

과제구분	GMO실용화연구	수행시기	전반기		
중장기 Code	D	RIMS Code	20050301035503		
연구과제 및 세부과제		연구분야 (Code)	수행 기간	연구실	책임자
강원 특화작물 형질전환 식물체 육성 연구		생명공학 LS1006	'05 ~'07	강원농업기술원 농산물이용시험	권순배
1) 강원 특화작물 형질전환 식물체 육성 연구		생명공학 LS1006	'05 ~'07	강원농업기술원 농산물이용시험	권순배
색인용어	강원특화작물, 칼라, 토마토, 바이러스저항성, 형질전환				

1. 연구목표

칼라(*Zantedeschia sp.*)의 바이러스병은 생육불량의 주 요인으로 절화품질이 저하되고, 고급 화종으로 외국에서는 품종 육성연구가 많이 이루어지고 있으나, 바이러스 저항성 품종 육성에 대한 연구는 미미한 실정이다. 본 연구에서는 칼라에서 바이러스병 저항성을 발현할 수 있는 유전자를 칼라 식물체에 형질전환법으로 도입시켜 내바이러스성 칼라 식물체의 개발을 목적으로 한다.

또한 본도의 특산작물인 토마토의 경우, 최근 바이러스로 인한 피해 증가추세로 토마토의 주요 바이러스인 CMV 저항성 토마토 형질전환체 개발을 추가하여 시험하였다.

2. 주요 결과

가. 강원 특화작물 형질전환 식물체 육성 연구

제1 세부과제 : 칼라의 바이러스병 저항성 형질전환체 육성

(시험 1) 칼라 조직배양 및 재분화 조건 확립

1) 공시품종 및 재분화조건 시험

칼라 생장점에서 최적 캘러스 유도배지의 조성은 MS 기본 배지, sucrose 3%, 0.5 mg/l TDZ가 적정하였다.

2) 형질전환체의 선발에 적합한 항생제 농도 구명

형질전환을 실시한 칼라의 캘러스 조직과 multi shoot로부터 형질전환 가능성 개체를 1차적으로 선발하기위한 적정 Phosphinotricyn (PPT) 농도는 3 mg/L이 좋았고, 유식물체로부터 선발을 위한 바스타 농도는 품종별로 저항성 정도가 달라 블랙매직(BM) 0.3%, 골든 어페어 (GA) 0.4%가 좋았다.

3) 순화조건의 확립

물을 흠뻑 적신 상토에 각각의 개체를 잘 눌러 심은 후, 물 빠짐이 좋게 하고 30% 차광막을 덮어 적당한 그늘을 만들어 주며 상대습도를 유지하면 90% 이상 생존하였다. 그러나 기내에서의 생장이 좋지 못하거나, 뿌리가 건강하지 못하고, 잎 모양이 기형일 경우는 20% 정도만 순화에 성공하였다.

표 1. 기내배양 칼라의 순화율 비교

배양토	온도(°C)	습도(%)	차광(%)	순화(%)
상토 A	25±5	60-90	30	90<
상토 B	"	"	30	90<

(시험 2) 칼라 형질전환체계 확립

○ 형질전환 - 1

형질전환용 벡터로는 pSBCG-M을 이용하여, 방법은 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 이용하는 방법으로 수행하였다. 각 공시시료 캘러스의 multiple-shoot 부분을 성장점에 가깝게 가능한 한 많이 잘라버린 후 실험에 사용하였고, 다수의 곤충핀을 이용한 방법은 식물체에 지나친 자극을 주어 공동배양 후배지에 치상하면 짓물러지므로 본 형질전환에 적합한 방법이 아니라고 판단, particle delivery system인 PDS 1000의 압력을 이용한 방법으로 형질전환 실시하였으며, 공동배양은 시간별로(캘러스와 *Agrobacterium*을 10분, 30분, 1시간, 3시간, 6시간, 12시간, 24시간, 72시간동안) 액체배지에서 실시하였으나, 6시간 이상 시간이 길어지면 캘러스 덩어리의 괴사율이 높아져 재분화율이 극히 낮았다. 따라서 3시간 이내로 하였으며, 항산화제 처리 기간은 7일이 적합(7일 이상에는 생존을 저하)하였다. 실험 결과 pSBCGM을 도입한 1,100 psi 공기압력으로 상처를 준 BM 실험군 102 개체 중 1개체에서 PCR로 유전자 도입이 확인되었다.

○ 형질전환 방법- 2

Mei-Kuen Yip 등(2006)에 따라 실시한 형질전환 결과 CMV CP gene을 도입한 칼라 절편체 596 (BM : GA = 404 : 192)개를 항생제 kanamycin 100 mg/l 배지에 치상 선발 결과 약 20%의 비율인 112(85 : 27) 개체가 얻어졌다. 이 개체들 중 약 40%인 45 (33 : 12) 개체에서 뿌리가 발생 하고 성장 중에 있으며, 추후 형질전환체를 분석할 예정이다.

제2 세세부과제 : CMV Gene 발현 토마토(cv.Hokusanmaru) 형질전환체 개발

(시험 1) 재분화 및 형질전환 체계 확립

기존의 토마토 형질전환법을 바탕으로 로꾸산마루의 형질전환 체계를 확립하였다. zeatin과 IAA의 조합, AgNO₃의 첨가여부, 기본배지 MS와 B5의 차이 등으로 나누어 실험하였다.

또한, stem, inter-node, leaf, cotyledon으로 부위별로 explant를 나누어 치상하였다. 3주가 지난 후에 재분화 결과를 관찰하였으며, 처음에 leaf, cotyledon, stem, internode 부분으로 나누어 치상 하였지만, 결과적으로 leaf와 cotyledon, stem과 internode 부분의 결과가 매우 비슷하게 관찰되어 같이 묶어서 결과를 데이터화 하였다. AgNO₃가 첨가된 배지에서는 leaf, cotyledon의 재분화는 전혀 이루어지지 않았으며, 상대적으로 MS 배지에서 B5 배지보다 재분화가 활발히 이루어졌다. 총30개의 대조구에서 zeatin 2 mg/l + IAA 0.2 mg/l, zeatin 2 mg/l + IAA 0.4 mg/l, zeatin 2 mg/l + IAA 0.5 mg/l, zeatin 1 mg/l + IAA 0.4 mg/l 4개의 대조구를 선발하여 2차 재분화 실험을 해본 결과 zeatin 2 mg/l + IAA 0.2 mg/l 배지에서 다른 조건들보다 재분화가 잘 이루어졌으며, 재분화 개체 모습의 기형이 가장 적었다. 또한 형질전환 실험의 효율을 높이기 위하여 explant는 모두 leaf로 사용하였다

(시험 2) 형질전환 토마토의 형질전환체 선발 및 분석

재분화 된 토마토 형질전환체로부터 CMV-CP 유전자 도입을 확인하기 위하여 PCR을 수행하였다. 항생제가 포함된 배지에서 재분화된 토마토 잎으로부터 genomic DNA를 추출하였으며 이를 가지고 PCR분석을 한 결과 1개체를 제외하고 나머지 모든 개체에서 두 primer 사이에 해당하는 약 650bp 크기의 증폭된 DNA band를 확인 할 수 있었으며 형질전환 되지 않은 대조구에서는 증폭이 일어나지 않았다.

PCR을 통해 CMV-CP gene의 도입이 확인된 개체들 중에서 4개체를 선택하여 southern blot을 수행하였다. southern blot은 제한효소 Xba I 으로 over-night으로 처리하고 DIG probe로 실험하였다. 4개체 중 두 개체에서 band가 확인되었으며, T01개체는 18, 4.3kb, T02 개체에서는 19kb에서 혼성화 반응을 보였다. 각 개체의 genomic DNA를 제한효소로 절단하였을 때 서로 다른 위치에서 삽입되었음을 알 수 있고, 이것으로 각 유전자의 발현이 다르게 조절되고 있음을 알 수 있었다.

CMV-CP gene의 RNA의 전사를 확인하기 위하여 CMV-CP primer로 RT-PCR을 시행하였다. 1번과 2번 개체에서 밴드가 증폭(656 bp)되어, 두 개의 개체에서 RNA로의 전사가 이루어 졌음을 확인 할 수 있었다. 현재 모든 분자적 분석에서 band가 증폭된 개체의 후대를 분석하기 위해 채종을 준비하고 있다. 이후 토마토 T1 세대의 분자적 분석은 물론 CMV병의 저항성 여부도 실험 할 예정이다.

3. 고 찰

칼라는 남아프리카가 원산지인 화훼식물로 천남성과(Araceae)에 속하는 구근 식물이다. 칼라는 크게 백색칼라와 황색, 분홍, 보라, 등의 유색칼라의 두 종류로 나누는데 우리나라에도 몇 가지 품종의 칼라(*Zantedeschia* spp.)가 뉴질랜드, 오스트레일리아와 네덜란드 등지에서 도입되어 재배되고 있다. 유색칼라는 전 세계적으로 뉴질랜드에서 절화 및 구근을 가장 많이 생산하고 있으며, 그 다음은 네덜란드, 이스라엘, 일본 순이나 최근에는 베트남, 스리랑

카, 인도네시아 등 동남아시아 지역에서 값싼 구근이 대량생산되고 있기도 하다.

칼라는 재배에 노동력이 적게 들고 연중 생산이 가능하며 관상의 대상인 화포의 모양이 뛰어나 분화와 절화 등 화훼 분야에 이용가치가 높아 국내에서의 재배면적과 수출이 늘어나고 있다. 칼라(*Zantedeschia* sp.)의 바이러스병은 생육불량의 주요인으로 작용하게 되는데 절화품질이 저하되어 농가소득의 감소를 초래한다. 한편 권 등(Arch Virol. 2002)은 연구결과를 통하여 이 바이러스가 *Potyvirus*에 속하는 새로운 바이러스임을 밝히고 *Zantedeschia mosaic virus*(ZaMV)라고 명명하였다. 현재 외국에서는 칼라의 품종육성 연구가 많이 되고 있으나 바이러스 저항성 등 내병성 품종의 육종은 극히 미흡한 실정이며 형질전환에 대한 연구는 국내외적으로 매우 미약한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 ZaMV의 CP gene을 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 방법으로 칼라에 도입하여 ZaMV 저항성 칼라를 개발하기 위한 기초 연구로 칼라의 형질전환 모델을 확립하고자 실험을 진행 하였으며 본 연구의 결과를 토대로 앞으로 칼라의 내병성 품종 육종 및 형질전환에 대한 연구가 더욱 활발히 이루어 질 수 있을 것으로 본다.

한편 오이 모자이크 바이러스 (Cucumber mosaic virus CMV)는 Bromoviridae, Cucumovirus 속의 대표 바이러스로서, 85과 365속 775종의 기주로부터 분리된다 (Palukaitis et al., 1992). CMV는 800여종의 식물 바이러스 중에서 450여종의 기주 식물을 가져 기주 범위가 가장 넓고, 세계적으로 널리 분포하는 바이러스이다. 우리나라에서 칼라 등 화훼류를 위시하여 박과류와 가지과 등의 원예작물에서 연간 35% 이상의 수량감소를 가져온다고 알려져 있다. 이것을 종자가격으로 추산해볼 때 연간 약 수십억 상당의 피해를 보고 있으며 농산물이나 가공품이 되었을 때의 피해 가격은 약 수천억 원이 넘는다. 현재 직접적으로 바이러스 병에 효과적인 방제방법은 없으므로 작물의 수량을 현저히 감소시키는 CMV병의 효과적인 방제를 모색하기 위한 방안의 하나로 본 연구에서는 토마토에 CMV-CP gene을 도입하여 CMV병의 저항성을 갖는 식물체를 개발하고자 하였다.

*Agrobacterium*을 이용한 형질전환의 경우는 식물의 조직 절편으로부터 재분화 능력이 높은 조직배양 체계의 확립이 형질전환 효율 향상에 가장 중요한 영향을 미치는 요인 중 하나로 알려져 있다. 본 연구에서는 이상과 같은 결과를 토대로 CMV-CP 유전자를 형질전환용 발현벡터에 삽입하고 이를 *Agrobacterium*을 이용한 외래유전자 도입 방법을 이용하여 칼라 (cv.Black Magic, Golden Affair), 담배(*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN)와 토마토 (*Lycopersicon esculentum* cv. Rokusanmaru)로 유전자 발현을 유도함으로써 CMV 감염으로부터 저항성을 향상시킬 수 있는지 알아보고 이러한 식물체를 확보하고자 하였다.

식물바이러스의 게놈 중 외피 단백질 유전자(CP gene)가 도입된 식물체가 바이러스에 강한 저항성을 나타낸다는 결과가 보고 된 이래 (Tumer et al., 1987), 최근 미국에서는 유전자 조작 방법을 이용하여 여러 종류의 바이러스에 저항성을 보이는 신품종 호박이 시판되기에 이르렀다(Wilkinson, 1997). 미국에서는 토마토의 저장성을 개선시킨 형질전환 토마토 3품종이 개발되어 시판되고 있지만(Wilkinson, 1997) 아직 형질전환에 의해 바이러스 저항성 품종이 시판되고 있지는 못한 상황이다. 본 연구에서는 토마토에 CMV-CP 유전자를 *Agrobacterium*

법으로 형질전환 하여 14개체의 R0 식물체(PCR 확인)를 얻을 수 있었다. 14개체를 모두 순화하여 Southern blot을 수행한 결과는 총 14개체에서 단 두 개체만이 혼성화 반응을 보였으며, 역시 RNA의 전사여부를 알아보는 RT-PCR에서도 두 개체만이 band가 증폭되었다. 담배의 형질전환보다는 매우 낮은 수치이지만, 유전여부가 확인된 개체에서 채종을 준비 중이며, 담배에서와 같이 후대 분석도 앞으로 시행할 예정이다.

이번 실험으로서 로꾸산마루(토마토)의 형질전환 체계가 이루어졌으므로, 앞으로 다른 유용한 유전자의 도입도 수월하게 이루어 질 것으로 판단된다

4. 결과활용 요약

	계	논문 게재	저서 발간	전문지 게재	기초 활용	학회 발표
계						3
강원 특화작물 형질전환 식물체육성 연구						3

5. 세부과제 Abstract

가. 강원 특화작물 형질전환 식물체 육성 연구

Transformation and development of specialized Gangwon provincial crop

Experiment 1 : Transformation of calla lily

1. Optimum condition of callus induction media of calla was MS salt, sucrose 3%, 0.5mg/l TDZ and 0.3% phytigel.
2. For the selection of acclimatized putative transformant, the optimum concentration of Basta (Bayer Crop Science Co.) was 0.3% against BM and 0.4 % against GA.
3. The optimum concentration of Phosphinotricyn(PPT) was 0.3 mg/l.
4. Transformation method #1
 - pSBCGM gene transformation was confirmed by PCR analysis in 1 out of 102 transformant wounded under 1,100 psi helium gas pressure
5. Transformation method #2
 - CMV CP gene transferred 596 tuber discs(BM : GA = 404 : 192) was plated on the kanamycin 100 mg/l media for the antibiotic selection and generated 112(85 : 27) plantlet in the ratio of 20%.
 - Among these, 45(33 : 12) plantlet was rooting and growing in the ratio of 40%.
 - 35 plantlet are growing from the result of repeated experiments : genetic analysis will carry out

Experiment 2 : Transformation of Tomato

1. Transformation was carried with *Cucumber Mosaic Virus* coat protein gene by *Agrobacterium tumefaciens*
2. Gene transferred 54 tobacco T0 transgenic plants was developed and then gathered T1 seeds were kanamycin tested.
 - The ratio of 3 : 1 genetic inheritance was agree with Mendel's law of heredity and heredity was confirmed by southern, northern blotting and RT-PCR.
 - The results of virus resistance examination of seven T1 plantlet, four was showed delayed-resistance character, one was highly-resistant and two plantlet was non-resistant.
3. Gene transferred 8 tomato T0 plants was confirmed by PCR, southern and RT-PCR.
 - Now growing for the analysis of T1 generation.