

담배 모자이크 바이러스 고추계통(TMV-P)의 외피단백질 유전자를 도입한 형질전환 담배의 TMV-P에 대한 반응

최장경* · 홍은주 · 이재열¹ · 장무웅²

강원대학교 농생물학과, ¹경북대학교 미생물학과, ²영남대학교 생물학과

Responses to Infection of Tobacco Mosaic Virus Pepper Strain (TMV-P) in Transgenic Tobacco Plants Expressing the TMV-P Coat Protein or Its Antisense RNA

Jang Kyung Choi*, Eun Ju Hong, Jai Youl Lee¹ and Moo Ung Chang²

Department of Agricultural Biology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

¹Department of Microbiology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

²Department of Biology, Yeungnam University, Kyongsan 712-740, Korea

ABSTRACT : The cDNAs of tobacco mosaic virus-pepper strain (TMV-P) coat protein (CP) genes were introduced into tobacco plants (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun nn) using a binary Ti plasmid vector of *Agrobacterium tumefaciens*. These cDNAs introduced into tobacco plants were detected by polymerase chain reaction. Symptom development was distinctly suppressed in the transgenic plant introduced by sense CP cDNA when the plant was inoculated with TMV-P, while in transgenic tobacco plants of antisense CP gene, symptom development was not suppressed as in non-transgenic plants. TMV-P concentration in the sense CP transgenic tobacco plant was decreased to 1/14 of the concentration in non-transgenic plants. Expression of the kanamycin resistance gene of these transgenic plants could be detected in the progeny.

Key words : tobacco mosaic virus-pepper strain, coat protein gene, transgenic plant.

담배 모자이크 바이러스(tobacco mosaic virus, TMV)는 약 6,400 뉴클레오티드의 외가닥 RNA를 계놈으로 가지고 있으며(7), 5' 말단으로부터 130 K와 180 K의 복제효소유전자(replicase gene), 30 K의 이동단백질유전자(movement protein gene, MP gene) 및 17.5 K의 외피단백질유전자(coat protein gene, CP gene)로 구성되어 있다(6).

우리나라의 고추에서 일반적으로 분리되고 있는 TMV-P계통 바이러스는 지금까지 보고된 다른 계통의 TMV들과는 생물적인 성질에서 많은 차이점을 보이고 있다(4). 최근 우리들은 이 바이러스 계놈 RNA의 일부 염기서열을 분석한 결과 이미 알려진 TMV의 유전자와 많은 차이가 있다는 것을 알게 되었다(미발표).

고추에 발생하는 바이러스병은 매년 막대한 피해를 입히고 있으며, 특히 TMV는 고추의 전체 바이러스병

중 가장 문제가 되고 있다(4). 그러나 바이러스병의 방제에는 뚜렷이 효과적인 방법이 없는 실정이고, 또한 TMV에 저항성인 고추의 품종 개발이 어려운 현실이다. 최근 유전자조작기술의 발전과 더불어 바이러스 유전자를 도입한 형질전환 식물이 바이러스병에 저항성을 갖는다는 보고들이 많고(1, 2, 5, 8, 12, 14, 15), 이의 실용성에 많은 관심이 집중되고 있다(17).

이 연구는 TMV-P의 계놈 RNA로부터 작성한 CP gene의 cDNA를 도입시킨 형질전환 담배를 육성하여 TMV-P에 대한 반응을 검토한 결과로서, 금후 고추에서의 적용을 목적으로 실시하였다.

재료 및 방법

공시 유전자. TMV-P의 CP gene에 대한 cDNA는 reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)에 의해서 합성하고, pUC19/*Escherichia coli*

*Corresponding author.

JM110에 클로닝시킨 클론을 공시하였다(11).

발현벡터의 작성. TMV-P CP gene의 cDNA를 삽입시킬 발현벡터는 CaMV 35S promotor와 NOS terminator 사이에 β -glucuronidase(GUS) 유전자를 포함하며, kanamycin 내성유전자를 가지고 있는 pBI 121(Promega)을 이용하였으며, pTi Ach5에서 T-DNA 부분이 결손된 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환시켰다. 즉 공시한 클론, JM110에서 추출한 플라스미드로부터 *Xba*I 및 *Sac*I을 처리하여 TMV-P CP cDNA를 얻은 다음, 같은 제한효소로 GUS부위를 절단한 발현벡터 pBI121에 삽입시켰다. 이렇게 작성된 발현벡터는 *E. coli* HB101에 형질전환시킨 다음, 클로닝된 콜로니를 선발하였다. 이들 클론으로부터 추출한 재조합플라스미드를 *Sac*I으로 처리하여 삽입된 CP cDNA가 sense방향으로 삽입된 클론과 antisense 방향으로 삽입된 클론을 각각 선발하였다(Fig. 1). *E. coli*에 삽입된 sense 및 antisense cDNA의 *A. tumefaciens*에의 도입은 conjugative plasmid pRK 2013을 이용한 triparental mating법(3)에 의하여 실시하였다.

담배에의 형질전환. *A. tumefaciens* Ti plasmid에 의한 담배(*Nicotiana tabacum* cv. Samsun nn)에의 형질전환은 Horsch 등(10)의 leaf disk법을 따랐다. 즉 kanamycin(25 μ g/ml) 및 rifampicin(100 μ g/ml)을 포함하는 Luria-Bertani(LB) 배지에서 28°C로 20시간 배양

한 각 CP cDNA가 도입된 LBA4404 배양액에 온실에서 생육시킨 담배잎으로부터 채취한 직경 약 6 mm의 leaf disk를 2-5분간 침지시킨 후, naphthaleneacetic acid(NA)(1 mg/l) 및 benzylaminopurine(BA)(0.1 mg/l)을 포함하는 Murashige and Skoog(MS) 배지(13)에 옮겨 약 3,000 lux의 조명하에서 배양하였다. 배양 5일 후에는 *A. tumefaciens* LBA4404를 제거하기 위하여 cefotaxime(500 μ g/ml) 및 kanamycin(200 μ g/ml)을 포함하는 MS배지에 leaf disk를 이식하였다. 이 배지에서 분화하여 성장한 식물체는 kanamycin이 포함된 rooting 배지에 옮겨 발근시켰고, 발근된 식물체는 흙에 이식하여 온실에서 육성하였다.

형질전환체의 선발. TMV-P CP gene의 cDNA가 도입된 형질전환식물체를 선발하기 위하여 육성된 식물로부터 CTAB(cetyltrimethylammonium bromide) 법(16)으로 DNA를 추출하였다. 이렇게 추출한 DNA로부터 도입된 유전자의 확인은 PCR방법을 이용하였다. PCR은 Scharf 등(18)의 방법에 따라 실시하였다. 이때 TMV-P CP gene에 대응하는 DNA의 증폭을 위한 primer는 CP gene의 염기서열에 효과적으로 반응할 수 있도록 작성한 oligonucleotide(11)를 합성하여 사용하였다. PCR반응은 PCR완충액($\times 5$) 10 μ l, 식물체 DNA 10~100 ng과 함께 각 100 pM의 양말단 primer, 0.1 mM MgCl₂, 0.1 mM dNTP 및 5 unit Taq DNA polymerase가 혼합된 50 μ l의 반응액에서 30회(1회 :

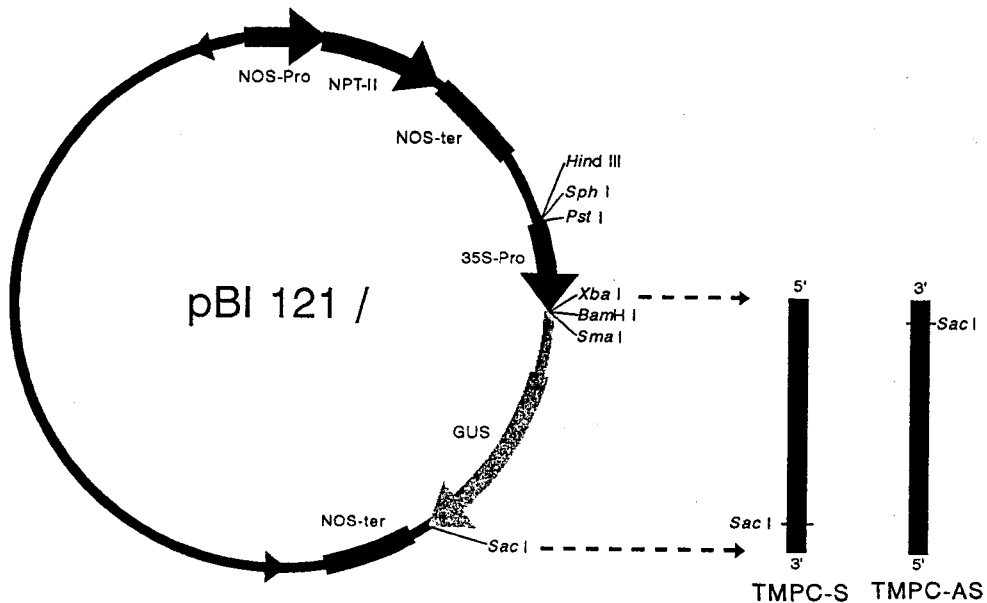


Fig. 1. A schematic representation of two CP cDNA inserts in sense (TMPC-S) and antisense (TMPC-AS) orientations in plant expression vector, pBI121.

denaturation 94°C - 1분, annealing 50°C - 2분, extension 72°C - 3분) 실시하였다. PCR산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동 후 확인하였다.

형질전환체의 TMV-P감염에 대한 반응. 각 CP gene이 도입된 형질전환 담배에 대한 TMV-P의 접종 실험은 각 유전자의 도입이 확인된 담배를 선발하여 온실에서 6~7엽기로 육성한 후 실시하였다. 이때 TMV-P의 농도는 0.05 mg/ml로 조정하여 carborundum(400 mesh)을 이용한 즙액접종법으로 접종한 후, 25~30°C의 온실에 두고 나타나는 병징을 관찰하였다. 한편 이들 형질전환 담배에 증식된 TMV-P의 농도는 *N. tabacum* cv. Samsun NN에서의 국부병반으로 검정하였다. 즉 TMV-P를 접종한 20일 후 형질전환체의 최상엽 0.2g씩을 채취하여 1 ml의 0.01 M 인산완충액(pH 7.5)에 마쇄한 즙액을 Samsun NN의 전개엽에 반엽법으로 접종하였고, 대조로서는 비형질전환 담배에 같은 조건으로 접종한 TMV-P의 즙액을 이용하였으며, 3일 후 여기에 형성된 국부병반수를 산정하였다.

형질전환체의 후대검정. TMV-P CP gene의

cDNA가 도입된 형질전환 담배의 유전적 안정성을 검정하기 위하여 형질전환체들로부터 채증한 자식 종자를 kanamycin(300 µg/ml)을 포함하는 agar배지에 치상하였다. 과중한 각 형질전환체의 종자는 20°C의 배양실(약 3,000 lux)에 두고 정상적으로 발아하여 성장하는 싹과 발아하지 못하거나 발아 후 황변하여 고사하는 싹의 수를 3주 후에 계산하였다. 이때 대조로서 같은 조성의 배지에 비형질전환 담배에서 채증한 종자도 과중하여 비교하였다.

결 과

TMV-P CP gene의 *A. tumefaciens*에의 도입. 공시한 각 CP gene의 cDNA를 삽입시킨 발현벡터 pBI121로 형질전환된 *E. coli* HB101을 pRK2013/*E. coli* HB101 및 *Agrobacterium* LBA4404와 혼합배양 후, kanamycin, rifampicin 및 streptomycin을 포함하는 선택배지에서 형질전환 콜로니를 선발하였다. 선발된 *A. tumefaciens*로부터 추출한 재조합 플라스미드를 제한효소 *Xba*I과 *Sac*I으로 절단한 후 전기영동한 결과, 각 클론으로부터 TMV-P CP gene의 분자크기에 해당

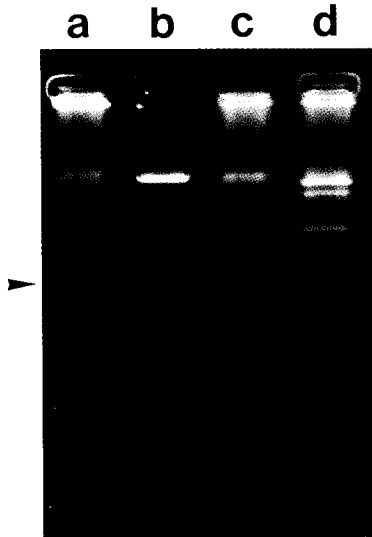


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of TMV-P CP cDNAs (arrow) introduced into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 by triparental mating. Lane a: plasmid DNA extracted from *A. tumefaciens* LBA4404, and lane b: pBI121/TMV-P CP cDNA digested with *Xba*I/*Sac*I. Plasmid DNAs extracted from *A. tumefaciens* transformed with pBI121/TMPC-S (sense CP cDNA, lane c) and pBI121/TMPC-AS (antisense CP cDNA, lane d) were digested with *Xba*I/*Sac*I.

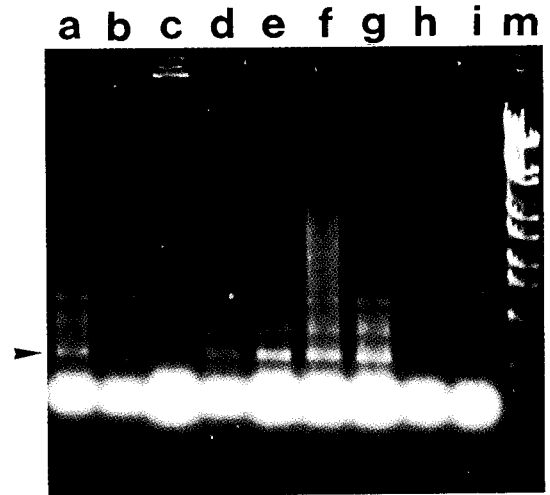


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of PCR products of TMV-P CP cDNAs introduced into tobacco plants. Amplified cDNA fragments (arrow) in DNAs extracted from tobacco transformed with pBI121/TMPC-S (a; TMPC-S4, b; TMPC-S5, c; TMPC-S19 and d; TMPC-S22), pBI121/TMPC-AS (e; TMPC-AS2, f; TMPC-AS6, g; TMPC-AS12 and h; TMPC-AS17) and nontransformant (i) were separated by 1.5% agarose gel. Lane m: λ DNA as a size marker digested with *Eco*T14I.

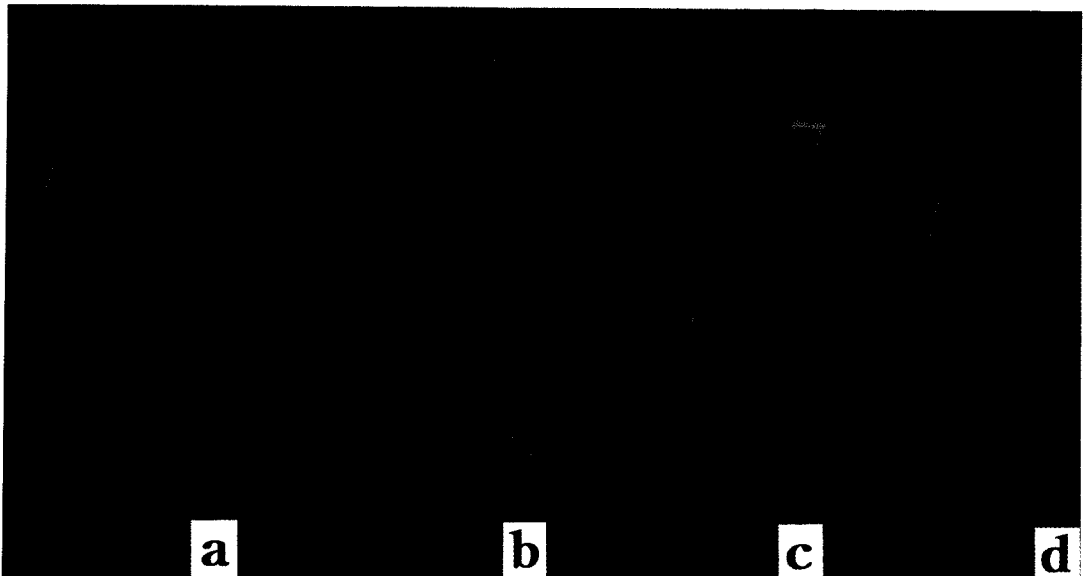


Fig. 4. Symptom development of transgenic and non-transgenic tobacco (Samsun nn) plants 20 days after inoculation with TMV-P. a : non-transgenic plant, b : transgenic plant transformed with sense CP gene (TMPC-S4), c : transgenic plant transformed with antisense CP gene (TMPC-AS2), and d: healthy non-transgenic plant.

하는 DNA의 절편이 확인되었다(Fig. 2).

한편 *A. tumefaciens*로부터 추출한 플라스미드를 CP gene의 primer를 이용하여 PCR로 증폭시킨 결과에서도 약 500 bp 크기의 DNA 증폭이 인정되어 LBA 4404 균체내로 재조합 발현벡터 pBI121이 도입되었음이 확인되었다.

형질전환 담배에서의 CP gene cDNA의 확인. 형질전환 담배의 DNA로부터 TMV-P CP gene cDNA의 삽입 유무를 확인하기 위하여 선택배지에서 육성시킨 형질전환 담배의 잎을 채취하여 CTAB법으로 DNA를 추출하였다. 이 DNA를 CP gene의 양말단 primer를 이용하여 PCR을 실시한 후 그 증폭산물을 전기영동한 결과, sense 및 antisense CP cDNA의 증폭이 확인되었다(Fig. 3).

형질전환 식물의 TMV-P 접종에 따른 반응. CP gene의 도입이 확인된 형질전환체중 같은 크기의 식물체를 선발하여 육성한 형질전환 담배에 TMV-P를 접종하였을 때, sense방향의 CP cDNA가 도입된 형질전환체(TMPC-S4)는 TMV접종에 따른 병징발현이 억제되어 접종 1개월 후에도 병징이 나타나지 않았다. 반면 antisense의 CP(TMPC-AS2)가 도입된 식물체는 비형질전환 담배와 마찬가지로 심한 모자이크가 발현되었으며(Fig. 4), 이러한 현상은 다른 형질전환체(TMPC-AS6 및 TMPC-AS12)에 접종하였을 경우에도

Table 1. Assay of virus concentration in leaves of transgenic and non-transgenic tobacco (Samsun nn) plants inoculated with TMV-P^a

Transgenic plant	No. of local lesions on Samsun NN ^b	
	Transgenic plant	Non-transgenic plant
TMPC-S4	14.7	198.3
TMPC-AS2	188.0	185.2

^a Inoculum was used with 0.2 g of each terminal leaf 20 days after TMV-P inoculation.

^b Average number of lesions produced on three half-leaves of Samsun NN.

Table 2. Genetic analysis of the T₁ progeny of transformants on the agar medium containing kanamycin

Transgenic plant	No. of seedlings (+/-) ^a	Expected ratio	χ^2
TMPC-S4	108/32	3.4 : 1	0.34
TMPC-AS2	126/52	2.4 : 1	1.66

^a No. of kanamycin resistant seedlings (+)/No. of seedlings susceptible to kanamycin (-).

같은 결과를 나타냈다. 한편 이들 식물에 증식된 바이러스의 농도를 접종 후 20일째에 Samsun NN에서 반염법으로 정량하였을 때, TMPC-S4에서 검출된 바이

리스 농도는 비형질전환 담배에 증식된 TMV의 약 1/14이었고, TMPC-AS2에서는 비형질전환체에 증식된 TMV 농도와 차이를 나타내지 않았다(Table 1).

형질전환 담배의 후대검정. 자가수정에 의하여 형성된 각 형질전환체의 자식 종자를 이용하여 조사한 T1 세대의 kanamycin 내성은 약 3 : 1의 분리비를 보였다(Table 2). 한편 비형질전환체의 종자는 kanamycin 배지에서 모두 생장이 억제되었다.

고 찰

1986년 Abel 등(1)이 TMV-U1 계통 바이러스의 게놈 RNA에서 CP gene에 대응하는 cDNA를 *Agrobacterium*의 binary vector를 이용하여 담배에 도입하였을 때, 형질전환된 담배가 TMV의 접종에 대하여 병징발현의 억제를 나타낸다는 사실을 보고한 이래, 여러 종류의 바이러스에서 CP gene을 이용한 바이러스 저항성 형질전환체의 개발에 관한 연구가 이루어졌다(5, 8, 12). 이러한 실험의 결과들은 대부분 같은 종의 바이러스 감염에 대해서 저항성을 갖는 것으로 알려져 있으며, 바이러스 CP gene의 도입으로 나타나는 형질전환 식물체의 바이러스 억제현상의 이유는 아직 확실히 밝혀져 있지는 않으나, 교차방어(cross protection) 현상과 같은 맥락에서 찾고 있다(17). 한편 CP gene 이외에 바이러스 게놈 RNA에 대응하는 antisense RNA를 식물체가 발현하도록 함으로써 형질전환체가 저항성을 발현하도록 하는 방법이 있다(5, 8, 14). 아직까지 식물바이러스의 게놈을 이용한 연구는 많이 이루어져 있지 않으나 이론적으로는 매우 타당성이 있어 관심이 모아지고 있다.

TMV-P는 우리나라의 고추에 널리 분포하면서 문제가 되고 있는 바이러스이다(4). 이 연구는 TMV-P의 게놈 RNA에서 CP gene을 sense 및 antisense 방향으로 담배에 도입하였을 때, TMV-P의 접종에 대하여 어떠한 반응을 나타내는가를 알아보았다. 이들 각 유전자가 도입된 형질전환 담배에 TMV-P를 접종한 결과, sense CP가 도입된 형질전환체는 TMV-P의 접종에 따른 병징발현이 효과적으로 억제되었다. 이러한 결과는 지금까지 보고된 바이러스 외피단백질이 발현되도록 작성된 형질전환체들에 있어서의 바이러스 저항현상과 일치하고 있다(1, 5, 12). 그러나 antisense CP가 도입된 형질전환체에서는 병징발현이 억제되지 않았는데, 그 이유를 다음과 같이 생각해 볼 수 있다. 우선 이 실험에서 선발한 형질전환체의 DNA에 삽입된 CP cDNA로부터 식물체내에 전사되는 antisense

RNA의 양이 매우 적거나 또는 전사되지 못하는 경우이다. 실제로 이 형질전환체로부터 TMV-P RNA의 검출을 시도하였으나 실패하였다. 이와 같은 결과는 Powell 등(14)도 TMV CP gene에 대응하는 antisense RNA를 발현하도록 작성한 형질전환 담배가 TMV의 감염을 억제하지 못하였다고 보고하고 있다. 다른 하나의 이유는 바이러스 게놈 RNA의 염기서열중에 antisense RNA로서의 효능을 발휘할 수 있는 특정한 부위가 존재할 가능성이 있다. Rezaian 등(15)은 오이 모자이크 바이러스(cucumber mosaic virus, CMV) 게놈으로부터 서로 다른 3부위의 cDNA를 도입하여 각각 antisense RNA를 발현할 수 있는 형질전환담배를 작성하였을 때, CMV의 감염에 대해서 유전자별로 저항현상에 차이가 현저하다는 사실을 보고하고 있다. 한편 CMV CP의 sense 및 antisense gene을 도입시킨 형질전환 담배에 CMV를 접종하였을 때, sense의 형질전환체에 비해서 antisense 식물체는 저농도의 바이러스를 접종하였을 경우에만 저항현상을 보였다는 보고도 있다(5). 따라서 antisense RNA를 발현시키는 형질전환체의 작성에는 금후 여러 측면의 검토가 필요할 것으로 생각된다.

이 실험에서 공시한 형질전환 담배의 T1종자를 대상으로 kanamycin 내성을 조사하였을 때, 각 형질전환체에서 약 3 : 1의 내성개체가 분리되어 멘델의 분리비와 유사하게 유전된다는 사실이 인정되었다. 이러한 결과는 TMV-P의 CP gene을 도입시킨 형질전환체의 유전적 안정성이 있다는 것을 시사해 주고 있다.

요 약

TMV-P 외피단백질유전자(CP gene)의 cDNA를 *Agrobacterium tumefaciens*의 binary Ti plasmid vector를 이용하여 담배(Samsun nn)에 도입하였다. 형질전환된 담배로부터 도입된 CP cDNA는 PCR에 의해서 확인되었다. 선발한 형질전환 담배중, CP gene이 sense방향으로 도입된 형질전환체는 TMV-P를 접종하였을 때 병징발현을 현저하게 억제하였다. 그러나 CP gene이 antisense 방향으로 도입된 형질전환체에서는 비형질전환 식물과 마찬가지로 바이러스의 접종에 따른 병징발현을 억제하지 못하였다. Sense CP gene이 도입된 형질전환체에 증식된 TMV-P의 농도는 비형질전환체에 증식된 바이러스 농도의 1/14이었다. 이들 형질전환체의 자식종자를 발아시켰을 때 kanamycin 내성이 인정되었다.

감사의 말씀

이 논문은 1991년도 한국과학재단의 목적기초 연구 과제(91-05-00-10) 연구비의 지원으로 수행 되었습니다.

참고문헌

1. Abel, P. P., Barun De, R. S. N., Hottman, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T. and Beachy, R. N. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232 : 738-743.
2. Angenent, G. C., Van den Ouweland, J. M. W. and Bol, J. F. 1990. Susceptibility to virus infection of transgenic tobacco plants expressing structural and nonstructural genes of tobacco rattle virus. *Virology* 175 : 191-198.
3. Bevan, M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 12 : 8711-8721.
4. Choi, J. K., Park, Y. S., Kim, J. O. and Park, E. K. 1989. Biological characterization of a strain of tobacco mosaic virus isolated from hot pepper. *Korean J. Plant Pathol.* 5 : 331-336.
5. Cuzzo, M., O'Connell, K. M., Kaniewski, W., Fang, R. X., Chua, N. H. and Tumer, N. E. 1988. Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *Bio/Technology* 6 : 549-557.
6. Dougherty, W. G. and Hiebert, E. 1985. Genome structure and gene expression of plant RNA viruses. In : *Molecular Plant Virology Vol. II*, ed. by J. W. Davies, pp. 23-81. CRC Press Inc., Florida.
7. Goelet, P., Lomonosoff, G. P., Butler, P. J. G., Gait, M. J. and Karm, K. 1982. Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 5818-5822.
8. Hemenway, C., Fang, R. X., Kaniewski, W. K., Chua, N. H. and Tumer, N. E. 1988. Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. *EMBO J.* 7 : 1273-1280.
9. Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J. and Schilperoort, R. A. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303 : 179-180.
10. Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G. and Fraley, R. T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227 : 1129-1231.
11. Lee, J. Y., Jung, D. S., Chang, M. U. and Choi, J. K. 1993. Effective cloning of coat protein gene isolated from tobacco mosaic virus pepper (TMV-P) strain. *Korean J. Plant Pathol.* 9 : 136-138.
12. Loesch-Fries, L. S., Merlo, D., Zinnen, T., Burhop, L., Hill, K., Krahn, K., Jarvis, N., Nelson, S. and Halk, E. 1987. Expression of alfalfa mosaic virus RNA 4 in transgenic plants confers resistance. *EMBO J.* 6 : 1845-1852.
13. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15 : 69-76.
14. Powell, P. A., Stark, D. M., Sanders, P. R. and Beachy, R. N. 1989. Protection against tobacco mosaic virus in transgenic plants that express tobacco mosaic virus antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 6949-6952.
15. Rezaian, M. A., Skene, K. G. M. and Ellis, J. G. 1988. Anti-sense RNAs of cucumber mosaic virus in transgenic plants assessed for control of the virus. *Plant Mol. Biol.* 11 : 463-471.
16. Rogers, S. O. and Bendich, A. J. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5 : 69-76.
17. Sanders, P. R., Sammons, B., Kaniewski, W., Haley, L., Layton, J., Lavalley, B. J., Delannay, X. and Tumer, N. E. 1992. Field resistance of transgenic tomatoes expressing the tobacco mosaic virus or tomato mosaic virus coat protein genes. *Phytopathology* 82 : 683-690.
18. Scharf, S. J., Horn, G. T. and Erlich, H. A. 1986. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science* 233 : 1076-1078.