

인시목 해충방제를 위한 Bt 살충단백질의 활용

서 미 정

(서울대학교 유전공학 연구소)

서 론

약 3억년 전부터 식물은 해충의 공격으로부터 자신을 방어할 수 있는 여러 기작들을 가지고 서로 균형을 이루며 진화해 왔다. 그러나 특정 농작물을 재배할 때 농작물의 수확량을 늘리기 위하여 방대한 양의 유기합성 농약을 사용하게 되었다. 이러한 합성 농약의 사용은 특정 해충에만 독성을 나타내는 것이 아니라 광범위한 생물체에 독성을 나타내므로 인류의 건강에 해를 끼쳤고, 분해되지 않는 성질때문에 심각한 환경오염 문제를 초래했다. 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 분해될 수 있고, 특정 해충에만 특이적으로 작용할 수 있는 *Bacillus thuringiensis*가 생산하는 독성단백질을 그대로 formulation해서 생물농약으로 사용하게 되었다. 그러나 이들은 자외선에 의해 쉽게 활성이 파괴될 뿐만 아니라, 생산 단가가 유기합성 농약에 비해 훨씬 비싸다. 이러한 연유로 독성단백질 유전자를 식물체에 도입해서 발현시킴으로써 특정 해충으로부터 농작물을 보호할 수 있는 내충능을 가진 식물체를 개발하게 되었다.

*B. thuringiensis*는 Gram 양성균이며 토양 박테리아로서 포자 형성시기에 결정 단백질인 δ -endotoxin을 생성하여 봉입체나 포자 껍질 부분에 저장한다(Dulmage, 1978). 대부분의 *B. thuringiensis* 균주에 의해 생성되는 δ -endotoxin은 인시목(Lepidoptera) 곤충에 독성을 나타내며, 일부는 파리목(Diptera)과 딱정벌레목(Coleoptera) 각각에 그리고 나머지는 인시목과 파리목 동시에 독성을 나타내는 것으로 알려져 왔다. 그러므로 δ -endotoxin이 독성을 나타내는 숙주범위와 유전자 염기서열의 구조적 유사성에 근거하여 크게 4개의 유전자 그룹인 Lepidoptera-specific(*cryI*), Lepidoptera와 Diptera specific(*cryII*), Coleoptera-specific

(*cryIII*) 그리고 *Diptera-specific(cryIV)*으로 세분화하였다(Hofte와 Whiteley, 1989).

독성단백질의 작용기작을 살펴보면, 섭취된 독성단백질들은 감수성있는 곤충의 장내에서 단백질 분해효소에 의해 소화된 다음 활성을 가진 독성단백질로 된다. 이 때, 활성을 가진 독성단백질은 중장 상피막에 존재하는 특이적 수용체에 결합한 다음, 독성단백질의 α -helix 부위는 막 안으로 삽입되어 양이온 선택적 채널을 형성한다. 그 결과 중장 세포로 K^+ 과 물이 새어 나오게 되므로써 결국 세포는 죽게 된다(Gill 등, 1992; English와 Slatin, 1992).

근두암종균의 일종인 *Agrobacterium tumefaciens*는 Ti(Tumor inducing) plasmid를 가지고 있어 *Agrobacterium*이 식물체의 상처난 부위에 감염되었을 때 plasmid의 일부가 식물체 핵내의 염색체로 전이됨이 밝혀졌다(Chilton 등, 1980). 이 plasmid를 이용하여 고등식물의 형질전환용 유전자 운반체를 개발하게 되었고, 이로써 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 방법으로 외래 유전자를 식물체내로 도입할 수 있게 되었다(Fraley 등, 1983).

이미 클로닝된 다양한 독성단백질 유전자, *cryIA(b)*와 *cryIA(c)*를 형질전환용 유전자 운반체에 삽입하여 담배와 토마토에 발현시키므로써 *Manduca sexta*(tobacco hornworm)라는 유충에 내충능을 보임을 보고하였다(Fischhoff 등, 1987; Barton 등, 1987; Vaeck 등, 1987). 이 과정에서 원핵생물의 유전자를 고등 식물에서 발현시킴으로써 원핵생물과 고등식물간의 사용되어지는 코돈(codon)이 서로 달라 외래 유전자의 발현 효율이 떨어지는 문제점을 밝혀내고 독성단백질 유전자 *cryIA(b)*와 *cryIA(c)*를 아미노산 서열에는 변화없이 염기서열 만을 변화시킨 변형된 *cryIA(b)*와 *cryIA(c)* 유전자를 독화에 도입하여 그 발현 효율을 증대시켰다(Perlak 등, 1990; Benedict 등, 1993). 또한, 단자엽 식물에서는 electroporation 방법이나 microprojectile bombardment 방법이 개발됨에 따라 옥수수과 벼에도 변형된 *cryIA(b)* 유전자의 도입 및 발현이 보고되었다(Kozziel 등, 1993; Fujimoto 등, 1993). 현재까지 개발된 이런 형질전환 식물체는 포장 실험중에 있다.

따라서 본 논문에서는 해충에만 특이하게 독성을 나타내는 독성단백질 유전자를 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 균주로부터 분리하여 클로닝하였다.

그리고 클로닝된 *cryIA(b)*와 이미 클로닝되어 분양받은 *cryIA(c)*(Min 등, 1986) 유전자의 독성 부위를 밝히고자 이들 유전자 클론들을 재조합하여 길이가 각기 다른 여섯 가지의 재조합된 *cryIA(b)*와 *cryIA(c)* 유전자 클론들을 확보하였다. 이들 6가지 클론들을 대장균에서 각각 발현시켜 한국에서 서식하는 인시목 해충인 담배 거세미나방(*Spodoptera litura*), 담배나방(*Heliothis assulta*), 누에(*Bombyx mori*), 배추좀나방(*Plutella xylostella*) 그리고 흰불나방(*Hypantiria cunea*) 등에 섭식시켜서 그들의 독성 정도를 비교 검토하였다. 아울러 이러한 결과를 토대로 *cryIA(b)*와 *cryIA(c)* 유전자를 고등식물의 형질전환용 유전자 운반체에 삽입하고, *Agrobacterium*을 이용한 외래 유전자 도입방법을 이용하여 담배(*Nicotiana tabacum*) 식물체에 도입 및 발현시킴으로써 담배나방에 대해 내성을 갖는 형질전환된 담배 식물체를 개발하고자 하였다.

본 론

1. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 균주로부터 독성단백질 유전자의 클로닝

(1) *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 균주로부터 plasmid의 분리 및 독성 단백질 유전자 부위확인

B. thuringiensis subsp. *kurstaki* HD-1 균주로부터 plasmid를 분리한 후 *Bam*HI 과 *Pst*I 으로 제한효소 처리하고 전기영동한 다음, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 균주로부터 클로닝된 *cryIA(c)* 유전자(Min 등, 1986)를 ³²P로 표지하여 probe로 사용해서 Southern 혼성화 반응을 수행한 결과 *Bam*HI으로 효소처리한 plasmid상의 15 kbp DNA band 위치에서 positive signal이 존재하였다(Fig. 1A(1)).

(2) EMBL3 vector에 독성단백질 유전자의 클로닝

15 kbp *Bam*HI DNA 절편을 클로닝하기 위하여 *Bam*HI arm을 가진 EMBL3 vector를

선택하여 ligation시킨 후 *in vitro* packaging하였다. Packaging 추출물을 *E. coli* 균주 LE392에 감염시키고 LB agar 배지에 도말하여 plaque 형성을 유도하였다. 형성된 plaque을 nitrocellulose 막으로 전이시킨 후 ^{32}P 로 표지된 *cryIA(c)* 유전자를 이용해서 Southern 혼성화 반응을 수행하였다. Positive signal을 나타내는 plaque의 DNA 양을 증대시키기 위하여 숙주 세포를 공급하여 배양한 후, phage DNA를 분리하였다. 분리된 phage DNA는 제한효소 *Bam*HI, *Hinc*II, 그리고 *Pst*I을 처리하여 전기영동한 후, ^{32}P 로 표지된 *cryIA(c)* 유전자를 이용해서 Southern 혼성화 반응을 수행한 결과 *Hinc*II를 처리한 plasmid DNA상에서 가장 강하고 작은 positive signal을 얻을 수 있었다(Fig. 1 A(2)).

(3)pBR322 vector에 독성단백질 유전자의 클로닝 및 제한효소 지도의 작성

*Hinc*II를 처리한 plasmid DNA상에 나타난 positive signal은 약 4 kbp에 해당하며, 4 kbp DNA 절편을 gel로부터 회수하여 pBR322의 *Eco*RV 위치에 삽입하므로써 pBTb1 재조합 plasmid를 얻었다. 재조합된 plasmid pBTb1을 이용하여 다양한 효소를 처리한 후 전기영동하므로써 제한효소 지도를 작성하였다(Fig. 1B).

2. *E. coli* 균주에서 *cryIA(b)*와 *cryIA(c)* 독성단백질의 발현

pBTb1과 pBTc1 클론을 이용하여 *E. coli*의 발현 vector인 pT6HB(Choi 등, 1988)에 subcloning하는 과정을 모식화하여 Fig. 2에 표시하였다.

(1)*cryIA(c)* 독성단백질 유전자의 5' upstream 부위에 존재하는 ATG 코돈의 제거 및 염기서열 분석

재조합 plasmid pMK73 (Min등, 1986)에 클로닝된 *cryIA(c)* 독성단백질 유전자를 *Bam*HI으로 처리한 후 3.7 kbp에 해당하는 독성단백질 유전자를 gel로부터 회수하여 pUC19의 *Bam*HI 위치에 삽입하였다. 이렇게 재조합된 plasmid를 pBTc1으로 명명하였다.

클로닝된 *cryIA(c)* 유전자의 5' upstream 부위에는 단백질 합성 개시코돈, ATG, 이 외에도 그 앞부위에 많은 ATG 코돈을 가지고 있으므로 독성단백질 유전자를

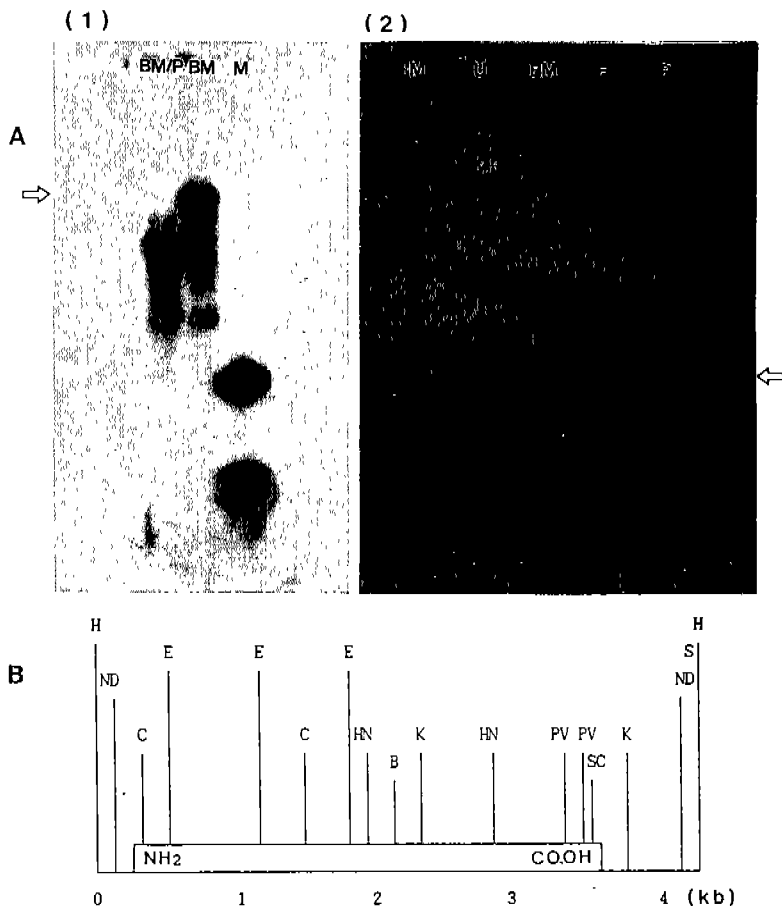


Fig. 1. Southern hybridization results for the cloning process of the insecticidal toxin gene from *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and a restriction map for the toxin gene. (A) DNA was isolated from *B. thuringiensis*, digested with *Bam*HI or *Bam*HI/*Pst*I, electrophoresed and Southern hybridized with ³²P-labeled *cry*IA(c) gene (1). Cloned toxin gene in EMBL-3 was isolated, restriction digested, electrophoresed and Southern hybridized with ³²P-labeled *cry*IA(c) (2). (B) *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 toxin gene in pBR322 (pBTb1) was digested with various restriction enzymes and run on a 0.8% agarose gel electrophoresis in the presence of ethidium bromide, visualized with U.V. and a restriction map of pBTb1 was built. M, BRL's 1 kbp DNA ladder; B, *Bcl*I; BM, *Bam*HI; C, *Cla*I; E, *Eco*RI; H, *Hinc*II; HN, *Hind*III; K, *Kpn*I; ND, *Nde*I; P, *Pst*I; PV, *Pvu*II; S, *Sal*I; SC, *Scal*I; U, uncut.

E. coli 혹은 식물체에서 발현시켰을 경우 이상한(abnormal) 단백질이 합성될 가능성이 존재하기 때문에 단백질 합성 개시코돈에서 단백질 합성이 시작되어 활성을 가진 단백질이 합성될 수 있도록 앞부위에 존재하는 모든 ATG 코돈을 제거하고자 하였다(Fig. 3).

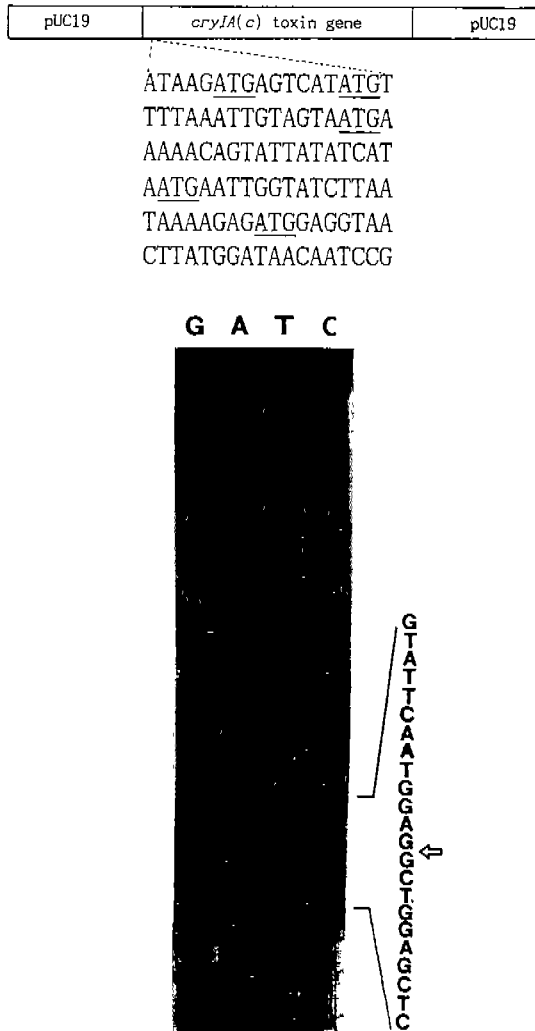


Fig. 3. Nucleotide sequence of the 5' end region of *B. thuringiensis* subsp. HD-73 toxin gene before (A) and after (B) Bal31 treatment. Arrow indicates the border line of the toxin gene and the vector, pBluescript SK(+). is the translation initiation codon of the toxin genes.

(2)pT6HB vector에 *cryIA(b)*와 *cryIA(c)* 유전자로부터 subcloning된 6가지 종류의 독성단백질 유전자의 subcloning

*cryIA(b)*와 *cryIA(c)* 독성단백질 유전자로부터 5' upstream 부위가 일부 제거되고 3' 부위가 서로 다르게 제거된 6가지 재조합 클론들인 pBTb1', pBTb2', pBTb3', pBTc1', pBTc2', 그리고 pBTc3'을 이용하여 *Bam*HI 효소로 절단한 후, 각각 4.0 kbp, 3.3 kbp, 2.4 kbp, 3.6 kbp, 3.3 kbp 그리고 2.4 kbp에 해당하는 DNA 절편을 회수한 다음 pT6HB vector의 Tac promoter와 terminator 사이의 *Bam*HI 위치에 삽입하였다. 이들 각각의 클론들을 pT6HB/BTb1', pT6HB/BTb2', pT6HB/BTb3', pT6HB/BTc1', pT6HB/BTc2' 그리고 pT6HB/BTc3'으로 명명하였다(Fig. 4).

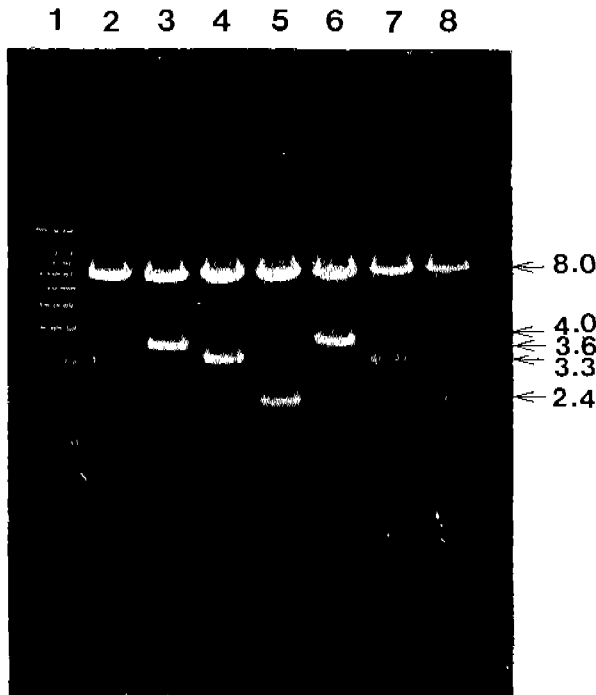


Fig. 4. Restriction pattern of the recombinant pT6HB carrying the toxin genes. The recombinant DNAs were digested with *Bam*HI and electrophoresed on a 0.8% agarose gel in the presence of ethidium bromide. 1, BRL's 1 kbp DNA ladder; 2, pT6HB; 3, pT6HB/BTc1'; 4, pT6HB/BTc2'; 5, pT6HB/BTc3'; 6, pT6HB/BTb1'; 7, pT6HB/BTb2'; 8, pT6HB/BTb3'. The bands at about 8 kbp are from the linearized pT6HB.

(3) *E. coli* 균주로부터 단백질의 분리 및 Western blot 분석

6가지 재조합 DNA를 포함하는 *E. coli* 균주로부터 독성단백질의 양을 증대시키기 위하여 IPTG를 사용하여 독성단백질의 발현을 유도하였다. pT6HB vector만을 가진 균주를 대조구로 사용하였으며, 그들의 단백질상에는 특이적 반응을 나타내는 Western band가 형성되지 않았다. pT6HB/BTb1', pT6HB/BTb2' 그리고 pT6HB/BTb3'을 각각 포함하는 *E. coli* 균주들의 경우에는 IPTG로 유도하기 전에는 약 130 kDa과 68 kDa에 해당하는 2가지 종류의 band가 관찰되었고, IPTG로 유도한 균주들의 경우에는 각각의 유전자 크기에 해당하는 단백질 130 kDa, 110 kDa 그리고 73 kDa의 band가 확인되었으며 그 외에도 68 kDa과 60 kDa에 해당하는 작은 크기의 단백질 band도 나타났다(Fig. 5A). 또한, pT6HB/BTc1', pT6HB/BTc2', 그리고 pT6HB/BTc3'을 포함하는 *E. coli* 균주들의 경우에도 비슷한 결과가 관찰되었는데, pT6HB/BTc2'의 경우에는 120 kDa와 68 kDa의 band가 나타났고, pT6HB/BTc3'의 경우에는 80 kDa과 68 kDa의 band와 pT6HB/BTc1'의 경우에는 130 kDa과 68 kDa의 band가 관찰되었으며, IPTG로 유도했을 경우에는 band의 강도가 더욱 더 진하게 나타났다(Fig. 5B).

(4) *E. coli*에서 발현된 독성단백질의 곤충에 대한 독성 조사

6가지 재조합된 독성단백질 유전자가 *E. coli* 균주에서 발현되는 것은 Western blot 분석으로 확인되었으며, 생성된 독성단백질의 독성능을 조사하기 위하여 인공적으로 사육된 몇가지 곤충에 대해 실험하였다.

*cryIA(b)*와 *cryIA(c)* 독성단백질 유전자를 포함하는 모든 균주는 담배거세미나방에 대해서는 어떤 독성능도 나타내지 않았다(Fig. 6A).

담배나방에 대해서는 이들 균주 모두가 강한 독성을 나타내었다. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1과 HD-73 균주로부터 얻은 독성단백질 추출물은 1일만에 모든 시료충을 죽였으나, *E. coli*로부터 얻은 독성단백질 추출물은 그렇게 효과적이지는 못했다. *cryIA(b)*와 *cryIA(c)*의 전장의 독성단백질을 포함하는 균주는 2일 동안 약한 독성능을 나타내었으나 3'부위가 제거된 균주에서는 거의 독성능이 관찰되지 않았다. 그러나 4일 동안 배양한 후에는 거의 모든 시료충이

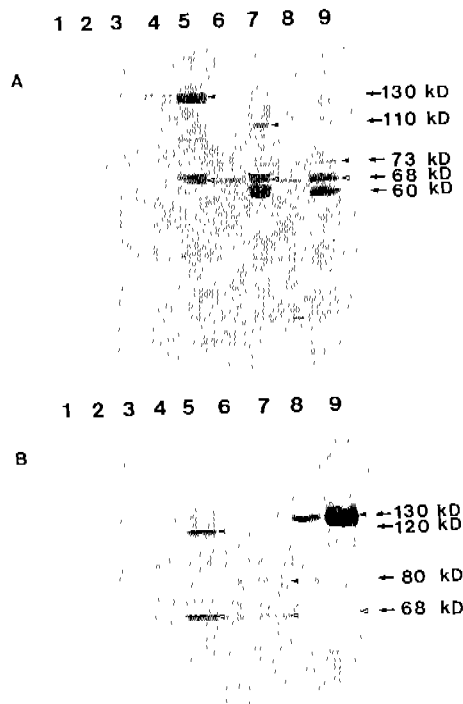


Fig. 5. Western blot analyses for the toxins produced in *E. coli* from the recombinant toxin genes in pT6HB. *E. coli*, strain JM109, cells carrying the plasmids were harvested and total proteins were extracted. To induce the activity of Tac promoter, IPTG was added in the culture in half of the cases. Polyclonal antibody against *B. thuringiensis*, HD-73, toxin was used. For the visualization of the bands, alkaline phosphatase reactions were carried out. A) 1, protein molecular weight marker (Sigma Chem. Co.); 2, noninduced bacterial cells with pT6HB only; 3, induced bacterial cells with pT6HB only; 4, noninduced bacterial cells with pT6HB/BTb1'; 5, induced bacterial cells with pT6HB/BTb1'; 6, noninduced bacterial cells with pT6HB/BTb2'; 7, induced bacterial cells with pT6HB/BTb2'; 8, noninduced bacterial cells with pT6HB/BTb3'; 9, induced bacterial cells with pT6HB/BTb3'. B) 1, protein molecular weight marker (Sigma Chem. Co.); 2, noninduced bacterial cells with pT6HB only; 3, induced bacterial cells with pT6HB only; 4, noninduced bacterial cells with pT6HB/BTc2'; 5, induced bacterial cells with pT6HB/BTc2'; 6, noninduced bacterial cells with pT6HB/BTc3'; 7, induced bacterial cells with pT6HB/BTc3'; 8, noninduced bacterial cells with pT6HB/BTc1'; 9, induced bacterial cells with pT6HB/BTc1'.

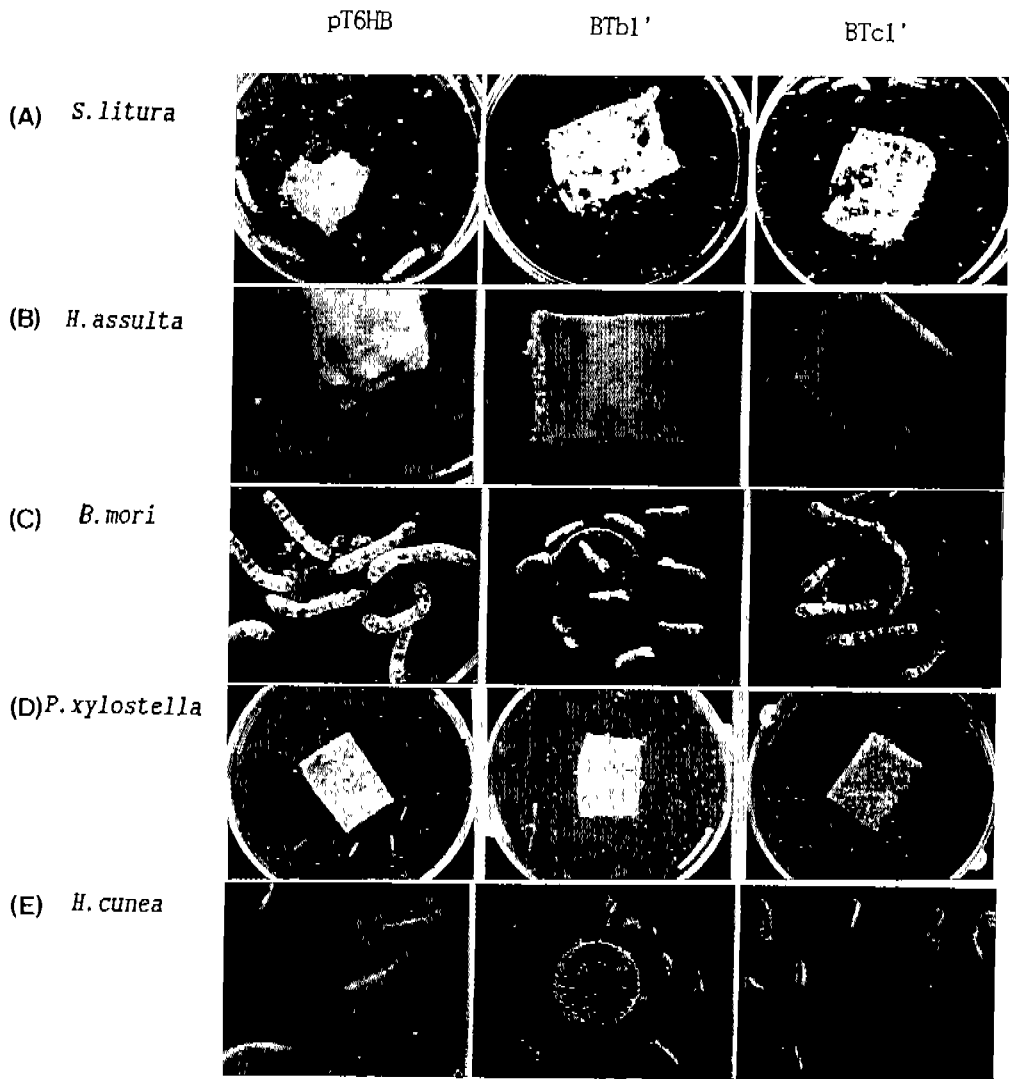


Fig. 6. Insecticidal activities of the toxins produced in *E. coli* carrying the full length toxin genes in pT6HB against various insects. Bacteria cells growing in a medium containing IPTG were harvested, washed with buffer and applied to the diet. Insects were fed on the diets for 7 days. pT6HB, *E. coli* cells carrying pT6HB only; BTb1', *E. coli* cells carrying pT6HB/BTb1'; BTc1', *E. coli* cells carrying pT6HB/BTc1'.

죽었음을 확인하였다(Fig. 6B와 7A).

누에에 대해서는 *cryIA(b)*가 *cryIA(c)* 독성단백질에 비해 훨씬 강한 독성을 나타냄을 관찰하였다. *cryIA(c)* 독성단백질의 경우에는 5일까지 거의 독성을 나타내지 않았고, 전장의 *cryIA(b)* 독성단백질은 하루 동안 거의 50% 시료충을 죽였으며, 3' 부위가 제거된 독성단백질의 경우에는 독성능이 감소됨을 알 수 있었다. *cryIA(c)* 독성단백질은 7일 경과 후에도 단지 30-50% 정도 시료충을 죽이는 데 그쳤다(Fig. 6C와 7B).

배추좀나방에 대해서도 2종류의 독성단백질이 모두 강한 독성을 나타내는 것으로 관찰되었다. *B. thuringiensis* 균주로부터 얻은 독성단백질 추출물과 *E. coli*로부터 얻은 독성단백질 추출물 모두 2일 동안 모든 시료충을 죽였다. 단지 *E. coli* 추출물의 경우 그 독성능이 조금 낮게 나타나는 것으로 볼 수 있었으며, 3' 부분이 제거된 균주의 경우에도 전장의 독성단백질과 같은 정도로 강한 독성을 나타내는 것으로 관찰되었다(Fig. 6D와 7C).

흰불나방에 대해서는 *B. thuringiensis*로부터 얻은 추출물의 경우 하루 동안 시료충을 모두 죽였으나 *E. coli*에서 생성된 독성단백질은 각각 서로 다른 독성능을 나타내었다. *cryIA(b)*에 비해 *cryIA(c)* 독성단백질이 보다 강한 독성을 나타냄을 알 수 있었고, 3' 부위가 제거된 독성단백질의 경우 독성능이 크게 감소되었다. 그러나 7일 동안에는 모든 시료충이 죽었음을 확인하였다(Fig. 6E와 7D).

3. 담배(*N. tabacum*) 식물체에서 독성단백질의 발현

(1) Binary vector, pBKS1-1에 독성단백질 유전자의 클로닝

3' 부위가 일부 제거된 독성단백질의 유전자의 경우에도 정확한 위치에서 단백질 합성이 종료될 수 있도록 단백질 합성 종결코돈, TAG를 반복하여 가지고 있는 두 종류의 oligomer 5'GATCCTAGGTAGGTAGA3'와 5'GATCCATCCATCTCTAG3'를 합성하였다. 이를 순수 분리하고 kinasing하여 annealing한 후, pBKS1(Song과 Hong, 1991) vector를 *Bam*HI으로 절단하고 dephosphorylation시킨 다음 ligation하여 pBKS1-1을 제조하였다. 또한, 이미 클론된 6개의 재조합 클론들인 pT6HB/BTb1', pT6HB/BTb2', pT6HB/BTb3', pT6HB/BTc1', pT6HB/BTc2' 그리고 pT6HB/BTc3'로부터

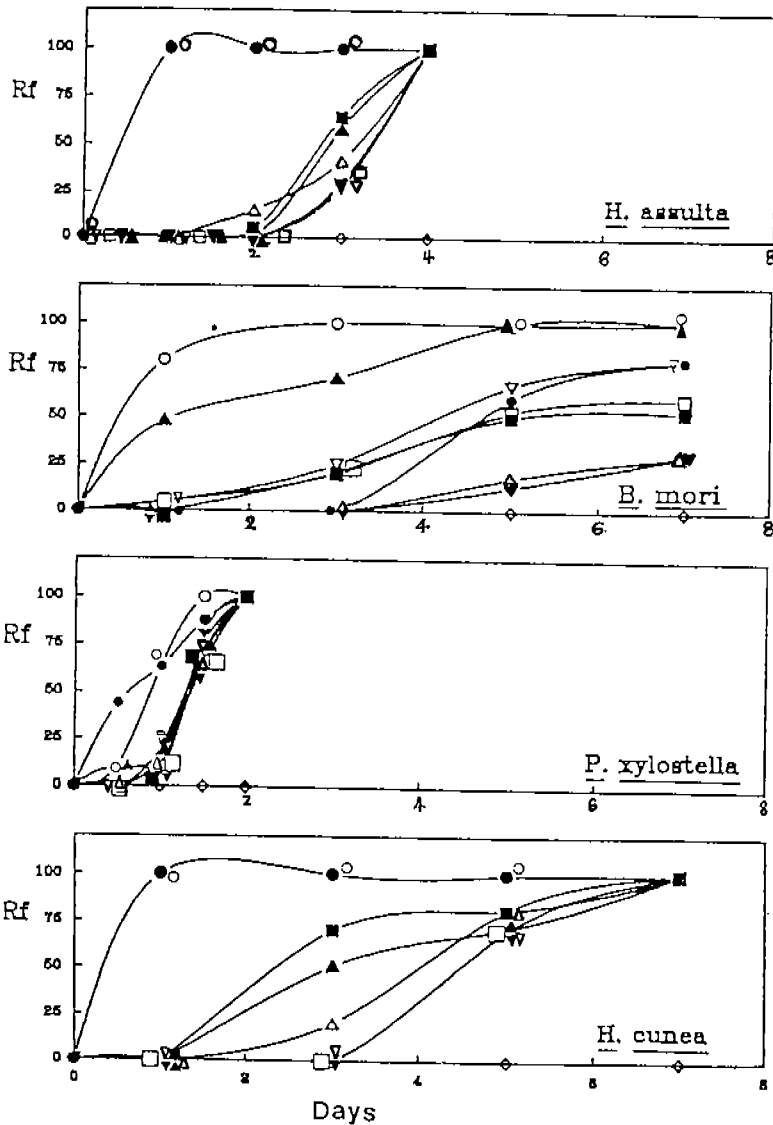


Fig. 7. Dose response curves for the insecticidal activities of the toxins produced in *E. coli*. Bacteria cells growing in a medium containing IPTG were harvested, washed with buffer and applied to the diet. Rf represents the percentile of the insects dead. Days represent the lengths of insect exposure to the diet. Each datum point was obtained by combining the number of insects dead from three replica plates with 5 insects tested per plate. ○—○, HD-1; ▲—▲, BTb1'; ▽—▽, BTb2'; □—□, BTb3'; ●—●, HD-73; ■—■, BTc1'; △—△, BTc2'; ▼—▼, BTc3'; ◇—◇, pT6HB.

plasmid를 분리하고 *Bam*HI으로 절단하여 각각 4.0 kbp, 3.3 kbp, 2.4 kbp, 3.6 kbp, 3.3 kbp, 그리고 2.4 kbp DNA 절편을 회수한 다음 제조된 pBKS1-1을 *Bam*HI으로 처리하고 dephosphorylation시킨 vector에 ligation시켰다. 각각의 독성단백질 유전자들은 CaMV35S 전사체의 promoter와 nopaline synthase 유전자의 terminator 사이에 삽입되었으며, 이 들 재조합 plasmid를 각각 pBKS1-1/BTb1', pBKS1-1/BTb2', pBKS1-1/BTb3', pBKS1-1/BTc1', pBKS1-1/BTc2', 그리고 pBKS1-1/BTc3'으로 명명하였다(Fig. 8).

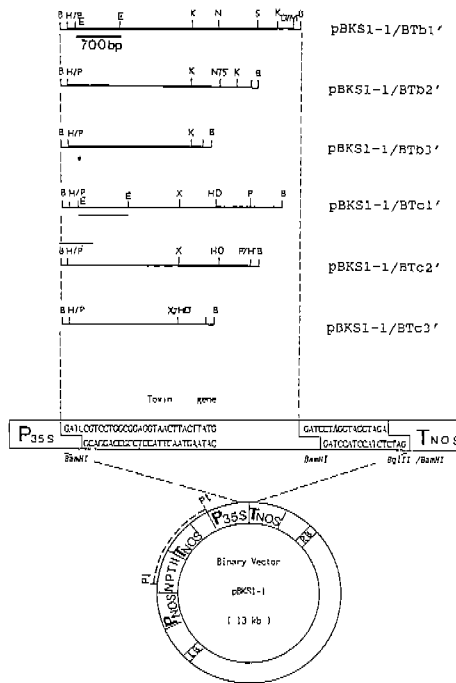


Fig. 8 Restriction enzyme maps of a binary vector, pBKS1-1, containing the toxin genes, *cryIA(b)* and *cryIA(c)*. Thick lines are for the toxin coding sequences. B, *Bam*HI; D, *Nde*I; E, *Eco*RI; H, *Hinc*II; HD, *Hind* III; K, *Kpn*I; N, *Nru*I; P, *Pvu*II; Pt, *Pst*I; S, *Sca*I; X, *Xho*I; LB, T-DNA left border; RB, T-DNA right border; NPTII, neomycin phosphotransferase gene II; Pnos, nopaline synthase promoter; Tnos, nopaline synthase terminator; P35S, cauliflower mosaic virus 35S promoter. ‘.’ indicates the restriction enzyme sites removed, ‘—’ indicates 0.7 kb DNA fragment for Southern probes and ‘---’ indicates 1.7 kb DNA fragment for NPTII probes. **ATG** is the translation initiation codon of the toxin genes and **TAG** is the translation termination codon

(2) 담배의 형질전환 및 기내 재분화

6종류의 독성단백질을 함유한 *Agrobacterium*과 담배의 잎 절편을 함께 배양한 후 담배 잎 절편은 항생제, kanamycin(250 mg/l)과 carbenicillin(250 mg/l) 그리고 식물 hormone, NAA(2 mg/l) 와 BAP(0.5 mg/l)를 함유한 MS 배지에 치상하여 형질전환된 담배 잎 절편으로부터 calli를 유도하였다. 약 2주 경과 후, 형성된 calli는 동일한 농도의 항생제와 BAP(0.5 mg/l)만을 함유한 MS 배지로 옮겨 shoot를 유기하였으며, 어떤 hormone도 함유하지 않은 선택 MS 배지에서 뿌리를 유도하였다. 6가지 종류의 독성단백질 유전자로 형질전환된 담배는 형태학적으로나 성장속도 그리고 발생단계에 있어서 형질전환 되지않은 담배와 거의 비슷하게 성장하였으며 서로 다른 독성단백질 유전자가 형질전환된 담배에서도 그들의 성장과 발달과정에서는 큰 차이를 발견할 수 없었다. 각각의 형질전환된 담배는 자가수분과 검정교배를 통하여 종자를 맺었고, 이들 종자는 후대 검정에 사용하였다.

(3) 담배의 염색체 상에 존재하는 독성단백질 유전자의 확인

형질전환된 담배의 어린 잎으로부터 염색체 DNA를 분리한 후, 합성한 oligomer 5'TTCAAAGCAAGTGGATTGAT3'와 5'ATCTGTATAGTTGCCAATAA3'를 이용하여 PCR을 수행하였다(Fig. 9A). 그 결과 독성단백질 유전자의 N-말단 부위에 해당하는 700 bp DNA band가 합성되었으며(Fig. 9B), 담배의 염색체 상에 독성단백질 유전자가 안정하게 삽입되어 있음을 확인하였다.

또한 형질전환된 담배로부터 분리한 염색체 DNA를 *EcoRI* 효소로 처리한 후 전기영동하여 nylon막으로 전이시킨 다음 ^{32}P 로 표지된 독성단백질 유전자를 probe로 하여 Southern 혼성화 반응을 수행한 결과 독성단백질의 N-말단 부위의 700 bp DNA band가 확인되었다(Fig. 10). PCR의 결과와 마찬가지로 독성단백질 유전자가 형질전환된 담배의 염색체로 안정하게 삽입되어 있음을 확인하였다.

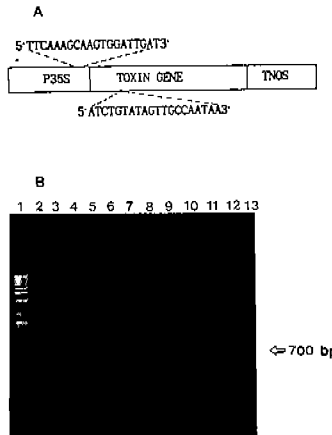


Fig. 9. PCR analysis for the *cryIA(b)* and *cryIA(c)* toxin genes from the transgenic tobacco plants. (A) primers used in PCR; (B) 1, BRL's 1 kb DNA ladder; 2 and 8, nontransgenic plants; 3-7, transgenic plants with the *cryIA(b)* toxin genes; 9-13, transgenic plants with the *cryIA(c)* toxin genes.

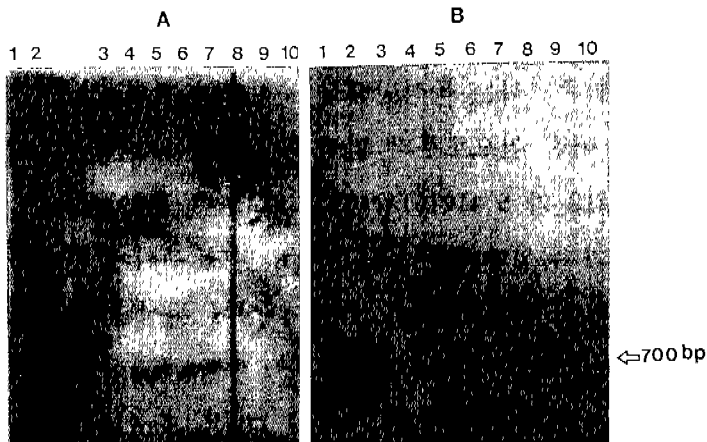


Fig. 10. Genomic Southern blot analyses for the *cryIA(b)* and *cryIA(c)* toxin genes from T₁ transgenic tobacco plants. Chromosomal DNA was *EcoRI* restriction digested, run on a 0.7% agarose gel, blotted onto Nytran membrane and hybridized with ³²P-labelled 0.7 kb *EcoRI* DNA fragment of the toxin gene. 1, BRL's 1 kb ladder; 2, *EcoRI* digestion of pBKS1-1 carrying the toxin gene; 3, *EcoRI* digestion of genomic DNA from tobacco plants transformed with bacterial β -glucuronidase gene; (A) 4-10, *EcoRI* digestions of genomic DNAs from the tobacco plants transformed with the *cryIA(b)* genes; (B) 4-10, *EcoRI* digestions of genomic DNAs from the tobacco plants transformed with the *cryIA(c)* genes; Southern bands at 0.7 kb were from the introduced toxin genes.

(4) 담배에서 발현된 독성단백질 RNA의 분석

poly(A⁺) RNA를 분리하는 과정에서 RNA의 상태와 각 시료에 해당하는 RNA가 동량으로 사용되었는지 확인하기 위하여 ³²P로 표지된 콩의 *rbcS* 유전자를 probe로 사용하여 Northern 혼성화 반응을 수행한 결과 형질전환된 식물체와 형질전환되지 않은 식물체 모두에서 약 1.2 kb에 해당하는 Northern band를 확인하였다(Fig. 11A). 이 결과를 토대로 poly(A⁺) RNA를 동량으로 사용하고 *nptII* 유전자를 probe로 이용해서 Northern 혼성화 반응을 수행하였다. 형질전환된 식물체에서만 *nptII* 유전자의 전사체에 해당하는 약 1.3 kb의 Northern band를 확인하였다(Fig. 11B). 이 결과 형질전환된 식물체에 도입된 외래 *nptII* 유전자가 안정되게 발현됨을 확인하였다. 그러나 독성단백질 유전자를 probe로 사용해서 Northern 혼성화 반응을 수행한 경우에는 뚜렷한 Northern band를 확인할 수 없었다.

(5) 담배에서 발현된 독성단백질의 곤충에 대한 독성조사

pBKS1-1/BTb1'으로 형질전환된 10개체 담배중 에서 유충의 무게 증가량을 대조구와 비교했을 때 40% 이상 억제시킨 경우는 4개체이고, 10-40% 정도로 억제시킨 경우는 1개체 그리고 거의 대조구와 차이가 없거나 10% 미만으로 억제시킨 것은 5개체로 나타났다. pBKS1-1/BTb2'으로 형질전환된 담배의 경우에는 10개체 중에서 3개체만이 유충의 성장을 40% 이상 억제시켰고, 10-40%로 억제시킨 것은 3개체 그리고 4개체는 거의 차이가 없거나 10% 미만으로 억제시켰다. pBKS1-1/BTb3'의 경우에는 40% 이상으로 억제시킨 것은 3개체, 10-40%는 2개체 그리고 0-10%는 5개체로 관찰되었다.

pBKS1-1/BTc'으로 형질전환된 담배는 40% 이상 억제된 것은 2개체, 10-40%인 것은 4개체 그리고 0-10%는 4개체로 나타났으며 pBKS1-1/BTc2'의 경우는 전체 8개체 중 3개체가 유충의 성장을 40% 이상 억제시켰으며, 10-40%로 억제시킨 것은 1개체 그리고 0-10%인 것은 4개체로 나타났다. pBKS1-1/BTc3'의 경우에는 40% 이상 유충의 성장을 억제시킨 것은 2개체, 3개체가 10-40%로 5개체가 0-10%로 억제시키는 것으로 관찰되었다(Table 1A).

전장의 독성단백질과 3' 부위가 제거된 독성단백질의 독성능에는 뚜렷한 차이가 발견되지 않았으며 *cryIA(b)*와 *cryIA(c)* 독성단백질도 거의 비슷한 정도의 활성을

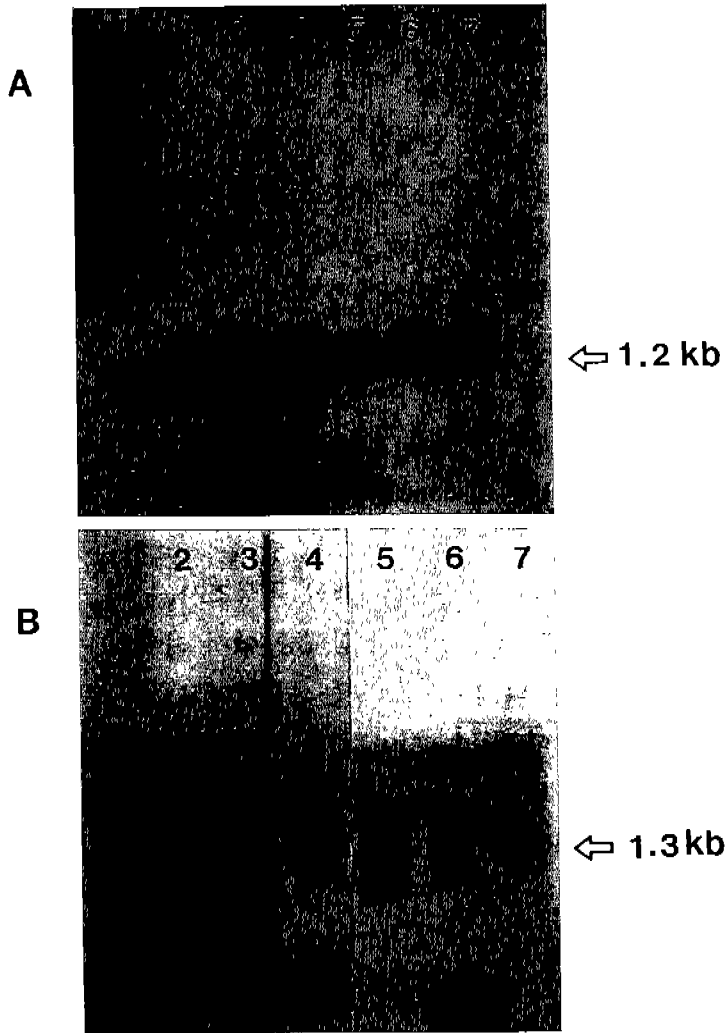


Fig 11. Northern blot analyses for the RNA isolated from T_1 transgenic tobacco plants. (A) Northern bands indicate the position for the ribulose-1, 5-biphosphate carboxylase and oxygenase gene transcripts as a positive control. (B) Northern bands indicate the position for the neomycin phosphotransferase II gene transcripts at 1.3 kb. The RNAs in pannel(A) were loaded with the same amount as in (B). 1, nontransgenic plant; 2, pBKS1-1/BTb1' transformed plant; 3, pBKS1-1/ BTb2' transformed plant; 4, pBKS1-1/BTb3' transformed plant; 5, pBKS1-1/ BTc1' transformed plant; 6, pBKS1-1/BTc2' transformed plant; 7, pBKS1-1 /BTc3' transformed plant.

Table 1 (A). Bioassay for the insect-resistance of the transgenic tobacco plants. Ten neonate tobacco budworm larvae fed on the leaves from the transgenic and nontransgenic tobacco plants for 7 days. Assays were performed for three times. +++, more than 40% of the insect-growth was inhibited; ++, 10-40% of the insect-growth was inhibited; +, less than 10% of the insect-growth was inhibited. Data were represented in the number of plants showing the degree of growth-inhibition/total number of plants tested.

Degree of the insect growth inhibited \ Toxin genes introduced	BTb1'	BTb2'	BTb3'	BTc1'	BTc2'	BTc3'
+++	4/10	3/10	3/10	2/10	3/8	2/10
++	1/10	3/10	2/10	4/10	1/8	3/10
+	5/10	4/10	5/10	4/10	4/8	5/10

(B). Bioassay for the insect-resistance of the T₂ transgenic tobacco plants. Ten third-instar larvae fed on the leaf from the T₂ transgenic and nontransgenic plants for 3 days. Assays were performed for three times.

Tested plants	No. of tested larvae	Total larval weight ± S.D. (mg)	Average larval weight ± S.D. (mg)	% of weight reduction
Nontransgenic plants	60	2819 ± 23	47 ± 0.38	-
* BTb1'	60	1363 ± 32	23 ± 0.53	51
* BTb2'	60	1962 ± 16	33 ± 0.27	30
* BTb3'	60	1701 ± 28	28 ± 0.47	40
* BTc1'	60	1551 ± 22	26 ± 0.37	45
* BTc2'	60	1846 ± 18	31 ± 0.30	34
* BTc3'	60	1549 ± 30	26 ± 0.50	45

* Transgenic plants transformed with the indicated toxin genes. S.D.: Standard Deviation

나타내는 것으로 관찰되었다. 7일 동안 배양이 끝난 다음 대조구와 비교해서 전장의 *cryIA(b)*와 *cryIA(c)* 독성단백질 유전자로 형질전환된 담배 잎의 섭식정도의 차이를 Fig. 12A에 나타내었다.

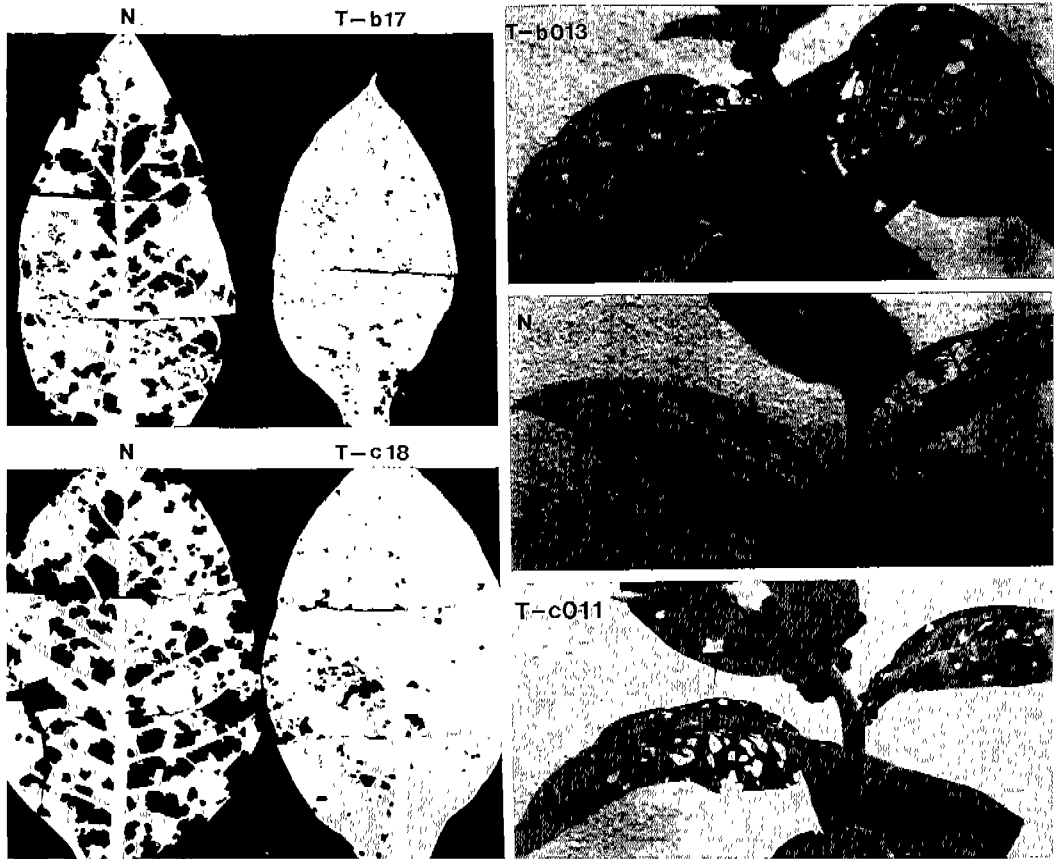


Fig. 12. Protections of the T₁ and T₂ transgenic tobacco plants from the *H. assulta* (tobacco budworm). Ten neonate larvae fed on the leaves from the T₁ transgenic and nontransgenic plants for 7 days (A), and ten third instar larvae fed on the leaves from the T₂ transgenic and nontransgenic plants for 3 days (B). N, leaves from nontransformed tobacco plants; T-b17, a leaf from the tobacco plant transformed with *cryIA(b)* gene; T-c18, a leaf from the tobacco plant transformed with *cryIA(c)* gene; T-b013, the T₂ transgenic tobacco plant transformed with *cryIA(b)* gene; T-c011, the T₂ transgenic tobacco plant transformed with *cryIA(c)* gene. T-b013 is the T₂ generation of T-b17, and T-c011 is the T₂ generation of T-c18.

(6)형질전환된 담배로부터 얻은 종자의 kanamycin에 대한 내성조사

*cryIA(b)*와 *cryIA(c)* 독성단백질 유전자로 형질전환된 담배 식물체는 도입된 외래 유전자가 그 후대에도 유전되어 형질이 발현되는지를 확인하기 위하여 우선 T₁ 식물체로부터 얻은 종자를 kanamycin을 함유한 배지에서 발아시켜 후대 식물체에서 *nptII* 유전자의 유전양상을 살펴보았다.

종자가 발아한 지 2주쯤 경과 후 *nptII* 유전자에 대한 분리비를 계산해 본 결과 형질전환된 30개의 식물체에서 26 개체는 *nptII* 유전자가 3:1의 분리비를, 4 개체는 15:1의 분리비를 나타내었다. 즉, *nptII* 유전자는 식물체의 염색체 상에 안정하게 삽입되어 그 후대에도 Mendel의 유전법칙에 따라 유전됨을 알 수 있다.

(7)후대 식물체의 염색체 상에 존재하는 독성단백질 유전자의 확인

pBKS1-1/BTb1'으로 형질전환된 경우에는 4 kbp, pBKS1-1/BTb2'은 3.3 kbp 그리고 pBKS1-1/BTb3'은 2.4 kbp에서 Southern band가 확인되었다. 또한 pBKS1-1/BTc1'으로 형질전환된 식물체는 3.6 kbp, pBKS1-1/BTc2'은 3.3 kbp 그리고 pBKS1-1/BTc3'은 2.4 kbp에서 Southern band를 확인할 수 있었다(Fig. 13). *nptII* 유전자와 마찬가지로 독성단백질 유전자도 식물체의 염색체상에 안정하게 삽입되어 존재하며, 후대 식물체로 정확하게 유전됨을 알 수 있었다.

(8)후대 식물체에서 발현된 독성단백질의 곤충에 대한 독성조사

접종된 유충은 비형질전환체와 비교하였을 때 형질전환된 잎의 면적당 0-20% 정도 적게 섭식하는 것으로 관찰되었다(Fig. 12B). 유충의 평균 무게 가량이 pBKS1-1/BTb1'으로 형질전환된 후대 식물체의 경우에는 51%, pBKS1-1/BTc2'은 30% 그리고 pBKS1-1/BTc3'은 40% 정도 억제되었으며, pBKS1-1/BTc1'으로 형질전환된 후대 식물체의 경우에는 45%, pBKS1-1/BTc2'은 34% 그리고 pBKS1-1/BTc3'는 45% 정도 억제시켰다(Table 1B).

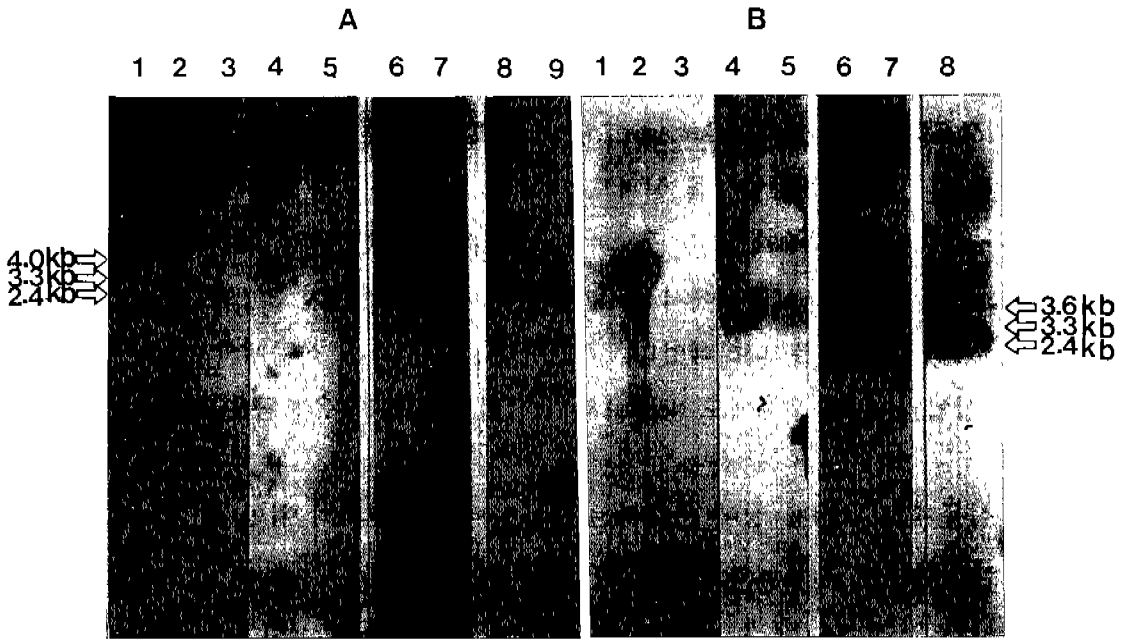


Fig. 13. Southern blot analyses for the *cryIA(b)* and *cryIA(c)* toxin genes from the transgenic tobacco plants in T₂ generation. DNAs were *Bam*HI restriction digested, run on a 0.6% agarose gel, blotted onto Nytran membranes and hybridized with ³²P-labelled RNA probes of the toxin genes. 1, BRL's 1 kb DNA ladder; (A) 2, *Pvu*II digestion of pGEM-1 carrying the BTb2' toxin gene; 3, *Bam*HI digestion of genomic DNA from nontransgenic tobacco plants; 4 and 5, *Bam*HI digestions of genomic DNAs from the tobacco plants transformed with the pBKS1-1/BTb1'; 6 and 7, *Bam*HI digestions of genomic DNAs from the tobacco plants transformed with the pBKS1-1/BTb2'; 8 and 9, *Bam*HI digestions of genomic DNAs from the tobacco plants transformed with the pBKS1-1/BTb3'; (B) 2, *Pvu*II digestion of pGEM-1 carrying the BTc2' toxin gene; 3, *Bam*HI digestion of genomic DNA from nontransgenic tobacco plants; 4 and 5, *Bam*HI digestions of genomic DNAs from the tobacco plants transformed with the pBKS1-1/BTc1'; 6 and 7, *Bam*HI digestions of genomic DNAs from the tobacco plants transformed with the pBKS1-1/BTc2'; 8, *Bam*HI digestion of genomic DNA from the tobacco plants transformed with the pBKS1-1/BTc3'.

결 론

*B. thuringiensis*가 포자 형성시기에 생성하는 δ -endotoxins의 유전자는 그들의 염색체 혹은 plasmid 상에 암호화되어 있다(Kronstad 등, 1983). Southern 혼성화 반응의 결과로부터 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1(KCTC #1507) 균주는 그들의 δ -endotoxin 유전자가 plasmid 상에 존재하는 것으로 확인되었으며(Fig. 1), 이 균주로부터 클로닝된 독성단백질 유전자는 그들의 제한효소 지도에 근거하여 이미 Thorne 등(1986)에 의해 보고된 δ -endotoxin 유전자 클론과 동일한 것으로 판명되었다. 독성단백질 유전자 클론들을 분류한 Schnepf 등(1990)의 보고에 의하면, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 균주로부터 클로닝된 유전자는 *cryIA(b)* 유전자군에 속하며, Min 등(1986)에 의해 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 균주로부터 클로닝된 유전자는 *cryIA(c)* 유전자군에 속하는 것으로 확인되었다.

*E. coli*에서 발현된 독성단백질의 곤충에 대한 독성조사 결과, *S. litura* 유충은 *cryIA(b)*와 *cryIA(c)*에 대해 매우 높은 저항력을 가지고 있는 것으로 판단된다. *cryIA(b)*와 *cryIA(c)*는 공히 *H. assulta*에 대해 강한 독성을 나타내며, *cryIA(b)*와 *cryIA(c)* 유전자의 3' 부위를 절단하였을 때 독성의 감소가 관찰되나 대부분의 독성 활성은 그대로 5' 부위에 남아있음을 확인할 수 있었다. *B. mori*에 대해서는 *cryIA(b)*와 *cryIA(c)* 사이에 뚜렷한 독성의 차이가 관찰되었다. *cryIA(b)*의 경우, 대부분의 유충이 3일 내에 치사하였으나, *cryIA(c)*의 경우는 반 정도의 유충이 일주일 경과 후에도 아직 살아 있었다. 두 유전자의 3' 부위에서 700-300 bp 혹은 1.6-1.2 kbp에 해당하는 DNA가 절단된 경우 뚜렷한 차이점이 관찰되지 않았으나, 3' 부위가 제거된 경우에는 전장의 독성단백질에 비해 독성이 크게 감소하였다. 그러므로 carboxy 말단 부위 쪽에도 독성 활성 부위가 존재함을 알 수 있다. *cryIA(b)*와 *cryIA(c)*는 공히 *P. xylostella*에 대해 강한 독성을 보여 이를 내로 모든 유충들의 치사가 확인되었다. 또한 3' 부위를 절단하였을 때도 강력한 독성이 그대로 유지되어 *P. xylostella*에 대해 독성의 활성을 나타내는 부위가 N-말단이 있는 쪽임이 확인되었다. *H. cunea*는 *cryIA(c)*에 의해 더욱 민감한 반응을 보였으나 *cryIA(b)*에 의해서도 5일 내로 완전한 치사율을 보였다. Carboxy

부위가 제거된 경우 독성이 감소되는 것으로 보아 이 부위도 *H. cunea* 에 대한 독성을 결정짓는 요소가 있음을 알 수 있었다(Figs. 6와 7). 여기에서 분석된 *cryIA(b)* 와 *cryIA(c)* 의 다섯 종의 유충에 대한 독성도의 비교 분석은 독성단백질의 각 유충 종 간의 특이성과 독성단백질 내의 활성 부위에 대한 부분적인 확인을 가능하게 하였으며, 이러한 독성단백질 유전자를 이용한 독성단백질 분할 및 분석은 *B. thuringiensis* 독성단백질이 독성을 나타내는 기작에 대한 근본적인 해석을 이끌어 낼 수 있을 것이다. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1과 HD-73 균주로부터 클론된 *cryIA(b)*와 *cryIA(c)* 유전자를 이용하여 국내에서 문제가 되고 있는 해충을 퇴치하기 위해 각각의 유충에 대한 독성검사를 실시하여 이들 유전자를 사용할 수 있음을 확인하였으며, 이러한 유전자를 담배에 도입하게 되었다. *cryIA(b)*와 *cryIA(c)* 유전자들이 도입된 형질전환체로부터 Northern 분석을 수행하였을 때, 식물체의 염색체상에 존재하는 *rbcS* 유전자나 독성단백질 유전자 도입 시 함께 도입된 *nptII* 유전자의 전사체 경우에는 Northern band가 확인되었으나 (Fig. 10), *cryIA(b)*와 *cryIA(c)* 유전자에 대한 Northern band는 확인되지 않았다. 현재까지 식물체에서 발견된 독성단백질 유전자의 전사체가 식물체내에서 매우 불안정한 몇가지 이유를 살펴보면, 첫째, 독성단백질 유전자의 코돈 usage가 식물체와는 많이 다르므로 단백질 합성의 효율이 떨어진다. 단백질 합성 효율, 전사체의 2차원적 구조, 전사체와 결합해야 할 polysome의 세포내 분포 양상, 그리고 합성된 단백질의 양 등이 전사체의 안정도에 영향을 끼친다고 보고(Daar와 Maquat, 1988)되므로 단백질 합성 효율이 낮은 독성단백질 유전자의 경우에는 그들의 전사체가 불안정할 수도 있다. 둘째, 독성단백질 유전자는 그들의 유전자를 암호화한 염기서열내에 polyadenylation에 관여하는 염기서열을 많이 가지고 있다. 그러므로 전사체가 완전히 합성되기도 전에 합성이 중단될 수도 있다. 마지막으로 독성단백질 유전자는 식물체의 유전자에 비해 AT 염기서열의 비율이 높다. Shaw 등(1986)의 보고에 의하면, 진핵생물의 전사체에서 많은 AT 염기서열은 전사체의 processing과 분해에 관련되어 있음을 밝혔다. 이러한 몇가지 문제점을 고려하면 독성단백질 유전자 전사체의 안정도를 높일 수 있으리라 사료된다.

또한 보다 강력한 내충능을 갖는 농작물의 개발을 위해서는 형질전환된 식물체에서 발견되는 독성단백질의 양적 증가를 피할 수도 있을 것이다. 본 연구에서도

cryIA(c) 독성단백질에 대한 다균항체를 이용하여 많은 시료에 대하여 여러 번 반복해서 Western 분석을 수행하였으나 뚜렷한 Western band를 관찰할 수 없었다. 이는 식물체에서 독성단백질이 극히 소량으로 발현되었으며, 사용된 다균항체가 독성단백질을 인식할 정도의 감도(sensitivity)를 갖지 못했기 때문이라 사료된다. 이에 Perlak 등(1990 과 1991)의 보고에 의하면 *cryIA(b)*와 *cryIA(c)* 유전자 전사체의 2차원적인 구조, polyadenylation에 관여하는 염기서열, 그리고 식물체에서 거의 사용되지 않는 코돈 등을 고려하여 아미노산 서열에는 변화없이 염기서열만을 변형시킨 변형된 독성단백질 유전자를 합성하고 이러한 변형된 독성단백질 유전자를 담배 혹은 토마토에 도입·발현시키므로써 원래의 독성단백질 유전자를 발현시켰을 때보다 독성단백질의 발현율이 100배가 증가되었음을 보여주었다. 그렇게 함으로써 독성단백질 유전자에 보다 저항능이 강한 해충에 독성능이 증가되는 것을 볼 수 있었다.

본 연구에서 *cryIA(b)*와 *cryIA(c)* 유전자가 도입된 형질전환된 담배의 경우 Fischhoff 등(1987)과 Barton 등(1987)에 의해 보고되어진 *M. sexta*(tobacco hornworm)에 비해 tobacco budworm(*H. assulta*)의 공격에 보다 내성이 약한 것으로 나타났다(Table 1). 이러한 사실은 앞에서도 언급한 바와 같이 같은 독성단백질이라 하더라도 서로 다른 유충에 대해 나타내는 독성의 정도가 서로 상이하므로 tobacco budworm이 tobacco hornworm보다는 *cryIA(b)*와 *cryIA(c)* 독성단백질에 대해 내성이 강한 것으로 판단된다. 이는 *cryIA(b)*와 *cryIA(c)* 독성단백질이 *M. sexta*(tobacco hornworm)와 *Trichopulsia ni*(cabbage looper)에는 보다 독성이 강하고 *Heliothis virescense*(tobacco budworm), *Spodoptera exigua*(beet armyworm), *Heliothis zea*(cotton bollworm), *Helicoverpa zea* 그리고 *Ostrinia nubilalis*(European corn borer 등에는 독성이 약한 것으로 보고된 사실과 일치하는 것을 볼 수 있다(Perlark 등, 1991; Koziel, 1993; Warren 등, 1992; Jenkins 등, 1993; Benedict 등, 1993). 그러므로 클론된 *cryIA(b)*와 *cryIA(c)* 독성단백질은 배추좀나방과 흰불나방 등에는 보다 강한 독성을 나타내므로 이들에 의해 많은 피해를 받는 농작물에 대해서는 *cryIA(b)*와 *cryIA(c)* 유전자를 이용하면 충분한 내충능의 부여가 가능할 것으로 판단된다. 그리고 전사체를 안정화 시키고 단백질 합성 효율을 증가시킬 수 있도록 유전자를 변형하고, 조직 특이성 promoter를 사용한다면 보다 내충능이 강한 식물체를 개발할 수 있으리라 사료된다.

참 고 문 헌

- Barton, K.A., H.R. Whiteley, and N.S. Yang. 1987. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiol.* 85: 1103- 1109.
- Benedict, J.H., E.S. Sachs, D.W. Altman, D.R. Ring, T.B. Stone, and S.R. Sims. 1993. Impact of δ -endotoxin-producing transgenic cotton on insect-plant interactions with *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*(Lepidoptera:Noctuidae). *Environ. Entomol.* 22(1): 1-9.
- Chilton, M.D., R.K. Saiki, N. Yadav, M.P. Gordon, and F. Quetier. 1980. T-DNA from *Agrobacterium* Ti plasmid is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2693-2697.
- Choi, Y.C., S.C. Lee, M.H. Han, and M.H. Yu. 1988. Optimization of the β -galactosidase polypeptide length for the overproduction of fusion protein in *E. coli*. *Korean Biochem. J.* 21: 102-109.
- Darr. I.O., and L.E. Maquat. 1988. Premature translation termination mediates triosephosphate isomerase mRNA degradation. *Mol. Cell Biol.* 8: 802-813.
- Dulmage, H.T. 1978. Genetic manipulation of pathogens:selection of different strains. *In genetics in relation to insect management*, ed. M.A. Hoy, J. J. McKeivey, Jr., New York:Rockefeller, 116-127.
- English, L., and S.L. Slatin. 1992. Mode of action delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*:A comparison with other bacterial toxins. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 22: 1-7.
- Fischhoff, D.A., K.S. Bowdish, F.J. Perlak, P.G. Marrone, S.H. McCormick, J.G. Niedermeyer, D.A. Dean, K. Kretzmer, E.J. Mayer, D.E. Rochester, S.G. Rogers, and R.T. Fraley. 1987. Insect tolerant transgenic tomato plants. *Bio/Technology* 5: 807-813.

- Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S. Adams, M. Bittner, L. Brand, C. Fink, J. Fry, G. Galluppi, S. Goldberg, N. Hoffmann, and S. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4803-4807.
- Fujimoto, H., K. Itoh, M. Yamamoto, J. Kyojuka, and K. Shimamoto. 1993. Insect resistant rice generated by induction of a modified δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Bio/technology* 11: 1151-1155.
- Gill, S.S., E.A. Cowles, and P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37 : 615-36.
- Hofte, H., and H.R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.
- Jenkins, J.N., W.L. Parrott, J.C. McCarty, Jr., F.E. Callahan, S.A. Berberich, and R.W. Deaton. 1993. Growth and survival of *Heliothis virescens*(Lepidoptera:Noctuidae) on transgenic cotton containing a truncated form of the delta endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 86(1): 181-185.
- Koziel, M.G., G.L. Beland, C. Bowman, N.B. Carozzi, R. Crenshaw, L. Crossland, J. Dawson, N. Desai, M. Hill, S. Kadwell, K. Launis, K. Lewis, D. Maddox, K. McPherson, M.R. Meghji, E. Merlin, R. Rhodes, G.W. Warren, M. Wright, and S.V. Evola. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology* 11: 194-200.
- Kronstad, J.W., H.E. Schnepf, and H.R. Whiteley. 1983. Diversity of locations for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J. Bacteriol.* 154: 419-428.
- Min, S.Y., H.Y. Park, M.H. Kim, and J.I. Kim. 1986. Cloning of insecticidal crystal toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and its toxicity to the fall webworm, *Hyphantria cunea*. *Korean Biochem. J.* 19(4): 363-371.

- Perlak, F.J., R.L. Fuchs, D.A. Dean, S.L. McPherson, and D.A. Fischhoff. 1991. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3324-3328.
- Perlak, F.J., R.W. Deaton, T.A. Armstrong, R.L. Fuchs, S.R. Sims, J.T. Greenplate, and D.A. Fischhoff. 1990. Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology* 8: 939-943.
- Schnepf, H.E., K. Tomczak, J.P. Ortega, and H.R. Whiteley. 1990. Specificity-determining regions of a lepidopteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 265: 20923-20930.
- Shaw, G., and R. Kamen. 1986. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*, 46: 659-667.
- Song, H.W., and C.B. Hong. 1991. Transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) cell line carrying human proinsulin gene. *Korean Society of Plant Tissue Culture* 18(3): 195-200.
- Suh, M.C., C.B. Hong, M. Kim, S.S. Kim, K.Y. Cho, J.I. Kim, and W.S. Sim. 1992. Relative insecticidal activities of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* toxins *cryIA(b)* and *cryIA(c)*, produced in *Escherichia coli*. *Mol. Cells* 2: 87-95.
- Thorne, L., F. Garduno, T. Thompson, D. Decker, M. Zounes, M. Wild, A.M. Walfield, and T. Pollock. 1986. Structural similarity between the *Lepidoptera*- and *Diptera*-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *israelensis*. *J. Bacteriol.* 166: 801-811.
- Vaeck, M., A. Reynaerts, H. Hofte, S. Jansens, M. De Beuckeleer, C. Dean, M. Zabeau, M. Van Montagu, and J. Leemans. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 328: 33 -37.
- Warren, G.W., N.B. Carozzi, N. Desai, and M.G. Koziel. 1992. Field evaluation of transgenic tobacco containing a *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene. *J. Econ. Entomol.* 85: 1651-1659.