

체세포배발생에 의한 *IbOr* 유전자 형질전환 카사바 개발

김선하 · 김명덕 · 박성철 · 정재철 · 이행순 · 곽상수

Development of transgenic cassava plants expressing *IbOr* gene by somatic embryogenesis

Sun Ha Kim · Myoung Duck Kim · Sung-Chul Park · Jae Cheol Jeong · Haeng-Soon Lee · Sang-Soo Kwak

Received: 9 March 2015 / Revised: 20 March 2015 / Accepted: 20 March 2015
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is a useful root crop for food, animal feed and various industrial materials including biofuel. Despite of its importance as an industrial crop, the genetic engineering approaches to manipulate transgenic plant development in cassava are limited. In this study, to develop new cultivar with high level of carotenoids and enhanced tolerance to environmental stresses, sweetpotato *IbOr* gene involved in accumulation of carotenoids was introduced into an Indonesian IDB high-yielding cassava cultivar under the control of oxidative stress-inducible *SWPA2* promoter through *Agrobacterium*-mediated transformation of friable embryogenic calli. The 19 transgenic lines were successfully generated on the basis of gDNA-PCR and *IbOr* transcript levels for further characterization in terms of carotenoid contents and environmental stresses. Therefore, *IbOr* transgenic cassava plants may be developed for enhanced biomass production with high levels of carotenoids on marginal lands.

Keywords cassava, *IbOr* gene, *SWPA2* promoter, carotenoid, oxidative stress

[†]These authors contributed equally to this work.

S. H. Kim[†] · S.-C. Park · J. C. Jeong · H.-S. Lee · S.-S. Kwak (✉)
한국생명공학연구원 식물시스템공학연구소
(Plant Systems Engineering Research Center, Korea Research
Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon
305-806, Korea)
e-mail: sskwak@kribb.re.kr

M. D. Kim[†]
국립한경대학교 유전공학연구소
(Institute of Genetic Engineering, Hankyong National
University (HNU), Anseong 456-749, Korea)

서론

카사바(*Manihot esculenta* Crantz)는 열대 아열대지역 뿌리 작물로 아프리카, 동남아시아, 일부 남아메리카에서 연간 2억톤 이상 생산되고 있다(FAO 2010). 그러나 재배장소에 따라 생산량의 차이가 심하고 재배 시 비료요구량이 크고 연작피해가 크다(Hillocks et al. 2002; Ziska et al. 2009). 카사바가 좋은 탄수화물작물이지만 비타민A, 철, 아연 같은 필수 무기영양분이 적어 아프리카, 아시아의 주식으로 이용하기에는 영양적 한계가 있다(FAO 2010). 실제로 개발도상국의 약 800만명의 어린이와 노약자가 필수 무기양분 결핍으로 고통 받고 있고 아프리카 5세 이하 어린이의 50%가 비타민A 부족으로 인한 야맹증, 면역결핍 등의 질병으로 고통 받고 있다(Cunningham and Gantt 1998; WHO 2009; Adenle et al. 2012). 따라서 카사바를 식량, 에너지원 등 산업적으로 활용하기 위해서는 영양적 기능을 높이고 환경스트레스에 강한 카사바 개발이 필요하다(Ferreira et al. 2008; Beltrán et al. 2010; Welsch et al. 2010; Giuliano 2014).

주황-황색계열의 카로티노이드는 식물의 세포내 plastid에서 합성되는 광합성 보조색소로서 광 흡수에 관여하고 과도한 광으로부터 세포를 보호한다. 체내에 섭취된 카로티노이드는 시각색소인 rhodopsin과 retinal로 전환되며 조직의 성장, 분화조절 등 생리활성기능을 갖는다. Vitamin A를 합성할 수 없는 인간과 동물은 음식을 통해 얻은 카로티노이드를 vitamin A의 전구체로 이용한다. 최근 Kim 등(2013)은 황색고구마로부터 *IbOrange* (*IbOr*) 유전자를 분리하여 백색고구마 배양세포에 과발현 하였을 때, β -carotene 뿐만 아니라 α -carotene, lutein, β -cryptoxanthin, zeaxanthin 등의 카로티노이드 함량이 증가 하고, 강한 염 스트레스 저항성을 가지는 것을 보고하였다(Kim et al 2013). 또한 자색 고구마,

감자 등 다양한 작물에 *IbOr*을 영양적 기능성과 다양한 환경스트레스내성을 위한 분자유종에 도구로서 이용하고 있다(Park et al. 2015; Goo et al. 2015).

카사바 분자유종에 대한 시도는 Lopez 등(2004)에 의해 약 57,000개의 카사바 unigene data가 발표된 이래로 Bull 등(2009)과 같은 많은 연구자들이 카사바 모델종인 TMS60444를 사용하여 friable embryogenic calli (FEC)를 이용한 *Agrobacterium* 형질전환 방법들이 개발되고 있다(Lopez et al. 2004; Ferreira et al. 2008; Bull et al. 2009; Zhang et al. 2010). 또한 Welsch 등(2010)이 카로티노이드 생합성 경로의 주요유전자인 *phytoene synthase (PSY)* 유전자의 single nucleotide polymorphism (SNP)에 의해 노란 카사바가 카로티노이드를 축적함을 밝힌 이후 카사바 카로티노이드 생합성 경로의 다양한 유전자들이 분리되고 이를 이용한 대사공학도 시도되고 있다(Welsch et al. 2010). 최근에는 Xu 등(2014)이 cytosolic superoxide dismutase (SOD), 카사바 *MeCu/ZnSOD*와 ascorbate peroxidase (APX)를 동시발현 시킨 형질전환 카사바를 개발하여 산화와 저온스트레스에 대한 내성을 증가시킨 카사바가 보고되었다(Xu et al. 2014).

본 연구에서는 산화스트레스 유도성 퍼옥시다제 *SWPA2* 프로모터 조절 하에 인도네시아 IDB사가 개발한 다수확 카사바 품종에 카로티노이드 축적에 관련된 고구마 *IbOr*유전자를 고발현시켜 카로티노이드 함량뿐만 아니라 고염분, 건조 등 스트레스내성이 증가된 형질전환 카사바를 개발하고자 하였다(Kim et al. 2003; Lu et al. 2006; Kim et al. 2011; Kim et al. 2013). 이를 위하여 IDB회사에서 개발한 다수확 카사바 품종의 체세포배발생 시스템을 확립하여 *Agrobacterium* 매개로 *IbOr* 고발현 형질전환 카사바를 제조하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 생육조건

카사바는 인도네시아 IDB사에서 개발한 다수확 카사바 품종을 분양 받아 온실에서 재배하며 실험에 사용하였다. 카사바의 액아 부분이 포함된 줄기를 2 cm 정도 잘라 70% ethanol에서 1분간 교반하면서 살균한 후, 5% sodium hypochlorite 용액에서 30분간 표면살균 하였다. 살균한 줄기는 멸균수로 5회 세정한 후, 멸균된 filter paper에 옮겨 물기를 제거하고 식물생장실로 옮겨 25°C 장일조건(낮 16시간, 밤 8시간)에서 증식하였다.

캘러스 유도 배지 조성

캘러스 유도배지는 기내에서 증식된 식물체의 미성숙 잎 절편 또는 액아의 분열조직을 2 mM CuSO₄, 12 mg/L picloram,

2% sucrose가 함유된 MS배지(Murashige and Skoog 1962)에서 4주간 암 배양(25±2°C)하였다. 유도된 캘러스는 12 mg/L picloram, 2% sucrose가 포함된 GD배지(Gresshoff and Doy 1974)에서 암 조건으로 4주간 배양한 다음 동일한 새 배지에 계대하여 4회 이상 4주간 배양하였다.

IbOr 발현벡터 제작

고구마로부터 분리한 *IbOr* (Genbank accession no. HQ828087) 유전자를 도입하여 카로티노이드를 생산하는 카사바 식물체를 개발하고자 발현벡터를 제작하였다(Kim et al. 2013). *pCAMBIA 2300-Nos* 벡터에 *SWPA2* promoter를 *HindIII*와 *XbaI*로 도입하여 *SWPA2::pCAMBIA2300*을 제작한 다음 *IbOr* (924 bp)을 *XbaI*과 *SacI*로 도입하여 *SWPA2::IbOr*을 완성하였고 *A. tumefaciens* strain EHA105에 freeze-thaw method을 통하여 형질전환 하였다.

Agrobacterium 매개 형질전환 및 PCR 확인

카사바 식물체 액아 분열조직으로부터 유도된 배발생캘러스를 형질전환 재료로 이용하여 대조군벡터(*SWPA2::pCAMBIA2300*)와 고발현벡터(*SWPA2::IbOr*)로 형질전환된 *Agrobacterium*을 GD배지(12 mg/L picloram, 2% sucrose, 200 μM acetosyringon) 20 mL에 계대배양 2주일된 배발생캘러스 5 g을 1시간 감염시킨 후 24°C, 16 h 광 조건에서 4일간 GD배지에서 공동배양 하였다. 공동배양한 캘러스는 500 mg/L cefotaxime이 첨가된 공동배양배지로 세정하여 250 mg/L cefotaxime이 첨가된 GD배지로 옮겨 28°C, 16 h 광 조건에서 4일간 배양하였다. 배양 후, GD선택배지(250 mg/L cefotaxime, 50 mg/L kanamycin)에서 3주간 배양하여 kanamycin 내성을 보이는 캘러스를 선발하였다.

PCR 분석

카사바에서 genomic DNA (gDNA)를 분리하기 위하여 Genomic DNA Isolation Kit (Qiagen)를 이용하여 분리하였다. 분리한 gDNA를 주형으로 PCR premix (Enzymomix)를 이용하여 *SWPA2* 프로모터와 *IbOr* 유전자를 포함하는 primer set (*SWPA2*-F: GAAACCTTAGAGGCAATTCATGCA, *IbOr*-R: CGTG-GGTCATGCTCGCTTGCCATAGCCATC) 그리고 Kanamycin 저항성 유전자 primer set (*NPTII*; *NPTII* F: GAGGCTA-TTCGGCTATGACTG, *NPTII* R: ATCGGGAGCGGCGATA-CCGTA)를 이용하여 94°C 5분간 1회 변성 후, 94°C 45초, 60°C 45초, 72°C 1분 반응을 30회 수행하여 얻어진 PCR 산물을 0.8% 아가로스젤을 이용하여 확인하였다.

또한 total RNA를 Plant RNA purification Regent (Geneall)를 이용하여 분리하였다. 분리된 total RNA를 cDNA synthesis

(Oligo DT) pre mix (Enzymomix)를 이용하여 cDNA를 합성하여 *IbOr*-RT-F: ATCTCCATGGAAGGCTCAAATC와 *IbOr*-RT-R: CGACGGATGAAGAAAAGGAG, β -actin F: TGATGA GTC-TGGTCCATCCA와 β -actin R: CCTCTACGACCCAATCT-CA를 이용하여 94°C 5분간 1회 변성 후, 94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분 반응을 28회 수행하여 얻어진 PCR산물을 1% 아가로스젤을 이용하여 확인하였다.

결과 및 고찰

체세포발생에 의한 식물체 재분화

IDB사 다수확 카사바 줄기의 액아(Fig. 1A)로부터 분열조직(Fig. 1B)을 분리하여 2 mM CuSO₄, 12 mg/L picloram, 2% sucrose가 함유된 MS배지에서 25±2°C의 암 조건으로 4주간 배양하여 미성숙 체세포배(Fig. 1C)를 유도하였다. 유도된 미성숙 체세포배는 12 mg/L picloram, 2% sucrose가 포함된 GD배지에서 암 조건으로 4주간 배양한 다음 동일한 새 배지에 계대하여 4회 이상 4주간 배양한 결과, 무르고 연한 부서지기 쉬운(friable) 상태의 배발생캘러스가 형성되었다. 형성된 배발생캘러스는 1 mg/L NAA, 2% sucrose가 함유된 MS배지에서 25±2°C의 암 조건으로 4주간 배양하여 이차 체세포배(Fig. 1D)를 유도하였으며, 2 mM CuSO₄, 0.4 mg/L BAP, 2% sucrose가 함유된 MS배지에서 3주간 배양하여 자엽단계의 성숙한 체세포배로 발달하였다(Fig. 1E). 성숙한 체세포배는 2 mM CuSO₄, 2% sucrose가 함유된 MS배지에서 발근하여 소식물체(Fig. 1F)로 발달하는 체세포배발생을 통한 IDB사 다수확 카사바 품종의 식물체 재분화시스템을 확립하였다.

특히 GD배지에서 비배발생캘러스와 배발생캘러스의

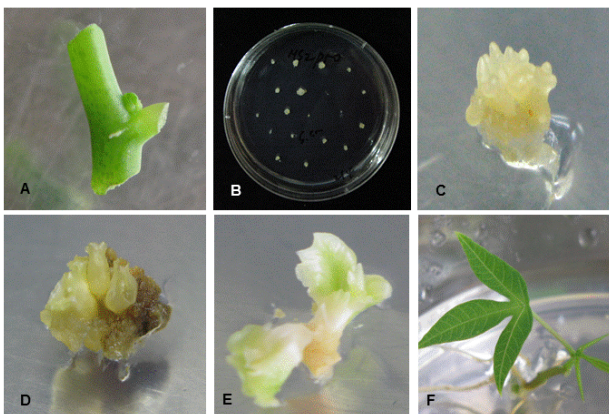


Fig. 1 Plant regeneration through somatic embryogenesis of Indonesian IDB high-yielding cultivar. (A) Axillary bud. (B) Isolated meristems. (C) Immature somatic embryos. (D) Mature somatic embryos. (E) Cotyledonary somatic embryos. (F) Plantlet development

혼재가 관찰되며 해부현미경을 통해 배발생캘러스만을 분리하며 계대배양 과정에서 비배발생캘러스를 주의 깊게 제거할 필요가 있다. 또한, 배발생캘러스의 상태를 양호하게 유지하기 위하여 실험 전에 재료의 viability assay를 수행하는 것도 효율적인 배발생캘러스를 유지하는 방법으로 생각된다. 그리고 카사바의 배발생캘러스는 regeneration efficiency를 고려해서 계대배양 6개월 정도 이내의 캘러스를 이용하는 것이 가장 적합하였다.

IbOr 발현 형질전환 카사바 개발

카사바 식물체 액아 분열조직으로부터 유도된 배발생캘러스에 *SWPA2::pCAMBIA2300*와 *SWPA2::IbOr* 벡터를 형

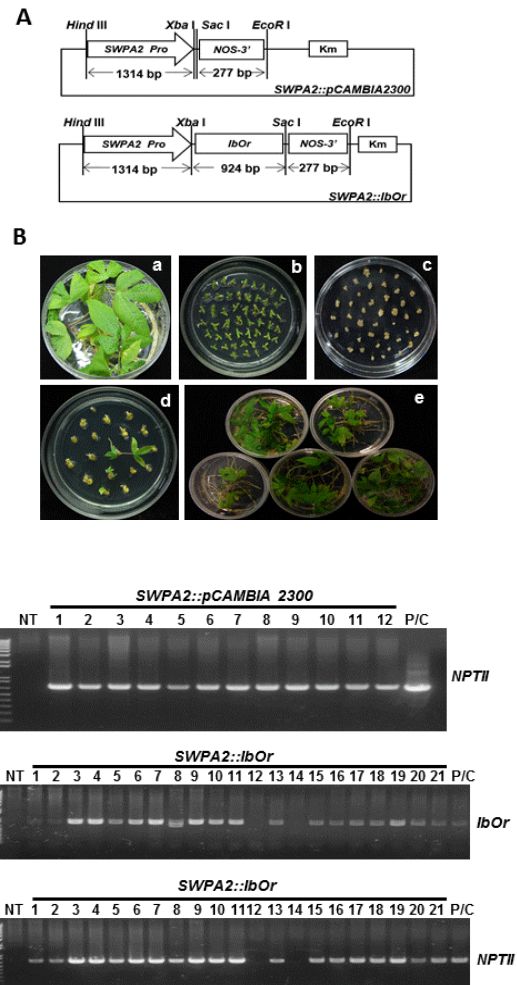


Fig. 2 Generation of transgenic cassava plants by *Agrobacterium*-mediated transformation of friable embryogenic calli. (A) Vector construction of *SWPA2::pCAMBIA2300* and *SWPA2::IbOr*. (B) (a) *In vitro* cassava; (b-d) Embryogenic calli; Kanamycin-resistant calli on selection medium containing 100 mg/L kanamycin. (e) Kanamycin-resistant cassava plantlets. (C) Genomic DNA PCR analysis using the *SWPA2pro::IbOr* primer set. Numbers (1-21) represent independent transgenic lines. NT, non-transgenic plant; P/C, positive control

질전환하였다(Fig. 2A, B). 그 결과 대조군벡터인 *SWPA2::pCAMBIA2300*의 경우 총 12개의 형질전환체를 얻었으며, *SWPA2::IbOr*의 경우 총 21개의 소식물체를 얻었다. 형질 전환 여부를 확인하기 위하여 선발마커인 *NPTII* 유전자와 *SWPA2* 프로모터와 *IbOr* 유전자를 포함하는 gene specific primer를 이용하여 gDNA-PCR을 수행한 결과 대조군벡터의 경우 12개, *SWPA2::IbOr*의 경우 19개의 형질전환개체를 얻었다(Fig. 2C). Kanamycin 선발과 gDNA-PCR을 통해 얻어진 1차 선발개체들을 대상으로 RT-PCR을 수행하여 *IbOr* 유전자의 발현을 분석하였다(Fig. 3A). 그 결과 대조군인 빈 벡터 12 개체와 *SWPA2::IbOr*의 19개 형질전환 카사바식물체를 얻었고 이들을 pot로 옮겨 증식 하였다(Fig. 3B). 향후 카사바 뿌리가 확보되면 카로티노이드 함량 및 다양한 스트레스처리를 통한 내성분석을 진행할 예정이다.

최근 연구에서 *IbOr* 유전자를 백색고구마 배양세포와 자색고구마에 고발현 하였을 때 β -carotene, β -cryptoxanthin 그리고 zeaxanthin의 양이 크게 증가하였다(Kim et al. 2013; Park et al. 2015). 또한 carotenoid는 항산화물질로 식물의 스트레스 상태에서 생산되는 활성산소를 제거하여 각종 환경스트레스에서의 적응에 용이 할 것으로 예상되며, 실제로 salt, MV, 건조와 같은 스트레스에 대한 내성을 보고한바 있다(Kim et al. 2011; Kim et al. 2012; Kim et al. 2013; Park et al. 2015). 본 연구에서 선발된 *IbOr*형질전환 카사바는 카로티노이드 함량을 증가시켜 영양적 기능 향상뿐만 아니라 다양한 환경스트레스의 내성증가가 기대된다. 또한 동남아시아, 아프리카 등 글로벌 조건 불리지역에서의 재배 가능여부를 조사할 필요가 있다.

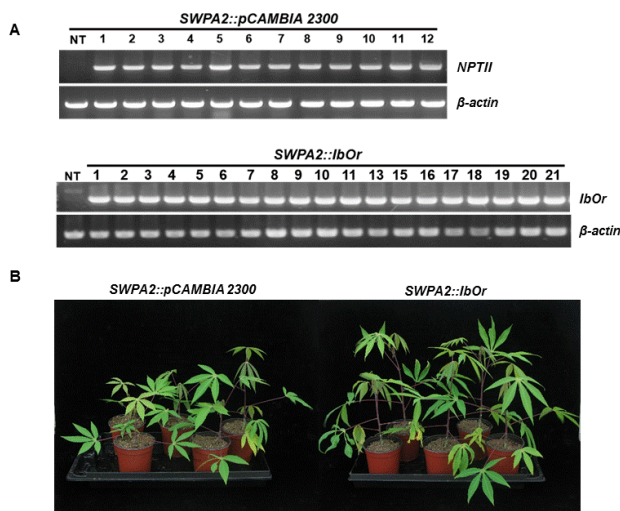


Fig. 3 RT-PCR analysis of transgenic cassava plants expressing *IbOr* under the control of the *SWPA2* promoter (*SWPA2::IbOr*). (A) RT-PCR analysis of 19 lines expressing stable *IbOr* gene integration in transgenic plants. (B) *SWPA2::IbOr* and *SWPA2::pCAMBIA2300* plants growth in pots

적 요

카사바는 열대와 아열대지역 뿌리작물로서 중요한 식량 자원일 뿐만 아니라 동물 사료, 전분, 바이오에탄올 등 다양한 산업소재로서 이용이 가능하다. 그러나 카사바의 산업적 중요성에 비해 형질전환기술을 이용한 신품종 개발은 아직까지 제한적이다. 본 연구에서는 인도네시아 IDB사가 개발한 다수확 카사바 품종을 이용하여 영양강화 및 환경스트레스에 저항성을 향상시킨 카사바를 개발하기 위하여 체세포배를 이용한 식물체 재분화시스템을 확립하였다. 카로티노이드 축적에 관련된 *IbOr* 유전자를 체세포배를 이용한 *Agrobacterium* 매개방법으로 카사바에 형질전환하였다. gDNA PCR과 RT-PCR을 통해 19개의 형질전환식물체를 성공적으로 확보하였다. 향후 카로티노이드 함량분석, 환경스트레스 내성분석 등을 통하여 *IbOr* 카사바 식물체의 농업적 유용성을 검정할 예정이다.

사 사

본 연구과제는 인도네시아 IDB사의 수탁과제와 한국생명공학연구원 주요사업(KRIBB Initiative Program)의 지원으로 수행되었다.

References

Adenle AA, Aworh OC, Akromah R, Parayil G (2012) Developing GM super cassava for improved health and food security: future challenges in Africa. *Agr Food Sec* 1:1-11

Bull SE, Owiti JA, Niklaus M, Beeching JR, Gruijssem W, Vanderschuren H (2009) *Agrobacterium*-mediated transformation of friable embryogenic calli and regeneration of transgenic cassava. *Nat Protoc* 4:1845-1854

Beltrán J, Prías M, Al-Babili S, LadinoY, López D, Beyer P, Chavarriga P, Tohme J (2010) Expression pattern conferred by a glutamic acid-rich protein gene promoter in field-grown transgenic cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Planta* 231: 1413-1424

Cunningham FX, Gantt E (1998) Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:557-583

FAO: FAOSTAT. 2010. <http://faostat.fao.org>

Ferreira CF, Alves E, Pestana KN, Junghans DT, Kobayashi AK, de Jesus Santos AK, Silva RP, Silva PH, Soares E, Fukuda W (2008) Molecular characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) with yellow-orange roots for beta-carotene improvement. *Crop Breed Appl Biotechnol* 8:23-29

Giuliano G (2014) Plant carotenoids: genomics meets multi-gene engineering. *Curr Opin Plant Biol* 19:111-117

Goo YM, Han EH, Jeong JC, Kwak SS, Yu J, Kim YH, Ahn MJ,

- Lee SW (2015) Overexpression of the sweet potato *IbOr* gene results in the increased accumulation of carotenoid and confers tolerance to environmental stresses in transgenic potato. *C. R. Biologies* 338:12–20
- Gresshof P, Doy CH (1974) Derivation of a haploid cell line from *Vitis vinifera* and importance of stage of meiotic development of anthers for haploid culture of this and other genera. *Z Pflanzenphysiol* 73:132–141
- Hillocks RJ, Thresh JM, Bellotti AC (2002) Cassava Biology, Production and Utilization. New York: CABI
- Kim KY, Kwon SY, Lee HS, Hur Y, Bang JW, Kwak SS (2003) A novel oxidative stress-inducible peroxidase promoter from sweetpotato: molecular cloning and characterization in transgenic tobacco plants and cultured cells. *Plant Mol Biol* 51:831–838
- Kim SH, Ahn YO, Ahn MJ, Lee H-S, Kwak SS (2012) Down-regulation of β -carotene hydroxylase increases β -carotene and total carotenoids enhancing salt stress tolerance in transgenic cultured cells of sweetpotato. *Phytochemistry* 74:69–78
- Kim SH, Ahn YO, Ahn MJ, Jeong JC, Lee HS, Kwak SS (2013) Cloning and characterization of an Orange gene that increases carotenoid accumulation and salt stress tolerance in transgenic sweetpotato cultures. *Plant Physiol Bioch* 70:445–454
- Kim YH, Kim MD, Choi YI, Park CH, Yun DJ, Noh EW, Lee HS, Kwak SS (2011) Transgenic poplar expressing Arabidopsis *NDPK2* enhances growth as well as oxidative stress tolerance. *Plant Biotechnol J* 9:334–347
- Lopez C, Jorge V, Piegu B, Mba C, Cortes D, Restrepo S, Soto M, Laudie M, Berger C, Cooke R, Delseny M, Tohme J, Verdier V (2004) A unigene catalogue of 5700 expressed genes in cassava. *Plant Mol Biol* 56:541–554
- Lu S, Van Eck J, Zhou X, Lopez AB, O'Halloran DM, Cosman KM, Conlin BJ, Paolillo DJ, Garvin DF, Vrebalov J, Kochian LV, Kupper H, Earle ED, Cao J, Li L (2006) The Cauliflower *Or* gene encodes a DnaJ cysteine-rich domain-containing protein that mediates high levels of β -carotene accumulation. *Plant Cell* 18:3594–3605
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473–497
- Park SC, Kim SH, Park S, Lee HU, Lee JS, Park WS, Ahn MJ, Kim YH, Jeong JC, Lee HS, Kwak SS (2015) Enhanced accumulation of carotenoids in sweetpotato plants overexpressing *IbOr*-*Ins* gene in purple-fleshed sweetpotato cultivar. *Plant Physiol Biochem* 86:89–90
- Welsch R, Arango J, Bär C, Salazar B, Al-Babilib S, Beltrán, Chavarriaga P, Ceballos H, Tohme J, Beyera P (2010) Provitamin A accumulation in cassava (*Manihot esculenta*) roots driven by a single nucleotide polymorphism in a phytoene synthase gene. *Plant Cell* 22:3348–3356
- World Health Organization (2009) Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995–2005. In WHO Global Database on Vitamin A Deficiency. (Geneva, Switzerland: World Health Organization)
- Xu J, Yang J, Duan X, Jiang Y, Zhang P (2014) Increased expression of native cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase improves tolerance to oxidative and chilling stresses in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *BMC Plant Biol* 14:208
- Zhang P, Wang WQ, Zhang GL, Kaminek M, Dobrev P, Xu J, Gruijssem W (2010) Senescence-inducible expression of isopentenyl transferase extends leaf life, increases drought stress resistance and alters cytokinin metabolism in cassava. *J Integr Plant Biol* 52(7):653–669
- Ziska LH, Runion GB, Tomecek M, Prior SA, Torbet HA, Sicher R (2009) An evaluation of cassava, sweet potato and field corn as potential carbohydrate sources for bioethanol production in Alabama and Maryland. *Biomass Bioenerg* 33:1503–1508