

형질전환된 꽃양배추에서 Proteinase Inhibitor II 유전자의 발현

김창길* · 정재동¹

경북농촌진흥원, ¹경북대학교 농과대학 원예학과

Expression of Proteinase Inhibitor II gene in Transgenic Flowering Cabbage, *Brassica oleracea* var. *acephala* DC.

KIM, Chang Kil* · CHUNG, Jae Dong¹

Kyungbuk Provincial RDA, Taegu, 302-301, Korea; and ¹Department of Horticulture, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea. *Corresponding author.

Hypocotyl explants of flowering cabbage were cocultured with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404::pGA875 harboring proteinase inhibitor II(PI-II) cDNA and then regenerated into plants. Successful transcripts of PI-II gene were detected by RNA dot blot analysis. Bioassay was conducted on transgenic flowering cabbage. It was confirmed that insecticidal activities of transformants were much higher than that of control plants. In progeny test of transformants, 27.4% of T₁ seeds was resistant on MS medium containing 20 mg/L kanamycin.

Key words: bioassay, transformant, progeny

오늘날 농작물의 병충해 방제에는 다량의 농약이 살포되고 있고 이로 인한 自然 및 人體에 미치는 피해는 해마다 급증하고 있다. 따라서 農藥의 구입과 살포에 소요되는 막대한 경비를 줄이고 自然環境에 미치는 公害를 최소화하기 위해 여러 作物에서 병충해에 강한 내병충성 품종이 육성 보급되고 있다. 그러나 기존의 내병충성 품종육성에는 저항성 유전자의 탐색으로부터 신품종이 개발되기까지 육종년 한이 장기간 소요되기 때문에 노동력과 경비의 부담이 크며, 저항성 유전자의 이용 또한 교잡 친화성이 있는 범위 내에서만 가능하다. 그러나 특정 내병충성 유전자를 식물체 내에 직접 도입할 수 있는 형질전환법은 이러한 단점을 보완할 수 있는 유일한 방법으로 정착되어 가고 있다.

미국에서는 이미 1958년에 토양 세균의 일종인 *Bacillus thuringiensis* (Bt)의 孢子를 微生物 상태로 조제하여 살충제로 사용된(Aronson et al., 1986) 이후, 독소단백질(Bt 유전자)을 담배(Vaech et al., 1987), 토마토(Delanny et al., 1989)와 같은 일부작물에 형질전환시켜 이미 실용화 단계에 있다. 그러나 Bt 독성 유전자는 곤충의 범위가 제한적이어서 여러 종류의 독성 유전자를 동시에 넣어주기 전에는 광범위한 저항성을 기대할 수 없는 단점이 있다. 반면, 곤충의

종류와 무관하게 독성을 가진 물질중의 하나로 가지과 식물에 존재하는 단백질 분해효소 억제물질(proteinase inhibitor)은 조직발달시 特異적으로 생성될 뿐만 아니라 감자와 토마토의 잎이 昆蟲에 의해 상처를 받았을 때 蓄積이 유도되는 것으로 알려져 있다(Pena-Cortez et al., 1988; Pena-Cortez et al., 1989; Ryan et al., 19970).

본 研究에서는 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하여 PI 유전자가 도입된 형질전환체를 획득하고 이들 형질전환체를 대상으로 유전분석과 生物檢定 등을 통하여 내충성 유전자의 이용가능성을 모색코자 일련의 실험을 遂行한 결과를 보고하는 바이다.

材料 및 方法

형질전환 및 식물체 재분화

꽃양배추(*Brassica oleracea* var. *acephala* DC.) '은배'의 종자를 1% NaOCl(active chlorine, 10~12%)용액에 30분간 살균하고 멸균수로 수세한 후 sucrose 3%와 한천 0.8%를 합

유한 MS배지에 파종하여 25 ± 2°C, 1일 16시간 명배양하였다. 무균배양 7일후 하배측을 1 cm 길이로 잘라 BA 1.0 mg/L가 첨가된 MS배지에 1일간 전배양한 다음, *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404::pGA 875(Figure 1)를 kanamycin 15 µg/mL와 tetracyclin 5 µg/mL이 첨가된 YEP(1% peptone, 1% yeast extract, 0.5% NaCl) 液體培地에서 28°C, 暗상태로 48시간 동안 분당 160 rpm으로 진탕배양하여 하배측과 2일간 공동배양하여 형질전환시켰다. *Agrobacterium*과 공동배양후 자엽과 하배측으로부터 균을 제거하기 위하여 carbenicillin 500 mg/L와 kanamycin 20 mg/L가 첨가된 재분화배지에 옮긴 후 25°C, 16시간 일광하에서 배양하였으며 2주마다 새로운 배지로 옮겨 주었다. 再分化된 shoot는 500 mg/L의 carbenicillin과 10 mg/L의 kanamycin이 첨가된 MS 배지에 이식하여 뿌리를 유도하고 뿌리가 형성된 꽃양배추는 포트에 이식하여 온실에서 순화시킨 다음 遺傳分析에 사용하였다.

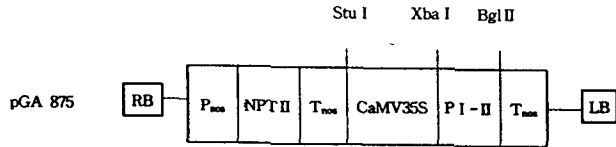


Figure 1. Structure of the binary vector pGA 875. Abbreviations used are : P_{nos}: nopaline synthase promoter, NPT II: neomycin phosphotransferase type II, T_{nos}: polyadenylation signal of the nopaline synthase gene, CaMV35S: 35S promoter of cauliflower mosaic virus, PI-II: coding region of the proteinase inhibitor-II cDNA of tomato, RB: T-DNA right border, LB: T-DNA left border.

Dot blot 분석

形質轉換된 꽃양배추에서 PI-II 유전자의 發現程度를 조사하기 위하여 먼저 Chomczynski 등(Pawlowski et al., 1994)의 방법에 준하여 다음과 같이 RNA를 抽出하였다. 각 식물체의 건전한 잎 1 g을 막자사발에 넣고 액체질소로 급냉 동시킨 상태에서 미세한 분말로 마쇄하고 solution D (4 M guanidinium thiocyanate, 25 mM sodium citrate, 0.5% sodium lauroylsarcosinate, 0.1 M β-mercaptoethanol) 10 mL 첨가하여 혼합한 다음 50 mL cap tube로 옮겨서 1 mL의 2 M sodium acetate(pH 4.0), 10 mL의 water saturated phenol, 2 mL의 chloroform/isoamylalcohol(49:1) 차례로 넣고 잘 섞은 다음 얼음 위에서 15분 정도 식힌 후, 4°C에서 10,000 ×g로 20분 동안 원심분리하여 상등액을 새 tube로 옮기고 10 mL의 isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 60분간 둔 다음 다시 한번 4°C에서 10,000 ×g로 20분간 원심분리하여 동량의 isopropanol로 침전시키고 75% 에틸알콜에 RNA pellet을 녹인 후 4°C에서 10,000 ×g로 10분 동안 원심분리하여 침전된 pellet을 진공 건조시킨 다음 재증류수에 녹여 추출한 RNA

를 25 µg/µl가 되도록 농도를 조절하여 nylon membrane상에 blotted시킨 후 PI-II 유전자의 cDNA probe와 hybridization 시킨 다음 mRNA의 측정정도를 조사하였다.

생물검정 및 후대검정

形質轉換된 꽃양배추의 殺蟲力檢定은 형질전환이 확인된 개체를 대상으로 1~2령기의 담배거세미 나방 유충을 꽃양배추의 잎에 각각 5~10마리씩 접종하였으며 처리후 잎의 섭식정도를 비교 분석하였다. 또한 이들 식물체들을 한달간 5°C에 저온단일처리한 다음 온실로 옮겨 개화시킨 후 자식종자를 채종하여 1% NaOCl에 30분간 살균후 각각 kanamycin 20 mg/L가 함유된 MS 배지에 파종하여 2주간 배양한 다음 생존율을 조사하였다.

結果 및 考察

PI-II cDNA가 도입된 식물발현 벡터인 pGA875를 *A. tumefaciens* LBA4404를 이용하여 꽃양배추의 하배측조직에 형질전환하여 식물체를 재분화 시켰다. 형질전환된 꽃양배추에서 PI-II 유전자와 전사가 일어나는지 알아보기 위해 RNA dot blot를 수행하였다. 그 결과(Figure 2) 형질전환된 식물체의 잎에서 분리된 RNA에서는 PI-II 유전자가 전사된 것을 확인할 수 있었으나 형질전환되지 않은 정상조직에서는 확인할 수 없었다.

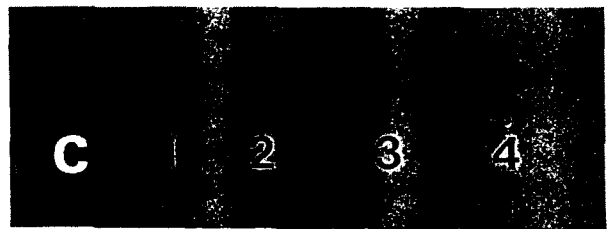


Figure 2. Dot blot analysis of RNA levels in transgenic and nontransgenic plant. Twenty micrograms of total RNA isolated from leaves were blotted on nylon membranes and hybridized with cDNA probe of the PI-II genes. C: nontransgenic plant, 1~4: transgenic plants.

Dot blot 분석결과 PI-II mRNA의 축적이 확인된 꽃양배추가 담배 거세미 나방에 대하여 어느정도 殺蟲力을 보이는가를 檢定하기 위하여 잎의 섭식정도를 조사 하였다. 그 결과(Table 1) 대조구에서 절취한 잎의 경우에는 담배 거세미나방의 유충이 계속해서 잎의 대부분을 갉아먹은 반면 형질전환된 잎의 경우 초기에는 대조구와 같이 잎의 대부분을 담배 거세미나방의 유충이 갉아 먹어버려 섭식정도에 차이가 없었다. 그러나 3번째 잎부터는 대조구에서 담배 거

Table 1. Bioassay of transgenic leaf blade of *Brassica oleracea* var. *acephala* using *Agrotis segetum*.

Test plant	No. of leaves tested in turn	Leaf area(cm ²)		B/A(%)
		before injury(A)	after injury(B)	
Control	1st	26	2	7.6
	2nd	28	2	7.1
	3rd	32	3	7.7
	4th	27	3	11.1
Transformant	1st	30	4	1.3
	2nd	31	6	19.3
	3rd	22	16	72.7
	4th	27	21	77.7
	5th	29	24	82.7

세미나방 유충의 섭식정도가 계속해서 왕성한 반면, 형질전환된 꽃양배추에서는 급격히 둔화되는 경향이였다(Figure 3).

현재까지 단백질 분해효소 억제제를 식물체에 형질전환시킨 예를 보면 콩과식물인 cowpea에서 분리된 trypsin inhibitor 유전자를 담배에 형질전환시킨 결과 *Heliothis virescens* 유충의 성장을 억제시켰다는 보고(Hilder et al., 1987)가 있다. 또한 Johnson 등(1989)이 감자와 토마토에서 분리된 단백질 분해효소 억제제 II 유전자를 *Agrobacterium* 벡터를 이용하여 담배에 도입한 결과 담배잎을 갉아먹는 유충에 대한 총해 抵抗性이 크게 증가됨을 보고하였다. 최근에는 벼와 옥수수 등에서 발견된 cysteine protease inhibitor가 Coleoptera 등과 같은 곤충의 소화기능을 저해하는 것으로 밝혀졌으며 이 유전자를 이용하여 내충성 형질을 지닌 형질전환체를 얻을 가능성이 있는 것으로 전망하고 있다(An, 1996). 뿐만 아니라 PI 유전자와는 달리 특정 곤충에만 작용한다고 알려져 있는 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 유전자를 Vaeck 등(1987)이 담배에 형질전환시켜 tobacco hornworm의 유충에 대해 높은 殺蟲力을 가짐을 보고하였다. Barton 등(1993)도 Btk 유전자인 HD- I의 일부 sequence를 식물에 맞게 변형하여 담배에 형질전환시켜 본 결과 형질전환체의 Bt 毒素 mRNA양과 단백질량은 형질전환체에 따라 차이가 있어서 tobacco hornworm의 생물검정 결과 이들 개체의 살충력은 식물체가 생산하는 Bt 毒素 mRNA양과 일치한다고 하였다. Delannay 등(1989)은 HD- I 유전자를 형질전환시킨 토마토에 대하여 포장실험을 수행한 결과 형질전환 개체들은 tobacco hornworm, tobacco fruitworm 등의 해충에 대하여 抵抗性을 가진다고 하여 형질전환체의 실질적인 이용가능성을 입증하기도 하였다

형질전환이 확인된 꽃양배추와 정상식물체에서 채종한 종자로부터 PI-II 유전자가 다음세대로 전이되는지 여부를 조사하기 위하여 kanamycin이 첨가된 배지에 멸균된 종자를 파종하여 생장여부를 관찰하였다(Figure 4). 형질전환된 식물체에서 채종한 종자는 kanamycin 20 mg/L 첨가배지에

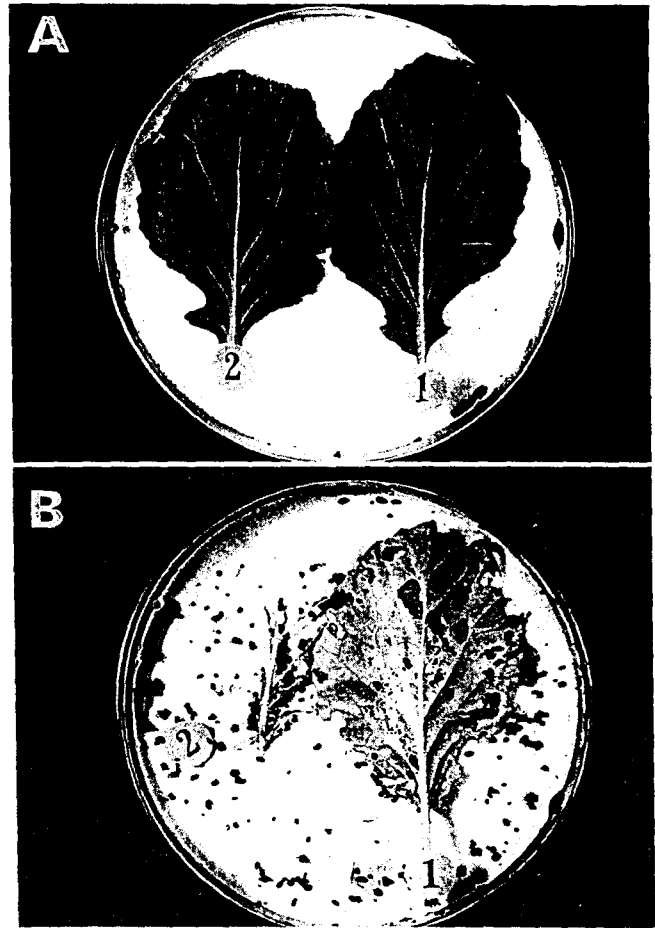


Figure 3. Bioassay of *B. oleracea* var. *acephala* transformed with PI- II gene. Leaf before (A) and after (B) injury. 1: transgenic plant, 2: nontransgenic plant.

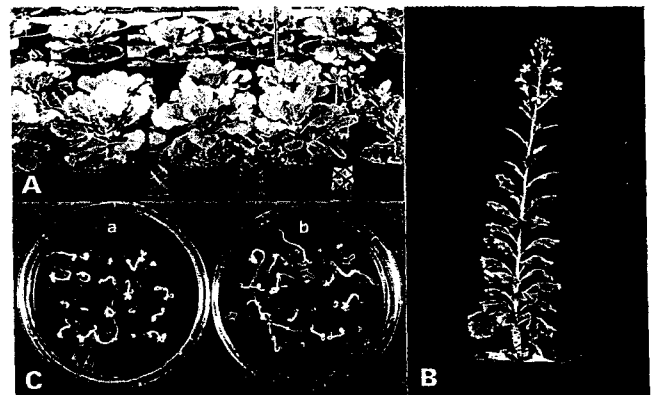


Figure 4. Progeny test of *B. oleracea* var. *acephala*. A: Transgenic pants grown in the greenhouse, B: Normal flowers of transgenic plants, C: Normal seeds (a) and transgenic (b) on the hormone free MS medium with 20 mg/L kanamycin. Arrow indicate transgenic seeds.

서 약 27%가 kanamycin 내성이었고 약 83%는 민감한 반응을 나타내었다. 그러나 대조구 종자는 발아하지 못하거나

Table 2. Segregation of resistance to kanamycin in progeny of selfed transformants of *B. oleracea* var. *acephala* with PI- I gene.

Plant line	No. of seedlings	Seedling type	
		Resistant	Susceptible
Control	100	0	100
Transformants	102	28	74

발아가 되더라도 모두 고사하였다(Table 2). *Agrobacterium* 을 이용하여 식물체에 도입된 외래유전자는 우성으로서 후대에 유전된다. 따라서 형질전환이 될때 삽입되는 외부유전자가 식물의 핵속에 한 개가 삽입된다면 이론적으로는 3:1 분리가 가능하다. 그러나 식물체 핵내로 삽입되는 유전자의 copy수가 한 개 이상이거나 혹은 외래 유전자가 감수분열중 상실되거나 메틸화나 돌연변이에 의해 손상을 입는 경우 등으로 인하여 종종 이들 형질전환 식물체들의 표현형이 멘델법칙을 따르지 않는 예가 많다. 담배의 경우 차세대에서 6~36%만이 내약제성을 나타내었고(Heberle-Bors et al., 1988; Topping et al., 1991), *Arabidopsis*에서는 외부 유전자의 10~50%만이 차세대로 유전되는 것으로 보고되어 있다(Schmidt and Willmitzer, 1988). 앞으로 생물검정을 통하여 확인된 형질전환체들을 대상으로 포장검정과 형질전환된 유전자의 후대 분리비가 이론치에 부합되지 않는점, 그리고 내충성 유전자의 안정적인 발현에 관하여 지속적으로 연구되어야 할 것으로 생각된다.

摘 要

PI-II cDNA가 도입된 식물발현 벡터인 pGA875를 가진 *A. tumefaciens* LBA4404를 이용하여 꽃양배추의 하배축 조직에 형질전환하여 식물체를 재분화 시켰다. Dot blot 분석으로 PI-II 유전자가 전사됨을 확인할 수 있었다. 또한 이들 개체를 담배겨세미나방 유충을 이용하여 생물검정한 결과 대조구에 비해 형질전환체 잎의 섭식정도가 현저히 떨어지는 것을 알 수 있었다. 개화후 이들 개체의 종자를 받아 후대검정을 실시하였을 때 27.4%가 kanamycin 내성을 가진 꽃양배추로 확인되었다.

引用文獻

An G (1996) Current status and future perspectives of biotechnology using plant tissue culture techniques. *Korean J Plant Tissue Culture* 20: 59-62
 Aronson AI, Beckman W, Durn P (1986) *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol Rev* 50: 1-24

Barton KA, Miller MJ (1993) Production of *Bacillus thuringiensis* insectidal proteins in plants. In ; Kung S and Wu R (eds.) *Transgenic Plants Vol. I*. Academic Press Sandiego California pp. 297-315
 Delanny X, Lavallo BJ, Proksch RK, Fuchs RL, Slims SR, Greenplate JT, Marroone PG, Dodson RB, Augustine JJ, Layton JG, Fischhoff DA (1989) Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. kurtaki insect control protein. *Bio/Technology* 7: 1265-1269
 Heberle-Bors E, Charvat B, Thompson D, Schemthaler JP, Barta AJM, Matzke MA (1988) Genetic analysis of T-DNA insertions into the tobacco genome. *Plant Cell Reports* 7: 571-574
 Hilder VA, Gatehouse AMR, Sheerman SE, Barker RF, Boulter D (1987) A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* 300: 160-163
 Johnson R, Narvaez J, An G, Ryan C (1989) Expression of Proteinase inhibitor I and II in transgenic tobacco plant ; Effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9871-9875
 Pawlowski K, Kunze R, Vries SD, Bisseling T (1994) Isolation of total, poly(A) and polysomal RNA from plant tissues. In : S.B. Gelvin, R.A. Schilperoort, Academic Publishers, Belgium, D5: 1-13
 Pena-Cortes H, Sanchez-Serrano JJ, Rocha-Sosa M, Willmitzer L (1988) Systemic induction of proteinase inhibitor- I gene expression in potato plants by wounding. *Plants* 174: 84-89
 Pena-Cortez H, Sanchez-Serrano JJ, Mertens R, Willmitzer L, Prat S (1989) Abscisic acid is involved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9851-9855
 Ryan CA, Huisman W (1970) The regulation of synthesis and storage of chymotrypsin inhibitor I on leaves of potato and tomato plants. *Plant Physiol* 45: 484-489
 Schmidt R, Willmitzer L (1988) High efficiency *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation of *arabidopsis thaliana* leaf and cotyledon explants. *Plant Cell Reports* 7: 583-586
 Topping JE, Wei W, Lindesey K (1991) Functional tagging of regulatory elements in the plant genome. *Development* 112: 1009-1019
 Vaeck M, Reynaerts A, Hofte H, Jansens S, De Beuckeleer M, Dean C, Zabeau M, Montagu MV, Leemans J (1987) Transgenic plants protected from insect attack. *Nature(London)* 328: 33-37

(1997년 10월 16일 접수)