

오이의 형질전환을 위한 선발마커로서 Glufosinate의 이용

조미애¹, 송윤미¹, 박윤옥¹, 고석민¹, 민성란², 유장렬², 최필선^{3*}
¹(주)유진텍부설연구소, ²한국생명공학연구원, ³남부대학교 생약자원학과

The Use of Glufosinate as a Selective Marker for the Transformation of Cucumber (*Cucumis sativus* L.)

Mi Ae Cho¹, Yun Mi Song¹, Yun Ok Park¹, Suck Min Ko¹, Sung Ran Min², Jang Ryol Liu², Pil Son Choi^{3*}

¹Eugentech Inc., Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Taejon 305-606 Korea

²Plant Cell Biotechnology Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Taejon 305-606 Korea

³Department of Medicinal Plant Resources, Nambu University, Kwangju 506-824 Korea

ABSTRACT *Agrobacterium tumefaciens*-mediated cotyledonary explants transformation was used to produce transgenic cucumber. Cotyledonary explants of cucumber (c.v., Eunchim) were co-cultivated with strains *Agrobacterium* (LBA4404, GV3101, EHA101) containing the binary vector (pPTN289) carrying with CaMV 35S promoter-*gus* gene as reporter and NOS promoter-*bar* gene conferring resistance to glufosinate (herbicide Basta) as selectable marker. There was a significant difference in the transformation frequency depending *Agrobacterium* strains. The EHA101 of bacterial strains employed gave the maximum frequency (0.35%) for cucumber transformation. Histochemical *gus* and leaf painting assay showed that 15 individual lines were transgenic with the *gus* and *bar* gene. Southern blot analysis also revealed that the *gus* gene was successfully integrated into each genome of transgenic cucumber.

Key words: *Agrobacterium* strains, β -glucuronidase (*GUS*), leaf painting assay, transgenic cucumber

서 론

오이는 미국, 아시아 및 유럽을 중심으로 재배되는 주요 박과작물로서 고효율 형질전환시스템이 개발 될 경우 생산량 저하와 식물체 생장에 심각한 영향을 주는 오이 모자이크바이러스 (CMV), zucchini yellow 모자이크 바이러스 (ZYMV), 수박 모자이크바이러스 등 (Powell-Abel et al. 1986; Nishibayashi et al. 1996) 병 저항성 신품종 개발을 더욱 촉진시킬 수 있을 것이다. 오이의 초기 형질전환방법은 *Agrobacterium rhizogenes*와 공동배양하여 얻은 모상근을 다시 재분화시키는 방법이었고 (Trulson et al. 1986), 이후 배축, 엽병, 잎 및 자엽 등 여러 가지 배양절편을 이

용하여 기관발생 (Sarmiento et al. 1992; Dong et al. 1991) 과 체세포배발생 (Chee 1990)을 통한 형질전환방법을 확립하여 왔다. 이러한 오이 형질전환연구에서 선발마커는 주로 *nptII* 유전자를 가장 많이 이용하여 왔으며, 동일 박과작물인 수박에서 phosphomannose isomerase (PMI) 유전자 (Reed et al. 2001)와 멜론에서 dihydrofolate reductase (DHFR) 유전자 (Dong et al. 1991)를 이용한 예도 드물게 있다. 그러나 지금까지 확립된 형질전환시스템의 재현성 부족, 높은 4배체 형질전환체 발생빈도, 선발마커로서 *nptII* 유전자의 부적절성 등은 오이의 안정적 반복적 형질전환법을 확립하는데 가장 큰 문제점으로 대두되고 있다 (Gaba et al. 2004).

오이 형질전환법에서 제초제 저항성 유전자인 *bar* 유전자를 선발마커로 이용한 예는 찾아볼 수 없다. *Streptomyces hygroscopicus*로부터 분리한 *bar*는 phosphinothricin acety-

*Corresponding author Tel 82-62-970-0161, Fax 82-62-970-0165
E-mail: cps6546@nambu.ac.kr

ltransferase (PAT) 효소를 합성함으로써 glufosinate의 독성을 불활성화시키는 것으로 알려져 있고 (Thompson et al. 1987), 이러한 작용기작을 이용하여 많은 식물의 형질전환에서 유용한 선발마커로서 이용되어 왔다 (D'Halluin et al. 1992). 특히 형질전환식물체에서 *bar*-유전자의 발현은 leaf painting assay와 같은 간단한 방법으로 확인할 수 있고, phosphinothricin을 포함한 triazines, sulfonyleureas, bromoxynil, glyphosate와 같은 다양한 제초제에 대해서도 저항성을 갖기 때문에 (Schroeder et al. 1993) 형질전환이 어려운 대두의 형질전환법에서 매우 효과적인 선발마커로 이용되고 있다 (Zhang et al. 1999; Cho et al. 2004).

따라서 본 연구에서는 오이의 안정적이며 재현성 있는 형질전환방법을 확립하기 위하여 선발마커로서 glufosinate의 이용 가능성을 확인하여 보고한다.

재료 및 방법

식물 재료

국내 오이 품종 중 기관발생능이 높은 오이 (은침) 종자를 70% 알코올에 1분간, 2% sodium hypochlorite 용액에 15분간 표면 살균 하였다. 2% sucrose와 0.8% agar가 첨가된 MS기본배지 (Murashige and Skoog 1962)에 페트리디쉬 당 10개의 종자를 치상하고 25°C 암상태에서 10일 동안 발아시켰다. 배양 10일 후 발아된 오이 유식물체로부터 경단분열조직이 포함되지 않게 조심스럽게 자엽절편을 절단한 후 *Agrobacterium*과 공동배양하기 위한 재료로 사용하였다.

Agrobacterium tumefaciens strains

CaMV 35S 프로모터, β -glucuronidase (*GUS*) 유전자, 선발표지로서 *bar* 유전자 (pPTN289, Figure 1A)와 *nptII* 유전자 (pPTN290, Figure 1B)를 freeze-thaw 방법으로 LBA4404, EHA101 및 GV3101에 각각 형질전환하여 균주로 사용하였다 (Jefferson et al. 1987). 50 mg/L streptomycin과 50 mg/L spectinomycin이 첨가된 LB액체배지 50 ml에 각각의 colony를 접종하여 28°C로 8시간 이상 배양한 후 대수기 증식기 ($OD_{650} = 0.6 - 1.0$)의 균을 사용하였다.

형질전환체 생산

오이 형질전환체를 얻기 위하여 약 50개 자엽절편을 pPTN289 벡터로 형질전환시킨 25 ml의 *Agrobacterium* 용액 (LBA4404, GV3101, EHA101)에 30분 동안 침지한 후 공동배양용 배지 (co-cultivation medium : CM, 1/10 MS salt, 20 mM MES, 100 mg/L cysteine, 3.2 mg/L BA, 0.5 mg/L IBA, 39 mg/L

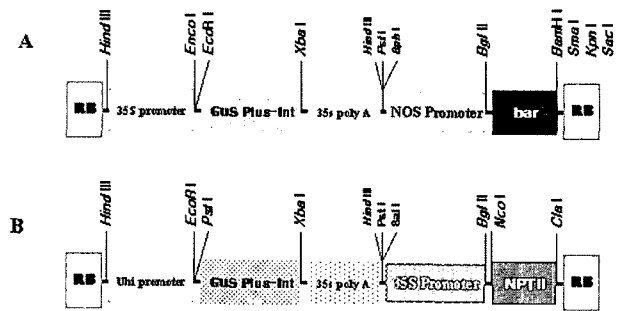


Figure 1. Plant transformation vectors (A: pPTN289, B: pPTN290) showing restriction sites. T-DNA region of pPTN289 and pPTN290 vectors (RB-Right border, *GUS* plus-int-*GUS* gene interrupted with eukaryotic intron, 35s poly A-35s polyAAA tail, *bar* - phosphinothricin acetyl transferase gene, *nptII* - neomycin phosphotransferase II gene)

acetosyringone, 3% sucrose, pH 5.4)에 6개씩 치상하여 3일 동안 공동 배양하였다. 공동 배양한 자엽절편을 3 - 5회 수세한 후 신초 유도배지 (shoot-induction medium: SI, MS salt, MS vitamin, 3% sucrose, 3.2 mg/L BA, 0.5 mg/L IBA, 5 mg/L glufosinate, 50 mg/L ticarcillin, 50 mg/L cefotaxime, 50 mg/L vancomycin, 3 mM MES, pH 5.6)에 옮겨 6 - 8주 동안 2주 간격으로 계대배양 하였다. 형성된 신초를 분리하여 신초 신장배지 (shoot-elongation medium: SE, MS salt, 0.1 mg/L IBA, 0.5 mg/L GA₃, 3 mg/L glufosinate, 50 mg/L ticarcillin, 50 mg/L cefotaxime, 50 mg/L vancomycin, 3 mM MES, pH 5.6)에 옮겨 3 cm 이상 신장시켰으며, 뿌리 유도배지 (root-induction medium: RI, 1/2 MS salt, 2% sucrose, 0.5 mg/L IBA, 50 mg/L cefotaxime, pH 5.6)에 옮겨 유식물체를 얻었다. 한편, pPTN290 벡터를 이용할 경우, 위의 모든 배지에서 5 mg/L glufosinate 대신 100 mg/L paromomycin을 첨가하여 수행하였다. 모든 배지는 8 g/L Phyto-agar를 첨가하기 전 pH를 조정하여 121°C, 1.2기압에서 15분간 고압 멸균 하였다. 배지는 90 × 15 mm 플라스틱 페트리디쉬에 25 ml씩 분주하여 사용하였다. 배양은 24°C로 조절되는 배양실에서 광도 46 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 16시간 광주기에서 배양 하였다. 선발배지에서 얻은 유식물체는 토양으로 옮겨 온실에서 순화 하였다.

β -Glucuronidase (*GUS*) 발현

*Agrobacterium*과 공동배양한 자엽절편으로부터 유도된 유식물체의 잎절편과 토양에서 순화시킨 성숙한 식물체의 화기 및 열매를 채취한 후, 37°C에서 5-bromo-4-chloro-3-indole-glucuronidase 용액에 침지 시켰다 (Jefferson et al. 1987). 24시간 후 70% 알코올 용액으로 탈색 시킨 후 *GUS* 양성 반응을 보인 식물체의 빈도를 조사하였다. 대조구로서는 *Agrobacterium*과 공동배양하지 않은 성숙한 식물체의 잎,

화기 및 열매를 사용하였다.

Leaf painting 및 Southern 분석

유식물체의 잎에서 *GUS* 양성반응을 나타낸 식물체를 토양에 순화 한 후 온실에서 성숙한 개체로 생육시켰다. 식물체의 크기가 50 cm 이상 되었을 때 1차 잎 표면에 0.1% 바스타 (Aventis Inc.)를 솜으로 처리 하였다. 5일 후 제초제에 대한 내성을 나타낸 식물체의 잎 조직으로부터 genomic DNA를 추출하였다 (Dellaporta et al. 1985). 약 10 µg의 DNA를 *EcoRI* 제한효소 반응액에 37°C에서 16시간 동안 반응시켜 절단 한 후 0.8% agarose 겔에 전기영동 하였다. Agarose 겔 상의 DNA 밴드를 Zeta^R-Probe nylon membrane (Bio-Rad, catalog #162-0196)에 옮겨 ³²P-dCTP (Stratagene, catalog #300385)로 표지된 약 2.0 kb *gus* probe를 이용하여 Southern 분석을 실시하였다 (Southern 1975).

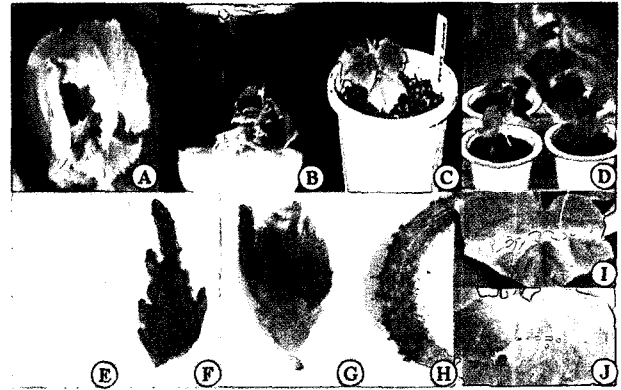


Figure 2. Plant regeneration from cotyledonary node explant of cucumber transformed with *gus* and *bar* gene. A: Putative transgenic shoot formation on SI medium with 5 mg/L glufosinate; B: Putative transgenic plantlet; C, D: Glufosinate-resistant plants grown in soil; E: *GUS*-negative leaf of non-transgenic cucumber; F: *GUS*-positive leaf; G: *GUS*-positive flower; H: *GUS*-positive fruit; I: Herbicide susceptible response of non-transgenic leaf; J: Herbicide tolerant response of transgenic leaf.

결과 및 고찰

오이 20 품종을 무균밭아시켜 얻은 유식물체의 자엽절편을 0.5 mg/L IBA와 3.2 mg/L BA를 조합 첨가한 MS배지에 배양한 결과, 95% 이상의 기관발생능을 갖는 오이 (은침) 1품종을 선정 하였다 (미발표). 은침 자엽절편을 *Agrobacterium*과 공동배양한 후 glufosinate가 첨가된 선발배지에서 배양한 결과, 배양 2주 후 자엽절편은 팽창되기 시작하였으며, 상처 부위로부터 켈러스가 형성 되었다. 자엽절편을 다시 동일배지에 옮겨 4 - 6주 동안 계속 배양할 경우 녹색반점을 갖는 많은 부정아 원기가 형성되었으며, 이러한 부정아 원기는 선발배지에서 노란색 또는 점차 갈변되는 주위 조직과는 뚜렷이 구분 되었으며, 배양 6 - 8주째 원기로부터 5 - 10 mm 크기의 multiple shoot를 얻을 수 있었다 (Figure 2A). 배양 6 - 8주후 건강하게 자란 신초를 분리하여 신초신장배지 (SE)와 뿌리유도배지에서 완전한 소식물체를 얻었다 (Figure 2B). 이러한 소식물체를 토양에 옮겨 순화시켜 성숙한 개체를 얻었다 (Figure 2C, D). 그러나 자엽절편을 pPTN290벡터

가 도입된 *Agrobacterium*용액으로 형질전환한 후 100 mg/L paromomycin이 첨가된 선발배지에서 배양하였을 때 자엽절편의 괴사 현상이나 갈변현상을 관찰할 수가 없었고, 자엽 상처부위로부터 켈러스 형성과 신초 발생이 왕성하게 일어났다. 공동배양된 오이 자엽절편 (10,126개)으로부터 12 개체의 glufosinate저항성 식물체와 3개체의 paromomycin저항성 식물체를 얻었으며, 모든 식물체의 잎, 화기, 열매에서 *GUS*양성반응을 보였으며, 잎에서는 basta에 저항성을 나타냈다 (Figure 2F, G, H, J, Table1).

선발배지에 첨가된 glufosinate는 상처를 받은 배양절편의 목부와 사부조직으로 흡수 되어 (Shelp et al. 1992) 형질전환이 일어나지 않은 세포의 경우에는 암모니아 축적으로 세포내 인산화과정을 저해시킴으로서 괴사현상이 나타나고, 형질전환이 일어난 세포의 경우 phosphinothricin acetyl transferase (PAT)효소를 합성함으로써 세포내로 흡수된 glufosinate를 불활성 형태로 전환시킴으로써 저항성을 갖게 한다 (Muller et al. 2001). 이러한 현상은 많은 식물에서 관찰되어지며, 특히 공동배양된 대두 자엽절편에서 뚜렷하게 관

Table 1. Frequency (%) of *GUS* expression in cucumber leaf of putative transgenic plants regenerated from cotyledonary explants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* strains

Crops	Vectors	<i>Agrobacterium</i> strains	No. of explants cocultured	No. of <i>GUS</i> expression (%)
Cucumber	pPTN289	GV3101	879	2 (0.23)
		LBA4404	813	0 (0.00)
		EHA101	2,824	10 (0.35)
	pPTN290	GV3101	4,180	3 (0.07)
		LBA4404	574	0 (0.00)
		EHA101	856	0 (0.00)

찰할 수 있다 (Zhang et al. 1999; Cho et al. 2004). 한편 선발배지에 첨가된 paromomycin은 neomycin phosphotransferase II (*nptII*) 효소 작용에 의해 불활성화 됨으로서 형질 전환이 일어나지 않은 세포는 피사 시키고, 형질전환세포는 항생제 저항성을 갖게 한다 (Roa-Rodriguez and Nottenburg 1999). 일반적으로 paromomycin은 단자엽식물인 옥수수의 체세포배발생을 이용한 형질전환과정에서 효과적인 선발마커로서 이용되고 있으며 (Cho et al. 2005), 콩과 등 주요 작물에서는 그 효과가 낮은 것으로 알려져 있다 (Roa-Rodriguez and Nottenburg 1999). 따라서 공동배양된 오이 자엽절편에서의 갈변현상과 피사현상은 배지에 첨가된 제초제, 즉 glufosinate의 독성으로 형질전환이 일어나지 않은 세포를 점차 피사시켜 나타난 현상으로 새롭게 형성된 대두 신초는 T-DNA 부위의 *bar* 유전자가 오이 genome에 도입 되어 발현 됨으로서 저항성을 갖게 된 것으로 생각된다. 반면 paromomycin이 첨가된 선발배지에서는 피사현상이나 갈변 현상이 관찰되지 않는 것으로 보아 형질전환이 일어나지 않은 세포의 증식도 함께 일어나는 것으로 추측된다. 따라서 오이 형질전환시스템에서는 선발마커로서 *nptII* 유전자보다는 *bar* 유전자를 사용하는 것이 효과적일 것으로 사료된다.

Agrobacterium 균주에 따른 형질전환율을 비교해 보면 오이의 경우 pPTN289 벡터가 도입된 GV3101에서 0.23% (2개체), LBA4404에서 0% 그리고 EHA101에서 0.35% (10개체)의 *GUS* 양성반응을 보였고, pPTN290이 도입된 GV3101 균주에서는 0.07% (3개체) 그리고 LBA4404와 EHA101에서는 *GUS* 양성반응을 보이지 않았다 (Table 1). 이와 같이 사용된 균주별 형질전환빈도는 뚜렷한 차이가 있었으며, 특히 *bar* 유전자를 선발표지로 포함하는 pPTN289 벡터가 도입된 EHA101 균주를 사용하였을 때 가장 효과적인 것으로 나타났다. 이러한 결과는 많은 작물의 형질전환연구에서 식물의 계통 또는 품종에 따라 *Agrobacterium* 균주의 감염성이 다른 것으로 알려져 있다 (Simmonds and Donaldson 2000; Lee et al. 1999; Cho et al. 2004). 특히, *Coleus blumei*에서는 사용된 다른 균주에 비해서 B6S3 균주가 가장 높은 감염성을 보여줌으로서 (Bauer et al. 2002) 균주의 종류와 특성에 따라 그리고 식물의 계통, 품종 및 종에 따라서도 다르게 나타남을 알 수 있기 때문에 안정적 그리고 고효율 형질전환법을 확보하기 위해서는 최적 *Agrobacterium* 균주 선정 과정이 필수적이라 할 수 있다.

기내에서 성숙한 오이 형질전환체 (15개체)를 토양에 이식하여 생장시킨 후 4개체 (TC-1, TC-2, TC-3, TC-4)의 잎 절편으로부터 genomic DNA를 추출하여 Southern 분석을 수행하였다. TC-1을 제외한 나머지 형질전환체의 genome에 *gus* 유전자가 안정적으로 도입되어 있음을 확인 하였다 (Figure 3). 따라서 *GUS* 발현과 Southern 분석 결과로 미루어 볼 때 자엽공동배양법에 의해 *gus* 유전자가 오이 genomic DNA에 삽입되어 안정적으로 발현하고 있음을 알 수 있었고,

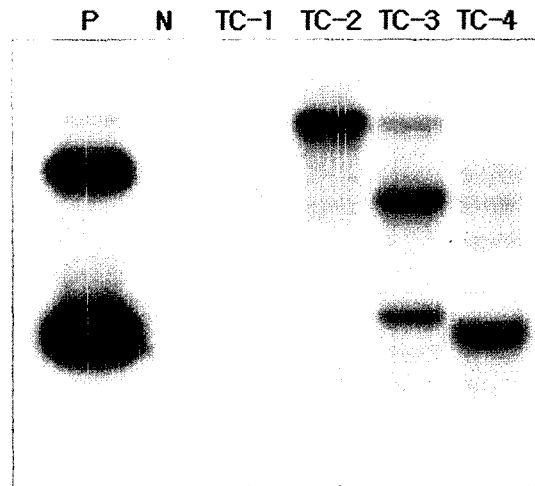


Figure 3. Southern blot analysis of 4 transgenic cucumber carrying *gus* gene. Total genomic DNA was digested with *EcoRI*. The 2.0 kb *gus* probe labeled with ³²P-dCTP was hybridized with genomic DNA (10 μg) of transgenic cucumber. P : Plasmid vector (pPTN289) digested with *EcoRI*; N: Non-transgenic cucumber; TC1-4: Transgenic cucumber.

특히 오이 형질전환시스템에서 glufosinate를 선발배지로 이용할 경우 paromomycin보다 더 효과적으로 형질전환체를 선발할 수 있음을 알 수 있었다.

적 요

*Agrobacterium*과 자엽절편의 공동배양으로 박과작물인 오이의 형질전환체를 생산하였다. 오이 배양재료는 “은침”의 자엽절편을 사용하였으며, reporter 유전자로서 *gus* 유전자와 선발표지로서 *bar* 또는 *nptII* 유전자로 각각 제작된 pPTN289와 pPTN290 벡터를 GV3101, LBA4404, EHA101에 형질전환하여 공동배양하였다. 형질전환빈도는 *Agrobacterium*의 종류에 따라 현저한 차이가 있었으며, 특히 사용한 균주중 EHA101에서 0.35%로 가장 높았다. 선발배지에서 형성된 오이 식물체중 제초제 저항성 (12개체)과 paromomycin 저항성 (3개체)을 얻었고, 이들 모두 *gus* 양성반응 나타났다. Southern 분석에 의하여 오이 형질전환체의 genome에 *gus* 유전자가 도입되어 있음을 확인 하였다.

사 사

본 연구는 농진청 바이오그린21사업단 (BioGreen21)과 작물유전체사업단 (CFG)으로부터 지원 받았으며, 네브라스카대학 Tom Clemente 박사로부터 pPTN289와 pPTN290 벡터를 공급받아 수행하였다.

인용문헌

- Bauer N, Levanic DL, Mihaljevic S, Jelaska S (2002) Genetic transformation of *Coleus blumei* Benth. using *Agrobacterium*. Food Technol Biotechnol 40: 163-169
- Chee PP (1990) Transformation of *Cucumis sativus* tissue by *Agrobacterium tumefaciens* and the regeneration of transformed plants. Plant Cell Rep 9: 245-248
- Cho MA, Choi DW, Liu JR, Clemente T, Choi PS (2004) Development of transgenic soybean using *Agrobacterium tumefaciens*. Kor J Plant Biotechnol 31: 255-259
- Cho MA, Park YO, Kom JS, Park KJ, Min HK, Liu JR, Clemente T, Choi PS (2005) Development of transgenic maize (*Zea mays* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Kor J Plant Biotechnol (In press)
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1985) Maize DNA miniprep. In: Malmberg R, Messing J, Sussex (eds), Molecular Biology of Plants: A laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor, New York, pp 36-37
- D'Halluin K, DeBlock M, Denecke J, Janssens J, Leemans J, Reynaerts A (1992) The *bar* gene as a selectable and screenable marker in plant engineering. Methods Enzymol 216: 415-426
- Dong JZ, Yang MZ, Jia SR, Chua NH (1991) Transformation of melon (*Cucumis melo* L.) and expression from the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic melon plants. Biotechnol 9: 858-863
- Gaba V, Zelcer A, Gal-On A (2004) Cucurbit biotechnology-the importance of virus resistance. In Vitro Cell Dev Biol Plant 40: 346-358
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) *GUS* fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J 6: 3901-3907
- Lee SH, Shon YG, Lee SI, Kim CY, Koo JC, Lim CO, Choi YJ, Han CD, Chung CH, Choe ZR, Cho MJ (1999) Cultivar variability in the *Agrobacterium*-rice cell interaction and plant regeneration. Physiol Plant 107: 338-340
- Muller B, Zumdick A, Schuphan I, Schmidt B (2001) Metabolism of the herbicide glufosinate ammonium in plant cell cultures of transgenic and non-transgenic sugarbeet, carrot, purple foxglove and thorn apple. Pest Manag Sci 57: 46-56
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497
- Nishibayashi S, Kayakawa T, Nakajima T, Suzuki M, Kaneko H (1996) CMV protection in transgenic cucumber plants with an introduced CMV-O cp gene. Theor Appl Genet 93: 672-678
- Powell-Abel P, Nelson RS, Hoffmann N, Roger SG, Fraley RT, Beachy RN (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. Science 232: 738-743
- Reed J, Privalle L, Powell ML, Meghji M, Dawson J, Dunder E, Suttie J, Wenck A, Launis K, Kramer C, Chang YF, Hansen G, Wright M, Chang YF (2001) Phosphomannose isomerase: an efficient selectable marker for plant transformation. In vitro Cell Dev Biol Plant 37: 127-132
- Roa-Rodriguez C, Nottenburg C (1999) *NptII* gene in combination with paromomycin as a selective agent. Patent EP 927765A1
- Saramento GG, Alpert K, Tang FA, Punja ZK (1992) Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and expression of kanamycin resistance in pickling cucumber. Plant Cell Tiss Organ Cult 31: 185-193
- Schroeder HE, Schotz AH, Wardley-Richardson T, Spencer D, Higgins TJV (1993) Transformation and regeneration of two cultivars of pea (*Pisum sativum* L.). Plant Physiol 101: 751-757
- Shelp BJ, Swanton CJ, Hall JC (1992) Glufosinate (phosphinothricin) mobility in young soybean shoots. J Plant Physiol 139: 626-628
- Simmonds DH, Donaldson PA (2000) Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of short-season soybean genotypes. Plant Cell Rep 19: 485-490
- Southern E (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98: 503-512
- Thompson CJ, Mowva NR, Tichard R, Cramer R, Davies JE, Lauwereys M (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. EMBO J 6: 2519-2523
- Trulson AJ, Simpson RB, Shahin EA (1986) Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants with *Agrobacterium rhizogenes*. TAG 73: 11-15
- Zhang Z, Xing A, Staswick P, Clemente TE (1999) The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. Plant Cell Tiss Org Cult 56: 37-46

(접수일자 2005년 4월 30일, 수리일자 2005년 5월 25일)