

유전자종을 이용한 형질전환 심비디움 식물체 생산체계 최적화

노희선 · 김미선 · 이유미 · 이이레 · 이상일 · 김종보

Optimization of particle gun-mediated transformation system in *Cymbidium*

Hee-Sun Noh · Mi-Seon Kim · Yu-Mi Lee · Yi-Rae Lee · Sang-Il Lee · Jong-Bo Kim

Received: 8 November 2011 / Accepted: 21 November 2011
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract This study is conducted to develop an efficient transformation system via particle bombardment with PLBs (Protocorm-like bodies) in *Cymbidium*. For this, pCAMBIA3301 vector which carries a herbicide-resistant *bar* gene and *gus* gene as a reporter gene was used for transformation with *Cymbidium* cultivars ‘Youngflower × masako’ line. To select transformants, proper concentration of herbicide, PPT (phosphinotricin), should be determined. As a result, 5 mg/l of PPT was selected as a proper concentration. Further, proper conditions for particle bombardment were determined to obtain a high frequency of transformation. Results showed that 1.0 µg of DNA concentration, 1,100 and 1,350 psi for helium gas pressure, 1.0 µm of gold particle and 6 cm of target distance showed the best result for the particle bombardment experiment. Also, pre-treatment with combination 0.2 M sorbitol and 0.2 M mannitol for 4 hrs prior to genetic transformation increased the transformation efficiency up to 2.5 times. Using transformation system developed in

this study, 3.2 ~ 4.0 transgenic cymbidium plants can be produced from 100 bombarded PLBs on average. Putative transgenic plants produced in this system confirmed the presence of the *bar* gene by PCR analysis. Also, leaves from randomly selected five transgenic lines were applied for Basta solution (0.5% v/v) to check the resistance to the PPT herbicide. As a result, three of them showed resistance and one of them showed the strongest resistance with the maintenance of green color as non-transformed plants showed. Using this established transformation system, more genes of interests can be introduced into *Cymbidium* plants by genetic transformation in the future.

Keywords *Cymbidium*, Particle bombardment, Protocorm-like bodies, Transformation, Transgenic plants

서론

심비디움은 인도북부에서부터 인도네시아, 타이, 남베트남, 중국, 한국 및 일본에 널리 걸쳐 있어 심비디움 벨트를 형성하고 있는 난과식물의 대표적 양란류의 하나이다 (Kim et al. 2010). 일부 착생종도 있으나 대부분 지생종이며 주로 해발 500 ~ 1,500 m의 산지에 자생하고 있다 (Coker 1993).

대표적인 상록성 초본식물이며 약 44개의 원종이 자생하며 (Du Puyd and Kribb 1988), 절화 또는 분화수명이 길어 전세계적으로 인기가 높은 난과식물이다 (Kim et al. 2010)

심비디움의 재배면적은 난 전체 재배면적 310 ha의 약 41%인 128 ha이며, 생산액은 391억 원으로 우리나라에서 재배되고 있는 난 품목 중 재배면적 및 생산량이 가장 높

H.-S. Noh, M. -S. Kim and Y. -M Lee should be considered as co-first authors.

H.-S. Noh · Y.-R. Lee · S.-I. Lee · J.-B. Kim (✉)
건국대학교 의료생명대학 생명과학부 생명공학전공
(Division of Life Science, major of Biotechnology, Konkuk University, Choong-Ju 380-701, Korea)
e-mail: jbhee1011@kku.ac.kr

M.-S. Kim
국립원예특작과학원 화훼과
(Division of Floriculture, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Su-Weon 441-440, Korea)

Y.-M. Lee
한국원자력연구원 정음방사선과학연구소
(Advanced Radiation Technology Institute, KAERI, Jeong-Up, 580-185, Korea)

은 작목이다(Kim et al. 2008a).

심비디움 육종은 주로 일본에 의해 이루어졌으며, 우리나라에서의 육종은 1990년도 초반부터 원예연구소에서 최초로 시작되어 현재 약 17품종이 개발된 상태이다(Kim et al. 2008b). 화색, 화기형태, 내서성 및 다화성 등의 주요 형질개량목표 외에도 세균, 곰팡이 및 바이러스 저항성, 내건조성과 내저온성을 갖는 심비디움 품종개발이 절실한 상황이다.

이러한 육종목표를 달성하기 위하여 기존의 교배, 선발 및 돌연변이 육종 외에 식물형질전환 기술의 도입에 의한 형질전환 식물체 생산관련 연구도 벼, 옥수수, 감자, 밀, 보리 등 주요 식량작물 외에도 백합(Kamo and Han 2008; Azadi et al. 2010), 히야신스(Popowich et al. 2007) 알스트로메리아(Lin et al. 2000; Kim et al. 2007), 글라디올러스(Kamo et al. 2000), 호접란(허 등 2009; Anzai et al. 1996; Chai et al. 2002 Mishiba et al. 2005) 및 덴드로비움(Men et al. 2003) 등 단자엽 화훼류에서도 보고되고 있다.

심비디움에서는 아그로박테리움과 유전자총 이 두가지 방법을 이용한 형질전환 체계가 보고되었는데 다른 단자엽화훼류 특히 호접란이나 덴드로비움과 비교하여 형질전환체 개발에 관한 연구가 매우 부진한 실정이다. 심비디움 형질전환 관련 연구를 조사한 Lee 등(2010)에 의하면 국내에서는 유전자총을 이용하여 Hong(1996) 등에 의해 최초로 *gus* 유전자 발현을 확인한 후, kanamycin으로 첨가된 선발배지에서 선발과정을 거쳐 형질전환체로 추정되는 rhizome 개체들을 생산하였다. PCR 검정을 통해 *np11* 유전자가 도입되었음을 확인하였으나 실제 형질전환 심비디움 식물체 생산으로는 이어지지 못했다. 한편 외국에서는 역시 유전자총을 이용하여 Yang 등(1999)에 의해 형질전환 심비디움 개체가 생산되었는데 kanamycin 선발배지에서 선발된 형질전환 심비디움 PLB들과 신초로부터 *gus* 유전자발현과 *np11* 유전자 도입을 PCR과 Southern blot을 통해 확인하였다.

최근에는 Chin 등(2007)에 의해 아그로박테리움을 이용한 형질전환 방법으로 hygromycin 선발배지에서 hygromycin 저항성을 나타내는 개체들을 선발하여 *gus* 발현까지 확인하였다. 또한 이들 개체들로부터 *gus* 및 *hpt* 유전자 도입을 PCR 검정을 통해 확인하고, single copy 유전자가 들어간 개체생산을 Southern blot 검정으로 확인하였다.

형질전환 난과식물체 생산 연구에 있어서 덴드로비움(Kuehnle and Sugii 1992)을 시작으로 많은 연구가 보고되었지만, 심비디움 식물체에서는 1992년 이후로 3~4편 내외의 소수에 불과한 실정이다. 이러한 어려움에도 불구하고 적합한 선발약제와 선발과정 개선, 유전자총 조건 확립, 아그로박테리움 접종 및 공동배양 조건확립, acetosyringone 및 삼투압조절제 등의 첨가 등 다양한 분야에

서의 개선을 통한 고효율의 형질전환 체계가 확립된다면 형질전환 심비디움 식물체가 대량 생산되는 시스템 개발도 가능할 것이다.

따라서 본 연구에서는 유전자총을 이용한 형질전환 식물체 생산체계 확립을 위하여 헬륨가스 압력, 유전자총 발사횟수, gold particle 크기 및 발사체와의 거리 등의 최적 조건을 구명하고 이를 통해 생산된 형질전환 식물체의 효율적 선발을 위한 삼투압조절제의 전처리 효과를 검증하고자 수행되었다.

재료 및 방법

식물재료

형질전환 연구에 사용된 식물재료는 국립원예특작과학원 화훼과에서 분양받은 4가지 심비디움 계통(97-0773-93, 97-0773-107, 97-0773-300, 용플라워×마사코) 중 조직배양 반응성이 가장 우수하고 번식이 잘되는 용플라워×마사코 계통의 기내 PLB (protocorm-like-body)를 재료로 이용하였다. PLB 증식을 위해 뿌리 및 신초를 제거한 PLB를 일정한 크기(가로×세로 0.5 cm)로 자른 후, 심비디움 PLB 증식배지인 HCa 배지(hyponex 3 g/l trypton 1.5 g/l, CaNO₃ 0.5 g/l, sucrose 20 g/l, activated charcoal 1 g/l, Plant agar 7.5 g/l, pH 5.2)에 치상 후 4주마다 계대배양을 실시하였다. 본 실험에서 모든 기내 배양은 온도 24±1°C, 16시간 광주기 조건 하에서 이루어졌다.

선발마커 농도

형질전환 식물체 선발과정에서 선발배지에 첨가되는 항생제 및 제초제의 선발농도는 매우 중요한 요인이다. 본 실험에 선발약제로서 첨가되는 PPT(phosphinotricin)의 적정처리 농도를 알아보기 위해 HCa배지에 PPT를 0, 3, 5, 10, 15 mg/l을 각각 첨가 후, 배양 4주후에 신초발생 및 고사율을 조사하였다.

형질전환 벡터 및 유전자 코팅

유전자총을 이용한 실험에 사용된 벡터는 CaMV(Cauliflower Mosaic Virus) 35S 프로모터와 nopaline synthase terminator에 의해 조절되는 phosphinotricin(*ppt*) 유전자를 선발표지로 포함하고, *gus* 유전자를 reporter 마커로 포함하는 pCAMBIA3301 벡터(CSIRO, Canberra, Australia)를 사용하였다.

유전자를 gold particle에 코팅하기 위하여 pCAMBIA3301 벡터로부터 HiYield™ Plasmid Mini kit(Real Biotech Cor-

poration, Taiwan)를 이용하여, plasmid DNA를 추출하였다. 추출한 plasmid DNA는 1.0 μm의 gold 50 mg을 70% 에탄올에서 10분간 소독 후, 0.1 M spermidine 300 μl 첨가 후 교반하였다. XHO-buffer (5 M NaCl 30 μl, 2 M Tris (pH8.0) 5 μl, ddH₂O 965 μl) 150 μl를 첨가한 후 6,000 rpm으로 5초간 centrifuge를 실시 후, 상층액을 제거하고 2.5 M CaCl₂ 250 μl, XHO-buffer 250 μl를 첨가하였다. 이 때 plasmid DNA 20 μl, 0.1M spermidine 200 μl를 첨가하고 10초간 교반 한 뒤 2.5 M spermidine 150 μl 첨가 후, 다시 10분간 교반을 실시하였다. 그 후 1,300 rpm으로 몇 초간 centrifuge 후 상층액을 제거한 다음 100% 에탄올 500 μl 첨가하여, 7,000 rpm에서 centrifuge 처리 후, 위 과정을 반복한다. 15 ml tube에 코팅된 DNA-gold 복합체를 옮긴 후, 100% 에탄올을 이용하여, 10 ml로 최종 volume을 맞추어 사용하였다.

유전자총 조건확립 실험

Particle bombardment 실험은 2일전 심비디움 PLB를 0.5 cm의 크기로 잘라 HCa 기본배지의 정중앙부분에 직경 4 cm 크기로 PLB 절편체를 치상 후, Biolistic Particle Delivery System (PDS-1000/He, Bio-red, USA)을 사용하여 PLB에 bombarding하였다.

유전자총의 조건확립을 위하여 pCAMBIA3301 벡터를 이용하여 DNA 농도 (1.0, 2.0 μg/1회 bombardment), gold particle 크기 (0.6, 1.0 및 1.6 μm), target 거리 (6, 9 cm) 그리고 헬륨가스 압력 (900, 1,100, 1,350 psi)을 달리하여 심비디움 형질전환에 적합한 적정 유전자총 조건을 구명하고자 하였다. Bombardment 실시 후, PLB를 PPT 5mg/l가 첨가된 HCa선발배지에 치상하여 3주마다 계대배양한 후, 6주 후에 PPT저항성 PLB 형성율을 조사하였다.

삼투압 처리효과

삼투압조절제 처리가 gus 유전자 일시발현 및 형질전환 효율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 4가지 처리구 (삼투압조절제 무처리, 0.2 M Mannitol, 0.2 M Sorbitol, 0.2 M Mannitol + 0.2 M Sorbitol 혼용처리)를 bombarding 하기

전에 위에서 기술한 4가지 처리구대로 배지에 첨가하여 4시간 동안 배양 후, bombardment를 수행하고 나서 삼투압 조절제가 포함되어 있지 않은 PPT 5 mg/l만 첨가된 HCa 선발배지에 3주간 배양한 후, 3주에 1회씩 계대배양을 수행하며 12주간 배양한다.

Bombardment 후 6주가 경과하고 나서, PPT-저항성 PLB 생존율을 측정하고 다시 3주 뒤에 GUS 발색검정을 실시한다. 최종적으로 12주가 경과할 때, 신초가 형성된 형질전환 PLB 수를 측정한다.

형질전환 식물체 순화

유전자총을 이용하여 형질전환 된 PLB는 PPT 5mg/l가 첨가된 HCa선발배지로 옮겨 4주마다 계대배양을 실시하며 12주간 선발하였다. 선발을 마친 PLB는 PPT가 첨가되지 않은 HCa배지로 옮겨 shoot 및 root를 유도 하였다. 4주마다 계대배양을 실시하며 식물체가 5~7 cm 정도 자라면 기외상태에서 순화과정을 거친 후, 온실로 이식하였다. 상기와정에 사용된 배지 및 각 단계별 배양기간에 대해 요약하였다 (Table 1).

형질전환 심비디움의 PCR 분석

형질전환 추정 식물체의 PLB 및 shoot를 채취한 후, 막자사발과 액체질소를 이용하여 미세한 가루로 분쇄한 후 genomic DNA Extraction Mini kit.(Real Biotech Corporation, Taiwan)를 이용하여 DNA를 추출하였다. PCR 분석은 유전자의 도입여부를 확인하는데 효과적인 분석방법인데 본 실험에서는 bar 유전자 (552 bp)의 도입을 확인하기 위해 forward primer로서 5'-TCAAATCTCGGTCGGGACGGGCA-3', reverse primer로서 5'-ATGAGCCCAGAACGCC-3'를 이용하여 pre-denaturation은 94℃에서 4분, denaturation은 94℃에서 30초, annealing은 58℃에서 30초, extension은 72℃에서 50초 로 33 cycle로 수행하였으며, last extension은 72℃에서 10분간 반응시켜 DNA를 증폭하였다. 증폭된 DNA는 0.7% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 목표 유전자의 도입여부를 확인하였다.

Table 1 Composition of media used for each step and its culture period in this study

Steps	Period	Media
Propagation PLB		HCa medium (Hyponex 3 g/l, Tryton 1.5 g/l, CaNO ₃ 0.5 g/l, Sucrose 20 g/l, Charcoal 1 g/l, Agar 7.5 g/l, pH 5.2)
Pre-culture	2 days	HCa medium
Delayed selection	3 weeks	HCa medium
Selection	12 weeks	HCa medium containing PPT 5mg/l
Shoot and root induction	8 ~ 12 weeks	HCa medium

GUS 발현 검정

Bombarding 처리가 끝난 PLB 절편을 Jefferson 등 (1987)의 방법에 따라 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indole-*glucuronidase* (*X-glc*) 용액에 침지하여 37°C에서 12시간 이상 반응 시킨 후, 70% 에탄올로 탈색시켜 GUS 발색여부와 정도를 관찰하였다.

제초제 저항성 검정

형질전환 심비디움 식물체에 도입된 *bar* 유전자의 발현을 확인하기 위하여 PPT선발을 거친 심비디움 형질전환 식물체의 엽을 절취한 후, Basta 용액 (0.5% v/v)에 처리하여 6일후에 갈변 및 고사를 관찰하였다.

결과 및 고찰

PPT (Phosphinotricin) 적정농도 선발

예비실험에서 심비디움 4개 계통 중 융플라워×마사코 계통이 PLB 증식율도 우수하였고, 높은 신초형성율을 보여 형질전환 실험체료로 선택하였다 (데이터 미제시). 이 계통을 이용하여 선발약제의 적정농도를 선발하기 위한 PPT 처리실험을 수행한 결과, 5 mg/l의 PPT 처리조건에서 배양 4주후에 PLB 생육도 저하되고 PLB로부터 신초형성도 억제되는 현상을 관찰하여 PPT를 5 mg/l 첨가 시 형질전환 개체 선발에 효율적인 농도라고 사료되었다 (Fig. 1). 본 연구와 동일한 pCAMBIA3301 벡터를 사용한 Lee 등 (2008)의 연구에서도 PPT 5 mg/l이 최적의 선발농도라고 한 결과와 일치하였다. 선발농도가 너무 낮을 경우 'escape' 발생 등의 문제가 생길 소지가 있고 또한 기존의 호접란 및 심비디움 형질전환에서 kanamycin을 선발약제로 사용한 경우가 있는데 이러한 경우, 대부분의 난과 식물들이 kanamycin에 선천적인 저항성을 보이는 경우가 많아 형질전환체 선발에 있어서 어려움을 겪는 것이 사실이다.

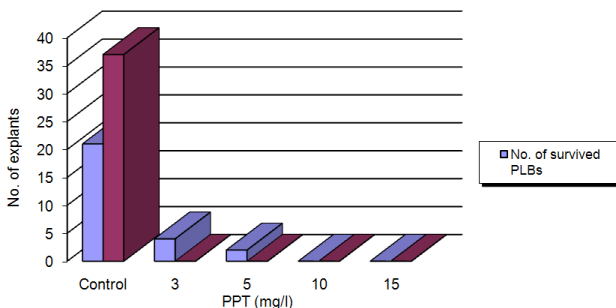


Fig. 1 Effect of PPT in the selection medium as a selective agent for the survival number of PLB and shoots in *Cymbidium* plants

알스트로메리아 (Kim et al. 2007); Lin et al. 2000), 백합 (Kamo and Han 2008)에서도 kanamycin이 선발약제로서 사용되는 경우, 선발효율이 저하되는 현상이 나타난다고 기술하였고, 심지어 백합의 경우, 상당수의 개체들이 200 mg/l kanamycin에도 고사하지 않고 오히려 생육이 촉진되었다 (Kamo and Han 2008).

유전자총 형질전환 조건

심비디움에서 pCAMBIA3301 벡터를 이용하여 PLB절편체에 bombardment할 때의 적정 조건을 구명하고자 DNA 농도, 헬륨가스 압력, target 거리 및 gold 입자의 크기 등을 달리하여 처리한 결과, DNA 농도 1.0과 2.0 µg/ 1회 유전자총 발사횟수 그리고 gold particle의 직경 1.0과 1.6 µm에서는 큰 차이를 보이지 않았다 (Table 2). 하지만, gold 입자크기에서 0.6 µm와 비교하면 2배 이상의 형질전환 효율을 보여 주었다. 또한, 헬륨가스 압력이 1,100 psi 그리고 유전자총과 목표 간의 거리가 6 cm인 경우에서 형질전환 효율이 가장 좋았다 (Table 2).

Yang 등 (1999)의 연구에서는 0.6 µm의 입자크기에서 87% gus 발색율을 나타내어 최고의 형질전환 효율을 보여주었으나, 본 실험에서는 1.0과 1.6 µm 모두 0.6 µm와 비교하여 2배 이상의 효율을 보여주었다 (Table 2). 다만 1.0과 1.6 µm 크기사이에서는 큰 차이가 나지 않았다. 또한 헬륨가스 압력차이도 Yang 등 (1999)의 연구에서는 형질전환 효율에 영향을 미치지 않는다고 보고한 반면 본 실험에서는 1,100과 1,350 psi의 압력조건에서 900 psi보다 3배 이상의 형질전환효율을 보여 주었다. 1,100과 1,350 psi 조건사이에서는 차이를 발견하지 못하였다. 이외에도 목표 조직과의 거리도 9 cm 보다는 6 cm 거리가 2배 이상 효율이 관찰되었다. 이러한 조건확립을 기반으로 하여 유전자총을 이용한 심비디움 식물체 생산과정을 Figure 2에 요약하였다.

삼투압조절제 전처리 효과

유전자총을 이용한 형질전환 실험에서 삼투압 조절제 전처리 효과는 오차드그라스 (Denchev et al. 1997), 옥수수 (Vain et al. 1993), peanut (Deng et al. 2001) 그리고 온시디움 (Li et al. 2005) 등 여러 단자엽 작물에서 연구되어져 왔다.

삼투압 조절제는 1990년대초부터 유전자총을 이용한 형질전환 작물개발에 널리 이용되어 왔는데 주로 mannitol과 sorbitol을 동등한 비율로 혼합하여 첨가하는 경우가 많았다. Vain 등 (1993)의 연구에서도 0.2 M sorbitol과 0.2 M mannitol을 같은 비율로 유전자총 실험 4시간 전과 유전자총 실험 후 16시간, 총 20시간동안 배지에 첨가하여

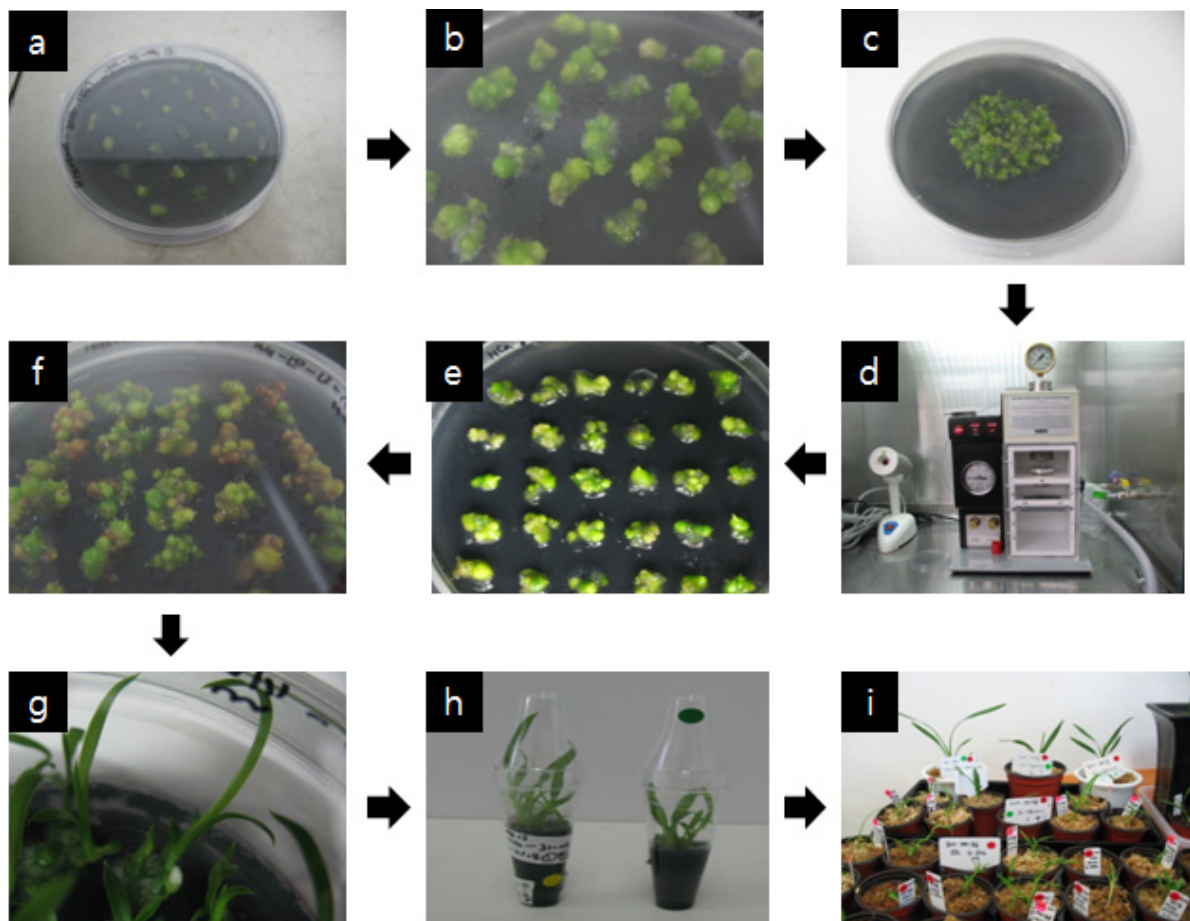
Table 2 Effects on the several parameters on the levels of GUS expression and PPT resistance after particle bombardment with pCAMBIA3301 in *Cymbidium* PLBs

Factors	Treatments	No. of GUS spots / PLB	% of PLBs with GUS spots / 100 PLBs*	No. of PPT + PLBs / 100 PLBs**	No. of PPT+ PLBs / 100 PLBs***
Gold particle (μm)	0.6	3.5 \pm 0.2	1.2	6	1
	1	7.2 \pm 1.3	3.3	12	3
	1.6	8.2 \pm 2.1	3.5	14	2
Hg pressure (psi)	900	1.1 \pm 0.2	0.8	7	1
	1,100	4.6 \pm 1.2	3.2	16	4
	1,350	4.8 \pm 1.4	3.3	15	3
Distance (cm)	6	5.6 \pm 0.4	4.7	11	8
	9	4.0 \pm 0.3	2.2	4	0
DNA concentrations ($\mu\text{g}/\text{bombardment}$)	1.0	2.5 \pm 0.2	3.5	18	6
	2.0	2.4 \pm 0.3	3.3	19	6

*: Data were collected 1 weeks after bombardment

**: Data were collected 3 weeks after bombardment

***: Data were collected 6 weeks after bombardment

**Fig. 2** Particle bombardment transformation procedures in *Cymbidium*

a. Initial growth of PLB, b. Propagation of PLB with shoots, c. Pre-culture of *Cymbidium* PLBs for 2 days, d. Shooting using particle bombardment experiment, e. Delayed selection time for 3 weeks, f. Transfer to HCa medium with PPT 5mg/l, g. Regeneration of putative transgenic *cymbidium* plantlets, h. Growing of putative transgenic cymbidium plants, i. Acclimatization of transgenic cymbidium plants

Table 3 Effect of osmotic treatment on transformation efficiency in PLBs of *Cymbidium* ‘Yoongflower * masako’

Osmotic treatments	No. of PPT+ PLBs / bombarded PLBs*	No. of GUS positive PLBs / 100 bombarded PLBs**	% of putative transgenic PLBs with shoots / 100 bombarded PLBs***
No osmoticum	22 / 225 (9.8%)	3.2±0.2	1.3±0.1
0.2M Mannitol	20 / 199 (10.1%)	2.5±0.2	1.2±0.4
0.2M Sorbitol	19 / 231 (8.2%)	2.9±0.4	1.5±0.3
0.2M Mannitol + 0.2M Sorbitol	38 / 207 (18.4%)	8.7±1.1	3.2±0.6

*: Data were collected 6 weeks after bombardment

**: Data were collected 9 weeks after bombardment

***: Data were collected 12 weeks after bombardment

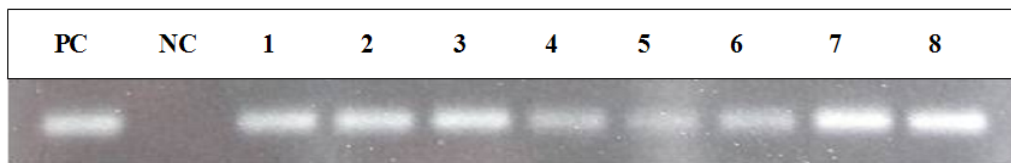


Fig. 3 PCR analysis for the presence of bar gene in putative transgenic *cymbidium* plants. Genomic DNAs were extracted from PLBs of 8 putative transgenic *cymbidium* lines and non-transformed (PC: positive control, NC: non-transformed plant, lane 1-8: transgenic *cymbidium* plant lines)

유전자총 실험을 수행한 결과, *gus* 유전자의 일시적 발색율에 있어서 2.7배 이상의 효율이 향상됨을 보고 하였다. 이러한 삼투압조절제 처리로 인한 형질전환 효율증대효과는 target 세포에서의 원형질분리가 일어나 유전자가 코팅된 gold입자들이 세포를 통과해서 지나간 후, 원형질이 외부로 나오지 못하게 하거나 그 물리적 피해를 경감시켜주는 효과라고 추측된다 (Vain et al. 1993).

Li 등 (2005)의 보고에 의하면 유전자총을 이용한 온시디움 형질전환 실험에서 sucrose 농도를 증가시킬수록 PLB의 생존율이 저하되었으나, 0.5 M sucrose로 2시간 전 처리한 PLB에서는 무처리구와 대비하여 3~4배 높은 증식율과 *gus* 발색율의 경우, 무처리구 대비 무려 14.8배나 높은 결과를 나타내었다.

본 연구에서도 0.2 M sorbitol과 0.2 M mannitol이 혼합하여 첨가된 처리구의 경우, 무처리구와 비교해서 2.7배 이상의 *gus* 발색율과 2.5배 향상된 형질전환 식물체 생산효율을 나타내었다 (Table 3). 삼투압조절제인 sorbitol과 mannitol이 0.2 M 씩 단용처리된 경우 무처리구와 의미있는 차이를 보이지 않았다. 이와 동일한 종류의 삼투압조절제와 농도를 처리하여 톨웨스큐 형질전환 연구에서도 긍정적인 효과를 보여 주었다 (Gao et al. 2008).

결론적으로 본 실험에서 “용플라워×마사코 심비디움 계통을 재료로 확립된 유전자총 조건과 삼투압 처리를 적용한 평균적인 형질전환 효율은 100개의 PLB를 유전자총을 이용하여 형질전환 수행하면, 최종적으로 온실까지 순화되는 형질전환 심비디움 개체수는 약 3.2~4.0개

정도가 생산되는 형질전환 효율이라고 할 수 있다.

PCR 분석 및 PPT 저항성 검정

형질전환 실험에서 획득한 심비디움 형질전환 재분화계통 중 8계통을 임의로 선발하여 PCR 분석을 한 결과, 8계통 모두 *bar* 유전자 도입을 확인하였다 (Fig. 3). 하지만 *Gus* 발색 반응이 나타난 계통임에도 불구하고 추가적으로 실시한 PCR 분석에서는 *bar* 유전자 도입이 확인되지 않은 경우가 있었는데 이는 유전자총에 의하여 온전하게 *bar* 유전자가 심비디움 genome내로 삽입되지 않았거나, 또는 온전히 삽입되었다 하더라도 gene silencing이나 기타 신초재분화 과정에서 *bar* 유전자가 소실된 것으로 추정된다.

이와 비슷한 사례가 콩 형질전환 연구에서 보고된 바 있다 (Lee et al. 2008). 따라서 보다 안정적이고 효율적인 형질전환 체계를 확립하기 위하여 아그로박테리움을 이용한 심비디움 형질전환 연구 또는 이 두가지 방법을 결합하여 적용하는 것도 고려해볼 수 있다고 사료된다.

PCR 검정을 통해 유전자 도입이 확인된 형질전환 심비디움 식물체 5 계통들의 신초를 절취하여 Basta 0.5% (v/v)에 처리하여 3일 후에 저항성 양상을 조사한 결과, 5 계통 중 3계통 (1번, 3번과 5번)들은 비형질전환 심비디움의 엽조직과 비교하여 Basta 제초제에 대한 저항성을 나타내었는데 특히 5번 계통은 최초 처리상태와 비슷한 정도의 녹색을 유지하여 강한 저항성을 보여 주었다

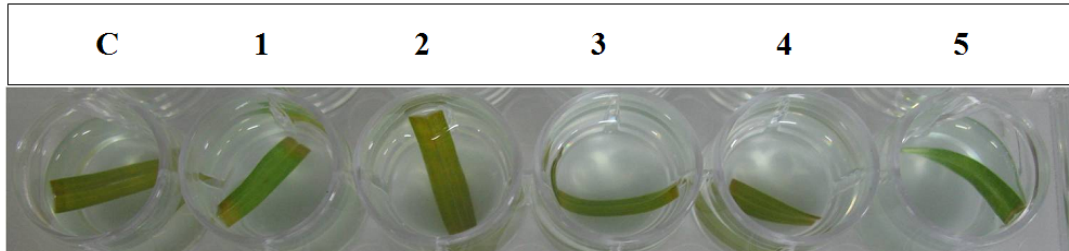


Fig. 4 Differential visible damage in the leaves on non-transformed-plant and transformed plants at 3 days after treatment with 0.5 % (v/v) Basta treatment for the evaluation of basta resistance. C: non-transformed plant, Lane 1-5: transformed cymbidium plants

(Fig. 4). 그러나 2번과 4번 계통은 대조구와 비교하여 차이가 없었다.

본 실험에서 유전자총을 이용하여 형질전환 심비디움 식물체를 생산하기 위한 적정조건을 확립하였으며, 이를 기반으로 PCR 분석을 통해 유전자 도입을 확인하고 추가적인 Basta 제초제처리를 통한 *bar* 저항성 유전자 발현 정도를 간접적으로 확인하였다. 이러한 체계를 바탕으로 *bar*나 *gus* 등의 선발이나 report 유전자 종류 이외의 바이러스 저항성이나 환경저항성 등 유용 유전자가 도입된 형질전환 심비디움 식물체 개발에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

본 실험은 심비디움 원괴체 (PLB: protocorm-like bodies)를 재료로 유전자총을 이용한 효율적인 형질전환 조건을 확립하고자 수행되었다. 이 PLB 조직에 제초제저항성 유전자인 *bar* 유전자와 reporter 유전자인 *gus*를 포함하고 있는 pCAMBIA3301 벡터를 이용하여 유전자총으로 형질전환 하였다. 형질전환 벡터에 포함되어 있는 제초제저항성 유전자 (*bar*)를 이용하여 선발하게 되므로 선발배지에 첨가될 제초제로서 PPT (Phosphinotricin)의 적정 농도를 찾고자 실험한 결과, 5 mg/l에서 최적의 대부분의 PLB의 생육이 억제되고 신초형성이 이루어지지 않았다. 이를 기반으로 유전자총 실험에 맞는 최적 조건을 찾는 실험을 수행하여 1.0 μm gold입자크기, 헬륨가스 압력은 1,100과 1,350 psi사이에서는 차이가 없다는 전제 하에 물리적 피해가 덜 가는 1,100 psi를 조건으로 선택하였고, 유전자총과 목표물과의 거리는 6 cm 그리고 DNA 농도는 1회 유전자총 발사횟수당 1.0 μg 조건을 최적조건으로 하였다. 이 조건을 기반으로 100개의 PLB를 형질전환 하면 평균적으로 6~8개의 PLB가 제초제 저항성을 나타내는 개체로 성장하고 최종적으로 2개체 정도가 온실에서 순화과정을 거쳐 완전한 형질전환 식물체로 생산된다. 이외에도 유전자총 실험 전에 0.2 M sorbitol과 0.2 M mannitol을 혼합처리하여 4시간 동안 배양시키면 2배 이상 효율을

높일 수 있게 되어, 결론적으로 100개의 PLB를 형질전환 수행하면 최종적으로 3.2~4.0개 정도의 형질전환 심비디움 식물체가 나오는 효율이라고 할 수 있다.

본 실험을 통해 생산된 형질전환 심비디움 개체들은 PCR 분석을 통해 유전자 도입을 확인하였고, 형질전환 개체 중 임의로 선발된 5계통들의 잎을 Basta 0.5% 용액에 침지한 결과, 3 계통은 제초제에 저항성을 가지는 것으로 확인되었고, 그중 1계통은 아주 강한 저항성을 보여주었다. 본 실험 결과들을 바탕으로 환경저항성 등의 유용유전자가 도입된 형질전환 심비디움 식물체 개발에 기여하리라 사료된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 농업공동연구사업 (project no. PJ006950072011)의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

허연재, 김은영, 양원태, 이영병, 이재현, 정영수, 남재성, 윤대진, 이기환, 김도훈 (2009) Protocorm-like body를 이용한 호접란 형질전환 연구, J of Life Sci 19(3):378-383
 Anzai H, Ishii Y, Shichinohe M, Katsumata K, Nojiri C, Morikawa H, Tanaka M (1996) Transformation of *Phalaenopsis* by particle bombardment. Plant Tiss Cult Lett 13:265-271
 Azadi P, Chin DP, Kuroda K, Khan RS, Mii M (2010) Macro elements in inoculation and co-cultivation medium strongly affect the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation in *Liilum*. Plant Cell Tiss Organ Cult 101:201-209.
 Chai ML, Xu. CJ, Senthil KK, Kim JY, Kim DH (2002) Stable transformation of protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Scientia hort 96:213-224.
 Chin DP, KI Mishiba, M Mii (2007) *Agrobacterium*-mediated transformation of protocorm-like bodies in *Cymbidium*. Plant Cell Rep 26(6): 735-743
 Coker J (1993) The genus *Cymbidium*. In: Gallagher D, Hewitt M,

- Jennings C. Australian orchid growing Australian Orchid Council Inc, Australia
- Denchev PD, Songstad DD, McDaniel JK, Conger BV (1997) Transgenic orchardgrass (*Dactylis glomerata*) plants by direct embryogenesis from microprojectile bombarded leaf cells. *Plant Cell Rep* 16:813-819
- Deng XY, Wei ZM, An HL (2001) Transgenic peanut plants obtained by particle bombardment via somatic embryogenesis regeneration system. *Cell Res* 11:156-160
- Du Puy D, Cribb P (1988) The classification of *Cymbidium*. Timber Press, Oregon, USA, pp 50-194
- Gao C, Long D, Lenk I, Nielsen KK (2008) Comparative analysis of transgenic tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Plant Cell Rep* 27:1601-1609
- Hong KA, So IS, Lee OY, Cheong CD, Riu KZ, U ZK (1996) Optimization of *Cymbidium* transformation system by the particle gun techniques. *Agri Chem Biotech* 39(4):260-264
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in high plants. *EMBO J* 6:391-397
- Kamo K, McElroy D, Chamberlain D (2000) Transforming embryogenic cell lines of *Gladiolus* with either a *bar-uidA* fusion gene or cobombardment. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 36:182-187
- Kamo K, Han BH (2008) Biolistic-mediated transformation of *Lilium longifolium* cv. Nellie white. *Hortscience* 43(6):1864-1869
- Kim JB, Raemakers CJJM, Jacobsen E, Visser RGF (2007) Efficient production of transgenic *Alstroemeria* plants by using *Agrobacterium tumefaciens*. *Ann Appl Biol* 151:401-412
- Kim MS, Cho HR, Lee HK, Lim JH, Choi SY, Kim YJ (2008a) A new cultivar *Cymbidium* 'White princess' with color and vigorous growth. *Flower Res J* 16(4):295-298
- Kim MS, Cho HR, Lee HK, Lim JH, Choi SY, Kim YJ (2008b) *Cymbidium* 'Honey Girl' with white color and medium plant size. *Flower Res J* 16(4):291-294
- Kim MS, Jeong MI, Lee YR (2010) *Cymbidium* hybrid 'Purple princess' with dark purple flower. *Kor J Hort Sci Technol* 28(4):715-718
- Kuehnle AR, Sugii N (1992) Transformation of *Dendrobium* orchid using particle bombardment of protocorms. *Plant Cell Rep* 11(9):484-488
- Lee KJ, Park HJ, Yi BY, Lee KR, Kim MS, Woo HJ, Jin YM, Kweon SJ (2008) Development of herbicide tolerant soybean using *Agrobacterium tumefaciens*. *J Plant Biotechnol* 35(1):69-74
- Lee YM, Kim MS, Lee SI, Kim JB (2010) Review on breeding, tissue culture and genetic transformation systems in *Cymbidium*. *J Plant Biotech* 37:357-369
- Li SH, Kuoh CS, Chen YH, Chen HH, Chen WH (2005) Osmotic sucrose enhancement of single-cell embryogenesis and transformation efficiency in *Oncidium*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 81:183-192
- Lin HS, Van der Toorn C, Raemakers CJJM, Visser RGF, De Jeu MJ, Jacobsen E (2000) Genetic transformation of *Alstroemeria* using particle bombardment. *Mol Breed* 6:369-377
- Men S, Ming X, Wang Y, Liu R, Wei C, Li Y (2003) Genetic transformation of two species of orchid by biolistic bombardment. *Plant Cell Rep* 21:592-598
- Mishiba KI, Chin DP, Mii M (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phalaenopsis* by targeting protocorms at an early stage after germination. *Plant Cell Rep* 24:297-303
- Popowich EA, Firsov AP, Mitiouchkina TY, Filipenya VL, Dolgov SV, Reshetnikov VN (2007) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Hyacinthus orientalis* with thaumatin II gene to control fungal diseases. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 90:237-244
- Vain P, McMullen MD, Finer JJ (1993) Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Rep* 12:84-88
- Yang J, Lee HJ, Shin DH, Oh SK, Seon JH, Paek KY, Han KH (1999) Genetic transformation of *Cymbidium* orchid by particle bombardment. *Plant Cell Rep* 18:978-984