

韓國春蘭과 다른 *Cymbidium*간의 交配親和性에 대한 RAPD 분석

최지용¹ · 소인섭^{1*} · 박천호² · 광병화²

¹제주대학교 원예학과, ²고려대학교 원예학과

Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis on Compatibility of Korean Native *Cymbidium goeringii* with Other *Cymbidium* Species

Choi, Ji-Yong¹ · So, In-Sup^{1*} · Pak, Chun-Ho² · Kwack, Beyoung-Hwa²

¹Dept. of Horticulture, Cheju Nat'l Univ., Cheju 690-756, Korea

²Dept. of Hort. Sci., Korea Univ., Seoul 136-701, Korea

*corresponding author

ABSTRACT *Cymbidium goeringii* native to Korea and other orchid plants were pot-grown from spring to autumn under the greenhouse conditions, and were subjected to artificial pollination to elucidate the compatibility by revealing viable seed formation. A notable compatibility was found when *Cym. goeringii* was selfed and was crossed with either *Cym. ensifolium*, *Cym. kanran*, *Cym. sinense*, *Cym. sinense* for. *albo-jucundissimum*, *Cym.* 'Crystal Cherry Angel', or *Cym.* 'Anmitsu Hime'. *Cym. goeringii*, however, did not show such compatibility when crossed with either *Cym. faberi*, *Cym. aloifolium*, *Dendrobium chrysotoxum*, or *Phalaenopsis* spp. RAPD analysis indicated that taxa relationship between *Cym. goeringii* and either *Cym. faberi* or *Cym. aloifolium* (respective chromosome number, 2n=40) was distant, showing no compatibility, and even more distant in the case of cross-pollination between *Cym. goeringii* and either *Dendrobium chrysotoxum* or *Phalaenopsis* spp. having different chromosome number from all *Cymbidium* species.

Additional key words: breeding, fertility, orchids

서 언

일반적인 식물들의 교배친화성은 주로 품종간의 교잡에서 높고, 종간교잡시에는 낮으며, 속간교잡은 거의 불가능한 것으로 알려져 있다. 난과식물(Orchidaceae)은 전세계적으로 600~800여 속과 17,000~30,000여 종이 분포하고 있는데(Bailey와 Bailey, 1976), 종·속간의 교잡이 비교적 쉽게 이루어져 과거 100여 년 동안 일반 재배가나 육종가들에 의해 새로운 속·종·품종들이 만들어져 왔고(Garay와 Sweet, 1974), 현재까지 난과식물은 종간잡종(inter-specific hybrid)는 물론 2~6속간잡종(inter-generic hybrid)이 성공되었는데, Brillianteara는 *Asapasia*×*Brassia*×*Cochlioda*×*Miltonia*×*Odontoglossum*×*Oncidium*의 6속간 교잡에 의한 것이다. 이들 대부분의 종간·속간교잡종의 공통점은 염색체수가 같다는 것이다(Garay와 Sweet, 1974; Tanaka와 Kamemoto, 1974, 1984). *Cymbidium*속의 염색체수는 대부분이 2n=40개로 종간교잡이 비교적 쉽게 일어나 현재 상업적으로 많은 교잡종들이 이용되고 있다. 우리 나라에 자생하고 있는 춘

란(*Cymbidium goeringii*)의 경우, 아직까지 염색체수가 다른 속은 물론이고 염색체수가 같은 *Cymbidium*속 사이에서도 교잡이 이루어지지 않고 있다. 본 연구는 춘란을 모본으로 염색체수가 같은 몇 가지 *Cymbidium*속 난의 종간교잡과 염색체수가 다른 속간교잡을 실시하였고, RAPD분석을 통한 이들의 유전적 근연관계를 밝혀 춘란의 교배육종에 있어서 교배친화성의 관계를 파악하고자 수행되었다.

재료 및 방법

춘란(*Cymbidium goeringii*)을 모계로 자가 수분을 비롯하여, 염색체수가 2n=40으로 춘란과 같은 동양란 계통인 *Cym. ensifolium*, *Cym. kanran*, *Cym. sinense*, *Cym. sinense* for. *albo-jucundissimum*, *Cym. faberi*, 열대 원산인 *Cym. aloifolium*, 서양란 품종인 *Cym.* 'Husky Honey', *Cym.* 'Crystal Cherry Angel', *Cym.* 'Anmitsu Hime'와 염색체수가 2n=38로 춘란과 다른 *Dendrobium chrysotoxum* 및 *Phalaenopsis* spp. 를 2년 동안 2회에 걸쳐 교배하여 종자

의 결실 및 유무와 파종후 발아 유무로 임성을 판단하였다.

개화시기에 차이가 있는 *Cymbidium kanran*의 경우, 화분피를 유산지에 싸서 저장병에 넣은 후 밀봉하여 5℃의 냉장고에 보관하였다가 수분에 이용하였다 (Pritchard와 Prendergast, 1989).

교배 실험에서 이용된 난들의 어린 잎을 재료로 하여 random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis를 이용하여 근연관계를 조사하였다. Total DNA는 CTAB 방법(Murry와 Thompson, 1980)과 microextraction 방법(Cenis, 1992; Dich와 Schubert, 1993)을 변형하여 추출하였다. Reaction buffer는 0.27μM primer와 1ng genomic DNA 용액에 1× buffer(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 50mM KCl, 0.1% Triton X-100, FINN-ZYNES Oy, Finland), 1.5mM MgCl₂, 200 μM dNTP mix(dATP, dTTP, dGTP, dCTP, FINN-ZYNES Oy, Finland)와 0.5U의 Dynazyme (*Thermus brockianus*, FINN-ZYNES Oy, Finland)을 첨가하여 총 14μl로 하고, 동일량의 mineral oil을 overlay하여 사용하였다. Primer는 Canada의 British Columbia 대학에서 구입한 인위적으로 합성된 deca-mer (10 nucleotides) 중에서 예비실험을 통하여 다양한 polymorphism을 보인 10개를 선발하여 사용하였다(Table 1).

증폭 조건은 Perkin Elmer PCR 증폭기 (GeneAmp PCR System 480 Thermal Cycler)로 94℃(denaturation) 20초, 38℃(annealing) 40초, 72℃(extension) 70초로 총 45 cycles을 수행하였으며 초기 denaturation을 95℃에서 5분 동안 시켰고, 마지막 extension은 72℃에서 15분간 실시하였다. 유연관계 분석은 개인용 컴퓨터 통계 프로그램인 NTSYS (ver. 1.9)를 이용하여 수행하였으며, 분석조건은 Sneath와 Sokal(1973)에 의해 개발된 비가중산술법 (UPGMA; unweighted pair group method with arithmetic averages)을 사용하였다.

Table 1. The list of 10 random primers sequences and GC contents used in RAPD for genetic relationship of orchids.

Primer No. ^z	Sequences	GC contents (%)
UBC 303	5'-GCGGGAGACC-3'	80
UBC 337	5'-TCCCGAACCG-3'	70
UBC 348	5'-CACGGCTGCG-3'	80
UBC 349	5'-GGAGCCCCCT-3'	80
UBC 353	5'-TGGGCTCGCT-3'	70
UBC 354	5'-CTAGAGGCCG-3'	70
UBC 384	5'-TGCGCCGCTA-3'	70
UBC 387	5'-CGCTGTGCGC-3'	70
UBC 389	5'-CGCCCGCAGT-3'	80
UBC 396	5'-GAATGCGAGG-3'	60

^zAccession number of UBC (University of British Columbia) primer set.

* This work was supported by the Korean Science and Engineering Foundation (KOSEF) through the Subtropical Horticulture Research Center at Cheju National University.

Table 2. Compatibility of *Cymbidium goeringii* pollinated with various *Cymbidium* species, *Dendrobium chrysotoxum*, or *Phalaenopsis* spp.

Maternal	Paternal	Fertility	1st ^a	2nd
<i>Cymbidium goeringii</i>	<i>Cym. goeringii</i> selfing (pollinated with own pollina)	○	23/25	24/25
	<i>Cym. goeringii</i> crossing (pollinated with a different flower)	○	24/25	25/25
	<i>Cym. ensifolium</i>	○	10/12	11/12
	<i>Cym. kanran</i>	○	9/12	10/12
	<i>Cym. sinense</i>	○	11/12	12/12
	<i>Cym. sinense</i> for. <i>albo-jucundissimum</i>	○	11/12	10/12
	<i>Cym. faberi</i>	×	0/6	0/6
	<i>Cym. aloifolium</i>	×	0/6	0/6
	<i>Cym. 'Husky Honey'</i>	×	0/12	0/12
	<i>Cym. 'Crystal Cherry Angel'</i>	○	8/12	9/12
	<i>Cym. 'Anmitsu Hime'</i>	○	11/12	12/12
	<i>Dendrobium chrysotoxum</i>	×	0/12	0/12
	<i>Phalaenopsis</i> spp.	×	0/12	0/12

^aData of 1st and 2nd year in the experinemt.

결과 및 고찰

춘란(*Cymbidium goeringii*)을 모계로 2년 동안 반복해서 교배한 결과, 자가수분은 물론 *Cym. ensifolium*, *Cym. kanran*, *Cym. sinense*, *Cym. sinense* for. *albo-jucundissimum*, *Cym. 'Crystal Cherry Angel'*, *Cym. 'Anmitsu Hime'* 등과의 교잡에서 교배친화성을 보였으나 *Cym. faberi*, *Cym. aloifolium*, *Cym. 'Husky Honey'*, *Dendrobium chrysotoxum*, *Phalaenopsis* spp. 등과는 교배친화성을 나타내지 않았다(Table 2). 염색체수가 2n=40으로 같은 *Cymbidium*속에서의 중간교잡은 비교적 쉽게 이루어진 반면, 염색체수가 2n=38로 다른 *Dendrobium chrysotoxum*이나 *Phalaenopsis* spp.와의 속간교잡은 전혀 이루어지지 않았다. 식물의 교배친화성에 미치는 영향으로는 크게 유전적인 요인과 환경적인 요인으로 나눌 수 있다. 유전적인 요인으로는 특정 유전자의 작용이나 생식기관의 성적 결함, 종내 및 종외교

잡, 염색체수의 차이 등이 원인이 된다. 난과식물에서는 종·속간의 교잡이 가능하기 때문에 특히 염색체수가 중요한 요인이 된다. 즉, 2배체 간의 교잡이나 2배체와 4배체 간의 교잡은 가능하지만, 2배체와 3배체, 3배체와 4배체 간의 교잡은 어렵다. 환경적인 요인은 수분시기와 종자

형성기의 광, 온도, 수분, 병충해 및 영양 등이 문제가 된다. 지나친 직사광선이나 과습, 이상 고온(30℃ 이상), 저온(10℃ 이하) 등에서는 임성이 떨어진다. 본 실험 결과, 염색체수가 같고 유전적인 배경이 비슷할 경우는 교배친화성이 비교적 쉽게 나타나지만, 다를 경우에는 일어나기가 어렵다는 것이 나타났다. 그러나 같은 염색체수를 가진 *Cym. faberi*, *Cym. aloifolium*, *Cym. 'Husky Honey'*가 춘란과 교배친화성을 보이지 않은 이유는 단순히 염색체수만을 가지고 교배친화성을 논할 수 없음을 보여준다.

RAPD법은 유전적 다양성 혹은 유연관계를 구분하고자 할 때 주로 이용하는 방법으로 RAPD법에 의한 polymorphism은 한 품종에서는 나타나더라도 다른 품종에서는 나타나지 않을 수도 있으며 특히 계통이 달라지면 더욱 그렇다(Eun, 1995). RAPD 분석 결과 총 97개의 band 중 33개가 polymorphism이 인정되었다(Fig. 1, 2). 춘란과의 근연관계를 조사해 보면, 춘란과 교배친화성을 보인 *Cym. 'Crystal Cherry Angel'*, *Cym. 'Anmitsu Hime'*, *Cym. ensifolium*, *Cym. sinense* for. *albo-jucundissimum*, *Cym. sinense*, *Cym. kanran*이 춘란과 근연관계가 가깝게 나타난 반면, 교배친화성을 보이지 않은 *Cym. faberi*, *Cym. 'Husky*

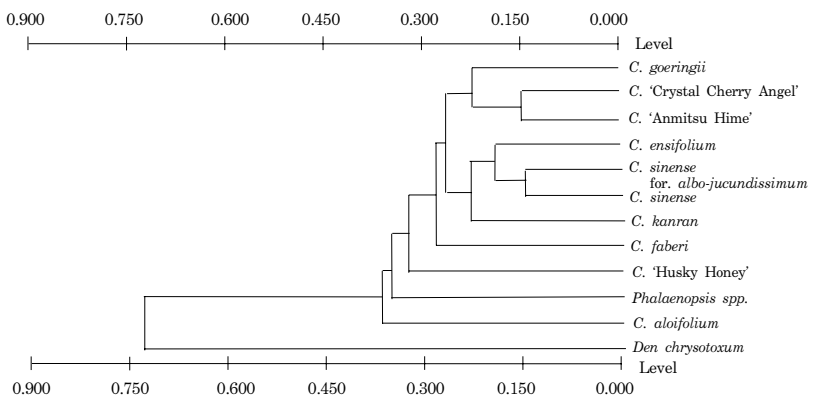


Fig. 3. Phenogram of 12 different orchid genotypes based on UPGMA analysis system.



Fig. 1. RAPD profiles obtained from the 12 different orchid species with the primer UBC303(5'-GCGGGAGACC-3'). M : Molecular size marker (1kb ladder, GIBCO. BRL.)
 1. *Cym. goeringii* 2. *Cym. ensifolium*
 3. *Cym. kanran* 4. *Cym. sinense* for. *albo-jucundissimum*
 5. *Cym. sinense* 6. *Cym. faberi*
 7. *Cym. aloifolium* 8. *Cym. 'Crystal Cherry Angel'*
 9. *Cym. 'Anmitsu Hime'* 10. *Cym. 'Husky Honey'*
 11. *Den. chrysotoxum* 12. *Phalaenopsis* spp.

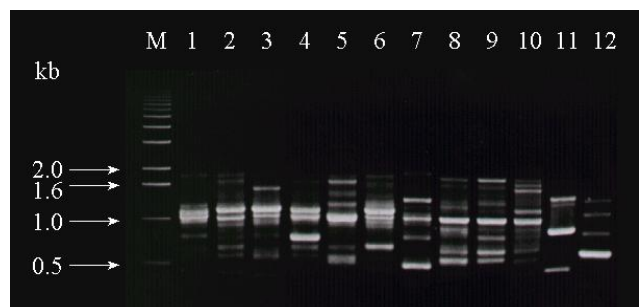


Fig. 2. RAPD profiles obtained from the 12 different orchid species with the primer UBC348(5'-CACGGCTGCG-3'). M : Molecular size marker (1kb ladder, GIBCO. BRL.)
 1. *Cym. goeringii* 2. *Cym. ensifolium*
 3. *Cym. kanran* 4. *Cym. sinense* for. *albo-jucundissimum*
 5. *Cym. sinense* 6. *Cym. faberi*
 7. *Cym. aloifolium* 8. *Cym. 'Crystal Cherry Angel'*
 9. *Cym. 'Anmitsu Hime'* 10. *Cym. 'Husky Honey'*
 11. *Den. chrysotoxum* 12. *Phalaenopsis* spp.

Honey', *Phalaenopsis* spp., *Cym. aloifolium*, *Dendrobium chrysotoxum*은 상대적인 근연관계가 먼 것으로 나타났다(Fig. 3). 상대적인 근연관계를 유전적인 거리(genetic distance (1-F) 값으로 살펴보면 0.268이 critical value 라고 할 수 있다.

따라서, 춘란의 종·속간 교배친화성에 미치는 유전적인 요인으로 염색체수가 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있으며, 염색체수가 같더라도 춘란과 유전적인 거리가 가까울수록 교배친화성이 좋은 것으로 판단된다.

적 요

온실에서 春蘭과 다른 공시 난과식물을 盆植하고, 인위적인 타가수분을 실시하여 교배친화성을 검정한 결과, 춘란은 자가수분은 물론 *Cym. ensifolium*, *Cym. kanran*, *Cym. sinense*, *Cym. sinense* for. *albo-jucundissimum*, *Cym. 'Crystal Cherry Angel'*, *Cym. 'Anmitsu Hime'*와 교배친화성을 보였으나 *Cym. faberi*, *Cym. aloifolium*, *Cym. 'Husky Honey'*, *Dendrobium chrysotoxum*, *Phalaenopsis* spp.는 교배친화성을 나타내지 않았다. RAPD 분석결과, 춘란과 동일한 염색체수를 가진 *Cym. faberi*, *Cym. aloifolium*, *Cym. 'Husky Honey'*는 교배친화성을 보인 다른 공시 *Cymbidium*들보다 유전적인 근연관계가 멀었으며, 염색체수가 다른 *Dendrobium chry-*

*sotoxum*와 *Phalaenopsis* spp.는 상대적인 근연관계가 훨씬 먼 것으로 나타났다.

추가 주요어 : 육종, 임성, 난

인용문헌

Bailey, L.H. and E.Z. Bailey. 1976. Hortus third. McMillan Publishing Co., New York. p.795.

Cenis, J.L. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Res.* 20:2308.

Dich, V. and I. Schubert. 1993. Midiprep method for isolation of DNA from plants with a high content of polyphenolics. *Nucleic Acids Res.* 21:3328.

Eun, M.Y. 1995. Genome mapping technology and its application in plant breeding. The 9th Plant Biotechnology Symposium: Plant Breeding and Molecular Biology, Suwon, Korea, July 7-8, 1995. pp.57-85.

Garay, L.A. and H.R. Sweet. 1974. Natural and artificial hybrid generic names of orchids. In: C.L. Withner (ed.). *The orchids: Scientific studies*. John Wiley & Sons, New York. pp.485-561.

Murray, J.M. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8:4321-4325.

Pritchard, H.W. and F.G. Prendergast. 1989. Factors influencing the germination and storage characteristics of orchid pollen. In: H.W. Pritchard (ed.). *Modern methods in orchid conservation: The role of physiology, ecology and management*. Cambridge University Press, Cambridge. pp.1-16.

Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal. 1973. *The principles and practice of numerical classification*. Numerical taxonomy. W. H. Freeman & Co., San Francisco. pp. 1-15.

Tanaka, R. and H. Kamemoto. 1974. List of chromosome numbers in species of the Orchidaceae. In: C.L. Withner (ed.). *The orchids: Scientific studies*. John Wiley & Sons, New York. pp. 411-483.

Tanaka, R. and H. Kamemoto. 1984. Chromosomes in orchids: Counting and numbers. In: J. Arditti (ed.). *Orchid biology: Reviews and perspectives, III*. Cornell University Press, Ithaca. pp. 330-397.