

고추 유전자변형체 후대 생육특성 검정

권태룡, 이문중, 한중술¹, 신동현², 오중열³, 김경민³, 김창길^{3*}

경북농업기술원, ¹원예연구소, ²경북대학교 식물생명과학부, ³경북대학교 환경원예학과

Characteristic of Progeny in Pepper Transformants

Tae-Ryong Kwon, Moon-Jung Lee, Jung-Sul Harn¹, Dong Hyun Shin²,
Jung-Youl Oh³, Kyung-Min Kim³ and Chang Kil Kim^{3*}

Gyeongbuk Agricultural Technology Administration, Daegu 702-708, Korea

¹National Horticultural Research Institute, Rural Development Administration, Suwon 441-440, Korea

²Department of Agronomy, College of Agriculture and Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

³Department of Environmental Horticulture, Kyungpook National University, Sangju 742-711, Korea

Abstract - For the resistance test for *Phytophthora blight* of T₁ and T₂ transformants in pepper, *Phytophthora blight* fungus was inoculated to seedlings of the T₁ and T₂ transformants by concentration (density: zoospore 10³/ml). Occurrence rate of blight at 5days after inoculation was 4.0 % in T₁-1 line and 10.0% in T₁-2 line, and its rate for 12 days after inoculation was 52.0% in T₁-1 line, 64.0% in T₁-2 line, respectively. Therefore, the lower occurrence rate to blight was enable to select resistant transformants in the some inoculation density (zoospore 10³/ml), meanwhile 'Kumtap' and 'Subicho' were 100% in highest occurrence rate to blight. For field test, in which blight was commonly occurred, of the Youngyang Pepper Experiment Station, the acquired transformant resisting to blight was similar to characteristics of domestic varieties, 'Subicho' for fruit shape, but there are some differences in growth, days to flowering, fruit characteristics. Occurrence of blight in T₂-1-6, and T₂-4-9 lines was smaller approximately 30% than commercial varieties, 'Kumtap', although occurrence of blight in field was showed higher difference among tested lines. In this study, we concluded that the transformants showing blight resistance selected from habitual field could be fixed at every generation, and the developed transformation system was also considered to develop transformants in pepper.

Key words - Red pepper, *Phytophthora blight*, Transformation, Disease resistance, Field test

서 언

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(1984)은 3개의 유전자가 관여한다고 하였다. 그리고 교잡육종법에 의한 역병 저항성 품종 개발 연구가 많이 시도되었으나 아직 실용 가능한 결과가 나오

지 않고 있고, 고추의 역병균에 대한 저항성의 차이는 고추가 *Phytophthora blight* 병균에 감염되었을 때 식물체내에서 생성 또는 축적되는 항균성물질인 phytoalexins에 기인한다는 보고가 많이 있다(Back *et al.* 1998). 이와같은 현상은 고추뿐만 아니라 담배 및 벼 등에서도 일어난다고 알려져 있다(Hain *et al.* 1993). 최근 phytoalexin의 생합성 기작이 밝혀지고, 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(Shah *et al.*, 1986), 바이러스(Harrison *et al.*, 1987; Powell-Abel *et al.*, 1986; Yu *et al.*, 1996)에 대한 저항성을 도입한 농작물의 개발을 위한 많은 연구가 시도되고 있다. Elicitins은 *Phytophthora*속의 균들이 분비하는 작은 단백질(10kDa)이며,

*교신저자(E-mail) : cckim@knu.ac.kr

담배의 *Phytophthora*에 대한 저항성을 나타내는 역할을 하는 것으로 알려져(Huet *et al.*, 1994) 있고, Kamoun 등(1993)이 처음으로 *Phytophthora paracitica*로부터 *elicitin* gene을 클로닝하였다. 따라서 본 연구는 고추의 역병저항성 품종 개발을 위하여 *Agrobacterium*법으로 역병저항성 유전자를 고추에 형질전환하여 형질전환체를 획득 하여(Kwon *et al.*, 2007), 고추 재배에서 가장 큰 문제인 역병피해를 줄일 수 있는 저항성 품종을 육성하기 위해서 역병저항성 유전자가 형질전환 개체로 확인된 T_0 로부터 종자를 수확하여 T_1 과 T_2 세대의 유묘접종 및 포장 검정을 통하여 고추의 신품종 육성을 위한 기초자료로 제공하고 자 수행하였다.

재료 및 방법

T_1 과 T_2 의 식물재료 및 형질전환체의 특성 조사

형질전환에 이용된 벡터는 pBI101에 *cyc600-syna* promotor가 구조화된 것에 Yin 등(1997)에게 분양받은 *elicitin* 유전자가 삽입하여 *Agrobacterium*(LBA4404/pBI101 *cyc 600-syna-elicitin*) 균주를 이용하여 형질전환에 사용하였다(Kwon *et al.*, 2007). ‘수비초’에 *elicitin* 유전자를 이용한 고추역병 저항성 형질전환체는 T_0 에서 형질전환체가 확인된(Kwon *et al.*, 2007) 개체에서 얻은 종자 T_1 5계통과 T_1 에서 형질전환체로 확인된 T_2 종자 4계통의 종자를 배노람수화제 200 배액에서 1시간 소독 후 침종하여 전열선이 설치된 온실에 파종하여, 약 20일 후 원조믹스 상토로 충진된 25공 포트에 본엽이 2~3매 전개 된 고추 묘를 가식하여 하우스에서 육묘하였다. T_1 과 T_2 형질전환체 고추의 생육특성은 농촌진흥청 신품종 심사를 위한 특성조사요령과 농사시험 표준조사방법에 준하여 초장은 지제부에서 최장엽단까지의 길이, 주경장은 지제부에서 제1화방까지의 길이, 경경은 지제부 줄기의 직경을 조사하였다. 과특성에 있어서 과육두께는 성숙과의 중간부위, 과장은 과탁으로부터 과정단까지의 길이, 과경은 과실의 최대 직경을 조사하였다.

역병저항성 검증

역병 저항성 검정을 위한 식물재료는 대조구인 ‘수비초’와 ‘금탑’을 이용하였고, 역병균 접종은 역병균(*Phytophthora capsici*)을 potato dextrose agar(PDA) 배지에 5일간 배양한 후 직경 5mm 균층을 petri dish에 분주한 V8배지(V8 주스 200mL + agar 20g + 증류수 800ml)에 이식하여 28°C에서 14시간 배양하였으며, 유주포자낭을 형성하기 위해 실내(20±1°C)에서 5일간 배양한 후 배지 표면에 살균수를 가하여 유주포자낭 현탁액을 만든 다음, 7°C에서 1시간, 실온에서 3시간 경과 시킨 후에 유주포자낭으로부터 방출된 유주포자를 혈구계측기

로 계수하여 유주포자 현탁액을 $10^3 \sim 10^5$ 개/ml 농도로 조정하여 사용하였다. 역병의 접종은 3월 30일에 본엽 4~5매시기의 고추 묘에 역병 유주포자 농도별로 주당 5ml를 관주하고 2일간 습실처리를 하였다(Fig. 1A). 접종 5일, 12후에 역병 발병률을 2회 조사하였다. 포장시험은 경상북도농업기술원 영양고추시험장 포장에서 수행하였다. 포장준비는 정식 2주전에 비료 및 석회, 퇴비를 포장에 사용한 후 정식하였다. 시비량은 N-P-K-석회-퇴비 = 190-112-149-750-30,000kg/ha로 하여 P, 석회, 퇴비는 전량기비로 N, K는 30% 기비, 70%는 추비로 정식 후 30일후부터 25일 간격으로 4회 사용하였다. 재배방법은 재식거리 160×40cm, 2열이며, 비배관리 및 병해충방제는 일반 농가재배관리에 준하며, 8월 역병 발생 및 본포생육을 농사시험연구 표준조사방법에 기준하여 조사하였다.

결과 및 고찰

고추 형질전환체 T_1 및 T_2 세대의 유묘에 역병접종시 발병율은 역병균을 유주포자 농도별로 접종한 결과 대비종인 ‘수비초’와 ‘금탑’은 접종 5일후 각각 80~100%, 20~80% 발병하였고, 접종 12일후에는 유주포자 10^3 개/ml에서 역병 발생이 100%이었다. 형질전환체는 유주포자 10^5 개/ml에서 접종 5일후 역병발병율은 T_1 -1 계통과 T_1 -2 계통이 각각 56.0%와 68.9%이었지만, 접종 12일후는 모든 계통에서 고사하였다. 유주포자 10^4 개/ml에서 접종 5일 후 T_1 -1 계통 4.0%, T_1 -2 계통 10.0%로 10^5 개/ml보다 발병율이 낮았지만, 접종 12일후에는 유주포자 10^6 개/ml와 같이 고사하였다. 유주포자 10^3 개/ml에서 접종 5일후 역병 발병율은 T_1 -1 계통 4.0%, T_1 -2 계통 10.0%이었으며, 접종 12일후는 T_1 -1 계통 52.0%, T_1 -2 계통 64.0%로 대비종인 ‘금탑’과 ‘수비초’ 100%에 비해 발병율이 낮았다. 이상의 결과 역병 형질전환체의 유묘 검정시 유주포자 10^5 개/ml에서는 시기별 발병정도는 차이가 있었지만 형질전환의 유무에 관계없이 모두 고사하였다. 유주포자 10^3 개/ml에서는 형질전환체의 저항성 계통선발이 가능하였다(Fig. 1B).

Elicitin gene을 이용한 역병 저항성 형질전환체를 영양고추 시험장의 역병 상습발병포장에서 재배하였다(Fig. 2A). 형질전환체의 생육특성은(Table 1) 초장 58.2~68.4cm, 초폭 53.4~68.0cm, 주경장 12.6~23.2cm, 경경 10.4~18.5mm로 계통간에는 다소 차이가 있었다. 1화방의 꽃이 80%개화까지의 일수인 개화소요일수는 T_1 -5 계통이 91일로 가장 빨랐고, T_2 -3-7 계통이 119일로 늦었다. 측지수는 8.0~9.3개로 많았다. 또한 Fig. 2B에서와 같이 형질전환 T_1 -1 계통과 대조구인 ‘금탑’의 포장 역병저항성 검증 실험으로 T_1 -1이 대조구인 ‘금탑’보다 역병저항성이 있는 것으로 나타났다. 과특성을 보면(Table 2,

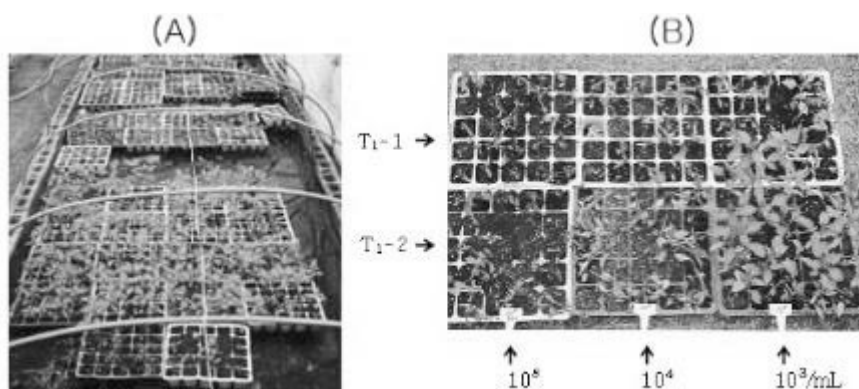


Fig. 1. Root rot of red pepper transformant after inoculation with *phytophthora capsici* in seedling. A: Overview of inoculation house with phytophthora blight in transgenic red pepper. B: Root rot of transgenic red pepper after inoculation with *phytophthora capsici* zoospores at different concentration level.



Fig. 2. Root rot of transgenic red pepper in field. A: Overview of field for *Phytophthora blight* in red pepper. B: Root rot of transgenic red pepper line T1-1 (left vertical-line) and 'Kumtap' (right vertical-line) in field.

Table 1. Growth characteristics of transgenic red pepper in field

| Transgenic line | Days to flower (day) | Plant height (cm) | Plant width (cm) | Stem length (cm) | Stem diameter (mm) | No. laterl branch (ea) |
|---------------------|----------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|------------------------|
| T ₁ -1 | 98 ^{bc*} | 58.2 ^b | 68.0 ^a | 12.6 ^b | 13.6 ^{ab} | 8.8 ^a |
| T ₁ -2 | 98 ^{bc} | 58.2 ^b | 53.7 ^c | 14.2 ^{ab} | 10.4 ^b | 9.2 ^a |
| T ₁ -3 | 117 ^a | 64.9 ^{ab} | 60.6 ^{abc} | 19.5 ^{ab} | 13.5 ^{ab} | 8.9 ^a |
| T ₁ -4 | 104 ^{abc} | 60.3 ^{ab} | 54.5 ^{bc} | 15.3 ^{ab} | 12.1 ^{ab} | 9.3 ^a |
| T ₁ -5 | 91 ^c | 60.4 ^{ab} | 53.4 ^c | 16.5 ^{ab} | 18.5 ^a | 9.0 ^a |
| T ₂ -1-6 | 106 ^{abc} | 64.6 ^{ab} | 62.0 ^{abc} | 18.2 ^{ab} | 11.5 ^{ab} | 8.8 ^a |
| T ₂ -3-7 | 119 ^a | 68.4 ^a | 66.0 ^{ab} | 23.2 ^a | 12.6 ^{ab} | 8.0 ^a |
| T ₂ -5-8 | 106 ^{abc} | 63.6 ^{ab} | 60.0 ^{abc} | 15.5 ^{ab} | 11.4 ^{ab} | 8.8 ^a |
| T ₂ -4-9 | 108 ^{ab} | 68.4 ^a | 63.0 ^{abc} | 15.0 ^{ab} | 11.4 ^{ab} | 8.6 ^a |
| average | 105.2 | 63.0 | 68.0 | 16.7 | 12.8 | 8.8 |

*In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Table 2. Characterization of fruit in red pepper transformants

| Transgenic line | Fruit receptacle | Fruit length (cm) | Fruit diameter (mm) | Fruit thickness (mm) | Fruit dry weight (g/ea) |
|---------------------|------------------|--------------------|---------------------|----------------------|-------------------------|
| T ₁ -1 | Cup type | 9.6 ^{ab} | 16.6 ^a | 1.87 ^{ab} | 1.4 ^{bc} |
| T ₁ -2 | Cup type | 10.4 ^{ab} | 16.7 ^a | 1.80 ^{abc} | 1.5 ^{bc} |
| T ₁ -3 | Cup type | 8.2 ^{ab} | 16.1 ^{ab} | 1.60 ^{abc} | 1.2 ^{bc} |
| T ₁ -4 | Cup type | 7.7 ^{abc} | 13.1 ^{bc} | 1.60 ^{abc} | 1.1 ^c |
| T ₁ -5 | Cup type | 11.6 ^a | 15.9 ^{ab} | 1.91 ^{ab} | 1.9 ^a |
| T ₂ -1-6 | Cup type | 10.4 ^{ab} | 16.3 ^{ab} | 2.02 ^{ab} | 1.7 ^{bc} |
| T ₂ -3-7 | Cup type | 7.4 ^{abc} | 13.4 ^{bc} | 1.83 ^{ab} | 1.6 ^{bc} |
| T ₂ -5-8 | Cup type | 9.8 ^{ab} | 14.6 ^{abc} | 1.92 ^{ab} | 1.3 ^{bc} |
| T ₂ -4-9 | Cup type | 10.0 ^{ab} | 16.2 ^{ab} | 2.05 ^a | 1.4 ^{bc} |
| average | - | 9.5 | 15.4 | 1.84 | 1.5 |

*In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

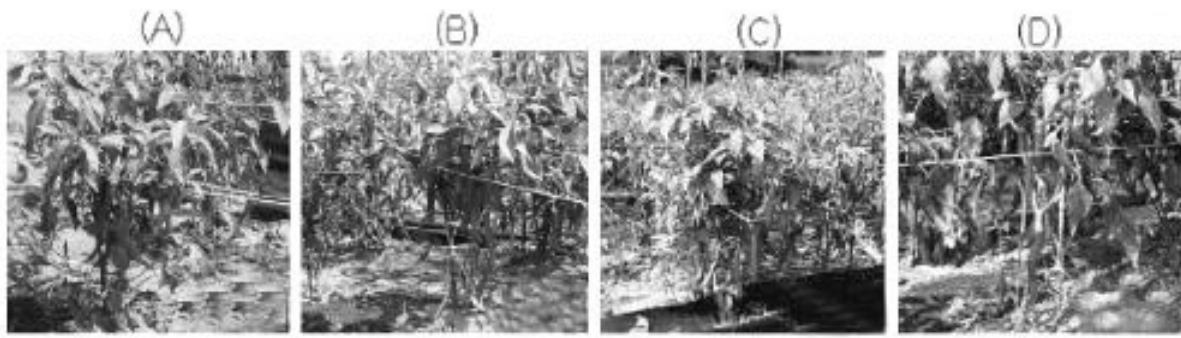


Fig. 3. Growth and fruit characteristics of selection line for *Phytophthora blight* at transgenic red pepper in field. A: T₁-1, B: T₁-2, C: T₂-1-6, D: T₂-4-9.

Table 3. Root rot of transgenic red pepper in field

| Cultivars & transgenic line | Root rot (%) | | |
|-----------------------------|--------------|--------|---------|
| | Jul. 5* | Aug. 3 | Sep. 20 |
| T ₁ -1 | 4.2 | 50.0 | 66.7 |
| T ₁ -2 | 8.3 | 35.4 | 54.2 |
| T ₁ -3 | 8.3 | 87.5 | 95.8 |
| T ₁ -4 | 8.3 | 70.8 | 95.8 |
| T ₁ -5 | 0.0 | 58.3 | 91.7 |
| T ₂ -1-6 | 14.6 | 45.8 | 68.8 |
| T ₂ -3-7 | 8.3 | 70.8 | 91.7 |
| T ₂ -5-8 | 11.9 | 71.4 | 88.1 |
| T ₂ -4-9 | 8.3 | 52.1 | 68.8 |
| Kumtap | 16.7 | 79.2 | 95.8 |

*Date of enumeration.

Fig. 3), 과장 7.4~11.6cm, 과경 13.1~16.7mm, 과육두께가 1.60~2.05mm이었으며, 1건과중은 1.1~1.9g으로 계통간에 차이가 있었다. 과탁형은 모두 컵형이었다. 측지수가 많고, 과탁이 컵형인 것과 과실모양 등이 수비초와 매우 유사하였다. 포장에서의 역병의 발생은(Table 3) 계통 간에 차이가 많았으며, T₂-1-6, T₂-4-9 계통들은 시판종인 ‘금탑’에 비해 약 30%정도 적었다. Yu 등(1996)이 항바이러스성고추 품종을 육종하기 위하여 TMV-OM strain의 Cp gene을 조직절편체배양을 통하여 형질전환실험을 수행하여 분자생물검정으로 성공적으로 형질전환체고추가 만들어 진 것이라고 보고하고 있지만, field에서 항 TMV의 확인 후 육종모본고추로 실용화가능성을 확인하지는 못한 결과보다, 본 실험의 연구결과가 더욱더 진전된 결과로 생각된다. 그리고 본 실험의 결과로 역병 균주의 유묘접종 및 포장시험에서 형질전환체가 비형질전환체에 비해 역병의 발생이 낮았다. 또한 Anand 등(2003)은 밀의 형질전환체를 획득한 후 목적의 유전자가 호모화하여 전체 식물체에서 발현하기 위해서는 T₁세대까지 육성해야 한다고 보고하고 있다. 따라서 본 연구에서도 포장에서 선발된 형질전환체는 세대 진전을 통한 저항성의 고정이 필요한 것으로 판단되었다.

적 요

고추 형질전환체 T₁ 및 T₂세대의 유묘에 역병균을 접종한 결

과 유주포자 10³개/mL에서 접종 5일후 역병 발병율은 T₁-1계통 4.0%, T₁-2 10.0%이었으며, 접종 12일후는 T₁-1 계통 52.0%, T₁-2 계통 64.0%로 대비종인 ‘금탑’ 과 ‘수비초’ 100%에 비해 발병율이 떨어져 유주포자 10³개/mL에서는 형질전환체의 저항성 계통선발이 가능하였다. 획득된 역병 저항성 형질전환체를 영양고추시험장의 역병 상습포장에서 재배한 결과 생육, 개화소요일수, 과특성 등은 계통간에 다소 차이가 있었으나, 과실모양은 수비초와 매우 유사하였다. 포장에서의 역병의 발생은 계통간에 차이가 많았으며, T₂-1-6 계통과 T₂-4-9 계통은 시판종인 금탑에 비해 약 30%정도 적었다. 포장에서 선발된 형질전환체는 세대의 진전을 통한 저항성의 고정이 필요한 것으로 판단된다. 이상의 결과로 본 연구에서 확립된 형질전환 시스템으로 고추의 역병저항성 형질전환체의 육성이 가능할 것으로 생각된다.

인용문헌

- An, G. 1987. Binary Ti vector for plant transformation and promoter analysis. *Methods in Enzymology* 153: 292-305.
- Anand A., H.N. Trick, B.S. Gill and S. Muthukrishnan. 2003. Stable transgene expression and random gene silencing in wheat. *Plant Biotechnology J.* 1: 241-251.
- Back, K., S. He, K.U. Kim and D.H. Shin. 1998. Cloning and bacterial expression of sesquiterpene cyclase, a key branch point enzyme for

- the synthesis of sesquiterpenoid phytoalexin capsidiol in UV-challenged leaves of *Capsicum annuum*. Plant Cell Physiol. 39: 506-509.
- Barksdale, T.H., G.S. Papavizas and S.A. Johnston. 1984. Resistance to foliar blight and crown rot of pepper caused by *Phytophthora capsici*. Plant Disease 68: 506-509.
- Gil Ortega, R., C. Palazon Espanol and J. Cuartero Zueco. 1991. Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the pepper line 'SCM-334'. Plant Breeding 107: 50-55.
- Hain, R., H.J. Reif, E. Krause, R. Langebartels, H. Kindl, B. Vornam, W. Wiese, E. Schmelzer, P.H. Schreier and R.H. Stocker. 1993. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. Nature 361: 153-156.
- Harrison, B.D., M.A. Mary and D.C. Baulcombe. 1987. Virus resistance in transgenic plant that express cucumber mosaic satellite RNA. Nature 328: 799-802.
- Huet, J.C., M. Salle-Tourne and J.C. Pernollet. 1994. Amino acid sequence and toxicity of the alpha elicitor secreted with ubiquitin by *Phytophthora infestans*. Mol. Plant Microbe. Interact. 7: 302-304.
- Horsch, R.B., J.E. Fry, N.L. Hoffmann, M. Wallroth, D. Eichholt, S.C. Rogers and R.T. Fraley. 1985. A simple and general method from transferring genes into plants. Science 227: 1229-1231.
- Kamoun, S., K.M. Klucher, M.D. Coffey and B.M. Tyler. 1993. A gene encoding a host-specific elicitor protein of *Phytophthora parasitica*. Mol. Plant Microbe. Interact. 6: 573-581.
- Kimble, K.A. and R.G. Grogan. 1960. Resistance to *Phytophthora* root rot in pepper. Plant Dis. Rep. 44: 872-873.
- Kwon, T.R., M.J. Lee, J.S. Harn, D.H. Shin, J.Y. Oh, K.M. Kim and C.K. Kim. 2007. *Agrobacterium-mediated* genetic transformation of pepper for the development of blight resistant cultivar. J. Plant Biotechnol. 34: 55-59.
- Leonian, L. H. 1922. Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. Nov. Phytophthology 12: 401-408.
- Powell-Abel, P., R.S. Nelson, B.N. Hoffman, S.G. Rogers, R.T. Fraley and R.N. Beschy. 1986. Delay of Disease development in transgenic plant that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. Science 232: 758-743.
- Shah, D.M., R.B. Horsh, H.H. Klee, G.M. Kishore, J.A. Winter, N.E. Turner, C.M. Hiromaka, P.R. Sanders, C.S. Gusser, S. Aykent, N.R. Siegal, S. Roger and R.T. Franley. 1986. Engineering herbicide tolerance in transgenic plant. Science 233: 478-481.
- Smith, P.G., K.A. Kimble, R.G. Grogan and A.H. Millett. 1967. Inheritance of resistance in pepper to *Phytophthora* root rot. Phytophthology 57: 377-379.
- Yin, S., L. Mei, J. Newman, K. Back and J. Chappell. 1997. Regulation of sesquiterpene cyclase gene expression. Characterization of an elicitor-and pathogen-inducible promoter. Plant Physiol. 115: 437-451.
- Yu, S.N., K.M. Bae and P.O. Lim. 1996. Transformation of TMV-OM strain coat protein gene in *Capsicum annuum* L. for viral disease resistance. Kor. J. Breeding 28: 85-91.

(접수일 2008. 3. 9; 수락일 2008. 8. 5)