

*Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 bialaphos 저항성 형질전환 벼의 개발

이효연* · 이춘환¹ · 김호일² · 한원동³ · 최지은³ · 김진호 · 임용표⁴
순천대학교 농과대학, ¹부산대학교 분자생물학과, ²농촌진흥청 농업과학기술원 생물자원부,
³순천대학교 자연과학대학, ⁴충남대학교 농과대학

Development of Bialaphos-Resistant Transgenic Rice Using *Agrobacterium tumefaciens*

LEE, Hyo-Yeon* · LEE, Choon-Hwan¹ · KIM, Ho-Il² · HAN, Won-Dong³
CHOI, Ji-Eun³ · KIM, Jin-Ho · LIM, Yong-Pyo⁴

College of Agriculture, Sunchon National University, Sunchon, 540-742, Korea:

¹Department of Molecular Biology, Pusan National University, Pusan, 609-745, Korea:

²Cytogenetics Division, National Agricultural Science and Technology Institute, RDA, Suwon, 441-707, Korea:

³College of Natural Science, Sunchon National University, Sunchon, 540-742, Korea: and

⁴College of Agriculture, Chungnam National University, Taejeon, 305-764, Korea. *Corresponding author

The bialaphos is a potent inhibitor of glutamine synthase in higher plants and is used as a non-selective herbicide. We have used the bialaphos resistant gene (Bar) encoding for an acetyltransferase isolated from *Streptomyces hygroscopicus* SF1293. Callus derived from mature seeds of rice (*Oryza sativa* L. cv. Dong Jin) were co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 carrying a plasmid pGPTV-HB containing genes for hygromycin resistance (HygR) and Bar. Transgenic plants showing in vitro resistance to 50 mg/L hygromycin and 10 mg/L bialaphos were obtained by using a two-step selection/regeneration procedure. Transformation efficiency of rice was about 30% which was as high as reported in other dicotyledons. Progenies (T₁ generation) derived from primary transformant of 17 lines were segregated with a 3 resistant : 1 sensitive ratio in medium containing hygromycin and bialaphos. Stable integration of Bar gene into chromosomal DNA was proven by Southern blot analysis of genomic DNA isolated from T₂ progenies. Transgenic plants (T₃) grown in the field were resistant to bialaphos (Basta) at a dosage lethal to wild type plants.

Key words: *Agrobacterium*, bar gene, herbicide resistance, transgenic rice

농업상 유용형질의 유전자를 미생물 또는 식물로부터 탐색하여 분자생물학 수준에서 동정하려는 연구가 국내외로 활발히 진행되고 있다. 또한 목적하는 유전자가 cloning되면 대상식물을 선정하여 형질전환 식물체를 만든 후에 도입된 외부 유전자가 식물체에서 정상적으로 발현하는가를 조사하는 연구도 동시에 진행되고 있다. 지금 까지 외부유전자를 식물에 도입하는데 있어서 비교적 재현성이 높고, 도입된 유전자의 유전형질이 안정적으로 다음세대에 전달되는

방법으로 *Agrobacterium* 감염법을 예로 들 수 있다. 병원균으로서의 *Agrobacterium* 숙주범위는 주로 쌍자엽 식물이기 때문에 일부 예외적인 식물종을 제외한 단자엽 식물에서는 이 형질전환법을 적용할 수 없는 것으로 알려져 왔다. 따라서 주요 곡류작물인 벼, 보리, 옥수수 등의 단자엽 식물에는 electroporation법 또는 particle gun법을 주로 이용하여 왔다. 그러나 최근 쌍자엽 식물에 적용하여 왔던 *Agrobacterium*법을 일부 개량하므로써 벼(Chan et al., 1993; Hiei et al.,

1994: Rashid et al., 1996), 옥수수(Gould et al., 1991: Shen et al., 1993) 등의 단자엽 식물에 항생제 저항성 유전자를 도입하여 형질전환 식물을 만들어 내고 있으나 아직까지 쌍자엽 식물에 비하면 식물의 종 및 품종에 한계가 있다. 그러므로 단자엽 식물에 대한 기존의 형질전환법을 보다 개량하여 유용한 외부 유전자를 여러종의 단자엽 식물에 도입할 필요가 있다.

본 연구는 토양 미생물인 *Streptomyces hygroscopicus* SF1239로부터 cloning된 bialaphos 저항성 유전자(Bar gene: Murakami et al., 1986; Thompson et al., 1987; Kumada et al., 1988)를 *Agrobacterium*법을 이용하여 국내에서 재배되는 벼 품종에 도입하고, 형질 전환된 식물체가 비선택성 제초제인 bialaphos에 대하여 저항성을 갖는지를 조사함과 동시에 그 식물의 유전적 특성을 조사하는데 목적이 있다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에 사용된 벼(*Oryza sativa* L.)는 우리나라 남부지방에서 많이 재배되고 있는 동진을 이용하였다.

Table 1. Media used for tissue culture and transformation of rice (*Oryza sativa* L.)

Medium	Composition
N6 callus induction	N6 salts and vitamins, 30 g/L sucrose, 2 mg/L 2,4-D, 2 g/L gelrite, pH 5.8
AB	3 g/L K ₂ HPO ₄ , 1 g/L NaH ₂ PO ₄ , 1 g/L NH ₄ Cl, 0.3 g/L MgSO ₄ · 7H ₂ O, 0.15 g/L KCl, 0.01 g/L CaCl ₂ , 2.5 mg/L FeSO ₄ · 7H ₂ O, 5 g/L glucose, 15 g/L agar, pH 7.2
YEP	10 g/L Bacto peptone, 10 g/L Bacto yeast extract, 5 g/L NaCl, 15 g/L agar, pH 7.2
N6 co-culture	N6 salts and vitamins, 30 g/L sucrose, 10 g/L glucose, 2 mg/L 2,4-D, 30 mg/L acetosyringone, pH 5.2
N6 selection	N6 salts and vitamins, 30 g/L sucrose, 2 mg/L 2,4-D, 2 g/L gelrite, 500 mg/L carbenicillin, 50 mg/L hygromycin, pH 5.8
AA suspension	AA salts and amino acids, B5 vitamins, 20 g/L sucrose, 2 mg/L 2,4-D, 0.2 mg/L kinetin, 30 mg/L acetosyringone, pH 5.8
MS regeneration	MS salts and vitamins, 30 g/L sucrose, 30 g/L sorbitol, 2 g/L casamino acids, 1 mg/L NAA, 3 g/L Bacto yeast extract, 2 mg/L BAP, 100 mg/L carbenicillin, 10 mg/L bialaphos, pH 5.8
MS hormone free	MS salts and vitamins, 30 g/L sucrose, 50mg/L hygromycin, 10 mg/L bialaphos, pH 5.8

Callus의 유도 및 전 배양

완숙종자의 종피를 제거하고 70% 에칠알코올에 1분 동안 침적한 후 2% sodium hypochloride 용액(200 μL의 Tween 20 첨가)에 15분 동안 교반하면서 표면 살균하였다. 표면 살균된 종자를 멸균수로 3회 세척하고 N6(Chu et al., 1975) callus 유도배지(Table 1)에 종자를 치상하였다. 25°C, 3000 lux의 연속광 조건에서 7-10일간 배양하여 callus를 유도하였다. 완숙종자의 배유와 자엽부분을 핀셋으로 제거하고 callus부분만을 채취하여 상기와 동일한 callus유도배지에 치상하였다. 치상시 갈변되었거나 점성물질이 붙어 있는 callus는 제거하고 3일간 25°C의 암배양 조건에서 전 배양하였다.

형질전환 vector 및 *Agrobacterium* 배양

형질전환에 사용된 vector는 binary vector인 pGPTV-HB (Figure 2A)로서 T-DNA 내부에 hygromycin phosphotransferase (HygR)과 phosphinothricin acetyl transferase (Bar) 유전자를 포함하고 있으며 T-DNA 외부에 spectinomycin 저항성 유전자를 갖고 있다. pGPTV-HB는 pGPTV-HPT (Detlef et al., 1992)의 nopaline 합성 promoter와 reporter 유전자인 β-glucuronidase (gus) 부위를 제거하고 그곳에 ubiquitin promoter (ubi-P)와 Bar 유전자를 치환하여 만들었다. pGPTV-HB의 증식은 *E. coli* HB101을 숙주로 이용하였으며 plasmid DNA의 추출은 Birnboim과 Doli(1979)의 방법을 이용하였다. 추출된 pGPTV-HB는 freezing-thawing방법을 이용하여 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 (염색체 DNA내에 kanamycin 저항성 유전자를 갖고 있음)에 형질전환 시켰다. 따라서 형질전환된 *Agrobacterium*은 hygromycin (50 mg/L), spectinomycin (100 mg/L), kanamycin (100 mg/L)의 3종류 항생제가 포함된 YEP 고체배지(Table 1)에서 증식하였다. 형질전환된 균주는 상기와 동일한 농도의 YEP 액체배지에서 배양을 한 후 그 이상 계대배양은 하지 않고 glycerol 원액과 1 : 1로 혼합하여 -80°C에 보존하였다. glycerol에 저장된 *Agrobacterium*을 상기와 동일한 농도의 항생물질이 포함된 AB고형배지(Table 1)에 streaking하고 28°C에서 3일간 암배양하였다.

Agrobacterium 감염

AB 고형배지에서 증식된 *Agrobacterium*을 멸균된 약스프로 회수하여 Acetosyringone (3,5-dimethoxy-4-hydroxyacetophenone, Aldrich)이 포함된 AA (Toriyama and Hinata, 1985) 액체배제(Table 1)에 희석(10⁷ cell/L)한 후 전 배양된 callus를 3-5분 정도 침적시켰다. 접종된 callus는 멸균된 여과지로 여분의 수분을 제거한 후, N6 co-culture배지

(Table 1)위에 멸균된 여과지를 한 장 깔고 그 위에 callus를 치상하였다. 사례 1개당 10개 정도의 callus를 치상하였고, 3일간 28°C의 암조건에서 *Agrobacterium*과 공동배양하였다.

Agrobacterium 제거 및 형질전환 callus의 선발

3일간 공동배양된 callus로부터 *Agrobacterium*을 제거하기 위하여 500 mg/L의 carbenicillin(주사용 슈도펜, 종근당)이 포함된 멸균수에 callus를 3회 세척하고, N6 selection 배지(Table 1)에 치상하였다. 25°C, 3000 lux의 광조건에서 30일 정도 배양하여 증식된 callus만을 선발하였다.

형질전환 식물체의 선발

선발배지에서 증식된 callus를 bialaphos 10 mg/L이 포함된 MS(Murashige and skoog, 1962) 재분화배지(Table 1)에 치상하고, 재분화 배지로부터 분화된 식물체를 생장조절물질이 첨가되지 않은 MS 배지(10 mg/L, bialaphos와 50 mg/L, hygromycin의 첨가)에 이식하여 뿌리를 유도하였다. 상기의 배양은 25°C, 3000 lux의 연속광 조건에서 행하여 졌다.

T₁ 세대의 hygromycin과 bialaphos 저항성 검증

Hygromycin과 bialaphos가 포함된 배지에서 shoot와 root가 정상적으로 생육한 개체만을 선발하여 순화시킨 뒤 1개의 pot당 형질전환 식물체를 3주씩 이식하고 온실에서 재배 관리하였다. 3반복 실험으로부터 얻어진 형질전환 식물체 중에서 외형적으로 정상적인 생육 과정을 거친 21개체의 식물체로부터 각각 채종한 종자(T₁)를 이용하여 hygromycin과 bialaphos 저항성 검증에 사용하였다. callus 유도시와 동일한 방법으로 종자를 표면 살균한 후에 hygromycin (50 mg/L)과 bialaphos (10 mg/L)를 첨가한 MS 배지에 종자를 치상하였다. 배양은 25°C, 3000 lux의 연속광 조건에서 행하여 졌으며, 저항성 검증은 파종 2주 후에 줄기와 뿌리의 신장을 관찰하여 조사하였다.

Southern-blot 분석

T₂ 세대의 형질전환 식물체와 wild type 벼의 염색조각 500 mg을 채취하여 액체질소로 분쇄시킨 후, 10배양의 isolation buffer[10% polyethylene glycol 6000, 0.35 M sorbitol, 0.1 M Tris-HCl (pH8.0), 0.5% spermidine, 0.5% spermine, 0.5% β -mercaptoethanol]를 넣고 교반하고 원심분리(15,000 rpm, 10분)하여 침전물을 얻었다. 이 침전물에 5배양의 lysis buffer (0.35 M sorbitol, 0.1 M Tris-HCl, 0.5% spermidine,

0.5% spermine, 0.5% β -mercaptoethanol)와 1/10배양의 10% sarcosine을 첨가하고 25°C에서 10분간 반응시킨 후 2배양의 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 용액을 넣고, 65°C에서 10분간 반응시켰다. 여기에 같은 양의 chloroform 용액을 첨가한 후 원심분리(25°C, 15,000 rpm, 10분)하여 상층액을 얻어냈고, isopropanol과 ethanol 처리 과정을 거쳐서 DNA를 추출하였다. DNA 10 μ g을 *Bam*HI 과 *Eco*RI 로 2중 소화하여 전기영동에 의해 0.8% agrose gel에 분획한 후 nylon membrane에 전사시켰다. Hybridization은 Southern (1975) 방법에 따라 행하여졌다. probe 작제를 위한 약 1kb의 Bar 단편(3' nos terminator 포함)은 pGPTV-HB plasmid DNA를 제한효소 *Bam*HI 과 *Eco*RI 로 처리하여 얻었으며, 그 단편은 ECL-labelling kit (Amersham社, England)의 방법에 준하여 labeling 및 검출하였다.

포장상태에서 제초제 저항성 검증

T₁, T₂ 세대의 식물 중에서 외형적으로 정상적이며 hygromycin과 bialaphos에 대하여 저항성 형질이 우성으로 분리되는 개체만을 자식하여 얻은 종자(T₃)를 실험재료로 이용하였다. 30°C의 항온기에서 수분을 흡수·발아시킨 종자를 모판에 파종하여 30일간 유묘를 육성하고 가로 세로 20 cm의 간격을 두고 논에 정식 하였다. 제초제는 벼의 止葉이 나오는 시기에 처리하였다. 제초제로는 시판되고 있는 비선택성 제초제인 바스타(유효성분 20%, 경농)를 3 g/L의 농도로 살포하였다.

결과 및 고찰

Hygromycin 저항성 callus의 선발

Agrobacterium EHA101 내에 binary vector인 pGPTV-HB를 형질전환 시킨 균주와 전 배양된 동진 벼의 callus (Figure 1A)를 3일간 공동배양하고, 50 mg/L의 hygromycin이 포함된 N6 선발배지에서 30일간 배양한 결과는 다음과 같다. 기존에 치상된 callus의 일부 세포로부터 새로운 callus의 증식이 관찰(Figure 1B)되었으며, 저항성 callus의 출현 정도는 치상된 callus의 대부분에서 관찰되었다(Table 2). 저항성 callus의 출현 과정을 살펴보면 배양초기에 N6 선발배지에서 대부분 증식이 억제되고 갈변화하는 현상을 보이다가 배양 2주 후부터 갈변된 callus의 일부 세포에서 흰색의 callus가 출현하면서 점차 빠른 속도로 증식되어 가는 특징을 갖고 있었다.

Bialaphos 저항성 shoot 및 root의 유도

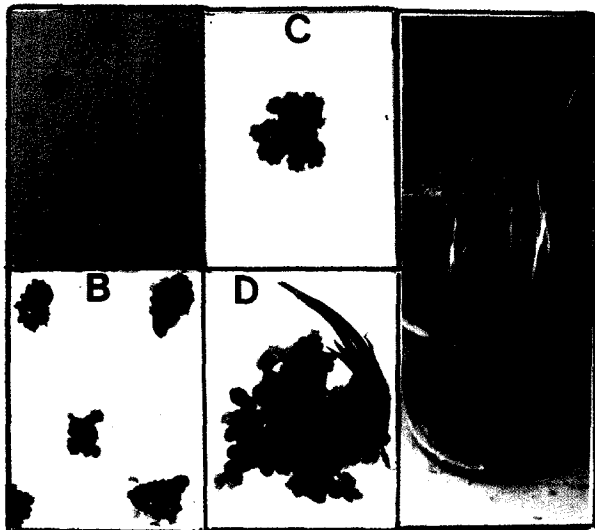


Figure 1. Production of transgenic rice plants in rice (cv. Dong Jin). (A) One-week-old scutellum derived calli used for co-cultivation with *Agrobacterium*. (B) Hygromycin-resistant cells proliferated on hygromycin-containing medium 30 days after selection. (C) Green spot calli formed from regeneration medium containing bialaphos after 3 weeks of culture. (D) Shoot formed from regeneration medium containing bialaphos after 5 weeks of culture. (E) Transgenic plants grown in pot cultivated for 5 weeks.

Table 2. Transformation efficiency (T.F.) by *Agrobacterium* EHA101 (pGPTV-HB) in rice cultivar Dong Jin.

Experiment	Number of scutellum-derived calli				T.F. (%)
	Co-cultivated calli (A)	Produced HygR ^a calli	Produced BarR ^b plants	Produced HygR and BarR plants (B/A)	
1	80	68	25	23	28.7
2	80	73	32	30	37.5
3	80	75	30	29	36.2

a Hygromycin resistant; b Bialaphos resistant

Hygromycin이 포함된 N6 선발배지에서 증식된 callus만을 선발하여 bialaphos 10 mg/L이 포함된 MS 재분화 배지에 치상한 결과는 다음과 같다. 배양 3주 후부터 callus에 녹색의 반점(Figure 1C)이 보이기 시작하다가 배양 5주경부터는 shoot의 분화가 외형적으로 관찰되었다(Figure 1D). 식물체의 재분화율은 저항성 callus로부터 약40%정도의 빈도로 나타났다(Table 2). shoot의 길이가 약 3 cm정도 되었을 때 hygromycin과 bialaphos가 첨가된 MS 배지에 shoot를 치상하고 발근을 유도한 결과 90%이상 뿌리의 성장과 동시에 shoot의 신장이 관찰되었다(Table 2). 배양 10주 후에는 pot에 이식할 수 있는 크기로 성장하였다(Figure 1E).

T₁ 세대의 식물체로부터 hygromycin과 bialaphos 저항성 검증

21개체의 식물체로부터 각각 채종한 종자(T₁)를 이용하여

hygromycin과 bialaphos 저항성 유전자의 분리비를 조사한 결과, 17개체에서는 hygromycin과 bialaphos에 대한 저항성 유전형질이 3 : 1로 분리되었고, 그 외 4개체는 저항성 형질이 멘델의 유전법칙과 다르게 분리되었다.

Southern-blot 분석

hygromycin과 bialaphos에 대하여 우성 유전자로 판정된 T₂ 세대의 형질전환 식물체 2개체와 wild type 벼 1개체의엽육조직의 DNA를 Bar probe를 이용하여 Southern 분석을 실시한 결과 wild type의 식물체에서는 band의 검출을 볼 수 없었으나 형질전환 식물체의 경우 약 1.0 kb의 band가 2 식물체에서 모두 검출되었다(Figure 2B)

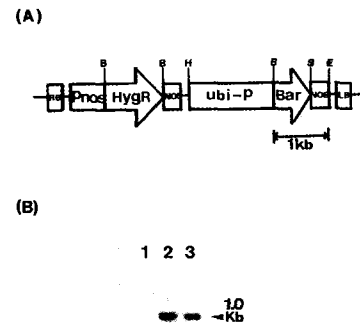


Figure 2. Transformation vector and Southern blot analysis. (A) Schematic diagrams of the pGPTV-HB binary vector. pGPTV-HB carrying Bar gene containing promoter (ubi-P), and the fragment replaced the promoter and β -glucuronidase gene with same restriction sites on the plant vector pGPTV. Pnos, promoter of nopaline synthase; HygR, gene for hygromycin phosphotransferase; NOS, terminator of nopaline synthase; ubi-P, polyubiquitin gene promoter of maize; Bar, gene for phosphinothricin acetyl transferase. B, *Bam*HI; H, *Hind*III; S, *Sac*I; E, *Eco*RI. (B) Southern blot analysis of two transgenic plants of Dong Jin (lanes 2-3) and an wild type plant (lane 1). An arrow indicates the expected band of 1.0 kb.

포장상태에서 제초제 저항성 검증

T₃ 세대의 형질전환 식물체와 wild type의 식물체를 포장 상태에서 비선택성 제초제인 바스타를 살포하고 3주 후에 관찰한 결과는 Figure 3에서 보여주는 바와 같이 wild type의 동진벼와 잡초는 모두 고사하였지만 형질전환 식물체는 외형적으로 아무런 피해를 받지 않고 정상적으로 성장하였다. 또한 제초제가 살포된 형질전환 식물체는 개화 및 종자의 채종에도 별다른 문제가 없었다. 이러한 결과는 Bar유전자의 유전형질이 단자엽 식물인 벼에 있어서도 정상적으로 발현되는 것을 보여준 것이다.

이상의 결과를 종합해보면 단자엽 식물인 벼에 있어서도



Figure 3. Growth inhibiting effect of bialaphos in wild type and bialaphos resistant rice plants. Transgenic and wild type plants were sprayed with Basta of about 3 g/L per 1.8m². Transgenic plants (A) survived bialaphos spraying and grew to maturity while the control plants (B) stopped growing and died. The photograph shows plant 3 weeks after spraying.

Agrobacterium 감염법을 이용하여 쌍자엽 식물과 동일하게 미생물로부터 cloning된 Bar 유전자를 도입할 수 있다는 것을 보여준 것이다. 본 연구에 있어서 30%정도(Table 2)의 높은 형질전환율을 보이는데 있어서 몇 가지 실험적인 기술이 필요하였다. 첫째로 *Agrobacterium* 감염에 사용할 callus는 배지에 치상 후 2주 이내에 종자에서 유도된 것을 이용하는 것이 형질전환 및 재분화에 유리하였고, 두 번째로 *Agrobacterium*과 공동배양시 acetosyringone의 첨가는 Hiei (1994) 등의 결과와 동일하게 형질전환에 많은 영향을 주었다. 세 번째로 형질전환 callus의 선발배지와 형질전환 식물체의 유도배지에 hygromycin과 bialaphos를 동시에 첨가한 것에 비하여 각각 분리해서 첨가함으로써 저항성 callus의 선발 및 형질전환 식물체의 유도에 효과적이었다(결과 미 제시). 이러한 이유는 *Agrobacterium*과 공동배양시킨 초기의 callus 및 식물체 재분화에 있어서 두 종류의 약제에 대한 선발압이 강하게 작용하여 일어나는 것으로 추측되나 아직까지 구체적인 증거는 없다.

지금까지 제초제 저항성 유전자가 도입된 식물은 담배(Anzai et al., 1990; Lee et al., 1994), 양배추(Christey et al., 1991), 감자(Choi et al., 1996), 페츄니아(Shan et al., 1986; Acom et al., 1996), 옥수수(Fromm et al., 1990; Spencer et al., 1990), 벼(Toki et al., 1992) 등의 식물에서 보고되었다. 이와 같이 제초제 저항성 식물의 개발은 학문적인 측면 이외에도 농업 생산성 향상을 증대시키는데 있어서도 대단히 중요한 의미를 갖고 있다. 최근 농촌의 노령화 및 노동력 감소로 인하여 제초제에 의한 잡초의 방제는 필수 불가결한 작업이 되었다. 현재 작물의 생육 기간 중에는 선택성 제초제가 일반적으로 널리 사용되나 선택성 제초제로는 쌍자엽, 단자엽의 모든 잡초를 제거하기에 불가능하다. 그러므로 비선택성 제초제의 사용이 요구되나 작물의 생육기간 중에는 잡초뿐만 아니라 재배작물에도 피해를 주기 때문에

현실적으로 사용이 불가능하다. 이러한 문제를 해결하는 방법으로 재배작물에 비선택성 제초제 저항성 유전자를 도입하는 것이 바람직한 방법이라고 생각된다. 본 연구에서 개발된 bialaphos 저항성 벼는 포장실험에서도 비선택 제초제인 바스타에 대해서 강한 저항성을 보여주었기 때문에 벼의 생육기간중에 제초작업이 가능하고, 또한 벼의 직파재배시에 가장 문제가 되고 있는 잡초 방제에 충분히 이용될 수 있으리라 기대된다.

사사 - 본 논문은 한국과학재단의 특정기초 연구과제(96-0402-04-01-3) 및 농림수산 특정 연구개발(296034-5) 사업비 지원으로 수행된 결과임.

적 요

비선택성 제초제인 bialaphos는 고등식물에 있어서 glutamine 합성을 억제하여 식물체를 고사시킨다. Acetyltransferase에 의해 encoding된 bialaphos 저항성 유전자는 세균 *Streptomyces hygroscopicus* SF1239로부터 cloning된 것을 사용하였다. Bialaphos 저항성 유전자를 *Agrobacterium* 감염법을 이용하여 국내에서 재배되는 벼(동진)에 도입한 결과 약 30%정도의 형질전환 식물체를 얻을 수 있었다. T₁ 세대의 17개체는 hygromycin과 bialaphos에 대한 저항성 유전형질이 3 : 1로 분리되었다. 또한 Southern 분석을 실시한 결과 wild type의 식물체에서는 Bar 유전자의 검출을 볼 수 없었으나 형질전환 식물체의 경우 Bar 유전자의 검출이 가능하였다. T₃ 세대의 형질전환 식물체와 wild type의 식물체를 포장상태에서 비선택성 제초제인 바스타를 살포하고 3주 후에 관찰한 결과 형질전환 식물체는 외형적으로 아무런 피해를 받지 않고 정상적으로 성장하였으나, wild type의 식물체와 잡초는 모두 고사하였다. 이상의 결과를 종합해보면 hygromycin과 bialaphos 저항성 유전자는 *Agrobacterium* 감염법을 이용하여 단자엽 식물인 벼에 도입할 수 있다는 것을 보여준 것이며, 또한 bialaphos 저항성 유전자가 식물에 도입됨으로써 비선택성 제초제에 대한 저항성 식물을 개발할 수 있다는 것을 보여 주었다.

인용문헌

- Acom SI, Park SK, Lim YP, Lee CH, Kim HJ, Kim HR, Lee HY (1996) Development of bialaphos-resistant *Petunia hybrida* by introduction of the bar gene using *Agrobacterium tumefaciens*. Korean J Plant Tissue Culture 23:177-181
- Anzai H, Yoneyama k, Yamaguchi I (1990) Transgenic tobacco resistant to abacterial disease by the detoxification of a pathogenic toxin. Mol Gen Genet 219:492-494

- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alk a line procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523
- Chan MT, Chang HH, Ho SL, Tong WF, Yu SM (1993) *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric α -amylase promoter/ β -glucuronidase gene. *Plant Mol Biol* 22:491-506
- Choi KH, Jeon JH, Kim HS, Joung YH, Cho SJ, Lim YP, Joung H (1996) Development of herbicide-resistant transgenic potato. *Korean J Plant Tissue Culture* 23:161-165
- Christey MC, Makaroff CA, Earle ED (1991) Atrazine-resistant cytoplasmic male-sterile-nigra broccoli obtained by protoplast fusion between cytoplasmic male-sterile *Brassica oleracea* and atrazine-resistant *Brassica campestris*. *Theor Appl Genet* 83:201-208
- Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY, Bi FY (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sin* 18:659-668
- Detlef B, Elke K, Jeff S, Robert M (1992) New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol Biol* 20:1195-1197
- Fromm ME, Morrish F, Armstrong C, Williams R, Thomas J, Klein TM (1990) Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio/Technology* 8:833-839
- Gould J, Devery M, Hasegawa O, Ulian EC, Peterson G, Smith RH (1991) Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. *Plant Physiol* 95:426-434
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal* 6:271-282
- Kumada Y, Anzai H, Takano E, Murakami T, Hara O, Itoh R, Imai S, Satoh A, Nagaoka K (1988) The bialaphos resistance gene (bar) plays a role in both self-defense and bialaphos production in *Streptomyces hygrosopicus*. *Antibiot* 41:1838-1845
- Lee HY, Nou IS, Kim JH, Liu JR, Lee JS, Kim HJ, Kameya T (1994) Development of bialaphos resistant transgenic tobacco plants by pollination and utilization of fertilization cycle. *Korean J Plant Tissue Culture* 21:99-103
- Murakami T, Anzai H, Imai S, Satoh A, Nagaoka K, Thompson CJ (1986) The bialaphos biosynthetic gene of *Streptomyces hygrosopicus*: Molecular cloning and characterization of the gene cluster. *Mol Gen Genet* 205:42-50
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Rashid H, Yokoi S, Toriyama K, Hinata K (1996) Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in Indica rice. *Plant Cell Report* 15:727-730
- Shan DM, Horsch RB, Klee HJ, Kishore GM, Winter JA, Tumer NE, Hironaka CM, Sanders PR, Gasser SC, Aykent S, Seigel NR, Rogers SG, Fraley RT (1986) Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science* 233:479-481
- Shen WH, Escudero J, Schlappi M, Ramos C, Hohn B, Koukolikova-Nicola Z (1993) T-DNA transfer to maize cells: histochemical investigation of β -glucuronidase activity in maize tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1488-1492
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:505-517
- Spencer TM, Gordon-Kamma WJ, Daines RJ, Start WG, Lemaux PG (1990) Bialaphos selection of stable transformants from maize cell culture. *Theor Appl Genet* 79:625-634
- Toki S, Takamatsu S, Nojiri C, Ooba S, Anzai H, Iwata M, Christensen AH, Quail PH, Uchimiya H (1992) Expression of a maize ubiquitin gene promoter-bar chimeric gene in transgenic rice plants. *Plant Physiol* 100:1503-1507
- Thompson CJ, Movva NR, Tizard R, Cramer R, Davies JE, Lauwereys M, Botterman J (1987) Characterization of herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygrosopicus*. *EMBOJ* 6:2519-2523
- Toriyama K, Hirata K (1985) Cell suspension and protoplast culture in rice. *Plant Sci* 41:179-183

(1998년 6월 3일 접수)