Research Report

스프레이 국화 형질전환을 위한 국내 육성 품종 선발

서은정^{1*}, 한봉희², 이연희¹, 이성곤¹, 홍준기¹, 김경환¹¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부 분자유종과²농업기술실용화재단 종자사업팀

The Selection of Domestically Bred Cultivars for Spray-type Chrysanthemum Transformation

Eun-Jung Suh^{1*}, Bong Hee Han², Yeon-Hee Lee¹, Seong-Kon Lee¹, Joon Ki Hong¹, and Kyung Hwan Kim¹¹Molecular breeding Division, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Junju 560-500, Korea²Department of Seed Service, The Foundation of Agri. Tech. Commercialization and Transfer, Suwon 441-100, Korea

Abstract: To select suitable spray chrysanthemum cultivars for *Agrobacterium*-mediated transformation, thirty-nine (39) spray cultivars bred in the National Institutes of Korea and a standard cultivar Jinba from Japan were collected and tested for regeneration rate and *Agrobacterium* infection assays. MS medium with 0.5 mg·L⁻¹ IAA and 1.0 mg·L⁻¹ BAP was used for shoot regeneration from leaf disks and internodes. The shoot regeneration rate in leaf disks was the highest in cultivar BRM, followed by cultivars VS, WW and YTM. The cultivar JB (Jinba) used as a transformation material in previous reports ranked similarly to cultivars PK and SPP. In shoot regeneration from internodes, the shoot regeneration rate was the highest for cultivar PA, followed by cultivar WW. The infection rate of leaves and internodes of 40 chrysanthemum cultivars with *agrobacterium* was investigated. Cultivars WPP, YNW, VS, PP, WW, FA, PA and YMN showed the highest infection levels in leaves, whereas cultivars WPP, PA, PK and YNW had the highest infection levels in internodes. Considering all of these results, cultivars VS and WW were the most appropriate for gene transformation of chrysanthemum using leaves, while cultivar PA was for internodes.

Additional key words: spray-type chrysanthemum, regeneration, *agrobacterium*, transformation, GUS (beta-glucuronidase)

서 언

국화(*Dendranthema grandiflora* (Ramat.) Kitamura)는 세계 3대 주요 화훼작물이고 한국과 중국에서는 가장 중요한 절화 중 하나로 간주되고 있으며, 삽목이나 분주로 번식하고 있다. 특히 스프레이 국화는 풍부한 색과 화형을 보이는 수많은 품종들 때문에 미국과 유럽에서는 2번째로 큰 절화 시장을 형성하고 있다(Chen, 2005; Li 등, 2009).

다른 작물과 마찬가지로 국화 역시 농업적으로 중요하면서도 상업성이 있는 형질들을 도입하기 위하여 일반적인

교배 또는 인위적인 돌연변이 유기를 통해 육종하고 있지만 도입할 수 있는 유용 형질은 한정적이다(Shinoyama 등, 2012). 최근에 분자생물학의 발전에 따라 교배나 돌연변이 육종을 통해서는 불가능한 형질도 도입이 가능해 졌는데(Shinoyama 등, 2006), 1975년에 처음 국화의 아그로박테리움에 대한 감수성이 보고된 이래로(Miller, 1975) 많은 연구자들이 아그로박테리움을 이용한 형질전환을 통해 유용한 농업형질을 국화에 도입하고자 하는 시도를 해오고 있다. 지금까지 국화에서 도입이 시도된 형질은 다양한데 화훼작물에서 가장 중요한 화형이나 화색 형질, 전체적인 형태조

*Corresponding author: seji00@korea.kr

※ Received 13 February 2015; Revised 04 August 2015; Accepted 14 August 2015. 본 연구는 농촌진흥청 어젠다 과제(과제번호 PJ010881)연구비에 의해 이루어진 것임.

질 관련 형질이 있으며 재배에 필요한 형질로 내충성, 바이러스 저항성, 개화시기조절, 곰팡이 저항성, 스트레스 저항성유전자의 도입이 보고되었으며 최근에 상업화 및 환경위해성평가를 위해 국화의 웅성불임관련 유전자의 도입도 보고되었다(Teixeira da Silva 등, 2013; Kim 등, 2010).

스프레이 국화의 경우 국내에서 다수의 품종이 개발되고 있으나 아직까지도 네덜란드 육종회사에서 개발된 다양한 화색과 화형을 가진 품종에 비해 국내 소비자의 기호를 충족시킬 절대적인 품종 육성이 미진한 실정이다(Hwang 등, 2013). 스탠다드 국화에 비해 스프레이 국화는 다양한 품종이 있는 것이 장점이지만 주력으로 재배되는 품종이 없어 각 품종이 절화시장에서 차지하는 부분이 미미하다. 형질전환에 있어서 지금까지는 대체적으로 스탠다드 품종에서 많은 시도가 있었지만 스탠다드 품종은 전체적인 화형이나 초장, 엽형에 영향을 주지 않는 방향으로 형질전환을 해야 하므로 목적하는 유전자 선정이 매우 국한되는 단점이 있다. 그에 반해 스프레이 국화는 시장성은 스탠다드에 비해 떨어지나 매우 다양한 품종 및 형태를 가지고 있어서 상대적으로 형질전환에 사용할 수 있는 유전자의 선택 폭이 넓을 것으로 보인다. 따라서 본 논문에서는 국내에서 개발한 다양한 스프레이 품종 국화들을 대상으로 재분화 정도 및 아그로박테리움의 감염 정도를 조사하여 아그로박테리움을 이용한 형질전환의 가능성을 검토해 보고 향후 다양한 품종의 스프레이 국화 형질전환체 개발을 위한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 수집 및 기내도입

스프레이 국화의 형질전환을 위해서 국립원예특작과학원과 충청남도 농업기술원 예산국화시험장, 전라북도 농업기술원으로부터 분양 받은 국내 육성 스프레이 품종 39종 및 기존에 형질전환에 대한 보고가 된 바 있는 스탠다드 국화인 신마(Han 등, 2007)를 포함한 총 40종의 품종에 대해 기내도입을 수행하였다. 모주로부터 정단부(3cm 정도)를 채취하여 70% 알코올에 30초, 1%의 차아염소산나트륨으로 15분 소독한 다음 멸균수로 세 번 세척하였다. 세척한 정단부는 MS 배지(Murashige and Skoog, 1962)에 활성탄이 $2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 첨가된 배지에 치상하고 8주마다 동일한 새 배지로 옮겨 증식하여 사용하였다.

품종별 재분화 시험

기내 도입한 국화 40 품종의 품종별 재분화 시험을 수행하기 위해서 각각의 잎과 마디부위를 절취하여 배양하였다. 잎은 기내도입 국화의 정단부 아래 2-3번째 잎을 약 5mm의 사각형으로 절단한 다음, 1회용 페트리디쉬에 10개씩 치상하여 4반복으로 사용하였으며 마디부위의 경우 액아가 포함되지 않도록 마디를 절단하여 동일한 방법으로 배양하였다. 재분화 배지는 MS 배지에 BAP $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, IAA $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, agar 0.7%가 첨가된 배지를 사용하였으며 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 조절되는 배양실에서 암배양하였다(Lee 등, 2012).

암상태에서 약 6주간 배양한 후 각각의 품종별로 잎 또는 마디 절편체에 형성된 신초의 수를 측정하여 품종간 및 조직간의 재분화 정도를 비교하였으며, 측정결과는 Duncan 다중검정 방법으로 통계처리하였다(Duncan, 1955).

아그로박테리움을 이용한 품종별·조직별 감염도 조사

아그로박테리움을 이용한 품종별, 조직별 감염정도를 조사하기 위해서 기내배양한 국화 식물체를 재분화배지에서 배양하였다. 잎과 마디 절편체를 각각 1회용 페트리디쉬에 12개씩 치상하여 3반복으로 배양하였다. 아그로박테리움을 이용한 접종은 binary vector pCambia2301(Cambia, Australia, <http://www.Cambia.org>)가 포함된 *A. tumefaciens* strain LBA4404 ($\text{OD}_{660} = 0.5$)를 이용하여 Han 등(2007)의 방법에 따라 잎과 마디 절편체에 접종한 다음, 3일간 25°C 에서 암조건에서 공동배양하였다. 공동배양 후 Jefferson 등(1987)의 방법을 변형하여 GUS 염색을 수행하였는데 공동배양한 잎과 마디 절편체를 GUS 버퍼(2mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide, 0.5mM Potassium Ferrocyanide, 0.5mM Potassium Ferricyanide, 0.1% Triton X-100, 20% methanol, 100mM Phosphate)에 담가 37°C 에서 12시간 침지하였다. 이때 내생 GUS의 활성을 억제하기 위해서 Kosugi 등(1990)의 방법을 참고하여 메탄올을 사용하였다. GUS 염색이 끝난 후 절편체를 99% 에탄올로 3-4차례 씻어 염록소를 제거한 다음 GUS 발현을 관찰하였다. 잎과 마디를 이용한 GUS염색에서 보다 정확한 품종간 차이를 구명하기 위해서 감염정도를 수치화하여 분류하였다. 잎의 경우 5mm의 사각형 잎 조각을 기준으로 GUS가 염색된 각 면마다 1점을 부여하여 품종별로 점수를 취합하여 분류하였으며 마디의 경우 전체 마디를 3등분한 다음 마디 전체가 염색되면 3점, 2/3이상 염색이 되었으면 2점을 부여하여 품종별로 감염된 정도를 구별하였다.

결과 및 고찰

국내 육성 스프레이 품종의 기내 도입

국화 형질전환에 있어서 아그로박테리움 감수성이나 재

분화율은 형질전환 효율에 영향을 미치는 중요한 요인으로 알려져 있으며(Shinoyama 등, 2012) 품종의 특성도 영향을 미친다고 알려져 있다. 지금까지 국화 형질전환은 대부분 스탠다드 국화인 수방력(Han 등, 2007) 이나 신마(Lee 등, 2013;

Table 1. The cultivars of chrysanthemum [*Dendranthema grandiflora* (Ramat.) Kitamura] used in this experiment. Thirty-nine of spray-type chrysanthemum were collected from National Institute of Horticultural & Herbal Science, Yesan Chrysanthemum Experiment Station and Jeollabuk-do Agricultural Research & Extension Service. One standard type chrysanthemum, 'Jinba', was used to compare transformation efficiency.

No.	Abb.	Cultivar	Institute	No.	Abb.	Cultivar	Institute
1	BMB	Black Marble	National Institute of Horticultural & Herbal Science	21	PPP	Pink Pangpang	National Institute of Horticultural & Herbal Science
2	BRM	Borami	Yesan chrysanthemum Experiment Station	22	PV	Pink Velvet	National Institute of Horticultural & Herbal Science
3	CB	Cherry Blossom	National Institute of Horticultural & Herbal Science	23	SC	Sweet Carpet	National Institute of Horticultural & Herbal Science
4	FA	Forest Aroma	National Institute of Horticultural & Herbal Science	24	SL	Seolak	National Institute of Horticultural & Herbal Science
5	GF	Golden Festival	National Institute of Horticultural & Herbal Science	25	SP	Secret Pink	National Institute of Horticultural & Herbal Science
6	GM	Gama	National Institute of Horticultural & Herbal Science	26	SPP	Sunny Pangpang	National Institute of Horticultural & Herbal Science
7	GP	Graden Party	National Institute of Horticultural & Herbal Science	27	VS	Vivid Scarlet	National Institute of Horticultural & Herbal Science
8	HPR	Hwiparam	Yesan chrysanthemum Experiment Station	28	WPP	Whitney Pangpang	National Institute of Horticultural & Herbal Science
9	IW	Ilweol	National Institute of Horticultural & Herbal Science	29	WW	White Wing	National Institute of Horticultural & Herbal Science
10	JB	Jinba	Japan	30	YDY	Yes Day	Yesan chrysanthemum Experiment Station
11	MF	Moon Festival	National Institute of Horticultural & Herbal Science	31	YE	Yellow Elegance	National Institute of Horticultural & Herbal Science
12	MJG	Mujigae	Yesan chrysanthemum Experiment Station	32	YH	Yes Happy	Yesan chrysanthemum Experiment Station
13	ML	Moon Light	Jeollabuk-do Agricultural research & Extension service	33	YMN	Yes Morning	Yesan chrysanthemum Experiment Station
14	OM	Orange Memory	National Institute of Horticultural & Herbal Science	34	YNW	Yes Now	Yesan chrysanthemum Experiment Station
15	OMB	Orange Marble	National Institute of Horticultural & Herbal Science	35	YPP	Yellow Pangpang	National Institute of Horticultural & Herbal Science
16	PA	Pure Angel	National Institute of Horticultural & Herbal Science	36	YST	Yes Star	Yesan chrysanthemum Experiment Station
17	PD	Prima Donna	National Institute of Horticultural & Herbal Science	37	YSW	Yes Swan	Yesan chrysanthemum Experiment Station
18	PDA	Plaisir D'Amour	National Institute of Horticultural & Herbal Science	38	YTG	Yes Together	Yesan chrysanthemum Experiment Station
19	PK	Peak	National Institute of Horticultural & Herbal Science	39	YTM	Yes Time	Yesan chrysanthemum Experiment Station
20	PP	Pink Pride	National Institute of Horticultural & Herbal Science	40	399	399	National Institute of Horticultural & Herbal Science

An 등, 2014; Song 등, 2014)에서 보고되었으며, 스프레이 국화에 대한 보고는 많지 않은 실정이다. 본 연구는 국내에서 육종을 통해 육성된 우수 스프레이 품종을 대상으로 형질전환을 하는데 반드시 확립되어야 할 조건인 재분화율과 아그로박테리움에 대한 감수성을 조사하기 위하여 총 39종의 스프레이 국화(Table 1)를 대상으로 기내 도입을 실시하였으며 이들로부터 잎과 마디 절편체를 채취하여 재분화 및 형질전환 시험을 수행하였다.

형질전환에 적합한 스프레이 국화 선발을 위한 품종간

재분화율 비교

식물체의 재분화율은 형질전환 효율과 밀접한 관계를 가지고 있다. 품종별 재분화 시험을 위해 IAA와 BAP를 사용한 Lee 등(2012)의 한가지 조건을 사용하였는데 두 생장조절제의 조합이 다양한 국화의 재분화에 매우 효과적인 것으로 보고된 바 있다(Aida 등, 1992; De Jong 등, 1995; Fukai 등, 1995; Ledger 등, 1991; Urban 등, 1994). 실제로 스프레이 및 스탠다드 국화 33개의 품종을 대상으로 품종간 재분화율을 조사한 Han 등(2009) 보고에서도 33개의 품종 중 7개 품종만이 IAA와 BAP 호르몬에 전혀 반응하지 않았다고 하였다. 본 시험은 동일조건에서 형질전환에 적합한 스프레이 품종을 선발한다는 목적을 가지고 수행되었기 때문에 기존에 다양한 국화 품종에서 효과가 보고된 IAA $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 와 BAP $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 조합을 품종간 재분화 차이를 구분하는 기준으로 정하였다. 국화에서 형질전환에 사용하는 식물의 조직으로는 꽃잎을 사용한 보고(Kim 등, 2010)도 있지만 잎이나 마디를 사용한 보고가 다수(Teixeira da Silva, 2005)여서 본 실험에서는 기내에서 배양한 잎과 마디를 이용하여 품종간 재분화율을 조사하였다. 스프레이 품종을 이용한 형질전환은 물랑루즈(Kim 등, 2010)와 핑크팡팡, 핑크프라이드 품종(Lee 등, 2012)을 이용한 보고가 있지만 대체적으로 스탠다드 품종에 관한 보고가 다수이다. 그래서 스프레이 국화들간 재분화 효율을 비교하기 위한 조사 품종에 스탠다드 품종인 신마(JB)를 넣어 대조구로 사용하였다.

잎을 이용한 재분화 시험결과 BRM, VS, WW품종이 가장 재분화율이 높았으며, 다음으로 JB는 YTM, PK, SPP품종과 유사한 수준의 높은 재분화율을 보였다(Table 2). 비교적 높은 재분화율을 보인 스프레이 품종 중에서 PK, OM품종은 다수의 신초가 유도되긴 했지만 3주 이후부터는 신초가 유리화되는 현상이 나타나 실제 형질전환에 이용하기에는 어려움이 있을 것으로 보였다(결과 미제시). 399품종 등

을 비롯한 10개 품종의 잎 조직에서는 BAP와 IAA를 이용한 재분화 배지에 전혀 반응을 하지 않았다. 마디를 이용한 재분화 시험에서는 PA품종이 월등히 높은 재분화율을 나타냈고 WW품종이 뒤를 이어 재분화율이 높은 것으로 나타났다(Table 3). 신마의 경우 마디를 이용할 경우 잎 절편체에 비해 재분화율이 훨씬 떨어지는 것으로 나타났는데, 이로 보아 신마는 기존의 보고와 같이 잎을 사용한 형질전환 방법이 더 유용할 것으로 생각되었다. 잎과 마디 조직을 이용한 재분화 시험에서 WW품종은 잎과 마디 두 조직 모두를 사용해서 형질전환이 가능한 품종으로 확인되었다. 6주간 암배양 후 일주일간 광상태에서 배양한 다음 신초의 재분화 결과는 그림 1과 같았다(Fig. 1). 신초의 재분화율은 품종과 사용하는 부위에 따라 달라지는데 일반적으로 잎이 마

Table 2. The shoot regeneration efficiency of various chrysanthemum cultivars using leaves. Induction of adventitious shoots from leaf explants of 40 different cultivars regenerated from medium containing BAP and IAA at 25°C in the dark for 6 weeks.

Cultivar	No. of regenerated shoots	Cultivar	No. of regenerated shoots
BMB	0.0 h ^z	PPP	7.3 g-h
BRM	31.3 a-c	PV	0.0 h
CB	7.3 f-h	SC	0.5 h
FA	0.0 h	SL	0.0 h
GF	7.8 f-h	SP	5.5 gh
GM	2.5 h	SPP	24.3 c-e
GP	0.0 h	VS	38.8 ab
HPR	0.0 h	WPP	9.8 e-h
IW	5.8 f-h	WW	43.5 a
JB	20.8 cd-g	YDY	6.3 f-h
MF	0.0 h	YE	1.0 h
MJG	4.0 h	YH	2.8 h
ML	0.0 h	YMN	14.5 d-h
OM	14.8 d-h	YNW	0.0 h
OMB	6.7 f-h	YPP	0.3 h
PA	12.3 e-h	YST	0.8 h
PD	7.3 f-h	YSW	0.5 h
PDA	5.0 h	YTG	8.5 g-h
PK	20.8 c-ef	YTM	26.8 b-d
PP	11.0 e-h	399	0.0 h

^zDifferent letters in same line represent significant differences by Duncan's multiple range test, $p \leq 0.05$.

Table 3. The shoot regeneration efficiency of various chrysanthemum cultivars using internodes.

Cultivar	No. of regenerated shoots	Cultivar	No. of regenerated shoots
BMB	4.0 jk ^z	PPP	13.5 e-k
BRM	19.8 d-h	PV	18.8 d-i
CB	21.3 d-h	SC	7.3 h-k
FA	9.8 f-k	SL	0.5 k
GF	16.5 e-j	SP	13.8 e-k
GM	2.5 jk	SPP	49.8 b
GP	1.8 k	VS	22.8 d-g
HPR	0.0 h	WPP	13.0 e-k
IW	12.8 f-k	WW	43.8 bc
JB	18.3 e-i	YDY	23.5 d-f
MF	9.0 f-k	YE	8.0 g-k
MJG	9.5 f-k	YH	12.0 f-k
ML	16.5 e-j	YMN	33.0 d
OM	28.0 de	YNW	0 e-h
OMB	15.0 e-k	YPP	0 k
PA	72.0 a	YST	11.8 f-k
PD	11.3 f-k	YSW	0.8 k
PDA	9.8 j-i	YTG	14.5 e-k
PK	22.0 d-h	YTM	16.7 e-j
PP	7.8 g-k	399	10.8 f-k

^zDifferent letters in same line represent significant differences by Duncan's multiple range test, $p \leq 0.05$.

디보다는 높다고 알려져있다(Han 등, 2009). 그러나 본 실험 결과 품종에 따라서 잎보다 마디가 재분화가 높은 품종도 있는 것으로 확인되었는데 식물체의 재분화율은 각 식물자체가 가지고 있는 유전적 배경과 특성에 따라 달라지는 것으로(Takatsu 등, 1998) 생각되며, 어떤 품종을 가지고 형질 전환을 하느냐에 따라 적합한 조직을 선택할 필요가 있을 것으로 보인다.

품종별·조직별 아그로박테리움 감염도 조사

국화의 성공적인 형질전환은 품종에 따라서 달라지는 아그로박테리움 균주의 특이성, 아그로박테리움 감염에 대한 감수성, 기내 식물체의 재분화 효율성에 영향을 받는다(Teixeira da Silva 등, 2004). 국화 형질전환에서 아그로박테리움 균주로 LBA4404가 가장 많이 사용되고 있어서(Teixeira da Silva, 2005), 본 시험에서는 품종간 아그로박테리움 감염도를 조사하기 위한 transient assay의 균주로 LBA4404를 사용하였다. Transient assay는 재분화에 사용한 동일한 잎과 마디를 대상으로 하였으며 *gus*를 포함한 벡터로는 pCAMBIA2301을 사용하였다.

GUS 염색 후 관찰하였을 때 FA, MGJ, OMB, PA, PP, VS, WPP, WW, YMN, YNW 등 품종이 높은 GUS활성을 나타내었다(Fig. 2). 마디를 이용한 경우에는 CB, FA, GP, MJG, OMB, PA, PK, SPP, WPP, YE, YMN, YNW, YTM 등 품종

Fig. 1. Shoot regeneration from 40 chrysanthemum cultivars. Regenerated shoots following dark culture for 6 weeks were exposed to light for about a week and each petri-dish was photographed. Each cultivar showed regenerated shoots from leaf (left) and internodes (right).

이 눈으로 식별 가능할 정도의 활성을 보였다(Fig. 3). 보다 정확한 품종간 차이를 구명하기 위해서 품종별 감염정도를 부위별로 수치를 부여하여 3그룹으로 분류하였다(Table 3).

품종에 따른 잎의 감염 정도는 WPP, YNW, VS, PP, WW, FA, PA, YMN 품종이 가장 높은 감염도를 보였으며(A그룹), 스탠다드 국화인 신마는 PPP 등의 품종과 유사한 수준

Fig. 2. Histochemical GUS staining with leaf disks. The same stage leaves as used in regeneration were infected with *Agrobacterium* LBA4404 strain containing pCambia 2301 and co-cultured for three days in the dark at 25°C. The inoculated leaf disks were stained in GUS buffer and incubated at 37°C for 12 hours. We investigated blue spots in leaf disks after several rounds of washing with absolute alcohol.

Fig. 3. Histochemical GUS staining with internodes. All procedures were followed as Fig. 2 except for the use of internodes.

Table 4. Results of agrobacterium-infection through transient assays. To compare cultivars, scores were given for each tissue. The number for leaf disks stained with all square sides was 4 and non-stained disks were considered 0. In the case of internodes, score was given grade by stained portion from 0 to 3.

Group Tissue	A	B	C
Leaf disks ^z	WPP, YNW, VS, PP, WW, FA, PA, YMN	PPP, MJG, SPP, MF, BMB, OMB, YE, 399, HPR, GP, SC, YTM, PD, PK, PDA, JB	PV, GM, BRM, YST, GF, SL, ML, OM, YDY, YPP, YTG, IW, CB, YSW, YH, SP
Internodes ^y	WPP, PA, PK, YNW	YMN, PD, GP, YE, SC, YTM, CB, PPP, MJG, FA, JB, SP, SPP, OMB, 399, WW, YSW	PDA, PP, BMB, ML, VS, YST, HPR, GF, IW, YDY, YH, PV, YTG, SL, OM, BRM, MF, GM, YPP

^zTotal score from 2 to 37 was C, 40 to 72 was B and 81 to 109 was A.

^yTotal score from 0 to 30 was C, 31 to 58 was B and 67 to 88 was A.

의 발현을 보였다(Fig. 2 and Table 3). 잎을 이용한 재분화 시험결과와 관련하여 분석하였을 때 재분화율이 높았던 품종 중 VS나 WW 품종은 아그로박테리움 감염도도 높은 편이어서 차후 잎을 이용한 스프레이 품종 형질전환 시 매우 유용한 품종으로 확인되었다. 마디를 이용한 경우 WPP, PA, PK, YNW 품종이 가장 감염도가 높게 나타났으며, PA 품종의 경우 마디를 이용한 재분화에서 월등한 재분화율을 보여 마디를 이용한 국화 형질전환에 가장 적합한 품종으로 확인되었다. Transient assay 후 감염된 부위를 수지화 하여 분류하는 방법은 품종간 아그로박테리움에 대한 감염도가 높은 품종을 선별하는데 비교적 적합한 방법으로 판단된다.

국내에서 개발된 스프레이 국화 품종을 대상으로 재분화와 아그로박테리움 감염도를 동일한 시험방법으로 조사한 결과, 잎 절편체의 형질전환에서는 VS, WW 품종이 가장 적합한 품종으로 확인되었으며, 마디를 이용한 형질전환에서는 PA 품종이 가장 적합한 품종으로 확인되었다. 특히 세 품종은 대조구로 사용한 신마 품종보다 재분화나 아그로박테리움 감염도가 높아서 향후 특정 유전자의 국화 내 발현을 조사하거나 국화에서 필요한 형질을 개량하기 위한 형질전환에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각되었다.

초 록

형질전환에 적합한 국화 스프레이 타입 품종을 선발하기 위해서 국내 연구기관에서 육성된 39개 품종 및 일본품종인 스탠다드 타입 신마를 모아 재분화율과 아그로박테리움 감염도를 조사하였다. 잎과 마디 절편체로부터의 신초 재분화를 위하여 IAA 0.5mg·L⁻¹와 BAP 1.0mg·L⁻¹가 첨가된 MS 배지를 사용하였다. 잎 절편체로부터의 신초 재분화는 BRM

품종이 가장 높았고 VS, WW, YTM 품종순으로 분화되었다. 이전에 형질전환재료로 보고된 바 있는 신마는 PK, SPP 품종과 유사한 수준을 보였다. 마디 절편체로부터의 신초 재분화는 PA 품종에서 가장 높았으며 WW 품종이 다음으로 확인되었다. 40개의 국화 품종을 대상으로 아그로박테리움에 대한 감염도를 조사한 결과, 잎 절편체에서는 WPP, YNW, VS, PP, WW, FA, PA, YMN 품종이 가장 높았고 마디 절편체에서는 WPP, PA, PK, YNW 품종이 가장 높았다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 국화의 잎 절편체를 이용한 형질전환은 VS와 WW 품종이 가장 적합한 반면에 마디형질전환에는 PA 품종이 가장 적합한 것으로 확인되었다.

추가 주요어 : 스프레이국화, 재분화, 아그로박테리움, 형질전환, GUS

인용문헌

- Aida, R., Y. Tabei, M. Hirai, and M. Shibata. 1992. *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum. *Breed. Sci.* 42: 270-271.
- An, J., A. Song, Z. Guan, J. Jiang, F. Chen, W. Lou, W. Fang, Z. Liu, and S. Chen. 2014. The over-expression of *Chrysanthemum crassum* *CsSOS1* improves the salinity tolerance of chrysanthemum. *Mol. Biol. Rep.* 41:4155-4162.
- Chen, L. 2005. Research and analysis of the international market of chrysanthemum. *Greenhouse Hortic.* 8:20-22.
- De Jong, J., W. Rademaker, and K. Ohishi. 1995. *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum. *Plant Tissue Cult. Biotechnol.* 1:38-42.
- Duncan, D.B. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometrics*

- 11:1-42.
- Fukai, S., J. De Jong, and W. Rademaker. 1995. Efficient genetic transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) using stem segment. *Breed. Sci.* 45:179-184.
- Han, B.H., E.J. Suh, S.Y. Lee, H.K. Shin, and Y.P. Lim. 2007. Selection of non-branching lines induced by introducing Ls-like cDNA into chrysanthemum (*Dendranthema × grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) 'Shuho-no-chikara'. *Sci. Hortic.* 115:70-75.
- Han, B.H., S.Y. Lee, and B.M. Park. 2009. Comparison of chrysanthemum cultivars based on direct shoot regeneration rates in tissue culture. *J. Plant Biotechnol.* 36:275-280.
- Hwang, J.C., Y.D. Chin, Y.M. Chung, S.K. Kim, C.W. Ro, and B.R. Jeong. 2013. A new spray chrysanthemum cultivar, 'Blue Hope' with anemone type and white petals for cut flower. *Korean J. Hortic. Sci. Technol.* 31:123-127.
- Jefferson, R.A. 1987. Plant reporter genes: The gus gene fusion system. *Genetic Engineering* 10:247-263.
- Kim, Y.H., H.M. Park, J.Y. Jung, T.M. Kwon, S.J. Jeung, Y.B. Yi, G.T. Kim, and J.S. Nam. 2010. Development of *Agrobacterium*-mediated transformation method for domestically bred chrysanthemum cultivar 'Moulinrouge' and genetic change of leaf morphology using *AtSICKLE* gene. *Korean J. Hortic. Sci. Technol.* 28:449-455.
- Kosugi, S., Y. Ohashi, K. Nakajima, and A. Yuji. 1990. An improved assay for β -glucuronidase in trans-formed cells: Methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -glucuronidase. *Plant Sci.* 70:133-140.
- Ledger, S.E., S.C. Deroles, and N.K. Given. 1991. Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum. *Plant Cell Rep.* 10:195-199.
- Lee, S.Y., B.H. Han, E.J. Hur, H.K. Shin, S.T. Kim, E.K. Lee, W.H. Kim, O.H. Kwon, and I.H. Lee. 2012. *FT*-transgenic spray-type chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) showing early flowering. *J. Plant Biotechnol.* 39:140-145.
- Lee, S.Y., J.H. Kim, K.S. Cheon, E.K. Lee, W.H. Kim, O.H. Kwon, and H.J. Lee. 2013. Phenotypic and molecular characteristics of second clone (T₀V₂) plants of the *LeLs*-antisense gene-transgenic chrysanthemum line exhibiting non-branching. *J. Plant Biotechnol.* 40:192-197.
- Li, Y.F., W.M. Fang, F.D. Chen, S.M. Chen, and C.L. Shi. 2009. Effect of different planting date on phenophase and quality of spray cut chrysanthemum produced in summer. *J. Yangzhou University, Agricultural and Life Sciences ed.* 30:80-83.
- Miller, M. 1975. Leaf, stem, crown, and root galls induced in chrysanthemum by *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytopathology* 65:805-811.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Shinoyama, H. and A. Mochizuki. 2006. Insect resistant transgenic-chrysanthemum [*Dendranthema × grandiflorum* (Ramat.) Kitamura]. *Acta Hortic.* 714:177-184.
- Shinoyama, H., R. Aida, R. Ichikawa, H. Ichikawa, Y. Nomura, and Y. Mochizuki. 2012. Genetic engineering of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*): Current progress and perspectives. *Plant Biotechnol.* 29:323-337.
- Song, A., J. An, Z. Guan, J. Jiang, F. Chen, W. Lou, W. Fang, Z. Liu, and C. Sumei. 2014. The constitutive expression of a two transgene construct enhances the abiotic stress tolerance of chrysanthemum. *Plant Physiol. Biochem.* 80:114-120.
- Takatsu, Y., H. Tomotsune, M. Kasumi, and F. Sakuma. 1998. Differences in adventitious shoot regeneration capacity among Japanese chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* (Ramat.) Kitamura) cultivars and the improved protocol for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 67:958-964.
- Teixeira da Silva, J.A. 2005. Effective and comprehensive chrysanthemum (*Dendranthema × grandiflora*) regeneration and transformation protocols. *Biotechnology* 4:94-107.
- Teixeira da Silva, J. A., H. Shinoyama, R. Aida, Y. Matsushita, S.K. Raj, and F. Chen. 2013. Chrysanthemum biotechnology: Quo vadis? *Crit. Rev. Plant. Sci.* 32:21-52.
- Teixeira da Silva, J.A. and S. Fukai. 2004. Effect of aminoglycoside antibiotics on in vitro morphogenesis from cultured cells of chrysanthemum and tobacco. *J. Plant Biotechnol.* 6:25-37.
- Urban, L.A., J.M. Sherman, J.W. Moyer, and M.E. Daub. 1994. High frequency shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*). *Plant Sci.* 98:69-79.