

국내 거베라 육종계통 형질전환 기초 조건 확립

이혜영¹, 이기정¹, 전은희¹, 신상현¹, 이재현¹, 김도훈¹, 정대수¹, 정용모², 조용조², 김정국³, 정영수^{1*}
¹동아대학교 생명자원과학대학 유전공학과, ²경남농업기술원 화훼육종연구소, ³고려대학교 생명공학원

Optimization of Genetic Transformation Conditions for Korean Gerbera Lines

Hye-young Lee¹, Ki-Jung Lee¹, Eun-Hee Jeon¹, Sang-Hyun Shin¹, Jai-Heon Lee¹, Doh-Hoon Kim¹,
Dae-Soo Chung¹, Yong-Mo Chung², Yong-Cho Cho², Jeong-Kook Kim³, Young-Soo Chung^{1*}

¹Dept. of Plant Genetic Engineering, Dong-A University, Busan, 604-714, Korea

²Flower Breeding Research Institute, Gyeongnam ARES, Changwon, 641-920, Korea

³School of Life Science and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

ABSTRACT Gerber (*Gerbera hybrida*) is a valuable ornamental species grown as a potted plant and cut flowers. However, genetic variability within the gerbera genus is very limited. So it is absolutely needed to introduce and widen genetic resources into gerbera lines by genetic transformation. For the purpose, 18 Korean gerbera lines were screened to establish *Agrobacterium*-mediated genetic transformation procedure. In an experiment to select Korean gerbera lines which are amenable to *Agrobacterium*-inoculation, 12 lines turned out to be positive in *Agrobacterium*-inoculation. More callus were produced from BA 2ppm, Zeatin 2ppm, IAA 0.2ppm in pre-culture and regeneration medium (2X media) but there was no difference in the frequency of GUS expression rate. In another experiment to find out optimal condition for highly efficient *Agrobacterium*-inoculation, petiole and leaf explants have been treated with four different pre-culture periods, two different co-culture periods and two different *Agrobacterium* strains. As a result, high GUS expression has been showed from petiole and leaf explants treated no pre-culture period with LBA4404 *Agrobacterium tumerfaciens*, 5 day co-culture period and dipping treatment.

Key words: *Gerbera hybrida*, *Agrobacterium tumerfaciens*, cefotaxime, Zeatin, IAA, BA (6-Benzlaminopurine), GUS (β -glucuronidase)

서 론

거베라 (*Gerbera hybrid Hort*, 2n=52)는 국화과 거베라 속에 속하는 숙근초화 식물 (Mercurio 2002)로 원산지는 아시아와 아프리카의 온대 및 열대지역이며, 1878년 남아프리카의 트랜스발 (Transval)지방에서 처음 발견된 후, 오늘날 재배품종의 기원이 되었다 (Grifing 1959). 그 후 1886년에 영국과 프랑스에 소개되었고 1930년대에는 절화용으로 북아프리카에서 사용하였다 (John et al. 1999).

현재 거베라는 품종보호대상작물지정으로 인하여 이에 따른 외국도입품종에 대한 로열티 지급이 불가피한 실정인 어서 국내 육성 신품종의 종묘 자급이 절실히 요구되어진다. 또한 화란 등 거베라 육종을 가장 많이 하고 있는 외국에서는 이미 거베라 신품종 육성을 위하여 유전공학 기법을 적용하고 있다. 따라서 국내에서도 생명공학기법 적용에 의한 고부가가치 신품종 육성과 다양한 변이와 품종을 단시간에 창출하기 위하여 형질전환기술 개발이 절대적으로 필요하다.

거베라의 조직배양 실험은 온실에서 재배된 꽃봉오리에서 부정지 (adventitious shoot)를 유도하기 위한 시도들이 처음 보고 되었다 (Pierik et al. 1973, 1975; Hedtrich 1979).

*Corresponding author Tel 051-200-7510 Fax 051-200-6536
E-mail: chungys@dau.ac.kr

그 후 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 방법이 보고되었으며 (Nagaraju 1998; Teresa Orikawska 1999), *in vitro* 절편체로부터 신초를 유도하기 위한 실험 등이 수행되었다 (Radjojective et al. 1987; Jerzy and Lubomski 1991; Reynoird et al. 1993; Teresa Orikawska 1999).

이 연구에서는 경남농업기술원 화훼육종연구소에서 육성한 18개 거베라 육종계통을 가지고 형질전환체를 얻기 위한 초기유전자도입조건을 확립하기 위한 다양한 실험을 수행하였다. 형질전환 순응형 계통을 얻기 위해 전처리 기간과 형질전환 선발 기간 동안 호르몬 농도 규명을 하였다. 그리고 전처리 기간 동안 다른 농도의 호르몬 처리, 4가지의 다른 전처리 기간과 공배양 기간이 형질전환에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험도 수행하였다.

재료 및 방법

식물 재료

본 실험에 사용된 재료는 2001년부터 2003년까지 경남농업기술원 화훼육종연구소에서 육성한 18개의 거베라 육종계통을 사용하였다. 형질전환 순응형 계통 스크린과 형질전환 조건 확립 실험에 이용된 계통은 기내도입 후, 3-4주 동안 증식된 엽병과 엽신을 사용하였다.

형질전환 벡터

거베라 형질전환을 위한 발현벡터를 제작하였다. 개화기 조절유전자로 알려진 FT (flowering locus T) 유전자를 pCAMBIA2301에 연결하여 거베라 형질전환 발현 벡터를 제작하였고 형질전환에 적합한 *Agrobacterium* 균주 비교실험을 위하여 LBA4404와 EHA105를 사용하였다 (Figure 1).

***Agrobacterium* 준비**

거베라의 형질전환 효율 비교를 위하여 *Agrobacterium*은 pCAMBIA2301에 FT유전자가 연결된 벡터를 LBA4404와 EHA105에 각각 넣어 사용하였다.

*Agrobacterium*은 형질전환 7일 전 kanamycin 100ppm과

rifampicin 25ppm이 포함된 YEP 고체 배지 (Table 1)에 streaking하여 28°C incubator에서 3일간 배양하였다. 배양한 *Agrobacterium*의 single colony를 채취하여 8시간 동안 YEP 액체 배지 (Table 1)에서 seed culture를 한 뒤 OD값이 0.6이 되었을 때, 30% glycerol을 동일 볼륨 첨가한 후, 1ml씩 분주하여 만든 stock을 형질전환실험에 사용하였다.

***Agrobacterium* 감염 및 공배양**

공배양 배지는 100 µM의 acetosyringone이 포함된 CCM 배지를 사용하였다 (Table 1). 형질전환 전날 미리 만들어 놓은 stock 1 ml을 YM 액체 배지에서 16시간 동안 large culture하였다. 그 후 30 ml로 나누어 tube에 담은 후 20°C 7000 rpm에서 15분 동안 centrifuge시킨 뒤, OD값 0.6정도의 혼탁액이 되도록 CCM 액체 배지에 녹여 균을 준비하였다. MS 고체 배지에서 3~4주 정도 자란 건실한 엽신과 엽병을 10번 blade로 약 1 cm의 크기로 절단 하였다. 공배양을 위해서는 미리 *Agrobacterium*을 CCM 액체 배지에 희석시켜 놓은 tube에 잘라 놓은 엽병과 엽신을 10초간 sonication과 30분간 접종시킨 후 하배축이 위로 향하도록 치상하여 3, 5일간 25°C에서 암배양 시킨 것으로 나누어 실험을 수행하였다. 그리고 *Agrobacterium*의 접종 효율을 높이기 위하여 수행한 dipping 방법은 16시간 동안 large culture한 200 ml의 *Agrobacterium*을 50 ml로 나누어 20°C 7000 rpm에서 15분 동안 centrifuge시킨 뒤, 1개 tube에만 CCM 액체 배지 3 ml만을 첨가하여 고농축으로 만든 뒤, 10번 blade에 준비된 고농축액을 묻혀 엽병과 엽신을 자를 때 사용하였다. 나머지 과정은 위에 설명된 것과 같이 수행하였다.

전처리

호르몬 전처리와 전처리 기간이 형질전환 효율증대에 미치는 영향을 알아보려고 실험을 수행하였다. 전처리를 위한 호르몬은 준비된 CCM 배지 (Table 1)에 BA 1.0, 2.0 ppm, Zeatin 1.0, 2.0 ppm, IAA 0.1, 0.2, 0.3 ppm의 농도로 첨가하였고, 전처리 기간은 0, 1, 2, 3, 6일로 나누어 실험을 수행하였다.

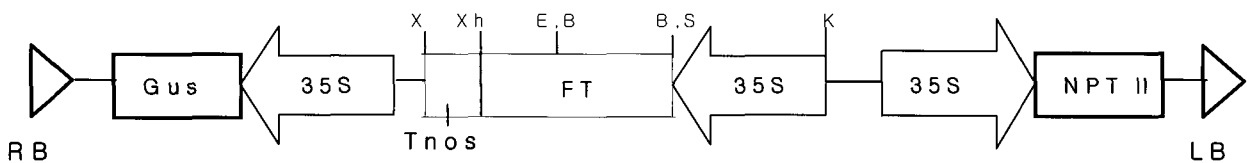


Figure 1. Expression vector construct for gerbera transformation. pCAMBIA2301-FT vector. BR, right border; BL, left border; NPT II, phosphinothricin; GUS, β-glucuronidase; 35S, CaMV 35S promoter; Tnos, terminator of nopaline synthase; B, BamH I; E, EcoR I; K, Kpn I; S, Sac I; X, Xba I; Xh, Xho I

Table 1. List of media and their composition used for gerbera transformation method

		Composition
YEP		Yeast Extract 10 g/l, NaCl 5 g/l, Peptic peptone 10 g/l, Plant Agar 1.0%, pH=7.0
LB		Yeast Extract 5 g/l, NaCl 5 g/l, Peptic peptone 10 g/l, Plant Agar 1.0%, pH=7.0
MS (multiplication medium)	Basic	MS vitamin 4.4 g/l, sucrose 3%, BA (6-benzylaminopurine) 1.0 mg/l, Sigma Agar 1.0%, pH=5.8
PRE (pre-culture medium)	Basic	MS vitamin 4.4 g/l, sucrose 2%, Sigma Agar 1.0%, pH=5.8
	Hormone concentration	BA (6-benzylaminopurine) 1 mg/l, 2 mg/l IAA 0.1 mg/l, 0.2 mg/l, 0.3 mg/l Zeatin 1 mg/l, 2 mg/l
CCM (co-cultivation medium)	Basic	MS vitamin 4.4 g/l, sucrose 2%, IAA 0.2 mg/l, Zeatin 2 mg/l, BA (6-benzylaminopurine) 2 mg/l, Acetosyringone 100 µM, pH=5.8, Solid : Sigma Agar 1.0%,
	Thiol compounds addition(1X)	L-Cystein 3.3 mM, DTT (dithiothreitol) 1.0 mM, Sodium thiolsulfate 1.0 mM,
RE (regeneration medium)	Basic	MS vitamin 4.4 g/l, sucrose 2%, Cefotaxime 500 mg/l, Sigma Agar 1.0%, pH=5.8
	Hormone concentration	BA(6-benzylaminopurine) 1 mg/l, 2 mg/l IAA 0.1 mg/l, 0.2 mg/l, 0.3 mg/l Zeatin 1 mg/l, 2 mg/l
	Kanamycin concentration	Kanamycin 5 ppm

재균 및 재분화

공배양 후, *Agrobacterium*의 재균을 위하여 500 ppm의 cefotaxime이 포함된 1/2 regeneration 액체 배지로 1회 세척하였다. 30 ml의 세척 용액을 넣은 50 ml tube에 엽병과 엽신을 넣었으며, 손으로 천천히 상하로 흔들어 주었다. 1회 세척된 엽병과 엽신은 RE (Regeneration : MS salt 4.4 g/l, BA 2.0 ppm, Zeatin 2.0 ppm, IAA 0.2 ppm, sucrose 2%, Agar 1%)-(1) (cefotaxime 500 ppm)배지에 치상하여 24°C 배양실에서 암배양 시켜 캘러스 발생을 관찰하였다. 호르몬 농도와 항생제 종류에 따른 캘러스 발생 효율을 알아보기 위한 실험에서는 호르몬 농도는 BA 1ppm, Zeatin 1 ppm, IAA 0.1 ppm (1 X media), BA 2 ppm, Zeatin 2 ppm, IAA 0.2 ppm (2 X media)씩 달리 첨가하였고, 항생제는 각각 같은 농도인 cefotaxime을 첨가하였다. 그 후 2주 간격으로 명배양 시키면서 RE (cefotaxime 500 ppm,

kanamycin 5 ppm)배지로 옮겨 치상하면서 관찰하였다.

GUS 발현 분석

형질전환의 효율을 검정하기 위하여 GUS 발색반응을 수행하였다. GUS 발색반응은 Jefferson (1987)의 방법을 사용하였다. 1ml의 GUS 발색용액을 만들기 위하여 3mg의 5-bromo-4-chloro-indolyl glucuronide (X-Gluc)을 150µl dimethyl formamide에 녹인 후, 850µl의 solution B (1% Triton X-100, 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, 5mM potassium ferrocyanide)를 첨가하였다. SI medium 치상 후 0.5cm 크기로 자란 shoot 및 캘러스를 절단하여 GUS 발색용액을 첨가한 후, 37°C incubator에서 overnight 처리하였다. 처리 후, destaining solution (ethanol 2.5ml, 10% formaldehyde 5ml, 5% glacial acetic acid 2.5ml)을 첨가하여 4°C에 보관하며 GUS 발현 여부와 정도를 관찰하였다.

결과 및 고찰

국내 거베라 육종계통 형질전환 순응형 genotype 선발

국내 거베라 형질전환 기초 조건 확립을 위하여 애기 장대 식물에서 발견된 FT 유전자를 pCAMBIA2301 vector 안으로 subcloning하여 형질전환 발현백터를 제작하였다 (Figure 4).

형질전환 순응형 genotype 선발을 위해 실험에 이용된 국내 거베라 계통 18개의 GUS 발현은 계통 간 큰 차이를 보였다. 계통 011, 015, 016, GM023, 031, 041, 052 등은 GUS 발현을 나타냈으나, 012, 014, 022, 023, 024, 042, 043, 051, 053, 128-65, H301 등은 GUS 발현을 나타내지 않았다. 기내 도입하여 증식한 거베라 계통의 발육이 균일하지 않았으나 증식 도중에 균 오염이 발생하여 실험을 할 수 없는 경우도 있었다.

캘러스 유도가 이루어지는 RE 배지에 이식 후, 발생하는 캘러스는 대부분 죽어가는 것이 현미경으로 관찰되었다. 이러한 것을 방지하기 위하여 Elomaa (Elomaa P 2001) 등이 사용한 황화합물과 똑같이 거베라 증식 배지 (Table 1)에 첨가하였다. 첨가된 Adenine hemisulfate, L-Tyrosine, NaH₂PO₄ · H₂O은 외국 품종 Terri 에서는 캘러스의 갈변을 방지 하였으나 국내 거베라 품종의 경우에는 첨가한 것이 첨가하지 않은 것에 비해 별다른 효과가 없었다 (data not shown).

전처리 배지에서 두 가지 다른 호르몬 농도가 캘러스 유도에 미치는 영향

전처리 배지에서 두 가지 다른 호르몬 농도 처리가 캘러스 유도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 *Agrobacterium* 감염에 순응성이 확인된 011, 016, 022을 포함한 12가지 품

종을 가지고 실험을 수행하였다 (Table 2). 전처리 기간은 6일로 고정하고 두 가지 다른 호르몬 농도 BA 1 ppm, Zeatin 1 ppm, IAA 0.1 ppm (1 X media)과 BA 2 ppm, Zeatin 2 ppm, IAA 0.2 ppm (2 X media)로 전 처리를 하여 BA 2 ppm, Zeatin 2 ppm, IAA 0.2 ppm (2 X media)를 첨가한 재분화 배지에 치상한 결과, 캘러스의 발생율은 품종 간에 약간의 차이는 있었으나, 첫 번째 농도 처리에서는 041, 042 품종에서만 캘러스 생성이 잘되었고, 두 번째 농도 처리에서는 011, 022, 031 품종을 제외한 나머지 9개 품종에서 캘러스가 잘 생성되었다. 전체적으로 품종을 비교하면 전반적으로 BA 2 ppm, Zeatin 2 ppm, IAA 0.2 ppm (2 X media)의 농도에서 더 양호한 결과를 보였다. 그리고 GUS 발현 정도도 첫 번째 호르몬 농도 처리보다 두 번째 농도 처리가 더 많이 강하게 나타났고, 캘러스의 부푼 정도도 두 번째 호르몬 처리 농도가 더 좋았다.

재분화 배지에서 세 가지 다른 호르몬 농도 처리가 캘러스 유도에 미치는 영향

위의 실험 결과 전처리 배지를 BA 2 ppm, Zeatin 2 ppm, IAA 0.2 ppm (2 X media)로 선택한 후, 보다 효율적인 캘러스 유도를 위하여 011, 016, 022을 포함한 12가지 품종을 가지고 재분화 배지의 적정 호르몬 농도를 규명하는 실험을 수행하였다 (Table 3). 12가지 품종 모두 전처리 기간은 6일로 고정하고 두 가지 다른 호르몬 농도 (1 X media; BA 1 ppm, Zeatin 1 ppm, IAA 0.1 ppm 또는 2 X media; BA 2 ppm, Zeatin 2 ppm, IAA 0.2 ppm)의 전처리 배지로 처리한 품종을 각각 세 가지 다른 호르몬 농도 (BA 1 ppm, Zeatin 1 ppm, IAA 0.1 ppm/ BA 2 ppm, Zeatin 2 ppm, IAA 0.2 ppm/ BA 1 ppm, Zeatin 1 ppm, IAA 0.3 ppm)로 처리한 재 분화 배지에서 캘러스 발생률을 엽병과 엽신으

Table 2. Comparison of callus induction from two different growth hormone concentrations in the pre-culture media

line	1x growth hormone		2x growth hormone	
	petiole (%)	leaf (%)	petiole (%)	leaf (%)
011	5.3	20.0	100	8.0
016	70.0	100	98.0	100
022	36.4	13.0	97.7	97.4
023	30.8	13.3	100	100
024	28.6	100	100	100
031	11.5	8.7	89.5	27.7
041	100	100	100	100
042	100	100	100	100
043	7.4	14.3	100	100
051	8.3	80.0	100	100
052	75.0	62.5	100	100
053	85.7	100	100	100

Table 3. Comparison of callus induction from three different growth hormone concentrations in the regeneration media

line	1x growth hormone in the pre-culture media						2x growth hormone in the pre-culture media					
	petiole (%)			leaf (%)			petiole (%)			leaf (%)		
	1x	2x	3x	1x	2x	3x	1x	2x	3x	1x	2x	3x
011	0	16.7	0	50.0	50.0	0	100	100	100	100	100	100
016	14.3	50.0	66.7	100	100	100	100	100	93.3	100	100	100
022	50.0	36.4	20.0	0	14.3	22.2	92.3	100	100	91.7	100	100
023	50.0	20.0	25.0	0	20.0	0	100	100	100	100	100	100
024	100	33.3	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
031	14.3	20.0	0	14.3	0	11.1	100	100	71.4	77.9	72.7	75.0
041	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
042	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
043	12.5	0	9.0	0	0	40.0	100	100	100	100	100	100
051	0	25.0	0	100	50.0	100	100	100	100	100	100	100
052	57.1	71.4	100	0	75.0	100	100	100	100	100	100	100
053	50.0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Table 4. Frequency of GUS expression for two different co-culture and four different pre-culture periods with two different *Agrobacterium* strains

line	LBA4404								EHA105							
	3-days				5-days				3-days				5-days			
	non	1	2	3	non	1	2	3	non	1	2	3	non	1	2	3
016	66 [#]	100	66	50	80	100	50	60	12	25	12	12	16	0	0	0
033	40	0	25	0	37	20	100	26	0	0	0	0	0	0	0	0
052	35	75	57	10	83	25	62	26	0	12	0	0	0	8	0	0
041	53	85	77	25	78	42	70	57	20	0	0	0	36	13	16	0

[#] Percentage of GUS positive response in all explants

로 나누어 측정하였다. 그 결과 품종에 따라 다소간의 차이는 있으나 전반적으로 BA 2 ppm, Zeatin 2ppm, IAA 0.2 ppm (2 X media)로 전 처리를 한 후, BA 2 ppm, Zeatin 2 ppm, IAA 0.2 ppm (2 X media)의 재분화 배지에서 키운 재료로부터 캘러스의 발생이 양호하였다 (Table 4). 그러나 이러한 처리 후 GUS 발현을 비교하였으나 캘러스 발생률과는 달리 전체적으로 낮은 GUS 발현을 나타냈다 (data not shown).

두 가지 다른 공배양 기간과 네 가지 다른 전처리 기간이 캘러스 유도에 미치는 영향

캘러스의 형성유도에 미치는 호르몬 조건을 확인한 후, 공 배양과 전 처리 기간이 캘러스 형성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 다섯 가지 계통 016, 033, GM023, 041, 052를 가지고 실험을 수행하였다. 이 다섯 가지 계통을 각각 0, 1, 2, 3일의 전 처리 기간과 3, 5일 공 배양 기간을 처리한

결과 전 처리를 하지 않고 5일 간 공 배양을 처리했던 엽병과 엽신에서 100%의 캘러스유도를 보였고 나머지 조건에서도 전반적으로 높은 캘러스 형성율 (84%-100%)을 나타내었다 (data not shown). 공 배양 기간 3일, 5일 처리 중에서 식물체의 상태는 3일이 그리고 전 처리를 하지 않은 것과 한 것 중에서는 전 처리를 하지 않은 것이 훨씬 더 식물체의 상태가 좋았다. 유전자의 도입여부를 보기 위하여 GUS 발현을 상, 중, 하로 나누어서 조사하여 비교해 본 결과, 계통 간 다소간의 차이가 있으나 전반적으로 공 배양 기간 3일, 5일 중에서는 5일이 엽병과 엽신에서 더 높은 GUS 발현을 나타냈으며, 네 가지 다른 전 처리 기간 중에서는 전 처리를 처리하지 않은 엽병과 엽신에서 더 많은 GUS 발현을 나타냈다 (Figure. 2 & 3). 그리고 공 배양 기간을 3일 처리한 경우에는 전처리를 처리하지 않은 것과 처리한 엽병과 엽신에서의 GUS 발현이 별다른 차이를 나타내지 못하였으나 공 배양 기간을 5일 처리한 경우에는 전 처리를 하지 않은 것이 처리한 엽병과 엽신에서 보다 뚜렷

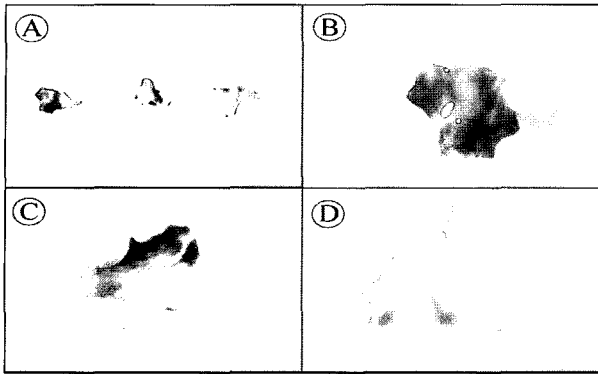


Figure 2. Comparison of transformation efficiency by different degrees of GUS expression. The explants were transformed with *Agrobacterium tumerfaciens* LBA4404 containing pCAMBIA2301-FT and assayed for GUS activity with histochemical method after 3 day of co-culture period. The explant were classified into 3 classes; high (b), medium (c), and low (d).

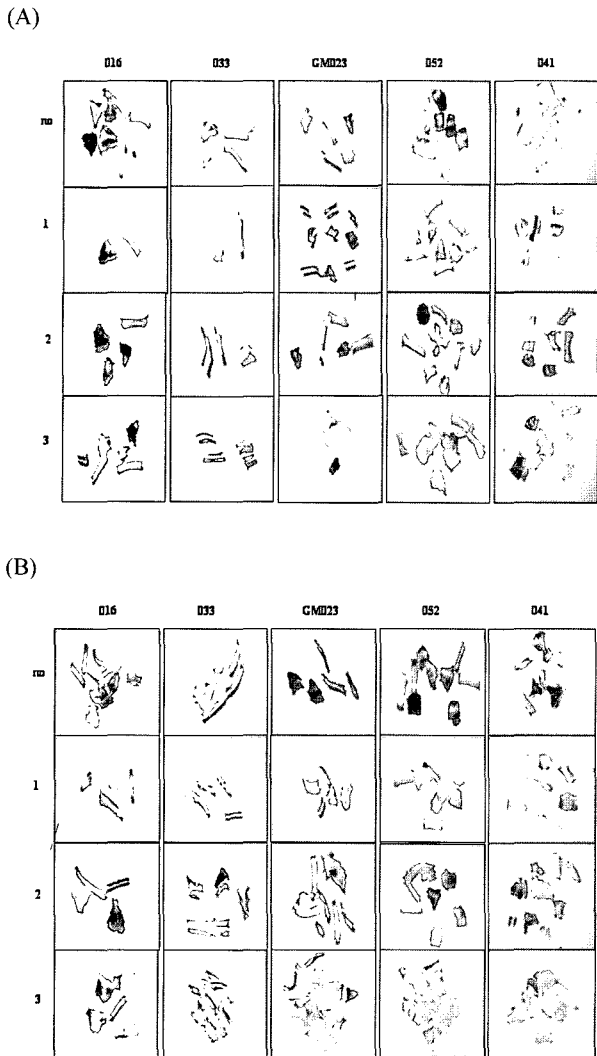


Figure 3. Comparison of transformation efficiency with different pre-culture and co-culture period. The explants were transformed with *Agrobacterium tumerfaciens* LBA4404 containing pCAMBIA2301-FT and assayed for GUS activity with histochemical method with various pre-culture periods (0, 1, 2, 3 day) after 3 day (A) or 5 day (B) co-culture.

하게 높은 GUS 발현을 나타냈다 (Figure 3).

두 가지 다른 *Agrobacterium tumerfaciens*가 형질전환 효율에 미치는 영향

거배라 형질전환에 적합한 *Agrobacterium tumerfaciens* 균주를 알아보기 위하여 4 가지 품종 016, 033, 041, 052을 가지고 실험을 수행하였다. 이들 품종을 두 가지 다른 *Agrobacterium tumerfaciens*인 LBA4404와 EHA105를 사용하여 각각 두 가지 다른 3, 5일 공 배양 기간과 네 가지 다른 0, 1, 2, 3일 전 처리를 하여 실험을 수행한 후 GUS 발현을 비교하였다. 그 결과 LBA4404를 사용한 경우, GUS 발현의 빈도가 25%에서 100%를 나타낸 반면에, EHA105를 사용한 경우 GUS 발현을 빈도가 0%에서 36%를 나타냈다 (Table 5). GUS유전자의 발현정도는 LBA4404가 EHA105에서 보다 훨씬 강한 발현을 보였으며, 앞의 결과와 마찬가지로 3일 공 배양 보다는 5일 공 배양 조건에서 강한 GUS 발현을 보였다 (Figure 4).

Agrobacterium 접종 중 dipping 처리가 형질전환 효율에 미치는 영향

Agrobacterium 접종 효율을 높이기 위하여 기존에 다른 식물에서 사용하고 있는 접종 방법인 dipping 처리를 016 등 3가지 계통을 가지고 실험을 수행하였다 (personnel communication). 전 처리를 하지 않은 엽병과 엽신을 dipping 처리 한 것과 하지 않은 것으로 나누어 3일 동안 공 배양 시킨 후 GUS 발현빈도를 비교하였다. 그 결과 033 품종을 제외한 나머지 016, 041 품종에서는 dipping을 처리한 것이 각각 90%, 95%인데 반해 dipping을 처리하지 않은 것에서는 66%, 53%로 dipping 처리한 것이 dipping 처리

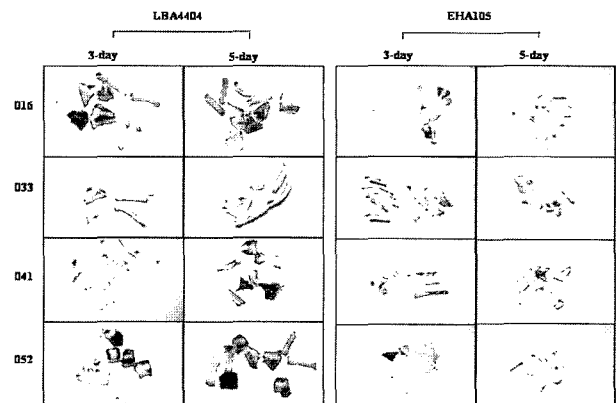


Figure 4. Transformation efficiency of two different *Agrobacterium* strains, LBA4404 and EHA105. The explants were transformed with two different *Agrobacterium tumerfaciens*, LBA4404 and EHA105, harboring pCAMBIA2301-FT. Two different co-cultivation periods, 3 day or 5 day, were tested.

Table 5. Effect of dipping treatment on transient GUS expression

	041	016	033
dipping	95% [#]	90%	40%
non-dipping	53%	66%	40%

[#] Percentage of GUS positive response in all explants

하지 않은 것보다 거의 두 배나 높은 GUS 발현빈도를 나타냈다 (Table 5). 접종 후 분석한 GUS 발현은 그 차이를 더 뚜렷이 나타내어 dipping 처리를 한 것이 하지 않은 것에 비하여 원하는 엽병과 엽신의 접종 부위에 정확하게 유전자가 도입되었음을 알 수 있었다 (Figure 5). 그러나 033 품종의 경우에는 dipping을 처리한 것과 처리하지 않은 것 간에 차이를 나타내지 않아 dipping 처리가 유전자형에 따라

그 효과가 다를 수 있었다.

위의 실험을 통하여 확립된 조건들로 유전자가 도입된 거베라 절편체들은 현재 캘러스가 유도되었고 유전자의 도입이 확인되었다 (Figure 6). 현재 이 유도된 캘러스를 재료로 높은 효율의 재분화 조건을 확립하기 위한 실험이 수행중이다.

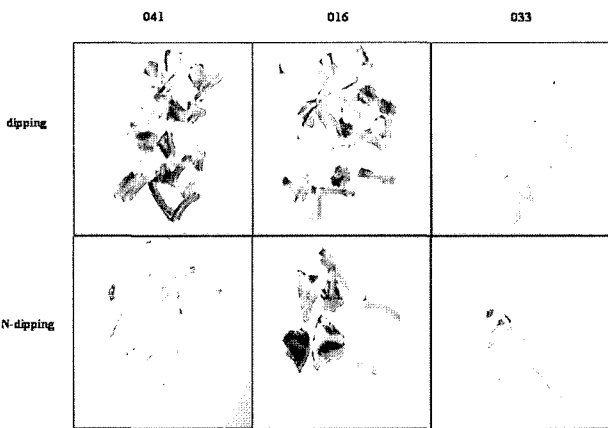


Figure 5. Comparison of transformation efficiency of dipping treatment. The explants were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 containing pCAMBIA2301-FT with no pre-culture period. All the explants were co-cultured for 3 days.

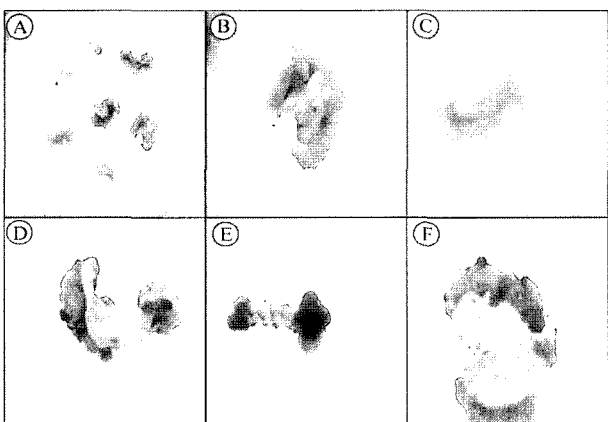


Figure 6. Callus formation and confirmation of gene introduction from the callus forming petiole and leaf explants. The explants transformed with LBA4404 (pCAMBIA2301-FT) and produced callus on selection medium containing 5ppm kanamycin and 500 ppm cefotaxime (a-c). GUS-assayed explants with callus (d-f).

적 요

본 연구에서는 거베라 형질전환 기초기술개발을 위한 연구를 수행하였다. 경남원예화훼시험장에서 육성된 국내 거베라 18품종 중, *Agrobacterium* 감염에 순응적인 품종을 선발하기 위하여 18개의 국내 거베라 품종을 스크린하여 011, 016, GM023 등 12개의 순응형 계통을 스크린 하였으며 효율적인 형질전환을 위한 제균 항생제로는 cefotaxime 이 선택되었다. 더 많은 캘러스 유도를 위한 전처리 배지의 호르몬 농도는 BA 2 ppm, Zeatin 2 ppm, IAA 0.2 ppm (2 x media)이 효율적이었고 재분화 배지의 호르몬 농도도 전처리 배지 호르몬의 농도와 동일하게 BA 2 ppm, Zeatin 2 ppm, IAA 0.2 ppm (2 x media)에서 효율적이었으나 GUS 발현에는 다른 차이가 없었다. 고효율 형질전환 체계 확립을 위하여 네 가지 다른 전처리 기간 처리와 두 가지 다른 *Agrobacterium tumefaciens* 사용, 두 가지 다른 공배양 기간을 처리한 결과 전처리 하지 않은 엽병과 엽신을 LBA4404 *Agrobacterium tumefaciens*을 사용하여 5일 간 공배양 기간을 가졌을 때와 dipping 처리하여 접종한 엽병과 엽신에서 높은 GUS 발현빈도를 나타냈다.

사 사

본 연구는 동아대학교 교내연구비지원에 의해 수행되었음.

인용문헌

Asen, S (1984) High pressure liquid chromatographic analysis of flavonoid chemical markers in petals from *Gerbera* flowers as an adjunct for cultivar and germplasm identification. *Phytochemistry* 11: 2523-2526

- Elomaa P (1996) Genetic modification of flavonoid pathway in ornamental plants. Ph D Thesis. University of Helsinki Finland
- Elomaa P, Honkanen, J, Puska, P, Suppanea, Y, Herariutta, M, Mehto, M, Kotilainen, L, Nevalainen and T. H. Teeri. (1993) *Agrobacterium*-mediated transfer of antisense chalcone synthase cDNA to *Gerbera hybrida* inhibits flower pigmentation. Bio Tech 11:508-511
- Elomaa P, Y. Helariutta, M. Kotilainen, and T. H. Teeri. (1996) Transformation of antisense constructs of the chalcone synthase gene superfamily into *Gerbera hybrida*: differential effect on the expression of family members. Mol Breed 2:41-50
- Elomaa P, M. Mehto, M. Kotilainen, Y. Helariutta, L. Nevalainen and T. H. Teeri. (1998) a bHLH transcription factor mediates organ, region and flower type specific signals on dihydroflavonoid-4-reductase(*dfr*) gene expression in the inflorescence of *Gerbera hybrida* (Asteraceae). Plant J 16(1):93-99
- Elomaa P, T. H. Teeri. (2001) Transgenic *Gerbera*. In YPS Bajaj, ed, Biotechnology in Agriculture and Forestry, Transgenic Crops III Vol 48 Springer Verlag Berlin, pp 139-154
- Grifing, B. (1959) Concept for general and specific combining ability in relation to diallel crossing system. Augt J Biological Sci 9:462-493
- Hansen HV (1985) A taxonomic revision of the genus *Gerbera* (Compositae. Mutisieae) sections *Gerbera*, *Parva*, *Piloselloides* (in Africa), and *Lasiopus*. Opera Bot 78:5-36
- Hedtrich CM (1979) Sprossregeneration aus Blättern und Vermehrung von *Gerbera jamesonii*. Gartenbauwissenschaft 44:1-3
- Helariutta, Y, Elomaa P, M. Kotilainen, P. Suppanea, T. H. Teeri. (1993) Cloning of cDNA coding for dihydroflavonoid-4- reductase(*dfr*) and characterization of *dfr* expression in the corollas of *Gerbera hybrida* var. Regina (Compositae) Plant Mol Biol 22:183-193
- Helariutta, Y, Elomaa P, M. Kotilainen, R. J. Griesbach, J. Schroder, T. H. Teeri. (1995) Chalcone synthase-like genes active during corolla development are differentially expressed and encode enzymes with different catalytic properties in *Gerbera hybrida* (Compositae). Plant Mol Biol 28:47-60
- John M. dole, Harold F. Wilkins. (1999) *Florticulture Principles and species*. Prenntice Hall 356-361
- Jerzy M, Lubomski M (1991) Adventitious shoot formation on ex vitro derived leaf explants of *Gerbera jamesonii*. Scirtia Hortic 47:115-124
- Kotilainen M, Helariutta Y, Elomaa P, Paulin L, Teeri TH (1994) A corolla-and carpel-abundant, non-specific lipid transfer protein gene is expressed in the epidermis and parenchyma of *Gerbera hybrida* var. Regina (Compositae) Plant Mol Biol 26:971-978
- Kotilainen M, Albert VA, Elomaa P, Helariutta Y, Koskela S, Mehto M, Pollanen E, Uimari A, Yu D, Teeri TH (1999) Flower development and secondary metabolism in *Gerbera hybrida*, an Asteraceae. FNL 28:20-31
- Martens. S, Forkmann G. (2000) Flavonoid biosynthesis in *Gerbera* hybrids : Enazymology and genetics. Acta Hort, 508 ISHS 2000
- Mercurio, G. (2002) *Gerbra* cultivation in greenhous. Schreurs, The Netgerlands
- Meynet J, sibi M (1984) Haploid plants from *in vitro* culture of unfertilized ovules in *Gerbera jamesonii*. Z Pflnzenzucht 93:78-85
- Meynet J (1983) Effects of *in vitro* propagation on the further growth behaviour of some *Gerbera* varieties. Agromonie 3:839-846
- Nagaraju, V, G. S. L. Srinivas, G. Lakshmi Sita (1998) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Gerbera hybrida*. Current Science Vol. 74 No. 7, 630-634
- Orlikowska T, Nowak E (1997) Factors affecting transformation of *Gerbera*. Acta Hortica 447:619-621
- Orlikowska T (1999) Regeneration of adventitious shoots in process of genetic transformation. In Altman A, Ziv M & Izhar S (eds) : Plant Biotechnology and *In Vitro* Biology in the 21st Century (pp 185-188) Kluwer Academic Publishers Dordrecht
- Penningsfeld F, Forchthammer L (1980) *Gerbera*. Ulmer Fachbuch, Zierpflanzenbau. Eugen Ulmer, Stuttgart 342 pp
- Pierik RLM, Steegmans HHM, Marelis JJ (1973) *Gerbera* plantlets from *in vitro* cultivated capitulum explants. Sci Hortic 1:117-119
- Pierik RLM, Jansen JLM, Maasdam A, Binnendijk CM (1975) Optimalization of *Gerbera* plantlet production from excised capitulum explants. Sci Hortic 3:351-357
- Pierik RLM, Steegmans HHM, Verhaegh JAM, Wouters AN (1982) Effect of cytokinin and cultivar on shoot formation to *Gerbera jamesonii* in vitro. Neth J Agric Sci 30:341-346
- Radojevic LJ, Djordjevic N, Manceva L (1987) Clonal multiplication of *Gerbera* by in vitro culture of different tissues. Acta Hortica 218-223
- Reynoird J-P, Chriqui D, Noin M, Brown S, Marie D (1993) plant regeneration from in vitro leaf culture of several *Gerbera species*. Plant Cell Tissue Organ Cult 33:203-210
- Ruffoni B & Massabo F (1991) Tissue culture in *Gerbera jamesonii* hybrida. Acta Hortica 289: 147-148
- Tankely S.D. and Orton T.J., Isozymesc in plant genetics and breeding. Elsevier 12 (1983)
- Tyrach A, Horn W (1997) Inheritance of flower colour and flavonoid pigments in *Gerbera*. Plant breeding 116:377-381
- Teresa Orlikowaka. Elzbieta Nowak, Agnieszka Marasek, Danuta Kucharska (1999) Effect of growth regulators and incubation period on *in vitro* regeneration of adventitious shoots from *Gerbera* petioles. Plant cell Tissue and Organ Culture 59:95-102