

오이 모자이크 바이러스 外皮蛋白質 遺傳子 分離 및 담배로의 形質轉換

孫星漢* · 金京煥 · 金永兌 · 朴鍾錫 · 金周坤¹ · 李光雄² · 黃永秀
農村振興廳 農業科學技術院 生物資源部 生化學科
¹水原大學校 工科大學 遺傳工學科, ²서울大學校 自然科學大學 生物學科

Isolation of Coat Protein Gene from Cucumber Mosaic Virus and Its Introduction into Tobacco

Seong-Han SOHN*, Kyung-Hwan KIM, Yeong-Tae KIM, Jong-Sug PARK, Ju-Kon KIM¹
Kwang-Woong LEE², and Young-Soo HWANG

Biochemistry Division, National Agricultural Science and Technology Institute, RDA, Suwon 441-707:

¹Department of Genetic Engineering, University of Suwon, Hwaseong, 445-743: and

²Department of Biology, Seoul National University, Seoul, 151-742. *Corresponding author.

The coat protein (CP) gene was cloned from RNA genome of the cucumber mosaic virus strain ABI (CMV-ABI) isolated in Korea. The comparisons of the nucleotide sequence of the cloned CP gene and its deduced amino acid sequences with other CP genes revealed that the CMV-ABI belongs to subgroup I (Type I), CMV-ABI developed the typical mosaic symptom in infected plants. Tobacco plants (Samsun and NC82) were transformed by leaf-disc transformation *via* *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 harbouring pVCP, which CMV-ABI CP gene was inserted into the pBI121, and a number of mature transgenic tobacco plants were developed. Southern and PCR analysis of genomic DNA from the transgenic plants showed that the CP gene was integrated into the genomes of the most of the transgenic plants. Results of the segregation patterns of resistance in T₁ seedlings of the plants to kanamycin showed that the transgenic plants containing 1, 2 and 3 copies of CP gene were 50%, 39% and 11% of the total transgenic plants, respectively.

Key word: *Agrobacterium tumefaciens*, CMV, *Nicotiana tabacum*

오이모자이크 바이러스(CMV: cucumber mosaic virus)의 분포는 全世界의이나 주로 溫帶地方에서 그 發生이 심한 것으로 알려지고 있다(Francki et al., 1979). CMV는 식물 바이러스 중 cucumovirus 系統으로서 4개(RNA 1, 2, 3, 4)의 positive sense RNA genome 외에 strain에 따라 衛星 RNA(satellite RNA)를 가지고 있는 球型 바이러스(icosahedral virus)에 속한다. RNA 1, 2의 유전자는 genome의 複製(replication)에 관련이 있고 RNA에는 外皮蛋白質(coat protein, CP)과 세포간의 移動에 관련되는 유전자인 movement protein(MP)이 존재한다. CMV는 寄主와 病徵(pathogenicity)에 따라 여러 종류의 strain이 보고되었고 그 寄主 範圍는 Chung 等 (1975)이 보고한 바와 같이 한국에서는 가지과 식물인 담배, 고추, 토마토, 가지 등을 비롯하

여 박과의 수박, 참외, 오이 등 27科 71種이었다.

CMV의 分類 및 系統에 관한 연구는 주로 기주범위, 病徵, 血清學的 反應(serological study) 등을 통하여 이루어진 후 核酸交雜法(hybridization analysis, Gonda and Symons, 1978; Piazzolla et al., 1979)과 CP의 peptide mapping(Edwards and Gonsalves, 1983) 등이 이용되었고 최근에는 RNA 3에 대한 PCR, 制限酵素地圖(Rizos et al., 1992), 염기서열 분석을 통하여 CMV가 두 가지의 subgroup으로 구분될 수 있다는 것을 확인하였다(Owen et al., 1990).

바이러스병 방제는 현재까지 특별한 방법이 없기 때문에 분자생물학적으로 저항성 작물의 개발이 시도되었는데 최초로 CP 유전자를 식물에 導入, 發現시켜 저항성을 유도한 경우는 tobacco mosaic virus (Abel et al., 1986)를 시작으로

하여 alfalfa mosaic virus (Tumer et al., 1987), potato virus X (Hemenway et al., 1988), tobacco streak virus (Van Dun et al., 1988) 등이 있으며 CMV에 대한 저항성 작물을 개발한 경우는 CMV strain D의 RNA 4 cDNA를 담배에 도입, 저항성을 附與하였고(Cuozzo et al., 1988) 그 외에도 CP 유전자를 도입하여 저항성을 유도한 경우도 있다(Quemada et al., 1991; Namba et al., 1991). CP나 다른 바이러스 유전자가 식물에 도입, 발현되어 저항성을 나타내는 저항성 기작을 밝히려는 연구 사례는 바이러스 由來 유전자의 발현으로 인해 바이러스가 식물 조직내에서 정상적인 複製를 방해받거나(Sanford and Johnston, 1985) 또는 도입된 유전자의 강한 발현이 식물이 가지고 있는 endogeneous gene이나 viral gene의 발현을 방해할 수 있다는 可能性(Herskowitz, 1987)도 제시되었으며 단백질을 생합성할 수 없는 non-translatable 외피단백질 유전자를 도입했을 때 CP를 생합성할 수 있는 유전자보다 더 높은 저항성을 보이는 결과가 제시되기도 하였다(Dougherty et al., 1994; Smith et al., 1994). 이러한 결과들을 미루어 볼 때 바이러스 유전자를 식물에 도입하여 저항성을 부여하기 위해서는 도입된 유전자의 발현의 초기단계인 RNA transcription 強度와 有關하며 일반적으로 알려진 co-suppression (Seymour et al., 1993; de Carvalho et al., 1992; Smith et al., 1990)과 유사한 機作으로 추정하고 있다.

본 연구는 農村振興廳 農業技術研究所 Kim 등(1992)이 分離 同定한 한국산 CMV를 이용하여 CP 유전자를 분리하고 그 구조를 밝히는 동시에 식물에 이 유전자를 插入, 發現시킴으로써 CMV에 저항성을 보이는 우수한 내바이러스성 작물을 개발하는 것을 목적으로 하며 본 논문에서는 一次的으로 CP 유전자를 분리 하여 그 구조 및 특성을 확인하고 이를 담배에 삽입 형질전환시켜 유전자의 도입을 확인한 후 後代에서 보이고 있는 유전자 分離樣相에 대해서 報告하고자 한다.

材料 및 方法

외피단백질 유전자 분리

농촌진흥청 농업기술연구소에서 분양받은 CMV를 담배 (*Nicotiana tabacum* var. Samsun)에 接種하여 增殖시키고 Takanami (1981)의 방법에 따라 이병주로부터 바이러스 粒子を 純粹分離 하였다. 분리된 바이러스 입자로부터 RNA를 추출하고 이로부터 cDNA 합성과 PCR을 이용하여 CP 유전자를 분리하였다. RNA로부터 cDNA를 합성하고 CP 유전자를 합성하는 방법은 RT-PCR kit (N808-0069, Perkin Elmer Cetus)를 사용하였고 CP 유전자를 합성하기 위한 primer는 N-末端(5'-TTT CTC ATG GAT GCT TCT CCG

CGA G-3')과 C-말단(5'-CCA TTT TAG CCG TAA GCT GGA TGG AC-3')을 사용하였다. PCR 수행시 온도조건은 denaturation(95° C/1 min), annealing(55° C/2 min), extension(72° C/3 min)으로 35회 增幅하였다. 증폭된 CP 유전자를 TA cloning kit (Invitrogen)를 이용하여 pCRII vector에 삽입하여 염기서열을 확인하였다.

담배 형질전환

pBI121 (Clontech)을 *SmaI/SacI*으로 절단하여 GUS 유전자를 제거시킨 運搬體에 염기서열이 확인된 CP 유전자를 *EcoRV/SacI*으로 切斷하여 ligation시킴으로써 CMV CP 유전자를 식물체에 도입시킬 수 있는 pVCP를 제작하였다. pVCP는 Holster 등(1978)의 방법에 따라 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 도입시켰다. *A. tumefaciens* LBA4404 (pVCP)를 바이러스 증식용 담배인 Samsun과 주 栽培種인 NC82에 Robert 등(1988)의 방법으로 담배 葉肉細胞에 형질 전환시켰다. 형질전환된 담배 세포는 캘러스 유기(2 mg/L NAA, 0.5 mg/L BA), shoot 유도(0.5 mg/L BA), 뿌리 유도(0.1 mg/L NAA)의 과정을 거쳐 유식물체로 재분화되었다. 이때 형질전환된 개체를 선발하기 위한 抗生劑는 kanamycin (100-150 mg/L)과 carbenicillin (500 mg/L)을 MS 배지에 첨가하여 사용하였다.

외피단백질 유전자 삽입 확인

재분화된 담배의 genomic DNA에 CP 유전자의 삽입 확인은 genomic DNA Southern blot과 PCR DNA gel blot로 확인하였다. 이를 위해 1차적으로부터 Murray와 Thompson (1980) 방법을 變用하여 DNA를 분리하였고, 분리된 DNA 10-15 μ g을 制限酵素로 절단한 후 0.8% agarose gel에 電氣泳動한 다음 nylon membrane (Gene Screen Plus, NEF976)에 vacuum transfer unit (Hoefer, TE80)을 이용하여 DNA를 옮긴 후 32 P-dATP로 labeling한 P1 (*Bam*HI fragment), P2 (*Pst*I/*Eco*RI fragment) probe (Figure 2)로 核酸交雜으로 Southern blotting을 수행하였다. 이때 핵산교잡방법은 65° C에서 6X SSC, 5% dextran sulfate, 0.1% SDS의 혼성화용액으로 24시간동안 핵산교잡한 후 2X SSC (30 min)와 2X SSC 0.1% SDS(2 hr)로 세척하였다. 세척된 nylon membrane은 X-ray film (Kodak X-OMAT)에 2일간 노출시켰다. PCR 및 PCR DNA gel blotting은 분리된 genomic DNA 1 μ g으로 CP 유전자의 분리와 동일한 방법으로 수행하고 agarose gel에 전기영동한 후 Southern blotting과 동일한 방법으로 핵산교잡을 수행하여 CMV CP 유전자의 식물체내 삽입을 확인하였다. PCR시 생합성반응이 정확히 일어났는가를 證明하기 위해서 식물의 *rbcS* 유전자를 200 bp 정도의 크기로 합성할 수 있는 intergenic sequence primer (5'-

TACTATGATGGCAGATACTGGACCATGTGGAAG-3', 5'-TTAGTAGCCTTCTGGCTTGTAGGCGATGAAACT-3')를 합성하고 CMV CP primer와 함께 반응을 수행하였다.

형질전환 담배의 후대(T1)의 Kanamycin 저항성 검정

형질전환된 담배(T₀)의 종자를 수확하여 1% sodium hypochlorite에 20분간 소독한 후 500 mg/L kanamycin이 첨가된 MS 기본배지에서 발아시켜 1개월 후 抵抗性인 개체와 感受性을 보이는 개체의 수를 확인하여 후대에서의 NPTII 유전자 및 CP 유전자의 분리비와 T₀세대에 삽입된 유전자의 수를 chi-square test로 推定하였다

結果 및 考察

오이모자이크 외피단백질 유전자의 構造 및 特性

분리된 바이러스 입자로부터 RNA를 추출하고 RT-PCR을 수행한 결과 894 bp의 DNA단편이 합성되었다. 합성된 DNA 斷片을 pCRII vector에 삽입한 후 염기서열을 결정한 결과(Figure 1), CP 유전자는 218개의 아미노산으로 구성되었음을 확인하였다. 이와 같은 구조는 다른 strain의 CP 유전자의 경우와 동일한 것으로 나타났으며(Noel and Tahar, 1987; Shintaku, 1991) 이미 보고된 strain의 염기서열과 아미노산 서열의 유사성을 비교한 결과(Table 1), Owen 등 (1990)이 제안한 CMV-Y, -O, -P6, -FC, -I17F 등의 strain이 속한 subgroup I(type I)과 염기 및 아미노산 서열에서 각각 92%, 97% 정도의 類似性을 보이는 데 반하여 CMV-Q, -WL이 속한 subgroup II(type II)와는 염기 및 아미노산서열은 각각 75%, 80%로 현격하게 차이가 나타남을 확인하여 본 연구에서 분리, 확인한 바이러스인 strain ABI(Agricultural Biotechnolgy Institute)는 subgroup I에 포

tttctcatggatgcttctccgcgagattgc	30
gtttcgtctactggatcttaagagctgtgtgtgtgttttctcttttctgtgtgtagatatt	93
tgagtcgagtc ATG GCA AAA TCT GAA TCA ACC AGT GCT GGT CGT AAC CGT	143
M A K S E S T S A G R N R	13
CGA CGT CGT CCG CGT CGT GGT TCC GSC TCC GCC TCC TCC TCC GCG GAT	191
R R R P R R R G S R S A S S S A A D	29
GCC AAC TTT AGA GTC CTG TCG CAG CAA CTT TCG CGA CTT AAT AAG AAG	239
A N F R V L S Q Q L S R L N K T	45
TTG GCA GCT GGT CGT CCT ACC ATT AAC CAC CCA ACC TTT GTG GGG AGT	287
L A A G R P T I N H P T F V G S	61
GAA CGT TGT AAA CCT GGG TAC ACG TTC TCA TCT ATT ACC CTG AAG CCA	335
E R C K P G Y T F S S J T L K P	77
CCG AAA ATA GAC CGC GGG TCT TAT TAT GGT AAA AGG TTG TTA CTA CCT	383
P K I D R G S Y Y G L R L L P	93
GAT TCA GTC ACG GAA TTC GAT AAG AAG CTT GTT TCG CGC ATT CAA ATT	431
D S V T E F D K K L V S R I Q I	109
CGA GTT ATT CCT TTG CCG AAA TTT GAT TCT ACC GTG TGG GTG ACA GTC	479
R V I P L P K F D S T V W V T V	125
CGT AAA GTT CCT GCC TCC TCG GAC CTG TCC GTC GCC GCC ATC TCT GCT	527
R K V P A S S D L S V A A I S A	141
ATG TTT GCG GAC GGA GCC TCA CCG GTA CTG GTT TAT CAG TAT GCT GCA	575
M F A D G A S P V L V Y Q Y A A	157
TCC GGA GTC CAA GCC AAC AAT AAA TTG TTG TAT GAT CTT TCG GCG ATG	623
S G V Q A N N K L L Y D L S A M	173
CGC GCT GAT ATT GGC GAC ATG CGA AAG ATC ACC GTT CTC GTG TAT TCA	671
R A D I G D M R K I T V L V Y S	189
AAA GAC GAT GCT CTC GAG ACG GAT GAG TTA GTA CTT CAT GTC GAC ATC	719
K D D A L E T D E L V L H V D I	205
GAG CAC CAA GSC ATT CCC ACA TCT GGG GTG CTC CCA GTT TGA atccgtg	768
E H Q R I P T S G V L P V *	219
tttcccagaacctccctccagttttctgagggcgggagctgagttggcagttttgctacaac	831
tgctcggagtcactaaacgctttgcggggaacgggttgcctaccagcttaccggctaaaatgg	894

Figure 1. Nucleotide and deduced amino acid sequence of CMV coat protein gene. The sequence data was registered on the GenBank, EMBL Data Library as an accession number L36525.

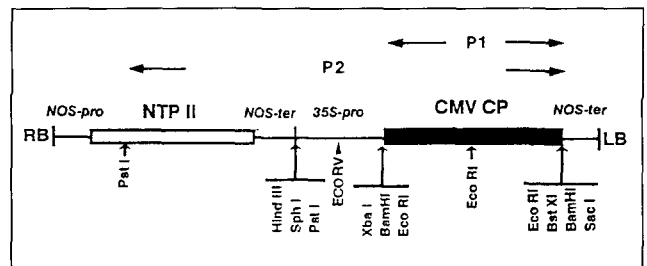


Figure 2. Schematic representation of the binary vector containing the CMV CP gene (pVCP) used for tobacco transformation. LB and RB, left and right borders of T-DNA. P1 and P2 indicate the probes hybridized for genomic DNA Southern and PCR DNA blottings, respectively.

Table 1. Comparison of nucleotide and amino acid sequence homologies of CMV-ABI CP gene with those of other CMV strains. Homology search and analysis were carried out with the DNASIS, PROSIS (Hitachi) and GenBank Database.

CMV Type	Strain	Match (%)	
		DNA homology	Protein homology
Subgroup I	I17F	92.9	97.2
	FC	93.6	96.8
	P6	94.4	96.8
	O	92.1	96.8
	Y	92.7	96.8
Subgroup II	Q	74.8	81.7
	WL	76.6	80.7

함되는 것으로 인정되었다. 또한 Shintaku 등(1992)이 밝힌 바와 같이 외피단백질 구조중 바이러스 症狀에 결정적인 위치에 해당하는 129번째 위치의 아미노산의 종류가 proline 으로서 chlorosis 증상을 보이는 serine일때와 달리 mosaic 증상을 보이는 strain으로 밝혀졌다.

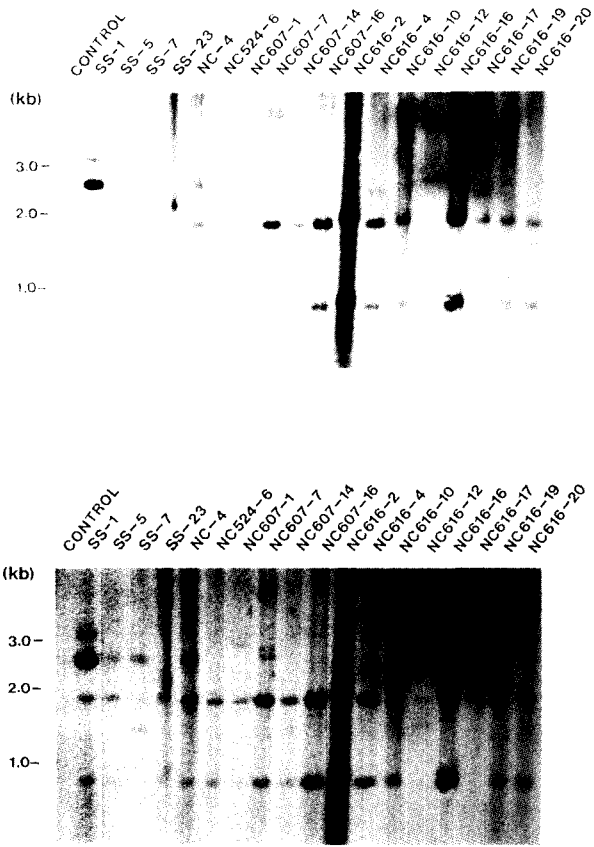


Figure 3. Southern analysis of genomic DNA from *To* transgenic tobacco lines. Genomic DNA were digested with *SacI* and *PstI*, electrophoresed on 0.8% agarose gels and transferred to nylon membranes. Molecular size markers are given at left in kilobases. The blot was probed with P2 fragment as shown in Figure 2. The probe contains the two genes of partial NPTII and complete CMV CP (CONTROL, untransformed plant; the other lanes, independent lines of transgenic tobacco).

담배 형질전환 및 유전자 삽입 확인

CP 유전자를 담배에 도입시키기 위하여 제작한 binary vector (pVCP)의 模式圖는 Figure 2와 같다. pVCP가 도입된 *A. tumefaciens* LBA4404를 바이러스 증식용 재료인 Samsun과 국내 주요 재배종인 NC82의 잎절편에 감염시키고 재분화를 유도하였다. 이때 형질전환된 개체를 선발하는데 Samsun의 경우 kanamycin을 150 mg/L로 사용하고 NC82의 경우 100 mg/L의 농도를 사용하여 최종적으로 Samsun은 16개의 개체를, NC82는 30개의 개체를 육성할 수 있었다.

형질전환된 담배에 CP 유전자가 올바르게 삽입되었는지 확

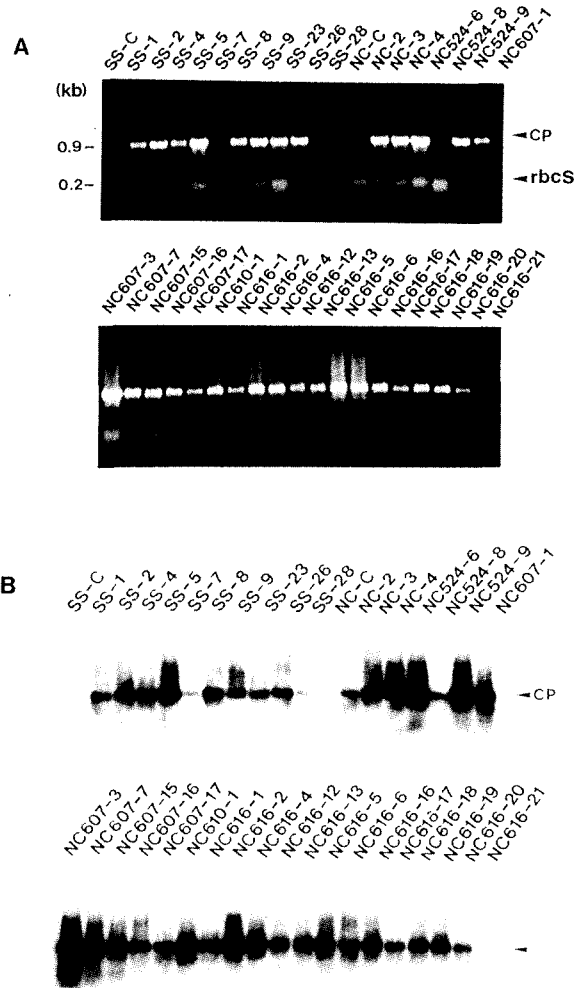


Figure 4. DNA gel blots of PCR-amplified products from genomic DNA of independent transgenic lines of tobacco. A, PCR-amplified products are indicated by arrow-heads, CMV CP bands were amplified at size 0.9 kb in transgenic plants only (primers for intergenic control produce the band at size 0.2 kb). B, DNA gel blots were hybridized with the probe P1 as shown in Figure 2. Molecular markers (kb) are shown on the left (SS-C and NC-C, untransformed tobacco plants; the other lanes, different lines of transgenic tobaccos).

인하기 위해서 genomic Southern blotting과 PCR gel blotting을 동시에 사용하였다. Figure 3은 형질전환된 서로 다른 유래의 담배의 잎 DNA를 제한효소인 *PstI/SacI*으로 절단하여 Southern blotting한 것으로서 이때 probe로 P2 (Figure 2)을 사용하였다. 이 경우 예상되는 band의 위치는 NPTII 일부 유전자에 해당하는 0.7 kb와 CMV CP와 35S promotor가 포함된 1.8 kb의 두 개의 band가 나타나게 된다. 그러나 Southern blotting에 사용된 대부분의 개체에서는 다같이 두 개의 band가 출현함을 확인할 수 있었으나 NC616-17에서는

Table 2. Estimation of copy numbers of transgenes in the transformants (T₀) produced by pVCP, and segregation patterns for kanamycin (Kan) in T₁ transgenic tobaccos.

Transformant line ^a	Number of plants ^b		Expected Segregation ratio	X ^{2c}	Probability ^d	Copy No.
	Kan ^R	Kan ^S				
SS-1	182	16	15:1	1.132	0.3-0.2	2
SS-3R	63	27	3:1	1.2	0.3-0.2	1
SS-3	195	10	15:1	0.658	0.5-0.3	2
SS-4	205	2	63:1	0.478	0.5-0.3	3
SS-4R	201	5	63:1	1.001	0.5-0.3	3
SS-5	118	8	15:1	0.002	0.99-0.95	2
SS-7	138	12	15:1	0.784	0.5-0.3	2
SS-8R	73	28	3:1	0.399	0.7-0.5	1
SS-9	207	2	63:1	0.498	0.5-0.3	3
SS-11	103	31	3:1	0.248	0.7-0.5	1
SS-21	93	6	15:1	0.006	0.95-0.8	2
SS-23	58	15	3:1	0.771	0.5-0.3	1
SS-28	214	23	15:1	4.827	0.05-0.01	2
NC2	109	8	15:1	0.068	0.8-0.7	2
NC3	232	3	63:1	0.124	0.8-0.7	3
NC4	168	71	3:1	2.824	0.2-0.05	1
NC524-6	176	66	3:1	0.666	0.5-0.3	1
NC524-9	141	46	3:1	0.016	0.7-0.5	1
NC607-1	176	62	3:1	0.140	0.8-0.7	1
NC607-3	125	27	3:1	4.245	0.05-0.01	1
NC607-14	166	48	3:1	0.753	0.5-0.3	1
NC607-15	190	54	3:1	1.071	0.5-0.3	1
NC607-16	249	15	15:1	0.322	0.7-0.5	2
NC610-1	175	53	3:1	0.374	0.7-0.5	1
NC616-1	164	64	3:1	1.146	0.3-0.2	1
NC616-2	222	18	15:1	0.640	0.5-0.3	2
NC616-4	207	17	15:1	0.685	0.5-0.3	2
NC616-5	185	55	3:1	0.555	0.5-0.3	1
NC616-8	189	60	3:1	0.108	0.8-0.7	1
NC616-10	181	64	3:1	0.164	0.5-0.3	1
NC616-13	235	24	15:1	4.021	0.05-0.1	2
NC616-16	265	13	15:1	1.175	0.3-0.2	2
NC616-17	152	49	3:1	0.041	0.95-0.8	1
NC616-19	155	53	3:1	0.025	0.95-0.8	1
NC616-20	241	20	15:1	0.889	0.5-0.3	2
NC616-23	145	8	15:1	0.272	0.7-0.5	2
SS-2	156	22	(7:1) ^e	-	-	1-2
SS-7R	113	20	(5:7:1)	-	-	1-2
NC607-3	125	27	(46:1)	-	-	1-2
NC607-7	153	32	(6:1)	-	-	1-2

^a Transformants with designations that differ only in the letters of the alphabet were regenerated from different lines of cells.
^b The segregation of kanamycin resistance by screening the seedlings on the media containing 500 mg/L kanamycin.
^c Chi-square values were calculated for an optimum segregation ratio which as expected from the ratio of resistant (Kan^R) : susceptible (Kan^S) plants.
^d X² probability with 1 degree of freedom.
^e Observed segregation ratio of resistant (Kan^R): susceptible (Kan^S) plants

NPTII 유전자의 band의 소멸이 관찰되고 SS-1, SS-5, SS-7, NC-4, NC607-7, NC616-12 등의 개체에서는 예상되는 크기 이상의 band 출현을 관찰할 수 있었다(Figure 3). 이러한 현상을 정확히 설명할 수는 없지만 삽입된 pVCP의 T-DNA 부위가 식물체 genome에 삽입될 때 또는 삽입되고 난 후에 재배열(gene rearrangement)의 가능성도 배제할 수 없으리라

Table 3. Frequency analysis of transgene copy number in transgenic tobacco plants (T₀)

No. kanamycin resistant plants	Copy number ^a		
	1	2	3
36 (100%)	18/36 (50%)	14/36 (39%)	4/36 (11%)

^aEstimation of copy number by segregation patterns for kanamycin-resistance.

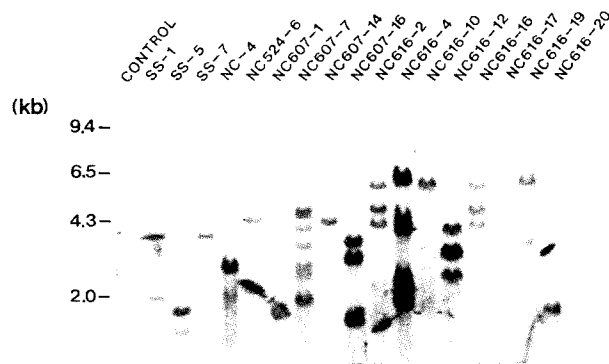


Figure 5. Genomic DNA Southern analysis for estimation of transgene numbers of T₀ transgenic tobacco lines. Genomic DNA were digested with *EcoRV*. Molecular size marker (kb) are given at left in kilobases. The blot was probed with P1 fragment as shown in Figure 2 (CONTROL, untransformed plant; the other lanes, different lines of transgenic tobacco).

사료된다.

또한 Southern blot에 추가적으로 38개의 개체에 대하여 PCR을 수행하고 이를 다시 gel blotting을 하여 확인한 바에 의하면 모든 개체에서 합성강도에 약간의 차이가 있지만 200 bp 정도의 *rbcs* 유전자의 band가 합성됨을 확인하여 모든 tube가 정확히 PCR이 수행됨을 확인하였고(Figure 4a) 대조로 사용된 담배의 DNA(Figure 4, c1, c2)를 제외하고는 모든 DNA에서 900 bp의 CP 유전자로 추정되는 band의 합성을 관찰하였다. 이들 900 bp의 band가 CMV CP 유전자임을 확인하기 위해 PCR gel을 blotting하여 P1 probe(Figure 2)와 혼성화반응을 수행한 결과(Figure 4B) CP 유전자임을 확인하였고 Southern blot에서 확인된 모든 개체는 PCR DNA gel blot로도 동일한 결과를 보여 PCR gel blot으로도 외부 유전자의 식물체 genome에의 삽입을 확인하였다.

유전자 도입 갯수의 확인

형질전환된 담배의 종자를 수확하여 500 mg/L kanamycin 이 포함된 MS 기본배지에서 발아시키고 1개월 후 저항성

을 보이는 개체와 감수성인 개체를 세어 chi-square test를 수행한 결과(Table 2)에서 kanamycin 저항성으로 확인한 유전자의 도입 갯수에 따른 비율을 보면 한 개의 유전자가 삽입된 경우는 검정한 형질전환 계통중 50%를 차지하였고 2개의 유전자가 삽입된 계통은 39%이며 3개의 유전자가 삽입된 경우는 11%에 불과하여 주로 1개의 유전자가 삽입된 형질전환 계통의 비율이 가장 높았다(Table 3). 대부분의 형질전환 개체는 삽입된 유전자의 갯수를 통계적으로 추정하는데 큰 문제가 없었으나 SS-2, SS-7R, NC607-3, NC607-7의 경우에는 뚜렷한 저항성을 보이는 데도 불구하고 관찰된 분리비로부터 통계적으로 유전자의 삽입 갯수를 추정할 수 없는 경우도 보였다(Table 2 하단).

종자 발아 시험으로 유전자 삽입 갯수를 확인하는 동시에 Southern blot을 통해서도 검증을 시도하였다. 도입된 형질전환 운반체(pVCP)의 T-DNA 부위중 35S promotor 한 곳에 절단위치만을 가진 *EcoRV*를 사용 genomic DNA를 절단하고 CMV CP에 해당하는 P1 probe (Figure 2)로 핵산교잡하여 유전자 도입 갯수 확인을 시도한 결과, Figure 5에서 단일 band의 출현을 보인 NC524-6, NC607-1, NC607-14, NC616-10, NC616-17, NC616-19계통은 Table 2에서도 한 개의 유전자가 삽입된 것으로 나타났고 Figure 5에서 두 개의 band 출현을 보인 SS-1, SS-5, SS-7, NC616-20의 경우도 Table 2에서 두개의 유전자가 삽입되었음을 보여주었다. 그러나 그 이외의 개체에서는 종자 발아 시험에서 나타난 유전자 삽입 갯수 보다 많은 band의 출현으로 모든 개체에서 Southern blot를 통한 결과와 정확히 일치하지는 않았다. 즉, Southern blot에서 NC607-7, NC607-16, NC616-2, NC616-4, NC616-16 계통에서 종자발아시험에서 보다 많은 band가 출현하였는데 이는 Southern blot에서의 band 강도가 비교적 동일한 수준으로 볼때 genomic DNA의 불완전한 切斷으로 인한 결과로는 단정하기는 어렵다. 그러나 개화시 주변 개체와의 격리에도 불구하고 다른 계통의 담배 花粉이 유입되어 受精되었을 경우와 체세포 분열 및 감수분열 시기에 CP 유전자의 식물세포내 재배열(rearrangement)이나 염색체의 交叉(crossing over)를 포함한 모든 가능성을 추적하고 있으나 아직 확실치는 않으며, T₂를 분석하면 정확한 유전자 삽입 갯수 및 원인을 파악하는데 중요한 자료로 이용될 수 있으리라 사료된다.

현재 이들 형질전환 계통을 kanamycin을 처리하여 저항성으로 분리된 후대 개체들만을 다시 선발하여 육성하였으며 이들 개체에 CMV를 접종하여 바이러스 병 증상 및 저항성 계통을 선발하고 저항성에 관련된 기작을 확인하는 중에 있다.

국내에서 분리 동정한 오이모자이크 바이러스(CMV)로부터 外皮蛋白質(CP) 遺傳子를 분리하였고 이의 염기서열을 결정된 결과 129번째 아미노산이 proline으로서 mosaic symptom을 보이고 염기 및 아미노산 서열의 유사성을 비교한 결과 subgroup I (type I)에 속한다는 것을 확인하였다. 분리한 CP 유전자를 식물형질전환용 운반체에 삽입하여 담배 재배종인 NC82와 바이러스 증식용인 Samsun에 잎절편을 통하여 형질전환시켰다. 형질전환된 담배의 DNA를 분리하여 Southern blotting과 PCR을 수행한 결과 대부분의 형질전환체에 CP 유전자가 삽입되었음을 확인하였고 T₁ 종자를 kanamycin이 첨가된 배지에서 후대 항생제 저항성 검정을 실시한 결과 1개의 CP 유전자가 삽입된 경우가 50%에 달했고 2개와 3개의 유전자가 삽입된 경우도 각각 39%와 11%에 달했다.

사 사 - 本研究는 農村振興廳 特定課題(1992-1994)로 수행된 연구의 一部分이며 본 연구 수행에 韓國產 오이모자이크 바이러스를 제공한 農村振興廳 農業技術研究所 病理科에 감사드린다.

인 용 문 헌

- Abel PP, Nelson RS, De B, Hoffman N, Rogers SG, Fraley RT, Beachy RN (1986) Delay of disease development in transgenic plants: the express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232: 783-743
- Chung BJ, Park HC, Lee SH (1975) Studies on the host range of cucumber mosaic virus in Korea. *Kor J Plant Prot* 11: 185-192
- Cuozzo M, O'Connell K, Kaniewski W, Fang RX, Chua NH, Tumer NE (1988) Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *Bio/Technology* 6: 549-557
- De Carvalho F, Cheysen G, Kushnir S, Van Montague M, Inz D, Castresana C (1992) Suppression of β -1,3-glucanase transgene expression in homozygous plants. *EMBO J* 11: 2595-2602
- Dougherty WG, Lindbo JA, Smith HA, Parks TD, Swaney S, Proebsting WM (1994) RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: Exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol Plant-Microbe Interactions* 7: 544-552
- Edwards MC, Gonsalves D (1983) Grouping of seven biological defined isolates of cucumber mosaic virus by peptide mapping. *Phytopathology* 73: 1117-1120
- Francki RIB, Mossop DW, Hatta T (1979) Cucumber mosaic virus. CMI ABB descriptions of plant virus, No 213.
- Gonda TJ, Symons RH (1978) The use of hybridization of analysis with complementary DNA to determine the RNA sequence homology between strains of plant virus: its application to several strains of

- cucumovirus. *Virology* **88**: 361-370
- Hemenway C, Fung RX, Kaniesky WK, Chua NH, Tumer NE** (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
- Herskowitz I** (1987) Functional inactivation of a gene by dominant negative mutation. *Nature* **329**: 219-222
- Holster M, De Waele D, Depicker A, Messens E, Van Montague M, Shell J** (1978) Transfection and transformation of *A. tumefaciens*. *Mol Gen Genet* **163**: 181-187
- Kim JS, Choi GS, Lee KH** (1992) An aphid non transmitting cucumber mosaic virus from gladiolus. *Res Rept RDA* **34**: 18-27
- Murray MG, Thompson WF** (1980) Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucl Acids Res* **8**: 4321
- Namba S, Ling K, Gonsalves C, Gonsalves D, Slightom JL** (1991) Expression of the gene coding the coat protein of cucumber mosaic virus (CMV) strain WL appears to provide protection to tobacco plants against infection by several different CMV strains. *Gene* **107**: 181-188
- Noel M, Tahar B** (1989) Nucleotide sequence of the coat protein gene and flanking regions of cucumber mosaic virus (CMV) strain I17F. *Nucl Acids Res* **17**: 10492
- Owen J, Shintaku M, Aeschleman P, Taher SB, Palukaitis P** (1990) Nucleotide sequence and evolutionary relationships of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA3. *J Gen Virol* **71**: 2243-2249
- Piazzolla P, Diaz-Ruiz JR, Kaper JM** (1979) Nucleic acid homologies of eighteen cucumber mosaic isolates determined by competition hybridization. *J Gen Virol* **45**: 361-369
- Quemada H, Gonsalves D, Slightom JL** (1991) CMV-C coat protein gene expression in tobacco; Protection against infection by CMV strains transmitted mechanically or by aphids. *Phytopathology* **81**: 794-802
- Rizos H, Gunn LV, Pares RD, Gillings MR** (1992) Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* **73**: 2099-2103
- Robert BH, Joyce F, Nancy H, Jeanne N, Stephen GR, Robert TF** (1988) Leaf disc transformation. In BG Stanton and AS Robert, eds, *Plant Molecular Biology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, PMAN A5/1-9
- Sanford JC, Johnston SA** (1985) The concept of pathogen derived resistance: deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J Theor Biol* **113**: 395-405
- Seymour GB, Fray RG, Hill P, Tucker GA** (1993) Down-regulation of two non-homologous endogenous tomato genes with a single chimaeric gene construct. *Plant Mol Biol* **23**: 1-9
- Shintaku M** (1991) Coat protein gene sequences of two cucumber mosaic virus strains reveal a single amino acid change correlating with chlorosis induction. *J Gen Virol* **72**: 2587-2589
- Shintaku MH, Zang L, Palukaitis P** (1992) A single amino acid substitution in the coat protein of cucumber mosaic virus induces chlorosis in tobacco. *Plant Cell* **4**: 751-757
- Smith CJS, Watson CF, Bird CR, Ray J, Schuch W, Grierson D** (1990) Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants. *Mol Gen Genet* **224**: 477-81
- Smith HA, Swaney SL, Parks TD, Wernsman EA, Dougherty G** (1994) Transgenic plant virus resistant mediated by untranslatable sense RNAs: expression, regulation and fate of nonessential RNAs. *Plant Cell* **6**: 1441-1453
- Takanami Y** (1981) A striking change in symptoms on cucumber mosaic virus-infected tobacco plants induced by a satellite RNA. *Virology* **109**: 120-126
- Tumer NE, O'Connell KM, Nelson RS, Sanders PR, Beachy RN, Faley RT, Shah DM** (1987) Expression of alfalfa mosaic virus coat protein gene confers cross-protection in transgenic tobacco and tomato plants. *EMBO J* **6**: 1181-1188
- Van Dun CMP, Overduin B, Van Volten-Doting L, Bol JF** (1988) Transgenic tobacco expressing tobacco streak virus or mutated alfalfa mosaic virus coat protein does not cross-protect against alfalfa mosaic virus infection. *Virology* **164**: 383-389

(1995년 5월 19일 접수)