

Agrobacterium LBA4404에 의한 국화 'Shuho-no-chikara'에 LEAFY 유전자의 도입

한봉희^{1*}, 예병우³, 이숙이¹, 이수영¹, 신학기²

¹원예연구소 원예생명공학과, ²원예연구소 초분화학과, ³농촌진흥청 연구관리과

Introduction of *LEAFY* Gene to *Chrysanthemum (Dendranthema x grandiflorum (Ramat.) Kitamura)* 'Shuho-no-chikara' Mediated by *Agrobacterium* LBA4404

Bong-Hee Han^{*}, Byeoung-Woo Yae³, Sook-Yi Yi¹, Soo-Young Lee¹, Hack-Kee Shin²

¹Horticulture Biotechnology Division, National Horticulture Research Institute, RDA, Suwon 440-310, Korea

²Herbaceous and Bulbous Crops Floriculture Division, National Horticulture Research Institute, RDA, Suwon 440-310, Korea

³Research Planning Division, RDA, Suwon 441-707, Korea

ABSTRACT Several experiments were carried out to transfer *LEAFY* gene to *Dendranthema grandiflora* 'Shuho-no-chikara' by *Agrobacterium* LBA4404 carrying pSK109 encoding *LEAFY* gene. Kanamycin 10 mg/L was used in first selection medium, and 20 mg/L in the second one. Co-culture for 3 days was more effective in increasing transformation efficiency than that for 7 days. The transformation efficiency by *Agrobacterium* LBA4404 carrying pSK109 encoding *LEAFY* gene was about 2.8% until the second selection, but only 0.13% of shoots (two plants) was confirmed as a transgenic plants in Southern analysis. The escape of putative transformants was occurred seriously in the process of selections, PCR analysis for confirming of neomycin phosphotransferase II (*npt II*), and Southern analysis for *LEAFY* gene. One transgenic plant appeared 7 days' early flowering in field.

Key words: Co-culture, kanamycin, selection

서 론

국화 (*Dendranthema grandiflora*)는 세계의 화훼시장에서 가장 중요한 화훼작물의 하나로 절화 및 분화로 판매되고 있다. 국화의 육종은 화색, 꽃의 형태나 크기, 재배환경에 대한 반응 및 양질에 대한 형질을 증진시키는 데 초점을 맞추어 왔다 (Broertjes et al. 1980). 전통적인 육종방법에 의하여 많은 우수한 특성들이 유기되었지만 전통적인 육종방법은 많은 제한을 가지고 있다. 첫째 gene pool이 한정되어 있고, 둘째 원연간의 교잡에서는 불화합성이나 배수성의 차이로 교배에 제한을 받

는다. 셋째 균일한 생육이나 개화는 다수의 gene에 의하여 영향을 받는다. 그래서 교배육종은 식물의 생육이나 발육에 관여하는 섬세한 균형요소들을 변화시킨다 (Mol et al. 1989). 따라서 이에 대한 대안으로 기존의 다른 형질은 변화시키지 않고 원하는 특성만 변화시키는 방법으로 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 방법이 사용되고 있다 (Hutchinson et al. 1989; Lu et al. 1989; van Wordragen et al, 1989). Firoozabady 등 (1991)은 *petunia*의 *chalcone synthase* 유전자를 국화에 형질전환을 하여 화색을 변화시켰으며, 최근 Takatsu 등 (1999)은 벼의 *chitinase* 유전자를 국화에 형질전환하여 gray mold에 저항성을 증진시켰다고 보고하였다. 국화에서 작기는 개화까지의 기간에 의하여 좌우되며 네덜란드에서는 연 3.5~4기작을 하고 있으나 국내에서는 소규모 재배, 종묘의 번식, 하계고온과 동

*Corresponding author Tel 031-290-6136 Fax 031-290-6100
E-mail bhhan@rda.go.kr

제저온 등 환경 및 재배요인으로 약 2기작을 하고 있는 실정이다. 따라서 본 실험은 개화조절 유전자 인 *APETALA1*과 연관되어 화아발육을 촉진하여 식물체에서 조기개화 특성을 나타내는 *LEAFY* 유전자 (Weigel et al. 1992)를 *Agrobacterium*을 이용하여 국화에 도입하여 조기개화 특성을 나타내는 계통을 육성하고자 실시하였다.

재료 및 방법

식물체 재료 및 신초 재분화

식물체 재료는 재분화율이 높은 국화 'Shuho-no-chikara'의 엽절편을 형질전환 재료로 사용하였다. MS 기본배지 (Murashige and Skoog 1962)에서 6주간 생육한 모식물체 신초의 제 2~3엽을 채취하였으며, 잎을 엽맥을 중심으로 5 mm 정도의 사각으로 잘라 *Agrobacterium*을 접종하였다. 엽절편에서 신초의 재분화는 MS 기본배지에 sucrose 30 g/L, BA 1.0 mg/L 및 NAA 0.1 mg/L가 첨가된 배지를 사용하였다.

배양 절편체의 kanamycin 저항성 검정

형질전환에 사용할 식물체의 적정 kanamycin 선발농도를 조사하고자 재분화 배지에 kanamycin을 0.0~30.0 mg/L까지 첨가하여 실험하였다. 엽절편을 5 mm 정도의 사각으로 절단하여 10절편체/plate를 배양하였다. 반복은 10개의 절편체가 배양된 plate 8개로 8반복하였으며, 배양 6주 후에 절편체의 생존율, 재분화율 등을 조사하였다. 배양은 온도 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 조절되는 배양실에서 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 로 조명하면서 배양하였다.

형질전환

형질전환을 위하여 *Agrobacterium strain* LBA4404를 사용하였으며 LBA4404는 *LEAFY* 유전자 (Weigel et al. 1992)가 삽입된 pSK109 벡터를 포함하고 있었다 (Figure 1). Kanamycin 50 mg/L와 rifampicin 100 mg/L가 첨가된 YEP 고체배지에서 생육하고 있는 *Agrobacterium* LBA4404의 단일균락을 kanamycin 20 mg/L와 rifampicin 100 mg/L가 첨가된 YEP 액체배지에 접종하여 28°C 에서 220 rpm으로 진탕배양하면서 O.D₆₆₀ 0.6~1.0

가 되도록 약 16시간 배양하였다. 배양액을 6,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액을 버리고 acetosyringone 100 μM 이 첨가된 MS 액체배지와 혼합하여 spectrophotometer를 이용하여 O.D₆₆₀ 0.8~1.0이 되도록 조절하였다. 엽절편체를 절단하여 준비된 배양액에 10분간 접종한 다음, 멸균된 filter paper에서 여분의 *Agrobacterium*을 제거한 후 재분화 배지로 이식하였다. 재분화배지로 이식된 절편체는 25°C 에서 3일간 암배양한 다음, 멸균수로 세척한 후 cefotaxime 400 mg/L가 첨가된 배지로 이식하여 7일간 배양한 후, kanamycin 10 mg/L와 cefotaxime 400 mg/L가 첨가된 1차 선발배지로 이식하였다. 배양 6주 후 재분화된 신초를 kanamycin 20 mg/L와 400 mg/L가 첨가된 배지에 이식하여 2차 선발을 하였다. 배양 6주 후 2차 선발배지에서 생존한 개체는 cefotaxime 400 mg/L가 첨가된 MS 배지에 이식하여 발근시킨 후, 완전히 성장한 개체의 잎으로부터 genomic DNA를 추출하여 *npt II* primer를 이용하여 PCR 검정 후, Southern blot 분석을 실시하였다. *Agrobacterium*에 의한 유전자 전환효율을 조사하기 위하여 공동배양 기간을 3일과 7일로 달리하여 실시하였다.

유전자 전환체의 PCR 및 Southern blot 분석

선발된 식물체에서 유전자 삽입여부를 확인하기 위하여 *npt II* 유전자에 대한 PCR 분석을 실시하였다. Genomic DNA는 QIAGEN사의 DNeasy plant mini kit을 이용하여 제조회사의 지침에 따라 추출하였다. *npt II*를 증폭하기 위한 primer는 forward primer (5' GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG 3')와 reverse primer (5' ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA 3')를 사용하였다. PCR은 template DNA 100 ng, dNTP 0.4 μM , primer 10~25 pmoles, *Taq* DNA polymerase 2 unit 등의 조성으로 총 반응액을 50 μL 로, 95°C 에서 2분간 pre-denaturation을 하였고, denaturation은 95°C 에서 1분, annealing은 55°C 에서 2분, polymerization은 72°C 에서 1분간하여 30 cycle을 하였으며 extension은 72°C 에서 5분간하여, GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer Applied Biosystem)을 이용하여 수행하였다. Southern blot 분석을 위하여 10 μg 의 genomic DNA를 제한효소 *EcoRI* 100 unit을 사용하여 절단한 후 0.7% agarose gel에 전기영동하였다. Gel을 0.2 N HCl에 10분간 처리 후 변성화 용액과 중성화 용액에 각 45분간 처리하여 nylon membrane (HybondTM-N⁺, Amersham)에 upward capillary 방식을 이용하여 DNA를 전이시켰다. 전이가 완료된 후, UV-cross linker를 이용하여 1200 mJ/cm²의 UV를 조사하여 DNA를 membrane에 고정시켰다. Membrane을 3시간 이상 pre-hybridization 시킨 후 표지된 탐침 DNA와 18~20시간 동안 65°C 에서 혼성화 반응을 수행하였다. 탐침 DNA는 1.2 kb의 *LEAFY* 유전자 전체서열을 사용하였으며 *Rediprime*TM II labeling system (Amersham-pharmacia)을 이용하여 제조회사의 지침에 따라 [α -³²P] dCTP로 표지하였다. 혼성화 반응 후 membrane을 65°C 에서 $2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS 용

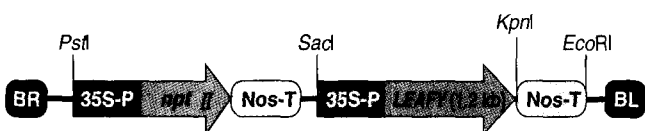


Figure 1. The T-DNA region of the binary vector pSK109 containing the neomycin phosphotransferase II gene (*npt II*), 35S promoter, and *LEAFY* gene.

액으로 10분, 1×SSC, 0.1% SDS 용액으로 15분 세척한 후, 상온에서 0.2×SSC, 0.1% SDS 용액으로 5분, 0.2×SSC 용액으로 1분간 세척한 후 -70°C에서 3~4일간 X-ray film에 노출시켜 확인하였다.

형질전환체 포장검정

Southern blot 분석결과 LEAFY 유전자의 삽입이 확인된 개체를 기내에서 계통별로 10개씩 증식한 다음, 그 중 6개를 순화하였다. 순화용토는 vermiculite 1 : perlite 1이 혼용된 인공용토를 사용하였으며, 4월 중순에 순화하여 5월 중순에 포장에 정식하였다. 10월에 식물체의 개화기를 조사하여 삽입 유전자의 발현 여부를 조사하였다.

결과 및 고찰

배양 절편체의 kanamycin 저항성 검정

엽절편의 적정 kanamycin 선발농도를 조사하고자 재분화 배지에 kanamycin을 0~30 mg/L까지 첨가하였고, 엽절편을 5 mm 정도의 사각으로 절단하여 배양하였다 (Figure 2). 엽절편체의 생존율은 kanamycin 10 mg/L가 첨가된 배지에서 약 22% 정도의 생존율을 나타냈으며 절편체의 재분화율도 10% 정도였다. 그러나 kanamycin 20 mg/L가 첨가된 배지에서는 엽절편은 약 5% 내외로 생존하였으나 전혀 재분화 식물체가 나타나지 않았다. 따라서 kanamycin 10 mg/L를 1차 선발배지로 선발하였고 20 mg/L를 2차 선발 배지로 선발하였다. Yepes 등 (1999)이 국화 'Polaris'와 'Golden Polaris'에 tospovirus의 nucleocapsid protein gene을 도입하는 데 효율적인 방법을 찾고자 Agrobacterium 및 유전자총을 이용한 연구에서 선발 후의 escape를 줄이는데 kanamycin의 단계적인 농도의 적용이 효

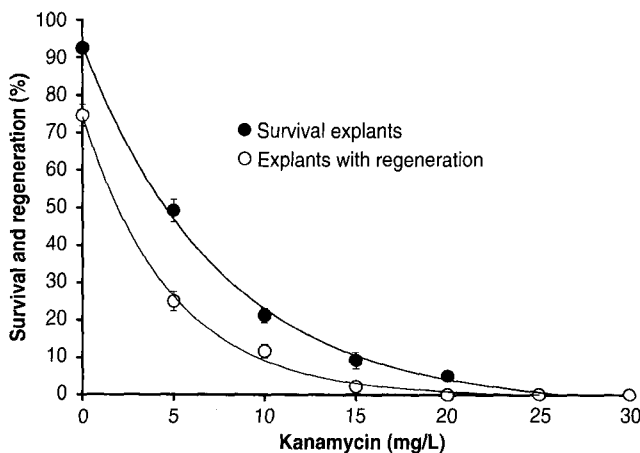


Figure 2. Kanamycin resistance of leaf explants on medium with 1.0 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA after 8 weeks in culture.

과적이었다는 결과를 보고하였다. Takatsu 등 (1998, 1999)이 국화의 줄기와 잎을 Agrobacterium과 공동배양 후, 선발을 위한 kanamycin 농도는 7.5~10 mg/L가 효과적이었다고 하였고, Kim 등 (1998)은 국화 'Fashion Yellow' 및 'Golden Glory'의 잎 절편체를 Agrobacterium과 공동배양 후 선발을 위한 kanamycin 적정 농도는 20 mg/L이었다고 보고한 바 있다. 국화 형질전환에서 국화 품종에 따라 형질전환체 선발을 위한 적정농도가 다르며, 재분화 배지에서 1차, 2차 선발을 한 후, 발근배지에서 완전한 식물체를 만들어 선발하는 방법을 사용하면 escape를 줄일 수 있다고 하였다 (Ledger et al. 1991). 본 실험에서 동일한 방법으로 형질 전환체를 선발하였다.

식물체 형질전환

공동배양 기간을 3일과 7일로 나누어 공동배양 기간이 엽절편의 유전자 전환에 미치는 영향을 조사하였다. 7일간 공동배양 한 처리구는 2차 선발배지에서 재분화된 신초의 1.9%인 28개체만이 생존하였다. 그러나 3일간 공동배양을 한 처리구에서는 2차 선발배지에서 3.1%인 19개체가 생존하여 3일간 공동배양을 한 것이 형질전환에 효과적이었다 (Table 1). 형질 전환체를 육성하기 위하여 국화 엽절편체에 LEAFY 유전자가 삽입된 pSK109 vector를 포함한 Agrobacterium LBA4404를 감염시켜 배양하였다 (Table 2). 1,549개의 신초를 재생하여 kanamycin이 첨가된 선발배지에서 1차, 2차 선발한 결과, 그중 10.1%인 156개체가 생존하였다. 156개체를 npt II 유전자에 대하여 PCR 분석을 한 결과, 그 중 2.3%인 36개체가 npt II 유전자를 가지고 있는 것으로 확인되었다 (Table 2, Figure 3). Npt II 유전자를 가지고 있는 것으로 확인된 36개체를 Southern 분석한 결과, 2개 (0.13%)만이 형질 전환체로 확인되었다 (Table 2,

Table 1. Effect of co-culture period on transformation efficiency of Dendranthema grandiflora 'Shuho-no-chikara'.

Co-culture period (days)	No. of explants	No. of regenerated shoots	First selection ^a	Second selection
7	448	1,490 (3.3 shoots/explant)	39 (2.6%)	28 (1.9%)
3	455	621 (1.4 shoots/explant)	27 (4.3%)	19 (3.1%)

^aRegenerated shoots were cultured on the medium with 10 mg/L kanamycin in the first selection and 20 mg/L in the second selection.

Table 2. PCR and Southern blot analysis of transformed Dendranthema grandiflora 'Shuho-no-chikara' plants.

Agrobacterium	No. of regenerated shoots	First selection	Second selection	PCR (npt II)	Southern blotting
leafy/pSK109/LBA4404	1,549	190 (12.3%)	156 (10.1%)	36 (2.3%)	2 (0.13%)

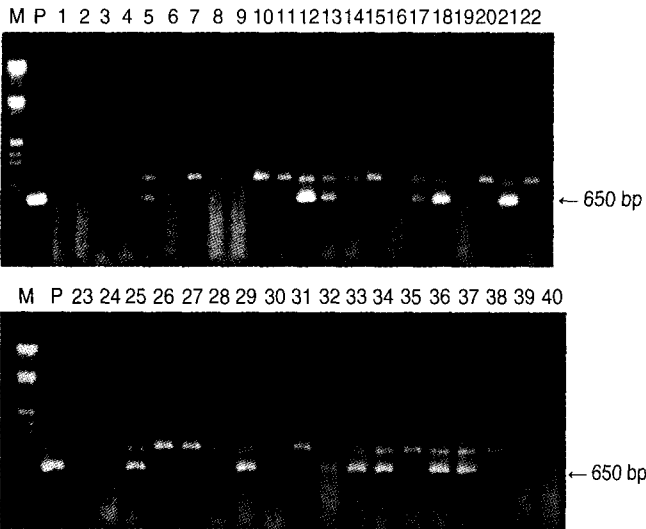


Figure 3. Polymerase chain reaction (PCR) analysis of transformants of *Dendranthema grandiflora* ‘Shuho-no-chikara’ for neomycin phospho-transferase II (*npt II*). (Lane M: Lamda *HindIII/EcoRI* molecular marker, Lane P: pSK109 positive control, Lanes 1~40: DNA from plants selected as a transformants).

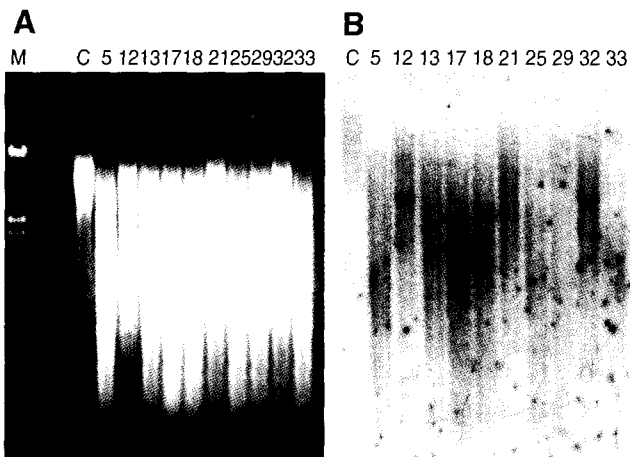


Figure 4. Southern blot analysis on transgenic plants of *Dendranthema grandiflora* ‘Shuho-no-chikara’ using ³²P-labeled *LEAFY* gene as a probe. A: Electrophoresis of genomic DNA, B: Confirmation of *LEAFY* gene (Lane M: Lamda *HindIII/EcoRI* size marker, Lane C: genomic DNA from non-transformed plant, Lanes 5~33: *EcoRI* digested genomic DNA from putative transformants).

Figure 4). 재분화된 신초에서 1차, 2차 선발, *npt II*에 대한 PCR, Southern blot 분석에 의한 *LEAFY* gene을 확인하는 과정에서 각 단계마다 많은 신초의 escape가 발생하였다 (Table 2). 국화는 kanamycin에 매우 민감하여 품종에 따라 다르지만 보통 10~50 mg/L를 선발배지에 첨가한다. 그러나 형질전환되지 않은 신초가 많이 얻어져 escape가 심하다고 알려져 있다 (Ledger et al. 1991; Fukai et al. 1995; Takatsu 1999). Takatsu 등 (1999)도 국화가 kanamycin에 매우 민감하여 10 mg/L를 사용하였는데 선발신초 중 85.8%의 escape가 발생하였다고 하였다. 본 실험에서도 1차 선발된 신초가 2차 선발에서는 많이 고사하는 경

Table 3. Characteristics of transgenic plants of *Dendranthema grandiflora* ‘Shuho-no-chikara’ expressing *LEAFY* gene.

Lines ^a	Day of flowering	Plant height (cm)	No. of branches / plant	Diameter of stem (mm)	Flower type
Control	Nov. 3	65.0	25.7	7.0	Normal
M-12	Oct. 26	49.1	18.0	6.3	Normal
M-32	Nov. 1	63.3	20.0	6.3	Normal

^aThe plants of control and transgenic lines were planted on May. 15 in the field.

향을 보였고, *npt II*에 대한 PCR 과정 및 Southern blot 분석을 하는 과정에서 escape가 심하게 발생하였다. Southern blot 분석 후, 유전자 전환체로 확인된 개체를 5월 중순에 포장에 재식한 결과, M-12 계통은 약 1주일 정도 조기개화 되었고 화형도 정상이었으나 초장이 약간 감소하였다 (Table 3). 따라서 M-12 계통은 *LEAFY* 유전자가 삽입되어 화아발육을 촉진하여 조기개화 특성을 나타내었다고 생각되었다.

적 요

pSK109를 포함하고 있는 *Agrobacterium* LBA4404을 통하여 국화 ‘Shuho-no-chikara’에 *LEAFY* 유전자를 도입하였다. 엽절편체의 생존율은 kanamycin 10 mg/L가 첨가된 배지에서 생존율을 약 22%, 절편체의 재분화율이 10% 정도였다. 그러나 kanamycin 20 mg/L가 첨가된 배지에서는 엽절편은 약 5% 정도 생존하였으나 전혀 재분화가 나타나지 않았다. 따라서 kanamycin 10 mg/L를 1차 선발배지로, 20 mg/L를 2차 선발배지로 선발하였다. *Agrobacterium* LBA4404와 국화 엽절편체를 3일간 공동배양 하는 것이 형질전환에 효과적이었다. *LEAFY* 유전자가 삽입된 pSK109 vector를 포함한 *Agrobacterium* LBA4404의 형질전환 효율은 2차 선발까지 약 2.8%였으며, Southern blot한 결과 0.13%만이 형질 전환체로 확인되었다. 형질 전환체 한계통은 포장에서 약 1주일 정도 조기개화하였고 화형은 정상이었다.

인용문헌

Broertjes C, Roest S, van Heen JWH (1980) A mutant of a mutant of an irradiation of progressive radiation induced mutants in a mutation breeding programme with *Chrysanthemum morifolium* Ram. *Euphytica* 29: 525-530

Fukai S, De Jong J, Rademaker W (1995) Efficient genetic transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) using stem segments. *Breed Sci* 45: 179-184

Firoozabady E, Lemieux CS, Moy YS, Moll B, Nicholas JA, Robinsons KEF (1991) Genetic engineering of ornamental crops.

- In vitro cellular and development biology(p. 96) Abstracts, Would Congress on Cell and Tissue Culture, June 16-20
- Hutchinson JF, Miller R, Kaul V, Stevenson T, Richards D (1989) Transformation of *Chrysanthemum morifolium* based on *Agrobacterium* gene transfer. J Cell Biochem Abstracts (p. 261). UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. March 27-April 7
- Kim JY, Park SJ, Um BY, Pak CH, Chung YS, Shin HS (1998) Transformation of chrysanthemum by *Agrobacterium tumefaciens* with three different types of vectors. J Kor Soc Hort Sci 39: 360-366
- Ledger SE, Deroles SC, Given NK (1991) Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Chrysanthemum*. Plant Cell Rep 10: 195-199
- Lu CY, Wardley T, Gilmour M, Nugent G, Mirabile P (1989) Genetic engineering of flowers at Calgene Pacific. Aust J Biothech 3: 285-287
- Mol JNM, Stuitje AR, van der Krol A (1989) Genetic manipulation of floral pigmentation genes. Plant Mol Biol 13: 287-294
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15: 473-497
- Takatsu Y, Tomotsune H, Kasumi M, Sakuma F (1998) Difference in adventitious shoot regeneration capacity among Japanese chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) cultivar and the improved protocol for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. J Japan Soc Hort Sci 67: 958-964
- Takatsu Y, Nishizawa Y, Hibi T, Akutsu K (1999) Transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). Sci Hort 82: 113-123
- van Wordragen MF, de Jong J, Dons HJ (1989) Transformation of *Chrysanthemum morifolium* using a supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain. J Cell Biochem Abstracts (p.271). UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. March 27-April 7
- Weigel D, Alvarez J, Smyth DR, Yanofsky MF, Meyerowitz EM (1992) *Leafy* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. Cell 69: 843-859
- Yepes LM, Mittak V, Pang SJ, Gonsalves D, Slightom JL (1999) *Agrobacterium tumefaciens* versus biolistic-mediated transformation of the chrysanthemum cv. 'Polaris' and 'Golden Polaris' with nucleocapsid protein genes of three tospovirus species. Acta Hort 482: 209-218

(접수일자 2003년 11월 20일, 수리일자 2003년 12월 8일)