

발간등록번호

11-1543000-001242-01

국화의 화색퇴화 원인구명과 고온적응형 품종개발
(Clarifying the Causes of Flower Colour Degradation
in Chrysanthemum and Developing New Cultivar
with Thermotolerance)

경북대학교

농림축산식품자료실



0002683

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “국화의 화색퇴화 원인구명 및 고온적응형 품종개발에 관한 연구” 과제의
보고서로 제출합니다.

2016년 2월 3일

주관연구기관명 : 경북대학교

주관연구책임자 : 김창길

1세부연구책임자 : 김창길

2세부연구책임자 : 한중술

연 구 원 : 전수민

연 구 원 : 박경일

연 구 원 : 임선형

협동연구기관명 : 경북농업기술원

협동연구책임자 : 김현석

요 약 문

I. 제 목

국화의 화색퇴화 원인구명 및 고온적응형 품종개발

II. 연구성과 목표 대비 실적

당초 신품종등록 출원 및 특허 출원의 목표는 2건으로, 최종 실적 4건 달성으로 목표를 200% 달성하였으며, 논문은 8건(SCI급 5건, 비 SCI급 3건)이지만 최종 실적은 9건(SCI 7건, SCIE 2건)으로 100% 이상 달성하였으며, 학술대회 발표는 6건이지만 최종 실적은 10건으로 100% 이상 달성하였다. 또한 인력양성 역시 박사 2명, 석사 2명 배출로 목표 대비 높은 실적을 달성 하였다.

III. 연구개발의 목적 및 필요성

우리나라에서 연중생산으로 농가 소득에 이바지하는 화훼류 중에 하나인 국화는 생육적온보다 고온인 여름철 환경조건에서 개화지연, 2차 측지 발생 및 기형화 발생이 많아 고품질·다수확의 절화재배가 어렵다. 특히, 적색이나 황색 같은 유색계통의 스프레이 국화에서 주로 나타나는 화색소 퇴화 현상은 절화품질을 심각하게 저하시키는 생리장해 현상으로 절대적으로 고온에서 발생한다. 이를 개선하고자 다양한 방법으로 품종 육성에 대한 연구가 있었지만 전통적인 육종방법은 시간과 노력, 경제력 손실이 많이 뒤따른다. 따라서 본 연구에서는 최근 다발하는 불량 재배환경(특히 이상 고온 지속)하에서도 안정적으로 화색이 발현되는 국화 유전자형(품종)을 개발하고자 고온기 화색발현에 영향을 미치는 다양한 분자유전학적·생리적 원인을 규명하고, 형질전환 방법을 이용하여 내열성 관련 외래 유전자가 도입된 고온적응형 국화를 개발하여 육종소재로 활용함과 동시에 특이프로모터를 이용하여 화색소 생합성과 관련된 구조유전자를 조절하는 *MYB* 유전자군의 발현을 제어함으로써 고온기에도 고품질의 국화 절화생산을 가능하게 함은 물론 GM 화훼작물의 조기 상업화 모델을 제시하고자 연구를 수행하였다.

IV. 연구개발 내용

고온하에서 화색이 안정적으로 발현되는 국화품종 개발 및 화색발현 안정화와 최적화를 위한 특허회피용 공동발현 벡터를 재조합하여 사용하였으며, 국화 형질전환 효율향상을 위해 형질전환 단계별 최적 조건(식물체 배양기간, 암배양 조건, 신초재생 호르몬

농도 등)을 연구하여 기술을 보다 체계적으로 확립하였다. 또한 *MYB* 유전자 도입 형질전환체 선발을 위해 효과적인 항생제 농도를 선발하였고, *MYB* 조절 유전자가 도입된 형질전환체의 발현양상을 분석, 집적화 하였고, 선발된 형질전환체를 안정적으로 순화하는 방법을 확립하였다. 내열성 발현 유전자 도입을 위해 내열성 전신발현 유전자를 삽입하여 특허회피용 내열성 유전자 발현 형질전환용 벡터를 재조합 하였고, 목표 유전자가 정상 발현되는 형질전환체를 선발하여 후대 성숙식물체의 고온하 생리특성을 구명하였다. 또한, 국화의 화색퇴화 원인규명 및 고온적응형 우수 육종소재 개발을 위해 스프레이 국화의 품종별, 화아발달 단계별 고온장해 특성 평가를 실시하였고, 특성평가 자료를 바탕으로 목적특성 부합형 계통 선발하여 교배 모본으로 사용하여 교배를 통한 유전인자 추적 및 육종소재를 개발하였다.

V. 연구개발결과

고온하에서 화색이 안정적으로 발현되는 국화품종을 육성하기 위해 *35S::RsMYB*와 *pInMYB::RsMYB*을 이용해 국화 스프레이 품종 피치엔디에서 9개체, 피치레드 9개체, 비비드스칼렛 21개체, 국화 스탠다드 품종 신마 3개체의 형질전환체를 육성하였고, 내열성 발현유전자가 도입된 국화 형질전환체를 육성하여 고온하에서의 생리특성을 살펴본 결과 비형질체 전환에 비해 높은 수준의 내열성을 나타낸 내열성 유전자가 도입된 국화 형질전환체를 육성하였다.

고온적응성이 우수한 신품종 개발을 위해 여름 개화용 국화인 하추국 계통의 유전자원 15품종을 수집하여 교배하여 생육 및 화색과 화형이 우수한 163계통을 1차 선발하였다. 1차 선발한 계통은 축성재배, 자연재배, 억제재배 등 3회에 걸쳐 특성검정을 실시하여 생육과 절화품질이 우수한 화이트썸머, 써니썸머, 핑크썸머, 옐로우썸머 등 4품종을 육성하였다.

VI. 연구개발에 따른 기대성과

적색계 스프레이 국화의 효율적인 고빈도 형질전환 기법 확립과 형질전환체 후대에서 도입 유전자의 안정적 발현 확인 및 형질전환 영양계통 고정과 육종소재로서의 활용은 화훼류의 분자육종기술 실용화에 직간접적으로 적용 가능할 것이며, 목표특성이 최소 20%이상 개선된 고온적응형 국화 소재는 고온기에도 안정적으로 화색발현(화색소 퇴화 억제)이 가능하여 품질저하와 수확량 감소에 따른 경제적 손실을 최소화할 것이다. 또한, 본 연구를 통해 제시된 “불량환경(이상 고온 등)에서도 정상생장과 발육이 가능한 GM화훼작물 개발에 관한 모델”은 지지부진한 국내 GM 화훼작물 조기 상업화를 가속화시킬 수 있는 기술적 토대가 될 것으로 기대된다.

SUMMARY

(영문요약문)

Discoloration of chrysanthemum flowers was found to be serious in summer season, resulting in declination of ornamental value in the market. Hence, enhancement of flower color by genetic engineering to overcome extreme temperature during summer season is necessary. In this study, we produced transgenic chrysanthemums (cvs. Peach Red, Peach ND, and Vivid Scarlet) using *Agrobacterium*-mediated transformation system, which contains anthocyanin regulatory *RsMYB1* gene isolated from radish (*Raphanus sativus* L.) by placing under the control of either cauliflower mosaic virus 35S or petal specific promoter InMYB. In order to consider the copy number of target gene (*RsMYB1*), transgenic plants confirmed by PCR were further analyzed by southern hybridization. In addition, expression level of anthocyanin biosynthetic genes was also confirmed by reverse-transcription(RT) PCR. Furthermore, expression level of anthocyanin in the transgenic plants were examined in the greenhouse.

Background: Several *MYB* genes belonging to R2R3 MYB transcription factors have been used in several plant species to enhance anthocyanin production, and have shown various expression or regulation patterns. This study focused on the effect of ectopic expression of an *RsMYB1* isolated from radish (*Raphanus sativa*) on chrysanthemum cv. 'Shinma'. Results: The RT-PCR results confirmed that *RsMYB1* regulated the expression of three key biosynthetic genes(*CmF3H*, *CmDFR*, and *CmANS*) that are responsible for anthocyanin production in transgenic chrysanthemum, but were not detected in the non-transgenic line. In all transgenic plants, higher expression levels of key biosynthetic genes were observed in flowers than in leaves. However, the presence of *RsMYB1* in chrysanthemum did not affect any morphological characteristics, such as plant height, leaf shape or size, and number of flowers. Furthermore, no anthocyanin accumulation was visually observed in the leaves and floral tissue of any of the transgenic lines, which was further confirmed by anthocyanin content estimation. Conclusion: To our knowledge, this is the first time the role of an MYB transcription factor in anthocyanin production has been investigated in chrysanthemum.

This research was conducted to develop genetic transformation of the recalcitrant chrysanthemum cv. Shinma by application of appropriate antibiotics and selective agents. Clavamox had the least inhibitory effect on shoot regeneration compared to timentin, carbenicillin, and cefotaxime. Clavamox, at a concentration of 125 mg L⁻¹, was found to be the most suitable for shoot regeneration and production of quality shoots, suppressing the growth of *Agrobacterium* in explants infected with strains GV3101 or C58C1 for 3 and 4 weeks, respectively. The concentration of phosphinothricin (PPT) was found to be 1.0 mg L⁻¹ for screening of putative transgenic shoots. Moreover, transgenic chrysanthemums were obtained by culturing explants co-cultivated with *A. tumefaciens* strain GV3101 harboring an anthocyanin regulatory gene *RsMYB1* isolated from radish (*Raphanus sativus*), which was placed under the control of cauliflower mosaic virus promoter (CaMV) 35S and petal-specific promoter *InMYB1* isolated from the morning glory (*Ipomoea nil*), on shoot regeneration medium supplemented with recommended concentration of antibiotic and selective agent. Flow cytometry analysis revealed that there was no variation in ploidy level between transgenic plants and donor plants (non-transformants). To our knowledge, this is the first report of the use of Clavamox and MYB transcription factor for genetic transformation of this chrysanthemum.

When encounter harsh environmental conditions such as drought, salinity, low temperature and high temperature, plants constantly monitor the environmental signals. Therefore, severe abiotic stresses cause adverse effects on the growth, development and productivity followed by generating morphological, physiological, biochemical and molecular changes in plants. Of abiotic stresses, high temperature especially emerged in vigorously growing season can have dramatic impacts on the productivity and quality of crops resulting in farmers' low income. Many of researches using the *Arabidopsis* as a model plant have clarified responses to heat stress, though these findings still remain to be obscure to crops.

Chrysanthemum is one of the most important commercial cut flowers in the world. In summer, heat stress by high temperature has effects on chrysanthemum like low productivity, flowering delay and discoloration. Monothiol glutaredoxins play important roles in maintaining redox homeostasis in living cells and share some conserved function across species. *Arabidopsis*

thaliana monothiol glutaredoxin AtGRX3 is critical for protection from oxidative stress in cytosol and/or nucleus. Collectively, we here report that over-expression of *AtGRX3* in chrysanthemum plants confers tolerance to heat stress. To improve the tolerance to heat stress in chrysanthemum, independent fourteen lines constitutively over-expressing *AtGRX3* that isolated from *A. thaliana* were generated via *Agrobacterium*-mediated genetic transformation technology. All lines were characterized by polymerase chain reaction, Southern hybridization, semi-quantitative reverse transcription-PCR, and bioassays. Over-expression of *AtGRX3* in *Chrysanthemum* plants enhanced photosynthetic performance and insistence of cell membrane permeability, and decreased oxidative damage in addition to promotion of plant growth under heat stresses. These findings suggest a specific protective role of the redox protein against high temperature stress, and provide a genetic engineering strategy to improve crop thermotolerance.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1 Process and objects of the project

Chapter 2 Domestic and foreign technique of abiotic stress
adjusted gene

Chapter 3 Materials and Methods

Chapter 3 Results

Chapter 4 Application of results for the agricultural industry

Chapter 5 Reference

목 차

제1장 연구개발과제의 개요 및 성과목표 -----	10
제1절 연구개발의 목적, 필요성 -----	10
1. 연구개발 대상기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성 -----	10
제2절 연구성과 목표 대비 실적 -----	12
 제2장 국내외 기술개발 현황 -----	 13
제1절 국내외 관련분야에 대한 기술개발현황 및 전망-----	13
1. 국화의 고온 스트레스에 대한 반응과 화색조절 연구 -----	13
2. 고온스트레스에 대한 내성연구 -----	16
3. 문제점과 전망 -----	18
 제3장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	 19
제1절 연구방법 -----	19
1. 화색발현 안정화와 최적화를 위한 특허회피용 공동발현 벡터 재조합 -----	19
2. 국화의 화색퇴화 양상 -----	19
3. 국화 국내육성 품종의 화색발현 유전자의 형질전환 효율향상을 위한 식물체 재분화 최적화 조건 확립 -----	20
4. 국화 화색발현유전자의 형질전환 및 삽입유전자 발현 식물체 선발 -----	22
5. 내열성 유전자 발현 형질전환용 운반체 재조합과 <i>Agrobacterium</i> 의 형질전환 -----	25
6. <i>Agrobacterium</i> 공동배양법에 의한 내열성 유전자 도입 형질전환체 획득과 재분화 식물체의 핵산분석 -----	25
7. 형질전환 국화의 영양번식 세대전진 -----	27
8. 국화 wild type 및 형질전환체의 고온스트레스에 대한 생리적 반응 구명 -----	27
9. <i>AtGRX3</i> 유전자 형질전환체의 고온스트레스 조건에서의 개화반응 정밀검정 -----	29
10. 국화의 화색퇴화 원인구명 및 고온적응형 우수 육종소재 개발 -----	29
제2절 연구결과 -----	30
1. 화색발현 안정화와 최적화를 위한 특허회피용 공동발현 벡터 재조합 -----	30
2. 국화의 화색퇴화 양상 -----	31
3. 국화 국내육성 품종의 화색발현 유전자의 형질전환 효율향상을 위한 식물체 재분화 최적화 조건 확립 -----	32
4. 국화 화색발현 유전자의 형질전환 및 삽입유전자 발현 식물체 선발 -----	43
5. 내열성 유전자 발현 형질전환용 운반체 재조합과 <i>Agrobacterium</i> 의 형질전환 -----	50
6. 내열성 유전자 도입 국화 형질전환체 획득과 핵산 분석 -----	52

7. <i>AtGRX3</i> 형질전환 계통의 내열성 생리검정 -----	62
8. 국화의 화색퇴화 원인구명 및 고온적응형 우수 육종소재 개발 -----	68
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	83
제1절 연도별 연구목표에 입각한 연구개발목표의 달성도 -----	83
제2절 관련분야의 기술발전예의 기여도 -----	84
제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	85
제1절 연구결과의 학술논문 게재 성과 -----	85
제2절 연구결과의 학술발표 성과 -----	86
제3절 특허출원 -----	87
제4절 연구인력 양성 -----	87
제5절 수상실적 -----	87
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	88
제7장 연구시설·장비 현황 -----	89
제8장 연구실 안전관리 이행실적 -----	90
제9장 참고문헌 -----	91

제1장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제1절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발 대상기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

가. 화훼산업의 경제적·산업적 중요성

화훼류는 원예산업의 한 축으로서 유럽, 북아메리카 및 일본시장에서 연간 1,500억 달러의 시장을 형성하고 있으며 특히 코스타리카, 콜롬비아, 케냐, 에티오피아 및 에콰도르 등 여러 개발도상국에서는 국가 경제의 중요한 부분을 차지하고 있다(Chandler 와 Tanaka, 2007).

우리나라 화훼산업은 '80년대 이후 급격히 성장하여 현재 생산 규모는 약 1조 원 수준으로 추정되고 있는데, 수출이 이러한 화훼 산업 성장의 견인차 역할을 하여 수출액에 있어 '90년 140만 달러에서 '10년에는 10,300만 달러로 10년 동안 70배 이상 급속히 증가하였다.

* 농업생산액 중 화훼 생산액 비중 : ' 80년대 초 0.2~0.6% → ' 10년대 2.1~2.9%

* 화훼농가 비중 : ' 80년 0.1% → ' 10년 0.9%

화훼류 중에서도 국화는 국내 재배면적, 생산액 및 수출규모 등 경제적으로나 산업적으로 중요도가 매우 높은 작목인데 '10년 재배면적은 583 ha로 우리나라 전체 절화류 재배면적 1,975 ha의 29.5%를 차지하고 있는 핵심 작목으로 생산액은 774억원에 달한다(MFAFF, 2011).

또한, 꽃은 전체 생산액의 10% 이상을 수출하는 품목이므로 수출 전략산업으로 발전할 가능성이 충분한데 우리나라 꽃 수출은 지속적으로 확대되어 2010년 말 기준으로 1억 달러 수출시대가 도래하였다. 이중 국화의 '10년 수출액은 13,802천 US\$로 국산품종의 수출이 전체 수출액의 32%를 차지한다.

특히, 본 연구과제의 참여업체인 경상북도 구미시설공단(구, 구미원예수출공사)은 네덜란드방식인 벤로형 유리온실을 대규모(25,000여평)로 갖추고 20여 품종의 스프레이 국화를 자동제어방식인 복합환경제어 시스템으로 재배하여 일본에 연간 약 12백만 송이를 전량 수출하고 있는데 이는 우리나라 국화 수출액의 90%를 차지하는 막대한 물량이다.

그러나 최근 여름철 고온으로 인해 2차 생장, 개화 불균일, 버들눈 발생, 화형 불균일 그리고 화색퇴화 등의 생리장해가 발생하여 수출용 스프레이 국화의 품질을 심각하게 떨어뜨리고 있고(그림 1), 이로 인한 경제적 손실이 수확량의 거의 30%에 달하고 있어 대책 마련이 시급한 실정이다.

나. 국화 품종육성 현황 및 문제점

현재 국내에는 400여 국화품종이 재배되고 있으며 연간 50~100품종이 새롭게 포장에 도입되는데, 이는 국화의 재배기간이 짧고 최대 4기작(/년)이 가능하며 시장에서의 소비자의 기호도 변화가 빨라 매년 새로운 품종에



1. 수출용 국화의 고온 생리장해

대한 요구도가 높기 때문이다.

국내 재배품종 중 국내육성품종의 비율은 ‘11년도 기준으로 22% 수준에 머무르고 있어 다양한 원예적 특성을 지닌 새로운 품종의 개발과 보급이 시급하다. 이에 따라 최근 농림수산식품부는 화훼산업발전대책으로 국내육성 품종의 보급률을 ‘17년까지 33%로 확대하는 것을 추진하고 있다.

또한, 국내에서 재배되고 있는 스프레이 국화는 대부분 네덜란드에서 육성되어 도입된 품종이기 때문에 당해 품종의 생육적온을 벗어나는 국내 여름철 고온 재배조건 하에서는 개화지연, 2차 측지 발생 및 관생화 발생 등으로 인해 절화의 품질저하가 초래되는 등 국내 재배용으로는 부적합하다는 점을 감안할 때, 국내 여름철 고온 재배환경에서도 우량한 절화생산이 가능한 품종육성이 무엇보다도 필요하다고 판단된다.

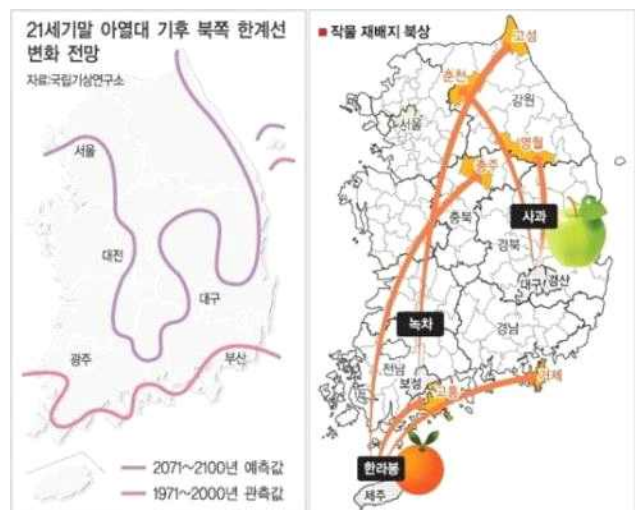
특히, 우리나라도 이제는 더 이상 기후변화의 안전지대가 아니며 지구온난화로 인한 이상 징후는 이미 여러 곳에서 나타나고 있는데, 그 일례로 최근 30년간 개나리, 벚꽃 등 봄꽃과 주요 수종의 개화기가 앞당겨 졌으며 농산물의 재배지도가 바뀌고 있음을 볼 때(그림 2), 고온내성과 같은 내재해성 특성의 도입이 국화를 포함한 다양한 작물의 육종목표에 우선순위로 고려되어야 할 것이다.

다. 연구개발의 필요성

오늘날 화훼육종가는 특정 종의 꽃이 본래 가지고 있지 않은 새로운 화색을 발현시키기 위해서 전통적인 교배육종과 더불어 천연색소 생합성과 관련된 여러 가지 유전자의 도입을 시도하고 있으며, 천연색소 중에서 카로티노이드 보다는 주로 안토시아닌을 포함한 플라보노이드계 생합성 대사 경로의 발현과 조절에 초점이 맞추어 왔다.

화훼류에서 특정 종이 가지고 있지 않는 화색으로의 변경은 형질전환 기법을 활용하는 유전자 변형(genetically modified: 이하 GM) 기술이 가장 널리 적용되는 분야이고, 화훼작물을 통털어 GM 화훼 작물 개발연구의 많은 부분이 화색을 변경시키는데 집중되어 있다. 그 중 가장 성공적인 화색 변경의 성과는 200여년 동안 장미 육종가들이 꿈꿔왔던 파란장미의 탄생이라고 할 수 있는데(Katsumoto 등, 2007), 장미에는 없는 파란색 계열의 안토시아닌 색소인 델피니딘을 생합성하는 능력을 부여하기 위해 전구물질인 미리시틴 합성을 위한 붓꽃 유래의 flavonoid 3'-5'-hydroxylase 유전자를 도입하고 장미의 내재 dihydroflavonol-4-reductase 유전자 발현을 억제시키는 전략을 구사하여 꽃말이 ‘불가능’인 파란 장미가 개발되었다.

화색은 크게 색소의 종류, 생합성된 색소의 혼합, 세포의 모양과 배열 및 색소가 저장되는 액포의 pH 등에 의해 결정되며 그 중 화색을 결정하는 가장 중요한 요소인 색소의 종류는 유전적으로 각 종에 고정되어 있지만 환경 요인에 의해서 함량과 색깔이 큰 영향을 받는다. 특히 적색, 청색, 자색을 나타내는 안토시아닌의 색깔에 영향을 주는 내부적 요인으로 보색소, pH,



2. 기온상승에 따른 농작물재배지 변화

금속이온, 탄닌 등이 있고 생합성량에 영향을 미치는 요인으로는 광과 온도, 토양 pH, 화학물질 등이 있다(Kim, 1999)(그림 3).

특히, 적색, 청색 및 자색과 같은 유색의 스프레이국화는 여름철 고온하에서 안토시아닌 색소의 축적이 부족하거나 화색소가 퇴화하는데 이는 절화품질을 현저히 저하시키는 요인이 되어 대외 수출의 커다란 걸림돌로 작용하고 있다. 이러한 화색퇴화 현상을 방지하기 위해 지금까지 양액 엽면시비, 차광, 환기 및 CO₂공급 등과 같은 다양한 처리방법이 시도되어 왔으나 그 효과가 거의 없거나 미미하여 보다 근본적인 해결방법이 필요하다.

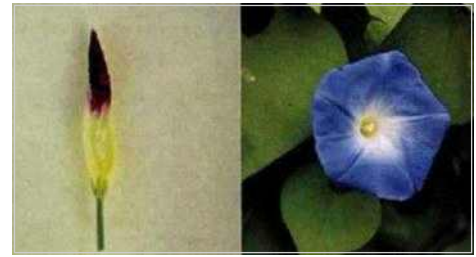


그림 3. pH에 따른 나팔꽃의 화색 변화

최근까지 고온에서도 비교적 화색의 퇴화가 적은 스프레이국화를 전통 교배육종 방법에 의해 선발 한 결과, 개화지연 정도가 약하고 하계 고온에도 화색이 퇴화되지 않는 헌트, 롤리팝 등 6품종을 육성하였으나 앞서 언급한 바와 같이 국화의 품종 기호도가 급하게 변한다는 점을 감안하면 관상 가치가 높아 기호도가 높으면서 내재해성인 품종을 신속하게 육성하기 위해서는 전통적 교배육종 방법과 병행하여 육종효율을 한 층 높일 수 있는 분자유전학적 접근이 필요하다.

앞서 언급한 바와 같이 적색 또는 황색과 같은 유색계통의 스프레이 국화에서 주로 나타나는 화색퇴화 현상은 절화품을 저하시키는 생리장해로서 대부분 고온에서 발생한다. 따라서 본 연구는 고온기 화색발현에 영향을 미치는 다양한 분자유전학적·생리적 원인을 구명함으로써 해결방법을 모색하는 한편 보다 적극적인 방법으로 빈번한 불량환경(이상 고온)하에서도 안정적으로 화색이 발현되는 GM국화를 개발하여 고품질 절화생산은 물론 GM 화훼작물의 조기 실용화를 위한 모델을 제시하고자 한다.

제2절 연구성과 목표 대비 실적

당초 신품종등록 출원 및 특허 출원의 목표는 4건으로, 최종 실적 4건 달성으로 목표를 100% 달성하였으며, 논문은 8건(SCI급5건, 비 SCI급 3건)이지만 최종 실적은 9건(SCI 7건, SCIE 2건)으로 100% 이상 달성하였으며, 학술대회 발표는 6건이지만 최종 실적은 10건으로 100% 이상 달성하였다. 또한 인력양성 역시 박사 2명, 석사 1명 배출로 목표 대비 높은 실적을 달성하였다.

제2장 국내·외 기술개발 현황

제1절 국내·외 연구 기술개발현황 및 전망

1. 국화의 고온 스트레스에 대한 반응과 화색조절 연구

Chrysanthemum morifolium(국화) 종 내에 존재하는 안토시아닌계 주 색소는 cyanidin 3-glucoside로 농도 차이에 의해 암적색에서부터 분홍까지 다양한 색깔을 나타내는 등 축적된 색소의 양적 효과가 있는 것으로 알려져 왔다(Kim, 1999). 최근 적색계 국화에는 malonylation된 형태인 cyanidin 3-O-6"-O-malonylglucoside와 cyanidin 3-O-3", 6"-O-dimalonylglucoside 등 두 가지 색소가 주요 색소로 분포하는 것으로 밝혀졌다. 안토시아닌 함량에 미치는 주요 환경 요인 중 가장 중요한 것은 온도인데 낮은 온도에서는 안토시아닌 함량이 증가되지만 높은 온도에서는 감소된다. 이러한 온도의 영향은 광합성과 관련지어 해석되는데, 안토시아닌과 같은 2차 대사산물은 거의 당과 결합되어 있는 배당체이고, 또 당으로부터 얻어진 에너지를 이용하여 색소가 합성되기 때문인 것으로 알려져 있다. 또한, 광합성 산물인 당은 안토시아닌 생합성에 관여하는 유전자인 *chs* 유전자가 발현하는데 직접적 신호로 작용하는 것으로 보고되었다(Weiss, 2000). 일반적으로 고온에서 안토시아닌 함량이 떨어지는 이유는 합성물 자체가 감소하기 때문으로 나타나고 있는데, 많은 연구에서 안토시아닌 생합성 관련 효소인 phenylalanin ammonia lyase(PAL), chalcone synthase(CHS), chalcone isomerase(CHI), dihydroflavonol reductase(DFR) 등의 활성이 온도의 영향을 많이 받는 것으로 보고되고 있다(Christie 등, 1994; Dela 등, 2003; Leyva 등, 1995; Marles 등, 2003). 이러한 고온에 의한 영향은 품종에 따라 상당한 차이를 나타내고 있는데 고온기에 비교적 화색이 잘 나타나는 'Wembley' 와 적색이 잘 발현되지 않는 'Relance' 의 온도별 화색 발현을 살펴본 결과 35°C/20°C(주간/야간)에서 1주일간 고온처리 하였을 경우 'Wembley' 는 25°C/20°C에 비해 안토시아닌 함량이 약 10.0% 감소하였지만, 'Relance' 는 43.4%로 크게 감소하였다(그림 4).

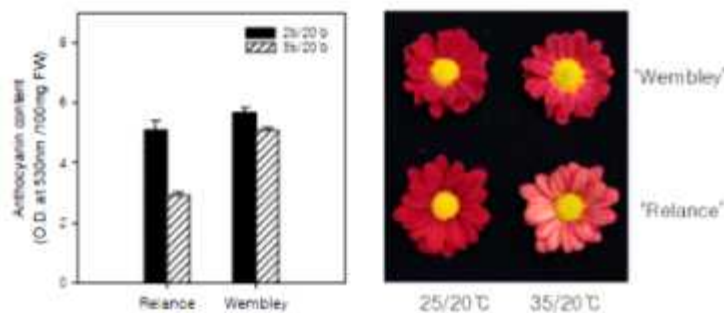


그림 4. 적색계 스프레이국화의 고온기 품종별 안토시아닌 함량비교, 허 등(2008)

플라보노이드는 수용성물질이고 노란색에서 빨간색 및 청색에 이르는 넓은 영역의 색을 나타내는 색소로 식물 특이적인 이차 대사산물인 리그닌(lignin), 스틸베노이드(stilbenoids), 쿠마린(coumarins)과 파이토알렉신(phytoalexins)을 합성하는 페닐프로파노이드(phenylpropanoid) 생합성 경로로부터 합성된다(그림 5). 일반적으로 chalcone과 안토시아닌은 당화(glycosylations),

말로닐화(malonylations) 및 아실화(acylations) 등의 여러 가지 수식작용을 거친 다음 액포 내로 저장된다.

꽃잎의 플라보노이드 성분은 종이나 품종에 따라 매우 다양하다. 따라서 식물이 지니지 않는 색깔의 플라보노이드를 생산하기 위하여 내재유전자의 발현조절과 더불어 목적하는 새로운 플라보노이드 합성과 관련된 외래유전자를 도입해야 한다(그림 6).

최근 대사조절 방법으로 RNA interference(RNAi)를 이용하는 방법이 사용되고 있다. RNAi 방법을 이용하여 토레니아와 담배에서 각각 CHS와 chalcone isomerase(CHI) 발현을 억제함으로써 화색 변경이 가능함이 보고되었다(Fukusaki et al., 2004; Nishihara et al., 2005). 짙은 파란색의 용담은 내재 *F3' 5' H* 유전자를 발현억제 시킨 결과 화색이 빨간색으로 변경되었고(Nakatsuka et al., 2008a), 토레니아에서 *F3' 5' H*와 *F3' H* 유전자를 동시에 발현억제 시킨 결과 펠라고니 단계열의 안토시아닌 축적이 유도되었다(Nakamura 등, 2010).

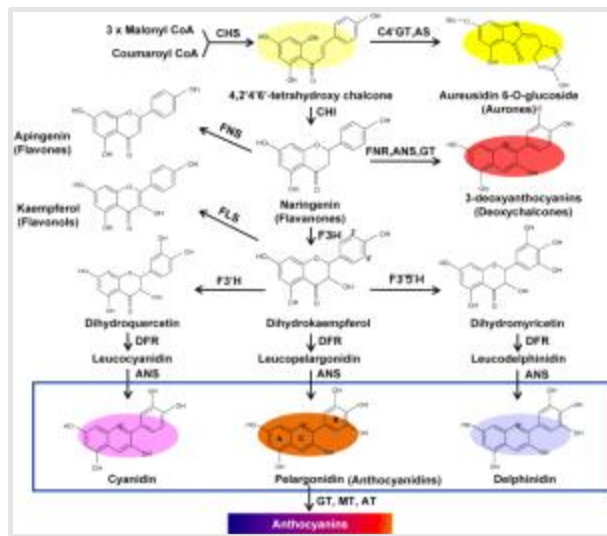


그림 5. 플라보노이드 생합성 경로



그림 6. 유전공학에 의한 화색변이에 성공한 작물

국화의 *CmCCD4a* 유전자의 발현이 꽃잎 특이적일 뿐 아니라 흰 꽃에서 강하고 노란 꽃에서

는 약한데 착안하여 흰꽃에서의 *CmCCD4a* 유전자 발현을 RNAi 기법을 통해 억제시킨 결과 짙은 노란 화색 표현형이 얻어졌다(그림 7). 비형질전환체에 비해 *CmCCD4a* 유전자 발현은 40% 정도로 감소되었고 꽃잎의 카로티노이드 함량은 대폭 증진($102 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)되어 짙은 황색 표현형을 나타내었다.



그림 7. 국화에서 *CmCCD4a* 유전자 발현을 RNAi 기법을 통한 화색변이

흥미롭게도 형질전환된 국화가 비형질전환체에 비해 상당히 작아지고 apical bud의 수가 줄어들었는데도 불구하고 꽃의 크기는 변함이 없는 점이 특이한데 그 원인은 아직 밝혀지지 않았다. 다만 *CmCCD4a* 작용에 의해 생성된 아포카로티노이드의 일부가 줄기나 뿌리 등으로 이동하여 branching을 저해하는 strigolactone 생성에 관여할 수도 있어 *CmCCD4a* 발현 저해에 의해 영양생장 단계에서 branching 촉진과 dwarf 형질이 나타날 수 있다고 제시하고 있다 (Ohmiya, 2009).

또한, 유전자의 발현조절을 위해서 프로모터의 선택 또한 매우 중요하다. 일반적으로 상시 전신발현을 유도하는 cauliflower mosaic virus 35S(*CaMV35S*) 프로모터를 이용하여 장미, 카네이션 및 토레니아 등 많은 화훼류에서 성공적으로 화색 변경이 이루어졌다(Katsumoto 등, 2007; Nakamura 등, 2010; Ono 등, 2006).

그러나, 용담과 국화 같은 몇몇 종의 작물에서 *CaMV35S* 프로모터는 도입유전자의 발현에 효과적이지 않았다(Aida 등, 2004; Yamasaki 등, 2011). 국화의 경우도 *CaMV35S* 프로모터를 이용한 형질전환보다는 국화의 ubiquitin extension 단백질의 프로모터 또는 chlorophyll a/b binding 단백질의 프로모터가 더 효과적으로 외래유전자를 발현시킬 수 있었다(Aida 등, 2004; Annadana 등, 2002)(그림 8).

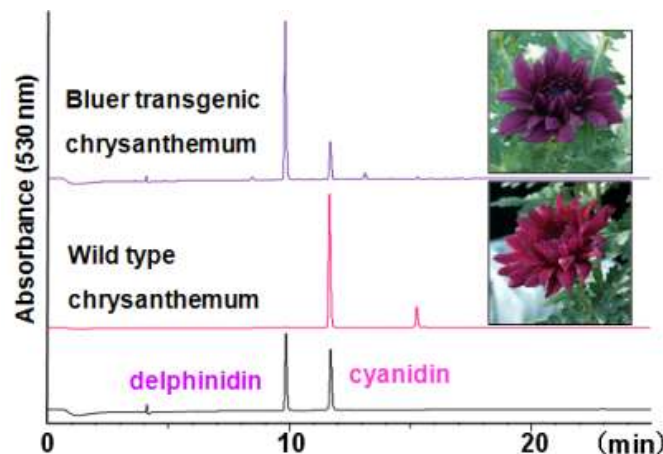


그림 8. Delphinidin-type anthocyanin(flavonoid 3',5'-hydroxylase gene의 축적을 용이하게 한 특이프로모터와 translational enhancer 통한 블루 국화개발

따라서 다양한 GM 화훼작물을 개발하기 위해서는 다양한 프로모터의 개발과 활용이 필요하며 다양한 프로모터의 활성 및 화색변경 정도 등을 고려하여 선택적으로 이용한다면 보다 정교한 화색변경이 가능할 것이다.

전사인자 조절을 통한 화색변경에 관한 최근 시도로, 플라보노이드 생합성에 관여하는 구조유전자의 발현은 MYB, basic helix loop helix(bHLH) 및 WD40 전사인자(MBW)에 의해 조절되는 것으로 알려지고(Koes et al., 2005), MBW 유전자군의 발현조절은 꽃과 과실에서의 안토시아닌 성분과 색소 축적뿐 아니라 다양한 생리에도 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(Davies 2009; Nishihara와 Nakatsuka, 2010)(그림 9)

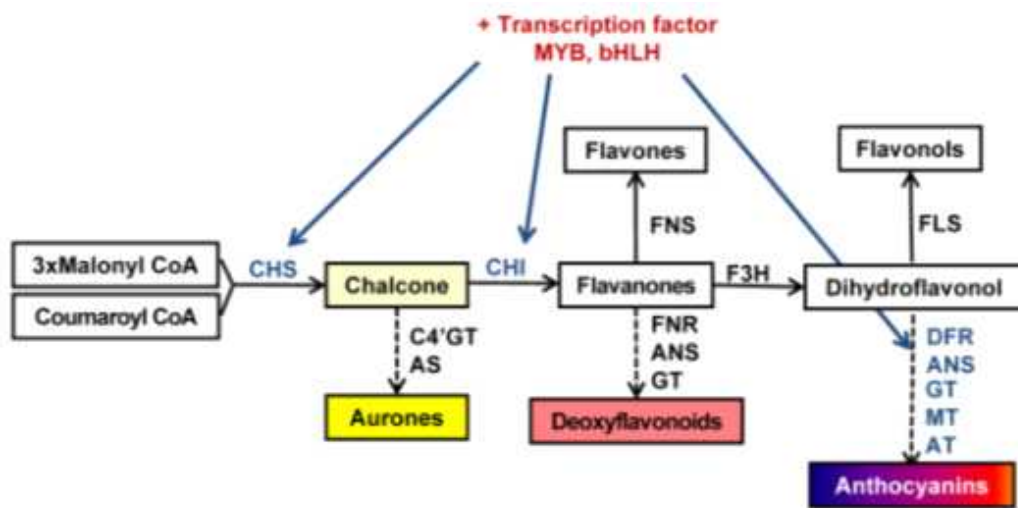


그림 9. Strategies of flavonoid pathway engineering in flower

MBW 유전자군은 일반적으로 플라보노이드 생합성 경로에 관련된 유전자 전체를 조절하기 때문에 MBW 유전자군에 속한 유전자 조절을 통해 플라보노이드 생합성 관련 다수 유전자를 동시에 조절하는 것이 가능하다.

2. 고온스트레스에 대한 내성 연구

최근 기후변화에 따른 이상 고온은 농업생산성에 큰 영향을 미치고 있는 반면 고온스트레스에 관한 분자유종학적 연구와 생리적 연구는 우리가 중요하게 생각하는 경제작물을 대상으로 하고 있지 않고 대부분 모델식물인 애기장대에 국한되어 있다(Battisti와 Naylor, 2009; Burke 등, 2009; Wu 등, 2012).

고온스트레스는 직·간접적으로 산화적스트레스(oxidative stress)를 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서 산화적스트레스 방어가 고온스트레스 하에서 국화의 내열성 확보에 중요한 구성요소가 된다고 할 수 있다(Adachi 등, 2009; Wahid 등, 2007)

내열성 획득과정은 단순하지 않고 다차원적인데, 예를 들어 heat shock transcription factor(HSF), heat shock protein(HSP), 활성산소족(reactive oxygen species: ROS) 중계 신호전달 및 효소 또는 비효소적 ROS 소거 기작 등이 식물의 고온스트레스 반응에 복잡하게 관련되어 있다(Kotak 등, 2007; Larkindale와 Vierling, 2008; Miller 등, 2008; Penfield, 2008).

ROS는 고온과 같은 비생물학적 스트레스(abiotic stress) 등에 의해 세포내에 축적되며 호기성 대사과정의 독성을 가지는 2차산물이다. 고온스트레스를 받는 동안에 ROS는 급격하게 증가하게 되고 이는 식물체를 구성하는 macro분자와 세포구조에 이상을 일으켜 결국에는 식물체의 생장과 발육을 저해시키게 된다(Gill와 Tuteja, 2010; Jaspers와 Kangasjarvi, 2010; Miller 등, 2008).

따라서 식물은 생존을 위해 독성인 ROS를 무독화 시키기 위해 다양한 세포내 효소 또는 비효소적 수단을 동원하게 된다. 그러나 ROS는 식물에서 고온스트레스를 포함한 스트레스에 적응하기 위한 하나의 신호가 되는 양면성이 있기 때문에 식물이 최종적으로 스트레스에 대한 내성을 확보하기 위해서는 ROS 축적 수준을 교묘하게 조절할 필요가 있다(Gill와 Tuteja, 2010; Miller 등, 2008; Miller 등, 2010; Penfield, 2008). 따라서 고온 등에 유발되는 산화적 피해를 방지하고, 동시에 스트레스 반응 신호전달체계를 긍정적으로 조절하기 위해서 식물체는 체내에 존재하는 총체적 항산화 네트워크를 복합적으로 지휘하여야 한다(Foyer와 Noctor, 2005; Rouhier 등, 2008)

Glutaredoxin(GRX)은 언급한 항산화네트워크의 한 부분으로서 thioredoxin(TRX) family에 속하는 다재성의 작은 단백질이며, dithiol 또는 monothiol을 경유하는 glutathione(GSH)의 존재 하에서 기질 단백질의 disulphide 결합의 역전적 환원을 중계한다. 따라서 GRX는 세포내 산화환원(redox) 상태와 redox 의존적 신호전달체계를 조절함으로써 다양한 세포내 공정과 산화적 스트레스에 대한 반응의 핵심 상위 조절자로서 역할을 수행할 수 있다. 또한 GRX는 광범위한 원핵 및 진핵생물에서 발견된다(Cheng 등, 2011; Lillig 등, 2008; Shelton 등, 2005; Rouhler 등, 2008). GRX는 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)의 돌연변이체 연구를 통해 그 일반적 기능이 처음으로 알려졌으며 식물계에도 광범위하게 분포하고 있음이 밝혀졌지만 세부적으로 연구된 것은 몇몇에 지나지 않았다(Cheng 등, 2006; Cheng 등, 2008; Chang 등, 2011; Garg 등, 2010; Guo 등, 2010; Rouhier 등, 2006; Sundaram와 Rathinasabapathi, 2010).

식물에 있어 고온스트레스 내성 획득은 항산화 효소(단백질)의 과발현을 통한 항산화 활성의 향상을 통해 가능하고 더불어 superoxide reductase(SOR)와 rubiscoactivase와 같은 redox 단백질도 애기장대에서 내열성을 증가시킬 수 있다(Kurek 등, 2007; Im 등, 2009)고 보고되었다. 또한 *Pteris vittata* GRX의 하나인 *PvGRX5*를 애기장대에서 발현시킴으로써 내열성을 향상시킬 수 있다고 보고하였다(Im 등, 2009; Kurek 등, 2007; Sundaram와 Rathinasabapathi, 2010). 그러나 언급한 다양한 내열성 획득에 관련 연구에도 불구하고 경제작물의 내열성을 향상시키기 위한 생명공학적인 연구는 극히 드문 실정이다.

최근 애기장대의 GRX 중 하나(*AtGRXS17*)를 RNAi 기법을 통해 동정하여 애기장대의 온도 의존적 배발생 후기 생장에 필수적임을 밝히는 한편 토마토에서 이 유전자를 과발현시킴으로써 내열성을 획기적으로 향상시킨 의미있는 연구결과가 발표되었다. *AtGRXS17*은 ROS 대사에 포함되는 핵심적 구성요소 중 하나이며 고온 하에서 식물체 생장에 필수적 요소로 밝혀졌고 토마토에서 과발현 했을 때 내열성(엽록소의 광산화 최소화, 세포막계의 산화적 피해 경감, catalase 활성 증가, H₂O₂ 축적 감소, HSF와 HSP 유전자의 up-regulation 등)을 획기적으로 향상시킬 수 있었다. 또한 세포질에 소량으로 산재해 있다가 고온스트레스에 의해 핵막으로 이동하였다(Cheng 등, 2011; Wu 등, 2012).

본 연구에서는 국화의 내열성 형질전환체 확보를 위해 상기 국내외 연구결과 보고를 통해 알려진 내열성 획득 가능 유전자군 중에서 가장 효과적일 것으로 추정되는 HSF 또는 HSP 유전자와 *GRX* 유전자가 후보로 활용될 수 있을 것이다.

3. 문제점과 전망

화훼 작물에서 플라보노이드 생합성경로의 유전자조작을 통하여 이루어진 화색 변경의 성공적인 사례들이 보고되어있으며, 플라보노이드 생합성관련 유전자의 분리 및 기능분석을 통해 플라보노이드 생합성 대사에 관한 깊이 있는 연구가 이루어짐에 따라 다양한 화훼류에서 원하는 화색변경이 가능하게 되었다.

초기 연구에서는 플라보노이드 생합성 경로상의 단일유전자를 과발현 또는 발현 억제함으로써 화색 관련 대사물질의 합성을 늘이거나 억제하는 방법이 사용되었으나, 기존에 없던 새로운 화색을 개발하기 위해 점차 내재 유전자의 발현조절과 더불어 새로운 플라보노이드 생합성관련 외래유전자를 도입하는 등 여러 가지 생명공학 기법을 병행하는 복잡한 방법들을 통하여 화색변경을 시도하고 있다. 또한, 보다 더 다양하고 독특한 화색 변경을 위해서는 대상 화훼 작물별로 내재하는 플라보노이드 생합성 경로의 조절 기작과 대사물질의 흐름에 대한 이해가 요구되고, 이를 바탕으로 목적하는 화색소 생산을 위해서는 정교한 대사공학 전략이 필요하다.

지금까지 일부 화훼류에서 화색변경을 위해 플라보노이드 생합성 대사경로 조절을 통한 화색 변경, 내재 플라보노이드 대사조절을 통한 화색 변경, 외래 유전자 추가 도입을 통한 화색 변경, 특정 플라보노이드 생산을 통한 화색 변경, 그리고 전사인자 조절을 통한 화색 변경 등을 시도하였으며 이들 접근방법에 의해 화색이 변경된 GM 화훼작물이 GM 식량작물과 마찬가지로 매우 한정적이긴 하지만 일부 화훼 중에서 상업화에 성공하였다.

그러나 지금까지 화색변경을 위한 유전공학 기술의 적용은 대부분 목표로 하는 대상작물에 존재하지 않는 다양한 ‘화색’을 도입하고자 진행되어왔으며 본 연구의 필요성에서 밝힌 바와 같이 고온에서 주로 발생하는 화색퇴화를 막기 위한 해결방법으로서 분자육종학적으로 접근한 사례는 없다고 할 수 있다.

국화는 연중 3-4기작이 가능하고 여름철 고온에서도 재배가 되고 있기 때문에 여름철 고온에 의한 여러 가지 생리장해(특히, 화색퇴화 현상)는 절화품질을 저하시켜 생산성을 악화시키고 있으며 이들 피해를 금액으로 환산한다면 대략 수십억원에서 수백억원에 이를 것으로 추정되고 있다. 따라서 여름철 고온의 환경조건하에서도 비교적 생육이 왕성하고 화색은 퇴화되지 않는 GM국화를 개발하고 보급한다는 것은 재배농가의 생산성 향상을 통한 이익 증대는 물론 대규모 수출재배단지의 여름철 안정생산을 통한 경영효율성에 기여하는 바가 매우 크다고 할 수 있다.

최근, 세계 GM작물의 재배면적은 1억 ha를 훨씬 넘어섰고 이러한 GM작물 재배 증가율은 지속 될 것으로 예측된다. 더불어 GM작물에 대한 거부 여론은 아직도 거세편이다. 화훼의 경우 비록 GM 품종이라 할지라도 대부분 관상용으로 활용되기 때문에 안전성 논란에서 좀 더 자유로울 수 있을 것으로 조심스럽게 판단할 수 있다.

그러나, 화훼작물의 경우 비록 비식용 GM임에도 불구하고 안전성 평가 과정에 소요되는 시간 및 비용이 GM 개발 과정에 투여되는 시간과 비용보다 더 많이 요구된다는 점을 감안할 때, 유전자조작을 이용하여 새로운 화색 또는 불량한 환경조건에서도 안정적인 화색을 발현하는 화훼작물을 개발하기 위해서는 생명공학적 방법을 동원한 화색변경이라는 목표에 좀 더 체계적으로 접근할 필요가 있으며 더불어 화훼용 GM작물의 상업화를 위한 실증적 평가 시스템의 창출과 지속적 보완이 요구된다고 할 수 있다.

제3장 연구개발 수행 내용 및 결과

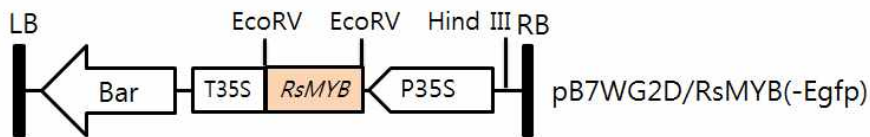
제1절 연구방법

1. 화색발현 안정화와 최적화를 위한 특허회피용 공동발현 벡터 재조합

가. 상업화에 알맞은 화색관련 벡터 재조합

상업화에 선결조건인 기존 특허를 회피하기 위해 화색관련 전사인자 조절 유전자(특허출원), 꽃잎특이 프로모터(MYB1 promoter provided by Nagoya University) 및 스트레스 특이 프로모터 (SWPA2)를 이용한 공동발현 벡터(*PB7WG2D-RsMYB1*과 *PB7WG2D-InMYB1*) 등 2종을 구축하였다. 기본 벡터인 pB7WG2D (gateway method), 재조합 벡터로 *Agrobacterium* strain LBA4404에 형질전환 시켰다(그림 1-1).

- 전신에서의 발현을 위해 p35가 존재하는 construct 제작



- 꽃잎에서의 pB7WG2D/RsMYB1의 발현을 위해 pInMYB1을 붙여서 제작

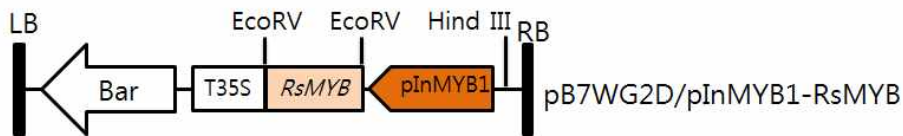


그림 1-1. 상업화에 알맞은 화색관련 벡터의 재조합

나. 유전자확인을 위한 PCR 수행

균주확인을 위해 attB1+attB2 primer를 이용하여 PCR 로 확인하였고 *35S-RsMYB1*의 PCR 조건은 98°C (30초)→[98°C (10초)→60°C (30초)→72°C (1분)]×25cycles→12°C 이고, *pInMYB1-RsMYB1*는 98°C (30초)→[98°C (10초)→65°C (15초)→68°C (1분)]×30cycles→72°C (7분)→4°C 조건으로 PCR을 수행하였다.

2. 국화의 화색퇴화 양상

국화의 재배시 고온이 화색퇴화의 주된 요인으로 실제 국화의 화색퇴화의 양상이 어떠한지 확인하기 위해 구미화훼시설공단에서 7월부터 10월까지 국화의 꽃을 채취하여 화색퇴화의 양상을 비교하였다. 꽃의 품종은 3품종으로 모두 붉은 계열의 화색을 띄고 있는 킹피셔, 샴페인, 예스송을 재료로 확인하였다.

3. 국화 국내육성 품종의 화색발현 유전자의 형질전환 효율 향상을 위한 식물체 재분화 최적화 조건 확립

가. 국화 스프레이 품종 피치 엔디의 형질전환 효율 향상

(1) 효과적인 형질전환을 위한 식물체 배양 기간

국화 품종 중 꽃잎 색깔이 분홍색을 띠는 ‘피치 엔디’, 붉은 색을 띠는 ‘피치 레드’, 주황색을 띠는 ‘비비드스칼렛’을 재료로 형질전환을 하기 위해 각 품종별 기내 배양 기간에 따른 신훈 재생율을 알아 보고자 실험을 실시하였으며 기외식물은 Naing 등 (2015)의 방법을 이용하여 기내로 옮겨 실험의 재료로 사용 하였다. 기내에서 배양된 식물체는 신훈 정단부분을 0.5-1.0cm 크기로 잘라 MS 배지를 기본으로 1.0 mg · L⁻¹ 6-benzylaminopurine (BA) 와 0.5 mg · L⁻¹ indole-3-aceticacid (IAA)을 첨가한 배지에 30일, 60일, 90일 배양하여 실험의 재료로 사용하였다. 또한 배양 기간별 식물 스트레스 정도를 판별하고자 DAB H₂O₂를 이용하여 스트레스 여부를 조사하였다. 그 방법은 0.1%(w/v) DAB(3,3’ -diaminobenzidin) 용액에 엽절편을 침지시켜 70rpm에서 12시간 암상태로 처리한 다음 94% EtOH로 엽록소가 모두 제거 될 때까지 헹구준 다음 94% EtOH에 보관하여 상태를 비교하였다.

(2) 효과적인 형질전환을 위한 암처리 기간

국화의 효과적인 형질 전환을 위해 형질전환시 암처리 기간에 따른 신훈 재생율의 효과를 관찰하기 위해 엽절편(0.5-1.0cm)을 MS 배지를 기본으로 1.0 mg · L⁻¹ BA와 0.5 mg · L⁻¹ IAA가 첨가된 배지에 3, 8, 12, 30, 28일 간 암처리(표 1-1)하여 그 효과를 확인 하였다.

표 1-1. 국화 품종 ‘피치 엔디’ 를 이용한 암처리 기간에 따른 신훈 재분화 효과 조사

Treatment (Days)	Pre-culture (2)	Co-culture (3)	Nurse-culture (7)	1st Selection (8)	2nd Selection (8)
I	L ^Z	D ^Y	L	L	L
II	D	D	L	L	L
III	D	D	D	L	L
IV	D	D	D	D	L
V	D	D	D	D	D

L^Z-1 시간 명(37 μmol · m⁻² · s⁻¹)/8 시간 암, D^Y-24 시간 암

(3) 효과적인 형질전환을 위한 적정 PPT 농도 선발

국화 품종 ‘피치 엔디’ 를 재료로 형질전환시 적정 실험한 DL-phosphinothricin(PPT) 농도를 선발하기 위해 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0mg · L⁻¹ 다양한 PPT 엽절편체를 45일간 배양하여 그 결과를 관찰 하였다.

나. 국화 스프레이 품종 비비드스칼렛의 신훈 재분화에 미치는 요인실험

(1) 식물생장조절제 종류 및 농도와 암배양 기간이 신훈 재분화에 미치는 영향

국화 품종 비비드스칼렛의 신훈 재분화에 미치는 식물생장조절제의 종류에 농도를 알아보기 위해 BA, NAA를 농도별로 1, 2, 3 mg · L⁻¹ 를 혼용하여 실험하였고, 이와 더불어 암배양 기간에 따른 신훈 재생율을 알아보기 위해 암배양 무처리, 10, 20, 30일 간 암배양 한 후 신훈 재

분화 효율을 관찰 하였다.

(2) 배지의 gelling agents 및 질산은이 신초 재분화에 미치는 영향

국화 품종 비비드스칼렛의 신초 재분화에 미치는 식물생장조절제의 종류에 농도를 알아보기 위해 gelrite, phytigel, agar, agarose를 사용하여 신초 재분화에 미치는 영향을 관찰하였고, 신초 유도시 사용되는 질산은을 농도별로 0, 1, 5, 10, 25 μ M 사용하여 신초 재분화에 미치는 영향을 관찰 하였다.

(3) 재생된 신초의 배수성 검정

국화 품종 비비드스칼렛을 앞서 연구한 신초 재분화에 효과적인 방법으로 신초를 재분화시켰을 때 모체와 재분화된 식물체와의 배수성을 검정하기 위하여 배수성 검정을 실시하였으며 배수성 검정은 Chung 등 (2014)의 방법을 이용하였다.

다. 국화 스프레이 품종 비비드스칼렛의 형질전환시 항생제 종류 및 농도에 따른 효과

(1) 국화 형질전환 시 항생제 종류에 따른 영향

국화 스프레이 품종 비비드스칼렛의 형질전환시 항생제 종류 및 농도에 따른 영향을 알아보기 위해 MS 배지에 BA 1.0 mgL^{-1} 와 NAA 2.0 mgL^{-1} 이 첨가된 기본 배지를 무처리구로 하고, clavamox 100, 200, 300, cefotaxime 100, 200, 300, carbenicillin 125, 250, 375 mgL^{-1} 농도로 처리하여 신초 재생 수, 뿌리 발근 수, 재생된 식물의 초장, 식물의 생체중 등을 관찰하였다.

(2) 국화의 비형질전환체와 형질전환체의 비교

국화 스프레이 품종 비비드스칼렛을 이용해 형질전환을 수행하여 형질전환체를 획득하였다. 형질전환체와 비형질전환체의 엽표피 조직과 기공의 크기와 빈도를 비교하여 그 차이를 관찰 하였다.

라. 국화 스탠다드 품종 신마의 신초 재분화에 미치는 요인 실험

(1) 식물생장조절제 농도에 따른 효과

국화 스탠다드 품종 신마를 이용해 엽조직에서 신초를 재생하기 위해 식물생장조절제인 BA 와 IAA를 농도별로 BA 0, 0.5, 1.0, 2.0 mgL^{-1} , IAA 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 mgL^{-1} 을 각각 혼용하여 신초 재분화 효과를 관찰하였다.

(2) 모식물체의 배양기간에 따른 효과

국화 스탠다드 품종 신마의 엽절편 배양시 모식물체의 배양 기간이 신초 재분화에 미치는 영향을 알아보기 위해 MS 배지에 0.5 mgL^{-1} NAA, 0.5 mgL^{-1} 첨가된 기본 배지에 모식물체를 4, 5, 6, 7, 8 주간 배양하여 실험의 재료로 사용하였다.

(3) 엽절편의 암배양 기간에 따른 효과

국화 스탠다드 품종 신마의 엽절편 배양시 암배양 기간이 신초 재분화에 미치는 영향을 알아보기 위해 MS 배지에 0.5 mgL^{-1} NAA, 0.5 mgL^{-1} 첨가된 기본 배지에 배양하여 암배양 기간을 0, 1, 2, 3 주간 처리하여 그 결과를 관찰하였다.

(4) 엽절편의 에틸렌억제제 처리에 따른 효과

국화 스탠다드 품종 신마의 엽절편 배양시 에틸렌억제제 처리가 신초 재분화에 미치는 영향을 알아보기 위해 MS 배지에 0.5 mgL^{-1} NAA, 0.5 mgL^{-1} 첨가된 기본 배지에 에틸렌억제제인 silver nitrate, silver thiosulfate, AVG를 농도별 0, 1, 5, 10, $25 \mu\text{M}$ 로 처리하여 결과를 관찰하였다.

(5) 식물생장조절제 종류에 따른 발근 효과

국화 스탠다드 품종 신마의 엽절편 배양으로부터 재생된 식물체의 발근을 유도하기 위해 다양한 옥신류의 호르몬을 농도별로 처리하였다. MS 배지를 기본으로 하여 IAA, NAA, IBA를 농도별로 0, 0.1, 0.2, 0.3 mgL^{-1} 첨가하여 발근 여부를 관찰하였다.

마. 국화 스탠다드 품종 신마의 형질전환시 항생제 선발 실험

(1) 국화 스탠다드 품종 신마의 형질전환시 항생제 종류별 신초 재분화 효율

국화 스탠다드 품종 신마의 형질전환시 항생제 종류가 신초 재분화 효율에 미치는 영향을 알아보기 위해 carbenicillin, cefotaxim, clavamox, timentin을 농도별로 0, 125, 250, 375 mgL^{-1} 농도로 처리하여 그 효과를 관찰하였다.

(2) 국화 스탠다드 품종 신마의 형질전환시 PPT 농도별 신초재분화 효율

국화 스탠다드 품종 신마의 형질전환시 phosphinothricin (PPT) 농도가 신초 재분화 효율에 미치는 영향을 알아보기 위해 ppt를 0, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 mgL^{-1} 농도별로 처리하여 결과를 관찰하였다.

4. 국화 화색발현 유전자의 형질전환 및 삼입유전자 발현 식물체 선발

가. 효과적인 형질전환 방법을 통한 형질전환체 육성

앞서 연구한 결과를 바탕으로 국화 형질전환시 보다 효과적인 방법으로 형질전환을 수행하기 위하여 그림 1-2와 같이 형질전환 방법을 수행하였다.

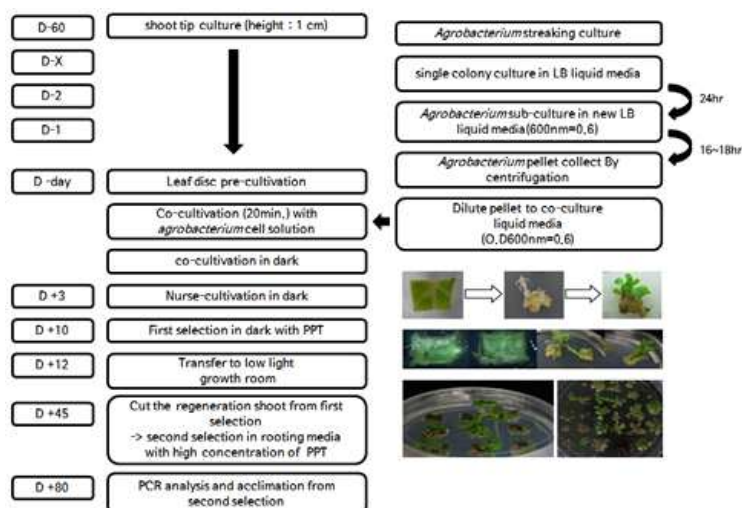


그림 1-2. 국화를 이용한 보다 효과적인 형질전환 방법

나. 유전적 분석

(1) 제초제 저항성 테스트

형질전환방법을 통해 유도된 신초들의 제초제 저항성을 시험하기 위해 제초제 ‘로레인(경농)’을 0.2%로 희석시킨 용액을 온실에서 순화시킨 putative transformant와 비형질전환체인 무처리구에 분무기로 살포한 다음 5일 후의 변화 양상을 관찰하였다.

(2) DNA 추출을 통한 PCR(Polymerase Chain Reaction) 검정

형질전환방법을 통해 유도된 신초들 중 고농도의 PPT에서도 고사 하지 않고 재분화하는 식물체를 샘플링하여 genomic DNA를 추출하였다. genomic DNA 추출 방법은 먼저 어린 잎을 채취하여 Real Biotech Corporation 사의 RBC HiYield™ Genomic DNA Mini Kit 방법으로 추출하였고, PCR은 표 1-2와 같은 primer를 사용하여 *RsMYBI*은 98°C(30초)→[98°C(10분)→98°C(1분)→72°C(1분)]×25cycles→72°C(1분) 조건으로, *InMYB*은 98°C(30초)→[98°C(10분)→65°C(15초)→68°C(1분)]×30cycles→72°C(7분) 조건으로, *Bar*는 95°C(2분)→[95°C(20초)→55°C(30초)→72°C(30초)]×30cycles→72°C(5분) 조건으로 PCR을 수행한 다음 2% agarose gel에 전기영동 ethidium bromide(EtBr)에 30분 염색 후 UV 하에서 결과를 확인하였다.

표 1-2. PCR, RT-PCR(reverse-transcription PCR)에 사용하는 primer sequence

Target Gene	Primer	Sequence(5'→3')	amplicon size
<i>RsMYBI</i>	Foward	ATG GAG GGT TCG TCC AAA GG	700bp
	Reverse	GAA ACA CTA ATC AAA TTA CAC AGT CTC TCC	
<i>InMYB</i>	Foward	AGC TCA AGC TAA GCT GGT TTT GGG TAT AAA TTG ACA	1kb
	Reverse	GTA CAA ACT TGT GAT GGC AGG CTG ACG TAA ATT C	
<i>Bar</i>	Foward	GGT CTG CAC CAT CGT	496bp
	Reverse	TCA GAT TTC GGT GAC GGG CA	
<i>CHS</i>	Foward	CAA CGG TTT TCT CCA TTA GGT	299bp
	Reverse	GAG GAC CAC GGT TTC GAC	
<i>CHI</i>	Foward	TGG TGC AAC CAT TGA CAA GT	300bp
	Reverse	AAA TTT GGT TCA GCA TCT GTA GTT	
<i>F3H</i>	Foward	ACC CGG TTC GTC CGT GAT GAG G	804bp
	Reverse	TGC CTG GTG GTC CGC ATT CT	
<i>DFR</i>	Foward	ATG AAA GAA GAC TCA CCA GCC A	1048bp
	Reverse	CTT CGT GAG TGT CCG CCT TT	
<i>ANS</i>	Foward	ATA CAT CCG AAC ACA AGA TG	432bp

	Reverse	AAT CGC TAG GTG TCG AGG GCC	
<i>Actin</i>	Foward	ACA ACG TTT TAC AAT GAG CTT CG	196bp
	Reverse	CCG TTC AGC AGT TGT AGT AA	

(3) Southern 검정

PCR로 유전자 삽입이 확인된 식물체의 copy 수를 확인하는 방법으로 southern analysis를 이용하였다. 그 방법은 그림 1-3과 같다.

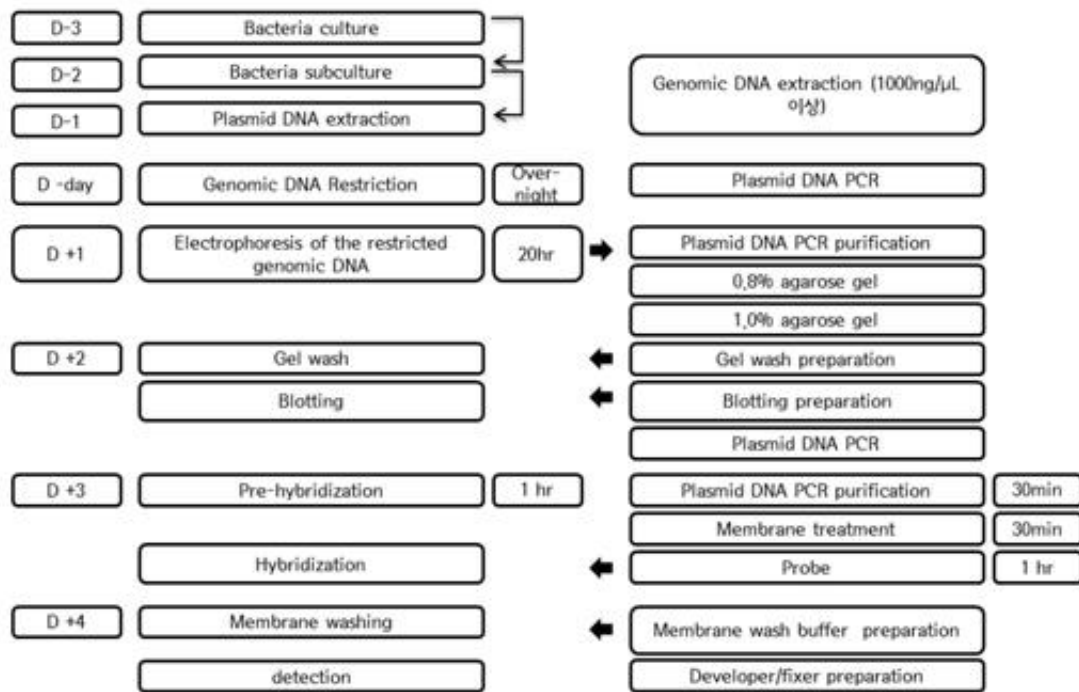


그림 1-3. 형질전환 식물체내 삽입 유전자 copy 확인을 위한 southern 방법

(4) RNA 추출 및 RT-PCR(reverse-transcription PCR) 검정

PCR로 유전자 삽입이 확인된 식물체의 어린잎을 100mg 채취하여 Ambion 사의 TRI Reagent[®] Solution의 방법으로 total RNA를 추출하였고, 추출한 RNA는 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Applied biosystems, USA)을 이용해 cDNA로 합성하였다. RT-PCR은 30°C (10분)→42°C (30분)→99°C (5분) 조건으로 실시하였다. 안토시아닌 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여 anthocyanin synthesis structure 유전자인 *CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR*, *ANS* 의 primer (표 2)을 디자인 하여 PCR을 수행하였다. *Actin*은 95°C (2분)→[95°C (20초)→57°C (40초)→72°C (30초)]×30cycles→72°C (5분)의 조건이며, annealing 온도가 *CHS* 57°C, *CHI* 55.6°C, *F3H* 64°C, *DFR* 59°C, *ANS* 60°C 이며 이외의 다른 조건은 동일한 조건에서 PCR을 수행한 다음 2% agarose gel 에 전기영동 한 다음 EtBr 에 30분 염색후 UV 하에서 결과를 확인하였다.

(5) 확인된 형질전환체의 안토시아닌 축적 양상비교

확인된 국화 형질전환체의 삽입 유전자별 안토시아닌 축적양상을 비교하기 위하여 비형질

전환체(대조구)와 형질전환체의 조직인 잎, 줄기, 뿌리 등을 현미경(Olympus szx16, Japan) 하에서 차이를 관찰하였다.

5. 내열성 유전자 발현 형질전환용 운반체 재조합과 *Agrobacterium*의 형질전환 가. 운반체의 준비

*E. coli*의 증식 → *E. coli*로부터 pCAMBIA2301 plasmid의 추출 → *Bgl* II 및 *Bst* EII 제한효소 처리를 통한 plasmid DNA의 절단 → 절단된 plasmid DNA의 전기영동 → 전기영동 gel의로부터 재조합용 목표 band DNA 추출

나. 식물체에서 목표유전자 cloning

애기장대와 벼의 열처리 후 RNA 추출 → RNA를 주형으로 kit(Invitrogen)를 활용하여 first strand cDNA 합성 → *Bgl* II 및 *Bst* EII 제한 site를 포함하는 *OsHSP26* 및 *AtGRX3* 특이적 primer set를 활용한 목표 유전자 증폭 → PCR 산물의 전기영동 후 증폭산물의 추출

다. *Agrobacterium* 형질전환

제한효소 처리 후 회수한 운반체 단편과 합성된 cDNA의 PCR 증폭 산물을 ligation → *E. coli* DH5a에 재조합 운반체 형질전환 후 항생제 첨가배지에서 선발 및 증식 → *E. coli*로부터 plasmid 추출 → *A. tumefaciens* LBA4404와 GV3101 균주로 freeze-thaw method(Holsters 등, 1978)를 통해 재조합 운반체의 형질전환과 항생제 첨가배지에서 형질전환 균주 선발

라. 재조합 운반체에서 목표유전자 염기서열 분석

재조합 운반체 형질전환 *E. coli*로부터 plasmid 추출 → 벡터 map 정보와 plasmid를 제공하여 전문회사에서 목표유전자 염기서열 분석

6. *Agrobacterium*공동배양법에 의한 내열성 유전자 도입 형질전환체 획득과 재분화 식물체의 핵산분석

가. 국화 품종

(1) 재분화능과 형질전환 실험

국화 스프레이 품종 ‘비비드스칼렛’, ‘피치앤디’, ‘오렌지앤디’ 와 국화 스탠다드 품종 ‘백마’ 를 이용하여 각 품종별 신초 재분화와 형질전환 실험을 수행하였다.

(2) 형질전환체 생리특성 등 검정

내열성 관련 유전자 *AtGRX3* 유전자를 형질전환 시킨 국화 스프레이 품종 비비드스칼렛, 피치앤디의 생리특성을 검정하였다.

나. 내열성 관련 목표 유전자

(1) 형질전환체 획득 실험

국화 품종에서 내열성 관련 유전자인 *OsHSP*, *AtGRX3*, *AVPL*, *CHX13* 유전자를 각각 형질전환 시켜 형질전환체를 획득하였다.

(2) 획득 형질전환체의 분석

내열성 관련 유전자 *AtGRX3-17*를 이용해 형질전환하여 획득한 형질전환체를 분석하였다.

다. 형질전환 프로토콜

(1) 기본 프로토콜

보다 효과적인 형질전환방법을 위해 문헌을 통해 기 보고된 형질전환 프로토콜을 일부 변형하여 실험을 수행하였다(그림 1-4).

(2) 선발마커

유전자의 종류에 부합하는 선발마커를 선택하기 위해 종류별 선발마커를 사용하여 유전자의 종류에 부합하는 마커를 선발하였다.

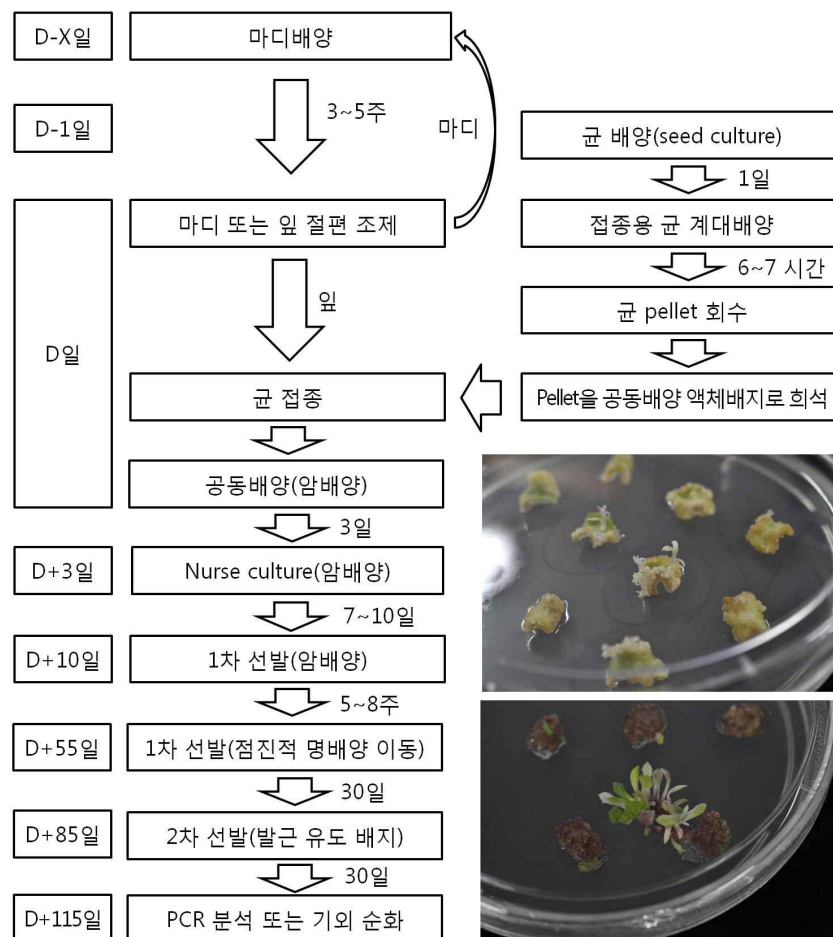


그림 1-4. *Agrobacterium* 공동배양법을 통한 국화 잎조직 이용 형질전환 체계

나. 형질전환 재분화 식물체의 핵산분석

(1) 형질전환체의 gDNA와 cDNA PCR 분석을 위한 *AtGRX3*와 *NPT II* 탐지용 primer 형질전환체의 분자생물학적 분석을 위한 primer를 표 1-3과 같이 설계하여 실험에 사용하였다.

표 1-3. 형질전환체의 gDNA와 cDNA PCR 분석을 위한 *AtGRX3*와 *NPT II* 탐지용 primer

외래 유전자	Primer	염기서열	증폭size
<i>AtGRX3</i>	Forward (X1F)	5'- ATgAgCggTACggTgAAggATA -3'	950 bp
	Reverse (X1R)	5'- TCAACCACTTTCCCACTgAA -3'	
<i>NPT II</i>	Forward (T1F)	5'- ACAAgATggATTgCACgCAgg -3'	780 bp
	Reverse (T1R)	5'- AACTCgTCAAgAAggCgATAg -3'	

(2) PCR, Reverse Transcriptional-PCR(RT-PCR) 및 Southern blot analysis

PCR, Reverse Transcriptional-PCR(RT-PCR) 및 Southern blot analysis수행하되 분자생물학적 실험 protocol은 “The Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook과 Russell, 2006)” 을 참조하는 한편 kit류 활용을 위해 Qiagen GmbH, Takara Bio Inc. 및 Invitrogen사의 추천 protocol을 적용하여 실험을 수행하였다.

7. 형질전환 국화의 영양번식 세대진전

가. T₀로 식물체로부터 T₁ 세대진전

T₀ 재분화 식물체 중 PCR 양성반응 유식물체는 마디배양을 통해 기내에서 T₀V₁ 세대진전 후 기외 순화시켰다.

나. T₀V₁ 유식물체의 선발마커 유전자 발현 검정

기내식물체는 kanamycin 첨가 배지에서 재분화능, 기외식물체는 Basta™ 살포하여 제초제에 대한 내성을 검정하였다.

다. T₀V₁ 유식물체에서 목표유전자 유래 전사체 탐지

기외 순화 식물체로부터 RNA 추출 후 semi-quantitative RT-PCR 수행하여 목표유전자 발현 여부를 검정하였다.

라. T₀V₁ 세대로부터 T₀V₂ 세대 및 T₀V₃ 세대진전

각 세대에 대해 연속적으로 적심, 신초 유도 및 녹지삽을 통해 T₀V₂ 세대 및 T₀V₃ 세대 식물체 다수 양성하여 후대 검정하는데 사용하였다.

8. 국화 wild type 및 형질전환체의 고온스트레스에 대한 생리적 반응 구명

가. 검정식물체 양성

형질전환 여부를 확인하기 위해 25±2°C, 16h 명/8h 암에서 본엽 7~8매까지 성장시킨 국화 품종 비비드스칼렛과 피치앤디의 wild와 각 유전자로 형질전환된 식물체를 일정크기로 키워 스트레스에 대한 생리적 반응 검정에 사용하였다.

나. 온도처리

고온스트레스에 대한 생리적 반응을 살펴보기 위해 20, 25, 30, 35, 40 및 45°C로 옮겨 연속처리하거나 35°C로 옮겨 3일 처리 후 45°C에서 3일 처리한 다음 반응을 관찰하였다.

다. 엽록소형광소멸분석

각 식물체의 엽록소형광소멸 분석을 위해 30분 이상 암적응시킨 제5엽 부위 대상으로 PAM을 이용한 Induction curve 작성하였으며 PAM setting 조건은 Measuring light (Int. 4), SAT-Pulse (Int. 8), Gain 1, Actinic light (Int. 1, PAR 38, Width 0:40, Fact. 1.00)하여 측정하였다.

(1) F_v/F_m : potential quantum yield = $(F_m - F_o)/F_m$

(2) Φ_{PSII} : quantum yield of PS II = $(F'_m - F_t)/F'_m$

(3) ETR: electron transport rate = $\Phi_{PSII} * PAR * 0.5 * ETR\text{-factor}$

(4) qP: coefficient of photochemical quenching = $(F'_m - F_t)/(F'_m - F'_o)$

(5) qN: coefficient of nonphotochemical quenching = $(F^o_m - F'_m)/(F^o_m - F'_o)$

(6) NPQ: Non-photochemical quenching = $(F^o_m - F'_m)/F'_m$

* 약자 설명 : F_m , maximum fluorescence yield; F'_m , maximum fluorescence yield reached during last saturation pulse; F_o , minimum fluorescence yield; F_t , steady-state fluorescence yield; PAR, photosynthetically active radiation; F'_o , minimum fluorescence yield reached during last saturation pulse; F^o_m , measurement of F_m in the dark-adapted state.

라. 전해질누출 측정

각 식물체의 전해질누출 정도를 측정하기 위해 온도처리 후 제2~3엽을 채취하여 증류수로 가볍게 세척 후 blot dry → 각 잎당 직경 1cm 구멍을 1개씩 뚫어 시료 채취 후 15mL 탈이온수가 첨가된 tube에 담고 감압 → 280~300 rpm으로 2시간 진탕 후 전기전도 측정 → 고압증기멸균기 121°C에서 20분간 끓인 후 전기전도도 측정; $EL (\%) = (E_o / E_t) * 100$

마. 3,3'-diaminobenzidine(DAB)-H₂O₂ 반응산물의 탐지

각 식물체가 받는 스트레스를 측정하기 위해 DAB-H₂O₂ 반응을 살펴보는 검정으로 우선 0.1% DAB(pH 3.8) 용액에 채취한 잎 침지 후 26°C 60 rpm으로 overnight → 70°C 94% 에탄올로 탈색 후 반응을 관찰하였다.

바. catalase(CAT) 활성 측정

각 식물체의 CAT 활성 측정을 위해 액체질소에서 잎조직 마쇄 하여 단백질 추출 buffer를 이용하여 1:5(m/v)로 현탁한 다음 4°C, 13,000 g로 15분간 원심분리 후 BCA 단백질 분석 kit(Pierce)로 정량하여 240 nm에서 H₂O₂의 소실율을 측정함으로써 CAT 활성 계산 : 1 unit(U)는 240 nm에서 분당 0.01의 흡광도 감소로 정의하였다.

9. *AtGRX3* 유전자 형질전환체의 고온스트레스 조건에서의 개화반응 정밀검정

가. *AtGRX3* 유전자 형질전환 식물체의 휴면타파

AtGRX3 유전자의 형질전환체 식물의 휴면타파를 위해 약 2개월 동안 T₀V₂세대 기내 모본은 5°C 냉장고에서, 기외 모본은 자연일동시켰다.

나. 검정 식물체 대량 확보

형질전환 식물체의 다양한 검정을 위해 형질전환 검정 식물체를 대량으로 확보하기 위하여 기외 모본의 주지 적심, 측지 유도 및 삼수 채취 후 녹지삽을 통해 T₀V₃ 식물체 대량 증식하였다.

다. T₀V₃ 세대 유묘의 고온스트레스 반응 검정

T₀V₃ 세대 유묘의 고온스트레스 반응 검정을 위해 고온스트레스 중 성장량, 상기 언급한 광합성 효율관련 지표, 전해질 누출, H₂O₂ 축적 등 조사하였다.

라. 생식생장 전환을 위한 단일 감응도 검정

생식생장 전환을 위한 단일 감응도 검정을 위해 성장상에서 단일조건 일수에 따른 화아분화, 개화시, 만개기 등 파악하였다.

마. 개화기 고온스트레스 조건에서 화색변화 검정

개화기의 고온 스트레스 조건 하에서 화색의 변화를 관찰하고자 고온스트레스를 주어 이에 따른 화색을 비교하였다.

10. 국화의 화색퇴화 원인구명 및 고온적응형 우수 육종소재 개발

가. 국화 고온기 생육 및 절화특성 변화

본 시험은 스프레이국화를 연중 생산해 수출하고 있는 구미시설공단 원예사업팀에서 2013년 2월부터 10월까지 9개월간 수행하였으며, 시험에 사용된 품종은 수출용 스프레이국화인 ‘레오파드’, ‘그린버드’ 및 ‘킹피셔’ 등 3품종으로 삼수는 5~6cm 길이로 채취하여 2주간 3.5°C의 저장고에 보관한 뒤 국화삼목전용상토(Big Ball, Klasmann-Deilmann, Germany)로 만든 소일블럭(4.5×4.5×4.5cm)에 삼목 하였고 삼목 후 충분히 관수하고 습도유지를 위해 유백색비닐을 덮었으며, 발근이 시작되는 1주일 후부터 비닐을 제거하여 관리하였다. 삼목 2주 후 재식거리 12.5×12.5cm 간격으로 정식하여 무적심 재배하였다. 전조는 고압나트륨등으로 심야 4시간(22:00~02:00)하였으며, 단일처리는 일장 10시간(18:00~08:00)으로 실시하였다. 2013년 2월부터 7월까지 12회 정식하였으며, 병해충 방제는 살균제와 살충제를 혼합하여 1주일 간격으로 살포하였으며, 시비는 전량 양액으로 관주하였다.

나. 고온적응형 국화 신품종 육성

(1) 유전자원 수집 및 특성조사

고온적응성이 우수한 국화 신품종 육성을 위해 여름 재배용 국화인 하추국 계통의 유전자원 15품종을 거창, 김천 등 국화재배 농가에서 2013년 수집하였고, 수집한 유전자원은 하우스

에 정식한 후 특성조사와 교배모본으로 사용할 묘를 증식하였다. 특성조사는 비닐하우스와 노지에 2014년 5월 27일 재식거리 12.5×12.5cm로 정식하여 실시하였으며, 시험포내의 온도와 광량을 조사하였고 일장조절은 하지 않았다.

(2) 인공교배

수집한 유전자원을 증식하여 2013년 7월 19일 하우스에 정식하였고, 동시 개화를 위해서 정식 후부터 3주간 전구식형광등을 설치하여 심야 3시간(22:00 ~ 01:00) 동안 조명하였다. 10월 한 달간 교배를 실시하였는데, 자방친으로 사용된 품종은 교배 3~7일 전에 가위로 설상화의 일부를 잘라내고 유산지 봉투를 씌웠고, 화분친으로 사용된 품종의 꽃가루를 일회용 페트리디쉬에 털어 모은 후 꽃의 암술머리가 Y자로 벌어졌을 때 교배용 붓으로 수분시켰다. 교배 45~50일 후 등숙된 종자를 채종하여 상온에 보관하였다.

(3) 우수계통 1차 선발

교배조합별로 채종된 종자를 이듬해 3월 6일에 원예용 상토를 넣은 과종상자(36×52cm)에 5cm 간격으로 줄뿌림하여 15~20일 후 128공 트레이에 가식하고 5월 8일에 재식거리 12.5×12.5cm로 비가림 하우스에 정식하였다. 자연개화 하는 7월부터 9월까지 화색과 화형 등 특성이 우수한 계통을 1차 선발하였다. 선발한 계통은 10월 중순에 무가온 하우스에 이식하여 월동시키면서 건조하지 않도록 관리하면서 특성검정에 사용할 묘를 증식하였다.

(4) 선발계통 특성검정

1차 선발된 계통의 특성검정을 위해서 축성재배, 자연재배 및 억제재배를 실시하였다. 축성재배는 3월 23일에 정식하여 6월 하순에 개화시켜 고온적응성(개화소요기간, 화색퇴화 등)을 검정하였으며, 자연재배는 4월 17일에 정식, 자연개화시켜 품종 고유의 특성을 조사하였다. 억제재배는 7월 16일에 정식, 10월 중순에 개화시켜 화아분화 및 일장반응을 검정하였다. 전조처리는 축성재배와 억제재배시에 실시하였는데, 전구식형광등을 설치하여 심야(4시간, 22:00 ~ 02:00)에 전조하였다. 단일처리는 축성재배시에만 전조종료 후 일장 10시간(08:00 ~ 18:00) 기준으로 실시하였다.

(5) 신품종 육성

3회의 특성검정으로 화색과 착화수 등 절화품질과 기호도가 우수한 C13-033, C13-035, C13-046, C13-107 등 4계통을 최종 선발하여 국립종자원에 품종보호 출원하였다.

제 2절 연구결과

1. 화색발현 안정화와 최적화를 위한 특허회피용 공동발현 벡터 재조합

화색관련 전사인자 조절 유전자(특허출원), 꽃잎특이 프로모터(MYB1 promoter provided by Nagoya University) 및 스트레스 특이 프로모터(SWPA2)를 이용한 공동발현 벡터 (*PB7WG2D-RsMYB1*과 *PB7WG2D-InMYB1*) 등 2종을 구축하였고, PCR 검정을 통해 균주의 삽입

을 확인하였다(그림 2-1).

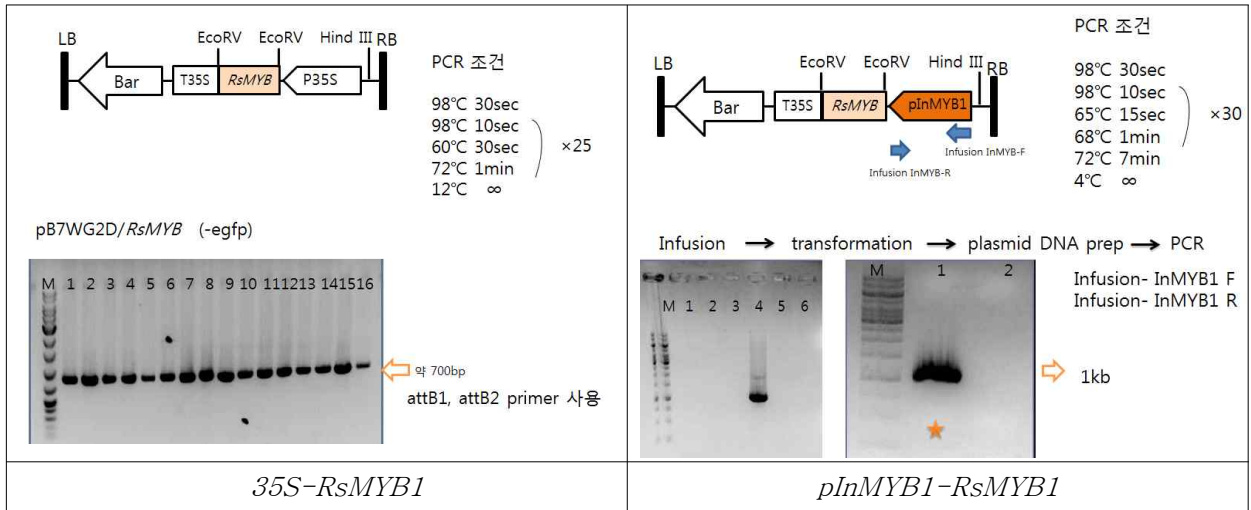


그림 2-1. PCR 검정을 통한 삽입된 유전자의 확인

2. 국화의 화색퇴화 양상

국화의 재배시 화색퇴화의 양상이 어떤지 확인하기 위해 구미화훼시설공단에서 7월부터 10월 까지 국화의 꽃을 채취하여 화색퇴화의 양상을 비교한 결과 킹피셔의 경우 8월 중순경(그림 2-2), 샴페인의 경우 7월 하순경(그림 2-3), 예스송의 경우 8월 상순경(그림 2-3)에 화색이 가장 많이 퇴화 되었고, 이는 여름철 고온기인 7월 하순에서 8월 중순까지의 계절과 일치한 결과이다. 또한 각 품종별로 고온기에서 온도가 점차 떨어지는 9월, 10월로 가면서 화색이 다시 회복하는 양상을 확인할 수 있었다.

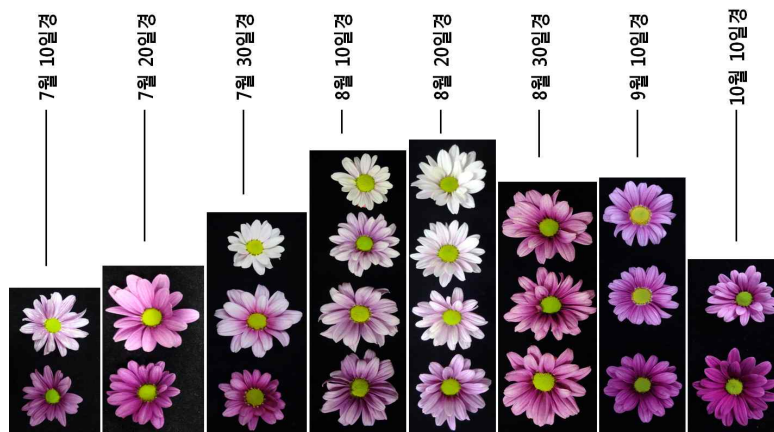


그림 2-2. 여름철 국화 품종 ‘킹피셔’의 수확 시기별 국화 화색발현 양상

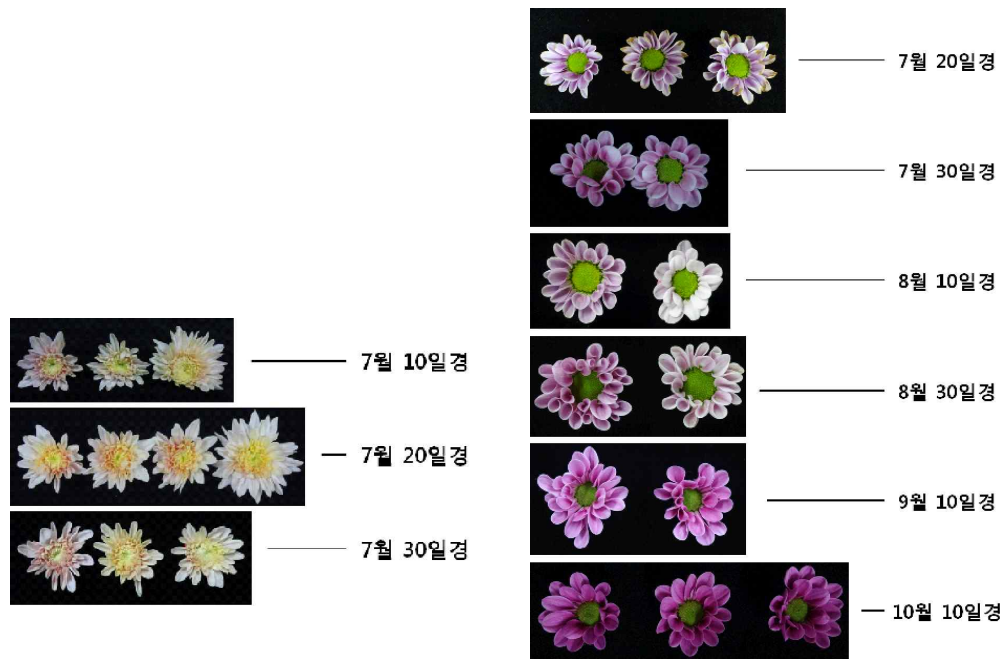


그림 2-3. 여름철 국화 품종 ‘삼페인’ (좌)과 ‘에스송’ (우)의 채취시기별 화색 발현 양상

3. 국화 국내육성 품종의 화색발현 유전자의 형질전환 효율 향상을 위한 식물체 재분화 최적화 조건 확립

가. 국화 스프레이 품종 피치 엔디의 형질전환 효율 향상

(1) 효과적인 형질전환을 위한 식물체 배양 기간

국화 스프레이 품종 피치 엔디의 기내 배양 기간에 따른 신초 재생율을 알아 보기 위해 모 식물체 배양 기간에 따른 결과는 60일간 배양한 모 식물체를 재료로 신초를 재분화 했을 때 가장 높은 신초 재분화율과 절편체당 신초수가 가장 많았으며(표 2-1, 그림 2-4), DAB-H₂O₂ 반응 역시 60일 배양한 재료에서 가장 약하게 관찰(그림 2-5)되어 모 식물체를 60일 배양 했을 때 식물이 가장 적은 스트레스를 받는다고 판단되었다.

표 2-1. 국화 스프레이 품종 피치엔디의 모 식물체 배양 기간에 따른 신초 재분화 효과.

Explant age (days)	Shoot regeneration(%)	No. of shoots per explant
30	42.2 c*	1.84 c
60	93.3 a	5.19 a
90	75.5 b	2.79 b

* Average of five replications. Value followed by same letter in column are not significantly different(P<0.05) according to Duncan's multiple range test(DMRT).

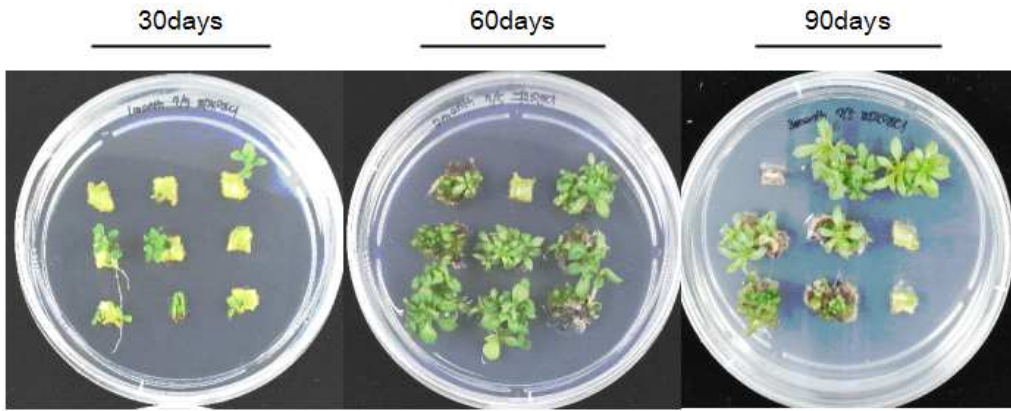


그림 2-4. 국화 스프레이 품종 피치엔디의 모식물체 배양 기간에 따른 신초 재분화 양상.

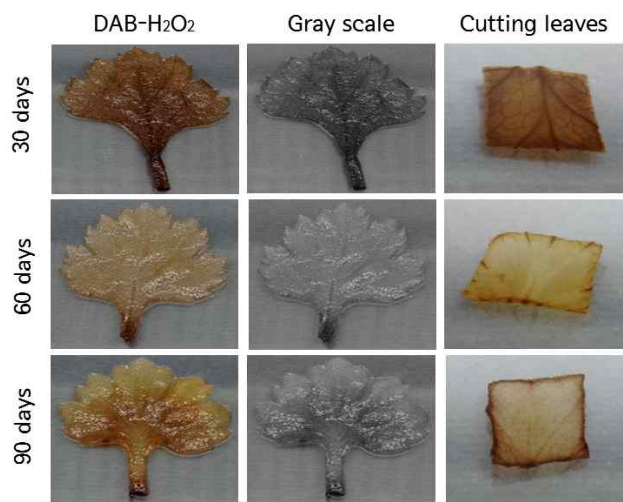


그림 2-5. 국화 스프레이 품종 피치엔디의 모식물체 배양 기간에 따른 DAB-H₂O₂ 반응 양상

(2) 효과적인 형질전환을 위한 암처리 기간

국화의 효과적인 형질 전환을 위해 형질전환시 암처리 기간에 따른 신초 재생율의 효과를 관찰한 결과 암처리를 12일간 처리 하였을 때 가장 높은 신초 재생율을 보였다(표 2-2, 그림 2-6).

표 2-2. 국화 스프레이 품종 피치 엔디를 이용한 암처리 기간에 따른 신초 재분화 효과

treatment (days)	Shoot regeneration(%)*	No. of shoots per explant
I (3)	40.7 d	1.18
II (5)	59.3 c	1.50
III (12)	77.8 a	4.19
IV (20)	63.0 b	4.12
V (28)	25.9 e	1.43

* Average of five replications. Value followed by same letter in column ar not significantly different(P<0.05) according to Duncan' s multiple range test(DMRT).

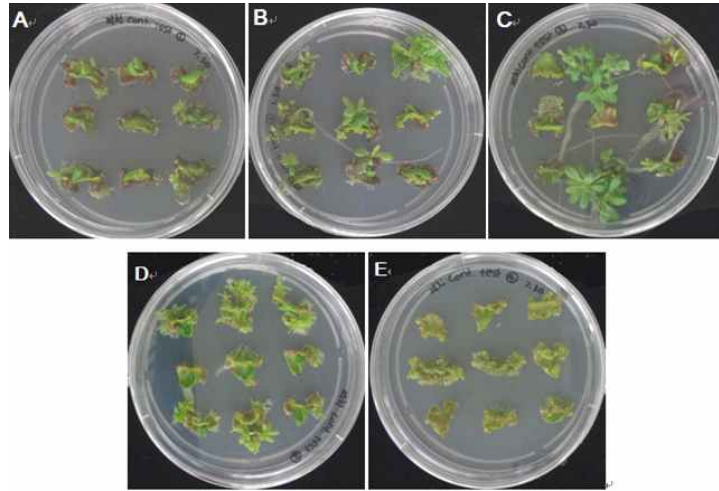


그림 2-6. 국화 스프레이 품종 피치 엔디를 이용한 암처리 기간에 따른 신초 재분화 효과

(3) 효과적인 형질전환을 위한 적정 PPT 농도 선발

국화 스프레이 품종 피치 엔디를 재료로 형질전환시 적정 실험한 PPT농도를 선발하기 위해 농도별 처리 후 관찰한 결과는 그림 2-7과 같이 $0.7\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 사용하는 것이 가장 적합하였고, 피치 레드와 비비드스칼렛의 PPT 농도는 $0.7\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 비비드스칼렛의 PPT 농도는 $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 가 적합하였다(그림 2-8).

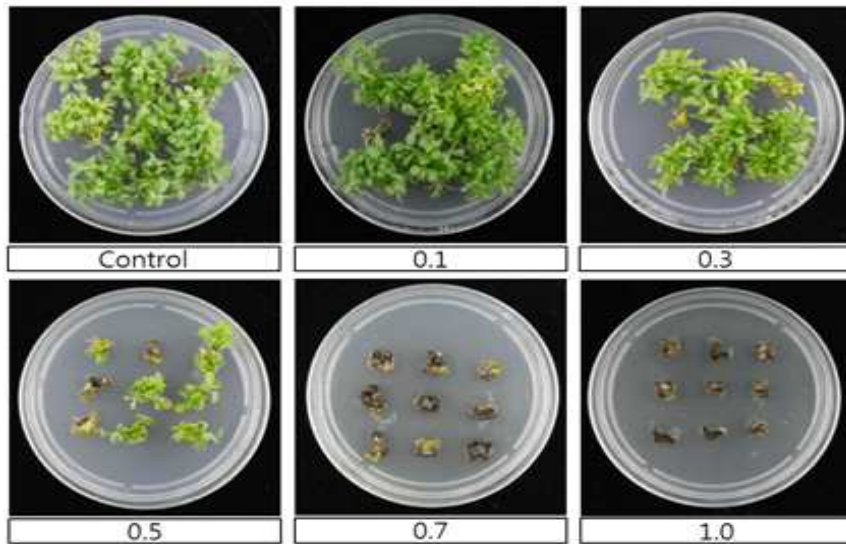


그림 2-7. 국화 스프레이 품종 피치 엔디를 이용한 적정 PPT 농도 선발

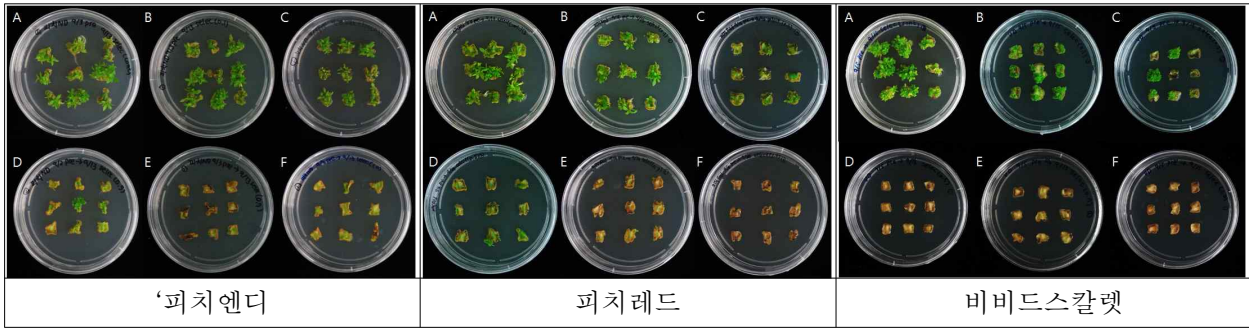


그림 2-8. 국화 품종별 ppt농도에 따른 재분화 양상. A-무처리, B- $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, C- $0.3\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, D- $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, E- $0.7\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, F- $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

나. 국화 스프레이 품종 비비드스칼렛의 신초 재분화에 미치는 요인실험

(1) 식물생장조절제 종류 및 농도와 암배양 기간이 신초 재분화에 미치는 영향

국화 품종 비비드스칼렛의 신초 재분화에 미치는 식물생장조절제의 종류에 농도를 알아보기 위해 BA, NAA를 농도별로 혼용하여 이와 더불어 암배양 기간에 따른 신초 재생율을 실험한 결과는 표 2-3, 2-4와 같다. 비비드스칼렛의 엽절편을 이용한 신초재분화에는 BA $1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NAA $2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 사용하여 암처리를 하지 않았을 때 신초재분화율이 가장 높을 뿐 아니라 신초의 수가 가장 많았다(표 2-3).

표 2-3. 국화 스프레이 품종 비비드스칼렛의 신초 재분화에 미치는 성장조절제와 암배양 무처리의 영향

PGRs(mgL^{-1})		No initial dark incubation		10-day-dark incubation	
BA	NAA	Shoot formation (%)	Mean no. of shoots	Shoot formation (%)	Mean no. of shoots
1	1	0b	0c	80c	2.7e
	2	100a	12.3a	80c	6.0bcd
	3	100a	8.0b	80c	5.3d
2	1	0b	0c	90b	6.7bc
	2	0b	0c	60d	5.3d
	3	100a	8.3b	80c	5.7cd
3	1	0b	0c	90b	7.0b
	2	0b	0c	100a	6.7bc
	3	0b	0c	100a	11.3a

Means within the same letter are not significantly different by DMRT ($P > 0.05$).

표 2-4. 국화 스프레이 품종 비비드스칼렛의 신초 재분화에 미치는 성장조절제와 암배양 기간에 따른 영향

PGRs(mgL^{-1})		20-day-dark incubation		30-day-dark incubation	
BA	NAA	Shoot formation (%)	Mean no. of shoots	Shoot formation (%)	Mean no. of shoots
1	1	0b	0f	0e	0c
	2	0e	2.0de	0e	0c
	3	70b	1.3ef	0e	0c

2	1	60c	5.7ab	26.7cd	1.7ab
	2	70b	3.7cd	33.3bc	1.3bc
	3	40d	4.3bc	36.7b	2.0ab
3	1	80a	2.7cde	0e	0c
	2	60c	3.3cd	46.7a	3.0a
	3	80a	7.0a	23.3d	1.3bc

Means within the same letter are not significantly different by DMRT ($P > 0.05$).

(2) 배지의 gelling agents 및 질산은이 신초 재분화에 미치는 영향

국화 품종 비비드스칼렛의 신초 재분화에 미치는 식물생장조절제의 종류에 농도를 알아보기 위해 gelrite, phytigel, agar, agarose를 사용하여 신초 재분화에 미치는 영향을 관찰한 결과 gelrite를 사용하였을 때 가장 높은 신초 재분화율을 나타내었으며(표 2-5), 신초 유도시 질산은을 농도별로 0, 1, 5, 10, 25 μ M 사용하여 신초 재분화에 미치는 영향을 관찰한 결과 신초 재분화시 무처리에서 가장 높은 신초 재분화율을 나타내었으며 이 결과를 바탕으로 신초 재분화에 질산은 사용은 부적합한 것으로 판단되었다(그림 2-9).

표 2-5. 국화 스프레이 품종 비비드스칼렛의 신초 재분화에 미치는 gelling agents의 영향

Gelling agent	Mean no. of leaves	Mean no. of roots	Plant height(cm)	Fresh weight (mg)
Gelrite	6.7b	12.3a	5.7a	466.7a
Phytigel	6.3b	7.7c	4.3b	273.3c
Agar	9.3a	9.7b	5.1ab	453.7b
Agarose	6.0b	9.7b	3.5c	235d

Means within the same letter are not significantly different by DMRT ($P > 0.05$).

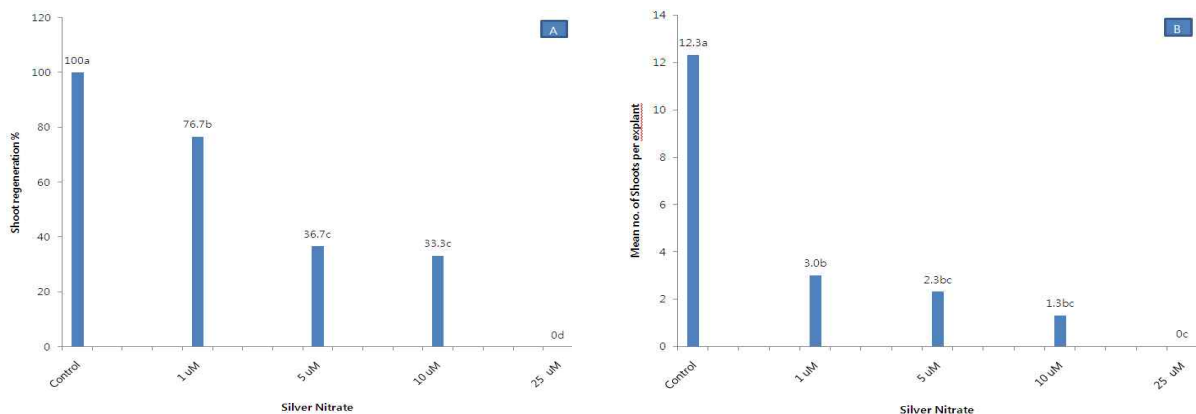


그림 2-9. 국화 스프레이 품종 비비드스칼렛의 신초 재분화에 미치는 질산은의 영향. A-신초재분화율, B-절편당 신초 수

(3) 재생된 신초의 배수성 검정

국화 품종 비비드스칼렛을 앞서 연구한 신초 재분화에 효과적인 방법으로 신초를 재분화시켰을 때 정상적으로 신초가 발달 되었고(그림 2-10), 모식물체와 재분화된 식물체와의 배수성에 차이를 검정한 결과 모식물체와 재분화된 식물체 사이의 배수성 차이는 나타나지 않았다(그림 2-11).

림 2-11).

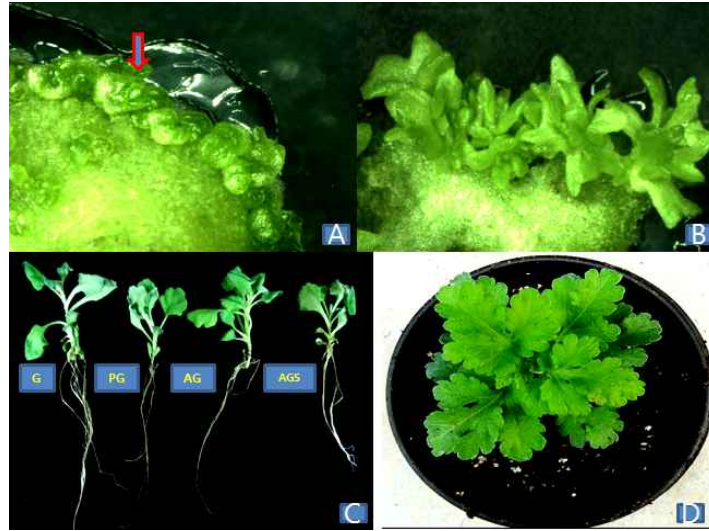


그림 2-10. 국화 스프레이 품종 비비드스칼렛의 엽절편에서 생성된 신초의 재분화 과정. A-신초 엽원기 표면, B- 신초로 발달된 엽원기, C-완전한 식물체로 재분화된 신초, D-온실로 순화 시) 킨 신초

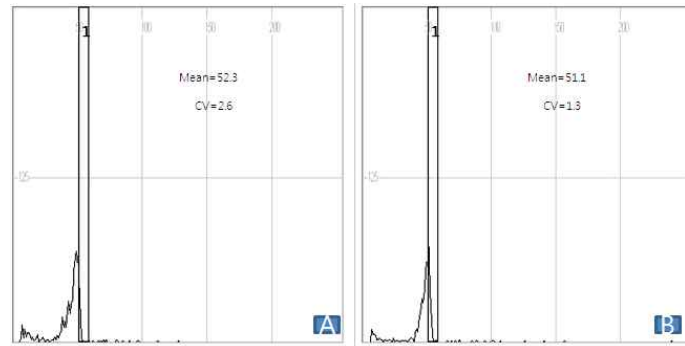


그림 2-11. 국화 스프레이 품종 비비드스칼렛으로 부터 재생된 식물체의 배수성 분석. A-모식물체, B-재분화된 식물체

다. 국화 스프레이 품종 비비드스칼렛의 형질전환 시 항생제 종류 및 농도에 따른 효과

(1) 국화 형질전환 시 항생제 종류에 따른 영향

국화 스프레이 품종 비비드스칼렛의 형질전환시 항생제 종류 및 농도에 따른 영향을 알아보기 항생제 종류, 농도별로 실험한 결과는 그림 2-12에서 보는 바와 같다. 무처리에 비해 항생제 농도가 높을수록 절편체당 신초 수가 감소하며, 항생제중에서 carbenicillin을 처리 하였을 때 절편체당 신초 수가 가장 낮게 나타났다. 또한 그림 2-13에서 보는 바와 같이 식물체당 엽수, 뿌리수, 초장, 생체중 모두 carbenicillin 처리에서 가장 많았으며, 항생제별 농도마다 차이는 있지만 cefotaxime 300mgL⁻¹에서 가장 낮은 결과를 나타내었다.

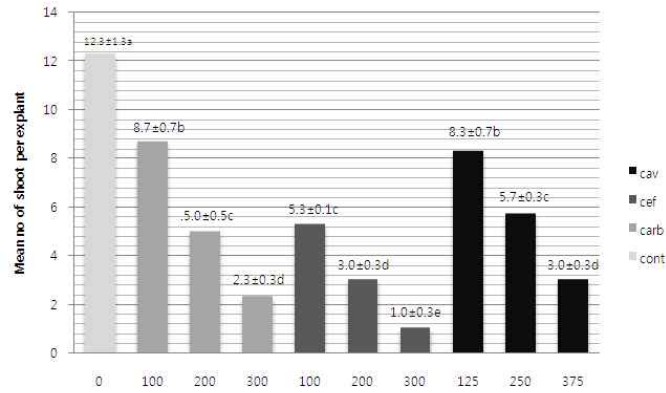


그림 2-12. 국화 형질전환시 항생제 종류에 따른 영향. Control- 1.0 mgL^{-1} 6-benzyladenine (BA) + 2.0 mgL^{-1} naphthalene acetic acid (NAA). Cav-Clavamox, cef-cefotaxime, carb-carbenicillin, cont-control.

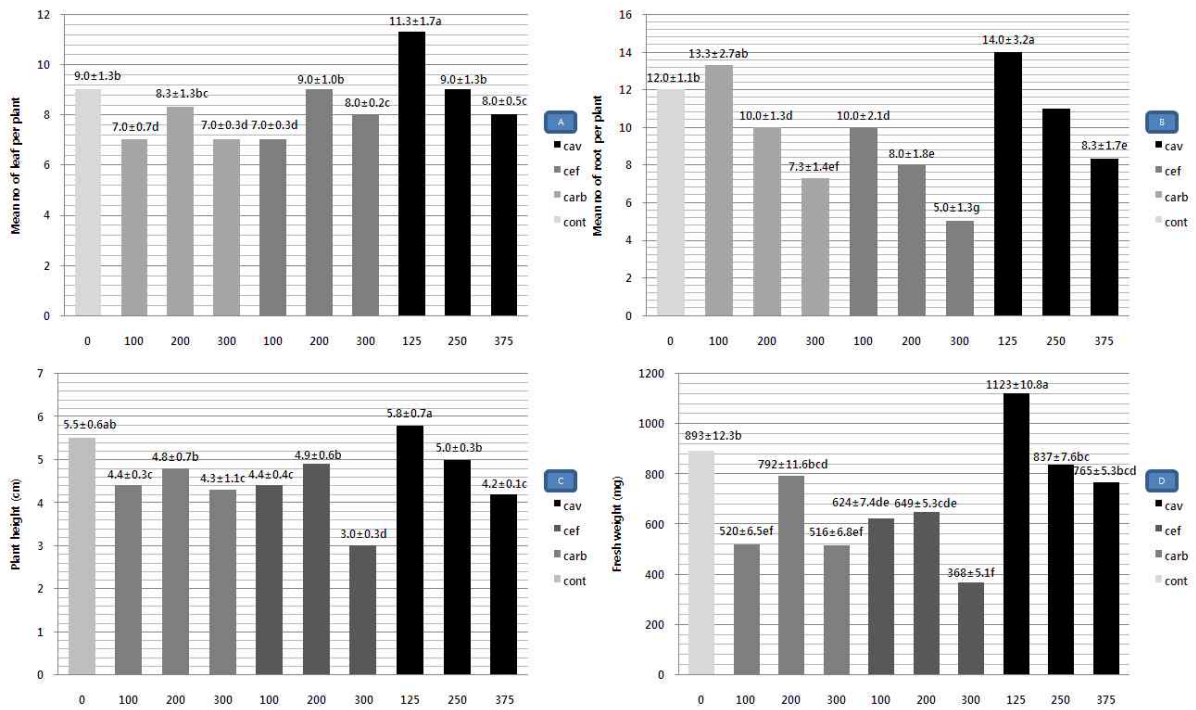


그림 2-13. 국화 형질전환시 항생제 종류(carbenicillin, cefotaxime, Clavamox) 및 다양한 생장 요인에 따른 신초재생 효율. A-식물체당 엽 수, B-식물체당 뿌리 수, C-초장,; D-배양 5주 후 생체중. Cav, Clavamox; cef, cefotaxime; carb, carbenicillin; cont, control

(2) 국화의 비형질전환체와 형질전환체 비교

형질전환체와 비형질전환체의 엽표피 조직과 기공의 크기와 빈도를 비교한 결과 그림 2-14와 표 2-6과 같이 비형질전환체와 형질전환체의 엽표피 조직의 구조와 기공의 크기 및 빈도에 차이가 나타나지 않았다.

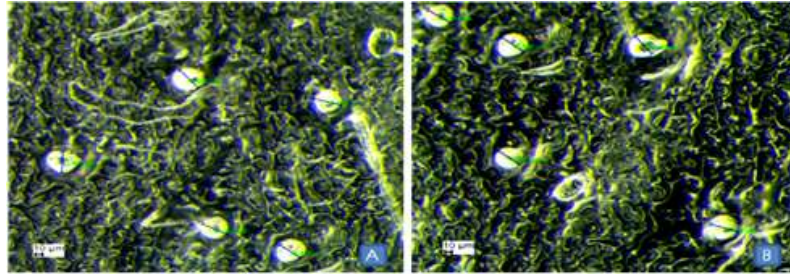


그림 2-14. 국화 스프레이 품종 ‘비비드스컬릿’의 비형질전환체와 형질전환체의 엽표피 조직 관찰. A-비형질전환체(mother plant)의 엽표피 조직, B-형질전환체의 엽표피 조직

표 2-6. 비형질전환체(mother plant)와 형질전환체의 기공의 크기와 빈도의 비교

Ploidy	Origin	Stomatal frequency	Size of Length (μM)	Stomata Width (μM)
Hexaploid	Mother plant (control)	6.0a	44.9 \pm 0.7a	40.4 \pm 0.6a
Hexaploid	Regenerated plant from Clavamox125 mgL ⁻¹	6.0a	44.7 \pm .3a	41.6 \pm 0.6a

라. 국화 스탠다드 품종 신마의 신초 재분화에 미치는 요인 실험

(1) 식물생장조절제 농도에 따른 효과

국화 스탠다드 품종 신마를 이용해 엽조직에서 신초를 재생하기 위해 식물생장조절제를 처리한 결과 BA 0.5 mgL⁻¹, IAA 0.5mgL⁻¹ 를 처리하였을 때 가장 높은 신초 재분화율과 가장 많은 절편체당 신초 수를 나타내었다(표 2-7).

표 2-7. 국화 스탠다드 품종 신마의 엽절편 배양시 식물생장조절 물질의 농도에 따른 신초 재분화 효과

PGRs (mg·L ⁻¹)		Shoot regeneration (%)	Mean no. of shoots per explant
BA	IAA		
0	0	0c	0c
0.5	0.1	0c	0c
	0.3	0c	0c
	0.5	30a	2.3a
	1.0	20b	1.3b
1.0	0.1	0c	0c
	0.3	0c	0c
	0.5	0c	0c
	1.0	20b	1.0b
2.0	0.1	0c	0c
	0.3	0c	0c
	0.5	0c	0c
	1.0	0c	0c

Means marked with the same letter are not statistically significantly different according to Duncan's multiple-range test ($p > 0.05$)

(2) 모식물체의 배양기간에 따른 효과

국화 스탠다드 품종 신마의 엽절편 배양시 모식물체의 배양 기간이 신초 재분화에 미치는 영향을 알아보기 위해 모식물체를 4, 5, 6, 7, 8 주간 배양한 결과 6주간 배양하였을 때 76.7%의 높은 신초 재분화율을 나타내었고, 절편체당 신초 수 7.2개로 가장 많았다(표 2-8).

표 2-8. 국화 스탠다드 품종 신마의 엽절편 배양시 배양기간에 따른 신초 재분화율.

Age of donor plant (weeks)	Shoot regeneration (%)	Mean no. of shoots per explant
4	40d	3.3d
5	60b	5.5b
6	76.7a	7.2a
7	50c	4.1c
8	30e	3.0d

Leaf explants were cultured on the optimal medium: supplemented with 0.5 mgL^{-1} a-naphthaleneacetic acid (NAA) and 0.5 mgL^{-1} 6-benzyladenine (BA) Means marked with the same letter are not statistically significantly different according to Duncan's multiple-range test ($p > 0.05$)

(3) 엽절편의 암배양 기간에 따른 효과

국화 스탠다드 품종 신마의 엽절편 배양시 암배양 기간이 신초 재분화에 미치는 영향을 알아보기 위해 암배양 기간을 0, 1, 2, 3 주간 처리한 결과 암배양을 1주간 처리 하였을 때 80%의 높은 신초 재분화율을 나타내었고, 절편체당 신초 수 9.7개로 가장 많았다(표 2-9).

표 2-9. 국화 스탠다드 품종 신마의 엽절편 배양시 암배양기간에 따른 신초 재분화율.

Dark treatment (weeks)	Shoot formation (%)	Mean no. of shoots per explant
Control (0)	76.7ab	7.2b
1	80a	9.7a
2	70bc	6.9b
3	63.3c	5.2c
4	43.3d	3.1d

Means marked with the same letter are not statistically significantly different according to Duncan's multiple-range test ($p > 0.05$)

(4) 엽절편의 에틸렌억제제 처리에 따른 효과

국화 스탠다드 품종 신마의 엽절편 배양시 에틸렌억제제 처리가 신초 재분화에 미치는 영향을 알아보기 위해 에틸렌억제제인 silver nitrate, silver thiosulfate, AVG를 농도별로 처리한 결과 무처리에서 가장 높은 신초 재분화율과 절편체당 신초 수를 나타내었고, 항생제 종류별 농도가 높아질수록 신초 재분화율과 절편체당 신초 수가 감소하였다. 특히 silver thiosulfate와 AVG의 고농도에서는 신초 재분화가 전혀 이루어지지 않았다(표 2-10).

표 2-10. 국화 스탠다드 품종 신마의 엽절편 배양시 에틸렌억제제 처리에 따른 싌초 재분화율.

Ethylene inhibitors (μM)	Shoot formation (%)	Mean no. of shoots per explant
0	80a	9.7a
Silver nitrate		
1	66.7b	7.1b
5	50c	4.3d
10	43.3cd	2.0fg
25	16.7f	1.3g
Silver thiosulfate		
1	63.3b	6.7b
5	46.7cd	3.7de
10	30e	2.3f
25	0g	0h
AVG		
1	60b	5.3c
5	40d	3.3s
10	26.6e	1.7fg
25	0g	0h

Means marked with the same letter are not statistically significantly different according to Duncan's multiple-range test ($p > 0.05$)

(5) 식물생장조절제 종류에 따른 발근 효과

국화 스탠다드 품종 신마의 엽절편 배양으로부터 재생된 식물체의 발근을 유도하기 위해 다양한 옥신류의 호르몬을 농도별로 처리한 결과 IAA는 $0.2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 을 처리하였을 때, NAA는 $0.2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 을 처리하였을 때, IBA는 $0.2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 을 처리하였을 때 가장 처리구별 높은 발근율을 나타내었고, 호르몬 중에서는 IBA를 사용하였을 때 가장 높은 발근율을 나타내었다. 발근된 뿌리의 길이 역시 IBA를 사용하였을 때 뿌리의 길이가 길었고 그 중 $0.2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 처리가 뿌리의 길이가 가장 긴 것으로 관찰되었다(표 2-11).

표 2-11. 옥신 종류가 국화 스탠다드 품종 '신마'의 엽절편 배양으로부터 재생된 기내 식물체 발근 유도에 미치는 영향

Auxin ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Mean no. of roots per explant	Root length (cm)
0	5.1e	6.3d
IAA		
0.1	7.3c	7.8c
0.2	9.0b	9.3b
0.3	7.0c	8.3bc
NAA		
0.1	6.1d	8.1bc
0.2	7.3c	9.3b

0.3	6.0d	9.1b
IBA		
0.1	9.1b	8.7b
0.2	12.0a	10.7a
0.3	8.7b	9.3b

Means marked with the same letter are not statistically significantly different according to Duncan's multiple-range test ($p > 0.05$)

마. 국화 스탠다드 품종 신마의 형질전환시 항생제 선발 실험

(1) 국화 스탠다드 품종 신마의 형질전환시 항생제 종류별 신초 재분화 효율

국화 스탠다드 품종 신마의 형질전환시 항생제 종류가 신초 재분화 효율에 미치는 영향을 알아보기 위해 carbenicillin, cefotaxim, clavamox, timentin을 농도별로 처리한 결과 70~80%로 높은 신초 재분화율을 보였지만, 절편체당 신초 수는 항생제 처리 농도가 높아 질수록 줄어들었다(표 2-12).

표 2-12. 국화 스탠다드 품종 신마의 형질전환시 항생제 종류별 신초 재분화 효율.

Antibiotics(mg·L ⁻¹)	Shoot formation (%)	Mean no. of shoots per explant
Control	80	9.7a
Carbenicillin		
125	80	6.1de
250	80	4.3gh
375	70	3.7hi
Cefotaxime		
125	80	6.7cd
250	70	4.9fg
375	70	3.3i
Clavamox		
125	80	7.6b
250	80	5.9de
375	80	4.3gh
Timentin		
125	80	7.2bc
250	80	5.5ef
375	80	3.7hi

(2) 국화 스탠다드 품종 신마의 형질전환시 PPT 농도별 신초재분화 효율

국화 스탠다드 품종 신마의 형질전환시 PPT 농도가 신초 재분화 효율에 미치는 영향을 알아보기 위해 PPT를 농도별로 처리한 결과 1.0 mg·L⁻¹ 가 적정농도로 판단되었다.(표 2-13) 앞서 연구한 내용을 바탕으로 국화 스탠다드 품종 신마를 형질전환하였다(그림 0).

표 2-13. 국화 스탠다드 품종 신마의 형질전환시 phosphinothricin (PPT) 농도별 신초재분화 효율

Selective agent (mg·L ⁻¹)	Shoot formation (%)	Mean no. of shoots per explant
Control	80	9.7
PPT		
0.3	70	6.7
0.5	50	4.8
0.7	26.7	2.3
1.0	0	0

4. 국화 화색발현 유전자의 형질전환 및 삽입유전자 발현 식물체 선발

가. 효과적인 형질전환 방법을 통한 형질전환체 육성

앞서 연구한 자료를 바탕으로 기존의 방법보다 효과적으로 형질전환을 실시하여 국화의 다양한 품종별 형질전환을 수행하였다. 국화 스프레이 품종의 피치엔디를 이용하여 형질전환을 수행하여 첫 번째 선발(그림 2-15)을 통해 putative transgenic plant을 선발할 수 있었다. 또한, 보다 정확한 선발을 위해 더 높은 농도의 PPT가 첨가된 배지(1.0 mg·L⁻¹)에서 putative transgenic plant을 선발하였고(그림 2-16), 이후 온실로 순화시켰으며(그림 2-17), 스탠다드 품종의 신마 역시 앞서 연구한 내용을 바탕으로 형질전환하여 putative transgenic plant을 선발하였다(그림 2-18).

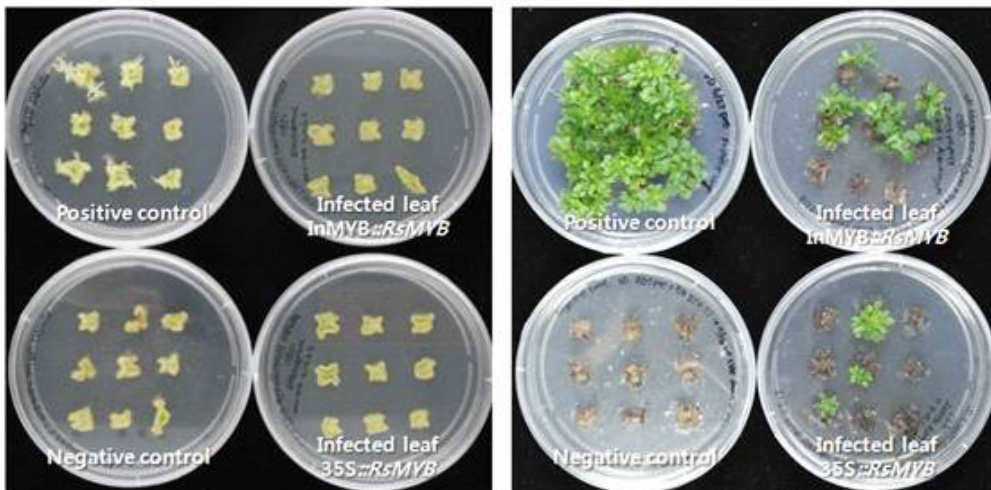


그림 2-15. 국화 스프레이 품종 피치엔디를 이용한 형질전환 후 PPT 0.7mg·L⁻¹ 첨가된 1차 선발배지

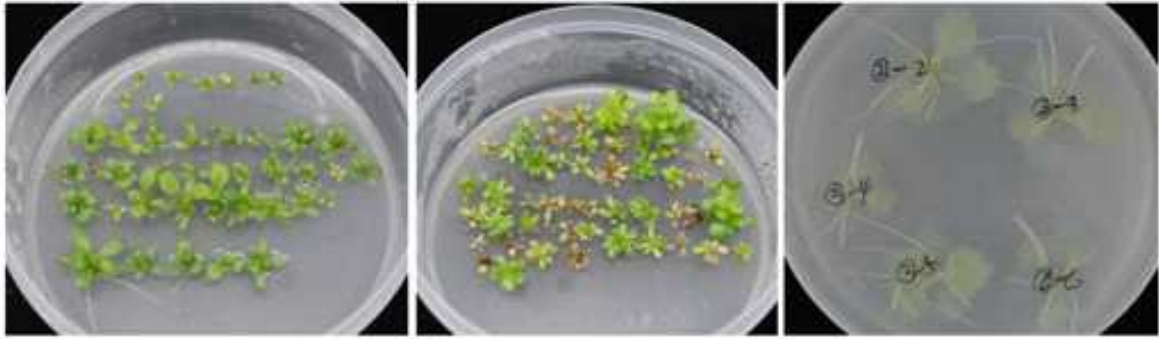


그림 2-16. 국화 스프레이 품종 피치엔디를 이용한 형질전환 후 PPT 1.0 mg·L⁻¹ 첨가된 2차 선발배지



그림 2-17. 국화 스프레이 품종 피치엔디의 선발된 putative transgenic plant의 순화

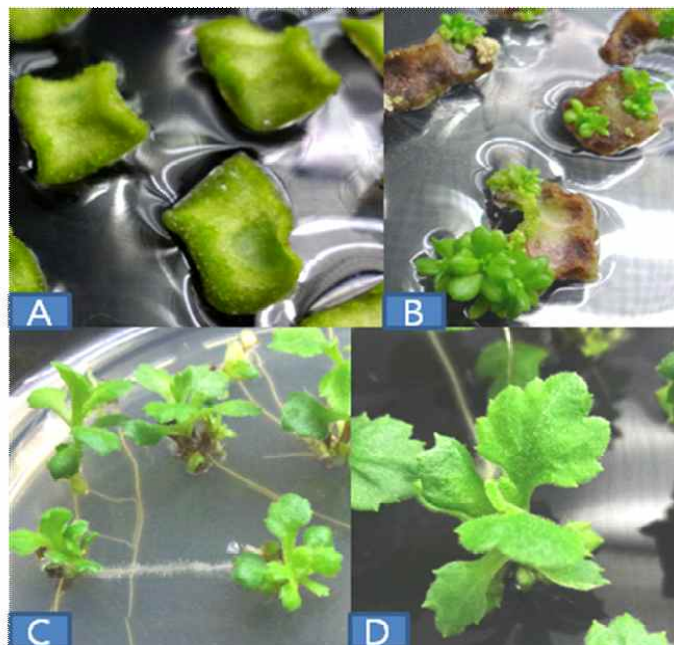


그림 2-18. 국화 스탠다드 품종 신마의 putative transgenic plant의 발달단계 A-절편체의 공동 배양 7일후, B-PPT 1.0 mg·L⁻¹ 선발배지에서 재분화된 신초, C-PPT 1.0mg·L⁻¹ 가 첨가된 발근배지에서 발근한 신초, D-발근 후 PPT 1.0mg·L⁻¹ 가 첨가된 배지에서 생육중인 신초

나. 유전적 분석

(1) 제초제 저항성 테스트

형질전환방법을 통해 유도된 신초들의 제초제 저항성을 시험하기 위해 제초제 ‘로레인(경농)’을 0.2%로 희석시킨 용액을 온실에서 순화시킨 putative transformant와 비형질전환체인 무처리구에 분무기로 살포한 다음 5일 후의 변화 양상을 관찰한 결과 비형질전환체인 무처리구는 제초제저항성이 없어 잎이 고사한 반면 putative transformant는 제초제 저항성이 있어 고사하지 않고 정상생육을 나타내었다(그림 2-19).

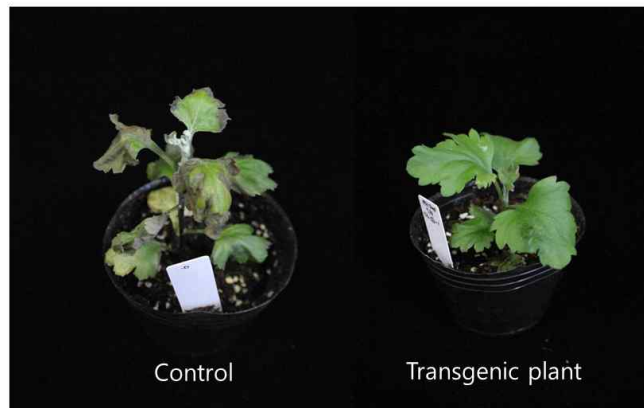


그림 2-19. 국화 스프레이 품종 피치엔디의 제초제 저항성 검정

(2) DNA 추출을 통한 PCR 검정

형질전환체의 DNA를 이용해 PCR을 통한 검정 결과 꽃잎(InMYB::*RsMYB1*)에서만 발현하는 형질전환체는 피치엔디 8 개체(그림 2-20), 피치레드 7개체(그림 2-21), 비비드스칼렛 20개체(그림 2-22), 신마 3개체(그림 2-26)를 얻을 수 있었고, 전발현(35S::*RsMYB*)하는 형질전환체는 피치엔디 1개체(그림 2-23), 피치레드 2개체(그림 2-24), 비비드스칼렛 1개체(그림 2-25)를 얻을 수 있었다.

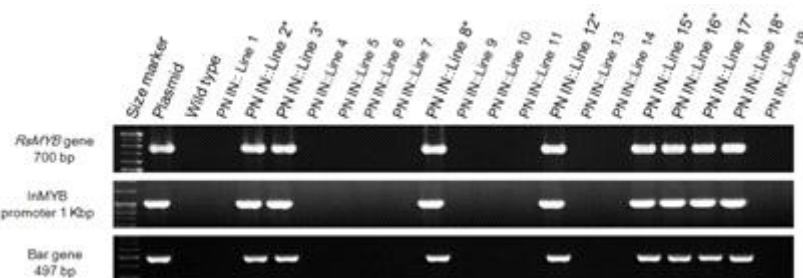


그림 2-20. 국화 스프레이 품종 피치엔디의 pB7WG2D:InMYB::*RsMYB1*의 PCR 검정

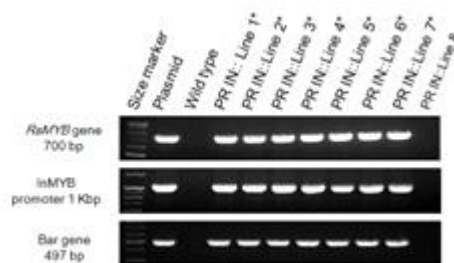


그림 2-21. 국화 스프레이 품종 피치레드의 pB7WG2D:InMYB::*RsMYB1*의 PCR 검정

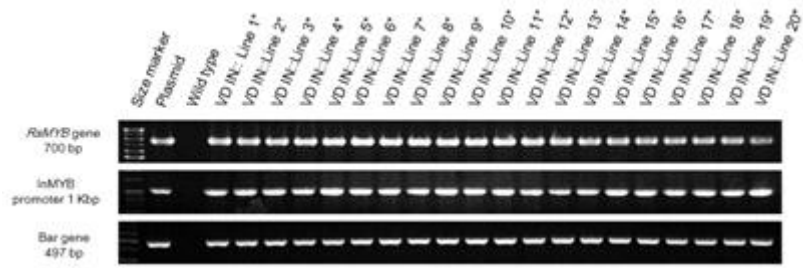


그림 2-22. 국화 스프레이 품종 비비드스칼렛의 pB7WG2D:InMYB::*RsMYB1*의 PCR 검정

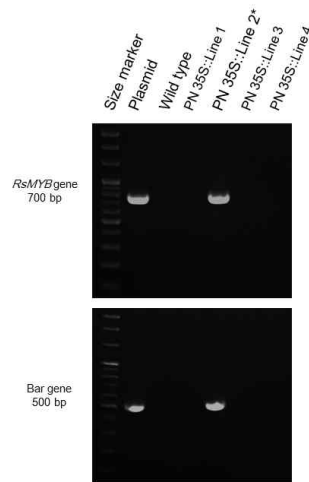


그림 2-23. 국화 스프레이 품종 피치엔디의 pB7WG2D:35S::*RsMYB*의 PCR 검정

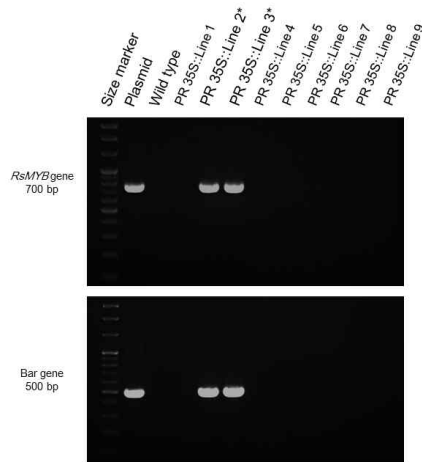


그림 2-24. 국화 스프레이 품종 피치레드의 pB7WG2D:35S::*RsMYB*의 PCR 검정

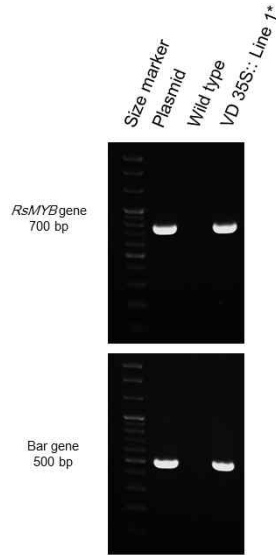


그림 2-25. 국화 스프레이 품종 비비드스칼렛의 pB7WG2D:35S::*RsMYB*의 PCR 검정

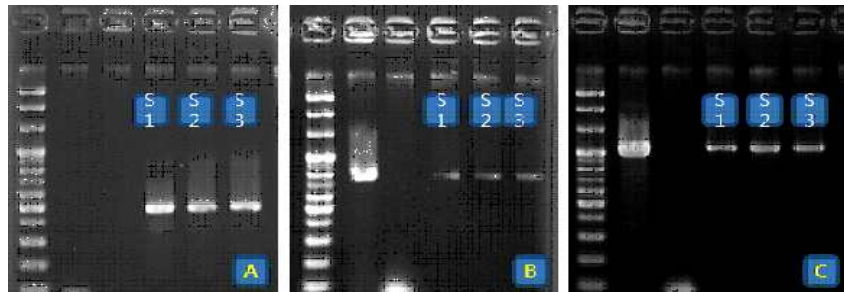


그림 2-26. PCR을 통한 국화 스탠다드 품종 신마의 선발마커(bar), target gene(*RsMYB*), petal specific promoter gene(*InMYB*)의 PCR 검정. A-bar, B-*RsMYB*, C-*InMYB*

선발효율을 표로 나타낸 결과 *InMYB* promoter에서는 비비드스칼렛이 형질전환 효율이 11.1%로 높게 나왔고, *35S* promoter에서는 피치레드가 형질전환 효율 1.9%로 높았다(표 2-14).

표 2-14. 국화 품종 피치엔디, 피치레드, 비비드스칼렛의 형질전환 효율

Vector	Cultivar	No. of leaf segments	No. of shoot regeneration	No. of Root regeneration	No. of transgenic plants*	Transformation efficiency (%)
InMYB	Peach ND	108	89	19	8	7.4
	Peach Red	108	93	7	6	5.6
	Vivid Scarlet	180	142	20	20	11.1
CaMV 35S	Peach ND	108	19	4	1	0.9
	Peach Red	108	40	9	2	1.9
	Vivid Scarlet	108	14	1	1	0.9

(3) Southern 검정

PCR로 유전자 삽입이 확인된 식물체의 copy 수를 확인하는 방법으로 southern analysis 한 결과 피치엔디는 2copy, 피치레드는 2copy, 1copy, 비비드스칼렛은 2copy로 확인되었다(그림 2-27).

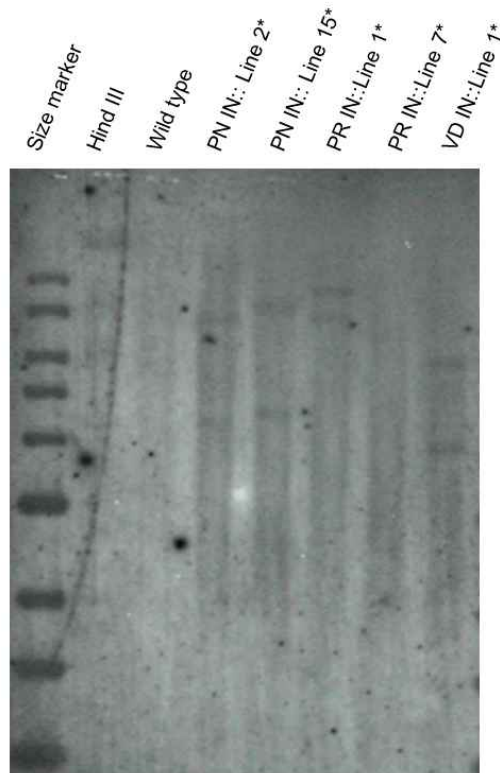


그림 2-27. 국화 품종 통한 피치엔디(PN), 피치레드(PR), 비비드스칼렛(VD)의 삽입된 target gene 및 copy 수 확인을 위한 southern 분석.

(4) RNA 추출 및 RT-PCR 검정

PCR로 유전자 삽입이 확인된 식물체에서 target gene의 발현 여부를 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행한 결과 형질전환체에서 target gene의 발현이 확인되었다(그림 2-28).

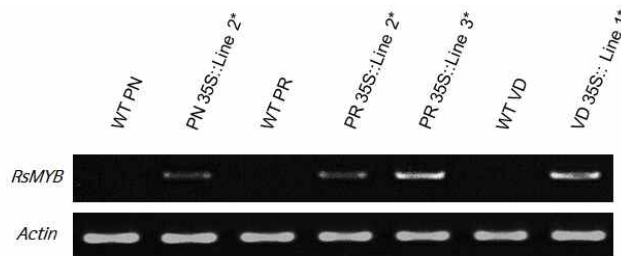


그림 2-28. 국화 품종 피치엔디(PN), 피치레드(PR), 비비드스칼렛(VD)의 삽입된 target gene의 발현분석을 위한 RT-PCR. WT PN-비형질전환체 피치엔디, WT PR-비형질전환체 피치레드, WT VD-비형질전환체 비비드스칼렛

(5) 확인된 형질전환체의 안토시아닌 축적 양상비교

확인된 국화 형질전환체의 삽입 유전자별 안토시아닌 축적양상을 비교하기 위하여 비형질 전환체(대조구)와 형질전환체의 조직인 잎, 줄기, 뿌리 등을 관찰한 결과 비형질전환체인 대조구에 비해 형질전환체(*35S:RsMYB*)의 줄기에서 안토시아닌 축적이 확인되었고(그림 2-29), 줄기 상부, 중부, 하부의 부위별 줄기의 안토시아닌 축적정도는 비교해본 결과 비형질전환체보다 형질전환체(*35S::RsMYB*, *InMYB::RsMYB*)의 줄기에서 더 많은 안토시아닌 축적이 관찰되었고, 이 중 전발현 유전자인 *35S::RsMYB*의 형질전환체에서 제일 많은 안토시아닌 축적이 관찰되었다(그림 2-30). 하지만 엽육조직과 잎의 표피조직에서는 안토시아닌 축적이 관찰되지 않았고, 뿌리에서 역시 안토시아닌의 축적을 관찰할 수 없었다(그림 2-31).

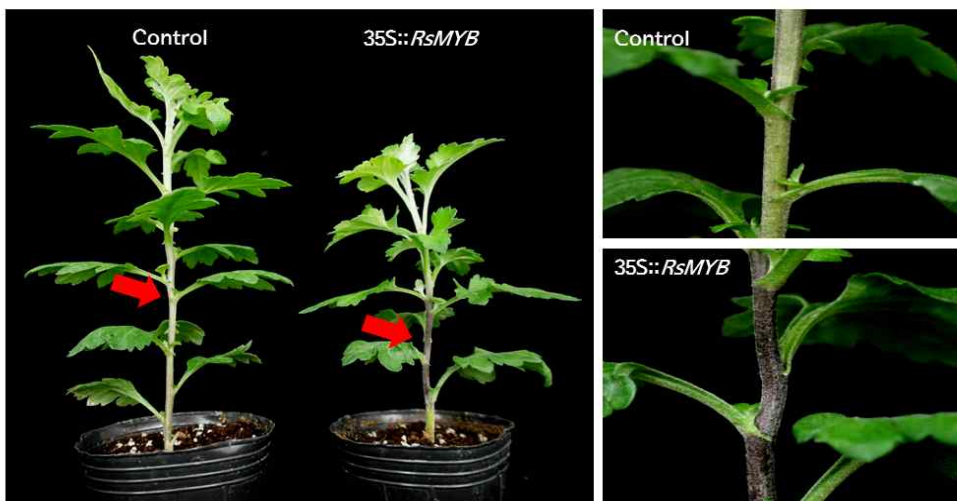


그림 2-29. 국화 스프레이 품종 피치엔디의 비형질전환체와 형질전환체(*CaMV35S::RsMYB*)의 안토시아닌 축적 양상



그림 2-30. 국화 스프레이 품종 피치엔디 비형질전환체(control)와 형질전환체(*35S::RsMYB*, *InMYB::RsMYB*)의 줄기에서 관찰되는 안토시아닌 축적 양상.

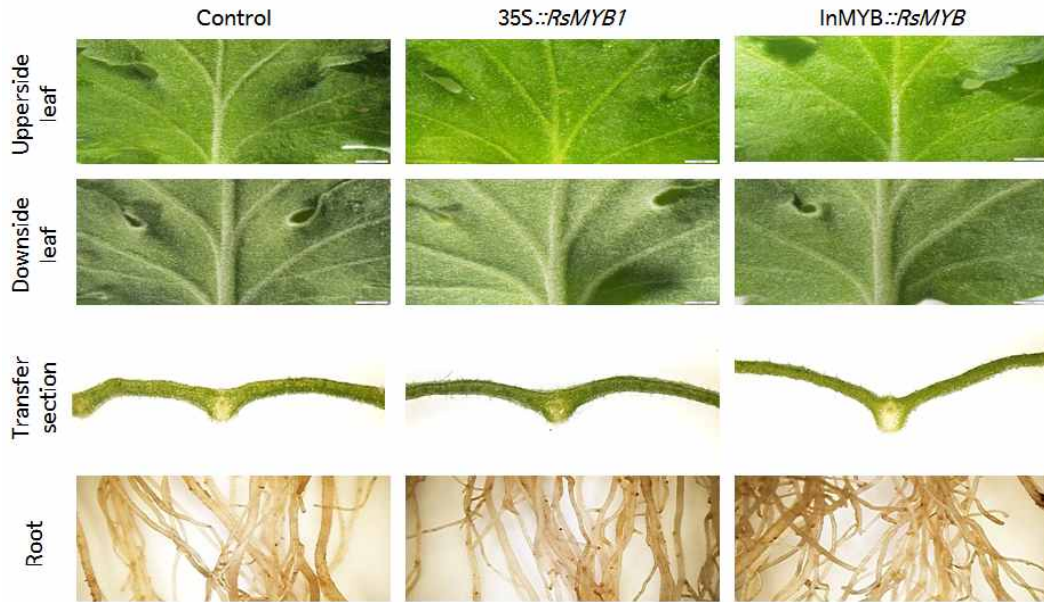


그림 2-31. 국화 스프레이 품종 피치엔디 비형질전환체(control)와 형질전환체(35S::RsMYB, lnMYB::RsMYB)의 잎 및 뿌리에서 관찰되는 안토시아닌 축적 양상.

5. 내열성 유전자 발현 형질전환용 운반체 재조합과 *Agrobacterium*의 형질전환 가. 내열성 발현 유전자 형질전환용 운반체의 지도

pCAMBIA2301을 기본벡터로 사용하여 내열성 발현 가능할 것으로 추정되는 *OsHSP26* 유전자와 *AtGRX3* 유전자를 재조합하였고, *AVP1*과 *CHX13* 유전자가 pBI121 기본벡터에 클로닝된 형질전환용 벡터는 미국 Kansas State University Prof. Sunghun Park으로부터 분양받아 사용하였다(그림 2-32).

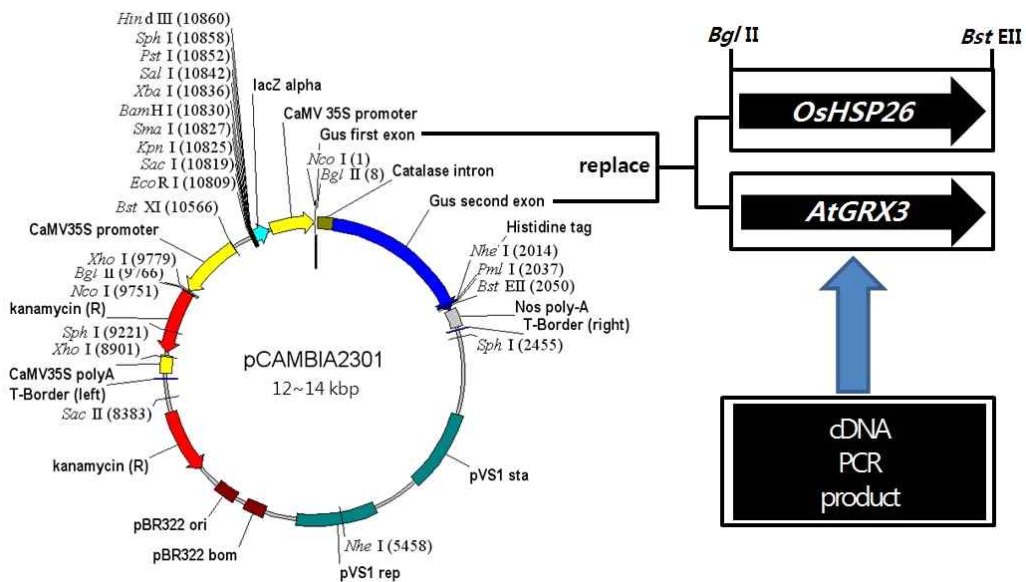


그림 2-32. 내열성 국화 형질전환체 획득을 위해 활용한 운반체 지도

나. 내열성 발현 유전자의 cDNA 염기서열

(1) *AtGRX3* 전장 1,467bp, 밀줄 참조)

5' -GTAAATCACAAACACAAAAAAGTGTTAAGAGATCCTTCTCCCTCT**AGATCT**ATGAGCGGTACGGTGAAGGATATC
GTTTCAAAGCGGAGCTTGATAACTTGCGCCAGAGCGGCGCACCCAGTCGTGCTTCACTTCTGGGCTTCTTGGTGTGATGC
TTCGAAGCAGATGGATCAAGTTTTCTCTCATCTCGCTACTGATTTCCCTCGTGTCACTTCTTTAGGGTTGAAGCTGAGG
AACATCCTGAGATATCTGAGGCTTACTCTGTTGCTGCTGTGCCTTATTTTCGTCTTCTTCAAGGATGGTAAAACCTGTGGAT
ACACTTGAGGGTGCAGATCCATCAAGTTTAGCTAATAAGGTTGGCAAAGTTGCTGGTTCTAGTACTTCTGCGGAGCCTGC
TGCTCCTGCAAGCTTAGGGTTGGCTGCTGGGCCAACGATTCTTGAACCTGTGAAGGAGAATGCGAAAGCTTCTTTACAAG
ACCGAGCTCAGCCTGTATCTACCGCCGATGCTCTCAAGAGCCGTTTGGAAAAGCTCACTAATTTCTCACCCCTGTCATGTTA
TTCATGAAAAGGTATTCTTGAAGAGCCTAGGTGTGGGTTTAGCAGGAAAGTAGTTGACATTTTTGAAAGAGGTTAACGTTGA
TTTTGGAAGTTTTGACATACTATCGGATAACGAAGTGCAGAGGGTTTGAAGAAATTCTCTAACTGGCCAACGTTTCTC
AGCTGTACTGCAACGGAGAGCTTCTTGGTGGAGCTGATATCGCAATAGCGATGCACGAGAGCGGTGAACATAAAGATGCT
TTCAAAGATCTTGGGATCACGACAGTTGGTTCAAAGAAAGTCAGGATGAAGCTGGAAAAGGAGGAGGGGTTAGTTCAGG
AAACACAGGCTTAAGTGAGACCCCTCCGAGCTCGGCTCGAAGGTCTGGTCAATTCCAAACAGTTATGCTGTTTATGAAAAG
GAAGACCAGAAGAACCAGTGTGGGTTTCAAGTGGGAAAGTGGTTGAAATCCTCAACCAAGAAAAATCGAGTTTTGGGAGT
TTCGATATCCTCTTAGATGACGAAGTTCGCCAAGGCCTTAAAGTGTATTCAAACCTGGTCAAGCTATCCTCAGCTTTACGT
GAAAGGCGAGCTTATGGGTGGATCAGACATTGTCTTGGAGATGCAAAAGAGCGGTGAGCTGAAAAAGGTTTACCGAGA
AAGGGATCACTGGAGAACAGAGTCTTGAAGATAGATTGAAGGCCTGATCAATTCCTCGGAAGTAATGCTATTTCATGAAA
GGTTCACCAGATGAACCGAAAATGCGGATTTAGCTCCAAAGTTGTGAAAGCATTGAGAGGAGAAAACGTGAGTTTTCGGATC
GTTTGATATCTTGACTGATGAAGAAGTAAGGCAAGGGATTAAGAATTTCTCAAACCTGGCCAACCTTTTCTCAGCTATACT
ACAAAGGTGAGTTAATTGGAGGATGTGATATCATTATGGAGCTAAGTGAGAGTGGTGTATCTCAAAGCAACTCTATCCGAG
TAA**GGTAACC**TACAAGTCTCTGTCTGCTGGTTTTGCCTTGGTGAGAGAGAACATTTTCAAGTTATGGTAATAATATGTTTTAG
GTGTTACAAACATTGATATTGTTGCTTCTCAAGCTTTGTCTTGTATTCTATTGCTGAGTCTATTAGATTACATAACTAT
TTTTCTCTCTTTGTATCAACATAATCTTTATTTATGGTTATCTTGACCACATTTGCTT-3'

(2) *OsHSP26* 전장 720bp, 밀줄 참조)

5' -AAGCAATCAAGCGACGATAAATTAGAGCACTCGCGACCTCTCCGACGATCTCCAGCTCACTGCTTTTAGGTTCTCAA
CTCTGATTTCTCTCTACTCTGT**AGATCT**ATGGCTGCTCCATTTCGCTCTCGTCAGCCGTGTCTCGCCAGCGGCGCGGCTC
CCCATCCGCGCCGCTGGAGGAGCGAGCCGACGGTCCGGCTCCCGTCTCGGGGAGGGCCCGCCAGCTCGCCGTGGCCCTC
CGCGGCGCAGGAGAACAGGGACAACACCGCCGTCGATGTCCACGTCAACCAGGACGGCGGGAACAGCAGGGGAACCGCG
TGCAGCGCCCGCCGCGCCGCTCGTCCGGCTTTGGACGGCATCTCCCGTTCCGGCTCGTGGACCCGATGTGCGCGATGCGG
ACGATGCGGCAGATGCTGGACACGATGGACCGGATGTTTCGACGACGTGCGCTGGGGTTCCCGCCACGCCGCGGAGGTC
GCTGGCGACGGGGGAGGTGCGGATGCCGTGGGACGTGATGGAGGACGACAAGGAGGTGAGGATGCGGTTTCGACATGCCGG
GCCTGTGCGGGGAGGAGGTGAAGGTGATGGTGGAGGACGACGCGCTCGTCATCCGCGGGGAGCACAAGAAGGAGGAGGGC
GAGGGCGCGGAGGGCTCCGCGACGGGTGGTGGAAAGGAGCGCAGCGTGAGCTCCTACGACATGCGGCTCGCGCTCCCCGA
CGAGTGCGACAAGAGCAAGGTCCGCGCCGAGCTCAAGAACGGCGTGCTGCTCGTCAACCGTCCCAAGACGGAGGTGGAGC
GCAAGGTCACTGACGTGACAGTCCAGT**AGGTTACC**GGCTGCTACTACTACTGAACGGTCACTCTGGAGGATGTGAGCCTG
TGACCGTGAGGGTTTAAAGCAGTGTGAGGTTTGAAGAAAGTGTGACTAGAGGTTGTAATTACTCAGCGAACGAGCGAATG
AATGGAATAATGCTAGTATGAGATAAAAGGTTTGGTTGCTCTC-3'

두 목표유전자(*AtGRX3*, *OsHSP26*)의 염기서열 모두는 NCBI 등재된 염기서열과 일치하였다.

다. 내열성 발현 유전자 재조합 운반체의 숙주세포 도입

(1) 플라스미드(운반체) 증식 : *E. coli* DH5 α

(2) *Agrobacterium tumefaciens* strain : High virulence strain “GV3101” [*AtGRX3* 유전자 발현 운반체(pCAM-GRX) 형질전환], “LBA4404[*OsHSP26* 유전자 발현 운반체(pCAM-HSP) 형질전환]

E. coli DH5 α 에서 증식한 벡터를 추출하여 *Agrobacterium* 2개 strain 각각에 형질전환한 후 다시 plasmid를 추출하여 PCR을 통해 도입 여부를 확인하였다.

6. 내열성 유전자 도입 국화 형질전환체 획득과 핵산 분석

가. 품종별 wild type의 잎 절편으로부터 재분화능 비교

(1) BA 1.0 mg/L와 IAA 1.0 mg/L 혼용 첨가배지에서의 4개 품종의 재분화율

BA 1.0 mg/L와 IAA 1.0 mg/L 혼용 첨가배지 조건에서 비비드스칼렛과 백마 품종이 형질전환이 가능할 정도의 높은 재분화율을 나타냈다(표 2-15).

표 2-15. 국화 품종별 잎 절편으로부터 신초 재분화율 비교

Cultivar	Shoot regeneration frequency (%)
Vivid Scarlet	98.0±4.5 a
Peach ND	42.0±8.4 b
Orange ND	8.0±8.4 c
Baekma	94.0±5.5 a

Values represent the mean±SD of five replicas, which followed by the same letter within the second column are not significantly different according to Duncan’s multiple range test at the 1% level.

(2) BA 1.0 mg/L와 IAA 0.1 mg/L 혼용 첨가배지에서 2개 품종의 재분화율

IAA 첨가농도를 10분의 1 수준으로 낮추었을 때 피치앤디 품종의 재분화율이 68.0%에 이르러 형질전환이 가능할 정도의 재분화율을 나타내었다(표 2-16).

표 2-16. 국화 품종별 잎 절편으로부터 신초 재분화율 비교

Cultivar	Shoot regeneration frequency (%)
Peach ND	68.0±9.2 a
Orange ND	12.0±8.4 b

Values represent the mean±SD of five replicas, which followed by the different letters within the second column are significantly different according to *t*-test at the 1% level.

(3) 각 품종별 선발 식물생장조절제 첨가 배지에서의 재분화

스프레이 품종인 비드스칼렛과 피치엔디 품종의 각 재분화 신허는 상당히 독립적인 반면 스탠다드 품종인백마는 재분화율이 높기는 하지만 재분화 신허가 cluster를 이루며 분화하여 형질전환의 효율에 영향을 미칠 수 있을 것으로 판단되었다(그림 2-33).

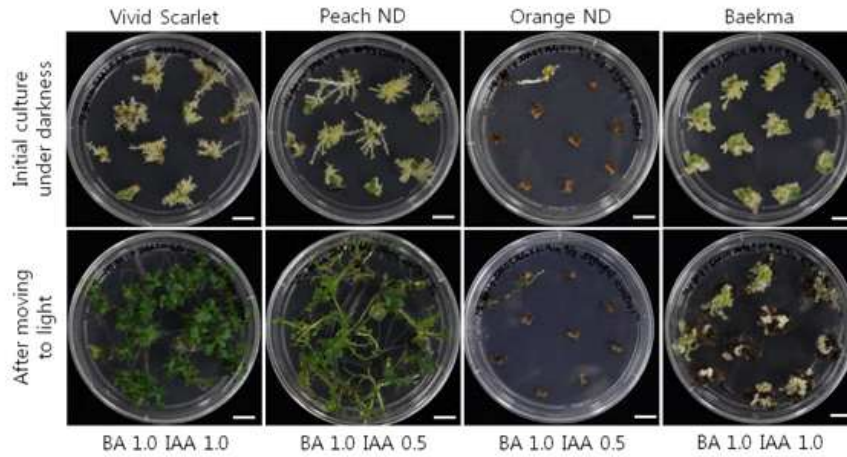


그림 2-33. 국화 품종 비비드스칼렛, 피치엔디, 오렌지엔디, 백마의 재분화를 위해 선발된 성장 조절제 첨가 배지에서의 각 품종의 재분화 상태

나. 형질전환체 선발을 위한 kanamycin 첨가 농도 설정

형질전환체 선발을 위해 kanamycin을 농도별로 처리한 결과 재분화 억제효과를 기준으로 선 발제로서 kanamycin 농도는 10 mg/L로 설정하였다(그림 2-34).

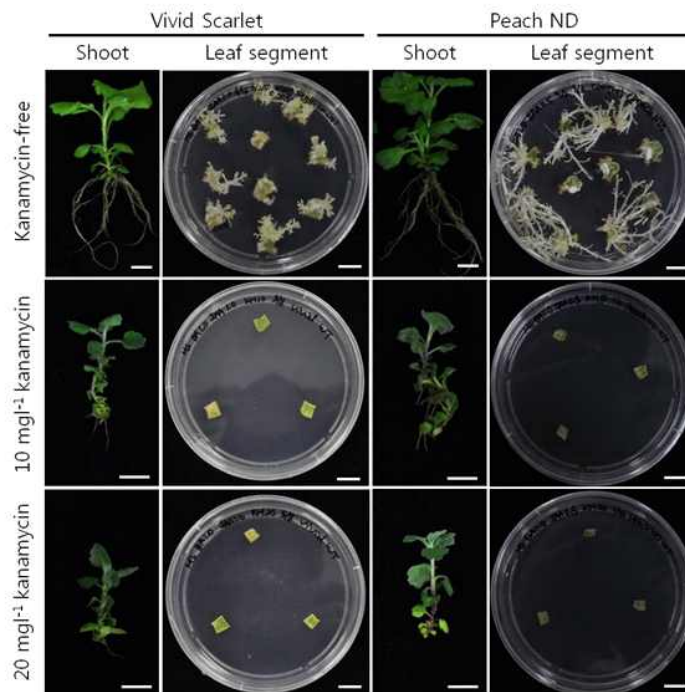


그림 2-34. 국화 품종 비비드스칼렛과 피치엔디의 kanamycin 첨가 농도에 따른 신허재분화 및 발근 양상. Bar = 1 cm.

다. 내열성 관련 유전자 형질전환과 형질전환체의 핵산분석

(1) 내열성 관련 유전자의 형질전환

(가) *AtGRX3* 형질전환 종합

AtGRX3 형질전환을 위해 각 품종을 대상으로 대량의 실험을 수행하여 얻어진 재분화 신초를 대상으로 PCR 분석을 실시한 결과, positive한 14개 형질전환체(비비드스칼렛 11개체, 피치앤디 3개체)를 획득함하였고, 오렌지앤디는 상기에서 언급한 바와 같이 재분화율 자체가 저조한 것에 기인하는 것으로 추정되며, 백마의 경우는 재분화 pattern이 형질전환의 어려움에 영향을 미친 것으로 판단되었다(표 2-17).

표 2-17. 국화 품종별 *AtGRX3* 유전자의 형질전환

품종	실험 batch 수	형질전환 처리 총 절편수	신초 재분화 총 절편수	발근배지 이식 총 신초수	발근개체 PCR 분석		
					검정 개체수	Positive 개체수	Negative 개체수
비비드스칼렛	12	4,402	635	541	484	11	473
피치앤디	8	2,051	141	58	46	3	43
오렌지앤디	3	658	1	1	1	0	1
백마	3	870	252	18	9	0	9

(나) *OsHSP26::nptII* 형질전환 내역

AtGRX3 형질전환에서 양호한 결과를 얻은 비비드스칼렛과 피치앤디 품종을 대상으로 역시 대량의 실험을 수행하였으나 형질전환환체를 획득하지 못하였다(표 2-18). 이는 병원성이 낮은 것으로 알려진 LBA4404 균주를 사용한 것에 원인이 있을 것으로 판단되기는 하지만 추후 이에 관한 추가 실험이 필요할 것으로 사료된다.

표 2-18. 국화 품종별 *OsHSP26::nptII* 유전자의 형질전환

품종	실험 batch 수	형질전환 처리 총 절편수	신초 재분화 총 절편수	발근배지 이식 총 신초수	발근개체 PCR 분석		
					검정 개체수	Positive 개체수	Negative 개체수
비비드스칼렛	7	2,443	318	299	187	0	187
피치앤디	5	1,654	58	57	35	0	35

(다) *AVPI::Bar* 형질전환 내역

AtGRX3 형질전환에서 양호한 결과를 얻은 비비드스칼렛과 피치앤디 품종을 대상으로 실험을 수행하여 비비드스칼렛 품종에서 2개의 형질전환체를 획득하였고, 피치앤디 품종에서는 형질전환체를 얻지 못하였다(표 2-19). 이는 선발마커 유전자로 *Bar*를 사용한 것에 원인(실제

wild-type 국화 식물체에 Basta™ 처리 시 상당한 내성을 보임.)이 있을 것으로 추정되지만 추가적인 실험을 통한 입증 필요하다.

표 2-19. 국화 품종별 *AVPL::Bar* 유전자의 형질전환

품종	실험 batch 수	형질전환 처리 총 절편수	신초 재분화 총 절편수	발근배지 이식 총 신초수	발근개체 PCR 분석		
					검정 개체수	Positive 개체수	Negative 개체수
비비드스칼렛	3	1,304	192	156	84	2	82
피치엔디	3	1,278	103	108	34	0	34

(라) *CHX13::Bar* 형질전환 내역

AtGRX3 형질전환에서 양호한 결과를 얻은 비비드스칼렛과 피치엔디 품종을 대상으로 *CHX13* 유전자 형질전환 시도를 하였으나 형질전환체를 얻지 못하였다(표 2-20). *AVPL::Bar* 카세트에서와 마찬가지로 선발마커 유전자가 국화를 대상으로는 부적절한 것에 원인이 있을 것으로 추정되지만 추가 입증 실험이 필요하다.

표 2-20. 국화 품종별 *CHX13::Bar* 유전자의 형질전환

품종	실험 batch 수	형질전환 처리 총 절편수	신초 재분화 총 절편수	발근배지 이식 총 신초수	발근개체 PCR 분석		
					검정 개체수	Positive 개체수	Negative 개체수
비비드스칼렛	3	1,186	168	143	88	0	88
피치엔디	3	1,122	148	133	51	0	51

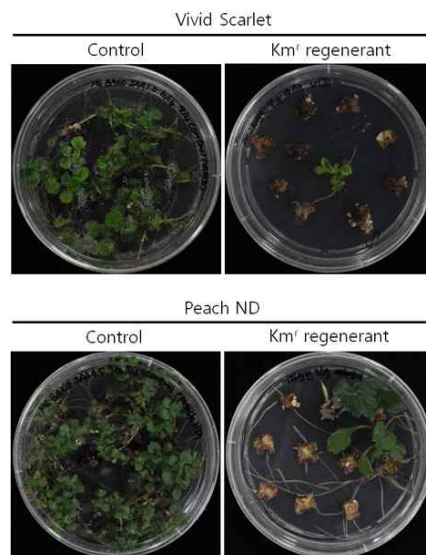


그림 2-35. Kanamycin 10 mg/L 첨가배지에서 국화 품종 비비드스칼렛과 피치엔디 형질전환 신초의 재분화

(2) 내열성 관련 유전자 형질전환체의 핵산 분석

(가) *AtGRX3::nptII* 형질전환체(국화 품종 비비드스칼렛)의 PCR 분석

*AtGRX3::nptII*를 대상으로한 PCR 분석에서 11개체에서 기대하는 증폭산물이 검출되었다(그림 2-36).

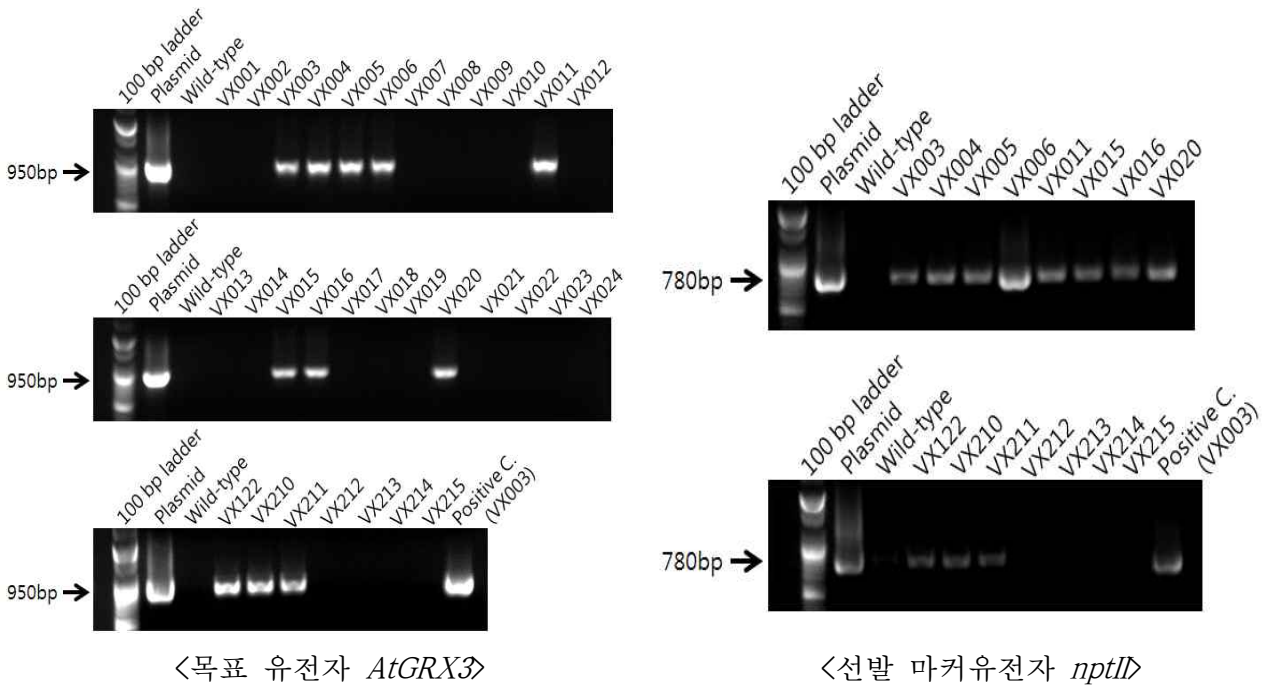


그림 2-36. *AtGRX3::nptII* 형질전환체(국화 품종 비비드스칼렛)의 PCR 분석

(나) *AtGRX3::nptII* 형질전환체(국화 품종 피치엔디)의 PCR 분석

*AtGRX3::nptII*를 대상으로한 PCR 분석에서 3개체에서 기대하는 증폭산물이 검출되었다(그림 2-37).

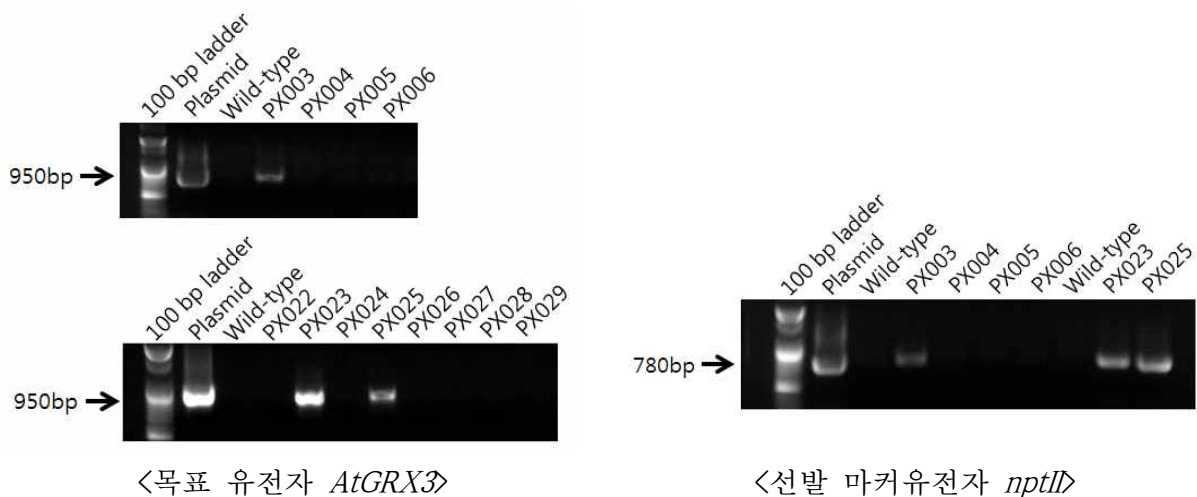
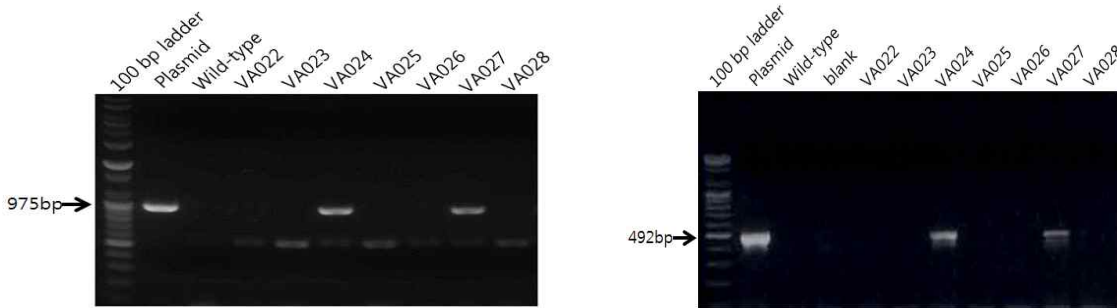


그림 2-37. *AtGRX3::nptII* 형질전환체(국화 품종 피치엔디)의 PCR 분석

(다) *AVPI::Bar* 형질전환체(국화 품종 비비드스칼렛)의 PCR 분석

*AVPI::Bar*를 대상으로한 PCR 분석에서 2개체에서 기대하는 증폭산물이 검출되었다(그림 2-38).



<목표 유전자 *AVPI*>

<선발 마커유전자 *Bar*>

그림 2-38. *AVPI::Bar* 형질전환체(국화 품종 비비드스칼렛)의 PCR 분석

(라) *AtGRX3::nptII* 형질전환체(국화 품종 비비드스칼렛, 피치엔디)의 Southern 혼성화 분석

AtGRX3 형질전환체의 Southern 분석을 통해 목표 유전자가 삽입된 것을 확인하였고, 아울러 목표 유전자의 copy 수는 1~5개에 달하였다(그림 2-39).

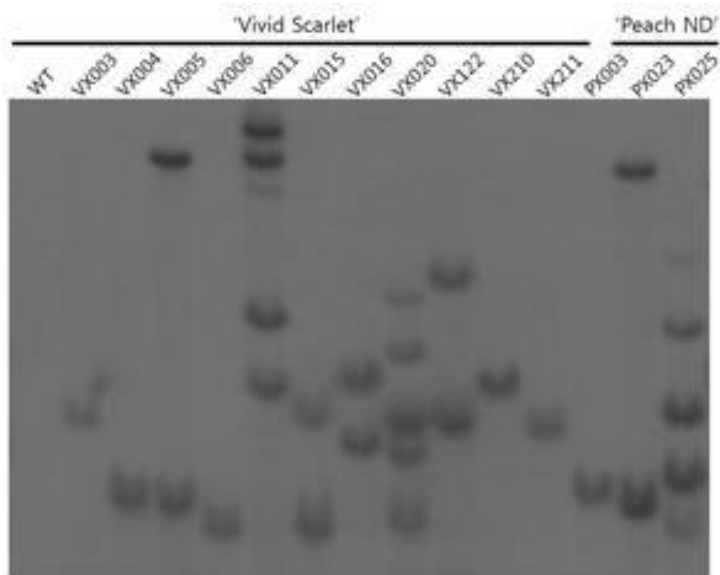


그림 2-39. 형질전환 식물체의 Southern 분석

(마) *AtGRX3::nptII* 형질전환체(비비드스칼렛, 피치엔디 품종)의 RT-PCR 분석

AtGRX3 형질전환체의 전사체 분석을 위해 semi-quantitative 역전사효소중합효소연쇄반응을 수행하였고 각 형질전환체는 발현량에 다소 차이가 있기는 하지만 모두 *AtGRX3* 유전자가 전사되는 것을 확인하였다(그림 2-40, 2-41).

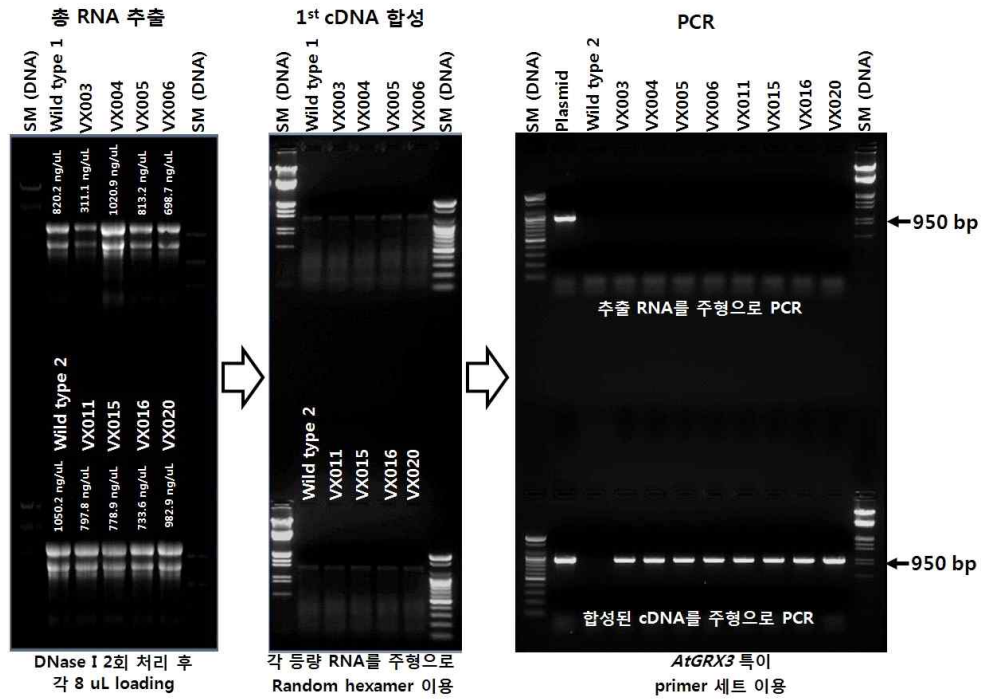


그림 2-40. 형질전환 식물체 국화 품종 비비드스칼렛의 역전사중합효소연쇄반응 분석

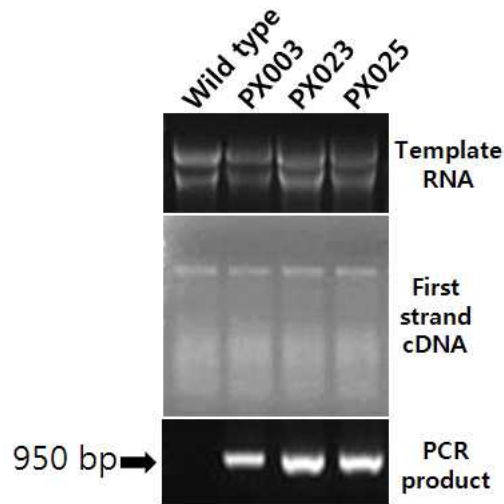


그림 2-41. 형질전환 식물체 국화 품종 피치앤디의 역전사중합효소연쇄반응 분석

(3) 내열성 관련 유전자 형질전환체의 배수성 분석

(가) 선발 식물체의 배수성 분석 종합

형질전환 실험을 통해 얻어진 재분화 개체 일부를 대상으로 배수성분석을 실시하였는데, 다양한 배수성 또는 이수성 개체가 존재하는 것으로 확인되었으나 형질전환체 모두는 wild-type과 동일한 배수성을 가지는 정상개체로 판단되었다(표 2-21).

표 2-21. 내열성 관련 유전자 형질전환체의 배수성 분석

Cultivar	Genotype	Ploidy	
		Normal	Abnormal
Vivid Scarlet	Non-transgenic	128	13
	<i>AtGRX3</i>	11	0
	<i>AVP1</i>	2	0
Peach ND	Non-transgenic	29	0
	<i>AtGRX3</i>	3	0

(나) 이상 배수성 식물체(국화 품종 비비드스칼렛)의 표현형

배수성 분석을 통해 염색체 이상이 있는 비형질전환 개체를 개화기까지 재배하며 표현형을 관찰하였는데, 이상 개체는 잎모양과 화기구조 및 화색이 정상개체와 비교하여 차이를 나타내었다(그림 2-42).

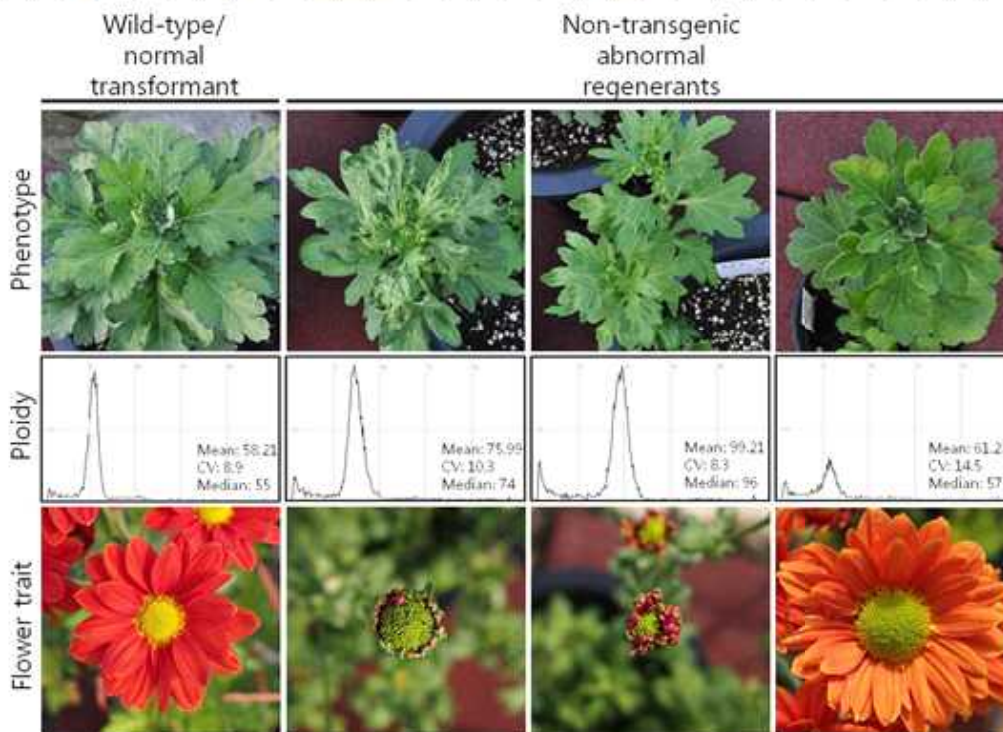


그림 2-42. 기내 재분화 식물체의 배수성 분석과 표현형

라. 내열성 관련 유전자 형질전환체의 생육특성 관찰

(1) 기내 및 배양실 환경조건에서 형질전환체의 생육 특성

(가) Wild-type과 *AtGRX3* 발현 비비드스칼렛 품종의 기내 및 실내환경에서의 생육비교

AtGRX3 발현 형질전환체는 기내 생육과 기외 pot 생육 실험 모두에서 wild-type에 비해 biomass가 큰 것이 관찰되었다(그림 2-43).



그림 2-43. *AtGRX3* 형질전환체와 wild-type의 기내와 배양실 환경조건에서의 생육차이

(나) Wild-type과 *AtGRX3* 발현 비비드스칼렛품종의 실내 수경재배에서의 생육비교

AtGRX3 발현 형질전환체는 기내 및 pot에서와 마찬가지로 수경재배 실험에서도 wild-type에 비해 biomass가 큰 것으로 관찰되었다(그림 2-44).

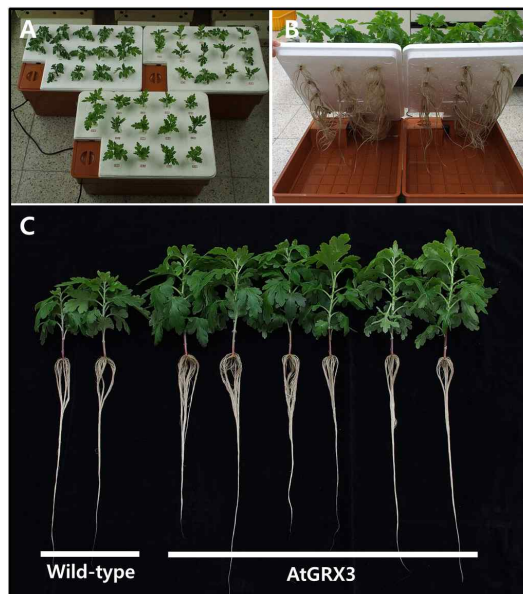


그림 2-44. *AtGRX3* 형질전환체와 wild-type의 수경재배 조건에서의 생육차이

(다) Wild-type과 *AtGRX3* 발현 비비드스칼렛과 피치앤디 품종의 단일처리(생장상)에 따른 화퇴 형성 비교

AtGRX3 발현 형질전환체를 대상으로 성장상에서 단일처리를 실시한 결과 wild-type과 비교하여 화아분화에 차이가 없었다(그림 2-45).

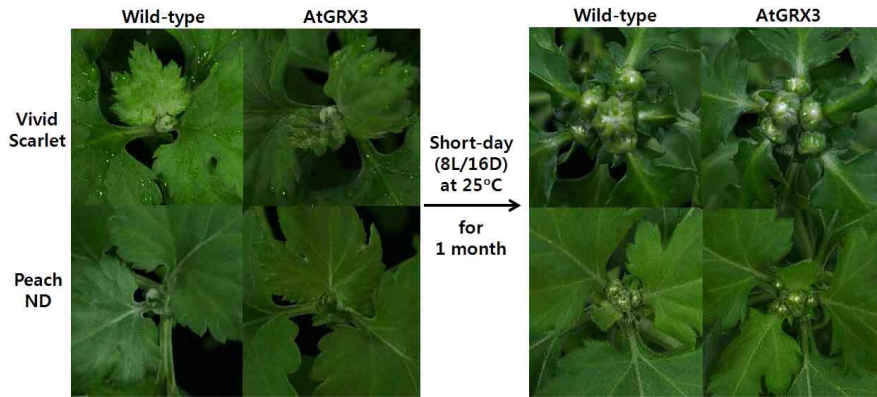


그림 2-45. 성장상에서의 인위적 단일처리에 따른 *AtGRX3* 형질전환체와 wild-type의 화아분화

(2) 실외환경에서 형질전환체의 생육특성

(가) Wild-type과 *AtGRX3* 발현 비비드스칼렛과 피치앤디 품종의 플라스틱 비가림 하우스에서의 생육비교

AtGRX3 발현 형질전환체를 대상으로 실외 비가림 시설에서 자연일장 조건으로 생육을 시켰을 때 개화기가 wild-type에 비해 약 5일 이상 빨라지는 특징적 표현형을 나타내었다(그림 2-46).

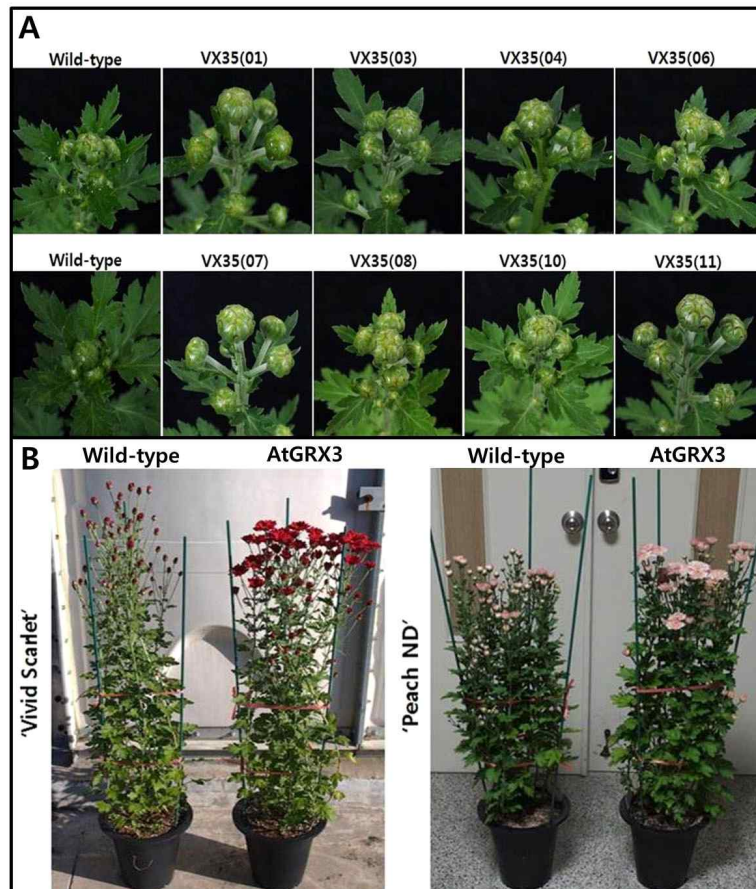


그림 2-46. 플라스틱 비가림 하우스 재배조건에서 *AtGRX3* 형질전환체와 wild-type의 화아분화 및 개화기 차이

(나) Wild-type과 *AtGRX3* 발현 ‘비비드스칼렛’ 품종의 플라스틱 하우스(농가환경)에서의 생육비교

AtGRX3 발현 형질전환체를 대상으로 농가 재배조건으로 개화를 유도시켰을 때 실외 비가림 시설에서와 마찬가지로 개화기가 약 5일 이상 빨라지는 것이 관찰되었다(그림 2-47). 생장상 실험과는 달리 자연일장 조건에서의 *AtGRX3* 형질전환체의 조기 개화 현상은 개화유도에 필요한 단일이 주어질 지라도 일사량이 영향을 미칠 수 있는 것으로 판단되었고, 이러한 조기개화 현상은 수확기를 당길 수 있어 유용한 특성으로 사료되었다.



그림 2-47. 농가 재배조건에서 *AtGRX3* 형질전환체와 wild-type의 개화기와 화색발현 차이. ※ 정식은 5월 9일, 단일처리 시작은 6월 2일 실시하였음. A: 7월 3일, B: 7월 24일, 화서: 7월 24일, C 꽃: 7월 31일

7. *AtGRX3* 형질전환 계통의 내열성 생리검정

가. 고온처리에 따른 wild-type 유식물체에서의 광합성효율 지표의 변화

AtGRX3 형질전환체의 내열성 검정을 위한 고온처리 조건을 설정하기 위해 항온과 변온실험을 수행하였다. 35°C 처리 후 45°C로 처리 하였을 때 광합성 지표들의 뚜렷한 저하가 관찰되었고(표 2-22), 한편 동일한 고온처리에서 비비드스칼렛이 피치앤디에 비해 내성을 보였다.

표 2-22. 적정 열처리 조건 탐색을 위한 wild type 대상 엽록소형광소멸분석

Heat treatment	Day after treatment	Cultivar	Parameter					
			Fv/Fm	Φ_{PSII}	ETR	qP	qN	NPQ
Before	-	Vivid S.	0.818	0.722	11.5	0.936	0.280	0.314

heat treatment		Peach ND	0.815	0.716	11.4	0.927	0.281	0.313	
			NS	NS	NS	NS	NS	NS	
Constant 35°C	1	Vivid S.	0.811	0.693	11.0	0.903	0.254	0.275	
		Peach ND	0.802	0.613	9.8	0.888	0.520	0.811	
				**	**	**	**	**	**
	2	Vivid S.	0.806	0.638	10.2	0.860	0.348	0.429	
		Peach ND	0.793	0.522	8.8	0.842	0.603	1.077	
				**	**	**	*	**	**
	3	Vivid S.	0.797	0.608	9.7	0.850	0.417	0.562	
		Peach ND	0.782	0.516	8.3	0.831	0.645	1.233	
				*	**	**	*	**	**
	4	Vivid S.	0.794	0.572	9.1	0.834	0.497	0.754	
		Peach ND	0.778	0.499	8.0	0.822	0.656	1.271	
				*	**	**	*	**	**
5	Vivid S.	0.792	0.560	8.9	0.824	0.559	0.844		
	Peach ND	0.770	0.493	7.9	0.808	0.664	1.307		
			**	**	**	*	**	**	
6	Vivid S.	0.791	0.553	8.8	0.821	0.576	0.971		
	Peach ND	0.762	0.470	7.5	0.799	0.680	1.381		
			**	**	**	**	**	**	
45°C after 35°C for 3days	1	Vivid S.	0.730	0.526	8.3	0.794	0.596	0.911	
		Peach ND	0.727	0.454	7.8	0.790	0.666	1.271	
				NS	*	*	NS	*	**
	2	Vivid S.	0.722	0.484	7.7	0.740	0.632	0.952	
		Peach ND	0.720	0.393	6.3	0.727	0.721	1.317	
				NS	**	**	NS	**	**
3	Vivid S.	0.687	0.379	6.3	0.680	0.709	1.420		
	Peach ND	0.676	0.350	6.1	0.675	0.736	1.539		
			NS	*	NS	NS	NS	NS	
Constant 45°C	1	Vivid S.	0.794	0.689	11.0	0.939	0.336	0.397	
		Peach ND	0.732	0.442	7.1	0.791	0.667	1.298	
				*	*	*	**	**	**
	2	Vivid S.	0.763	0.549	8.8	0.886	0.578	0.999	
Peach ND		0.643	0.369	5.9	0.725	0.672	1.385		
			*	*	*	*	*	**	

Asterisk and double asterisk indicate p values of <0.05 and <0.01 , respectively.

나. 고온 변온처리에 따른 형질전환 유식물체에서의 광합성효율 지표의 변화

(1) *AtGRX3* 형질전환 비비드스칼렛 품종

AtGRX3 유전자의 형질전환체 비비드스칼렛은 광합성효율에 있어 고온처리 약 3일 후부터 wild-type과 차이를 나타내었고 약 6일 후에는 그 차이가 뚜렷하게 관찰되었다(그림 2-48).

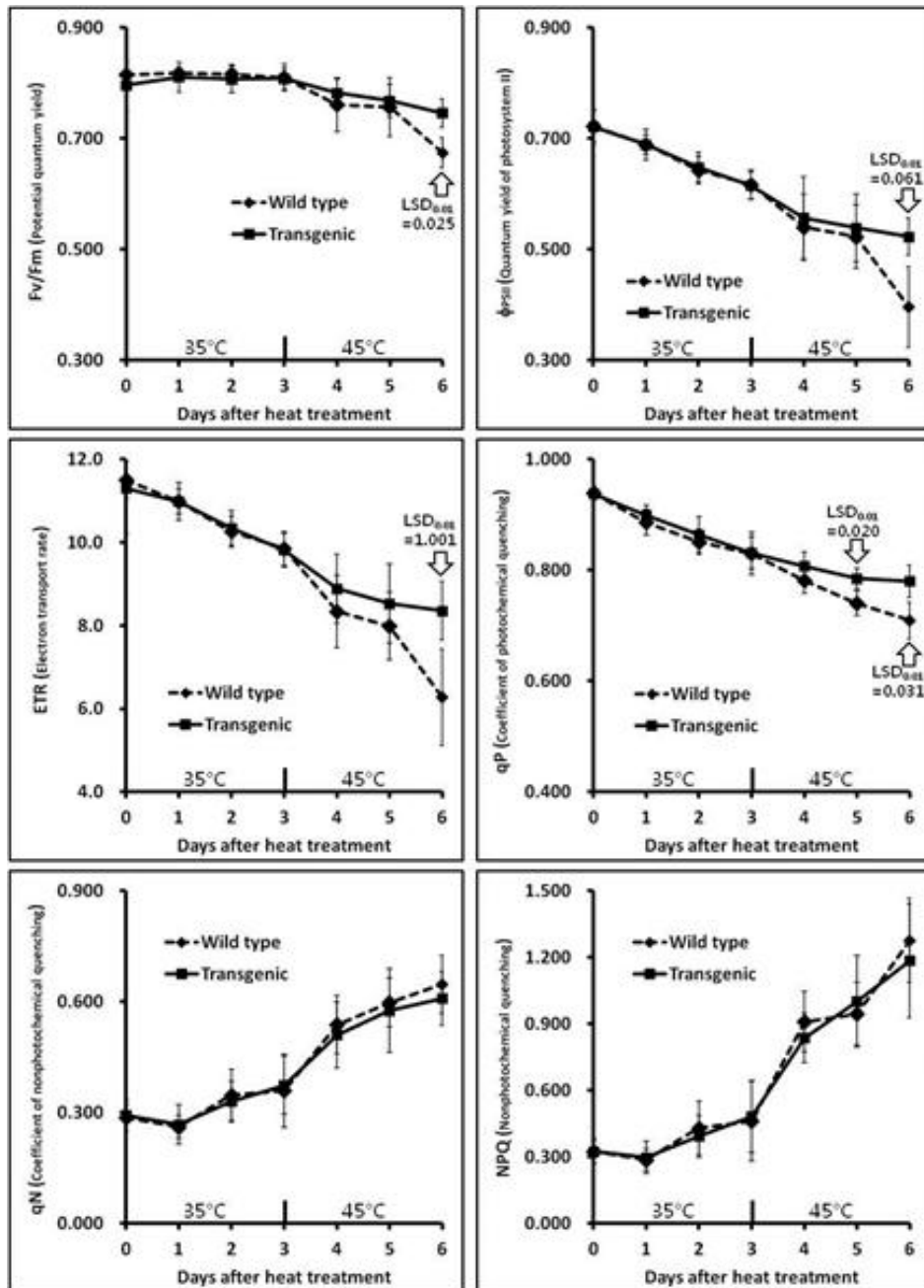


그림 2-48. 고온 변온처리에 따른 비비드스칼렛 품종 *AtGRX3* 형질전환체와 wild-type의 광합성 효율

(2) *AtGRX3* 형질전환 피치앤디 품종

AtGRX3 유전자가 형질전환된 피치앤디는 고온 조건하에서 wild-type과 비교하여 광합성에 차이를 나타내지는 않았다(그림 2-49).

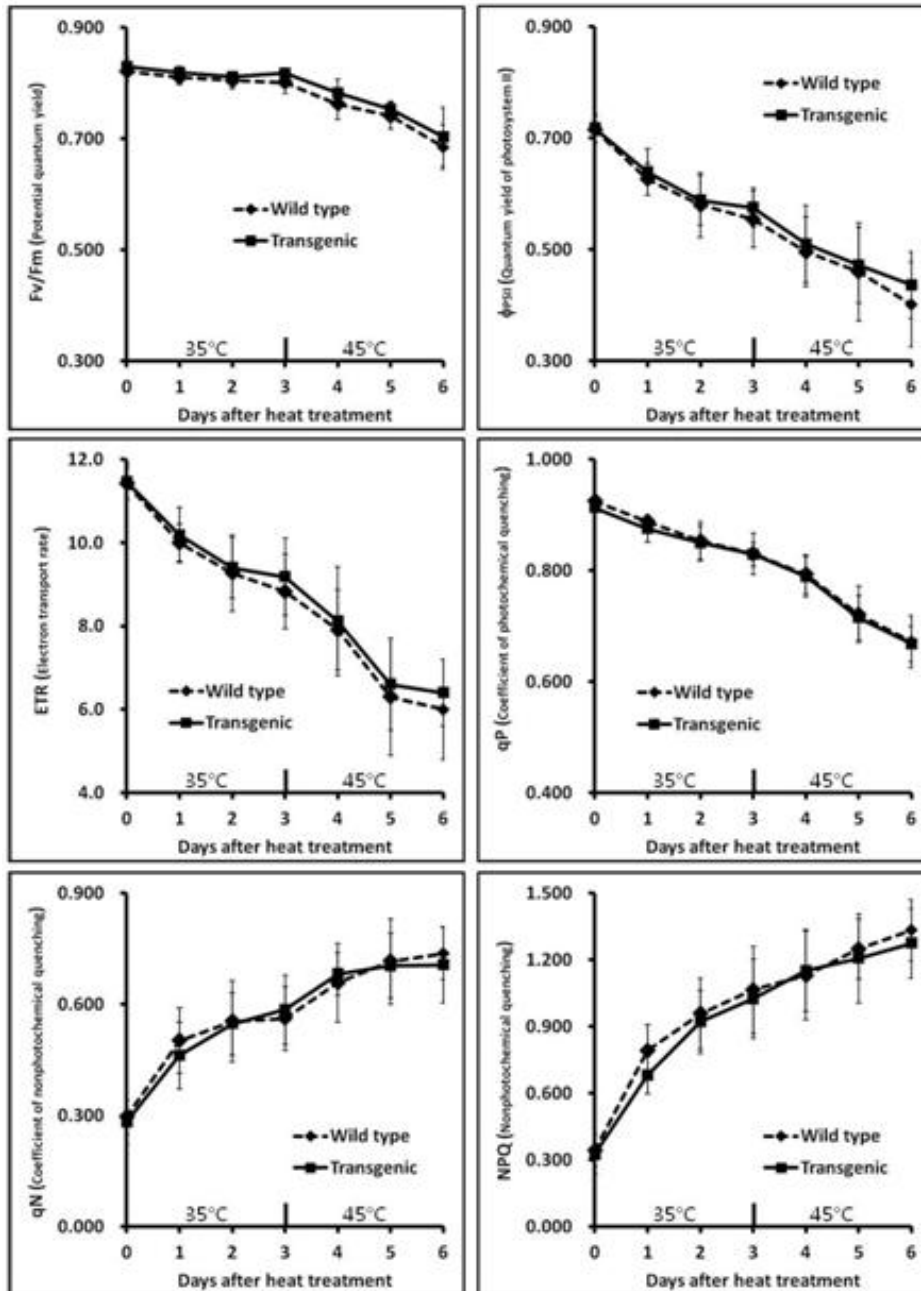


그림 2-49. 고온 변온처리에 따른 피치앤디 품종 *AtGRX3* 형질전환체와 wild-type의 광합성 효율

다. 고온스트레스에 따른 *AtGRX* 형질전환체의 전해질누출과 활성산소종 발생 양상

(1) 고온스트레스에 의한 *AtGRX3* 발현 비비드스칼렛과 피치앤디의 전해질 누출

AtGRX3 유전자가 형질전환된 비비드스칼렛과 피치앤디는 고온처리에 따른 전해질누출이 wild-type에 비해 상대적으로 적었으며, 또한 비비드스칼렛의 전해질누출이 피치앤디에 비해 월등이 낮았는데(그림 2-50), 이러한 결과는 엽록소형광소멸분석의 결과와도 일치하였다.

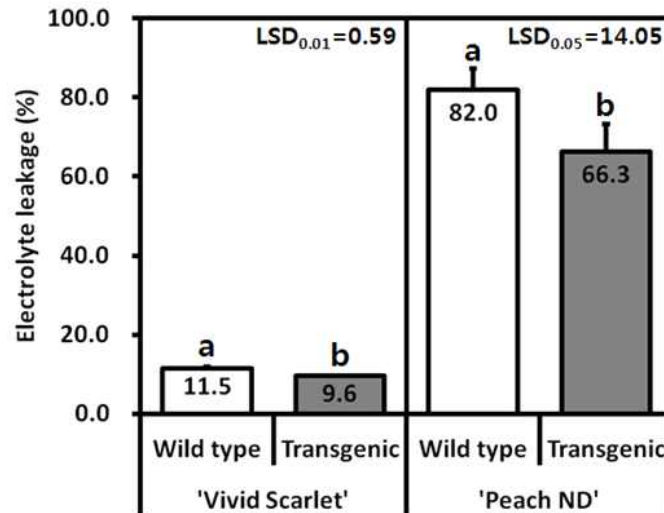


그림 2-50. 고온스트레스에 따른 *AtGRX3* 형질전환체와 wild-type의 전해질누출

(2) 고온스트레스에 의한 *AtGRX3* 발현 비비드스칼렛과 피치앤디의 H_2O_2 발생

고온처리에 의해 발생하는 활성산소종의 하나인 H_2O_2 는 *AtGRX3* 형질전환 식물체가 각 wild-type 식물체에 비해 적었으며(그림 2-51). 이는 고온내성을 반영하는 것으로 판단되었다.

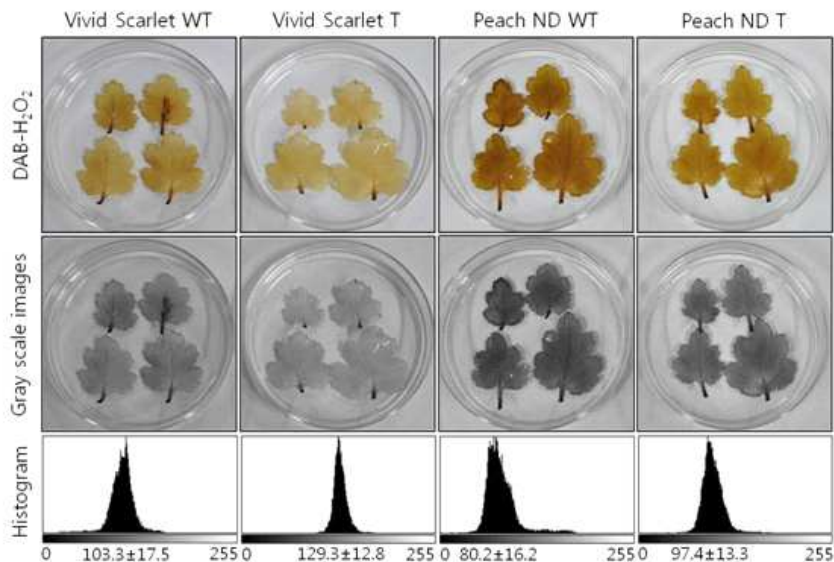


그림 2-51. 고온스트레스에 따른 *AtGRX3* 형질전환체와 wild-type의 H_2O_2 발생량

라. 고온스트레스에 따른 *AtGRX* 형질전환체의 유식물체와 화기 표현형

(1) 성장상 조성 고온스트레스에 의한 wild-type과 *AtGRX3*발현 유식물체 정단부 표징 변화
 wild-type은 고온처리에 의해 유묘의 정단부가 손상을 받았지만 *AtGRX3* 형질전환 식물체는 정상적 표현형을 나타내었다(그림 2-52).

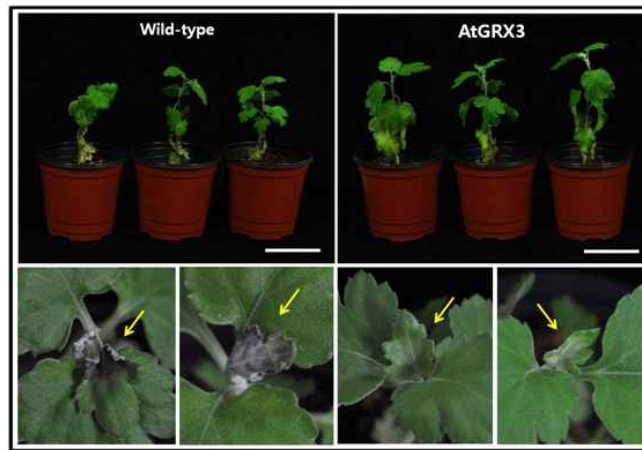


그림 2-52. 성장상에서 고온스트레스에 조우한 *AtGRX3* 형질전환체와 wild-type의 정단부 표현형

(2) 성장상과 하계 실외에 조성된 고온스트레스에 의한 wild-type과 *AtGRX3*발현 성숙식물체의 화기 표징 변화

성장상 및 하계 실외 시설재배에서 자연적으로 조성된 고온스트레스 조건에서 고온 조우 초기에는 wild-type이 *AtGRX3* 형질전환 식물체에 비해 화색감퇴가 다소 늦은 경향이기는 했지만 고온이 지속됨에 따라 wild-type은 *AtGRX3* 형질전환체에 비해 급속하게 화색의 감퇴와 화기 갈변현상이 나타났다(그림 2-53). 따라서 *AtGRX3* 형질전환체는 하계 지속되는 고온환경에서 wild-type에 비해 높은 수준을 내열성을 나타낸다고 판단할 수 있었다.

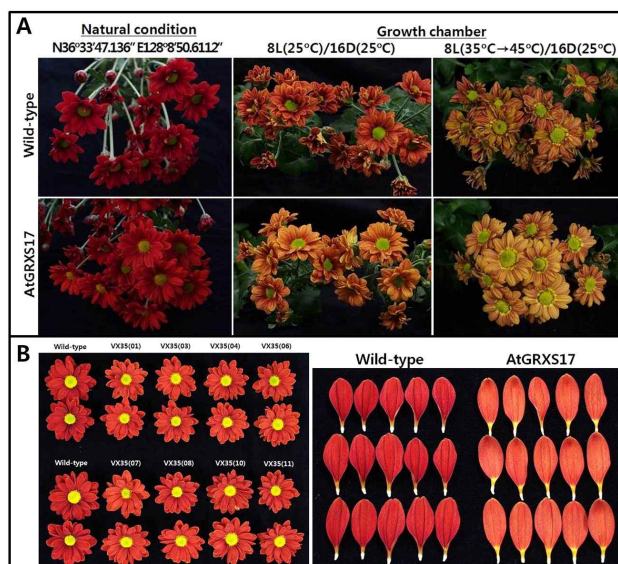


그림 2-53. 성장상과 하계 비가림 시설에서 고온스트레스에 조우한 *AtGRX3* 형질전환체와

8. 국화의 화색퇴화 원인구명 및 고온적응형 우수 육종소재 개발

가. 국화 고온기 생육 및 절화특성 변화

스프레이국화의 여름 고온기 생육 및 절화특성 변화를 조사하기 위해 2월부터 10월까지 온실에서 12회 재배하였는데, 온실 내의 평균온도 변화를 보면 5월 상순까지 20℃를 유지하다가 5월 중순부터 온도가 서서히 올라가 6월 중순부터는 25℃ 이상이 되었으며, 8월 중순에는 30.2℃까지 올라갔다가 점차 내려와 10월 상순부터 다시 20℃가 되었다(그림 2-54).

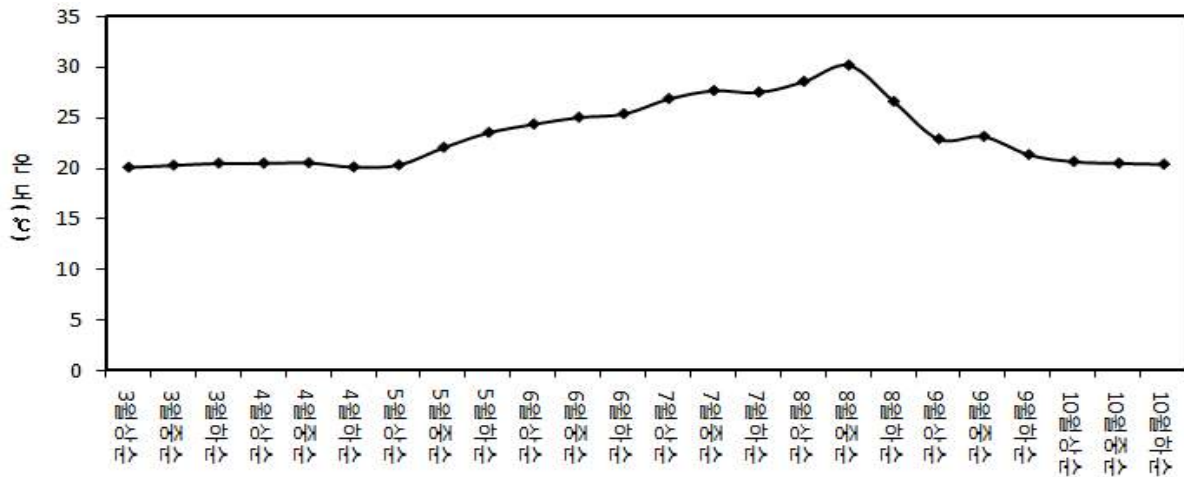


그림 2-54. 온실 내 평균온도 변화

정식차수 및 품종별 재배작형을 보면 표 2-23과 같은데, 2월 24일부터 7월 27일까지 짧게는 4일 길게는 21일 간격으로 정식하였고, 정식 후 생육정도에 따라 3~4주 후에 단일처리를 실시하여 개화시켰다.

표 2-23. 정식차수 및 품종별 재배작형(월. 일)

정식차수	레오파드			그린버드			킹피셔		
	정식	단일	개화	정식	단일	개화	정식	단일	개화
1차	2.24	3.20	5.07	2.24	3.20	5.07	2.24	3.20	5.07
2차	3.06	3.28	5.14	3.06	3.28	5.18	3.06	3.28	5.15
3차	3.20	4.10	5.28	3.22	4.12	6.02	3.20	4.10	5.28
4차	4.02	4.23	6.12	4.02	4.23	6.14	4.02	4.23	6.11
5차	4.19	5.15	7.06	4.19	5.15	7.06	4.19	5.15	7.04
6차	5.02	5.25	7.16	5.06	5.28	7.21	5.03	5.27	7.19
7차	5.15	6.05	7.28	5.14	6.05	7.30	5.14	6.05	7.30
8차	6.01	6.24	8.23	6.01	6.24	8.25	6.01	6.24	8.23
9차	6.12	7.04	9.08	6.20	7.12	9.15	6.20	7.12	9.14

10차	7.03	7.25	9.27	7.03	7.25	9.27	6.24	7.16	9.14
11차	7.09	8.06	10.07	7.10	8.04	10.04	7.09	8.06	10.02
12차	7.25	8.14	10.10	7.25	8.14	10.10	7.27	8.19	10.11

황색의 홑꽃 화형인 레오파드 품종의 생육 및 절화품질은 표 2-24와 같은데, 줄기직경은 정식차수에 따른 차이가 없었으나, 착화수는 4월과 5월에 정식한 4~7차 정식차수가 많은 경향이 있었다. 단일처리시부터 개화기까지의 소요일수는 6월에 개화하는 4차 정식차수부터 증가해 9월 상순에 개화한 9차 정식차수까지 증가하다가 이후 감소하였다. 황색 정도를 나타내는 색도값 b는 6월부터 9월까지 개화하는 4~10차 정식차수에서 연한 황색을 나타내었다.

표 2-24. 레오파드 품종의 정식차수별 생육 및 절화품질

정식 차수	줄기직경 (mm)	착화수 (개/본)	개화소요 일수(일) ^z	색 도		
				L	a	b
1차	6.6±0.4 ^y	10.7±0.9	48	79.8±0.5	-3.2±0.8	86.4±2.4
2차	7.9±0.6	11.6±1.2	47	79.7±0.6	-4.1±0.7	81.1±3.1
3차	7.3±0.5	13.4±2.3	48	79.6±0.7	-4.1±0.5	80.7±6.0
4차	8.0±0.7	16.0±3.5	50	78.3±1.0	-4.9±0.5	76.8±3.4
5차	7.6±0.8	15.3±4.8	52	79.4±0.8	-5.2±0.4	76.5±2.2
6차	6.5±0.4	16.0±2.8	52	76.1±1.9	-4.1±0.5	77.6±3.3
7차	7.2±0.3	15.1±2.4	53	77.0±1.2	-5.0±0.4	75.0±2.3
8차	7.3±0.4	13.3±1.9	60	77.2±2.0	-5.0±0.5	74.2±2.3
9차	7.5±0.4	12.1±1.7	66	79.1±0.6	-4.9±0.6	74.5±3.5
10차	7.0±0.4	13.2±1.1	64	79.4±0.5	-5.1±0.5	77.6±3.3
11차	6.2±0.6	12.5±1.7	62	79.4±0.4	-3.5±0.5	85.8±2.0
12차	6.3±0.4	15.0±2.3	57	79.2±0.6	-3.7±0.5	84.0±2.4

^z단일처리시부터 개화기까지의 일수

^yMean±Standard deviation(n=20)

그린버드 품종은 녹색의 품종 화형인데 줄기직경과 착화수는 정식차수에 따른 차이가 없었지만, 개화소요일수는 8~9월 개화 작형에서 많이 길었다. 녹색 정도를 나타내는 -a값이 7~8월 개화 작형에서 약간 컸지만 황색 정도를 나타내는 b값도 상대적으로 더 커서 약간 연녹색을 띄었다(표 2-25).

표 2-26은 진분홍색의 홑꽃 화형인 킹피셔 품종의 생육 및 절화품질로, 줄기직경과 착화수는 그린버드 품종과 같이 정식차수에 따른 차이가 없었지만, 개화소요일수는 7~9월 개화 작형에서 많이 길었다. 적색 정도를 나타내는 a값은 6월에 개화하는 4차 정식차수부터 8월에 개화하는 8차 정식차수까지 작아졌다가 9차 정식차수부터 다시 증가하였다.

표 2-25. 그린버드 품종의 정식차수별 생육 및 절화품질

정식 차수	줄기직경 (mm)	착화수 (개/본)	개화소요 일수(일) ^z	색 도		
				L	a	b
1차	7.1±0.5 ^y	14.6±1.9	48	74.0±1.7	-6.8±0.8	22.1±3.2
2차	8.1±0.4	16.2±2.2	51	66.9±4.7	-6.0±1.3	21.7±2.0
3차	7.7±0.3	16.7±2.6	51	69.2±2.1	-7.5±0.6	25.2±2.8
4차	8.2±0.6	14.9±3.3	52	66.5±1.3	-8.2±0.5	29.7±2.6
5차	7.0±0.5	15.2±3.0	52	69.6±1.7	-7.7±0.6	25.5±1.8
6차	6.3±0.5	15.4±3.7	54	65.6±3.2	-9.1±0.8	31.0±3.9
7차	6.7±0.5	15.2±1.8	55	66.7±2.4	-9.0±0.8	30.4±3.4
8차	6.3±0.5	14.2±1.4	62	64.1±4.0	-8.8±1.1	31.5±3.7
9차	5.5±0.2	14.0±1.9	65	67.8±2.5	-5.8±0.5	20.4±2.1
10차	5.7±0.3	16.0±2.3	64	72.4±3.1	-7.5±0.8	23.3±3.5
11차	5.8±0.3	17.5±1.8	61	69.8±3.2	-8.0±0.9	27.1±4.0
12차	5.4±0.4	15.1±2.4	57	71.7±3.3	-7.4±1.0	23.9±4.1

^z단일처리시부터 개화기까지의 일수

^yMean±Standard deviation(n=20)

표 2-26. 킹피셔 품종의 정식차수별 생육 및 절화품질

정식 차수	줄기직경 (mm)	착화수 (개/본)	개화소요 일수(일) ^z	색 도		
				L	a	b
1차	6.5±0.5 ^y	19.4±4.2	48	36.7±2.7	38.2±2.0	-14.1±1.3
2차	8.1±0.5	23.7±2.3	49	40.9±3.7	33.7±2.9	-15.5±0.8
3차	7.1±0.5	23.3±2.4	48	45.5±4.4	31.0±3.5	-13.9±0.6
4차	8.1±0.4	20.3±3.1	49	49.3±2.6	26.8±2.3	-13.9±0.5
5차	7.4±0.7	22.8±3.5	50	49.2±2.9	25.5±3.1	-12.4±0.9
6차	6.6±0.4	20.0±3.7	53	53.2±4.0	21.0±3.7	-11.5±1.5
7차	7.0±0.4	18.9±3.6	55	57.8±3.0	19.0±2.9	-9.5±1.7
8차	7.3±0.5	20.5±2.2	60	52.5±4.8	22.1±3.2	-11.4±1.6
9차	6.8±0.5	18.5±1.9	64	45.3±3.8	30.5±2.8	-12.1±1.1
10차	6.9±0.4	19.5±3.7	60	41.6±3.7	32.7±2.5	-14.4±0.9
11차	6.1±0.8	20.2±1.9	57	42.3±2.4	30.5±2.0	-14.3±0.8
12차	6.8±0.5	19.3±3.4	53	34.9±2.8	36.1±1.5	-13.9±0.9

^z단일처리시부터 개화기까지의 일수

^yMean±Standard deviation(n=20)

나. 고온적응형 국화 신품종 육성

(1) 유전자원 수집 및 특성조사

국화 유전자원 수집 내역은 표 2-27과 같이 김천, 거창, 구미 등 3지역에서 2013년 4월부터

6월까지 15품종을 수집하였고 모두 하추국 계통의 홑꽃이다. 하추국 계통은 7~9월에 자연개화하는 계통으로 고온적응성이 추국에 비해 우수한 특성을 가지고 있다.

표 2-27. 국화 유전자원 수집 내역

품종명	계 통	화 색	화 형	수집지역	수집시기
샤로트	하추국	적색/황색	홑꽃	김천	2013년 4월
핑크레이디	하추국	분홍색	홑꽃	김천	2013년 4월
뽕빠이	하추국	분홍색	홑꽃	김천	2013년 4월
모 라	하추국	분홍색	홑꽃	김천	2013년 4월
미야코	하추국	분홍색	홑꽃	거창	2013년 4월
시즈에	하추국	백색	홑꽃	거창	2013년 4월
나즈제미	하추국	백색	홑꽃	거창	2013년 4월
소요카제	하추국	백색	홑꽃	거창	2013년 4월
카나타	하추국	황색	홑꽃	거창	2013년 4월
츠클바네	하추국	황색	홑꽃	거창	2013년 4월
야스라기	하추국	황색	홑꽃	구미	2013년 5월
클레리나	하추국	백색	홑꽃	구미	2013년 5월
세이히토시오	하추국	황색	홑꽃	거창	2013년 6월
세이하치스	하추국	분홍색	홑꽃	거창	2013년 6월
세이스즈무시	하추국	백색	홑꽃	거창	2013년 6월

수집한 국화 유전자원을 비닐하우스와 노지에 각각 정식하여 특성조사를 실시하였는데, 시험포의 평균 온도와 광량은 표 2-28과 같다. 재배기간 동안 7월의 평균온도가 가장 높았으며, 하우스 재배가 노지재배보다 평균온도는 0.8~1.4℃ 높았다. 광량(PPF)은 하우스와 노지 모두 6월이 가장 많았으며, 하우스 재배가 노지재배보다 172~260.4umol/m²/s 적었다.

특성조사 결과는 표 2-29과 같은데, 하우스 재배가 노지재배보다 온도가 높아 개화가 지연되어 초장이 컸으며, 노지재배에서 대부분의 품종이 줄기직경과 꽃직경이 컸다. 착화수는 모라 품종과 야스라기 품종을 제외한 모든 품종이 노지재배가 많았다.

표 2-28. 시기별 평균 온도 및 광량

구 분	평균온도(℃)			PPF(umol/m ² /s)		
	하우스(A)	노지(B)	차이(A-B)	하우스(A)	노지(B)	차이(A-B)
6월	24.1	22.7	1.4	216.2	476.6	-260.4
7월	26.4	25.4	1.0	192.8	451.5	-258.7
8월	24.0	23.2	0.8	120.8	292.8	-172.0
9월	21.6	20.6	1.1	144.0	346.9	-202.9

표 2-29. 품종별 생육 및 절화품질

품종명	재배 장소	초 장 (cm)	줄기직경 (mm)	착화수 (개/본)	꽃직경 (cm)	개화기 (월. 일)
클레리나	하우스	81.7	6.6	10.0	5.3	8. 12
	노지	84.3	7.1	17.3	5.5	8. 08
미야코	하우스	79.5	5.7	19.8	4.1	8. 07
	노지	67.0	7.1	23.0	4.5	8. 11
시즈에	하우스	60.0	5.3	29.0	3.2	8. 14
	노지	55.5	6.8	38.3	3.6	8. 09
나츠제미	하우스	74.8	6.1	12.3	3.6	8. 18
	노지	68.3	7.6	19.8	4.0	8. 15
소요카제	하우스	77.4	5.4	24.0	4.1	8. 12
	노지	71.5	5.6	27.0	4.3	8. 07
카나타	하우스	48.4	5.6	31.3	3.9	8. 22
	노지	55.7	6.3	37.0	3.8	8. 19
샤로트	하우스	98.0	6.1	14.3	5.2	9. 09
	노지	86.5	7.8	16.0	5.5	9. 04
핑크레이디	하우스	100.3	5.1	24.8	3.3	9. 11
	노지	74.3	6.7	26.3	3.5	8. 29
즈쿠바네	하우스	101.0	5.7	45.3	3.4	9. 08
	노지	80.7	6.8	52.3	3.3	8. 30
뽀빠이	하우스	102.8	4.6	31.3	3.7	9. 11
	노지	87.0	5.2	36.7	4.0	9. 10
세이하치스	하우스	119.0	5.6	40.0	3.3	9. 13
	노지	102.5	6.5	47.5	3.2	9. 13
모 라	하우스	132.3	6.5	35.7	4.4	9. 18
	노지	94.0	6.5	24.0	4.0	9. 15
세이스즈무시	하우스	100.5	6.8	36.8	3.7	9. 15
	노지	93.3	6.5	46.0	3.6	9. 13
야스라기	하우스	116.3	6.2	40.3	2.8	9. 21
	노지	118.0	6.0	34.3	2.7	9. 19
세이하토시오	하우스	137.0	6.9	36.3	2.8	9. 30
	노지	125.0	7.4	39.0	3.1	9. 30

(2) 인공교배

2013년 10월에 65조합 1,795화를 교배하여 12월에 1,588화에서 45,125립을 채종하였다(표 2-30).

표 2-30. 인공교배 실적

교배조합수	교배화수	채종조합수	채종화수	채종립수
65	1,795	65	1,588	45,125

(3) 우수계통 1차 선발

7월부터 9월까지 생육 및 화색과 화형이 우수한 163계통을 1차 선발하였다(그림 2-54).



그림 2-54. 1차 선발한 주요 계통의 사진

(4) 선발계통 특성검정

1차 선발한 계통을 축성재배하여 선발한 21계통의 생육 및 절화특성은 표 2-31과 같다. 선발한 계통 모두 홑꽃이며 본당 착화수는 대체로 많은 편이며 꽃직경은 대부분 5cm 이하의 소국이었다. 개화소요일수는 50~60일 정도였다.

표 2-31. 축성재배로 선발한 계통의 생육 및 절화특성

계통명	화색	화형	초장 (cm)	줄기직경 (mm)	착화수 (개/본)	꽃목길이 (cm)	꽃직경 (cm)	개화소요일수(일) ^z
C13-001	분홍색	홑꽃	71.6	5.6	35.6	3.6	4.4	49.0
C13-004	황색	홑꽃	93.8	5.6	20.8	5.1	5.3	50.0
C13-005	백색	홑꽃	93.6	6.1	34.0	5.1	4.1	53.0
C13-014	백색	홑꽃	96.7	5.9	16.3	5.9	5.0	55.0
C13-018	분홍색	홑꽃	111.8	6.1	31.6	7.6	5.1	51.0

C13-021	백색	홀꽃	95.6	5.5	18.2	6.5	5.1	52.0
C13-033	백색	홀꽃	85.6	6.1	32.5	3.7	4.5	48.0
C13-035	적/황색	홀꽃	108.7	5.6	15.4	6.5	6.0	55.0
C13-046	분홍색	홀꽃	95.5	5.7	22.3	5.1	3.7	55.0
C13-047	황색	홀꽃	99.5	5.6	23.0	4.0	3.6	54.0
C13-052	분홍색	홀꽃	95.6	6.3	33.4	7.9	4.4	54.0
C13-068	백색	홀꽃	94.6	4.7	9.4	6.6	3.5	61.0
C13-070	연분홍	홀꽃	96.0	5.5	22.2	5.1	4.7	55.0
C13-075	백색	홀꽃	83.0	4.7	20.8	6.0	4.7	52.0
C13-083	황색	홀꽃	125.8	5.8	26.4	11.3	5.6	61.0
C13-107	황색	홀꽃	105.5	6.8	23.5	9.1	4.5	63.0
C13-111	백색	홀꽃	84.0	5.7	11.7	6.8	4.7	54.0
C13-122	황색	홀꽃	101.0	5.0	27.3	6.4	3.4	52.0
C13-146	황색	홀꽃	97.6	6.4	27.8	7.6	4.6	53.0
C13-147	황색	홀꽃	99.6	5.6	14.8	7.2	4.4	56.0
C13-159	적/황색	홀꽃	124.0	5.8	32.0	8.0	4.7	56.0

*정식일 : 2015년 3월 23일, 단일처리일 : 2015년 4월 20일

²단일처리시부터 개화기까지의 일수

정식 후 자연일장으로 재배하여 6월 하순부터 7월 중순까지 생육이 우수하고 화형이 안정된 14계통을 선발하였다(표 2-32).

표 2-32. 자연재배로 선발한 계통의 생육 및 절화특성

계통명	화색	화형	초장 (cm)	줄기직경 (mm)	착화수 (개/분)	꽃목길이 (cm)	꽃직경 (cm)	개화기 (월.일)
C13-001	분홍색	홀꽃	55.0	5.5	33.4	2.7	4.5	6.23
C13-002	연황색	홀꽃	78.8	5.1	27.0	10.6	4.4	6.25
C13-004	황색	홀꽃	94.2	5.3	16.0	10.0	4.3	6.27
C13-005	백색	홀꽃	75.0	5.5	36.4	8.9	3.8	6.28
C13-009	백색	홀꽃	104.4	5.6	24.6	7.9	3.8	6.28
C13-016	분홍색	홀꽃	95.8	5.4	33.4	11.7	5.0	6.28
C13-033	백색	홀꽃	89.8	6.1	30.0	8.5	4.8	7.05
C13-035	적/황색	홀꽃	102.4	6.1	15.4	11.9	6.5	7.14
C13-046	분홍색	홀꽃	104.6	6.9	24.6	12.3	3.9	7.15
C13-052	분홍색	홀꽃	95.4	6.1	33.8	11.0	4.6	7.05
C13-075	백색	홀꽃	88.4	5.6	26.6	14.4	5.0	7.04
C13-076	백색	홀꽃	74.2	5.7	19.2	6.0	3.8	7.04
C13-107	황색	홀꽃	97.6	7.9	21.6	9.8	4.8	7.14

C13-111	백색	홀꽃	85.4	5.4	13.6	14.3	4.9	7.04
---------	----	----	------	-----	------	------	-----	------

*정식일 : 2015년 4월 17일, 자연일장재배

표 2-33. 억제재배로 선발한 계통의 생육 및 절화특성

계통명	화색	화형	초장 (cm)	줄기직경 (mm)	착화수 (개/본)	꽃목길이 (cm)	꽃직경 (cm)	개화소요 일수(일) ²
C13-005	백색	홀꽃	102.0	4.8	21.0	7.3	3.5	42.0
C13-016	분홍색	홀꽃	101.4	5.3	17.2	8.7	4.7	50.0
C13-021	백색	홀꽃	68.0	4.6	19.8	10.9	5.1	41.0
C13-033	백색	홀꽃	72.4	5.3	28.8	6.7	3.6	43.0
C13-035	적/황색	홀꽃	85.2	5.9	17.8	6.1	5.6	50.0
C13-046	분홍색	홀꽃	113.0	5.6	27.0	6.3	3.7	47.0
C13-047	황색	홀꽃	92.6	5.6	32.4	5.2	3.8	48.0
C13-052	분홍색	홀꽃	97.2	6.1	30.4	6.9	4.6	47.0
C13-068	백색	홀꽃	84.4	5.8	19.2	5.0	3.9	46.0
C13-070	연분홍	홀꽃	96.8	5.5	31.2	5.3	4.6	47.0
C13-075	백색	홀꽃	98.8	4.4	19.2	10.7	4.5	42.0
C13-083	황색	홀꽃	126.6	7.0	25.2	13.9	6.4	46.0
C13-107	황색	홀꽃	106.2	6.2	20.8	7.4	5.0	48.0
C13-147	황색	홀꽃	103.6	5.9	16.8	9.5	5.4	50.0

*정식일 : 2015년 7월 16일, 전조종료일 : 2015년 8월 13일

²단일처리시부터 개화기까지의 일수

전조 처리를 통한 개화억제 등 일장반응 검정을 위해 실시한 억제재배로 14계통을 선발하였는데, 대부분 착화수가 많고 개화가 빠른 계통이었다(표 2-33).

(5) 신품종 육성

축성, 자연, 억제재배를 통하여 C03-033, C03-035, C03-046, C03-107등 4계통을 최종 선발하여 각각 화이트썸머, 써니썸머, 핑크썸머, 옐로우썸머로 명명하였다(그림 2-55).



그림 2-55. 최종 선발한 4품종. A-화이트썸머, B-써니썸머, C-핑크썸머, D-옐로우썸머

(가) 화이트썸머

① 육성경위

백색의 홑꽃 화형으로 하추국인 시즈에 품종에 나츠비요리 품종을 2013년 교배하여 2014년 3월에 파종, 5월에 614개체를 정식하여 7월 자연개화기에 화색과 화형이 우수한 205번 개체를 1차 선발하였다(그림 2-56). 선발한 계통은 C13-033으로 선발번호를 부여하고 2015년 하우스에서 축성재배, 자연재배, 억제재배 작형의 특성을 조사한 결과, 생육이 균일하고 절화품질이 우수하여 화이트썸머(White Summer)로 명명하여 국립종자원에 품종보호 출원하였다(출원번호 2015-648호).

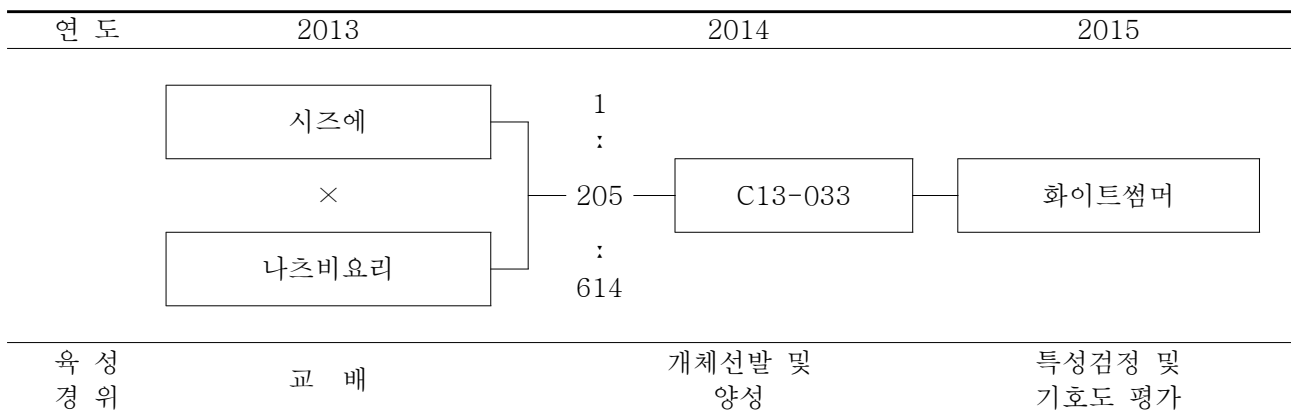


그림 2-56. 화이트썸머 품종의 육성과정

② 주요특성

화이트썸머 품종의 고유특성은 홑꽃으로 화색은 백색이며 턱잎은 작고 화서형태는 산방화서형이다(표 2-34).

표 2-34. 화이트썸머 품종의 고유특성

품 종 명	초 형	줄기색	턱잎크기	화서형태	화 형	화 색
화이트썸머	직립형	녹 색	작다	산방화서형	홀꽃	백색 (W155A) ²
시즈에 (대조)	직립형	녹 색	작다	산방화서형	홀꽃	백색 (W155A)

²Royal Horticultural Society(RHS) color chart.

화이트썸머 품종의 축성재배와 억제재배에서의 평균 개화소요일수는 45.5일이었으며, 본당 착화수는 30.7개, 꽃직경은 4.1cm이었고(표 2-35), 자연일장 재배시 7월 상순에 개화하는 하추국이다(표 2-36).

표 2-35. 화이트썸머 품종의 가변특성

품 종 명	개화소요 일수(일)	초 장 (cm)	줄기직경 (mm)	착화수 (개/본)	꽃목길이 (cm)	꽃직경 (cm)
화이트썸머	1차	48.0	85.6	6.1	32.5	3.7
	2차	43.0	72.4	5.3	28.8	6.7
	평균	45.5	79.0	5.7	30.7	5.2
시즈에 (대조)	1차	46.0	81.6	6.2	34.0	3.6
	2차	43.0	76.0	5.3	27.0	5.9
	평균	44.5	78.8	5.8	30.5	4.8

※ 1차 - 정식 : 2015년 3월 23일, 전조종료 : 2015년 4월 20일

※ 2차 - 정식 : 2015년 7월 16일, 전조종료 : 2015년 8월 13일

표 2-36. 화이트썸머 품종의 자연일장 재배특성

품 종 명	개화일 (월. 일)	초 장 (cm)	줄기직경 (mm)	착화수 (개/본)	꽃목길이 (cm)	꽃직경 (cm)
화이트썸머	7. 05	89.8	6.1	30.0	8.5	4.8
시즈에(대조)	7. 05	77.8	6.0	31.8	10.5	4.2

※ 정식 : 2015년 4월 17일, 자연개화

(나) 썬니썸머

① 육성경위

백색의 홀꽃 화형으로 하추국인 클레리나 품종에 적색과 황색의 복색 홀꽃인 샤토트 품종을 2013년 교배하여 2014년 3월에 파종, 5월에 333개체를 정식하여 7월 자연개화기에 화색과 화형이 우수한 37번 개체를 1차 선발하였다(그림 2-57). 선발한 계통은 C13-035으로 선발번호를 부여하고 2015년 하우스에서 축성재배, 자연재배, 억제재배 작형의 특성을 조사한 결과, 생육이 균일하고 절화품질이 우수하여 썬니썸머(Sunny Summer)로 명명하여 국립종자원에 품종보호 출원하였다(출원번호 2015-645호).

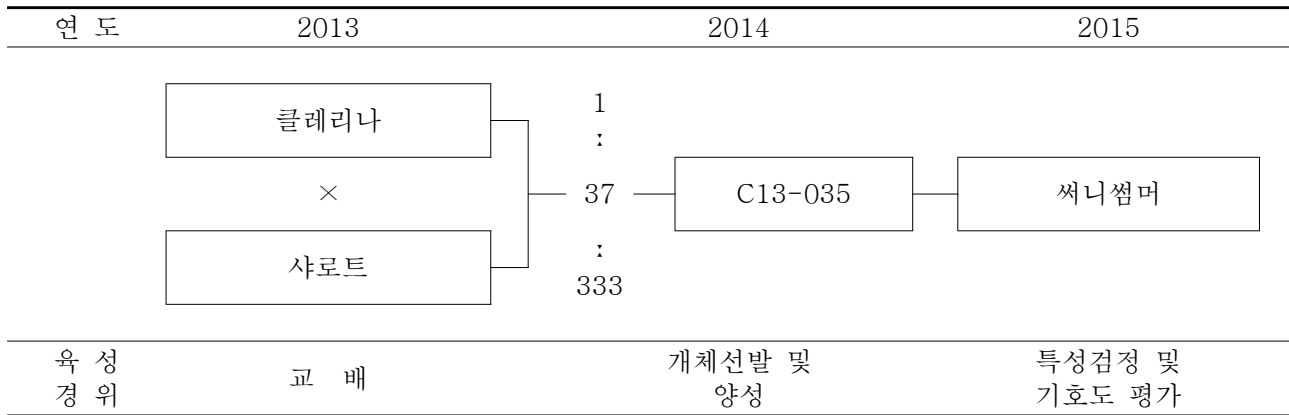


그림 2-57. 씨니썸머 품종의 육성과정

② 주요특성

씨니썸머 품종의 고유특성은 홑꽃으로 화색은 적색과 황색의 복색으로 산방화서형 화서형태이다(표 2-37).

표 2-37. 씨니썸머 품종의 고유특성

품 종 명	초 형	줄기색	턱잎크기	화서형태	화 형	화 색
씨니썸머	직립형	자주빛 녹 색	중간	산방화서형	홑꽃	적/황색 (R44A/Y12A) ²
샤로트 (대조)	직립형	자주빛 녹 색	중간	산방화서형	홑꽃	적황색 (R44C/Y12B)

²Royal Horticultural Society(RHS) color chart.

씨니썸머 품종의 축성재배와 억제재배에서의 평균 개화소요일수는 52.5일이었으며, 본당 착화수는 16.6개, 꽃직경은 5.8cm이었고(표 2-38), 자연일장 재배시 7월 중순에 개화하는 하추국이다(표 2-39).

표 2-38. 씨니썸머 품종의 가변특성

품 종 명	개화소요 일수(일)	초 장 (cm)	줄기직경 (mm)	착화수 (개/본)	꽃목길이 (cm)	꽃직경 (cm)
씨니썸머	1차	55.0	108.7	5.6	15.4	6.5
	2차	50.0	85.2	5.9	17.8	6.1
	평균	52.5	97.0	5.8	16.6	6.3
샤로트 (대조)	1차	53.0	113.6	5.8	16.2	8.3
	2차	47.0	98.6	6.1	19.4	8.5
	평균	50.0	106.1	6.0	17.8	8.4

※ 1차 - 정식 : 2015년 3월 23일, 전조종료 : 2015년 4월 20일

※ 2차 - 정식 : 2015년 7월 16일, 전조종료 : 2015년 8월 13일

표 2-39. 씨니썸머 품종의 자연일장 재배특성

품 종 명	개화일 (월. 일)	초 장 (cm)	줄기직경 (mm)	착화수 (개/본)	꽃목길이 (cm)	꽃직경 (cm)
씨니썸머	7. 14	102.4	6.1	15.4	11.9	6.5
샤로트(대조)	7. 09	118.2	6.3	17.6	14.8	6.8

※ 정식 : 2015년 4월 17일, 자연개화

(다) 핑크썸머

① 육성경위

분홍색과 백색의 복색 홑꽃 화형으로 하추국인 모라 품종에 분홍색 홑꽃인 카나타 품종을 2013년 교배하여 2014년 3월에 파종, 5월에 490개체를 정식하여 7월 자연개화기에 화색과 화형이 우수한 107번 개체를 1차 선발하였다(그림 2-58). 선발한 계통은 C13-046으로 선발번호를 부여하고 2015년 하우스에서 축성재배, 자연재배, 억제재배 작형의 특성을 조사한 결과, 생육이 균일하고 절화품질이 우수하여 핑크썸머(Pink Summer)로 명명하여 국립종자원에 품종보호 출원하였다(출원번호 2015-647호).

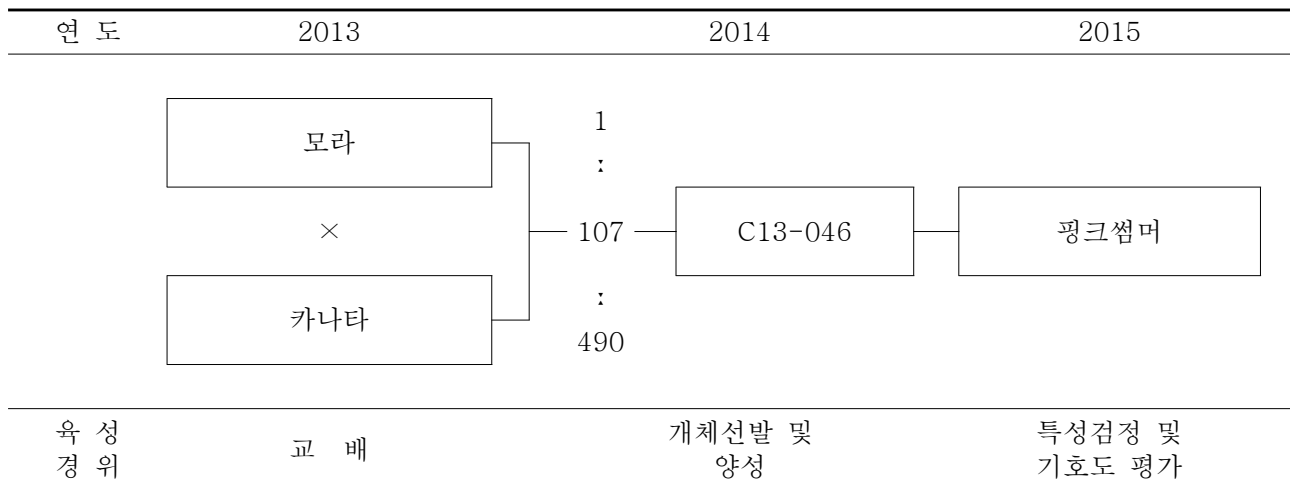


그림 2-58. 핑크썸머 품종의 육성과정

② 주요특성

핑크썸머 품종의 고유특성은 홑꽃으로 화색은 분홍색으로 턱잎은 크고 화서형태는 심한반구형이다(표 2-40).

표 2-40. 핑크썸머 품종의 고유특성

품 종 명	초 형	줄기색	턱잎크기	화서형태	화 형	화 색
핑크썸머	직립형	자주빛 녹 색	크다	심한반구형	홑꽃	분홍색 (P75A) ²
미야코 (대조)	직립형	자주빛 녹 색	매우작다	산방화서형	홑꽃	분홍색 (RP70B)

²Royal Horticultural Society(RHS) color chart.

핑크썸머 품종의 축성재배와 억제재배에서의 평균 개화소요일수는 51.0일이었으며, 본당 착화수는 24.7개, 꽃직경은 3.7cm이었고(표 2-41), 자연일장 재배시 7월 중순에 개화하는 하추국이다(표 2-42).

표 2-41. 핑크썸머 품종의 가변특성

품 종 명	개화소요일수(일)	초 장 (cm)	줄기직경 (mm)	착화수 (개/본)	꽃목길이 (cm)	꽃직경 (cm)
핑크썸머	1차	55.0	95.5	5.7	22.3	5.1
	2차	47.0	113.0	5.6	27.0	6.3
	평균	51.0	104.3	5.7	24.7	5.7
미야코 (대조)	1차	52.0	88.6	4.8	23.2	7.2
	2차	43.0	101.2	4.6	28.2	8.6
	평균	47.5	94.9	4.7	25.7	7.9

※ 1차 - 정식 : 2015년 3월 23일, 전조종료 : 2015년 4월 20일

※ 2차 - 정식 : 2015년 7월 16일, 전조종료 : 2015년 8월 13일

표 2-42. 핑크썸머 품종의 자연일장 재배특성

품 종 명	개화일 (월. 일)	초 장 (cm)	줄기직경 (mm)	착화수 (개/본)	꽃목길이 (cm)	꽃직경 (cm)
핑크썸머	7. 15	104.6	6.9	24.6	12.3	3.9
미야코(대조)	7. 15	109.6	6.3	26.0	11.6	4.0

※ 정식 : 2015년 4월 17일, 자연개화

(라) 옐로우썸머

① 육성경위

백색의 홑꽃 화형으로 하추국인 나츠제미의 방임수분으로 2013년 채종하여 2014년 3월에 파종, 5월에 886개체를 정식하여 7월 자연개화기에 화색과 화형이 우수한 357번 개체를 1차 선발하였다(그림 2-59). 선발한 계통은 C13-107으로 선발번호를 부여하고 2015년 하우스에서 축성재배, 자연재배, 억제재배 작형의 특성을 조사한 결과, 생육이 균일하고 절화품질이 우수하여 옐로우썸머 (Yellow Summer)로 명명하여 국립종자원에 품종보호 출원하였다(출원번호 2015-646호).

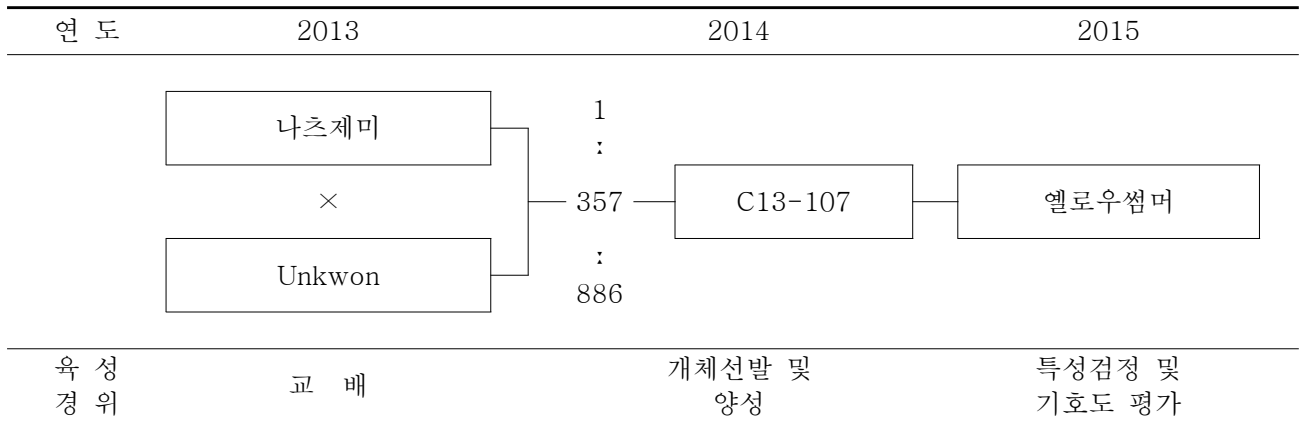


그림 2-59. 옐로우썸머 품종의 육성과정

② 주요특성

옐로우썸머 품종의 고유특성은 홑꽃으로 화색은 황색으로 턱잎크기는 중간이고 화서형태는 심한반구형이다(표 2-43).

표 2-43. 옐로우썸머 품종의 고유특성

품 종 명	초 형	줄기색	턱잎크기	화서형태	화 형	화 색
옐로우썸머	직립형	자주빛 녹 색	중간	심한반구형	홑꽃	황색 (Y12A) ²
츠쿠바네 (대조)	직립형	자주빛 녹 색	작다	산방화서형	홑꽃	황색 (Y014B)

²Royal Horticultural Society(RHS) color chart.

옐로우썸머 품종의 축성재배와 억제재배에서의 평균 개화소요일수는 55.5일이었으며, 본당 착화수는 22.2개, 꽃직경은 4.8cm이었고(표 2-44), 자연일장 재배시 7월 중순에 개화하는 하추국이다(표 2-45).

표 2-44. 옐로우썸머 품종의 가변특성

품 종 명		개화소요 일수(일)	초 장 (cm)	줄기직경 (mm)	착화수 (개/본)	꽃목길이 (cm)	꽃직경 (cm)
옐로우썸머	1차	63.0	105.5	6.8	23.5	9.1	4.5
	2차	48.0	106.2	6.2	20.8	7.4	5.0
	평균	55.5	105.9	6.5	22.2	8.3	4.8
츠쿠바네 (대조)	1차	65.0	108.6	6.4	26.4	10.5	3.9
	2차	48.0	105.0	5.9	24.2	8.9	4.7
	평균	56.5	106.8	6.2	25.3	9.7	4.3

※ 1차 - 정식 : 2015년 3월 23일, 전조종료 : 2015년 4월 20일

※ 2차 - 정식 : 2015년 7월 16일, 전조종료 : 2015년 8월 13일

표 2-45. 옐로우썸머 품종의 자연일장 재배특성

품 종 명	개화일 (월. 일)	초 장 (cm)	줄기직경 (mm)	착화수 (개/본)	꽃목길이 (cm)	꽃직경 (cm)
옐로우썸머	7. 14	97.6	7.9	21.6	9.8	4.8
츠쿠바네(대조)	7. 18	113.7	7.0	26.0	10.0	4.5

※ 정식 : 2015년 4월 17일, 자연개화

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연도별 연구목표에 입각한 연구개발목표의 달성도

제1세부 : 고온하에서 화색이 안정적으로 발현되는 국화품종 개발

당초목표(연도)	개발 내용	달성도(%)
○ 화색발현 안정화와 최적화를 위한 특허회피용 공동발현 벡터 제조합 (2013년)	화색발현 안정화와 최적화를 위한 특허회피용 공동발현 벡터 제조합	100
○ 국화 형질전환 효율향상 기술 체계화와 MYB 유전자 도입 형질전환체 선발 (2014년)	국화 형질전환 효율향상을 위한 체계화 확립 및 형질전환체 선발함	100
○ MYB 조절 유전자가 도입된 형질전환체의 발현양상 분석과 도입 유전자 집적화 (2015년)	유전자가 도입된 형질전환체의 발현양상 분석	100

제2세부 : 내열성 발현 유전자가 도입된 국화 형질전환체 육성

당초목표	개발 내용	달성도(%)
○ 내열성 유전자 발현 형질전환용 벡터 제조(2013년)	내열성 유전자 발현 형질전환용 벡터를 제조함	100
○ 목표 유전자 정상 발현 형질전환체 선발 및 후대 성숙식물체의 고온하 생리특성 구명(2014~2015년)	목표 유전자 정상 발현 형질전환체를 선발하여 후대의 성숙식물체에서의 고온하 생리 특성을 구명함	100

제1협동 : 국화의 화색퇴화 원인규명 및 고온적응형 우수 육종소재 개발

당초목표	개발 내용	달성도(%)
○ 스프레이 국화의 품종별, 화아발달 단계별 고온장해 특성 평가 (2013~2014년)	국화의 품종별 고온장해 특성 평가 완료	100
○ 목적특성 부합형 계통 선발, 교배를 통한 유전인자 추적 및 육종소재 개발 (2014~2015년)	고온적응형 우수 육종소재 개발 (4품종 출원 등록)	100

제2절 관련분야의 기술발전예의 기여도

최근 불량 재배환경(특이 이상 고온 등)하에서도 안정적으로 생육하는 작물 육종에 대한 다양한 분야에서 연구가 진행되고 있는데, 이에 본 연구는 국화의 고온하에서도 화색이 퇴화하지 않고 안정적으로 발현되는 국화 형질전환체를 개발하여 다른 국화과 화훼류(거베라 등)의 다양한 품종에 적용가능 할 뿐만 아니라 기존의 사용되고 있던 벡터가 아닌 자체 제작한 벡터를 사용하여 새로운 품종 육성에 보다 효과적으로 이용되며 다양한 품종육성에 기여할 수 있다.

제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제1절 연구결과의 논문 게재성과

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	SCI여부/IF (SCI/비SCI)
1	Secondary somatic embryogenesis in <i>Chrysanthemum morifolium</i> (Ramat.) cv. Borami	Journal of Horticultural Science and Biotechnology	Aung Htay Naing	88(6) 762-767	SCI/0.509
2	Expression of <i>RsMYB</i> in chrysanthemum regulates key anthocyanin biosynthetic genes	Electronic Journal of Biotechnology	Aung Htay Naing	18(5)3 59-364	SCI/0.681
3	Optimization of factors affecting efficient shoot regeneration in chrysanthemum cv. Shinma	Brazilian Journal of Botany	Aung Htay Naing	-	SCI/0.648
4	Primary and secondary somatic embryogenesis in <i>Chrysanthemum morifolium</i> cv. 'Baeksun' and assessment of ploidy stability of somatic embryogenesis process by flow cytometry	Acta Physiologiae Plantarum	Aung Htay Naing	35 2965-2974	SCIE/1.524
5	The effect of anifreeze protein on the cryopreservation of chrysanthemum	Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)	Su Min Jeon	123 665-671	SCI/2.125
6	Elimination of chrysanthemum stunt viroid and chrysanthemum chlorotic mottle viroid from infected chrysanthemum by cryopreservation	Protoplasma	Su Min Jeon	-	SCI/2.651
7	Application of encapsulation-vitrification in combination with airdehydration enhances cryotolerance of <i>Chrysanthemum morifolium</i> shoots tips	Scientia Horticulturae	Su Min Jeon	194 91-99	SCI/1.365
8	An efficient protocol for <i>Agrobacterium</i> -mediated genetic transformation of recalcitrant chrysanthemum cultivar Shinma	Acta Physiologiae Plantarum	Aung Htay Naing	38(2)	SCIE/1.584
9	MYB transcription factor isolated from <i>Raphanus sativus</i> enhances anthocyanin accumulation in chrysanthemum cultivars	3 Biotech	Eun Sun Kee	In press	SCIE/-

제2절 연구결과의 학술발표 성과

번호	발표제목	회의명칭	발표자	발표일시	장소
1	Agro-infiltration 방법을 이용한 국화에서 mPAP1 유전자 일시발현	2013 한국원예학회 임시총회 및 제 99차 추계학술발표회	기은선, 아웅타이나잉, 김창길	2013.11.01	원광대학교 승산기념관 및 문화체육관
2	An efficient method for adventitious shoot regeneration from petal-segment explants of <i>Chrysanthemum morifolium</i>	2013 한국원예학회 임시총회 및 제 99차 추계학술발표회	마혜쉬 체트리, 전수민, 김창길	2013.10.31	원광대학교 승산기념관 및 문화체육관
3	Influence of clavamox in comparison to cefotaxime on somatic embryogenesis of chrysanthemum and analysis of ploidy stability of the regenerated plants	2013 한국원예학회 임시총회 및 제 99차 추계학술발표회	아웅타이나잉, 기은선, 임선형, 한중술, 임기병, 김창길	2013.11.01	원광대학교 승산기념관 및 문화체육관
4	Establishment of cryopreservation method for CSVd elimination from <i>Chrysanthemum morifolium</i>	29th international Horticultural Congress	전수민, 아웅타이나잉, 김창길	2014.08.19	Brisbane, Australia
5	Agrobacterium mediated transformation of standard chrysanthemum using anthocyanin regulatory gene from leaves	2014 한국식물생명공학회 추계학술발표회, 정기총회 및 9th 한일국제공동심포지움	정녹아이, 김창길	2014.10.31	경북대학교 글로벌 플라자
6	Agrobacterium-mediated transformation에 의한 국화로의 꽃잎 특이 InMYB 프로모터 +RsMYB 유전자 도입 및 발현	2014 한국식물생명공학회 추계학술발표회, 정기총회 및 9th 한일국제공동심포지움	기은선, 아웅타이나잉, 김창길	2014.10.31	경북대학교 글로벌 플라자
7	Optimization of factors affecting efficient shoot regeneration in chrysanthemum	2014 한국식물생명공학회 추계학술발표회, 정기총회 및 9th 한일국제공동심포지움	기은선, 아웅타이나잉, 한중술, 임선형, 임기병, 김창길	2014.10.30	경북대학교 글로벌 플라자
8	Agrobacterium-mediated transformation of chrysanthemum using <i>RsMYB1</i> anthocyanin regulatory gene	2014 한국원예학회 임시총회 및 제101차 추계학술발표회	아웅타이나잉, 정녹아이, 기은선, 임선형, 김창길	2014.10.23	창원컨벤션센터(CECO)
9	Transfer and expression of <i>RsMYB</i> gene in <i>Chrysanthemum</i> by Agrobacterium-mediated transformation	2015 (사) 한국식물생명공학회 정기 학술발표회 및 총회	기은선, 김창길	2015.06.19	한국문화연구원
10	Attempts to eliminate chrysanthemum stunt viroid (CSVd) and chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd) from infected chrysanthemums by cryopreservation	2015 (사) 한국식물생명공학회 정기 학술발표회 및 총회	전수민, 아웅타이나잉, 김창길	2015.06.19	한국문화연구원

제3절 특허출원

번호	출원등록명	출원등록번호	산업재산권종류	출원등록일
1	화이트썸머	102012-000648	품종	2015.11.16
2	씨니썸머	102015-000645	품종	2015.11.16
3	핑크썸머	102015-000647	품종	2015.11.16
4	엘로우썸머	102015-000646	품종	2015.11.16

제4절 연구인력 양성

번호	인력양성명	인력양성 대상수	인력양성년도
1	석, 박사인력양성	석사 1명, 박사 1명	2015년
2	석, 박사인력양성	석사 1명, 박사 1명	2014년

제5절 수상실적

번호	일자	홍보명칭	주요내용
1	2014. 10. 30	(사)한국식물생명공학회 우수발표논문상 수상	우수발표논문상
2	2015. 06. 19	(사)한국식물생명공학회 우수발표논문상 수상	우수발표논문상

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보
(해당없음)

제7장 연구시설·장비 현황
(해당사항 없음)

제8장 연구실 안전관리 이행실적

* LMO관리의 안전을 위해 폐기물 위탁업체와 계약하여 폐기물을 안전하게 관리하였음.

폐기물 위·수탁 운반·처리 계약서

1. 계약 명 : 폐기물 위·수탁 계약 ("을"일관청구)
2. 배 출 장 소 : "갑"의 사업장
3. 처 리 장 소 : 동양에코 주식회사
4. 위·수탁 계약기간 : 2014년 10월 01일부터 2015년 12월 31일까지
5. 계약 일반 조건 : 붙임 참조.
6. 대 급 지 급 조 건 : "을"은 처리비와 수집·운반비를 매월(말)일 마감하여 세금계산서와 거래명세표 등을 "갑"에게 제출하고, "갑"은 "을"에게 처리비, 수집·운반비(또는 수집·운반비 포함)를 ('갑'의 지급기준일)이내에 현금 또는 계좌입금 등의 방법으로 지급하고, "을"은 "병"에게 수집·운반비를 정산 지급한다.
7. 전자세금계산서 : E-mail:
8. 위·수탁 폐기물 및 처리금액 (VAT 별도)

폐기물 종류	구분	성상	물 량 (예상계출량)	처 리 비		운 반 비		처리방법
				단위	금 액	단위	금 액	
식물성잔재물	일반	고상	10톤	톤	230,000	대	400,000	고온소각
			이	하	여	백		

위 계약은 상호 대등한 입장에서 신의성실의 원칙에 따라 계약을 체결하고 본 계약상의 내용을 이행·증명하기 위하여 "배출자와 중간·최종처리업자" 또는 "배출자와 중간·최종처리업자 및 수집·운반업자"가 기명날인한 후 각 1부씩 보관하기로 한다.

2015년 05월 일

상 호	경북대학교 농업과학기술연구소	소재지	대구광역시 북구 대학로 80(산격동)
-----	--------------------	-----	----------------------

제9장 참고문헌

* 보고서 작성 시 인용된 모든 참고문헌을 열거

- Ahmad P, Jaleel CA, Salem MA, Nabi G, Sharma S. 2010. Roles of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit Rev Biotechnol* 30:161-175
- Ahmad P, Sarwat M, Sharma S. 2008. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *J Plant Biol* 51:167-173
- Allan AC, Hellens RP, Laing WA. 2008. MYB transcription factors that colour our fruit. *Trends Plant Sci* 13:99-102.
- Bandyopadhyay S, Gama F, Molina-Navarro MM, Gualberto JM, Claxton R, Naik SG, Huynh BH, Herrero E, Jacquot JP, Johnson MK, Rouhier N (2008) Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters. *EMBO J* 27:1122-1133
- Bashandy T, Guillemot J, Vernoux T, Caparros-Ruiz D, Ljung K, Meyer Y, Reichheld JP (2010) Interplay between the NADP-linked thioredoxin and glutathione systems in *Arabidopsis* auxin signaling. *Plant Cell* 22:376-391
- Battisti DS, Naylor RL. 2009. Historical warnings of future food insecurity with unprecedented seasonal heat. *Science* 323:240-244
- Becerra DC, Forero AP, Góngora GA. 2004. Age and Physiological Condition of Donor Plants Affect *in vitro* Morphogenesis in Leaf Explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *Plant Cell Tiss Org* 79:87-90.
- Busov V, Meilan R, Pearce D, Rood S, Ma C, Tschaplinski T, Strauss S. 2006. Transgenic modification of *gai* or *rgl1* causes dwarfing and alters gibberellins, root growth, and metabolite profiles in *Populus*. *Planta* 224:288-299.
- Chandler S, Tanaka Y. 2007. Genetic modification in floriculture. *Crit Rev Plant Sci* 26:169-197.
- Cheng NH, Liu JZ, Liu X, Wu Q, Thompson SM, Lin J, Chang J, Whitham SA, Park S, Cohen JD, Hirschi KD (2011) *Arabidopsis* monothiol glutaredoxin, AtGRXS17, is critical for temperature-dependent postembryonic growth and development via modulating auxin response. *J Biol Chem* 286:20398-20406
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK. 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci* 12:444-451
- Chung MY, Kim CY, Jeon SM, Lee DJ, Naing AH, Chung JD, Kim Ck. 2014. In vitro induction of tetraploids in an interspecific hybrid of *Calanthe* (*Calanthe discolor* × *Calanthe sieboldii*) through colchicine and oryzalin treatments. *Plant Biotechnol Rep* 8:251-257.
- Cominelli E, Gusmaroli G, Allegra D, Galbiati M, Wade HK, Jenkins GI, et al. 2008. Expression analysis of anthocyanin regulatory genes in response to different light qualities in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol* 165:886-94.
- De Bondt A, Eggermont K, Druart P, De Vil M, Goderis I, Vanderleyden J, Broekaert W. 1994.

- Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. *Plant Cell Rep* 13:587-593.
- Deluc L, Bogs J, Walker AR, Ferrier T, Decendit A, Merillon JM, et al. 2008. The transcription factor VvMYB5b contributes to the regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in developing grape berries. *Plant Physiol* 147:2041-53.
- Du H, Zhang L, Liu L, Tang XF, Yang WJ, Wu YM, et al. 2009. Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. *Biochemistry* 74: 1-11.
- Elomaa P, Uimari A, Mehto M, Albert VA, Laitinen RA, Teeri TH, Elomaa P, Uimari A, MehtoM, Albert VA, Laitinen RA, Teeri TH. 2003. Activation of anthocyanin biosynthesis in *Gerbera hybrida* (*Asteraceae*) suggests conserved protein-protein and protein-promoter interactions between the anciently diverged monocots and eudicots. *Plant Physiol* 133:1831-42.
- Espley RV, Hellens RP, Putterill J, Stevenson DE, Kutty-Amma S, Allan AC. 2007. Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10. *Plant J* 49:414-27.
- Frand AR, Cuozzo JW, Kaiser CA. 2000. Pathways for protein disulphide bond formation. *Trends Cell Biol* 10:203-210
- Gonzalez A, Zhao M, Leavitt JM, Lloyd AM. 2008. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* 53:814-827.
- Gonzalez A, ZhaoM, Leavitt JM, Lloyd AM. 2008. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings.
- Grotewold E. 2006. The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu Rev Plant Biol* 57:761-80.
- Han BH, Lee SY, Lim JH. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene in *Chrysanthemum* (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) 'Linneker Salmon' . *J Plant Biotechnol* 35:147-153
- Han BH, Suh EJ, Lee SY, Shin HK, Lim YP.2007. Selection of non-branching lines induced by introducing Ls-like cDNA into *Chrysanthemum* [*Dendranthema x Grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] 'Shuho-no-chikara' . *Scientia Hort* 115: 0-75
- Huh EJ, Shin HK, Choi SY, Kwon OG, Lee YR. 2008. Thermosusceptible Developmental Stage in Anthocyanin Accumulation and Color Response to High Temperature in Red *Chrysanthemum* Cultivars. *Kor J Hort Sci Technol* 26:357-361.
- Jin H, Martin C. 1999. Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol Biol* 41:577-85.
- Katsumoto Y, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Brugliera F, Holton TA, Karan M, Nakamura N, Yonekura-Sakakibara K, Togami J, Pigeaire A, Tao GQ, Nehra NS, Lu CY, Dyson BK, Tsuda S, Ashikari T, Kusumi T, Mason JG, Tanaka Y. 2007. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating

- delphinidin. *Plant Cell Physiol.* 48:1589–1600.
- Lin-Wang K, Bolitho K, Grafton K, Kortstee A, Karunairetnam S, McGhie T, Espley R, Hellens R, Allan A. 2010. An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae. *Plant Biol* 10:50.
- Ling HQ, Kriseleit D, Ganai MW. 1998. Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Cell Rep* 17:843–847.
- Lowe JM, Davey MR, Power JB, Blundy KS. 1993. A study of some factors affecting *Agrobacterium* transformation and plant regeneration of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Plant Cell Tiss Org* 33:171–180.
- Mano H, Ogasawara F, Sato K, Higo H, Minobe Y. 2007. Isolation of a regulatory gene of anthocyanin biosynthesis in tuberous roots of purple-fleshed sweet potato. *Plant Physiol* 143:1252–68.
- Mathews H, Clendennen SK, Caldwell CG, Liu XL, Connors K, Matheis N, et al. 2003. Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *Plant Cell* 15:1689–703.
- Matousek J, Vrba L, Skopek J, Orctova L, Pesina K, Heyerick A, et al. 2006. Sequence analysis of a “true” chalcone synthase (chs_H1) oligofamily from hop (*Humulus lupulus* L.) and PAP1 activation of chs_H1 in heterologous systems. *J Agric Food Chem* 54:7606–15.
- Maxwell K, Johnson GN. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J Exp Bot* 51:659–668
- Meissner RC, Jin H, Cominelli E, Denekamp M, Fuertes A, Greco R, et al. 1999. Function search in a large transcription factor gene family in Arabidopsis: Assessing the potential
- Mohebodini M, Mokhtar JJ, Mahboudi F, Alizadeh H. 2011. Effects of Genotype, Explant Age and Growth Regulators on Callus Induction and Direct Shoot Regeneration of Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Australian J Crop Sci* 5:92–95.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15:473–497
- Naing A, Il Park K, Chung M, Lim K, Kim C. 2015. Optimization of factors affecting efficient shoot regeneration in chrysanthemum cv. Shinma. *Braz J Bot* 1–10.
- Naing Ah, Park KI, Lim SH, Kim CK. 2014. Appropriate choice of antibiotics for plant regeneration and optimization of selective agents to be used in genetic transformation of chrysanthemum. *Plant Omics* 7:237–243.
- Ojeda L, Keller G, Muhlenhoff U, Rutherford JC, Lill R, Winge DR. 2006. Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 281:17661–17669
- Park SH, Kim GH, Jeong BR. 2005. Adventitious Shoot Regeneration in Chrysanthemum as Affected by Plant Growth Regulators, Sucrose, and Dark Period. *JKor Soc Hort Sci* 46:335–340.

- Pattanaik S, Kong Q, Zaitlin D, Werkman J, Xie C, Patra B, Yuan L. 2010. Isolation and functional characterization of a floral tissue-specific R2R3 MYB regulator from tobacco. *Planta* 231:1061–1076.
- Petty LM, Harberd NP, Carré IA, Thomas B, Jackson SD. 2003. Expression of the *Arabidopsis gai* gene under its own promoter causes a reduction in plant height in chrysanthemum by attenuation of the gibberellin response. *Plant Science* 164:175–182.
- Ramsay NA, Glover BJ. 2005. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends Plant Sci* 10:63–70.
- Schmidt R, Willmitzer L. 1988. High efficiency *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* leaf and cotyledon explants. *Plant Cell Rep* 7:583–586.
- Shen LY, Petolino JF. 2006. Pigmented maize seed via tissue-specific expression of anthocyanin pathway gene transcription factors. *Mol Breed* 2006;18:57–67.
- Sherman JM, Moyer JW, Daub ME. 1998. A Regeneration and *Agrobacterium*-mediated Transformation System for Genetically Diverse *Chrysanthemum* Cultivars. *J Amer Soc Hort Sci* 123:189–194.
- Springob K, Nakajima J, Yamazaki M, Saito K. 2003. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Nat Prod Rep* 20:288–303.
- Stracke R, Werber M, Weisshaar B. 2001. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol* 4:447–56.
- Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler R, Miller G. 2011. ROS and redox signaling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ* 35:259–270
- Tanaka Y, Ohmiya A. 2008. Seeing is believing: Engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. *Curr Opin Biotechnol* 19:190–7.
- Van Wordragen MF, de Jong J, Huitema HBM, Dons HJM. 1991. Genetic transformation of *Chrysanthemum* using wild type *Agrobacterium* strains; strain and cultivar specificity. *Plant Cell Rep* 9:505–508.
- Yamagishi M, Shimoyamada Y, Nakatsuka T, Masuda K. 2010. Two *R2R3-MYB* genes, homologs of petunia *AN2*, regulate anthocyanin biosyntheses in flower tepals, tepal spots and leaves of asiatic hybrid lily. *Plant Cell Physiol* 51:463–474.
- Zhu LH, Li XY, Welander M. 2008. Overexpression of the *Arabidopsis gai* gene in apple significantly reduces plant size. *Plant Cell Rep* 27:289–296.

첨부: 특허, 논문 및 시장분석

〈 특허, 논문 및 시장분석 〉

▣ 핵심연구과제와 관련한 기술별로 아래의 항목에 따라 1-2장정도로 자유롭게 요약 기술합
 제목은 12point, 본문내용은 10point로 작성하며 줄간 간격은 조정 가능함

1. 본 연구와 관련된 기술의 국내외 수준 비교

기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라 관련기술수준	연구사업단 보유기술수준		
MBW 유전자군의 발현조절에 의 한 화색발현 안정화기술	일본, 미국	60%	60%	80%	
내열성 발현 유전자가 도입된 형 질전환체 육성	미국	50%	60%	80%	
형질전환기술에 의한 화색변이 국화 개발	일본	50%	50%	70%	

- 1) 기술명은 본 연구사업단과 관련(기보유기술 또는 향후 개발예정기술)된 기술을 기재
- 2) 현재 기술수준은 세계최고수준을 100%으로 할 때 우리나라 및 신청한 연구사업단의 기술수준 표시
- 3) 기술개발 목표수준은 연구사업단 종료시의 기술수준을 세계최고수준(100%) 대비 목표로 제시
- 4) 부가설명이 필요한 경우 비고란에 작성

2. 특허조사분석

가. 특허조사분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허DB	특허정보원(www.kipris.or.k), Aureka DB
검색기간	20100101 ~ 20151231
검색범위	제목 및 초록

※ 특허조사분석시 활용하였던 특허정보이용과 관련된 내용을 기재

나. 특허 조사·분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

- 국내 특허분석은 특허청 특허정보검색서비스(<http://portal.kipris.or.kr/>)를 이용하여 특허 및 관련 기술 동향을 분석한 결과, 국화+형질전환체+agrobacterium 을 키워드로 검색한 결과, 121건의 특허가 검색되었으며 이들 중 형질전환체 개발과 관련된 특허 12종, 그 외 프로모터 개발과 고유물질 생산 등에 관련된 특허로 검색되었다. 이중 국화 형질전환체 개발과 관련된 특허는 1건으로 안토시아닌 생합성 유전자 플라보노이드 3', 5'-하이드록실라아제(flavonoid 3', 5'-hydroxylase) (F3',5'H)를 아그로박테리움에 삽입하여 새로운 국화품종 (Novel Chrysanthemum Cultivar)이 등록되어 있음.

기술명		MYB 유전자군의 발현조절에 의한 화색발현 안정화기술	MYB 유전자군의 발현조절에 의한 화색발현 안정화기술	내열성 발현 유전자가 도입된 형질전환체 육성
Keyword		MYB, chrysanthemum	promoter, chrysanthemum	heat tolerance, transgenic plant
검색건수		4	10	19
유효특허건수		3	3	11
핵심특허 및 관련성	특허명	METHOD FOR PRODUCTION OF CHRYSANTHEMUM PLANT HAVING PETALS CONTAINING MODIFIED ANTHOCYANIN	METHOD FOR PRODUCING CHRYSANTHEMUM PLANT HAVING PETALS CONTAINING MODIFIED ANTHOCYANIN	Enhancement of Reproductive Heat Tolerance in Plants
	보유국	일본	미국	미국
	등록년도	2009	2012	2011
	관련성(%)	70	70	60
	유사점	유용한 전사 조절 영역을 이용하여 국화 또는 국화 이외의 식물에 대하여 플라보노이드 합성계를 제어하는 방법 및 안토시아닌을 축적하는 방법은 본 연구와 유사함.	유용한 전사조절 영역과 꽃잎 특이프로모터를 이용하여 국화의 꽃잎에서만 안토시아닌의 축적이 가능하게 하는 방법은 본 연구와 유사함.	내열성 유전자를 도입하여 고온스트레스에 대해 내성이 증가한 식물체 생산에 성공한 제반 기술.
차이점	상기 특허는 유용한 전사조절영역을 이용하여 화색을 바꾸는 기술인 반면 본 연구는 고온하에서도 안정적으로 화색소를 축적시키고자 하는 것임. 즉, 사용유전자의 활용방법 및 범위가 서로 상이함.	상기 특허가 조직특이적 발현에 국한되었는 반면 본 연구는 조직 특이적이면서 스트레스(고온) 특이적으로 발현시키고자 하는 것임. 즉, 사용하고자하는 프로모터의 종류와 범위가 서로 상이함.	상기 특허에서 사용한 유전자의 종류와 사용범위가 서로 상이함.	

- 1) 기술명은 본 연구사업단과 관련(기보유기술 또는 향후 개발예정기술)된 기술을 기재
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 연구사업단 관련기술과 관련성이 높은 특허를 의미
- 3) 기존특허는 검색된 특허중 연구사업단 관련기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 상위 3개 특허를 기준으로 작성

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	한국, 미국, 일본, 유럽
논문 DB	국회도서관(www.nanet.go.kr), Pubmed(www.pubmed.gov) 등 논문DB
검색기간	20100101 ~ 20151231
검색범위	제목, 초록 및 키워드

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

기술명	MBW 유전자군의 발현조절에 의한 화색발현 안정화기술	내열성 발현 유전자가 도입된 형질전환체 육성
Keyword	Chrysanthemum, anthocyanin, transgenic, flavonoid	Chrysanthemum and (thermotolerance or heat tolerance or heat resistance or high temperature tolerance or high temperature resistance)
검색건수	11	21
유효논문건수	5	2
핵심논문 및 관련성	논문명	“Yellow Jimba”: suppression of carotenoid cleavage dioxygenase (<i>CmCCD4a</i>) expression turns white chrysanthemum petals yellow
	학술지명	J Jpn Soc Hort Sci
	저자	Ohmiya 등
	게재년도	2009
	관련성(%)	50
	유사점	색소관련 유전자의 발현을 통한 화색변이개체 획득
차이점	본 연구에서는 유용한 전자조절영역을 이용하여 단순히 화색을 바꾸는 기술이 아니라 고온하에서도 안정적으로 화색소를 축적시키고자 하는 것임. 즉, 사용 유전자의 종류 및 범위가 서로 상이함.	본 연구에서는 고온 스트레스에 특이적인 <i>HSF</i> , <i>HSP</i> 유전자 및 redox 항상성 중추 조절 유전자인 <i>GRX</i> 를 사용하여 형질전환 계통을 확보하는데 필요한 제반기술을 수행할 것임.

- 1) 기술명은 본 연구사업단과 관련(기보유기술 또는 향후 개발예정기술)된 기술을 기재
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효논문건수는 검색한 논문 중 연구사업단 관련기술과 관련성이 높은 논문을 의미
- 3) 기존논문은 검색된 논문 중 연구사업단 관련기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 상위 3개 논문을 기준으로 작성

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

○ 국화는 절화류 중 재배면적 비중이 가장 높은 작물로 2014년의 경우 440ha로 전체 절화류 1,551h 중 28.4%를 차지하고 있으며, 수출액은 4,732천\$로 전체 화훼류 수출액의 11.6%를 차지하고 있음(농림축산

식품부, 2015)

○ 2015년 12월말 기준 국립종자원에 품종보호 출원된 품종수는 807품종으로 이중 509품종은 국내 육성품종으로 63%에 달하지만(국립종자원, 2016) 육종역사가 짧고 종묘생산 및 보급체계가 미흡하여 국산품종의 보급률은 25%정도이다.

○ 2014년 12월말 기준, 국립종자원에 품종보호 출원된 국화 품종은 612품종으로 이중 국내육성 품종은 국립원예특작과학원에서 육성한 'Ilweol'(Shin et al., 2005)과 'Yellow Candy'(Lim et al., 2011), 충남 농업기술원에서 육성한 'Yes Line'(Pak et al., 2008)과 'Hwiparam'(Pak et al., 2009), 경북농업기술원에서 육성한 'Noble ND'(Kim et al., 2010a)와 'White Ball'(Kim et al., 2010b), 경남농업기술원에서 육성한 'Moulin Rouge'(Hwang et al., 2008)와 'Magic Yellow'(Hwang et al., 2011) 등을 포함하여 325품종에 달한다(www.seed.go.kr). 하지만 네덜란드와 같은 육종 선진국에 비해 육종 역사가 짧고 종묘생산 및 보급체계가 미흡하여 국산품종의 보급률은 아직 25% 정도이다.

○ 우리나라에서 가장 큰 화훼도매시장인 양재동 화훼공판장에서 거래되고 있는 국화 품종 수는 400여종 이상으로 매년 50여종 이상의 신품종이 시장에 등장하고 도태하는데(www.yfmc.co.kr), 특히, 스프레이국화는 소비형태가 꽃꽂이나 꽃다발로 사용되기 때문에 소비자의 기호도 변화가 빨라 시장에서의 품종 변화가 큰화종이다.

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

○ 일본의 2014년 국화 재배면적은 5,007ha로 전체 절화류 15,090ha의 33.2%이며, 생산량은 15.73억본으로 이중 대국이 8.55억본, 스프레이국화가 2.42억본, 소국이 4.76억본이다(일본 농림수산성, 2015).

○ 일본은 세계 최대의 국화 생산국이자 소비국가로 2015년 수입금액은 129.2억엔인데 이중 말레이시아가 전체의 65%인 84.1억엔, 베트남이 16%, 중국은 15%, 한국은 1.6%인 2.1억엔이다(한국무역협회, 2016).

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

○ 먼저, 본 연구결과를 수행하여 얻어진 고온에서도 화색이 안정적으로 발현되는 국내 육성 형질전환 국화는 안정성평가를 통하여 품종등록과 상업화를 추진하고자 한다.

○ 국화는 전체 생산액의 10% 이상을 수출하는 품목임으로 수출 전략산업으로 발전할 가능성이 충분한데 우리나라 꽃 수출은 지속적으로 확대되어 2010년 말 기준으로 1억 달러 수출시대가 도래하였음. 이중 국화의 '10년 수출액은 13,802천US\$로 국산품종의 수출이 전체 수출액 32%를 차지하고 있음으로 경쟁력있는 국화의 국산품종의 개발은 로열티 경감과 수출의 길을 동시에 열 것임.

○ 특히, 본 연구과제의 참여업체인 0000(구, 00000)에서는 여름철 고온으로 인해 2차생장, 개화불균일, 버들눈 발생, 화형불균일 그리고 화색퇴화 등의 생리장해로 인해 수출용 스프레이 국화의 품질저하로 인해 경제적 손실이 거의 30%에 달하고 있음으로 기술이전을 통해 이를 해결할 수 있는 방안이 될

것임.

○ 현재 국내에서 400 여 국화품종이 재배되고 있으며 연간 50~100품종이 새롭게 도입되는데, 이는 국화의 재배기간이 짧아 최대 4기작(/년)이 가능하고 시장에서의 소비자 기호도의 변화가 빨라 새로운 품종에 대한 요구도가 증가하고 있고, 최근 농식품부 화훼산업발전 대책에서도 국내육성 품종의 보급률을 '17년까지 33%로 늘리기로 하였으므로 본 연구결과에서 얻어진 다양한 신품종들은 이러한 국가 정부 정책에 부합하는 결과를 가져와 로열티 경감과 수입대체 효과를 유발시킬 수 있을 것임.

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

산업화 기준 항 목	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	12억	14	14	16	20	76억
경제적 파급효과	20억	22	24	30	35	131억
부가가치 창출액	22억	26	30	40	50	168억
합 계	54	62	68	86	105	375억

- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

5. 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획

가. 분석결과 향후 연구계획

1) 특허분석 측면

- 국내 특허분석은 특허청 특허정보검색서비스(<http://portal.kipris.or.kr/>)를 이용하여 특허 및 관련기술 동향을 분석한 결과, 국화+형질전환체+agrobacterium 을 키워드로 검색한 결과, 110건의 특허가 검색되었으며 이들 중 형질전환체 개발과 관련된 특허 10종, 그 외 프로모터 개발과 고유물질 생산 등에 관련된 특허로 검색되었다. 이중 국화 형질전환체 개발과 관련된 특허는 1건으로 안토시아닌 생합성 유전자 플라보노이드 3', 5'-하이드록실라아제(flavonoid 3', 5'-hydroxylase) (F3',5'H)를 아그로박테리움에 삽입하여 새로운 국화품종 (Novel Chrysanthemum Cultivar)이 등록되어 있음.
- 국외 특허분석은 transgenic plant and chrysanthemum의 특허 358건 중 50건의 내용을 살펴본 결과, 유전자에 관한 특허가 9건, 유전자 조절에 의한 물질생산이 21건, 발현 조절 5건, 다양한 프로모터 4건, 형질전환체 및 방법에 관해 6건 등으로 구분되었음. 미국의 경우 *agrobacterium*을 이용한 *Chrysanthemum morifolium*의 형질전환 방법 1건, 중국의 경우 Creeping type ground-cover 국화의 형질전환 방법과 관련된 특허 1건, 국화 기내재분화 효율성 향상과 관련된 특허 1건이 각각 등록되어 있음.

- 따라서 특허는 유전자탐색 및 형질전환 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 이들 유전자를 이용한 산업화 방향으로 연구를 추진하여 무에서 유래된 MYB 유전자도입 국화 형질전환체 개발 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임

2) 논문분석 측면

- 지난 10여년 동안 국화의 형질전환은 *Agrobacterium*에 의한 형질전환 기술의 개발에 집중되어 왔으며(Aswath 등, 2004; De Jong 등, 1994; Fukai 등, 1995; Ledger 등, 1991; Renou 등, 1993), 주로 형태적 생리적 변화, 내병성, 내충성 등 도입된 유전자의 형질발현에 초점을 맞추고 있다(Han 등, 2007; Kubo 등, 2006; Mitiouchkina와 Dolgov, 2000; Takatsu 등, 1999).
- *DgLsL* anti-sense partial 유전자를 국화 'Zinba'에 형질전환하고 *DgLsL* anti-sense partial 유전자의 도입을 확인하였음. 그러나 *DgLsL* anti-sense partial 유전자가 도입된 모든 형질전환체에서 측지가 발생하였으며, 형질전환체 LS2, LS9, LS10 3계통은 비형질전환체(대조구)보다는 조기 개화하는 특성을 보였음.
- 저온저항성 유전자(BN115)가 도입된 국화형질전환체의 생육특성을 조사한 결과 저온저항성 유전자가 도입된 식물체의 세포가 외부환경에 안정적으로 적응하여 세포내 파괴나 상해를 받지 않는 것으로 나타남(Choi 등, 2008).
- *MdMADS2* 유전자가 도입된 국화형질전환 6개체의 개화일수가 형질전환되지 않은 국화에 비해 2-11일정도 조기개화하는 특성을 보였다고 하였음(Han 등, 2009).
- 국내에서 교배육종 방법으로 개발된 다양한 스프레이형 국화품종들에 대한 재분화 능력을 조사하고 그 중에서 재분화 능력이 탁월한 무랑루즈를 선별하고 아그로박테리움을 이용한 무랑루즈의 효율적인 형질전환법을 확립하였다. 또한 확립한 형질전환 방법을 이용하여서 애기장대에서 분리된 *AtSICKE* 유전자를 '무랑루즈' 국화에 도입하고 발현시킴으로써 새로운 엽형의 변화를 성공적으로 유도하였음.
- 국화의 *CmCCD4a* 유전자의 발현이 꽃잎 특이적일 뿐 아니라 흰 꽃에서 강하고 노란 꽃에서는 약한데 착안하여 흰꽃에서의 *CmCCD4a* 유전자 발현을 RNAi 기법을 통해 억제시킨 결과 짙은 노란 화색 표현형이 얻어졌다. 비 형질전환체에 비해 *CmCCD4a* 유전자 발현은 40% 정도로 감소되었고 꽃잎의 카로티노이드 함량은 대폭 증진($102\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)되어 짙은 황색 표현형을 보였다.
- 흥미롭게도 형질전환된 국화가 비형질전환체에 비해 상당히 작아지고 apical bud의 수가 줄어들었는데도 불구하고 꽃의 크기는 변함이 없는 점이 특이한데 그 원인은 아직 밝혀지지 않았다. 다만 *CmCCD4a* 작용에 의해 생성된 아포카로티노이드의 일부가 줄기나 뿌리 등으로 이동하여 branching을 저해하는 strigolactone 생성에 관여할 수도 있어 *CmCCD4a* 발현 저해에 의해 영양생장 단계에서 branching 촉진과 dwarf 형질이 나타날 수 있다고 제시하고 있다(Ohmiya, 2009).

- 또한, 유전자의 발현조절을 위해서 프로모터의 선발 또한 매우 중요하다. 상시 발현을 유도하는 cauliflower mosaic virus 35S(CaMV35S) 프로모터를 이용하여 장미, 카네이션, 토레니아와 같은 화훼류들은 성공적으로 화색 변경을 이루어졌다(Katsumoto et al., 2007; Nakamura et al., 2010; Ono et al., 2006).
- 그러나, 용담과 국화 같은 몇몇 종의 작물에서 CaMV35S 프로모터는 도입유전자의 발현에 효과적이지 않았다(Aida et al., 2004; Yamasaki et al., 2011). 국화의 경우도 CaMV35S 프로모터를 이용한 형질전환보다는 국화의 ubiquitin extension 단백질의 프로모터 또는 chlorophyll a/b binding 단백질의 프로모터가 더 효과적으로 외래유전자를 발현시켰다(그림 6; Aida et al., 2004; Annadana et al., 2002).
- 이상에서 살펴본 바와 같이 기존 논문은 국화의 화색과 화형관련 형질을 변화시키기 위해 형질전환 기술을 이용하는데 치중하고 있으며 일부 논문에서는 무측성과 관련된 연구결과도 보고하고 있다. 반면, 본 연구과제에서는 화색의 발현의 안정화를 위해 특이프로모터의 활용과 조절유전자의 제어는 물론 고온관련 유전자를 공동발현 시키는 방향으로 연구를 추진하여 얻어진 연구결과들을 국내외 관련학회에서의 발표는 물론 SCI학술지에 게재할 계획임

3) 제품 및 시장분석 측면

- 화훼류는 원예산업의 한 축으로서 유럽, 북아메리카 및 일본시장에서 연간 1,500억 달러의 시장을 형성하고 있으며 특히 코스타리카, 콜롬비아, 케냐, 에티오피아 및 에콰도르 등 여러 개발도상국에서는 국가 경제의 중요한 부분을 차지하고 있다(Chandler and Tanaka, 2007).
- 국내 화훼산업은 '80년대 이후 급격히 성장하여 현재 생산 규모는 약 1조 원 수준으로 추정되고 있는데, 수출이 이러한 화훼 산업 성장의 견인차 역할을 하여 수출액에 있어 '90년 140만 달러에서 '10년에는 10,300만 달러로 10년동안 70배 이상 급속히 증가하고 있다.
- 특히, 화훼류 중에서도 국화는 전체 생산액의 10% 이상을 수출하는 품목이므로 수출 전략산업으로 발전할 가능성이 충분한데 '10년 수출액은 13,802천 US\$로 국산품종의 수출이 전체 수출액 32%를 차지하고 있다는 점을 감안한다면 본 연구과제를 통해 얻어진 고온 내성 국화 신품종의 상품화를 통하여 대외 수출경쟁력제고는 물론 고온기 각종 생리장애로 인해 나타나는 경제적 손실을 최소화할 수 있을 것임.
- 현재, 국내에서 재배되고 있는 스프레이 국화는 대부분 화란에서 육성된 품종으로 당해 품종의 생육적온을 벗어나는 국내의 여름철 고온 재배조건 하에서는 개화지연과 2차 측지 및 관생화 발생 등으로 절화의 품질저하를 초래하고 있어 국내 재배용으로는 부적합하다는 점을 감안할 때, 국내 여름철 재배환경에 적합한 품종육성을 통하여 국산 품종에 보급률 확대를 통한 로열티 경감은 물론 GM 화훼작물의 조기 상업화를 위한 모델을 제시하고자 한다.

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.