J Plant Biotechnol (2016) 43:272-280
DOI:http://dx.doi.org/10.5010/JPB.2016.43.3.272

ISSN 1229-2818 (Print)
ISSN 2384-1397 (Online)

Review

# 국화 유전체 연구의 동향

원소윤 · 김정선 · 강상호 · 손성한

# Current status and prospects of chrysanthemum genomics

**So Youn Won · Jung Sun Kim · Sang-Ho Kang · Seong-Han Sohn**

Received: 30 March 2016 / Revised: 27 July 2016 / Accepted: 31 July 2016
ⓒ Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** Chrysanthemum is one of the top floriculture species with ornamental and medicinal value. Although chrysanthemum breeding program has contributed to the development of various cultivars so far, it needs to be advanced from the traditional phenotype-based selection to marker-assisted selection (molecular breeding) as shown in major cereal and vegetable crops. Molecular breeding relies on trait-linked molecular markers identified from genetic, molecular, and genomic studies. However, these studies in chrysanthemum are significantly hampered by the reproductive, genetic, and genomic properties of chrysanthemum such as self-incompatibility, inbreeding depression, allohexaploid, heterozygosity, and gigantic genome size. Nevertheless, several genetic studies have constructed genetic linkage maps and identified molecular markers linked to important traits of flower, leaf, and plant architecture. With progress in sequencing technology, chrysanthemum transcriptome has been sequenced to construct reference gene set and identify genes responsible for developments or induced by biotic or abiotic stresses. Recently, a genome sequencing project has been launched on a diploid wild Chrysanthemum species. The massive sequencing information would serve as fundamental resources for molecular breeding of chrysanthemum. In this review, we summarized the current status of molecular genetics and genomics in chrysanthemum and briefly discussed future prospects.

S. Y. Won (✉) · J. S. Kim · S.-H. Kang · S.-H. Sohn
농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부 유전체과
(Genomics Division, Department of Agricultural Biotechnology, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Jeonju, 54578, Republic of Korea)
e-mail: soyounwon@korea.kr

**Keywords** Molecular breeding, Molecular markers, Transcriptome, Next-generation sequencing, Compositae

## 서 론

국화(*Chrysanthemum morifolium*)는 화형, 화색, 형태 등이 매우 다양하여 전세계적으로 중요한 화훼 작목으로 절화, 분화, 화단국의 형태로 이용된다. 국화는 관상용뿐만 아니라 플라보노이드(flavonoid), 터핀(terpene) 등의 생리활성 천연물을 포함하여 한방재료 혹은 식용으로도 널리 활용된다(Kumar et al. 2005). 분류학상 국화는 국화과(Asteraceae/Compositae) 국화족(Anthemideae) 국화속(*Chrysanthemum*)에 속하며, 국화과는 속씨식물의 10%이상을 포함하는 거대한 과로써 해바라기(sunflower), 양상치(lettuce), 치커리(chicory)와 같은 농작물뿐만 아니라 농업적으로 중요한 잡초종도 포함한다(Hodgins et al. 2014).

새로운 품종을 개발하고 형질을 개선하기 위하여 도입육종, 교잡육종, 돌연변이육종이 활발히 수행되어왔으나 국화는 목적형질의 정확한 육종과 유전연구가 다음과 같은 이유로 매우 어렵다. 국화속 식물은 기본 염색체 수가 x=9이며, 2배체부터 10배체까지 다양한 배수성을 보인다. 특히 재배국(*C. morifolium*)은 *C. chanetii*, *C. erubescens*, *C. indicum*, *C. japonense*, *C. lavandulifolium*, *C. makinoi*, *C. sinense*, *C. ornatum*, *C. vesticum*, *C. zawadskii* 등이 자연교잡하여 발생된 이질육배체(allohexaploid, 2n=6x=54)인 것으로 추정되며, 이수성(aneuploid)이 높아 체세포에 47~63개 염색체가 존재하는 것으로 보고되었다(Anderson 2006; Zhang et al. 2014). 그리고 국화는 이계교배(outbreeding)를 하고 자가불화합성(self-incompatibility)이 있어서 이형접합성(heterozygosity)이 매우 높고 유전연구를 위한 집단을 구축하기가 어렵다(Anderson 2006). 게다가 유전체의 크기도 매우 거대하여 9.4Gb 이상으로 보고되었고(http://data.kew.org/cvalues/), 국화과 식물의

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Table 1** List of chrysanthemum linkage maps

| Population | Population type, size | Marker types | Number of markers[a] | Number of linkage group[a] | Map size (cM)[a] | Comment | Reference |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 'Yuhualuoying' × 'Aoyunhanxiao' | $F_1$, 142 | RAPD, ISSR, AFLP | 210/190 | 44/33 | 1034/1095 | First report on chrysanthemum genetic linkage map | Zhang et al. 2010 |
| 'Yuhualuoying' × 'Aoyunhanxiao' | $F_1$, 142 | SRAP | 333/342 | 57/55 | >1900/1900 | Analyzed QTL for traits of inflorescence, leaf, plant architecture and flowering time | Zhang et al. 2011<br>Zhang et al. 2012a<br>Zhang et al. 2012b<br>Zhang et al. 2013 |
| 'QX-145' × 'Nannongyinshan' | $F_1$, 92 | SRAP, SSR | 160/169 | 25/21 | 1457/1973 | Analyzed QTL for branching traits | Peng et al. 2015 |

[a]Values for each parent are shown as maternal plant/paternal plant.

전사체를 분석한 결과 whole genome duplication (WGD)이 최소 3회 발생하여 유전체의 구조가 복잡하다(Barker et al. 2008).

주요 식량, 채소작물은 교잡과 선발에 의한 전통육종에서 분자육종(molecular breeding)으로 전환되고 있다. 분자육종은 형질과 연관된 불변의 분자표지(molecular marker)를 이용하여 표현형(phenotype)을 간접적으로 선발하는 marker-assisted selection (MAS) 방법으로 수행된다. 따라서 환경의 영향에 의한 표현형의 변이를 배제한 상태에서 개체를 선발하여 정확도가 높고, 조기에 선발이 가능하여 육종연한을 획기적으로 단축시킬 수 있다. 주요 식물의 표준 유전체가 해독되고, 차세대염기서열분석(next-generation sequencing, NGS)기술로 유전집단과 유전자원의 유전형(genotype)을 저비용에 빠르게 분석할 수 있어서 분자표지를 대량 발굴할 수 있고, 더 나아가 표현형 정보와 통합하여 형질과 연관된 분자표지도 규명되어 분자육종을 더욱 가속화할 것이다. 그러나 국화에서는 종을 구분하고, 유전자원의 다양성과 구조를 분석하며, 근연관계를 규명하는 수준에서 분자표지가 주로 활용되었고(Chen et al. 2007; Lema-Rumińska et al. 2004; Wang et al. 2007), 최근에서야 분자표지를 활용하여 국화 유전자지도(genetic linkage map)가 제작되었으며, 몇몇 주요 형질에 대하여 linkage mapping을 통한 양적형질 유전자좌(quantitative trait loci, QTL) 분석, 연관분석(association study) 등의 유전 연구가 수행되었다. 한편, NGS를 이용하여 국화의 전사체가 분석되었고, 이를 기반으로 분자표지도 발굴되었다. 본 논문에서는 최근에 구축된 국화의 유전자지도와 QTL 연구 결과에 대하여 요약하고, 국화의 전사체, 유전체 연구동향과 향후 전망에 대하여 논하고자 한다.

## 본 론

### 국화 유전자지도 및 QTL 연구

국화와 같이 자가불화합성과 자식약세로 유전집단을 구축하기가 어렵고, 특히 이형접합성이 높은 식물종은 two-way pseudo-testcross mapping으로 유전연구가 수행된다(Grattapaglia and Sederoff, 1994; Ritter et al. 1990). 즉, 이형접합성이 높은 양친을 교배하여 확보한 $F_1$ 집단을 1:1로 분리하는 testcross marker를 이용하여 양친에 대하여 각각 mapping을 수행한 후 모계와 부계의 유전자지도를 따로 작성한다(Grattapaglia and Sederoff, 1994; Ritter et al. 1990). 3:1로 분리하는 intercross marker를 이용하여 두 유전자지도를 통합할 수도 있다(Kirst et al. 2012). 한편, 국화의 중요한 형질은 환경의 영향을 받고, 여러 유전자가 동시에 조절하기 때문에 QTL이 분석되었다. 특히 화훼작물의 상품성을 고려하여 꽃, 잎, 식물체의 구조적 특성 및 개화기와 관련된 QTL이 동정되었다.

*C. morifolium*의 유전자지도는 덩굴성 지피품종 'Yuhualuoying'과 직립형 분화국 'Aoyunhanxiao'을 교배하여 확보한 $F_1$ 세대 142개체를 이용하여 작성되었다(Table 1)(Zhang et al. 2010). 집단을 randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), inter simple sequence repeat (ISSR), amplified fragment length polymorphism (AFLP) 표지로 분석한 후 양친에 대하여 각각 유전자지도를 작성한 결과, 'Yuhualuoying'은 44개, 'Aoyunhanxiao'은 33개의 linkage group (LG)을 형성하였다(Zhang et al. 2010). 이는 생식세포의 염색체수(2n=6x=54)인 27보다 많은 것으로, 두 개 또는 세 개의 분자표지로만 구성된 minor LG이 대부분이고, 다수의 분자표지가 LG에 포함되지 않아서 유전자지도가 확장될 수 없었기 때문이다(Zhang et al. 2010). 유전자지도의 크기는 양친에서 각각 1034cM과 1095cM로 국화 유전체의 51%와 55%를 포괄하였다(Zhang et al. 2010). 한편, intercross marker를 이용하여 양친의 유전자지도를 통합한 결과, 6개의 LG을 확보하였으나, 일부 분자표지가 재배열되거나 분자표지간의 거리에 소규모 차이가 있었다(Zhang et al. 2010).

동일한 $F_1$ 집단을 sequence related amplified polymorphism (SRAP)으로 분석하고 유전자지도를 다시 작성하여 완성도가 개선되었다(Table1) (Zhang et al. 2011). 'Yuhualuoying'은 57개, 'Aoyunhanxiao'는 55개의 LG을 형성하여 이전의 유전

자지도보다 LG의 개수가 증가하였다(Zhang et al. 2011). 그러나 이전의 유전자지도는 대부분이 minor LG로 구성된 반면, major LG이 'Yuhualuoying'은 12개에서 33개로, 'Aoyunhanxiao'는 9개에서 29개로 현저히 증가하여 QTL 분석이 가능해졌다(Zhang et al. 2011). 개선된 유전자지도를 활용하여 꽃의 지름, 설상화(ray floret)의 개수 및 길이에 영향을 주는 QTL이 각각 4개씩 존재하는 것으로 밝혀졌다(Zhang et al. 2011). 한편, 잎의 특성을 조절하는 QTL도 동정되어 길이와 너비는 각각 5개의 QTL이, 길이와 너비의 비율은 2개의 QTL이 조절하였고, 잎의 길이와 너비는 높은 연관관계가 있어 3쌍의 epistatic QTL이 있었다(Zhang et al. 2012a). 국화의 형태를 결정하는 QTL을 분석한 결과 키와 너비는 각각 2개의 QTL이, 꽃목길이(flower neck length)는 1개의 QTL이 조절하며, 마디 길이에 대해서는 QTL을 찾을 수 없었고, 11쌍의 epistatic QTL도 규명되었다(Zhang et al. 2012b). 집단의 양친이 개화기에도 차이가 있는 것으로 보고되어 봉오리형성기, 화색이 보이는 시기, 개화시, 만개기, 꽃이 시드는 시기를 조사한 후 SRAP map에 통합한 결과 35개의 additive QTL과 10쌍의 epistatic QTL도 발굴되었다(Zhang et al. 2013).

스프레이 국화에서 분지(branching)는 재배와 상품성에 매우 중요한 형질로 다양한 방법으로 분지 형성과 관련된 QTL이 발굴되었다. 우선, 분지형성에 차이가 큰 'QX-145'와 'Nannongyinshan'을 교배하여 92개의 $F_1$ 집단을 구축한 후 SRAP과 simple sequence repeat (SSR) 표지를 이용하여 유전자지도를 작성한 결과, 'QX-145'에서는 25개의 LG이, 'Nannongyinshan'에서는 21개의 LG이 형성되었고 map의 크기는 각각 1,456.6cM, 1,927cM였다(Table 1) (Peng et al. 2015). 분지의 특성을 조사한 후 QTL을 분석한 결과, primary branch의 길이는 4개의 QTL, 분지의 개수, 길이, 각도는 각각 4개, 3개, 4개의 QTL이 영향을 주었다(Peng et al. 2015). 한편, 식물체의 키, 분지의 개수 및 길이에 차이가 있는 'Kitam'과 'Relinda'를 교배하여 확보된 160개의 $F_1$ 집단에서 AFLP로 유전자지도를 작성한 시도가 있었으나 분자표지가 부족하고 6배체여서 불가능하였다(Klie et al. 2016). 그러나 ANOVA 분석으로 분지의 개수, 식물의 키, 꽃의 크기 등과 높은 연관을 보이는 17개의 QTL이 발굴되었다(Klie et al. 2016). 또한, 분지형성에 strigolactone 호르몬이 중요하다고 보고되어 이의 생합성, 인식 등에 관련된 BRC1, CCD7, CCD8, MAX2 유전자가 분자표지로 발굴되었다(Klie et al. 2016). 동일한 집단에서 4종의 유전자를 PCR로 다형성을 검정한 후 형성된 분지와의 상관관계를 분석한 결과 MAX2를 제외한 다른 유전자에서 모두 7개의 분자표지가 발굴되었다(Klie et al. 2016).

## 국화의 GWAS 연구

위와 같이 biparental population에서 QTL을 동정하는 linkage mapping은 집단의 구조에 영향을 받지 않고, 영향력이 낮은 QTL도 동정할 수 있어서 유리하다(Abdurakhmonov and Abdukarimov 2008). 그러나 유전적 다양성이 제한적이며, meiotic recombination의 빈도가 낮아 fine mapping을 위해서는 집단의 규모와 분자표지의 개수가 커야 한다(Abdurakhmonov and Abdukarimov 2008). 반면에, 다양한 유전자원을 표현형과 유전형의 연관분석(association mapping)에 직접 활용할 경우에는 다양한 종류의 표현형과 연관된 분자표지를 발굴할 수 있다(Abdurakhmonov and Abdukarimov 2008). 게다가 meiotic recombination 빈도가 매우 높아 map의 해상도가 높고, 집단의 구축에 시간과 비용이 적게 든다는 장점도 있다(Abdurakhmonov and Abdukarimov 2008). 이러한 형질연관분석은 많은 식물종에서 reference 유전체가 해독되고, 유전자원의 유전형을 NGS로 전게놈 수준으로 분석이 가능해짐에 따라 genome-wide association studies (GWAS)로 확대되었다. 국화는 유전체 정보가 없고 분자표지도 충분치 않아 GWAS 수준의 분석은 없었으나, 주요품종과 유전자원에서 유전형이 분자표지로 분석되고, 표현형과의 연관분석이 수행되었다. 2012년도에 이러한 연구가 최초로 보고되어, 중국에서 대표적인 58개의 품종에서 18종류의 중요한 형질을 조사하고, 19종의 SRAP 표지로 유전형을 분석한 결과, 3종류의 꽃 형질이 5개의 allele과, 줄기와 잎의 형질이 각각 1개의 allele과 연관되어 있었다(Li et al. 2012). 이러한 연관분석은 더욱 확장되어 480종류의 품종을 수집한 후 줄기에서 6종류의 형질과 꽃과 잎에서 각각 21종의 형질을 관찰하고, 20종류의 SSR 표지로 유전형을 분석하였다(Zhang et al. 2014). 다형성을 보이는 204개의 allele 중에서 42개의 allele이 19종류의 표현형과 연관되었고, 몇몇 allele은 여러 형질에 동시에 연관되었다(Zhang et al. 2014). 한편, 159 품종의 국화를 대상으로 꽃차례(inflorescence)와 식물체 구조의 형질 11종을 조사하고, SRAP, start codon targeted (SCoT), expressed sequence tag-simple sequence repeat (EST-SSR) 표지를 이용하여 유전형을 분석하였다(Li et al. 2016). 그 결과 707개의 allele 중에서 54개가 형질과 높은 연관성이 있었다(Li et al. 2016).

## 국화의 전사체(Transcriptome) 분석

NGS가 도입되기 이전에 *C. morifolium*의 꽃차례에서 발현되는 7,307개의 expressed sequence tag (EST)가(Chen et al. 2009), *C. lavandulifolium*에서 234개의 EST가 이미 보고되었다(Huang et al. 2012). 2013년도부터는 NGS에 의한 국화의 전사체 분석이 다수 보고되어 다양한 국화속 식물에서 환경스트레스, 병충해의 피해뿐만 아니라 다양한 발달단계에서 특이적으로 발현되는 전사체가 발표되었다. 국화는 유전체가 아직 해독되지 않았기 때문에 전사체를 분석함으로써 유전자의 종류를 파악하고 이로부터 분자표지를 전게놈 수준으로 발굴할 수 있다. 한편, 다양한 환경, 발달상태에서 특이적

으로 발현되는 유전자를 동정함으로써 유전자의 기능연구가 가능하게 되었다. 국화의 전사체를 분석한 연구의 구체적인 결과는 다음과 같고 Table 2에 요약하였다.

NGS를 활용한 국화의 전사체 연구는 6배체인 재배국의 원 조상으로 알려졌으며 재배국보다 유전체의 크기가 작고 구조가 간단한 2배체인 *C. nankingense*와 *C. lavandulifolium*에서 시작되었다. *C. nankingense*는 중국에서 자생하며 고온, 저온, 건조 등 극한의 환경에 잘 적응하는 유전자원으로(Yang et al. 2006; Zhao et al. 2009) RNA-seq을 수행하여 70,895개의 유전자를 확보하였으며 이들 중 64.59%인 45,789개가 NCBI에 등록된 유전자와 상동성을 보여 그 기능이 규명되었다(Table 2) (Wang et al. 2013). 확보된 유전자에서 SSR 표지를 제작하여 국화속 식물들의 다형성을 검정한 후 근연관계도 조사되었다(Wang et al. 2013). 한편, 국화는 재배중에 저온에 노출될 경우 화아분화와 개화가 저해되어 피해가 크지만, 0°C 이상의 적당한 저온에서 적응하면 영하의 온도에 장기간 노출되어도 내한성을 보이는 저온순화(low temperature acclimation)를 습득한다. 이를 조절하는 기작을 규명하고자 *C. nankingense*에서 저온순화 및 내한성 여부에 따라 RNA-seq을 수행하였다(Table 2) (Ren et al. 2014). 그 결과 저온인식, 신호전달 유전자, 전사조절인자, 전사후 조절인자 등이 저온순화와 내한성에 관여하는 것으로 보고되었다(Ren et al. 2014). 저온뿐만 아니라 질소결핍도 식물생장을 저해하는 주요인자로 보고되어 질소의 시비량에 따라 잎과 뿌리에서 발현되는 전사체가 분석되었다(Table 2). 그 결과 광합성, 질소대사, 전사조절인자, protein kinase가 질소결핍시 발현에 변화가 있었다(Wang et al. 2015). *C. lavandulifolium*에서는 가급적 많은 종류의 유전자를 확보하기 위하여 다양한 시료를 활용하였는데, 어린 잎, 성숙한 잎, 꽃봉오리 등 다양한 발달단계의 시료뿐만 아니라 건조, 염, 저온, 고온, 호르몬 abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA)가 처리된 시료를 pooling하고 전사체를 분석, 조립하여 108,737개의 유전자를 확보하였다(Table 2) (Wang et al. 2014). 그리고 국화의 가장 중요한 형질인 개화 조절에 관련된 광주기, gibberellins, 춘화처리, autonomous pathway, 전사조절인자의 유전자가 집중적으로 분석되었다(Wang et al. 2014).

2배체인 국화속 식물에서 수행된 전사체 분석은 재배국인 *C. morifolium*으로 확장되어 다양한 품종과 환경적 조건에서 분석되었다. 우선 abiotic 요인인 건조 스트레스 처리에 의한 유전자의 발현을 분석하여 98,180개의 유전자가 재배국에서 NGS로 2013년도에 최초로 구축되었다(Table 2) (Xu et al. 2013). 특히, 8,558개의 유전자가 건조 스트레스와 관련되었으며, 이들 중 전사조절인자는 306개, protein kinases는 228개가 포함되었다(Xu et al. 2013). 특히 MYB, Zinc finger, AP2/EREBP, HB가 중요하며, 이들 중에 일부는 ABA와 circadian clock과 관련된 것으로 보고되었다(Xu et al. 2013). Protein kinases 중에서는 leucine rich repeat kinase, S domain kinase, SNF1-related protein kinase, MAPK가 중요하였다(Xu et al. 2013). 게다가 호르몬, 당, 아미노산, 지방산, 이차대사산물 등 건조 스트레스와 관련한 주요 생화합물의 합성과 분해기작을 조절하는 유전자가 보고되었다(Xu et al. 2013).

병충해와 같은 biotic 스트레스는 상품의 가치를 떨어뜨려 경제적 손실을 초래하는 주요한 요인으로 *C. morifolium*에 곰팡이병, 바이러스병, 충해 등을 유발한 후 전사체의 발현양상이 비교되었다. 우선 점무늬병을 일으키는 곰팡이 *Alternaria tenuissima*를 접종한 잎과 이와 이웃하여 systemic response을 보이는 잎, 그리고 이들의 대조구에서 전사체가 분석되었다(Table 2) (Li et al. 2014). 그 결과 병원균 인식, reactive oxygen species의 합성, 세포벽 조절, jasmonic acid (JA)와 SA 호르몬 신호전달 등과 관련된 유전자들이 발현에 변화가 있었고, 특히 광합성 유전자는 곰팡이병의 감염에 발현이 감소되는 경향이 있었다(Li et al. 2014). 한편, 국화왜화바이로이드(*Chrysanthemum stunt viroid*, CSVd)에 감염된 *C. morifolium*에서도 전사체가 분석되었는데, 이는 여러 NGS 중에서 GS FLX454가 전사체 분석에 활용되었다(Table 2) (Jo et al. 2014). 본 연구에서는 확보된 유전자로 gene ontology 분석을 수행하여 CSVd 감염시 영향을 받는 유전자군을 동정하였다(Jo et al. 2014). 한편, 기존에 구축된 국화 전사체 정보를 이용하여 135K microarray가 개발되어 3종의 RNA virus 감염에 의한 전사체의 변화가 분석되었다(Table 2) (Choi et al. 2015). 오이모자이크바이러스(*Cucumber mosaic virus*, CMV), 토마토반점위조바이러스(*Tomato spotted wilt virus*, TSWV), 감자바이러스X(*Potato virus X*, PVX)에 감염될 경우 33개의 유전자가 공통적으로 변화가 있었다(Choi et al. 2015). Chitine response와 ethylene signaling과 같은 스트레스 반응 유전자가 발현이 증가되었고, 특히 TSWV에서는 DNA의 대사와 관련된 유전자의 발현이 감소하였다(Choi et al. 2015). 병원균의 감염에 의한 피해뿐만 아니라 진딧물과 같은 충해도 중요하기 때문에 진딧물에 저항성인 품종에서 진딧물 처리 여부에 따라 전사체가 분석되었다(Table 2) (Xia et al. 2014). 해충에 의한 피해 중에 물리적 상처를 고려하여 잎에 인위적으로 구멍을 낸 대조구에서도 전사체가 추가적으로 분석되었다(Xia et al. 2014). 그 결과 광합성, reactive oxygen species, 세포벽, 호르몬 신호체계, 전사조절인자 관련 유전자들이 발현에 영향을 받았다(Xia et al. 2014).

궁극적으로 국화는 관상용이기 때문에 꽃이 발달하는 기작을 이해하는 것은 매우 중요하다. 단일식물인 국화에서 단일(short-day) 처리에 의해 화아분화가 유도되는 기작을 이해하고자 전사체가 분석되었다(Table 2) (Liu et al. 2015). 장일(long-day) 처리 중인 영양생장점(vegetative buds), 단일을 시작한 후 화아분화가 되기 전까지의 봉오리(buds), 화아분화가 시작되어 설상화에 화색이 보이기 전까지의 꽃눈(floral buds)에서 전사체가 분석되었다(Liu et al. 2015). 그 결과 floral buds와 vegetative buds 간에는 1,876개의 유전자가

**Table 2** List of transcriptome analysis in *Chrysanthemum* species

| Species | Sequencer | Number of unigenes | Orthologue (%)[a] | Experimental scheme | Main pathway[d] | Reference |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *C. nankingense* | HiSeq2000 | 70,895 | 64.59 | Used a diploid species<br>Developed EST-SSR markers | NA[e] | Wang et al. 2013 |
| *C. nankingense* | HiSeq2000 | NA[b] | NA[b] | Used a diploid species<br>Studied cold acclimation and low temperature tolerance | $Ca^{2+}$ signaling, MAPK cascade, post-transcriptional regulation, functional proteins in stress | Ren et al. 2014 |
| *C. nankingense* | HiSeq2000 | NA[b] | NA[b] | Used a diploid species<br>Studied shoot and root in nitrogen deficient and normal conditions | Nitrogen and energy metabolism, early stress response, photosynthesis | Wang et al. 2015 |
| *C. lavandulifolium* | HiSeq2000 | 108,737 | 53.43 | Used a diploid species<br>Constructed gene set with plant in vegetative and flowering stage and with tissue pooled after stress treatments<br>Focused on the genes in floral bud emergence | Flowering pathway | Wang et al. 2014 |
| *C. morifolium* cv. Fall color | HiSeq2000 | 98,180 | 59.16 | Studied dehydration stress | Proline metabolism, hormone response | Xu et al. 2013 |
| *C. morifolium* cv. Zaoyihong | HiSeq2000 | NA[b] | NA[b] | Infected by the nectotrophic fungus *Alternaria tenuissima*<br>Studied both local and systemic response after inoculation | Photosynthesis, pathogen recognition, antioxident pathway, cell wall modification, hormone response | Li et al. 2014 |
| *C. morifolium* cv. Shinma | GS FLX454 | 11,600 | 60.03 | Infected by *Chrysanthemum stunt viroid* | NA[e] | Jo et al. 2014 |
| *C. morifolium* cv. Nannongxunzhang | HiSeq2000 | NA[b] | NA[b] | Used an aphid resistant cultivar<br>Studied aphid-treated, punctured and control plants | Hormone response, antioxident pathway, photosynthesis, cell wall biosynthesis, secondary metabolism | Xia et al. 2014 |
| *C. morifolium* cv. Fenditan | HiSeq2000 | 91,367 | 47.21 | Studied vegetative buds, floral buds and buds | Photoperiod, flower organ determination | Liu et al. 2015 |
| *C. morifolium* cv. Purple Reagan | HiSeq2000 | 103,517 | 58.65 | Used a pentaploid light-responding pigmentation cultivar<br>Studied flowers at 3 developmental stages and with light or shade conditions | Anthocyanine pathway | Hong et al. 2015 |
| *C. morifolium* × C. nankingense | Illumina[c] | 116,697 | 58.41 | Used a wide-crossed chrysanthemum to study mechanisms of embryo abortion | Cell death, homone response, energy metabolism | Zhang et al. 2014 |
| *C. morifolium* | Chrysanthemum 135K microarray | NA | NA | Used microarray instead of NGS<br>Studied infection by 3 RNA viruses such as CMV, TSWV and PVX | Chitin response, ethylene signaling, DNA metabolism, RNA processing, chloroplast genes | Choi et al. 2015 |

[a]The percentage of genes annotated by BLASTX or other tools is calculated.

[b]*De novo* assembly of transcriptome was not conducted. Sequencing reads were mapped to previously reported unigenes to identify differentially expressed genes.

[c]The exact sequencing platform is not informed in the original paper.

[d]The list indicates the pathways that are differentially expressed in given experimental conditions and discussed in the original papers. Since transcription factors and protein kinases are addressed in most papers, they are not included here.

[e]The original paper provided the overview of genes and pathways in chrysanthemum instead of detailed pathways responsible for specific traits.

floral buds와 buds 간에는 3,300개의 유전자가 발현에 차이가 있었다. 이러한 유전자는 전사조절인자, 탄수화물대사, protein kinases, 호르몬 신호전달, 방어기작 등에 관련이 있었다(Liu et al. 2015). 특히 국화에서 광주기성을 조절하는 CRY, PHY, LHY, EFL4, FKF1, TOC1, ZTL, GI, CO, FT 유전자 등과 꽃 발달을 조절하는 ABC model에 해당하는 유전자들도 규명되었다(Liu et al. 2015). 국화는 꽃의 형태뿐만 아니라 화색도 중요하기 때문에 이를 조절하는 기작도 규명되었다(Hong et al. 2015). 이를 위하여 빛을 처리하면 자색의 꽃을 피우는 품종에서 빛의 처리 여부 및 꽃의 발달 정도에 따라 전사체를 분석하여 각 처리구 마다 특이적으로 발현되는 유전자를 목록화하였다(Table 2) (Hong et al. 2015). 특히 안토시아닌의 생합성 경로에 있는 구조유전자와 전사조절인자인 MYB과 bHLH가 꽃에서 빛에 의해 안토시아닌을 생합성하여 자색을 유도하는 것으로 밝혀졌다(Hong et al. 2015).

국화의 형질을 개선하기 위하여 스트레스 저항성이 높은 야생종과 원연교잡(wide cross)을 수행하지만 생식적 격리로 인하여 육종 효율이 매우 낮은 문제가 있다. 국화의 생식적 격리는 주로 배의 사산(embryo abortion)이 원인인 것으로 알려졌으나, 이의 정확한 기작이 알려지지 않았다. 이러한 배경에서 *C. morifolium*을 *C. nankingense*로 수정시켜 원연교잡을 수행한 배에서 전사체가 분석되었다(Table 2) (Zhang et al. 2014). 원연교잡 후 18일부터 배의 사산이 관찰되기 때문에 교배후 12일된 건강한 구상형 배(globular embryo)와 18일된 심장형 배(hear-shaped embryo)를 건강한 것과 사산된 것으로 분류하여 최종 3 종의 배에서 RNA-seq이 수행되었다(Zhang et al. 2014). 건강한 배와 비교하여 사산된 배에서는 옥신, 에너지 생산, 단백질 합성과 관련된 유전자는 발현이 억제된 반면, 에틸렌 호르몬, 단백질 분해와 관련된 유전자는 발현이 증가하였다(Zhang et al. 2014). 전사조절인자도 종류에 따라 발현양상에 차이가 있었으며, 특히 programmed cell death과 관련된 caspase 단백질의 발현이 사산된 배에서 증가하였다(Zhang et al. 2014).

## 국화의 miRNA 연구

miRNA는 길이가 21~22nt인 non-coding RNA의 한 종류로 target mRNA를 base-pair로 인식한 후 mRNA를 절단하거나 translation을 억제함으로써 RNA silencing을 매개하여 식물의 발달 및 생리에 중요한 역할을 한다(Rogers and Chen 2013). 특히 miRNA의 target mRNA가 대부분이 전사조절인자로 하위유전자의 발현에도 영향을 주기 때문에 그 영향력이 매우 커서 국화에서도 NGS를 활용하여 miRNA가 전게놈 수준에서 분석되었다(Xia et al. 2015; Zhang et al. 2015). 원연교잡 후에 확보된 3종류의 배에서 228개의 miRNA가 동정되었으며, 각각의 배에서 특이적으로 발현되는 miRNA도 규명되었다(Zhang et al. 2015). 한편, 진딧물 혹은 물리적 상처가 가해진 실험구와 대조구에서 miRNA를 분석하여 다른 종에서도 잘 보존된 303개의 miRNA와 234개의 신규 miRNA를 발견하여 최종 537개의 miRNA가 확보되었다. 특히 기능이 잘 알려진 miRNA 중에서 miR159a, miR160a, miR393a가 진딧물의 피해에 식물이 특이적으로 반응하였다(Xia et al. 2015). 두 논문에서는 miRNA의 target mRNA도 일부 보고하였다.

## 국화의 유전체(Genome) 연구

QTL과 GWAS로 확보되는 유전자영역은 매우 커서 다수의 유전자를 포함하고 있기 때문에 실제로 형질을 조절하는 유전자를 pinpoint하기 위하여 fine-mapping을 수행하여 그 영역을 좁히고, 각각 유전자의 기능, 변이, 발현량 등이 분석될 필요가 있다(Huang and Han 2014). 이러한 후속 연구를 수행하고 분자육종을 위한 유용한 분자표지를 발굴하기 위해서는 유전체 정보가 필요하나 국화는 아직 유전체가 해독되지 않았다.

국화과 식물은 유전체가 복잡하여 다른 과에 비하여 유전체 연구가 많이 부족하나, 경제적으로 중요한 작물에 대하여 UC Davis가 주도하는 'Compositae Genome Project'에서 적극적으로 진행 중이다. 그러나 국화가 속한 국화족은 연구에서 제외된 실정이다. 국화과 식물중에서는 제초제 glyphosate에 저항성을 보이는 잡초인 망초(*Conyza canadensis*, horseweed)의 유전체가 해독되었으며(Peng et al. 2014), 해바라기(http://www.sunflowergenome.org/)와 양상치(https://lgr.genomecenter.ucdavis.edu/)의 유전체가 해독되고 있다.

*C. morifolium*은 몇몇 종의 자연교잡에서 유래된 이질육배체이고 유전체가 거대하며(9.4Gb) 이형접합성으로 유전체 해독이 어렵다. 따라서 *C. morifolium*의 복잡한 유전체를 처음부터 해독하는 대신에 2배체인 근연종의 유전체를 해독한 후에 6배체에 대하여 비교분석을 진행할 필요가 있다. 국내에 자생하는 대표적인 국화속 식물은 화색이 노란색인 산국(*C. boreale*)과 감국(*C. indicum*)이 있으며, 흰색 혹은 자색인 구절초(*C. zawadskii*)와 마키노국화(*C. makinoi*)가 있다(Kim and Tobe 2009; Kim et al. 2014). 구절초는 잎의 형태 및 주요 서식지 등에 따라 7종이상의 아종으로 더욱 분류된다(Kim and Tobe 2009; Kim et al. 2014). 산국과 마키노국화는 2배체이면서 일부 이수체가 산국에서 발견되었고, 감국은 2배체와 4배체를 보인다. 구절초는 다른 자생국화보다는 높은 배수성을 보여 2배체부터 10배체까지 보고되었다(Kim et al. 2003; Lee 1969).

현재 국화 유전체의 해독은 포스트게놈 다부처유전체사업의 지원으로 2014년부터 농촌진흥청(국립농업과학원, 국립원예특작과학원)에서 진행되고 있다. *C. morifolium*의 유전체는 해독이 매우 어려울 것으로 예상되어 우선 *C. boreale*을 공시재료로 선정하였다. karyotype을 분석한 결과

*C. boreale*은 2배체(2n=2x=18)였으며(Kwon et al. 2013), Illumina의 HiSeq으로 염기서열을 분석하여 K-mer frequency를 조사한 결과 유전체의 크기가 대략 2.9Gb으로 예측되었다(unpublished data). 한편, repeat 서열은 전체 유전체의 70%이상을 차지한 것으로 나타났다(unpublished data). 유전체는 현재 1차 조립되었으며, contiguity와 coverage를 향상시키기 위한 작업을 수행하고 있다. 이와는 별도로 엽록체의 염기서열을 규명하기 위하여 HiSeq에 의한 염기서열을 NCBI에 등록된 국화 엽록체의 염기서열에 mapping시킨 후 reference-guided assembly 방법으로 조립하고 annotation을 완료하였다. 이 정보는 국화속 식물간의 엽록체 염기서열을 비교하여 근연관계를 분석하는데 사용할 예정이다.

## 결 론

국화는 종 특성상 형질 유전연구가 어려워 분자육종이 다른 작물보다 많이 지연되었지만, 이를 실현하기 위한 기반을 구축하고자 여러 시도가 있었다. NGS를 활용하여 국화의 전사체를 다양한 발달단계 및 환경조건에서 분석함으로써 농업·경제적으로 중요한 형질을 조절하는 유전자군이 발굴되었고, 형질과 연관된 분자표지를 발굴하기 위한 QTL mapping과 연관분석도 수행되었다. 그러나 국화의 형질 유전연구에 활용된 유전자지도의 밀도가 낮아 확보된 분자표지를 분자육종에 직접 활용할 수 없고 후속연구가 필요하다. 한편, genotyping-by-sequencing (GBS) 혹은 restriction-site-associated DNA sequencing (RAD-seq)과 같은 NGS 기술을 활용하여 유전집단의 유전형을 신속하고 정확하게 분석할 수 있게 됨에 따라 형질과 연관된 분자표지를 빠르게 발굴할 수 있게 되었다. 그러나 $F_1$ mapping을 수행하는 국화는 이형접합성이 높고 유전체의 크기가 거대하기 때문에 유전체의 염기서열이 없는 상태에서 새로운 기술을 접목하여 유전형을 분석하는 것은 여전히 어렵다.

현재까지 확보된 산국의 1차 draft 유전체 서열은 완성도가 더욱 개선될 필요가 있다. 국화과 식물에서 WGD가 3회 있었고 산국에 repeat이 많아 염기서열을 100bp씩 분석하여 조립하는 단거리 분석장비로는 극복하기가 힘들 것으로 예상된다. 그러나 Pacific Biosciences의 SMRT (Single Molecule Real Time) sequencing과 같은 장거리의 3세대 장비를 활용함으로써 repeat의 길이보다 길게 염기서열을 읽고 조립함으로써 유전체의 완성도를 향상시킬 수 있기를 기대한다. 국화속 식물은 그 유전정보가 매우 부족하여 전통적인 표현형을 기반으로 한 분류체계가 국가마다 차이가 있으며, 표현형으로 국화속 식물을 분류한 결과가 분자표지로 분류한 것과 일치하지 않는 경우도 있었다. 따라서 산국의 유전체 정보는 국화속 식물 연구의 표준으로 활용되어 유전자 기능 연구를 통한 유용유전자와 분자표지 발굴 등에 활용되며, 고차배수성으로 유전체 해독이 어려운 국화속 식물의 유전체 해독에 reference로 활용될 수 있다. 특히 산국은 국화의 재배와 수출에 큰 손해를 일으키는 흰녹병에 저항성을 보여 병 저항성과 관련된 유전자를 발굴하고 기작을 이해하는데 유전체가 활용되고 육종소재로도 활용될 수 있다. 최종적으로는 야생근연종인 산국의 유전체를 해독하여 재배국의 유전체 해독, 형질 유전연구, 분자육종에 활용할 수 있기를 기대한다.

## 적 요

국화는 관상용, 약용으로 활용되는 주요한 화훼 작물중의 하나이다. 국화의 육종 프로그램은 다양한 품종의 개발에 기여하였으나, 다른 주요한 식량, 채소작물에서 보여졌듯이 전통적인 표현형 기반의 품종선발에서 분자표지를 활용한 선발로 진일보할 필요가 있다. 이러한 분자육종은 유전학, 분자생물학, 최근에는 유전체 연구로 규명된 형질연관 분자표지에 의존한다. 그러나 자가불화합성, 자식약세, 이질육배체, 이형접합성, 거대한 유전체와 같은 국화의 생식적, 유전적, 유전체의 특성으로 인하여 이러한 연구는 심각하게 지연되고 있다. 그럼에도 불구하고 유전연구를 통하여 국화의 유전자지도가 구축되었고 꽃, 잎, 식물구조와 같은 국화의 주요한 형질과 연관된 분자표지가 규명되었다. 염기서열 분석기술이 발달됨에 따라 국화의 전사체가 해독되어 국화의 표준유전자 목록이 구축되고 발달단계에 따라 혹은 생물적·비생물적 환경에서 특이적으로 발현되는 유전자도 규명되었다. 또한 2배체인 야생의 국화속 식물의 유전체 해독 프로젝트가 시작되었다. 이러한 대량의 염기서열 정보는 국화의 분자육종을 위한 근원적인 자원으로 활용될 수 있을 것이다. 이 총설에서는 국화의 분자유전학, 유전체 연구의 현황을 요약하고 향후 전망을 논의한다.

## 사 사

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(PJ01035802)의 지원에 의해 수행되었습니다.

## References

Abdurakhmonov IY, Abdusattor A (2008) Application of association mapping to understanding the genetic diversity of plant germplasm resources. International Journal of Plant Genomics 2008:574927

Anderson NO (2006) Chrysanthemum, p.389-437. In: NO Anderson (ed.). Flower breeding and genetics: issues, challenges and

opportunities for the 21st century. Springer Science & Business Media

Barker MS, Kane NC, Matvienko M, Kozik A, Michelmore W, Knapp SJ, Rieseberg LH (2008) Multiple paleopolyploidizations during the evolution of the Compositae reveal parallel patterns of duplicate gene retention after millions of years. Molecular Biology and Evolution 25:2445-2455

Chen H, Miao F, Zhao H (2007) Genetic relationship of 85 chrysanthemum [*Dendranthema* × *grandiflora* (Ramat.) Kitamura] cultivars revealed by ISSR analysis. Acta Horticulturae Sinica 34:1243-1248

Chen S, Miao H, Chen F, Jiang B, Lu J, Fang W (2009) Analysis of expressed sequence tags (ESTs) collected from the inflorescence of chrysanthemum. Plant Molecular Biology Reporter 27: 503-510

Choi H, Jo Y, Lian S, Jo K-M, Chu H, Yoon J-Y, Choi S-K, Kim K-H, Cho WK (2015) Comparative analysis of chrysanthemum transcriptome in response to three RNA viruses: Cucumber mosaic virus, Tomato spotted wilt virus and Potato virus X. Plant Molecular Biology 88:233-248

Grattapaglia D, Sederoff R (1994) Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. Genetics 137:1121-1137

Hodgins KA, Lai Z, Oliveira LO, Still DW, Scascitelli M, Barker MS, Kane NC, Dempewolf H, Kozik A, Kesseli RV (2014) Genomics of Compositae crops: reference transcriptome assemblies and evidence of hybridization with wild relatives. Molecular Ecology Resources 14:166-177

Hong Y, Tang X, Huang H, Zhang Y, Dai S (2015) Transcriptomic analyses reveal species-specific light-induced anthocyanin biosynthesis in chrysanthemum. BMC Genomics 16:202

Huang H, Niu YJ, Cao HW, Tang XJ, Xia XL, Yin WL, Dai SL (2012) cDNA-AFLP analysis of salt-inducible genes expression in *Chrysanthemum lavandulifolium* under salt treatment. Journal of Plant Physiology 169:410-420

Huang X, Han B (2014) Natural variations and genome-wide association studies in crop plants. Annual Review of Plant Biology 65:531-551

Jo Y, Jo K-M, Park S-H, Kim K-H, Cho WK (2014) Transcriptomic landscape of chrysanthemums infected by Chrysanthemum stunt viroid. Plant Omics Journal 7:1

Kim JS, Pak J-H, Seo B-B, Tobe H (2003) Karyotypes of metaphase chromosomes in diploid populations of *Dendranthema zawadskii* and related species (Asteraceae) from Korea: diversity and evolutionary implications. Journal of Plant Research 116:47-54

Kim JS, Tobe H (2009) Variations of leaf thickness in the *Chrysanthemum zawadskii* complex and in two related Korean species: *C. boreale* and *C. indicum* (Asteraceae). Korean Journal of Plant Taxonomy 39:29-34

Kim SJ, Lee CH, Kim J, Kim KS (2014) Phylogenetic analysis of Korean native *Chrysanthemum* species based on morphological characteristics. Scientia Horticulturae 175:278-289

Kirst M, Myburg A, Sederoff R (2012) Genetic mapping in forest trees: markers, linkage analysis and genomics, p. 105-142. In : J. Setlow (ed.). Genetic Engineering: Principles and Methods, Volume 26. Springer, New York, NY

Klie M, Menz I, Linde M, Debener T (2016) Strigolactone pathway genes and plant architecture: association analysis and QTL detection for horticultural traits in chrysanthemum. Molecular Genetics and Genomics 291:957-969

Kumar A, Singh SP, Bhakuni RS (2005) Secondary metabolites of *Chrysanthemum* genus and their biological activities. Current Science 89:1489-1501

Kwon S-J, Hwang Y-J, Younis A, Bok RK, Lim K-B, Eun C-H, Lee J, Sohn S-H (2013) Karyomorphological analysis of wild *Chrysanthemum boreale* collected from four natural habitats in Korea. Flower Research Journal 21:182-189

Lee YN (1969) A cytotaxonomic study on *Chrysanthemum zawadskii* complex in Korea (2) polyploidy. Journal of Plant Biology 12:35-48

Lema-Rumiñska J, Zalewska M, Sadoch X (2004) Radiomutants of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) of the Lady group: RAPD analysis of the genetic diversity. Plant Breeding 123:290-293

Li H, Chen S, Song A, Wang H, Fang W, Guan G, Jiang J, Chen F (2014) RNA-Seq derived identification of differential transcription in the chrysanthemum leaf following inoculation with *Alternaria tenuissima*. BMC Genomics 15:9

Li P, Zhang F, Chen S, Jiang J, Wang H, Su J, Fang W, Guan Z, Chen F (2016) Genetic diversity, population structure and association analysis in cut chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). Molecular Genetics and Genomics 291: 1117-1125

Li R-W, Wang C, Dai S-L, Luo I-Y, Li B-Q, Zhu J, Lu J, Liu Q-Q (2012) The association analysis of phenotypic traits with SRAP markers in *Chrysanthemum*. Scientia Agricultura Sinica 45:1355-1364

Liu H, Sun M, Du D, Pan H, Cheng T, Wang J, Zhang Q (2015) Whole-transcriptome analysis of differentially expressed genes in the vegetative buds, floral buds and buds of *Chrysanthemum morifolium*. Plos One 10:e0128009

Peng H, Zhang F, Jiang J, Chen S, Fang W, Guan Z, Chen F (2015) Identification of quantitative trait loci for branching traits of spray cut chrysanthemum. Euphytica 202:385-392

Peng Y, Lai Z, Lane T, Nageswara-Rao M, Okada M, Jasieniuk M, O'Geen H, Kim RW, Sammons RD, Rieseberg LH, Stewart CN (2014) *De novo* genome assembly of the economically important weed horseweed using integrated data from multiple sequencing platforms. Plant Physiology 166:1241-1254

Ren L, Sun J, Chen S, Gao J, Dong B, Liu Y, Xia X, Wang Y, Liao Y, Teng N (2014) A transcriptomic analysis of *Chrysanthemum nankingense* provides insights into the basis of low temperature tolerance. BMC Genomics 15:1

Ritter E, Gebhardt C, Salamini F (1990) Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. Genetics 125: 645-654

Rogers K, Chen X (2013) Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. Plant Cell 25:2383-2399

Wang HB, Jiang JF, Chen SM, Qi XY, Peng H, Li PR, Song AP, Guan ZY, Fang WM, Liao Y, Chen FD (2013) Next-generation sequencing of the *Chrysanthemum nankingense* (Asteraceae) transcriptome permits large-scale unigene assembly and SSR marker discovery. Plos One 8:e62293

Wang L, Jiang J, Song A, Wang H, Li P, Guan Z, Chen F, Chen S (2015) Comparative transcriptome analysis of *Chrysanthemum nankingense* in response to nitrogen deficiency. Scientia Horticulturae 195:101-107

Wang Y, Fang W, Chen F, Zhao H, Liu Z (2007) In vitro conservation of chrysanthemum 'Jinba' and genetic stability of regenerated plantlets. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica 27:1341-1348

Wang Y, Huang H, Ma Y, Fu J, Wang L, Dai S (2014) Construction and *de novo* characterization of a transcriptome of *Chrysanthemum lavandulifolium*: analysis of gene expression patterns in floral bud emergence. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 116: 297-309

Xia X, Shao Y, Jiang J, Du X, Sheng L, Chen F, Fang W, Guan Z, Chen S (2015) MicroRNA expression profile during aphid feeding in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). Plos One 10:e0143720

Xia X, Shao Y, Jiang J, Ren L, Chen F, Fang W, Guan Z, Chen S (2014) Gene expression profiles responses to aphid feeding in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). BMC Genomics 15:1050

Xu YJ, Gao S, Yang YJ, Huang MY, Cheng LN, Wei Q, Fei ZJ, Gao JP, Hong B (2013) Transcriptome sequencing and whole genome expression profiling of chrysanthemum under dehydration stress. BMC Genomics 14:15

Yang WH, Glover BJ, Rao GY, Yang J (2006) Molecular evidence for multiple polyploidization and lineage recombination in the *Chrysanthemum indicum* polyploid complex (Asteraceae). New Phytologist 171:875-886

Zhang F, Jiang J, Chen S, Chen F, Fang W (2012a) Detection of quantitative trait loci for leaf traits in chrysanthemum. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 87:613-618

Zhang F, Chen SM, Chen FD, Fang WM, Li FT (2010) A preliminary genetic linkage map of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) cultivars using RAPD, ISSR and AFLP markers. Scientia Horticulturae 125:422-428

Zhang F, Chen S, Chen F, Fang W, Chen Y, Li F (2011) SRAP-based mapping and QTL detection for inflorescence-related traits in chrysanthemum (*Dendranthema morifolium*). Molecular Breeding 27:11-23

Zhang F, Chen S, Jiang J, Guan Z, Fang W, Chen F (2013) Genetic mapping of quantitative trait loci underlying flowering time in Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). Plos One 8:e83023

Zhang F, Jiang J, Chen S, Chen F, Fang W (2012b) Mapping single-locus and epistatic quantitative trait loci for plant architectural traits in chrysanthemum. Molecular Breeding 30:1027-1036

Zhang F, Dong W, Huang L, Song A, Wang H, Fang W, Chen F, Teng N (2015) Identification of microRNAs and their targets associated with embryo abortion during chrysanthemum cross breeding via high-throughput sequencing. Plos One 10:e0124371

Zhang F, Wang Z, Dong W, Sun C, Wang H, Song A, He L, Fang W, Chen F, Teng N (2014) Transcriptomic and proteomic analysis reveals mechanisms of embryo abortion during chrysanthemum cross breeding. Scientific Reports 4:6536

Zhang YS, Dai L, Hong Y, Song XB (2014) Application of genomic SSR Locus polymorphisms on the identification and classification of chrysanthemum cultivars in China. Plos One 9:e104856

Zhao HE, Liu ZH, Hu X, Yin JL, Li X, Rao GY, Zhang XH, Huang CL, Anderson N, Zhang XQ, Chen JY (2009) Chrysanthemum genetic resources and related genera of *Chrysanthemum* collected in China. Genetic Resources and Crop Evolution 56:937-946