과 제 구 분	경상기본 Code : LS 0209	수행시기	전반기	연구기간	2003
연구과제명	국화 내충성 신품종 육성			과제책임자	소 호 섭
세부과제명	국화 형질전환을 위한 마커선발				
색 인 용 어	국화, 형질전환, 마커				

연구원별 임무

구 분	소 속	성 명	전화번호	담 당 임 무
세부과제책임자	경기도원 환경농업연구과	소호섭	031)229-5813	시험연구수행
공동연구자	〃	한영희	031)229-5811	조사분석
	〃	박경열	031)229-5820	시험지도
	경희대학교	박영두	031)201-2663	항생제 선발 지도

ABSTRACT

Efficient plant regeneration media from in vitro cultured leaf segmaents of chrysanthemum(*Dendranthema X gradiflorum*) were selected, when MS medium supplemented with 1mg/L NAA and 0.1~0.2mg/L BA in 'Subangryeock'(over 70%) variety, with 2mg/L NAA and 0.2mg/L BA in 'Baekwang'(80%), and with 1mg/L NAA and 0.05mg/L BA in 'Puma'(10%), respectively. Also we selected chrysanthemum transformants cultured in MS medium added with 1~2mg/L(in 'Baekwang') hygromycin or with 0.1~0.5mg/L(in 'Subangryeock'), 0.5~1.0mg/L(in 'Baekwang'), and 0.5mg/L (in 'Puma') phosphinothricin but could not select chrysanthemum transformants with kanamycin in all varieties.

Key word : Chrysanthemum, plant regeneration, transformant, kanamycin, hygromycin, phosphinothricin

1. 연구목표

2002년 국내 화훼 재배면적은 장미 771ha, 국화 678ha, 서양란 240ha 그리고 백합 224ha로써 국화는 장미 다음으로 재배면적이 넓고, 수출도 많이 하는 매우 중요한 화훼작물이다. 국화는 전통적인 육종방법에 의하여 많은 우수한 특성들이 유기되었지만 한정된 유전자와 교잡 불화합성 때문에 품종육성의 한계가 있다.

이러한 문제점을 해결하기 위하여 기존의 형질은 변화시키지 않고 원하는 형질만 삽입 시키는 형질전환 방법이 사용되고 있다(최 등 1993, 이정민 등 1997, 조 등 1997, 김미정 등 1998, 김주영 등 1998).

형질전환체와 비형질전환체를 구별할 때 쓰이는 유전자를 마커(marker)라 하며, 가장 많이 사용되는 마커로는 항생제와 제초제 저항성 유전자로 *nptII*, *hpt*, *bar* 유전자이다. 먼저 *nptII*는 *neomycin phosphotransferase*로써 대장균(*E. coli*)에서 발견되어 항생제인 kanamycin, *hpt*는 *hygromycin phosphotransferase*로써 방선균의 일종인 *Streptomyces hygroscopicus*에서 추출되었고 hygromycin B, *bar(pat)*는 *phosphinothricin acetyltransferase*로써 토양방선균의 대표적 속인 *Streptomyces*에서 bialaphos/glufosinate로 선발하는 제초제 저항성 유전자이다. 이외에도 *gfp*는 green fluorescent protein으로 해파리(*Aequorea victoria*)에서 유래되어 특정 파장에서 형광을 띄는 유전자, mannose를 선발 마커로 사용되는 *pmi*유전자, xylose와 rhamnose가 선발마커인 *xyla*유전자, 선발마커가 아닌 성장과 형태형성으로 구분하는 *lec1*, *ipt*, *rol-a*, *-b*, *-c* 유전자가 있으며(Bowen 1993), 이러한 선발마커는 계속 연구 개발중에 있다.

국화 재배의 가장 큰 저해요인은 총채벌레와 진딧물이지만 밤나방과 해충(Noctuidae *Spodoptera litura*)인 파밤나방(beet army worm)과 담배 거세미나방(common cutworm 또는 tobacco cutworm)의 피해도 상당히 커 수량과 품질을 크게 떨어뜨리고(최귀문 등 1991), Hofte 등(1989)에 의해 발견된 *Bt* 독소 유전자를 담배, 토마토, 목화, 배추에 형질전환 시켜 밤나방과 해충에 저항성이 있다고 보고하였다(이정민 등 1997, 최성진 등 1993, Perlak 등 1990, 조현석 등 1997).

따라서 국화 재배시 문제가 되는 밤나방과 해충 저항성 형질전환체를 육성하기 위해 국화 재분화 배지와 항생제 내성 검정을 위한 마커를 선발하고자 본 시험을 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 품 종

본 실험에 사용된 국화 품종은 하추국인 백광(7월 개화), 추국인 수방력(10~11월 개화)과 스프레이 국화인 퓨마(10~11월 개화)를 원예연구소에서 분양받아 조직배양 및 형질전환 재료로 사용하였다.

나. 형질전환을 위한 식물체 재분화 배지 선발

생장점 배양으로 재분화된 국화품종을 절간배양으로 증식시켰으며, 증식된 조직배양묘의 2cm 정도 크기의 완전히 전개된 신엽 1~2매를 4등분으로 절단하였다. 그리고 일회용 페트리디쉬(100mm×20mm)당 10개의 엽절편을 생장조정제인 NAA 1, 2mg/L과 BA 0.05, 0.1, 0.2mg/L을 서로 조합하여 MS기본배지(agar 0.8%, sucrose

2% pH 5.7)에 첨가한 후 배축면을 위로 가게 치상하였다. 환경조건은 초기 1주간은 암조건에서 배양한 후 16/8시간 명기/암기 주기로 조절되고 25℃를 유지하는 조건에서 배양 하였으며, 치상 후 60일에 식물체 재분화율을 조사하였다.

다. 형질전환체 선발을 위한 항생제 내성 검정

국화 내충성 형질전환에 이용하고자 하는 벡터는 각각 kanamycin에 저항성을 보인 *npt*유전자, hygromycin에 저항성을 보인 *hpt*유전자, phosphinothricin에 저항성을 보인 *bar*유전자가 있다. 그러므로 형질전환 식물체를 선발하기 위해 kanamycin 0, 10, 20, 30, 40, 50mg/L, hygromycin 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0mg/L, phosphinothricin 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0mg/L을 배지에 각각 첨가하고 10개의 엽절편체를 치상한 후 60일에 고사율과 잎의 SPAD를 조사하였다. 고사율은 식물체가 완전히 고사된 것과 잎이 황화된 것은 시간이 지남에 따라 모두 고사되었으므로 고사율에 포함하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 형질전환을 위한 식물체 재분화 배지선발

형질전환 기법을 이용한 밤나방과 해충 저항성 국화를 개발하기 위하여는 먼저 재분화 체계를 확립해야 하는데 생장조정제인 NAA와 BA를 조합하여 엽절편을 치상한 결과는 표 1과 같다.

표 1. 국화 품종별 식물체 재분화율

처리내용(mg/L)		식물체 재분화율 (%)			절편당 재분화수 (개)		
NAA	BA	수방력	백광	퓨마	수방력	백광	퓨마
1	0.05	55	40	10	1.6	1.4	0.2
1	0.1	70	65	0	3.1	1.7	0
1	0.2	70	55	0	3.7	1.3	0
2	0.05	55	45	5	1.8	1.3	0.1
2	0.1	35	70	0	1.0	2.0	0
2	0.2	30	80	0	1.0	3.0	0

식물체 재분화율은 수방력 NAA 1mg/L +BA 0.1~0.2mg/L, 백광 NAA 2mg/L + BA 0.2mg/L, 퓨마 NAA 1mg/L + BA 0.05mg/L을 첨가한 배지에서 각각 70%, 80%, 10%로 가장 높았다. 이에 따른 절편체당 재분화된 국화 소식물체는 수방력

3.1~3.7개, 백광 3.0개, 퓨마 0.2개였다. 김미정 등(1998)은 국화과인 구절초와 감국의 엽절편에서의 재분화는 IAA 0.2mg/L + BA 3mg/L 첨가 배지에서 20%의 재분화 효율을 보였으며, 이윤정 등(1999)은 국화 '남전'품종에 대해서 NAA 2mg/L +BA 0.5mg/L 처리된 배지의 엽절편에서 83%의 재분화율을 확인하였다. 한봉희 등(2003)은 형질전환을 위한 수방력 엽절편 배양시 MS배지에 NAA 0.1mg/L + BA 1.0mg/L 첨가처리에서 높은 재분화 개체를 획득하였다고 하였다. 재분화율을 본 시험과 비교한 결과 김미정 등(1998)의 결과보다는 낮았고 이윤정 등(1999)의 결과와 유사하였다. 그러나 각각의 결과는 품종이나 생장조정제의 종류와 농도에 따라 차이가 크게 나타났다.

나. 형질전환체 선발을 위한 항생제 내성 검정

항생제인 kanamycin, hygromycin 그리고 제초제인 phosphinothricin을 농도별로 재분화배지에 첨가하여 국화 엽절편을 배양한 결과는 표 2와 같다. 수방력은 kanamycin 10mg/L에서 고사율은 100%, SPAD는 11.1이었고, hygromycin 2.0mg/L에서 고사율은 20%, SPAD는 25.2, 5.0mg/L에서 고사율은 75%, SPAD는 10.4였다. Phosphinothricin 0.5mg/L에서 고사율은 60%, SPAD는 18.1로 측정되었다. 백광은 kanamycin 10mg/L에서 고사율은 100%, SPAD는 4.7이었고, hygromycin 2.0mg/L에서 고사율은 100%, SPAD는 6.1이었다. Phosphinothricin 1.0mg/L에서 고사율은 80%, SPAD는 15.2로 측정되었다. 퓨마는 kanamycin 10mg/L, hygromycin 5.0mg/L에서 고사율은 각각 100%, SPAD는 각각 4.4와 6.9이었고, phosphinothricin 0.5mg/L에서 고사율은 50%, SPAD는 20.0으로 측정되었다.

형질전환체 선발시 선발마커 농도가 높아 고사율이 80%이상을 선발하는 강선발은 재분화 식물체가 형질이 전환될 확률이 매우 높은 반면 재분화 효율이 낮고, 비록 고사율이 다소 낮을 때 선발하는 즉 고사율이 약 50%되는 약선발은 재분화 효율이 높지만 비형질전환체 발생이 높아 PCR검정등 2차 선발에 노력이 더 필요한 특징이 있다.

본 시험에서 각 마커의 고사율이 50%가 되는 농도를 선발 기준으로 결과 SPAD 값은 수방력은 kanamycin에서는 선발할 수 없었으며, hygromycin 2.0~5.0mg/L, phosphinothricin 0.1~0.5mg/L, 백광은 kanamycin에서는 선발할수 없었으며, hygromycin 1.0~2.0mg/L, phosphinohricin 0.5~1.0mg/L, 퓨마는 kanamycin에서는 선발할 수 없었으며, hygromycin 2.0~5.0mg/L, phosphino thricin 0.5mg/L이었다.

표 2. 선발마커 농도에 따른 국화 품종별 엽절편의 고사 정도

처리내용 (mg/L)		고사율♩(%)			SPAD		
		수방력	백광	퓨마	수방력	백광	퓨마
Kan	0	0	20	0	44.3	30.1	47.0
〃	10	100	100	100	11.1	4.7	4.4
〃	20	100	100	100	6.3	4.2	2.4
〃	30	100	100	100	6.4	5.0	3.9
〃	40	100	100	100	4.2	3.4	5.4
〃	50	100	100	100	2.4	5.0	4.8
Hyg	0.5	0	20	0	40.4	31.2	50.5
〃	1.0	0	0	0	36.5	30.0	38.2
〃	2.0	20	100	0	25.2	6.1	38.8
〃	5.0	75	100	100	10.4	5.1	6.9
〃	10.0	100	100	100	1.3	0.4	3.0
PPT	0.05	0	20	0	54.3	26.0	55.1
〃	0.1	0	40	20	45.1	22.4	25.7
〃	0.5	60	20	50	18.1	22.1	20.0
〃	1.0	80	80	100	17.8	15.2	13.2
〃	2.0	100	100	100	11.3	12.4	6.0

♩고사율 : 황화(chlorosis) 포함

4. 적 요

가. 식물체 재분화율과 절편당 재분화수는 품종에 따라 차이가 크며, 수방력은 NAA 1+ BA 0.1~0.2mg/L에서 재분화율 70%이상, 재분화수 3.1~3.7개, 백광은 NAA 2+ BA 0.2mg/L에서 재분화율 80%, 재분화수 3.0개였으나 퓨마는 NAA 1+ BA 0.05mg/L 첨가배지에서 재분화율 10%, 재분화수 0.2개였다.

나. 품종에 따른 엽절편체 선발마커 종류 및 농도는 수방력은 kanamycin에서 선발되지 않았으며, hygromycin 2.0~5.0mg/L, phosphinothricin 0.1~0.5 mg/L, 백광은 kanamycin에서 선발되지 않았으며, hygromycin 1.0~2.0 mg/L, phosphinothricin 0.5~1.0mg/L, 퓨마는 kanamycin에서 선발되지 않았으며, hygromycin 2.0~5.0mg/L, phosphinothricin 0.5mg/L에서 형질전환 식물체를 선발할 수 있었다.

5. 인용문헌

김미정, 김영희. 1998. 구절초와 감국의 신초재분화와 *flavonoid 3′,5′- Hydroxylase* 유전자의 형질전환. 한국원예학회지. 39:355-359.

김주영, 박선정, 엄보영, 김조영, 박선정, 엄보영, 정영수, 신정섭. 1998. 다양한 vector를가진*Agrobacterium tumefaciens*을 이용한 국화 형질전환. 한국원예학회지. 39:360-366.

박하승, 서정근, 최영재. 1998. 우량국화묘 생산 및 절화품질 향상 기술 개발 : 조직배양에 의한 우량 무병묘 생산기술 개발시험. 시험연구보고서 1997 충청남도농촌진흥원. 849-857.

이윤경, 권영주, 이규민, 형남인. 1999. 국화의 엽절편 배양에 의한 식물체 재생. 식물조직배양학회지. 26:59-63.

이정민, 류종석, 권무식. 1997. *Bacillus thuringiensis* 살충성 결정단백질 유전자(*cryIIA*)의 형질전환 식물 제작. 한국식물조직배양학회. 24:305-311.

조현석, 이연희, 박범석, 김호일, 손재근. 1997. 형질전환에 의한 살충성유전자 *cryⅡA*의 배추로의 도입. 한국육종학회지. 29:92-102.

최성진, 김준철. 1993. 형질전환 토마토식물(*Lycopersicon esculentum*)의 자가수분후세대에서 살충성유전자의 전달. 한국식물조직배양학회지. 20:321-327.

Bowen,B.A. 1993. Markers for plant gene transfer. In:Kung,S.D; Wu,R., eds. Trnasgenic plants. vol.1. Sandiego : Academic Press;89-123.

Hofte H., Whiteley HR. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiological Reviews. 53:242-255.

Perlak, FJ., Deaton, RW., Armstrong, TA., Fuchs, RL., Sims, SR., Greenplate, JT., Fischhoff, DA. 1990. Insect resistant cotton plants. Bio/Technology. 8:939-943.