

옥수수 calreticulin 과발현 토마토에서 tobamovirus의 상엽 이동 억제

한증술

Suppression of tobamovirus movement toward upper leaves in the tomato plant over-expressing a maize calreticulin

Jeung-Sul Han

Received: 1 December 2010 / Accepted: 15 December 2010
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract To ascertain the effect of over-expressed maize calreticulin in tomato plant on tobamovirus movement in addition to validating potentiality of the gene (*ZmCRT*) as a means for the virus-resistance resource, four *ZmCRT*-expressing homozygous lines were generated from the T_0 plants as using an *Agrobacterium*-mediated transformation, nucleic acid analyses, and a conventional breeding method. Of them, a line was subjected to the bioassay for tolerances to tobacco mosaic virus-U1 (TMV-U1) and tomato mosaic virus (ToMV) followed by RT-PCR and a chlorophyll fluorescence quenching analyses. Both transgenic plants transcribing *ZmCRT* and wild-type plants showed no symptom by 20 days after viruses inoculation, however the photosystem II quantum yield parameter measured from the upper leaves of ToMV-inoculated plants revealed that *ZmCRT* transgenic plants have higher photosynthetic ability than wild-type ones at that time, which indirectly implies that over-expressed *ZmCRT* product acts as a barrier to the cell-to-cell and/or systemic movement of ToMV. Moreover, *ZmCRT* transgenic plants showed remarkably longer shoot length than wild-type ones in 40 days after TMV-U1 or ToMV inoculation each, which might be resulted from higher photosynthetic ability during the phase not yet showing any external symptoms. Collectively, over-expressed *ZmCRT* protein in tomato plants is able to interrupt the systemic movement of infected TMV-U1 and ToMV even though not perfect.

Keywords tomato, calreticulin, genetic transformation, tobamovirus, systemic movement, chlorophyll fluorescence quenching analysis

서론

Calreticulins (CRTs)은 동물의 세포소기관 뿐 아니라 식물의 소포체 (endoplasmic reticulum: ER), 원형질연락사 (plasmodesmata: PD) 및 골지체 등에서 발견되며 3개의 Ca결합 영역을 보유한 Ca결합단백질의 하나이다 (Baluška et al. 1999; Persson et al. 2001, 2003; Shaterian et al. 2005). 또한 CRT는 세포 내 Ca^{2+} 신호전달과 항상성 (Persson et al. 2003), molecular chaperone으로서 calnexin과 공조한 단백질 folding (Hebert et al. 1996; Miernyk 1999; Saito et al. 1999), 내염성 발현 (Shaterian et al. 2005) 및 고농도 Ca^{2+} 스트레스에 대한 내성 발현 (Wyatt et al. 2002; Åkesson et al. 2005) 등 다양한 기작에 직간접적으로 관여하는 것으로 알려져 있다. 더불어 *Tobacco mosaic virus* (TMV)의 movement protein (MP)이 기주의 PD에서 CRT와 상호작용한다는 것이 최근에 밝혀졌는데, 흥미로운 점은 CRT 과발현 형질전환체에서는 TMV MP가 PD로 이동하는데 방해를 받아 바이러스의 세포간 이동 (cell-to-cell movement)이 저해되며 이러한 현상은 *Turnip vein clearing virus*와 같은 다른 tobamovirus의 경우에도 관찰된다는 것이다 (Chen et al. 2005). 바이러스의 세포간 이동에 결정적 역할을 담당하는 MP (Citovsky et al. 1992; Ding et al. 1992; Chen et al. 2000)가 과발현 CRT로 인해 PD에 제대로 위치하지 못함으로써 바이러스의 세포간 이동이 어려워지면 초기감염된 바이러스의 체관부 접근이 지연되거나 불가능하게 될 것이고 (Laporte et al. 2003) 결국 바이러스의 장거리이동 (systemic movement)

J.-S. Han (✉)
경북대학교 생태환경대학 생태환경보전전공
(Department of Ecological Environment Conservation, College of Ecology & Environment Science, Kyungpook National University, 386 Gajang-dong, Sangju 742-711, Republic of Korea)
e-mail: peterpan@knu.ac.kr

이 방해를 받을 것이라는 추론이 가능하다. 실제로 Chen 등 (2005)은 *CRT* 과발현 *Nicotiana benthamiana*의 엽연부에 TMV를 인공접종한 28일 후에도 상업에서 TMV의 coat protein (CP)을 검출할 수 없었다고 보고하였다.

CRT 과발현 식물체에서 나타나는 tobamovirus의 이동 억제에 관한 언급한 실험결과는 농업적 측면에서 유용하게 활용될 수 있다. 세계적 과채류인 토마토 (*Solanum lycopersicum* L.)의 경우 136여 종의 바이러스에 감수성이며 그 중 8종이 특히 심각한 피해를 야기하는 tobamovirus이다 (Brunt et al. 1997). 모델 식물에와 동일하게 농업적으로 중요한 토마토에서도 *CRT* 과발현이 tobamovirus의 세포간 또는 장거리 이동 억제에 효과적이라면 지금까지 바이러스 저항성 획득을 위해 형질전환에 주로 활용되고 있는 바이러스 유래 유전자 또는 그 단편과 더불어 *CRT*는 또 하나의 유용한 수단이 될 수 있을 것이다.

본 연구의 목적은 토마토에서 tobamovirus에 대한 저항성 획득을 위한 목표 유전자로서 *CRT*의 활용 가능성을 검증하는 것이다. 이를 위해 옥수수 (*Zea mays*)에서 동정된 *CRT* (*ZmCRT*)를 토마토에 형질전환함으로써 *ZmCRT* 발현 식물체를 획득하고 고정된 후 tobamovirus에 속하는 TMV와 *Tomato mosaic virus* (ToMV)를 인공접종하여 그 유식물체에서 나타나는 병징을 관찰하는 한편 바이러스 접종 식물체의 광합성 효율을 측정하였다.

재료 및 방법

토마토 유전자형과 tobamovirus 분리주

토마토는 미국 Texas A&M 대학교 Vegetable and Fruit Improvement Center에서 육성한 내흔계통 'FTX'을 분양 받아 사용하였다. 바이러스는 TMV-U1과 ToMV로 감염된 냉동건조물을 국립원예특작과학원으로부터 분양 받아 *N. tabacum* cv. Turkish Samsun과 cv. Samsun에서 각각 증식한 후 접종원으로 사용하였다.

플라스미드, *Agrobacterium* 균주 및 *ZmCRT* 형질전환

옥수수의 calreticulin을 coding하는 염기서열 (*ZmCRT*: GenBank accession #AF190454)이 pUC119 (Vieira and Messing 1987; GenBank accession #U07650)를 backbone으로 하는 pE1775 binary vector (Lee et al. 2007)에 cloning되었는데, 이 vector (pE1775-*ZmCRT*: supplied by Dr. Sunghun Park at Kansas State Univ.)에서 *ZmCRT*는 3개의 octopine synthase transcriptional activating element와 1개의 mannopine synthase 2' activating & promoter element가 연속적으로 연결된 superpromoter에 의해 그 발현이 조절된다 (Fig. 1A; Lee et al. 2007). pE1775-*ZmCRT*를 freeze-thaw method (Holsters et al. 1978)를 통해

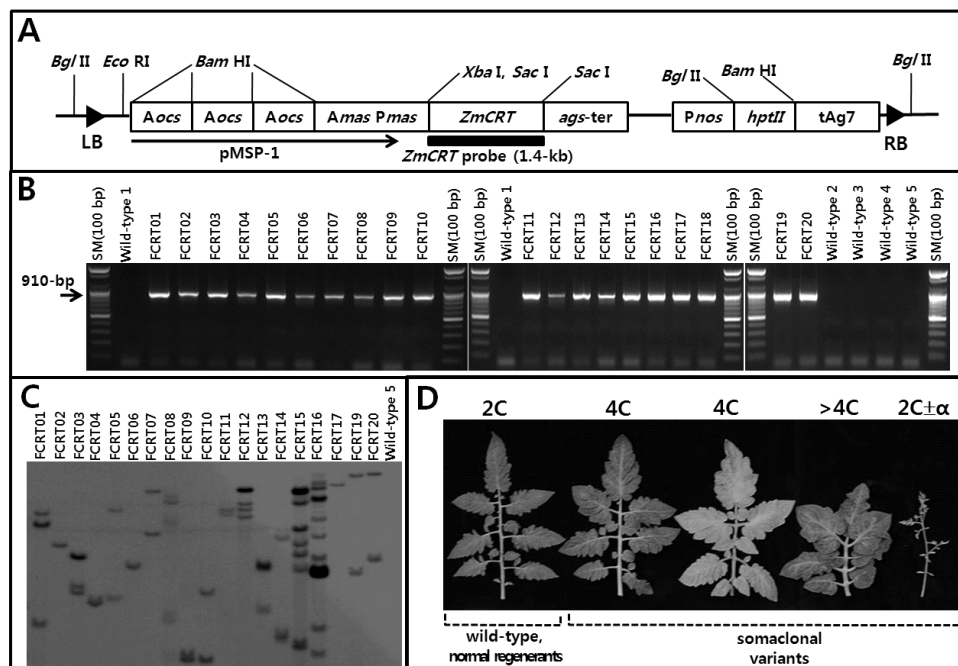


Fig. 1 Nucleic acid analyses of *ZmCRT* transgenic tomato plants and leaf morphologies of regenerated plants with different ploidy. (A) T-DNA map. *Aocs*: octopine synthase transcriptional activating element, *Amas Pmas*: mannopine synthase 2' transcriptional activating and promoter elements, *ZmCRT*: *Zea mays* calreticulin gene, *ags-ter*: polyA addition signal from the agropine synthase gene, *Pnos*: nopaline synthase promoter, *hptII*: hygromycin phosphotransferase gene, *tAg7*: polyA addition signal for T-DNA gene. (B and C) PCR and Southern blot analyses of T_0 plants, respectively. Lanes FCRT01 to FCRT20 represent each regenerated transgenic plant. (D) morphological comparison of leaves in regenerated plants with different ploidy levels

A. tumefaciens LBA4404 균주에 도입하였고 이를 토마토 'FTX'의 하배축 절편을 이용한 형질전환 (Park et al. 2003, 2005)에 이용하였다.

식물체의 핵산분석

ZmCRT 단편의 증폭을 위한 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction: PCR)은 forward와 reverse primer (Table 1) 각각이 최종농도 200 μM이 되도록, gDNA는 DNeasy Plant Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden German)을 이용하여 유식물체로부터 추출하여 최종농도 0.8 ng/μL가 되도록 각각 PerfectShot Ex Tag Kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)에 첨가하여 수행하였다. 더불어 삽입 유전자의 재확인과 T-DNA copy수 결정을 위하여 Southern 혼성화 분석을 수행하였는데 식물체 gDNA의 절단은 제한효소 *Xba* I을 단용, plasmid로부터 probe 제작을 위해서는 제한효소 *Xba* I과 *Sac* I을 혼용하였으며 절단된 genomic DNA (gDNA)의 분획, 분획된 gDNA의 membrane 전이 및 probe와의 혼성화 등은 Chung 등 (2010)의 방법을 따랐다.

재분화 식물체에서 나타나는 배수성 변이가 표현형 이상뿐 아니라 목표유전자 발현에 기인한 특성의 구별을 모호하게 할 수 있다 (Dan et al. 2003). 실제로 본 연구에서도 일부 유식물체의 엽형이 wild-type과 뚜렷한 차이를 나타내었는데, 이들 배수성 T₀ 변이체를 고정세대 육성용 모본에서 제외시키기 위한 목적으로 DNA 형광탐지를 기반으로 하는 배수성분석기 (PAII: Partec, Münster, Germany)를 활용하여 Han 등 (2004)의 방법을 따라 그 분석을 수행하였다.

한편, ToMV를 접종한 식물체에서 *ZmCRT*의 전사와 바이러스 축적 양상을 분석하기 위하여 *ToMV-CP* 유전자를 대상으로 반정량적 reverse transcriptional polymerase chain reaction (semi-quantitative RT-PCR) 분석을 수행하였다. 바이러스 접종 후 40일경 어린 상엽으로부터 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)를 이용하여 총 RNA를 추출한 후 DNA 오염을 제거하기 위하여 DNase I (Invitrogen, Carlsbad, USA)으

로 2회 처리하였다. 이어서 분광광도계 (NanoDrop 2000: Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)로 RNA를 정량한 후 각 시료가 동일 농도가 되도록 희석하였으며 등량의 각 RNA 시료를 template로, random hexamer를 primer로 첨가한 SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen)을 이용하여 cDNA를 합성하였고, 합성된 각 cDNA 2 μL와 primer 조합 (Table 1)을 첨가하여 PCR을 수행함으로써 *ZmCRT*, *ToMV-CP* 및 actin 유전자 (*ACT*: GenBank accession #AB199316, BT013707) 단편을 각각 증폭하였다.

형질전환 동형접합세대 육성

PCR 분석에서 *ZmCRT* 단편이 증폭되고 Southern 혼성화 분석에서 T-DNA의 1 copy 삽입과 배수성분석을 통해 이 배체로 확인된 T₀ 식물체를 대상으로 인공교배를 통해 T₁ 집단을 육성하였다. T₁ 집단의 각 식물체에 대한 PCR 분석을 통해 *ZmCRT* 단편의 증폭이 확인된 개체는 개체별로 T₂ 집단을 육성한 후 다시 각 집단에 대한 PCR 분석을 수행함으로써 목표유전자가 분리하지 않는 고정집단을 선발하였다.

바이러스 접종

TMV-U1과 ToMV 분리주가 증식된 *N. tabacum* cv. Turkish Samsun과 cv. Samsun의 잎을 채취하여 막자사발에 넣고 20 mM sodium phosphate/bisphosphate 완충액 (pH 7.0)를 첨가한 후 마쇄하여 접종원으로 사용하였다. T₂세대 토마토를 파종한 후 20일경인 본엽 2매 완전전개 시점에 제1본엽의 뒷면에 carborundum 분말을 도포한 후 바이러스 접종원을 묻인 면봉으로 뒷면 전체를 상처가 나지 않도록 가볍게 문질러주었다.

엽록소형광 quenching 분석

ZmCRT 형질전환체와 wild-type 식물체의 ToMV 접종에 따른 광합성 효율을 비교하기 위하여 ToMV 접종 20일 후

Table 1 Genes and primer sets for PCR and RT-PCR analyses applied in the current study

Target DNA	Purpose	Sequences of primer set (forward and reverse)	Expected amplicon (size)	Reference (GenBank accession)
<i>ZmCRT</i>	Transgene detection	5'-TGAGTTCAGCAACAAGGATA-3' 5'-CTCATCCTCTAGGTCATCATCCTCAT-3'	910 bp	#AF190454
<i>ZmCRT</i> cDNA	Transcript detection	5'-AAATGGAAGGCACCTATGATTGACAACC-3' 5'-CTCATCCTCTAGGTCATCATCCTCAT-3'	291 bp	#AF190454
<i>ToMV-CP</i> cDNA	ToMV detection	5'-ATGTCTTACTCAATCACTTCTCCA-3' 5'-TGTACAGTCCAGTACCTCTTACTA-3'	421 bp	#DQ873692 & DQ661035
tomato <i>ACT</i> cDNA	internal control for RT-PCR analysis	5'-AGGCAGGATTTGCTGGTGAT-3' 5'-ACCAGTGGTACGACCGCTAG-3'	398 bp	#AB199316 & BT013707

WinControl software (version2.08; Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany)가 구동하는 pulse amplitude modulation fluorometer (Mini-PAM; Heinz Walz GmbH)를 활용하여 포화광 pulse 하에서 광계II (photosystem II: PSII) 유래 형광 (Chl-F)을 측정하였다. 각 식물체의 상부 바로 아래 완전 전개된 잎에 Dark Leaf Clip (DLC-8; Heinz Walz GmbH)을 각각 고정하여 30분 이상 암적응 시킨 후 measuring light intensity 2, actinic light intensity 5, pulse 간격 40초의 조건으로 quenching을 수행하고 측정된 형광값에 의존하는 매개변수를 획득한 후 non-photochemical quenching (NPQ; Bilger and Björkman 1990)과 PSII quantum yield (Φ_{PSII} ; Genty et al. 1989)를 산출하였다. NPQ는 $(F_m - F_m')/F_m'$ 식으로, Φ_{PSII} 는 $(F_m' - F_t)/F_m'$ 식으로 구하였으며 F_m 은 암적응된 상태에서의 최대 Chl-F, F_m' 은 명적응된 상태에서의 최대 Chl-F, F_t 는 명적응된 상태에서의 포화광 pulse 조사 직전 Chl-F 값을 의미한다. ToMV가 접종된 *ZmCRT* 형질전환 T_2 세대 식물체, ToMV 접종 wild-type 및 바이러스 미접종 wild-type 각 5개체로부터 얻어진 매개변수 값의 평균을 구하여 처리간 비교하였다.

결과 및 고찰

ZmCRT 형질전환 토마토 획득과 동형접합계통 육성

토마토 내흔계통 'FTX'의 하배축 절편을 이용한 *ZmCRT* 형질전환을 수행하여 총 20개체의 T_0 재분화 식물체를 획득하고 PCR 분석을 수행하였는데, 모든 개체에서 *ZmCRT* 유전자 단편 (910 bp)이 증폭되었다 (Fig. 1B). 이것은 본 연구에서 활용된 토마토 형질전환 체계 (Park et al. 2003, 2005)가 유전자형 'FTX'에도 상당히 효과적이라는 것을 나타낸 결과라고 할 수 있다. T-DNA의 삽입을 재확인하고 copy 수를 결정하기 위하여 1개체 ('FCR18')를 제외한 19개체를 대상으로 Southern 혼성화 분석을 실시하였는데 단 3개체 ('FCRT02', 'FCRT06', 'FCRT17')만이 1 copy T-DNA가 삽입되었고 나머지 개체는 2~10 copy의 T-DNA가 삽입된 것으로 확인되었다 (Fig. 1C). 형질전환 초기 세대에서 T-DNA가 2 copy 이상 존재할 경우 비분리 고정계통 육성 과정에서 집단의 규모를 키워야 하는 단점과 경우에 따라서는 도입 유전자의 발현 자체가 억제될 수도 있다 (Stam et al. 1997). 따라서 다양한 접근방법을 통해 1 copy T-DNA 삽입효율을 높이거나 copy수에 무관하게 도입 유전자의 발현을 유도할 수 있는 방법 (Mlynárová et al. 1995; De Buck et al. 2007)이 토마토 형질전환에 적용되어야 할 것으로 사료된다. 또한 본 연구에서 활용한 형질전환 체계뿐 아니라 대부분의 토마토 형질전환에서는 배수성 변이체를 포함한 체세포변이체의 고빈도 발생을 야기

할 수 있는 캘루스를 경유하여 식물체를 재분화시키고 있다 (Bulk et al. 1990; Fras and Maluszynska 2003). 이는 재분화된 토마토 형질전환체의 경우 최소한 배수성 분석이 필요하다는 것을 의미한다고 할 수 있는데, 실제로 본 연구에서 재분화된 일부 형질전환체도 비정상적 4배성 및 이수성을 나타내는 것으로 분석되었다. 이들 비정상적 배수체는 엽형의 뚜렷한 변화 또는 엽색의 변화를 수반하였다 (Fig. 1D). 배수성 분석 결과를 토대로 1 copy T-DNA가 삽입된 'FCRT06' T_0 식물체는 4배체로 판단되어 세대진전에서 제외하고 'FCRT02'와 'FCRT17'을 대상으로 인공 자가수분을 실시하여 T_1 집단을 각각 육성하였다. 두 집단의 각 식물체에 대한 PCR 분석을 수행한 결과 두 집단 모두 멘델식 분리 (positive:negative=3:1)를 하였고 (data not shown), *ZmCRT* 단편의 증폭이 확인된 각 집단의 T_1 식물체 5주에 대해 다시 인공 자가수분을 실시하여 총 10개의 T_2 집단을 육성하였다. 각 T_2 집단의 개체에 대한 PCR 분석을 다시 실시하여 *ZmCRT* 유전자가 모두 탐지되는 4개 집단을 확인 (data not shown)하였으며 그 중 'FCRT02' T_0 식물체로부터 육성된 계통을 다음 실험의 재료로 사용하였다.

Tobamovirus가 접종된 *ZmCRT* 형질전환체의 표현형

ZmCRT 형질전환 고정세대 종자를 파종하여 본엽이 2매 완전 전개한 시점 (파종 후 20일)에 TMV-U1과 ToMV 분리를 각각 접종한 20일 후 (파종 후 40일) 병징을 관찰한 결과 형질전환체와 wild-type 모두에서 육안으로 식별할 수 있는 병징이 관찰되지 않았으나 바이러스 접종 40일 후 (파종 후 60일)에는 주로 신엽을 중심으로 토마토 유전자형과 바이러스를 달리한 4조합 모두에서 뚜렷한 모자이크 병징이 관찰되었다 (Fig. 2A, 2B). ToMV 접종 식물체에 한한 반정량적 RT-PCR 분석은 모자이크 병징이 접종 후 감염된 바이러스의 상업으로 이동에 따른 결과임을 확인시켜 주었다 (Fig. 2C). 그러나 형질전환 식물체가 *ZmCRT*를 전사함에도 불구하고 wild-type과 비교하여 모자이크 병징의 심도에는 차이가 없었다. 이러한 결과는 Chen 등 (2005)이 tobamovirus 접종 후 28일까지 상업에서 바이러스 CP를 탐지할 수 없다는 보고와 차이를 나타내는 것으로 그 원인이 접종방법의 차이인지 바이러스의 병원성 차이인지 단언하기 어렵다. 전자를 채택한다면 본 연구에서는 잎의 뒷면 전체에 바이러스를 접종하였기 때문에 바이러스의 유관속 접근이 용이했던 반면 Chen 등 (2005)은 바이러스를 엽연부에 접종함으로써 바이러스의 유관속 접근이 굉장히 어려웠을 것이라는 추측이 가능하다. 그러나 본 연구에서 TMV-U1과 ToMV를 접종한 *ZmCRT* 형질전환체에서 나타나는 특징적인 표현형은 *ZmCRT* 형질전환체의 초장이 바이러스를 접종하지 않

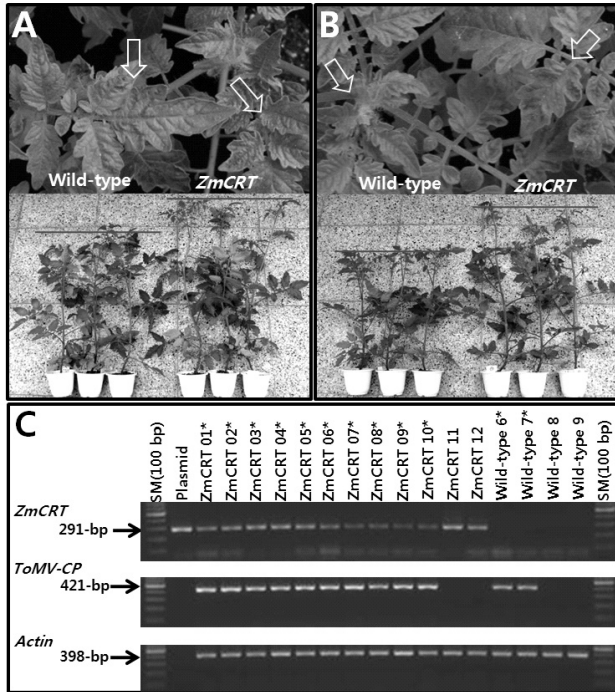


Fig. 2 Viral symptoms and RT-PCR analysis in 60-day-old (40 days after virus inoculation) *ZmCRT* homozygous tomato plants. (A and B) TMV-U1- and ToMV-infected plants, respectively. Arrows in the upper pictures indicate typical mosaic symptoms and horizontal lines in the lower pictures reflect a distinction in plant length between wild-type and *ZmCRT* transgenic plants. (C) Transcripts detection of *ZmCRT* and *ToMV-CP* genes in ToMV-inoculated and ToMV-not inoculated plants. Lanes *ZmCRT*01 to *ZmCRT*12 represent each homozygous transgenic plant at T₂ generation and asterisks indicate ToMV-inoculated individuals. The cDNA from tomato actin gene (*ACT*) transcript was used as a internal control

은 wild-type와 비교하여 비등한 수준으로 길다는 점이다 (Fig. 2A, 2B). 바이러스 접종 시험구에서 wild-type 대비 *ZmCRT* 형질전환체가 긴 초장을 갖게 된 원인은 과발현된 calreticulin 단백질이 tobamovirus의 상엽 이동을 지연시켰기 때문으로 사료된다.

엽록소형광 (Chl-F) quenching 분석을 통한 바이러스접종 형질전환체의 광합성 효율 검증

바이러스 감염과 광합성 효율과의 관계, 특히 바이러스 감염에 따른 Chl-F 변화에 관한 주목할 만한 보고가 있다 (Wolf and Millatiner 2000; Pérez-Bueno et al. 2006; Christov et al. 2007; Pineda et al. 2008). Pineda 등 (2008)은 병원성이 다른 *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) 2개 strain을 *N. benthamiana*에 각각 접종한 4~6일 후에 포화광 pulse를 조사하여 얻어진 Chl-F 매개변수 중 NPQ와 Φ_{PSII} 가 무병징 상태인 식물체간 바이러스 감염정도를 판별하는데 효과적이라고 하였다. 언급한 바와 같이 본 연구에서 TMV-U1

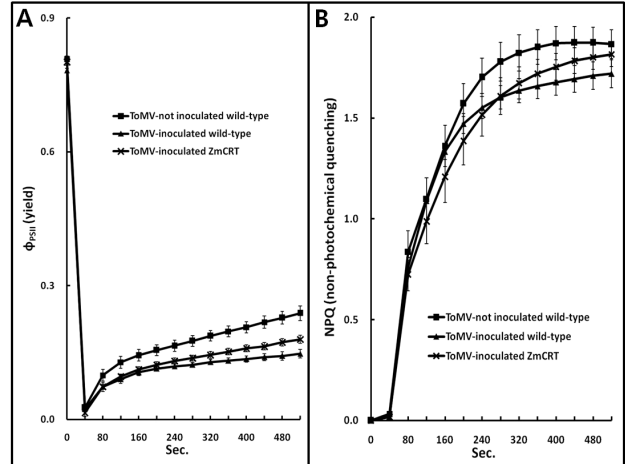


Fig. 3 Kinetics of two fluorescence parameters in the 40-day-old (20 days after ToMV inoculation) tomato plants subjected to chlorophyll fluorescence quenching analysis. (A) photosystem II quantum yield (Φ_{PSII}). (B) non-photochemical quenching (NPQ). Each plant was adapted under the dark for more than 30 min before the analysis, and saturation pulse was irradiated at intervals of 40 sec

과 ToMV를 접종한 20일 후 *ZmCRT* 형질전환체와 wild-type 및 바이러스 미접종 wild-type 모두는 병징이 관찰되지 않아 상엽을 대상으로 Chl-F quenching 분석을 수행하여 매개변수 NPQ와 Φ_{PSII} 를 산출한 후 상호 비교하였다. 암적응된 시료의 잠재적 quantum yield인 Fv/Fm (Kitajima and Butler, 1975; Fv=Fm-F₀; F₀: dark or initial fluorescence)값은 바이러스 미접종 wild-type 0.81±0.01 (mean±S.E.), ToMV 접종 wild-type 0.78±0.01 및 ToMV 접종 *ZmCRT* 형질전환체 0.80±0.01로 측정되어 바이러스 미접종 wild-type이 경시적으로 가장 높았으나 각 처리간 통계적 차이는 인정되지 않았다. 그러나 포화광 pulse가 지속되는 명적응 상태에서 Φ_{PSII} 값에 처리간 뚜렷한 차이를 나타내었는데 최종적으로 바이러스 미접종 wild-type이 0.24, ToMV 접종 wild-type이 0.15, 그리고 ToMV 접종 *ZmCRT* 형질전환체가 0.18로 산출되어 (Fig. 3A) 바이러스 감염이 토마토 식물체의 PSII quantum yield에 영향을 미칠 뿐 만 아니라 *ZmCRT* 발현이 상엽으로의 ToMV 이동 또는 감염을 줄일 수 있는 것으로 판단되었다. 한편, NPQ는 시간이 경과함에 따라 미접종 wild-type, ToMV 접종 *ZmCRT* 형질전환체, ToMV 접종 wild-type 순으로 높은 경향을 보이는 하였지만 통계적 차이는 인정되지 않았다 (Fig. 3B). 이러한 결과는 tobamovirus 접종 후 무병징 시기에 바이러스 감염정도를 Φ_{PSII} 또는 NPQ가 대별할 수 있다는 보고 (Pérez-Bueno et al. 2006; Pineda et al. 2008)와 일부 일치하는 것이다. 요약하면 *ZmCRT* 과발현은 tobamovirus의 상엽이동을 감속시키고, 따라서 상엽의 바이러스 감염이 지연됨으로 인해 상엽의 광합성 효율 감소가 제어된 것으로 추론할 수 있다. 즉, 이러한 추

론으로 병징관찰이 가능한 시점 (바이러스 접종 40일 후)에 도달한 *ZmCRT* 형질전환체와 wild-type간 생장량 차이 (Fig. 2A, 2B)의 원인 설명이 가능하다.

사 사

이 논문은 2009학년도 경북대학교 신입교수정착연구비에 의하여 연구되었음.

인용문헌

- Åkesson A, Persson S, Love J, Boss WF, Widell S, Sommarin M (2005) Overexpression of the Ca^{2+} -binding protein calreticulin in the endoplasmic reticulum improves growth of tobacco cell suspensions (*Nicotiana tabacum*) in high- Ca^{2+} medium. *Physiol Plant* 123:92-99
- Baluška F, Šamaj J, Napier R (1999) Maize calreticulin localizes preferentially to plasmodesmata in root apex. *Plant J* 19:481-488
- Bilger W, Björkman O (1990) Role of the xanthophylls cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth Res* 25:173-185
- Brunt A, Crabtree K, Dallwitz M, Gibbs A, Watson L, Zurcher E (1997) Plant viruses online: descriptions and lists from the VIDE database. <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
- Bulk RW, Löffler HJM, Lindhout WH, Koornneef M (1990) Somaclonal variation in tomato: effect of explants source and a comparison with chemical mutagenesis. *Theor Appl Genet* 80:817-825
- Chen MH, Sheng J, Hind G, Handa AK, Citovsky V (2000) Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *EMBO J* 19:913-920
- Chen MH, Tian G-W, Gafni Y, Citovsky V (2005) Effects of calreticulin on viral cell-to-cell movement. *Plant Physiol* 138:1866-1876
- Christov I, Stefanov D, Velinov T, Goltsev V, Georgieva K, Abracheva P, Genova Y, Christov N (2007) The symptomless leaf infection with grapevine leafroll associated virus 3 in grown in vitro plants as a simple model system for investigation of viral effects on photosynthesis. *J Plant Physiol* 164:1124-1133
- Chung MY, Han JS, Giovannoni J, Liu Y, Kim CK, Lim KB, Chung JD (2010) Modest calcium increase in tomatoes expressing a variant of *Arabidopsis* cation/ H^+ antiporter. *Plant Biotechnol Rep* 4:15-21
- Citovsky V, Wong ML, Shaw A, Prasad BVV, Zambryski PC (1992) Visualization and characterization of tobacco mosaic virus movement protein binding to single-stranded nucleic acids. *Plant Cell* 4:397-411
- Dan H, Imaseki H, Wasteneys GO, Kazama H (2003) Ethylene stimulates endoreduplication but inhibits cytokinesis in cucumber hypocotyls epidermis. *Plant Physiol* 133:1726-1731
- De Buck S, Peck I, De Wilde C, Marjanac G, Nolf J, De Paep A, Depicker A (2007) Generation of single-copy T-DNA transformants in *Arabidopsis* by the CRE/loxP recombination-mediated resolution system. *Plant Physiol* 145:1171-1182
- Ding B, Haudenschild JS, Hull RJ, Wolf S, Beachy RN, Lucas WJ (1992) Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 4:915-928
- Fras A, Maluszynska J (2003) Regeneration of diploid and tetraploid plants of *Arabidopsis thaliana* via callus. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 45:145-152
- Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 990:87-92
- Han JS, Oh DG, Mok IG, Park HG, Kim CK (2004) Efficient plant regeneration from cotyledon explants of bottle gourd (*Lagenaria siceraria* Standl.). *Plant Cell Rep* 23:291-296
- Hebert DN, Foellmer B, Helenius A (1996) Calnexin and calreticulin promote folding, delay oligomerization and suppress degradation of influenza hemagglutinin in microsomes. *EMBO J* 15:2961-2968
- Holsters M, De Waele D, Depicker A, Messens E, Van Montagu M, Schell J (1978) Transfection and transformation of *A. tumefaciens*. *Mol Gen Genet* 163:181-187
- Kitajima H, Butler WL (1975) Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochim Biophys Acta* 376:105-115
- Laporte C, Vetter G, Loudes A-M, Robinson DG, Hillmer S, Stussi-Garaud C, Ritzenthaler C (2003) Involvement of the secretory pathway and the cytoskeleton in intracellular targeting and tubule assembly of *Grapevine fanleaf virus* movement protein in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell* 15:2058-2075
- Lee LY, Kononov ME, Bassuner B, Frame BR, Wang K, Gelvin SB (2007) Novel plant transformation vectors containing the superpromoter. *Plant Physiol* 145:1294-1300
- Miernyk JA (1999) Protein folding in the plant cell. *Plant Physiol* 121:695-703
- Mlynárová L, Jansen RC, Conner AJ, Stiekema WJ, Nap JP (1995) The MAR-mediated reduction in position effects can be uncoupled from copy number-dependent expression in transgenic plants. *Plant Cell* 7:599-609
- Park S, Cheng NH, Pittman JK, Yoo KS, Park J, Smith RH, Hirschi KD (2005) Increased calcium levels and prolonged shelf life in tomatoes expressing *Arabidopsis* $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ transporters. *Plant Physiol* 139:1194-1206
- Park SH, Morris JL, Park JE, Hirschi KD, Smith RH (2003) Efficient and genotype-independent *Agrobacterium*-mediated tomato transformation. *J Plant Physiol* 160:1253-1257
- Pérez-Bueno ML, Ciscato M, vande Ven M, García-Luque I, Valcke R, Barón M (2006) Imaging viral infection: studies on *Nicotiana benthamiana* plants infected with the pepper mild mottle tobamovirus. *Photosynth Res* 90:111-123
- Persson S, Rosenquist M, Svensson K, Galvão R, Boss WF,

- Sommarin M (2003) Phylogenetic analyses and expression studies reveal two distinct groups of calreticulin isoforms in higher plants. *Plant Physiol* 133:1385-1396
- Persson S, Wyatt SE, Love J, Thompson WF, Robertson D, Boss WF (2001) The Ca^{2+} status of the endoplasmic reticulum is altered by induction of calreticulin expression in transgenic plants. *Plant Physiol* 126:1092-1104
- Pineda M, Soukupová J, Matouš, Nedbal L, Barón M (2008) Conventional and combinatorial chlorophyll fluorescence imaging of tobamovirus-infected plants. *Photosynthetica* 46: 441-451
- Saito Y, Ihara Y, Leach MR, Cohen-Dole MF, Williams DB (1999) Calreticulin functions *in vitro* as a molecular chaperone for both glycosylated and non-glycosylated proteins. *EMBO J* 18:6718-6729
- Shaterian J, Georges F, Hussain A, Waterer D, Jong HD, Tanino KK (2005) Root to shoot communication and abscisic acid in calreticulin (CR) gene expression and salt-stress tolerance in grafted diploid potato clones. *Environ Exp Bot* 53:323-332
- Stam M, Mol JM, Kooter JM (1997) The silence of genes in transgenic plants. *Annal Bot* 79:3-12
- Vieira J, Messing J (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Meth Enzym* 153:3-11
- Wolf S, Millatiner A (2000) Effect of tobacco mosaic virus movement protein on photosynthesis in transgenic tobacco plants. *J Plant Physiol* 156:253-258
- Wyatt SE, Tsou PL, Robertson D (2002) Expression of the high capacity calcium-binding domain of calreticulin increases bioavailable calcium stores in plants. *Transgenic Res* 11:1-10