

형질전환 연초의 복합바이러스 저항성

이기원 · 채순용 · 이청호 · 이영기 · 강신웅 · 박성원 · 박은경

한국인삼연초연구원 원료연구부

(1999년 6월 7일 접수)

Multiful virus resistance of transgenic tobacco plant.

Ki won Lee*, Soon Yong Chae, Cheong Ho Lee, Young Gi Lee,

Shin Woong Kang, Seong Weon Park and Eun Kyung Park

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

(Received June 7, 1999)

ABSTRACT : KF 116 was TMV resistant tobacco plant and KB 301 was PVY resistant plant transformed with TMV CP gene and PVY CP gene, respectively. These resistant plants were cross-fertilized and the 4 lines of the TMV-PVY resistant plants were selected from F1 hybrid plants. The rate of PVY-resistant plant in these hybrids was 100 percent and that of TMV-resistant plants including delay type was 90-98 percent at 4 weeks after virus inoculation. It was confirmed that the TMV and PVY CP genes were integrated into the genome of hybrid plants by genomic PCR, and Southern blot hybridization. The genome of F1 hybrid plants had one copy and 4 copies of PVY-CP gene and TMV-CP gene, respectively, and CaMV 35S promoters were not methylated, regardless of the difference symptom development to TMV.

Key words : TMV CP gene, PVY CP gene, TMV-PVY resistant tobacco plant, DNA methylation

우리 나라 연초산지의 TMV 병은 광범위한 지역에서 지속적으로 발병되고 있어서 그 피해가 매우 심각한 상태로 일부지역에서는 연초경작을 포기해야 하는 상황까지 이르고 있으나 그 방제가 불가능한 병이므로 저항성 품종의 육종이 가장 근본적인 대책이다. 지금까지 바이러스 병에 대한 저항성 품종 개발 연구가 꾸준히 진행되었는데 연초 품질의 저하, 다른 병해에 대한 저항성 저하 또는 결여, 불리한 경종적 및 건조특성 등으로 성공한 경우는 드물다. 그러나 최근 본 실험실에서는 TMV CP 유전자를 이용한 TMV 저항성 품종을 육성하여 그 유전자의 발현여부 및 5 세

대에서의 유전자 안정성에 의한 TMV 저항성에 대하여 발표한 바 있다(Park 등, 1998).

종전에는 버어리종 산지에서 많이 나타났던 PVY의 발병이 최근 감자재배가 성해짐으로써 황색종 산지에서도 심각한 상황이며 피해지역도 늘어나고 있다. 따라서 황색종 연초에서 TMV만의 저항성 품종이 큰 의미가 없어졌음이 사실이다.

PVY의 발생률은 황색종 연초에서만 1.6%가 되고 있으며 이병 되었을 경우 내용성분이 부실해지고 물리성이 나빠져 원료 잎담배의 품질이 크게 저하되고 있다. 그러나 PVY는 자연상태에서 진딧물에 의해 전염되므로 방제가 대부분 진딧물

*연락처 : 305-345, 대전광역시 유성구 신성동 302, 한국인삼연초연구원 원료연구부

*Corresponding author : Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, 302 Shinsong-Dong, Yusong-Ku, Taejon 305-345, Korea

의 제거 및 밀도 감소와 관련이 있는데 여러 가지 경종적 및 진딧물의 화학적 방제방법이 효과적이지 않으므로 역시 저항성 품종의 사용이 가장 실제적이고 효과적인 방제방법으로 알려져 있으며, 실제로 PVY CP 유전자 조작에 의한 저항성 품종이 발표된 바 있다. 본 실험에서는 각각의 바이러스에 저항성인 형질전환 식물체를 교배하여 TMV 및 PVY에 대한 복합적인 바이러스 저항성을 나타내는 품종을 선발하고 그 특성을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

TMV 및 PVY 저항성 품종의 교배

TMV CP 유전자, CaMV 35S promoter, nos terminator, NPT II 유전자가 황색종 연초에 형질전환된 TMV 저항성 품종과 PVY CP 유전자 외에 동일한 유전자가 형질전환된 PVY 저항성 품종을 교잡 육종을 통하여 복합 저항성 품종을 육성하고자 하였다. 이때 TMV 저항성 품종인 KF 116중 TN 2116-1, TN 2116-2, TN 2514-2, TN 2514-5 계통과 PVY 저항성 품종으로는 KB301중 CN 14-21-1, CN 14-21-2, 14-21-4, CN 14-1-3 계통을 교배에 이용하였다. 이때 교배는 CN 14-21-1×TN 2116-1, CN 14-21-2×TN 2116-2, TN 2514-5×CN 14-1-3, TN 2514-2×CN 14-21-4의 조합으로 그 F1 hybrid 식물체를 획득하였다.

바이러스 저항성 검정

TMV 저항성 형질전환 식물체와 PVY 저항성 형질전환 식물체를 교배하여 그 F1 hybrid의 바이러스 저항성 검정을 하였다. 이때 사용한 바이러스는 한국에서 분리한 TMV common strain과 PVY-VN을 사용하였다. 접종원으로는 TMV와 PVY에 감수성인 연초 품종 NC82의 이병된 건조엽을 이용하였으며, 이를 각각 0.01M phosphate buffer(pH 7.2)로 100배(w/v) 희석한 다음 600mesh carborundum과 면봉을 이용하여 식물체당 2매씩 접종하였다. 이때 TMV와 PVY에 대한 복합저항성 검정을 하기 위하여 동시접종을 실시하였다.

TMV와 PVY를 동시 혹은 2일 간격으로 접종하였을 때 병징이 나타나는 결과에는 차이가 없었다. 대조구로서 NC 82에 바이러스를 접종하였으며 접종 2주후부터 바이러스 병징 발현 유무를 조사하였다. 또한 접종 2주 후에 병징이 나타나지 않았던 식물체를 직경 12 cm 플라스틱 포트에 옮겨 심거나 시험 포에 옮겨 심어 표준경작재배법에 준하여 재배하면서 병징의 발현을 관찰하였다. 접종 후 병징이 전혀 나타나지 않고 생육도 정상이면 완전저항성 (Resistance, R)으로, 1-2매의 잎에 불규칙한 반점이 발생하고 생육이 정상이면 지연형으로 (Delayed type, D), 잎의 2/3 이상 병징 발현, 엽맥괴저 및 생육위축이 발견되면 감수성 (Susceptible, S)으로 판단하였다.

Polymerase chain reaction (PCR)

F1 hybrid 연초식물체에서 분리된 DNA를 95℃에서 1분간 변성, 55℃에서 2분간 annealing, 72℃에서 3분간 증폭을 40회 시키는 조건으로 PCR을 실시하였다. 이때 사용한 primer는 5'-GT CATAGTGATGAGGTAGAGTCAAG-3' 5'-GAGT AGCATCTAACGTTTCGGCAG-3'로서 이는 TMV CP 유전자를 함유하는 sequence로서 이를 이용하였을 때 320 bp의 DNA가 합성되도록 하여 TMV CP유전자를 확인하였으며, PVY CP 유전자를 확인하기 위하여 사용된 primer는 3'-GCCAACTGT GATGAATGGGCTTATG-5'와 3'-GACGAAATCA CAACACCACCCAAG-5'로서 이를 이용하였을 때 800 bp의 DNA 합성되도록 하였다

DNA 메틸화 조사

F1 hybrid 식물체내에 삽입된 유전자중 CaMV 35S promoter 부분의 DNA 메틸화 여부를 확인하기 위하여 genomic DNA를 분리하여 Southern blot hybridization을 실시하였으며, 이때 사용한 제한 효소는 *Ava* I, *Eco* RI, *Pst* I을 단일 혹은 이중 처리를 하였다.

결과 및 고찰

각 바이러스에 대한 저항성 검정

TMV 저항성 품종인 KF 116 (TN 2116-1, TN 2116-2, TN 2514-2, TN 2514-5 계통) 과 PVY 저항성 품종인 KB301(CN 14-21-1, CN 14-21-2, 14-21-4, CN 14-1-3 계통)을 모친 혹은 부친으로서 조잡하여 4개 hybrid 계통을 획득하였으며, 이들 각각의 line을 TMV와 PVY를 동시 접종하여 접종 4주후에 저항성을 검정하였다. 이때 4개 line 모두 PVY에 대해서는 100%의 저항성을 보였는데 이들 저항성은 화분친의 종류에 관계없이 항상 PVY에 대하여 저항성을 보였다(표 1). 그러나 TMV에 대해서는 90% 이상의 저항성주율을 나타냈지만 그중 14.0-29.5%의 지연성 발생을 보여 그 모주인 KF 116과 비슷한 양상을 띄었다 (Park 등, 1998).

Table 1. Resistance to PVY and TMV of the F1 hybrid plants

Cell lines	Percent of virus resistance					
	TMV			PVY		
	R	D	S	R	D	S
Burley 21	100	-	0	0	0	0
NC 82	0	0	100	0	0	0
CN 14-21-1 × TN 2116-1	60.8	29.5	9.7	100	0	0
CN 14-21-2 × TN 2116-2	84.9	14.0	1.1	100	0	0
TN 2514-5 × CN 14-1-3	79.1	19.8	1.1	100	0	0
TN 2514-2 × CN 14-21-4	80.9	17.9	1.2	100	0	0

The plants in the two- to three- leaf stage from each of cell line were inoculated with PVY and TMV. The virus inocula were prepared by grinding the infected and dried tobacco plant in 0.01 M phosphate buffer solution (pH 7.2) and using 100 fold dilution. Data were taken in 4 weeks after inoculation.

F1 hybrid 식물체의 유전자 확인

F1 hybrid 식물체로부터 genomic DNA를 분리하여 TMV CP 유전자에 해당하는 primer를 이용하여 PCR을 실시하였을 때 그림 1-A의 lane 3-6

에서 보는바와 같이 약 320 bp의 DNA 가 합성되었으며, 역시 같은 방법으로 PVY CP 유전자에 해당하는 primer를 이용하여 PCR을 실시하였을 때 그림 1-B의 lane 2-5에서 보는바와 같이 약 800 bp의 DNA 밴드가 확인되었다. 이와 같은 결과에 의하여 F1 hybrid식물체에는 TMV 및 PVY CP 유전자가 삽입되었음을 확인 할 수 있었으며, 각각의 바이러스에 대한 저항성은 외래에서 형질 전환된 유전자에 의한 것으로 확인하였다.

F1 hybrid 식물체내에서의 CaMV 35S promoter의 메틸화 확인

KF116과 KB301을 재래적인 방법으로 교잡한 F1 hybrid의 TMV 및 PVY의 저항성을 검정하였을때 TMV CP 및 PVY CP 유전자가 모두 삽입되었음에도 불구하고 TMV에 대한 저항성은 KF 116처럼 그 병증이 감수성(S), 지연형(D), 완전저항성(R)으로 나눌 수 있었다 (Lee 등, 1996). PVY에 비하여 TMV에 대한 저항률이 낮아지고, 또 TMV의 병증에 대하여 완전저항성 (R) 및 지연형 (D)으로 나타나는 원인을 알아보기 위하여 식물체 내에 삽입되어 있는 각 바이러스의 CP 유전자의 copy수를 측정해 보고, CaMV 35S promoter의 메틸화 여부를 확인한 바 그 결과는 다음과 같다

TMV 에 대하여 나타나는 증상에 따라 R, D, S별로 구분하여 각각으로부터 genomic DNA를 추출한 후 Southern blot hybridization을 실시하였다. 이때 추출된 DNA로부터 삽입된 유전자의 copy수를 측정하기 위하여 Eco RI을 이용하였는데, 이 제한효소는 CaMV 35S promoter, TMV CP 유전자 내에는 그 제한자리가 존재하지 않고 left border sequence 근처에 존재하고 있다. Eco RI 단독처리를 한 결과 모주인 KF116과 F1 hybrid 식물체 모두 4 copy(그림2-A)가 삽입되어 있음을 알았고, 이는 각 병증에 따른 차이가 없는 것으로 확인되었다. 메틸화 여부를 확인하기 위하여 Ava I과 Pst I을 Eco RI과 함께 이용했다. Ava I과 Pst I은 cystidine 잔기가 메틸화 되었을 때 분해되지 않는 특성이 있고 CaMV 35S promoter의 시작 부분에 존재하고 있다. TMV에 대한 증상별로 구분하여 각각의 옆으로부터 genomic DNA를 분리하

형질전환 연초의 복합바이러스 저항성

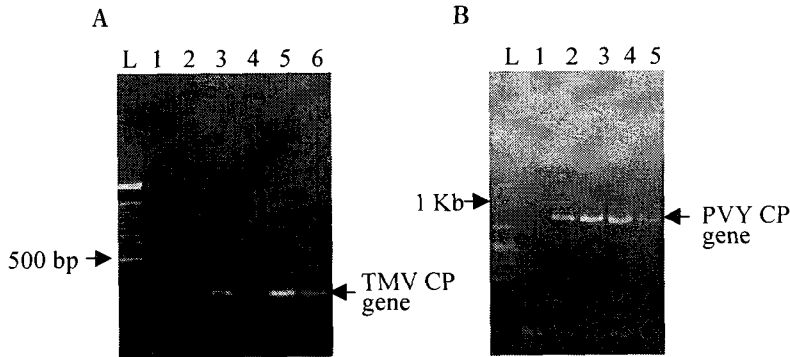


Fig 1. Genomic PCR analysis of the TMV CP gene and PVY CP gene in F1 hybrid plants, from KF 116 line × KB 301 line cross-fertilization.

- A : The TMV CP genes were amplified with specific primers and the PCR product were 320 bp in 1.5% agarose gel. Lane L, 100 bp ladder; lane 1, normal plant NC 82; lane 2, transgenic plant KB 103, PVY resistant; lane 3, CN14-21-1 × TN 2116-1; lane 4, CN 14-21-2 × TN 2116-2; lane 5, TN 2514-5 × CN 14-1-3; lane 6, TN 2514-2 × CN 14-21-4.
- B : The PVY CP genes were amplified with primer and the products were about 800 bp in 1.5% agarose gel. Lane L, 1 Kb ladder; lane 1, transgenic plant KF 116, TMV resistant; lane 2, CN14-21-1 × TN 2116-1; lane 3, CN 14-21-2 × TN 2116-2; lane 4, TN 2514-5 × CN 14-1-3; lane 5, TN 2514-2 × CN 14-21-4.

여 *Pst* I 과 *Eco* RI, 또 *Ava* I과 *Eco* RI을 처리하여 TMV CP 유전자를 probe로 하여 hybridization 하였을 때, 그림 2-B에서처럼 모주인 KF 116 (lane 2)을 비롯하여 각각의 병증에 따른 차이를 보이지 않아 *Pst* I-*Eco* RI의 단편은 약 2.3 Kb이며 (그림 2-B), 그림을 제시하지는 않았지만 *Ava* I-*Eco* RI 단편은 약 2.0 Kb 크기를 확인하였다. 이로 보아 식물체내에 삽입된 TMV CP 유전자를 함유하고 있는 vector DNA의 promoter는 메틸화 되지 않은 것으로 추정되었다.

또한 같은 방법으로 PVY에 대하여 완전 저항성을 나타내며 TMV감염에 대하여 각 증상에 따라 R, D, S type 별로 구분하여 각각으로부터 genomic DNA를 추출한 후 PVY CP 유전자를 probe로 이용하여 Southern blot hybridization을 실시하였다. 이때의 추출된 DNA로부터 삽입된 유전자의 copy수를 측정하기 위하여 *Eco* RI 단독처리를 한 결과 모주인 KF116과 F1 hybrid식물체 모두 1 copy(그림 3-A)가 삽입된 것이 확인되었으며, 또한 같은 방법으로 *Pst* I과 *Ava* I을 이용

하여 *Eco* RI과 함께 처리를 했을 경우에도 그림 3-B에서처럼 모주인 KB 301(lane 1)과 F1 hybrid 식물체 사이에 차이를 보이지 않아 *Pst* I-*Eco* RI 단편은 약 0.8 Kb이며 (그림 3-B), *Ava* I-*Eco* RI 단편은 약 1.5 Kb 크기를 확인하였다. 이로 보아 식물체내에 삽입된 PVY CP 유전자를 함유하고 있는 vector DNA의 promoter도 메틸화 되지 않은 것으로 추정되었다.

삽입된 NPT II 유전자도 중복되어 삽입되어 있으므로 그 발현여부를 확인하기 위하여 F1 hybrid 식물체의 종자를 kanamycin이 포함된 배지에서 발아시험을 하였는데, 이때의 결과는 97 - 98%로서 NPT II 유전자는 중복되어 존재하지만 발현되고 있음이 확인되었다.

실제로 외부에서 삽입된 유전자의 copy수와 유전자 발현에 대하여 많은 연구가 진행되었는데 학자에 따라 그 결과의 차이가 있어서, 삽입된 유전자의 copy수와 발현과의 상관관계는 확정 지을 수 없다고 보고된 경우가 있으며 (Dean 등, 1988, Jones 등, 1987, Rogers 등, 1985, Shirsat 등, 1989),

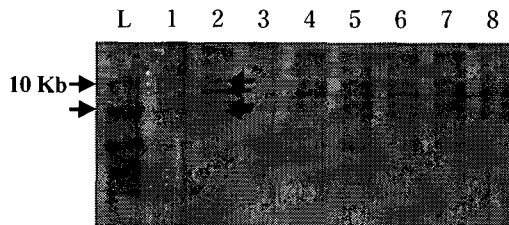
CAT(chloramphenicol acetyl transferase)유전자를 연초에 형질전환 하였을 때 그 copy 수가 많아짐에 따라 그 CAT의 양이 많아 졌다고 보고 된 바 있다 (Gendloff 등, 1990). 그러나 이와 반대로 T-DNA가 식물체에 삽입된 copy수와 유전자 발현과의 관계를 GUS 유전자를 이용하여 실험하였을 때 삽입 copy수가 1개일 때에는 GUS의 발현율이 높아 그 활성이 높았으며 둘 이상이었을 때는 그 활성이 낮아졌다고 보고된 바도 있다 (Hobbs, 1990). 아직 기작에 대하여는 확실하게 밝혀지지 않았지만 homology가 있는 여러 copy가 유전자의 위치와 관계없이 같은 유전자 내에 삽입되면 유전자의 메틸화에 의하여 유전자가 비 활성화된다고 보고 된 바 있다 (Hobbs 등, 1993).

본 실험에서 TMV의 증상별로 구분하여 각각의 DNA를 분리하여 *Ava* I, *Pst* I, *Eco* RI 등의

제한 효소를 이용하여 promoter 부분의 메틸화 여부를 확인한 바, TMV CP가 포함되어 있는 부분과 PVY CP가 포함되어 있는 부분의 promoter는 메틸화 되지 않았음을 확인하였으며, 교배 식물체 내에 들어 있는 NPT II 유전자도 발아 시험을 통하여 발현되고 있음을 확인 한 바, 본 실험에 사용된 식물체는 그 유전자 내에 같은 promoter, maker gene, terminator를 포함한 vector가 존재하여도 서로에 대하여 영향을 받지 않는 것으로 추정된다.

본 실험에 이용된 품종의 TMV 병증에 대한 반응처럼 형질전환 식물체 내에서의 variation 영향이 알려져 있는데 이는 각 학자에 따라 ① epigenic effect가 그 원인이 될 수도 있고 (Jones 등, 1987), ② 형질전환 식물체를 포함한 식물체들은 생리적으로 동등한 세포가 아니므로 시간적,

A : Digestion of *Eco* RI



B : Digestion of *Eco* RI + *Pst* I

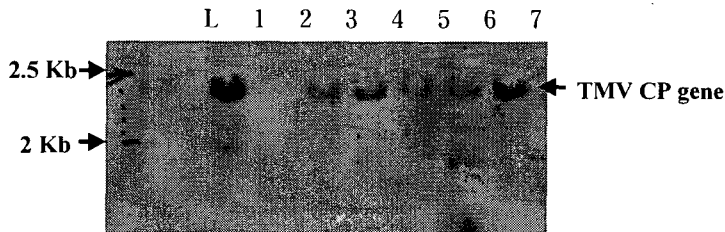
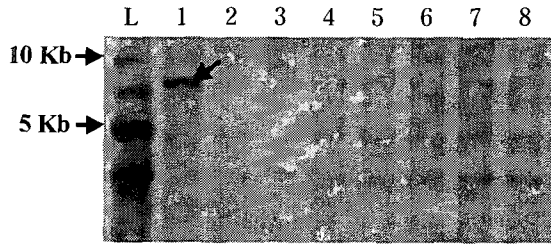


Fig 2. Southern blot hybridization of DNA extracted from leaf of F1 hybrid plants, digested with restriction enzymes and hybridized with TMV CP gene probe. A, Distested with *Eco* RI; and B, *Eco* RI together with *Pst* I. Lane L, 1 Kb ladder; lane 1, KB 301; Lane 2, KF 116; lane 3, NC 82; lane 4, resistance type; lane 5-6, delayed type; lane 7-8, susceptible type.

A : Digestion of *Eco RI*



B : Digestion of *Eco RI* + *Pst I*

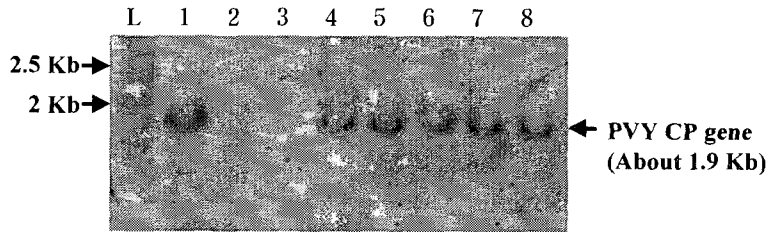


Fig 3. Southern blot hybridization of DNA extracted from leaf of F1 hybrid plants, digested with restriction enzymes and hybridized with PVY CP gene probe. A, digested with *Eco RI*; B, *Eco RI* together with *Pst I*. Lane L, 1 Kb ladder; lane 1, KB 301; Lane 2, KF 116; lane 3, NC 82; lane 4, resistance type; lane 5-6, delayed type; lane 7-8, susceptible type.

공간적으로 유전자 발현에 차이가 있을 수 있으며 (Czernilofsky 등, 1986, Dean 등, 1988, Williamson 등, 1989), ③ 형질전환식물체는 외래유전자가 한 개 혹은 많은 locus에 여러 개 삽입되어도 full-length가 존재하거나, 절단되거나, 재정리되는 경우가 있으므로 한 유전자의 영향으로만 해석을 하면 혼돈이 될 수 있다 (Deroles와 Gardner, 1988, Speilmann과 Simpson, 1986)라고 해석하고 있다. 그러므로 본 실험에서 이용된 저항성 품종의 저항성 차이를 단순히 gene copy수와 관련지어 결론을 맺기는 어려우며 그 저항성 기작은 추후에 더 연구되어야 할 것으로 사료되었다.

결 론

TMV CP 유전자와 PVY CP 유전자가 각각 삽입되어 각각의 바이러스에 대하여 저항성을 띄는

연초품종을 교배하여 TMV와 PVY에 대하여 복합적인 저항성 품종을 육성하였다. 교배에 의해 4 line을 획득하여 이로부터 genomic DNA를 분리하여 PCR을 실시하였을 때, 각 식물체는 TMV CP 유전자와 PVY CP 유전자를 동시에 포함하고 있음이 확인되었다. 이들 식물체를 PVY 및 TMV에 대한 저항성 검정을 실시하였을 때의 결과는 PVY에 대하여서는 완전한 저항성을 나타내었고 TMV에 대한 저항성은 지연형을 포함해서 90-98%이었으며, TMV에 대한 반응도 모주와 마찬가지로 완전저항성, 지연형, 감수성으로 구분되었다. 각 식물체의 DNA로부터 Southern blot hybridization 방법을 통하여 gene copy수를 측정해 보았을 때 PVY CP 유전자는 1 copy, TMV CP 유전자는 4 copy 삽입되어 있는 것으로 확인되었고, 중복되어 있는 promoter는 메틸화 되지 않았음을 알았다.

참 고 문 헌

- Czernilofsky, A. P., Hian, R., Baker B., Wirtz, U. (1986) Studies of the structures and functional organization of foreign DNA integrated into the genome of *Nicotiana tabacum*. *DNA* 5: 473-482.
- Dean, C., Jones, J., Favreau, M., Dunsmuir, P., Bedbrook, J. (1988) Influence of flanking sequences on variability in expression levels of an introduced gene in transgenic tobacco plants, *Nucl. Acids Res.* 16: 9267-9283.
- Derosles, S. C., Gardner, R. C. (1988) Analysis of the T-DNA structure in a large number in a large number of transgenic petunias generated by *Agrobacterium*-mediated transformation, *Plant Mol. Biol.* 11: 365-377.
- Gendloff, E. H., Bowen, B., Buchholz, W. G. (1990) Quantitation of chloramphenicol acetyl transferase in transgenic tobacco plants by ELISA and correlation with gene copy number, *Plant Mol. Biol.* 14: 575-583.
- Hobbs, Shaun L. A., Pascal Kpodar and Catherine M. O. DeLong. (1990) The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant Mol. Biol.* 15: 851-864.
- Hobbs, Shaun L. A., Warkentin T. D. and DeLong Catherine M. O. (1993) Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression, *Plant Mol. Biol.* 21: 17-26.
- Jones, J. D. G., Gilbert, D. E. Grady, K. L., Jorgensen, R. A. (1987). T-DNA structure and gene expression in petunia plants transformed by *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives, *Mol. Gen. Genet* 207: 478-485.
- Lee, K. W., Park, S. W., Kim N. W., Par, E. K., Choi, W. Y. (1996) Delay of disease symptom development in transformed tobacco plants with TMV coat protein cDNA, *Korean J. Plant Tissue Culture* 23: 15-20.
- Park, S. W., Lee, K. W., Lee, C. H., Kim, S. S. Par, E. K. and Choi, S. Y. (1998) Stable expression of TMV resistance and responses to major tobacco diseases in the fifth generation of TMV CP transgenic tobacco, *J. Kor. Soc. Toba. Sci.* 20: 66-70.
- Rogers, S. G., O'Connell, K., Horsch, R. B., Fraley, R. T. (1985). Investigations of factors involved in foreign protein expression in transformed plants. In: Zaitlin M, Day P, Hollaender A (eds.), *Biotechnology in plant Science*, pp. 219-226. Academic Press. London.
- Shirsat, A. H., Wilford, N., Croy, R. R. D. (1989) Gene copy number and levels of expression in transgenic plants of a seed specific gene, *Plant Sci.* 61: 75-80.
- Spielmann, A., Simpson, R. B. (1986) T-DNA structure in transgenic tobacco plants with multiple independent integration sites, *Mol. Gen. Genet.* 205: 291-299.
- Williamson, J. D., Hirsch-Wyncott, M. E., Larkins, B. A., Gelvin, S. B. (1989) Differential accumulation of a transcript driven by the CaMV 35S promoter in transgenic tobacco, *Plant Physiol.* 90: 1570-1576.