식물생명공학회지 제34권 제1호
J Plant Biotechnol
Vol. 34, No. 1, 55-59 (2007)

고추의 역병 저항성 품종 개발을 위하여 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 elicitin 유전자 도입

권태룡[1], 이문중[1], 한증술[2], 신동현[3], 오중열[4], 김경민[4], 김창길[4*]
[1]경북농업기술원, [2]원예연구소, [3]경북대학교 식물생명과학부, [4]상주대학교 원예학과

Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation of Pepper for the Development of Blight Resistant Cultivar

Tae-Ryong Kwon[1], Moon-Jung Lee[1], Jung-Sul Han[2], Dong Hyun Shin[3], Jung-Youl Oh[4], Kyung-Min Kim[4], and Chang Kil Kim[4*]
[1]*Gyeoungbuk Agricutural Technology Administration, Daegu 702-708, Korea*
[2]*National Horticultural Research Institute, Rural Development Administration, Suwon 441-440, Korea*
[3]*Department of Agronomy, College of Agriculture and Life Sciences, Kyunpook National University, Daegu 702-701, Korea*
[4]*Department of Horticulture, Sangju National University, Sangju 742-711, Korea*

ABSTRACT The study was carried out to develop transformants resisting to *Phytophthora blight* disease in the domestic pepper cultivar Subicho. In transforming of syn600 promoter with *elicitin* gene using *Agrobacterium* (LBA4404/pBI101 syn600-synα-elicitin) to cotyledons of pepper, rate of shoot formation in 'Subicho' was 11.1% in medium containing 3 mg/L zeatin and 0.05 mg/L NAA, and also 12.8% in medium containing combination of 4 mg/L zeatin and 0.05 mg/L NAA. For PCR reaction using *elicitin* gene primer of transformants regenerated from cotyledons, we detected a specific band of 536 bp, and also showed strong signal at position of 536 bp in accordance with NPTII gene used as probe in Southern blot. Transformants pepper shown resistance to blight fungus was inoculated to seedlings of the T_1 and T_2 transformants by concentration (density: zoo spore 10^3/mL).

서 론

고추 (*Capsicum annuum*)는 세계적으로 중요한 채소의 하나이다. 다양한 유전자원은 재래육종에 의하여 개발되어 왔으나 탄저병, 역병, 세균성점무늬병 등 병해에 의한 피해가 해마다 심각한 것으로 알려져 있다. 고추의 역병은 Leonian (1992)에 의해 New Mexico의 Las Cruces 부근 포장에서 발생한 것이 처음으로 분리, 동정되었다. Kimble과 Grogan (1960)은 고추의 역병에 저항성인 계통을 처음으로 보고하였는데 PI201234가 가장 강한 것으로 보고하였다. 역병의 저항성 유전의 양식은 여러 가지 설이 있다. Smith 등 (1967)은 상가적 효과가 없는 두 개의 우성유전자가 관여한다고 하였고, Barksdale 등 (1984)은 1개의 우성유전자에 의해 지배된다고 하였으며, Gil Ortega 등 (1991)은 3개의 유전자가 관여한다고 하였다. 선행 연구에서 PI201234 (Kimble and Grogan 1960), ACC2258 (Gil Ortega et al. 1990), SCM334 (Gil Ortega et al. 1991)등 세계적으로 인정받는 역병 저항성 계통들이 선발되었다. 또한 현재까지 고추에 있어서 역병의 극복을 위한 교잡육종이 계속되어 왔다. 이러한 교잡육종법에 의한 역병 저항성 품종 개발 연구가 많이 시도되었으나 아직 실용 가능한 결과가 나오지 않고 있고, 최근 유전공학 분야의 급속한 발전으로 많은 작물에서 여러 가지 유전자 운반체와 표지유전자가 개발되어 유용 유전자를 식물체내로 도입하여 새로운 식물체를 육성할 수 있게 되었다 (An 1987, Horsch et al. 1985). 형질전환 기술을 이용하여 제초제

*Corresponding author Tel 054-530-5236 Fax 054-530-5239
E-mail: ckkm@sangju.ac.kr

(Shah et al. 1986), 바이러스 (Harrison et al. 1987, Powell-Abel et al. 1986)에 대한 저항성을 도입한 농작물의 개발을 위한 많은 연구가 시도되고 있다. 고추도 국내외에서 유용유전자의 도입을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다 (Lee et al. 1993, Lee et al. 2004, Lee 1999). 자엽, 본엽, 배축 등을 이용하여 고추의 형질전환을 시도하고 있지만, 조직배양에서 식물체 재분화 효율 (Fari and Czako 1981, Phillips and Hubstenberger 1985)이 저조하여 형질전환이 어려워 유전자 도입을 통한 새로운 신품종 개발에 장애가 되고 있다 (Li et al. 1990). 따라서 본 연구는 고추재배에서 가장 큰 문제인 역병피해를 줄일 수 있는 저항성 품종을 육성하기 위해서 형질전환 시스템 및 유용 유전자의 도입의 체계를 확립하고자 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

고추 (*Capsicum annuum* L.)의 형질전환에는 국내 재배종인 '수비초'를 이용하였다. 종자는 70% ethanol에 30초, 2% NaOCl에 15분간 소독한 후 멸균수로 3회 세척하여 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지가 분주된 배양병당 20～30립씩을 치상하여 16시간 일장 40 μmol·m^{-2}·sec^{-1}의 cool-white 형광, 25±2℃에서 배양실에서 발아시켰다. 발아 후 10～14째에 자엽을 엽병 1～2 mm 정도를 포함하도록 절단하여 형질전환 재료로 사용하였다.

형질전환

형질전환에 이용된 벡터는 pBI101에 cyc600-synα promotor가 구조화된 것에 Yin 등 (1997)에게 분양받은 *elicitin* 유전자가 삽입된 것이다. *Agrobacterium* (LBA4404/pBI101 cyc 600-synα-*elicitin*)은 LB배지에 50 mg/L kanamycin이 첨가된 고체배지에서 클로니를 증식하여, LB배지에 50 mg/L kanamycin이 첨가된 액체배지상에서 28℃, 150 rpm의 조건에서 1일간 현탁배양하였다. 배양된 균주는 5,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액은 버리고 MS액체배지로 녹여 사용하였다.

고추 형질전환은 자엽을 치상하여 전배양, 공동배양, 선택배지 배양을 통해 신초를 유기시켰다. 신초를 유기하기 위해 고추 재분화 시험에서 선발된 생장조절제 조합인 3～4 mg/L zeatin과 0.05 mg/L NAA가 첨가된 MS배지를 사용하였다. 4 ppm zeatin, 0.05 ppm NAA, 5 ppm $AgNO_3$를 첨가한 MS배지에서 전배양 2, 3일, 공동배양 2, 3, 4일처리를 하였다. 자엽의 엽병 유무에 따른 재분화율은 3～4 ppm zeatin과 0.05 ppm NAA을 첨가한 MS배지 수행하였다. 모든 처리는 온도 25±1℃, 16시간 명조건에서 배양하였다. Root의 유도배지는 0.5 mg/L NAA로 하였다.

PCR Southern 분석

형질전환된 식물체에 형질전환 유전자의 도입을 확인하기 위하여 PCR 방법을 이용하였다. DNA 추출은 형질전환체의 잎조직 0.5 g을 CTAB법에 의해 수행하였고, PCR 분석을 위해 반응액은 *TaKaRa Ex Tag* (TaKaRa, Japan) 1 ul (5 U/μl), dNTP mixture (2.5 mM) 1 ul, 5 μl 10 × PCR Buffer, 2 μl primer, 2 μl template DNA와 39 μl H_2O로 전체가 50 μl가 되도록 하였다. Primer는 kanamycine 저항성인 NPTII 유전자의 primer인 5'-GTGGAGAGGCTATTCGGCTA-3'와 5'-CAACAA TGATATTCGGC AAG-3'을 이용하였다. PCR 반응은 Perkin Elmer사의 PCR system 2400 기종을 사용하여 95℃ 3분 그리고 94℃ 1분, 60℃ 20초, 72℃ 1분으로 해서 35 cycle 반응시킨 후 72℃에서 7분간 extension하였다. PCR 반응에 의해 536 bp의 밴드를 확인한 후 membrane에 blot하여 NPTII gene을 probe로 사용하여 Southern blot 분석을 하였다.

역병저항성검정

역병 저항성 검정을 위해 역병균 (*Phythophthora capsici* Leon)을 potato dextrose agar (PDA) 배지에 5일간 배양한 후 직경 5 mm의 균총을 petri dish에 분주한 V8배지 (200 mL V8 쥬스 + 20 g agar + 800 mL 증류수)에 이식하여 28℃에서 14시간 배양하였으며, 유주포자낭을 형성하기 위해 실내 (약 20℃)에서 5일간 배양한 후 배지 표면에 살균수를 가하여 유주포자낭 현탁액을 만든 다음, 7℃에서 1시간, 실온에서 3시간 경과시킨 후에 유주포자낭으로부터 방출된 유주포자를 혈구계측기로 계수하여 유주포자 현탁액을 10^3～10^5개/mL 농도로 조정하여 사용하였다. 역병의 접종은 본엽 4～5매시기의 고추 묘에 역병 유주포자 농도별로 주당 5 mL을 관주하고 2일간 습실처리를 하였다.

결과 및 고찰

고추 자엽에 *Agrobacterium* (LBA4404/pBI101 cyc600-synα-elicitin)을 이용한 cyc600 promoter에 구축된 *elicitin* 유전자의 형질전환 실험에서 신초의 형성율은 '수비초'의 경우 3 mg/L zeatin과 0.05 mg/L NAA 함유 배지에서 11.1%, 4 mg/L zeatin과 0.05 g/L NAA 함유 배지에서 12.8%였다 (Table 1). 형질전환시 전배양과 공동배양기간에 따른 재분화율은 Table 2와

Table 1. Shoot regeneration from cotyledon tissues as cocultivated with *Agrobacterium* in Subicho

Plant growth regulators (mg/L)	Inoculated cotyledon	Number of shoots	Shoot regeneration (%)
Zeatin 3 + NAA 0.05	207	23	11.1
Zeatin 4 + NAA 0.05	288	37	12.8

Table 2. Shoot regeneration from cotyledon of red pepper as pre and cocultivated with *Agrobacterium*

Coculture period (Days)	Inoculated cotyledon	Preculture period (Days)	
		2	3
2	247	26 (10.5)[a)]	69 (27.9)[a)]
3	290	79 (27.2)	201 (69.3)
4	240	153 (63.8)	160 (66.7)

[a)]Number of shoot regeneration (%).

Table 3. Effect of petiole on shoot regeneration from cotyledon culture of red pepper

Plant growth regulators (mg/L)	Petiole		Non petiole	
	No. of inoculated	No. of shoot regeneration (%)	No. of inoculated	No. of shoot regeneration (%)
Zeatin 3 + NAA 0.05	285	27 (9.5)	300	7 (2.3)
Zeatin 4 + NAA 0.05	300	42 (14.0)	280	23 (8.2)

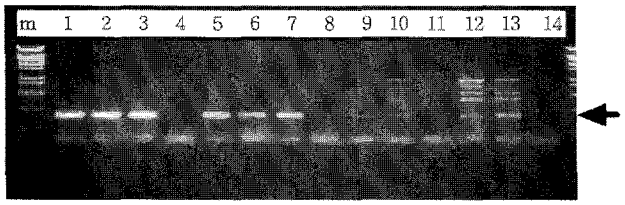

Figure. 1. PCR products of transgenic plants using *Agrobacterium* (LBA4404/pBI101 cyc600-synα).m, λDNA (BstEII); Lanes 1, pBI121 vector with nptIIgene; Lane 2~3, trnasgenic tobacco; Lanes 4, intact red pepper: Lane 5~14,transgenic red pepper. PCR product of NPTII gene was indicated by arrow.

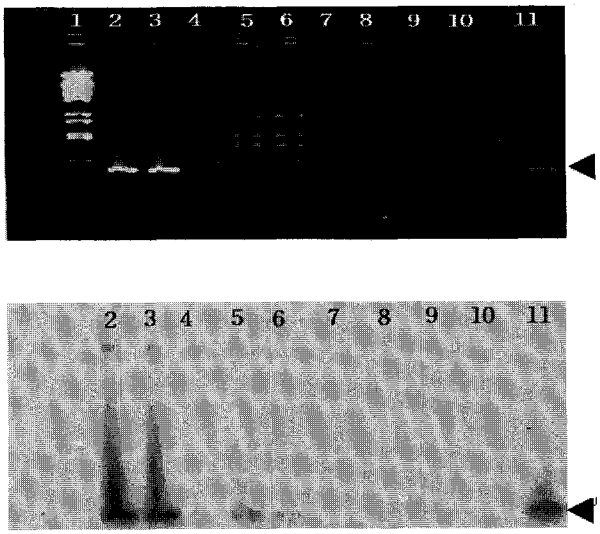

Figure. 2. PCR (up) and Southern blot analysis (below) of transgenic plants (T_0) of red. pepper. Top : Detection of NPT-II gene from transgenic plants by genomic PCR. Lane 1, size marker; Lane 2, positive control as the pBI121 binary vector; Lane 3, positive control as the transgenic tobacco plant; Lane 4, negative control as the untransgenic plant; Lane 5~11, transgenic plant. Bottom : PCR Southern blot analysis of transgenic plants.

같다. 전배양 기간에 따른 재분화율은 3일에서 높았으며, 공동배양의 경우 2일 27.9%, 3일 69.3%, 4일 66.7%로 고추 형질전환 할 때 전배양과 공동배양은 3~4일 정도가 적당하였다. 치상된 자엽의 엽병 유무에 따른 재분화율은 3~4 ppm zeatin과 0.05 ppm NAA를 첨가한 MS배지에서 조사한 결과 (Table 3), 형질전환에 이용되는 자엽은 엽병을 포함하여 치상하는 것이 재분화율이 높았다. 형질전환 효율은 낮지만 형질전환체를 성공적으로 개발한 보고들 (Dong et al. 1995, Kim et al. 1997, Lee et al. 1993, Manoharan et al. 1998, Ramirez-Malagon 1996, Shivegowda et al. 2002, Wang et al. 1991, Zhu et al. 1996)로 구분되는데 형질전환체가 얻어진 연구는 공통적으로 *Agrobacterium* 형질전환 방법으로 자엽 등을 공동배양하고 kanamycin배지에서 선발한 연구결과들이 본 실험에서 이용된 재료는 일치하였으나, 공동배양기간과 자엽에 엽병을 포함한 본 연구에서 형질전환율이 보다 높게 나타났다.

자엽으로부터 재분화된 형질전환체의 NPTII유전자의 primer를 이용한 PCR 반응에서 형질전환이 되지 않은 intact 고추 (Lanes 4)에서는 536 bp의 밴드가 나타나지 않았으나 형질전환된 재분화 식물체 중에서 lanes 5, 6, 7, 9, 10, 12, 13에서는 536 bp의 PCR product를 관찰할 수 있었고 lanes 8, 11, 14에서는 product가 나타나지 않았다 (Figure. 1). PCR 반응에 의해 536 bp의 밴드를 확인한 후 membrane에 blot하여 NPTII gene을 probe로 사용하여 PCR Southern 분석을 한 결과, Figure. 2에서 보는 바와 같이 536 bp 부위에 밴드와 signal을

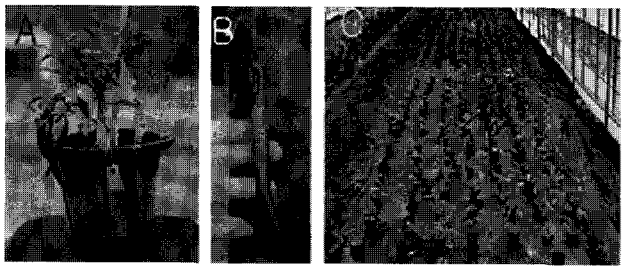

Figure. 3. Growth of transgenic red pepper (T_0, A) and its fruit (B). The growth of pepper transformant T_1 generation in green house (C).

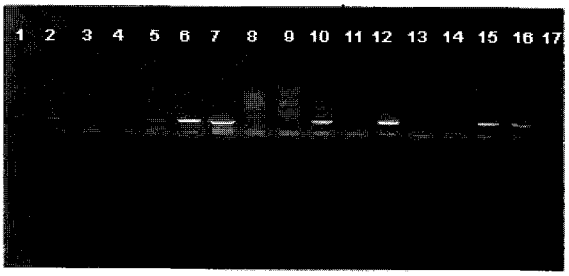

Figure. 4. PCR products from T_1 plants of transgenic red pepper. Lane 1, λ BstEII digested size marker; Lane 2; S1, Lane 3; S3, Lane 5; S5, Lane 6; S4, Lane 7; S1-1, Lane 8; S1-2, Lane 9; S1-4, Lane 10; S3-6, Lane 11; S3-7 , Lane 12; S3-8, Lane 13; S3-9, Lane 14; S4-13, Lane 15; S1-5, Lane 16; S3-10, Lane 17; S3-11.

Figure. 5. PCR (left) and Southern analysis (right) of pepper that transformed cyc600-synα construct. Lane 1: λBstEII size marker, lane2: S1, lane3: S1-1, lane4: S1-5, lane5: S3, lane6: S3-6, lane7: S3-8, lane8: S3-10.

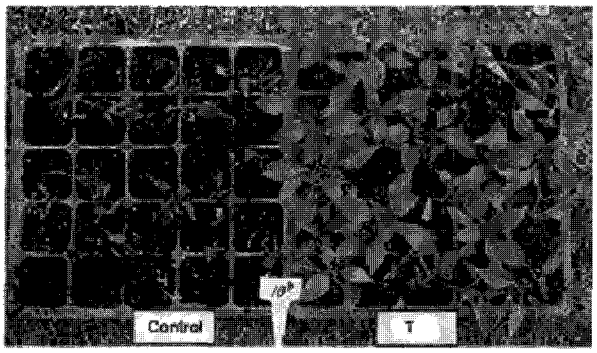

Figure. 6. Root rot of red pepper after inoculation with *phytophthora capsici* (10^3 zoo-spores/mL). T: Transformats.

관찰할 수 있었는데, lane 11, 12, 13의 고추형질전환 식물체에서 강한 signal을 보였다. 또한 최근에 Lee 등 (2004)이 보고한 캘러스를 형성한 후 형질전환율은 캘러스 과정을 거치지 않고 직접적인 식물체재분화보다 유전자 이입에 잘되어 결국 형질전환효율이 높다고 하였으나, 본 실험에서 나타난 분자생물학적 검정에서도 형질전환효율이 보다 높게 나타났다. 따라서 본 연구에서 확립한 형질전환 시스템으로 형질전환 고추 식물체의 육성이 가능할 것이다.

T_0식물체에서 채종한 T_1식물체 (Figure. 3)의 유전자 도입을 확인하기 위하여 PCR을 수행하였다. T_1식물체에서는 Lanes 2～6의 S1～S5 계통 모두에서 *elicitin*의 유전자 밴드가 나타나 형질전환체임을 확인하였고, T_1식물체인 Lanes 7～17에서는 Lane 7의 S1-1 등 7계통에서 elicitin 유전자 밴드가 나타났으며, Lane 8의 S1-2 등 4계통에서는 밴드가 나타나지 않아 형질전환체의 후대에서 분리가 일어남을 확인할 수 있었다 (Figure. 4). Synα primer에 의해 증폭된 DNA의 크기는 synα와 동일하였으나, 실제 synα와 같은 유전자인지를 확인하기 위하여 synα clone을 이용하여 Southern blot analysis를 하였다. 그 결과 band가 나타난 300 bps 정도의 위치에서 blot이 나오는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure. 5). 위의 결과에서 cyc600 promoter-syn α의 construct가 수비초의 genomic DNA에 삽입되었으며, 유주포자 10^3개/mL에서는 형질전환체의 저항성 계통선발이 가능하였다 (Figure. 6).

적 요

고추 형질전환은 *Agrobacterium* (LBA4404/pBI101 cyc600-synα-*elicitin*)을 이용한 cyc600 promoter에 구축된 *elicitin* 유전자의 형질전환시 shoot의 형성율은 수비초의 경우 3 mg/L zeatin과 0.05 mg/L NAA 함유 배지에서 11.1%, 4 mg/L zeatin과 0.05 mg/L NAA 함유 배지에서 12.8%였다. 전배양 3일, 공동배양 3～4일에서 재분화율이 높았다. 자엽으로부터 재분화된 형질전환체의 NPTII유전자의 primer를 이용한 PCR 반응에서 형질전환된 재분화 식물체는 536 bp의 밴드를 확인하였다. Membrane에 blot하여 NPTII gene을 probe로 사용하여 Southern blot 분석에서 고추형질전환 식물체는 536 bp 부위에 강한 signal을 보였다. elicitin 유전자를 이용한 역병 저항성 형질전환체 수비초 T_0세대의 생육은 계통간에 다소 차이는 보였고, 계통 모두 생육은 저조한 반면 개화 및 수정 등의 임성은 정상적이었다. 자식을 통해 채종한 T_1 식물체의 유전자 도입을 확인하기 위하여 PCR을 수행한 결과 T_0식물체 S1～S5 계통에서 *elicitin* 밴드가 나타나 형질전환체임을 확인하였고, T_1식물체인 S1-1 등 7계통에서 *elicitin* 밴드가 나타났고, S1-2 등 4계통에서는 밴드가 나타나지 않아 형질전환체가 후대에서 분리가 일어남을 확인할 수 있었다. Syn α clone을 이용하여 Southern blot analysis를 한 결과 band가 나타난 300 bp 정도의 위치에서 blot이 나오는 것을 관찰할 수 있었다. 위

의 결과에서 cyc600 promoter-syn α의 construct가 수비초의 genomic DNA에 삽입되었는 것을 확인할 수 있었다. 고추형질전환체의 유묘에 역병균을 접종한 결과 유주포자 10^3개/mL에서 형질전환체의 저항성 계통선발이 가능하였다.

인용문헌

An G (1987) Binary Ti vector for plant transformation and promoter analysis. Methods in Enzymology 153: 292-305

Barksdale TH, Papavizas GS, Johnston SA (1984) Resistance to foliar blight and crown rot of pepper caused by *Phytophthora capsici*. Plant Disease 68: 506-509

Dong C, Jiang C, Feng L (1995) Transgenic tomato and pepper plants containing CMV-sat-RNA CDNA. Acta Horticulture 402: 78-86.

Fari M, Czako M (1981) Relationship between position and morphogenetic response of pepper hypocotyl explant cultured in vitro. Scientia Horticulture 15: 207-213.

Gil Ortega R, Palazon Espanol C, Cuartero Zueco J (1990) Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the Mexican pepper 'Line 29'. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 20: 117-122

Gil Ortega R, Palazon Espanol C, Cuartero Zueco J (1991) Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the pepper line 'SCM-334'. Plant Breeding 107: 50-55

Harrison BD, Mary MA, Baulcomble DC (1987) Virus restance in transgenic plant that express cucumber mosaic satellite RNA. Nature 328: 799-802

Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Wallroth M, Eichholt D, Rogers SC, Fraley RT (1985) A simple and general method from transferring genes into plants. Science 227: 1229-1231

Kim SJ, Lee SJ, Kim BD, Paek KH (1997) Satellite-RNA-mediated resistance to cucumber mosaic virus in transgenic plants of hot pepper (*Capsicum annuum* cv. Golden Tower). Plant Cell Report 16: 825-830

Kimble KA, Grogan RG (1960) Resistance to pytophthora root rot in pepper. Plant Dis Rep 44: 872-873

Lee SJ, Kim BD, Pack KH (1993) In vitro plant regeneration *Agrobacterium*- mediated transformation from cotyledone explants of hot pepper. Korean J Plant Tissue Culture 20: 289-294

Lee YH, Kim HS, Kim JY, Jung M, Park YS, Lee JS, Choi SH, Her NH, Lee JH, Hyung NI, Lee CH, Yang SG, Harn CH (2004) A new selection method for pepper transformation: callus-mediated shoot formation. Plant Cell Reports 23: 50-58

Lee SW (1999) Review of current gene transformation studies in pepper (*Capsicum* spp). J Kor Capsicum Res Coop 5: 57-66

Leonian LH (1922) Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. Nov Phytophthology 12: 401-408

Li W, Parrott WA, Hildebranf DF, Collins GD, Williams EG (1990) *Agrobacterium* induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and formation of shoot-like structures expressing introduced genes. Plant Cell Reports 9: 360-364

Manoharan M, Sree Vidya CS, Lakshmi Sita G (1998) *Agrobacterium* -mediated genetic transformation in hot chilli (*Capsicum annuum* L. var. Pusa jwala). Plant Sci 131: 77-83

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 5: 473-479

Phillips GC, Hubstenberger JF (1985) Organogenesis in pepper tissue cultures. Plant Cell Tiss Org Cult 4: 261-269

Powell-Abel P, Nelson RS, Hoffman BN, Rogers SG, Fraley RT, Beschy RN (1986) Delay of Disease development in transgenic plant that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. Science 232: 758-743

Ramirez-Malagon R, Ochoa-Alejo N (1996) An improved and reliable chili pepper (*C. annuum* L.) plant regeneration method. Plant Cell Report 16: 226-231

Shah DM, Horsh RB, Kiee HH, Kishore GM, Winter JA, Tumer NE, Hiromaka CM, Sanders PR, Gusser CS, Aykent S, Siegal NR, Roger S, Franley RT (1986) Engineering herbicide tolerance in transgenic plant. Science 233: 478-481

Shivegowda ST, Mythli JB, Anand L, Saiprasad GVS (2002) In vitro regeneration and transformation in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). J Horti Sci Biotech 77: 629-634

Smith PG, Kimble KA, Grogan RG, Millett AH (1967) Inheritance of resistance in pepper to phytophthora root rot. Phytophthology 57: 377-379

Wang Y, Yang M, Pan N, Chen ZH (1991) Plant regeneration and transformation of sweet pepper (*Capsicum frutescens*). Acta Bot Sin 33: 780-786

Yin S, Mei L, Newman J, Back K, Chappell J (1997) Regulation of sesquiterpene cyclase gene expression. Characterization of an elicitor- and pathogen-inducible promoter. Plant Physiol 115: 437-451

Zhu YX, Yang WJ, Zhang YF, Chen ZL (1996) Transgenic sweet pepper plants from *Agrobacterium* mediated transformation. Plant Cell Rep 16: 71-77

(접수일자 2006년 10월 25일, 수리일자 2007년 2월 14일)