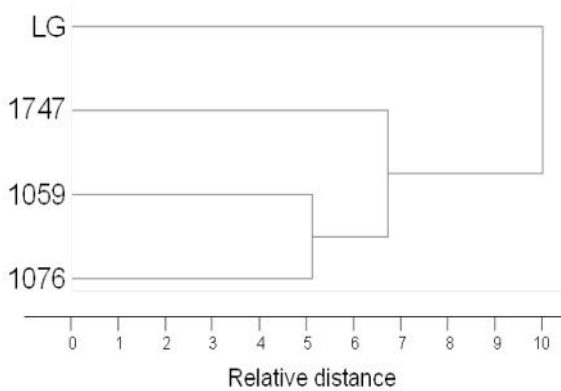


그림 9. 호접란 양친과 정역교배한 후대 집단의 계층적 완전 결합 클러스터링 방법을 이용하여 계층적 군집분석 방법 (Hierarchical Cluster Analysis, HCA). 계층적 군집분석 방법은 거리 측정을 위해 Euclidean을 사용하였다.

3-2 개화수명이 긴 호접란 품종의 유전체 분석

가. 호접란 KSLG의 유전체 분석

(1) 유전체 조립을 위한 NGS 데이터 생산

- 호접란 *Phalaenopsis* KS Little Gem(이하 KSLG)의 유전체 구조를 분석하고, 품종 보호 및 개화수명 연관 분석 마커를 개발하기 위해 유전체 서열을 시퀀싱하고 조립하였다. 한편 유전자 예측과 unigene 작성, 유전자 발현 분석을 위해 전사체 분석을 조직별, 개화시기별로 나눠 진행하였다.
- 유전체 서열 조립은 Illumina short read NGS 데이터를 사용하였다. NGS read의 K-mer 분석과 cyto flowmetry로 KSLG의 유전체 크기를 약 4.9 Gb로 추정하였다. 유전체 서열 조립 결과 약 2.9 Gb로 조립되었고, 유전자 49,482개가 예측되었다. 각 연구 분야의 세부결과는 아래와 같다.



그림 01. Genomic DNA 추출에 사용한 호접란 KSLG의 모습과 추출한 genomic DNA 전기영동

- 영양 성장 1년된 호접란 KSLG 식물체의 잎을 채취하고, DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)를 사용하여 genomic DNA 정제하였다(그림 01).
- 호접란 KSLG 유전체 서열 조립을 위한 파이프라인은 Illumina short read를 이용하는 유전체 조립의 일반적인 과정을 따랐다(그림 02). Illumina Nextera DNA Library Prep Kit와 Nextera Mate Pair Library Preparation Kit를 사용하여 길이가 250 bp, 500 bp인 paired-end (PE) 라이브러리와 3 kb, 8 kb인 mate-paired (MP) 라이브러리를 제작하였다.
- NGS 시퀀싱은 Illumina MiSeq과 NextSeq 플랫폼을 사용하였다. Trimmomatic으로 어댑터와 저품질(Q<20) 서열을 제거하였다. 중복된 서열은 FastUniq 프로그램을 사용하여 제거하였다. 비핵유전체인 엽록체 DNA 서열은 bowtie2로 필터링하여 따로 분류하였다. 서열의 에러 교정은 SOAPec을 사용하였다. 이상의 전처리 과정을 거쳐

354 Gb (PE 234.4 Gb, MP 119.7 Gb)의 NGS 서열을 확보하였다(표 01, 표 02).

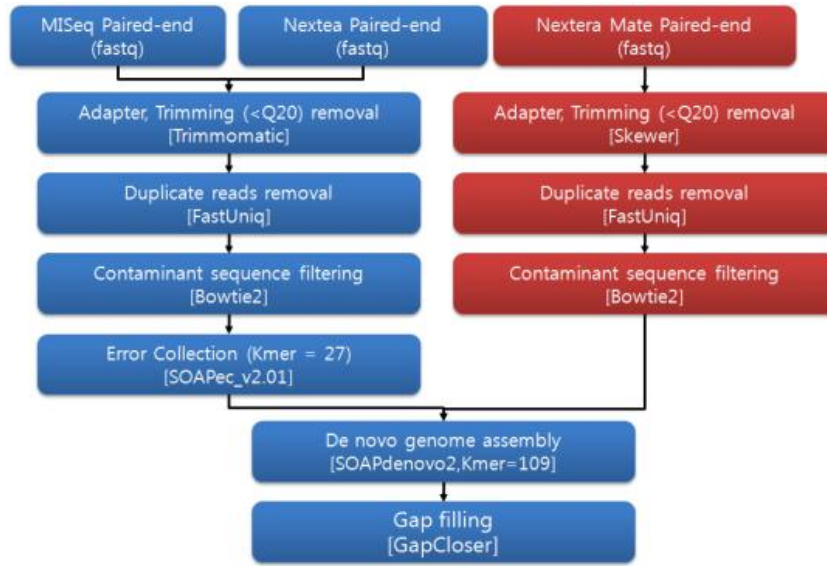


그림 02. 호접란 유전체 서열의 품질 관리 및 조립 분석 파이프라인

표 01. 호접란 KSLG 유전체 분석을 위한 Illumina PE 및 MP 서열 생산 통계

Platform	Library	Total reads	Total base (Gb)	Coverage (X)
MiSeq	500 bp PE	55,342,880	17	4
NextSeq	250 bp PE	831,030,230	126	28
	500 bp PE	611,557,398	92	21
	3 kb MP	478,501,724	72	16
	8 kb MP	314,376,118	48	11
Total		2,290,808,350	354	79

PE, paired-end; MP, mate-paired

표 02. 품질관리 작업을 거친 서열 통계

	원시 데이터 (Gb)	Adapter 제거 및 Trimming(<Q20) 서열 (Gb)	Duplicate 제거서열(Gb)	비핵유전체 제거서열(Gb)	원시 데이터 대비 비율
PE	234.4	188.9	183.8	171.4	73.13%
MP	119.7	52.4	46.6	46.6	38.90%
Total Base	354.1	241.3	230.3	218.0	61.56%

PE, paired-end; MP, mate-paired

(2) 호접란 KSLG 유전체의 유전체 크기 추정

- 호접란 KSLG의 유전체 크기는 K-mer 분석과 flow cytometry의 두 가지 방법을 사용하여 추정하였다. 유전체의 크기는 flow cytometry의 결과를 채택하였고, K-mer 분석에서는 유전체의 이형접합도를 파악하였다. 유전체 서열조립을 위한 Illumina short read 데이터의 양은 유전체 크기에 비교하여 평가하였다.

□ K-mer 분석에 의한 유전체 크기 추정과 특성 분석

- 호접란 KSLG 유전체의 크기와 이형접합도 특성을 K-mer 분석으로 분석하였다. NextSeq PE read (2×150 bp) 171 Gb를 재료로 Jellyfish v2.1.3 프로그램을 사용하여 K-mer (K=17) 분석을 수행하였다. 그 결과 Homozygous read peak와 heterozygous read peak가 각각 뚜렷이 형성되어 이형성(heterozygosity) 수준이 높은 것으로 판단되었고, 유전체의 크기는 약 4.5 Gb 정도로 추정되었다(그림 03).

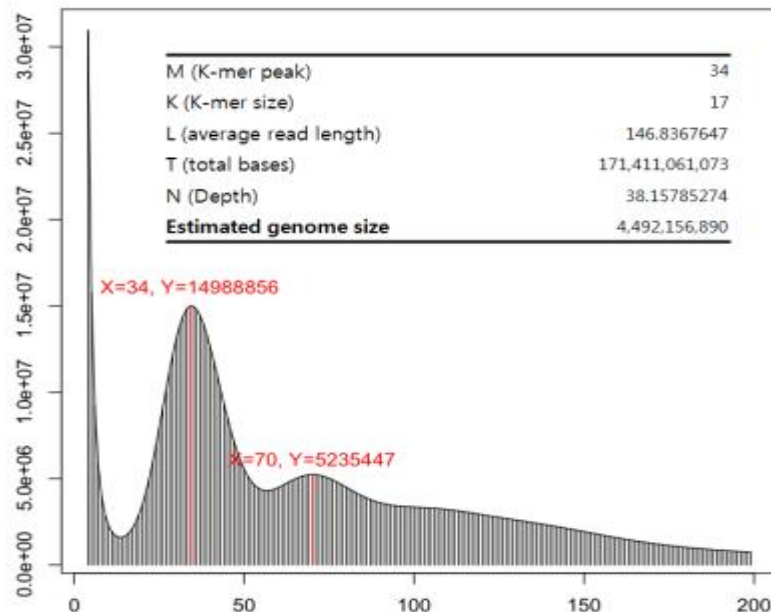


그림 03. 호접란 KSLG의 유전체 크기 결정을 위한 K-mer 분석

□ flow cytometry를 이용한 호접란 KSLG 유전체의 크기 예측

- 호접란 KSLG 유전체의 크기를 flow cytometry를 이용하여 교차 측정하였다. 참조 식물로 유전체 크기가 1.2Gb/2C인 무(*Raphanus sativus* cv. WK10039)를 사용하여 상대적으로 계산된 KSLG 유전체의 크기는 약 4.9 Gb로서, 앞서 K-mer 분석으로 계산된 4.5 Gb보다 약간 더 컸다(표 03). 거대 유전체에서 나타날 수 있는 다량의 반복서열과 이질염색질이 추정 유전체 크기 차이의 원인으로 생각된다. 이와 유사한 경향은 유전체 해독이 완료된 *P. equestris*에서도 확인된다. *P. equestris*의 경우, K-mer

분석에 의한 추정 값은 2.4 Gb이나(Cai et al. 2015), flow cytometry에 의한 추정 값은 3.2 Gb(Lin et al. 2001)로서, KSLG의 경우와 비슷하게 flow cytometry에 의한 추정 값이 더 크다. 따라서 호접란 KSLG 유전체의 크기는 약 4.9 Gb로 추정하였다.

표 03. Flow cytometry를 이용한 호접란 KSLG 유전체의 크기 추정

Plant	Tissue	Mean fluorescence		pg(2C)	Estimated genome size (Gb)
<i>Raphanus sativus</i> (WK10039)	leaf	12	2n = 2x	1.2	1.2
<i>Phalaenopsis equestris</i>					3.2
<i>Phalaenopsis</i> x KSLG	root tip	50.29	2n = 4x	5.0	4.9

(3) 호접란 KSLG 유전체의 조립 및 정보 분석

□ KSLG 유전체 서열 데이터의 총량 평가

- Flow cytometry로 추정한 유전체 크기를 기준으로 품질관리를 거친 NGS 데이터 218 Gb는 호접란 KSLG의 전체 유전체 크기의 44x 수준으로서, NGS 데이터를 이용한 완성도 높은 유전체 서열조립에 필요하다고 일반적으로 알려진 기준인 100x에는 부족하다. 그러나 유전자 예측 및 마커 개발 등에 필요한 서열을 제작할 수 있는 수준으로 판단되어 유전체 서열을 조립하였다.

□ 호접란 KSLG 유전체의 de novo assembly

- SOAPec 프로그램으로 서열 오류가 교정된 PE read 171.4 Gb와 MP read 46.6 Gb를 재료로 SOAPdenovo 2 프로그램을 사용하여 de novo assembly를 수행하였다. de Bruijn assembly를 위한 최적의 K-mer 값은 KmerGenie 프로그램을 사용하여 109로 결정하였다. MP 서열을 사용하여 scaffolding을 수행한 후, GapCloser 프로그램을 사용하여 조립된 scaffold 내의 gap filling 작업을 수행했다.
- 그 결과, 호접란 KSLG 유전체는 총 크기 4.24 Gb인 약 7백만 개의 scaffold로 조립되었다. 이중 길이 1 kb 이상인 scaffold는 302,928개이고, 조립서열의 전체 크기는 2.98 Gb였다(표 04).

표 04. 호접란 KSLG 유전체 조립 결과

Length	Total base (Gb)	Total N base (Gb)	Total Base (without N)(Gb)	Scaffold N50 (kb)	Contig N50 (kb)
≥ 100 bp	4.24	0.85	4.16	15.43	10.04
≥ 500 bp	3.15	0.85	3.06	32.71	20.29
≥ 1,000 bp	2.98	0.85	2.90	36.13	22.19
≥ 10,000 bp	2.35	0.63	2.29	51.37	30.23
≥ 100,000 bp	0.59	0.08	0.59	152.46	67.80

□ 호접란 유전체의 반복 서열 분석

- 호접란 KSLG 유전체 조립서열에서 RepeatMolder 프로그램을 이용하여 1,807개의 반복 서열을 추출하였다. RepeatMasker 프로그램을 이용하여 유전체 조립서열 중 반복서열들의 구성을 분석한 결과, 가장 많은 반복서열은 Ty1/Copia 유형과 Ty3/Gypsy 유형의 LTR 반복서열로서 전체 유전체 조립서열 중 각각 19.4%와 4.3%를 구성하고 있었다(표 05).
- 전체적으로 반복서열의 양은 총 2.96 Gb로 전체 유전체 조립서열(4.24 Gb)의 69.8%에 해당했으며 1 kb이상 조립서열 2.98 Gb의 경우 약 47.1%인 1.4 Gb를 차지하고 있었다.

표 05. 호접란 KSLG 유전체 조립서열의 반복서열 조성

Class	Sub Class	Number	Length (bp)	Genome Coverage
ARTEFACT		27	3,112	0.00
DNA		5,169	778,848	0.02
	CMC-EnSpm	118,260	29,905,965	0.70
	Dada	3,204	337,569	0.01
	Ginger	1,670	307,792	0.01
	Kolobok-Hydra	2	92	0.00
	MULE-MuDR	21,071	2,766,267	0.07
	Merlin	2	111	0.00
	MuLE-MuDR	14,213	6,400,155	0.15
	Novosib	1,835	172,181	0.00
	P	20	950	0.00
	PIF-Harbinger	96,268	15,781,908	0.37
	Sola	66	3,635	0.00
	TcMar	9	824	0.00
	TcMar-Fot1	2,564	303,258	0.01
	TcMar-Pogo	6	366	0.00

	TcMar-Stowaway	829	40,940	0.00
	TcMar-Tc1	15	1,069	0.00
	TcMar-Tc2	6,648	2,623,629	0.06
	hAT	18,858	3,804,000	0.09
	hAT-Ac	192,263	38,156,832	0.90
	hAT-Tag1	28,025	6,889,369	0.16
	hAT-Tip100	5,719	1,241,486	0.03
LINE		67	4,945	0.00
	L1	250,538	90,874,115	2.14
	L1-Tx1	1,996	299,557	0.01
	Penelope	35	2,984	0.00
	R2	21	1,158	0.00
	RTE-BovB	262,141	78,346,225	1.85
	RTE-X	26	2,808	0.00
LTR		19,191	3,175,689	0.07
	Caulimovirus	11,318	5,960,326	0.14
	Ty1/Copia	558,012	181,122,325	4.27
	DIRS	6	272	0.00
	ERV1	1,174	358,021	0.01
	Ty3/Gypsy	1,836,418	824,854,713	19.44
Other	Composite	7	677	0.00
	centromeric	1	65	0.00
RC				
	Helitron	10,905	1,323,563	0.03
Retroposon		8	656	0.00
SINE		12	623	0.00
	L1	1	38	0.00
	RTE	47	5,071	0.00
tRNA	tRNA	44	2,644	0.00
	tRNA-L1	1	52	0.00
	tRNA-R2	1	74	0.00
	tRNA-RTE	169	17,785	0.00
Unknown		5,165,501	1,351,089,834	31.84
Total interspersed		8,634,383	2,646,964,578	62.38
Low complexity		849,931	101,297,765	2.39
Satellite		282,961	51,401,532	1.21
	centr	5	246	0.00
	subtelo	5	279	0.00
Simple_repeat		1,903,655	157,594,102	3.71
rRNA		41,760	5,445,931	0.13
snRNA		603	52,818	0.00
Total		11,713,303	2,962,757,251	69.82

□ 호접란 KSLG 유전체의 유전자 예측

○ 유전자 모델

- KSLG 유전체 조립서열에서 유전자 모델을 예측하기 위하여 길이가 1 kb 이상인 scaffold 2.98 Gb를 대상으로 ab initio, transcript alignment, protein alignment 등 3가지 예측 방법에 가중치를 두어 통합하는 EVIDENCEModeler (EVM)를 사용하였다.
- 4종의 ab initio 프로그램, PASA와 Cufflinks를 조합한 Trinity transcript alignment, 애기장대, 호접란, 옥수수, 벼, 수수 등 5종의 단백질 서열을 이용하는 Exonerate 프로그램의 결과를 EVM으로 통합하였다.
- EVM 통합에는 각 분석법의 신뢰도에 대한 가중치 값으로 ab initio 분석의 경우 1, 단백질 서열 alignment 분석의 경우 5, 전사체 서열 alignment 분석의 경우 10을 적용하였다. 통합된 유전자 서열은 InterProScan (Zdobnov and Apweiler 2001) 프로그램으로 주석을 결정하였다.
- 그 결과, 최종적으로 49,328개의 유전자가 예측되었다. 이 수치는 참조 대상인 2배체 *P. equestris*의 유전자 모델과 비교하여 약 1.7배로서, 4배체인 KSLG에서 기대되는 수준으로 판단된다(표 06).

표 06. 호접란 KSLG의 유전자 예측

Method	Program	Predicted genes	Gene prediction parameters
ab initio	SNAP	147,962	<i>A.thaliana</i> .hmm option
	GlimmerHMM	93,907	<i>Arabidopsis</i> HMM parameter
	GeneMarkHMM	320,204	a_thaliana_mod option
		286,617	o_sativa.mod option
	AUGUSTUS	182,359	<i>A. thaliana</i> gene model RNA-seq mapping with Tophat
Transcripts alignment	PASA & Cufflinks	426,111	
Protein alignment	Exonerate	3,250	<i>A. thaliana</i> protein
		53,694	<i>P. equestris</i> protein
		4,523	<i>Z. mays</i> protein
		3,378	<i>O. sativa</i> protein
		3,144	<i>S. bicolor</i> protein
Integration	EVIDENCEModeler	49,482	

- 유전자 구조를 비교할 때 유전자 당 엑손의 수와 크기는 KSLG와 *P. equestris* 두 종 사이에서 큰 차이가 없으나, 인트론의 길이는 *P. equestris*가 KSLG에 비해 약 2.3배 크게 나타났다(표 07). 이로부터 종합적으로 판단할 때, KSLG 유전체에서는 길이가 긴 유전자가 덜 포함되었고, 그 이유는 조립서열 scaffold 길이가 다소 짧기 때문인 것으로 판단된다.

표 07. 호접란 KSLG의 단백질 암호화 유전자 예측 결과

	<i>P. KSLG</i>		<i>P. equestris</i>
	total genes	annotated genes	gene
No. of gene	49,482	39,104	29,431
Average gene length (bp)	2,829	1,048	7,359
Average exon length (bp)	251	255	246
Average intron length (bp)	1,266	1,501	2,922
Average exon per gene	2.6	3.1	3.2

- 호접란 KSLG 유전자 예측의 주석 결정을 위하여 Gene Ontology와 orthoMCL 분석을 실시하였다. 그 결과 호접란 KSLG 유전체의 예측유전자는 애기장대, 벼, 옥수수, *P. equestris* 등과 비교했을 때 상동유전자들의 분포에 편향이 없었으며 이들과 7,291개 유전자 패밀리를 공유하고 있었다. 또한 9,181개 유전자로 구성된 3,433개의 고유 유전자 패밀리를 보유하고 있는 것으로 나타났다(그림 04).

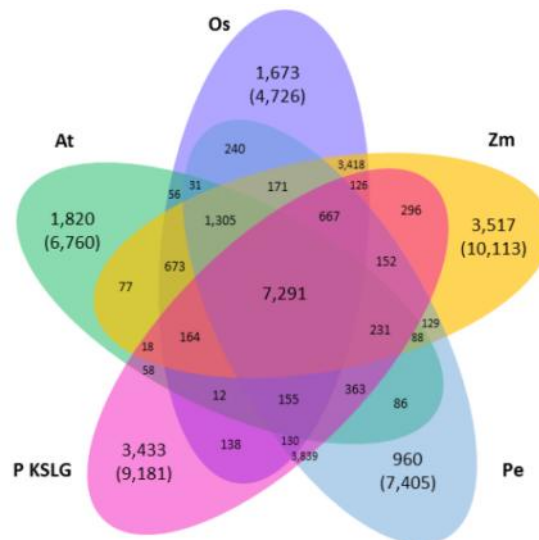


그림 04. *Phalaenopsis* KSLG 유전체의 예측유전자 49,328개에 대한 상동유전자 비교 분석
At, *Arabidopsis thaliana*; Os, *Oryza sativa*; Zm, *Zea mays*; P KSLG, *Phalaenopsis* KSLG; Pe, *Phalaenopsis equestris*

나. 개화수명 우수 품종 판별을 위한 분자마커의 개발

(1) 엽록체 유전체의 조립 및 분자 마커의 개발

- 식물의 엽록체는 유전체의 구조와 염기서열이 높은 수준으로 보존되어 있기 때문에

분류 및 계통 분석에서 광범위하게 사용되고 있다. 특히 엽록체는 모계유전되므로 특정 계통의 모계를 추적하는 최적의 분자마커로 사용된다.

- 난과식물에서 종 동정이나 계통 분류를 위한 분자마커는 엽록체 마커와 핵 rDNA ITS 마커가 일반적으로 사용되고 있으나 많은 경우 아주 작은 길이 차이 다형성에 근거하기 때문에 polyacrylamide gel이나 capillary electrophoresis로 분석해야 하는 기술상의 어려움이 있다.
- 핵 유전체 서열 생산과정에서 확보한 엽록체 서열 12.4 Gb를 이용하여 엽록체 유전체 서열을 조립하였다. Illumina Trinity 프로그램을 이용하여 선형의 조립서열을 얻은 후 BLAST를 이용하여 원형의 엽록체 DNA 서열로 전환하였다. 엽록체 DNA의 유전자 예측은 DOGMA 프로그램을 사용했으며, OGDRAW 프로그램을 이용하여 유전자 지도이미지를 작성하였다.

□ 엽록체 PCR 마커의 설계

- 호접란 KSLG 엽록체 유전체(Genbank acc. NC_025593.1)는 148,918 bp의 크기로서, 호접란 참조 서열인 *P. subsp. formosana* (Genbank acc. NC_007499.1)의 148,964 bp, *P. equestris* (Genbank acc. NC_017609.1)의 148,959 bp와 유사했다. 예측된 유전자의 수와 위치는 세 종에서 모두 동일하게 보존되어 있었다(그림 05).
- 품종의 모계 계통을 구분할 수 있는 엽록체 분자마커를 개발하기 위하여, *P. aphrodite* f. *formosana*와 *P. equestris*, *P. KSLG*의 엽록체 유전체 서열을 ClustalW 프로그램으로 다중정렬하여 염기서열 다형성이 높은 6 곳(*trnS-trnG*, *atpI-rps2*, *rpoC2-rpoC1*, *petN-psbM*, *ndhC-trnV*, *rpl16* 인트론)을 선발하였다. 이곳의 길이다형성은 9-61 bp 크기로 agarose gel 전기영동으로 충분히 분석 가능하다고 판단되었다(표 08). 이에 따라 각 locus 마다 1개씩의 프라이머쌍을 디자인하였다(표 09).
- 이 중에서 특히 *rpl16* intron은 호접란 세 종간에 길이 차이가 61 bp나 되어 길이 다형성 분석이 용이할 것으로 판단되었다. NCBI에 등록된 난과 엽록체 서열을 모두 합하여 11개의 서열을 정렬시킨 후 *rpl16* 유전자의 구조를 파악하였다. *rpl16* 유전자는 9 bp 길이의 짧은 exon1과 1,214 bp 길이의 intron, 399 bp 길이의 exon2로 구성되는데, intron 내에 서열이 보존된 곳을 사이에 두고 변이가 많은 지역이 2곳 있다. 이곳의 길이 변이는 매우 다양하여 종 구분 분자마커로 적합하다고 판단된다(그림 06).
- 엽록체 *rpl16*의 인트론은 group II 인트론에 속하는 종류로서 이 인트론들은 엽록체 유전체 내에서 그 위치가 잘 알려져 있고, 주로 단일 카피 유전자에서 나타나며, 2차 구조와 3차 구조가 잘 밝혀져 있을 뿐만 아니라 엑손 부분이 잘 보존되어 있는 장점이 있어 종 구분에 사용될 수 있다.

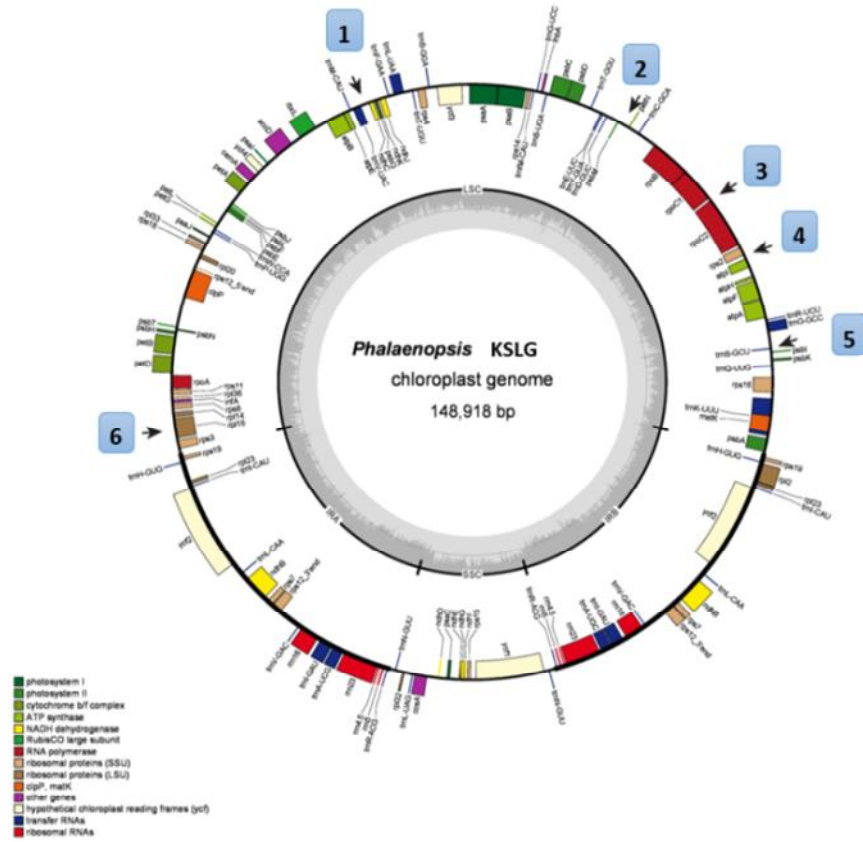


그림 05. 호접란 KSLG의 엽록체 유전체 지도

표 08. 호접란 엽록체 유전체에서 발굴된 염기서열 길이 다형성 지역

Locus_id	Locus	Position (nt)	Type	InDel length (bp)
1	<i>trnS-trnG</i> IGS	8,396	Deletion	42
2	<i>atpI-rps2</i> IGS	16,500	Insertion	15
3	<i>rpoC2-rpoC1</i> IGS	21,653	Insertion	9
4	<i>petN-psbM</i> IGS	30,811	Deletion	24
5	<i>ndhC-trnV</i> IGS	52,167	Deletion	39
6	<i>rpl16</i> intron	84,524	Deletion	61

표 09. 호접란 엽록체 다형성 분자마커의 특성 요약

Locus	Type	Estimated size (bp)		Forward / Reverse primer (5' to 3')	Length (bp)	Tm (°C)	GC (%)
		KSLG	Other <i>Phalaenopsis</i>				
<i>trnS-GCU-trnG-GCC</i>	IGS	839	839-911	gggccagtactcttttgttccg	23	58.2	52.2
				aaattgggcctcaaactttcaagct	25	57.8	40.0
<i>atpI-rps2</i>	IGS	171	155-171	gagagttcaccaaaaacaaactaacct	27	55.7	37.0
				acgatgatgctatcgcttcgattcg	25	58.7	48.0
<i>rpoC2-rpoC1</i>	IGS	111	103-111	accggaattcccacaagtatgg	22	57.0	50.0
				atacaggggttttgccggg	19	57.6	57.9
<i>petN-psbM</i>	IGS	316	316-341	gggcttgcaattcttttgat	21	54.3	42.9
				agtttgaaatgaaatgtggaatcagaag	28	54.5	32.1
<i>ndhC-trnV</i>	IGS	515	485-568	tgtttgctgtaggacataccttct	25	55.7	40.0
				ccaacggacctaattggtattgt	24	55.2	41.7
<i>rpl16</i>	intron	251	251-319	gaatttcttctcatccagctctc	24	55.3	45.8
				ggcgtgattcaatagaggtaaagaaaa	27	55.4	37.0

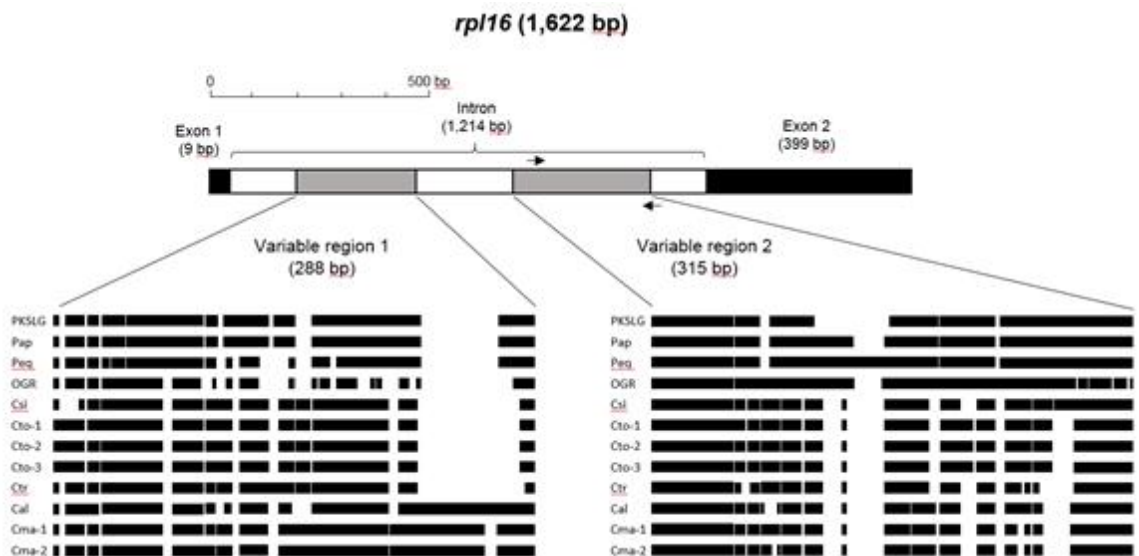


그림 06. 난과 엽록체의 *rpl16* 유전자의 염기서열 다형성

난과 8종 11개 엽록체 *rpl16* 유전자의 모델과 변이지역(Variable region1, 2)의 구조변이의 다중정렬. *Phalaenopsis* KSLG, *P. aphrodite*, *P. equestris*, *Oncidium* Gower Ramsey, *Cymbidium sinense*, *C. tortisepalum* (voucher KUN:HJL091027, KUN:HJL091035, KUN:YJB100601), *C. tracyanum* (voucher KUN:YJB100606), *C. aloifolium* (voucher KUN:YJB100604), *C. mannii* (voucher KUN:YJB100602, KUN:YJB100603).

(2) COS 유전자 기반 분자마커 개발

□ COS 마커의 개요

- 다양한 식물 종들의 유전체가 해독되면서 근연 종에서 공통적 보존된 상동유전자(Conserved Ortholog Set, COS)를 정의할 수 있게 되었다. COS 유전자는 유전자의 구조와 염기서열이 잘 보존되어 있기 때문에 보존된 exon 서열상에 프라이머를 위치시켜 변이가 상대적으로 많은 intron을 증폭하여 PCR 마커를 설계할 수 있다.
- COS 마커는 해독된 종의 유전체 정보를 이용하여 설계하기 때문에 유전자의 증폭 결과를 예상 할 수 있으며, 보존된 서열에 프라이머가 위치하므로 넓은 범위의 분류군에서 높은 성공률을 기대할 수 있다.
- 현재 난과 식물의 분자표지는 엽록체와 nuclear rDNA ITS, 적은 수의 SSR에 의존하고 있는데, 유전체 크기 전체를 포괄하기에는 마커의 수가 부족하다. 또한 SSR의 경우 상위 분류군으로의 적용성이 낮은 단점이 있다. 이에 따라 호접란의 근연 계통의 단자엽 모델식물에서 COS 유전자를 선발하고, 이로부터 길이다형성 PCR 마커를 개발하고자 하였다.

□ 호접란 COS 유전자 구성

- COS 유전자를 구성하기 위하여 호접란(*P. equestris*)과 바나나(*Musa acuminata*), 벼(*O. sativa*) 유전체에서 단일 카피 유전자를 탐색하고, 상호간에 상동성 교차검색(reciprocal BLAST search) 방법으로 단자엽 식물 COS를 구성하였다.
- 1차로 검색된 단일카피 유전자는 벼 13,877개, 바나나 2,712개, *P. equestris* 10,610개였고, 2차로 수행한 단일카피 유전자 간 reciprocal BLAST 분석 결과 COS 유전자 672개를 선발하였다(그림 07).

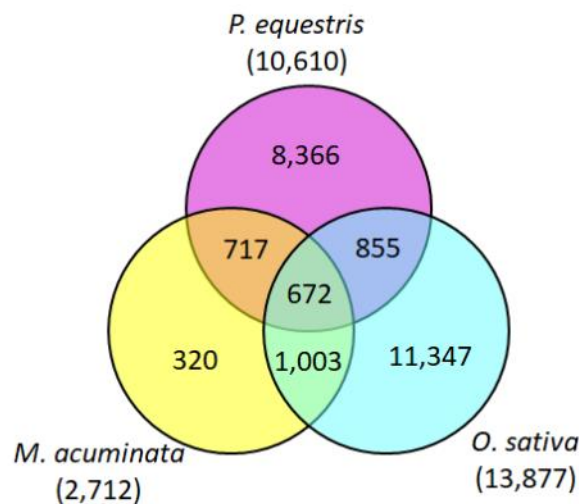


그림 07. 단자엽식물 COS 유전자 선발 밴다이어그램.

호접란(*P. equestris*), 바나나(*M. acuminata*), 벼(*O. sativa*) 유전체의 단일카피 유전자 중 상동성 교차검색(reciprocal BLAST search) 방법으로 탐색된 공통 COS 유전자

□ 호접란 COS 마커의 설계

- 호접란 COS 분자마커는 유전자 내의 인트론을 목표하도록 프라이머를 설계하였다. 과정을 요약하면, 우선 exon이 2개 이상인 COS 유전자 593개를 선별하고, KSLG의 전사체 unigene 서열에 대응되는 발현유전자 582개(98%)를 선별하였다. 프라이머의 설계는 *P. equestris*의 유전자 모델을 참조하였고, 인트론을 목표하는 프라이머쌍(평균 길이 23 bp) 221개를 설계하였다.
- 인트론 목표 프라이머쌍을 KSLG의 유전체 조립서열에서 in silico PCR을 수행하여 길이 다형성을 나타내는 COS 마커(프라이머쌍) 45개를 선별하였다. In silico PCR로 예상된 KSLG와 *P. equestris*에서의 증폭 산물의 평균적인 크기는 각각 391 bp와 366 bp였다(표 10).

표 10. 호접란 COS 마커 221개의 특성

	Tm (°C)	GC (%)	Length (bp)	Amplicon 예상 증폭 크기 (bp)	
				<i>P. KSLG</i>	<i>P. equestris</i>
Average	55.7	47.0	23	391.4	366.2
Max	64.6	60.0	25	1449	1502
Min	39.6	13.6	20	51	135
Median	55.9	45.8	23	260.5	246.5

□ 호접란 COS 마커의 검증

- 호접란 참조 유전체 *P. equestris*와 KSLG, 근연 시판품종인 *P. 'Sogo Vivien'* 등 3 종류의 *Phalaenopsis*에서 호접란 COS 마커를 검증하였다. PCR 시험 결과, COS 프라이머 세트는 93.3%의 증폭 성공률을 나타내어 COS 마커가 호접란 근연종간에 범용적으로 증폭되는 것을 확인하였다. 특히 KSLG의 경우 allele 수가 2개 이상인 마커가 절반 이상으로 나타나 배수화된 재배품종 유전체의 다양한 allele을 잘 증폭하고 있었다(표 11).

표 11. 호접란 엽록체 마커 및 COS 마커의 검증 결과

마커유형 (수)	종	1밴드 증폭	2밴드 증폭	3개 이상	증폭실패	성공률 (%)
엽록체 (6)	<i>P. KSLG</i>	5	0	0	1	83.3
	<i>P. equestris</i>	5	0	0	1	83.3
	<i>P. 'Sogo Vivien'</i>	5	0	0	1	83.3
COS (45)	<i>P. KSLG</i>	20	15	10	0	100
	<i>P. equestris</i>	30	6	6	3	93.3
	<i>P. 'Sogo Vivien'</i>	24	13	8	0	100

□ 엽록체 및 COS PCR 마커의 재배품종 및 야생종 적용

- 호접란 엽록체 마커 6종과 COS 마커 45 종을 호접란 재배품종과 야생종 19개에 적용하여 종/품종 구분을 위한 마커를 선발하였다. 시험에 사용된 재배품종 및 야생종은 *P. KSLG*, *Doritis pulcherrima*, *P. amabilis*, *P. bellina*, *P. cornu-cervi*, *P. equestris*, *P. fuscata*, *P. hieroglyphica*, *P. javanica*, *P. manni*, *P. modesta*, *P. pantherina*, *P. philippinensis*, *P. pulchra*, *P. sanderana*, *P. schilleriana*, *P. 'Sogo Vivien'*, *P. speciosa var. tetraspis*, 그리고 *P. sumatrana* 등으로 강산난원을 통해 확보하였다.
- CTAB 추출방법을 사용하여 잎에서 genomic DNA를 추출하고 25 ng/μl 농도로 희석하여 PCR에 사용하였다. PCR은 95°C에서 5 분간 변형한 뒤, 95°C에서 15 초, 60°C에서 15 초, 72°C에서 30 초간 34 cycle 반복한 뒤 72°C에서 최종 신장을 5 분간 수행하였다. PCR 산물은 0.5X TBE buffer와 1-3% agarose gel을 사용하여 150V에서 1.5 시간 전기영동 하였다.
- PCR 결과 총 19 종류의 호접란 샘플 사이에서 KSLG를 효과적으로 구분할 수 있는 엽록체 마커 1종 *rp116*과 COS 마커 3종을 선발하고 COS001, COS002, COS003으로 명명하였다(표 12). COS 마커의 경우 3종 모두 KSLG에서 2개의 증폭 밴드를 생성했다. 이는 선발한 COS 유전자가 *P. KSLG*에서 단일 좌위의 서로 다른 allele을 갖고 있음을 나타낸다.
- COS 마커 3종의 PCR 산물을 시퀀싱 한 결과, 다양한 난초과 식물에서의 InDel 영역을 확인할 수 있었다. COS001에서는 147 bp에 해당하는 InDel을 확인할 수 있었으며 COS002에서는 24 bp에 해당하는 InDel을 확인할 수 있었다. 이에 비하여 COS003에서는 특정 종에서만 증폭되고, 증폭된 밴드는 다양한 InDel 크기를 지니는 것을 확인할 수 있었다(그림 08, M009).

표 12. 호접란 KSLG의 품종구분을 위한 유전자 기반 분자마커 요약

마커 유형	마커 이름	Primer sequence (5' to 3')	예측 크기 (bp)		목표 유전자	
			<i>P. KSLG</i>	<i>P. equestris</i>		
엽록체	<i>rpl16</i>	Forward	gaatttcttctcatccagctcctc	251	319	Chloroplast <i>rpl16</i>
		Reverse	ggcgtgattcaatagaggtaaagaa aa			
COS	COS001	Forward	gtatcttatccatatcaagtgcggc	387 520	386	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase E
		Reverse	tccaccatcagcttcacttctc			
	COS002	Forward	gggttattagccttcgcagctg	200 224	200	Uncharacterized protein
		Reverse	ctgaggtggcagaggcttggat			
	COS003	Forward	gacagcaattttgattgatcaggg	525 621	526	DNA repair helicase <i>xpb1</i>
		Reverse	ggtcaagttggtcattcagctgata			

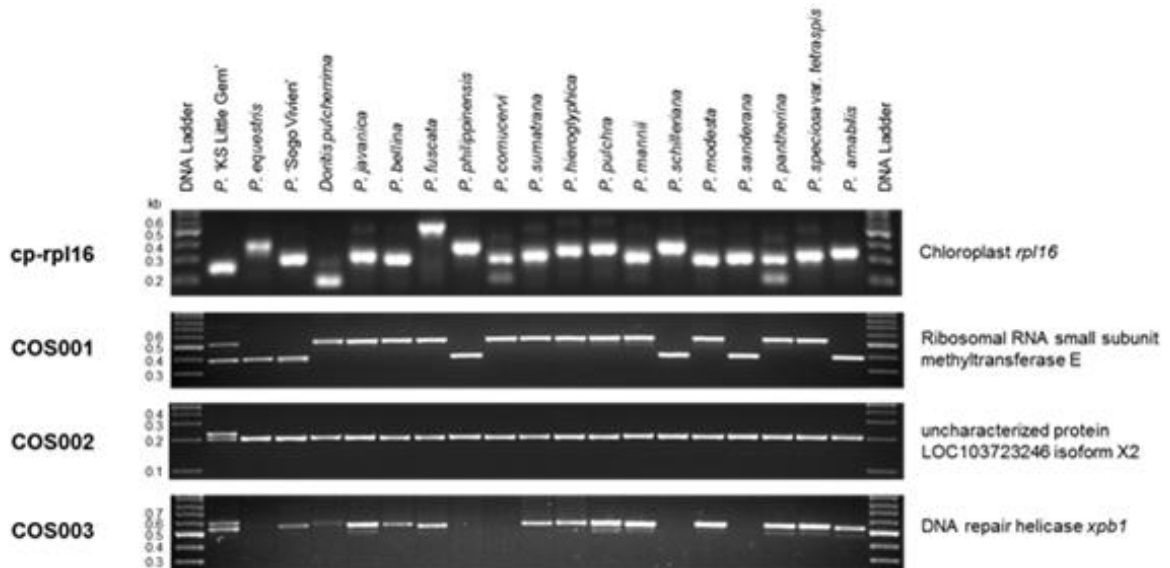


그림 08. 호접란(*Phalaenopsis*와 *Doritis*) 19종에서 선발된 종/품종 구분 마커 4종의 PCR 증폭 전기영동

C. COS003

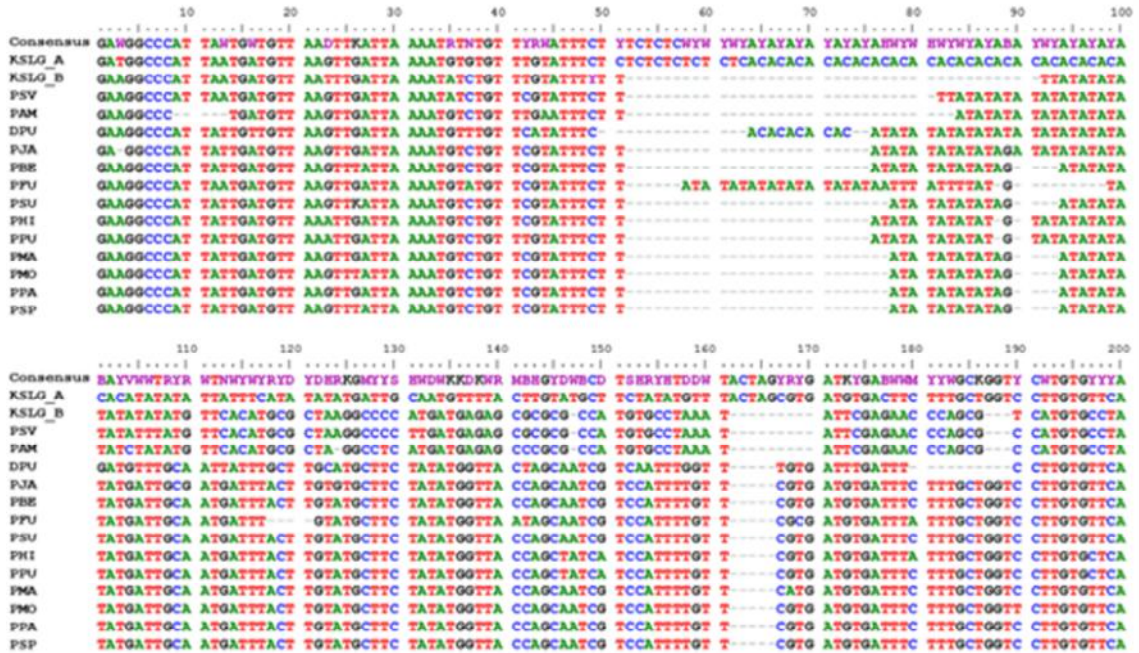


그림 09. 호접란 COS 마커 3종의 야생종 서열 정렬

(A) COS001, (B) COS002, (C) COS003. KSLG, *P. 'KSLG'*; PEQ, *P. equestris*; PSV, *P. 'Sogo Vivien'*; DPU, *D. pulcherrima*; PJA, *P. javanica*; PBE, *P. bellina*; PFU, *P. fuscata*; PPH, *P. philippinensis*; PCO, *P. cornu-cervi*; PSU, *P. sumatrana*; PHI, *P. hieroglyphica*; PPU, *P. pulchra*; PMA, *P. manni*; PSC, *P. schilleriana*; PMO, *P. modesta*; PSA, *P. sanderana*; PPA, *P. pantherina*; PSP, *P. speciosa* var. *tetraspis*; PAM, *P. amabilis*. 종명 뒤의 알파벳 A와 B는 allele을 구분함.

(3) SSR 마커 개발

□ 호접란 KSLG 유전체의 SSR 마커 개발

○ EST-SSR 탐색

- 호접란 KSLG의 전사체 조립서열인 unigene 서열에서 EST-SSR 마커를 설계하고, KSLG와 *P. equestris* 유전체 서열에서 in silico PCR로 다형성 SSR 마커 133개를 선별하였다. Unigene 서열에 존재하는 SSR은 SSRIT 프로그램을 사용하여 dimer-octamer 단위의 서열을 검색하였다. 이 중 마커 판별이 용이한 20 nt 이상 길이의 Class I SSR을 선별하였다.
- 그 결과, 길이가 200 bp 이상인 unigene 101,975개 중 약 46%에 해당하는 46,601개의 unigene에서 1.7개/unigene 빈도로 SSR이 확인되었다. 그 중 Class I SSR은 대부분 dimer나 trimer이고, 그 수는 2,683개로 낮은 비율을 차지했다(표 13).

○ SSR 마커 설계

- Primer3 프로그램을 이용하여 Class I SSR을 목표하는 PCR 프라이머를 설계한 후, KSLG와 *P. equestris* 유전체에서 예상되는 allele 별 PCR 증폭크기(allele)를 in silico

PCR로 계산하였다. 그 결과 두 종간에 증폭 길이의 다형성을 나타내는 SSR 마커 3,402개를 선발하였다.

표 13. Unigene SSR 통계

Class II SSR (12-19nt)			Class I SSR(≥ 20nt)		
Type	개수	총 길이(kb)	Type	개수	총 길이(kb)
Di-	2,608	5.22	Di-	1,032	2.06
Tri-	7,922	15.84	Tri-	803	1.61
Tetra-	4,681	9.36	Tetra-	193	0.39
Penta-	920	1.84	Penta-	142	0.28
Hexa-	45,458	90.92	Hexa-	206	0.41
Hepta	10,840	21.68	Hepta	233	0.47
Octa-	4,192	8.38	Octa-	74	0.15
Total	76,621	153.24	Total	2,683	5.37
SSR이 발견된 unigene 수			46,601 (전체 unigene의 46%)		
Unigene 당 SSR 수			1.70		

○ 종간 다형성 SSR 마커 선발

- 호접란 KSLG와 *P. equestris*의 유전체 서열을 대상으로 in silico PCR을 수행한 결과, 3,402개의 선발 SSR 마커의 allele 수는 KSLG의 경우 평균 6.3 alleles/locus로 나타나 마커 개발을 위한 추가적인 SSR 선발이 필요했다. 이에 따라 allele 수가 ① KSLG에서 2-4개이면서 ② *P. equestris*에서 1개일 것, ③ 증폭산물 길이가 150-500 bp 범위 내에 있을 것, ④ allele간 길이 차이가 30% 이상일 것의 4가지 기준을 적용하여 133개의 Class I SSR을 선발한 후, 최종적으로 다형성이 가장 높을 것으로 기대되는 16개의 프라이머 세트를 합성하여 호접란 야생종에 적용하였다.

□ SSR 마커 검증 및 선발

○ 다형성 SSR 마커의 적용 및 선발

- SSR 다형성 마커 16개를 19종의 호접란 품종·야생종에 적용하였다. 그 결과 일부 종에서 PCR 증폭이 성공적으로 이뤄지지 않았고, 5개에서만 분석 가능한 결과를 얻었다(그림 10).

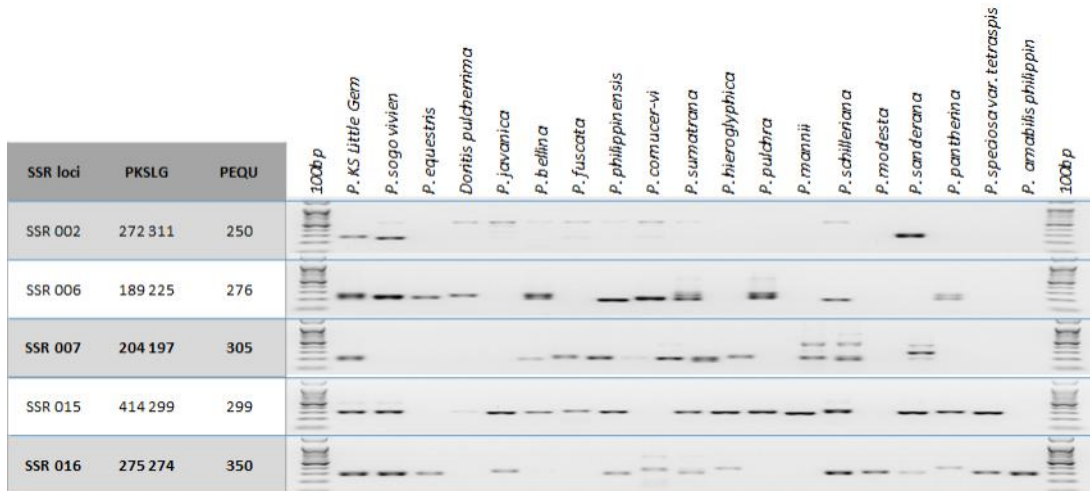


그림 10. 호접란 야생종 및 품종 19종에 적용하여 선발된 SSR 마커 5개의 결과 전기영동

- 16개의 SSR을 시험 적용해 본 결과 호접란의 SSR은 유전자위의 특이성이 높은 것으로 나타나 중간에 범용적으로 적용하기 어렵다고 판단되었다.

(4) 호접란 KSLG 판별 분자표지

- 호접란 및 근연종 난과 식물의 유전다양성과 종/품종 구분을 위한 다형성 분자표지를 개발하기 위하여, KSLG의 유전체 조립서열, 엽록체 유전체, 전사체 unigene 서열을 제작하여 이용하였다. 생물정보학적 방법을 사용하여 근연종 유전체 서열을 이용하여 단자엽식물 COS 유전자 목록을 작성하였고, 여러 마커들의 중간 다형성을 예측함으로써 다양한 호접란에서 범용적으로 적용할 수 있는 종 판별 분자마커를 개발하고자 하였다.
- 그 결과, 엽록체 분자표지 6개, COS 분자표지 45개와 SSR 마커 16개를 19종의 호접란 및 근연종에 적용하여 선발하였다.
- SSR 마커는 범용적으로 증폭되지 않아 넓은 범위의 분류군에의 적용하기에는 한계가 있는 것으로 나타났다.
- 엽록체 *rpl16* 분자표지는 모든 종에서 PCR 증폭이 이뤄졌고, 조사한 호접란 종/품종 집단에서 KSLG를 명확하게 구분하였다.
- COS 분자표지는 대부분의 종에서 PCR 증폭이 성공적으로 이루어졌고, 교배품종인 KSLG의 이형접합 allele이 구분되어 나타났다. 특히 45개 COS 분자 표지 중 3개의 COS 분자표지(COS001-003)로 KSLG를 다른 종·품종과 효과적으로 구분해 낼 수 있어 엽록체 *rpl16* 분자표지와 함께 호접란 KSLG의 종 판별마커로서 그 효용성이 높을 것으로 사료된다.

다. 호접란 KSLG의 개화수명관련 유전자의 발굴 I: 에틸렌 생합성 및 신호전달 경로의 분석

(1) 호접란 KSLG의 개화수명과 에틸렌 경로와의 연관성

□ 호접란의 개화수명

- 난과 식물의 개화수명은 수분(pollination) 후 꽃잎의 시듦 모델에서 에틸렌 생성과 감수성(신호전달)에 의해서 조절되는 것으로 알려져 있다. 일부 개화수명이 긴 카네이션 품종은 에틸렌 생합성 속도가 낮기 때문에 꽃의 노화가 지연되는 것으로 밝혀져 있는데 호접란에서도 에틸렌-개화수명 가설이 시험되고 있으나 아직 뚜렷한 결론에는 이르지 못하고 있다.
- 에틸렌에 의한 꽃의 노화 기작은 에틸렌 생성과 신호전달이라는 두 개의 독립적인 경로를 거친다. 따라서 에틸렌 생성이 저해되거나 또는 신호전달에 문제가 있어서 감수성이 낮은 경우 노화가 지연될 수 있다. 이에 따라 본 연구에서는 호접란의 에틸렌 감수성 실험을 실시하였으며, 한편으로 호접란 유전체상의 에틸렌 생합성 및 신호 전달 경로의 유전자들을 동정하였다.

□ 에틸렌 처리에 따른 꽃 노화 반응 실험

- 호접란 KSLG의 에틸렌 감수성을 확인하기 위하여 꽃이 핀 화분을 일정 농도의 에틸렌에 노출시켰다. 직육면체의 밀폐된 아크릴박스(54 Liter) 안에 에세폰(ethephon)을 상자 체적 대비 일정 무게를 넣은 후, 1M KOH 용액 10 ml을 처리하여 에틸렌을 발생시켜 일정시간 노출되도록 하였다(그림 11). 노
- 출 시스템의 유효성은 에틸렌 감수성이 높은 식물인 사루비아와 페튜니아를 사용하여 검증하였다. 에틸렌 농도 0-10 ppm 범위에 24시간 노출시켰을 때, 0.1 ppm부터 사루비아와 페튜니아의 꽃잎이 시들기 시작하였기 때문에 이 농도를 처리 기준으로 삼았다. 또한 호접란 품종 토니스포티를 시험한 결과 0.3 ppm 농도부터 꽃잎이 시들었으므로, KSLG의 처리에는 0.3 ppm 농도를 사용하였다.
- 호접란 KSLG 화분을 밀폐된 상자 안에서 0 ppm 또는 0.3 ppm 에틸렌에 24시간 처리한 후, 개방된 생장상에서 키우며 꽃잎의 시드는 경과를 관찰하였다.
- 0.3 ppm의 에틸렌을 처리한 식물은 처리 당일부터 꽃잎이 시들었고, 0 ppm 처리 식물은 4일 경과 후 시들었다. 에틸렌 처리에 의한 반응은 *P. 'Sogo Vivien'* 도 동일하게 나타났다. 이에 비해 폭로 상자에 넣지 않은 식물은 시들지 않았다.
- 따라서 에틸렌 처리 결과, 꽃의 노화가 촉진되었고, 또한 밀폐된 상자에서 24시간을 넣어두는 것만으로도 꽃이 조기노화하는 효과가 있었다. 이는 밀폐된 공간에서 식물체에서 생성된 에틸렌이 축적된 결과로 사료된다. 이러한 결과로 볼 때, 호접란 KSLG의 에틸렌 감수성은 정상이라고 판단되었다(그림 11D).



그림 11. 호접란 KSLG의 에틸렌 감수성 검정 실험

A, B, 에틸렌 민감성 식물인 사루비아(A)와 페튜니아(B)의 에틸렌 반응 대조 실험. 약 0.1 mg/L 농도의 에틸렌을 처리한지 24 시간 후 꽃잎이 탈리함. C, 호접란 교배품종(토니스포티)의 감수성. 0.3 ppm 농도에 반응함. D, 호접란 KSLG의 에틸렌 감수성. 0.3 ppm 농도에서 24시간 노출시킴. 비노출 식물은 4일 경과 후 꽃잎이 접히기 시작하였으나, 노출식물은 처리 당일(1 d) 꽃잎이 접히기 시작하여 2일 경과 후 완전히 접힘. P. 'sogo vivien' 도 KSLG와 동일하게 반응함

□ 에틸렌 생합성 및 신호전달 경로

- 에틸렌의 생합성과 신호전달 경로 유전자들은 애기장대 등 모델식물을 통해 비교적 잘 알려져 있다. 에틸렌은 methoinine에서 시작하여 SAM과 ACC를 거쳐서 생성되고, 이 3단계는 각각 SAS와 ACS, ACO 유전자가 매개한다.
- 한편 에틸렌 신호전달은 수용체 복합체인 ETR1과 CTR1 등에 의해서 불활성화된 상태에 있다가 에틸렌이 결합되면 하위의 EIN2와 EIN3가 활성화 되어 최초의 에틸렌 경로 전사인자인 ERF1과 ERF2가 발현된다(그림 12).

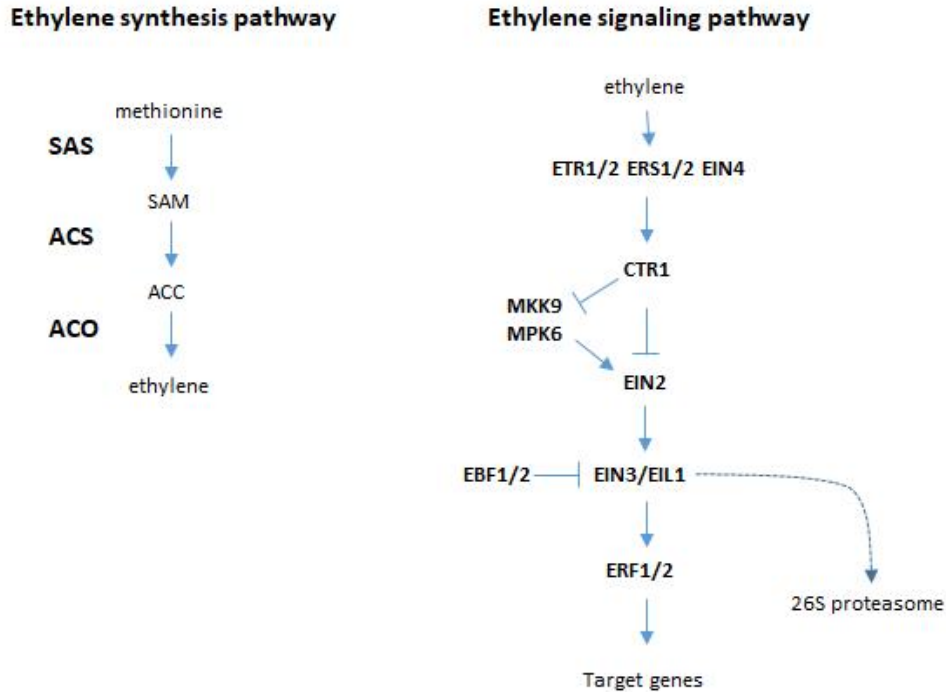


그림 12. 에틸렌의 생합성 및 신호전달 경로 모델

○ 호접란 KSLG의 에틸렌 생합성 및 신호전달 경로 유전자의 동정

- 호접란 KSLG의 에틸렌 생합성 및 신호전달 경로 유전자를 동정하기 위하여 BLAST를 이용한 상동성 교차 검색 방법을 사용하였다. 주요 모델식물인 애기장대, 벼, 바나나의 유전체에서 동정된 에틸렌 생합성 및 신호전달 경로 유전자들을 KEGG 데이터베이스에서 수집하였고, BLASTP 검색방법을 사용하여 e-value 기준 $1e^{-10}$ 수준에서 유사한 단백질 서열의 유전자들을 추출하였다. 특히 호접란과 근연관계 단자엽 식물인 바나나 유전체의 에틸렌 관련 유전자 서열을 이용하여 호접란 KSLG 유전체를 1차 검색하였다. 이렇게 선발된 호접란 KSLG 유전자는 다시 바나나 단백질 서열에 대해 상동성을 검색하여 서로 상호상동관계인 유전자를 최종 선발하였다(표14-16).
- 유전자의 수가 많은 *AP2/ERF* 유전자군의 동정은 Pfam motif를 탐색하여 후보 유전자를 추출한 뒤, 알려진 *AP2/ERF* 단백질들과 구조적 유사성(query coverage ≥ 60)이 있는 것을 선별하였다.
- 그 결과, 호접란 KSLG의 에틸렌 경로 유전자의 수는 바나나와 비교하여 비슷했으나 2배체 야생종인 *P. equestris*에 비해 2배 이상 많아, 4배체 유전체에서 기대되는 수준이었다. 특히 *ERF1*과 *ERF2* 유전자의 개수는 23개로서 *P. equestris*의 3개에 비해 큰 차이가 있었다.

표 14. 호접란 KSLG 및 주요 모델 식물의 에틸렌 생합성 및 신호전달 경로 유전자의 구성

Species	SAS	ACS	ACO	ETR/ ERS/ EIN4-like	CTR1	MKK4/5	MPK6	EIN2	EIN3/ EIL	EBF1/2	ERF1/2
<i>A. thaliana</i>	4	9	5	5	1	2	1	1	6	2	1
<i>O. sativa</i>	3	3	7	5	2	2	1	4	6	2	2
<i>M. acuminata</i>	11	4	13	7	3	4	3	3	17	8	7
<i>P. equestris</i>	2	7	7	3	1	2	2	1	4	2	3
<i>P. KSLG</i>	7	18	16	8	3	3	2	1	9	11	23

표 15. 호접란 KSLG 유전체의 에틸렌 생합성 경로 유전자 예측

Species	Gene	SAS	ACS	ACO
	No.	2	7	7
<i>P. equestris</i>		PEQU_05138	PEQU_02831	PEQU_12634
		PEQU_13059	PEQU_02851	PEQU_38817
			PEQU_03444	PEQU_38990
			PEQU_20446	PEQU_40607
			PEQU_24566	PEQU_40917
			PEQU_30343	PEQU_14210
			PEQU_41665	PEQU_14212
	No.	7	18	16
<i>P. KSLG</i>		PL217280	PL080170	PL023210
		PL246310	PL202390	PL101300
		PL315050	PL223450	PL101310
		PL370350	PL223460	PL269900
		PL415080	PL323230	PL387010
		PL739590	PL348160	PL491320
		PL739600	PL458460	PL621610
			PL563040	PL621630
			PL712230	PL624800
			PL736420	PL630390
			PL737370	PL621580
			PL737380	PL302400
			PL746560	PL302420
			PL750160	PL302390
			PL856960	PL256440
		PL879080	PL393700	
		PL891170		
		PL159881		

표 16. 호접란 KSLG 유전체의 에틸렌 신호전달 경로 유전자 예측

Species	Gene	<i>ETR/ERS/EIN4-like</i>	<i>CTR1</i>	<i>MKK4_5</i>	<i>MPK6</i>	<i>EIN2</i>
	No.	3	1	2	2	1
<i>P. equestris</i>		PEQU_04208	PEQU_07009	PEQU_15829	PEQU_26377	PEQU_40634
		PEQU_22903		PEQU_04687	PEQU_14319	
		PEQU_01924				
	No.	8	3	3	2	1
<i>P. KSLG</i>		PL185010	PL616610	PL151010	PL653670	PL180890
		PL184980	PL394401	PL334730	PL900960	
		PL464740	PL348250	PL346190		
		PL484780				
		PL604230				
		PL615730				
		PL615740				
		PL945890				

(계속)

Species	Gene	<i>EIN3/EIL</i>	<i>EBF1/2</i>	<i>ERF1</i>	<i>ERF2</i>
	No.	4	2	3	
<i>P. equestris</i>		PEQU_00346	PEQU_08289	PEQU_34814	
		PEQU_10689	PEQU_17984	PEQU_14656	
		PEQU_19283		PEQU_16670	
		PEQU_16294			
	No.	9	11	8	15
<i>P. KSLG</i>		PL220630	PL060680	PL878370	PL440550
		PL303770	PL062440	PL643910	PL557130
		PL303780	PL162610	PL643900	PL677520
		PL425540	PL174940	PL489740	PL639460
		PL445080	PL256500	PL205230	PL172660
		PL445060	PL271740	PL946820	PL864440
		PL688830	PL365620	PL203440	PL654430
		PL760220	PL399830	PL864440	PL072210
		PL940700	PL402950		PL865590
			PL679030		PL072200
			PL742570		PL619890
					PL576860
					PL166870
					PL936670
					PL705450

라. 호접란 KSLG의 개화수명관련 유전자의 발굴 II: 전사체 분석

- 호접란 KSLG의 전사체 분석은 2개의 독립적인 실험으로 수행하였다. 첫째, 7개의 식물 조직에서 whole transcriptome RNA-seq을 수행하여 조직, 특히 꽃-특이 발현 유전자를 선별하고, 유전체 유전자 모델 예측을 위한 전사체 데이터로 활용했다. 둘째, 유전자

예측이 끝난 후, 개화 주수에 따른 꽃 샘플에서 mRNA-seq을 수행해서 에틸렌 생합성/신호전달 경로 유전자의 발현 변화를 분석하였다.

(1) 조직별 전사체 분석

□ 식물체 조직 샘플링

- KSLG의 생활사를 포괄하는 7개의 조직에서 whole transcriptome RNA-seq 분석을 수행하였다. 분석에 포함한 조직은 1년 성장 잎(LIY), 1년 성장 뿌리(RIY), 저온처리된 잎(LV), 꽃대(INF), 꽃 봉오리(FB), 1주령 꽃(F1W), 3개월령 꽃(F3M) 등이며 강산난원에서 제공받았다(그림 13).

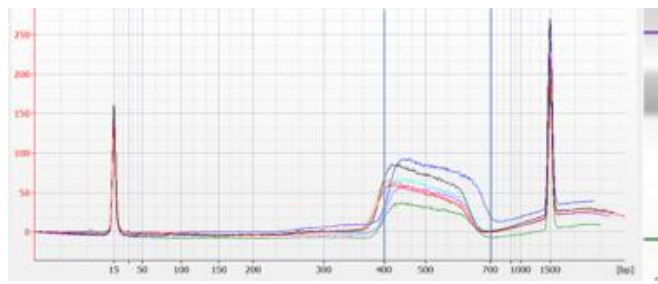
□ NGS 시퀀싱

- 7개의 식물조직으로부터 total RNA를 Ribospin Plant kit (GeneAll)를 이용하여 추출하였다. NGS 라이브러리는 Illumina TruSeq library construction kit을 이용하여 500 bp 크기로 제작하였다(그림 14). NGS 시퀀싱은 Illumina MiSeq 플랫폼에서 300 bp PE read를 조직별로 약 3 Gb씩 생산하였다.
- 일반적으로 전사체 분석은 라이브러리를 짧게 제작하지만, 본 실험은 전사체 unigene 서열 조립과 유전체 조립서열의 유전자 모델 예측에 활용하기 위하여 길게 제작하였다. 또한 300 bp 길이의 PE read를 생산하여 전사체 unigene 서열 조립의 완성도 수준을 높이고자 하였다.
- 생산된 NGS 서열은 Trimmomatic 프로그램을 이용하여 어댑터 서열과 저품질 염기서열을 제거하였고, PE read를 선별한 전처리 데이터를 전사체 unigene 서열 조립에 사용하였다(표 17).



1. LIY: 잎(1년 성장), 저온처리 전 8~10번 잎
2. RIY: 뿌리(1년 성장), 저온처리 전
3. LV: 잎(1년 성장), 저온처리 1개월, 8~10번 잎
4. INF: 꽃대 (꽃 봉오리 맺기 전)
5. FB: 꽃 봉오리 (1 cm 미만)
6. F1W: 꽃 1주일, 1-2번 꽃
7. F3M: 꽃 3개월, 1-2번 꽃

그림 13. Whole transcriptome RNA-seq 분석에 사용한 호접란 KSLG의 조직



Tissue	Conc. (nM)
L1Y	296.7
R1Y	267.9
LV	227.9
INF	285.3
FB	407.2
F1W	371.7
F3M	349.4

그림 14. 호접란 KSLG 조직별 RNA-seq library의 크기 확인

표 17. 오염원 서열을 제거한 7개 조직별 서열 데이터에 대한 통계

Library*	Bases (bp)	Reads	Max (bp)	Min (bp)	Mean (bp)	Median (bp)
L1Y_f	1,252,620,396	7,003,330	285	36	179	169
L1Y_r	1,054,963,372	7,003,330	285	36	151	150
R1Y_f	959,604,930	5,308,495	285	36	181	171
R1Y_r	806,183,607	5,308,495	285	36	152	151
LV_f	1,405,685,993	7,754,905	285	36	181	171
LV_r	1,186,062,905	7,754,905	285	36	153	152
INF_f	1,174,294,175	6,653,453	285	36	176	166
INF_r	999,296,917	6,653,453	285	36	150	149
FB_f	900,838,938	5,091,269	285	36	177	166
FB_r	770,411,538	5,091,269	285	36	151	149
F1W_f	926,392,115	5,134,254	285	36	180	170
F1W_r	788,986,345	5,134,254	285	36	154	152
F3M_f	1,076,969,584	6,052,037	285	36	178	167
F3M_r	918,826,634	6,052,037	285	36	152	150
Total	14,221,137,449	85,995,486				

* f, forward PE reads; r, reverse PE reads

□ 전사체 서열(unigene) 조립

- SOAPdenovo-trans 프로그램을 사용하여 약 8600만개, 14.2 Gb의 PE reads 데이터로부터 unigene 176,488개, 108.3 Mb를 조립하였다(표 18). 그 결과 길이가 200 bp 이상인 101,975개의 unigene을 다음 단계의 annotation 및 DEG 분석에 사용하였다.

표 18. 호접란 KSLG 전사체 unigene의 통계

	Unigene	Contig	Singleton	Scaffold	Total base (Mb)	N50 length (bp)	GC (%)
Total unigene	176,488	138,614	37,874	37,874	108.3	827	39.67%
≥ 200bp	101,975						

□ 호접란 유전자 서열 확보 및 데이터베이스 목록화

- 대만의 Orchid 유전체 정보 데이터베이스인 Orchidstra (그림 15)에서 *P. aphrodite*와 *P. bellina*, *P. equestris*의 발현유전자 서열을 다운로드하여 DB로 구축하였다. 이 정보들을 호접란 KSLG unigene의 유전자 분석에 이용하였다.

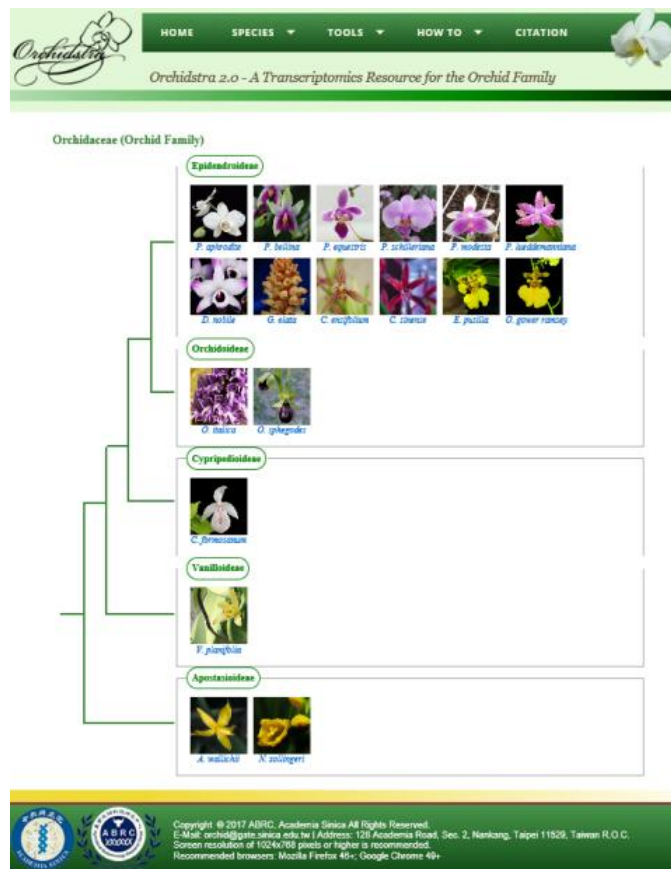


그림 15. Ochidstra 데이터베이스 홈페이지
 (<http://orchidstra2.abrc.sinica.edu.tw/orchidstra2/index.php>)

□ Unigene 서열의 유전자 예측

- 호접란 KSLG unigene의 유전자 예측은 Orchidstra와 NCBI NR database, NCBI Gene Ontology의 3가지 참조 데이터베이스에 따라 결정하였다. 그 결과, 길이가 200 bp 이상인 호접란 KSLG Unigene 101,975개 중 70,935개(unigene 서열의 약 70%)의 주석을 결정하였다(표 19).
- Unigene 대부분은 Orchidstra에 등록된 *Phalaenopsis* 전사체 서열에 대응되었고, 나머지 중 392개가 NCBI NR 및 BlastGO 데이터베이스에서 추가적으로 검색 되었다. 상동성 결과를 얻지 못한 30% 가량은 non-coding RNA 또는 unknown 유전자의 전사체나 기타 다른 생물의 전사체로 추정된다.

표 19. 호접란 KSLG unigene 서열의 유전자 예측 통계

Total unigene (>=200 bp)	101,975
matched to Orchidstra	70,935
(additionally) matched to NR or BlastGO	392
un-matched	30,648

□ KSLG unigene의 발현 분석

- 호접란 KSLG unigene에 7종류 조직의 whole transcriptome RNA-seq read를 eXpress 프로그램을 사용하여 매핑하고, 조직별 발현량을 RPKM으로 계산하였다. 101,975개의 unigene에 ① RPKM 50 이상, ② 발현량 편차 80% 이상의 기준을 적용하여 10,731개의 차등발현유전자(differentially expressed gene, DEG)를 선발하고 발현패턴을 hierarchical clustering으로 시각화하였다. 한편, 꽃 조직 DEG를 찾기 위하여 개화 후 3개월된 꽃에서 특이적으로 발현되는 유전자군을 선발하고, 해당 발현패턴을 나타내는 유전자군의 특성을 분석하였다.
- 조직별 차등 발현유전자 10,731개의 centroid linkage 패턴에서 3개월령 꽃에서 특이적으로 또는 1주일령과 차별적으로 발현되는 꽃-특이 발현 유전자군(node) 3곳에서 890개의 unigene를 선발하였다(그림 16).

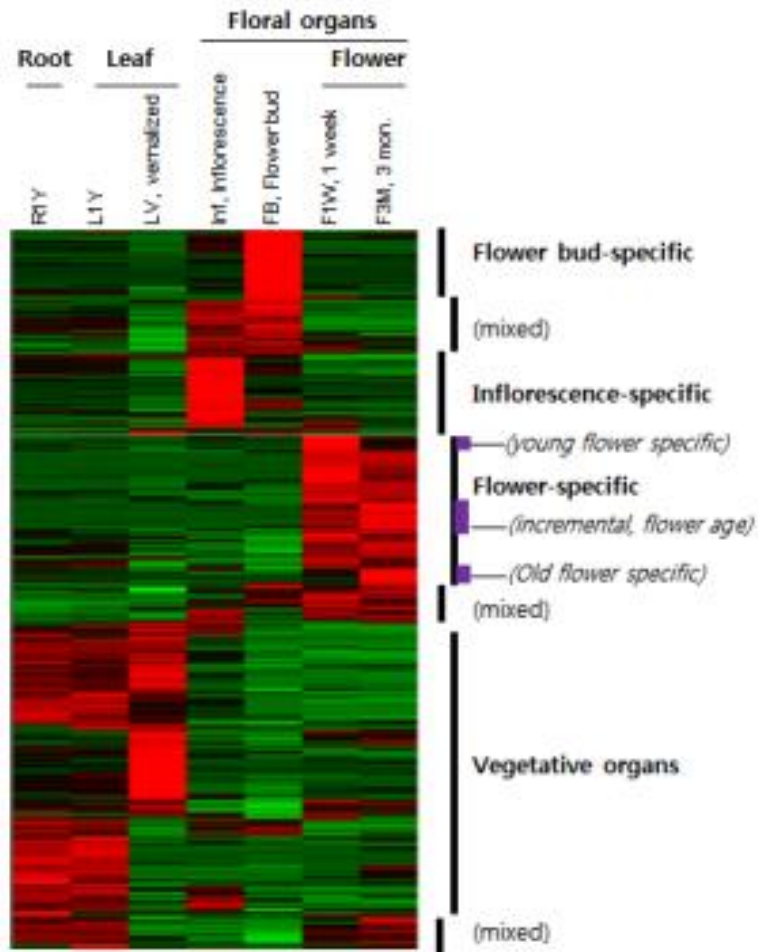


그림 16. 조직별 차등발현 unigene 10,731개의 hierarchical cluster

RPKM으로 나타낸 unigene의 발현량을 Euclidean distance와 centroid clustering 방법을 사용하여 분석함. Cluster별 발현패턴을 조직에 따라 구분하고, 꽃-특이 발현 유전자 cluster는 보라색 선으로 나타냄.

- 꽃-특이 발현 unigene 890개의 heatmap을 Log 변환한 RPKM 값으로 작성하였다(그림 17). 401개의 unigene이 주로 꽃 조직에서 강하게 발현되었다. Gene enrichment test 결과, 각 cluster별 주요 유전자는 주로 배발생, 조직분화, 호르몬 신호전달, 이차대사 등에 관련된 유전자가 많이 포함되어 있었다.

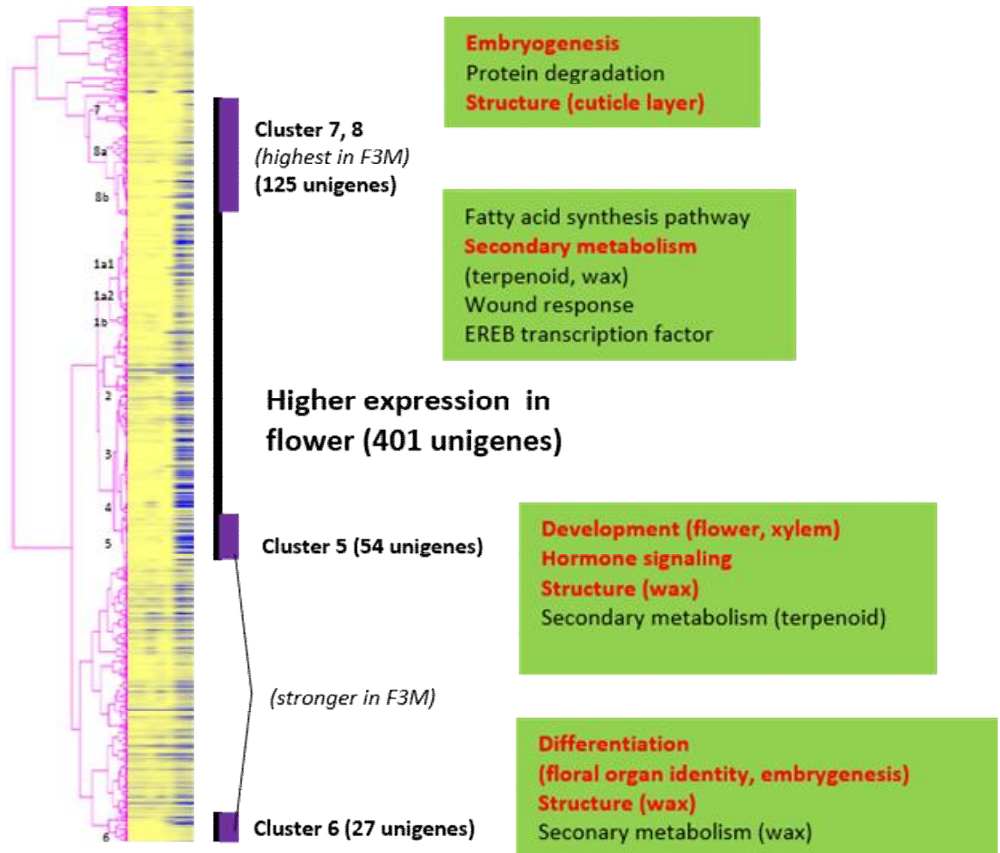


그림 17. 꽃-특이 발현 unigene의 890개의 발현량 heatmap

- 꽃의 노화와 관련된 유전자를 선별하기 위하여 3개월령 꽃에서 강한 발현을 보이는 4개 cluster, 206개의 unigene을 선택하였다. 이 중 에틸렌의 생합성과 신호전달에 관련된 unigene이 37개(18%) 파악되었다. 특히 cluster 5(꽃 발달, 호르몬 신호전달 등) 유전자 54개중 17개(31%)가 에틸렌 관련 유전자로 예측되었다(표 20).

표 20. 3개월령 꽃-특이 발현 unigene 중 에틸렌 관련 유전자의 구성

Cluster	No. unigene	No. ethylene-related unigenes	Proportion
cluster 5	54	17	31%
cluster 6	27	2	7%
cluster 7	39	3	8%
cluster 8	86	15	17%

(2) 에틸렌 생합성/신호전달 경로 유전자의 발현 분석

□ 꽃의 노화에 따른 KSLG 유전자의 발현 변화 분석

- 호접란 KSLG 유전체에서 예측된 유전자 49,482개에 대하여 꽃의 수명에 따른 유전자 발현의 변화를 분석하였다. KSLG 개화 후 0, 2, 4, 6, 8주가 경과한 꽃에서 mRNA-seq 방법으로 유전자의 발현을 분석하고, 이중 에틸렌 경로 유전자의 발현 변화를 분석하였다. 저온처리가 된 식물체는 강산난원에서 제공받았고, 명지대 식물배양실에서 생장시키며 개화된 식물 중 개화단계가 비슷한 식물체들을 골라 2반복으로 mRNA-seq을 수행하였다.
- 호접란 KSLG의 개화 후 시간대별(0, 2, 4, 6, 8주) CTAB 추출방법을 사용하여 꽃에서 total RNA를 추출하였다. Illumina TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit를 사용하여 NGS 라이브러리를 제작한 후, Illumina NextSeq 500 sequencing system을 사용하여 평균 3천만개의 PE reads (2×75 bp)를 생산하였다. 유전자별 전사체 발현량은 Tophat2를 사용하여 KSLG 유전체 서열에 read를 매핑한 후 HTSeq로 단백질 암호화 영역에 매핑된 read count를 계산하고, FPKM과 TMM 값으로 환산하였다.
- 에틸렌 생합성/신호전달 경로 유전자 335개의 발현량을 $\text{Log}_2(1+\text{FPKM})$ 으로 변환하여 Euclidean distance/centroid hierarchical clustering으로 유집분석 수행하였으며(그림 18), 또한 FPKM 발현값으로 heatmap 작성하였다(그림 19-20).

□ 에틸렌 생합성/신호전달경로 유전자 중 꽃-특이 발현 유전자 선발

- 에틸렌 생합성/신호전달 경로 유전자 중 꽃에 특이적으로 발현되는 유전자 32개가 선별되었다(그림 18). EIN3/EIL 유전자 3개를 제외하고 모두 ERF 유전자였고, 생합성 경로 유전자들은 꽃에서 발현이 많은 경우가 없었다(그림 18B). 이중 ERF 유전자 3개(PK075180, PK278860, PK282640)는 꽃-조직 특이성이 뚜렷했으며, 꽃이 개화 후 노화됨에 따라 발현량이 점차 감소하는 양상을 보였다(그림 18C).

① *ACO*

- 에틸렌 생합성 경로 유전자 중에서는 대체적으로 발현량이 많은 *ACO* 유전자(PK348570)은 꽃에서 개화 후 시간에 따라 발현이 증가하는 경향을 나타냈다(그림 19A).

② *EIN3*

- 꽃에서 발현이 상대적으로 높은 *EIN3/EIL* 유전자 3개(PK169780, PK169790, PK377510)도 시간에 따라 꽃에서 발현량이 증가하는 경향을 나타냈다(그림 19B).

③ *AP2/ERF*

- *AP2/ERF* 유전자군 268개 중에서 꽃-특이 발현 양상을 보이는 유전자 3개(PK075180, PK278860, PK282640)는 꽃 조직 이외에서는 FPKM 값이 0으로, 꽃에서만 발현되었다. 그 외 PK411460, PK062570, PK129900, PK381160, PK381170 등이 꽃에서 상대적으로 발현량이 높게 나타냈다(그림 20).

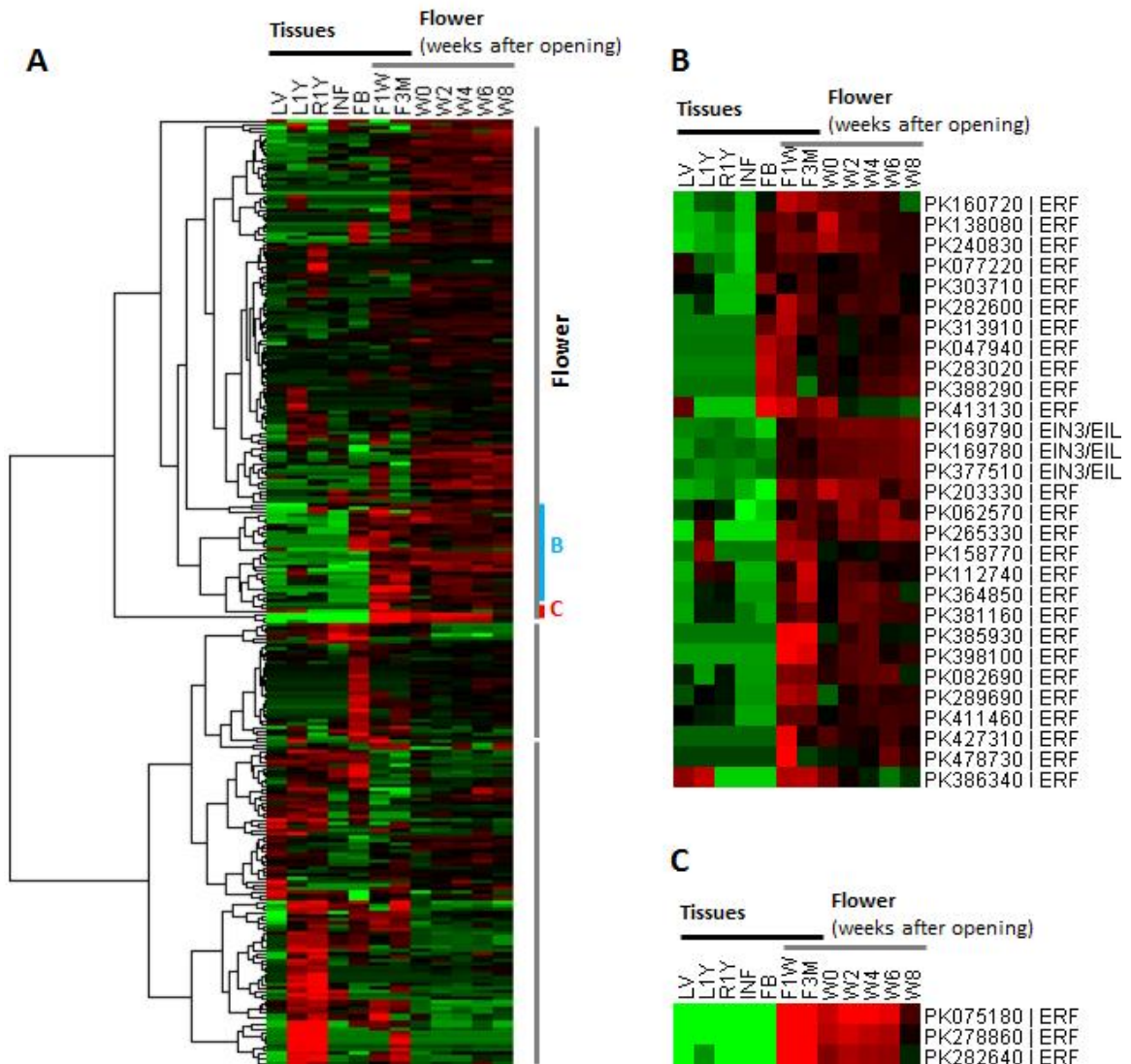


그림 18. 에틸렌 생합성 및 신호전달 경로 유전자들의 조직 및 개화 후 시간별 발현양상 유집분석

A, 에틸렌 생합성 및 신호전달 경로 유전자 335개의 조직(LV, 저온처리 잎; L1Y, 1년생 잎; R1Y, 1년생 뿌리; INF, 꽃대; FB, 꽃눈; F1W, 개화 1주; F3M, 개화 3개월) 및 개화 후 시간대(W0, W2, W4, W6, W8, 각각 주수)별 유전자(mRNA) 발현 패턴. 유전자의 길이에 따라 발현량을 $\text{Log}_2(1+\text{FPKM})$ 값으로 변환한 후 hierarchical clustering을 수행함. 꽃에서 특이적으로 발현된 유전자 그룹을 B, C로 표시함.

B, 꽃(F1W, F3M 및 W0-W8)에서 특이적으로 발현된 에틸렌 신호전달 경로 유전자

C, 꽃에서 매우 특이적으로 발현된 ERF 대립유전자 3종(PK075180, PK278860, PK282640).

A. Ethylene biosynthesis pathway

gene_id	LV	L1Y	R1Y	INF	FB	F1W	F3M	FW0	FW2	FW4	FW6	FW8
PK136710 SAM	224	456	415	599	538	490	373	1753	674	491	504	253
PK176470 SAM	11	55	44	162	88	51	22	25	10	9	9	9
PK402600 SAM	19	52	53	120	62	38	27	38	17	11	11	10
PK119790 SAM	22	21	29	71	51	22	20	24	10	6	8	7
PK207070 SAM	16	23	34	46	35	8	2	21	9	8	8	6
PK402610 SAM	0	33	0	6	0	0	0	7	0	3	4	6
PK394000 ACS	14	5	6	5	18	30	6	28	28	30	26	41
PK389050 ACS	10	13	9	5	4	3	3	8	10	11	9	10
PK123240 ACS	2	7	9	2	6	0	3	3	5	4	3	4
PK123230 ACS	4	1	4	0	4	0	0	4	3	5	4	5
PK405740 ACS	0	1	2	0	0	0	0	3	1	1	0	0
PK038940 ACS	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
PK401570 ACS	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PK476590 ACS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PK407570 ACS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PK181120 ACS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PK460540 ACS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PK181130 ACS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PK256570 ACS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PK348570 ACO	19	29	36	47	42	100	106	44	116	135	227	248
PK051080 ACO	0	40	54	12	42	5	54	4	1	1	2	0
PK343580 ACO	24	13	9	8	6	18	6	22	29	25	34	24
PK343610 ACO	0	21	18	8	4	0	21	1	0	0	1	0
PK051090 ACO	1	16	10	5	4	0	0	2	1	0	2	0
PK216440 ACO	0	11	7	0	2	0	0	1	2	0	1	0
PK343620 ACO	0	0	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0
PK150360 ACO	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PK345480 ACO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

B. Ethylene signaling pathway

gene_id	LV	L1Y	R1Y	INF	FB	F1W	F3M	FW0	FW2	FW4	FW6	FW8
PK271070 ETR/ERS	35	35	33	37	37	37	54	69	71	81	74	79
PK340710 ETR/ERS	22	18	19	31	12	49	31	59	60	63	60	65
PK334920 ETR/ERS	6	12	13	13	9	19	25	32	40	41	62	61
PK259960 ETR/ERS	26	23	20	30	19	45	31	52	52	53	52	56
PK100450 ETR/ERS	27	42	10	12	25	24	14	13	15	16	24	23
PK500500 ETR/ERS	12	12	19	21	10	24	28	20	20	21	19	30
PK100520 ETR/ERS	7	7	9	15	4	9	0	16	15	19	23	28
PK340700 ETR/ERS	0	1	2	4	10	0	0	0	0	0	0	0
PK162420 RTH	26	12	46	13	30	15	28	25	34	26	27	27
PK162430 RTH	38	0	0	35	41	0	39	30	30	29	33	23
PK317450 RTH	9	11	11	5	0	3	3	16	17	16	23	25
PK341171 CTR1	20	23	20	17	21	33	35	72	74	73	68	76
PK080721 MKK4	9	22	15	15	10	20	18	26	22	21	18	28
PK193581 MKK4	9	12	18	12	6	7	3	12	12	11	13	9
PK187551 MKK4	6	11	5	10	0	8	6	15	13	13	14	11
PK481180 MPK6	6	4	8	18	5	23	23	36	37	38	38	48
PK360750 MPK6	4	5	4	19	15	12	21	22	20	23	24	26
c136478_g1_6 EIN2	92	39	42	39	21	50	53	84	81	89	84	64
c136478_g1_11 EIN2	28	12	15	12	2	8	26	28	29	28	27	19
PK169790 EIN3/EIL	36	39	44	30	18	156	202	254	286	299	273	333
PK377510 EIN3/EIL	49	40	44	37	50	192	179	238	261	297	292	326
PK169780 EIN3/EIL	16	26	24	25	20	98	72	128	128	136	143	163
PK238270 EINS/EIL	8	20	27	21	22	47	55	117	88	75	82	107
PK249700 EINS/EIL	0	0	10	16	10	10	27	33	26	21	21	23
PK121270 EINS/EIL	5	5	9	9	14	26	26	29	21	21	17	29
PK249690 EINS/EIL	4	3	3	9	7	15	10	15	13	15	15	12
PK498400 EINS/EIL	0	0	2	1	0	8	0	7	5	9	5	6
PK413030 EINS/EIL	3	1	5	3	2	4	2	6	7	7	8	5
PK094550 EBF	20	24	25	21	35	33	27	114	129	95	66	78
PK087180 EBF	45	37	27	24	43	66	74	38	63	71	79	84
PK225490 EBF	8	14	7	12	7	7	8	75	55	53	49	69
PK027250 EBF	25	18	27	12	30	36	25	19	25	26	27	34
PK142490 EBF	9	7	6	8	5	17	10	10	12	12	14	12
PK028400 EBF	6	1	2	7	16	2	8	17	12	14	11	16
PK151380 EBF	6	6	5	3	5	2	6	12	12	15	9	14
PK223590 EBF	3	4	6	6	7	4	3	14	11	12	9	9
PK403930 EBF	2	9	3	6	3	6	9	7	8	6	7	7
PK204310 EBF	2	2	1	0	6	4	3	2	1	2	2	2
PK373000 EBF	0	2	1	0	5	2	2	2	1	1	1	2

그림 19. 에틸렌 생합성 및 신호전달 경로 유전자의 발현량 heatmap

- A, 에틸렌 생합성 경로 유전자(SAM, ACS, ACO) 28개의 조직별, 개화시기별 발현량(FPKM 값). 꽃에서 개화 후 발현량이 증가하는 ACO 유전자(PK348570)를 회색으로 표시함.
- B, 에틸렌 신호전달 경로 유전자(ETR/ERS, RTH, CTR1, MKK4-SIMKK, MPK6, EIN2, EIN3/EIL, EBF) 39개의 조직별, 개화시기별 발현량(FPKM 값). 꽃에서 높게 발현된 EIN3/EIL 유전자(PK169790, PK377510, PK169780)를 회색으로 표시함.

gene_id	LV	L1Y	R1Y	INF	FB	F1W	F3M	FW0	FW2	FW4	FW6	FW8
PK300630 ERF	344	284	279	89	73	221	224	142	227	260	340	261
PK411460 ERF	138	108	100	36	36	297	287	132	200	225	240	220
PK062570 ERF	45	94	65	5	16	104	179	136	292	206	285	123
PK086150 ERF	270	178	167	42	52	119	100	68	106	117	182	142
PK129900 ERF	29	37	66	44	31	164	260	58	92	134	17	193
PK075180 ERF	0	0	0	0	0	237	183	80	140	124	103	27
PK278860 ERF	0	0	0	0	0	126	91	42	54	46	38	11
PK282640 ERF	0	1	0	0	0	104	81	24	34	30	27	5
PK381160 ERF	21	67	66	30	21	148	206	88	207	183	151	139
PK381170 ERF	30	75	46	57	16	156	164	7	10	97	13	168
PK276180 ERF	31	25	38	146	51	17	13	30	2	3	1	6
PK220120 ERF	0	143	122	0	0	0	7	0	0	0	0	0
PK200530 ERF	111	17	30	27	0	22	20	10	27	27	34	11
PK250090 ERF	25	64	107	38	30	95	65	10	8	7	7	6
PK147950 ERF	0	90	100	0	0	5	0	1	0	0	1	0
PK473750 ERF	0	86	100	0	0	0	20	0	0	0	0	0
PK095090 ERF	35	82	56	64	53	99	64	74	73	62	61	54
PK174550 ERF	0	65	96	0	0	0	11	0	0	0	0	0
PK268530 ERF	94	41	23	50	44	43	62	32	32	31	35	36
PK232320 ERF	0	58	93	2	39	37	53	7	15	14	19	18
PK185950 ERF	34	81	77	39	33	92	62	10	4	5	7	5
PK149400 ERF	11	59	76	47	37	78	83	91	89	81	78	82
PK046760 ERF	0	90	82	0	10	11	7	2	0	0	1	0
PK147940 ERF	0	90	82	0	10	11	7	2	0	0	1	0
PK372240 ERF	3	3	0	6	78	5	7	3	2	4	1	2
PK138670 ERF	23	75	56	18	26	12	25	9	7	7	6	8
PK435780 ERF	75	15	30	23	0	19	33	11	17	17	28	53
PK407870 ERF	47	20	19	50	24	43	62	59	70	58	61	65
PK371090 ERF	40	34	30	41	68	55	70	44	51	38	32	42
PK075410 ERF	19	36	69	14	33	20	36	23	37	29	26	38
PK372280 ERF	2	62	33	4	5	9	23	4	6	5	19	4
PK460600 ERF	8	60	52	19	25	25	33	17	23	23	26	25
PK134950 ERF	19	56	50	18	27	20	31	16	19	20	29	27
PK062580 ERF	56	25	26	18	0	11	20	1	5	3	8	4
PK488670 ERF	0	49	54	0	0	0	18	0	0	0	0	0
PK247200 ERF	54	23	40	4	9	2	2	2	2	2	4	2
PK242000 ERF	20	52	41	12	9	41	27	5	3	5	4	8
PK310320 ERF	29	28	40	4	5	51	15	5	6	7	19	7
PK298030 ERF	20	5	7	12	51	11	9	12	9	9	11	17

그림 20. 호접란 KSLG의 AP2/ERF 유전자군의 발현량 heatmap

A, 호접란 KSLG 유전체 조립서열에서 예측된 AP2/ERF 유전자 268개 중에서 발현량(FPKM 값)이 50 이상인 유전자 39개의 발현 양상. 꽃(F1W, F3M, W0-W8)에서만 특이적으로 발현된 ERF 유전자 3개(PK075180, PK278860, PK282640)를 회색으로 표시함.

마. 개화수명 관련 마커 개발 및 조기 선발 시스템 개발

(1) 에틸렌 생합성/신호전달 경로 유전자 마커

- 난과 식물의 꽃은 수분(pollination)이 일어난 후 에틸렌 생성이 증가하여 꽃잎이 탈락하는 것으로 알려져 있다. 이에 근거하여 호접란 KSLG의 에틸렌 생합성 및 신호전달 경로 유전자, 특히 꽃에서 높게 발현되거나 개화 후 시간경과에 따라 발현량이 증가하는 에틸렌 경로 유전자들을 대상으로 대립유전자를 구분할 수 있는 다형성 마커를 개발하고자 하였다.

□ 마커 후보 유전자의 선발

- 전사체 발현분석에서 꽃에서 상대적으로 높게 발현된 에틸렌 관련 유전자인 ACO와 EIN3/EIL, ERF와 신호전달 경로의 ETR1/ERS, CTR1, 생합성 경로 ACS 유전자의 유전체 조립서열에서 InDel 유형의 PCR 마커를 디자인하였다.
- 호접란 KSLG의 배수성(4배체)을 감안하여 대립유전자 서열을 BLAST 검색하여 정렬한 후, 인접 유전자와의 관계를 고려하여 allelic synteny를 판별하였다. 선발된 유전자의 모델에 근거하여 exon-intron-exon 경계를 증폭하도록 InDel 마커를 디자인하였다.

□ 유전자별 대립유전자 탐색 및 마커 설계

① *ETR1*

- 호접란 KSLG의 에틸렌 수용체 *ETR1/ERS* 유전자 2개(PK259960, PK271070)는 서로 allele 관계였고 유전자가 예측되지 않은 조립서열이 더 발견되어 총 3개의 allelic 조립서열을 정렬하였다. 인트론 1번에 큰 InDel 존재하여 이를 목표로 PCR 프라이머를 설계하였다(그림 21).

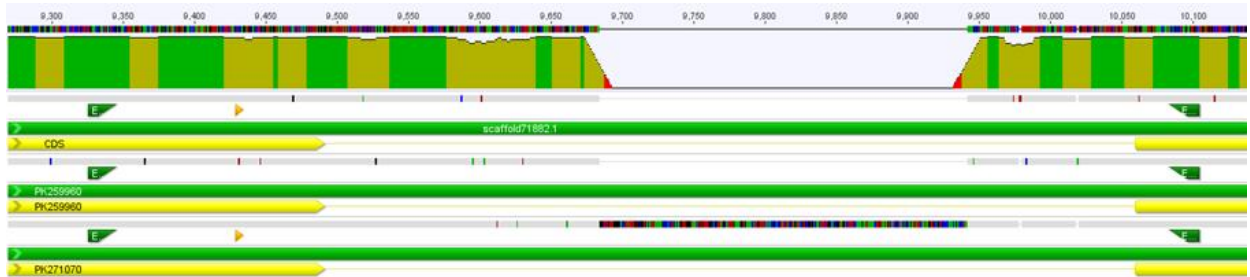


그림 21. 호접란 KSLG의 에틸렌 수용체 *ETR1/ERS* 유전자 마커의 설계

에틸렌 수용체 *ERS1* 유전자(PK259960, PK271070)의 대립유전자 조립서열 3개의 다중정렬과 인트론1의 InDel을 증폭하는 PCR 마커의 설계. 프라이머의 위치를 녹색 화살표로 표시함.

② *CTR1*

- *CTR1* 유전자는 호접란 KSLG 유전체의 단일 컨티그에서 예측되지 않았을 뿐만 아니라 15개 exon이 다수의 scaffold에 분산되어 있다. 즉, upstream 영역과 exon1, exon2부터 exon4, 마지막으로 가장 긴 exon5-exon15까지 세부분으로 나뉘서 조립되어 있다. 유전자의 전체 길이는 세부분을 합쳐서 약 30 kb에 걸쳐 있는 것으로 추정되었다. 애기장대 *CTR1*의 길이는 5,490 bp, CDS는 2,466 bp로서 821 아미노산을 암호화하고 있지만, 호접란에서 동정된 2개의 unigene (*P. aphrodite* PATC144265와 KSLG c134790_g1_i3) 서열에서 추정된 CDS 길이는 2,397 bp 길이로 799 아미노산을 암호화하여 약간 작은 크기였다.
- 호접란 KSLG의 에틸렌 신호전달 *CTR1* 유전자(PK341171)는 조립서열 3개가 상동 검색되었고, 애기장대의 *CTR1* 유전자 모델에서 intron13에 해당하는 인트론에 다수의 InDel이 조사되었다. 그러나 이 영역이 길어서 PCR 방법으로 exon-intron-exon 증폭이 어려우므로 인트론 내부 2곳(CTR1-int13-1과 CTR1-int13-2)에 2개의 마커를 설계하였다(그림 22).

③ *ACO*

- 호접란 KSLG의 에틸렌 생합성 *ACO* 유전자(PK348570)에 상동인 조립서열은 4개가 검색되었다. 그러나 각각의 유전자모델이 완전하지 않아 인트론에 존재하는 InDel을 증폭하기 위한 PCR 프라이머를 정확하게 설계할 수 없었다. 이에 따라 프라이머를 위치시킬 exon 서열을 완성하기 위해 sequencing용 프라이머를 추가로 설계하였다(그림 23).

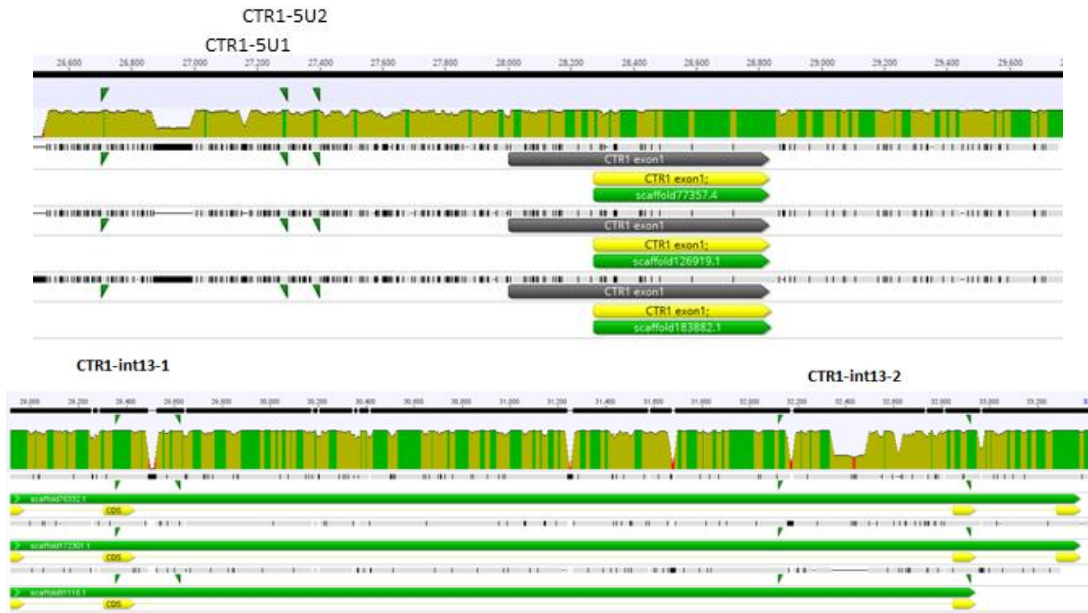


그림 22. 호접란 KSLG의 에틸렌 신호전달 *CTR1* 유전자 마커의 설계

에틸렌 신호전달 *CTR1* 유전자의 N-말단(exon1)과 C-말단(exon5-15)의 다형성 영역 정렬과 마커의 설계. 기준 *CTR1* 유전자(PK341171)의 대립유전자 조립서열 3개를 다중정렬하고 5'-UTR 1곳을 목표로 하는 2개의 마커 CTR1-5U1, CTR1-5U2와 인트론 13의 InDel 2곳을 증폭하는 PCR 마커 CTR1-int13-1과 CTR1-int13-2의 설계. 프라이머의 위치를 녹색 화살표로 표시함.

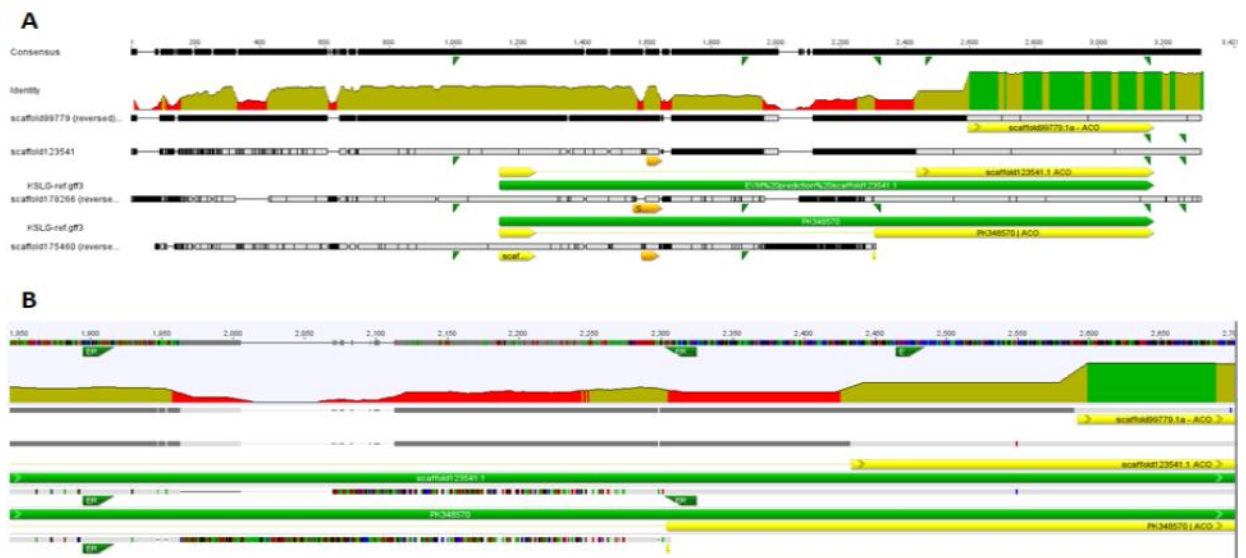


그림 23. 호접란 KSLG의 개화 후 발현이 증가하는 에틸렌 생합성 효소 *ACO* 유전자 마커의 설계

A, 꽃 조직 및 개화 후 시간에 따라 발현이 증가하는 에틸렌 생합성 효소

ACO 유전자(PK348570)의 대립유전자 서열 4개의 다중정렬.

B, 인트론에 존재하는 InDel 마커 설계. 프라이머의 위치를 녹색 화살표로 표시함.

④ *ERF*

- 호접란 KSLG의 꽃-특이 *ERF* 유전자(PK075180, PK278860, PK282640) 3개는 대립유전자 관계로 파악되었다. 인트론 내에 일관적인 PCR 마커를 설계할 수 없었고, 3' -하위에 존재하는 SSR(AT)을 증폭하는 마커를 설계하였다(그림 24).



그림 24. 꽃-특이 발현 *ERF* 유전자 마커의 설계

- A, 꽃-특이 발현 *ERF* 대립유전자(PK075180, PK278860, PK282640)의 유전체 조립서열 3개의 다중정렬.
- B, *ERF* ORF 하위에 존재하는 SSR(AT) 영역을 증폭하는 PCR 마커의 설계. 프라이머의 위치를 녹색 화살표로 표시함.

□ 호접란 에틸렌 생합성/신호전달 경로 유전자 마커의 특성

- 설계된 에틸렌 생합성/신호전달경로 유전자 마커의 목록과 특성은 표 21에 정리하였다.

표 21. 호접란 KSLG의 에틸렌 생합성 및 신호전달 경로 유전자 마커의 특성

Gene	Marker	Type	Oligo name	Sequence (5' to 3')	Alleles (bp)			Diff.
					A	B	C	
<i>ACS7</i>	ACS7-5U1	SSR	ACS7-5U-f1	gacctcacgattgggcct	324	284	40	
			ACS7-5U-r1	gccagcaaagtatggggaatcctc				
	ACS7-5U2	InDel	ACS7-5U-f2	caggttcactgagcataaggtgtag	830	449	381	
			ACS7-5U-r2	ccacactgaaggctgtcata				
<i>ACS8</i>	ACS8-3U1	InDel	ACS8-3U1-F1	attgcttgcaggtgggttcg	432	386	47	
			ACS8-3U1-R1	tgtgaagcaatgctggcagata				
<i>ACS11</i>	ACS11-5U1	SSR	ACS11-5U1-F1	gctttaaaccatacactacttgc	622	569	54	
			ACS11-5U1-R1	gcaactgaaagtcttgaccca				
<i>ACS12</i>	ACS12-5U1	complex (SSR, InDel)	ACS12-5U1-f1	actgcttctcaaacaggtgc	425	389	37	
			ACS12-5U1-r1	cttcgtgatgacctccaagaa				

<i>CTR1</i>	CTR1-int4	InDel	ctrl-intron4-f1	ggagactgggacactgactgcat	1087	533	555					
			ctrl-intron4-r1	actacagttgcaaagagcatg								
	CTR1-5U	InDel	ctrl-5u-r2	gtggtcgattagccgaatgtg	592	453	139					
			ctrl-5u-f1	taagagagatgagcgaggagc								
ctrl-5u-r1			tatagtggtcggttgcttgg	694				555	140			
CTR1-int13-1	InDel	ctrl-intron13-f1	ctgacgtgtacagcttcggtg	269	235	35						
		ctrl-intron13-r1	ccatgatcaagccaatcagt									
CTR1-int13-2	InDel	ctrl-intron13-f2	gcacatgtagcctgattgtct	768	643	126						
		ctrl-intron13-r3	taattgaagccacaactgggt									
<i>ACO</i>	ACO1-1	InDel	ER-ACO-Pf1	gcagcagctgagattattatgc	409	323	86					
			ER-ACO-Pr1	ggagattccgtggttcagtaac								
	ACO1-2	barcode	ER-ACO-Pf2	cttcttctccgccatctcc								
			ER-ACO-Pr2	tgggtataggctgagagctca								
<i>ETRL/ERS</i>	ETRL1	InDel	ETRL-Pf1	tgaaccgaactgactccgg	776	520	256					
			ETRL-Pr1	tgacaactcttgacggctgc								
<i>ERF</i>	ERF1	complex (SSR,InDel)	ERF1-Pr1	gaagggacttacagtgaccctg	323	239	84					
			ERF1-Pf1	ccgtcgtcttcaggctagat								
	ERF2			ERF2-Pf1	gtgggtgagagcagagatgt	233	234	365				
				ERF2-Pr1	cagtagttgctaataatcaaaattgg				133, 132			
<i>ACS</i>	FL-ACS1F1	InDel	FL-ACS1F1	gccccaacgagatccttac	323	409	87					
			FL-ACS1R1	tgtagcaatggacggggaaga								
<i>ACO</i>	FL-ACO2F1	InDel	FL-ACO2F1	tctgcacaatcaagccggagg	594	594	644					
			FL-ACO2R1	acctttggacgtgacttccgt				51				
			FL-ACO2F2	cctaggaggtttggtgattttaccag					292	326	297	35,3 0
			FL-ACO2R2	agaggaccagccaggtaattccatg								

□ 호접란 KSLG의 에틸렌 생합성/신호전달 경로 유전자 마커의 검증

- 호접란 KSLG 외에 *Phalaenopsis*와 *Doritis* 속 호접란 야생종 18종을 포함하여 총 19종을 대상으로, 설계된 유전자 마커가 다양한 유전적 배경에서 적용되는지 검증하였다.
- *ACS7*, *ACS11*, *ACS12*, *CTR1* 등 4개의 유전자에 대해 검증한 결과, ACS7-5U1, ACS12-5U1, CTR1-5U1, CTR1-int13-1, CTR1-int13-2 등 3개 유전자, 5개 마커로 호접란 KSLG에서 allele 증폭이 가능하였다.
- 특히 ACS7-5U1과 CTR1-int13-2 등 2개의 마커에서 대부분의 야생종에서 PCR 증폭이 성공적으로 이루어졌고, 또한 allele 크기 변이가 뚜렷하였기 때문에 종·품종 구분 마커로서도 활용이 가능하다고 판단되었다(그림 25).

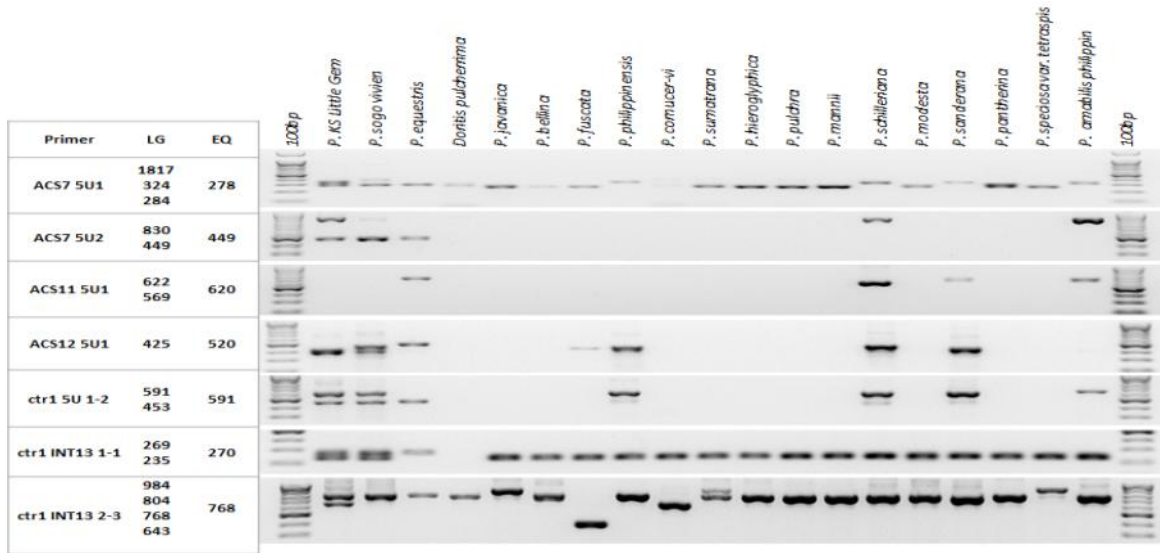


그림 25. 호접란 KSLG의 에틸렌 생합성 경로 ACS 유전자 및 신호전달 경로 CTR1 유전자에서 개발한 InDel 마커의 검증

호접란 *Phalaenopsis* 및 *Doritis* 속 야생종 18종을 포함하여 총 19종의 호접란을 대상으로 ACS7, ACS11, ACS12 및 CTR1 유전자의 InDel PCR 마커를 검증함. KSLG와 *P. equestris*의 PCR 증폭 크기는 각 표준유전체 조립서열에서 in-silico PCR 기법으로 예측함.

(2) 분자 마커의 교배집단 적용 및 개화수명 연관 분석

□ 분자표지 적용 유전집단의 구성

○ 교배 집단의 구성

- 호접란 KSLG를 모본으로 하여 작성된 교배집단 중에서 샘플링과 개화기간 데이터가 확보가능 한 교배집단 2개를 선택하였다. 개화수명이 긴 KSLG와 이와 다른 계통에서 육성된 교배품종인 KA11을 정역교배하여 개발한 F₁ 집단 1184(KSLG x KA11)에서 19개체, 1193(KA11 x KSLG)에서 11개체 등 총 30개체의 식물체를 선정하였다(표 22).

○ 집단의 검정 및 특성

- 모계를 판정할 수 있는 엽록체 *rp116* 유전자 InDel 마커를 사용하여 모계를 분석함으로써 식물체의 집단 구성을 검증하였다. 그 결과, 1184집단의 1개체(1184-67)의 모계가 KSLG가 아니라 KA11인 것으로 판정되어 1193 집단으로 재분류하였다(그림 26). 개화수명은 68일~162일의 범위에서 평균 125.2 ± 26.0 일이며, 두 교배집단 간의 차이가 없었다($P > 0.05$).

표 22. 개화수명연관마커 적용을 위한 교배집단의 특성

교배집단	교배조합 (모계친 × 부계친)	개체수	개화일수			
			최단일수	최장일수	평균일수*	표준편차
1184	KSLG × KA11	18	69	162	127.3	28.9
1193	KA11 × KSLG	12	68	154	121.9	21.8
합계		30	68	162	125.2	26.0

(*Not significant in one-way ANOVA at p=0.05)

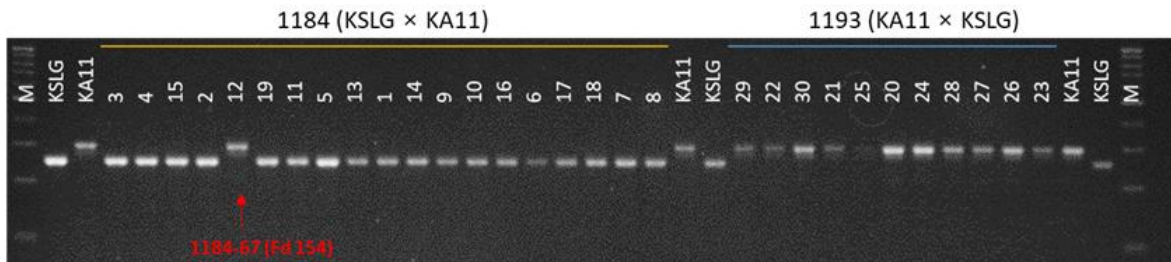


그림 26. 호접란 엽록체 *rpl16* InDel 마커를 이용한 교배집단의 모계 계통 검증. 1184 집단의 12번 개체(빨간색 화살표)는 모계가 KA11로 밝혀져 분석에서 제외함

□ 에틸렌 생성 및 신호전달 경로 마커의 적용

- 호접란 에틸렌 생성경로의 *ACS*, *ACO* 유전자와 신호전달경로의 *ETR1*, *CTR1*, *ERF* 유전자 마커 16종을 두 교배집단 총 30개체에 적용하였다.

○ PCR 및 전기영동 조건

- 교배집단 식물체 30개체의 잎 약 1cm²을 액체질소와 스테인레스 비드로 마쇄한 후, CTAB 방법을 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. PCR 부피는 25 ul이고, genomic DNA 50 ng, 프라이머 농도는 0.5 uM로 사용하였다. PCR 반응액은 자체 제조한 2.5× 농도의 PCR premix (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 25 mM KCl, 25 mM (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgSO₄, 0.25% Triton X-100, 0.5 mM each of dNTP, 0.025% Cresol Red, 0.5 M Trehalose, 1 U Pfu-S DNA polymerase, 2.5 U Taq DNA polymerase)를 사용하였다. PCR 온도 프로그램은 [95도 5분, 30 cycle (95도 30초, 50-65도 30초, 72도 1분), 72도 5분, 16도 보관]으로 프라이머에 따라 온도를 최적화하여 설정하였다.

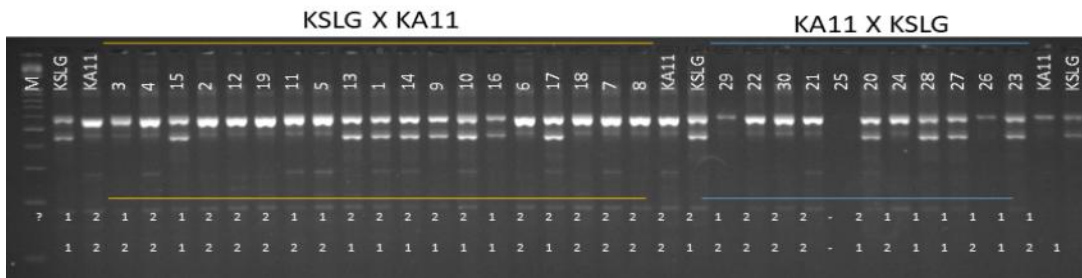
○ 개화수명 연관 분석

- PCR 결과를 전기영동하고, 밴드를 구분하여 binary 값으로 allele 유무를 판정하였다. 부계친과 모계친인 KSLG와 KA11에서 다형성이면서 후대에서 Mendel segregation이 일어난 locus의 allele을 선별하였다.

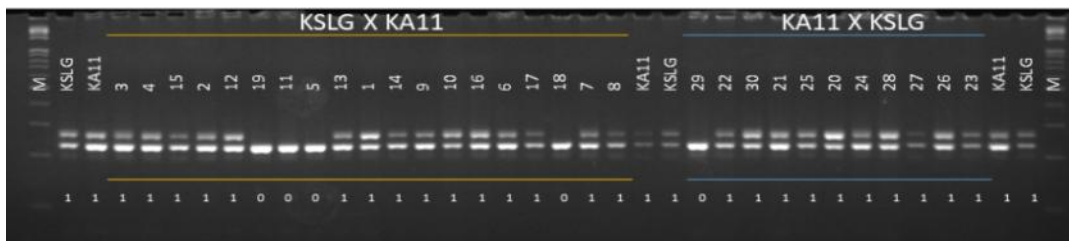
- 개체마다 판독한 allele 값과 개화수명(일수)에 대한 연관도를 GLM 분석을 사용하여 결정계수(R^2)로 구하고, $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

○ 적용결과

- 16개 마커 중 다형성이며 양친 판독이 가능하며, Mendel segregation이 확인되는 locus는 ACS8-3U1, ACS7-5U2, ACS12-5U1, ACO1-1, CTR1-5U, CTR1-int13-1 등 6개 유전자에서 7개 locus였다(표 23-25). 한편, 꽃에서 특이적으로 발현되었던 *ACO*와 *ERF* 유전자 마커들에서는 교배집단 내에서 다형성이 없거나, 또는 예측한 allele이 증폭되지 않았거나 판독이 어려웠다.
- 다형성을 나타낸 7개 locus, 12개 allele들은 개화수명과의 연관성은 뚜렷하게 나타나지 않았다. 그러나 GLM 분석을 교배집단별로 나눠서 수행한 결과 KSLG를 화분친으로 사용한 1193집단(KA11 x KSLG)에서 CTR1-5U 마커와 개화수명과의 상관성이 0.334(CTR1-5U 591 bp) 또는 0.398(CTR1-5U 453 bp)로 유의하게 나타났다($p < 0.05$). 이상의 결과를 바탕으로 후대 집단을 추가 확보하면 분자표지 기반 선발 체계를 마련할 수 있을 것으로 기대한다. CTR1-5U 마커의 전기영동 결과는 그림 27에 나타냈다.
- 한편, 본 연구에서 에틸렌 경로 마커의 발굴에 적용한 유전분리집단은 그 크기가 제한적이었다. 또한 4배체의 교배종으로 분리 양상이 복잡하며, 양친의 개화수명이 모두 긴 특성이 있어서 분리집단에서도 표현형의 분포가 개화수명이 긴 방향으로 편향되어 있었다. 향후 적절한 양친으로 구성한 유전분리집단을 충분한 규모로 육성하여 해독된 유전체로부터 발굴한 다양한 분자마커를 적용하여 유전다형성을 검증해야 할 것이다.

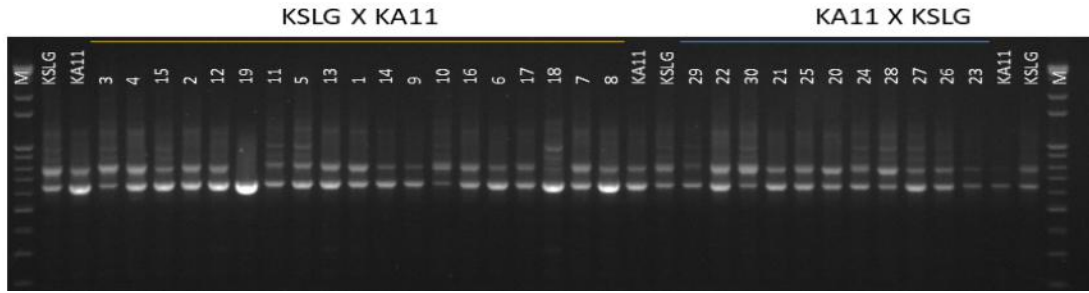


Marker (allele size in bp)



Marker (allele size in bp): CTR1-int13-1 (235/269)

p): CTR1-5U (453/591)



Marker (allele size in bp): CTR-int13-2 (643/768)

그림 27. 교배집단에 적용한 에틸렌 경로 유전자 마커의 전기영동 결과 예시

표 23. 호접란 교배집단에서 ACS7과 ACS8 유전자 다형성 마커와 개화수명의 연관 분석

번호	식물체 ID	개화 일수	ACS8-3U1	ACS8-3U1	ACS8-3U1	ACS7-5U2	ACS7-5U2
	allele(bp)		386	386a	432	449	830
	KSLG		1	0	1	1	1
	KA11		0	1	1	0	1
3	1184-55	162	1	0	1	0	1
4	1184-57	160	0	1	1	1	1
15	1184-73	157	0	1	1	1	1
2	1184-54	155	0	1	1	0	0
19	1184-80	150	0	1	1	0	1
11	1184-66	149	1	0	1	1	1
5	1184-58	139	1	0	1	1	1
13	1184-68	139	1	0	1	1	1
1	1184-51	138	1	0	1	0	1
14	1184-71	134	1	0	1	0	1
9	1184-63	127	0	1	1	1	1
10	1184-65	119	1	0	1	1	1
16	1184-74	118	1	0	1	1	1
6	1184-60	111	0	1	1	0	1
17	1184-76	106	1	0	1	0	1
18	1184-79	82	0	1	1	1	1
7	1184-61	77	0	1	1	0	1
8	1184-62	69	1	0	1	0	1
12	1184-67	154	0	1	1	0	1
29	1193-73	140	1	0	1	0	1
22	1193-57	136	1	0	1	0	1
30	1193-75	136	1	0	1	1	1
21	1193-53	133	1	0	1	1	1
25	1193-66	128	0	1	1	1	1
20	1193-11	117	0	1	1	0	1
24	1193-63	117	0	1	1	1	1
28	1193-72	115	0	1	1	1	1
27	1193-70	113	1	0	1	0	1
26	1193-69	106	0	1	1	0	1
23	1193-61	68	1	0	1	0	1
R ²	1184		0	0		0.03	
	1193		0.002	0.002		0.025	
	Total		0	0		0.03	

표 24. 호접란 교배집단에서 *ACS12*와 *ACO1* 유전자 다형성 마커와 개화수명의 연관 분석

번호	식물체 ID	개화 일수	ACS12-5 U1	ACS12- 5U1	ACS12- 5U1	ACS12-5 U1	ACO1- 1	ACO1- 1	ACO1- 1
allele			320a	320	389	425a	323	409a	409
	KSLG		1	1	1	1	1	1	1
	KA11		1	0	1	0	0	0	1
3	1184-55	162	1	1	1	1	0	1	1
4	1184-57	160	1	0	1	0	1	1	1
15	1184-73	157	1	0	1	1	0	1	1
2	1184-54	155	1	1	1	0	0	1	1
19	1184-80	150	1	1	1	1	0	1	1
11	1184-66	149	1	0	0	1	1	0	1
5	1184-58	139	1	0	1	1	0	0	1
13	1184-68	139	1	1	1	1	1	1	1
1	1184-51	138	1	1	1	0	0	1	1
14	1184-71	134	1	1	1	1	0	0	1
9	1184-63	127	1	1	1	1	1	0	1
10	1184-65	119	1	1	1	1	1	0	1
16	1184-74	118	1	1	1	1	1	1	1
6	1184-60	111	1	1	1	0	1	0	1
17	1184-76	106	1	1	1	1	0	1	1
18	1184-79	82	1	1	1	1	0	1	1
7	1184-61	77	1	1	1	1	0	0	1
8	1184-62	69	1	1	1	1	1	0	1
12	1184-67	154	1	1	1	1	0	0	1
29	1193-73	140	1	0	1	0	0	1	1
22	1193-57	136	1	1	1	0	0	0	1
30	1193-75	136	1	1	1	0	0	1	1
21	1193-53	133	1	0	1	1	0	1	1
25	1193-66	128	1	1	1	0	0	1	1
20	1193-11	117	1	1	1	1	0	1	1
24	1193-63	117	1	0	1	1	0	1	1
28	1193-72	115	1	0	1	1	0	1	1
27	1193-70	113	1	1	1	0	0	1	1
26	1193-69	106	1	1	1	0	0	0	1
23	1193-61	68	1	0	1	1	0	0	1
	1184			0.207			0.048	0.139	0.011
R ²	1193			0.087			0.023	0.04	0.023
	Total			0.021			0.043	0.09	0.001

표 25. 호접란 교배집단에서의 *CTR1* 유전자 다형성 마커의 개화수명과의 연관 분석

번호	식물체 ID	개화 일수	CTR1-5U	CTR1-5U	CTR1-5U	CTR1-5U	CTR1-int13 -1	CTR1-int13 -1
allele			591	591a	453	453a	235	269
	KSLG		1	0	1	0	1	1
	KA11		0	1	0	1	1	1
3	1184-55	162	1	0	0	1	1	1
4	1184-57	160	0	1	0	1	1	1
15	1184-73	157	1	0	1	0	1	1
2	1184-54	155	0	1	0	1	1	1
19	1184-80	150	0	1	0	1	1	0
11	1184-66	149	1	0	0	1	1	0
5	1184-58	139	1	0	0	1	1	0
13	1184-68	139	0	1	1	0	1	1
1	1184-51	138	0	1	1	0	1	1
14	1184-71	134	0	1	1	0	1	1
9	1184-63	127	0	1	1	0	1	1
10	1184-65	119	0	1	1	0	1	1
16	1184-74	118	1	0	1	0	1	1
6	1184-60	111	0	1	0	1	1	1
17	1184-76	106	0	1	1	0	1	1
18	1184-79	82	0	1	0	1	1	0
7	1184-61	77	0	1	0	1	1	1
8	1184-62	69	0	1	0	1	1	1
12	1184-67	154	0	1	0	1	1	1
29	1193-73	140	1	0	0	1	1	0
22	1193-57	136	0	1	0	1	1	1
30	1193-75	136	0	1	0	1	1	1
21	1193-53	133	0	1	0	1	1	1
25	1193-66	128	-	-	-	-	1	1
20	1193-11	117	0	1	1	0	1	1
24	1193-63	117	1	0	0	1	1	1
28	1193-72	115	1	0	1	0	1	1
27	1193-70	113	1	0	1	0	1	1
26	1193-69	106	1	0	0	1	1	1
23	1193-61	68	1	0	1	0	1	1
	1184		0.152	0.152	0.006	0.006	0.003	
R ²	1193		0.334*	0.288	0.398*	0.307	0.068	
	Total		0	0.001	0.018	0.016	0.014	

* Significant by GLM analysis at $p < 0.05$.

3-3 개화수명이 긴 호접란의 핵형분석과 염색체 분자표지 개발

가. 염색체 검정 방법 개발

(1) 시료의 채취

- 시료채취 시간: 8~9시 사이
- 시료의 크기: 2~5cm 사이의 뿌리 사용



그림 1. (A)와 같이 뿌리의 길이가 2~5cm 정도 되는 뿌리에서는 metaphase cell이 관찰되어지나 (B)와 같이 5cm 이상의 이미 성숙한 뿌리에서는 주로 prophase cell의 상태로 존재한다.

- 시료채취 방법: 난의 뿌리의 경우 뿌리 끝에서 흡수한 물을 보유하도록 돕는 두꺼운 근피층으로 싸여 있어 전처리제의 처리가 다른 일반 뿌리에 비해 어려운 점이 있다. 채취한 뿌리를 통째로 처리하는 경우는 전처리제가 잘 처리되지 않아 처리 전 뿌리를 종방향으로 나누어 처리를 실시한 결과, 전처리제의 효과를 볼 수 있었다.



그림 2. 뿌리를 종방향으로 처리한 것(왼쪽)과 통째로 처리한 것(오른쪽). 뿌리를 통째로 사용할 었을 때 전처리의 효과는 매우 적다.

(2) 전처리제 사용방법 및 처리 효과

표 1. 전처리 및 처리방법에 따른 효과.

전처리 시약	처리 온도	처리 시간	염색체 검경 내용
α -bromonaphtalene	실온	4시간	- 염색체가 작은 시료에는 적절하지 않음
		4시간	- Prophase cell이 대부분으로 관찰 됨
8-hydroxyquinoline	17~20°C	5시간	- Metaphase cell의 비중이 다른 처리에 비해 높음 - 핵형분석하기에 적합함
		6시간	- Metaphase cell이 있으나 5시간 처리에 비해 많지 않음 - 일부 metaphase cell은 심하게 응축됨 - 일부는 핵형분석하기에 적합함

- 세포주기의 중기상의 고정을 위해 사용되는 대표적인 시약은 α -bromonaphtalene과 8-hydroxyquinoline 등이 대표적이다. α -bromonaphtalene은 주로 염색체의 길이가 긴 식물체에 효과적이며 8-hydroxyquinoline은 염색체의 길이가 작은 식물체에 효과적인 것으로 알려져 있다. 난 염색체의 경우 숫자가 많고 길이가 작아 α -bromonaphtalene 보다는 8-hydroxyquinoline에서 효과적이었다. 8-hydroxyquinoline에서의 처리 경우, 시간별로 차이가 있었는데 염색체 분석이 용이한 중기상의 고정을 위해서는 그림 3과 같이 5시간 처리가 가장 적합하였다.

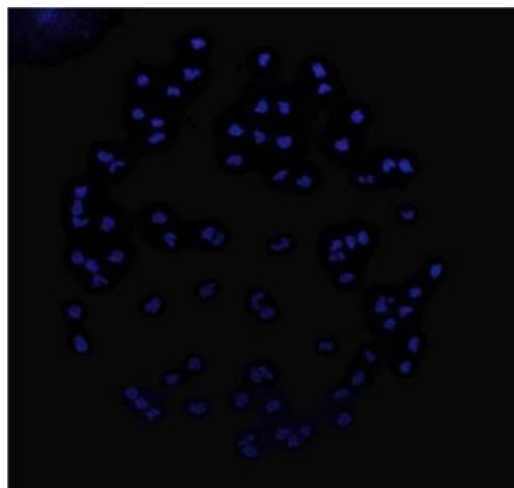


그림 3. 시료를 8-hydroxyquinoline, 17~20°C 에서 5시간 처리한 결과

(3) KS Little Gem의 염색체 검경 결과

- 배수성 검경 결과: KSLG는 4배체로 $2n=4x=76$ 의 염색체로 구성되며 염색체의 길이는

1~3um로 관찰되었다.

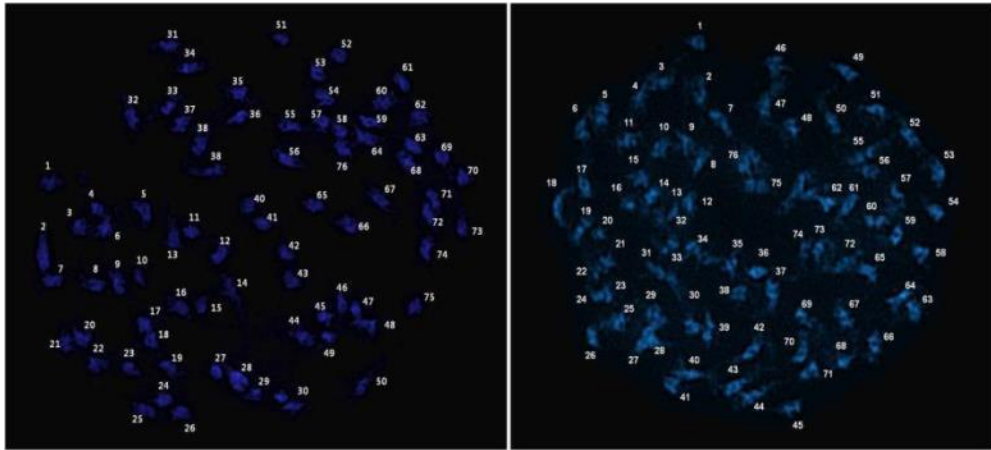


그림 4. KSLG의 배수성 검정 결과

나. 우수 호접란 배수성 검정

- 현재까지 보고된 호접란의 배수성 검정결과를 문헌에서 조사하여 아래 표 2에 정리하였다. 난과 식물의 종류가 다양하고 분류되어진 종의 숫자가 많은것에 비해 염색체 분석의 빈도는 매우 적었다. 또한 알려진 난 원종의 경우 $2n=2x=38$ 로 2배체였으며 DNA content도 2.80~14.36 (pg/2C)로 다양하게 분석되었다. 그러나 국내에서 고유하게 분석되어진 난 염색체의 결과는 전무한 실정이다.

표 2. 우수 호접란 배수성 검정 결과

Elite Phalaenopsis	Ployploidy	Mean DNA content
<i>Phalaenopsis amabilis</i> var. <i>aphrodite</i>	$2n=2x=38$	2.80 (pg/2C)
<i>Phalaenopsis cornu-cervi</i>	$2n=2x=38$	6.44 (pg/2C)
<i>Phalaenopsis equestris</i>	$2n=2x=38$	5.53 (pg/2C)
<i>Phalaenopsis schilleriana</i>	$2n=2x=38$	-
<i>Phalaenopsis stuartiana</i>	$2n=2x=38$	3.13 (pg/2C)
<i>Phalaenopsis amboinensis</i>	$2n=2x=38$	14.36 (pg/2C)
<i>Phalaenopsis violacea</i>	$2n=2x=38$	-
<i>Phalaenopsis Doritis pulcherrima</i>	$2n=2x=38$	13.49 (pg/2C)

Lin et al., 2001. Nuclear DNA contents of *Phalaenopsis* sp. and *Doritis pulcherrima*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 12(2): 195-199.

- 선발한 우수 호접란 중 기 확보된 *Phalaenopsis cornu-cervi*의 배수성 검정: *Phalaenopsis cornu-cervi*는 2배체로 $2n=2x=38$ 로 관찰되었다. 또렷한 중기상의 염색체를 확인하는 것은 어려웠으나 일부 염색체(21, 23, 24, 28 등)에서 NOR이 뚜렷이 관찰되었다. DAPI 염색체 결과 전반적으로 밝게 염색이 되어 genome 전반에 걸쳐 반복염기서열의 분포가 산발되어 있을 것으로 예상할 수 있다.

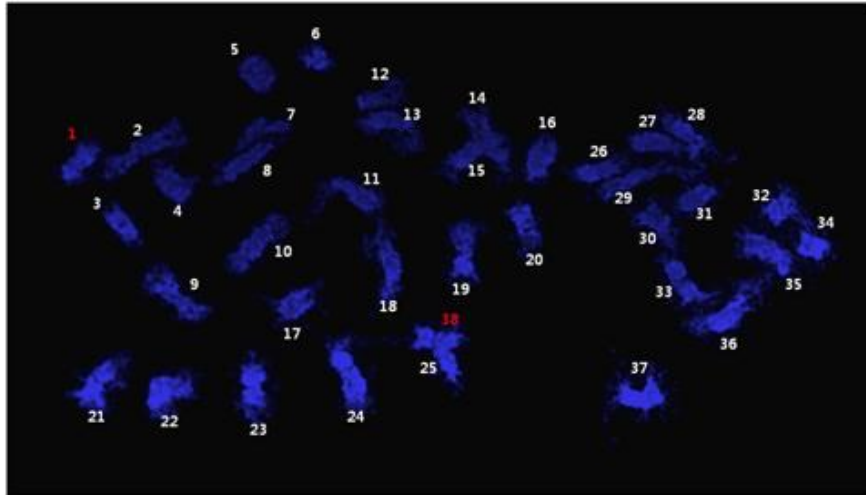
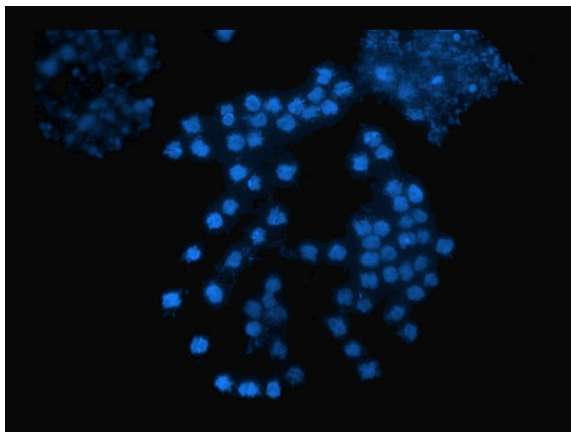


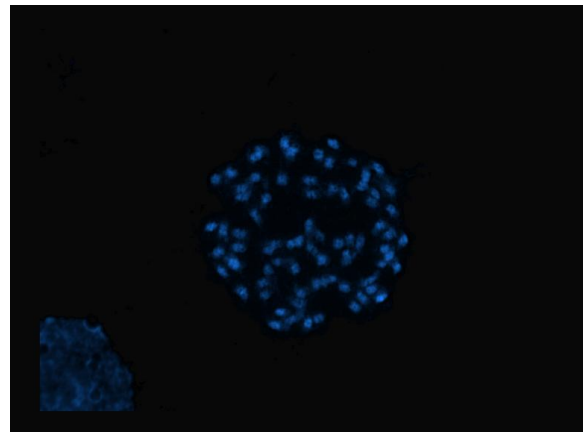
그림 5. *Phalaenopsis cornu-cervi*의 염색체 검정

다. 강산난원 육성 우수 호접란의 배수성 검정

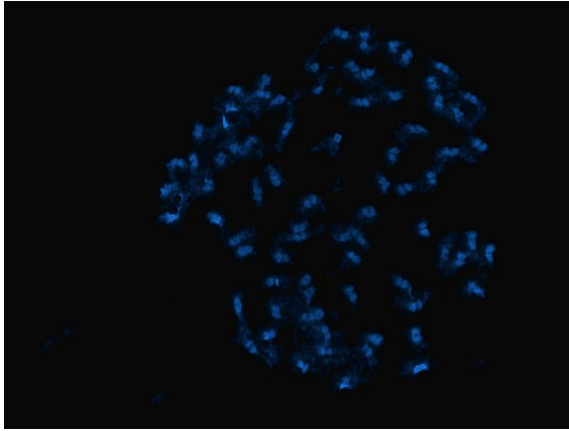
- 강산난원에서 교배육성에 이용되는 우수 호접란의 배수성 검정 결과, 주로 $2n=4x=76$ 로 4배체의 비율이 높았으나 일부는 $2n=3x=57$ 로 3배체도 관찰되었다. 일반적으로 3배체의 경우, 화분의 임성이 없어 교배육성에서 부분으로의 사용이 부적절한 것으로 알려져 있다. 염색체의 크기는 앞서 분석되어진 강산난원 KSLG과 같이 1~3um로 매우 크기가 작게 관찰되었다.



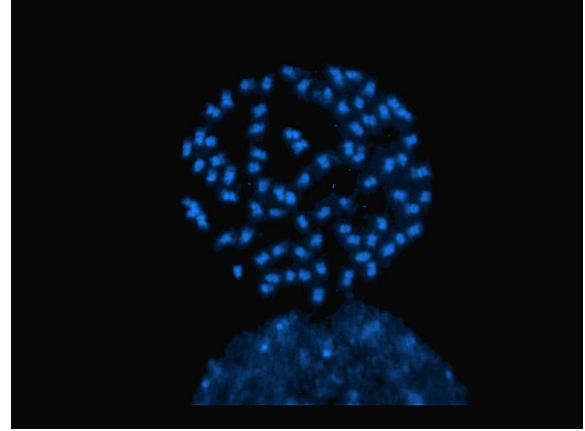
$2n=4x=76(785-2)$



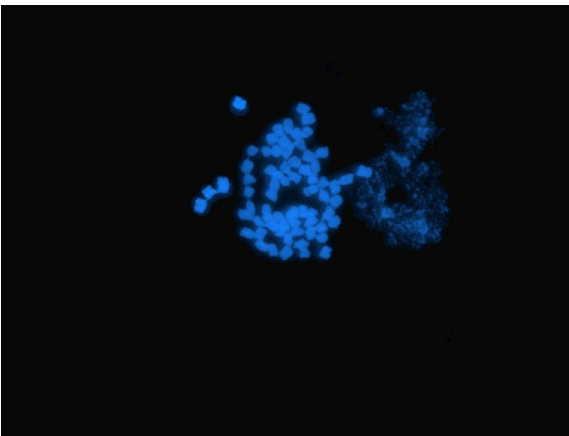
$2n=4x=76(KA02)$



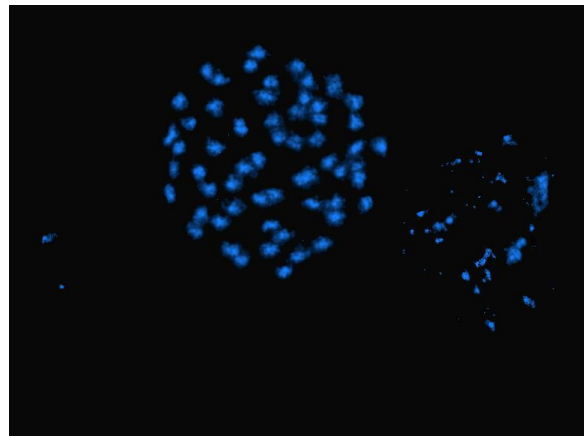
2n=4x=76(KA15)



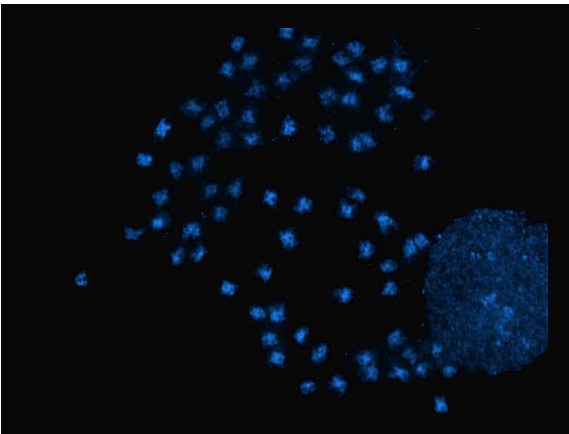
2n=4x=76(KL-33)



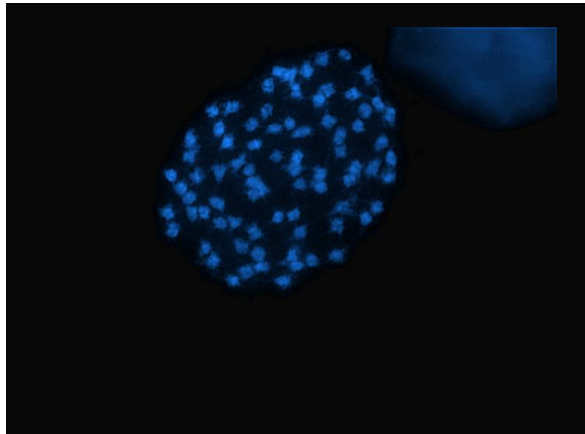
2n=4x=76(KO405)



2n=3x=57(KO4861)



2n=4x=76(KS313)



2n=4x=76(KS519)

그림 6. 강산난원 육성 우수 호접란의 배수성 검정.

라. 수집된 우수 호접란 배수성 검정

- 핵형분석을 위해서는 배수성 연구가 선행되어야 하므로 국내 재배 호접란 품종의 배수성 및 염색체를 관찰하였다. 그 결과 3종(071001, 071002, 071022) 4배체, 4종(071003, 071006, 071011, 071012)은 3배체로 관찰되었다. 염색체의 크기 역시

1~3um로 관찰되었다.

표 3. 수집된 우수 호접란의 배수성 검정 결과.

Sample	Cultivar name	Ploidy level	Chromosome
071001	White and Red lip 57	tetraploid	2n=4x=76
071002	Sogo Kiti	tetraploid	2n=4x=76
071003	Sara Gold	triploid	2n=3x=57
071006	Taida pearl	triploid	2n=3x=57
071011	Leopard prince	triploid	2n=3x=57
071012	White	triploid	2n=3x=57
071022	-	tetraploid	2n=4x=76

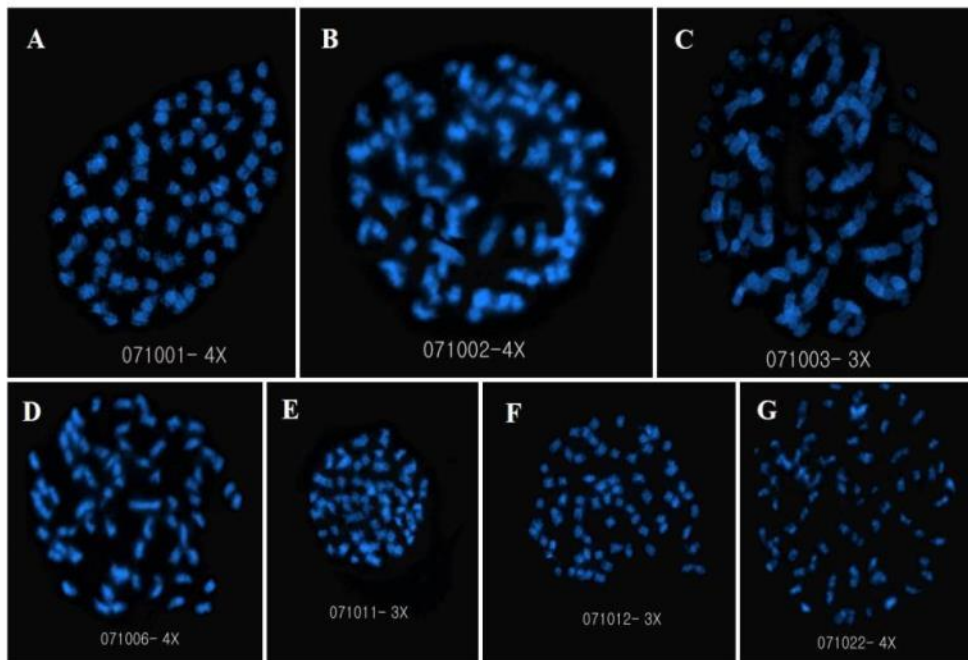


그림 7. 재배종 호접란의 염색체 검정. (A) 071001; (B) 071002; (C) 071003; (D) 071006; (E) 071011; (F) 071012; (G) 071022.

마. KS Little Gem FISH 핵형분석

- KS Little Gem FISH 핵형분석 결과, 45S rDNA(red fluorescence)와 5S rDNA(green fluorescence)가 3쌍씩 관찰되었다. 그 중 1쌍의 45S와 5S는 co-localization하였다.

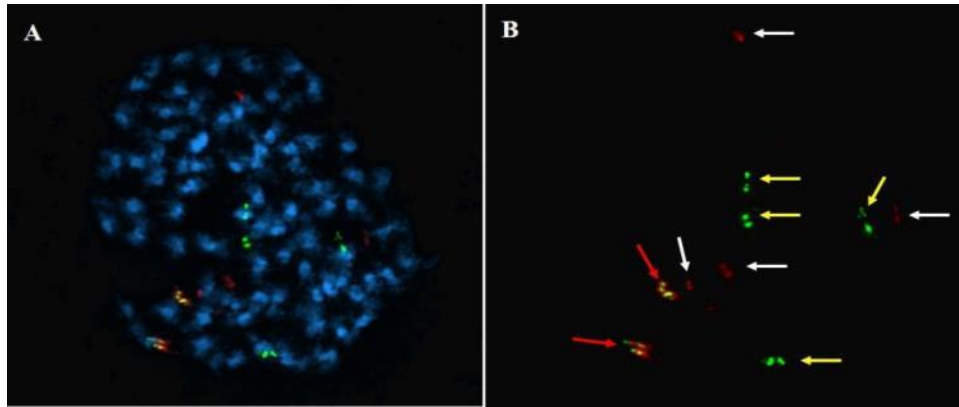


그림 7. KS Little Gem FISH 핵형분석 결과. Yellow arrow: 5S rDNA; White arrow: 45S rDNA; Red arrow: 45S and 5S

3-4 개화수명이 긴 호접란 신품종 전용 배지개발 및 기내변이 회피기술 개발

가. 배양단계별 배양묘 균일화 조건 구명

- 팔레뉴시스 KSLG 액아 배양시 균일한 배양묘를 얻기 위하여 다음과 같이 실험을 수행하였다.
- 배양에 적합한 식물생장조절제 종류 및 농도 구명하기 위해 MS 배지에 BA 3, 5, 7mg/L 와 TDZ 0.5, 1, 2mg/L 등을 첨가하여 액아를 배양한 결과(표 1, 그림 1), 생존율은 TDZ첨가배지보다 BA첨가 배지에서 83.3%~88.5%로 전반적으로 높았다. 또한 BA 5~7mg/L 첨가배지에서 shoot 형성과 shoot 길이 모두 양호하였으며 Mixed type shoot 형성을 또한 양호하였다. 반면 TDZ첨가배지의 경우 TDZ농도가 증가할수록 shoot 형성이 낮아지고 shoot 길이 또한 감소하였다. 따라서 팔레뉴시스 KSLG을 배양하기 위해서는 MS기본배지에 BA를 5mg/L 첨가하는 것이 적합할 것으로 판단된다.

표 1. 팔레뉴시스 KSLG 액아배양에 적합한 식물생장조절제 종류 및 농도

Media	% of survival	Shoot type			Flower stalk type		Mixed type (shoot + flowerstalk)		% of callus
		% of shoot formation /bud	No. of shoots /bud	Shoot length (cm)	% of stalk formation /explant	Bud No. of explant	% of mix type	No. of buds /explant	
Control	53.3	50.0	1.0	41.6	0.0	0.0	3.3	0.0	0.0
MS+B3	83.3	36.7	1.0	47.4	3.3	4.0	40.0	2.4	3.3
MS+B5	88.0	40.0	1.2	45.7	0.0	0.0	44.0	2.9	4.0
MS+B7	88.5	38.5	1.1	45.6	0.0	0.0	46.2	2.4	3.8
MS+T0.5	76.7	40.0	1.0	42.2	10.0	4.0	23.3	2.9	3.8
MS+T1.0	70.0	20.0	1.2	28.2	6.7	3.5	40.0	2.7	3.3
MS+T2.0	62.1	6.9	1.0	28.0	10.3	4.0	34.5	2.2	10.0

B 3, 5, 7 : BA 3, 5, 7mg/L. T 0.5, 1, 2 : TDZ 0.5, 1, 2mg/L.

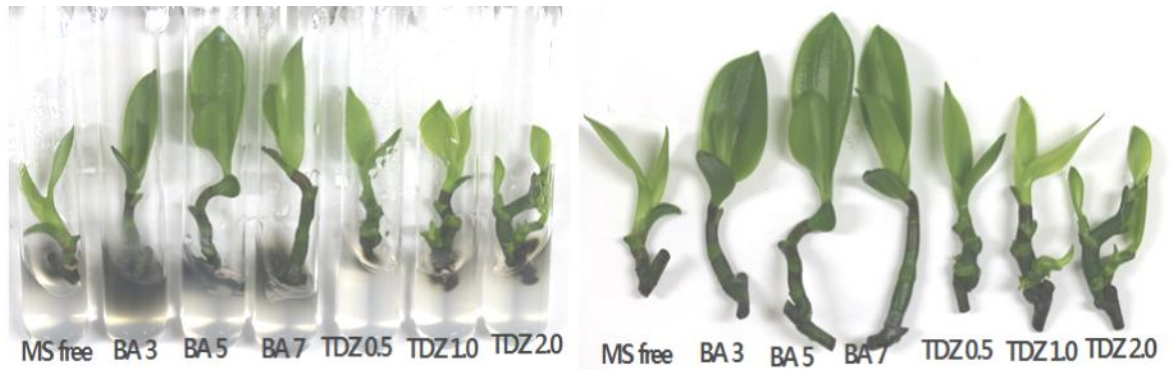


그림 1. 배지내 식물생장조절제 종류 및 농도에 따른 생육정도

- 팔레놉시스 KSLG 액아배양 시 정상적인 shoot이외에 화경 또는 shoot가 부착된 화경이 형성되었다(그림 2). 이러한 기내에서 형성된 화경으로부터 정상적인 균일한 배양묘를 유도하기 위해 MS배지와 Hyponex배지에 BA 5~10mg/L 첨가배지에서 배양한 결과(표 2), hyponex배지에 비해 MS배지에서 배양했을 때 생존율이 100%로 양호하였으며, 특히 BA 5~7mg/L 첨가배지에서 정상적인 shoot형성율이 70~80%로 높았으며 shoot길이 또한 양호하였다. 반면 hyponex배지의 경우 정상 shoot가 형성되었으나 shoot길이가 MS 배지에 비해 감소하였으며 또한 액아로부터 다시 화경이 유도되거나 Mixed shoot가 형성되었다. 따라서 팔레놉시스 KSLG 액아배양에서 기내 화경이 형성될 경우 다시 MS배지에 BA 5mg/L 첨가배지에서 2차 배양을 하면 정상적이고 양호한 기내 shoot를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.



그림 2. 팔레놉시스 KSLG 액아배양 시 배양조건에 따른 4종류의 배양식물체 형태.

표 2. 팔레뉴시스 KSLG 기내화경의 2차 배양시 적합한 배지 및 성장조절제 농도

Media	% of survival	Shoot type			Flower stalk type		Mixed type (shoot+flower stalk)			% of callus
		% of shoot formation /bud	No. of shoots/ bud	Shoot length (cm)	% of stalk formation /explant	Bud No. of explant	% of mix type	Shoot length (cm)	No. of buds /explant	
H+B5	90.9	69.7	1.4	23.3	3.0	4.0	9.0	19.0	2.0	9.0
H+B7	96.3	51.8	2.0	23.9	11.1	3.6	25.9	25.6	2.1	7.4
H+B10	93.7	43.7	2.0	23.5	21.8	3.7	21.8	25.5	2.7	6.2
MS+B5	100.0	83.3	1.7	32.7	0.0	0.0	16.6	33.4	2.0	0.0
MS+B7	100.0	70.0	2.1	30.6	0.0	0.0	26.6	32.5	2.3	0.0
MS+B10	100.0	65.6	2.3	29.8	0.0	0.0	34.3	31.4	2.2	0.0

B 5, 7, 10 : BA 5, 7, 10mg/L.

- 액아배양시 균일한 배양묘를 얻기위해 MS 기본배지에 BA 5mg/L을 첨가한 배지에 팔레뉴시스 KSLG 액아 위치별 배양 효율을 조사한 결과(표 3), 첫 번째 위치한 액아가 생존율이 88%로 가장 높았으며 액아위치가 낮아질수록 생존율은 낮아지는 경향을 나타내었으며 특히 3번째 액아의 경우 생존율이 현저히 감소하였다. shoot 형성을, 화경형성을 및 Mixed type shoot 형성을 또한 첫번째 위치한 액아가 가장 높은 반면 액아위치가 낮아질수록 감소하였다. 따라서 액아배양 시 되도록 1~2번째 액아를 사용하는 것이 유리할 것으로 판단된다.

표 3. 팔레뉴시스 KSLG액아위치별에 배양효율.

Position of node	% of survival	Shoot type			Flower stalk type		Mixed type (shoot+flower stalk)			% of callus
		% of shoot formation /bud	No. of shoots/ bud	Shoot length (cm)	% of stalk formation/ explant	No. of buds/ explant	% of mix type	Shoot length (cm)	No. of buds /explant	
First	88.0	44.0	1.1	37.4	16.0	3.8	28.0	39.7	2.4	0.0
Second	73.9	43.5	1.1	35.5	8.7	3.0	13.0	35.0	2.7	8.7
Third	58.3	12.5	1.3	28.3	8.3	3.5	25.0	33.4	2.7	12.5
Fourth	36.0	12.0	1.0	30.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	24.0

(Media : MS+BA 5mg/L.)

- MS 기본배지에 BA 5mg/L을 첨가한 배지에 팔레뉴시스 KSLG액아배양시 균일한 배양묘를 얻기 위하여 화경의 개화상태에 따른 배양효율을 조사한 결과(표 4), 화아가 형성되지 않는 초기단계

또는 화아가 형성된 단계의 화경의 액아 배양시 생존율이 85~88%로 양호하였으며, shoot 형성을, 화경형성을 및 Mixed type shoot 형성을 또한 화아가 형성되지 않는 초기단계 또는 화아가 형성된 단계에서 전반적으로 양호하였다. 반면 개화가 시작되면서 생존율 및 shoot 형성이 감소하였으며 꽃이 개화하여 노화된 화경의 액아를 사용하면 생존율, shoot 형성을 및 Mixed type shoot 형성이 급격히 감소하여 배양재료로 부적합한 것을 알 수 있었다. 일반적으로 팔레뉴시스의 액아배양은 개화 후 화형, 화색 등 꽃의 형태를 확인 후 배양하기 때문에 첫 번째 꽃이 개화한 상태의 화경을 배양했을 때 생존율과 shoot 형성을 및 Mixed type shoot 형성이 양호하므로 액아 배양 배양효율에는 크게 영향을 미치지 않을 것으로 판단된다.

표 4. 팔레뉴시스 KSLG화경의 개화상태에 따른 배양효율.

Flower stalk condition	% of survival	Shoot type			Flower stalk type		Mixed type (shoot+flower stalk)			% of callus
		% of shoot formation /bud	No. of shoots /bud	Shoot length (cm)	% of stalk formation /explant	Bud No. of explant	% of mix type	Shoot length (cm)	No. of buds/ explant	
S1	88.4	46.1	1.0	45.8	0.0	0.0	34.6	38.1	2.4	7.6
S2	85.7	33.3	1.0	38.9	9.52	3.5	33.3	30.4	2.5	9.5
S3	74.0	18.5	1.2	35.6	11.1	4.0	29.6	30.9	2.7	14.8
S4	72.4	27.5	1.5	27.8	0.0	0.0	31.0	33.0	2.4	13.7
S5	41.1	5.8	1.0	15.0	0.0	0.0	17.6	20.6	2.0	17.6

Media : MS+BA 5mg/L. S1: No visible flower bud; S2 flower bud formation; S3: first flower blooming; S4: third flower blooming; S5: all flower senescence.

- 액아배양시 균일한 배양묘를 얻기 위해 MS 기본배지에 BA 5mg/L을 첨가하여 팔레뉴시스 KSLG화경절편의 절단 방법 및 절편 크기 따른 배양효율을 조사한 결과(표 5, 그림 3), 수직으로 자른 절편체보다는 수평으로 자랐을 경우 생존율이 높았으며, 특히 절단길이가 짧은 것보다는 1.5cm로 길 때 생존율이 93%로 월등히 우수하였다. 반면 액아자체만 분리하여 배양할 경우 대부분이 갈변하여 생존율이 급격히 감소하였다. Shoot 형성을, 화경을 및 Mixed type shoot 형성을 또한 화경절편체의 길이가 길 때 양호하였으며 형성된 shoot의 크기 또한 화경절편체의 길이가 길수록 유리하였다. 따라서 화경을 이용한 액아배양을 할 경우 화경절편체 길이를 1.5cm 이상 길게 하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

표 5. 팔레뉴시스 KSLG 화경절편의 절단 방법 및 절편 크기 따른 배양효율.

Condition of flower stalk	% of survival	Shoot type			Flower stalk type		Mixed type (shoot+flower stalk)			% of callus
		% of shoot formation /bud	No. of shoots /bud	Shoot length (cm)	% of stalk formation /explant	Bud No. of explant	% of mix type	Shoot length (cm)	No. of buds /explant	
Axillary bud	19.4	6.45	1.00	34.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	12.90
1cm vertical cut	50.0	20.00	1.33	35.82	20.00	3.67	10.00	33.31	2.00	0.00
0.7cm horizontal cut	60.0	13.33	1.25	35.74	13.33	3.75	23.33	28.52	2.29	10.00
1.5cm horizontal cut	93.3	30.00	1.00	40.00	36.67	3.73	20.00	36.30	2.67	0.00

Media : MS+BA 5mg/L.

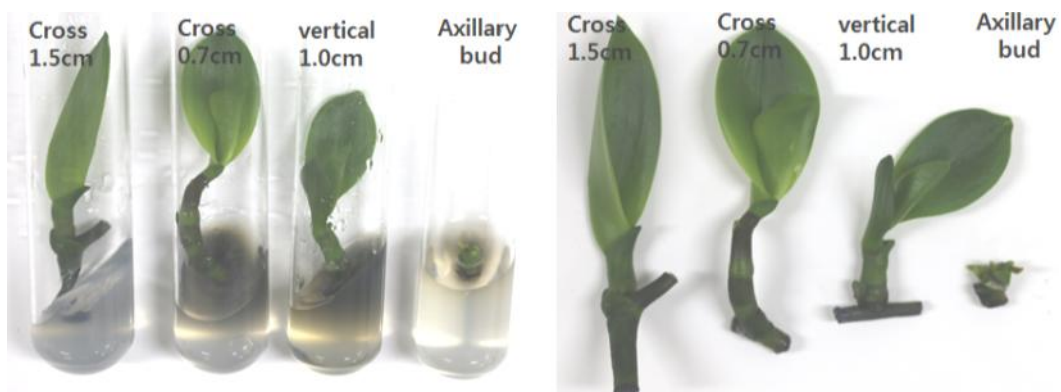


그림 3. 화경절편의 절단 방법 및 절편 크기 따른 생육정도.

- 팔레뉴시스 KSLG액아배양시 암처리 기간에 따른 균일한 배양묘를 얻기 위하여 16시간 명배양, 1주, 4주 암처리 후 16시간 명배양을 하였으며 결과는 표 6, 그림 4와 같다. 암처리를 했을 경우 명배양에 비해 생존율이 전반적으로 낮게 나타났다. 명배양의 경우 화경과 Mixed type shoot 형성율이 양호한 반면 암처리 후 명배양 하였을때는 정상 shoot형성은 높은 반면 Mixed type shoot 형성율이 낮았다. 따라서 팔레뉴시스 KSLG의 액아배양시 암처리보다는 16시간

명배양하는 것이 유리한 것으로 판단된다.

표 6. 팔레뉴시스 KSLG 액아배양 시 암처리 기간에 따른 배양효율.

Period of dark treatment (week)	% of survival	Shoot type		Flower stalk type		Mixed type (shoot+flower stalk)		% of callus		
		% of shoot formation /bud	No. of shoots/bud	Shoot length	% of stalk formation/explant	Bud No. of explants	% of Mix type		Shoot length	No. of buds/explant
0	90.3	45.1	1.0	38.7	6.4	4.0	32.2	34.5	2.5	6.4
1	75.9	51.7	1.2	40.9	0.0	0.0	17.2	32.3	2.2	6.9
4	61.5	38.4	1.0	40.8	0.0	0.0	19.2	33.8	2.2	3.8

Media : MS+BA 5mg/L.



그림 4. 화경절편의 액아배양 시 암처리 기간에 따른 생육정도

- 팔레뉴시스 KSLG 액아배양시 균일한 배양묘를 얻기 위해 MS 기본배지에 BA 5mg/L을 첨가한 배지내에 활성탄의 농도에 따른 배양효율을 알아본 결과는 표 7, 그림 5과 같다. 생존율의 경우 활성탄을 2g/L 첨가했을 때 82.6%로 약간 높게 나타났으나, 전반적인 생존율은 첨가하지 않은 경우와 큰 차이를 나타내지 않았다. 한편 활성탄을 첨가할 경우 정상 shoot 형성이 양호하였고 shoot길이도 양호하였다. 반면 활성탄을 첨가하지 않을 경우 Mixed type shoot 형성율이 높게 나타났으며 액아가 callus화 되는 비율 또한 높게 나타났다. 따라서 팔레뉴시스 KSLG화경의 액아배양 시 활성탄을 2g/L 첨가하는 것이 바람직한 것으로 판단된다.

표 7. 팔레놉시스 KSLG 액아배양 시 배지내 활성탄 농도에 따른 배양효율.

Con. of charcoal (g)	% of survival	Shoot type			Flower stalk type		Mixed type (shoot+flower stalk)			% of callus
		% of shoot formation /bud	No. of shoots /bud	Shoot length	% of stalk formation /explant	Bud No. of explant	% of mix type	Shoot length	No. of buds/ explant	
0	77.7	33.3	1.2	36.5	0.0	0.0	37.0	30.8	2.6	7.4
0.5	78.2	69.5	1.0	46.0	0.0	0.0	8.7	35.5	2.5	0.0
1	78.7	63.6	1.0	44.2	0.0	0.0	12.1	29.0	2.0	3.0
2	82.6	65.2	1.0	45.6	0.0	0.0	17.3	31.3	1.7	0.0

(Media : MS+BA 5mg/L.)

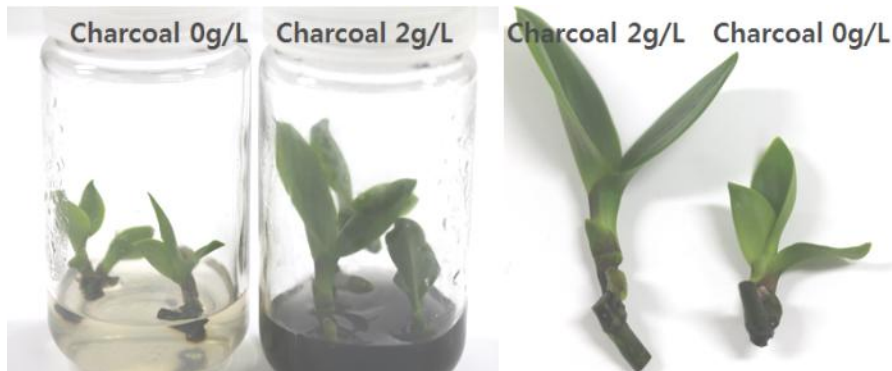


그림 5. 액아배양 시 배지내 활성탄 첨가여부에 따른 생육정도.

나. 기내 배양묘 강건화 조건 구명

- 균일도 및 강건도가 높은 신초증식을 위한 배지종류, 배양방법 및 배양환경 구명 팔레놉시스 KSLG 기내 유묘의 배양시 생육이 강건하고 균일한 배양묘를 얻기 위해 MS와 하이포넥스 2 종류의 배지에 BA 3, 5, 7mg/L 또는 TDZ 2, 3mg/L 등을 첨가하여 배양 후 유묘의 증식 정도를 비교한 결과는 아래 표 1 및 그림 1과 같다.

표 1. 팔레놉시스 KSLG 유묘의 기본배지 및 BA, TDZ 농도에 따른 신초증식 정도

Basic Media	Con. of PGA (mg/L)	Normally differentiated shoot (>1.2cm)				Clustered shoot	
		No. of shoots	Length of shoot (mm)	Thickness of leaf (mm)	FW of explant (mg)	No. of undifferentiated shoots	FW of clustered shoot(mg)
Hyponex	BA 3	3.2	21.4	0.6	767.5	1.3	104.2
	BA 5	4.5	19.3	0.6	981.0	1.8	219.7
	BA 7	4.5	19.5	0.5	936.9	2.9	323.8
	TDZ 2	1.6	18.4	0.4	365.0	4.6	864.2
	TDZ 3	1.6	18.6	0.4	341.4	5.1	907.7
MS	BA 3	3.0	22.7	0.5	849.2	0.7	67.0
	BA 5	4.1	21.1	0.5	966.8	1.3	187.4
	BA 7	3.6	19.5	0.5	873.0	1.7	249.3
	TDZ 2	1.9	19.6	0.4	479.9	4.3	1343.6
	TDZ 3	1.4	18.5	0.4	372.3	4.5	1482.7

- 기내 유묘의 배양시 1cm 이상 자란 생육이 강건하고 정상적인 균일한 배양묘의 신초증식 수 및 생체중은 MS배지에 비해 하이포넥스 배지에서 전반적으로 유리하였으며, 신초의 길이에서는 차이가 없었다. 식물생장조절제에 종류 및 농도에 따른 정식정도를 보면 1cm 이상 자란 정상적인 균일한 배양묘의 경우 하이포넥스 기본배지에 BA 5mg/L 첨가배지에서 신초증식 수가 4.53개로 가장 많았으며 BA 7mg/L 첨가배지에서도 양호하였으며 생체중 또한 BA 5mg/L 첨가배지가 가장 높았다. 반면 TDZ첨가배지의 경우 TDZ농도가 증가할수록 정상적인 shoot 형성율이 낮아지고 shoot 길이 또한 감소하였다. TDZ 첨가시 정상적인 신초형성은 BA비해 낮았으며 덩어리 상태의 미분화된 신초형태를 띄었으며 TDZ 농도가 높을수록 비정상적인 신초덩어리의 수와 생체중이 높았다. 따라서 팔레놉시스 KSLG을 정상적인 유묘의 증식을 위해서는 하이포넥스를 기본배지에 BA를 5~7 mg/L 첨가하는 것이 적합할 것으로 판단된다.



그림 1. 식물생장조절제 종류 및 농도에 따른 팔레뉴시스 ‘Little Jam’ 유묘 증식 정도

(HB3 : hypoenex+BA 3mg/L, HB5: hypoenex+BA 5mg/L, HB7: hypoenex+BA 7mg/L,

HT2: hypoenex+TDZ 2mg/L, HT3 : hypoenex+TDZ 3mg/L)

- 팔레뉴시스 KSLG 기내 유묘의 배양시 생육이 강건하고 균일한 배양묘를 얻기 위해 하이포넥스 기본배지에 BA 5mg/L 첨가한 후 식물재료의 처리방법(잎을 절단하지 않고 식물전체를 이용, 잎의 1/5 절단, 잎을 1/2절단, 잎을 4/5절단) 달리하여 배양했을 때 유묘의 증식 정도를 비교한 결과는 표 2와 같다.
- 잎을 절단하지 않고 배양했을 때 신초증식 수, 신초길이 및 생체중이 각각 4.69개, 22.74mm 및 1216.39mg으로 가장 높았으며 잎을 1/5절단했을 경우 또한 신초증식 수, 신초길이 및 생체중 모두 양호하였다. 하지만 잎의 절단 길이가 많아질수록 정상적인 신초증식 수, 신초길이 및 생체중이 감소하는 경향을 나타내었으며 비정상적인 미분화된 신초형성이 증가하였다. 따라서 팔레뉴시스 KSLG의 정상적인 유묘의 증식을 위해서는 기본식물재료는 잎을 제거하지 않고 치상하는 것이 유리할 것으로 판단된다.

표 2. 팔레놉시스 KSLG 유묘증식 시 식물체 절단정도에 따른 배양 정도

Methods of leaf cutting	Normally difference shoot (>1.2cm)				Clustered shoot	
	No. of shoots	Length of shoot (mm)	Thickness of leaf (mm)	FW of explant (mg)	No. of undifferentiated shoots	FW of clustered shoot(mg)
No cut	4.6	22.7	0.5	1216.3	1.2	113.0
1/5 cut	4.6	21.9	0.5	1159.9	1.5	134.6
1/2 cut	3.9	21.2	0.5	985.5	1.5	143.0
4/5 cut	3.6	20.4	0.4	759.9	1.8	166.8

- 팔레놉시스 KSLG 기내 유묘증식 시 암처리 기간에 따른 균일한 배양묘를 얻기 위해 하이포넥스 기본배지에 BA 5mg/L 첨가한 후 16시간 광주기로 하여 명배양, 1주, 2주, 4주 암처리 후 명배양 했을 때 결과는 표 3과 같다. 정상적인 신초형성 수 및 생체중은 1주 암처리 후 명배양한 배지에서 5.12로 가장 높았으며 암처리 기간이 길어질수록 신초형성 수와 생체중은 감소하였다. 신초의 길이 및 엽육두께는 암처리하지 않고 바로 명배양한 배지에서 높았으며 암처리 기간이 길어질수록 신초길이가 감소하고 생체중도 현저히 감소한 반면 비정상적인 신초형성율은 증가하였다.
- 따라서 팔레놉시스 유묘 증식시 균일하고 건전한 유묘를 얻기 위해서는하이포넥스 기본배지에 BA 5mg/L 첨가한 후 16시간 광주기로 하여 1주암처리 후 명배양 했을 때 가장 유리한 것으로 판단된다.

표3. 팔레놉시스 KSLG 유묘증식 시 암처리 기간에 따른 배양 정도

Dark Period	Normally differentiated shoot (>1.2cm)				Clustered shoot	
	No. of shoots	Length of shoot (mm)	Thickness of leaf (mm)	FW of explant (mg)	No. of undifferentiated shoots	FW of clustered shoot(mg)
0 week dark	4.3	23.4	0.5	1257.1	1.2	125.3
1 week dark	5.1	21.2	0.4	1322.5	1.2	123.6
2 week dark	3.8	19.6	0.4	821.1	1.1	113.6
4 week dark	2.8	19.4	0.4	597.2	0.9	102.1

- 팔레놉시스의 기내 증식과정에서 가장 큰 문제는 절편체로부터 페놀물질이 분비되어 배지를 심하게 갈변시켜 기내식물체의 증식 및 생육에 지장을 초래하게 된다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 갈변억제물질인 페놀을 억제하고자 하는 노력이 있어왔지만 큰 효과가 없는 것으로 밝혀졌다. 따라서 본 연구는 이러한 페놀 물질에 대한 유전적인 관점에서 기본적으로 이해하고 방법을 개선하고자 팔레놉시스 절편체 배양 조건별 페놀물질의 분비와 관련된 유전자(*PhPAL*, *PhPPO*, *PhPOD*)의 발현양상을 알아보려고 하였다.
- 팔레놉시스 KSLG 잎 절편체의 기내배양시 배양시간경과에 따른 *PhPAL*, *PhPPO*, *PhPOD*의 발현양상을 알아보기 위해 MS기본배지에 BA 3mg/L 첨가한 배지에 잎절편체를 배양하여 *PhPAL*, *PhPPO*, *PhPOD* 유전자의 상대적인 발현량을 알아본 결과는 그림 2와 같다. *PhPAL*의 경우 절편체 배양 초기인 치상 3시간부터 유전자 발현이 급격히 증가하여 12배양 12일 까지 높은 발현율을 유지하였다. *PhPPO*의 경우 절편체 치상 초기인 3시간에 가장 발현이 높았으며 배양 3일 후부터는 거의 발현되지 않았다. *PhPOD*의 경우 절편체 배양 후 서서히 발현이 증가하여 증가하여 배양 3일후 가장 발현이 높았으며 그후 약간 감소하는 양상을 나타내었다.

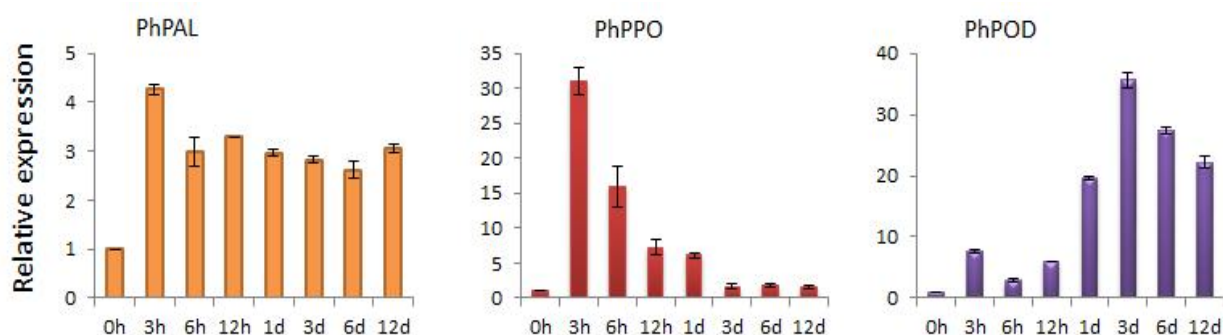


그림 2. 팔레놉시스 KSLG 잎 절편배양시 배양 시간 경과에 따른 *PhPAL*, *PhPPO*, *PhPOD* 유전자의 발현양상

- 팔레놉시스 KSLG 잎 절편체의 기내배양시 배지내 성장조절제 첨가시 *PhPAL*, *PhPPO*, *PhPOD*의 발현양상을 알아보기 위해 MS기본배지에 BA 0, 7 mg/L , TDZ 0, 3mg/L 첨가한 배지에 잎 절편체를 배양하여 *PhPAL*, *PhPPO*, *PhPOD* 유전자의 상대적인 발현량을 알아본 결과는 그림 3 및 4와 같다.
- 배지내 성장조절제 BA 7 mg/L , TDZ 3mg/L 첨가한 배지에서 배양한 절편체에서 페놀형성 관련 유전자인 *PhPAL*, *PhPPO*, *PhPOD* 유전자의 발현이 현저히 감소함을 알 수 있었다. 이러한 실험을 바탕으로 팔레놉시스 Little Jam' 조직배양시 유묘의 증식에 이용되는 성장조절제인 BA와 TDZ는 페놀물질 관련 유전자의 활성을 억제하는 역할을 하는 것으로 확인되었다.

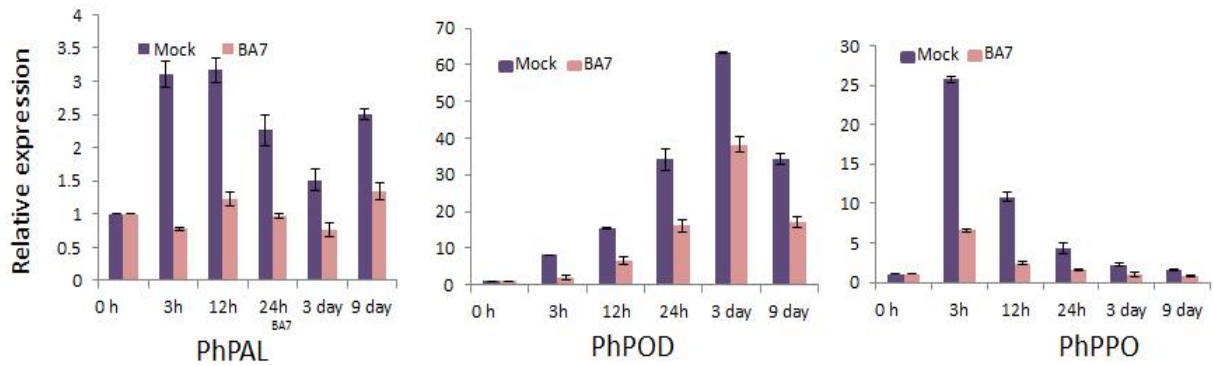


그림 3. 팔레놉시스 KSLG 잎 절편배양시 BA 무처리 배지와 BA 7mg/L 첨가한 배지에서 배양 시간대별 *PhPAL*, *PhPPO*, *PhPOD* 유전자의 발현양상

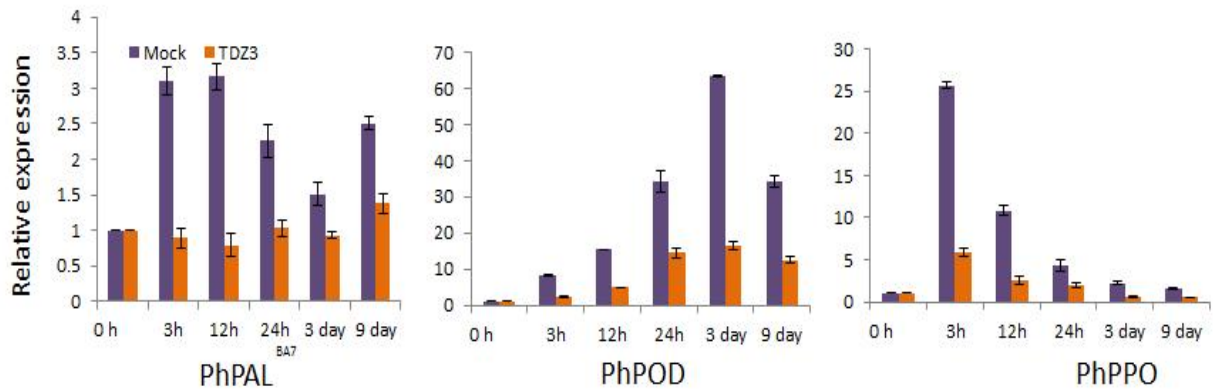


그림 4. 팔레놉시스 KSLG 잎 절편배양시 배양 시간대별 TDA 무처리 배지와 TDZ 3mg/L 첨가한 배지에서 배양시간에 따른 *PhPAL*, *PhPPO*, *PhPOD* 유전자의 발현양상.

다. 기내배양 클론묘의 형태적 유전적 변이 검정 및 클론묘 안정성 검정

(1) 기내배양 시 계대배양 및 유묘유래에 따른 변이발생 빈도 및 발생형태

- 팔레놉시스 KSLG 기내배양 시 계대배양 및 유묘유래에 따른 변이발생 빈도 및 발생형태를 보면 표 1과 같다. MS배지(MS +코코넛액 50mL/L+sucrose 20g/L)에 NAA 0.2mg/L와 BA 1.0mg/L를 첨가한 배지에서 PLB를 증식한 후 MS free 배지(MS +코코넛액 50mL/L+sucrose 20g/L)에서 유도된 유묘의 경우 PLB의 계대배양의 횟수에 따라 변이율이 차이를 나타내었는데 계대배양을 1회 후 형성된 유묘는 변이가 나타나지 않는 반면 계대배양 5회 후 형성된 유묘의 변이는 5.2%, 계대배양 10회 후 얻어진 유묘는 28.4%의 변이율을 나타내었다. MS배지(MS +코코넛액 50mL/L+sucrose 20g/L)에 BA 5.0mg/L를 첨가한 배지를 이용하여 팔레놉시스 액아로부터 형성된 유묘를 동일한 배지에서 다신초 증식을

한 경우 1회 계대배양을 통해 얻어진 유묘의 경우 변이가 나타나지 않았으나, 5회 계대배양 후 얻어진 유묘는 4.8%의 변이를 나타내었으며 10회 계대배양의 경우 22.8%의 변이를 나타내었다. 즉 PLB 또는 다신초로 증식하는 과정에서 계대배양 횟수가 증가하면 변이체의 증가율을 증가함을 알 수 있었다. 육안으로 확인되는 변이 형태는 먼저 엽육이 두꺼워지고, 잎 표면이 거칠거나 마디가 길어지면서 잎의 크기가 현저히 감소해졌으며 뿌리는 매우 두꺼워지는 경향을 나타내었으며 일부는 왜소화와 함께 원형형태의 잎을 가지면서 엽육색이 연해지거나 잎이 타원형으로 길어지면서 뒤틀리는 형태를 나타내었다.

표 1. 팔레놉시스 KSLG 기내배양시 계대배양 및 유묘유래에 따른 변이발생 빈도 및 발생형태

Cultured individual and step		Individual variation	Mutation rate
Origin of seedling	No. of subcultures	(each 500)	(%)
PLB propagation	1	0	0.0
	5	26	5.2
	10	142	28.4
Multiple shoot propagation	1	0	0.0
	5	24	4.8
	10	114	22.8

- 팔레놉시스 KSLG 기내배양시 MS기본배지(MS + 코코넛액 50mL/L+sucrose 20g/L)에 BA 농도를 0, 5, 10mg/L 등의 농도로 계대배양을 5회 실시했을 때 성장조절제의 농도에 따른 변이발생 빈도 및 발생형태를 보면 표 2와 같다. 액배양을 통해 형성된 유묘를 이용하여 다신초 증식을 BA의 농도를 달리하여 5회 계대배양을 했을 때 BA의 농도에 따라 변이발생율에 차이를 나타내었는데 배지내 BA 1mg/L 첨가하여 계대배양을 한 경우 변이율이 1%인 반면 BA의 농도가 증가함에 따라 변이율이 증가하였는데 BA를 5mg/L 첨가하여 계대배양을 한 경우 변이율이 4.8%, BA를 10mg/L 첨가하여 계대배양을 한 경우 7.6%를 나타내었다. 따라서 변이발생을 최소화하기 위해서는 증식율이 다소 낮더라도 BA농도를 5mg/L 이하로 낮추는 것이 바람직한 것으로 판단된다.

표 2. 팔레놉시스 KSLG 기내배양시 성장조절제의 농도에 따른 변이발생 빈도 및 발생형태

Origin of seedling	BA concentration	Individual variation (each 500)	Mutation rate (%)
Multiple shoot propagation (5 times subculture)	0	5	1.0
	5	24	4.8
	10	38	7.6

(2) 조직배양묘의 변이발생의 해부학적인 형태

- 팔레뉴시스 KSLG 기내배양시 MS기본배지(MS +코코넛액 50mL/L+sucrose 20g/L)에 BA를 5mg/L의 농도로 계대배양을 5회 실시했을 때 다양한 형태의 변이체를 육안으로 확인할 수 있었는데 이를 크게 7가지 형태로 구별하였다(그림 1). Type 1 변이체의 경우 정상 식물체의 잎 표면은 매끄럽고 잎 주변부가 정상적인 대칭이면서 둥근형태를 띠는 반면 변이체의 경우 잎 표면이 거칠고 잎 주변부가 거칠고 거치를 나타내었으며 엽육 또한 현저히 두꺼워졌다. Type 2의 경우 정상식물체와 비교하여 잎 형태가 비대칭의 비정상적인 잎형태를 나타내었으며 잎 표면이 불규칙하고 엽색이 진하게 나타났다. Type 3의 경우 정상식물체 잎은 매끄러운 반면 잎 표면이 울퉁불퉁한 굴곡을 나타내었으며 잎모양 또한 비대칭 형태를 나타내었다. Type 4의 경우 잎이 급격하게 왜소해지면서 단축된 마디간격이 넓어졌으며 뿌리가 정상에 비해 현저히 비대해지는 형태를 확인할 수 있었다. Type 5의 경우는 Type 4의 변이체와 비슷하게 잎이 현저히 축소되었지만 마디간격은 정상이었으며 뿌리두께 또한 정상이었다. Type 6의 경우 ype 4의 경우와 비슷하게 잎이 급격하게 왜소해지면서 잎 형태는 정상식물체는 타원형인 반면 변이체의 경우 원형이었으며 엽색이 매우 정상식물체에 비해 매우 연한 녹색이었다. Type 7의 경우 정상 잎에 비해 심하게 뒤틀린 형태를 나타내었다. 변이체 형태 7가지 중 가장 많이 발생하는 변이형태는 Type 1이었으며 다음으로 Type 4의 형태를 나타내었다.





그림 1. 팔레놉시스 KSLG 기내배양묘의 다양한 변이체 유형

(3) 조직배양묘의 변이발생의 유전적 검정

- 팔레놉시스 KSLG 기내배양시 MS기본배지(MS +코코넛액 50mL/L+sucrose 20g/L)에 BA를 5mg/L의 농도로 계대배양을 5회 실시했을 때 발생하는 다양한 형태의 변이체를 육안으로

확인할 수 있었는데 이를 형태별로 크게 7가지로 구별하였으며 이를 유전학적인 검정을 위해 변이체를 구별하는데 8종의 ISSR 분자마커를 이용하여 (표 3) PCR을 실시하였다.

표 3. 변이체의 유전적 분석을 위해 사용된 ISSR 분자마커 primer sequence(Samarford S et al. , 2013).

Primer	Sequence (5'-3')	Tm(°C)
T06	AGAGAGAGAGAGAGAGT	56.9
T05	CGTTGTGTGTGTGTGTGT	60.2
UBC842	GAGAGAGAGAGAGAGAC	60.2
I2	ACACACACACACACACAT	54.8
UBC812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	54.8
I65	AGAGAGAGAGAGAGAGCC	61.8
UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAGCT	59.1
I74	ACTGACTGACTGACTG	54.2

- 팔레놉시스 KSLG의 정상식물체와 기내 변이체를 대상으로 ISSR 분자마커 기술을 이용한 유전분석한 결과(표 4, 그림 2, 3), 정상 식물체에서는 총 55개의 밴드를 구별할 수 있었으며 밴드 수는 4개에서 9개까지 다양하였으며 평균 6.9개를 나타내었다. 한편 팔레놉시스 KSLG의 기내배양시 발생하는 변이체 7종(Type 1~7)을 대상으로 ISSR 분자마커를 이용한 유전분석을 결과 총 405개의 band를 확인할 수 있었으며 평균 7.2개를 나타내었다. 이중 polymorphic band를 나타낸 것은 17개였으며 범위는 0~6개까지 다양하였다.

표 4. ISSR 분자마커를 이용한 팔레놉시스 KSLG 기내 변이체의 유전분석

Primer	Size scope (bp)	No. of bands in normal plant	No. of band in 7 mutation species	Polymorphic band
T06	400-1171	6	47	0
T05	228-1537	9	67	4
UBC842	935-3355	8	59	3
I2	382-1851	8	58	2
UBC812	384-2329	4	28	0
I65	484-3074	9	63	0
UBC834	420-2655	5	35	2
I74	297-2028	6	48	6
Total		55(6.9)	405(7.2)	17

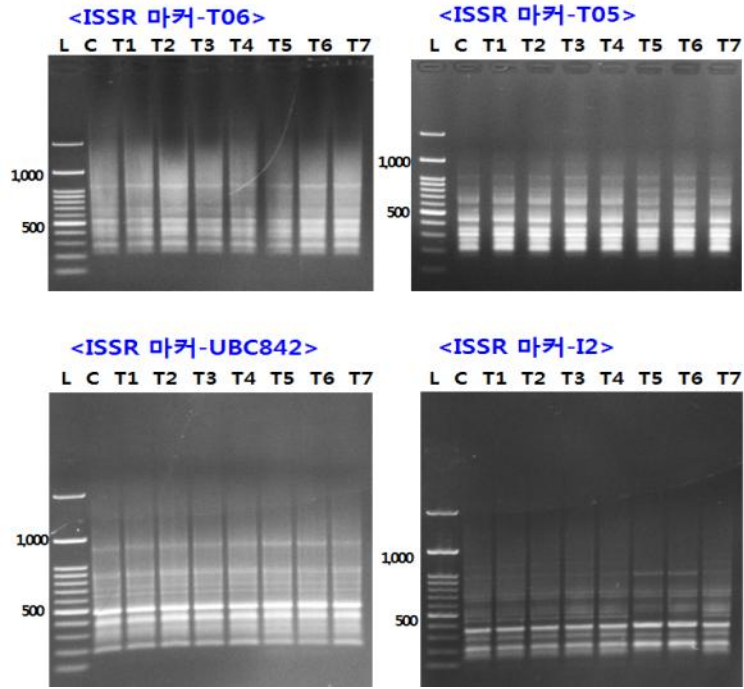


그림 2. ISSR 분자마커(T06, T05, UBC842, I2) 를 이용한 팔레놉시스 KSLG 기내 변이체의 유전분석 (T1- type1; T2- type2; T3- type3; T4- type4; T5- type5; T6- type6; T7- type7)

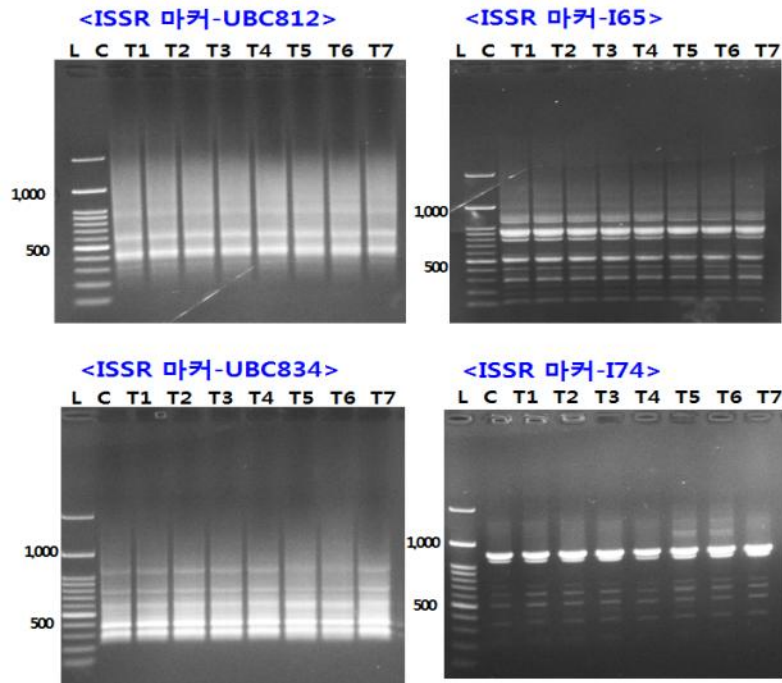


그림 3. ISSR 분자마커(UBC812, I65, UBC834, I74) 를 이용한 팔레놉시스 KSLG 기내 변이체의 유전분석 (T1- type1; T2- type2; T3- type3; T4- type4; T5- type5; T6- type6; T7- type7)

(4) 조직배양묘의 변이발생의 최소화 방법

- 지금까지 실험을 통해 팔레놀시스 KSLG 기내배양시 발생하는 다양한 형태의 변이체를 확인할 수 있었는데 이러한 연구내용을 바탕으로 팔레놀시스 KSLG의 액아배양 후 다아체의 대량증식 시 변이체의 발생을 최소화 할 수 있는 방안은 다음과 같다.

- ① 계대배양회수 증가 시 변이체 발생증가 → 계대배양 횟수를 5회 이하로 한다.
- ② 배지내의 호르몬 농도(BA) 가 증가하면 변이체 발생 증가 → 증식율을 일정 유지하면서 배지내의 호르몬 농도(BA)를 최대한 낮춘다.
- ③ 계대배양 시 식물체의 스트레스를 최소화 시킨다.
 - 최대한 빠른 시간에 작업 후 배지에 치상한다.
 - 계대배양 과정에서 배양재료가 건조하지 않도록 한다.
 - 작업과정에서 핀셋이나 메스에 의한 상처를 최소화한다.
 - 배지에 치상할 때 식물체간 적당한 간격(밀도)을 유지한다(250mL 배양병당 7-8개체 치상)

라. 조직배양기술 프로그램 설계 및 실용화 교육

- 최적 조직배양 기술 워크숍 및 교육 : 조직배양에 관한 기본개념 및 원리를 이해하고 다양한 분야에서 식물 조직배양이 이용에 대해 소개한 후 식물조직배양실의 설계 및 실제 운영에 필요한 다양한 기술을 중심으로 실용화 교육을 실시하였다.
- 팔레놀시스를 포함한 다양한 난과 식물의 조직배양 방법(종자과종, 성장점 배양, 액아배양, 대량증식)을 실제 현장에 적용할 수 있는 기술 등을 중심으로 실습을 통해 실용화 교육을 실시하였으며, 구체적인 결과는 다음과 같다.

- 일 시 : 2017년 3월 13일(월) 14:00~21:0
- 장 소 : 경북대학교 농생대1호관 교수세미나실
- 주 최 : 농림수산식품기술기획평가원, 농림축산식품부, 경북대학교
- 참석인원 (22명) : 경북대 교수 및 대학원생 19명, 삼육대 대학원생 1명, 경산시농업기술센터 2명
- 주요교육내용

Time	Major content
14:00 ~ 15:00 (강의)	* 식물조직배양의 기초 * 난과식물의 조직배양
15:00 ~ 16:00 (강의 및 실습)	* 조직배양용 배지만들기 (MS배지, 하이포넥스배지) * 성장조절제 조제 및 이용 실제
16:00 ~ 18:00 (강의 및 실습)	* 난과식물 초대배양 및 증식 - 심비디움 성장점 배양 및 PLB 증식 - 자란 종자 무균 파종 - 팔레놀시스 액아 배양 및 신초 계대배양 - 기타 원예작물(초본류, 목본류) 증식
18:00 ~ 21:00 (질문 및 토의)	- 호접란 조직배양기술 관련 회의 및 간담회 (석식)

<실용과 교육 과정 >



<실용화 교육자료>



식물조직배양(plant tissue culture)

- 세포가 가지고 있는 전염성능(전염성능 totipotency)
 - 이용하여 기내(in vitro)의 인공배지에서 무균적으로 세포, 조직, 기관 등을 배양하여 이로부터 완전한 개체를 재분식시키는 것

재분화
(re-differentiation)

<간접배양>
Callus

<직접배양>

체세포배양성
Somatic embryogenesis

기관배양성
Organogenesis

발표 순서

- 01 조직배양의 뜻 & 이용
- 02 난과식물의 특징 & 번식
- 03 난과식물 종자의 기내무균파종
- 04 심비디움 성장점 배양
- 05 팔레놀시스 액아배양 및 대량증식
- 06 석곡 기내 대량증식

식물조직배양의 목적어람

- 생장점 배양을 통한 무병묘의 대량 생산
 - 가장 어린 접목기 바로 밑에 있는 줄기의 끝부분의 분화되지 않는 정단분화조직(생장점)은 분열속도가 높고 세포분열속도가 빠르므로 이 속속보다 빠르게 생장점 조직배양시 무병묘 생산이 가능
 - 생장점 배양 → 하이브리드 접합 → 대량증식
- 2차태사 산물의 기내 대량 생산
 - 합산화, 합합물질, 합성약물 등의 유익한 생리활성 기능을 가진 고차 대사산물의 대량생산(피라클, 알코, 색소, 천연염료 등) → 생물반응기(Bio reactor)

조직배양의 뜻 & 이용

인공종자 생산 & 유전자원 기내 보존

체세포 배(경아, 경정, PLB) 등 인공태유와 씨껍질 기능을 가진 핵술(말린산 알술)에 넣어 인공종자 생산, cryopreservation

배배양 & 약배양신공육 육생

배배양 (embryo rescue): 미숙알배를 적절하여 인공배지에서 배양 발육시켜 완전한 식물을 획득(배우배양, 자갈배양)이종육안교양, 난과식물 종자배양

약배양 (anther culture): 어린 꽃삭을 기내에서 배양하여 스포자 또는 어린 꽃가루로부터 단수체를 얻는 것 (단수체 염색체 재조합 통한 육종친한 단수)



6분자 이후부터 정량가능한 육종식물도 분얼하기 전의 14일당 단계

조직배양에 이용되는 식물생장 조절제

생장조절제 종류	용매	용액농도
NAA	1N NaOH	황기(정량용)
IAA	90% EtOH	황기(정량용)
GA	1N NaOH	황기(정량용)
2,4-D	90% EtOH	황기
picloram	1N NaOH	황기(정량용)
dicamba	1N NaOH	정량용
CRA	에탄올	황기(정량용)
GAP	1N NaOH	황기(정량용)
Kinath	1N NaOH	황기(정량용)
2iath	1N NaOH	정량용
zeatin/iboxide	H ₂ O	정량용
TDZ	DMSO	정량용
SP	1N NaOH	황기(정량용)
GA ₃ , GA ₄ , GA ₇	에탄올	정량용

숙신 : 부종균(rod) 배양, 단세포식물의 결이소 배양, 재배양, 스포자배양, 결이소 부종균 배양, 단세포식물의 결이소 배양, 부종아(shoot) 배양, Multishoot 배양

시표배양



<여과액>

세포유한인명질체 육안, protoplast

나술 침질체도 혼합하여 세포조 감정을 하기 위해 기술 (중합방법-PEG법, 전기자극법, 칼슘조(레이저)법 등) 중합방법: 대칭중합, 비대칭중합, 세포질중합



식물생장 조절제 Stock 만들기

저장액 농도 : 100-1,000PPm 으로 만들어 냉동보관(냉장보관)
(사용시 완전 녹여서 사용)

저장액 만들기 실제 :
Kinetin 1,000ppm 만들기

1ppm=1mg/L
1,000ppm= 1,000mg/L (= 1mg/1mL) (= 50mg/50mL)

- Kinetin 50mg 측정(미탈저울)
- 말론류로(50mL)에 넣기
- 1 1N NaOH을 1mL 정도 넣어 녹이기(물백스이름)
- 증류수로 50mL 채우기
- 1.5mL tube에 1m씩 분주하여 냉동보관

TOX실업


조직배양용 배지

식물조직이나 기관을 기내하는 육종배양장점에서 생장하모르 스프로 알분을 만드는 능력이 약하므로(중수배양액), 배지를 통해 생장에 필요한 영양물질을 공급하여야 함

예) MS배지(1962년), white배지, 85배지, 3배배지, 하이포메스배지

배지의 구성물질

- 16가지 무기염소 : 대량염소(9), 미량염소(7)
- 성장조절제 : 배류 성분
- 비타민 : B1, B2, B6, B12, 나이아신(PP), 피리독신(PP), 티오미노시톨
- 아미노산 : 글리신, 글루탐산, 아르기닌 등
- 천연산물 : 아지론(CW), 알자, 바나나, 사과
- 활성탄 : 배지의 불기성 향상, 독성물질 흡수
- 지지체 : 아가(Agar), 겔라틴, phytagel



배지만들기 과정



재료 및 도구준비 → 증류수 교환 → 시약첨입 후 증류수에 녹이기

노출 → pH 조절(2N HCl, NaOH) → 환원시키기

1. 포기나누기(분주)

2. 종자번식

(드문년 포기나누기 이외, 번영해상시 크로이굴함/서민년 고도에 따른년 대만함 크로)

- 공생발아
- 비공생발아(무균파종)

3. 조직배양(생장점배양, 화경배양, 마디배양--)

■ 난과식물의 종류별 배발생 소요일수

종명	비명	개화시 배우상 일	수부 포일수		
			신구형상일수	수장	비명상일수
사우한	Celasthe discolor	일기	31	40	90
금사우한	Celasthe zaidolii	일기	45	50	100
어름사우한	Celasthe reflex	일기	20	30	60
지한	Eleclis atrata	일기	31	40	100
인삼요강물	Cyrtopodium japonicum	일기	45	50	90
외경난초	Spiranthes zhenzai	일년	0	4	14
나비난초	Orchids graminifolia	일과외	9	13	40
비오르난초	Habenaria falcata	일과외	4	8	30
향난	Neofinetia falcata	일기	25	30	80
조난	Cymbidium goeringii	일기	45	50	100
만난	Cymbidium koreanum	일과외	131	140	230
카틀리아	Cattleya	일기	110	130	230
반다	Vanda	일과외	180	200	250

인공수분 오
방기 성숙한 오
씨포두리 수확

수분 오 씨포두리 비대

1. 포기나누기(분주)

- 자생지에서 모주로 부터 역아가 발생하므로 이를 포기나누기(분주)함
- 대량종식이 어려움
- 육중에 이용하기가 부적합함

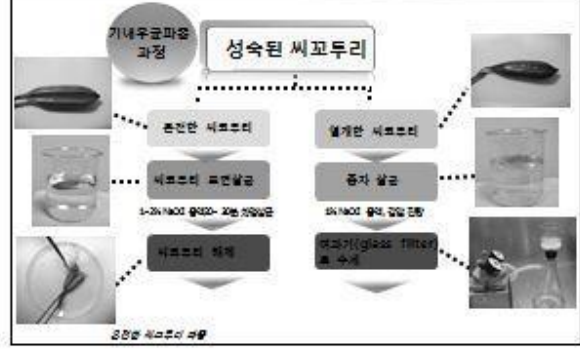
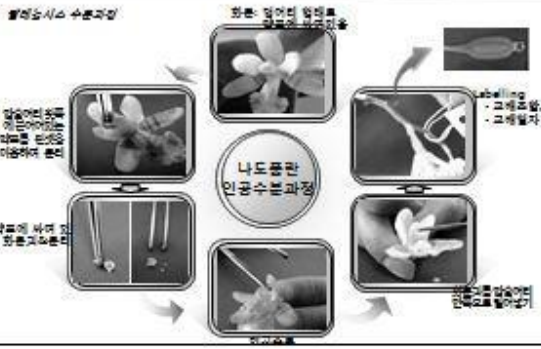


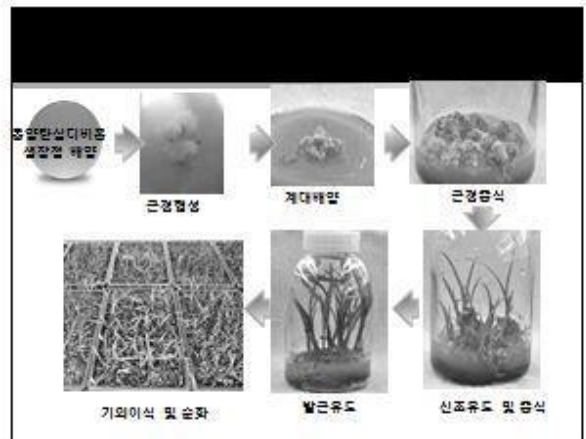
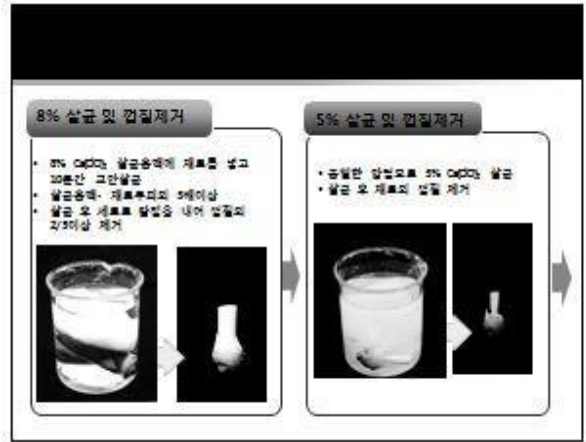
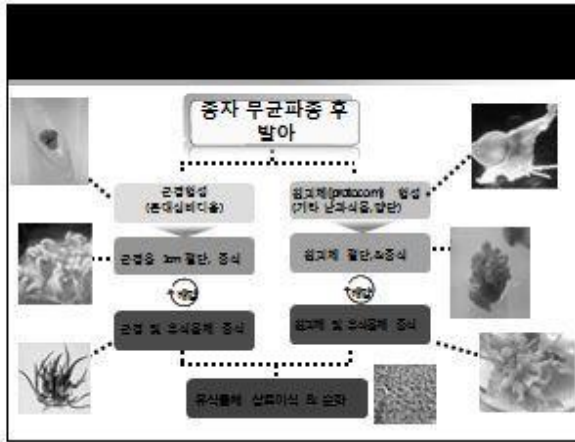
2. 종자번식- 난과식물 종자의 특징

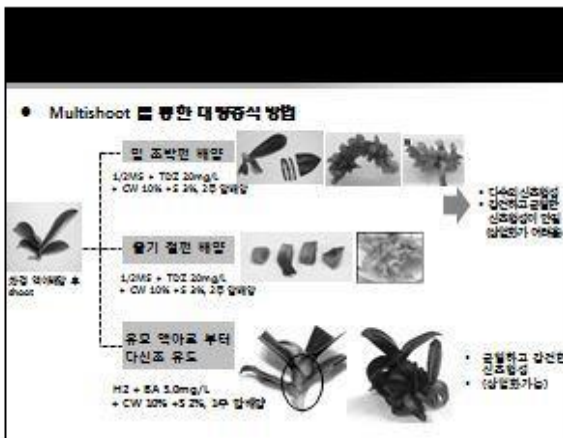
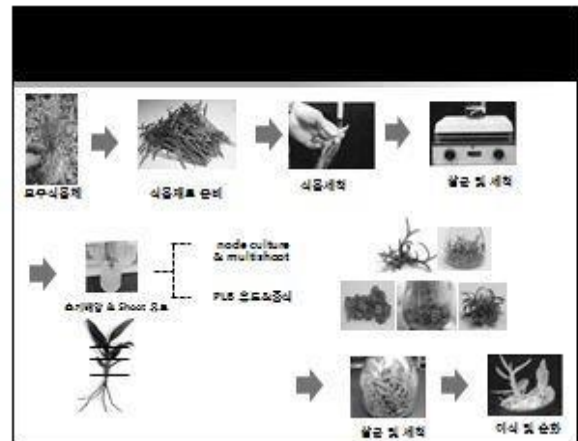
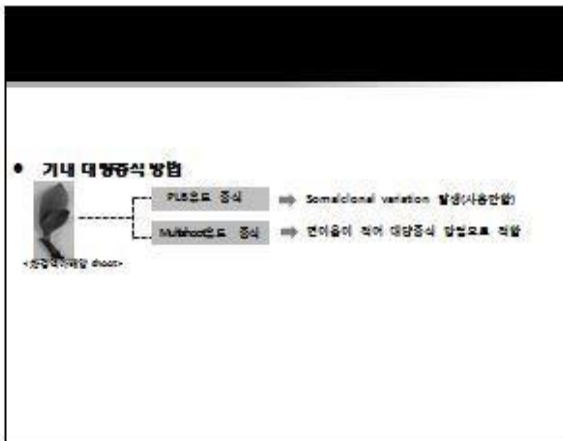
- 미세종자(씨포두리당 1,300개-100만개의 종자)
- 200-300개의 세포로 이루어진 미수백, 백유가 없거나 미발달됨
- 종자발아에 필요한 전분을 분해해서 당화할 수 없음
- 자연발아 시 공생균에 감염되어 영양분을 공급받을때 발아 가능



- 조직배양을 이용한 인공 기내파종
- 1922년 누드슨(Knudsen)에 의해 최초로 시도됨
- 종자유실이 적음
- 발아율이 높음
- 비공생 발아가 가능
- 난과식물의 육종 및 선발과정에 매우 유용하게 이용됨
- 기내발아의 성공: 종자의 중실도와 해지의 조성이 중요







3-5 개화수명이 긴 호접란 신품종 육성

가. 수집된 호접란 유전자원으로부터 개화기간이 긴 유전자원 탐색

(1) 우량품종 선발을 위한 교배집단의 특성조사와 DB화

(가) 교배집단의 특성조사

- 생육 및 개화특성이 우수하여 선발된 570개체에 대해서 다음과 같이 UPOV 특성조사 기준에 따라 생육특성을 조사하였으며 그 외 개화일과 폐화일 그리고 개화수명에 대해서 조사하였다.
- 식물체 : 크기, 꽃대의 수
- 잎 : 잎 길이, 너비, 모양, 가장 넓은 부분의 위치, 끝부분의 모양, 끝부분의 대칭, 자세, 무늬, 뒷면의 반점, 뒷면의 주요색, 뒷면의 안토시아닌 색.
- 꽃차례: 꽃차례 형태, 꽃차례의 길이, 꽃수, 화경 길이, 화경 굵기, 안토시아닌 색.
- 꽃: 측면의 모양, 정면에서의 길이, 정면에서의 너비, 꽃잎의 배열, 향기, 윗꽃받침, 측면 꽃받침과 꽃잎, 끝열편 (너비, 길이, 모양, 세로축의 휘어짐, 가장 넓은 부분의 위치, 뒤틀림, 가장자리 물결정도, 뒷면의 바탕색, 2차색, 반점의 수, 반점의 크기, 반점의 색, 줄무늬의 수, 줄무늬의 색, 물모양의 밀도, 그물모양의 색), 순판 (끝열편의 길, 너비, 모양, 수염, 수염 길이, 끝열편의 돌기 및 움기, 측열편의 모양, 측열편의 휘어짐) 특징 총 97항목이 있다.
- 생태적 특징 : 개화기간, 소화수명, 개화기 등

표 1. 조사표사례 (103-V-9개체)

번호	특성	표현형태	계급	표준종	조사시기 및 방법
1 (?) (+) QN	식물체(plant) : 길이	65	7	(a) VG/MS	지세부에서 꽃차례를 포함한 식물체 끝부분까지의 길이
2 (?) QN	식물체 : 꽃대의 수	1대 1-2대 2대 2-3대 3대 3대 이상	1 2 3 4 5 6	(a) VG/MS	
3 QN	잎(leaf) : 길이	34.5	3 5 7	(a) (b) VG/MS	
4 QN	잎 : 너비	7.2	3 5 7	(a) (b) VG/MS	
5 (+) QN	잎 : 모양	좁고 가늘고 길다 중간 가늘고 길다 매우 가늘고 길다	3 5 7	(a) (b) VG	
6 (+) QN	잎 : 가장 넓은 부분의 위치	기부 쪽 중앙 정부 쪽	1 2 3	(a) (b) VG/MS	
7 (+) PQ	잎 : 끝부분의 모양	평활한(lacinate) 동축한(subtuse) 충축한(emarginate)	1 2 3	(a) (b) VG	
8 QN	잎 : 끝부분의 대칭	대칭 또는 조금 비대칭 중간 정도 비대칭 양한 비대칭	1 2 3	(a) (b) VG/MS	
9 QN	잎 : 자세(attitude)	완전립 수명 반달여름(semi-drooping)	3 5 7	(a) (b) VG/MS	
10 (?) OL	잎 : 무늬	없다 있다	1 9	(a) (b) VG	
11 (?) OL	잎 : 뒷면의 반점	없다 있다	1 9	(a) (b) VG	
12 (+) PQ	잎 : 뒷면의 주요색(main color)	도란의 녹색(sulfurous green) 연한 녹색 녹색 선한 녹색	1 2 3 4	(a) (b) VG	

번호	특성	표현형태	계급	표준종	조사시기 및 방법
13 QN	잎 : 뒷면의 안토시아닌 색	없거나 매우 약하다 약하다 중간 강하다	1 3 5 7	(a) (b) VG/MS	
14 (?) (+) OL	꽃차례(inflorescence) : 형태	매우 약하다 단립꽃차례 중상꽃차례 복중상꽃차례	1 2 3	(a) VG	
15 QN	꽃차례 : 꽃차례의 길이	28	3 5 7	(b) VG/MS	
16 QN	꽃차례 : 꽃수 (꽃차례, 형태, 단립꽃차례, 완공 제외)	26	5 7	(a) VG/MS	
17 QN	화경(peduncle) : 길이	짧다 중간 길다	3 5 7	(a) VG/MS	
18 (+) QN	화경 : 굵기	30.5	2 3	(a) VG/MS	
19 QN	화경 : 안토시아닌 색	없거나 약하다 중간 강하다	1 3 5	(a) VG	
20 (+) PQ	꽃 : 측면의 모양	오목(concave) 평평(lat) 볼록(convex)	1 2 3	(b) VG	
21 (?) (+) QN	꽃 : 정면에서의 길이	49.5	3 5 7 9	(c) VG/MS	
22 (?) (+) QN	꽃 : 정면에서의 너비	57.2	1 3 5 7 9	(b) VG/MS	
23 (+) QN	꽃 : 꽃잎의 배열	떨어짐(free) 접촉(touching) 겹침(overlapping)	1 2 3	(c) VG/MS	
24 QN	꽃 : 향기	없거나 약하다 중간 강하다	1 2 3	(b) VG/MS	

번호	특 성	표현형태	계급	표준품종	조사시기 및 방법
25 QN	빛깔반질 : 길이	29.3	3 5 7	(c) VG/MS	
26 QN	빛깔반질 : 너비	21	3 5 7	(c) VG/MS	
27 QN	빛깔반질 : 모양	가로로 길다 중간 세로로 길다	3 5 7	(c) VG	
28 QN	빛깔반질 : 가장 넓은 부분의 위치	가무 쪽 중앙 정무 쪽	1 2 3	(c) VG/MS	
29 (+) QN	빛깔반질 : 세로축의 회어짐	안으로 굽은(incurving) 평행한(straight) 뒤로 굽은(recuring)	1 2 3	(c) VG/MS	
30 (+) QN	빛깔반질 : 가로 자른 면의 모양	오목(concave) 평행(straight) 볼록(convex)	1 2 3	(c) VG/MS	
31 QL	빛깔반질 : 회틀림(twisting)	없다 있다	1 9	(c) VG	
32 QN	빛깔반질 : 가장자리 융결정도	없거나 약하다 중간 강하다	1 2 3	(c) VG/MS	
33 (-) (+) PQ	빛깔반질 : 뒷면의 배당색(ground color)	N78-B		(c) 라트 칼라이트 번호 기재 VG	
34 (-) (+) PQ	빛깔반질 : 2차색(over color, 있음 경우)	I55-D		(c) 라트 칼라이트 번호 기재 VG	
35 (-) QN	빛깔반질 : 변질의 수	없다 적다 중간 많다	1 3 5 7	(c) VG/MS	
36 QN	빛깔반질 : 변질의 크기	없다		(c) VG/MS	
37 PQ	빛깔반질 : 변질의 색	없다		(c) 라트 칼라이트 번호 기재 VG	

번호	특 성	표현형태	계급	표준품종	조사시기 및 방법
52 QN	꽃잎 : 모양	가로로 길다 중간 세로로 길다	3 5 7	(c) VG	
53 (-) QN	꽃잎 : 가장 넓은 부분 의 위치	가무 쪽 중앙 정무 쪽	1 2 3	(c) VG/MS	
54 (+) QN	꽃잎 : 세로축의 회어짐	안으로 굽은 평행한 뒤로 굽은	1 2 3	(c) VG/MS	
55 (+) QN	꽃잎 : 가로 자른 면의 모양	오목 평행 볼록	1 2 3	(c) VG/MS	
56 QL	꽃잎 : 회틀림	없다 있다	1 9	(c) VG	
57 QN	꽃잎 : 가장자리 융결 정도	없거나 약하다 중간 강하다	1 2 3	(c) VG/MS	
58 (-) (+) PQ	꽃잎 : 뒷면의 배당색	N78-B		(c) 라트 칼라이트 번호 기재 VG	
59 (-) (+) PQ	꽃잎 : 2차색(있을 경 우)	N/A		(c) 라트 칼라이트 번호 기재 VG	
60 (+) QN	꽃잎 : 2차색의 범위	N/A	3 5 7	(c) VG/MS	
61 (-) QN	꽃잎 : 변질의 수	없다 적다 중간 많다	1 3 5 7	(c) VG/MS	
62 QN	꽃잎 : 변질의 크기	N/A	3 5 7	(c) VG/MS	
63 PQ	꽃잎 : 변질의 색	N/A		(c) 라트 칼라이트 번호 기재 VG	
64 (-) QN	꽃잎 : 줄무더기의 수	없다 적다 중간 많다	1 3 5 7	(c) VG/MS	

번호	특 성	표현형태	계급	표준품종	조사시기 및 방법
38 (-) QN	꽃잎반질 : 줄무더기의 수	없다 적다 중간 많다	1 3 5 7	(c) VG/MS	
39 PQ	꽃잎반질 : 줄무더기의 색	없다		(c) 라트 칼라이트 번호 기재 VG	
40 (-) QN	꽃잎반질 : 그물모양의 정도	없다 낮다 중간 높다	1 3 5 7	(c) VG/MS	
41 PQ	꽃잎반질 : 그물모양의 색	없다		(c) 라트 칼라이트 번호 기재 VG	
42 (+) PQ	측면 꽃반질 : 뒷면의 배당색	N78-B		(c) 라트 칼라이트 번호 기재 VG	
43 PQ	측면 꽃반질 : (+) 2차색(있을 경우)	없다		(c) 라트 칼라이트 번호 기재 VG	
44 QN	측면 꽃반질 : 변질의 수	없다 적다 중간 많다	1 3 5 7	(c) VG/MS	
45 PQ	측면 꽃반질 : 변질의 색	N78-B		(c) 라트 칼라이트 번호 기재 VG	
46 QN	측면 꽃반질 : 줄무더기의 수	없다 적다 중간 많다	1 3 5 7	(c) VG/MS	
47 PQ	측면 꽃반질 : 줄무더기의 색	N78-B		(c) 라트 칼라이트 번호 기재 VG	
48 QN	측면 꽃반질 : 그물모양 의 정도	없다 낮다 중간 높다	1 3 5 7	(c) VG/MS	
49 PQ	측면 꽃반질 : 그물모양 의 색	N/A		(c) 라트 칼라이트 번호 기재 VG	
50 (-) QN	꽃잎(Petal) : 길이	26.6	3 5 7	(c) VG/MS	
51 (-) QN	꽃잎 : 너비	30.6	3 5 7	(c) VG/MS	

번호	특 성	표현형태	계급	표준품종	조사시기 및 방법
77 (-) (+) PQ	꽃잎연 : 배당색	71-A		(c) 라트 칼라이트 번호 기재 VG	
78 (+) PQ	꽃잎연 : 2차색(있을 경 우)	N/A		(c) 라트 칼라이트 번호 기재 VG	
79 (-) QN	꽃잎연 : 변질의 수	없다 적다 중간 많다	1 2 3 4	(c) VG/MS	
80 QN	꽃잎연 : 변질의 크기	N/A		(c) VG/MS	
81 PQ	꽃잎연 : 변질의 색	N/A		(c) 라트 칼라이트 번호 기재 VG	
82 (-) QN	꽃잎연 : 줄무더기의 수	없다 적다 중간 많다	1 2 3 4	(c) VG/MS	
83 PQ	꽃잎연 : 줄무더기의 색	N/A		(c) 라트 칼라이트 번호 기재 VG	
84 (-) QN	꽃잎연 : 그물모양의 정도	없다 낮다 중간 높다	1 2 3 4	(c) VG/MS	
85 PQ	꽃잎연 : 그물모양 의 색	N/A		(c) 라트 칼라이트 번호 기재 VG	
86 (-) (+) PQ	측면연 : 배당색	71-A		(c) 라트 칼라이트 번호 기재 VG	
87 (+) PQ	측면연 : 2차색(있을 경 우)	N/A		(c) 라트 칼라이트 번호 기재 VG	
88 (-) QN	측면연 : 변질의 수	없다 적다 중간 많다	1 2 3 4	(c) VG/MS	
89 PQ	측면연 : 변질의 색	N/A		(c) 라트 칼라이트 번호 기재 VG	
90 (-) QN	측면연 : 줄무더기의 수	없다 적다 중간 많다	1 2 3 4	(c) VG/MS	

번호	특 성	표현형태	계급	표준품종	조사시기 및 방법
91	축열면 : 줄부대의 색 PQ	N/A			(c) RFS 칼라코드 번호 기재 VG
92	축열면 : 그물모양의 (*) 정도 QN	없다 낮다 중간 높다	1 2 3 4		(c) VG/MS
93	축열면 : 그물모양의 PQ 색	N/A			(c) RFS 칼라코드 번호 기재 VG
94	순관 : 캘러스(callus) (+) 정도 QN	평평 또는 조금 올라옴 중간 올라옴 강하게 올라옴	1 2 3		(c) VG/MS
95	순관 : 캘러스의 색 PQ	L3A			(c) RFS 칼라코드 번호 기재 VG/MS
96	순관 : 솜털(pubescence) QL	없다 있다	1 9		(c) VG
97	꽃술대(Column) : 색 PQ	155-D			(c) RFS 칼라코드 번호 기재 VG

○ 570개체에 대해서 UPOV 특성조사 기준에 따라 생육특성을 조사한 결과는 아래와 같다. 여기서는 대표적인 26개체에 대해서 나타내었으며 570개체의 모든 조사결과는 DB화 하였다.

표 2. 생육 및 개화특성이 우수한 호접란 잎의 특성.

개체명	식물 체 길이	꽃대 의 수	잎 길 이	잎 너 비	잎 모 양	잎가장 넓은 부분의 위치	잎끝부 분의 모양	잎끝 부분 의 대칭	잎자세	잎무 늬	잎윗 면의 반점	잎윗면 의 주요색	잎윗면 의 안토시아닌
664-7	55	1	20.5	8.1	5번	정부쪽	뭉툭한	3번	수평	없음	없음	3번	2번
103-V-9	65	1	14.5	7.2	5번	중양	뭉툭한	3번	반직립	없음	없음	3번	1번
1170-1	75	1	24.5	8.7	5번	중양	뾰족한	3번	반직립	있음	없음	3번	2번
1031-8	47	1	14.5	7.5	5번	중양	뭉툭한	3번	반직립	없음	없음	2번	1번
1161-22	70	1	21	8	5번	중양	오목한	3번	반직립	없음	없음	3번	1번
1159-9	67	1	69.5	8.5	5번	중양	오목한	1번	반직립	없음	없음	4번	1번
1160-5	68.5	1	24	7.7	5번	중양	뾰족한	2번	반직립	있다	없다	4번	9번
1146-11	63	1	20	8.6	5번	정부쪽	뭉툭한	1번	반직립	없다	없다	3번	1번
1141-20	69	1	21	9	5번	중양	뾰족한	2번	반직립	없다	없다	3번	1번
1136-18	60	2	19	7.5	5번	중양	뭉툭한	1번	반직립	없다	없다	3번	1번
1140-2	65	1	16	8.7	5번	중양	뭉툭한	2번	반직립	없다	없다	3번	1번
1147-3	51	1	22	8.5	5번	중양	뾰족한	1번	반직립	없음	없음	3번	1번

1136-17	66	1	19.5	8.5	5번	중양	뽕족한	1번	반직립	없음	없음	3번	1번
1146-12	59	1	20.5	9	5번	중양	뽕족한	1번	수평	없음	없음	3번	1번
1125-3	57	1	15	7.5	5번	중양	뽕족한	1번	반직립	없다	없다	3번	1번
1159-9	65	1	19.5	8.5	5번	중양	뽕족한	1번	수평	있다	없다	4번	1번
1138-8	67	1	19	6.5	5번	중양	뽕족한	1번	수평	있다	없다	4번	1번
1165-1	96	1	18	9	5번	중양	뽕족한	2번	반직립	없다	없다	4번	1번
1125-18	69	1	21	8.5	5번	중양	뽕족한	1번	반직립	없다	없다	3번	1번
1126-17	60	1	22.5	9.5	5번	중양	뽕족한	1번	반직립	있다	없다	3번	1번
1126-8	91	1	28	9	5번	중양	뽕족한	1번	반직립	있다	없다	3번	1번
1136-12	82	1	15	7.5	5번	중양	뽕족한	1번	반직립	없다	없다	3번	1번
1144-5	62	1	26.5	9.5	5번	중양	뽕족한	1번	반직립	있다	없다	3번	1번
KS103-6	75	1	14	6	5번	중양	뽕족한	1번	반직립	없다	없다	4번	1번
601	67	1	21	8.5	5번	중양	뽕족한	1번	반직립	있다	없다	2번	1번
Lay	54	1	18	6	5번	중양	뽕족한	1번	반직립	없다	없다	3번	1번

표 2. 계속(화서의 특성).

개체명	꽃차례형태	꽃차례길이	꽃차례꽃수	화경길이	화경굵기	화경안토시아닌
664-7	복총상화서	18	16	34	5.4	있음
103-V-9	복총상화서	28	26	30.5	4.9	있음
1170-1	복총상화서	25	18	45.5	6.1	있음
KS-1031-8	총상화서	20	10	31	5	있음
1161-22	총상화서	29	13	39	4.7	있음
1159-9	총상화서	29	11	40	5.2	있음
1160-5	복총상화서	31	13	39	5.5	있음
1146-11	복총상화서	29	19	34	5.58	있음
1141-20	복총상화서	28	30	38	5.6	있음
1136-18	복총상화서	25	25	34	5.3	있음
1140-2	총상화서	30	14	34	5.62	있음
1147-3	총상화서	21	11	29	5.3	있음
1136-17	복총상화서	28	33	37	5.3	있음
1146-12	복총상화서	18	23	30	6.3	있음
1125-3	복총상화서	25	26	28	6.9	있다

1159-9	총상화서	33	12	39	5.3	있다
1138-8	총상화서	25	9	43	5.5	있다
1165-1	총상화서	44	16	51	5.7	있다
1125-18	복총상화서	25	30	44	5.5	강하다
1126-17	복총상화서	23	15	37	5.7	강하다
1126-8	복총상화서	41	29	50	6	강하다
1136-12	복총상화서	32	22	60	6	강하다
1144-5	총상화서	30	15	30	4.8	중간
KS103-6	총상화서	42	21	35	4	중간
601	복총상화서	23	17	43	6	강하다
Lay	총상화서	23	13	30	4.1	없다

표 2. 계속 (꽃의 특성)

개체명	윗꽃받침 가장 넓은부분	윗꽃받침 세로축의 휘어짐	윗꽃받침 가로자른 면모양	윗꽃받침 뒤틀림	윗꽃받침 가장자리 물결정도	윗꽃받침 바탕색	윗꽃받침 2차색	윗꽃받침 반점의 수
664-7	중앙	안으로굽은	오목	없음	없음	155-D	72-C	없다
103-V-9	중앙	평평	평평	없음	없거나약함	N78-B	155-D	없다
1170-1	중앙	뒤로굽은	오목	없음	없거나약함	75-A	170-D	없다
1031-8	중앙	뒤로굽은	오목	없음	없거나약함	155-D	75-B	없다
1161-22	중앙	안으로굽은	블록	없음	없거나약함	162-C	없음	없다
1159-9	중앙	평평	평평	없음	없거나약함	75-A	없음	없다
1160-5	중앙	평평	평평	없음	없음	12-B	없다	없다
1146-11	중앙	평평	평평	없음	없음	N74A	없다	중간
1141-20	중앙	뒤로굽은	블록	없음	없음	N74A	없다	중간
1136-18	중앙	안으로굽은	오목	없음	없음	75-A	없다	없다
1140-2	중앙	안으로굽은	오목	없음	없음	N78-C	없다	없다
1147-3	중앙	안으로굽은	블록	없음	없거나약함	N78-A	없다	많다
1136-17	중앙	뒤로굽은	오목	없음	없거나약함	N78-B	없다	많다
1146-12	중앙	뒤로굽은	오목	없음	없거나약함	N78-B	없다	많다
1125-3	중앙	안으로굽은	오목	없다	없다	N78-C	없다	적다
1159-9	중앙	뒤로굽은	블록	없다	없다	N78-D	없다	없다
1138-8	중앙	뒤로굽은	오목	없다	약하다	N74-B	없다	많다
1165-1	중앙	평평	평평	없다	없다	N74-D	없다	많다
1125-18	중앙	안으로굽은	오목	없다	없다	N78-A	없다	적다
1126-17	중앙	뒤로굽은	블록	없다	없다	N78-B	없다	중간
1126-8	중앙	뒤로굽은	블록	없다	없다	N78-C	없다	없다
1136-12	중앙	평평한	평평	없다	없다	N78-D	없다	중간
1144-5	중앙	평평한	평평	없다	없다	186-B	없다	많다

KS103-6	중양	평평한	평평	없다	없다	N78-B	없다	적다
601	중양	뒤로굽은	오목	없다	없다	N74-A	없다	많다
Lay	중양	뒤로굽은	오목	없다	없다	155-D	없다	없다

표 2. 계속 (꽃의 특성)

개체명	꽃정면의 모양	꽃정면의 길이	꽃정면의 너비	꽃정면의 배열	꽃향기	윗꽃받침 길이	윗꽃받침 너비	윗꽃받침모양
664-7	오목	59.2	67.6	접촉	없음	35.8	23.7	세로로길다
103-V-9	오목	49.5	57.2	떨어짐	없음	29.3	21	세로로길다
1170-1	볼록	70.9	87.3	떨어짐	없음	40	27.2	세로로길다
1031-8	오목	57.9	61.9	접촉	없음	32.3	22.7	세로로길다
1161-22	볼록	61.3	73	떨어짐	없음	35.6	25	세로로길다
1159-9	평평	65.3	84	떨어짐	없음	41.8	30.6	세로로길다
1160-5	평평	69.83	78.47	떨어짐	없음	38.77	29.33	세로로길다
1146-11	평평	70.2	85.24	떨어짐	없음	41	28.01	세로로길다
1141-20	볼록	60.39	64.87	떨어짐	없음	33.05	24.05	세로로길다
1136-18	오목	52.33	60.8	떨어짐	없음	29.24	19.13	세로로길다
1140-2	볼록	63.99	73.85	떨어짐	없음	36.07	26.49	세로로길다
1147-3	볼록	68.37	78.4	떨어짐	없음	40.33	23.9	세로로길다
1136-17	오목	54.02	57.04	떨어짐	없음	28.11	18.41	세로로길다
1146-12	오목	64.08	77.66	떨어짐	없음	38.07	28.4	세로로길다
1125-3	오목	60.56	68.17	떨어짐	없음	34.38	21.3	세로로길다
1159-9	볼록	73.82	85.35	떨어짐	없음	44.15	31.61	세로로길다
1138-8	오목	68.57	81.81	떨어짐	없음	39.28	30.49	세로로길다
1165-1	평평	76.51	56.4	떨어짐	없음	45.49	27.77	세로로길다
1125-18	볼록	55.74	60.47	떨어짐	없다	33.26	23.57	가로로길다
1126-17	오목	67.36	80.57	떨어짐	없다	39	31.27	가로로길다
1126-8	오목	71.4	90.11	떨어짐	없다	42.97	30.05	가로로길다
1136-12	평평	66.91	76.24	떨어짐	없다	39.05	28.13	가로로길다
1144-5	평평	65.09	74.24	떨어짐	없다	36.4	22.42	가로로길다
KS103-6	평평	50.49	54.71	떨어짐	없다	28.99	19.87	가로로길다
601	오목	64.49	81.05	떨어짐	없다	38.37	29.470	가로로길다
Lay	오목	46.83	49.98	떨어짐	없다	26.59	17.79	가로로길다

표 2. 계속 (꽃의 특성)

개체명	윗꽃받침 반점의크 기	윗꽃받침 반점의색	윗꽃받 침줄무 늬의수	윗꽃받침 줄무늬의 색	윗꽃받침 그물모양 의밀도	윗꽃받침 그물모양 의색	측면꽃 받침바 탕색	측면꽃 받침2차 색	측면꽃받 침반점의 수
664-7	없다	없다	없다	없다	없다	없다	155-D	72-C	없다
103-V-9	없다	없다	없다	없다	없다	없다	N78-B	없음	중간
1170-1	없다	없다	중간	75-A	없다	없다	75-A	없음	없다
1031-8	없다	없다	중간	75-A	없다	없다	155-D	75-B	많다
1161-22	없다	없다	중간	70-B	없다	49-B	163-C	없음	중간
1159-9	없다	없다	많다	71-C	없다	49-B	75-A	없음	많다
1160-5	없다	없다	중간	186-B	없다	없다	12-B	없음	중간
1146-11	작다	69-A	중간	N78-A	없다	없다	N74-A	N155-D	많다
1141-20	작다	69-A	중간	64-A	없다	없다	N74-A	없음	중간
1136-18	없다	없다	중간	73-A	없다	없다	75-A	없음	많다
1140-2	없다	없다	없다	N74-B	없다	없다	N78-C	없음	많다
1147-3	작다	N155-D	없다	없다	중간	72-A	N78-A	없다	중간
1136-17	작다	N155-D	중간	N78-A	없다	없다	N78-B	없다	많다
1146-12	작다	N155-D	중간	N78-A	없다	없다	N78-B	없다	많다
1125-3	작다	N155-D	중간	N74-B	없다	없다	N74-B	없다	많다
1159-9	없다	없다	중간	N78-C	없다	없다	N78-C	없다	중간
1138-8	작다	N155-D	중간	N74-A	없다	없다	N74-A	없다	많다
1165-1	작다	N155-D	중간	N74-C	없다	없다	N155-D	없다	많다
1125-18	작다	N155-D	많다	71-A	없다	없다	N78-A	없다	많다
1126-17	작다	N156-D	많다	71-A	없다	없다	N78-B	없다	많다
1126-8	없다	없다	많다	N78-B	없다	없다	N78-C	없다	많다
1136-12	작다	N158-D	많다	N78-B	없다	없다	N78-D	없다	적다
1144-5	중간	155-D	없다	없다	중간	71-A	186-B	없다	중간
KS103-6	작다	155-D	없다	없다	중간	N78-A	N78-B	없다	중간
601	크다	N78-A	없다	없다	높다	N74-A	N74-A	없다	많다
Lay	없다	없다	없다	없다	없다	없다	155-D	없다	많다

개체명	측면꽃 반침 점의 색	측면꽃반침 줄무늬의 수	측면 꽃반침줄 무늬의 색	측면꽃반침 그물모양의 밀도	측면 꽃반침그물 모양의 색	꽃잎 길이	꽃잎 너비	꽃잎 모양
664-7	없다	없다	없다	없다	없다	33.28	38.75	가로로길다
103-V-9	N78-B	많다	N78-B	없다	없다	26.6	30.6	가로로길다
1170-1	없다	중간	73-A	없다	없다	39.7	47.6	가로로길다
KS-1031-8	N78-A	없다	없다	없다	없다	29.6	37.5	가로로길다
1161-22	70-B	중간	70-B	없다	없다	33.3	42	가로로길다
1159-9	71-C	많다	71-C	없다	없다	38.5	45.5	가로로길다
1160-5	185-C	없다	없다	없다	없다	37.39	47.6	가로로길다
1146-11	N78-A	중간	N78-A	없다	없다	38.61	47.15	가로로길다
1141-20	69-A	중간	64-A	없다	없다	31.28	37.66	가로로길다
1136-18	N72-B	중간	75-A	없다	없다	28.72	33.15	가로로길다
1140-2	70-B	없다	없다	중간	N74-B	34.61	40.76	가로로길다
1147-3	72-A	없다	없다	중간	72-A	35.04	37.18	가로로길다
1136-17	N155-D	중간	N78-A	없다	없다	28.62	29.86	가로로길다
1146-12	N155-D	중간	없다	없다	없다	37.96	43.41	가로로길다
1125-3	N74-B	중간	N74-B	없다	없다	33.24	37.29	가로로길다
1159-9	N78-C	중간	N78-C	없다	없다	40.85	46.58	가로로길다
1138-8	N74-A	중간	N74-A	없다	없다	37.72	48.55	가로로길다
1165-1	N155-D	중간	N74-C	없다	없다	41.84	46.94	가로로길다
1125-18	71-A	많다	71-A	높다	71-A	30.57	35.59	가로로길다
1126-17	71-A	많다	71-A	높다	71-A	39.45	46.77	가로로길다
1126-8	N78-A	많다	N78-A	높다	N78-A	42.25	46.87	가로로길다
1136-12	N78-A	많다	N78-A	높다	N78-A	36.09	41.97	가로로길다
1144-5	155-D	없다	없다	중간	71-A	33.16	34.07	떨어짐
KS103-6	N78-B	없다	없다	중간	N78-A	27.12	29.12	떨어짐
601	N74-A	없다	없다	높다	N74-A	36.94	47.91	떨어짐
Lay	59-B	없다	없다	없다	없다	25.92	25.36	떨어짐

표 2. 계속 (꽃의 특성)

개체명	꽃잎가장 넓은부분	꽃잎 세로축의 휘어짐	꽃잎가로 자른면의 모양	꽃잎 뒤틀림	꽃잎 가장자리 물결정도	꽃잎 바탕색	꽃잎 2차 색	꽃잎 2차 색범위
664-7	기부쪽	평평	평평	없음	약하다	155-D	72-C	작다
103-V-9	기부쪽	평평	평평	없음	약하다	N78-B	없다	없음
1170-1	기부쪽	평평	평평	없음	약하다	75-A	없다	없음
1031-8	기부쪽	평평	평평	없음	약하다	155-D	없다	작다
1161-22	기부쪽	평평	평평	없음	약하다	162-C	없다	없음
1159-9	기부쪽	평평	평평	없음	약하다	75-A	없다	없음
1160-5	기부쪽	없다	평평	없다	없다	12-B	없다	없다
1146-11	기부쪽	없다	평평	없다	없다	N74-A	없다	없다
1141-20	기부쪽	없다	평평	없다	없다	N74-A	없다	없다

1136-18	기부쪽	없다	평평	없다	없다	75-A	없다	없다
1140-2	기부쪽	없다	평평	없다	없다	N78-C	없다	없다
1147-3	기부쪽	평평	평평	없다	약하다	N78-A	없다	없다
1136-17	기부쪽	평평	평평	없다	없다	N78-B	없다	없다
1146-12	기부쪽	평평	평평	없다	없다	N78-B	없다	없다
1125-3	기부쪽	평평	평평	없다	없다	N78-C	없다	없다
1159-9	기부쪽	평평	평평	없다	없다	N78-D	없다	없다
1138-8	기부쪽	평평	평평	없다	약하다	N74-B	없다	없다
1165-1	기부쪽	평평	평평	없다	없다	N74-B	없다	없다
1125-18	기부쪽	평평	평평	없다	없다	N78-A	없다	없다
1126-17	기부쪽	평평	평평	없다	없다	N78-B	없다	없다
1126-8	기부쪽	평평	평평	없다	없다	N78-C	없다	없다
1136-12	기부쪽	평평	평평	없다	없다	N78-D	없다	없다
1144-5	기부쪽	평평	평평	없다	없다	N78-B	없다	없다
KS103-6	기부쪽	평평	평평	없다	없다	N78-B	없다	없다
601	기부쪽	평평	평평	없다	없다	N74-A	없다	없다
Lay	기부쪽	평평	평평	없다	없다	155-D	없다	없다

표 2. 계속 (꽃의 특성)

개체명	꽃잎 반점의 수	꽃잎 반점의 크기	꽃잎 반점의 색	꽃잎줄 무늬의 수	꽃잎줄 무늬의 색	꽃잎그물 모양의밀도	꽃잎그물 모양의색
664-7	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음
103-V-9	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음
1170-1	없음	없음	없음	중간	75-A	없음	없음
1031-8	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음
1161-22	없음	없음	없음	없음	49-B	높다	49-B
1159-9	없음	없음	없음	많다	없음	없음	없음
1160-5	없다	없다	없다	없다	없다	중간	186-B
1146-11	적다	작다	69-A	많다	N78-A	없다	없다
1141-20	적다	작다	69-A	많다	64-A	없다	없다
1136-18	없다	없다	없다	중간	73-A	없다	없다
1140-2	없다	없다	없다	많다	N74-B	없다	없다
1147-3	적다	작다	N154-D	없다	없다	중간	72-A
1136-17	적다	작다	N155-D	중간	N78-A	없다	없다
1146-12	적다	작다	N156-D	많다	N78-A	없다	없다
1125-3	적다	작다	N155-D	중간	N78-B	없다	없다
1159-9	없다	없다	없다	중간	N78-C	없다	없다
1138-8	적다	작다	N155-D	중간	N74-A	없다	없다
1165-1	많다	작다	N155-D	많다	N74-C	없다	없다
1125-18	적다	작다	155-D	많다	71-A	없다	없다
1126-17	적다	작다	155-D	많다	71-A	없다	없다

1126-8	적다	작다	155-D	많다	N78-A	없다	없다
1136-12	적다	작다	155-D	많다	N78-B	없다	없다
1144-5	적다	작다	155-D	없다	없다	중간	71-A
KS103-6	적다	작다	155-D	많다	N78-A	없다	
601	많다	작다	N74-A	많다	N74-A	없다	
Lay	없다	없다	없다	없다	없다	없다	

표 2. 계속 (꽃의 특성)

개체명	순판끝열 편의길이	순팔끝열 편의너비	순판끝열 편의모양	순판수 염	순판수염 의길이	순판끝열편의 돌기맞춤기	순판측열 편의모양	순판측열편 의휘어짐
664-7	16.4	19.9	삼각형	있다	10.4	중간	형태IV	중간
103-V-9	16.5	15.8	난형	있다	2.3	없다	형태IV	중간
1170-1	18	18.5	삼각형	있다	7.8	없다	형태IV	중간
1031-8	17.2	17.3	삼각형	있다	4.7	없다	형태IV	중간
1161-22	19.8	21.2	삼각형	있다	5.2	없다	형태IV	중간
1159-9	20.7	19	삼각형	있다	9	없다	형태IV	중간
1160-5	26.19	22.36	삼각형	있다	6.08	없다	형태IV	중간
1146-11	19.53	20.24	삼각형	있다	11.16	없다	형태IV	중간
1141-20	18.48	18.04	삼각형	있다	8.17	없다	형태IV	중간
1136-18	18.4	17.84	삼각형	있다	9.57	없다	형태IV	중간
1140-2	19.18	19.2	삼각형	있다	7.98	없다	형태IV	중간
1147-3	17.98	19.24	마름모형	있다	4.25	강하다	형태IV	중간
1136-17	16.96	16.44	삼각형	있다	6.66	약하다	형태IV	중간
1146-12	19.02	17.75	삼각형	있다	6.94	약하다	형태V	중간
1125-3	18.52	18.82	삼각형	있다	5.88	없다	형태IV	중간
1159-9	21.37	19.78	삼각형	있다	6.82	없다	형태IV	중간
1138-8	19.1	19.98	삼각형	있다	9.68	없다	형태V	중간
1165-1	20.75	18.83	윗쪽이긴 마름모형	있다	4.32	없다	형태IV	중간
1125-18	18.26	17.75	삼각형	있다	7.5	없다	형태IV	중간
1126-17	22.32	23.59	삼각형	있다	11.86	없다	형태IV	중간
1126-8	19.55	21.94	삼각형	있다	11.12	없다	형태IV	중간
1136-12	18.77	18.96	삼각형	있다	6.55	없다	형태IV	중간
1144-5	17.43	16.72	윗쪽이긴 마름모형	없다	3.08	중간	형태IV	중간
KS103-6	16.75	15.54	난형	없다	1.77	없다	형태IV	중간
601	21.28	21.81	삼각형	없다	10.54	없다	형태IV	중간
Lay	16.59	15.91	난형	없다	5.31	중간	형태V	중간

표 2. 계속 (꽃의 특성).

개체명	순판끝열 편의길이	순판끝열 편의너비	순판끝열 편의모양	순판수염	순판수염 의길이	순판끝열편의 돌기및융기	순판측열 편의모양	순판측열편 의휘어짐
664-7	16.4	19.9	삼각형	있다	10.4	중간	형태IV	중간
103-V-9	16.5	15.8	난형	있다	2.3	없다	형태IV	중간
1170-1	18	18.5	삼각형	있다	7.8	없다	형태IV	중간
KS-1031-8	17.2	17.3	삼각형	있다	4.7	없다	형태IV	중간
1161-22	19.8	21.2	삼각형	있다	5.2	없다	형태IV	중간
1159-9	20.7	19	삼각형	있다	9	없다	형태IV	중간
1160-5	26.19	22.36	삼각형	있다	6.08	없다	형태IV	중간
1146-11	19.53	20.24	삼각형	있다	11.16	없다	형태IV	중간
1141-20	18.48	18.04	삼각형	있다	8.17	없다	형태IV	중간
1136-18	18.4	17.84	삼각형	있다	9.57	없다	형태IV	중간
1140-2	19.18	19.2	삼각형	있다	7.98	없다	형태IV	중간
1147-3	17.98	19.24	마름모형	있다	4.25	강하다	형태IV	중간
1136-17	16.96	16.44	삼각형	있다	6.66	약하다	형태IV	중간
1146-12	19.02	17.75	삼각형	있다	6.94	약하다	형태V	중간
1125-3	18.52	18.82	삼각형	있다	5.88	없다	형태IV	중간
1159-9	21.37	19.78	삼각형	있다	6.82	없다	형태IV	중간
1138-8	19.1	19.98	삼각형	있다	9.68	없다	형태V	중간
1165-1	20.75	18.83	윗쪽이긴 마름모형	있다	4.32	없다	형태IV	중간
1125-18	18.26	17.75	삼각형	있다	7.5	없다	형태IV	중간
1126-17	22.32	23.59	삼각형	있다	11.86	없다	형태IV	중간
1126-8	19.55	21.94	삼각형	있다	11.12	없다	형태IV	중간
1136-12	18.77	18.96	삼각형	있다	6.55	없다	형태IV	중간
1144-5	17.43	16.72	윗쪽이긴 마름모형	없다	3.08	중간	형태IV	중간
KS103-6	16.75	15.54	난형	없다	1.77	없다	형태IV	중간
601	21.28	21.81	삼각형	없다	10.54	없다	형태IV	중간
Lay	16.59	15.91	난형	없다	5.31	중간	형태V	중간

표 2. 계속 (꽃의 특성)

개체명	순판측열 편의휘어짐	순판끝 열편에 대한 측열편의 크기	끝열편 바탕색	끝열 편2차 색	끝열편 반점의 수	끝열편 반점의 크기	끝열편 반점의 색	끝열편 줄무늬 의 수	끝열편 줄무늬 의 색	끝열편 그물모양 의 밀도
664-7	중간	더작다	71-B	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음
103-V-9	중간	더작다	71-A	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음
1170-1	중간	더작다	60-A	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음

1031-8	중간	더작다	N78-A	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음
1161-22	중간	더작다	N74-A	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음
1159-9	중간	더작다	61-A	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음
1160-5	중간	더작다	61-B	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음
1146-11	중간	더작다	61-A	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음
1141-20	중간	더작다	61-A	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음
1136-18	중간	더작다	61-A	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음
1140-2	중간	더작다	61-A	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음
1147-3	중간	더작다	59-B	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다
1136-17	중간	더작다	59-C	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다
1146-12	중간	더작다	71-A	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다
1125-3	중간	더작다	71-B	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다
1159-9	중간	더작다	71-A	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다
1138-8	중간	더작다	61-A	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다
1165-1	중간	더작다	60-A	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다
1125-18	중간	더작다	72-A	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다
1126-17	중간	더작다	71-A	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다
1126-8	중간	더작다	72-A	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다
1136-12	중간	더작다	61-A	없다	없다	없다	없다	없다	71-A	없다	없다
1144-5	중간	더작다	71-A	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다
KS103-6	중간	더작다	61-A	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다
601	중간	더작다	61-A	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다	없다
Lay	중간	더작다	72-A	155-D	많다	작다	72-A	없다	없다	없다	없다

표 2. 계속 (꽃의 특성).

개체명	끝열편그물 모양의 색	측열편 바탕색	측열편 2차색	측열편반점 의 수	측열편 반점의 색	측열편줄 무늬의 수	측열편줄 무늬의 색
664-7	없음	71-B	155-D	적다	71-B	없음	없음
103-V-9	없음	71-A	없음	적다	71-A	없음	없음
1170-1	없음	60-A	없음	없다	없다	적다	60-A
KS-1031-8	없음	N78-A	없음	중간	N78-A	없음	없음
1161-22	없음	N74-A	없음	적다	N74-A	없음	없음
1159-9	없음	61-A	없음	중간	61-A	없음	없음
1160-5	없음	N78-A	61-B	없음	없음	없음	없음
1146-11	없음	N74-A	61-A	없음	없음	없음	없음
1141-20	없음	61-A	없음	없음	없음	없음	없음
1136-18	없음	60-B	없음	없음	없음	없음	없음
1140-2	없음	61-A	없음	없음	없음	없음	없음
1147-3	없다	59-B	없다	중간	59-B	없음	없음
1136-17	없다	59-C	없다	없다	없다	없음	없음

1146-12	없다	71-A	없다	없다	없다	없음	없음
1125-3	없다	71-B	없다	없다	없다	없다	없다
1159-9	없다	71-A	없다	없다	없다	없다	없다
1138-8	없다	61-A	없다	없다	없다	없다	없다
1165-1	없다	60-A	없다	없다	없다	없다	없다
1125-18	없다	72-A	N78-A	없다	없다	없다	없다
1126-17	없다	71-A	N78-B	없다	없다	없다	없다
1126-8	없다	72-A	N78-C	없다	없다	없다	없다
1136-12	없다	61-A	N78-D	없다	없다	없다	없다
1144-5	없다	71-A	없다	없다	없다	없다	없다
KS103-6	없다	61-A	없다	없다	없다	없다	없다
601	없다	61-A	없다	없다	없다	없다	없다
Lay	없다	72-A	155-D	중간	72-A	없다	없다

표 2. 계속 (꽃의 특성)

개체명	측열편그물 모양의 밀도	측열편그물 모양의 색	순판켈러스	순판켈러스의 색	순판솜털	꽃술대색
664-7	없음	없음	강하게올라옴	13A	없음	155-D
103-V-9	없음	없음	강하게 올라옴	13A	없음	155-D
1170-1	없음	없음	강하게올라옴	7-C	없음	155-D
KS-1031-8	없음	없음	없음	9-C	없음	155-D
1161-22	없음	없음	강하게올라옴	13-B	없음	155-D
1159-9	없음	없음	강하게올라옴	8-A	없음	155-D
1160-5	없음	없음	강하게올라옴	13-A	없음	155-D
1146-11	없음	없음	강하게올라옴	13-A	없음	155-D
1141-20	없음	없음	강하게올라옴	13-A	없음	155-D
1136-18	없음	없음	강하게올라옴	13-A	없음	155-D
1140-2	없음	없음	강하게올라옴	13-A	없음	155-D
1147-3	없음	없음	강하게올라옴	9-B	없다	N155-D
1136-17	없음	없음	강하게올라옴	14-A	없다	N155-D
1146-12	없음	없음	강하게올라옴	13-A	없다	N155-D
1125-3	없다	없다	강하게올라옴	9-B	없다	N155-D
1159-9	없다	없다	강하게올라옴	9-C	없다	N155-D
1138-8	없다	없다	강하게올라옴	9-B	없다	N155-D
1165-1	없다	없다	강하게올라옴	5-B	없다	N155-D
1125-18	없다	없다	강하게올라옴	9-A	없다	155-D
1126-17	없다	없다	강하게올라옴	9-A	없다	155-D
1126-8	없다	없다	강하게올라옴	9-A	없다	155-D
1136-12	없다	없다	강하게올라옴	9-A	없다	155-D
1144-5	없다	없다	강하게올라옴	9-A	없다	155-D
KS103-6	없다	없다	강하게올라옴	9-B	없다	155-D

601	없다	없다	강하게올라옴	9-B	없다	155-D
Lay	없다	없다	강하게올라옴	4-D	없다	155-D

○ 수집된 집단 중에 대표적인 26개체의 사진은 다음과 같다.



604-7



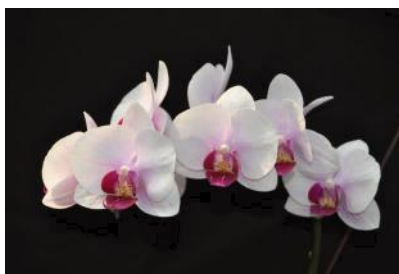
1146-11



1140-2



1161-22



1031-8



1159-9



1126-8



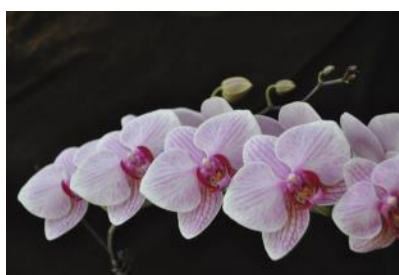
1145-2



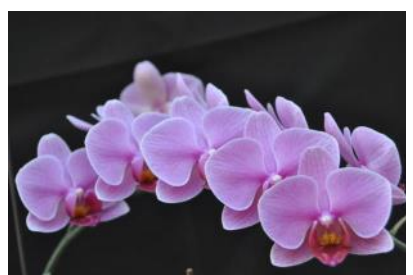
1159-2



425-2



1136-12



1136-18



1121-10



1170-1



1160-5



1147-3



Lay



KS 103-6



1121-10



601



Lay



1145-22



1145-23



1145-24



1121-14



1121-15



1121-16

그림 2. 생육 및 개화특성이 우수한 호접란

(2) 국외 수집 우량개체의 특성

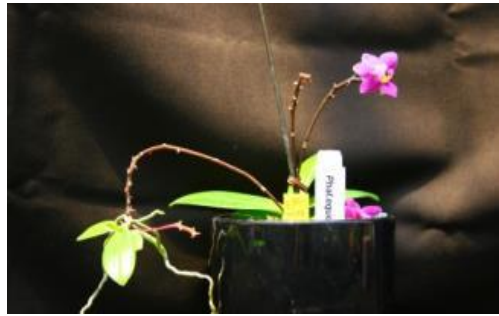
- 국외에서 수집한 우량 개체는 총 12종으로 일반적인 특성을 조사하고 온실에서 관리 중에 있으며 이를 모부본으로 활용할 계획이다. 수집원종과 품종의 특성조사 결과는 표 5와 같으며 개화시의 모습은 그림 5, 6과 같다.

표 5. 외국 수집 우량개체의 특성조사.

	조사항목	잎						화서		꽃			
		길이	너비	엽수	자세	윗면색	안토시아닌색	화수	길이	길이	너비	꽃색	
원종	1	<i>P. TS Cupid x equestris</i>	118	40	11	반직립	밝은 녹색	있다	77	150	10.6	8.1	4-181C
	2	<i>P.equestris</i>	85	33	9	반직립	밝은 녹색	없다	23	145	16.3	10.8	2-N78A
	3	<i>P. violacea x P. Be Tris x P. violacea</i>	420	69	11	평평	밝은 녹색	없다	3	45	24.0	16.7	2-N81A
	4	<i>P. equestris</i> 'Orange'	145	51	6	반직립	밝은 녹색	있다	49	550	13.3	9.1	2-76A
	5	<i>Dtps.</i> 'Lius Berry'	146	69	4	반직립	녹색	없다	26	350	19.7	18.0	
품종	1	KNO-103 : Vivien 'Chin Lih'	100	65	8	반직립	녹색	없다	21	310	21.8	21.2	2-N78A
	2	COFFEE	123	49	6	반직립	밝은 녹색	없다	19	350	19.5	19.5	2-N78A
	3	KNO-113 : Green Apple	130	53	6	반직립	녹색	있다	17	280	29.2	23.8	1-1D
	4	FXF-21919 : Little Pearl	71	28	9	반직립	밝은 녹색	있다	5	230	16.1	20.0	2-61A
	5	FMK-22010 : Chiada Kitty	135	69	5	반직립	밝은 녹색	있다	21	350	24.2	26.6	4-155D
	6	KWO-96 : Fullers Pink	158	59	5	반직립	녹색	있다	17	430	34.4	42.3	2-75A
	7	FWF-35129 : Madonna	164	56	7	반직립	밝은 녹색	없다	29	325	21.5	22.5	4-155D



P. TS Cupid x equestris



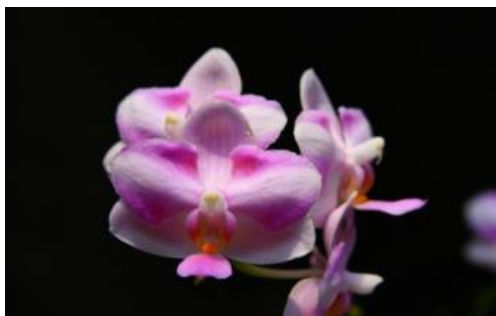
P. equestris



P. violacea x P. Be Tris x P. violacea



P. equestris 'Orange'



Dtps. 'Lius Berry'

그림 5. 수집원종



KNO 103 : Vivien 'Chin Lih'



Coffee



KNO-113 : Green Apple



FWF-35129 : Madonna



FXF 21919 : Little Pearl



FMK 22010 : Chiada Kitty



KWO-96 : Fullers Pink

그림 6. 수집품중

(3) 수집종의 보존 및 유지

- 국외에서 우수개체를 다수 수집하여 보존, 유지관리하고 있으며 이를 신품종을 육성하는데 대부분으로 활용하고 있다(그림 7)



그림 7. 보존관리 중인 호접란 수집 종.

(4) 우수 품종의 개화특성 조사

- 개화수명이 길고 생육이 우수한 품종에 대한 개화특성을 비교하기 위하여 25℃의 Growth chamber(생장장)에서 개화수명이 긴 KSLG를 비롯한 725, 930, 932, 933 그리고 대만 품종인 춘리를 10월 28일 저온처리를 하여 개화특성을 비교하였다.
- 저온처리에 대한 품종별 개화특성 조사결과는 표 3과 같다. 화경출현일은 KSLG가 11월 18일로 가장 빨랐으며 752가 12월 7일로 가장 늦었다. 개화일 역시 KSLG가 가장 빨랐다. 생육특성 조사 결과 KSLG가 엽수가 많고 잎도 두꺼웠으며 화경이 굵고, 화경수, 소화수 등도 다른 품종에 비해 많았다. 이와 같은 결과로부터 KSLG가 저온에 대한 감수성도 높고 분화로서의 좋은 특성을 갖춘 것으로 판단되었다.

표 3. 저온처리에 대한 품종별 개화특성.

Cultivar	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Leaf number	Leaf thickness (cm)	Flower stalk emergence (M.D)	Flower date (M.D)	Flower stalk diameter (mm)	No. of flower stalks	No. of florets
LG	11.6	5.3	12.3	2.24	11. 18	2. 19	4.57	2.0	40.3
752	15.3	5.9	6.2	2.24	12. 7	3. 8	4.13	2.2	25.6
930	15.8	5.8	7.4	1.70	12. 1	2. 24	4.25	1.2	15.1
932	15.9	6.0	7.6	1.92	12. 1	3. 3	3.83	2.0	15.8
933	17.7	6.1	7.1	1.74	12. 1	3. 9	3.65	1.6	17.2
춘리	13.7	6.0	6.2	1.55	12. 3	3. 3	4.38	2.2	29.2

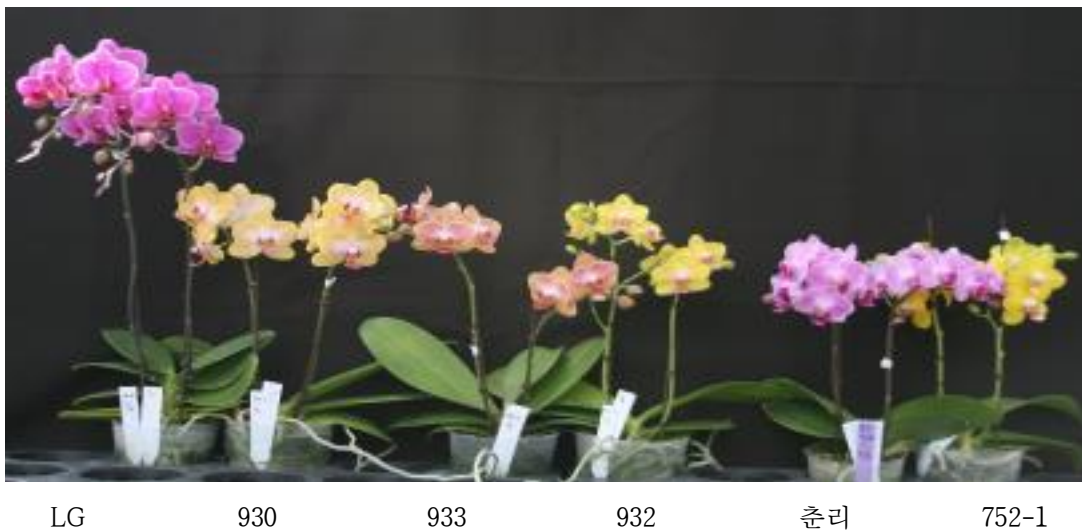


그림 8. 저온처리에 대한 품종별 개화특성.

나. 개화수명과 관련된 유전자원의 교배

(1) 우수개체 간 교배

- 관리 중인 유전자원 중에서 개화수명, 화색, 화형, 엽형 등이 우수한 개체 간 교배를 50조합 실시하였다. 그 결과 결실도는 교배조합에 따라 차이가 있었으며 27개 조합이 양호하였다. 결실이 양호한 교배조합은 파종하여 생육과 꽃 형질이 우수한 개체를 선발하였다. 이와 같이 교배조합에 따른 결실도는 향후 호접란의 교배조합 선정에 활용될 것으로 기대된다.

표 4. 교배 조합 리스트.

일련번호	교배일시	모본	부분	결실도		비고
				양호	불량	
1	1. 02	1023	KNO 120	○		
2	1. 02	KNO 113	103-9		○	
3	1. 02	KNO 144	103-9	○		
4	1. 02	KNO 147	103-9	○		
5	1. 02	KNO 120	103-9		○	
6	1. 29	KNO 95	103	○		
7	1. 29	103	KNO 95	○		
8	3. 11	1076-27	1035-1		○	
9	3. 11	1037	1035-1		○	
10	3. 15	1041-10	KNO 168	○		
11	3. 17	KNO 82	2157		○	
12	3. 17	2157	KNO 82	○		
13	3. 24	KNO 113	1076-27		○	
14	3. 24	KNO 150	705-5		○	
15	3. 24	KNO 150	705-6		○	
16	4. 1	1076-41	2157		○	
17	4. 1	2157	1076-27		○	
18	4. 1	2157	1076-2		○	
19	4. 2	1076-73	KNO-111	○		
20	4. 2	1041-29	KNO 168	○		
21	4. 2	KNO 111	1076-73		○	
22	4. 2	KNO 122	1076-73		○	
23	4. 4	KNO 164	KNO 168		○	
24	4. 5	705-5	478-V5		○	
25	4. 5	705-5	KNO 168	○		
26	4. 5	705-6	KNO 120	○		
27	4. 9	KNO 167	1076-22		○	
28	4. 9	2157	1076-45(Y)		○	
29	4. 9	2157	1076-45	○		
30	4. 9	KNO 167	1076-45		○	
31	4. 10	1098-1	1076-20	○		
32	4. 10	1098-1	1076-44		○	
33	4. 14	103	KNO 141		○	
34	4. 15	2157	1092-7	○		
35	4. 15	2157	KNO 141	○		
36	4. 15	705-6	KNO 113	○		
37	4. 15	KNO 141	1076-22		○	
38	4. 15	KNO 141	103	○		
39	4. 16	825-14	2157	○		
40	4. 16	825-15	2157	○		
41	4. 16	825-18	2157	○		
42	4. 17	KNO 141	2157		○	
43	4. 17	1041-28	KNO 168	○		
44	4.17	1041-32	KNO 168	○		
45	4. 18	705-5	1076-07		○	
46	4. 18	1006-3	KNO 168	○		
47	4.18	705-5	1076-7		○	
48	4. 22	KNO 167	103	○		
49	4. 25	705-5	KNO 165	○		
50	4. 25	KNO 111	1076-43		○	



그림 4. 교배하여 성숙 중인 꼬투리.

다. 기내선발, 실생묘 생산, 우량개체 선발방법 확립

(1) 기내외 배양묘 건강화 조건 구명

- 기존방법

- ① 우수형질계통 품종 간 교배 후 꼬투리 생성
- ② 파종배지(Hy 6-6.5-19, potato, sucrose 등) 무호르몬 배지에 치상 후 상시 26℃ 온도와 2000Lux 광조건에서 배양
- ③ 1~2개월후 잎눈이 보이면 분화배지에 이식 후 배양
- ④ 2~3개월후 잎이 어느 정도 성장하면 정식배지에 이식
- ⑤ 1~2개월후 뿌리가 어느 정도 성장하면 순화과정을 거쳐 기외이식

- 새로운 방법

- ① 우수형질계통 품종 간 교배 후 꼬투리 생성
- ② 파종배지(Hy 20-20-20, potato, banana, sucrose, coconut water 등) 천연호르몬배지에 치상 후 26℃ 온도와 암배양 조건에서 2주간 배양후 2000Lux 광조건으로 전환
- ③ 1개월 후 계대배양 하여 같은 조건에서 배양

- ④ 2개월 후 잎이 성장하면 정식배지에 계대배양해서 암배양 조건에서 2주간 배양 후 2000Lux 광조건으로 전환
- ⑤ 1개월 후 26℃ 온도에 5000Lux 광조건으로 전환
- ⑥ 1개월 후 26℃ 온도에 10000Lux 광조건으로 전환
- ⑦ 1개월 후에 기외이식

- 파종방법 개선

KS Little Gem을 상기의 기존배지에 15병, 새로운 배지에 15병 파종 후 2개월 경과한 다음 관찰한 결과 기존파종배지에서 보다 새로운 파종배지에서 발아성공률이 높아졌다.



KSLG



기존배지 파종



새로운 배지 파종



비교

- 정식방법 개선

KS Little Gem을 기존방법으로 10병, 새로운 방법으로 10병으로 식재하여 순화과정에서 암배양후 광을 1개월 간격으로 2000룩스에서 5000룩스, 10000룩스로 서서히 올렸더니 식물체가 광에 더 빨리 적응하여 잎의 생장이 촉진되었다. 결과적으로 잎이 큰 식물체가 광합성을 많이 하여 생장의 차이는 더 커지는 것으로 나타났다.



기존 방법



새로운 방법



비교

(2) 실생묘 생산, 우량개체 선발방법 확립

(가) 우량 교배 후대의 생육 특성 조사

- 무균파종 후 온실 이식 전 우량 교배 6조합(KS 1502, KS 1506, KS 1514, KS 1521, KS 1527, KS 1532)을 선발하고 각 조합당 300개체에 대해서 엽수, 엽장, 엽폭, 엽두께, 근수,

근장 및 근직경을 측정하였다(표 6).

- 측정한 결과 엽두께는 교배 조합 간에 큰 차이가 없었으나 엽수는 KS 1532, 엽장은 KS 1506, 엽폭은 KS 1502, KS 1511, KS 1514, 근수와 근장은 KS 1511, KS 1514, 근직경은 KS 1514가 제일 큰 것으로 나타났다.
- 이들 교배조합 후대에 대해서는 개화 시 까지 생육특성을 관찰하여 우량 후대는 선발하여 신품종으로서의 가치를 판단하여 품종출원을 할 계획이다.

표 6. 우량 교배 후대 플라스크묘의 생육 특성 조사.

Cultivar	No. of leaves	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Leaf thickness (mm)	No. of roots	Root length (cm)	Root diameter (mm)
KS 1527	4.0	6.0	1.1	0.8	4.1	3.8	2.4
KS 1502	3.6	3.4	1.4	0.7	3.1	3.8	2.2
KS 1532	4.2	5.3	1.0	0.8	3.8	3.8	2.7
KS 1511	3.9	6.0	1.4	0.8	5.2	5.5	2.1
KS 1506	3.9	6.7	1.1	0.8	5.1	4.7	2.3
KS 1514	3.2	5.7	1.4	0.8	3.9	5.2	2.9

(나) 생장 중 생리특성 파악분석(광조건, 온도조건, 비료조건 개선)

- 기존의 온도, 광, 시비관리를 개선하여 최적의 재배시스템을 확립
- 기존 재배관리 시스템
 - ① 플라스크묘를 수태로 1.7인치 포트에 기외 이식 후 광조건은 12,000 Lux에 25℃~27℃ 온도조건에서 비료 10-30-20 (N-P-K, 피터스)을 EC 0.6으로 조절하여 10일에 한번 씩 관주하고 5개월 유지
 - ② 5개월 후 수태로 2.5인치 포트에 기외 이식 후 광조건은 20,000 Lux로 하고 25℃~27℃ 온도조건에서 비료 10-30-20 (N-P-K)을 EC 0.6으로 조절하여 10일에 한번 씩 관주하고 5개월 동안 유지
 - ③ 5개월 후 수태로 3.5인치 포트에 기외 이식 후 광조건은 20,000 Lux로 하고 25℃~27℃ 온도조건에서 비료 10-30-20 (N-P-K)을 EC 0.6으로 조절하여 10일에 한번 씩 관주하고 5~7개월 동안 유지
 - ④ 5~7개월 후 광조건은 20,000 Lux로 하고 25℃~18℃ 온도조건에서 비료 10-30-20 (N-P-K)과 20-20-20 (N-P-K)을 EC 0.6으로 조절하여 1주에 한번 씩 교차 관주하고 꽃 봉오리가 발생한 이후부터는 비료없이 관수만 3~5일에 한번 씩 함
- 새로운 재배관리 시스템
 - ① 플라스크묘를 수태로 1.7인치 포트에 기외 이식 후 광조건은 7,000~10,000 Lux로 하고 25℃~27℃ 온도조건에서 수온이 25℃ 정도 되도록 데워서 비료 10-30-20 (N-P-K)을 EC 0.4로 조절하여 1주에 한번 씩 관주하고 비료 20-20-20 (N-P-K)을 EC 0.4로 조절하여 하루에 한번 씩 엽면살포 하면서 5개월 동안 유지

- ② 5개월 후 수태로 3.5인치 포트에 기외 이식 후 광조건은 15,000~20,000 Lux로 하고 28℃~29℃ 온도조건에서 수온이 25℃ 정도 되도록 데워서 비료 10-30-20 (N-P-K)을 EC 0.6~0.8로 조절하여 하여 1주에 한번 씩 관주하고 비료 20-20-20 (N-P-K)을 EC 0.6로 조절하여 하루에 한번 씩 엽면살포 하면서 5~8개월 동안 유지
- ③ 6~8개월 후 광조건은 15,000~20,000 Lux로 하고 25℃~18℃ 온도조건에서 수온이 25℃ 정도가 되도록 데워서 비료 10-30-20 (N-P-K)을 EC 0.8로 조절하여 1주에 한번 씩 관주하고 화경이 5cm 정도 성장하면 비료 20-20-20 (N-P-K)을 EC 0.6으로 조절하여 이틀에 한번 씩 실린지 하면서 꽃봉오리가 생길 때 까지 유지하고 꽃봉오리가 생긴 후 부터는 비료없이 관수만 4일에 한번 씩 함
- 플라스크묘(소묘) 재배관리 시스템 개선에 의한 생육의 차이
플라스크묘를 기존방법으로 20개체, 새로운 방법으로 20개체 기외 이식 후 5개월 경과한 다음 관찰한 결과 기존 방법보다 새로운 방법으로 재배했을 때 잎의 크기도 더 크고 식물체의 생육상태가 더 좋았다.



그림 8. 소묘 비교(좌: 새로운 방법, 우: 기존방법)

- 중묘 재배관리 시스템 개선에 의한 생육의 차이
중묘를 기존방법으로 20개체, 새로운 방법으로 20개체 기외 이식 후 5개월 경과한 다음 관찰한 결과 기존방법보다 새로운 방법으로 재배했을 때 뿌리생장은 비슷하나 잎이 더 크고 생육속도가 더 빨랐다.



그림 9. 중묘 비교(좌: 새로운 방법, 우: 기존방법)

- 개화주 재배관리 시스템 개선에 의한 개화의 차이

개화주를 기존방법으로 20개체, 새로운 방법으로 20개체를 개화실로 이동한 다음 4개월 경과 후 관찰한 결과 기존방법으로 재배했을 때 꽃대가 거의 외대였으나 새로운 방법으로 재배했을 때는 꽃대가 모두 쌍대로 나왔다.

기존 방법으로 재배했을 때는 기외 이식 후 개화까지의 기간이 19~21개월이 소요되나 새로운 방법으로 재배할 경우 14~17개월이면 출하가 가능하며 재배기간이 약 4~5개월 단축되었다. 관수할 때 수온을 25℃ 정도로 데워서 사용하면 후사리움(뿌리부터 썩는 병)의 발생하는 빈도가 현저하게 감소하였다. 새로운 방법으로 온도, 광, 비료를 관리하면 기존의 재배방법 보다 생육이 강건하고 빠르며 결과적으로 4~5개월 정도 재배기간이 단축되어 생산비를 절감하는데 효과적이었다.



그림 10. 개화주 비교(좌: 새로운 방법, 우: 기존방법)

라. 온도 적응생리 연구 및 저온/고온 적응 재배 가능성 탐구

(1) 실험방법

- 온도 적응생리 연구 및 저온/고온 적응 재배 가능성 탐구를 하기 위하여 Growth chamber 를 이용하여 표 7와 같은 조건으로 실험을 실시하였다.
- 실험재료는 온실 이식 후 1 개월 된 KS Little Gem 묘를 사용하였다. 온도는 20°C, 25°C, 30°C로 하고, 비료농도는 피터스 0.33, 0.5, 1.0 g/L로 조정하여 실험 하였다. 실험 종료 후 모든 실험식물을 표 9, 10, 11과 같이 생육조사를 실시하였다. 관수는 3일 간격으로 시비는 10일 간격으로 실시하였다.

표 7. 온도 적응생리 연구 및 저온/고온 적응 재배 가능성 탐구 실험조건.

Experiment condition	Chamber 1	Chamber 2	Chamber 3
Temperature	20°C	25°C	30°C
Fertilizer(Peters)	0.33, 0.5, 1.0 g/L	0.33, 0.5, 1.0 g/L	0.33, 0.5, 1.0 g/L
Light	14000 lux	14000 lux	14000 lux
Humidity	60%	60%	60%

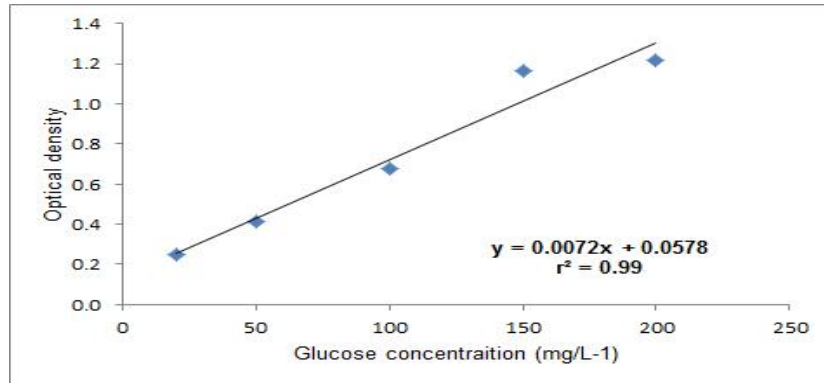
- HPLC (High Performance Liquid Chromatography)에 의한 당분석

- 온도와 시비량이 호접란 묘의 당함량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 HPLC를 이용하여 잎의 glucose, fructose 및 sucrose 함량을 분석하였다. 건조된 호접란 묘의 잎과 뿌리를 각각 10mg씩 3반복으로 추출하여, 각각 액체질소에서 마쇄 한 후 3차 증류수 20ml과 함께 섞은 다음 원심분리(8000rpm, 20분)하여 상등액을 추출하였다. 이들 상등액을 여과지(No. 541.UK)로 거른 후 3차 증류수로 20ml가 되도록 하였다. 이들을 각각 Sep-pak C18 cartridge로 정제하고 membrane filter(milipore 0.20ml)여과한 다음 HPLC로 당함량(glucose, fructose 및 sucrose)을 분석하였다.

- 전분분석

- 유리당을 추출하고 남은 잔사를 사용하여 Phenol-sulfuric acid 방법(Dubois et al. 1956)을 이용하여 전분함량을 분석하였다. 건조시킨 시료를 비이커에 넣고 H₂SO₄ 1ml를 가한 다음 서서히 마그네틱 바를 돌리면서 증류수 0.5mL를 한 방울 씩 넣은 후 검은 색으로 변성 하면서 발열했을 때 H₂SO₄를 1mL 추가하였다. 발열이 끝난 후 증류수를 0.5mL씩 추가하여 총량을 10mL로 맞춘 다음 여과지로 여과 한 후 50mL 메스플라스크로 정량을 하였다. 이들 시료에서 0.5mL을 취한 다음 5% phenol 0.5mL를 가하여 진탕하고 다시 2.5mL의 H₂SO₄를 넣어 반응시켜 상온에 두었다. 표준용액으로는 glucose를 사용하여 25, 50, 75, 100mg/L의 용액을 만들어 시료와 동일한 방법으로 수행하였다. 전분 측정은 UV-VIS

Spectrophotometer(UV-1800, SHIMA-DZU, Kyoto, Japan)를 사용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 당표준 용액의 흡광도로 탄수화물의 표준곡선 (그림 11)을 작성하였으며 이를 이용하여 각 시료의 흡광도를 전분함량으로 환산하였다.



(2) 생장분석결과

- 호접란묘의 엽생장에 미치는 온도와 시비의 영향은 표 8과 같다. 엽수, 엽장, 엽폭, 엽두께는 모두 25℃에서 가장 좋게 나타났다. 엽장, 엽폭 경우에 30℃에서 제일 짧게 나타났으며 엽두께 같은 경우에 20℃와 30℃에 각각 1.7 mm 정도로 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 엽록소는 25℃가 가장 많았으며 20℃, 30℃ 순이었다. 이와 같이 호접란 묘의 엽생장에 미치는 온도와 시비의 영향을 분석한 결과 시비량 보다는 온도의 영향을 많이 받는 것으로 나타났으며 온도는 25℃가 가장 좋은 것으로 나타났다.

표 8. KS Little Gem 호접란묘의 엽생장에 미치는 온도와 시비의 영향.

Temp. (°C)	Fertilizer ^z rate(g.L ⁻¹)	No. of leaves	Leaf length (cm)	Leaf width(cm)	Leaf thickness(mm)	Chlorophyll (SPAD)
20	0.33	7.9 abc ^y	7.2 b	3.6 b	1.8 ab	46.2 c
	0.50	7.8 abc	7.3 b	3.6 b	1.7 abc	48.6 bc
	1.00	7.6 bc	7.3 b	3.7 b	1.7 abc	50.0 ab
25	0.33	8.4 a	7.2 b	3.7 b	1.9 a	53.0 a
	0.50	8.2 ab	7.6 ab	3.7 b	1.9 a	52.7 a
	1.00	7.9 abc	7.8 a	4.0 a	1.8 abc	50.4 ab
30	0.33	7.6 bc	6.3 c	3.6 b	1.7 abc	31.2 d
	0.50	7.6 bc	6.3 c	3.3 c	1.6 c	32.2 d
	1.00	7.2 c	6.4 c	3.6 b	1.8 ab	30.6 d
Temperate (T)		*	***	***	**	***
Fertilizer (F)		NS	NS	NS	NS	NS
T*F		*	NS	NS	NS	NS

^z Peters (N=P=K= 20:20:20)

^y Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test, p<0.05.

NS, *, **, Not significant and significant at P<0.05,0.01,0.001.

- 온도와 시비량이 호접란 묘의 뿌리생장의 미치는 영향은 표 9와 같다. 근수는 25°C, 0.5g/L에서 14.6으로 제일 많았고 30°C, 1.0g/L에서 9.8로 제일 적은 것으로 나타났다. 근장은 20°C, 25°C가 길었으며 20°C와 25°C 간에 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 직경은 20°C에서 평균 5.7mm로서 제일 컸고 25°C, 30°C 순으로 나타났다.

표 9. KS Little Gem 호접란묘의 뿌리생장에 미치는 온도와 시비의 영향.

Temp. (°C)	Fertilizer ^z rate(g.L ⁻¹)	No. of roots	Root	
			Length (cm)	Diameter(mm)
20	0.33	13.8 a ^y	12.9 ab	5.7 ab
	0.50	13.9 a	12.9 ab	5.5 ab
	1.00	14.1 a	13.2 a	6.0 a
25	0.33	14.3 a	12.8 ab	4.9 bc
	0.50	14.6 a	13.0 ab	5.1 b
	1.00	15.0 a	13.3 a	5.3 bc
30	0.33	11.2 b	9.4 c	4.2 c
	0.50	9.9 b	10.8 bc	4.2 c
	1.00	9.8 b	10.8 bc	4.6 bc
Temperate (T)		***	**	***
Fertilizer (F)		NS	*	NS
T*F		NS	NS	NS

^z Peters (N=P=K= 20:20:20)

^y Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test, p<0.05.

NS, *, ** Not significant and significant at P<0.05, 0.01, 0.001.

- 온도와 시비량이 호접란 묘 잎과 뿌리의 생체중에 미치는 영향은 표 10과 같다. 온도의 경우 잎의 생체중은 25°C 가장 좋았으며 그다음이 20°C, 30°C 순이었다. 시비량의 경우 동일 온도 조건에서는 시비량이 많을수록 생체중도 증가하였다. 뿌리의 생체중은 잎의 생체중과 유사한 경향을 나타내었으나 30°C의 경우 시비량이 많아지면 뿌리의 생체중은 감소하였다. 잎과 뿌리의 비율의 경우 20°C와 25°C는 1.2 정도로 비슷하였으나 30°C에서는 2 이상으로 나타났다. 특히 30°C의 경우 시비량이 증가할수록 잎과 뿌리의 비율이 증가하여 1.0g/L에서는 2.9를 나타내었다. 이러한 결과는 호접란의 경우 고온에서 시비량의 증가는 뿌리의 성장을 억제하기 때문인 것으로 생각되었다.

표 10. KS Little Gem 호접란묘 뿌리와 잎의 생체중에 미치는 온도와 시비의 영향.

Temp. (°C)	Fertilizer ^z rate(g.L ⁻¹)	Fresh weight (g)		Total (g)	Leaf/root ratio
		Leaf	Root		
20	0.33	10.0 bc ^y	8.4 b	18.4	1.2
	0.50	10.2 bc	8.8 ab	19.0	1.2
	1.00	10.7 b	9.8 a	20.5	1.1
25	0.33	10.9 b	9.2 ab	20.1	1.2
	0.50	11.1 ab	9.3 ab	20.4	1.2
	1.00	12.2 a	9.7 a	21.9	1.3
30	0.33	8.2 d	4.1 c	12.3	2.0
	0.50	8.7 d	3.3 c	12.0	2.6
	1.00	9.2 cd	3.2 c	12.4	2.9
Temperate (T)		**	***	***	***
Fertilizer (F)		NS	NS	NS	NS
T*F		NS	NS	NS	NS

^z Peters (N=P=K= 20:20:20)

^y Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test, p<0.05.

NS, *, **, Not significant and significant at P<0.05, 0.01, 0.001.

(3) HPLC에 의한 당분석 결과

- 온도와 시비량이 호접란 잎의 당함량에 미치는 영향은 표 11과 같다. Sucrose는 25°C, 1g/L에서 함량이 0.76mg으로 제일 많은 것으로 나타났다. 그다음이 20°C와 30°C 순이었다. 또한 Sucrose 함량은 동일 온도 조건에서는 시비량이 많을수록 함량이 높은 것으로 나타났다. Glucose와 fructose 함량도 sucrose와 유사한 경향을 나타내었으며 25°C, 1g/L에서 함량이 가장 높았다. 총 당함량 역시 25°C, 1g/L에서 1.34mg으로 제일 많았고 30°C, 0.33g/L에서 0.32mg으로 가장 적은 것으로 나타났다.
- 이와 같이 잎에 sucrose의 함량이 glucose와 fructose 보다 높은 것은 sucrose 경우 이동당으로 잎에서 광을 이용하여 합성한 당을 다른 기관으로 보내는 역할을 하기 때문으로 판단된다. 또한 당함량이 25°C와 1g/L에서 가장 높은 것으로 보아 호접란 묘의 광합성은 25°C가 최적이며 또한 시비량이 증가할수록 광합성량도 증가하는 것으로 생각되었다.

표 11. 온도와 시비가 호접란 잎의 당함량에 미치는 영향.

Temp. (°C)	Fertilizer ^z rate(g.L ⁻¹)	Sucrose (mg)	Glucose (mg)	Fructose (mg)	Total (mg)
20	0.33	0.24 e ^y	0.07 c	0.09 cd	0.40
	0.50	0.35 de	0.07 c	0.09 cd	0.51
	1.00	0.51 bc	0.06 c	0.11 c	0.68
25	0.33	0.62 b	0.15 b	0.20 b	0.97
	0.50	0.60 b	0.06 c	0.10 cd	0.76
	1.00	0.76 a	0.24 a	0.30 a	1.30
30	0.33	0.29 e	0.01 d	0.02 f	0.32
	0.50	0.28 e	0.02 d	0.03 ef	0.33
	1.00	0.45 cd	0.06 c	0.06 de	0.57
Temperate (T)		*	**	*	
Fertilizer (F)		NS	NS	NS	
T*F		NS	NS	NS	

^z Peters (N=P=K= 20:20:20)

^y Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test, p<0.05.

NS, *, ** Not significant and significant at P<0.05, 0.01, 0.001.

- 온도와 시비량이 호접란 뿌리의 당함량에 미치는 영향은 표 12와 같다. 뿌리의 sucrose 함량역시 25°C에서 높은 경향을 나타내었으나 온도 간에 유의한 차이는 없었다. Glucose 함량 또한 25°C에서 높았으며 20°C와는 유의한 차이는 없었다. Fructose 함량은 25°C에서 그리고 시비량이 많을수록 높았으며, 1g/L에서 2.12mg으로 가장 높았다. 전체 당함량은 25°C에서 그리고 시비량이 많을수록 높았으며 1g/L에서 3.04mg으로 가장 높았다. 이와 같이 잎의 당함량과는 반대로 뿌리의 sucrose 함량은 단당류인 glucose와 fructose 보다 낮았다. 이것은 뿌리가 잎에서 합성한 당을 이용하는 기관이라는 것을 나타낸다고 볼 수 있다.

표 12. 온도와 시비가 호접란 뿌리의 당함량에 미치는 영향.

Temp. (°C)	Fertilizer ^z rate (g.L ⁻¹)	Sucrose (mg)	Glucose (mg)	Fructose (mg)	Total (mg)
20	0.33	0.14 a ^y	0.50 abc	0.60 bc	1.24
	0.50	0.06 a	0.48 abc	0.52 c	1.06
	1.00	0.12 a	0.52 abc	0.72 bc	1.36
25	0.33	0.06 a	0.40 abc	1.08 bc	1.54
	0.50	0.20 a	0.98 a	1.16 b	2.34
	1.00	0.16 a	0.76 ab	2.12 a	3.04
30	0.33	0.08 a	0.02 c	0.06 d	0.16
	0.50	0.10 a	0.12 bc	0.24 cd	0.46
	1.00	0.08 a	0.42 abc	0.52 c	1.02
Temperate (T)		**	**	NS	
Fertilizer (F)		NS	NS	NS	
T*F		NS	NS	NS	

^z Peters (N=P=K= 20:20:20)

^y Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test, p<0.05.

NS, *, ** Not significant and significant at P<0.05, 0.01, 0.001.

(4) 전분분석 결과

- 온도와 시비가 잎과 뿌리의 전분함량에 미치는 영향은 표 13과 같다. 잎의 전분함량의 경우 25℃, 1g/L처리에서 86.1mg으로 가장 많았으며 시비량이 감소할수록 전분함량도 감소하였다. 이러한 경향은 20℃와 30℃에서도 동일하였다. 특히 30℃에서 시비량이 제일 적은 0.33mg/L의 경우 잎의 전분함량은 7mg으로 25℃, 1g/L처리의 1/14밖에 되지 않았다.
- 뿌리의 전분함량의 경우도 잎과 마찬가지로 25℃, 1g/L처리에서 가장 많았으며 동일 온도에서는 시비량이 감소할수록 전분함량도 감소하였다.
- 일반적으로 전분은 저장당으로 저장기능이 있는 뿌리의 전분함량이 잎보다 많다. 그러나 본 실험의 결과 호접란의 경우 뿌리보다 오히려 잎에서 전분함량이 많았다. 이는 호접란의 잎은 광합성 기관으로서의 기능 뿐만 아니라 저장기관으로서의 기능도 함께 가지고 있기 때문으로 생각되었다.
- 이와 같이 생장량의 결과와 함께 25℃, 1g/L처리에서 당과 전분함량도 높은 것으로 보아 그 조건에서 호접란 묘의 광합성이 가장 높고 그 결과 생장이 제일 왕성한 것으로 판단되었다. 따라서 호접란 묘의 관리에는 25℃와 1g/L의 시비가 적당한 것으로 판단되었다.

표 13. 온도와 시비가 호접란 잎과 뿌리의 전분함량에 미치는 영향.

Temp. (°C)	Fertilizer ^z rate(g.L ⁻¹)	Leaf (mg)	Root (mg)	Total (mg)
20	0.33	26.6 e ^y	33.8 d	60.4
	0.50	41.4 d	45.6 c	87.0
	1.00	57.0 c	49.3 b	106.3
25	0.33	56.5 c	56.6 a	113.1
	0.50	63.3 b	46.9 c	110.2
	1.00	86.1 a	57.0 a	143.1
30	0.33	7.0 g	3.4 f	10.4
	0.50	25.1 e	9.4 e	34.5
	1.00	43.2 d	11.4 e	54.6
Temperate (T)		***	***	***
Fertilizer (F)		NS	NS	NS
T*F		NS	NS	NS

^z Peters (N=P=K= 20:20:20)

^y Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test, p<0.05.

NS, *, ***, Not significant and significant at P<0.05, 0.01, 0.001.



그림 12. 온도에 따른 호접란 묘의 성장변화.

마. 개화수명이 긴 호접란 신품종 육성

(1) 강산난원 등록품종

표 14. 등록품종

번호	품종명	출원일	출원번호	등록일	등록번호
1	GS Yellow Green	15. 6. 11	2015-413	17. 7. 8	6268
2	GS Ruby	16. 3. 30	2016-246	17. 6. 21	6760
3	GS Modern Girl	16. 3. 4	2016-194	17. 6. 21	6763

① GS Yellow Green

○ 품종 보호 출원서

접수인원	방식심사인		달	일	심사관
품종 보호 출원서					
출원인	성명 (대표자)	시재환	주민등록번호 (외국인은 국적)		
	주소			지 분	
	법인명칭	강산난원	전화번호		
대리인	성명 (대표자)		주민등록번호		
	주소				
	법인명칭		전화번호		
육성자	성명 (대표자)	시재환	주민등록번호 (외국인은 국적)		
	주소			전화번호	
품종이 속하는 작물의 학명 및 일반명	도리태능시스 Doritaenopsis		품종의 명칭	시예스 벨로우그린 GS Yellow Green	
종자산업법 제27조 제3항의 규정에	출원국명	출원일자	출원번호	출원서류	미첨부
	대한민국				
품종의 특성 설명	별첨				
품종특성검정의 설명	별첨				
종자산업법 제 26조 제1항 및 동법시행규칙 제28조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.					
2015년 6 월 일					
출원인(대리인) 서재환 (인)					
국립종자원장 귀하					
구비서류					수수료
1. 품종보호출원서 부분 1부					38,000원
2. 출원용종의 사진 및 종자서표					
3. 품종보호출원 수수료 납부승인서 1부					
4. 우선권주장 수수료 납부승인서 1부 (우선권을 주장하는 경우에 한한다)					
5. 관리에 관한 지분을 증명하는 서류 1부 (지분이 인정되어 있는 경우에 한한다)					
6. 대리권을 증명하는 서류 1부 (대리인의 경우에 한한다)					



그림 13. GS Yellow Green의 품종보호 출원서 및 개화시의 모습.

○ 육성과정

- 2007년 4월 유통중인 *Phal. Tzu Chiang Glint*(부)와 *Dtps. Sogo Pride* “SOGO F-1016“(모)를 교잡하여 결실된 꼬투리를 2007년 9월에 파종하여 발아된 주들을 2009년 1월에 기외이식을 하였다. 기외이식 하여 2011년 3월에 개화를 시켜 이중 형질발현이 우수한 본종을 1주 선정하여 KS 752-1 계통으로 명명하였다. 본주를 2011년에 바로 화경 배양하여 300주를 증식하였고 2014~2015년 3월부터 6월까지 개화된 종들의 균일성과 안정성을 조사하여 문제가 없는 것을 최종확인 하였다.

○ 품종특성조사표

표 15. 품종특성조사

No.	특성	실측치(cm)	No.	특성	실측치(cm)
1	식물체 크기	18.8	35	측면꽃받침: 주된색	5a
2	잎의 길이	17.5	36	측면꽃받침: 무늬색	n74a
3	잎의 넓이(폭)	6.2	37	꽃잎(petal): 모양	마름모형
4	잎의 모양	좁은도란형	38	꽃잎: 길이	2.4
5	잎: 선단의 모양	둔형	39	꽃잎: 너비	2.3
6	잎: 선단의대칭	대칭	40	꽃잎: 세로축의 만곡	평피기
7	잎: 자세(attitude)	수평	41	꽃잎: 횡단면의 모양	평평
8	잎: 윗면의 색	녹색	42	꽃잎: 꼬임	없다
9	잎: 안토시아닌색소	없음	43	꽃잎: 가장자리 물결모양	없다
10	화서(inflorescence)형태	복총상화서	44	꽃잎: 색의 수	1
11	화서: 길이	13	45	꽃잎: 무늬	단색
12	화서: 화수	9	46	꽃잎: 주된 색	5a
13	화경(peduncle):길이	31	47	농담품종 꽃잎의농담면적	작다
14	화경: 두께	0.3	48	꽃잎: 무늬 색	-
15	화병:안토시아닌의별현유무	없음	49	순판(lip):끝얼편의 길이	1.8
16	꽃: 화형	평피기	50	순판: 끝얼편의 너비	1.4
17	꽃:꽃잎과꽃받침표면의질감	거칠다	51	순판: 수염의 유 무	없다
18	꽃:정면에서 측정한 길이	4.6	52	순판: 수염의 길이	-
19	꽃:정면에서 측정한너비(폭)	4.9	53	순판: 끝 얼편의 모양	마름모형
20	꽃: 꽃잎의 배열	떨어짐	54	순판:끝얼편의 돌기맞춤기	있다
21	꽃: 향기(fragrance)	있다	55	순판: 측얼편의 유형	Ⅲ
22	꽃받침(sepal): 모양	난형	56	순판:측얼편의 만곡형태	I
23	꽃받침: 길이	2.5	57	순판:끝얼편에대한측얼편크기	작다
24	꽃받침: 너비	2.1	58	순판: 끝얼편의 색의수	2
25	꽃받침: 종단면의 만곡	평피기	59	순판:끝얼편의 무늬	농담
26	꽃받침: 횡단면의 모양	평평	60	순판: 끝얼편 주된색	155d
27	꽃받침: 꼬임(twisting)	있다	61	순판: 끝얼편 무늬색	n74
28	꽃받침: 가장자리 물결모양	없다	62	순판: 측얼편의 무늬	반점
29	윗꽃받침: 색의수	1가지	63	순판: 측얼편의 주된색	155d
30	윗꽃받침: 무늬	단색	64	순판: 측얼편의 무늬색	n74
31	윗꽃받침: 주된색	5a	65	순판: 캘러스(callus)	두드러짐
32	윗꽃받침: 무늬색	-	66	순판: 연모(유모)	없다
33	측면꽃받침: 색의수	2	67	꽃술대(column):끝의색	155d
34	측면꽃받침: 무늬	반점			

○ 품종 특성기술서

1. 종(種) 및 학명 : *Doritaenopsis spp.*

2. 품종명 : GS Yellow Green(지에스 옐로우 그린)

3. 식물체의 주요 형태적 특성

- 식물체 크기는 18.8cm, 잎 길이는 17.5cm, 잎 너비는 6.2cm 정도에 좁은도란형임
 - 잎 선단은 둔형에 대칭이며 자세는 수평이고 윗면은 녹색임
 - 잎 안토시아닌은 없으며 복총상화서에 화서길이는 13cm, 화수는 9개 정도임
 - 화경길이는 31cm 두께는 0.3cm 정도에 평피기이며 꽃잎과 꽃받침 표면은 거칠다
 - 꽃잎의 배열은 떨어지고 향기가 있으며 꽃받침은 난형에 길이는 2.5cm, 너비는 2.1cm 정도임
 - 꽃받침 종단면의 만곡은 평피기에 횡단면은 평평하며 측면꽃받침은 농담임
 - 꽃잎의 색은 5a 이고 꽃잎은 마름모형임
 - 꽃잎 세로축의 만곡은 평피기에 횡단면은 평평하며 순판 끝열편은 마름모형임
 - 순판측열편의 무늬는 반점으로 주된색은 155d, 무늬색은 n74 이고 꽃술대 끝의 색은 155d임
-

4. 출원품종이 대조품종과 구별되는 특성(Sogo Pride)

- 식물체 크기가 출원품종은 18.8cm이나 대조품종은 22.8cm로 대조품종이 더 큼
 - 잎의 자세는 수평에 복총상화서이나 대조품종은 반직립에 총상화서임
 - 화서 길이는 13cm 정도에 화수는 9송이 이나 대조품종의 9cm에 7송이임
 - 출원품종의 꽃잎의 주된색은 5a 이나 대조품종은 8b로 출원품종이 더 진함
 - 출원품종의 순판 끝 열편의 모양은 마름모형이고 대조품종은 타원형임
-

5. 출원품종의 균일성과 안정성을 기술(대조품종 포함)

- 2014년 3월과 11월에 최종 개화주 300주에 대해 균일성과 안정성에 대해 조사한 결과 문제점이 없었음
-

6. 품종구별에 도움이 되는 추가정보 및 재배상 유의사항

- 특기사항 없음.
-

7. 품종육성에 관한 정보

7.1 위 품종은 유전적 변형기술을 이용하여 육성된 품종(GMO)입니까?

예(), 아니오(o)

7.2 유전적 변형기술에 의한 품종(GMO)인 경우 유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률(제정 2001.3.28 법률 제 6448호, 산업자원부)에 따라 분야별 농림부 장관이 고시한 “유전자변형농산물의 환경위해성평가심사지침(농림부고시 제2002-2호)”에 따라 안전성을 평가하고 그 결과를 첨부하였습니까?

예(), 아니오(o)

7.3 관련규정에 의해 실험을 실시한 경우 안전성 결과를 첨부하였습니까?

예(), 아니오(o)

※ 질문 3에서 아니오에 해당되는 경우 안전성 결과가 제출되기 전에는 다음의 절차가 진행되지 않습니다.

가. 품종의 심사(품종보호출원품종의 경우)

나. 품종생산·수입·판매신고필증의 교부(품종생산·수입·판매 신고품종의 경우)

② GS Ruby의 출원내역

○ 품종보호 출원서


접수인원			발식심사관	담당	심사관
품종보호출원서					
출원인	성명 (대표자)	서재환	주민등록번호 (외국인은 국적)		
	주소			지 분	
	법인명칭	강산난원	전화번호		
대리인	성명 (대표자)		주민등록번호		
	주소			지 분	
	법인명칭		전화번호		
육성자	성명 (대표자)	서재환	주민등록번호 (외국인은 국적)		
	주소			지 분	
	법인명칭		전화번호		
품종이 속하는 작물의 학명 및 일반명	도리태농시스 Doritaenopsis		품종의 명칭	지메스 루비 GS Ruby	
종자산업법 제27조 제3항의 규정에	출원국명	출원일자	출원번호	증명서류 첨부 미첨부	
품종의 특성 설명	별첨				
품종특징과정의 설명	별첨				
종자산업법 제 26조 제1항 및 동법시행규칙 제28조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.					
2016년 3월 일					
출원인(대리인) 서재환 					
국립종자원장 귀하					
구비서류				수수료	
1. 품종보호출원서 부분 1부				38,000원	
2. 출원품종의 사진 및 종자시료					
3. 품종보호출원 수수료 납부증명서 1부					
4. 우선권주장 수수료 납부증명서 1부 (우선권을 주장하는 경우에 한한다)					
5. 권리에 관한 지분을 증명하는 서류 1부 (지분이 약정되어 있는 경우에 한한다)					
6. 대리권을 증명하는 서류 1부 (대리인의 경우에 한한다)					



그림 14, GS Ruby의 품종보호출원서 및 개화시의 모습.

○ 육성과정

- 2009년 3월 강산난원의 육종등록품종인 *Phal.* KS Little Gem(부)과 (*Dtps.* Sunrise Star X *Phal.* Dragon Tree Eagle)(모)를 교잡하여 결실된 꼬투리를 2009년 9월에 파종하여 발아된 주들을 2010년 10월에 기외이식을 하였다. 기외이식 하여 2012년 3월에 개화를 시켜 이중형질발현이 우수한 본종을 1주 선정하여 KS 1076-17 계통으로 명명하였다. 본주를 2012년에 바로 화경 배양하여 200주를 증식하였고 2015년12월-2016년 3월까지 개화된 종들의 균일성과 안정성을 조사하여 문제가 없는 것을 최종확인 하였다.

○ 품종 특성기술서

1. 종(種) 및 학명 : *Doritaenopsis spp.*

2. 품종명 : GS Ruby(지에스 루비)

3. 식물체의 주요 형태적 특성

- 식물체 크기는 21cm, 잎 길이는 15.2cm, 잎 너비는 6.5cm정도에 잎은 중간 가늘고 김
 - 잎 끝부분은 뾰족한 모양에 중간정도 비대칭이며 잎 자세는 반직립 이고 윗면은 녹색임
 - 잎 안토시아닌은 없으며 총상꽃차례에 꽃차례길이는16cm, 화수는 10개 정도임
 - 화경길이는 21cm 두께는 0.4cm정도에 안토시아닌은 없다
 - 꽃의 정면에서의 길이는 5.1cm 이고 너비는 6cm 에 배열은 떨어짐
 - 꽃잎과 꽃받침의 바탕색은 178d이고 줄무늬가 많으며 향기는 없음
 - 순판 끝열편의 길이는 1.8cm에 너비는 1.4cm이고 수염은 없으며 끝열편의 모양은 타원형임
 - 끝열편의 바탕색은 60a 이고 이차색은 n78a임
 - 순판 캘러스는 중간 올라옴이고 캘러스의 색은 21a임
-

4. 출원품종이 대조품종과 구별되는 특성(KS Little Gem)

- 식물체 크기가 출원품종은 21cm이나 대조품종은 18cm로 출원품종이 더 큼
 - 꽃의 수는 출원품종이 10송이 대조품종이 14송이로 대조품종이 더 많음
 - 출원의 꽃잎의 주된색은178d이고 대조품종은 n78b 임
 - 출원품종은 줄무늬색이 185a 이고 대조품종은 n78a 임
 - 끝열편의 바탕색은 60a에 2차색은 n78a 이나 대조품종은 59a에 72a임
-

5. 출원품종의 균일성과 안정성을 기술(대조품종 포함)

- 2015년 12월부터 2016년 3월까지 최종 개화주 200주에 대해 균일성과 안정성에 대해 조사한 결과 문제점이 없었음
-

6. 품종구별에 도움이 되는 추가정보 및 재배상 유의사항

- 특기사항 없음.
-

7. 품종육성에 관한 정보

7.1 위 품종은 유전적 변형기술을 이용하여 육성된 품종(GMO)입니까?

예(), 아니오(o)

7.2 유전적변형기술에 의한 품종(GMO)인 경우 유전자변형생물체의국가간이동등에관한법률(제정 2001.3.28 법률 제6448호, 산업자원부)에 따라 분야별 농림부 장관이 고시한 “유전자변형농산물 의환경위해성평가심사지침(농림부고시 제2002-2호)” 에 따라 안전성을 평가하고 그 결과를 첨부 하였습니까?

예(), 아니오(o)

7.3 관련규정에 의해 실험을 실시한 경우 안전성 결과를 첨부하였습니까?

예(), 아니오(o)

※ 질문 3에서 아니오에 해당되는 경우 안전성 결과가 제출되기 전에는 다음의 절차가 진행되지 않습니다.

가. 품종의 심사(품종보호출원품종의 경우)

나. 품종생산·수입·판매신고필증의 교부(품종생산·수입·판매 신고품종의 경우)

③ GS Modern Girl의 출원내역

○ 품종 보호 출원서


접수인원				방식심사관	달 달	심사관
품종보호출원서						
출원인	성명 (대표자)	서재환			주인등록번호 (외국인은 국적)	
	주소				지 분	
	법인명칭	강산년월			전화번호	
대리인	성명 (대표자)				주인등록번호	
	주소					
	법인명칭				전화번호	
육성자	성명 (대표자)	서재환			주인등록번호 (외국인은 국적)	
	주소				전화번호	
품종이 속하는 작물의 학명 및 일반명		팔레놉시스 Phalaenopsis		품종의 명칭	지에스 모던걸 GS Modern Girl	
종자산업법 제27조 제3항의 규정에 대한민국	출원국명	출원일자	출원번호	증명서류 첨부 미첨부		
	대한민국					
품종의 특성 설명 별첨						
품종육성과정의 설명		별첨				
종자산업법 제 26조 제1항 및 동법시행규칙 제28조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.						
2016년03월 일						
출원인(대리인) 서재환 						
국립종자원장 귀하						
구비서류 1. 품종보호출원서 부분 1부 2. 출원품종의 사진 및 종자시료 3. 출원품종의 사진 및 종자시료 4. 우선권주장 수수료 납부증명서 1부 (우선권을 주장하는 경우에 한한다) 5. 권리에 관한 지분을 증명하는 서류 1부 (지분이 약정되어 있는 경우에 한한다) 6. 대리권을 증명하는 서류 1부 (대리인의 경우에 한한다)				수수료 38,000원		



그림 15. GS Modern Girl의 품종보호출원서 및 개화시의 모습.

○ 육성과정

- 2008년 4월 유통중인 *Phal.* Little Gem Stripes(부)와 *Phal.* Sogo Ray(모)를 교잡하여 결실된 꼬투리를 2008년 9월에 파종하여 발아된 주들을 2010년 6월에 기외이식을 하였다. 기외이식 하여 2012년 3월에 개화를 시켜 이중 형질발현이 우수한 본종을 1주 선정하여 KS 770-1 계통으로 명명하였다. 본주를 2012년에 바로 화경 배양하여 300주를 증식하였고 2014~2015년 3월부터 6월까지 개화된 종들의 균일성과 안정성을 조사하여 문제가 없는 것을 최종확인 하였다.

○ 품종 특성기술서

1. 종(種) 및 학명 : *Phalaenopsis spp.*

2. 품종명 : GS Modern Girl(지에스 모던걸)

3. 식물체의 주요 형태적 특성

- 식물체 크기는 24cm, 잎 길이는 18.5cm, 잎 너비는 7cm 정도에 잎은 중간 가늘고 김
 - 잎 끝부분의 모양은 둔형에 대칭이며 잎 자세는 반직립 이고 윗면은 녹색임
 - 잎 안토시아닌은 없으며 총상화서에 꽃차례길이는 27cm, 화수는 19개 정도임
 - 화경길이는 56cm 두께는 0.5cm 정도에 안토시아닌은 없다
 - 꽃의 정면에서의 길이는 5.2cm 이고 너비는 6.5cm 에 배열은 떨어짐
 - 꽃잎과 꽃받침의 바탕색은 155d이고 2차색은 n74c 임
 - 순판 끝열편의 길이는 1.7cm에 너비는 2cm이고 수염의 길이는 1.1cm 이고 끝열편의 모양은 삼각형임
 - 끝열편의 바탕색은 n74c 이고 이차색은 n74d임
 - 순판 켈러스는 강하게 올라옴이고 켈러스의 색은 13a임
-

4. 출원품종이 대조품종과 구별되는 특성(Sogo Ray)

- 식물체 크기가 출원품종은 24cm이나 대조품종은 19cm로 출원품종이 더 큼
 - 꽃의 크기는 출원은 5.2cm에 6.5cm이나 대조는 5.1cm에 5.6cm로 출원이 더 큼
 - 화수는 출원품종이 19송이이고 대조품종은 9송이로 출원품종이 더 많음
 - 출원과 대조품종의 꽃잎의 주된 색은 155d이고 2차색은 n74c로 출원품종만 있음
 - 끝열편의 바탕색은 n74c에 2차색은 n74a 이나 대조품종은 n78b에 13b임
-

5. 출원품종의 균일성과 안정성을 기술(대조품종 포함)

- 2014년 3월과 2015년 3월에 최종 개화주 300주에 대해 균일성과 안정성에 대해 조사한 결과 문제점이 없었음
-

6. 품종구별에 도움이 되는 추가정보 및 재배상 유의사항

- 특기사항 없음.
-

7. 품종육성에 관한 정보

7.1 위 품종은 유전적 변형기술을 이용하여 육성된 품종(GMO)입니까?

예(), 아니오(o)

7.2 유전적 변형기술에 의한 품종(GMO)인 경우 유전자 변형 생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률(제정

2001.3.28 법률 제6448호, 산업자원부)에 따라 분야별 농림부 장관이 고시한

“유전자 변형 농산물의 환경위해성 평가 심사 지침(농림부고시 제2002-2호)”에 따라 안전성을

평가하고 그 결과를 첨부하였습니까?

예(), 아니오(o)

7.3 관련 규정에 의해 실험을 실시한 경우 안전성 결과를 첨부하였습니까?

예(), 아니오(o)

※ 질문 3에서 아니오에 해당되는 경우 안전성 결과가 제출되기 전에는 다음의 절차가 진행되지 않습니다.

가. 품종의 심사 (품종보호출원품종의 경우)

나. 품종생산·수입·판매 신고필증의 교부(품종생산·수입·판매 신고품종의 경우)

(2) 강산난원 출원 품종

표 15. 출원품종 .

품종명	출원일	출원번호
GS Gold Star	17. 2. 15	2017-96
GS Spring Dance	17. 2. 15	2017-97

① GS Gold Star의 출원내역

○ 품종보호출원서


접수인원	발식심사관		담당	실사관
품종보호출원서				
출원인	성명 (대표자)	서재환	주민등록번호 (외국인은 국적)	
	주소		지 분	
	법인명칭	강산난원	전화번호	
대리인	성명 (대표자)		주민등록번호	
	주소			
	법인명칭		전화번호	
육성자	성명 (대표자)	서재환	주민등록번호 (외국인은 국적)	
	주소		전화번호	
	육성지			
품종이 속하는 작물의 학명 및 일반명	Phalaenopsis		품종의 명칭	지애스 골드스타 GS Gold Star
종자산업법 제27조 제3항의 규정에	출원국명	출원일자	출원번호	증명서류 첨부 미첨부
품종의 특성 설명	별첨			
품종특성과정의 설명	별첨			
종자산업법 제 26조 제1항 및 동법시행규칙 제28조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.				
2017년2월 일				
출원인(대리인) 서재환 				
국립종자원장 귀하				
구비서류 1. 품종보호출원서 부분 1부 2. 출원물종의 사진 및 종자시료 3. 품종보호출원 수수료 납부증명서 1부 4. 우선권주장 수수료 납부증명서 1부 (우선권을 주장하는 경우에 한한다) 5. 권리에 관한 지분을 증명하는 서류 1부 (지분이 약정되어 있는 경우에 한한다) 6. 대리권을 증명하는 서류 1부 (대리인의 경우에 한한다)				수수료 38,000원



그림 16. GS Gold Star의 품종보호출원서 및 개화시의 모습.

○ 육성과정

- 2007년 5월 유통중인 *Phal. Sogo Pride*(부)와 *Phal. Brother Sara Gold*(모)를 교잡하여 결실된 꼬투리를 2007년 10월에 파종하여 발아된 주들을 2009년 3월에 기외이식을 하였다. 기외이식 하여 2011년 3월에 개화를 시켜 이중 형질발현이 우수한 본종을 1주 선정하여 KS 761-51 계통으로 명명하였다. 본주를 2012년에 바로 화경 배양하여 200주를 증식하였고 2015년 9월부터 익년가을까지 개화된 종들의 균일성과 안정성을 조사하여 문제가 없는 것을 최종확인 하였다.

○ 품종 특성기술서

1. 종(種) 및 학명 : *Phalaenopsis spp.*

2. 품종명 : GS Gold Star(지에스 골드 스타)

3. 식물체의 주요 형태적 특성

- 식물체 길이는 27cm, 잎 길이는 14cm, 잎 너비는 7.5cm 정도에 꽃대는 2대임
 - 잎 끝부분의 모양은 뾰족하고 대칭이며 자세는 반직립이고 윗면은 연한녹색임
 - 잎 안토시아닌은 없으며 총상화서에 꽃차례길이는 18.5cm, 화수는 10개 정도임
 - 화경길이는 28.3cm 두께는 0.3cm 정도임
 - 꽃정면의 배열은 떨어지고 향기가 있으며 꽃정면의 길이는 5.4cm, 너비는 5.3cm 정도임
 - 꽃잎의 색은 9b 이고 2차색은 155d 임
 - 순판끝열편의 길이는 1.5cm이고 너비는 1.3cm에 순판끝열편의 모양은 마름모형임
 - 꽃잎 세로축의 만곡은 평피기에 횡단면은 평평하며 순판 끝열편은 마름모형임
 - 끝열편의 바탕색은 155d 이고 끝열편의 2차색은 186d임
-

4. 출원품종이 대조품종과 구별되는 특성(Sogo Gotris)

- 식물체 길이가 출원품종은 27cm이나 대조품종은 22cm로 대조품종이 더 작음
 - 윗면의 주요색은 출원품종은 연한녹색이나 대조품종은 녹색임
 - 꽃차례의 길이는 출원품종은 18.5cm이나 대조품종은 21cm로 대조품종이 더 김
 - 출원품종의 꽃잎바탕색은 9b이나 대조품종은 8b임
 - 출원품종의 꽃잎 2차색은 155d이나 대조품종은 79b 임
-

5. 출원품종의 균일성과 안정성을 기술(대조품종 포함)

- 2016년 3월과 11월에 최종 개화주 300주에 대해 균일성과 안정성에 대해 조사한 결과 문제점이 없었음
-

6. 품종구분에 도움이 되는 추가정보 및 재배상 유의사항

- 특기사항 없음.
-

7. 품종육성에 관한 정보

7.1 위 품종은 유전적 변형기술을 이용하여 육성된 품종(GMO)입니까?

예(), 아니오(o)

7.2 유전적 변형기술에 의한 품종(GMO)인 경우 유전자 변형 생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률(제정

2001.3.28 법률 제6448호, 산업자원부)에 따라 분야별 농림부 장관이 고시한

“유전자 변형 농산물의 환경위해성 평가 심사 지침(농림부고시 제2002-2호)”에 따라 안전성을

평가하고 그 결과를 첨부하였습니까?

예(), 아니오(o)

7.3 관련 규정에 의해 실험을 실시한 경우 안전성 결과를 첨부하였습니까?

예(), 아니오(o)

※ 질문 3에서 아니오에 해당되는 경우 안전성 결과가 제출되기 전에는 다음의 절차가 진행되지 않습니다.

가. 품종의 심사(품종보호출원품종의 경우)

나. 품종 생산·수입·판매 신고필증의 교부(품종 생산·수입·판매 신고품종의 경우)

② GS Spring Dance의 출원내역

○ 품종보호 출원서


필수인원	방식심사관		담당	심사관
품종보호출원서				
출원인	성명 (대표자)	서재한	주민등록번호 (외국인은 국적)	
	주소		지 분	
	법인명칭	강산난원	전화번호	
대리인	성명 (대표자)		주민등록번호	
	주소			
	법인명칭		전화번호	
육성자	성명 (대표자)	서재한	주민등록번호 (외국인은 국적)	
	주소		전화번호	
품종이 속하는 작물의 학명 및 일반명	팔레놉시스 Phalaenopsis	품종의 명칭	지애스 스프링 댄서 GS Spring Dancer	
종자산업법 제27조 제3항의 규정에	출원국명	출원일자	출원번호	증명서류 첨부 미첨부
	대한민국			
품종의 특성 설명	별첨			
품종특성과정의 설명	별첨			
종자산업법 제 26조 제1항 및 동법시행규칙 제28조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.				
2017년2월 일				
출원인(대리인) 서재한 				
국립종자원장 귀하				
구비서류				수수료
1. 품종보호출원서 부분 1부				38,000원
2. 출원품종의 사진 및 종자시료				
3. 품종보호출원 수수료 납부증명서 1부				
4. 우선권주장 수수료 납부증명서 1부 (우선권을 주장하는 경우에 한한다)				
5. 권리에 관한 지분을 증명하는 서류 1부 (지분이 약정되어 있는 경우에 한한다)				
6. 대리권을 증명하는 서류 1부 (대리인의 경우에 한한다)				



그림 17. GS Spring Dance의 품종보호출원서 및 개화시의 모습.

○ 육성과정

- 2008년 3월 유통중인 *Phal. Brother Little Hatter*(부)와 *Phal. Brother Spring Dancer*(모)를 교잡하여 결실된 꼬투리를 2008년 9월에 파종하여 발아된 주들을 2010년 5월에 기외이식을 하였다. 기외이식 하여 2012년 3월에 개화를 시켜 이중 형질발현이 우수한 본종을 1주 선정하여 KS 1008-1 계통으로 명명하였다. 본주를 2012년에 바로 화경 배양하여 300주를 증식하였고 2016년 9월부터 개화된 종들의 균일성과 안정성을 조사하여 문제가 없는 것을 최종확인 하였다.

○ 품종 특성기술서

1. 종(種) 및 학명 : *Phalaenopsis spp.*

2. 품종명 : GS Spring Dancer(지에스 스프링 댄서)

3. 식물체의 주요 형태적 특성

- 식물체 길이는 24cm, 잎 길이는 9.2cm, 잎 너비는 4.5cm 정도에 꽃대는 1대임
 - 잎 끝부분의 모양은 뾰족하고 대칭이며 자세는 반직립이고 윗면은 연한녹색임
 - 잎 안토시아닌은 없으며 복층상화서에 꽃차례길이는 짧고 화수는 14개 정도임
 - 화경길이는 28.7cm 두께는 0.26cm 정도임
 - 꽃정면의 배열은 떨어지고 향기가 없으며 꽃정면의 길이는 3.9cm, 너비는 3.7cm 정도임
 - 꽃잎의 색은 155d 이고 2차색은 n78a 임
 - 순판끝열편의 길이는 1.8cm이고 너비는 1.2cm에 순판끝열편의 모양은 삼각형임
 - 꽃잎 세로축의 휘어짐은 안으로 굽은에 꽃잎 가로 자른면의 모양은 오목함
 - 끝열편의 바탕색은 n78a 이고 끝열편의 2차색은 162c 임
-

4. 출원품종이 대조품종과 구별되는 특성(Pink Girl)

- 식물체 길이가 출원품종은 24cm이나 대조품종은 31cm로 출원품종이 더 작음
 - 잎윗면의 주요색은 출원품종은 연한녹색이나 대조품종은 진한녹색임
 - 화경의 길이는 출원품종은 27.8cm이고 대조품종은 20.1cm으로 출원품종이 더 길
 - 출원품종의 꽃잎 2차색은 n78a이나 대조품종은 n80c 임
 - 출원품종의 끝열편의 길이는 1.8cm이나 대조품종은 1.3cm 임
 - 순판 끝열편의 모양은 출원품종은 삼각형이나 대조품종은 원형임
-

5. 출원품종의 균일성과 안정성을 기술(대조품종 포함)

- 2016년 3월과 11월에 최종 개화주 300주에 대해 균일성과 안정성에 대해 조사한 결과 문제점이 없었음
-

6. 품종구별에 도움이 되는 추가정보 및 재배상 유의사항

- 특기사항 없음.
-

7. 품종육성에 관한 정보

7.1 위 품종은 유전적 변형기술을 이용하여 육성된 품종(GMO)입니까?

예(), 아니오(o)

7.2 유전적 변형기술에 의한 품종(GMO)인 경우 유전자 변형 생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률(제정 2001.3.28 법률 제 6448호, 산업자원부)에 따라 분야별 농림부 장관이 고시한 “유전자 변형 농산물 의 환경위해성 평가 심사 지침(농림부 고시 제 2002-2호)”에 따라 안전성을 평가하고 그 결과를 첨부 하였습니다습니까?

예(), 아니오(o)

7.3 관련 규정에 의해 실험을 실시한 경우 안전성 결과를 첨부 하였습니다습니까?

예(), 아니오(o)

※ 질문 3에서 아니오에 해당되는 경우 안전성 결과가 제출되기 전에는 다음의 절차가 진행되지 않습니다.

가. 품종의 심사(품종보호출원품종의 경우)

나. 품종 생산·수입·판매 신고필증의 교부(품종 생산·수입·판매 신고품종의 경우)

바. 개발된 신제품의 국내외 적응력 및 시장개척 프로토콜 개발

(1) 국내 난 시장 및 유통분석

(가) 국내 난 시장 현황 및 판매전략

- 현재 국내시장의 호접란유통은 대부분 생산자 -경매장 -중도매인 -화원 -소비자의 순으로 이루어지고 있다.
- 국내의 경매장은 한국화훼농협(본점, 음성, 대전), at화훼공판장(양재), 농협부산훼공판장, 부경훼공판장, 광주훼공판장 등이 있으며 국내연간 묘의 수입수량은 약 800만본 - 900만본으로 추산되고 있다.
- 부정청탁금지법 시행 이후 화훼소비의 급감으로 현재의 유통시스템의 개선책이 절실한 실정이다.
- 국내판매전략은 기존유통시장은 그대로 존속시키며 새로운 수요를 창출하여 새로운 시장을 형성해야 할 것으로 판단된다.
- 즉 기존유통조직은 선물용을 위주로 한 시장이다.
새로운 시장은 저가 대량 소비시장으로 다음과 같다.
 - 전략소비대상 : 일반가정용 및 사무실 테이블용 등
 - 전략품종 : 미니와 초미니 품종 개발
 - 가격대 : 누구나 손쉽게 구입할 수 있는 가격으로 1만원대 이하로 예상한다.
 - 판매처 : 각종 슈퍼마켓 및 백화점 등
 - 판매방법 : 생산자 직접납품 및 직판장 운영
- 이를 위해 생산자는 생산가를 절감해야 하며 품종도 가정용과 테이블에 맞는 미니계통 육성과 품질도 소비자가 선호할 수 있는 다양하고 컬러플한 상품 및 안전한 수송을 위한 포장개발이 필요할 것으로 생각된다.



그림 18. 미니 호접란



초미니 호접란



(나) 국내 난 농장 연계 생산 및 판매현황

- 2014년부터 강산난원이 개발한 핑크계통으로 개화수명이 긴 KS Little Gem 품종(2011년도 난대상 수상)을 국내의 호접란 재배농장인 충무 허경식, 서산음성 윤동규(펜 오키드), 일산 윤호철(해지난원), 김해 김병중(선난원)에게 매년 묘종 1,500본(1.7인치 포트)을 본당 1,500원에 공급하여, 시험재배 및 릴레이생산을 하고 있다. 이들 호접란 재배농장에서 KS Little Gem은 문제없이 잘 재배되고 있으며 시험재배는 성공적으로 진행되고 있다.
- 현재 연계생산으로 생산된 상품은 서울, 부산 등의 경매시장을 통해 판매되고 있으며 시장반응은 매우 긍정적이며 품질면에서도 외국 품종과 비교하여 손색이 없을 정도로 호평을 받고 있다.
- 인지도 부족으로 아직까지 대량소비는 이루어지지 않고 있으나 신품종의 보급특성상 매년 꾸준하게 시장에 공급이 되어 인지도를 높여 간다면 생산과 소비가 지속적으로 증가될 것으로 판단된다.
- 또한 생산단계별로 전문화된 생산체계, 즉 배양실의 플라스틱묘 생산부터 기외이식, 육묘, 개화주까지 재배 그리고 냉방실에서의 개화주 상품생산과 출하 등의 각 단계별로 가장 경제적이고 효율적인 릴레이생산을 하고 있으며 이를 통하여 생산비절감과 고품질의 상품을 생산 보급함으로써 생산확대 뿐만 아니라 소비확산으로 생산자의 소득을 향상시킬 수 있을 것으로 생각된다.

(2) 해외시장 개척

(가) 미국시장 현황

- 미국 Florida주 Orlando 근교의 양란 생산업체 중 호접란 생산업체의 생산형태는 대부분이 대만에서 수입한 묘종을 키워 현지 시장에 판매하고 있다.

- 수입요종의 품종은 다양하며 규격은 flask묘, 1,7 “묘, 개화주로 각 생산업체의 형편에 맞게 선택되고 있으나 점차 개화주 수입의 비중이 증가하고 있다.
- 그 이유는 품질면에서 미국 자체 생산묘와 수입묘를 비교했을 때 수입묘가 좋기 때문이다. 이는 공급국인 대만의 시설과 전문화된 기술로 대량생산한 결과로 판단된다.
- 수입이 증가되고 있는 개화주의 경우는 컨테이너 단위로 수송하여 보통 4개월 정도 냉방실에서 꽃대를 올려 중도매인 및 소매인에게 판매하고 있다.
- 한국인 생산업체의 경우 연간 약 80만주를 판매하고 있는 경우도 있다.
- flask묘와 1,7 “소묘는 항공으로 수송되고 개화주는 선편으로 운송된다.
- 한국인 생산업체는 KORUS CO,LTD를 비롯하여 AK NERSERY INC., NAM’S ORCHIDS INC., DIEFF PLACE ORCHIDS, BJ ORCHID, SOON ORCHID, KANG’S NERSERY INC., ARIRANG ORCHID, FIRST ORCHID NERSERY INC., WORLD ORCHIDS, FATHER N SON ORCHIDS 등이 있으며 이들을 방문하였다.
- 미국 진출시에는 한국인 생산업체의 도움을 받는 것이 필요하다고 판단된다.
- 대형화훼유통업체인 COST FARMS 및 도소매업체를 만나 미국의 호접란 소비트렌드와 강산난원 개발품종의 미국시장 진출 가능성을 타진하였고 긍정적인 답변을 받았다.
- 미국동부의 소비트렌드는 대형(화경10cm이상) 위주이며 그 다음으로 중형(화경 7~9cm), 소형(화경 7cm이하)의 순으로 판매가 이루어지고 있다. 비율은 대:중:소가 50%:35%:15%로 소비되며 화색은 다민족으로 구성된 미국의 인구특성상 백색, 황색, 적색 및 혼합색을 비롯하여 다양한 칼라가 소비되고 있는 것으로 파악된다.
- 미국시장의 진출전략은 중대형위주로 추진되어야하며 다민족의 각기취향에 맞게 다양한 크기와 화색이 요구된다.
- 상품의 품질은 중정도이며 자체생산보다 가격이 비교적 저렴한 수입묘로 생산 연중판매가 이루어지고 있다.
- 따라서 가격적인면도 고가보다는 저가대량소비가 유리할 것으로 판단된다.
- 강산난원 육성품종 시장진출 가능성은 긍정적이며 진출방법은 초기에는 시간이 소요되더라도 현지 시험생산 후 판매경과를 보며 점진적으로 추진되어야 할 것으로 생각된다.
- 또한 미국 시장기호에 맞는 중대형 출시를 서둘러야 될 것으로 판단된다.
- 아울러 무한국제경쟁에서 선점할 수 있는 마케팅방법 즉 미국현지 생산 직접 납품 등의 연구가 필요하다.



미국농장



미국 현지 교포 호접란 농장 (교포 농장)



대만산 호접란 수출 포장 BOX



대만산 수입 호접란 온실 이동 작업



미국농장의 개화주의 모습



대만에서 화분채 미국으로 수출함

그림 19. 미국 호접란 재배농장 및 호접란 시장 견학.

(나) 해외 생산기지 조성파 미국수출

- 우리나라 호접란의 해외수출은 국가의 중점사업으로 집중적으로 육성한 대만과 비교하여 시설, 재배기술, 품종 등 모든 면에서 열세이다.
- 특히 미국수출의 경우 대만은 미국과 식물검역협정의 조기타결로 검역이 간소화되어 순조롭게 수출이 되고 있으나 한국의 경우는 미국과의 재배매체수출검역협정의 지연으로 현재까지 미국의 바이어가 요구하는 개화주 규격의 수출은 불가능한 실정이다. 이를 극복하기 위한 방편으로 강산난원은 제3국 우회수출을 시도하기 위하여 2015년에 미국으로 호접란 개화주의 수출이 가능한 대만의 YOUNG HOME ORCHIDS에 강산난원에서 육성한 호접란

의 플라스틱 묘를 위탁생산을 하고 있다.

- 현재 강산난원이 육성한 KS Little Gem 품종을 비롯하여 수종을 생산 중에 있다. 대만의 YOUNG HOME ORCHIDS는 국내외에서 호접란 주문시 즉각 대응할 수 있는 생산기지 역할과 동시에 급변하는 해외정보의 수집 안테나 기능도 할 것으로 기대하고 있다.
- 호접란의 미국수출은 현재 진행 중에 있으며 상기 OEM기지에서 생산한 플라스틱묘를 2016년 12월에 릴레이재배와 수출전문업체인 대만의 KV ORCHID에게 재배를 의뢰하였다. 품종은 강산난원 육성품종인 GS-122와 GS-124로 미국동부의 바이어가 요구하는 개화주 규격(2.8 “-3.5”)을 우선 견본용으로 각각 800주씩 수출키로 약정하고 대금은 지불하였다 (Invoice 참조).
- 미국으로의 수출은 운임 등 경비절감 문제로 선박을 이용하여야하나 선내에서 장기간(20일 내외) 이동에 견딜 수 있는 품종의 수송력시험과 이를 대비한 선적전후의 전처리. 후처리 및 포장 등의 기술적인 문제로 수출전문회사인 대만의 KV ORCHID가 담당한다. 즉 플라스틱묘에서 1.7인치 포트묘까지는 강산난원이, 1.7인치부터 2.8인치 개화주까지는 KV ORCHID가 담당한다.
- 현재 KV ORCHID에서 재배되고 있는 두 품종은 2017년 말경에 미국으로 선적되어 2018년 봄부터 여름시즌에 미국시장에 시험 판매될 예정이다. 우선 시장의 반응을 면밀하게 모니터링해야 하겠지만 외국의 경우 신품종의 론칭은 인기유무와 관계없이 3년 정도는 꾸준히 판매되어 인지도를 확보하는 것이 신품종보급의 일반적인 방법이다.

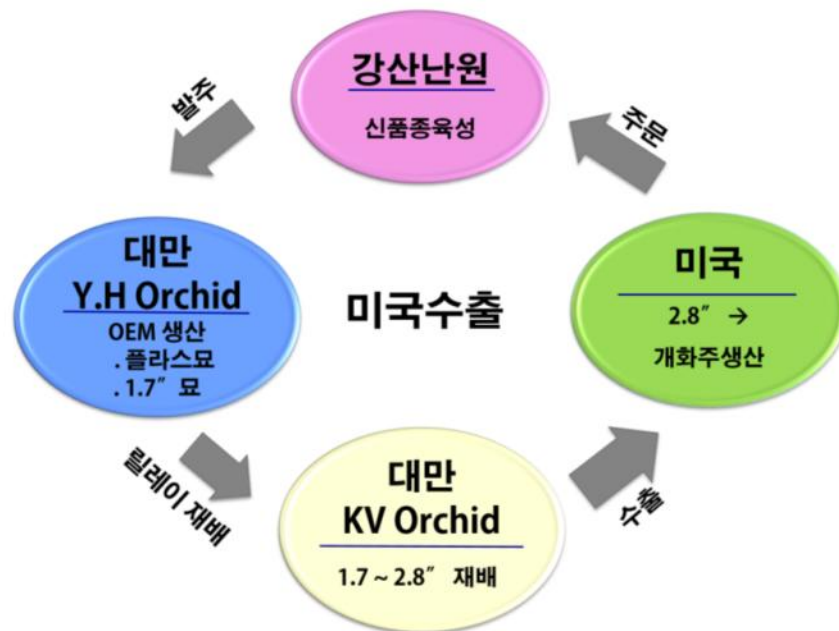


그림 20. 호접란 미국 수출 모식도.



그림 21. 강산난원과 KV Orchid와의 거래내역



Signature	Signature
<p>Korus Orchid Corp 1808 Plymouth-Sorrento RD Apopka FL 32712. President Byung Gu Hwang</p>	<p>Gangsan Orchids 55-38, Daejeo Jangang-ro 71 Beon-gil, Gangseo-gu, Busan, Korea President Jae Hwan Seo</p>
2016-12-2	

그림 22. 강산난원과 Korus Orchid 미국회사와 MOU체결.

사. 호접란 전문가 초청 우량계통 선발

(1) 1차 전문가 초청 우량계통 선발

- 호접란 전문가를 초청하여 우량계통 20개체를 선발하였으며 결과내용은 다음과 같다.

- 행사개요

○ 기 간 : 2016년 2월 23일(화) 14:00~21:00

○ 장 소 : 강산난원

○ 주 최 : 농림수산물기술기획평가원, 농림축산식품부, 경북대학교

○ 주요 행사 및 평가회 구성

· 강산난원 신제품 설명회(참가인원 : 30명)

· 호접란 우량계통 선발

- 주요행사 내용

시 간	주 요 내 용
14:00 ~ 14:30	- 내·외빈 도착 및 등록
14:30 ~ 16:00 [신제품 설명회]	· 사회 : 임기병 교수 · 장소: 강산난원 세미나실 - 내빈소개 - 인사말 (홍영표 회장) - 행사소개 (서재환 대표) - 신제품 설명회 (서재환 대표)
16:00 ~ 18:00 [신제품 평가회]	· 사회 : 서재환 대표 · 장소 : 강산난원 온실 - 품종보호등록·출원된 호접란 소개 - 신제품 소개 - 호접란 우량계통 선발
18:00 ~ 21:00	- 개화수명이 긴 호접란 신제품 회의 (석식)

- 방명록

2016 전문가 초청 호접란 우량계통 선발

2016. 2. 23

연번	소속	성명	사 인
1	경북대학교	박희우	Yes
2	경북대	김종영	Yes
3	한국외대	김민정	Yes
4	강산난원	서영보	Yes
5	강산난원	서재환	Yes
6	경북대	박이원	Yes
7	강산난원	이성길	Yes
8	한국외대	박승돈	Yes
9	대우대	김기성	Yes
10	강산난원	이수진	Yes
11	경북대	박기성	Yes
12	강산난원	서영보	Yes
13	한국외대	오현성	Yes
14	경북대	김우주	Yes
15	"	한희재	Yes

2016 전문가 초청 호접란 우량계통 선발

2016. 2. 23

연번	소속	성명	사 인
16	한국외대	김기재	Yes
17	경북대	오영	Yes
18	한국외대	김진호	Yes
19	"	이후진	Yes
20	"	신봉근	Yes
21	경북대	박태기	Yes
22	경북대	이상성	Yes
23	경북대	이희연	Yes
24	리얼리얼(주)	서동원	Yes
25	" (수령사)	박인재	Yes
26	한국외대	구보연	Yes
27	경북대	홍영표	Yes
28	"	최명자	Yes
29	강산난원	대기영	Yes
30	경북대	임기병	Yes

- 보도자료

□ 제 목 : 호접란 육종 20년 집념의 결실 눈앞! 국산 호접란 신품종 개발박차

□ 부 제 : 강산난원, 전문가 초청 호접란 20개체 선발

□ 내 용 :

경북대학교와 강산난원이 공동으로 추진하고 있는 개화수명이 긴 호접란 신품종 선발대회가 2016년 2월 23일(화) 부산 대저에 위치한 강산난원 육종농장 현장에서 열렸다. 경북대학교와 강산난원은 농림축산식품부 iPET 지원으로 호접란 종주국인 대만의 아성에 도전할 획기적인 신품종 개발에 착수하였다. 올해 3년차인 본 과제는 그동안 결과를 정리하고 새로운 교배를 통하여 선발된 호접란 계통들을 전문가 평가를 받았다.

강산난원은 최근 개발한 개화수명이 긴 호접란 20개체와 2010년 난전시회 대상수상작인 ‘KSLG’ 을 비롯하여 ‘KS Harmony’, ‘KS Vivien’ 등 품종보호등록·출원 24품종을 소개하였다.

이번 평가회에는 난 연구자, 화훼 유통 전문가, 대학 등 30여명의 전문가가 참석해 난 소비 경향과 수출 대상 나라에 적합한 우수 품종을 선발하였다.

강산난원은 1987년에 설립 이후 약 9240m²첨단 시설과 조직배양실을 갖추어 한국과 세계인의 취향에 맞는 호접란을 육종해 왔으며 현재 경북대학교 임기병교수와 수출전략기술개발사업의 일환으로 “개화수명이 긴 호접란 유전분석 및 마커개발” 과제를 수행 중에 있으며 앞으로 개화수명이 긴 호접란 신품종 육성이 기대된다.

화훼 유통 전문가와 대학교의 여러 전문가들은 한국 호접란을 대표하는 우수품종개발에 힘써주기를 당부했다.



(2) 2차 전문가 초청 우량계통 선발

- 호접란 전문평가단 품평회 행사 결과는 다음과 같다.

- 행사개요

○ 일 시 : 2017년 3월 3일(금) 15:00~21:00

○ 장 소 : 강산난원

○ 주 최 : 농림수산물기술기획평가원, 농림축산식품부, 경북대학교

- 주요 행사 및 평가회 구성
 - 강산난원 신제품 품평회
 - 호접란 신제품 및 우량계통 평가
 - 간담회
 - 주요 행사 내용
- 참석인원 (43명)

- 행사내용

시 간	주 요 내 용
14:00~14:30	- 내·외빈 도착 및 등록
14:30~16:00 [신제품 설명회]	사회 : 임기병 교수 장소: 강산난원 세미나실 - 내빈소개 - 인사말 (최상태 교수) - 인사말 (노기태 구청장) - 행사소개 (서재환 대표) - 신제품 설명회 (서재환 대표)
16:00~18:00 [신제품 평가회]	사회 : 서재환 대표 장소 : 강산난원 온실 - 품종보호등록·출원된 호접란 소개 - 호접란 신제품 소개 - 호접란 신제품 및 우량계통 품평회
18:00~21:00	- 개화수명이 긴 호접란 신제품 관련 회의 및 간담회 (석식)

- 방명록

2017 전문가 초청 호접란 신제품 품평회

2017. 3. 3.

연번	소 속	성명	서명
1	천안농공교과실	김 영	
2	대아대 영예연구소	고재철	
3	농협신문	임예향	
4	부산농수산진흥원	황문규	
5	경산농업기술원	김기현	
6	동원생명	김병우	
7	농산농협회	김경목	
8	경남의	최상태	
9	충남대	박민우	
10	귀금속진흥원	최성훈	
11	간사축우회	이병근	
12	간사축우회	김복식	
13	민선원	노현우	
14	국립자연자원연구소	박무익	
15	수출입검역본부	이동우	
16	동아대학교농생명	김민우	
17	농림축산검역본부	김정환	
18	농산진흥원	김성주	
19	경산농협	김희진	

2017 전문가 초청 호접란 신제품 품평회

2017. 3. 3.

연번	소 속	성명	서명
20	강서정농산아	이정성	
21	세종대농원	박기희	
22	강산난원	서재환	
23	경북대	임기병	
24	강산난원	서경보	
25	경북대	박이현	
26	경북대	최유현	
27	경북대	버티꺼	
28	경북대	조명관	
29	강서정농산아	이종우	
30	"	윤인성	
31	강산난원	서명보	
32	강산난원	이유서	
33	경산농협	김정환	
34	농림축산검역본부	김정우	
35	"	이재승	
36	"	신원범	
37	경북대	김희진	
38	강서정농산아	노기태	

2017 전문가 초청 호접란 신제품 품평회

2017. 3. 3.

연번	소 속	성명	서명
39	천안농공교과실	김영	
40	삼육대	김희진	
41	경산농협	김정환	
42	대협	최재호	
43	경북대	김희진	

- 보도자료

□ 제 목 : 강산난원에서 전문가 초청 호접란 신품종 품평회 열려

□ 부 제 : 앞으로 유망한 미니, 미디계통 등 개화수명이 긴 호접란 22계통 선발

□ 내 용 :

2017년 3월 3일 금요일 오후 3시부터 6시까지 농림수산식품기술기획평가원과 농림축산식품부, 경북대학교 주최로 강산난원에서 호접란 신품종 품평회가 개최되었다.

강산난원은 최근 선발한 미니, 미디계통 등 다양한 화색의 개화수명이 긴 호접란 22계통과 2010년 난전시회 대상수상작인 ‘KSLG’ 을 비롯하여 ‘KS Peace’, ‘KS Twinkel’, ‘KS Gem’, ‘KS Beauty’, ‘GS Yellow Vivien’, ‘GS Modern Girl’, ‘GS Yellow Green’ 등 다양한 품종보호등록·출원 품종과 함께 강산난원에서 새롭게 육성 중인 유향종도 함께 소개하였다.

이번 평가회에는 난 연구자, 화훼 유통 전문가, 대학 교수 등 40여명의 전문가가 참석해 난 소비 경향과 수출 대상 국가에 적합한 우수 품종을 선정하였다.

강산난원은 1987년에 설립 이후 약 9,240m²의 첨단 시설과 조직배양실을 갖추어 한국뿐만 아니라 세계적인 취향에 적합한 호접란을 육성하고 있으며 현재 경북대학교 임기병교수와 수출전략기술개발사업의 일환으로 “개화수명이 긴 호접란 유전분석 및 마커개발” 과제를 수행 중에 있다. 개화수명이 120일 이상인 개체는 2013년도 3개체, 2014년도 2개체, 2015년도 49개체로 총 54개체가 선발되었다. 이 중에는 개화수명이 170일이나 되는 개체도 있으며 본 연구 과제를 통해서 개화수명이 긴 호접란 신품종의 육성이 기대된다.

강산난원은 국내외 경기침체와 김영란법 시행으로 인한 매출감소로 경영이 어려운 상황에서도 새로운 트렌드를 만들기 위한 미니, 미디계통, 유향종 등 신품종육성은 물론이고 LED와 다양한 오브제를 결합한 실내장식용 상품 개발과 미국, 일본 해외시장 개척 등으로 위기를 극복하고자 혼신의 노력을 다하고 있다.

화훼 유통 전문가와 대학의 여러 전문가들은 새로운 품종에 대한 평가와 함께 한국 호접란을 대표하는 우수품종개발에 힘써주기를 당부했다.



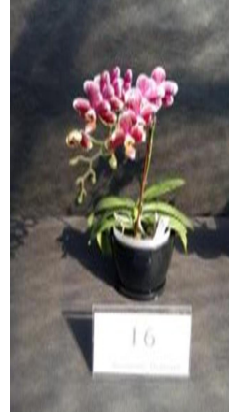
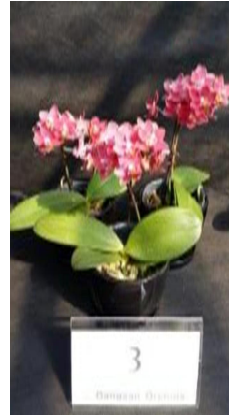
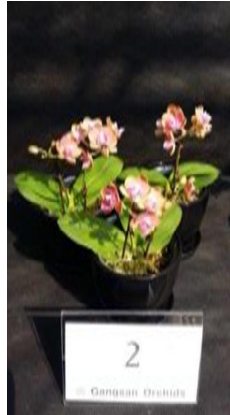


그림 23. 호접란 품평회 모습과 소개된 신품종.

蘭시장 공공...신품종 개발로 '돌파'

2017 전문가 초청 호접란 품평회...22개품 전시

이예람 기자 > 승인 2017.11.08 10:23



정착금지법 시행으로 인해 인사불 선출중심의 호접란 시장이 소비위축 등의 직격타를 맞고 있는 가운데 최근 화제업계는 호접란의 생활형 소비와 수출을 촉진키 위한 자구책을 마련코자 꾸준한 노력을 전개하고 있다.

농림축산식품부, 농림수산식품기술기획평가원, 경북대학교 주최로 지난 3일 부산 대저동 소재의 강산난원에서 마련된 '2017 전문가 초청 호접란 신품종 품평회'에서는 경북대 임기행 교수팀과 강산난원이 공동개발한 생활형 소비와 수출을 촉진할 수 있는 호접란 신품종이 첫 선을 보였다.

이번 품평회에서는 오랫동안 소비자들이 호접란의 꽃을 즐길 수 있도록 개화수명을 연장시킨 품종과 생활형 소비를 높이기 위한 대나무종 등 중 22개종의 호접란을 전시했다. 이 중 노랑배합의 흰 잎의 조화가 일품인 GS Gold Star는 꽃 단면의 두께를 늘림으로써 생육이 견딜수록 낙엽이 떨어지는 노랑색 호접란의 탈색문제를 개선하는 동시에 개화수명을 연장키도 했다.

또한 25인치 포트사이즈의 소형 다화품종인 GS Yellow Green은 테이블장식에 알맞은 콤팩트한 사이즈로 유럽바이어들의 관심을 모으고 있다. 이 품종은 현재 대만(에이전시)를 통해 유럽 수출을 준비하고 있다.

특히 이날 품평회에서는 소주 컵 사이즈인 17인치의 초미니호접란이 공개돼 전문가들의 눈길을 사로잡았다. 최계조 대저농협 조합장과 최성환 (사)한국화훼생산자협의회장은 '손바닥보다 작은 호접란의 개화가 가능하다는 것이 신기하다'며 놀라움을 금치 못했다.

서재환 강산난원 대표는 '기존 35인치 사이즈로 유통되던 호접란을 17인치 사이즈로 줄일 수 있는 기술을 개발해 생육기간을 기존 2년반에서 1년으로 줄이면서 생산단가도 낮출 수 있었다'며 '소비자들이 부담 없는 가격에 호접란을 구매할 수 있도록 작가래 유통을 통해 소비자가 5000~8000원을 맞추는 것이 목표'라고 말했다.

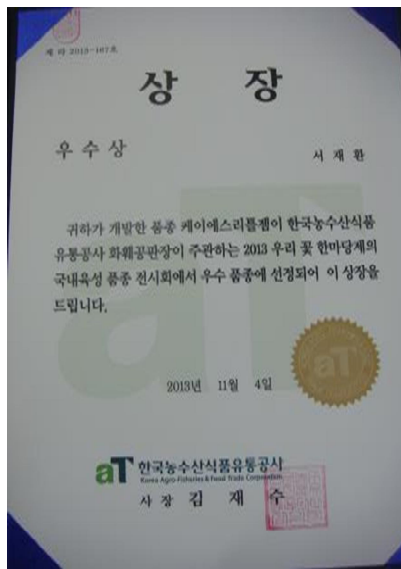
이예람 기자 leeyr@afnews.co.kr

<저작권자 © 농수축산신문, 무단 전재 및 재배포 금지>

그림 24. 보도자료

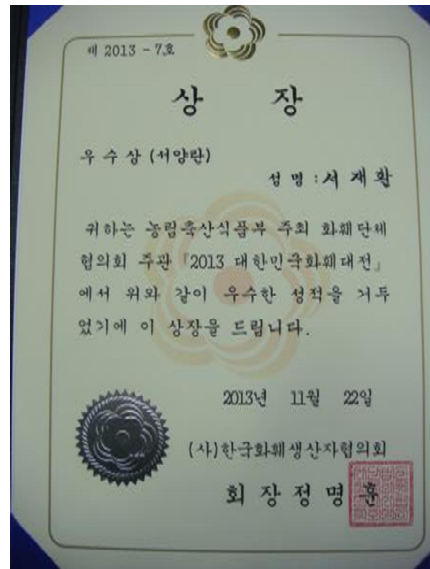
아. 국내 수상 실적

- 우리 꽃 한마당 : 우수상



- 일시 : 2013. 11. 04.
- 장소 : 양재동 AT 센터
- 주관 : 농수산유통공사

- 대한민국 화훼 대전 : 우수상



- 일시 : 2013. 11. 22
- 장소 : 고양시 킨텍스
- 주관 : 한국화훼생산자 협의회

자. 국내외 호접란 전시회 참관

- 해외 참관



<국제 IPG EXPO>
-일시 : 2013.12.07.
-장소 : 중국 광저우



<동경 국제 난전> -일시 : 2014.2.19. -장소 : 도쿄 돔



<대만 국제 난전> -일시 : 2014.03.12. -장소 : 대만 타이난

- 국내 참관



<호접란 품평회> -일시 : 2014.01.21. -장소 : 원예특작과학원 -주관 : 농진청, 원예특작과학원



<도시농업박람회> -일시 : 14.03.28. -장소:BEXCO <체험 학습> -일시 : 3.28 -장소 : 강산난원

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

4-1 목표달성도

[제1세부연구] 개화수명이 긴 호접란 유전분석 및 마커개발

연 차	세부연구개발목표	달성도 (%)	연구개발수행내용
1차년도	개화수명이 긴 호접란 특성조사 및 유전분석을 통한 유전양식 구명	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유전자원 수집 및 특성조사 ○ 특성조사 DB화 및 집단작성 ○ 수집종의 보존 및 유지
	개화수명과 관련된 분자표지 개발을 통한 육종효율증대	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개화수명 우수 품종의 유전체 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 호접란 KS Little Gem(KSLG)의 유전체 서열 조립을 위한 NGS 데이터 354.1Gb를 생산하고 가공함 ○ 호접란 유전체 크기 결정 <ul style="list-style-type: none"> - 호접란 KSLG의 유전체 크기를 두 가지 방법으로 추정함. Illumina NGS 데이터의 K-mer 분석으로 약 4.5Gb, flow cytometry 방법으로 약 4.9Gb로 추정함
	개화수명이 긴 호접란의 핵형분석을 통한 분자표지 방법 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 호접란 염색체 분석을 위한 최적 조건을 구명하고 조건에 맞추어 염색체 슬라이드를 제작함 ○ 강산난원 보유 교배육성재료 8종의 염색체 배수성을 검정함
2차년도	개화수명이 긴 호접란 특성조사 및 유전분석을 통한 유전양식 구명	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 배수성 및 화분임성 조사에 기초한 교배 후대집단의 유전분석 <ul style="list-style-type: none"> - 우량계통의 배수성 검정함 - 화분임성과 배수성과의 연관성을 검정함
	개화수명이 긴 호접란의 유전체 염기서열조립	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개화수명 우수 품종의 유전체 서열 조립 및 해독 <ul style="list-style-type: none"> - SOAPdenovo assembler를 이용하여 호접란 KSLG의 유전체 서열을 조립하여, 길이 1 kb 이상의 scaffold 약 2.98 Gb를 조립함. Contig와 scaffold의 N50 길이는 22.19 kb와 36.13 kb로서 유전자 예측을 위한 최소 길이를 충족함 - 유전자 49,482개를 예측하고 이의 주석을 결정함
	우수 호접란의 세포유전학적 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내수집 우수 교배육성재료 7종의 염색체 배수성을 검정 ○ 두 종류의 ribosomal DNA를 이용한 KS Little Gem FISH 염색체 분석 수행
3차년도	개화수명이 긴 호접란 특성조사 및 유전분석을 통한 유전양식 구명	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 호접란 우수개체 선발방법 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 기내선발 요인분석 : 염색, 잎의 직립성, 강건도 등 ○ Flow cytometer를 이용한 개화수명

			<p>이 긴 계통의 DNA contents조사</p> <ul style="list-style-type: none"> - 모·부분과 F₁과의 DNA contents 조사
	개화수명 관련 분자표지 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개화수명 우수 품종과 일반 품종 간의 유전체 다형성 분석 - KSLG의 엽록체 유전체를 조립하고, 다양한 난과 엽록체 서열과 비교하여 개발한 다형성 마커 6종을 품종·야생종 19종에 적용함 - EST-SSR 발굴, 다형성 SSR 마커 133종 개발 - 단자엽 식물 공통의 COS 유전자를 구성하고, 호접란에서 다형성 COS 마커 221종 개발 ○ 호접란 중·품종 구분 마커 개발 - 엽록체 마커 <i>rpl16</i>과 COS 마커 3개로 <i>Phalaenopsis</i>와 <i>Doritis</i> 호접란의 중·품종을 구분함 ○ 개화수명 관련 유전자 발굴 및 분자표지 개발 - 호접란 KSLG 에틸렌 감수성 실험 - 에틸렌 호르몬의 생합성과 신호전달 경로 유전자 동정 - 꽃의 노화와 개화수명에 관련된 유전자의 RNA-seq 분석
	개화수명이 긴 호접란 신품종 메리클론 생산법 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개화수명이 긴 호접란 신품종 KSLG의 초기배양(액아배양)에 적합한 배지, 배양조건, 조직배양을 위한 최적배양재료선발 방법 등에 관한 최적조건을 구명하여 우량 초기배양묘 배양체계 확립 후 대량증식을 위해 이용함 ○ KSLG의 기내배양 시 균일하고 강건한 대량기내 배양묘 증식에 적합한 배지종류, 배양방법 및 배양환경 조건을 확립하고, 대량증식 시 발생하는 문제점(폐놀)을 최소화 할 수 있는 방법을 구명함
4차년도	개화수명이 긴 호접란 유전분석을 통한 유전양식 구명	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개화수명이 긴 호접란 우수개체 선별방법 개발 - 개화수명이 긴 유전자와 링크되어 있는 특성 상관관계 분석 - 유전양식 구명
	개화수명 긴 개체 조기 선별 MAS 시스템 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개화수명 관련 유전자 분자표지 개발 - 호접란 KSLG의 에틸렌 생합성 및 신호전달 경로 유전자의 대립 유전자를 동정하고, 다형성 마커 16종을 설계함 ○ 분자표지의 유전자원 및 유전집단에 적용 - 호접란 KSLG를 화분친 또는 모친으로 작성된 2개의 교배집단 확보 - 교배집단 총 30개체를 대상으로 16종

			<p>의 개화수명 연관 마커를 적용함</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 개화수명 조기 선발용 MAS 시스템 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 마커 대립유전자위와 개화수명의 연관성을 GLM으로 분석함 - 유의성이 있는 <i>CTRI</i> 유전자 마커 1종을 선발함
	선발 신제품 기내변이 회피 기술 개발 및 조직배양 실용화 교육	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ KSLG의 기내대량 증식과정에서 배양방법별 발생하는 변이체를 형태적, 유전적으로 검정, 구명함으로써 기내변이를 최소화 할 수 있는 기술을 확립하였음 ○ 식물조직배양의 설계 및 실제 운영에 필요한 기본 및 다양한 기술을 중심으로 실용화 교육을 실시함 ○ 난과식물을 중심으로 현장에 적용할 수 있는 조직배양기술 프로그램 설계 및 실용화 및 워크숍을 실시함

[제1협동연구] 개화수명이 긴 호접란 신제품 육성

연 차	세부연구개발목표	달성도 (%)	연구개발수행내용
1차년도	기 확보된 개화수명이 긴 우량모본 및 교배조합 분석을 통한 교배 효율 증진	100	- 기 선발된 개화수명이 긴 호접란 6계통의 교배조합 분석을 통하여 개화수명 우수 품종과의 교배조합 추가 선정함
2차년도	우수 품종 육성을 위한 교배조합 작성 및 계통선발	100	- 개화 특성검정 및 계통선발을 통하여 교배조합작성 및 개화수명 우수 호접란 5품종 선발 육성함
3차년도	우량 교배 후대의 생육 및 선발	100	- 기내 배양묘의 순화온도가 생장과 생산성에 미치는 영향을 구명함 - 무균과종 후 온실 이식 전 교배조합당 우량개체 300개 선발함
	우수 품종 육성 및 계통선발	100	- 전문가 초청 우량 계통 선발함 - 개화수명이 긴 호접란 선발개체의 적응성 시험 후 3품종 출원함
4차년도	우수품종 특성검정 및 등록	100	- 개화수명 긴 호접란 3품종 등록 및 2품종 출원함
	선발품종 시장 기호성 조사	100	- 전문 평가단의 품평회를 개최 시장성 있는 품종을 조사함
	우량 신제품 브랜드화와 국내외시장 개척 프로토콜 개발	100	- 국내 난시장 및 유통/물류 환경분석을 통하여 신제품 마케팅 - 호접란의 미국시장 개척방안 구축함

4-2 관련분야 기여도

가. 개화수명이 긴 호접란 특성조사 및 유전분석을 통한 유전양식 구명

- 원예품종의 육성은 우수 원종, 우수계통 및 품종의 수집이 매우 중요하다. 또한 이들에 대한 특성을 분석하고, 특성 분석 데이터를 DB화하는 것은 신품종 육성의 기본이며 이를 근거로 보다 효율적인 신품종 육성이 가능하게 된다.
- 본 연구에서는 우수 유전자원 278개체를 수집하고 이들에 대해서 UPOV 특성조사 기준에 따라 97항목과 개화일, 개화기간, 소화수명 등 개화품질에 대해서 추가적으로 조사하여 DB화 및 집단을 작성하여 신품종 육성에 기반을 만드는데 기여하였다.
- 우수 유전자원의 배수성과 화분의 입성은 신품종 육성을 위한 교배시 대단히 중요한 자료가 된다. 특히 본 연구의 주목적은 개화기간이 긴 우량계통의 선발, 육성이기 때문에 우수 유전자원 중에서 개화기간이 긴 우량계통의 배수성과 화분입성과의 관계를 분석하여 교배효율을 높이는데 기여하였다.
- 호접란은 종간은 물론이고 속간교잡이 가능하며, 유전적으로 헤테로한 작물이기 때문에 교잡시 모본의 유전양식을 알아내는 것은 우수형질을 F₁에 도입하는데 있어서 매우 중요하다. 본 연구에서는 개화기간이 긴 KSLG를 모부본으로 정역교배하여 이들 모부본과 F₁간의 형질에 대해서 상관관계 및 주성분 분석하였다. 이를 통해 개화수명과 관련된 주요 형질과 모부본과의 관계를 밝혀내었으며 이 결과는 개화수명이 긴 호접란 육성에 활용될 것이다.

나. 호접란 고유 품종의 유전체 해독

- 최근 원예품종의 개발은 유전체 정보를 이용하여 육종 효율성을 높이는 방향으로 발전하고 있으며, 특히 호접란 육종에서 유전체학의 활용은 시작 단계에 있다. 본 연구는 국내에서 자체 개발한 우수 품종의 유전체를 독자적으로 해독하여 그 정보를 확보함으로써, 호접란 육종 선진국인 대만 등과 경쟁할 수 있는 유전체 육종의 기초를 확립하는데 기여했다.
- 세계적으로 호접란 유전체의 해독은 2건[야생종 *P. equestris*(2015)와 2종의 동계, 하계 개화 교배품종(2016)]이 각각 대만과 중국 연구팀에 의해서 보고되었다. 이들은 모두 유전적으로 고정되어 매우 낮은 수준의 이형접합도를 보이는 호접란 식물체의 유전체를 해독하였다. 이에 비해 4배체 교배 품종인 호접란 KSLG는 매우 이질적인 유전적 배경이 조합되어 높은 수준의 이형접합도를 갖고 있었고, 이에 따라 유전체 서열 조립의 난이도가 높았다. 그럼에도 불구하고, 본 연구에서는 여러 제한적인 여건에서도 기존에 보고된 호접란의 유전자의 수를 충족하는 유전체 서열을 조립하고 해독함으로써 거대 유전체 작물의 유전 정보를 성공적으로 해독할 수 있는 기술적 발전을 이뤄 호접란 유전체 연구에 학술적으로 기여하였다.

다. 호접란 고유 품종 판별과 육종 활용을 위한 분자마커 지원 체계 수립

- 난과 식물의 육종은 원예형질에 연관된 분자마커나 연관지도가 전혀 없기 때문에 분자마커 지원 육종이 현재까지 불가능했다. 또한 다양한 원예형질을 탐색할 수 있는

교배집단이 없었기 때문에 분자마커의 개발 자체도 어려운 상황이다.

- 본 연구에서 원예형질이 우수한 호접란의 유전체 해독과 생물정보 분석을 통해 엽록체 유전체와 핵 유전체에서 개발한 종·품종 구분 마커를 개발하였고, 이를 다양한 배경의 야생종과 교배 품종에 적용할 수 있어 기존의 마커들보다 범용성이 뛰어나다는 것을 입증하였다. 따라서 본 연구를 통해 확립한 분자마커와 이의 개발 양식은 다양한 유전자원의 평가와 도입에 용이하게 활용할 수 있다. 또한 유전자 기반 분자 마커는 품종 보호를 위한 판별마커로 활용할 수 있으므로 육종가의 권리 보호와 신품종 육종의 의욕 고취에 기여할 수 있다.
- 호접란의 개화수명은 화훼 상품으로서의 가치에 큰 영향을 준다. 호접란에서는 에틸렌을 매개로 하는 꽃의 노화 기작이 제시되어 왔으나, 실험적으로 증명되지 못해왔는데, 그 이유는 호접란 유전체 내에 여러 카피로 존재하는 에틸렌 관련 유전자들과 각 대립유전자들을 유전체 수준에서 정밀하게 동정하지 못했기 때문이다. 본 연구를 통해 4배체인 호접란 KSLG에서 발굴된 에틸렌 경로는 2배체인 *P. equestris*보다 2배 이상의 유전자들로 구성되어 있었으며, 특히 *P. equestris*에서는 구조가 밝혀지지 않았던 핵심 유전자를 모두 구명하였다. 또한 유전적 배경의 다양성이 KSLG의 대립유전자 조립 서열에 존재하기 때문에 다형성 마커의 개발에 유용하게 적용할 수 있어 향후 그 활용도가 높을 것으로 기대한다.

라. 우수 호접란의 배수성 검정

- 전 세계적으로 난과식물의 이용 및 육종 현황을 볼 때 국내에서의 난과식물 염색체 분석 결과는 전무한 실정이고 국외에서도 그 실적이 많지 않다. 이는 난과 식물의 염색체는 수가 많고 크기가 매우 작으며 분석이 어렵기 때문이다. 그러나 염색체 배수성의 분석은 화분의 임성에 대단히 큰 영향을 미치는 요인으로 효율적인 교배육성을 위해서는 반드시 정보의 수집이 필요하다. 특별히 3배체(triploid)나 이수체(aneuploid)의 경우 화분의 임성이 낮거나 없어서 부분으로 쓰이기에 적합하지 않다. 배수성을 구별하는 방법으로는 flow cytometer 또는 염색체 검정법을 이용하는데 호접란의 경우 flow cytometer의 이용 시 부위별(잎, 줄기, 뿌리 등)로 배수성이 다양하게 관찰되어 정확한 확인이 어렵다. 또한 flow cytometer는 이수체의 여부는 판별이 어려우므로 염색체 검정법을 통해 분석하는 방법이 가장 정확하다. 본 연구에서는 교배육성에 모본, 부분으로 사용되는 재료의 배수성을 검정하였다. 이러한 연구결과는 호접란의 교배육성을 하는데 기초정보로서 유용하게 사용될 것으로 기대한다.

마. 개화수명이 긴 호접란 신품종 KS Little Gem의 기내 대량증식 방법 확립

- 지금까지 호접란의 기내 대량증식 방법에 대해서 다양한 품종, 계통을 대상으로 연구가 이루어져 왔으며 품종에 따라 대량증식 및 우량유묘 생산에 적합한 기본배지, 배양조건, 배양환경 등의 조건이 다른 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구과제에서는 개화수명이 긴 호접란 신품종 KS Little Gem을 대상으로 강건하고 균일한 기내 배양묘 생산을 위한 배양조건 및 변이체 최소한 방안에 관한 연구를 수행하였다. 그 결과 초기배양 과정부터 변이체를 최소화하면서 대량증식과정까지 과정을 체계화 하였다. 확립된 기술들은 앞으로 호접란 신품종 KS Little

Gem을 대량생산 및 보급하는데 기여할 것으로 판단된다.

바. 개화수명이 긴 호접란 신품종 육성

- 강산난원에서 육성한 KSLG은 개화수명이 약 120일 정도 대단히 길다. 본 연구에서는 이를 모 부분으로 다른 우수 원종, 품종 등과 교배하여 다양한 교배집단을 양성하였다. 이들 중에서 강건하여 재배하기 쉽고 생육이 빠르고 화색과 화형이 훌륭하고 개화수명이 긴 개체를 선발하였다. 현재까지 3품종을 등록하고 2품종을 출원하였다. 앞으로 이들 교배집단을 활용한다면 지속적으로 개화기간이 긴 우량개체를 육성하는데 기여할 것으로 판단된다.

사. 우량 신품종의 브랜드화와 국내외시장 개척 프로토콜 개발

- 신품종의 브랜드화를 위하여 2014년부터 강산난원이 개발한 개화수명이 긴 KS Little Gem 품종을 국내의 호접란 재배농장에 매년 묘종 1,500본을 공급하여, 시험재배 및 릴레이생산을 하고 있다. 현재까지 시험재배는 성공적으로 진행되고 있다. 릴레이생산으로 생산된 상품은 서울, 부산 등의 경매시장을 통해 판매되고 있으며 시장반응은 매우 긍정적이며 품질면에서도 외국 품종과 비교하여 손색이 없을 정도로 호평을 받고 있다. 신품종의 보급특성상 매년 시장에 공급이 되어 인지도를 높여 간다면 생산과 소비가 지속적으로 증가할 것으로 판단된다.
- 현재 미국을 대상으로 수출을 계획하고 있다. 한국의 경우 미국과의 재배매체수출검역협정의 지연으로 미국의 바이어가 요구하는 개화주 규격의 수출은 불가능한 실정이다. 따라서 미국 수출이 가능한 대만과의 릴레이 생산으로 수출을 시도 중에 있다.
- 강산난원에서 육성한 품종을 대만의 YOUNG HOME ORCHID사에서 플라스크묘와 1.7인치 묘까지 를 생산하고 1.7인치부터 2.8인치(개화주)까지는 대만의 호접란 수출전문회사인 KV ORCHID가 담당하여 수출하는 시스템으로 역할을 분담하였다.
- 현재 이 시스템에 의해서 강산난원 육성 품종인 GS-122와 GS-124 두 품종은 내년 봄부터 여름시즌에 미국시장에 판매될 예정이다. 이는 우리나라에서 육성된 오리지널 품종이 해외에서 판매되는 첫 사례가 될 것이며, 미국에 직접 수출이 불가능한 한국에서 새로운 호접란 수출 시스템이 될 것으로 판단된다.

5. 연구결과의 활용계획

1-1 개화수명이 호접란 육성

- 우수자원 특성의 DB화와 상관관계 및 주성분분석으로 알아낸 대부분의 유전양식 결과는 개화수명이 긴 호접란 육성에 활용

2-1 호접란 종·품종구분 마커

- 특허 등록(출원 중) 후 호접란의 종·품종 구분과 품종 보호를 위한 마커로 활용 및 보급

3-1 호접란 유전체 정보

- 유전체 서열은 NCBI에 등록하고, 논문으로 출판
- 개화수명 등 주요 형질 연관 유전자 개발에 활용

4-1 개화수명관련 분자표지

- 본 연구에서 개발된 분자표지는 교배집단에서 추가적인 검증을 실시한 후 호접란 육종 현장에 보급할 계획

5-1 염색체 정보 데이터베이스화

- 분석 결과는 기보유 염색체 데이터베이스를 통해 정보 공유 및 국내 난 육성가들에게 공개

6-1 호접란 기내 대량증식 방법

- 호접란의 변이체를 최소화 할 수 있는 기내 대량증식방법을 국내 호접란증식 업체에 교육 및 보급할 계획

7-1 신품종 호접란의 국내외 판매 확대

8-1 추가 연구의 필요성

가. 개화수명 등의 분석을 위한 계획적인 유전집단의 필요성

- 개화수명연관 분자표지 추가 검증 및 개선 : 본 연구에서 개발된 개화수명 연관 분자표지는 검증을 위한 분리집단이 없어 대립유전자와 개화수명 간의 연관성을 확증하기 어려웠다. 기준 식물체(KSLG)를 자가교배하거나 양친계통 중 2배체 간의 교배집단을 육성할 경우 개화수명 뿐 아니라 다양한 목적 형질들의 유전을 분석할 수 있을 것으로 사료된다.

나. 개화수명 연관 분자표지의 개선

- 본 연구에서 유전체를 해독한 호접란 KSLG의 염색체는 4배체이기 때문에 최대 4개의 대립유전자가 존재한다. 현 단계에서 연구비와 유전체 조립 기술의 한계로 인해 유전체 조립서열의 완성도는 각 대립유전자를 모두 확인하기에 미흡한 부분이 있다. 따라서 본 연구를 통해 동정된 호접란의 에틸렌의 생합성과 신호전달 경로 유전자의 일부는 PCR 증폭이나 클로닝으로 확인하여 확립한 후 각 대립유전자를 구분할 수 있는 정밀한 마커로 개선할 필요가 있다.
- 현재 호접란의 개화수명에 대한 분자유전학적 연구는 무작위 고밀도 마커 개발과 연관지도 작성 등의 전통적인 QTL 발굴 방식과 달리, 노화호르몬인 에틸렌 생합성과 감수성, 화기발달 관련 전사인자 등 소수의 유전자군을 대상으로 시도되고 있다. 호접란 유전체가 매우 큰 점과 염색체 배수성을 감안할 때 전통적인 방식의 연관마커 탐색보다는 특정 후보 유전자 기반 마커를 개발·활용하게 될 것이다.
- 본 연구에서는 4배체 호접란 KSLG의 유전체를 유전자 예측이 가능한 수준으로 조립 해독하였고, 특히 꽃의 노화 모델인 에틸렌 경로 유전자를 대부분 동정하였으며, 전사체 발현분석 등을 통해 다수의 후보 유전자를 발굴하였다. 향후 후보유전자들의 대립유전자 다형성을 확인하고, 적절한 유전분리집단을 충분한 규모로 육성하면 개화수명 연관 마커 개발의 성공가능성을 획기적으로 높일 수 있을 것으로 기대한다.

다. 최신 유전체편집 기술을 이용한 유전체 정보의 활용

- 최근의 원예 육종은 분자생물학 기술을 적극적으로 도입하고 있다. 꽃 형질에 영향을 주는 주요 유전자의 기능을 분석하기 위한 신속한 방법으로 VIGS가 활용되고 있으며 형질전환방법으로 목표 유전자를 표적하는 CRISPR/Cas9 유전체편집 기술도 도입되고 있다. 특히 유전체편집은 GMO 관련 규제와 사회적 우려가 상대적으로 낮기 때문에 호접란과 같은 화훼 품종 개발에 활용되기 적합하다고 사료된다. 본 연구를 통해 발굴한 다양한 호접란의 신규 유전자를 최신 분자생물학적 기술을 이용하여 활용하면 호접란 신품종 개발에 진일보한 발전을 이룰 수 있을 것이다.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당사항 없음

7. 연구개발결과의 보안등급

해당사항 없음

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

○ 경북대학교 연구실 안전조치 이행계획

가. 연구실 안전조치 이행계획

I. 연구실 안전 담당 기관: 경북대학교

담당 : 총괄 - 사무국 시설과 (담당자: 남경환, 053-950-5055)

교육 - 환경과학기술연구소 (담당자: 이영호, 053-950-6813)

II. 경북대학교 안전조치 이행계획

1) 연구실 안전환경관리자 지정

- 관련근거 : 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 제6조의 2 및 시행령 제5조

- 대구캠퍼스 : 남경환, 이영호

2) 연구실 안전관리규정 비치

- 관련근거 : 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 제6조 및 시행규칙 제2조
- 안전관리규정, MSDS, 비상연락망, 연구실 안전수칙 비치 및 게시
- 대상 : 923실(자연과학대학, 공과대학, IT대학, 농업생명과학대학, 예술대학, 사범대학, 수의과대학, 약학대학, 생활과학대학, 간호대학, 의학전문대학원, 치의학전문대학원, 공동 실험실습관, 생태환경대학, 과학기술대학, 기타 연구시설 등)

3) 연구실 안전점검 실시

- 관련근거 : 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 제8조 및 시행령 제7조
- 주관부서 : 시설과
- 정기점검 1회/년
- 점검대상 : 957개실
- 정기점검 실시 후 연구실 위험 요소, 전기시설 등 보완설치

4) 연구실 정밀안전진단 실시

- 관련근거 : 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 제9조 및 시행령 제9조, 시행규칙 제4조
- 정기점검 : 1회/2년
- 정밀안전진단대상 : 유해화학물질 및 유해인자 취급 연구실, 독성가스 취급연구실에 대한 진단, 화학물질을 취급하는 연구실은 화학물질 반응성평가와 실내 공기질 측정
- 정밀안전진단 진단 결과에 의거 전기 및 안전시설 등 보완설치 진행

5) 연구실 안전교육 실시

- 관련근거 : 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 제18조 및 시행령 제17조, 시행규칙 제9조, 경북대학교 연구실 안전관리 규정」 제5조, 제6조, 제7조
- 모든 과학기술분야 연구활동종사자는 반기 6시간 이상 정기교육 및 신규채용시 2시간 이상 신규교육 실시
- 우리 대학은 2013년 상반기 「경북대학교 연구실안전관리시스템(<http://safe.knu.ac.kr>)」을 구축하고 상반기, 하반기 온라인정기교육 실시중
- IT대학 전자공학부에서는 교내 반도체클린룸에 출입하는 연구활동종사자를 대상으로 상반기, 하반기 반도체공정 정기교육 실시중
- 신규교육의 경우, 집합교육이 원칙이므로 매년 상반기, 하반기에 과학기술분야 신규종사자를 대상으로 집합교육 실시중
- 교육실적

연도	교육명	일자	교육형태	교육인원(명)	교육장소	주관부서
2014 년	2014년도 상반기 정기(온라인)교육	2014.3.~2014.8.	정기교육	4,720	온라인	환경과학기술연구소
	2014년도 하반기 정기(온라인)교육	2014.9.~현재	정기교육	3,097	온라인	환경과학기술연구소
	2014년도 상반기 반도체공정 정기교육	2014.2.28.	신규교육	65	IT 3호관 111호	전자공학부
	2014년도 하반기 반도체공정 정기교육	2014.9.30.~10.1.	신규교육	61	IT 3호관 111호	전자공학부
	2014년도 상반기 신규채용자 교육	2014.5.20.	신규교육	374	글로벌플라자 효석홀	환경과학기술연구소
	2014년도 하반기 신규채용자 교육	2014.10.28.	신규교육	60	공동실험실습관 세미나실	환경과학기술연구소

6) 연구활동종사자 보험 가입

- 관련근거 : 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 제14조 제1항 및 시행령 제15조 제1항
- 가입대상 : 학부생(14,563명), 대학원생(3,762명), 연구원 (420명) 총 18,945명 가입
- 공제가입금액 : 사망 1억원/인당, 부상 1천만원/인당

7) 연구활동종사자 건강검진

- 관련근거 : 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 제18조 제4항 및 시행규칙 제10조 제1항
- 2015년 건강검진 기관 : 계명대학교 동산의료원
- 건강검진 대상사 : 위험물질 및 바이러스 등에 노출될 위험성이 있는 연구활동종사자 (대학원생 및 연구원으로서 연구실 상시 출입자)로 매년 실시
- 건강검진 대상인원 및 예산 : 약 1,100명/ 60,000천원
- 건강검진 종류 : 일반건강검진 + 특수건강검진

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Exploitation of induced 2n-gametes for plant breeding	경북대	교신 저자	Plant Cell Rep.	2.869	2014.02.28	중복사사	SCI/36회
2	논문	소형 다화 분지성 호접란 신품종 'KS-비비안' 육성	경북대	교신 저자	화훼연구		2014.09.30	단독사사	비SCI
3	논문	소형 다화 분지성 호접란 SM 333 육성	경북대	교신 저자	원예과학기술지	0.365	2015.03.31	중복사사	SCIE
4	논문	The complete chloroplast genome of <i>Phalaenopsis</i> "Tiny Star"	경북대	참여 저자	Mitochondrial DNA Part A	3.350	2014.08.05	단독사사	SCI/8회
5	논문	진분홍색 대형 호접란 '화수 511' 육성	경북대	교신 저자	화훼연구		2015.07.31	단독사사	비SCI
6	논문	Phenotypic analysis of parents and their reciprocal F1 hybrids in <i>Phalaenopsis</i>	경북대	교신 저자	HEB	0.812	2015.11.04	단독사사	SCIE
7	논문	핑크 스트라이프 호접란 'Hwasu 3551' 육성	경북대	제1 저자	Korean J. Breed. Sci.	0.365	2016.12.31	단독사사	비SCI
8	논문	Development of gene-based Identification Markers for <i>Phalaenopsis</i> 'KS Little Gem' Based on Comparative Genome Analysis	경북대	참여 저자	HEB	0.812	2017.04.30	단독사사	SCIE
9	논문	황색 소형 호접란 'SM 6310' 육성	경북대	교신 저자	Korean J. Breed. Sci.		2017.09.30	단독사사	비SCI
10	논문	주요 스프레이 국화 품종의 형태적 특성과 변이계수, 유전율 및 유전자 전이율	경북대	교신 저자	원예과학기술지	0.365	2016.03.23	단독사사	SCIE

11	논문	주요 절화 국화 품종의 착생 부위별 형태 생태적 특성과 관련된 변이계수, 유전력 및 유전자 전이율	경북대	교신저자	화훼연구	2016.03.18	단독사사	비SCI
12	논문	주요 절화용 스프레이 국화 품종의 탄수화물 함량과 변이계수, 유전력 및 유전자 전이율에 대한 통계학적 분석	경북대	교신저자	화훼연구	2016.03.18	단독사사	비SCI
13	특허	호접란 품종 식별을 위한 프라이머 세트 및 이를 포함하는 마커용 조성물	경북대		한국	2017.05.10	단독사사	특허등록 10-173667 0
14	특허	호접란 품종 식별을 위한 KSLG-CP001 프라이머 세트 및 이를 포함하는 마커용 조성물	경북대		한국		단독사사	출원 10-2016-0 070215
15	특허	호접란의 품종 식별을 위한 프라이머 세트 및 이의 용도	경북대		한국		단독사사	출원 10-2016-0 126074
16	품종	지에스엘로우그린	강산 난원		한국	2016.07.18		제6268호
17	품종	지에스루비	강산 난원		한국	2017.06.21		제6760호
18	품종	지에스모던걸	강산 난원		한국	2017.06.21		제6763호
19	품종	지에스골드스타	강산 난원		한국	2017.02.15		출원 2017-96
20	품종	지에스스프링댄서	강산 난원		한국	2017.02.15		출원 2017-97

11. 기타사항

해당사항 없음

12. 참고문헌

- Altinbas, M. and Sepetoglu, H. 1993. Determination of grain yield effects in hybrids of *Vigna unguiculata* L. population. *East Turkey Soil and Forest J.* 13:775-784.
- Aoyama M (1989) Karyo-morphological studies in *Cymbidium* and its allied genera. *Bul Hiroshima Bot Garden* 11:1-121
- Aoyama M Tanaka R (1988) Notable chromosome numbers in *Cymbidium lancifolium*, *C. javanicum* and *C. nipponicum*. *J Jap Bot* 63:329-333
- Been, C. G. 2010. Breeding of fragrant yellow w *Phalaenopsis* and scent pattern analysis by GC/SAW electronic nose system. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 28:656-663
- Been, C. G., J. K. Kim, and S. K. Kim. C. W. Roh. 2011. Development of a *Phalaenopsis*(P. Blume) cultivar ‘Yellow Cream’ with striped yellow flower. *Flower Res. J.* 16:149-151.
- Been, C. G., J.K. Kim, and S. K. Kim. 2008. Development of a new w *Phalaenopsis* cultivar ‘Little Dew’ with white miniature type flowers. *Flower Res. J.* 16:149-151.
- Been, C. G., J.K. Kim, and Y. C. Cho. 2007. A New *Phalaenopsis* (P. Blume.) cultivar ‘Shintaeguek’ with white flowers. *Flower Res. J.* 15:136-138.
- Cai J, Liu X, Vanneste K, Proost S, Tsai WC, Liu KW, Chen LJ, Xu Q, Bian C, Zheng Z, Sun F (2015) The genome sequence of the orchid *Phalaenopsis equestris*. *Nature genetics* 47:65-72
- Carol Goodwillie¹, Risa D. Sargent, Christopher G. Eckert, Elizabeth Elle, Monica A. Geber, Mark O. Johnston, Susan Kalisz, David A. Moeller, Richard H. Ree, Mario Vallejo-Marin and Alice A. Winn, 2010. Correlated evolution of mating system and floral display traits in flowering plants and its implications for the distribution of mating system variation. *New Phytologist* 185: 311-321.
- Christenson, E. A. 2001. *Phalaenopsis*. Timber Press, Portland, Oregon, USA
- Durate, R.A. and Adams, M.W.1972. A path coefficient analysis of some yield component interactions in field beans. *Crop Sci.* 31: 1179-1185.8.
- Felix LP, Guerra M (2000) Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of Cymbidioid orchids. *Genet Mol Biol* 23:1-27
- Freed, H. 1980. An updated on breeding with the Boreneo type *Phalaenopsis violacea*. *Am. Orchid. Soc. Bull.* 49:843-849.

- Hsu CC, Chung YL, Chen TC, Lee YL, Kuo YT, Tsai WC, Hsiao YY, Chen YW, Wu WL, Chen HH (2011) An overview of the *Phalaenopsis* orchid genome through BAC end sequence analysis. *BMC Plant Biology* 11:3
- Hyang Young Joung, Young Ran Lee, Mi Seon Kim, Jin Hee Lim, Hak Ki Shin, Hae Ryong Cho, Hae Kyung Rhee, Sang Kun Park. 2010. New *Phalaenopsis* ‘Sweet Pinky’ of Dark Pink Medium Petal with Fragrance. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 28(5):899-901.
- Jones, W. E., A. R. Kuehnle, and K. Arumuganathan. 1998. “nuclear DNA content of 26 Orchid (Orchidaceae) genera with emphasis on *Dendrobium*. *Annals of Botany* 82: 189-194.
- Kim, Y.R. Lee, H.K. Rhee, S.K. Park, H.K. Shin, H.Y. Jung, and J.H. Lim. 2011. A new hybrid, dark pink spotted type *Phalaenopsis* ‘Pink Marble’ . *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 29: 503-506.
- Korea Seed & Variety Service (KSVS) (2005). Guidelines of characteristics for application and registration of new varieties in *Phalaenopsis* (P. Blume). p. 1-58. Anyang, Korea.
- Lee, Y.R., M.S. Kim, J.Y. Kim, and M. I. Jeong. 2006a. A new *Phalaenopsis* cultivar, ‘Pink dream’ with dark pink flower. *K. J. Breed.* 38:195–196.
- Lee, Y.R., M.S. Kim, J.Y. Kim, and M. I. Jeong. 2006b. A new *Phalaenopsis* cultivar, ‘Yellow Star’ with brown spot. *K. J. Breed.* 38:193–194.
- Li YG, Guo WH, Wu BJ (2002) Studies on karyotypes of four species of *Cymbidium* in China. *Acta Bot Boreali-occidentalia Sin* 22:1438-1444
- Lin, Sandy, et al. “Nuclear DNA contents of *Phalaenopsis* sp. and *Doritis pulcherrima*. “*Journal of the American Society for Horticultural Science* 126.2 (2001): 195-199.
- Logacheva MD, Schelkunov MI, Penin AA (2011) Sequencing and Analysis of Plastid Genome in Mycoheterotrophic Orchid *Neottia nidus-avis*. *Genome Biology and Evolution* 3:1296-1303
- M.S. Kim, Y.R. Lee, H.K. Rhee, S.K. Park, H.K. Shin, H.Y. Jung, and J.H. Lim. 2011. A New Hybrid, Dark Pink Spotted Type *Phalaenopsis* ‘Pink Marble’ . *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 29(5):503-506.
- MA Al-Faruque, KS Sultana, MA Rahman, AK Ghose and HM Al-Amin. 2015. Variabilities, correlation and morphological characteristics of different local orchids. *Eco-friendly Agril. J.* 8(05): 62-66.
- MAFRA, Gwacheon, Ministry for Agriculture, Food and Rural Affairs(MAFRA). 2013.
- Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (MIFAFF). 2010. The present condition of cultivation of flowers. MIFAFF, Gwacheon, Korea.

- Naserian, B., Asadi, A.A., Rahimi, M. and Ardakani, M.R. 2007. Evaluation of wheat cultivar mutants for morphological and yield traits and comparing of yield components under irrigated and rainfed conditions. *Asian J. Plant Sci.* 6:214-224.
- Oh, J.S., P.S. Hwang and W.B. Chung (2005). Degree of heterosis and heterobeltiosis in F₁ hybrids of Eggplant. *J Life Sci*15:132-135
- Orchid (Orchidaceae) Genera with Emphasis on *Dendrobium*." *Annals of Botany* 82.2 (1998): 189-194.
- Park, B.G. Park, H.Y. Kim and K.B. Lim, 2015. Breeding of Phalaenopsis 'SM 333' with mini multiple flower formation. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 33:149-154.
- Raghava, S.P.S, S.S Negi, and D. Nancharaih. 1992. Genetic variability, correlation and path analysis in chrysanthemum. *Indian J. Hort.* 49:200-204.
- Shahinnia, F., Rezai, A.M. and Tabatabaei, S.B.E. 2005. Variation and path coefficient analysis of important agronomic traits in two-and six-rowed recombinant inbred lines of barley (*Hordeum vulgare*L.). *Czech J. Genet. Plant Breed.* 41:246-250.
- Tang, C.Y and W.H. Chen. 2007. Breeding and development of new varieties in Phalaenopsis, p. 1-22. In: W.H. Chen and H.H. Chen (eds). *Orchid biotechnology*. World Scientific, Singapore.
- Trávníček, Pavel, et al. "Challenges of flow-cytometric estimation of nuclear genome size in orchids, a plant group with both whole-genome and progressively partial endoreplication." *Cytometry Part A* 87.10 (2015): 958-966.
- Troyer A.F., Larkins J.R., 1985. Selection of early flowering in corn: 10 late synthetics. *Crop Sci.* 25: 695-697.
- Uchiyama H, Matsumoto Y, Aoyama M (2003) Chromosome numbers and nuclear DNA contents of Epidendrum orchid. *Chromosome Sci* 7:131
- Vo Thi Co, Jeong-Hwan Mun, Hee-Ju Yu, Yoon-Jung Hwang, Mi-Young Chung, Chang-Kil Kim, Hong Yul Kim, Ki-Byung Lim. Phenotypic analysis of parents and their reciprocal F₁ hybrids in *Phalaenopsis* (2015). *Hort. Environ. Biotechnol.* 56(5):612-617
- Woei-Jiun Guo and Nean Lee. 2006. Effect of Leaf and Plant Age, and Day/Night Temperature on Net CO₂ Uptake in *Phalaenopsis amabilis* var.formosa. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 131(3):320-326.
- Yu-Ge L, Weihong G, Boji W (2002) A karyological study of seven species and one variety of Cymbidium from China. *Acta Phytotaxonomica Sinica* 5:406-413.