

## 유전자종을 이용한 팔레놉시스 형질전환 효율향상에 삼투압 조절제 및 발사횟수차이가 미치는 영향

노희선 · 김종보

### Effects of osmoticum treatments and shooting chances on the improvement of particle gun-mediated transformation in *Phalaenopsis*

Hee Sun Roh · Jong Bo Kim

Received: 31 October 2014 / Revised: 3 November 2014 / Accepted: 3 November 2014

© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** This study was carried out to develop an efficient transformation protocol via particle bombardment with PLBs (protocorm-like bodies) in *Phalaenopsis*. To achieve this aim, osmoticum treatment and an increasing shooting chances in particle bombardment process were applied for this study. In addition, pCAMBIA3301: ORE7 vector which contains a herbicide-resistance bar gene as a selectable marker and ORE7 gene as a gene of interests were employed. With regard to the increasing chances of shooting in particle bombardment, double shooting was the best results with 1.5 ~ 2.5 times higher than those of a single or triple shooting treatment in the production of PPT (D-L-phosphinothricin)-resistant PLBs. However, regeneration rate of shoots in double shooting was not high as a single shooting. Further, double shooting showed 35 ~ 40% higher than that of a single shooting in the frequency of browning. Regarding effects of different osmotic treatments, combination of 0.2 M sorbitol with 0.2 M mannitol showed the best results in transformation efficiency, regeneration of transformants and reduction of browning. Putative transgenic *Phalaenopsis* plants were analyzed by PCR analysis and confirmed the presence of *bar* and ORE 7 gene. Also, real-time PCR was conducted by using 21 transgenic plants and showed only 4 plants had one copy of transgene; whereas, the other 17 plants had more than 2 copies of transgene. Transgenic

*phalaenopsis* plants produced in this study were transferred to pots and flowered normally without morphological variations in flower and leaf.

**Keywords** Orchids, Particle bombardment, *Phalaenopsis*, Regeneration, Transformation

#### 서론

난은 과거부터 동양에서는 사군자 중의 하나로, 서양에서는 부의 상징으로(Yoon and Jeong 2011) 사랑받아 왔으며, 가장 진화된 식물로 25,000 ~ 30,000여종이 전 세계에 분포되어 있다(Lee 2006). 그 중 팔레놉시스는 꽃이 아름답고 개화기간이 길어 전 세계적으로 지속적인 사랑을 받고 있는 화훼류로 우리나라 화훼 수출 상위권에 속하며, 2012년 화훼재배현황에 따르면 전체 난 생산액의 30.5%를 차지하고 있다(MIFAFF 2012). 그리고 유묘기부터 개화기까지 기간이 짧아 고소득의 농가소득을 기대할 수 있는 화훼작물이다(Christenson 2001; Freed 1980). 이러한 상황에서 팔레놉시스는 높아진 소비자 기호도에 의한 고품질 요구도와 재배기간 동안의 난방비 증가로 인한 신품종 요구도가 높아지고 있다(Roh et al. 2013)

팔레놉시스는 대만이 국가주도적으로 산업을 육성하여 해마다 100여 품종 이상의 신품종을 육성하고 있으며(Park et al. 2013), 국내에서도 교배육종을 통하여 여러 품종을 개발하고 있다. 그러나, 10년 이상 소요되는 오랜 육종기간은 짧은 유행과 고품질에 대한 소비자의 요구도를 맞추기에 한계가 있다고 할 수 있다(Roh et al. 2012). 따라서 식물형질전환 기술을 통한 신품종 개발이 팔레놉

H. S. Roh · J. B. Kim (✉)  
건국대학교 의료생명대학 생명공학과  
(Department of Biotechnology, College of Biomedical & Health Sciences, Glocal Campus, Konkun university, Choong-Ju, 380-701, Korea)  
e-mail: jbhee1011@kku.ac.kr

시스 신제품개발 프로그램에 있어서 필요한 실정이다 (Roh et al. 2012). 그러나 난과 식물에서 형질전환 연구는 그 역사가 20년을 갓 넘는 짧은 역사를 가지고 있는데 일반적으로 형질전환이 벼, 밀, 감자나 옥수수 등의 식량작물이나 장미, 거베라, 국화 및 백합 등 다른 화훼류들과 비교해도 형질전환이 쉽지 않은 작물로 알려져 있다. 이러한 식물형질전환이 어려운 작물은 보통 배양 절편체, 적합한 선발마커 및 이에 맞는 선발약제 그리고 선발과정 개선, 아그로박테리움이나 유전자총 실험 수행 조건 확립 및 항산화제 및 삼투압조절제 첨가에 의한 고효율의 형질전환 시스템이 확립이 무엇보다 필요하다.

형질전환 난 식물체 개발역사는 Kuehnle와 Sugii (1992)에 의해 처음 시작되어 팔레놉시스에서는 Anzai et al. (1996)이 유전자총을 이용하여 최초로 형질전환 팔레놉시스 식물체를 생산한 이래 2000년대 이후로 약 10여 편의 논문이 발표되었다(Roh et al. 2012). 그러나 대부분 아그로박테리움을 이용한 논문이고 10여 편 중 유전자총을 이용한 연구는 3편에 불과하다(Roh et al. 2011). 국내에서도 Na et al. (2010)에 의해서 아그로박테리움을 이용한 팔레놉시스 형질전환 연구가 발표되었는데 아그로박테리움 형질전환 조건 확립에 필요한 최적의 균주와 접종시간, 공동배양기간 그리고 선발약제 농도설정에 관한 연구결과이고 기내 형질전환 팔레놉시스 식물체 생산까지의 결과를 보여 주었다. 그러나 유전자총을 이용한 팔레놉시스 연구는 최근 Roh et al. (2013)에 의해 최초로 시도되어 아그로박테리움을 이용한 경우 12% 그리고 유전자총의 경우 6% 정도의 형질전환 효율을 보여 주었다.

유전자총을 이용한 형질전환 효율을 높이기 위한 실험 연구에서 삼투압 조절제 전처리를 적용한 연구사례는 orchard grass (Denchev et al. 1997), 옥수수 (Vain et al. 1993), peanut (Deng et al. 2001)과 난과식물에서는 온시디움 (Li et al. 2005) 등에서 나타나 있다. 이러한 삼투압 조절제 처리는 1990년대 초반부터 형질전환 작물 연구에서 널리 사용되어 몇몇 연구에서 도입유전자의 일시적 발현이 좋아지는 등의 효과를 나타내었다.

따라서 본 연구에서는 삼투압 조절제 전처리 및 유전자총 발사횟수 조절을 통하여 유용유전자인 ORE7 (노화지연유전자)을 팔레놉시스에 효율적으로 도입하는데 필요한 고효율의 유전자총 형질전환 체계를 확립하고자 본 실험을 진행하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 PLB 증식

본 실험에 사용된 팔레놉시스는 부산 강산난원(서 재환

대표)에서 분양 받은 KN-02 계통을 이용하여 기내에서 PLB (Protocorm-like bodies)를 번식시킨 후, 형질전환 실험에 이용하였다. PLB 증식은 PLB를 가로×세로 약 5mm의 크기로 자른 후, VW (Vacin and Went 1949) 배지를 수정한 증식배지인 VWAB배지 (1.625 g VW, 30 g/l apple powder, 30 g/l banana powder, 30 g/l potato powder, 10 g/l sucrose, 1 g/l activated charcoal, 7.5 g/l agar, pH 5.2)에 치상하여 24 ± 1°C, 16시간 광주기 조건하에 배양하였으며, 4주마다 계대배양을 실시하였다.

### 유전자총 형질전환

유전자총 형질전환은 Roh et al. (2011)의 방법에 따라 수행하였으며, 유전자총 실험에 사용된 vector는 선발유전자로 *bar* 유전자와 목적유전자인 ORE7 (노화지연유전자) 유전자가 포함된 pCAMBIA3301 vector를 사용하였다. 유전자의 gold입자 코팅과정은 Roh et al. (2011)의 방법에 따라 수행하였으며 사출거리 6 cm, 1,350 psi rupture disk, 헬륨가스압력 28 psi (pound per square inch) 조건하에 PDS-1000/He (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 장치를 이용하여 수행하였다. 유전자총 처리한 PLB는 PPT (DL-Phosphinothricin) 20 mg/l가 첨가된 기본배지에 옮겨 선발을 진행하였다.

### 삼투압 처리 및 유전자총 발사횟수에 따른 형질전환 효율 증진 실험

유전자총 처리 시 삼투현상에 의한 흡수증진을 통해 팔레놉시스 형질전환 효율을 높이고자 기본배지에 0.2 M mannitol, 0.2 M sorbitol, 0.2 M mannitol + 0.2 M sorbitol을 처리 하여 비교 실험을 진행하였다. 이 삼투압처리제들을 유전자총 실험 수행하기 4시간 전에 배지에 첨가하여 4시간 동안 배양 후, 유전자총 실험을 수행한 후에도 동일한 배지에 8시간 정도 배양한 후, 삼투압 조절제가 들어있지 않은 일반 선발배지로 이식하였다. 또한 유전자총 처리 시 발사횟수가 팔레놉시스 형질전환에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기로 1회, 2회, 3회 발사처리를 통해 형질전환 효율 비교 실험을 수행하였다. 그 결과 가장 효율적이었던 2회 발사 및 0.2 M mannitol + 0.2 M sorbitol 처리와 기존 심비디움 형질전환 방법(Roh et al. 2011)을 팔레놉시스 PLB 형질전환에 적용하여 비교실험을 진행하였다.

### 형질전환체 선발 및 분석과정(PCR 및 real-time PCR)

PPT 20 mg/l에서 선발한 추정형질전환 팔레놉시스 PLB 들은 다음과 같은 PCR 분석을 통해 선발유전자인 *bar* 유전자의 도입을 확인 후, 유용유전자인 ORE7 유전자의 도

입 역시 확인하였다. 그리고 나서 real-time PCR 분석을 수행하였다. PCR 분석을 위해 형질전환 PLB를 채취 후, 막자사발 및 액체질소를 이용하여 분쇄한 뒤, genomic DNA extraction kit (Real Biotech Corporation, Taiwan)을 이용하여 DNA를 추출하였다. 본 실험에 사용된 *bar* 유전자 (*bar*: 552 bp)의 도입을 확인하기 위해 forward primer로서 5'-TCAAATCTCGGTCGGGACGGCA-3', 그리고 reverse primer로서 5'-ATGAGCCCAGAACGCC-3'를 사용하였다. PCR 조건은 pre-denaturation은 94°C에서 4분, denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 58°C에서 30초, extension은 72°C에서 50초로 33 cycles 그리고 last extension은 72°C에서 10분간 반응시켜 증폭반응을 수행하였다. 증폭된 DNA는 0.7% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 목표유전자의 도입여부를 확인하였다.

ORE7 유전자 (ORE7: 936 bp)의 PCR 분석을 위해서는 forward primer로서 5'-ATGGAAGGCGTTACGAGCAAG-3', 그리고 reverse primer로서 5'-TTAAAAAGGTGGTCTGAAGGTG-3'를 사용하였다. PCR 조건은 *bar* 유전자 분석과정과 동일하게 수행하였다.

ORE7 유전자가 도입된 형질전환 팔레놉시스 식물체의 real-time PCR 분석을 위해서 qPCR 분석기기(CFX-96; Biorad, USA)를 사용하였는데 외가닥 cDNA 합성은 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (Toyobo, Japan)의 매뉴얼에 따라 이루어졌고, 합성된 cDNA는 분광광도계(spectrophotometer; Biochrome, U.K)를 이용하여 정량하였다. PCR 분석에 필요한 cDNA의 정량오차를 줄이고 순도를 보존하기 위해 모든 cDNA 샘플들은 3 ng/μl 농도로 희석하여 -20°C에서 사용 시까지 보관하였다. 각 반응은 3μL의 DNA (3.3 ng/ul), 1μL의 10배 primetime assay (4 nm probe+8 nm primer) 그리고 7.5 μL의 Premix Ex Taq probe qPCR (Takara, Japan)으로 하여 총 15 μL 용량으로 맞춰 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 3분간 denaturation 수행하고, 95°C에서 10초씩 그리고, 60°C에서 30초간 총 40 cycles로 annealing과 extension 과정을 수행하였다. Primer는 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)에서 제공되는 온라인 프라이머 제작도구인 Primer 3를 이용해서 디자인하여 primer time qPCR assay (IDT: Integrated DNA technology, Coralville, IOWA, USA)를 이용해서 다음

과 같이 프라이머 합성 하였다. *bar* 유전자를 위해서 forward primer로 5'-ACAGCTTCAACCGCAGGGCG-3' 그리고 reverse primer로 5'-CGTGGACGTTTTCCCGGTGCT-3'를 사용하였으며, 또한 probe 서열로 5Cy5/AGGGTCGACCCGATTCA-GCCCGA/3IAbRQSp/를 사용하였다.

#### 형질전환체 재분화, 순화 및 개화

PPT 20 mg/l에서 12주 이상 선발과정을 거친 형질전환 팔레놉시스 PLB 및 2~5 cm 크기의 잎이 달려있는 개체들을 PPT가 첨가되지 않는 일반 증식배지로 옮겨 발근을 유도 하였다. 생육이 우수하고 발근이 우수한 개체들을 기외상태에서 1~2주간 순화과정을 거쳐 바크가 들어있는 직경 10 cm 화분으로 이식하여 증식하였다.

## 결과 및 고찰

### 유전자총 발사횟수에 따른 형질전환 효율 증진 실험

본 연구를 수행하는데 사용된 pCAMBIA3301:ORE7 벡터는 노화지연 특성을 나타내는 ORE 7 유전자가 삽입된 벡터인데 잎의 노화를 억제하는 negative 조절자로 작용하여 애기장대에서 노화지연 형질을 발현하여 잎의 크기 증가, 개화기간과 꽃의 숫자의 증가 그리고 biomass의 증가를 나타내는 형질을 보여 주었다(Lim et al. 2007). 이러한 형질이 발현되는 형질전환 팔레놉시스 식물체를 개발하기 위한 기초연구 성격으로 본 연구를 수행하였다.

일반적으로 유전자총을 이용한 형질전환 실험에서 1회 발사를 하는 것이 통상적인 실험과정이나, 마나나(Sreeramanam et al. 2005), 밀(Gharanjik et al. 2008) 그리고 동일한 난과 식물인 온시디움(Lee et al. 2007)에서 1회 이상 발사를 하여 더 많은 형질전환 빈도를 높이고자 하는 시도가 보고 되었다. 유전자총 발사횟수에 따른 형질전환 효율 증대효과에 대해 알아보려고, 1, 2, 3회 발사 시 선발율, 신초 발생율, 갈변율을 측정한 결과 2회 발사 시 가장 높은 10.3%의 형질전환 효율을 보였다(Table 1). 팔

**Table 1** Effects of an increasing shooting chance in particle bombardment for the high efficiency of *Phalaenopsis* transformation protocol

# of gene gun shooting	# of PPT resistant PLBs /100 bombarded PLBs*	# of putative transgenic PLBs with shoots /100 bombarded PLBs**	% of browning*
1	3.8 ± 1.3	5.3 ± 1.0	4.0 ± 1.0
2	10.3 ± 1.5	2.8 ± 1.0	5.5 ± 1.4
3	7.5 ± 1.3	2.0 ± 1.4	5.9 ± 1.2

\*Data were collected 8 weeks after bombardment

\*\*Data were collected 16 weeks after bombardment

레놉시스와 같은 난과식물인 온시디움에서는 유전자총을 1회 발사한 경우 보다 2회 발사 시 GUS발현율이 2배 높은 것으로 나타나 본 연구결과와 일치하였다(Lee et al. 2007). 또한 하나나(Sreeramanan et al. 2005)와 밀(Gharanjik et al. 2008)의 경우에도 2회 발사 시 가장 높은 형질전환 효율을 보였다. 하지만 발사횟수가 증가할수록 신초발생은 저하되고 갈변율은 높아지는 것으로 나타나(Table 1), 발사 횟수의 증가는 절편체에 스트레스를 주어 재분화율을 낮추고 갈변율을 높이는 것으로 사료된다. 따라서 향후 이러한 스트레스를 감소시켜 형질전환 효율을 높이거나 유지하면서 갈변율을 감소시키는 항산화제 처리 같은 연구가 필요하다고 판단된다.

서로 다른 삼투압 조절제 조합과 농도에 따른 형질전환 효율 증진

지금까지 유전자총을 이용한 형질전환 실험에서 주로 sorbitol과 mannitol을 균등비율로 처리한 결과가 많았는데 Vain et al. (1993)의 연구에서도 0.2 M sorbitol과 mannitol을 동등한 비율로 유전자총 실험수행 4시간 전 그리고 유전자총 실험 후 16시간 동안 처리한 결과 GUS 유전자의 발현이 2.7배 이상 증가하였다. 이러한 형질전환율의 일시적 증가는 삼투압 조절제 처리에 의해 목적 세포에서 원형질 분리가 일어나 유전자총 발사 시 gold 입자들이 통과한 후, 원형질이 외부로 못 나오게 하거나 또는 원형질 분리에 의해 입자들에 의한 물리적 충격을 감소시킨 것에 기인한다고 추측된다(Vain et al. 1993).

본 연구에서도 기본배지에 0.2 M mannitol, 0.2 M sorbitol, 0.2 M mannitol + 0.2M sorbitol을 처리 후 최적의 조합을 알아본 결과, 0.2M mannitol + 0.2M sorbitol 처리 시 20.7%로 가장 높은 형질전환 효율을 보였을 뿐 아니라, 12%의 높은 재분화율과 1.8%의 낮은 갈변율을 보여 형질전환 팔레놉시스 식물체의 성장과 분화에도 긍정적인 효과가 있음을 보였다(Table 2). 국내에서도 유전자총을 이용한 형질전환 심비디움 식물체 생산연구에서도 0.2 M mannitol + 0.2 M sorbitol 혼합 처리 시 무처리구에 비해 2.7배 높은

gus 발색율과 2.5배 향상된 형질전환 효율을 나타내었다(Roh et al. 2011). 이러한 연구결과는 톨웨스큐(Gao et al. 2008) 및 옥수수(Vain et al. 1993)의 연구결과와도 유사하였다.

형질전환 방법 비교

본 연구결과 확립된 조건인 0.2 M mannitol + 0.2 M sorbitol 혼용 처리 그리고 2회 유전자총을 발사하는 조건을 기존의 심비디움 형질전환 연구(Roh et al. 2011)에서 보고한 방법을 팔레놉시스에 적용하여 형질전환효율을 비교하였다. 그 결과, 본 연구에서 제시된 방법이 기존방법에 비해 약 2.5배의 높은 형질전환 효율을 나타냈다(Fig. 1).

PCR 분석 및 형질전환 식물체 순화 및 증식

본 연구에서 생산된 형질전환 팔레놉시스 개체들은 PPT (phosphinothricin) 20 mg/l 첨가된 선발배지로 4주 간격으로 계대배양하며 약 8주에서 12주간의 선발과정을 거쳤다. 이 중 생육이 우수한 7 계통들을 임의로 선발하여 PPT에 저항성을 나타내는 bar 유전자가 도입되었는지를 PCR 분석으로 확인한 결과, 7 계통 중 6 계통에서 552 bp

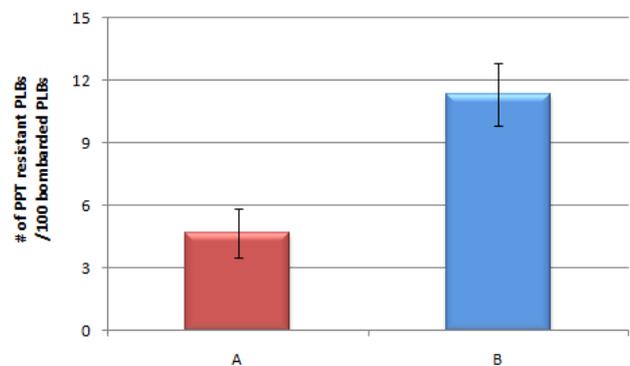
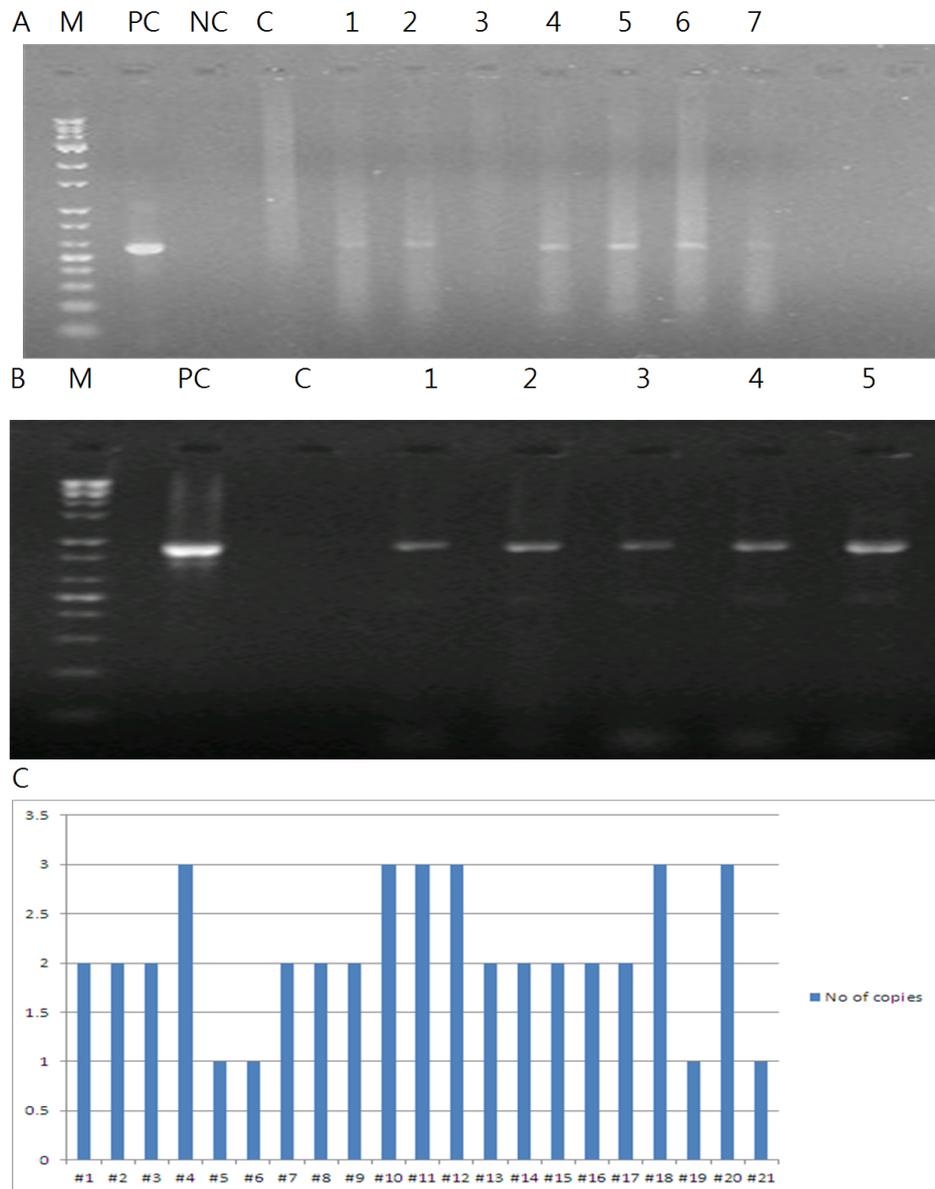


Fig. 1 Comparison of two different transformation protocols in *Phalaenopsis* (A: Roh et al. (2011) method, B: transformation protocol developed in this study)

Table 2 Effect of osmotic treatments on transformation efficiency in PLBs of *Phalaenopsis* “KN-02”

Osmoticum treatment	# of PPT resistant PLBs /100 bombarded PLBs*	# of putative transgenic PLBs with shoots /100 bombarded PLBs**	% of browning*
Control	11.3 ± 3.1	4.7 ± 1.2	4.1 ± 0.9
0.2 M Mannitol	8.0 ± 2.6	3.7 ± 1.2	5.5 ± 1.8
0.2 M Sorbitol	14.0 ± 2.6	7.3 ± 2.1	4.4 ± 1.0
0.2 M Mannitol +0.2 M Sorbitol	20.7 ± 1.5	12.0 ± 2.6	1.8 ± 0.8

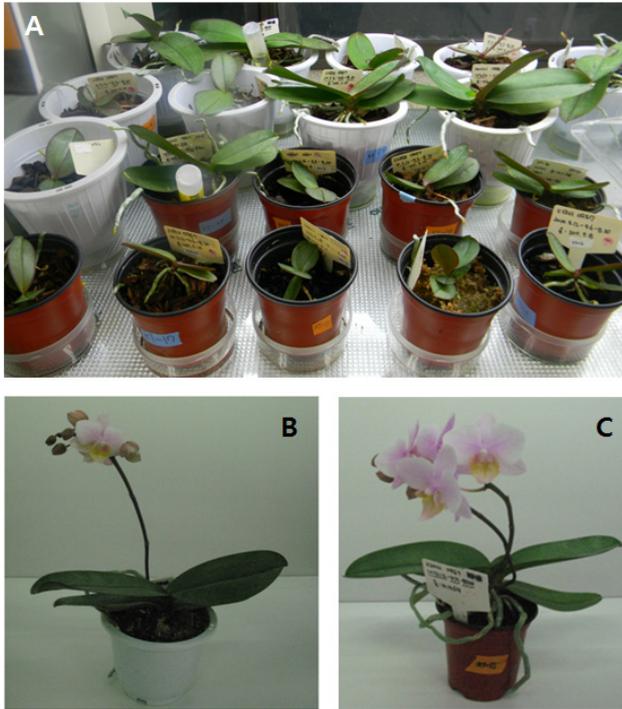
\*Data were collected 8 weeks after bombardment  
 \*\*Data were collected 16 weeks after bombardment



**Fig. 2** Molecular analysis of transgenic *Phalaenopsis* plants by PCR and real-time PCR analysis (A: *bar* gene (552 bp), B: ORE7 (936 bp), C: Copy number analysis by real-time PCR, PC: positive control, NC: negative control (water), C: control (non-transformed plants), #1-#21 transgenic phalaenopsis plant lines)

크기의 *bar* 유전자 도입을 확인하였다(Fig. 2A). 또한 목적유전자인 ORE7 유전자가 도입되었는지 5 계통을 임의로 선발해서 검정한 결과, 역시 5 계통 모두 936 bp 크기의 ORE7 유전자가 도입되었음을 확인하였다(Fig. 2B). *Bar* 유전자 검정에서 6 계통 중 1 계통에서 유전자 도입이 확인 안 된 경우는 이는 팔레놉시스 식물체로 *bar* 유전자가 온전하게 삽입이 안 되었거나 선발이나 재분화 과정에서 유전자가 소실된 것으로 추정된다. 그리고 도입된 ORE7 유전자의 copy 수를 확인하기 위하여 형질전환 된 팔레놉시스 35개체 중 임의로 21개체를 선발하여 real-time PCR을 수행한 결과, 오직 4 개체가 1 copy를 가지고 있고, 11개체가 2 copies 그리고 6 개체가 3 copies를

가지고 있는 것을 보여 주었다(Fig. 2C). 이러한 결과는 유전자총을 이용한 형질전환 시스템이 아그로박테리움 형질전환 방법과 비교해서 일반적으로 1 copy 이상의 유전자 삽입이 이루어지고 있는 결과와도 일치한다. PPT 제조제를 이용한 선발이 끝난 형질전환 팔레놉시스 개체들을 PPT가 첨가되지 않은 배지로 옮겨 발근을 유도한 후, 생육을 더 유도하였다. 성장상태가 좋은 형질전환 팔레놉시스 개체들을 다시 직경 10 cm 크기 화분으로 이식하였다(Fig. 3A). 이러한 개체들 중 일부는 2~4개월 후 꽃봉오리가 맺힌 후(Fig. 3B), 정상적으로 개화를 하였다(Fig. 3C). 현재까지 약 60 여 개체의 형질전환 팔레놉시스 식물체가 증식 중에 있으며, 더 많은 개체들의 개화가



**Fig. 3** Production of transgenic *Phalaenopsis* plants via particle bombardment (A: Acclimatized transgenic plants B: Flower buds in transgenic plants C: Flowering of transgenic plants)

되면 생육조사 그리고 비형질전환 팔레놉시스 개체들과의 변이발생여부 등을 조사할 예정이다. 본 연구에서 유전자총을 이용한 팔레놉시스 식물체 생산에 적합한 프로토콜을 개선하였고, 이를 바탕으로 향기도입이나 바이러스 저항성 같은 다른 유용 유전자가 도입된 팔레놉시스 식물체 개발 및 대량증식이 향후 가능하리라 판단된다.

## 적요

본 연구는 팔레놉시스의 원과체유사체를 재료로 효율적인 형질전환 체계를 확립하기 위해 수행되었다. 이를 위해 PPT 제초제에 저항성을 가지는 *bar* 선발유전자와 노화 지연 형질을 보이는 ORE 7 유전자를 함유하는 pCambia 3301:ORE7 벡터를 이용하여 유전자총 형질전환 시 발사 횟수 증가 그리고 유전자총 실험 전후에 삼투압조절제 처리를 하여 실험목적 달성과자 하였다. 실험결과, 2회 발사처리가 1회나 3회 발사횟수와 비교하여 1.5~2.5배 이상의 형질전환 효율을 보여 주었으나, 신초 재분화율이 낮고 갈변율은 높은 현상을 보여 주었다. 다양한 삼투압 조절제 처리에 의한 형질전환효율 향상 실험에선 0.2 M mannitol과 0.2 M sorbitol 이 2가지 조절제 혼합처리가 단용처리나 무처리구에 비해 형질전환 효율과 신초재분화율에서 최소 1.5~3배 이상의 효율을 보여 주었고, 갈변율도 2배 이상 낮게 나타났다. PCR 분석을 통하여

*bar* 유전자와 ORE7 유전자가 도입되었음을 확인하였고, 임의로 선발한 형질전환 팔레놉시스 21개체를 대상으로 real-time PCR 분석을 통해 4개체가 1 copy의 목적유전자를 가지고 있으며, 나머지 17 개체들은 2 copy 이상의 유전자를 보유하고 있음이 밝혀졌다. 본 연구에서 생산된 형질전환 팔레놉시스 개체들은 순화과정을 거쳐 화분으로 이식하여 생육과정을 거쳐 꽃이나 잎에 변이가 없는 개화과정을 보여 주었다.

## 사사

본 논문은 농촌진흥청 농업공동연구사업(project no. PJ009296082014)의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

## References

- Anzai H, Isjii Y, Shichinihe M, Katsumata K, Nojiri C, Morikkawa H, Tanaka M (1996) Transformation of *Phalaenopsis* by particle bombardment. *Plant Tiss Cult Lett* 13:265-272
- Christenson EA (2001) *Phalaenopsis*. Timber Press, Portland, Oregon, USA
- 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
- Freed H (1980) An update on breeding with the Boreneo-type *Phalaenopsis violacea*. *Amer Orchid Soc Bull* 49:843-849
- Gao G, 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
- Gharanjik S, Moieni A, Mousavi A, Alizadeh H (2008) Optimization of transient expression of uidA gene in androgenic embryos of wheat (*Triticum aestivum* L. cv Falat) via particle bombardment. *Iranian J of Biotech* 6: 207-213
- Kuehnle AR, Sugii N (1992) Transformation of Dendrobium orchid using particle bombardment of protocorms. *Plant Cell Rep* 11(9):484-488
- Lee JS (2006) *Orchids in Korea*. Hyang-Moon Publisher, Seoul, Korea
- Lee SY, Kim MS, Kim JY, Mok IG (2007) Optimal conditions for gene transfer through particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Oncidium*. *Flower Res J* 15(3): 145-150
- 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
- Lim PO, Kim YM, Breeze E, Koo JC, Woo HR, Ryu JS, Park DH, Beynon J, Tabrett A, Buchanan-Wollaston V, Nam HG (2007) Overexpression of a chromatin architecture-controlling AT-hook protein extends leaf longevity and increases the post-harvest storage life of plants. *The Plant J* 52:1140-1153
- Ministry of Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (2012) Statistics of floriculture cultivation in 2011.
- Na AS, Been CG, Jeong BR (2010) Approaches on optimum conditions for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phalaenopsis*. *Flower Res J* 18(1):1-8
- Park PH, Park YJ, Kim MS, Lee YR, Park PM, Lee DS, Yae BW (2013) Analysis of Genetic Diversity and Identification of Domestic Bred *Phalaenopsis* Varieties Using SRAP and SSR Markers. *Kor J Hort Sci Technol* 31(3):337-343
- Roh HS, Kim MS, Lee YM, Lee YR, Lee SI, Kim JB (2011) Optimization of particle gun-mediated transformation system in *Cymbidium*. *J Plant Biotechnol* 38:293-300
- Roh HS, Lee SI, Lee YR, Baek SY, Kim JB (2012) Recent trends in tissue culture and genetic transformation of *Phalaenopsis*. *J Plant Biotechnol* 39:225-234
- Roh HS, Kim MS, Baek SY, Kim JB (2013) Comparison of transformation efficiency by using *Agrobacterium* and particle bombardment in *Cymbidium* and *Phalaenopsis*. *Flower Res J* 21(4):199-205
- Sreeramanan S, Maziah M, Abdullah MP, Sariah M, Xavier R, NorAini MF (2005) Physical and biological parameters affecting transient GUS and GFP expression in banana via particle bombardment. *Asia Pac J Mol Biol Biotechnol* 13:35-57
- Vacin EF and Went FW (1949) Some pH changes in nutrient solutions. *Bot Gaz* 110:605-613
- 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
- Yoon KY and Jeong SY (2011) *Orchids of World*. Kim-Young publisher, Pa-ju, Kyong-Ki, Korea