

대두 칼모듈린 단백질, GmCaM-4를 발현하는 형질전환 감자의 무름병 저항성 확인

박형철 · 전현진 · 김민철 · 이신우 · 정우식

Identification of disease resistance to soft rot in transgenic potato plants that overexpress the soybean *calmodulin-4* gene (*GmCaM-4*)

Hyeong Cheol Park · Hyun Jin Chun · Min Chul Kim · Sin Woo Lee · Woo Sik Chung

Received: 14 May 2020 / Revised: 1 June 2020 / Accepted: 14 June 2020
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Calmodulin (CaM) mediates cellular Ca^{2+} signals in the defense responses of plants. We previously reported that GmCaM-4 and 5 are involved in salicylic acid-independent activation of disease resistance responses in soybean (*Glycine max*). Here, we generated a *GmCaM-4* cDNA construct under the control of the *cauliflower mosaic virus* (*CaMV*) 35S promoter and transformed this construct into potato (*Solanum tuberosum* L.). The constitutive over-expression of GmCaM-4 in potato induced high-level expression of pathogenesis-related (*PR*) genes, such as *PR-2*, *PR-3*, *PR-5*, *phenylalanine ammonia-lyase* (*PAL*), and *proteinase inhibitorII* (*pinII*). In addition, the transgenic potato plants exhibited enhanced resistance against a bacterial pathogen, *Erwinia carotovora* ssp. *Carotovora* (*ECC*), that causes soft rot disease and showed spontaneous lesion phenotypes on their leaves. These results strongly suggest that a CaM protein in soybean, GmCaM-4, plays an

important role in the response of potato plants to pathogen defense signaling.

Keywords Calmodulin, Disease resistance, *Erwinia* (soft rot), Pathogen-related gene, Potato

서 언

지구온난화는 전세계적으로 중요한 환경문제의 하나로 대두되고 있으며 19세기에서 20세기의 약 100년 동안 지구의 평균온도는 0.3 ~ 0.6°C 정도 상승하였으며, 한반도 내륙에서는 지난 100년 동안 기온이 약 1.4°C 상승하였다(Korea Meteorological Administration 2008). 이는 지구의 평균기온 상승률의 2 배에 이르는 수치이다. 이와 같은 현상에 의하여 폭우, 지진, 한파, 태풍과 같은 기상이변은 농작물의 생산력을 예측할 수 없게 만들어 인류의 생존에 크나큰 위협으로 다가올 것이다. 또한, 병충해의 성장을 빠르게 할 뿐만 아니라 이동을 자유롭게 하여 농업생태계의 큰 피해를 확산 시킬 것이다. 이와함께, 병충해에 의한 농작물 손실의 감소를 위한 광범위한 화학비료와 농약의 의존은 다양한 내성 병원균들의 발생을 유도하여 최종적으로 더욱 심각한 농작물의 피해가 발생되게 될 것이다. 그러므로, 작물의 병 저항성 적응 기작 연구를 통한 유용 유전자의 확보와 활용을 통한 생산량 증대와 같은 농업생태계의 지속성 및 생태적 다양성 확보가 필요하다.

식물은 동물과 달리 이동할 수 없기 때문에 다양한 병원균으로부터 공격받게 되면 정교한 기작을 통하여 지역적이고 조직적으로 방어 기작을 작동하게 된다(Jackson and Tayler 1996). 우선적으로 식물체에 병원균이 공격하게 되면 그 지역의 세포가 자체적으로 사멸 하게 된다. 이것을 초민감성 세포사멸(HR; hypersensitive response)이라 부른다(Goodman

H. C. Park (✉)
국립생태원 보전평가연구본부 기후생태연구실 취약생태연구팀
(Team of Vulnerable Ecological Research, Division of Climate and Ecology, Bureau of Conservation & Assessment Research, National Institute of Ecology, Seocheon 33657, Korea)
e-mail: hcpark@nie.re.kr

H. J. Chun · M. C. Kim · W. S. Chung (✉)
경상대학교 대학원 응용생명과학부 식물분자생물학 및 유전자조작 연구소
(Division of Applied Life Science (BK21 Plus Program), Plant Molecular Biology and Biotechnology Research Center, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea)
e-mail: chungws@gnu.ac.kr

S. W. Lee
경남과학기술대학교 생명과학대학 농학·한약자원학부
(Department of Agronomy & Medicinal Plant Resources, Gyeongnam National University of Science & Technology, Jinju 52725, Korea)

et al. 1994). 이를 신호로하여 병원균이 직접 침입하지 않은 부위에 광범위 저항성을 확보하는 전신획득 저항성(SAR; system acquired resistance)을 나타내게 된다(Ryals et al. 1996). 이것은 병원균이 침입하였을 때 기초 병저항성(basal defense)을 갖도록 하며 최종적으로 phytoalexin과 같은 항균성 물질을 생산하거나 병저항성 단백질(PR proteins; pathogenesis-related proteins)을 축적하여 병원균에 대한 저항성을 획득하게 된다. 또한, 식물체가 병원균에 저항성을 갖기 위해서는 식물 세포의 수용체가 신속하게 병원균을 인식하고 신호전달체계가 작동하게 된다. 이와 같은 반응의 초기단계에서 칼슘(Ca^{2+}) 신호가 관여하게 된다(Dixon et al. 1994).

칼슘신호는 식물세포에서 병원균의 침입 뿐만 아니라 적색광, 저온, 접촉 및 중력과 같은 비생물학적 반응에서도 이차매개체로 작용하여 다양한 신호전달 체계를 구축하게 된다(Bush 1995). 다양한 환경에 대응하여 세포질내 칼슘의 농도가 고도(amplitude), 빈도(frequency), 기간(duration), 공간적 분포(spatial distribution)에 따라 많은 경우의 신호전달체계가 작동한다(McAinsh and Hetherington 1998; McAinsh and Pittman 2009). 이와 같은 다양한 칼슘 신호는 세포내의 칼슘 센서로 작용하며 칼슘 결합 부위(EF-hand motif)를 가지고 있는 칼슘 결합 단백질에 의해서 생화학적 변화들로 해독된다. 모델식물인 애기장대에서 약 250개 정도의 칼슘 결합 부위를 가진 단백질의 존재가 보고된다(Day et al. 2002). 식물에서 대표적인 칼슘 결합 단백질은 크게 세가지 부류로 나눌 수 있으며 첫번째로 가장 잘 알려진 부류는 칼모듈린(calmodulin; CaM)이며 모든 진핵생물에서 잘 보고되어 있다(Snedden and Fromm 2001; Yang and Poovaiah 2003). 두번째로 calcium-dependent protein kinase (CDPK) 단백질로써 catalytic kinase domain과 칼슘 결합 부위를 함께 가지고 있다(Cheng et al. 2002). 세번째 그룹은 SOS3 family이며 calcineurin B-like protein (CBL)으로도 알려진다(Luan et al. 2002; Zhu 2002). 위와 같은 칼슘센서는 구조 및 효소활성의 변화를 통하여 이온수송, 대사, 번역후 단백질 조절 그리고 유전자 발현을 포함하는 세포과정에 관여하는 목적 단백질의 기능 조절을 위하여 칼슘신호를 전달하게 된다(Kim et al. 2009).

칼모듈린은 위의 세가지 칼슘 결합 단백질 중에서 가장 잘 연구되고 보고된 그룹이다. 보통적으로 148개의 아미노산으로 4개의 칼슘 결합 부위(EF-hand motif)로 구성되어 있다. 칼슘이 칼모듈린에 결합하게 되면 구조적인 변화가 유도되어 칼모듈린과 결합하는 단백질들과 유리하게 결합할 수 있는 조건을 갖추게 된다(Hoeflich and Ikura 2002; Snedden and Fromm 1998). 칼모듈린은 효소 활성은 없지만 칼슘과 결합한 후 다양한 목적 단백질(target protein)의 활성을 조절하여 세포 신호전달에 관여하게 된다. 특히, 대사조절, 세포골격 조절, 식물호르몬 신호전달, 이온수송, 단백질 접힘, 단백질 인산화/탈인산화, 인지질 대사, 그리고 전사조절과 같은 다양한 분야의 세포신호전달에 관여하는 것으로 보고된다

(Bouché et al. 2005; Snedden and Fromm 2001; Yang and Poovaiah 2003). 포유동물에서는 소수의 칼모듈린이 보고되고 있지만 식물에서는 많은 종류의 칼모듈린 및 칼모듈린 유사 유전자의 존재가 보고 된다(Snedden and Fromm 2001; Reddy 2001). 애기장대에서 30개가 넘는 칼모듈린 유전자가 있으며, 감자, 밀, 담배 그리고 대두 등에서도 다양한 형태(isoform)의 칼모듈린이 존재함을 보였다(Lee et al. 1995; Takezawa et al. 1995; Poovaiah et al. 1996; Yang et al. 1996; The Arabidopsis Genome Initiative 2000).

대두에서는 GmCaM-1부터 GmCaM-5의 5개의 칼모듈린이 존재하며 아미노산 유사성과 기능에서의 차이로 크게 두개의 그룹으로 나눌 수 있다. 아미노산을 비교해 보면, GmCaM-1에서 GmCaM-3는 동물의 칼모듈린과 96% 정도의 유사성을 보여주며 GmCaM-4와 GmCaM-5는 GmCaM-1과 비교해서 78%의 낮은 아미노산 유사성을 보여 줌으로써 지금까지 보고된 칼모듈린 중에서 담배의 NtCaM13과 함께 하나의 독립된 그룹으로 분류되고 있다(Lee et al. 1995; Yamakawa et al. 2001). 또한, 위의 두 그룹에서 대표되는 GmCaM-1과 GmCaM-4의 목적 단백질 활성의 차이를 보였다(Cho et al. 1998; Chung et al. 2000; Kondo et al. 1999; Lee et al. 2000). Phosphodiesterase, 식물 Ca^{2+} -ATPase, 식물 Glu decarboxylase 그리고 CaM-dependent protein kinase II와 같은 목적 단백질은 GmCaM-1과 GmCaM-4에 의해서 유사한 양상의 효소 활성을 보였다. Calcineurin, myosin light chain kinase, red blood cell Ca^{2+} -ATPase, 그리고 식물 NAD kinase와 같은 목적 단백질은 오직 GmCaM-1 단백질에 의해서 효소 활성을 보였으며, nitric-oxide synthase의 경우는 GmCaM-4 단백질에 의해서만 효소 활성을 보였다. 이와 같은 결과는 대두의 대표적인 두개의 칼모듈린이 아미노산 유사성 뿐만 아니라 효소활성 측면에서도 차이를 보임으로써 각각의 칼모듈린 기능의 다양성을 설명하고 있다. 흥미롭게도, 대두에서 아미노산 서열의 다양성을 보이는 GmCaM-4와 GmCaM-5는 식물체내에서 병원균의 침입에 빠르게 발현되어 salicylic acid (SA) 비의존적인 신호전달 과정에 관여하였고, MYB2 전사인자의 조절을 통하여 고염 저항성에도 관여함을 애기장대 형질전환 식물체를 이용하여 확인하였다(Heo et al. 1999; Park et al. 2004a; Yoo et al. 2005).

대두의 GmCaM-4는 세포 신호전달과정에서 생물학적 및 비생물학적 환경스트레스에 관여하는 단백질로써 다양한 기능을 수행할 것이다. 그러므로, 환경스트레스에 반응하는 GmCaM-4의 전사조절부위(promoter)의 기능 및 기작 연구가 보고되었다. 특히, 병원균과 고염에 반응 하는 전사조절 부위(-1207 to -1128 bp; -858 to -728 bp)에 결합하는 각각 ZF-HD와 GT-1 like 전사조절인자를 확인하였다(Park et al. 2004b; 2007; 2009; 2010). 이와 같은 다양한 결과를 바탕으로 GmCaM-4를 작물에 활용하기 위하여, 감자 형질전환 식물체의 무름병 저항성 및 농업적 특성 연구를 수행하였다(Sohn et al. 2012).

본 연구에서는 대두에서 분리된 환경스트레스에 특이적으로 발현하는 GmCaM-4의 감자 형질전환 식물체 구축 및 병저항성 관여 유전자들의 발현에 따른 감자 형질전환 식물체의 초민감성 세포사멸(HR)에 관한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

식물 재료 및 사용 균주

식량작물인 감자를 이용하여 *GmCaM-4* (NCBI Gene ID: 547787)의 형질전환을 위한 감자 품종(*Solanum tuberosum* L. cv. Dejima)이 사용되었고 이 식물체는 23°C의 온도와 8시간 광/16시간 암 주기로 4,000 lux 조건에서 성장하였다(Goo et al. 2008). 감자 형질전환 및 재분화를 위하여 2~3주 동안 배양병에서 성장한 감자의 잎을 멸균수와 70%에탄올로 표면소독후 Tween-20을 포함하는 0.5% 차아염소산 나트륨(sodium hypochlorite) 용액으로 재소독 하였다. 그런 후 차아염소산 나트륨을 제거하기 위하여 멸균수로 반복하여 세척을 수행했다(Chun et al. 2011). 또한, 유전자의 클로닝을 위하여 *Escherichia coli* XL1-Blue *MRF'*와 DH5 α 를 사용하였고(Stratagene, USA), 감자 형질전환을 위하여 *Agrobacterium tumefaciens*의 LBA4404 균주가 사용되었다.

Vector 제작 및 감자 형질전환

대두로 부터 분리된 *GmCaM-4* cDNA를 주형으로 사용하였고, Table 1에서 표시한 primers를 이용하여 감자 형질전환용 vector 제작을 위하여 Polymerase Chain Reaction (PCR)을 수행

하였다. PCR 산물은 *pGEM-T Easy* vector (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 클로닝 후 염기서열을 분석하였다. 그리고, *Xho*I과 *Xba*I의 제한효소로 절단하고 선별마커를 *bar* 유전자를 가지고 있는 Binary vector, *pBin19* (Bevan, 1984)의 *cauliflower mosaic virus (CaMV 35S)* promoter와 *Nos* terminator 사이에 삽입하였다. 그런 후, *pBin19-GmCaM-4*를 제작하고 *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404)를 이용한 감자 형질전환을 수행하였다(Visser et al. 1989). 최종적으로 형질전환된 감자 식물체를 구축하기 위하여 소독된 감자의 잎을 5 mm × 5 mm의 자엽을 절편조각으로 만든 후, *pBin19-GmCaM-4*가 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404)을 감염시켜 감자 형질전환 식물체를 구축하였다. Phosphinothricin (PPT)는 *pBin19-GmCaM-4*를 포함하는 재조합 vector를 가지고 있는 형질전환 식물체 선별용으로 사용되었으며, 형질전환된 개체를 확보하기 위하여 선별배지에 0.5 mgL⁻¹의 저농도 Phosphinothricin (PPT)을 사용하여 1차 선별 하고, 2.5 mgL⁻¹의 PPT를 사용하여 최종적으로 재분화를 유도하였다. *GmCaM-4*가 형질전환된 감자는 30 g L⁻¹의 sucrose와 0.1 mg L⁻¹의 GA₃를 함유하는 MS (Murashige and Skoog 1962)배지에서 성장하고 유지되었다.

RNA blot 분석

형질전환된 감자에서 *GmCaM-4*와 병저항성에 관여하는 유전자들의 발현도를 분석하기 위하여 Chun et al. (2011)의 방법에 따라 RNA blot을 수행하였다. *GmCaM-4*가 형질전환된 감자에서 total RNA를 TRIzol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 분리하였다. 분리된 total RNA의 20 μ g을 1.5% formaldehyde/agarose gel에서 전기영동을 하고 nylon

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

Primer names	Primer sequences (5' → 3')
<i>GmCaM-4</i> (F)	TGCATTACTGTGGAAGAAGCTTG
<i>GmCaM-4</i> (R)	CATCACCGTCCAAATCTGCG
<i>PAL</i> (<i>Phenylalanine ammonia-lyase</i>)(F)	CTGCTGAGGCTGTGGACATG
<i>PAL</i> (<i>Phenylalanine ammonia-lyase</i>)(R)	AGAGCAACTCTTGCACCTCTCC
<i>PR-2</i> (β -1,3- <i>glucanase</i> ; <i>gluB1</i>)(F)	CAACTTGCCATCACATTCCG
<i>PR-2</i> (β -1,3- <i>glucanase</i> ; <i>gluB1</i>)(R)	TCGATAGGTCCAGGCTTTCTC
<i>PR-3</i> (<i>Chitinase</i> ; <i>chiB3</i>)(F)	CCAGGTAATTGCCAGAGCCA
<i>PR-3</i> (<i>Chitinase</i> ; <i>chiB3</i>)(R)	GGTGATGACATCGTGGCAAG
<i>acidic PR-5</i> (<i>Thaumatin-like protein</i>)(F)	TCAGTAGGACCACATGACCCTG
<i>acidic PR-5</i> (<i>Thaumatin-like protein</i>)(R)	GTCACCTCATGCTGCCACTTTTG
<i>basic PR-5</i> (<i>Osmotin-like protein</i>)(F)	GCTGCCACTATCGAGGTACG
<i>basic PR-5</i> (<i>Osmotin-like protein</i>)(R)	TCTTCATCACTTGCGAGGCATC
<i>pinII</i> (<i>Proteinase inhibitorII</i>)(F)	CATGTTGATGCGAAGGCTTG
<i>pinII</i> (<i>Proteinase inhibitorII</i>)(R)	CCTTGGGCTCATCACTCTCTC

membrane (NEN, Boston, MA, USA)을 전기영동된 gel위에 놓고 membrane에 RNA를 이동시켰다. UV cross-linker를 수행하여 이동된 RNA를 고정하고 각각의 유전자들을 위하여 Table 1의 프라이머를 가지고 얻어진 PCR 산물들을 이용하여 α -[32 P]dATP의 방사선 동위원소로 표지된 probe를 0.5 mM Na_2HPO_4 pH 7.2, 1 mM EDTA, 1% BSA, 7% SDS로 구성된 hybridization buffer 에서 65°C 조건에서 18시간 동안 혼성화시킨 후, 2 x SSC (1 x SSC는 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate), 1% SDS의 washing buffer를 65°C에서 15분간 2번 반복하여 세척하고, 0.1 x SSC, 1% SDS의 washing buffer로 65°C에서 10분간 2번 반복하여 세척하였다. 세척된 membrane은 X-ray 필름 카세트에 X-ray 필름과 함께 넣어 -80°C에서 24시간 동안 보관후에 필름을 현상하였다.

초민감성 세포사멸 및 병 저항성 분석

초민감성 세포사멸 분석을 위하여 *GmCaM-4*가 형질전환된 감자의 잎을 사용하여 autofluorescence 검사를 수행하였다 (Dietrich et al. 1994; Park et al. 2004a). MS 배지에서 2~4주 동안 성장한 형질전환 식물체의 잎을 alcoholic lactophenol (95% ethanol:lactophenol, 2:1)에 2분 동안 끓인 후, 70% 에탄올과 멸균수로 차례대로 세척하여 클로로필을 제거하였다. 70% glycerin으로 슬라이드 위에 올린 후 ultraviolet epifluorescence microscope를 사용하여 autofluorescence를 관찰하였다. *GmCaM-4*가 형질전환된 감자에서 병 저항성 연구를 위하여 국립식량과학원 고령지농업연구센터의 감자 포장에서 수확한 괴경에서 분리한 *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* (*Ecc*) 균주를 사용하였다(Chun et al. 2011). 이 균주는 LB 배지에서 28°C의 조건에서 24시간 동안 배양되었고 분광광도계를 이용하여 멸균수에서 5×10^8 CFU/ml의 농도의 미생물 현탁액을 사용하여 *GmCaM-4*가 형질전환된 식물체에 처리하였다.

결과 및 고찰

대두의 *GmCaM-4* 유전자를 이용한 감자 과발현 식물체 제작

대두 칼모듈린, GmCaM-4 단백질의 다양한 기능 및 기작은 잘 보고 되었다(Gifford et al. 2013). 그 결과를 바탕으로 다양한 작물에 환경저항성 증가를 위한 유전자의 활용에 관한 연구가 필요 할 것이다(Rao et al. 2014). 중요한 식량자원인 감자에 병 저항성을 증가시키기 위하여 *GmCaM-4* 유전자를 *Xho*I과 *Xba*I의 제한효소를 이용하여 *CaMV* 35S promoter를 가지고 있는 binary vector인 *pBin19* vector에 도입하였다(Fig. 1A). 이렇게 구축된 *pBin19-GmCaM-4* construct를 제작하고 *Agrobacterium tumefaciens*에 도입하여 국내에서 재배가 많이 되지만 무름병에 약한 감자품종(*Solanum tuberosum* L. cv.

Dejima)에 형질전환하여 121개체의 식물체를 확보하였다. 또한, vector (Control)가 형질전환된 감자와 비교하여, *GmCaM-4* 유전자의 발현정도를 분석하고자 재분화된 식물체에서 total RNA를 분리하고 *GmCaM-4* 유전자를 probe로 사용하여 northern blot을 수행하였다. 형질전환된 121개체의 감자 중에서 최종적으로 6개체를 선별하였고, 동일한 양의 RNA 전기영동 양상에 비교하여 T78과 T79 개체를 제외한 4개체에서 *GmCaM-4* 유전자의 발현이 잘 되고 있었다. 또한, T20과 T21 개체에서 *GmCaM-4* 유전자의 발현도가 가장 높음을 보였다(Fig. 1B). 그 결과는 대두의 *GmCaM-4* 유전자가 *CaMV* 35S promoter에 의해서 형질전환에 사용한 감자에서 발현이 잘 되고 있음을 보여 주는 결과이다.

GmCaM-4 유전자가 형질전환된 감자에서 병 저항성 관련 유전자들의 발현

GmCaM-4 유전자가 과발현된 담배와 애기장대에서 병 저항성에 관여하는 *PR* 유전자들의 발현이 증가됨을 보고하였다 (Heo et al. 1999; Park et al. 2004a). 본 연구에서 구축한 감자 형질전환 식물체에서 *PR* 유전자의 발현을 관찰하였다. *GmCaM-4* 유전자의 발현이 잘 되고 있는 4개 (T20, T21, T56, T80)의 감자 형질전환 식물체에서 분리한 RNA를 이용하여 northern blot을 수행하였다(Fig. 2). 사용된 probe는 Table 1의 primer를 사용하여 확보된 감자의 *Phenylalanine ammonia-lyase* (*PAL*), β -1,3-*glucanase* (*PR-2*), *Chitinase* (*PR-3*), *Thaumatic-like protein* (*acidic PR-5*), *Osmotin-like protein* (*basic PR-5*), 그리고 *Proteinase*

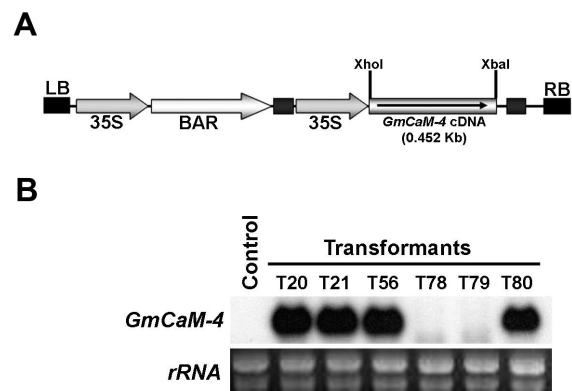


Fig. 1 Identification of *GmCaM-4* expression in transgenic potato plants. (A) Schematic representation of a binary vector that contains the *GmCaM-4* used for transformation. LB, left T-DNA border sequence; RB, right T-DNA border sequence; 35S, *CaMV* 35S promoter; Bar, bialaphos resistance gene. (B) Expression pattern of *GmCaM-4* mRNA in northern blot analysis. Transgenic potato plants transformed with *pBin19-GmCaM-4* (OX lines) and vector control (Control) were analyzed for *GmCaM-4* expression. Equal loading of RNA (20 μ g) in each lane was confirmed by pre-staining the gel with ethidium bromide as a loading control (lower; *rRNA*). RNA blots were probed with 32 P-labeled *GmCaM-4* cDNA

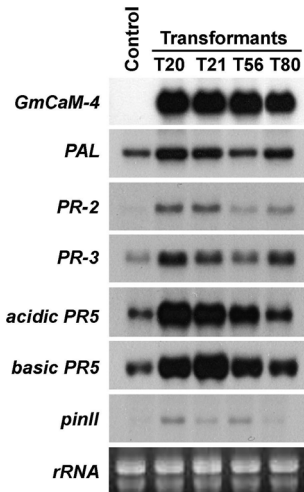


Fig. 2 Constitutive expression of defense-related genes in *GmCaM-4* transgenic potato plants. Total RNA was isolated from a control transgenic plant harboring an empty vector (Control) and four representative independent transgenic plants expressing the *GmCaM-4* gene. The endogenous levels of defense-related genes in transgenic potato plants were analyzed with northern blot analysis. rRNA was used as a loading control

*inhibitorII (pinII)*의 유전자들을 사용하였다. 대조구인 vector가 형질전환된 감자에서 PR 유전자들의 발현을 비교하여, 4개의 개체중에서 *GmCaM-4*의 발현율이 높은 T20과 T21의 식물체에서 PR 유전자들의 발현이 높았다. 그러므로, 감자에서 *GmCaM-4* 유전자의 과발현으로 인하여 PR 유전자들의 발현이 증가 된다는 결과를 시사하였다. 병 저항성 관련 유전자들의 발현율이 높은 두개체 (T20과 T21)의 감자 형질전환 식물체를 사용하여 표현형 및 병 저항성 실험을 수행하였다.

GmCaM-4 유전자가 과발현된 감자의 세포사멸 및 병 저항성 검정

최종적으로 형질전환된 감자에서 *GmCaM-4*의 기능을 통하여 PR 유전자들의 발현 증가는 다양한 병원균들로부터 방어작용을 수행하게 된다. 그와 같은 반응은 형질전환된 감자에 병원균을 처리하지 않은 상태의 앞에서 UV-excitable fluorescent materials로 구별이 가능한 초민감성 세포사멸의 분석을 통하여 확인 할 수 있다. Vector가 형질전환된 대조구와 비교하여 *GmCaM-4* 유전자의 발현이 높음에 따라 PR 유전자의 발현이 가장 높은 T20과 T21의 형질전환 감자의 앞에서 autofluorescence materials의 축적을 UV 필터를 이용하여 확인하였다(Fig. 3A). 그와 같은 결과는 미리 입력된 신호에 의하여 HR과 유사한 표현형을 나타냄으로써, 병 저항성의 획득을 의미한다. 본 연구를 통하여 얻어진 다양한 결과를 바탕으로 병원성 세균인, *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* (*Ecc*)를 국립식량과학원 고령지농업연구센터의 감자포장

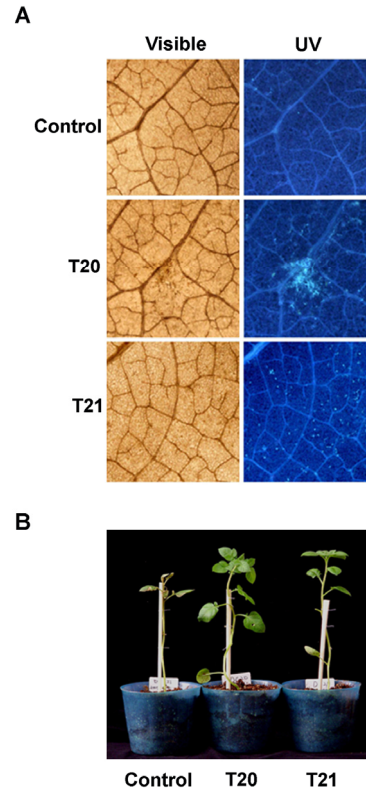


Fig. 3 Cell death phenotype and enhanced soft rot resistance in *GmCaM-4* transgenic potato lines. (A) Spontaneous micro-HR formation in *GmCaM-4* transgenic potato plants. Leaf tissues of transgenic potato plants expressing vector control (Control) and *GmCaM-4* (T20 and T21) were illuminated with white light (Visible) and ultra-violet light (UV) to detect autofluorescent materials. (B) Identification of disease resistance against *Erwinia carotovora* in *GmCaM-4* transgenic potato plants. Potato plants transformed with *pBin19-GmCaM-4* (T20 and T21) or vector control (Control) were inoculated with *Erwinia carotovora* (5×10^8 cfu per ml). The photograph of disease symptoms was taken after the incubation

에서 수확한 괴경으로부터 분리하여 대조군과 *GmCaM-4* 형질전환 식물체에 처리하여 병 저항성을 분석하였다. *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* (*Ecc*)는 식물의 무름병을 일으키며 주로 뿌리, 잎 등에 생긴 상처나 기공 등을 통하여 침입하는데 마늘, 양파, 감자 등에서 중요한 병원균으로 보고된다. Fig. 3B에서와 같이 대조군이 무름병에 의해 고사한 반면, T20과 T21 개체는 무름병에 저항성을 가질뿐만 아니라 새로운 잎이 생성됨을 보였다. 이전의 연구결과와 같이 감자에 발현된 *GmCaM-4* 유전자는 다양한 PR 유전자의 발현을 유도하고 최종적으로 병원균으로부터 저항성을 보인다.

적 요

급속한 산업화와 인구증가에 따른 심각한 환경과 식량문제는 인류의 생존을 위협하는 가장 중요한 현안문제로 대두되

고 있다. 또한, 인구 증가에 따른 식량부족을 해결하기 위하여 농약과 화학비료의 무분별한 사용으로 인하여 농토는 산성화되어 황폐화가 되고 있고 먹이사슬 및 자연생태계의 파괴는 더 많은 농약의 사용을 필요하고 있다. 과도한 농약 사용으로 경제적인 부담의 가중과 잔류 농약으로 인한 소비자의 건강을 위협하고 있다. 또한, 증가된 화석연료의 사용은 공기중의 이산화탄소를 증가시켜 지구 온도의 상승을 초래하고 있으며, 결과적으로 기상이변, 지구온난화 및 사막화 등의 심각한 환경문제를 초래했다. 특히, 서늘한 기온에서 잘 자라는 배추, 무우, 감자 등의 고령지 농작물의 질적인 저하를 초래하여 피해가 증가하고 있지만, 최근들어 감자와 같은 알칼리성 건강식품의 붐으로 수요가 증가되고 있다. 본 연구에서 환경스트레스에 관여하는 대두의 특이적인 칼모듈린, *GmCaM-4* 유전자를 감자에 과발현 시켜서 *PR* 유전자들의 발현이 지속적으로 유지되어 식물방어 기작이 활성화 되었음을 확인하였다. 또한, 그 형질전환 식물체는 초민 감성 세포사멸 현상을 보였고, 무름병을 일으키는 병원균인 *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* (*Ecc*)를 이용하여 *GmCaM-4*가 과발현된 감자에서 병 저항성이 증가하는 것을 확인 하였다. 최종적으로 지금까지 많이 연구되고 보고된 유전자원인 대두의 *GmCaM-4* 유전자를 활용하여 주요 식량자원인 감자에서 과발현 형질전환 식물체를 확보하여 다양한 병 저항성 증가를 통한 작물 생산성 향상에 매우 우수한 기술로 기대되는 바이다.

사 사

본 연구는 국립생태원의 기후변화 대응 구상나무의 분자생태학적 연구 과제(NIE-C-2020-15)와 농촌진흥청 차세대바이오그린21 사업 연구비(No. PJ01325401)의 지원으로 수행되었다.

References

- Bevan M (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res* 12:8711-8721
- Bouché N, Yellin A, Snedden WA and Fromm H (2005) Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annu Rev Plant Biol* 56:435-466
- Bush DS (1995) Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46:95-122
- Cheng SH, Willmann MR, Chen HC and Sheen J (2002) Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol* 129:469-485
- 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
- Chun HJ, Park HC, Goo YM, Kim TW, Cho KS, Cho HS, Yun D-J, 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
- Chung WS, Lee SH, Kim JC, Heo WD, Kim MC, Park CY, Park HC, Lim CO, Kim WB, Harper JF and Cho MJ (2000) Identification of a calmodulin-regulated soybean Ca^{2+} -ATPase (SCA1) that is located in the plasma membrane. *Plant Cell* 12:1393-1407
- Day IS, Reddy VS, Shad Ali G and Reddy AS (2002) Analysis of EF-hand-containing proteins in *Arabidopsis*. *Genome Biol* 3:RESEARCH0056
- Dietrich RA, Delaney TP, Uknes SJ, Ward ER, Rylas JA, Dangl JL (1994) *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell* 77:565-577
- Dixon RA, Harrison MJ and Lamb CJ (1994) Early events in the activation of plant defense responses. *Annu Rev Phytopathol* 32:479-501
- Gifford JL, Jamshidiha M, Mo J, Ishida H, Vogel HJ (2013) Comparing the calcium binding abilities of two soybean calmodulins: towards understanding the divergent nature of plant calmodulins. *Plant Cell* 25:4512-4524
- Goo YM, Chun HJ, Kim T-W, Lee CH, Ahn MJ, Bae SC, Cho KJ, Chun JA, Chung CH and Lee SW (2008) Expressional characterization of dehydroascorbate reductase cDNA in transgenic potato plants. *J Plant Biol* 51:35-41
- Goodman RN and Novacky AJ (1994) The hypersensitive reaction in plants to pathogens: a resistance phenomenon. APS Press, St. Paul, MN
- 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
- Hoeflich KP and Ikura M (2002) Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell* 108:739-742
- Jackson AO and Tayler CB (1996) Plant-microbe interactions: life and death at the interface. *Plant Cell* 8:1651-1668
- Kim MC, Chung WS, Yun D-J and Cho MJ (2009) Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants. *Mol Plant* 2:13-21
- 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
- Korea Meteorological Administration (2008) Report of Global Atmosphere Watch. Seoul, Korea. pp177
- 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 and 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
- Luan S, Kudla J, Rodríguez-Concepción M, Yalovsky S and Gruissem W (2002) Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell* 14 Suppl.:S389-S400
- McAinsh MR and Hetherington AM (1998) Encoding specificity in Ca²⁺ signaling systems. *Trends Plant Sci* 3:32-36
- McAinsh MR and Pittman JK (2009) Shaping the calcium signature. *New Phytol* 181:275-294
- 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 (2004a) 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, Kim ML, Kang YH, Jeon JM, Yoo JH, Kim MC, Park CY, Jeong JC, Moon BC, Lee JH, Yoon HW, Lee S-H, Chung WS, Lim CO, Lee SY, Hong JC and Cho MJ (2004b) Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. *Plant Physiol* 135:2150-2161
- Park HC, Kim ML, Kang YH, Jeong JC, Cheong MS, Choi W, Lee SY, Cho MJ, Kim MC, Chung WS and Yun D-J (2009) Functional analysis of the stress-inducible soybean calmodulin isoform-4 (*GmCaM-4*) promoter in transgenic tobacco plants. *Mol Cells* 27:475-480
- Park HC, Kim ML, Kim HS, Park JH, Jung MS, Shen M, Kang CH, Kim MC, Lee SY, Cho MJ, Chung WS and Yun D-J (2010) Specificity of sequences recognized by the Zinc finger homeodomain protein, GmZF-HD1 in soybean. *Phytochemistry* 71:1832-1838
- Park HC, Kim ML, Lee SM, Bahk JD, Yun D-J, Lim CO, Hong JC, Lee SY, Cho MJ and Chung WS (2007) Pathogen-induced binding of the soybean zinc finger homeodomain proteins GmZF-HD1 and GmZF-HD2 to two repeats of ATTA homeodomain binding site in the calmodulin isoform 4 (*GmCaM4*) promoter. *Nucl Acids Res* 35:3612-3623
- Poovaiah BW, Takezawa D, An G and Han TJ (1996) Regulated expression of a calmodulin isoform alters growth and development in potato. *J Plant Physiol* 149:553-558
- Rao SS, El-habbak MH, Havens WM, Singh A, Zheng D, Vaughn L, Haudenschild JS, Hartman GL, Korban SS, Ghabrial SA (2014) Overexpression of GmCaM4 in soybean enhances resistance to pathogens and tolerance to salt stress. *Mol Plant Pathol* 15:145-160
- Reddy AS (2001) Calcium: silver bullet in signaling. *Plant Sci* 160:381-404
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willitis MG, Molina A, Steiner HY and Hunt MD (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8:1809-1819
- Snedden WA and Fromm H (1998) Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends Plant Sci* 3:299-304
- Snedden WA and Fromm H (2001) Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. *New Phytol* 151:35-66
- Sohn H, Cho K, Cho J, Gwon O, Cheon C, Choi J, Chung W and Lee SW (2012) Agronomic characteristics and field resistance to bacterial soft rot of transgenic potato overexpressing the soybean *calmodulin* 4 gene (*SCaM4*). *J Plant Biotechnol* 39:295-299
- 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
- The Arabidopsis Genome Initiative (2002) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796-815
- Visser RGF, Jacobsen E, Hesselting-Meinders A, Schans MJ, Witholt B and Feenstra WJ (1989) Transformation of homozygous diploid potato with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system by adventitious shoot regeneration on leaf and stem segments. *Plant Mol Biol* 12:329-337
- 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 and poovaiah BW (2003) Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends Plant Sci* 8:505-512
- 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
- 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
- Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53:247-273