

발간등록번호
11-1543000-000986-01

담배가루이 제어용 RNAi 발현 토마토 유묘 개발 및 대량 생산 기술 확립

(Developing the method to control whitefly using effective
RNAi and establishing mass production system for RNAi
expressed tomato seedlings)

충남대학교 산학협력단

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “담배가루이 제어용 RNAi 발현 토마토 유묘 개발 및 대량 생산 기술 확립”
과제의 보고서로 제출합니다.

2015 년 10 월 30 일

주관연구기관명 : 충남대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 윤 영 남

연 구 원 : 유 용 만

연 구 원 : 임 현 섭

요 약 문

I. 제 목

- 담배가루이 제어용 RNAi 발현 토마토 유묘 개발 및 대량 생산 기술 확립

II. 연구성과 목표 대비 실적

성과목표	사업화지표								연구기반지표								
	지식 재산권		기술이전	사업화					기술이중	학술성과			교육지도	이력양성	정책 활용홍보		기타 (타 연구용 등)
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보 전시	
										SCI	비 SCI						
최종목표	1		1							2	5		1			1	
연구기간 내 달성실적	1		1							4	5	11	0			1	
달성율(%)	100		100							200	100		0			100	

III. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

- (1) 담배가루이 억제 RNAi 선별 high throughput 식물바이러스 개발
- (2) RNAi 발현 토마토 유묘 대량생산 기술 확립
- (3) 담배가루이 RNAi 발현 토마토를 이용한 담배가루 증식억제 유도
- (4) 담배가루이 제어 우수 RNAi 평가 및 선발
- (5) 담배가루이의 확산 방지 및 geminivirus 습득 억제 전략 수립
- (6) RNAi 발현 토마토에서의 담배가루이 섭식행동 분석(EPG recording)

2. 연구개발의 필요성

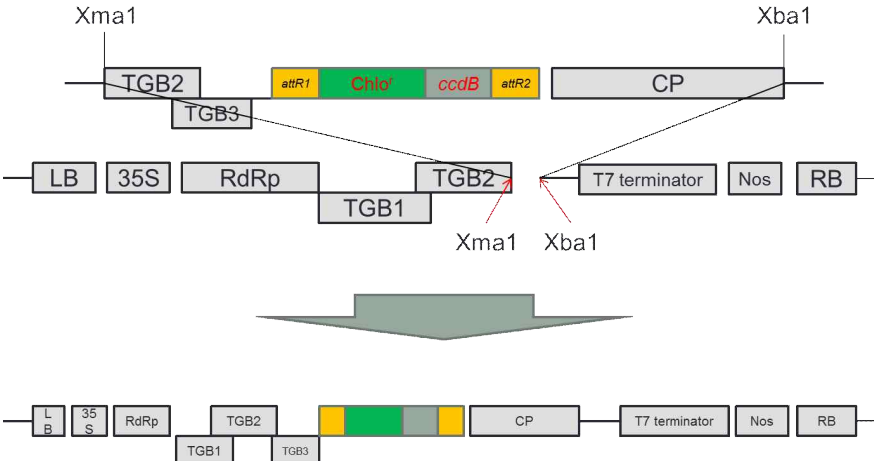
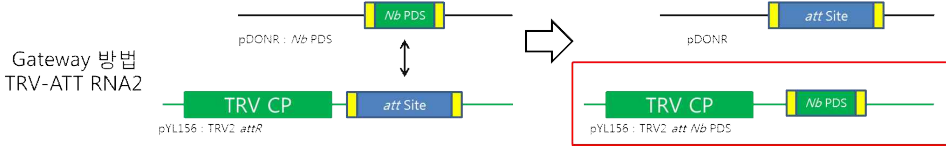
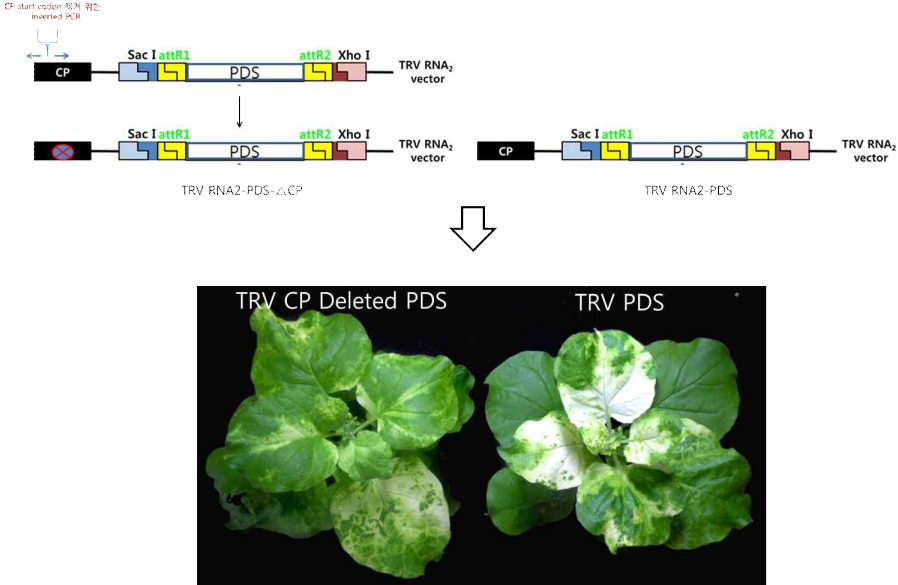
- (1) 최근 이상기온 현상에 의해 새로운 바이러스병의 매개곤충이 증가하고 이로 인해 식물바이러스병이 증가 됨. 우리나라의 경우 식물 바이러스병은 채소류(87.5%)에서 가장 많이 발생되고 있으며, 발작물(4.0%), 과수류(3.5%), 화훼류(2.1%), 벼(2.1%) 순으로 발생하는 것으로 보고되어 있음.
- (2) 특히, 전 세계적으로 토마토황화잎말림바이러스병을 일으키는 것으로 알려진 토마토황화잎말림바이러스(Tomato Yellow Leaf Curl Virus, TYLCV)는 담배가루이에 의해 매개되어 최근 국내에서 많은 피해가 발생하고 있음. 토마토황화잎말림바이러스병은 강낭콩과 무, 고추 등에도 감염되어 피해를 주며 전국적으로 확산되는 추이를 보임. 2008년 경남 통영에서 처음 발생한 토마토황화잎말림바이러스병(TYLCV)은 현재 토마토가 재배되고 있는 중·남부지방의 4개시·군으로 확산되고 있으며 경제적 피해가 날로 증가하는 추세임.

- (3) 토마토 황화잎말림바이러스병은 접촉, 접목, 농작업 및 화분수정 등에 의해서 감염되지 않으며 오직 매개충인 담배가루이에 의해서만 전파. 토마토황화잎말림바이러스병의 매개는 담배가루이 가운데 Q biotype만이 매개하는 것으로 알려져 있음.
- (4) 기후변화, 시설재배의 증가 및 효과적인 담배가루이 방제법의 부재로 인해 담배가루이가 날로 증가하고 있으며, TYLCV 또한 빠른 속도로 전파되고 있음. 바이러스의 전파를 막기 위해서는 담배가루이를 방제하는 것이 가장 효과적이므로, 담배가루이에 대한 새로운 방제방법 개발이 매우 시급함.
- (5) RNAi 발현 벡터를 이용한 해충 저항성 식물의 제조기술은 신속하고 효율적으로 담배가루이를 제어하는 기술로써 담배가루이에 의한 식물바이러스병 전파를 막고 농가 피해를 줄일 수 있는 획기적인 기술임.

IV. 연구개발 내용 및 범위

연구개발내용	연구범위
담배가루이 억제 RNAi 선별 high throughput 식물바이러스 개발	<ol style="list-style-type: none"> 1. 토마토에서 담배가루이 RNAi 발현이 용이한 식물바이러스를 선정 2. 식물바이러스 AltMV, TRV에 담배가루이 RNAi 대량 삽입이 가능하도록 Gateway system 구축 및 특허 출원 3. 바이러스 관다발 이동 불가능한 바이러스 전환 개발
RNAi 발현 토마토 유묘 대량생산 기술 확립	<ol style="list-style-type: none"> 1. RNAi 발현 바이러스 접종 방법 고안 2. 대량접종기술 Pilot test 3. 담배가루이의 RNAi 발현 토마토 유묘에 대량 접종 방법 확립 (진공접종방법 개발 및 plate당 400 seedling 접종)
담배가루이 RNAi 발현 토마토를 이용한 담배가루이 증식억제 유도	<ol style="list-style-type: none"> 1. Gateway system이 도입된 AltMV 벡터에 담배가루이 난소제어 RNAi(chickadee RNAi) 삽입 후 토마토에서 RNAi 발현 및 정량 측정 2. 담배가루이의 난소제어 RNAi 발현 토마토에서 담배가루이 개체군 동태 분석
담배가루이 제어 우수 RNAi 평가 및 선발	<ol style="list-style-type: none"> 1. RNAi 선별을 위해 식물바이러스에 담배가루이 cDNA library 제작(Gateway system 적용) 2. 담배가루이의 cDNA library가 cloning된 RNAi TRV를 토마토에 적용하여 우수 RNAi 선별 및 치사효율 측정 3. 선별된 RNAi 유전자 서열 파악 및 기작연구
담배가루이의 바이러스 전염기작 분석	<ol style="list-style-type: none"> 1. 담배가루이 구침 표면분석(SEM&TEM) 2. 유인식물선발 3. 기피식물선발
EPG system을 이용한 담배가루이의 섭식행동 확인	<ol style="list-style-type: none"> 1. EPG system을 이용한 정상 토마토에서의 EPG 섭식패턴 분석 2. 흡즙형 곤충에 효과적인 Cyantraniliprole 약제 처리한 토마토에서의 담배가루이 EPG 섭식패턴 분석 3. 어린 토마토 유묘에 RNAi 삽입 후, RNAi 발현 토마토에서의 담배가루이의 섭식행동 확인 및 EPG 섭식패턴 분석

V. 연구개발결과

연구개발내용	연구개발결과
<p>1. 담배가루이 억제 RNAi 선별 high throughput 식물바이러스 개발</p>	<p>1. 토마토에서 담배가루이 RNAi 발현이 용이한 식물바이러스 선정</p> <ul style="list-style-type: none"> - 토마토 감염이 가능하며 RNAi 적용에 용이한 식물바이러스 AltMV 선별 <p>2. 식물바이러스 AltMV, TRV에 담배가루이 RNAi 대량 삽입이 가능하도록 Gateway system 구축 및 특허 출원</p> <ul style="list-style-type: none"> - Alternanthera mosaic virus를 이용한 gateway system RNAi 발현용 벡터 개발 
	<p>- Tabacco mottle virus를 이용한 gateway system RNAi 발현용 벡터 개발</p> 
	<p>3. 바이러스 관다발 이동 불가능한 바이러스 전환 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - TRV CP 제거하여 바이러스 이동이 불가능한 벡터 완성 

2. RNAi 발현
토마토 유묘
대량생산 기술
확립

1. RNAi 발현 바이러스 접종 방법 고안
 - 담배가루이 RNAi가 삽입된 AltMV vector를 Agrobacteria에 형질전환 후, 다수의 콜로니를 yellow tip을 이용하여 대량접종 하는 방법을 확립
2. 대량접종기술 Pilot test
3. 담배가루이의 RNAi 발현 토마토 유묘에 대량 접종 방법 확립 (진공접종방법 개발 및 plate당 400 seedling 접종)



담배 Seedling Sorting 장치



담배 Seedling Agroinfiltration 장치
(200 seedlings/plate)

3. 담배가루이
RNAi 발현
토마토를 이용한
담배가루이
증식억제 유도

1. Gateway system 이 도입된 AltMV 벡터에 담배가루이 난소제어 RNAi(chickadee RNAi) 삽입 후 토마토에서 RNAi 발현 및 정량 측정
 - AltMV-Chickadee RNAi는 토마토에 Agrobacteria colony 형태로 접종하여 Chickadee RNAi 의 Ct value를 측정하였으며, 50일 동안 안정적으로 Chickadee RNAi 가 발현됨을 real time qPCR로 확인하였음.

	20 일	30일	40일	50일
Actin Ct	22 ±0.4	25 ±0.5	26 ±0.4	24 ±0.2
Chickadee RNAi	12 ±0.2	13 ± 0.1	14 ±0.3	12 ±0.4
Delta Ct [Actin-Chickadee]	10	12	12	12

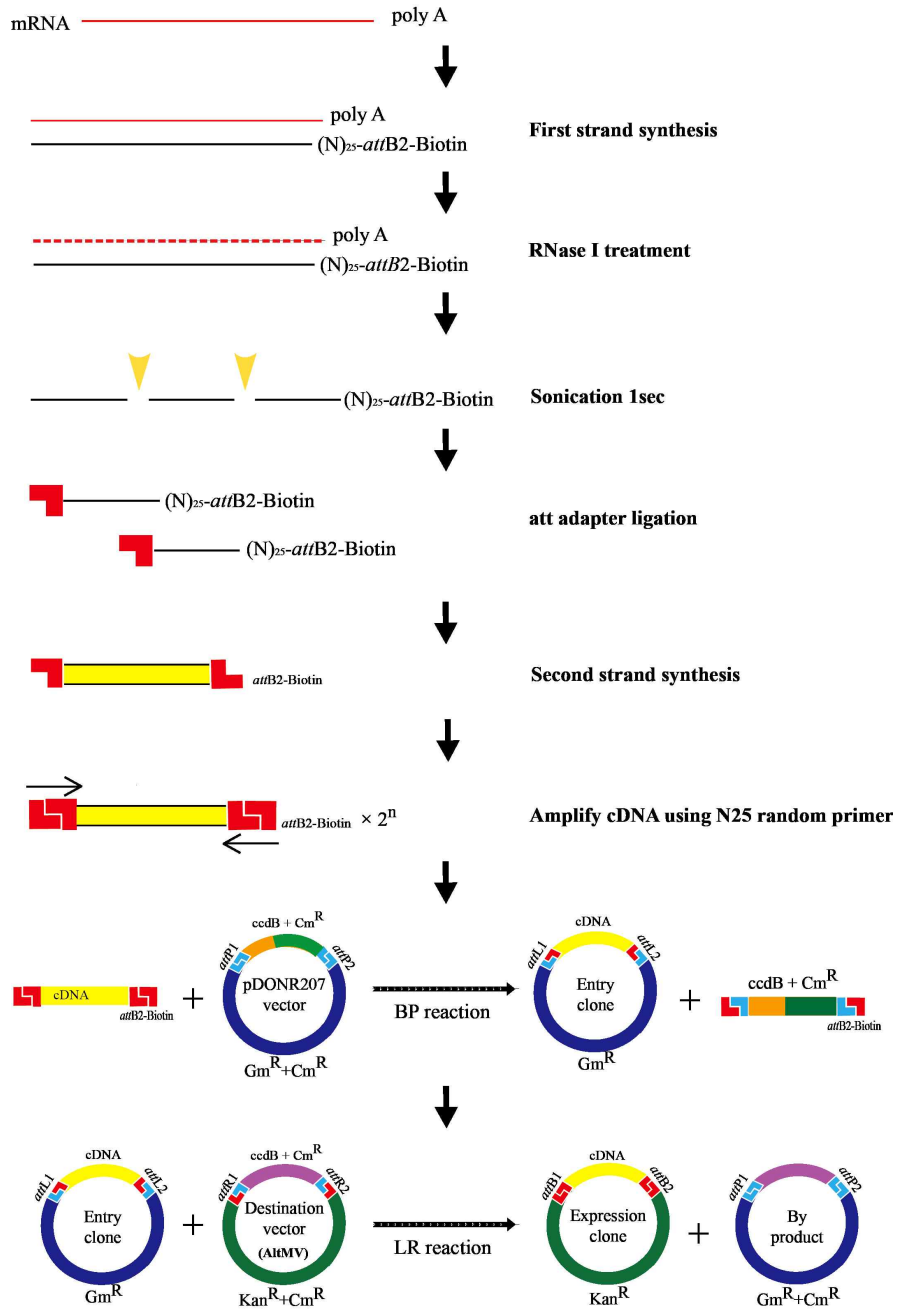
2. 담배가루이의 난소제어 RNAi 발현 토마토에서 담배가루이 개체군 동태 분석
 - AltMV-Chickadee RNAi는 토마토에 담배가루이 개체수 감소 확인.
 - RNAi 발현 토마토에서 담배가루이의 치사율이 증가함을 확인하였고, 담배가루이의 Chickadee RNA발현을 Real-time qPCR로 측정하여 토마토에서 AltMV를 통하여 발현하는 RNAi가 직접적인 효과가 있음을 확인함.

표 . 죽어있는 담배가루이 Chickadee mRNA 발현억제 효과

평균 Ct(15마리 담배가루이)	AltMV chickadee 흡즙	AltMV 흡즙	Control
chickadee	31.57	29.64	28.03
actin	29.52	31.76	29.51
delta Ct (chickadee - actin)	2.02	-2.12	-1.48

4. 담배가루이 제어
우수 RNAi 평가
및 선발

1. RNAi 선별을 위해 식물바이러스에 담배가루이 cDNA library 제작
- Gateway system을 적용하여 담배가루이 cDNA library 제작 방법 확립

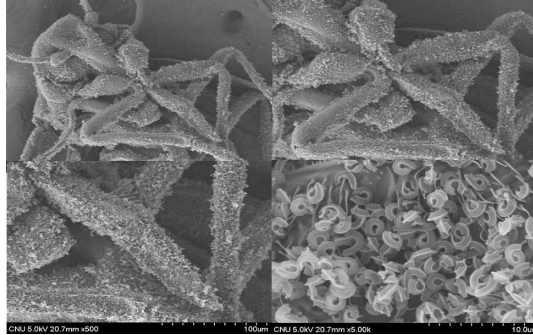


2. 담배가루이의 cDNA library가 cloning된 RNAi TRV를 토마토에 적용하여 우수 RNAi 선별 및 치사효율 측정
- RNAi 스크리닝 후 선별된 RNAi중 1, 2, 11, 35, 37, 73번을 Genebank에 Annotation 및 유전정보가 없는 염기서열 35번(Wh0035)를 담배가루이 개체 밀도 Case 실험에 이용
- Wh0035 발현된 토마토에서 서식 후 사멸한 담배가루이 개체 5마리에서 Target 유전자 Wh0035의 담배가루이내 발현량은 살아있는 담배가루이보다 약 25배가량 감소한 것으로 나타남
3. 선별된 RNAi 유전자 서열 파악 및 기작연구

5. 담배가루이의
바이러스
전염기작 분석

1. 담배가루이 구침 표면분석(SEM&TEM)

- 담배가루이 전염기작을 분석하기 위해 전자현미경(SEM; Scanning Electronic Microscopy)을 이용하여 담배가루이 구침을 분석.
- 분석 결과, 담배가루이 구침에는 인편으로 덮혀 분석이 어려운 것으로 확인.



2. 유인식물선발

- *Brassica oleracea*(cauliflower), *Lycopersicon esculentum*(tomato), *Euphorcia pulcherrima*(poinsettia)

3. 기피식물선발

- *Thymus vulgaris*(타임), *Pogostemon cablin*(광곽향), *Urtica pilulifera*(쑤기풀), *Thymus capitatus*(스페니쉬 오레가노; 허브일종), *Mentha arvensis*(박하), *Zingiber officinae*(생강), *Lilium lancifolium*(백합), *Ephedra sp.* (네마황)

6. EPG system을
이용한
담배가루이의
섭식행동 확인

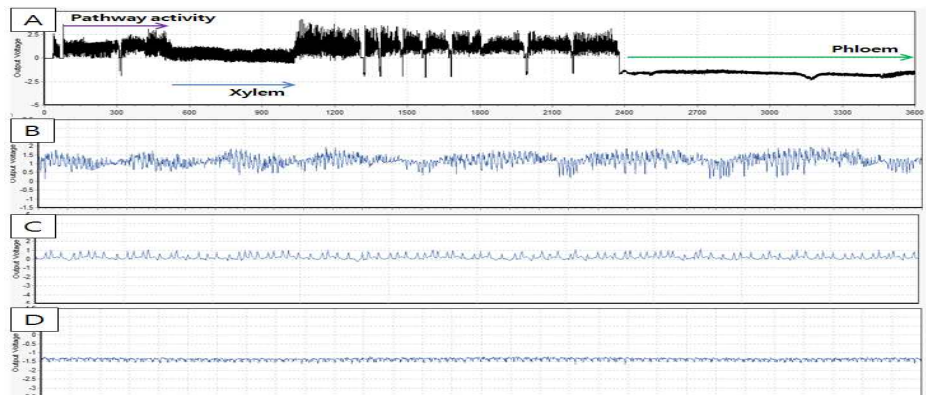
1. EPG system을 이용한 정상 토마토에서의 EPG 섭식패턴 분석

- 담배가루이는 주로 phloem feeder로 알려져 있으나, 토마토 기주에서는 특이적으로 xylem feeder로 나타남.

2. 흡즙형 곤충에 효과적인 Cyantraniliprole 약제 처리한 토마토에서의 담배가루이 EPG 섭식패턴 분석

- EPG 패턴 분석을 통해 Cyantraniliprole 약제가 담배가루이 섭식에 있어서 저해 또는 기피의 효과가 있는 것으로 확인 됨.

3. 어린 토마토 유묘에 RNAi 삽입 후, RNAi 발현 토마토에서의 담배가루이의 섭식행동 확인 및 EPG 섭식패턴 분석



VI. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 정석적 성과

- 가. Gateway system을 적용한 식물바이러스 벡터를 제작하고, 이를 이용한 cDNA library 제작 방법 확립- 담배가루이 뿐만 아니라 다른 곤충의 cDNA library 제작에 적용 가능
- 나. 담배가루이 억제 RNAi 선별 high throughput 식물바이러스 개발
- 다. 담배가루이의 모든 EST를 근거로 하는 cDNA library 제작
- 라. 담배가루이 제어 우수 RNAi 평가 및 선발
- 마. 담배가루이 RNAi 발현 토마토를 이용한 담배가루이 증식억제 유도
- 바. 담배가루이 RNAi 발현 토마토를 이용한 담배가루이 방제 방법 확립
- 사. RNAi 발현 토마토 유묘 대량생산 기술 확립

2. 정량적 성과

- 가. 특허출원 1건,
- 나. 기술이전 1건
- 다. SCI 논문 4건, 비SCI 논문 5건, 학술발표 11건

3. 성과활용 및 계획

- 가. 본 연구를 통해 확립한 곤충 cDNA library 제작 방법과 식물바이러스를 이용한 해충 방제 방법을 타 작물과 해충에 적용 확대 가능
- 나. 산업체 기술이전(기 완료)을 통해 농업현장에 적용할 수 있도록 기술 활용

SUMMARY

Climate change has resulted in an increase in the types and numbers of insect vectors of several virus diseases affecting vegetables and other crops in Korea. Specifically, the whitefly-transmitted Tomato yellow leaf curl virus has recently become widespread. In order to control whiteflies we have tested expression of RNAi in whitefly host plants through use of a plant viral vector. It has previously been demonstrated that RNAi injected into insects is effective, but this is not applicable for control of insects in the field. To develop a method to deliver RNAi through whitefly host plants we first created a Gateway cDNA library in a modified plant viral vector system to screen potential RNAi constructs for efficacy of whitefly control. Firstly, the whitefly cDNA library was cloned into Gateway modified *Tobacco rattle virus* and *Alternanthera mosaic virus* vectors. Through use of a high throughput RNAi screening system with the viral vector, several genes were selected (Wh0001, Wh0002, Wh0011, Wh0035, Wh0037, Wh0073, Wh0101, Wh0102, Wh0130) causing reduced whitefly fecundity. Each of these genes were evaluated for whitefly mortality, and finally we selected genes Wh0035 and Wh0130. At the same time the EFG data indicated that it is affected by Cyantraniliprole treatment. For mass production of RNAi expression in tomato, three week-old seedlings were vacuum infiltrated with the RNAi expression vector construct. Our results on combined RNAi expression and Cyantraniliprole treatment for maintenance shows promise for elimination of whitefly, and virus free vegetable production.

CONTENTS

Chapter 1. Overview and performance goals of the research and development projects	17
Section 1. The need for research and development	17
Section 2. The target range of research and development	22
1. Plant viral vector development for RNAi expression and screening of RNAi of tobacco whitefly suppression	22
2. Feeding behavior analysis according to whether infected geminivirus in tobacco whitefly using the EPG system	24
Section 3. Research achievement results against goals	25
Chapter 2. Technical developments in national and international	26
Section 1. This study compared the relevant domestic technology level	26
Chapter 3. Contents and development results of perform research	27
Section 1. Development of high throughput plant viruses for screening of RNAi for tobacco whitefly suppression	27
1. Select a plant virus for easily expression of tobacco whitefly RNAi in tomato	27
2. Development of vector for Gateway system RNAi expression using Alternanthera mosaic virus	27
3. Development of vector for Gateway system RNAi expression using Tobacco rattle virus	29
4. Virus switch development of non-moving to vascular bundle sheath	31

Section 2. Establishment of mass production technology for RNAi expression tomato seedlings	33
1. Research of Fraunhofer technology as protein producers using <i>Nicotiana benthamiana</i> and cucumber mosaic virus	33
Section 3. Induced growth inhibition of tobacco whitefly using tobacco whitefly RNAi expression	34
1. RNAi Expression and cloning effect measurement of insert the tobacco whitefly RNAi to AltMV-ATT-P using reported chickadee gene	34
Section 4. Evaluation and selection of excellent RNAi for control of the tobacco whitefly	37
1. cDNA production (200-250 bp fragment) of the tobacco whitefly	37
2. Redundancy check of 106 cDNA library after cDNA production (200-250 bp fragment) of the tobacco whitefly	40
3. 20 cDNA library of sequences (Genebank confirmed 15 and 5 not exist)	41
4. TRV cloning efficiency of Gateway cDNA library in tobacco whitefly ..	45
5. Revaluation of tobacco genomic RNAi in TRV RNA2 redundancy	49
Section 5. Evaluation and selection of excellent RNAi for control of tobacco whitefly	51
1. Screening and selection of tobacco whitefly RNAi using inoculation to tomato seedlings (1) - 2nd year	51
2. Screening and selection of tobacco whitefly RNAi using inoculation to tomato seedlings (2) - 3rd year	67
Section 6. The mechanism research of selected tobacco whitefly RNAi	80
1. Inoculation of RNAi Wh0035 to tomatoes and evaluation of differences of tobacco whitefly population in 2nd year	80
2. Inoculation of RNAi Wh0001, Wh0002 and Wh0030 to tomatoes and evaluation of differences of tobacco whitefly population in 3rd year	82

Section 7. Analysis of virus transmission mechanisms of tobacco whitefly	85
1. Transmission mechanism analysis of tobacco whitefly by SEM	85
2. Screening of attracted and inhibit plants for spread of tobacco whitefly	85
Section 8. Feeding behavior of tobacco whitefly using EPG system	86
1. Analysis of EPG system Feeding behavior of tobacco whitefly using EPG system on normal tomato plant	86
2. Analysis of EPG system Feeding behavior of tobacco whitefly using EPG system on normal tomato plant and Cyantraniliprole sprayed plant	99
3. Analysis of EPG system Feeding behavior of tobacco whitefly using EPG system on RNAi injected tomato plant	97
Chapter 4. Goal achievement and contribution to the relevant field	102
Chapter 5. Research and development results and performance utilization plan	104
Section 1. Research achievements	104
1. Performance and utilization goals compared to the performance of research and development results	104
2. Intellectual Property	104
3. Published papers and presentation in academic conferences	104
Section 2. Utilization plan of research achievements	107
1. Research in practice. Industrialization plan (technology implementation, etc.)	107
2. Diffusion plan of education guidance and PR	107
3. Securing planning of intellectual property rights such as patents, breed and papers, etc.	107
4. Additional studies and utilizing the other research plans	108
Chapter 6. International scientific and technological information gathered from the research and development process	110

Chapter 7. Status of research facility equipments	111
Chapter 8. Practices performance of laboratory safety management	112
Chapter 9. References	113

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표	17
제 1 절 연구개발의 필요성	17
제 2 절 연구개발의 목표 및 범위	22
1. RNAi 발현 식물바이러스 벡터 개발과 이를 이용한 담배가루이 억제 RNAi 선별	22
2. EPG system을 이용한 담배가루이의 geminivirus 보독 여부에 따른 섭식행동 분석	24
제 3 절 연구성과 목표 대비 실적	25
제 2 장 국내외 기술개발 현황	26
제 1 절 본 연구관련 국내외 기술수준 비교	26
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	27
제 1 절 담배가루이 억제 RNAi 선별을 위한 high throughput 식물바이러스 개발	27
1. 토마토에서 담배가루이 RNAi 발현이 용이한 식물바이러스를 선정	27
2. Alternanthera mosaic virus를 이용한 gateway system RNAi 발현용 벡터 개발 ..	27
3. Tobacco rattle virus를 이용한 gateway system RNAi 발현용 벡터 개발	29
4. 바이러스 관다발 이동 불가능한 바이러스 전환 개발	31
제 2 절 RNAi 발현 토마토 유묘 대량생산 기술 확립	33
1. Nicotiana benthamiana와 Cucumber Mosaic Virus를 이용한 단백질 생산 업체 Fraunhofer 기술 연구	33

제 3 절 담배가루이 RNAi 발현 토마토를 이용한 담배가루이 증식억제 유도	34
1. AltMV-ATT-P에 기 보고된 담배가루이 RNAi chickadee를 삽입하여 RNAi 발현 및 cloning 효과 측정	34
제 4 절 담배가루이 제어 우수 RNAi 평가 및 선발	37
1. 담배가루이 cDNA 제작	37
2. 담배가루이 cDNA 제작 후 106개의 cDNA library의 redundancy 확인	40
3. 20개 cDNA library의 염기서열	41
4. 담배가루이 Gateway cDNA library의 TRV cloning 효율	45
5. 담배가루이 genomic RNAi in TRV RNA2 Redundancy 재평가	49
제 5 절 담배가루이 제어 우수 RNAi 평가 및 선발	51
1. 토마토 유묘에 담배가루이 RNAi 접종 및 선별(1) - 2차년도	51
2. 토마토 유묘에 담배가루이 RNAi 접종 및 선별(2) - 3차년도	67
제 6 절 선발된 RNAi 기작 연구	80
1. 2차년도 선발된 Wh0035 RNAi 토마토 접종 및 담배가루이 개체군 차이	80
2. 3차년도 선발된 Wh0001, Wh0002, Wh0030 RNAi 토마토 접종 및 담배가루이 개체군 차이	82
제 7 절 담배가루이의 바이러스 전염기작 분석	85
1. 담배가루이 전염기작 분석(SEM)	85
2. 담배가루이 확산방지를 위한 유인, 기피식물 탐색	85
제 8 절 EPG system을 이용한 담배가루이의 섭식행동 확인	86
1. EPG system을 이용한 정상 토마토에서의 EPG 섭식패턴 분석	86
2. EPG를 이용하여 RNAi 비 발현 토마토에서의 담배가루이 섭식행동 분석 및 Cyantraniliprole 약제에 대한 영향 분석	89
3. EPG를 이용하여 RNAi 발현 토마토에서의 섭식행동분석	97

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	102
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	104
제 1 절 연구성과	104
1. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적	104
2. 지식재산권	104
3. 논문게재 및 학술회의 발표	104
제 2 절 연구성과 활용계획	107
1. 실용화·산업화 계획(기술실시 등)	107
2. 교육지도·홍보 등 기술확산 계획	107
3. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획	107
4. 추가연구, 타연구에 활용계획	108
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	110
제 7 장 연구시설·장비 현황	111
제 8 장 연구실 안전관리 이행실적	112
제 9 장 참고문헌	113
<별첨> 특허, 논문 및 시장분석 보고서	126

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제 1 절 연구개발의 필요성

- 식물 바이러스 병은 매년 새로운 바이러스 병이 발견됨에 따라서 그 경제적 중요성이 점차 증대되고 있는 실정이다.
 - 2002년 7차 ICYV 보고에 의하면 17과 79속 951종이 보고되었으나 2005년 8차 ICYV 보고에서는 20과 89속 1,200 종이 보고 되었다.
 - 세계적으로는 연간 600억 달러의 경제적 손실을 야기하는 것으로 추산하고 있으며, 네덜란드의 경우 TuMV에 의한 피해만 매년 900만 파운드로 추산하고 있으며, 우리나라의 경우, 농촌진흥청의 자료에 따르면 RSV에 의한 피해액이 172억원, CMV에 의한 피해액이 470억원에 이를 것으로 추산하고 있다.
- 식물 바이러스 병은 최근의 기후변화와 이에 따른 지구온난화 현상에 원인이 되어 새로운 바이러스병 매개곤충이 증가하고 있는 것으로 추정되고 있다.
- 우리나라의 경우 바이러스병은 채소류(87.5%)에서 가장 많이 발생되고 있으며, 발작물(4.0%), 과수류(3.5%), 화훼류(2.1%), 벼(2.1%) 순으로 발생하고 있는 것으로 보고되어 있다.
 - 채소류 가운데는 고추에서 51.6%로 가장 높은 검출율을 보이고 있어 피해가 가장 심하며, 그 다음이 토마토(26.5%), 파프리카(9.5%) 순이며, 그 외에도 멜론, 수박, 오이, 호박 등에서 바이러스병이 많이 검출됨.
 - 바이러스 종류별로는 CMV가 가장 피해를 많이 주고 있으며, 그 다음이 TSWV, TYLCV, BBWV, PMMoV, TBSV, CGMMV의 순으로 피해를 주고 있는 것으로 나타남.
- 전세계적으로 토마토 황화잎말림바이러스병을 일으키는 것으로 알려진 토마토황화잎말림바이러스병(Tomato Yellow Leaf Curl Virus, TYLCV)는 가루이에 의해 매개되어 최근 국내에서 많은 피해가 발행하였다.
- 담배가루이(Q biotype)는 토마토에서 TYLCV(Tomato Yellow Leaf Curl Virus)와 TLCV(Tobacco Leaf Curl Virus) 매개한다.



그림 1. TYLCV에 감염된 토마토

- 토마토황화잎말림바이러스병은 강낭콩과 무, 고추 등에도 감염되어 피해를 준다.



그림 2. TYLCV에 감염된 강낭콩(좌)과 무(중), 고추(우)의 피해

- 토마토황화잎말림바이러스병은 전국적으로 확산되는 추이를 보이고 있는데, 2008년 12개 지역에서 발견되었으나, 2009년에는 47개 지역으로 확산되었다.

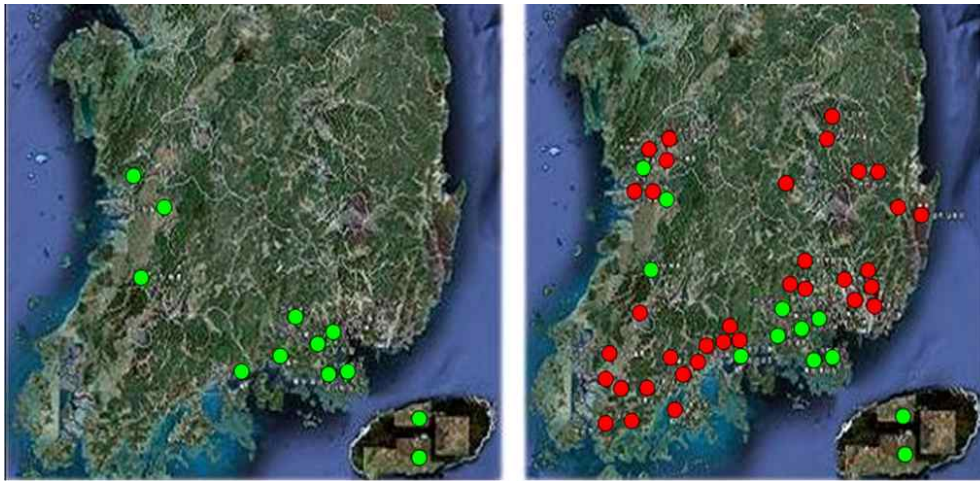


그림 3. TYLCV의 감염지역의 확산 현상(좌: 2008년; 우: 2009년).

- 토마토황화잎말림바이러스병의 매개는 오직 담배가루이 가운데 Q biotype만이 토마토에서 매개하는 것으로 알려져 있다.
- 토마토황화잎말림바이러스병은 접촉, 접목, 농작업 및 화분수정 등에 의해서 절대로 감염되지 않는다.

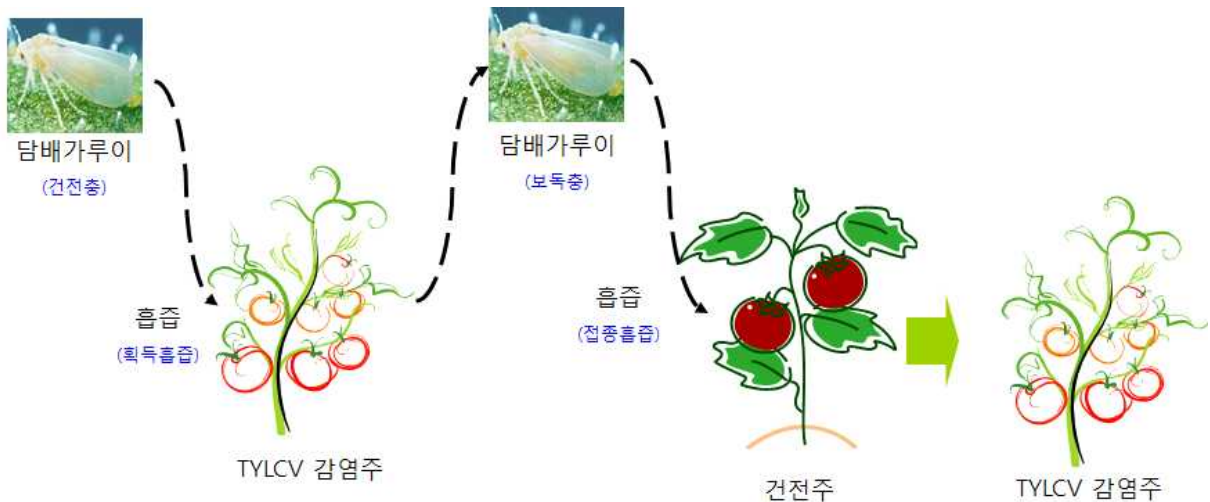


그림 4. 담배가루이 Q-type에 의한 TYLCV의 전파 방식

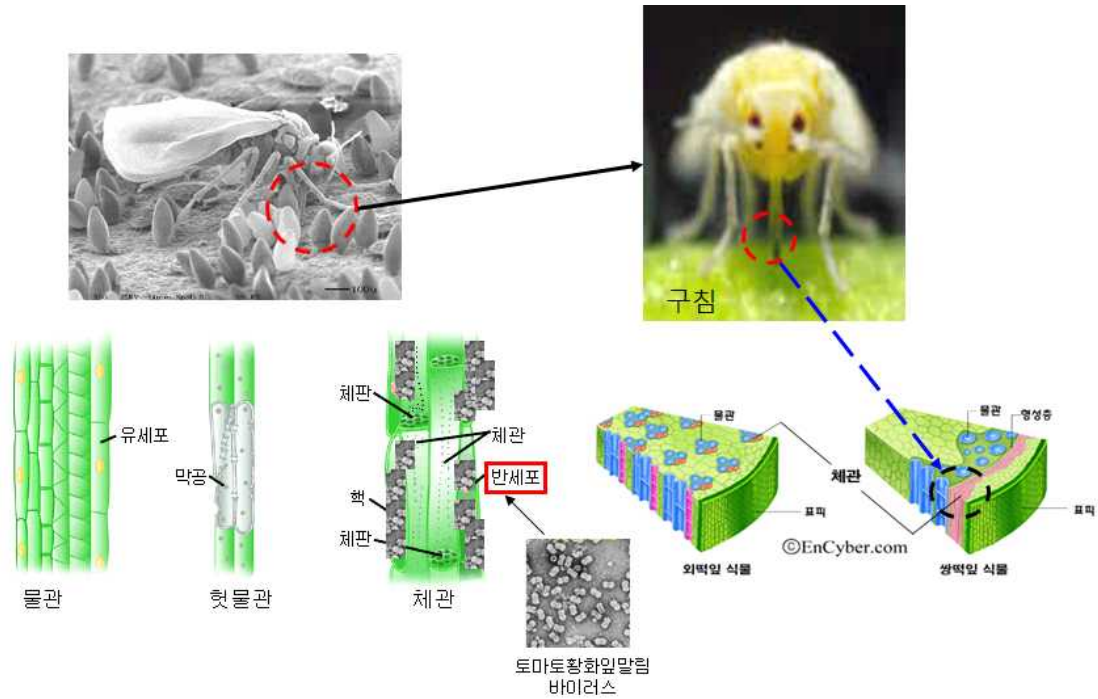


그림 5. 토마토에서 담배가루이 Q-type에 의한 TYLCV의 감염기작

- 2009년 경남 통영에서 처음 발생한 토마토황화잎말림바이러스병(TYLCV)은 현재 토마토가 재배되고 있는 중·남부지방의 4개시·군으로 확산되고 있으며 경제적 피해가 날로 증가 추세이다.
- 기후변화 및 가루이의 방제에 관한 정확한 방법 부재로 인한 담배가루이의 증가로 Geminivirus 인 TYLCV의 감염속도가 매우 증가되고 있다.
- 담배가루이는 Bt(Bacillus thuringiensis)에 의한 해충제어가 어려워 새로운 방제방법 개발이 매우 시급하고 신속한 실정으로, 담배가루이 제어방법 개발로 농가의 피해를 최소화하기 위함에 이 연구의 목적이 있다.
- 토마토에서 바이러스 감염시 주요 피해 증상
 - 감염 2~3주 후 병징 나타나며 심하면 고사
 - 잎말림 증상, 황화 증상, 잎맥 사이 색깔이 얼어짐
 - 유효기 감염 시 심한 위축 및 성장 저지가 나타남
 - 가지 끝 신초 및 정단 부분 작아짐
 - 감염 후 새로 나온 줄기나 잎은 잘 자라지 않음
 - 꽃 모양은 정상이나 과실이 맺히기 전에 떨어져 수량이 크게 감소됨
 - 이미 달린 열매는 작고 성숙기에 육질에 수분이 없어 상품성이 저하됨
 - 일부 방울토마토의 경우 열매가 멍쳐 달리는 증상이 발생함

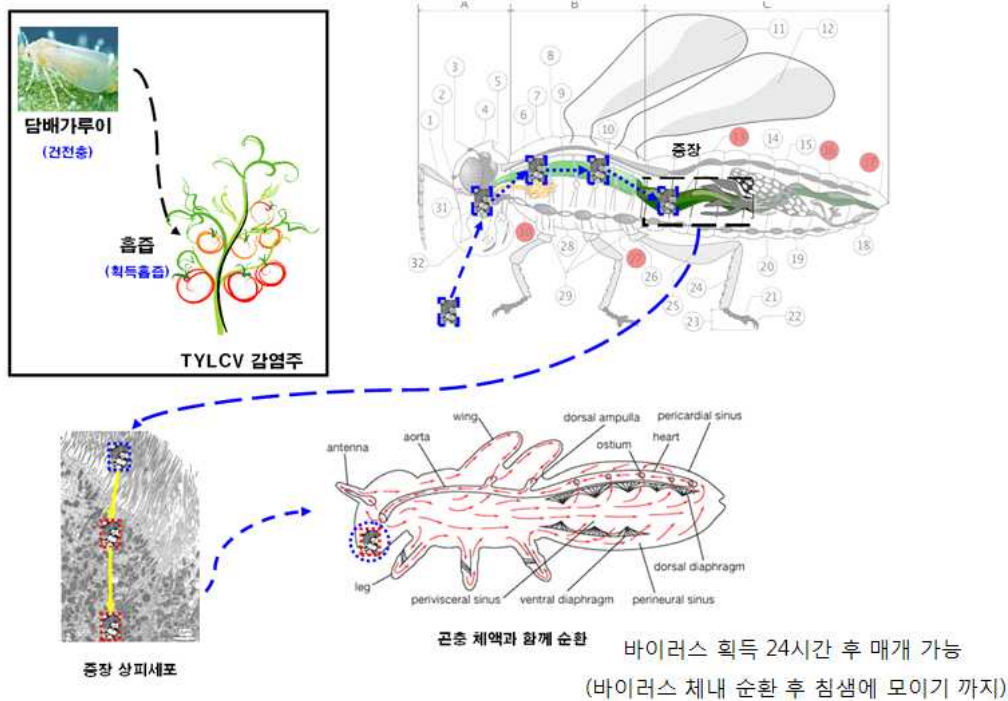


그림. TYLCV의 담배가루이 체내에서의 이동 및 증식 경로

○ 담배가루이

- 알, 유충, 성충 모두 기주식물 잎 뒷면에 기생
- 암컷 성충의 수명 : 10~24일
- 산란 : 어린잎에 66~224개(B biotype: 320개) (작물의 위아래 구분 없이 잎의 뒷면에 산란)
- 알에서 깨어난 1령충 이동하다 적당한 장소를 찾으면 칩 모양의 구기를 식물체에 꽂고 고착
- 식물체내 분포 : 작물전체 잎 뒷면에 알부터 번데기까지 골고루 관찰됨
- 1세대 기간(알 ~ 성충) : 27℃ 3주
- 8℃ 이하 : 성장 정지
- 연간 발생 세대수 : 야외(3~4세대), 시설(10세대 이상) 발생
- 온실가루이보다 높은 온도 선호 : 28~30℃
- B-biotype의 특성 : 생식력 강함, 카바마이트계와 유기인계 농약에 저항성, 기주범위 넓음
- Q-biotype의 특성 : B 계통보다 번식률 낮고, 사망률 높음, F1세대에서 암컷의 발생수 적음, B 계통보다 네오니코티노이드계 농약에 높은 저항성을 나타냄
- 토마토 황화잎말림병 매개(TYLCV)
- 담배가루이의 생태형(biotype) : 24가지 생태형이 보고되어 있으며, 그 중에서도 B와 Q가 농업에 큰 문제를 일으킴
- 기주식물 : 500여종
- Biotype Q : 2005년도 국내 발생보고, 2007년도 전국적 발생(16작물, 14잡초), B 타입보다 약제 감수성이 낮음(약제에 잘 죽지 않음)
- 매개충으로써의 담배가루이(biotype Q)
 - ① 넓은 기주범위
 - ② 15 ~ 20 분 흡즙 바이러스 획득 24시간 후 매개 가능

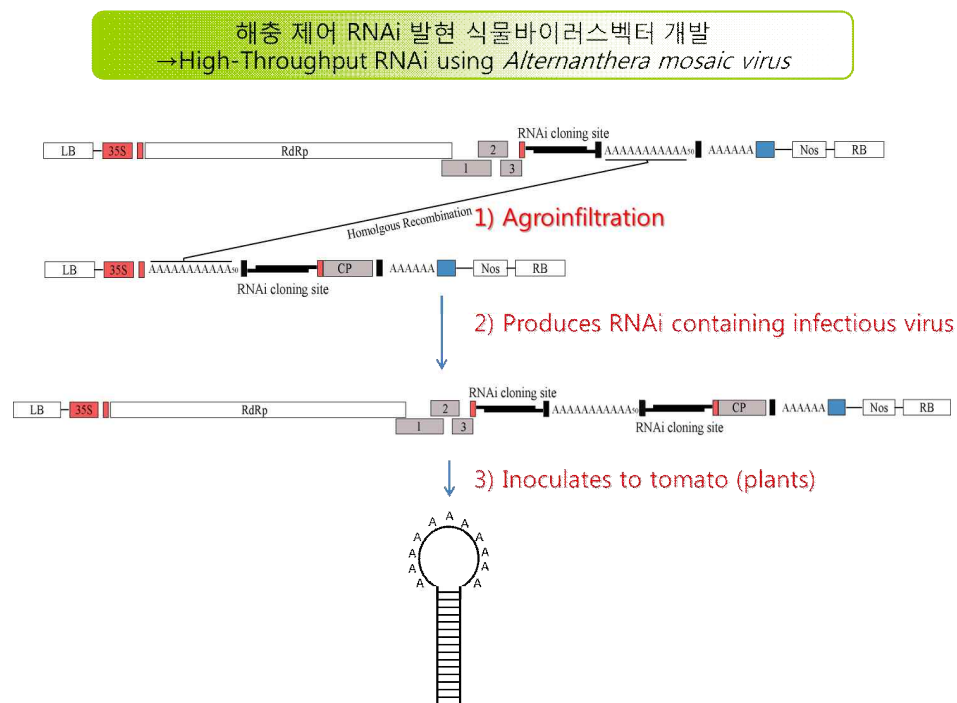
- ③ 바이러스 전이시키는데 최소 15분 필요
- ④ 흡입된 바이러스 총체내 20일 정도 보유(총체내 바이러스 증식 안됨)
- ⑤ 경란전염 안됨

제 2 절 연구개발의 목표 및 범위

1. RNAi 발현 식물바이러스 벡터 개발과 이를 이용한 담배가루이 억제 RNAi 선별

가. 담배가루이 RNAi를 발현시키는 식물바이러스 벡터 제작

- 습식을 통한 제어방법은 선충에서 큰 효과를 얻고 있으며 최근에 Phloem-sucking 곤충에 집중적인 연구가 진행되고 있고 담배가루이 중장(mid-gut)에서 효율적으로 RNAi가 흡수되어 제어 효과가 있다고 보고됨.
- 담배가루이 감염되는 주요 작물에 기생하는 식물바이러스 infectious clone 제작하여 RNAi cloning site 추가
- Bipartite RNA 바이러스를 이용한 재조합(recombination) 유도하여 RNAi 클로닝을 매우 용이하게 함 (그림)
- 제작된 Bipartite infectious clone은 바이러스의 Replicase, Helicase, Silencing Suppressor기능을 다양하게 하여 RNA replication을 조절하게 함⇒ RNAi 발현량 조절가능
- 토마토(담배가루이의 국내 대표적 기주식물)에서 담배가루이 억제 RNAi 발현 가능한 식물바이러스 벡터 개발 ⇒ 식물바이러스에 담배가루이 억제 RNAi를 발현 시킬 수 있으며 바이러스의 strain에 따라 RNAi의 양을 조절할 수 있어 RNAi에 대한 정량적 효율을 측정할 수 있음
- 기주범위가 넓고 토마토와 같은 대표적 작물d 기주이며 곤충매개로 전염되지 않는 Alternanthera mosaic potexvirus (Bipartite)를 담배가루이 RNAi 발현용 벡터로 제작 가능



나. 식물바이러스 벡터를 이용하여 담배가루이를 target으로 하는 RNAi 발현

- 담배가루이 EST를 바탕으로 RNAi 구조 제작 ⇒ 식물바이러스에서 발현 (250bp-500bp로 다양하게 제작) ⇒ RNAi의 target을 증식, 배란, 바이러스매개 accessory protein으로

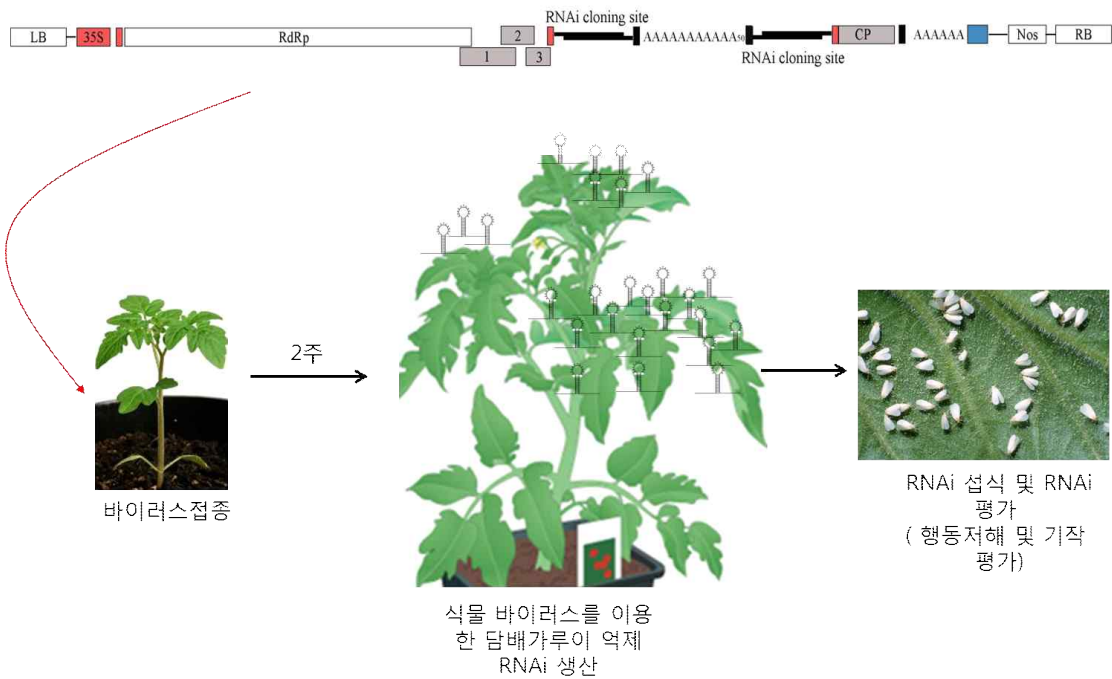
분류하여 제작

- 식물바이러스에 담배가루이 증식/배란/매개를 저해하는 RNAi cloning
- RNAi 종류는 200 가지 이상으로 하며 모두 식물바이러스에 cloning 함
- 200 종류의 RNAi를 포함하는 식물바이러스를 토마토에 접종하여 RNAi를 발현시킴
- AltMV의 helicase의 변형을 이용하여 AltMV 내에서 담배가루이 억제 RNAi 발현량을 조절가능하며 토마토에 AltMV를 접종하므로 RNAi를 토마토 내에서 발현시킴

다. 식물바이러스를 이용한 담배가루이 target RNAi 효율평가

- 식물바이러스를 이용한 200종류의 RNAi 의 발현율을 측정(토마토)
- RNAi 발현율에 따른 담배가루이의 섭식행동/흡수/제어 분석
- RNAi의 target인 담배가루이 mRNA 의 발현양 비교 분석
- 담배가루이 제어 RNAi 선별

선별된 RNAi를 식물바이러스를 이용하여 기작평가 →
 형질전환 토마토 제작 → 토마토에 RNAi 발현 후 담배가루이에 섭식



라. 비전염성식물바이러스 대량접종 방법 및 RNAi 발현 토마토 유묘 생산방법 확립(참여기업)

- 비전염성식물바이러스 대량 접종 기술 확립
- transient RNAi 발현 토마토 유묘 대량 생산

마. 담배가루이 제어 RNAi transient발현 토마토 효능평가

- RNAi transient발현된 토마토를 담배가루이에 직접 섭식시켜 담배가루이의 섭식행동/제어분석

2. EPG system을 이용한 담배가루이의 geminivirus 보독 여부에 따른 섭식행동 분석

- Electrical Penetration Graph(EPG)를 이용한 바이러스 비보독 담배가루이의 정상 토마토와 바이러스 감염 토마토에서의 섭식 패턴 분석
- EPG를 이용한 geminivirus 보독충의 정상 토마토와 바이러스 감염 토마토에서의 섭식 패턴 분석

제 3 절 연구성과 목표 대비 실적

성과목표	사업화지표									연구기반지표							
	지식 재산권		기술이전	사업화					기술이용	학술성과		교육지도	이력양성	정책 활용홍보		기타 (타 연구 활용 등)	
	출원	특허		제품화	기술창업	매출상승	고용상승	투자유치		논문				학술발표	정책 활용		홍보 전시
			SCI						비 SCI								
최종목표	1		1							2	5		1			1	
연구기간 내 달성실적	1		1							4	5	11	0			1	
달성율(%)	100		100							200	100		0			100	

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

- 세계적으로 담배가루이를 직접 목표로 이용되는 RNAi 는 개발되고 있으나 현장 적용은 어려운 상황임, 반면 본 연구개발을 통하여 신속하게 제어 RNAi를 선별하고 이를 식물바이러스 또는 형질전환 방법으로 작물에 적용하여 해충방제가 매우 용이할 것으로 기대됨
- RNAi를 이용한 해충제어기술은 국내에서는 처음으로 시도 되는 기술이며, 국외의 경우에도 RNAi를 이용한 해충제어에 접목한 경우는 찾아보기 어려운 실정임. 일부 글로벌 종자회사에서 RNAi를 접목하여 연구를 수행 중에 있는 것으로 판단되나 아직까지는 정보의 공개(논문이나 특허 등)를 하지 않고 있어 어느 단계까지 연구가 진행되고 있는지 알 수 없는 상황임
- 또한 RNAi 발현 식물바이러스 벡터 제작 기술은 미국 등 선진국에서 활용되고 있는 기술로 이 기술 또한 국내에서는 처음으로 시도하는 기술이며, 국외에서는 일부 시도한 논문을 찾아 볼 수 있으나 실용화 단계에는 미치지 못하고 있음. 그렇지만 이 기술이 상용화 되기에는 곤충의 RNAi의 종류와 작물의 종류에 따라서 그에 알맞은 비병원성 바이러스를 찾아서 적용해야만 하는 기술인 만큼 일률적으로 기술의 수준을 평가하기에는 무리가 있음
- 현재 특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), Aureka DB 등을 이용하여 기술 수준을 비교는 RNAi 기술과 유사한 특허를 가지고 있는 기술을 찾을 수 없는 실정임
- 기존 논문은 담배가루이의 EST libaray 분석과 RNAi 선별 연구 및 주사를 통한 RNAi 효과를 분석하고 있음
- 논문의 경우 2007년에 Ghanim, M et al이 *Insect Biochem. Mol. Biol.*에 투고한 “Tissue-specific gene silencing by RNA interference in the whitefly *Bemisia tabaci*” 논문에서 유사점을 발견할 수 있으며, 이 논문에서는 EST를 이용하여 RNAi 제작을 수행하였고, tissue 및 developmental specific gene expression를 RNAi로 저해시키는 연구를 수행하였으며, RNAi를 식물에 발현시켜 섭식으로 공급하고 RNAi는 식물바이러스벡터를 이용하여 공급하게 되는 과정을 나타내고 있으나 그 이후의 연구 결과는 알 수 없는 상황임
- 국내에서 whitefly 에 의한 geminivirus 의 피해를 예방하기 위하여 현재 농촌진흥청 연구소에서 담배가루이의 분포 및 geminivirus 의 기주범위에 대하여 연구가 되어 있으나 직접적으로 담배가루이를 제어 할 수 있는 기술개발은 되어있지 않음. 국내 바이러스 예방용 친환경농자재가 등록되어 일부 사용하고 있으나, 관련제품에 대한 방제효과 방제 기작 등 관련 연구가 되어 있지 않음. 따라서 이들의 연구를 통한 체계적인 방제력을 바탕으로 바이러스병에 대한 피해를 최소화하는 연구가 필요함

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 담배가루이 억제 RNAi 선별을 위한 high throughput 식물바이러스 개발

1. 토마토에서 담배가루이 RNAi 발현이 용이한 식물바이러스를 선정

- 토마토 감염 바이러스 전국적 조사 → 토마토기주 식물바이러스를 이용한 담배가루이 RNAi 발현 목적
 - 2012년 8월- 2012년 10월 까지 전국 원예/채소단지의 바이러스병 조사를 토마토 바이러스 선별 하였음
 - Soybean mosaic virus 와 Potexvirus X를 선별하였으며 상대적으로 크기가 작고 subgenomic RNA를 생산하여 RNA를 copy하는 Potexvirus X가 RNAi 적용에 용이하므로 Potexvirus X를 infectious clone 제작 후 RNAi를 삽입 시킬 multiple cloning site 제작하였음

2. Alternanthera mosaic virus를 이용한 gateway system RNAi 발현용 벡터 개발

- 가. RNAi를 용이하게 clone 가능한 벡터 개발 → 선별된 식물바이러스에 Gateway system 도입
 - Potexvirus Alternanthera mosaic viurs의 infectious clone 제작하여 아래와 같이 gateway system 적용한 AltMV-Gateway system 적용 vector 완성

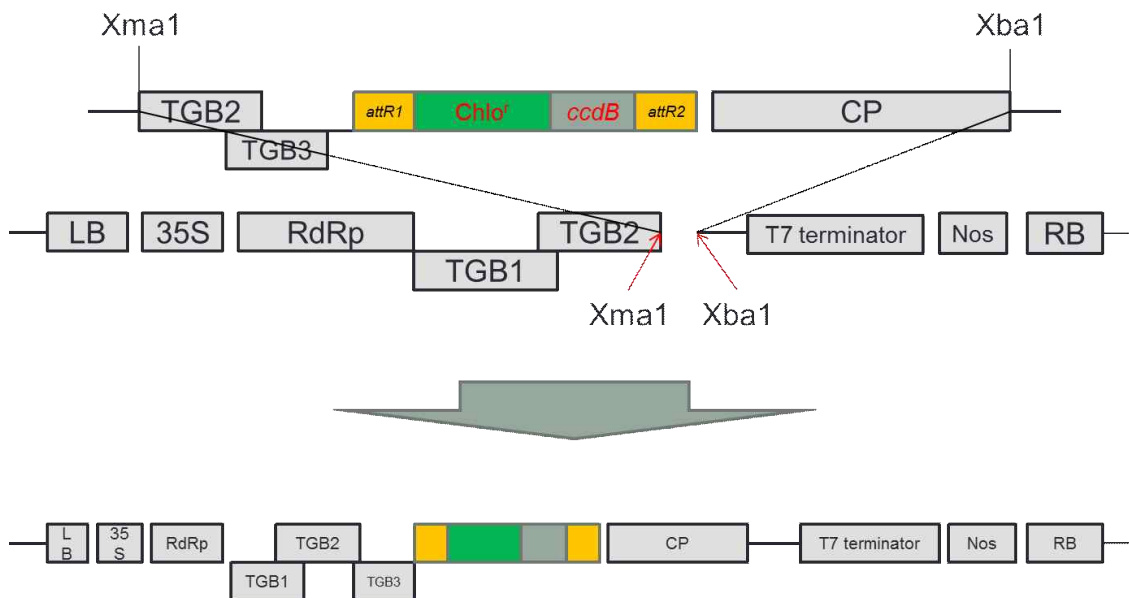


그림 9. AltMV gateway system vector

- Cloning 효율 100% → LR reaction 을 통한 용이한 cloning 벡터 제작

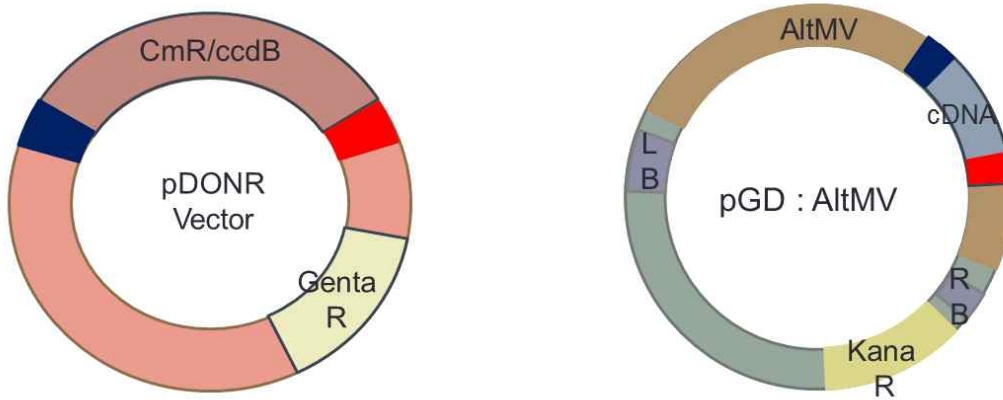


그림 10. Gateway cloning system의 LR recombination

- 나. 식물바이러스 벡터의 Silencing Suppressor 기능 조절 → RNA copy를 최대한 높이며 RNAi를 많이 생산할 수 있도록 조절
- AltMV TGB1 기능은 Gene Silencing Suppressor 와 Cell to Cell movement 기능을 유지하고 있으며 TGB1 의 아미노산 88번의 Leucin을 Proline으로 전환하면 Gene Silencing Suppressor 기능이 약화된다고 보고됨. RNAi를 식물바이러스에서 고농도 생산할 경우 식물바이러스의 Silencing Suppressor 기능은 반드시 미비해야 함. 따라서 아래 그림과 같이 아미노산 Leucin 를 Proline 변경하였음

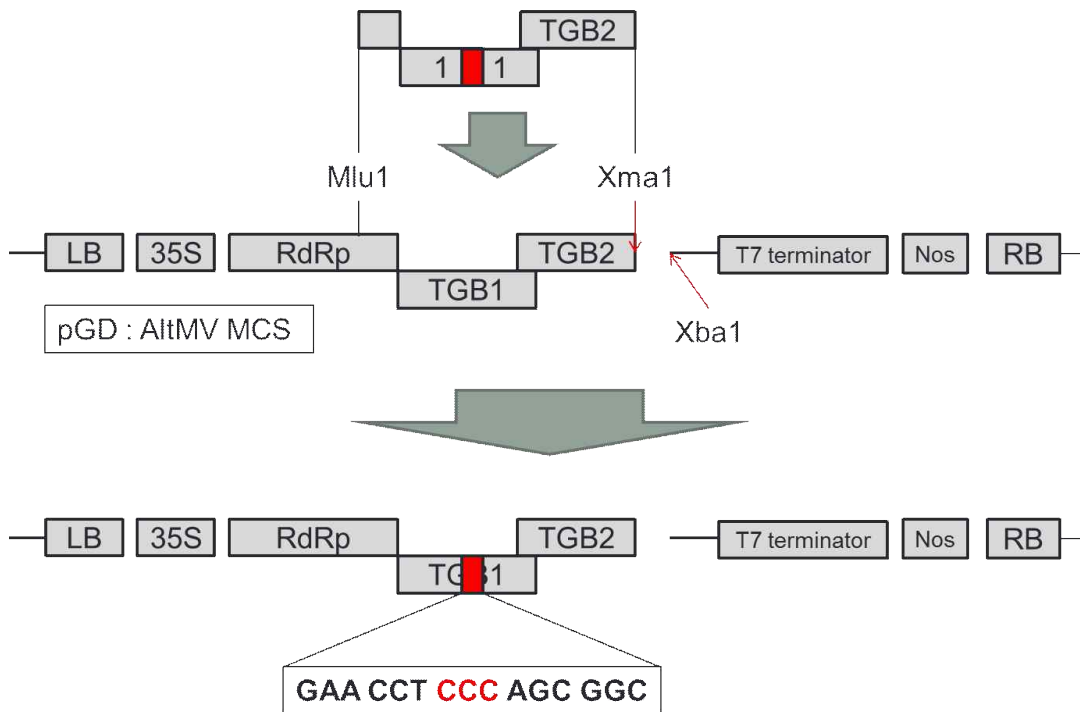


그림 11. AltMV vector modification

- 변경후 Gateway system 적용 하였고 두 종류의 벡터(AltMV-ATT-P/AltMV-ATT-L) 제작 완료하였음

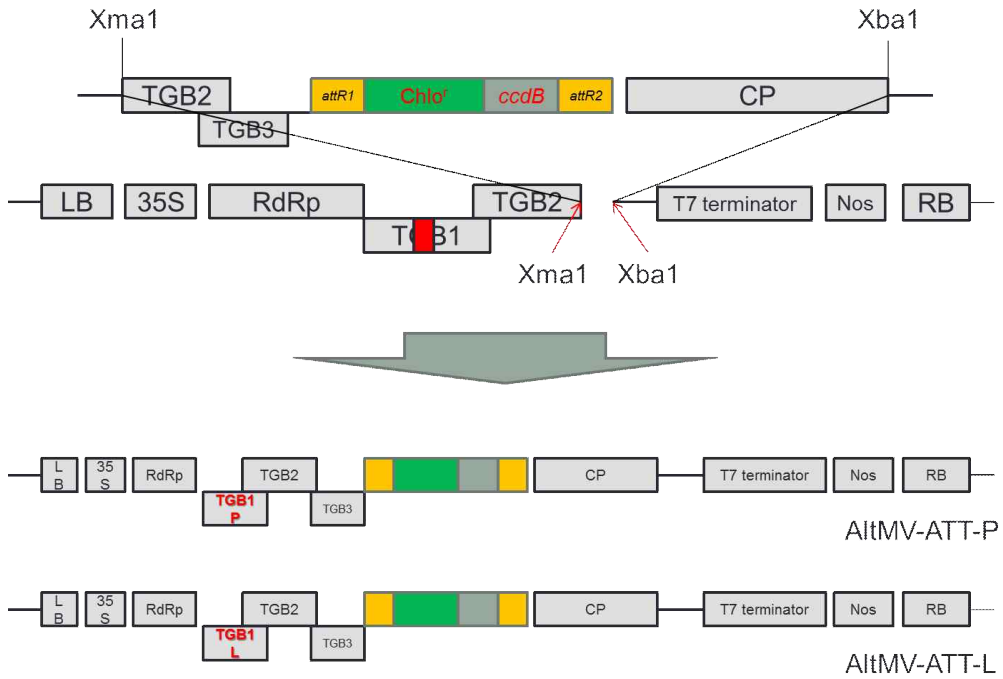


그림 12. AltMV Silencing Suppressor 기능에 따른 gateway system vector

3. Tobacco rattle virus를 이용한 gateway system RNAi 발현용 벡터 개발

- 가. TRV RNA1 SacI/XhoI 위치에 Gateway selection 서열 삽입 후 PDS RNAi 발현 효과 측정
- 1차년도 개발 대상인 Alternanthera Mosaic Virus의 접종 후 삽입된 RNAi 부분의 불안정한 이유로 토마토에서 안정적으로 발현되는 Tobacco Rattle Virus 로 변경하였음
 - TRV RNA2 MCS 위치에 SacI 과 XhoI 으로 자른 후 Gateway system의 ATT 염기서열을 아래 그림과 같이 삽입하였음(그림 13)

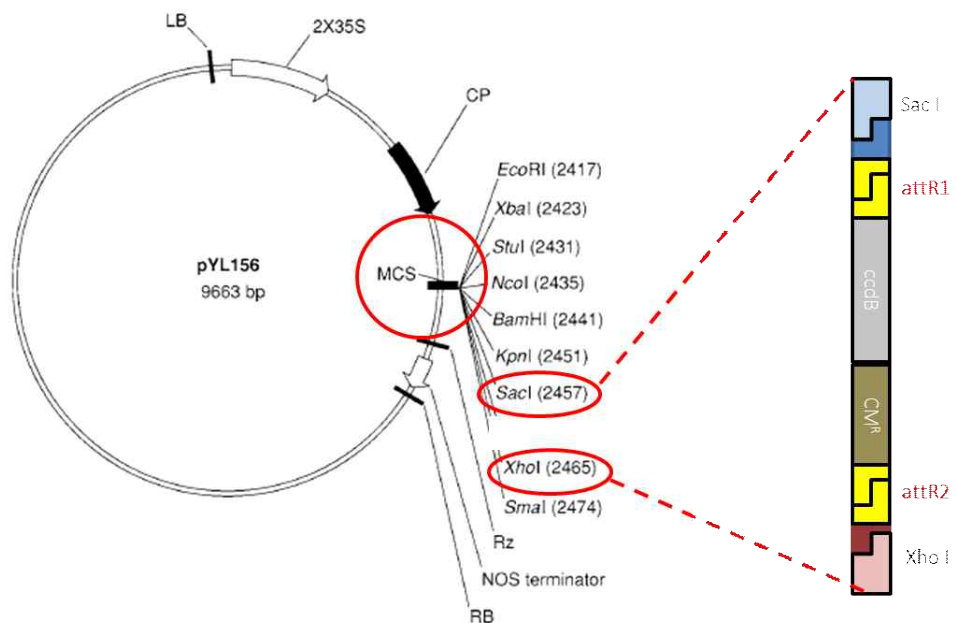


그림 13. TRV RNA2 Gateway system 삽입

- 상기의 벡터는 VIGS (Virus Inducing Gene Silencing) 용으로 사용되었으나 본 연구팀에 의하여 최초로 Gateway system 의 ATT 염기서열을 삽입하여 Cloning을 매우 용이하게 하는 목적과 담배가루이의 cDNA library RNAi 염기서열을 용이하게 삽입하는 목적으로 개발하였음
- 기존의 TRV VISG 벡터 (ATT Site가 없음) 와 본 연구팀이 개발한 TRV-ATT RNAi 발현 차이를 비교하고자 담배의 PDS 유전자를 삽입하여 PDS 유전자 RNAi 발현 및 효과를 확인 한 후 TRV-ATT 이용을 토마토 제어 RNAi 선별로 확대하였음

나. TRV RNA2의 RNAi 발현 확인 및 이용

- 기존의 TRV Vector는 ATT Gateway site가 존재하지 않음. 따라서 Gateway ATT site 존재여부에 따른 RNAi 효과가 감소 또는 나타나지 않을 수 있으므로 토마토에 감염을 잘 일으키며 병징 발생이 없는 TRV의 효과 검증이 필요함. 따라서 아래와 같이 PDS (Phytoene Desaturase) 유전자 250 bp (Genebank: EU165355.1, 301-560)를 삽입하여 비교 실험을 진행하였음(그림 14)

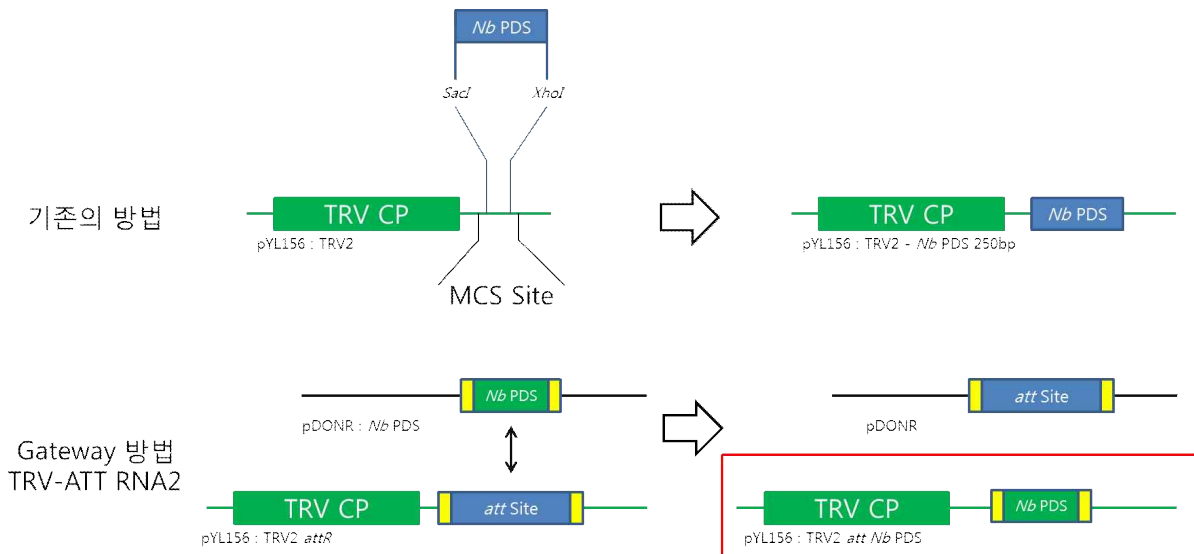


그림 14. TRV-RNA2 PDS RNAi 유전자 삽입

- 상기의 방법으로 제작된 RNAi 생산용 2개의 Vector (TRV & TRV : ATT)는 담배에 Agroinfiltration을 통하여 접종시켰으며 접종 후 30일 후 PDS RNAi 로 변화되는 표현형이 관찰되었음. 변화되는 표현형은 기존방법에 비하여 큰 차이를 찾을 수 없으며 PDS RNAi 의 발현을 확인함. 따라서 본 연구팀은 새로 개발된 TRV:ATT vector를 담배가루이의 genomic cDNA RNAi 발현 Vector로 이용 결정함(그림 14)

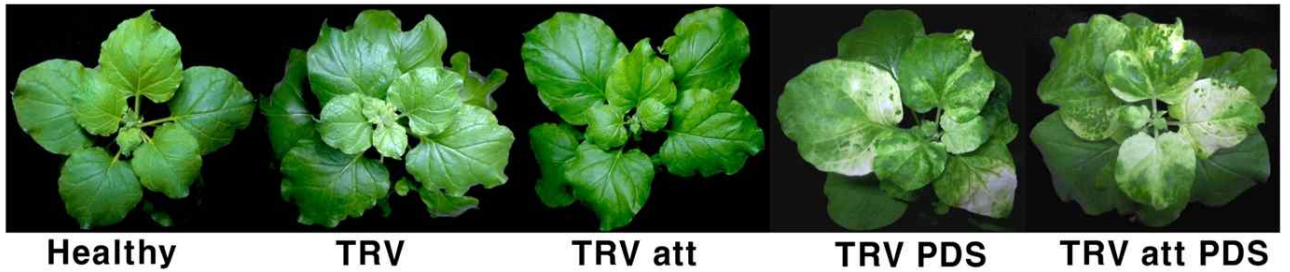


그림 15. TRV-ATT-RNA2에서 PDS RNAi 발현

4. 바이러스 관다발 이동 불가능한 바이러스 전환 개발

○ CP 가 제거된 Tobacco Rattle Virus 개발

- Seedling에 바이러스의 이동 기작이 제거된 바이러스를 접종 후 바이러스는 RNAi 만을 생산하며 접종한 CP가 제거된 바이러스는 Agroinfiltration 된 세포외에 새로이 형성된 세포로 이동이 불가능. 하지만 small RNA는 세포와 세포사이 관다발을 통하여 새로이 형성된 잎으로 이동함이 보고되었음

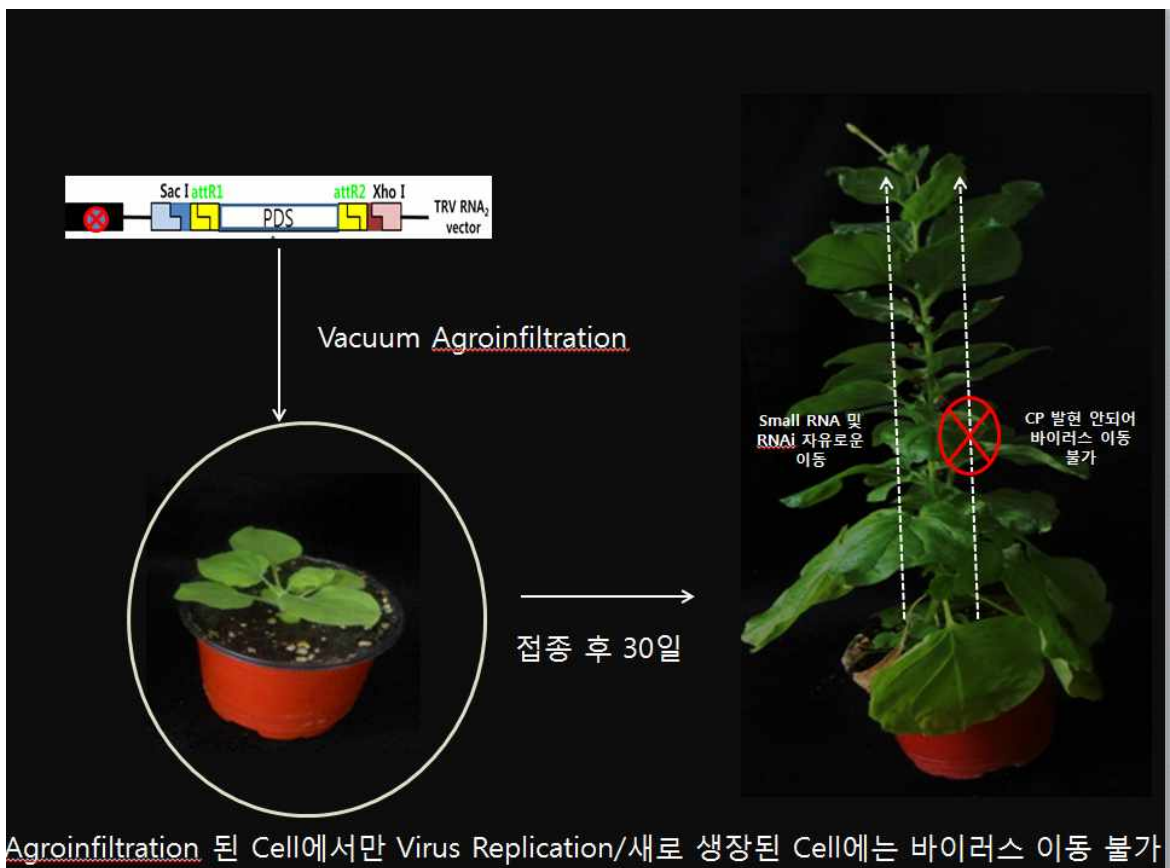


그림 16. RNAi 발현 바이러스 카세트 개발

- 따라서 상기의 그림 18과 같이 TRV 바이러스에서 RNAi만 발현시키고 바이러스 이동을 불가능하게 하여 Agroinfiltration으로 이동 불가능한 바이러스만을 접종 후 담배가루이 제어 RNAi 만을 발현시킬 수 있음
- 기존에 제작한 TRV-PDS-RNA2 벡터를 아래그림의 방법으로 CP region 에 ATG를 제거한

Inverted Primer를 제작하여 Inverted PCR를 수행하였으며 CP의 ATG가 제거된 TRV CP deleted PDS 벡터를 완성하였음

- 완성된 TRV CP deleted PDS는 TRV-PDS-RNA2 와 각각 TRV RNA1 과 접종하였으며 접종 후 30일째 TRV CP deleted PDS 처리 담배에서 PDS silencing 표현형이 미약하게 관찰되었음 → RNAi 이동 증명/바이러스는 새로운 세포에서는 검출되지 않음
- TRV 벡터의 이동단백질 연구를 다양하게 진행하여 CP 외 이동단백질관련 단백질 억제를 통하여 RNAi 량을 늘리는 방법을 모색하였으며 RNAi의 안정성(지속성) 확인

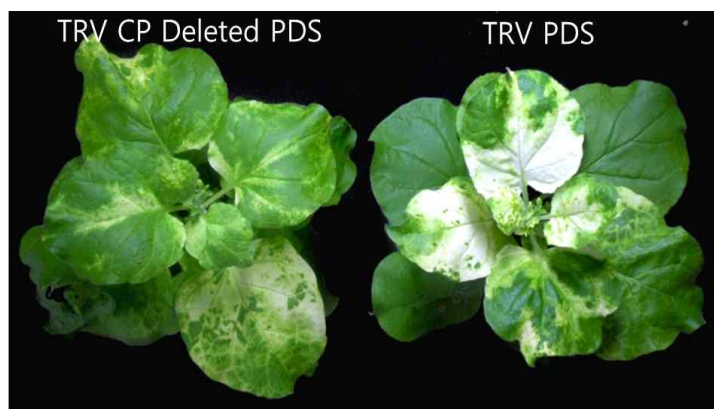
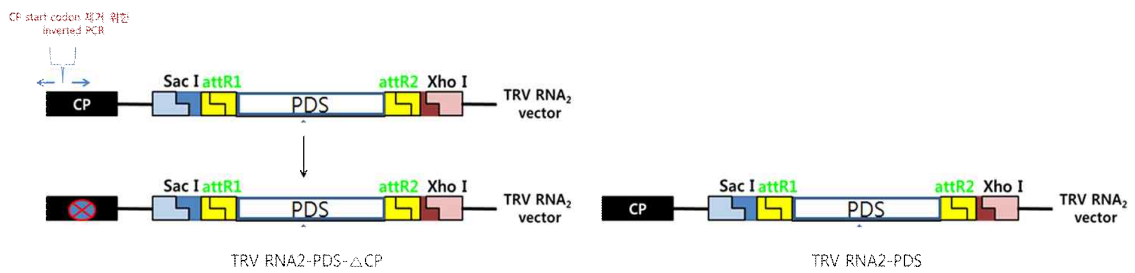


그림 17. CP가 제거된 TRV-PDS RNAi의 효과

제 2 절 RNAi 발현 토마토 유묘 대량생산 기술 확립

1. *Nicotiana benthamiana*와 Cucumber Mosaic Virus를 이용한 단백질 생산 업체 Fraunhofer 기술 연구

- Fraunhofer 에서는 유용 단백질생산을 위하여 식물바이러스에 단백질 ORF를 삽입 후 담배 Seedling에 아래의 그림과 같이 Vacuum infiltration을 통하여 바이러스를 대량 접종하며(그림 10), 접종 후 4주까지 담배를 성장시킨 후 단백질 정제에 들어감 (2013년 12월 15일 (주) 제노레버 코리아 중국 방문)
- 대량접종 기술은 특허기간이 만료되어 같은 기술을 토마토 대량접종에 적용하는 것에 문제없음



담배 Seedling Sorting 장치



담배 Seedling Agroinfiltration 장치
(200 seedlings/plate)

그림 18. 토마토 대량 접종 방법

제 3 절 담배가루이 RNAi 발현 토마토를 이용한 담배가루이 증식억제 유도

1. AltMV-ATT-P에 기 보고된 담배가루이 RNAi chickadee를 삽입하여 RNAi 발현 및 cloning 효과 측정

- 담배가루이 total RNA에서 ATT 엽기서열이 포함된 Chickadee 프라머를 이용하여 증폭 300 bp의 Chickadee 담배가루이 cDNA를 아래 그림과 같이 Gateway system으로 AltMV-ATT-P에 삽입하였음

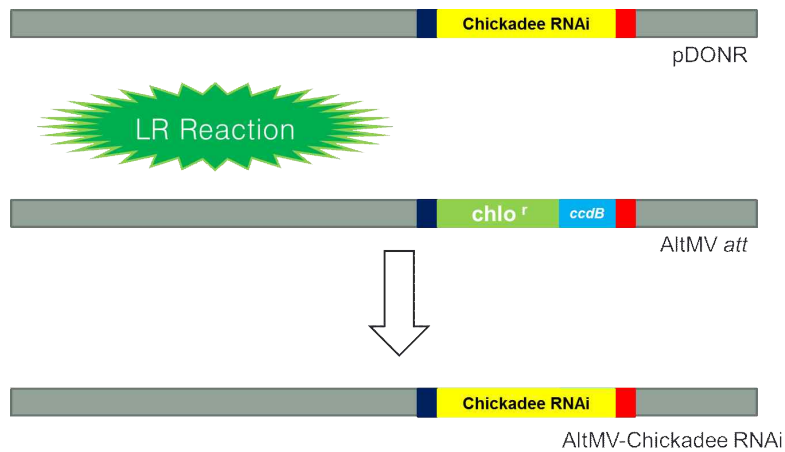
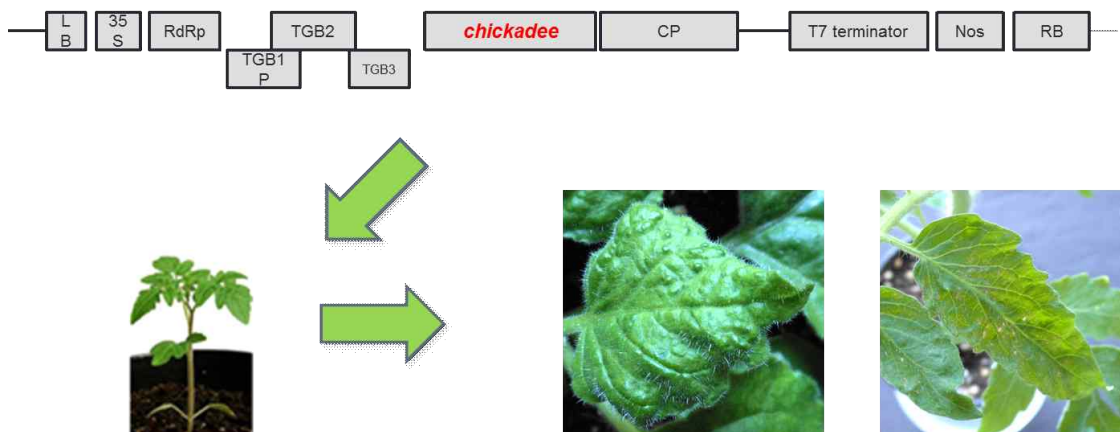


그림 19. Chickadee RNAi 클로닝

- AltMV-Chickadee RNAi는 토마토에 Agrobacteria colony 형태로 접종하여 아래 그림과 같이 병징을 접종후 20일 후에 유발하였으며 20일, 30일, 40일, 50일 간격으로 Chickadee RNAi 의 Ct value를 측정하였으며 (아래 표), 50일동안 안정적으로 Chickadee RNAi 는 발현됨을 real time qPCR로 확인하였음. Agrobacteria colony 접종으로 대량 접종 기술 적용 가능하게 됨



담배와 토마토에 접종

그림 20. Chickadee RNAi 효과 검정

표 1. 담배가루이 Chickadee RNA 감소량 평가 (q-RT-PCR)

	20 일	30일	40일	50일
Actin Ct	22 ±0.4	25 ±0.5	26 ±0.4	24 ±0.2
Chickadee RNAi	12 ±0.2	13 ± 0.1	14 ±0.3	12 ±0.4
Delta Ct [Actin-Chickadee]	10	12	12	12

- AltMV-Chickadee RNAi는 토마토에 담배가루이 개체수 감소 확인

2. RNAi 발현 토마토에서의 담배가루이 치사율 확인

- RNAi 발현 토마토에서 담배가루이의 치사율이 증가함을 확인하였고, 담배가루이의 Chickadee RNA 발현을 Real-time qPCR로 측정하여 토마토에서 AltMV를 통하여 발현하는 RNAi가 직접적인 효과가 있음을 확인함.



그림 21. 담배가루이 RNAi 접종 실험

- 동일 개체의 사육된 담배가루이를 그림 1과 같이 AltMV-Chickadee RNAi 발현 토마토, AltMV만 접종된 토마토, 바이러스를 접종하지 않은 토마토에 사육된 담배가루이를 아크릴 케이스에 방사하였음. (온도 $25 \pm 10^{\circ}\text{C}$, 광주기 16L:8D, 상대습도 50~60%, 아크릴 사각 케이스(30 × 30 × 50cm). 20일 후 real time qPCR 이용하여 잎에 서식하고 있는 담배가루이와 바닥에 치사된 담배가루이의 Chickadee mRNA 발현량을 비교하였으며 잎에서 서식하고 있는 담배가루이의 Chickadee mRNA의 발현은 약 8 배가량 감소되었으며(표 1) 치사된 담배가루이에서는 16배 감소 확인되어(표 3) 바이러스를 통한 RNAi 가 섭식을 통해 직접적으로 담배가루이에 치사를 유도했음을 확인하였음.

표 2. 잎에서 서식한 담배가루이 Chickadee mRNA 발현억제 효과

평균 Ct (15마리 담배가루이)	AltMV chickadee RNAi 접종 토마토	AltMV 접종 토마토	Control
chickadee	29.68	26.15	27.27
actin	28.64	28.51	29.44
delta Ct (chickadee - actin)	1.04	-2.36	-2.17

표 3. 죽어있는 담배가루이 Chickadee mRNA 발현억제 효과

평균 Ct(15마리 담배가루이)	AltMV chickadee 흡즙	AltMV 흡즙	Control
chickadee	31.57	29.64	28.03
actin	29.52	31.76	29.51
delta Ct (chickadee - actin)	2.02	-2.12	-1.48

제 4 절 담배가루이 제어 우수 RNAi 평가 및 선발

1. 담배가루이 cDNA 제작(200-250 bp fragment)

- 담배가루이 (*Bemisia tabaci*)를 25C, 광주기(L:D=16:8), 55%의 상대습도로 담배가루이를 사육한 후 TRI reagent로 total RNA를 추출하였으며 FastTrack MAG mRNA isolation Kit을 이용하여 담배가루이의 mRNA를 정제하였음
- 담배가루이 cDNA는 SuperScript Full Length cDNA Library Construction Kit II를 이용, 그 protocol을 본 연구 내용에 맞게 수정하여 실험을 수행하였음. 정제된 담배가루이의 mRNA는 아래의 random primer를 이용하여 cDNA를 합성하였으며 RNase 처리 후 남아있는 RNA를 제거하고 담배가루이 total cDNA만 정제하였음. N25 random primer는 Gateway system에 용이하게 cloning되는 adaptor 서열을 붙이기 위한 목적임(그림 22)

primer	sequence
N25 random primer	5'-Biotin-GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGG(N) ₂₅ -3'

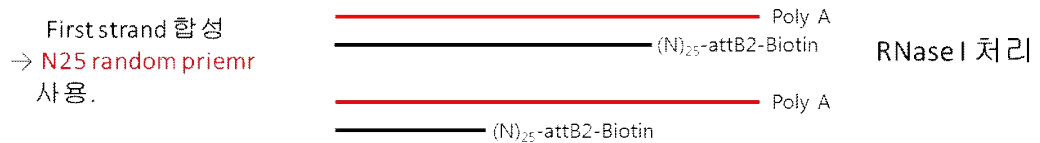


그림 22. 담배가루이 cDNA 합성 primer design 및 적용

- 최종 합성된 담배가루이 cDNA library는 RNAi로 작용하기 위해서 토마토에서 발견되는 식물바이러스 (Tobacco Rattle Virus)의 Gateway site에 모두 삽입되어야 하므로 cDNA의 크기는 250 bp 미만이어야 함. 따라서 아래의 그림과 같이 합성된 담배가루이 cDNA library는 초음파로 분쇄하는 Step을 추가하였음. 본 연구팀은 초음파 처리시간에 따른 RNAi cDNA library 생성차이에 대한 차이점을 산출하여 초음파처리 1초가 최대량의 담배가루이 cDNA library 생산에 적합하다고 결론지었음(그림 2)

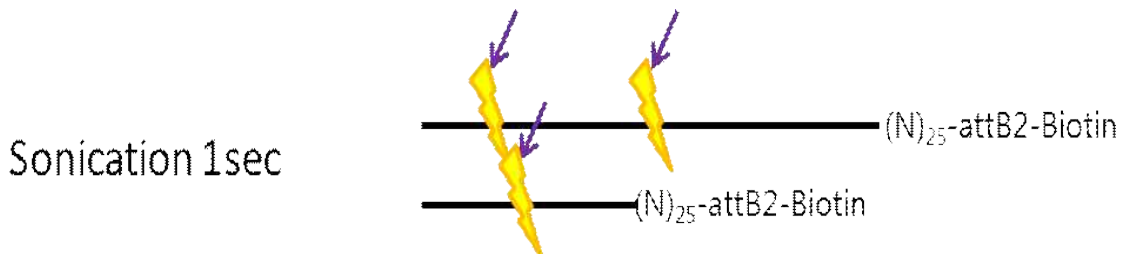


그림 23. 250bp cDNA 제작을 위한 초음파 처리

primer	sequence
attB1 adapter	5'-TCGTCGGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGG-3' 3'-CCCCTGTTGAAACATGTTTTTTCAACC p-5'

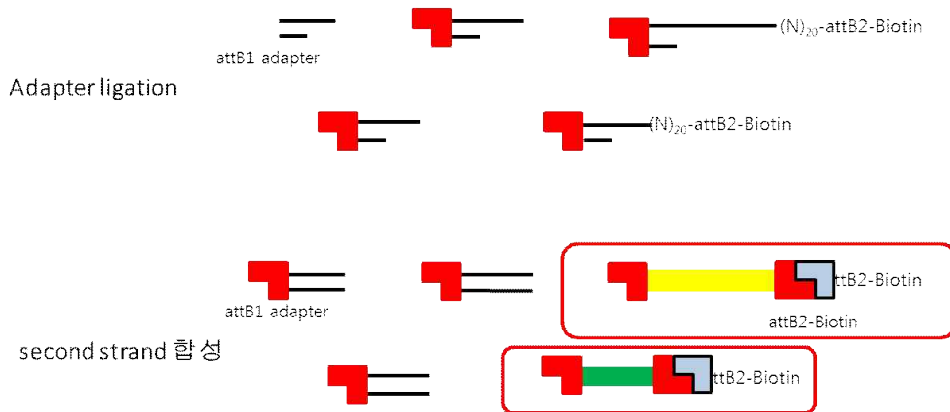


그림 24. 담배가루이 cDNA RNAi Gateway adapter 삽입

- 초음파 처리 후 정리된(250 bp 미만) 담배가루이 cDNA library는 그림 6에 제시된 attB1 adapter primer를 이용하여 5' 과 3' 에 Gateway adapter site를 추가 부착하였음. 초음파 처리 후 N6 와 N25 primer를 이용하여 담배가루이 cDNA를 증폭함. N6 Primer 의 담배가루이 cDNA의 증폭이 500 bp 상의 cDNA가 고농도로 존재하여 N6 primer 로 증폭된 cDNA를 pDONR 207 BP reaction 단계로 진행하게 됨(그림 25)

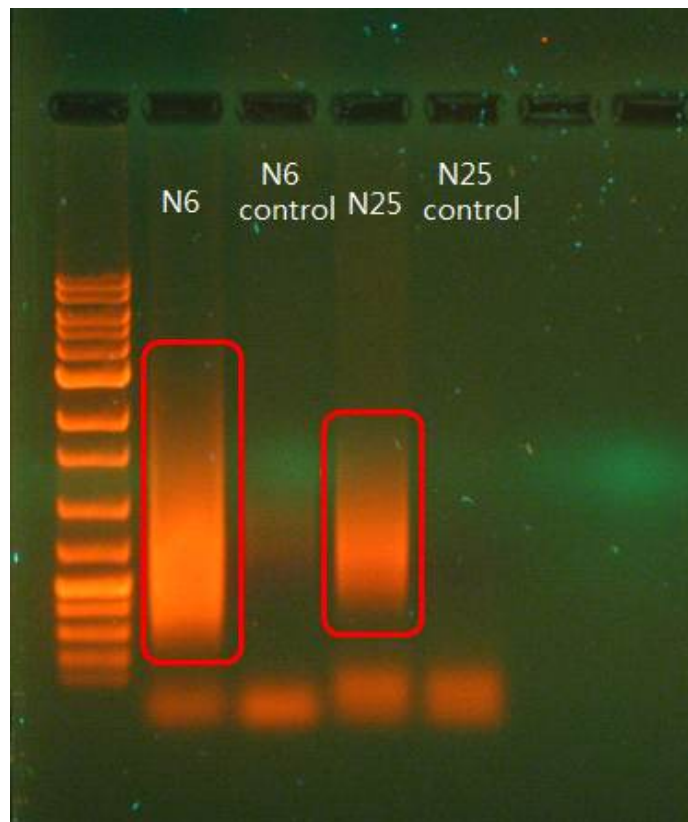


그림 25. 담배가루이 genomic RNAi용 cDNA 증폭

- 담배가루이 cDNA library 의 5 ‘와 3’ 부분에 성공적으로 adapter 가 부착된 cDNA library 는 N6 random primer 과 5’ primer를 이용하여 second strand 가 합성된 cDNA library fragment를 증폭하여 Gateway donor vector 인 pDONR 207 vector 에 삽입하여 최종적으로 TRV-ATT에 삽입하게 됨(그림 26)

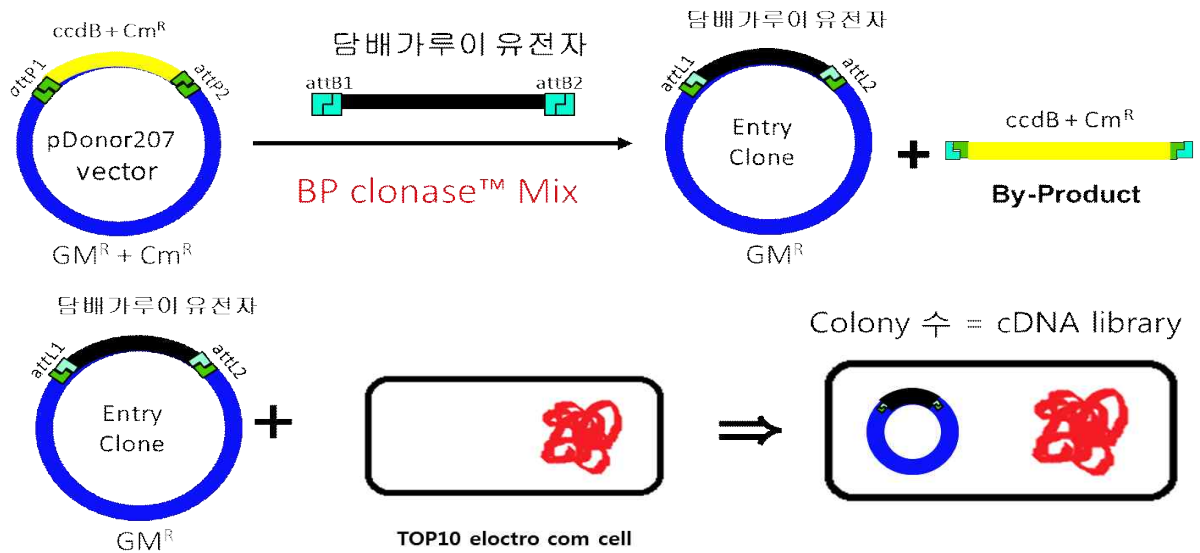


그림 26. 담배가루이 Gateway cDNA genomic library 생산 방법

- ATT Primer 로 증폭된 250 bp 미만 cDNA library 는 Gateway donor vector에 삽입되어 E Coli에 넣어주게 되며 항생제 저항성을 갖은 세균 개체(즉 담배가루이 cDNA library가 존재하는 세균) 만이 콜로니를 형성하며 세균 콜로니 하나는 각각의 담배가루이 cDNA가 삽입되었다는 것으로 해석될 수 있음. 따라서 콜로니수가 106 개가 되어야 cDNA library 제작 성공여부를 판단 할 수 있음. → **세계 최초 담배가루이 gateway용 cDNA library 생산(그림 26)**

Dilution	Amount Plated (ul)	Colonies Per Plate	Titer (cfu/mL)	Average Titer (cfu.mL)	Total Volume (mL)	Total CFUs (cfu)
10^{-3}	100ul	262	2.62×10^5	2.91×10^5	6	1.75×10^6
10^{-4}	100ul	32	3.2×10^5			



그림 27. 담배가루이 Genomic cDNA library 생산 및 library 수 확인

2. 담배가루이 cDNA 제작 (200-250 bp fragment) 후 106개의 cDNA library 의 redundancy 확인

- 10^6 의 cDNA library를 포함하는 세균 colony 수는 충분한 담배가루이 cDNA가 삽입되었다고 할 수 있으나, 때로는 특정 mRNA의 발현양이 많은 경우에는 한 두 종류의 mRNA 의 cDNA가 다수 전체 cDNA library 에 존재하는 경우가 있음(그림 28)
- 따라서 반복적인 cDNA 가 존재여부를 확인하기 위하여 본 연구팀은 상기의 그림에 나타난 콜로니 20개에서 담배가루이의 cDNA를 지니고 있는 plasmid를 추출하여 삽입된 크기와 염기서열을 아래와 같이 직접 확인하였음 (표 1)

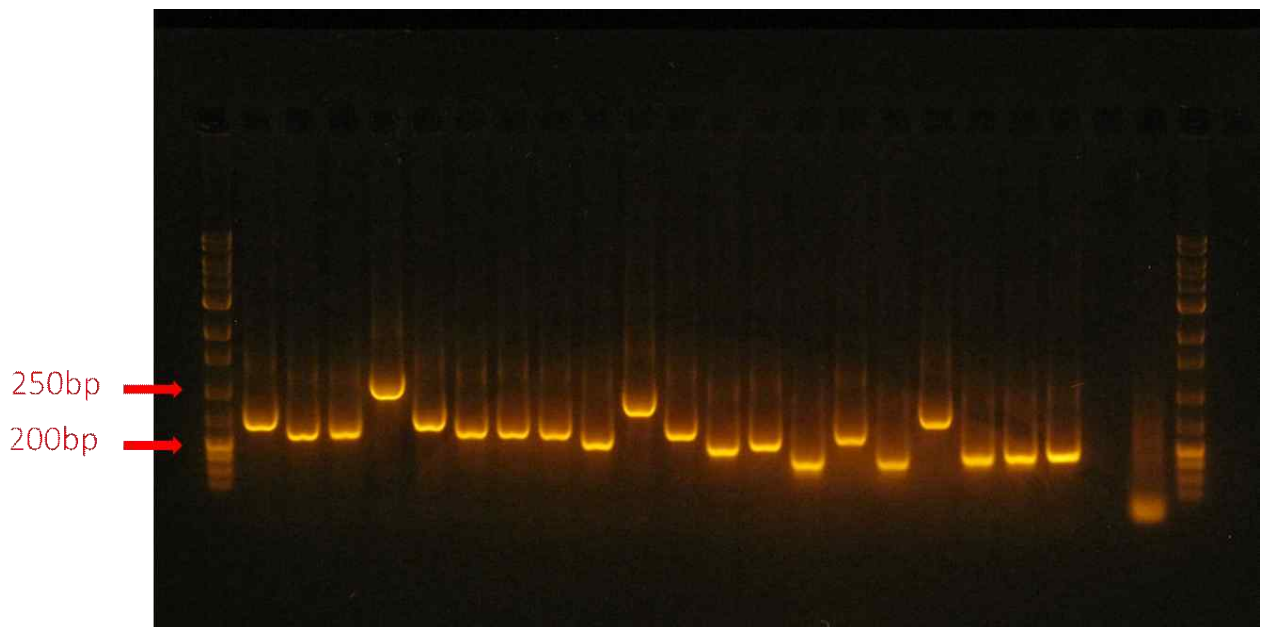


그림 28. 담배가루이 cDNA library의 redundancy 및 크기 확인

- 각각의 세균에서 plasmid를 추출하여 삽입된 위치의 5' 과 3' 의 primer 염기서열을 사용하여 PCR로 증폭하여 200-250bp의 다양한 크기의 담배가루이 cDNA library 가 cDNA library로 구성됨을 확인하였음. 또한 각각의 PCR product 는 염기 서열 확인 작업을 통하여 아래와 같은 결과를 획득하였음

표 4. 담배가루이 cDNA library의 RNAi 염기 분석

염기서열	Sample 수
담배가루이(<i>B. tabaci</i>) 유전자	15
다른 유전자 및 data 정보 없는 유전자	5
Sequencing fail	0

3. 20개 cDNA library 의 염기서열(15개 Genebank 확인 / 5개 Genebank 존재안함)

- 20개의 염기서열로 볼 때 본 연구팀이 개발한 담배가루이 cDNA library는 200-250bp의 다양한 크기와 Redundancy가 없음을 확인하였음

Whitefly cDNA Library sequence data(2014-01-22)

No.1 EST:C_Forward-2098 *Bemisia tabaci* forward SSH library *Bemisia tabaci* cDNA, mRNA sequence.

Blast: (*Bemisia tabaci* biotype B vitellogenin mRNA)

```

1      TTGAGGAAC T CAGAACCCTG GACGCGAAAC AAATGGAACA AGCTTCCCAA GAGCTTCATT
61     TCAACTCCGC CCAGGCCTCC AGCCACAGCC GTCAAGATGC TCTGAAATCT CTCGCCTGGA
121    AATCCTTCTG TGATGCCTTA GTTGAAGCCG GTACCGGACC TGCCTTTTTG CAAATCCAAA
181    AGATCATTGA ACACCAACAA GTCTCCGACG CCGAAGCCGC TCGCATGATC AGCCGTCTTC
241    CAGTCACCGC TCGTTTCCA GACAAGGAAT ACATGAACTC TTTCTTCAAC TTTGTCAGAT
301    CCAACAATGT TCAACACCAG AACCAACTCA ACGAAACTGC TCTCCTTGCT TTCGCTGAGC
361    TTTGCCGTAA AGCCGATGTA AACGCCAGGT ACGCCACGA TTAG
  
```

No.2 EST Data 없음

Blast: (*Bemisia tabaci* biotype B vitellogenin mRNA)

```

1      CTGAACATGC GCGTTGGGAG GGTCTGGGCA GATGGGTTGG TTCCGAAGAT TAAGAAGACA
61     GCGGCAACAC GGACTTCTTG GTTTTCTTGG GTGTTTTGGT AGATCTTGAA GAGGACATTG
121    CGGGCAAGGT TGGGGTAGAC GCGTGCAAGT TCGTTAAGGG AGAGGACCAT GACAGTGCCT
181    TGGAAGTTGG AGATTGGGAC CTTTCTTCA AGGTAGGGCT CGAAAATTTC GAGGATCTTG
241    GGGTGAGCAA AGTTTCCAAT GGCACGGATG TAAGCTTGGA TCTTGCGGCA CTCCCCTCCG
301    CCGCGGCC
  
```

No.3 EST: BL-15033 *Nilaparvata lugens* illumina library *Nilaparvata lugens* cDNA 5', mRNA sequence와 유사

Blast: (*Acyrtosiphon pisum* twitchin-like)

```

1      ATCTGGTTGT ATGCTTCTTT GGCTGGTCAT CTTTATCTTA ATCTTAAAAG ATTCTTTGAT
61     TTGTTTCGTG CCTTTGTACC ATGTGAATGT GGGCGTTGGC TTGGCAGTGC ACTTGCATTT
121    CATGACAATC GGAGTTCCAC TTTTATTTGG AATGATTTTG GTTTCTCGA TGAAAGAGGG
181    AGCAAATCCG GCTCCATTTT CACCACTGTC AAAATTTAAA CTAATTGTAG CATTACTTTC
  
```

241 TCCTAATTCA TATTTGGCGG TCACTTTGTA CTTCCCCGCG TCTCATAGCG TCAGTACG

No.4 EST: AJAG-aaa20a01.g1 Aph cDNA-InfSeedling *Aphanomyces cochlioides* cDNA, mRNA sequence와 유사함.

Blast: (*Cardinium endosymbiont* cEper1 of *Encarsia pergandiella* complete genome)

1 GGTAACCTAC CGTGTCCAGA CGAACTCCGA AACTATCAG TTTTGCTTAG GAGTGAGGGC
61 TAGGGCGTTA AGGTCCTAGT CCGAGAGGGA AAGAACCAG ACCATCAGCT AAGGTCCCCA
121 AATATATACT AAGTTGAACT AAGAAGGTTT AGTTGCTTAG ACAGTCAGGA TGTTGGCTTG
181 GAAGCAGCCA TTCATTTGAA GAGTGCCTAA CAGCTCACTG ATCGAGCGAC AAAGCGTCGA
241 TGATAAACGG GCATTAAGTA TATTACCGAA GCTATGGCCT TGCTGCTTTG GGCAGTAAGG
301 GGTAGGAGAG CATTCTAATA AAGCTGAAGC TAAGTAGTAA TGCTTAGTGG ATTGATTAGA
361 AAAGAAAATG TAGGCATGAG TAACCAAAAT AATGGTGAGA AACCATTACA CCGTAAGACT
421 AAGGTTTCCA TGGCGATGGT TGTCATCCAT GGGTTAGTCG GTCCCTAAGC TGAAGCCAAA
481 AGGCGTAAGT AATGGAAAAT CGGTTAATAT TCCGATACTA GCTAGCAACA AGAGAAGGGG
541 GGACGAAAAA GTGAAAAGTC TGCCTTCTGA CGAATTTAGA AAGTTAAAGC CCGTAGATAT
601 AGGTGTGGCA GGCAAATCCA CCATACTTGT CGAAAGTGAT AGTACTGCAA TCCTCCGGGA
661 GCGTAGATAT GACCCTAATC ATGTTTCAA GAAAAGCCTC TAATCGTTTT AGTGTTAGCA
721 ACCGTACCCG CGAA

No.5 EST: TYLCV008_B01 Whitefly *Bemisia tabaci* (reared on TYLCV infected plants) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence.

Blast: sequence 정보부족

1 CATAGAGTGC GGGTGGAGTG TGCCTGACGA CATAGGGTTG TCCGTAGTAG TGGAAACAG
61 AGGGGGCGGC GTGGTGCTCG AGGACCTGGG GTTACGGTG GACTCCGTAG GTGAACGGAA
121 CCGGGAGCTG GGAATCACG ACGACGGGCT TGATCTCGG AACGGGGGCC GGGCAGGGAG
181 CGTGGGCGTG CTTGTACGAG GGCTGGCTGA TGACGTCATA TTTGGCCTGG ACTGGGGCGG
241 CTTGATCTT GGCCGGGGCC TGGGCGTAGG TGCGGTAGGA CTGCGGGTAG GCCGGGTACT
301 GGTAGGACTG CTGCTGGTAG TACTGCTGCT GGGGGTACTG GTACTGTTGG TAGGAGTCGG
361 CGAAGTACGA GGGGCTGGCG GCGCGGGGCC GGAGTT

No.6 EST: BT-HINST-023-1-F3-T3_F03 Whitefly *Bemisia tabaci* instar (crawler to pupae) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence

Blast: *Bemisia tabaci* heat shock protein 90 (HSP90) gene, partial sequence

1 CCCGAGATAC ACGGCGCGGG GGCATCTGAT GAGTTGGAGA TCAGTTCTCT TAAGAAAAT
61 TCTTTATTAG AATAGAAGGT GTTGACGATC AATGACATCA ACTGGGCGAT TTCGCGCTGG
121 AAAACAAAGG TTTCGGCTTG TTCATGGTT GCGTCTTCTG GCATCTTGGT GGAATGAAT
181 TCGGACAACA CGAGGTAGAA AAAGAAGGAG TAAAAAGGCC TGCGAATGCC GCTTCCGCCT
241 CAGAGACTTC GAACTTTCAA CTTCTTTGT GAGTGCCTGT TTTCTCGAGG TTTCCGAGCT
301 CCACCGCTAG CGAC

No.7 EST: 5_Reverse-4679 *Bemisia tabaci* reverse SSH library *Bemisia tabaci* cDNA, mRNA sequence.

Blast: *Bemisia tabaci* biotype B vitellogenin mRNA, complete cds)

1 GTTATTGTGT ATGGCTTGT TTGGGTATCT GCAAGTTGGG ATGGAGTTGA CGGAGAAGCA
61 GGTCTTGTCT CCTTCGTTCA TGGAGCGGTA AAGCTTGTGG ATGGATGGTC CGTTTTGGTT
121 TCTCTGTTTC TAGCTCTCCA TGCTTGGGCT GGAGGAGGAG CTGCTGCTGG AGGAACTGCT
181 GGAGGATCCG TTGCGGTTCT TGTTGCGGTT GTTGTGCGG TTGTTGTTGT CGTTGTTGTT
241 ACCGTTGTTG TTGTAGTAGT AGGAGTTGTC CATGGAGGAG GAAGAGGAGG AACTGTCAGA
301 GCTGGAGGAG GAAGAGCTGC TGCAG

No.8 EST: EST Data 없음.

Blast: *Bemisia tabaci* biotype Q vitellogenin mRNA, partial cds)

```
1 ATGCTTTTTT TCGTGTGTCT GGGGCTTGGT AGAGCTTGGG GAAGGGTTGG TGTTCTTCTT
61 CGCTGCTGGC GACAGAGGAT CCGTAGGAGC TGTTGTCGTC AGAGGATGAG CTGGAGTCAG
121 AGGAGCTGGA GGAGCTAGAG GAGCTGGAGG AGCTGGAAGA GCTGGAGGAG CTGGAAGAGT
181 CAGAGGAGTC AGAGGAGCTG CTGGAGGAAG AGGATCCAGA TCCGTGGTGG CGGGCAAAGC
241 TGGCGAATTT GCCGTTGTTG TAACGGTCGT TTTCTCGGA GCTGCTGGAG CTGGAGCACC
301 GTCGCGCACG CGT
```

No.9 EST: BT-TYLCV-050-1-F6-T3_F06 Whitefly *Bemisia tabaci* (reared on TYLCV infected plants) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence.

Blast: blast상 sequence 정보부족

```
1 GTGGGGGTCG GACCTGTTTCG CGTGTGTTGT ACTGGGCGGG GGCAGGAGTAC TCGGCGGCGG
61 CCGTGTAGGC GGGAGCGGCG TACTGGGCAA TAGGGGCGGC CTCCTGGTAG GACTTGTACT
121 CAGAAGGGTA GCGGGGTGCG GAGTACTGCT GGGGGTACTG TTGGTAGGAG TCCAAGTAGG
181 CTGGGCTGCT GGCAGCTTGG CCGTAGTACG GTCCCCGGT GCGCTCGGTG
```

No.10 EST: EST Data 없음. (예쁜꼬마선충 25% Query cover)

Blast: blast상 sequence 정보부족

```
1 ACGGGGCTGC AGGGGGTACT TGGGGCGAAG GCGGGTGCTG GGGCGAAAGC GTGATGAACG
61 TATGCGGGGG CGTAGGCTGG AGCGAAGGCA GGTGCTGGAG CAAAGGCGGG TGCTGGAGCA
121 AAGGCGGGTG CTGGAGCAA GCGGGGTGCT GGGGCGAAGG CGGGTGCCGG AGCGAAGGCG
181 GCGGCGGTGG CAACGGCGTA ACGCTTTTCA CGGCTGAGCT CTGTGGACTC CTCTCCGTAG
241 GCGAAGACGG CGCACAAGGC GAAGACGACG GCAACCTGGA ATTCATGTT GGATTTGGT
301 TGGTGCTGCT GAGCCGTGTT ATCGAATGGA AGGCACAAAA GAAATTGATG CCGTTTGATG
361 ATTATTGGAC TCTTTTATAC AAATGGGAAA AACTGAGTGG TGGTGTAAT CTGATCCTCT
421 CAGTTTCTTA TTTCGGGATT TCGCAGGCTT TGTCAAAGTC ATCGATAGCT GTGGGCTGCA
481 GCGCCGACGA GAAAATATCT AGATCGCACA TCTCATCCAC ATCTACGAG GTCGGCC
```

No.11 EST: BT-TOMOV-016-1-F9-T3_F09 Whitefly *Bemisia tabaci* (reared on TOMOV infected plants) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence.

Blast: blast상 sequence 정보부족

```
1 AAGAAAGATA GCGTGGGGGG GGGCCGACTT CTTGACGAT GACGGCTTGG GGCCCTTCAA
61 GCTCATGAAC TTGAGGGTGC TCGTAGTTGT CGACGATCAC AGGTTTCTGG GTGTAGGCGT
121 GGAGGACTGC GCTCTGGTGG TGTTTCAAA CGTACGGCTG GGCATAGTAG TTGATCATTT
181 GCGGGGCTGA GTGGTGTTC AGCACCTTAG GGGTGAGAGG GAGCCGAAG GTGTACGGGA
241 CCGGGTGCTG GACTGGACG GTGACAGGCT TGATCTCCGG GACCGGGGCT CAGTGGGCGA
301 TTGG
```

No.12 EST: E_Forward-2275 *Bemisia tabaci* forward SSH library *Bemisia tabaci* cDNA, mRNA sequence.

Blast: negative sequence

```
1 CTTGCCTCTG TCCCATCTCT AGACAGTCAC GTTACCCTA GTCTAAGACC AGCTGCTGCC
61 AAAGCTGCAA AGAGCACAGT GCAGTTTGA GACTGTAG AGCATTACT CATCAAGTAC
121 GGTAATAAAA TTGTGAATGA GCAGTTCCTC TTGAATAGGC TTGCCAAGC TGAACCATAC
181 GATCT
```

No.13 EST: HBT004_H01_T3_015 Whitefly *Bemisia tabaci* (non-viruliferous) cDNA

library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence.

Blast: blast상 sequence 정보부족

```
1 GGTAGAGTGG GGTGGAGCGG CATCACGGAC TTGGTAGACT GGGTACTGAG ATTGAGAGGA
61 GATCTCGGGG GCGGCAGCGT ACTGGATTCC GGATGATTCC AGAGACTTCA GGTCACCGGC
121 GTAAGCGTAA GAAGGGTACT GCTGGTAGGA TCCTCCGTAG TAAGACTGGC TGTTGGCCGG
181 GATGTTGTAG TAAGGGTACT CGGCGACATG TTCAGCTTGC TAG
```

No.14 EST: EST Date 없음.

Blast: blast상 sequence 정보부족

```
1 CCAAGCGATG AATGTGAAGT GTGTGTATCG ATGGTCAAAC GATTTCAGC CACTTTAGAC
61 AATCAATCA AAGACAACCC CAGCCCTCTA CTCTGGCAC
```

No.15 EST: BT-TOMOV-022-1-E11-T3_E11 Whitefly *Bemisia tabaci* (reared on TOMOV infected plants) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence.

Blast: blast상 sequence 정보부족

```
1 TCAGTCGGCA TGGGTTAATA TTATTCAATT TGTCTGAAAC TTGGCAGAGT CTTCTTGTTT
61 AAATGAATTG ATTCAGGGA GTAAGACCAA AAAAATTCTC AAAAGAAATT TTTCCATGTG
121 TGATTGGGCC ACTATAGCCA TCGATATGAT AAATCCGGTC CTTGAGTCA CGTCACTCCG
181 CTTGATTGCA ATCAATGTAT TCTGTTCTAT TTCGGAGCGA CCCTAGCAAC CTGAAAATTT
241 TTGCATCGTC TTGCAAACC CACTACTACC CCTAGGTG
```

No.16 EST: 010421KABA013855HT (KABA) *A. deliciosa* petal *Actinidia deliciosa* cDNA clone KABAA01385, mRNA sequence.

Blast: *Bemisia tabaci* biotype Q vitellogenin mRNA, partial cds

```
1 CTTCGTTGGC GGGGTATCGA TGGGGACCTT TCCTTCGAAG TAGGGCTCGA AGACGCTGAG
61 GATTGTGGG TGAGCGAAGT TTCCGAAGAC GCGGGTGTCTG ACCTTG
```

No.17 EST: BT-TOMOV-035-1-H7-T3_H07 Whitefly *Bemisia tabaci* (reared on TOMOV infected plants) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence.

Blast: blast상 sequence 정보부족

```
1 ATCATTCAAT CTTCTCGTTC TCCAGCAATC AACTCCACCA CAACCAACCA ACCATCACCA
61 TGGCTTTCTC TGCTGTCTGC GTCGGACTCG CCGTCCTCAA CCTGGCCGCC GCCATGCCGT
121 ACCCGTCCGC CAAGCTCTCC TGCCCGAAGC CACCCCTACC GGAGATCAAG CCCAGGTCA
181 TCCAGGTCGT CGCCCCCGCT CCGGTCAACA TCGGACCCCA GGCTCCAGGA GTGATCGAGC
241 ACGCCTCCGC CCCGTACGAG ATCAACTACT TCGGCAAGCC CTACATCGTC AAGCACAAGC
301 AGGCCGCCGT CCTAACGTC CTCACCCAGA CCCCAGTCTG CGTCGACGAA TACGCCGCC
361 CCGTTGTCAA CGAGGCTGCT GCTCCCCCG CCGTCATCGT CGAGGAAGTC TGCCCTGAGG
421 TCCAAGCCCC ACGCCGCCAG CC
```

No.18 EST: RP003238994.5prime RP D melanogaster mixed embryo RACE from pooled PCR products *Drosophila melanogaster* cDNA 5, mRNA sequence.

Blast: blast상 sequence 정보부족

```
1 GTGAAATGTG ATGTCGAAAT GCTGTGTTCA TGCCGCTTTA CGTTTACATA AAATATGTGT
61 TCGCAACTGT GTGGTTTTGG ATTTCTGTTG TTTCAATTA AGTGAATTA TCTACCGCCC
121 CATCTGACTG CATGTGT
```

No.19 EST: BT-TYLCV-063-1-C4-T3_C04 Whitefly *Bemisia tabaci* (reared on TYLCV infected plants) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence.
 Blast: blast상 sequence 정보부족

```

1      ACAGGCCCAT TGTGCCAGAA ATCAGAATCA TGTTTTGATG CTTGATCTTT GTAGATTGGC
61     TGAAAATAAT AAGATGAGTG TAAACACCAA ATTTCTACAT TCAGTACTAA CCGAGATATG
121    GCGCTTTGAA AAATTTAGTC TATGAAATCA GCCACCACG
  
```

No.20 EST: 5_Reverse-4678 *Bemisia tabaci* reverse SSH library *Bemisia tabaci* cDNA, mRNA sequence.

Blast: *Bemisia tabaci* biotype B vitellogenin mRNA, complete cds

```

1      CCAGCCAATA CCGTGGTGCC GTCCGTGGTA TCTGTGGAAC CTACTCCAAC CAATACGCCG
61     ATGACTTCAC CAGCCCCAAG AACTGCGTCA TGAGAAACCC AGAATACTTC ACCGCCGCCT
121    ACGCCTTCAT CGACTCCTCC TCTCCGCCC AACTCAACGC CCAACTCGAC CCCCCGTCTG
  
```

4. 담배가루이 Gateway cDNA library 의 TRV cloning 효율

- 본 연구팀이 오랜 기간 동안 제작한 담배가루이 Gateway cDNA RNAi library 의 최소 copy 수와 Redundancy 확인 후 TRV ATT vector 에 그림 11과 같이 적용 실험을 진행하였음

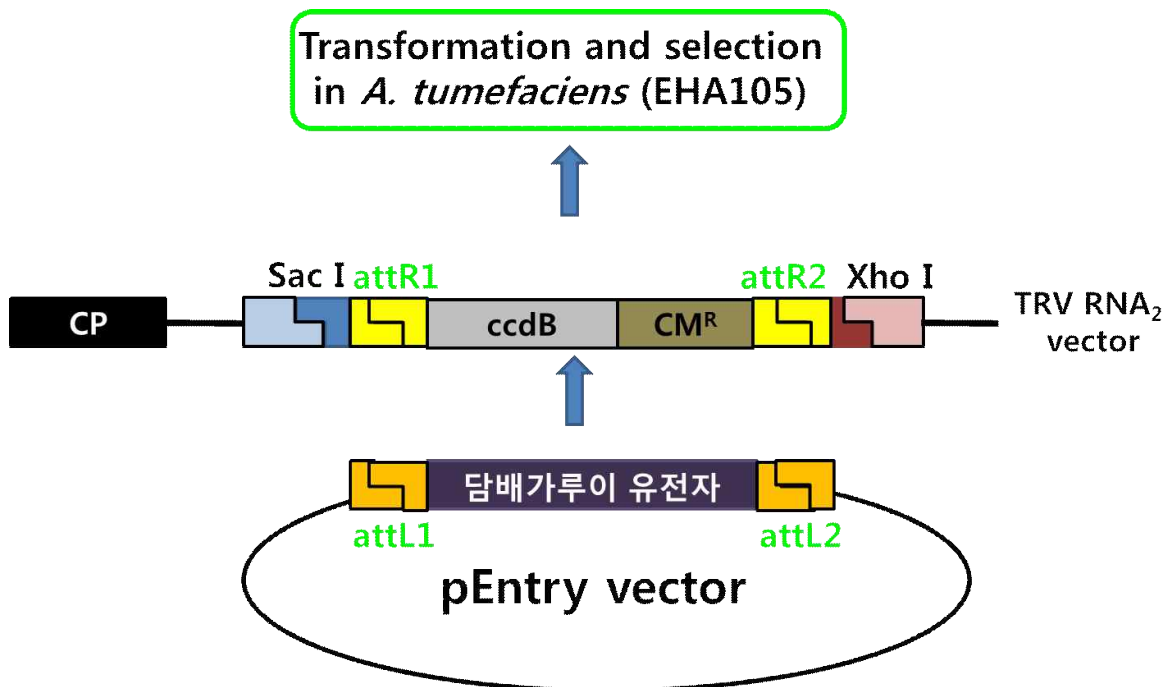


그림 29. 담배가루이 cDNA genomic RNAi library의 TRV 삽입

- 담배가루이 Gateway cDNA RNAi library 는 Gateway system pEntry vector에 삽입이 되어있으며 각각의 cDNA RNAi 는 TRV RNA-2에 random 하게 삽입되고 Agrobacterium에 형질전환 과정을 통해 선택배지에서 선별함. 선택배지에서 자라는 Agrobacterium 각각은 각각의 담배가루이 RNAi를 TRV-RNA2에 삽입되어 있음.

- Gateway cDNA RNAi library 의 Redundancy를 확인하는 방법과 유사하게 TRV-RNA2 가 담배가루이 cDNA RNAi를 반복적인 서열을 피하고 고루 클로닝이 되어 있음을 확인하기 위하여 Agrobacterium colony를 상기 그림에 SacI/XhoI 위치의 염기서열을 이용하여 증폭하였으며 아래와 같은 염기서열 정보를 얻었음 → Redundancy가 없으며 다양한 RNAi 가 TRV-RNA2에 삽입되었음

No.1 EST Blast: U_U-R_Forward-3491.b1 *Bemisia tabaci* forward SSH library *Bemisia tabaci* cDNA, mRNA sequence.

DNA Blast: Data 없음

```

1      GGGCGCCACG CTCGGCTTTT AAGTTATTTG TTAGCTTAGT GAAAACATCAT TTGGCTAGAT
61     AAAAATGATA TCGTCTACGA CACCTGGCAA GCCGGAAAAC GGTCATGCAG TGAAAGGAGT
121    CCCTCCTGGC GACTACAGAC TTGTCGGCTT TGACCTGGAC ACTACTGGTA GAAAATTGAT
181    TGATGAAATC TGCCAAATTG CCGCCTACAC CCCC GTTCGT CCGTTCCCC G

```

NO.2 EST Blast: Data 없음.

DNA Blast: *Ulva linza* histone type 2 (h2) mRNA, complete cds

```

1      GATTCCGTTG ATTCATTCTG AGTCGTCGCT CGCACTCGCA CCGTGAACCA TGGCACGTAC
61     CAAGCAAACC GTCGTAAGT CCACCCAGCG TCAGAAAAGA G

```

No.3 EST Blast: Data 없음.

DNA Blast: Data 없음

```

1      GTTAATTTTT TTTTCACTCT CGCCCATTTT TAACATACAG CAGTCGCATT TGC GTTTATC
61     GATGACTTTG ATTTTATTTT AACTTTCAAC TCTTTGGAAA GCATCGATCA CACTTGAGGT
121    AGCCATTCAA TATATTTAAA AGTTGGCCAG AGTTATTTTT TACCCTGTTA TACCTAAAAT
181    TTAATTATTA TTACTTTTAC CCAACCGATG AGTTGTCATG GTATCGGAAA ACGCGTCTTA
241    TTCTCTTGAT TTGCAAATC CAATTAATAA ATTGAGCCCC ATGACAAGAC CAATGTGTGA
301    ATTCTGGTTC TAACGGATTA AGTCAATTAA TTTCTATGGT CATCGCAGTG TTTTAAAAC
361    ACCACCCTCA TTTAAAATA AAAATAGTAG CCAGAAACTC CCCCTCCTT TTTTACTCA
421    AATTTTCTGA CTCAGTGAGA ATAATTCTAA AACTTCCGAG ACCAACCTAC TGCATGAAGA
481    TTTTTATGG ATCATTGACG AAGTTTCTCA ATTTAACTT GTACTTTCCA AAGCTCAACA
541    ATATGTCATC GAACATCAGC TCATTAAAAG TTGAAGTGAA TTTAAGAAT CAAAATATT
601    GTATTATTTG CGTCCTATCT TTAACATGGA TATTGTGATC CTCGAAATTC GTGCTTAGAT
661    TAGGAAAACG CCTGTCATCT AGGAATGGGG CGTATCATAG CTCTTAGCGT ATATCTGTCA
721    ATTGTTTACT TAGTCCTCCC GCTTAAATGA GCGAGATTGA TTGATACCGC T

```

No.4 EST Blast: TOMOV-BT006_E08 Whitefly *Bemisia tabaci* (reared on TOMOV infected plants) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence.

DNA Blast: Data 없음

```

1      GGGTTGATCG GGGCTTTTGT CGGTTACAAT TAAAGTACTG GGAAGACTCC TCGAACAGCA
61     CAAATTTGAA ATATCTTACA CCTTGTCGTA TATTG

```

No.5 EST Blast: FP919033 *Acyrtosiphon pisum* whole insect males *Acyrtosiphon pisum* cDNA clone ACI0AAF8YK08 5', mRNA sequence.

DNA Blast: PREDICTED: *Acyrtosiphon pisum* ATP-dependent RNA helicase DDX42-like (LOC100163407), mRNA

```

1      CCAGCAAGAG GATTTTCTTC CATGTATCTG TAGTATGATT CTTATTGTC TTCTTCGTCA
61     ATATCAAATC TAAGTCCTTT ATCTTTTCT TTCTTTTAT TGGTTACCTT GACTCCTTGC

```

121 TCCTTCTAAC CTCTAGGTA

No.6 EST Blast: U_U-U_Forward-3830.b1 *Bemisia tabaci* forward SSH library *Bemisia tabaci* cDNA, mRNA sequence.

DNA Blast: *Bemisia tabaci* biotype Q vitellogenin mRNA, partial cds

```
1      GCCCTCCCC AATACACCGT TTTCGGAGCC AAGCGCTGGG CCTTCTTCGA CGAAGAATTC
61     TTCAACCAAA TCCCAAGACG TCTGAACGAT GCTCTCTCTA AGGTTCAAAA TGGACAATCT
121    TTCAACTCCA CCAAATTCTA CAACGACATC TCTCTCTCCC TTGCTCTCTC CACTGCCACT
181    GGTCTGCCAT TCTCTTACAC TCTCAAGGTC CCCACTCTCG TCCAAGCCGG TGGAGAAGTT
241    CAAGCCAGAG TTCAAGGTCA CAACTCCAAC AACAACAACA ACCTCTTCCG TATCCCTGAA
301    GCTGTTAACG TAACCGCCGA AATTGAAATT GTTTACGCCA CTGAATTGAA ATCTGAACTT
361    GGATTCGTCA CTCCATTCAA CCACGAACGT TACGTTGCTG GTCTTGCCAA GAACATCTTT
421    GTTAACATCC CAGTTAAGGT CGCCGCCAAT GTGGACATCG CCAACACCAA GGTCGAATTC
481    TACATGAAGC CCATGAACAA CCAGAACGAA CAAAAAATCT TCCACTACGG ATCTTACCCT
541    TACACCGCAA TCCAAAACAT CTTCGACTTC CGCCCCCTCG CCAATGCCTC CTT
```

No.7 EST Blast: BT-TYLCV-017-1-A5-T3_A05 Whitefly *Bemisia tabaci* (reared on TYLCV infected plants) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence.

DNA Blast: *Bemisia tabaci* biotype Q vitellogenin mRNA, partial cds

```
1      GCTATCGCGG CTTGTTGGGG GTTGCTGTTG TTGCGGTTGT TGTTGTTGTT GCGGTTGTTG
61     TCGTTGGACT GGGAAGAGCT GGAAGAGGAG CTGGAGTCGC TGCTAGAGCT GGATGAGCTG
121    GAGGAGGAAG AAGAGGAGCT GCTGCTGGAG TCACTGGATG AGCTGCTGCT AGAGTCGCTA
181    GATGAAGAGC TGCTGCTGGA GTAGGAGGAG TCCTGGTCCT TGGCGTACTT GTTGTCTTG
241    TAGTACTTGT TGTACTGGGA GTTGAGGGGG TCGTAGTATT TGGCGTTCTT GTAGGCGGAT
301    TCGTAGTATT TGTCGTTGTT GTTGTATTTG TATCCGTATC CGGCGTTCGC TGC GCGCTAG
361    GTAA
```

No.8 EST Blast: Data 없음.

DNA Blast: Data 없음

```
1      TTTGAGAGCT TTGATTCTCC TCTTCACCGG AGCAGGGAGA TTCGCGATCA TTTCTTGATT
61     AAGCCTTCT TGAAGAGCTG CAAGAATATC AGGCCGTCTG AAAACCTGGG CGATGTTGCT
121    GTCATCTCCA GTATCTTCTT CCATTCCTTC AGTCTCATCA TTA CTGTCAA CCTTTTGTGG
181    GTCTGCAGCC ATTGTTGATT CAGATAGTTA ACGTGCACGA GAAAAAAGAC ACTTCCACGG
241    CCCACATGTC ATTGC
```

No.9 Sequencing fail.

No.10 EST Blast: HBT004_H01_T3_015 Whitefly *Bemisia tabaci* (non-viruliferous) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence.

DNA Blast: Data 없음

```
1      GGATTAGTAT ATTTACTATT CACACTTTGA TCATCCAAGG AATCCACCAC CATGTTGCTT
61     GCTCTGTCCG TCGTCGCCTT CTTGGCCGCT GCCCACGCCG CCGAGTACCC TTA CTACAAC
121    ATCCCGGCCG CCAGCCAGTC TTA CTACGGA GGATCCTACC AGCAGTACCC TTCTTACGCT
181    TACGCCGGTG ACCTGAAGTC TCTGGAATCA TCCGGAATCC AGTACGCTGC CACCCCCGAG
241    ATCTCCTCTC AGTCTCAGTA CCCAGTCTAC CAAGTCCGTG ACGCCGCCCC CGTCGCCAGA
301    TACGAATCCG CCATCGCCAC CCCTGATGTC GCCCGCGCTA TC
```

NO.11 EST Blast: 2_Reverse-4323 *Bemisia tabaci* reverse SSH library *Bemisia tabaci* cDNA,

mRNA sequence.

DNA Blast: *Bemisia tabaci* biotype ZHJ-II vitellogenin mRNA, complete cds

```
1 ACTTTGTTAG CAGCGCGCTC GGGCTACGAG CGTAAGCAAG AGTGGCGACG TAATCAGCGT
61 TCTTTTGTCC GAAGAATTGA GCAGAGATGT CGATAACATC GATGTTGGCA CTTTGAACCT
121 CAGATTGAGC ACGGCTGGCG AATTGGTTCA TTCTCTGTTC GTTGTCAGGT TGGTAGGAAAG
181 ATGGAACAGC ATCGTTTTGG TTGTTGTTGT GTTGTTAGA GTTACCTTCG TTGTTGTTTT
241 CCTTGTGGC GTATTTGTTG GCATAGTTCA AGGCGAACTT GGCGCATTG AGCGTCTGGG
```

No.12 EST Blast: Data 없음.

DNA Blast: Data 없음

```
1 GCGGCAGCCA GTGCTCAACT TCAAACCAC CACTTTTGGG AAACCATCGA AAATGGAATG
61 CGGAAGGACA TCGAGGCGGC CCACCAAGAC TTTATGGACT TGTTGCTCA ACCATCGGAG
121 GTGAAACCCA AAGTTGAGGC CTCGCCGCG ACGAGCAGCG AGGAGAAACC TGCCGTCTCA
181 GCGCCCTCTG CCACCGATGT CGCAACCACC AACGACACCA GTCCACCGA GAATGATTCC
241 AGCGAGGAGG ACATCTCCGG AGAGACCGAA ATGGAACCTT TCAAGAAAGT GTTTGGCAGG
301 CCCAAAACAG CTGGAT
```

No.13 EST Blast: BT-TYLCV-059-1-F4-T3_F04 Whitefly *Bemisia tabaci* (reared on TYLCV infected plants) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence.

DNA Blast: Data 없음

```
1 CCGCCAGCC CCAGTTGCTG CCCCCAATT CGCCACCAA GAGATCGCCG CCCCAGGTA
61 CGCTGCCGTC GAATCTGCTG CCCCCCGGTA CGCCGTCGCT GAAGCTTCTG TCCCCGGTA
121 CGCTGAGGTC CAACAGTACT CCGCTCCAAT CTACCAGGCC CGCTCCTACG ACGCCCCAT
181 CGCCCGCTTG GTTTGGCTCG GTA
```

No.14 EST Blast: BT_TYLCV003_A09 Whitefly *Bemisia tabaci* (reared on TYLCV infected plants) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence.

DNA Blast: *Hyphomonas neptunium* ATCC 15444, complete genome

```
1 GCAGAGAAGT CGAAGGCGTT GACGAAGGCA CTGTTGATTG CGGCGCAGGA TTGCGGTCCT
61 CATA
```

No.15 EST Blast: Data 없음.

DNA Blast: Data 없음

```
1 TGTGATAGTC GACCAACTAC CCCTCTTCAA AATAGCTTCC CAATTTGCAC CAATCCAATA
61 CCCTCTCGGT CTTTTATCC AAGCTCTCCC ACAACCACCC CGCACCAATC GCTG
```

No.16 EST Blast: ID0AAA3BF12FM1 ApMS *Acyrtosiphon pisum* cDNA clone ID0AAA3BF12 5', mRNA sequence.

DNA Blast: *Acyrtosiphon pisum* ATP citrate lyase (Atpcl), mRNA

```
1 GTGTCTCGCC GCGAGGAGGG TGGCGGTACA GATCCTTGTT TCAATCGCTT CTGGTCCATG
61 AAATGTCCTA CAGAACCGAT GGTCTACCC GAGACCATCA GACCCTGAT TGATCCCATG
121 TCTATGTATT CTTGAGCCTC TTCCCTGTG AAGCTACCAC TGTGCCTTAT TAAATCACAG
181 AATGCAACAG CAATGCAGCC ATCAGCGTTT AAAATTAGGT TTGGTTTCTT AGATGTTGTA
241 ATTTTTTCCA CTTCTAAGGC GTAATTGAGA ATTGGAGTGG TCGGAAAATT TTCTAATACA
301 AATTCTTTGA TAATTTTAC TCTCATGTCA GGGTTGTTA TCGATTAAAC TCTGTGACCA
361 ATACCCATGA TAAGTTGACC CTTCTTCTC ATGGTATTCA CAAATTCCAT TGGGATGAGT
421 CCTGAATCGT AGGCATCCGT GAACTGTTT GCTGCTTCAT TTAGGGCACC ACCAAATCTG
481 TCACCAATTG TGAGTAAACC TGAGACGAGC GAGGAAACTA GATCTTTTCC AGCTCTGGCA
```

541 CAGACGATGG TATTATGAGC ACCAGATACA GCAGGACCAT GATCGGCTGT GACCATTAGA
601 CACATTTCAA AGAATTTACA AACGTATGCA GGTAAGACC GTTGAACCA CAG

No.17 EST Blast: BT_TYLCV003_A09 Whitefly *Bemisia tabaci* (reared on TYLCV infected plants) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence.

DNA Blast: *Bemisia tabaci* biotype Q vitellogenin mRNA, partial cds

1 GTTCGGATCG GTTGTAGTGT CCGTAGAAGA GGAAACGAGA TTTCTCAGCA ACTGGGCTAC
61 GGGCGAAGGC AAAGGTGCAA ACGTAGTCGG CTCCTTTTG TCCAAGGAAT TGGGCAGAGA
121 AGTCGAAGGC GTTGACGAAG GCACTGTTGA TTCCGCGCA GGATTGCGGT CCTCATA

No.18 Sequencing fail.

No.19 Sequencing fail.

No.20 EST Blast: Data 없음.

DNA Blast: Data 없음

1 GGTCATGGAG CACTTGTTGG CGTGGATACA AGCTGGAAAT AGTTCGCTGC AAGTGGAATG
61 GTTCGCCAG TGCCCGCCG

5. 담배가루이 genomic RNAi in TRV RNA2 Redundancy 재평가

- 담배가루이 cDNA library RNAi 가 삽입된 TRV RNA2의 redundancy 평가를 초기 생산된 *E. coli*에서 20개의 유전자, Agrobacterium에서 20개 유전자, 접종된 토마토에서 약 40개의 유전자 염기서열을 획득하였으며 이를 종합하여 유전자의 염기서열을 align 하여 유사도를 확인하였다. 유사도는 총 72개의 sample에서 Identity가 13.32% 미만으로 매우 낮은 일치도를 보여 본 연구팀이 제작한 담배가루이 cDNA RNAi Library TRV-RNA2는 다양한 cDNA가 삽입된 매우 우수한 세계최초 담배가루이 Genomic RNAi library임(그림 30)

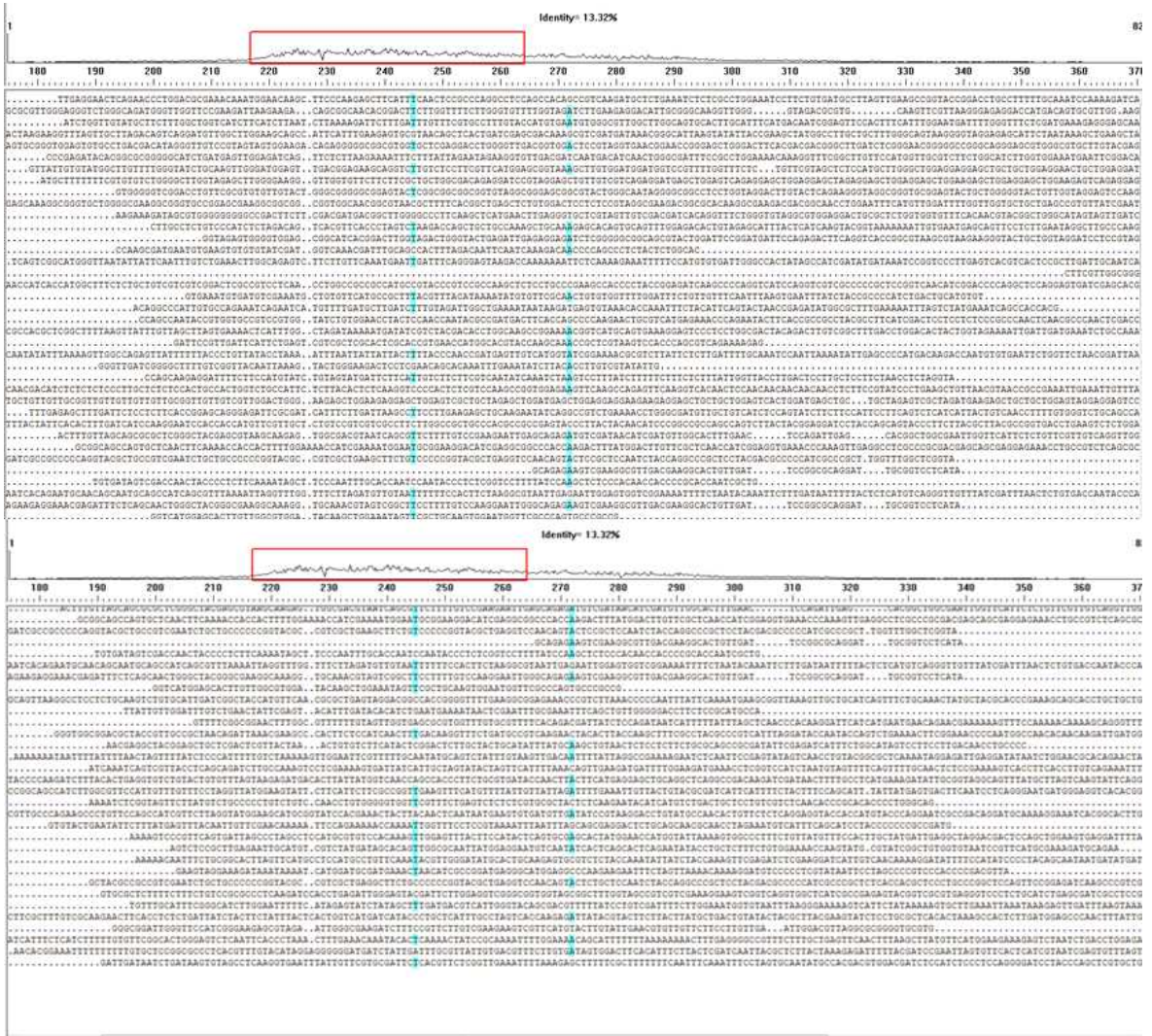


그림 30. 담배가루이 RNAi 염기서열의 상동성 조사

제 5 절 담배가루이 제어 우수 RNAi 평가 및 선발

1. 토마토 유묘에 담배가루이 RNAi 접종 및 선발(1) - 2차년도

가. 토마토 유묘에 담배가루이 RNAi 발현 식물바이러스 TRV 접종

- 토마토 Seedling에 4주 간격으로 담배가루이 RNAi 가 삽입되어 있는 식물바이러스 TRV 각각의 Agrobacterium colony를 접종하여 RNAi가 발현하는 토마토 유묘를 제작하고, 담배가루이를 방사, 4주째 아래의 그림과 같이 담배가루이 개체수식을 평가하였음(그림 31)

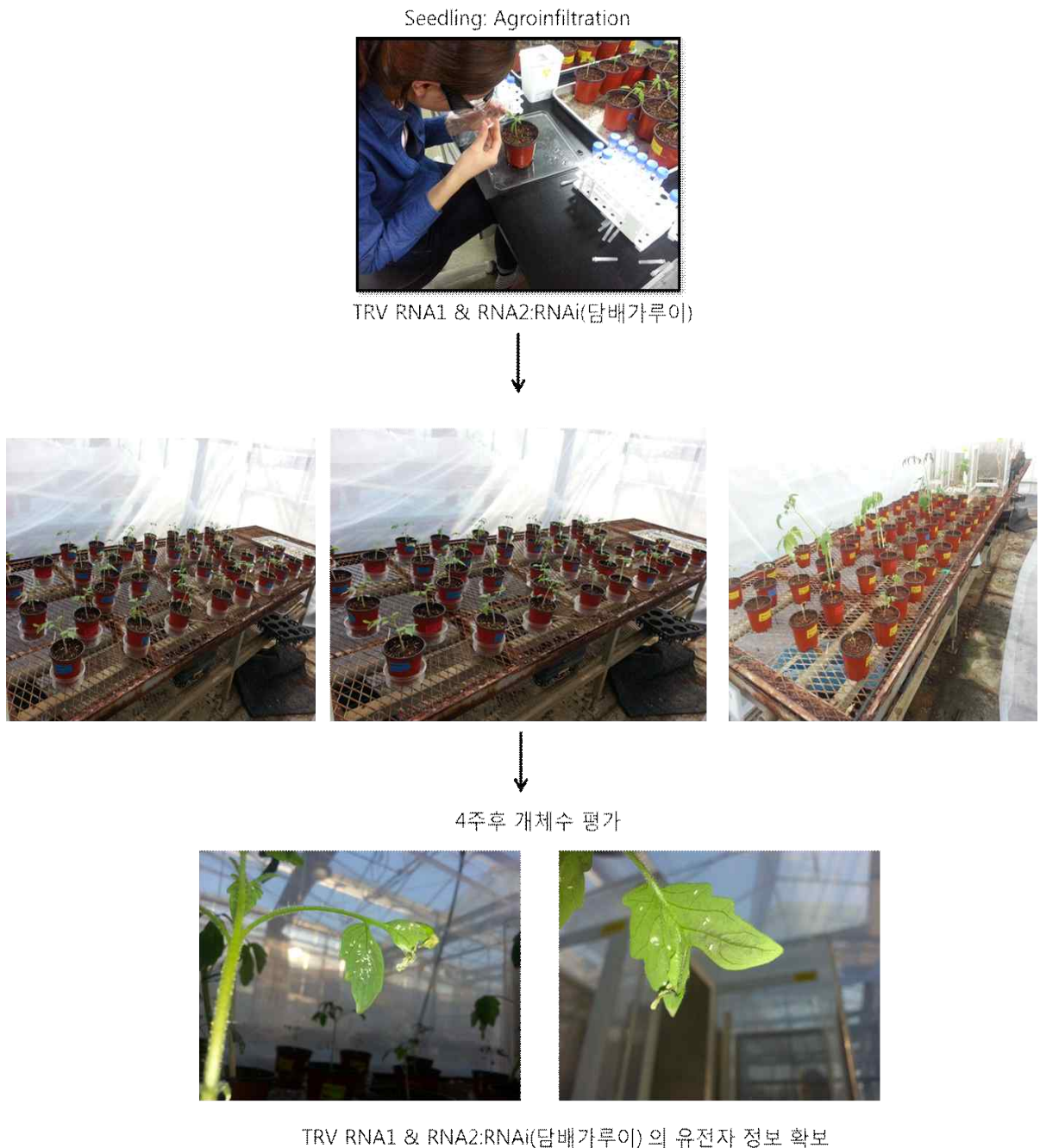


그림 9. 담배가루이 Genomic library RNAi 발현 TRV 적용

나. 담배가루이 RNAi 발현 토마토에서의 알, 약충수 변화 확인

- 총 92개의 담배가루이 RNAi 발현 TRV를 접종하여 평가하였으며, 알과 약충의 수가 현저히 감소한 토마토에 대해 표에 굵은 글씨로 표시함.

표 5. 담배가루이 RNAi 발현 TRV에 따른 담배가루이 알, 약충 개체수 변화

No	Stock ID	접종일	외부반출	담배가루이접종	알, 약충 2014. 03. 26
1	wh0001	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	85
2	wh0002	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	773
3	wh0003	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	1,135
4	wh0004	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	1,647
5	wh0005	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	1,467
6	wh0006	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	1,618
7	wh0007	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	2,022
8	wh0008	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	858
9	wh0009	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	271
10	wh0010	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	208
11	wh0011	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	476
12	wh0012	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	517
13	wh0013	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	1,065
14	wh0014	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	2,264
15	wh0015	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	138
16	wh0016	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	171
17	wh0017	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	1,298
18	wh0018	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	1,717
19	wh0019	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	1,686
20	wh0020	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	556
21	wh0021	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	542
22	wh0022	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	1,276
23	wh0023	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	223
24	wh0024	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	192
25	wh0025	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	-
26	wh0026	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	2,303
27	wh0027	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	1,130
28	wh0028	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	345
29	wh0029	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	387
30	wh0030	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	912
31	wh0031	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	379
32	wh0032	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	1,270
33	wh0033	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	653
34	wh0034	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	641
35	wh0035	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	759
36	wh0036	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	1,736
37	wh0037	2014.02.22	2014.02.22	2014.02.27	380
38	Wh0038	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	1,064

39	Wh0039	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	1,692
40	Wh0040	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	13,591
41	Wh0041	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	653
42	Wh0042	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	629
43	Wh0043	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	730
44	Wh0044	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	2,000
45	Wh0045	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	420
46	Wh0046	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	115
47	Wh0047	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	613
48	Wh0048	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	510
49	Wh0049	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	52
50	Wh0050	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	1,431
51	Wh0051	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	633
52	Wh0052	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	782
53	Wh0053	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	658
54	Wh0054	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	906
55	Wh0055	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	103
56	Wh0056	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	712
57	Wh0057	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	660
58	Wh0058	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	193
59	Wh0059	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	260
60	Wh0060	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	707
61	Wh0061	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	551
62	Wh0062	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	999
63	Wh0063	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	482
64	Wh0064	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	818
65	Wh0065	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	84
66	Wh0066	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	463
67	Wh0067	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	82
68	Wh0068	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	166
69	Wh0069	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	121
70	Wh0070	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	238
71	Wh0071	2014.03.07	2014.03.10	2014.03.12	232
72	wh0073	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	2,624
73	wh0074	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	778
74	wh0075	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	1,786
75	wh0076	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	1,475
76	wh0077	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	1,047
77	wh0078	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	1,683
78	wh0079	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	758
79	wh0080	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	1,412
80	wh0081	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	806

81	wh0082	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	2,112
82	wh0083	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	1,989
83	wh0084	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	1,630
84	wh0085	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	695
85	wh0086	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	1,879
86	wh0087	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	1,303
87	wh0088	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	1,004
88	wh0089	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	1,296
89	wh0090	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	1,638
90	wh0091	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	1,361
91	wh0092	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	1,984
92	Negative control 1	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	2,367
93	Negative control 2	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	679
94	Negative control 3	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	1,037
95	Negative control 4	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	2,412
96	Negative control 5	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	2,388
97	Positive control 1	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	2,110
98	Positive control 2	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	1,704
99	Positive control 3	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	1,218
100	Positive control 4	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	953
101	Positive control 5	2014.03.24	2014.04.05	2014.04.08	1,838

다. 담배가루이 RNAi 발현 토마토에서의 성충수 변화 확인

- 알, 약충 개체수 뿐만 아니라 담배가루이 RNAi 발현에 따른 성충의 개체수 변화를 생충수 측정을 통해 확인

표 6. 담배가루이 RNAi 발현 TRV에 따른 담배가루이 성충개체수 변화

No	Stock ID	접종일	담배가루이접종	생충수(성충)			
				1 주	2 주	3 주	4 주
1	Wh0001	2014.02.22	2014.02.27	25	21	12	4
2	wh0002	2014.02.22	2014.02.27	55	25	13	8
3	wh0003	2014.02.22	2014.02.27	39	64	44	15
4	wh0004	2014.02.22	2014.02.27	62	94	51	24
5	wh0005	2014.02.22	2014.02.27	73	35	40	16
6	wh0006	2014.02.22	2014.02.27	133	96	36	18
7	wh0007	2014.02.22	2014.02.27	70	101	46	8
8	wh0008	2014.02.22	2014.02.27	39	40	30	24
9	wh0009	2014.02.22	2014.02.27	14	21	7	7
10	wh0010	2014.02.22	2014.02.27	6	5	4	9
11	wh0011	2014.02.22	2014.02.27	23	11	9	1
12	wh0012	2014.02.22	2014.02.27	14	22	14	8

13	wh0013	2014.02.22	2014.02.27	68	54	33	18
14	wh0014	2014.02.22	2014.02.27	54	47	12	19
15	wh0015	2014.02.22	2014.02.27	5	5	2	6
16	wh0016	2014.02.22	2014.02.27	12	10	9	6
17	wh0017	2014.02.22	2014.02.27	54	104	49	14
18	wh0018	2014.02.22	2014.02.27	92	58	17	12
19	wh0019	2014.02.22	2014.02.27	131	45	30	35
20	wh0020	2014.02.22	2014.02.27	45	17	37	15
21	wh0021	2014.02.22	2014.02.27	31	29	16	7
22	wh0022	2014.02.22	2014.02.27	41	44	32	20
23	wh0023	2014.02.22	2014.02.27	9	4	12	10
24	wh0024	2014.02.22	2014.02.27	2	4	9	8
25	wh0025	2014.02.22	2014.02.27	죽음			
26	wh0026	2014.02.22	2014.02.27	44	46	44	45
27	wh0027	2014.02.22	2014.02.27	55	44	17	12
28	wh0028	2014.02.22	2014.02.27	27	12	14	6
29	wh0029	2014.02.22	2014.02.27	28	21	13	20
30	wh0030	2014.02.22	2014.02.27	45	61	34	16
31	wh0031	2014.02.22	2014.02.27	6	5	9	5
32	wh0032	2014.02.22	2014.02.27	143	55	26	16
33	wh0033	2014.02.22	2014.02.27	20	13	16	8
34	wh0034	2014.02.22	2014.02.27	40	26	27	12
35	wh0035	2014.02.22	2014.02.27	55	64	41	20
36	wh0036	2014.02.22	2014.02.27	77	60	53	36
37	wh0037	2014.02.22	2014.02.27	16	22	13	3
38	wh0038	2014.03.07	2014.03.12	10	9	6	19
39	wh0039	2014.03.07	2014.03.12	29	72	70	56
40	wh0040	2014.03.07	2014.03.12	189	139	100	85
41	wh0041	2014.03.07	2014.03.12	17	26	53	52
42	wh0042	2014.03.07	2014.03.12	9	5	21	23
43	wh0043	2014.03.07	2014.03.12	21	11	27	23
44	wh0044	2014.03.07	2014.03.12	36	78	39	42
45	wh0045	2014.03.07	2014.03.12	3	13	19	32
46	wh0046	2014.03.07	2014.03.12	1	1	26	22
47	wh0047	2014.03.07	2014.03.12	3	25	8	8
48	wh0048	2014.03.07	2014.03.12	6	19	26	156
49	wh0049	2014.03.07	2014.03.12	2	4	13	20
50	wh0050	2014.03.07	2014.03.12	6	5	31	38
51	wh0051	2014.03.07	2014.03.12	13	30	13	12
52	wh0052	2014.03.07	2014.03.12	4	6	78	69
53	wh0053	2014.03.07	2014.03.12	1	5	17	68
54	wh0054	2014.03.07	2014.03.12	4	5	136	214
55	wh0055	2014.03.07	2014.03.12	7	2	165	85
56	wh0056	2014.03.07	2014.03.12	5	9	32	163
57	wh0057	2014.03.07	2014.03.12	2	3	191	148

58	wh0058	2014.03.07	2014.03.12	7	10	10	171
59	wh0059	2014.03.07	2014.03.12	15	18	81	180
60	wh0060	2014.03.07	2014.03.12	20	16	31	208
61	wh0061	2014.03.07	2014.03.12	3	2	41	189
62	wh0062	2014.03.07	2014.03.12	2	3	77	71
63	wh0063	2014.03.07	2014.03.12	10	19	16	39
64	wh0064	2014.03.07	2014.03.12	24	13	107	156
65	wh0065	2014.03.07	2014.03.12	2	4	31	51
66	wh0066	2014.03.07	2014.03.12	2	6	1	55
67	wh0067	2014.03.07	2014.03.12	17	7	5	24
68	wh0068	2014.03.07	2014.03.12	14	14	27	33
69	wh0069	2014.03.07	2014.03.12	4	6	17	63
70	wh0070	2014.03.07	2014.03.12	6	11	2	136
71	wh0071	2014.03.07	2014.03.12	4	2	22	70
72	wh0073	2014.03.24	2014.04.08	37	57	22	5
73	wh0074	2014.03.24	2014.04.08	43	123	47	23
74	wh0075	2014.03.24	2014.04.08	30	136	49	48
75	wh0076	2014.03.24	2014.04.08	63	55	33	23
76	wh0077	2014.03.24	2014.04.08	125	97	52	67
77	wh0078	2014.03.24	2014.04.08	49	83	27	25
78	wh0079	2014.03.24	2014.04.08	87	140	64	65
79	wh0080	2014.03.24	2014.04.08	84	105	60	29
80	wh0081	2014.03.24	2014.04.08	10	30	13	24
81	wh0082	2014.03.24	2014.04.08	96	171	47	33
82	wh0083	2014.03.24	2014.04.08	38	231	55	11
83	wh0084	2014.03.24	2014.04.08	41	123	33	11
84	wh0085	2014.03.24	2014.04.08	104	105	14	36
85	wh0086	2014.03.24	2014.04.08	44	107	53	33
86	wh0087	2014.03.24	2014.04.08	66	72	51	9
87	wh0088	2014.03.24	2014.04.08	83	96	109	20
88	wh0089	2014.03.24	2014.04.08	39	86	62	20
89	wh0090	2014.03.24	2014.04.08	72	107	53	34
90	wh0091	2014.03.24	2014.04.08	37	64	18	11
91	wh0092	2014.03.24	2014.04.08	21	56	151	35
92	Negative control 1	2014.02.22	2014.02.27	74	143	66	32
93	Negative control 2	2014.02.22	2014.02.27	75	83	54	31
94	Negative control 3	2014.02.22	2014.02.27	66	50	26	4
95	Negative control 4	2014.02.22	2014.02.27	113	93	45	27
96	Negative control 5	2014.02.22	2014.02.27	78	74	90	21
97	Negative control 6	2014.03.07	2014.03.12	9	15	23	185
98	Negative control 7	2014.03.07	2014.03.12	27	138	53	36
99	Negative control 8	2014.03.07	2014.03.12	6	4	4	80
100	Negative control 9	2014.03.07	2014.03.12	5	14	208	163
101	Negative control 10	2014.03.07	2014.03.12	11	9	190	73
102	Negative control 11	2014.03.24	2014.04.08	135	171	137	4

103	Negative control 12	2014.03.24	2014.04.08	430	150	28	36
104	Negative control 13	2014.03.24	2014.04.08	99	104	20	5
105	Negative control 14	2014.03.24	2014.04.08	284	165	16	22
106	Negative control 15	2014.03.24	2014.04.08	199	311	44	15
107	Positive control 1	2014.02.22	2014.02.27	19	22	8	13
108	Positive control 2	2014.02.22	2014.02.27	102	64	37	22
109	Positive control 3	2014.02.22	2014.02.27	63	41	17	7
110	Positive control 4	2014.02.22	2014.02.27	57	47	20	13
111	Positive control 5	2014.02.22	2014.02.27	85	43	36	11
112	Positive control 6	2014.03.07	2014.03.12	6	21	28	58
113	Positive control 7	2014.03.07	2014.03.12	6	11	4	28
114	Positive control 8	2014.03.07	2014.03.12	5	11	45	101
115	Positive control 9	2014.03.07	2014.03.12	4	7	7	44
116	Positive control 10	2014.03.07	2014.03.12	3	8	6	23
117	Positive control 11	2014.03.24	2014.04.08	406	127	51	13
118	Positive control 12	2014.03.24	2014.04.08	345	208	49	15
119	Positive control 13	2014.03.24	2014.04.08	34	76	15	25
120	Positive control 14	2014.03.24	2014.04.08	78	69	57	19
121	Positive control 15	2014.03.24	2014.04.08	115	80	18	39

라. 담배가루이 방제 효과 있는 우수 RNAi 유전자 선발

- 온실에서 수십개의 RNAi 발현 토마토 유묘에 대량의 담배가루이를 방사하여 개체수 평가를 함으로써 생활사는 확인이 어려워 담배가루이의 발육단계(알, 약충, 성충)별로 개체수 평가를 진행하였음(표 7).
- RNAi 발현 토마토 유묘에서의 발육단계별 개체수 평가를 통하여 다양한 시각에서 RNAi 선발이 가능함.
- 담배가루이 집중 평가를 통해 담배가루이가 기피하는 토마토 선발 (Sample number: 1, 2, 11, 35, 37, 73) (표 7)

표 7. 담배가루이 RNAi 발현 TRV에 따른 담배가루이 개체수 변화와 우수 RNAi 유전자 선발

No	Stock ID	접종일	4주후	
			담배가루이 생충수	담배가루이 생충수
1	Wh0001	2014.02.22	4	8
2	Wh0002	2014.02.22	8	156
3	Wh0003	2014.02.22	15	20
4	Wh0004	2014.02.22	24	38
5	Wh0005	2014.02.22	16	12
6	Wh0006	2014.02.22	18	69
7	Wh0007	2014.02.22	8	68
8	Wh0008	2014.02.22	24	214
9	Wh0009	2014.02.22	7	85
10	Wh0010	2014.02.22	9	163
11	Wh0011	2014.02.22	1	148
47	Wh0047	2014.03.07		
48	Wh0048	2014.03.07		
49	Wh0049	2014.03.07		
50	Wh0050	2014.03.07		
51	Wh0051	2014.03.07		
52	Wh0052	2014.03.07		
53	Wh0053	2014.03.07		
54	Wh0054	2014.03.07		
55	Wh0055	2014.03.07		
56	Wh0056	2014.03.07		
57	Wh0057	2014.03.07		

12	Wh0012	2014.02.22	8	58	Wh0058	2014.03.07	171
13	Wh0013	2014.02.22	18	59	Wh0059	2014.03.07	180
14	Wh0014	2014.02.22	19	60	Wh0060	2014.03.07	208
15	Wh0015	2014.02.22	6	61	Wh0061	2014.03.07	189
16	Wh0016	2014.02.22	6	62	Wh0062	2014.03.07	71
17	Wh0017	2014.02.22	14	63	Wh0063	2014.03.07	39
18	Wh0018	2014.02.22	12	64	Wh0064	2014.03.07	156
19	Wh0019	2014.02.22	35	65	Wh0065	2014.03.07	51
20	Wh0020	2014.02.22	15	66	Wh0066	2014.03.07	55
21	Wh0021	2014.02.22	7	67	Wh0067	2014.03.07	24
22	Wh0022	2014.02.22	20	68	Wh0068	2014.03.07	33
23	Wh0023	2014.02.22	10	69	Wh0069	2014.03.07	63
24	Wh0024	2014.02.22	8	70	Wh0070	2014.03.07	136
25	Wh0025	2014.02.22		71	Wh0071	2014.03.07	70
26	Wh0026	2014.02.22	45	72	Wh0073	2014.03.24	5
27	Wh0027	2014.02.22	12	73	Wh0074	2014.03.24	23
28	Wh0028	2014.02.22	6	74	Wh0075	2014.03.24	48
29	Wh0029	2014.02.22	20	75	Wh0076	2014.03.24	23
30	Wh0030	2014.02.22	16	76	Wh0077	2014.03.24	67
31	Wh0031	2014.02.22	5	77	Wh0078	2014.03.24	25
32	Wh0032	2014.02.22	16	78	Wh0079	2014.03.24	65
33	Wh0033	2014.02.22	8	79	Wh0080	2014.03.24	29
34	Wh0034	2014.02.22	12	80	Wh0081	2014.03.24	24
35	Wh0035	2014.02.22	3	81	Wh0082	2014.03.24	33
36	Wh0036	2014.02.22	36	82	Wh0083	2014.03.24	11
37	Wh0037	2014.02.22	3	83	Wh0084	2014.03.24	11
38	Wh0038	2014.03.07	19	84	Wh0085	2014.03.24	36
39	Wh0039	2014.03.07	56	85	Wh0086	2014.03.24	33
40	Wh0040	2014.03.07	85	86	Wh0087	2014.03.24	9
41	Wh0041	2014.03.07	52	87	Wh0088	2014.03.24	20
42	Wh0042	2014.03.07	23	88	Wh0089	2014.03.24	20
43	Wh0043	2014.03.07	23	89	Wh0090	2014.03.24	34
44	Wh0044	2014.03.07	42	90	Wh0091	2014.03.24	11
45	Wh0045	2014.03.07	32	91	Wh0092	2014.03.24	35
46	Wh0046	2014.03.07	22				

마. 선발된 담배가루이 RNAi 염기서열 정보 확인

- 평가를 통해 선발된 토마토에서 TRV2 를 RT-PCR 로 증폭하고 삽입된 RNAi 염기서열을 확인하였음
- 1차 스크리닝 작업으로 각각의 담배가루이 cDNA RNAi가 클로닝되어 있는 TRV2-RNA-att 91개의 토마토에서 total RNA를 분리하여 아래의 그림의 TRV RNA2 만 PCR로 증폭하였음. 정제한 total RNA는 oligo dT Primer 로 cDNA를 합성하였으며 합성된 cDNA는 PCR Primer 1번(GTAAGGTTACCGAATTCTCTA) 과 2번(AAACTTCAGACACGGATCTACT)을 이용하여 TRV RNA2에 삽입된 담배가루이 RNAi의 염기서열을 증폭하였으며 이를 확인하여 염기서열 정보를 획득하였음(그림 32)

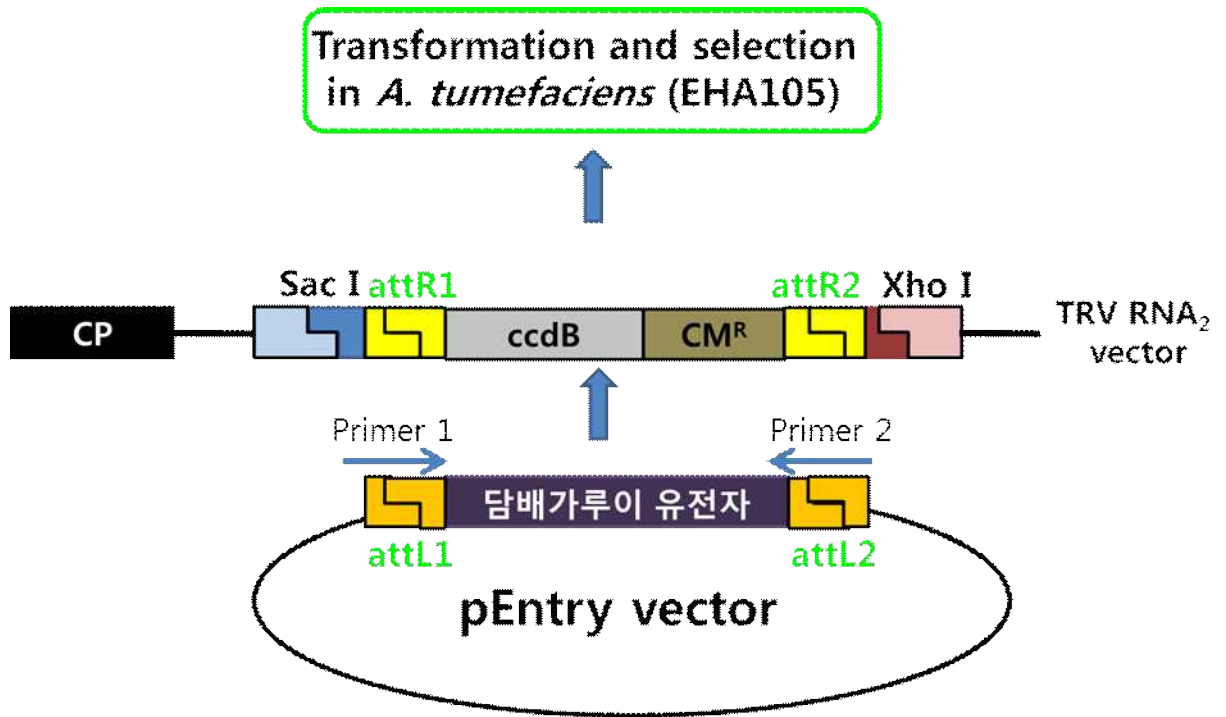


그림 32. 선별 RNAi 유전정보 확인

- 각각의 토마토에서 증폭된 담배가루이 RNAi의 염기서열은 아래와 같으며, 50개의 RNAi의 염기서열 또한 상기의 염기서열과 중복되지 않아 Redundancy가 없는 담배가루이 cDNA RNAi로 다시 평가 되었으며 토마토 내에서 RNAi의 발현을 재확인하였음
- 발현된 RNAi중 담배가루이기 개체수가 매우 적은 토마토에서 정제된 RNAi의 염기서열은 아래의 염기서열 중 붉은색으로 표시하였음

No.1 wh0001 EST Blast: U_U-R_Forward-3491.b1 *Bemisia tabaci* forward SSH library
Bemisia tabaci cDNA, mRNA sequence.

DNA Blast: Data 없음

```

1      GGGCGCCACG CTCGGCTTTT AAGTTATTTG TTAGCTTAGT GAAAACTCAT TTGGCTAGAT
61     AAAAATGATA TCGTCTACGA CACCTGGCAA GCCGAAAAC GGTCATGCAG TGAAAGGAGT
121    CCCTCCTGGC GACTACAGAC TTGTCGGCTT TGACCTGGAC ACTACTGGTA GAAAATTGAT
181    TGATGAAATC TGCCAAATTG CCGCCTACAC CCCC GTTCGT CCGGTTCCCC G

```

NO.2 wh0002 EST Blast: Data 없음.

DNA Blast: *Ulva linza* histone type 2 (h2) mRNA, complete cds

```

1      GATTCCGTTG ATTCATTCTG AGTCGTCGCT CGCACTCGCA CCGTGAACCA TGGCACGTAC
61     CAAGCAAACC GTCGTAAGT CCACCCAGCG TCAGAAAAGA G

```

No.3 wh0003 EST Blast: Data 없음.

DNA Blast: Data 없음

```

1      GTTAATTTTT TTTTCACTCT CGCCCATTTT TAACATACAG CAGTCGCATT TGCGTTTATC
61     GATGACTTTG ATTTTATTTT AACTTTCAAC TCTTTGGAAA GCATCGATCA CACTTGAGGT
121    AGCCATTCAA TATATTTAAA AGTTGGCCAG AGTTATTTTT TACCCTGTTA TACCTAAAAT
181    TTAATTATTA TTACTTTTAC CCAACCGATG AGTTGTCATG GTATCGGAAA ACGCGTCTTA
241    TTCTTTGAT TTTGCAAATC CAATTAATAA ATTGAGCCCC ATGACAAGAC CAATGTGTGA

```

301 ATTCTGGTTC TAACGGATTA AGTCAATTAA TTTCTATGGT CATCGCAGTG TTTTAAAAC
 361 ACCACCCTCA TTTAAAATA AAAATAGTAG CCAGAACTC CCCCTCCTT TTTTACTCA
 421 AATTTTCTGA CTCAGTGAGA ATAATTCTAA AACTTCCGAG ACCAACCTAC TGCATGAAGA
 481 TTTTTATGG ATCATTGACG AAGTTTCTCA ATTTAACTT GTACTTCCA AAGCTCAACA
 541 ATATGTCATC GAACATCAGC TCATTAAGG TTGAAGTGAA TTTAAGAAT CAAAAATATT
 601 GTATTATTG CGTCCTATCT TTAACATGGA TATTGTGATC CTCGAAATTC GTGCTTAGAT
 661 TAGGAAAACG CCTGTCATCT AGGAATGGGG CGTATCATAG CTCTAGCGT ATATCTGTCA
 721 ATTGTTACT TAGTCCTCCC GCTTAAATGA GCGAGATTGA TTGATACCGC T

No.4 wh0004 EST Blast: TOMOV-BT006_E08 Whitefly *Bemisia tabaci* (reared on TOMOV infected plants) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence.

DNA Blast: Data 없음

1 GGGTTGATCG GGGCTTTTGT CGGTTACAAT TAAAGTACTG GGAAGACTCC TCGAACAGCA
 61 CAAATTTGAA ATATCTTACA CCTTGTCGTA TATTG

No.5 wh0005 EST Blast: FP919033 *Acyrtosiphon pisum* whole insect males *Acyrtosiphon pisum* cDNA clone ACI0AAF8YK08 5', mRNA sequence.

DNA Blast: PREDICTED: *Acyrtosiphon pisum* ATP-dependent RNA helicase DDX42-like (LOC100163407), mRNA

1 CCAGCAAGAG GATTTTCTTC CATGTATCTG TAGTATGATT CTTCAATTGC TTCTTCGTCA
 61 ATATCAAATC TAAGTCCTTT ATCTTTTCT TTCTCTTAT TGGTTACCTT GACTCCTTGC
 121 TCCTTCTAAC CTCTAGGTA

No.6 wh0006 EST Blast: U_U-U_Forward-3830.b1 *Bemisia tabaci* forward SSH library *Bemisia tabaci* cDNA, mRNA sequence.

DNA Blast: *Bemisia tabaci* biotype Q vitellogenin mRNA, partial cds

1 GCCCTCCCC AATACACCGT TTTCCGAGCC AAGCGCTGGG CTTCTTCGA CGAAGAATTC
 61 TTCAACCAA TCCAAGACG TCTGAACGAT GCTCTCTTA AGGTTCAAAA TGGACAATCT
 121 TTCAACTCCA CCAAATTCTA CAACGACATC TCTCTCTCC TTGCTCTCTC CACTGCCACT
 181 GGTCTGCCAT TCTTTACAC TCTCAAGGTC CCCACTCTCG TCCAAGCCGG TGGAGAAGTT
 241 CAAGCCAGAG TTCAAGGTCA CAACTCCAAC AACAACAACA ACCTCTCCG TATCCCTGAA
 301 GCTGTTAACG TAACCGCCGA AATTGAAATT GTTTACGCCA CTGAATTGAA ATCTGAACTT
 361 GGATTCGTCA CTCCATTCAA CCACGAACGT TACGTTGCTG GTCTTGCCAA GAACATCTTT
 421 GTTAACATCC CAGTTAAGGT CGCCGCCAAT GTGGACATCG CCAACACCAA GGTCGAATTC
 481 TACATGAAGC CCATGAACAA CCAGAACGAA CAAAAAATCT TCCACTACGG ATCTTACCCT
 541 TACACCGCAA TCCAACACAT CTTGACTTC CGCCCCCTCG CCAATGCCTC CT

No.7 wh0007 EST Blast: BT-TYLCV-017-1-A5-T3_A05 Whitefly *Bemisia tabaci* (reared on TYLCV infected plants) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence.

DNA Blast: *Bemisia tabaci* biotype Q vitellogenin mRNA, partial cds

1 GCTATCGCGG CTTGTTGGGG GTTGCTGTTG TTGCGGTTGT TGTTGTTGTT GCGGTTGTTG
 61 TCGTTGGACT GGGAAGAGCT GGAAGAGGAG CTGGAGTCGC TGCTAGAGCT GGATGAGCTG
 121 GAGGAGGAAG AAGAGGAGCT GCTGCTGGAG TCACTGGATG AGCTGCTGCT AGAGTCGCTA
 181 GATGAAGAGC TGCTGCTGGA GTAGGAGGAG TCCTGGTCCT TGGCGTACTT GTTGTCTTG
 241 TAGTACTTGT TGTACTGGGA GTTGAGGGG TCGTAGTATT TGGCGTCTT GTAGGCGGAT
 301 TCGTAGTATT TGTCGTTGTT GTTGTATTG TATCCGTATC CGGCGTTCGC TGC GCGCTAG
 361 GTAA

No.8 wh0008 EST Blast: Data 없음.

DNA Blast: Data 없음

```
1 TTTGAGAGCT TTGATTCTCC TCTTACCCGG AGCAGGGAGA TTCGCGATCA TTTCTTGATT
61 AAGCCTTCCT TGAAGAGCTG CAAGAATATC AGGCCGTCTG AAAACCTGGG CGATGTTGCT
121 GTCATCTCCA GTATCTTCTT CCATTCCTTC AGTTCATCA TTA CTGTCAA CCTTTGTGG
181 GTCTGCAGCC ATTGTTGATT CAGATAGTTA ACGTGCACGA GAAAAAAGAC ACTTCCACGG
241 CCCACATGTC ATTGC
```

No.9 wh0009 Sequencing fail.

No.10 wh0010 EST Blast: HBT004_H01_T3_015 Whitefly *Bemisia tabaci* (non-viruliferous) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence.

DNA Blast: Data 없음

```
1 GGATTAGTAT ATTTACTATT CACACTTTGA TCATCCAAGG AATCCACCAC CATGTTGCTT
61 GCTCTGTCCG TCGTCGCCTT CTTGGCCGCT GCCCACGCCG CCGAGTACCC TTA CTACAAC
121 ATCCCGGCCG CCAGCCAGTC TTA CTACGGA GGATCCTACC AGCAGTACCC TTCTTACGCT
181 TACGCCGGTG ACCTGAAGTC TCTGGAATCA TCCGGAATCC AGTACGCTGC CACCCCGAG
241 ATCTCCTCTC AGTCTCAGTA CCCAGTCTAC CAAGTCCGTG ACGCCGCCCC CGTCGCCAGA
301 TACGAATCCG CCATCGCCAC CCCTGATGTC GCCCGCGCTA TC
```

NO.11 wh0011 EST Blast: 2_Reverse-4323 *Bemisia tabaci* reverse SSH library *Bemisia tabaci* cDNA, mRNA sequence.

DNA Blast: *Bemisia tabaci* biotype ZHJ-II vitellogenin mRNA, complete cds

```
1 ACTTTGTTAG CAGCGCGCTC GGGCTACGAG CGTAAGCAAG AGTGGCGACG TAATCAGCGT
61 TCTTTGTCC GAAGAATTGA GCAGAGATGT CGATAACATC GATGTTGGCA CTTTGAACTC
121 CAGATTGAGC ACGGCTGGCG AATTGGTTCA TTCTGTGTTT GTTGTGAGGT TGGTAGGAA
181 ATGGAACAGC ATCGTTTTGG TTGTTGTTGT GTTTGTGTTA GTTACCTTCG TTGTTGTTT
241 CCTTGTGGC GTATTTGTTG GCATAGTTCA AGGCGAACTT GGCGCATTG AGCGTCTGG
```

No.12 wh0012 EST Blast: Data 없음.

DNA Blast: Data 없음

```
1 GCGGCAGCCA GTGCTCAACT TCAAAACCAC CACTTTTGGA AAACCATCGA AAATGGAATG
61 CGGAAGGACA TCGAGGCGGC CCACCAAGAC TTTATGGACT TGTTGCTCA ACCATCGGAG
121 GTGAAACCCA AAGTTGAGGC CTCGCCCGCG ACGAGCAGCG AGGAGAAACC TGCCGTCTCA
181 GCGCCCTCTG CCACCGATGT CGCAACCACC AACGACACCA GTTCCACCGA GAATGATTCC
241 AGCGAGGAGG ACATCTCCGG AGAGACCGAA ATGGAACTCT TCAAGAAAGT GTTTGGCAGG
301 CCCAAAACAG CTGGAT
```

No.13 wh0013 EST Blast: BT-TYLCV-059-1-F4-T3_F04 Whitefly *Bemisia tabaci* (reared on TYLCV infected plants) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence.

DNA Blast: Data 없음

```
1 CCTGCCAGCC CCAGTTGCTG CCCCCAAATT CGCCACCCAA GAGATCGCCG CCCCCAGGTA
61 CGCTGCCGTC GAATCTGCTG CCCCCCGGTA CGCCGTCGCT GAAGCTTCTG TCCCCCGGTA
121 CGCTGAGGTC CAACAGTACT CCGCTCCAAT CTACCAGGCC CGCTCCTACG ACGCCCCAT
181 CGCCCCGCTG GTTTGGCTCG GTA
```

No.14 wh0014 EST Blast: BT_TYLCV003_A09 Whitefly *Bemisia tabaci* (reared on

TYLCV infected plants) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence.

DNA Blast: *Hyphomonas neptunium* ATCC 15444, complete genome

```
1 GCAGAGAAGT CGAAGGCGTT GACGAAGGCA CTGTTGATT CCGCGCAGGA TTGCGGTCCT
61 CATA
```

No.15 wh0015 EST Blast: Data 없음

DNA Blast: Data 없음

```
1 TGTGATAGTC GACCAACTAC CCCTCTTCAA AATAGCTTCC CAATTTGCAC CAATCCAATA
61 CCCTCTCGGT CCTTTTATCC AAGCTCTCCC ACAACCACCC CGCACCAATC GCTG
```

No.16 wh0016 EST Blast: ID0AAA3BF12FM1 ApMS *Acyrtosiphon pisum* cDNA clone ID0AAA3BF12 5', mRNA sequence.

DNA Blast: *Acyrtosiphon pisum* ATP citrate lyase (Atpcl), mRNA

```
1 GTGTCTCGCC GCGAGGAGGG TGGCGGTACA GATCCTTGTT TCAATCGCTT CTGGTCCATG
61 AAATGTCCTA CAGAACCGAT GGTTCTACCC GAGACCATCA GACCGTTGAT TGATCCCAT
121 TCTATGTATT CTTGAGCCTC TTCCTTGTG AAGCTACCAC TGTGCCTTAT TAAATCACAG
181 AATGCAACAG CAATGCAGCC ATCAGCGTTT AAAATTAGGT TTGGTTTCTT AGATGTTGTA
241 ATTTTTTCCA CTTCTAAGGC GTAATTGAGA ATTGGAGTGG TCGGAAAATT TTCTAATACA
301 AATTCTTTGA TAATTTTTAC TCTCATGTCA GGGTTGTTTA TCGATTTAAC TCTGTGACCA
361 ATACCCATGA TAAGTTGACC CTTCTTCCTC ATGGTATTCA CAAATTCCAT TGGGATGAGT
421 CCTGAATCGT AGGCATCCGT GAACTGTTTC GCTGCTTCAT TTAGGGCACC ACCAAATCTG
481 TCACCAATTG TGAGTAAACC TGAGACGAGC GAGGAAACTA GATCTTTTCC AGCTCTGGCA
541 CAGACGATGG TATTATGAGC ACCAGATACA GCAGGACCAT GATCGGCTGT GACCATTAGA
601 CACATTTCAA AGAATTTACA AACGTATGCA GGTAAAGACC GTTGAACCA CAG
```

No.17 wh0017 EST Blast: BT_TYLCV003_A09 Whitefly *Bemisia tabaci* (reared on TYLCV infected plants) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence.

DNA Blast: *Bemisia tabaci* biotype Q vitellogenin mRNA, partial cds

```
1 GTTCGGATCG GTTGATAGTGT CCGTAGAAGA GGAAACGAGA TTTCTCAGCA ACTGGGCTAC
61 GGGCGAAGGC AAAGGTGCAA ACGTAGTCGG CTCCTTTTG TCCAAGGAAT TGGGCAGAGA
121 AGTCGAAGGC GTTGACGAAG GCACTGTTGA TTCCGCGCA GGATTGCGGT CCTCATA
```

No.18 wh0018 Sequencing fail.

No.19 wh0019 Sequencing fail.

No.20 wh0020 EST Blast: Data 없음.

DNA Blast: Data 없음

```
1 GGTTCATGGAG CACTTGTTGG CGTGGATACA AGCTGGAAAT AGTTCGCTGC AAGTGGAATG
61 GTTCGCCAG TGCCCGCCG
```

No.21 wh0021 EST Blast : U_U-I_Forward-2627.b1 *Bemisia tabaci* forward SSH library *Bemisia tabaci* cDNA, mRNA sequence.

DNA Blast: *Drosophila grimshawi* GH23965 (Dgri\GH23965), mRNA

```
1 AGTTGCTGTG CAGTTAAGGC CTCCTCTGCA AGTCTGTGCA TTGATCGGCT ACCATGTTCA
61 ACGCGCTGAG TAGGACGGCC ACCGGGGTTT TGAAGGCGGA GAAACCCGTC TAAACCCCC
121 AATTTATTCA AAATGAAGCG GTTAAAGTTG CTGCATCAGT TTCTGCAAAC TATGCTACGC
```

181 ACCCGAAAGC AGCACCTGCT GCTGGCAAGG GCAAAGTTGT TGCCGTTATT GGTGCCGTCG
241 TTGACGTCCA ATTCGATGGA GACCTGCCTC CAATTCTAAA TGCTCTTGAA GTCGCCAAGC
301 AAAACCCCC CCG

No.22 wh0022 EST Blast: data 정보 없음.

DNA Blast: data 정보 없음.

1 TTATTGTTGG ATTTGTCTGA ACTATTTCGAG TACATTTGAT ACACATCTGA ATGAAAATAA
61 CTCGAATTG CGAAATTCA GCTGTTGGGG GACCTTCTCC GCATGCCA

No.23. wh0023 sequencing fail.

No 24. wh0024 EST Blast: BT-HINST-001-1-H11-T3_H11 Whitefly *Bemisia tabaci* instar (crawler to pupae) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence. DNA Blast: Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-205L13 in linkage group 11, complete sequence

1 GTTTTCGGCG GAACTTTGGC GTTTTTGTG GTTGGTGAGC GCGTGGTTTG TCGTTTTCA
61 CAGACGATTA TCTCCAGATA ATCATTTTTA TTTAGCTCAA CCCACAAGGA TTCATCATGA
121 ATGAACAGAA CGAAAAAGT TTCCAAAAAC AAAAGCAGGG TTTTCTCGC CAGGAAATCG
181 TACTTGAAGA AAAAGCCAAC ACCTAACCAT ACGTCT

No 25. wh0025 EST Blast: U_U-P_Forward-3278.b1 *Bemisia tabaci* forward SSH library *Bemisia tabaci* cDNA, mRNA sequence.

DNA Blast: *Bemisia tabaci* biotype B vitellogenin mRNA, complete cds

1 GGGTGGCGGA CGTACCGTT GCCGCTAACA GATTAAACGA AGCCCACTTC TCCATCAACT
61 TTGACAAGGT TTCTGATGCC GTCAAGAACT ACACTTACCA AGCTTTCGCC TACGCCCGTC
121 ATTTAGGATA CCAATACCAG TCTGAAAAC TCGGAAACCC CAATGGCCAA CACAACAAGA
181 TTGATGGTTA CTTCAAGTTC TCCCCTAAGT TCGACTTCGC CCAGTTCTAC TTCAACGCTC
241 CTTCCGTAGC CGCTTCTTC AAGAACGTCC CAGTTCACCA ATACGTCGCT GACTTTTTCA
301 CCCCCTGCC ACGACATCGC AC

No 26. wh0026 Sequencing fail.

No 27. Wh0027 EST Blast: data 정보 없음.

DNA Blast: data 정보 없음.

1 AACGAGGCTA CGGAGCTGCT CGACTCGTTA CTAACCTGTG TCTCATACT CGGACTCTTG
61 CTAATGCATA TTTATGCAAG CTGTAACCTCT CCTTCTTGC GCAGCCGCGA TATTCGAGAT
121 CATTCTGGC ATAGTCCTTC CTTGACAACC TGCCCC

No 28. Wh0028 EST Blast: data 정보 없음.

DNA Blast: data 정보 없음.

1 AAAAAAATAA TTTTATTTA ACTAGTTTTA TCTCCCATTT TTGTCTAAAA AGTTGGAATT
61 CGTTTTTGCA ATATGCAGTC TATTTGTAAG TTGACAATTT TATTAGGCCG AAAAGAATCT
121 CAATTCCGAG TATAGTCAAC CTGTACGGCG CTCAAATAG GAGATTGAGG ATATAATCTG
181 GAACGCACAG AACTAAAAA TGAACCTTT TGACTAGCAT GGACGTTGAT ACATGTTTTT
241 TCAGGACCTG ACTGCACGTT GCTGTTG

No 29. Wh0029 EST Blast: data 정보 없음.

DNA Blast: data정보 없음.

```
1 ATCAAATCAG TCGTTACCTC AGCAGATCTT GCCAAAGTCC TCGAAAAGTG ATTATCATTG
61 CTAGTATACT AGTTCATTTT AAACAGTTGA AGATGATTTT GGAAGATGAA ACCTCGGTCC
121 ATCTAATGTA GTTTTAGT TCGCAACTCT CCGAAAAGTC ACCTTCACCT TGTCAGAAAT
181 TTTCCCTCTG TGAGAACTTG ACACTGTGTT TTCAAGTACT TTCTGTGTGT TCTGTGACCT
241 TTGTCAGCCG AAGTCCCGTG CTCTCCGCT
```

No 30. Wh0030 EST blast: data정보 없음.

DNA Blast: data정보 없음.

```
1 CTGTTTAAAA AAATCAAGGT CAAGCCAGTC AAGCGTTCGG ATAAGTCTGA TTGTTGGATT
61 CTAGCTGTTC AAGAAGACGC CTCTGGGCCT AAGTCAAGTG ATGAAAAACC CATGACGTCA
121 GCTGAAGTGA AGACTTGTAC CAGCTCCTTG CCTCCAGTAT CCAGAACGTG TCCCTTACCC
181 CAAGATCTTT ACACTGAGGT GTCTGTACTG TGTTTAGTAA GAGATGACAC TTATTATGGT
241 CAACCAGCCA CCCTTCTGCG TGATACCAAC TTAATTCATG AGGAGCTGCA GGCTCAGGCC
301 GACAAGATCG ATAACCTTTG CCTCATGAAA GATATTGCGG TAGGCAGTTT ATGCTTAGTC
361 AAGTATTCAG GTGACTGGTA CCGTGCAGAG ATTCTATCCA TCGCACCTCT GAAGGTGCAA
421 TTGCTTACT ATGGAGATTG CATTTATGT CCCGCTGAAA ATCTCAGGGA AATACCCACG
481 GAGCTCAAGC CAAGATCCAG GACCATCTC AAGTCAAAC TTGCTGAGAA TGCATCGAAG
541 AAGTATTATA AGAAAAGCGT TTACAGTTGT TTGAAGATCA AACCTCTCCA CCTTCAGAA
601 AAGGATAACA GTTGGGTTGT GGCTGTGGAA GGAGATCCCT GTCCACCAAC TAGTTTGAAC
661 GACGTCACTG AGAAGAAACC ATCTGTCAA CCAGGAACAT CTCCAGTGAA GGCAAGCCCC
721 GTCCAGCAAG CATA
```

No 31. Wh0031 EST Blast: CATF10874.fwd CATF *Artemisia annua*, Tanzanian, from Sandeman Seeds, 1-2kb *Artemisia annua* cDNA clone CATF10874 5', mRNA sequence.

DNA Blast: data정보 없음.

```
1 GGTTATTCCG GCAGCCATCT TGGCGTTCCA TTGTTTGTCTT CCTAGTTAT GGAAGTATTC
61 TTCATTCTTC GCCGTTGAA GTTTCATGTT TTATTGTTAT TAGATTTTGA AATTGTTACT
121 GTACGCGATC ATTCATTTT TACTTTCCAG CATTATTAT GAGTACTTC AATCCTCAGG
181 GAATGATGGG AGGTCACACG GGCCAACAAA CGCATTATC ATCTCAACAA CAGCAACAAC
241 AAGTCAACCC TAGTAATAAT TACATTCAAC AACCAAATCA ACAACAGTGG TGGTGTTACA
301 GGTAACAAC TGCCTGGAC CCCCTGATCA GTGCTTCACG C
```

No 32. Wh0032 EST Blast: BT-HINST-021-1-A9-T3_A09 Whitefly *Bemisia tabaci* instar (crawler to pupae) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence.

DNA Blast: data정보 없음.

```
1 AAAATCTCGG TAGTCTTAT GTCTGCCCC TGTCTGTCCA ACCTGTGGGG GTGGTTCGTT
61 TCTGAGTCTC TCTCGTGCGC TACTCTCAAG AATACATCAT GTCTGACTGC TCCTGTCGTC
121 TCAACACCCG CACACCCCTG GGCAG
```

No 33. Wh0033 EST Blast: NACBU27TF *Aedes aegypti* infected with *Brugia Malayi* *Aedes aegypti* cDNA clone NACBU27, mRNA sequence.

DNA Blast: *Aedes aegypti* actin partial mRNA

```
1 GTGGAAATGT TTCTTTATTC TTTCCCCCGA TTCGTGCCAA ACAGTTTGGG TCAAGTTATC
61 ACAATCGGAA ATGAAAGGTT CCGTTGCCA GAAGCCCTGT TCCAGCCATC GTTCTTAGGT
121 ATGGAAGCAT GCGGTATCCA CGAACTACT TACAACCTAA TAATGAAGTG TGATGTTGAT
181 ATCCGTAAGG ACCTGTATGC CAACACTGTT CTCTCAGGAG GTACCACCAT GTACCCAGGA
241 ATCGCCGACA GGATGCAAAA GGAAATCACG GCACTTGAC CATCTACCAT GAAAATCAA
```

301 ATCATTGCCC CACCCGAAAG GAAATACTCC GTATGGATCG GTGGTTCAT CTTGGCCTCC
361 CTCTCCACCT TCCAACAGAT GTGGATCTCA AACAGGAGT ACGACGAATC CGGCCATCC
421 ATTGTTTACA GGAAATGTTT CTAAGTTATT GTATTATTGG GTATTTCCGGT TATCGATTCC
481 CACGCAACTC TCCGCTCCGG C

No 34. Wh0034 EST Blast: BT-TYLCV-018-1-H5-T3_H05 Whitefly *Bemisia tabaci* (reared on TYLCV infected plants) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence

DNA Blast: data 정보 없음.

1 GTGTAAGTAA TATTCTTTAT GAGTTTACAA TTGTTTGAAC AAAAATTCCA GAAAAACCAA
61 AATTGGTTTC CTCCGTAATA TTAATTTAG CAGCGAGGAC TCTGCAGCAA CGCAACCTAG
121 AAATGTCATT TCAGCATCCT ACCCCCCCGC CGATG

No 35. Wh0035 EST Blast: data정보 없음.

DNA Blast: data정보 없음.

1 AAAAGTCCCG TTCAGTGATT AGCCCTAGCC TCCATGCGTG TCCACAAAGT TGGAGTTTAC
61 TTCCATACTC AGTGCAGCA CTATGGAACC ATGGTATTAA AAGTGGCCCT TTCTGTTATG
121 TTTCCACTTG CTATGATTGA GGCTAGGACG ACTCCAGCTG GAAGTGAGGA TTTTACCGCG
181 TTGCTGGAGG AATTCAAACA GTTGAGCCG CTTCGAGAGG CAGCTCGCTT ATATACTT

No 36. Wh0036 EST Blast: BT-TOMOV-014-1-H12-T3_H12 Whitefly *Bemisia tabaci* (reared on TOMOV infected plants) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence

DNA Blast: data정보 없음.

1 AGTCTCCGCT TGAGAATTGC ATGTCGTCTA TGATAGCACA GTTGGCGCAA TTATGGAGGA
61 ATGTCAATAT CACTCAGCAC TCAGAATATA CCTGCTCTTT CTGTGGAAAA CCAAGTATGC
121 GTATCGGCTG TGGTGTAATC CGTTCATGCG AAAGATGCAG AA

No 37. Wh0037 EST Blast: BT-TYLCV-048-1-B11-T3_B11 Whitefly *Bemisia tabaci* (reared on TYLCV infected plants) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence.

DNA Blast: *Bemisia tabaci* mitochondrion, complete genome

1 AAAACAATT TCTGCGCAC TTAGTTCATG CCTCCATGCC TGTTCAAATA CGTTGGGATA
61 TGCCTGCAA GAGTGCCTCT CTACCAAATA TTATCTACCA AAGTTCGAGA TCTCGAAGGA
121 TCATTGTCAA CAAAAGGATA TTTTCCATAT CCCCTACAGC AATAATGATA TGATTTTTTA
181 TATGTATAGG AAATTCTCCA ATA

No 38. Wh0038 EST Blast: data정보 없음.

DNA Blast: data 정보 없음.

1 GAAGTAGGAA AGATAAATAA AATCATGGAT GCGATGAAAC TAACATCGCC GGATGAGGGC
61 ATGGAGGCC AAGAAGAATT TCTAGTTAAA ACAAAGGAT GTCCCCCTCG TATAATTCCT
121 AGCCCCGTCC CACCCGACG TTA

No 39. Wh0039 EST Blast: BT-TYLCV-059-1-F4-T3_F04 Whitefly *Bemisia tabaci* (reared on TYLCV infected plants) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence.

DNA Blast: data 정보없음.

```
1 GCTACGCCGC CGTCGAATCT GTCGCCCCC GGTACGCCGT CGCTGAGGCT TCTGCCCCC
61 GGTACGCTGA GGTCCAACAG TACTCTGCTC CAATCTACCA GGCCCCGCTCC TACGACGCC
121 CCATCGCCCC CTCTACCAC GCTCCCTGCC CGGCTCCAGT TCCGGAGATC AAGCCCCGTCG
181 TAGTCAAGTC CAACCTCCCC GTGCCATAA CCTACGGAGT CCACCGTGAA CCCAGGTGA
241 TCGAGACCA CTCTGCTCC TCTGTCTCC ACTACTACGG ACAACCCTAC GTAGTCAAGC
301 ACACCCAGAG CGCTGTCCTC CACGCCTACA CCCACAAGCC CGTCGTTGTC GACGAGTACG
361 AACACCCCTA TCCCCAGATT CTGG
```

No 40. Wh0040 EST Blast: BT-TYLCV-020-1-D4-T3_D04 Whitefly *Bemisia tabaci* (reared on TYLCV infected plants) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence.

DNA Blast: data정보없음.

```
1 GTGCGCTCTT TTCTTCTGT CCGCGCCCTC AAGATCCACC TGAGATTGGG AGTACGATTC
61 TTGGAGGTCG GCGGGTGGTA GCGGCTTGG TAGCCGTCGT CGAAAGGAAG TCGGTCAGGT
121 GGCTCATCGC CGAGAGTACG GTCGCGTGAG GGTCCCTCTG CATCTGAGCG ATCGCCTCCG
181 GACTCACGCC CACCATCTCG GC
```

No 41. Wh0041 Sequencing fail.

No 42. Wh0042 Sequencing fail

No 43. Wh0043 Sequencing fail.

No. 44 wh0044 EST Blast: data정보 없음.

DNA Blast: data정보 없음.

```
1 TGTTTGCAAT TCGGGCATCT TGGAAATTTT CATAGAGTAT CTATAGCTTT GATGACGTCA
61 TTGGGTACAG CGACGTTTT ATCCTGTCTGA TTTTCTTGA AATGGTGTA TTTAAGGGAA
121 AAAGTCATTC TATAAAAAGT GCTTGAAATT AAATAAAGAG TTGATTTAAG TAAAAAATC
181 GGACATTATG GTCCGTTTT ACAGCGTCAA CATAACCCTC AACGCGTGAT GCTTGCTTG
```

No 45. Wh0045 Sequencing fail.

No 46. Wh0046 EST Blast: data 정보 없음.

DNA Blast: data 정보 없음.

```
1 AGACAAATCA CATCCAAAAC ACATTTAACT ACCTTCCTCA TATAGACATT TTGAACCATA
61 TGATTACGAA AGTGACCCGC GTGCTTCTTG ACTTATGCGC GACACACGCA GGCCTTCGCT
121 TTGTCGCAAG AACTTCACCT CTCTGATTAT CTACTTCTAT TTACTIONG GTCATGATCA
181 TACCCTGCTC ATTTGCCTAG TCACCAAGAG ATTATACGTA CTCTTACTT ATGCTGACTG
241 TATACTACGC TTACGAAGTA TCTCCTGCGC TCACACTAAA GCCACTCTTG ATGGAGCCCA
301 ACTTTATTGT TAGAAATGTT CTCTATGCCC GGCATGTCC CGAATTACCT TACTACTACGA
361 TTCGTTAATC ATATCCTGGT CTGAATTTTA TTAGGGAAGT AGTAGTAGCT GTTTTAGTAT
421 GATCATTCAA TGTCTTGC GC AAGCATTATG TCTTTTTTGG GATACGCATC TTATCTCAGC
481 TTAGCTCCAC ATTTTTTGT TGGTCTGAAG ATTTTCAAGT ATTTGACTTC AAAACTGAAC
541 TTTGTGAGAC CCCAGAGCCC CTCGACCTCA GGT
```

No 47. Wh0047 EST Blast: BT-TYLCV-060-1-E4-T3_E04 Whitefly *Bemisia tabaci*

(reared on TYLCV infected plants) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence.

DNA Blast: *Bemisia tabaci* biotype B vitellogenin mRNA, complete cds

```
1 GGGCGGATTG GGTTCATCG GGAAGAGCGT AGAATTGGGC GAAGATCTTT CCGTTCTTGT
61 CGAAGAAGTC GTTCATGTAC TTGTATTGAA CGTGTGTTC TTCCTTGTG AATTGGACGT
121 TAGGCGCGGG GTGCGTG
```

No 48. Wh0048 EST Blast: data 정보 없음.

DNA Blast: data 정보 없음.

```
1 CAATTTAAAG TTGAGGGCTC CGCCCATTCT CAAAAACAA AAGGAATAGT ATCATTCTC
61 ATCTTTTTGT GTTCGGCACT GGGAGTCTCA ATTCACCTA AACTTTGAAA CAAATACACT
121 CAAAACATC CGCAAATTT TGGAAAACAG CTTTTTTTA AAAAAAATT TGAGGGGGCCG
181 TTTCTTTGCT GAGTTCACT TTAAGCTTAT GTTCATGGAA GAAAGAGTCT AATCTGACCT
241 GGAGATTTGG AGAATCGCCC CTGCAATAC TGTTGATTA AGCGTGAACA CCCTGTATGT
301 TATTTGTTAA TTTAAAATTT ATACGTGATA AGTGCCTGAT TATTTTTTTT ACTTTTAGTT
361 ACCTTGTGCC GTTAATTTTT TTTAACAGGG ATACCCTGTG TGTTATTTGT TAACTTGAAA
421 TTTTGTCTG ATGAAGTGCC TCACTATGTG CCATTAATTT TCCTAAACAA GGAAATTACG
481 CCCGTCTTTT CTTACGCTC
```

No 49. Wh0049 EST Blast: data 정보 없음.

DNA Blast: data 정보 없음.

```
1 AACACGGAAA TTTTTTTTTT GTGCTCCGGC GCCCTCACGT TTGTACATAG GAGGGGGGAT
61 GATCTATTGA TTTGCGTTAT TGTGACGTTT CTTGTGATAG TGGACTTCAC ATTTCTTACT
121 CGATCAATTA CGCTCTTACT AAAGAGATTT TTACGATCCG AATTAGTGTT CACTCATCGT
181 AATCGAGTGT TTAGTGCAAT CGAGCCGACT CGCGGCTTGA ATTTTGTGT CCAAGTTCC
241 AACCACACCA CCATATGGCC CCGTG
```

No 50. Wh0050 EST Blast: A_Forward-1888 *Bemisia tabaci* forward SSH library *Bemisia tabaci* cDNA, mRNA sequence.

DNA Blast: data 정보 없음.

```
1 GATTGATAAT CTGATAAGTG TAGCCTCAAG GTGAATTTAT TGTTTCGTGCG ATTCTCACGT
61 TCTCGTTGA AATTTTAAAG AGCTTTTTTCG CTTTTTTTCA ATTTCAAATT TCCTAGTGCA
121 ATATGCCACG ACGTGGACGA TCTCCATCTC CCTCCAGGGG ATCCTACCCA GCTCGTGCTG
181 CCCCAGCACG CGCTGCCCA ACGCAGCCAG CACACACCAC CCGCCCTCAT
```

- 충남대학교 온실의 공간상 문제로 다량의 토마토는 진행할 수 없으나 4주간 간격으로 연속 실험을 통하여 우수 RNAi 선별을 진행하였다.

2. 토마토 유묘에 담배가루이 RNAi 접종 및 선별(2) - 3차년도

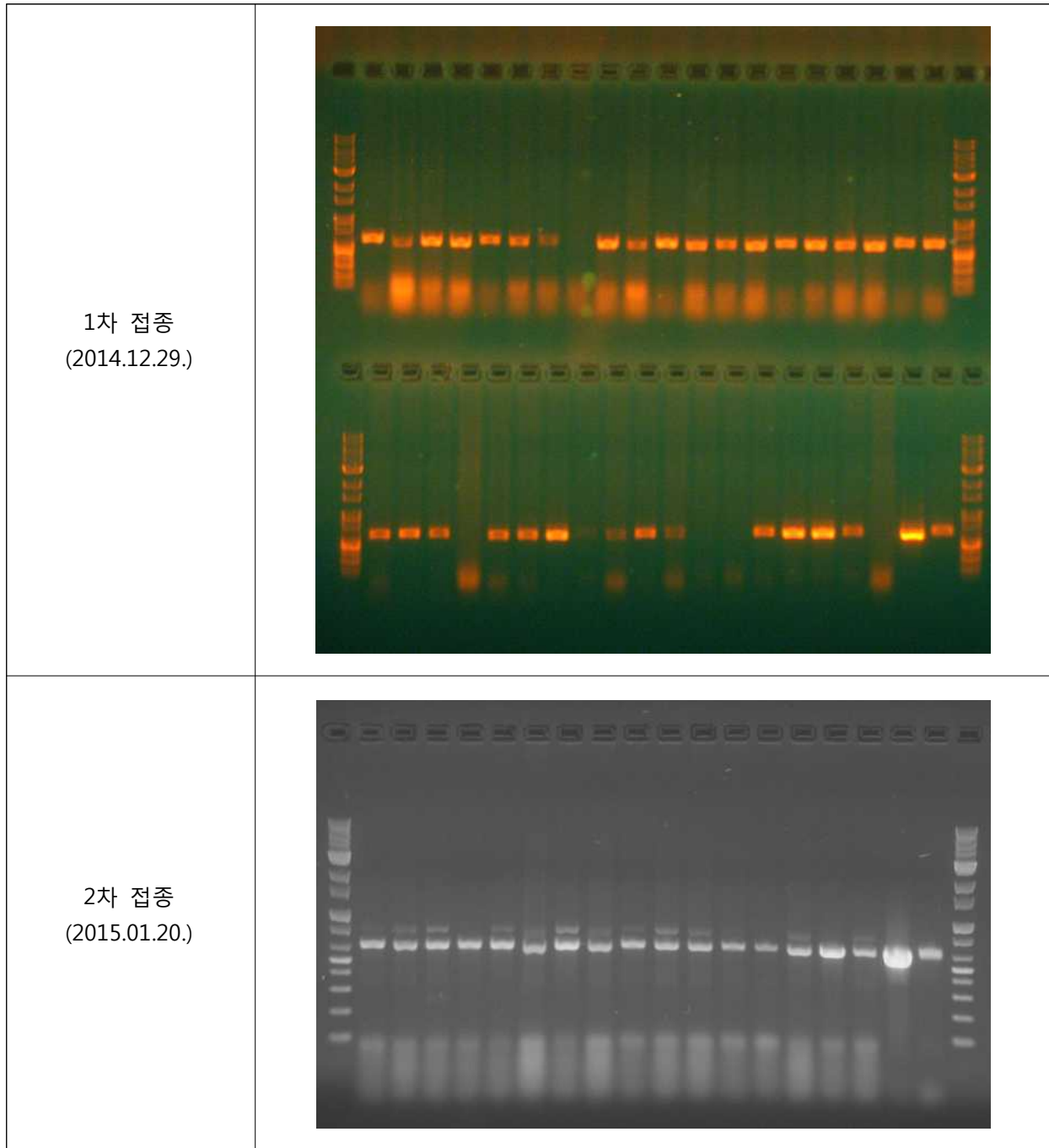
가. 토마토 유묘에 담배가루이 RNAi 발현 식물바이러스 TRV 접종

- 토마토에 RNAi가 접종된 것을 확인한 후 포장실험을 진행하기 위해 담배가루이 RNAi를 토마토에 반복적으로 접종하고 접종여부를 진단하였음. 토마토는 25°C, 16L:8D 조건에서 3주간 생육하였고, 바이러스 접종은 TRV RNA1, TRV RNA2, TRV RNA2: whitefly cDNA가 들어있는 *Agrobacterium* cell을 infiltration buffer에 현탁하고 Acetosyringone을 첨가하여 주사바늘을 제거한 주사기로 잎 뒷면에 접종하였음. RNAi

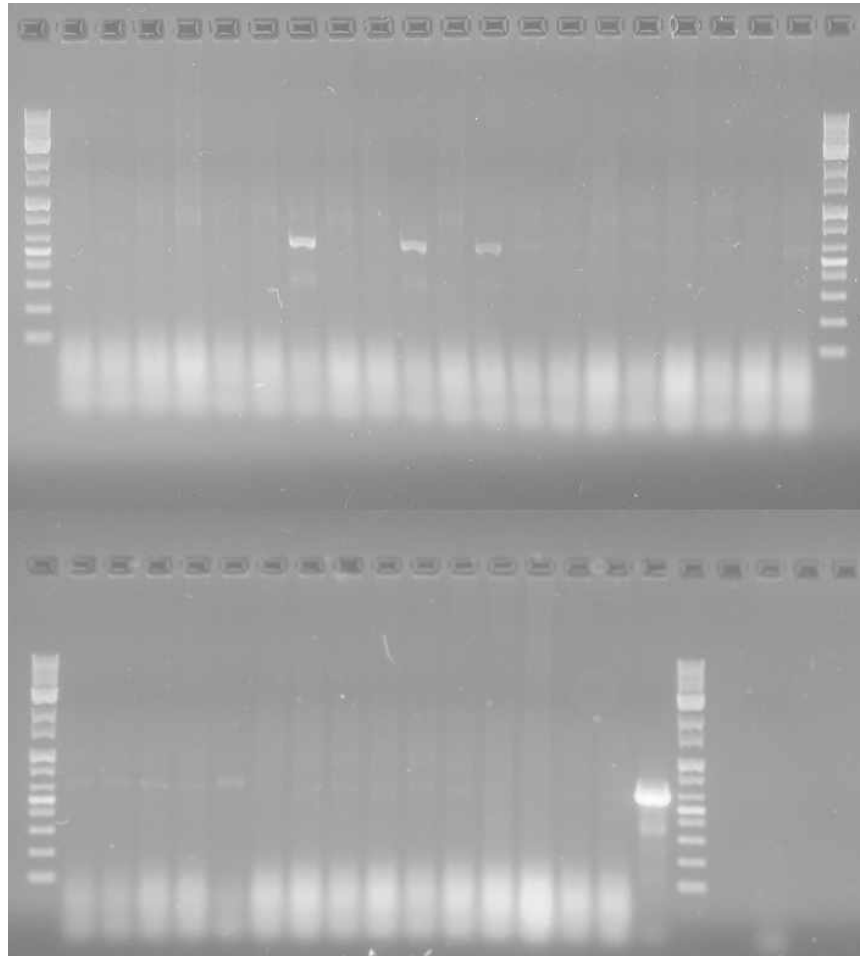
접종여부는 TRV의 외피단백질(Coat protein, CP)를 detection하여 확인하였음.

표 8. 토마토 내 바이러스 진단에 사용된 primer

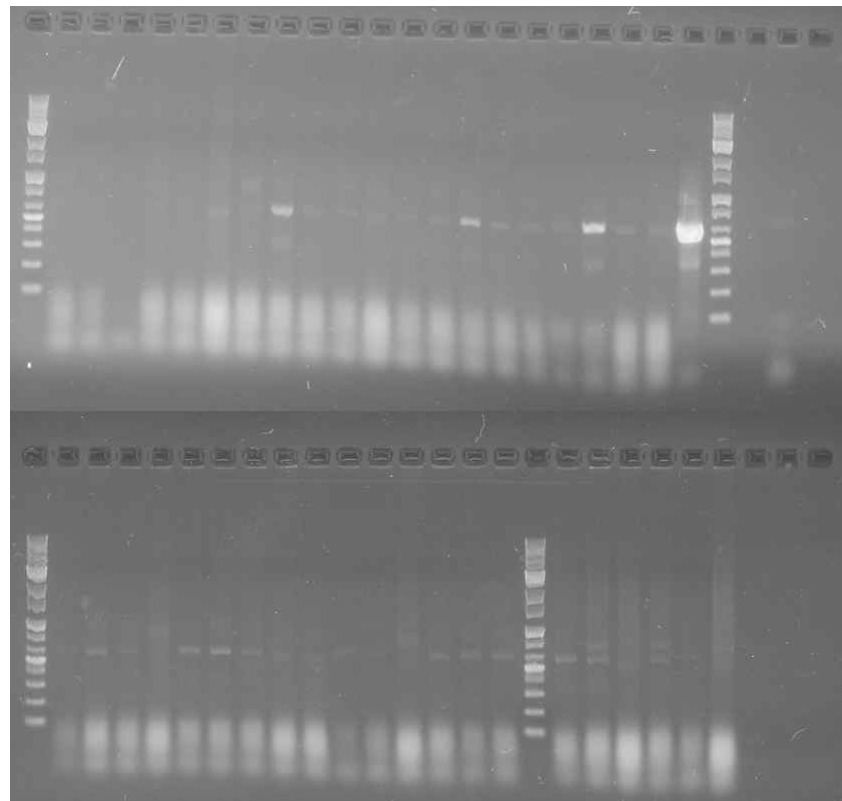
oligomer name		sequence(5'-3')
TRV	F	TGG GAG ATA TGT ACG ATG AAT C
CP	R	GGA TTA GGA CGT ATC GGA CC



3차 접종
(2015.02.03.)



4차 접종
(2015.02.17.)



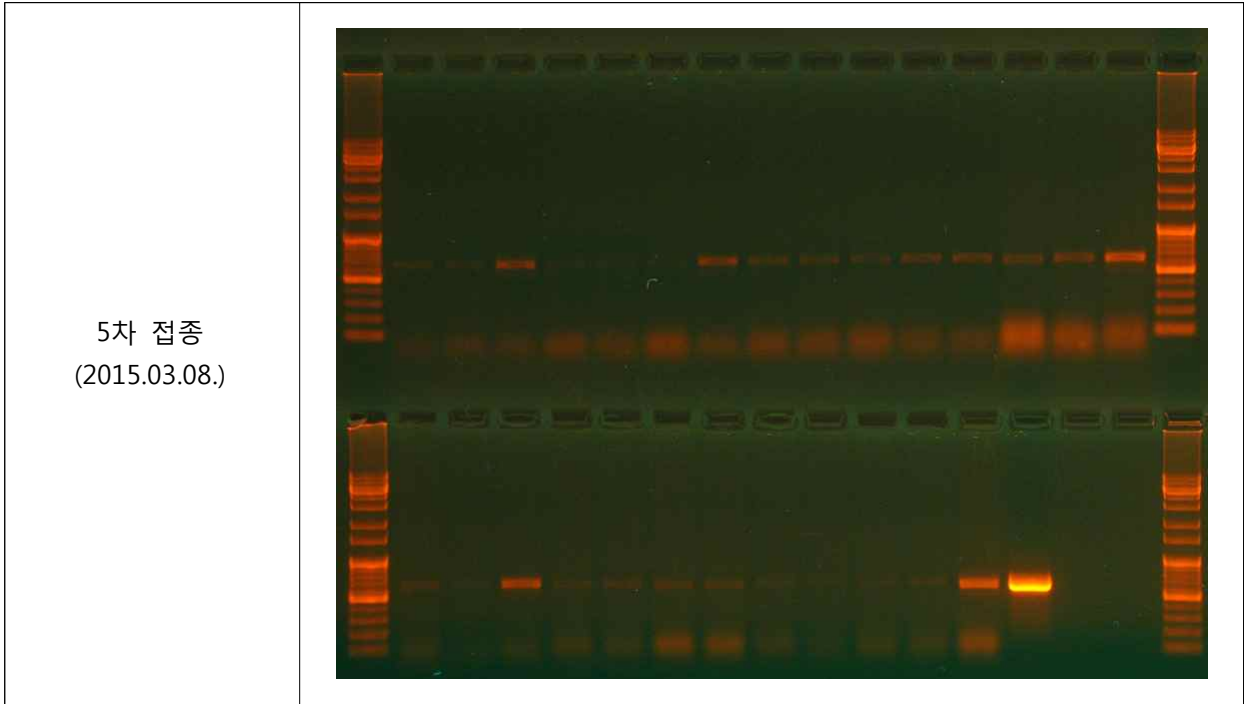


그림 33. 토마토 유묘에서 RNAi 발현용 식물바이러스 진단

- 반복적인 접종을 통해 담배가루이 RNAi를 삽입한 바이러스가 토마토 식물 내에서 정상적으로 발현하는 것을 확인하였고, 충남대학교 온실에서 포장실험을 진행함.
- 포장실험은 TRV2-담배가루이 RNAi 가 삽입되어 있는 각각의 Agrobacterium clony를 TRV1과 혼합하여 RNAi sample 하나당 토마토 3주씩, 총 토마토 Seedling 210 주에 접종하였고, 1~4주 동안 담배가루이 성충 개체서식, 3~6주 동안 담배가루이 알·약충 개체서식을 평가하였음(그림 34, 표 9, 10, 11).

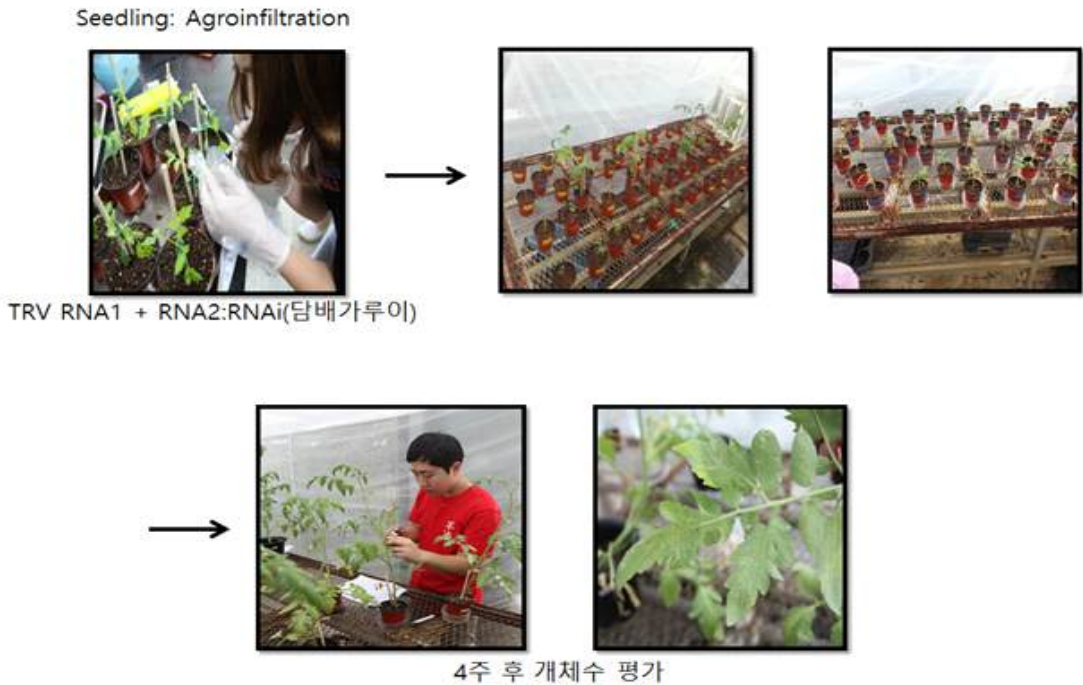


그림 34. 토마토 유묘에 담배가루이 RNAi 발현 TRV 적용



그림 35. RNAi 효능 검정 (야외실험)

나. 담배가루이 RNAi 발현 토마토에서의 알, 약충수 변화 확인
 - 2차년도에 이어 64개의 RNAi 발현 TRV를 접종 후, 담배가루이 알과 약충 방제 효과를
 검정

표 9. 담배가루이 RNAi 발현 TRV 적용에 따른 담배가루이 알·약충 개체수 변화

No	Stock ID	접종일	담배가루이접종	생충수(3 반복 평균)			
				3 주	4 주	5 주	6 주
1	wh0101	2015.04.18	2015.04.27	140.0	246.0	185.3	114.0
2	wh0102	2015.04.18	2015.04.27	201.0	182.7	215.0	165.0
3	wh0103	2015.04.18	2015.04.27	205.3	295.7	330.7	198.3
4	wh0104	2015.04.18	2015.04.27	160.3	224.3	201.0	232.3
5	wh0105	2015.04.18	2015.04.27	208.7	160.7	142.7	242.3
6	wh0106	2015.04.18	2015.04.27	193.0	265.3	245.3	217.7
7	wh0107	2015.04.18	2015.04.27	573.7	191.7	270.0	280.7
8	wh0108	2015.04.18	2015.04.27	510.0	276.3	231.3	177.3
9	wh0109	2015.04.18	2015.04.27	533.7	390.3	297.3	286.0
10	wh0110	2015.04.18	2015.04.27	399.0	345.7	246.3	308.3
11	wh0112	2015.04.18	2015.04.27	363.3	281.0	237.3	257.7
12	wh0113	2015.04.18	2015.04.27	368.0	256.3	165.0	179.7
13	wh0114	2015.04.18	2015.04.27	317.7	486.3	371.7	375.7
14	wh0116	2015.04.18	2015.04.27	413.7	183.3	271.0	214.7
15	wh0119	2015.04.18	2015.04.27	375.7	218.3	292.0	243.7
16	wh0120	2015.04.18	2015.04.27	262.7	252.3	320.0	207.0
17	wh0121	2015.04.18	2015.04.27	285.3	208.0	312.7	277.3

18	wh0122	2015.04.18	2015.04.27	291.7	153.0	223.3	118.0
19	wh0123	2015.04.18	2015.04.27	287.7	212.7	222.3	223.7
20	wh0124	2015.04.18	2015.04.27	331.7	213.3	199.3	158.5
21	wh0125	2015.05.19	2015.05.29	149.3	198.0	124.3	52.7
22	wh0126	2015.05.19	2015.05.29	81.7	139.0	84.7	39.0
23	wh0127	2015.05.19	2015.05.29	134.0	277.7	129.0	41.7
24	wh0128	2015.05.19	2015.05.29	124.0	248.0	113.0	47.3
25	wh0129	2015.05.19	2015.05.29	66.0	132.3	102.7	61.0
26	wh0130	2015.05.19	2015.05.29	37.7	276.7	100.3	36.7
27	wh0131	2015.05.19	2015.05.29	115.3	200.0	123.0	55.7
28	wh0132	2015.05.19	2015.05.29	179.5	107.5	49.5	30.5
29	wh0133	2015.05.19	2015.05.29	154.3	183.7	98.7	67.0
30	wh0134	2015.05.19	2015.05.29	57.3	120.7	55.7	16.0
31	wh0136	2015.05.19	2015.05.29	155.7	155.3	182.7	51.3
32	wh0137	2015.05.19	2015.05.29	325.0	301.3	216.3	179.7
33	wh0138	2015.05.19	2015.05.29	134.3	124.0	85.0	30.7
34	wh0139	2015.05.19	2015.05.29	79.7	141.3	73.7	25.7
35	wh0140	2015.05.19	2015.05.29	91.0	95.0	69.0	25.3
36	wh0141	2015.05.19	2015.05.29	100.3	178.0	108.7	39.3
37	wh0142	2015.05.19	2015.05.29	156.7	160.3	64.3	39.0
38	wh0143	2015.05.19	2015.05.29	261.0	209.0	176.7	83.3
39	wh0145	2015.05.19	2015.05.29	284.7	158.7	94.7	69.7
40	wh0146	2015.05.19	2015.05.29	276.3	204.0	172.0	94.3
41	wh0147	2015.05.19	2015.05.29	209.7	97.5	76.5	44.5
42	wh0148	2015.05.19	2015.05.29	254.7	160.3	59.7	41.3
43	wh0149	2015.05.19	2015.05.29	103.0	156.7	92.3	24.7
44	wh0151	2015.05.19	2015.05.29	113.0	91.3	50.7	32.0
45	wh0152	2015.05.19	2015.05.29	41.0	107.7	64.7	14.0
46	wh0153	2015.06.02	2015.06.15	246.7	193.7	156.7	130.3
47	wh0154	2015.06.02	2015.06.15	173.3	167.7	151.3	137.0
48	wh0155	2015.06.02	2015.06.15	153.3	172.0	150.7	129.3
49	wh0157	2015.06.02	2015.06.15	196.7	194.0	139.7	138.0
50	wh0158	2015.06.02	2015.06.15	220.0	164.0	104.0	105.0
51	wh0159	2015.06.02	2015.06.15	225.7	170.3	109.0	110.0
52	wh0161	2015.06.02	2015.06.15	257.0	198.3	116.7	127.7
53	wh0162	2015.06.02	2015.06.15	264.7	184.7	134.3	132.0
54	wh0163	2015.06.02	2015.06.15	322.3	205.3	132.3	116.0
55	wh0164	2015.06.02	2015.06.15	402.7	222.0	189.7	164.0
56	무처리	2015.04.18	2015.04.27	707.7	543.7	312.0	351.5
57	무처리	2015.05.19	2015.05.29	343.3	558.0	574.5	560.5
58	무처리	2015.06.02	2015.06.15	493.0	542.0	264.3	294.0
59	TRV ori	2015.04.18	2015.04.27	758.7	541.3	536.7	590.0
60	TRV ori	2015.05.19	2015.05.29	417.4	448.3	473.0	370.7

61	TRV ori	2015.06.02	2015.06.15	432.0	413.7	300.7	314.4
62	TRV att	2015.04.18	2015.04.27	496.7	445.0	361.6	367.6
63	TRV att	2015.05.19	2015.05.29	474.3	517.0	534.7	386.3
64	TRV att	2015.06.02	2015.06.15	523.6	512.7	349.3	316.3

표 10. 담배가루이 RNAi 발현 TRV에 따른 담배가루이 알 방제가와 우수 RNAi 유전자 선발

No	Stock ID	무처리(negative control) 대비 방제가				TRV original(positive control) 대비 방제가				TRV att(positive control) 대비 방제가			
		3주	4주	5주	6주	3주	4주	5주	6주	3주	4주	5주	6주
1	Wh0101	71.4	30.6	23.6	50.1	76.7	55.8	68.7	82.2	60.2	26.2	46.9	66.7
2	wh0102	65.3	61.7	29.1	28.4	71.8	75.6	71.0	74.4	51.8	59.3	50.7	52.3
3	wh0103	69.8	33.2	-27.6	15.5	75.4	57.5	47.7	69.8	57.9	29.0	11.3	43.7
4	wh0104	73.2	52.0	42.8	24.9	78.2	69.4	76.6	73.1	62.7	49.0	60.3	49.9
5	wh0105	70.4	65.7	65.0	-2.3	75.9	78.2	85.7	63.4	58.8	63.6	75.7	31.8
6	wh0106	69.2	47.5	19.6	8.8	75.0	66.6	67.1	67.4	57.2	44.3	44.1	39.2
7	wh0107	30.9	50.8	13.3	-31.3	43.8	68.7	64.5	53.1	3.8	47.7	39.7	12.5
8	wh0108	33.4	31.9	17.3	22.2	45.8	56.7	66.1	72.2	7.3	27.7	42.5	48.1
9	wh0109	40.4	33.2	19.4	-26.0	51.5	57.5	67.0	55.0	17.0	29.0	44.0	16.0
10	wh0110	40.9	-5.6	9.1	-40.7	52.0	32.8	62.7	49.7	17.8	-12.1	36.8	6.2
11	wh0112	42.4	36.4	30.2	-5.9	53.2	59.5	71.4	62.2	19.8	32.5	51.5	29.4
12	wh0113	44.3	25.5	43.2	28.0	54.7	52.6	76.8	74.3	22.4	20.8	60.6	52.0
13	wh0114	50.5	-29.0	-61.4	-66.3	59.8	17.9	33.9	40.6	31.2	-37.0	-12.2	-10.8
14	wh0116	30.9	50.3	-4.2	20.6	43.8	68.4	57.3	71.6	3.8	47.2	27.6	47.1
15	wh0119	37.4	38.3	-33.8	17.7	49.1	60.7	45.2	70.6	12.9	34.4	7.0	45.2
16	wh0120	67.9	34.4	-25.9	17.3	73.9	58.3	48.4	70.4	55.3	30.3	12.5	44.9
17	wh0121	55.0	37.8	-20.0	-15.9	63.4	60.4	50.8	58.6	37.3	33.9	16.6	22.7
18	wh0122	56.8	58.5	-2.7	57.0	64.9	73.6	57.9	84.6	39.9	55.9	28.6	71.3
19	wh0123	58.8	35.6	14.6	2.1	66.5	59.0	65.0	65.0	42.7	31.6	40.6	34.8
20	wh0124	50.2	37.0	27.0	35.1	59.5	59.9	70.1	76.8	30.7	33.1	49.3	56.8
21	Wh0125	64.2	67.9	81.2	93.1	69.8	62.1	78.1	89.9	72.6	67.0	80.0	89.5
22	wh0126	80.1	81.8	89.9	95.1	83.2	78.6	88.2	92.8	84.7	81.3	89.3	92.5
23	wh0127	69.2	57.9	86.0	94.3	74.0	50.3	83.7	91.7	76.4	56.7	85.2	91.2
24	wh0128	73.1	62.5	85.7	93.1	77.3	55.9	83.4	89.9	79.4	61.5	84.9	89.5
25	wh0129	82.8	79.6	84.8	88.7	85.5	76.0	82.3	83.5	86.9	79.1	83.9	82.7
26	wh0130	89.5	56.3	84.5	92.5	91.2	48.5	81.9	89.1	92.0	55.0	83.5	88.6
27	wh0131	73.1	70.3	83.7	92.3	77.4	65.0	81.0	88.8	79.5	69.4	82.7	88.2
28	wh0132	57.7	83.9	93.9	94.5	64.3	81.0	92.9	92.0	67.6	83.4	93.6	91.6
29	wh0133	64.9	76.9	89.0	93.0	70.4	72.8	87.2	89.8	73.1	76.3	88.3	89.3
30	wh0134	91.1	84.0	92.9	97.7	92.5	81.2	91.7	96.7	93.2	83.6	92.5	96.5
31	wh0136	73.2	78.6	75.2	94.6	77.5	74.8	71.0	92.2	79.5	78.0	73.6	91.8
32	wh0137	8.0	41.2	60.5	65.5	22.5	30.7	53.9	49.8	29.6	39.6	58.1	47.4
33	wh0138	69.2	77.3	90.6	96.1	74.0	73.2	89.1	94.3	76.4	76.7	90.1	94.1
34	wh0139	83.6	78.4	88.9	96.8	86.2	74.5	87.0	95.3	87.5	77.8	88.2	95.1
35	wh0140	81.9	85.8	89.5	95.4	84.8	83.2	87.7	93.3	86.2	85.4	88.9	92.9
36	wh0141	76.8	74.1	86.4	93.5	80.4	69.4	84.2	90.5	82.3	73.3	85.6	90.0
37	wh0142	58.8	75.2	90.9	94.5	65.3	70.8	89.4	92.0	68.5	74.5	90.4	91.6

38	wh0143	30.1	63.6	73.2	85.3	41.1	57.1	68.8	78.6	46.5	62.6	71.6	77.6
39	wh0145	40.5	75.4	84.9	92.3	49.8	71.0	82.4	88.9	54.5	74.7	84.0	88.3
40	wh0146	26.3	61.4	68.3	81.8	37.9	54.5	63.0	73.6	43.6	60.3	66.3	72.3
41	wh0147	55.9	90.1	92.0	99.3	62.8	88.4	90.7	99.0	66.2	89.9	91.5	99.0
42	wh0148	44.0	77.0	90.8	93.6	52.8	72.9	89.2	90.7	57.2	76.4	90.2	90.2
43	wh0149	76.4	79.0	87.2	95.4	80.1	75.2	85.1	93.3	81.9	78.4	86.4	92.9
44	wh0151	77.9	86.6	93.3	94.5	81.4	84.3	92.2	92.0	83.1	86.3	92.9	91.6
45	wh0152	89.6	86.6	89.8	97.4	91.3	84.2	88.1	96.1	92.1	86.2	89.2	96.0
46	wh0153	56.8	60.2	25.5	33.2	41.9	49.2	24.4	40.2	57.9	57.8	36.2	46.7
47	wh0154	61.0	67.6	25.7	28.1	47.6	58.7	24.6	35.7	62.0	65.7	36.4	42.6
48	wh0155	61.0	60.0	21.9	39.2	47.6	49.0	20.7	45.6	62.0	57.7	33.1	51.5
49	wh0157	54.2	59.4	35.6	39.4	38.4	48.2	34.6	45.8	55.4	57.0	44.9	51.7
50	wh0158	42.0	65.0	51.0	51.8	22.0	55.4	50.2	56.9	43.6	62.9	58.0	61.6
51	wh0159	37.7	60.0	50.7	47.0	16.2	49.0	50.0	52.6	39.3	57.7	57.8	57.7
52	wh0161	38.1	57.7	44.0	44.5	16.7	46.0	43.2	50.3	39.7	55.1	52.1	55.7
53	wh0162	42.5	60.8	48.3	52.3	22.7	50.0	47.6	57.3	44.0	58.5	55.8	61.9
54	wh0163	37.9	61.9	38.2	45.9	16.5	51.4	37.3	51.5	39.6	59.6	47.1	56.8
55	wh0164	35.9	69.4	45.7	49.8	13.9	60.9	44.9	55.1	37.6	67.5	53.5	59.9

표 11. 담배가루이 RNAi 발현 TRV에 따른 담배가루이 약충 방제가와 우수 RNAi 유전자 선발

No	Stock ID	무처리(negative control) 대비 방제가				TRV original(positive control) 대비 방제가				TRV att(positive control) 대비 방제가			
		3주	4주	5주	6주	3주	4주	5주	6주	3주	4주	5주	6주
1	Wh0101	93.9	70.7	58.0	80.5	92.6	52.5	57.4	77.1	90.9	60.3	51.9	72.6
2	wh0102	81.3	69.5	33.1	71.3	77.4	50.5	32.1	66.2	72.3	58.6	23.3	59.5
3	wh0103	72.9	53.8	16.2	64.4	67.2	25.1	14.9	58.1	59.9	37.4	4.0	49.8
4	wh0104	83.8	63.2	28.1	40.6	80.4	40.3	27.0	30.1	76.0	50.1	17.6	16.3
5	wh0105	70.7	73.6	43.3	55.8	64.6	57.1	42.4	48.0	56.7	64.1	35.0	37.7
6	wh0106	78.2	53.6	23.2	59.7	73.6	24.8	22.0	52.6	67.7	37.1	11.9	43.3
7	wh0107	0.5	74.0	13.6	58.3	-20.1	57.8	12.3	50.9	-47.2	64.7	1.0	41.2
8	wh0108	19.4	60.5	34.6	69.8	2.8	36.0	33.6	64.5	-19.2	46.5	25.1	57.4
9	wh0109	0.1	24.9	-10.4	51.7	-20.6	-21.8	-12.1	43.1	-47.8	-1.8	-26.6	31.9
10	wh0110	47.8	64.1	33.3	51.5	37.0	41.7	32.3	42.9	22.7	51.3	23.6	31.6
11	wh0112	58.3	56.2	17.5	50.8	49.7	28.9	16.3	42.1	38.4	40.6	5.5	30.7
12	wh0113	53.8	70.9	51.1	64.4	44.2	52.8	50.3	58.1	31.6	60.6	43.9	49.8
13	wh0114	62.2	36.6	24.2	37.1	54.3	-2.8	23.1	26.0	44.0	14.1	13.2	11.4
14	wh0116	58.1	76.8	31.0	52.5	49.4	62.4	29.9	44.1	38.0	68.6	20.8	33.0
15	wh0119	61.6	74.1	47.6	40.3	53.6	57.9	46.8	29.7	43.2	64.8	40.0	15.8
16	wh0120	55.1	66.2	21.4	58.7	45.8	45.2	20.2	51.5	33.6	54.2	9.9	41.9
17	wh0121	67.0	77.5	20.1	48.5	60.1	63.5	18.9	39.4	51.2	69.5	8.4	27.4
18	wh0122	61.8	80.7	60.4	73.4	53.9	68.6	59.8	68.7	43.5	73.8	54.6	62.6
19	wh0123	60.1	77.5	43.3	61.7	51.9	63.5	42.4	55.0	41.0	69.5	35.0	46.0
20	wh0124	57.6	76.4	45.5	69.6	48.8	61.7	44.6	64.2	37.3	68.0	37.5	57.1
21	Wh0125	-400.0	49.4	65.7	80.2	-70.0	15.8	48.8	63.8	14.1	29.7	60.9	76.1

22	wh0126	-152.9	44.8	64.4	84.5	14.0	8.2	46.9	71.8	56.6	23.3	59.4	81.3
23	wh0127	-429.4	15.9	39.7	85.4	-80.0	-39.9	10.0	73.4	9.1	-16.9	31.2	82.5
24	wh0128	-482.4	24.1	56.2	85.1	-98.0	-26.2	34.6	72.9	0.0	-5.5	50.0	82.1
25	wh0129	-41.2	61.2	70.2	91.0	52.0	35.5	55.5	83.6	75.8	46.1	65.9	89.2
26	wh0130	58.8	24.1	74.0	97.5	86.0	-26.2	61.1	95.5	92.9	-5.5	70.3	97.0
27	wh0131	-335.3	36.6	55.9	80.8	-48.0	-5.5	34.1	65.0	25.3	11.9	49.6	76.9
28	wh0132	-544.1	66.5	80.0	94.9	-119.0	44.3	70.1	90.7	-10.6	53.4	77.2	93.8
29	wh0133	-529.4	22.8	55.2	67.1	-114.0	-28.4	33.2	40.1	-8.1	-7.3	48.9	60.4
30	wh0134	-382.4	53.0	78.7	94.7	-64.0	21.9	68.2	90.4	17.2	34.7	75.7	93.7
31	wh0136	-1,052.9	43.2	37.1	74.9	-292.0	5.5	6.2	54.2	-98.0	21.0	28.3	69.8
32	wh0137	-152.9	67.5	70.8	78.3	14.0	45.9	56.4	60.5	56.6	54.8	66.7	73.9
33	wh0138	-435.3	80.0	61.0	87.9	-82.0	66.7	41.7	78.0	8.1	72.1	55.4	85.4
34	wh0139	-329.4	58.0	79.7	89.8	-46.0	30.1	69.7	81.4	26.3	41.6	76.8	87.7
35	wh0140	-429.4	70.4	81.3	96.0	-80.0	50.8	72.0	92.7	9.1	58.9	78.6	95.1
36	wh0141	-288.2	41.2	57.1	91.0	-32.0	2.2	36.0	83.6	33.3	18.3	51.1	89.2
37	wh0142	-211.8	53.4	79.4	87.0	-6.0	22.4	69.2	76.3	46.5	35.2	76.4	84.3
38	wh0143	-341.2	57.6	51.4	84.5	-50.0	29.5	27.5	71.8	24.2	41.1	44.6	81.3
39	wh0145	-1,376.5	54.4	77.5	67.4	-402.0	24.0	66.4	40.7	-153.5	36.5	74.3	60.8
40	wh0146	-382.4	72.7	78.1	88.8	-64.0	54.6	67.3	79.7	17.2	62.1	75.0	86.6
41	wh0147	-970.6	48.3	62.9	61.4	-264.0	13.9	44.5	29.7	-83.8	28.1	57.6	53.5
42	wh0148	-1,058.8	45.5	84.4	88.5	-294.0	9.3	76.8	79.1	-99.0	24.2	82.2	86.2
43	wh0149	-311.8	40.2	69.2	96.6	-40.0	0.5	54.0	93.8	29.3	16.9	64.9	95.9
44	wh0151	-576.5	70.1	81.6	93.5	-130.0	50.3	72.5	88.1	-16.2	58.4	79.0	92.2
45	wh0152	-5.9	54.4	84.1	98.1	64.0	24.0	76.3	96.6	81.8	36.5	81.9	97.8
46	wh0153	40.6	69.6	57.6	77.5	43.9	58.8	67.5	77.9	46.5	68.0	71.5	75.1
47	wh0154	70.1	70.9	61.5	77.9	71.7	60.5	70.5	78.4	73.1	69.4	74.2	75.6
48	wh0155	79.7	79.0	66.3	72.3	80.8	71.5	74.2	72.9	81.7	77.9	77.4	69.4
49	wh0157	68.2	70.5	59.9	66.3	69.9	59.9	69.3	67.0	71.3	68.9	73.1	62.7
50	wh0158	73.6	75.9	71.4	76.3	75.0	67.2	78.0	76.9	76.2	74.6	80.8	73.8
51	wh0159	76.8	79.7	67.6	77.7	78.1	72.4	75.2	78.2	79.1	78.6	78.3	75.3
52	wh0161	61.3	70.9	69.0	68.3	63.4	60.5	76.2	69.0	65.1	69.4	79.2	64.9
53	wh0162	51.5	72.6	50.1	57.8	54.2	62.8	61.8	58.7	56.3	71.2	66.5	53.3
54	wh0163	30.1	62.4	62.9	74.8	33.9	48.9	71.5	75.3	37.0	60.4	75.1	72.1
55	wh0164	-5.8	45.5	9.0	38.8	0.0	26.0	30.3	40.2	4.8	42.6	39.0	32.3

다. 담배가루이 RNAi 발현 토마토에서의 성충수 변화 확인

- 2차년도에 이어 64개의 RNAi 발현 TRV를 접종 후, 담배가루이 성충 방제 효과를 검정

표 12. 담배가루이 RNAi 발현 TRV 적용에 따른 담배가루이 성충 개체수 변화

No	Stock ID	접종일	담배가루이접종	성충수(3 반복 평균)			
				1 주	2 주	3 주	4 주
1	wh0101	2015.04.18	2015.04.27	2.7	4.3	3.0	2.3
2	wh0102	2015.04.18	2015.04.27	4.0	5.3	3.3	5.3
3	wh0103	2015.04.18	2015.04.27	7.7	11.0	4.7	7.7
4	wh0104	2015.04.18	2015.04.27	6.3	14.3	2.0	22.0
5	wh0105	2015.04.18	2015.04.27	5.3	6.0	2.3	6.7
6	wh0106	2015.04.18	2015.04.27	6.3	4.7	2.7	6.7
7	wh0107	2015.04.18	2015.04.27	11.3	9.7	4.3	4.7
8	wh0108	2015.04.18	2015.04.27	13.3	10.7	4.0	7.7
9	wh0109	2015.04.18	2015.04.27	23.0	8.0	2.7	14.3
10	wh0110	2015.04.18	2015.04.27	9.3	6.3	2.3	7.3
11	wh0112	2015.04.18	2015.04.27	10.0	6.0	3.7	4.0
12	wh0113	2015.04.18	2015.04.27	8.0	5.7	3.3	2.3
13	wh0114	2015.04.18	2015.04.27	28.3	12.0	3.3	40.7
14	wh0116	2015.04.18	2015.04.27	22.0	14.0	4.3	5.3
15	wh0119	2015.04.18	2015.04.27	11.3	7.7	3.3	11.7
16	wh0120	2015.04.18	2015.04.27	12.7	10.0	10.7	10.0
17	wh0121	2015.04.18	2015.04.27	11.7	14.3	3.7	16.3
18	wh0122	2015.04.18	2015.04.27	12.0	7.0	2.7	3.7
19	wh0123	2015.04.18	2015.04.27	11.0	7.0	1.7	2.0
20	wh0124	2015.04.18	2015.04.27	8.7	7.0	2.0	2.7
21	wh0125	2015.05.19	2015.05.29	12.3	9.0	7.0	7.7
22	wh0126	2015.05.19	2015.05.29	19.7	10.0	5.3	5.0
23	wh0127	2015.05.19	2015.05.29	13.3	15.0	14.3	8.3
24	wh0128	2015.05.19	2015.05.29	18.0	7.7	6.0	4.0
25	wh0129	2015.05.19	2015.05.29	16.3	10.7	6.0	6.0
26	wh0130	2015.05.19	2015.05.29	7.3	5.0	3.3	2.0
27	wh0131	2015.05.19	2015.05.29	7.0	6.3	5.3	4.3
28	wh0132	2015.05.19	2015.05.29	12.5	8.5	8.5	1.5
29	wh0133	2015.05.19	2015.05.29	11.7	18.7	9.7	8.3
30	wh0134	2015.05.19	2015.05.29	12.0	7.3	5.7	3.3
31	wh0136	2015.05.19	2015.05.29	39.0	32.0	17.0	13.7
32	wh0137	2015.05.19	2015.05.29	16.7	13.3	8.3	7.3
33	wh0138	2015.05.19	2015.05.29	12.0	12.0	3.7	4.3
34	wh0139	2015.05.19	2015.05.29	16.7	10.7	5.7	6.3
35	wh0140	2015.05.19	2015.05.29	10.0	5.7	5.3	2.7
36	wh0141	2015.05.19	2015.05.29	18.3	14.3	6.0	2.7
37	wh0142	2015.05.19	2015.05.29	12.7	11.0	7.3	6.0
38	wh0143	2015.05.19	2015.05.29	18.0	17.7	13.7	10.7
39	wh0145	2015.05.19	2015.05.29	43.0	32.7	9.7	11.7
40	wh0146	2015.05.19	2015.05.29	11.3	12.3	10.7	5.7
41	wh0147	2015.05.19	2015.05.29	11.7	15.7	8.0	10.5
42	wh0148	2015.05.19	2015.05.29	11.7	8.3	4.7	6.7
43	wh0149	2015.05.19	2015.05.29	12.7	7.7	7.7	4.3
44	wh0151	2015.05.19	2015.05.29	16.7	12.7	5.0	6.0
45	wh0152	2015.05.19	2015.05.29	11.0	8.0	5.7	4.7

46	wh0153	2015.06.02	2015.06.15	34.7	23.7	24.0	23.7
47	wh0154	2015.06.02	2015.06.15	20.3	22.3	22.0	20.3
48	wh0155	2015.06.02	2015.06.15	15.0	20.7	30.3	21.7
49	wh0157	2015.06.02	2015.06.15	27.0	31.3	22.0	19.3
50	wh0158	2015.06.02	2015.06.15	17.7	22.7	29.0	21.3
51	wh0159	2015.06.02	2015.06.15	28.7	30.7	28.0	40.3
52	wh0161	2015.06.02	2015.06.15	45.3	34.0	38.3	25.3
53	wh0162	2015.06.02	2015.06.15	43.0	26.0	30.7	33.3
54	wh0163	2015.06.02	2015.06.15	77.3	53.7	54.0	38.0
55	wh0164	2015.06.02	2015.06.15	65.3	60.3	52.0	42.0
56	무처리	2015.04.18	2015.04.27	22.7	21.0	11.7	15.7
57	무처리	2015.05.19	2015.05.29	43.7	50.7	36.7	20.5
58	무처리	2015.06.02	2015.06.15	64.7	96.7	80.0	54.0
59	TRV ori	2015.04.18	2015.04.27	20.0	12.3	13.7	19.7
60	TRV ori	2015.05.19	2015.05.29	40.7	39.7	38.7	19.7
61	TRV ori	2015.06.02	2015.06.15	44.7	43.3	45.0	50.3
62	TRV att	2015.04.18	2015.04.27	18.7	19.0	15.0	25.3
63	TRV att	2015.05.19	2015.05.29	31.7	38.0	35.0	21.3
64	TRV att	2015.06.02	2015.06.15	52.0	62.3	54.0	55.7

표 13. 담배가루이 RNAi 발현 TRV에 따른 담배가루이 성충 방제가와 우수 RNAi 유전자 선발

No	Stock ID	무처리(negative control)				TRV original(positive control)				TRV att(positive control)			
		대비 방제가				대비 방제가				대비 방제가			
		1주	2주	3주	4주	1주	2주	3주	4주	1주	2주	3주	4주
1	wh0101	88.2	79.4	74.3	85.1	86.7	64.9	78.0	88.1	85.7	77.2	80.0	90.8
2	wh0102	82.4	74.6	71.4	66.0	80.0	56.8	75.6	72.9	78.6	71.9	77.8	78.9
3	wh0103	66.2	47.6	60.0	51.1	61.7	10.8	65.9	61.0	58.9	42.1	68.9	69.7
4	wh0104	72.1	31.7	82.9	-40.4	68.3	-16.2	85.4	-11.9	66.1	24.6	86.7	13.2
5	wh0105	76.5	71.4	80.0	57.4	73.3	51.4	82.9	66.1	71.4	68.4	84.4	73.7
6	wh0106	72.1	77.8	77.1	57.4	68.3	62.2	80.5	66.1	66.1	75.4	82.2	73.7
7	wh0107	50.0	54.0	62.9	70.2	43.3	21.6	68.3	76.3	39.3	49.1	71.1	81.6
8	wh0108	41.2	49.2	65.7	51.1	33.3	13.5	70.7	61.0	28.6	43.9	73.3	69.7
9	wh0109	-1.5	61.9	77.1	8.5	-15.0	35.1	80.5	27.1	-23.2	57.9	82.2	43.4
10	wh0110	58.8	69.8	80.0	53.2	53.3	48.6	82.9	62.7	50.0	66.7	84.4	71.1
11	wh0112	55.9	71.4	68.6	74.5	50.0	51.4	73.2	79.7	46.4	68.4	75.6	84.2
12	wh0113	64.7	73.0	71.4	85.1	60.0	54.1	75.6	88.1	57.1	70.2	77.8	90.8
13	wh0114	-25.0	42.9	71.4	-159.6	-41.7	2.7	75.6	-106.8	-51.8	36.8	77.8	-60.5
14	wh0116	2.9	33.3	62.9	66.0	-10.0	-13.5	68.3	72.9	-17.9	26.3	71.1	78.9
15	wh0119	50.0	63.5	71.4	25.5	43.3	37.8	75.6	40.7	39.3	59.6	77.8	53.9
16	wh0120	44.1	52.4	8.6	36.2	36.7	18.9	22.0	49.2	32.1	47.4	28.9	60.5
17	wh0121	48.5	31.7	68.6	-4.3	41.7	-16.2	73.2	16.9	37.5	24.6	75.6	35.5
18	wh0122	47.1	66.7	77.1	76.6	40.0	43.2	80.5	81.4	35.7	63.2	82.2	85.5
19	wh0123	51.5	66.7	85.7	87.2	45.0	43.2	87.8	89.8	41.1	63.2	88.9	92.1
20	wh0124	61.8	66.7	82.9	83.0	56.7	43.2	85.4	86.4	53.6	63.2	86.7	89.5
21	wh0125	71.8	82.2	80.9	62.6	69.7	77.3	81.9	61.0	61.1	76.3	80.0	64.1

22	wh0126	55.0	80.3	85.5	75.6	51.6	74.8	86.2	74.6	37.9	73.7	84.8	76.6
23	wh0127	69.5	70.4	60.9	59.3	67.2	62.2	62.9	57.6	57.9	60.5	59.0	60.9
24	wh0128	58.8	84.9	83.6	80.5	55.7	80.7	84.5	79.7	43.2	79.8	82.9	81.3
25	wh0129	62.6	78.9	83.6	70.7	59.8	73.1	84.5	69.5	48.4	71.9	82.9	71.9
26	wh0130	83.2	90.1	90.9	90.2	82.0	87.4	91.4	89.8	76.8	86.8	90.5	90.6
27	wh0131	84.0	87.5	85.5	78.9	82.8	84.0	86.2	78.0	77.9	83.3	84.8	79.7
28	wh0132	71.4	83.2	76.8	92.7	69.3	78.6	78.0	92.4	60.5	77.6	75.7	93.0
29	wh0133	73.3	63.2	73.6	59.3	71.3	52.9	75.0	57.6	63.2	50.9	72.4	60.9
30	wh0134	72.5	85.5	84.5	83.7	70.5	81.5	85.3	83.1	62.1	80.7	83.8	84.4
31	wh0136	10.7	36.8	53.6	33.3	4.1	19.3	56.0	30.5	-23.2	15.8	51.4	35.9
32	wh0137	61.8	73.7	77.3	64.2	59.0	66.4	78.4	62.7	47.4	64.9	76.2	65.6
33	wh0138	72.5	76.3	90.0	78.9	70.5	69.7	90.5	78.0	62.1	68.4	89.5	79.7
34	wh0139	61.8	78.9	84.5	69.1	59.0	73.1	85.3	67.8	47.4	71.9	83.8	70.3
35	wh0140	77.1	88.8	85.5	87.0	75.4	85.7	86.3	86.4	68.4	85.1	84.8	87.5
36	wh0141	58.0	71.7	83.6	87.0	54.9	63.9	84.5	86.4	42.1	62.3	82.9	87.5
37	wh0142	71.0	78.3	80.0	70.7	68.9	72.3	81.0	69.5	60.0	71.1	79.0	71.9
38	wh0143	58.8	65.1	62.7	48.0	55.7	55.5	64.7	45.8	43.2	53.5	61.0	50.0
39	wh0145	1.5	35.5	73.6	43.1	-5.7	17.6	75.0	40.7	-35.8	14.0	72.4	45.3
40	wh0146	74.0	75.7	70.9	72.4	72.1	68.9	72.4	71.2	64.2	67.5	69.5	73.4
41	wh0147	73.3	69.1	78.2	48.8	71.3	60.5	79.3	46.6	63.2	58.8	77.1	50.8
42	wh0148	73.3	83.6	87.3	67.5	71.3	79.0	87.9	66.1	63.2	78.1	86.7	68.8
43	wh0149	71.0	84.9	79.1	78.9	68.9	80.7	80.2	78.0	60.0	79.8	78.1	79.7
44	wh0151	61.8	75.0	86.4	70.7	59.0	68.1	87.1	69.5	47.4	66.7	85.7	71.9
45	wh0152	74.8	84.2	84.5	77.2	73.0	79.8	85.3	76.3	65.3	78.9	83.8	78.1
46	wh0153	46.4	75.5	70.0	56.2	22.4	45.4	46.7	53.0	33.3	62.0	55.6	57.5
47	wh0154	68.6	76.9	72.5	62.3	54.5	48.5	51.1	59.6	60.9	64.2	59.3	63.5
48	wh0155	76.8	78.6	62.1	59.9	66.4	52.3	32.6	57.0	71.2	66.8	43.8	61.1
49	wh0157	58.2	67.6	72.5	64.2	39.6	27.7	51.1	61.6	48.1	49.7	59.3	65.3
50	wh0158	72.7	76.6	63.8	60.5	60.4	47.7	35.6	57.6	66.0	63.6	46.3	61.7
51	wh0159	55.7	68.3	65.0	25.3	35.8	29.2	37.8	19.9	44.9	50.8	48.1	27.5
52	wh0161	29.9	64.8	52.1	53.1	-1.5	21.5	14.8	49.7	12.8	45.5	29.0	54.5
53	wh0162	33.5	73.1	61.7	38.3	3.7	40.0	31.9	33.8	17.3	58.3	43.2	40.1
54	wh0163	-19.6	44.5	32.5	29.6	-73.1	-23.2	-20.0	24.5	-48.7	13.9	0.0	31.7
55	wh0164	-1.0	37.6	35.0	22.2	-46.3	-39.2	-15.6	16.6	-25.6	3.2	3.7	24.6

마. 선발된 담배가루이 RNAi 염기서열 정보 확인

- 평가 후 담배가루이에 대한 무처리(negative control)와 TRV RNA2 original, TRV-RNA2-att(positive control) 대비 방제가를 바탕으로 담배가루이가 기피하는 RNAi sample wh0101, wh0102, wh0130 3개를 선별하였음(표 12, 13).
- 선발한 3개의 RNAi는 접종했던 토마토에서 Total RNA를 분리한 후, oligo dT primer와 random primer로 cDNA를 합성하였으며 PCR primer(표 14)를 이용하여 TRV RNA2 vector 내의 담배가루이 RNAi 염기서열을 증폭하였음.

표 14. 토마토 내 담배가루이 RNAi 증폭에 사용된 PCR primer

oligo	sequence(5'-3')
LR check F	GTA AGG TTA CCG AAT TCT CTA
LR check R	AAA CTT CAG ACA CGG ATC TAC T

- 증폭한 담배가루이 RNAi 부분은 sequencing 서비스를 의뢰하여 염기서열 정보를 확인하였으며, 그 정보는 다음과 같음.

1. Wh0001

DNA BLAST : *Bemisia tabaci* biotype Q vitellogenin mRNA, partial cds / GU332722.1

EST BLAST : unknown

```

1   GCAACAATGG GAAACAACAA CAACAACGGA AACAACGACA ATGACGCCGA ATACGAAAAG
61  CGCAACGGCC ACAACGGCCA CAACGGAAAC AACGGACACA ACGGACACAA CGGAAACAAC
121 GGAAACAACG GCCACAACGG CCACAACGGA AAGAACGTCG ACGGTAGCTC CAGCTCCAGC
181 AGTCCGAGG AAAACGACCG TTACAACAAC GGCAAATTCG CCAGCTTTGC CCGCCACCGC
241 GGATCTGGAT CCTCCTCCTC CAGCAGCTCC TCTGACTCCT CCGACTCTTC CAGCTCCTCC
301 AGCTCCTCCA GCTCTCCAG CTCCTCCAGC TCCTCCAGCT CCTCTGACTC TAGCTCCTCT
361 GACGACAACA GTCCTACGG ATCCTCTGTC GCCAGCAGCG AAGAAGAACA CCGACCCTCC
421 CCCACCGCGT TACGG
  
```

2. Wh0002

DNA BLAST : *Bemisia tabaci* biotype B vitellogenin mRNA, complete cds / GU332720.1

EST BLAST : BT-TYLCV-032-1-A3-T3_A03 Whitefly *Bemisia tabaci* (reared on TYLCV infected plants) cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence / EE601017.1

```

1   GGCTTGAAC CCCGCCGCA AAGTCCAATT CAACAAGGAA GAACAACACG TTCAATACAA
61  GTACATGAAC GACTTCTTCG ACAAGAACGG AAAGATCTTC GCCCAATTCT ACGCTCTTCC
121 CGATGGAACC ATCCGCTTCT TCGTCTCTCA AGTGGTCTT GAATCTTCT ACGATGGTGC
181 TCGCGTCAAA TTCCAAGCCG CCAGCCAATA CCGTGGTGCC GTCCGTGGTA TCTGTGGAAC
241 CTACTIONAAC CAATACGCCG ATGACTTCAC CAGCCCCAAG AACTGCGTCA TGAGAAACCC
301 AGAATACTTC ACCCTCCAT CCGGCAACAC T
  
```

3. Wh0030

DNA blast : unknown

EST blast : BT-HINST-005-1-C5-T3_C05 Whitefly *Bemisia tabaci* instar (crawler to pupae)

cDNA library *Bemisia tabaci* cDNA 5', mRNA sequence / EE602933.1

```

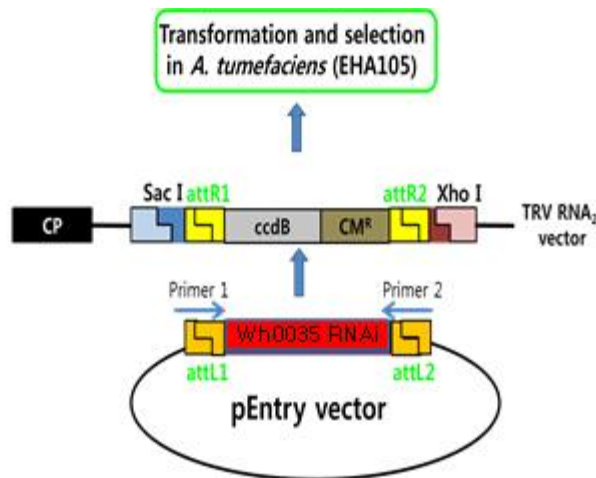
1   TAGTGCGGAG ATGCTGGGCG CCTGAAGTCA AGAATGTTGA CCAGATTGTT GCCGTCGTGA
61  AAAACGCATC GGTAGACTTC ACCAAAAAAG TCAACGACGT TCTAACAACC GTCAAAACAG
121 AGGTTGATCC AAATGCCAAA GCAGCAGCTG CTGCTTTCCA AAAGTTTTAT TCCGAAGTGA
181 ACAAGACGGC GACTGAGTTG GCCAAGAAGG TGCCAGAACT TCAGTCGGCG GATGTCGAGA
241 AGGTCTTCAC CAAGTCACTC AGCAGCATCG TCGAGGAAGG AAGCAAGTTG AGAGCTGCCC
301 TGGAAGAGGA AGCACCTCAT GCGCAAGAAA GTTTGACCAA GGCTGCCAG AACATTATTG
361 ACAGCGCTGT CAAGGCTGCA AATTCAATCG CTACTIONAAGT GCACGAGACT GTCGGCCACA
421 ATAATCAATC CCAACCACGT GTGACG
  
```


제 6 절 선발된 RNAi 기작 연구

1. 2차년도 선발된 Wh0035 RNAi 토마토 접종 및 담배가루이 개체군 차이

가. 토마토에서 Wh0035 cDNA 증폭 및 TRV RNA2 벡터 삽입

- RNAi 스크리닝 후 선별된 RNAi중 (1, 2, 11, 35, 37, 73) Genebank에 Annotation 및 유전정보가 없는 염기서열 35번(Wh0035)를 담배가루이 개체 밀도 Case 실험에 이용하였음 (향후 특허 출원이 용이함)
- 일차적으로 획득된 유전정보 서열을 바탕으로 Primer를 제작하였으며(그림의 Red 부분), 이를 이용하여 담배가루이 cDNA로부터 Wh0035 RNAi의 염기서열을 증폭하였음. 증폭된 염기서열은 약 200 bp 이며 Gateway 클로닝 방법으로 TRV2-RNA에 삽입하였음(그림 36)



```

ATTAAAAGTCCCG TTCAGTGATT AGCCCTAGCC TCCATGCGTG TCCACAAAGT TGGAGTTTAC
TTCCATACTC AGTGCGAGCA CTATGGAACC ATGGTATTAA AAGTGGCCCT TTCTGTTATG
TTCCACTTG CTATGATTGA GGCTAGGACG ACTCCAGCTG GAAGTGAGGA TTTTACCGCG
TTGCTGGAGG AATTCAAACA GTTGGAGCCG CTCGAGAGG CAGCTCGCTT ATATACTT TTA
    
```

그림 36. 담배가루이 제어 우수 RNAi 분리 및 적용

나. TRV RNA1 + TRV RNA2 RNAi Wh0035 토마토 접종 실험

- 포장에서 스크리닝 작업으로 얻어진 RNAi 의 정확한 기작 분석과 담배가루이 Target RNAi의 효과 검증이 필요하여 선별된 RNAi 0035을 TRV에 발현시켜 발현되지 않는 토마토와 담배가루이 개체변화에 관한 비교하였음
- 아래의 그림 13과 같이 7개의 Case내 토마토와 담배가루이를 위치해 놓고 각각의 조건에 따라 담배가루이 개체 변화를 관찰하였음. 7개의 조건은 바이러스만 감염된 토마토/바이러스(Gateway system 염기서열이 추가된)만 감염된 토마토/바이러스를 통하여 eGFP 단백질이 발현되는 토마토/바이러스를 통하여 Chickadee 유전자(기보고된 RNAi)가 발현되는 토마토/바이러스를 통하여 Heat Shock Protein(기보고된 RNAi) 이 발현되는 토마토/바이러스를 통하여 Wh0035이 발현되는 토마토(Gateway 염기서열 포함)/바이러스를 통하여 Wh0035이 발현되는 토마토 임

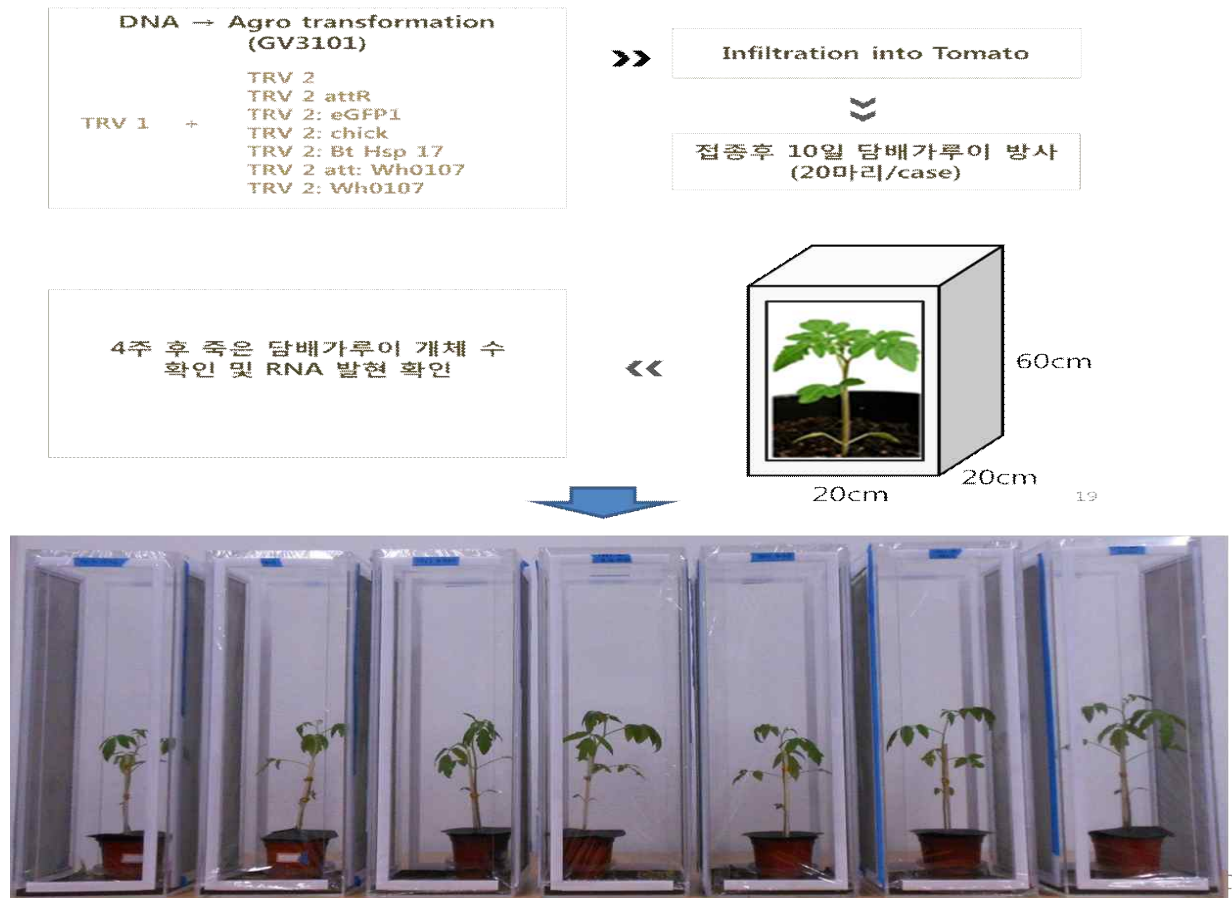


그림 37. 선별된 우수 RNAi 제어효과 검증

- 7개의 토마토에 상의의 바이러스를 접종하였으며, 접종 후 10일 담배가루이 20마리를 각각의 Case에 방사한 후 담배가루이 개체수를 조사하였으며, 30일째 죽은 담배가루이의 RNAi target의 RNA 의 발현량을 비교하였음
- 30일후 사멸된 담배가루이 또는 살아있는 담배가루이로부터 Target 유전자의 발현량을 비교하였으며 확보된 primer (담배가루이 actin/Chickadee/Wh0035)를 사용하여 actin 대비 target 유전자의 발현량을 비교하였음. 특히 Chickadee 발현 (기 보고된 담배가루이 RNAi)된 토마토와 Wh0035 발현 토마토에서는 많은 개체수의 담배가루이가 사멸되었음 (표 9)
- Wh0035 발현된 토마토에서 서식 후 사멸한 담배가루이 개체 5마리에서 Target 유전자 Wh0035의 담배가루이내 발현량은 살아있는 담배가루이보다 약 25배가량 감소한 것으로 나타남 (표 9)
- 향후 Wh0035는 정확한 유전기작을 밝혀 Annotation과 같이 특허로 출원시킬 예정임

표 15. RNAi 의한 담배가루이 target RNA 발현량 측정

	TRV1						
	TRV2	TRV att R1	TRV2 att: eGFP	TRV2: Chi	TRV2: Bt Hsp 17	TRV2 att: Wh0035	TRV2 att: WH0035
30 dpi 사충수	-	-	-	24	10	17	15
Δ Ct (Actin-Chi)	2.2±0.5	2.5±0.8	3.0±1.2	-2.0±1.2	3.2±2.0	2.5±1.2	1.8±2.2
Δ Ct (Actin-Wh0035)	4.2±1.5	4.5±2.2	3.2±1.9	2.9±2.1	4.7±2.5	-3.2±1.0	-2.8±0.9
				Chi about 18배 감소	Chi about 24배 감소	Wh0035 about 20배 감소	Wh0035 about 24배 감소

- 상기의 표에서 제시된 delta Ct 값에 근거하여 본 연구팀의 RNAi screening 방법으로 지속할 경우 우수한 유전자를 선별 할 수 있는 가능성을 제시하게 되었음

2. 3차년도 선별된 Wh0001, Wh0002, Wh0030 RNAi 토마토 접종 및 담배가루이 개체군 차이

가. 토마토에서 Wh0001, Wh0002, Wh0030 cDNA 증폭 및 TRV RNA2 벡터 삽입

- RNAi 스크리닝 후 선별된 RNAi는 일차적으로 획득된 유전자 염기서열을 바탕으로 제작한 primer(표 16)를 이용하여 담배가루이 Total RNA로부터 wh0001, wh0002, wh0030의 염기서열을 증폭하였음. 증폭한 염기서열은 약 250bp로, 제한효소 Sac I 과 Xho I 을 이용하여 att site가 없는 TRV RNA2 vector에 삽입하였음(그림 38).

표 16. 선별된 RNAi 증폭에 사용된 primer

oligo	sequence (5'-3')
wh0001	F AAA GAG CTC GCA ACA ATG GGA AAC AAC AAC A
	R AAA CTC GAG AGG ATC CAG ATC CGC GGT G
wh0002	F AAA GAG CTC TAG TGC GGA GAT GCT GGG C
	R AAA CTC GAG GTG AAG ACC TTC TCG ACA TC
wh0030	F AAA GAG CTC GCA ACA ATG GGA AAC AAC AAC
	R AAA CTC GAG ATC CAG ATC CGC GGT GGC

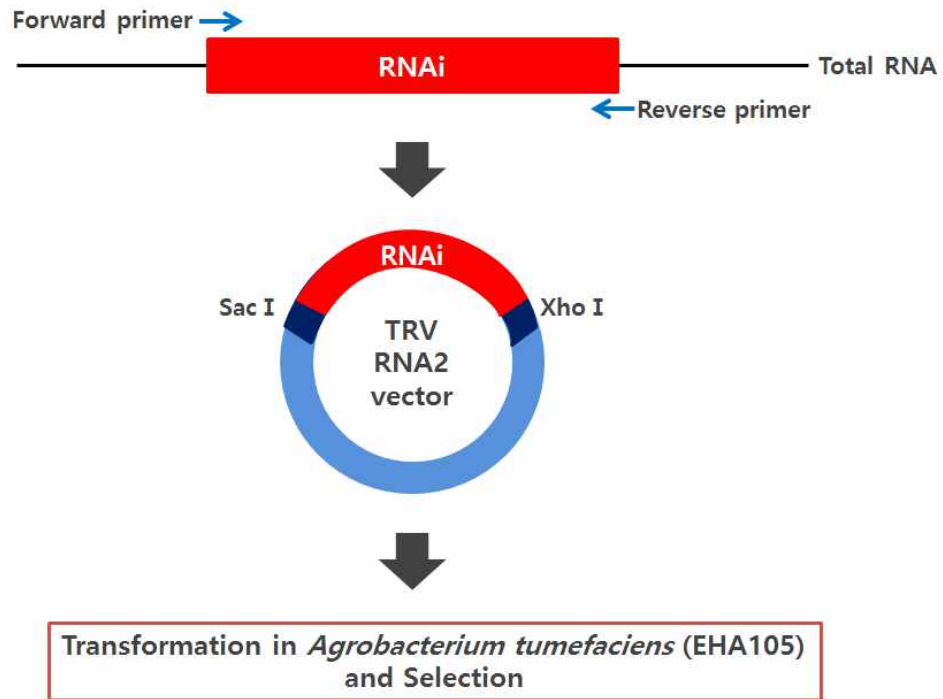


그림 38. TRV RNA2에 선별된 RNAi 적용

- TRV RNA2 vector에 삽입한 wh0001, wh0002, wh0030은 식물체내에서의 RNAi 발현을 확인하기 위해 담배(*Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabaccum*)에 재접종하였음. 접종 기주인 담배는 *Nicotiana benthamianana*, *N. tabaccum*을 25°C, 16L:8D 조건에서 4주간 생육하였고, 바이러스 접종은 TRV RNA1, TRV RNA2, TRV RNA2:RNAi가 들어있는 *Agrobacterium* cell을 infiltration buffer에 현탁하고 Acetosyringone을 첨가하여 주사바늘을 제거한 주사기로 잎 뒷면에 접종하였음.



Nicotiana tabaccum 접종



Nicotiana benthamiana 접종

↓ 10일 후



그림 39. 선별된 RNAi를 담배(*Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabaccum*)에 접종

- 식물체내에서의 RNAi 발현 여부는 RNAi 접종 10일 후 담배에서 Total RNA를 추출한 후, 앞서 획득한 RNAi의 염기서열을 바탕으로 제작한 primer와 TRV CP primer(표 16)로 PCR하여 전기영동을 통해 TRV CP(524bp)와 RNAi(150bp)의 band를 확인하였음.
- 식물체내에서 가장 안정적으로 RNAi가 발현됨으로 확인된 wh0030을 이용하여 담배가루이 개체 실험을 진행하였음.

나. wh0030 RNAi 재접종된 토마토 내 RNAi 이동 및 담배가루이 개체군 차이(실험중)

- RNAi 스크리닝 작업으로 선별한 RNAi의 정확한 기작과 RNAi의 효과를 확인하기 위해 선별된 wh0030을 토마토에 재접종한 후 담배가루이를 섭식시켜 개체변화를 관찰하고 qRT-PCR을 통해 담배가루이 개체 내 유전자 발현량 변화를 분석하였음.
- 각각의 조건에 따른 담배가루이의 개체 변화를 관찰하기 위해 8개의 토마토에 무처리/ 기존의 바이러스(TRV)/ Gateway system 염기서열(att site)이 추가된 바이러스/ eGFP가 삽입된 바이러스/ chickadee 유전자(기보고된 RNAi)가 삽입된 바이러스/ Heat shock protein(기보고된 RNAi)가 삽입된 바이러스/ wh0030이 삽입된 바이러스/ att site와 wh0030이 삽입된 바이러스를 각각 처리한 뒤 Case에 넣고 접종 10일 째에 담배가루이 20마리씩 방사하였음.

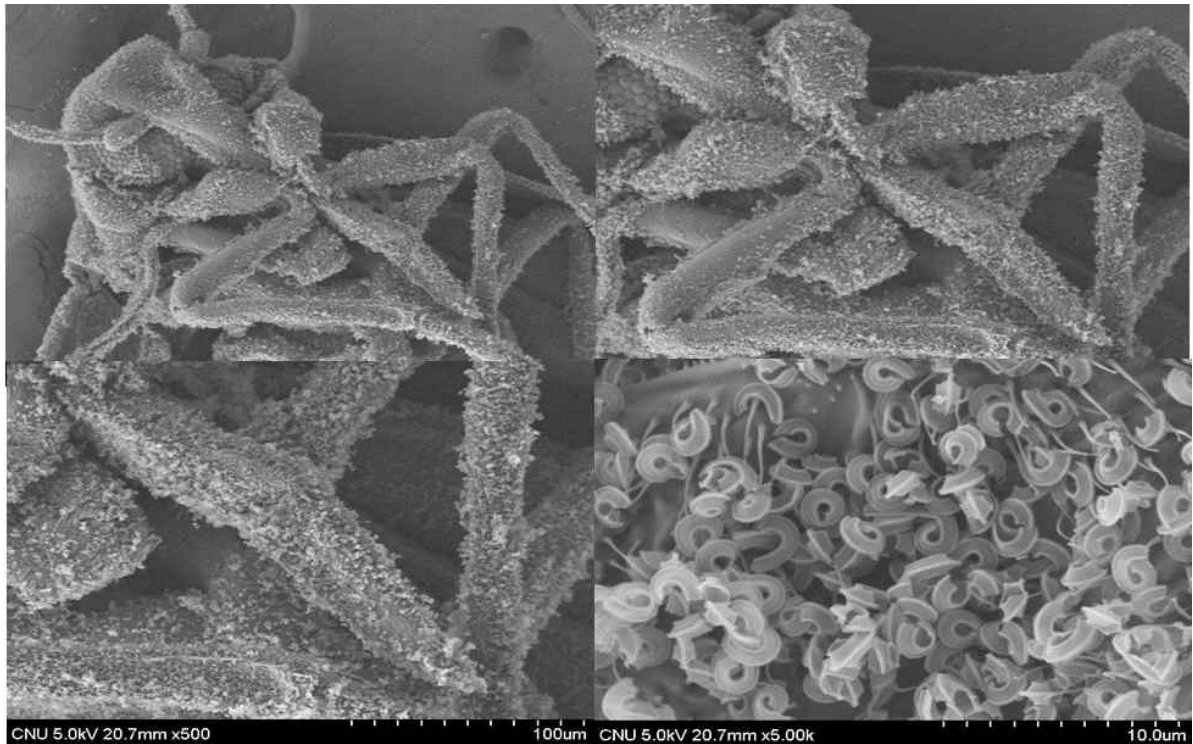


그림 40. 선별된 우수 RNAi 제어효과 검증

제 7 절 담배가루이의 바이러스 전염기작 분석

1. 담배가루이 전염기작 분석(SEM)

- 담배가루이 전염기작을 분석하기 위해 전자현미경(SEM; Scanning Electronic Microscopy)을 이용하여 담배가루이 구침을 분석하였다. 담배가루이를 광학현미경 하에서 두부를 절단하여 시편을 만들어 자연 건조 후 분석하였다.
- 분석 결과, 담배가루이 구침에는 인편으로 덮혀 분석이 어려운 것으로 나타났다.



2. 담배가루이 확산방지를 위한 유인, 기피식물 탐색

- 현재까지 발표된 문헌들을 토대로 담배가루이에 대한 유인, 기피 식물을 선별하였다.
- 유인식물 : Brassica oleracea (cauliflower), Lycopersicum esculentum (tomato), Euphorcia pulcherrima (poinsettia)
- 기피식물 : Thymus vulgaris(타임), Pogostemon cablin(광곽향), Urtica pilulifera(썩기풀), Thymus capitatus(스페니쉬 오레가노; 허브일종), Mentha arvensis(박하), Zingiber officinae(생강), Lilium lancifolium(백합), Ephedra sp. (네마황) 등

제 7 절에 해당되는 사항은 1차년도 결과 발표에서 RNAi에 집중하여 연구할 것을 주문하고 연구를 중단할 것을 요구하여 제 7 절 내용은 이후 연구가 진행되지 않았습니다. 유인식물과 기피식물의 탐색을 포함한 방제전략에 관한 내용도 심사위원들의 요청으로 삭제되었습니다.

제 8 절 EPG system을 이용한 담배가루이의 섭식행동 확인

1. EPG system을 이용한 정상 토마토에서의 EPG 섭식패턴 분석

- EPG system은 담배가루이와 같은 흡즙형 곤충들의 섭식행동을 관찰할 수 있는 기술로, 흡즙형 곤충과 기주식물이 하나의 전기회로로 연결되어 흡즙형 곤충이 섭식하기 위하여 움직이게 되면서 나타나는 전기적 저항을 육안으로 확인 할 수 있도록 미세한 전압을 증폭하여 기록하는 장치이다.
- EPG는 첫째, 식물과 흡즙형 곤충간의 상호작용; 둘째, 곤충에 의해 전파되는 식물병원균 및 바이러스 전이; 셋째, 섭식 자극 또는 저해되는 곤충의 섭식 행동 및 위치 파악과 같은 연구에 이용되고 있다.
- 담배가루이가 토마토 잎을 섭식할 때 나타나는 섭식행동을 EPG 기술을 이용하여 관찰하고, 섭식과형을 통해 담배가루이의 섭식행동에 있어서의 차이를 비교·분석하여 결과적으로 RNAi 발현 토마토에서의 영향을 알아보는데 그 목적이 있다.
- 기주식물은 토마토 유묘, 공시충으로 담배가루이를 이용하여 곤충-기주식물간의 상호작용 연구와 관련하여, 담배가루이의 섭식패턴을 EPG system을 이용하여 5시간동안 확인하였다.
- 담배가루이는 주로 phloem feeder로 알려져 있으나, 토마토 기주에서는 특이적으로 xylem feeder로 나타났다.
- 공시충과 기주: 담배가루이를 포트에 파종한지 약 3주 된 토마토 유묘를 기주식물로 사용하여 아크릴 사육상(40x44x50cm)에서 온도 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 50~60%, 광주기 16L:8D의 사육실 조건에서에서 유지하였다.
- EPG 기록: Electrical Penetration Graph(EPG)기록은 성충으로 우화한지 2~3일된 담배가루이 성충을 채집하여 CO₂를 이용하여 마취시킨 후, 직경이 12.7 μm 인 금선을 약 7cm로 잘라 전도성 있는 silver conductive paint(P-100, CANS, Japan)을 이용하여 담배가루이의 날개에 부착하였다. 담배가루이 날개에 금선을 부착한 후에 부착된 금선을 GIGA-8 DC EPG amplifier(Wageningen University, Netherland)에 연결하였다. EPG를 기록하는 과정에서 생기는 전기적 잡음을 제거하기 위하여 Faraday cage 안에서 실시하였다. 이와 같이 연결된 EPG 시스템에서 파종한지 약 3주된 토마토에서의 담배가루이의 섭식행동을 총 3시간동안 기록하였다. EPG waveform은 EPG data acquisition(daq)(Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands)를 통하여 IBM personal computer에 저장하였으며, 저장된 자료는 EPG signal analysis(ana)(W.F. Tjallingii, Wageningen University, The Netherlands)로 분석하였다.
- RNAi 비발현토마토는 무처리와 TRV RNA2, att site가 포함된 TRV RNA2가 삽입접종된 것을 비교구로 하였다. 비교구의 EPG는 파종 후 4주째 되는 토마토에 담배가루이 TRV RNA2, att site가 포함된 TRV RNA2를 접종삽입한 후 10일째에 실시하였다.



그림 42. EPG를 이용한 RNAi 비발현토마토에서의 담배가루이의 섭식행동분석

- 담배가루이의 섭식행동을 관찰한 EPG 기록은 담배가루이가 시스템에서 이탈하거나 혹은 죽은 경우를 제외하고 정상적으로 토마토 앞에서 흡즙을 한다고 판단된 경우만 5반복을 모아 섭식행동을 분석하였다.
- 통계분석: SPSS statistics(ver. 22)를 이용하여 일원배치분산분석을 실시하였다.

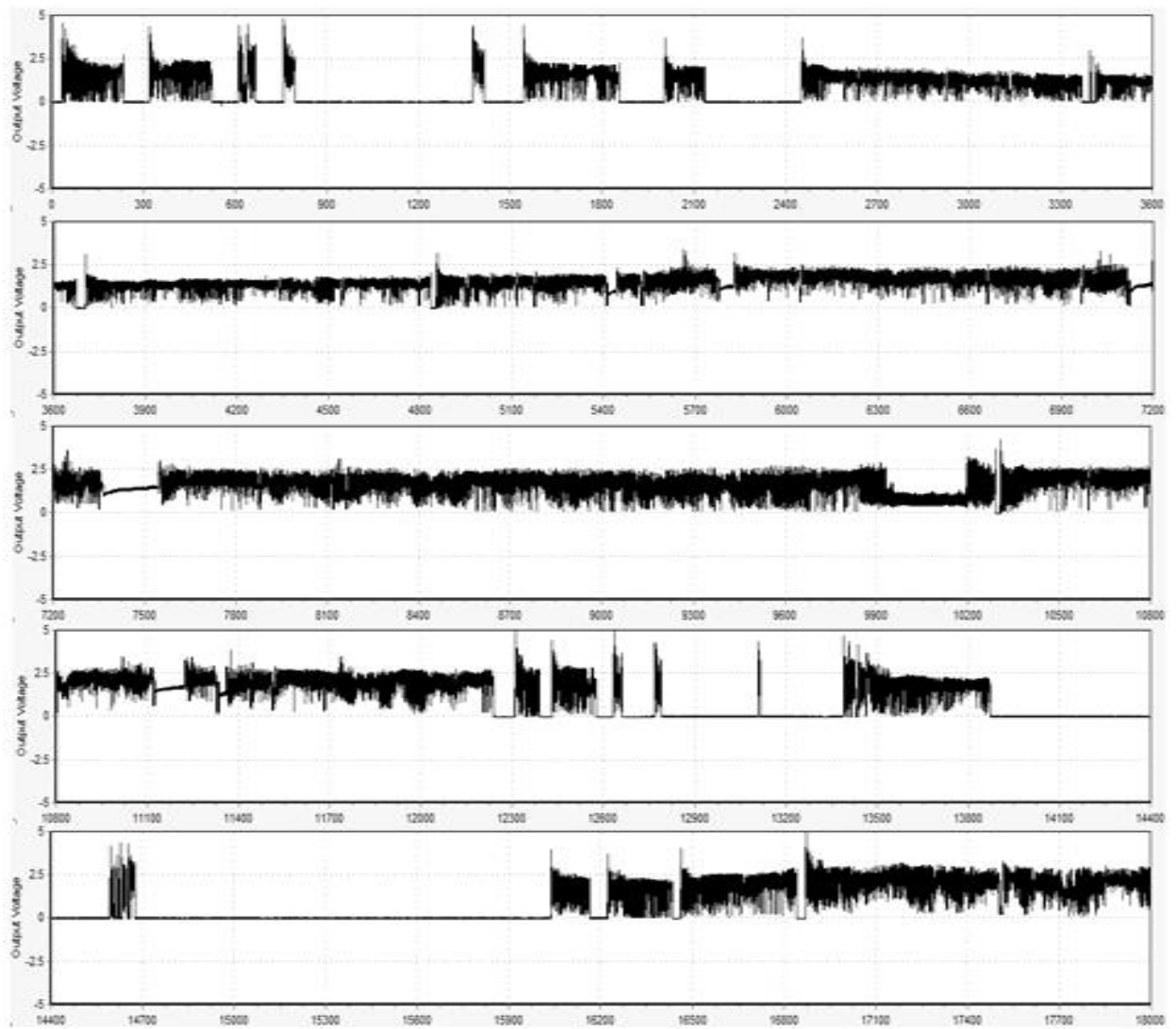


Fig. 43. The typical feeding patterns of *Bemisia tabaci* during 5 hours.

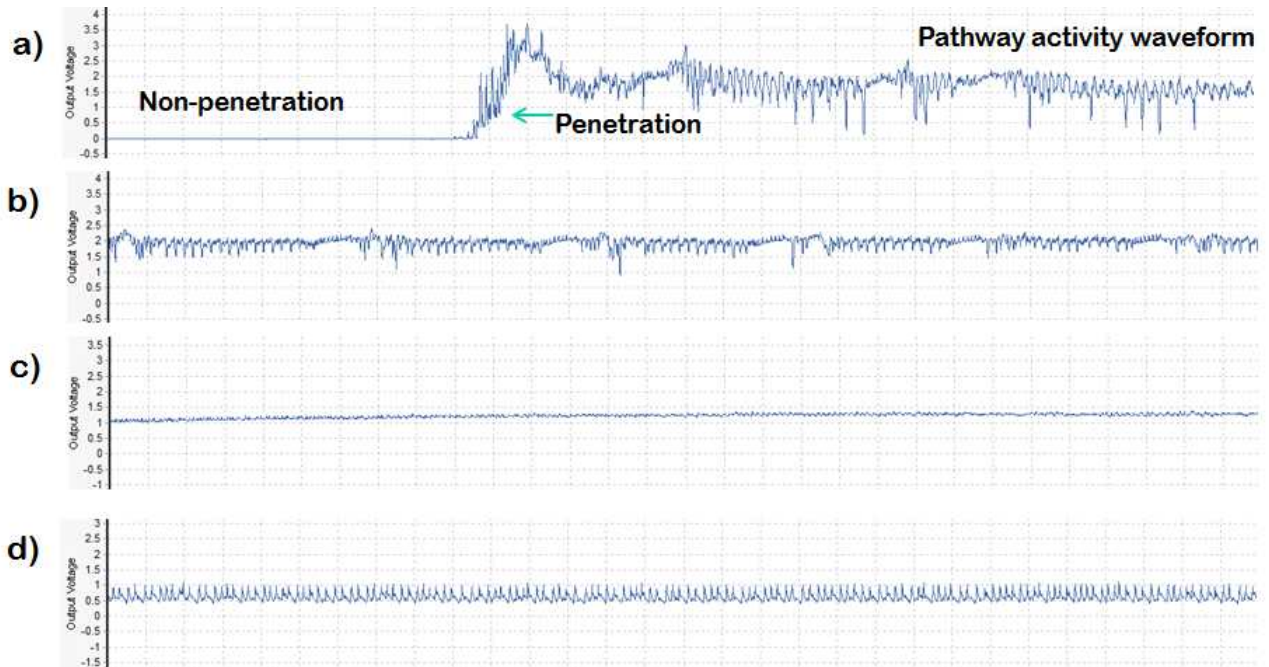


Fig. 44. Characteristics of EPG waveforms recorded from *Bemisia tabaci*. (a) Np (non probing), Pathway activity waveform (b) Parenchyma cell activity waveform, (c) Phloem feeding waveform, (d) Xylem feeding waveform; Frame (30 seconds), Range (2.5).

Table 17. Data of *B. tabaci* EPG waveforms of during a 5 hours access period to tomato plant; duration of each waveform event(sec), average \pm SD

	Non probing	Pathway activity	Phloem feeding	Xylem feeding
Spending time	5,623 \pm 2,845.0	315.1 \pm 213.4	49.2 \pm 151.8	5,528.8 \pm 4,230.3

2. EPG를 이용하여 RNAi 비 발현 토마토에서의 담배가루이 섭식행동 분석 및 Cyantraniliprole 약제에 대한 영향 분석

- EPG는 첫째, 식물과 흡즙형 곤충간의 상호작용; 둘째, 곤충에 의해 전파되는 식물병원균 및 바이러스 전이; 셋째, 섭식자극 또는 저해되는 곤충의 섭식 행동 및 위치 파악과 같은 연구에 이용되고 있음.
- 담배가루이가 토마토 잎을 섭식할 때 나타나는 섭식행동을 EPG 기술을 이용하여 관찰하고, 섭식과형을 분석하였으며 더 나아가서 담배가루이의 효과적인 방제를 위하여 Diamide계통인 cyantraniliprole 약제를 사용하였을 경우에 나타나는 담배가루이의 섭식행동에 있어서의 차이를 비교·분석하여 약제에 대한 영향을 알아보는데 그 목적이 있음.
- Cyantraniliprole은 second generation anthranilic diamide계 살충제로써 Dupont Co. 에서 개발하였음. Anthranilic diamide계통 약제는 특이한 작용기작을 가지는데, Cyantraniliprole의 기작은 Ryanodin receptor(RyRs)와 바인딩하여 저장되어 있는 칼슘을 다량 방출하여 근육세포의 조절기능을 비활성화 시킴으로써 근육의 수축이나 체내의

근육이 마비로 인해 활동이나 섭식이 중단되므로 해충의 치사를 야기시킴. 그리고 cyantraniliprole은 척추동물에 매우 저독성이고, 비선택성 살충제이므로 살충제 피해를 최소한으로 감소시킬 수 있으며, 경엽처리, 토양관주처리를 통하여 나비목, 노린재목 등 흡즙형, 저작형 해충방제에 효과가 있다고 알려짐.

- 공시충과 기주: 담배가루이를 포트에 과중한지 약 3주 된 토마토 유묘를 기주식물로 사용하여 아크릴 사육상(40x44x50cm)에서 온도 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 50~60%, 광주기 16L:8D의 사육실 조건에서에서 유지하였다. 본 실험에는 cyantraniliprole 단일약제를 추천농도로 토마토 유묘에 경엽 처리하여 음진시킨 후에 사용하였음.



그림 4. 토마토 유묘에 cyantraniliprole 약제 경엽처리

- 통계분석: Cyantraniliprole 약제의 처리 유무에 따른 토마토 유묘에서의 담배가루이의 섭식행동비교는 SPSS statistics(ver. 21)를 이용하여 독립표본 T-test를 실시하였음.



그림 46. EPG를 이용한 RNAi 비발현 토마토에서의 담배가루이의 섭식행동분석

나. 담배가루이의 섭식패턴분석

- EPG 기술은 식물과 곤충간의 조직적인 상관관계를 알아보는데 유용한 기술로, 흡즙형 구침을 가진 곤충의 섭식행동을 연구하기 위한 방법 중의 하나임. 이 방법은 곤충과 기주식물을 하나의 전기적 회로로 연결하고 구침의 활동에 따른 전압의 변화에 기초하여 분석하게 되며 전기적인 시스템에 기록된 각 파형은 곤충이 식물에 구침을 삽입하는 것과 그 구침의 위치에 의해 관찰됨.
- 담배가루이의 섭식행동 중에 나타나는 파형에는 구침을 삽입하지 않은 NP(non probing)파형, 구침을 찔러 기주식물의 섭식부위를 찾는 Pathway activity파형, 물관부를 섭식하는 Xylem파형, 총 3가지 파형을 위주로 담배가루이의 섭식행동을 분석하였음. 본 실험에서 EPG 기록하는 3시간 동안 체관부 섭식파형과 potential drop이 나타나지 않아, 분석대상에서 제외하였음. 오히려 pathway activity와 물관부에 주로 머무는 것으로 나타남.
- 담배가루이 EPG 기록을 보면, 담배가루이를 토마토 유묘 위에 올린 후, 기록 초기에 불규칙한 형태의 높은 증폭정도를 보이는 파형이 나타나면서 담배가루이 구기와 식물 조직 간의 전기적 연결시작을 보임. 전기적 연결 신호 후 빈도와 증폭정도가 다소 불규칙적인 패턴들이 나타나기 시작하는데, 이는 pathway activity 파형임. 이 파형은 구침의 끝부분이 세포간극에서의 탐침양상을 보여주는 것으로 표피, 엽육과 같은 식물체의 조직적인 요인과 밀접한 연관이 있음. 이러한 파형은 식물을 섭식하기에 앞서 세포간극의 식물즙액을 얻기 위해 세포를 찌르는 행동을 반복함으로써 먹이의 적합성을 판별해내는 주된 행동이라 볼 수 있음. 하지만 본 실험에서의 pathway activity에 대하여 무처리구 토마토와 cyantraniliprole 약제 처리 토마토간의 통계적 유의성은 없었음.
- EPG 기록을 시작하고 cyantraniliprole 약제처리구(3187.0 ± 2626.4)보다 무처리구(1191.1 ± 822.6)에서 물관부 섭식이 처음으로 나타나기까지의 더 빨리 나타났으며($P=0.043$), 물관부에 처음 구침을 꽂아 섭식이 유지되는 시간 또한 cyantraniliprole 약제처리구(764.8 ± 818.3)보다 무처리구 토마토 (1993.5 ± 1222.1)에서 더 오래 유지되는 것으로 나타남($P=0.017$). 따라서 Cyantraniliprole 약제가 담배가루이 섭식에 있어서 저해 또는 기피의 효과가 있는 것으로 볼 수 있음.

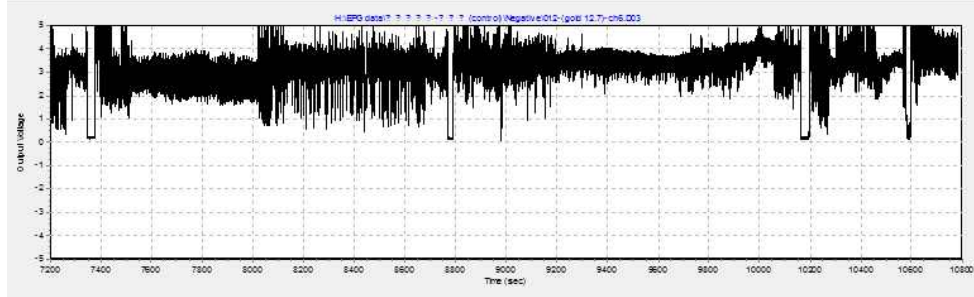
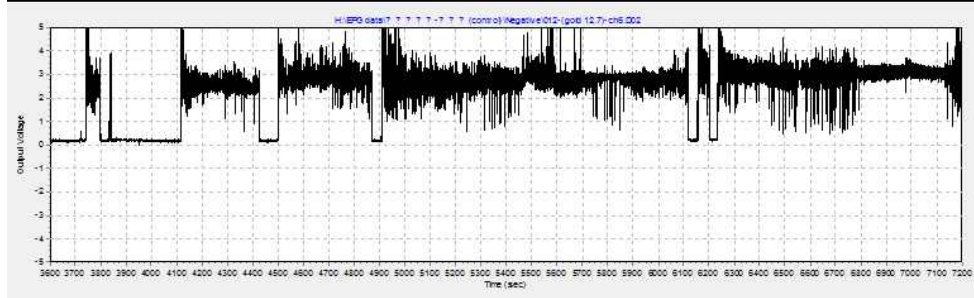
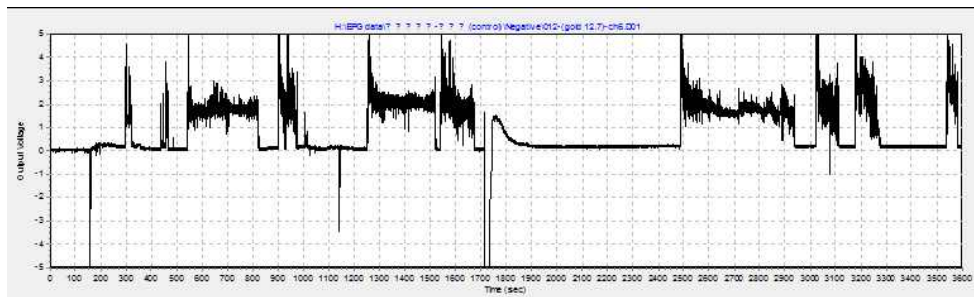
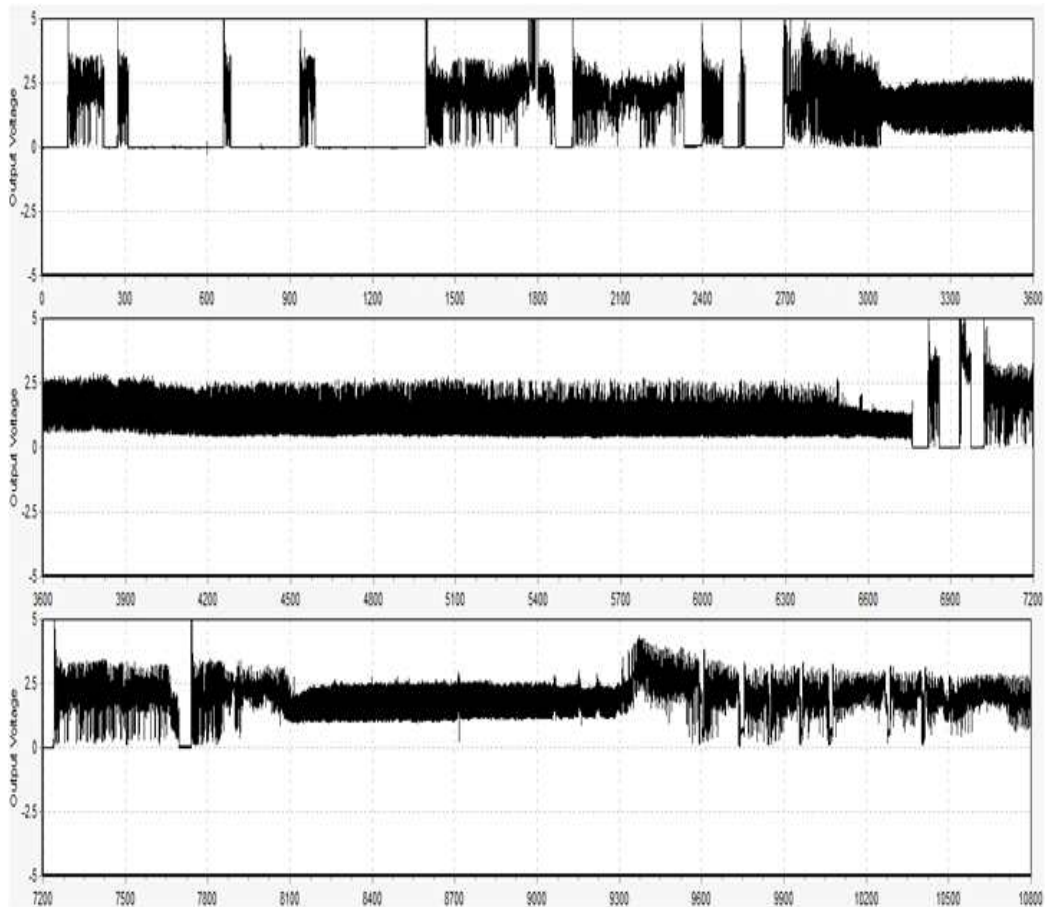


그림 47. EPG를 이용하여 3시간동안 기록한 무처리구에서의 담배가루이의 섭식과형

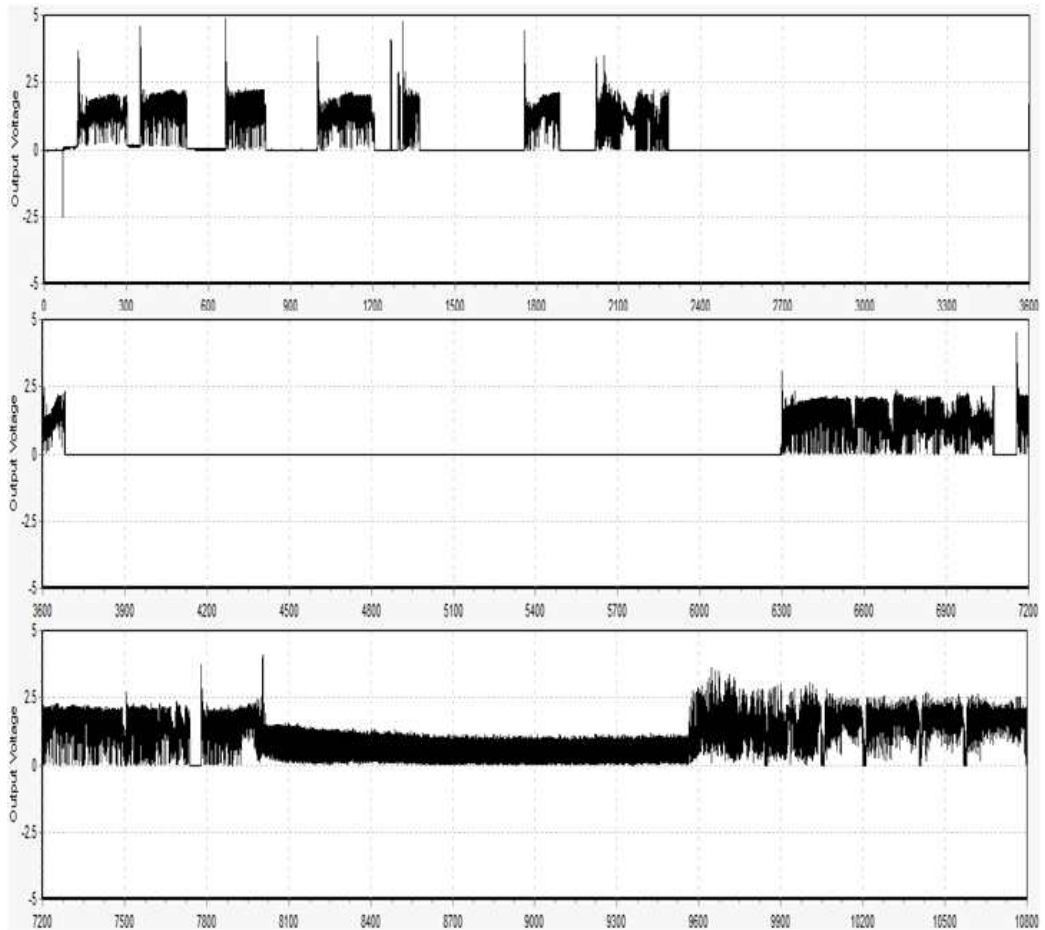
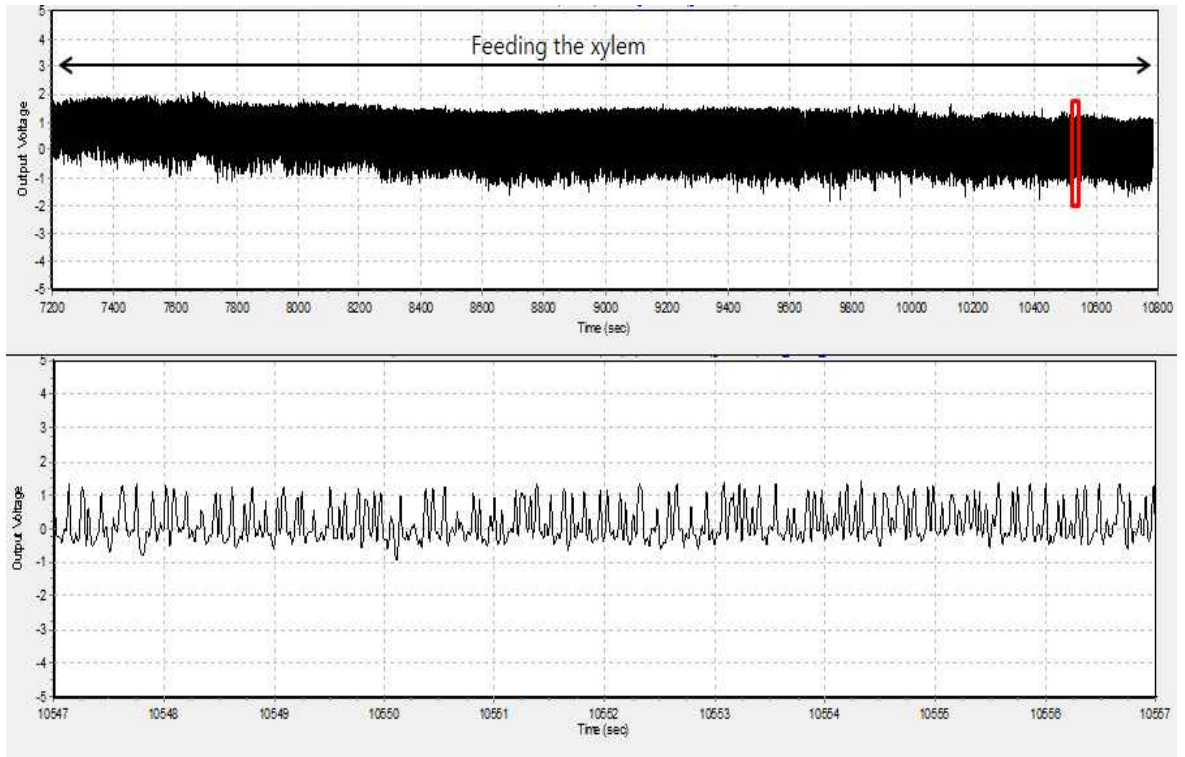


그림 48. Cyantraniliprole 경엽 처리한 토마토를 섭식하는 담배가루이의 섭식과형

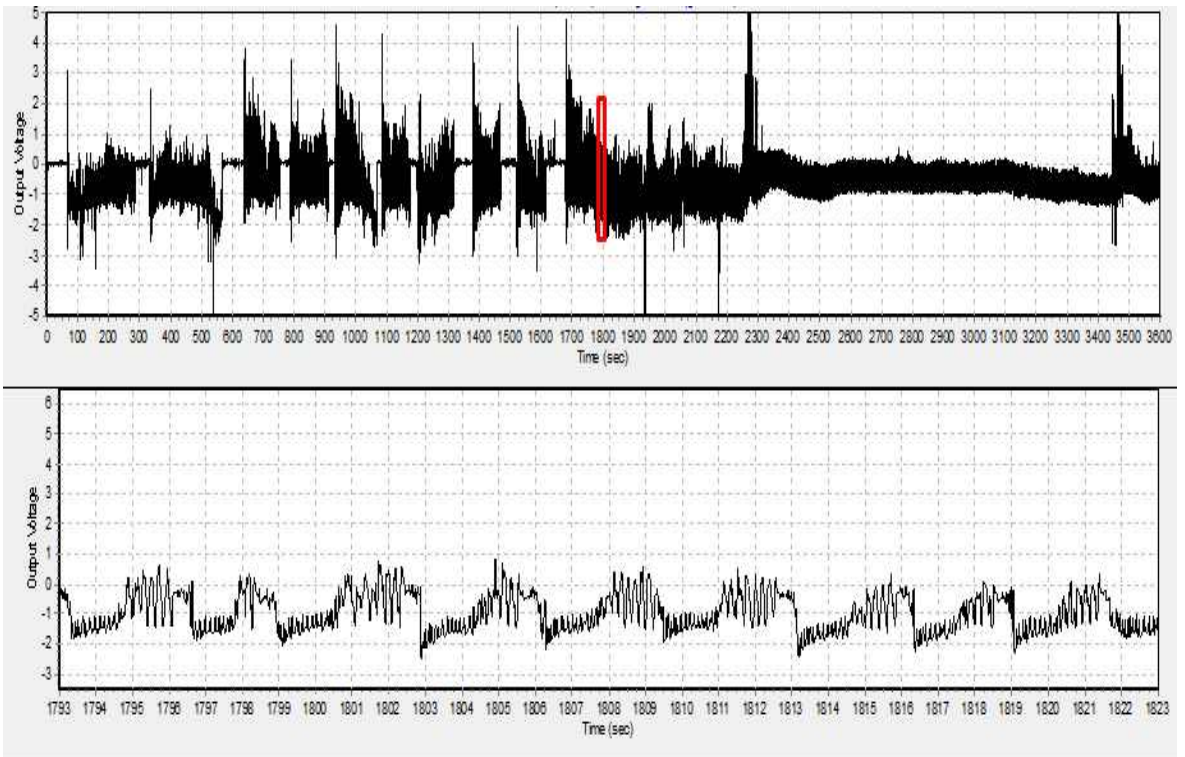
표 18. 특정식물조직의 저항요인에 따른 EPG 매개변수

EPG parameters	Tissue(s)/factors involved
1. Time to the first probe	Surface factors
2. Total number of probes	Surface factors+epidermis/mesophyll
3. Duration of 1st probe	Surface factors+epidermis/mesophyll
4. Duration of pathway phase	All plants tissue except phloem and xylem
5. Time to first feeding xylem	All plants tissue except xylem
6. Duration of first feeding xylem	Xylem
7. Total duration of feeding xylem	Xylem
8. Duration of non probe time	

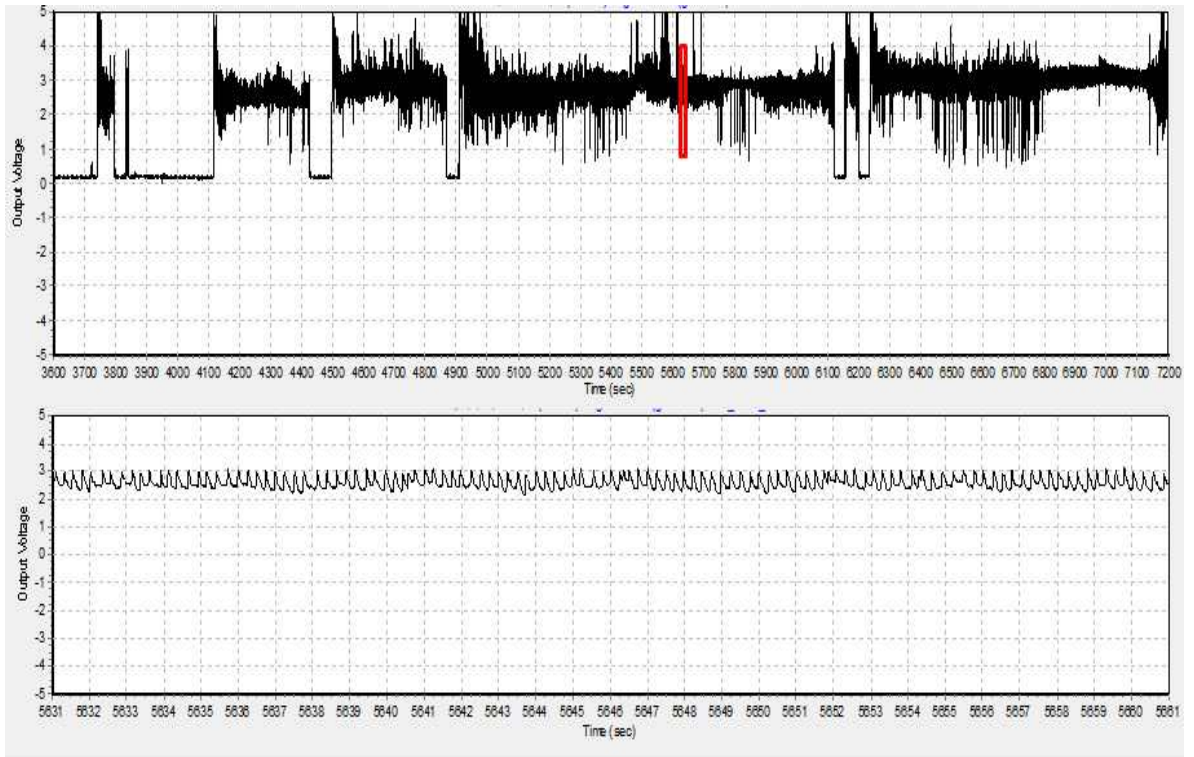
A



B



C



D

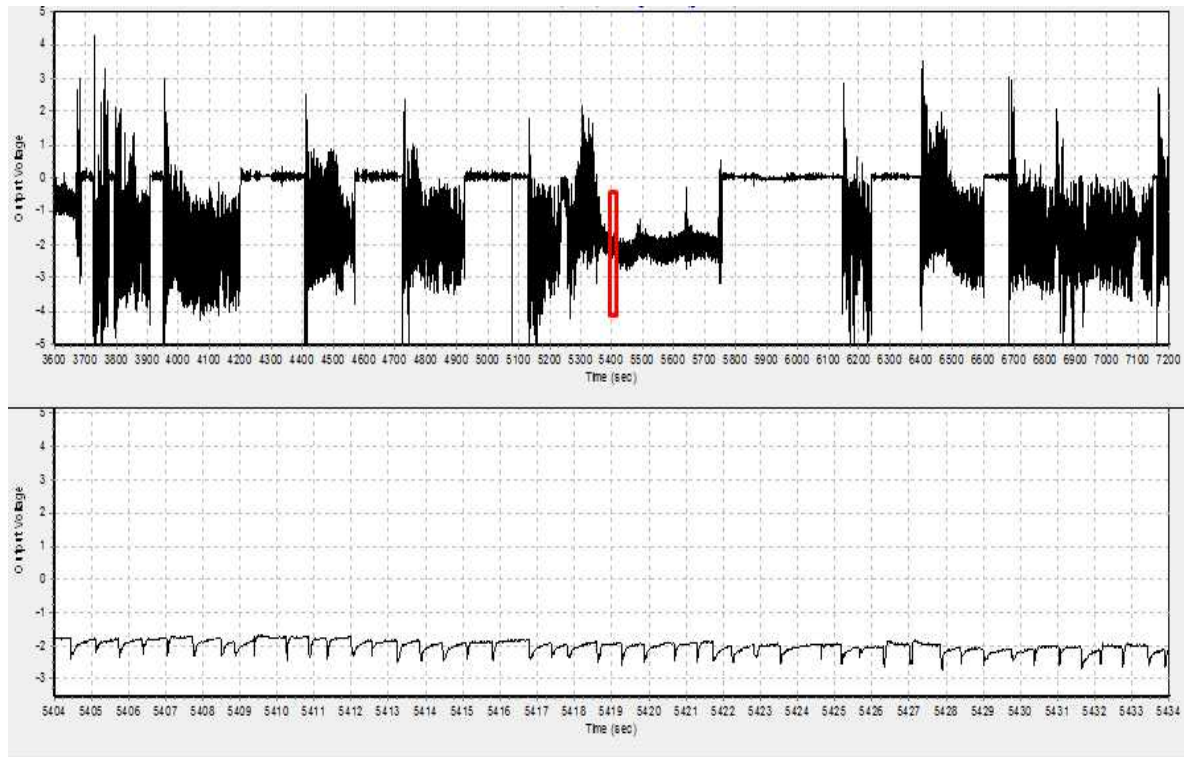


그림 49. 담배가루이 섭식과형의 특징. (A) 물관부섭식과형; Frame(10초), Range(5.0), (B) Pathway activity; Frame(30초), Range(5.0), (C,D) 체관부섭식과형: C-체관부 침분비활동, D-체관부 섭취활동; Frame(30초), Range(5.0)

표 3. Cyantraniliprole 처리 유무에 따른 담배가루이의 EPG 섭식 매개변수의 평균값(seconds)

	Untreated	Treated cyantraniliprole	<i>P</i>
1. Time to the first probe	243.2±222.3	403.3±394.0	0.413
2. Total number of probe	17.0±9.1	15.2±8.5	0.652
3. Duration of first probe	1545.8±1838.2	743.1±1272.1	0.273
4. Duration of pathway phase	2901.3±1986.3	3639.2±2660.8	0.491
5. Time to first feeding xylem	1191.1±822.6	3187.0±2626.4	0.043*
6. Duration of first feeding xylem	1993.5±1222.1	764.8±818.3	0.017*
7. Total duration of feeding xylem	4130.8±2010.8	5235.1±9900.5	0.743
8. Duration of non probe time	2559.2±1326.4	5540.7±1936.5	0.001*

Value represent by mean±SD, **P*<0.05; T-test in SPSS (ver. 21.0).

표 20. 비교구에 따른 담배가루이의 EPG 섭식 매개변수의 평균값(seconds)

	Untreated	TRV RNA2	att site가 포함된 TRV RNA2	<i>P</i>
1. Time to the first probe	214.1±135.6	516.2±747.4	117.8±70.3	0.547
2. Total number of probe	41.3±19.6	19.0±9.6	21.0±16.0	0.233
3. Duration of first probe	22.7±11.1	111.1±104.2	326.6±490.9	0.465
4. Duration of pathway phase	4,156.8±2,617.6	3,729.6±1,735.6	5,479.7±3,795.8	0.745
5. Time to first feeding xylem	7,279.9±1,093.8	4,590.7±3,810.4	3,409.2±5,904.8	0.563
6. Duration of first feeding xylem	579.3±133.3	496.2±654.7	19.6±33.9	0.239
7. Total duration of feeding xylem	628.0±142.0	773.8±1,133.2	19.6±33.9	0.391
8. Duration of non probe time	5,250.0±2,242.2	4,600.4±1,271.7	3,768.5±2,404.1	0.687
9. Time to first feeding phloem	2,407.8±2,882.0	1,783.4±3,088.9	846.8±1,466.7	0.767
10. Duration of feeding phloem	560.2±849.7	135.7±235.0	901.3±1,561.0	0.680

Value represent by mean±SD, *P*<0.05; ANOVA in SPSS (ver. 22.0).

3. EPG를 이용하여 RNAi 발현 토마토에서의 섭식행동분석

- 담배가루이가 RNAi 발현 토마토 잎을 섭식할 때 나타나는 섭식행동을 EPG 기술을 이용하여 관찰 및 섭식파형 분석
- 앞선 실험에서 개체군의 밀도가 적게 나타난 토마토를 4개 선발하여 EPG에 이용하였음(no. 73, 83, 84, 87). 담배가루이의 섭식행동을 관찰한 EPG 기록은 담배가루이가 시스템에서 이탈하거나 혹은 죽은 경우를 제외하고 정상적으로 토마토 잎에서 흡즙을 한다고 판단된 경우만 모아 3반복을 실시하여 섭식행동을 분석하였음.
- RNAi 발현 토마토에서는 no. 73을 제외한 나머지 토마토 섭식시체관부 섭식파형이 나타남. 본 실험에 사용한 토마토는 RNAi 발현 토마토에서의 개체군의 동태 확인이 끝난 후 개체군 밀도가 낮게 조사된 토마토를 이용하여 EPG를 하였음. 따라서 RNAi 주입된 지 최소 4주가 지난 토마토를 사용하였으므로 예비실험으로서 진행됨.
- EPG는 파종 후 약2~3주째 되는 토마토에 담배가루이 RNAi를 접종삽입한 후 10일 된 RNAi 발현토마토(앞서 무처리 토마토 EPG에서의 조건과 동일하게, EPG 기록은 파종 후 4주가 된 토마토를 이용할 수 있도록 10일 당겨서 접종)를 이용하였으며, 담배가루이는 성충으로 우화한지 2-3일 되는 것을 사용하였다.





그림 50. EPG를 이용한 RNAi 발현 토마토에서의 담배가루이의 섭식행동 분석

- 과중한지 최소 6주가 지난 토마토를 사용하여 예비실험으로써 EPG 분석을 실시하였으므로, 토마토의 신장이 큰 관계로 앞선 방법과 달리, 삼각 플라스크를 이용하여 전기적인 회로를 만듦. 줄기를 잘라 약 3~5cm 가량을 플라스크 안의 물에 잠기게 넣고, 플라스크 입구는 솜으로 막아 토마토의 중심을 잡아줌. 플라스크 가지에 전극을 꽂아 하나의 전기회로를 만든 후 실험을 진행하였음.

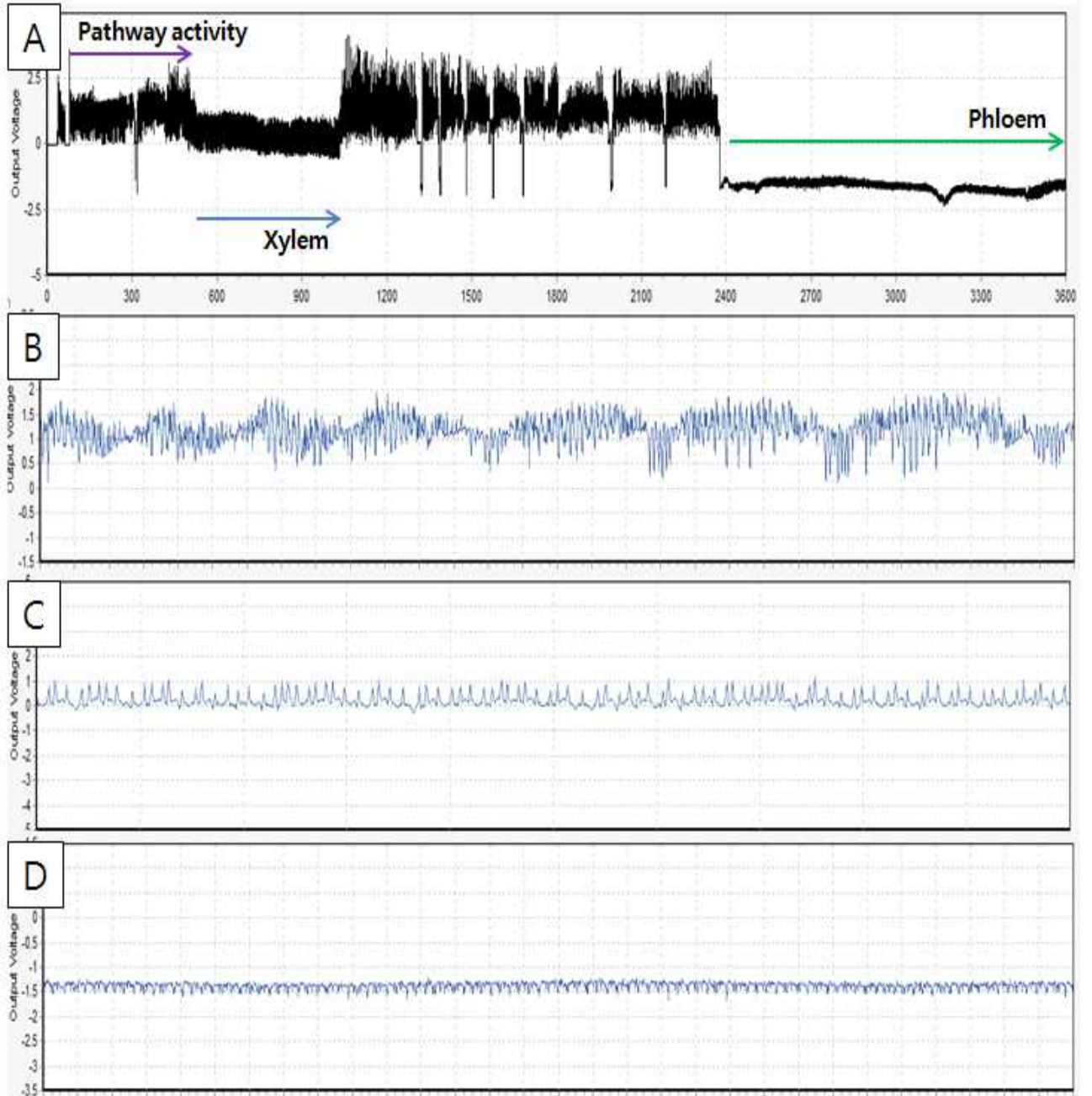


그림 51. RNAi 발현 토마토에서의 담배가루이 섭식과형의 특징. (A) 주요과형(60분), (B) Pathway activity; Frame (30초), Range (2.5) (C) 물관부섭식과형; Frame (10초), Range (5.0) (D) 체관부섭식과형; Frame (30초), Range (2.5).

표 21. RNAi 발현토마토에서의 담배가루이의 EPG 섭식 매개변수의 평균값(seconds)

	RNAi			
	No. 73	No. 83	No. 84	No. 87
1. Time to the first probe	200.8±195.2	97.6±113.5	3,201.2±2758.8	58.1±47.8
2. Total number of probe	17.3±11.0	3.7±2.1	3.0±2.6	7.0±3.0
3. Duration of first probe	333.7±429.6	623.1±824.8	3,148.1±3184.8	244.0±130.6
4. Duration of pathway phase	6,216.6±2787.0	2,839.8±1575.2	4,145.8±1739.0	2,812.4±1283.0
5. Time to first feeding xylem	3,741.5±1824.4	704.2±601.9	5,500.4±4781.8	1,253.8±712.4
6. Duration of first feeding xylem	2,978.2±3650.7	720.9±761.0	2,789.6±1860.2	852.4±931.0
7. Total duration of feeding xylem	6,894.5±5287.0	1,038.0±1169.5	3,484.0±2567.8	849.4±949.8
8. Duration of non probing time	1,361.6±987.4	410.2±313.9	4,705.3±559.4	411.8±89.2
9. Time to first feeding phloem	0.0±0.0	4,148.6±2976.6	725.9±1257.2	4,048.4±1901.2
10. Duration of feeding phloem	0.0±0.0	6,272.9±2650.7	1,099.3±1904.0	6,675.5±1951.4

표 22. RNAi 발현토마토에서의 담배가루이의 EPG 섭식 매개변수의 평균값(seconds)

	담배가루이 RNAi		
	wh0001	wh0002	wh0030
1. Time to the first probe	11.4±19.7	1,464.6±2,468.0	1,616.2±1,872.9
2. Total number of probe	13.3±4.2	10.7±11.5	20.3±17.0
3. Duration of first probe	442.4±344.1	46.8±23.5	353.9±371.4
4. Duration of pathway phase	2,232.6±1,191.1	4,893.3±3,040.7	3,394.7±4,313.8
5. Time to first feeding xylem	2,890.0±5,005.6	4,786.8±4,301.7	-
6. Duration of first feeding xylem	91.7±158.8	326.8±288.0	0±0
7. Total duration of feeding xylem	138.7±240.3	326.8±288.0	0±0
8. Duration of non probing time	7,576.2±1,132.8	5,316.4±3,540.6	7,235.8±4,198.5
9. Time to first feeding phloem	-	-	-
10. Duration of feeding phloem	0±0	0±0	0±0

- 2011년에 발표된 “Cucumber mosaic virus and its 2b RNA silencing suppressor modify plant-aphid interactions in tobacco” 논문에 의하면, EPG를 통해 확인한 결과, CMV바이러스에 감염되어 있는 담배, 특정 바이러스 유전자 product(2b protein)를 가진 담배를 섭식하는 진딧물은 감염되지 않은 담배에 비하여 체관부섭식시간이 길게 나타났다고 보고된 바 있음. 이는 바이러스 감염이 된 경우, 진딧물의 저항성을 상승시켜 체관부를 섭식을 더욱 유도하는 효과를 나타낸다고 볼 수 있음. 따라서, 본 연구팀의 실험을 통해

담배가루이 유전자를 삽입한 바이러스벡터를 이용하여 RNAi 효과가 잘 일어날 경우, 약간의 체관부 섭식을 통하여 담배가루이의 발생을 감소시킬 수 있으리라 기대됨.

- 비교구 대비 모든 RNAi 발현토마토에서 체관부 섭식은 나타나지 않았고, wh0030을 제외한 나머지 샘플에서 물관부 섭식과형을 관찰할 수 있었다. 비교구와 대비하여 RNAi 발현토마토 wh0001은 첫 탐침까지 약 10배정도 빨랐지만, 구침을 삽입하지 않은 NP(non probing)과형을 보인 총 시간이 약 1.5배 증가하였다. RNAi 발현토마토 wh0002의 경우에는 첫 탐침까지 약 5배정도 오래 걸렸고, 총 탐침횟수도 가장 적었다. RNAi 발현토마토 wh0030은 물관부를 거의 섭식하지 않았으며, 구침을 기주에 삽입하지 않은(NP) 시간 또한 wh0001과 비슷하게 길었다. 따라서 모든 RNAi 발현토마토에서 비교구 토마토보다 섭식시간이 짧아지는 경향을 보여주고 있어, 현재 선발된 3종류의 RNAi는 섭식에 관련된 유전자를 방해하는 것으로 추정된다.
- 결과적으로, 선발된 3종류의 RNAi는 담배가루이의 섭식을 저해하여, 토마토에 발생하는 TYLCV(Tomato yellow leaf curl virus)의 매개를 방해할 수 있을 것으로 사료된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	연구목표	달성도	관련분야 기술발전 기여도
1차년도	• 담배가루이 억제 RNAi 선별 high throughput 식물바이러스 개발	100%	• 식물바이러스 cDNA library RNAi 발현 벡터 최초개발 및 다양한 해충에 적용 가능
	• 담배가루이 RNAi 발현 토마토를 이용한 담배가루 증식억제 유도	120%	• 섭식방법을 이용한 RNAi 적용 및 RNAi 대량적용 가능성 제시
	• RNAi 발현 토마토 유묘 대량기술 확립	100%	• Agroinfiltration 을 이용한 RNAi 대량 적용 가능성 타진
	• 담배가루이의 ADP translocase, ribosomal protein L9, V-ATPase 외 담배가루이 EST 를 근거로 한 RNAi 제작 및 효율평가	100%	• 주입방법이 아닌 식물체내 발현 섭식방법을 통한 RNAi 적용기술 확인 및 응용확대
	• 담배가루이 전염기작 분석(SEM&TEM)	70%	• AltMV 외 다양한 기주범위에 감염능이 있는 TRV의 Gateway cDNA library RNAi 적용벡터개발로 유용 RNAi 스크린 적용 식물범위 확대→ 식물바이러스를 이용한 RNAi 선별 시스템 특허출원
	• 담배가루이 확산방지 위한 유인, 기피식물 탐색	70%	• RNAi 섭식후 Target RNA 발현저하 확인 및 개체군 동태 차이점 확인 후 RNAi 효과 검증
	• EPG system을 이용한 담배가루이의 섭식행동 확인	100%	• 체관을 통한 섭식기작 확인을 통하여 RNAi의 정확한 Delivery 검증가능함
• 담배가루이 약제선발 및 약효검정	100%	• 진공흡즙을 통한 Agroinfiltration 의 효과 확인 및 사업화연계 RNAi 발현 유묘 생산 라인 구축 가능하게 됨	
2차년도	• AltMV-ATT-P 벡터를 이용하여 담배가루이 제어 우수 RNAi 선별 (Tobacco Rattle Virus로 전환)	100%	• 식물바이러스를 이용한 담배가루이제어 RNAi 선별 포장실험을 통한 6개의 우수 RNAi 선별 (wh0001, wh0002, wh0011, wh0035, wh0037, wh0073)
	• 담배가루이의 RNAi 발현 토마토에서 담배가루이 개체군 동태 분석	100%	• 3개의 제어 RNAi 발현 토마토를 이용한 담배가루이의 개체군동태 분석을 통한 효과확인 및 RNAi 유전자 특허출원 준비
	• 담배가루이의 RNAi 발현 토마토 여부에 따른 섭식행동 분석	100%	• 식물바이러스의 일부를 변경하여 바이러스기능을 제거시킨 후 RNAi 만을 발현시키는 카세트 개발. 다양한 RNAi 적용방법 개발

	<ul style="list-style-type: none"> 담배가루이의 RNAi 발현 토마토 유묘의 접종체계 및 대량생산 기술 	90%	<ul style="list-style-type: none"> 대량생산라인 설계 및 RNAi 발현 벡터를 이용한 RNAi 발현 유묘 생산시스템 (주)제노레버 기술이전을 통한 대량생산 및 판매 전략 구축 가능하게 됨
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> 토마토 포장 실험 진행 후 50 개 RNAi 선별 	100%	<ul style="list-style-type: none"> 식물바이러스를 이용한 담배가루이제어 RNAi 선별 포장실험을 통한 3개의 우수 RNAi 선별 (wh0101, wh0102, wh0130)
	<ul style="list-style-type: none"> 선별된 RNAi 기작 연구 	90%	<ul style="list-style-type: none"> 4개의 제어 RNAi 발현 토마토를 이용한 담배가루이의 개체군동태 분석을 통한 효과확인 및 RNAi 유전자 특허출원 준비
	<ul style="list-style-type: none"> 바이러스 관다발 이동 불가능한 바이러스 전환 개발 	100%	<ul style="list-style-type: none"> 식물바이러스의 일부를 변경하여 바이러스기능을 제거시킨 후 RNAi 만을 발현시키는 카세트 개발. 다양한 RNAi 적용방법 개발
	<ul style="list-style-type: none"> 토마토 Seedling 에 대량 접종방법 확립 	100%	<ul style="list-style-type: none"> 대량생산라인 설계 및 RNAi 발현 벡터를 이용한 RNAi 발현 유묘 생산시스템 (주)제노레버 기술이전을 통한 대량생산 및 판매 전략 구축 가능하게 됨
	<ul style="list-style-type: none"> 담배가루이의 섭식행동을 EPG system을 이용하여 전기생리학적으로 접근. 	100%	<ul style="list-style-type: none"> 담배가루이 RNAi 발현 유묘에 담배가루이를 접종하여 EPG 패턴의 변화를 살펴봄으로서 효과적인 스크리닝을 가능하게 함

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구성과

1. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

(단위 : 건수)

성과목표	사업화지표								연구기반지표								
	지식 재산권		기술이전	사업화					기술인중	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	출원	특허		제품화	기술창업	매출창출	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보 전시	
			SCI						비 SCI								
최종목표	1		1							2	5		1			1	
연구기간 내 달성실적	1		1							4	5	11	0			1	
달성율(%)	100		100							200	100		0			100	

2. 지식재산권

구 분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
특허출원	AltMV 유래 게이트웨이 발현벡터 및 이의 용도	대한민국	충남대 학교 산학협력단	2015.04.08	10-2015-0049442				

3. 논문게재 및 학술회의 발표

가. 논문게재

논문(국내외 전문학술지) 게재							
번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (편수)
1	Utilization of a Tobacco Rattle Virus vector to Clone an Nicotiana benthamiana cDNA Library for VIGS.	Agriculture Journal (Kyushu university)	서은영	60(2)	일본	큐슈대학교	SCI (1)
2	Survey of Apple Chlorotic Leaf Spot Virus and Apple Stem Grooving Virus Occurrence in Korea and Frequency of Mixed Infections in Apple	Agriculture Journal (Kyushu university)	한재영	60(2)	일본	큐슈대학교	SCI (0.5)

3	Developing an <i>Alternanthera Mosaic Virus</i> vector for efficient cloning of whitefly cDNA RNAi to screen gene function.	Agriculture Journal (Kyushu university)	고나연	60(1)	일본	큐슈대학교	SCI (0.5)
4	Sequence variability in the HC-Pro coding regions of Korean soybean mosaic virus isolates is associated with differences in RNA silencing suppression	Archives of Virology	리미가	159(6)	오스트리아	SPRINGER WIEN	SCI (1)
5	Cytotoxic Effects And Androgen Receptor Expression According To Concentrations Of Genistein With Silencing Cyclooxygenase-2 Gene Expression In Prostate Cancer Cells	Agriculture Journal (Kyushu university)	김진우	59 (2)	일본	큐슈대학교	SCI (1)
6	RNAi 기법으로 담배가루이 방제를 위해 선발된 유전자의 식물체내 발현.	충남대학교 농업과학연구	김정희	42(2)	대한민국	충남대학교	비SCI (1)
7	담배가루이(<i>Bemisia tabaci</i> , Aleyrodidae, Hemiptera)에서 Virus-induced Gene Silencing (VIGS) Vector를 이용하기 위한 cDNA Library 제작	한국응용곤충학회지	고나연	54(2)	대한민국	한국응용곤충학회	비SCI (1)
8	RNAi에 의한 담배가루이(<i>Bemisia tabaci</i> , 가루이과, 노린재목)의 개체군 밀도변화.	충남대학교 농업과학연구	고나연	42(1)	대한민국	충남대학교	비SCI (1)
9	EPG를 이용한 담배가루이(<i>Bemisia tabaci</i>)의 섭식행동과 Cyantraniliprole에 대한 섭식변화	충남대학교 농업과학연구	권혜리	41(2)	대한민국	충남대학교	비SCI (1)
10	Preliminary data suggests that seed transmission rates of bean pod mottle virus and soybean mosaic virus in soybean may be affected by mixed infection or expression of the Kunitz trypsin inhibitor.	식물병연구	남문	19(2)	대한민국	한국식물병리학회	비SCI (1)

나. 국내 및 국제 학술회의 발표

국내 및 국제 학술회의 발표					
번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2013 한국식물병리학회 춘계학술대회	김현승	2013. 04. 25 ~ 2013. 04. 26	충남대학교	대한민국
2	The 6 th Korea-China-Japan Graduate Student Forum.	고나연	2013. 09. 03 ~ 2013. 09. 05	충남대학교	대한민국
3	2013년도 한국응용곤충학회 추계학술발표회	고나연	2013. 10. 24 ~ 2013. 10. 25	강원도 횡성 웰리힐리파크	대한민국
4	AFELiSA, International Symposium on Agricultural, Food, Environmental and Sciences in Asia	김현승	2013. 11. 07 ~ 2013. 11. 08	미야자키 선호텔	일본
5	Entomological Society of America 61 st Annual Meeting.	고나연	2013. 11. 10 ~ 2013. 11. 13	텍사스	미국
6	2014 한국응용곤충학회 춘계학술발표회	고나연	2014. 04. 23 ~ 2014. 04. 25	강원도 평창 휘닉스파크	대한민국
7	2014 한국응용곤충학회 추계학술발표회	고나연	2014. 10. 16 ~ 2014. 10. 17	STX리조트 (문경)	대한민국
8	2014 미국곤충학회	고나연	2014. 11. 16 ~ 2014. 11. 19	포틀랜드	미국
9	2015 한국응용곤충학회 춘계학술발표회	김정희	2015. 04. 22 ~ 2014. 04. 24	리솜리조트	대한민국
10	2015 한국응용곤충학회 추계학술발표회	김정희	2015. 10. 15 ~ 2015. 10. 16	군산 컨벤션센터	대한민국
11	Entomological Society of America 63rd Annual Meeting.	김정희	2015. 11. 15 ~2015. 11. 18	미네소타	미국

다. 기술거래 및 기술료

기술거래(이전)					
번호	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)
1	전용실시권	AltMV 유래 게이트웨이 발현벡터 및 이의 용도	(주)제노레버코리아	2015. 08. 25	1,000,000

라. 홍보실적

홍보실적(신문, 방송, 저널 등)				
번호	홍보유형	매체명	홍보내용	홍보일자
1	신문기사	한국경제	제노레버, 빌리언21, 충남대연구팀 개발'친환경 해충방제 기술' 상용화 추진.	2015. 08. 26

제 2 절 연구성과 활용계획

1. 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

- 본 연구를 통하여 얻어진 담배가루이 RNAi 선별을 위한 방법은 각종 해충 제어 RNAi 선별 기술로 연계 할 수 있음. 식물바이러스 벡터에 Gateway system을 삽입하여 RNAi 스크리닝 기술은 세계 최초 개발이며 각종 해충의 cDNA library를 바탕으로 RNAi 제작가능.
- 특정 작물에 감염하는 바이러스 벡터의 개발이 선행된다면, 본 연구를 통해 개발된 시스템을 적용하여 다양한 작물을 가해하는 해충 방제가 가능
- 식용 작물 뿐만 아니라, 흡즙성 곤충이 가해하는 화훼류 등의 비식용식물에 본 연구를 적용
- 특허출원 된 본 기술(특허번호 10-2015-0049442)은 담배가루이 분 아니라 각종 해충의 RNAi 선별에 적용될 수 있음. 유해곤충의 cDNA RNAi library 제작적용
- 진공접종 방법을 이용한 대량접종 기술은 토마토를 비롯한 각종 채소작물에 적용할 수 있음
- 식물바이러스를 통한 RNAi 발현기술을 RNAi 발현 카셋트를 이용한 RNAi 발현으로 변경개발하여 소비자들의 거부감(바이러스감염 식물)을 해소. 생산 및 판매시장접근을 용이하게 하고자 함
- 선별 된 RNAi의 생물 및 인체에 대한 안전성 검증 계획을 수립하여 소비자들의 거부감을 해소
- 본 기술개발은 (주) 제노레버 코리아에 기술이전 되었으며 토마토 유묘에 RNAi (선별된 9종류 RNAi)를 발현시켜 판매계획을 수립하고자 함
- 또한 EPG data 및 기피제 처리에 대한 적용 manual 을 농가에 제공하므로 RNAi 발현 유묘 판매 및 종합적관리를 통한 담배가루이 피해를 최소화 할 계획임
- 산업화를 위해 국내외 식물 바이러스를 통한 특정 유전자 발현 식물 유통 관련 법규를 검토 할 계획임

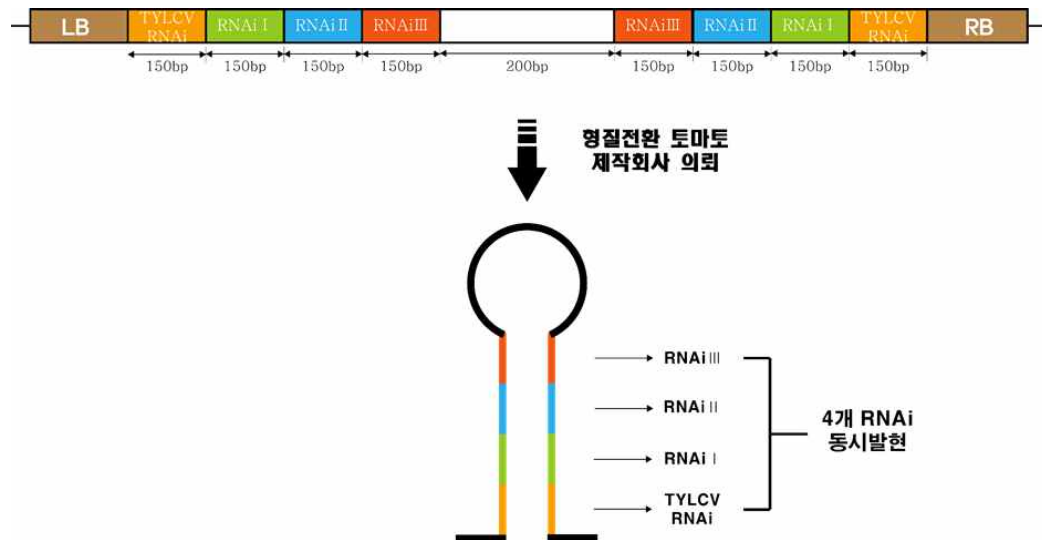
2. 교육지도·홍보 등 기술확산 계획

- 연구결과 (바이러스매개 담배가루이의 기피현상) 의 추가적인 데이터 (선별된 RNAi 의 기능 최종 분석, RNAi 흡즙 후 담배가루이의 생리적 활동성 변화) 를 얻기 위한 연구지속
- 2016년 토마토 재배 농장(예산일대-충남농업기술원 연계) 일부에 약 300 주 (담배가루이 RNAi 발현 유묘 공급) 를 무상으로 공급하여 담배가루이에 의한 TYLCV 예방관련 기술을 지역언론 및 중앙언론사를 통해 홍보 계획임. 담배가루이 제어기술 결과를 (주)제노레버의 향후 유묘 판매 전략에 포함시켜 RNAi 발현 토마토 유묘 시장을 확대할 예정임

3. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획

- 기존 특허는 해충 제어 RNAi 선별방법에 대한 특허(2015년 출원)이었으며 4개의 RNAi 의 유전자기능 규명을 추가하여 담배가루이 RNAi 염기서열을 특허로 출원할 예정
- 4 개의 RNAi 와 TYLCV 제어 RNAi를 동시에 발현하는 형질전환나 토마토 개발의 타당성 및 제작방법 완성 (아래 그림). 토마토형질전환 전문업체를 통한 형질전환 토마토개발

- 추가적인 연구결과(선별된 9개의 RNAi의 담배가루이의 생리활성제어 효과의 생화학적 분석)를 기존연구결과와 함께 세계 유명 저널과 학회에 발표하여 담배가루이제어 RNAi 효과를 홍보할 계획
- 형질전환 토마토 개발 (다종의 RNAi 발현 토마토)



4. 추가연구, 타연구에 활용계획

- 현재 선별된 RNAi 9종류의 형질전환 토마토 개발의 필요성 타진 후 연구전개
- 본 연구기간동안 바이러스(TYLCV)를 흡즙한 담배가루이의 토마토 흡즙 후 특이현상에 관련된 연구계획은 포함되지 않았으나, 본 연구기간동안 기초 적용 실험을 통해 RNAi 처리 토마토는 바이러스 흡즙한 담배가루이의 기피현상은 나타났지만 10% 정도 감염률을 보여 100% 제어 할 수 있는 기술이 보완되어야 한다고 판단되며, 현재 연구 진행중에 있음
- TYLCV 흡즙한 담배가루이의 대량사육 방법 확립과 이를 이용한 섭식기피 RNAi 스크린
- 향후 연구를 통해 바이러스를 흡즙한 담배가루이의 RNAi 발현 토마토의 생활사 연구와 담배가루이를 원천적으로 제어 할 수 있는 RNAi 선별이 필요함
- 제작된 cDNA RNAi library 를 지속적인 적용을 통하여 선별된 3개의 RNAi 의 담배가루이 흡즙을 원천적으로 예방하는 RNAi 선별을 위한 스크리닝 작업을 지속적으로 하고자 함

표. TYLCV 토마토를 섭식한 담배가루이의 RNAi 발현 토마토 서식실험(진행중)

구분	정상토마토 (200마리)	RNAi(000) 발현 토마토 (200마리)
1주차	발아후 4주차 된 토마토(10주)에 TYLCV 감염 토마토에서 사육한 담배가루이 접종	발아 후 2주차에 RNAi 발현 바이러스 접종(RNAi발현 토마토 제작)후, 4주차에 TYLCV 감염 토마토에서 사육한 담배가루이 접종
2~3주차	사육 및 관찰 진행	사육 및 관찰 진행

4주차 (현재)	10주 토마토 모두 TYLCV 병징 발생	10주 토마토 중 2주에서 TYLCV 병징 발생
5주차	사육 및 관찰 진행	사육 및 관찰 진행
6주차	토마토 TYLCV 진단	토마토 TYLCV 진단

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 특허정보: 없음
- 논문정보

연번	논문 정보
1	Nayhanne T. de Paulab, Josias C. de Faria, Francisco J.L. Aragão., 2015. Reduction of viral load in whitefly (<i>Bemisia tabaci</i> Gen.) feeding on RNAi-mediated bean golden mosaic virus resistant transgenic bean plants. <i>Virus Research</i> . 210, 245-247.
2	Asokan R, Rebijith KB, Roopa HK, Kumar NK., 2015, Non-invasive delivery of dsGST is lethal to the sweet potato whitefly, <i>Bemisia tabaci</i> (G.) (Hemiptera: Aleyrodidae). <i>Applied Biochemistry and Biotechnology</i> . 175(4), 2288-99.

제 7 장 연구시설·장비 현황

* 해당사항 없음

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

- 본 연구를 수행하기 위하여 충남대학교의 본 연구팀은 본교에서 시행하는 모든 안전점검 및 안전교육을 실시하였으며 연구실 안전환경 조성에 관한 법률에 따라 연구실험실 정밀안전진단과 자체 안전 및 소방교육을 실시함.
- 참여연구원들의 건강 검진이 충남대학교 연구실안전관리센터 주관으로 매년 실시되었으며, 연구원들의 출장 시에는 반드시 여행자 보험을 가입하여 연구원들의 안전과 건강에 만전을 기함.

제 9 장 참고문헌

- Backus EA, Habibi J, Yan FM, Ellersieck M. 2005. Stylet penetration by adult *Homalodisca coagulata* on grape: Electrical penetration graph waveform characterization, tissue correlation, and possible implications for transmission of *Xylella fastidiosa*. *Annals of the Entomology Society of America*. 98 (6): 787-813.
- Baulcombe, D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356-363.
- Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, Johnson S, Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M, Vaughn T, Roberts J. 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotech.* 25: 1322-1326.
- Baum, J.A., T. Bogaert, W. Clinton, G. R. Heck, P. Feldmann, O. Ilagan, S. Johnson, G. Plaetinck, T. Munyikwa, M. Pleau, T. Vaughn and J. Roberts. 2007 Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotechnol.*, 25: 1322-1326
- Bedford ID, Briddon RW, Brown JK, Rosell RC, Markham PG. 1994. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Ann. Appl. Biol.* 125: 311-325.
- Bettencourt, R., Terenius, O., Faye, I.. 2002. Hemolin gene silencing by ds-RNA injected into *Cecropia* pupae is lethal to next generation embryos. *Insect Mol. Biol.* 11, 267-271. Bettencourt, R., Terenius, O., Faye, I.. 2002. Hemolin gene silencing by ds-RNA injected into *Cecropia* pupae is lethal to next generation embryos. *Insect Mol. Biol.* 11, 267-271.
- Bhatia V, Bhattacharya R, Uniyal PL, Singh R, Niranjana RS. 2012. Host generated siRNAs attenuate expression of serine protease gene in *Myzus persicae*. *Plos One* 7: 10: e46343.
- Blua MJ, Toscano N. 1994. *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) development and honeydew production as a function of cotton nitrogen status. *Environmental Entomology*. 23: 317-321.
- Boina DR, Youn Y, Folimonovac S, Stelinski LL. 2011. Effects of pymetrozine, an

- antifeedant of Hemiptera, on Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, feeding behavior, survival and transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Pest Manag. Sci.* 67: 146-155.
- Bombarely, A., H. G. Rosli, J. Vrebalov, P. Moffett, L. A. Mueller, and G. B. Martin. 2012. A draft genome sequence of *Nicotiana benthamiana* to enhance molecular plant-microbe biology research. *Mol plant microbe interact.* 25: 1523-1530.
- Bosch, M., L. P. Wright, J. Gershenzon, C. Wasternack, B. Hause, A. Schaller and A. Stintzi. 2014. Jasmonic acid and its precursor 12-oxophytodienoic acid control different aspects of constitutive and induced herbivore defenses in tomato. *Plant Physiol.*, p.114
- Boutla, A., C. Delidakis, I. Livadaras and M. Tabler. 2003. Variations of the 3' protruding ends in synthetic short interfering RNA (siRNA) tested by microinjection in *Drosophila* embryos. *Oligonucleotides*, 13: 295-301
- Boykin, L.M., Shatters, Jr. R.G., Rosell, R.C., McKenzie, C.L., Bagnall, R.A., De Barro, P., and Frohlich, D.R., 2007. Global relationships of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) revealed using Bayesian analysis of mitochondrial COI DNA sequences. *Mol. Phylogen. Evol.* 44, 1306-1319.
- Brigneti G, Mart-n-Hern-ndez AM, Jin H, Chen J, Baulcombe DC, Baker B, Jones JD. 2004. Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *Plant J.* 39: 264-272.
- Brigneti, G., O. Voinnet, W. X. Li, L. H. Ji, S. W. Ding and D. C. Baulcombe. 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *The EMBO journal*, 17(22): 6739-6746.
- Burban C, Fishpool LDC, Fauquet C, Fargette D and Thouvenel JC. 1992. Host associated biotypes within West African population of the whitefly *Bemisia tabaci* (Genn.)(Hom. Aleyrodidae). *J. Appl. Entomol.* 113: 416-423.
- Burch-Smith TM, Schiff M, Liu Y, Dinesh-Kumar SP. 2006. Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 142: 21-27.
- Burch-Smith, T. M., J. C. Anderson, G. B. Martin and S. P. Dinesh-Kumar. 2004. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *The Plant Journal*, 39(5): 734-746.

- Byrne DN. 1999. Migration and dispersal by the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*. *Agricul. For. Meteorol.* 97: 309-316.
- Caballero RS, Cyman DJ, Schuster HE, Portillo, Slater R. 2013. Baseline susceptibility of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B in southern Florida to cyantranilliprole. *Crop Protection.* 44: 104-108.
- Cakir, C., M. E. Gillespie and S. R. Scofield. 2010 Rapid determination of gene function by virus-induced gene silencing in wheat and barley. *Crop science*, 50(Supplement_1): S-77.
- Chapman, S., T. Kavanagh, and D. Baulcombe. 1992. Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant J.* 2:549-557.
- Cheng, S. F., Y. P. Huang, L. H. Chen, Y. H. Hsu and C. H. Tsai. 2013 Chloroplast phosphoglycerate kinase is involved in the targeting of Bamboo mosaic virus to chloroplasts in *Nicotiana benthamiana* plants. *Plant physiology*, 163(4): 1598-1608.
- Choi GM. 1990. Ecology and control of vegetable insect pests. NIAST. pp. 224.
- Choi YM, Kim GH. 2004. Insecticidal activity of spearmint oil against *Trialeurodes vaporariorum* and *Bemisia tabaci* adults. *Korean J. Appl. Entomol.* 43: 323-328.
- Christiaens, O., Swevers, L., Smagghe, G., 2014. DsRNA degradation in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) associated with lack of response in RNAi feeding and injection assay. *Peptides* 53, 307-314.
- Chu D, Zhang YJ, Cong B, Xu BY, Wu QJ. 2004. The invasive mechanism of a world important pest, *Bemisia tabaci* biotype B. *Acta Entomologica Sinica.* 47: 400-406.
- Clegg, M. T., B. S. Gaut, G. H. Learn and B. R. Morton. 1994 Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 91(15): 6795-6801.
- Cordova D, Benner EA, Sacher MD, Raul JJ, Sopa JS, Lahm GP, Selby TP, Stevenson TM, Flexner L, Gutteridge S, Rhoades DF, Wu L, Smith RM, Tao Y. 2006. Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of

- action, ryanodine receptor activation. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 84 (3): 196-214.
- Cruz, S. S., S. Chapman, A. G. Roberts, I. M. Roberts, D. A. Prior, and K. J. Oparka. 1996. Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:6286-6290.
- Czosnek H, Ghanim M, Ghanim M. 2002. The circulative pathway of begomoviruses in the whitefly vector *Bemisia tabaci*-insights from studies with tomato yellow leaf curl virus. *Ann. Appl. Biol.* 140: 215-231.
- Devine GJ, Denholm I. 1998. An unconventional use of piperonyl butoxide for managing the cotton whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Bull. Entomol. Res.* 88: 601-610.
- Dong, Y., T. M. Burch-Smith, Y. Liu, P. Mamillapalli and S. P. Dinesh-Kumar. 2007 A ligation-independent cloning Tobacco rattle virus vector for high-throughput virus-induced gene silencing identifies roles for NbMADS4-1 and -2 in floral development. *Plant Physio.*, 145: 1161-70.
- Escobar, N. M., S. Haupt, G. Thow, P. Boevink, S. Chapman, and K. Oparka. 2003. High-throughput viral expression of cDNA-green fluorescent protein fusions reveals novel subcellular addresses and identifies unique proteins that interact with plasmodesmata. *Plant cell*. 15:1507-1523.
- Fairbairn DJ, Cavallaro AS, Bernard M, Mahalinga-Iyer J, Graham MW, Botella JR. 2007. Host-delivered RNAi: An effective strategy to silence genes in plant parasitic nematodes. *Planta*. 226: 1525-1533.
- Fu, D. Q., B. Z. Zhu, H. L. Zhu, W. B. Jiang, and Y. B. Luo. 2005. Virus-induced gene silencing in tomato fruit. *Plant J*. 43:299-308.
- Garzo E, Soria C, Gomez-Guillamon ML, Fereres A. 2002. Feeding behavior of *Aphis gossypii* on resistant accessions of different melon genotypes (*Cucumis melo*). *Phytoparasitica*. 30: 129-140.
- Ghanim, M., Kontsedalov, S., Czosnek, H., 2007. Tissue-specific gene silencing by RNA interference in the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 732-738.

- Ghanim, M., S. Kontsedalov and H. Czosnek. 2007 Tissue-specific gene silencing by RNA interference in the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Insect biochemistry and molecular biology*, 37(7): 732-738.
- Godge, M. R., A. Purkayastha, I. Dasgupta and P. P. Kumar. 2008 RETRACTED ARTICLE: Virus-induced gene silencing for functional analysis of selected genes. *Plant cell reports*, 27(2): 209-219.
- Hahn, B.S., 2010. Recent studies on development of transgenic plants induced root-knot nematode resistance by RNA interference suppression of nematode genes and nematode prevention. *Res. Plant Dis.* 16, 10-20.
- Hammond, J., M. D. Reinsel and C. J. Maroon-Lango. 2006 Identification and full sequence of an isolate of *Alternanthera* mosaic potexvirus infecting *Phlox stolonifera*. *Archives of virology*, 151(3): 477-493.
- Hisano, H., S. Sato, S. Isobe, S. Sasamoto, T. Wada, A. Matsuno and S. Tabata. 2007 Characterization of the soybean genome using EST-derived microsatellite markers. *DNA research*, 14(6): 271-281.
- Horowitz AR, Kontsedalov S, Khasdan V, Ishaaya I. 2005. Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 58: 216-225.
- Huvenne H, Smagghe G. 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. *J. Insect Physiol.* 56: 227-235.
- Jang, C., E. Y. Seo, J. Nam, H. Bae, Y. G. Gim, H. G. Kim and H. S. Lim. 2013 Insights into *Alternanthera* mosaic virus TGB3 functions: interactions with *Nicotiana benthamiana* PsbO correlate with chloroplast vesiculation and veinal necrosis caused by TGB3 over-expression. *Frontiers in plant science*, 4: 5.
- Jiang YX, De Blas C, Barrios L, Fereres A. 2000. Correlation between whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) feeding behavior and transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Entomologia Experimentalis et Applicata.* 52: 69-81.
- Johnson DD, Walker GP, Creamer R. 2002. Stylet penetration behavior resulting in inoculation of a semipersistently transmitted closterovirus by the whitefly *Bemisia argentifolii*. *Entomologia Experimentalis et Applicata.* 102: 115-123.

- Jones, D., 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *Euro. J. Plant Pathol.* 109, 197-221.
- Karatolos N, Gorman K, Williamson MS, Denholm I. 2012. Mutations in the sodium channel associated with pyrethroid resistance in the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*. *Pest Manag. Sci.* 68: 834-838.
- Kim HY, Lee YH, Kim JH, Kim YH. 2008. Comparison on the capability of four predatory mites to prey on the eggs of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Korean J. Appl. Entomol.* 47(4): 429-433.
- Kim, J. S., J. D. Jung, J. A. Lee, H. K. Park, K. H. Oh, W. J. Jeong and K. Y. Cho. 2006 Complete sequence and organization of the cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Baekmibaekdadagi) chloroplast genome. *Plant cell reports*, 25(4): 334-340.
- Kiselevsky, D. B., O. Y. Frolova, A. G. Solovyev, Y. L. Dorokhov, S. Y. Morozov, and V. D. Samuilov. 2014. Plant cell death caused by fungal, bacterial, and viral elicitors: protective effect of mitochondria-targeted quinones. *Biochemistry(Mosc)*. 79:1322-1332.
- Ko N.-Y., H.-S. Kim, J.-K. Kim, S. Cho, E.-Y. Seo, H.-R. Kwon, Y. M. Yu, T. Gotoh, J. Hammond, Y. N. Youn, H.-S. Lim. 2015. Developing an *Alternanthera* mosaic virus vector for efficient cloning of Whitefly cDNA RNAi to screen gene function. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.* 60:139-149.
- Ko NY, Lim HS, Yu YM, Youn YN. 2015. Construction of cDNA Library for Using Virus-induced Gene Silencing (VIGS) Vector with the Sweetpotato Whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Korean J. Appl. Entomol.* 54: 91-97.
- Ko NY, Youn YN. 2015. Change of population density of tobacco whitefly (*Bemisia tabaci*, Aleyrodidae, Hemiptera) by RNAi. *CNU J. Agricul. Sci.* 42: 7-13.
- Lahm GP, Selby TP, Freudenberger JH, Stevenson TM, Myers BJ, Seburyamo G, Smith BK, Lindsey F, Christopher EC, Daniel C. 2005. Insecticidal anthranilic diamides: A new class of potent ryanodine receptor activators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 15 (22): 4898-4906.
- Lahm GP, Stevenson TM, Selby TP, Freudenberger JH, Cordover D, Flexner L, Bellin ACA, Dubas CM, Smith BK, Hughes KA, Hollingshau JG, Clark CE, Benner EA. 2007. Rynaxypyr™ : A new insecticidal anthranilic diamide that

- acts as a potent and selective ryanodine receptor activator. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 17 (22): 6274-6279.
- Lee H, Song W, Kwak HR, Kim JD, Park JG, Auh CK, Kim DH, Lee KY, Lee SC, Choi HS. 2010. Phylogenetic analysis and inflow route of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) and *Bemisia tabaci* in Kor. *Mol. Cell*. 30: 467-476.
- Lee YS, Lee SY, Park EC, Kim JH, Kim GH. 2002. Comparative Toxicities of Pyriproxyfen and Thiamethoxam against the Sweetpotato Whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *J. Asia-Paci. Entomol*. 5: 117-122.
- Lei H, Tjallingii WF, van Lenteren JC. 1998. Probing and feeding characteristics of the greenhouse whitefly in association with host-plant acceptance and whitefly in association with host-plant acceptance and whitefly strains. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 79: 77-84.
- Lein, W., B. Usadel, M. Stitt, A. Reindl, T. Ehrhardt, U. Sonnewald, and F. Bornke. 2008. Large-scale phenotyping of transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum*) to identify essential leaf functions. *Plant Biotechnol J*. 6:246-263.
- Leshkowitz, D., Gazit, S., Reuveni, E., Ghanim, M., Czosnek, H., McKenzie, C., Shatters, R.L., Brown, J.K., 2006. Whitefly (*Bemisia tabaci*) genome project: analysis of sequenced clones from egg, instar, and adult (viruliferous and non-viruliferous) cDNA libraries. *BMC Genomics* 7,79.
- Lim, H. S., A. M. Vaira, L. L. Domier, S. C. Lee, H. G. Kim and J. Hammond. 2010a Efficiency of VIGS and gene expression in a novel bipartite potexvirus vector delivery system as a function of strength of TGB1 silencing suppression. *Virology*, 402: 149-163.
- Lim, H. S., A. M. Vaira, M. D. Reinsel, H. Bae, B. A. Bailey, L. L. Domier and J. Hammond. 2010b Pathogenicity of *Alternanthera mosaic virus* is affected by determinants in RNA-dependent RNA polymerase and by reduced efficacy of silencing suppression in a movement-competent TGB1. *Journal of general virology*, 91(1): 277-287.
- Lin, J. W., M. P. Ding, Y. H. Hsu and C. H. Tsai. 2007 Chloroplast phosphoglycerate kinase, a gluconeogenic enzyme, is required for efficient accumulation of Bamboo mosaic virus. *Nucleic acids research*, 35(2): 424-432
- Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP. 2002. Virus-induced gene silencing in tomato.

- Plant J. 31: 777-786.
- Liu, E., and J. E. Page. 2008. Optimized cDNA libraries for virus-induced gene silencing (VIGS) using tobacco rattle virus. *Plant Methods*. 4:5.
- Liu, E., Page, J.E., 2008. Optimized cDNA libraries for virus-induced gene silencing (VIGS) using tobacco rattle virus. *Plant Methods* 4, 1-13.
- Liu, Y., M. Schiff, and S. P. Dinesh-Kumar. 2002b. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J.* 31:777-786.
- Liu, Y., M. Schiff, R. Marathe, and S. P. Dinesh-Kumar. 2002a. Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J.* 30:415-429.
- Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S.P., 2002. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J.* 31, 777-786.
- Lu, R., Malcuit I, Moffett P, Ruiz MT, Peart J, Wu AJ, Rathjen JP, Bendahmane A, Day L, Baulcombe DC. 2003. High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *EMBO J.* 22: 5690-5699.
- Lu, R., Martin-Hernandez, A.M., Peart, J.R., Malcuit, I., Baulcombe, D.C., 2003. Virus-induced gene silencing in plants. *Methods* 30, 296-303.
- Lu, Z. C. and F. H. Wan. 2011 Using double-stranded RNA to explore the role of heat shock protein genes in heat tolerance in *Bemisia tabaci* (Gennadius). *The Journal of experimental biology*, 214(5): 764-769.
- Lucas, W. J. 2006. Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology*. 344:169-184.
- Luo, Y., Wang, X., Yu, D., Chen, B., Kang, L., 2013. Differential responses of migratory locusts to systemic RNA interference via double-stranded RNA injection and feeding. *Insect Mol. Biol.* 22, 574-583.
- Macfarlane, S. A. 2010. Tobraviruses-plant pathogens and tools for biotechnology. *Mol Plant Pathol.* 11:577-583.

- Mao, Y. B., W. J. Cai., J. W. Wang, G. J. Hong, X. Y. Tao, L. J. Wang and X. Y. Chen. 2007 Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature biotechnology*, 25(11): 1307-1313.
- Martin B, Collar JL, Tjallingii WF, Fereres A. 1997. Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. *Journal of General Virology*. 78: 2701-2705.
- McLean DL, Kinsey MG. 1964 Technique for electrically recording aphid feeding + salivation. *Nature*. 202: 1358-1359.
- Montllor CB, Tjallingii WF. 1989. Stylet penetration by two aphid species on susceptible and resistant lettuce. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 52 (2):103-111.
- Mu-iz M. 2000. Host suitability of two biotypes of *Bemisia tabaci* on some common weeds. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 95: 63-70.
- Mutti, N. S., Y. Park, J. C. Reese and G. R. Reeck. 2006 RNAi knockdown of a salivary transcript leading to lethality in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Science*, 6: 1-7.
- Nauen R, Stump N and Elbert A. 2002. Toxicological and mechanistic studies on neonicotinoid cross resistance in Q type *Bemisia tabaci*. *Pest Manag. Sci*. 58: 868-875.
- Navas-Castillo J, Camero R, Bueno M, Moriones E. 2000. Severe yellowing outbreaks in tomato in Spain associated with infections of Tomato chlorosis virus. *Plant Disease*. 84: 835-837.
- Oliveira MRV, Henneberry TJ, Anderson P. 2001. History, current status and collaborative research project for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection*. 20: 709-723.
- Perring TM, Cooper AD, Rodriguez RJ, Farrar CA, Bellows TS. 1993. Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. *Sci*. 259: 74-77.
- Perring TM. 2001. The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Prot*. 20: 739-765.

- Pitino M, Coleman AD, Maffei ME, Ridout CJ, Hogenhout SA. 2011. Silencing of aphid genes by dsRNA feeding from plants. *PloS one*. 6: e25709.
- Pitino, M. and S. A. Hogenhout. 2013 Aphid protein effectors promote aphid colonization in a plant species-specific manner. *Mol Plant Microbe Interact.*, 26: 130-139.
- Pollard DG. 1955. Feeding habits of the cotton whitefly, *Bemisia tabaci* Genn. (Homoptera: Aleyrodidae). *Annals of Applied Biology*. 43 (4): 664-671.
- Price, D.R., Gatehouse, J.A., 2008. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends Biotech.* 26, 393-400.
- Prod'homme, D., A. Jakubiec, V. Tournier, G. Drugeon and I. Jupin. 2003 Targeting of the turnip yellow mosaic virus 66K replication protein to the chloroplast envelope is mediated by the 140K protein. *Journal of virology*, 77(17): 9124-9135.
- Rangasamy M, Siegfried BD. 2012. Validation of RNA interference in western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae) adults. *Pest Manag. Sci.* 68: 587-591.
- Ratcliff, F., A. M. Martin-Hernandez, and D. C. Baulcombe. 2001. Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J.* 25:237-245.
- Reinero, A. and R. N. Beachy. 1986 Association of TMV coat protein with chloroplast membranes in virus-infected leaves. *Plant molecular biology*, 6(5): 291-301.
- Sapountzis, P., G. Duport, S. Balmand, K. Gaget, S. Jaubert-Possami, G. Febvay, H. Charles, Y. Ranbe, S. Colella and F. Calevro. 2014 New insight into the RNA interference response against cathepsin-L gene in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*: Moting or gut phenotypes specifically induced by injection or feeding treatment. *Insect biochemistry and molecular biology*, 51: 20-32.
- Sattelle DB , Cordova D, Cheek TR. 2008. Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. *Invertebrate Neuroscience*. 8: 107-119.

- Schoelz, J. E. and M. Zaitlin. 1989 Tobacco mosaic virus RNA enters chloroplasts in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(12): 4496-4500.
- Scofield, S. R. and R.S. Nelson. 2009 Resources for virus-induced gene silencing in the grasses. *Plant physiology*, 149(1): 152-157.
- Scott JG, Michel K, Bartholomay LC, Siegfried BD, Hunter WB, Smagghe G, Zhu KY, Douglas AE. 2013. Towards the elements of successful insect RNAi. *J. Insect Physiol.* 59: 1212-1221.
- Secker AE, Bedford ID, Markham PG, Williams MEC. 1998. Squash, a reliable field indicator for the presence of the B biotype of tobacco whitefly, *Bemisia tabaci*. In: Brighton crop protection conference-pests and Diseases. Brit. Crop Prot. Council. Farnham, UK. pp. 837-842.
- Seo E.-Y., S. Cho, J. S. Moon, T. Gotoh, H. G. Kim, L. L. Domier, S. Lim, K. H. Kim, J.-K. Moon, J. Hammond, H.-S. Lim, K. H. Song. 2015. A high throughput soybean gene identification system developed using Soybean yellow common mosaic virus (SYCMV). *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.* 60:127-138.
- Shingles J, Lilley CJ, Atkinson HJ, Urwin PE. 2007. *Meloidogyne incognita*: molecular and biochemical characterization of a cathepsin L cysteine proteinase and the effect on parasitism following RNAi. *Exper. Parasitol.* 115: 114-120.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H.A., Fire, A.. 2001. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107, 465-476.
- Tian, T., L. Rubio, H. H. Yeh, B. Crawford and B. W. Falk. 1999 Lettuce infectious yellows virus: in vitro acquisition analysis using partially purified virions and the whitefly *Bemisia tabaci*. *J Gen Virol.*, 80: 1111-1117.
- Tjallingii WF. 1978. Electronic recording of penetration behavior by aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata.* 24: 721-730.
- Tjallingii WF. 1988. Electrical recording of stylet penetration activities. *Aphid, their biology, Nature Enemies and Control* (eds. A. K. Minks & P. Harrewijn), pp. 95-108. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

- Torrance, L., G. H. Cowan, T. Gillespie, A. Ziegler and C. Lacomme. 2006 Barley stripe mosaic virus-encoded proteins triple- gene block 2 and Gammab localize to chloroplasts in virus- infected monocot and dicot plants, revealing hitherto-unknown roles in virus replication. *J Gen Virol.*, 87: 2403-2411.
- Upadhyay, S.K., Chandrashekar, K., Thakur, N., Verma, P.C., Borgio, J.F., Singh, P.K., Tuli, R., 2011. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. *J. Biosci.* 36, 153-161.
- van Lenteren JC, Woets J. 1988. Biological and integrated pest control in greenhouses. *Annual Review of Entomology.* 33: 239-269.
- Vel-squez AC, Chakravarthy S, Martin GB. 2009. Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *J. Vis. Exp.* 28: 1-4.
- Voinnet, O., C. Lederer and D. C. Baulcombe. 2000 A Viral Movement Protein Prevents Spread of the Gene Silencing Signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell*, 103(1): 157-167.
- Walshe, D.P., Lehane, S.M., Lehane, M.J., Haines, L.R., 2009. Prolonged gene knockdown in the tsetse fly *Glossina* by feeding double stranded RNA. *Insect Mol. Biol.* 18, 11-19.
- Whyard S, Singh AD, Wong S. 2009. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39: 824-832.
- Wynant N, Santos D, Van Wielendaele P, Vanden Broeck J. 2014. Scavenger receptor-mediated endocytosis facilitates RNA interference in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Mol. Biol.* 23: 320-329.
- Xue K, Wang XY, Huang CH, Wang RJ, Liu B, Yan FM, Xu CR. 2009. Stylet penetration behaviors of the cotton aphid *Aphis gossypii* on transgenic Bt cotton. *Insect Science.* 16: 137-146.
- Yadav BC, Veluthambi K, Subramaniam K. 2006. Host-generated double stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection. *Mol. Biochem. Parasitol.* 148: 219-222.
- Yang, D., H. Lu and J. W. Erickson. 2007 Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila*

- embryos. *Curr Biol.*, 10:1191-1200.
- Yin HD, Wang XY, Xue K, Huang CH, Wang RJ, Yan FM, Xu CR. 2010. Impacts of transgenic Bt cotton on the stylet penetration behaviors of *Bemisia tabaci* biotype B : Evidence from laboratory experiments. *Insect science*. 17: 344-352.
- Yoon YJ, Yu YM, Lee MH, Han EJ, Hong SJ, Ahn NH, Kim YK, Jee HJ, Park JH. 2010. Characterization of *Lecanicillium lecanii* Btab01 isolated with bioactivities to tobacco whitefly (*Bemisia tabaci*). *Korean J. Appl. Entomol.* 49: 417-422.
- Youn Y, Backus EA, Serikawa RH, Stelinski LL. 2011. Correlation of an electrical penetration graph waveform with walking by Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Florida Entomologist* 94(4): 1084-1087.
- Youn YN, Chang YD. 1993. Electrical feeding patterns and stylet movement of rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera), in the rice plant. *Kor. J. Appl. Entomol.* 32(2): 208-217.
- Youn YN. 1998. Electrically recorded feeding behavior of *Nephotettix cincticeps*. *J. Asia-Pacific Entomol.* 1(2): 147-161.
- Yuan, C., C. Li, L. Yan, A. O. Jackson, Z. Liu, C. Han, J. Yu and D. Li. 2011 A high throughput Barley stripe mosaic virus vector for virus induced gene silencing in monocots and dicots. *PLoS One.*, 6: e26468.
- Zha, W., X. Peng, R. Chen, B. Du, L. Zhu and G. He. 2011 Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-mediated RNA interference in the hemipteran insect *Nilaparvata lugens*. *PLoS One.*, 6: e20504.
- Zhang LP, Zhang YJ, Zhang WJ, Wu QJ, Xu BY, Chu D. 2005. Analysis of genetic diversity among different geographical populations and determination of biotypes of *Bemisia tabaci* in China. *Journal of Entomology*. 129: 121-128.

< 별첨 >

특허, 논문 및 시장 분석보고서

신청과제명	담배가루이 제어용 RNAi 발현 토마토 유묘 개발 및 대량 생산 기술 확립		
주관연구책임자	윤영남	주관기관	충남대학교

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
RNAi를 이용한 해충제어	미국	10%	30%	90%	
RNAi 발현 식물바이러스 벡터 제작 기술	미국	10%	50%	100%	

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), Aureka DB
검색기간	최근 5년간
검색범위	RNAi and Pest management

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	(기술 1)	(기술 2)
Keyword		
검색건수		
유효특허건수		
핵심특허 및 관련성	특허명	
	보유국	
	등록년도	
	관련성(%)	
	유사점	
	차이점	

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	Aureka DB, pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), 국회도서관(www.nanet.go.kr)
검색기간	최근 5년간
검색범위	초록

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		(기술 1)
Keyword		RNAi and Pest(whitefly) management
검색건수		4
유효논문건수		1
핵심논문 및 관련성	논문명	Tissue-specific gene silencing by RNA interference in the whitefly Bemisia tabaci
	학술지명	Insect Biochem Mol Biol
	저 자	Ghanim, M <i>et al.</i>
	게재년도	2007
	관련성(%)	40%
	유사점	- EST를 이용하여 RNAi 제작 - tissue 및 developmental specific gene expression를 RNAi 로 저해시킴
	차이점	- RNAi를 식물에 발현시켜 섭식으로 공급 - RNAi는 식물바이러스벡터를 이용하여 공급하게 됨

가. 생산 및 시장현황

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

- 국내에서 whitefly 에 의한 geminivirus 의 피해를 예방하기 위하여 현재 농촌진흥청 연구소에서 담배가루이의 분포 및 geminivirus 의 기주범위에 대하여 연구가 되어 있으나 직접적으로 담배가루이를 제어 할 수 있는 기술개발은 되어있지 않음.
- 국내 바이러스 예방용 친환경농자재가 등록되어 일부 사용하고 있으나, 관련 제품에 대한 방제효과 방제 기작 등 관련 연구가 되어 있지 않음. 따라서 이들의 연구를 통한 체계적인 방제력을 바탕으로 바이러스병에 대한 피해를 최소화하고자 함.

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

- 세계적으로 바이러스를 방제하거나 예방하기 위한 작물보호제의 생산 및 판

매는 보고된바 없음.

- 담배가루이를 직접 목표로 이용되는 RNAi 는 개발되고 있으나 현장 적용은 어려운 상황임, 반면 본 연구개발을 통하여 신속하게 제어 RNAi를 선별하고 이를 식물바이러스 또는 형질전환 방법으로 작물에 적용하여 해충방제가 매우 용이할 것임 .
- 우리나라에서 등록된 바이러스 예방용 친환경농자재를 체계적인 연구를 통하여 개발하고, 방적전략을 수립하면 세계시장에서 경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 기대됨.

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

- 가루이가 매개하는 바이러스병을 예방하기 위한 RNAi 기법을 이용한 종합적 해충방제 방법과 보급으로 바이러스 병을 예방하여 생산량을 증가시켜 경제적 이익을 창출할 수 있을 것으로 기대됨.
- 현재 바이러스병에 의한 농작물의 피해액을 추정하는 것이 불가능한 상태임.
 - 일부 애호박에서의 바이러스 감염여부에 따른 피해조사를 한 결과를 인용하면 다음 표에서 알 수 있는 바와 같이 농가소득이 1/3 수준으로 격감하는 것을 알 수 있음.

표1. 애호박 재배시 바이러스 감염에 따른 경제적 피해 수준(1,000평 기준).
(경남 진주 농가 조사)(자료제공: (주)경농)

평균	방제 성공 농가 (최대-최소)	방제 실패 농가	
		성공농가 대비 증감율	생산량 및 수익
수량 (박스당 20개)	8,000박스 (10,000~6,000)	57% (44~70%)	4,560 박스
단가 (박스당)	15,000원 (25,000~5,000)	60% (50~70%)	9,000 원
농가 소득 (평균)	120,000,000원	34.2%	41,040,000원

- 위의 자료를 바탕으로 전국 시설재배 농가에서의 피해규모를 추정해보면, 2009년 농업통계에 따르면, 전체 시설호박 재배면적이 3,457ha이고, 10a 당 생산량이 5,186kg로 48.25박스가 생산되며, 전국 총생산량은 179,288,000Kg이다. 여기서 피해율이 50%만 잡는다고 하여도, 약 400 억 원 정도의 피해를 입는 것으로 추정된다.

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목	산업화 기준					
	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	100	200	300			600
경제적 파급효과	1000	1000	1500			3,500
부가가치 창출액	0	0	100			100
합 계	1,100	1,200	1,900	0	0	4,200

- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

○ <의견> 본 시장조사는 연구를 통한 직접산업화 부분인, DNA chip, 및 친환경 바이러스, 담배가루이 방제제 판매 부분에 국한된 것임. 따라서 제시된 수치는 방제에 따른 경제적 가치부분 비해 매우 적을 것으로 판단되며, 방제 및 억제관련 제품의 시장성이 훨씬 높을 것으로 판단되어져 DNA chip 부분보다는 방제부분에 대한 시장조사가 적합하나, 현재 이 부분에 대한 통계의 집계가 어려워, 직접 산물에 국한한 시장규모를 제시함.

5. 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획

가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

1) 특허분석 측면

○ 현재까지 담배가루이를 제어하는 효과적인 방제법은 없으나, 이번 연구를 통해 매개충인 담배가루이와 매개 식물바이러스를 예방, 또는 방제하는 RNAi를 이용한 종합적 제어방법을 개발, 국내, 외에 출원할 계획임.

2) 논문분석 측면

○ 기존 논문은 담배가루이의 EST library 분석과 RNAi 선별 연구 및 주사를 통한 RNAi 효과를 분석하였으나, 본 연구과제에서는 RNAi 실제 섭식을 통하여 담배가루이를 제어하는 기작 규명이 가능하며 우수 RNAi를 신속하게 작물에 적용시켜 해충종합적 방제를 유도 할 수 있음. 또한 이러한 결과는 Journal of Virology, Molecular Ecology 학술지 등에 게재할 계획임

○ 기존 논문은 유기인계와 피레스로이드계와 같은 오래된 살충제의 저항성 기작 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 최근에 광범위하게 대량으로 사

용되는 neonicotinoid계 약제에 대한 저항성을 진단하는 방향으로 연구를 추진하여 야외 계통의 저항성 진단을 통한 저항성 개체군 관리 논문 등을 Pesticide Management Science와 Pesticide Biochemistry and Physiology 등에 게재할 계획임

- 가루이의 바이러스 보독 여부와 관련된 섭식행동의 차이를 규명하며, 바이러스의 식물체내에서의 복제와 이동, 바이러스의 침투 억제에 관련된 내용으로 곤충학관련, 바이러스병학 관련 국내·외의 논문집에 게재할 수 있을 것임.

3) 제품 및 시장분석 측면

- 국내에는 현재 가루이가 매개하는 토마토 유해 바이러스를 동정하는 RNAi를 이용한 제어 기술은 아직 없으며, 이는 바이러스 매개 해충 예방용 종합적방제 방법 통한 바이러스병 예방(방제) 전략을 수립

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.