

과제구분	기본연구	수행시기		전반기	
연구과제 및 세부과제명		연구분야	수행기간	연구실	책임자
형질전환에 의한 내충성 국화 신품종 육성		생명공학	'08~'09	농업기술원 환경농업연구과	소호섭
밤나방과 해충 저항성 국화의 분자생물학적 검정		생명공학	'08~'09	농업기술원 환경농업연구과	소호섭
색인용어	국화, 해충저항성, 형질전환, 분자생물학적 검정				

ABSTRACT

This study was conducted to do molecular biological test of insect resistant chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) plant. Insect resistant gene, *cry1Ac1* was used to optimize parameters required for agrobacterium transformation of leaf discs of chrysanthemum (Gama, Gumsu, Baekhwa, Juwang, Taeyang, Garcia, KingFisher, and SR). For transformation of chrysanthemum leaves, were co-cultured with plasmid DNA containing *cry1Ac1* (1,865bp) under the ribulose biphosphate carboxylase oxygenase (*rbcS*) promoter and the *bar* genes under the cauliflower mosaic virus (CaMV 35S) promoter. And we selected two primer sets (993bp and 427bp) for the molecular biological test. 35 plants of Gama, 16 plants of Gumsu, 50 plants of Baekhwa, 4 plants of Juwang, 16 plants of Taeyang, 9 plants of Garcia, 2 plants of KingFisher, and 3 plants of SR contained the insect resistant transgene were regenerated. These insect resistant transformants were required the molecular biological test and the progeny test.

Key words : Insect resistance, chrysanthemum, transformation, molecular biological test

1. 연구목표

국화의 품종 개발은 교배 및 돌연변이 육종(Broertjes와 Lock 1985)으로 이루어져 왔으나, 교배 성공률이 낮고(Wolff 등 1993) 자가 불화합성이어서 교배 육종이 효과적이지 못하여 외래 유전자를 식물체내로 도입하는 분자육종 방법이 제시되고 있다.

최근 생명공학의 발달로 식물체 형질전환용 운반체가 개발됨으로써 외부 유용유전자를 이종숙간의 식물체로 도입 발현시킴으로써 새로운 유전인자가 도입된 형질전환 식물체를 육성할 수 있게 되었다(An 1987; Hibi 1994). 외래 유전자를 식물세포내로 도입한 형질전환 식물을 얻는 기술은 Herrera-Estrella 등(1983)에 의하여 담배에서 처음으로 완성되었다. Agrobacterium을 이용한 형질전환 기술은 agrobacterium이 식물의 상처 부위를 통해 DNA 일부(T-DNA)를 기주 식물의 핵내 DNA에 삽입함으로써 외래 유전자가 안정적으로 도입되는 장점이 있다(Hiei 등 1997).

따라서 본 시험은 형질전환 기술에 의해 얻어진 밤나방과해충 저항성 국화의 분자생물학적 검정으로 해충저항성 국화를 품종 등록하고자 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시험품종

본 실험에 사용된 국화는 가마, 금수, 백화, 주왕, 태양, Garcia, KingFisher 및 SR 8품종을 원예연구소에서 분양받아 조직배양 및 형질전환 재료로 사용하였다.

나. 형질전환용 binary vector 제작

살충성 유전자인 *cry IAc* 유전자는 농업생명공학연구원에서, pMJU벡터를 명지대에서 분양받아 pMJRTB벡터를 제작하였다. pMJRTB벡터는 HB101벡터와 같은 helper 플라스미드와 함께 tri parental mating(TPM)을 하는 벡터로 사용하였다.

다. 균주 및 배양

국화 형질전환을 위한 agrobacterium 균주는 LBA4404를 농업생명공학연구원에서 분양받아 사용하였다. 배양된 균주의 콜로니는 spectinomycin 50mg/L 첨가된 액체 YEP (10mg/L peptone, 10g/L yeast extract, 5g/L NaCl)배지에 3ml 접종하여 28°C에서 250rpm으로 2일간 진탕 배양하였다.

라. 아그로박테리움 접종 및 박멸

3일동안 전배양된 엽절편체의 아그로박테리움 접종은 O.D. 값이 0.8이 되는 agrobacterium 배양액 25ml와 MS 액체배지로 혼합하여 총 25ml당 엽절편체 25개를 배양액에 섞은 후 28°C에서 30분 동안 75rpm으로 진탕 배양하였다. 접종된 엽절편체는 멸균된 filter paper에서 엽절편체에 남아있는

배양액을 제거시킨 후 MS배지(agar 0.8%, sucrose 2% pH 5.7)에 치상하여 3일 동안 암상태에서 공동배양하였다. 공동 배양 후 agrobacterium을 제거하기 위하여 250mg/L cefotaxime이 첨가된 MS 액체배지에 5회 세척후 선발배지에 치상한후 16/8시간 명기/암기 주기로 조절되고 25℃를 유지하는 조건에서 배양하였다.

마. 형질전환체 기내선발

선발배지에 치상한후 30일 부터 재분화된 식물체를 채취하여 동일한 선발배지에 기내 삽목하여 14일간 관찰한후 생존 개체만 선발하였다. 1차 선발된 식물체는 선발마커의 2배의 농도가 첨가된 마커선발 배지에 다시 기내 삽목하여 14일간 관찰한후 생존 개체만 선발하였다. 2차선발된 식물체는 2차 선발배지에 다시 기내 삽목하여 14일간 관찰한후 생존 개체만 선발하였다. 선발배지는 MS 기본배지(agar 0.8%, sucrose 2% pH 5.7)와 PPT 0.5mg/L이 첨가된 배지에 NAA 1.0mg/L + BA 1.0mg/L을 처리한 배지에 국화 엽절편체를 치상하였고 28℃에서 16시간 명배양하고 30일간 배양한 후에 재분화율을 조사하였다.

바. PCR(polymerase chain reaction) 검정

시료조제는 PCR pre mix(코아 바이오텍) 4ul, *cryIAC1* 유전자 내의 1.6kbp 크기의 프라이머를 디자인한 sense primer 20pM, antisense primer 20pM, 국화 대조구를 포함한 형질전환체 어린 엽은 바이오니아(K3030) 키트에서 추출된 genomic DNA template 약 20ng을 넣고 ddH₂O로 전체 볼륨을 20ul으로 적정한 후 spin down을 실시하여 PCR reaction을 시켰다. PCR(MJ research사) 프로그램은 94℃에서 5min 동안 pre denaturation, 94℃에서 1min동안 denaturation, 49℃에서 1.5min동안 시킨후 primer annealing, 72℃에서 2min동안 primer extension시킨후 primer annealing과 primer extension을 35회 반복으로 반응시켰으며, 마지막으로 72℃ 7min을 반응시킨후 4ul를 전기영동에 이용하였다. 1% agarose gel에 50×TAE stock buffer에서 0.5×TAE buffer 60ml을 조제한후 전자렌지에서 1min간 agarose를 녹인 다음 천천히 식혔다. DNA intercalating agent인 EtBr 301.6ug을 넣고 잘 섞어준 후 전기영동키트에서 gel을 조제하였다. 1kb ladder 마커와 함께 PCR산물 4ul를 loading한 후 100v에서 20분간 전기영동한 다음 이미지분석기를 통하여 band를 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

가. DNA 분석

밤나방과 해충에 대한 살충성 유전자인 *cryIAC1* 유전자를 국화 내로 도입하기 위하여 제작된 바이너리 벡터인 pMJU-RTB는 그림 1과 같다. pMJU 벡터에 *ClaI*과 *PstI* 제한효소로 잘려진 *rbcS* 프로모터 유전자를 1차 삽입 하였고 다시 *PstI* 제한효소로 잘려진 *cryIAC1* 유전자와 벡터를 ligation하여 내충성 유전자 식물 형질전환 벡터를 제작하였다.

pMJU-RTB 벡터는 transit peptide (TP)가 포함된 *cry1Ac1* 유전자가 발현하도록 프로모터는 식물 엽록체 발현 특이성이 있는 *rbcS* (ribulose biphosphate carboxylase oxygenase) 프로모터와 *pinII* 터미네이터 유전자와 형질전환 식물체를 선발하기 위하여 마커로 사용하는 제초제 저항성 *bar* 유전자를 발현하기 위하여 35S 프로모터와 *nos* 터미네이터 유전자로 구성되었다. 또한 식물 형질전환 효율을 증진시키기 위하여 RB (right border)와 LB (left border) 앞에 MAR (matrix attachment region) 유전자를 각각 삽입하였다.

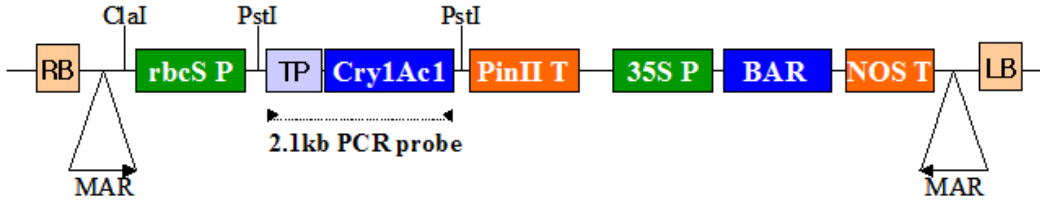


그림 1. 내충성 유전자 형질전환 벡터인 pMJU-RTB 제작

내충성 유전자인 *cry1Ac1* 유전자를 염기서열 분석한 결과 1,865bp로 구성되었음을 확인하였다(그림 2).

```

1 CCATGGACAA CAACCCAAAC ATCAACGAAT GCATTCCATA CAACTGCTTG AGTAACCCAG AAGTTGAAGT
71 ACTTGGTGGA GAACGCATTG AAACCGGTTA CACTCCATC GACATCTCT TGTCTTGAC ACAGTTTCTG
141 CTCAGCGAGT TCGTGCCAGG AGCTGGGTTT GTTCTCGGAC TAGTTGACAT CATCTGGGGT ATCTTTGGTC
211 CATCTCAATG GGATGCATTC CTGGTGCAAA TTGAGCAGTT GATCAACCAG AGGATCGAAG AGTTCGCCAG
281 GAACCAGGCC ATCTCTCGTT TGAAGGATT GAGCAATCTC TACCAAATCT ATGCAGAGAG CTTCAGAGAG
351 TGGGAAGCCG ATCCTACTAA CCCAGCTCTC CGCGAGGAAA TCGGTATTC AATCAACGAC ATGAACAGCG
421 CCTTGACCAC AGCTATCCCA TTGTTCCGAG TCCAGAACTA CCAAGTTCCT CTCTGTCCG TGTACGTTC
491 AGCAGTAAT CTTCACCTCA GCGTGCCTCG AGAGCTTAGC GTGTTTGGGC AAAGATGGGG ATTCGATGCT
561 GCAACCATCA ATAGCCGTTA CAACGACCTT ACTAGGCTGA TTGGAAACTA CACCGACTAC GCTGTTCTGTT
631 GGTACAACAC TGGCTTGGAG CGTGTCTGGG GTCCTGATTC TAGAGATTGG GTGAGATACA ACCAGTTCAG
701 GAGAGAATTG ACCCTCACAG TTTTGGACAT TGTGGCTCTC TTCCCGAACT ATGACTCCAG ACGTTACCCT
771 ATCCGTACAG TGTCCTCACT TACCAGAGAA ATCTACACTA ACCCAGTCTC TGAGAACTTC GACGGTAGCT
841 TCCGTGGTTC TGCCAGGGT ATCGAAAGAT CCATCAGGAG CCCACACTTG ATGGACATCT TGAACAGCAT
911 AACTATCTAC ACCGATGCTC ACAGAGGATA CTATTACTGG TCTGGACACC AGATCATGGC CTCTCCAGTT
981 GGATTCTCCG GACCTGAGTT TACCTTTCTC CTCTATGGAA CTATGGGAAA CGCCGCTCCA CAACAACGTA
1051 TCGTTGCTCA ACTAGGACAG GGTGTCTACA GAACCTTGT TCCACCTTG TACAGAAGAC CCTTCAATAT
1121 CGGTATCAAC AACCAGCAAC TTTCCGTTCT TGACGGAACA GAGTTCGCCT ATGGAACCTC TTCTAACTTG
1191 CCATCCGCTG TTTACAGAAA GAGCGGAACC GTTGATTCTT TGGACGAAAT CCCACCACAG AACAACAATG
12611 TGCCACCCAG GCAAGGATT CCCCACAGG TTAGCCACGT GTCCATGTT CCGTCCGAT TCAGCAACAG
331 TTCCGTGAGC ATCATCAGAG CTCTATGTT CTCTTGGATT CACCGTCTG CCGAGTTCAA CAACATCATC
1401 GCATCTGATA GTATTACTCA AATCCCTGCC GTGAAGGGAA ACTTCCTTTT CAATGGAAGC GTAATCAGCG
1471 GACCAGGATT CACTGGCGGA GATCTTGTGA GACTTAACAG CTCTGGCAAC AACATTGAGA ATAGAGGCTA
1541 CATCGAAGTT CCTATCCACT TCCCATCCAC ATCTACTAGA TACAGAGTTA GGGTTAGATA CGCCTCTGTG
1611 ACCCAATCC ACCTTAACGT GAACTGGGGC AATTCATCTA TCTTCTCAA CACCGTTCCA GCTACTGCTA
1681 CCTCACTCGA TAATCTCAA TCCAGCGATT TTGTTACTT CGAAAGTGCC AACGCATTCA CTTCTTCATT
1751 GGGCAACATC GTGGGTGTTA GGAATTTGAG CGGTACTGCA GGAGTGATCA TTGACAGATT CGAGTTCATT
1821 CCTGTTACTG CCACTCTTGA GGCTGAGTAC AATCTTTAAG GTACC 1865

```

그림 2. 내충성 유전자 염기서열 (sequencing) 분석

아그로박테리움 형질전환에 의해 획득한 국화 식물체에서 내충성 유전자가 삽입 되었는지 확인하기 위하여 *cry1Ac1* 유전자를 디자인한 결과 107번째 유전자에서 127번째 유전자까지의 21bp(5'-CATCGACATCTCCTTGTCCTT-3')를 sense primer 1로, 200번째 유전자에서 220번째 유전자까지의 20bp (5'-ATCTTTGGTCCATCTCA ATG-3')를 sense primer 2로, 607번째 유전자에서 626번째 유전자까지의 20bp (5'-A CTACACCGACTACGCTGTT-3')를 antisense primer 2로, 1,079번째 유전자에서 1,099번째 유전자까지의 21bp (5'-CAGAACCTTGCTTCCACCTT-3')를 anti sense primer 1로 명명하였으며 primer 1 (sense primer 1 + antisense primer 1)로 PCR 하였을 경우 유전자 산물의 크기는 993bp이며, primer 2 (sense primer 2 + antisense primer 2)로 PCR 하였을 경우 유전자 산물의 크기는 427bp가 되도록 primer를 2종 선발하였다.

나. 품종별 해충 저항성 형질전환체 선발

형질전환에 의한 해충 저항성 국화를 개발하기 위하여 *cry1Ac1* 유전자를 발현하는 pMJU-RTB 바이너리 벡터가 포함된 아그로박테리움 균주를 가마 등 8품종의 엽절편에 치상하여 형질전환하였다. 가마 품종에 대한 내충성 유전자 형질전환으로 재분화 개체를 획득하였다 (표 1). 2009년 3월 5일 등 7회에 걸쳐 1,061개의 엽절편체를 치상하여 총 35개의 재분화된 국화 식물체를 얻어 평균 3.3%의 재분화율을 보였다. 재분화율은 치상일이 늦을수록 높은 경향이였으며 특히 9월 21일 치상한 엽절편체에서 12개가 재분화하여 재분화율이 15%로 가장 높았다.

표 1. 가마 품종에 대한 내충성 형질전환체의 재분화

치상일	치상수	재분화수	재분화율
09. 3. 5	260	2	0.8
09. 5. 3	164	2	1.2
09. 5. 4	164	2	1.2
09. 6.20	259	3	1.2
09. 7.16	60	5	8.3
09. 8.31	74	9	12.2
09. 9.21	80	12	15.0
합계	1,061	35	3.3

금수 품종에 대한 내충성 유전자 형질전환으로 재분화 개체를 획득하였다 (표 2). 2009년 2월 12일 등 12회에 걸쳐 1,751개의 엽절편체를 치상하여 총 16개의 재분화된 국화 식물체를 얻어 평균 0.9%의 재분화율을 보였다. 특히 7월 20일 엽절편체를 치상한 처리구에서 재분화율이 5.0%로 가장 높았으나, 금수 품종은 가마 품종에 비해 낮은 재분화율을 보였다.

표 2. 금수 품종에 대한 내충성 형질전환체의 재분화

치상일	치상수	재분화수	재분화율
09. 2.12	108	1	0.9
09. 2.27	165	1	0.6
09. 3.12	363	2	0.6
09. 4.22	271	5	1.8
09. 5. 3	155	1	0.6
09. 5. 4	172	2	1.2
09. 6. 8	200	0	0
09. 7. 4	80	0	0
09. 7.20	40	2	5.0
09. 8.10	50	0	0
09. 8.24	76	2	2.6
09. 9. 7	71	0	0
합계	1,751	16	0.9

백화 품종에 대한 내충성 유전자 형질전환으로 재분화 개체를 획득하였다 (표 3). 2009년 4월 7일 등 13회에 걸쳐 1,856개의 엽절편체를 치상하여 총 50개의 재분화된 국화 식물체를 얻어 평균 2.7%의 재분화율을 보였다. 한편 7월 16일 이후에 치상한 처리구는 8.0% 이상의 재분화율을 보였으며, 특히 8월 31일 처리구에서 재분화율이 20.0%로 가장 높았다.

표 3. 백화 품종에 대한 내충성 형질전환체의 재분화

치상일	치상수	재분화수	재분화율
09. 4. 7	105	1	1.0
09. 4.17	110	0	0
09. 5.11	178	2	1.1
09. 5.12	195	2	1.0
09. 6.13	256	0	0
09. 6.20	252	0	0
09. 7. 4	250	0	0
09. 7. 9	148	0	0
09. 7.16	45	7	15.6
09. 7.20	103	9	8.7
09. 7.27	50	4	8.0
09. 8.24	74	7	9.5
09. 8.31	90	18	20.0
합계	1,856	50	2.7

주왕 품종에 대한 내충성 유전자 형질전환으로 재분화 개체를 획득하였다 (표 4). 2009년 3월 12일 등 7회에 걸쳐 834개의 엽절편체를 치상하여 총 4개의 재분화된 국화 식물체를 얻어 평균 0.5%의 재분화율을 보였다. 주왕 품종은 다른 처리구의 품종에 비해 재분화율이 다소 낮은 품종이며 5월 12일

치상하였을 때 재분화율이 1.1%로 치상일 중에서 가장 높았다.

표 4. 주왕 품종에 대한 내충성 형질전환체의 재분화

치상일	치상수	재분화수	재분화율
09. 3.12	140	1	0.7
09. 4.17	148	0	0
09. 5.11	130	1	0.8
09. 5.12	181	2	1.1
09. 8.10	81	0	0
09. 8.17	84	0	0
09.10. 5	70	0	0
합계	834	4	0.5

태양 품종에 대한 내충성 유전자 형질전환체로 재분화 개체를 획득하였다 (표 5). 2009년 2월 27일 등 7회에 걸쳐 824개의 엽절편체를 치상하여 총 16개의 재분화된 국화 식물체를 얻어 평균 1.9%의 재분화율을 보였다. 2월 27일에 치상한 경우에 1개, 8월 3일은 15개의 재분화 개체를 획득하여 각각 0.5와 21.7%의 재분화율을 보였고 6월 8일, 6월 20일, 8월 17일, 9월 7일과 10월 26일에 치상했을 때는 재분화 개체를 획득하지 못했다.

표 5. 태양 품종에 대한 내충성 형질전환체의 재분화

치상일	치상수	재분화수	재분화율
09. 2.27	198	1	0.5
09. 6. 8	147	0	0
09. 6.20	209	0	0
09. 8. 3	69	15	21.7
09. 8.17	60	0	0
09. 9. 7	64	0	0
09.10.26	77	0	0
합계	824	16	1.9

Garcia 품종에 대한 내충성 유전자 형질전환체로 재분화 개체를 획득하였다 (표 6). 2009년 2월 27일 등 4회에 걸쳐 847개의 엽절편체를 치상하여 총 9개의 재분화된 국화 식물체를 얻어 평균 1.1%의 재분화율을 보였다. 특히 4월 22일 치상한 경우에 1.7%의 재분화율로 치상일 중에서 가장 높았다.

표 6. Garcia 품종에 대한 내충성 형질전환체의 재분화

치상일	치상수	재분화수	재분화율
09. 2.27	220	2	0.9
09. 3. 5	187	1	0.5
09. 3.12	198	2	1.0
09. 4.22	242	4	1.7
합계	847	9	1.1

KingFisher 품종에 대한 내충성 유전자 형질전환으로 재분화 개체를 획득하였다(표 7). 2009년 2월 12일 등 3회에 걸쳐 466개의 엽절편체를 치상하여 총 2개의 재분화된 국화 식물체를 얻어 평균 0.4%의 재분화율을 보였다. KingFisher 품종은 SR 품종과 더불어 재분화율이 가장 낮은 품종이었다.

표 7. KingFisher 품종에 대한 내충성 형질전환체의 재분화

치상일	치상수	재분화수	재분화율
09. 2.12	120	1	0.8
09. 3. 5	147	1	0.7
09. 6.13	199	0	0
합계	466	2	0.4

SR 품종에 대한 내충성 유전자 형질전환으로 재분화 개체를 획득하였다 (표 8). 2009년 4월 7일 등 6회에 걸쳐 689개의 엽절편체를 치상하여 총 3개의 재분화된 국화 식물체를 얻어 평균 0.4%의 재분화율을 보였다. 재분화율은 4월 7일 치상시 1.3%, 7월 27일 치상시 2.9%를 보였으나 5월 22일, 5월 29일, 6월 26일, 7월 9일 치상하였을 경우 재분화 개체를 얻지 못하였으며, SR 품종은 KingFisher 품종과 더불어 재분화율이 가장 낮은 품종이었다.

표 8. SR 품종에 대한 내충성 형질전환체의 재분화

치상일	치상수	재분화수	재분화율
09. 4. 7	77	1	1.3
09. 5.22	209	0	0
09. 5.29	180	0	0
09. 6.26	58	0	0
09. 7. 9	95	0	0
09. 7.27	70	2	2.9
합계	689	3	0.4

외래 유전자를 식물세포내로 도입한 형질전환 식물을 얻는 기술은 Herrera-Estrella 등(1983)에 의하여 담배에서 시작하여 다양한 vector를 가진 *Agrobacterium tumefaciens*을 이용한 국화

(*Dendranthema grandiflora*) 'Golden Glory'의 형질전환(김 등 1998), tomato spotted wilt virus(TSWV) 저항성 국화(*Dendranthema grandiflora*) 'Polaris'의 형질전환(Sherman 1998), 벼의 chitinase 유전자를 이용한 국화 'Kitamura' 품종의 재빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*) 저항성 형질전환체를 생산하였고(Takatsu 1999), 제초제 저항성 유전자(Choi 등 1996)와 바이러스 저항성 유전자(Ishida 등 2002) 등 유용 유전자의 도입을 통한 신품종의 육성과 백신과 같은 산업용 의약품 생산(Haq 등 1995) 및 화색을 변경(김과 김, 1998)하는 등 다양한 분야의 연구가 활발하게 진행되었다. 식물체 내로 인공 합성한 Cry 유전자들을 발현시키기 위하여 내충성 토마토(최 등 1993), 배추좀나방 유충에 대한 살충력이 있는 배추(조 등 1997), 살충성 담배(이 등 1997), 밤나방과 해충 저항성 국화(소 등 2008)를 개발하였다.

따라서 개발된 밤나방과 해충에 저항성이 있는 국화 형질전환체에 대하여 삽입 유전자의 분자생물학적 검정에 필요한 프라이머를 2종 선발하였으며 가마 35개체, 금수 16개체, 백화 50개체, 주왕 4개체, 태양 16개체, Garcia 9개체, KingFisher 2개체와 SR 품종에서 3개체의 형질전환체를 획득하였다.

4. 적 요

본 시험은 형질전환 기술에 의해 얻어진 밤나방과해충 저항성 국화의 분자생물학적 검정으로 해충 저항성 국화를 개발하고자 삽입 유전자의 DNA 분석과 가마 등 8품종에 대한 형질전환을 수행하였으며 그 결과는 다음과 같다.

- 가. 국화 엽의 엽록체에 목표 유전자를 발현시키기 위하여 *rbcS* 프로모터와 살충성 유전자를 삽입하고, 형질전환체를 선발하기 위한 *bar* 단백질이 함께 발현하는 형질전환 벡터를 제작하였다. 목표유전자인 *cryIAC1*은 1,865bp로 구성되었고 분자생물학적 검정을 위한 primer 2종 (993bp와 427bp)을 선발하였음
- 나. 품종별 해충 저항성 유전자 형질전환한 결과 가마 품종은 1,061개 엽절편을 치상하여 35개체를, 금수 품종은 1,751개 엽절편을 치상하여 16개체를, 백화 품종은 1,856개 엽절편을 치상하여 50개체를, 주왕 품종은 834개 엽절편을 치상하여 4개체를, 태양 품종은 824개 엽절편을 치상하여 16개체를, Garcia 품종은 847개 엽절편을 치상하여 9개체를, KingFisher 품종은 466개 엽절편을 치상하여 2개체를, SR 품종은 689개 엽절편을 치상하여 3개체를 획득하였음 종합적으로 볼 때 해충 저항성 국화 형질전환 개체를 가마 등 8품종에서 획득하여 분자 육종에 의한 신품종 육성의 기틀을 제공하였고, 밤나방과 해충 저항성 유전자 (*cryIAC1*) 형질전환시 분자생물학적 검정용 primer를 2종 선발하였다.

5. 인용문헌

김미정, 김영희. 1998. 구절초와 감국의 신초 재분화와 flavonoid 3',5'-Hydroxylase 유전자의 형질전환. 한국원예학회지. 39:355-359.

- 김주영, 박선정, 김조영, 박선정, 엄보영, 정영수, 신정섭. 1998. 다양한 vector를 가진 *Agrobacterium tumefaciens*을 이용한 국화 형질전환. 한국원예학회지. 39:360-366.
- 소호섭, 한영희, 이지영, 임재욱. 2008. 국화 밤나방과해충 저항성 형질전환체 육성. 2007년도 시험연구보고서. 경기도농업기술원. IV. 환경농업연구 611-645.
- 이정민, 류중석, 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 cry II A의 배추로의 도입. 한국육종학회지. 29:92-102.
- 최성진, 김준철. 1993. 형질전환 토마토식물(*Lycopersicon esculentum*)의 자가수분후세대에서 살충성 유전자의 전달. 한국식물조직배양학회지. 20:321-327.
- An, G. 1987. Binary Ti vectors for plant transformation and promoter analysis. *Methods Enzymol.* 153:292-305.
- Broertjes, C. and C.A.M. Lock. 1985. Radiation-induced low-temperature tolerant solid mutants of *Chrysanthemum morifolium* Ram, *Euphytica.* 34:97-103.
- Choi, K.H., D.C. Yang, J.H. Jeon, H.S. Kim, Y.H. Joung and H. Joung. 1996. Expression of cold-regulated gene in transgenic *Solanum tuberosum* L. *Korean J. Plant Tissue Culture.* 23:311-315.
- Haq, T.A., H.S. Mason, J.D. Clements and C.J. Arntzen. 1995. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science.* 268:714-716
- Herrera-Estrella, L., M. Dipicker, M. VanMontagu and J. Schell. 1983. Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature.* 303:209-213.
- Hibi, N. 1994. Biochemical and molecular analysis of putrescine N-methyltransferase in plants. Doctorial Thesis. Kyoto university.
- Hiei, Y., T. Komari and T. Kubo. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 35:205-218.
- Ishida, I., M. Tukahara, M. Yoshioka, T. Ogawa, M. Kakitani and T. Toguri. 2002. Production of anti-virus, viroid plants by genetic manipulations. *Pest Manag. Sci.* 58:1132-1136.
- Sherman, JM. 1998. A Regeneration And *Agrobacterium*-Mediated Transformation System For Genetically Diverse *Chrysanthemum* Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science.* 123:189-194
- Takatsu, Y., Y. Nishizawa, T. Hibi and K. Akutsu. 1999. Transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Ramat. Kitamura) expressing a rice chitinase gene shows

enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Scientia Horticulturae*. 82:113-123

Wolff, K. and J. Peters-van Rijn. 1993. Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Tzvelov) using random primers. *Heredity*. 71:335-341.

6. 연구결과 활용제목

○ 해충저항성 국화 형질전환 및 분자생물학적 검정을 위한 primer 선발(기초활용)

7. 연구원 편성

세부과제	구분	소속	직급	성명	수행업무	참여년도
						'09
밤나방과 해충 저항성 국화의 분자생물학적 검정	책임자	농업기술원 환경농업연구과	농업연구사	소호섭	시험수행	○
	공동 연구자	"	농업연구관	한영희	자료분석	○
		"	농업연구사	이지영	분석조사	○
		"	농업연구관	김성기	결과검토	○