

Protocorm-like body를 이용한 호접란 형질전환 연구

허연재 · 김은영 · 양원태 · 이영병 · 이재현 · 정영수 · 남재성 · 윤대진¹ · 이기환² · 김도훈*

동아대학교, ¹경상대학교, ²국립식량과학원 기능성작물부

Received December 12, 2008 / Accepted March 5, 2009

Agrobacterium-Mediated Transformation of Phalaenopsis by Using Protocorm-Like Body. Yeon-Jae Hur, Eun-Young Kim, Won-Tae Yang, Young-Byoung Lee, Jae-Hun Lee, Young-Soo Jung, Jae-Sung Nam, Dae-Jin Yun¹, Ki-Hwan Yi² and Doh-Hoon Kim*. Dong-A University, ¹Gyeong-Sang National University, ²Department of Functional Crop, National Institute of Crop Science - *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation procedure for the phalaenopsis orchid, established by using Protocorm-like bodies (PLBs), was aimed at the introduction of target genes into individuals with divergent genetic backgrounds. PLBs obtained from the axillary bud of a peduncle were maintained on a hypoxenex medium supplemented with 1 g/l of activated charcoal, 30 g/l of sucrose and 0.1 mg/l thiamine. The multiplication rate of PLBs was about 90% in case of subculture PLBs to be cut transversely into 1/3 part from top position. The PLBs were inoculated with *Agrobacterium* strain EHA105 harboring both β -glucuronidase (GUS) and hygromycin-resistant genes for 20 minutes after dipping treatment. Transformation efficiency was the highest with a *Agrobacterium* culture medium and dipping treatment of O.D. 0.8. Newly induced PLBs were put on selection medium containing 1 mg/l hygromycin for 2 months. Hygromycin-resistant phalaenopsis plants that regenerated after the selection culture of PLBs showed histochemical blue staining due to GUS. Transgene integration of the hygromycin-resistant plants was confirmed by PCR and Southern blot using GUS specific primers and probe.

Key words : Phalaenopsis, transformation, *Agrobacterium*, protocorm-like body

서 론

호접란(Phalaenopsis)은 난초과의 다년생 식물로 열대아시아, 인도네시아, 오스트레일리아 북부 및 필리핀이 원산지이다. 현재 우리 농가의 고소득 수출 화훼작목으로 위치를 굳혀가고 있으며 매년 재배농가와 생산량 및 시장규모가 증대되고 있다. 난 종류는 새로운 형태의 꽃, 색깔 및 병저항성 등이 소비자의 소비나 품종의 시장성에 있어 매우 중요한 요인이며, 대부분 전통적인 교배조합을 통해 다양한 품종을 만들어내고 있다. 그러나 이러한 전통적인 교잡육종법은 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환법에 비해 목적 유전자를 선별적으로 도입하는데 시간이 많이 걸리기 때문에 상대적으로 효율성이 떨어지게 된다[8]. 세계시장 규모 등을 고려할 때, 형질전환에 의한 다양한 신종육종성이 필요하지만, 아직 형질전환 기술이 체계적으로 확립되어 있지 않은 실정이다. 특히 호접란은 외떡잎 식물로서 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에 어려움이 있다. 지금까지 몇몇 연구자들이 호접란 형질전환 실험을 수행하였다. Belarmino and Mii [1]가 2000년에 최초로 화경에서 유도된 세포로부터 *Agrobacterium*을 이용한 호접란의 형질전환에 성공하였으나 형질전환에 적합한 식물재료를 얻기가 상대적으로 어렵고, Chai 등[2]은 PLB (Protocorm-like body)

를 이용한 형질전환에 성공하였으나 이 또한 호접란의 종류에 따라 형질전환 효율에 큰 차이를 보여 안정적인 형질전환 방법으로 사용하기에는 어려움이 있다. 최근 Mishiba 등[8]이 종자를 이용하여 PLB를 유도하고 여기에 형질전환을 하는 방법을 확립하였다. 그러나 형질전환 효율이 아직 낮고, 특히 종자로부터 유도되는 PLB는 변이체가 많이 생겨 상품화하기에는 많은 문제를 안고 있다. 또한, 호접란의 형질전환 효율을 높이기 위해서는 상태가 양호한 PLB를 유도하는 것이 매우 중요하며, 활성탄소, sucrose 및 thiamine 등의 처리가 형질전환체의 재분화에 효과적인 것으로 알려져 있다[3,9].

따라서 본 연구에서는 *Agrobacterium*을 이용한 호접란의 효율적인 형질전환법을 확립하기 위하여, 몇 가지 배양 조건이 PLB의 증식율에 미치는 영향과 형질전환 효율 증대를 위한 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

식물 재료 및 배양 조건

형질전환에 필요한 PLB를 얻기 위하여 호접란 화경의 측아를 이용하였다. 측아를 조심스럽게 떼어 낸 다음 핀셋으로 고정시킨 뒤 scarpel을 이용하여 위로부터 1/3 지점을 잘라내고, 배지에 치상하여 PLB를 유도하였다. 유도된 PLB는 25°C 배양실에서 12시간 광조건에서[12], 0.8%의 Agar가 함유된 pH 5.6의 하이포넥스 배지를 기본으로 하여 1주일마다

*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7507, Fax : +82-51-200-7505

E-mail : dhkim@dau.ac.kr

Table 1. Composition of Hyponex media used for PLB multiplication in Phalaenopsis

Items	Contents
Hyponex (N:P:K=6.5:4.5:19)	1 g/l
Hyponex (N:P:K=20:20:20)	1 g/l
Pepton	2 g/l
Potato	30 g/l
Activated Charcoal	1 g/l
Sucrose	30 g/l
Agar	8 g/l
pH	5.6

계대 증식시켰다(Table. 1).

호접란 PLB 증식을 위한 배지 첨가물의 조건

활성탄소 분말의 첨가가 페놀성 화합물의 제거에 미치는 영향을 조사하기 위하여 활성탄소 분말을 PLB 증식배지에 각각 0.5 g/l과 1 g/l을 첨가하였다. 또 식물호르몬(thiamine)의 첨가가 PLB 증식에 얼마나 효과가 있는지 알아보기 위하여 thiamine을 0.1 mg/l의 농도로 배지에 첨가하여 thiamine을 첨가하지 않은 배지와 PLB 생육을 비교하였다. PLB 증식배지 내 sucrose 농도 차이가 PLB 증식율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 기본 Hyponex 배지에 sucrose를 10, 20 및 30 g/l의 농도로 첨가하여 증식율을 조사하였다.

Agrobacterium 준비 및 감염

호접란 형질전환을 위해 GUS 유전자를 함유하고 있는 pCAMBIA 1302 벡터를 *Agrobacterium* EHA105에 도입하였다. *Agrobacterium*은 형질전환 실험 2일 전에 hygromycin 50 mg/l과 kanamycin 75 mg/l이 함유된 YEP배지에서 진탕배양되었다. 배양된 *Agrobacterium*을 acetosyringone이 함유된 AAM 배지에 OD값 0.8이 되도록 현탁하였다. PLB는 접종하기 3일 전에 새 PLB 배지에 계대하여 pre-culture 하였다. 이 PLB를 filter paper 위에 올려 핀셋으로 고정시킨 뒤 철제침에 준비된 현탁액을 묻혀 PLB를 전체적으로 3-4번 찔러 상처 내는 dipping 처리를 하였다. 그 후 *Agrobacterium*을 현탁한 AAM 배지에 dipping 처리된 PLB 절편을 담가 다시 20분 간 접종한 후 100 uM acetosyringone이 함유된 AAM 배지에 치상하여 25°C에서 5일간 암배양하였다.

제균 및 치상

5일 동안 공배양한 접종 개체는 carbenicillin이 200 mg/l 함유된 멸균수에 3회 세척한 뒤 멸균된 filter paper에 올려 건조시켰다. 그리고 dipping 처리되지 않은 PLB의 절단면부분이 배지에 닿도록 치상하였다. 이후 hygromycin이 함유된 배지에서 광조건을 주어 PLB를 선발한 뒤 형질전환 식물체를 만들었다.

GUS expression assay

형질 전환체의 GUS activity 측정을 위하여 접종한 PLB 조직을 50 mM NaH₂PO₄·H₂O, 10 mM EDTA와 0.3 M Mannitol이 함유된 5-bromo-4-chloro-indolyl glucuronide (X-Gluc) 염색용액에 넣어 37°C 배양기에서 overnight 처리하였다. 처리 후 99.5%의 ethanol을 탈색용액으로 사용하여 chlorophyll이 제거될 때까지 반복적으로 탈색시킨 뒤 PLB와 식물체의 GUS 발현 여부를 관찰하였다.

형질전환체의 선발

호접란 형질전환체의 선발을 위해 GUS 염색을 나타내는 개체를 우선적으로 선발한 뒤 그 대상 식물체로부터 genomic DNA를 추출하였다. Primer는 1.2 kb 크기의 GUS 유전자를 증폭하기 위하여 5'-GGTGGGAAAGCGCGTTACAA G-3'와 5'-GTTTACGCGTTGCTTCCGCCA-3'를 이용하였다. PCR 조건은 Pre-denaturation 은 94°C에서 5분, denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 55°C에서 30초, extension은 72°C에서 1분 30초로 30 cycle을 하였으며 last extension은 72°C에서 10분간 반응하였다. 증폭된 DNA는 1% agarose gel에서 전기영동하여 band 유무를 관찰하였다. 형질전환 식물체의 Southern blot 분석을 하기 위하여 10 ug의 genomic DNA를 *EcoRI*으로 절단하여 0.8% agarose gel에서 전기영동한 뒤 capillary transfer법을 이용하여 nylon membrane으로 전이시켰다. Membrane은 [α -³²P]dCTP로 표지된 GUS-specific DNA를 probe로 하여 65°C에서 24시간 동안 hybridization되었다. 이후 membrane을 세척한 뒤 X-ray film에 노출시켜 밴드를 확인하였다.

결과 및 고찰

활성탄소, thiamine 및 sucrose의 첨가가 호접란 PLB 증식에 미치는 영향

호접란 PLB 증식배지에 활성탄소를 첨가하여 PLB 증식에 미치는 영향을 조사한 결과(Fig. 1), 활성탄소가 1 g/l 첨가된 배지에서 배양한 PLB의 경우 활성탄소가 0.5 g/l 첨가된 배지에 비해 초기 생육 단계에서는 큰 차이가 없었으나 시간이 경과할수록 PLB의 증식에 차이를 보였다. 이는 배양기간이 경과함에 따라 PLB의 단편으로부터 분비되는 페놀성 화합물의 양이 많아지지만 활성탄소가 이를 제거하므로써 PLB 증식에 좋은 영향을 미치는 것으로 생각된다. 호접란의 PLB 증식에 미치는 sucrose의 적정 농도를 규명하기 위해 실험을 실시한 결과(Fig. 2), sucrose가 10 g/l 첨가된 처리구가 sucrose 20 g/l과 30 g/l 처리구에 비하여 PLB 증식율이 매우 낮았으며 sucrose 20 g/l과 30 g/l 처리구 간에는 유의적인 차이가 인정되지 않았다. Nhut 등[9]은 백합을 대상으로 활성탄소와 sucrose가 형질전환체의 재분화에 좋은 영향을 미

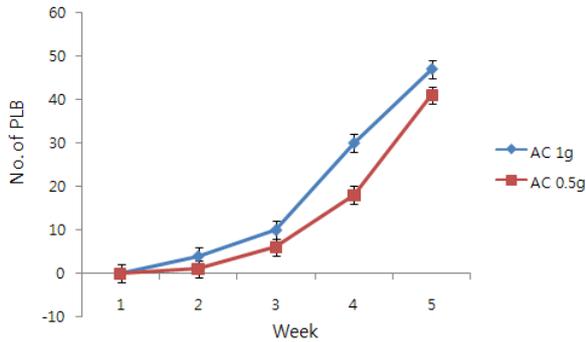


Fig. 1. Effect of activated charcoal (AC) concentration on PLB multiplication in Phalaenopsis. Vertical bars represent standard errors of 3 replicates.

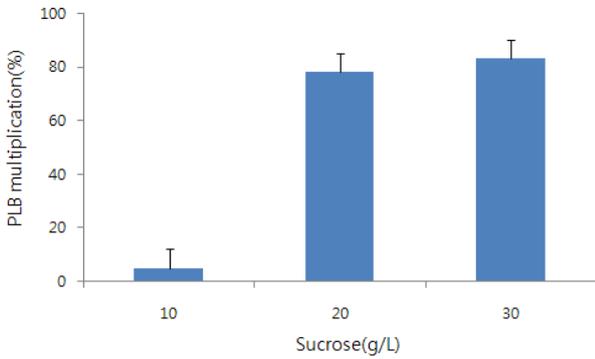


Fig. 2. Effect of sucrose concentration on PLB multiplication in Phalaenopsis. It was evaluated from 10, 20 and 30 g/l sucrose in hyponex media. Vertical bars represent standard errors of 3 replicates.

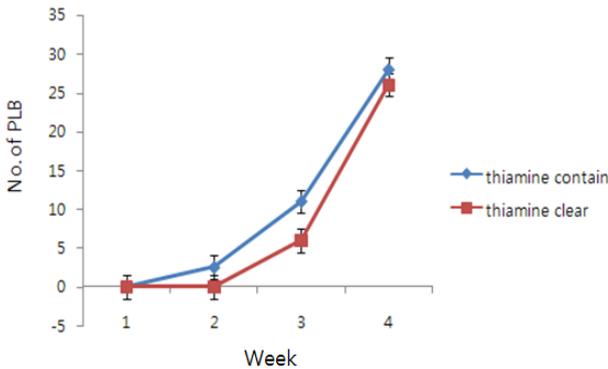


Fig. 3. Effect of thiamine concentration on PLB multiplication in Phalaenopsis. Vertical bars represent standard errors of 3 replicates.

친다고 보고하였고, 본 연구에서도 비슷한 결과를 나타냈다. 호접란 배양시 티아민의 처리가 PLB 증식에 미치는 영향에 대해 조사한 결과(Fig. 3), 티아민 처리가 무처리에 비해 배양 후 3일을 전후하여 PLB 유도 및 증식에 효과적이 것으로 나타났다. 이러한 결과로 보아 초기 PLB 유도에 티아민이 중요한 역할을 하는 것으로 생각되며, Cortina 등[3]은 토마토 형

질 전환 시 thiamine 처리가 형질전환체 재분화에 큰 영향을 미친다고 보고하였고, 호접란 PLB 증식 시에도 thiamine이 같은 영향을 미치는 것으로 나타났다.

PLB 계대 배양 시 절단 방법이 증식 과정에 미치는 영향 호접란 계대 배양 시 PLB의 절단 정도가 PLB의 증식율에 미치는 영향을 조사한 결과(Fig. 4), PLB를 위로부터 1/3부위를 절단하여 계대 배양한 경우 PLB의 증식율이 90% 이상으로 가장 높았고, 절단 부위가 1/2 정도인 경우 80%, 절단부위가 위로부터 2/3 정도인 경우 40% 정도의 PLB의 증식율을 보이며, 절단부위가 아래쪽으로 내려갈수록 증식율이 떨어지는 경향을 나타냈다.

형질전환

Agrobacterium 접종 방법은 유도된 PLB를 scarpel을 이용하여 절단한 뒤 절편체를 *Agrobacterium* 배양액에 넣어 감염시키는 방법을 개선하여 *Agrobacterium* 배양액을 농축한 후 철제 침에 묻혀 PLB를 찢어 감염시키는 dipping 처리를 하였다. 특히 상처를 내는 철제 침 자체에도 농축된 *Agrobacterium* 배양액을 묻혀서 더 효율적으로 감염시키는 방법을 사용하였다. 또한 이렇게 처리된 PLB를 다시 OD값 0.8 정도의 *Agrobacterium* 배양액에 넣어 20분간 더 접종시키고 효율을 높였다. Dipping 처리된 호접란 PLB를 20분간 *Agrobacterium* 배양액에 넣어 접종시키는 것이 가장 효과적인 것으로 나타났으며, 감염 시간을 30분으로 한 경우 *Agrobacterium*의 과다증식으로 PLB의 증식이 지연되며 다시 재균 작업을 거치더라도 제대로 자라지 못했다(자료 미제시). *Agrobacterium* 배양액의 농도가 호접란의 형질전환에 미치는 영향을 조사한 결과(Fig. 5), 배양액의 흡광도 값이 0.8 일 때 형질전환 효율이 가장 높았고, 1.2의 경우 과다증식된 *Agrobacterium*이 많이 생겨 제거에 어려움이 있었으며, 이로 인해 PLB의 증식이 억제되고 형질전환된 PLB를 선별하기가

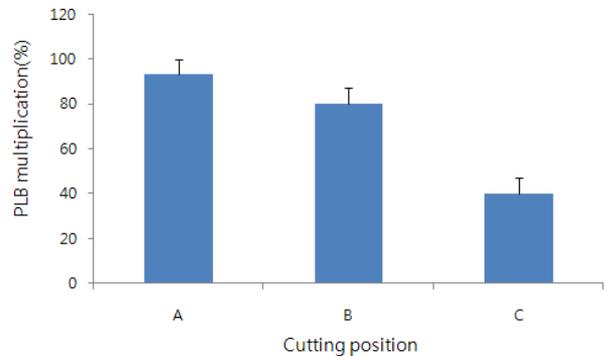


Fig. 4. Effect of cutting position on PLB multiplication in Phalaenopsis. A, 1/3 part from top position; B, 1/2 part from top position; C, 2/3 part from top position. Vertical bars represent standard errors of 3 replicates.

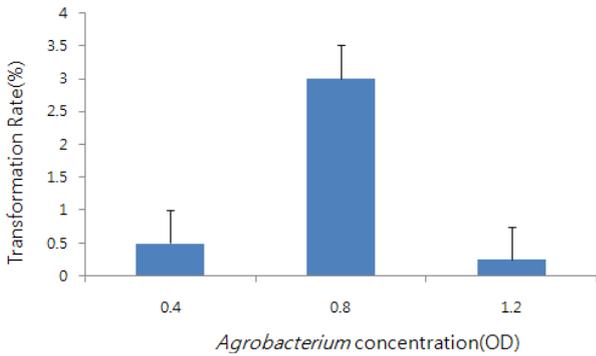


Fig. 5. Effect of *Agrobacterium* concentration on transformation efficiency in *Phalaenopsis*. Vertical bars represent standard errors of 3 replicates.

매우 어려웠다. OD가 0.4인 경우는 OD가 1.2일 때와는 반대로 *Agrobacterium*의 감염이 잘 되지 않아 형질전환 효율이 낮게 나타난 것으로 생각된다.

형질전환체의 선발

본 실험에서는 형질전환체의 선발을 위한 적정 항생제의 농도를 조사하기 위해 hygromycin의 농도를 1.0, 1.5, 3.0 및 6.0 mg/l로 나누어 배지에 첨가하여 실험을 수행하였다. 접종된 PLB는 hygromycin 농도가 높아질수록 PLB의 증식이 억제되며 형질전환 되지 않은 개체는 갈변하며 고사했다 (Fig. 6). 그리고 형질전환된 개체도 항생제의 농도가 증가함에 따라 형질전환체의 증식이 억제되는 경향을 나타내어 1 mg/l의 저농도 hygromycin을 함유한 배지에서 형질전환된 PLB를 선발하는 것이 바람직할 것으로 생각된다. 외떡잎식물인 벼의 경우 형질전환 캘러스의 선발을 위해 40 mg/l 정도의 고농도 hygromycin을 사용하고 있는데 반해 같은 외떡잎식물인 호접란 PLB의 경우 항생제에 대한 감수성이 높아 벼 캘러스보다 훨씬 낮은 농도에서 선발을 해야 PLB의 증식이 원활이 이루어져 선발효율을 높일 수 있을 것으로 생각된다.

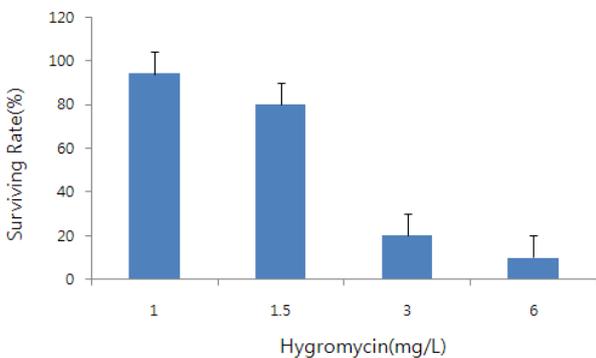


Fig. 6. Effect of hygromycin concentration in selection medium on surviving rate of putative transgenic PLBs in *Phalaenopsis*. Vertical bars represent standard errors of 3 replicates.

다. *Agrobacterium*이 접종된 PLB를 hygromycin이 함유된 PLB 증식 배지에 치상하여 형질전환된 PLB를 선발하였고, 새롭게 유도된 PLB를 shooting 배지에 옮겨 multishoot을 유도한 후 rooting 배지에 옮겨 재분화 개체를 확보하였다. 선발된 형질전환체를 GUS assay로 형질전환 유무를 확인한 결과 (Fig. 7), 형질전환된 호접란 PLB로부터 증식된 대부분의 새로운 PLB는 GUS 염색이 강하게 나타났고 (Fig. 7A, B), 특히 dipping 처리된 부위에서 새롭게 생성되는 PLB에서 GUS 염색이 강하게 나타났다. 형질전환체의 잎 부위에서도 GUS 발현을 확인할 수 있었으나 (Fig. 7C) 형질전환 되지 않은 야생형 식물체는 GUS 염색이 되지 않았다 (Fig. 7D). 이러한 결과로 보아 호접란 PLB를 dipping 처리함으로써 형질전환 효율을 더욱 증대시킬 수 있을 것으로 생각된다.

또한 GUS 유전자가 도입된 PLB와 식물체로부터 genomic DNA를 추출하여 GUS 특이적인 primer를 제작하여 PCR을

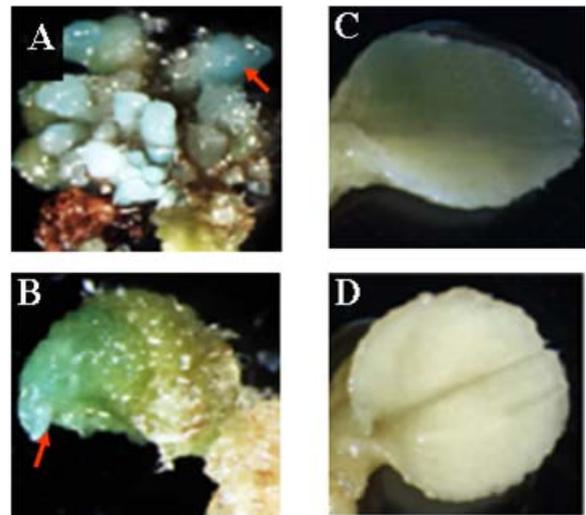


Fig. 7. Analysis of GUS expression in transgenic and wild type plants. Hygromycin-resistant PLBs and plant exhibited GUS expression. A and B, newly regenerated PLBs from transformed PLB; C, transgenic plant; D, wild type plant.

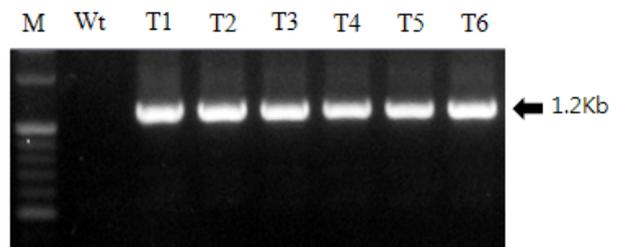


Fig. 8. PCR analysis of the GUS gene in transgenic *Phalaenopsis* plants. Genomic DNAs extracted from transgenic plants were used for PCR amplification with GUS-specific primers. M, DNA size markers; Wt, Wild type plant; T1-T6, transgenic plants.

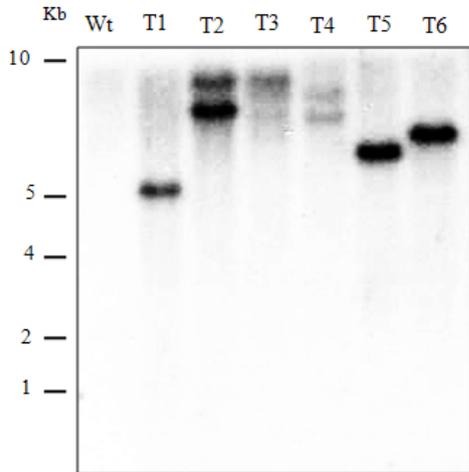


Fig. 9. Southern blot analysis of the GUS gene in transgenic *Phalaenopsis* plants. Genomic DNA extracted from transgenic plants were digested with *EcoR I* and hybridized with a GUS-specific probe. Wt, Wild type plant; T1-T6, transgenic plants.

수행할 결과(Fig. 8), 형질전환체에서 1.2 kb 크기의 GUS 밴드를 얻을 수 있었고, 야생형에서는 밴드가 나타나지 않아 GUS 발현을 보이는 개체들은 정상적으로 형질전환된 것을 알 수 있었다. 도입된 GUS 유전자의 insertion number를 알아보기 위해 genomic DNA를 *EcoR I*으로 절단하고 GUS 유전자의 단편을 probe로 하여 Southern blot 분석을 실시한 결과(Fig. 9), 전체 6개체의 형질전환체 중에서, 3개체는 single insertion site를 나타냈고, 나머지 3개체는 두 개 이상의 insertion site를 나타냈다.

요 약

본 연구는 *Agrobacterium*을 이용한 효율적인 호접란 형질전환 시스템의 확립을 위해 실시하였고, 호접란 PLB의 대량 증식을 위한 배지 조성은 하이포넥스 기본 배지에 활성탄 1 g/l, 티아민 0.1 mg/l 및 sucrose 30 g/l을 배지에 첨가한 경우 PLB가 안정적으로 증식되었다. 계대 배양시 PLB 절단 방법이 PLB의 생존과 증식에 큰 영향을 미치며, PLB 위쪽으로부터 1/3 부위를 절단하여 계대 배양한 경우 90% 이상의 가장 높은 증식률을 나타냈다. *Agrobacterium* 접종 시 균이 묻어 있는 침으로 PLB를 찔러 상처를 내는 dipping 방법을 이용하여 형질전환 효율을 높일 수 있었다. *Agrobacterium* 배양액의 흡광도 값이 0.8일 때 형질전환 효율이 가장 높았고, 형질전환된 PLB의 선발은 1 mg/l 정도의 저농도 hygromycin을 함유한 배지에 계대배양 하는 것이 효율적이었다. 호접란 형질전환체를 먼저 GUS assay를 통하여 선발하였고, 선발된 개체로부터 genomic DNA를 추출하여 GUS 특이적 primer와 probe로 PCR과 Southern blot 분석을 수행하고 유전자의

도입여부를 조사한 결과 GUS 염색된 형질전환체에서 정상적으로 GUS 유전자가 도입된 것을 확인할 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 2005학년도 동아대학교 학술연구비(공모과제) 지원에 의하여 연구되었음.

References

1. Belarmino, M. M. and M. Mii. 2000. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Phalaenopsis* orchid. *Plant Cell Rep.* **19**, 435-442.
2. Chai, M. L., C. J. Xu, K. K. Senthil, J. Y. Kim, and D. H. Kim. 2002. Stable transformation of protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Scientia Horticulturae* **96**, 213-224.
3. Cortina, C. and F. A. Cullianez-Macia. 2004. Tomato transformation and transgenic plant production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **76**, 269-275.
4. Knapp, J. E., A. P. Kausch, and J. M. Chandless. 2000. Transformation of three genera of orchid using the bar gene as a selectable marker. *Plant Cell Rep.* **19**, 893-898.
5. Lee, B. M. 2001. Effect of sonication and vir genes on transient gene expression in *Agrobacterium*-Mediated transformation. *Journal of Life Science* **11**, 316-320.
6. Liao, C. -H., S. -J. You, V. Prasad, H. -H. Hsiao, J. -C. Lu, N. -S. Yang, and M. -T. Chan. 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an *Oncidium* orchid. *Plant Cell Rep.* **21**, 993-998.
7. Men, S., X. Ming, Y. Wang, R. Liu, C. Wei, and Y. Li. 2003. Genetic transformation of two species of orchid by biolistic bombardment. *Plant Cell Rep.* **21**, 592-598.
8. Mishiba, K. -i., D. P. Chin, and M. Mii. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phalaenopsis* by targeting protocorms at an early stage after germination. *Plant Cell Rep.* **24**, 297-303.
9. Nhut, D. T., B Van Le, S. Fukai, M. Tanaka, and K. T. T. Van. 2001. Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture. *Plant Growth Regulation* **33**, 59-65.
10. Semiarti, E., A. Indrianto, A. Purwantoro, S. Isminingsih, N. Suseno, T. Ishikawa, Y. Yoshioka, Y. Machida, and C. Machida. 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation of the wild orchid species *Phalaenopsis amabilis*. *Plant Biotechnology* **24**, 265-272.
11. Shin, D. I. and H. S. Park. 2005. Sodium hypochlorite solution as a chemical wounding agent for improving *Agrobacterium*-mediated chinese cabbage seed transformation. *Journal of Life Science* **15**, 1034-1036.
12. Su, V. and B. -D. Hsu. 2003. Cloning and expression of putative cytochrome P450 gene that influences the colour

- of *Phalaenopsis* flowers. *Biotechnology Letters* **25**, 1933-1939.
13. Wang, N. N., S. F. Yang, and Y. Y. Charng. 2001. Differential expression of 1-aminocyclopropane-1- carboxylate synthase genes during orchid flower senescence induced by the protein phosphatase inhibitor okadaic acid. *Plant Physiol.* **126**, 253-260.
 14. You, S. -J., C. -H. Liao, H. -E. Huang, T. -Y. Feng, V. Prasad, H. -H. Hsiao, J. -C. Lu, and M. -T. Chan. 2003. Sweet pepper ferredoxin-like protein (*pf1p*) gene as a novel selection marker for orchid transformation. *Planta* **217**, 60-65.