

유전자총 실험조건 최적화를 통한 형질전환 백합 식물체 생산

김종보

Optimization of a protocol for the production of transgenic lily plants via particle bombardment

Jong Bo Kim

Received: 20 March 2017 / Revised: 20 March 2017 / Accepted: 20 March 2017

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Transgenic lily plants have been obtained after particle bombardment, using PDS-1000/He system and scale explants of lilies, followed by PPT (D-L-phosphinothricin) selection. In this study, scales of the lily plants cv. ‘red flame’ were bombarded with a plasmid containing the *bar* gene as a selectable marker, and the *AtSIZ* gene as a gene of interest, showing salt tolerance and drought tolerance respectively, and both being driven by the CaMV 35S promoter. For optimization of a protocol, factors which optimized and showed a high transformation efficiency under following conditions, were considered: a bombardment pressure of 1100 psi, a target distance of 6 cm and 1.0 μm of gold particle, and 24-h pre-culture and post-culture on MS medium containing 0.2 M sorbitol and 0.2 M mannitol as osmoticum agents. After bombardment, all the bombarded scales of lily were transferred to MS medium without selective agents, for a week. Subsequently, these bombarded scales were transferred to a selection MS medium containing 10 mg/l PPT, and incubated for a month for further selection, after which they were cultured for another 4–8 weeks with a 4-week subculture regime on the same selection medium. After transferring into hormone-free MS medium, the PPT-resistant scales with shoots were successfully rooted and regenerated into plantlets. PCR analysis revealed that the surviving putatively transformed plantlets indicated the presence of both the *bar* gene and the *AtSIZ* gene. In conclusion, when 100 scales of lily

cv. Red flame are bombarded, this study produced approximately 17–18 transgenic plantlets with an optimized bombardment protocol. The protocol described here can contribute to the breeding program of lilies.

Keywords Lily, Monocot, Particle bombardment, Selection, Transformation

서 언

나리는 한국, 중국 및 일본 등 동북아 온대지방에 주로 분포하며(Woodcock and Stearn 1950), 유럽과 남미에도 일부 자생하는 화훼작물이다(Park 1997). 해외뿐만 아니라 국내에서도 절화로 인기가 많은 구근류의 하나이며, 국내에서 2015년 기준 2,900만본이 161 ha에서 생산되어 판매량은 171.5억 원으로 이러한 재배규모, 생산량 및 판매금액에서 국내 3위를 차지하고 있다(Ministry of Food, Agriculture, Forestry and Fisheries 2015).

최근 들어 화훼산업에 있어서 다양해지고 있는 소비자의 기호도를 만족시키고 기후변화에 따른 작물생육저하 및 경지면적 감소 등의 문제를 해결하기 위해서는 육종 프로그램을 통한 우량 나리품종 개발이 시급하다. 현재까지 육성된 백합 품종들은 도입, 교배와 선발 그리고 방사선돌연변이원 이용 기술을 이용해서 우수 나리 품종육종이 이루어져 왔지만, 최근에는 생명공학 기술, 특히 그 중 형질전환 기술을 이용한 다양한 화색 및 식물형태, 바이러스 및 환경저항성 등의 형질개선 등이 주요 육종목표로 등장하였다(Bakhshae et al. 2016). 나리에 있어서 식물형질전환 기술을 이용한 연구에서 Langeveld et al. (1995)에 의해 처음으로 보고된 이후 주로 아그로박테리움을 이용하여 많은 연구가

J. B. Kim (✉)
건국대학교 글로벌캠퍼스 의료생명대학 생명공학과
(Department of Biotechnology, College of Biomedical & Health Sciences, Glocal Campus, Konkuk university, Choong-Ju, 27478, Korea)
e-mail: jbhee1011@kku.ac.kr

수행되어왔다(Mercuri et al. 2003; Nam and Kim 2004; Hoshi et al. 2004; Ogaki et al. 2008; Azadi et al. 2010; Liu et al. 2011; Wang et al. 2012). 한편 유전자총을 이용한 형질전환 나리식물체 개발에 관한 연구에서는 1998년 최초로 Watad et al. (1998)에 의해 보고된 이후로 Irifune et al. (2003)와 Kamo and Han (2008) 등이 연구를 수행하였다. 일부 형질전환이 어려운 단자엽 화훼류에 속하는 알스트로메리아(Hoshino et al. 2008; Kim et al. 2007; Lin et al. 2000), 히야신스(Popowich et al. 2007), 심비디움(Roh et al. 2011 and 2013), 팔레놉시스(Roh et al. 2014)나 툴립(Wilmink et al. 1992) 등과 비교하면 형질전환연구가 비교적 많이 수행되었음을 알 수 있다. 나리 형질전환 연구에 많이 사용된 아그로박테리움 방법은 비교적 안정성과 재현성이 높고, 형질전환 시 유전자 copy수가 낮게 들어가는 장점이 있지만(Hiei et al. 1997), 숙주식물에 제한이 있고 박테리아 배양 및 공동배양에 시일이 오래 걸리는 단점도 있다(Hiei et al. 1994).

반면 유전자총은 Sanford et al. (1993)에 의해 개발된 이후로 여러 작물의 형질전환연구에 사용되는 과정에서 숙주에 제한이 없고, 형질전환 방법이 간편하고 실험수행기간도 짧으며, 여러 종류의 세포에 적용할 수 있는 장점들을 보여주었다. 나리 식물체에서 형질전환 식물체가 고효율로 생산되기 위해서는 여러 요인들이 관여하는데, 조직배양 조건과 배지성분 등이 형질전환 효율과 형질전환 식물체 분화에 중요하다(Watad et al. 1998). 유전자총 실험 조건 역시 형질전환 효율과 관련이 있는데, 입자의 종류, 크기와 양 그리고 입자속도와 입자에 코팅되는 외래 DNA 양 및 발사횟수 등이 주요 요인이다(Morrish et al. 1993). 또한 유전자총 발사 전후에 삼투압조절제 등의 전처리 여부도 형질전환 효율에 영향을 미치는데(Watad et al. 1998), 옥수수(Vain et al. 1993), 온시디움(Li et al. 2005), peanut (Deng et al. 2001) 및 팔레놉시스(Roh et al. 2014) 등의 연구에서 보고 되었다. 상기 연구사례에서 보듯이 아그로박테리움을 이용한 경우보다 유전자총을 이용한 연구가 미비한 실정이며 이는 유전자총 실험 수행 시 필수적인 유전자총 발사조건과 선발 등의 조건이 확립되지 않은 영향도 크다고 볼 수 있다.

따라서 본 연구에서는 유전자총 실험에 중요한 성공요소들인 발사체와의 거리, 압력 및 최적의 금입자 크기를 찾고 또한 유전자 총을 이용한 형질전환 실험 시 삼투압 유지에 도움을 주고 일부 작물에서 도입 유전자 발현을 좋아지게 하는 삼투압 조절제의 처리효과를 구명하여 내건성 및 내

염성을 유용형질을 나타내는 AtSIZ(복합환경저항성유전자) 유전자를 나리 식물체에 효율적으로 전달할 수 있는 최적의 유전자총 형질전환 체계를 확립하고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에 재료로 사용된 나리 식물체는 국립원예특작과학원 화훼과에서 육성한 ‘레드플레임’ 품종의 기내식물체로부터 인편절편체를 분리하여 MS basal salts with vitamins 4.41 g/l, plant agar 7.0 g/l (Duchefa, Haarlem, The Netherlands), sucrose 30 g/l이 첨가되고 pH는 5.8로 조정된 인편증식용 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에서 4주 간격으로 계대배양으로 증식한 인편조직들을 형질전환 재료로 사용하였다. 모든 기내 배양은 251°C, 16시간 광주기에 광도는 약 2,000 lux 조건 하에서 수행하였다.

PPT 적정농도 실험

본 실험에 사용된 벡터 내에 선발유전자로 *bar* 유전자가 포함되어 있는데, 형질전환 개체를 효율적으로 선발하기 위해 선발배지 내에 선발목적으로 첨가되는 제초제 PPT (phosphinothricin)의 최적 농도를 결정하기 위해 PPT를 선발배지에 0, 5, 10, 15 및 20 mg/l로 농도를 달리하여 첨가한 후, 실험을 수행하였다. 농도에 따른 고사율 데이터는 4주 후 수집하였다.

벡터 및 유전자총 형질전환 조건확립

유전자총 실험에 사용된 vector는 선발유전자로 *bar* 유전자와 목적 유용유전자인 AtSIZ(복합환경저항성유전자; 내건성 및 내염성) 유전자가 포함된 pCAMBIA3301 vector를 제노마인주 첨단생명공학연구소(경북 포항 소재)로부터 분양받아 사용하였다(Fig. 1 참고). 유전자의 금입자 코팅과정은 Roh et al. (2011)의 방법에 따라 수행하였으며, 유전자총 실험은 PDS-1000/He (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 장치를 이용하여 나리 인편조직에 bombarding 하였다. 실험 조건 확립



Fig. 1 Structure of the T-DNA region of pCAMBIA3301:AtSIZ vector provided by Genomine INC (Pohang, Korea) (NPTII (neomycin phosphotransferase); NOS: nopaline synthase promoter; TNOS: 3' signal of nopaline synthase; 35S: Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S promoter

을 위하여 금 입자 크기(0.6, 1.0 및 1.6 μm), 헬륨가스 압력(900, 1100 및 1350 psi) 그리고 목적 절편체까지의 거리(3, 6 및 9 cm)로 조건을 달리하여 실험을 수행하였으며, 유전자 총 챔버 내의 진공 시 압력은 28 in Hg로 통일하였다. Bombardment 실험 후, 인편절편체를 PPT가 첨가되지 않은 MS배지로 옮겨 1주일간 배양 후, 다시 PPT 10 mg/l이 첨가된 선발배지로 옮겨 4주 간격으로 계대배양을 실시하여 총 8주간 선발과정을 수행하였다.

삼투압 처리 및 유전자총 발사횟수에 따른 형질전환 효율 증진 실험

상기 실험을 거쳐 확립된 유전자총 발사조건(금입자 1.0 μm , 1,100 psi 그리고 6 cm 사출거리)을 기본조건으로 형질전환 실험을 수행 시, 삼투압조절제 처리를 통해 유전자 발현을 증가에 효과가 있는지 구명하고자 무처리구, 0.2 M mannitol, 0.2 M sorbitol, 0.2 M mannitol + 0.2 M sorbitol 이렇게 4개 처리구로 비교 실험을 진행하였다. 이 삼투압처리제들을 실험 수행하기 24시간 전에 인편증식용 고체 MS배지에 첨가하여 24시간 동안 배양 후, 유전자총 실험을 수행한 후에도 동일한 배지에 24시간 정도 배양한 후, 삼투압 조절제가 들어있지 않은 일반 MS배지로 이식하였다. 그리고 나서 위와 동일하게 1주일 후, PPT 10 mg/l이 첨가된 선발배지로 옮겨 4주 후 선발배지에서 생존한 인편조직을 조사하였다. 또한 선발 8주 후에 PPT 10 mg/l이 첨가된 선발배지에서 신초가 형성된 인편 절편체 비율을 조사하여 형질전환 효율을 간접적으로 조사하였다.

형질전환체 선발 및 분석과정(PCR)

PPT 10 mg/l에서 8주간 생존한 형질전환 인편 조직에서 분화된 신초들로부터 DNA를 추출하여 다음과 같은 PCR 분석을 통해 선발유전자인 *bar* 유전자의 도입을 확인 후, 유용유전자인 *AtSIZ* 유전자의 도입 역시 확인하였다. PCR분석을 위해 형질전환 인편에서 분화된 엽조직 0.1 g을 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'-TCAAATCTCGTCTCGGGACGCA-3', 그리고 reverse primer로서 5'-ATGAGCCAGAACGCCC-3'를 사용하였다. *AtSIZ* 유전자(1,794 bp)의 PCR 분석을 위해서는 forward primer로서 5'-ATGTGCGGTGCAAAGAGCAACC-3', 그리고 reverse primer로서 5'-TTATGCCACATTCTGCTCAT-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 0.8%

agarose gel에서 100 V에서 30분간 전기영동을 실시하여 목표유전자의 도입여부를 확인하였다.

형질전환체 재분화, 순화 및 개화

PPT 10 mg/l에서 4주 간격으로 계대배양 후, 8~12주 이상 선발과정을 거쳐 신초가 다수 형성된 형질전환 나리 인편들을 PPT가 첨가되지 않는 증식 MS 고체배지로 옮겨 발근 및 추가 생육을 유도 하였다. 생육이 우수하고 발근이 우수한 개체들을 기외 상태에서 1~2주간 순화과정을 거쳐 혼합상토가 들어있는 직경 10 cm 화분으로 이식하여 증식 및 활착 하였다.

통계처리

모든 처리구는 각 100개씩 백합 인편을 사용하였으며, 유전자총 최적 조건실험은 5반복 그리고 삼투압조절제 효과 검증실험은 4반복 수행하였다. 모든 통계처리는 SPSS (window version)으로 던컨다중검정(DMRT)에 의한 ANOVA 검정을 수행하였다.

결과 및 고찰

선발 적정 PPT농도

유전자총을 이용한 나리 형질전환 식물체 연구에서 제초제 저항성 유전자를 선발유전자로 사용하는 경우, 선발배지에 첨가할 제초제 성분의 적정농도 결정이 중요하다. 일반적으로 제초제저항성 유전자인 *bar* 유전자가 제대로 삽입되었을 경우, PPT를 첨가한 배지에서 형질전환 개체는 생존하게 되는데 식물 종마다 감수성이나 저항성이 달라 형질전환 실험 전에 최적의 선발농도를 정하지 않으면 선발에 어려움을 겪게 된다. 본 실험에서 PPT 0, 5, 10, 15 및 20 mg/l 농도로 첨가된 MS고체배지에서 인편을 대상으로 4주간 배양한 결과, Figure 2는 무처리구에서는 100% 생존하였으나, 5 mg/l에서 이미 93% 인편이 고사하였고, 10 mg/l 이상 농도에서는 100% 고사하였음을 나타내고 있다. 이러한 PPT 선발농도는 유전자총을 이용한 알스트로메리아(Lin et al. 2000)나 심비디움(Roh et al. 2011)에서 사용된 PPT 5 mg/l보다 다소 높은 농도이긴 하나, 이러한 농도는 같은 단자엽 식물이더라도 종에 따른 PPT 감수성의 차이에서 기인한다고 본다. 심지어 같은 나리이지만 캘러스 조직의 경우는 PPT 0.5 mg/l의 저농도에서도 고사함을 나타내었다(Kamo and Han 2008). 선발농도가 너무 낮은 경우, Roh et al (2011)에서 지적한 것처럼 'escape' 발생 우려도 있고 또한 일부 난과 식물(Roh et al. 2011) 및 알스트로메리아(Kim et al. 2007; Lin et al. 2000)와 나리에서도 제초제성분이 아닌 항생제인

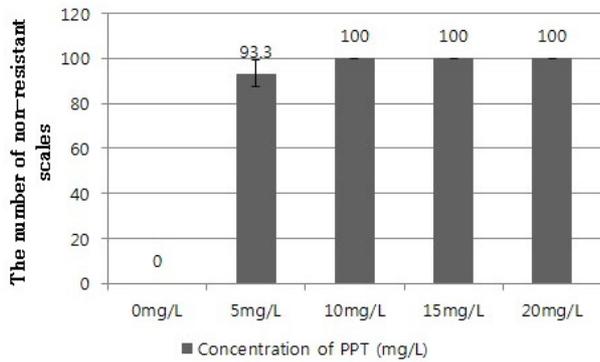


Fig. 2 Selection of the correct concentration of PPT (phosphinothricin), as a selective agent for selection of putatively

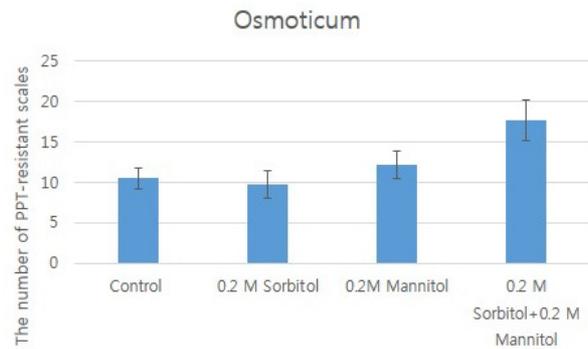


Fig. 3 Effect of osmoticum treatments on the number of survived scales with shoots of lily plants, after 8 weeks on selection medium containing PPT 10 mg/l of particle bombardment process. Vertical bars represents mean standard deviation (n=4). Data were calculated as the surviving scale explants per 100 bombarded scales of lily plants

kanamycin을 형질전환체 선발약제로 사용 시 비형질전환 세포나 조직도 상당한 카나마이신 저항성을 나타내므로 이러한 화웨이 형질전환에 있어서는 현재로서 제초제저항성 기반의 선발체계가 도입되어야 한다고 판단된다. 심지어 200 mg/l 이상의 고농도 kanamycin에도 비형질전환 나리 캘러스들이 고사하지 않았다고 보고되었다(Kamo and Han 2008).

입자크기, 압력 및 목표 조직까지의 거리에 따른 형질전환 효율 증진 실험

나리 형질전환 식물체를 개발하기 위하여 나리 인편 절편체에 유전자총 적용 시 적정조건을 구명하고자 금 입자 크기, 헬륨가스 농도 및 목표 절편체와의 거리 이 3가지 요인에 대해 실험을 수행하였다. 유전자총 실험에서 텅스텐 등 다른 금속 입자를 제외하고 금입자를 사용한 이유는 텅스텐 입자는 금 입자와 비교하여 효율도 낮고(데이터 미 제시), 식물과 연구자 모두에게 잠재적 위험성이 있는 것으로 판단되어 본 연구에서는 금 입자를 사용하였는데, Table 1에서 나타난 것처럼 금 입자 크기는 0.6 μm에서만 효율이 낮았고, 1.0과 1.6 μm에서는 0.6 μm과 비교해서 6주 후 PPT가 10 mg/l 첨가된 선발배지에서 2배 이상의 선발배지에서의 생존율을 보여 주었다. 12주 경과 후, 신초가 형성된 나리 인편의 개수에서도 약 6.5% 내외의 효율을 보여 주었다. 따라서 본 연구에서도 1.0 μm 크기의 금 입자를 사용하기로 했는데, 이러한 결과는 심비디움(Roh et al. 2011)과 알스트로메리아(Lin et al. 2000) 연구결과와 동일함을 나타내었다. 반면

Table 1 Effect of size of gold particle during the particle bombardment on transformation efficiency in scales of *Lilium longiflorum* “red flame”

Size of gold particle (μm)	# of PPT resistant scales /100 bombarded scales*	# of putative transgenic scales with shoots /100 bombarded scales**
0.6	9.0 ± 1.4***c	3.3 ± 0.2
1.0	21.5 ± 4.2a	6.5 ± 2.1
1.6	14.0 ± 2.2b	6.4 ± 2.5

*Data were collected 4 weeks after bombardment, **Data were collected 8 weeks after bombardment

***Values are means Means followed by the same letters in each column are not significantly different (p<0.05) using DMRT (Duncan’s Multi Range Test).

Table 2 Effect of pressure during the particle bombardment on transformation efficiency in scales of *Lilium longiflorum* “red flame”

Pressure (psi)	# of PPT resistant scales /100 bombarded scales*	# of putative transgenic scales with shoots /100 bombarded scales**
900	8.2 ± 2.6***b	5.9 ± 2.2
1,100	19.6 ± 4.5a	11.0 ± 2.6
1,350	21.6 ± 3.2a	10.5 ± 3.3

*Data were collected 4 weeks after bombardment, **Data were collected 8 weeks after bombardment

***Values are means. Means followed by the same letters in each column are not significantly different (p<0.05) using DMRT (Duncan’s Multi Range Test).

Table 3 Effect of distances between target scale tissues and holder of particle bombardment device on transformation efficiency in scales of *Lilium longiflorum* “red flame”

Distances (cm)	# of PPT resistant scales /100 bombarded scales*	# of putative transgenic scales with shoots /100 bombarded scales**
3	19.5 ± 8.0***a	8.8 ± 2.1
6	19.3 ± 6.2a	10.6 ± 3.5
9	8.3 ± 3.1b	9.1 ± 4.2

*Data were collected 4 weeks after bombardment, **Data were collected 8 weeks after bombardment

***Values are means Means followed by the same letters in each column are not significantly different ($p < 0.05$) using DMRT (Duncan's Multi Range Test).

최초로 유전자총을 적용한 나리 연구보고에서는 0.75 μm 크기의 텅스텐 입자를 사용하였으며, Kamo and Han (2008)은 동일한 크기의 금 입자를 사용하였다. 심비디움의 다른 연구에서는 0.6 μm 크기의 금 입자에서 87%의 *gus* 유전자 발현율을 보여주는 결과도 보고 되었다(Yang et al. 1999). 또한 헬륨가스 압력은 Table 2에서 나타나듯이 900 psi에서 PPT 선발배지에서 생존율이 8.2%로 낮았으나, 1,100 및 1,350 psi는 20% 정도의 생존율을 보여주었고 신초형성율도 10-11%로 900 psi의 5.9%와 비교해서 1.5배 이상 높은 효율을 보여주었다. 1,100 및 1,350 psi 두 처리구 사이의 유의성 있는 차이는 없었지만, 1,350 psi의 경우, 더욱 강한 압력으로 인하여 bombarding 후, 선발 및 형질전환 식물체 분화과정에서 물리적인 피해가 예상되므로 1,100 psi를 최적 압력으로 선정하였다. 본 실험에서 최적 압력으로 선정된 1,100 psi는 최초의 유전자총을 이용한 백합연구보고(Watad et al. 1998)뿐만 아니라 심비디움(Roh et al. 2011)과도 같은 압력 수준임을 보여 주었다.

목표 절편체까지의 거리에 대한 최적화 실험은 Table 3에서 나타난 것처럼 3 cm와 6 cm에서 100개 인편 중 6주 후에 20여개 정도가 PPT 저항성을 나타내었고, 9 cm에서는 절반 이하의 생존율을 나타내었다. 본 연구에서는 3 cm는 생존율이나 12주 후 신초발생율도 6 cm와 차이도 없거나 오히려 낮으므로 본 연구에서는 6 cm가 최적 거리라는 결과가 나왔는데 이 역시 심비디움의 6 cm (Roh et al. 2011)와 같거나 알 스트로메리아의 5.5 cm (Lin et al. 2000)처럼 거의 차이가 나지 않는 결과라고 할 수 있다.

삼투압조절제 처리 효과 구명

상기 형질전환 조건(금 입자 크기 1.0 μm , 압력 1,100 psi 및 목표조직까지 거리 6 cm)으로 삼투압조절제 효과 구명실험을 수행하였는데, 유전자총 발사 후, 4주 후에 생존한 인편의 수는 삼투압조절제 처리와 대조구 간에 거의 차이가 없었으나, 신초 발생율의 경우는 Figure 2에 나타나듯이 대조구와 비교해서 60% 이상 높은 결과를 보여 주었다. 이러한

연구는 옥수수(Vain et al. 1993)와 동일한 결과인데 이 연구에서는 *gus* 유전자 발현비율이 2.7배 이상 증가하였다. 심비디움(Roh et al. 2011)의 유전자총 형질전환 연구에서도 0.2 M Sorbitol과 0.2 M Mannitol 혼합처리구가 대조구와 비교해서 생존 절편체수도 2배 이상이었고 특히 신초가 재분화된 절편체 숫자는 2.7배 이상을 나타내었다. 이러한 연구는 팔레놉시스(Roh et al. 2014)에서도 유사한 결과를 보여 주었다.

유전자총을 이용한 형질전환 연구에서 sorbitol과 mannitol 2 종류 혼합처리구가 형질전환 효율을 높인 연구사례는 톨웨스큐(Gao et al. 2008)에서도 관찰되었다.

PCR 검정에 의한 유전자도입 확인 및 형질전환체 증식

8주에서 12주 정도 선발과정을 거친 형질전환 나리 소식물체로부터 유엽을 채취해서 DNA 추출 후, 선발유전자인 *bar* 유전자와 목적유전자인 *AtSIZ* 유전자가 도입되었는지 여부를 PCR 검정으로 확인한 결과, Figure 4A에서처럼 선발과정을 거친 백합식물체 중 무작위로 6계통을 선발하여 검정하였다. 그 결과 그 중 5계통에서 *bar* (552 bp) 밴드가 관찰되었으며, 이 중 4계통을 다시 선발하여 *AtSIZ* 유전자(1,794 bp)가 도입되었는지를 확인한 결과, Figure 4B처럼 4 계통 중 3 계통에서 밴드가 확인되었다. 이렇게 유전자 도입이 안된 계통은 온전하게 나리 계놈으로 삽입이 부분적으로 되었거나 선발 및 증식과정 중에 escape 발생된 것으로 추정된다. 본 연구 수행 결과, 형질전환 나리 16계통 65 식물체가 생산되어 증식 중에 있고, 추가 증식과정을 통하여 향후 기내 및 기외 상태에서 형질전환 및 비형질전환 나리 식물체들간의 변이발생 여부조사를 포함하는 생육 및 배수체 검정 그리고 내염성 및 내건성에 대한 추가적인 기능성 검정이 이루어져야 할 것으로 판단된다.

적 요

유전자총을 이용한 형질전환 체계와 PPT (D-L-phosphinothricin) 선발을 통하여 나리 인편조직으로부터 형질전환 식물체가

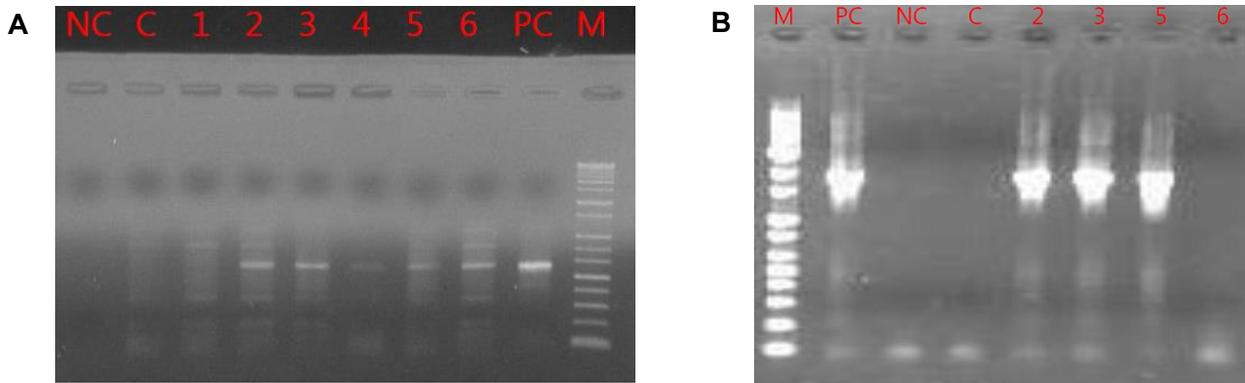


Fig. 4 Molecular analysis of transgenic lily plants by PCR analysis (A: *bar* gene (552 bp), B: *AtSIZ* (1,794 bp), (M: marker, PC: positive control, NC: negative control (water), C: control (non-transformed plants), lane 1-6: transgenic lines)

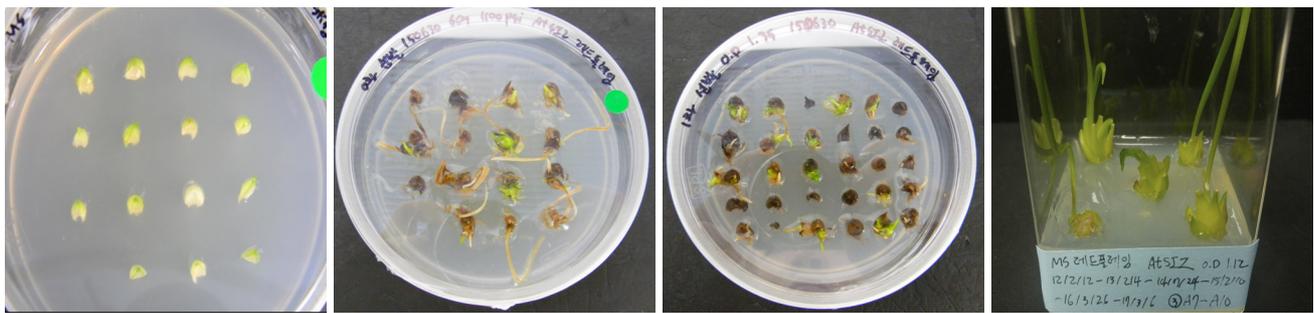


Fig. 5 Production of transgenic lily plants via particle bombardment (A: scales after particle bombardment; B: Selection and propagation of putative transgenic lily plantlets; C: Growth of putative transgenic shoots with roots; D: Grown-transgenic *in vitro* lily plants. Scales with shoots and lily plantlets shown in B-C were on selection medium containing PPT 10 mg/l)

획득되었다. 본 연구에서 나리 ‘레드플레임’ 품종의 인편조직에 선발유전자로 제초제저항성 유전자인 *bar* 유전자 그리고 내염성과 내건성의 복합환경저항성을 나타내는 *AtSIZ* 유전자를 목적유전자로 가지고 있는 플라스미드를 금입자에 코팅해서 유전자총을 이용해서 형질전환 하였다. 이러한 형질전환 체계 확립을 위해 헬륨가스 압력은 1,100 psi, 금입자크기는 1.0 μm 그리고 목적 절편체까지의 거리는 6 cm 그리고 유전자총 처리 24시간 전과 후에 0.2 M sorbitol과 0.2 M mannitol을 혼합해서 MS배지에 첨가한 프로토콜로부터 우수한 형질전환 결과를 나타내었다. 유전자총 발사 처리 후, 1주간 선발제로 사용되는 PPT가 없는 MS 배지로 이식하여 배양 후, PPT 10 mg/l이 첨가된 선발배지에서 4주 간격의 계대배양을 통해 8-12주간 선발과정을 거친다. PPT 선발배지에서 생존한 신초가 형성된 형질전환 나리 인편 조직들을 호르몬이 없는 MS 배지로 다시 옮겨주면 발근 및 추가 생육이 이루어진다. 생존한 형질전환 나리 기내 소식물체들로부터 PCR 검정을 통해 선발유전자인 *bar* 유전자 그리고 목적유전자인 *AtSIZ* 유전자의 도입이 확인되었다. 결론적으로 100여개의 나리 인편조직을 본 연구에서 확립된 유전자총 실험프로토콜을 이용하면 대략적으로 형질전환 나리 17-18 개체를 획득할 수 있으며 본 연구에 기술된 유전자

총 매개 형질전환 체계는 추가적인 보완이 이루어지면, 향후 나리 육종 프로그램에 기여할 것이다.

사 사

이 논문은 건국대학교 KU 학술연구비 지원에 의한 논문임.

References

Azadi P, Chin PD, Kuroda K, Khan SR, Mii M (2010) Macro elements in inoculation and co-cultivation medium strongly affect the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation in *Lilium*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 101:201-209

Bakhshaie M, Khosravi S, Azadi P, Bagheri H, Van Tuyt JM (2016) Biotechnological advance in *Lilium*. *Plant Cell Rep* 35:1799-1826

Deng XY, Wei ZM, An HL (2001) Transgenic peanut plants obtained by particle bombardment via somatic embryogenesis regeneration system. *Cell Res* 11:156-160

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
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* 6:271-282
- Hiei Y, Komari T, Kubo T (1997) Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol* 35:205-218
- Hoshi Y, Kondo M, Mori S, Adachi Y, Nkano M, Kobayashi H (2004) Production of transgenic lily plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep* 22:359-364
- Hoshino Y, Kashihara Y, Hirano T, Murata N, Shinoda K (2008) Plant regeneration from suspension cells induced from hypocotyls derived from interspecific cross *Alstroemeria pelegrina* A. *magenta* and transformation with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 94:45-54
- Irifune K, Morimoto Y, Uchihama M (2003) Production of herbicide resistant transgenic lily plants by particle bombardment. *J Jpn Soc Hort Sci* 72:511-516
- Kamo K, Han BH (2008) Biolistic-mediated transformation of *Lilium longiflorum* cv. Nellie white. *Hortscience* 43(6):1864-1869
- Kim JB, Raemakers CJM, Jacobsen E, Visser RGF (2007) Efficient production of transgenic *Alstroemeria* plants by using *Agrobacterium tumefaciens*. *Ann Appl Biol* 151:401-412
- Langeveld SA, Gerrits MM, Derks Anton FLM, Boonekamp PM, Bol JF (1995) Transformation of lily by *Agrobacterium*. *Euphytica* 85:97-100
- 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
- Lin HS, van der Toorn C, Raemakers CJM, Visser RGF, De Jeu MJ, Jacobsen E (2000) Genetic transformation of *Alstroemeria* using particle bombardment. *Mol Breed* 6:369-377
- Liu J, Zhang J, Xu B, Jia C, Zhang J, Tan G, Jin Z (2011) Regeneration and production of transgenic *Lilium longiflorum* via *Agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 47:348-356
- Mercuri A, De Benedetti L, Bruna S, Bregliano R, Bianchini C, Foglia G, Schiva T (2003) *Agrobacterium* -mediated transformation with *rol* genes of *Lilium longiflorum* Thunb. *Acta Hort* 612:129-136
- Ministry of Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (2015) Statistics of floriculture cultivation in 2015.
- Morrish F, Songstad DD, Armstrong CL, Fromm M (1993) Micro-projectile bombardment: a method for the production of transgenic cereal crop plants and the functional analysis of genes. In: Hiatt A (ed), *Transgenic plants: fundamentals and applications*. Marcel Dekker, New York, pp 131-171
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Planta* 15:473-497
- Nam SW, Lee HK (2004) *Agrobacterium*-mediated transformation from callus pretreated with particle bombardment in *Lilium lancifolium* Thunb. *Kor J Plant Biotechnol* 31:13-17
- Ogaki M, Furuichi Y, Kuroda K, Chin DP, Ogawa Y, Mii M (2008) Importance of co-cultivation medium pH for successful *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lilium*. *Plant Cell Rep* 27: 699-705
- Park NB (1997) Proceedings of symposium on the commercialization of lily production and breeding. Hort. Res. Institute RDA. 68-97
- Popowich EA, Firsov AP, Mitiouchkina TY, Filipenya VL, Dolgov SV, Reshetnikov VN (2007) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Hyacinthus orientalis* with thaumatin II gene to control fungal disease. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 90:237-244
- 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, 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
- Roh HS and Kim JB (2014) Effects of osmoticum treatments and shooting chances on the improvement of particle gun-mediated transformation in *Phalaenopsis*. *J Plant Biotechnol* 41:216-222
- Sanford JC, Smith FD, Russel JA (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods Enzymol* 217:483-510
- Vain P, McMullen MD, Finer JJ (1993) Osmoticum treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Rep* 12:84-88
- Wang Y, van Kronenburg B, Menzel T, Maliepaard C, Shen X, Krens F (2012) Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of multiple lily cultivars. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 111:113-122
- Watad AA, Yun DJ, Matsumoto T, Niu X, Wu Y, Kononowicz AK, Bressan RA, Hasegawa PM (1998) Microprojectile bombardment-mediated transformation of *Lilium longiflorum*. *Plant Cell Rep* 17:262-267
- Wilmink A, van de Ven BCE, Dons JJM (1992) Expression of the GUS-gene in the monocot tulip after introduction by particle bombardment and *Agrobacterium*. *Plant Cell Rep* 11:76-80
- Woodcock HBD, Stearn WT (1950) *Lilies of the world*. Scribners, New York
- Yang J, Lee HJ, Shin DH, Oh SK, Seon JH, Paek KY, Han KH (1999) Genetic transformation of *Cymbidium* orchid by particle bombardment. *Plant Cell Rep* 18:978-984