

Agrobacterium을 이용한 PAP 유전자의 현삼으로 도입 및 형질발현

유창연^{1†}·성은수¹·임정대¹·황선애¹·채영암²

*강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부

Introduction and Expression of PAP gene using *Agrobacterium* in *Scrophularia buergeriana* Miquel

Chang Yeon Yu^{1†}, Eun Soo Seong¹, Jung Dae Lim¹, Shan Ai Huang¹ and Young Am Chae²

¹Division of Applied Plant Science, College of Agriculture & Life Sciences, Kangwon National University, Chuchon 200-701, Korea

²College of Agriculture & Life Science Seoul National University Suwon 441-744, Korea

ABSTRACT : Exogeneous application of pokeweed antiviral protein (PAP), a ribosomal-inactivating protein in the cell wall of *Phytolacca americana* (pokeweed) protects heterologous plants from viral and fungal infection. A cDNA clone of PAP introduced into *Scrophularia buergeriana* Miquel by transformation with *Agrobacterium tumefaciens*. For plant transformation, explants were precultured on shoot induction medium without kanamycin for 2-5 day, and then they were cocultured with *Agrobacterium* for 10 minutes. The explants were placed on coculture medium in dark condition, 28℃ for 2days. After explants were washed in MS liquid medium, they were transferred into selection medium including kanamycin 50mg/L (MS salts+1mg/l BAP+2mg/l TDZ+0,2mg/l NAA+MS vitamin+3% sucrose+0.8% agar, pH5.8). From PCR analysis, NPT II band was confirmed in transgenic plant genome and showed resistance against fungi in antifungal activity test. Micro assay to which protein extracted from transgenic line were added, revealed hyphae growth inhibition and no spore germination at high concentration. The characteristics of inhibited hyphae was represented transparent and thin. Expression of PAP in transgenic plants offers the possibility of developing resistance to viral and fungal infection.

Key words : *Scrophularia buergeriana* Miquel, pokeweed antiviral protein (PAP), ribosomal-inactivating protein (RIP)

서 언

현삼 (*Scrophularia buergeriana* Miquel) 은 현삼과에 속하는 다년생 초본으로 주요 약용작물 중 하나

이며 주요 성분은 p-methoxycinnamic acid, harpagide, phytosterol 등이며, 건조된 뿌리는 玄蓼이라 하여 소염, 인후염, 비염, 혈압강하, 강심작용에 쓰인다 (육, 1989). 종자로 번식을 할 경우 발

† Corresponding author (Phone) : 033-250-6474, E-mail : cyu@cc.kangwon.ac.kr
Received April 18, 2001

아와 생육이 불 균일하며 1년간의 육묘를 거쳐 이 식을 해야하는 단점이 있다. 뿌리로 번식을 할 경우 그해에 큰 뿌리를 얻을 수 있으나 증식율이 낮고 종근 보관의 어려움이 있으며 번식 시 발생한 상처를 통한 바이러스와 세균성 병원균의 침입을 피할 수 없어 시간 경과에 따라 수확량과 품질이 저하된다고 하였다. (김등, 1995) 최근 많은 미생물, 식물체, 동물 등에서 추출된 단백질이나 여러 가지 대사물질들이 fungi, bacteria, virus에 대하여 항균성을 나타낸다는 보고가 있으며 이러한 특성을 이용하여 이들을 식물체에서 발현함으로써 내병성 품종들을 육성하고자 하는 노력이 계속되고 있다. 이들 중 병원체의 ribosome의 elongation factor를 불활성시키는 RIP(ribosome inactivating protein)의 일종으로 여러 가지 fungi, bacteria, virus에 대하여 광범위한 저항성을 나타내고 있는 PAP가 관심의 대상이 되고 있다. PAP는 양자리공에서 분리된 항바이러스성 단백질로서 PAP, PAP-II 그리고 PAP-S로 3가지 유형으로 나누는데 이들은 계절적으로 또는 조직적으로 다르게 발현되는 것으로 알려져 있다 (Houston et al., 1983). PAP는 합성된 후 세포질에 있지 않고 cell wal matrix로 이동하는(Ready et al., 1986) 것으로 알려져 있다. 이러한 Ribosome inactivating protein의 염기서열 결정을 통하여 항균성을 나타내는 다른 protein과 PAP의 유사성을 밝혔다(Kataoka et al., 1991).

따라서 본 연구는 양자리공으로부터 분리한 PAP cDNA를 현삼에 형질전환 시키고 형질전환된 식물체의 항균성 및 병원성 검정을 수행함으로써

fungi, bacteria, virus에 대하여 광범위한 저항성을 갖는 품종을 육성하기 위하여 실시되었다.

재료 및 방법

기내배양에 의한 현삼 식물체 재분화

1) 실험재료

식물체 재료로는 MS기본배지에서 기내배양 되어 성숙되어 있는 현삼의 액아를 제거한 잎과 줄기부분을 채취하여 실험재료로 이용하였다.

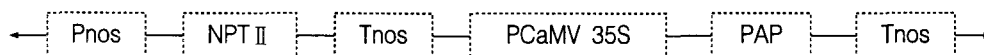
2) 재분화 조건

기본 배지로는 MS(Murashige and Skoog) 배지를 사용하였으며 생장조절물질 처리는 NAA, 2,4-D, TDZ 3종류를 사용하여, 각각의 배지에 생장조절물질 처리별 농도는 각각 0.01, 0.1, 2mg/l로 하였으며 2,4-D와 TDZ을 동일 생장조절물질로 MS배지에 조합처리 하였다. 생장조절물질 처리를 한 배양병에 10반복씩 치상을 해서 4-8주간 배양하였다. 배양조건은 1,000lux, 16시간 광처리, 8시간 암처리, 25℃에서 배양하였다. 위의 조건으로 처리한 배지에서 shoot가 유기된 것을 1/2MS 기본배지(0.8% agar, 3% sucrose)에 계대배양하여 발근을 유도하였다.

*Agrobacterium*에 의한 형질전환

1) Construction of plant expression vector

양자리공으로부터 분리한 PAP cDNA를 CaMV 35S promoter하에서 발현시키기 위하여, *Sac* I와 *Bam* H I 으로 이중절단하고 Erase-a-base system



pJMC 102

Fig. 1. Diagram of the T-DNA region.

LB : left border; RB : right border; Pnos : nopaline synthase promoter; *npt* II : neomycine phosphotransferase II ; P35s : CaMV 35S promoter; Tnos : nopaline synthase terminator. PAP : coding region of PAP

(Promega사)을 이용하여 번역 시작점(ATG)까지 적당히 deletion한 후, *Bam*H I linker를 첨가하여 ligation하였다. Deletion 종말점은 Sanger 방법으로 염기서열을 결정하여 확인하였다. 식물발현벡터 pBI 121은 *Sac* I I으로 절단하고 *Bam*H I linker를 첨가하여 ligation하였다. PAP 유전자를 지닌 조작된 1kb *Bam*H I 절편을 조작된 pBI 121의 *Bam*H I 부위에 클로닝하여 식물형질전환 발현벡터 pJMC 102를 완성하였다 (Fig. 1.).

2) 재분화된 식물체에서 Kanamycin 저항성 측정 현삼에 대한 kanamycin 저항성 검정에 대한 보고가 없기 때문에 형질전환체를 선발하기 전에 kanamycin의 적정농도를 알아보기 위해서 실험을 실시했다. MS + 1mg/l BAP + 2mg/l TDZ + 0.2mg/l NAA 배지에 kanamycin을 0, 50, 100, 200, mg/l를 각각 첨가한 후 현삼 잎의 절편체를 치상하고 7-14일간 배양하여 저항성 정도를 알아보았다.

3) *Agrobacterium* strains

Agrobacterium tumefaciens LBA4404은 28°C shaking incubator에서 48시간 동안 LB liquid medium (Bacto-tryptone 10g, Bacto-yeast extract 5g, NaCl 10g, pH7.0+50mg/l Km)에서 암상태로 배양했다. Bacterial suspension의 O.D가 대략 A₆₀₀=1.0이 될 때까지 배양한다. *Agrobacterium* strain 배양액을 10 : 1로 희석하여 각각 식물체를 접종할 준비를 하였다.

4) *Agrobacterium*에 의한 형질전환

무균상태로 배양한 현삼을 액아, 줄기, 잎 조직 부위를 각각 절단한 후 전처리배지 (MS salt + 1mg/l BAP + 2mg/l TDZ + 0.2, g/l NAA + MS vitamin + 3% sucrose + 0.8% Bacto agar, pH5.8)에 치상하여 2-3일간 배양하였다. 조직배양을 통해 재분화 실험을 한 결과 TDZ를 사용한 것이 가장 효율이 높았으므로 BAP와 NAA조합 배지도 재분화율이 높은 편이라서 혼합하여 사용하였다. Cytokinin과 auxin의 조합비율은 10 : 1로 하여 배지에 첨가하였다.

Agrobacterium 배양에서 2-5분간 접종시킨 다음, 배양액의 물기를 멸균시킨 킴와이프스에 말리고 다시 전처리 배지에서 48시간 동안 cocultivation하였다. 48시간 동안 cocultivation한 후 MSO liquid medium + 500mg/l carbenicillin을 첨가한 제균액에 절편체를 잘 씻어내어 절편체 주위에 자란 *Agrobacterium*을 제거한 후 멸균된 킴와이프스에서 물기가 제거 될 때까지 말렸다. 제균처리한 식물체 절편을 신초형성 배지에 한 plate당 7-8개씩 치상하였다.

형질전환의 확인

1) 형질전환 식물체의 genomic DNA 분리

Kanamycin이 첨가된 배지에서 선발한 식물체로부터 Rs-AFP1이 삽입되었는지의 여부를 확인하기 위하여 CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) 법으로 기내배양된 현삼의 DNA를 추출하였다. 기내에서 kanamycin 저항성 식물체로 선발된 각 개체의 현삼 잎 0.5g씩을 채취하여 CTAB용액을 넣고 튜브를 얼음에 놓고 bluestick으로 2번 갈아준다. 혼합하여 잘 섞은 뒤 60°C에서 1시간 동안 배양한다. Phenol chloroform isoamylalcohol (25 : 24 : 1) 용액을 CTAB용액과 동일양으로 넣고 흔들어준 후 5,000rpm에서 15분간 원심분리 한다. DNA 상층액을 분리하여 새 tube로 옮겨준 뒤 isopropanol을 넣고 흔들어 준다. 10,000rpm, 15분간 원심분리한 뒤, dH₂O를 넣고 녹여준다. Chloroform을 넣고 한번 더 원심분리를 한다. 상층액을 분리해서 다시 새 tube로 옮기고 100% ethanol을 처리한 후 원심분리 한다. 상층액을 버린 후 생긴 pellet을 건조시킨다. TE buffer or dH₂O로 pellet을 녹여준 뒤 RNase를 첨가하고 37°C에서 1시간 배양한 후 0.8% agarose gel상에서 DNA band를 확인하였다.

2) PCR analysis

식물체로부터 PAP 유전자가 도입되었음을 확인하기 위한 PCR 분석에서 선발표지유전자인 *nptII* gene을 확인하기 위하여 N-1 (5' -GAA-GCT-ATT-

CGG-CTA-TGA-CTG-3')과 N-2(5'-ATC-GGG-AGC-GGC-GAT-ACC-CTA-3') primer를 합성하였다. PCR 기기는 TOUCHDOWN™(HYBRID)을 사용하였으며 증폭조건은 표 1과 같다.

Table 1. The optimal amplification condition of PCR analysis in *Scrophularia buergeriana* Miquel.

Mixture of reaction	Primer	Condition of reaction
Template DNA 10ng 2.5μM primer 1.25mM dNTP		Denaturation(94℃ 1min)
10×buffer(with MgCl ₂ BIOTOOLS), Taq polymerase (BIOTOOLS)	N-1 and N-2	Annealing(60℃ 1min) Extension(72℃ 1min 30sec.) : 40cycles Post-elongation(72℃ 5min)
Total volume 25μl		

형질전환 식물체의 항균활성 검정

PAP가 도입된 형질전환 현삼으로부터 분리된 총단백질의 항균활성을 fungus인 *Asperigillus awamori*, *Cladosporium herbarum*을 대상으로 하여 항균활성을 검정하였다.

1) 형질전환된 식물체에서 단백질 추출

PAP (*Phytolacca* Antiviral Protein)로 형질전환된 식물체와 대조구로 형질전환되지 않은 식물체를 대상으로 하여 총단백질을 추출하였다. 형질전환된 식물체와 형질전환되지 않은 대조구 식물체의 잎에 상처를 내고 접종균 (*F. oxysporum*, PDA, 25℃에서 24h)을 붓으로 도말하였으며 감염시켰다. 12시간 후에 접종한 잎 이외의 잎(0.5g)을 취하여 1ml의 sodium phosphate buffer (pH 7.4)로 총단백질을 추출하였다. Bradford assay method로 단백질 농도를 측정하였다. 형질전환된 식물체로부터 병원균이 감염된 후 시간에 따른 protein의 발현의 변화를 알아보기 위하여 감염된 12, 24, 72, 120 시간 후로

나누어 감염된 형질전환된 식물체와 형질전환되지 않은 대조구 식물체의 잎로부터 시료를 취하였으며 SDS-PAGE (staining : Coomassie Brilliant Blue)를 수행하였다.

2) 형질전환된 식물체의 총단백질에서의 항균성 검정

Fungus에 대한 항균성 검정은 Walden (1986)에 의한 방법을 일부 변형하여 사용하였다. Petri dish에 blank-paper disc (BBL 0.25 inch) paper 5개를 1.2cm의 간격으로 위치시키고 중앙에 균주를 접종하였으며 나머지 4개의 각 filter paper에 형질전환된 식물체 line과 형질전환되지 않은 식물체로부터 추출한 단백질을 농도별로 분주, 27℃의 incubator에 7일 동안 배양하면서 균사생장정도를 육안으로 확인하였다.

균생장을 저해시키는 단백질의 농도를 구멍은 피침균으로 곰팡이 균주 (*Asperigillus awamori*, *Cladosporium herbarum*)를 사용하였고 곰팡이 배양용 PDB Slant에 곰팡이 포자발아저해시험용 배지 (0.2% glucose, 0.1% yeast extract, 0.1% citric acid, 0.37% Na₂HPO₄ · 12H₂O) 2 ml를 첨가한 후 유리봉으로 상기 곰팡이 포자를 분리시키고 이를 다시 가제로 여과하였으며 여과액을 96 well plate의 구에 100 μl씩 분주, 50개의 포자가 관찰될 때까지 희석하였다. 형질전환된 식물체로부터 추출한 단백질을 농도별로 희석하여 96 well plate에 첨가한 후 27℃에서 24시간 동안 암배양을 수행하였다. 현미경으로 포자발아가 저해되는 정도와 형태적 특성 및 농도를 측정하였다.

3) 형질전환된 식물체의 내병성 검정

형질전환된 식물체의 내병성 정도를 검정하기 위하여 포트에서 생육하고 있는 식물체의 뿌리에 칼로 1cm 정도의 상처를 내고 2가지 race (R3, R10)의 접종균 현탁액 (*F. oxysporum*, PDB, 25℃에서 24h)에 10분 정도 담그어 두었다가 다시 토양에 이식하였다. 대조구로서 형질전환되지 않은 식물체

를 동일한 방법으로 처리하였다. 2주 후에 식물체로부터 병증의 발현을 확인하였고 4주 후에 각각의 식물체에 대한 병해발생의 등급을 육안으로 확인하여 1-5까지로 나누어 표기하였고 식물의 초장, 잎수 및 지상부, 지하부의 근중을 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 현삼의 기내배양 및 식물체 재분화

현삼의 잎조직과 줄기조직을 여러 가지 성장조절물질이 첨가된 MS배지에 치상 하였을 때 NAA, 2, 4-D, 에서보다 TDZ에서 가장 많은 신초분화를 보이는 것으로 나타났다. 신초 수에 있어서는 줄기를 치상하였을 때 현저하게 많은 수가 나타나는 것을 볼 수 있었고 신초의 길이도 잎을 치상했을 때보다 줄기를 치상했을 때 성장조절물질의 농도에 별다른 관계없이 더 길었다(Table 2).

2, 4-D와 TDZ를 조합 처리한 MS배지에 현삼의 잎과 줄기조직을 치상한 결과 신초수와 길이는 2, 4-D 0.01mg/l와 TDZ 0.01, 0.1, 2mg/l의 조합에서 가장 많은 신초분화수와 가장 긴 길이를 나타내는 것을 볼 수 있었다. 하지만 줄기를 치상한 2, 4-D 0.01mg/l와 TDZ 2.0mg/l를 제외한 나머지 호르몬 처리에서는 분화가 억제되었다.

본 실험의 결과, 낮은 농도의 auxin인 2, 4-D 0.01mg/l와 cytokinin인 TDZ(0.01, 0.1, 2.0mg/l)이 조합처리시 shoot 분화가 좋았으나, 2, 4-D의 농도가 높아질수록 TDZ과 조합처리시 shoot 분화가 잘 안되는 결과를 보였다(Table 3). 이러한 결과는 auxin류의 식물생장조절물질이 기내배양 시 줄기분화 및 생장을 억제하고 뿌리분화를 촉진한다는 보고와 일치하였으며(송 등, 1994) thdiazuron (N-phenyl-N'-1, 2, 3-thidiazol-5yl-urea)의 사용은 사과(Nieuwkerik et al., 1986)와 까마중(Yu et al., 1994)의 배양에서와 마찬가지로 다른 cytolininfb보다 줄기분화에 더 효과적이라는 결과를 얻었다.

Table 2. Effect of NAA, 2,4-D and TDZ on the regeneration and growth of shoots from leaf and stem explants of *Scrophularia buergeriana* after 45 days.

Growth regulators (mg/l)	No. of shoot		shoot length(mm)	
	Leaf explant	Stem explant	Leaf explant	Stem explant
NAA	0.01	0.0	0.0	0.0
	0.1	0.1±0.1	0.0	7.9±7.9
	2.0	0.0	0.0	0.0
2,4-D	0.01	0.1±0.1	2.2±1.5	4.4±4.4
	0.1	0.0	0.0	0.0
	2.0	0.0	0.0	0.0
TDZ	0.01	1.5±0.7	5.8±1.7	6.8±2.9
	0.1	2.1±0.6	8.8±0.9	13.9±4.0
	2.0	0.6±0.3	9.0±2.9	5.7±2.6
LSD(5%)	0.7	3.1	8.7	10.0

Table 3. Effect of combination treatment with 2,4-D and TDZ on the regeneration and growth of shoots from leaf and stem tissue of *Scrophularia buergeriana* after 45days.

Growth regulators (mg/l)	No. of shoot		shoot length(mm)	
	Leaf explant	Stem explant	Leaf explant	Stem explant
2,4-D TDZ				
0.01	0.01	0.8±0.3	3.3±0.5	28.0±7.1
	0.1	2.5±0.6	4.3±0.8	31.0±3.9
	2.0	2.0±1.4	4.0±1.1	23.2±5.3
0.1	0.01	0.0	0.0	0.0
	0.1	0.0	0.1	0.0
	2.0	0.0	1.0±1.0	0.0
2.0	0.01	0.0	0.0	0.0
	0.1	0.0	-	0.0
	2.0	0.0	0.0	0.0
LSD(5%)	1.5	1.7	7.8	7.4

2. 현삼의 kanamycin 저항성 측정

Kanamycin을 이용한 형질전환 식물체의 효율적인 식물체 선발을 하기 위하여 항생제 농도별로 저항성을 알아보았다. MS + 1mg/l BAP + 0.1mg/l NAA배지에서 kanamycin 0, 50, 100, 150, 200mg/l를 첨가한 후 현삼 잎 절편을 치상하였다. 10-17일간 배양한 후 저항성 정도를 조사했다. 그 결과 저항은 kanamycin 50mg/l이 첨가된 배지에서 분화가 급격히 감소하고 kanamycin 100mg/l 이상 첨가된 배지에서는 분화가 안되었다 (Table 4).

Table 4. Kanamycin resistance of leaf explant in *Scrophularia buergeriana*.

Kanamycin (mg/l)	No. of leaf	No. of survival explant
0	30	18
50	30	4
100	30	0
150	30	0
200	30	0

3. *Agrobacterium*에 의한 형질전환

잎과 줄기 절편을 치상하여 재분화율을 조사한 결과, 1개의 절편당 2-3개 이상의 multiple shoots가 생겨났으며, 절편체의 wound site에서 callus와 신초의 성장이 눈에 띄게 나타났다. 액아배양에 의한 형질전환에서는 재분화율은 우수하였으나 백화현상이 심하였고 신초 분화가 진행되다가 성장이 멈추는 현상을 보여주었다. Kanamycin 농도별로 분석해 보면 kanamycin 농도가 낮을 때 재분화율이 높았으며, 특히 kanamycin 10mg/l이 첨가된 배지에서 가장 높은 재분화율을 나타내었기 때문에 그 이상의 농도인 kanamycin 50mg/l이 첨가된 배지에서 선발을 수행하였으며 8주 후에 분화되어 11.8%의 재분화율을 보였다.

4. 형질전환 식물체의 PCR분석

형질전환 후 재분화 된 현삼식물체로부터 분리된 염색체 상에 유전자가 도입되었는지 여부를 확인하기 위해 PCR 분석을 수행하였다. 형질전환시 선발 표지 유전자로 사용되는 NPT II gene의 확인에서는 정상식물체에서는 나타나지 않는 DNA 절편이 형질전환 식물체에서 나타났으며 kanamycin 50 mg/l 첨가된 배지에서 선발된 식물체에서 NPT II gene (700bp)이 plant genome 안으로 삽입되었음을 확인하였다 (Fig 2.).

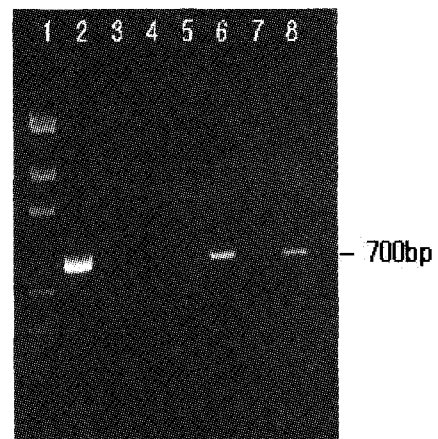


Fig. 2. Detection of RIP-PAP gene in transgenic plant by using N-1 and N-2 primer. lane 1 : DNA ladder maker, lane 2 : PCR product of NPT II gene fragment, lane 3 : PCR amplification of normal plant (wild type, control), lane 4-8 : PCR amplification of transgenic plant selected in medium containing Km 50 mg/L (leaf disk).

5. 내병성 유전자가 삽입된 형질전환 식물체 항균 활성 측정

형질전환된 식물체의 잎에서부터 총단백질을 분리하였으며 *Asperigillus awamori*, *Cladosporium herbarum*을 사용하여 항균성 검정을 수행한 결과 형질전환 되지 않은 대조구 식물체가 균사의 생장이 50% 저해되는 반수저해농도 (IC₅₀)의 값이 ml 당

500 µg 이상이 요구되어 실제 항균성이 없는 반면 항바이러스성 단백질인 PAP가 도입된 line인 10-13-1, 10-14-1이 IC₅₀의 값이 *Asperigillus awamori*에 대해서 각각 320 µg/ml 과 300µg/ml으로 나타났으며 *C. herbarum*에 대해서도 IC₅₀ 값이 10-13-1에서는 80µg/ml, 10-14-1에서는 100µg/ml로 나타나 높은 항균성을 나타내었다(Table 5). 이러한 것은 항바이러스성 유전자로 잘 알려진 PAP 유전자가 fungi에 대해서도 높은 항균활성을 가지는 것을 나타내며 RIP유전자를 대상식물에 형질전환 시킴으로서 fungal infection에 대하여 저항성종을 개발할 수 있을 것이라 사료된다.

Table 5. Variation of antifungal activity of transgenic lines in *Scrophularia buergeriana*.

Antifungal activity(IC ₅₀ value) µg/ml			
Fungus	Control	PAP(Transgenic line)	
		10-13-1	10-14-1
<i>Asperigillus awamori</i> ,	> 500	320	300
<i>Cladosporium herbarum</i>	> 500	80	100

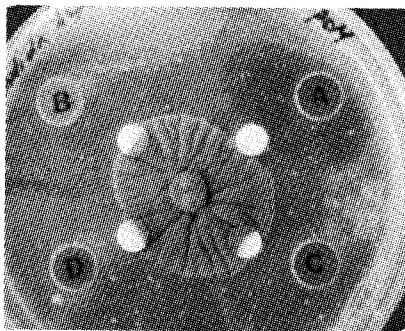


Fig. 3. Antifungal activity of transgenic plant in *Scrophularia buergeriana*. Discs contained 25µl total protein(A), diluted 1 : 5(B), 1 : 10(C), of transgenic plant and control plant(D)

각각의 형질전환식물체에서 추출한 단백질의 첨가에 따른 포자발아의 양상을 살펴보면 형질전환되

지 않은 식물체의 단백질을 첨가한 구와 포자만 들어 있는 구에서는 포자가 발아하여 균사생장이 왕성하였으나(Figure 4. A, C) 형질전환된 식물체에서 추출한 단백질을 첨가한 구에서는 생장이 저해되었다.

*Asperigillus awamori*의 경우에 PAP 형질전환체의 단백질을 첨가한 경우 모두 포자가 발아하지 못하고 균사생장이 지연되며 포자와 성장하는 균사가 투명하여졌으며 성장하는 균사의 굵기도 가늘어지는 특성을 나타내었다(Figure 4. B, D). 이러한 것은 도입한 유전자의 발현으로 인한 생성된 단백질의 작용특성이 차이에 기인하는 것으로 판단되며 각각 다른 항균단백질의 첨가에 따라 포자에서 균사의 성장하는 양상이 다르게 나타난다는 보고(Franky et al., 1992)와 유사한 결과를 얻었다.

병원체 접종 후 시간의 경과에 따른 형질전환 식물체의 SDS-page를 수행한 결과 병원체 감염에 따른 PAP 유전자의 발현에 의하여 형질전환된 식물체에서 형질전환되지 않은 식물체에는 나타나지 않는 32kDa의 밴드가 명확하게 나타내었으나 이러한 PAP protein 발현의 변화는 감염된 지 약 12시간이 최대가 되고 그 이후로는 점차 발현수준이 감소하였다(Fig 5). 이러한 것은 PAP 유전자를 포함한 RIP 계열의 protein의 방어 기작이 감염초기에 이루어진다는 보고(Ready et al., 1984)를 증명하는 것이라 할 수 있다.

6. 내병성 유전자의 도입에 의한 현삼 형질전환체의 내병성 검정

PAP유전자를 현삼에 형질전환 하였고 형질전환체의 항균활성 검정하였으나 실제 포장에서의 적응성 실험하기 위해 포장에서의 병원성 검정과 생육조사를 을 수행한 결과 초장은 control 식물체에서 평균 13.3으로 나타났지만 형질전환체 PAP는 17.68cm, 16.41cm로서 형질전환 식물체가 비교적 높았고 엽 수에서는 대략 10~15개로서 차이가 없었으며 지상부, 지하부의 생체중은 형질전환 식물체가 다소 높게 나타났다. Control 식물체에서 *Fusarium*에

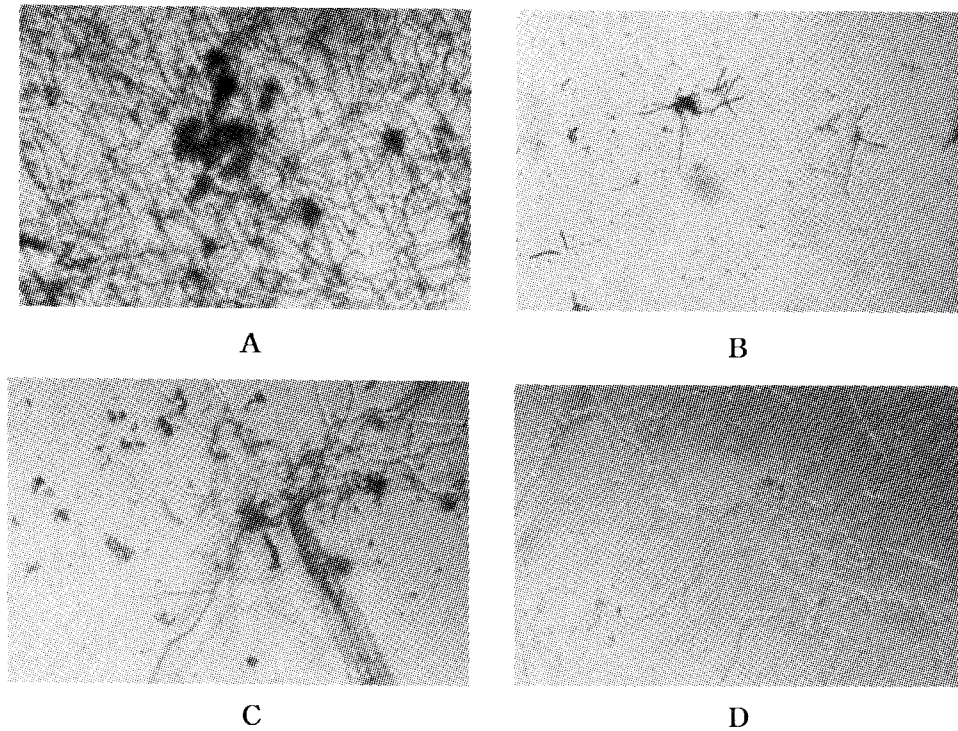


Fig. 4. Difference in morphology of inhibited hyphae photomicrograph was taken after 24h of incubation of a *Asperigillus awamori* and *Cladosporium herbarum* spore suspension in 96-well microassay plate. A : *Asperigillus awamori* (control), B : *A. awamori* with protein of transgenic plant(PAP) C : *Cladosporium herbarum* (control), B, D : *C. herbarum* with protein of transgenic plant(PAP).

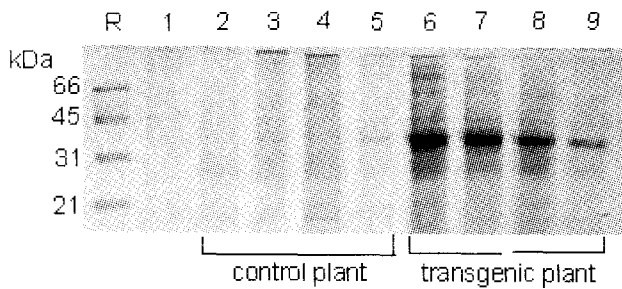


Fig. 5. Comparison of protein pattern against *Fusarium oxysporum* infection through SDS-PAGE in the *Scrophularia buergeriana*. R, protein marker, the molecular masses are indicated in the left margin; lane 1, non-infected control plant; lane 2~5, infected control plant(12h, 24h, 72h, 120h respectively); lane 6~9 infected PAP-inserted transgenic plant (12h, 24h, 72h, 120h respectively)

의한 전형적인 병징인 뿌리썩음과 유관속 시들음 증상이 나타났고 (Fig 6) 병징의 scale을 1-5(1 :

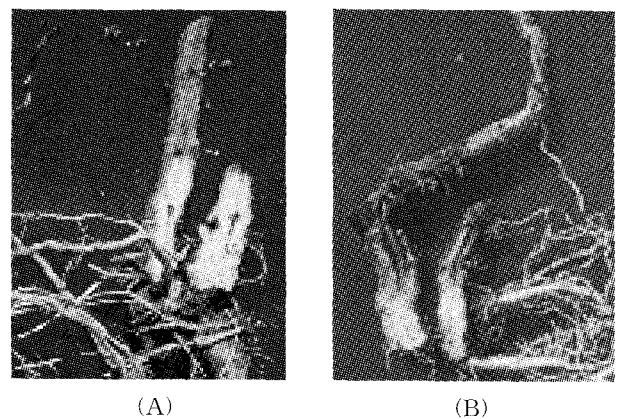


Fig. 6. Pathogenicity test of transgenic plant infected *Fusarium oxysporum*. (A) Transgenic plant(PAP-P-10-8-2) (B) Control plant

Table 6. Pathogenicity test of transformant *Scrophularia buergeriana* (The pathogen was isolated by infected root).

Genotype /Pathogen		Shoot height (cm)	No. of leaf	Above (g)	Below (g)	Disease ratings scales
Control	R-3	12.32	10	3.58	8.32	3.2
	R-10	14.28	11	4.82	9.20	3.0
PAP	R-3	17.68	13	7.96	11.19	2.4
	R-10	16.41	11	4.26	9.82	2.5
AFP	R-3	13.00	12	6.28	15.41	2.0
	R-10	19.18	15	9.07	15.56	2.0

healthy plant, 5 dead plant)로 평가했을 때 3.2와 3.0로 나타난 반면 형질전환 식물체의 경우 control에 비하여 건강한 상태를 유지시켰고 scale은 2.0-2.5수준을 나타내었다(Table 6). 이로서 현삼에 도입된 PAP유전자에 의해 형질전환된 식물체가 fungi에 대해서 저항성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

적 요

현삼의 기내배양에서 낮은 농도의 2,4-D(0.01, 0.1mg/l) 와 TDZ(0.01, 0.1, 2.0mg/l)이 조합처리시 shoot 분화가 좋았으나, 2,4-D의 농도가 높아질수록 TDZ과 조합처리시 shoot 분화가 저조 하였다.

형질전환 확인을 위한 PCR 분석에서 선발표지 유전자로 사용되는 NPT II gene의 확인하였는데 형질전환되지 않은 식물체에서는 나타나지 않는 DNA 절편이 형질전환 식물체에서 나타났으며 kanamycin 50 mg/l 첨가된 배지에서 선발된 식물체에서 NPT II gene(700bp)이 plant genome 안으로 삽입되었음을 확인하였다.

형질전환 식물체의 항균활성 검정에서는 *Asperigillus awamori*에 대해 대조구 식물체와 같이 항균성이 없는 것으로 나타났으나 항바이러스성 단백질인 PAP가 도입된 식물체에서는 IC₅₀의 값이 *Asperigillus awamori*에 대해서 각각 320 µg/ml 과 300µg/ml, *C. herbarum*에 대해서도 IC₅₀ 값이

80µg/ml, 100µg/ml로 높은 항균성을 나타내었다.

형질전환 식물체와 형질전환되지 않은 식물체를 대상으로 SDS-PAGE를 수행하여 본 결과 감염된 형질전환되지 않은 잎과 감염되지 않은 잎에서는 나타나지 않는 30kDa의 분자량을 가지는 새로운 band가 PAP 유전자에 의하여 형질전환된 식물체에서 각각 확인되었다.

*Asperigillus awamori*의 경우에 PAP 형질전환체의 단백질을 첨가한 경우 모두 포자가 발아가 억제 되었고 균사생장이 지연되었으며 균사가 성장되더라도 포자와 성장하는 균사가 투명하여졌으며 성장하는 균사의 굵기도 가늘어지는 특성을 나타내었다.

병원균 접종 후 생육조사에 의하면 형질전환 식물체가 초장과 지상부, 지하부의 생체 중에서 모두 형질전환 되지 않은 식물체보다 다소 높게 나타났다.

*Fusarium*에 의한 전형적인 병징인 뿌리썩음 병과 유관속 시들음 증상이 형질전환 되지 않은 식물체에서 병징의 scale은 3.2와 3.0으로 나타나는 반면 형질전환된 식물체에서는 2.0과 2.5으로 비교적 낮게 나타났다.

사 사

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것임.

LITERATURE CITED

- Houston L. L., S. Ramakrishnan and M. A. Hermodson 1983. Seasonal variation in different forms of Pokeweed antiviral protein, a potent inactivator of ribosomes. *J. Biol. Chem.* 258(16) : 9601-9604
- Katoaka J. H., N. Habuka, M. Furuno and M. Miyano. 1991. DNA Sequence of *Mirabilis* antiviral protein (MAP) a ribosome-inactivating protein with an antiviral property, from *Mirabilis jalapa* L. and Its expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 226(13) : 8426-8430
- Nieuwkerk J. P., R. H. Zimmerman, and I. Forman. 1986. Thidiazuron stimulation of apple shoot propagation in vitro. *Horticulture* 21 : 516-518
- Ready N. P., D. T. Brown, and J. D. Robertus. 1984. Ricin-like lant toxin are evolutionarily related to single-chain ribosome-inhibiting proteins from *Phytolacca*. *J. Biol. Chem.* 259(24) : 15252-15256
- Franky T. R. G., H. M. E. Schoots, N. F. C. De Bolle, F. Van Leuven, S. B. Rees, J. Vanderley-den, B. P. A. Cammue and W. F. Broekaert 1992. Analysis of two novel classes of antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.* 267 : 15301-15309.
- Walden K. R. and P. S. Claude 1986. Isolation and partial characterization of two antifungal proteins from barley. *Biochimica et Biophysica Acta* 880 : 161-170
- Yu, C. Y., Y. A. Chae, S. D. Ahn, and D. H. Cho 1994. Effect of thidiazuron on regeneration from Long-term cultured callus of solanum spp. *K. J. Med. Crop Sci.* 2(1) : 39-43.
- 김규원, 백기화, 정근식, 정재동, 최광태. 1996. 식물 조직배양 기술(4) : p27-28, p53-54
- 송원섭, 양승렬, 박충현. 1994. 백도라지 × 더덕의 미숙배주 배양에 의한 식물체 재생. *약작지.* 2(3) : 219-226.
- 육창수. 1989. 原色韓國藥用植物圖鑑. 아카데미서적