

SCaM4 과발현 형질전환 감자의 농업적 특성 및 감자 무름병 저항성 평가

손황배 · 조광수 · 조지홍 · 권오근 · 천충기 · 최지경 · 정우식 · 이신우

Agronomic characteristics and field resistance to bacterial soft rot of transgenic potato overexpressing the soybean calmodulin 4 gene (SCaM4)

Hwangbae Sohn · Kwangsoo Cho · Jihong Cho · Ohgeun Gwon · Chunggi Cheon · Jigyeong Choi · Woosik Chung · Shin Woo Lee

Received: 13 November 2012 / Accepted: 30 November 2012
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract We performed *in vitro* assay and field trials to assess levels of changes in intrinsic properties and resistance against soft rot of the potato cv. Dejima upon the introduction of a soybean calmodulin 4 gene (*SCaM4*). Field trials with four lines overexpressing *SCaM4* gene were conducted over two seasons, and harvested tubers were evaluated in bioassay for resistance to *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*. The *SCaM4* transgenic potato lines inoculated with 10^8 CFU/ml of *P. carotovorum* ssp. *carotovorum* showed enhanced resistance compared to control. Among the *SCaM4* transgenic lines, the transgenic line SCaM4-4 exhibited the highest tolerance to soft rot *in vitro* assays, so did in field trials. In the field trial, the soft rot resistance of SCaM4-4 line was more than 5 times higher compared to that of control cultivar, Dejima. The major agronomic characteristics of the *SCaM4* transgenic lines were not different from those of the nontransgenic ‘Dejima’. The result demonstrated that the transformation of a calmodulin 4 gene was a successful

strategy in development of potato cultivar enhanced to soft rot.

Keywords calmodulin, disease resistance, potato, soft rot, transgenic plants

서론

감자 무름병은 *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*에 의해 발생하며 재배 및 저장 과정에서 심각한 경제적 손실을 야기한다. 감자 무름병균은 화학적 방제 수단 없이 저항성 품종 육성을 하고자 노력하나 무름병 저항성을 보이는 근연 야생종이 없어 전통 교배 육종으로는 저항성 품종 개발에 어려움이 있다(Gnanamanickam and Charkowski 2006; Latour et al. 2008; Palva et al. 1993; 1994). 그러나 감자의 경우 형질전환의 용이성과 영양 번식 작물이라는 특징으로 별도의 육종과정이 필요 없어 형질전환 기술을 활용하기에 적절하며 국내외에서 형질전환 감자를 개발하고자 많은 노력을 기울이고 있다(James 2009). 최근 국내에서 재배면적이 넓으나 무름병에 의한 수량 및 품질 저하로 경제적 손실이 큰 감자품종 대지에 Ca^{2+} 신호전달체계가 활성화된 형질전환체를 개발하여 감자 무름병 저항성을 높이고자 노력하고 있다(Chun et al. 2008, 2011).

Ca^{2+} 는 세포벽에 축적되어 무름병균 침입을 막는 기계적 저항성 증가와 무름병균 침입 시 Ca^{2+} 에 의한 신호전달체계의 활성화에 따른 저항성 반응을 증가를 유도한다. $Ca(NO_3)_2$ 용액을 감자 괴경에 처리하면 감자 무름병 발생률이 현저하게 낮아진다(McGuire and Kelman 1984).

H. Sohn · K. Cho (✉) · J. Cho · O. Gwon · C. Cheon · J. Choi
농촌진흥청 국립식량과학원 고령지농업연구센터
(Highland Agriculture Research Center, National Institute of
Crop Science, Pyeongchang 232-955, Korea)
e-mail: kscholove@korea.kr

W. Chung
경상대학교 대학원 응용생명과학부, 식물분자생물학 및
유전자조작연구소
(Division of Applied Life Science, Plant Molecular Biology and
Biotechnology Research Center, Jinju 660-701, Korea)

S. W. Lee
경남과학기술대학교 생명자원과학대학농학·한약자원학부
(Division of Agronomy and Medical Resources, Gyeongnam
National University of Science and Technology, Jinju 660-758,
Korea)

식물체내 일부 병원균 침입 시 세포내 Ca^{2+} 유입이 일어나며 증가된 Ca^{2+} 는 칼모듈린(Calmodulin, CaM), Ca^{2+} -dependent protein kinases(CDPKs), 칼모듈린 결합 단백질 등 칼슘 신호 암호해독자인 Ca^{2+} 결합단백질에 인식되어 주요 신호 전달자로 작용한다(Roberts et al. 1992; Lecourieux et al. 2006). Ca^{2+} 와 Ca^{2+} 결합단백질은 내병성 유도신호로 작용하여 phytoalexins 및 pathogenesis related(PR) proteins 형성과 과민성 괴사 등 저항성 반응을 유도한다(Sacks et al. 1993; Heo et al. 1999; Lecourieux et al. 2006).

칼모듈린 결합 단백질은 지금까지 50개 이상으로 다양한 기능을 수행하며 모델 식물인 애기장대에서 AtCaM-2 결합 단백질인 *Arabidopsis thaliana* Calmodulin-Binding Protein 63 kD(AtCBP63)을 분리하였다. 감자에서 *AtCBP63* 유전자를 과발현 시켰을 때 병저항성에 관여하는 PR-2, PR-3, PR-5 유전자가 발현되었으며 무름병에 대한 실내검정 결과 비형질전환체에 비하여 저항성이 증가하였다(Chun et al. 2011). Ca^{2+} 결합단백질 중 칼모듈린은 가장 연구가 잘 되어 있으며 식물에서 다양한 형태(isoform)로 존재하며 대두의 경우 5개의 칼모듈린 형태가 있다. 그 중 *SCaM4* 유전자를 담배, 애기장대에서 과발현 할 경우 과민성 괴사반응과 전신성 면역반응에 관련된 유전자의 발현과 함께 병원성, 비병원성 병원균에 대한 광범위 저항성을 관찰할 수 있었다. H_2O_2 , salicylic acid(SA), jasmonic acid(JA)를 처리 시 *SCaM4* 유전자가 발현되지 않은 것으로 보아 *SCaM4* 과발현체의 경우 SA와 JA관련 저항성 반응과는 다른 저항성 경로로 저항성을 나타내는 것으로 보고되었다(Heo et al. 1999; Yoo et al. 2005). Ca^{2+} 와 Ca^{2+} 결합단백질은 다양한 병원균에 대한 광범위 저항성에 관여하며 특히, *SCaM4* 감자 과발현체의 경우 무름병균에 저항성을 보여 향후 실용화를 위한 포장검정, 안전성 평가 등이 이루어진다면 감자 무름병 저항성 품종 육성에 활용하기에 적절할 것으로 사료된다(Heo et al. 1999; Chun et al. 2008).

SCaM4 형질전환체를 실용화하기 위해서는 식품학적 안전성과 환경유해성여부 평가가 이루어져야 하며 무엇보다 작물학적 특성 측면에서 비형질전환체와 비교했을 때 실질적인 동등성을 가지는지에 대한 평가가 선행되어야 한다. 본 연구는 *SCaM4* 유전자를 도입한 형질전환 감자 계통들 중에서 무름병 저항성이 우수하여 실용화 가능성이 큰 계통을 선발하여 형질전환 감자와 비형질전환 감자의 실질적 동등성을 확인하기 위하여 농업적 특성을 평가하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 재배조건

포장 검정에 이용한 형질전환 감자는 1999년 대두에서 분

리한 *SCaM4*를 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens*)을 이용하여 경남과학기술대학교에서 형질전환을 하였으며, 감자 품종 대지의 경우 국내에서 재배면적이 넓으나 무름병에 약하여 무름병 저항성을 증진시키고자 하였다(Chun et al. 2008). 2008년 실내검정에서 무름병 저항성을 보이는 *SCaM4* 과발현 4계통을 경남과학기술대학교에서 분양을 받았다. 고령지농업연구센터의 LMO 격리포장(강원도 평창군 대관령면)에서 *SCaM4* 과발현체의 T3세대부터 유지 증식하였으며 감자 무름병 저항성 검정 및 주요 농업형질 평가를 수행하였다. *SCaM4* 과발현체 4계통과 대비품종 대지를 이용하였으며 시험구는 계통별로 1열에 3주를 기본으로 완전임의배치 3반복으로 처리하였다. 재배 방법은 농촌진흥청에서 발행한 감자총서에 준한 감자표준재배법으로 재배, 관리하였다(RDA 2011).

감자 무름병 저항성 검정

SCaM4 과발현 감자의 무름병 저항성 검정을 위하여 실내 및 포장검정을 수행하였다. Sjekke 등(1995)의 potato slice method를 변형하여 감자 무름병에 대한 실내검정을 수행 하였다. 고령지농업연구센터 감자 포장에서 수확한 괴경에서 *Pectobacterium carotovorum ssp. carotovorum* 균주를 분리하여 사용하였다. Tryptic soy agar(Difco Labs, Detroit, MI, USA)에서 병원균을 배양(25°C, 24시간)하였으며 20 mM $MgCl_2$ 에 희석하여 분광광도계로 $OD_{530}=0.8$ 에 맞추어 사용하였다. 0.5% 차아염소산 나트륨 용액(sodium hypochlorite)용액으로 표면 소독한 괴경을 5 cm 두께로 절단하여 저항성 검증에 사용하였다. 페트리 디쉬(직경 9 cm)상에서 멸균수로 적신 거름종이 위에 절단된 괴경을 올려 놓고 병원균을 접종하여 배양(25°C, 24시간)하였다. 감자 무름병 정도는 병반의 직경을 측정하였다. 2011년에 고령지농업연구센터 LMO 격리포장에 공시된 과발현체 4계통과 대지 품종을 파종하여 포장검정을 수행하였다. 파종 후 90일 경 줄기에 발생한 무름병 발생률을 조사하였으며 파종 후 120일 경에 감자 수확 시 괴경 무름병 발생률을 최종 평가하였다. 반복 당 10주씩 선정하여 저항성 조사를 수행하였다.

주요 농업형질 조사

2009년도 실내 저항성 검증을 통하여 선발된 형질전환 계통은 2년간(2010~2011년) 격리망실에서 재배하면서 특성 평가를 수행하였다. 작물학적 특성은 재배 중 감자 특성평가 기준에 준하여 실시하였으며 수확은 파종 후 120일에 이루어졌다(RDA 2011). 지상부의 형태적 특성을 생육 중에 지속적으로 관찰하였으며 수확 시 괴경 특성과 무름병 발생 등을 조사하였다. 수량조사는 반복 당 10

주씩 3반복 굴취하여 괴경 개수 및 무게를 측정하였다. 상품감자 수량은 80 g 이상 감자 무게를 조사하여 표시하였다.

결과 및 고찰

무름병 저항성 검정

본 연구에서는 공시 계통들의 감자 무름병에 대한 저항성 반응 정도를 실내검정 후 무름병 무방제 LMO격리포장에서 시험을 진행하였다. 실내검정에서 대조 품종인 대지와 비교하여 *SCaM4* 과발현 형질전환 감자에서 병원균의 성장이 전반적으로 억제됨을 관찰할 수 있었다. *SCaM4* 과발현 계통인 SCaM4-4 계통은 병반 직경이 약 0.1 cm로 대지 품종 5 cm에 비해 매우 강한 저항성을 보였다(Fig. 1). 이와 같은 결과는 *SCaM4* 과발현 감자에 대한 감자 무름병에 대한 실내 저항성 검정을 한 Chun 등 (2008)의 보고와 일치하였다.

LMO 격리포장에서 줄기 및 괴경에서 무름병 발생률을 조사한 결과 감자 무름병에 감수성인 대지 품종은 줄기에서 63%, 괴경에서 4.8% 발생률을 보였으나 공시한 *SCaM4* 형질전환 계통의 줄기와 괴경에서 무름병 발생률은 각각 5~33% 와 0~4.8%로 모든 과발현 계통에서 낮은 경향을 보였다(Fig. 2). *SCaM4* 과발현 계통 SCaM4-4는 실내 검정 결과와 동일하게 포장 검정에서 줄기와 괴경에서 매우 낮은 병 발생률을 보여 무름병에 강한 저항성

을 보였다(Fig. 1~2). 애기장대, 담배, 감자에서 *SCaM4* 유전자 과발현 시 phytoalexins 및 pathogenesis related(PR) proteins의 발현으로 다양한 병원균에 대하여 저항성을

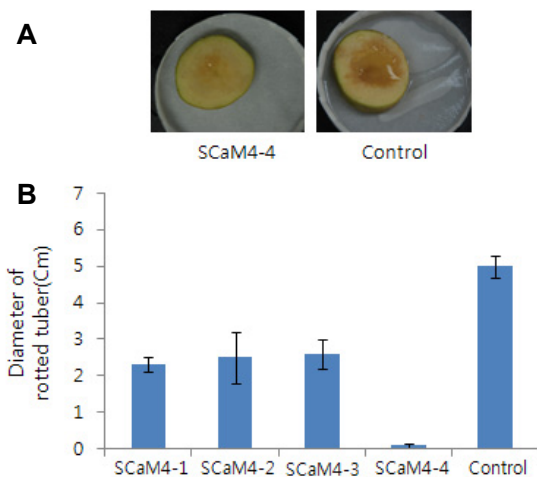


Fig. 1 Disease severity against *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* in transgenic potato plant constitutively expressing the soybean calmodulin 4 gene (*SCaM4*)

(A) Potato tubers were sliced and then 5 μ l bacterial suspension were dropped on center of sliced tubers. The photo was taken at 1 day after the inoculation. Representative results of control and transgenic lines overexpressing *SCaM4* are shown (B). The results are mean value of three independent experiments

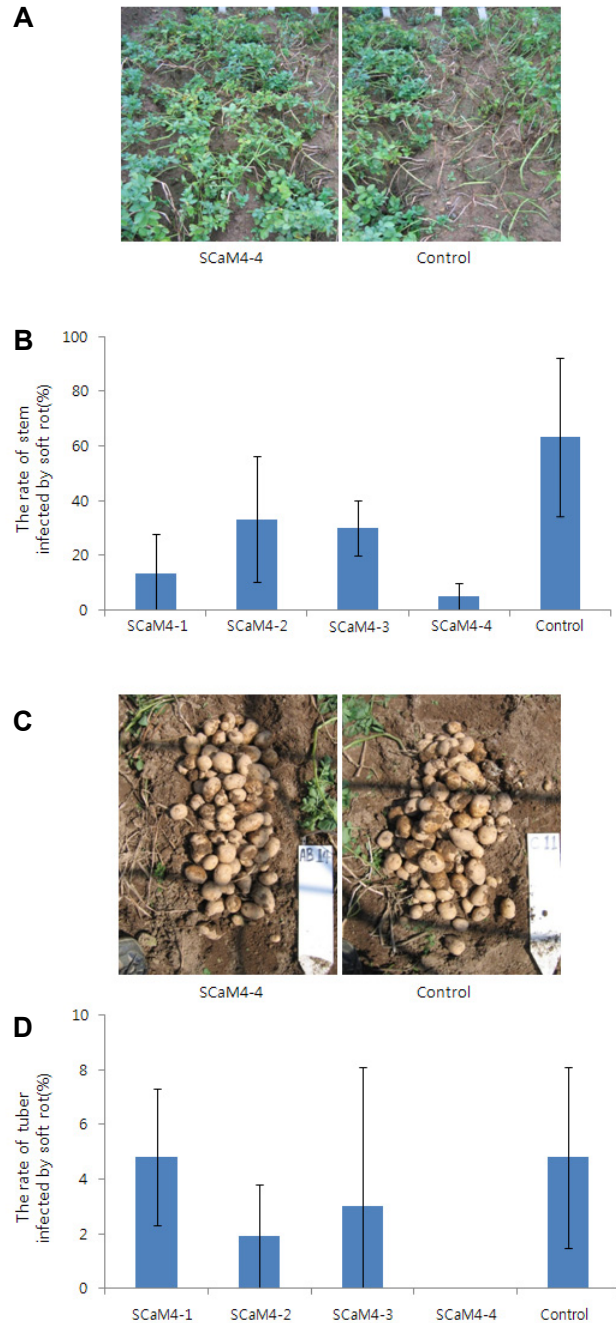


Fig. 2 Comparison of soft rot resistance of the *SCaM4* transgenic lines and control 'Dejima' evaluated at Daegwallyeong area in 2011 (A) The photographs were taken at 90 days after having sown the SCaM4-4 and control. (B) The infected rate was calculated by the number of infected stems / total number of stems. (C) The photographs were taken at 120 days after having sown the SCaM4-4 and control. (D) The infected rate was measured by the number of infected tubers per total number of harvested tubers. The results are mean value of three independent experiments. The bar is standard deviation

Table 1 Growth characteristics of transgenic and non-transgenic potatoes

Lines	Emergence rate (%)	Stem height (cm)	No. of stem/plant	Degree of growth uniformity (1~5, high)	Stem form	Flower color
SCaM4-1	94.9	66.1	4.9	3	Erect	White
SCaM4-2	100	66.5	6.4	3	Erect	White
SCaM4-3	97.4	65.7	6.1	3	Erect	White
SCaM4-4	88.3	56.5	5.1	3	Erect	White
Daejima	100	68.9	6.3	3	Erect	White

보인 기존 결과로 보아 공시된 형질전환 감자에서 *SCaM4* 과발현으로 칼슘 관련 신호전달에 의하여 병 저항성 반응이 활성화되어 감자 무름병 저항성을 보이는 것으로 사료된다(Heo et al. 1999; Chun et al, 2008, 2011). 특히, 실내 검정에서 저항성을 보인 과발현 계통 SCaM4-4의 경우 동일하게 포장 검정에서도 무름병 저항성을 확인할 수 있어 향후 이용 가능성이 클 것으로 판단된다.

주요 농업형질

내병성 형질전환 감자의 작물학적 특성은 감자총서(RDA, 2011)에 제시된 특성 평가기준을 적용하였으며, 식물체의 생육 특성을 중점적으로 평가하였다(Table 1). 본 시험에 공시된 형질전환 계통은 경장, 경수, 생육 균일도, 생육특성, 꽃색 등에서 비형질전환체인 대지와 큰 차이가 없었으나 SCaM4-4 계통은 출현율, 경장, 경수에 있어 비형질전환체에 비해 다소 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 괴경의 주요 외관품질을 평가하기 위하여 공시한 4계통들의 수확 후 괴경 특성을 살펴보면 형태는 원형이었고, 육색은 담황색을 공통적으로 나타내어 대비 품종인 대지와 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 눈 깊이, 눈 기부의 색, 괴경 균일도 역시 형질전환체와 대조품종인 대지와 차이가 없었다. 형질전환 계통의 감자 한 주당 평균 괴경 수는 7~12개로 대비 품종인 대지의 10개와 유사했다. 형질전환 괴경 1개의 평균 무게는 65~80 g으로 대조품종 56 g보다 컸으며, 이에 비례하여 전체 수량 및 상품 감자의 비율도 높게 나타냈다(Fig. 3). *SCaM4* 과발현 계통은 괴경비대기에 대비품종보다 줄기 무름병 피해가 적어 동화 산물의 생성 및 집적이 원활하여 수량 특성이 좋아진 것으로 추정되었다(RDA 2011). 형질전환 후 T4세대까지 LMO 격리포장에서 선발 유지된 형질전환 감자는 주요 작물학적인 특성이 비형질전환체와 차이가 없어 *SCaM4* 과발현에 의한 목표 형질의 이외에는 영향이 없는 것으로 사료된다.

이상의 결과로 볼 때, *SCaM4* 과발현체는 무름병 저항성을 보였으며 대조품종인 대지와 작물학적 특성에 있어 차이가 없어 두 작물의 실질적 동등성을 확인할 수 있었

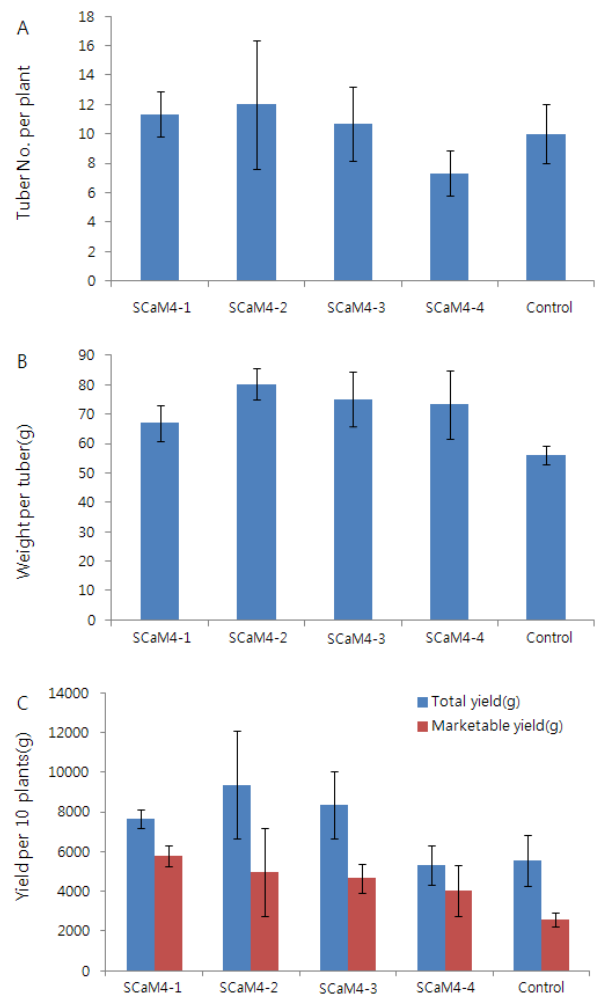


Fig. 3 Yield characteristics of *SCaM4* transgenic lines and control. Tuber number per plant(A), weight per tuber(B) and total and marketable yield per 10 plants(C) were measured at 120 days after having sown the transgenic lines and control. The results are mean value of three independent experiments. The bar is standard deviation

다. 또한, *SCaM4* 유전자의 경우 다양한 병원균에 대한 저항성 반응에 관여하여 *SCaM4* 과발현 감자 계통 역시 무름병균 이외에도 다양한 감자병에 대하여 저항성을 보일 것으로 사료된다. 이러한 *SCaM4* 과발현 감자의 병저항성 특성은 살균제 사용을 줄여 친환경적인 감자 재배가

가능할 것으로 기대된다. 향후 *SCaM4* 과발현체의 식품학적 안전성과 환경위해성 평가가 필요할 것으로 사료된다.

적 요

SCaM4 과발현 감자의 무름병에 대한 저항성은 대비 품종인 ‘대지’에 비해 실내·외 검정에서 저항성인 것으로 나타났으며, *SCaM4* 과발현 SCaM4-4 계통의 경우 실내·외에서 무름병 저항성이 강하였다. *SCaM4* 과발현 형질 전환 감자 계통들에 대한 포장 검정 결과 공시된 4 계통은 꽃색, 줄기형 등에서 대조품종인 대지와 차이가 없었다. 괴경특성 및 수량성의 경우 주당 괴경수는 유사했으나 과발현체의 경우 줄기 무름병 저항성으로 동화산물의 생성 및 집적이 원활하여 괴경 무게 증가하여 수량이 증가하는 경향성을 보였다. 실내외검정에서 무름병에 강한 저항성을 보인 SCaM4-4 라인은 대조품종인 대지와 실질적인 동등성을 확인할 수 있어 향후 식품학적 안전성과 환경위해성 평가가 이루어진다면 실용화 가능성이 클 것으로 사료된다.

인용문헌

- Chun HJ, Goo YM, Kim TW, Chung WS, Yun DJ, Lee CH and Lee SW (2008) Over-expression of SCaM4, a soybean calmodulin, confers increased soft rot disease resistance in potato (*Solanum tuberosum* L.). Proceedings of the Korean Society of Plant Biotechnology Conference 95
- Chun HJ, Park HC, Goo YM, Kim TW, Cho KS, Cho HS, Yun DJ, Chung WS and Lee SW (2011) AtCBP63, a Arabidopsis calmodulin-binding protein 63, enhances disease resistance against soft rot disease in potato. J Plant Biotechnol 38:62-68
- Gnanamanickam S, Charkowski A (2006) The soft rot *Erwinia*. Plant-associated bacteria. Springer The Netherlands pp 423-505
- Heo W, Lee S, Kim M, Kim J, Chung W, Chun H, Lee K, Park H, Choi J, and Cho MJ (1999) Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses. Proc Natl Acad Sci USA 96:766-771
- James C (2009) Global status of commercialized biotech/GM crops. ISAAA Brief No. 41. ISAAA: Ithaca, NY
- Kim SH, Kang YH, Han HJ, Bae DW, Kim MC, Lim CO, and Chung WS (2009) Identification of another calmodulin-binding domain at the C-terminal region of AtCBP63. J Plant Biotechnol 36: 53-58
- Latour X, Fature D, Diallo S, Cirou A, Smadjia B, Dessaux Y, Orange N (2008) Control of bacterial diseases of potato caused by *Pectobacterium* spp. (*E. carotovora*). Cahiers Agric 17:355-360
- Lecourieux D, Renjeva R, and Pugin A (2006) Calcium in plant defense-signalling pathways. New phytol 171:249-269
- MacGuire RG and Kelman A (1985) Reduced severity of *Erwinia* soft rot in potato tubers with increased calcium content. Phytopathol 74:1250-1256
- Palva T K, Holmström KO, Heino P, and Palva E T (1993) Induction of plant defense response by exoenzymes of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Mol Plant-Microbe Interact 6:190-196
- Palva TK, Hurtig M, Saindrenan P, and Palva ET (1994) Salicylic acid induced resistance to *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in tobacco. Mol Plant-Microbe Interact 7:356-363
- Roberts DM and Harmon AC (1992) Calmodulin-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 43:375-414
- Rural Development Administration (2011) The potato. RDA, Suwon, Korea
- Setterblad CN, Vidal S, and Palva ET (2000) Interacting signal pathways control defense gene expression in Arabidopsis in response to cell wall-degrading from *Erwinia carotovora*. Mol Plant-Microbe Interact 13:430-438
- Sjefke JHM, Florack DEA, Hoogendoorn C, and Stiekma WJ (1995) *Erwinia* soft rot resistance of potato cultivars transformed with a gene construct coding for antimicrobial peptide ceropin B is not altered. Amer J Potato Research 72:437-445