

## Molecular Breeding of Tobacco Plants Resistant to TMV and PVY

E. K. Park, Y. H. Kim, S. S. Kim, S. W.  
Park, C. H. Lee and K. H. Paik<sup>1</sup>

*Korea Ginseng and Tobacco Research Institute*

<sup>1</sup>*Graduate School of Biotechnology, Korea University*

## 분자생물학적 TMV 및 PVY 저항성 연초 육종

박은경 · 김영호 · 김상석 · 박성원 ·

이청호 · 백경희<sup>1</sup>

*한국인삼연초연구원*

<sup>1</sup>*고려대학교 생명공학원*

### ABSTRACT

Plant viruses of tobacco including tobacco mosaic virus (TMV) and potato virus Y (PVY) cause severe economic losses in leaf-tobacco production. Cultural practices do not provide sufficient control against the viruses. Use of valuable resistant cultivars is most recommendable for the control of the viruses. However, conventional breeding programs are not always proper for the development of virus-resistant plants mostly owing to the frequent lack of genetic sources and introduction of their unwanted properties. Therefore, we tried to develop virus-resistant tobacco plants by transforming commercial tobacco cultivars, NC 82 and Burley 21, with coat protein (CP) or replicase (NIB) genes of TMV and PVY necrosis strain (PVY-VN) with or without untranslated region (UTR) and with or without mutation. Each cDNA was cloned and inserted in plant expression vectors with 1 or 2 CaMV 35S promoters, and introduced into tobacco leaf tissues by *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404. Plants were regenerated in kanamycin-containing MS media. Regenerated plants were tested for resistance to TMV and PVY. In these studies, we could obtain a TMV-

### 초록

담배 모자이크 바이러스(TMV)와 감자 바이러스 Y(PVY) 등 식물바이러스병은 잎담배 생산에 심한 경제적 손실을 초래하고 있다. 바이러스병 방제를 위한 여러 가지 경종적 방법은 충분한 방제 효과를 얻지 못하는 경우가 많아 바이러스의 방제에는 우수한 저항성 품종의 사용이 가장 바람직한 것으로 알려져 있다. 그러나 기존의 육종 방법이 저항성 품종 개발에 항상 바람직한 것은 아닌데 그 이유는 저항성 유전자원이 없는 경우가 많고 또한 육종을 통해 유전자원의 열등한 특성이 도입될 수 있기 때문이다. 따라서 본 연구실에서는 TMV와 PVY의 여러 가지 형태의 외피단백질(CP) (비전사부분 포함 또는 제거, 비전사부분 등) 및 복제유전자(NIB) (3' 및 5' 결손 유무, 돌연변이)를 상용 담배 품종인 NC 82와 Burley 21에 형질전환시켜 바이러스 저항성 개발을 시도하였다. 각각의 유전자 cDNA를 1-2개의 35S promotor를 가진 식물발현벡타에 클로닝한 후 *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404를 이용하여 여 식물의 잎조직에 도입시킨 후 kanamycin 함유 MS 배지에서 식물체를 재분화하였다. 재분화 식물체는 TMV와 PVY에 대한 저항성 검정을 하였다. 그 결과 TMV에 저항성인 TMV CP 형질전환 식물체와 8 가지 NIB 형질전환

resistant transgenic line transformed with TMV CP and 6 genetic lines with PVY-VN cDNAs out of 8 CP and replicase genes. In this presentation, resistance rates, verification of gene introduction in resistant plants, stability of resistance through generations, characteristics of viral multiplication and translocation in resistant plants, and resistance responses relative to inoculum potential and to various PVY strains will be shown. Yield and quality of leaf tobacco of a promising resistant tobacco line will be presented.

## 1. Introduction

In tobacco cultivation in Korea, diseases caused by viruses are the most severe problems in leaf-tobacco production and limiting factors for improving leaf-tobacco quality. The yearly PVY incidence reaches 5.1 % for burley tobacco and 1.6 % for flue-cured tobacco, amounting about 5,300 million ~~billion~~ Won (5.9 million dollars). Also the quality of leaf tobacco is degraded by the virus infection because infected leaves have poor contents and physical properties as raw material for cigarette manufacturing. Economic losses caused by TMV exceed those by PVY in flue-cured tobacco plantations alone, amounting 5,800 million Won (6.5 million dollars) a year. The disease incidence is 5.3% in average, and leaf-tobacco yields decrease approximately by 50% with 30-40 % leaf quality loss if plants are infected in early stages.

There are a variety of ways to control plant viruses. In case of TMV, treatment of seedlings with milk at transplanting, sanitation, and removal of tobacco root debris may be practical control practices, but many times they are not satisfactory in the full control of TMV. PVY is transmitted by aphids in nature, and control

식물체 계통 중에 6 계통의 저항성 형질전환 식물체를 획득하였다. 여기에서는 TMV와 PVY의 접종시험을 통하여 각각의 바이러스에 대한 형질전환 담배의 계통별 저항성 정도를 조사하고, 저항성 형질전환 식물체에서의 도입 유전자 확인하며, 세대별 저항성의 유전 및 안정성을 살펴보고자 한다. 또한 유망 저항성 형질전환 계통의 식물체 내에서의 바이러스 증식 및 이동과 관련된 저항성 기작, 여러 가지 PVY 계통에 대한 저항성 유무, 수량, 생육 특성 및 주요 화학 성분 함량 등을 발표하고자 한다.

## 1. 서론

우리나라의 담배 재배에 있어서 잎담배 생산에 가장 큰 문제 중의 하나는 바이러스 병해이며 이는 또한 잎담배 품질 향상에 제한요인이 되고 있다. 감자 바이러스 Y(PVY)의 발생율은 버어리종에서는 5.1%, 황색종에서는 1.6%가 되어 금액으로는 연간 53억원 (5백9십만 달러)에 이르고 있다. 또한 이병 담배잎은 내용성분이 부실해지고 물리성이 나빠져 원료 잎담배의 품질이 크게 저하되어 결국에는 제조담배의 품질이 나빠진다. 황색종 산지에서만 발생하는 담배 모자이크 바이러스(TMV)에 의한 경제적 손실은 PVY보다 커 연간 58억원 (6백5십만)의 피해가 초래되고 있는데, 평균 발생율이 5.3%로 이병 식물체는 약 50%의 수량 감소와 초기 감염시 30-40%의 잎담배 품질의 감소가 있는 것으로 추정된다.

바이러스병 방제에는 여러 가지 방법이 있다. TMV의 경우에는 유묘의 우유처리, 위생관리, 이병 연초뿌리 잔해물의 제거 등이 실제적인 경종적 방제 방법인데 많은 경우에 있어서 TMV의 완전 방제에는 만족할 만한 수준이 되지 못하고 있다. PVY는 자연상태에서 진딧물에 의해 전염되므로 저항성 품종 이용을 제외하고는 PVY의 방제가 대부분 진딧물의 제거 및 밀도 감소와 관련이 있다. 그러나 여러 가

methods other than resistance are related to elimination and reduction of the insect vectors. Various cultural and chemical methods to control the insect vectors have been applied to be unsuccessful in fully controlling PVY infection, and thus use of resistant plants is regarded as one of the most efficient and reliable control methods.

In the breeding of resistant crops, however, resistant gene sources have not been readily available for many viruses. Also very few resistant cultivars bred have been extensively cultivated for the control of virus diseases because of inferior genes linked to target genes, rendering other agronomic traits such as qualitative and quantitative yield worse.

Development in recombinant DNA techniques in recent years has made it possible to incorporate only target genes into plants for giving new single traits including disease resistance. For virus resistance, viral genomes have been mostly used to transform plants; they are satellite RNAs, antisense RNAs, the whole or portion of viral replicase, and viral coat protein (CP) genes (Beachy, 1993). So far, a variety of crops were transformed with viral genes that show resistant to the viruses. Among them, a few transgenic crops including squash and papaya have been commercialized in recent years. However, no transgenic tobacco plants were admitted for sale except in China where virus-resistant tobacco plants are cultivating in more than 2 million acres.

## 2. TMV-resistant tobacco

### 2.1 Gene construction and transformation.

During the past five years, we have tried to develop transgenic plants resistant to TMV by using TMV coat protein (CP) cDNA using several

지 경종적 및 화학적 진딧물의 방제 방법이 효과적인 PVY 방제가 되지 못하고 있다. 따라서 저항성 품종의 사용이 연초의 주요 바이러스병 방제에 가장 실제적이고 효과적인 방제 방법으로 알려져 있다.

저항성 품종의 육성, 특히 기존의 방법에 있어서나 식물의 저항성 유전자를 이용할 경우 바이러스 종류에 따라 저항성 유전자가 발견되지 않은 경우가 많다. 또한 아직까지 바이러스 저항성 품종이 크게 상용화되지 않은 이유는 도입할 유전자와 연관되어 있는 열등한 유전자를 기존의 육종 방법으로는 완전히 배제하기가 힘들어 다른 농경적 특성 특히 수량이나 품질이 나빠지기 때문이다.

최근에 유전자 재조합 기술이 발달로 특정 유전자만을 식물체에 도입시켜 병저항성 등 새로운 특성을 부여할 수 있게 되었다. 바이러스 저항성에 있어서는 대부분이 식물의 형질 전환에 바이러스 유전자가 이용되는데, 이들 유전자는 바이러스의 위성 RNA, antisense RNA, 복제유전자의 전체 또는 일부 및 외피단백질 유전자이다 (Beachy, 1993). 지금까지 여러 작물에서 바이러스 유전자로 형질전환된 바이러스 저항성 형질전환 식물체가 개발되었다. 그 중 몇 가지 작물 (애호박 및 파파야 등)이 최근에 상용화되었다. 그러나 형질전환 바이러스 연초에 있어서는 중국에서 200만 에이커 (80만 ha)가 실제적으로 재배되어 판매되고 있을 뿐 아직까지 다른 나라에서 형질전환 연초의 판매가 허용되어 있지 않고 있는 실정에 있다.

## 2. TMV 저항성 연초

### 2.1 유전자 재조합 및 형질전환.

지난 5년간 본 연구실에서는 여러 가지 vector를 사용하여 TMV 외피단백질 유전자 (CP)를 연초에 형질전환시켜 TMV 저항성 연

vector systems. Firstly we isolated the CP gene by genetic engineering techniques, and transformed tobacco leaf tissues. Regenerated plants were tested for TMV resistance by the mechanical inoculation of the virus. A number of transformed tobacco plants were tested for resistance by inoculating TMV, and 12 transgenic plants showed resistance to TMV infection, having vector system of pSK 101 or pSK 103, and *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404 or A281 (Table 1). Among these plants only one plant to which the viral gene was introduced via a plant expression vector of pSK101 and carried by *A. tumefaciens* LBA 4404 showed high resistance to TMV, delaying symptom development up to the seed harvesting time. The constructed plant expression vector of pSK 101 was shown in Figure 1, consisting of *DraI* - *Bam*HI fragment from pBT1.3 containing TMV CP gene and 3' flanking sequence which were inserted into the pBI121 at the sites of *Sma*I and *Sac*I. The constructed gene contained kanamycin-resistant *NPT*II gene, which can be used to select transformants. The size of TMV CP cDNA inserted in pSK101 plasmid was 434

초의 개발에 주력하였다. 이를 위해 우선적으로 TMV의 CP를 유전공학기법을 이용하여 분리하고 유전자의 cDNA 구축후, 이들 유전자를 담배 잎조직에 형질전환시켜 재분화시켰다. 재분화 식물체는 바이러스를 인공 접종한 후 저항성 검정을 실시하였다. 많은 형질전환 식물체의 저항성을 검정한 결과 12 식물체가 TMV 감염에 저항성을 보였는데 이들의 식물발현벡타는 pSK 101 또는 pSK 103이었고 *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404 또는 A281를 사용하여 식물체에 형질전환한 것이었다 (Table 1). 이들 형질전환 식물체중 pSK101 발현벡타와 *A. tumefaciens* LBA 4404를 사용하여 유전자가 도입된 한 식물체가 가장 높은 TMV 저항성을 가지고 있었는데, 이 식물체는 종자 채종시까지 병징 발현을 지연시켰다. 식물발현벡타 pSK 101의 유전자 지도는 Figure 1에서 보는 바와 같이 TMV CP를 지니고 있는 PBT1.3에서 유래한 *DraI*-*Bam* HI fragment와 pBI121의 *Sma*I and *Sac*I 부위에 삽입되어 있는 3' flanking sequence로 구성되어 있다. 또한 재조합된 유전자는 kanamycin 저항성 유전자 *NPT* II가 들어 있어서 형질전환체를 선별하는데 이용되었다. pSK101에 삽입되어 있는 *TMV* CP cDNA의 크기는 434bp인데 이것은 3' terminal

Table 1. Resistant regenerated transgenic tobacco plants

Transgenic plant No.	Vector	CP cDNA (bp)	<i>Agrobacterium</i>	Tobacco
121-0	pSK 101	434	LBA 4404	NC 82
121-4	pSK 101	434	LBA 4404	NC 82
112-0	pSK 101	434	A281	KF 109
112-2	pSK 101	434	A281	KF 109
112-5	pSK 101	434	A281	KF 109
112-6	pSK 101	434	A281	KF 109
112-8	pSK 101	434	A281	KF 109
112-11	pSK 101	434	A281	KF 109
312-0	pSK 103	740	A281	KF 109
312-2	pSK 103	740	A281	KF 109
312-1	pSK 103	740	A281	KF 109

bp, which was deleted 50 bp at the 3'terminal codon.

To confirm the presence of TMV CP cDNA in the nuclei of transformants, chromosomal DNA was extracted, doubly treated with restriction endonucleases including *EcoRI* and *HindIII*, and electrophoresed in agarose gel, which was put to Southern blot hybridization. In this experiment, TMV CP cDNA was detected in the transformed plants, but not in normal tobacco plants, confirming that the viral gene was introduced into the transformed plants.

codon 부위의 50 bp가 결손되어 있는 상태이다.

형질전환 식물체의 핵내에 도입한 TMV CP cDNA의 존재를 확인하기 위해 염색체 DNA를 추출하여 restriction(제한효소) (*EcoRI*, *HindIII* 등)으로 이중 처리하고 agarose gel 상에서 전기영동하여 Southern blot hybridization을 실시하였다. 그 결과 형질전환 식물체에서 TMV CP cDNA가 전기영동한 gel 위의 특정 위치에 나타났으나 비형질전환 식물체에서는 발견되지 않아 바이러스 유전자가 형질전환 식물체에 삽입되어 있음이 확인되었다.

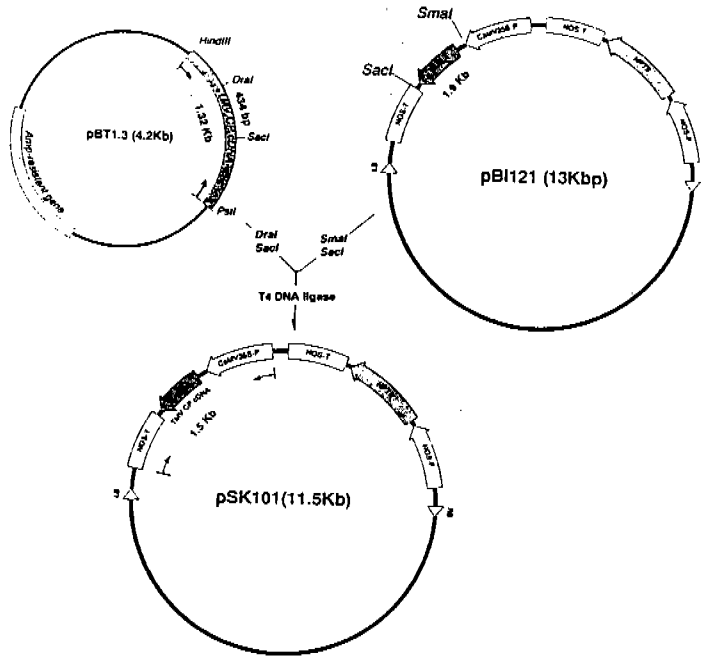


Fig. 1. Map of plant expression vector pSK plasmid.

## 2.2 Resistance of transgenic tobacco plants transformed with TMV CP gene.

As already mentioned, out of several resistant regenerated plants transformed with TMV CP genes, only one transformant, 121-0, was highly resistant to TMV infection. In this transformed

## 2.2 TMV CP 유전자로 형질전환된 연초의 저항성.

위에서 언급한 바와 같이 TMV CP 유전자로 형질전환된 여러 가지 형질전환 식물체중 한 식물체, 121-0만이 TMV에 대해 높은 저항성을 가지고 있었다. 이 형질전환 식물체에서

plant, symptom development was delayed (symptoms were developed at the later stage of the infection), and only chlorotic spots appeared on some of the upper leaves (Fig. 2). Viral density was lower by 22-30 % up to 30 days after inoculation in the diseased leaves of the transgenic plant, compared with those of non-transgenic plants, when they were assayed by inoculation test on a local lesion host, *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc. However, virus was detected in healthy-looking leaves of the transgenic plant inoculated with TMV.

는 TMV 접종 후 병징발현이 지연되어 생육후기까지 병징발현이 억제되었고 단지 상위엽에 작은 황반이 다소 형성될 뿐이었다 (Fig. 2). 병반에서의 바이러스 밀도도 비형전식물체에 나타난 증상에 비해 접종 30일 후에도 22-30%로 낮았다. 이는 국부병반 기주인 *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc에 이병부분을 접종하여 비교한 결과이다. 그러나 바이러스는 병징이 나타나지 않은 형전식물의 잎에서 발견되어 비록 병징은 나타나지 않았으나 바이러스는 연초 식물체에 미량으로 존재하는 것으로 나타났다.

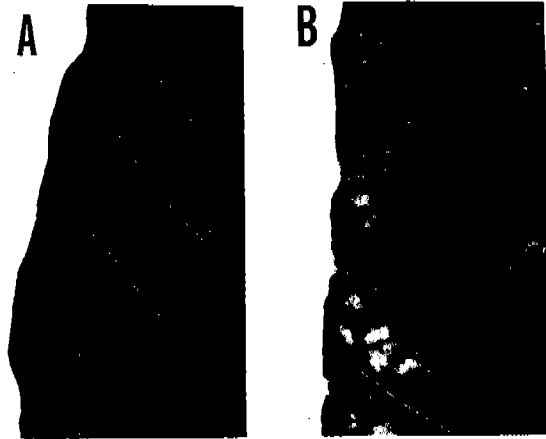


Fig. 2. Symptom development on leaves of transgenic tobacco (A) and *Nicotiana tabacum* cv. NC 82 (B) at 6 weeks after inoculation.

### 2.3 Resistance of the 1st progeny (T<sub>1</sub>)

Six transformants resistant to TMV including the highly resistant one, 121-0, were self-fertilized, and seeds were harvested. They were planted and inoculated with TMV-infected leaf sap at 2-4 true leaf stages, and transplanted into an isolated field. In this experiment, the percentages of resistant plants to the total plants inoculated were not more than 30 % at 3 weeks after inoculation except the progeny of 121-0

### 2.3 형전식물의 T<sub>1</sub>세대 저항성 검정

고도 저항성 형전식물체 121-0을 포함한 6종의 형질전환체를 자가 수정하여 종자를 수확하였다. 이들의 종자를 파종한 후 식물체가 2-4엽기에 이르렀을 때 TMV 이병 잎 즙액을 접종한 후 격리된 포장에 이식하였다. 이 실험에서 TMV에 저항성인 식물체수의 비율(저항성주율)은 121-0계통 (T<sub>1</sub>)을 제외하고는 모두 접종 3주후 30%를 넘지 못했으나, 121-0 계통은 70.1%의 저항성주율을 나타내었다 (Fig. 3).

which showed 70.1 % of resistant plants (Fig. 3). The resistance incidence was maintained over 50 % up to the later stage of infection. Contrary to the mother plant, 121-0, which showed chlorotic spot symptoms, no symptom appeared on the resistant T<sub>1</sub> plants of 121-0, even on suckers, up to the later stage of infection.

However, among the plants showing no symptom at the earlier stage of infection, chlorotic spot symptoms and mosaic symptoms appeared on leaves and on suckers, respectively, at the later stages, which was termed as delayed symptom development.

Virus was not detected in healthy-looking leaves of resistant transgenic plants when leaf sap was inoculated on the local lesion host, Xanthi-nc tobacco, and tested by serological reaction using TMV antiserum. However, virus was sometimes detected in symptomless suckers. As in the mother plant, TMV CP cDNA was also detected in all the resistant transgenic plants, suggesting that the inserted gene was inherited to the progeny.

121-0의 저항성주율은 접종 후 8주후에도 50% 이상을 유지하였다. 모식물체에서의 저항성은 약간의 병징이 발생되었으나 이와는 달리 T<sub>1</sub>의 저항성 식물체에서는 생육후기까지 본엽은 물론 액아에서도 병징이 나타나지 않았다.

초기에 병징이 없고 후기에 병징이 나타난 식물체는 모식물체와 유사하게 생육후기에 본엽에 황반이 나타났으며 액아는 약한 모자이크 증상을 보였다. 이러한 병징을 delayed symptom으로 명명하였는데 잎담배의 수량생산에는 큰 영향이 없을 것으로 사료된다.

저항성 형질식물의 건전부위의 잎을 갈아 TMV의 국부병반 식물체인 Xanthi-nc 담배에 접종하여 생물검정하거나 혈청학적 방법으로 검정하였을 때 반응이 나타나지 않아 바이러스가 검출되지 않는 것으로 나타났다. 그러나 TMV는 가끔은 병징이 나타나지 않은 액아에서는 검출되었다. 형질전환 식물체 모본(T<sub>0</sub>)과 마찬가지로 모든 저항성 형질전환 식물체에서 삽입된 TMV CP cDNA가 검출되어 삽입된 유전자가 후대로 유전되는 것을 확인하였다.

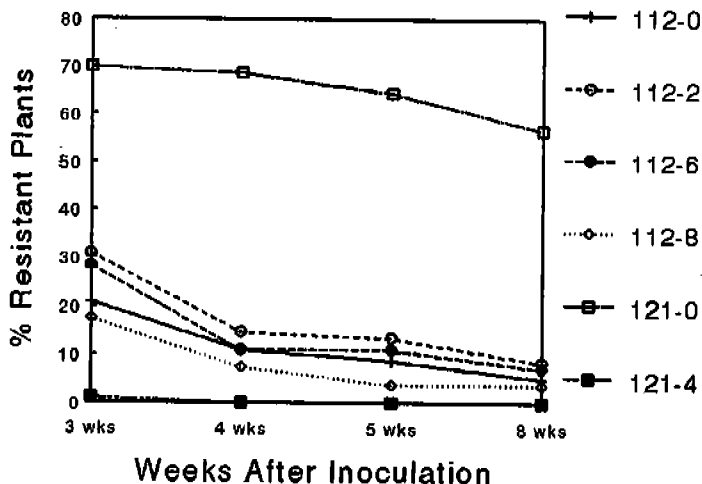


Fig. 3. Resistance to TMV in self-fertilized transgenic plants (T<sub>1</sub>).

Table 2. Percentages of resistant plants according to generations of the resistant transformant (T<sub>0</sub>), 121-0, 8 weeks after inoculation

T <sub>1</sub>		T <sub>2</sub>		T <sub>3</sub>	
Line No.	% Resistance	Line No.	% Resistance	Line No.	% Resistance
121-0	58.8	1210R-1	30.7	1210R-1-1	52.3
				1210R-1-2	30.9
				1210R-1-3	88.5
		1210R-2	20.3	1210R-2-1	93.8
				1210R-2-2	76.8
				1210R-2-3	67.4
		1210R-3	57.9	1210R-3-1	67.4
				1210R-3-2	97.0
				1210R-3-3	68.2
		1210R-4	65.1	1210R-4-1	70.3
				1210R-4-2	69.0
				1210R-4-3	80.7
		1210R-5	57.0	1210R-5-1	100.0
				1210R-5-2	62.3
				1210R-5-3	38.7
		1210R-6	60.6	1210R-6-1	99.0
				1210R-6-2	68.3
				1210R-6-3	62.6
		1210R-7	17.6	1210R-7-1	88.6
				1210R-7-2	90.4
				1210R-7-3	64.7
		1210R-8	27.6	1210R-8-1	54.6
				1210R-8-2	87.3
				1210R-8-3	47.9
		1210R-9	31.9	1210R-9-1	58.8
				1210R-9-2	61.8
				1210R-9-3	94.3
		1210R-10	36.4	1210R-10-1	75.7
				1210R-10-2	78.1



## 2.4 The progeny analysis of transformed tobacco plants.

Resistant T<sub>1</sub> plants were self-fertilized and the properties of the TMV-resistant progenies were investigated. In the T<sub>2</sub> generation, transgenic lines had 17.6 - 65.1% of resistant plants, among which 4 lines had about the same resistant plants as T<sub>1</sub> (Table 2). In the T<sub>3</sub>, only 3 out of 29 lines had less than 50%, and 5 lines had more than 90% resistance incidence.

It is not known why the TMV resistance of the transgenic plants increased much in the T<sub>3</sub> generation. In the T<sub>4</sub> generation of the highly resistance T<sub>3</sub> lines, most lines were also highly resistant, having more than 90% resistant plants, indicating that the resistance lines may be stable through the next generation. Especially 3 T<sub>4</sub> lines had almost 100% resistance. This suggests that these lines, at least in the T<sub>4</sub> generation, can be used practically in fields for the control of TMV.

In the T<sub>3</sub> generation, neither main leaves nor suckers of transgenic plants without symptom appearance had positive serological reactions to TMV antiserum as well as positive biological

## 2.4 형전식물체의 후대 검정.

저항성 T<sub>1</sub> 식물체를 자가수정하여 생산된 후세대 식물체의 특성을 조사하였다 (Table 2). T<sub>2</sub> 세대에서는 10계통의 저항성주율은 17.6-65.1%로 나타났는데 그중 4계통이 T<sub>1</sub>의 저항성주율과 유사하게 나타났다 (Table 2). T<sub>3</sub> 세대에서는 29 계통중에 3계통만이 50% 이하의 저항성주율을 보였으며 5 계통은 90% 이상의 저항성주율을 나타내었다.

T<sub>3</sub> 세대에서 일부 계통의 저항성주율이 T<sub>1</sub>나 T<sub>2</sub> 세대에 비해 급격히 증가하였는지 그 이유는 확실치 않다. T<sub>3</sub> 세대에서 고도의 저항성을 보인 3 계통의 T<sub>4</sub> 세대 역시 90% 이상의 저항성주율을 나타내어 고도의 저항성을 보이므로 이 계통의 저항성은 차세대를 통해서도 안정적인 특성을 나타내는 것이라 볼 수 있다. 특히 T<sub>4</sub>의 3계통은 거의 100%의 저항성을 가지고 있었다. 따라서 적어도 T<sub>4</sub> 세대의 저항성 계통들은 TMV의 방제를 위해 실제적으로 포장에서 이용 가능할 것으로 사료된다.

T<sub>3</sub> 세대의 저항성 계통에서 본엽이나 액아에 병징이 나타나지 않은 곳에서는 혈청학적 방법으로나 Xanthi-nc 담배를 이용한 생물검정 방법으로도 바이러스가 검출되지 않았다. 그러

Table 3. Detection of TMV in grafted T<sub>3</sub> transgenic plants

Stock	Scion	Symptom appearance	
		Stock	Scion
NC82	1210R-4-3	+	+
NC82	1210R-4-3	+	-
NC82	1210R-5-1	+	-
NC82	1210R-5-1	+	-
NC82	1210R-5-2	+	+(LC)
1210R-4-3	NC82	+	+
1210R-4-3	NC82	-	+
1210R-5-1	NC82	-	+
1210R-5-1	NC82	-	+
1210R-5-2	NC82	+(LC)	+

\* LC: local chlorotic symptom (delayed symptom development).

responses of TMV inoculation assay on Xanthine tobacco. However, in a grafting experiment, in which transgenic and non-transgenic stocks, were inoculated with TMV and grafted by healthy scions, all non-transgenic plants showed symptom development (Table 3). This aspect suggests the mechanism of resistance may be related to the inhibition of TMV multiplication, not to the block of TMV infection and movement.

### 2.5 Agronomic characteristics of transgenic plants.

In field conditions, no noticeable differences in plant growth, flowering, plant shape, and number of leaves of transgenic tobacco plants (T<sub>4</sub>) from those of normal plants were noticed. Also there was no significant difference in leaf-tobacco production, based on amount of yield and value (reflecting leaf quality), between the transgenic and nontransgenic healthy plants. Chemical components of transgenic tobacco plants (T<sub>4</sub>) were also similar to those of nontransgenic healthy plants (Table 4). This indicates the transgenic plants may not be different from the normal NC82 tobacco except resistance to TMV infection.

나 접목시험에서 TMV를 인공 접종한 저항성 형전식물이나 비형전식물 (NC 82) 대목에 건전한 담배 식물체를 접종하였을 때 비형전식물체에 TMV 증상을 보여 발병함을 알 수 있었다 (Table 3). 이 사실은 형전식물의 저항성 기작이 TMV의 감염이나 이동을 차단하는 것이 아니라 바이러스의 증식을 억제함으로써 저항성을 가지게 되는 것으로 보인다.

### 2.5 형전식물의 농경적 특성

T<sub>4</sub> 세대 TMV 저항성 형전식물은 포장조건 하에서 식물의 생육, 개화 시기, 식물의 형태, 엽수 등이 모본인 NC 82와 인식할 만한 차이가 없었음을 T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> 형질전환 식물체의 포장시험을 통해 확인할 수 있었다. 또한 잎담배의 수량과 품질을 감안한 잎담배의 생산을 금액으로 환산해 본 결과 형전식물은 건전한 NC 82와 유의성 있는 차이를 볼 수 없었으며 화학 성분에 있어서도 건전한 형전식물과 건전한 비형전식물간에 유의성 있는 차이가 없었다 (Table 4). 이러한 점은 형전식물은 TMV의 감염에 대한 저항성을 제외하고는 NC 82와 다를 바 없음을 나타내는 것이라 하겠다.

Table 4. Chemical components (%) of transgenic tobacco plants (T<sub>4</sub>)

Line	Total alkaloids	Nicotine	Reducing Sugar (RS)	Total Nitrogen	RS/nicotine
Transgenic tobacco	3.2-3.9	2.9	16.0-16.3	2.3-2.5	5.6-5.7
NC82	3.0	2.7	16.4	2.3	6.2
LSD	NS	NS	NS	NS	NS

\* NS: not significant at 1%

## 3. PVY-resistant tobacco

### 3.1 Gene construction and transformation.

Eight PVY-necrosis strain (PVY-VN) genes

## 3. PVY 저항성 형질전환 연초

### 3.1 유전자 재조합과 형질전환.

PVY 저항성 식물체 개발을 위한 재조합 유

were used for the construction of recombinant genes for PVY resistance (Fig. 3). They are full-length CP, CP with no untranslatable region (UTR), UTR (antisense), full-length replicase (NIb), 5'-deleted NIb, 3'-deleted NIb, and ADD mutant of NIb. The complementary DNA (cDNA) of PVY-VN genes were synthesized through reverse-transcription primed with oligo (dT) and polymerization using RNase H-digested template from isolated RNAs extracted from purified virus particles. The cDNAs were cloned into plant expression vector plasmids (pMBP1 or pMBP2), and introduced into tobacco plants by co-culturing tobacco leaf disks with *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 containing the plasmids

전자 구축에 사용된 유전자는 모두 8 종의 PVY-VN 유전자를 이용하였다 (Fig. 3). 즉 PVY-VN의 full-length CP, UTR이 포함되지 않은 CP, UTR (antisense), full-length replicase (NIb), 5'-deleted NIb, 3'-deleted NIb 및 NIb의 ADD mutant 등 8 종류로 이들 유전자의 cDNA는 순화된 바이러스에서 RNA를 분리한 후 해당 primer를 사용하여 역전사(reverse transcription) 와 중합 (polymerization)으로 cDNA를 합성하였다. 이 cDNA는 식물발현벡터 (pMBP1 또는 pMBP2)에 클로닝한 후 Horsch et al. (1985)의 방법에 의거하여 *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404를 잎조직에 감염시켜 해당유전자를 담배 식물체(*Nicotiana tabacum* cv. Burley 21)에 도입하였다.

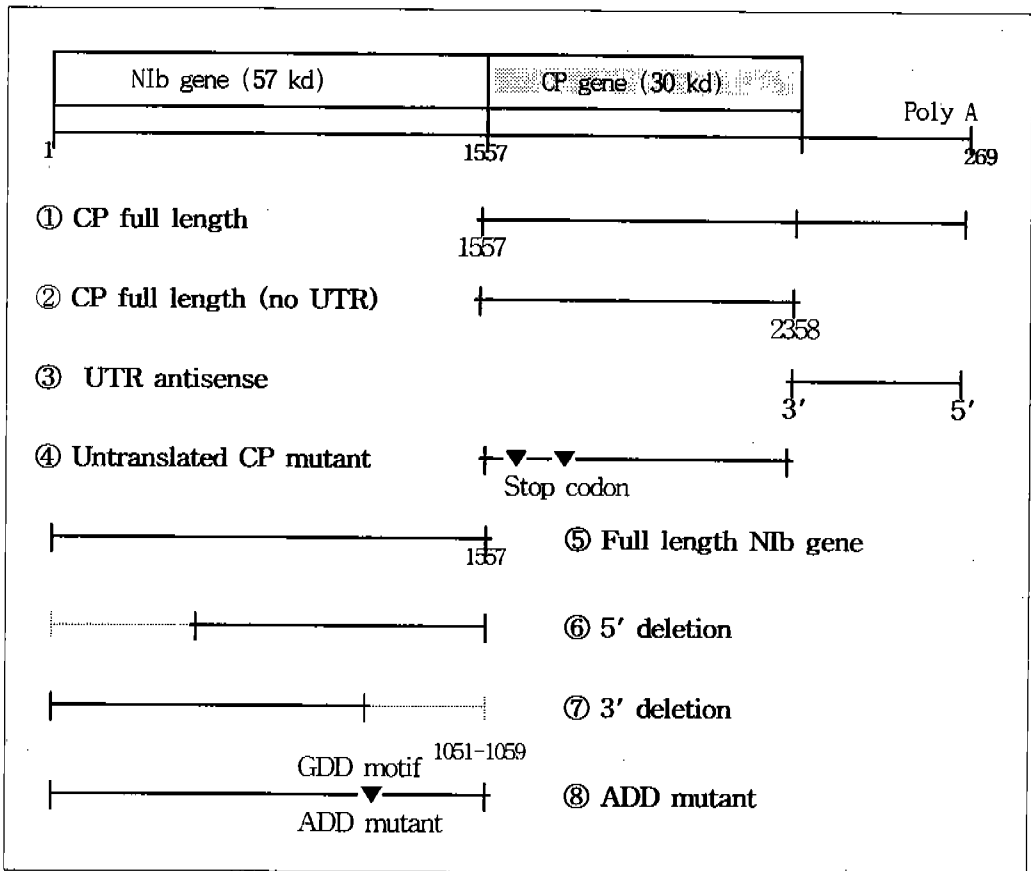


Fig. 4. Viral genes used for the development of PVY resistance

before plant regeneration, essentially based on Horsch et al (1985).

Induction of callus and shoot formation were done on solid Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 2.0 mg/l benzylamino purine and 200 mg/l kanamycin sulfate as selection agents. For root induction kanamycin-resistant regenerated shoots were transferred to hormone-free MS medium supplemented with 100 mg/l kanamycin. After root development (2 to 3 weeks), plantlets were transferred to soil and developed into the whole plant in a greenhouse. Transgenic plants resistant to PVY

켈루스 유기와 shoot의 형성은 2.0 mg/l benzylamino purine과 200 mg/l kanamycin sulfate를 함유한 Murashige and Skoog (MS) 고체 선택배지에서 수행되었으며 뿌리 유기는 kanamycin에 저항성인 shoot들을 100 mg/l kanamycin이 함유된 hormone-free MS 배지에서 수행되었다. 2-3 주후 뿌리 발달이 이루어진 후 식물체를 토양에 이식하였으며 완전하게 자랄 때까지 온실에서 키웠다. PVY에 저항성인 형질전환 식물체는 온실에서 수확까지 키웠으며 봉투를 씌워줌으로써 자가수분시켜 결실하게 하였다. 이 종자로부터 나온 식물체는 다시 온실에서 파종하여 자라게 한 다음 PVY에 대한 저항성

Table 5. Resistance of transgenic plants transformed with PVY-VN genes

Gene	Transformants (T <sub>0</sub> )		T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	
	Access No.	Resistance characters	% Resistance	Line	% Resistance
CP-full length	all susceptible symptoms		-	-	-
CP with no UTR	CPU1	no symptom	75.2	CPU1- 9	51
				CPU1-27	51
				CPU1-49	82
				CPU1-55	33
	CPU1-63	100			
	CPU1-100	100			
	CPU2	no symptom	79.5	CPU2-1~9	74-99
	CPU3	delayed symptom	34.7	not tested	
CP (no UTR) -antisense	CPU-A1	no symptom	0.8	not tested	
UTR antisense	all susceptible symptoms		-	-	-
Untranslated CP mutant	TGA1	no symptom	75.0	TGA1-1~5	72-100
	TGA2	no symptom	16.7	not tested	
	TGA3	no symptom	11.1	not tested	
NIb-full length	2NS-1	no symptom	76.7	2NS-1-1~19	9-100
	2NS-2	delayed symptom	32.5	not tested	
	2NS-3	delayed symptom	5.0	not tested	
NIb-3' deleted	N3'-1~7	no symptom	0-65.7	in the process of test	
NIb-5' deleted	N5'-1~3	no symptom	22.2-81.2	in the process of test	
NIb-ADD mutant	ADD-1	no symptom	25.9	not tested	
	ADD-2	no symptom	58.1	in the process of test	
	ADD-3	no symptom	18.5	not tested	

were fully grown in a greenhouse and self-fertilized to produce seeds. The progenies were grown and tested for resistance to PVY in the greenhouse.

### 3.2 Resistance of transgenic plants.

Regenerated plants were tested for resistance to PVY by inoculating PVY-infected plant sap. Resistant transformants were obtained from 6 genes out of 8 genes transformed; full-length CP and antisense UTR had no resistance (Table 5).

Resistant plants had no or delayed symptom development up to the later stage of infection. The resistance was diversified in the T<sub>1</sub> generation, showing that the progenies of the transformants with delayed symptom development generally had lower percentages of resistant plants. The T<sub>1</sub> progenies with CP (with no UTR), untranslated CP, full-length NIb, 3'-deleted NIb, and 5'-deleted NIb contained lines of about 75 % resistance. These lines may be transformed with 1 copy of the corresponding gene, and segregated 3 to 1 in the T<sub>1</sub> generation according to the Mendel's law of segregation. Several T<sub>2</sub> lines derived from these T<sub>1</sub> lines had 100 % resistance, supporting the above hypothesis.

### 3.3 Verification of introduced genes in transgenic plants.

Polymerase chain reaction (PCR) analysis was used for the detection of the introduced gene, using the same primer sets for the genes. Two specific primers derived from *nptII* gene sequences were used to detect a 0.7 kb fragment. And also two specific primers for direct detection of each gene were used for PCR analyses. The amplified DNA samples were then fractionated by electrophoresis on 0.8% agarose

검정을 수행하였다.

### 3.2 형질전환 식물체의 저항성.

형질전환 식물체는 PVY에 감염된 잎의 즙액을 접종한 후 발병유무를 조사하여 저항성을 조사하였다. 그 결과 8종의 PVY 유전자가 도입된 형질전환체 중 full-length CP와 antisense UTR를 제외한 6종의 형질전환체가 PVY에 저항성을 나타내었다 (Table 5).

저항성 형질전환 식물체는 감염 후기까지 병징이 나타나지 않거나 병징 발현이 지연되었다. T<sub>1</sub> 세대에서는 저항성이 분화되었는데 대체로 T<sub>0</sub>세대에서 저항성이 낮은 형질전환체 (delayed symptom이 나타난 식물체)의 후대가 저항성주율이 낮게 나타났다. T<sub>1</sub> 세대에서는 CP (no UTR), untranslated CP, full-length NIb, 3'-deleted NIb, 및 5'-deleted NIb의 형질전환 계통들은 약 75 %의 저항성주율을 보이는 계통들이 있었는데 이러한 계통들은 아마도 해당 유전자가 1 개 들어가서 멘델의 분리의 법칙에 의해 T<sub>1</sub> 세대에서 3:1로 저항성이 분리되지 않았나 생각된다. 이러한 T<sub>1</sub> 계통들의 T<sub>2</sub> 세대에서는 100%의 저항성주율을 보이는 계통들이 간혹 있었다.

### 3.3 형질전환 식물체에 도입된 유전자 확인.

도입된 유전자의 cDNA 합성에 이용된 primer를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR) 분석 방법으로 형질전환체에 도입된 유전자를 검정하였는데, 그 한 가지는 *nptII* 유전자로부터 유래하는 것으로 0.7kb fragment를 검정하는 것이며 다른 한 가지는 도입된 유전자를 직접 검정하는 primer이다. 증폭된 DNA 시료는 0.8% agarose gel 상에서 전기영동하여 검정하였다. 증폭된 DNA 산물이 병징 발현이

M + - 1

18

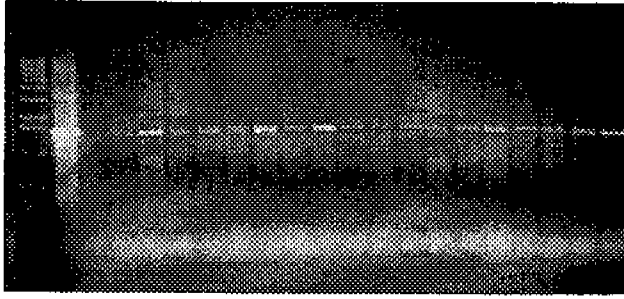


Fig. 5. Detection of PVY-VN Nib gene in the T<sub>1</sub> transgenic plants by PCR analysis. M: 1 kb ladder, +: positive control, -: negative control (a healthy untransformed plant), 1-18: resistant transgenic plants.

gel. Amplified product could be detected from all of the resistant transformants which showed no symptom or delayed symptom development and also in T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub>, the inserted genes could be detected in resistant transgenic plants by PCR analyses, but not from the non-transformed plants (Fig. 5). This indicates that the genes inserted were inherited to the progenies.

### 3.4 Characteristics of resistance of transgenic plants to PVY.

The transgenic tobacco lines (CPU1-63, CPU1-100) with CP with no UTR, which had 100% resistance in the T<sub>2</sub> generation, were further tested for PVY resistance in the next generation to examine the characteristics of resistance to PVY infection.

No PVY disease occurred in T<sub>3</sub> transgenic lines in the field up to 10 weeks after mechanical inoculation (Table 6), as no symptom was observed on main leaves and suckers of the transgenic plants. This indicates that the transgenic lines are homogeneous. In aphid transmission, no transgenic plants were infected by PVY, while 15 out of 20 plants of Burley 21 were infected.

없거나 지연형의 병징 발현을 보인 모든 저항성 형질전환식물체에서 확인된 반면 비형질전환식물체에서는 발견되지 않았다 (Fig. 5). 이는 이 실험에서 유전자 조작에 의해 도입된 바이러스의 유전자가 다음 세대로 유전되었음을 나타내는 것이라 할 수 있다.

### 3.4 형질전환 식물체의 PVY에 대한 저항성 특성.

PVY의 CP (no UTR)로 형질전환된 형질전환연초 계통 (CPU1-63, CPU1-100)은 T<sub>2</sub> 세대에서 100%의 저항성주율을 보였는데 이들 계통을 대상으로 다음 세대에서의 저항성과 여러 가지 특성들을 조사하였다.

T<sub>3</sub> 세대에서는 형질전환 식물체는 인공접종 10주후까지 본엽이나 액아에 아무런 증상을 나타내지 않고 계통내 모든 식물체에서 병발생이 되지 않는 100%의 저항성주율을 나타내었다 (Table 6). 이러한 점은 형질전환 계통이 유전적으로 균일함을 반영하는 것이라 생각된다. 진딧물 전염 실험에서도 형질전환 계통들은 20개체중 하나도 이병되지 않은 반면 비형질전환식물인 Burley 21은 20개체중 15개체가

This suggests that the transgenic plants may be stable in PVY resistance in natural growth conditions, in which PVY is usually transmitted by aphids.

Resistance of the transgenic lines to several strains of PVY was also tested. All of the transgenic lines tested showed similar responses

PVY에 이병되었다. 이것으로 보아 PVY 저항성 형질전환 계통은 진딧물에 의해 전염되는 자연상태에서도 안정된 저항성을 나타낼 것으로 생각된다.

이들 형질전환 계통이 여러 가지 PVY 계통들에 대해서도 저항성을 나타내는지를 조사한 결과, 모든 형질전환 계통들이 PVY의 계통들

Table 6. Resistance of T<sub>3</sub> lines of the transformant with CP with no UTR tested by mechanical inoculation and aphid transmission

Line	% Resistant plants after mechanical inoculation			Aphid transmission (Infected/inoculated plants)(%)
	4 weeks	6-8 weeks	10 weeks	
63- 1	100	100	100	0/20 (0)
63- 9	100	100	100	0/20 (0)
63-15	100	100	100	0/20 (0)
100-2	99	100	100	0/20 (0)
Burley 21	0	0	0	15/20 (75)

\* Plants were mechanically inoculated with PVY-infected plant sap before transplanting.

\* Three *Myzus persicae* adults for each plant were used for PVY transmission.

to PVY strains, they were not infected with PVY-VN and PVY strain N (originated from the Netherlands), but 1 to 3 and 1 to 4 out of 10 plants were diseased with strain NN from USA and Chile strain, respectively (Table 7). However, the symptoms caused by both strains were mild, showing chlorotic spots. This suggests that the

에 대해 유사한 반응을 보였다. 즉, PVY-VN이나 네델란드 계통 PVY-N에 의해서는 병징이 발현되지 않았으나 미국 계통 PVY-NN이나 칠레 계통에 의해서는 10 개체중 1-3개체 또는 1-4개체가 이병되었다 (Table 7). 그러나 후자의 두 계통 의한 생긴 병징은 약하여 황반증상만이 나타났다. 이러한 결과는 이들 형질전

Table 7. Resistance to the transgenic lines (T<sub>3</sub>) to PVY strains

Line	No. of symptomatic/inoculated plants			
	VN	N	NN	Chile
63- 1	0/10	0/10	1/10	3/10
63- 9	0/10	0/10	1/10	1/10
63-15	0/10	0/10	2/10	4/10
100-2	0/10	0/10	3/10	4/10
Burley 21	10/10	10/10	10/10	10/10

\* Plants were mechanically inoculated with PVY-infected plant sap.

\* VN: from Korea, N: from the Netherlands, NN: from USA, Chile: from Chile

transgenic lines were resistant to all of the PVY strains tested.

Other characteristics related to PVY resistance were also examined. When the transgenic plants were inoculated with different inoculum concentrations, 2, 10,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ , and  $10^5$  dilutions of infected plant sap, no plant showed symptom development at low as well as high concentrations.

In a graft transmission experiment, PVY infection did not occur in the resistant transgenic plants grafted to Burley tobacco plants infected with PVY. However, healthy Burley 21 plants were rarely infected with PVY when they were grafted to the resistant transgenic plants inoculated with PVY. These results suggest that PVY multiplication may be greatly inhibited in the transgenic plants.

### 3.5 Usability of transgenic plants for the control of PVY.

Agronomic characters such as resistance to other diseases, growth status, yield and chemical components were investigated to determine the usability of the transgenic plants in the practical cultivation.

All of the transgenic lines resistant to PVY showed the same responses to other diseases such as TMV, black shank, powdery mildew, and bacterial wilt as the standard cultivar, Burley 21, of Korea (Table 8). Hypersensitive local lesions were formed on inoculated leaves by TMV at room temperature, while systemic necrosis occurred at high temperature (over 28 °C). They were susceptible to major diseases as Burley 21.

Agronomic characters (stalk height, number of leaves per plant, days to flowering, and mid-vein rate) and yield of tobacco leaves were not significantly different between Burley 21 and the

한 식물체는 각종 PVY 계통에 대해서 저항성을 보일 것으로 생각된다.

PVY에 대한 저항성과 관련된 다른 특성들도 역시 조사되었는데, 접종 농도를 달리하여 (이병 식물즙액을 2, 10,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ 로 희석) 접종하였을 때에 접종농도가 저농일때나 고농도일때나 모두 발병되지 않아 접종원의 농도와 병발생관계는 무관한 것으로 생각되었다. 또한 접목접종 실험에서 형전식물체나 비형전식물체인 Burley 21를 대목으로 하고 건전한 접수를 접목한 후 대목에 PVY를 접종한 결과 형질전환 접수에서는 전혀 발병되지 않았으며 형질전환 대목에 Burley 21가 접수로 접목된 경우에는 일부 접수에서 병징이 발현되었다. 이러한 결과는 PVY의 증식이 형질전환 식물체에서 대단히 억제되었음을 나타내는 것이라 하겠다.

### 3.5 PVY 방제로 본 형전식물체 유용성

여러 가지 경종적 특성, 즉 다른 병해에 대한 저항성, 생육 특성 및 수량 그리고 연초 잎의 주요 화학적 성분을 조사하여 실제 경작에 있어서 형전식물 계통의 유용성을 조사하였다.

PVY에 저항성인 모든 형전식물 계통은 TMV, 담배 역병, 흰가루병 (백분병) 및 입고병에 대해 모본이며 우리나라의 표준 품종인 Burley 21과 같은 특성을 보여주었다 (Table 8). 형전식물은 Burley 21과 같이 TMV에 대해서 상온에서는 과민성 국부 병반 증상의 저항성 반응을 보였으나 고온 (28°C 이상)에서는 전신 괴사가 발생하였으며, 다른 조사한 병해에 대해서는 모두 감수성으로 나타났다.

농경적 특성으로 경장, 개체당 엽수, 개화일수, 중골비 등과 잎담배의 수량은 형전식물과 Burley 21과 유의성 있는 차이가 없는 것으로 나타났다. (Table 9). 또한 담배 잎의 주요 화학적 성분인 알칼로이드 함량, 니코틴 함량,



Table 8. Resistance of the transgenic lines (T<sub>3</sub>) to major tobacco diseases by artificial inoculation

Lines	TMV		Black shank	Powdery mildew	Bacterial wilt
	Normal	High Temp.			
Burley 21	HR	SN	S	S	S
All transgenic lines	HR	SN	S	S	S

\* HR: hypersensitive response (local lesion formation), SN: systemic necrosis.  
S: Susceptible

transgenic lines resistant to PVY (Table 9). Also major chemical components of tobacco leaf were not different between the transgenic and non-transgenic plants (Table 10). All of these results suggest that there may be no additional change of agronomic characters owing to the gene transformation in this study except the resistance to PVY infection, and cultivation methods for the transgenic lines may follow those for the original cultivar, Burley 21.

전질소 함량, 질소대 니코틴의 비 등도 형질식물과 비형질식물간에 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다 (Table 10). 이러한 모든 결과로 볼 때 본 연구에서 외래 유전자의 형질전환에 따른 특성은 PVY에 대한 저항성을 제외하고는 인식할 만한 변화가 없는 것으로 생각된다. 따라서 새로운 품종의 육성에 따른 경종적 방법의 변화도 없어서 형질전환 식물의 재배는 기존의 Burley 21의 표준 재배법에 준하면 될 것이다.

Table 9. Comparison of agronomic characters between the transgenic lines (T<sub>3</sub>) and Burley 21

Line	Stalk height (cm)	Leaves/plant	Days to flowering	Mid-vein rate (%)	Yield index relative to Burley 21
63-1	140	23.2	68	29.9	101
63-9	144	24.3	69	30.3	98
63-18	146	23.2	68	30.4	98
100-2	145	23.6	69	30.9	101
Burley 21	144	23.3	68	29.6	100
LSD	NS	NS	NS	NS	NS

#### 4. Conclusion

The transgenic tobacco plants transformed with TMV CP and PVY CP (with no UTR) genes showed stable resistance to TMV and PVY, respectively, through generations. All of the resistant transgenic plants had the inserted genes, indicating that the resistances were inherited to the next generations. In the resistant transgenic

#### 4. 결 론

TMV CP나 PVY CP (no UTR) 유전자로 형질전환된 담배 식물체는 각각의 바이러스에 대해 매우 안정적인 저항성을 여러 세대에 걸쳐 보여주었다. 모든 저항성 형질전환 식물체에서 도입된 유전자가 존재함이 확인되었는데 이는 이들 저항성이 다음 세대로 유전되는 것을 나타내는 것이다. 저항성 형질전환 식물체

Table 10. Major chemical components of leaves of the transgenic lines (T<sub>3</sub>)

Line	Total alkaloids(%)	Nicotine (%)	Total nitrogen (%)	Total nitrogen/ nicotine
63-1	3.44	2.94	3.26	1.1
63-9	3.47	3.01	3.20	1.1
63-18	3.42	2.97	3.15	1.1
100-2	3.51	3.10	3.23	1.1
Burley 21	3.42	3.00	3.29	1.1
LSD	NS	NS	NS	NS

plants, viral concentrations appeared to be extremely low, probably owing to the inhibition of viral replication, so that symptom expression might be very limited. Appearance of mild chlorotic spot symptoms in some cases of TMV-resistant transgenic plants also support that the resistant mechanism may be related to the inhibition of viral multiplication. The PVY-resistant transgenic plants were not infected by PVY through aphid transmission and graft transmission as well as mechanical inoculation, and resistant to various PVY strains. All of these results suggest that the resistance may be stable in variable field conditions.

The TMV- and PVY-resistant transgenic plants had similar agronomic characters (growth characteristics, yield, and resistance to other major pathogens) to the original tobacco cultivars, NC 82 and Burley 21. In this respect, cultural practices may not be altered for cultivating new transgenic lines, which may be advantages of genetically engineered breeding over conventional breeding. In case of PVY-resistant transgenic plants in our study, various lines with various genes other than PVY CP (with no UTR) were developed. These lines may be alternatives if there is any drawbacks in the CP-transformed transgenic lines.

The resistant transgenic plants can be

에서는 바이러스의 밀도가 매우 낮은 것으로 나타났는데 이는 바이러스의 복제가 억제된 때문으로 생각되며 이에 따라 병징 발현이 매우 제한되었다고 여겨진다. 약간의 TMV 저항성 형질전환 식물체에서 약한 황반증상이 발현되는데 이러한 사실이 이들 식물체의 바이러스에 대한 저항성기작이 바이러스의 증식 억제와 상관이 있음을 뒷받침하고 있다. PVY 저항성 형질전환 연초는 즙액접종뿐만 아니라 진딧물 전염에 의해서나 접촉 전염에 의해서도 발병되지 않았고, 여러 가지 PVY 계통들에 대해서도 저항성을 보였다. 이러한 모든 결과로 보아 이 저항성 연초의 저항성이 포장 상태에서 안정적일 것으로 본다.

TMV나 PVY에 저항성인 형질전환 식물체는 모두 여러 가지 경종적 특성(생육 특성, 다른 주요 병해에 대한 저항성)이 원래의 연초 품종인 NC 82와 Burley 21과 별다른 차이가 없는 것으로 나타났다. 이러한 점에서 새로운 형질전환 식물의 개발로 인한 경종적인 변화는 없을 것으로 생각되는데 이는 기존 육종에 비해 유전공학적 기법에 의한 육종의 이점이라 여겨진다. 본 연구에서 PVY 저항성 형질전환 식물의 경우 PVY CP (no UTR) 이외에도 여러 가지 유전자가 삽입된 저항성 형질전환 식물체가 개발되었다. 이러한 계통들은 CP로 형질전환된 계통에 이상이 발견될 경우 즉시 대체될 수 있을 것으로 판단된다.

저항성 형질전환 식물체는 바이러스의 방제

effectively used for the control of virus diseases, contributing to the increase of yield and quality of tobacco, and to the stable leaf-tobacco production. Also cultural control practices such as elimination of inoculum sources and pesticide sprays for controlling insect vectors can be minimized, decreasing control cost and environmental problems.

를 위해 효과적으로 사용될 수 있어서 담배의 수량 증대나 품질향상에 기여할 수 있으며 안정적인 잎담배 생산 기반을 다지는데 도움이 될 수 있다. 또한 바이러스 방제를 위한 경종적 방제나 매개 곤충을 방제하기 위한 농약 살포 등 방제행위에 따른 비용을 절감할 수 있으며 환경 오염을 줄일 수 있다는 장점이 있다.

## REFERENCES

- Abel, P. P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T., Beachy, R. N. (1986) *Science* 232:738.
- An, G. (1987) *Methods Enzymol.* 153, 293-305
- Beachy, R. N., Loesch-Fries, S., and Tumer, N. E. (1990) *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 451-474
- Beck, E., Ludwig, G., Averswald, E. A., Reiss, B., and Schaller, H. (1982) *Gene* 19, 327-336
- Donson, J., Keamey, C. M., Turpen, T. H., Khan, I. A., Kurath, G., Turpen, A. M., Jones, G. E., Dauson, W. O., Lewandowski, D. J. (1993). *Molecular Plant Microbe Interactions* 6: 635-642.
- Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19, 1349
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffman, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G., and Fraley, R. T. (1985) *Science* 227, 1229-1231
- Lindbo, J. A., and G. W. Dougherty. 1992. *Mol. Plant-Micro. Inter.* 5: 144-153
- Maiti, I. B., Murphy, J. E., Shaw, J. G., and Hunt, A. G. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6110-6144
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962) *Physiol. Plant* 15, 473-497
- Powell-Abel, P., R. S. Nelson, N. Hoffman, S. G. Rogers, R. T. Fraley, and R. N. Beachy. 1986. *Science* 232: 738-743
- Reimann-Philipp, U., Beachy, R. N. (1993) *Molecular Plant Microbe Interactions* 6: 323-330
- Robaglia, C., Durand-Tardif, M., Tronchet, M., Boudazin, G., Astier-Manificier, S., and Casse-Delbart, F. (1989) *J. Gen. Virol.* 70, 935-947
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467
- Smith, H. A., Swaney, S. L., parks, T. D., Wernsman, E. A., and Dougherty, W. G. (1994) *Plant Cells* 6: 1441-1453.