

두 가지 제초제에 대하여 저항성을 가지는 항생제 마커-프리 형질전환 감자 육성

방일란^{1,4}, 김진석^{2*}, 공수¹, 모황성¹, 민석기², 권석윤³, 이규화^{1,5}, 임학태^{1*}
¹강원대학교, ²한국화학연구원, ³한국생명공학연구원, ⁴이화여자대학교, ⁵동북임업대학교

Development of Antibiotics Marker-free Potato Having Resistance Against Two Herbicides

Yi-Lan Fang^{1,4}, Jin-Seog Kim², Su Gong¹, Hwang-Suk Mo¹, Seok-Ki Min², Suk-Yoon Kwon³,
Kui-Hua Li^{1,5}, and Hak-Tae Lim^{1*}

¹Department of Plant Biotechnology, Division of Biotechnology, School of Bioscience & Biotechnology,
Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea.

²Chemical Biotechnology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology (KRICT), Daejeon 305-600, Korea.

³Plant Genome Research Center, KRIBB, Daejeon 305-806, Korea

⁴Structural Biopharmacy, College of Pharmacy, Ewha Woman's University, Seoul 120-750, Korea.

⁵College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

ABSTRACT This study was conducted to develop an antibiotics marker-free potato (*Solanum tuberosum* L., cv. Taedong valley) plant having resistance against two herbicides. *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105, harboring a binary vector plasmid pCAMBIA3300 containing *bar* gene under the control of a promoter CaMV35S and linked *CP4-EPSPS* genes driven by CaMV35S promoter, was used in the current study. The leaf segments of newly bred potato variety (cv. Taedong Valley) was co-cultured with *Agrobacterium*. Then, the regenerated individual shoots were excised and transferred to potato multiplication medium supplemented with 0.5 mg/L phosphinothricin. The shoots were rooted in MS medium without hormone and obtained putative transgenic plant E3-6. Integration of target genes into the E3-6 plant and their expression was confirmed by PCR, Southern analysis, and ELISA test. The tissue necrosis test on young leaf blade and shikimic acid accumulation test using the tissue of E3-6 plant were conducted to investigate the resistance to glufosinate-ammonium and glyphosate, respectively. The transgenic plants (E3-6) simultaneously showed a high resistance to both herbicides. The same results were surely obtained also in the whole plants foliar-treated with alone or mixture of two herbicides, glufosinate-ammonium and glyphosate.

*Corresponding author Tel 033-250-6474 Fax 033-243-6340

E-mail: potatokorea@empal.com

서 론

감자는 생육기간이 짧고 단위면적당 생산량이 많아 세계 4대 식량작물 중의 하나로서 재배되고 있다. 또한, 세계적으로 1980년대 이후부터 많은 기능성 품종들이 생명공학적인 방법에 의해 육성되고 있어 이들의 실용화로 향후 감자 재배 면적은 계속 증가될 것으로 예상된다 (Mullins et al. 2006).

일반 작물재배에 있어서 많은 노동력을 요구하며 생산량에 지대한 영향을 미치는 것은 잡초문제이다. 감자 역시 종에 따라 다르지만 봄에서 가을까지 전 기간동안에 재배 가능한 작물이므로 실제 거의 모든 잡초가 방제 대상이 되며 이를 위해 여러 제초제가 개발되어 사용되고 있다 (Kim et al. 2001). 그러나 보다 적은 노동력으로 최대의 잡초방제 효과를 얻기 위한 방안의 하나로서 비선택성 제초제 저항성 유전자를 감자에 도입시킨 다음, 해당 제초제를 처리하여 발생 잡초를 손쉽게 제거하는 방법이 연구되어왔다. 제초제 저항성 형질전환 작물의 기술개발이 본격적으로 활성화되기 시작한 것은 몬산토사 (Monsanto)가 1996년에 라운드업-레디 (Roundup-Ready) 콩을 미국에 출시한 이후부터이다. 현재는 옥수수, 콩, 목화, 유채 (또는 캐놀라), 벼, 기타 작물을 대상으로 주로 비선택성 제초제 (예, glyphosate, glufosinate-ammonium)를 중심으로 제초제 저항성 작물이 개발되어 실용화되고 있는데 (Duke 2005) 거의 모두가 한 가지의 제초제 저항성 유전자를 가지면서 선택표지 (selection marker) 유전자로서 항생제 저항성 유전자가 포함된 것들이다. 그렇기 때문에 다음과 같은 몇 가지 기술적 개선이 필요한 상황이다. 첫째, 대부분 한 종류의 제초제 저항성 유전자가 도입된 품종이 재배되고 있는 바, 이 경우 동일 제초제가 연용됨에 따라 제초제 및 분해 중간산물의 생물내 축적, 해당 제초제에 잘 방제되지 않는 잡초의 번무와 잡초군락 변이, 저항성 잡초 출현 촉진 등의 문제점이 발생되고 있다 (Arregui et al. 2003, Owed and Zelaya 2005, Sandermann 2006). 둘째, 형질전환체의 대부분이 항생제 내성 유전자를 포함하고 있는 바, 이들을 재배하면 자연적으로 환경 또는 인축에 대해 항생제 내성 유전자를 노출시키기 때문에 “항생제 내성 확산”이라는 문제가 야기될 우려가 있다. 셋째, 비선택성 제초제라 할 지라도 동일 농도에서 모든 잡초를 똑같이 방제하지는 못하기 때문에 난방제 잡초를 모두 방제하기 위해서 고농도 처리되는 경우가 많다. 금후 친환경 농업을 위해서는 가능한 한 제초제의 저농도 투입이 요구된다.

따라서 잡초방제 측면에서의 이러한 기술적 과제들을 해결하기 위해서, 본 연구에서는 살초기작이 다르고 살초효과 면에서 상가 및 상승작용을 가져 제초제 처리량 저감 재배 체계를 도입할 수 있도록 두 가지 비선택성 제초제에 저항성을 가지되 항생제 마커를 포함하지 않는 형질전환 감자를 육성하고자 하였다.

재료 및 방법

제초제 내성 유전자 발현운반체 제조

CP4-EPSPS (CP4 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase) 유전자를 분리하기 위하여, *Bgl*II 및 *Sac*I 제한효소 위치가 각각 도입된 프라이머 (5'-TAG CAG ATC TTT CAA GAA TGG-3', 5'-AAG GCA TGC AGG CTG TAG CCA-3')를 합성하였다. 또한 유전자 변형 콩인 라운드업-레디 (Roundup-Ready, Monsanto) 콩에서 통상적인 방법으로 총 RNA를 분리하고, 이로부터 역전사효소를 이용하여 cDNA를 제조하였다. 상기의 프라이머와 합성 cDNA를 사용하여 94°C에서 1분, 52°C에서 1분, 72°C에서 2분의 1사이클의 PCR을 30회 수행하여 *CP4-EPSPS* 유전자를 증폭한 후, 공급자가 제공하는 프로토콜에 따라 증폭된 PCR 산물을 pGEM-T Easy에 클로닝 하였다. 그 후 얻어진 *CP4-EPSPS* 절편을 CaMV35S 프로모터 하류의 *Bam*HI과 NOS 종결인자 상류의 *Sac*I 위치에 삽입한 후, 이를 *bar* 유전자가 선발표지로 포함되어 있는 pCAMBIA3300 (Center for Application of Molecular Biology to International Agriculture, Australia)에 도입하여 식물체용 발현벡터를 제작하였다 (p35S-EPSPS-B). 이 발현벡터를 An (1987)의 방법에 따라 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (Hood et al. 1993)에 도입하였다.

감자 형질전환체 육성

형질전환을 위해 사용한 감자 (*Solanum tuberosum*) 품종은 국내 신품종인 태동밸리 (Taedong Valley, 품종등록번호 202002000007)와 대조구로 대서 (Atlantic)를 이용하였다. *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105/p35E-Bar의 단일 콜로니를 취하여 kanamycin 50 mg/L이 첨가된 LB배지에 접종하고 이것을 28°C 교반배양기에서 180 rpm의 속도로 하룻밤 배양하여 균농도가 600 nm에서의 흡광도 0.8이 되도록 배양한 후, 배양액을 3000 rpm으로 원심분리하여 얻어진 *Agrobacterium*

을 MS 액체배지에 동량으로 희석하였다.

감자의 절편체 (잎, 줄기, 엽병)를 일정한 크기로 잘라 전 배양배지 (potato pre-culture media, PPM)에서 24시간 배양한 다음, 상기에서 제조된 *Agrobacterium* 희석액에 넣어 10분간 감염시켰다. 그 후, 이를 멸균된 여과지에서 10분간 건조시키고, 건조된 절편을 공배양 배지 (potato co-culture media, PCM)에서 48시간동안 암배양한 후 선발 배지 (potato selection media, PSM)에 옮겨 재분화 선발을 통해 신초를 유지하였다. 재분화된 신초들을 phosphinothricin (PPT) 5 mg/L가 각각 포함된 계대배양배지 (sub-culture media, SUM)에 옮겨 생존하는 것들을 선발하였다. 선발된 신초들은 호르몬이 없이 carbenicillin 500 mg/L가 포함된 기본 MS 고체배지 (PRMM 배지)에서 발근시켰다. 발근된 개체는 조심스럽게 꺼내어 물에 잘 씻은 다음 원예용 부농상토 5호가 담긴 포트에 이식하고 이를 1주일동안 비닐 덮힌 생육상자의 과습조건에 유지시킨 후 2-3일간 간헐적으로 비닐을 벗겨 자연조건에서 서서히 적응토록 하여 순화시켰다. 감자 형질전환 과정시에 사용된 여러 가지 배지의 조성은 표 1에서와 같다.

감자 형질전환체의 유전자 도입 확인

PCR, Southern analysis, 효소면역반응 분석 등을 통해 유전자 도입여부를 확인하였다.

PCR 검정: *Bar*와 *CP4-EPSPS* 유전자의 존재여부를 확인하기 위하여 각각의 특이 프라이머 (*bar*의 경우 5'-CGG TCT GCA CCA TCG TCA ACC-3'와 5'-GTC CAG CTG CCA GAA ACC CAC-3', *CP4-EPSPS*의 경우 5'-CCG TAA GGA AGG CGA CAC-3'와 5'-AGG AAG CTC ATG GCG ATG-3')를 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR 증폭반응은 GeneAmp

PCR system 9700 (Perkin Elmer)에서 실시하였는바, 94°C에서 3분간 변성 반응시킨 후, 94°C에서 30초 변성, 60°C (*bar*)/65.6°C (*CP4-EPSPS*)에서 30초 중합 (polymerization) 어닐링 (annealing), 그리고 72°C에서 30초씩 35회 신장 반응을 행하고, 72°C에서 10분간 추가 신장시켰다. 사용한 효소는 Taq 중합효소 (Takara)이며 PCR 증폭의 결과는 1.0 % (w/v) agarose gel에서 전기영동으로 확인하였다.

Southern 분석: 감자 식물체 잎으로부터 DNeasy Plant Maxi kit (QIAGEN 사)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. Genomic DNA 30 µg씩을 제한효소 EcoRI 및 HindIII로 절단하여 agarose gel에서 전기영동을 수행하였다. 이를 Zeta Probe membrane (Bio-Rad 사)으로 전달한 후, ³²P로 표지한 유전자 단편을 탐침으로 이용하여 혼성화(hybridization) 반응을 수행하였다. 혼성화 반응이 종료된 후, membrane을 세척하고, X-선 필름에 노출시켜 밴드를 확인하였다.

효소면역반응 (ELISA) 검정: EPSPS를 검출하기 위하여 Agdia PSP 74000/0096 PathoScreen Kit을 사용하여 ELISA-DAS 방법 (Clark and Adams 1977)으로 조사하였다.

감자 형질전환체의 제초제 저항성 검정

형질전환 식물체의 제초제 저항성 검정을 위해서는 두 단계로 조사하였다. 첫 번째 단계는 간이검정법으로서 *bar* 유전자 활성화에 따른 저항성의 경우는 잎의 일부에 glufosinate-ammonium (순도 50% 내외, Bayer CropScience)을 도포처리하여 세포괴사 여부를, *CP4-EPSPS* 유전자 활성화에 따른 저항성의 경우에는 glyphosate (순도 62%, (주) 경농) 용액에 치상된 잎절편 내의 shikimate 축적여부를 조사하였다. 두 번째 단계에서는 식물체가 정상적인 생육을 거쳐 일정한 크기

Table 1. Compositions of media used for potato transformation in this study

Medium ¹	Composition of medium (mg/L)								
	NH ₄ NO ₃	CaCl ₂	NAA	BA	2,4-D	Zeatin	GA ₃	Carbeni-cillin	Phosphinothricin
PPM	80	14.7	10	10					
PCM					2				
PSM			0.01			2	0.1	500	0.5
SUM								500	5
MUM								500	

¹Except PRMM, all the medium contains the 1×MS salt with 1×vitamin mixture and 30 g/L sucrose. PPM, potato pre-culture media, PCM, potato co-culture media, PSM, potato selection media; SUM, subculture media; MUM, Multiplication media.

에 이르렀을 때 비선택성 제초제를 식물체 전체에 경엽처리하여 실제 제초제 저항성을 나타내는지 확인하였다.

제초제 저항성의 간이검정: *Bar* 유전자 활성화에 따른 저항성 간이검정으로는 glufosinate-ammonium 용액을 250 - 1000 µg/ml 농도로 조제하여 (0.1% Tween 20 함유) 순화된 어린 식물체 잎의 약 1cm²에 10 µl씩 도포 처리한 후 세포 괴사 여부를 육안으로 확인하였다. 한편, *CP4-EPSPS* 유전자 활성화에 따른 저항성 간이검정으로는 glyphosate 용액에 치상한 식물체 조직의 shikimate 축적 여부를 조사하였다 (Kim et al. 2006).

전식물체 경엽처리에 의한 제초제 저항성 검정: 기내에서 번식중인 발근된 식물체를 부농상토 5호가 담긴 직경 13 cm, 높이 12 cm의 원형 포트에 이식하여 순화시킨 다음, 온실 (주간 25°C 내외/야간 20°C 내외)에서 2개월간 생장시켰다 (지상부가 20-30 cm 정도 자람). Glyphosate와 glufosinate-ammonium 원제를 0.1% Tween 20 + 43% acetone 용액에 각각 750 µg/ml 및 500 µg/ml 농도로 용해시킨 후, 이들을 각각 단독으로 또는 혼합하여 감자 식물체의 잎에 흠뻑 젖을 정도로 포트당 50 ml씩 살포하였다. 제초제가 처리된 감자 식물체를 온실조건에 옮겨, 처리 후 2일째와 7일째에 잎의 엽록소 함량 변화와 광계 II의 광량자 수율 변화를 측정하여 제초활성 반응을 조사하였다. 잎의 엽록소 함량은 엽록소계 (SPAD 502, Minolta, Japan)를 이용하여 비파괴적으로 조사하였으며, 광량자 수율값 (quantum yield, Fv/Fm)은 펄스 진폭 변조 형광계 (Pulse Amplitude Modulation Fluorometer; PAM 2000, Walz, Germany)를 이용하여 조사하였다 (Schreiber et al. 1996).

결 과

제초제 내성 유전자 발현운반체 제조

Bar 유전자를 포함하는 pCambia3300에 CaMV35S 프로모터와 NOS 종결인자 사이에 *CP4-EPSPS* 유전자를 도입하여 식물체용 발현 운반체 p35S-EPSPS-B를 제작하였다 (Figure

1). 이를 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105에 도입하였으며 *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105/p35E-*Bar*로 명명하여 한국생명공학연구원 부설 유전자은행 (KCTC)에 2006년 10월 25일자로 기탁하였다 (KCTC 11008BP).

감자 형질전환체 육성

태동밸리와 대서 두 품종의 기내 배양된 식물체로부터 잎, 줄기, 엽병의 절편체를 채취한 후 이들을 각각 *bar*와 *CP4-EPSPS* 유전자가 포함된 *Agrobacterium*과 공동배양한 결과, PPT 0.5 mg/L이 첨가된 PSM 배지에서 10일 후부터 절편체의 절단면에서 캘러스가 형성되기 시작하였으며 약 6-8 주 후에 싹초가 발생하기 시작하였다. 1차 선발배지에서 유기된 여러 싹초들을 PPT 5 mg/L이 첨가된 SUM 배지로 옮긴 후 형질전환식물체를 선발하였다. 형질전환과정 중 싹초 유도 선발배지 (PSM)와 발근 유도 선발배지 (PRMM)에서 선발된 개체의 싹초발생율과 발근율은 표 2와 같았다. 최종

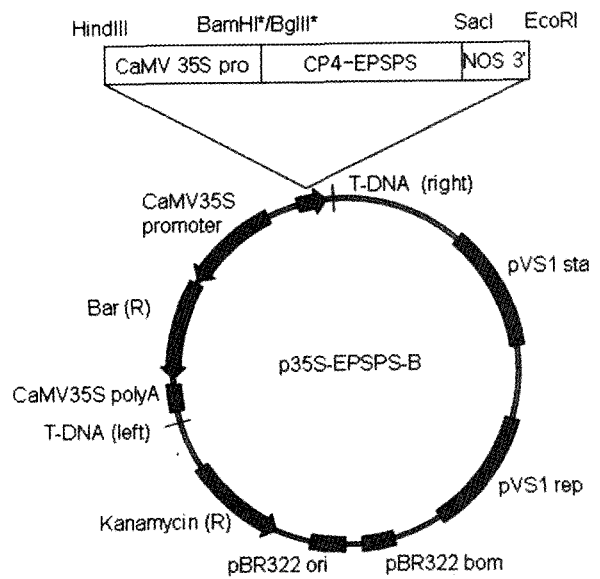


Figure 1. A plant expression vector, p35-EPSPS-B containing CP4-EPSPS gene under control of CaMV35S promoter, for transformation of potato.

Table 2. Frequency of shoot and root regeneration in two potato varieties co-cultured with *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105/p35E-*Bar*

Variety	No. of explants			Shoot regeneration (%)			Rooting frequency (%)		
	Leaf	Internodal	Petiole	Leaf	Internodal	Petiole	Leaf	Internodal	Petiole
Taedong Valley	193	295	49	77(39.9)	10(3.4)	2(4.1)	3(1.6)	0	0
Atlantic	270	327	85	28(10.4)	4(1.2)	0	0	0	0

적으로 3개체 중 신초발생과 발근이 가장 좋은 한 개체를 선택하여 이를 E3-6로 명명하였다.

감자 형질전환체의 유전자 도입 확인

PCR, Southern 분석, 효소면역반응 분석 등을 통해 유전자 도입여부를 확인하였다. PCR을 통한 검정 결과, 선발된 감자 식물체 시료 (E3-6)에서 *bar*와 *CP4-EPSPS* 유전자 밴드가 관찰되어, 감자 식물체 내에 상기 유전자들이 삽입된 것을 확인할 수 있었다 (Figure 2). Southern 분석의 결과, 형질전환되지 않은 대조군 식물체 (NT)에서는 어떠한 밴드도 나타나지 않았으나 형질전환된 식물체 (E3-6)는 *bar*의 경우 3개 밴드, *CP4-EPSPS*의 경우 3개 이상의 밴드가 보여 감자 genome

내에 안정적으로 도입되었음을 알 수 있었다 (Figure 3). 특히 *CP4-EPSPS*의 경우, 비형질전환 식물체에서도 Southern 분석에 사용된 *CP4-EPSPS* 유전자의 일부 절편과 혼성화되는 밴드가 관찰되었는데, 이는 비특이적 결합 혹은 감자의 *EPSPS* 유전자와 혼성화된 결과로 추정된다. 한편, 효소면역반응 (ELISA) 검정을 통해 *CP4-EPSPS* 유전자가 정상적으로 발현되는지를 확인하고자 감자 형질전환체로부터 단백질을 추출한 후, EPSPS 항체를 이용한 효소면역반응을 실행하였다. PPT::EPSPS vector를 사용하여 형질전환된 E3-6 line은 negative의 흡광도 (0.039)의 34배에 해당하는 흡광도 (1.332)를 나타내었고 positive (1.230) 흡광도보다는 높은 흡광도를 보여 E3-6은 형질전환체로 판단하는 동시에 매우 높은 단백질 발현양을 알 수 있었다 (Figure 4).

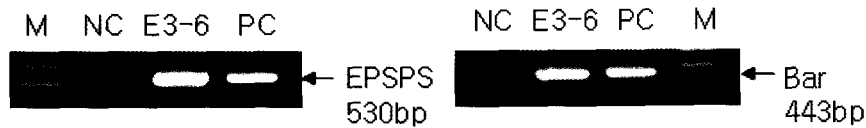


Figure 2. PCR analysis of two herbicide resistance genes, *bar* and *EPSPS* gene, in putative transgenic lines. M: molecular DNA weight marker, NC: negative control (non-transgenic plant); PC: positive control (plasmid DNA); E3-6: putative transgenic plant.

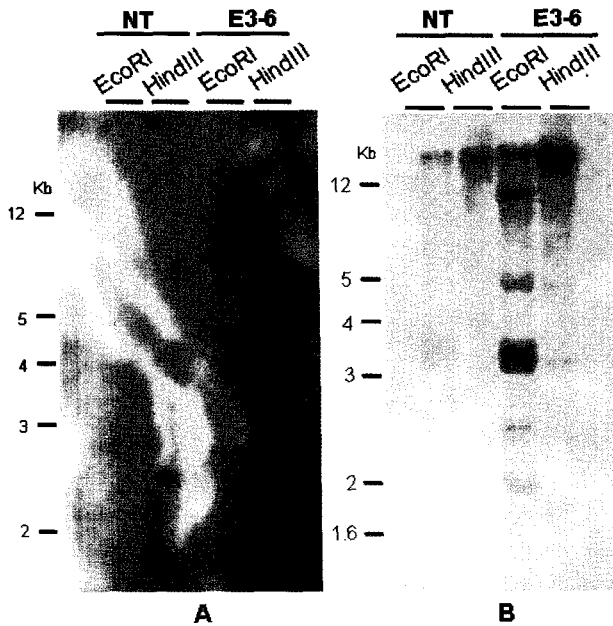


Figure 3. Southern analysis of genomic DNA prepared from non-transgenic (NT) and putative transgenic (E3-6) potato. A: probed with fragment of *bar* gene, B: probed with fragment of *CP4-EPSPS* gene.

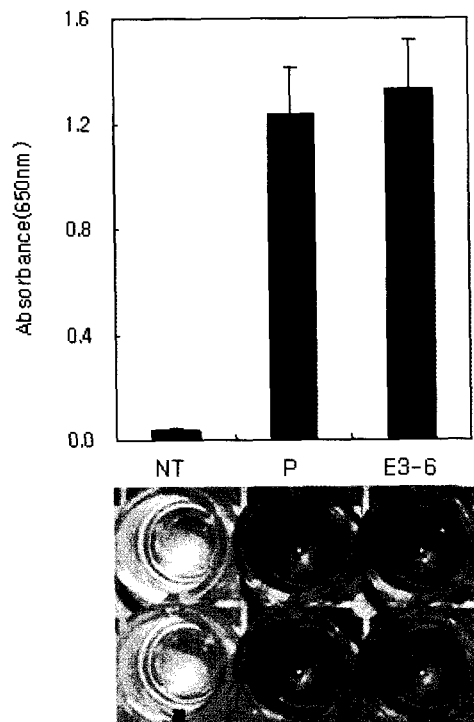


Figure 4. ELISA analysis of EPSPS using proteins prepared from non-transgenic potato (NT), putative transgenic (E3-6) potato and plasmid (P). Data represent means \pm SE of three replicates.

감자 형질전환체의 제초제 저항성 검증

제초제 저항성 간이검정: 감자 형질전환체에서의 *bar* 유전자 활성화에 따른 제초제 저항성 여부를 알기 위한 간이검정으로서 glufosinate-ammonium을 여러 농도로 조제하여 순화된 어린 식물체 잎에 도포처리한 결과, 형질전환체는 세포괴사가 전혀 관찰되지 않았지만 비형질전환체는 황화증상과 함께 세포괴사가 일어났다. 한편, *CP4-EPSPS* 유전자 활성화에 따른 제초제 저항성 여부를 알기 위한 간이검정으로서 glyphosate 용액에 치상한 식물체 조직의 shikimate 축적 여부를 조사한 결과, 감자 형질전환 식물체에서는 380nm의 흡광도 증가가 관찰되지 않아 glyphosate에 대해 저항성인

것으로 판단되었다 (Table 3).

전식물체 경엽처리에 의한 제초제 저항성 검증: Glyphosate와 glufosinate-ammonium 각각의 용액 또는 이들의 혼합물을 감자 성체식물에 처리한 후 2일째와 7일째에 잎의 엽록소 함량 변화와 광계 II의 광량자 수율 변화를 측정하여 제초활성 반응을 조사하였다. 그 결과, 비형질전환체에 glufosinate-ammonium을 단독처리한 경우, 처리 후 2일째에 괴사 증상이 나타나기 시작하였고, 이때 광량자 수율값은 무처리구의 41% 수준이었지만 엽록소 함량에서는 차이가 관찰되지 않았다. 3일째에는 잎이 마르기 시작하여 5일째에 거의 고사되었으며, 처리 후 7일째에는 엽록소 함량과 광량자 수율 모두 0.0 Fv/Fm이었다. 그러나, 형질전환체는 약해가 전혀 나타나지 않아 모든 값이 무처리구와 동일한 수치를 보였다 (Table 4, 5). 한편, 비형질전환체에 glyphosate를 단독처리한 경우, 처리 후 2일째에는 제초활성이 전혀 나타나지 않아 광량자 수율과 엽록소 함량 공히 무처리구와 차이가 거의 없었다. 처리 후 7일째는 생육억제와 황화증상이 나타났으며 이 때 광량자 수율은 0.647 Fv/Fm로서 무처리구의 82.9% 수준이었고, 엽록소 함량은 무처리구의 52.7% 수준을 보였다. 그러나 형질전환체는 약해가 전혀 나타나지 않아 모든 값이

Table 3. Comparison of shikimic acid accumulation induced by glyphosate treatment in non-transgenic and transgenic potato (E3-6)

Glyphosate (µg/mL)	Shikimate accumulation (A380 nm)	
	Non-transgenic plant	Transgenic plant (E3-6)
4	0.284 ± 0.02	0.016 ± 0.01
16	0.663 ± 0.09	0.001 ± 0.01
64	0.854 ± 0.11	0.037 ± 0.03

Table 4. The effect of alone- or mixture-treatment of glyphosate and glufosinate-ammonium on photosynthetic II quantum yield, Fv/Fm in leaves of non-transgenic (NT) and transgenic potato (E3-6)

Herbicide treatment	2 DAT ¹⁾		7 DAT	
	NT	E3-6	NT	E3-6
Untreated	0.783 ± 0.009	0.781 ± 0.030	0.780 ± 0.011	0.781 ± 0.020
Glyphosate, 750 µg/ml	0.783 ± 0.008	0.790 ± 0.007	0.647 ± 0.079	0.783 ± 0.014
Glufosinate-ammonium, 500 µg/ml	0.321 ± 0.046	0.782 ± 0.005	0.000 ± 0.000	0.776 ± 0.015
Glyphosate + Glufosinate-ammonium, 750 + 500 µg/ml	0.303 ± 0.067	0.785 ± 0.005	0.000 ± 0.000	0.784 ± 0.005

¹⁾DAT: days after treatment

Table 5. The effect of alone- or mixture-treatment of glyphosate and glufosinate-ammonium on chlorophyll contents in leaves of non-transgenic (NT) and transgenic potato (E3-6)

Herbicide treatment	2 DAT ¹⁾		7 DAT	
	NT	E3-6	NT	E3-6
Untreated	33.1 ± 3.1	32.5 ± 3.0	33.8 ± 2.5	33.9 ± 3.2
Glyphosate, 750 µg/ml	32.6 ± 1.7	33.3 ± 1.9	17.8 ± 3.8	34.5 ± 2.1
Glufosinate-ammonium, 500 µg/ml	32.1 ± 1.9	32.8 ± 2.3	00.0 ± 0.0	34.0 ± 2.3
Glyphosate + Glufosinate-ammonium, 750 + 500 µg/ml	31.2 ± 1.8	33.9 ± 2.1	00.0 ± 0.0	34.4 ± 2.4

¹⁾DAT: days after treatment

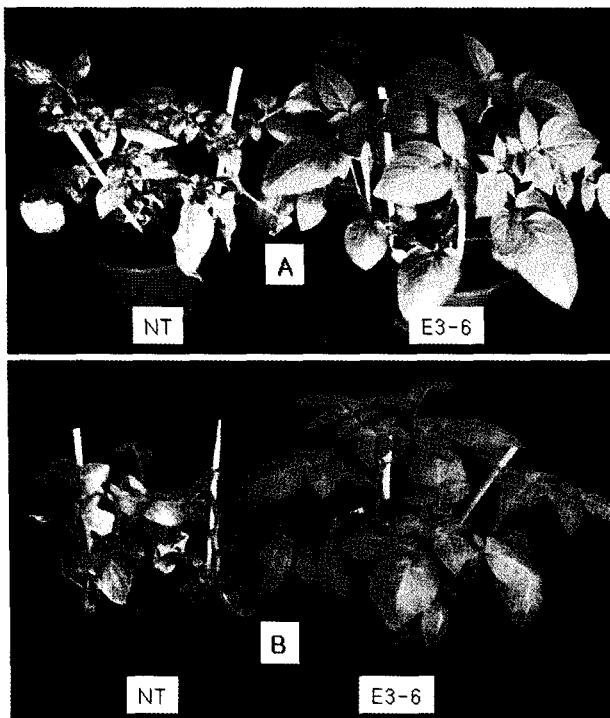


Figure 5. Herbicidal response of non-transgenic (NT) and putative transgenic (E3-6) potato foliage-treated with glufosinate-ammonium (A) and glyphosate (B). Photographs showing the damage in plants 10 days after spraying herbicides.

무처리구와 동일한 수치를 보였다 (Table 4, 5). Glyphosate와 glufosinate-ammonium을 혼합 처리한 경우에는 glufosinate-ammonium을 단독처리한 경우와 비슷한 결과를 나타내었다. 이상의 실험결과를 종합해 볼 때, E3-6 형질전환 감자는 두 제초제를 각각 단독으로 처리할 때나 혼합하여 동시처리할 때에도 동일한 저항성이 나타남을 확인하였다 (Table 5, Figure 5).

고 찰

제초제 저항성 작물 개발을 위해 연구대상이 되었던 유전자는 CP4-EPSPS, bar, nitrilase, hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase, acetolactate synthase, protoporphyrinogen IX oxidase, P450 monooxygenase, phytoene desaturase 등 여러 가지이지만 (Jeong and Han 2000, Li and Nicholl 2005, Matringe et al. 2005), 2005년 현재 상업적으로 성공한 유전자는 CP4-EPSPS, glyphosate oxidoreductase (GOX), bar 등 몇 가지에 불과하다 (Duke 2005). 여기에서 bar 도입 작물에는 glufosinate-ammonium 제초제가, CP4-EPSPS와 GOX 등이 도입된 작물에는 glyphosate 제

초제가 주로 사용된다. Glufosinate-ammonium은 비농경지에서 오랫동안 사용되어 온 제초제로서 (Steckel et al. 1997) 식물의 glutamine synthase를 저해하여 체내에 암모니아를 축적시키고 살포 후 5일정도 지나면 식물체를 강력히 고사시키는데 (Tachibana et al. 1986), 토양에 떨어지면 곧 분해가 되는 특징이 있어 환경오염 정도가 타 제초제에 비하여 매우 적다고 알려져 있다. 그러나 잡초방제 측면에서 비교적 고농도 처리가 요구되는 그룹에 속해있고, 식물별 감수성 정도 (Tharp et al. 1999)가 달라 처리 농도를 낮추었을 때 부분적으로 방제가 용이하지 않은 잡초들도 있다. 한편, glyphosate 제초제는 몬산토사가 개발하여 20년 이상 사용되어온 비선택성, 비잔류성, 광범위 제초스펙트럼, 경엽처리 제초제로서 (Dill 2005) 처리 후 식물체에 용이하게 흡수 이동된다. 흡수된 제초제 성분은 방향족 아미노산 생합성 과정의 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase (EPSPS)를 저해함으로써 식물체를 서서히 고사시킨다 (Dill 2005). 그러나 잡초방제 측면에서 비교적 고농도 처리되는 그룹에 속해 있고 저농도 처리시 상대적으로 광엽잡초 방제력이 떨어지는 경향이다. 위에서 언급된 바와 같이, 현재 재배되는 대부분의 제초제 저항성 작물은 특정 비선택성 제초제 (glyphosate 또는 glufosinate-ammonium)에 대해 저항성을 가진 것들이다. 이들을 지속적으로 재배할 경우 동일 제초제를 연용하게 됨에 따라 특정 제초제의 환경내 축적, 저항성 잡초 조기 출현 등이 우려되며, 제초스펙트럼에서 벗어난 잡초들의 우점화로 잡초방제 효과가 감소될 수 있다. 이러한 상황에 대비하여 새로운 형질전환 작물 개발과 더불어 합리적인 제초체계 확립 연구가 진행되어야 한다.

본 연구에서는 두가지 제초제 저항성 유전자가 도입된 항생제 마커프리 감자를 국내 신품종 “태동벨리”를 대상으로 개발한 것이다. 따라서 이들 감자를 재배하면 다음과 같은 효과를 거둘 수 있다고 여겨진다. 첫째, 잡초방제를 위해 선택할 수 있는 약제가 하나에서 두 가지로 확대되기 때문에 잡초방제 체계 (혼합처리 및 체계처리)를 보다 원활하게 세울 수 있고, 서로 다른 특성의 제초제를 사용하게 됨에 따라 잡초방제효과를 향상시킬 수 있어 궁극적으로 보다 적은 노동력 투입으로 감자 생산성을 높일 수 있을 것이다. 둘째, 한 가지 비선택성 제초제만 사용할 수 있도록 제작된 감자를 재배할 경우, 제초제를 계속적으로 사용함으로써 인해 저항성 잡초의 조기 출현 문제가 발생될 수 있는데 본 발명의 감자는 서로 다른 기작의 제초제를 교대로 처리할 수 있기 때문

에 저항성 잡초 조기 출현 문제를 막거나 최소화 시킬 수 있다. 아울러 glyphosate 제초제는 자연계에서 이미 몇몇 저항성 잡초가 발생된 것으로 보고되고 있는 바 (Sandermann 2006), 저항성 잡초 발생이 아직 보고되지 않은 glufosinate-ammonium 을 처리함으로써 이들을 용이하게 방제할 수 있다 (Duke et al. 2005). 셋째, 두 약제간 상승효과를 나타내는 제초제를 혼합처리 할 경우, 최종 처리 약량 (제초제 투입량)을 낮출 수 있어 환경부담을 감소시키는 효과를 가진다. (Kim 등 2006) 은 glufosinate-ammonium + glyphosate 혼합처리는 작물의 약해를 줄이면서 광엽잡초를 효과적으로 제거하고자 할 때 사용될 수 있는 합제 조합이라고 보고하였다. 넷째, 본 연구에서 개발된 감자는 항생제 마커프리이기 때문에 항생제 내성 확산 문제에서 벗어날 수 있다. 다섯째, 본 연구에서의 태동벨리 감자는 우수 품질의 가공용 감자이기 때문에 소비량이 많아 농가소득 증대에 보다 크게 기여할 것으로 여겨진다.

그러나 본 연구의 개발감자 보급에 있어서 부정적인 측면도 예측되는 바, 도입된 두 가지 제초제 저항성 유전자가 까마중, 배풍등과 같은 까마중 속 (*Solanum* spp.) 잡초로 전이되어 이중저항성을 가진 잡초가 발생될 염려이다. 그러나 이러한 경우가 발생될 확률은 낮다고 여겨진다. 왜냐하면 감자의 개화로 인해 주변의 까마중과 배풍등 잡초로 유전자가 이동되었다는 보고는 아직 없는 상황이기 때문이다. 설령 이러한 경우가 발생된다 할지라도 다른 제초제를 사용하여 해당 잡초를 선택적으로 제거할 수 있는 기법의 개발이 가능하다. 따라서 본 연구에서 개발된 감자를 재배할 경우, 손실보다는 이익이 더 클 것으로 여겨지며, 본 형질전환감자 계통이 실용화되기 위해서는 금후 재배적 특성, 품질 평가, 안정성 평가 등의 추가 연구가 필요하다 하겠다.

적 요

본 연구에서는 제초제 저항성 *bar* 유전자 및 *CP4-EPSPS* 유전자를 포함하는 발현벡터로 형질전환되고 항생제 마커 유전자를 포함하지 않는 제초제 복합 저항성 감자 식물체를 육성하고자 실험하였다. *Bar* 유전자를 포함하는 pCAMBIA3300 에 CaMV35S 프로모터에 의해 조절되는 *CP4-EPSPS* 유전자를 도입하여 식물체용 발현 운반체를 제작하고, 이를 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105에 도입하였다. 태동벨리 잎 절편체를 *Agrobacterium*과 공동배양한 다음, phosphinothricin 0.5 mg/L이 첨가된 배지에서 선발하고 호르몬 무처리 MS발

근시켜 형질전환체 (E3-6)를 얻었다. PCR, Southern 분석, 효소면역반응 분석 등을 통해 두 가지 유전자가 도입되었으며 이들이 정상적으로 발현됨이 확인되었다. E3-6 식물체는 glufosinate-ammonium의 어린 식물체 잎 도포처리, glyphosate 용액에 치상한 식물체 조직에서의 shikimate 축적 여부 조사를 통하여 조사한 결과, 두 제초제에 대해 저항성을 나타내었다. 또한 형질전환감자의 전식물체에 대해 glyphosate와 glufosinate-ammonium 각각의 용액 또는 이들의 혼합물을 처리한 후 제초활성 반응을 조사한 결과, E3-6 형질전환 감자는 두 제초제를 각각 단독으로 처리할 때나 혼합하여 동시 처리할 때에도 동일한 저항성이 나타남을 확인하였다.

사 사

본 연구는 바이오그린21 연구사업단 (과제번호: 2005030103446600701)의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- An G (1987) Binary Ti vectors for plant transformation and promoter analysis. *Methods Enzymol* 153: 292-305
- Clark MF and Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol* 34: 475-483
- Dill GM (2005) Glyphosate-resistant crops: history, status and future. *Pest Manag Sci* 61: 219-224
- Duke SO (2005) Taking stock of herbicide-resistant crops ten years after introduction. *Pest Manag Sci* 61: 211-218
- Duke SO and Cerdeira AL (2005) Transgenic herbicide-resistant crops: current status and potential for the future. *Outlooks on Pest Management* 208-211
- Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgen Res* 2: 208-218
- Jeong JH and Han SS (2000) Molecular breeding of herbicide resistance in higher plants. *Kor J Weed Science* 20 (3): 159-173
- Kim JS, Kim S, Ma SY Park JE (2001) Recent and future outlooks of herbicide physiology. *Kor J Weed Science* 21(2): 122-143
- Kim JS, Lee BH, Kim SH, Min SK, Choi JS (2006) An improved method to determine corn (*Zea mays* L.) plant response to glyphosate. *J Plant Biotechnol* 33(1): 57-63

- Li X and Nicholl D (2005) Development of PPO inhibitor-resistant cultures and crops. *Pest Manag Sci* 61: 277-285
- Matringe M, Sailland A, Pelissier B, Rolland A, Zink O (2005) p-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor-resistant plants. *Pest Manag Sci* 61: 269-276
- Mullins E, Milbourne D, Petti C, Doyle-Prestwich BM, Meade C (2006) Potato in the age of biotechnology. *Trends Plant Sci* 11: 254-260
- Owen MDK and Zelaya IA (2005) Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides. *Pest Manag. Sci* 61: 301-311
- Sandermann H (2006) Plant biotechnology: ecological case studies on herbicide resistance. *Trends Plant Sci* 11(7): 324-329
- Schreiber U, Kuhl M, Klimant I, Reising H (1996) Measurement of chlorophyll fluorescence within leaves using a modified PAM fluorometer with a fiber-optic microprobe. *Photosynth Res* 47: 103-109
- Steckel GJ, Wax LM, Simmons FW, Philips WH (1997) Glufosinate efficacy on annual weeds is influenced by rate and growth stage. *Weed Technol* 11: 484-488
- Tachibana K and Kaneko K (1986) Development of a new herbicide, bialophos. *J Pestic Sci* 11: 297-304.
- Tharp BE, Schabenberger O, Kells JJ (1999) Response of annual weed species to glufosinate and glyphosate. *Weed Technol* 13: 542-547

(접수일자 2007년 7월 2일, 수리일자 2007년 7월 24일)