

한국 분리주 감자 잎말림 바이러스 (PLRV) 외피 단백질 유전자의 클로닝 및 감자 내 도입

서효원*, 이정윤, 박영은, 조지홍, 함영일, 조현묵
농촌진흥청 고령지농업연구소

Cloning of Coat Protein Gene from Korean Isolate Potato Leafroll Virus (PLRV) and Introduction into Potato (*Solanum tuberosum*)

Hyo-Won Seo*, Jung-Yoon Yi, Young-Eun Park, Ji-Hong Cho, Young-Il Hahm, Hyun-Mook Cho

National Institute of Highland Agriculture, Pyongchang 232-950, Korea

ABSTRACT The coat protein gene (AF296280) of the Korean isolate Potato leafroll virus (PLRV) was cloned and the open reading frame (627 bp) was transformed into potato (*Solanum tuberosum* cv. Superior). Out of seventeen individual transgenic lines, five lines were identified to confer resistance to PLRV through the five generation's selection program in the greenhouse as well as isolated trial field. Successful introduction and genetic stability of coat protein gene in the genome of potato were confirmed by polymerase chain reaction (PCR), Southern blot hybridization and northern blot hybridization. Some of the transgenic lines were highly resistant to PLRV but did not show any resistance to less homologous Potato virus Y (PVY). Our results suggest that the resistance to PLRV is due to homology dependent gene silencing by sense strand coat protein gene. In addition, the results of field test through five generations showed that there were no significant differences comparing to nontransgenic potatoes in the morphological aspect of shoot as well as tuber. No remarkable differences were also observed in the major agronomic characters and yields except for the resistance to PLRV.

Key words: Coat protein, PLRV, *Solanum tuberosum*, transgenic potato

서 론

재배되고 있는 감자의 대부분은 4배체 (tetraploid)로 교잡을 통한 육종이 다른 작물에 비해 매우 어렵다. 또한, 감자는 괴경을 통해 영양번식을 하는 작물로 씨감자 생산에 필요한 기간이 길어 씨감자 증식과정에서 다양한 병원체에 노출되어 병리적 퇴화 가능성이 높다. 특히, 다양한 종류의 바이러스에 대한 기주식물로 한번 감염되면 다음 세대로 계속된 전염이 이루어지므로 씨감자의 생산과 재배 과정에서 바이러스 감염방지에 각별한 노력이 필요한 작물이다. 감자에 피해를 주는 여러 가지 바이러스 중에서 Potato virus Y (PVY)와 더불어 Potato leafroll virus (PLRV)

는 우리나라뿐만 아니라 세계적으로 감자에 큰 피해를 주는 바이러스이며 (Hahm et al. 1990; Presting et al. 1995), 국내에서 재배되는 대부분의 감자 품종이 이 바이러스에 감수성으로 씨감자 생산과정이나 재배과정에 주요한 피해 원인이 되고 있다. 그러므로 PLRV에 대한 저항성을 갖는 감자 품종의 개발이 매우 절실하지만, 전통적인 교배를 통한 감자육종 방법만으로는 이형접합성인 감자의 유전적 특성으로 인해 매우 어렵다. Powell-Abel 등 (1986)이 Tobacco mosaic virus (TMV)의 외피단백질로 형질전환된 담배가 TMV에 대해 강한 저항성을 나타냈다는 최초의 보고 이후, 바이러스의 외피 단백질 유전자를 이용한 바이러스 저항성 식물체의 개발에 대한 연구와 실용화가 많이 이루어지고 있다. 이와 같은 바이러스 유전자 도입에 따른 저항성의 요인은 sense 혹은 antisense로 발현된 바이러스 유전자 transcripts에 의한 유전자 침묵 (PTGS, post-

*Corresponding author Tel 033-330-7815 Fax 033-330-7715
E-mail: shwonkw@rda.go.kr

transcriptional gene silencing)의 결과로 규명되고 있다 (Baulcombe 1996; English et al. 1996; Goodwin et al. 1996). 감자의 경우 Potato virus X (PVX) (Angell and Baulcombe 1997)와 PVY (Lawson et al. 1990) 등의 감자 바이러스에 대한 저항성 식물체 개발에 대한 연구가 보고된 바 있다. PLRV의 경우 1989년 Mayo 등에 의해 PLRV 유전자의 염기서열 및 특성이 완전히 밝혀진 이후, 외피단백질 유전자를 이용한 형질전환 감자 개발에 대한 연구가 보고되고 있으며 (Baker et al. 1992; Presting et al. 1995), 국내에서도 PLRV 외피단백질 유전자를 이용한 저항성 형질전환 감자개발에 대한 연구가 수행된 바 있으나 (Joung et al. 1996) 실재 많이 재배되고 있는 장려품종에 대한 저항성 품종 육성에 대한 연구결과는 매우 적다. 본 연구는 국내에서 분리된 PLRV의 외피단백질 유전자를 이용하여 재배되고 있는 장려품종 감자에 도입하여 저항성인 감자품종을 개발하기 위해 수행되었다.

재료 및 방법

식물재료 및 PLRV

형질전환의 재료로 이용한 수미 품종 감자 (*Solanum tuberosum* cv. Superior)는 농촌진흥청 고령지농업연구소에서 실시하고 있는 씨감자 생산 프로그램의 기본종급 씨감자를 이용했다. PLRV는 대관령 지역의 감자 포장에서 전형적인 감염증상을 보이는 이병된 수미 품종 감자의 잎에서 분리된 것으로 배추 (*Brassica campestris*)에서 증식시킨 무시충 복숭아혹진딧물 (*Myzus persicae*)을 PLRV가 감염된 것으로 확인된 감자 잎에서 2일 이상 보독시킨 다음 지표식물인 땅파리 (*Physalis floridana*)의 잎에 옮겨 2일 이상 흡즙, 접종시킨 후 약 4주 이후 분리하였다.

PLRV 외피단백질 유전자의 클로닝

PLRV 입자는 접종된 땅파리의 잎에서 Kojima 등 (1969)의 방법을 다소 변형하여 분리하였다. PLRV 입자에서 바이러스 RNA만을 분리하기 위해 TRI Reagent (Sigma, USA)를 이용하여 바이러스 외피단백질을 포함한 기타 단백질들을 제거하여 순수 분리하였다. RT-PCR은 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Germany)을 이용하여 합성한 viral RNA의 1차 합성된 cDNA를 PCR (Thermo Cycler 480, Perkin-Elmer, USA)로 증폭하는 과정으로 수행하였다. 1차 합성된 cDNA의 증폭은 Mayo 등 (1989)에 의해 보고된 PLRV 유전자 염기서열 (AF156992)의 ORF3로부터 고안된 primer인 5'-CGGGATCCACGTGGATCAATTGTT-3'와 5'-CGCTCGAGTTTGGGGTTTTGA-3'를 이용하였

으며, 94°C로 4분 동안 denaturation시킨 다음, 94°C로 1분, 57°C에 1분 그리고 72°C에 1분의 반응을 35회 반복하여 증폭하여 정제한 다음 pCR4-TOPO TA 클로닝 운반체 (Invitrogen, USA)에 sub-cloning하였다. Sub-cloning된 외피단백질 유전자의 DNA 염기서열 분석은 Sanger 등 (1977)의 방법을 응용하여 제작된 AccuPower™ DNA Sequencing Kit (Bioneer, Korea)으로 실시하였으며, PCR 반응이 끝난 반응액을 6% (w/v) polyacrylamide gel에 전개하여 silver staining을 실시하여 염기서열을 판독하였다.

형질전환용 벡터구축 및 세균 형질전환

제한효소 *Bam* HI과 *Sac* I linker를 부가시킨 PLRV 외피단백질 유전자와 식물체 발현 벡터인 pBI121을 제한효소 *Bam* HI과 *Sac* I으로 각각 절단하고, T4 DNA ligase를 이용하여 ligation을 실시하여 CaMV35S promoter-PLRV CP 구조를 포함하는 발현벡터 pCPLR-1를 구축하였다. 대장균의 형질전환은 Hanahan (1983)의 방법을 일부 수정한 열충격 방법을 이용하였으며, competent cell은 *E. coli* DH5a를 이용하였다. *Agrobacterium*의 형질전환은 *Agrobacterium* LBA4404 strain에 Holster 등 (1978)과 An 등 (1988)의 방법을 참고하여 다소 변형한 freeze-thaw 방법을 이용하여 형질전환 하였다.

감자의 형질전환 및 분석

Sodium hypochlorite로 표면을 살균하고 증류수로 세척한 감자 피경을 직경 1 cm의 cork borer로 절취하고 2 mm 두께의 tuber disc를 만들어 *Agrobacterium*과 공동배양을 수행하였다. 1.0 mg/L zeatin와 0.5 mg/L IAA가 포함된 MS 배지에서 20°C 암상태에서 48시간 동안 실시하였다. 이 후 조직을 1 mg/L zeatin, 500 mg/L carbenicillin, 0.05 mg/L IAA와 100 mg/L의 kanamycin이 포함된 MS 고체배지로 옮겨 25±1°C, 16시간의 일장조건으로 배양하였다. 4주 후 carbenicillin의 농도를 200 mg/L로 낮춘 배지로 계대 배양하고 이 후 3주 간격으로 계대배양 하면서 재분화된 shoot를 hormone-free한 발근배지로 옮겨 유식물체를 형성하고, 순화 및 경화시켜 상토에서 성장시켰다. 이 후 수확된 피경을 파종하여 얻은 제 2세대 감자 식물체에서 총 DNA를 분리하여 PCR 및 genomic Southern 분석을 실시하였다. PCR 분석은 PLRV CP 유전자에 특이적인 primer들 (5'-CGTGCGATCAATTGTATTTG-3'과 C-terminal의 5'-GAGCTCTATTTGGGGTTTTG-3')을 이용하였으며, NPTII 선발유전자에 특이적인 primer들 (5'-CTGAATGAAG-TGCAGGACGAGG-3'과 5'-GCCAACGCTATGTCCT-GATAGC-3')을 각각 이용하여 PCR을 실시하고 각각의 산물을 DIG-labeled된 특이적 probe와 혼성화시켜 형질전

환 여부를 판단하였다. Genomic Southern은 PCR로 확인된 일부 개체의 총 DNA를 *Bam*HI으로 절단하여 0.8% agarose gel에 전기영동하고 N⁺ Nylon 막에 capillary로 전이시켜 수행하였다. 유전자발현을 확인하기 위한 transcripts의 확인은 Northern 분석을 통해 실시하였으며, 혼성화가 이루어진 DIG-labeled probe는 제조회사 (Roche)에서 제공한 방법대로 검출하였다. 형질전환 감자의 바이러스 저항성은 온실 내 접종저항성과 격리포장에서 포장저항성을 평가 하였다. 저항성의 여부는 진딧물 접종 후 2주가 지난 다음 잎에서 추출한 즙액을 PLRV에 대한 polyclonal antibody (Agdia, USA)를 이용한 ELISA를 통해 확인하였다. 형질전환감자의 식물학적 특성 및 생육특성 검정은 격리포장에서 채배하면서 실시하였으며, 감자 품종성능 검정기준에 준하여 실시하였다.

결과 및 고찰

PLRV 외피단백질 유전자 특성

분리된 바이러스 입자를 전자현미경 (TEM, Hitachi 7100S, 100 kV)으로 관찰한 결과, 직경 24~25 nm 크기의 구형의 PLRV 입자들이 분리되었음을 확인하였다 (Figure 1). PLRV의 외피단백질 유전자에 해당하는 627 bp의 염기서열 (Figure 2)은 기존 등록된 유전자들과 96%이상의 유사성을 나타내었으며 (Figure 3), 이전 국내에서 분리된 South Korean isolate (Joung et al. 1996, accession no. U73777)와는 98%의 상동성을 가지는 것으로 확인되어 새로운 Korean isolate로 GenBank (Accession no. AF296280)에 등록하였다. 이와 같이 우리나라에서 분리된 PLRV 외피단백질 유전자 사이의 높은 상동성은 PLRV의 경우 다른 바이러스들과는 달리 지역별 분리주 간의 strain 분화가

뚜렷하지 않다는 Hooker (1981)의 고찰과 부합한다. 분리된 PLRV 외피단백질 유전자는 약 23.2 kDa (208 amino acids)에 해당하는 친수성 단백질 (hydrophobicity -0.73)을 발현시킬 것으로 추정되었는데, PLRV가 감염된 식물체의 도관세포 세포질에만 존재하는 특성의 주요한 요인인 것으로 판단된다. 완전 해독된 유전자 (Mayo et al. 1989)상에서의 위치는 PLRV 유전자 5897개의 염기 중 ORF3 (3693~4316)에 해당하는 부위로 VPg 유전자를 암호하는 ORF4 (3718~4158, Figure 2의 굵은 밑줄 안쪽 영역)를 포함하는데 ORF3에 겹쳐진 ORF4에서 발현된 17 kDa인 VPg는 핵산 결합 단백질로서 PLRV 유전자의 세포간 이동에 관여할 것으로 알려져 있다 (Ohshima et al. 1993).

운반체 구축과 감자 형질전환

PLRV 외피단백질 유전자가 sense 방향으로 구축된 운반체인 pCPLR-1을 *E. coli* DH5a를 형질전환 시켜 플라스미드를 분리하여 약 0.6 kb의 insert를 확인하고, *Agrobac-*

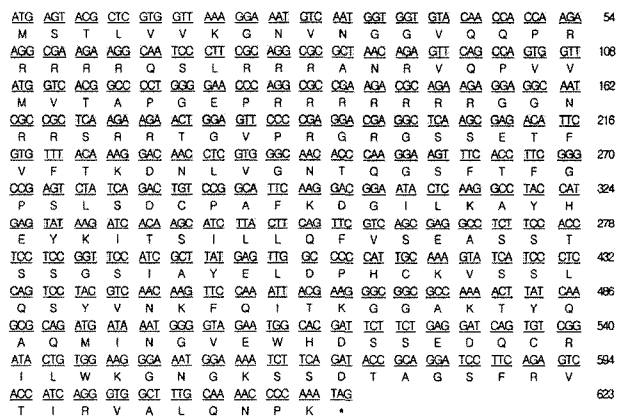


Figure 2. The nucleotide sequence of the 627bp coat protein gene of PLRV Korean isolate. The shaded and inner part of the underlined codons indicate the ORF4 movement-associated protein gene of the PLRV.

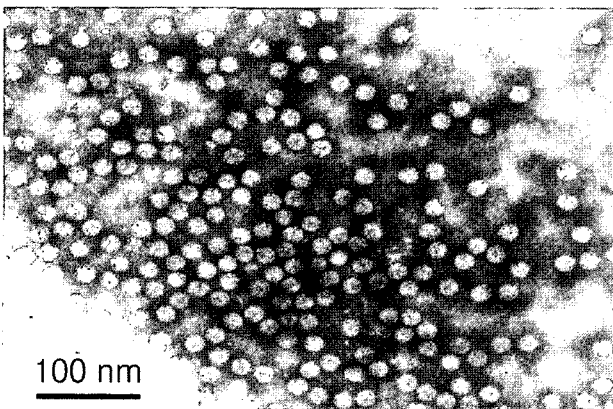


Figure 1. The electron microscopic structure of the PLRV particles. Purified PLRV particles were stained with 2% (w/v) PTA and observed with the TEM.

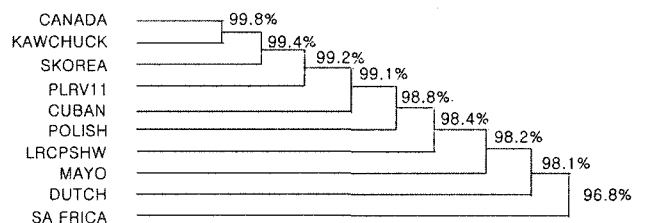


Figure 3. Comparison of the nucleotide sequence of the PLRV Korean isolate coat protein gene with other PLRV local isolate coat proteins by Higgins-Sharp multiple alignment (Higgins and Sharp, 1988). GenBank accession numbers: Mayo (1989), D00530; Cuban (1995), S77421; Nether (1997), X77325; Polish (1995), X74789; SAfrica (1997), AF022782; SKorea (1996), U73777; Canada (1997), D13953; PLRV11 (1994), X77322; Kawchuk (1989), D13753.

terium을 형질전환 시켰다. *Agrobacterium*과 공존배양을 통해 감염시킨 괴경 및 잎 조직에서 재분화된 유식물체는 kanamycin과 carbenicillin이 포함된 MS 고체선택배지에서 선별하였으며, 온실에서 순화 및 경화시키고, 피트모스 상토에서 증식한 후 괴경을 확보하였다. 형질전환에 이용한 '수미' 감자의 경우 우리나라에서의 재배면적이 전체 감자 재배면적의 60% 이상을 차지하는 주요 품종이지만 PLRV에 감수성 (Hahm et al. 1990)으로 저항성 인자의 도입이 시급한 품종이다. PLRV 외피단백질 유전자의 구축을 sense 방향으로 구축한 이유는 PLRV 외피단백질 유전자를 이용한 이전의 연구 보고들 (Kawchuk et al. 1991; Barker et al. 1992)에서 이러한 구조의 cassetting이 저항성의 유도에 유리한 것으로 보고한 바 있기 때문이었다. Native sense 외피단백질 유전자로 형질전환된 감자에서 외피단백질 유전자의 발현이 염기서열이 겹쳐진 17 kDa movement protein 유전자의 발현과 경쟁적으로 이루어질 가능성이 크므로 유전자의 발현 효율을 높이기 위해 VPg 단백질의 개시 암호 부위를 돌연변이시킨 후 형질전환에 이용하는 연구도 이루어진 바 있지만 (Presting et al. 1995), sense와 anti-sense 모두를 이용해도 저항성 유도가 가능한 것으로 보고되었다 (Waterhouse et al. 1998). 조직화학적 reporter 유전자인 β -glucuronidase (GUS) 유전자를 운반체 제작 과정에서 제거한 것은 유해성의 논란이 될 수 있는 외래유전자의 수를 감소시키고, 발현된 이 후에 세포 내에 지속적으로 축적되는 GUS 유전자의 발현산물이 다른 효소의 작용이나 대사과정을 방해할 가능성이 높아 포장에서 GUS transgene이 감자의 수량과 식물체 활력을 감소시킨다는 기존의 연구결과들 (Dale and MacPortlan 1992; Belknap et al. 1994; Davies 1996)에 착안한 것이다.

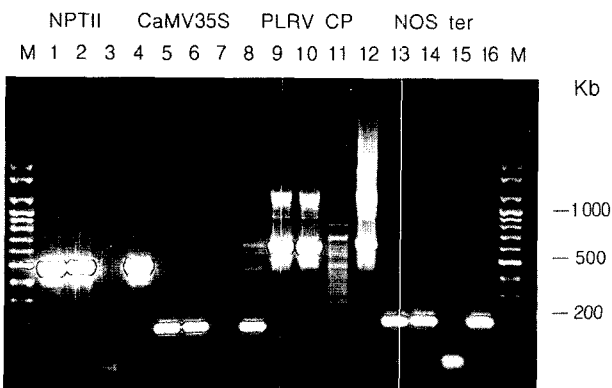


Figure 4. Selection of the transformants by PCR with specific primer sets which can amplify transgenes. Amplification was performed for 40 cycles at 94°C for 20 sec, 54°C for 45 sec, and 72°C for 1 min, for denaturation, annealing, and extension, respectively. M, marker 100 bp ladder; 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13, and 14, transgenic line TS4; 3, 7, 11, and 15, non-transformed cv. Superior as negative control; 4, 8, 12, and 16, pCPLR-1 as positive control.

형질전환 감자 분석

감자 게놈 내로의 PLRV 유전자의 삽입 확인은 재분화된 식물체를 T2세대까지 증식한 다음 실시하였다. T2~T3 세대에서의 형질전환 여부는 PLRV 외피단백질 유전자를 증폭할 수 있는 특이 primer들을 이용하여 PCR (Figure 4) 및 PCR-Southern blot (Figure 5)을 실시하여 판단하였다. 외피단백질 유전자에 특이적인 primer와는 달리 NPTII primer의 경우 negative control에서 false positive DNA 밴드가 증폭되어 나타나는 경우가 있었는데 여러 연구자들과의 연락을 통해 이러한 사실이 가지과 작물의 경우에 NPTII sequence를 근거로 고안한 primer의 증폭 산물에서 공통적으로 나타나고 있음을 확인하였다. EU에서 추천한 공식적인 GMO의 판별방법에서도 PCR을 이용한 이러한 가능성에 대한 각별한 주의가 필요하다는 점을 지적하고 있다 (Promega Note 1998). NPTII와 외피단백질 유전자가 공통적으로 증폭된 개체를 이용한 genomic Southern blot 결과 1~5 copy의 transgene을 확인할 수 있었다 (Figure 6). 형질전환체에서 외피단백질 유전자의 발현 수준은 대부분의 선별계통들에서 비교적 낮고 고르게 발현되는 것을 확인하였다 (Figure 7). PLRV의 경우 native sense 외피단백질 유전자로 형질전환된 개체에서 외피단백질 산물이 검출되지 않거나 검출한계에 미치지 못한 보고들 (Smith et al. 1988; Presting et al. 1995)이 확인되는데 이번 경우와 같이 외피단백질 유전자의 발현수준이 낮은 것에서 기인된 결과들로 보인다. PVY와 PVX의 외피단백질 유전자로 형질전환된 감자의 경우 (van der Vlugt et al. 1992) 외피단백질 발현

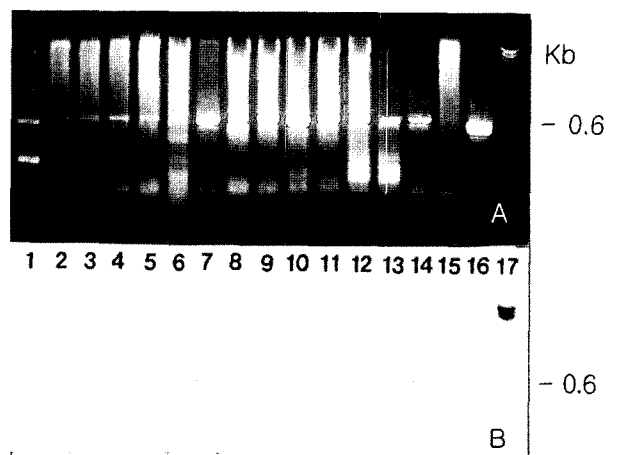


Figure 5. PCR-Southern screening of T3 transgenic potatoes. A, PCR amplified DNA from transgenic potatoes. The DNA of putative transgenic potatoes were amplified with specific primers for PLRV coat protein gene and electrophoresised on 0.8% (w/v) agarose gel. B, Southern blot analysis of panel A. The DIG-labeled PLRV coat protein gene was used as the probe. lane 1-14, transgenic potatoes; lane 15, negative control; lane 16, pCPLR-1 as positive control; lane 17, DIG-labeled marker λ HindIII.

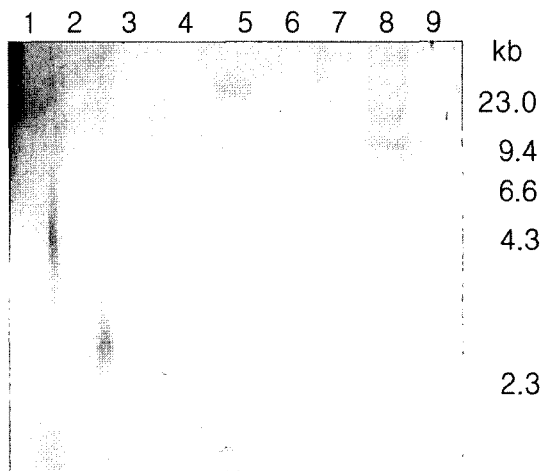


Figure 6. Determination of transgene copy numbers in the selected transgenic potatoes. The 10 µg of genomic DNA from transgenic potatoes were digested with Xba I. Following fractionation on 0.8 % (w/v) agarose gel, the restricted DNA were transferred onto nylon membrane and hybridized with DIG-labeled probe. A : lane 1, non-transgenic potato; lane 2 - 9, transgenic potatoes cv. Superior.

수준이 낮은 계통들에서 보다 큰 저항성을 보였는데 copy 수와 무관하게 낮게 발현되는 외피단백질 유전자의 발현수준은 동일한 바이러스의 감염에 저항성 나타내는 것과 관련이 있는 것으로 추측된다. PLRV의 polyclonal 항체를 이용한 western blot을 통해서도 외피단백질은 검출되지 않았는데 이는 형질전환된 외피단백질 유전자 cistron이 비록 폴리펩타이드로 발현된다 하더라도 항원으로 인식될 수 있는 epitope을 형성할 수 없거나, 검출역가 이하의 농도로 발현되기 때문일 수 있다. 이러한 가능성은 PLRV 외피단백질이 western blot으로 검출되지 않았던 다른 보고들 (Kawchuck et al. 1991; Barker et al. 1992)과도 일치하는데 PLRV 입자의 de novo 합성경로에서 하나의 cistron으로부터 발현된 폴리펩타이드 만으로는 epitope을 형성하기 어렵기 때문일 가능성도 있다.

형질전환 감자의 바이러스 저항성 및 특성평가

온실 내에서 보독시킨 진딧물의 접종을 통해 PLRV에 저항성인 것으로 조사된 Tsup-2, Tsup-3, Tsup-7, Tsup-14와 Tsup16을 TS1~TS5로 각각 계통명을 부여하였다 (Table 1). T3세대에서 저항성 계통으로 선발된 이후의 저항성 line의 판단은 일정세대 (T4-T5)를 포장에서 노출시켜 비교적 고른 PLRV에 대한 접종 압력이 가해진 것으로 판단된 후 대비된 비형질전환 품종과의 수량 및 바이러스 감염 정도를 PLRV에 특이적인 polyclonal 항체를 이용한 ELISA (OD₄₀₅)를 통해 확인하였다 (Table 2). T3세대의 형질전환 감자를 대상으로 한 온실내에서의 접종을 통하여 얻어진

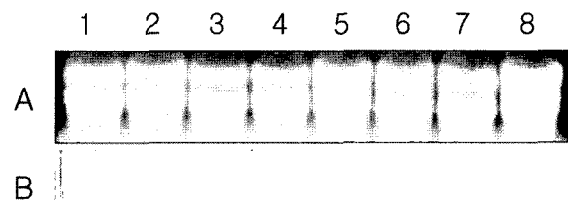


Figure 7. Northern blot analysis of transgenic cv. Superior. A, Denatured rRNA samples from T4 generation of transgenic cv. Superior lines. B, The transcripts of coat protein genes detected with the DIG-labeled probes. lane 1, Tsup-1; lane 2, Tsup-2; lane 3, Tsup-3; lane 4, Tsup-7; lane 5, Tsup-14; lane 6, Tsup-15; lane 7, Tsup 16; lane 8, non transgenic cv. Superior.

Table 1. PLRV resistance of the clonal propagated T3 putative transgenic cultivars by inoculation of the viruliferous *M. persicae* in the greenhouse

Clone	Repeat	ELISA values at OD ₄₀₅			
		1	2	3	4
Tsup-1		0.114	0.302	0.021	0.203
Tsup-2		0.017	0.002	0.022	0.051
Tsup-3		0.081	0.043	0.078	0.003
Tsup-4		0.316	0.112	0.109	0.097
Tsup-5		0.083	0.200	0.403	-
Tsup-6		0.165	over	0.306	-
Tsup-7		0.004	0.001	0.055	-
Tsup-8	over	0.132	-	-	-
Tsup-9		0.090	0.107	-	-
Tsup-10		0.204	0.311	-	-
Tsup-11		0.113	0.022	0.321	0.303
Tsup-12	over	over	0.542	0.231	
Tsup-13		0.121	0.325	0.015	0.243
Tsup-14		0.027	0.015	0.004	0.030
Tsup-15		0.131	0.093	-	-
Tsup-16		0.001	0.033	-	-
Tsup-17		0.332	0.193	-	-
Csup		0.006	0.034	0.009	-
Isup		0.790	over	0.664	-

Tsup-no.; transgenic cv. Superior. Isup; PLRV inoculated control varieties cv. Superior. **bold-faced**; selected as resistant lines to PLRV infection.

저항성 검정의 결과 (Table 1)와 T5세대 형질전환 감자를 대상으로 한 포장저항성 검정 결과 (Table 2)와는 약간의 차이를 나타냈는데, 이는 진딧물을 이용한 PLRV 접종시 동일한 양의 바이러스 접종이 이루어지지 않은 결과일 가능성이 있다. PLRV는 감염된 기주식물의 도관세포에만 존재하기 때문에 다량의 바이러스 입자를 확보하기가 대단히 어렵고 (Smith et al. 1988) 기계적 접촉을 통한 인위적인

Table 2. Cross-resistance test to PVY in transgenic lines of cv. Superior transformed with PLRV coat protein gene in T5 generation

Viruses	Lines					Positive Control	Negative Control
	TS1	TS2	TS3	TS4	TS5		
PLRV* (O.D. ₄₀₅)	0.073 ±0.022	0.082 ±0.019	0.047 ±0.038	0.061 ±0.027	0.110 ±0.077	0.330 ±0.107	0.010
PVY** (O.D. ₄₀₅)	0.770 ±0.301	0.471 ±0.212	0.763 ±0.311	0.221 ±0.101	0.440 ±0.210	0.391 ±0.018	0.031

*PLRV was field-inoculated with viruliferous green peach aphid (*M. persicae*). **PVY was mechanically inoculated by carborandum scrubbing with PVY crude extracts from infected tobacco (*N. debneyi*) leaf. Each value represents the mean ±SE.

접종이 거의 불가능하며, 진딧물, 특히 복숭아혹진딧물 (*Myzus persicae*)에 의해서만 전염이 이루어지므로 (Lamb et al. 1996) 저항성의 판단을 위한 실험이 매우 어렵다. 형질전환된 감자의 경우 온실과 포장에서 이루어진 특성분석 결과가 서로 차이를 나타낼 수 있으며 (Davies 1996), 온실에서 이루어지는 PLRV 접종은 식물체의 생육단계나 접종 시기의 주변온도 등에 의해 영향을 받는다는 보고 (Tamada and Harrison 1981; Syller 1994) 등을 통해서도 저항성 차이의 원인을 추측할 수 있다.

외피단백질 유전자로 형질전환된 식물체에서 유연관계가 적은 다른 바이러스에 대한 저항성도 부분적으로 확인한 기존의 여러 보고들 (Anderson et al. 1989; Ratcliff et al. 1999)과 유사도가 높은 유전자를 갖고 있는 바이러스 그룹에 대한 교차저항성을 나타낸다는 기존의 연구결과들 (Hemenway et al. 1988; Stark and Beachy 1989; Lawson et al. 1990)을 근거로 국내 감자에서 많은 피해를 주고 있는 PVY에 대한 교차저항성 여부를 검정하여 보았다 (Table 2). 접종에 사용한 PVY는 국내에서 분리되어 특성이 파악된 바 있는 PVY-O 계통 (Seo et al. 2000)이었고, PVY를 즙액접종 한 후에 형질전환 감자의 저항성을 검정해 본 결과 저항성을 나타내지 않았다. 이는 PVY와 PLRV가 서로 다른 바이러스에 속하여 외피단백질의 유사도가 낮은 데에서 기인된 것일 수 있는데, Soybean mosaic virus (SMV) 외피단백질유전자로 형질전환된 담배에서 Potyvirus에 속하는 Tobacco etch virus (TEV)와 Potato virus Y (PVY)에 대한 교차 저항성을 보인다는 보고 (Stark and Beachy 1989)는 특정 바이러스 유전자로 형질전환된 식물에서 다른 바이러스에 대한 교차저항성이 유전자간 높은 유사도와 밀접한 관련이 있다는 것을 의미한다. 여러 보고들 (Angell and Baulcombe 1997; Kooter et al. 1999; Waterhouse et al. 1999)에서 언급한 바와 같이 바이러스에 대한 저항성은 식물세포의 고유대사와 직접적인 관련이 없는 외래 유전자가 발현됨에 따른 세포내 methylation 기작의 활성화에 의하거나 일정 수준의 유사도를 가진 유전자 자신이나 transcripts에 의해 침입된 바이러스 유전자와의 ectopic pairing에 의한 병원성 억제 기작에 의한 가능성이 있음을 의미한다.

형질전환 감자의 농업형질 평가

형질전환된 감자의 농업적 형질특성의 파악은 UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants 1986)의 규정에 준하여 실시하였다. UPOV의 규정은 새로운 품종의 상품화를 위해 신품종이 가진 형질의 신규성과 구별성 등을 정밀하게 조사토록 규정하고 있다. 형질전환 감자 중 실용화 가능성이 높은 것으로 판단되는 계통들에 대하여 중점적으로 식물학적 및 농업적 특성분석을 실시하였다. 형질전환 수미 계통들의 경우, PLRV에 대한 저항성을 제외하고는 주요 생육특성과 농업적 형질에서 특별한 차이점을 발견할 수 없었다 (Table 3). 즉, 형질전환 계통들의 경우 초기의 지상부 출현 정도 (emergence), 출현의 균일도 (uniformity), 개화 시기와 피경의 휴면 등에서 비형질전환 수미와 차이가 거의 없는 것으로 조사되었으며, 줄기의 길이나 수에서 비형질전환 수미보다 다소 높은 것으로 조사되었다. 또한 식물학적인 특성분석 결과 지상부 높이, 생육특성 등에서는 비형질전환 수미 품종과 차이를 확인할 수 없었으며, 감자의 수량성은 형질전환된 수미 계통에서 다소 높은 것으로 조사되었다 (Table 3). 감자의 경우 PLRV에 의한 수량성 감소가 다른 바이러스에 비하여 큰 것으로 알려져 있는데 이는 세포내 비정상적인 전분축적과 지상부 발달의 억제를 통한 것으로 알려져 있다 (Salazar, 1996). 실제로 포장재배를 통해 바이러스를 감염시킨 형질전환 감자의 지상부 생육이 형질전환되지 않은 감자에 비해 왕성한 결과 (Table 3)는 이 후 수량에도 영향을 주었을 것으로 판단된다. 형질전환된 감자에서 나타나는 표현형이 형질전환 되지 않은 감자와 유사하다는 점은 외래 유전자인 PLRV 외피단백질 유전자의 발현이 외래유전자의 삽입에 의한 위치효과를 배제한다면 감자의 형태발생에는 관여하지 않는 것으로 판단할 수 있다. Sense 방향의 PLRV 외피단백질 유전자에 의한 PLRV 저항성의 보다 명확한 분석을 위해서는 형질전환된 세포의 methylation 활성화의 비교와 같은 후속 연구가 필요할 것으로 판단된다. 향후 선발된 PLRV 저항성 계통들에 대한 세대간 저항성의 안정성을 확인하고 형질전환 작물의 위해성 평가를 위해 포장 평가를 지속할 계획이다.

Table 3. Major characteristics of transgenic lines of cv. Superior

Characters	Lines	TS1	TS2	TS3	TS4	TS5	Control	Grade or Unit
Emergence		1	1	1	1	1	1	1-8
Uniformity		3	3	2	2	3	2	1-9
Plant type		2	2	2	2	2	2	1, 2, 3
Growth habit		5	5	5	5	5	4	3, 5, 7
Thickness of main stem		5	5	5	5	5	5	3, 5, 7
Stem length ^b		98.5±7.0a	95.3±10.2ab	94.5±9.9ab	94.5±8.6ab	91.2±6.9ab	87.2±5.7b	cm
Yield ^b		2,173a	2,315a	2,328a	2,365a	2,323a	1,971a	kg/10a
Tuber shape		Short oval	Short oval	Short oval	Short oval	Short oval	Short oval	
Flesh color		white	white	white	white	white	white	
Tuber dormancy		85	85	90	90	90	88	days

^bDMRT 0.05, Each value represents the mean±SE.

적 요

한국 분리주 감자잎말림바이러스 (PLRV)로부터 627bp 크기의 외피단백질 유전자의 ORF (AF296280)를 분리하여 장려품종 감자인 '수미'를 형질전환 하였다. 17계통의 형질전환체를 선발하여 온실과 포장에서 5세대를 증식하면서 PLRV에 대한 저항성이 큰 5계통을 선발 하였다. 도입된 유전자들의 유전적 안정성을 확인하기위해 PCR, Southern, 그리고 northern blot 분석을 수행하였다. 또한 클론으로 증식된 형질전환 감자들의 특성과 저항성도 검정하였다. 형질전환된 감자들에서 PLRV의 외피단백질 유전자는 안전적으로 발현되며 저항성을 유지하였으며, 유사도가 비교적 낮은 감자 바이러스 Y (PVY)에는 저항성을 나타내지 않았다. 따라서 이러한 저항성은 도입된 유전자와 유사성도가 높은 바이러스에 저항성을 나타내는 homology dependent gene silencing으로 판단되었다. 유망계통 형질전환 감자 계통들의 포장평가를 통해 PLRV에 대한 저항성을 제외한 주요한 농업적 특성과 식물학적 특성은 형질전환 되지 않은 감자와 큰 차이를 보이지 않았다.

인용문헌

An G, Ebert PR, Mitra A, Ha SB (1988) Binary Vectors. In Plant Molecular Biology Manual. PMAN-A3: 1-19
 Anderson Ej, Stark DM, Nelson RS, Powell PA, Tumer NE, Beachy RN (1989) Transgenic plants that express the coat protein genes of tobacco mosaic virus or alfalfa mosaic virus interfere with disease development of some nonrelated viruses. *Phytopathology* 79: 1284-1289
 Angell SM, Baulcombe DC (1997) Consistent gene silencing

in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. *EMBO J* 16: 3675-3684
 Barker H, Reavy B, Kumar A, Webster KD, Mayo MA (1992) Restricted virus multiplication in potatoes transformed with the coat protein gene of potato leafroll luteovirus: similarities with a type of host gene-mediated resistance. *Ann Appl Biol* 120: 55-64
 Baulcombe, DC (1996) RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Mol Biol* 32: 79-88
 Belknap WR, Corsini D, Pavsek JJ, Synder GW, Rockhold DR, Vayda ME (1994) Field performance of transgenic Russet Burbank and Lemhi Russet potatoes. *Amer Potato J* 71: 285-296
 Dale PJ, MacPortlan HC (1992) Field performance of transgenic potato plants compared with controls regenerated from tuber discs and shoot cuttings. *Theor Appl Genet* 84: 585-591
 Davies HV. (1996) Recent developments in our knowledge of potato transgenic biology. *Potato Res* 39: 411-427
 English JJ, Mueller E, Baulcombe DC (1996) Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell* 8: 179-188
 Goodwin J, Chapman K, Swaney S, Parks TD, Wernsman EA, Doughety WG (1996) Genetic and biochemical dissection of transgenic RNA-mediated virus resistance. *Plant Cell* 8: 95-105
 Hahm YI, Park CS, Kim JK, Choi JK (1990) Inoculum source and reinfection of potato leafroll virus on potato seed stocks in Daekwallyeong area. *Kor J Plant Pathol* 6: 497-503
 Hanahan, D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580
 Higgins DG, Sharp PM (1988) CLUSTAL: A package for performing multiple sequence alignments on a micro-computer. *Gene* 73: 237-244

- Hemenway C, Fang RX, Kaniewski W, Chua NH, Turner N (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
- Holster MD, de Waele A, Depicker E, Messens M, Montagu V, Schell J (1978) Transfection and transformation of *A. tumefaciens*. *Mol Gen Genet* 163: 81-187
- Hooker WJ (1981) Compendium of potato diseases. APS Press, St. Paul, MN, pp 68-70
- Joung YH, Jeon JH, Kim HS, Joung H (1996) Transformation of potato leafroll virus coat protein gene into potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée). *Kor J Plant Tiss Cult* 23: 77-81
- Kawchuk LM, Martin RR, McPherson J (1991) Sense and anti-sense RNA-mediated resistance to potato leafroll virus in Russet Burbank potato plants. *Mol Plant-Microbe Inter* 4: 247-253
- Kojima M, Shikata E, Sugawara M, Murayama D (1969) Purification and electron microscopy of potato leafroll virus. *Virology* 39: 162-173
- Kooter JM, Matzke MA, Meyer P (1999) Listening to the genes: transgene silencing, gene regulation and pathogene control. *Trends Plant Sci* 4: 340-340
- Lamb JW, Duncan GH, Reavy B, Gildow, FE, Mayo MA, Hay RT (1996) Assembly of virus-like particles in insect cells infected with a baculovirus containing a modified coat protein gene of potato leafroll luteovirus. *J Gen Virol* 77: 1349-1358
- Lawson C, Kaniweski L, Haley R, Rozman C, Newell P, Sanders NE (1990) Commercial potato cultivar resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank. *Bio/Technology* 8: 127-134
- Mayo MA, Robinson DJ, Jolly CA, Hyman (1989) Nucleotide sequence of potato leafroll luteovirus RNA. *J Gen Virol* 70: 1037-1051
- Ohshima K, Nakaya T, Matsumura T (1993) Nucleotide sequence of coat protein and 17 k protein Genes for a potato leafroll virus Japanese isolate. *Ann Phytopath Soc Jap* 59: 204-208
- Powell-Abel P, Nelson RS, Hoffman N, Rogers SG, Fraley RT, Beachy RN (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232: 378-743
- Presting GG, Smith OP, Brown CR (1995) Resistance to potato leafroll virus in potato plants transformed with the coat protein gene or with vector control constructs. *Phytopathology* 85: 436-442
- Promega (1998) Screening for genetically modified organisms in food using promega's Wizard Resin. *Pomega Note* 73: 23-25
- Ratcliff FG, MacFarland SA, Baulcombe DC (1999) Gene silencing without DNA:RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* 11: 1207-1215
- Salazar LF (1996) Potato viruses and their control. International Potato Center (CIP). Lima, Peru
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
- Seo HW, Kim ES, Yi JY, Hahm YI (2000) Diagnosis of Potato Virus Y with Digoxigenin-labeled cRNA Probe. *Plant Pathol J* 16(3): 183
- Smith OP, Harris KF, Toler RW, Summers MD (1988) Molecular cloning of potato leaf roll virus complementary DNA. *Phytopathology* 78: 1060-1066
- Stark DM, Beachy RN (1989) Protection against potyvirus infection in transgenic plant: Evidence for broad host spectrum resistance. *Bio/Technology* 7: 1257-1264
- Syller J (1994) The effect of temperature on the availability and acquisition of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. *Ann App Biol* 125: 141-145
- Tamada, T, Harrison BD (1981) Quantitative studies on the uptake and retention of potato leafroll virus by aphids in laboratory and field condition. *Ann Appl Biol* 98: 261-276
- UIPOV (1986) Guide for the conduct of tests for distinctness, homogeneity and stability. *Potato (Solanum tuberosum L.) Tg/23/5*: 5-25
- van der Vlugt RAA, Ruiter K, Goldbach R (1992) Evidence for sense RNA-mediated protection to PVY^N in tobacco plants transformed with the viral coat protein cistron. *Plant Mol Biol* 20: 631-639
- Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13959-13964
- Waterhouse PM, Smith NA, Wang MB (1999) Virus resistance and gene silencing: killing the messenger. *Trends Plant Sci* 95: 452-4547

(접수일자 2005년 6월 16일, 수리일자 2005년 9월 14일)