

장기간 기내 배양한 춘란(*Cymbidium goeringii* Lindley) 및 한란(*Cymbidium kanran* Makino)의 변이 비교

류재혁, 이효연¹, 배창휴*

순천대학교 웰빙자원학과, ¹제주대학교 생명공학부

Variation Analysis of Long-term *in vitro* Cultured *Cymbidium goeringii* Lindley and *Cymbidium kanran* Makino

Jaihyunk Ryu, Hyo-Yeon Lee¹ and Chang-Hyu Bae*

Department of Bioresources Science, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

¹Faculty of Biotechnology, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Abstract - RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis was examined to detect variation of *in vitro* cultured 30 rhizomes of *Cymbidium goeringii* Lindley and *Cymbidium kanran* Makino, with long-term (8 years) subculture, respectively. Out of 151 DNA bands detected, the 40 were polymorphic with a polymorphic rate 26.4% in the *C. goeringii*. Out of 155 DNA bands detected, the 56 were polymorphic with a polymorphic rate 36.1% in the *C. kanran*. Genetic similarity matrix (GSM) shows from 0.825 to 1.00 with an average of 0.944 in the rhizomes of *C. goeringii* and 0.812 to 1.00 with an average of 0.913 in the *C. kanran*. According to the clustering analysis, *C. goeringii* was divided into 1 group and 2 independent individuals and its structure of clustering was simple than that of *C. kanran*. The higher polymorphism and the decreased GSM were showed in the long-term *in vitro* cultured *C. goeringii* and *C. kanran* supplemented with growth regulators. The results provide as fundamental data to develop a new materials for plant breeding and resources plant.

Key words - *C. goeringii* Lindley, *C. kanran* Makino, RAPD, Genetic similarity matrix, Somaclonal variation

서 언

식물학상 단자엽식물 중 가장 진화된 식물인 난과 (Orchidaceae) 식물은 전 세계적으로 800속, 20,000~25,000 종으로 분화되어 있으며(Arditti, 1992), 우리나라에는 29속 92종 11변종이 있다(Chung *et al.*, 1985). 편의상 난은 동양란과 서양란으로 나누며, 동양란은 한국, 일본, 중국 등의 온대지방에서 자라는 *Cymbidium* 식물을 일컫는데 우리나라에는 춘란, 한란을 비롯하여 소란, 죽백란, 대홍란 등이 있다(Kim and Lee 1992; Lee and Kwack, 1985). 난은 대부분 타식성 식물이기 때문에 유전인자의 조성이 heterozygous한 형태이며, 이종속간에도 교잡이 잘 되기 때문에 유전인자가 매우 다양한 식물이다(Garay and Sweet, 1974; Harn, 1973).

식물의 기내배양은 체세포분열을 통한 식물체의 재분화로 동질성을 지닌 클론을 대량으로 얻을 수 있다는 이점을 가지고 있으나 기내배양 과정 중 유전적 변이가 일어남으로써 종종 원치 않는 방향으로 재분화식물체의 증식이 이루어진다(Karp, 1991; Scowcroft *et al.*, 1987; Larkin and Scowcroft, 1981). 조직배양에서 나타나는 유전적 변이인 체세포변이(somaclonal variation)는 표현형 수준에서 뿐만 아니라 염색체의 수적·구조적 수준에서도 변이가 이루어지며(Bang *et al.*, 1994; Evans, 1989), 염색체 및 유전자 수준에서 이 체세포 변이에 대한 연구가 이루어지고 있다(Martins *et al.*, 2004; Goto *et al.*, 1998; Brown, 1989; Peschke *et al.*, 1987; Zheng *et al.*, 1987). 이러한 변이가 발생하는 주요 원인으로는 배지에 첨가하는 생장 조절물질(Zhou, 1995)과 장기간 계대배양(Martins *et al.*, 2004; Goto *et al.*, 1998) 등을 들 수 있다.

*교신저자(E-mail) : chbae@sunchon.ac.kr

장기간 기내 배양한 식물체의 변이성에 관한 연구로 4년 이상 배양된 *Prunus dulcis*의 RAPD 및 ISSR 분석(Martins *et al.*, 2004), 4년간 배양된 *Malus pumila*의 RAPD 분석(Modgil *et al.*, 2005), 10년 이상 배양된 *Pinus thunbergii*의 RAPD 분석(Goto *et al.*, 1998) 등으로 기내 배양시 장기간 배양과 첨가되는 생장조절물질의 종류에 따라 변이성에 차이가 있음을 보고하고 있다.

지금까지 기내 배양한 난과식물에서 RAPD 방법을 이용하여 생장점과 캘러스에서 유도된 *Cymbidium*의 변이성(Silva *et al.*, 2006), *Dendrobium*의 유전적 안정성(De Melo Ferreira *et al.*, 2006), 경성란의 유전적 안정성(Kishor and Devi, 2009) 등에 대하여 연구 되었다. 또한 자가수정한 한국자생 춘란 후대의 표현형 및 유전적 다양성 분석(Kim, 2004), 자생춘란 및 *Cymbidium* 품종 간 계통구명을 위한 연구(Choi *et al.*, 1998), *Paphiopedilum* 및 *Phragmipedium*의 종·속간 분자적 유연관계분석(Chung, 2003) 등 주로 난의 계통분류학적 측면의 연구들이 진행된 바 있다. 그러나 RAPD 방법을 이용하여 기내 배양된 *Cymbidium* 식물속의 변이성 분석에 관한 국내 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 실험에서는 *Cymbidium*속 식물의 종간 관계인 춘란과 한란의 근경을 기내에서 장기간 배양할 때 발생할 수 있는 변이성을 RAPD 수준에서 탐색함으로써 기내배양 중 발생하는 변이빈도를 구명하고, 기내 배양계를 이용한 돌연변이 연구의 기초자료를 작성하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

식물재료

식물 재료로는 *Cymbidium*속 춘란(*Cymbidium goeringii* Lindley)과 한란(*Cymbidium kanran* Makino) 2종류를 공시하였다. 난의 근경을 유도하기 위하여 춘란과 한란의 종자를 무균으로 발아시켜서 유도된 근경이 5 cm 정도 크기로 자랐을 때 2~3 cm 길이로 분리하여 MS배지(Murashige and Skoog, 1962)에 NAA 2.0 mg/L, kinetin 0.5 mg/L를 첨가하고 멸균 전 pH 5.6으로 적정한 근경증식용 배지에 배양하였다(Lee *et al.*, 1998). 증식된 근경은 MS배지에 malt extract 4 g/L, potato starch 3.5 g/L, active carbon 0.2 g/L, NAA 1.0 mg/L, BA 0.1 mg/L를 첨가하고, 멸균 전 pH 5.8로 적정한 배지를 이용하여 8주 간격으로 8년간

계대배양을 실시하여 4~5 cm 길이의 춘란과 한란 근경 각 30개체를 DNA 추출에 이용하였다. 배양조건은 25 ± 2°C로 유지되는 배양실에서 20 mol·m⁻²·sec⁻¹ 광도로 16시간/일 조명하면서 배양하였다.

DNA 추출

DNA 추출은 CTAB법(Fang *et al.*, 1992)으로 실시하였다. 추출된 DNA는 0.8% agarose gel에서 전기 영동하여 밴드를 확인하였고, Nanodrop Spectrophotometer(Thermo Fisher Scientific, Netherlands)를 이용하여 DNA농도를 측정하였다.

RAPD 분석

기내에서 장기간 배양한 춘란과 한란 근경의 변이성 분석을 위해 Bae 등(2003)의 결과에서 12개 primer와 예비 실험 결과 재현성과 다형성이 우수한 13개 primer를 추가로 선별하여 총 25개의 random primer(Operon Technologies, USA)를 사용하였다(Table 1). PCR을 위한 반응액은 주형 DNA 25 ng, primer 10 pmol, *Taq* polymerase 1 unit(Intron), dNTP(dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 0.2 mM, 10xPCR buffer [100 mM Tris-HCl(pH 8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂]를 총 25 µl로 하여 혼합하였다. PCR 조건은 Genamp PCR System 2700(Applied Biosystems, UK)을 이용하여 94°C에서 4분간 초기 변성시킨 후 94°C에서 1분, 37°C에서 1분, 72°C에서 2분을 40회 반복한 후 최종적으로 72°C에서 7분간 반응시킨 후 반응을 종료하였다. PCR한 증폭산물 12 µl를 1.5% agarose gel에 loading하여 전기영동(50V, 60분)한 후 EtBr 염색하고, Gel Doc XR(Bio-rad, USA)에서 주요 밴드를 확인하였다. 실험의 재현성을 위해 2회 반복 실험하여 증폭된 DNA 단편을 자료로 취하였다.

Data 분석

RAPD로 분석된 DNA 밴드 양상은 이진수를 이용하여 밴드가 있으면 (1), 없으면 (0)으로 data를 표시하여 통계 프로그램에 입력하였다. 분석에 이용된 통계프로그램은 SPSS V.12(SPSS Inc., USA)로서 단순일치계수(simple-matching coefficient)로 유전적 유사도지수를 산출하였고, 군집분석은 평균연결법(Average linkage method)으로 실시하였다.

Table 1. Primers sequence, number of total amplified bands and number of polymorphic bands in the RAPD analysis of *Cymbidium goeringii* Lindley

Primer	Sequence	G+C (%)	No. of total bands	No. of polymorphism bands	Polymorphism rate(%)
OPA-01	CAGGCCCTTC	70	6	0	0.0
OPA-18	AGGTGACCGT	60	6	0	0.0
OPB-05	TGCGCCCTTC	70	5	0	0.0
OPB-06	TGCTCTGCCC	70	6	0	0.0
OPB-11	GTAGACCCGT	60	5	2	40.0
OPB-12	CCTTGACGCA	60	7	2	28.5
OPB-14	TCCGCTCTGG	70	8	4	50.0
OPB-16	TTTGCCCGGA	60	5	0	0.0
OPC-05	GATGACCGCC	70	8	1	12.5
OPC-10	TGTCTGGGTG	60	6	4	66.6
OPC-15	GACGGATCAG	60	6	3	50.0
OPC-16	CACACTCCAG	60	6	4	66.6
OPD-03	GTCGCCGTCA	70	8	4	50.0
OPD-07	TTGGCACGGG	70	8	2	25.0
OPD-08	GTGTGCCCCA	70	5	2	40.0
OPD-10	GGTCTACACC	60	3	1	33.3
OPD-11	AGCGCCATTG	60	6	0	0.0
OPD-12	CACCGTATCC	60	4	3	75.0
OPD-13	GGGGTGACGA	70	7	1	14.2
OPD-18	GAGAGCCAAC	60	6	1	16.6
OPE-03	CCAGATGCAC	60	8	0	0.0
OPE-07	AGATGCAGCC	60	3	1	33.3
OPE-15	ACGCACAACC	60	6	0	0.0
OPG-14	GGATGAGACC	60	8	4	50.0
OPG-18	GGCTCATGTG	60	5	1	20.0
Total			146	39	26.4

결과 및 고찰

RAPD에 의한 밴드 양상

장기간 기내 배양한 배양체의 유전적 안정성을 검토하고자 25개의 primer를 이용하여 춘란과 한란의 근경에 대한 RAPD 분석을 수행한 결과는 다음과 같다.

춘란의 경우 총 151개의 RAPD 절편이 증폭되었고 그 중 40개가 다형성 밴드로 26.4%의 다형성을 보였다(Table 1). 각 primer 별 증폭된 DNA 절편의 수는 최소 3개(OPD-10, OPE-07)에서 최대 8개(OPB-14, OPC-05, OPD-03, OPD-07, OPE-03)로 한 primer 당 평균 밴드수는 6.04개

였다. 다형성 밴드의 수는 1개(OPC-05, OPD-10, OPD-13, OPD-18, OPE-07, OPG-18)에서 최대 4개(OPB-14, OPC-10, OPC-16, OPD-03, OPG-14)로 primer 당 평균 1.6개의 다형성 밴드가 검출되었다. 그러나 7개 primer(OPA-01, OPA-18, OPB-06, OPB-16, OPD-11, OPE-03, OPE-15)에서는 모두 같은 밴드 패턴을 가졌다(Table 1). 춘란의 개체 특이적 증폭 산물로서 3개 primer(OPB-14, OPC-10, OPC-16)에서 4개체의 시료(No. 8, 10, 15, 26)에 대하여 4개의 개체 특이적 RAPD 절편이 검출되었다(Fig. 1). 그리고 검출된 밴드는 200~1100 bp 범위에 분포하였다.

한란은 증폭된 총 155개의 밴드 중 56개의 다형성 밴드

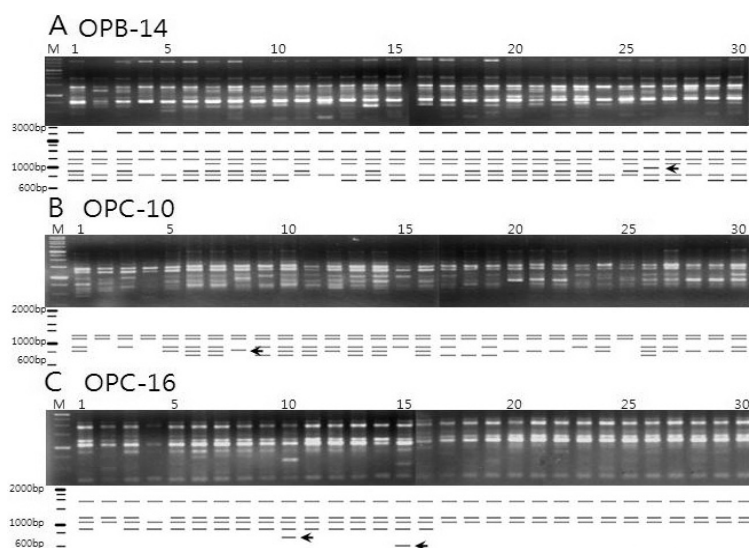


Fig. 1. Diagram of RAPD electrophoresis photograph for 30 individuals of long-term *in vitro* cultured *Cymbidium goeringii*. Amplification products were separated on 1.5% agarose gels in 1xTAE buffer and photographed using gel documentation system (Bio-rad, USA). Primer names are included in Table 1. Arrows indicate a specific band of individuals.

Table 2. Primers sequence, number of total amplified bands and number of polymorphic bands in the RAPD analysis of *Cymbidium kanran* Makino

Primer	Sequence	G+C(%)	No. of total bands	No. of polymorphism bands	Polymorphism rate(%)
OPA-01	CAGGCCCTTC	70	6	1	16.6
OPA-18	AGGTGACCGT	60	8	3	37.5
OPB-05	TGCGCCCTTC	70	6	4	66.6
OPB-06	TGCTCTGCCC	70	6	2	33.3
OPB-11	GTAGACCCGT	60	4	1	25.0
OPB-12	CCTTGACGCA	60	8	3	37.5
OPB-14	TCCGCTCTGG	70	7	5	71.4
OPB-16	TTTGCCCGGA	60	5	1	20.0
OPC-05	GATGACCGCC	70	8	2	25.0
OPC-10	TGTCTGGGTG	60	8	3	37.5
OPC-15	GACGGATCAG	60	12	11	91.6
OPC-16	CACACTCCAG	60	6	4	66.6
OPD-03	GTCGCCGTC	70	3	0	0.0
OPD-07	TTGGCACGGG	70	8	7	87.5
OPD-08	GTGTGCCCCA	70	5	0	0.0
OPD-10	GGTCTACACC	60	3	0	0.0
OPD-11	AGCGCCATTG	60	8	5	62.5
OPD-12	CACCGTATCC	60	5	0	0.0
OPD-13	GGGGTGACGA	70	6	0	0.0
OPD-18	GAGAGCCAAC	60	6	1	16.6
OPE-03	CCAGATGCAC	60	7	0	0.0
OPE-07	AGATGCAGCC	60	3	0	0.0
OPE-15	ACGCACAACC	60	5	0	0.0
OPG-14	GGATGAGACC	60	7	3	42.8
OPG-18	GGCTCATGTG	60	5	1	20.0
Total			150	53	36.1

가 검출되어 36.1%의 다형성을 나타내었다(Table 2). 각 primer 별 총 밴드 수는 최저 3개(OPD-03, OPD-10, OPE-07)에서 최고 12개(OPC-15)로 한 primer 당 평균 밴드수는 6.2개로 나타났다. 8개 primer(OPD-03, OPD-08, OPD-10, OPD-12, OPD-13, OPE-03, OPE-07, OPE-15)에서는 모두 같은 밴드 패턴을 나타내었고, 각 primer 당 다형성 밴드의 수는 1개(OPA-01, OPB-11, OPD-18, OPG-18)에서 최대 11개(OPC-15)로 평균 2.24개의 다형성 밴드가

관찰되었다(Table 2). 한란의 개체 특이적 증폭 산물로 5개(OPB-14, OPB-16, OPC-15, OPC-16, OPD-07) primer에서 5개체의 시료(No. 3, 5, 8, 10, 15)에 대하여 8개의 특이적인 밴드가 관찰되었으며 7개의 개체특이적 밴드를 제시하였다(Fig. 2). 검출된 밴드는 300~1300 bp 범위였다.

이와 같이 춘란과 한란 간에는 증폭 DNA 절편수와 다형성 DNA 절편수가 다르게 나타났으며, 이 결과는 종간 차이가 있음을 시사하고 있으나 기내 배양시 변이율은 배양

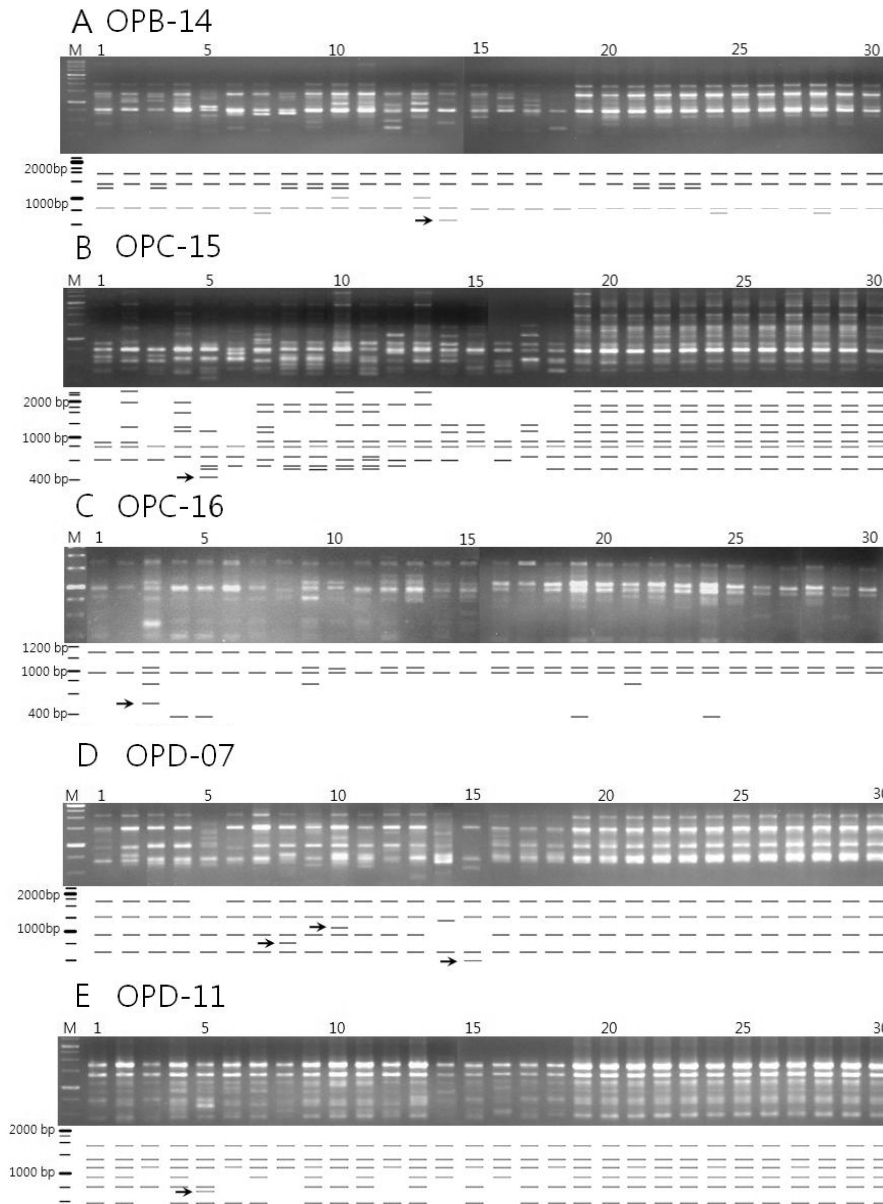


Fig. 2. Diagram of RAPD electrophoresis photograph for 30 individuals of long-term *in vitro* cultured *Cymbidium kanran*. Amplification products were separated on 1.5% agarose gels in 1xTAE buffer and photographed using gel documentation system (Bio-rad, USA). Primer names are included in Table 2. Arrows indicate a specific band of individuals.

시료간의 균일성, 첨가되는 성장조절물질, 배양기간 등 다양한 인자의 영향을 받으므로(Zhou, 1995; DeVerno *et al.*, 1999; Modgil *et al.*, 2005) 좀 더 검토가 필요한 부분이다.

춘란과 한란에서 각각 나타난 26.4%, 36.1%의 다형성은 De Melo Ferreira 등(2006)이 90일 간격으로 6회 계대 배양한 경성란의 잎을 RAPD 분석한 결과 및 Silva 등(2006)이 기내 배양된 *Cymbidium*의 캘러스와 성장점의 RAPD 분석에서 모두 같은 밴드 패턴을 나타낸 결과 보다 높은 다형성을 나타낸 결과이다. 또한 장기간 기내 배양된 사과 10개체간 RAPD 분석한 결과에서 나타난 23.3%의 다형성 (Modgil *et al.*, 2005)과 유사한 결과이다. 춘란과 한란 모두 *Cymbidium* 원종 계통의 RAPD 분석결과 다형성이 99%인 점(Choi, 2001)과 *Cymbidium* 품종간 RAPD 절편의 다형성이 78%인 결과(Obara and Kako, 1998) 보다 낮게 나타난 결과이다. 특히 자가 수분하여 획득한 종자에서 유래한 한국춘란의 유묘 46개체 분석에서 나타난 다형성인 97.8% (Kim, 2004) 보다 본 실험에서 RAPD 절편 다형성이 낮게 나타난 것으로 보아 본 연구의 장기간 기내 배양하는 동안 유도되는 변이빈도는 교배종간 및 계통 간에 존재하는 변이빈도에는 이르지 못한다는 것을 알 수 있다.

그 밖에 RAPD 분석으로 *Cymbidium*(Park *et al.*, 2005; So *et al.*, 1998), 호접란(*Phalaenopsis*) 기내배양 개체에서도 체세포변이에 관련된 RAPD 마커를 선발하였다(Na *et al.*, 2007). 따라서 본 연구에서 개체 특이적 밴드를 나타낸 primer는 춘란과 한란의 기내배양 개체에서 변이 관련 마커로 활용될 수 있으므로 변이성 특이 마커의 개발이 기대된다.

유전적 유사도 지수와 군집분석

기내에서 장기간 배양된 근경의 변이 정도를 RAPD 수준에서 파악하여 육종적 측면에서 활용하고자 유전적 유사도 지수를 산출하고 군집분석을 실시하여 개체군간, 그리고 품종간 변이 정도를 비교 하였다.

RAPD에서 획득한 DNA 밴드 자료를 토대로 단순일치 계수(Simple-matching coefficient)를 사용하여 유전적 유사도 지수를 분석한 결과, 춘란 30개체 간의 유전적 유사도 지수는 최저 0.868(No. 4번과 30번 사이)에서 최대 0.987(No. 1번과 7번, 5번과 6번 사이)사이로 춘란 30개체의 유전적 유사도 평균은 0.931이었다(Table 3). 한란에서 30개체간 유전적 유사도 지수는 최저 0.812(No. 14번~28번 사이)

였고, 29번과 30번 개체 사이의 유전적 유사도가 1.00으로 유전적 다형성은 나타나지 않았다. 한란 30개체 간의 유전적 유사도 평균은 0.913으로서 춘란보다 낮게 나타났으며 넓은 범위의 유전적 유사도를 나타낸 결과이다(Table 4). 이러한 결과는 Kim(2004)이 자가수분하여 얻은 종자에서 발아시킨 한국춘란 유묘 46개체에 대한 RAPD 분석 결과로 얻은 유전적 유사도지수(최저 0.634에서 최대 0.843)와 Park 등(2005)이 밝힌 *Cymbidium* 5종과 14품종의 유전적 유사도 지수(최저 0.114, 최고 0.634) 보다 높은 유전적 유사도를 나타낸 것이다. 또한, Modgil 등(2005)이 4년간 계대배양한 *Malus pumila* 10개체 간에서 나타난 유전적 유사도 지수(최저 0.840, 최고 0.980)와 비슷하거나 약간 높은 수준이다.

평균연결법(Average Linkage Method)으로 군집분석을 실시하여 개체를 분류한 결과(Fig. 3, Fig. 4), 유전적 유사도 지수 0.900에서 춘란은 1개 그룹과 독립적으로 존

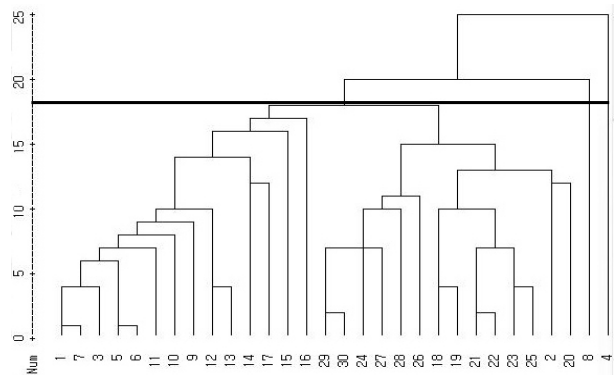


Fig. 3. UPGMA phenogram of 30 individuals of long-term *in vitro* cultured *Cymbidium goeringii* LINDLEY.

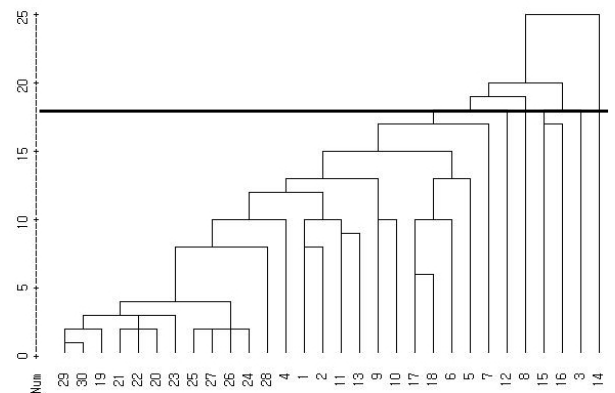


Fig. 4. UPGMA phenogram of 30 individuals of long-term *in vitro* cultured *Cymbidium kanran* MAKINO.

재하는 2개체(4번, 8번 개체)가 나누어졌으며, 군집된 개체들의 유전적 유사도는 0.919~0.987이었다(Fig. 3). 한란은 1개 그룹과 그룹에 속하지 못한 6개체(3번, 8번, 12번, 14번, 15번, 16번, 개체)로 나누어졌으며 군집된 개체들의 유전적 유사도는 0.910~1.00이었다(Fig. 4). 이는 한란이 춘란 보다 높은 변이를 가진 개체가 많았으며, 군집된 그룹의 유전적 유사도 지수가 넓게 나타났기 때문에 춘란과 비교하여 변이성이 높은 것으로 판단된다. 한편 춘란과 한란 모두 뿌리와 신초로의 기관분화가 이뤄지지 않은 근경상태에서 시료를 분석하였기에 유집단위내 개체간 형태적 차이는 나타나지 않았다. 기내 배양체의 군집분석에 관한 연구로 2년간 기내 배양한 *Saussurea involucreta* 식물체 및 같은 기간 자생지에서 재배한 식물체간에 RAPD 분석한 결과 기내배양 식물체는 같은 집단으로 유집되었으며, 유집된 기내배양 식물체의 유사도 지수는 0.906에서 0.961사이로 나타났다(Yuan *et al.*, 2009). 또한 기내 배양한 *Piper longum* 식물체 20개체를 RAPD 분석한 결과 유사도지수 0.800에서 1개 그룹과 독립적으로 존재하는 2개체로 나누었다(Parani *et al.*, 1997).

이상의 분석에서 나타난 바와 같이 다른 개체와 비교하여 높은 유전적 변이를 가진 개체를 선발해 간다면 기내 배양을 이용한 돌연변이유종 측면에서도 활용이 기대된다(Lee *et al.*, 1998; Broertjes and Van Harten, 1988). 또한 기내 배양계를 이용하여 변이유도를 단시간 내에 극대화하기 위해서는 장기간기내 배양을 통해서 체세포변이를 유발하는 것뿐만 아니라(Parani *et al.*, 1997; Raimondi *et al.*, 2001; Modgil *et al.*, 2005) 기내 배양체에 돌연변이원을 처리함으로써 변이를 극대화하여 특정개체를 선발하는 것이 효과적일 것으로 사료된다.

적 요

기내 배양된 *Cymbidium*속 춘란과 한란의 근경을 대상으로 장기배양에 따른 변이성을 비교하기 위하여 RAPD 분석을 실시하였다. 춘란은 총 151개 DNA 밴드 중 40개의 다형성 밴드가 증폭되어 다형성 비율은 26.4%였으며, 한란은 총 155개 밴드 중 56개의 다형성 밴드가 증폭되어 36.1%의 다형성 비율을 나타내었다. 단순일치 계수(simple-matching coefficient)를 사용하여 유전적 유사도 지수를 분석한 결과, 춘란의 개체간의 유전적 유사도 지수는 0.825~

1.00 사이로 평균 0.944였다. 한란의 개체간 유전적 유사도 지수는 0.812~1.00 사이로 평균 0.913이었다. 군집분석결과 춘란은 유전적 유사도 지수 0.841과 0.837에서 1개의 그룹과 유집되지 않는 2개체로 나누어졌으며 한란보다 단순하게 유집되었다. 이와 같이 성장조절제가 첨가된 기내 배지에서 장기간 배양된 *Cymbidium* 근경은 유전적 다형성을 나타냈으며, 유전적 유사도 지수도 다소 낮게 나타났다. 이 결과는 추후 여러 가지 변이원을 이용한 자원식물개발과 품종육성의 기초자료로 활용될 것으로 기대된다.

사 사

이 논문은 한국과학재단에서 시행한 원자력연구 개발사업(과제번호 2009-0078590)의 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Arditti, J. 1992. Classification and naming of orchids. Fundamentals of Orchid Biology. John Wiley and Sons Press, New York, USA. pp. 55-101.
- Bae, C.H., T. Abe, J.I. Lyu, S. Gensaram, Y.H. Shin, H.Y. Lee and S. Yoshida, 2003. Characteristics of plant organism irradiated with heavy-ion beam. Proceed. J. Kor. Plant Biotech. p. 126 (in Korean).
- Bang, J.W., J.H. Park and E.Y. Choi. 1994. Chromosome variation in callus cells derived from different cytogenetic type plants of *Scilla scilloides* Complex. Kor. J. Plant Tissue Cult. 21:59-63 (in Korean).
- Broertjes, C. and A.M. Van Harten. 1988. Applied mutation for vegetatively propagated crops. Elsevier Science Publisher, Amsterdam, Netherlands. pp. 225-285.
- Brown, P.T.H. 1989. DNA methylation in plants and its role in tissue culture. Genome 31:717-729.
- Choi, S.H. 2001. Phylogenetic analysis of oriental *Cymbidium*. Department of Horticulture, Ph.D. Thesis, Seoul Women's Univ. pp. 31-43.
- Choi, J.Y., I.S. So, C.H. Pak and B.H. Kwack. 1998. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis on compatibility of Korean native *Cymbidium goeringii* with other *Cymbidium* species. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 16:361-363 (in Korean).
- Chung, J.D., C.K. Chun, S.S. Kim and J.S. Lee 1985.

- Factors affecting growth of rhizome and organogenesis of Korea native *Cymbidium kanran*. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 26:281-288 (in Korean).
- Chung, S.Y. 2003. Molecular phylogenetical relationship of *Paphiopedilum* and *Phragmipedium*. Department of Horticulture, Ph.D. Thesis, Seoul Women's Univ. pp. 25-38 (in Korean).
- De Melo Ferreira, W., G.B. Kerbauy and A.P.P. Costa. 2006. Micropropagation and Genetic Stability of a *Dendrobium* Hybrid (Orchidaceae). *in vitro* Cell. Dev. Bio. Plant 42(6): 568-571.
- DeVerno, L.L., Y.S. Park, J.M. Bonga and J.M. Barrett. 1999. Somaclonal variation in cryopreserved embryogenic clone of white spruce (*Picea glauca* Voss). Plant Cell Rep. 18:948-953.
- Evans, DA. 1989. Somaclonal variation : Genetic basis and breeding application. Trends in Genet. 5:46-50.
- Fnag, G., S. Hammar and R. Grumet, 1992. A quick inexpensive method of removing polysaccharides from plant genomic DNA. Biotechniques 13:52-55.
- Garay, L.A. and H.R. Sweet. 1974. Natural and artificial hybrid genetic names of orchid. In C.L. Withner (eds.). The Orchids. Jhon Wiley and Son Press, New York, USA. pp. 485-561.
- Goto, S.R., C. Thakur and K. Ishii. 1998. Determination of genetic stability in long term micropropagated shoots of *Pinus thunbergii* part using RAPD markers. Plant Cell Rep. 18:193-197.
- Harn, C. 1973. Orchid. Kor. J. Plant Tissue Cult. 1:40-47 (in Korean).
- Jung, M.S., Y.H. Joung, J.H. Lee, J.K. Choi, K.S. Kim and T.H. Han. 2008. Assessment of genetic diversity of *Hedera* spp. using RAPD marker technique. J. Kor. Flower Res. 16:28-35 (in Korean).
- Karp, A. 1991. On the current understanding of somaclonal variation. In Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology Vol 7. Oxford University Press, New York, USA. pp. 1-58.
- Kim, B.M. 2004. Analysis of phenotypic and genetic polymorphism of self-pollinated Korean native *Cymbidium goeringii* seedlings. Department of Horticulture, M.A. Thesis, Seoul Women's Univ. pp. 20-29 (in Korean).
- Kim, J.Y. and J.S. Lee. 1992. Effect of cultural conditions on rhizome growth and organogenesis of *Cymbidium lancifolium* native to Korea *in vitro*. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 33:471-476 (in Korean).
- Kishor, R. and H.S. Devi. 2009. Induction of multiple shoots in a monopodial orchid hybrid (*Aerides vandarum* Reichb.f \times *Vanda stangeana* Reichb.f) using thidiazuron and analysis of their genetic stability. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 97(2):121-129.
- Larkin, P.J. and W.R. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation-a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60:197-214.
- Lee, J.S. and B.H. Kwack. 1985. Studies on ecology of Korean native wild orchids. III. Geographical distribution of genus *Cymbidium*. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 26:140-144 (in Korean).
- Lee, H.Y., J.S. Jung and J.S. Lee. 1998. Induction of chlorophyll deficient mutant plant of *Cymbidium kanran* by EMS treatment. Kor. J. Plant Tissue Cult. 25:183-187.
- Martins, M., D. Sarmiento and M.M. Oliveira 2004. Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. Plant Cell Rep. 23:492-496.
- Modgil, M., K. Mahajan, S.K. Chakrabarti, D.R. Sharma and R.C. Sobti. 2005. Molecular analysis of genetic stability in micropropagated apple rootstock MM106. Sci. Hort. 104:151-160.
- Murashige T and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-479.
- Na, A.S., C.G. Been, K.B. Lim and R.J. Byoung. 2007. Observation of morphological variations and selection of specific RAPD marker for somaclonal variation in *Phalaenopsis* clones. J. Kor. Flower Res. 15:174-178.
- Obara-Okeyo, P. and S. Kako. 1998. Genetic diversity and identification of *Cymbidium* cultivars as measured by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Euphytica 99:95-101.
- Park, Y.C., M.S. Seong, S.R. Kim and S.W. Song. 2005. RAPD-mediated genetic relationship analysis of *Cymbidium*. J. Kor. Flower Res. 13:25-30 (in Korean).
- Parani, M., A. Anand and A. Parida. 1997. Application of RAPD fingerprinting in selection of micropropagated plants of *Piper longum* for conservation. Current Sci. 73:81-83.
- Peschke, V.M., R.L. Phillips and B.G. Genenbach. 1987. Discovery of transposable element activity among progeny of tissue culture derived maize plants. Science 238:804-807.
- Raimondi, J.P., R.W. Masuelli and E.L. Camadro. 2001. Assesment of somaclonal variation in asparagus by RAPD

- fingerprinting and cytogenic analyses. *Sci. Hort.* 90:19-29.
- Scowcroft, W.R., R.I.S. Bretell, S.A. Ryan, P.A. Davis and M.A. Pallota. 1987. Somaclonal variation and genomic flux. *In Plant Tissue and Cell Culture* (eds.). Alan R. Liss, England. pp. 275-286.
- Silva, J.A., N. Singh and M. Tanaka. 2006. Priming biotic factors for optimal protocorm-like body and callus induction in hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae), and assessment of cytogenetic stability in regenerated plantlets. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 84(2):100119-100128.
- So, I.S., J.Y. Choi, T.S. Ko and B.J. Oh. 1998. Growth characteristics of a dwarf mutant in *Cymbidium kanran* and its genetic relationship evaluated by random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Kor. Flower Res. Soc.* 7:11-18 (in Korean).
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik and L.J. Livuk. 1990. DNA Polymorphisms amplified by arbitray primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531-6535.
- Yuan, X.F., Z.H. Dai, X.D. Wang and B. Zhao. 2009. Assessment of genetic stability in tissue-cultured products and seedlings of *Saussurea in volucrata* by RAPD and ISSR markers. *Biotech. Lett.* 31(8):1279-1287.
- Zheng, K.L., S. Castiglione, M.G. Biasini, C. Morandi and F. Sala. 1987. Nuclear DNA amplification and genetic mapping. *Nucl. Acids Res.* 19:303-306.
- Zhou, T.S. 1995. *In vitro* culture of *Doritaenopsis*: comparison between formation of the hyperhydric protocorm-like body (PLB) and the normal PLB. *Plant Cell Rep.* 15: 181-185.

(접수일 2010.1.27; 수락일 2010.12.23)

Table 3. Genetic similarity matrix of *in vitro* cultured 30 individuals of *Cymbidium goeringii* LINDLEY by RAPD analysis*

<i>Cymbidium goeringii</i>																																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30							
1	1.000																																				
2	0.947	1.000																																			
3	0.980	0.954	1.000																																		
4	0.914	0.927	0.921	1.000																																	
5	0.974	0.947	0.967	0.927	1.000																																
6	0.974	0.934	0.967	0.914	0.987	1.000																															
7	0.987	0.934	0.967	0.901	0.960	0.974	1.000																														
8	0.934	0.921	0.940	0.887	0.921	0.921	0.934	1.000																													
9	0.967	0.927	0.960	0.894	0.954	0.967	0.967	0.940	1.000																												
10	0.967	0.927	0.947	0.907	0.967	0.967	0.967	0.901	0.947	1.000																											
11	0.967	0.927	0.960	0.907	0.954	0.967	0.967	0.927	0.947	0.947	1.000																										
12	0.960	0.934	0.954	0.927	0.974	0.960	0.947	0.907	0.927	0.954	0.954	1.000																									
13	0.960	0.934	0.954	0.914	0.960	0.960	0.960	0.907	0.940	0.954	0.954	0.974	1.000																								
14	0.947	0.921	0.954	0.874	0.934	0.947	0.960	0.921	0.940	0.927	0.940	0.934	0.947	1.000																							
15	0.940	0.927	0.947	0.894	0.940	0.927	0.927	0.901	0.921	0.934	0.921	0.954	0.954	0.914	1.000																						
16	0.934	0.907	0.927	0.901	0.934	0.934	0.934	0.894	0.914	0.927	0.940	0.934	0.947	0.907	0.914	1.000																					
17	0.934	0.934	0.940	0.887	0.934	0.934	0.947	0.934	0.927	0.927	0.940	0.921	0.934	0.947	0.914	0.934	1.000																				
18	0.947	0.947	0.954	0.901	0.934	0.947	0.947	0.934	0.940	0.927	0.967	0.921	0.934	0.934	0.914	0.934	0.960	1.000																			
19	0.921	0.947	0.940	0.887	0.907	0.921	0.921	0.921	0.914	0.901	0.940	0.894	0.907	0.921	0.887	0.907	0.934	0.974	1.000																		
20	0.947	0.947	0.940	0.901	0.934	0.934	0.947	0.921	0.914	0.914	0.940	0.921	0.921	0.934	0.901	0.934	0.947	0.947	0.947	1.000																	
21	0.954	0.940	0.947	0.894	0.940	0.940	0.940	0.940	0.934	0.921	0.960	0.927	0.927	0.940	0.907	0.927	0.940	0.980	0.954	0.954	1.000																
22	0.947	0.947	0.940	0.887	0.934	0.934	0.934	0.921	0.927	0.914	0.940	0.921	0.921	0.934	0.901	0.907	0.921	0.960	0.947	0.947	0.980	1.000															
23	0.954	0.940	0.960	0.894	0.954	0.954	0.940	0.927	0.960	0.921	0.947	0.927	0.927	0.940	0.921	0.914	0.940	0.967	0.940	0.940	0.974	0.967	1.000														
24	0.940	0.927	0.934	0.907	0.954	0.940	0.927	0.901	0.921	0.934	0.934	0.940	0.940	0.927	0.907	0.914	0.927	0.940	0.914	0.940	0.960	0.954	0.960	1.000													
25	0.927	0.927	0.934	0.894	0.927	0.927	0.927	0.927	0.934	0.907	0.934	0.914	0.901	0.927	0.907	0.887	0.927	0.927	0.954	0.927	0.960	0.954	0.974	0.934	1.000												
26	0.907	0.894	0.914	0.874	0.921	0.921	0.907	0.881	0.901	0.914	0.927	0.907	0.907	0.921	0.874	0.921	0.921	0.934	0.921	0.907	0.940	0.934	0.927	0.954	0.901	1.000											
27	0.927	0.914	0.921	0.881	0.927	0.914	0.914	0.914	0.921	0.907	0.934	0.914	0.914	0.914	0.894	0.927	0.927	0.940	0.914	0.927	0.960	0.940	0.947	0.960	0.921	0.954	1.000										
28	0.914	0.914	0.907	0.894	0.914	0.901	0.901	0.901	0.894	0.894	0.934	0.914	0.901	0.901	0.881	0.914	0.914	0.940	0.914	0.927	0.960	0.954	0.934	0.947	0.934	0.940	0.947	1.000									
29	0.947	0.934	0.927	0.887	0.934	0.921	0.934	0.921	0.927	0.927	0.940	0.921	0.921	0.921	0.901	0.921	0.934	0.960	0.934	0.934	0.980	0.960	0.954	0.967	0.940	0.947	0.967	0.967	1.000								
30	0.940	0.914	0.934	0.868	0.927	0.914	0.927	0.914	0.921	0.921	0.934	0.914	0.914	0.927	0.894	0.914	0.927	0.940	0.940	0.940	0.960	0.940	0.947	0.960	0.921	0.954	0.960	0.947	0.967	0.967	0.980	0.980	0.980	0.980	1.000		

*Genetic similarity was calculated on the basis of simple-matching coefficients.

1~30 : Individuals numbers.

Table 4. Genetic similarity matrix of *in vitro* cultured 30 individuals of *Cymbidium kanran* MAKINO by RAPD analysis*

		<i>Cymbidium kanran</i>																																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30					
1	1.000																																			
2	0.955	1.000																																		
3	0.929	0.883	1.000																																	
4	0.929	0.922	0.870	1.000																																
5	0.903	0.870	0.870	0.896	1.000																															
6	0.935	0.903	0.916	0.929	0.929	1.000																														
7	0.909	0.903	0.851	0.903	0.864	0.896	1.000																													
8	0.896	0.890	0.877	0.890	0.877	0.909	0.883	1.000																												
9	0.909	0.916	0.864	0.929	0.864	0.909	0.896	0.922	1.000																											
10	0.903	0.909	0.857	0.896	0.857	0.890	0.890	0.903	0.942	1.000																										
11	0.942	0.948	0.870	0.922	0.883	0.903	0.929	0.916	0.942	0.948	1.000																									
12	0.890	0.883	0.857	0.870	0.857	0.903	0.890	0.864	0.890	0.922	1.000																									
13	0.942	0.948	0.870	0.922	0.870	0.903	0.916	0.890	0.916	0.935	0.948	1.000																								
14	0.864	0.844	0.831	0.831	0.818	0.838	0.864	0.838	0.825	0.844	0.857	0.870	1.000																							
15	0.935	0.903	0.890	0.903	0.890	0.909	0.883	0.870	0.857	0.877	0.903	0.877	1.000																							
16	0.903	0.883	0.896	0.857	0.844	0.877	0.877	0.851	0.864	0.870	0.883	0.883	0.896	0.883	1.000																					
17	0.948	0.929	0.916	0.916	0.948	0.883	0.896	0.909	0.903	0.916	0.903	0.929	0.864	0.922	0.903	1.000																				
18	0.942	0.909	0.909	0.909	0.922	0.942	0.877	0.890	0.890	0.883	0.896	0.883	0.909	0.870	0.916	0.883	1.000																			
19	0.922	0.942	0.877	0.955	0.890	0.922	0.896	0.896	0.935	0.929	0.929	0.903	0.942	0.851	0.896	0.864	0.948	1.000																		
20	0.929	0.935	0.883	0.961	0.896	0.929	0.903	0.890	0.929	0.922	0.922	0.896	0.935	0.844	0.903	0.870	0.942	0.935	0.994	1.000																
21	0.929	0.922	0.883	0.948	0.883	0.916	0.903	0.890	0.929	0.922	0.909	0.883	0.922	0.831	0.890	0.870	0.942	0.922	0.981	0.987	1.000															
22	0.935	0.929	0.890	0.955	0.890	0.922	0.896	0.896	0.935	0.929	0.916	0.890	0.890	0.929	0.838	0.896	0.864	0.935	0.929	0.987	0.994	1.000														
23	0.922	0.942	0.877	0.942	0.877	0.909	0.883	0.896	0.948	0.929	0.916	0.890	0.890	0.929	0.838	0.883	0.864	0.935	0.916	0.987	0.981	0.987	1.000													
24	0.903	0.935	0.857	0.935	0.883	0.903	0.903	0.877	0.942	0.922	0.922	0.896	0.935	0.844	0.877	0.870	0.929	0.909	0.981	0.974	0.961	0.968	0.981	1.000												
25	0.909	0.942	0.864	0.942	0.877	0.909	0.896	0.883	0.948	0.929	0.929	0.903	0.942	0.851	0.883	0.877	0.935	0.916	0.987	0.981	0.968	0.974	0.987	0.994	1.000											
26	0.916	0.935	0.870	0.948	0.883	0.916	0.903	0.890	0.955	0.922	0.935	0.909	0.935	0.857	0.890	0.883	0.942	0.922	0.981	0.974	0.961	0.968	0.981	0.987	0.994	1.000										
27	0.916	0.935	0.870	0.948	0.883	0.916	0.903	0.890	0.942	0.935	0.935	0.909	0.948	0.857	0.890	0.870	0.942	0.922	0.994	0.987	0.974	0.981	0.981	0.987	0.994	0.987	1.000									
28	0.896	0.916	0.851	0.916	0.864	0.883	0.896	0.857	0.896	0.890	0.903	0.877	0.903	0.812	0.870	0.838	0.922	0.890	0.961	0.955	0.955	0.948	0.948	0.948	0.955	0.948	0.942	0.955	1.000							
29	0.929	0.948	0.883	0.948	0.883	0.916	0.903	0.890	0.929	0.922	0.935	0.909	0.935	0.844	0.903	0.857	0.942	0.922	0.994	0.987	0.974	0.981	0.981	0.987	0.981	0.974	0.981	0.974	0.981	0.981	0.981	0.968	1.000			
30	0.929	0.948	0.883	0.948	0.883	0.916	0.903	0.890	0.929	0.922	0.935	0.909	0.935	0.844	0.903	0.857	0.942	0.922	0.994	0.987	0.974	0.981	0.981	0.987	0.981	0.974	0.981	0.974	0.981	0.981	0.968	1.000	1.000	1.000		

*Genetic similarity was calculated on the basis of simple-matching coefficients.
1-30 : Individuals numbers.