과제구분	기본연구	수행시기		전년	반기
연구과제 및 세부과제명		연구분야	수행 기간	연구실	책임자
색소합성유전자 현	형질전환에 의한 신품종육성	생명공학	'08~'09	농업기술원 환경농업연구과	한영희
국화 색소합성 유전자 형질전환체 육성		생명공학	'08~'09	농업기술원 환경농업연구과	한영희
색인용어	국화, 형질전환, 색소합성, B—peru유전자, Cpap1—D유전자				

ABSTRACT

These experiments were conducted to make vector by anthocyanin biosynthetic gene ligated B-peru and Cpap1D gene, and then to introduce anthocyanin biosynthetic gene in *Petunia hybrida* 17 varieties in 2008 and 13 varieties in 2009 by Agrobacterium mediated. The vector were made *Agrobacterium* C58C1 containing the binary vector pB7WG2D carrying B-peru and Cpap1D gene. Pigment was revealed that the binary vetor(B-peru and Cpap1D/pB7WG2D) was infiltered into leaf. The shoot regeneration percent was 1.2~46.4% from 8,389 leaf discs of 17 varieties in 2008 and 1.7~9.8% from 6,192 leaf discs of 17 varieties in 2009 by cocultivation with *Agrobacterium* suspension cultured on MS medium. The plant regeneration from shoots obtained 253 plants of 4 varieties in 2008 and 850 plants of 5 varieties in 2009. But these were not confirmed transformants by PCR and strip bar test and were blighted by sprayed phospinothricin in greenhouse.

Key words: Chrysanthemum, Transformation, Anthocyanin biosynthetic gene, B-peru and Cpap1-D gene.

1. 연구목표

국화는 세계적 뿐만 아니라 우리나라에서 절화 및 분화작물로서 많이 재배되는 중요한 작물이다. 품종육성은 병해충 저항성 등 도 있지만 주로 화색을 중심으로 이루어져 왔다. 기존 육종방법에 의해 품종을 육성해 왔으나, 최근 들어 기존의 육종방법의 한계를 넘은 새로운 품종을 육성하는 유전공학적 방법이 시도 되고 있다.

페튜니아(Meyer 등 1987, Kim 1998), 거베라(Kim 1998), Nicotiana, 장미, 국화(Dolgov 등 1997), 카이네이션(Florigene 2003)에서 꽃색을 변화시킨 형질전환체를 성공했으며 그중 Florigene 회사에서 카이네이션, 장미 등을 상품화시켰다.

식물체에서 색에 관여하는 색소는 플라보노이드, 카로티노이드, 베타라인이 있으며, 이중 Flavonoid 는 유관속식물의 액포에 축적되는 2차 대사물질로서 chalcone, flavonone, flavonone, anthocyanin 등으로 이루어져 있으며 특히 anthocyanin에 의해 색깔 결정에 영향을 미치게 된다 (Kim 1999, Kevin 등 1997, Park 등 2002, 林雅亭과 黃鵬林 2000).

색소합성 유전자인 MYB전사요인들은 옥수수 종자에서 발현 유도(Cone과 Burr 1989), 사과에서 유전자 분리 및 동정하였고(Ban et al), 우리나라에서는 담배와 배추에 MYB전사 유전자를 삽입하여 식물체에 안토시아닌의 발현을 확인하였다.

따라서 본 연구는 B-peru유전자와 Cpap1-D유전자을 합성시킨 색소합성유전자가 삽입된 *Agrobacterium* 균주를 이용하여 국화 품종의 절편체를 형질전환시켜 특성검정을 통해 신품종을 육성하고자 수행하였다.

2. 재료 및 방법

1) 시험재료

시험품종은 2008년 금수 등 17 품종, 2009년 가마 등 13 품종을 기내 배양된 식물체를 시험재료로 사용하였다. 절편체는 잎 (사방 0.5mm)을 NAA 1.0 mg/L, BA 0.2mg/L, Sucrose 2g/L를 첨가한 MS배지에 치상하여 7일간 암 배양한 후에 2,000lx에 16시간 명배양 하였다.

2) 벡터제작, 균주 및 배양

색소합성유전자인 B-peru유전자, Cpap1D유전자와 pB7WG2D벡터를 국립농업과학원 기능성물질개 발과에서 분양받아 2단계에 걸쳐 삽입시켜 B-peru+Cpap1D/pB7WG2D 바이너리 벡터를 제작한 후 Agrobactrium균주인 C58C1에 삽입 제작하였다. 배양된 균주의 콜로니는 spectinomycin 50mg/L과 rifampicin 50mg/L가 첨가된 LB배지에 3ml를 접종하여 28℃에 250rpm에서 3일간 진탕배양 하여 증식한 후 안토시아닌 색소 합성유전자가 발현 여부를 확인하기 위해 유전자 기능 검정을 하였다.

3) 형질전환

Agrobacterium 균주를 spectinomycin 50mg/L과 rifampicin 50mg/L가 첨가한 LB배지에 접종하

여 28°C에 250rpm에 3일간 진탕 인큐베이터에서 배양하여 이용하였다($OD_{540} = 0.7 \sim 1.0$ 범위). Agrobacterium 군주 접종은 1주일간 암배양시켜 캘루스가 형성된 잎 절편체를 균 넣은 페트리디쉬에 20분간 담가 서서히 흔들어 주었다. 그런 후 절편체를 $2 \sim 5$ 분간 건조시킨 다음에 NAA 1.0mg/L, BA 0.2mg, Sucrose 2g/L가 첨가된 MS배지에 치상하여 28°C에 암 배양 3일 동안 공동배양 후 절편체를 cefotaxin 200mg/L 넣은 코니칼 튜브에 5분 정도 담가 서서히 흔들어 균을 박멸시킨 다음 절편체를 여과지 위에 놓아 $3 \sim 5$ 분 정도 건조시킨 후에 phosphinothricin 1.0mg/L첨가된 앞에서 언급된 동일 MS배지에 치상하여 25 ± 2 °C에 2,000lx 16시간에서 4주간 3회 배양을 하였다.

4) 형질전환체 확인 및 검정

(1) PCR분석

Genomic DNA는 형질전환과 비형질전환체의 기내 식물체로부터 분리 하였다. B-peru유전자와 Cpap1D유전자의 프라이머는 각각 증폭하였고 PCR mixture는 1 unit의 taq ploymerase, 2.5mM dNTP mixture, 20pM primer, 20ng 추출된 DNA를 포함 하였다. PCR 조건은 94℃에 1분, 4분, 49℃에 1.5분 72℃에 1분으로 구성하여 45회를 하였다. 증폭된 DNA는 1% agarose gel에서 전기영동하여 이미지분석기를 통해 형질전환 여부를 확인하였다.

(2) Strip bar 검정

기내 또는 온실에 순화된 식물체를 에펜도르프튜브에 채취하여 같아서 액을 만들어 PAT(Phosphinothricin)acetyl transferase가 발현되는 strip bar를 식물체즙액에 담가 물올림 시켜 형질 전환체를 확인하였다.

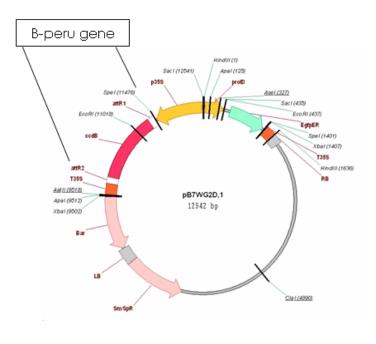
(3) 바스타 살포에 의한 형질전환 확인

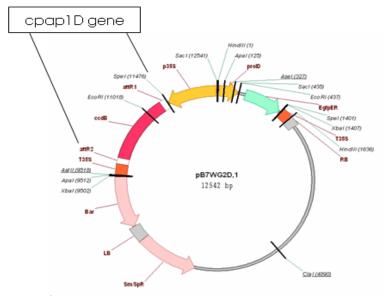
색소합성유전자의 삽입이 추측되는 개체를 원예용 범용상토인 바로커 ((주) 서울 농자재)가 들어있는 108공 플러그 묘판에 순화시킨 후 Phosphinothricin 3mg/L을 살포하여 생존개체수를 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 색소합성유전자 클로닝 및 유전자 기능 검정

B-peru유전자와 cpap1D유전자를 pB7WG2D운반체에 그림1에서 보는 바와 같이 cloning 하였다. 1 단계로 B-peru/pB7WG2D을 *HindIII*로 하여 -rol-GFP-T35S의 영역이 절단되어 CIP처리와 elution 하였고, 2단계로 cpap1D/pB7WG2D를 이용하여 양쪽 끝에 *HindIII* site를 넣어 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 P35S-cpap1D-T35S의 산물이 증폭되어 *HindIII*를 처리한 후 elution시켰다. B-peru유전자 산물과 cpap1D유전자의 산물을 ligation후 선발하였다.





					HindIII			Hir	dIII	
LB	nosT	BAR	P35S	P35S	B-peru	T35S	P35S	Cpap1-D	T35S	RB

그림 1. 색소합성유전자의 클로닝 및 map (B-peru+cpap1D/pB7WG2D)

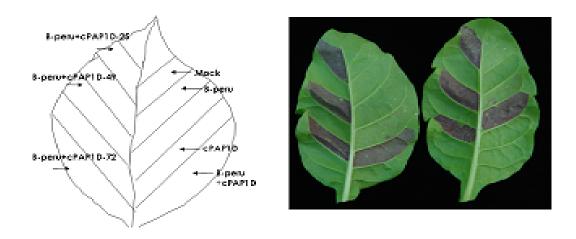


그림 2. B-peru+cpap1D/pB7WG2D의 agroinfilteration을 이용한 유전자 기능 검정

그림1에서 제작된 B-peru+cpap1D/pB7WG2D의 유전자를 그림2에서 보는 바와 같이 엽에 infilteration시킨 결과 B-peru+cpap1D유전자 모두 색소가 발현됨을 확인하였지만 B-peru유전자, cpap1D유전자 단독은 색소가 발현되지 않았다.

나. 식물체 형질전환 및 형질전환체 확인

국화 품종별 치상수 및 기내 형질전환 선발율은 표1과 표2에서 보는바와 같다. '08년에 국화 17품종 8,389개의 엽절편체를 유전자 접종한 결과 11품종에 1,156개의 식물체가 재분화되었으며 재분화율은 1.2~46.4%이었다. '09년에는 '08년도에 재분화가 잘되지않는 품종을 제외하고 또한 유색계통을 추가하여 국화 13품종에 6,192개의 엽절편체를 접종한 결과 주왕 등 6개 품종에서 314개가 식물체로 재분화되었으며, 재분화율은 1.7~9.8%이였다.

표 1. '08년 품종별 치상수 및 기내 선발율

품 종	치상수	재분화 절편수	재분화수	절편체당 재분화수	기내선발율
고 동	872	24	39	1.6	4.5
함 백	781	74	160	2.1	20.4
설 악	402	4	6	1.5	1.5
백 운	686	32	50	1.6	7.3
주 왕	572	104	200	1.9	35.0
백 화	900	188	418	2.2	46.4
수 리	247	5	6	1.2	2.4
금 수	483	89	138	1.5	28.6
킹피셔	486	5	6	1.2	1.2
태 양	296	0	0	0	0
반 야	168	0	0	0	0
이노센스	836	10	19	1.9	2.2
핌피아	287	57	114	2.0	40.0
기 백	329	0	0	0	0
도드람	510	0	0	0	0
황 매	298	0	0	0	0
가르시아	236	0	0	0	0
17품종	8,389	592	1,156	_	_

표 2. '09년 품종별 치상수 및 기내 선발율

품 중	치상수	재분화 절편수	재분화수	절편체당 재분화수	기내선발율
가 마	569	27	27	1.0	4.7
금 수	840	26	38	1.5	4.5
백 화	1,616	122	159	1.3	9.8
설 악	219	0	0	0	0
주 왕	742	47	65	1.4	8.8
천왕	175	0	0	0	0
태양	312	8	11	1.4	3.5
유로옐로	80	0	0	0	0
가르시아	430	0	0	0	0
킹피셔	268	0	0	0	0
샤론	805	14	14	1.0	1.7
베스비오	68	0	0	0	0
요코오노	68	0	0	0	0
13품종	6,192	244	314	_	_

'08년와 '09년에 기내에서 얻은 재분화된 식물체를 증식배지에 옮겨 얻은 형질전환체는 표3과 표4와 같다. '08년에 6품종 277개의 재분화된 식물체를 치상하여 547개체의 형질전환체를 얻었지만 그중식물체는 주왕 등 4품종에서 253개체를 얻었고 나머지는 고사되었으며, 또한 '09년에도 5품종의 409개의 재분화된 식물체를 치상하여 1,162개체의 형질전환체를 얻었지만 그중 식물체는 850개체를 얻었고 나머지는 고사되었다(그림3).

표 3. '08년 품종별 형질전환체 증식

품 종	재분화			형질전환체 증식		
在 💍	식물체	식물체수	계	고시주	식물체	
함백	7	1.0	7	7	0	
주왕	52	3.6	189	120	69	
백화-	74	2.2	165	81	84	
수리	1	1.0	1	1	0	
금수	22	2.3	50	26	24	
핌피아	121	1.1	135	59	76	
계	277	_	547	294	253	

그러므로 품종에 따라 기내 선발율이 많은 차이를 보였으며, 이는 Seiichi 등(1995)이 genotype에 의해 식물체 재분화율이 상당히 영향을 미친다고 보고된 것과 같은 경향을 보였다.

표 4. '09년 품종별 형질전환체 증식

エス	재분화	재분화 계통당		형질전환체 증식				
품 종	식물체	식물체수	계	과주	식물체			
금수	22	2.3	68	26	42			
핌피아	121	1.1	218	59	159			
백화	169	2.2	561	81	480			
천왕	22	2.3	50	26	24			
주왕	75	3.6	265	120	145			
계	409	_	1,162	312	850			

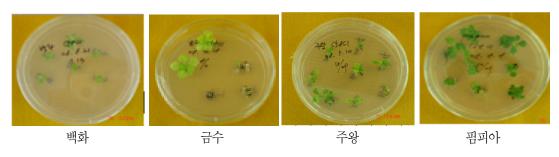
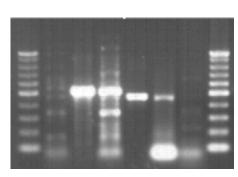


그림 3. C58C1 유전자 접종후 선발된 기내 식물체

기내 형질전환체의 형질전환 여부를 확인코자 두 유전자에 대한 PCR검정을 그림4와 같이 확인한 결과 형질전환 됨을 확인하였다.



1 lane: 100bp ladder

2 lane : Control(핌피아 모주)

3 lane : B-peru 유전자

4. lane : 핌피아 형질전환체

5 lane : Cpap1-D 유전자

6. lane : 펌피아 형질전환체

7 lane : Control(핌피아 모주)

8 lane: 100bp ladder

그림4. PCR검정에 의한 국화 형질전환체(핌피아 15-1(08.4.11접종)) 확인

그렇지만 Strip-bar 검정은 5품종 89개체를 하였으나 모두 bar유전자 밴드가 나타나지 않았다(표5와 그림5).

표 5. 품종별 Strip-bar 검정

품 종	계통수(개)	개체수 (개)	유무
금수	10	11	무
핌피아	39	40	무
백화	16	16	무
샤론	5	5	무
주왕	14	17	무
계	84	89	-

 $1\ 2\ 3\ 4\ 5\ 6\ 7\ 8\ 9\ 10\ 11\ 12\ 13\ 14\ 15\ 16\ 17\ 18\ 19\ 20\ 21\ 22\ 23\ 24\ 25\ 26\ 27\ 28\ 29\ 30\ 31\ 32\ 33$ **※** 품종 : 금수(1~5), 핌피아(7~8), 주왕(8~17), 백화(18~33)

그림 5. 품종별 Immuno strip-bar 검정

또한 기내 형질전환체를 온실에서 순화시킨 5품종 662개체의 식물체에 phosphinothricin을 살포하 였으나 모두 고사되어 형질전환 개체를 얻지 못하였다(표6과 그림6).

표 6. 품종별 Phosphinothricin(PPT) 처리후 생존율

품 종	계통수(개)	개체수 (개)	생존율
금수	16	33	0
핌피아	101	127	0
백화	158	384	0
천왕	1	2	0
주왕	71	116	0
계	347	662	0



살포전



살포후

그림 6. Phosphinothricin(PPT)살포에 의한 형질전환체 확인

Posphinothricin가 첨가된 배지에서 선발하여 배양하였음에도 재분화된 식물체가 형질전환되지 않 은 것은 식물체 재분화에 이용된 엽절편체로 부터 식물체로 분화되는 동안 phosphinothricin 내성을 지닌 세포에서 생성하는 식물호르몬의 양으로 인접해 있는 정상세포 즉 형질전환 되지 않은 세포가 생육할 수 있다는 보고(Scoristan 과 Melcher 1987, 정 등 1992, Aeom et al. 1996)와 유사한 현상 이 본 실험에서도 나타난 것으로 판단된다. 따라서 형질전환 작물에 대한 생리적, 배수성 등 유전적인 작용에 대한 보다 연구가 필요할 것으로 생각된다.

4. 적 요

색소합성유전자인 B-peru 유전자와 Cpap1D유전자의 벡터를 제작하여 2008년 금수 등 17품종, 2009년 가마 등 13품종을 색소합성유전자가 삽입된 아그로박테리움에 형질전환 시킨 결과는 아래와 같다.

- 가. C58C1유전자는 B-peru 유전자와 cpap1D유전자를 pB7WG2D 운반체에 클로닝하여 C58C1 아그로박테리움에 삽입하여 제작하였다.
- 나. B-peru + cpap1D/pB7WG2D 운반체를 agro-infilteration을 이용하여 유전자 기능을 검정한 결과 안토시아닌 색소가 발현되었다.
- 다. '08년에 17품종의 8,389개 잎절편체를 유전자 접종한 결과 백화 등 11품종에서 1,156개가 식물체로 재분화되어 재분화율은 1.2~46.4%이었으며, '09년 13품종 6,192개 잎절편체를 접종한 결과 백화 등 6개 품종에서 314개가 식물체로 재분화 되어 재분화율은 1.7~9.8% 이었다.
- 라. 기내 형질전환체는 '08년에 주왕 등 7품종에서 얻었으나 선발중 고사되고 주왕 69개체 등 4품 종 253개체를 얻었으며, '09년에는 백화 480개체 등 5품종 모두에서 850개체를 얻었다.
- 마. 기내 형질전환체를 Strip-bar 검정과 온실에서 순화시킨 형질전환체를 phosphinothricin 살포 처리하였으나 형질전환체를 얻지 못하였다.

5. 인용문헌

Aeom S. I., S. K. Park, Y. P. Lim, C. H. Lee, H. J. Kim, H. R. Kim and H. Y. Lee. 1996 Devlopment of bialaphos—resistant Petunia hybrida by introduction of the bar gene using Agrobacterium tumefaciens. Kor J. Plant Tiss. Cult. 23:177~181.

Ban Y, C. Honda, Y. Hatsuyama, M. Igarashi, H. Bessho and T. Moriguchi. 2007. Isolation and functional Analysis of a MYB Transcription factor gene that is a key regulator for the development of red coloration in apple skin. Plant Cell Physiol.48(7): 958–970.

Brugliera F., D. Tull, T.A. Holton, M. Karan, N. Treloar, K. Simpson, J. Skurozynska, J.G. Nason. 2000. Introduction of cytochrome b5 enhances the activity of flavonoid 3'5'(cytochrome P450) in transgenic canation. 6th International Congress pf Plant Molecular Biology. U. of Laval, Quebec. pp6-8.

Davies K., S. Bloor, G. Spiller. 1998. Production of yellow colour in flower: redirection of flavonoid biosynthesis in Petunia. Plant J. 13:259~266.

Dolgov, S. V., T. Y. Mitiouchkina and K. G. Skryabin. 1997. Agrobacterial Transformation of Chrysanthemum. Hort. Biotech. In Vitro Cult. and Breeding (Eds. A. A. Itman, M. Ziv). Acta Hort. 447, ISHS. 329~334.

Han, B. H., B. W. Yae, S. Y. Yi, S. Y. Lee and H. K. Shin. 2003. Introduction of LEAFY

Gene to Chrysanthemum(Dendranthemax grandiflorum (Ramat.) Kitamura) 'Shuho-no-chikara' Mediated by Agrobacterium LBA4404. Kor. J. Plant Biotechnol., 30(4), 335~339.

Http://www. florigene. com./Web/ florigenecomau/ 2003-03-25.

Johnson, E. T., H. Yi, B. Shin, B. J. Oh, H. Cheong and G. Choi. 1999. Cymbidium hybrida Dihydroflavonol 4-reductase does not Efficiently Reduce Dihydrokaempferol to Produce Orange Pelargonidin—Type Anthocyanins, (In Abstract). Plant J. 19(1) 81-85.

Johnson, E. T., S. Ryu, H. Yi, B. Shin, H. Cheong and G. Choi. 2001. Alteration of a Single Amino Acid Changes The Substrate Specificity of Dihydroflavonol 4—reductase(In Abstract). Plant J. 25(3) 323~333.

Kevin M, Davies and K. E. Schwinn. 1997. Flower Colour. CAB International Biotechnology of Ornamental Plants (eds. R.L. Geneve, J.E. Preece and S.A. Merkle). pp259-294.

Kim, J. H.. 1999. The Nature of Flower Colour. Jinsol limited.

Kim, J. Y., S. J. Park, B. Y. Um, C. H. Pak, Y. S. Chung and J. S. Shin. 1998. Transformation of Chrysanthemum by Agrobacterium tumefaciens with Three Different Types of Vectors. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 39(3) 360~366.

Kim, Y. H.. 1998. Analysis of Flavonoid 3',5'-Hydroxylase Gene in Transgenic Petunia(Petunia hybrida) Plants. Kor. J. Plant Tissue Culture, 25(5) 323~327.

Kim, Y. H.. 1998. Agrobacterium tumefaciens—mediated Transfer of Flavonoid 3',5'—Hydroxylase Gene into Gerbera hybrida. Kor. J. of Breeding, 30(4) 325~330.

Koers R., N.DeVetten, J. Mol. 2000. Cytochrome b5 from Petunia PCR-interational Patent Application No. WO 00/09720.

Meyer, P., I. Heidmann, G. Forkmann and H. Saedler. 1987 A new Petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. Nature 330 667~678.

Mitiouchkina, T. Y. and S. V. Dolgov. 2000. Modification of Chrysanthemum Plant and Flower Architecture By rolC Gene From Agrobacterium rhizogens Introduction. Proc. 19th Int'l Symposium Improvement Ornamental Plants(Ed. A. Cadic). Acta Hort. 508. ISHS. 163~169.

Park, J. S., J.B. Kim, K. H. Kim, S. H. Ha, B. S. Han and Y. H. Kim, 2002. Flavonoid Biosynthesis: Biochemistry and metabolic Engineering. Kor. J. Plant Biotechnology 29(4) 265~275.

Seiichi, F., J. de Jong and W. Rademaker. 1995. Efficient Genetic Transformation of Chrysanthemum (Dendranthema grandiflorum (Ramat.) Kitamura) Using Stem Segments. Breeding Science 45(2) 179~184.

Socristan M. D. and G. Melchers. 1987. Regenration of plant from habituated and Agrobacterium transformed single-cell clones of tabacco. Mol. Gen. Genet 152:111~117.

林雅亭, 黃鵬林. 2000. 花色基因轉殖的 發展與應用. 臺灣花卉園藝. 42~45.

한영희, 소호섭, 이지영, 박경열, 임재욱, 박영두, 박종석. 2007. 국화 화색유전자 형질전환. 경기도 농업기술원 보고서. 594~610.

6. 연구결과 활용제목

국화 색소의 형질전환에 대한 기초자료 활용

7. 연구원 편성

계변하게	세부과제 구분		직급	성명	수행업무	참여	년도
세구좌세	↑℃	소속	역비	78.6	下% 11十	'08	'09
국화 색소합성 유전자 형질	책임자	농업기술원 환경농업연구과	농업연구관	한영희	세부과제총괄	0	0
전환체 육성	공동연구자	"	농업연구사	소호섭	과제수행	0	0
		농촌진흥청	<i>"</i>	임선형	유전자제공	0	0
		농업기술원	농업연구관	김성기	결과검토	_	0
		농업기술원	농업연구관	임재욱	결과검토	0	_