

## TMV 저항성 형질전환 연초식물체 제 5 세대에서 유전자 안정성 및 고온조건에서의 유전자 발현

이기원 · 박성원\* · 이청호 · 박은경 · 김상석 · 최순용<sup>1</sup>  
한국인삼연초연구원 원료연구부, <sup>1</sup>한남대학교 미생물학과

### Gene Expression in The Fifth Generation of TMV Resistant Transgenic Tobacco Plants at Elevated Temperature.

LEE, Ki Won · PARK, Seong Weon\* · LEE, Cheong Ho · PARK, Eun Kyung · KIM, Sang Seock · CHOI, Soon Yong<sup>1</sup>

Department of Leaf Technology, Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon, 305-345, Korea:  
and <sup>1</sup>Department of Microbiology, HanNam University, Taejon, 300-791, Korea. \*Corresponding author.

Tobacco mosaic virus(TMV) coat protein cDNA was transformed to *Nicotiana tabacum* cv. NC82 and the transgenic tobacco plants resistant to TMV infection were isolated in the next generation. The expression of TMV coat protein cDNA and genetic stability of the fifth generation of TMV resistant transgenic tobacco plants at the higher temperature were investigated. The TMV coat protein cDNA was amplified by genomic PCR in all the TMV resistant transgenic tobacco plants. The TMV coat protein expressed in the transgenic tobacco plants was detected at very low level by immunoblot hybridization. Even in transgenic plants that showed the viral symptom only on very late sucker growth (delay type plants), the coat protein expression in the suckers was much less than that of susceptible tobacco infected with TMV. The TMV coat protein expressed in the transgenic tobacco plants was below 0.01% of total protein. Transcription and expression of the coat protein cDNA in delay type plants were observed at high temperature (38° C), and TMV replication was suppressed at both 28° C and 38° C. This indicates that unlike the resistance conferred by 'N' gene. TMV resistance of transgenic tobacco plant won't break down at high temperature.

**Key words:** TMV coat protein cDNA, transgenic plant, tobacco diseases

최근 유전공학기법의 발달로 외부 유용 유전자를 식물에 도입하는 형질전환 기술이 개발되어 Bevan 등(1985) 및 Baulcombe 등(1986)은 바이러스 유전자를 식물체에 도입하여 발현시킨바 있으며 이는 점차 실용화 단계로 접어들고 있다. Powell 등(1986)이 TMV 외피 단백질 유전자를 연초에 도입하여 형질전환된 연초의 바이러스 병징발현 지연현상이 나타나는 것을 보고한 이래 바이러스 외피단백질의 유전자나 위성 RNA의 cDNA, 혹은 바이러스 염기서열의 antisense strand를 이용하는 유전공학적 cross protection에 대한 연구가 활발하게 진행되기 시작하였다. 실제로 Powell 등(1986)의 발표 이후에도 tobacco streak virus (TSV) (Van Dun CMP et al., 1988), cucumber mosaic virus (CMV)

(Cuozzo M et al., 1988), alfalfa mosaic virus (ALMV) (Tumer NE et al., 1987), tobacco rattle virus (TRV), tomato spotted wilt virus (TSWV) (Godbach R, Slightom JL, 1993) 등의 외피단백질이 도입된 형질전환 연초에서 바이러스 감염이 지연된다는 연구결과가 보고되었다. 또한 연초이외의 작물에도 바이러스 외피단백질을 이용한 바이러스 저항성 식물에 대한 연구가 시도되었는데, 최근에는 오이와 파파이아에 CMV, papaya ringspot virus (PRV)의 외피단백질 유전자를 도입하였고 (Ling K et. al., 1991), potato leaf roll virus (PLRV), potato virus S (PVS)의 외피단백질 유전자를 이용한 감자에 대하여 그 저항성 및 안정성 연구가 진행 중이며 (Gonsalves D et al, 1993), 또한 zucchini yellow

mosaic virus (ZYMV)의 외피단백질 유전자가 도입된 squash는 이미 상품화를 위하여 생산되고 있는 실정이다 (Gonsalves D et al., 1993).

한편 바이러스 외피단백질 유전자 이외에도 Gerlach 등 (1987)은 TRV에 있는 위성 RNA의 cDNA를 연초에 도입하였고, Harrison 등(1987)은 CMV의 위성 RNA의 cDNA를 토마토 식물체에 도입하였다. 그러나 위성 RNA를 가지고 있는 바이러스가 제한적이고 또한 병을 더욱 심화시키는 경우도 있다는 점이 위성 RNA 사용의 한계점으로 작용하게 되었다. 다른 방법으로는 바이러스 염기서열의 antisense strand를 발현시키는 방법으로 Hemeway 등(1988)은 PVX, Cuozzo등(1988)은 CMV의 외피단백질 유전자의 antisense RNA를 연초에 도입하였는데 저항성은 기대에 못미치는 수준이었으나, 이런 방법으로 만들어진 작물은 종자를 통해서 도입된 유전자가 후대에 지속되는 장점이 있으므로 계속적인 연구대상이 되고 있다. 그러나 형질전환 식물체에 도입된 유전자의 후대에서의 안정성에 대한 논의가 끊어지지 않고 있으며 실제로 Powell 등(1986)의 식물체는 2세대에 이미 유전자의 안정성이 유실된 경우의 보고도 있었다. 본 실험은 이미 온실 및 포장에서 선발되어 생육한 TMV 저항성 연초 제 5세대 식물체를 핵산과 단백질 수준에서의 안정성을 확인하고 또한 고온상태에서도 유전적인 안정성과 저항성 발현 여부를 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 형질전환 식물체

형질전환 식물체의 종자는 파종상에 파종한 후 자엽이 나왔을 때 육묘용 포트(4×4×4cm)에 이식하고 본엽이 나오면 온실의 플라스틱포트에 1포기씩 옮겨 심거나 혹은 포장에 이식하였다.

### 바이러스 접종

접종 바이러스는 한국에서 분리한 TMV common strain를 이용하였으며, carborundum과 면구를 이용하여 담배의 전개엽에 직접 상처를 낸후 접종하였다. 이때 접종원은 TMV를 0.5 ug/ml이 되도록 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2), 1 mM EDTA에 현탁하여 사용하였으며 바이러스의 축적량은 식물체의 즙액을 Xanthi-nc에 접종하여 나타난 반점수를 계수하는 local-lesion test를 이용하여 조사하였다.

### 형질전환 식물체의 유전자 분석

형질전환식물체의 외피 단백질 유전자 분석은 Lee 등

(1993)의 방법을 사용하였으며, 형질전환 식물체의 외피 단백질 분석은 다음과 같은 방법을 이용하였다. 연초잎 조직 1g을 채취하여 액체질소로 얼리고 pestle로 마쇄한 후 1 mL의 단백질 추출용액(30 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5; 0.4 M NaCl; 10 mM 2-mercapto-ethanol)을 넣고 현탁하여 원심분리하였으며 그 상정액을 Bradford법에 의하여 총 단백질량을 실시하였다. 또한 단백질 추출액을 12% SDS-PAGE상에서 분리하였으며, 이를 완충액 (20 mM Tris-base, pH 8.0; 150 mM glycine; 15% methanol)내에서 semi-dry transfer cell을 이용하여 nitrocellulose membrane에 전이시켰다. 이 membrane에 완충액 TTBS (100 mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.9 % NaCl; 0.1% Tween 20)를 가하여 1시간 동안 반응시키고 TMV항체 희석액을 첨가하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨후 TTBS로 15분간 세척하고 GAR-HRP를 넣어 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이를 TBS (100 mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.9% NaCl)완충액으로 15분간 세척하여 DAB/NiCl<sub>2</sub> 발색용액에 넣어 밴드를 확인하였다.

### RNA 분석

연초에서 발현되는 RNA의 분석은 연초잎 조직에서 guanidium thiocyanate방법으로 RNA를 추출하여 RT-PCR법에 의하여 실행하였으며(Vris et al., 1988) 이때 사용된 DNA primer는 5'-CTACTCCATCTCAGTTCGTG-3', 5'-GAGTAGCATCTAACTTTTCGGCAG-3'로서 이는 TMV 외피 단백질 유전자를 함유하는 서열로서 이를 이용하였을 때에는 320 bp의 DNA가 합성될수 있도록 제작하였다.

## 결과 및 고찰

### TMV 저항성 형질전환 연초 제 5세대 식물체의 TMV 저항성 유전자 안정성

Tobacco mosaic virus(TMV) 외피단백질 유전자를 연초 (*Nicotiana tabacum* cv. NC82)에 형질전환하고 형질전환 식물체 후세대에서 TMV 저항성인 연초를 선발하였다 (Park SW and Lee KW, 1996). 선발된 TMV 저항성 형질전환 식물체에서 도입된 외부 유전자가 형질전환 식물체 세대를 거듭하였을 때 그 유전적인 안정성여부가 논의되고 있는데, 본식물체는 제 4 세대까지의 유전자안정성 및 바이러스 저항성 정도 등은 이미 보고한 바(Park et al., 1996)와 같으며, 제 5 세대 형질전환 식물체의 TMV에 대한 저항성이 도입된 TMV 외피단백질 유전자에 의한 특성인지 여부를 확인하기 위하여 genomic PCR에 의하여 유전자 분석 및 바이러스 저항성 정도(park et al., 1998)등을 조사하였다. 유전자 분석에 사용된 primer는 TMV 외피 단백질 유전자를 함유

하는 서열로서 이를 사용하였을 때에는 320 bp의 DNA가 합성될 수 있도록 제작된 primer를 사용하였다. 형질전환 식물체로부터 genomic DNA를 추출하여 PCR을 실시한바 Figure 1에서와같이 320bps의 DNA가 증폭되었음을 확인하였다. 형질전환되지 않은 연초에서는 band가 확인되지 않았으나(Figure 1, lane 2, 3), 형질전환 제 5세대 식물체에서는 도입된 유전자가 확인되었다(Figure 1, lane 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). 이와같은 결과로보아 형질전환 식물체의 제 5세대의 염색체에도 TMV 외피단백질 유전자가 존재하고 있음을 확인하였고 제 5세대 식물체의 TMV에 대한 저항성도 TMV 외피단백질 유전자의 존재에 의한 것임을 추정할 수 있었다.

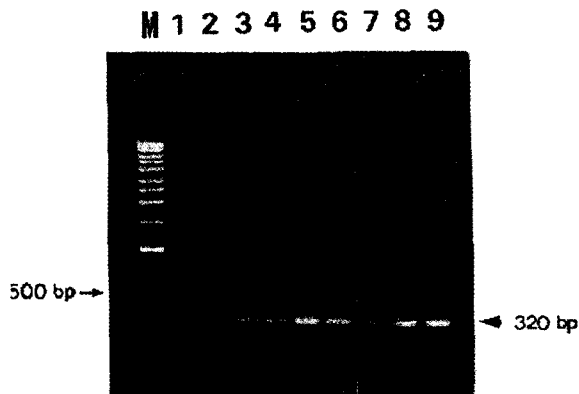


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of genomic PCR products of the transgenic tobacco plants. Lane M: Kb ladder, lanes 1-2: normal NC 82, lanes 3-9: the fifth generation of transgenic plants.

### 형질전환 식물체 제 5 세대의 TMV 외피단백질 유전자 발현

형질전환 식물체내에서 발현되는 TMV 외피단백질의 발현정도를 조사하기 위하여 포장에서 생육한 수확기의 연초 잎 조직의 단백질 분석을 실시하였다. 이때 TMV 완전 저항성 연초와 액아에만 TMV의 병반이 약하게 나타나는 고도의 지연형인 연초를 분리하여 시료를 채취하였다. 각 채취된 연초 잎 조직 1g에서 총단백질을 분리하고 그 중 20 ug을 SDS-PAGE에 의하여 분자량별로 분리하여 이를 nitrocellulose membrane에 전이시킨후 TMV 항체를 이용한 immunoblot hybridization을 실시한 결과는 Figure 2와 같다. Figure 2의 lane 1-2는 TMV가 감염되지 않은 정상 NC 82로서 TMV 외피단백질의 band가 발견되지 않았고 lane 4-6은 TMV 완전 저항성 식물체로서 적은양이지만 TMV 외피단백질을 합성하고 있었으며 lane 7은 TMV가 감염된 NC 82로서 조직내에 존재하는 TMV의 양이 많음을 확인할 수 있

었다. 이에 반하여 lane 3은 고도의 지연형 식물체로서 본엽에는 병징이 없으며 액아에만 지연형인 병반이 나타난 식물체이지만 조직내에 존재하는 TMV의 양이 lane 7의 TMV가 감염된 NC82에 비하여 훨씬 적게 존재하고 있음을 알 수 있었으며 lane 4-6의 바이러스 저항성 식물체보다 비교적 많은 양이 존재하는 고도 지연형 식물의 경우 바이러스의 증식이 완전히 억제되지는 않았다.

TMV에 저항성인 연초식물체 내에 많은 외피단백질이 합성된다면 연초의 품질저하가 우려되므로 합성되는 외피단백질의 양을 총단백질량에 비교하여 정량분석하였다. 정제된 TMV 200, 100, 50, 10, 5, 2 ng을 각각 Immnoblot hybridization을 실시하여 형질전환 식물체에서 발현되는 외

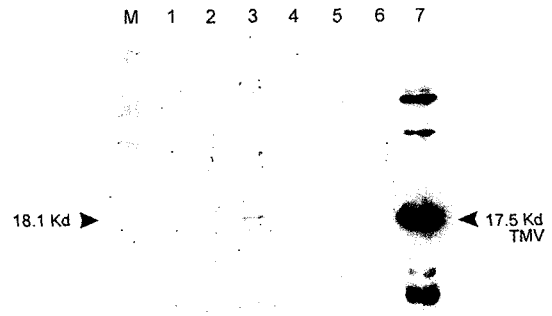


Figure 2. Immuno blot analysis of the fifth generation transgenic tobacco plants under the field conditions. Lane M: Pre-stained Marker, lane 1-2: TMV non-infected NC82, lanes 3: delayed phenotype resistant plant, lane 4-6: TMV resistant plants, lane 7: TMV infected NC82. The arrow indicates TMV coat protein.

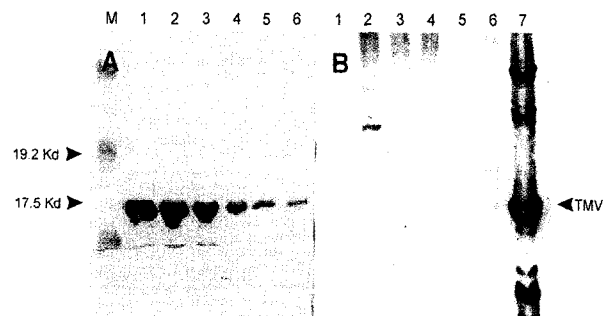


Figure 3. Immunoblot analysis of the transgenic tobacco plants grown in the field conditions for TMV coat protein accumulation. A: Concentration of purified TMV. Lane M: pre-stained marker, lane 1: 200 ng, lanes 2: 100 ng, lane 3: 50 ng, lane 4: 10 ng, lanes 5: 5 ng, lanes 6: 2 ng of purified TMV. B: TMV CP accumulation of transgenic tobacco plants. Lanes 1: TMV non-infected NC82, lanes 2-6: transgenic plants, lanes 7: TMV infected NC82. The arrow indicates TMV coat protein.

피단백질의 양과 비교하였다 (Figure 3). 이결과 형질전환 식물체에서 발현되는 외피단백질의 양은 Figure 3A, lane 6

의 정제된 TMV의 양과 비교할 때 2 ng이하로서 이는 20 ug의 총단백질량에 대비하여 0.01% 이하임이 확인되었다. 이 결과는 CaMV 35S promoter로 식물체에서 발현되는 단백질이 많지 않다는 이론과 유사하였다. 이상의 결과로 보아 TMV 외피단백질 유전자가 형질전환된 식물체는 후 세대에서도 안정하게 외피단백질을 합성하였으며 그 양도 이전 세대와 같은 수준으로 매우 미약하여 담배의 품질에는 영향을 미치지 않을 것으로 추정되었다.

형질전환 식물체의 고온처리시 TMV에 대한 저항성

TMV 저항성인 형질전환 식물체가 고온에서도 그 저항성을 유지할 수 있는지의 여부를 확인하기 위하여 TMV 병징 발현지연형 식물체에 TMV를 접종한 후 28°C와 37°C에 14 일동안 처리하면서 7일 간격으로 local-lesion test에 의하여 NC 82와 비교하여 TMV에 대한 저항성 정도를 조사하였다. 이때 TMV 증식율을 조사하기 위하여 TMV 접종엽의 즙액을 Xanthi-nc를 이용하여 local lesion의 수를 세는 방법을 이용하였으며, 이때 대조구로서는 NC 82를 사용하였다 (Table 1). TMV CP 유전자가 발현하지 않는 정상 NC82 식물체에 TMV 이병즙액을 접종하여 28°C, 38°C 그리고 38°C와 28°C로 일교차를 두어 7일과 14일 동안 처리하였을 때는 TMV 병징이 심한 NC82 대조구와 비교할 때 시간이 경과함에 따라 처리 기간이나 온도에 따른 차이가 없이 바이러스의 농도가 증가하였다 (Table 1). 그러나 형질전환 연초 식물체는 TMV를 접종한 후 28°C에서만 7일동안 처리하였을 때에는 TMV의 밀도 변화가 없었지만 14일 후에는 3% 정도 증가하였는데 이와같은 결과는 25°C에서 14일 동안 처리하였을 때 virus의 밀도가 20%의 증가에 비하여 오히려 TMV의 증식이 억제되어 TMV에 대한 높은 저항성을 유지하였으며, TMV를 접종한 후 일교차를 10°C 두어 빛이 있을 때에는 38°C, 어두운 상태일 때는 28°C의 조건이었을 때에도 TMV의 증식이 억제되었다 (Table 1). 이결과는 N. glutinosa 유래의 Necrosis gene이 육종방법으로 도입되어

Table 1. TMV populations in the TMV resistant transgenic plants with TMV CP gene and the nontransgenic susceptible tobacco (NC82) plants under different temperature conditions

Temperature after inoculation		Relative Viral population (%) <sup>a</sup>			
		7days after inoculation		14days after inoculation	
Light (16hrs)	Dark (8hrs)	Susceptible NC82	Resistant	Susceptible NC82	Resistant
28°C	28°C	100	0	100	20
38°C	38°C	100	0	100	3
38°C	28°C	100	0	100	0

<sup>a</sup>Percentage of viral population is relative to that of a susceptible tobacco leaf (NC82) with severe mosaic symptoms (tested by the half-leaf inoculation method). Plants were adapted for 24 hrs at each temperature prior to inoculation. They were inoculated with TMV (crude sap) and placed in growth chambers at the indicated temperatures. 10 replications.

TMV 저항성을 나타내는 연초의 경우는 고온처리시 바이러스 저항성이 일부 약해지는 경우와 다르게 나타났다. 따라서 본 실험에 이용된 TMV 저항성 연초 식물체는 30°C 가 넘는 우리나라 여름의 기온조건에서도 TMV에 대한 저항성은 계속 유지되리라 사료된다.

고온처리시 형질전환 식물체의 TMV 외피단백질 유전자 발현

형질전환 식물체가 고온처리에서도 TMV 외피단백질 유전자에 해당되는 RNA와 외피단백질을 합성하는지 확인하기 위하여 형질전환 식물체를 고온 (38°C)에서 15, 24, 48 시간동안 처리한 후 각각 시료를 채취하였다. 각각 채취한 시료로부터 guanidium thiocyanate법으로 RNA를 추출하여 RT-PCR법에 의하여 분석하였다. 이때 사용한 primer는 genomic PCR에서 이용한것으로서 형질전환 식물체내에 TMV 외피단백질 유전자에 해당되는 RNA가 전사되었다면 그 RNA를 이용하여 320bp 크기의 DNA band가 합성되도록 제작하였다. Figure 4의 lane 1은 정상 NC 82로서 DNA band가 합성되지 않았으며 lane 2, 3, 4는 각각 15, 24, 48 시

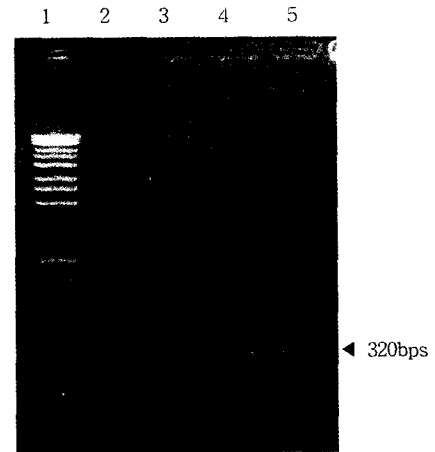
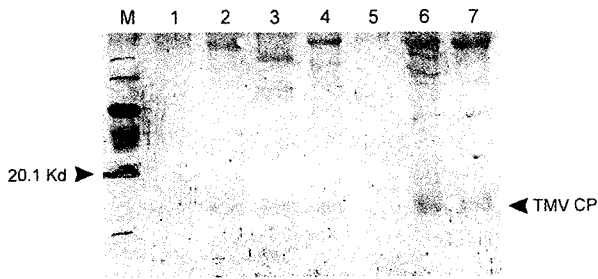


Figure 4. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product (1.5%). RT-PCR was carried out with the TMV CP transcript of tobacco plants incubated at 38°C. Lanes 2: NC82, lanes 3~5: extracts of transgenic plants incubated for 15 hr, 24 hr, 48 hr, respectively. The arrow indicates 320bps of RT-PCR product.

간동안 처리한 시료로서 고온처리 시간에 관계없이 같은 수준의 DNA가 합성되었음을 확인한바 고온의 조건에서도 TMV 외피단백질 유전자로부터 RNA가 합성되었음을 알 수 있었다. 또한 고온에서 외피단백질의 합성여부를 확인하기 위하여 각각 처리된 시료로부터 단백질을 추출하고 그중 20 ug을 이용하여 Immuno blot hybridization을 실시하였다. 이때 Figure 5에서 처럼 TMV 외피단백질 band가 확인되어 고온상태에서도 외피단백질이 합성되고 있음을 알 수 있었다. Nejidat와 Beachy (1989)는 형질전환 식물체를 고온에



**Figure 5.** Immunoblot analysis of transgenic tobacco plants. Lane M: Molecular weight marker, lanes 1: non transgenic NC 82, lanes 2~3, 4~5, 6~7: transgenic plants incubated for 15 hr, 24 hr, 48 hr, respectively, at 38°C. Sample leaf disks were pooled from 3 plants and extracted, and 20  $\mu$ g of total protein was fractionated by SDS-PAGE in 12.5% gels and analyzed by immunoblotting. The arrow indicates TMV coat protein.

처리하였을 때 TMV에 대한 저항성에 약화되었는데 이때 TMV CP유전자의 발현여부를 조사한 결과 mRNA는 발현되었으나 CP는 발견되지 않았는데 이 결과로서 형질전환 식물체가 TMV에 대한 저항성을 띄는 것은 세포내에서 발현되는 TMV의 CP의 양과 관련이 있다고 보고하였다. 그리고 Nelson 등(1988)도 TMV CP유전자가 형질전환된 토마토가 상온일 때에는 TMV에 대한 저항성을 띄었으나 고온에 처리하였을 때에는 그 저항성이 떨어졌으며 역시 TMV CP는 발견되지 않았다고 보고하였는데 이러한 것은 TMV CP의 합성이 되지 않는 것이 아니고 합성은 되지만 분해된 것으로 추정하였다. 고온의 상태에서도 형질전환 식물체의 세포내에는 TMV 외피단백질에 해당하는 RNA와 외피단백질이 존재하고 있었으며, 이에 따라 형질전환 식물체의 TMV에 대한 저항성은 TMV 외피단백질과 RNA에 의한 복합적인 작용이라 추정되지만 추후 계속해서 조사되어야 한다고 사료되었으며 또한 본 실험에 이용된 TMV에 저항성을 보이는 형질전환 식물체는 고온에서도 TMV에 대한 저항성이 계속 유지되고 있으므로 30°C가 넘는 우리나라 여름의 기온 조건에서도 재배가 가능하다고 사료된다.

## 적 요

Tobacco mosaic virus(TMV) 외피단백질 유전자를 연초 (*Nicotiana tabacum* cv. NC82)에 형질전환하고 형질전환 식물체 후세대에서 TMV 저항성인 연초를 선발하여, 선발된 TMV 저항성 제 5세대 형질전환 식물체의 도입된 유전자 발현 및 고온에서의 특성 등을 조사하였다. TMV 저항성 식물체의 염색체 DNA에 TMV 외피 단백질 유전자가 안정되게 존재하고 있음을 genomic PCR을 수행하여 확인하였다. 또한 형질전환 식물체내에서 TMV 외피 단백질 발현은

Immunoblot hybridization 방법으로 확인하였다. TMV 저항성 형질전환 연초식물체에서 발현된 단백질의 양은 매우 적었으며 특히 본엽에는 병징이 나타나지 않았으나 수확기 마지막 액아에 TMV의 반점이 나타난 병징발현 지연형의 형질전환 식물체의 경우에도 발현된 단백질의 양은 정상 NC 82에 TMV가 감염되었을 때와 비교하여 현저히 적었다. TMV 저항성 형질전환 식물체 내에서 발현되는 TMV 외피 단백질의 양은 총 단백질에 대비하여 0.01% 이하이었다. TMV 병징 발현 지연형인 형질전환 식물체에 TMV를 인공 접종한 후 고온처리상태에서 외피 단백질 유전자의 전사 및 발현을 RT-PCR과 Immuno blot hybridization 통하여 확인하였으며, 이때 TMV의 증식도 억제되었으므로 개량멸치시 나타나는 고온조건하에서도 저항성이 안정적으로 발현될 수 있음을 알 수 있었다.

## 인 용 문 헌

- Baulcombe DC, Sanders GR, Bevan MW, Mayo MA, Harrison BD (1986) Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature(London)* 321: 446-449
- Bevan MW, Mason SE, Goelet P (1985) Expression of tobacco mosaic virus coat protein by a cauliflower mosaic virus promoter in plants transformed by *Agrobacterium*. *EMBO J* 4: 1921-1926
- Cuozzo M, O'Connell KM, 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
- Goldbach R, de Hann P (1993) Prospects of engineered forms of resistance against tomato spotted wilt virus. *Seminars in Virology* 4: 381-384
- Gonsalves D, Slightom JL (1993) Coat protein-mediated protection: analysis of transgenic plants for resistance in a variety of crops. *Seminars in Virology* 4: 397-405
- Harrison BD, Mayo MA, Baulcombe DC (1987) Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus satellite RNA. *Nature* 328: 799-802
- Hemeway C, Fang RX, Kaniewski 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
- Lee KW, Park SW, Kim NW, Park EK (1993) *J. of The Korean Society of Tobacco Science* 15: 161-166
- Ling K, Namba S, Gonsalves C, Slightom JL, Gonsalves D (1991) Protection against detrimental effects of potyvirus infection in transgenic tobacco plants expressing the papaya ringspot virus coat protein gene. *Bio/Technology* 9: 752-758

- Nelson RS, McCormick SM, Delannay X, Dube P, Layton J, Anderson EJ, Kaniewski M, Proksch RK, Horsch RB, Rogers SG, Fraley RT, Beachy RN (1988)** Virus tolerance, plant growth and field performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from tobacco mosaic virus. *Bio/Technology* 6: 403-409
- Powell AP, Nelson RS, De B, 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: 738-743
- Tumer NE, O'Connell KM, Nelson RS, Sanders PR, Beachy RN, Fraley 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
- Park SW and Lee KW (1996)** The progeny analysis of transformed tobacco plants with TNV coat protein cDNA. *Korean J Plant Tissue Culture* 23: 199-204
- Park SW, Lee KW, Kim NW, Park EK (1996)** Development of tobacco mosaic virus-resistant tobacco plants by introducing a TMV coat protein cDNA. *Korean J Plant Tissue Culture* 23: 21-26
- Park SW, Lee KW, Lee CH, Kim SS, Park EK, and Choi SY (1998)** Selectable expression of TMV resistance and responses to major tobacco disease in the fifth generation of TMV CP transgenic tobacco. *J of the Korean Society of Tobacco Science* 20: 66-70
- Van Dun CMP, Overduin B, Van Volten-Doting L, Bol JF (1988)** Transgenic tobacco expressing tobacco streak virus or mutated alfalfa mosaic virus infection. *Virology* 164: 383-389
- Vris SD, Hoge H, Bisseling T (1988)** Isolation of total and polysomal RNA from plant tissues. In SB Gelvin and RA Schilperoort, eds, *Plant Molecular Biology manual*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pp B6:1-13

(1997년 6월 18일 접수)