

팔레놉시스 조직배양 및 형질전환 최근 연구동향

노희선 · 이상일 · 이이레 · 백선영 · 김종보

Recent trends in tissue culture and genetic transformation of *Phalaenopsis*

Hee-Sun Roh · Sang-Il Lee · Yi-Re Lee · Sun-Young Baek · Jong-Bo Kim

Received: 5 December 2012 / Accepted: 15 December 2012
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract This report describes recent advances in tissue culture and genetic transformation of commercial *Phalaenopsis*. Recently, an importance of *Phalaenopsis* has been increased due to its popularity with beautiful flowers and is widely used for pot plants as well as cut-flower. Its use is rapidly enlarging in worldwide. Thus, demands for the release of new elite cultivars in *Phalaenopsis* have been increased. During the last several decades, some critical progresses have been made in tissue culture and genetic transformation in *Phalaenopsis* species. Cooperation with these biotechnological methods are supposed to promote the release of commercial *Phalaenopsis* cultivars in the near future. Until now, no technical review on tissue culture and genetic transformation in *Phalaenopsis* has been reported in Korea. Therefore, we inquired the brief history and techniques of tissue culture system in Korea.

Keywords *Agrobacterium*, particle bombardment, *Phalaenopsis*, regeneration, transformation

서론

난은 오래전부터 인간과 매우 친숙한 식물이었으며, 국내에서도 승진이나 개업 등 경축 행사 등에 선물용으로도 인기가 많고 고급취미로 인식이 되어 오고 있는 실정이다. 이러한 난은 세계 각지에 다양한 지역에 분포하며, 관상용으로 심지어 일부 지역에서는 식용으로도 사랑 받

으며 재배 또는 서식되어 왔다(윤과 정 2010).

최근 국내에서도 인기가 점점 증가하고, 산업적으로도 중요도가 높아지고 있는 실정이다. 농림수산식품부(2011)에 의하면 2011년도 전체 화훼생산액이 8,214억원이고, 분화류가 그중 33.7%인 2,766억원을 차지하고 있는데, 이중 난이 전체 분화의 2위인 29.1%를 차지하고 있다. 또한 팔레놉시스는 현재 우리나라 난 전체 재배면적 212.5 ha의 약 20.5%인 44.0 ha로 심비디움(110 ha)에 비해 적지만 생산액이 258.4억원으로 257.9억원인 심비디움보다 높으며(11'농림수산식품부 통계, MIFAFF), 우리 농가의 고소득 수출 화훼작목으로 위치를 굳혀가고 있다(Hur et al. 2009). 국내 소비에서 특이한 점은 팔레놉시스는 국내에서 경조사용으로 많이 소비된다는 점이다(Park et al. 2009).

2008년 미국에서 시작된 세계적인 경제위기 이후 화훼 시장은 어려움을 겪으면서 시장 및 거래규모가 감소하고 있으나, 난류는 감소폭이 적고 오히려 팔레놉시스는 증가하고 있다. 수출 분야에서도 화훼 수출액 중 1위(전체 화훼 수출액의 20% 차지)이며 지난 10년간 4.5배(2000년 442만\$ → 2011년 2,026만\$) 증가하였다. 이 중 심비디움이 화훼수출액 중 1위이고 2위가 팔레놉시스가 차지하고 있다. 이러한 사례 등을 고려할 때 국내 유통 및 소비되는 양란 중 심비디움과 팔레놉시스 이 두 작물이 가장 중요한 분화용 화훼류라고 할 수 있다. 그러나, 2006년 12월 품종보호대상작물로 지정된 이후, 외국 품종보호권에 대한 로열티 지불이 가시화 되고, 점차 이에 대한 분쟁이 생겨나는 등 양란 시장에서 우량 품종개발 및 수출전략에서의 변화가 필요한 시점이다. 또한 난의 소비는 유행에 민감하게 반응하여 새로운 품종에 대한 요구도가 높은 편이다. 기존에 수행되어 왔던 전통 육종방법은 육종 연한이 길어 급변하는 유행과 소비자의 고품질에 대한 요구도를 맞추는 데 한계가 있어, 형질전환을 통한 신품

H.-S. Roh · S.-I. Lee · Y.-R. Lee · S.-Y. Baek · J.-B. Kim (✉)
건국대학교 의료생명대학 생명공학과
(Department of Biotechnology, College of Biomedical & Health Sciences, Glocal campus, Konkuk University, Choong-Ju, 380-701, Korea)
e-mail: jbhee1011@kku.ac.kr

종 개발이 필요한 실정이다. 또한 난 형질전환에 있어 안정적이고 고효율의 조직배양 체계는 형질전환 효율을 높이는데 있어 필수적 일뿐 아니라, 무배유 종자인 난의 발아 및 증식에도 도움이 된다.

본 논문에서는 이러한 중요성을 지닌 양란 중 팔레놉시스 우량 품종 증식 및 보급에 널리 사용되는 조직배양 기술 그리고 향후 전통육종기술과 결합하여 새롭게 창출된 유전 변이를 이용하여 소비자 수요를 충족시키고 생산비를 절감할 수 있는 형질전환 기술을 이용하는 사례 등에 관한 최근 연구동향을 보고하고자 한다.

팔레놉시스 소개

팔레놉시스(*phalaenopsis*)는 ‘나방(*phalaina*)’과 ‘같은(*opsis*)’이란 뜻의 두 단어를 합친 것으로, 꽃 모양이 나방을 닮았다 하여 호접란(胡蝶蘭)이라고도 한다. 폭이 넓고 두꺼운 잎이 3~7장정도 붙는다. 화색은 백색, 진한 분홍색, 황색, 연녹색 및 반점무늬가 있는 것 등 다양하여 여성에게 인기가 많다. 꽃은 주로 겨울부터 봄에 개화하는데, 이 중에는 여름이나 가을에 개화하는 품종도 있다(강 2001). 팔레놉시스는 전형적인 단경성 난으로 별브는 없고, 원

산지는 히말라야·미얀마·필리핀·태국·인도네시아 등의 동남아시아로 열대아시아에서부터 오스트레일리아까지 넓은 지역에 걸쳐 40~50종이 분포하고 있으며, 대부분 다습한 지역의 나무에 착생하지만 일부는 바위에 착생하기도 한다(윤과 정 2011).

팔레놉시스 조직배양

난은 유전적으로 이형접합성(*heterozygous*)이기 때문에 교잡 육종으로 육성한 품종을 종자로 번식시키면 개체간의 생육 차이, 개화기의 불균일성, 개체 간 화색 및 화형의 차이를 보이는 등 다음세대에서 모본과 동일한 특성을 지닌 개체를 얻기 어렵고 형질이 다양하게 분리되어(한 등, 2007) 실생묘의 묘 손실율이 20~50%에 달한다. 이에 반해 조직배양에 의해 번식되는 영양계 묘들은 유전적으로 균일하여 실생번식 시 발생하는 문제점들을 극복할 수 있고, 형질전환 시 안정적인 조직배양 환경은 형질전환 효율을 높여주는 역할을 한다(김 등 2001). 난과 식물의 대표적인 조직배양 방법에는 생장점배양(Morel 1960, 1964)과 정단배양(Wimber 1963) 방법이 있다. 먼저 생장점배양은 위구경의 눈으로부터 채취한 생장점을 이용하여

Table 1 A review of tissue culture in *Phalaenopsis* plants

Species	Explant	Explant production	Proliferation	Regeneration	Reference
<i>P. gigantea</i>	leaf	-	-	-	Niknejad et al. (2011)
<i>P. bellina</i>	leaf	78% 14 PLBs per explant	9 PLBs per explant	-	Khoddamzadeh et al. (2011)
<i>P. amabilis</i> , <i>P. 'Nebula'</i>	leaf	50-80% 8.2 and 3.5 embryos per responding explant	-	90%	Gow et al. (2010)
<i>P. gigantea</i>	protocorm	28%	58-66%	-	Mariam et al. (2010)
<i>P. firedance "SFIL"</i>	Root	20%	-	-	Fan et al. (2010)
<i>P. amabilis</i> (L.) Bl. cv. 'Lovely'	leaf	75% 10 PLBs per explant	-	100%	Sinha et al. (2010)
<i>P. chiali strioes</i> × <i>P. Freed's danseise</i> ,	flower stalk	-	-	12.9 shoot/ 18 explants	Choi and Koh (2009)
<i>P. amabilis</i> , <i>P. 'Happy Valentine'</i> , <i>P. 'White Windian'</i> , <i>P. 'Renaissance'</i> , <i>P. 'New Cinderella'</i> , <i>P. 'Brother Lawrence'</i> , <i>P. 'Sogo Pride'</i> , <i>P. 'Little Mary'</i> , <i>P. 'Little Steeve'</i> .	flower stalk node	-	-	190 shoot/ 30 explants	Na et al. (2007)
<i>P. 'Hwa Feng Red Jewel'</i>	PLBs	-	2.3%	-	Liu et al. (2006)
<i>P. amabilis</i> var. <i>formosa</i>	leaf	93.8% 19.4 embryos per explant	-	-	Chen and Chang (2006)
<i>phalaenopsis</i>	leaf	-	19.9 ± 1.8 shoots/explant	-	Myint et al. (2006)

배양하는 방법이며, 정단배양은 3 cm 정도 성장한 신초를 사용하여 성장점을 얻어 배양하는 방법이다. 이때, PLB를 형성하기도 하는데 PLB는 원괴체와 비슷하지만 기내에서 조직 절편체 또는 callus에 의해 형성되는 구조물로서 Morel(1960)에 의해 처음 기록 되었다. 팔레놉시스의 증식에 관한 연구는 Roter(1949)에 의해 시작 되었으며 최근 보고된 팔레놉시스 조직배양 연구사례는 Table 1에 요약된 바와 같이 팔레놉시스는 여러 부위를 통하여 대량 증식에 이용하고 있으나, 우리나라에서는 대부분 PLB를 이용하여 묘를 대량 증식하고 있다.

국내에서는 1990년대 초반부터 농가에 팔레놉시스 조직배양묘가 보급되기 시작하여 그동안 많은 발전을 이루어 왔다. 조직배양 묘는 실생묘와 비교하여 생육이 비교적 고르고 개화가 거의 동시에 이루어지며 화색과 화형이 동일하여 그 결과 재배에 있어서 용이함과 우수한 상품성을 가지게 된다(김 2010). 그러나, 일부품종에 있어서 변이문제가 발생하여 난 산업에 커다란 걸림돌이 되고 있다. 현재 이를 극복하기 위한 방법으로 난 조직으로부터 직접 다산 초를 유도하는 등의 연구가 진행 중이지만 연구가 부족하고 효율성이 PLB를 통한 증식에 비해 떨어져 아직 우리나라에서는 protocorm-like bodies(PLB)를 통한 클론묘 생산이 주를 이루고 있다(김 2010). 팔레놉시스 조직배양에는 많이 이용되는 PLB 배양법 외에도 액아 및 부정아 이용법 등이 있는데 PLB 이용법은 PLB 유도를 위하여 화경이 많이 필요하지 않고, PLB 자체의 증식속도가 다른 절편체인 액아나 부정아보다 빠른 장점이 있다. 또한 조직배양 작업 시에도 PLB 분리하는 작업이 액아를 분리하는 작업보다 쉬운 점도 장점이라고 할 수 있다(김 2010). 반면 액아를 이용한 조직배양 체계는 증식속도도 PLB 조직배양법에 비해 느리고 액아 분리가 어렵고 액아 자체의 재료확보를 위해 많은 화경재료가 필요한 단점이 있다. 이러한 점을 고려하면 PLB 조직배

양법이 가장 우수해 보이나, 변이발생이 큰 단점이 있어서 액아법이나 부정아 형성을 통한 증식이 시도되어 왔다. 팔레놉시스의 육종 및 증식의 선진국인 대만 등지에서는 주로 부정아를 이용하여 팔레놉시스 증식이 이루어지고 있다(김 2010). 그러나, 액아나 부정아 이용 증식법은 식물생장조절제 사용을 통해 증식효율을 높여 PLB 조직배양법과 유사하거나 더 높은 증식효율을 가지고자 하나 그에 비례하는 높은 변이 발생율이 문제라고 할 수 있다.

세계적으로 팔레놉시스 연구초기에는 성장점배양 또는 경정배양(Intuwong and Sagawa 1974)이 시도 되었으나, 성장점 적출을 위해서는 모주를 희생시켜야하고, 폐놀 성분이 과다 발생하여 성장점 조직이 쉽게 죽어 성공률이 매우 낮다는 문제가 있어(Bea 2003), Figure 1과 같이 화경유래 엽절편 배양(Fig. 2) (Tanaka and Sakanishi 1978) 과 화경 절간 절편체 배양(Homma and Asahira 1985; Lin 1986), 근단 배양(Kobayashi et al. 1991) 및 액아 배양(Tse et al. 1971; Inchihashi 1992) 등이 널리 이용되고 있으며, 이들 조직으로부터 유도된 PLB 혹은 callus는 충분히 증식된 후 재분화 과정을 거쳐 모주와 동일한 형질을 가진 식물체로 대량 생산된다. PLB는 Figure 1에서와 같이 팔레놉시스의 여러 부위를 이용하여 PLB를 유도 할 수 있다. PLB 유도 및 증식 배지로는 1/2 MS 배지, Hyponex 배

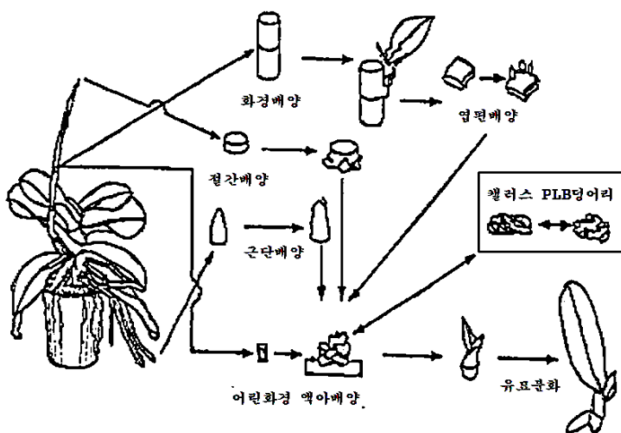


Fig. 1 Proliferation system and culture methods of *Phalaenopsis* (김 등 2001).

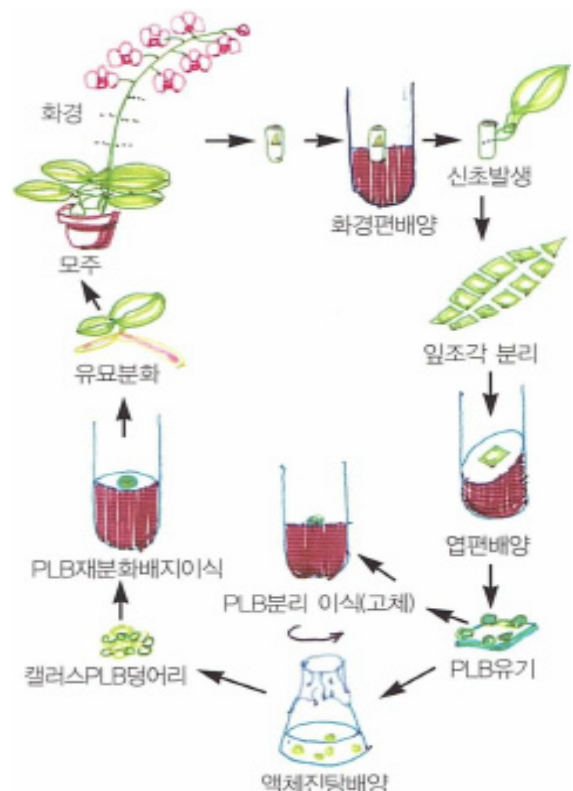


Fig. 2 The culture of leaf tissue of *Phalaenopsis* (김 등 2001).

지(Kano 1965), VW 배지(Vacin and Went 1949), NP 배지 등이 이용되고 있다.

본 연구진은 변형된 VW배지(VWAB, Table 2)를 이용하였다. PLB는 VW배지 하에서 증식(Fig. 3a)중 싹 또는 뿌리가 발생한 개체(Fig. 3b)를 따로 분리(Fig. 3c)하여 새로운 VW 배지에 계대 배양 하여 정상적인 생육을 유도하였다. 모든 기내 배양 시 환경은 25±2°C의 배양온도에 광주기는 16시간 명조건 처리 하였다. 재분화 된 식물체는 엽장이 3 cm이상 되고 뿌리 역시 충분히 자랐을 때 (Fig. 3d) 수태 혹은 바크를 이용하여 순화하였다. 이 때 기내와 외부 환경과의 습도 및 온도 차이를 고려하여 25±2°C의 배양대에서 유리비커를 이용하여 높은 습도를 유지 시키며 순화기간을 주어 외부환경에 적응할 수 있도록 하였다(Fig. 3e). 외부환경에 적응한 호접란은 정상적으로 생육하며, 변이는 발생하지 않았다(Fig. 3f).

최근에 수행된 팔레놉시스 조직배양 연구사례를 살펴보면 Niknejad et al.(2011)에서는 잎 조직에서부터 PLB를 유도하기 위하여 여러 종류의 호르몬을 처리한 결과, NDM 배지(New Dogashima Medium, Tokuhara and Mii 1993)에 1 mg/l NAA(α -naphthaleneacetic acid)와 0.1 mg/l 혹은 0.5 mg/l TDZ(Thidiazuron)를 첨가하여 4-6개월 배양하였을 때 100%의 확률로 callus 및 PLBs가 유도 되었다. 또한 1 mg/l NAA와 0.1 mg/l TDZ를 혼용한 처리구에서 가장 많은 수의 PLB 유도를 보였으며, 호르몬이 없는 NDM 배지로 계대배양 하였을 때 안정적으로 재분화 되었다. 또한 Khoddamzadeh et al.(2011)는 *P. bellina*의 안정적인 PLB 증식을 위해 실험한 결과 1.0 mg/l NAA와 3.0 mg/l TDZ의 조합에서 72%의 효율로 PLB가 유도되었으며, 1/2MS(Murashige and Skoog,

1962)배지와 액체 VW 배지에서 에서 가장 높은 PLB 생존 및 증식을 보고 하였다.

Sinha et al.(2010)에서는 TDZ를 별도로 처리하지 않고, BA와 Kinetinin을 이용하여 실험한 결과, 2.0 mg/l BA (Benzyl adenine)와 0.5 mg/l NAA를 혼용 처리하였을 때 *P. amabilis* cv. Lovely의 어린 잎 조직에서 75% 효율로 PLB가 유도 되었다. 유도한 PLB는 1/2 MS로 계대 하였을 때 100% 발근 하여 소식물체로 발달하였다. 이 외에도 팔레놉시스와 도리테놉시스의 PLB 증식 효율실험에서는 고체 NP(New Phalaenopsis, Inchihashi 1992) 혹은 KC(Knudson C, Knudson 1946) 배지에 sucrose 대신 trehalose를 첨가한 경우에 더 효과적이었다(Liu et al. 2006). Trehalose는 난의 종자 발아 시 균과의 공생을 통해 생성되어 난 종자 발아의 에너지원으로서 작용하는 것으로(Ernst et al. 1971; Smith 1973), sucrose와 같은 효과를 가진다(Muller et al. 1999).

이러한 잎 등의 절편체로부터 PLB를 유도하는 조직배양법 외에도 Gow et al.(2010)과 Chen and Chang(2006)은 잎 조직에서 embryo를 유도하였다. Gow et al.(2010)의 보고에서는 두 종의 팔레놉시스를 이용하여 실험한 결과 두 종 모두 잎 절편체를 이용하였을 때 가장 높은 효율 (50~80%)로 embryo가 유도 되었으며, 0.5 mg/l의 BA를 첨가한 경우 plantlet 발생 비율이 증가하였고, 절편체의 갈변율이 감소하였다. 상세하게는 1/2 MS배지에 0.1-3 mg/dm³ TDZ 첨가 후 20-30일 배양 시 callus 없이 바로 somatic embryo가 유도 되었으며, 호르몬이 첨가되지 않은 배지 하에서 성공적으로 기내 소식물체를 얻었다. 이렇게 획득한 소식물체들은 5-6개의 잎과 3-4개의 뿌리가 발생하였을 때 순화하였고, 6개월 후에도 모두 생존하였다(Chen and Chang

Table 2 A review of transformation studies in *Phalaenopsis*

species	Gene(s)	Explant	Method	Reference
<i>P. amabilis</i>	<i>hpt II</i>	pollen	At	Tsay et al. (2012)
<i>P. Blume</i>	<i>EgTCTP, mgfp5, hpt</i>	PLBs	PB	Kanchanapoom et al. (2012)
<i>P. amabilis</i>	<i>NPT I, bar, CymMV CP, ORSV CP</i>	Calli	PB	Fan (2011a)
<i>P. equestris</i> var. <i>Alba</i>	<i>NPT I, bar, ORSV CP</i>	Calli	PB	Fan (2011b)
<i>P. amabilis</i>	<i>npt II, LTP</i>	callus	At	Qin et al. (2011)
<i>p. violacea</i>	<i>hpt II, gusA, gfp</i>	PLBs	At	Sreeramanan and Xavier (2010)
<i>P. 'Taisuco Windian', P. 'Nancy Ammour', P. 'Pink Twilight', P. 'Taipei Gold', P. 'Maki Watanabe', P. 'Brother Lawrence'</i>	<i>hpt, npt II, GUS</i>	PLB	At	Na et al. (2010)
<i>P. amabilis Blume</i>	<i>npt II, GFP</i>	protocorm	At	Semiarti et al. (2010)
<i>Phalaenopsis</i>	<i>gus</i>	PLB	At	Hur et al. (2009)
<i>P. violacea</i>	<i>gusA</i>	PLB	At	Sreeramanan et al. (2008)

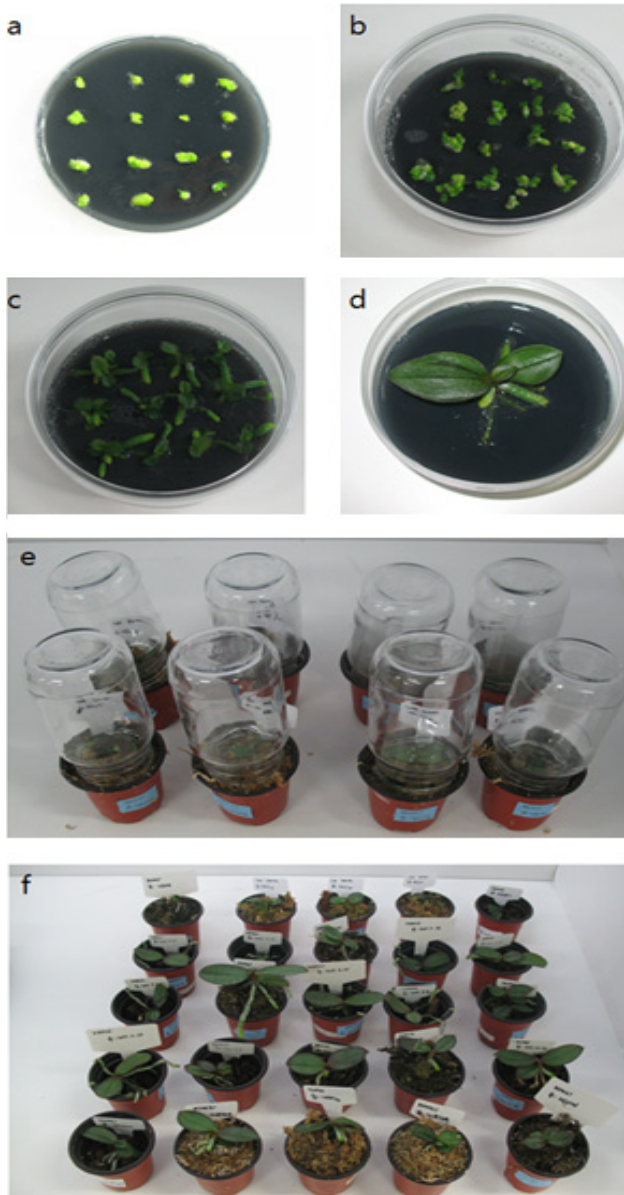


Fig. 3 Regeneration process from PLB tissues of *Phalaenopsis* plants. (a) Protocorm-like bodies (PLBs) of *Phalaenopsis* on VWAB medium, (b) PLB growth shoot and root formation, (c) PLB growth with shoot and root elongation (d) Regeneration of in vitro *Phalaenopsis* plants, (e) Acclimatization of *Phalaenopsis* (f) Growth of *Phalaenopsis* plants.

2006). 또한 팔레놉시스의 protocorm을 NDM배지에 BA 첨가 시 5-30%의 증식을 보이는 반면 0.1-0.3 mg/l의 TDZ를 첨가하여 실험을 수행한 결과 40일 배양 시 protocorm이 약 28% 증식 하였고, 80일 배양 하면 최대 58-66% 까지 증식함을 보고하였다(Mariam et al. 2010).

부정아 등을 유도해서 팔레놉시스 증식에 이용하기 위해서는 캘러스 유도작업이 필요한데 뿌리 절편체로부터 MS배지에 0.1 mg/l NAA, 0.3 mg/l BA, 10 g/l sucrose를 첨가 하였을 때 20%의 높은 callus 유도 확률을 보여 잎 절편체

보다 callus 유도에 적합하다 보고 하였다(Fan et al. 2010).

반면에 Choi and Koh(2009)와 Na et al.(2007) 및 Myint et al.(2006)은 PLB의 팔레놉시스 조직으로부터 직접 다신초 형성에 관하여 보고 하였다. PLB 혹은 callus 유도를 통해 생산한 조직배양 묘는 변이 발생율이 높아, 상업적 이용 가치가 저하 되므로 이에 대한 대안을 마련하고자 PLB, callus 과정을 거치지 않고 직접 다신초를 유도하여 식물체를 생산하고자 수행하였다.

Choi and Koh(2009)는 4 g/l Hyponex가 화경절편 조직 배양에 적절하며, 다신초 형성에는 0.3 mg/l TDZ 혹은 5 mg/l BA가 적합하다고 하였다. 또한 Hyponex 4g/l를 기본 배지로 하여 TDZ와 BA의 효과를 비교하였을 때, TDZ가 더 효과적이었으며, 화경의 모든 부위를 절단한 화경절편조직을 배양함으로써 배양재료의 이용을 확대 시켰다. Na et al.(2007)에서는 다신초 유기 및 증식에는 VW배지나 Hyponex배지 보다는 1/2MS배지가 적합하며 호르몬의 농도는 BA 5 mg/l와 TDZ 1 mg/l가 적절하다 보고 하였다. 또한 계대배양 횟수가 증가 할수록 신초수의 발생은 증가 하였으나 6회 이상에서는 기형 신초의 발생이 30%에 육박하고 고사율이 증가하므로 2개월에 한 번씩 계대배양 하는 것이 바람직하다 보고하였다. Myint et al.(2006)는 팔레놉시스의 유엽을 1/2MS 배지에 9.08 μM TDZ가 첨가된 배지에 치상하였을 때 다신초가 형성 되고, 동일한 배지에서 정상 생육 하였으며, 분화된 다신초들은 1/2MS배지에 5.37 μM, 1.46 μM kinetin, 2% coconut water가 첨가된 배지에서 가장 높은 발근 을 보고 하였다.

위에서 언급한 논문뿐 아니라 이전의 논문에서도 PLB, callus, embryo 유도에 공통적으로 TDZ가 사용되었으며, BA나 kinetin의 다른 cytokinin과 비교하였을 때도 더 높은 유도 효율을 보였다(Chang and Chang 1998; Myint 2004). 따라서, TDZ는 다른 cytokinin에 비해 난의 기관 유도에 더 효과적이라 할 수 있으며(Ernst 1971; Bhadra and Hossain 2004), Huettman and Precece(1993)는 TDZ는 다른 BA나 Kinetin 보다 더 적은 농도로 PLB를 유도 할 수 있다고 하였다.

팔레놉시스 형질전환

팔레놉시스의 형질전환은 Anzai et al.(1996)이 particle bombardment를 이용하여 형질전환 호접란을 생산한 이래로 여러 편의 논문이 보고되었다. 최근 5년간 발행된 팔레놉시스 논문을 정리하면 Table 2와 같다.

Tsay et al.(2012)는 팔레놉시스와 도리테놉시스의 pollen에 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하여 *hpt II* 유전자 도입 후, 5 mg/l hygromycin에서 2개월간 선발 후 PCR과 Southern blot분석을 통해 형질전환 식물체를 확인하였으며, *Agrobacterium*의 농도는 $0.5-1 \times 10^8$ CFU/ml, acetosyringone의 농도는 0.1 mM일 때, 공동배양 기간은 6시간 처리

하였을 때 가장 높은 형질전환 효율을 보였다. 그러나, Kanchanapoom et al.(2012)은 Tsay et al.(2012)이 5 mg/l의 낮은 농도의 hygromycin에서 선발한데 반해 20 mg/l hygromycin의 높은 농도에서 선발을 하였다. 목표 유전자인 EgTCTP gene이 포함된 vector를 금입자에 코팅하여 목적조직에 유전자총으로 형질전환 한 후, hygromycin 선발과정을 거친 그룹에서는 93.3%의 GFP 발현율을 보였고 이들의 95.7%의 재분화율을 보여 주었다.

Qin et al.(2011)에서는 calli가 1-2 mm 크기 일 때, OD₆₀₀ 0.4에서 20분간 접종 및 공동 배양 후 호르몬이 없는 배지로 계대 하였을 때, 12.2%의 가장 높은 형질전환 효율을 보였으며 형질전환 개체는 PCR 및 Southern blot으로 유전자를 검정 한 후 저온처리 하여 내한성 유전자인 LTP의 기능성 검정을 수행하였다. Sreeramana and Xavier (2010)의 연구에서는 pCambia1304를 *Agrobacterium* 균주 EHA101과 EHA105에 각각 도입하여 실험한 결과 EHA105에서 더 높은 효율을 보였으며, 공동배양 기간 중 L-cystein은 200 mg/l, 질산 은은 600 µM, 배양 온도는 24°C에서 암배양 하였을 경우 가장 높은 형질전환 효율을 보였다. Na et al.(2010)의 논문에서 역시 *Agrobacterium* 균주별 실험을 진행하였는데, EHA105(pGA643)보다 LBA4404(pTOK233)에서 높은 생존율을 보였으며, LBA4404(pTOK233)보다 AGL1(pCambia3301)에서 새로운 PLB 및 유식물체 형성율이 높다고 보고하였다. 형질전환 효율을 높이기 위한 최적 조건에 관한 실험에서는, *Agrobacterium* 균주와 VW 배지의 1:10 현탁액에 PLB를 1시간 감염시키고, 공동배양 5일을 처리하는 것이 PLB의 생존 수가 많았으나 조직이 연화되고 약해져 고사하므로 공동배양 3일이 PLB 형질전환에 적합하다 보고하였다.

형질전환 효율을 높이기 위해서는 상태가 양호한 PLB를 유도하는 것이 중요하기 때문에, Hur et al.(2009)은 활성탄소, sucrose 및 thiamine 등의 처리를 통해 재분화 효율을 높이고 PLB의 절단면을 다르게 처리하여 절단부위별 PLB의 증식효율을 비교 하였다. 그 결과 Hyponex배지에 활성탄소 1 g/l, thiamine 0.1 mg/l, sucrose 30 g/l 처리한 경우 PLB가 안정적으로 증식 되었으며, 위쪽으로부터 1/3 지점을 절단하여 계대배양 한 경우 90% 이상의 높은 PLB 증식률을 보였다. 이러한 PLB 증식율을 나타내는 증식체계를 이용하여 gus 유전자를 함유하고 있는 pCambia 1032 벡터를 *Agrobacterium* 균주 EHA105에 도입하여 이용하여 형질전환 효율을 높이고자 하였다. 그 결과, 접종 시 *Agrobacterium* 배양액을 농축한 후 날카로운 금속침에 묻혀 PLB를 찢러 감염시키는 dipping 처리 후, *Agrobacterium* 배양액의 흡광도 값이 0.8일 때, 20분간 *Agrobacterium* 배양액에 넣어 접종 시키는 것이 가장 효과적이라 보고하였다.

앞서 정리한 논문에서 대부분 형질전환 개체의 선발약제로, hygromycin, PPT 혹은 MSO를 사용하였다. 흔히 이

용되는 kanamycin을 이용하지 않는 것은 난에는 aminoglycoside계의 선발약제에 대한 내성을 자체적으로 가지고 있어, kanamycin을 이용하여 선발 하는 경우 다른 선발약제에 비해 고농도와 장기간의 선발기간을 요구하기 때문이다. 따

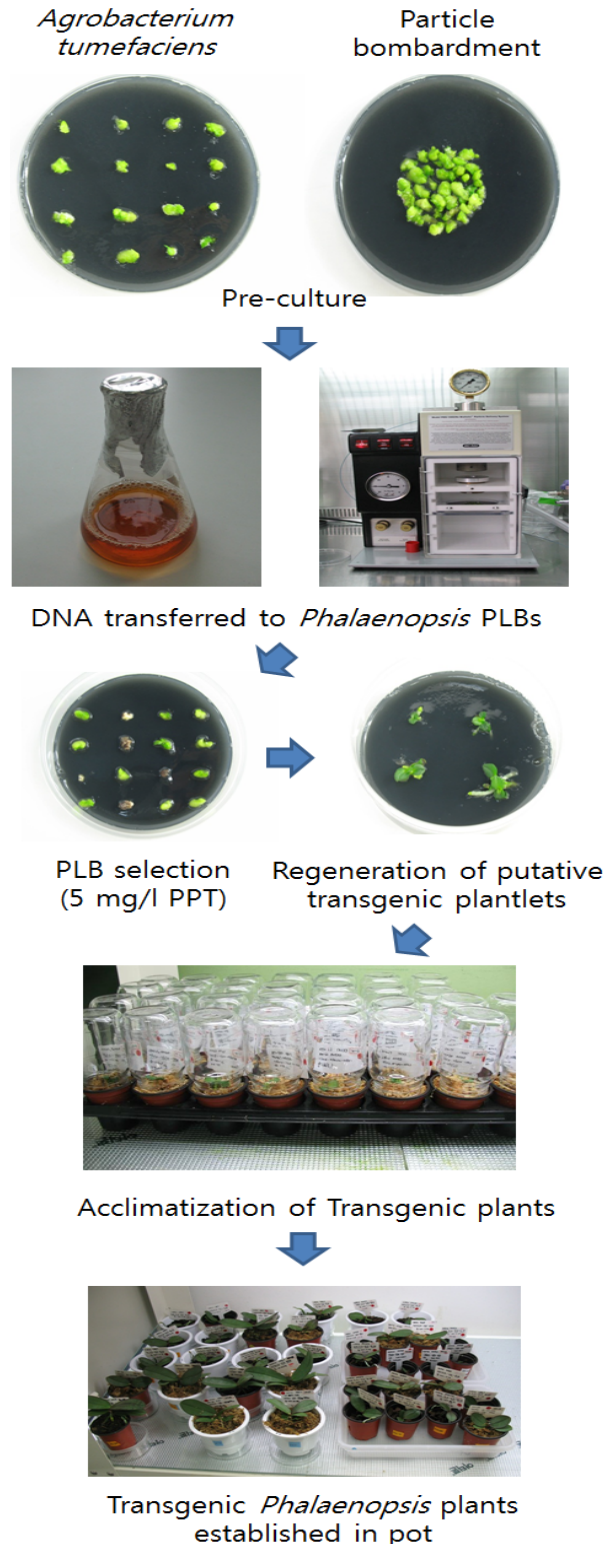


Fig. 4 Production of transgenic plants from PLBs of *Phalaenopsis*.

라서, 팔레놉시스와 같은 난을 이용한 형질전환 시 선발약제로는 kanamycin보다는 hygromycin이나 PPT를 이용한 선발이 더 효율적이다.

그 외에도 형질전환 기술을 이용하여 바이러스 저항성 팔레놉시스 식물체를 개발하는 연구보고(Fan 2011a)도 있었는데, 팔레놉시스에 심비디움 모자이크 바이러스(*Cymbidium Mosaic Virus*)와 ORSV(*Odontoglossum Ringspot Virus*)에 대한 저항성을 가진 형질전환 팔레놉시스 식물체를 생산 하고자 particle bombardment를 이용하여 형질전환 하였다. ORSV와 CymMV는 난에서 자주 발생하며 큰 피해를 입히는 virus로, Fan(2011a)은 CymMV와 ORSV CP gene 도입을 통해 virus에 내성을 갖는 팔레놉시스 식물체를 생산하고자 진행하였다. 먼저 최적의 형질전환 조건을 알기 위해 고체 혹은 액

체 배지에서 선발을 진행하였고, 고체배지에서는 0.5 μM MSO(L-methionin sulfoximine)에서 1개월 배양 후 2 μM MSO 배지로 계대하여 4개월간 배양 시 18.6%의 효율을 보였으며, 액체 배양 시 각각 절반의 농도인 0.2 μM MSO에서 1개월 배양 후 1 μM MSO가 첨가된 배지로 계대 하여 4개월 배양 시 12.7%의 선발 효율을 보였다. 선발한 팔레놉시스는 PCR, Southern blot, Northern blot 그리고 Western blot을 수행하여 CymMV-ORSV의 CP gene의 삽입과 발현 여부를 검정하였다. 마찬가지로 Fan(2011b)에서는 ORSV에 내성을 갖는 품종을 육종하고자 수행한 실험에서 위와 같은 조건으로 선발 시 고체에서 18.8%, 액체에서 12.9%의 효율을 보였으며, 성공적으로 ORSV 저항성 팔레놉시스를 생산하였다.

Table 3 The composition of the media used in the process of tissue culture and genetic transformation in *Phalaenopsis* plants

Media	Plant tissue culture Media component	Agrobacterium Media component	Particle bombardment Media component
Basal medium	VWAB VW1 1.625 g apple 30 g banana 30 g potato 30 g sucrose 10 g charcoal 1 g Agar 7.5 g pH 5.2	VWAB	VWAB
Agrobacterium culture		YEP Peptone 10 g Yeast extract 10 g pH 7.5	
Agrobacterium washing		Washing medium MS2 4.4 g Sucrose 30 g BA3 500 μl pH 5.8	
Agrobacterium infection		MS (Liquid) MS 4.4 g Sucrose 30 g pH 5.8	
Cocultivation		VWAB + Acetosyringone 100 Mol	
Resting medium		VWAB + cefotaxime 200 mg	VWAB
Selection medium		VWAB + cefotaxime 200 mg + PPT4 5 mg	VWAB + PPT 5 mg
Plant regeneration medium		VWAB + cefotaxime 200 mg	VWAB

¹VWAB: Vacin and Went medium supplemented with apple, banana, potato

²MS: Murashige and Skoog 1962

³BA: Benzyl adenine

⁴PPT: DL-Phosphinothricin

팔레놉시스에서의 주요 형질전환 방법

Agrobacterium 매개법과 particle bombardment를 이용한 형질전환은 팔레놉시스 뿐 아니라 식물 형질전환에 있어 가장 대표적인 방법이다.

본 연구진은 팔레놉시스의 PLB를 사용하여 particle bombardment 실험과 *Agrobacterium*을 이용한 실험을 수행하였으며, 형질전환 체의 선발제로서는 PPT를 이용하였고, 단계별 배지 조성은 Table 3과 같다. Particle bombardment를 이용한 형질전환에서 bombardment 전 PLB는 실험 2일 전에 VWAB 배지의 중앙에 직경 3~4 cm의 원모양으로 치상하여 둔다. 그 후 gold 코팅 된 유전자를 Biolistic Particle Delivery System(PDS-1000/He, Bio-rad, USA)을 이용하여 목표 식물체와 microcarrier간의 거리 6 cm, 사출 압력 1,350 psi, vaccum 압력 25 in Hg 하에서 1회 bombardment 후 4주간 PPT-free 배지에서 휴식기간을 주었다. 이후 PPT 5 mg/l가 첨가되어 있는 VWAB 선발 배지에서 12주간 선발 후, 생존 한 PLB만 항생제가 첨가되지 않은 VWAB 배지로 계대하여 재분화를 유도하였다. *Agrobacterium* 매개법 역시 접종 2일 전 미리 PLB를 준비 한 후, 액체 MS(Table 3)에 희석된 *Agrobacterium* 균에 20분간 침지하여 접종하였다. 접종한 PLB는 acetosyringone 100 µM이 첨가된 VWAB배지에서 3일간 암조건 에서 공동배양 후, 수세배지(Table 1)를 이용하여 수세하였다. 수세 후 PLB는 200 mg/l의 cefotaxime이 첨가된 PPT-free 배지에서 4주간 휴식 후, 5 mg/l PPT와 200 mg/l의 cefotaxime이 첨가된 선발 배지에서 12 주간 선발 되었다. 선발된 식물체는 cefotaxime 200 mg/l가 첨가된 VWAB 배지에서 재분화를 유도하였다. Particle bombardment와 *Agrobacterium*을 이용하여 형질전환 된 재분화 팔레놉시스는 초장이 3 cm 정도 되었을 때, 수태 혹은 바크를 이용하여 순화 하였다. 이와 같은 방법으로 생산한 팔레놉시스 형질전환 식물체는 현재 도입유전자의 발현 및 기능성 여부를 검정하고 있다.

결론

팔레놉시스는 한국뿐 아니라 전 세계적으로 인기 있는 분화식물체로서 소비자의 요구를 만족시키기 위해서는 다양하고 우수한 형질을 가진 팔레놉시스의 품종개발이 필요하다. 현재까지 대부분의 팔레놉시스 신품종 육종은 관행육종에 의해 이루어지고 있으며 한정적인 유전자원과 긴 육종연한은 신품종 개발에 한계를 가져올 수밖에 없기 때문에 형질전환 기술을 도입한 품종개발이 절실하다.

이러한 형질전환의 효율을 높이기 위해서는 체계화 된 절편체 증식 및 재분화 시스템 구축이 필요한 실정이다.

현재 널리 이용되고 있는 PLB의 경우 급속하게 대량증식을 할 수 있는 유리한 점이 있는 반면 품종에 따라 변이율이 급격히 상승하는 문제점을 가지고 있어 이에 대한 해결책 마련이 시급하다.

팔레놉시스의 형질전환의 경우, 최근 10여 년 동안 10여 편 정도의 연구가 이루어졌지만 대부분이 형질전환 효율성을 높이는 실험이고, 유용유전자 도입에 관한 연구는 미미한 실정이다. 따라서 좀 더 고효율의 형질전환 팔레놉시스 체계 확립뿐 아니라 유용 유전자가 도입된 형질전환체의 생산과 실용화에 대한 연구와 노력이 필요하다고 판단된다.

사사

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업 / 농업현장실용화 기술개발(project no. PJ0069502012)의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

- 강법선(2001) 우아하고 화려한 신비의 화초 난, 대원사
 김원진 외 (25인 공저 (2001) 화훼육종기술. 농촌진흥청 원예연구소. p455
 김주학(2010) 호접란 묘 생산 system과 국내 배양실의 문제점. 제10회 난 심포지움. 학술발표초록집 p 11-19
 농림수산식품부(2011) 화훼재배현황통계
 윤경은, 정소영(2011) 세계의 난. 김영사
 한지학 외 76인 공저(2007) 식물형질전환. 정문각
 Anzai HY, Ishii MS, Katsumata K, Nojiri C, Morikawa H, Tanaka M (1996) Transformation of *Phalaenopsis* by particle bombardment. *Plant Tiss Cult Lett* 13:265-272
 Been CG (2003) Production of *Phalaenopsis* clones by shoot propagation. *Flower Res J* 11(2):171-176
 Bhadra SK, Hossain MM (2004) Induction of embryogenesis and direct organogenesis in *Micropera pallida* Lindl., an epiphytic orchid of Bangladesh. *J Orchid Soc India* 18:5-9
 Chang C and Chang WC (1998) Plnat regeneration from callus culture of *Cymbidium ensifolium* var. misericos. *Plnat Cell Rep* 17:251-255
 Chen JT and Chang WC (2006) Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. *Biologia Plant* 50(2):169-173
 Choi JY, Koh JC (2009) Multiple shoot formation from flower stalk tissue cultures of *Phalaenopsis* hybrid. *Flower Res J* 17(3):165-171
 Ernst R, Arditti J & Healey PL (1971) Carbohydrate physiology of orchid seedlings. II. Hydrolysis and effects of oligosaccharides. *Am J Bot* 58:827-835
 Fan S (2011a) Development of transgenic *Phalaenopsis* resistant

- to two viral infections. 4th International Conference on Biomedical Engineering and Informatics
- Fan S (2011b) Genetic engineering of ORSV-resistant *Phalaenopsis*. 4th International Conference on Biomedical Engineering and Informatics
- Fan S, Qibin Z, Lu Q, Guoshu L, Haiyan Y (2010) Preliminary studies on influential factors on callus induction of *Phalaenopsis*. International Conference on Biomedical Engineering and Informatics 3060-3064
- Gow WP, Chen JT, Chang WC (2010) Enhancement of direct somatic embryogenesis and plantlet growth from leaf explants of *Phalaenopsis* by adjusting culture period and explant length. Acta Physiol Plant 32:621-627
- Homma Y and Asahira T (1985) New means of *Phalaenopsis* propagation with internodal sections of flower stalk. J of the Jpn Soc for Hort Sci 54:379-387
- Huetteman CA, Precece JE (1993) Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell Tiss Org Cult 33:105-119
- Hur YJ, Kim EY, Yang WT, Lee YB, Lee JH, Jung YS, Nam JS, Yun DJ, Yi KH, Kim DH (2009) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phalaenopsis* by using protocorm-like body. J of Life Sci 19(3):378-383
- Inchihashi S (1992) Micropropagation of *Phalaenopsis* through the culture of lateral buds from young flower stalks. Lindleyana 7:208-215
- Intuwong O and Y Sagawa (1974) Clonal propagation of *Phalaenopsis* by shoot tip culture. Ameri Orchid Soc Bull 43:893-895
- Kanchanapoom K, Nakkaew A, Kanchanapoom K, Phongdara A, (2012) Efficient biolistic transformation and regeneration capacity of an EgTCTP transgene in protocorm-like bodies of *Phalaenopsis* orchid. Notulae Botan Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 40(1):58-64
- Kano K (1965) Studies on the media for orchid seed germination. Memoirs of Faculty of Agriculture Kagawa University 20:1-68
- Khoddamzadeh AA, Sinniah UR, Kadir MA, Kadzimin SB, Mahmood M, Sreeramanan S (2011) In vitro induction and proliferation of protocorm-like bodies (PLBs) from leaf segments of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) Christenson. Plant Growth Reg 65:381-387
- Knudson L (1946) A new nutrient solution for the germination of orchid seed. Ameri Orchid Soc Bull 15:214-217
- Kobayashi M, Komatuda M, Yonar S (1991) Studies on the vegetative propagation of *Phalaenopsis* through root tip culture Abstr. J of Jpn Soc for Hort Sci 59:664-665
- Lin CC (1986) In vitro culture of flower stalk internodes of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis*. Lindleyana 1:158-163
- Liu THA, Lin JJ, Wu RY (2006) The effects of using trehalose as a carbon source on the proliferation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* protocorm-like-bodies. Plant Cell Tiss and Org Cult 86:125-129
- Mariam AL, Rosmah M, Zaleha AA, Lai HT, Lilly MG, Rimi R (2010) Effects of N6-Benzyladenine and thidiazuron on proliferation of *Phalaenopsis gigantea* protocorms. Asia Pac J Mol Biol Biotech 18(1):217-220
- Morel GM (1960) Producing virus-free cymbidium, Ameri Orchid Soc Bull 29:495-497
- Morel GM (1964) Tissue culture-a new means of clonal propagation of orchids. American Orchid Soc Bull 32:105-107
- Muller J, Wiemken A, Aeschbacher R (1999) Trehalose metabolism in sugar sensing and plant development. Plant Sci 147:37-47
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15:473-497
- Myint KT, Kim CK, Chung MY, Park JS, Chung JD (2006) Direct induction of multiple shoots from stem tissue of *Phalaenopsis* hybrids. Flower Res J 14(2):69-74
- Myint KT (2004) A newly established regeneration system through direct organogenesis and embryogenesis on *Phalaenopsis*. Ph.D. Thesis. Kyungpook National Univ Daegu Korea.
- Na AS, Been CG, Jeong BR (2007) Selection of optimum culture and subculturing conditions for multiple shoot induction and proliferation of *Phalaenopsis*. Flower Res J 15(3):139-144
- Na AS, Been CG, Jeong BR (2010) Approaches on optimum conditions for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phalaenopsis*. Flower Res J 18(1):1-8
- Niknejad A, Kadir MA, Kadzimin SB (2011) In vitro plant regeneration from protocorms-like bodies (PLBs) and callus of *Phalaenopsis gigantea* (Epidendroideae: Orchidaceae) Afri J of Biotech 10(56):11808-11816
- Qin X, Liu Y, Mao S, Li T, Wu H, Chu C, Wang Y (2011) Genetic transformation of lipid transfer protein encoding gene in *Phalaenopsis amabilis* to enhance cold resistance. Euphytica 177:33-43
- Park YS, Lim SH, Lee SD, Park IT (2009) A new *Phalaenopsis* cultivar 'Jaha' with large purple petal. Flower Res J 17(3): 205-207
- Roter G (1949) A method of vegetative propagation of *Phalaenopsis* species and hybrid. Ameri Orchid Soc Bull 18:738-793
- Semiarti E, Indrianto A, Purwantoro A, Martiw INA, Feroniasanti YML, Nadifah F, Mercuriana IS, Dwitani R, Merciana HM, Iwakawa H, Yoshiok Y, Machida Y, Machida C (2010) High-frequency genetic transformation of *Phalaenopsis amabilis* orchid using tomato extract-enriched medium for the pre-culture of protocorms. J of Hort Sci and Biotech 85(3): 205-210
- Sinha P, Jahan MAA, Munshi JL, Khatun R (2010) High Frequency Regeneration of *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. cv. Lovely through In vitro Culture. Plant Tiss Cult and Biotech 20(2):185-193
- Smith SE (1973) Asymbiotic germination of orchid seeds on carbohydrates of fungal origin. New Phytol 72:497-499
- Sreeramanan S and Zuraida AR (2010) Early GFP gene assessments influencing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system in *Phalaenopsis violacea* orchid. Emirates J of Food and Agri 22(2):103-116
- Sreeramanan S, Vinod B, Sashi S, Xavier R (2008) Optimization of the transient gus gene transfer of *Phalaenopsis violacea* orchid via *Agrobacterium tumefaciens*: an assessment of factors

- influencing the efficiency of gene transfer mechanisms. *Advances in Natural and Appl Sci* 2(2):77-88
- Sreeramanan S, Xavier R (2010) Emerging factors that influence efficiency of T-DNA gene transfer into *Phalaenopsis violacea* orchid via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system. *Inter J of Bio* 2(2):64-72
- Tanaka M and Y Sakanishi (1978) Factors affecting the growth of in vitro cultured lateral buds from *Phalaenopsis* flower stalks. *Scient Horti* 8:169-173
- Tokuhara K, Mii M (1993) Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Rep* 13:7-11
- Tsay HS, Hol HM, Gupta SK, Wang CS, Chen PT, Chen ECF (2012) Development of pollen mediated activation tagging system for *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis*. *Elec J of Biotech* 0717-3458
- Tse AT, Smith RJ, Hackett WP (1971) Adventitious shoot formation on *Phalaenopsis* nodes. *Ameri Orchid Soc Bull* 40:807-810
- Vacin EF, Went FW (1949) Some pH changes in nutrient solutions. *Bot Gaz* 110:605-613
- Wimber DE (1963) Clonal multiplication of *Cymbidium* through tissue culture of the shoot meristem. *Ameri Orchid Soc Bull* 32:105-107