

국화 (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) 'Linneker Salmon'에 *Agrobacterium*을 이용한 *Bacillus thuringiensis cry1Ac* 유전자의 형질전환

한봉희^{1*}, 이수영¹, 임진희²
¹원예연구소 원예생명공학과, ²원예연구소 화훼과

Agrobacterium-mediated transformation of *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) 'Linneker Salmon'

Bong Hee Han¹, Su Young Lee¹, and Jin Hee Lim²

¹Horticultural Biotechnology Division, National Horticultural Research Institute, 540-41 Tap-dong, Gwonson-gu, Suwon 441-440, Korea

²Floriculture Division, National Horticultural Research Institute, 540-41 Tap-dong, Gwonson-gu, Suwon 441-440, Korea

ABSTRACT *Cry1Ac* gene was introduced into chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) 'Linneker Salmon' through *Agrobacterium*-mediated gene transformation to develop new lines showing resistance to tobacco cutworm (*Spodoptera litura*). *Cry1Ac* gene was transferred into chrysanthemum by *Agrobacterium* C58C1 containing pCAMBIA2301. After infection of *Agrobacterium* C58C1 with leaf segments, the segments were cultured on regeneration medium (MS + 1.0 mg/L BA + 0.5 mg/L IAA) containing 10 mg/L kanamycin for the first selection, on the same medium containing 20 mg/L kanamycin for the second selection, and on rooting medium (MS basal medium) containing 20 mg/L kanamycin for the third selection. Until the third selection, sixty nine plantlets (1.6%) were survived and rooted. Thirty six ones (0.8%) among them were confirmed as putative transformants with *nptII* gene by *nptII* primer PCR, and 35 (0.8%) of 36 ones as transformants with *nptII* gene and *cry1Ac* gene by Southern analysis. The gene transformation efficiency of *cry1Ac* gene was favorable with 0.8%. The resistance of tobacco cutworm (*Spodoptera litura*) in chrysanthemum transformant introduced *cry1Ac* gene was tested in green house. Three transformants were confirmed to have resistance to tobacco cutworm.

서 론

국화 (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura)는 절화 및 분화로 이용되고 있으며, 세계에서 재배되고 있는 절

화작물중 매우 중요한 작물이고, 한국에서도 장미 다음으로 생산량에서 2위를 차지하고 있는 작물이다. 국화의 많은 특성은 전통적인 육종방법에 의하여 개량되어 왔다. 전통적인 육종방법과 비교하여 분자생물학적 방법은 특수한 형질을 도입하는 대안으로 사용되고 있다. 국화는 삼목 또는 흡지에 의하여 주로 번식하기 때문에 형질전환을 통하여 얻어

*Corresponding author Tel 031-290-6197 Fax 031-290-6219
E-mail: bhhan@rda.go.kr

진 우수한 계통을 유용한 품종으로 쉽게 개발할 수 있다. 지난 10여년 동안 국화의 형질전환은 *Agrobacterium*에 의한 형질전환 기술의 개발에 집중되어 왔다 (Aswath et al. 2004; De Jong et al. 1994; Fukai et al. 1995; Ledger et al. 1991; Renou et al. 1993; Takatsu et al. 1999). 최근에 몇몇 국화 형질전환 연구는 형태적 생리적 변화, 내병성, 내충성 등 도입된 유전자의 형질발현에 초점을 맞추고 있다 (Han et al. 2007; Kubo et al. 2006; Mitiouchkina and Dolgov 2000; Takatsu et al. 1999). 국화에 *Bt* 유전자 및 내병성 유전자의 도입은 형질전환의 어려움 때문에 제한적이었으나 최근에 국화에 효율적이고 안정성 있는 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 체계가 개발되어 많은 연구에서 보고되고 있다 (Aswath et al. 2004; Khodakovskaya et al. 2005; Petty et al. 2003; Takatsu et al. 1999). 국화 재배에서 병충해에 의한 수량의 손실 및 살충 및 살균제의 손실은 심각한 문제이다. Gram-positive 박테리아인 *Bacillus thuringiensis* (*Bt*)는 아포체의 살충성 crystal protein을 생산한다. 이러한 protein을 delta-endotoxin 또는 *Bt*-toxin이라 부르며 나비류, 쌍시류 및 딱정벌레류의 해충에 높은 독성을 띤다 (Shinoyama et al. 2002). 국화에 delta-endotoxin *Bt* 유전자와 같은 해충 저항성 유전의 도입은 포장에 살충제를 살포하는 경제적인 문제를 줄이거나 회피할 수 있는 하나의 대안기술을 제공하고 있다. 최근 *Bt*-toxin을 암호화하고 있는 유전자들이 해충의 피해를 줄이기 위하여 국화에 성공적으로 도입되고 있다 (Shinoyama et al. 2002, 2003). 해충의 피해를 줄이기 위하여 식물 형질전환에 *Bt* 유전자의 사용은 최근 가장 믿을 수 있는 전략으로 고려되고 있으며, *Bt* 유전자의 하나인 *cryIAc* 유전자에 의하여 발현되는 독성은 해충, 특히 나비목 해충의 방제에 널리 사용되고 있으며 (Dandekar 1998), 가장 효과적인 것으로 입증되었다 (Leroy et al. 2000). 본 연구에서는 *Bacillus thuringiensis cryIAc* 유전자를 도입하여 나비목 해충인 담배거세미 나방 (tobacco cutworm; *Spodoptera litura*)에 저항성을 나타내는 국화를 육성하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

식물체 재료, 신초 재분화 및 선발

식물체 재료는 재분화율이 높은 스프레이 국화 (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) 'Lineker Salmon'의 엽절편을 형질전

환 재료로 사용하였다. 국화 모본에서 생육이 왕성한 신초를 채취하여 70% ethyl alcohol에 10초, 1.0% sodium hypochlorite (NaOCl) 용액에서 15분 동안 표면살균한 다음, 멸균수로 3회 세척하여 배양하였다. 신초는 2%의 활성탄이 첨가된 MS 배지 (Murashige and Skoog 1962)에서 배양하였으며 8주 간격으로 계대배양하면서 재료를 채취하였다. 절편체는 8주간 생육한 모식물체 신초의 제 2~3엽을 채취하였으며, 잎을 엽맥을 중심으로 5 mm 정도의 사각으로 잘라 *Agrobacterium*에 접종하였다. 엽절편에서 신초의 재분화는 MS 기본배지에 sucrose 30 g/L, BA 1.0 mg/L 및 IAA 0.5 mg/L가 첨가된 배지를 사용하였다. 접종 후 형질전환체 선발에서 1차 선발은 재분화 배지에 10 mg/L kanamycin과 400 mg/L cefotaxime이 첨가된 배지에서, 2차 선발은 20 mg/L kanamycin과 400 mg/L cefotaxime이 첨가된 배지에서 선발하였으며, 발근은 MS 기본배지에 20 mg/L kanamycin과 400 mg/L cefotaxime이 첨가된 배지에서 수행하였다. 배양은 1차 선발 과정은 암상태에서, 2차선발 및 발근선발은 명상태에서 진행하였으며, 배양은 온도 25±2°C로 조절되는 배양실에서 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 로 조명하면서 배양하였다.

Binary vector, *Agrobacterium* 준비 및 형질전환

유전자는 농업생명공학연구소에서 배추에서 추출한 *cryIAc* 유전자를 형질전환에 이용하였다. *CryIAc* 유전자를 형질전환을 하기 위하여 binary vector pCAMBIA 2301 (CAMBIA, Australia, <http://www.cambia.org>)를 가지고 있는 disarmed *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1을 사용하였다. pCAMBIA 2301 plasmid는 선발 marker로서 neomycin phosphotransferase (*nptII*) 유전자를, 형질전환 유전자로는 *cryIAc* 유전자를, reporter gene으로서는 GUS 유전자를 포함하고 있었다. 이들 유전자는 CaMV 35S promoter와 3'-nos terminator로 조절되고 있었으며, 이 벡터는 직접 형질전환에 의하여 *A. tumefaciens* strain C58C1에 삽입되었다 (그림 1). *A. tumefaciens* strain C58C1 균주는 50 mg/l kanamycin과 100 mg/L rifampicin이 첨가된 5 mL의 YEP 액체배지 (10 g/l peptone, 10 g/l yeast extract, 5 g/L NaCl, pH 7.5)에 접종하여 28°C에서 220 rpm으로 진탕 배양하면서 O.D₆₆₀ 0.5-1.0가 되도록 약 16시간 배양하였다. 동일 배양체 1.0 mL를 채취하여 동일배지에 O.D₆₆₀ 0.5-1.0가 되도록 동일조건에서 재배양하였다. 배양액을 6,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액을 버리고 acetosyringone

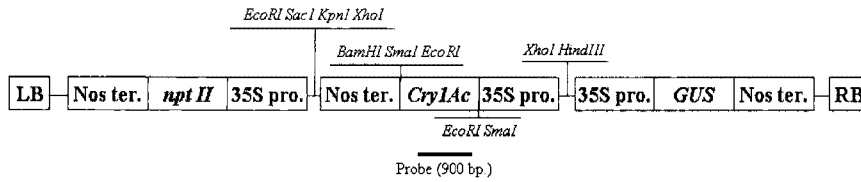


Figure 1. A linear map of pCambia 2301 with *cry1Ac* gene and *nptII* gene used for plant transformation.

(3',5'-dimethoxy-4'- hydroxyacetophenone) 100 μ M이 첨가된 MS 액체배지와 혼합하여 spectrophotometer를 이용하여 *Agrobacterium*의 농도가 O.D₆₆₀ 0.8~1.0이 되도록 조절하였다.엽 절편체 (5 mm × 5 mm)를 MS배지에 있는 *Agrobacterium* 배양체와 10분간 접촉한 다음, 멸균된 filter paper에서 여분의 *Agrobacterium*을 제거한 후 재분화 배지 (MA + 1.0 mg/L BA + 0.5 mg/L IAA)로 이식하였다. 재분화 배지로 이식된 절편체는 25°C에서 3일간 암배양한 다음, 멸균수로 세척한 후 kanamycin 10 mg/L와 cefotaxime 400 mg/L가 첨가된 재분화 배지로 이식하여 암배양 하였다. 배양 8주 후 재분화된 싌초를 kanamycin 20 mg/L와 cefotaxime 400 mg/L가 첨가된 배지에 이식하여 2차 선발을 하였으며, 배양 4주 후 2차 선발배지에서 생존한 개체는 kanamycin 20 mg/L와 cefotaxime 400 mg/L가 첨가된 MS 배지에 이식하여 발근시켰다. 발근된 개체는 putative 형질전환체로 유전자 분석을 위하여 2 g/L의 활성탄이 첨가된 MS 배지에서 유지하였다.

형질전환체의 *nptII* 및 transgene primer PCR 및 Southern blot 분석

유전자 삽입여부를 확인하기 위하여 선발된 식물체와 대조구 식물체 (비형질전환체)에서 *nptII* 유전자에 대한 PCR 분석을 실시하였다. *NptII* 및 transgene primer PCR과 Southern blot 분석을 위한 genomic DNA는 DNeasy plant mini kit (Qiagen, Germany)을 이용하여 제조회사의 지침에 따라 기내에서 성장한 식물체 엽에서 추출하였다. *NptII*를 증폭하기 위한 primer는 forward primer (5' GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG 3')와 reverse primer (5' ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA 3')를 사용하였다. PCR 혼용액은 template DNA 100 ng, dNTP 200 μ M, primer 10 pmoles, *Taq* DNA polymerase 2U 등의 조성으로 총 반응액을 50 μ L로 하였으며, pre-denaturation 단계는 95°C에서 5분간, denaturation 단계는 95°C에서 1분간, annealing 단계는 55°C에서 1분간, polymerization 단계는 72°C에서 1분간 (30 cycles), 그리고 extention 단계는 72°C에서 7분간으로 Icyclor System (Bio-

RAD)을 이용하여 수행하였다. Transgene의 도입여부를 확인하기 위하여 *cry1Ac* transgene primer는 forward primer (5' TGG GCA AAG ATG GGG GAT TC 3')와 reverse primer (5' CAC GGC AGG GAT TTG AGT GTA 3')를 사용하였다. PCR 분석에 의하여 *nptII* 유전자와 transgene이 삽입되었다고 확인된 putative 형질전환체에 대하여 Southern 분석을 실시하였다. Southern 분석을 위하여 genomic DNA의 추출은 앞에서 언급한대로 추출하였으며, 20 μ g의 genomic DNA를 제한효소 *HindIII* (80 unit)을 사용하여 절단한 후 0.7% agarose gel에서 전기영동하였다. Gel을 0.2 N HCl에 10분간 처리후 변성화 용액과 중성화 용액에 각 45분간 처리하여 nylon membrane (Hybond™-N+, Amersham)에 upward capillary 방식을 이용하여 DNA를 전이시켰다. 전이가 완료된 후, UV-cross linker를 이용하여 1200 mJ/cm²의 UV를 조사하여 DNA를 membrane에 고정시켰다. Membrane을 3시간 이상 pre-hybridization 시킨 후 표지된 probe DNA와 18-20시간 동안 65°C에서 혼성화 반응을 수행하였다. Probe DNA는 Rediprime™II labeling system (Amersham-pharmacia)을 이용하여 제조회사의 지침에 따라 [α -³²P] dCTP로 표지하였다. 반응 후 membrane을 65°C에서 2x SSC, 0.1% SDS용액으로 10분, 1x SSC, 0.1% SDS용액으로 15분 세척한 후, 상온에서 0.2x SSC, 0.1% SDS 용액으로 5분, 0.2x SSC용액으로 1분간 세척한 후 -70°C에서 3-4일간 x-ray film에 노출시켜 확인하였다.

RNA 추출, cDNA 합성 및 real-time PCR

총 RNA는 RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)로 제조회사의 지침에 따라 기내에서 생육중인 100 mg의 국화 잎 으로부터 추출하였다. 첫 번째 strand cDNA는 PrimeScript™ 1st strand cDNA synthesis kit (TAKARA, Japan)로 제조회사의 지침에 따라 DNase I (Promega, USA)를 처리한 1 μ g의 총 RNA에서 합성하였다. Primer들은 program primer3 (Rozen and Skaletsky 2000)를 사용하여 제작하였다. *Cry1Ac* 유전자의 primer sequence는 forward, 5'-AAGAGTTCGCCAGGAACCAG-3'와 reverse, 5'-TGCGAACAAATGGGATAGCTG-3'로 합성하

였다. 국화 actin cDNA (GenBank accession no. AB205087)는 RT-PCR에 의하여 확인하였으며, 계속 대조구로 사용하였다. 국화 actin에 대한 primer sequence는 forward, 5'-ACATGCTATCTTGCGTTTGG-3'와 reverse, 5'-CTCTCACAATTTCCCGTTCA-3'로 합성하였다. 비형질전환체 식물체를 선택하여 도입 유전자의 1x 발현을 나타내도록 표시하였다. 두 단계로 PCR이 수행되었다. 첫 번째 strand cDNA는 분리된 reverse 전사 (RT) 단계에서 합성되었다. Strand cDNA는 RT buffer system의 억제효과를 줄이기 위하여 1/10으로 희석하였다. Real-time PCR은 MJ MINI OPTICON (BioRad, USA)를 사용하여 수행하였다. 증폭반응은 총량 20 ul에 10 ul의 2x DyNamo SYBR Green PCR Master Mix (FINNZYMES, Finland), 2 ul의 primer (최종 500 nM), 2ul의 cDNA를 혼합하여 최초 95°C에서 10분간 반응시키고, 95°C에서 30초와 57°C에서 30초, 72°C에서 30초간의 cycle을 40회하여 최종 72°C에서 10분간 증폭시켜 각 sample 당 2회 반복으로 실시했다. 각 유전자의 상대적 발현량 분석을 위하여 2 (T) (-Delta Delta C) 방법 (Livak and Schmittgen 2001)를 사용하였다.

형질전환체 포장검정

Southern blot 분석결과 *cry1Ac* gene의 삽입이 확인된 개체를 기내에서 계통별로 10개씩 증식한 다음, 그중 7개를 순화하였다. 순화용토는 vermiculite 1 : perlite 1이 혼용된 인공용토를 사용하였으며, 6주간 순화하여 배양토 (부식토 40% + 발효 60%)가 담긴 직경 30 cm 화분에 정식하여 온실에서 재배하였다. *Cry1Ac* 유전자가 형질전환된 식물체는 초장이 약 30 cm 정도 되었을 때, 담배겨세미 나방 (*tabacco cutworm*; *Spodoptera litura*)의 유충 (2령~3령)을 개체별로 5마리씩 접종하여 2반복하였으며 접종 1주일 후에 가해 정도를 조사하였다. 조사방법으로는 개체에 생존한 유충수와 유충이 가해한 국화의 패해정도를 조사하였다. 패해정도에 따라 정도가 심한 것은 50% 가해, 중간 것은 30% 가해, 경미한 것은 10% 가해한 것으로 계산하였다.

결과 및 고찰

Cry1Ac 유전자가 발현하는 형질전환 국화의 생산

Cry1Ac 유전자를 형질전환하기 위하여 총 5,091 엽절편체가 실험에 사용되었다. 균주접종 후 엽절편체를 10 mg/L

kanamycin이 함유된 재분화 배지 (MS + 1.0 mg/L BA + 0.5 mg/L IAA)에서 1차 선발을 하였고, 재분화 배지에 20 mg/L kanamycin이 첨가된 배지에서 2차 선발을 하였으며, 20 mg/L kanamycin이 첨가된 MS 배지에서 발근시켜 3차 선발을 하였다. 3차 발근선발까지 vector control과 *cry1Ac* 유전자가 삽입된 construction에서 69개의 신초가 생존하여 발근하였다. *NptII* primer로 PCR을 한 결과 그중 36개의 신초가 putative transformant로 확인되었고 (그림 2), Southern 분석을 한 결과, 35개체가 *nptII* 유전자와 *cry1Ac* 유전자를 가진 형질전환체로 확인되었다 (그림 3). *Cry1Ac* 유전자의 형질전환율은 0.8%로 양호하였다 (표 1). Yepes 등 (1999)은 국화 'Polaris'와 'Golden Polaris'에 tospovirus의 nucleocapsid protein gene을 도입하는데 효율적인 방법을 찾고자 *Agrobacterium* 및 유

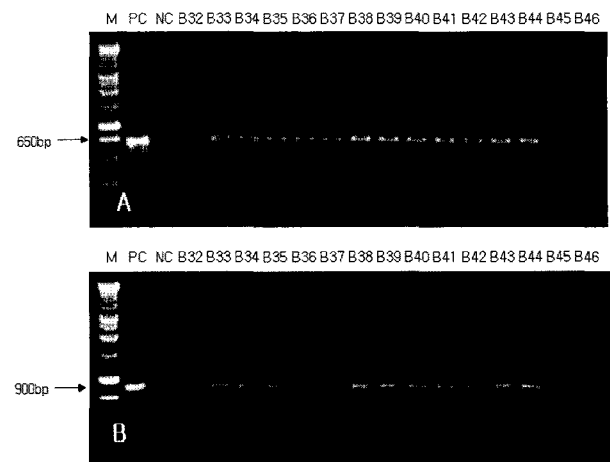


Figure 2. Electrophoregramme of amplified fragments from *nptII* (A) and *cry1Ac* gene primer (B). Putative transformed plants was infected with C58C1 containing *cry1Ac* gene (M: Lamda-*HindIII* digested marker DNA, PC: pCambia 2301 vector DNA, NC: non-transformed plant, B32-B46: putative transgenic plants).

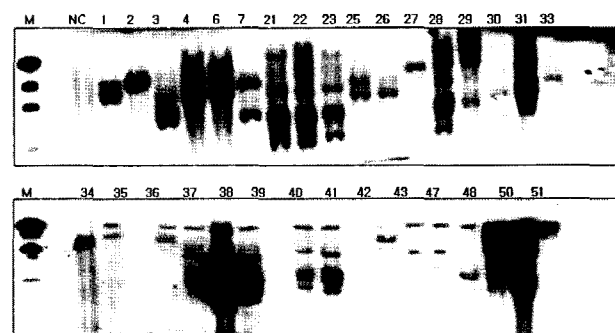


Figure 3. Results of Southern blot analysis of transgenic plants carrying a putative *cry1Ac* homologous fragments. Among 36 putative transgenic plants by *nptII* primer PCR analysis, 35 plants were confirmed to have the insertion of *cry1Ac* gene (M: size marker, NC: negative control).

Table 1 The frequency of transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*) 'Lineker salmon' plants by *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1 harboring binary vector pCAMBIA 2301.

Gene construction	No. of explants (A)	No. of shoots survived on the 3rd selection medium ² (B)	No. of transgenic shoots by PCR analysis to <i>npt II</i> (C)	No. of transgenic shoots by Southern analysis (D)	Efficiency (%)		
					(B/A)	(C/A)	(D/A)
Host control	374	0	0	0	0	0	0
Vector control	436	7	3	0	1.6	0.7	0
<i>Cry1Ac</i>	4,281	62	36	35	1.4	0.8	0.8

²MS medium was containing 400 mg/L cefortaxime, and 20 mg/L kanamycin.

전자총을 이용한 연구에서 선발 후의 escape를 줄이는데 kanamycin의 단계적인 농도의 적용이 효과적이었다는 결과를 보고하였다. Takatsu 등 (1998, 1999)이 국화의 줄기와 잎을 *Agrobacterium*과 공동배양 후, 선발을 위한 kanamycin 농도는 7.5~10 mg/L가 효과적이었다고 하였고, Han 등 (2003)은 국화 'Shuho-no-chikara'의 형질전환에서 잎 절편체를 *Agrobacterium*과 공동배양 후 선발을 위한 kanamycin 적정 농도는 1차 10 mg/L, 2차 20 mg/L이었다고 보고한 바 있다. 또한 Boase 등 (1998)이 국화 'Peach Margaret'에 leaf color (*Lc*) gene을 도입하기 위하여 잎 절편체를 *Agrobacterium*과 공동배양 후 kanamycin 20 mg/L가 포함된 발근배지에서 식물체를 발근하였다고 보고하였다. 본 실험에서도 kanamycin 선발농도를 1차에서는 10 mg/L, 2차는 20 mg/L, 발근선발에서 20 mg/L를 사용하였다. 또한 국화의 형질전환에서 1차, 2차 선발을 한 후, 발근배지에서 완전한 식물체를 만들어 선발하는 방법을 사용하면 escape를 줄일 수 있다고 하였다 (Ledger et al. 1991). 본 실험에서도 1차, 2차 선발을 한 후 발근선발 과정을 거침으로써 escape를 많이 줄일 수 있었다. 국화는 kanamycin에 매우 민감하여 품종에 따라 다르지만 보통 10~50 mg/L를 선발배지에 첨가한다. 그러나 유전자 전환되지 않은 신초가 많이 얻어져 escape가 심하다고 알려져 있다 (Ledger et al. 1991; Fukai et al. 1995; Takatsu 1999). Takatsu 등 (1999)도 국화가 kanamycin에 매우 민감하여 10 mg/L를 사용하였는데 선발신초 중 85.8%의 escape가 발생하였다고 하였다. 본 실험에서도 1차 선발된 신초가 2차 선발에서는 많이 고사하는 경향을 보였고, *nptII*에 대한 PCR 과정에서 escape가 많이 발생하였다 (표 1).

Transgene primer PCR에 의한 형질전환체 확인

3차 선발배지에서 선발된 62개체로부터 DNA를 추출하여

nptII primer로 PCR을 이용하여 kanamycin 저항성 유전자인 *nptII* 유전자가 확인된 개체 36개체를 선발하였다. 선발된 36개체는 다시 transgene을 증폭하도록 제작된 primer를 이용하여 PCR한 결과 35개의 개체에서 purified pCAMBIA2301 (positive control)과 같은 크기의 900 bp에서 밴드가 형성되었다 (그림 2). 이는 형질전환체에서 추출된 DNA 안에 *cry1Ac* 유전자가 존재한다는 것을 확인해 주는 결과로 *cry1Ac* 유전자가 국화에 도입되었다는 것을 의미한다. 종자번식 식물체의 형질전환에서는 후대의 분리 때문에 Southern 분석을 하여 도입된 유전자의 copy수를 확인하는 것이 매우 중요한데, 영양번식 작물에서는 transgene PCR에서 유전자가 도입되었다고 확인된 개체는 Northern 분석이나 RT-PCR에 의하여 발현을 분석하고 포장검정을 하는 것이 도입된 유전자의 발현을 보는 데는 더 효과적이라 생각된다.

Real-time PCR 및 형질전환체 포장검정

Southern blot 분석결과 *cry1Ac* gene의 삽입이 확인된 개체를 기내에서 계통별로 7개씩 순화하였다. *Cry1Ac* 유전자가 형질전환된 식물체를 real-time PCR로 *cry1Ac* 유전자의 단백질 발현량을 측정하였다. 형질전환된 식물체 대부분에서 *cry1Ac* 유전자의 단백질 발현이 대조구보다 낮았으나, 형질전환체 B-3, B-21, B-53 식물체는 단백질 발현량이 대조구보다 월등히 높았다 (그림 4). 또한 *cry1Ac* 유전자가 형질전환된 식물체는 초장이 약 30 cm 정도 되었을 때, 담배겨세미나방의 유충 (2령~3령)을 개체별로 5마리씩 접종하였고 접종 1주 후에 가해 정도를 조사하였다. 형질전환 식물체 35개체 중 유충의 생존율, 피해엽율, 피해엽수가 적은 계통 3계통을 선발하였다 (표 2). *Cry1Ac* 형질전환체 대부분에서 도입형질이 발현되지 않았으며, 3계통에서만 도입유전자의 형질이 발현하였다.

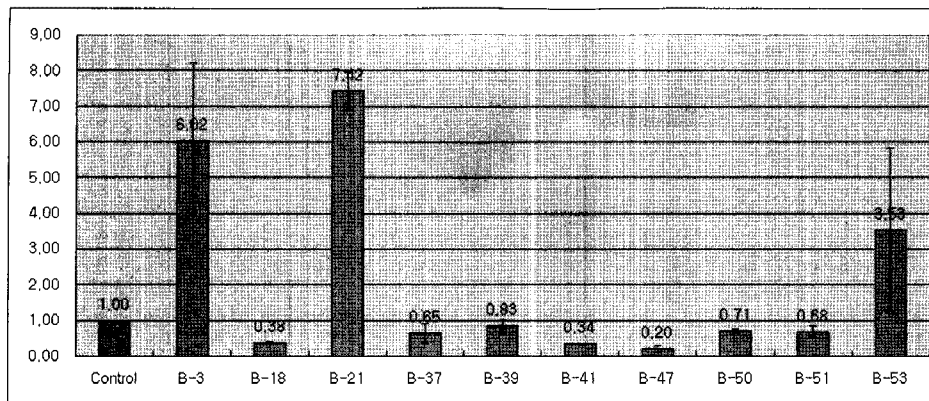


Figure 4. Expression of *cryIac* genes in chrysanthemum 'Linneker Salmon'. Quantitative real-time RT-PCR analysis was performed twice using primers specific to *cryIac* gene, and the expression levels were normalized against actin levels; mean values \pm SE are shown.

Table 2. Resistance of chrysanthemum cv. Linneker Salmon introduced *cryIac* gene to tobacco cutworm (*Spodoptera litura*)

Gene transgenic line	Larva survival (%)	The rate of damaged leaves (%)	No. of damaged leaves
Linneker Salmon (Contra)	83.3 \pm 11.8	20.6 \pm 5.7	1.9 \pm 0.5
B-3	0.0	11.5 \pm 3.7	0.7 \pm 0.4
B-21	0.0	8.8 \pm 2.8	1.0 \pm 0.4
B-37	16.7 \pm 11.7	21.8 \pm 2.1	1.8 \pm 0.3
B-50	36.7 \pm 2.4	8.0 \pm 1.8	0.9 \pm 0.2
B-53	0.0	6.0 \pm 1.4	0.6 \pm 0.2

적 요

국화에 담배거세미 나방 (tobacco cutworm; *Spodoptera litura*)에 저항성을 나타내 국화를 육성하기 위하여 *cryIac* 유전자를 형질전환하였다. *CryIac* 유전자는 pCAMBIA2301를 포함하는 *Agrobacterium* C58C1을 통하여 국화 'Linneker salmon'에 도입하였다. *Agrobacterium* C58C1을 접종한 후 엽절편을 10 mg/L kanamycin이 함유된 재분화 배지 (MS + 1.0 mg/L BA + 0.5 mg/L IAA)에서 1차 선발을 하였고, 재분화 배지에 20 mg/L kanamycin이 첨가된 배지에서 2차 선발을 하였으며, 20 mg/L kanamycin이 첨가된 MS 배지에서 3차 발근선발을 하였다. 3차 발근선발까지 69개의 신태 (1.6%)가 생존하여 발근하였다. *NptII* primer로 PCR을 한 결과 그 중 36개의 신태 (0.8%)가 putative transformant로 확인되었고, Southern 분석을 한 결과, 35개체 (0.8%)가 *nptII* 유전자와 *cryIac* 유전자를 가진 형질전환체로 확인되었다. *CryIac* 유전자의 형질전환율은 0.8%로 양호하였다. 온실에서 담배거세미 나방에 대한 저항성을 검정한 결과, 3개체의 형질전환체가 저항성을 나타내는 것으로 확인되었다.

인용문헌

- Aswath CR, Mo SY, Kim SH, Kim DH (2004) IbMADS4 regulates the vegetative shoot development in transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* (Ramat.) Kitamura). *Plant Sci* 166: 847-854
- Boase MR, Bradley JM, Borst NK (1998) Genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* of florists' chrysanthemum (*Dendranthema* \times *Grandiflorum*) cultivar 'Peach Margaret'. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 34: 46-51
- Dandekar AM, McGranahan GH, Vail PV, Uratsu, SL, Leslie CA, Tebbets JS (1998) High levels of expression of full-length *cryIA* (*c*) gene from *Bacillus thuringiensis* in transgenic somatic walnut embryos. *Plant Sci* 131: 181-193
- De Jong J, Mertens MMJ, Rademaker W (1994) Stable expression of the GUS reporter gene in chrysanthemum depends on binary plasmid T-DNA. *Plant Cell Rep* 14: 59-64
- Fukai S, De Jong J, Rademaker W (1995) Efficient genetic transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) using stem segments. *Breeding Sci* 45: 179-184

- 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* × *grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) "Shuho-no-chikara". *Sci Hort* 115: 70-75
- Han BH, Yae BW, Yi SY, Lee SY, Shin HK (2003) Introduction of *LEAFY* gene to chrysanthemum (*Dendranthema* × *grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) 'Shuho-no-chikara' mediated *Agrobacterium* LBA4404. *Korean J. Biotechnology* 30: 335-339
- Khodakovskaya M, Li1 Y, Li1 J, Vankova R, Malbeck J, McAvoy1 R (2005) Effects of cor15a-IPT gene expression on leaf senescence in transgenic *Petunia x hybrida* and *Dendranthema* × *grandi.orum*. *Journal of Experimental Botany* 56: 1165-1175
- Kubo T, Tsuru M, Tsukimori A, Shizukawa Y, Takemoto T, Inaba K, Shiozaki S (2006) Morphological and physiological changes in transgenic chrysanthemum morifolium Ramat. "Ogura-nishiki" with *rolC*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 75: 312-317
- Ledger SE, Deroles SC, Given NK (1991) Regeneration and *agrobacterium* mediated transformation of chrysanthemum. *Plant Cell Rep* 10: 195-199
- Leroy T, Henry AM, Royer M, Altosaar I, Frutos R, Duri, D, Philippe R (2000) Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene for resistance to leaf miner. *Plant Cell Rep* 19: 382-389
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-T} (-Delta Delta C) method. *Methods* 25: 402-408
- Mitiouchkina TY, Dolgov SV (2000) Modification of chrysanthemum plant and flower architecture by *rol C* gene from *Agrobacterium rhizogenes* induction. *Acta Hort* 508: 163-169
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-49
- Petty LM, Harberd NP, Carre IA, Thomas BT, 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 Sci* 164: 175-182
- Renou JP, Brochard P, Jalouzot R (1993) Recovery of transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) after hygromycin resistance selection. *Plant Sci* 89: 185-197
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132: 365-386
- Shinoyama H, Komano M, Nomura Y, Nagai T (2002) Introduction of delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* to chrysanthemum (*Dendranthema* × *grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) for insect resistance. *Breeding Sci* 52: 43-50
- Shinoyama H, Mochizuki A, Komano M, Nomura Y, Nagai T (2003) Insect resistance in transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) by the introduction of a modified δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Breeding Sci* 53: 359-367
- Takatsu Y, Nishizawa Y, Hibi T, Akutsu T (1999) Transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Sci Hort* 82: 113-123
- Takatsu Y, Tomotsune H, Kasumi M, Sakuma F (1998) Difference in adventitious shoot regeneration capacity among Japanese chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) cultivar and the improved protocol for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *J Japan Soc Hort Sci* 67: 958-964
- Yepes LM, Mittak V, Pang SJ, Gonsalves D, Slightom JL (1999) *Agrobacterium tumefaciens* versus biolistic-mediated transformation of the chrysanthemum cv. 'Polaris' and 'Golden Polaris' with nucleocapsid protein genes of three tospovirus species. *Acta. Hort* 482: 209-218

(접수일자 2008년 6월 11일, 수리일자 2008년 6월 25일)