

식물세포에 살충독소유전자의 전이연구: 2. *B. thuringiensis* 살충독소유전자의 subcloning과 *Nicotiana tabacum*의 원형질체와 칼루스로부터 신속재생연구

이 형 환 · 조 상 현 · 황 성 희 · 김 수 영

건국대학교 생물학과 및 유전공학연구소

Transfer of Insecticidal Toxin Gene in Plants: 2. Subcloning of *B. thuringiensis* Insecticidal Protein Gene and Rapid Plantlet Regeneration from *Nicotiana tabacum* Protoplast and Callus

Hyung-Hoan Lee, Sang-Hyun Cho, Sung-Hee Hwang and Soo-Young Kim

Institute for Genetic Engineering & Department of Biology

Konkuk University, Seoul 133-701, Korea

ABSTRACT

The insecticidal protein gene in the pKL-20-1 clone derived from *Bacillus thuringiensis* serovar, *kurstaki* plasmid was subcloned in the plant shuttle vector, pGA643. The 7.3 kb fragment was cloned in the BglII and HpaI sites of pGA643 vector and expressed in *E. coli* S17-1, which produced insecticidal proteins killing *Bombyx mori* larvae. The clone was named pHL-20. The protoplast formation, calli induction and plantlet regeneration of *Nicotiana tabacum* were carried out. A tremendous number of mesophyll protoplasts of *N. tabacum* were formed, up to 7×10^6 protoplast per ml, for 20 hours in darkness in the enzyme solution of 0.5% cellulase and 0.1% macerosin, pH 5.8. The viabilities of the protoplasts were maintained above 80% for 6 days in the media containing 2 mg/l of NAA and 1 mg/l of kinetin. Calli were induced from the protoplasts and leaves of the *N. tabacum* on MS medium containing 0.5 mg/l BAP. Under the culture conditions the protoplasts underwent repeated cell division into calli. Plantlets were regenerated from callus cultures derived from protoplast and leaves. Shoots were induced in a medium containing 1 mg/l of BAP.

서 론

최근 농작물의 해충방제를 위하여 많은 양의 화학살충제가 사용되고 있고, 이에 의한 피해가 날로 늘어가기 때문에 무공해 살충제 개발에 흥미있는 연구가 이루어지고 있으며, 특히 무공해 살충 물질을 생산하는 *Bacillus thuringiensis* 내독소의 이용에 관한 연구로 내독소유전자를 클로닝하여 식물체 등에 전이하는 연구가 보고 되었다(1).

이러한 외래 유전자의 전이연구와 함께 최근에는 식물세포 배양법이 개발되어 식물을 실험실에서 배양하여 품종의 개량과 생산량을 증가시키는 연구(2, 3)와 식물세포벽을 제거하여 원형질체를 만든후에 이것을 다시 재생시켜서 완전한 식물로 성장시키는 연구도 보고되었다(4-8). 특히 외래 유전자를 식물체에 도입함으로써 새로운 유전정보를 전이하는 연구(1, 9)는 최근에 넓은 숙주범위를 갖는 종양유도Ti 플라스미드 운반체를 이용하여 외래 유전자를 쉽게 식물세포에 도입할 수

있게 되었다(10-12).

담배는 많은 사람들이 애용하는 식물종의 하나여서 상기의 *B. thuringiensis* 살충 내독소를 만드는 유전자를 담배식물세포에서 발현을 시킬 수 있다면 가장 이상적인 곤충 방제에 길이 열리게 되며 생산량의 증가를 얻을 수 있다. 따라서 이에 대한 연구를 위하여 살충독소 단백질 유전자를 클로닝을 하고, 담배 식물체로부터 원형질체 형성 및 재생의 기초 연구가 필요하다.

본 실험에서는 *B. thuringiensis* 살충단백질 유전자의 식물체용 운반체에서의 발현을 확인하고, 담배(*Nicotiana tabacum*)의 염색조직으로부터 원형질체 형성과 생존을 조사 및 깎루스 유도과 이로부터 유식물체의 재생에 관한 연구를 하였고에 보고한다.

실험 재료 및 방법

박테리아, 플라스미드 및 식물종자

운반체 플라스미드는 pGA643 (이호자, 경희대학교) 및, 운반체 숙주박테리아로는 *E. coli* S17 1 (이호자, 경희대학교)를 사용했다. *Escherichia coli* HB101 / pKL-20-1 살충독소유전자와 probe pHL-0.9 재조합 플라스미드(13)는 본 연구실에 보관중인 것을 사용했다. 담배(*Nicotiana tabacum* L. var. *bright yellow* 4) 종자는 시종의 종자상에서 구입하여 사용했다.

사용한 제한효소 및 시약

제한효소 등은 Bethesda Research Laboratories, Inc. (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하여 제조회사가 추천한 완충액등을 사용했다. 기타 시약은 Sigma회사(St. Louis, USA)에서 구입하여 사용했다.

플라스미드의 분리 및 클로닝과 형질발현

*E. coli*균에 있는 플라스미드의 분리는 lysozyme SDS 용균법을 이용하여 순수 분리하였다(15). DNA의 제한효소 절단은 Lee et al.(13)의 방법을 사용했다. pKL-20-1 클론의 7.9Kb PstI 단편을 Mung Bean nuclease (Stratagene Co. USA)로 blunt end를 만들고 BglII로 절단하여 7.3 Kb 단편을 만들었고, 클로닝 운반체인 pGA643 플라스미드 DNA는 BglIII와 HpaI으로 이중절단하여 상기 외래 DNA를 클로닝 했으며, 형질전환은 Lee et al.(13)의 방법을 사용했다. 형질전환된 대장균을 20μg/ml kanamycin이 첨가된 배지에서 배양하였고, 형질 발현은 누에유충에 대한 살충력(13) 분석으로 실시했다.

전기영동과 DNA 추출

0.7% agarose를 사용하여 전기영동을 했으며(16), agarose gel에서 DNA 단편의 추출은 Lee et al.(13)의 방법을 이용했다.

Nick translation과 Southern blot hybridization

Probe DNA는 nick translation kit(Promega CO., USA)을 사용하여 α-³²P CTP(Amersham Co)를 표지했으며, Southern blot hybridization은 Southern(17)의 방법을 사용했으며, autoradiography는 Lee et al. (13)방법을 참고했다.

원형질체 형성

담배종자를 온도 27°C, 습도 80%와 자연광을 발하는 형광등(Truc lite, Duro-Test, USA)이 설치된 항온실에서 일광주기 16시간으로 조사하면서 16주 동안 배양하여 중엽이 완전히 전개된 담배식물로 부터 Sink et al.(19)과 Uchimiya와 Murashige(20)의 방법을 수정하여 원형질체를 분리했다. 완전히 전개된 담배 잎의 가장자리 부분과 잎맥을 제거하고 3g 씩 A, B, C 군으로 나눈 뒤, 멸균증류수로 세척한 후 실온에서 70% 에탄올에 6-8 초간 담그고, tween-80 한 방울을 포함한 1.0% sodium hypochlorite 용액에 15분간 담근다. 이것을 멸균 증류수로 3회 세척하고 가로와 세로가 10mm 크기가 되도록 자른 뒤 원형질체 분리를 위하여 200ml의 CPW 용액(14)에 60분간 동안 침전시킨 다음 상기 세척액을 파스태렐으로 제거하고 여기에 각각 30ml의 A(1.0% cellulase, 0.5% macerosin, pH 5.8), B(0.5% cellulase, 0.1% macerosin), C(0.5% cellulase, 0.5% macerosin) 효소 혼합액에 넣고 어두운 곳에서 20시간 동안 23°C에서 처리한 후, 분리된 원형질체는 CPW 용액으로 3회 세척한 후 21% sucrose를 첨가한 CPW 용액에서 150×g로 15분간 원심분리하여 원형질체를 정제하였다.

원형질체 생존률의 조사

담배 원형질체의 생존률을 조사하기 위하여 원형질체 형성 후 7일간 계속 조사했다. 생존율은 Fluorescein diacetate 5mg을 아세트산 1.0ml에 용해한 용액을 CPW 용액을 이용하여 0.01%로 희석한 다음, 분리한 원형질체 약 1방울에 2-3 방울을 적하하여 5분 후에 haemocytometer 를 이용하여 형광현미경으로 관찰하였다. 생존률(%)은 형광을 발한 원형질체의 수를 전체 원형질체의 수로 나눈후에 100을 곱하여 구하였다.

원형질체 배양

분리한 담배 원형질체를 5×10^4 protoplast / ml의 농도로 희석하여 MS배지에 13% mannitol 첨가된 재생배지에 auxin으로는 2,4-D (2,4 dichlorophenoxyacetic acid), NAA (α -naphthaleneacetic acid)와 IAA(indole 3-acetic acid) (Janssen Co)를 각각 2mg과 4mg / l 씩, cytokinin으로는 kinetin과 BAP(6 benzylaminopurine)(Sigma Co)를 각각 1mg / l 씩 단독 혹은 혼합하여 페트리접시(35mm Falcon)에 100μ l 씩 분주한 후에 파라필름으로 밀봉한 후 27°C의 어두운 곳에서 24시간 배양하고, 500 lux에서 48시간 배양한 뒤 최종적으로 2000 lux에서 일광주기 16시간으로 배양하여 캘러스를 유도했다.

캘러스 형성 및 재분화

담배식물 잎육조직의 캘러스를 유도하기 위해 담배 잎새를 0.5×0.5cm 정도 자른 뒤, 이 단편을 70% 에탄올에 20초간 담그고, 다시 20% (V / V) sodium hypochlorite 용액에 30분간 담근 후에 멸균된 증류수로 3회 세척하고, 물기를 멸균종이로 제거한 후 5mm의 크기로 자르고 말단이 MS-BAP (0.5mg / l BAP) 한천배지 또는 캘라이트의 표면에 닿게 이식한 뒤 2000 lux, 27°C에서 일광주기 16시간 배양하였다. 담배엽육조직과 원형질체로부터 유도된 캘러스는 1.0mg / l BAP가 첨가된 MS 배지에서 재분화를 유도했다.

결과 및 고찰

***E. coli*에서 살충단백질 유전자의 클로닝 및 발현**

*B. thuringiensis*균에서 분리한 플라스미드에서 살충단백질을 생산하는 살충단백질 유전자를 이미 클로닝하여 보고한 바 있으며(13), 이 클로닝된 유전자를 식물 세포에 전이하기 위한 전초단계로 식물세포 재조합 운반체인 pGA643에 클로닝을 하여 발현이 되는지를 연구했다. pKL 20 1 재조합 DNA에 살충유전자(7.9 Kb)가 있으며(13), pKL 20-1 플라스미드 DNA를 PstI 제한효소로 절단한 결과는 Fig. 1에 제시됐다. Fig. 1B에서 보는 바와 같이 재조합 플라스미드 DNA가 두개의 단편으로 절단되었으며, 삽입된 7.9 Kb DNA가 절단되어 나타난 것을 볼 수 있다. Fig. 1B의 7.9 Kb DNA를 추출하여 다시 이것을 방법에서 설명한 바와 같이 절단하여 얻은 7.3 Kb DNA를 pG643 운반체의 BglIII와 HpaI 부위에 클로닝을 하였으며, 이것을 *E. coli* S17-1 숙주세포에 형질전환 시키었다. HpaI 부위의 절단부위속에 상이한 blunt end가 재조합되었기 때문에 HpaI 부위는 파괴되었다. 형질전환하여 얻은 클론을 pHIL-20으로 명명했다.

pHL-20클론 DNA를 추출하여 pGA643 운반체내의 multicloning restriction sites에 있는 BglIII와 SstI로 절단하여 전기영동을 실시한 후에 니트로셀룰로스에 전이시키어 probe DNA와 Southern hybridization를 한 결과가 Fig. 2에 제시됐다. Fig. 2E와 F는 probe DNA와 Southern hybridization이 된 것을 나타내는 것으로, 상기 결과는 살충독소 유전자가 있는 DNA 단편이 클로닝이 되었음을 증거하는 것이다. McLinden et al.,(21), Oh et al., (22)은 *B. thuringiensis* endotoxin plasmid의 Sau 3A 단편을 클로닝을 했고, Held et al.,(23)은 EcoRI 단편을 클로닝하여 대장균에서 발현을 시킨 보고가 있다. 클로닝된 DNA단편이 다양한 것은 *B. thuringiensis* 종류에 따라서

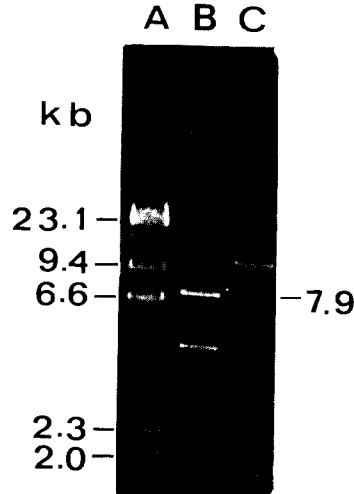


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis pattern of pKL-20-1 plasmid DNA. Lanes A, λ phage DNA digested with HindIII; B, pKL-20-1 DNA digested with PstI; C, pKL-20-1 plasmid DNA.

Table 1. Bioassay of clone pHL-20 lysate against *Bombyx mori* larvae

Lysates	No. of tested larvae	No. of the dead at 48 H
Control(food only)	20	0
<i>E. coli</i> S17-1	20	0
<i>B. thuringiensis</i> HD1	20	20
Clone pHL-20	20	7

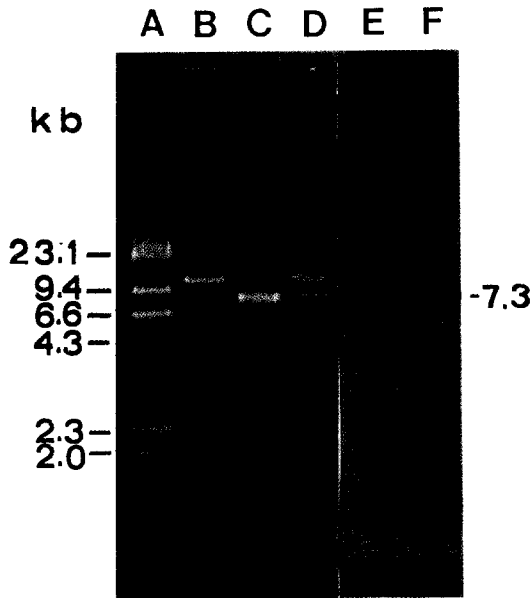


Fig. 2. Southern hybridization of (α - 32 P)-labeled probe DNA to the 7.3 Kb and pHL-20 DNAs digested with BglII and SstI. Lanes A, λ phage DNA digested with HindIII; B, pGA6 43 DNA digested with BglII and HpaI and; C, 7.3 Kb DNA from pKL-20-1 plasmid digested with BglII and PstI; D, pHL-20 plasmid DNA digested with BglII and SstI; E and F, the corresponding autoradiogram of lanes C and D.

플라스미드의 종류가 다양한 때문이다.

pHL-20 클론이 생산한 살충 단백질이 살충성을 갖는지를 알기 위하여, *E. coli* pHL-20 재조합 클론을 배양한 후에 초음파 분쇄기로 처리하여 누에(*Bombyx mori*) 3령 유충에 처리한 결과가 Table 1에 제시됐다. 클론과쇄액을 먹이에 도말하여 먹인 후에 조사한 것으로 *B. thuringiensis* 내독소 치사율의 약35%를 나타냈다. 이 결과는 상기 클론pHL-20 살충단백질 유전자가 발현됨을 입증하는 결과이다.

담배 원형질체 형성조건 및 생존률에 미치는 영향

담배 종자를 토양에 심은 후 16주가 된 식물을 이용하여 원형질체를 분리하였으며, 원형질체 생산 최적 조건을 조사하기 위하여 3 효소군으로 나누어서 실시하였다. 3종류의 효소 혼합액에 의해서 형성된 원형질체의 수는

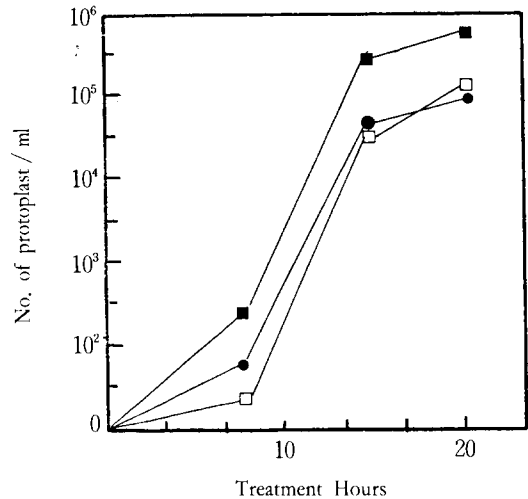


Fig. 3. Yield of mesophyll protoplasts of *Nicotiana tabacum*. Symbols: (□), A group; (■), B group and (○) C group.

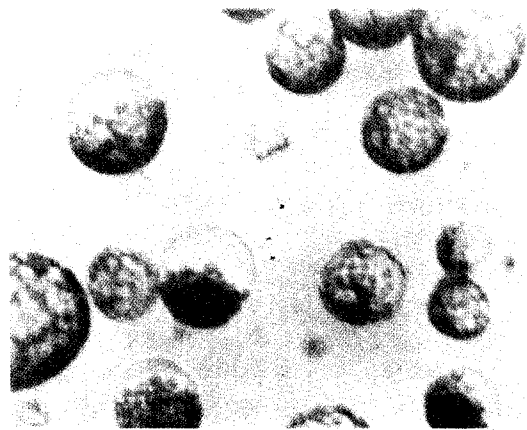


Fig. 4. Photograph of the mesophyll protoplast of *N. tabacum* after 20 h enzyme treatment ($\times 200$).

B효소군(cellulase 0.5%와 macerosin 0.1%)에서 최고의 원형질체가 생산이 되었다. 즉 암소에서 20시간 동안을 처리하였을 때에 7×10^5 원형질체/ml를 생산하여, 다른 두 그룹에 비해 약 3배의 원형질체가 생산되었다(Fig. 3). 20시간 동안 B 효소군 그룹에서 처리하였을 때의 원형질체 사진은 Fig. 4에 제시했으며, 원형질체의 세포막 형태는 안정되어 보이며, 윤곽이 뚜렷했다. 이와 유사

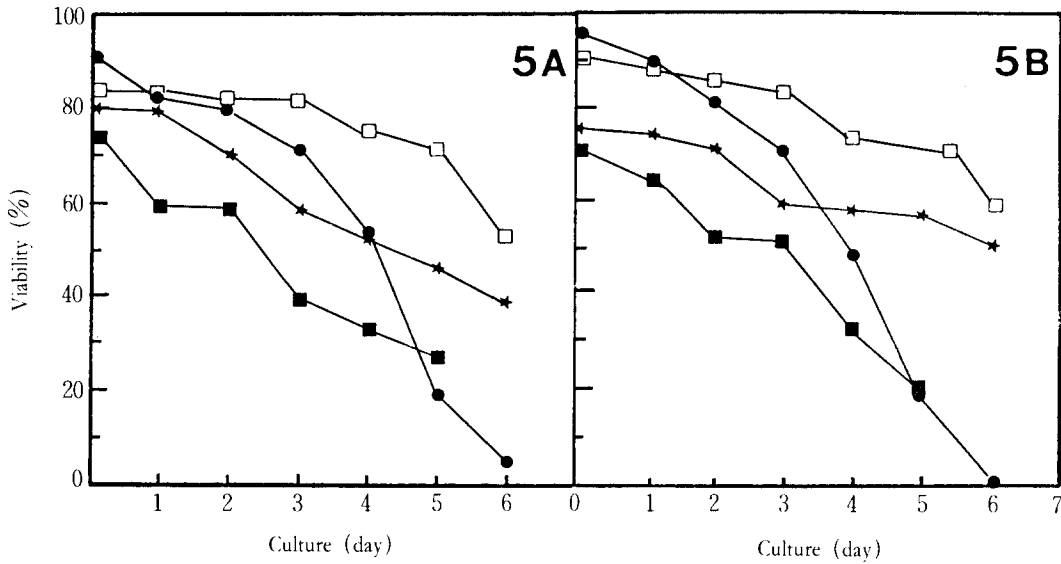


Fig. 5. Effects of auxins on the viability of *N. tabacum* protoplast. The protoplasts were cultured on 2mg/l (5A) and 4mg/l (5B) of each auxin. Symbols: (●), control: (□), IAA: (■), 2,4-D AND (★), NAA.

한 연구로는 Bourgin *et al.*,(6)이 1% cellulase를 사용한 것이 보고 되어 있다.

cytokinin을 첨가하지 않고 auxin종류인 NAA, IAA, 2,4-D를 각각 2mg/l씩 단독 첨가한 배양에서 5×10^4 protoplast/ml의 농도로 배양한 원형질체의 생존률(Fig. 5)을 보면, IAA를 첨가한 배지에서 배양 후 6일 까지 60% 이상의 생존률을 유지했으며, 2,4-D를 첨가한 배지는 무호르몬처리구와 같이 2일 까지 60% 생존률이 유지되다가 그 이후 떨어졌고, NAA를 첨가한 배지는 3일까지는 60%의 생존율을 나타냈으나 그 이후에는 떨어졌으며 무호르몬처리구는 배양 5일 후부터, 생존률이 급격히 떨어졌다(Fig. 5A). Fig. 5B에서 보는 바와 같이 auxin 종류를 4mg/l씩 단독 첨가한 배양에서는 2mg/l를 처리한 경우보다 생존율이 비교적 높았다. cytokinin 종류별로 1mg/l를 단독 처리한 결과는 Fig. 6에 있으며, 무호르몬처리구 배지에서의 배양보다 BAP를 첨가한 배지가 배양 후 6일까지 약 80%의 높은 생존률을, kinetin 처리구에서는 3일째까지 80%의 생존율을 유지한 것으로 나타났다. 대조군과 kinetin 처리구는 처리 3일째에 급격히 생존율이 떨어졌다. Meyer와 Cooke(24)는 cytokinin만 처리하였을 경우에는 무호르몬처리구보다 유독하다고 하였으나, 본 연구에서는 무호르몬처리구보다 cytokinin을 처리하는 것이 생존률을 높이는 것으로 나타

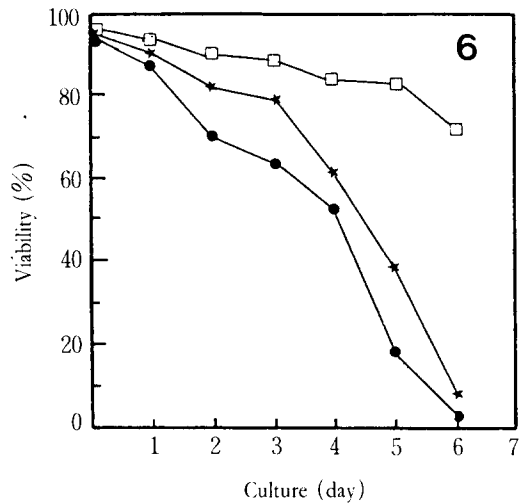


Fig. 6. Effects of cytokinins on the viability of *N. tabacum* protoplast. The protoplasts were cultured on 1mg/l of each cytokinin. Symbols: (●), control: (□), BAP and (★), kinetin.

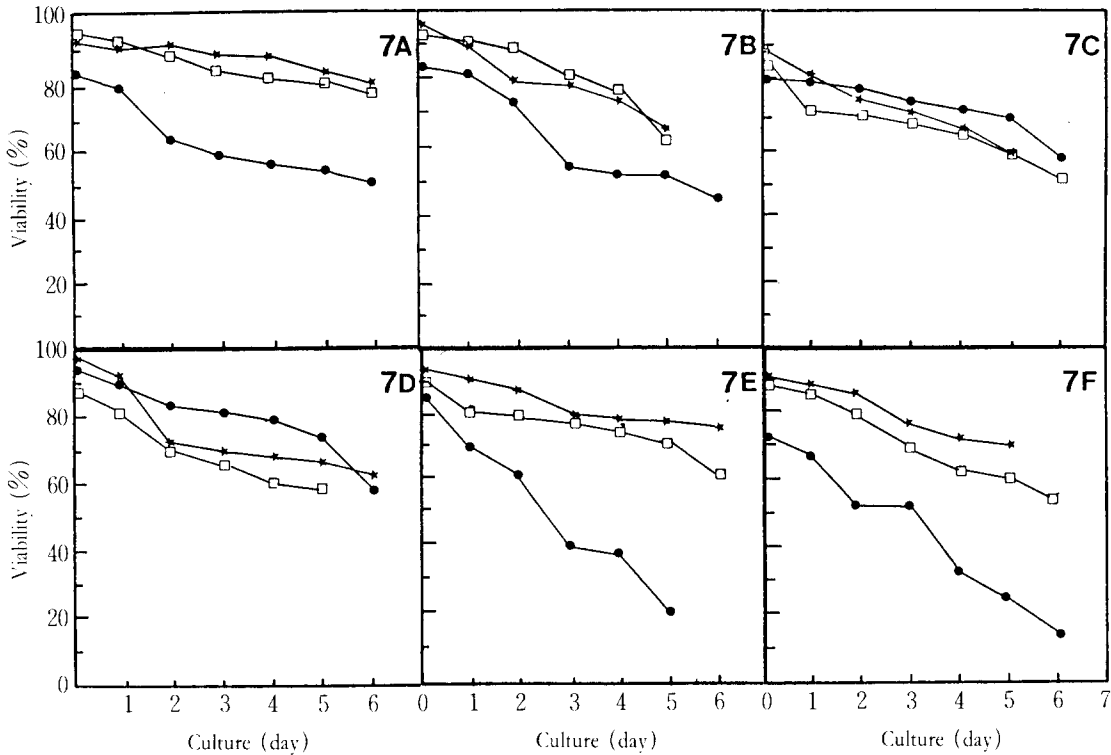


Fig. 7. Effects of cytokinin and auxin on the viability of *N. tabacum* protoplast. The protoplasts were cultured on the media containing 2mg/l NAA (7A), 4mg/l NAA(7B), 2mg/l IAA(7C), 4mg/l IAA (7D), 2mg/l 2,4-D(7E) and 4mg/l 2,4-D(7F) as auxins and 1mg/l of cytokinins. Symbols: (●), control; (□), BAP and (★), kinetin.

났다.

Auxin과 cytokinin을 같이 처리한 것 중에서 NAA를 2mg/l 와, cytokinin 종류인 kinetin과 BAP를 각각 1mg/l 로 함께 첨가한 배지에서 배양한 원형질체의 생존률 (Fig. 7)을 보면, kinetin과 BAP를 1mg/l 씩을 함께 첨가한 배지에서 생존율을 배양후 6일까지 80% 이상이 유지되었으나(Fig. 7A), 같은 조건에서 NAA만 4mg/l 로 높인 배지에서는 배양 후 4일째 부터 80% 이하로 떨어졌다(Fig. 7B). IAA을 2mg/l, cytokinin인 kinetin과 BAP를 각각 1mg/l 로 함께 첨가한 배지에서는 4일 후부터 생존률이 60% 이하로 떨어졌다(Fig. 7C). IAA를 4mg/l 로 높인 배지에서는 kinetin을 1mg/l 첨가한 배지에서 배양 후 6일 까지 60% 이상의 생존률을 보였다(Fig. 7D). 2,4-D를 2mg/l, kinetin과 BAP를 각각 1mg/l 로 함께 첨가한 배지에서는 배양 후 6일 까지, kinetin 첨가 배지는 80% 이상, BAP 첨가배지가 60% 이상의 생존률

을 보였다(Fig. 7E). 2,4-D를 4mg/l 로 높인 배지에는 kinetin 첨가 배지가 배양 후 5일까지 70% 이상의 생존률을 보였다(Fig. 7F). Auxin 종류를 각각 2mg 또는 4mg의 차이를 두어 처리하였으나 큰 차이를 보이지 않았다. 배양후 생존률이 급격히 떨어지는 이유는 억제 물질이 배지에 축적되어 세포가 사멸하거나 파열된다는 보고도 있다(24).

원형질체 보존에 대한 결과에서 보면, Uchimiya와 Murashige (20)은 담배 원형질체 배양에서 2,4-D나 IAA 보다 NAA가 배양중에 세포벽 재생에 높다고 되어 있으나, 본 연구에서는 auxin의 단독 효과로는 2mg/l 의 2,4-D를 첨가한 배지가 좋았다. auxin과 cytokinin을 함께 처리한 배지로는 2mg/l 의 NAA와 1mg/l BAP 또는 kinetin을 함께 처리한 배지에서 배양 후 6일까지 80% 이상의 생존률을 보였고, 2mg/l 의 2,4-D와 1mg/l 의 kinetin을 함께 첨가한 배지에서는 배양 후 6일 까지

80%의 생존률을 나타내는 것으로 보아 원형질체 배양은 auxin과 cytokinin을 함께 처리하여야 효율적으로 담배 원형질체를 생존 유지시킬 수 있다는 것을 알수 있었고, 본 연구 결과와 유사한 연구보고로는 2,4-D를 2mg/l, kinetin을 0.1 mg/l로 처리한 Reynolds와 Murashige (25)의 보고가 있다.

담배 원형질체의 분열과 callus 생성유도 및 식물 재생
원형질체 배양배지에 5×10^4 protoplasts/ml의 농도로



Fig. 8. Divided protoplasts of *N. tabacum* ($\times 400$).



Fig. 10. Calli induced from the leaf fragments or the protoplasts of *N. tabacum*. The yellow parts indicate calli formation.

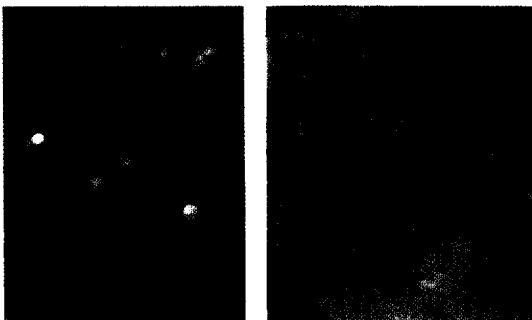


Fig. 9. Protoplast (9A) and callus divisions (9B) of *N. tabacum*. They were stained with fluorescein diacetate. 9A: The greenish parts (arrow) of the protoplast represent dividing parts ($\times 100$). 9B: the calli were stained in green and observed under a fluorescent microscope ($\times 100$).

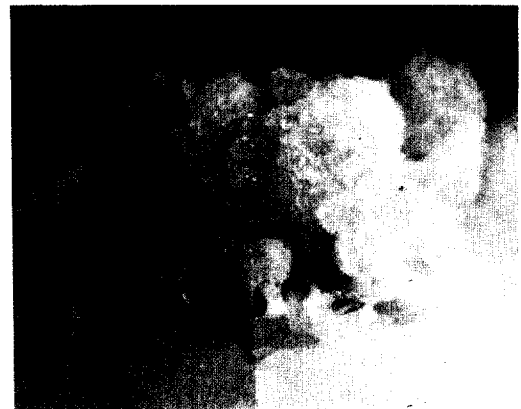


Fig. 11. The callus transplanted to fresh medium after 3 weeks culture. The greenish parts represent young leaves.



Fig. 12. Expanding leaves and shoots in the calli after 6 weeks culture.



Fig. 13. Stem, leaves and roots of the *N. tabacum* plant regenerated from the calli after 7 weeks culture.

Torrey(26)이 보고한바 있다. 2000lux에서 광주기 16시간으로 배양한지 2주째부터 원형질체가 분열하고 있었고, 캘러스 형성의 첫 단계로서 원형질체가 덩어리를 형성했으며, 같은 조건으로 3주 동안 유도한 캘러스를 분리하여 fluorescein diacetate로 염색을 한 후 형광현미경으로 관찰한 사진이 Fig. 9B이며, 배지 위에 넓게 퍼져 있었으며, 형광성을 나타내는 것으로 보아 분열증식을 하고 있음을 확인할 수 있었다. Fig. 10은 앞의 원형질체에서 형성된 캘러스이며, 약 45일이 된 것이고, 캘러스를 무균적으로 새로운 배지에 이식하여 배양한 것이다.

Fig. 11은 캘러스를 재분화배지에 이식하여 배양한 것으로 이식한지 1주만에 녹색의 옆원기가 분화하기 시작하였다. Fig. 12는 캘러스에서 많은 잎과 줄기가 분화되어 나오고 있는 사진이다. Fig. 13은 연속적인 계대배양 후 5주만에 완전한 식물체로의 성장을 나타내고 있으며 뿌리가 형성되어 있는 사진이다. 이상의 계대배양은 여러번 실시했으며, 재생이 안전성이 있게 이루어졌다.

식물체의 완전한 분화가 본 실험에서 이루어졌으므로 외래유전자를 식물체로 도입할 수 있는 기초연구에 필요한 기본적인 기술이 개발되었으므로 이를 이용한 연구가 앞으로 많이 이루어 질 수 있다고 생각한다.

적 요

B. thuringiensis serovar. *kurstaki*에서 유래한 살충독소

유전자가 포함된 7.3 Kb DNA 단편을 식물세포용 재조합 운반체인 pGA643의 BglII와 HpaI 부위에 재클로닝하여 *E. coli* S17-1 균주에서 형질발현을 했고, 클론이 생산한 살충단백질은 누에(*Bombyx mori*) 유충을 치사시켰다. 담배(*Nicotiana tabacum* L. var. *BY₄*) 엽육조직으로부터 원형질체를 형성하고, 캘러스를 유도한 다음에 식물체로 재생을 하는 것이 연구의 목적이었다. 원형질체의 형성률은 암소에서 20시간을 0.5% cellulase와 0.1% macerosin (pH 5.8)으로 처리했을 때에 ml 당 7×10^5 원형질체가 형성되어 가장 높게 나타났다. 담배 원형질체의 생존률은 auxin과 cytokinin 혼합 처리시 2mg/l NAA 와 1mg/l의 kinetin을 처리했을 때에 6일간 약 80%이상의 생존률을 나타냈다. 이와같은 배양조건 하에서 배양된 원형질체로부터 캘러스가 유도생성되었고, 캘러스에서 부터 완전한 식물체로의 분화가 일어났으며, 약 87일이 걸리었다. 여러번의 계대배양에서도 재생이 안전성이 있게 이루어졌다.

감 사

본 연구는 문교부 유전공학연구비(1989-1990)에 의해서 수행되었으며, 일부는 대우재단의 지원으로도 수행되었음

참 고 문 헌

1. M. Vaeck et al.(1987), *Nature* **328**: 33-37.
2. T. Y. Cheng and T. H. Voqui(1977), *Science*, **198**: 306-307.
3. G. C. Phillips and G. B. Collins(1979), *Crop Science*, **19**: 59-64.
4. D. P. Cummings, et al.(1976), *Crop Science*, **16**: 465-470.
5. L. Caffaro, et al.(1982), *Protoplasma*, **111**: 107-111.
6. J. P. Bourgin, et al.(1978), *Physiol. Plant.*, **45**: 288-292.
7. W. R. Scoweroft and P. J. Larkin(1980), *Aust. J. Plant Physiol.*, **7**: 635-644.
8. R. Gill, A. Rashid and S. C. Maheshwari,(1981), *Protoplasma*, **106**: 351-354.
9. J. S. Lee, et al.(1989), *Kor. J. Genetics*, **11**: 65-72.
10. H. N. Wood, et al.(1978), *Plant Physiol.*, **11**: 175-180.
11. N. Murai, et al.(1983), *Science*, **222**: 476-482.
12. L. D. Commai, et al.(1985), *Nature*, **317**: 741-744.
13. H. H. Lee, S. H. Hwang and Y. S. Park,(1990), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, **6**: 647-652.
14. J. B. Power, S. E. Cummins and E. C. Cocking,(1970), *Nature*, **225**: 1016-1018.
15. T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. p382.
16. R. W. Davis, D. Botstein and L. B. Roth,(1980), *Advanced bacteria Genetics*, Cold Spring Harbor, N. Y. p148.
17. E. Southern,(1975), *J. Mol. Biol.*, **98**: 503-510.
18. T. Murashige and F. Skoog(1962), *Plant Physiol.*, **15**: 473-497.
19. K. C. Sink and R. P. Niedz,(1982), *Proc. 5th Intl. Congress Plant Tissue and Cell Culture*, p.583-585.
20. H. Uchimiya and T. Murashige, (1976), *Plant Physiol.* **57**: 424-429.
21. J. H. McLinden, J. R. Sabourin, B. D. Clark, D. R. Gensler, W. E. Workman and D. H. Dean,(1985), *Appl. Environment. Microbiol.*, **50**: 623-630.
22. S. S. Oh, T. Y. Chung, R. M. Faust and H. C. Ryu, (1988). Res. Report. Agri. Sci. Inst. Korea, **30**: 61-67.
23. G. A. Held, L. A. Bullar, Jr., E. Ferrari, J. Hoch, A. I. Aronson and S. A. Manich,(1982), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **79**: 6065-6071.
24. Y. Meyer and R. Cooke(1979), *Planta*, **147**: 181-185.
25. J. F. Reynolds and T. Murashige(1979), *Plant cell lines*. In: W. B. Jacoby and I. H. Pastan(Editors), *Methods in Enzymology*, Vol. 58, Academic Press, New York, NY, p478-486.
26. S. B. Bawa and J. G. Torrey,(1971), *Bot. Gaz.*, **13**: 240-245.

(Received; September 4, Revised; October 10,
Accepted; November 7)