

# 호접란 내병성 육성을 위한 형질전환 기술 개발 및 이용

김두환\* · 강경원\*\*

(\*건국대학교 농업생명과학대학 원예학과 · \*\*BABO 난농원)

## Development of Transformation Technique for Disease Resistant Phalaenopsis

Doo-Hwan Kim\* · Kyung-Won Kang\*\*

\*Dept. of Horticultural Science, KonKuk University

\*\*BABO ORCHID FARM, Namyangjoo 39, Korea

### 적 요

호접란의 수출경쟁력을 높이기 위해서는 무엇보다도 고품질 신품종육성이 매우 절실한 실정이나 지금까지 우리나라에서는 호접란 육종에 필요한 유전자원과 기술부족으로 자체의 기술개발 및 품종육성이 이루어지지 않아 대부분의 묘를 대만, 태국 등에서의 수입에 의존하고 있으며 이를 위해 산학연 협력에 의한 활발한 육종연구가 절실히 필요하다. 이에 본 연구에서는 고품질우수 신품종을 육성하기 위해서 현재 실제로 호접란의 도입 및 재배를 통해 선발 및 판매를 하고 있는 농가와 협력하여 고품질 우수계통을 육종재료로 공급받아 최근 활발하게 이용하는 유전공학적인 방법인 형질전환을 이용하여 신품종 육성을 하고자 한다.

우수 호접란 계통의 수집, 도입 및 형질전환기술의 활용에 대한 연구로 국내와 국외 일본, 대만 등에서 우수계통을 계속적으로 수입 및 도입하여 현재 30여 계통을 확보하여 계통 특유의 형질을 분석하였다. 형질전환체의 생산을 위한 기초작업으로서 식물체 재분화 체계 효율증대를 위해 PLB의 유기 및 증식은 기존의 배지조건인 VW배지와 MVW배지를 이용하였고 PLB의 재분화효율을 증가시키기 위해 여러 가지 배지를 이용하여 실험한 결과 Hyponex 배지에서 가장 재분화가 많이 일어나는 것으로 나타났다. 형질전환시 키메라 식물체의 발생율을 낮추기 위해 계획서상의 PLB 뿐 아니라 캘러스 유기를 위하여 최적배지를 선발하고자 하였다. 캘러스 유기를 위한 최적 배지선발은 계속 진행중이며 현재 VW배지를 기본배지로 0.5mg/L 2,4-D, 0.1mg/L BA를 첨가한 경우에 callus 형성율이 가장 높았다. 그리고 2,4-D를 단용처리한 경우보다 BA와 혼용한 경우에 callus형성율이 높았으며 2,4-D의 농도가 높아질수록 고사하는 개체수가 많은 것으로 나타났다. 또한 화색에 따른 캘러스 유기율의 차이에 대한 연구결과 Stripe는 모든 조합에서 callus를 형성하였으나 white red lip의 경우 0.1mg/L 2,4-D를 단용처리한 경우나 0.1mg/L BA를 첨가한 경우에 callus를 형성하였다.

형질전환의 방법에 있어 본 연구는 Agrobacterium 및 Gene gun 등에 의한 호접란에 적합한 형질전환 기술 체계를 확립하여 내병성 유전자 Chitinase 및  $\beta$ -1,3-glucase를 Agrobacterium 및 gene gun을 이용하여 식물체로 도입하였다. 먼저 Agrobacterium을 이용한 형질전환에서는 기존에 이용하고 있는 Agrobacterium LBA4404와 p-SmGFP가 포함된 vector pTOK233를 이용하여 목적유전자(target gene)의 선발 및 유용유전자를 식물체로 전환하는 데 가장 적합한 방법을 모색하였다.

Agrobacterium을 이용한 형질전환 효율증진 방법연구로서 먼저 형질전환체 선발을 위하여 PLB의 항생제(hygromycin) 저항성 정도를 실험한 결과 hygromycin 3mg/L 수준이 적당한 것으로 나타났다. 또한 접종시간이 형질전환에 미치는 영향에

관한 실험결과 모든 처리에서 PLB의 생존율이나 재분화된 식물체의 수에는 큰 차이를 나타내지 않는 것으로 나타났으며 접종농도의 경우 Bacterium suspension culture시간이 길어질수록 PLB의 생존율이 높아졌으나 재분화된 식물체의 수는 적은 것으로 나타났다.

Gene gun을 이용한 형질전환 효율증진 방법연구로서 Gene gun 이용시 DNA plasmid를 입힌 텡스텐의 식물체로의 주입을 위하여 적정 헬륨압력에 대한 실험결과 헬륨의 압력이 높아질수록 PLB생존율 및 식물체 재분화율이 더 낮아지는 것으로 나타나 약 900psi정도가 적당한 것으로 나타났다.

형질전환체를 검정하기 위해 GFP분석과 PCR방법을 이용하였다. hygromycin저항성을 보이는 식물체를 PCR분석 한 결과 580bp 부위에서 HPT gene의 크기와 같은 band가 확인되었으며 형질전환체로 예상되는 식물체의 잎과 뿌리를 이용하여 GFP분석을 한 결과 형질전환이 된 것으로 나타났다.

## II. 재료 및 방법

### I. 서론

호접란은 최근 우리나라에서 일반가정용, 사무실관상용, 호텔이나 공공시설의 접견실 장식용, 각종선물용 등으로 점차 그 이용이 증가되고 있다. 선진국에서도 꽃수요가 장미, 백합 등 절화류에서 양란으로 변화되는 추세이고 특히, 호접란의 세계시장 규모가 크게 증가되어 미국, 유럽, 일본 등으로의 수출 시장 잠재력이 매우 큰 것으로 손꼽히고 있으며 이러한 세계추세와 마찬가지로 우리나라에서도 재배면적이 매우 크게 증가하고 있다. 또한 우리나라의 경우 호접란 최대 수출국인 대만에 비해 개화유도에 유리한 서늘한 기후조건을 갖고 있어 생산비절약 등에 의한 수출 경쟁력이 높을 것으로 예상된다.

이러한 이점과 수출경쟁력을 높이기 위해서는 무엇보다도 고품질 신품종육성이 매우 절실한 실정이나 지금까지 우리나라에서는 호접란 육종에 필요한 유전자원과 기술부족으로 자체의 기술개발 및 품종육성이 이루어지지 않아 대부분의 묘를 대만, 태국 등에서의 수입에 의존하고 있으며 이를 위해 산학연 협력에 의한 활발한 육종연구가 절실히 필요하다. 이에 본 연구에서는 고품질우수 신품종을 육성하기 위해서 현재 실재적으로 호접란의 도입 및 재배를 통해 선발 및 판매를 하고 있는 농가와 협력하여 고품질 우수계통을 육종재료로 공급받아 최근 활발하게 이용하는 유전공학적인 방법인 형질전환을 이용하여 신품종 육성을 하고자 한다.

1. 형질전환 육종에 이용될 우수 호접란 계통  
국내외 수집 및 도입

가. 국내 농가에서 우수 호접란 계통 수집 및 평가  
(형태적 특성 및 개화특성 등)와 선발

나. 국외(대만, 일본, 태국 등) 농가 및 회사에서 우수 호접란 계통 수집 및 평가(형태적 특성 및 개화특성 등)

일본의 난 박람회와 난 재배 및 배양농가로부터의 우수계통 도입

다. 조사항목

① 화색과 꽃크기 : LP(light pink), DP(dark pink), p(pink), Y(yellow), W(white), WR(꽃잎은 white이고 lip은 red), MN(꽃크기가 mini size), MD(꽃크기가 midi size)

② 화폭 : 꽃의 첫 번째화의 가로길이

③ 소화수 : 꽃수를 조사하였고 만약 화경이 2대가 있는 경우 '&(예, 3&5)'로 표시하여 화경마다의 꽃수를 기록하였고 만약 1대의 화경에서 분지가 생긴 경우 '+'(예, 2+4+5)'로 표시하여 각 분지마다의 꽃수를 기록하였다.

④ 배열, 화형, 엽품질, 전체품질 : 배열과 화형은 1-5(1: high quality, 5: low quality)까지 등급을 통해 기록하였다.

⑤ 화경장 : 화경의 첫 번째화까지의 길이

## ⑥ 업수

2. 유전공학적 방법에 의한 고품질 품종육성을 위하여 Agrobacterium 및 Gene gun 등에 의한 형질전환 기술 체계 확립 및 이용

가. 형질전환 육종을 위한 protocom-like-body(PLB) 유기 및 식물체 재분화 체계 효율 증대

형질전환 효율 증진을 위하여 호접란의 PLB 유기 및 식물체 재분화 체계의 효율성을 증진시킴

나. Agrobacterium을 이용한 형질전환 효율증진 방법 연구

Agrobacterium tumefaciens line은 LBA4404였고 vector는 pBII21(NPT II와  $\beta$ -glucuronidase(GUS))와 pTOK233(hygromycin 저항성, Sm-GFP)를 사용하였다. 식물체로의 유전자 전환을 위한 적합방법을 모색하기 위해 목적유전자(target gene)의 선발, PLB의 표면이 단단하므로 형질전환 전에 물리적 상처를 내는 방법, 접종방법 및 시간, 공동배양기간, acetocyringone 적정농도 등의 방법을 확립하고자 하였다.

다. Gene gun을 이용한 형질전환 효율증진 방법연구

Gene gun기기는 Biolistic PDS-1000(Bio-rad)을 사용할 것이며 plasmid는 pTOK233을 이용한다. 식물체로의 유전자 전환을 위한 적합방법을 모색하기 위해 Microprojectile에 DNA를 집착시키는 적정 재료(텡스텐, 백금, 금 등) 및 DNA 적정농도, microprojectile의 크기, microprojectile의 이동속도, 헬륨가스의 압력 정도의 조건에 있어서 최적 조건을 확립하고자 하였다.

라. 형질전환체 검정방법 확립

1차적으로 hygromycin에 대한 적정 killing point를 확립하여 형질전환 식물체를 선발하고 선발된 식물체에서 유전자의 올바른 도입을 확인할 수 있는 검정방법을 확립하고자 하였다(GUS gene assay, GFP gene assay, PCR 분석, southern blotting 등).

마. 유용유전자 도입에 의한 신품종 육성

내병성 유전자인 Chitinase 및  $\beta$ -1, 3 - glucase를 Agrobacterium 및 gene gun을 이용하여 형질전환시켜 새로운 품종을 육성하고자 하였다.

### III. 결과 및 고찰

1. 형질전환 육종에 이용될 우수 호접란 계통 국내외 수집 및 평가와 선발

국내, 대만, 일본 등에서 우수 호접란 계통을 수집 및 도입하였으며 형질전환에 활용하기 위해서 수집 계통들의 특성을 조사하였다(Table 1). 이 중 선발된 우수계통은 형질전환에 이용하였다.

2. 형질전환 육종을 위한 PLB 유기 및 식물체 재분화 체계 효율 증대

가. PLB유기 및 식물재분화 체계(액아배양)

공시재료는 고양시 재배농가에서 구입하였으며, 모주에서 절취한 화경을 70% EtOH을 문힌 탈지면으로 기부에서 선단을 향해 3회 닦아낸 후 화경편을 적당한 크기로 절취하였다. 절취한 화경편을 건조 멸균된 플라스크에 넣고 화경편이 잠기도록 70% EtOH을 넣고 10-20초간 살균한 후 Tween 20이 첨가된 1% NaOCl용액에서 15분간 진공살균하였다. 살균된 화경편의 눈 주위를 사각형으로 칼집을 내고 화경에서 축방향으로 눈을 떼어 10cm×2.5cm test-tube에 1개씩 치상하고 배양하였다.

액아배양 배지는 VW(Vacin and Went: sucrose 20g/L, gellan gum 4g/L, pH 5.3, 121°C에서 15분간 멸균)를 기본배지로 사용하였으며 coconut water 100mg/L를 첨가하였다.

액아배양을 통해 유기된 PLB는 MVW(contains with vitamin solution as MS, sucrose 40g/L, apple 50g/L, potato 50g/L)배지에서 증식시켰으며 재분화를 시키기 위해 증식된 PLB를 hyponex 배지(hyponex 3g/L, peptone 2g/L, sucrose 20g/L, potato 30g/L, agar 8g/L, charcoal 1g/L)에 계대배양하였고

Table 1. Morphological characteristics of phalaenopsis germplasm

Line No.	화색	화폭	소화수	배열	화형	화경장	엽수	엽품질	전체품질	도입처
PK001	LP	9	5	3	4	46	4	3.5	3	ZUMMA
PK002	LP	11	6+2	3	3.5	46	4	3	2.5	ZUMMA
PK003	MDDP	6.5	5	4	3	45	4	2	3.5	일본
PK004	MDP	5.5	11+17	4	2	25	5	2	2	사하라
PK005	MDDP	5.5	5+3	2.5	3	23	5	2	2	일본, 칭화
PK006	MDP	4.5	20+15	2.5	2	33	7	2	1.5	U-U-LONG
PK007	MDP	4.5	3+2	2	2.5	26	7	2	1.5	일본
PK008	MNY	8	5	3	3		4	2	2	TAITA
PK009	MNY	7	4	2	3		5	2	2	TAITA
PK010	MNY	8.5	5	2	4		5	2	3	TAITA
PK011	MNDP	8	7	3	3		5	2	3	TAITA
PK012	MNDP	6	7	3	2		5	2	3	TAITA
PK013	DP	10	9	1.5	2	42	5	3	2	천일
PK014	MDDP	5.2	9+12+6	4	3				2.5	CHAMPION
PK015	MNDP	3.1	12+15	2					2	CHAMPION
PK016	MNDP	3.1	8+7+12	2					2	CHAMPION
PK017	W	12	11	2	2.5	35	8	2.5	2	태국
PK018	DP	9.5	8	1	1.5	45	2	3	1.5	대자농원
PK019	DP	10	8	3	1.5	56	5	3.5	1.5	대자농원
PK020	DP	11	9	1.5	2.5	47	4	3	1.5	임마누엘
PK021	DP	9.5	8&(3+3+5)	3	3	50	5	3.5	2	임마누엘
PK022	P	9.5	6	1.7	2.5	35	2	2	2	임마누엘
PK023	P	11	10	2.5	3	50	6	3	2.5	임마누엘
PK024	P	10	9 & 8	2.5	2.5	32	3	3	2.5	임마누엘
PK025	LP	9.5	11	1.5	3	52	4	2.5	2.3	임마누엘
PK026	LP	11	9	2	2.5	52	3	3.5	3.5	임마누엘
PK027	LP	11	7	3.5	3	41	3	2.5	3.5	임마누엘
PK028	WR	11	9+5	3.5	3	39	4	2.5	2	임마누엘
PK029	WR	12	13	1.3	2	40	4	3.5	1.8	임마누엘
PK030	WR	10.5	8+9	3.5	3	39.5	3	2	3	임마누엘
PK031	DP	9	9	2.5	1.5	48	7	2.5	2	남양주
PK032	LP	7	10+8	2	1.3	32	6	3.5	2	남양주
PK032	DP	9	8+2	3.5	3	45	6	3	3	호수
PK033	DP	8	9	3.5	2.5	37	7	1.5	2.5	호수

배양환경은 28°C로 유지하며 1,000~1,500lux의 조도에  
서 16시간 일장을 유지하였다.

#### 나. Callus유기를 위한 최적 배지선발

화경에서 절취한 액아와 액아배양에서 형성된  
PLB를 이용하였다. Callus 형성을 위한 배지는 VW배  
지를 기본배지로 사용하였으며 2,4-D (0.1, 0.5,  
1.0mg/L)와 BA(0.05, 0.1mg/L)를 첨가하여 배양하였  
다. 배양 2주마다 계대배양하면서 형성된 PLB를 제  
거하여 callus 형성률을 조사한 결과 0.5mg/L 2,4-D,  
0.1mg/L BA를 첨가한 경우에 callus 형성률이 가장  
높았다. 그리고 2,4-D를 단용처리한 경우보다 BA와  
혼용한 경우에 callus형성률이 높았으며 2,4-D의 농도  
가 높아질수록 고사하는 개체수가 많아졌다(Table 2).

PLB를 배양한 경우에는 화색계통에 따라 callus형  
성율에 차이가 있었다. Stripe는 모든 조합에서 callus  
를 형성하였으나 white red lip의 경우 0.1mg/L 2,4-D  
를 단용처리한 경우나 0.1mg/L BA를 첨가한 경우에  
callus를 형성하였다. 액아배양에서와 마찬가지로 2,4-  
D의 농도가 높아질수록 고사하는 개체수가 많아졌다  
(Table 3). Ishii(1988)는 PLB로부터 callus를 유기할  
때 0.1mg/L 2,4-D, 0.01mg/L BA에서 가장 효과적이  
었으며, 2,4-D의 농도가 높을수록 갈변고사하는 개체  
수가 많았다고 하였다.

#### 3. Agrobacterium을 이용한 형질전환 효율증진 방 법연구

##### 가. 항생제 저항성 시험

PLB를 이용하여 형질전환체 선발을 위한 항생제  
저항성을 측정하였다. 'Hikaru' 품종에 대하여 재분화  
배지에 hygromycin을 0, 3, 5, 7, 9mg/L수준으로 PPT  
를 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0mg/L 농도  
로 첨가하여 배양 12주후 생존율 및 재분화율을 조사  
하였다. 배양환경은 28°C로 유지하였으며 1,500lux의  
조도에서 16시간 일장을 유지하였다.

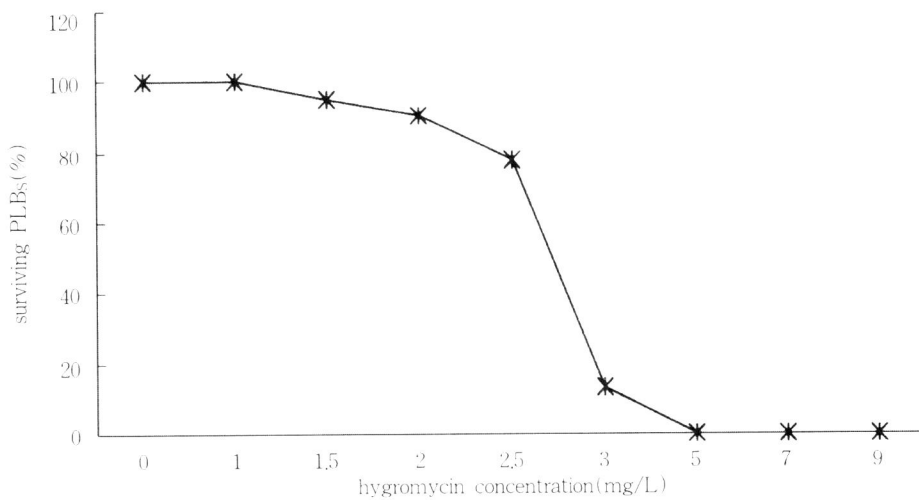
Hygromycin은 3mg/L 수준에서부터 생육이 저해되  
기 시작하였으며 9mg/L이상에서는 모든 개체가 고사  
하여 선발 marker로 hygromycin 3mg/L 수준이 적당  
한 것으로 나타났다(Fig. 1, 2). 배양 8주후 PPT 농도  
에 따른 PLB생존율 및 재분화율을 조사한 결과  
PLB생존율은 6mg/L 수준에서부터 저하되기 시작하  
였으며 유식물 재분화는 1.2mg/L에서부터 영향을 받  
았다(Fig. 3). PPT는 아미노산 합성을 저해하는 제조  
제로서 초기에는 그 영향이 미흡하나 배양 3개월 후  
조사한 결과 0.4mg/L 이상의 모든 처리에서 PLB의  
재분화가 이루어지지 않아 선발농도로 0.5mg/L를 사  
용하였다.

Table 2. Effect of plant growth regulator on callus induction from lateral bud of Phalaenopsis.

PGR(mg/L)		Number of segments				
2,4-D	BA	Cultured	Forming calli	Forming PLBs	Shoots	Died
0	0	20	0	8	10	2
0.1	0	20	2	10	4	4
	0.05	20	2	6	12	0
	0.1	20	4	4	8	4
0.5	0	20	4	2	2	12
	0.05	20	8	8	4	0
	0.1	20	14	0	2	4
1.0	0	20	2	0	4	14
	0.05	20	0	0	2	18
	0.1	20	10	0	4	6

Table 3. Effect of plant growth regulator on callus induction from PLB of 2 *Phalaenopsis* lines.

PGR(mg/L)		Lines	Number of segments			
2,4-D	BA		Cultured	Forming calli	Forming PLBs	Died
0	0	White red lip	20	1	16	3
		stripe	20	2	17	1
0.1	0	White red lip	20	6	14	0
		stripe	20	0	20	0
	0.05	White red lip	20	0	20	0
		stripe	20	4	16	0
0.5	0.1	White red lip	20	6	11	3
		stripe	20	3	17	0
	0	White red lip	20	0	4	16
		stripe	20	3	4	13
1.0	0.05	White red lip	20	0	8	12
		stripe	20	3	16	1
	0.1	White red lip	20	1	6	13
		stripe	20	3	17	0
1.0	0	White red lip	20	0	0	20
		stripe	20	1	4	15
	0.05	White red lip	20	0	1	19
		stripe	20	2	2	16
0.1	White red lip	20	0	2	18	
	stripe	20	0	4	16	

Fig. 1. Effect of hygromycin concentration on PLB surviving rate of *Phalaenopsis* CV. 'Hikaru'.

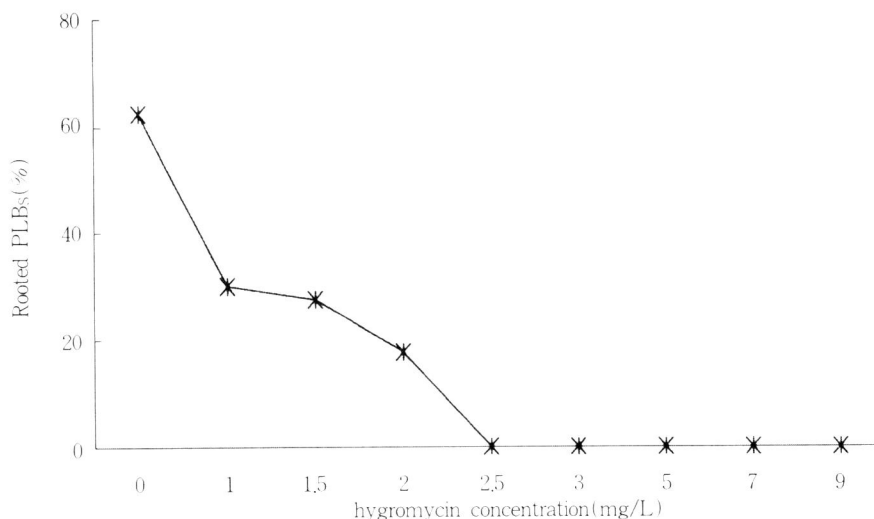


Fig. 2. Effect of hygromycin concentration on PLB regeneration rate of Phalaenopsis CV. 'Hikaru'.

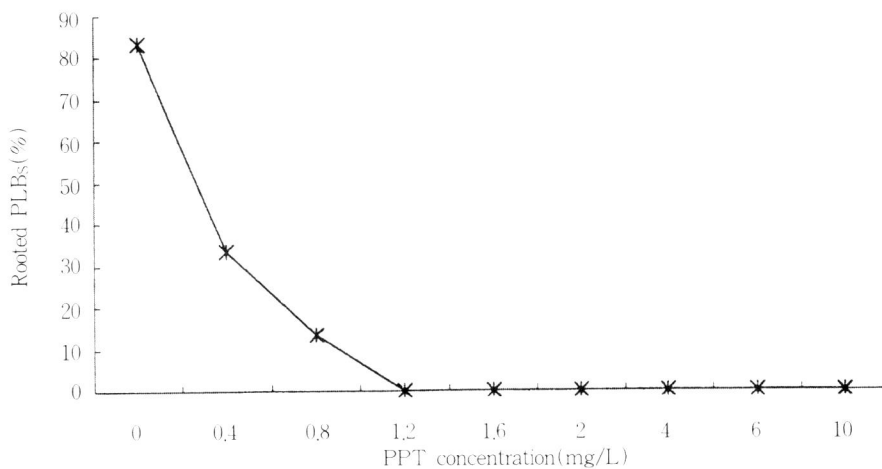


Fig. 3. Effect of PPT concentration on PLB regeneration rate of Phalaenopsis CV. 'Hikaru'.

나. Agrobacterium을 이용한 형질전환체계 확립

Agrobacterium tumefaciens line은 LBA4404였고 pTOK 233(binary vector, meomycin phosphotranferase II (NPT II), β-glucuronidase(GUS))과 pSBGM(Fig. 5) 2가지 vector를 사용하여 ABST배지(Table 4)에서 28℃의 압조건으로 3일간 배양하여 사용하였다.

배양된 A. tumefaciens는 colony를 모두 모아 30ml

AAM 배지에서 1시간동안 현탁배양하였다(25℃, 압 조건, bacteria 밀도는 약 3-5×10<sup>9</sup> cell/ml). PLB는 외부를 메스로 상처를 주어 16분, 30분, 45분동안 A. tumefaciens에 침지한 후 MVW-AS배지에서 2일간 co-culture하였다(25℃, 압조건).

Co-culture 뒤, PLB는 멸균수 및 500mg/L cefotaxime 용액에서 5차례 행구어 bacteria를 제거하

고, MVW-C배지에서 12주간 배양하여 증식시켰다. 증식된 PLB는 각각을 분리하여 1-2.5mg/L hygromycin과 0.5mg/L PPT가 첨가된 재분화배지에서 선발하였다(25°C, 2,000lux 16hr 일장).

Infection 시간이 형질전환에 미치는 영향에 관한 실험결과 모든 처리에서 PLB의 생존율이나 재분화된 식물체의 수에는 큰 차이를 나타내지 않았다 (Table 5).

Bacterium suspension culture 시간이 길어질수록 PLB의 생존율이 높아졌으나 재분화된 식물체의 수는 적은 것으로 나타났다. 앞으로 더욱 적당한 bacterium 농도를 찾는 것이 필요하다(Table 6).

4. Gene gun을 이용한 형질전환 효율증진 방법 연구 헬륨의 압력을 900psi

DNA plasmid는 pTOK233(selection marker는 hygromycin 저항성 유전자, reporter gene은 Sm-GFP 유전자를 포함함)을 사용하였으며 Biolistic PDS-1000(Bio-rad)을 사용하여 1.6 $\mu$ m크기의 tungsten을 헬륨압력 900psi, 1,500psi로 달리하여 형질전환에 미치는 영향을 구명하고자 하였다.

Biolistic PDS-1000(Bio-rad)을 사용시 헬륨의 압력을 900psi, 1,500psi로 달리하여 처리한 결과 헬륨의 압력이 높아질수록 PLB생존율 및 식물체 재분화율이

Table 4. Media for *Phalaenopsis* transformation.

Medium	Composition
MVW	VW, 100g/L potato, 40g/L sucrose, 8g/L agar, 1g/L activate charcoal, pH 5.3
ABST	AB medium plus 50mg/L spectinomycin, 10mg/L tetracyclin
AAM	AA salt and amino acids, MS vitamins, 500gm/L casamio acid, 68.5g/L sucrose, 36g/L glucose, 100uM acetosyringone, pH 5.2
MVW-AS	MVW medium plus 100uM acetosyringone, pH 5.3
MVW-C	MVW medium plus 200mg/L cefotaxime

Table 5. Effect of infection time on the production efficiency of hygromycin resistant putative transformants (rooted plantlets) on the selection medium after 8 weeks.

Infection time(min)	No. of inoculated PLBs	No. of survived PLBs(%)	No. of rooted PLBs(%)
16	526	488(92.7)	77(15.7)
30	457	457(89.7)	77(18.7)
45	414	391(94.4)	68(17.3)

Table 6. Effect of suspension culture time of Agrobacterium on the production efficiency of hygromycin-resistant putative transformants (rooted plantlets) on the selection medium after 8 weeks.

suspension culture time(hr)	No. of inoculated PLBs	No. of survived PLBs(%)	No. of rooted PLBs(%)
26	180	165(91.6)	18(10.9)
47	142	135(95.0)	9(6.6)



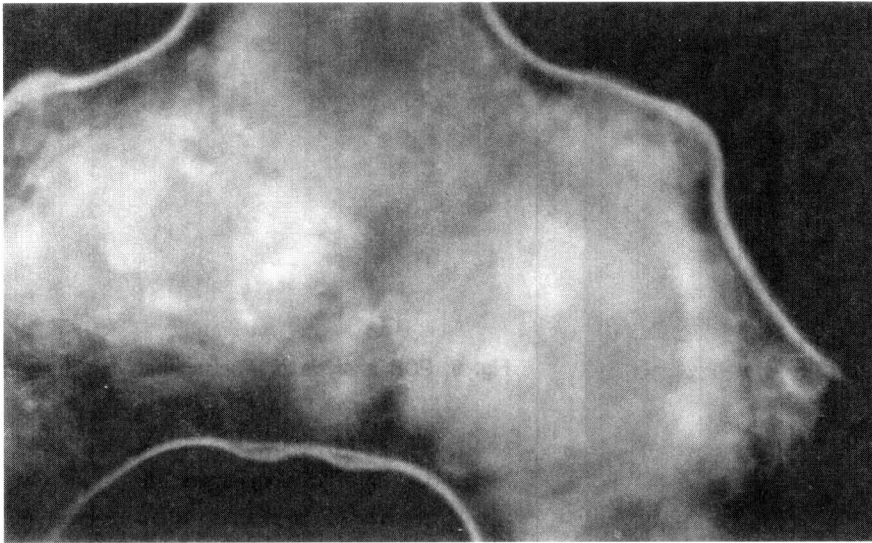


Fig. 4. Expression of GFP in leaf tissue of *Phalaenopsis* CV. 'Hikaru'



Fig. 5. Expression of GFP in root tissue of *Phalaenopsis* CV. 'Hikaru'

Table 7. Effect of helium pressure on the efficiency of hygromycin-resistant putative transformants (rooted plantlets) pSm GFP on the selection medium after 8 weeks.

helium pressure (psi)	No. of inoculated PLBs	No. of survived PLBs(%)	No. of rooted PLBs(%)
900	375	324(86.4)	102(31.4)
1500	634	518(81.7)	86(16.6)

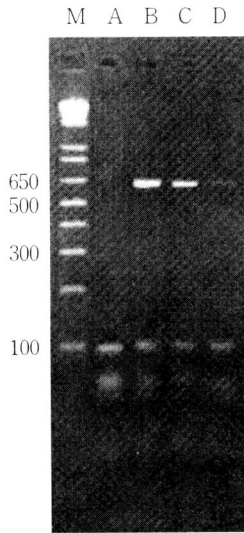


Fig. 6. PCR analysis of *Phalaenopsis* transformants.

M : Marker DNA  
 A : control plantlet  
 B, C, D : Transformed plantlets  
 (presence of the expected DNA fragment 580bp)

더 낮아지는 것으로 나타나 약 900psi정도가 적당한 것으로 나타났다(Table 7).

5. 형질전환체 검정방법 확립

가. GFP(Green Fluorescence protein) 분석

선발배지에서 0.5mg/L PPT에 대하여 저항성을 보이는 식물체는 microtome으로 뿌리와 잎을 절단하여 Olympus 형광현미경하에서 관찰하였다(Fig. 4, 5).

나. PCR 분석

형질전환 식물체와 control의 잎과 뿌리를 채취하여 CTAB방법을 이용하여 DNA를 추출하였다. 액체질소를 이용하여 곱게 갈아준 후, Extraction buffer (50mM Tris-HCl(pH 8.0), 25mM EDTA, 0.35M sorbitol, β-mercaptoethanol, 5% srkosyl 266ul, 5% sarkosyl 36ul, 0.7mM NaCl)에 녹인 8.6% CTAB용액을 37ul 첨가하여 이용-)를 넣어준 후 10분간 잘 섞어주고 동량의 phenol/chloroform(phenol : chloroform : isoamylalcohol = 25 : 24 : 1)을 첨가하여 잘 섞어준 후 65°C incubator에 15분가 두고 12,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 이 중 적당량의 상등액을 취하여 동량의 chloroform을 넣어주고 다시 12,000rpm에서 5분간 원심분리시켜 상등액을 뜬 후 동량의

isopropanol을 넣어 -20°C에서 30분간 보관하였다. 그 후 12,000rpm에서 15분간 원심분리하여 tube의 상등액을 조심시 버리고 70% EtOH로 수세한 뒤 pellet을 건조시켰다. Pellet이 건조되면 0.1X TE buffer를 200ul 넣어주고 RNase(1mg/ml)를 3ul넣어 준 후 50-60°C incubator에 10분간 넣어 DNase를 제거시키고 37°C에서 1시간 두어 RNase를 활성화시켰다. DNA는 1.3% agrose와 UV spectrometer(260nm/280nm)를 통해 순도 및 농도검정을 하였다.

Vector에 삽입된 HPT 유전자를 확인하기 위해 5'-ACAGCGTCTCCGACCTGATG CA-3' (sense) 5'-AGTCAATGACCGCTGTTATGCG-3(antisense) sequence를 이용하여 primer를 합성하여 사용하였다.

유전자 도입을 확인하기 위한 PCR 반응용액은 DNA 80ng, primer 1uM, dNTP 200uM, MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, enzyme 1unit 농도로 총 30ul을 사용하였으며, PCR 증폭은 MJ Research의 PTC-100을 사용하여 94°C에서 5분간 predenaturation 시킨 후 94°C 1분간 denaturation 하였다. annealing은 62°C에서 1분간 실시하였으며 72°C에서 2분간 extension시키면서 총 38cycle을 수행하였다. 이후 72°C에서 10분간 full extension시켰다. 최종 반응물은 EtBr이 포함된 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 형질전환 유무를 확인하였다.

HPT primer를 사용하여 hygromycin저항성을 보이

는 식물체에서 추출한 DNA를 PCR분석한 결과 580bp 부위에서 band를 확인할 수 있었으며 대조구에서는 band를 발견할 수 없었다(Fig. 6).

#### IV. 결론

유전공학적 방법인 형질전환을 이용하여 호접란 내병성품종을 육성하기 위하여 본 연구는 5가지 세 부연구를 실시하였다.

첫째, 우수 호접란 계통의 수집, 도입 및 형질전환으로의 활용을 대한 연구로 국내와 국외 일본, 대만 등에서 우수계통을 계속적으로 수입 및 도입하여 현재 30여 계통을 확보하여 계통 특유의 형질을 분석하였다.

둘째, 형질전환체의 생산을 위한 기초작업으로서 식물체 재분화 체계 효율증대로서 PLB의 유기 및 재분화 체계는 기존의 배지조건인 VW배지와 MVW 배지를 이용하였고 형질전환시 키메라 식물체의 발생율을 낮추기 위해 계획서상의 PLB 뿐 아니라 캘러스 유기를 위하여 최적배지를 선발하고자 하였다. 캘러스 유기를 위한 최적 배지선발은 계속 진행중이며 현재 VW배지를 기본배지로 적합한 호르몬의 종류와 농도를 선발하고 있으며 또한 화색에 따른 캘러스 유기율의 차이에 대한 연구도 진행중이다.

셋째, Agrobacterium을 이용한 형질전환 효율증진 방법연구로서 먼저 형질전환체 선발을 위하여 PLB의 항생제(hygromycin) 저항성 정도를 실험하였으며 PLB와 Agrobacterium의 접촉시간과 접촉농도에 대한 실험이 진행되었다.

넷째, Gene gun을 이용한 형질전환 효율증진 방법 연구로서 Gene gun 이용시 DNA plasmid를 입힌 텡스텐의 식물체로의 주입을 위하여 적정 헬륨압력에 대한 실험이 진행되었다.

다섯째, 형질전환체의 검정방법 확립으로서 형질전환체로 예견되는 식물체의 조직을 절단하여 현미경에 의해 관찰하는 GFP분석과 DNA를 추출하여 식물체에 도입된 유전자를 확인하는 PCR분석방법에 형질전환체를 선발할 수 있었다.

#### 참고문헌

1. Ball, E., Dianeteisinger and J. Arditti(1974), Clonal propagation of Phalaenopsis, Malayan Orchid Rew, 12(2): 6~9.
2. Campos, L. P., J. V. Raelson and W. F. Grant (1994), Genome relationships among Lotus species based on random amplified polymorphic DNA(RAPD), Theor. Appl. Genet. 88: 417~422.
3. Chang, Y. M, Kim, M, K, Kim, S. J, Oh, H, I and LIU, J. R.(1991), Introduction of  $\beta$ -Glucuronidase Gene into Carrot(Daucus, Carota, L.) by a Ti-Plasmid Vector System and Its Expression, Nucleic Acids Res 18: 55~602.
4. Chin-chi Lin(1986), In-vitro culture of flower stalk internodes of phalaenopsis and dorietaenopsis, Lindleyana 1(3): 158~163.
5. Chin-chi Lin(1987), Histological observations on in-vitro formation of protocorm-like bodies from flower stalk internodes of phalaenopsis, Lindleyana 2(1): 58~65.
6. Demeke, T., R. P. Adams and R. Chibbar(1992), Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA(RAPD): a case study in Brassica, Theor. Appli. Genet. 84: 990~994.
7. Doyle, J.J. and J. L. Doyle(1987), A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, Phytochem. Bull. 19: 11~15.
8. Edwards, K., C. Johnstone and C. Thompson(1991), A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis, Nucleic Acids Res 19: 1349.
9. Fatokun, C. A., D.Danesh, N. D. Young and E. L. Stewart(1993), Molecular taxonomic relationships in the genus Vigna based on RFLP analysis, Theor. Appl. Genet 86: 97~104.
10. Fu fan may lay(1978), Clonal propagation of aranda, ascocenda, cattleya by leaf tissue culture, Garden's Bulletin, Singapore 31: 132~138.

11. Griesbach, R. J.(1984). The in vivo propagation of Phalaenopsis orchids, Australian orchid rew, 49(4): 41~42.
12. Griesbach, J. R.(1983). The use of indoleacetyl amino acid in the vitro propagation of Phalaenopsis orchid, Scientia Horticulturae 19(1938): 363~366.
13. Hamill, J. D. S, Rounsley, A. Spencer, G. Todd, and M. J. C. Rhodes(1991). The use of the polymerase chain reaction in plant transformation studies, Plant Cell Reports 10: 221~224.
14. Homma, Y. and T. Asahira(1985). New Means of Phalaenopsis Propagation with Internodal Section of Flower Stalk, J. Japan, Soc. Hort. Sci, 54(3): 379~387.
15. Intuwong, O and Y. Sagawa(1974). Clonal propagation of Phalaenopsis by shoot tip culture, A.O.S. of Bulletin: 893~895.
16. Kazan, K., J.M. Manners and D.F. Cameron(1993). Genetic variation in agronomically important species of Stylosanthes determined using random amplified polymorphic DNA markers, Theor. Appl Genet, 85: 882~888.
17. Kuehnle, A. R. and N. Sugii(1992). Transformation of Dendrobium orchid using particle bombardment of protocorms, Plant Cell Reports 11: 484~488.
18. Kimura, Y. and N.Kurihara. コチヨウランの大量増殖法, 農業および園藝 66(8): 951~958.
19. Lu, C. Y. G. Nugent, T. Wardley-Richardson and S. F. Chandler(1991). Agrobacterium-mediated transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.), Bio/Technology 9: 864~868.
20. M' Ribu, H. K. and K. W. Hilu(1994). Detection of interspecific and intraspecific variation in Panicum millets through random amplified polymorphic DNA, Theor. Appl Genet, 88: 412~416.
21. Pieper, W. and K. Zimmer(1976). Clonal Propagation of Phalaenopsis In Vitro, Acta Horticulturae 64: 21~23.
22. Reisinger, M. D., E. A. Ball, and J. Arditt(1976). Clonal propagation of Phalaenopsis by means of flower-stalk node cultures, Orchid Rew, 84: 45~52.
23. Ryder, M. H. M. E. Tate, and A. Kerr(1985). Virulence properties of strains of Agrobacterium on the apical and basal surfaces of carrot root discs, Plant Physiol 77: 215~221.
24. Tanaka, M.(1978). ラン科植物 フェレノブシスの營養繁殖, 農業および園藝 53(9): 1158~1163.
25. Tanaka, M. and Y. Sakanishi(1977). Clonal Propagation of Phalaenopsis by Leaf Tissue Culture, A. O. S. of Bulletin, p. 733~737.
26. Tanaka, M. (1978). ラン科植物 フェレノブシスの營養繁殖(2), 農業および園藝 53(10): 1275~1279.
27. Tanaka, M., Y. Senda, and A. Hasegawa(1976). Plantlet formation by root-tip culture in Phalaenopsis, A. O. S. of Bulletin, p. 1022~1024.
28. Tanaka, M.(1989). 洋ランのマイクロプロパゲーションにおける最近の話題, 新花卉 143: 86~96.
29. Tanaka, M. 花卉 フェレノブシス, クロ-ン植物生産の實務・花卉, p. 226~233.
30. Vain, P., N. Keen, J. Murillo, C. Rathus, C. Nemes, and J. J. Finer(1993). Development of the particle inflow gun, Plant Cell Tissue Organ Culture 33: 237~246.
31. Vasil V., A. M. Castillo, D. Re, M. E. Fromm and I. K. Vasil(1992). Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus, Bio/Technology 10: 667~674.
32. Wan, y., J. M. Widholm and P. G. Lemaux (1995). Type I callus as a bombardment target for generation fertile transgenic maize (*Zea mays* L.), Planta 196: 7~14.

33. Yoneda, K. and H. momose(1988), PLB and Plantlet Formation by Root-tip Culture in Phalaenopsis, Bull. Coll. Agr. & Vet. Med., Nihon Univ., No. 45: 191~196.