

## 인삼의 Chlorophyll a/b Binding Protein 유전자를 도입한 연초의 광합성 특성

이기원\* · 채순용 · 김갑식 · 박성원 · 황혜연<sup>1</sup> · 이영복<sup>1</sup>

한국인삼연초연구원, <sup>1</sup>충남대학교 농과대학 식물자원학부  
(2001년 11월 5일 접수)

## Photosynthetic Characterization of Transgenic Tobacco Plant by Transformation of Chlorophyll a/b Binding Protein Gene of Korean Ginseng

Lee, K-W\* · S. Y. Chae · K. S. Kim · S. W. Park · H. Y. Hwang<sup>1</sup> · Y. B. Lee<sup>1</sup>

Department of Advanced Biotechnology, Korea Ginseng & Tobacco Institute, Daejeon, 305-345, Korea

<sup>1</sup>Division of Plant Science & Resources, Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea

(Received November 5, 2001)

**ABSTRACT** : A CAB cDNA vector(pKGCAB), encoding the light harvesting chlorophyll a/b binding protein in Korean ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer), was constructed with the CaMV35S promoter of plant expression vector. The chimeric vector was transformed into tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. NC 82) using *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 strain, and the transgenic tobacco plant CAB-TP2 was selected. Photosynthetic rates of the CAB-TP2 plant at before-flowering stage were increased about 20% under low irradiance conditions of quantum 100 and 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , however, the rates were similar to those of NC 82 under quantum 1000 and 2000  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  conditions. The plants were germinating under low- or normal irradiance condition and the quantum yield of photosystem III were measured. The differences of the Fv/Fm values between conditions were 0.07 and 0.01 in NC 82 and CAB-TP2, respectively. The mature leaves in the position 8-10 of the CAB-TP2 at before-flowering stage revealed 10% higher Fv/Fm values in range of 0.759 to 0.781 and 40% more chlorophyll contents of 70-93mg/ml than those of normal NC 82. These data suggest the possibility that the increase in photosynthetic activity of leaves under low light intensity in the canopy of CAB-TP2 transgenic tobacco might lead to increase the quality of lower tobacco leaves.

**Key words** : Tobacco, CAB-TP2, chlorophyll contents, CO<sub>2</sub> assimilation, Fv/Fm value

---

\*연락처 : 305-345 대전광역시 유성구 신성동 302 번지, 한국인삼연초연구원

\*Corresponding author : Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, 302 Shinseong-Dong, Yusong-Gu, Daejeon 305-345, Korea

## 서 론

고등식물이 이용하는 대부분의 빛 에너지는 엽록소 a/b에 의하여 흡수되는데 이 엽록소는 엽록체 내의 틸라코이드 막에 단백질과 비 공유결합 되어 엽록소-단백질 복합체 형태로서 존재한다 (Flachmann 1997). 이 엽록소-단백질 복합체는 광계 I(photosystem I, PS I) 과 광계 II(photosystem II, PS II)를 구성하고 있다. 각 광계의 반응 중심은 광수확 엽록소 a/b 복합체 (Light-harvesting complex, LHC)로 둘러싸여 있으며, 이 복합체는 핵 내의 CAB 유전자에 의해 발현된다. 이때 LHC의 기능은 빛 에너지를 잡기 위한 안테나의 시스템으로서 광합성을 위한 빛을 모으는 중요한 역할을 한다 (Funk et al. 1995; Jansson 1993).

식물 잎이 하는 가장 중요한 일은 빛을 받아 당을 생성하는 광합성 작용이다. 빛에 충분히 노출된 잎은 광합성 작용을 활발히 하여 많은 당을 생산하지만 빛이 가리워진 잎은 광합성이 불가능한 잎도 있어서 조기 낙엽으로 도태될 수 있다. 특히 양지성 작물인 담배는 생육초기에는 넓은 범위의 광도 조건하에서 양호한 생육을 보이는데 중기 이후에는 중·상위엽이 넓고 길게 생육하므로써 직사광이 중·하위엽으로 비추는 것을 막는 상태가 되어 상·하의 잎 사이에 광에 대한 경합이 일어나게 된다. 실제로 잎에 도달한 광선은 일광의 10%정도만 잎을 투과하게되고 엽맥을 침투해온 광선의 대부분은 편광 혹은 산란광으로 잎을 통과하게 되므로 중·하위엽에 도달하는 광은 일광의 1% 이하이다. 잎 3매가 겹쳐 있을 때 두 번째 잎은 6%에 해당되는 빛 에너지를, 세 번째 잎은 0.35%의 빛 에너지만을 이용할 수 있게 되므로, 담배의 경우 중·상위엽에 의해 해가림이 되는 하위엽은 그 수확시기가 지나면 조기낙엽 및 품질의 저하가 되는 것이 사실이다.

따라서 본 실험은 저광도에서 광흡수 효율이 높아 빛 에너지를 효율적으로 화학에너지로 변환시킴으로서 저광도에서도 활발한 광합성을 하고 있는 고려 인삼으로부터 에너지의 변환에 핵심적인 역할을 하고 있는 유전자인 CAB 유전자를 연초에 도입함으로써 저광도에서의 광합성 효율을 높여준과

동시에 형질전환된 담배의 광합성량과 엽록소량을 측정하여 품종육성의 기초자료로 활용코자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 인삼 CAB 유전자의 형질전환

인삼 cDNA clone중 연초 CAB 유전자와 그 염기서열상 유사성이 높은 pKGCAB(GinBank Accession No. AF034631) clone에서 PCR을 이용하여 transit peptide와 poly A를 포함하는 0.99kb 단편을 식물 발현 벡터인 pBI 121에 cloning하였다. 재 조합된 식물발현 벡터를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404에 도입하였으며, 이를 담배(*Nicotiana tabacum* cv. NC 82) 잎 절편에 동시배양법에 의하여 재분화 식물체를 획득하였다. 재분화된 식물체는 genomic PCR에 의해 CAB 유전자의 삽입여부를 확인한 후 (그림 1) 온실에 옮겨 재배하여 재종하였다.

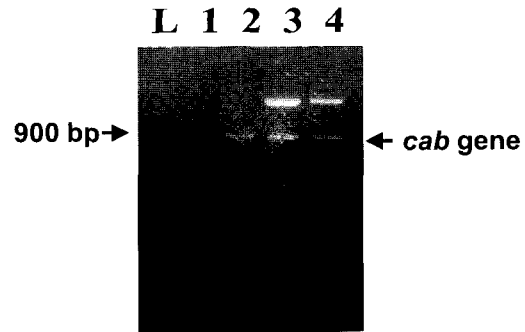


Fig 1. Genomic PCR analysis for *cab* gene in transgenic plants.

The PCR was performed with the genomic DNA isolated from transgenic plants.

Lane L, 1kb ladder; lane 1, Normal NC82; lane 2-4, transgenic plant.

### 식물체의 광합성량 측정

식물체의 광합성량은 Li-6400 Portable Photosynthesis system (Li-Cor Inc., Lincoln, NE)를 이용하여 CO<sub>2</sub> 교환율(CO<sub>2</sub>-exchange rates, CER)을 측정하였다.

**Fv/Fm치 및 클로로필 함량 측정**

Fv/Fm값 측정은 온실에서 재배된 연초의 잎을 미리 차광을 한 암 조건에서 10분 동안 적응시킨 후 PAM fluorometer(Walz, Effeltrich, Germany)를 이용하였다. 이때 포화광 ( $3200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )을 700msec 동안 조사하여 초기형광값 (initial fluorescence,  $F_0$ )와 최대 형광값 (maximal fluorescence,  $F_m$ )을 측정함으로써 광계 II에서의 quantum yield 값인 Fv/Fm 치를 유도하였다. 클로로필 함량은 식물체의 생엽을 지름 1 cm로 잘라 80% acetone에 차광조건에서 2시간동안 추출하여 5분 동안 원심분리 한 상정액을 Porra 등(1989)의 방법으로 계산하였다.

**결 과**

**형질전환 식물체의 선발**

인삼의 CAB 유전자를 연초 식물체에 형질전환을 실시하여 수 종의 재분화 식물체를 획득 할 수 있었으며, 이때 각 재분화 식물체를 genomic PCR 법에 의해 형질전환된 식물체를 선발하였다. 이때 선발된 식물체중 CAB-TP2 식물체는 정상 식물체인 NC 82에 비하여 하위엽의 과다성숙에 의한 노화가 늦고, 성장이 양호함을 보였다(그림 2). 특히 이 식물체의 종자를 저광도 조건 (25 lux)에서 발아 시켰을 때의 생존율이 높은 특성을 보였다(Kim et al. 1999). 식물체내에 원래 존재하고 있는 CAB

유전자는 일주성 시계와 빛에 의해 유전자 발현이 조절되고 있으므로 차광의 조건은 그 발현이 불가능해지는 결과를 초래한다 (Flachmann and Kühlbrandt 1995; Millar and Kay 1991). 그러나 CAB-TP2 식물체내에 삽입된 고려인삼의 CAB 유전자는 CaMV35S promoter에 의해 일주성 시계와 빛에 관계없이 항상 발현할 수 있기 때문에, CAB-TP2 식물체내에 형질전환된 인삼의 CAB 유전자의 특성이 나타나고 있음을 알 수 있었다(Kim 등 1999).

**광량별 광합성량의 조사**

CAB-TP2 식물체와 대조구로서 정상 NC 82 식물체를 온실에서 재배하여 개화기 직전에 광합성량을 비교한 결과는 그림 2와 같다.

Quantum  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 와  $500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 을 조사하였을 때 NC 82의 광합성량은 각각  $7.9 \text{ CO}_2 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 와  $15.6 \text{ CO}_2 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 이었으며, CAB-TP2 식물체의 광합성량은 8.7,  $19.4 \text{ CO}_2 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로서 정상 식물체에 비하여 약 20% 상승되었다. 이는 완두콩의 CAB 유전자를 연초에 도입한 형질전환체의 광합성량이 20% 상승되었다는 보고와 유사한 결과였다(Ko et al. 1992). Quantum 1000 또는  $2000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 을 조사하였을 때에 NC 82의 광합성량은 각각  $15 \text{ CO}_2 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 와  $11.5 \text{ CO}_2 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 나타났고, CAB-TP2 식물체의 광합성량은 15.2



Fig 2. Phenotypes of transgenic plant contained cab gene. The right plant is CAB-TP2 and the left plant is normal NC 82 as a control.

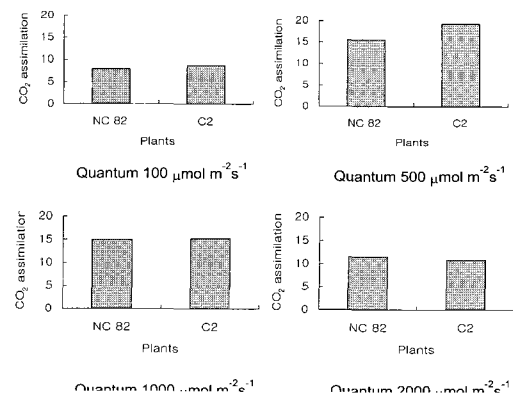


Fig 3. Changes in CO<sub>2</sub> assimilation of transgenic plants and NC 82 at varying irradiance conditions.

CO<sub>2</sub> μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>, 10.9 CO<sub>2</sub> μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>로서 정상식물체와 비슷한 수준이었다. 이는 CAB 유전자가 도입됨으로써 특히 고광도 조건에서 많은 빛 에너지를 흡수하여 광합성 과정 중 전자전달 기작의 과부하에 의한 엽록소 및 엽육세포의 파괴가 나타날 수 있는 우려를 배제 한 결과이며, 특히 광량이 적은 조건인 100 혹은 500 μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>인 저광도에서 대조식물보다 광합성이 더 활발하게 진행되었는데 이는 담배식물체에 인삼 유전자 도입이 잘 이루어진 결과로 사료된다.

**광합성 효율(Fv/Fm) 및 클로로필 함량 조사**

CAB-TP2 식물체와 NC 82의 종자를 채취하여 파종한 직 후 40 μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>의 조건으로 차광하고 또 차광하지 않은 온실조건에서 발아 시켜 떡잎 시질의 Fv/Fm 값을 측정 한 결과가 그림 4와 같다. 이때 대조구로 이용한 정상 NC 82는 광 조건에서는 0.792, 차광조건에서는 0.727이었으며 CAB-TP2 식물체는 광 조건에서는 0.806, 차광조건에서는 0.786 이었다. Fv/Fm 치는 PS II계에서의 광합성 능력을 측정하는 방법으로 NC 82가 발아하고 성장하는 각 시기별로 조건에 따라 0.07의 차이가 있었으며, CAB-TP2 식물체의 경우에는 0.01의 차이를 보인 것으로 보아 CAB 유전자가 형질전환된 식물체는 광의 조건에 상관없이 PS II계의 광합성능이 향상되어 있는 것으로 보인다.

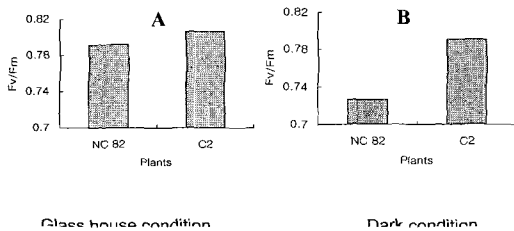


Fig 4. Effect of light intensities on Fv/Fm values at early stages of tobacco seedling.

A: Glass house condition, B: Dark condition (40 μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>).

개화기 직전의 형질전환 식물체와 NC 82의 잎을 이용하여 Fv/Fm 치를 조사하였다. 이때 각 잎의

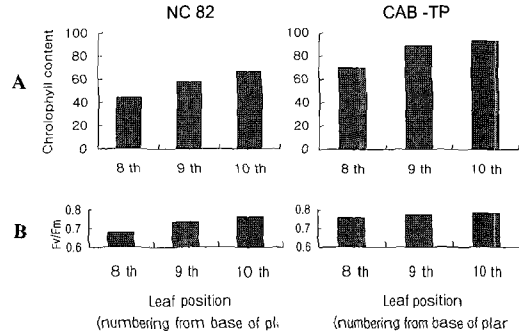


Fig 5. Chlorophyll contents(A) and rates of Fv/Fm(B) in mature leaves(8-10 position) of transgenic plant and NC 82 grown in glasshouse. Chlorophyll contents were measured on leaf disks. The disks were extracted in a 80% acetone in the dark (4°C), and the rate of Fv/Fm was measured with leaf discs predarkened for 10 min at temperature.

광합성 능력의 차이를 보기 위하여 각 잎 위치별로 측정하였으며, 그 결과는 그림 5-B 와 같다. 정상 식물체인 NC 82의 경우 8매엽은 0.679를 나타내었고, 9매엽은 0.735, 10매엽은 0.764이었으며, 이에 반하여 CAB-TP2 식물체는 8매엽은 0.759 9매엽은 0.774, 10매엽은 0.781로서 전체적으로 정상 식물체보다 높은 수준으로 이는 약 10%정도 광합성능이 향상되었음을 의미하며, 특히 CAB-TP2 식물체는 각 잎 위치에 따른 Fv/Fm 치의 차이가 NC 82에 비하여 적은 것으로 보아 각 잎 위치에 관계없이 비슷한 광합성 능력이 있음을 알 수 있었다. 형질전환 식물체의 클로로필 함량은 70 - 93 mg/m<sup>2</sup>로서 NC 82의 44 - 58 mg/m<sup>2</sup>에 비하여 40% 정도 많았고, 특히 조사된 엽위별 8, 9, 10매엽에서 형질전환 식물체의 8매엽이 정상식물체의 10매엽보다도 클로로필 함량이 많았다 (그림 5-A). 이는 형질전환 식물체의 수광량이 많은 것에서 기인된 것으로 보인다. 식물이 노화될 때에 클로로필 함량과 Fv/Fm 값이 떨어진다는 결과 (John et al. 1995)에 의하면 CAB-TP2의 경우 정상 NC 82에 비하여 그 수치가 월등하게 높았으므로 그 노화의 진척이 늦어짐을 알 수 있었다.

이와 같은 결과는 양지성 작물인 담배의 중 ·

상위잎이 길고 넓게 자라는 특성으로 인하여 직사광이 중·하위 잎으로 비추는 것을 막는 상태가 되어도 그 광합성 능력에는 크게 영향 미치지 않으므로 연초 중·하위잎의 성장과 품질향상이 가능할 것으로 기대된다.

## 결 론

고려인삼의 CAB 유전자를 식물 발현벡터에 클로닝 한 후, *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404에 도입하여 연초(*Nicotiana tabacum*) 품종 NC 82의 잎 절편에 동시배양법에 의하여 형질전환 식물체를 획득하였다.

온실에서 생장한 정상 식물체와 형질전환 식물체 CAB-TP2를 개화기 직전에 광량별로 조사 하고 광합성량을 조사 하였다. Quantum 100,  $500 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 을 각각 조사하였을 때, 광합성량은 CAB-TP2 식물체는 NC 82에 비하여 20% 상승하였다. 그러나 Quantum 1000,  $2000 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 을 조사하였을 때의 광합성량은 정상식물체와 비슷한 수준으로 저 광도에서만 광합성량이 상승되는 긍정적인 결과를 얻었다.

식물체를  $40 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 조건으로 차광하고 또는 차광하지 않은 온실조건에서 발아 시켜 초기 유묘기에 광합성 효율(Fv/Fm)을 측정하였을 때, NC 82는 광조건과 암조건의 차이가 0.07 이었으며 CAB-TP2 식물체는 그 차이가 0.01로서 정상 식물체에 비하여 차광조건과 그렇지 않았을 때의 차이가 월등히 적었다.

온실에서 재배한 식물체를 개화기 직전에 광합성 효율(Fv/Fm)을 측정하고 동시에 클로로필 함량을 측정한 결과 하위엽의 경우, NC 82보다 CAB-TP2 식물체가 그 효율이 10% 증가하였으며 클로로필 함량도 정상 식물체보다 약 40% 증가하였다.

## 참 고 문 헌

1. Flachmann, R. and W. Kühlbrandt(1995) Accumulation of plant antenna complexes is regulated by post-transcriptional mechanisms in tobacco. *The Plant cell* 7:149-160.
2. Flachmann, R.(1997) Composition of photosystem II antenna in light-harvesting complex II antisense tobacco plants at varying irradiances. *Plant Physiol.* 113:787-794.
3. Funk, C., W. P. Schröder, A. Napiwotzki, S. E. Tjus, G. Renger, and B. Andersson(1995) The PSII-S protein of higher plants: A new type of pigment-binding protein. *Biochemistry* 34:11133-11141.
4. Jansson, S.(1994) The light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins. *Biochimica et biophysica Acta* 1184:1-19.
5. John, I., R. Drake, A. Farrell, W. Cooper, P. Lee, P. Horton, and D. Girerson(1995) Delayed leaf senescence in ethylene-deficient ACC-oxidase antisense tomato plants: molecular and physiological analysis. *The Plant Journal* 7(3):483-490.
6. Kim, K. S., K-W. Lee, J. C. Lee, W. Y. Yea, S. Y. Chae, and E. K. Park(1999) Cloning of CAB encoding chlorophyll a/b binding protein of photosystem II in Korean ginseng and Use- in Plant. *Journal of Korea Society of Tobacco Science* 21(2) : 152-159.
7. Ko, K., Z. W. Ko, D. H. Turpin, C. Labates, N. Mohanty, and A. Granell(1992) Overproduction of chlorophyll a/b binding protein enhances photosynthetic activity in transgenic tobacco. in : Murata N, (eds), *Research in Photosynthesis*, vol. III, Kluwer Academic publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 445-448.
8. Millar, A. J. and S. A. Kay(1991) Circadian Control of cab gene transcription and mRNA accumulation in arabidopsis. *The plant Cell* 3:541-550.
9. Millar, A. J. and S. A. Kay(1996) Integration of circadian and phototransduction pathways in the network controlling CAB gene transcription in Arabidopsis. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA 93:15491-15496.

10. Porra, R. J., W. A. Thompson, and P. E. Kriedemann(1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 975:384-394.