

Phosphinothricin Acetyltransferase 유전자 도입에 의한 제초제 저항성 감자의 선발*

한성수¹ · 정재훈¹ · 방극수² · 양덕춘³

Selection of Herbicide Resistant Potatoes Transformed with Phosphinothricin Acetyltransferase Gene*

Han, S.S.¹, J.H. Jeong¹, K.S. Bang² and D.C. Yang³

ABSTRACT

This experiment was conducted to introduce PAT (phosphinothricin acetyltransferase, non-selective herbicide bialaphos resistant gene) gene into potato (*Solanum tuberosum*. cv. Desiree). Optimal shoot regeneration from leaf discs and stem segments was obtained in MS medium supplemented with 0.1 mg/L IBA and 0.5 mg/L BA, and the frequency of shoot regeneration was 54% in leaf discs and 46% in stem segments. In this condition, leaf discs and stem segments of potato were co-cultivated with *A. tumefaciens* MP90 which contained binary vector with GUS::NPTII gene and PAT gene. Transgenic shoots were regenerated from leaf and stem-derived calli on selection medium with 100mg/L kanamycin. The 100 μM acetosyringone treatment during the co-cultivation highly enhanced(4 times than the control) the shoot regeneration on selection medium. When the putative transgenic plants were transferred to medium with 10mg/L basta, all of them were survived. After PCR, GUS test, and Southern blot analysis of the survived plant, we confirmed that the gene was stably integrated into the potato genome and expressed. After the transgenic plants were transplanted in soil, and the transgenic plants were sprayed with the herbicide basta (300ml/10a), the transgenic plants remained green but control plants were died.

Key words : *Agrobacterium tumefaciens* MP90, Basta, PAT(phosphinothricin acetyltransferase) gene, Potato, Transformation.

¹ 원광대학교 생명자원과학대학 Wonkwang University, Iksan, Chonbuk, 570-749.

² 이리 농공전문대학 원예학과 Iri National College of Agricultural and Technology, Iksan, Chonbuk, 579-749.

³ 한국인삼연구소연구원 유전생리부 Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taedok Science Town, Taedon, 305-345.

* 본 연구는 1996년도 원광대학교 교내연구비 지원에 의해 수행되었습니다. (1997. 10. 16 접수)

서 언

외부유용유전자를 작물에 도입하여 새로운 변이체를 창출한다는 것은 농업과 식물육종에 있어서 매우 중요한 작업이라 할 것이다. 또한 그것이 경제적, 산업적으로 중요한 작물인 경우에는 다른 어떠한 육종보다 더욱 실용적이고 효과적인 방법이다. 감자는 세계적으로 중요한 식품의 주요재료 중 하나이다. 그러나 감자의 생산에는 질병, 곤충, 그리고 잡초로 인한 몇가지 문제점들이 내재되어 있다. 특히, 포장에서의 작물재배시 가장 문제가 되는 것은 잡초로 인한 피해이다. 잡초는 작물생산량을 감소시키고 농작물 관리에 어려움을 줄 뿐만 아니라 병충해의 숙주으로써 작용하는 등 그 피해의 범위와 크기가 매우 넓고 크다¹⁾. 따라서 최근의 인건비 상승과 더불어 제초제사용이 날로 증가되고 있는데, 감자의 경우도 제초제를 1회 단독 처리하는 경우가 40%정도이며 손제초와 제초제사용을 병용하는 경우가 30% 정도에 이르고 있다²⁾. 현재에는 수많은 제초제가 잡초방제를 위해 개발되어 왔으며 이제는 거의 모든 잡초를 방제할 수 있게 되었다. 그러나 제초제의 토양잔류와 환경오염 문제, 그리고 새로운 제초제 개발의 어려움과 개발비용의 증가 등 제초제의 사용과 개발에는 많은 문제점이 있는 것이 사실이다. 따라서 기존의 유용한 제초제를 보다 효율적으로 사용해야 할 필요성이 증가하고 있다.

최근 분자생물학의 발달로 제초제에 저항성을 가진 다양한 유전자를 클로닝할 수 있게 되었고, 획득된 많은 유전자를 작물의 특성에 맞게 식물세포내로 도입하여 제초제 저항성 작물을 개발하려는 연구도 활발히 진행되고 있다^{3,16,21,22,23,27)}. 제초제 bialaphos는 L-glutamic acid 유사물질인 phosphinothricin에 2분자의 alanine이 첨가된 tripeptide로써 *Streptomyces* species에서 생산되며 L-phosphinothricin은 식물과 동물체내의 glutamine synthetase의 저해제로써 알려지고 있다³³⁾. 또한 약제 처리시 토양에 잔류되지 않고 자연상태에

서 급속히 분해되어 제초제로써 이상적인 특성을 가지고 있으나 비선택적 특성 때문에 사용에 제약을 받아왔다. 한편, *streptomyces hygroscopicus*에서 phosphinothricin acetyltransferase (PAT)라는 효소가 자체 독성물질인 bialaphos에 내성을 나타냄을 발견하여, 유전자를 클로닝 함으로써²⁹⁾ 현재 이 유전자를 이용한 형질전환 식물체를 개발하려는 연구가 많이 진행되고 있다^{8,12,17,32)}.

따라서 본 연구는 비선택적 제초제 즉 bialaphos를 원제로 하는 basta에 저항성을 나타내며 강하게 발현되는 유전자인 PAT gene을 중요한 식량자원인 감자에 도입시키고자 여러가지 식물생장조절제를 사용하여 재분화체제를 확립하고, *A. tumefaciens*을 이용한 형질전환을 시도하여 제초제 저항성 감자를 선발하였던 바 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

본 실험에서 사용된 식물재료는 MS¹⁹⁾기본배지에서 3주 동안 배양된 감자(*Solanum tuberosum* L.)의 잎과 줄기로써, 품종은 Desiree를 대상으로 하였다. 감자의 잎은 1cm² 정도를, 줄기는 axillary bud를 제거한 0.5-1cm 크기의 절편체를 사용하였다.

감자의 재분화를 위하여 MS 기본배지에 3%의 sucrose를 넣고, 식물생장조절제 IBA 0.1mg/L과 BA (0.25, 0.5, 1, 2mg/L), Kinetin (0.25, 0.5, 1, 2mg/L), Zeatin (0.25, 0.5, 1, 2mg/L)을 각각 농도별로 혼용처리하였으며, pH는 5.6으로 맞추었다. 살균은 121℃에서 15분간 하였으며 살균하기전에 agar를 0.8%되게 넣었다. 감자의 전생육조건은 광도 2,000 lux, 16간 광주기, 25℃의 조건에서 하였다.

1. 균주 및 형질전환

본 연구에 사용된 PAT(phosphinothricin acetyltransferase) gene은 CaMV 35S-35S promoter와 AMV leader sequence, GUS::NPTII gene, Nos terminator로 구성된 marker gene과 CaMV 35S-35S promoter와 AMV leader sequence, PAT gene,

Nos terminator로 구성된 재조합 저항성 유전자가 subcloning된 것으로 *Agrobacterium* host는 disarmed Ti-plasmid를 가진 MP90을 사용하였다. PAT gene을 함유하고 있는 *A. tumefaciens*의 배양은 single colony를 취하여 kanamycin 25mg/L, gentamycin 25mg/L이 첨가된 LB배지에 접종하고, 이것을 28°C shaking incubator에서 180rpm의 속도로 overnight 배양하였으며, 대수증식기 상태인 균농도(OD₆₀₀=0.8)가 되었을 때의 균을 형질전환에 사용하였다.

감자의 형질전환은 증식된 *Agrobacterium*을 감자의 절편체와 공동배양하는 방법으로 하였다. 공동배양은 먼저 배양한 균주를 3,000rpm으로 원심분리하여 상층액을 버리고 10mM MgCl₂에 희석시킨 후 다시 원심분리하여 MS액체배지에 동량으로 희석하였다. 여기에 감자의 잎과 줄기를 10분동안 침지하였으며 이를 멸균된 여과지에서 10분간 건조시켰다. 건조된 절편은 100 μM의 acetosyringone (3,5'-dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone)이 첨가된 공동배양배지 (MS+2,4-D 2mg/L)에서 3일간 배양한 후 kanamycin 100mg/L과 carbenicillin 500mg/L이 함유되어 있는 1차 재분화 선발배지(MS+IBA 0.1mg/L-BA 0.5mg/L)로 옮기고 3주간격으로 계대하여 shoot를 유도하였다. 유기된 shoot는 정단부위를 1cm 정도로 잘라 Basta 10mg/L가 첨가된 2차선발배지에 옮겨 선발하였다.

2. Polymerase Chain Reaction(PCR)

선발배지에서 선발된 감자 식물체로부터 genomic DNA를 Edwards 등¹⁹⁾의 방법에 따라 추출하였다. PCR(Perkin Elmer Cetus, Potodyne Incorporated)의 반응액은 (주)Bioneer의 Pre-mix를 사용하여 DNA 50ng, Primer 20pmol을 넣고 3차 멸균수로 total volume을 20μl로 맞추었으며, 반응 조건은 96°C에서 2분간 pre-denaturation한 후, 94°C에서 30초간 변성, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 2분간 증폭을 45회 반복시킨 후 72°C에서 15분간 post-extension 시키는 조건으로 하였다. 이때 사용한 primer는 NPTII 유전자와 PAT 유전자 각각의 양쪽 끝에 상보적

인 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3', 5'-ATCGGGAGCGGCGATACCGTA-3'와 5'-AGG-ACAGAGCCACAAACACC-3', 5'-ATGCTTGTA-TCCAGCTGCG-3'로서 각각 700bp와 357bp의 DNA가 합성된다. 합성된 DNA는 10μl를 취해 1.2% agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide용액에 넣어 염색하고 UV 조사로 밴드를 확인하였다.

3. β-Glucuronidase(GUS) 활성 실험

항생제 및 Basta선발배지에서 선발되었으며, PCR에 의해 NPT와 PAT band가 확인된 식물체의 잎과 줄기 그리고 뿌리절편체들을 취해 5-bromo-4-chloro-3-indole-β-glucuronidase(X-glc)용액에 침지시킨 후 37°C에서 12시간 동안 반응시킨 후 70% 알코올로 탈수를 하였으며¹⁵⁾, 대조구로는 *Agrobacterium*과 공동배양하지 않은 감자 절편체를 사용하였다.

4. Southern 분석

형질전환된 감자의 염색체안에 안정적으로 PAT 유전자가 삽입되었는지를 확인하기 위해 DIG으로 표지된 probe를 사용하여 southern blot 분석을 실행하였다. 감자의 genomic DNA는 Dellaporta DNA추출방법⁹⁾을 사용하여 분리하였으며, 15μg의 DNA를 EcoRI와 HindIII로 절단하여 0.8%의 agarose gel에서 전기영동하였다. 이를 nylon membrane에 transfer하고 DIG으로 표지된 PAT 유전자를 probe로 사용하여 southern blot을 실시하였다.

5. 포장실험

포장실험은 먼저 기내에서 계대한지 3주째된 식물체를 각 line별로 모래와 흙이 1:1로 섞인 모양에 이식하였으며, 약 4주간 생육시켰을 때 일정한 활착과 생육을 관찰할 수 있었으며 건강한 식물체를 얻을 수 있었다. 형질전환 식물체에 재조합 저항성 유전자인 PAT 유전자가 안정하게 도입되고 발현되는지를 확인하기 위해 일반 농가에서 사용하는 Basta액제 (주)경농)를 300mL/10a 농도로 형질전환체와 대

조식물체에 살포하여 그 생육을 관찰하였다.

결과 및 고찰

1. 식물체 재분화 및 형질전환

감자에서의 식물체 재분화 및 형질전환에는 주로 소피경 disk¹⁴⁾, leaf disk^{7,11,13,20)}, stem³⁰⁾, tuber disk^{24,28)}, 등을 이용하였는데, 본 실험에서는 Desiree 품종의 잎과 줄기를 식물체 절편으로 사용하였다. 재분화 조건을 찾기위해 각각 50개체씩의 잎과 줄기를 사용하였으며, 재분화율은 callus형성과 shoot 및 root형성을 조사하여 백분율로 나타내었다(Table 1).

Callus는 치상 후 약 10일 후부터 잎과 줄기의 절단면에서 형성되기 시작하였으며, 특히 줄기의 경우 절편체 전면에서 callus가 형성되었으며 약 75-100%의 callus 형성율을 보였다. Shoot 형성은 식물체 절편간에 차이를 보이지 않았으며, 생장조절제에 따라서는 IBA 0.1mg/L와 BA 0.5mg/L 조합처리에서 잎은 54%, 줄기는 46%의 재분화율을 보여 다른 처리구에 비해 8-30%정도 높은 재분화율을 보였다. 또한 shoot가 형성된 식물체는 대부분 뿌리를 형성하였다.

따라서 MS기본배지에 IBA 0.1mg/L와 BA 0.5mg/L를 조합처리한 배지를 재분화배지로 하였으며 Desiree 품종을 대상으로 형질전환을 시도하였다.

식물체의 형질전환방법 중에서 *Agrobacterium*을 이용하는 방법은 매우 안정적으로 외부 유전자를 식물체 염색체내로 삽입할 수 있다. 여기에는 많은 유전자의 작용이 관여하는데 특히 *Agrobacterium*이 식물체에 감염되어 Ti-plasmid의 T-DNA를 transfer하는데 중요하게 작용하는 vir(virulence)유전자의 발현은 세놀성 화합물인 acetosyringone에 의해 유도됨이 밝혀졌다^{4,6,15,26)}. 또한 대부분의 쌍자엽식물에는 acetosyringone이 분포되어 있으나 단자엽식물체에는 존재하지 않아 *Agrobacterium*의 기주특이성을 해석하는 요인으로 알려져 있다^{3,18,31)}. 따라서 공동배양시에 100 μ M의 acetosyringone을 첨가하여 이에 따른 형질전환율의 변화를 보았는데, 그 결과는 Fig. 2와 같다. 모두 80개씩의 잎과 줄기절편체를 가지고 공동배양을 실시한 결과 acetosyringone 무첨가 배지에서는 각각 5%, 2.5%의 형질전환율을 나타낸 반면 acetosyringone 처리에서는 19%와 10%의 형질전환율을 나타내 acetosyringone 무처리보다 처리구가 약 3-4배 정도의 높은 형

Table 1. The effect of plant growth regulator on the callus formation and plant regeneration in *Solanum tuberosum* L.

Treatments (mg/L)	Callus formation (%)		Shoot regeneration (%)		Root regeneration (%)		
	Leaf	Stem	Leaf	Stem	Leaf	Stem	
IBA 0.1 BA 0.25		44	32	36	30	36	
	BA 0.5	76	78	54	46	42	46
	BA 1	56	100	34	36	34	36
	BA 2	40	92	36	34	36	34
IBA 0.1 Kinetin 0.25		44	24	38	24	38	
	Kinetin 0.5	54	84	30	38	30	36
	Kinetin 1	48	88	28	32	26	30
	Kinetin 2	42	88	26	26	24	26
IBA 0.1 Zeatin 0.25		58	24	26	24	26	
	Zeatin 0.5	50	80	28	30	28	30
	Zeatin 1	40	90	34	36	32	36
	Zeatin 2	44	86	38	40	34	36

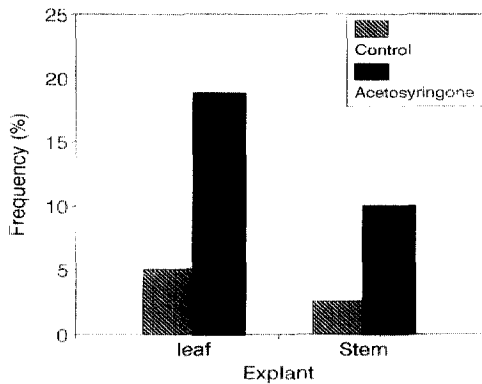


Fig. 1. Effect of acetosyringone(100 μ M) on the frequency of *Agrobacterium*-mediated transformation in potato.

질 전환율을 나타내었다(Fig. 1).

이는 *Arabidopsis thaliana*의 형질전환시 acetosyringone첨가에 의해 형질전환효율이 2-3%에서 55-63%로 증가하였다는 보고²⁵⁾와 일치하는 결과로써 acetosyringone이 감자의 형질전환효율 향상에도 효과적임을 알 수 있었다. 한편, 형질전환체는 kanamycin 100mg/L 농도로 선발을 시도하였으며, 균제거를 위해 carbencillin 500mg/L을 사용하였다. 선발매지에 절편체를 저장한 후 10여일 뒤부터 callus가 형성되었으며, 배양 6주부터 잎과 줄기에서 싹의 형성을 볼 수 있었다(Fig. 2-A,B,C,D). 배양기간 동안 3주마다 새로운 매지로 옮겨 주었으며, 배양 8주부터 줄기의 절편체에서 싹의 신장 및 뿌리의 분화가 이루어져 완전한 식물체로 재생됨을 볼 수 있었다(Fig. 2-E,F). 형질전환 식물체는 싹의 정단부위를 1cm 가량 절단해 Basta 10mg/L이 함유된 재분화매지에 옮겼을 때 정상적인 생육을 보였으며, 대조구는 7일만에 모두 고사되어 형질전환체와 구별할 수 있었다(Fig. 2-G,H). 또한 이렇게 선발된 형질전환체는 줄기절편을 이용하여 MS고체매지에서 대량배양이 가능하였다(Fig. 2-I,J). 한편, 형질전환체 선발과정에서 감자의 callus에서 유기된 shoot는 대부분 basta 선발매지에 살았으나, 직접 shoot가 유기된 경우에는 kanamycin 선발매지에서는 살아도, basta 선발매지에서는 고사되는 경우가 있는데, 이는

PAT gene이 감자의 genome내에 도입되지 않았거나 도입되었다 하더라도 강하게 발현되지 않은 결과라 사료된다. 따라서 감자의 형질전환 효율을 높이기 위해서는 acetosyringone을 첨가한 공동배양매지에서 공동배양 후 먼저 항생제에 저항성인 감자의 배발생 callus를 유기하고 여기에서 재분화시키는 조건을 확립하여야 할 것으로 사료된다.

2. 형질전환체의 특성검정

2차 선발매지에서 선발된 감자식물체 5개 line과 대조식물체로 공동배양하지 않은 감자조직을 사용하여 NPT와 PAT유전자가 도입되었는지를 PCR에 의해 조사하였다. 감자의 DNA를 추출하여 PCR 증폭을 수행한 결과 대조식물체에서는 NPT 및 PAT유전자의 증폭을 볼 수 없었으며, 형질전환체로 선발된 5개 line에서는 700bp 크기의 NPT유전자 밴드와 357bp 크기의 PAT유전자 밴드의 증폭을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 따라서 선발된 5개의 line은 *Agrobacterium*에 의해 식물체내로 유전자가 삽입되어 체조직 저항성 유전자에 의해서 형질전환 되었음을 확인할 수 있었다. 또한 형질전환체로 선발된 5개 line의 염색체수에 안정적으로 PAT 유전자가 삽입되어 있는지를 확인하기 위하여 DIG으로 표지된 PAT 유전자를 probe로 사용하여 souther blot을 실시한 결과 대조구에서는 특이 밴드가 나타나지 않았으나 형질전환체에서는 안정적으로 PAT 유전자가 도입되어 특이 밴드를 형성하였다(Fig. 4). 한편, 본 실험에 사용한 binary vector에는 GUS유전자가 NTPII 유전자와 함께 도입되어 있으므로 형질전환식물체에서 GUS유전자의 활성을 측정하기 위해 감자의 잎과 줄기 그리고 뿌리를 각각 X-gluc용액에 하루밤 침지시킨 후 70% EtOH에 탈수시켰다. 형질전환 감자는 먼저 뿌리의 정단부위부터 강한 청색을 나타냈으며, 줄기와 잎으로 점차 확산되었다(Fig. 5-A,C). 그러나 *Agrobacterium*과 공동배양하지 않은 감자식물체에서는 청색 반응이 일어나지 않았으며, 형질전환체와 구별할 수 있었다(Fig. 5-B,D).

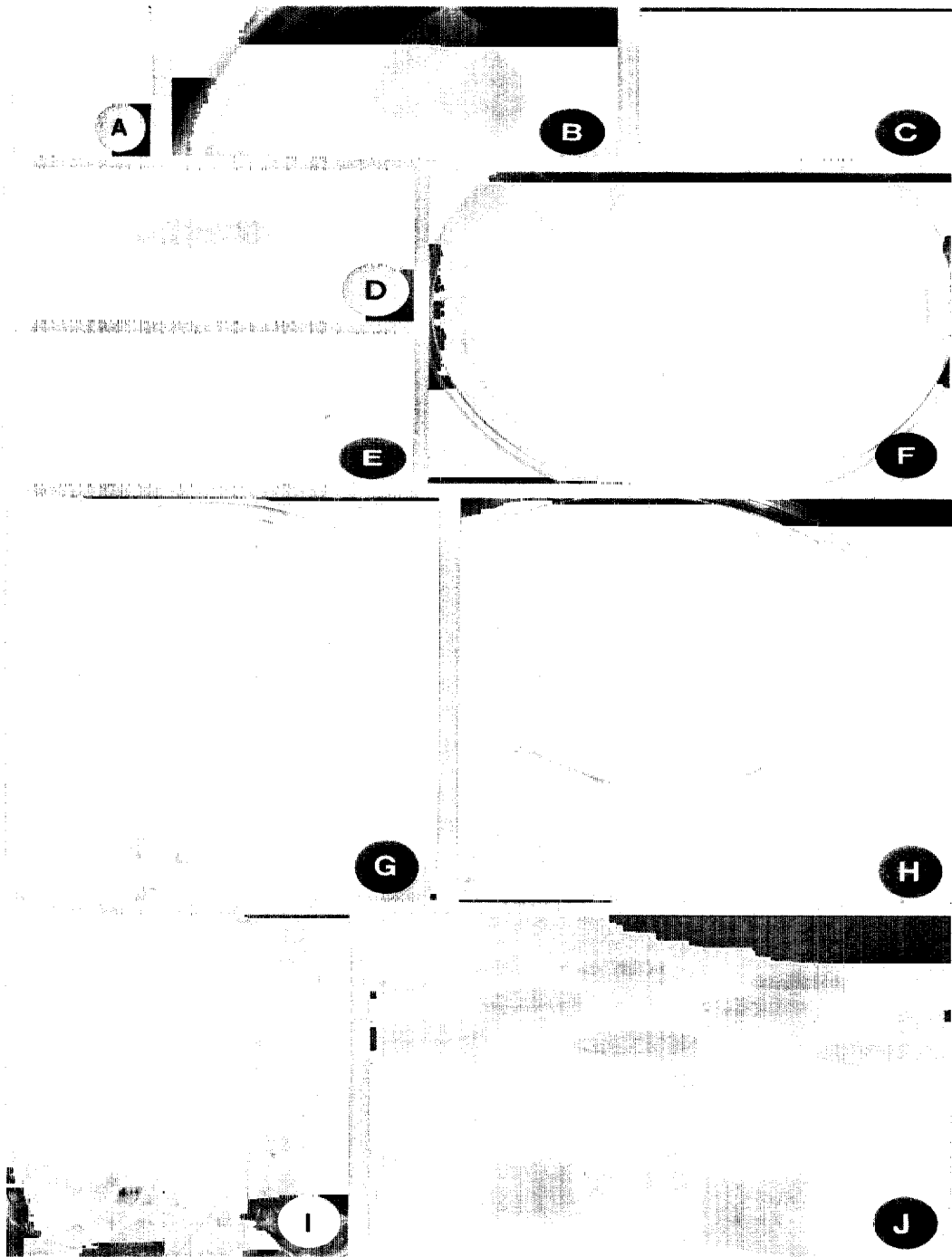


Fig. 2. Production of herbicide-resistant transformed plants of potato. A-C ; Callus formation from stem(A), and leaf(B,C) explants on selection medium with 100 mg/L kanamycin, D-E ; Shoot(D) and Root(E) formation from stem-derived callus formed on selection medium with 100 mg/L kanamycin, F ; Numerous plant formation from leaf-derived callus formed on selection medium with 100 mg/L kanamycin, G ; Non-transformed shoot dead on medium with 10mg/L Basta, H ; Transformed shoot survived on medium with 10mg/L Basta, I,J ; Propagation of transgenic potato plants by stem cutting.

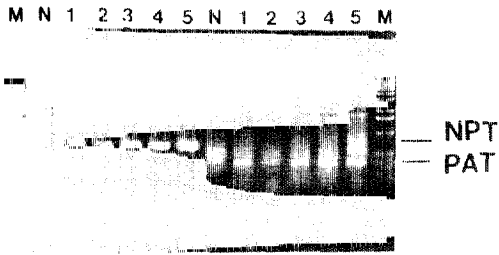


Fig. 3. PCR products of NPTII and PAT genes from transgenic potatoes. Lanes M : Marker, C : Normal potato, 1-5 : Transgenic potatoes.

C N 1 2 3 4 5

PAT →

Fig. 4. Southern blot analysis of transformed potato introduced PAT gene. Lanes C : Positive PAT plasmid, N : Normal potato, 1-5 : Transgenic potatoes.

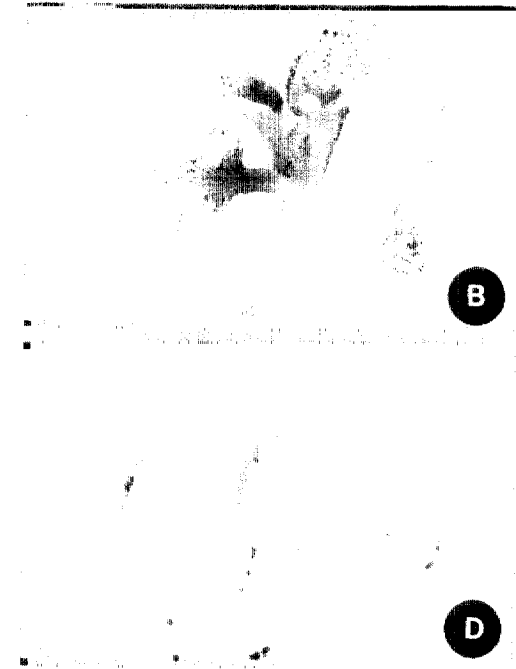
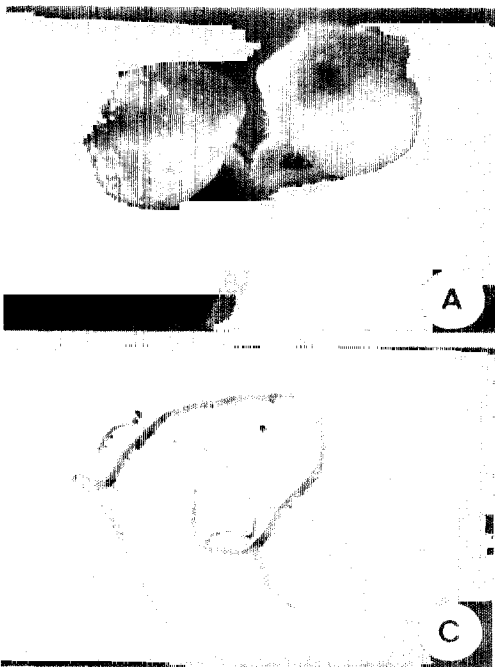


Fig. 5. Histochemical GUS test of transformed leaf (A) and root tip(C), or normal leaf(B) and root tip(D).

3. 포장실험

형질전환체로 확인된 식물체를 포장으로 이식한 후 대조구와 비교하여 생육을 관찰한 결과 모두 정상적인 생육을 하였으며, 이식한지 4주 정도가 경과되었을 때 뿌리가 안정적으로 활착되었다. 이때 실제 농가에서 사용되는 Basta 액제((주)진흥) 300ml/10a 농도를 식물체가 줄박 적색의 노릇을 띠고 있었는데, 대조구로 사용한 감자는 이식한후 2일이 경과되면지 검차 없이 잘리는 현상을 보였으며, 7일이 경과되면지 활착화 고사되었다(Fig. 6-A). 반면에 형질전환체는 이러한 피해를 받지 않고 양정히 생육하였다(Fig. 6-B).

따라서 농가에서 사용하는 Basta의 농도에 저분 실험에서 관찰한 감차 형질전환체는 성공적으로 감춘이 가능하도록 분 형질전환체는 농가에서 사용할 경우, 손쉽게 보조제를 살포함으로써 제초제에 소요되는 일천바의 감소와 비용이 한결 낮아 애망에 도움을 줄 것으로 사료된다.

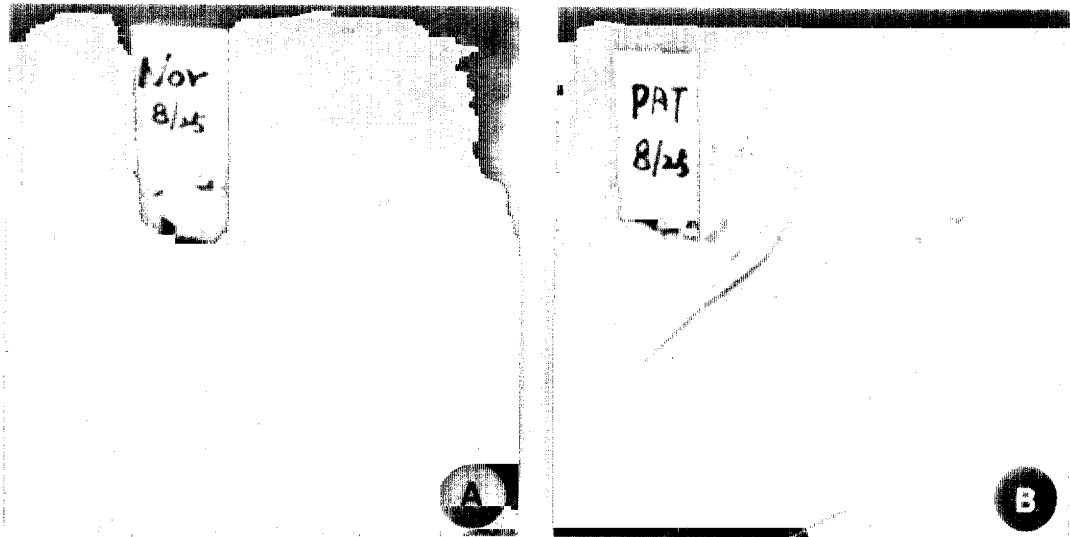


Fig. 6. Control(A) and transformed(B) potato plants after one week treatment with herbicide basta 300ml/10a in greenhouse.

요 약

비선택성 제초제 Bialaphos(basta)에 저항성인 PAT gene을 감자(*Solanum tuberosum*, cv. Desiree)에 도입하고자 본 실험을 실시하였다. 잎과 줄기 절편을 이용한 신초재분화의 최적조건은 MS배지에 IBA 0.1mg/L + BA 0.5mg/L 조합처리하였을 때 가장 양호하였으며 재분화율은 잎은 54%, 줄기는 46%이었다. 이 조건에서 감자의 잎과 줄기 절편을 GUS : NPTII gene과 PAT gene을 가진 binary vector를 함유한 *A. tumefaciens* MP90에 공동배양하였다. 공동배양시 acetosyringone 100 μ M을 첨가할 경우 형질전환율이 잎의 경우 19%, 줄기의 경우 10%로 무처리보다 약 4배가량 높았다. Kanamycin 100mg/L에서 캘러스가 형성된 후 이로부터 재생된 식물체를 약 6주후 Basta 10mg/L을 포함한 재분화배지에 옮겼을 경우 모두 생존하였다. 선발된 식물체의 형질전환여부를 조사하기 위해서 PCR, GUS반응 및 Southern blot를 실시한 결과 형질전환체에 도입된 유전자가 안정되게 삽입되어 발현됨을 확인하였다. 확인된 형질전환체는 포장에 이식하여 순화시켰으며, 4주 후 세초제를 살포한 결과 대조구로 사용할 감자는 모두 고

사되었으나, 형질전환체는 정상적인 생육을 보였다. 따라서 본 실험결과 PAT 유전자를 감자 식물체에 도입하여 감자 genome내에 안정되게 삽입되어 발현되는 제초제 저항성 감자를 선발할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. 한국농약공업협회 1993. 10월호. 농약 정보.
2. 한국농약공업협회 1993. 12월호. 농약 정보.
3. Ashby, A.M., M.D. Watson, G.J. Loake and C.H. Shaw. 1988. Ti plasmid-specified chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* C58 super (D) toward vir-inducing phenolic compounds and soluble factors from monocotyledonous and dicotyledonous plants. *J. Bacteriol.* 170 : 4181-4187.
4. Banta, L.M., R.D. Joerger, V.R. Howtitz, A.M. Campbell, and A.N. Binns. 1994. Glu-255 outside the predicted ChvE binding site in VirA is crucial for sugar enhancement of acetosyringone perception by *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 176 : 3242-3249.
5. Chaleff, R.S., and M.F. Parsons. 1978. Direct

- selection *in vitro* for herbicide-resistant mutants of *Nicotiana tabacum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75(10) : 5104-5107.
6. Chen, C.Y., and S.C. Winans. 1991. Controlled expression of the transcriptional activator gene *virG* in *Agrobacterium tumefaciens* by the *Escherichia coli* lac promoter. J. Bacteriol. 173 : 1139-1144.
 7. DeBlock M. 1988. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. Theor Appl Genet. 76 : 767-774.
 8. DeBlock, M., M. Bettermann, J. Vadewiele, C. Dockx, V. Thoen, N. Gossele and J. Leemans. 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. EMBO J. 6 : 2513-2518.
 9. Dellaorta et al. 1983. Short protocols in molecular Biology. 2nd edition. Plant Mol. Biol. Rep. 1(4) : 19. 2-9.2-10.
 10. Edwards, K., C. Johnson and C. Thompson. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Res. 19 : 1349.
 11. Filho E.S.F., L.F.A. Figueiredo and D.C. Monte-Neshech. 1994. Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) cv. Mantiqueira using *Agrobacterium tumefaciens* and evaluation of herbicide resistance. Plant Cell Reports. 13 : 666-670.
 12. Greef, W.D., R. Delon, M. De Block, J. Leemans and J. Botterman. 1989. Evaluation of herbicide resistance in transgenic crops under field conditions. Biotechnology 7 : 61-64.
 13. Higgins E.S., J.S. Hulme, and R. Shields. 1992. Early events in transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Science. 82 : 109-118.
 14. Ishida B.K., G.W. Snyder and W.R. Belknap. 1989. The use of *in vitro*-grown microtuber discs in *Agrobacterium*-mediated transformation of Russet Burbank and Lemhi Russet potatoes. Plant Cell Reports. 8 : 325-328.
 15. Jefferson, R.A., T.A., Kavanagh and M.W. Bevan. 1987. GUS fusion : β -glucuronidase as a sensitivity and versatile gene fusion marker in higher plant. EMBO J. 6 : 3901-3907
 16. Johal, G.S., and J.E. Rahe. 1988. Glyphosate, hypersensitivity and phytoalexin accumulation in the incompatible bean anthracnose host-parasite interaction. Physiological and Molecular Plant Pathology. 32 : 267-281.
 17. Kumada, Y., H. Anzai, E. Takano, T. Murakami, O. Hara, R. Itoh, S. Imai, A. Satoh and K. Nagaoka. 1988. The bialaphos resistance gene (*bar*) plays a role in both self-defense and bialaphos biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. J. Antibiotics. XLII(12) : 1838-1845.
 18. Messens, E., R. Dekeyser and S.E. Stachel. 1990. A nontransformable *Triticum monococcum* monocotyledonous culture produces the potent *Agrobacterium vir*-inducing compound ethyl ferulate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87 : 4368-4372.
 19. Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15 : 473-477
 20. Ooms G., M.M. Burrel, A. Karp, M. Bevan and J. Hille. 1987. Genetic transformation in two potato cultivars with T-DNA from disarmed *Agrobacterium*. Theor Appl Genet. 73 : 744-750.
 21. Oxroby, E., and M.A. Hughes. 1989. Breeding for herbicide resistance using molecular and cellular techniques. Euphytica. 40 : 173-180.
 22. Penaloza-Vazquez A., A. Oropeza, G.L. Mena and A.M. Bailey. 1995. Expression of the hygromycin B phosphotransferase gene confers tolerance to the herbicide glyphosate Plant Cell Reports. 14 : 482-487.
 23. Schulz, A., F. Wengenmayer and H.M. Good-

- man. 1990. Genetic Engineering of Herbicide Resistance in Higher Plants. *Plant Sciences*. 9(1) : 1-15.
24. Sheerman, S., and M.W. Bevin. 1988. A rapid transformation method for *Solanum tuberosum* using binary *Agrobacterium tumefaciens* vectors. *Plant Cell Reports*. 7 : 13-16.
 25. Sheikholeslam, S.N., and D.P. Weeks. 1987. Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 8 : 291-298.
 26. Shimoda, N., T. Yamamoto, J. Nafamine, S. Usami, M. Katayama, Y. Sakagami and Y. Machida. 1990. Control of expression of *Agrobacterium vir* genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87 : 6684-6688.
 27. Stalker, D.M., K.E. McBride and L.D. Malyj. 1988. Herbicide Resistance in Transgenic Plants Expressing a Bacterial Detoxification Gene. *Science*. 242 : 419-422.
 28. Stiekema, W.J., F. Heidekamp, J.D. Louwerse, H.A. Verhoeven and P. Dijkhuis. 1988. Introduction of foreign genes into potato cultivars Bintje and Desiree using an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector. *Plant Cell Reports*. 7 : 47-50.
 29. Thompson, C.J., N.R. Movva, R. Tizard, R. Crameri, J.E. Davies, M. Lauwereys and J. Botterman. 1987. Characterization of the Herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces Hygroscopicus*. *EMBO J.* 6 : 2519-2523.
 30. Twell O., and G. Ooms. 1987. The 5 flanking DNA of a patatin gene directs tuber specific expression of a chimeric gene in potato. *Plant Mol Biol.* 9 : 365-375.
 31. Usami, S., S. Morikawa, I. Takebe and Y. Machida. 1987. Absence in monocotyledonous plants of the diffusible plant factors inducing T-DNA circularization and *vir* gene expression in *Agrobacterium*. *Mol. Gen. Genet.* 209 : 221-226.
 32. Vasil, V., A.M. Castillo, M.E. Fromm and I.K. Vasil. 1992. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/technology*. 10 : 667-674.
 33. Wild, A. and C. Wendler. 1993. Inhibitory Action of Glufosinate on Photosynthesis. *Z. Naturforsch.* 48c : 369-373.