

사업구분 : 기본연구	Code 구분 : LS1007	농업생명공학(전반기)
연구과제 및 세부과제명	연구기간	연구책임자 및 참여연구원(☎)
나리 바이러스 저항성 신품종 육성	'02~'06	경기도원 환경농업연구과 소호섭(229-5813)
나리 바이러스 저항성 유용벡터 제작	'02~'04	경기도원 환경농업연구과 소호섭(229-5813)
색인용어	나리, 바이러스 저항성, 형질전환, 벡터, LSV, CMV	

ABSTRACT

The goal of this work was to develop an efficient method for lily virus (CMV : cucumber mosaic virus and LSV : lily symptomless virus) resistant transformation, taking into account for two different types of vector. These binary vectors(the pBI121 and the pMJ101 vector) of *CMV* or *LSV coat protein* gene were transformed using agrobacterium LBA4404. So we constructed 3 types binary vector (pBI121-CMV, pMJ101-CMV, pMJ101-LSV).

Key words : Lily, transformation, vector, LSV, CMV

1. 연구목표

나리를 재배할 때 바이러스병이 가장 문제시 되고 있다. 전 세계적으로 보고되어 있는 나리 바이러스는 약 20여종에 이르며 국내에는 현재까지 6여종이 보고되어 있다. 그 중 피해가 심한 바이러스는 Lily symptomless virus (LSV), Cucumber mosaic virus (CMV), Tulip breaking virus (TBV)로 알려져 있다. 바이러스 감염은 나리의 품종과 바이러스의 종류에 따라 다르고 한가지 보다 두 종류 이상의 바이러스가 복합 감염되어 있을 때 피해가 심하다(이금희).

바이러스 방제는 토양소독 및 이병주 제거, 잡초 제거 또는 살충제를 살포하여 매개충을 근절하는 방법이 있지만 완전한 방제는 불가능하기 때문에 분자생물학적 기법을 이용한 바이러스 저항성 작물 개발이 요구되고 있다.

분자생물학 기법을 이용한 바이러스 저항성 작물에는 Tomato golden mosaic virus(TGMV) 복제에 관여하는 *AL1*유전자의 antisense RNA를 이용한 토마토(임성열, 1998), 감자 바이러스 Y (PVY)의 외피단백질을 이용한 감자(박영두 등, 1997), 오이 모자이크 바이러스 (CMV) 외피단백질을 이용한 담배(손성한 등, 1997), 담배 모자이크 바이러스 (TMV) 외피 단백질을 이용한 담배(박성원등, 1996, 이기원등 1996)와 바이러스 무병묘 오이(이기원등 1996) 등이 연구되었다.

본 연구는 분자생물학적 기법을 이용한 나리 바이러스 저항성 작물을 개발하기 위해서 먼저 나리 바이러스 중에서 가장 문제시 되는 오이 모자이크 바이러스 (CMV)와 나리 무증상 바이러스 (LSV)의 외피 단백질을 pBI121벡터, 과발현(over expression)하는 pMJ101벡터에 삽입시켜 바이러스 저항성 벡터를 제작하고자 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 벡터

나리 바이러스 외피 단백질의 일부 유전자인 *CMV CP*, *LSV CP* 유전자를 농업생명공학연구원에서 분양받아 *CMV CP* 유전자는 pBI121 벡터에 삽입시켜 pBI121 + *CMV CP* 바이너리 벡터를 제작하였고, 명지대에서 pMJ101 벡터를 구입하여 pMJ101 + *CMV CP*, pMJ101 + *LSV CP* 바이너리 벡터를 제작하였다.

나. 균주 및 배양

국화 형질전환을 위한 *agrobacterium* 균주는 LBA4404로써 농업생명공학연구원에서 분양받아 pBI121-*CMV* 벡터와 heat shock 방법으로, pMJ101 벡터는 HB101 벡터와 같은 helper 플라스미드와 함께 tri parental mating (TPM) 방법으로 아그로박테리움에 형질전환시켰다. 배양된 균주의 콜로니는 spectinomycin 100mg/L 첨가된 액체 YEP(10mg/L peptone, 10g/L yeast extract, 5g/L NaCl) 배지에 3ml 접종하여 28°C에서 250rpm으로 2일간 진탕 배양하여 증식한 후 플라스미드 DNA를 추출하여 아그로박테리움에 삽입되었는지를 PCR을 통해서 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

바이러스 외피 단백질 유전자인 *CMV CP*, *LSV CP*를 pBI121 벡터와 pMJ101 벡터에 subcloning 한 벡터의 map은 그림1과 같다. pBI121 벡터는 *CaMV 35S* 프로모터와 *Nos* 터미네이터를 구성하는 *CMV CP* 유전자 세트와 더불어 *hpt* 유전자가 있어 하이그로마이신을 배지에 첨가하여 형질전환 식물체를 선발할 수 있는 벡터이다. 임성렬(1998)은 TGMV 바이러스의 일부인 *ALI* 유전자를 pBinAR에 삽입시킬때 프로모터를 *CaMV 35S*를 이용하여 바이너리 벡터를 제작하였고, 소호섭(2004)은 밤나방과 살충성 유전자를 이용하여 pGRBT 바이너리 벡터 제작시 프로모터를 *CaMV 35S* 프로모터로, 터미네이터를 *Nos* 유전자가 있는 벡터를 이용하였다.

pMJ101 벡터는 *CMV CP*, *LSV CP* 유전자 외에도 유전자 발현에 필요한 프로모터 부위를 포함하여 제초제 유효성분에 저항성이 있는 *bar* 유전자를 coding하고 있다. 특히 단자엽 식물인 벼에서 형질전환이 용이하도록 하는 rice *OsCc1* 프로모터를 가지며, 왼쪽과 오른쪽 경계에 matrix attachment region(MAR)이 있는 것이 이 벡터의 특징으로 tri-parental mating 방법에 의해서 벡터를 제작하였다. pMJ101 벡터는 소호섭(2004)이 제작한 pMJRTB 벡터와 마찬가지로 *bar* 유전자를 형질전환체 선발 유전자로 이용하였으며, 살충성 유전자 대신에 바이러스 외피단백질이, *rbcS* 프로모터 대신에 *OsCc1*이 대치되었으나 터미네이터는 *pinII* 유전자로 서로 같았다.

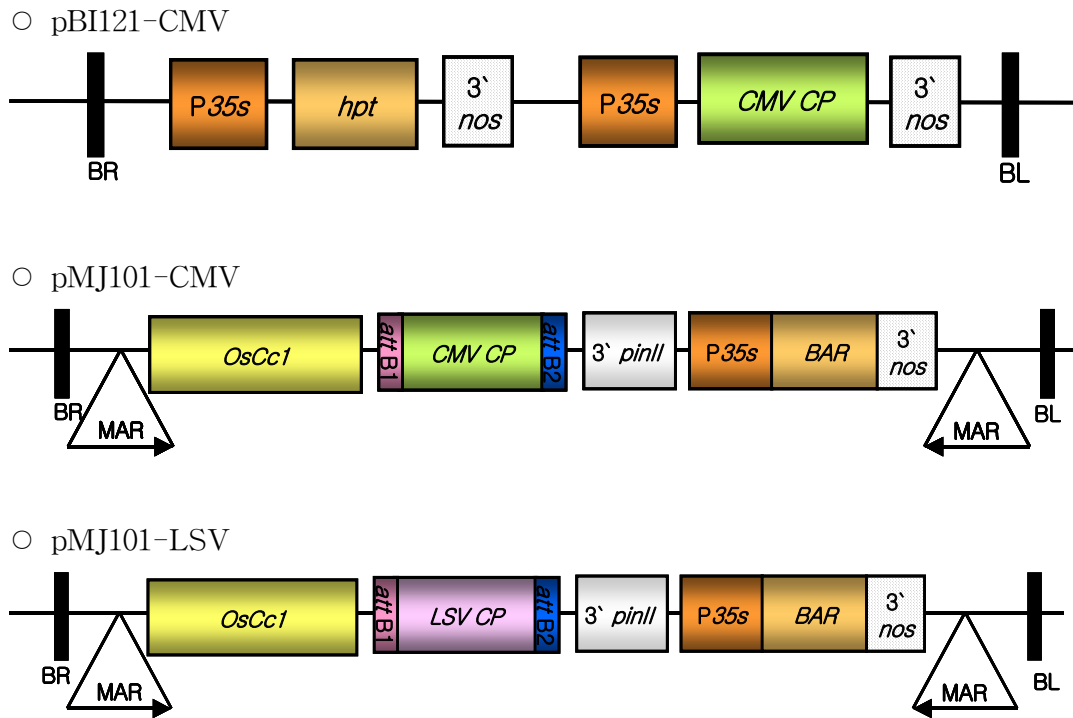


그림1. 바이러스 저항성 형질전환을 위하여 제작된 바이너리 벡터 constructs.

제작된 바이너리 벡터 constructs는 먼저 대장균 DH5 α 에 형질전환한 후 아그로박테리움으로의 도입을 pBI121-CMV 벡터는 LBA4404 아그로박테리움과 heat shock 방법으로 conjugation시켰으며, pMJ101 벡터는 LBA4404와 helper 플라스미드인 pRK2013(HB101)과 tri-parental mating을 통하여 conjugation시켰다.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

1kb →
0.5kb →

그림2. PCR 및 전기영동에 의해 제작된 바이너리 벡터 확인
(Lane 1,16 : 1kb ladder molecular marker, Lane 6, 7 : pMJ101-CMV,
Lane 8, 9 : pMJ101-LSV, Lane 10~15 : pBI121-CMV)

Conjugation시킨 다음 아그로박테리움 DNA를 추출한 후 pMJ101-CMV는 894bp를 복제할 수 있는 CMV894 프라이머, pMJ101-LSV는 939bp를 복제할 수 있는 LSV939 프라이머, pBI121-CMV는 663bp를 복제할 수 있는 CMV3-2 프라이머를 디자인한 후 인공 합성하였다. 합성한 각각의 primer로 PCR한 결과 그림2에서 보는 바와 같이 pMJ101-CMV백터는 894bp, pMJ101-LSV백터는 939bp, pBI121-CMV백터는 663bp 크기의 DNA조각을 복제하여 아그로박테리움에 conjugation되었음을 확인할 수 있었다.

4. 적요

나리 바이러스 저항성 벡터를 제작하기 위해 *CMV CP*, *LSV CP* 유전자와 pBI121백터 등 2종을 2002~2004년도에 걸쳐 3년간 벡터를 제작한 결과는 다음과 같다.

가. pBI121-CMV백터는 *hpt* 유전자를 마커로 35S 프로모터를 가지며 CMV 외피 단백질 일부를 발현시키는 벡터임

나. pMJ101 백터는 *bar* 유전자를 마커로 단자엽식물에서 특이적으로 발현하는 *OsCc1* 프로모터가 있으며, CMV와 LSV의 외피 단백질 일부를 발현시켜 이들 바이러스가 침입하지 못하도록 각각 제작하였음

다. 제작된 pBI-CMV백터는 663bp, pMJ101-CMV백터는 894bp, pMJ101-LSV백터는 939bp에서 band를 확인하였음

따라서 pBI121-CMV, pMJ101-CMV, pMJ101-LSV 플라스미드 벡터 3종의 나리 바이러스 저항성 아그로박테리움 벡터를 제작하였다.

5. 인용문헌

- 박영두, Ronis, D.H. Duysen, M.E. Cheng, and Z.M. Lorenzen. 1997. 감자 바이러스 Y 저항성 형질전환 감자 개발. 식물조직배양학회지 24 : 313-317
- 박성원, 이기원, 김남원, 박은경. 1996. TMV 외피단백질 cDNA 도입에 의한 담배 모자이크 바이러스 저항성 연초 개발. 식물조직배양학회지 23 : 21-26
- 소호섭, 한영희, 박경열, 박영두. 2004. 2003년도 시험연구보고서. 국화 내충성 유전자 형질전환을 위한 유용벡터 제작. 경기도농업기술원. 538-541
- 손성한, 김경환, 박종석, 황덕주, 한 장호, 이광웅, 황영수. 1997. 오이모자이크바이러스 외피단백질유전자 발현 담배의 바이러스 저항성 분석. 식물조직배양학회지 24 : 153-160
- 이금희, 백합 바이러스병, <http://www.cheju.rda.go.kr/agrinfo/htm/agro21/CGI-BIN/BE040604.htm>
- 이기원, 이은경, 유상희; 이영복. 1996. Agrobacterium tumefaciens의 Binary Vector System을 이용하여형질전환된 담배와 오이에서의 담배 모자이크 바이러스 외피단백질 유전자의 발현 한국식물조직배양학회. 23-4. 205-210
- 임성렬. 1998. Tomato golden mosaic virus(TGMV) AL1-gene의 antisense RNA 발현 형질 전환 식물체. 식물조직배양학회지 25 : 147-152