전자빔 조사 기내 배양 양란 심비디움(*Cymbidium* spp.)의 유전적 다양성

류재혁^{1,2} · 소현수¹ · 배세호¹ · 강현숙² · 이병철² · 강시용² · 이효연³ · 배창휴^{1*}

¹순천대학교 웰빙자원학과, ²한국원자력연구원 첨단방사선연구소, ³제주대학교 생명공학부

Genetic Diversity of *in vitro* Cultured *Cymbidium* spp. Irradiated with Electron Beam

Jaihyunk Ryu¹, Hyun-su So¹, Se-ho Bae¹, Hyun Suk Kang², Byung Cheol Lee², Si-Yong Kang³,
Hyo-Yeon Lee⁴, and Chang-Hyu Bae^{1*}

¹Division of Bioresources Science, Sunchon National University, Suncheon 540-742, Korea

²Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongup 580-185, Korea

³Faculty of Biotechnology, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Abstract : The study was carried out to evaluate growth and genetic diversity among *in vitro* cultured protocorms of *Cymbidium* spp. that irradiated with 10 Gy~300 Gy of electron beam. Shoot induction and shoot length were decreased by an increase of intensity of electron beam, and shoot induction was significantly decreased over 200 Gy of electron beam irradiation in 10 weeks culture. As a result of ISSR (inter-simple sequence repeats) analysis, out of 80 bands detected overall, 10 bands were identified to be polymorphic with a rate of 12.5% at control group, and 90 bands detected overall, 38 bands were identified to be polymorphic with a rate of 42.2% at electron beam treatment. According to the RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis, out of 92 bands detected overall, 12 bands were identified to be polymorphic with a rate of 13.0% at control group, and 121 bands detected overall, 53 bands were identified to be polymorphic with a rate of 43.8% at electron beam treatment. Genetic similarity matrix (GSM) of electron beam treatment was lower than that of control. The result indicates that the beam treatment accelerated genetic diversity by promoting polymorphism of DNA. According to the cluster analysis by using both ISSR and RAPD markers, individuals of *C. spp.* were divided into control and electron beam treatment group. Our results indicate that the electron beam irradiated *in vitro* cultured *C. spp.* might be resulted in promoting higher polymorphism but decreasing GSM.

Keywords : *Cymbidium* spp., Electron beam, ISSR, Genetic similarity matrix

서 언

식물학상 단자엽식물 중 가장 진화된 식물로 알려진 난과(Orchidaceae) 식물은 전 세계적으로 500~800속(屬), 25,000~30,000여 종(種)으로 분화되어 있으며, 우리나라에는 29속 92종 11변종이 있다(Lee and Kwack 1985). 심비디움(*Cymbidium*)은 전 세계적으로 재배역사가 긴 식물로 한국, 중국 및 일본 등의 온대지역 원산인 동양계와 열대 및 아열대 지역을 원산

지로 하는 서양계로 크게 구분되며, 인도 북부에서 인도네시아, 미얀마, 타이, 남베트남, 중국, 한국, 일본에 걸쳐 심비디움 벨트(Asiatic *Cymbidium* belt)를 형성하고 있다(Chung et al. 1984). 난은 우리나라 화훼산업에서 매우 비중이 높으며 대부분 중국으로 수출하고 있다(Park et al. 2011). 국내 심비디움 육종은 국가주도로 실시하고 있으나 국산 품종의 보급율은 2011년 현재 약 4.0%에 불과하여 종묘의 해외 의존도가 매우 높아 농가의 로열티 부담을 경감하기 위해 우수한 국산 품종의 육성과 보급이 시급한 실정이다(Park et al. 2011, Kim et al. 2011, MIFFAFF 2010).

난과 식물의 번식은 분주, 종자발아 또는 조직배양 등의 방법에 의해 행해져 왔으나 분주의 경우 증식 속도가 느리고,

*Corresponding author (E-mail: chbae@sunchon.ac.kr, Tel: +82-61-750-3214, Fax: +82-61-750-3210)

(Received on December 21, 2012. Revised on January 16, 2013.
Accepted on January 23, 2013.)

종자를 이용하면 후대가 모체와 동일하지 않기 때문에 동일한 개체의 대량 증식을 위해서 조직배양을 이용한 유묘의 증식이 적용되고 있다. 특히 *Cymbidium*의 생장점 조직으로부터 원괴체 형성을 통한 양란의 대량생산으로 산업화가 가능하게 되었다(Rego and Faria 2001). 식물의 기내배양은 체세포분열을 통한 식물체의 재분화로 동질성을 지닌 클론을 대량으로 얻을 수 있다는 이점을 가지고 있으나 기내배양 과정에서 체세포변이(somaclonal variation)가 일어나며(Larkin and Scowcroft 1981), 이러한 변이가 발생하는 주요 원인으로는 배지에 첨가하는 생장조절물질(Zhou 1995)과 장기간 계대배양(Martins et al. 2004) 등을 들 수 있다.

인위적인 돌연변이는 기존의 우량 형질을 유지하면서 육종가가 원하는 유전형질을 개량할 수 있고 육종기간도 대폭 단축할 수 있는 장점을 지니고 있다. FAO-IAEA 돌연변이 품종 데이터베이스에 의하면 2010년 현재 돌연변이로 개발된 품종은 세계 63개국 172종 식물에서 3,000여 품종에 달하고, 화훼류 가운데 전 세계적으로 돌연변이 육종으로 등록된 품종은 570여종이다. 최근 5년간 돌연변이체나 교배모본으로 육성한 품종이 전체 화훼시장의 30~40%를 차지한다(IAEA 2010). 물리적 돌연변이유발원으로 X선, 감마선, 이온빔, 중성자빔 등이 식물의 돌연변이 연구에 사용되고 있다(Sheela et al. 2006, Bae et al. 2005a, Bae et al. 2005b, Bae et al. 2005c, Bae et al. 2000a, Bae et al. 2000b). 이들 돌연변이원을 식물체나 배양세포에 이용하여 많은 돌연변이 유전자원을 확보할 수 있으며, 유도된 돌연변이체는 식물의 다양한 기능을 구명하는데 유용하다(Bae et al. 2001, Abe et al. 2000, Bae et al. 2000, Bae et al. 1999a). 또한 감마선, 이온빔, 전자빔 등 방사능 잔류에 대한 안전성이 검증된 다양한 방사선을 이용한 돌연변이 육종법은 식물 종에 따라 적정 선량을 적용하여 단기간에 화학적 돌연변이원 보다 안전하게 변이종을 육성할 수 있다(Hiroyasu et al. 2009, Jia and Li 2008). 기내배양 난 식물체의 방사선 돌연변이 유발에 관한 연구로 심비디움(Sung et al. 2009), 덴드로비움(Sheela et al. 2006), 호접란(Kim 2009) 등이 있는데 주로 감마선을 이용한 연구이다.

전자빔은 파장이 극히 짧으므로 진공인 경우 또는 전기장 및 자기장이 없을 경우에는 직선으로 전달되고, 사용되는 가속전압에 대응하는 전자빔의 파장은 0.1~0.005 nm로 X선의 파장범위(0.001~5 nm)와 비슷하다. 이러한 전자빔을 생물체에 조사하면 전자가 DNA 구조를 이루는 특정부위와 에너지 공명을 일으키고 흡수되어 DNA를 들뜬상태로 전환시

키고, 이온, 라디칼 등의 파편으로 쪼개지거나 당 또는 인산기로 흡수된 에너지가 전달됨으로써 DNA 가닥의 절단을 일으킨다(Park et al. 2008, Ptasńska and Sanche 2006). 또한 감마선과 양성자 빔에 비하여 투과 깊이가 얇고 고에너지 빔 조사가 가능하다. 양성자 빔은 지금까지 백합 및 글레디오스 등의 화훼작물의 화색변이에 이용되었고(Sun et al. 2007), 국내에서 돌연변이원으로 적용한 사례는 한국들잔디(Lee et al. 2008, Jung et al. 2007)가 있으나 기내배양 식물체에 조사한 사례는 찾아보기 힘들다.

난 육종에 있어서 유전적 다양성 및 계통의 체계적 분류가 중요한데 예전에는 난의 잎, 꽃, 벌브 등과 같은 형태적 형질을 토대로 하는 방법을 이용하여 왔다. 하지만 이 같은 형태적 형질은 유전적으로 가까운 품종들을 구별해 내기가 어렵고, 재배방법 및 환경의 영향을 많이 받는다. ISSR 기법은 반복염기서열이 4~10회 반복적으로 genome상의 SSR이 상보적으로 증폭되어 품종 간에 다형성을 보이고, RAPD의 낮은 재현성, AFLP의 고비용, SSR의 복잡함을 극복할 수 있으며, SSR을 프라이머 결합부위로 이용하므로 증폭산물에 대한 정보를 유추할 수 있는 장점을 가지고 있다(Russel et al. 1997). RAPD (random amplified polymorphic DNA) 분석은 10개 내외의 염기서열로 구성되어 있으며 그 중 하나의 염기만 바뀌어도 증폭 양상이 달라지는 특성을 이용해 다형성 검정에 이용할 수 있다. RAPD는 target DNA의 염기서열에 대한 정보가 필요 없으며 그 기술이 간단하고 빠르다(Deragon and Landry 1992).

본 연구는 기내배양 식물체의 전자빔 조사에 따른 생장의 변화와 유전적 변이의 다양성을 ISSR 분석 및 RAPD 분석으로 검토하여 돌연변이원으로서 전자빔의 활용과 기내돌연변이육종의 기초자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

양란 심비디움(*Cymbidium* spp.)은 난 재배 농가(오कि드팜, 순천)에서 분양받았고, 무균상 내에서 표면소독시킨 난의 생장점을 채취하여 생장점 배양용 MS 기본배지(Murashige and Skoog 1962)에 원괴체를 증식하였다. 증식된 원괴체를 Lee et al. (1998)의 방법으로 근경유도배지(MS 기본배지, 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/L, 가압멸균 전 pH 5.8)와 신초

유도배지(MS 기본배지, malt extract 4 g/L, Casamino acid 2 g/L, potato starch 3.5 g/L, active carbon 0.2 g/L, NAA 0.1 mg/L, BA 1.0 mg/L, 가압멸균전 pH 5.8)에 각 20 개체 3반복 총 60 개체를 치상하여 전자빔 조사용 재료로 사용하였다. 배양실은 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $20 \text{ mol.m}^{-2}.\text{sec}^{-1}$ 광도로 조명(16시간/일)하면서 시료를 배양하였다.

전자빔 처리 및 기내 생장 조사

전자빔 조사는 2009년 12월 24일, 2 MeV/n의 빔에너지와 0.5 mA의 빔 전류 조건에서 10 Gy, 20 Gy, 50 Gy, 100 Gy, 200 Gy, 300 Gy (± 15) 선량별로 양란 심비디움의 원괴체에 각각 60 개체씩 한국 가속기 및 플라즈마 연구협회(Korea Accelerator and Plasma Research Association's, Cheorwon, Korea)의 ELV-8 가속기를 사용하여 조사하였다.

전술한 선량별로 전자빔을 조사한 양란 심비디움 원괴체를 각각 60개체씩 근경유도배지와 신초유도배지가 각각 포함된 배양병에 치상한 후 10주간 배양하여 원괴체 생존율 및 0.2 cm 이상 새로운 신초가 유도된 개체수의 백분율을, 그리고 20개체 3반복으로 유도된 신초장의 평균을 조사하였다.

DNA 추출

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

ISSR 및 RAPD 분석

기내배양하여 전자빔을 조사한 양란 심비디움 원괴체를 6종류의 선량(10 Gy~300 Gy)별로 각각 2개체씩과 대조구를 포함한 총 18개체의 시료를 공시하였다. ISSR 프라이머(University of British Columbia, Canada) 선발은 20개 프라이머로 예비 실험 후 밴드가 명확하고 다형성이 우수한 15개의 프라이머를 선발하여 분석에 사용하였다. ISSR PCR 반응은 25 ng의 template DNA, 10 pmol의 프라이머, *Taq* polymerase 1unit (iNtRON Biotechnology), 10×PCR reaction buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.3; 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl_2), 0.2 mM dNTP를 포함하는 25 μl 의 반응액을 PCR에 사용하였다. PCR 조건은 94°C 에서 5분간 초기 denaturation을 행한 뒤, 94°C 에서 1분간 denaturation, 52°C 에서 45초간 annealing, 72°C 에서 1분 30초를 10회 반복하고, 94°C 에서 1분간 denaturation, 48°C 에서 45초간 annealing, 72°C 에서 1분 30초간 extension 과정을 35회 반복하였다. 마지막으로 72°C 에서 7분간 반응시켰으며, ASTEC PC 818 (Astec, Japan)을 사용하여 하였다.

URATION, 48°C 에서 45초간 annealing, 72°C 에서 1분 30초간 extension 과정을 35회 반복하였다. 마지막으로 72°C 에서 7분간 반응시켰으며, ASTEC PC 818 (Astec, Japan)을 사용하여 하였다.

RAPD 프라이머(Operon Technologies, USA) 선발은 25개의 프라이머로 예비실험 후 밴드가 명확하고 다형성이 우수한 15개의 프라이머를 선발하여 분석에 사용하였다. RAPD PCR 반응은 25 ng의 template DNA, 10 pmol의 프라이머, *Taq* polymerase 1unit (iNtRON Biotechnology), 10×PCR reaction buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.3; 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl_2), 0.2 mM dNTP를 포함하는 25 μl 의 반응액을 PCR에 사용하였다. PCR 조건은 94°C 에서 4분간 초기 denaturation을 행한 뒤, 94°C 에서 1분간 denaturation, 37°C 에서 1분간 annealing, 72°C 에서 2분간 extension과정을 40회 반복하였다. 마지막으로 72°C 에서 7분간 반응시켰으며, Gene Amp[®] 2700 (Applied Biosystem, UK)을 사용하였다. PCR 산물은 15 μl 를 agarose 겔(1.5%)에 전기영동(50 V, 60분)한 후 ethidium bromide (EtBr)로 염색하여 Gel Doc XR (Bio-rad, USA)을 사용하여 주요밴드를 확인하였다.

데이터 분석

ISSR 및 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.

결과 및 고찰

기내 생장에 미치는 전자빔의 영향

전자빔 조사후 기내배양시킨 양란 심비디움 원괴체의 생존율을 조사한 결과 모든 시험구에서 98% 이상 생존율을 나타내었다(Fig. 1). 이는 양란 심비디움의 원괴체에 감마선 조사 시 선량의 증가에 따라 생존율이 감소하여 3~5 Krad (30~50 Gy) 사이의 선량에서 50%의 개체가 생존한 것(Sung et al. 2009)보다 높은 생존율을 나타낸 것이다. 담배와 벼 식물체의 캘러스 및 종자에 양성자빔, 중이온빔, 중성자빔을 처리한 결과(Bae et al. 2005a, Bae et al. 2005b, Bae et al. 2005c, Bae et al. 2000a, Bae et al. 2000b)에서도 방사선의

Fig. 1. Profiles of electron beam (2 MeV/n, 0.5 mA) irradiated *Cymbidium* spp. protocorm. A: Rhizome induction medium, B: Shoot induction medium.

선종과 선량에 따라 감수성이 다르게 나타났다.

각 선량별 원괴체에서 신초로 분화된 개체의 비율과 유도된 신초의 길이를 조사한 결과(Table 1), 두 종류의 배지 모두 선량의 증가에 따라 원괴체로부터 신초유도가 감소되었으며, 200 Gy 이상의 선량을 조사한 처리구에서는 근경유도배지에서 13.3%, 신초유도배지에서 31.6%로 전자빔처리로 대조구에 비해 기관분화가 크게 억제되었다. 이러한 결과는 덴드로비움(*Dendrobium* cv. Sonia)의 원괴체에 20 Gy와 30 Gy 선량으로 감마선 조사시 선량의 증가에 따라서 신초분화가 감소한 결과(Sheela et al. 2006)와 유사하였다.

원괴체에서 유도된 신초장은 신초유도배지 10~50 Gy 처리구에서 5.47~5.51 cm로 대조구 5.5 cm와 차이가 없었으며, 200 Gy 이상에서는 크게 감소하여 300 Gy에서 유도된 신초장은 0.78 cm로 대조구의 14% 수준이었다. 근경유도배지에서도 10~50 Gy 처리로 대조구의 4.02 cm와 차이를 나

타내지 않고, 100 Gy 이상 조사에서 신초장이 크게 감소하여 300 Gy에서 유도된 신초장은 0.65 cm로 대조구의 16% 수준이었다. 이는 덴드로비움(*Dendrobium* cv. Sonia)의 원괴체에 감마선을 조사하였을 때 20 Gy와 30 Gy에서 각각 3.4 cm와 2.0 cm로 대조구 초장평균 9.8 cm보다 감소한 결과(Sheela et al. 2006)와 유사하였다.

한편 배지에 포함된 생장조절물질의 종류에 따라 신초유도가 다르게 나타났는데, 사이토키닌의 농도가 높은 조건의 배지에서 신초유도율이 높고 초장도 길었다. 이것은 생장조절제의 기관분화에 대한 일반적인 경향을 나타낸 것으로 신초유도배지가 근경유도배지보다 사이토키닌의 일종인 BA의 농도가 높게 포함되어 있어 신초유도를 촉진시켰기 때문이다. 또한 옥신(NAA)의 농도가 높은 근경유도배지에서 신초가 분화된 것은 Kim et al. (1989)의 사례와 유사하며, 옥신의 농도가 높게 포함된 근경유도배지에서도 신초가 유도된 것으로

Table 1. Percentage (%) of shoot induction and shoot length of the *in vitro* cultured protocorms of *Cymbidium* spp. in 10 weeks under various dose of electron beam (2 MeV/n, 0.5 mA) irradiation.

Dosage (± 15 Gy)	Percentage of shoot induction (%) ^z		Shoot length (cm) ^y	
	RIM ^x	SIM ^w	RIM ^x	SIM ^w
Cont.	70.0	93.3	4.02 $\pm$ 1.69	5.50 $\pm$ 1.54
10	66.6	91.6	4.03 $\pm$ 1.87	5.47 $\pm$ 1.51
20	68.3	91.6	4.04 $\pm$ 1.72	5.51 $\pm$ 1.53
50	66.6	93.3	4.06 $\pm$ 1.74	5.47 $\pm$ 1.75
100	51.6	81.0	3.77 $\pm$ 1.64	5.06 $\pm$ 1.51
200	13.3	31.6	2.11 $\pm$ 1.13	3.05 $\pm$ 1.07
300	6.6	18.3	0.65 $\pm$ 0.21	0.78 $\pm$ 0.09

보아 배양체 내부로부터 사이토키닌류가 생성된 것으로 추정할 수 있다. 기내배양 중에 있는 배양체에서 성장조절물질의 자생적 생성 사례는 일부 난과식물에서 보고(Peres and Kerbaux 1999)되었다.

ISSR 및 RAPD 분석에 따른 유전적 다양성

기내 배양하여 6종류의 선량(10 Gy~300 Gy)별로 전자빔을 조사한 양란 심비디움 원괴체 각각 2개체씩과 대조구 6개체를 포함한 총 18개체의 시료를 공시하여 15개의 ISSR 프

Table 2. Primers sequence, number of total amplified bands and number of polymorphic bands in the ISSR analysis of protocorms of *Cymbidium* spp. with electron beam (2 MeV/n, 0.5 mA) irradiation^z.

ISSR Primer	Sequence	No. of total bands		No. of polymorphism bands		Polymorphism rate (%)	
		Control	EBT ^y	Control	EBT ^y	Control	EBT ^y
UBC 811	(GA)8C	5	6	0	1	0	16.6
UBC 827	(AC)8G	8	9	1	2	12.5	22.2
UBC 835	(AG)8Y ^c C	5	8	2	6	40.0	75.0
UBC 840	(GA)8YT	7	8	0	3	25.0	50.0
UBC 841	(GA)8YT	9	9	2	6	0	66.6
UBC 847	(CA)8RC	8	7	0	2	0	28.5
UBC 853	(TC)8AT	2	3	0	1	0	33.3
UBC 856	(AC)8YA	6	8	0	3	50.0	37.5
UBC 873	(GACA)4	8	6	4	4	20.0	66.6
UBC 861	(ACC)5	5	6	1	2	0	33.3
UBC 862	(AGC)6	3	3	0	1	0	33.0
UBC 866	(CTC)5	3	4	0	2	0	50.0
UBC 880	(GGAGA)3	1	3	0	3	0	100
UBC 889	DBD(AC)7	5	5	0	2	0	40.0
UBC 891	HVH(TG)7	5	5	0	0	0	0
Total		80	90	10	38	12.5	42.2

Table 3. Primers sequence, number of total amplified bands and number of polymorphic bands in the RAPD analysis of protocorms of *Cymbidium* spp. with electron beam (2 MeV/n, 0.5 mA) irradiation^z.

RAPD Primer	Sequence	No. of total bands		No. of polymorphism bands		Polymorphism rate (%)	
		Control	EBT ^y	Control	EBT ^y	Control	EBT ^y
OPA-01	CAGGCCCTTC	5	11	0	7	0	63.6
OPA-18	AGGTGACCGT	7	9	2	5	28.5	55.5
OPB-05	TGCGCCCTTC	4	8	2	6	50	75.0
OPB-06	TGCTCTGCCC	7	7	0	0	0	0
OPB-11	GTAGACCCGT	9	9	0	2	0	44.4
OPB-12	CCTTGACGCA	6	8	1	4	16.6	50.0
OPB-14	TCCGCTCTGG	3	4	0	0	0	0
OPB-16	TTTGCCCGGA	9	9	2	5	22.2	55.5
OPC-05	GATGACCGCC	7	9	1	5	14.2	55.5
OPC-10	TGTCTGGGTG	8	10	3	5	37.5	50.0
OPC-15	GACGGATCAG	6	9	1	6	16.6	66.6
OPC-16	CACACTCCAG	7	8	0	2	0	25.0
OPE-07	AGATGCAGCC	3	4	0	1	0	25.0
OPG-14	GGATGAGACC	5	5	0	0	0	0
OPG-18	GGCTCATGTG	6	11	0	5	0	45.4
Total		92	121	12	53	13.0	43.8

라이머로 PCR을 수행하였다(Table 2, Table 3). 대조구 6개체에서 총 밴드수는 최저 1개(UBC 880)에서 최고 9개(UBC 841)로 한 프라이머 조합당 평균 밴드수는 5.33개였으며, 10개 프라이머(UBC 811, UBC 840, UBC 847, UBC 853, UBC 856, UBC 862, UBC 866, UBC 880, UBC 891)에서는 모두 동일한 밴드패턴을 나타내었다. 다형성 밴드 수는 최소 0개(UBC 811, UBC 840, UBC 847, UBC 853, UBC 856, UBC 862, UBC 866, UBC 880, UBC 891)에서 최대 4개(UBC 873)로 평균 0.66개였다. 전자빔 조사구에서는 총 밴드 수는 최소 3개(UBC 853, UBC 862, UBC 880)에서 최대 9개(UBC 827)로 평균 밴드 수는 6.00개였으며, 다형성 밴드 수는 최소 0개(UBC 891)에서 최대 6개(UBC 835, UBC 841)로 평균 2.53개의 다형성 밴드가 검출되었다(Table 2).

ISSR 분석 결과, 대조구에서 증폭된 총 80개의 밴드 중 다형성 밴드는 10개로 12.5%의 다형성을 나타내었다. 전자빔 조사구에서는 총 90개의 밴드가 증폭되었고, 그 중 다형성 밴드는 38개로 42.2%의 다형성을 나타내었다. 또한 RAPD 기법으로 변이성을 분석한 결과(Table 3), 대조구에서 증폭된 총 92개 중 다형성 밴드는 12개로 13.0%의 다형성을 나타냈으며, 전자빔 조사구에서는 증폭된 총 121개의 밴드 중 다형성 밴드는 53개로 43.8% 다형성을 나타내었다. 이는 대조구보다 다형성이 3.5배 증대된 결과이며, 8년간 기내배양한 춘란과 한란 근경을 각각 30개체씩 RAPD 분석한 결과(Ryu et al. 2011)에서 얻은 다형성 26.4%와 36.1%보다 높은 결과로 전자빔처리가 장기간 기내배양으로 발생하는 체세포변이(somaclonal variation)보다 높게 다형성을 유발시킨 것으로

Fig. 2. ISSR (A~E) and RAPD (F~G) electrophoresis profiles for 2 MeV/n energy and 0.5 mA current electron beam irradiated *Cymbidium* spp. Amplification products were separated on agarose gels (1.6%) in 1xTAE buffer and photographed using gel documentation system (Bio-rad, USA). Lane M : 1 Kb ladder marker. Primer names are included in Table 2 and Table 3.

사료된다. 또한 30 Gy의 감마선을 조사한 흑녹두(*Vigna mungo*)의 ISSR 분석에서 33.3%의 다형성을 나타낸 것(Souframanien et al. 2002)보다 높은 수준의 변이성을 나타낸 것이다. Silva et al. (2006)이 기내 배양된 *Cymbidium*의 캘러스와 생장점 배양체의 RAPD 분석에서 모두 같은 밴드 패턴을 나타낸 것과는 다른 결과이다. 이상과 같이 전자빔 처리에 의하여 양란 심비디움 원괴체의 변이성이 증가하였음을 알 수 있다.

ISSR 분석 및 RAPD 분석 결과, 전자빔 조사구에서 증폭된 변이 밴드는 총 7개 primer (UBC 811, UBC 841, UBC 856, UBC 862, UBC 873, OPC-15, OPC-16)에서 11개가 검출되었고, 550~1800 bp 사이에 분포하였다(Fig. 2). 이러한 돌연변이의 원인으로 Brown (1993)은 방사선에 의해 매우 민감하게 반응하는 어떤 절편(염기)들이 손실, 삽입, 전좌, 역위 및 점 돌연변이 등에 의하여 프라이머의 인식범위가 손실 또는 생성되어 프라이머의 결속 부위간의 거리가 변하여 PCR 증폭시 증폭된 단편이 다형화 현상으로 나타난다고 하였다.

유전적 유사도 지수와 군집분석

RAPD와 ISSR 분석한 결과를 토대로 유전적 유사도 지수를 산출하여 양란 심비디움의 원괴체 개체들간 변이정도를

비교하였다.

ISSR 결과를 바탕으로 단순일치 계수(simple-matching coefficient)를 사용하여 유전적 유사도지수를 분석한 결과(Table 4), 유전적 유사도 지수는 최저 0.677(신초유도배지 100 Gy 처리구와 근경유도배지 6번 대조구 사이)에서 최고 1.000(신초유도배지 5번 대조구 근경유도배지 4번 대조구 사이)으로 18개체의 유전적 유사도 지수 평균은 0.828이었다. 대조구 6개체의 유전적 유사도지수 평균은 0.962였으며, 전자빔 조사구간의 유전적 유사도 지수 평균은 0.847로서 대조구보다 낮았다. 이는 류 (2012)가 민들레 종자에 양성자빔 조사시의 유전적 유사도 지수 평균은 0.790로 무처리구의 0.994보다 낮게 나타나 방사선 조사에 의해 변이성이 증가한 것과 유사하였다.

RAPD 분석에서 유전적 유사도 지수를 분석한 결과(Table 5), 유전적 유사도 지수는 최저 0.608(근경유도배지 50 Gy 처리구와 신초유도배지 대조구 6번 사이)에서 최고 1.000(근경유도배지 대조구 2번과 근경유도배지 대조구 1번 사이)으로 18개체의 유전적 유사도 지수 평균은 0.808이었다. 대조구 6개체의 유전적 유사도 지수 평균은 0.963이었으며, 근경유도배지에서 배양한 개체들 간의 유전적 유사도 지수 평균은 0.799, 신초유도배지에서 배양한 개체들 간의 유전적 유사

Table 4. Genetic similarity matrix of electron beam irradiation of *in vitro* cultured *Cymbidium* spp. by ISSR analysis^z.

	Cont. ^y	Cont. ^y	Cont. ^y	Cont. ^x	Cont. ^x	Cont. ^x	10Gy ^y	10Gy ^x	20Gy ^y	20Gy ^x	50Gy ^y	50Gy ^x	100Gy ^y	100Gy ^x	200Gy ^y	200Gy ^x	300Gy ^y	300Gy ^x
cont. ^y	1.000																	
Cont. ^y	0.979	1.000																
Cont. ^y	0.958	0.958	1.000															
Cont. ^x	0.938	0.938	0.917	1.000														
Cont. ^x	0.938	0.938	0.917	1.000	1.000													
Cont. ^x	0.938	0.938	0.979	0.938	0.938	1.000												
10Gy ^y	0.781	0.781	0.781	0.719	0.719	0.760	1.000											
10Gy ^x	0.771	0.771	0.771	0.708	0.708	0.750	0.927	1.000										
20Gy ^y	0.781	0.781	0.781	0.719	0.719	0.760	0.979	0.948	1.000									
20Gy ^x	0.802	0.802	0.802	0.781	0.781	0.823	0.854	0.885	0.875	1.000								
50Gy ^y	0.771	0.750	0.750	0.708	0.708	0.729	0.906	0.854	0.906	0.781	1.000							
50Gy ^x	0.781	0.760	0.781	0.760	0.760	0.802	0.750	0.760	0.750	0.875	0.802	1.000						
100Gy ^y	0.719	0.719	0.698	0.719	0.719	0.677	0.896	0.844	0.896	0.771	0.844	0.708	1.000					
100Gy ^x	0.781	0.760	0.760	0.760	0.760	0.781	0.729	0.740	0.729	0.813	0.802	0.896	0.729	1.000				
200Gy ^y	0.802	0.781	0.781	0.781	0.781	0.750	0.740	0.750	0.792	0.823	0.875	0.771	0.917	1.000				
200Gy ^x	0.813	0.792	0.792	0.771	0.771	0.792	0.760	0.750	0.760	0.823	0.813	0.885	0.760	0.948	0.927	1.000		
300Gy ^y	0.792	0.771	0.750	0.771	0.771	0.750	0.740	0.708	0.740	0.760	0.813	0.844	0.760	0.885	0.948	0.896	1.000	
300Gy ^x	0.792	0.771	0.771	0.750	0.750	0.771	0.740	0.750	0.740	0.802	0.813	0.885	0.740	0.948	0.948	0.958	0.896	1.000

^zGenetic similarity was calculated on the basis of simple-matching coefficients. ^yRhizome induction medium. ^xShoot induction medium

Table 5. Genetic similarity matrix of electron beam irradiation of *in vitro* cultured *Cymbidium* spp. by RAPD analysis^z.

	Cont. ^y	Cont. ^y	Cont. ^y	Cont. ^x	Cont. ^x	Cont. ^x	10Gy ^y	10Gy ^x	20Gy ^y	20Gy ^x	50Gy ^y	50Gy ^x	100Gy ^y	100Gy ^x	200Gy ^y	200Gy ^x	300Gy ^y	300Gy ^x
cont. ^y	1.000																	
Cont. ^y	1.000	1.000																
Cont. ^y	0.992	0.992	1.000															
Cont. ^x	0.915	0.915	0.923	1.000														
Cont. ^x	0.923	0.923	0.931	0.977	1.000													
Cont. ^x	0.915	0.915	0.923	0.985	0.992	1.000												
10Gy ^y	0.800	0.800	0.808	0.762	0.754	0.762	1.000											
10Gy ^x	0.685	0.685	0.692	0.677	0.685	0.692	0.838	1.000										
20Gy ^y	0.723	0.723	0.715	0.685	0.677	0.669	0.862	0.823	1.000									
20Gy ^x	0.738	0.738	0.731	0.762	0.738	0.746	0.708	0.731	0.738	1.000								
50Gy ^y	0.677	0.677	0.669	0.623	0.615	0.608	0.831	0.854	0.923	0.723	1.000							
50Gy ^x	0.754	0.754	0.746	0.777	0.754	0.762	0.754	0.762	0.754	0.938	0.754	1.000						
100Gy ^y	0.692	0.692	0.685	0.669	0.646	0.654	0.846	0.823	0.923	0.769	0.954	0.800	1.000					
100Gy ^x	0.731	0.731	0.738	0.738	0.731	0.738	0.762	0.754	0.808	0.823	0.762	0.823	0.808	1.000				
200Gy ^y	0.777	0.777	0.769	0.800	0.777	0.785	0.746	0.723	0.762	0.915	0.731	0.900	0.777	0.800	1.000			
200Gy ^x	0.738	0.738	0.731	0.762	0.754	0.762	0.723	0.777	0.754	0.908	0.738	0.923	0.785	0.838	0.885	1.000		
300Gy ^y	0.754	0.754	0.746	0.746	0.723	0.731	0.738	0.792	0.738	0.831	0.754	0.862	0.738	0.746	0.900	0.862	1.000	
300Gy ^x	0.731	0.731	0.723	0.754	0.746	0.754	0.731	0.769	0.746	0.915	0.746	0.931	0.792	0.831	0.892	0.992	0.869	1.000

^zGenetic similarity was calculated on the basis of simple-matching coefficients. ^yRhizome induction medium. ^xShoot induction medium

도지수 평균은 0.814로 나타났다. 이러한 결과는 감마선을 조사한 자란 8개체를 RAPD 분석하여 도출된 최저 0.541에서 최고 0.770 사이(Lee 2005)의 유전적 유사도지수보다 높게 나타난 것이다.

RAPD와 ISSR 분석결과를 토대로 평균연결법으로 군집분석을 실시한 결과, 전자빔 처리시 ISSR 분석(Fig. 3)에서 3개, RAPD 분석(Fig. 4)에서 2개의 그룹으로 나뉘어졌으며, 대조구와 전자빔 처리구가 모두 분리되어 각각 독립적인 그룹으로 유집되었다. 이러한 결과는 자란의 종자에 감마선을 조사하여 발아시킨 유묘의 RAPD 분석에서 대조구와 빔처리구가 각각 다른 그룹으로 유집된 것(Lee 2005)과 유사한 결과이다.

이상과 같이 RAPD와 ISSR 분석 결과를 보면 양란 심비디움의 원괴체에 전자빔을 처리함으로써 유전적 다형성이 증가하였으며, 이는 장기간 기내 배양한 배양체에서 보인 유전적 다형성(Ryu et al. 2011) 보다 높은 수준이었다. 따라서 전자빔이 돌연변이원으로 단기간 내에 기내 배양중인 난 기관의 유전적 변이를 유발시킨 것으로 판단된다. 이러한 결과를 토대로 높은 유전적 변이를 가진 개체를 선발, 식물체로 재분화시켜 육성한다면 난과 식물의 육종소재개발의 기초자료로서 활용할 수 있을 것으로 기대된다(Sheela et al. 2006, Bae et al. 2005a, Lee et al. 1998).

Fig. 3. Dendrogram illustrating genetic relationships among electron beam treatment protocols of *Cymbidium* spp. generated by cluster analysis with average linkage method. A total of 87 ISSR bands produced by 15 primers were calculated for the clustering. Eighteen plant materials were treated with electron beam shown in Table 1.

Fig. 4. Dendrogram illustrating genetic relationships among electron beam treatment protocorm of *Cymbidium* spp. generated by cluster analysis with average linkage method. A total of 121 RAPD bands produced by 15 primers were calculated for the clustering. Eighteen plant materials were treated with electron beam shown in Table 1.

적 요

기내배양한 양란 심비디움 원괴체에 전자빔(2 MeV/n, 0.5 mA)을 10 Gy~300 Gy로 조사하여 생장 변화와 유전적 변이의 다양성을 검토하였다. 전자빔을 조사 후 배양 10주째에 선량의 증가에 따라 원괴체로부터 신초유도가 감소하였고, 200 Gy 이상의 선량을 조사한 처리구에서는 신초분화가 크게 억제되었다. 원괴체 18개체를 ISSR 분석한 결과 대조구는 12.5% 다형성을 나타내었고, 전자빔 조사구에서는 42.2%의 다형성을 나타내었다. RAPD 분석한 결과 대조구에서 13%의 다형성을 나타내었고, 전자빔 조사구에서는 43.8%의 다형성을 나타내었다. 따라서 RAPD 및 ISSR 분석 모두에서 전자빔 조사시 대조구보다 3.5배 정도 다형성이 증가한 것으로 나타났다. 유전적 유사도 지수(GSM)는 전자빔 처리가 대조구보다 낮게 나타나 전자빔 처리에 의하여 개체들 간의 유전적 다양성이 높아진 것으로 보인다. 군집분석 결과 RAPD와 ISSR 분석 모두 대조구와 전자빔 처리구가 분리되어 그룹을

이루었다. 이와 같이 전자빔 조사로 기내 배양 양란 심비디움의 유전적 다형성이 증대됨을 확인하였다.

사 사

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

인 용 문 헌

1. Abe T, Bae CH, Ozaki T, Wang JM, Yoshida S. (2000) Stress-tolerant mutants induced by heavy-ion beams. Proceedings of 39th Gamma Field Symposium, Naka-gun, Ibaraki-ken, Japan 39: 45-56.
2. Bae CH, Abe T, Matsuyama N, Fukunishi N, Nagata T, Nakano T, Kaneko Y, Miyoshi K, Matsushima H, Yoshida S. (2001) Regulation of chloroplast gene expression is affected in *ali*, a novel tobacco albino mutant. Ann. Bot. 88: 545-553.
3. Bae CH, Abe T, Nagata N, Fukunishi N, Matsuyama T, Nakano T, Yoshida S. (2000a) Characterization of a periclinal chimera variegated tobacco (*Nicotiana tabacum* L). Plant Sci. 151: 93-101.
4. Bae CH, Abe T, Kim DC, Lee YI, Jong JS, Min KS, LEE HY. (2000b) Effect of a heavy-ion beam irradiation on anthers, calli and seeds of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4. Plant Biotechnol. 27(2): 109-115.
5. Bae CH, Chai JS, Kim JH, Yang TG, Lyu JI, Lee HY, Yang DC. (2005a) Characteristics of tobacco and rice plants irradiated with neutron beam. Kor. J. Plant Res. 18(3): 359-366.
6. Bae CH, Lee YI, Kim DC, Min KS, Kim JH, Jung JS, Lee HY, Yoshida S. (1999) Characterization of *in vitro* growth and differentiation of an albino mutant of *Nicotiana tabacum* L. Plant Biotechnol. 26(3): 197-203.
7. Bae CH, Lyu JI, Kim MS, Abe T, Lee HY, Yang DC. (2005b) Growth and DNA alteration of heavy-ion beam irradiated tobacco (*Nicotiana plumbaginifolia*) plant. Kor. J. Plant Res. 18(1): 169-178.
8. Bae CH, Lyu JI, Sarantuya G, Chai JS, Kim JH, Yang TG, Lee MY, Yang DC. (2005c) Effects of proton beam irradiation on germination and growth of tobacco and rice

- plants. Kor. J. Plant Res. 18(3): 462-469.
9. Bae SH. (2011) Genetic variability of *in vitro* cultured organs in *Cymbidium goeringii* and *Cymbidium* spp. Sunchon National University Master's Degree Thesis. pp. 13-44.
 10. Brown PTH. (1989) DNA methylation in plants and its role in tissue culture. Genome 31: 717-729.
 11. Chung JD, Chun CK, Kim SS. (1984) Asymbiotic germination of *Aerids japonicum*. I. Determination of optima medium and cultural condition for germination of seeds and growth of seedling. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 25(4): 305-312.
 12. Deragon JM, Landry BS. (1992) RAPD and other PCR-based analysis of plant genomes using DNA extracted from small leafdisks. PCR Methods Appl. 1: 175-180.
 13. Fang G, Hammar S, Grumet R. (1992) A quick and inexpensive method of removing polysaccharides from plant genomic DNA. Biotechniques 13: 52-55.
 14. Hiroyasu Y, Akemi S, Yoshihiro H, Konosuke D, Atsushi T, Toshikazu M. (2009) Mutation induction with ion beam irradiation of lateral buds of chrysanthemum and analysis of chimeric structure of induced mutants. Euphytica 165: 97-103.
 15. IAEA. (2010) <http://www-mvd.iaea.org>.
 16. Jia CF, Li AL. (2008) Effect of gamma radiation on mutant induction of *Fagopyrum dibotrys* Hara. Photosynthetica. 46(3): 363-369.
 17. Jung JH, Kim DY, Hong MJ, Kim JY, Park SH, Lee BC, Han YH, Seo YW. (2007) Effect of electron beam on seed germination and seedling growth of creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.). Kor. J. Breed. Sci. 39(1): 77-81.
 18. Kim KW, Han YO, Kim JC. (1989) Effect of culture conditions on the multiplication of *Cymbidium* protocorm-like bodies *in vitro*. Resources Devel. 8: 41-46.
 19. Kim MS, Rhee HK, Park SG, Shin SH, Jung HY and Lim JH. (2011) A dark purple *Cymbidium* cultivar 'Purple Star' with medium sized plant for pot flower. Kor. J. Breed. Sci. 43(6): 559-563.
 20. Kusumoto, M. (1980) Effects of coconut milk, agar and sucrose concentrations and medium pH on the proliferation of *Cymbidium* protocorm-like bodies cultured *in vitro*. J. JPN. Horticult. Sci. 48(4): 503-509.
 21. Kim JH. (2009) Effect of gamma irradiation on growth and radiosensitivity of *Phalaenopsis* cultured *in vitro*. The Graduate School, Catholic University of Daegu. Master's Thesis.
 22. Larkin PJ, Scowcroft WR. (1981) Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60: 197-214.
 23. Lee HY, Jung JS and Lee JS. (1998) Induction of chlorophyll deficient mutant plant of *Cymbidium kanran* by EMS treatment. Kor. J. Plant Tissue Cult. 25:183-187.
 24. Lee YJ, Hong MJ, Kim DY, Lee TG, Kim DS, Kim JB, Lee BC, Han YH, Seo YW. (2008) Germination and seedling growth in response to ionizing radiation in creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.). Kor. J. Breed. Sci. 40(1): 15-21.
 25. Lee JS, Kwack BH. (1985) Studies on ecology of Korean native wild orchids III. -Geographical distribution of genus *Cymbidium*. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 26(2): 140-144.
 26. Lee KH. (2005) γ -ray radiation on *Bletilla striata* R. seeds and occurrence of variation in the seedlings. Chonbuk National University. Master's Thesis.
 27. Lee YK, Chang HH, Kim WR, Kim JK, Kim JS. (1989) RAPD pattern of radiation induced variants of oyster mushroom(*Pleurotus ostreatus*). Korean J. Environ. Agric. 17(3): 195-199.
 28. Martins M, Sarmiento D, Oliveira MM. (2004) Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. Plant Cell. Rep. 23: 492-496.
 29. MIFAFF (Ministry of Food, Agriculture, Forestry and Fisheries). (2010). The present status of cultivation in flower crops. Gwacheon, Korea.
 30. Murashige T, Shoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
 31. Ptasńska S, Sanche L. (2006) On the mechanism of anion desorption from DNA induced by low energy electrons. J. Chem. Phys. 125: 144713-144722.
 32. Park SY, Noh HA, Cho H, Dumont A, Ptasinska S, Bass AD, Sanche L. (2008) DNA damage by X-ray and low energy electron beam irradiation. J. Kor. Radiation Protec. 33(2): 53-59.
 33. Park PH, Kim MS, Lee YR, Park PM, Lee DS, Yae WB. Analysis of genetic diversity in *Cymbidium* varieties using SRAP. Kor. J. Breed. Sci. 43(5): 399-404.
 34. Peres LEP, Kerbauy GB. (1999) High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl (Orchidaceae). Plant Cell Reports 18: 1002-1006.

35. Rego LV, Faria RT. (2001) Tissue culture in ornamental plant breeding: A review. *Crop Breed. Appl. Biotech.* 1(3): 283-300.
36. Russel TR, Fuller JD, Macaulay M, Hatz BG, Jahoor A, Powell WP, Waugh R. (1997) Direct comparison of level of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs, and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.* 95: 714-722.
37. Ryu, JH. (2012) Growth and development characteristics and genetic diversity analysis of genus *Taraxacum* accessions collected in Korea. Sunchon National University. Ph.D. Thesis. pp.57-61.
38. Ryu JH, Lee HY, Bae CH. (2011) Variation analysis of long-term *in vitro* cultured *Cymbidium goeringii* lindley and *Cymbidium kanran* Makino. *Kor. J. Plant Res.* 24(2): 139-149.
39. Sheela VL, Sarada S, Anita S. (2006) Development of protocorm-like bodies and shoots in *Dendrobium* cv. Sonia following gamma irradiation. *J. Trop. Agri.* 44(1-2): 86-87.
40. Silva JA, Singh N, Tanaka M. (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.
41. So IS, Choi JY, Ko TS, Oh BJ. (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(2):11-18.
42. Souframanien J, Pawar SE, Rucha AG. (2002) Genetic variation in gamma ray induced mutants in blackgram by RAPD and ISSR markers. *Indian J. Genet. Plant Breed.* 62(4): 291-295.
43. Sung MS, Park YC, Ko TS, Kang SG, Yang SH, Ko SJ, Sung SJ. (2009) Induction of mutant by irradiation of γ -ray on *in vitro* protocorm like body of *Cymbidium*. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 27 (Suppl. II) p. 143.
44. Sun M, Li P, Zhang QX. (2007) Flower color and florescence mutants obtained using electron beam irradiation of chrysanthemum buds. *Acta. Horticult.* 760(2): 667-672.
45. Zhou TS. (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.