

자리공 항바이러스 단백질 II 유전자의 형질전환에 의한 연초의 바이러스 저항성 품종 개발 (I)

강신웅 · 이영기 · 이기원 · 박성원 · 이청호*
한국인삼연초연구원 원료연구부
(1999년 6월 7일 접수)

Development of Virus Resistant Tobacco Plant by Transformation of the Pokeweed Antiviral Protein II cDNA (I)

Shin Woong Kang, Yung Gi Lee, Ki Won Lee, Seong Weon Park
and Cheong Ho Lee*
Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea
(Received June 7, 1999)

ABSTRACT : Pokeweed antiviral protein II (PAP-II) encoding cDNA was synthesized by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) from *Phytolacca americana* leaf. The PAP-II cDNA fragment of 974bp was subcloned to pBluescript II SK- *Sma*I site and the inserted PAP-II cDNA fragment was sequenced by dideoxy sequencing method. The number of nucleotides of PAP-II cDNA coding region containing start and stop codon was 933bp. To develop a virus-resistant tobacco plant, PAP-II cDNA fragment was inserted to pKGT101B and the insertion of PAP-II cDNA fragment was confirmed by restriction enzyme analysis and colony PCR.

Key words : *Phytolacca americana*, PAP-II cDNA, virus resistant

바이러스에 의한 질병을 해결하기 위한 연구가 분자생물학의 발전으로 많은 진척을 나타내고 있다. 그 중 바이러스 유전자를 발현벡터에 삽입시켜 식물체내로 도입시킴으로써 바이러스에 저항성을 지니는 형질전환 식물체를 만드는 방법이 성공한 이래로 많은 방법들이 소개되었다 (Powell 등, 1986). 그러나 바이러스 유전자를 식물체내에 도입시켜 항바이러스능을 지니는 형질전환 식물체를 만들 경우, 도입시킨 바이러스 유전

자에 의하여 새로운 돌연변이가 유발되고 이로 인한 새로운 형태의 바이러스가 생길 수 있다는 경고가 있고 난 후(USDA-APHIS workshop, 1995), 항바이러스 단백질에 관한 연구는 보다 많은 과학자들에 의하여 각광을 받게 되었다.

자리공에서 발견된 단백질인 pokeweed antiviral protein (PAP)는 ribosome inactivating protein (RIP)의 일종으로 항바이러스능을 지니고 있음이 알려졌으며, RIP는 이미 10개 이상의 식물 속에

*연락처 : 305-345, 대전광역시 유성구 신성동 302, 한국인삼연초연구원 원료연구부

*Corresponding author : Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, 302 Shinsong-Dong, Yusong-Ku, Taejon 305-345, Korea

서 발견되어졌다. *Cucurbitaceae*, *Phytolaccaceae* 및 *Caryophyllales* 속의 식물의 경우, 조직 100 g 내에 수 mg에서 수백 mg 정도의 농도로 존재하는 것으로 보고된 바 있다(Barbieri 등, 1993). *Phytolacca americana* (미국자리공)에서 발견된 PAP는 분자량이 약 30,000 dalton 정도 되는 single chain으로 이루어진 basic protein으로 type I RIP에 속하며, 봄철에 미국자리공의 잎에서 주로 발견되는 기본적인 형태의 단백질로서 잎의 mesophyll cell의 세포벽 matrix에 존재한다(Irvine 등, 1980). 또한 PAP-S (seed form)는 씨에서 발견되는 단백질이며, PAP-II (late summer form)는 여름철에 주로 많이 생산되는 단백질로 알려졌다. 그러나 시기별로 약간의 차이는 있으나, PAP-I과 마찬가지로 주로 잎 부위에서 발견되는 단백질로 밝혀졌다. PAP이 지닌 RIP로서의 작용기작은 site-specific RNA N-glycosidase로서 진핵세포의 경우는 28S rRNA, 원핵세포는 23S rRNA 내에 존재하는 conserved loop 내의 한개의 adenine을 depurination 시킴으로써 translocation step을 방해하여 단백질 합성을 저해한다고 알려졌다(Montanaro 등, 1975; Eiklid 등, 1980; Endo와 Tsurugi, 1987; Bonness 등, 1994). 또한 PAP은 현재까지 알려진 RIP중 항바이러스능을 동시에 지니고 있는 단백질로 보고된 바 있으나(Stirpe 등, 1992), 항바이러스능을 나타내는 정확한 기작에 대해서도 아직까지 밝혀져 있지 않다. 또한 PAP-II에 관해서는 PAP-I에 비해 알려진 바가 그리 많지 않은 상태이며, 현재 이 단백질에 대한 연구는 계속 진행중에 있다.

본 연구에서는 PAP 유전자를 식물체로 형질전환시켰을 경우 광범위한 바이러스 저항성을 나타낸다는 보고(Lodge 등, 1993)를 바탕으로, 이 중 PAP-II가 지니고 있는 항바이러스능을 연초대로 형질전환시켜, 바이러스에 대하여 저항성을 지니는 황색종 담배 품종을 개발하고자, 먼저 RT-PCR 방법에 의하여 미국자리공 잎에서 PAP-II cDNA를 클로닝하고, 염기서열을 분석한 뒤, PAP-II cDNA 가닥을 식물발현벡터에 삽입시켜, 연초 식물체에 형질전환시킬 수 있는 근간이 되는 연구를 수행하고자 하였다.

재료 및 방법

미국자리공 잎으로부터의 total RNA 분리 및 RT-PCR에 의한 PAP-II cDNA 가닥의 합성

액체 질소하에서 분말로 만든 미국자리공(*Phytolacca americana*)잎으로부터 acid guanidium thiocyanate-pheno-chloroform 추출법(Chomczynski와 Sacchi, 1987)을 사용하여 total RNA를 분리하였으며, PAP-II cDNA 유전자 가닥을 클로닝하도록 design한 antisense primer (5'-CAG GAT CCA GCT GAT TTG AAT CAC-3')를 넣어주고 cDNA synthesis kit (Boehringer Mannheim 사 제품, Germany)를 이용하여 1st strand cDNA 가닥을 합성하였다. 합성 반응이 끝난 후 PAP-II sense primer (5'-GCT TCG GAT CCG CAA CAG GGA ATG-3') 및 PAP-II antisense primer 10 pmole씩을 첨가한 후 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. 94°C 30초, 55°C 1분, 72°C 1분 30초로 35 cycle을 반복 반응시켰으며, 반응 종료후 EtBr이 첨가된 1% agarose gel하에서 전기영동을 실시하였고, 합성된 가닥의 분리를 위해서는 2% agarose gel을 사용하였다.

합성된 PAP-II cDNA 가닥의 subcloning 및 염기서열 분석

합성된 PAP-II cDNA 가닥을 glass powder등을 이용하여 gel로부터 분리 정제한 다음, Klenow 반응을 시켜 fill-up을 시킨 뒤, 재차 순화하였다. 순화된 PAP-II cDNA 가닥을 재조합 벡터 pBluescriptII SK-의 *Sma*I 위치에 T₄ DNA ligase를 이용하여 삽입시키고, PAP-II cDNA 가닥이 삽입된 클론을 X-gal/IPTG를 사용하여 선발하였다. 선발된 클론으로부터 plasmid DNA를 순수분리하여 제한효소 반응을 통하여, 삽입여부 및 방향성을 확인하였다(Sambrook 등, 1989). 또한 T7 sequencing kit (Pharmacia 사 제품, U.S.A.)를 이용하여 dideoxy-sequencing 방법에 따라 PAP-II cDNA의 염기서열을 분석하였다(Sanger 등, 1977). 염기서열 분석에는 3 µg의 plasmid DNA를 0.2 N NaOH / 0.2 mM EDTA용액으로 변성시켜 사용하였으며, [α -³⁵S] dCTP 존재하에, 12°C에서 3분간

에 걸친 효소반응후, ddNTP termination mixture 를 넣어주고 37°C에서 5분간 반응 후 4 μl의 정지용액을 가하여 반응을 정지시켰다. 7 M urea를 포함한 6% polyacrylamide gel에서 전기영동시킨 후, 전조시킨 gel을 X-ray 필름에 노출시켜 나타나는 band를 읽어 염기서열을 결정하였다.

PAP-II cDNA 가닥의 식물발현벡터내 재조합 및 확인

염기서열의 분석으로 PAP-II cDNA임이 확인된 cDNA 가닥을 식물발현벡터인 pKGT101B(pBI121에서 GUS 유전자를 제거하고 35S promoter downstream 부위에 *XbaI-BamHI-XbaI-SacI* site를 만들어 놓은 벡터)의 35S promoter의 down stream 부위에 제한효소 반응후 Klenow enzyme에 의한 fill-up, T₄-ligase 반응등을 이용하여 삽입시켰으며, PAP-II cDNA 가닥의 삽입여부는 제한효소반응 및 colony PCR 방법에 의하여 확인하였다. Colony PCR에 사용한 primer는 클로닝시와 동일한 primer를 사용하였다.

결과 및 고찰

RT-PCR에 의한 PAP-II cDNA의 합성 및 subcloning

PAP-II genomic DNA는 두 개의 exon 사이에서 한 개의 intron이 존재하고 있는 형태를 지니고 있음이 보고된 바 있어(Poyet 등, 1994), genomic DNA로부터는 PAP-II cDNA를 바로 얻을 수 없으므로, 미국자리공 잎에서 추출한 total RNA (mRNA를 포함하고 있는)로부터 역전사핵산중합반응 (RT-PCR)에 의하여 974 bp의 PAP-II cDNA를 증폭하였다(Fig. 1). 미국자리공 잎에서 추출한 total RNA로부터 증폭된 PAP-II cDNA를 포함하고 있는 974bp의 band를 2% agarose gel로부터 분리한 후, Klenow enzyme을 사용하여 말단부위를 fill-up시키고, 재순화하여 pBluescript II SK-*SmaI* 위치에 T₄-DNA ligase를 사용하여 삽입시켰다. Xgal/IPTG를 사용하여 PAP-II cDNA 가닥이 삽입된 클론을 선별하였으며, 이중 *LacZ* promoter에 대하여 정방향으로 삽입된 클론을

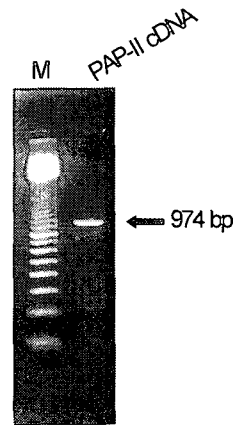


Fig. 1. 2% Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products. 974bp of PAP-II cDNA fragment was amplified by RT-PCR. Lane M, 100 base pair ladder; arrowed 974bp DNA band contains full-length PAP-II cDNA.

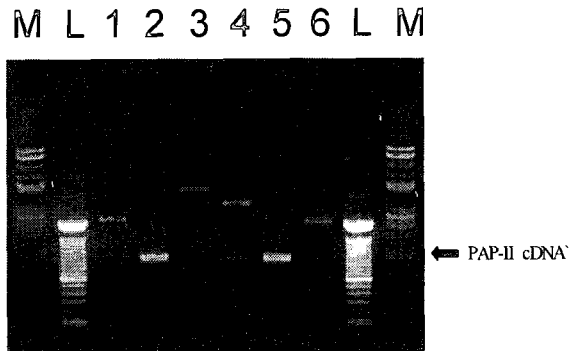


Fig. 2. Restriction pattern of p2701 plasmid DNA which containing PAP-II cDNA. Lane M, size marker (Lambda *HindIII* + Lambda *PstI*); Lane L, 100 base pair ladder; Lane 1 and 6, pBluescript II SK-*SmaI* cut; Lane 2 and 6, purified PCR product (974bp PAP-II cDNA) after Klenow enzyme reaction; Lane 3, p2701 plasmid DNA *HindIII* cut; Lane 4, p2701 *BamHI* cut

p2701로 명명하였으며, 역방향으로 삽입된 클론은 p2702로 명명하였다. 증폭된 PAP-II cDNA 가

닥의 삽입은 제한효소반응에 의하여 확인되었다 (Fig. 2).

PAP-II cDNA의 염기서열 분석

합성된 PAP-II cDNA 가닥의 염기서열을 분석한 결과 PAP-II cDNA를 클로닝하기 위해 사용한 primer 부위를 포함하여 974bp가 확인되었다(Fig. 3). 974bp 중 밑줄로 표시되어진 부분이 합성에 사용된 primer 부분이며, 5' 부분으로부터 22번째 부위의 ATG가 starting 부위이며, 전체 open reading frame은 start, end 부위를 포함하여 933 nucleotides로 이루어져 있음이 확인되었다. 이는 Poyet 등 (1994)이 발표한 PAP-II의 mRNA(Gene-

bank accession number x78628)크기와 일치하는 결과이다. 그러나 x78628의 염기서열과 비교해보면, 149의 T가 C로, 187이 A가 G로, 256의 T가 C로 551의 A가 G로, 674의 A가 T, 910의 T가 C로 바뀌어져 총 6개의 염기서열이 다른 것이 확인되었으며, 이로 인하여 N terminal로부터 42번째의 아미노산인 leucine이 proline으로, 55번째의 threonine이 alanine으로, 78번째의 phenylalanine이 leucine으로, 176번째의 glutamine이 arginine으로, 217번째의 tyrosine이 phenylalanine으로, 296번째의 tyrosine이 histidine으로 총 6개의 아미노산이 다른 것을 확인하였다(Fig. 4). x78628과 비교해 볼 때 5개의 위치에서 염기서열이 다르게 나타난

GCTTCGGATC CGCAACAGGG AATG (PAP-II sense primer)

1 GCTTCGGATC CGCAACAGGG AATGAAGATG AAGGTGTAG AAGTAGTTGG GTTGGCAATA 60
 61 TCGATATGGC TGATGCTTAC ACCACCAGCT TCTTCAAACA TAGTGTTTGA CGTTGAGAAT 120
 121 GCCACACCAG AACCTACTC TAATTTTCcG ACTAGTTTGC GAGAAGCTGT GAAAGACAAG 180
 181 AAATTGgCAT GCCATGGAAT GATAATGGCC ACAACCTCA CTGAACAACC CAAGTATGTG 240
 241 TIGGTTGACC TCAAAcTCGG ATCTGGAACA TTCACATTAG CAATCAGAAG GGGAAACTTA 300
 301 TATTTGGAGG GCTATTCTGA CATTACAAT GGAAAATGTC GTTATCGGAT CTTC AAGGAT 360
 361 TCAGAATCCG ATGCCAAGA GACCGTTTGC CCCGGGGACA AAAGCAAGCC TGGCACTCAG 420
 421 AATAATATCC CCTATGAAAA GAGTTACAAA GGGATGGAAT CAAAGGGTGG GGCTAGAACT 480
 481 AAATTAGGGT TAGGAAAGAT AACACTCAAG AGTCGAATGG GTAAAACTA CGGCAAGGAT 540
 541 GCAACGGATC gAAGCAGTA TCAAAAAAAT GAGGCTGAAT TTCCTCTTAT AGCCGTTCAA 600
 601 ATGGTACTG AGGCATCAAG GTTCAAATAC ATTGAGAACA AAGTGAAGGC TAAATTTGAT 660
 661 GATGCCAATG GGTtTCAGCC AGATCCTAAA GCTAATTCCC TAGAGAAAAA TTGGGACAGT 720
 721 GTTTCTAAGG TCATTGCAA AGTTGGCACC TCCGGTGATA GACTGTGTTAC TTTACCTGGA 780
 781 GACCTAAAAG ATGAGAATAA TAAACCTTGG ACTACGGCCA CCATGAACGA CCTTAAAGAAC 840
 841 GACATTATGG CACTCCTAAC CCACGTTACT TGCAAGGTTA AAAGTCCAT GTTCCCTGAA 900
 901 ATTATGTCCc ATTATTATAG GACTAGTATT AGTAACCTTG GTGAATTCGA GTGATTCAAA 960

CACTAAGTTT

961 TCATATCAAT GTTG 974 (3')

AGTCGACCTA GGAC (PAP-II antisense primer)

Fig. 3. Nucleotide sequences of the synthesized PAP-II cDNA fragment. Open reading frame of PAP-II cDNA containing start and stop codon has been sequenced 933bp (from 22 to 954). The start and stop codons indicates with shade and PAP-II cDNA sense and antisense primer sequences are undelined.

자리공 항바이러스 단백질 II 유전자의 형질전환에 의한 연초의 바이러스 저항성 품종 개발(I)

1 Lys Met Lys Val Leu Glu Val Val Gly Leu Ala Ile Ser Ile Trp Leu Met Leu 18
 19 Thr Pro Pro Ala Ser Ser Asn Ile Val Phe Asp Val Glu Asn Ala Thr Pro Glu 36
 37 Thr Tyr Ser Asn Phe Pro Thr Ser Leu Arg Glu Ala Val Lys Asp Lys Lys Leu 54
 55 Ala Cys His Gly Met Ile Met Ala Thr Thr Leu Thr Glu Gln Pro Lys Tyr Val 72
 73 Leu Val Asp Leu Lys Leu Gly Ser Gly Thr Phe Thr Leu Ala Ile Arg Arg Gly 90
 91 Asn Leu Tyr Leu Glu Gly Tyr Ser Asp Ile Tyr Asn Gly Lys Cys Arg Tyr Arg 108
 109 Ile Phe Lys Asp Ser Glu Ser Asp Ala Gln Glu Thr Val Cys Pro Gly Asp Lys 126
 127 Ser Lys Pro Gly Thr Gln Asn Asn Ile Pro Tyr Glu Lys Ser Tyr Lys Gly Met 144
 145 Glu Ser Lys Gly Gly Ala Arg Thr Lys Leu Gly Leu Gly Lys Ile Thr Leu Lys 162
 163 Ser Arg Met Gly Lys Ile Tyr Gly Lys Asp Ala Thr Asp Arg Lys Gln Tyr Gln 180
 181 Lys Asn Glu Ala Glu Phe Leu Leu Ile Ala Val Gln Met Val Thr Glu Ala Ser 198
 199 Arg Phe Lys Tyr Ile Glu Asn Lys Val Lys Ala Lys Phe Asp Asp Ala Asn Gly 216
 217 Phe Gln Pro Asp Pro Lys Ala Ile Ser Leu Glu Lys Asn Trp Asp Ser Val Ser 234
 235 Lys Val Ile Ala Lys Val Gly Thr Ser Gly Asp Ser Thr Val Thr Leu Pro Gly 252
 253 Asp Leu Lys Asp Glu Asn Asn Lys Pro Trp Thr Thr Ala Thr Met Asn Asp Leu 270
 271 Lys Asn Asp Ile Met Ala Leu Leu Thr His Val Thr Cys Lys Val Lys Ser Ser 288
 289 Met Phe Pro Glu Ile Met Ser His Tyr Tyr Arg Thr Ser Ile Ser Asn Leu Gly 306
 307 Glu Phe Glu *** (309)

Fig. 4. Amino acid sequences of PAP-II. Immature pokeweed antiviral protein II is composed of 309 amino acid residues. The shaded and underlined amino acid residues are different to those of X78628 (Genebank).

것은 PCR 반응시 나타날 수 있는 효소의 reading error로도 볼 수도 있으나, PAP-II cDNA를 클로닝한 다른 실험실에서도 염기서열이 x78628과 다르게 나타난 경우를 비추어 볼때 (personal communication), PCR반응에 의한 reading error 여부를 확인하기 위해서는 먼저 클로닝된 PAP-II cDNA 가닥을 사용하여 *in vitro* translation을 통해 합성된 단백질이 RIP activity를 지니는지를 확인해보고, 분리된 PAP-II의 아미노산 sequence를 부위별로 확인하는 작업이 향후 필요할 것으로 사료된다.

연초로의 형질전환을 위한 식물발현벡터로의 삽입 및 확인

PAP-II cDNA 재조합 클론인 p2701을 *HindIII*를 반응시키고 Klenow enzyme 반응에 의하여 blunt end로 만든 다음 *SacI*을 반응시켜 분리한 PAP-II

cDNA 가닥을 식물발현벡터인 pKGT101B에 삽입시켰다. 즉 pKGT101B를 *BamHI*으로 반응시키고, Klenow enzyme 반응에 의하여 blunt end로 만든 다음 *SacI*을 반응시켜 먼저 분리해 놓은 PAP-II cDNA 가닥을 T₄-DNA ligase를 사용하여 재조합하였으며, *XbaI* 과 *SacI*을 동시에 반응시키면 삽입된 약 1Kbp정도의 가닥이 나타나는 것으로 PAP-II cDNA 가닥의 삽입을 확인하였다(Fig. 5A). 또한 colony PCR을 통하여 선별된 클론을 대상으로 PAP-II cDNA 가닥의 재조합 여부를 확인하였던 바 약 970bp 정도에서 band가 나타나는 것으로 PAP-II cDNA 가닥이 식물발현벡터내로 삽입이 되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 5B). PAP-II cDNA 가닥의 삽입이 확인된 클론은 p2715로 명명하였으며, 향후 *Agrobacterium tumefaciens*에 형질전환시켜 바이러스 저항성 연초품종을 만드는데 사용하고자 하였다.

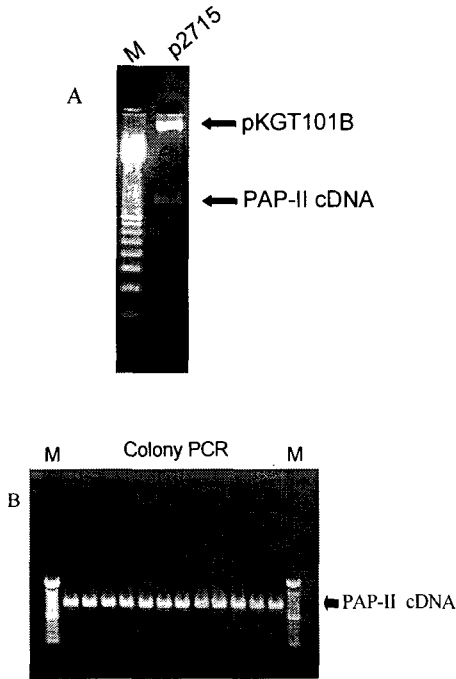


Fig. 5. Restriction enzyme pattern of p2715 plasmid DNA (PAP-II cDNA fragment inserted into pKGT101B) (A) and identification of PAP-II cDNA insertion by colony PCR (B). (A) Lane M, 100 base pair ladder; p2715 plasmid DNA *Xba*I + *Sac*I cut, (B) Lane M, 100 base pair ladder; other lanes indicate PAP-II cDNA containing clones.

결 론

미국자리공 (*Phytolacca americana*)의 잎으로부터 total RNA를 분리하였으며, 이를 이용하여 pokeweed antiviral protein II (PAP-II)의 cDNA를 역전사핵산중합반응 (RT-PCR)에 의해 합성하였다. 순수분리된 974bp의 PAP-II cDNA 가닥을 pBluescript II SK- *Sma*I 위치에 subcloning 시켰으며, 삽입된 PAP-II cDNA 가닥의 염기서열을 dideoxy sequencing 방법에 의하여 확인하였다. 그 결과 933bp에 달하는 가닥이 start codon, PAP-II, stop codon을 지니고 있음이 확인되었다.

바이러스 저항성 연초 품종을 개발하기 위하여 염기서열이 확인된 PAP-II cDNA 가닥을 식물발현백터인 pKGT101B에 재조합하였으며, PAP-II cDNA 가닥의 삽입은 제한효소 반응 및 colony PCR을 통하여 확인되었다. 향후 *Agrobacterium tumefaciens*에 형질전환시켜 바이러스 저항성 연초품종을 만드는데 사용하고자 하였다.

참 고 문 헌

- Barbieri, L., M. G. Batelli and F. Stirpe (1993) Ribosome-inactivating proteins from plants. *Bioch Biophys. Acta* 1154:237- 282.
- Bonness, M. S., M. P. Ready, J. D. Irvin and T. J. Mabry (1994) Pokeweed antiviral protein inactivates pokeweed ribosomes; implications for the antiviral mechanism. *Plant J.* 5:173-183.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Eiklid, K., S. Olsnes and A. Pihl (1980) Entry of lethal doses of abrin, ricin and modeccin into the cytosol of HeLa cells. *Exp. Cell Res.* 126:321-326.
- Endo, Y. and K. Tsurugi (1987) RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain: mechanism of action of the toxic lectin ricin of eukaryotic ribosomes. *J. Biol. Chem.* 262: 8128-8130.
- Irvin, J. D., T. Kelly and J. D. Robertus (1980) Purification and properties of a second antiviral protein from *Phytolacca americana* which inactivates eukaryotic ribosomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 200:418-425.
- Lodge, J. K., W. K. Kaniewski and N. E. Tumer (1993) Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7089-7093.

자리공 향바이러스 단백질 II 유전자의 형질전환에 의한 연초의 바이러스 저항성 품종 개발(I)

- Montanaro, L., S. Sperti, A. Mattioli, , G. Testoni and F. Stirpe (1975) Inhibition by ricin of protein synthesis *in vitro*. *Biochem. J.* 146; 127-131.
- Powell, A. P., R. S. Nelson, B. De, N. Hoffmann, S. G. Rogers, R. T. Fraley and R. N. Beachy(1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein. *Science* 232:738-743.
- Poyet, J. L., J. Radom and A. Hoeveler (1994) Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the pokeweed antiviral protein II from *Phytolacca americana* and its expression in *E. coli*. *FEBS Lett.* 347; 268-272.
- Sambrook, F., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., S. Nicker and A.R. Coulson (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463- 5467.
- Stirpe, F., L. Babieri, M. G. Batteli, M. Soria and D. A. Lappi (1992) Ribosome-inactivating proteins from plants: Present status and Future prospects. *Bio/Technology* 10:405-412.
- USDA-APHIS Workshop (1995) *Transgenic Virus-resistant Plants and New Plant Viruses*, College Park, Maryland, USA.