

## 애기장대 칼모듈린 결합 단백질 AtCBP63을 발현시킨 형질전환 감자의 무름병 저항성 증가

전현진<sup>†</sup> · 박형철<sup>†</sup> · 구영민 · 김태원 · 조광수 · 조현설 · 윤대진 · 정우식 · 이신우

### AtCBP63, a *Arabidopsis* Calmodulin-binding Protein 63, Enhances Disease Resistance Against Soft Rot Disease in Potato

Hyun Jin Chun · Hyeong Cheol Park · Young Min Goo · Tae Won Kim · Kwang Soo Cho · Hyeon Seol Cho · Dae-Jin Yun · Woo Sik Chung · Shin Woo Lee

Received: 2 March 2011 / Accepted: 12 March 2011

© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** Calmodulin (CaM), a  $Ca^{2+}$  binding protein in eukaryotes, mediates cellular  $Ca^{2+}$  signals in response to a variety of biotic and abiotic external stimuli. The  $Ca^{2+}$ -bound CaM transduces signals by modulating the activities of numerous CaM-binding proteins. As a CaM binding protein, AtCBP63 (*Arabidopsis thaliana* CaM-binding protein 63 kD) has been known to be positively involved in plant defense signaling pathway. To investigate the pathogen resistance function of AtCBP63 in potato, we constructed transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) plants constitutively overexpressing AtCBP63 under the control of cauliflower

mosaic virus (CaMV) 35S promoter. The overexpression of the AtCBP63 in potato plants resulted in the high level induction of pathogenesis-related (PR) genes such as PR-2, PR-3 and PR-5. In addition, the AtCBP63 transgenic potato showed significantly enhanced resistance against a pathogen causing bacterial soft rot, *Erwinia carotovora* ssp. *Carotovora* (ECC). These results suggest that a CaM binding protein from *Arabidopsis*, AtCBP63, plays a positive role in pathogen resistance in potato.

**Keywords** Calmodulin, Disease resistance, Pathogenesis-related gene, Potato, Soft rot

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

H. J. Chun · Y. M. Goo · T. W. Kim · S. W. Lee (✉)  
경남과학기술대학교 농학 · 한약자원학부  
(Division of Agronomy & Medicinal Resources, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea)  
e-mail: shinwlee@gntech.ac.kr

H. C. Park · D.-J. Yun · W. S. Chung (✉)  
경상대학교 대학원 응용생명과학부, 식물분자생물학 및 유전자조작 연구소  
(Division of Applied Life Science (BK21 program), Plant Molecular Biology and Biotechnology Research Center, Jinju 660-701, Korea)  
e-mail: chungws@gnu.ac.kr

K. S. Cho  
국립식량과학원, 고령지농업연구센터  
(Highland Agriculture center, National Institute of Crop Science, RDA, Pyungchang, 232-955)

H. S. Cho  
광양보건대학 물리치료과  
(Department of Physical Therapy, Gwangyang Health College, Gwangyang, 545-703)

## 서론

산업혁명 이후 급격하게 증가된 화석연료의 사용은 공기 중에 주 온실가스인 이산화탄소의 농도를 크게 증가시켜 지구의 온도를 지속적으로 상승하게 하여, 지구온난화 문제를 초래하였다. 이와 같은 환경문제로 인하여 서늘한 기온에서 잘 자라는 감자, 배추, 무 등의 고랭지 원예 작물의 생육이 저하되고, 여러 가지 병원균에 의한 농작물의 피해가 증가하고 있다. 전세계적으로 작물손실의 삼분의 일 (1/3) 정도가 직접적으로 병원균의 침입에 의해서 야기되고 있다고 보고된다. 또한, 병원균에 의한 농작물 손실을 감소시키기 위하여 농약의 광범위한 사용으로 인하여 경작지 토양이 산성화되고 여러 가지 환경오염의 악순환을 초래하고 있다 (Agrios 1988). 이러한 농약의 사용은 또한 생태계에 존재하는 자연 천적들의 감소를 유발하게 되고 이는 더 많은 농약 사용을 유도하게 되

는 효과를 나타낸다. 지속적인 화학 농약의 사용은 다양한 내성 병원균들의 발생을 유도하고 이들은 더욱 심각한 농작물의 양적/질적인 저하를 유발함과 다른 화학농약의 사용을 유발함으로써 생산경비의 증가를 유도하고 있다. 이러한 병원균과 화학 농약의 문제를 해결하고자 식물의 질병을 억제할 수 있는 병 저항성을 유도하는 유용 유전자를 확보하고자 하는 연구가 전세계적으로 많은 연구자들에 의하여 이루어지고 있다. 또한, 식물체에서의 병 저항성 조절기작에 대한 기초적인 연구도 동시에 활발하게 이루어지고 있다.

식물체는 동물과는 달리 면역세포나 기관이 따로 존재하지 않으므로 모든 세포가 병원균의 침입을 인지하여 신호전달하고 생체 방어 시스템을 가동하여 병원균에 대한 방어작용을 할 수 있어야 한다. 식물은 두 가지의 내병성 기작들을 가진다. 하나는 병원균이 침입한 세포에서 나타나는 초민감성 세포사멸 (HR; hypersensitive cell death)이고 다른 하나는 병원균이 직접 침입하지 않은 부위에서 광범위하게 나타나는 전신획득 저항성 (SAR; systemic acquired resistance)이다. HR은 병원균이 침투한 부위에서 세포사멸을 유도하여 병원균이 식물에 침입하지 못하도록 하는 기능을 하고, SAR은 감염되지 않은 식물 전 부위가 유도된 병 저항성을 갖도록 하여 실질적인 병원균이 침입을 하게 될 때 기초 병저항성 (basal defense) 갖도록 하고 또한 신속하게 병저항성 신호전달을 유도하는 기능을 한다고 알려져 있다. SAR에 의하여 식물은 최종방어 산물로서 phytoalexin과 같은 항균성 물질을 합성하거나 병저항성 단백질인 PR (pathogenesis-related) 단백질을 축적하여 병원균에 대한 내성을 가지게 된다.

식물세포가 이와 같은 병원균에 대한 내병성을 가지기 위해서는 신속하게 침입한 병원균을 인식하고 정확한 신호전달을 하여 식물세포의 적절한 반응을 해야 한다. 식물세포에 병원균이 침입하게 되면 수용체가 인식을 하고 이는 곧바로 신호전달 과정의 이차 매개체로 세포질내의  $Ca^{2+}$ 의 증가를 유도하게 된다. 병원균에 따라서 식물세포는 서로 다른 고도 (amplitude), 빈도 (frequency), 기간 (duration)의  $Ca^{2+}$  농도 증가 양상을 보인다 (Dixon et al. 1994; Dolmetsch et al. 1997). 이러한 세포질 내  $Ca^{2+}$  유입은 세포 내의 여러 가지 calmodulin (CaM),  $Ca^{2+}$ -dependent protein kinases (CDPKs), calcineurin B-like proteins (CBLs) 등 칼슘 신호 암호해독자 (decoder)인  $Ca^{2+}$  결합단백질에 의해서 인식되어 하부 (downstream)로 내병성 유도 신호를 전달하게 된다 (Chin and Means 2000). 결과적으로  $Ca^{2+}$  유입과 칼슘매개 신호전달은 reactive oxygen species, salicylic acid, jasmonic acid 등의 신호전달 물질들의 합성을 유도하여 HR과 SAR에 직접적으로 관여하고 있다 (Sacks et al. 1993).

칼슘신호 암호해독자 역할을 하는  $Ca^{2+}$  결합단백질 중에서 칼모듈린 (Calmodulin, CaM)은 현재까지 가장 잘 연

구되어 있는  $Ca^{2+}$  결합단백질로써,  $Ca^{2+}$ -binding motif인 4개의 EF-hands를 가지고 있다. 동물세포와는 달리 식물 세포에서는 다양한 형태 (isoform)의 칼모듈린을 암호화하는 유전자가 존재하며, 현재까지 *Arabidopsis* (Ling et al. 1991), potato (Takezawa et al. 1995), wheat (Yang et al. 1996), tobacco (Yamakawa et al), soybean (Lee et al. 1995) 등에서 보고되어 있다. 특히, 대두에서는 5개의 칼모듈린 형태 (GmCaM-1부터 GmCaM-5)가 보고되어 있다. GmCaM-1, GmCaM-2, GmCaM-3 유전자는 동물의 칼모듈린과 약 96% 정도의 높은 유사성을 보여주는 반면, GmCaM-4와 GmCaM-5는 약 78% 정도의 낮은 유사성을 보여 주는데, 이를 바탕으로 GmCaM-4와 GmCaM-5는 지금까지 보고된 칼모듈린 유전자들 중에서 가장 비보존화된 유전자군으로 알려져 있다 (Lee et al. 1995; Yamakawa et al. 2001). GmCaM-4와 GmCaM-5 단백질은 식물체내에서 salicylic acid (SA)에 비의존적으로 생체 방어신호전달 작용에 관여하며, 내염성에 관여한다고 보고되었다 (Heo et al. 1999; Park et al. 2004; Yoo et al. 2005). 또한, 이들 칼모듈린과의 결합 단백질은 보존화된 칼모듈린과는 달리  $Ca^{2+}$  농도의 차이에 따라 결합 단백질의 활성도의 차이도 보여 주었다 (Cho et al. 1998; Kondo et al. 1999; Lee et al. 2000). 이와 같이 다양한 형태를 가지고 있는 칼모듈린이 여러 종류의 결합 단백질과 결합하여 다양한 세포 신호전달을 조절하게 될 것으로 예측이 된다.

칼모듈린에  $Ca^{2+}$ 이 결합하면 구조적인 변화를 유발하게 되고, 다양한 결합 단백질들과 상호작용을 하여 세포 신호전달을 조절한다 (Hoefflich and Ikura 2002). 비록, 칼모듈린은 효소적인 활성은 가지고 있지 않을지라도 다양한 결합 단백질과 상호작용을 하여, 결합 단백질의 활성을 조절하는 기능을 하게 된다. 지금까지 식물체에서 보고된 칼모듈린 결합 단백질은 50개 이상으로 다양한 기능을 수행하여 세포 신호전달을 조절하게 된다 (Snedden and Fromm 2001; Kim et al. 2009a). 모델 식물인 애기장대 (*Arabidopsis*)에서 AtCaM-2 결합 단백질인 *Arabidopsis thaliana* Calmodulin-Binding Protein 63 kD (AtCBP63)을 분리 하였고, 다양한 실험방법을 통하여 칼모듈린과 결합 특이성을 보고하였다. AtCBP63 유전자는 563개의 아미노산을 암호화하는 유전자이며, 이를 바탕으로 63 kD 정도의 단백질 크기이다. 또한, 이전의 연구에서 칼모듈린과 결합하는 부위는 R<sup>531</sup>에서 V<sup>550</sup> 사이에 존재하고 있으며, 1 (W534), 8 (F541), 그리고 14 (F547)의 위치에 소수성의 아미노산이 존재하여 1-8-14의 칼모듈린 결합 규칙을 잘 따르고 있었다 (Rhoads and Friedberg 1997; Kim et al. 2009b). 한편, AtCBP63 유전자는 JA (Jasmonic acid)와 MeJA (Methyl jasmonate)의 처리에 의해서 강하게 발현됨을 관찰할 수 있었고, SA (salicylic acid) 처리에도 약한 발현 정도를 보여주었다 (Kim et al. 2009b). 이와 같은 결과는 식물체에

서 AtCBP63 단백질이 병원균의 저항성에 관여함을 시사하였다. 그리고, AtCBP63은 MAMP에 의하여 유도되는 SA (salicylic acid)의 축적과 식물의 세균 병원균에 대한 내병성에 관여하는 것으로 보고되었다 (Wang et al. 2009). 본 연구에서는 AtCBP63을 과발현하는 형질전환 감자를 구축하고 그들 형질전환 감자를 이용하여 감자 무름병 저항성 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 생육조건

감자 품종 (*Solanum tuberosum* L. cv. Dejima)을 형질전환을 위하여 사용하였다. 식물체는 4,000 lux의 세기에서 8시간 광/16시간 암 주기로, 23°C의 조건에서 생육하였다. 2~3주 동안 생육한 감자의 잎을 준비하여 멸균수로 세척하고 70% 에탄올로 1차 표면소독을 실시한 후에, Tween-20을 포함하는 0.5% 차아염소산 나트륨 (sodium hypochlorite) 용액으로 2차 소독을 하였다. 그리고, 차아염소산 나트륨을 제거하기 위해 멸균수로 5회 반복하여 세척을 하였다. 소독된 감자의 잎을 사용하여 식물체의 재분화 및 형질전환 재료로 사용하였으며, 감자 형질전환용 균주는 *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404 계통)가 사용되었다. 또한, 유전자 조작을 위한 균주는 *Escherichia coli* (XL1-Blue *MRF'*와 DH5 $\alpha$  계통)이 사용되었다 (Stratagene, USA).

### 식물형질전환용 Vector 제작 및 감자 형질전환

감자 형질전환용 vector를 제작하기 위하여 *AtCBP63* cDNA (1.476 kb)를 사용하여 양쪽 말단에 *Sma*I의 제한효소 자리를 가진 primers를 각각 이용하여 PCR 증폭을 수행하였다. PCR 산물을 *pGEM-T Easy* vector (Promega, Madison, WI)에 삽입하여 DNA 염기서열을 확인하였다. 기본 binary vector를 *pCambia1300-PT*를 사용하였으며, 이 vector는 enzyme site가 변형되고 선발마커로 hygromycin 저항성 유전자를 가지고 있는 *pCambia1300*으로부터 유도된 vector이다. *pCambia1300-PT* vector를 *Sma*I의 제한효소를 사용하여 절단한 후에 calf intestinal alkaline phosphatase (CIP, New England Biolabs)를 37°C에서 1시간 동안 처리한 후, 이미 준비된 *AtCBP63* 유전자와 서로 연결하여 클로닝 하였다. *pCambia1300-PT* (Control)와 *pCambia1300-PT-AtCBP63*을 각각 *Agrobacterium*에 형질전환 시켰다. 감자 형질전환 식물체를 구축하기 위하여 소독된 감자의 잎을 5 mm x 5 mm의 자엽 절편조각으로 만든 후, 형질전환된 *Agrobacterium*을 자엽 절편체에 감염시켜 형질전환 하였다. 형질전환된 감자는 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지를 포

함하는 shoot 유도배지에서 재분화시켰고, hygromycin 항생제를 사용하여 형질전환체를 선별하였다 (Yi et al. 2004).

### Northern blot 분석

*pCambia1300-PT* (Control)와 *pCambia1300-PT-AtCBP63*가 형질전환된 감자에서 Northern blot을 수행하기 위하여 Park et al. (2002)의 방법을 사용하였다. 우선, total RNA는 TRIZOL reagents (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 각각의 형질전환 식물체로부터 분리하였다. 분리된 20  $\mu$ g의 total RNA는 1.5% (w/v) formaldehyde-agarose gel에서 전기영동을 수행한 후, gel 위에 nylon membrane (NEN, Boston, MA)을 놓고 membrane에 RNA를 전이시켰다. UV cross-linker를 이용하여 RNA를 고정 시킨 후, *AtCBP63* 유전자를  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]dATP의 방사선 동위원소로 표지한 probe를 0.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.2, 1 mM EDTA, 1% BSA, 7% SDS를 포함하는 hybridization buffer에서 65°C에서 18시간 동안 혼성화시킨 후, 1% SDS, 2 x SSC 의 washing buffer를 65°C에서 15분간 2번 반복하여 세척하고, 1% SDS, 0.1 x SSC 의 washing buffer 로 65°C에서 10분간 2번 반복하여 세척하였다. 세척한 membrane은 필름 카세트에 필름과 함께 넣어서 -80°C에서 24 hr 동안 보관한 후에 필름을 현상하였다.

### RT-PCR 검정

형질전환된 식물체로부터 RT-PCR을 수행하기 위하여 Northern blot을 위해 분리한 total RNA로부터 cDNA를 합성 하였다. 우선, total RNA에 DNase I (deoxyribonuclease I, Sigma)을 상온에서 15분간 처리한 후, 70°C에서 10분간 불활성화 시켰다. ReverTra Ace reverse transcriptase (100 unit  $\mu$ L<sup>-1</sup>, TOYOBO)의 역전사 효소, 2  $\mu$ g의 total RNA와 oligo (dT)<sub>20</sub> primer를 함께 넣어 최종 25  $\mu$ L의 반응 혼합물에서 First-strand cDNA를 합성하였다. Table 1에서 보이는 감자 PR 유전자들의 primers를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR에서 사용된 효소는 EF-Taq DNA polymerase (2.5 unit  $\mu$ L<sup>-1</sup>, Solgent, Daejeon, Korea)를 사용하였으며, 95°C에서 2분 동안 예열과정을 거친후, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 2분 동안 25 cycles을 수행하였고, 최종적으로 72°C에서 10분의 extension하여 RT-PCR을 수행하였다. PCR산물은 agarose gel에서 전기영동한 후, UV 조건에서 ethidium bromide를 이용하여 관찰 하였다. Potato Actin 유전자는 internal positive controls로 사용 되었다.

### 병원균 처리 및 병저항성 측정

형질전환된 감자에서 병 저항성을 관찰하고자 이전에 한

국 강원도의 대관령 감자로부터 분리한 *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* (*Ecc*) 균주를 사용하였다. 이 균주는 tryptic soy agar (Difco Labs, Detroit, MI, USA)에서 20°C의 온도 조건과 24시간 동안 배양되었다. 배지에서 성장한 균주에 멸균수를 사용하여 미생물 현탁액을 제조함과 동시에 분광광도계 (OD<sub>530</sub> = 0.8)를 사용하여 colony forming units (cfu) per ml의 농도를 계산하였다. Potato slice method는 Sjefke et al. (1995)의 방법을 약간 변형하여 수행하였으며, 미생물 배양액을 감자의 tuber discs에 감염시키고 멸균수가 포함되어 있는 거름종이 위에 놓아서 25°C에서 24시간 동안 배양하였다. 또한, 병원균을 처리할 감자의 tuber는 미리 차아염소산 나트륨 (sodium hypochlorite) 용액에 10분간 담궈서 소독을 한 후, 건조 시켰다. 감자의 tuber discs위에 감염된 미생물의 성장을 관찰하기 위하여 반지름 직경을 측정하였다.

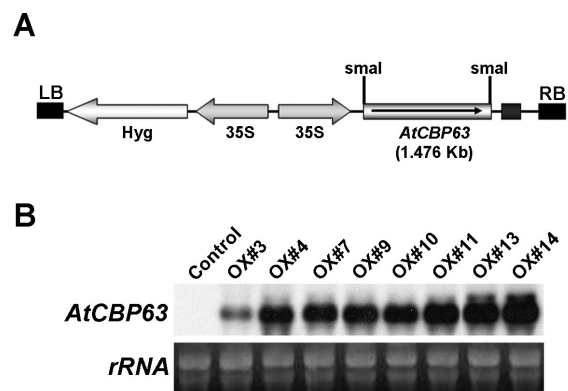
### 결과 및 고찰

#### 감자에서의 AtCBP63 유전자의 발현

애기장대의 *AtCBP63* 유전자를 형질전환용 binary vector인 *pCambia1300-PT* vector의 *Sma*I의 제한효소를 이용하여 재조합하였다 (Fig. 1A). 이렇게 재조합된 *pCambia1300-PT-AtCBP63* 과 *pCambia1300-PT* vector를 각각 감자에 형질전환 하여, 형질전환된 감자로부터 total RNA를 추출하고 northern blot 분석을 통하여 *AtCBP63* 유전자의 발현정도를 관찰하였다. *pCambia1300-PT* vector (Control)가 형질전환된 감자에서는 *AtCBP63* 유전자의 발현이 관찰되지 않는 반면에, *pCambia1300-PT-AtCBP63*이 형질전환된 감자에서는 증가된 유전자 발현을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1B). 이 중에서 중간정도의 발현을 보이는 OX#7번과 강하게 발현을 보이는 OX#14번을 가지고 병원균 저항성 실험을 수행하였다.

#### AtCBP63 유전자가 과발현된 감자에서의 PR 유전자들의 발현

*AtCBP63* 유전자는 미생물 병원균과 미생물 방어 기작에 관여하는 다양한 호르몬에 의해서 발현이 증가하고, 세포내에서 여러가지 신호 전달에 관여하는 칼모듈린과 결합하였다 (Kim et al. 2009b). 이러한 유전자의 특성은 병원균에 대한 식물 방어 기작을 위한 신호전달에 관여할 수 있음을 시사한다. 이를 증명하기 위하여, Table 1에서 보여주는 감자 PR 유전자들의 primer를 이용하여 *AtCBP63* 유전자가 과발현된 감자에서 PR 유전자들의 발현을 RT-PCR을 통하여 분석하였다. *pCambia1300-PT* vector (Control)가 형질전환된 감자에서는 환경적인 영향으로 PR-2, PR-3, PR-5 유전자들의 발현이 약하게 증가한 반면, *pCambia1300-*



**Fig. 1** The expression of *AtCBP63* in potato transgenic plants. (A) Schematic map of a binary vector that contains *AtCBP63* used for transformation. LB, left T-DNA border sequence; RB, right border sequence; 35S, CaMV 35S promoter; Hyg, hygromycin resistance gene. (B) Northern blot analysis. Transgenic potato plants transformed with *pCambia1300-PT-AtCBP63* (OX lines) and control plant transformed with *pCambia1300-PT* vector (Control), were analyzed for *AtCBP63* expression. Equal loading of RNA (20 μg) in each lane was confirmed by pre-staining the gel with ethidium bromide as a loading control (lower; *rRNA*). RNA blots were probed with <sup>32</sup>P-labeled *AtCBP63* cDNA

**Table 1** Gene-specific primer sequences used for RT-PCR in this study

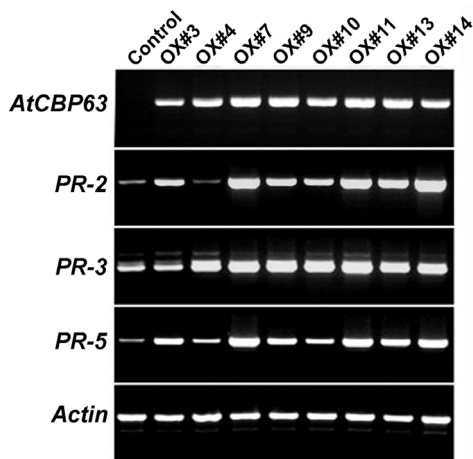
Primer names	Primer sequences (5' → 3')
<i>AtCBP63-F</i>	GGAGATGGAGCCGTGGAG
<i>AtCBP63-R</i>	TCATCAGGACATCAGGGTGG
<i>PR-2</i> (β-1,3-glucanase; <i>gluB1</i> )-F	CAACTTGCCATCACATTCCG
<i>PR-2</i> (β-1,3-glucanase; <i>gluB1</i> )-R	TCGATAGGTCCAGGCTTTCTC
<i>PR-3</i> (Chitinase; <i>chiB3</i> )-F	CCAGGTAATTGCCAGAGCCA
<i>PR-3</i> (Chitinase; <i>chiB3</i> )-R	GGTGATGACATCGTGGCAAG
<i>PR-5</i> (Osmotin-like protein)-F	GCTGCCACTATCGAGGTACG
<i>PR-5</i> (Osmotin-like protein)-R	TCTTCATCACTTGCAGGCATC

*PT-AtCBP63*가 형질전환된 감자에서는 PR-2, PR-3, PR-5 유전자들의 발현이 현저하게 증가함을 알 수 있었다 (Fig. 2). 특히, 병원균 저항성 실험을 수행할 형질전환 식물체인 OX#7번과 OX#14번에서 PR 유전자들의 발현이 뚜렷하게 증가 된다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 *AtCBP63* 유전자가 과발현된 형질전환 감자에서는 병원균의 침입과 상관없이 식물 생체 방어 신호기작이 활성화 되어 있음을 시사한다.

#### AtCBP63 유전자가 과발현된 형질전환 감자의 병저항성 검증

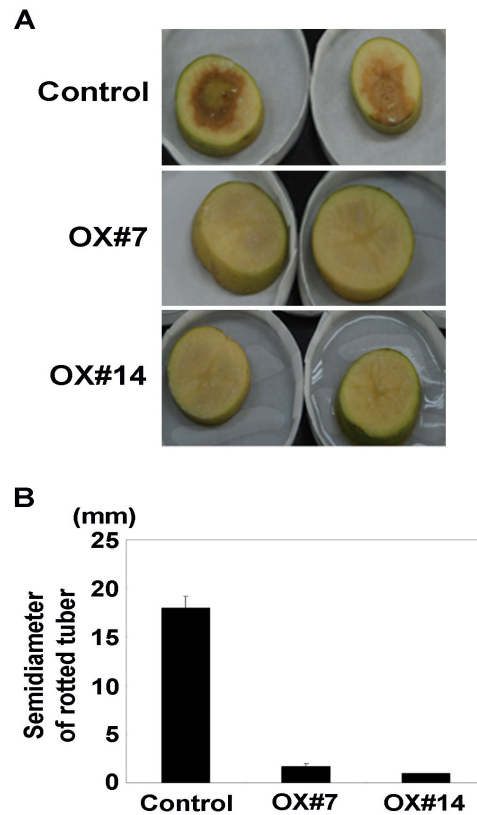
병원성 세균인 *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* (*Ecc*)는 식물의 무름병 (soft rot disease)을 일으킨다. 이 병원균은 직접 식물세포를 뚫고 들어가지는 못하고 주로 뿌리, 잎, 구경 등에 생긴 상처나 기공, 수공, 밀선 등을 통해서 침입 할 수 있는데 특이하게도, 식물의 세포벽을 분해하는 효소를 분비하여 조직을 연화시키는 것으로 보고되었다. 거의 모든 채소, 과일 등의 다양한 식물에서 병을 일으키는데 특히 마늘, 양파, 감자 등에서 아주 중요한 병원균으로 알려져 있다. 본 연구에서는 멸균수가 흡착되어있는 거름종이 위에 대조군과 비교하여 *AtCBP63*이 과발현된 형질전환 감자의 tuber discs에 *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* (*Ecc*)를 감염 시켰을 때, 그 병원균의 성

장을 관찰하였다. Vector (Control)가 형질전환된 감자에서 *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* (*Ecc*)를 감염시켰을 때, 빠른 속도로 병원균의 성장을 관찰한 반면, *AtCBP63*이 과발현된 OX#7번과 OX#14번에서는 병원균의 성장이 억제됨을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3A). 각각의 감자 tuber discs에서 병원균 성장의 반지름을 측정 한 결과, vector (Control)가 형질전환된 감자에서는 17.5 mm인 반면, *AtCBP63*이 과발현된 감자에서는 약 2 mm로 vector에 비해 약 90% 줄어든 성장률을 보여 주었다 (Fig. 3B). 이와 같은 결과들을 바탕으로, *AtCBP63* 유전자가 과발현된 형질전환 감자에서는 식물 생체 방어 신호기작이 활성화되어서 병원성 세균인 *carotovora* subsp. *Carotovora* (*Ecc*)의 무름병에 대한 저항성이 증가하였음을 확인하였다. 결론적으로, 식물체는 다양한 외부의 병원균이 침입하게 되면 일차적으로 세포 내에서 칼슘의 농도가 증가되고, 증가된



**Fig. 2** RT-PCR analysis of constitutive expression of *PR* genes in transgenic *AtCBP63* potato plants

Total RNA was isolated from transgenic potato plants transformed with pCambia1300-PT-*AtCBP63* (OX lines) and control plant transformed with pCambia1300-PT vector (Control), respectively. PCR amplifications were carried out in conditions of a 2 min denaturation at 95°C, followed by 25 cycles of 95°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 2 min. After PCR, 10 µl of each reaction was removed and electrophoresed in 1% agarose gel. *Actin* amplification was used as the standard to verify uniform gene amplification. The RT-PCR analysis was repeated three times using RNA extracted from three independent experiments and similar results were obtained



**Fig. 3** Enhanced soft rot resistance of *AtCBP63* transgenic potato lines

(A) *AtCBP63* confers resistance against *Erwinia carotovora* in transgenic potato tubers. Potato tubers transformed with pCambia1300-PT-*AtCBP63* (OX lines) or pCambia1300-PT vector (Control) were sliced, inoculated with *Erwinia carotovora* ( $5 \times 10^8$  cfu per ml) and incubated for 24 hrs at 25°C. The photographs were taken after the incubation. The results are representative of three different trials. (B) Semi-diameters of *Erwinia carotovora* growth were measured after the incubation. The results are mean value of three independent experiments

칼슘은 신호전달을 위해서 칼모듈린과 구조적으로 결합하여 AtCBP63 단백질의 활성을 부여하여 다양한 최종 병원균 방어 유전자들의 발현을 증가시키게 되어 병 저항성을 증가시킬 것으로 사려된다. 앞으로, AtCBP63 단백질이 어떻게 최종 방어 유전자들의 발현을 증가시키는지에 관한 기작 연구를 수행하고자 한다.

## 적 요

원예작물의 생육을 저하시키는 각종 병충해로 인한 과도한 농약과 화학비료의 사용은 환경오염뿐만 아니라 작물의 생산량에도 큰 영향을 미치고 있다. 식물생명공학기술을 이용하여 농약이나 화학비료 사용량을 획기적으로 줄일 수 있는 식물체의 개발, 즉 형질전환을 이용한 분자육종기술은 병충해 내성 농작물을 개발하여 과도한 화학비료의 사용에 따르는 여러가지 문제점들을 극복할 수 있는 대안으로 대두되고 있다. 본 연구에서는 모델식물인 애기장대에서 분리한 식물생체방어 신호전달에 관련된 *AtCBP63* 유전자를 감자에 과발현시켰고, 이러한 형질전환 감자에서 병저항성에 관여하는 유전자인 PR-2, PR-3, PR-5 유전자들의 발현이 증가되어 지속적으로 식물 방어 기작이 활성화되어 있음을 확인하였다. 또한, 감자에서 무름병 (soft rot disease)을 일으켜 막대한 피해를 유발하는 병원성 세균인 *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* (*Ecc*)를 이용하여 *AtCBP63* 유전자를 과발현한 감자에 감염시켰을 때, 병 저항성이 증가한다는 사실을 검증하였다. 앞으로, 다양한 곰팡이 균에 대응하여 *AtCBP63* 유전자를 과발현한 감자에 저항성을 검증하고자 한다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 어젠더 과제 (PJ006681042011)로 수행되었으며, 일부는 교육과학 기술부의 World Class University (WCU) Program 연구비 (R32-10148)와 한국연구재단 일반연구지원사업의 Basic Science Research Program 연구비 (2010-0010607)로 수행하였음.

## 인용문헌

Agrios GN (1988) Plant pathology, 3<sup>rd</sup> edn. Academic Press, New York, pp 17-26  
 Chin D and Means AR (2000) calmodulin: a prototypical calcium sensor. Trends Cell Biol 10:322-328  
 Cho MJ, Vaghy PL, Kondo R, Lee SH, David JP, Rehl R, Heo WD and Johnson JD (1998) Reciprocal regulation of mammalian

nitric oxide synthase and calcineurin by plant calmodulin isoforms. Biochemistry 37:15593-15597  
 Dixon RA, Harrison MJ and Lamb CJ (1994) Early events in the activation of plant defense responses. Annu Rev Phytopathol 32:479-501  
 Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC and Healy JI (1997) Differential activation of transcription factors induced by  $Ca^{2+}$  response amplitude and duration. Nature 24:855-858  
 Heo WD, Lee SH, Kim MC, Kim JC, Chung WS, Chun HJ, Lee KJ, Park CY, Park HC, Choi JY 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  
 Hoefflich KP and Ikura M (2002) Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms Cell 108: 739-742  
 Kim MC, Chung WS, Yun D-J and Cho MJ (2009a) Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants. Mol Plant 2:13-21  
 Kim SH, Kang YH, Han HJ, Bae DW, Kim MC, Lim CO and Chung WS (2009b) Identification of another calmodulin-binding domain at the C-terminal region of AtCBP63. J Plant Biotechnol 36:53-58  
 Kondo R, Tikunova SB, Cho MJ and Johnson JD (1999) A point mutation in a plant calmodulin is responsible for its inhibition of nitric-oxide synthase. J Biol Chem 274:36213-36218  
 Lee SH, Johnson JD, Walsh MP, Van Lierop JE, Sutherland C, Xu A, Snedden WA, Kosk-kosicka D, Fromm H, Narayanan N and Cho MJ (2000) Different regulation of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent enzymes by plant calmodulin isoforms and free  $Ca^{2+}$  concentration. Biochem J 350:299-306  
 Lee SH, Kim JC, Lee MS, Heo WD, Seo HY, Yoon HW, Hong JC, Lee SY, Bahk JD, Hwang I, Cho MJ (1995) Identification of a novel divergent calmodulin isoform from soybean which has differential ability to activate calmodulin-dependent enzymes. J Biol Chem 270:21806-21812  
 Ling V, Perera I and Zielinski RE (1991) Primary structures of Arabidopsis calmodulin isoforms deduced from the sequences of cDNA clones. Plant Physiol 96:1196-1202  
 Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plantarum 15:473-497  
 Park CY, Heo WD, Yoo JH, Lee JH, Kim MC, Chun HJ, Moon BC, Kim IH, Park HC, Choi MS, Ok HM, Cheong MS, Lee SM, Kim HS, Lee KH, Lim CO, Chung WS and Cho MJ (2004) Pathogenesis-related gene expression by specific calmodulin isoforms is dependent on NIM1, a key regulator of systemic acquired resistance. Mol. Cells 18:207-213  
 Park HC, Kang YH, Chun HJ, Koo JC, Cheong YH, Kim CY, Kim MC, Chung WS, Kim JC, Yoo JH, Koo YD, Koo SC, Lim CO, Lee SY and Cho MJ (2002) Characterization of a stamen-specific cDNA encoding a novel plant defensin in Chinese cabbage. Plant Mol Biol 50:59-69  
 Rhoads AR, Friedberg F (1997) Sequence motifs for calmodulin recognition. FASEB J 11:331-341

- Sacks WR, Ferreira P, Hahlbrock K, Jabs T, Nürnberger T, Renelt A and Scheel D (1993) Elicitor recognition and intracellular signal transduction in plant defense. In: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. (Nester, E., ed.) Kluwer Academic publishers Dordrecht, Boston, London Vol 2:485–495
- Sjefke JHM, Florack DEA, Hoogendoorn C and Stiekema WJ (1995) *Erwinia* soft rot resistance of potato cultivars transformed with a gene construct coding for antimicrobial peptide cecropin B is not altered. *Amer J Potato Research* 72:437–445
- Snedden WA and Fromm H (2001) Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. *New Phytol* 151:35–66
- Takezawa D, Liu ZH, An G and Poovaiah BW (1995) Calmodulin gene family in potato: developmental and touch-induced expression of the mRNA encoding a novel isoform. *Plant Mol Biol* 27:693–703
- Wang L, Tsuda K, Sato M, Cohen JD, Katagiri F, Glazebrook J. (2009) Arabidopsis CaM binding protein CBP60g contributes to MAMP-induced SA accumulation and is involved in disease resistance against *Pseudomonas syringae*. *PLoS Pathog* 5 (2):e1000301
- Yamakawa H, Mitsuhara I, Ito N, Seo S, Kamada H, Ohashi Y (2001) Transcriptionally and post-transcriptionally regulated response of 13 calmodulin genes to tobacco mosaic virus-induced cell death and wounding in tobacco plant. *Eur J Biochem* 268:3916–3929
- Yang T, Segal G, Abbo S, Feldman M and Fromm H (1996) Characterization of the calmodulin gene family in wheat: structure, chromosomal location, and evolutionary aspects. *Mol Gen Genet* 252:684–694
- Yi JY, Seo HW, Yang MS, Robb EJ, Nazar RN and Lee SW (2004) Plant defense gene promoter enhances the reliability of shiva-1 gene-induced resistance to soft rot disease in potato. *Planta* 220:165–171
- Yoo JH, Park CY, Kim JC, Heo WD, Cheong MS, Park HC, Kim MC, Moon BC, Choi MS, Kang YH, Lee JH, Kim HS, Lee SM, Yoon HW, Lim CO, Yun DJ, Lee SY, Chung WS and Cho MJ (2005) Direct interaction of a divergent CaM isoform and the transcription factor, MYB2, enhances salt tolerance in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 280:3697–3706