

최 종  
연구 보고서

# 양란 신품종 육성을 위한 지표인자 개발과 동양란 변이체 생산에 관한 연구

Development of DNA Marker for *Cymbidium* Cultivar  
and Oriental *Cymbidium* Variegates

연구 기관

주관 연구 기관 서울여자대학교

협동 연구 기관 고려대학교

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “ 양란 신품종 육성을 위한 지표인자 개발과 동양란 변이체  
생산에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001년 10월 28일

주 관 연 구 기 관 명 : 서울여자대학교

총괄연구책임자: 이 종 석

제1협동연구기관명: 고려대학교

제1협동연구책임자: 박 천 호

제2협동연구기관명: 고려대학교

제2협동연구책임자: 신 정 섭

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “ 양란 신품종 육성을 위한 지표인자 개발과 동양란 변이체  
생산에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001년 10월 28일

주관연구기관명 : 서울여자대학교

총괄연구책임자 : 이 종 석

연 구 원 : 정 영 수  
(동 아 내)

김 지 연

한 승 원

이 제 준

장 연 경

제1협동연구기관명 : 고려대학교

제1협동연구책임자 : 박 천 호

연 구 원 : 엄 보 영  
경 윤 정  
홍 정

제2협동연구기관명 : 고려대학교

제2협동연구책임자 : 신 정 섭

연 구 원 : 배 정 명  
조 성 현  
정 지 응  
강 효 미

# 요 약 문

## I. 제 목

양란 신품종 육성을 위한 지표인자 개발과 동양란 변이체 생산에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

국내 화훼산업 중 난과 식물이 차지하고 있는 재배면적이나 생산량이 많고, 그 중에서도 *Cymbidium* 속 식물이 가장 많이 취급되고 있는데 생산 금액이나 생산량으로 미루어 볼 때 매우 중요한 품목이다. 또한 *Cymbidium*속 식물은 비교적 다소 냉량한 기후 조건에서도 생산이 가능하며 절화수명 또한 길어서 절화 및 분화 수출용으로 적합한 품목으로 판단된다. 우리나라 난류의 수출입 동향을 살펴보면 네덜란드, 중국, 일본, 홍콩, 대만 등으로 일부 수출이 되고, 태국, 화란, 뉴질랜드 등으로부터 많은 양의 묘종이 수입되고 있다. 최근 자동화 시설로 인건비의 절감과 재배여건이 좋아졌으나, 우리나라의 기후적 여건에 적합한 품종이나 세계시장의 기호에 알맞은 신품종의 개발 및 도입에 어려움이 있다.

또한 유묘의 수요는 해마다 크게 증가하고 있으나 기내 유묘생산시 인건비의 상승과 생장점 배양기술의 미숙 그리고 바이러스 감염묘의 기내생산, 배양환경의 미비로 활착율이 낮은 유묘의 공급이 국내에서 생산된 조직배양묘의 재배를 기피하는 원인이 되고 있다. 따라서 일본이나 대만, 태국 등지에서 배양묘와 신품종을 도입할 때 값비싼 로열티를 지불하면서 묘종을 수입, 재배하고 있기 때문에 원가상승에 큰 영향을 미치고 경영을 어렵게 하는 근본적인 원인이 되고 있다. 이에 우리나라도 우량 품종을

육성하여 농가에 안정적으로 공급해야 함은 물론 기술의 속국화가 되는 것을 막아야 하며 수입위주의 난산업을 수출에 초점을 두어 활성화 하기 위해 수출 유망 품종을 적극 개발해야 할 것이다. 또한 동양란 중에서 잎에 무늬가 들어있는 종류는 일반종에 비하여 관상가치가 높을 뿐만 아니라 가격이 월등하게 높은 것이 일반적인 현실이다. 특히 우리나라에서 자생하는 온대산 심비디움속 중에서 한란(*Cymbidium kanran*)은 천연기념물 제 191호로 지정되어 보호되고 있는 식물이며 춘란(*Cymbidium goeringii*)은 *Cymbidium*속 중에서는 내한성이 강하여 우리나라의 남부지방은 물론 중부 내륙지방까지도 분포되어 자라는 상록성 식물로서 내한성 품종을 육성하기 위한 중요 유전자 원일 뿐만 아니라 잎에 무늬가 들어있는 종류는 관상가치와 희소성 때문에 부가가치가 매우 높다. 그러나 지금까지 이들 잎무늬종의 한란이나 춘란은 거의 모두가 자생지에서 자연적 돌연변이를 일으킨 개체들을 채취하여 재배해 왔기 때문에 가격이 매우 높고 개체의 확보가 쉽지가 않다. 따라서 본 연구과제에서는 동양란에 있어서 인위적으로 돌연변이체를 유도한 다음 조직배양기법을 이용하여 증식시키면 동일한 소질을 가진 우수변이 개체를 대량으로 복제하여 생산이 가능할 것으로 판단된다. 본 연구에서 난 변이종의 개발목표는 화학적, 물리적, 생명공학적인 방법 등, 가능한 모든 방법을 이용하여 고 부가가치의 동양란을 다량 생산하는 기술과 생산체계의 확립에 있다. 이와 같은 연구목표달성을 위하여 국내 난 조직배양의 전문가와 생명공학연구분야의 전문가들로 연구진을 구성하여 다양한 연구방법을 통한 동양란 변이체 생산과 생산기술 개발에 연구를 수행하고자 하였다. 생명공학기법을 이용한 변이체 생산을 위하여 초기에는 유전자총을 사용하여 변이 유전자를 도입하려고 하였으며, 효율을 좀더 극대화하기 위하여 생물학적 방법인 아그로박테리움을 이용한 형질전환을 하고자 하였고 생명공학적인 방법 이외에도 호르몬과 화학약품처리를 통한 효율적인 동양란 변이체 생산 연구를 폭넓게 수행하고자 한다. 또한 모든 식물체내에서 체세포변이를 일으키는 것으로 최근에 알려진 retrotransposon에 관한 연구까지 총체적이고 다양한 시도가 연구 목표달성을 위하여 수행하였다. 또한 연구에 참여한 많은 참여 연구원들은 난을 주제

로 학위논문과정을 수행중인 박사, 석사과정 학생들로 구성하여 연구의 효율성을 높이고자 하였다. 유전자총과 아그로박테리움을 이용한 형질전환을 위하여 제작된 expression vector는 특별한 발육상이나 특정한 조건이 주어지면 jumping해 다니며 유전자를 파괴(gene blocking)하여 변이체(variegation)를 만드는 것으로 알려진 옥수수 transposable element (Ac 9)를 coding region으로 하고 이 유전자의 jumping을 온도로 조절(thermo-regulation)하기 위하여 온도유발 promoter인 soybean Gmhsp17.3-B의 promoter를 연결한 expression vector를 사용하고자 한다. 유전자총 사용의 최적조건을 얻기 위하여 GUS유전자를 포함하고 있는 expression vector를 이용하여 난 rhizome조직을 적절히 관통시키기 위한 제반 bombardment 조건과 유전자총 (PDS1000/He)내의 진공정도, rupture disk의 강도, macrocarrier와 stop screen과의 거리, stop screen으로부터 재료까지의 거리 등 유전자 도입의 최대효율을 얻도록 하고자 하였다. 또한 돌연변이 유발원(EMS, MMS, colchicine, trifluralin)의 적절한 사용조건을 확립하여 변이체를 얻기 위한 효과적인 방법을 모색하고, 이를 위하여 종자 및 rhizome등 다양한 재료에 돌연변이원을 처리하여 가장 반응이 잘되고 또한 유묘로 단시일 내에 재분화 유도가 가능한 재료와 조건의 확립과 형질전환 및 돌연변이원의 처리를 위한 조직배양 기초연구도 수행하고자 한다. 연구 계획서에 예정된 실험 외에도 최근에 보고되는 다양한 연구결과에 착안하여 trifluralin 과 고농도의 2,4-D 처리 시험도 수행하고자 한다. 본 연구를 통한 연구개발의 중요성은 무엇보다도 동양란에서 고부가가치의 난을 생산할 수 있는 기술을 개발하거나 고부가가치의 난을 다량 생산하여 농가 보급함으로써 농가의 소득을 증대 시킬 수 있고, 동양란 변이체를 일상적으로 생산하고 보급함으로써 현재 변이체를 얻기 위하여 동호인들을 중심으로 산체에 나서 난의 자연 균락지를 파괴하는 자연훼손을 조금이라도 막을 수 있다는데 그 연구의 의의를 찾아볼 수가 있다. 학문적으로는 아직 연구가 미진한 동양란을 재료로 유전자를 도입하는 체계를 갖추으로써 앞으로 농업적으로 유용한 유전자를 도입하여 고부가가치의 난 품종을 생산하는 체계를 확보할 수 있다는데도 본 연구의 중요성을 찾

을 수 있다고 판단된다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

보다 좋은 형질의 양란 신품종을 육성하기 위하여 우선 모본을 확보하되 원종과 일반 품종을 다양하게 수집한 뒤 그들의 형태적 특성을 관찰하고, 수집한 모본은 개화된 종류를 중심으로 각각 selfing을 실시하고 기타 여러 종류의 난과 수분을 시켜 수정된 종류는 종자의 성숙을 주의 깊게 관찰 후 완전히 성숙한 F1 종자를 확보하였고 수확한 종자는 기내에서 파종하는 방법으로 진행하고자 한다.

발아된 유묘의 증식을 위해 알맞은 배지의 조건을 구명하고 확보된 이들 F1 유묘의 고온 적응성, 병저항성, 내한성 등과 같은 우수 형질들에 대한 잡종강세 발현 감정을 효소분석을 통해 실시하며 적응성이 뛰어난 유묘의 기내 증식 방법을 확립하고 대량 번식 추진을 추진하고자 한다.

동양란 변이체 생산 연구에 있어서는 형질전환용 expression vector를 개발하였는데, soybean heat-shock promoter에 maize transposable element Ac(9)을 연결하여 온도변화에 따라 유전자발현이 조절 가능한 vector를 제작하였다. 유전자총 사용을 위한 재료 확보를 위하여 공시재료로서는 한란과 춘란을 중심으로 신초가 형성되기 직전의 rhizome을 계대배양하여 particle bombardment용 재료를 확보하며, 형질전환 전 후의 조직배양 체계확립을 위해 MS배지와 Hyponex배지를 기본배지로 하여 NAA와 BA의 농도조절에 의한 유식물체 생산을 유도한다. Bombardment의 optimization을 위하여 rhizome을 적절한 헬륨가스압력, 재료까지의 비행거리 그리고 particle size에 따른 실험조건의 최적화를 이루고, GUS유전자를 포함한 vector를 이용하여 bombardment frequency 계산 및 최적조건을 조사한다. 아그로박테리움을 이용한 형

질질전환실험용 균주로는 binary vector pAT6K를 포함하고 있는 LBA4404를 사용하고 pAT6k는 열에 의해서 유전자의 발현이 유도되는 heat shock promoter에 옥수수에서 염색체를 옮겨 다니는 것으로 알려진 transposable element 유전자(transposase)가 연결된 하나의 gene cassette과, 항생제 선발 유전자인 카나마이신 저항성 유전자, 그리고 발색반응을 통하여 형질전환 여부를 구별할 수 있는  $\beta$  - glucuronidase 유전자 (GUS)를 포함하도록 한다. pAT6k plasmid는 electroporation에 의해 LBA4404 안으로 도입하여 형질전환을 위하여 사용하고 형질전환효율에 미치는 전처리의 영향을 알아보기 위하여 실험을 수행하며, 형질전환효율에 미치는 wounding 처리의 효율을 알아보기 위한 실험도 수행한다. 이외에 EMS, MMS, 콜히친 등의 화학약품과 2,4-D, Trifluralin을 이용한 변이체 유발을 위한 실험을 수행하되 EMS, MMS, 콜히친은 0.1, 0.2, 0.3%의 농도에 각각 1,2,3,4,5주간 처리한 다음 생존율과 변이발생 유무를 조사하고 2,4-D와 Trifluralin의 처리는 유리 배양병에 1ppm, 2ppm, 4ppm, 8ppm 농도의 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)를 포함한 근경증식용 고체배지(MS salt 4.4g/L, sucrose 30g/L, 활성탄 0.5g/L, NAA 0.1mg/L, agar 8g/L)를 100mL 넣고, 2개월에서 3개월 동안 계대 배양된 생육이 왕성한 길이 2~3cm 정도 크기의 근경을 배지에 치상한 추가적 화학약품 처리로서는 염색체의 분열을 중기에 고정시키고 분열을 억제하는 것으로 알려진 Trifluralin 처리를 실시하고, 처리 후 근경의 성장 및 재분화 그리고 식물의 형태적 변이 현상을 관찰한다. 또한 식물에서 체세포변이를 일으키는 것으로 알려진 retrotransposon을 cloning 하기 위해 PCR을 수행하는데 retrotransposon을 증폭시키기 위해 PCR에 사용된 primer는 24mer인 5'-GTI TAW YKT IGA YGA YRT IYT IRT-3'와 27mer인 5'-ICK YTC ISW YTG ICC RTC IST YTG IGG-3'을 사용하도록 한다. PCR에 의해 증폭된 DNA는 TA cloning vector(Invitrogen)를 이용하여 ligation 하며, Invitrogen사의 Top10 cell로 transformation 시켜 colony PCR로 확인하고 염기서열을 분석한다. 형질전환 및 처리된 식물의 순화를 통한 변이체유묘의 성체화를 하였고 형태적 변이를 관찰하도록 한다



## IV . 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 제 1 분야 양란 신품종 육성을 위한 지표인자 개발

#### 1-1. 양란 신품종 육성

- 내건성 품종 생산을 위한 계통 육성

양란 교배에 의해 생성된 F1들에 대해 내건성 정도를 스크린하여, 내건성 계통들을 확보하였다. 이들에 대한 특성조사 결과를 토대로 양란 신품종 가능성을 타진한 다음 품종으로서 유망한 계통들을 농가에 보급할 예정이다.

- 내서성 품종 생산을 위한 계통 육성

난의 유연관계를 통한 교배로써 잡종강세를 최대한 이용하여 농민에게 유용한 품종을 육성하는데 있어서 양란의 교배 육종을 위한 육종프로그램에 직접 이용할 수 있는 기초자료를 제공하였고 본 연구결과는 고품질, 고순도, 내재해성, 고선히도의 양란 품종을 개발·육성하는데 활용할 수 있는 자료를 마련하였다.

#### 1-2. DNA 지표인자 개발

- 양란 원종, 육성종 및 교배종간 원연관계를 구명

총 29개 양란 품종에 대하여 RAPD분석을 실시하고 그 분석결과에 따른 양란 원종, 육성종 및 교배종간 원연관계를 구명하였다. 여기에는 총 35개의 UBC primer (10-mer)에서 98개의 informative RAPD 확인하였고 UPGMA 기법을 이용한 genetic similarity를 추정함으로써 차후 고 품질 양란 육성을 위한 교배조합선정의 지표를 마련하였다.

- SCAR primer set를 확보와 genotyping 실시

Informative RAPD band를 SCAR primer로의 전환을 시도하여 20개의 SCAR primer set를 확보하였고, 이를 양란 품종구분을 위해 RAPD보다 재현성이 높은 genotyping을 실시하였으며, 널리 이용되는 SCAR 기법의 문제점을 지적하고 이를 개선하기 위한 기법을 제시하여 적용하였다.

- 높은 재현성 확보와 line discrimination 기법 정립

총 50개의 single copy – gene coding region specific primer set를 개발하여 (CE-계열 STS primer sets) genotyping에 있어서 고질적 문제로 지적되었던 높은 재현성을 확보하였으며, specific allele tagging에 의거한 line discrimination 기법을 정립하였다. 더 나아가서, “Polymorphism – Real gene” 의 관계로 보다 구체적인 유전정보의 획득이 가능하도록 하였으며, 해석상의 모호성이 완전히 배제된 genotyping 기술 확립함은 물론, DB구축을 통한 일관성 있는 자료축적 방안의 제시하였다.

## 제 2 분야 동양란 변이체 생산

- 변이생성 유발 형질전환용 발현백터

본 연구에 사용된 Soybean heat-shock promoter에 maize transposable element Ac(9)을 연결하여 온도변화에 따라 유전자발현이 조절 가능한 발현백터는 다른 식물에서도 변이체를 생성하기 위하여 사용할 수 있는 여건을 마련하였다.

- 동양란 형질전환을 위한 유전자총 사용조건 확립

유전자총을 사용한 변이체 생성 유전자의 도입은 동양란 근경에 유전자를 도입할 때의 가장 적합한 유전자 총 사용조건을 확립하였다. 향후, 난류의 형질전환을 위한

기초적인 연구자료로 활용될 수 있을 자료를 제공하였다.

- 아그로박테리움을 이용한 유전자 형질전환 조건 확립

아그로박테리움을 이용한 유전자 도입실험을 수행한 결과, 근경의 활력을 높게 해주는 전처리기가 매우 중요함을 알 수 있었다. Wounding 조건 실험에서는 무처리나, 2일보다 4일의 wounding이 형질전환효율과 빈도에 좋은 것으로 나타났다. 또한 본 실험에서 동양란 근경의 효율적인 유전자 도입을 위하여 seasand를 사용하여 상처를 내었는데 매우 효과적인 것으로 판명되었다. 같은 방법을 유사식물재료의 형질전환을 위하여 활용할 수 있다는 것을 제공하였다.

- 생체 비파괴적 시약을 이용한 난 변이체 생산조건 확립

안전하고 고효율의 동양란 변이체 생산을 위하여 돌연변이원으로 기존에 사용되었던 MMS, EMS, colchicine 등, 기존 돌연변이원 이외에 colchicine과 같은 기능을 가지며, 세포의 분열주기 조절에 사용되는 metaphase blocking reagent인 Trifluralin을 근경에 처리하여 변이체를 효과적으로 유도하였다. Trifluralin 5 $\mu$ M과 10 $\mu$ M 처리에서 잎이 뒤틀리는 형(twisted leaf), 줄무늬가 나타나는 형(striped leaf) 엽폭이 두껍고 키가 작게 나타나는 단엽형(short and wide leaf), 잎의 수에 비하여 키가 작은 왜화형(shrinked leaf), 잎이 곡선으로 말리는 형(curled leaf)등의 형태적 변이를 나타내었다. 따라서 trifluralin은 농가에서도 손쉽게 배지에 처리하여 다양한 형태의 화훼식물변이체 생산을 위해 사용될 수 있는 안전하고 효율적인 시약으로써의 활용가능성을 제시하였다.

- 추가적인 돌연변이원 가능성 탐색

현재 염색체관찰을 위해 사용되는 시약은 DNA synthesis inhibitor인 hydroxyurea(HU)와, metaphase blocking agent인 colchicines과 amiprophos-

methyl 등이 사용되고 있는데, 세포에 지나친 상해를 주지 않는다면 이와 같은 다양한 시약을 처리하는 것도 변이체 생산에 도움을 줄 것으로 생각된다.

- 동양란 자체 유전자에 의한 변이체 생산 가능성 탐색

조직배양이나 스트레스 조건에서 활성화 되어 체세포변이를 일으키는 것으로 알려진 retrotransposon을 본 연구에서 클로닝하였는데, 이들의 활성화조건을 규명할 경우, 동양란 변이체 생산을 매우 손쉽게 할 수 있는 방법이 개발될 가능성이 매우 높다는 결과를 제시하여 응용이 가능하도록 하였다.

- 돌연변이원(MMS, EMS, colchicine)을 이용한 동양란 변이체 생산 조건 확립

한란은 MMS 0.1% 농도에서 3주 처리한 것이 일 변이체 발생율이 가장 높았으며, EMS 0.1% 농도에서 3주 또는 4주 처리한 경우에도 변이체가 많이 생산되었다. 한란의 경우, colchicine을 처리하였을 때 전체적인 생존율과 변이체 발생율이 높았는데 0.2%와 0.3%의 농도에서 3주간 처리한 것이 가장 효과가 좋았다. 본 실험 결과 얻어진 돌연변이원의 처리조건을 농가에 보급하여 농가에서 변이체를 생산할 수 있는 기술로 활용할 수 있다.

- 돌연변이처리에 의해서 생산된 변이체 증식 및 농가 보급

위의 결과를 종합하여, 현재 생산된 변이체는 농가에 공급하여서 다량으로 증식 및 품종화를 꾀하고, 농가에서도 변이체를 손쉽게 생산할 수 있는 시약이나 방법을 공급하여, Trifluralin과 같은 효과적인 시약이 보급되어 진다면 조직배양 배지 등에 쉽게 첨가되어 동양란 변이체를 다량으로 생산하는데 사용될 수 있으며 현재 한란 중투와 서, 호, 복륜 등 다양한 변이체의 근경을 유발하여 증식 중에 있다.

또한 본 과제를 통하여 개발된 중투와 복륜 한란은 현재 제주도의 농가에 보급하여 생산 중에 있다.

## SUMMARY

### 1. Development of DNA marker for the production of *Cymbidium* cultivar

#### 1-1. Production of *Cymbidium* cultivar

The main purpose of *Cymbidium* breeding is to produce better variety with higher quality than previous ones. But the achievement of this goal has been limited due to the scarcity of genetic information and too much variation from the species. Therefore, it is necessary to elucidate genetic background including breeding pedigree to create proper cross combination. The elucidation of genetic background is easily obtained from the genetic analysis with DNA markers. In this study, 16 original *Cymbidium* species and most popular 21 cultivars were selected and scrutinized for horticulturally important morphological characteristics. Full crosses as many as possible were carried out among the selected cymbidiums. As a result, different fertilities were observed, for example, higher fertility from selfing of species and between species and varieties. The fastest germination was observed from seeds of the cross between 'Venus' × 'Moon Venus' at 115th days after seeding. Most of those seeds from the crosses between 'Moon Light' × *C. ebrunum*, 'Pepermint Party' × *C. ebrunum*, and *C. ebrunum* × *C. ebrunum* showed germination at the 150th day after seeding. The best media condition for germination was Hyponex and half strength MS media was next, indicating that low salts condition without hormone application helps germination. In an experiment to test drought-, low temperature-, and high temperature-resistance, the hybrid seeds from the crosses between *C. ebrunum* × *C. 'Ayako Tanaka'*, *C. 'Pepermint Party'* × *C. ebrunum* showed higher endurance for the treatments than others. Another test to check the sensitivity against *Fusarium*,

casual agent for rotten disease, was performed. The result indicated that most original species showed resistance against *Fusarium* and the resistance gradually decreased in the crosses between varieties. Summarizing the results, creation of various combination of crosses including original species is most desirable way to produce F1 hybrid variety with favorable vigor.

#### 1-2. Development of DNA marker

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

In the study present here, specific primer sets were developed from RAPD and

methylation-sensitive-enzyme-restricted genomic DNA clones (active genome semi-library). Our first goal was to develop practical and reliable easy-to-use method to discriminate Korean *Cymbidium* lines in which very narrow genetic diversity is expected. We focused on detail description of the alleles, band sizes of amplified products, the presence and absence of recognized sequences by 4 endonucleases, *AhaI*, *HaeIII*, *HinA*, and *RsaI* within the amplified products, and their sizes of cleaved products, in a locus among lines tested. Newly developed cultivars, consequently, could be easily characterized via comparison of defined alleles by specific locus tagging (STS-PCR with the primer sets in DB) followed by allele analysis.

## 2. Production of oriental *Cymbidium* variegates

An experiment was carried out to produce high value variegates of Oriental *Cymbidium* via genetic transformation and chemical treatments. The most optimal condition for genetic transformation with gene gun was decided on the bombardment pressure 1350 psi and no difference was observed from different distance conditions between rupture disk and plant materials. The genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens* was also performed with the expression vector pAT6K containing maize transposable element which is known to be a jumping element over chromosome. For better transformation efficiency, preculture of rhizomes for 3days or 7days and wounding period for 0, 2, 4 days were applied. The results from GUS analysis indicated that 7days preculture (42%) and 4days wounding (67%) treatment would provide higher efficiency of genetic transformation. In an experiment with 2,4-D treatment (1, 2, 4, 8 ppm) to induce morphological variants, all the treated rhizomes showed hairy appearance but no remarkable morphological changes. In an experiment with trifluralin

treatment to create morphological variants, various types of variation were observed. Those were twisted leaf, striped leaf, wide leaf, shrunk leaf, and curled leaf. And some plants possessed more than two morphological variations were observed. According to the present results trifluralin seemed to be a good candidate for safe and efficient mutagenesis.



# CONTENTS

Chapter 1. Introduction.....	1
1. Research background .....	1
1st division Development of DNA marker for cymbidium breeding.....	1
1-1. Cymbidium hybrid production .....	1
1-2. DNA marker .....	1
2nd division Oriental cymbidium variegates production.....	3
2. Rational for research project.....	6
1) Rational for technical aspect.....	6
1st division Development of DNA marker for cymbidium breeding.....	6
2nd division Oriental cymbidium variegates production.....	7
2) Economical and social aspect.....	8
1st division Development of DNA marker for cymbidium breeding.....	8
2nd division Oriental cymbidium variegates production.....	9
3) Current status of related technics.....	9
1st division Development of DNA marker for cymbidium breeding.....	9
1-1. Cymbidium hybrid production .....	9
1-2. DNA marker .....	10
2nd division Oriental cymbidium variegates production.....	13
3. Purpose and research area .....	13
1st division Development of DNA marker for cymbidium breeding.....	13
1-1. Cymbidium hybrid production .....	13
1-2. DNA marker .....	14
2nd division Oriental cymbidium variegates production.....	14
Chapter 2. Materials and Methods .....	16
1. Plant materials .....	16
1st division Development of DNA marker for cymbidium breeding.....	16
1-1. Cymbidium hybrid production .....	16
1-1-1 First year crosses .....	16
1-1-2 Second year crosses .....	19
1-2. DNA marker .....	20
1-2-1 Development of RAPD marker and phylogenetic study .....	20
1-2-2 Development of SCAR marker and genotyping .....	20
1-2-3 Selection of plant for CE and CReT-STS-PCR primer set test.....	20

2nd division Oriental cymbidium variegates production.....	21
2. Methods.....	21
1st division Development of DNA marker for cymbidium breeding.....	21
1-1. Cymbidium hybrid production.....	21
1-1-1 Interspecific crossed of <i>Cymbidium</i> .....	21
1-1-2 F1 hybrid production and germination.....	21
1-1-3 Drought resistance screening of F1 hybrids.....	22
1-1-4 Hot temperature resistance screening of F1 hybrids.....	22
1-1-5 Enzyme analysis of F1 hybrid.....	23
1-1-6 Fusarium resistance line selection.....	23
1-2. DNA marker.....	24
1-2-1 DNA extraction.....	24
1-2-2 RAPD analysis and phylogenetic study.....	25
1-2-3 SCAR (defined element tagging primer) primer sets.....	26
1-2-4 Application of SCAR primer.....	26
1-2-5 Genotyping by RE treatment of monomorphic SCAR-PCR.....	27
1-2-6 Construction of active genome region-enriched semi-library.....	27
1-2-7 Sequence analysis of active genome region-enriched semi-library clone & STS primer construction.....	28
1-2-8 RE cutting of monomorphic CE-PCR product.....	28
1-2-9 Genotyping by retrotransposon elements.....	29
2nd division Oriental cymbidium variegates production.....	29
2-1 Genetic transformation by microprojectile bombardment.....	30
2-2 Bacterial strains and plasmids for transformation.....	32
2-3 Preculture.....	33
2-4 Wounding.....	33
2-5 Co-cultivation.....	34
2-6 Wash-out and regeneration.....	35
2-7 GUS expression assay.....	36
2-8 DNA extraction and PCR.....	36
2-9 2,4-D treatment.....	37
2-10 Trifluralin treatment.....	37
2-11 PCR amplification of retrotransposon.....	38
2-12 Production of variegates using mutagen.....	39
Chapter 3. Results and discussion.....	40
1st division Development of DNA marker for cymbidium breeding.....	40
1-1. Cymbidium hybrid production.....	40

1-1-1	F1 hybrid production .....	40
1-1-2	F1 hybrid production and germination .....	44
1-1-3	Drought resistance screening of F1 hybrids .....	48
1-1-4	Hot temperature resistance screening of F1 hybrids.....	51
1-1-5	<i>Fusarium</i> resistance line selection .....	52
1-2.	DNA marker .....	54
1-2-1	RAPD marker and phylogenetic study.....	54
1-2-2	SCAR marker and its application .....	58
1-2-3	Active genome region-enriched semi-library clone analysis and STS primer construction.....	70
2nd division	Oriental cymbidium variegates production .....	82
2-1	Expression vector .....	82
2-2	Microprojectile bombardment .....	83
2-3	Effect of preculture for transformation .....	84
2-4	Effect of wounding period for transformation .....	86
2-5	2,4-D treatment for variegate production.....	90
2-6	Trifluralin treatment for variegate production.....	90
2-7	Oriental cymbidium retrotransposon subcloning.....	100
2-8	Variegate production using mutagen.....	101
Chapter 4. References.....		113
Appendix .....		118

# 목 차

제 1 장 서 론.....	1
제1절 연구배경.....	1
제 1 분야 양란 신품종 육성을 위한 지표인자 개발.....	1
1-1. 양란 신품종 육성.....	1
1-2. DNA 지표인자 개발.....	2
제 2 분야 동양란 변이체 생산.....	3
제2절 연구개발의 필요성.....	6
제1항 기술적 측면.....	6
제 1 분야 양란 신품종 육성을 위한 지표인자 개발.....	6
제 2 분야 동양란 변이체 생산.....	7
제2항 경제·사회적 측면.....	8
제 1 분야 양란 신품종 육성을 위한 지표인자 개발.....	8
제 2 분야 동양란 변이체 생산.....	9
제3항 국내의 관련기술의 현황과 문제점.....	9
제 1 분야 양란 신품종 육성을 위한 지표인자 개발.....	9
1-1. 양란 신품종 육성.....	9
1-2. DNA 지표인자 개발.....	10
제 2 분야 동양란 변이체 생산.....	13
제3절 연구개발의 목적과 범위.....	13
제 1 분야 양란 신품종 육성을 위한 지표인자 개발.....	13
1-1. 양란 신품종 육성.....	13
1-2. DNA 지표인자 개발.....	14
제 2 분야 동양란 변이체 생산.....	14
제 2 장 재료 및 실험방법.....	16
제1절 연구재료.....	16
제 1 분야 양란 신품종 육성을 위한 지표인자 개발.....	16
1-1. 양란 신품종 육성.....	16
제1항 1차년도 교배.....	16
제2항 2차년도 교배.....	19
1-2. DNA 지표인자 개발.....	20
제1항 RAPD 표지인자 개발 및 근연도 추정.....	20
제2항 SCAR primer조합의 적용기준과 양란 품종 선별.....	20
제3항 CE-계열 및 CReT-STs-PCR primer set의 시험을 위한	

양란 재료 선정.....	20
제 2 분야  동양란 변이체 생산.....	21
제2절  실험방법.....	21
제 1 분야  양란 신품종 육성을 위한 지표인자 개발.....	21
1-1. 양란 신품종 육성.....	21
제1항 <i>Cymbidium</i> 속간 교배실험.....	21
제2항  F1종자의 생산 및 파종.....	21
제3항  F1 유묘의 신품성 육성을 위한 내건성 품종 선발.....	22
제4항  F1 유묘의 신품성 육성을 위한 내서성 품종 선발.....	22
제5항  잡종강세 현상 구명을 위한 효소분석.....	23
제6항  F1 유묘의 신품성 육성을 위한 <i>Fusarium</i> 내병성 품종 선발.....	23
1-2. DNA 지표인자 개발.....	24
제1항  DNA 추출.....	24
제2항  RAPD 분석 및 근연도 추정.....	25
제3항  Polymorphic RAPD의 cloning을 통한 defined element tagging primer 조합의 개발(SCAR primer sets).....	26
제4항  SCAR primer의 적용.....	26
제5항  Monomorphic SCAR-PCR 산물의 제한효소 처리 및 Genotyping.....	27
제6항  양란 active genome region-enriched semi-library 구축.....	27
제7항  Active genome region-enriched semi-library clone들의 염기서열 분석과 STS primer 합성 및 적용.....	28
제8항  제한효소를 이용한 monomorphic CE-PCR product의 절단.....	28
제9항  Retrotransposon elements의 근연종의 품종구분 적용.....	29
제 2 분야  동양란 변이체 생산.....	29
제1항  유전자총을 이용한 형질전환.....	30xlix
제2항  형질전환 Bacterial strains and plasmids.....	32
제3항  전배양.....	33
제4항  Wounding.....	33
제5항  Co-cultivation.....	34
제6항  Wash-out and regeneration.....	35
제7항  GUS expression assay.....	36
제8항  DNA 추출 및 PCR.....	36
제9항  2,4-D treatment.....	37
제10항  Trifluralin treatment.....	37
제11항  PCR amplification of retrotransposon.....	38
제12항  돌연변이원 사용 변이체 생산.....	39
제 3 장  결과 및 고찰.....	40

제 1 분야	양란 신품종 육성을 위한 지표인자 개발.....	40
1-1.	양란 신품종 육성.....	40
제1항	교배실험.....	40
제2항	F1 종자의 생산 및 파종.....	44
제3항	F1 유묘의 신품성 육성을 위한 내건성 품종 선발.....	48
제4항	F1 유묘의 신품성 육성을 위한 내서성 품종 선발.....	51
제5항	F1유묘의 신품성 육성을 위한 <i>Fusarium</i> 내병성 품종 선발.....	52
1-2.	DNA 지표인자 개발.....	54
제1항	RAPD 표지인자 개발 및 근연도 측정.....	54
제2항	SCAR 표지인자 개발 및 적용.....	58
제3항	Active genome region-enriched semi-library clone들의 염기서열 분석 과 STS primer 합성 및 적용.....	70
제 2 분야	동양란 변이체 생산.....	82
제1항	형질전환 벡터.....	82
제2항	유전자총을 이용한 형질전환.....	83
제3항	전배양 처리가 형질전환효율에 미치는 영향.....	84
제4항	Wounding기간이 형질전환 효율에 미치는 영향.....	86
제5항	2,4-D 처리가 변이체 생산에 미치는 영향.....	90
제6항	Trifluralin 처리가 변이체 생산에 미치는 영향.....	90
제7항	난 retrotransposon subclonig.....	100
제8항	돌연변이원 사용 변이체 생산.....	101
제 4 장	인용 문헌.....	113
부 록	.....	118

# 제 1 장 서 론

## 제1절 연구배경

제 1 분야 양란 신품종 육성을 위한 지표인자 개발

### 1-1. 양란 신품종 육성

난과식물은 단자엽식물 중에서 식물학적으로 가장 진화된 것으로 알려져 있다. 난은 일반 식물처럼 유성적으로 종자번식을 하고 무성적으로 영양번식을 한다. 난 종자는 배유가 없기 때문에 난균의 도움으로 발아되거나 무균배지를 만들어 인위적으로 난종자의 발아와 원피체 발육을 도울 수 있게 된다. 양란에 관한 연구 배경은 다음과 같다

#### ① 조직학적 연구

난 종자로부터 배발생까지의 과정과 번식체에서 식물체로의 분화를 형태학적, 조직학적인 면에서 비교 분석하였다(백 등, 1990). 그리고 *Neofinetia falcata*의 callus로부터 증식과 재분화, PLB에서 callus 유도과 배발생 callus로부터 재분화된 식물의 꽃형태 연구, 원형질체 나출과 배양 등의 연구가 진행되었다 (新美善行 등, 1995).

#### ② 종자발아 연구

발아 촉진을 목적으로 적정 파종 시기, 종자 살균방법과 종피의 투수성을 증대, 발아억제 물질 용해, 종피의 연화를 위한 KOH, Ca(ClO)<sub>2</sub> 처리, 초음파처리, 배지의 종류, 광조건, 성장조절제에 따른 발아정도 등에 관한 실험 결과는 일관성이 부족했으며, 일반적으로 사용하는 배지조건은 Hyponex 3g/L, peptone 4g/L, NAA 0.1mg/L, Kinetin 0.01mg/L이다 (최 등, 1993).

#### ③ 조직배양시 적정배지 선발

동양란 근경의 적정배지로는 MS 배지, 1/2MS, Hyponex, Knudson C 등의 배지가 효과적이었으며 첨가물로서 peptone 3g/l, charcoal 0.1%, sucrose 3%, agar 0.7% 또는 0.8% 그리고 과즙 등을 사용하였다. 그리고 NAA, BA, Kinetin 등의 성장조절제를

동일 비율로 저농도 첨가시 근경의 증식에 효과적이었고 이들의 비율을 달리하여 고농도를 첨가하였을 경우에 분화가 촉진되었다 (백 등, 1989).

#### ④ 환경에 따른 개화생리 연구

여름철 고온에 의한 *Cymbidium*의 성장장애를 극복하고 개화촉진을 위하여 야간저온과 GA를 처리한 결과 화아 발달과 개화기를 앞당겼고, 연부병의 이병율을 감소시켜 조기출하와 상품성에 매우 효과적이었다 (김, 1994). 화아유도와 개화, 꽃색에 대한 온도와 관수의 효과, 개화유도에 대한 IAA의 효과, 고온으로 인한 화아의 blasting 연구, 절화수명 연장 등의 제배적인 연구결과가 보고된 바 있었다.

#### ⑤ 육종학적인 연구

국내에서는 교잡육종에 관한 연구가 몇 편 (김, 1997; 김, 1997, 경, 1997)이 보고되었을 뿐 육종에 관한 연구는 극히 미비한 실정이다. 이에 반해 해외에서는 영국 RHS(Royal Horticultural Society)에 공인 받는 신품종의 수가 매월 100여종에 이를 정도로 활발한 연구가 수행되고 있다.

⑥ 그 외 해부학, 계통발생학, 수분생리, 생태학, 분류학 등에 관한 다수의 연구보고가 있었다.

### 1-2. DNA 지표인자 개발

최근 우리나라 화훼 농가에서 가장 중요한 작물로 취급되고 있는 난과 식물은 다른 식물에 비해 종속간의 교잡이 비교적 쉬우나, 환경이나 원연으로 인한 생식적 격리도 인해 임성이 떨어지는 특성을 보인다. 교배시에는 근연관계가 멀수록 잡종강세현상이 나타나므로 정확한 진단방법에 의해 교배 가능한 영역 내에서 유전적으로 원거리인 품종간에 교배를 시키면 저항성 및 다양한 형질을 가진 새로운 품종들을 생산할 수 있다 그러나 난과식물은 국내외적으로 제배면적이 높은데도 불구하고, 종간의 근연관계와 이를 기초로 한 체계적인 육종이 이루어져 있지 않아 품종의 가계(pedigree) 정보나 난 genome에 대한 기초연구가 요구되고 있다.



품종으로서의 요건이 충족된 신품종이 개발되면 이를 법적으로 보호해 줌으로써, 육종가와 신품종 생산자의 권리를 보호해 주고, 우수품종 보급을 촉진하여 궁극적으로는 농업생산성 증가와 농민소득 증대를 도모할 수 있다. 이것은 특허권, 저작권, 상표권, 의장권 등과 같은 지적 소유권의 한 형태이다. 많은 노력으로 새로운 품종이 육성되더라도, 공개된 이후 다른 사람들에 의해 재생산되는 경우가 많아, 육종가의 투자에 대한 적절한 보상의 기회가 박탈되어진다. 그러나 식물 신품종 보호 및 변이로 인한 상품가치의 상실 등에 효과적으로 대처하기 위해서는 상품성이 확보되는 시기뿐만 아니라, 전 생육기에서 언제든지 형질검정이 가능하여야 한다. 양란은 형태적, 생리적 표지인자를 이용하여 품종을 구분하여 왔는데, 가용한 표지인자의 수가 제한적이며, 적용에서도 모호한 점이 상당하여 특정 line이나 변이체를 정확히 구분하는 데에는 많은 어려움이 따랐다. 그러므로, 보편적이면서도 검정 절차가 단순화되어 시간과 경비를 절약함과 동시에 검정결과와 일관성이 확보된 기법을 개발하는 것이 급선무라고 할 수가 있다.

## 제 2 분야 동양란 변이체 생산

동양란 중에서 잎에 무늬가 들어있는 종류는 보통종에 비하여 관상가치가 높을 뿐만 아니라 가격이 월등하게 높은 것이 일반적인 추세이다. 특히 우리나라에서 자생하는 온대산 심비디움속 중에서 한란(*Cymbidium kanran*)은 희귀보호식물이며 춘란(*Cymbidium goeringii*)은 내한성이 강하고 잎에 무늬가 들어있는 종류는 관상가치와 희소성 때문에 무늬종을 육성할 경우 부가가치가 매우 높다. 그러나 아직까지도 잎무늬종의 한란이나 춘란은 거의 모두가 자생지에서 자연적 돌연변이를 일으킨 개체들을 불법으로 채취하여 제베해왔다. 근래에 들어서 난의 조직배양이나 종자의 무균발아 기술이 발달되어 널리 이용되면서부터 동양란의 기내 대량생산이 가능하게 되었기 때문에 잎무늬종의 기내 대량생산도 가능할 것으로 판단된다. 일반식물에 있어서 EMS나 MMS 등과 같은 화학약품이나 방사선을 처리하여 돌연변이를 일으키게 하거나 유전공

학적인 기법으로서 transposable element를 포함한 expression vector를 이용하여 chimera적인 변이체를 유도하는 방법이 알려져 있다. 따라서 한란과 춘란을 비롯한 동양란에 있어서도 이와 같은 기법을 이용하여 인위적으로 체세포 돌연변이체를 유도한 다음 조직배양기법으로 대량증식 시키면 동일한 소질을 가진 우수 변이개체를 대량으로 복제하여 생산이 가능할 것으로 판단된다.

난과식물을 재료로 유전자총(particle bombardment)을 이용한 형질전환 실험의 예로써는, *Dendrobium*(Kuehnle 과 Sugii, 1992; Chia et al. 1994)과 *Phalaenopsis*의 protocorm-like bodies(PLBs)로의 형질전환 실험이 있었고(Belardino 와 Mii, 2000), 그리고 *Vanda*(Chia et al. 1990) 와 양란을 재료로 형질전환을 한 실험보고는 있었으나(Yang et al., 1999), oriental cymbidium을 재료로 형질전환을 했다는 보고는 아직 없다. 따라서, 동양란의 변이체 생산에 있어 느린 생육으로 인한 형질전환의 어려움을 극복하고 유전자 도입에 따른 안정적인 고부가가치의 동양란 생산 기술을 확립한다면 이는 동양란의 산업화와 고부가가치화에 기여할 수 있다고 생각된다. 옥수수 등의 전이 유전자인 transposable element(또는 transposon)는 염색체내에서 jumping 하면서, 유전자의 기능을 block하여 변이체를 유도하는 것으로 알려져 있는데, 염색체내에서의 전이(transposition)가 낮은 빈도로 일어나고, 발생 시기도 조절할 수가 없어 그 이용이 매우 어려운 것으로 알려져 왔다(Doring, 1989; Levy and Walbot, 1990). 낮은 빈도의 전이를 극복하기 위하여 strong promoter에 의해 transposon의 발현을 유도하는 연구가 수행되었으며(Grevelding et al., 1992), 또한 *Antirrhinum*에 있는 transposon(*Tam3*)은 저온에 의해 발현이 유도되어지는 것으로 연구 결과 밝혀져, transposon의 활성화가 조절될 수 있는 가능성을 보여주었다(Carpenter and Coen, 1991). 그리고 이러한 연구 결과를 토대로, 보다 정교한 유전자 발현을 시도한 연구가 진행되어, 조직 특이적 promoter를 이용한 형질전환 실험 결과에서 담배와 예기장대 풀의 특별한 조직에서만 transposon이 활성화되는 결과를 보여주기도 하였고(Honma et al., 1993; Rommens et al., 1992), 온도에 따라 transposon의 발현을 조절할 수 있

는 체계가 완성되기도 하였다(Balcells et al., 1994). Balcells 등은 옥수수 Ac transposase 유전자에 heat-shock promoter를 연결함으로써 고온 처리에서 약 120 배 이상의 transposase 유전자 발현을 보이는 형질전환 애기장대풀을 만들었으며, 그 후대에서도 열처리에 의해 transposon이 염색체의 새로운 위치로 전이하였음을 확인 하였다. 이들에 의해 사용된 heat-shock promoter(Gmhsp17.3-B)는 콩의 heat shock 단백질 유전자에서 분리된 것으로서 heat shock consensus element를 TATA box 부근에 가지고 있으며, 두 개의 중첩된 element는 열에 의해서 유발되는 유전자의 발현을 위해서 필요한 것으로 알려져 있다(Schoffl et al., 1989). Heat-shock promoter와 같은 inducible promoter의 사용은 현재, 식물 형질전환을 위해서 사용되는 promoter들의 대부분은 strong promoter이고, 이들은 형질전환 유전자들의 강력한 발현을 유도하나 때로 지나친 발현으로 인해 식물체의 형태적 기형화를 만드는 등 문제점을 나타내고 있는 점을 고려할 때, 올바른 유전자 조작을 위하여 바람직한 일이라고 생각된다. 앞으로는 유전자의 효율적인 식물내로의 도입뿐만 아니라, 적절한 시기와 양의 발현조절도 중요한데, 이런 목적을 달성하기 위하여 heat shock promoter와 같은 inducible promoter의 사용을 적극 활용해야 할 것으로 생각된다.

고부가가치의 동양란 변이체 생산을 위하여 돌연변이원으로 MMS, EMS, colchicine 등과 같은 시약이 이용될 수도 있지만, 이들은 식물체의 생육을 저해하고 치사율이 높을 것으로 추측되어 진다. 최근에 세포유전학 연구에 세포의 분열주기 조절에 사용되는 metaphase blocking reagent인 Trifluralin은 콜히친과 비슷한 기능을 가지며, 식물세포에 독성이 별로 없는 것으로 알려져 있다(Lee et al., 2000). Trifluralin은 기존 돌연변이원과 다르게 식물세포의 생장에 장애를 일으키지 않으며, 세포 분열중기에 염색체를 같은 상에 머물게 함으로써 세포분열 중에 염색체가 배가가 되거나 염색체 배가로 인한 재조합을 일으키는 것으로 알려져 있다. 따라서 생육이 왕성한 성장점에 처리 할 경우에, 염색체 이상으로 인한 변이체가 생성될 가능성이 매우 높다. 세포 유전학에서 쓰이는 시약 중에 이와 같은 유사한 목적으로 쓰일 수 있는 것으로는 DNA

synthesis inhibitor인 hydroxyurea(HU)와, 또 다른 metaphase blocking agent인 amiprophos-methyl 등이 있는데, 이들도 세포에 지나친 상해를 주지 않는다면 이들을 이용함으로써 동양란 변이체 생산에 도움을 줄 것으로 생각된다.

최근 일련의 연구는 동물이나 효모에서와 마찬가지로 식물에도 다양한 종류의 retrotransposon이 존재하고 발현되는 것으로 보고되어 있고(Laten et al., 1998), 식물 genome의 상당한 부분이 retrotransposon sequence로 반복되어 있음이 밝혀지고 있다. 식물 retrotransposon의 일반적인 발현은 각기 다른 조직에서의 비교 연구가 행하여지지 않았기 때문에 정확하게 식물의 retrotransposon을 규명하기에는 어려움이 따르나, 대부분의 식물 retrotransposon이 스트레스나 환경적 요인에 의해서 활성화되어지고, 가장 잘 특성이 연구된 식물 retrotransposon은 특히 in vitro에서 protoplast의 분리나 세포배양에서 활성화되는 것으로 알려져 있다(Grandbastien et al., 1998). 이외에도 식물 retrotransposon은 발육상 전개에 따른 호르몬과 발육요인에 의해서(Pouteau et al., 1991), 또는 병 발생에 대한 방어기작의 일환으로 발현되는 것으로 연구 보고된 바 있다(Grandbastien et al., 1997). Retrotransposon에 대한 활성화된 연구는 이들을 이용한 gene-tagging과 transformation vector제작과 같은 응용분야 뿐만 아니라, 유전자 발현 조절에 관한 기초연구와 유전자의 구조에 영향을 미치는 환경조건과 같은 매우 귀중한 연구에 많은 정보를 제공해 줄 것으로 생각된다.

## 제2절 연구개발의 필요성

### 제1항 기술적 측면

#### 제 1 분야 양란 신품종 육성을 위한 지표인자 개발

난과 식물은 다른 식물에 비해 종속간의 교잡이 비교적 쉬우나, 환경이나 유전적 원인으로 인한 생식적 격리로 인해 임성이 떨어지고 또한 어느 정도 근연관계가 필수적 교잡종의 강세현상이 나타나므로 RAPD법에 의한 상대적인 교배친화성과 근연관계의

연구가 요구된다. 신품종 육성을 위해서는 난의 유전학적인 기초자료가 마련되어야 한다. 그러나 양란은 품종 및 계통간의 변이가 다양하여 분류화 작업이 제대로 이루어지지 않아, 품종의 가계 (pedigree) 정보나 난 genome에 대한 기초연구가 요구된다. 현재 분류화 작업에는 형태적 형질, 동위효소 변이 등이 이용되고 있으나 이들은 품종간의 변이를 충분히 구별화 시키기에는 변별력이 적어서 사용이 매우 제한적이다. 대부분의 종묘회사나 농가에서는 우량한 계통을 선발하는 작업에 있어서 육안으로 형태적 형질을 관찰하거나 혹은 동위효소 변이 등을 이용하고 있다.

최근에 널리 사용되는 DNA 인자들을 고소득 작목인 양란에 이용하게 되면 품종분류의 체계화가 이루어질 수 있으며 이 지표인자들을 이용하여 원년간 교잡을 할 경우 잡종강세와 같은 유용한 형질을 육종프로그램에 직접 이용할 수 있다. 최근 농림부와 농촌진흥청 종자보급소에서는 OECD 가입의 후속조치 중의 일환으로 종자산업법을 제정하여 금년 말에 발효될 예정으로 있어 신품종을 등록하여 육종가의 배타적인 권리를 보호하기 위해서는 형태적 특성의 분석도 있어야 하지만 세밀화된 구별화가 없으면 보호의 기능을 제대로 할 수가 없다. DNA marker가 없이 새로운 품종을 개발하는데 장기간의 시간이 소요되는데, 본 연구 완성의 결과로 얻어지는 DNA marker를 이용할 경우 단기간 내에 원하는 형질들이 조합된 genotype을 식별할 수 있어 유망한 품종을 개발, 보호하는데 이용할 수 있으리라 사료된다.

## 제 2 분야 동양란 변이체 생산

현재 난 변이체 들은 자연상태에서 자생하는 개체들을 수집하고 있는 실정이기 때문에 이들의 확보가 그리 쉽지가 않다. 난 조직배양이 널리 보급되어 있음에도 불구하고 유전자를 형질전환하는 체계가 확립되어 있지 않다. 상대적으로 값비싼 동양란의 경우, 생육이 매우 완만하여 조직배양을 기초로 한 유전자조작이 매우 어려운 것이 현실이지만, 현재 사용되고 있는 물리적, 생물학적인 형질전환 방법 등, 모든 가능한 방법을 총동원하여 유전자 도입을 시도할 필요성이 있다. 물리적인 방법인 유전자총을

사용할 경우 callus 상태에서 재분화까지 장시간 소요될 가능성이 있으므로 이를 피하여야 한다. 형질전환을 위한 식물재료로서는 rhizome을 이용하고 bombardment를 시도함으로써 형질전환된 세포와 비형질전환된 세포들의 혼합체를 구성시키고 이들 키메라 상태의 조직으로부터 항생제에 의한 선발 없이 식물로의 재분화를 유도함으로써 빠른 변이체의 생성을 유도할 수가 있다. 변이체를 유발시키기 위한 유전공학적 기법으로는 transposable element를 포함한 expression vector를 유전자총을 이용하여 rhizome상태에서 형질전환시킨 후 transposable element들에 의해 염색체상의 정상적인 유전자들의 발현을 무작위적으로 억제시켜 키메라적인 변이체를 유도한다. Expression vector를 만들 때 transposable element를 soybean heat-shock promoter에 연결함으로써 그 발현시기를 조직배양시 온도변화로 조절한다. 형질전환 이외에 기존에 돌연변이 유발을 위하여 사용되는 화학물질 뿐만 아니라, 돌연변이 유발이 가능한 다양한 화학약품을 처리하여 그 가능성을 알아봄으로써 농가에서 돌연변이원으로 쉽게 사용할 수 있는 시약을 개발하고 보급하는 것도 매우 중요한 일이라고 생각된다.

## 제2항 경제·사회적 측면

### 제 1 분야 양란 신품종 육성을 위한 지표인자 개발

잡종강세를 이용하여 다량의 우수한 형질을 동시에 갖는 양란 품종개발에 사용할 수 있으며, 고소득 작목으로 개발하여 세계화에 능동적으로 대처하는 것이다. 1차산업인 농업을 2차산업으로 의미를 부각시킬 수 있게 되고, 농민들의 고부가가치 작목재배에 의한 소득증대에 기여할 수 있다. 국내 화훼산업 중 난류는 면적이나 생산에 있어 급격한 증가현상을 나타내고 있으며 부가가치가 높아서 생산량이나 금액면에서 최대의 품목으로 신장하고 있다. 일반 농산물의 수입자유화로 인하여 우리나라의 농가가 위기에 처한 현시점에서 일반 화훼류에 비하여 고수익성의 양란은 국내 수요보다 수출에

중점을 두어 수출 유망 품종으로 적극 개발해야 한다. 국내의 화훼수출 산업을 위해 보다 우수한 형질을 가진 신품종의 개발을 위해 RAPD법에 의한 근연관계를 기초로 한 새로운 교배조합 연구가 요구된다. 이를 위해선 품종 및 계통의 분류화와 같은 기초적인 다양한 유전학적인 연구가 필요하다.

이러한 기초자료를 이용하여 신품종을 육성함으로써 국내수요의 저변확대 및 해외시장확보를 통한 국내 난류재배 산업을 활성화 시킬 수 있으리라 기대한다.

## 제 2 분야 동양란 변이체 생산

동양란 변이체 생산기술은 농가의 고수익을 보장해 줄 뿐만 아니라, 동양란의 다양한 품종생산을 통한 사회 저변확대에도 크게 도움을 줄 것으로 생각된다. 적절한 인위적인 변이체의 생산은 변이체의 가격의 안정도 가져와 일반인들도 변이체를 쉽게 수집하고 키울 수 있는 길을 열어줄 것으로 생각된다. 일인당 국민소득 증가 추세와 더불어 일반인들의 취미생활이 다양화되고 있는 경향에 맞춰 변이체에 대한 일반국민의 생산과 소비가 늘게 될 것이라고 생각된다. 현재와 같은 추세의 난 소비증가와 수입증가를 고려해 볼 때 국제경쟁력을 지닌 고품질, 고부가가치의 난 생산이 요구되어지고 있고, 특히 한란과 춘란을 비롯한 풍란, 나도풍란, 석곡을 비롯하여 심지어는 양란까지도 새로운 변이체를 개발하여 고부가가치의 고소득작물로서 개발할 필요가 있다.

## 제3항 국내의 관련기술의 현황과 문제점

### 제 1 분야 양란 신품종 육성을 위한 지표인자 개발

#### 1-1. 양란 신품종 육성

RFLP와 RAPD-PCR 방법을 비롯해 상기한 기술들은 생물분야뿐만 아니라, 농업 연구에서도 많이 이용하고 있는 방법들이다. 근연관계의 연구를 위한 RAPD는 단시간내 수행할 수 있고, 소량의 DNA로도 가능한 간단한 방법이다. PCR-based

marker(SCAR) 방법은 RFLP marker에 소량의 DNA를 가지고도 수행할 수가 있으며 DNA blotting을 하지 않아도 되는 장점이 있는 반면 SCAR는 매우 정확도가 높은 경제적인 방법이다. Dedryver 등(1996)은 여러 품종의 밀에서 rust resistance gene *Lr24* 에 관련된 marker를 찾는데 SCAR 법을 이용하였다.

본 연구에서 가장 큰 취약점은 양란에 대한 유전학적 근거를 이용한 교잡과 품종개발이 없다는 것이다. 밀, 보리, 콩, 옥수수 및 *Arabidopsis*의 경우에는 이미 많은 DNA 지표인자를 이용하여 유용한 형질을 표식하거나 이를 이용한 효율적인 육종체계들이 확립되고 있다. 또한 본 연구에서 시도하고자 하는 DNA 인자의 개발이 양란에서는 국제적으로도 이루어진 바가 없으나 본 과제의 협동연구자가 이미 여러 작물에서 이들 DNA 인자들을 개발하여 활용한 바가 있으므로 연구의 수행에는 전혀 문제가 없다고 사료된다. DNA marker를 육종에 이용할 수 있는 체계 및 이용에 관한 인식이 국내에서 크게 부족하다는 것이 가장 큰 취약점 중의 하나이다. 외국에서는 한가지 작물에 대해 국가내의 여러 기관이나 관련국가가 동시에 참여하여 공동으로 연구를 실시하거나, 독자적으로 실시한 연구의 결과라 할지라도 관심있는 연구자들끼리 서로 육종에 공동으로 이용하는 경향이 많다.

## 1-2. DNA 지표인자 개발

### 가. 낮은 DNA marker 활용도

핵산 표지 인자(DNA marker)의 개념이 국내에 소개된 이래, 많은 연구기관 및 단체들이 DNA marker 기술을 다양한 분야에 적용해 오고 있다. 농업적으로는 한 작물의 국내 품종들과 외국 품종들이 보이는 'polymorphism'의 관찰로, 유전자원의 다양성 추정 및 특성 형질(저항성, 큰 형질차이 등) 품종의 표지인자 개발 등에 이용되어 왔다. 그러나, 국내 품종들을 정확히 구분하고, 더 나아가서 품질의 우수성 및 균일성을 지속적으로 확보하기 위한 방편으로 DNA 인자를 사용하는 데에는 인식이 높지 못했다. 그 주된 이유로는, 환경적응종(ecotype)의 특성을 지니는, 국내 품종간의



polymorphism의 발견이 쉽지 않을 뿐더러, 발견된다 하더라도 이 정보를 재현성이 보장되는 DNA marker로의 확립이 쉽지 않고, 표지된 유전자좌(locus) 및 특정 유전자좌 내의 대립 유전자들(alleles)의 조성(genotype)을 구체적으로 명시 할 수 있는 기법이 제시되지 못했다는 점 등을 들 수가 있다. 그 결과, 가시적이며 수치적으로 일관성을 지니는 database의 구축이 불가능했으며 더불어 연구자간 원활한 정보의 공유도 극도로 제한되어 있다.

#### 나. Polymorphism의 창출 기법의 효율성과 신뢰성

벼, 보리, 옥수수 등과 같이 유전자 연관지도가 제작된 주요 식량작물의 경우에는 각각의 염색체 특정부위를 표지하는 specific primer조합들이 체계적으로 개발되어 있으나, 그 연구 연력과 DB의 양이 미흡한 작물들은 유전분석 및 품종구분을 목적으로 polymorphism을 확인하기 위해서 분석되지 않은 DNA(un-defined elements)의 일부분을 증폭하거나(RAPD기법과 AFLP기법), 전체 염색체를 대상으로 하여 분석을 시도(RLGS 기법)하는 것으로 출발하는 것이 대부분이다. 그러나, RAPD기법(Williams et al., 1990)은 그 실험 절차가 비교적 간단하지만 모든 증폭 산물들을 안정적으로 반복해서 관찰하기가 어려우며, AFLP(Vos et al., 1995) 및 RLGS(Anderson and Anderson, 1979) 기법은 실험 과정상 여러 단계의 처리 절차를 거쳐야 하기 때문에 실험상의 오류가 발생하기 쉬울 뿐만 아니라, 기법의 특성상 충분히 훈련된 연구 인력과 특수한 장비를 추가로 요구된다는 단점이 있다.

#### 다. 표지인자 활용절차의 단순화, 보편화 및 결과의 일관성

한 품종, 혹은 하나의 품종군에서만 확인되는 특이 증폭 산물들은 DNA marker로 활용하기 위해서, 특이 증폭 산물들을 곧바로 수치적으로 정보화(사용한 primer 이름과 증폭산물의 크기를 함께 명시하는 등의 방식)하여 연구 재료들의 유전연관 정도를 추정하거나, 특정 형질을 표지하는 DNA marker를 선발해 내는 등의 연구는 이미 오

래 전부터 우리 나라에서도 시도되어 왔다. 그러나, DNA marker를 이용하여 한 작목의 품종을 엄정히 구분해 내고, 종자의 오염, 혹은 형질의 변성 등을 정확히 판정하는데 적용하기 위해서는, polymorphism을 확인하는 작업 이상으로 정보화된 polymorphism의 일관된 결과의 견지와 확인 절차의 단순화, 보편화가 필수적이다.

단시일 내에 작물의 품종들 안에 DNA marker개발을 위한 polymorphism을 확인하는 작업으로 가장 쉽게 적용할 수 있는 기법 중 하나가 RAPD이다. RAPD방법은 대개 9-13 bp의 적은 primer를 선택하여 PCR에 이용하기 때문에 2개의 상보적인 염기서열에 의해서 게놈 내의 여러 부위가 증폭된다. RAPD 지표인자들은 특정위치에 작용하는 primer들의 특성상 우성적 특성을 보이고 실험실내에서의 쉬운 조작으로 인해 mapping이나 원연관계 분석과 같은 실험에 적용되어왔다. 그러나, RAPD는 실험조건뿐만 아니라, 사용하는 기자제에 따라라도 결과의 심한 변이를 보인다. AFLP는 단시간 내에 많은 polymorphism을 확인할 수 있다는 장점이 있지만, 반복적으로 실험을 진행하기에는 많은 절차상의 어려움을 내포하고 있다.

실험 절차상 많은 시간과 노력을 요구하는 RFLP기법을 단순화하기 위해 probe clone들의 말단 염기서열 분석을 실시하고 그 정보를 바탕으로 specific primer 조합을 합성하여 사용하는 기법(STS-PCR)이 소개된 이후(Olson, et al., 1989), polymorphism 확인 절차의 단순화, 보편화 및 일관성 모두를 STS-PCR기법으로 확보하려 하는 것이 세계적 추세이다. 물론 STS-PCR primer로 전환시키는 데에는 많은 경비와 시간이 소요되는 것은 사실이지만, 일단 전환되어서 'marker'로 확립된 후에는 새로이 육성되어지는 품종 및 외국 도입종, 더 나아가서 근연종 및 원연종 모두에 광범위하게 적용되어질 수 있으므로 영구적으로 사용할 수 있다는 장점이 있다. 이러한 취지에서 SCAR marker들이 개발되어져 왔는데, 이는 RAPD band들을 염기서열 분석을 통해 재현성이 높은 marker로 전환시킨 형태로써 RAPD지표인자의 염기서열분석을 통하여 만든다.

## 제 2 분야 동양란 변이체 생산

현재까지 *Cymbidium*에서의 형질전환 식물의 보고된 예가 없었다. 이는 동양란의 더딘 생육특성과 조직배양상의 어려움을 고려해 볼 때 연구가 쉽지 않기 때문이다. 근래에 *Agrobacterium*을 이용하는 방법으로는 유전자 전이가 잘 되지 않는 *Cymbidium* 속 식물에 대해서 유전자총에 의한 형질전환 조건이 검토되어 졌는데(홍경애 등, 1996) 이들은 vibrator를 이용하여 rhizome을 얇게 절단 후(200 $\mu$ m로부터 5mm두께까지), 유전자총을 사용하여 카나마이신과 GUS유전자를 도입시켜 저항성 callus를 얻고 이들 callus로부터 DNA를 추출하여 유전자의 존재를 확인하는 식으로 연구가 진행된다. 그러나 이들 callus상태의 형질전환 세포들로부터 식물을 재분화 시키는 데는 오랜 시간이 소요되고 형질전환이 순조롭게 이루어질 가능성이 희박할 것으로 판단된다. 특히 동양란의 경우 particle bombardment의 대상 재료가 rhizome의 작은 절편인데 이들은 대부분 callus로 유도되기 때문에 식물체의 분화가 어려운 난점이 있다. 이와 같이 조직배양 중 식물체의 유기에 장시간이 소요되는 문제점은 당분간 *Cymbidium* 속에서의 유전자 전이에 커다란 장애요인이 될 것으로 사료된다. 현재 고부가가치 화훼식물로서 난 변이체를 인위적으로 얻기 위한 연구는 체계적으로 시행된 바가 거의 없으며 특히 동양란 계통인 한란이나 춘란에서의 변이체 생산은 조직배양 자체의 어려움과 여러 가지 한정적인 요인으로 인해 인위적 시도가 어려운 상태이다.

## 제3절 연구개발의 목적과 범위

### 제 1 분야 양란 신품종 육성을 위한 지표인자 개발

#### 1-1. 양란 신품종 육성

본 연구의 목표는 난의 교잡육종을 통해 보다 화색이 다양하고 환경적응성이 강한 품종을 육성하여 국내 수요에 충당함은 물론 수출산업에 기여해야 한다는 것이다. 양란은 세계 각국에서 백여년 동안 교잡을 통해 각양각색의 교배종이 육성되었는데 최근

엔 소형으로서 향기가 있는 꽃을 육종하는 방향으로 진행되고 있으며 개화가 쉽게 잘 되고, 개화기간이 길며 향기가 있는 *Cymbidium*의 품종개발이 요구되고 있다. 난의 육종을 위해서는 유전학적인 기초자료가 마련되어야 하는데, 양란은 품종 및 계통간의 변이가 다양하여 분류화 작업에 어려움이 있다. 따라서 DNA 지표인자를 이용한 보다 기초적이고 과학적인 연구를 동반한 교잡 육종이 필요하다.

품종 및 계통의 구별화 작업을 위한 marker를 개발하기 위해 다양한 심비디움 원종을 확보하는 것이다. 모본은 원종과 일반 품종을 다양하게 수집한 뒤 그들의 형태적 특징과 유전학적 형질을 관찰하고 개화한 종류는 각각 selfing을 포함하여 여러 종류의 난과 수분을 하여 F1 종자를 확보해야 한다. 또한 이들을 기내에서 무균적으로 파종을 하여 F1유묘를 생산토록 하며, F1 유묘의 고온 적응성, 병저항성, 내한성 등과 같은 우수 형질들에 대한 잡종강세 발현 검정을 효소분석을 통해 실시하도록 한다. 그리하여 적응성이 우수한 유묘를 기내 대량증식을 추진하고자 하는데 기여하고자 하였다.

## 1-2. DNA 지표인자 개발

본 연구의 목표는, DNA marker를 적극적으로 활용하여, 난 품종간의 유전적 거리를 추정함으로써 난 재배농가에서 이루어지는 교잡육종의 자료를 제공하는 것과, 품종 특이적 DNA marker를 효율적으로 확보하고 이러한 정보들을 체계적으로 DB화 시킬 수 있는 방안을 제시함으로써, 앞으로 새로 생산되는 난 품종의 보호측면에 초점을 맞추었다.

## 제 2 분야 동양란 변이체 생산

본 연구의 목표는, transposable element를 근간으로 하면서 온도조절에 따라 유전자 발현이 조절되는 돌연변이 유발 expression vector의 개발하고, 유전자총과 아그로박테리움을 이용한 동양란에서의 키메라적인 변이체의 생산 및 다양한 돌연변이원을

이용하여 변이체를 생산하는데 그 목표가 있다. 연구범위는 특별한 발육상이나 특정한 조건이 주어지면 jumping해 다니면서 유전자의 발현을 억제하므로서 변이체 (variegation)를 만드는 것으로 알려진 transposable element (Ac 9)를 coding region 으로 하고 이 유전자의 jumping을 온도로 조절(thermo-regulation)하기 위하여 온도 유발 promoter인 soybean Gmhsp17.3-B의 promoter와 연결시켜서 expression vector를 제작하고, GUS유전자를 포함하고 있는 expression vector pZO1052를 이용하여 난 rhizome조직을 적절히 관통시키기 위한 제반 bombardment 조건을 확립하는데 있다. 유전자총 (PDS1000/He)내의 진공정도, rupture disk의 강도, macrocarrier와 stop screen과의 거리, stop screen으로부터 재료까지의 거리 등을 변형시켜 알맞은 조건을 확립한다. 또한 아그로박테리움을 이용한 형질전환을 통하여 효과적인 변이체를 얻기 위하여서 전처리와 상처를 효율적으로 내고 유전자의 도입을 효율적으로 하기 위한 다양한 시도를 하고자 하였다. 또한 다양한 종류의 돌연변이원을 처리하여 유전 공학적인 기술이외의 방법을 모색하여 총체적인 변이체 생산 기술을 확립하는데 있어서 단시일 내에 재분화 유도가 가능한 재료와 조건을 확립하고자 하였다. MS배지와 Hyponex배지를 중심으로 NAA와 BA농도를 달리하여 rhizome의 건실한 생육을 유도 하고 이로부터 재분화를 유도하되 재분화 직전의 rhizome을 bombardment 또는 돌연 변이원의 처리 재료로 사용토록 하며, 실험결과 만들어진 변이체들은 농가에 보급하여 품종으로서 확립하고자 하였다.

## 제 2 장 재료 및 실험방법

### 제1절 연구재료

제 1 분야 양란 신품종 육성을 위한 지표인자 개발

#### 1-1. 양란 신품종 육성

##### 제1항 1차년도 교배

본 실험은 1997년 12월과 1998년 5월 사이에 개화된 *C. ebrunum*, *C. tracyanum*, *C. sinesense*의 3가지 원종과 현재 국내에서 가장 인기 있는 21 품종을 선발하고 이들의엽장, 엽수, 꽃수, 화경장, 화색, 꽃크기, 개화기, 내병성정도 등을 조사하였다(Fig 1, Table 1, 2, 3). 원종인 *C. ebrunum*은 백색의 소심으로 향기가 있으나, 꽃수와 화형이 좋지 않은 결점이 있어 이러한 단점을 보완하기 위해 *C. 'Red King'*이나 *C. 'Moonlight'* 등과 교배하였다. *C. tracyanum*의 경우는 초장과 화형이 크고 내병성이 강해 내병성이 약한 단점이 있어서 대형종인 *C. 'Venus'*과 교배하여 내병성 있는 품종을 선발하고자 하였다.

Table 1. Three different cymbidium species and cultivars used as materials for this study.

Species	Leaf length (cm)	Leaf number (ea)	Flower number (ea)	Flower stock length (cm)	Flower color	Flower diameter (cm)	Flowering season	Disease resistance
<i>C. ebrunum</i>	50	15	1-2	30	bright white	7	12-1	1 <sup>2)</sup>
<i>C. tracyanum</i>	70	17-18	10	100	bronze	12	11-2	1
<i>C. sinesense</i>	45	8-9	7	50	light green	7	10-12	2

<sup>2)</sup> Disease resistance : 1(very strong), 2(strong), 3(moderate), 4(susceptible), 5(very susceptible)

Table 2. Twenty one cymbidium cultivars used as materials and their characteristics.

Cultivars	Leaf length (cm)	Leaf number (ea)	Flower number (ea)	Flower stock length (cm)	Flower color	Flower diameter (cm)	Flowering season	Disease resistance
<i>C.</i> 'Red King'	60	12-15	10	45	Red	10	11-1	1 <sup>2)</sup>
<i>C.</i> 'Murasakigengii'	35	15	15	45	light red	2	11-1	1
<i>C.</i> 'Moonlight'	64	13-14	14-15	50-55	bright yellow	11/8	10-11	3
<i>C.</i> 'Lapin Hat'	75	8-9	25-30	55-60	light pink	7.5	11-2	1
<i>C.</i> 'Mizunomaru'	60	15	20-25	45	light green	5.5	11-2	1
<i>C.</i> 'Ayakodanaka'	65	10	20	45	light yellow	5.8	10-12	2
<i>C.</i> 'Venus'	62	9-10	10-12	56-65	light pink	5.9	11-1	5
<i>C.</i> 'Moon Venus'	70	11-12	14-17	55-60	bright yellow	6.2/5.4	9-12	1
<i>C.</i> 'Sky Mint Party'	61	15-16	13-14	68	bright yellow	7.3/6.8	11-12	2
<i>C.</i> 'Dooyo'	40	8-9	20-25	30	light green	3.5	11-12	2
<i>C.</i> 'HuskyHoney'	65	10	15-20	45	bright white	4.5	11-1	1
<i>C.</i> 'Paranase'	60	12	10-15	40	light pink	3.8	2-4	3
<i>C.</i> 'Ballerina'	60	9-10	13-17	53-56	light pink	5.8/4.9	11-1	3
<i>C.</i> 'Hyrosymaeyes'	45	30	30-40	20	light pink	2.5	11-1	1
<i>C.</i> 'Marlin Monro'	60	11-13	10-15	50-55	light pink	6.5	11-1	2
<i>C.</i> 'Pepamint Party'	65	12	15	40	bright yellow	6.0	11-1	3
<i>C.</i> 'Grace Kelly'	65	15	10	50	bright white	7.0	12-3	2
<i>C.</i> 'Keny Winecolor'								
<i>C.</i> 'Drum'								
<i>C.</i> 'Jungfrau'	100	10-14	8-15	70-100	white	10/7	2-4	2
<i>C.</i> 'White Excel'	70	10-12	9-11	80-99	white	8/7.5	12-3	2

<sup>2)</sup> Disease resistance : 1(very strong), 2(strong), 3(moderate), 4(susceptible), 5(very susceptible)



Fig. 1. Twelve cymbidium species and cultivars used for pollination.



## 제2항 2차년도 교배

2차년도의 교배를 위해 1998년 12월-1999년 3월 사이에 개화된 2가지 원종과 국내에서 가장 인기 있는 17품종을 대상으로엽장, 엽수, 꽃수, 화경장, 화색, 꽃 크기, 개화기, 내병성정도 등을 조사하였다(Table 3). 또한 본 특성표를 토대로 하여 형질특성의 보완이 가능한 조합을 임의적으로 선정하여 각각의 모본에 대해 190조합을 교배하여 이들의 임성과 임실 후 기대조합을 고찰하였다.

Table 3 . The characteristics of twenty different cymbidium species and cultivars used for plant materials for this study.

Species and cultivars	Leaf length (cm)	Leaf number (ea)	Flower number (ea)	Flower stock length (cm)	Flower color	Flower diameter (cm)	Flowering season	Disease resistance
<i>C. chrunum</i>	50	15	1-2	30	bright white	6/6	12-1	1 <sup>d</sup>
<i>C. tracyanum</i>	70	17-18	10	100	bronze	12/11	11-2	1
<i>C. 'Ayako Tanaka'</i>	60	18-20	30	70	yellow	5.5/5.2	9-11	1
<i>C. 'Ballerina'</i>	60	9-10	13-17	55	light pink	6.3/5.8	11-1	3
<i>C. 'Banana Boat'</i>	65	15-20	15	65	yellow	6.0/5.5	11-1	3
<i>C. 'Keny Wine color'</i>	55	25	35	40	red	5.2/4.5	10-1	1
<i>C. 'Miss Taipei'</i>	63	20	25-30	43	red	5.5/5.2	10-12	2
<i>C. 'Mizunomaru'</i>	60	15	20-25	45	light green	5.8/5.5	11-1	1
<i>C. 'Murasakigengii'</i>	35	15	15	45	light red	2	11-1	1
<i>C. 'New Yasko'</i>	50	20	35-40	40	green	4.5/4.0	10-1	2
<i>C. 'Pepamint'</i>	55	20	30	42	pink	4.8/4.5	10-1	2
<i>C. 'Pianist'</i>	65	12	15	40	bright yellow	6.5/5.8	12-3	2
<i>C. 'Rapine Hat'</i>	75	8-9	25-30	55-60	pink	6.5/6.0	11-2	2
<i>C. 'Skymint Patty'</i>	65	17	20-25	68	bright yellow	7.3/6.8	11-12	2
<i>C. 'Sunny Moon'</i>	60	17	20	70	bright yellow	7.0/5.5	11-12	2
<i>C. 'Waltze Romance'</i>	55	20	25-30	65	green	6.0/5.5	11-12	1
<i>C. 'White Excel'</i>	60	20	25	70	white	6.0/5.5	11-12	3
<i>C. 'Young Kyoung'</i>	58	23	30	43	red	5.5/5.3	10-1	1

<sup>d)</sup> Disease resistance : 1(very strong), 2(strong), 3(moderate), 4(susceptible), 5(very susceptible)

## 1-2. DNA 지표인자 개발

### 제1항 RAPD 표지인자 개발 및 근연도 추정

영양체 증식이 용이한 양란의 품종개발에서는 잡종강세를 기대할 수 있는 허용되는 범위 내에서의 원연간 교배가 유리하고 교배조합의 양친을 선정하는 것이 가장 중요하기 때문에, 교배 모본들의 우수 특성에 대한 고찰 및 모본들간 유전적 거리를 추정하는 작업이 선행되어야 한다. 교배친으로 사용되었던 양란 원종 및 품종들 총 28 line 을 기준으로 RAPD 분석을 실시하고 근연도를 추정하였다(Fig. 2 참조).

### 제2항 SCAR primer조합의 적용기준과 양란 품종 선별

SCAR PCR 기법은 일종의 specific primer를 사용, 특정 염색체부위를 정확히 표지하고자 하는데 그 의미가 있다. 양란은 육종특성상 부모친에서도 상당한 heterogeneity가 예상되므로, SCAR primer set을 품종구분 혹은 특수목적 하에서의 육종목표의 달성에 표지인자로 사용할 수 있기 위해서는 PCR 증폭산물의 높은 재현성과 정확한 해석이 필수적이다. 이를 위하여 교배 실험에서 F1이 형성된 4개 line의 유전자형 분석(genotyping)을 시도하기 위해 F1 line의 부모친(allele donor) 6개 품종과 별도의 비부모친 품종(C. 'Jung' and C. 'Banana Boat')을 선택하였다(Table 3 참조). 합성된 26쌍의 SCAR primer set 중 6가지를 이용하여 앞에서 언급한 12개 line(8개 품종, 4개 F1 line)에서 6개의 polymorphic allele들을 3반복 실험을 통해 재확인하고, genotyping을 실시 하였다.

### 제3항 CE-계열 및 CReT-STs-PCR primer set의 시험을 위한 양란 재료 선정

SCAR primer set들이 보여주었던 한계를 극복하기 위해서 유전자를 coding하고 있는 'active chromosome'의 DNA를 선택적으로 STs-PCR primer set들로 전환된 CE-계열 STs-PCR primer set들과 retrotransposon sequence에서 전환된 CReT-계열 STs-PCR primer set들을 양란 품종구분에 적용하였다. 유전적인 원연이 잘 유지

되리라고 판단되는 양란 원종들과 좁은 범위의 유전적 다양성이 예상되는 국내 육성종들의 genotyping을 시도하기 위해 각각 14 line(양란원종들; Group A)과 12개 line(1개 원종, 7개 육성종, 그리고 4개 F1 육성종; Group B)을 선정하였다(Table 6 참조).

## 제 2 분야 동양란 변이체 생산

동양란 변이체를 만들기 위한 식물재료로 한란(*Cymbidium kanran*), 죽백란(*Cymbidium lancifolium*), 춘란(*Cymbidium goeringii*), 춘죽(춘란×죽백란) 등의 동양란의 근경을 사용하였다. 화학물질로서는 MMS(methyl-methane-sulfonate), EMS(ethyl-methane-sulfonate), colchicine, 2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) 그리고 Trifluralin 을 사용하였다.

## 제2절 실험방법

### 제 1 분야 양란 신품종 육성을 위한 지표인자 개발

#### 1-1. 양란 신품종 육성

##### 제1항 *Cymbidium* 속간 교배실험

1차 년도의 21개 품종과 2차년도의 17개 품종의 자료를 토대로 형질특성의 보완이 가능한 조합을 선정하여 원종간, 원종과 품종, 또는 품종간 교배를 실시하였다. 개화시기가 다른 품종은 화분피를 채취하여 유산지로 싹 다음, 지장병에 밀봉하여 5℃의 냉장고에 보관하였다가 수분에 이용하였다(Pritchard 와 Prendergast, 1982).

##### 제2항 F1종자의 생산 및 파종

교배한 *Cymbidium* 중 성숙된 20개의 종자꼬투리를 수분 4-6개월 후에 채취하였다. 종자 꼬투리는 70% EtOH에 약 5초간 침지 후 2% sodium hypochlorites 용액에 15분간 침지한 다음 멸균수로 3회 수세한 뒤 꼬투리를 열게하여 종자를 무균배지에 파

종하였다. 이들 F1 종자 받아서 적정 배지 조건을 알아보기 위해 MS, 1/2MS, Hyponex 배지에 7g/L agar, 30g/L sucrose를 첨가하였으며 activated charcoal 0.1g/L을 첨가하거나 첨가하지 않은 배지에 파종하되 50mL의 배지가 담긴 300mL 배양병에 종자를 파종한 후 16시간의 명기와 8시간의 암기를 유지하였다.

### 제3항 F1 유묘의 신품성 육성을 위한 내건성 품종 선발

F1 유묘의 잠종강제 현상을 알아보기 위하여 2000년 6월 8일부터 2000년 7월 27일까지 건조처리를 하여 순화실험을 실시하였다. 공시재료는 F1 교배종인 *C. 'Venus'* × *C. 'Moon Venus'*, *C. 'Pepermint Party'* × *C. ebrunum*, *C. 'Banana Boat'* × *C. tracyanum*, *C. ebrunum* × *C. 'Ayako Tanaka'*, 과 모본인 *C. 'Ayako Tanaka'*, *C. tracyanum*을 사용하였다.

기내에서 약 10-15cm 정도 자란 유묘를 뿌리부분만 수태에 감아 약 1개월간 기외에서 순화시킨 후 품종당 20반복으로 실험을 수행하였다. 건조처리를 위하여 실험 개시일부터 관수를 하지 않았으며 비로 인한 자연 관수를 예방하기 위해 전 실험기간동안 온실에서 실시하였다. F1 유묘의 저온순화실험을 위하여 4℃의 성장상에서 품종당 20개체의 식물을 수태에 심어 실시하였고 주 2회 관수하였다.

실험 결과 환경 스트레스에 대한 내성 감정을 하기 위해 처리 3주 후부터 2주 간격으로 생존율을 측정하였고, 내부의 생리적인 변화를 알아보기 위해 엽록소 함량, SOD의 효소 활성도를 측정하였다.

### 제4항 F1 유묘의 신품성 육성을 위한 내서성 품종 선발

F1 유묘의 내서성을 알아보기 위하여 2001년 6월 12일부터 2001년 7월 15일까지 고온 처리를 하여 순화실험을 실시하였다. 공시재료는 F1 교배종인 *C. 'Venus'* × *C. 'Moon Venus'*, *C. 'Pepermint Party'* × *C. ebrunum*, *C. 'Banana Boat'* × *C. tracyanum*, *C. ebrunum* × *C. 'Ayako Tanaka'*, 과 모본인 *C. 'Ayako Tanaka'*, *C. tracyanum*을 사용하

였다.

순화 방법은 내건성 실험과 동일하게 하되, 기내에서 약 10-15cm 정도의 크기로 자란 유묘의 뿌리부분을 수태로 감아 약 1개월간 기외에서 순화시킨 후 각 품종당 20 개체씩을 실험재료로 사용하였다. 고온 처리를 위하여 고려대학교 온실 내에 낮 온도가  $30^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  되는 조건에서 실시하였고 주 2회 관수를 하였다.

#### 제5항 잡종강세 현상 구명을 위한 효소분석

엽록소 함량은 DMF법을 이용하여 측정하였고 효소의 추출은 liquid nitrogen에 동결시킨 1g의 엽조직을 5mL의 추출 buffer(50mM phosphate buffer pH 7.0, 0.2% insoluble polyvinylpyrrolidone, 0.1mM EDTA, 3mM  $\text{MgCl}_2$ )로 마쇄후 15,000g로 15분간 원심분리하여 상층액을 추출하였다. 총 단백질 함량은 Bradford법(1976)을 이용하여 정량하였고 SOD의 활성도 측정은 Du와 Bramlage(1994)의 방법을 이용하였다. 효소 추출액+100 $\mu$  L에 3mL의 반응액(50mM phosphate buffer, pH 7.8, 13mM methionine, 75 $\mu$  M NBT, 2 $\mu$  M riboflavin, 0.1mM EDTA)을 투명한 시험관에 넣어 잘 섞어준 뒤 그 혼합액을 8개의 15W 형광램프 50cm 아래에서 10분간 조사하여 560nm에서 흡광도를 측정하였다. 형광등을 조사하지 않아 발색되지 않은 것을 대조구로 하여 다음과 같이 SOD activity 1unit을 측정하였다.

$$\text{SOD units/mL} = (V_0/V-1) \times (\text{dilution factor})$$

$V_0$  = 효소 추출물이 없는 상태 하에서의 흡광도 변화의 기울기

$V-1$  = 효소 추출물이 있는 상태 하에서의 흡광도 변화의 기울기

#### 제6항 F1 유묘의 신품성 육성을 위한 *Fusarium* 내병성 품종 선발

난에 피해를 주는 여러 병충해 중에서도 *Fusarium oxysporum* f.sp. *cattleyae*에 의해 발병하는 난 부패병은 *Cymbidium*속을 위시한 *Cattleya*, *Dendrobium*, *Phalenopsis*,

*Oncidium*등에서 쉽게 발병한다. 이 병은 특히 고온다습한 여름에 유묘의 생육에 치명적 해를 주고 있다. 특히 양란 *Cymbidium* 배양묘의 기외순화시 조직배양된 식물체가 외부로 옮겨지면 환경적 스트레스를 받게 되는데, 그 중 하나가 병에 대한 저항성이 약한 것이다. 따라서 본 연구는 신품종 육성시 품종에 따른 *Fusarium*(부패병)에 대한 감수성을 알아봄으로써, 저항성 품종을 육성하는데 기초자료로 활용하기 위해 본 실험을 실시하였다.

본 실험은 2000년 7월 3일부터 9월 3일 까지 고려대학교 온실에서 실시하였다. 시험에 이용된 종류로는 원종으로서 *C. tracyanum*, *C. ebrunum*, 원종×품종으로서 *C. ebrunum*×*C. Sunny Romance*', *C. tracyanum*×*C. 'Moon Venus'* 품종과 품종간 교배인 *C. 'Venus'*×*C. 'Moon Venus'*, *C. 'Venus'*×*C. Sunny Romance*'을 이용하였다. 식재 재료는 바크 : 코코피트 : 제주산 송이를 1:1:1(V/V/V) 비율로 섞은 것을 사용하였으며, 마감프 K를 한 화분에 1g씩 사용하였다. 각 처리 공히 10cm정도 크기의 플라스틱 묘를 수태에 싸서 5주씩 10반복으로 식재하였으며 관리는 일반 관리방법에 준하였다.

병원균(*Fusarium oxysporum* f.sp. *cattleya*)의 분리는 이병된 *C. 'Anmitsu Hime'* 유묘의 가구경에서 이병 부위를 Czapek -dox 배지에 접종하여 27℃, 150 rpm으로 4일간 진탕 배양하여 포자를 유기하였다. 포자 현탁액을 cheese cloth 2겹으로 mycelia를 제거한 후, hemocytometer로 계수하였다. 또한 병원균의 동정을 위해 ×950배에서 검경하였다. 신품종에는 포자 현탁액으로 처리하였고, 농도는 5×10<sup>7</sup>로 한주당 3ml씩 토양관주 하였으며, 처리 2주, 4주, 6주, 8주 발병 후 생존율을 조사하였다.

## 1-2. DNA 지표인자 개발

### 제1항 DNA 추출

전체 DNA는 CTAB 방법(Murray and Thompson, 1980)을 변형하여 추출하였다. 1g 정도의 녹체를 액체질소에서 마쇄한 다음, 추출용액 [200mM Tris-HCl(pH 8.0),

25mM EDTA, 0.5% SDS, 250mM NaCl, 1%  $\beta$ -mercaptoethanol] 6ml을 첨가, 65°C에 40분간 처리하였다. 냉장 보관된 20% Polyvinyl-pyrrolidone 용액 2.4ml과 1/2 vol의 7.5M ammonium acetate 용액을 첨가후 Ice-bed에 처리하였다. 15,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취했다. 동일 volume의 isopropanol을 이용하여 30분간 -20°C에서 처리한 다음, 15,000rpm에서 원심분리 하였다. 침전물을 건조시킨 후, TE buffer[10mM Tris(pH 8.0), 0.1mM EDTA] 500 $\mu$ l로 녹였다. 양질의 DNA를 얻기 위하여 동일 volume의 chloroform/isoamyl alcohol(24:1)를 처리하여 정선하였으며, DNA의 양은 260nm 파장으로 O.D값을 측정하여 결정하였다. 정량된 DNA는 RAPD분석을 위해 1ng/ $\mu$ L로, STS-PCR (SCAR-, CE- 및 CReT-계열)을 위해서 25ng/ $\mu$ L로 희석하여 사용하였다.

## 제2항 RAPD 분석 및 근연도 추정

1차적인 DNA 표지인자의 개발을 위하여 양란 품종들에 대해 총 35개의 UBC primer(10-mer random primer)를 적용하여 RAPD를 수행하였다. PCR 반응은 1 $\mu$ M의 primer와 20 ng의 genomic DNA를 1X PCR buffer [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>]와 200 $\mu$ M dNTP mix, 그리고 0.5 unit의 *rTaq* polymerase (Takara, Japan)로 하였다 (14 $\mu$ L final). Thermal Cycler<sup>®</sup>480 (Perkin Elmer, USA)을 사용하여, 94°C에서 5분간 초기 변성 후, 94°C에서 30초 35°C에서 45초, 72°C에서 90초로 35회 반복하고, 72°C에서 5분간 반응하였다. 반응이 끝난 시료는 7 $\mu$ L 씩 취하여 1.5% agarose gel (Seakem LE agarose, FMC, USA)에서 100 volt로 약 25 cm 전기영동 후 EtBr로 염색하였다. Polymorphic band들은 특이 band의 유부(Dominant marker scoring: present = 1, absent = 0)에 따라 확인하였고, 각 polymorphic marker의 구분은 사용한 primer의 이름과 증폭산물의 크기(bp)를 함께 표시하였다. 자료를 binary data로 전환하였고, UPGMA분석방법을 이용하여 추정된 genetic similarity matrix를 작성하였다.

### 제3항 Polymorphic RAPD의 cloning을 통한 defined element tagging primer 조합의 개발(SCAR primer sets)

RAPD에서 확인된 특이 band는 그 크기를 면밀히 검토하여 기록하고, 특정 양란 품종의 RAPD band를 elution하여 cloning하였다. RAPD 특이 band는 agarose gel에서 오려내어 glassmilk (GeneClean<sup>®</sup> kit, BIO 101, USA)와 침전 상승제인 glycogen (0.1 $\mu$ g/elution, MRC, USA)을 이용하여 회수하였다. 회수된 RAPD band들은 pGEM-T<sup>®</sup> Easy Vector System (Promega, USA)을 이용하여 T-A cloning하였고, Top 10 cell (Invitrogen, USA)에 transformation하였다. E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit I을 이용하여 plasmid를 추출하였으며 ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer에 전기영동을 실시하고 ABI PRISM<sup>™</sup> 310 Data Collection (version 1.0.2)과 Chromas (<http://trishul.sci.gu.edu.au/~conor/chromas.html>; version 1.43) software를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 분석 완료된 clone의 양 말단 부위에서 18bp를 선정하여 SCAR primer set들을 합성하여 적용하였다.

### 제4항 SCAR primer의 적용

Primer 제작을 위한 염기서열 분석에 사용한 plasmid를 PCR 증폭의 주형으로 사용하였을 때 증폭효율이나 강도에 전혀 문제가 없었던 21개의 SCAR primer set을 먼저 적용하였다.

초기에는 SCAR primer set을 검정 품종과 F1 line에 일반적인 PCR 기법을 적용하여 test 하였다(95 $^{\circ}$ C 5분 처리 후, 95 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 1분 의 순서로 35 cycles; PE 480 grade PCR machine). PCR reaction의 재현성을 극대화 시키고, 관찰되는 band를 그 size에 의해 allele로 표지 해주기 위해서, touch-down PCR 기법 (95 $^{\circ}$ C 5분 처리 후, 95 $^{\circ}$ C 10초, 65 $^{\circ}$ C  $\rightarrow$  60 $^{\circ}$ C 30초 ; 매 cycle 당 0.5 $^{\circ}$ C 씩 감소, 72 $^{\circ}$ C 30초 의 순서로 10회전 후 95 $^{\circ}$ C 10초, 60 $^{\circ}$ C 20초, 72 $^{\circ}$ C 30초 의 순서로 추가



로 25회전을 실시; PE geneAmp 9600 PCR machine)을 적용하여서 모든 SCAR primer set들을 사용하였다. 5 $\mu$ L의 증폭한 DNA를 1% agarose gel과 5% polyacrylamide gel에 전기영동하여 증폭산물을 확인하였다.

#### 제5항 Monomorphic SCAR-PCR 산물의 제한효소 처리 및 Genotyping

예시된 reference line의 염기서열 분석에 의거한 제한효소들을 적용하여 primer set에 의해 표지된 안쪽에서 잠재적인 polymorphism을 찾고자 시도하였다. 대부분의 제한 효소들은 PCR buffer에서도 그 활력을 유지하기 때문에, 별다른 처리 없이 PCR product에 대해 바로 제한효소 3 unit를 넣어서 적절 온도에서 3시간 반응하여 전기영동을 실시하였다.

#### 제6항 양란 active genome region-enriched semi-library 구축

진핵생물의 functional gene upstream에서는 흔히 'CpG island'라는 반복적 염기서열이 존재하며, junk DNA 부위의 'CpG' island는 고도로 methylation되어있는 것이 보편적이다. Active genome이라고도 불리는 유전자 coding 부위와 그렇지 않은 'junk DNA'에서의 큰 차이점 중 하나는 methylation 유무라고 보고되고 있다 (Bird et al., 1985; Boyes and Bird, 1991). 반면에 E. coli strain들 중에는 wild type의 *Mcr A* 및 *BC* 유전자를 지니고 있는 것들이 있는데, 여기에 genomic DNA 절편을 cloning 하여 transformation 시켜 줄 경우에는 methylation된 cytosine이 포함된 DNA들은 *Mcr A* 및 *BC* protein에 의해 절단되게 되어 clone이 유지 되지 못한다. 반면에 active genome은 methylation이 되어 있지 않기 때문에 결국 DH5alpha에 transformation 된 DNA clone은 대부분 active genome region에서 유래된 DNA 절편들을 insert로 지니게 된다.

그 동안의 교배 실험에서 가장 많이 교배모본으로 사용되었던 양란의 원종 중 *C. ebrunum*의 reference line을 설정하였고, DNA 1 $\mu$ g을 methylation insensitive

endonuclease인 *Msp* I (C<sup>^</sup> CGG)로 절단하였다. 절단 산물을 agrose gel에 전기 영동하여 200 bp ~ 1 kb 부위를 오려내고, DNA를 glassmilk (GeneClean<sup>®</sup> kit, BIO 101, USA)와 침전 상승제인 glycogen (0.1 µg/elution, MRC, USA)을 이용하여 회수하였다. pGEM3zf(+) (Promega, USA)를 *Acc* I (*Hpa* II와 절단부위에서 상보적 염기서열)으로 절단하고 전기영동하여 완전히 절단된 plasmid 만을 회수하였다. 위 두가지 산물을 ligation하고, wild type의 *Mcr* A 및 BC 유전자를 지니는 *E.coli*, DH5alpha (Invitrogen, USA)에 transformation하여 소위 ' active genome region-enriched semi-genomic DNA library' 를 구축하였으며, 각각의 clone들은 ' CE-' 라고 명명하였다.

#### 제7항 Active genome region-enriched semi-library clone들의 염기서열 분석과 STS primer 합성 및 적용

합성된 각각의 primer 조합을 최적조건으로 적용하기 위해서는, primer annealing 온도의 설정이 중요하다. 그러나, 시간적, 인력적 효율을 감안할 때, 양쪽 primer T<sub>m</sub> 값의 차이 및 재료 식물의 염색체 조성 특성 등 적정 온도설정에 영향을 미칠 수 있는 여러 가지 변수를 모두 고려해서 검사대상의 재료가 바뀔 때 마다 primer 조합의 최적 반응조건을 확립하는 것은 매우 비효율적이다. 따라서, 모든 PCR 반응의 보편성이 강조되면서도 비특이적 증폭산물 출현 정도가 억제되는 조건을 확립하는데 주력하였다. 첫째는, 비특이적 증폭산물의 과도한 출현을 억제하기 위하여, 모든 PCR은 'touch-down'으로 실시하였다. 둘째는, 많은 primer 조합 적용에 있어서 보편성과 일관성을 확보하기 위하여 좁은 온도범위를 (55°C-60°C) primer T<sub>m</sub>값으로 적용하였다.

#### 제8항 제한효소를 이용한 monomorphic CE-PCR product의 절단

제한효소를 이용하면, polymorphism을 추가로 발견할 수 있다는 점 이외에도, specific primer조합으로 증폭된 산물들에 보다 정교한 정보를 추가할 수 있다는 장점

이 있다. 제한효소는 기록의 일관성을 견지하기 위하여 'frequent cutter'중에서 4가지를 선택하여 사용하였다 (*RasI*; GT<sup>^</sup> AC, *HinM*; G<sup>^</sup> ANTC, *HaeIII*; GG<sup>^</sup> CC, *AclI*; AG<sup>^</sup> CT) (Bioneer, Korea). Monomorphic band가 전기영동에서 확인되면, PCR 산물 10 $\mu$ L를 5 unit의 각 제한효소를 첨가한 후 [10 $\mu$ L of PCR product + 5 $\mu$ L of digestion cocktail (1X final digestion buffer supplied from the company, 5 unit of restriction enzyme)], 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 처리하였다. 전기영동하고 절단산물의 크기를 100 bp size marker에 의거 측정하여 기록하였다. 제한효소를 적용하기 전에 미리 증폭산물 중 'target band'를 지정하였고, 절단 산물들의 크기의 합이 이 target band와 반드시 일치할 때만 분석하였기 때문에 재현성이 떨어지는 minor band가 절단되어 나타나는 polymorphism을 구분할 수 있었다. 단 몇 개의 line에서 증폭산물이 없음으로 인해 polymorphism (dominantly scored PCR products)이 관찰되는 유전자좌들 역시 제한효소를 처리하여 추가적인 polymorphic allele를 찾아보고자 시도하였다. 이 경우에는 PCR 증폭산물이 확인되지 않은 line들 ('0'; absent in the loci scored dominantly)을 'null allele'로 처리하여 각 품종의 유전적 유사성 (genetic similarity)정도를 측정하기 위한 raw data에서 'missing data'로 간주하였다.

#### 제9항 Retrotransposon elements의 근연종의 품종구분 적용

Informative RAPD band들을 SCAR primer set으로 전환하는 과정에서 7개의 clone들이 retrotransposon elements로 확인되었으며, 이를 양란 근연종들의 genotyping에 적용하였다. 보다 안정적인 T<sub>m</sub> 값을 확보하기 위하여 T<sub>m</sub> range 55-60 $^{\circ}$ C로 설정하여 CReT-계열 STS-primer set들을 합성하여 적용하였다. PCR 조건은 Touch-down PCR을 기준으로 사용하였으며, long range PCR이 가능한 ExTaq (TaKaRa, Japan)을 PCR에 사용하였고, 1% agarose gel에서 전기영동을 하였다.

#### 제 2 분야 동양란 변이체 생산

## 제1항 유전자총을 이용한 형질전환

### 가. Expression vector제작

현재 발현백터의 중심유전자인 transposable element(SLJ 7C3, Activator)가 경상대 PMBBRC(Plant Molecular Biology & Biotechnology Center)의 한창덕박사로부터 분주되어 증식을 위해 Invitrogen One Shot™ competent cell안으로 transformation 되었으며 유전자의 분리 및 조작을 위하여 다량으로 순수 분리하였다. 또한 유전자의 발현을 조작하게 될 heat shock promoter는 영국의 John Innes Center의 Dr. Coupland에게 분양을 받아 발현백터(Heat shock promoter Transposase, pAt6K)로 사용하였다.

### 나. 조직배양 체계 확립 및 항생제 저항성 검증

한란과 춘란 근경의 증식과 식물체분화에 적합한 NAA와 BA의 농도를 구명하기 위하여 MS 배지에 농도별 단용 및 혼용실험을 실시하였다. 특히 particle bombardment의 효율을 극대화하기 위하여 bombardment직전 근경의 전처리 조건을 확립하기 위한 시험을 시행하였다. 전처리배지는 MS배지에 NAA를 1mg/L을 첨가하는 것이 근경의 활력에 가장 좋은 것으로 판명되어 전처리배지로 사용하였다. 또한 항생제에 대한 자연저항성 정도를 알아보기 위하여 근경을 항생제 hygromycin을 각 25, 50, 75, 100, 150 ppm을 포함한 MS배지에 치상하여 3개월간 관찰하였다. Hygromycin 25ppm조건을 제외한 모든 처리구에서 갈변화 현상을 관찰하였으며 농도가 높을수록 갈변화가 빠르게 진행되는 것을 관찰할 수 있었기 때문에 형질전환 실험은 hygromycin 25 ppm을 포함한 MS배지를 사용하였다.

### 다. 유전자총 사용방법 확립

유전자총 사용의 최적화 조건을 찾기 위해 다양한 조건의 bombardment는 듀폰사의 유전자총 PDS1000을 이용하여 시행되었다(그림1). 사용된 검정유전자로써는 GUS

유전자를 포함한 plasmid pZO1052와 형광유전자인 GFP (Green fluorescent protein)를 포함한 plasmid pCAMBIA-smGFP가 사용되었다. Bombardment 사용조건으로는 강도조절을 위하여 3가지의 다른 압력조건(1100, 1350, 1500psi)과 재료와 stop screen과의 거리를 2가지로 달리 하였다. GUS유전자의 발현정도는 발색되는 반점의 수에 의해 상·중·하의 세등급(아래사진참조)으로 분류하였으며 GFP유전자의 발현 또한 같은 세등급으로 나누어 bombardment의 효율성을 조사하였고(그림2) GFP와 GUS발현검정은 아래와 같은 방법으로 수행하였다.

### GFP발현검정

유전자총을 이용하여 bombardment를 한후 약 2-3일 지난 근경에 대해서 GFP발현을 검사하였다. 식물 sample을 액체 parafilm에 embed시킨 후 -20℃에서 얼린후 얼린 sample을 microtome HM505E (microm, Germany)를 이용하여 얇게 자른 뒤 (두께 20μ m) 광학현미경(Zeiss Universal microscope, Germany)과 FITC filter를 이용하여 절편된 sample을 관찰하였다.

### β-glucuronidase의 발색반응

GUS는 Jefferson(1987)이 서술했던 방법을 이용하여 분석을 실시하였다. 형질전환 조직체를 고정시키기 위하여 0.3% formaldehyde를 포함하는 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 1시간 가량 고정시킨 후, GUS assay-용액(1.9mM X-Glu, 0.5mM potassium ferricyanide, 0.5mM potassium ferrocyanide, 0.3% Triton X-100 in 0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.0)에서 하룻밤 동안 염색하였다. 조직화학적 반응이 완료된 다음 FAA-용액[10%(v/v) formaldehyde, 42.5%(v/v) ethanol, 5%(v/v) acetic acid]에 12시간 동안 처리하여 시료내의 엽록체배경을 제거하고 청색의 GUS활성에 의해서 생성된 발현을 관찰한 후 사진촬영을 하였다.

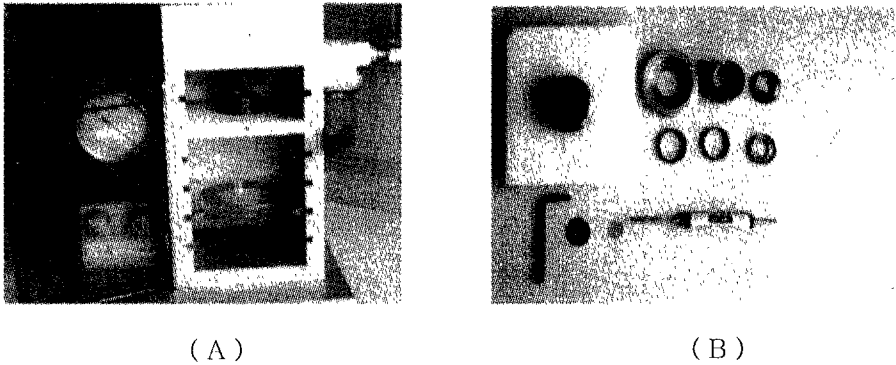


Fig. 2. Gene gun PDS1000 used for microprojectile bombardment experiment on rhizomes of Oriental cymbidium. Front view of PDS1000 (A) and accessories of gene gun (B).

< 동양란 근경부위 발현백터 pZO1052의 GUS유전자 발현양상 >

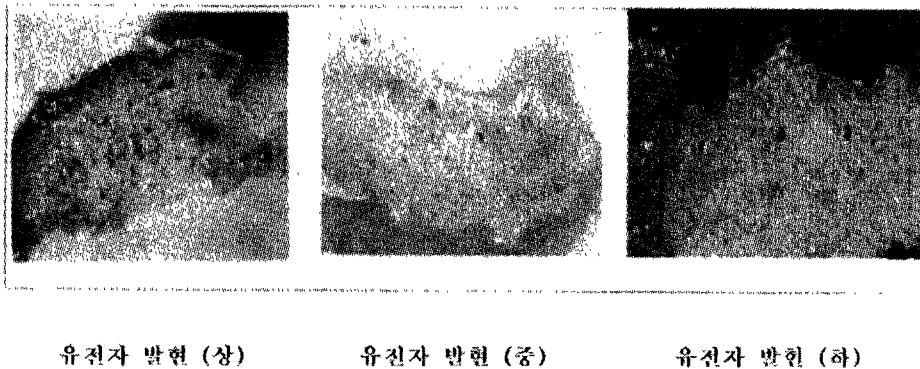


Fig. 3. Quantification of bombardment by GUS expression level analysis. The level of GUS expression was decided by counting the number; more than 500 spots/cm<sup>2</sup> for high, 100-500 for medium, and less than 100 for low.

제2항 형질전환 Bacterial strains and plasmids

형질전환을 통한 동양란 변이체 생산을 위하여서 동양란 근경을 재료로 genetic transformation을 수행하였다. 유전자의 전이방법은 생물학적 방법인 *Agrobacterium*

*tumefaciens*를 사용하였고 아그로박테리아 균주로는 binary vector pAT6K(그림1)를 포함하고 있는 LBA4404를 사용하였다. pAT6k는 열에 의해서 유전자의 발현이 유도 되는 heat shock promoter에 옥수수에서 염색체를 옮겨 다니는 것으로 알려진 transposable element 유전자 (transposase)가 연결된 하나의 gene cassette과, 항생제 선발 유전자인 카나마이신 저항성 유전자, 그리고 발색반응을 통하여 형질전환 여부를 구별할 수 있는  $\beta$  - glucuronidase 유전자(GUS)를 포함하였다. pAT6k plasmid는 electroporation에 의해 LBA4404안으로 도입되어진 후, 형질전환을 위하여 사용되었다.

### 제3항 전배양

형질전환효율에 미치는 전처리 영향을 알아보기 위하여 실험을 수행하였다. 250ml의 삼각플라스크에 증식용 액체배지 50mL를 넣고 길이 2-3cm 크기의 근경을 20-30개 정도씩 넣은 후, shaking incubator에서 50~60rpm의 속도로 회전배양 시켰다. 전처리 일수가 형질전환의 효율에 미치는 영향을 보기 위하여 전처리 조건은 무처리구(0일)를 포함하여 3일, 7일 두 조건으로 시행하였다.

### 제4항 Wounding

형질전환효율에 미치는 wounding 처리의 효율을 알아보기 위하여 실험을 수행하였다. 7일간 전처리한 근경을 삼각플라스크에 치상하고 약 30-40mL의 증식용 액체배지와 30g의 autoclave한 seasand(Junsei, Japan)를 첨가하였다. Wounding을 하기 위하여 삼각플라스크를 shaking incubator에서 90-100rpm의 속도로 2일과 4일간, 그리고 무처리로 시행하였으며, wounding처리 후, 아그로박테리아와 공배양을 수행하였다. (Fig. 4)

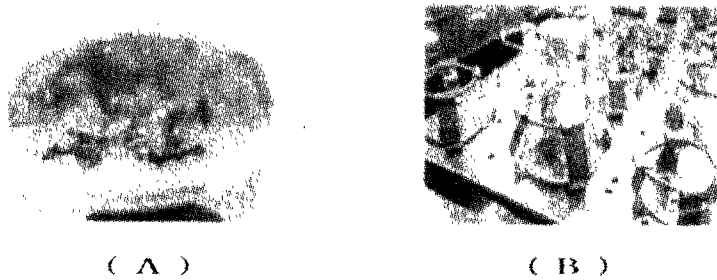


Fig. 4. Wounding of rhizome of oriental cymbidium with seasands and shaking incubator. (A) For efficient wounding into meristem tissue of rhizomes, 30g of seasands were added into the 3days or 7days precultured flask (B) The rhizomes cocultured with seasands were wounded with mild shaking at 90~100rpm for 2days or 4days.

#### 제5항 Co-cultivation

*A. tumefaciens* LBA4404안으로 형질전환용 binary vector를 electroporation에 의해 도입한 후, positive colony를 glycerol stock으로 만들었으며, 형질전환실험을 위한 균주로 사용하였다. 형질전환 3일전 LBA4404(pAT6k)를 항생제 ampicillin 75ppm이 포함된 고체 YEP배지(yeast 5g, pepone 5g, NaCl 2.5g, pH 7.0)에 streaking한 후, 28°C incubator에 치상하였으며, 형질전환 당일 매우 왕성히 자란 아그로박테리아를 형질전환을 위해 사용하였다. 공배양 배지로는 100 $\mu$  M의 acetosyringone 이 포함된 액체 AAM배지 {AA salts and amino acids(Toriyama and Hinata, 1985), MS vitamins (Murashigs and Skoog, 1962), casamino acid 0.5g/L, sucrose 68.5g/L, glucose 36g/L, pH 5.2} 를 사용하였다. 50mL의 코닝튜브에 AAM 액체배지 30mL를 채운 후, spetula를 이용하여 배양된 아그로박테리아를 OD값 0.5정도의 혼탁액이 될 정도로 풀어 넣었다. 준비된 아그로박테리아 용액에 wounding처리한 rhizome을 넣고 약 20분간 접촉을 시켰으며 접촉 후에는 고체AAM배지에 치상하였다. 치상된 plate는 28°C의 incubator에서 암조건으로 3일간 배양시켰다(Fig. 5).



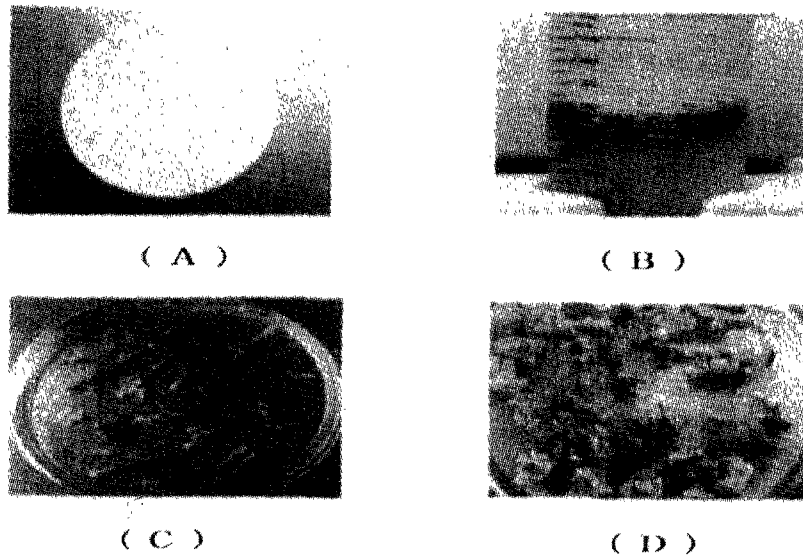


Fig. 5. General procedures of genetic transformation of oriental cymbidium. (A) Preprtion of *Agrobacterium tumefaciens* on YEP media with ampicillin (75ppm). The *Agrobacterium*(LBA4404) harbored the expression vector pAt6k which contains transposable element transpoase. (B) Cocultivation of oriental cymbidium rhizomes with LBA4404(pAt6k) dissolved in liquid AAM media for 20min. (C) Placement of inoculation oriental cymbidium rhizomes at the solid AAM media for 3days at 28°C. (D) Completion of cocultivation of Oriental cymbidium rhizomes for 3days. Over-grown *Agrobacteria* can be seen on the surface of the rhizomes.

#### 제6항 Wash-out and regeneration

3일간의 co-cultivation 후에 아그로박테리아를 제거하기 위하여 200mg/L의 cefotaxime (DUCHEFA, Netherlands)과 300mg/L의 carbenicillin (DUCHEFA, Netherlands) 그리고, 0.05%의 Triton X-100이 포함된 멸균수를 이용하여 3-4회 세척하였다. 50mL의 코닝튜브에 30mL의 세척 용액을 넣은 후, 공배양된 근경을 넣었으며, mini 3D-shaker을 이용하여 매회 30분간 상하로 shaking을 해주었다. 3-4회의 세척 된 근경들은 kanamycin 50mg/L와 carbenicillin 300mg/L가 포함된 재분화 고체

배지(MS salt 4.4g/L, sucrose 30g/L, 활성탄 0.5g/L, NAA 0.1mg/L, BA 0.5mg/L, agar 8g/L)에 치상하여 25°C의 배양실에서 배양하면서 생육을 관찰하였다.

#### 제7항 GUS expression assay

형질전환의 효율을 검정하기 위하여 Jefferson등(1987)의 방법을 사용하여 GUS 발색반응을 수행하였다. GUS발색반응은, 1ml의 GUS발색용액을 만들기 위하여 3mg의 5-bromo-4-chloro-indolyl glucuronic(X-Gluc)을 150 $\mu$ L dimethyl formamide 에 녹인 후, 850 $\mu$ L의 solution B(1% Triton X-100, 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, 5mM potassium ferricyanide, 5mM potassium ferrocyanide)를 첨가하였다. 형질전환 후, 약 1-2주가 경과된 근경들을 재료로 GUS 발색용액을 첨가한 후, 37°C incubator에서 overnight하였다. 처리 후, destaining solution (ethanol 2.5mL, 10% formaldehyde 5mL, 5% glacial acetic acid 2.5mL)으로 GUS용액을 1회 세척하고 집진시킨 다음, 4°C에 보관하며 GUS 유전자의 발현여부와 정도를 관찰하였다.

#### 제8항 DNA 추출 및 PCR

형질전환 유전자의 도입을 확인하기 위하여 근경으로부터 DNA를 추출하였다. 막자사발에 형질전환된 근경 1g을 넣은 후, 액체질소를 이용하여 마쇄하였으며 마쇄한 시료를 50mL 코닝튜브에 넣고 7ml의 CTAB(1% CTAB, 50mM Tris-HCl, 10mM EDTA) extraction buffer와 70 $\mu$ L의  $\beta$ -Mercaptoethanol(1% of total volume)을 넣은 후 부드럽게 혼합하였다. 60°C로 고정시킨 shaking incubator에서 1시간 30분동안 처리한 후, 실온에서 10분간 식혔다. Chloroform : isoamylalcohol(24 : 1)을 CTAB buffer 와 동일 양으로 넣고 4°C에서 6000rpm으로 10분간 원심 분리하여 상등액을 채취하여 chloroform: isoamylalcohol(24 : 1)을 넣고 교반하여 준 뒤, 같은 조건으로 다시 원심분리한 후 상등액을 취하였다. 추출한 상등액에 isopropanol을 넣은 후, DNA를 spooling하였고, 70% 에탄올에 세척한 후, 건조시켜 TE buffer(pH8.0)에

녹여 양을 측정하였다. DNA의 질을 확인하기 위하여 0.8% gel에서 전기영동을 한 후, EtBr 염색하여 관찰하였으며 추출한 DNA로 PCR 분석을 하였다. 50~100ng의 genomic DNA를 주형으로 하여, 3 $\mu$ L PCR 10 $\times$ buffer {20mM Tris-HCl(pH8.0), 100mM KCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT} , 2 $\mu$ L 200 $\mu$  M dNTP mixture(2.5mM of each dNTP), 1 $\mu$ L의 5' 과 3' 20 $\mu$ mol primer, 0.15 $\mu$ L(1units) Taq polymerase(Takara Co., Japan)을 혼합하여 총 30 $\mu$ L의 양으로 수행하였다. 사용한 GUS primer forward는 5'-CTC GAC GGC CTG TGG GCA TTC AGT-3' 이었으며 reverse는 5'-CGT CGT CTT TTC GGC GGC TGA AGC-3' 이었다. PCR의 조건으로서는 94 $^{\circ}$ C에서 4분 동안 pre-denature하였고 94 $^{\circ}$ C에서 45초 동안 denature한 다음, 55 $^{\circ}$ C에서 45초의 annealing을 거쳐서 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30초 동안 elongation을 하였다. 같은 조건으로 34cycle 수행하였으며, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 안정화시킨 후 4 $^{\circ}$ C에서 유지하였다. PCR에 의해 증폭된 DNA를 1% gel에서 전기영동 후, EtBr로 염색하여 관찰하였다.

#### 제9항 2,4-D treatment

생장호르몬 2,4-D가 변이체 생산을 위한 형태적 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험을 수행하였다. 유리 배양병에 1ppm, 2ppm, 4ppm, 8ppm 농도의 2,4-D를 포함한 근경증식용 고체배지(MS salt 4.4g/L, sucrose 30g/L, 활성탄 0.5g/L, NAA 0.1mg/L, agar 8g/L)에서 2~3cm 정도가 되는 근경을 2~3개월 동안 배양된 근경을 배지 표면에 치상하였다. 치상된 재료는 25 $^{\circ}$ C 배양실(낮16시간/밤8시간)에서 근경의 성장 및 재분화를 유도하면서 식물체의 형태적 변이를 관찰하였다.

#### 제10항 Trifluralin treatment

동양란 변이체를 유도하기 위해 Trifluralin을 처리하였다. DMSO에 Trifluralin을 녹인 후, 1 $\mu$  M, 5 $\mu$  M, 10 $\mu$  M의 농도를 포함한 액체 증식용 배지(MS salt 4.4g/L,

sucrose 30g/L, 활성탄 0.5g/L, NAA 0.1mg/L.)를 조성하였다. 왕성한 생육을 보이는 근경을 유리 배양병안에 준비된 고체 재분화배지(MS salt 4.4g/L, sucrose 30g/L, 활성탄 0.5g/L, NAA 0.1mg/L, BA 0.5mg/L, agar 8g/L)에 치상하였고, 준비된 처리용액을 4mL씩 근경 위로 분주한 후, 무균상태에서 밀봉하였다. 치상된 재료는 25℃ 배양실(낮16시간/밤8시간)에서 근경의 성장 및 재분화가 유도되었고 이들의 형태적 변이를 관찰하였다.

### 제11항 PCR amplification of retrotransposon

동양란에서의 retrotransposon을 cloning 하기 위해 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하였다. 50~100ng의 genomic DNA를 주형으로 하여, 5 $\mu$ L PCR 10 $\times$  buffer {20mM Tris-HCl(pH8.0), 100mM KCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT} , 4 $\mu$ L 200  $\mu$  M dNTP mixture(2.5mM of each dNTP), 3 $\mu$ L의 5' 과 3' 100pmol primer, 1 $\mu$ L (5units) Taq polymerase(Takara Co., Japan)을 혼합하여 총 50 $\mu$ L의 양으로 수행하였다. Retrotransposon을 증폭하기 위해 PCR에 사용된 primer는 24mer인 5'-GTI TAW YKT IGA YGA YRT IYT IRT-3'와 27mer인 5'-ICK YTC ISW YTG ICC RTC IST YTG IGG-3'을 5' 과 3' primer로 각각 사용하였다. PCR의 조건으로서는 94℃에서 3분 동안 pre-denature하였고 94℃에서 30초 동안 denature한 다음, 48℃에서 30초의 annealing을 거쳐서 72℃에서 3분 동안 elongation을 하였다. 같은 조건으로 10cycle 수행하였으며, annealing의 온도를 매 cycle 당 0.5℃씩 감소시켰다. Annealing에서 elongation까지의 시간이 75초가 소비되도록 온도변환시간을 설정하였다. 10cycle의 touchdown PCR 후에, 94℃에서 30초, 48℃에서 30초, 72℃에서 2분 30초의 조건으로 35cycle의 PCR을 수행하였다. Annealing에서 elongation까지의 시간이 72초가 소비되도록 온도변환시간을 설정하였고 마지막으로 72℃에서 7분간 안정화시킨 후 4℃를 유지하였다. PCR에 의해 증폭된 DNA는 1% gel에서 전기영동 후, EtBr로 염색하여 관찰하였다. 전기영동하여 발현된 DNA 밴드를 gel과 함께 잘라내어

elution(CLONTEC)하였다. Elution후 TA cloning vector(Invitrogen)를 이용하여 ligation 하였으며, Invitrogen사의 Top10 cell로 transformation 시켜 colony PCR로 확인하였다.

#### 제12항 돌연변이원 사용 변이체 생산

돌연변이 유도를 위해 다른 식물종에서 널리 쓰이는 화학적 돌연변이원인 MMS, EMS 그리고 colchicine에 대한 실험을 수행하였다. 한란과 춘란을 재료로 각각 0.1, 0.2, 0.3%의 농도로 1주에서 5주간 근경에 처리를 하였다. 모든 처리는 MS액체배지에서 수행되었으며 배지의 조건은 charcoal 0.5g/L, sucrose 30g/L, agar 7g/L, pH 5.3이었다. 처리후 180일 과 210일이 경과한 후 근경들의 생존율을 조사하였고 돌연변이 여부를 조사하였다. 이후 돌연변이원의 농도를 세분하여 MMS와 EMS는 각각 0.01, 0.05, 0.1, 0.2%, colchicine은 0.1, 0.2, 0.3%로 조절하여 1주에서 5주간 처리한 후 생존율과 변이체 발생율은 조사하였으며, 한편 기내배양된 변이체는 서울여자대학교 유리온실에서 순화시켰다.

## 제 3 장 결과 및 고찰

### 제 1 분야 양란 신품종 육성을 위한 지표인자 개발

#### 1-1. 양란 신품종 육성

##### 제1항 교배실험

##### 가. 1차년도 교배

*Cymbidium sinense*는 향기를 갖고 있으므로 향기가 없는 품종과 교배하여 향기가 있는 품종을 만들려고 하였다(Table 4). 품종간 교잡시 임성이 있는 조합에서 기대가 되는 조합으로는 C. 'Murasakigengii'×C. 'Mizunomaru'로 모본에서 초세 조절과 화형의 문제를 보완할 수 있으리라 사료되었으며 C. 'Venus'×C. 'Moon Venus'에서도 내병성과 꽃수를 보완할 수 있으리라 생각되었다.

각 품종별 특성을 살펴보면 백색계인 'Jungfrau'는 순백색의 대륜화로, 순판에 작은 홍색의 반점이 있는데, 화형이 좋아서 절화용으로 가장 많이 이용되는 대표적 품종이다. 그리고 'White Excel'은 수술대는 홍색이고 용기부의 황색이 아름답고, 꽃대서기가 좋은 절화용 품종으로 최상의 인기품종이지만, 리드의 생육기간이 길어서 출하기가 늦어지며, 고온에 노출시 주두에 기형이 생기는 단점이 있다. 분홍색계인 'Parnasc'는 밝고 맑은 자줏빛의 꽃잎으로, 순판은 역삼각형으로 적색이 들어있어서 인상적인데 생육이 잘되며, 꽃대서기도 잘 되는 봄출하용 품종인데 단점으로는 개화기때 온도가 높으면 꽃떨이 현상이 발생한다. 그리고 발레리나는 옅은 핑크색의 꽃잎으로 순판은 짙은 핑크색의 반점이 주변에 번지는 것이 특색으로서 안아피기형의 품종이다. 동양란 교잡종인 'Murasakigengii'는 꽃잎이 적자색이며 동시에 꽃대도 적자색의 품종인데 식물체가 강건하고, 다화성이며 향기가 있으나 리드의 생육기간이 짧은 단점이 있다.

Table 4. Fertility ratio of *Cymbidium* species and cultivars crossed for 6 months from December in 1997 to May in 1998.

	C E	C T	C S	R K	M K	M L	R H	M M	A D	V	M V	S P	D Y	H H	P N	B	H E	M O	P P	K W C	D	J	W E
CE <sup>2)</sup>	0	0	X	0	X	0		X	0	X				0			0	0					
CT	0	0	X	0	X	0																	
CS	0			X			0	X															
RK	0								X	X								X					
MK	X						X	0	X	X					0				0				
ML	0	X																					
RH			0		X	0								X	0					0			
MM			X					X				X											
AD	0			X																			
V	X			X	X						X												
MV					X					0						X				X			
SP													X										
DY						X				X	X												
HH	0				X			X						X		0					0		
PN	0										X	X			0			X	0				
B																0				0			
HE	0				X				X		X				X				X				
MO	0																						
PP	0				X	0									X					X			
KW C			X				X						X			X		X		X			
D																						X	
J				X							X												X
WE				X			X																X

<sup>2)</sup> *C. eburnum*, *C. tracyanum*, *C. sinesense*, *C. 'Red King'*, *C. 'Murasakigengii'*, *C. 'Moonlight'*, *C. 'Lapin Hat'*, *C. 'Mizunomaru'*, *C. 'Ayako Tanaka'*, *C. 'Venus'*, *C. 'Moon Venus'*, *C. 'Skymint Patty'*, *C. 'Dooyo'*, *C. 'Husky Honey'*, *C. 'Paranase'*, *C. 'Ballerina'*, *C. Hyrosyma Eyes'*, *C. 'Marlin Monro'*, *C. Pepermint Party'*, *C. 'KenyWineColor'*, *C. 'Drum'*, *C. 'Jungfrau'*, *C. ' White Excel'*

## 나. 2차년도 교배

교배 결과 원종끼리의 selfing이나 원종과 품종간 교배시에 높은 임성을 보였으며, 품종간에는 수분 후 꼬투리가 비대가 되지 않거나 비대 후 탈리층이 형성되어 떨어져 버리는 조합이 원종간 또는 원종과 품종간의 조합에 비해 많았다(표 5). 기대되는 조합은 Ayako Tanaka'의 경우 꽃이 밀어지고, 작은 단점을 Sky Mint Patty'와의 조합으로 보완이 가능하며, Ballerina'의 경우 꽃이 적게 달리는 것은 ' Moon Light'에서, 초세가 나쁜 것은 ' Sunny Moon'로서 보완이 가능하다. ' Banana Boat'는 꽃달리기가 나쁜데 ' Pianist' 와의 조합이 기대되며, ' Kenny Wine Color'은 꽃이 작은 것이 흠이므로 ' Sunny Moon', 'Waltze Romance'과의 조합이 가능성이 있다. ' Miss Taipei'도 꽃달리기가 나쁜 단점은 ' Ayako Tanaka'으로 보완이 가능할 것으로 판단되며 ' Miznomaru'는 꽃이 작은 것이 단점으로서 ' Sky Mint Patty' 으로 보완할 수 있을 것으로 생각되었다. ' New Yasko'는 임성있는 조합이 품종 중 가장 많았는데, 이 품종도 꽃의 크기를 크게 할 수 있는 ' Rapine Hat'과의 조합이 기대된다. ' Sky Mint Patty', 'Sunny Moon'은 노랑색꽃으로서 형질이 비슷하나 ' Sky Mint Patty'를 모본으로 했을 때 임성이 있어서, 서로 보완이 가능하리라 생각된다. ' Waltze Romance'의 경우 화형이 좋고 꽃달리기가 좋은 품종으로서 화색을 백색(*C. ebrunum*)이나 적색의 방향성(*C. 'Murasaki Gengii'*)으로 개량한다면 상업성 있는 품종의 개발이 가능하다고 생각된다.

교잡육종에 있어서 임성의 차이는 주로 환경적인 측면이나 유전적 소질때문에 발생하는 것으로 생각된다. 조(1995)는 교배성에 미치는 영향으로 유전적 요인과 환경적 요인을 들었는데, 유전적 요인으로 특정 유전자의 작용이나 생식기관의 이상, 염색체 수의 차이 등이 원인이 된다고 하였다. 특히 2배체와 3배체, 3배체와 4배체의 교잡이 잘 되지않는데 외적 조건으로서 수분 후 광, 온도, 수분, 병충해 등이 문제가 되며, 30℃이상의 고온이나 10℃미만의 저온, 과도한 직사광이나 음지에서는 임성이 떨어지는 것으로 알려져 있다. 현재 상업적으로 유통되고 있는 *Cymbidium* 품종은 원종을



기본으로 하여 원종간 품종간 또는 품종간의 다교잡에 의하여 육성된 것으로 과거 교배조합의 작성은 재배 경험에 의하거나 우연적 확률에 기대하는 경우가 많은 것이 사실이다. *Cymbidium*속의 종간교잡이 잘 이루어질 수 있는 것은 원종의 염색체수가  $2n=40$ 으로 그 genome이 유사하다는 특성 때문이며 종간교잡에 의해 새로운 개체가 나올 확률이 다른 식물에 비해 높은 것으로 보고 되어있다(Seth와 Cribb, 1984; Tanaka와 Kamemoto, 1974). 자후 종간 또는 품종간 교잡시 조합표(Table 4, 5)에서 나타난 결과를 참고로 하여 이루어져야 할 것으로 생각된다.

Table 5. Results of crosses between *Cymbidium* species and cultivars during the cross period from December in 1998 to March in 1999.

	E N	T N	A T	B	B B	K E C	M T	M M	M L	M G	N Y	P P	P P	R H	S M P	S M	W R	W E	Y G
ET <sup>2)</sup>	O	O			O		X	X			O		X		O		X	O	
TN	O	O			O		X	X			O		X		O		X	O	
AT	X		X			O		O	X		X	O			O		X		O
B	X		X	O			X		O		O			X		O		X	O
BB	O				X	O		O	X		O		O		O		X		X
KEC		O			X	O	O			O	O			O		O	X	O	
MT	X		O		X		X				X		X		O		X		X
MM		O		O		X			X	O		O			O		X		X
ML	X		O		O		X			X			X	O		O		O	X
MG		O		X	O		X	O	X		O		X		X	O			X
NY		O			O		O			O		O		O	X	X		X	O
PP		X		X		X	O		X	O			X		O		O		X
P	X		O		O		X	O		O			X		X	O		X	
RH			O		X	O		X	O		X	O		X				O	X
SMP	O			X		O		O	X	X	O		O	O		O		O	X
SM		O			O		X		O	O			X		X	O		O	O
WR	O	O		X		X		X	O	O			X				X	O	
WE		O		X		O			O		X			X	O	X		X	O
YG	O			O	X		O			O	X	O		O				X	X

<sup>2)</sup>*C. ebrunum*, *C. tracyanum*, *C. sinesense*, *C. 'Red King'*, *C. 'Murasakigengii'*, *C. 'Moonlight'*, *C. 'Lapin Hat'*, *C. 'Mizunomaru'*, *C. 'Ayako Tanaka'*, *C. 'Venus'*, *C. 'Moon Venus'*, *C. 'Skymint Patty'*, *C. 'Dooyo'*, *C. 'Husky Honey'*, *C. 'Paranase'*, *C.*

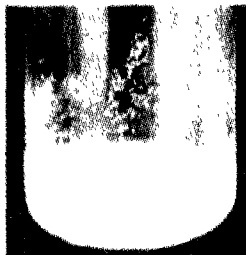
'Ballerina', *C. Hyrosyma Eyes*, *C. 'Marlin Monro'*, *C. Pepermint Party*, *C. 'KenyWineColor'*, *C. 'Drum'*, *C. 'Jungfrau'*, *C. ' White Excel'*

제2항 F1 종자의 생산 및 파종

파종 후 발아정도는 ' Venus' ×' Moon Venus' 가 파종 115일만에 가장 빨리 발아되었다. 그리고 ' Moon Light' ×*C. ebrunum*, ' Pepermint Party' ×*C. ebrunum*, *C. ebrunum*×*C. ebrunum*의 경우도 대부분 파종 150일 후에 모두 발아하였다(Fig. 6, Table 6).



<Pollinated seedpod>



<Seeds sowed in vitro>



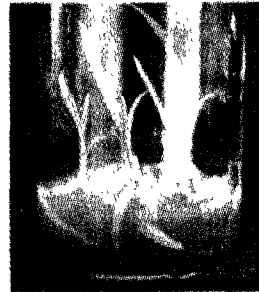
<Seeds developed protocorm like body>



<Shoots from protocorm>



<Shoots subcultured in vitro>



<Well growing seedlings in vitro>

Fig. 6. In vitro seedling production of F1 hybrids crossed between species and cultivars.

Table 6. Germination speed and shoot length of *Cymbidium* hybrid cultivars.

Cultivars	Days for germination	Shoot length (cm)
<i>ebrunum</i> × <i>ebrunum</i>	182	rhizome
<i>ebrunum</i> × Ayako Tanaka	-	-
<i>ebrunum</i> × Husky Honey	-	-
<i>ebrunum</i> × Hiroshima Eyes	-	-
Marlin Monroe × <i>ebrunum</i>	-	-
Kenywine Color × <i>ebrunum</i>	-	-
Husky Honey × <i>ebrunum</i>	-	-
Pepermint Party × <i>ebrunum</i>	157	5
Moon Light × <i>ebrunum</i>	149	5
Ayako Tanaka × <i>ebrunum</i>	135	4
<i>tracyanum</i> × <i>tracyanum</i>	-	-
<i>tracyanum</i> × Moon Light	-	-
<i>tracyanum</i> × Red King	-	-
<i>tracyanum</i> × <i>ebrunum</i>	-	-
Moon Light × <i>tracyanum</i>	-	-
Kenywine Color × <i>tracyanum</i>	-	-
Parenasse × Raphine Hot	-	-
Murasakigengi × Pepermint Party	-	-
Venus × Moon Venus	115	8
<i>sinense</i> × <i>ebrunum</i>	-	-
<i>sinense</i> × Laphin Hot	-	-

교잡종의 파종용 배지 중에서는 Hyponex 배지가 가장 좋았고 그 다음은 1/2 MS 배지이었으며 MS배지가 발아율이 낮았던 점으로 미루어 보아 종자발아를 위해서는 배지 내의 염류 농도가 낮은 것이 좋은 것으로 나타났으며 activated charcoal을 첨가

한 것이 배지내 phenol 물질을 흡수하여 보다 건강한 유묘를 생산할 수 있었다. 그러나 *C. ebrunum*×*C. Sunny Romance*의 경우 배지의 종류에 관계없이 모든 배지에서 발아가 잘 되었다. 교배를 통하여 얻은 종자 중에서 발아된 F1은 *C. ebrunum*×*C. Sunny Romance*, *C. FK*×*C. ebrunum*, *C. Jung Frau*×*C. ebrunum*, *C. Moon Light*×*C. ebrunum*, *C. Perpermint Party*×*C. ebrunum*, *C. 1317*×*C. ebrunum*, *C. Walts Romance*×*C. ebrunum*, *C. tracyanum*×*C. Moon Light*, *C. Banana Boat*×*C. tracyanum*, *C. Moon Venus*×*C. Moon Light*, *C. Venus*×*C. Moon Venus*로 모두 11종류이다. 형태적인 특징을 보면 *C. ebrunum*의 경우 잎이 가늘고 직립성으로 비교적 곧게 자라나는데 *C. ebrunum*와 교배한 *C. ebrunum*×*C. Sunny Romance*, *C. FK*×*C. ebrunum*, *C. Jung Frau*×*C. ebrunum*, *C. Moon Light*×*C. ebrunum*, *C. Perpermint Party*×*C. ebrunum*, *C. 1317*×*C. ebrunum*, *C. Walts Romance*×*C. ebrunum*도 휘는 각도가 작으며, 특히 *C. ebrunum*×*C. Sunny Romance*는 잎이 매우 가늘고 직립성이었다(Fig. 7). 이에 반해 *C. Banana Boat*×*C. tracyanum*의 경우 엽폭이 크고 잎이 휘는 각도가 크며, *C. tracyanum*×*C. Moon Light*, *C. Banana Boat*×*C. tracyanum*도 유사한 형태를 나타내었다(Fig. 8). 이들 F1의 유전적인 형질도 모본과 유사한지에 대한 검정은 생육과정 중에 추가적인 관찰이 필요한 것으로 생각되었다.

발아 후 유묘가 1-2cm 정도 성장하였을 때 계대배양을 위한 적정 배지의 선별 실험을 위해, 기본배지로서는 Hyponex와 MS를 사용하였으며 여기에 BA 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0mg/L와 NAA 0.5, 1.0mg/L를 혼용첨가하고 7 g/L agar, 30 g/L sucrose를 첨가하였으며 pH는 5.7로 조정하였다. 실험 결과 대부분의 경우 Hyponex 배지가 좋았으며 생장조절제는 처리하지 않거나 BA 0.5mg/L과 NAA 0.5mg/L을 처리한 경우에만 정상적으로 생육되었다. 그리고 BA 5.0와 10.0mg/L를 첨가했을 경우 식물체가 짧아지고 엽폭이 커지며 뿌리가 굵어지는 기형적인 생장을 하는 것으로 나타났다(Fig. 9) 따라서 양란 유묘의 기내배양시에는 생장조절물질을 첨가하지 않는 것이 좋은 것으로 나타났다.

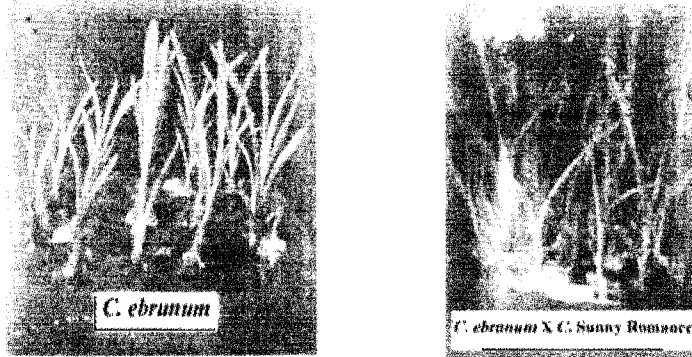


Fig. 7. Seedling of *C. ebrunum* and *C. ebrunum*×*C. Sunny Romance*

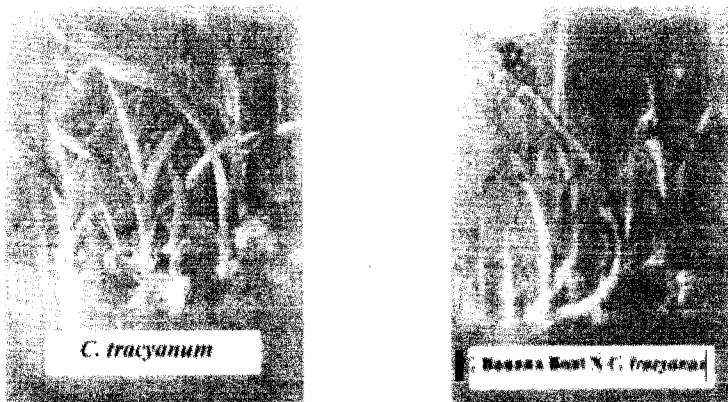


Fig. 8. Seedling of *C. tracyanum* and *C. Banana Boat*×*C. tracyanum*

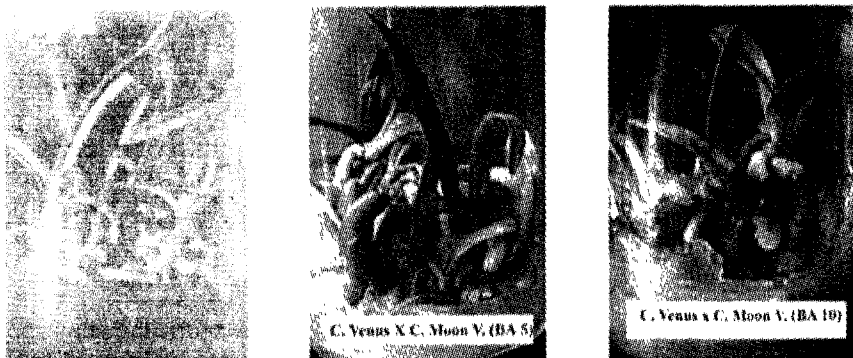


Fig. 9. Seedling growth status of *C. Banana Boat*×*C. tracyanum*

Hyponex medium added BA 0, 0.5 and 10.0mg/L(from left to right)

### 제3항 F1 유묘의 신품성 육성을 위한 내건성 품종 선발

F1 유묘 *C. 'Venus'×C. 'Moon Venus'*, *C. 'Pepermint Party'×C. ebrunum*, *C. 'Banana Boat' ×C. tracyanum*, *C. ebrunum×C. 'Ayako Tanaka'*, 과 모본인 *C. 'Ayako Tanaka'*, *C. tracyanum*의 건조와 저온에 대한 내성을 알아보기 위한 실험 결과, *C. 'Venus'×C. 'Moon Venus'*와 *C. 'Banana Boat' ×C. tracyanum*의 경우 처리 3주 후부터 가장 먼저 피해 증상이 나타나 고사율이 15-20%이었으며 실험종료시까지 100% 고사되었고 나머지 품종의 경우에는 대부분 처리 5주 후부터 피해증상이 나타나기 시작했다(Fig. 10, 11, Table 7).

식물 체내의 엽록소 함량을 조사한 결과 *C. ebrunum×C. 'Ayako Tanaka'*과 *C. 'Ayako Tanaka'*의 경우, 처리 후 7주까지는 다른 교배종에 비해 그 함량이 높게 나타난 것으로 보아 그들이 비교적 건조의 피해를 적게 받는 것으로 사료된다(Fig. 12).

건조처리 후 3주와 7주째의 SOD 활성도를 측정된 결과 *C. ebrunum×C. 'Ayako Tanaka'*과 *C. 'Pepermint Party'×C. ebrunum*의 SOD 활성은 다른 교배종에 비해 실험 초기에 높게 나타났으며 종료시기인 7주 후에는 다소 감소하였으나 여전히 다른 품종에 비해 높게 나타났다. *C. tracyanum*의 경우, 초기의 활성도는 낮았으나 3주 후부터 급격히 상승하여 7주후에도 비교적 높은 활성을 나타냈다(Fig. 13).

이상의 결과로부터 본 실험에 사용된 F1 교배종 중에서 *C. ebrunum×C. 'Ayako Tanaka'*과 *C. 'Pepermint Party'×C. ebrunum*이 모본이나 다른 교배종에 비해 건조에 비교적 강한 것으로 판단되었다.

저온 스트레스에 대한 F1 교배종의 저항성을 알아보기 위해 4℃ 생장상에서 생육시킨 결과 처리 8주 후 까지 큰 변화를 나타내지 않았으며 품종간의 차이도 보이지 않은 것으로 관찰되었다. 따라서 저온기에 0℃ 이하의 온도에서 chilling injury를 유도하는 실험이 보완되어야 할 것으로 판단되었다.

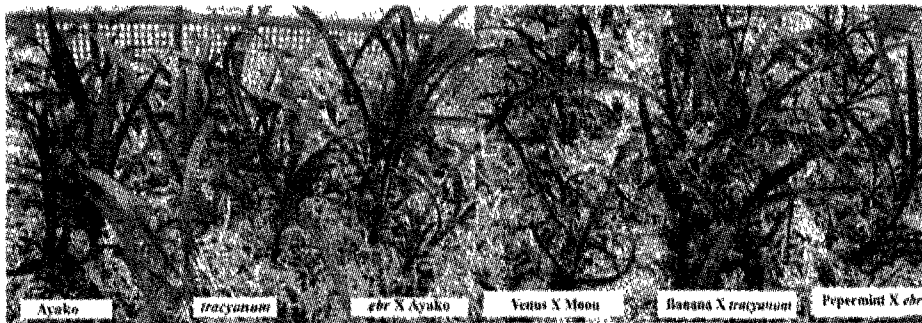


Fig. 10. Cymbidium seedlings before drought treatment

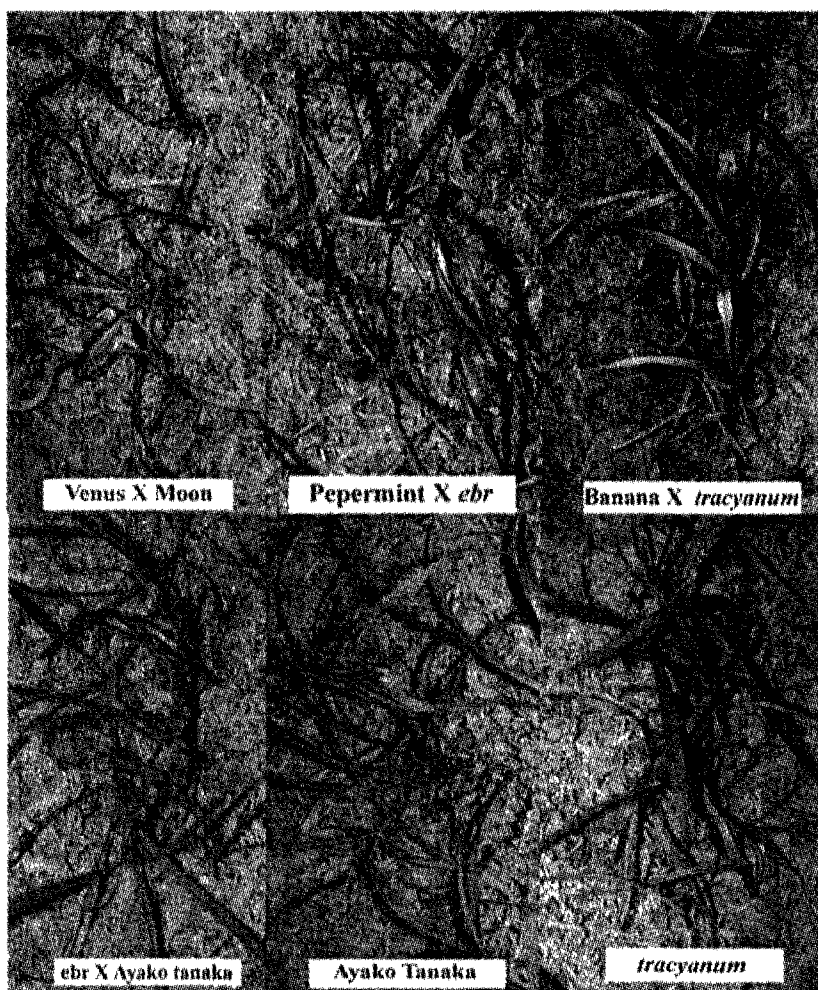


Fig. 11. Cymbidium seedlings 7 weeks after drought treatment.

Table 7. Survival rates of cymbidium hybrids and species after drought treatment.

unit : %

Species	Weeks after treatment		
	3 weeks	5 weeks	7 weeks
<i>C. 'Venus'</i> X <i>C. 'Moon Venus'</i>	85	45	0
<i>C. 'Pepermint Party'</i> X <i>C. ebrunum</i>	90	80	25
<i>C. 'Banana boat'</i> X <i>C. tracyanum</i>	80	55	0
<i>C. ebrunum</i> X <i>C. 'Ayako Tanaka'</i>	100	85	45
<i>C. 'Ayako Tanaka'</i>	100	70	15
<i>C. tracyanum</i>	95	85	25

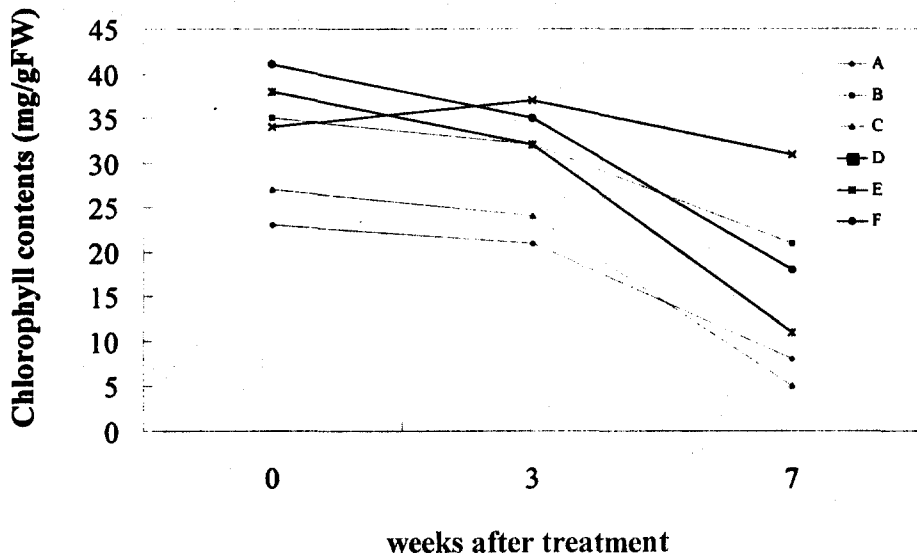


Fig. 12. Changes of chlorophyll contents of cymbidiums after drought treatment.

- A: *C. 'Venus'*×*C. 'Moon Venus'*,      B: *C. 'Pepermint Party'*×*C. Ebrunum*  
 C: *C. 'Banana boat'* ×*C. tracyanum*,      D: *C. ebrunum*×*C. 'Ayako Tanaka'*  
 E: *C. 'Ayako Tanaka'*,      F: *C. tracyanum*



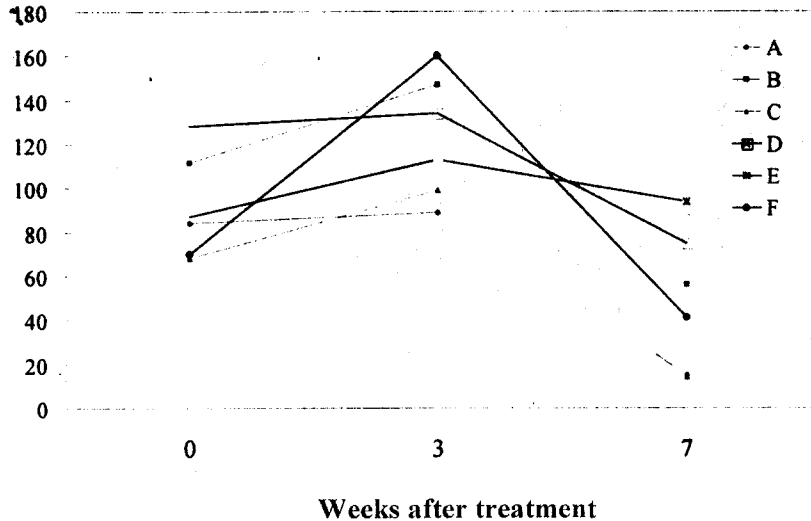


Fig. 13. Changes of SOD activity of cymbidiums after drought treatment. A, B, C, D, E and F; See Fig. 12.

#### 제4항 F1 유묘의 신품성 육성을 위한 내서성 품종 선발

F1 유묘 C. 'Venus'×C. 'Moon Venus', C. 'Pepermint Party'×C. *ebrunum*, C. 'Banana Boat' ×C. *tracyanum*, C. *ebrunum*×C. 'Ayako Tanaka', 과 모본인 C. 'Ayako Tanaka', C. *tracyanum*의 여름철 더위에 대한 내서성 실험을 실시한 결과 내건성의 경우와 같이 C. 'Venus'×C. 'Moon Venus'에서 4주 후 가장 먼저 피해 증상이 나타났다.

C. 'Banana Boat'×C. *tracyanum*의 경우에도 처리 5주 후부터 고온에 의한 입고병 증상이 나타났다. 그러나 C. *ebrunum*×C. 'Ayako Tanaka'과 모본인 C. 'Ayako Tanaka', C. *tracyanum*의 경우 처리 7주까지 건강한 녹색의 잎을 유지하였으나, 8주째부터 고온 피해 증상이 나타났다(Fig. 14).

이는 C. *ebrunum*, C. *tracyanum*, C. 'Ayako Tanaka'의 경우 병에 대한 내성과 내서성이 강한 종으로서 이들과 교배된 'Pepermint Party'×C. *ebrunum*, C. *ebrunum*×C. 'Ayako Tanaka' 또한 내서성이 있는 교잡종인 것으로 사료된다.

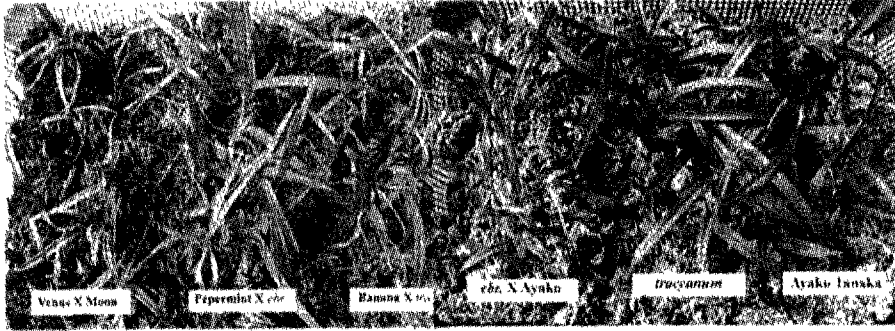


Fig. 14. Cymbidium seedlings 7 weeks after high temperature(30±5°C) treatment.

### 제5항 F1유묘의 신품성 육성을 위한 *Fusarium* 내병성 품종 선발

#### 가. 병원균의 분리 및 병원성 검증

C. 'Anmitsu Hime' 유묘 재배시 발생된 이병주의 가구경에서 병원균을 분리하였다. 건전식물체에 병원균을 접종한 7일후 병징이 발현되었으며, 현미경으로 촬영결과 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cattleyae*임을 확인하였는데(Fig. 15) 투명하고 격막이 있는 소형 및 대형의 분생포자가 발생하였으며 종의 특성인 후막포자도 관찰되었다.

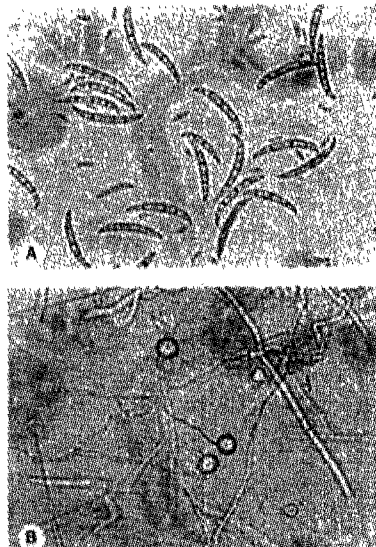


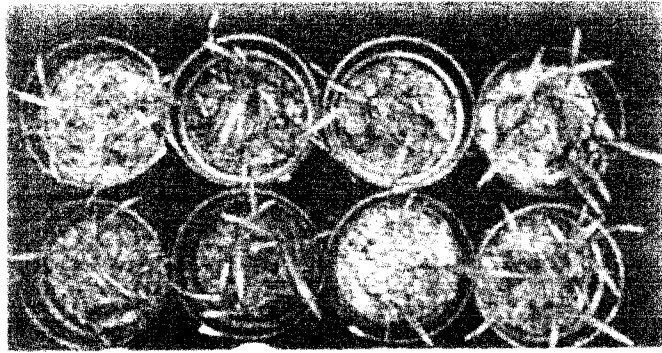
Fig. 15. Conidiospores of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cattleyae* collected and applied for the present studies (A, ×950). Chlamidospores are usually formed singly or in pairs (B, ×1,660)

나. *Fusarium* 저항성 신품종 선발

교배조합에 따라 발병 시기와 생존율에 큰 차이가 있음을 알 수 있었는데 대체적으로 원종이 *Fusarium*에 강했고 품종간 교배시 내병성이 약한 경향을 보였다. 원종의 경우 처리 4주 후부터 고사되는 개체가 생기기 시작하였으나, 8주 후 *C. tracyanum*은 82%, *C. ebrunum*은 66%가 생존하여 차이를 보였다. 원종 × 품종간 교배에 있어서는 *C. tracyanum*을 모본으로 사용한 교배조합에서 생존율이 높았다. 품종간 교배에 있어서도 생존율에 차이가 있었는데, 같은 모본이지만 부분이 상이한 경우 *Fusarium*에 대한 저항성이 달랐다(Table 8, Fig. 16). 이상의 결과로 미루어보아 *Fusarium*저항성이 있는 원종을 선발하여 교배에 이용하고, 품종간 교잡보다는 교배친에 원종을 사용하는 것이 *Fusarium*에 저항성을 갖는 품종의 작출이 가능할 것으로 사료되었는데 *C. tracyanum* × *C.* 'Moon Venus' 교배조합이 나머지 3가지 조합에 비해 유묘 순화시 *Fusarium*에 대한 저항성이 강한 것으로 나타났다. 따라서 각 원종 별 *Fusarium*저항성을 조사하여 교배 및 선발에 이용한다면, 양란 심비디움 유묘재배시 큰 문제가 되고 있는 부패병의 사전 방제가 가능해지리라 생각된다.

Table 8. Survival rates of *Cymbidium* species and their parents after *Fusarium* inoculation. unit : %

Species and their parents	Weeks after inoculation			
	2 weeks	4 weeks	6 weeks	8 weeks
<i>C. ebrunum</i>	100	94	74	66
<i>C. tracyanum</i>	100	96	88	82
<i>C. ebrunum</i> X <i>C.</i> 'Sunny Romance'	88	76	62	48
<i>C. tracyanum</i> X <i>C.</i> 'Moon Venus'	92	82	72	56
<i>C.</i> 'Venus' X <i>C.</i> 'Moon Venus'	80	60	36	26
<i>C.</i> 'Venus' X <i>C.</i> 'Sunny Romance'	74	32	20	12



A B C D

Fig. 16. The different fungal resistance by crossing combination observed after inoculation with *Fusarium oxysporum* f.sp. *cattelyae* (2 months after inoculation of the *fusarium*).

A: *C.* 'Venus'×*C.* Sunny Romance'

B: *C. tracyanum*×*C.* 'Moon Venus'

C: *C.* 'Venus'×*C.* 'Moon Venus'

D: *C. tracyanum* (selfing)

## 1-2. DNA 지표인자 개발

### 제1항 RAPD 표지인자 개발 및 근연도 측정

영양체 증식이 용이한 양란을 품종개량하고자 할 경우에는 잡종강세현상을 기대할 수가 있으며 이를 위해서는 원연간 교배가 유리하다. 이러한 경우, 교배조합에 어떤 양진을 선정하는 것이 효과적인지를 판단하는 것이 중요한데, 교배 모본들의 우수한 특성의 파악과 모본들간에 유전적 거리를 측정하는 작업이 선행되어야 한다. 본 항에서는 주요 양란에 있어서 원종들간의 유전적 거리를 효과적으로 추정하기 위하여 polymorphism을 RAPD기법을 통해 undefined elements로부터 확인하고 이 정보를 사용하였고, 교잡된 품종들의 중요형질 및 형태적 특성을 조사하여 RAPD marker에 의해 도출된 결과와 비교하였다. 나아가서, polymorphic RAPD band들을 STS-PCR primer로 전환하여 SCAR marker를 확보하고 재현성이 강조된 정확한 모본들의 genotype을 분석하는데 있어서 본 실험에서 개발된 DNA 지표인자들의 활용방향을

타진하였다.

### 가. RAPD 분석

교배 조합의 양친으로 사용된 총 29개 양란 원종 및 품종 line들에 대하여 35개의 RAPD primer들 (UBC #1~100, #301~399 사이에서 GC contents가 비교적 높은 primer들을 선정하여 사용)을 적용하였다(Fig. 17).

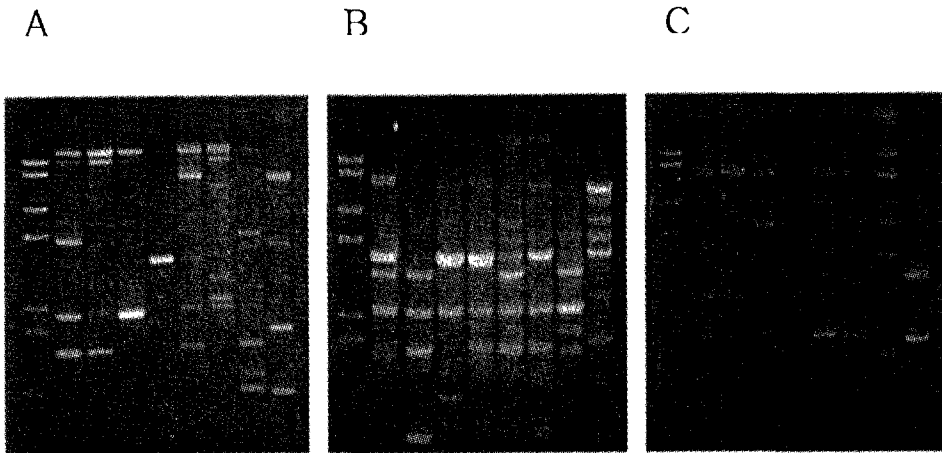


Fig. 17. Example of RAPD primer application to detect polymorphism among 29 *Cymbidium* lines. Here, only 8 lines (ID 1 ~ ID 8) are exhibited out of 29 lines listed in Fig. 18. Panel A. UBC primer # 3 produced clear and strong RAPDs. Panel B. RAPDs produced by UBC primer # 243 are not clear due to too high backgrounds. Panel C. UBC primer # 275 produced weak RAPDs by which sound band scoring was limited.

그림 17에 나타나 있는 것과 같이 상당히 많은 수의 UBC primer들이 panel B 및 C의 형태로 RAPD를 생성해 내었으며, 이러한 경우에는 무엇보다도 증폭산물이 하나의 유전자좌(locus)에서 기인된 것인지를 판단하기가 매우 어려워져 증폭에 사용된 primer 이름과 증폭산물의 크기를 이용하여 각 line에 대해 scoring을 시도할 때 어려움이 있었다. 주된 이유로는 agarose gel의 낮은 resolution power를 들 수 있는데,

수십 bp자이를 뚜렷이 구분하기가 어려워, 전혀 다른 유전자좌들의 대립유전자들이 각 line에서 서로 비슷한 증폭산물을 생성하는지에 대한 판단이 쉽지 않았다. 이러한 문제들은 각 line의 증폭산물을 따로 elution하여 염기서열을 분석한 결과, 서로 판이하게 다른 염기서열을 보이는 것만으로도 쉽게 판단할 수 있었다. 총 98개의 polymorphic bands를 35개의 UBC primer들로부터 확인할 수 있었고 여기에서 나타난 특이 band들은 차후 SCAR primer를 제작하기 위하여 특정 line으로부터 elution을 실시하였다.

#### 나. Polymorphic RAPD band screening을 통한 근연도 분석

RAPD를 통해 확인된 총 98개의 polymorphic band의 scoring data binary data set (0 present, 1 absent)으로 전환하여 근연관계를 추정하였다(Fig. 18). *Cymbidium* 속내 종간, 품종간의 유사도는 그림과 같이 크게 4 group으로 구분되어진다. 분류군의 전체 유사도는 0.59 - 0.93으로 비교적 높게 나타났는데 1 group에는 *C. dayanum*과 Red King이 속하고, 2 group에는 *C. devonianum*, *C. faberi*, *C. nevio-marginata*, *C. forrestii*, *C. glacillum*, *C. flaccidion*의 원종만이 포함되며, 3 group에는 *C. medidum*, *C. ebrunum*, *C. sinense*, *C. rubirgenum*, *C. takashu-sosin*, *C. tracyanum*, Ballerina, Miznomaru, Moon Light, Parnasse, Pepermint Party, Pianist, Laphine Hat, Venus가 속하였으며, 나머지 4 group에는 *C. ensifolium*, *C. insigne*, *C. pumilum*, Ayako Tanaka, Hirosima Eyes, Husky Honey, Marlin Monroe가 포함되었다.

Group 1의 경우 *C. dayanum*과 *C. Red King*이 속하는데 이들의 유사도는 0.81로 높게 나타났고, 형태적인 면 중에서 초장, 꽃수, 꽃색 그리고 내병성 정도에서 매우 일치한다. Group 2는 모두 원종만이 포함되며 이중 *C. devonianum*과 *C. faberi*가 가장 유연관계가 가까운 것으로 나타났는데 이들은 원산지와 개화기, 내병성 정도에 있어 유사하게 나타났다.

29개체 중 group 3에 속하는 Parnasse와 Peperint Party의 유사도가 0.93으로 가장 높은 유연관계를 갖는 것으로 나타났다. 이들은 초장과 내병성 정도에서 유사한 점

을 보이나 형태적으로 특징에 대한 결과와 대부분 일치하는 점이 없어 그들의 모본이나 재배환경 등이 유사할 것으로 추정된다. 그리고 Parnasse, Pepermint Party, Pianist, 그리고 Laphine Hat은 유연관계가 비교적 가까워 같은 ancestor를 가진 것으로 생각된다.

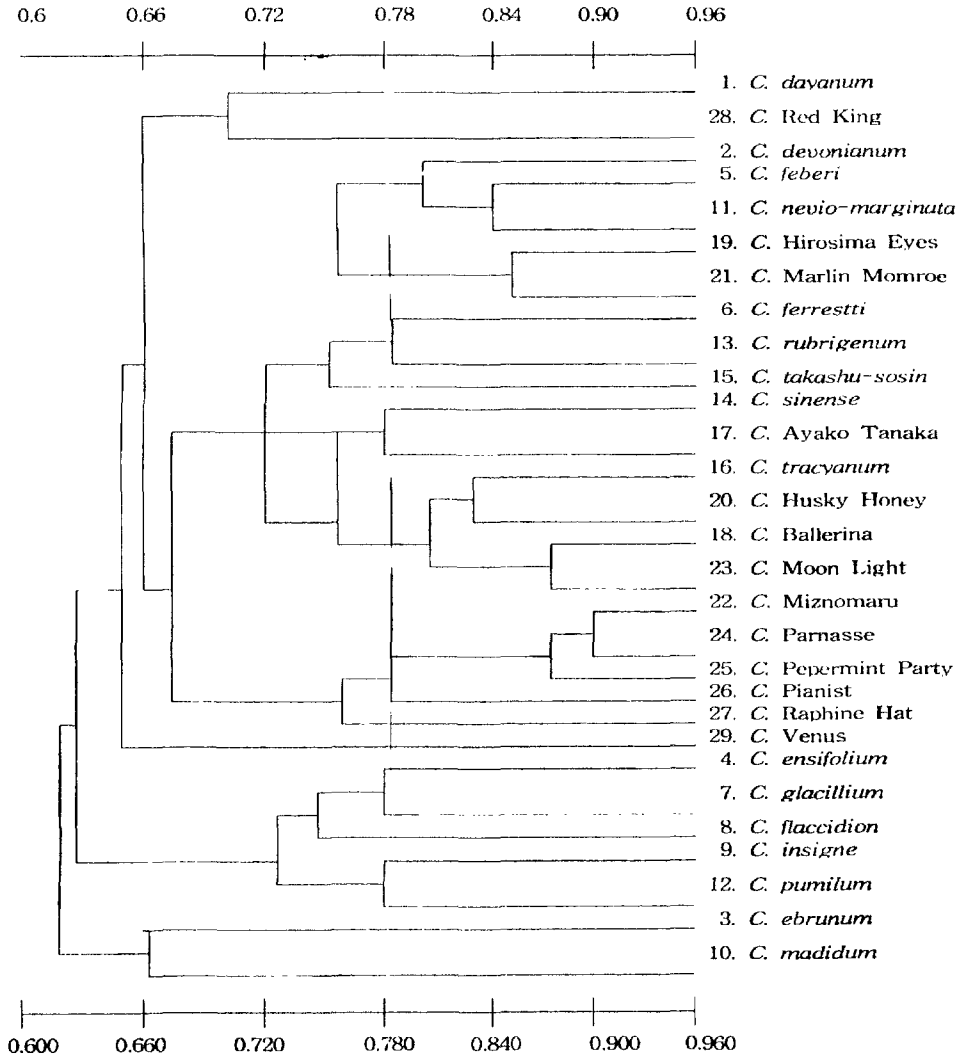


Fig. 18. UPGMA-derived cluster analysis illustrating relationship among 29 *Cymbidium* lines. Numbers are experimental identification number.

3 Group 중 *C. cbrunum*과 *C. sinense*가 하나의 sub-group으로 이루어지고 0.81의 높은 유사도를 나타내는데, 이들은 원산지가 동일하고 향기가 있으며 내병성이 강하다는 점에서 일치하였다. 또한 3 group 중 Hiroshima Eyes, Husky Honey, Marlin Monroe가 sub-group으로 나타났는데 이들의 모본이 공통적으로 *C. insigne*라는 점에서 동일한 선조로부터 파생되었음을 알 수 있었다. 그리고 Hiroshima Eyes와 Marlin Monroe가 0.83의 유사도를 보였는데 이는 형태적으로 꽃색과 개화기가 일치하였다. *C. ensifolium*과 Ayako Tanaka가 0.69의 유사도를 가진 sub-group으로 분류되었는데 이들 간에 형태적인 유사점은 거의 없으나 Ayako Tanaka가 *C. ensifolium*와 Alexandri의 교배종으로 *C. ensifolium*이 모본이라는 점에서 표현형으로 나타나지 않는 유전형질이 매우 유사함을 알 수 있었다.

이상의 29개체 중 *C. insigne*가 가장 원연인 것으로 나타났는데 원산지가 준고산지대일 가능성이 매우 크며 겨울철에 주로 개화한다는 점에서 다른 원종들과 차이가 있음을 알 수 있었다. 본 연구를 통해 형태적으로 구별되는 양란 심비디움 속내의 종간, 품종간에 높은 유전적 변이가 확인되었으며 형태적으로 유사한 계통들의 분류가 가능하였다.

## 제2항 SCAR 표지인자 개발 및 적용

RAPD는 작물의 DNA marker 개발을 위한 품종간 polymorphism을 단시일 내에 확인하는 작업으로 가장 쉽게 적용할 수 있는 기법 중 하나이다. 그러나, 짧은 길이의 primer를 이용하여 염기서열 정보가 전혀 존재하는 않는 미지의 염색체부위 (undefined elements)를 무작위로 증폭하고 그 산물들에서 polymorphism을 확인하기 때문에 실험의 재현성이 높지 못하다는 단점도 있다. 그러므로 RAPD기법은 품종간 근연도 추정에는 효율적일 수는 있으나, 낮은 수준의 재현성과 우성적으로 scoring되는 (dominantly scored; present and absent) polymorphism의 특성으로 인하여 각각의 품종들을 정확히 판별하기 위한 수단으로 적용하기에는 많은 어려움이 따르게 된다.



본 항에서는 undefined elements에서 유래된 polymorphic RAPD들을 실험의 재현성이 높은 SCAR marker로 전환시키고 이들을 품종표지 인자로 활용하는 방안의 제시와 그 과정에서 파생되는 현실적 문제점들에 대하여 언급하고자 한다.

#### 가. RAPD marker에서의 SCAR primer set 합성

Band강도가 elution 및 cloning에 충분하다고 판단되는 30개의 특이 RAPD band를 agarose gel에서 elution 하여 T-vector에 cloning을 시도하였고 염기서열분석을 실시하였다. 분석된 염기서열은 보다 정확한 RAPD-derived band size를 제공하였다 (Table 9). 각 line에서 특이적으로 증폭된 band를 cloning하여 분석한 결과, 대부분 동일한 band에서 파생된 plasmid들이 서로 다른 염기서열을 지닌다는 것을 발견할 수 있었고 한 line의 특이 band 염기서열을 기준으로 다른 line들에 대해 제한효소를 적용해 보았을 때 쉽게 관찰되는 'incomplete digestion' 현상으로도 같은 크기의 'heterogeneous PCR products'를 확인할 수 있었다. 이것은 gel에서 elution된 하나의 RAPD band가 여러 부위의 genomic DNA에서 동시에 증폭된 산물임을 의미하는 것으로, AFLP기법의 selective amplification (보통 분석대상의 1/64 만을 선별적으로 증폭함) 절차가 없는 RAPD기법이 지니는 단점이라고 볼 수 있을 것이다. 최종적으로 20개의 RAPD band들이 cloning 및 염기서열 분석이 성공적으로 수행되었다.

#### 나. SCAR 인자의 적용

SCAR PCR 기법은 일종의 specific primer를 사용하여 특정 염색체부위를 정확히 표지하고자 하는데 그 의미가 있다. 양란은 육종특성상 부모친에서도 상당한 heterogeneity가 예상되므로, SCAR primer set을 품종구분 혹은 특수목적 하에서의 육종목표의 달성에 표지인자로 사용할 수 있기 위해서는 PCR 증폭산물의 높은 재현성과 정확한 해석이 필수적이다. 더 나아가서는 각 F1 line의 검정결과에서 부모친의 유전자형(AA 혹은 Aa type)을 유추해 낼 수 있어야 하기 때문에 비특이적으로 증폭

(nonspecific primer annealing)되어지는 산물들은 오히려 정확한 유전자형의 유추를 저해하는 요인으로 작용할 수 있다.

Table 9. The information of cloned informative RAPD bands.

Clone name	Clone information		Clone Size (bp) <sup>c</sup>	Homology search <sup>d</sup>
	Name of the original UBC primer <sup>a</sup>	DNA source <sup>b</sup> ( <i>Cymbidium</i> )		
CR001	# 303	<i>dayanum</i>	560	No match
CR002	# 305	<i>ebrunum</i>	592	No match
CR003	# 308	<i>faberi</i>	619	No match
CR004	# 040	<i>rubirgenum</i>	324	putative retroelement pol polyprotein
CR005	# 017	<i>faberi</i>	479	putative reverse transcrip-tase
CR006	# 004	<i>tracyanum</i>	321	No match
CR007	# 004	<i>glacillum</i>	418	putative gag-pol precursor
CR009	# 303	<i>insigne</i>	347	No match
CR011	# 305	<i>puilum</i>	297	putative retroelement pol polyprotein
CR013	# 308	<i>madidum</i>	209	No match
CR015	# 006	<i>insigne</i>	323	No match
CR016	# 006	<i>ebrunum</i>	411	No match
CR018	# 017	<i>flaccidion</i>	668	No match
CR019	# 006	<i>rubirgenum</i>	409	putative gag-pol precursor
CR020	# 342	<i>insigne</i>	1.2kb	No match
CR023	# 313	<i>ebrunum</i>	649	putative gag protein
CR026	# 304	<i>faberi</i>	631	No match
CR027	# 012	<i>puilum</i>	764	No match
CR028	# 006	<i>ensifolium</i>	846	No match
CR029	# 040	<i>ebrunum</i>	324	putative retroelement pol polyprotein
20	Total			

<sup>a</sup> The original UBC primer name used to detect the polymorphic RAPD band

<sup>b</sup> The DNA source of eluted bands. To avoid of source contamination, just on line' s RAPD band was isolated and cloned

<sup>c</sup> Detail sequence information is in Appendix Table 1.

<sup>d</sup> GenBank search. The e-values were from 2.00E-3 (CR019) to 2.00E-16 (CR011).

이러한 문제점들이 자료해석에 주는 영향을 최소화 하기 위해서 자료규합에 있어서 몇 가지 기준을 설정하였다. 첫째, 특정 SCAR primer set으로 인해 증폭되어지는 PCR 산물들은 각각 band size로 구분하여 allele로 등록한다. 둘째, reference line (Table 9)을 통하여 관찰한 특정 primer set의 증폭산물의 크기가 다른 양란품중에서도 비슷한 추세로 관찰되어야 한다. 셋째, 높은 재현성을 재고하기 위해 하나의 primer set에서 증폭되어지는 산물의 수(DNA band)는 1개로 보며 다른 minor band들은 PCR 조건의 조정으로 없애주거나 해석에서 제외시킨다.

교배 실험에서 F1이 형성된 4개 line의 유전자형 분석 (genotyping)을 시도하기 위해 F1 line의 부모친 (allele donor) 6개 품종과 별도의 비 부모친 품종( C. ' Jungfrau' and C. ' Banana Boat' )을 선택하였다(Table 11 참조). 합성된 26쌍의 SCAR primer set 중 6가지를 이용하여 앞에서 언급한 12개 line (8개 품종, 4개 F1 line)에서 6개의 polymorphic allele들을 3반복 실험을 통해 재확인하고, genotyping을 실시 하였다.

SCAR primer set들의 합성은 clone 염기서열 양 말단 18bp을 선정하여 제작하였으며 (Table 10), 초기에는 김정 품종과 F1 line (Table 11 참조)에 일반적인 PCR 기법을 적용하여 test 하였다(Fig. 19).

이때의 가장 큰 문제점은 상당히 높은 annealing 온도가 적용 되었음에도 불구하고 하나의 primer set에 의해 너무 많은 수의 band가 증폭된다는 것이며, 그 재현성도 극도로 낮았다 (Fig. 20; panel A, normal PCR). 이러한 문제로 인하여 각 품종 및 F1 line에서 특이적으로 나타나는 모든 band를 일일이 band size에 의해 구분하여 specific allele로 표지해주는 것이 거의 불가능 하였으며 표지된 유전자형의 해석또한 매우 어려웠다. 주된 이유로는 primer set들이 동시에 genomic DNA의 여러 부위에 (특히 highly repetitive sequence region) 비특이적으로 반응하기 때문인 것으로 판단되었다.

Table 10. SCAR primer sets converted from polymorphic RAPD bands among tested lines listed in Fig. 18.

Primer Name	Primer Sequence		Exp. <sup>a</sup> Size (bp)	Used to screen 12 lines <sup>b</sup>
	Forward (5' -3' )	Reverse (5' -3' )		
CR001	GCGGGAGACCTAAGATGTAGA	CGATGTGGCTGTTTTGAGTT	560	O
CR002	GCTGGTACCCATGAGGAGAAT	TAAGGCTCCCCTGGTTTTAGA	592	
CR003	CCTGACACGAGAAATCAAAGG	TATAAATGAAGCTGCGGTGGA	619	O
CR004	TACCTGGGCATTGAGGAAAA	TGAGCTTTTTGGTTTCAGTGG	324	O
CR005	GGCCTCCAAACCTGGTAGATA	ACTCTTACGGCGCTTGCTTAT	479	
CR006	CTGGGCCTACAAACAAAGAAA	AAAAGTCAAGCGATAATTCCA	321	O
CR007	TACTGTTGTGCTGCTGCTACG	TTTTGTCCTTACCACCGAATG	418	
CR009	GAGCTCGGATAGGCTGAGATT	AGACCTAGACCAAACCGCAAG	347	O
CR011	GCTGGTACCCCAACACTCG A	GCTGGTACCCTGTA CTGATGG	297	
CR013	AGCGGCTAGGGCACGTGGACG	AGCGGCTAGGCTTACTTGGCA	209	
CR015	TGAACACAAGGCAAGTACCAA	GCCTACAAGCAAAGCATGAAT	323	
CR016	ACTAGAGCTCCCCCTTCCTC	GATCCAAACTTTTGCCCTAC	411	
CR018	CATCACAGCAACCATCCTCTA	GCAAACAGGAGTAAGCGAAGA	668	
CR019	AACTTGCAAACCTTCCTTGGT	CCTGGGCCTAGGAGACTAGAG	409	
CR020	GAGATCCCTCCTAAAAGAACC	TTTTGAGAATTGGGGTCATTC	1.2kb	
CR023	GTGGGAATCCAAGGCAACATA	AAAGGAGGCTGCTAAGCTTGT	649	
CR026	CCAATCTGTTGAAGCTCAAGG	TGGGCTGGTTATGTTGTCACT	631	O
CR027	TGCCCTCAATTCAAAATCAAA	ACTGGGGATCGGGTATATGAA	764	
CR028	ACAGCGACATCGTCCATAAAT	CAGGCTATCTGCTGAGGATTG	846	
CR029	TTACCTGGGCATTGAGGAAAA	TGAGCTTTTTGGTTTCAGTGG	324	
20	Total			6 (45%)

<sup>a</sup> Expected PCR band size estimated depend on the sequences of clones (see Table 9).

<sup>b</sup> Only the primer sets showing very good replicated PCR results were tested for 12 *Cymbidium* lines in Fig. 18.

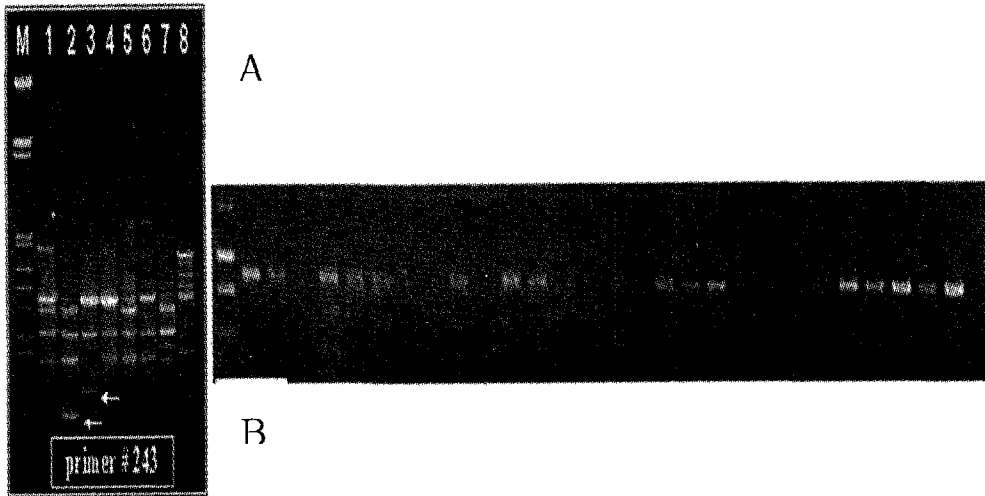


Fig. 19. Example of SCAR primer set application. Here, only 8 lines (ID 1-ID 8) are exhibited out of 29 lines listed in Fig. 18. Panel A. UBC primer # 243 was applied to produce polymorphic RAPDs. The lower band indicated by white arrow was eluted and cloned to synthesis SCAR primer set. Panel B. SCAR primer set was tested to restore the polymorphism among 29 tested lines detected by UBC primer # 243. Note that agarose gel electrophoresis was is not good enough to achieve fine scoring (see the weak bands among blank lanes).

PCR reaction의 재현성을 극대화 시키고, 관찰되는 band를 그 size에 의해 allele로 표지해주기 위해서, touch-down PCR 기법을 적용하여서 모든 SCAR primer set들을 시험하였다. 또한 증폭산물의 효과적인 분리와 allele 등록 (band 크기로 표시)의 원활성을 제고하기 위해서 분리도가 낮은 agarose gel을 사용하지 않고, 5% nondenaturing polyacrylamide gel (effective separation rage; 30bp - 700bp)을 사용하였다 (Fig. 20, 21, 23).

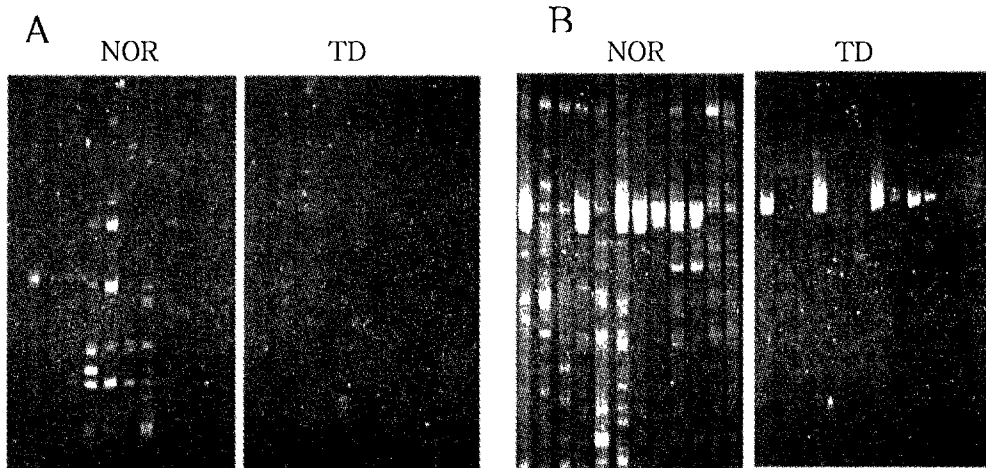


Fig. 20. Comparison of two different PCR conditions; Normal PCR (NOR) and touch down (TD) PCR. CR023 (Panel A) and CR026 (Panel B) was applied to produce polymorphism among 12 tested lines. Expected band size, 631bp, is observed (see Table 10).

대부분의 primer set에서 uni-band form으로 DNA 절편이 증폭되었다(Fig. 20; panel B, Touch down PCR, CR026의 경우, Fig. 21; panel A). 그러나, 어떤 primer set (CR002, CR007, CR011, CR018, CR023)에서는 관찰 가능한 band를 발견할 수 없었다 (Fig. 20; panel B, Touch down PCR, CR023의 경우). 주된 이유로는 너무 좁은 범위의 primer annealing 온도가 적용 되었으며 cloning 된 대부분의 RAPD band의 size가 상대적으로 작아서 (대개가 500 bp 미만; Table 9 참조) primer design시 한 쌍을 이루는 각각의 primer가 비슷한  $T_m$  값을 갖도록 조절되지 못한 채, 분석된 염기서열의 양 말단에서 선택한 점도 touch down PCR에서 DNA 절편을 증폭하지 못한 primer set 이 의외로 많았기 때문인 것으로 판단된다.

일단 touch down 기법을 통해 증폭된 PCR 산물들은 minor band가 상당부분 없어졌고, reference line에서 예측되는 band size 부위(Table 10)에서 major band가 관찰되었다(Fig. 21; panel A, CR003의 경우). 그러나, CR001의 경우(Fig. 21; panel B)는 예측되었던 크기인 560bp에서는 monomorphic으로 band가 증폭됨과 동시에 1.0kb

부위에서 dominant pattern을 보이는 또 다른 allele를 증폭함으로써 하나의 primer set이 두 개의 allele를 높은 재현성을 보이며 표지하는 좋은 예를 보여 주었다.

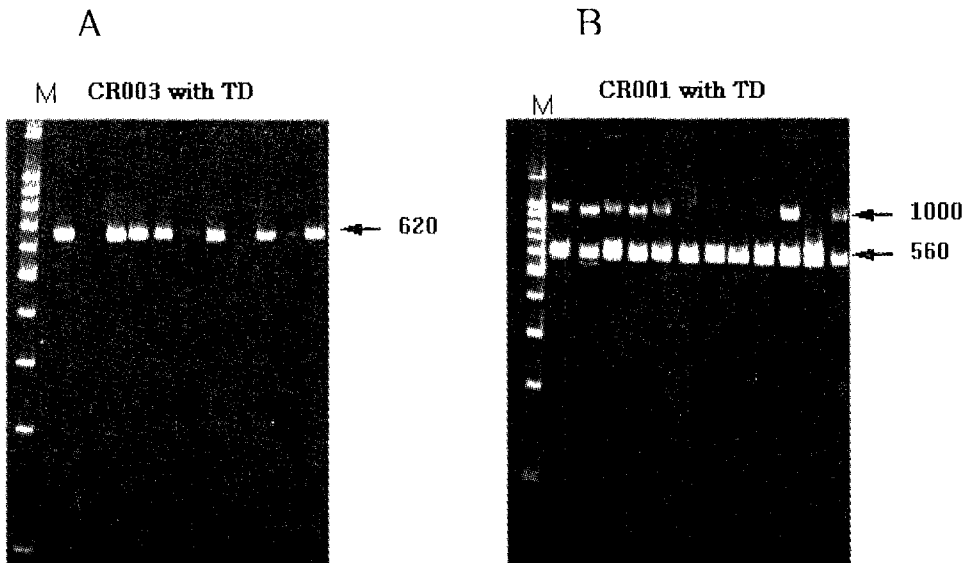


Fig. 21. Typical pattern of PCR products by applying SCAR primer sets under touch-down PCR condition. Arrows indicate the tagged allele expressed with detected band sizes among lines tested. Letter M indicate DNA size ladder (Promega, 100bp ladder). There are 12 lanes represent each line tested (see Table 11) with downstream order from line I.D 1 to line I.D 12. Panel A. CR003 detected the expected band size, 620bp and dominantly scored. Panel B. CR001 tagged another allele, 1000bp with the expected allele, 560bp.

#### 다. Monomorphic SCAR-PCR 산물의 제한효소 처리 및 Genotyping

Touch down PCR을 통한 SCAR primer test에서 포함 5개의 primer set (CR001-1 kb allele, CR003, CR004, CR006, CR026)가 dominant type으로 단일 DNA 절편이 증폭되었으며 (Table 10). 나머지 10개 primer set은 (CR001-560 allele, CR005, CR009, CR013, CR016, CR019, CR020, CR027, CR028, CR029) 더 이상

polymorphism을 나타내지 않았다. 결국 총 20개의 SCAR primer set들 중 6개만을 genotyping에 사용할 수 있었다(Table 10). Polymorphic RAPD marker로 전환할 때 uninformative band(monomorphism)으로 전환되는 이유는 Fig. 22에 간략히 묘사되어 있다.

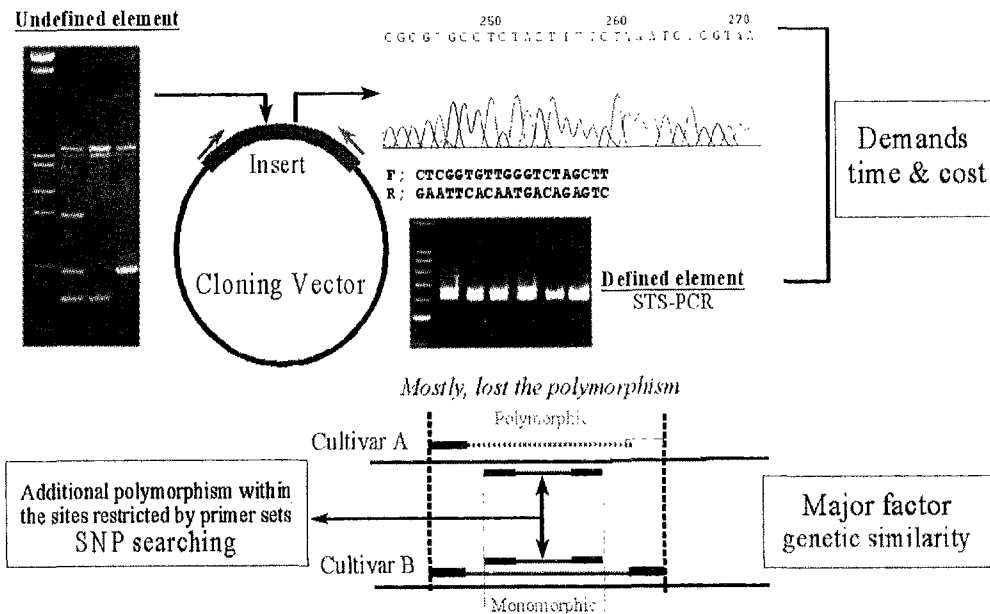


Fig. 22. Diagram explaining the reason of 'lost polymorphism' during conversion of undefined elements into defined elements, SCAR-primer sets.

CR013, CR016, CR019, 그리고 CR029의 경우는 제시된 제한효소를 모두 처리하였으나, 절단된 DNA의 패턴이 모든 line과 F1에서 동일하였다. 이 네가지 primer set에 의해 증폭되는 DNA 절편은 모두 400bp 미만으로 (Table 9), 제한효소의 작용점을 효과적으로 설정하기가 어려웠으며, 또한 제한효소를 이용하여 잠재된 polymorphism (즉, single nucleotide polymorphism) 을 찾아내는데 충분치 못한 절편크기가 그 주요인이었다고 판단된다.

CR005, CR020, CR027, 그리고 CR028 primer set들은 충분한 크기와 강도의



major DNA 절편을 증폭하였으나(Table 9), 제한효소를 처리하였을 때 매우 복잡한 양상으로 절단 산물들이 관찰되어서 정확한 genotyping이 어려웠다(Fig. 23; panel B, CR015의 경우). 앞서서도 언급하였듯이 SCAR primer set들이 증폭강도가 강한 RAPD band, 즉 repetitive sequence에서 유래될 가능성이 높다는 점이 반응조건이 엄격한 touch down PCR 하에서도 여러 군데의 DNA 주형들을 동시에 증폭하는 경향이 높다고 판단된다. 제한효소를 처리하여 잠재된 polymorphism을 확인할 수 있었던 것은 CR009 경우(Fig. 23, Hind III 처리)밖에 없어서 그 효율이 아주 낮았다.

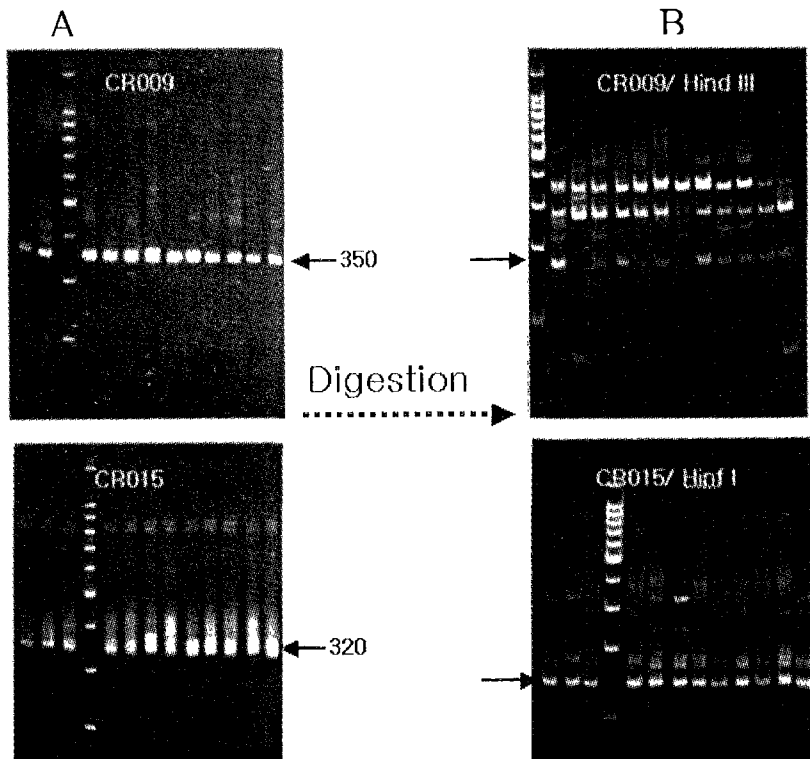


Fig. 23. Examples of cleaved Touch down (TD) PCR product with selected restriction enzymes. There are 12 lanes represent each line tested (see Table 11) with downstream order from line I.D 1 to line I.D 12. Panel A. CR009 and CR015 detected the expected band sizes, 350bp and 320bp, but lost polymorphism. Panel B. Application of endonucleases Hind III, and Hinf I reveal the latent polymorphism within CR009 product only. Note the serious background digested PCR products may be derived from minor PCR products and heterogeneity of the target bands, 350 and 320bp.

6가지 primer set으로 이용한 12개 line (8개 품종, 4개 F1 line)에서 총 6개의 polymorphic allele들을 확인할 수 있었다. 3반복 실험을 통해 확인된 allele 들의 재현성이 안정적이라는 것을 확인한 후 genotyping을 실시 하였다 (Table 11).

Table 11. List of revealed informative marker-genotypes among *Cymbidium* lines by applying 20 SCAR primer sets listed in Table 10.

Line ID tested <sup>a</sup>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Primer <sup>b</sup>	Enzyme <sup>c</sup>	Genotyping scores <sup>d</sup>											
CR001		O	O	O	O	O					O		O
CR003		O		O	O	O		O		O		O	
CR004		O		O		O		O		O	O	O	
CR006			O	O	O	O	O	O		O	O	O	
CR009	Hind III	O		O	O	O	O		O	O	O	O	O
CR026			O			O			O	O	O		

<sup>a</sup> Form tested line ID 1 to 12; jung, peppermint, moon venus, F K, banana boat, venus, sunny romance, *ebrium*, sunny romance x *ebrium* , peppermint x *ebrium*, venus x moon venus, and F K x *ebrium*. The genetic similarity among lines tested is presented at Figure 19.

<sup>b</sup> The expected band sizes are in Table 10.

<sup>c</sup> Endonuclease adopted to reveal latent polymorphism nested the amplified PCR product

<sup>d</sup> Present (O) and absent (blank)

단 하나의 경우를 제외하고는(CR004 - 340bp allele에서 *C. 'Peppermint' x C. ebrium* F1, ID 10 genotyping) 모든 allele들의 genotyping은 이상이 없었다. CR004-340bp allele의 경우 양친에서 확인되지 않았음에도 불구하고 F1에서는 확인되었다. 세가지 양친 중 적어도 한쪽에서 allele가 확인됨에도 불구하고 F1에서는 allele를 확인할 수가 없었는데 ('Aa' genotype 경우; CR001-1.0kb allele in *C. Venus x C. Moon Venus*, ID 11; CR003-620bp allele and CR026-630bp allele in *C. F K x C. ebrium*, ID 12), 이 경우는 [( 'Aa' ) x ( 'aa' ) and ( 'aa' ) x ( 'Aa' )]로 부모친의

유전자형을 해석하면 가능하다. 결론적으로 F1 line 판정만으로 볼 때 오류율은 1/24 로써 RAPD분석 산물에만 의존할 때에 비하여 아주 높은 수준의 genotyping 결과의 신뢰성을 확보할 수 있었다. 그러나, 본 실험에서 사용된 모든 SCAR primer derived polymorphism이 dominant marker type으로 scoring 되었기 때문에 RAPD-, AFLP-marker 와 같이 genotype, 'AA'와 'Aa' type의 구분이 어렵다는 데에서 파생되는 문제를 극복하기 위해 많은 수의 primer set이 적용되어야 한다는 단점은 해결할 수는 없었다.

라. SCAR primer set 활용에 대한 고찰

총 30개의 informative RAPD band들로부터 증폭강도가 약했던 RAPD band들의 elution 및 cloning 실패와 (7/30, 23%), 염기서열분석시의 착오 (plasmid 검정 - 3/30; 10%)등의 이유로 20개의 SCAR primer set들이 제작되어 67% 라는 그리 높지 못한 전환 성공률을 보였으며, 최종적으로 6개의 SCAR primer set이 polymorphic alleles를 확인할 때까지는 20% (6/30; Table 10, 11 참조) 라는 매우 낮은 전환율을 보였다. 비록 검정하려는 양란의 품종수가 많아 질수록 SCAR primer 조합들이 polymorphic alleles를 표지 할 수 있는 가능성이 높아지게 될 것이므로 차후 이용에는 별 문제점이 없다고 판단되지만, SCAR primer 조합들이 보여준 몇 가지 전형적인 특징들은 정확성과 재현성이 강조되는 양란품종 구분에는 문제점을 일으킬 수도 있다고 판단된다. 무엇보다도 touch down PCR이 적용되었음에도 불구하고 대부분의 SCAR primer set들은 잡박한 PCR 산물을 형성하는 경향이 심하여 'one primer - one allele tagging' 이 원활치 못하다는 단점을 보였다. 이는 specific primer set에 의해 제한되는 범위 내에 존재할 수 있는 잠재적 polymorphism (latent polymorphism, 즉 single nucleotide polymorphism; SNP)을 제한효소를 이용하여 확인하는 과정의 효율을 크게 떨어뜨렸다 (Fig. 23 참조). 이러한 경향은 SCAR primer set의 sequence origin인 RAPD band에서 기인한다고 판단해야 할 것이다.

Polymorphism을 보이는 RAPD band의 효율적인 elution 및 cloning을 위해서는 증폭강도가 비교적 강한 band에 치중할 수 밖에 없는데, RAPD band 강도는 반드시 DNA template의 copy number와 밀접한 관련을 지니고 있다. 즉, 대부분의 증폭도가 강한 RAPD band는 10mer라는 짧은 primer의 특성상, repetitive sequence가 고도로 밀집되어 있는 ‘Junk DNA’ 부위에서 유래되었다고 보는 것이 논리적일 것이다. 이 부위에서 개발된 DNA 표지인자들이 실질적으로 품종의 형질특성을 지배하는 중요 유전자들과 연관되어있을 경우는 고도의 linkage analysis를 통하지 않고는 규명하기가 어렵다. 그러므로, Fig. 21, 22에서 확인되는 SCAR primer 합성 및 적용에 있어서의 경비적/시간적 비효율성과 Fig. 23에서 확인되는 ‘unique allele tagging’을 통한 정확한 품종구분(line discrimination)의 모호성은 완벽히 제거하기는 매우 어려울 것으로 판단된다.

### 제3항 Active genome region-enriched semi-library clone들의 염기서열 분석과 STS primer 합성 및 적용

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

엄밀한 의미에서의 polymorphism은 하나의 유전자좌에서 여러 개의 상이한 대립유

전자들(heterogeneous alleles)이 존재한다는 것을 의미한다. Polymorphism이 발견되었을 때, 어떤 유전자좌에 속하는 어떤 대립 유전자들로부터 기인되는 것인지에 대한 정확한 해석이 선행되지 않으면, 각 품종이 지니는 특정 대립유전자의 특성을 기술할 수가 없다. 그 동안 많은 DNA marker들이 보고되었음에도 불구하고 품종표지가 어려웠던 것은, 재현성을 확보하기 위한 노력의 부족보다는 polymorphism을 보였던 특정 유전자좌(locus)를 제대로 관리하지 못하였음에 기인되었다고 할 수 있다.

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

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

분할 수 있는 기법을 확립하는데 중점을 두었다.

가. Active genome region-enriched semi-library clone들의 염기서열 분석과 STS primer 합성 및 적용

CE-clone들에 대하여 염기서열 분석을 실시하고 homology search를 시도한 결과, 대개의 CE-clone들은 예상했던 바와 같이 많은 유전자 부위를 포함하고 있었다 (Table 12).

Table 12. Result of homology searches of CE-group clones<sup>a</sup>.

Name	Size	E-value	Matched proteins	Accession
CE001	748	1.00E-101	photosystem I P700 apoprotein A2	BAA83435
CE004	514	6.00E-18	putative mitochondrial uncoupling protein	NP_172866
CE005	566	6.00E-13	Unknown protein	AAK62450
CE007	483	2.8	mitochondrial ribosomal protein L4	XP_008899
CE008	410	8.00E-31	serine/threonine-specific protein kinase	NP_200402
CE009	476	4.00E-16	hypothetical protein	BAB19402
CE010	528	7.9	auxin-induced protein	AAB38965
CE011	492	5.1	unknown protein encoded within prophage CP-933U	NP_288437
CE012	511	0.008	awaiting functional assignment	NP_192000
CE013	442	9.00E-21	ABA-responsive element binding protein 3 (AREB3)	BAB12406
CE014	455	2.00E-17	ABA-responsive element binding protein 3 (AREB3)	BAB12406
CE016	426	5.00E-11	sterility protein 1	AAA32028
CE017	550	7.00E-81	ATP synthase beta subunit	AAD50847
CE018	414	8.00E-12	unknown protein	NP_172053
CE019	702	2.00E-14	hypothetical protein	NP_054982
CE020	757	1.9	exportin 1b	CAC39223
CE021	572	6.00E-05	hypothetical protein	NP_084744
CE022	561	3.2	Unknown	AAC44057
CE025	816		Orf122	AAG12204
CE027	595	1.00E-04	beta-glucosidase, putative	NP_188435
CE028	813	1.00E-20	Orf122	AAG12204

CE029	762	6.00E-15	putative membrane related protein	AAL07016
CE031	471	0.91	CG6283 gene product	AAF56652
CE034	632	1.00E-62	putative DNA cytosine methyltransferase Zmet3	AAF68437
CE036	575	8.00E-05	hypothetical protein	NP_084744
CE038	616	6.4	putative protein	NP_199642
CE040	750	1.00E-109	PSI P700 apoprotein A2	NP_042465
CE042	527	3.6	hypothetical protein	NP_178953
CE049	490	3.00E-15	hypothetical protein	NP_084748
CE050	489	7.00E-05	putative protein	NP_191045
CE051	475	2.7	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase	JC5031
CE054	588	3.00E-36	putative alpha/beta hydrolase	AAG13432
CE057	572	2.00E-05	hypothetical protein	NP_084744
CE058	487	0.34	hypothetical protein	AAK52147
CE061	323	3.00E-26	cytochrome P450	AAG17470
CE062	323	7.5	cytochrome b	AAD31971
CE063	341	5.00E-07	putative glucosyltransferase	NP_181910
CE064	337	2.00E-29	ORF589	CAA49143
CE065	341	6.00E-12	hypothetical protein	NP_181426
CE066	344	3.3	Sec7p	AAK40234
CE067	278		Not reported	
CE068	277	1.00E-38	predicted glycosyl transferase	NP_192122
CE069	300		Not reported	
CE070	336	8.00E-04	hypothetical protein TC0129	F81737
CE072	276	4.00E-26	putative protein	NP_195839
CE073	262	2.8	(X98235) type I	CAA66887
CE075	309	4.5	alpha-Est8 gene product	AAF54012
CE076	345	5.00E-23	unknown protein	AAK93677
CE077	309	0.31	IgA Fc receptor precursor - Streptococcus agalactiae	A60234
CE078	305	1.6	hypothetical protein	NP_174819
CE079	406	8.7	Tbx6 protein	BAA87864
CE080	311		Not reported	
CE082	294	2.7	3-DEOXY-MANNO-OCTULOSONATE	NP_222936
CE083	304	0.7	hypothetical protein	NP_176641
CE084	279	6.00E-17	hypothetical protein	BAB39907

<sup>a</sup> Search results, E-values indicate the significance of matched results. Values over than 0.1 means no match.

합성된 각각의 primer 조합을 최적조건으로 적용하기 위해서는, primer annealing 온도의 설정이 중요하다. 그러나, 시간적, 인력적 효율을 감안할 때, 양쪽 primer Tm 값의 차이 및 재료 식물의 염색체 조성 특성 등 적정 온도설정에 영향을 미칠 수 있는 많은 변수를 모두 고려해서 검사대상의 재료가 바뀔 때 마다 primer 조합의 최적 반응조건을 확립하는 것은 매우 비효율적이다. 따라서, 모든 PCR 반응의 보편성이 강조되면서도 비특이적 증폭산물 출현 정도가 억제되는 조건을 확립하는데 주력하였다. 첫째, 비특이적 증폭산물의 과도한 출현을 억제하기 위하여, 모든 PCR은 'touch-down' 으로 실시하였다. 둘째, 많은 primer 조합 적용에 있어서 보편성과 일관성을 확보하기 위하여 좁은 온도범위를 (55°C-60°C) primer Tm값으로 적용하였다(Table 13).

Table 13. STS-PCR primer sets converted from CE-clones<sup>a</sup>.

Primer name	Primer sequence		Expected band size
	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	
CE004	CAT AGC AGA CAA TGC GGA TCG	CAA TGG GAT CGC TTT GCT TTC	46
CE005	GGA TCG GGT TTC GAG AGG AAG	ACA TTT AGG ATT GCC TAT CCG TAG	86
CE007	GGT GGC AAC TAA ACA CGA GGG	GGA GCG GTG AAA TGC GTA GAG	50
CE008	CCA GAC CCT TTG AAA GGA GTC	GCC CAA CTC TGA TCA AAT CCA	91
CE009	GGT TGT TTC TGC TGC ACG TG	CAT CTC CCT CCA CTT GCA GTG	27
CE010	CTA GAG TCG GCT TCG GTC AGC	TCA CTC CCC CAT AGG ACC TAC	71
CE011	CAA TGG TGG CAA CTA AAC ACG	GGA GCG GTG AAA TGC GTA GAG	42
CE012	GAG CGG GCT CCC ATG C	GGA CAA ACT TGC AGA CTC ATT AG	57
CE014	GGC CAA GGG ATA GAC ATG GAG	GCC TCC ATC ACA TTC TGG TGC	18
CE016	AAT GGG GAA GAG GAC CGA AAC	GCG GAC AGC TAA TGC CTT CC	99
CE017	CCT TCA CGA GTA CGT TCA CC	GGT CGA GAT ACT AGT CGG TCA GC	79
CE018	GAT CAT CAT CGA CAC GGA CCC	CCT ATT ATT TCC CAA AAG AGT GGA GAG	355
CE019	CTG GAC AAT TAG ACA TCC AAC CCG	CTG AAG AAA GCA GCA ATC AAT AGG	668
CE020	CTC GGG GTC CTT CAC AGC	GGT CAT GCC ACA TTT ATC TCT TGG	537
CE021	CGT CAC ACT ATG GGA GCT GG	CGC CGA TGA GCA CAT TGA AC	543
CE025	CCT CTG TCT TAC CGC GGC	CGA ACG AGA ATG GAT AAG AGG C	677
CE027	TGC CTT GAT GAT CTT CTG ATT ACG	CCT GCA TCA CAG AAC ATG TCA TC	536
CE029	GAT GGA CAG TCC AAG AGT AGT AGC	CCC AGA AAG ATG CAG TAA CGG	406



CE031	TCT GTT TTT GGT GAT ATG AGC CTC	AGC CAA CTG CAC CAC TAG C	453
CE034	GGA GTT GTC TCT CTC AAA GAA GGG	GGT GCA GCC TTA TGA TGC C	576
CE036	CCT TGT ACA CAC CGC CCG	GTA GCT GAG AGC CCT CAC AG	535
CE038	GGT TTG TAG AAG ACG GGA TGG	GCT AGT AGA TCT GAG CAG CCG	549
CE040	GAC CTA TTG CTC ATG CAA TTT GGG	GAT ACT GTG TCC AAT CCC GAA G	652
CE042	CAG ATC ATA GCT CCG CCA TGC	GTT CGC AAA CCT CGA CTT GTC	436
CE049	GTC AAC CTT TCG AAC TGG TGC	CAC TGC TTG GGA GCT CAC G	426
CE050	CGC AGT TTT TGA TGA TCG CC	CAT TTC GTA GGG CTT ACT GCG	421
CE051	GGA GAA CAG AGC TCG GCG	GGA CTG GCA GGC AAT AGC C	461
CE054	CGA AGA ACC TAA CAG AGG AGG C	CGT GGT AGT CTA TCC AGG CG	534
CE058	GGA GCG GTG AAA TGC GTA GAG	GTC TGT TCA GGG TTC CAA ACT C	478
CE061	GAC GAC CTT CTC TCC CGC	GAC GGA GGG GTA CAG TCT G	314
CE062	ATG TAC AAT ATG ATG AAG TAT TGA GGG	CGC TGA TGT TAA TGG GCA TTG G	238
CE063	GTT GCG AAG TTG GAG GTG C	GTC CTC ACA TAG CTT TAA GTG ACT C	288
CE064	GGC ATA AAT GCG AGG AGG ATG	GAC TTT TGA CGG GCC AGC	334
CE065	CTT CTA TCT TCG CTT AAA GAT CAC G	GTA CTC TCA TTT CCG TCA GTG C	336
CE066	GAG CGA TCC GTT CTA CTG CG	CCA CCA ACT AAT GGC GGT CG	337
CE067	GAG ATC ACG GCA GCA ACG	CTC CTC CGT TTT GTA TTA ACT CCC	275
CE068	GCC GTG CTA CTT CAA CAC G	CCA GAA TGA AGA TCA CGA CAG C	264
CE069	GAG TCG GTA ACC ACG GAG AC	GGA TAA ACA AAC GAC TAC CTA CCG	297
CE070	GTA TAT TCG CCC TCT GAG TCG C	GGA CCG AAT GGT GTC AGG ATG	324
CE072	GAG TCG GCA TGC TTG GAA TG	CAG GGA GAA GAA CTG ATT CGG	264
CE073	CGA GCA AAA CCA AAC AGA GC	AGC CGC TTC AGA AAC AAT AGC	256
CE075	GGA GCA GAG ATG TTG CCG	GGA AAC TAC TGG GAA GCT GC	279
CE076	CGA AGG CTT GTC TTA TTC CGC	GCC ATT GAC ATC AAC AAG CC	311
CE077	GTG ATG GCT TTC GAT CCG C	CAG CGT AGC CTT CAC TCC TG	292
CE078	CAT GGA AAG AGG CGG CG	GGA GAC CGA ACA TTT CTC TAT GAC	300
CE079	AGA ATC AGC CCG GAC CTC	CGG CGA ACT CTA TTA AGT GAA GC	367
CE080	CCT CTC TCA GCC GAA TAC TCT C	GAT TTG TGC TGG ATT CAA GAC AG	303
CE082	GCG CTA AGC TTT GTG CAG TAC	TAG CCG ATG ATT CAA AAG CGG	239
CE083	CCA TCT CCA GCT CTC AGC TTC	ATA ATG CAC AAG CCT CAA TTA ACC	281
CE084	GAG AAT TGG GTA CGC CGT GG	AGC GAC CCA ACA GAA GAA CTC	262
50	Total		

<sup>a</sup>*Cymbidium ebrunum* was used as the DNA source

나. Specific allele tagging을 통한 양란 품종 분석

합성된 CE-계열 primer set을 이용하여 선정된 양란 품종(Table 14)에 대하여 PCR을 실시하였다. 총 60개의 CE-primer sets가 적용되어 졌으며, 대략적인 PCR product에 대한 설명은 Fig. 24에 제시되어 있다. 그림에서 보듯이 대부분의 PCR product들이 염기서열 분석에서 예상된 크기를 정확히 그리고 매우 양호하게 증폭하였다. 이러한 경향은 앞 절에서 설명한 SCAR primer set들의 그것과는 매우 대조적인 것인데, 주된 이유로는 앞 절에서 설명한 SCAR primer set들의 그것과는 매우 대조적인 것인데, 주된 이유로는 low copy 혹은 single copy로 유전자들의 존재하는 ‘active genome’ 부위만을 선택적으로 allele tagging을 위한 STS-PCR primer의 sequence origin으로 사용했기 때문이다.

Table 14. List of cymbidium lines for testing CE-type STS-PCR primer sets for detecting and databasing of line specific allele profiles in each locus tested.

Group A			Group B		
ID	Name	Type	ID	Name	Type
1	<i>C. dayanum</i>	OSP <sup>z)</sup>	1	<i>C. ebrunum</i>	OSP
2	<i>C. ebrunum</i>	OSP	2	<i>C. Pepermint Party</i> x <i>C. ebrunum</i>	F1
3	<i>C. devonianum</i>	OSP	3	<i>C. Pepermint Party</i>	Hbd
4	<i>C. ensifolium</i>	OSP	4	<i>C. Sunny Romance</i> x <i>C. ebrunum</i>	F1
5	<i>C. feberi</i>	OSP	5	<i>C. Sunny Romance</i>	Hbd
6	<i>C. ferrestti</i>	OSP	6	<i>C. Drum</i>	Hbd
7	<i>C. glacillium</i>	OSP	7	<i>C. Moon Venus</i>	Hbd
8	<i>C. flaccidion</i>	OSP	8	<i>C. Raphin Hot</i>	Hbd
9	<i>C. insigne</i>	OSP	9	<i>C. Ayako Tanaka</i>	Hbd
10	<i>C. madidum</i>	OSP	10	<i>C. Sundust</i>	Hbd
11	<i>C. nevio-marginata</i>	OSP	11	<i>C. Raranase</i>	Hbd
12	<i>C. pumilum</i>	OSP	12	<i>C. Murasaki Gengi</i>	Hbd
13	<i>C. rubrigenum</i>	OSP			
14	<i>C. sinese</i>	OSP			

z) OSP: original species, Hbd: hybrid

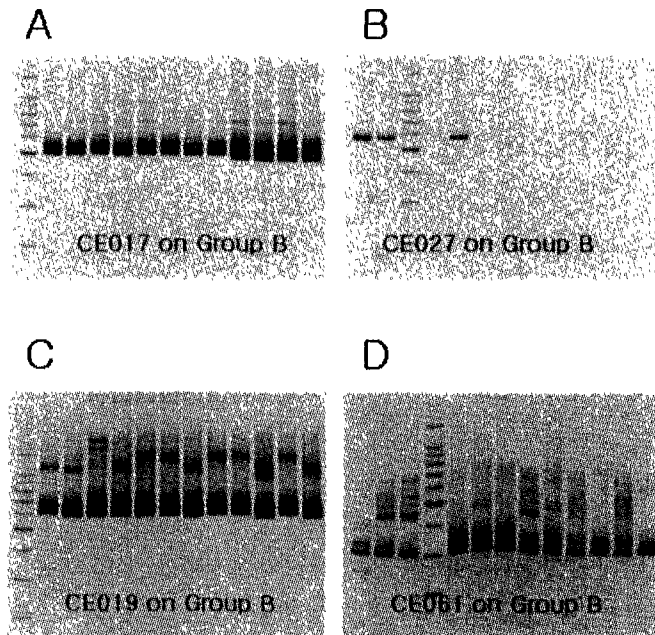


Fig. 24. Examples of amplification products of specific primer sets described in Table 13, the CE-group primers. Productions of amplification using each primer set were resolved in a 5% non-denaturing polyacrylamide gel to increase the resolution power and stained with EtBr. Only one type of 100 bp size marker (M: Promega, USA) was used in every gel to estimate the size(s) of detected locus (loci) and allele(s) more reliably across gels. All presented primer sets here, tested on 12 Group B lines and tagged the exact size of the expected band sizes (see Table 14). Panel A. Primer set CE017 detected one monomorphic locus among 12 *Cymbidium* lines and be restricted by 4 endonucleases (*RsaI*, *HinfI*, *HaeIII*, and *AclI*) later to find possible additional polymorphism which latent within the primer binding sites. Most CE-primer sets displayed very strong and clear amplified products having the exact size of expected band size mentioned in Table 5. Panel B. Result of primer set CE017. Tagged alleles are scored as dominant marker type i.e., present and absent (null allele). The PCR products were also restricted with 4 endonucleases mentioned above. Panel C. Primer set CE019 amplified two different loci resolved by their amplified sizes. One locus has two alleles scored codominantly, and the other locus displays monomorphism. Panel D Primer set, CE061 display very interesting amplified band patterns. Some lines exhibits very strong band signals, meanwhile other lines show weak band density. These four general 'types' of PCR amplification products with 50 specific primer sets were commonly observed. The predominant pattern was Panel A, strongly and clearly tagged alleles with monomorphism.

Fig. 24에서 보는 바와 같이 PCR 산물들은 크게 4가지 유형으로 구분되었다. 첫째, 하나의 유전자좌를 표지하면서도 대립유전자는 해당 유전자좌에서 한 가지로 나타나는 경우 (monomorphism; Panel A, CE017-480bp locus), 둘째, 하나의 primer 조합이 하나의 유전자좌를 표지하면서 dominant type으로 polymorphism이 확인되는 경우 (Panel B, CE027 locus), 셋째, 하나의 primer 조합에 의해 두 개 이상의 유전자좌가 표지되면서 서로 다른 scoring 경향을 보일 때 (Panel C, CE019-670bp locus와 CE019-1.2kb + 1.5kb locus), 그리고 마지막으로 CE061-310bp locus의 경우 (panel D)와 같이 각 양란 품종에서 서로 다른 증폭정도를 보이는 경우이다. 모든 확인된 대립 유전자들을 표지에 사용된 primer 조합이름과 증폭산물의 크기를 이용하여 구분하였다. Fig. 24의 panel A 와 B의 경우에는 잠재적인 polymorphism을 추가로 확인하기 위해서 4가지 제한효소로 PCR products를 절단하고 다시 전기영동 하였다. Specific primer 조합을 이용한 PCR 증폭산물은 primer binding site의 염기서열에 따라 결정되기 때문에 각 primer에 의해 제한된 genomic DNA부위 안쪽에서 커다란 수준의 삽입 (addition) 혹은 결실 (deletion)이 일어난 경우 (공우성 marker)와 primer binding site에서의 mutation이 일어난 경우 (우성 marker)만이 gel 상에서 구분이 가능한 polymorphism이다. 증폭산물 내부에 잠재된 polymorphism (SNP)을 추가로 확인하기 위해서 monomorphism을 보이는 PCR 산물들을 제한효소로 처리하였다 (Fig. 25).

Specific primer 조합을 이용한 유전자좌의 표지는 PCR 증폭산물의 유부 및 그 크기를 표시해 줌으로써 이루어진다. 그러나 표지된 유전자좌에서 품종간 단 하나의 대립유전자가 관찰될 때는 표지된 유전자좌로부터 얻을 수 있는 정보가 상당히 제한된다 (Fig. 25 panel A와 C에서 digestion 전의 PCR products들). 또한 검사한 유전자좌에서 polymorphism이 인정되더라도 대부분의 품종이 동일한 대립유전자를 가지는 경우에도 (Fig. 25 Panel B, CE034) 품종표지를 위한 polymorphism의 가치가 떨어진다. 이러한 경우에는 4가지 제한효소로 PCR산물을 절단하고 절편들의 크기를 비교하여

SNP를 확인함과 동시에 각 품종의 대립유전자들에 제한효소 작용점 및 절편들의 크기 정보를 추가하여 한 품종이 지니는 '특정 대립유전자의 관리'가 좀더 구체적일 수 있도록 시도하였다.

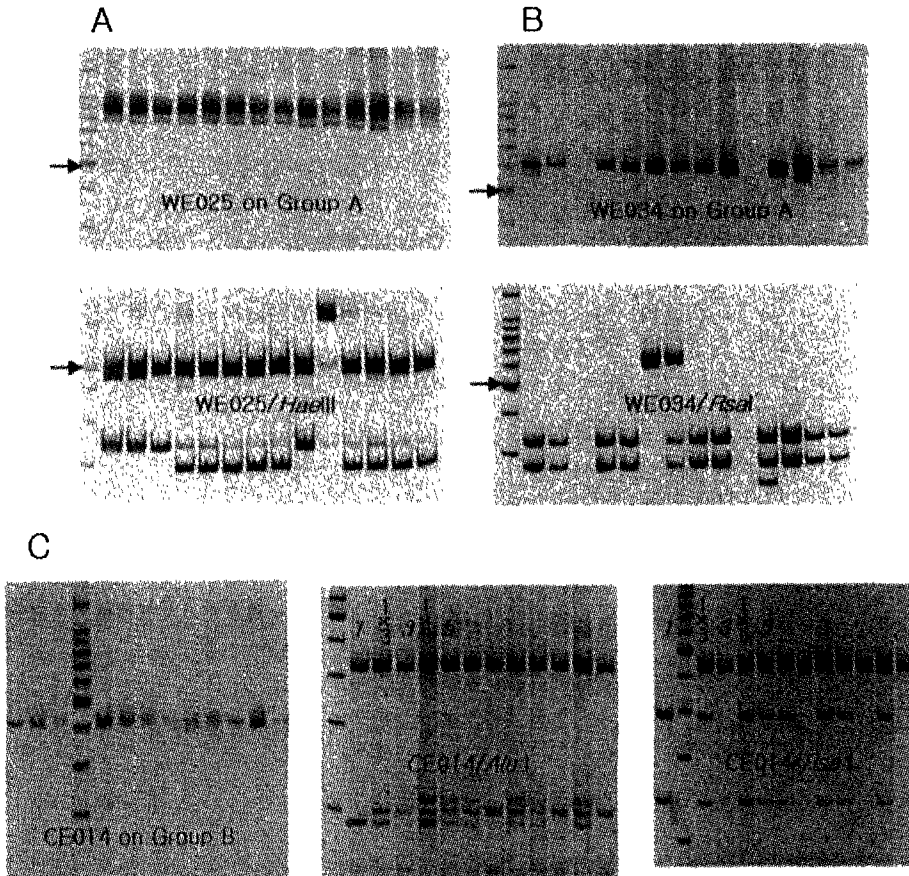


Fig. 25. Examples of applying endonucleases to find additional polymorphic allele(s) latent within the amplified genomic DNA region tagged by one primer set. Cleaved amplified products are displaying polymorphic restriction patterns, and appearing to be codominant. Arrows in panel A and B indicate the 500bp fragments among 100bp size ladders (Promega). Panel A. Primer set WE025 identified a monomorphic locus in 14 *Cymbidium* lines, Group A (see Table 6). Note that the amplified product has the exact expected band size. Out of four endonucleases, *RsaI*: GT↓AC, *HinfI*: G↓ANTC, *HaeIII*: GG↓CC, and *AluI*: AG↓CT, *HaeIII* displays polymorphic alleles at the locus, CE025. Now, there are at least 4 different alleles of which was not revealed by the PCR products themselves. Panel B. Application of CE034 on Group A, detected two alleles (present and null allele), and additional cleavages of the present bands detected two additional

polymorphic alleles. Panel C. Application of CE014 on Group B detected only one allele types, and followed cleavages with *AhaI* and *RsaI* display very clear genotyping results. Note that line 2 and line 4 are F1 line derived from two separate crosses between line 1 (*C. ebrunum*) and line 3 (*C. perpermint party*) and line 1 (*C. ebrunum*) and line 5 (*C. Sunny Romance*). In most cases, CE-primer sets and following treatments with endonucleases was good enough to detect at least two different alleles among 12 Group A lines. Meanwhile, it was very rare to confirm polymorphic alleles among 14 Group B lines.

다. 양란 품종구분을 위한 DB 구축의 모형 제시

제한 효소의 적용과정 및 해석을 Primer set CE014이 본 실험에 사용되었던 group B의 경우를 예시하여 설명하고자 한다 (Fig. 25, panel C; 양란 group B, 즉 육성종들에 대한 검정결과, table 6 참조). 모든 12개 양란 품종들에서 PCR에 의해서 420 bp 유전자좌가 표지되었으나, 한 가지의 대립유전자만이 확인되었다. PCR 산물들에 대해서 4가지 제한효소를 동시에 처리하여, 420 bp내에는 *HinI* 및 *HaeIII* 의 제한효소 작용점 (G<sup>^</sup> ANTC와 AG<sup>^</sup> CT)이 존재하지 않음을 알 수 있었다. *AhaI* 과 *RsaI* 의 처리에서는 절단산물을 확인할 수 있었으며 추가적인 polymorphism을 보이고 있는데, 이 두 결과를 잘 비교해 보면, F1 품종 line 2번 (1 x 3; *C. ebrunum* x *C. perpermint party*) 및 4번 (1 x 5; *C. ebrunum* x *C. Sunny Romance*)을 형성했던 각 parental line들이 포함하는 CE014-420bp allele들의 형태가 명확해 진다. 즉, *C. ebrunum*과 *C. Perpermint Party*은 homogeneous allele들로 이루어진 반면, *C. Sunny Romance*는 heterogeneous CE014-420bp alleles를 지니고 있다는 것이 명확하게 나타나고 있다. 이를 근거로 하여 각 품종의 정확한 genotyping이 가능하다. 예를 들면, Table 13, Table 14에 제시된 각 양란 육성품종 및 원종들을 (Group B) 실험 ID로 구분하여서, 1번 품종은 homo (AA type)이며, 2번은 AB type의 hetero, 3번은 BB type의 homo, 4번은 AB type의 hetero, 5번은 AB type의 hetero등 codominant scoring에 의거한 정확한 genotyping이 가능해진다. 결론적으로 CE014 primer 조합에 의해 표지되는 유전자좌는 실지로는 적어도 2개이상의 서로 다른 대립유전자들로

구성되어진다는 것을 알 수 있게 된다. 하지만 모든 염기서열을 분석하기 전에는 적용된 12개 품종들이 CE014-420bp locus에 대해서 몇 가지 대립유전자들을 함유하고 있는지는 알 수 없다. 단순히 12개 품종 안에서 확인되는 polymorphism만을 고려할 때 4가지의 제한효소 처리 및 별도의 전기영동 등의 많은 노력과 경비를 투자하여 단 한가지의 대립유전자를 추가로 확인한 것으로 극히 비효율적인 것으로 보이지만, 하나의 품종이 지니는 대립유전자의 특성을 기술하는 데에 중점을 두어 각 품종들을 관찰한다면 아래와 같은 매우 유용한 정보를 얻을 수 있다 (1번 품종만을 고려할 때; *C. ebrunum*).

- 1) CE015 primer 조합은 1번 품종에 대해 반드시 420 bp의 증폭산물을 생성한다.
- 2) *HinfI* 및 *HaeIII*에 의해서는 420 bp의 증폭산물이 절단되어서는 않된다.
- 3) *AluI*에 의해 단 한곳이 절단되고, 330 bp와 90 bp의 절편들이 확인되는 homo type 이어야 한다.
- 4) *RsaI*으로 절단할 때 반드시 280 bp와 140 bp 등 두개의 band가 정확히 보이는 homo type이어야 한다.

이러한 정보들을 각 유전자좌에 단계적으로 누적할 수 있다면, 극히 좁은 범위의 유전적 변이를 보이는 작물 품종들에도 각 품종의 정확한 표지에는 전체 chromosome 수준에서 확인되는 품종들간 polymorphism level이 문제가 아니라 각 품종에서 확인된 대립 유전자들의 정확한 묘사가 더욱 중요하다는 것이 분명해 진다. 이를 위해서는 무엇보다도 specific primer 조합이 재현성이 높게 한 품종에 대해서 하나의 유전자좌에 속하는 품종 고유의 대립유전자만을 혹은 뚜렷한 major band의 형태로 표지한다는 전제가 있어야 한다. 따라서 본 연구에서는 품종구분에 적용할 primer 조합을 touch-down PCR을 이용하여 엄정히 선별하였고, 제한효소를 이용한 PCR 산물의 처리 전 반드시 target band를 설정하여, gel에서 확인하기 어려운 minor band들이 절단됨으로 인하여 확인되는 polymorphism은 철저히 구분하여 DB에서 제외시켰다.

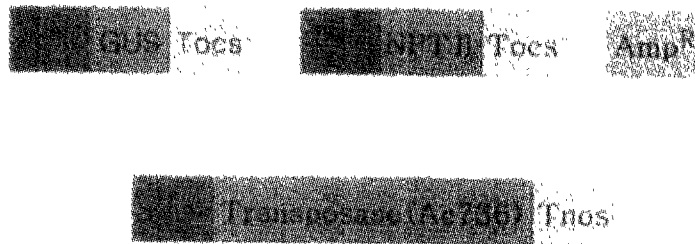
## 제 2 분야 동양란 변이체 생산

### 제1항 형질전환 벡터

유전자 도입 방법을 이용하여 유전적으로 안정적이고 반복적으로 얻을 수 있는 동양란 변이체 생산 실험을 수행하였다. 동양란의 형질전환을 위하여 pAt6k를 도입유전자를 포함한 형질전환 벡터로 사용하였다(Fig. 26). pAt6k는 발색반응에 의해서 형질전환의 여부를 확인할 수 있는 GUS 유전자( $\beta$ -glucuronidase)와 형질전환 식물체를 선별하는데 사용할 수 있는 항생제 카나마이신 저항성 유전자(NPTII)를 포함하고 있으며, 염색체내에서 jumping하면서, 유전자의 기능을 block하므로써 변이체를 유도하는 것으로 알려진 옥수수 TE인 transposase (Ac736)를 포함하고 있다. Maize transposase 유전자의 발현은 열처리에 의해서 조절될 수 있도록 heat shock promoter에 연결되어 있다. GUS 유전자의 promoter는 nopaline synthase의 promoter가 연결되어 있으며, NPTII 유전자의 promoter는 cauliflower mosaic virus 35S 의 promoter로 구성되어 있다. 또한 bacterial selection marker로서 항생제 ampicillin 저항성 유전자를 가지고 있다. pAt6k 형질전환 발현 벡터 안에 있는 3개의 유전자는 모두 다른 promoter에 의해서 발현이 조절됨에 따라서 이들 유전자가 식물 내로 도입된 후에, 도입유전자의 sequence homology에 의해서 유전자의 발현이 silencing 될 가능성은 매우 낮은 것으로 생각된다. 또한 transposase의 발현을 조절하기 위해 사용된 heat shock promoter는 promoter안에 heat shock에 의해 유전자의 발현을 조절할 수 있는 특이적 염기서열을 가지고 있는데(Schoffl et al., 1989), 이 특성을 이용하여 유전자의 발현을 열처리로 조절할 수 있다(Balcells et al., 1994). 현재, 식물 형질전환을 위해서 사용되는 promoter들의 대부분은 strong promoter이고, 이들은 형질전환 유전자들의 강력한 발현을 유도하나 때로 지나친 발현으로 인해 식물체의 형태적 기형화를 만드는 등의 문제점을 나타내고 있다. 따라서, 앞으로는 유전자의 효율적인 식물 내로의 도입뿐만 아니라, 적절한 시기와 양의 발현 조절도 중요하다. 이런 목적을 달성하기 위하여 heat shock promoter와 같은



inducible promoter의 사용을 적극 활용해야 할 것으로 판단된다. 본 실험에서는 1차적으로 옥수수 transposable element를 동양란에 도입하고 생육과정 중에 열처리를 통해 도입유전자의 transposition을 유도함으로써 다양한 변이체를 얻기 위하여 heat shock promoter에 연결된 transposase를 형질전환 하였다.



<Fig. 26. Expression binary vector pAT6K>

Fig. 26. Expression binary vector for Oriental *Cymbidium* genetic transformation.

Tnos denotes the promoter of the nopaline synthase. GUS denotes the coding region of  $\beta$ -glucuronidase gene. Tocs denotes the terminator of the octopine synthase gene. P35s denotes the promoter of the cauliflower Mosaic virus 35s gene. NPTII denotes the coding region of kanamycin resistance gene. Amp<sup>R</sup> denotes the ampicillin resistance gene for bacterial selection marker. Phs denotes the promoter of the heat shock protein gene. Transposase denotes the coding region of the maize transposable element Ac736. Tnos denotes the termination of the nopaline synthase gene.

## 제2항 유전자총을 이용한 형질전환

유전자총 실험결과 1,350 psi rupture disk를 사용하였을 때가 가장 좋았으며 재료의 위치는 유전자총 챔비내부의 가장 아래층과 바로 위에서의 위치차이를 볼수가 없었다(Table 15 참조). 예비실험후 모든 재료에 대한 bombardment는 1350 psi rupture disk를 사용하여 유전자총 내부의 가장 아래층과 다음 층에서 각각1번씩 같은 재료에

2번씩 bombardment를 실시하였는데 모든 실험은 gold particle(직경1.6미크론)을 사용하였다. 형질전환 후 모든재료는 bombardment로 부터의 회복을 위하여 healing 배지( MS + 2% mannitol)에서 1주간 진탕배양되었고 그후 일부는 항생제 hygromycin 25 ppm을 포함한 재분화배지(MS + 1ppm BA + 0.1 ppm NAA)에 치상하였는데 일부는 항생제를 포함하지 않은 재분화배지에 치상하여 계속적으로 근경의 성장과 변이체 형성의 징후를 관찰하였다.

Table 15. Microprojectile bombardment optimization using expression vector pZO1052.

	1100 psi	1350 psi	1500 psi
-1 (1st stair in chamber)	Upper	---*	12
	Middle	---	10
	Lower	---	15
-2 (2nd stair in chamber)	Upper	---	13
	Middle	---	10
	Lower	---	12

### 제3항 전배양 처리가 형질전환효율에 미치는 영향

전처리가 형질전환 효율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험을 수행하였다. 삼각 플라스크에 증식용 액체배지를 넣고 적당량의 근경을 25℃의 온도에서 무처리구(0일)를 포함하여 3일, 7일의 두 조건으로 회전 배양시켰다. 전배양한 근경을 형질전환시킨 후, 형질전환 효율과 유전자 도입 효율을 측정하였다(Table 16, Fig. 27). 효율적인 형질전환을 위해 전처리를 수행한 실험에서 3일의 전처리 기간보다 7일의 전처리 기간이 형질전환빈도에 더 높은 수치를 나타냈다(Table 16). 3일 전처리조건에서는 총 103개의 무작위로 적출한 근경 중 23개(22%)가 GUS 발현을 보인 반면, 7일 전처리 구에서는 43개(42%)가 GUS 유전자 발현을 보였다. 또한, 7일 배양한 근경들이 3일

배양한 근경보다 GUS 유전자 발색에 있어서 더 짙은 색을 나타내었는데, 이는 유전자 도입 효율이 더 높은데 기인한 것으로 생각(Fig. 27)되는데 이 결과는 3일보다 7일 배양했을 때의 근경이 생육이 왕성하였기 때문이라고 판단된다. GUS 발색에 있어서는 근경의 몸체 부분보다는 근경의 성장점 부위인 tip 부분에서 진한 색을 나타내어, 유전자의 도입부위가 본 실험에서 목표로 한 근경의 성장점부위로 집중되고 있음을 알 수 있었다. 3일과 7일의 두 가지 조건 이외의 전처리 영향을 알아보기로 14일 배양한 근경을 재료로 형질전환을 시도한 경우에는, 일부근경의 발육이 7일 전배양보다 더 왕성하여 진한 GUS 발색을 보이는 것도 있었으나, 근경의 형태에서 성장점 부위인 tip 부분이 동그란 모양으로 비뚤어지는 양상을 보였다. 본 실험의 결과로 미루어볼 때, 성장점 부위에 효율적인 유전지도입을 위하여 전배양은 반드시 수행되어야 할 매우 중요한 과정이라고 생각되어 진다. 동양란의 느린 생육특성을 고려해 볼 때, 근경의 왕성한 생육이 형질전환 전에 우선되지 않으면 동양란 근경세포의 외부 유전자에 대한 창(window of competency)이 매우 좁아 아그로박테리아의 machinery에 의한 유전자의 도입이 매우 어려울 것으로 판단된다. 다른 작물에서 전처리를 수행한 경우에 있어서는, 벼 캘러스를 전배양을 했을 때, 형질전환효율이 증가되었다는 보고가 있었다(Hiei et al., 1994; Toki, 1997; Cho et al., 1998). Hiei 등(1994)은 종자에서 유도된 캘러스를 형질전환 4일전에 새로운 배지에 전처리하는 것이 고효율의 형질전환을 위해서 매우 중요한 과정이라고 하였고, Cho(1998)등도 한국 벼 품종을 재료로 한 실험에서 같은 결과를 보고하였다. 최근까지도 아그로박테리아에 매우 저항성이 강하여 형질전환이 수월하지 않던 벼도 배지 개선을 포함한 조직배양기술과 전처리등의 과정을 통하여 형질전환 효율이 급속도로 증가한 것을 고려할 때, 동양란의 형질전환효율을 높이기 위해 다양한 생리활성물질을 포함한 배지 개선과 다양한 전처리조건이 탐색되어야 할 것으로 판단된다.

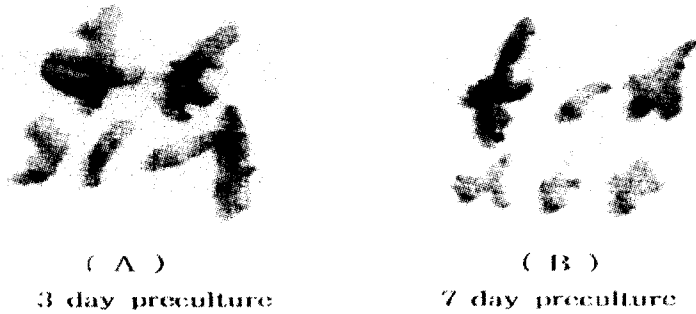


Fig. 27. Effect of preculture period of oriental *Cymbidium* rhizome on genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens* harboring pAt6k (Ac transposase). For efficient transformation, rhizomes were precultured for 3days (A) or 7days (B) in MS liquid media supplemented with 0.5g/L activated charcoal, 0.1 mg/L NAA.

Table 16. Comparison of transformation frequency of rhizomes from two different preculture periods.

Rep	Preculture			
	7days		3days	
	GUS positive	Total	GUS positive	Total
1	16	18	4	11
2	14	30	9	44
3	13	55	10	48
Total	43(42%)	103	23(22%)	103

<sup>a</sup>GUS assay was conducted at 14 days after inoculation with LBA4404(pAt6K).

#### 제4항 Wounding기간이 형질전환 효율에 미치는 영향

Wounding 처리기간이 형질전환 효율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험을 수행하였다. 7일간 전배양한 근경이 들어있는 근경증식용 액체배지에 30g의 seasand(Junsei, Japan)를 첨가하여, 25°C의 shaking incubator에서 90rpm의 속도로

2일과 4일간 처리하였다. Wounding 처리 후, 형질전환을 하였으며, GUS 분석을 통하여 형질전환 효율과 유전자 도입 효율을 측정하였다. GUS분석 결과 2일의 wounding이 4일의 wounding처리보다 더 높은 형질전환빈도를 나타냈다(Table 17). 2일의 wounding 처리구에서는 37개의 근경중, 11개(30%)가 GUS 발현을 나타냈으며, 4일 wounding 처리구에서는 48개중 32개(67%)의 근경이 GUS발현을 나타내어 높은 유전자 도입빈도를 보였다. Seasand를 넣지 않고 형질전환을 수행한 무처리 조건에서는 42개의 근경 중 7개만 GUS 양성반응을 보여 17%의 낮은 유전자 도입빈도를 나타냈다. GUS발색의 강도에 있어서도 4일 wounding 처리구에서 가장 짙은 발색을 보여 장기간의 상처가 유전자도입효율에 있어서도 좋은 결과를 나타내었다(Fig. 28). 무처리에서 seasand에 의한 wounding유도 없이도 몇몇의 근경들이 GUS발색을 보인 것은 액체배지 안에서 회전배양 시에 근경과 근경사이의 마찰로 자연 상처가 난 것으로 보이며, 이로 인해 약한 유전자의 도입이 일어난 것으로 생각된다. Seasand를 이용한 근경의 wounding유도는 아직 보고된 바가 없으며, 본 실험에서는 근경의 성장점조직에 아그로박테리아 감염을 위하여 상처를 내는데 매우 효율적이라고 판단된다. 그러나 적절한 양의 seasand를 첨가해 주는 것이 효율적인 wounding을 위하여 매우 중요할 것으로 보이는데 seasand에 비해 액체배지의 양이 지나치게 많은 경우, 근경이 배지의 표면에 떠서 shaking이 되어 플라스크 아래쪽에 있는 seasand와의 접촉불량으로 wounding이 유도되지 않았고, 근경의 양이 많거나 배지의 양이 적을 경우, shaking시 근경들이 한쪽으로 몰린 상태를 유지한 채, shaking이 원활하지 않아 wounding이 유도되지 않았다. 그러므로 적절한 seasand의 양과 배지의 양, 근경의 양을 wounding이 가장 효율적으로 수행될 수 있도록 적절히 조절하여야 할 것이다. 또한 shaking할 때에 rpm의 조건에 있어서 80rpm의 조건에서는 느린 shaking으로 근경이 효율적이지 않았으며 100rpm 이상의 조건에서는 너무 빠르고 강도가 높아 shaking으로 인한 식물의 상처가 컸다. wounding에 있어서 shaking의 rpm은 90rpm에서 시행하였을 때 가장 효율적인 결과를 나타내었다. 4일 이상 wounding을 실행한 근경과 rpm을 높

여 현탁 배양한 근경은 과도한 wounding으로 인해 식물체 자체에서 polyphenol이 발생함으로써 배지가 갈변됨을 확인할 수 있었고, 또한 재분화시 근경 주변의 배지가 붉게 되고 근경은 갈변되어 고사하는 현상이 발생하였다. 이러한 결과로 볼 때 형질전환을 수행하기 위한 wounding은 매우 적절한 강도로 수행되어야 함을 알 수 있었다.

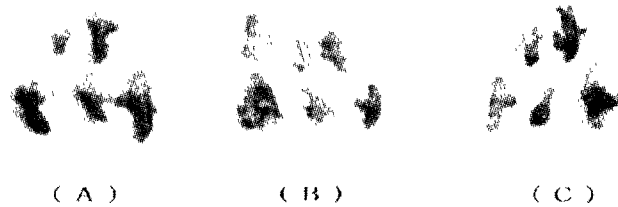


Fig. 28. Effect of wounding period of Oriental *Cymbidium* rhizomes on the genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens* harboring pAt6k (Ac transposase). For efficient transformation, rhizomes were wounded for 0day(A), 2day(B), 4day(C) in MS liquid media supplemented with 0.5g/L activated charcoal, 0.1 mg/L NAA, and 30g/L of seasand.

근경의 형질전환 실험 수행 후, 식물체를 얻기 위해서 재분화 배지에 치상하였다. 그러나, 대부분의 근경이 과도한 wounding으로 인하여 재분화 유도 시 성장이 원활하지 못하였고 대부분 polyphenol로 추정되는 붉은 색 물질의 누출과 갈변으로 고사하는 경향을 나타내었다. 식물체의 polyphenol은 일반적으로 식물체가 상해를 입었을 경우 분비되는 물질이나, 한란의 경우 상해 없이도 근경 배양 시, 특히 cytokinin류의 생장조절물질을 과다 첨가했을 때 갈변도가 심하게 나타난다는 보고가 있다(Choi et al. 1998). 그러므로, 형질전환 수행 후, 상처받은 근경을 재분화로 유도하기 위해서는 상처의 빠른 회복을 위한 특별한 처리가 필요하다. 따라서 형질전환 후, 갈변을 막기 위한 조건을 확립하기 위해 sucrose, mannitol, chitosan과 같은 시약을 처리하여 상처의 회복을 촉진시키기 위한 다양한 실험을 수행하는 것이 필요하다. 형질전환 유전자

의 도입을 확인하기 위하여 형질전환 수행 약 2주 후, 동양란 근경으로부터 DNA를 추출하여 PCR를 수행하였는데 PCR 결과 도입된 유전자를 확인할 수 있었다(Fig. 29). 결과적으로 아그로박테리움을 이용한 형질전환 실험에 있어서는 전처리에서는 3일 배양보다 7일 배양이, wounding에서는 부처리와 2일보다 4일의 wounding이 더 높은 형질전환빈도와 유전자 도입효과를 가져온다는 것을 알 수 있었다.

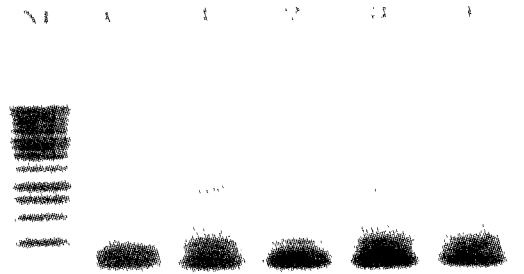


Fig. 29. PCR amplification of  $\beta$ -glucuronidase gene in the transformed Oriental *Cymbidium* rhizomes. M, size maker (1kb DNA ladder); C, control ; Lane 1 - 4, transformants.

Table 17. Transformation frequency of rhizome from three different wounding periods.

Rep	Wounding					
	0day		2day		4day	
	<sup>a</sup> GUS	Total	GUS	Total	GUS	Total
1	4	12	4	13	9	13
2	2	10	5	13	10	15
3	1	20	2	11	13	20
Total	7(17%)	42	11(30%)	37	32(67%)	48

<sup>a</sup>GUS assay was conducted at 14 days after inoculation with LBA4404(pAt6K).

## 제5항 2,4-D 처리가 변이체 발생에 미치는 영향

생장 호르몬인 2,4-D가 변이체 생산을 위한 형태적 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험을 수행하였다. 1ppm, 2ppm, 4ppm, 8ppm 농도의 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid(2,4-D)이 첨가된 근경 증식용 고체배지에 생육이 왕성한 근경을 5반복으로 치상하여, 식물의 형태적 변이를 관찰하였다. 모든 처리에서 근경들이 hairy가 되는 현상이 전반적으로 관찰되었다(Fig. 30). 처리 농도별 차이는 치상 후 2달에서 4달 지난 상태에서 관찰한 결과, 전체적인 hairy 현상과 더불어 4ppm 처리에서 뿌리 및 근경의 왕성한 활력을 관찰하였다. 그러나 농도별 처리간에 hairy 현상의 강약은 발견할 수 없었으며, 전반적인 신초의 형성은 무처리구 보다 지연되는 것을 관찰하였다. 신초의 형성은 2,4-D처리 후, 약 6개월째부터 관찰되었는데, 가장 높은 농도인 8ppm에서 먼저 진행되었고, 신초가 생성된 뒤에는 4ppm의 처리구에서 약간 빠르게 진행되었다. 특히 4ppm 처리구에서는 일부 플라스크내의 근경들이 배지 속으로 생육을 전개하지 못하고, 배지 표면 위로 솟아오르는 현상도 관찰되었다. 그러나 현재까지 2,4-D 처리구에서 성장된 식물체에서는 어떠한 형태적 변이도 발견할 수 없었는데 2,4-D 처리에서는 근경에 심한 hairy 현상과 초기의 생육지연을 제외한 어떤 변이체도 발견할 수 없었다.

## 제6항 Trifluralin 처리가 변이체 생산에 미치는 영향

난 변이체 생산을 위하여 돌연변이원으로 기존에 사용되었던 MMS, EMS, 콜히친 등은 식물체의 생육을 저해하고 치사율이 높아 사용자들이 많은 어려움을 겪고 있다. 이들 기존 돌연 변이원의 단점을 개선하고 변이체 생산에 대한 효율을 높이기 위하여 콜히친과 같은 기능을 가지며, 세포의 분열주기 조절에 사용되는 metaphase blocking reagent인 Trifluralin을 근경에 처리하여 변이체 유도효과를 알아보기 위하여 실험을 수행하였다. 처리된 3개의 농도구, 1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M중에서, 5 $\mu$ M과 10 $\mu$ M에서 형태적 변이가 관찰되었다(Table 18).



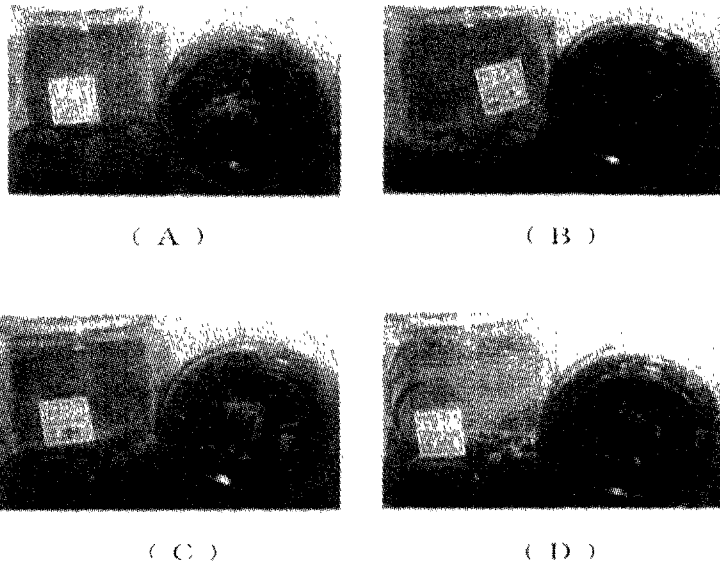


Fig. 30. Application of 2,4-D to induce abnormal morphology and varied plants.

A: 1ppm, B: 2ppm, C: 4ppm, D: 8ppm

잎의 형태적 변이는 잎이 자라면서 틀어지는 형(twisted leaf), 줄무늬가 나타나는 형(striped leaf), 엽폭이 두껍고 키가 작게 나타나는 단엽형(wide and short leaf), 잎의 수에 비하여 키가 작은 왜화형(shrunk leaf), 잎이 곡선으로 말리는 형(curled leaf) 등의 형태를 나타내었다(Fig. 31). 또한 잎이 틀어지는 유형과 함께 줄무늬가 발견되는 개체, 줄무늬를 가지고 있으면서도 단엽인 개체, 왜화형 이면서도 줄무늬를 가지고 있는 개체 등, 하나의 형태적 변이가 아닌 두 가지 또는 두 가지 이상의 여러 형태를 함께 지니며 발현이 되는 식물체도 관찰되었다(Fig. 32, Table 19). 자라면서 잎의 형태가 물결치듯이 틀어지는 형태는 식물체 전체적으로 나타나는 경우도 있었으나, 일부의 잎에서만 관찰되는 경우도 있었고, 잎이 일부 꼬이는 듯이 옆으로 비틀어지는 모양도 관찰되었다. 변이체의 형태적인 분류와 진위를 구별하기 위하여 변이를 보이는 잎들의 진행 상태에 따라 초엽부터 새로 전개되는 잎까지 모두 형태적 변이를 나타내는 것을 지속형(sustaining type), 초기에는 형태적 변이를 보이다 새로 전개되는 잎에서는 사

라지는 식물체를 퇴화형(disappearing type), 초기에는 형태적 변이를 나타내지 않다가 나중에 전개되는 앞에서 변이를 보이는 것을 전개형(developing type)으로 구분되었다(Table 19). 퇴화형은 전체 87개의 식물체 중 39개(44%)가 나타남을 확인할 수 있었으며, 지속형은 87개의 식물체 중 30개(34%)를 확인할 수 있었다. 위의 두 경우에 비해 전개형은 1개체(1%)만을 확인할 수 있었다. 선발된 초기 변이체 중에는 자라면서 어떠한 변이도 확인할 수 없는 정상적인 개체로 되는 개체수도 17개 확인되었다. 줄무늬의 변이체가 잎이 틀어지는 형태와 함께 나타나는 형(SL+T)은 총 변이체중에서 18개체로서 가장 높았고, 줄무늬의 변이체만 발생한 개체는 11개체, 줄무늬와 함께 왜화형을 가지고 있는 변이체(SL+S)와 줄무늬형, 트위스트형, 단엽형 이 세가지를 모두 지니고 있는 변이체(SL+T+WL)는 각각 9개의 개체가 확인되었다. 또한 줄무늬, 트위스트, 왜화형 세 가지를 지니고 있는 변이체(SL+T+S)는 7개를 확인할 수 있었으며, 줄무늬형, 트위스트, 단엽, 왜화까지 네 가지를 동시에 지닌 변이체(SL+T+WL+S)도 4개가 확인되었다. 줄무늬는 잎의 끝으로 갈수록 세로줄의 무늬가 확연히 뚜렷해짐을 확인할 수 있었고, 대부분 잎의 가장자리에 줄무늬가 나타났는데 잎을 확실히 나누어 줄무늬가 나타나는 개체도 관찰되었다. 단엽형의 변이체에서는 다른 변이체들에 비해 녹색의 정도가 조금 더 짙었고, 엽폭이 다른 잎의 폭에 비해 넓게 나타났다. 왜화형들에서는 초장의 길이는 짧으나 엽수가 다른 변이체나 정상적인 난에 비하여 수가 많은 개체들을 특징적으로 관찰할 수 있었다. 유형별 총 변이체는 2종류의 변이형을 가진 것이 전체 87개의 식물체 중 34개인 39%로 나타났고, 3종류의 변이형을 동시에 가진 것이 18개로 20%, 4종류의 변이형을 지니고 있는 개체가 5개인 5%로 최종확인 되었다. 본 실험결과, metaphase blocking agent로 cytogenetic연구에서 cell cycle을 synchronize시켜 염색체의 관찰을 용이하게 하기위해서 쓰이고 있는 Trifluralin은 동양란 변이체 생산을 위한 매우 효율적인 시약으로써의 가능성이 매우 높다(Lee et al., 2000). 현재, 염색체관찰을 위해 사용되는 시약은 DNA synthesis inhibitor인 hydroxyurea(HU)와, metaphase blocking agent인 colchicines 그리고

amiprophos-methyl 등이 사용되고 있는데, 세포에 지나친 상해를 주지 않는다면 이와 같은 다양한 시약을 처리하는 것이 변이체 생산에 도움을 줄 것으로 생각된다.

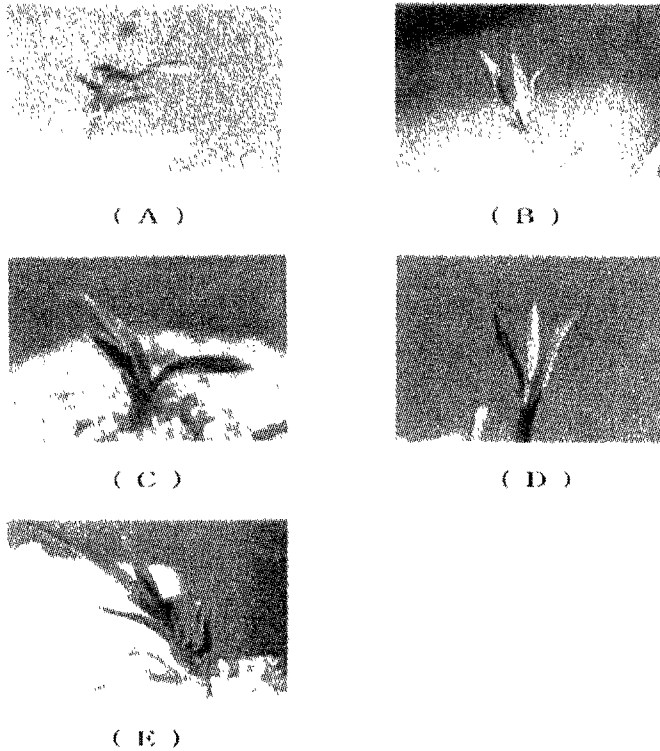
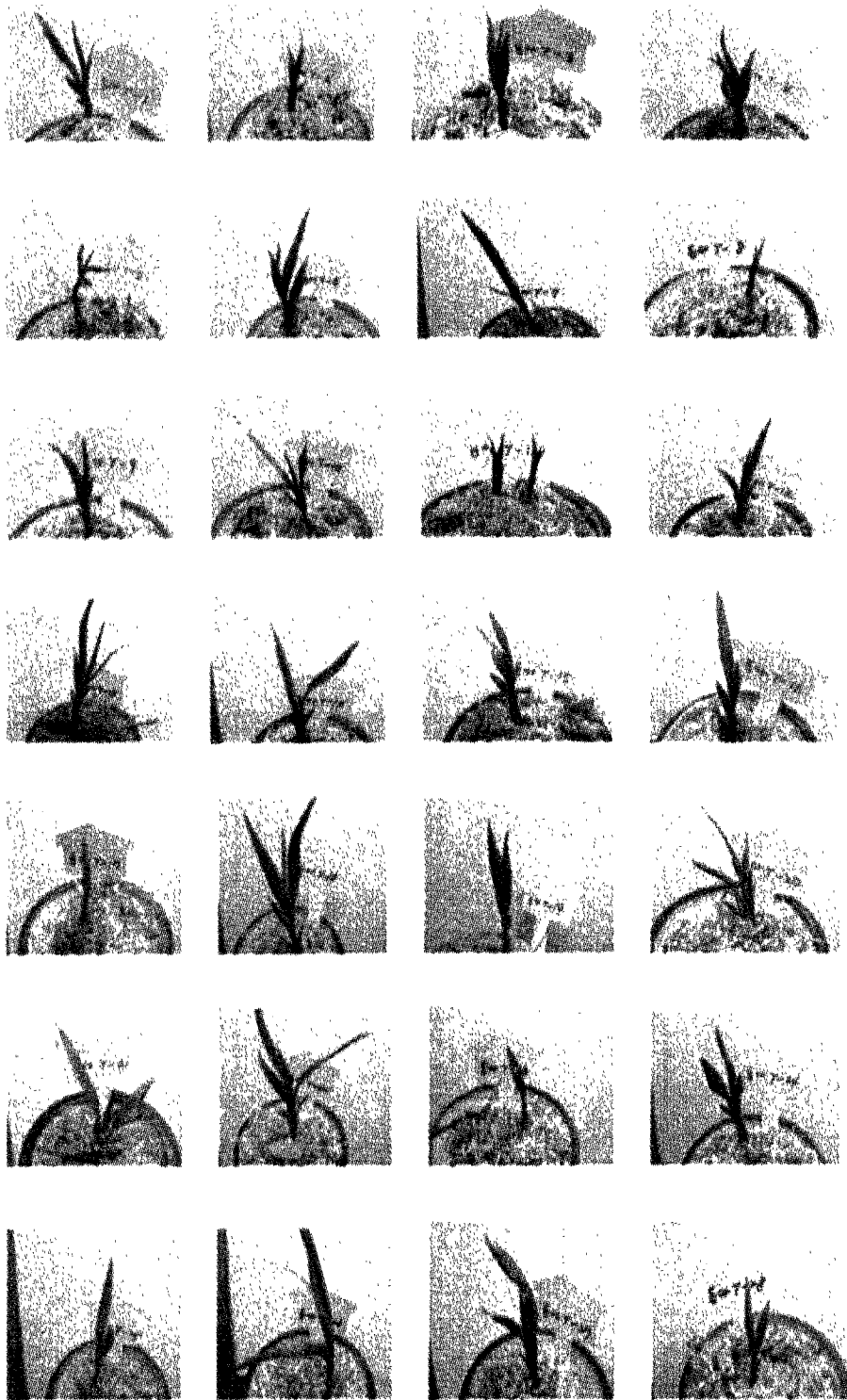
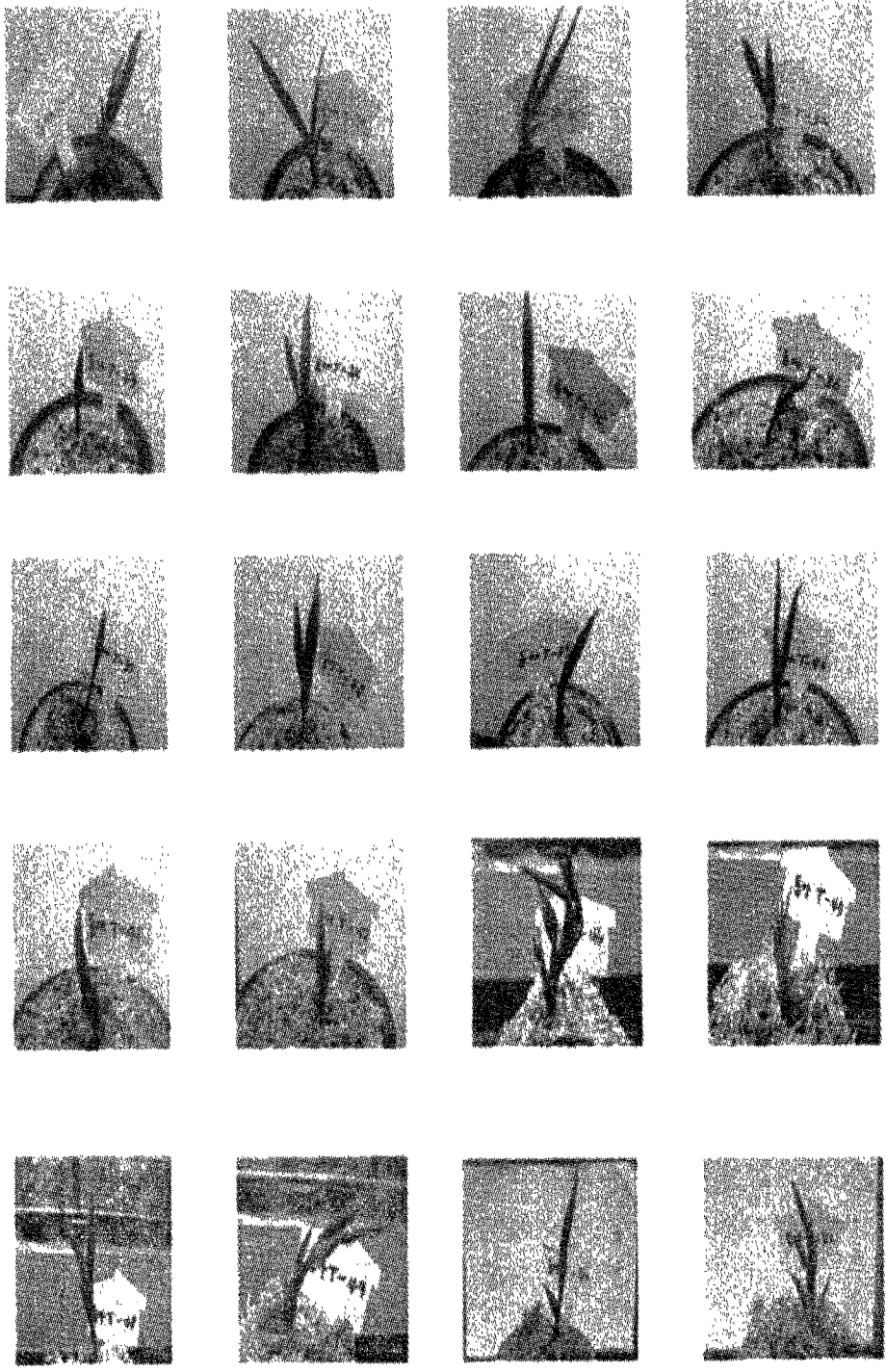
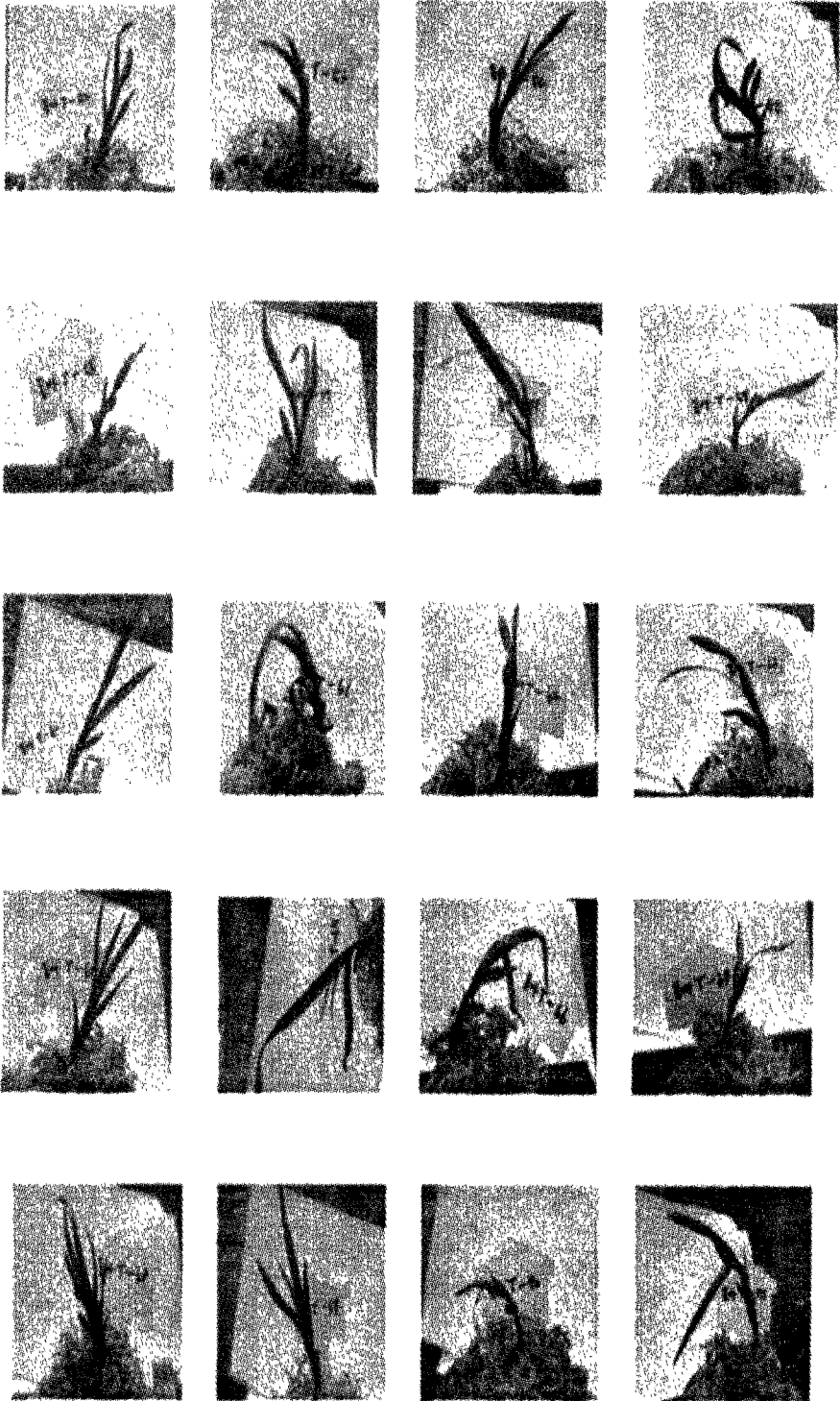
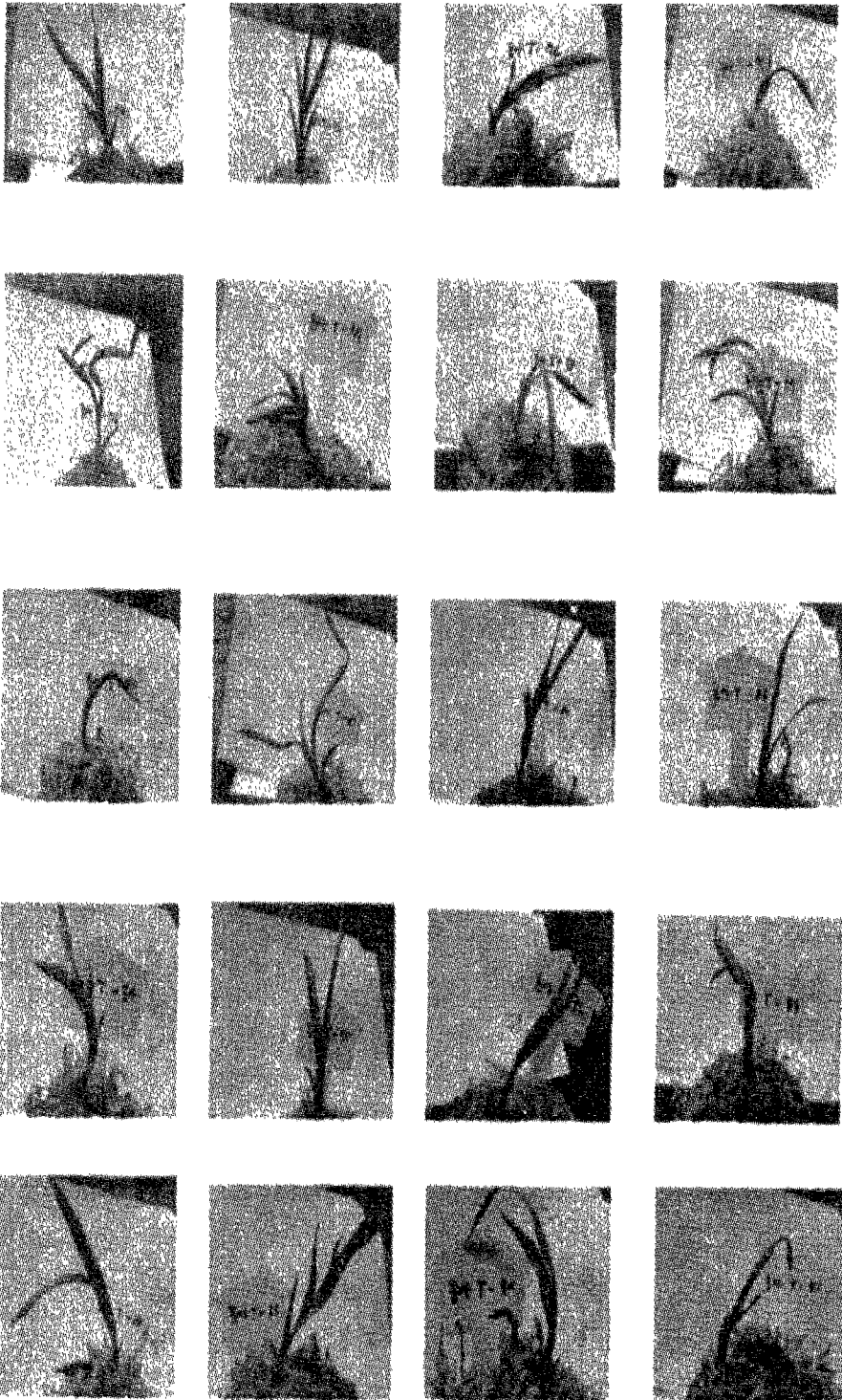


Fig. 31. Examples of morphological changes observed among the plants treated with various stimulants. Shrunken leaf(A), twisted leaf(B), wide leaf(C), striped leaf(D), curled leaf(E).









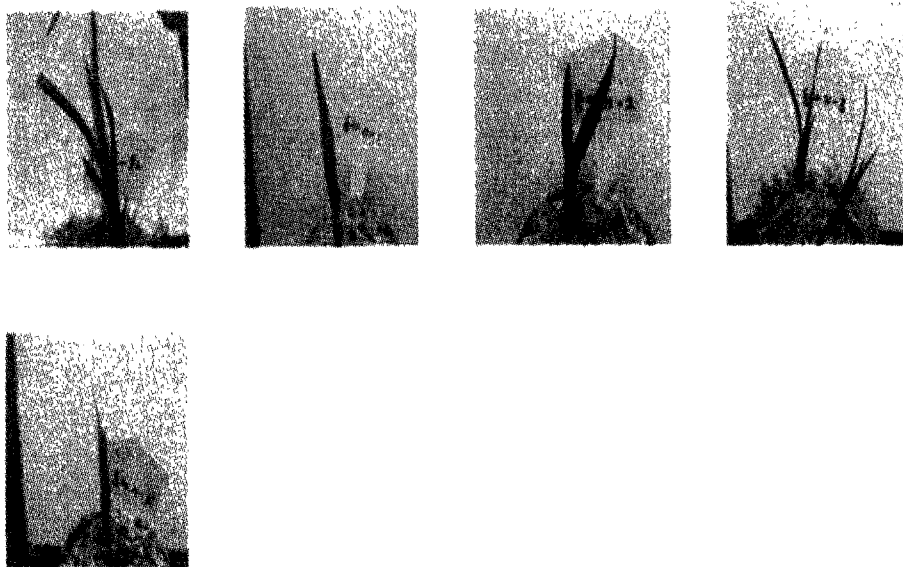


Fig. 32. Collections of morphologically abnormal oriental cymbidium produced from chemical and hormone treatments. For the nomination of mutants, "Dong-A T" and a serial number were assigned for chemically- induced mutants, and "Dong-A N" for the naturally-induced.

Table 18. Survey on the morphological changes of the oriental cymbidium variegates derived from chemical treatment and natural occurrence.

No	Origin	Length	Leaf number	Striped leaf	SL	T	WL	S	C
1	CL <sup>z</sup>	5.5	6	-3,-4,-5	+	+	+		
2	CL	4	6	0,-5	+	+			
3	CL	5.5	5	0,-4	+		+		
4	CL	6	6	0,-5	+	+	+		
5	CL	3	7	0,-6	+	+		+	
6	CL	7.3	7	0,-6	+				
7	CL	9.3	6	--					
8	CL	2.5	3	--				+	
9	CL	4	6	0,-5	+				
10	CL	6.8							
11	CL	2.5	5	0,-4	+			+	
12	CL	2.2	6	0,-5	+				
13	CL	9.5	6	0,-5	+	+			
14	CL	7.3	7	-2,-6	+	+			



15	CL	4.5	6	0,-5	+	+		+	
16	CL	6.2	6	0,-5	+			+	
17	CL	4	5	0,-4	+			+	
18	CL	9	6	0,-5	+	+	+		
19	CL	7	7	0,-6	+	+	+	+	
20	CG*CL	4.5	9	-4,-5	+	+		+	+
21	CG*CL	6	11	--			+	+	
22	CL	10	7	-3,-6	+	+	+		
23	CL	4	3	0,-2	+			+	
24	CL	6.5	6	-4		+	+		
25	CL	6.5	5	-3,-4	+	+	+		
26	CL	12	5	-3,-4	+	+			
27	CL	6.5	4	0,-3	+	+	+	+	
28	CL	4.5	5	0,-4	+	+	+	+	
29	CL	6.5	6	-4,-5	+	+	+		
30	CL	7	4	-3	+				
31	CL	7.5	5	-2,-3	+	+			
32	CL	6.5	4	0,-3	+			+	
33	CL	3	4	-3	+	+		+	
34	CL	7	5	-2,-4	+		+	+	
35	CL	6	4						
36	CL	2.5	4			+		+	
37	CL	4	5						
38	CL	7	5	-2,-4	+				
39	CL	5	4	-1,-3	+	+			
40	CL	6	3						
41	CL	5	5	-1,-3	+		+	+	
42	CL	4.5	4	0,-3	+	+	+	+	
43	CK	7	4	0,-3	+		+		
44	CK	5.5	4						
45	CK	6.6	4	0,-1	+				
46	CG*CL	6	7	0,-6	+	+	+		
47	CG*CL	4.5	6	-2,-4	+				
48	CG*CL	9.5	6	0,-2	+				
49	CG*CL	6	7	0,-6	+				
50	CG*CL	8.5	7	0,-6	+				+
51	CG*CL	4	6	0,-5	+			+	
52	CG*CL	7	6	-4	+	+			
53	CG*CL	4	7	-2,-6	+			+	
54	CG*CL	6	6	-2,-5	+			+	
55	CG*CL	6	6	-2	+				+
56	CG*CL	3	7	-5	+			+	
57	CG*CL	10	4	-1,-3	+	+			

58	CG*CL	10	5	0,-4	+	+			
59	CL	5	5					+	
60	CL	12	5	-4	+	+			
61	CL	6.5	5						+
62	CL	6	4	-1,-2	+				
63	CL	7.5	4	-2,-3	+	+			
64	CG*CL	7	5	-3,-4	+				
65	CG*CL	13	7	-5,-6	+				
66	CG*CL	11	6	-1,-5	+				+
67	CG*CL	5	3						
68	CG*CL	5	7	-2,-6	+	+		+	
69	CG*CL	9	6	-2,-5	+				

<sup>a</sup> CL: *C. lancifolium*; CK: *C. kanran*; CG\*CL: *C. goeringii*×*C. lancifolium*

### 제7항 난 retrotransposon subclonig

동양란에서의 retrotransposon을 cloning 하기 위해 24mer인 5'-GTI TAW YKT IGA YGA YRT IYT IRT-3'와 27mer인 5'-ICK YTC ISW YTG ICC RTC IST' YTG IGG-3'을 5' 3' primer로 각각 사용하여 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하였다(Suoniemi et al., 1998). PCR 수행 후, 증폭된 DNA를 1%의 agarose gel에 전기영동하여 증폭을 확인하였는데(Fig. 33). PCR 증폭 결과, 1.9Kb, 1.6Kb, 1.3Kb, 900bp, 250bp의 다섯가지 밴드를 확인하였고, 이중에서 1.9Kb의 밴드가 가장 뚜렷한 증폭을 보였다. 증폭된 PCR product를 TA cloning vector(Invitrogen)로 subcloning을 하였고 white colony들에 대한 insert를 colony PCR로 확인하였다. 확인 결과, 작은 단편의 DNA만 선택적으로 subcloning이 되었고, 염기서열분석 결과 이들 증폭된 DNA의 염기서열은 *Nicotiana tabacum* 의 retrotransposon인 Romani-Nt2 와 높은 homology를 나타내었다(Fig. 34). 식물에 있어서 retrotransposon의 존재 유무는 동물에 비해 최근에 밝혀졌는데(Laten et al., 1998), 모든 식물이 retrotransposon을 가지고 있으며, 또한 식물 genome의 상당한 부분이 retrotransposon sequence로 반복되어 있음이 밝혀지고 있다. 본 실험에서 동양란에서 retrotransposon을 증폭하고 subcloning을 하고자 한 목적은 식물 retrotransposon들이 동물 retrotransposon과

마찬가지로 발육상이나 스트레스 조건에서 활성화되어, 식물조직 배양 중에 체세포변이와 같은 형질변이를 일으키는 주요인으로 알려지고 있기 때문에(Hirochika et al., 1996; Grandbastien et al., 1989), 이를 이용하여 외부로부터의 유전자 도입없이 변이체를 유도하는 연구를 하기 위한 기초작업으로 수행하였다.

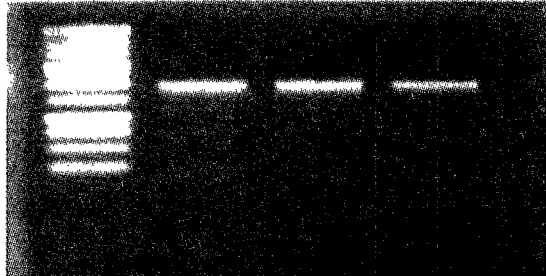


Fig. 33. Amplification of oriental cymbidium retrotransposon with degenerate *rt* (5'-GTTTAWYKIGAYGAYRTIYTIR-3') primers and in (5'-ICKYTICISWYTGICCRTCISTYTGIGG-3') primers. PCR was carried out with MJ RESEACH PTC-100.

```

1.3Kb:
IRQXDGESLKEYFQRFSSA*QXPGVDPEXXXXXXXXXXXXXXXXGYFYSSLMRETVHSYADLV 193
  Q  GESL+EY  +F+      P+                                Y  L  ++    L
O.sativa
LTQNSGESLREYVRHFNECRNTIPEITDASVIRAFKSGVRDRYTTQELATRRITTRRLF 363
192 HRIEAQISADEAISAHRQQFEPSSKRKKVPGKGDVQTSQKKKRGSN 55
  +E  A++A+  R++P+      +K P  D  SKKK  N
364 EIVEQCAHANDAL---RRKNDKPKTGGEKKPAIDTSESSKKKNRKN 406
  
```

Fig. 34. Aligment of PCR amplified *Cymbidium* retrotransposon fragment with putative gag-pol precursor from *Oryza sativa* (GeneBank accession number AAL31060.1)

### 제8항 돌연변이원 사용 변이체 생산

한란과 춘란을 재료로 돌연변이원인 MMS, EMS, colchicine을 각각 0.1, 0.2, 0.3% 의 농도로 MS 액체배지에 1주에서 5주간 shaking 하면서 근경을 처리하였다. 180일

과 210일이 경과한 후 근경들의 생존율을 조사하였고 돌연변이 가능성을 관찰하였다 (Table 19, 20, Fig. 35, 36, 37 참조). 춘란에 돌연변이원을 처리하였을 경우 농도가 낮을수록 생존율이 높게 나타났으며 처리시간에 있어서는 MMS의 경우 3주 이후부터 생존율이 감소하였고, EMS의 경우 4주처리까지는 증가를 보이다가 5주처리구에서 감소를 보였다. 돌연변이징후를 나타내는 개체수에 있어서는 생존율과 밀접한 관계를 보이는 듯 하였으며 MMS와 EMS 처리중 생존율이 가장 높은 처리구에서 가장 많은 변이개체수가 나타났다(각각 11개체와 10개체). 한란을 재료로 하여 돌연변이원을 처리한 경우에는 EMS 0.1%에서 1주처리후 생존율이 감소되었으며, MMS는 0.1% 2주 처리구 까지 증가를 보이다가 감소하였고, 0.2% 처리구에서는 생존율이 급격히 감소하였다. 콜히친 처리구에서는 다른 돌연변이원 처리보다 생존율이 높았고 처리시간에 따른 큰 차이는 없었으며 0.2%와 0.3%농도의 3주처리에서 생존율이 높았을 뿐만 아니라 돌연변이징후개체가 가장 많이 확인되었다. 육안으로 관찰한 변이의 형태는 가장 빈번하게 나타나는 유형이 황록색의 잎을 가진 서(曙)와 사피(蛇皮) 형태이었고 산반(散斑), 그리고 총생잎도 나타날 가능성이 있었으나 확실한 것은 상당한 기일이 경과되어야만 확인할 수 있을 것으로 생각되었다.

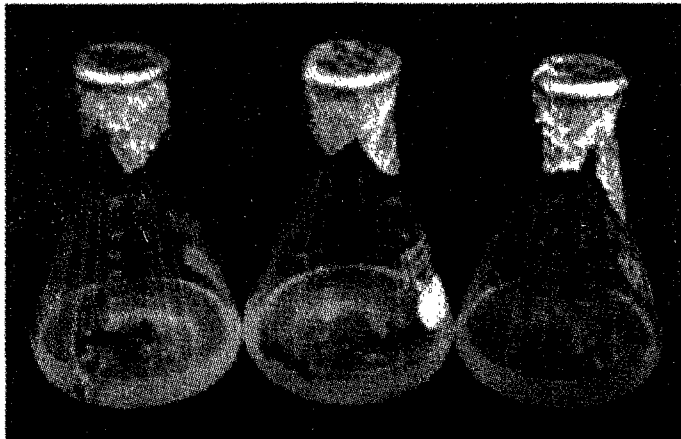


Fig. 35. *Cymbidium kanran* rhizome treated with EMS 0.1, 0.2 and 0.3% for 2weeks(90days after treatment). Leaf variegated symptom were observed in shoot.

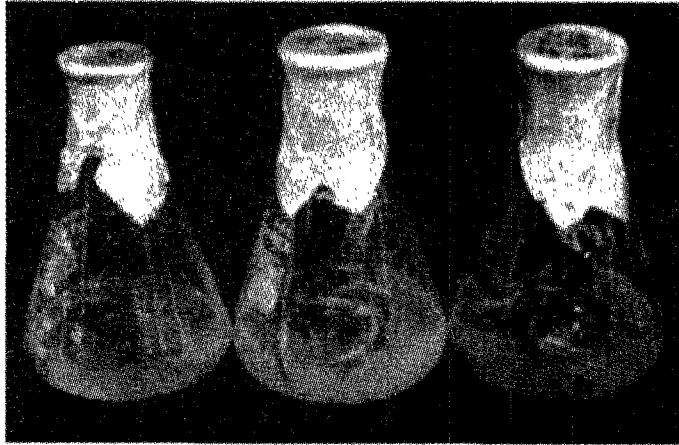


Fig. 36. *Cymbidium kanran* rhizome treated with colchicine 0.1, 0.2 and 0.3% for 3 weeks (210 days after treatment).

Variegation symptom were observed in shoot.



Fig. 37. *Cymbidium kanran* rhizome treated with colchicine 0.3% for 3 weeks (9 months after treatment).

Yellowish white color strip is observed in leaf of new shoot.

Table 19. Effect of MMS and EMS treatment on induction of leaf variegated (chimeric type) *Cymbidium goeringii*.

Conc(%)	Treatment duration				
	1week	2weeks	3weeks	4weeks	5weeks
MMS 0.1	75.0*	83.3	91.6	33.3	33.3
MMS 0.2	16.6	8.3	--	--	--
MMS 0.3	--	8.3	--	--	--
EMS 0.1	66.6	75.0	83.3	83.3	58.3
EMS 0.2	41.6	25.0	16.6	41.6	--
EMS 0.3	50.0	8.3	--	--	--

@ data were observed 180 days after inoculation with mutagen

\* survival ratio in percentage

Table 20. Effect of MMS, EMS and colchicine treatment on induction of leaf variegated (chimeric type) *Cymbidium kanran*.

Conc(%)	Treatment duration				
	1week	2weeks	3weeks	4weeks	5weeks
MMS 0.1	41.6z	25.0	8.3	25.0	25.0
MMS 0.2	--	--	--	--	--
MMS 0.3	--	--	--	--	--
EMS 0.1	66.6	83.0	75.0	--	--
EMS 0.2	33.3	8.3	8.3	--	--
EMS 0.3	--	--	--	--	--
Colchicine0.1	66.3	66.6	66.6	75.0	66.6
Colchicine0.2	50.0	58.3	91.6	75.0	--
Colchicine0.3	83.0	50.0	91.6	75.0	83.0

@ data were observed 180 days after inoculation with mutagen

\* survival ratio

이상의 실험결과를 토대로 적정농도를 확인하였으며, 적정화된 농도의 처리를 한란과 춘란의 근경에 처리하였다. 춘란의 근경에 EMS 0.01%를 2주간 처리한 것에서 각각 2개체씩의 잎부늬 변이종(서호반)을 얻었고 0.05%의 농도로 1주와 3주간 처리한 것에서도 잎부늬 변이종의 유발이 관찰되었다. 한편 MMS를 0.01%의 농도로 3주간 처리한 것에서도 1개체의 잎 부늬변이종이 유발되었다(Fig. 38). 춘란의 변이 발생율은 EMS 0.01% 와 0.05% 농도에서 그리고 MMS 0.01%을 처리하였을 때 발생율이 높았다. 한란의 경우에는 MMS 0.01%의 농도로 2주 처리한 것에서 Fig. 39과 같이 잎부늬 변이종(중투)이 유도되어 근경을 증식하여 식물체를 생산중에 있으며 콜히친 0.3%를 2주간 처리했을 때 산반부늬의 잎변이종(Fig. 40) 과 중투(Fig. 41과 Fig. 42)가 유발되었으며 EMS나 MMS의 경우, 0.01% 이상의 농도에서는 근경이 고사되었고, 콜히친은 0.2% 와 0.3%에서 잎변이 발생율이 높았다. 부늬종 한란과 춘란의 근경생육 및 신초 분화에는 NAA 및 BA를 0.1mg/L 혼용첨가하는 것이 효과적이었다. 본 실험에서 얻어진 한란과 춘란에 대한 돌연변이원 처리에 따른 생존율과 변이발생율은 Table 21과 같다.

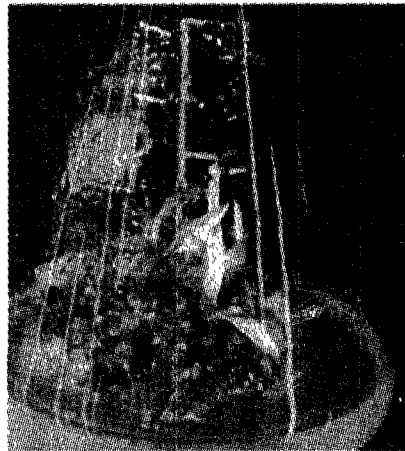


Fig. 38. Treatment of 0.01% EMS for 3 weeks on rhizome of *Cymbidium goeringii*. Yellowish white color leaf were generated from the rhizome.

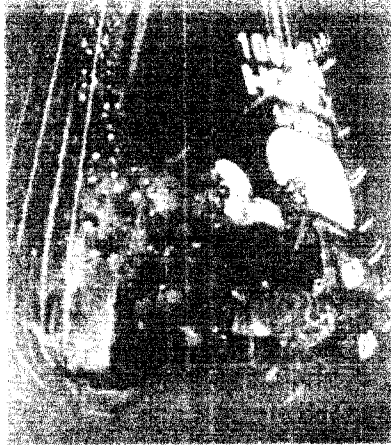


Fig. 39. Treatment of 0.01% MMS for 2 weeks in rhizome of *Cymbidium kanran*.  
rhizome. Leaf variegated shoot was generated from the rhizome.



Fig. 40. Treatment of 0.3% colchicine for 2 weeks in *Cymbidium kanran* rhizome.





Fig. 41. *Cymbidium kanran* shoot;  
non-treated plant(left) and colchicine-treated plant(right)



Fig. 42. *Cymbidium kanran* seedling;  
non-treatment(right) and colchicines treatment(left)

Tabel 21. Comparison of rhizome survival and induction rate of leaf variegated *Cymbidium goeringii* with MMS and EMS treatment.

	Conc(%)	Treatment				
		1week	2weeks	3weeks	4weeks	5weeks
EMS	0.01	80 <sup>a</sup>	80(17 <sup>b</sup> )	80		
	0.05	80(8)	90(8)	100	-	-
	0.1	-	-	40	-	-
	0.2	-	-	-	-	-
MMS	0.01	100(8)	90(8)	80(8)	-	-
	0.05	-	-	-	-	-
	0.1	-	-	-	-	-
	0.2	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> survival ratio

<sup>b</sup> induction rate of leaf variegation

Tabel 22. Effect of MMS, EMS and colchicines treatment on rhizome survival and induction rate in leaf variegated *Cymbidium goeringii*.

	Conc(%)	Treatment				
		1week	2weeks	3weeks	4weeks	5weeks
EMS	0.01	42 <sup>a</sup>	25	8.3	25	25
	0.05	-	-	-	-	-
	0.1	-	-	-	-	-
	0.2	-	-	-	-	-
MMS	0.01	66.6	83(8)	75	-	-
	0.05	33.0	8.0	8.0	-	-
	0.1	-	-	-	-	-
	0.2	-	-	-	-	-
colchicine	0.1	67	67	67(17)	75	67(8)
	0.2	50(8)	58	92(17)	75(16)	75(17)
	0.3	83	50(23)	92(33)	75	83(17)

<sup>a</sup> survival ratio

<sup>b</sup> induction rate of leaf variegation

한편, 한란의 잎변이종 중에서 복륵의 경우에는 근경의 증식율도 높을 뿐만 아니라 shoot의 분화도 잘 되었으며(Fig. 45) 기외로 꺼냈을 때 순화가 잘 되어 대량생산이 가능하였고 실제 대량생산하여 온실에서 재배중이며(Fig. 52) 이들은 유묘로부터 3년 만에 개화시킬 수 있었는데 2000년 10월에 자색의 꽃을 피웠다(Fig. 53).

<Various leaf variegated plants generated from rhizome treated with mutagen>



Fig. 43. SW K-1 *Cymbidium kanran*.  
(mediochlorinata)



Fig. 44. SW K-2 *Cymbidium kanran*.  
(albomaculata)



Fig. 45. SW K-3 *Cymbidium kanran*.  
(aureomarginata)



Fig. 46. SW K-4 *Cymbidium kanran*.  
(white color mediochlorinata)

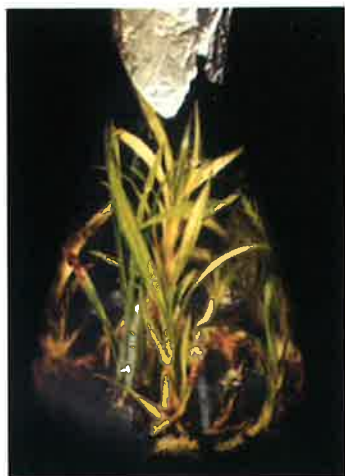


Fig. 47. SW K-5 *Cymbidium kanran*.  
(mediochlorinata with aureostriata)



Fig. 48. SW K-6 *Cymbidium kanran*.  
(aureochlorinata with striata)



Fig. 49. SW G-1 *Cymbidium goeringii*.  
(aureomaculata)



Fig. 50. SW G-2 *Cymbidium goeringii*.  
(aureostriata on shoot tip)



Fig. 51. SW G-3 *Cymbidium goeringii* (striata with albomaculata).



Fig. 52. Potted seedlings of leaf variegated(aureomarginata) *C. kanran* originated from mutagen treated rhizome.

Fig. 53. 3year old plant of potted *C. kanran* (aureomarginata). The plant was bloomed on Oct. 2000.

Table 23. Leaf variegates produced from mutagen treatment.

Abbreviation	Variiegated type	Morphological characteristics of mutagen
SW K-1	<i>Cymbidium kanran</i> (mediochlorinata) 한란 중투(巾透)	잎의 안쪽은 완전한 황록색이고 외곽에 진한 녹색의 선이 가늘게 둘러져 있음. 근경은 황록색
SW K-2	<i>Cymbidium kanran</i> (albomaculata) 한란 서(曙)	잎이 황록색인데 특히 새잎이 출현할 때는 순황색이었다가 잎이 전개되면서 녹색이 진하게 들어감. 포의가 적갈색
SW K-3	<i>Cymbidium kanran</i> (marginata) 한란 복륜(覆輪)	잎의 바탕색은 녹색이며 외곽으로 백색의 선이 둘러져 있음. 근경은 녹색
SW K-4	<i>Cymbidium kanran</i> (albomarginata) 한란 백중투(白巾透)	잎의 바탕색은 백색이며 외곽에 녹색의 선이 가늘게 둘러져 있는데 잎의 자세는 약간 꼬임. 신초가 나올 때 포의가 붉은색
SW K-5	<i>Cymbidium kanran</i> (mediochlorinata with aureostriata) 한란 중투호(巾透縞)	잎은 황록색 바탕에 진한 녹색의 가는 선이 외부와 내부에 있음. 근경은 황록색
SW K-6	<i>Cymbidium kanran</i> (aureochlorinata with striata) 한란 호복륜(縞覆輪)	잎은 녹색 바탕에 잎가장자리에 황백색의 굵은선이 있으며 안쪽에도 황백색의 선이 있음
SW G-1	<i>Cymbidium goeringii</i> (aureomaculata) 춘란 서(曙)	잎은 황록색이며 폭이 약간 가는 편이다. 근경도 황록색
SW G-2	<i>Cymbidium goeringii</i> (aureostriata on tip) 춘란 잎끝무늬(爪)	잎은 황록색바탕에 전체 길이의 1/3부분까지 유백색이며 잎이 가늘고 포의(苞衣)가 황백색
SW G-3	<i>Cymbidium goeringii</i> (striata with albomaculata) 춘란 산반호(散班縞)	잎이 짧고 녹색바탕에 산반(散斑)과 줄무늬(縞)가 있음. 근경은 황록색

## 제 4 장 인용 문헌

Amar Kumar. 1998. The evolution of plant retroviruses: moving to green pastures. *Trends in Plant Science* 3(10):371-374.

Anderson, N. L., and Anderson, N. G. 1979. Microheterogeneity of serun transferring, haptoglobin, and a  $\mu$ HS glycoprotein examined by high resolution two-dimensional electrophoresis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 88:258.

백기엽, 안성용, 심결보. 1990. 동양란의 개발과 미세번식 체계확립 II. 배양한 rhizome의 polyphenol 함량, 기관형성의 조직학적 관찰 및 동위원소의 검정. *한국원예학회지* 31:263-275.

백기엽, 심결보, 김정주, 1989. 동양란의 개발과 미세번식 체계확립 I. 동양란 종자의 무균발아와 배지 및 성장조절제가 기관 형성에 미치는 영향. *한국원예학회지* 30:234-247.

Becker, J., Vos, P., Kuiper, M., Salamini, F., and Heun, M. 1995. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Molecular and General Genetics* 249: 65.

Beridze, T. 1986. *Satellite DNA*(trns.). Springer-Verlag, Berlin.

Belarmini M.M. et al. 2000. Agrobacterium-mediated genetic transformation of a phalaenopsis orchid. *Plant Cell Reports* 19:435-442.

Bennetzen, J.L. 1996. The contribution of retroelements to plant genome organization, function and evolution. *Trends Microbiol.* 4:347-353.

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

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

Chaparro, J.X., D.J. Werner, D.O. Malley, and R.R. Sederoff. 1994. Targeted mapping and linkage analysis of morphological, isozyme, and RAPD markers in

peach. Theor. Appl. Genet. 87:805-815.

曹章煥. 1995. 植物育種學. p.84-86, 121-122. 선진문화사, 서울.

최수옥, 정재동. 1993. 온대계 *Cymbidium* 속의 종자 무균배양. 한국화훼연구회지 2:79-84.

D'Ovidio, R., O.A. Tanzarell, and E. Porceddu. 1990. Rapid and efficient detection of genetic polymorphism in wheat through amplification by polymerase chain reaction. Plant Mol. Biol. 15:169-171.

Dedryver, F., M.F. Jubier, J. Thouvenin, and H. Goyeau. 1996. Molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr24* in different wheat cultivars. Genome 39:830-835.

Dressler R.L. 1981. The orchids: natural history and classification. p. 201-266. Harvard University Press, Cambridge, Mass.

Dweikat, I., S. Mackenzie, M. Levy, and H. Ohm. 1993. Pedigree assessment using RAPD-DGGE in cereal crop species. Theor. Appl. Genet. 85:497-505.

Eickbush, T.H. Origin and evolutionary relationships of retroelements, in the evolutionary biology of viruses (Morse, S.S., ed.). p. 121-157. Raven Press, New York.

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

Grandbastien, M A. et al. 1997. The expression of the tobacco *Tnt1* retrotransposon is linked to the plant defense responses. Genetica 100:241-252.

Hirochika, H. et al. 1996. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. Proc. Natl. Acad. Sci. 93:7783-7788.

Hirochika, H. 1997. Retrotransposons of rice: their regulation and use for genome



analysis. Plant Mol. Biol. 35:231-240

홍경애, 소인섭, 이옥영, 정충덕, 류기중, 유장걸. 1996. DNA 입자총에 의한 *Cymbidium*속 난의 형질전환 조건 검토. 한국농화학회지 39:260-264.

김갑중, 경윤정, 박천호, 광병화. 1997. 춘란과 기타 *Cymbidium* 교잡종의 종자발아. (in press)

김미애, 경윤정, 박천호, 광병화. 1997. *Cymbidium*속 서양란과 건란 및 이들 교잡종의 유묘생육 차이에 관하여. (in press)

Knapp J. E. et al. 2000. Transformation of three genera of orchid using the *bar* gene as a selectable marker. Plant Cell Reports 19:893-898.

Lee J. H. et al. 2000. Flow cytometric analysis and chromosome sorting of barley(*Hordeum vulgare* L.). Mol. Cell 10(6):619-625.

Konieczny, A. and F.M. Ausubel. 1993. A procedure for mapping Arabidopsis mutation using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. The Plant Journal 4:403-410.

Kuehnle, A.R. and N. Sugii. 1992. Transformation of Dendrobium orchid using particle bombardment of protocorms. Plant Cell Reports 11:44-488.

Kumar. A. et al. 1997. The *Tyl-copia* group of retrotransposons in plants: genomic organisation, evolution and use as molecular markers. Genetica 100:205-217.

경윤정, 박천호, 광병화. 1997. 심비디움속 동양란 종간 교잡종의 유묘생육에 나타나는 잡종강세 현상에 관하여. (in press)

Lluís Balcells et al. 1994. A heat-shock promoter fusion to the *Ac* transposase gene drives inducible transposition of a *Ds* element during *Arabidopsis* embryo development. The Plant Journal 5(5):755-764.

Marie-Angele G. et al. 1998. Activation of plant retrotransposons under stress condition, trends in plant science. 3(5):181-187.

Mhiri, C. et al. 1997. The promoter of the tobacco Tnt1 retrotransposon is induced

by wounding and by abiotic stress. *Plant Mol. Biol.* 33:257-266.

Miller-Neumann, M., J.I.Yoder, P. Starlinger. 1984. The DNA sequence of transposable element *Ac* of *Zea mays* L. *Mol. Gen. Genet.* 198:19-24.

Natha J. Shackelford and Caryl A. Chlan. 1996. Identification of antibiotics that are effective in elimination *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology Reporter* 14(1):50-57.

新美善行, 赤座千子, 山本眞希, 早田保義. 1995. フウランのカルスを利用した増殖と植物體再生. *일본원예학잡지* 발표요지 64:594-595.

난의 산업현황, 발전방향, 이용. 1994. 난연구회.

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

Park Myung-joo, et al. 1998. Effect of medium composition on *Phalaenopsis* micropropagation using lateral buds from flower stalks. *Kor. J. Hort. Sci & Tech.* 16(1):42-44.

Pritchard, H.W. and F.G. Prendergast. 1982. Factors influencing the germination and stroage characteristics of orchid pollen. p. 1-16. In: Prichard, H.W. *Modern methods in orchid conservation*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

Rowland, L.J. and A. Levi. 1994. RAPD-based genetic linkage map of blueberry derived from a cross between diploid species (*Vaccinium darrowi* and *V. elliottii*). *Theor. Appl. Genet.* 87:863-868.

Schoffl, F., M. Rieping, G. Baumann, M. Bevan, and S. Angerm ller. 1989. The function of plant heat shock promoter elements in the regulated expression of chimaeric genes in transgenic tobacco. *Mol. Gen. Genet.* 217:246-253.

Seth, C.J. and P.J. Cribb. 1984. A reassessment of the sectional limits in the genus *Cymbidium* Swartz. In: Arditti, J.(ed). *Orchid biology: reviews and perspectives*, III. p. 283-322. *Cornel Univ. Press*, Ithaca.

Sheng J. S. and Vitaly Citovsky V. 1996. *Agrobacterium*-plant cell DNA transpot :

Have virulence proteins, will travel. *The plant cell* 8:1699–1710.

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

Takeda, S. et al. 1998. Transcriptional activation of the tobacco retrotransposon *Tto1* by wounding and methyljasmonate. *Plant Mol. Biol.* 36:365–376.

Tanaka, R. and H. Kamenoto. 1974. List of chromosome numbers in species of the Orchidaceae. In: Withner, C.L.(ed.). *The orchids*. p. 411–483. John & Sons, new York.

Tao, T., J.M. Manners, M.M. Ludlow, and R.G. Henzel. 1993. DNA polymorphisms in grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Theor. Appl. Genet.* 86:679–688.

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

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

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

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

Yang J. et al. 1999. Genetic transformation of *Cymbidium* orchid by particle bombardment, *Plant Cell Reports* 18:978–984.

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

## 부 록

### 1. 기술교육(13회)

년 도	일 시	교육장소 및 대상
1998	4. 24	전남 함평 농촌지도소 - 춘란의 번식
1998	5. 30	국방대학원 최고경영자과정(17기) - 동양란 재배와 번식
1998	6. 24	농협대학 농업 최고경영자과정 - 난의 조직배양
1998	9. 11	경상대학교 농과대학 최고농업경영자과정 - 난재배와 대량생산기술
1998	11.10	서울대학교 농생대 최고농업경영자과정
1999	6. 30	국방대학교 최고경영자과정(18기)
1999	11. 5	서울대학교 농생대 최고농업경영자과정
2000	5. 1	국방대학교 최고경영자과정(19기)
2000	10. 24	서울대학교 농생대 최고농업경영자과정 - 난재배기술
2001	5. 1	국방대학교 최고경영자과정(20기)
2001	5. 18	강릉대학교 최고농업경영자과정
2001	10. 30	서울대학교 최고농업경영자과정
2001	11. 13	대한민국 한란전시회 세미나 주제강의(전남광주)

### 2. 기술이전(1건)

년 도	일 시	명 칭	생산자
2001	1월	제주한란 복륜중투 배양기술 이전	'난촌'대표 고철민

### 3. 홍보(1건)

년도	방영일시	방영제목 및 프로그램	방영 방송국
2001	11. 16	무늬종 한란의 상업화 KBS 아침뉴스	KBS

4. 논문발표 내역(10건)

발표 년도	계제논문 제목	발표자	계제 잡지명
1998	온대산 심비디움속 종간 교잡종 유묘의 Fusarium 저항성	경윤정 외 3명	한국원예학회지 39(2):207-212
1998	죽백란×춘란의 기내배양시 배지조건과 생장조절물질의 영향	이종석 외 2명	한국원예학회 춘계학술대회, 16(1)
1998	한란의 급속증식을 위한 생장조절물질과 항산화제 처리효과	최지용 외 3명	한국원예학회 춘계학술대회, 16(1)
1998	줄무늬 변이종 비아란의 분화에 미치는 배지 조건 및 생장조절물질의 영향	이종석 외 2명	한국원예학회 추계학술대회, 16(3)
1999	RAPD, SCAR marker를 이용한 심비디움속 양란의 유연관계 분석	경윤정 외 4명	한국원예학회 추계학술대회, 17(5)
2000	복분 한란의 대량번식을 위한 배지 및 생장조절물질의 영향	이종석 외 2명	한국원예학회 춘계학술대회, 18(2)
2000	아그로박테리움을 이용한 동양란 형질전환	김혜정 외 5명	한국원예학회 춘계학술대회, 18(2)
2001	Genetic transformation of oriental cymbidium by a modified <i>Agrobacterium</i> infection method	정영수 외 3명 (포스터 발표)	2001 일본생리학회 후쿠오카, vol 42(s126) 2001년3월23-26
2001	보춘화 잎변이종(사피)의 기내분화 및 생육에 미치는 생장조절물질의 영향	이종석 외 1명	한국원예학회 추계학술대회, 19(별호II)
2001	아그로박테리움과 유전자총을 이용한 동양란의 형질전환	정영수 외 5명(구두발표)	한국원예학회 추계학술대회, 19(별호II)

5. 석사학위(2건)

발표년도	논문제목	발표자	수여대학
1999	잎무늬종 비아난의 식물체 분화에 미치는 생장조절물질의 영향	김두연	서울여자대학교
2001	형질전환과 화학처리가 동양란 변이체 생산에 미치는 영향	김혜정	동아대학교