

무측지성 국화 형질전환 계통 영양번식 제2세대의 형태적 및 분자생물학적 특성

이수영 · 김정호 · 천경성 · 이은경 · 김원희 · 권오현 · 이해진

Phenotypic and molecular characteristics of second clone (T_0V_2) plants of the LeLs-antisense gene-transgenic chrysanthemum line exhibiting non-branching

Su Young Lee · Jeong-Ho Kim · Kyeong-Seong Cheon · Eun Kyung Lee · Won Hee Kim · O Hyeon Kwon · Hye Jin Lee

Received: 17 October 2013 / Accepted: 2 November 2013

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract This study examined the phenotypic and molecular characteristics of the 2nd clone (T_0V_2) plants of LeLs-antisense gene-transgenic chrysanthemum line (LeLs80) that exhibited non-branching, proving the relevance of these characteristics as a factor for use in environmental risk assessment. Results of the Southern blot analysis showed that three copies of the LeLs-antisense gene were introduced into the transgenic line, and northern analysis showed that the transcribed gene was normally expressed in the transgenic line. A flanking T-DNA sequencing method was used to determine that sequences of 184 and 464 bps flanked the LeLs-antisense gene in the transgenic line. These sequences, respectively, matched the 35S promoter for expression of the *npt II* gene and the NOS terminator for expression of the LeLs-antisense gene within the pCAMBIA 2300 vector.

Keywords Characteristics, Chrysanthemum, LeLs-antisense gene, Molecular, Non-branching, Phenotypic, Transgenic

서론

스탠다드형 절화 국화에 있어서 무측지성은 농가 경영비를 절감시킬 수 있는 특성으로 절화용 신품종 개발의 중요한 육종 목표이다. 국화를 포함한 화훼작물의 신품종

육종의 주요 기술인 교잡육종 기술을 이용하여 국립원예특작과학원에서도 1999년과 2000년에 무측지성 특성을 가진 ‘금오’ 및 ‘용마’ 품종을 개발한 바 있으나 대중적인 인기를 얻지 못하였고, 이후에는 현재까지 무측지성 품종이 개발된 바 없다. 이는 국화 같은 영양번식성 작물에 있어서 신품종을 육성하기 위하여 교잡육종기술을 적용할 경우 교잡후대로 전이되기를 원하는 교배모본의 특성만을 전이시키는 것이 거의 불가능하기 때문이다. 이러한 교잡육종 기술의 단점을 보완할 수 있는 기술인 형질전환 기술을 이용하여 기존 품종의 특성이 보완된 새로운 품종을 개발하고자 하는 노력들이 이루어지고 있다. 2000년 이전에는 *Agrobacterium*에 의한 국화 형질전환 기술 개발 자체에 집중되어 왔으나(Takatsu et al. 1999; Mitiouchkina and Dolgov 2000), 최근에는 내병성(Kim et al. 2011b), 내충성(Kim et al. 2011a), 무측지성(Han et al. 2007; Hur et al. 2013; Khodakovskaya et al. 2009), 응성불임성(Shinoyama et al. 2012), 왜화성(Kubo et al. 2006), 조기개화성(Han et al. 2009; Khodakovskaya et al. 2009; Lee et al. 2012; Shulga et al. 2011) 등의 특성이 개선된 형질전환체를 개발하고자 유전자를 도입한 후 획득된 형질전환체에서 도입 유전자의 발현 연구 및 상업화를 위한 환경위해성 평가 연구(Shinoyama et al. 2008)까지도 진행되고 있다. 본 연구팀에서도 2009년에 Schumacher 등(1999)이 식물조절단백질 VHII family에 속하며, 그 mutant 유전자 lateral suppressor (*ls*)가 토마토에서 측아 생장점 발생을 억제하는 기능을 한다고 보고한 *ls* 유전자의 역방향 유전자 LeLs-antisense를 도입하여 비형질전환체에 비하여 측지가 64.4~70.0% 덜 발생하는 국화 ‘신마’ 유래 LeLs52 등 무측지성 형질전환 5계통을 선발한 바 있다. 그러나 2010년도에 이 형

S. Y. Lee (✉) · J. H. Kim · K. S. Cheon · E. K. Lee
W. H. Kim · O. H. Kwon · H. J. Lee
국립원예특작과학원
(National Institute of Horticultural and Herbal Science, 30,
Subong-ro, Gwonseon-gu, Suwon, 441-440, Korea)
e-mail: lsy8542224@korea.kr

질 전환 5계통의 영양번식 제1세대(T₀V₁)에서의 무측지성을 조사해 본 결과, LeLs80 1계통만이 무측지성이 유지되는 것을 확인하였다(Hur et al. 2013). 이에 본 연구에서는 형질전환 세대(T₀V₀)에서와 같이 영양번식 제1세대(T₀V₁)에서도 무측지성 특성을 유지한 국화 무측지성 형질전환 계통 LeLs80의 영양번식 제2세대(T₀V₂)에서의 형태적 특성을 조사하고, T₀V₀에서 확인하지 못했던 분자생물학적 특성을 분석하여 환경위해성평가 연구 대상인 형질전환 이벤트로서의 자격을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

시험재료

토마토유래 측아발생 유전자(Genebank accession No. 001247250)가 pCAMBIA2300벡터에 역방향으로 삽입되어 있는 *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 균주 감염을 통해 국화 ‘신마’로 도입되어 무측지성을 보이는 형질전환 계통 LeLs80의 T₀V₂ 식물체를 사용하였다.

형태적 특성 조사

무가온 유리 온실에서 월동된 무측지성 형질전환 계통 LeLs80의 T₀V₁ 식물체로부터 삽수를 채취하여 2011년 7월 13일에 삽목한 후 8월 10일 토양에 정식하였고, 자연 조건으로 재배한 후 2011년 8월 10일에 초장 및 측지수 등 형태적 특성을 10개체씩 2반복 조사하였다.

Southern 분석

Genomic DNA는 DNeasy plant mini kit (Qiagen Co., USA)을 이용하여 제조회사의 지침에 따라 기내에서 성장한 무측지성 국화 형질전환 계통 LeLs80의 T₀V₂ 식물체와 대조 식물체 앞에서 추출하였다. 50 ug의 genomic DNA를 *EcoRI* 100 unit로 처리한 후 TBE buffer (45 mM Tris-borate, 45 mM boric acid, 1 mM EDTA (pH 8.0)가 포함된 1.0% agarose gel 상에서 17시간 동안 전기영동하였다. Upward capillary 방식을 이용하여 agarose gel상에 전개된 DNA단편들을 nylon membrane (Hybond™-N+, GEhealthcare Co. UK)으로 전이시키기 위해 전기영동된 agarose gel을 0.2N HCl 10분, 변성화 용액 45분, 중성화 용액 30분 처리하였다. 전이가 완료된 후, UV-cross linker (CL-1000, UVP Co. USA)를 이용한 1,200 mJ/cm²의 UV 조사를 통해 DNA 단편들이 membrane에 고정되도록 하였다. 65°C에서 12시간 pre-hybridization 후 탐침 DNA와 65°C에서 18~20시간 동안 혼성화 반응을 수행하였다. 탐침 DNA는 Rediprime™II labeling system

(GEhealthcare Co. UK)을 이용하여 제조회사의 지침에 따라 [α -³²P] dCTP로 표지하였다. Membrane을 65°C에서 2X SSC, 0.1% SDS용액으로 10분, 1X SSC, 0.1% SDS용액으로 15분간 세척한 후, 다시 상온에서 0.2X SSC, 0.1% SDS용액으로 5씩 2회, 0.2X SSC용액으로 5분간 세척한 후 표지 인식을 위해서 Bio-Imaging analyzer (BAS-1800II, FUJIFILM Co. Japan)를 이용하여 확인하였다.

Northern 분석

RNA는 Trizol (Invitrogen Co. USA)을 이용하여 무측지성 국화 형질전환 계통 LeLs80 T₀V₂ 식물체와 대조 식물체 잎으로부터 추출하였다. RNA농도는 NanoVue (GE healthcare Co. UK)로 측정하였고, 30 ug의 RNA를 1X MOPS buffer와 6.3% (w/v) formaldehyde가 포함된 1% (w/v) agarose gel에서 100 V로 1시간 전개시킨 후, nylon Hybond™-N+ membrane (GEhealthcare Co. UK)에 capillary transfer 방법으로 blotting 하였다. 30 ng의 LeLs-antisense 유전자로부터 증폭시킨 PCR 산물 DNA를 RedyprimeII™ Random Prime labeling System (GEhealthcare Co. UK)을 이용하여 labeling하여 탐침으로 사용하였다. Hybridization과 blot 세척 및 표지인식은 Southern 분석 방법과 동일하게 수행하였다.

도입 목표유전자 주변 염기서열 분석

Flanking T-DNA sequencing법(Fig. 1)을 이용하여 무측지성 국화 형질전환 계통 LeLs80의 T₀V₂ 식물체 genome내 LeLs-

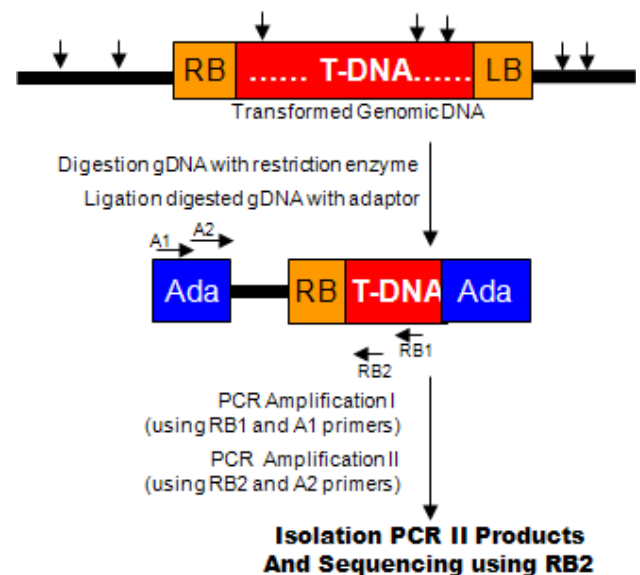


Fig. 1 Representation of the flanking T-DNA sequencing method used to analyze sequences flanking the LeLs-antisense gene in the genome of the 2nd clone (T₀V₂) plants of the LeLs-antisense gene-transgenic chrysanthemum line (LeLs80)

antisense 유전자 주변의 염기서열을 분석하였다. Southern 분석과 같은 방법으로 추출한 genomic DNA 500 ng을 제한효소 *Msp* I 2 U, *Hae*III 2 U, T4 DNA ligase (Takara, Japan) 5 U, adaptor 50 pmol 등과 섞어 만든 반응 용액 20 μ L를 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 처리하였다. 반응 용액에 T-DNA와 adapter 특이 primer를 섞어 PTC-200 thermal cycler (MJ research, USA)을 이용하여 PCR 반응을 두 번에 걸쳐 실시하였다. 첫 번째는 위의 반응 용액 1 μ L에 Ada1 과 LB1 또는 RB1 primers 0.5 pmol을 섞어 20 μ L로 만들어 95 $^{\circ}$ C 5분 1회, 94 $^{\circ}$ C 30초와 72 $^{\circ}$ C 1분 20회, 72 $^{\circ}$ C 10분 1회 실시하였다. 두 번째는 첫 번째 PCR반응 용액 5 μ L에 Ada2과 LB2 또는 RB2 primers 0.5 pmol을 섞어 20 μ L로 만들어 94 $^{\circ}$ C 5분 1회, 94 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 1분 40회, 72 $^{\circ}$ C 10분 실시하였다. 두 번째 PCR 증폭산물은 1% agarose gel 전기영동으로 확인하였으며, 특이 밴드는 HiYieldTM Gel/PCR DNA Extraction Kit (Biocompare Co. USA)을 이용하여 정제한 후 LB2 또는 RB2 primer를 이용하여 ABI7300XL로 염기서열을 분석하였다. 각각의 primer 염기서열은 다음과 같다. Ada1은 5'-GCGTAATACGACTCACTATAGCAATTAACC-3', Ada2는 5'-GACTCACTATAGCAATTAAC-3', LB1은 5'-GCCC-GTCACCGAGATTTGACTCGA-3', RB1은 5'-GCAGCTTG-AGCTTGGATCAGATTGTCG-3', LB2는 5'-AAACCCTTAG-TATGTATTTGTATTTGT-3', RB2는 5'-GTTTCCCGCCTTC-AGTTTA-3'이다. 이후 pCAMBIA2300 전 염기서열과의 비교 분석은 Main workbench (CLCbio Co. Denmark) 프로그램을 이용하였다.

결과 및 고찰

2009년에 토마토유래 측지발생관련 유전자의 역방향 유전자인 LeLs-antisense가 도입되어 비형질전환체에 비하여 무측지성이 60% 증진되어 선발된 무측지성 국화 형질전환 5계통 중 T₀V₁에서도 무측지성을 유지했던(Hur et al. 2013) LeLs80계통이 T₀V₂ 식물체에서도 도입유전자의 발현 특성의 안정성을 조사하였다. 비형질전환체의 무측지율은 4.9%이었던 것에 비해 LeLs80계통의 무측지율은 42.9%이었다(Table 1). 이것은 비형질전환체에 비하여 무측지성이 38% 증진된 것이고, T₀V₁ 식물체에서의 무측지율 45.1%와 같은 특성을 보인 것이다. 이것으로 볼 때 LeLs-antisense유전자가 LeLs80 계통의 genome상에서 안

정적으로 삽입되어 있고, 그 특성도 안정적으로 발현하고 있음을 확인할 수 있었다. 더욱이 LeLs80계통의 T₀V₂ 식물체의 무측지율 42.9%는 2007년에 본 연구팀에 의해 보고(Han et al. 2007)된 국화 유래 측지발생관련 유전자 cDNA가 역방향으로 도입된 '신마'유래 형질전환체의 무측지율(20~30%) 보다 증진된 것이고, Jiang 등(2010)이 국화 유래 측지발생관련 유전자 *DgLsL*를 'Jinghai'에 역방향으로 도입하여 획득한 형질전환체가 보여준 무측지율 14.0~19.7% 보다도 훨씬 증진된 것이다.

형질전환 세대에서 확인하지 못했던 LeLs80계통내 목표유전자 도입 copy수를 T₀V₂ 식물체에서 확인하기 위해 Southern 분석을 수행한 결과, LeLs-antisense 유전자가 3 copy 도입되었음을 확인할 수 있었고(Fig. 2), Northern 분석을 실시한 결과, LeLs-antisense 유전자의 전사체 또한 정상적으로 발현되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

Flanking T-DNA sequencing법에 의해 무측지성 국화 형질전환 계통 LeLs80에서 도입 목표 유전자 주변의 염기서열을 분석하기 위해 추출한 genomic DNA에 제한효소 처리와 두 번의 PCR 수행 후 전기영동에 의해 증폭산물을 확인한 결과, T-DNA의 left border쪽의 경우 비형질전환체와 차이가 없었던 반면 T-DNA의 right border쪽에서는 비

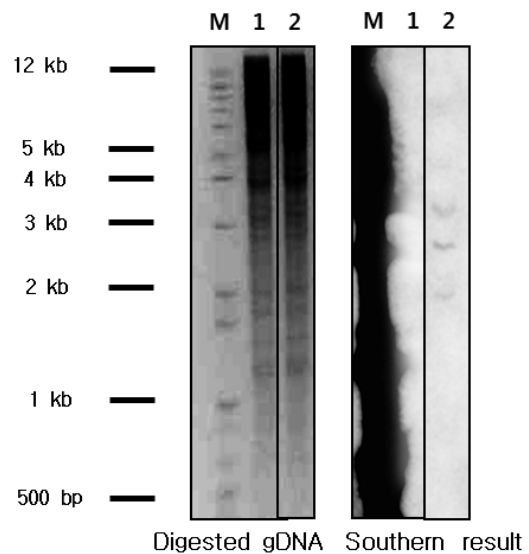


Fig. 2 Southern blot analysis of the 2nd clone (T₀V₂) plants of the LeLs-antisense gene-transgenic chrysanthemum line (LeLs80). Total genomic DNA of non-transgenic plant and transgenic plant was digested by *Eco*RI. M: 1kb plus ladder marker, Lane 1; non-transgenic plant, Lane 2: transgenic plant

Table 1 Phenotypic characteristics of the 2nd clone (T₀V₂) plants of the LeLs-antisense gene-transgenic chrysanthemum line (LeLs80)

Genotype	Number of nodes	Number of nodes with axillary bud	Number of nodes without axillary bud	Percentage of nodes without axillary bud (%)
LeLs80	35.8±12.5	20.4±9.0	15.5±7.3	42.9±14.4
NC	37.3±6.3	35.5±6.3	1.8±1.8	4.9±4.8

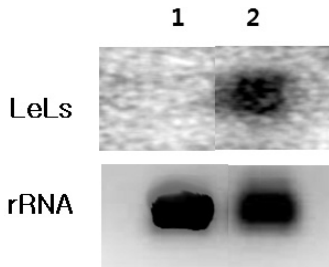


Fig. 3 Northern blot analysis of the 2nd clone (T₀V₂) plants of the LeLs-antisense gene-transgenic chrysanthemum line (LeLs80). M: 1kb plus ladder marker, Lane 1; non-transgenic plant, Lane 2: transgenic plant

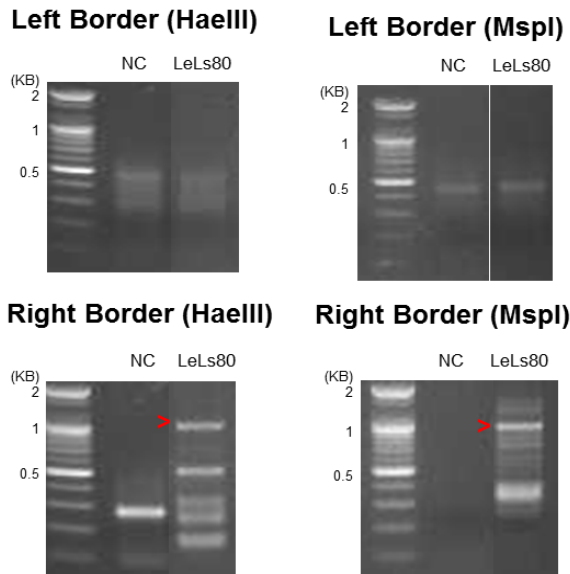


Fig. 4 The second PCR product produced by the flanking T-DNA sequencing method used to analyze sequences flanking the LeLs-antisense gene in the genome of the 2nd clone (T₀V₂) plants of the LeLs-antisense gene-transgenic chrysanthemum line (LeLs80)

형질전환체와 차이를 보였다. 이는 무측지성 국화 형질 전환 계통 LeLs80 genome상에서 T-DNA LB border 전후의 염기서열이 확인되지 않음을 증명하는 결과라고 할 수 있다. *Hae*III 처리의 경우 5개의 main band가, *Msp* I 처리의 경우 2개의 main band가 증폭되었다. 이처럼 한 개 band가 증폭되지 않고 여러 개 band가 증폭된 것은 Southern 분석에 의해 확인된 것처럼 LeLs-antisense 유전자가 3 copy 도입되었기 때문인 것으로 추정된다(Fig. 4). 이들 증폭밴드들을 분리하여 염기서열을 분석한 결과, 도입 목표유전자 주변에서 186 bp 및 464 bp의 pCAMBIA2300 T-DNA right border 부근으로 추정된 염기서열이 확인되었고, pCAMBIA2300 전 염기서열과의 비교 분석한 결과, pCAMBIA2300 T-DNA 영역내 left border와 right border 사이의 선발마커 유전자 *NPT II*의 발현 promoter와 LeLs-antisense 유전자 발현 terminator 염기서열의 일부와 일치하였다(Table 2, Fig. 5).

화훼작물은 세계적으로 가장 먼저 상업화된 LMO 작물 중의 하나로서 호주의 Florigene사에서 개발된 블루 카네이션 형질전환 품종은 1996년에 상업화된 바 있으며 현재 8품종이 시판중이다. 이후 2009년 말 일본의 Suntory사에서 상업화시킨 블루 장미 형질전환 품종 ‘APPLAUSE’은 일본과 미국에서 시판 중이다. 카네이션과 장미에 이은 형질전환 화훼 품종이 개발될 가능성이 높은 화훼류가 본 연구의 대상작목과 같은 국화로서 일본의 경우 내충성 국화 형질전환체의 환경위해성평가 연구 결과를 2008년에 보고한 바 있다. 일본 Fukui 농업시험장과 주꾸바 대학에서 2008년에 modified *cryIAb* 유전자를 국화 ‘Yamate-shiro’에 도입하여 획득한 내충성을 보인 형질전환체를 상업화하기 위해 독성평가 등 환경위해성, 야생종과의 교잡화합성 등 환경위해성평가 시험을 수행하였다가 야생종과의 교잡화합성이 문제가 되어 이후 상업화를 위

Table 2 Analysis of sequences flanking the LeLs-antisense gene in the genome of the 2nd clone (T₀V₂) plants of the LeLs-antisense gene-transgenic chrysanthemum line (LeLs80) identified using a flanking T-DNA sequencing method

Name of inserted fragment	Identity of inserted fragment	
	Length (bp)	Region
<i>Hae</i> III RB	186	35S promoter of <i>nptII</i> gene
<i>MSP</i> I RB	464	NOS terminator of LeLs-antisense gene

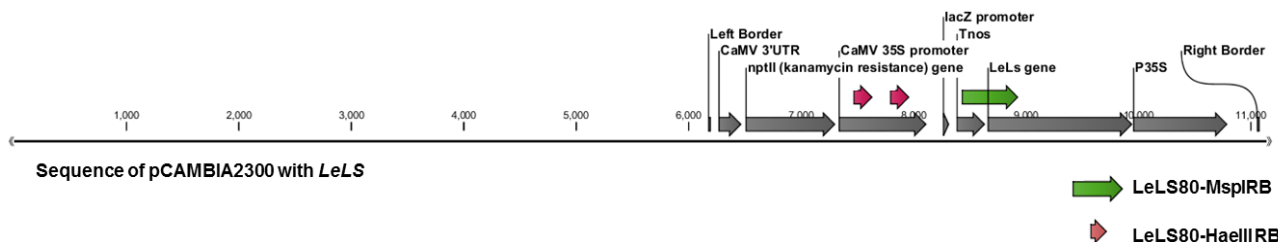


Fig. 5 Comparison between sequences of pCAMBIA230 vector including LeLs-antisense gene and ones flanking the LeLs-antisense gene in the genome of the 2nd clone (T₀V₂) plants of the LeLs-antisense gene-transgenic chrysanthemum line (LeLs80)

하여 옹성불임화 쪽으로 연구를 진행하고 있다(Shinoyama et al. 2008; 2012). 반면, 국내 국화 형질전환 연구의 경우는 무측지성, 화형, 조기개화 형질전환체 개발에 관한 연구 보고는 있으나 환경위해성 평가 연구에 진입하지는 못한 실정이므로 환경위해성 평가 연구로 이어질 필요가 있다. 화훼류 형질전환체가 상업화되기 위해 반드시 수행되어야 하는 독성, 잡초화 가능성, 교잡화합성 등의 환경위해성평가 연구는 적지 않은 연구비가 지원되어야 하므로 도입유전자의 분자생물학적 분석이 완료되어야 하고 유전자 발현 특성이 안정적이어야만 한다. 본 연구에서는 형질전환세대(T_0V_0)에 이어 T_0V_1 에서도 토마토 유래 측지발생관련 유전자의 역방향 도입을 통해 무측지성을 보인 국화 LeLs80 계통이 T_0V_2 에서도 도입유전자의 특성 발현이 안정적임을 확인하였다. 또한 Southern 분석 및 Northern 분석을 통하여 도입유전자의 도입 및 발현을 확인하였고, 더욱이 도입 목표 유전자의 주변 염기서열도 분석하였다. PCR전의 처리 제한효소의 종류를 늘리는 등과 같이 도입유전자 주변 염기서열 분석에 대한 보완이 필요하긴 하지만 도입 유전자 주변 염기서열 분석을 통하여 형질전환체의 genome 상에서 도입 목표유전자 이외의 T-DNA 단편이 삽입되었는지를 확인한 국화 형질전환체 개발 연구 보고로서는 본 연구가 최초일 것이다. 이상의 연구결과로서 무측지성 국화 형질전환 계통 LeLs80은 환경위해성평가 연구로 진행될 수 있는 이벤트로서의 자격조건이 증명되었다고 할 수 있다. 향후 연구비 지원에 의해 환경위해성평가 연구가 진행되고, 또 환경위해성 심사를 통과할 수 있을 정도의 결과가 얻어진다면 본 연구를 통해 얻어진 무측지성 국화 형질전환 계통 LeLs80은 형질전환 계통 자체의 품종화뿐 아니라 앞으로 국화를 포함하여 국내 고부가가치성 화훼류 형질전환체 품종 개발의 근간이 될 수 있을 것으로 판단된다.

적 요

환경위해성평가 연구 대상인 형질전환 이벤트로서의 자격을 확인하고자 형질전환세대(T_0V_0)에서와 같이 영양번식 제1세대(T_0V_1)에서도 도입유전자 LeLs-antisense의 발현 특성인 무측지성을 유지한 국화 무측지성 형질전환 계통 LeLs80의 영양번식 제2세대(T_0V_2)의 형태적 및 분자생물학적 특성을 조사하였다. LeLs80 계통의 T_0V_2 에서도 LeLs-antisense 유전자의 발현 특성인 무측지성이 안정적으로 유지되는 것을 확인하였다. 또한, Southern 및 Northern 분석에 의해 LeLs-antisense 유전자가 3 copy 도입되었으며, LeLs-antisense 유전자의 전사체가 정상적으로 발현되는 것도 확인할 수 있었다. 또한 flanking T-DNA sequencing method를 이용하여 LeLs-antisense 유전자의 주변 염기서

열 분석 통해 LeLs80 계통의 genome내 LeLs-antisense 유전자 주변에 186~464 bp의 pCAMBIA2300 T-DNA right border 부근으로 추정되는 염기서열이 확인되었고, pCAMBIA2300 전 염기서열과의 비교 분석한 결과, pCAMBIA2300 T-DNA left border와 right border내 선발마커 유전자 *NPT II*의 발현 promoter 부분과 LeLs-antisense 유전자 발현 terminator 일부 염기서열과 일치하였다.

사 사

본 연구는 2013년도 차세대바이오그린21사업(과제번호 PJ009496)에 의해 지원되었습니다.

References

- Han BH, Lee SY, Choi SY (2009) MmMADS2-transgenic chrysanthemum (*Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) showing the reduction of the days to flowering. *J. Plant Biotech.* 36:366-372
- 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 Horticulturae* 115:70-75
- Hur YJ, Han BH, Park SK, Lee SY, Jung KM, Park CH (2013) Inhibition of chrysanthemum axillary buds via transformation with the antisense tomato *lateral suppressor* gene is season dependent. *Hort Environ Biotechnol* 54:280-287
- Jiang BB, Miao HB, Chen SM, Zhang SM, Chen FD, Fang WM (2010) The lateral suppressor-Like gene, DgLsL, alternated the axillary branching in transgenic chrysanthemum (*Chrysanthemum x morifolium*) by modulating IAA and GA Content. *Plant Mol Biol Rep* 28: 144-151
- Khodakovskaya M, Vankova R, Malbeck J, Li A, Li Y, McAvoy R (2009) Enhancement of flowering and branching phenotype in chrysanthemum by expression of *ipt* under the control of a 0.821 kb fragment of the LEACO1 gene promoter. *Plant Cell Rep.* 28:1351-1362
- Kim YS, Lim S, Kang KK, Jung YJ, Lee YH, Choi YE, Sano H (2011a) Resistance against beet armyworms and cotton aphids in caffeine-producing transgenic chrysanthemum. *Plant Biotechnol* 28: 393-395
- Kim YS, Lim S, Yoda H, Choi CS, Choi YE, Sano H (2011b) Simultaneous activation of salicylate production and fungal resistance in transgenic chrysanthemum producing caffeine. *Plant Signaling Behavior* 6: 409-412
- 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
- Lee SY, Han BH, Hur EJ, Shin HK, Kim ST, Lee EK, Kim WH,

- Kwon OH, Lee IH (2012) FT-transgenic spray-type chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) showing early-flowering. J. Plant Biotech. 39:140-145
- Mitiouchkina, TY, Dolgov SV (2000) Modification of chrysanthemum plant and flower architecture by *rolC* gene from *Agrobacterium rhizogenes* induction. Acta Hort. 508:163-169.
- Shinoyama H, Mochizuki A, Nomura Y, Kamada H (2008) Environmental risk assessment of genetically modified chrysanthemums containing a modified cry1Ab gene from *Bacillus thuringiensis*. Plant Biotechnol. 25: 17-29
- Shinoyama H, Sano T, Saito M, Ezura H, Aida R, Nomura Y, Kamada H (2012) Induction of male sterility in transgenic chrysanthemums (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) by expression of a mutated ethylene receptor gene, *Cm-ETR1/H69A*, and the stability of this sterility at varying growth temperatures. Mol Breeding 29: 285-295
- Shulga OA, Mitiouchkina TY, Shchennikova AV, Skryabin, KG, Dolgov SV (2011) Overexpression of AP1-like genes from Asteraceae induces early-flowering in transgenic Chrysanthemum plants. In Vitro Cell. Develop. Biol.-Plant 47: 553-560
- Schumacher K, Schmitt T, Rossberg M, Schmitz C, Theres K (1999) The lateral suppressor (Ls) gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. Proc Natl Acad Sci USA 96:290-295
- Takatsu Y, Nishizawa Y, Hibi T, Akutsu K (1999) Transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* (Ramat.) Kitamura) expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). Sci Hort 82:113-123