

## 오이 모자이크 바이러스 위성RNA의 cDNA가 도입된 형질전환 담배의 육성

이상용\* · 홍은주<sup>1</sup> · 최장경<sup>1</sup>

강원대학교 삼림자원보호학과, <sup>1</sup>강원대학교 농생물학과

### Transgenic Tobacco Plants Introduced with cDNA of Cucumber Mosaic Virus Satellite RNA

Sang Yong Lee\*, Eun Ju Hong<sup>1</sup> and Jang Kyung Choi<sup>1</sup>

Department of Forest Resources Protection, College of Forestry, Kangweon National University,  
Chuncheon 200-701, Korea

<sup>1</sup>Department of Agricultural Biology, College of Agriculture, Kangweon National University,  
Chuncheon 200-701, Korea

**ABSTRACT :** The cDNA of CMV-As satellite RNA was introduced into tobacco plants (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) using a binary Ti plasmid vector system of *Agrobacterium tumefaciens*. The cDNA of satellite RNA introduced into tobacco plants was detected by polymerase chain reaction (PCR) and molecular hybridization analyses. Symptom development was distinctly suppressed in the transgenic tobacco plants when inoculated with CMV-Co. CMV concentration in the transgenic tobacco plants was decreased to 1/40 of non-transgenic tobacco plants. The kanamycin resistance gene of the transgenic tobacco plants was also detected in the progeny.

**Key words :** cucumber mosaic virus, satellite RNA, binary Ti plasmid vector, transgenic plants.

오이 모자이크 바이러스(cucumber mosaic virus, CMV)는 3종의 계놈RNA와 1종의 서브계놈RNA를 포함하고 있는 직경 30 nm의 구형 바이러스이다. CMV의 계통에 따라서는 이들 계놈RNA 이외에 위성RNA (satellite RNA)를 가지고 있는 것이 있다(9). 위성RNA는 CMV의 병징발현에 관여한다는 사실이 입증되었는데 (8, 15, 16, 22, 29), 위성RNA의 종류에 따라서는 CMV의 병징을 완화시키는 효과도 있는 것으로 알려져 있다(14). 이와 같은 위성RNA의 기능을 이용하여 위성RNA를 식물체 유전자에 도입하여 발현시킴으로써, CMV에 대한 저항성 식물체를 육성하기 위한 연구들이 성공적으로 수행되고 있다 (1, 10, 17, 19, 20, 23).

최 등 (4)은 퇴록반문의 쑥부쟁이(*Aster yomena*)로부터 CMV-As 계통을 분리하였고, 이 CMV가  $0.136 \times 10^6$  dalton의 위성RNA를 갖고 있음을 보고하였다(24). 이 위성RNA는 polymerase chain reaction (PCR)에 의한 cDNA 합성 및 염기서열의 분석결과,

전장 382개의 염기로 구성되어 있다는 것이 밝혀졌고 (6), 기 보고된 CMV-Y 계통의 위성RNA(8)와는 77%의 상동성이 있는 것으로 나타났다(6). 한편 이 등 (18)은 CMV-As의 위성RNA를 이용한 형질전환 식물체의 육성을 목적으로 이 위성RNA-cDNA를 *Agrobacterium tumefaciens*의 binary Ti plasmid vector system에 도입시킨 바 있다.

이 연구는 CMV-As 계통의 위성RNA-cDNA를 *A. tumefaciens*의 binary Ti plasmid vector system을 이용하여 담배에 도입 발현시킴으로써, CMV에 대한 저항성을 갖는 형질전환 담배를 육성할 것을 목적으로 실시하였다.

### 재료 및 방법

**발현 vector.** CMV-As 위성RNA의 발현 vector는 *A. tumefaciens*의 binary Ti plasmid vector system을 이용하였다. 즉 외래유전자 삽입 vector는  $\beta$ -glucuronidase(GUS) 유전자, kanamycin 내성 유전자 및 CaMV 35S RNA promotor를 갖고 있는 전장

\*Corresponding author.

약 13 Kb의 T-DNA 유래의 pBI 121을 이용하였으며 (13), *A. tumefaciens*는 pTi Ach 5에서 T-DNA 부분이 결손된 pAL 4404를 갖고 있는 *A. tumefaciens* LBA 4404를 사용하였다(11). *E. coli* HB101의 형질전환은 Sleigh 등(27)의 방법에 준하여 실시하였으며, pBI 121은 conjugative plasmid 인 pRK 2013을 이용한 triparental mating 법(2)에 의하여 *A. tumefaciens* LBA 4404로 도입시켰다.

**식물체의 형질전환.** *A. tumefaciens* binary Ti plasmid vector에 의한 담배(*Nicotiana tabacum* cv. Sam-sun NN)의 형질전환은 Horsch 등(12)의 leaf disk 법에 따라 실시하였다. 즉 kanamycin (25 µg/ml) 및 rifampicin(100 µg/ml)을 함유한 LB배지에서 28°C로 20시간 배양한 2 ml의 CMV-As 위성RNA-cDNA가 도입된 *A. tumefaciens* LBA 4404 배양액에 담배로부터 채취한 직경 약 6 mm의 leaf disk를 2~5분간 침지시킨 후  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid(NA) (1 mg/l) 및 benzylaminopurine(BA) (0.1 mg/l)을 함유한 MS 배지(21)에 옮겨 약 3,000 lux의 조명하에서 배양하였다. 배양 5일 후에는 *A. tumefaciens* LBA 4404를 제거할 목적으로 NA 및 BA와 함께 cefotaxime(500 µg/ml)을 함유한 MS배지에 leaf disk를 이식하였으며, 약 2주 후에는 형질전환체의 선발을 목적으로 같은 홀몬제와 cefotaxime(500 µg/ml) 및 kanamycin (200 µg/ml)을 함유한 MS배지에 leaf disk를 이식하였다. Kanamycin 내성배지에서 성장한 식물체는 kanamycin을 포함한 rooting 배지로 옮겨 발근시켰고, 발근한 식물체는 흙에 이식하여 온실에서 육성하였다.

**DNA의 추출.** CMV-As 위성RNA의 cDNA가 도입되었는지의 여부를 확인하기 위하여 각 형질전환체로부터 DNA를 추출하였다. 이때 *E. coli* 및 *A. tumefaciens*로부터 plasmid DNA는 alkaline lysis법(3)에 의하여 추출하였으며, 담배 잎조직으로부터의 DNA는 CTAB(cetyltrimethylammonium bromide)법(25)으로 추출하였다.

**형질전환 cDNA의 확인.** *A. tumefaciens* 및 식물체에 도입된 CMV-As 위성RNA의 cDNA를 검정하기 위하여 PCR법을 이용하였다. PCR은 Scharf 등(26)의 방법에 준하여 thermal cycler(Perkin Elmer Cetus) 및 GeneAmp RNA PCR kit를 사용하여 실시하였으며, 이때 CMV-As 위성RNA-cDNA의 증폭을 위한 primer는 이 RNA의 염기서열(6)을 참조하여 3'말단측 5'-GGGTCCTGTATAGGA-3', 5'말단측 5'-GTTTTGTTIGATGGA-3'의 oligonucleotide를 합성하여 사용하였다. PCR은 GeneAmp RNA PCR 완

충액(X5) 10 µl 및 목적 DNA 10~100 ng과 함께 각 100 pM의 양 말단 primer, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM dNTPs 및 5 unit Taq DNA polymerase가 혼합된 50 µl 반응액에서 25회(denaturation 94°C 1분, annealing 45°C 2분, extension 72°C 2분) 실시하였다.

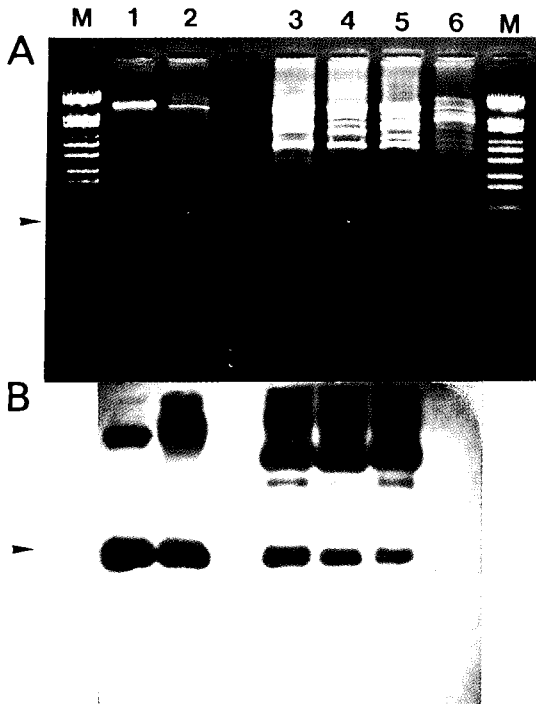
**분자교잡검정.** 분자교잡검정은 Southern 방법(28)에 준하여, enhanced chemiluminescence(ECL) gene detection kit(Amersham)을 이용한 화학루미네센스법(5)에 따라 실시하였으며, probe는 pUC 119에 삽입된 CMV-As의 위성RNA-cDNA(pCMS A9)를 *Xba*I 및 *Sac*I 처리하여 agarose gel에서 분리한 후 horseradish peroxidase(HRP)로 표지하였다.

**형질전환 담배에 대한 CMV의 접종실험.** 형질전환 식물체의 CMV 접종실험은 위성RNA를 가지고 있지 않은 CMV-Co 계통(4)을 사용하였다. 접종방법은 CMV-Co를 접종한 담배의 장폴로부터 최 등(4)의 방법으로 바이러스를 순화한 후 3 µg/ml 농도의 CMV를 carborundum(400 mesh)을 이용하여 3~4엽기의 형질전환 및 비형질전환 담배에 상법에 따라 즙액접종을 실시하였으며, 25~30°C의 온실에 두고 접종후 나타나는 병징을 관찰하였다. 한편 담배에 증식된 바이러스의 농도는 동부(*Vigna unguiculata*, White eye)에서의 국부병반으로 측정하였다. 즉 CMV-Co를 접종하고 20일 후 형질전환 및 비형질전환 담배의 같은 위치에 있는 잎의 조직을 각 0.2 g씩 채취하여, 1 ml의 0.01 M 인산완충액(pH 7.5)에 마쇄한 다음 얻은 즙액을 동부의 초생엽에 대엽법으로 접종하여 형성된 국부병반수를 산정하였다.

**형질전환담배의 후대검정.** CMV-As 위성RNA의 cDNA가 도입된 형질전환 담배의 유전적 안정성을 검정하기 위하여 형질전환 담배들로부터 채취한 자식의 종자를 kanamycin(300 µg/ml)을 포함하는 agar 배지에 치상하였다. 파종한 각각의 종자는 배양실(20°C)에 두고 정상적인 생장을 나타내는 싹과 발아하지 못하거나 황변되는 싹의 수를 3주후에 계산하였다. 이때 대조로 같은 배지에 비형질전환 담배의 종자도 별도로 파종하여 비교하였다.

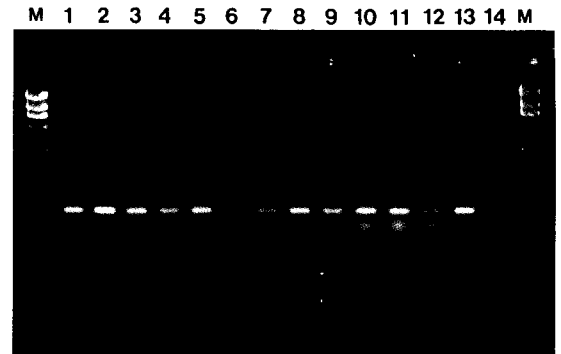
## 결 과

위성RNA-cDNA의 *A. tumefaciens*로의 도입. CMV-As 위성RNA에 대한 cDNA 삽입 plasmid vector(pBI 121-CMS A9)로 형질전환된 *E. coli* HB 101을 pRK 2013(*E. coli* HB 101) 및 *A. tumefaciens* LBA 4404와 혼합배양한 후, kanamycin, rifampicin 및 streptomycin을 함유한 선택배지에서 형질전환 콜로

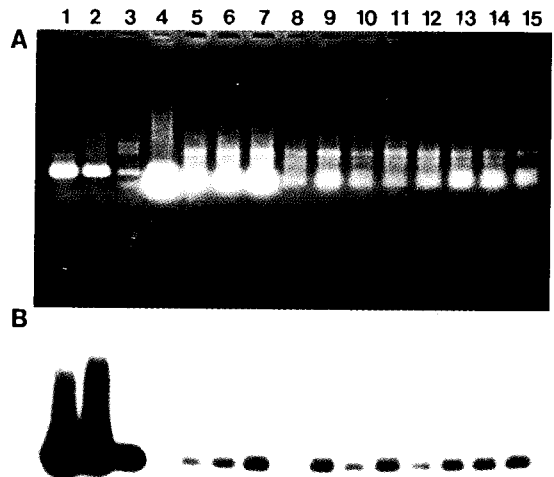


**Fig. 1.** Southern blot hybridization of the satellite cDNA introduced into *A. tumefaciens* LBA 4404 by tri-parental mating. A: pCMS A9 (lane 1) and pBI 121-CMS A9 (lane 2) were digested with *Xba*I/*Sac*I. The plasmid DNAs extracted from transformed *A. tumefaciens* (lanes 3~5) and nontransformed *A. tumefaciens* (lane 6) were also digested with *Xba*I/*Sac*I, and then the cDNAs were separated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel. M:  $\lambda$ DNA as a size marker digested with *Eco*T14 I. Arrow indicates the expected DNA fragment containing CMS A9. B: The plasmid DNAs were transferred onto nylon membrane and hybridized by ECL method. The *Xba*I/*Sac*I fragment (CMV satellite cDNA) of pCMS A9 was used as a probe.

니를 선별하였다. Fig. 1-A는 선택배지에서 선별한 *A. tumefaciens*로부터 추출한 plasmid를 southern blot hybridization을 위하여 *Xba*I 및 *Sac*I으로 절단하여 1.5% agarose gel에서 전기영동한 결과로(Lane 3~5), 같은 효소로 절단 후 전기영동한 pCMS A9(Lane 1) 및 pBI 121-CMS A9(Lane 2) 위성RNA-cDNA와 같은 위치에서 cDNA band가 확인되었다. Fig. 1-B는 pCMS A9을 *Xba*I 및 *Sac*I으로 절단한 cDNA를 probe로 사용하여 ECL 방법에 의하여 southern blot hybridization을 실시한 결과로 전기영동에서 확인된 약 400 bp의 DNA band 들과 강한 교잡반응을 나타냄으로서 *A. tumefaciens* LBA 4404 균체내에 pBI



**Fig. 2.** Electrophoresis on a 1.5% agarose gel of PCR products of satellite cDNA introduced into *A. tumefaciens* LBA 4404. Lane 1 and 2: Amplified DNA fragments of pCMS A9 and pBI 121-CMS A9, respectively. Lanes 3~13: Amplified DNA fragments of plasmid DNA from transformed *A. tumefaciens*. Lane 14: Amplified DNA fragments of plasmid DNA from nontransformed *A. tumefaciens*. M:  $\lambda$ DNA as a size marker digested with *Hind*III.



**Fig. 3.** Southern blot hybridization of PCR products of satellite cDNA introduced into tobacco plants. A: Amplified DNA fragments of pCMS A9 (Lane 1), pBI 121-CMS A9 (Lane 2), transformed *A. tumefaciens* (Lane 3), nontransformed tobacco plant (Lane 4) and transformed tobacco plant (Lanes 5~15) were separated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel. B: The gel plate was transferred onto nylon membrane and hybridized by ECL method. The *Xba*I/*Sac*I fragment (CMV-As satellite cDNA) of pCMS A9 was used as a probe.

121-CMS A9이 도입되었음이 확인되었다.

한편 pBI 121-CMS A9으로 형질전환시킨 *A. tumefaciens*로부터 추출한 plasmid를 CMV-As 위성RNA의 양말단 primer를 이용하여 PCR 법으로 증폭시킨 결과에서도 약 400 bp의 DNA가 증폭된 결과를 나타냄으로서 *A. tumefaciens* LBA 4404 균체내에 pBI 121-CMS A9이 도입이 확인되었다(Fig. 2).

형질전환 담배에 도입된 위성RNA-cDNA의 확인.

형질전환 담배의 DNA로부터 CMV-As 위성RNA-cDNA의 삽입 유무를 확인하기 위하여, 선택배지에서 육성시킨 형질전환 담배의 잎을 채취하여 CTAB 법으로 DNA를 추출하였다. 이 DNA를 위성RNA의 양말단 primer를 이용하여 PCR을 실시한 후, 그 증폭산물을 1.5% agarose gel에서 전기영동한 결과 약 400 bp의 DNA를 비롯한 2~3종의 저분자

DNA의 증폭이 확인되었다(Fig. 3-A). 한편 pCMS A9을 *Xba*I 및 *Sac*I으로 절단한 cDNA를 probe로 이용하여 ECL 방법으로 위의 PCR에 의한 증폭산물을 대상으로 southern blot hybridization을 실시한 결과, 10개체의 형질전환 담배에서 위성RNA의 cDNA probe와 분자교잡반응을 나타냈다(Fig. 3-B).

형질전환 담배의 CMV 병징발현 억제효과. 형질전환 식물체의 CMV 감염에 따른 병징발현 억제효과를 검정할 목적으로 3~4엽기의 형질전환 담배 10개체 및 비형질전환 담배에 CMV-Co 계통을 접종하였다. 그 결과 접종 15일 후 비형질전환 식물체는 형질전환 식물체에 비하여 심한 생육부진 현상을 나타내는데 비하여 형질전환 식물체는 건전 식물체의 생육상태와 거의 차이가 없었다 (Fig. 4 : a, b, c). 이들 각 식물체의 잎에 형성된 병징은 비형질전환



Fig. 4. Symptoms in the non-transgenic (a and d) and transgenic tobacco plants (b and e) inoculated with CMV-Co. c and f: non-transgenic healthy plants. Photographs were taken 15 days after inoculation.

**Table 1.** Assay of CMV-Co concentration in infected leaves of transgenic and non-transgenic tobacco (Sam-sun) plants

Transgenic plant	Inoculum <sup>a</sup>	No. of local lesions on cowpea <sup>b</sup>	
		Transgenic plants	Non-transgenic plants
CS 8	Terminal leaf	4.0	176.3
	2nd leaf from top	0.5	124.5
CS 17	Terminal leaf	8.0	128.0
	2nd leaf from top	1.5	161.8

<sup>a</sup>Inoculum was 0.2 g of each leaf 20 days after inoculation.

<sup>b</sup>Average number of local lesions produced on four primary leaves of cowpea (White eye).

식물체에서는 심한 모자이크 병징을 나타내는데 비하여 형질전환 식물체에서는 2개체에서 약한 모자이크 증상이 발현되었을 뿐 나머지 8개체는 무병징을 나타내었다 (Fig. 4 : d, e, f).

한편 병징이 발현되지 않은 형질전환 담배 2개체 (CS 8, CS 17)를 이용하여 형질전환 식물체에서의 바이러스농도를 동부에 형성되는 국부병반수에 의하여 측정된 결과, 하엽보다 상엽에서 약간의 병반수가 증가하는 현상을 보이기는 하였으나, 비형질전환 식물체 즙액의 점중에 비하여 약 1/40 정도의 병반만이 형성되었다(Table 1).

형질전환 담배의 후대검정. 자가수분에 의하여 얻어진 형질전환 담배의 S1 세대 종자를 대상으로 agar 배지에서 kanamycin내성을 조사한 결과, 형질전환체의 종자는 정상적으로 성장하는 개체와 성장하지 못하는 개체의 비가 약 3 : 1의 분리비를 나타내었다 (Table 2). 한편 비형질전환체의 종자는 kanamycin 배지에서 모두 생장이 억제되었다.

## 고 찰

CMV-As 계통은 위성RNA가 존재하지 않는 다른 CMV계통들에 비하여 담배를 비롯한 기주식물에서 매우 미약한 병징을 발현시킨다(4). 이는 위성RNA의 존재에 의하여 담배나 토마도에 매우 특징적인 병징을 발현시키는 CMV-Y 계통(22)이나 CMV-I<sub>17</sub>N 계통(1)과 비교하였을 때, CMV-As 위성RNA가 갖는 병징간섭의 특성으로 볼 수 있다. CMV의 위성RNA는 지금까지 30종 이상이 보고되었으나(7), 이들 위성RNA의 분자구조를 분석하여 보면 특징적인 유

**Table 2.** Genetic analysis of the S1 progeny of the transgenic tobacco plants

Transgenic plant	Kanamycin resistance		
	(+/-) <sup>a</sup>	Ratio	$\chi^2(3 : 1)$
CS 8	202/61	3.31 : 1	0.45
CS 17	225/68	3.31 : 1	0.51

<sup>a</sup>No. of kanamycin resistance seedlings/no. of seedlings susceptible to kanamycin.

전자로서의 기능은 발견되지 않고 있으며, 다만 CMV의 감염에 의한 기주의 병징에 간섭하여 병징의 변화에 영향을 준다는 사실만이 알려져 있을 뿐이다 (6, 8, 14, 15, 16, 22, 29). 이와 같이 CMV의 병징에 간섭하는 위성RNA의 성질을 이용하여 CMV 저항성 형질전환 식물체의 개발에 많은 관심이 쏟아졌고, 몇몇 실험에서는 CMV의 증식을 억제하는 형질전환체의 육성에 성공하고 있다 (1, 10, 17, 19, 20, 23).

Baulcombe 등 (1)은 CMV I<sub>17</sub>N 계통의 위성RNA의 cDNA로 형질전환된 담배는 CMV의 감염에 대해서 강한 병징발현 억제효과를 얻을 수 있었으며, 이러한 형질은 종자번식한 후대의 식물체에서도 발현된다는 것을 보고하였다. 또한 이 실험에서 위성RNA의 cDNA가 monomer나 dimer의 어떤 형태로 삽입된 경우에도 이들이 병징발현에 미치는 영향에는 차이가 없었음을 보고하였다. 한편 이 형질전환 담배는 CMV 이외에도 tomato aspermy virus (TAV)의 감염에 대하여도 병징완화 효과를 나타내었으며, 이때 CMV의 경우는 복제량이 비형질전환 식물에서 보다 상대적으로 감소되었으나, TAV의 경우는 계놈의 복제량이 감소되지 않는다는 것을 보고함으로써 병징완화 효과는 점종된 바이러스 계놈의 복제량과는 무관함을 시사한 바 있다(10). Paek과 Hahn(23)도 CMV I<sub>17</sub>N 계통의 위성RNA-cDNA를 이용하여 형질전환 담배를 육성하였을 때, CMV-Y 계통의 감염에 따른 병징발현 억제효과와 함께 점종한 CMV의 30 K 단백질이 감소된다고 보고하였다. 그러나 이 위성RNA의 cDNA를 토마도에 형질전환 시켰을 때에는 CMV-Y에 대해서는 강한 병징발현 억제효과를 나타내었으나, CMV-K 계통을 점종하였을 때에는 병징발현의 억제효과가 나타나지 않음으로서 바이러스 위성RNA 형질전환체의 저항성은 바이러스 및 위성RNA의 계통과 함께 기주식물의 상호작용에 따라서 차이가 있음을 시사하였다(17).

우리들은 CMV-As 계통이 가지고 있는 위성RNA의 cDNA를 도입시킨 형질전환 담배를 육성하였다. 이 형질전환 담배에 CMV를 점종하였을 때

비형질전환 담배에 비하여 일부는 약한 모자이크 병징이 발현되었으나, 대부분의 형질전환 담배는 병징이 거의 발현되지 않고 건전담배와 유사하게 성장하였다. 이들 형질전환체에 증식된 바이러스 농도를 조사하였을 때 비형질전환 담배보다 약 1/40의 바이러스가 검출되어 CMV의 감염에 대하여 확실한 저항성을 나타내었다. 한편, 형질전환담배의 S1 종자를 대상으로 kanamycin 내성을 조사하였을 때 kanamycin 내성의 개체가 약 3 : 1로 분리되어 멘델의 분리비와 유사하게 유전된다는 사실이 인정되었다.

따라서 앞으로는 CMV-As 계통의 위성RNA의 cDNA 를 도입시킨 형질전환 담배의 유전적 안정성 검정과 함께 CMV의 계통 및 다른 바이러스에 대한 병징발현의 억제효과를 분석하여 형질전환 식물체의 실용가능성을 검토할 계획이다.

## 요 약

CMV-As 위성RNA의 cDNA를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404의 binary Ti plasmid vector를 이용하여 담배에 도입시켰으며, PCR 및 분자교잡 검정의 결과로부터 위성RNA-cDNA가 담배에 도입되었음이 확인되었다. CMV-Co 계통을 이용한 증액 접종 실험결과, 형질전환 식물체에서 강한 병징발현 억제효과가 나타났으며, 형질전환 식물체의 바이러스 농도는 비형질전환체의 약 1/40이었다. 또한 형질전환 식물체의 후대검정 결과, kanamycin 내성 유전자가 발현되었다.

## 감사의 말씀

이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었습니다.

## 참고문헌

- Baulcombe, D. C., Saunders, G. R., Bevan, M. W., Mayo, M. A. and Harrison, B. D. 1986. Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature* 321 : 446-449.
- Bevan, M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 12 : 8711-8721.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7 : 1513-1522.
- Choi, J. K., Kwon, S. B., Lee, S. Y. and Park, W. M. 1990. Some properties of two isolates of cucumber mosaic virus isolated from *Aster yomena* and *Commelina communis*. *Korean J. Plant Pathol.* 6 : 138-143.
- Choi, J. K. and Sano, T. 1990. Hybridization detection of CMV satellite RNA using enhanced chemiluminescence. *Korean J. Plant Pathol.* 6 : 507-510.
- Choi, J. K., Sano, T., Uyeda, I. and Shikata, E. 1990. Complementary DNA cloning and nucleotide sequence of three satellite RNAs associated with cucumber mosaic virus. *Korean J. Plant Pathol.* 6 : 491-496.
- Collmer, C. W. and Howell, S. H. 1992. Role of satellite RNA in the expression of symptoms caused by plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30 : 419-442.
- Devic, M., Jaegle, M. and Baulcombe, D. 1989. Symptom production on tobacco and tomato is determined by two distinct domains of the satellite RNA of cucumber mosaic virus (strain Y). *J. gen. Virol.* 70 : 2765-2774.
- Francki, R. I. B. 1985. *The plant Viruses*, Vol. 1, *Polyhedral virions with tripartite genomes*. Plenum, New York and London.
- Harrison, B. D., Mayo, M. A. and Baulcombe, D. C. 1987. Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus satellite RNA. *Nature* 328 : 799-805.
- Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J. and Schilperoort, R. A. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303 : 179-180.
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G. and Fraley, R. T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227 : 1229-1231.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. and Bevan, M. W. 1987. GUS fusion :  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6 : 3901-3907.
- Kaper, J. M. and Tousignant, M. E. 1977. Cucumber mosaic virus-associated RNA 5. I. Role of host plant and helper strain in determining amount of associated RNA 5 with virions. *Virology* 80 : 186-195.
- Kaper, J. M., Tousignant, M. E. and Lot, H. 1976. A low molecular weight RNA associated with divided genome plant virus : Defective or replicating satellite RNA? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72 : 1237-1243.
- Kaper, J. M. and Waterworth, H. E. 1981. Cucumoviruses. In : *Handbook of Plant Virus Infection*, ed. by