

## DNA 입자총에 의한 *Cymbidium*속 난의 형질전환 조건 검토

홍경애 · 소인섭 · 이옥영 · 정충덕 · 류기중 · 유장걸\*

제주대학교 방사능이용연구소

**초록 :** *Cymbidium*속 난의 형질전환계를 확립하기 위해서, microprojectile bombardment 방법을 이용하여 춘란 (*Cymbidium virescence*)의 rhizome 조직세포에 외래 유전자를 도입하는 조건을 검토하였다. 각 parameter별 적정조건으로서 텅스텐 입자의 크기는 1.11  $\mu\text{m}$ , He 가스 압력은 77.33 kg/cm<sup>2</sup>, gap distance는 6.35 mm, target distance는 7.0 cm 이었다. DNA피복입자를 투사한 400  $\mu\text{m}$  두께의 rhizome 절편을 2개월간 배양한 뒤 GUS 활성을 조사한 결과 이 유전자가 발현되는 세포들이 관찰되었다. Kanamycin (100 mg/L)을 첨가한 배지에서 6개월 동안 선택배양을 통해 얻은 rhizome의 DNA를 PCR로 분석한 결과 nptII 유전자의 삽입을 확인할 수 있었다.(1996년 5월 27일 접수, 1996년 7월 8일 수리)

### 서 론

난과 (Orchid family)에 속하는 식물은 약 750 속, 25,000 종이 알려져 있고, 이 중에서 동양난 (*Cymbidium*)은 3,000 여개의 품종으로 분류되고 있는데 꽃색과 향기 및 잎모양이 매우 다양하여 가격도 많은 차이가 있다. 생활수준의 향상과 더불어 한란과 춘란 등 *Cymbidium*속 난에 대한 전체 수요량이 급격히 증가하고 있을 뿐만 아니라 독특한 특징을 가진 변이종에 대한 선호도가 매우 크지만, 새로운 품종의 개발은 그 수요를 뒤 따르지 못하고 있는 실정이다. 지금까지 난의 신품종 개발은 재래적인 교잡육종법에 의존해 왔는데, 이 방법엔 채종과 발아 등에 소요되는 시간이 너무 길뿐 아니라, 어느 특정형질만을 선택적으로 도입시키는 것이 불가능하기 때문에 신품종 창출이 크게 제한되어 왔다.

최근 분자생물학의 발전과 더불어 transgenic plant 기법이 여러가지 식물의 품종개량에 응용되고 있는데, *Agrobacterium*을 이용한 형질전환계가 보편적으로 사용되고 있다. 그러나 *Agrobacterium*은 단자엽 식물에 대해 감염율이 낮아 난의 형질전환계로는 적합하지 않다. 그리고 난은 원형질체를 배양하여 식물체를 얻는 것이 용이하지 않기 때문에 전기자극법 (Electroporation)이나 화학물질 처리 (PEG)에 의한 원형질체 형질전환 방법도 난의 육종에는 적합하지 않다. 반면 microprojectile bombardment 방법은, 쌍자엽 식물이나 단자엽 식물 모두에 적용될 수 있을 뿐만 아니라 세포막을 제거하여 원형질체를 만들 필요가 없기 때문에 효소처리에 따른 부작용이 없고 원형질체의 식물체 재분화 과정을 필요로 하지 않는다는 장점을 갖고 있어서<sup>10)</sup> 곰팡이,<sup>1)</sup> 담배,<sup>3,12,13,14)</sup> 옥수수,<sup>7)</sup> 벼,<sup>2)</sup> 잔디<sup>15)</sup> 등의 품종개량에 응용되어 왔다.

난과식물의 경우에 *Dendrobium*속의 육종에 microprojectile bombardment 방법이 응용된 예<sup>8)</sup>가 있으나 아직 *Cymbidium*속에 적용된 예는 없다.

본 연구는 제주도에서 대량 생산되는 양란과 한란 등 *Cymbidium*속 난의 신품종 개발을 위해 microprojectile bombardment방법에 의한 형질전환계를 확립하고자 수행하였다.

### 재료 및 방법

#### 식물재료

춘란 (*Cymbidium virescence*) 종자를 기내에서 발아시켜 얻은 rhizome을 공시재료로 사용하였다. 조직절편의 두께별 성장량 조사를 위해서는 vibratome (Scientific co., Series 1000)을 이용하여 styroform block에서 rhizome을 200, 400, 600  $\mu\text{m}$ , 2~3 mm, 5 mm 두께로 무균적으로 절단한 것을 사용하였다. 조직절편의 생육과 식물체 재생에 적합한 배지 조건을 찾기 위해서 MS를 기본배지로 하여 2배와 4배로 농도를 낮춘 배지와 일반적으로 난 배양에 널리 이용되고 있는 Hyponex 배지에 생리활성 물질인 arginine, aspartic acid, rutin을 각각 1, 5, 10, 20 mg/L 농도로, 활성탄은 0.5, 1.0, 2.0 g/L의 농도로 첨가하고 NAA 0.1, 1.0, 2.0, 5.0 mg/L 와 Fulmet (Kyowa Hakko Kogyo Co., Japan)를 1.0, 5.0, 10.0, 20.0  $\mu\text{g/L}$ 의 농도로 단용 혹은 혼용한 배지에 치상하여 조직절편의 생육효과를 조사했다.

#### DNA-coated microprojectile의 제조

형질전환에 사용된 vector는 식물체내에서 발현 가능한 binary vector인 pBI121 (Clontech Co., USA) 이었고

찾는말 : *Cymbidium virescence*, microprojectile bombardment, npt II gene, PCR

\*연락처

이 plasmid의 T-DNA 내에는 neomycin phosphotransferase II (npt II)와  $\beta$ -glucuronidase (GUS) 유전자가 삽입되어 있다. pBI121의 증식에는 *E.coli* (HB101)을 사용하였으며 plasmid DNA 추출은 Wizard megaprep kit (Promega Co., USA)을 이용하였다.

DNA-coating에 사용된 tungsten microcarrier (Bio-Rad) 60 mg을 먼저 에탄올로 소독하고 50% glycerol 1 mL를 가해서 저장용액으로 만들었다. 이 microcarrier 현탁액 25  $\mu$ l에 DNA 용액 2.5  $\mu$ l (1  $\mu$ g/ $\mu$ l), 2.5 M CaCl<sub>2</sub> 용액 25  $\mu$ l, 0.1 M spermidine (Sigma Co., USA) 용액 10  $\mu$ l를 혼합하면서 가해준 후 원심분리하여 얻어진 pellet을 70%와 100% 에탄올로 차례로 세척 원심분리하고 여기에 100% 에탄올 24  $\mu$ l를 가하여 현탁액을 조제하였다. 이 DNA-coated microcarrier를 ultrasonicator에서 진탕하면서 6  $\mu$ l를 취한 뒤 macrocarrier에 신속하게 옮겨 건조시키고 1~2시간 이내에 사용하였다.

#### Microprojectile bombardment 조건

직경 6 cm인 petridish에 0.8% agar를 포함하는 Hyponex 배지를 넣어 굳힌 다음 400  $\mu$ m 두께의 rhizome 절편 30개를 한겹으로 배열하고, Biolistic Particle Delivery System (Biorad, PDS-1000/He)을 사용하여 DNA피복 입자를 투사(bombardment)하였다. Tungsten particle의 크기(0.73, 1.11, 1.32  $\mu$ m), helium pressure (63.27, 77.33, 91.39 kg/cm<sup>2</sup>), gap distance (3.175, 6.350, 9.525 mm)와 target distance (3.8, 7.0, 10.2 cm) 등 각 parameter별로 3 수준씩 처리하고 GUS활성을 조사하였다. 이 때 초점을 둔 parameter 이외의 것은 중간 수준을 기준으로 하였다.

#### GUS assay

DNA피복입자를 투사하여 2개월 동안 생육시킨 식물체 절편에 GUS assay 용액 (1.9 mM X-Gluc, 20% methanol, 0.5 mM potassium ferricyanide, 0.5 mM potassium ferrocyanide, 0.3% Triton X-100 in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0) 500  $\mu$ l를 가하여 37°C에서 일정시간 방치한 후 시료내에 있는 chlorophyll을 제거하기 위해 50% ethanol, 10% formaldehyde, 5% glacial acetic acid에 24시간 동안 침지한 후 시간 경과에 따라 광학현미경 하에서 청색으로 염색된 조직절편을 관찰하여 GUS의 발현 여부를 판정하였다.

#### 형질전환체 선발 및 도입 DNA 확인

DNA피복입자를 투사한 rhizome 조직절편은 먼저 kanamycin이 없는 Hyponex배지에서 2개월간 배양한 후 kanamycin sulfate 100 mg/L를 함유하는 배지에 옮겨 2개월 후까지 생존하는 rhizome을 선발하여 kanamycin 배지에서 계속 배양하였다.

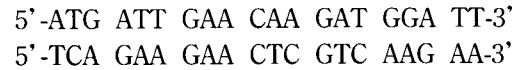
세포내에 도입된 유전자의 DNA를 확인하기 위해서는, rhizome을 가아제에 포장하여 액체질소에서 동결시켜 freeze-dryer에서 건조시킨 후 분쇄하고 이중 500 mg을 취하여 CTAB 방법<sup>4)</sup>으로 DNA를 분리하고 nptII DNA를

Table 1. Rhizome growth and the thickness of rhizome section

Thickness of rhizome section	200 $\mu$ m	400 $\mu$ m	600 $\mu$ m	2~3 mm	5 mm
Rhizome growth (%) <sup>1)</sup>	all dead	55	64	78	89

<sup>1)</sup>Calculated based on 200 rhizome sections

polymerase chain reaction(PCR)으로 검정하였다. nptII DNA 증폭에 사용된 primer 쌍은 둘 다 20 mer이며 다음과 같은 염기서열을 갖고 있다.



PCR 반응액의 MgCl<sub>2</sub> 농도는 1.5 mM, dNTP는 각각 200  $\mu$ M, primer는 각각 0.25  $\mu$ M로 하고, Taq DNA polymerase는 반응액 50  $\mu$ l에 대하여 2.5 u를 사용하였고 각 thermal cycle은 96°C, 1분 (denature)-58°C, 30초 (annealing)-72°C, 1분 (elongation)을 1 cycle로 해서 총 30 cycle로 증폭시켰다. PCR 조건은 kanamycin 유전자가 들어 있는 두 개의 plasmid(pFAD3와 pBI121)를 각각 template로 사용하여 적정화하였다.

#### 결과 및 고찰

##### Rhizome 배양 조건

조직절편의 생장에 영향을 줄 것으로 보이는 배지의 종류, 조직절편의 두께, 생리활성 물질의 농도, 활성탄의 첨가, 성장조절물질의 농도에 대해 적정조건을 검토하였다. 배지로는 MS배지와 Hyponex배지 두가지를 검토했는데, MS의 경우 1배, 2배, 4배 희석배지 중에서 4배 희석된 것이 양호하였다. Hyponex배지는 peptone을 첨가한 것과 첨가하지 않은 것에 대해 검토했는데 peptone을 첨가한 것이 보다 좋았다.

조직절편의 두께에 따라 배양도중의 생존율이 차이가 있었는데, 조직절편이 두꺼울수록 생존율이 높은 경향을 보였으나 외래 유전자를 도입할때는 하나의 zygote로부터 유래된 세포에서의 식물체 재생이 바람직하므로 rhizome이 생육할 수 있는 최소 두께인 400  $\mu$ m (Table 1)로 조직을 절편하였다.

생리활성 물질로서 rutin, arginine, aspartic acid를 배지에 첨가할 때 조직의 생존율이 증가했으며, 각 물질의 농도가 10 mg/L일 때 가장 양호하였다. 활성탄을 배지 중에 첨가했을 때도 조직의 생존율이 증가했는데, 입상을 사용했을 때가 분말 보다 양호하였으나 활성탄의 농도가 1.0 g/L 이상에서는 오히려 고사하는 것이 많았다. 성장조절물질 NAA와 Fulmet의 효과는 단용처리 보다 혼용처리에서 좋았으며, 특히 NAA 1.0 mg/L와 Fulmet 5  $\mu$ g/L의 조합에서 rhizome 생육이 가장 양호하였다.



Fig. 1. Transient GUS expression in the bombarded rhizome.

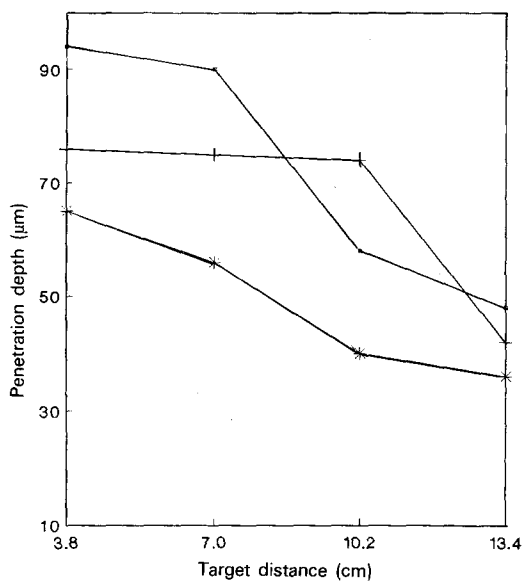


Fig. 2. Change of tungsten particle's penetration into the rhizome tissue depending the gap distance and the target distance. Gap distance, □-□; 3.175, +-+; 6.350, \*-\*; 9.525. Penetration depth (µm) Target distance (cm)

**Rhizome의 GUS유전자 발현**

실험에 사용된 pBI121은 식물세포내에서 발현될 수 있는 nptII와 GUS 유전자를 가지고 있는데 그 중에서 GUS유전자는 발현되었을 때 기질 X-gluc. (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-glucuronic acid)<sup>5)</sup>의 존재하에서 청색 화합물을 생성하므로 흔히 도입유전자의 확인을 위한 reporter gene으로 사용된다. 본 실험에서도 GUS활성을 이용하여 DNA도입효율을 평가하고자 먼저 rhizome 세포내에 도입된 GUS유전자의 발현조건을 조사하였다.

GUS유전자가 들어있는 pBI121을 피복한 텅스텐입자를 투사한 rhizome 절편에 GUS assay 용액을 넣고 '재료 및 방법'의 'GUS assay'에서 기술한 과정을 거쳐 시간별로 조직의 발색 여부를 관찰하였다. 본 실험의 GUS assay조건에서 약 50시간 후에 Fig. 1에서 보는 바와

Table 2. Effect of the bombardment parameters on GUS expression in the rhizome of *Cymbidium virescence*.

Micro particles (µm)	Helium pressure (kg/cm <sup>2</sup> )	Gap distance (mm)	Stopping screen	Target distance (cm)	Plasmid	GUS expression percentage*
<b>0.73**</b>	77.33	6.350	Middle	7.0	pBI121	5.5
<b>1.32</b>	77.33	6.350	Middle	7.0	pBI121	30.8
1.11	<b>63.27</b>	6.350	Middle	7.0	pBI121	13.2
1.11	<b>91.39</b>	6.350	Middle	7.0	pBI121	60.0
1.11	77.33	<b>3.175</b>	Middle	7.0	pBI121	4.4
1.11	77.33	<b>9.525</b>	Middle	7.0	pBI121	3.3
1.11	77.33	6.350	<b>Top</b>	7.0	pBI121	34.1
1.11	77.33	6.350	<b>Bottom</b>	7.0	pBI121	8.8
1.11	77.33	6.350	Middle	<b>3.8</b>	pBI121	30.8
1.11	77.33	6.350	Middle	<b>10.2</b>	pBI121	6.6
1.11	77.33	6.350	Middle	7.0	<b>pBI221</b>	5.5
1.11	77.33	6.350	Middle	7.0	<b>pBarGus</b>	33.0
<b>1.11</b>	<b>77.33</b>	<b>6.350</b>	<b>Middle</b>	<b>7.0</b>	<b>pBI121</b>	72.2

\*average % of GUS expression for the bombarded 30 rhizome sections(3 replications).

\*\*The bold indicates variables of each column.

같이 한 절편당 두개 내지 세개의 청색반점들이 나타났다. DNA피복입자를 투사하지 않은 조직에서는 청색반점이 전혀 나타나지 않는 것으로 보아 이들 청색반점들은 GUS발현에 의한 것으로 간주되었다. 본 실험 조건에서 GUS발현에 소요된 시간은 약 50시간으로 유사한 조건에서 벼<sup>6)</sup>의 경우 24~48 시간이 소요되었다는 보고와 다소 차이가 있는데, 이는 식물재료의 대사활성의 차이에 기인된 것으로 보인다. 즉 난은 생장이 느린 식물로서 대사활성도 낮아 유전자의 발현에 소요되는 시간이 더 긴 것으로 생각되었다.

**DNA 도입 조건**

DNA 도입효율에 영향을 주는 각 parameter들의 검토에 앞서 실험에 사용된 400 µm 두께의 rhizome 조직 절편에 대한 입자의 투과력을 알아보기 위해, 텅스텐 입자의 크기와 He 가스 압력을 고정하고 gab distance와 target distance를 달리했을 때 조직내부로 입자가 침투하는 깊이를 측정한 결과 Fig. 2와 같았다. 예상한 바와 같이 gab distance와 target distance가 작을수록 입자의 침투거리가 길었다. 조사된 gab distance와 target distance의 범위내에서 입자의 침투깊이는 약 30~90 µm로 조직의 두께 400 µm 보다 작아, 입자의 조직내 침투거리만을 고려할 때는 gab distance와 target distance가 짧을수록 입자의 투과력이 커 DNA 도입효율도 증가할 것으로 예상되었다. 그러나 gab distance와 target distance가 너무 짧은 경우에 세포가 상하거나 시료상자 밖으로 조직절편이 튀어 나와 오히려 좋지 않았다. 실제 GUS 발현율로 평가했을 때 gab distance와 target distance는 Table 2에서 보는 바와 같이 각각 중간 수준인 6.350 mm과 7.0 cm이 가장 좋았다.



Fig. 3. Selective growth of transformed rhizome on kanamycin medium.

Gab distance와 target distance 이외의 parameter들도 Table 1에서 보는 바와 같이 DNA 도입효율에 큰 영향을 주는 것으로 나타났다. DNA 운반체로 사용된 텅스텐 입자는 크기에 따라 DNA 도입효율에서 상당한 차이를 보였는데, 조사된 0.73, 1.11, 1.32  $\mu\text{m}$  중에서 1.11  $\mu\text{m}$ 가 가장 좋았다. He 가스 압력은 63.27, 77.33, 91.39  $\text{kg}/\text{cm}^2$  중에서 77.33  $\text{kg}/\text{cm}^2$ 이 가장 양호하였다. Stopping screen의 위치 역시 검토된 top, middle, bottom중에서 middle이 가장 높은 GUS 발현율을 보였다. 한편, 투사조건 외에도 목표유전자 (GUS)를 construction한 plasmid의 종류에 따라서도 GUS발현율이 다른 것으로 나타났는데, 사용된 pBI121, pBarGus, pBI221중에서 pBI121이 가장 높은 GUS 발현율을 보였다.

Seki<sup>11)</sup> 등에 의하면 *A. thaliana* 엽의 He 가스 압력은 115  $\text{kg}/\text{cm}^2$ , 뿌리일 경우는 200  $\text{kg}/\text{cm}^2$ 에서 가장 좋은 결과를 얻었다고 보고하였고, Nishihara<sup>9)</sup> 등은 *Lilium longiflorum*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana rustica*와 *Paeonia lactiflora*의 화분에 대한 He 가스 압력은 200  $\text{kg}/\text{cm}^2$ 가 적합하다고 보고하여 본 실험의 결과와는 다소 차이가 있었는데 이는 시료조직의 물리성이 다른데 원인이 있는 것으로 생각된다.

각 parameter의 최적 조건에서도 DNA 피복입자들이 macrocarrier에 균일하게 피복되지 않을 경우 조직의 특정 부위의 세포에만 집중적으로 입자들이 투사되어 GUS 발현율이 떨어졌다. 그러므로 DNA 현탁액을 macrocarrier에 균일하게 피복하는 것도 높은 DNA 도입율을 유지하는데 매우 중요한 것으로 나타났다. 각 parameter들의 최적조건에서 GUS 발현조직의 비율로 평가할 때 DNA 도입효율은 약 72%였다.

#### 형질전환체 선발

DNA피복 입자를 투사한 rhizome 절편으로부터 형질 전환세포를 선발하기 위해서는, 먼저 투사조직을 NAA 1  $\text{mg}/\text{L}$ 와 Fulmet 5  $\mu\text{g}/\text{L}$ 를 첨가한, kanamycin이 없는 Hyponex 배지에서 2개월간 배양하였다. 이 때 초기에는 조직세포들이 갈색으로 변하여 전부 죽은 것 처럼 보

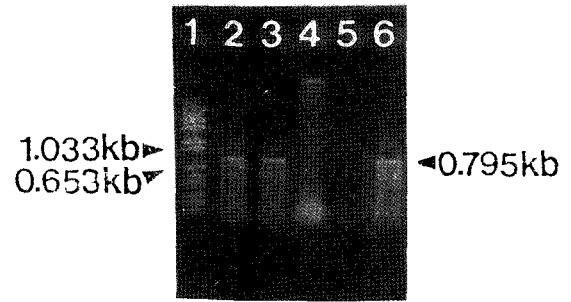


Fig. 4. PCR products of NPT II gene in pBI121.

1. Marker(pBR328/BglI-HinfI)
2. PCR of pBI121 with NPTII
3. PCR of pFAD3 with NPTII
4. Total DNA from rhizome without PCR
5. PCR of DNA from nonbombarded rhizome
6. PCR of DNA from bombarded rhizome

였으나 10일 내지 15일 후 일부 세포가 분열하여 3개월 후에 조그마한 rhizome을 형성하였다. 이 과정에서 얻은 rhizome들을 kanamycin 100  $\text{mg}/\text{L}$ 가 들어있는 배지에 옮겨 배양했을 때 일부는 생장이 정지되거나 죽었지만 어떤 rhizome들은 Fig. 3과 같이 계속생장을 보였다. Kanamycin에 대한 야생형 춘란 rhizome 조직절편의 감수성 조사결과, 배지중의 kanamycin 농도가 100  $\text{mg}/\text{L}$  일때 세포의 생장이 정지되어 죽었기 때문에 이 농도의 kanamycin을 함유하는 배지에서 생장이 정지하거나 죽은 상기 rhizome들은 형질전환되지 않은 것으로 생각되었다. 한편 본 실험에 사용한 pBI121은 식물세포에서 발현될 수 있는 두개의 유전자를 가지고 있는데 그 중에서 nptII 유전자의 산물은 kanamycin을 불활성화시키므로 이 유전자가 도입된 식물세포는 kanamycin에 대해 저항성을 나타낸다. 그러므로 상기 농도의 kanamycin 배지에서 계속생장을 보이는 rhizome들은 nptII 유전자가 도입된 형질전환체로 추정되었다.

형질전환체의 도입 유전자를 확인하기 위하여 kanamycin 배지에서 선발된 개체에 대해 nptII 유전자를 PCR로 분석하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 DNA피복 입자를 투사하지 않은 rhizome으로부터 추출한 DNA를 nptII-specific primer pair로 PCR에 의해 증폭했을 때는 어떤 band도 관찰되지 않았다. 그러므로 야생형 rhizome에는 본 실험에 사용한 primer pair에 의해 증폭되는 DNA가 없음이 확인되었다. 한편 DNA 피복입자를 투사하여 kanamycin 배지에서 선발한 rhizome DNA의 PCR에서는 0.795 kb의 band가 증폭되었다. 이 0.795 kb의 DNA band는, nptII 유전자가 들어있는 pFAD3와 pBI121를 동일한 primer pair로 증폭했을 때 나타난 DNA fragment와 크기가 같았다. 그러므로 형질전환체로 선발된 rhizome에 nptII유전자가 도입된 것을 알 수 있었다.

#### 감사의 글

본 연구는 1994년도 교육부 학술연구조성비(유전공학)에 의해서 수행된 것으로 연구비지원에 감사 드립니다.

### 참 고 문 헌

- Bhairi, S. M., and Staples, R. C. (1992) Transient expression of the beta-glucuronidase Gene introduced into uromyces appendiculatus uredospores by particle bombardment. *Phytopathology*, **82**(9), 986-989.
- Christou, P., Ford, T. L., and Kofron, M. (1991) Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/technology*, **9**, 957-962.
- Daniell, H., Krishnan, M., and McFadden, B. A. (1991) Transient expression of  $\beta$ -glucuronidase in different cellular compartments following biolistic delivery of foreign DNA into wheat leaves and calli. *Plant cell Rep.* **9**, 615-619.
- Gawel, N. J. and R. L. Jarret. 1991 A modified CTAB DNA extraction procedure for Musa and Ipomoea. *Plant Molecular Biology Reporter*. **9**(3), 262-266.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., and Bevan, M. W., 1987 GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, *EMBO J*, **6**, 3901-3907.
- Jeon, J. S., H. S. Jung, S. K. Sung, J. S. Lee, Y. D. Choi, H. J. Kim., and K. W. Lee. (1994) Introduction and expression of foreign genes in rice cells by particle bombardment. *J. Plant. Biol.* **37**(1), 27-36.
- Klein, T. M., Fromm, M., Weissinger, A., Tomes, D., Schaff, S., Sletten, M. and Sanford, J. C. (1988) Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **85**, 4305-4309.
- Kuehne, A. R., Sugii, N. (1992) Transformation of *Dendrobium* Orchid Using Particle Bombardment of Protocorms. *Plant Cell Reports*. **11**(9), 484-488.
- Nishihara, M., M. Ito, I. Tanaka, M. Kyo, K. Ono, K. Irifune, and H. Morikawa. (1993) Expression of the  $\beta$ -glucuronidase gene in pollen of Lily (*Lilium longiflorum*), tobacco (*Nicotiana tabacum*), *Nicotiana rustica*, and peony (*Paeonia lactiflora*) by particle bombardment. *Plant Physiol.* **102**, 357-361.
- Sanford, J. C. (1990) Biolistic plant transformation. *Plant Physiol.* **79**, 206-209.
- Seki, M., Y. Komeda, A. Iida, Y. Yamada, and H. Morikawa. (1991) Transient expression of  $\beta$ -glucuronidase in *Arabidopsis thaliana* leaves and roots and *Brassica napus* stems using a pneumatic particle gun. *Plant Molecular Biology*. **17**, 259-263.
- Svab, Z., Hajdukiewicz, P., and Maliga, P. (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 8526-8530.
- Tomes, D. T., Weissinger, A. K., Ross, M., Higgins, R., Drummond, B. J., Schaaf, S., Maloneshoneberg, J., Staebell, M., Flynn, P., Anderson, J. and Howard, J. (1990) Transgenic tobacco plants and their progeny derived by microprojectile bombardment of tobacco leaves *Plant Mol. Biol.* **14**, 261-268.
- Yamashita, T., Iida, A., Morikawa, H. (1991) Evidence that more than 90 percent of  $\beta$ -glucuronidase expressing cells after particle bombardment directly receive the foreign gene in their nucleus. *Plant Physiology*. **97**(2), 829-831.
- Zhong, H., Bolyard, M. G., Srinivasan, C., Sticklen, M. B. (1993) Transgenic plants of turfgrass (*Agrostis palustris* Huds) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. *Plant Cell Reports*. **13**(1), 1-6.

#### Optimization of *Cymbidium* transformation system by the particle gun techniques

Kyung-Ae Hong, In-Sup So, Ok Young Lee-Stadelmann, Choong-Duk Cheong, Key-Zung Riu and Zang-Kual U.\* (*Cheju Applied Radioisotope Research Institute, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea*)

**Abstract:** Process of particle bombardment for efficient transformation of *Cymbidium vivescence* rhizome microcross sections was investigated using Biolistic particle delivery system with pBI121 harboring the  $\beta$ -glucuronidase(GUS) and the neomycin phosphotransferaseII(nptII). The best result was obtained from the combination of 1.11  $\mu$ m tungsten particles coated with pBI121, 77.33 kg/cm<sup>2</sup> helium pressure, 6.35 mm gap distance, and 7.0 cm target distance. Transient expression of the reporter gene, GUS, bombarded into the rhizome microsections was observed by the histochemical assay. The marker gene, nptII, delivered by bombarding the tungsten particles coated with the plasmid DNA was identified in the transformed rhizome by polymerase chain reaction.

\*Corresponding author