

사철국화(*Chrysanthemum morifolium*)에 *Ced-9*유전자를 전이시키기 위한 연구

김명선, 김영호

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《꽃이 피어있는 기간이 오래고 생활력이 강한 품종의 화초들을 연구육종하여 많이 퍼치도록 하여야 합니다.》

사철국화는 우리 나라 국화생산에서 주요품종으로 재배되고있다.

우리는 사철국화잎절편을 재료로 리용하여 아콥토시스억제유전자인 *Ced-9*를 *Agrobacterium* 형질전환법으로 전이시키기 위한 기초연구를 하였다.

재료와 방법

식물재료로는 평양화초연구소에서 재배하고있는 사철국화 노란색품종을 MS+0.1mg/L NAA배지에서 증식시킨것을 리용하였다.

세균계통과 2원운반체 pCambia13011-Ced9/EHA105를 가진 *Agrobacterium*은 1개의 알립유전자 글루쿠로니다제유전자(*uidA*)를 가지는데 이것은 꽃양배추모자이크비루스(CaMV) 35S 프로모터에 의하여 조절된다. 또한 하이그로미딘 포스포트랜스페라제(HPT II)유전자는 T-DNA 경계에 있으며 하이그로미딘(Hyg)에 의한 형질전환체들의 선발에 리용된다.

잎절편의 싹분화 MS+3.0mg/L BA+0.1mg/L NAA배지에 잎절편을 접종하여 5~6주 지나면 상처주위에 싹들이 유도되는데 이것을 뿌리내리기를 위해 MS+0.1mg/L NAA배지[3]에 옮기였다.

형질전환체선발을 위한 하이그로미딘의 최적농도 결정 각이한 농도의 하이그로미딘(0, 10, 15, 20, 25mg/L)을 첨가한 MS+3.0mg/L BA+0.1mg/L NAA배지에 잎절편을 접종하고 싹분화률을 조사하였다.

균배양과 형질전환체선발 pCambia13011-Ced9/EHA105를 가진 *Agrobacterium*을 100mg/L 리파미딘과 100mg/L 카나미신이 첨가된 YEB고체배지에 접종하고 28℃에서 배양하였다. 다음 50mg/L 카나미신을 포함하는 YEB액체배지(20mL)에 접종하여 하루밤 자래우고 1:1 000 액체YEB배지로 희석하였다.

국화잎절편들을 0.8cm×0.8cm크기로 잘라 MS+1.0mg/L BA+0.1mg/L NAA배지에서 2, 4 일동안 예비배양한 다음 *Agrobacterium*배양액에서 2min동안 감염시켰다. 외식체를 무균려과종이에 놓아 물기를 흡수시킨 다음 MS+1.0mg/L BA+0.1mg/L NAA배지에서 공존배양하였다. 공존배양후에 외식체들을 무균수로 3번 씻어 300mg/L 세포탁심과 15mg/L 하이그로미딘을 첨가한 MS싹유도배지에 접종하여 형질전환체들을 선발하였다. 형질전환체의 계대증식은 300mg/L 세포탁심과 30mg/L 하이그로미딘을 첨가한 MS+0.1mg/L NAA배지[1]에서 진행하였다.

PCR에 의한 *Ced-9*유전자분석 형질전환식물들로부터 게놈DNA를 추출한 다음 P_{35S}와 T_{nos}, *Ced-9*유전자단편검출을 위하여 PCR증폭을 진행하였다.

PCR조건은 다음과 같다. 94℃에서 예비변성 5min→30회전의 94℃에서 변성 1min, 55℃에서 어닐링 1min, 72℃에서 연장 2min→72℃에서 10min 최종연장하였다. 3개의 유전자들에 대한 증폭산물들은 2% 아가로스겔전기영동과 염색[1, 2]에 의하여 확인하였다.

형질전환식물에서 가물견딜성판정 선발개체(조직배양 7대)와 출발개체의 순화된 모를 300g의 기질이 들어있는 15cm직경의 화분에 심고 8~10일이 자랄 때까지 정상관리하다가 20일 동안 가물스트레스처리를 진행하면서 식물체의 잎시들지수를 조사하였다.

가물견딜성을 평가하는데 쓰이는 잎시들지수[4]는 다음과 같다.

0급: 정상상태

1급: 맨 윗층의 2~3잎들이 약간 시든 상태

2급: 윗층잎들이 시들고 아래층잎의 잎꼭지는 수평으로 드리워진 상태

3급: 아래층잎몸이 아래로 드리워졌으며 잎꼭지가 수평아래로 60~30° 드리워진 상태

4급: 윗층잎몸이 구부러지게 모여지고 아래층잎몸의 잎꼭지가 수평아래로 거의 90° 드리워진 상태

5급: 포기전체의 잎이 시들어 아래로 드리워진 상태

6급: 전체 포기가 완전히 마른 상태

결과 및 논의

1) 사철국화잎절편의 Hyg감수성판정

유전자전이를 위한 사철국화잎절편의 Hyg감수성판정결과는 표 1과 같다.

표 1. 사철국화잎절편의 Hyg감수성판정

지표	Hyg농도/(mg·L ⁻¹)				
	0	10	15	20	25
접종수/개	30	30	30	30	30
싹분화률/%	82	15	0	0	0
고사률/%	0	33.3	100	100	100

배지: MS+3.0mg/L BA+0.1mg/L NAA

표 1에서 보는것처럼 Hyg농도가 증가함에 따라 싹분화와 유상조직형성이 억제되었으며 15mg/L부터는 완전히 억제되었다. 이로부터 사철국화잎절편의 유전자전이를 위한 Hyg감수성농도를 15mg/L로 정하였다.

2) 사철국화마디의 Hyg감수성판정

유전자전이를 위한 사철국화마디의 Hyg감수성판정결과는 표 2와 같다.

표 2. 사철국화마디의 Hyg감수성판정

지표	Hyg농도/(mg·L ⁻¹)				
	0	10	20	30	40
접종수/개	30	30	30	30	30
생장률/%	100	100	26.6	0	0
뿌리형성률/%	100	100	0	0	0
고사률/%	0	0	0	100	100

배지: MS+0.1mg/L NAA

표 2에서 보는것처럼 Hyg농도가 증가함에 따라 생장률과 뿌리형성률이 감소되었으며 30mg/L부터는 완전히 억제되어 고사되었다. 따라서 사철국화마디의 유전자전이를 위한 Hyg 감수성 농도를 30mg/L로 정하였다.

3) 형질전환에 미치는 예비배양과 공존배양의 영향

형질전환에 미치는 예비배양과 공존배양의 영향은 표 3과 같다.

표 3. 형질전환에 미치는 예비배양과 공존배양의 영향

구분	예비배양 /d	공존배양 /d	접종수 /개	공존배양후 피해률/%	썩분화수 /개	선발수 /개
대조	2	2	200	0	0	0
시험구	2	2	230	2	5	5
		3	210	3	3	3
		4	200	10	1	0
	4	2	240	12	2	2
		3	200	12	2	2
		4	200	21	0	0

MS+3.0mg/L BA+0.1mg/L NAA+15mg/L Hyg+300mg/L Cef+당 3%, pH 5.8, 대조는 균감염시키지 않은 잎절편

표 3에서 보는것처럼 잎절편에서 Hyg저항성개체는 예비배양 2, 4일, 공존배양 2, 3일에서 각각 7, 5개가 선발되었다. 또한 예비배양과 공존배양일수가 늘어남에 따라 피해률이 높아지는 경향성이 나타났다. 이것은 형질전환체선발률이 예비배양에서는 4일, 공존배양에서는 3일까지는 높으나 그이상 배양하면 낮아진다는것을 보여준다. 공존배양 2일에서 잎절편의 형질전환률은 1.5%이다. 선발된 Hyg저항성개체들은 마디선발배지에서 재선발을 진행하였다.

4) PCR에 의한 *Ced-9*유전자분석

선발된 12개체의 T-DNA결합을 확인하기 위하여 대조와 하이그로미췌저항성식물계통들에서 분리한 계놈DNA에 대한 PCR분석을 진행하였다. 특이프라이머들은 도입유전자(P_{35S}와 T_{nos}, *Ced-9*)의 존재를 검증하기 위하여 PCR분석에 리용되었다. 각이한 크기(123, 199, 869bp)의 P_{35S}와 T_{nos}, *Ced-9*토막들은 모든 형질전환식물들의 계놈DNA에서 검출되었지만 대조식물들에서는 검출되지 않았다. 유전자전이식물의 PCR분석결과 목적유전자가 존재한다는것을 알수 있었다.(그림 1)

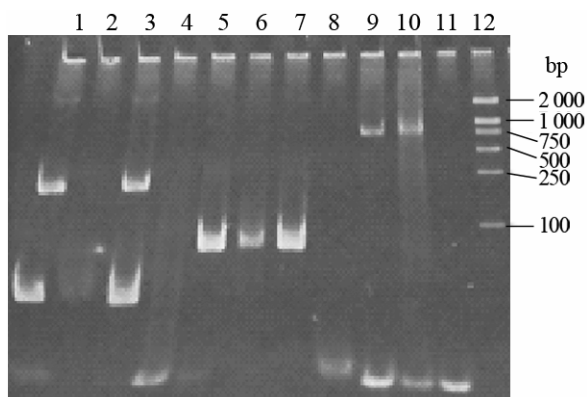


그림 1. 형질전환식물의 PCR분석

1-선발개체의 P_{35S}프라이머에 대한 PCR산물, 2-*A. tumefaciens*의 P_{35S}프라이머에 대한 PCR산물, 3-출발개체의 P_{35S}프라이머에 대한 PCR산물, 4-H₂O의 P_{35S}프라이머에 대한 PCR산물, 5-선발개체의 T_{nos}프라이머에 대한 PCR산물, 6-*A. tumefaciens*의 T_{nos}프라이머에 대한 PCR산물, 7-출발개체의 T_{nos}프라이머에 대한 PCR산물, 8-H₂O의 T_{nos}프라이머에 대한 PCR산물, 9-선발개체의 *Ced-9*프라이머에 대한 PCR산물, 10-*A. tumefaciens*의 *Ced-9*프라이머에 대한 PCR산물, 11-출발개체의 *Ced-9*프라이머에 대한 PCR산물, 12-DNA 표식자(DL2000)

5) 전이식물에서 가물견딜성판정

가물조건에서 전이식물의 잎시들지수를 조사한 결과는 그림 2와 같다.

그림 2에서 보는것처럼 출발개체는 물주기를 중지한 후 4일째부터 시들기 시작하였으나 선발개체는 5일째부터 시들기 시작하였다.

10일 지난 후 출발개체의 잎시들지수는 선발개체식물체의 잎시들지수보다 1.2배 높았다. 이로부터 선발개체의 가물견딜성이 출발개체보다 높다는것을 알수 있다.

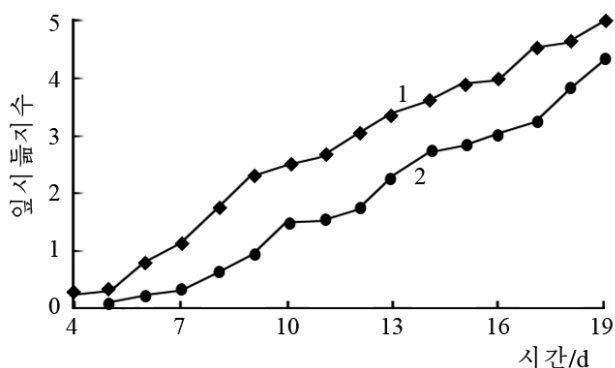


그림 2. 가물조건에서 전이식물의 잎시들지수
1-대조구, 2-시험구

맺 는 말

유전자전이를 위한 사철국화잎절편의 Hyg감수성농도는 15mg/L, 마디의 Hyg감수성농도는 30mg/L, 공존배양 2일에서 잎절편의 형질전환률은 1.5%이다.

PCR분석을 통하여 *Ced-9*유전자가 사철국화에 전이되었다는것을 확인하였으며 전이국화의 가물견딜성은 1.2배 높아졌다.

참 고 문 헌

- [1] M. Aftabi et al.; Molecular Biology, 7, 1, DOI: 10.4172/2168-9547.1000202, 2018.
- [2] T. A. Wani et al.; Journal of Plant Biochemistry & Physiology, 4, 2, DOI: 10.4172/2329- 9029.1000167, 2016.
- [3] 张爱民 等; 安徽农业科学, 39, 19671, 2011.
- [4] 李志亮 等; 园艺学报, 32, 4, 653, 2005.

주체109(2020)년 1월 5일 원고접수

Transformation of *Ced-9* Gene into *Chrysanthemum morifolium* “Sachol”

Kim Myong Son, Kim Yong Ho

The Hyg-sensitivity concentration of leaf segments of *C. morifolium* “Sachol” for transformation was 15mg/L, and that of node is 30mg/L.

On the second day after co-cultivation, transformation efficiency of leaf segments was 1.5%.

PCR analysis confirmed that *Ced-9* gene transformed to *C. morifolium* “Sachol” and in the evaluation of drought-resistant the level of *C. morifolium* “Sachol” was 1.2 times higher.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, transformation, *Ced-9* gene, *Chrysanthemum morifolium*