

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0062898 (43) 공개일자 2011년06월10일
(51) Int. Cl. <i>C12N 15/82</i> (2006.01) <i>A01H 1/00</i> (2006.01) <i>C12N 5/04</i> (2006.01)	(21) 출원번호 10-2009-0119765 (22) 출원일자 2009년12월04일 심사청구일자 2009년12월04일	(71) 출원인 경상대학교산학협력단 경상남도 진주시 가좌동 900 (72) 발명자 정병룡 경상남도 진주시 신안동 466-2번지 시바네산 경상남도 진주시 가좌동 경상대학교 455-318 송주연 부산광역시 부산진구 초읍동 370-1번지 (74) 대리인 특허법인이름

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 국화의 꽃잎 절편체를 이용한 국화의 형질전환 방법 및 이에 의해 형질전환된 국화

(57) 요약

본 발명은 국화의 꽃잎 절편체를 이용한 국화의 형질전환 방법 및 이에 의해 형질전환된 국화에 관한 것이다. 본 발명에 따른 국화의 형질전환 방법은, 재분화율이 높은 국화의 꽃잎 절편체를 GUS 유전자를 포함하는 아그로박테리움 현탁액에 침지하여 감염시킨 후, 접종된 꽃잎 절편체를 SIM 배지로 옮겨 2일 동안 공동배양한 다음, 꽃잎 절편체를 MS 액체배지에서 세척하고 1차 선발배지(SIM 배지)로 옮겨 배양한 다음, 4주 후에 재분화된 국화를 선택하고, 2차 선발배지(발근유도배지, RIM)로 옮겨 배양하여 형질전환시키는 것을 특징으로 한다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

- 1) 국화를 깨끗이 세척하고 표면 소독한 후, 소독된 국화로부터 꽃잎을 분리하고 절단한 다음, 꽃잎 절편체를 재분화배지(SIM)에서 2일 동안 사전배양하는 단계,
- 2) GUS 유전자를 포함하는 pCAMBIA 2301을 도입한 아그로박테리움속 균주를 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 카나마이신 및 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 리팜피신이 첨가된 YEP 액체 배지(10 g/L 박토펙톤, 10 g/L 효모 추출물, 및 5 g/L NaCl)에서 진탕 배양하는 단계,
- 3) 상기 1)단계에서 사전배양된 꽃잎 절편체를 GUS 유전자를 포함하는 아그로박테리움 현탁액(O.D. 0.8)에 20~50분 동안 침지하여 감염시키는 단계,
- 4) 상기 접종된 꽃잎 절편체를 SIM 배지로 옮기고, 2일 동안 공동배양하는 단계,
- 5) 상기 공동배양 후 꽃잎 절편체를 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 세포탁심이 첨가된 MS 액체배지에서 세척하고, 1차 선발배지 [$7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 카나마이신 및 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 세포탁심이 첨가된 SIM 배지]로 옮겨 배양하는 단계, 및
- 6) 4주 후, 재분화된 국화를 선택하고, 2차 선발배지 [$20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 카나마이신 및 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 세포탁심이 첨가된 발근유도배지(RIM)]로 옮겨 배양하는 단계를 포함하는, 꽃잎 절편체를 이용한 국화의 형질전환 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 1)단계에서 표면 소독은 국화를 70%(v/v) 에탄올 용액으로 20~50초 동안, 1.5%(v/v) 차아염소산나트륨 용액에서 5~15분 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 꽃잎 절편체를 이용한 국화의 형질전환 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 2)단계에서 아그로박테리움속 균주는 아그로박테리움 투메파시엔스인 것을 특징으로 하는 꽃잎 절편체를 이용한 국화의 형질전환 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 2)단계에서 진탕 배양은 $25\sim 30^\circ\text{C}$ 에서 150~200rpm으로 1~2일 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 꽃잎 절편체를 이용한 국화의 형질전환 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 1)단계, 4)단계 및 5)단계에서 재분화배지(SIM)는 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA, $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 키네티인이 첨가된 MS 배지와 3%(w/v) 수크로오스 및 0.8%(w/v) 아가를 포함하는 것을 특징으로 하는 꽃잎 절편체를 이용한 국화의 형질전환 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 6)단계에서 발근유도배지(RIM)는 MS 배지, 3%(w/v) 수크로오스 및 0.8%(w/v) 아가를 포함하는 것을 특징으로 하는 꽃잎 절편체를 이용한 국화의 형질전환 방법.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 방법으로 형질전환된 국화.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 국화의 꽃잎 절편체를 이용한 국화의 형질전환 방법 및 이에 의해 형질전환된 국화에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 국화(*Dendranthema X grandiflorum*)는 일장의 조절만으로 연중 개화할 수 있는 특징을 가진 식물로 가장 인기있는 절화 중 하나이며, 장미, 카네이션과 더불어 세계 3대 화훼작물 중 하나이다. 국화는 국내뿐만 아니라 전세계적으로 중요한 화훼작물로 절화용, 분화용, 정원용 등으로 매우 다양하게 이용되고 있으며, 화훼원에서 경제적으로 중요하다. 따라서, 농가소득 증가에 기여하기 위하여 국화의 품종 육성 방법에 관한 연구가 꾸준히 진행되어 오고 있다.

[0003] 종래의 국화 품종 육성 방법으로는 관행적 육종 방법, 즉 선발 및 돌연변이 유도를 통하여 이루어져 왔으나, 최근 들어서는 외부 유전자의 도입을 통한 형질전환 방법이 국화의 새로운 육종 방법으로 자리잡아 가고 있다.

[0004] 유전공학적 분자 육종 방법을 성공적으로 수행하기 위해서는 적합한 시료를 얻는 방법, 표적 세포 내로 외부 유전자를 효과적으로 이식하는 방법, 및 형질전환된 세포로부터 완전한 식물체를 얻는 재분화 기술이 필요하다. 따라서, 식물체의 재분화에 관한 연구가 활성화되고 있다.

[0005] 일반적으로, 조직배양을 통해 전체 식물을 재분화하는 능력은 대부분의 형질전환 시스템의 필수조건으로, 줄기(마디 및 절간), 액아, 측아, 잎, 다수의 절편체, 경단분열조직 끝부분 생장점(shoot tip) 또는 분열조직, 원형질체(protoplasts), 뿌리, 꽃자루, 꽃 등을 포함한 많은 절편체 근원에서 이루어져 왔다. 일부 연구자들은 국화에서 줄기, 잎 및 꽃잎 절편체로부터의 재분화율이 꽃잎 절편체에서 가장 많이 나타나고(꽃잎 절편체 당 9.30 신초의 수), 국화의 줄기 및 잎 절편체의 재분화율은 국화의 꽃잎 절편체에 비해 낮은 재분화율을 나타낸다고 보고하고 있다.

[0006] 또한, 최근 가장 일반적으로 이용되고 있는 식물 형질전환 기술은 식물 병원균인 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)를 벡터로 이용하는 기술이다. 이들 세균은 그들의 Ti(tumor-inducing) 또는 Ri(root-inducing) 플라스미드 DNA 중 일부인 T-DNA를 감염된 식물 세포내로 전이시키는 능력을 갖고 있다. 따라서, 표적 유전자를 T-DNA 내에 재조합한 후 이를 보유한 균주와 식물체를 공동 배양하면 식물 세포의 형질전환이 가능해진다.

[0007] 국화는 아그로박테리움속 균주에 의해 쉽게 감염된다고 알려져 있어, 이를 이용한 형질전환 연구에 관하여도 꾸준히 진행되어 오고 있다. 식물형질전환 기술은 식물 병원균인 아그로박테리움을 식물조직 절편에 감염시키는 과정을 거치게 되는데, 형질전환의 효율을 높이기 위해 식물조직의 배양에 사용되는 배지의 조성을 달리하는 시도와 아그로박테리움의 종류, 벡터의 구성, 항생제 마커의 선택, 식물체 절편의 종류, 페놀성 화합물의 첨가, 배양온도의 변화, 공동배양 기간 등을 중심으로 다양한 연구가 시도되고 있다. 아그로박테리움을 이용하여 형질전환의 효율을 높이는 방법으로는, 표적 조직을 칼로 절단하거나 입자로 충격을 주는 방법(미국 특허 제 5,792,935호), 또는 초음파를 이용하는 방법(미국 특허 제 5,693,512호) 등이 이용되었으나 효과가 크지는 않았다. 또한, 떡잎 마디에서 신초의 재분화가 가능하기 때문에, 이 조직을 표적 조직으로 사용하여 형질전환한 보고가 있다(미국 특허 제 5,824,877호). 그러나, 이 경우 4~5일 발아된 떡잎 마디를 사용하였고 형질전환 및 재분화 효율이 매우 낮았다. 또한, 식물세포로의 유전자 도입의 효율을 향상시키는 방법으로서, 대한민국 등록특허공보 제 10-0807434호에는 식물세포 또는 식물조직을 원심처리하여 아그로박테리움속 균주를 통하여 식물세포로의 유전자 도입의 효율을 향상시키는 방법에 관하여 기재되어 있으며, 대한민국 등록특허공보 제 10-0767867호에는 식물세포 또는 식물조직을 열처리 및 원심처리하여 아그로박테리움속 균주를 통하여 식물세포로의 유전자 도입의 효율을 향상시키는 방법에 관하여 기재되어 있다. 따라서, 식물체의 형질전환 효율을 개선하기 위해서는 재분화 효율, 유전자 도입방법, 선발시기 등이 중요하다고 생각된다.

[0008] 지금까지, 국화의 형질전환 연구는 다양한 절편체를 이용하여 수행되어 왔다. 그러나, 국화의 꽃잎 절편체의 재분화율이 다른 절편체에서 보다 높음에도 불구하고 국화의 꽃잎 절편체를 이용한 형질전환 연구는 지금까지 전무한 상태이다. 일부 몇몇 원예작물에서 꽃잎 절편체를 이용하여 재분화하는 연구가 진행되어 왔으나, 절편체를 다루는 기술의 부재 등 여러 가지 이유로 형질전환화는 아직까지 전무한 상태이다.

[0009] 따라서, 재분화율이 높은 국화의 꽃잎 절편체를 이용하여 국화를 형질전환하면 형질전환 효율을 높일수 있을뿐만 아니라, 다양한 유용 유전자를 도입함으로써 고부가가치의 신품종 개발이 가능할 것으로 생각된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0010] 본 발명자들은 국화의 형질전환 효율을 높일 수 있는 방법에 대해 연구하던 중, 재분화율이 높은 꽃잎 절편체를 GUS 유전자를 포함하는 아그로박테리움 현탁액에 침지하여 감염시킨 후, 접종된 꽃잎 절편체를 SIM 배지로 옮겨 2일 동안 공동배양한 다음, 꽃잎 절편체를 MS 액체배지에서 세척하고 1차 선발배지(SIM 배지)로 옮겨 배양한 다음, 4주 후에 재분화된 국화를 선택하고, 2차 선발배지(발근유도배지, RIM)로 옮겨 배양하여 국화를 형질전환시켰으며, 형질전환 국화의 잎 전체에서 GUS 유전자가 발현됨을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결수단

[0011] 본 발명은 국화의 꽃잎 절편체를 이용한 국화의 형질전환 방법 및 이에 의해 형질전환된 국화를 제공하고자 한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명은
- [0013] 1) 국화를 깨끗이 세척하고 표면 소독한 후, 소독된 국화로부터 꽃잎을 분리하고 절단한 다음, 꽃잎 절편체를 재분화배지(SIM)에서 2일 동안 사전배양하는 단계,
- [0014] 2) GUS 유전자를 포함하는 pCambia 2301을 도입한 아그로박테리움속 균주를 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 카나마이신 및 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 리팜피신이 첨가된 YEP 액체 배지(10 g/L 박토펙톤, 10 g/L 효모 추출물, 및 5 g/L NaCl)에서 진탕 배양하는 단계,
- [0015] 3) 상기 1)단계에서 사전배양된 꽃잎 절편체를 GUS 유전자를 포함하는 아그로박테리움 현탁액(O.D. 0.8)에 20~50분 동안 침지하여 감염시키는 단계,
- [0016] 4) 상기 접종된 꽃잎 절편체를 SIM 배지로 옮기고, 2일 동안 공동배양하는 단계,
- [0017] 5) 상기 공동배양 후 꽃잎 절편체를 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 세포탁심이 첨가된 MS 액체배지에서 세척하고, 1차 선발배지 [$7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 카나마이신 및 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 세포탁심이 첨가된 SIM 배지]로 옮겨 배양하는 단계, 및
- [0018] 6) 4주 후, 재분화된 국화를 선택하고, 2차 선발배지 [$20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 카나마이신 및 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 세포탁심이 첨가된 발근유도배지(RIM)]로 옮겨 배양하는 단계를 포함하는, 꽃잎 절편체를 이용한 국화의 형질전환 방법을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 형질전환된 국화를 제공한다.
- [0020] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0021] 본 발명에 따른 꽃잎 절편체를 이용한 국화의 형질전환 방법은, 재분화율이 높은 국화의 꽃잎 절편체를 GUS 유전자를 포함하는 아그로박테리움 현탁액에 침지하여 감염시킨 후, 접종된 꽃잎 절편체를 SIM 배지로 옮겨 2일 동안 공동배양한 다음, 꽃잎 절편체를 MS 액체배지에서 세척하고 1차 선발 배지(SIM 배지)로 옮겨 배양한 다음, 4주 후에 재분화된 국화를 선택하고, 2차 선발 배지(발근유도배지, RIM)로 옮겨 배양하여 형질전환시키는 것을 특징으로 한다.
- [0022] 구체적으로는, 국화를 깨끗이 세척하고 70%(v/v) 에탄올 용액으로 20~50초 동안, 1.5%(v/v) 차아염소산나트륨 용액에서 5~15분 동안 표면 소독한 후, 멸균수로 2~5번 세척한다. 소독된 국화로부터 꽃잎을 분리하여 꽃잎을 두 부분으로 절단한다 [말단 부분(위치 1) 및 중간부분(위치 2)]. 꽃잎 절편체를 재분화배지(SIM)에서 2일 동안 사전배양한다. 상기 재분화배지(SIM)는 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA, $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 키네티딘이 첨가된 MS 배지와 3%(w/v) 수크로오스 및 0.8%(w/v) 아가를 포함한다.
- [0023] GUS 유전자를 포함하는 pCambia 2301을 도입한 아그로박테리움속 균주를 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 카나마이신 및 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 리팜피신이 첨가된 YEP 액체 배지(10 g/L 박토펙톤, 10 g/L 효모 추출물, 및 5 g/L NaCl)에서 25~30℃에서 150~200rpm으로 1~2일 동안 진탕 배양한다. 상기 아그로박테리움속 균주는 아그로박테리움 투메파시엔스가 바람

직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0024] 상기 꽃잎 절편체를 GUS 유전자를 포함하는 아그로박테리움 현탁액(0.D. 0.8)에 20~50분 동안, 바람직하게는 30분 동안 침지하여 감염시킨 후, 접종된 꽃잎 절편체를 SIM 배지로 옮겨 1일, 2일, 3일 동안 공동배양한다. 공동배양 기간이 2일에서 재분화율이 가장 높게 나타난다. 따라서, 이 기간을 형질전환의 최적의 공동배양 기간으로 선택한다. 그 다음 꽃잎 절편체를 $250\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 세포탁심이 첨가된 MS 액체배지에서 3~5번 세척하여 아그로박테리움속 균주를 제거한 후, 여과지 위에 놓고 물기를 제거하여 잔여의 아그로박테리움속 균주를 제거한다. 그 다음 1차 선발배지[$7.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 카나마이신 및 $250\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 세포탁심이 첨가된 SIM 배지]로 옮겨 배양한 다음, 4주 후에 재분화된 국화를 선택하고, 2차 선발배지[$20\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 카나마이신 및 $250\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 세포탁심이 첨가된 발근유도배지(RIM)]로 옮겨 배양한다. 상기 발근유도배지(RIM)는 MS 배지, 3%(w/v) 수크로오스 및 0.8%(w/v) 아가를 포함한다.

[0025] 상기 방법으로 형질전환된 국화를 GUS 발색반응 및 PCR 분석 실험을 하여 형질전환 국화의 잎 전체에서 GUS 유전자가 발현됨을 확인하였다. 따라서, 국화의 꽃잎 절편체를 이용하여 국화가 효율적으로 형질전환됨을 알 수 있다.

[0026] 국화는 꽃대가 동시에 올라오고 거의 동시에 개화하므로, 국화의 꽃잎은 유전적으로 거의 동일하다고 생각된다. 또한, 국화는 단일조건 하(8시간 미만)에서 개화되므로 꽃잎 절편체를 1년 내내 이용할 수 있으며, 꽃 수가 많고 꽃 당 15~20개의 꽃잎을 가지므로 꽃잎의 절편체의 수는 줄기나 잎의 절편체의 수보다 더 많다. 또한, 꽃잎 절편체를 2일 동안 배양하고 1주일 지난 후 꽃잎 절편체의 생체중을 측정한 결과 꽃잎 절편체의 생체중이 6.5mg 에서 8.5mg 으로 증가하였는데, 이는 꽃잎 절편체의 절단 부위에 캘러스가 유도되어 꽃잎 자체가 단단해진 것이라고 생각된다. 따라서, 꽃잎 절편체의 취급이 용이할 수 있다. 또한, 국화의 꽃잎 절편체의 재분화율(꽃잎 절편체 당 9.30 신초의 수)이 줄기나 잎의 절편체의 재분화율보다 높다.

[0027] 상기한 바와 같이, 본 발명에 따른 국화의 형질전환 방법은 연중 이용할 수 있고 취급이 용이하며 재분화율이 높은 꽃잎 절편체를 이용함으로써, 국화의 형질전환 효율을 높일 수 있으며 경제적이다. 따라서, 고부가가치의 원예작물을 용이하게 육성할 수 있다.

[0028] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0029] 실시예 1 : 꽃잎 절편체를 이용한 국화의 형질전환

[0030] 1. 국화의 꽃잎 절편체의 사전배양

[0031] 국화를 흐르는 수돗물에 깨끗이 세척한 다음, 70%(v/v) 에탄올 용액으로 30초 동안, 1.5%(v/v) 차아염소산나트륨 용액에서 10분 동안 표면 소독한 후 멸균수로 3번 세척하였다. 소독 후, 국화로부터 꽃잎을 분리하여 무균상태의 꽃잎만 절편체로 사용하였다. 꽃잎을 6mm 길이의 두 부분으로 나누어 절단하였다[말단 부분(위치 1) 및 중간부분(위치 2)]. 그 다음 절단 가장자리가 건조되는 것을 막기 위해 절편체를 즉시 접종하였다. 즉, 신초 재분화를 위해 꽃잎 절편체를 25ml의 재분화배지(SIM, shoot induction medium) [$1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA(indole-3-acetic acid), $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA(6-bentylaminopurine), $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 키네티(6-furfurylaminopurine)이 첨가된 MS 배지 + 3%(w/v) 수크로오스 + 0.8%(w/v) 아가]에서 2일 동안 사전배양하였다. 모든 실험은 암실에서 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 조정하였으며, 16/8h의 명/암 주기로 $45 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 빛에 노출시켰다.

[0032] 2. 형질전환용 아그로박테리움속 균주 및 배양

[0033] 국화의 형질전환을 위해 사용된 아그로박테리움 투메파시엔스 LBA4404 균주는 경상대학교로부터 제공받았다. 형질전환용 벡터로는 GUS 유전자를 포함하는 pCAMBIA 2301(이중벡터 p35SGUS 인트론)을 사용하였다. p35SGUS 인트론은 NOS-조종 네오마이신 포스포트랜스퍼라제(NPT II) 선택 유전자 및 35S-조종 GUS 마커 유전자를 포함한다. 아그로박테리움 투메파시엔스에서 마커 유전자의 발현을 막기 위해, GUS 유전자를 박테리아가 아닌 식물에 의해 제거될 수 있는 식물 인트론에 의해 차단시켰다. GUS 유전자를 포함하는 pCAMBIA 2301을 아그로박테리움 투메파시엔스 LBA4404 균주에 도입한 후, 이를 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 카나마이신 및 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 리팜피신이 첨가된 YEP 액체 배지(10 g/L 박토펙톤, 10 g/L 효모 추출물, 및 5 g/L NaCl)에 넣고 28°C 에서 180rpm으로 1~2일 동안 진탕 배양하였다.

[0034] 본 발명의 형질전환용 벡터인 GUS 유전자를 포함하는 pCAMBIA 2301의 모식도는 도 1에 나타내었다.

[0035] 3. 꽃잎 절편체에 아그로박테리움 투메파시엔스를 접종하여 형질전환 국화의 제조

[0036] 꽃잎 절편체에 아그로박테리움 투메파시엔스를 접종하기 위해, 사전배양된 꽃잎 절편체를 25ml의 GUS 유전자를 포함하는 아그로박테리움 투메파시엔스 현탁액 (O.D. 0.8)에 30분 동안 침지하여 감염시켰다. 과일의 세포 잔류 물을 살균한 필터 종이로 제거한 후, 접종된 꽃잎 절편체를 SIM 배지로 옮기고, 암실에서 2일 동안 공동배양하였다. 공동 배양 후 아그로박테리움 투메파시엔스를 제거하기 위해, 절편체를 $250\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 세포탁심이 첨가된 MS 액체배지에서 5번 세척한 다음 여과지 위에 놓고 물기를 제거하여 잔여의 아그로박테리움속 균주를 제거하였다. 그 다음 1차 선발배지 [$7.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 카나마이신 및 $250\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 세포탁심이 첨가된 SIM 배지]로 옮겨 배양하였다. 4 주 후, 2~3cm 정도 자란 재분화된 국화를 선택하고, 2차 선발 배지 [$20\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 카나마이신 및 $250\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 세포탁심이 첨가된 발근유도배지(RIM; MS 배지 + 3%(w/v) 수크로오스 + 0.8%(w/v) 아가)]로 옮겨 배양하였다.

[0037] 국화의 꽃잎 절편체로부터 형질전환 국화의 재분화 과정을 현미경으로 관찰한 결과는 도 2에 나타내었다[A, 위치 1에서 캘러스 유도; B, 위치 2에서 캘러스 유도; C, 위치 1에서 신초 형성; D, 위치 2에서 신초 형성; E, 1차 선발배지 [$7.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 카나마이신 및 $250\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 세포탁심이 첨가된 SIM 배지]에서 배양하여 성장한 신초; 및 F, 2차 선발배지 [$20\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 카나마이신 및 $250\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 세포탁심이 첨가된 발근유도배지(RIM)]로 옮겨 발근 유도된 국화].

[0038] 도 2에 나타난 바와 같이, 국화의 꽃잎 절편체를 GUS 유전자를 포함하는 아그로박테리움 투메파시엔스와 공동배양한 후 1주 정도에 절단 위치 1 및 2에서 신초가 약하게 형성되었고(A와 B), 2주 정도에 절단 위치 1 및 2에서 신초가 형성됨을 관찰하였다(C 및 D). 또한, 공동배양한 국화의 꽃잎 절편체를 1차 선발배지 [$7.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 카나마이신 및 $250\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 세포탁심이 첨가된 SIM 배지]에서 배양 후 4주째에 신초가 성장되었음을 관찰하였다(E). 또한, 2~3cm 정도 자란 재분화된 국화를 선택하여 2차 선발배지 [$20\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 카나마이신 및 $250\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 세포탁심이 첨가된 발근유도배지(RIM)]로 옮겨 배양한 경우 뿌리와 신초가 잘 발달된 국화를 관찰하였다 (F). 따라서, 국화의 꽃잎 절편체를 이용하여 국화가 효율적으로 형질전환되었음을 알 수 있다.

[0039] 실험예 1 : 공동배양 기간이 국화의 꽃잎 절편체의 신초 형성에 미치는 영향

[0040] 공동배양 기간이 국화의 꽃잎 절편체의 신초 형성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 사전배양된 꽃잎 절편체 [말단 부분(위치 1) 및 중간부분(위치 2)]를 25ml의 GUS 유전자를 포함하는 아그로박테리움 투메파시엔스 현탁액(O.D. 0.8)에 침지하여 30분 동안 감염시킨 후, 접종된 꽃잎 절편체를 SIM 배지로 옮기고, 암실에서 1, 2 및 3일 동안 공동배양하여 절편체의 총 갯수를 세어 재분화율을 확인하였다.

[0041] 결과는 표 1에 나타내었다.

표 1

공동배양 기간 (day)	절단 위치	절편체의 총 갯수	재분화된 절편체의 총 갯수	재분화율 (%)
1	1	125	6.0	4.8
	2	241	10.0	4.1
2	1	113	12.0	10.6
	2	255	30.0	13.3
3	1	115	4.0	3.5
	2	283	6.0	2.1

[0043] 표 1에 나타난 바와 같이, 국화의 꽃잎 절편체와 GUS 유전자를 포함하는 아그로박테리움 투메파시엔스를 2일 동안 공동배양한 경우 재분화율이 가장 높게 나타났다. 특히, 국화의 꽃잎 절편체의 중간부분(위치 2)에서의 재분화율이 말단 부분(위치 1)에서보다 더 높게 나타났다. 따라서, 2일 공동배양기간을 형질전환의 최적기간으로 선

택하였다.

[0044] **실험예 2 : 카나마이신의 농도가 국화의 꽃잎 절편체의 재분화에 미치는 영향**

[0045] 카나마이신의 농도가 국화의 꽃잎 절편체의 재분화에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 하기와 같은 두가지 실험을 수행하였다.

[0046] **1. 신초 형성을 위해 형질전환체의 1차 선발**

[0047] 국화를 흐르는 수돗물에 깨끗이 세척한 다음, 70%(v/v) 에탄올 용액으로 30초 동안, 1.5%(v/v) 차아염소산나트륨 용액에서 10분 동안 표면 소독한 후 멸균수로 3번 세척하였다. 소독 후, 국화로부터 꽃잎을 분리하여 무균상태의 꽃잎만 절편체로 사용하였다. 꽃잎을 6mm 길이의 두 부분으로 나누어 절단하였다[말단 부분(위치 1) 및 중간부분(위치 2)].

[0048] 신초 형성을 위해, 사전실험으로 여러 농도의 카나마이신(0.0, 10.0, 20.0, 25.0, 50.0 또는 100.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)이 첨가된 SIM 배지에서 꽃잎 절편체를 배양하였다. 그 결과, 단지 0.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 카나마이신만이 신초 형성을 보여 주었고, 다른 농도에서는 신초를 형성하지 못하고 갈변하였다. 따라서, 보다 낮은 농도의 카나마이신에서 실험을 수행하였다.

[0049] 형질전환체의 1차 선발을 위하여, 여러 농도의 카나마이신(0.0, 2.5, 5.0, 7.5, 또는 10.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)이 첨가된 SIM 배지에서 꽃잎 절편체를 배양하였다. 카나마이신은 고압멸균하기 전 여과멸균하여 냉각된 배양액에 첨가하였다. 그 다음 꽃잎 절편체를 포함한 페트리 접시를 16시간 동안 광 주기에 노출시켰다. 모든 실험은 3번 반복하였다. 길이 5mm를 초과하는 신초 및 뿌리의 갯수를 4주 후에 기록하였다.

[0050] 결과는 도 3에 나타내었다.

[0051] 도 3에 나타난 바와 같이, 꽃잎 절편체마다 형성되는 신초들은 카나마이신 농도가 증가할수록 감소하였다. 특히, 10.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 카나마이신에서 재분화된 신초는 현저히 감소하였으며, 배양된 지 2주만에 갈변하였다. 따라서, 신초 형성을 위해서 7.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 카나마이신을 선택하였다.

[0052] **2. 발근 형성을 위해 형질전환체의 2차 선발**

[0053] 상기 1에서 배양된 꽃잎 절편체 중 재분화된 국화를 선택하고, 형질전환체의 2차 선발을 위하여 여러 농도의 카나마이신(0.0, 5.0, 10.0, 15.0, 또는 20.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)이 첨가된 MS 배지에서 꽃잎 절편체를 배양하였다.

[0054] 결과는 표 2에 나타내었다.

표 2

[0055] 카나마이신의 농도가 국화의 꽃잎 절편체의 발근 형성에 미치는 영향

카나마이신 농도($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	꽃잎 절편체 당 형성된 발근 갯수	발근 형성율(%)
0.0	3.8 ± 1.9	100.0
5.0	1.0 ± 0.3	57.7
10.0	0.1 ± 0.0	6.0
15.0	0.1 ± 0.0	4.8
20.0	0.0 ± 0.0	0.0

[0056] 표 2에 나타난 바와 같이, 20.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 카나마이신에서 재분화된 신초는 없었으며, 발근 형성율은 0.0%로 발근 형성을 방해함을 알 수 있다. 따라서, 발근 형성을 위해서 20.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 카나마이신을 선택하였다.

[0057] **실험예 3 : GUS 유전자 발현**

[0058] 국화의 꽃잎 절편체로부터 국화가 효율적으로 형질전환되었는지 확인하기 위하여, GUS 발색반응을 수행하였다. GUS 발색반응은 Rueb 및 Hensgens의 방법을 사용하였다[Rueb, S., Hensgens, L.A.M. 1989. Improved histochemical staining for beta-Dglucuronidase activity in monocotyledonous plants. Rice Genetics Newsletter 6: 168]. GUS 유전자 발현을 위하여, 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-글루쿠로나이드(X-Gluc)를 기질로 하여 분석하였다(Jefferson, 1987). 또한, GUS 리포터 유전자를 포함하는 pCAMBIA 2301 플라스미드를 이용하였다. 상기 실시예 1에서 형질전환된 국화 조직들을 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ X-Gluc, 2.0 mM 포타슘 페리시아나이드(potassium ferricyanide) 및 포타슘 페로시아나이드(potassium ferrocyanide), 10mM EDTA(pH 8.0) 및 50mM 인산나트륨 완충액(pH 7.0)으로 이루어진 완충액에서 배양하였다. 반응 혼합물을 하룻밤 동안 배양한 다음, 조직들을 70% 알콜로 세척하고, 조직 내 푸른색-착색이 존재하는지 현미경으로 관찰하였다.

[0059] 결과는 도 4에 나타내었다.

[0060] 도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 형질전환 국화에서는 GUS 유전자가 잎 전체에서 발현된 반면, 비형질전환 국화에서는 GUS 유전자가 발현되지 않았다. 따라서, 국화의 꽃잎 절편체를 이용하여 국화가 효율적으로 형질전환되었음을 알 수 있다.

[0061] 실험예 4 : PCR 분석

[0062] 상기 실시예 1의 형질전환 국화에서 GUS 유전자의 존재를 검출하기 위하여, 0.4g(생체중)의 국화 조직으로부터 식물계놈 DNA를 GeneAll DNA 추출키트(Exprep™ Plasmid SV; GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하여 추출하였다. 분리된 계놈 DNA를 GUS-특이적 PCR을 위한 주형으로 사용하였다. GUS 유전자 프라이머로는 5'-ACCTGCGTCAATGTAATGTTCTGC-3' 및 5'-TCACCGAAGTTCATGCCAGTCCAG-3'를 사용하여 GUS 유전자(예상중폭길이, 461 bp)의 존재를 검출하였다. 두 PCR 반응들은 95℃에서 5분 동안 핫스타트(hot start)하고, 레디 믹스 PCR 반응키트(HiPi PCR 5x Master Mix Kit, elpisbio biotechnology, Taejeon, Korea)를 이용하여 94℃에서 30초 동안 변성화, 60℃에서 30초 동안 어닐링, 72℃에서 40초 동안 신장화를 30번 반복하였다. PCR 산물(461 bp)을 1x TBE (트리스, 붕산, 0.5mM EDTA)에서 1% 아가로스 겔로 전기영동하여 분리하고, EtBr(0.1ml/ml)로 착색하였다. 겔들을 자외선 하에서 시각화하였다.

[0063] 결과는 도 5에 나타내었다.

[0064] 도 5에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 형질전환 국화의 PCR 산물(461 bp) 거의 모두에서 GUS 유전자가 발현됨을 확인하였다.

산업이용 가능성

[0065] 본 발명에 따른 국화의 형질전환 방법은 연중 이용할 수 있고 취급이 용이하며 재분화율이 높은 꽃잎 절편체를 이용함으로써, 국화의 형질전환 효율을 높일 수 있으며 경제적이다. 따라서, 고부가가치의 원예작물을 용이하게 육성할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0066] 도 1은 형질전환용 벡터인 GUS 유전자를 포함하는 pCAMBIA 2301의 모식도를 나타낸 도이다 [RB, 오른쪽 가장자리; 35ST, CaMV 35S의 3' 신호; NPTII, 네오마이신 내성 유전자; 35SP, CaMV 35S 프로모터; GUS, GUS 마커 유전자; Nos T, Nos 종결자; LB, 왼쪽 가장자리].

[0067] 도 2는 국화의 꽃잎 절편체로부터 형질전환 국화의 재분화 과정을 현미경으로 관찰한 도이다 [A, 위치 1에서 캘러스 유도; B, 위치 2에서 캘러스 유도; C, 위치 1에서 신초 형성; D, 위치 2에서 신초 형성; E, 1차 선발배지 [$7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 카나마이신 및 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 세프트락심이 첨가된 SIM 배지]에서 배양하여 성장한 신초; 및 F, 2차 선발배지 [$20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 카나마이신 및 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 세프트락심이 첨가된 발근유도배지(RIM)]로 옮겨 발근 유도된 국화].

[0068] 도 3은 카나마이신의 농도가 국화의 꽃잎 절편체의 신초 형성에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

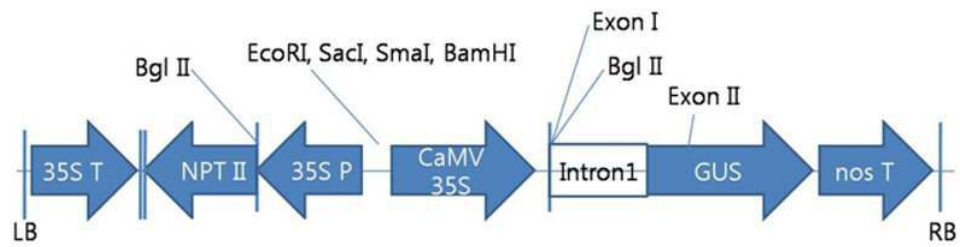
[0069] 도 4는 본 발명에 따른 형질전환 국화에서 GUS 발현 정도를 나타낸 도이다 (A: 본 발명의 형질전환 국화, B: 비형질전환 국화).

[0070] 도 5는 본 발명에 따른 형질전환 국화의 PCR 분석 결과를 나타낸 도이다(P: 플라스미드 벡터 pCAMBIA 2301, W:

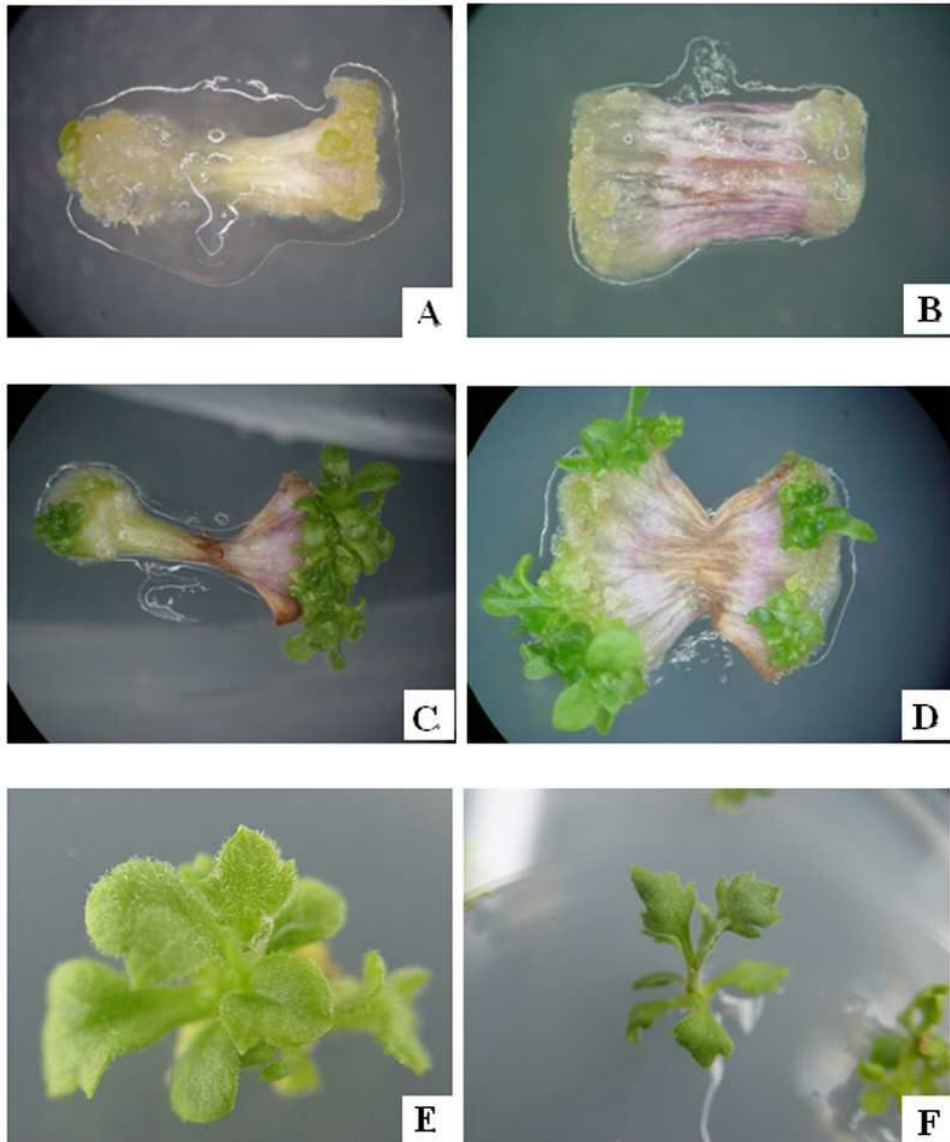
와일드 타입].

도면

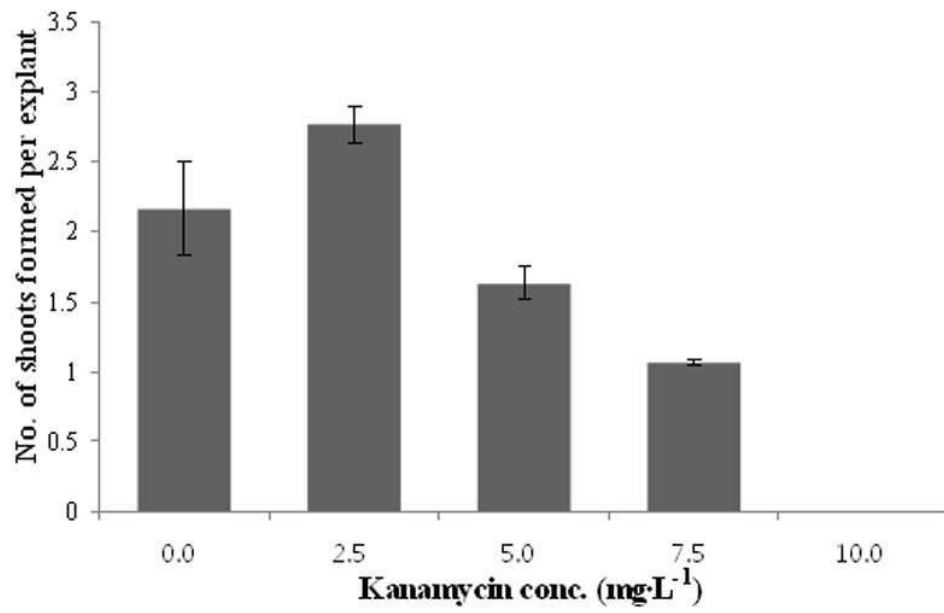
도면1



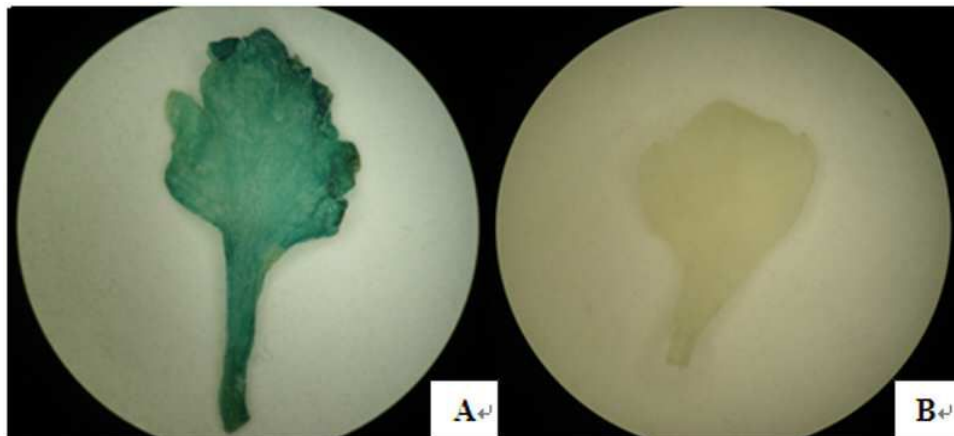
도면2



도면3



도면4



도면5

