

바이러스 외피단백질 유전자로 형질전환된 연초 식물체의 TMV 저항성 발현 및 유전자 안정성

박성원^{*} · 이기원 · 이청호 · 이영기 · 강신웅 · 최순용¹
한국인삼연초연구원 원료연구부, ¹한남대학교 미생물학과
(1999년 6월 7일 접수)

Expression of TMV Resistance and Gene Stability of the Tobacco Plants Transformed with the Viral CP cDNA

Seong Weon Park^{*}, Ki Won Lee, Cheong Ho Lee, Yung Gi Lee,
Shin Woong Kang and Soon Yong Choi¹

Division of Leaf Technology, Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon 305-345,
Korea : ¹Department of Microbiology, HanNam University, Taejon 300-791, Korea

(Received June 7, 1999)

ABSTRACT : Tobacco plants(*Nicotiana tabacum* cv. NC82) transformed with TMV CP cDNA were self-fertilized until 8th generation(R₈), and the transgenic plants from 6th to 8th generation were analyzed for their resistance to tobacco mosaic virus(TMV) and stability of the gene expression. The 6th generation of the plants(R₆) showed high resistance(81-91%) to TMV at eight weeks after artificial inoculation with the virus. The transgenic cell line 601 was the most prominent in the expression of resistance. 98% of the plants showed no symptom without any agronomic phynotepe variation when they were inoculated with the virus in a experimental field. However, 2% of the plants were revealed as delay type of symptom with mild mosaic on a few leaves. The viral resistance in greenhouse tests of the 7th generation(R₇) was 54-64%, and the number of delay type plants were increased than that of 6th generation plants. In the 8th generation, 81% of the plants was complete resistant to the virus. The TMV CP cDNA of the transgenic plants of each generation was also confirmed by genomic PCR, and there was no systemic viral multiplication in the resistant plants. It suggests that the viral resistance and gene expression of the transgenic plants might be stable through the generations.

Key words : TMV, CP cDNA, resistant tobacco, transformation.

식물체가 병원체의 유전자 발현산물을 생육기에, 혹은 기능을 잃어버린 상태로 다량 생산하게 되면 병원체의 정상적인 증식이 교란되어 병징을 완화 하거나 감염을 차단시킬 수 있다고 발표되었다

(Sanford and Johnston, 1985, Lindbo and Dougherty, 1992). 그리고 Powell-Abel 등(1986)이 TMV 외피 단백질 유전자를 연초에 도입하여 형질전환된 연초의 바이러스 병징발현 지연 현상이 나타나

^{*}연락저자 : 305-345, 대전광역시 유성구 신성동 302번지, 한국인삼연초연구원

^{*}Corresponding author : Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, 302 Shinsung-Dong, Yusong-Ku, Taejon 305-345, Korea

는 것을 보고함으로써 실용화 가능성을 열게 되었다. 이후 많은 연구결과가 뒤따른 바 있는데, Cuozzo 등(1988)과 Bardonnet 등(1994)은 cucumber mosaic virus(CMV)와 grapevine fanleaf nepovirus(GFNV)의 외피 단백질 유전자를 연초에 형질전환하여 바이러스에 저항성인 식물체를 선발하였으며 Maiti 등(1993)은 tobacco vein mottling virus(TVMV)의 proteinase 유전자를 연초에 형질전환하여 바이러스에 저항성인 식물을 선발하였다. 또한 Donson 등(1993)은 TMV 바이러스 복제 유전자를 변형 재조합하여 형질전환된 연초 식물체가 TMV 및 tomato mosaic virus(ToMV), tobacco mild green mosaic virus(TMGMV), ribgrass mosaic virus(RMV) 등의 다른 바이러스에도 저항성이 있음을 보고한 바 있다.

본 연구의 수행을 통하여 얻어진 TMV CP cDNA가 형질전환된 TMV 저항성 연초(*N. tabacum* cv. NC82)는 최초의 형질전환 재분화 식물체로부터 자기수분의 방법으로 매세대 저항성을 검정하여 선발된 TMV 고도저항성 계통으로서, R₅의 경우 NC82와 대비하여 품질과 생육특성에 있어서 차이가 없을 뿐만 아니라 역병, 입고병, 흰가루병 등에 대한 저항성도 차이가 없었다(박 등, 1996). 본 실험에서는 바이러스 저항성 형질전환 연초가 후세대에서도 바이러스 저항성을 안정적으로 유지하는지 여부와 도입된 TMV CP cDNA가 세대를 지나면서도 연초에 존재하는지 등을 조사하였다.

재료 및 방법

형질전환 연초의 TMV 저항성 검정

TMV 감수성 NC 82 및 형질전환 연초에 TMV를 인공접종하여 저항성 정도를 조사하였다. 접종원은 전형적 전신감염 모자이크 증상을 보이는 감수성 연초(NC 82)의 상위엽을 0.01 M potassium phosphate buffer(pH 7.2)와 함께 갈아 (1:6, w/v) 그 착즙액을 접종원으로 사용하였으며 접종은 이식 2주후에 실시하였다. 접종 2주후부터 2주일 간격으로 8주후 까지 이병주를 육안으로 관찰하여 조사하였다.

형질전환 식물체의 유전적 분석

포장에서 채취한 연초 염색조직에서 이 등(1996)의 방법으로 염색체 DNA를 분리하였으며, 분리된 염색체 DNA에서 TMV CP cDNA 염기서열로부터 합성된 primer를 이용하여 박 등(1998)의 방법으로 PCR을 수행하여 후세대 형질전환 연초 식물체의 유전자 존재여부를 확인하였다. 형질전환 식물체의 바이러스 존재여부는 박 등(1996)의 방법으로 수행하였다.

결과 및 고찰

R₆세대 형질전환 연초의 TMV 저항성

TMV 저항성인 형질전환 연초식물체를 R₅세대까지 TMV 인공접종에 의한 완전저항성주율을 실험포장에서 조사하였으며 R₅세대 평균 완전저항성주율은 86%이었다(박 등, 1996.). 이결과는 R₃세대 및 R₄세대의 완전저항성주율인 16-64%, 50-100%보다 세대가 계속되면서 증가하였다(박 등, 1995). 형질전환 연초 R₅세대 15계통중에서 온실내 저항성 검정을 통해 TMV에 대해 고도의 저항성을 보이고 식물체의 생육특성이 좋은 6계통을 선발하고 R₆세대 6계통 689주를 시험포장에 이식한 후 배토 직후에 TMV를 인공접종한 후 2주 간격으로 8주까지 바이러스 완전저항성 주율을 조사한 결과 접종 2주후 NC82는 100% 감염되었으나 형질전환 연초 6계통은 모두 100%의 저항성주율을 보였으며 접종 4주, 6주 및 8주후에도 각각 92-100%, 82-99%, 81-98%의 완전저항성주율을 보여 형질전환 6계통은 모두 TMV에 대하여 고도의 저항성을 나타냈으며 R₆세대 평균 완전저항성주율은 88%이었다(Table 1). 우리나라 황색종 재배품종인 NC 82는 바이러스를 인공접종하고 2주후 조사결과 모두 전형적인 모자이크 병징(Systemic)을 나타내었다. 반면에 형질전환 계통들은 인공접종 2주후에는 조사주수 모두에서 TMV 병징을 전혀 찾아 볼 수 없었다. 다만, 4 주후부터는 계통에 따라 잎에 미약하나마 국부적 황반을 보이는 지연형이 발견되기 시작하였고 수확기인 접종 8주후에는 계통에 따라 지연형 개체의 비율이 2~19%에 달하였다. 그러나 이들 지연형 개체의 경우에도 잎이 성숙하면서 국

부황반은 식별할 수 없을 정도였으며 전체적으로 TMV 병징을 보이는 감수성 개체는 나타나지 않았다.

Table 1. TMV resistance of the R₆ generation of transgenic tobacco plants in the experimental field

Cell lines	#plants ^a	% resistant plant (weeks after inoculation)			
		2	4	6	8
NC 82	58	0	-	-	-
TN 601	116	100(0) ^b	100(0)	99 (1)	98 (2)
TN 602	112	100(0)	92(8)	88(12)	87(13)
TN 603	115	100(0)	93(7)	82(18)	81(19)
TN 604	115	100(0)	98(2)	94 (6)	90(10)
TN 605	116	100(0)	95(5)	89(11)	87(13)
TN 606	116	100(0)	96(4)	85(15)	85(15)

^a: All plants were inoculated mechanically with TMV-infected tobacco sap diluted with 0.01M phosphate buffer, pH7.2 (1:6,w/v)

^b: number in parenthesis is % of plants showed delayed symptom

R₇세대 이후 형질전환 연초의 TMV 저항성

세대단축을 위하여 동계온실에서 R₇세대의 유묘기(4-6엽매)에 TMV를 인공접종하여 TMV 완전저항성주율을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 접종 6주후 TMV 감수성 개체는 없었으나 완전저항성주율은 54-64%로 낮았으며 국부적 황반현상이 나타나는 개체의 비율이 R₆ 세대보다 증가하였다. 이 결과는 포장에 아닌 온실에서 수행된 결과로서 포장에서 다시 조사한 결과 유묘기에 접종되어도 포장에서 바이러스 저항성이 증진되는 것으로 보아 온실 실험의 경우 온도, 일장, 식물체의 소질 등의 원인으로 사료되었다. 그러나 세대를 거듭하면서 형질전환 식물체의 바이러스 완전저항성주율이 낮아진 것은 바이러스의 저항성이 형질전환 식물체에 존재하는 DNA에 의한 것이 아니고 RNA 발현 정도에 의한 것인지 등은 추후 연구되어야 할 것으로 사료되었다. 한편 R₈세대에서도 인공접종의 경우 평균 완전저항성주율은 81%로 이결과는 R₇세대에서와 유사한 경향을 보여 R₈세대까지 TMV 저

Table 2. TMV resistance of the R₇ generation of transgenic tobacco plants in the green house condition

Cell lines	#plants ^a	% resistant plant (weeks after inoculation)		
		3	4	6
KF 116 - I	140	86.4	63.6	54.3
KF 116 - II	142	83.1	65.5	58.5
KF 116 - III	104	90.4	85.6	64.6
NC 82	143	0	-	-

^a: All plants were inoculated mechanically with TMV-infected tobacco sap diluted with 0.01M phosphate buffer, pH7.2 (1:6,w/v).

Table 3. TMV resistance of R₇ and R₈ generation of transgenic tobacco plants in the experimental field

Cell lines ^a	#plants	% resistant plant (weeks after inoculation) ^b			
		2	4	6	8
NC 82	140	0	0	0	0
KF 116(R ₇)	20	95	95	95	85
800(R ₈)	179	99	96	90	81

^a: all plants were inoculated with TMV

^b: percentage of TMV resistant plant without delay type at weeks after inoculation

항성이 안정적으로 발현되고있음을 확인하였다 (Table 3).

후세대 형질전환 연초 식물체의 유전자 안정성

R₆ 및 R₇ 세대 형질전환 연초 식물체 염색조직의 Genomic PCR을 실시하여 형질전환 연초의 TMV CP gene의 안정적 유전여부를 확인한 결과는 Fig. 1과 같다. 정상 연초 NC82는 유전자가 존재하지 않았으나(lane 3) 형질전환 연초는 R₆(lane 7, 8, 9), R₇세대(lane 4, 5, 6) 식물체 모두 TMV CP 유전자가 존재하고 있음이 확인되었다. TMV를 인공접종한 형질전환 식물체에 바이러스가 존재하고 있는지 여부를 조사하기 위하여 형질전환

1 2 3 4 5 6 7 8 9

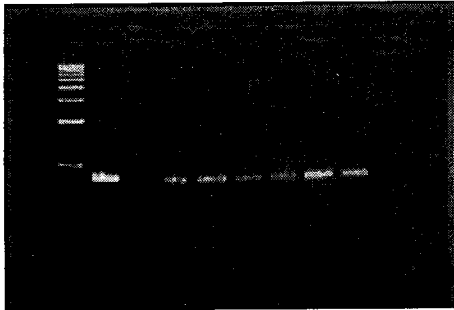


Fig. 1. Genomic PCR of transgenic tobacco plants. Lane 1: DNA kb ladder marker, 2: pSK101 plasmid, 3: normal NC82, Lane 4, 5, 6: R₇ generation of transgenic tobacco plant, Lane 7, 8, 9: R₆ generation of transgenic tobacco plant.

Table 4. Detection of virus in transgenic tobacco plants

Cell lines ^a	Virus detection ^b	
	Biological	Serological
KF 116-I	-	-
KF 116-II	-	-
KF 116-III	-	-
1439	-	-
2116	-	-
2514	-	-
1439 delay	+	+
1439 susceptible	++	++

^a: Plant tissue was harvested in six weeks after artificial inoculation

^b: The virus was detected by back-inoculation to Xanthi-nc tobacco (biological) and by ELISA, -: not detected, +: detected

연초의 엽육즙액에 대한 생물검정 및 항혈청 시험을 수행한 결과는 Table 4와 같으며 TMV를 인공 접종 6주후에도 완전저항성 식물체에는 바이러스가 존재하지 않았으나 delay type 및 susceptible type 연초에는 바이러스가 존재하고 있음을 확인하였다.

결론

연초(*N. tabacum* NC82) 품종에 TMV CP cDNA를 형질전환하여 재분화된 연초 식물체의 자가수분에 의한 후세대 (R₆세대 이후) 연초의 TMV 저항성 발현정도 및 유전자의 안정성을 조사하였다. 형질전환 연초 R₆세대 식물체의 TMV 저항성은 인공접종 8주후에 81-91%로 모두 TMV에 고도저항성이었으며 병징발현지연형의 빈도율은 2-19%이고 평균 완전저항성주율은 88% 이었다. 유묘기 (4-6엽매) TMV 인공접종에 의해 형질전환 연초 R₇세대의 저항성주율을 온실에서 조사한 결과, 접종 6주후 감수성 개체는 없으나 완전저항성주율은 54-64%로 국부적 황반현상이 나타나는 개체의 비율이 R₆세대보다 증가하였다. R₈세대에서도 인공접종의 경우 완전저항성 주율이 R₇세대에서와 같은 경향을 보여 R₈세대까지 바이러스 저항성이 안정적으로 발현됨을 확인하였다. R₆ 및 R₇세대 연초의 Genomic PCR을 실시하여 형질전환 연초의 TMV CP 유전자의 안정적 유전여부를 확인하였으며 형질전환 식물체의 엽육즙액에 대한 항혈청 시험결과 완전저항성 개체에는 바이러스가 존재하지 않았음이 확인되었다.

참고 문헌

- 김상석, 박성원, 이청호, 이기원, 이영기, 이윤환, 박은경, 김남원 (1997) 유전자 조작에 의한 TMV 저항성 연초 품종 육성. 한국인삼연초연구원. *담배연구보고서*(연초경작 육종 및 환경편). 65-113
- 박은경, 박성원, 이청호, 이기원, 이영기, 김상석, 이윤환, 김남원 (1996) 유전자 조작에 의한 TMV 저항성 연초품종 육성. 한국인삼연초연구원 1996년도 *담배연구보고서*(경작분야: 육종 및 환경편):73-124
- Bardonnnet, N., M. A. Serghini, and L. Pinck (1994) Protection against virus infection in tobacco plants expressing the coat protein of grapevine fanleaf nepovirus. *Plant Cell Reports*. 13: 357-360.

- Cuozzo M., K. M. O'Connell, W. Kaniexski, R. X. Fang, N. H. Chua, and N. E. Tumer (1988) Viral protection in transgenic tobacco plants expression the cucumber mosaic virus coat protein of its antisense RNA. *Bio/Tech.* 6:549-557.
- Donson, J., C. M. Kearney, T. H. Turpen, I. A. Khan, G. Kurath, A. M. Turpen, G. E. Jones, W. O. Dawson, and D. J. Lewandowski (1993) Broad resistance to tobamovirus is mediated by a modified tobacco mosaic virus replicase transgene. *Molecular Plant Microbe Interactions* 6: 635-642.
- Lee, K. W., S. W. Park, N. W. Kim, E. K. Park, W. Y. Choi (1996) Delay of disease symptom development in transformed tobacco plants with TMV coat protein cDNA. *Korean J. Plant Tissue Culture* 23(1): 15-20.
- Lindbo, J. A. and W. G. Dougherty(1992) Pathogen-derived resistance to a Potyvirus : Immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a Potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5(2): 144-153.
- Maiti, I. B., J. F. Murphy, J. G. Shaw, and A. G. Hunt (1993) Plants that express a potyvirus proteinase gene are resistant to virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6110-6114
- Park, S. W. and K. W. Lee (1996) The progeny analysis of transformed tobacco plants with TMV coat protein cDNA. *Korean J. Plant Tissue Culture* 23(4): 199-204
- Park, S. W., K. W. Lee, C. H. Lee, S. S. Kim, E. K. Park, S. Y. Choi (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(1): 66-70
- Powell-Abel, P., R. S. Nelson, D. Barun, N. Hoffmann, S. G. Rogers, R. T. Fraley, and R. N. Beachy (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232: 738-743.
- Sanford, J. C. and S. A. Johnston (1985) The concept of pathogen derived resistance: Deriving resistance genes from the parasites own genome. *J. Theor. Biol.* 113:395-405