

배추의 형질전환용 선발항생제로서 Paromomycin의 이용

조미애^{1,3}, 민성란², 고석민¹, 유장렬², 이준행³, 최필선^{3*}

¹유유진택부설연구소, ²한국생명공학연구원, ³남부대학교

Use of Paromomycin as a Selectable Marker for the Transformation of Chinese Cabbage

Mi Ae Cho¹, Sung Ran Min², Suck Min Ko¹, Jang Ryol Liu²,
Jun Haeng Lee³ and 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 Hypocotyl explants of *Chinese cabbage* (cvs. "Jeong Sang" and "Seoul") produced adventitious shoots on Murashige and Skoog (MS) basal medium supplemented with 4 mg/L AgNO₃, 5 mg/L acetosyringone, 4 mg/L 6-benzyladenine and 3 mg/L alpha-naphthaleneacetic acid (SI) after cocultivation with strains of *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) harboring the pCAMBIA1301 and the pPTN290 containing hygromycin-resistance gene and paromomycin-resistance gene as a selectable marker genes, respectively. There was a significant difference in the frequency of transgenic plants depending on antibiotics and cultivars used. Paromomycin was better than hygromycin, and cultivar "Jeong-sang" was higher than "c.v. Seoul" in the frequency of transgenic plants. In particular, the highest frequency (0.70%) of transgenic plants was obtained from selection medium (SI) containing 100 mg/L paromomycin in c.v., "Jeong-sang". GUS positive response were obtained 9 plants and 3 plants from the cultivars, "Jeong-sang" and "Seoul", respectively. They were grown to maturity in a greenhouse and normally produced T₁ seeds. GUS histochemical assay for progeny (T₁) revealed that the transgenes were expressed in the plant genome.

서 론

배추의 형질전환연구는 기관발생이나 체세포배발생을 통한 안정적인 식물체재생연구가 선행 되어진 후 (Chi et al. 1990, Choi et al. 1996, 1998, Zhang et al. 1998) particle bombardment법이나 *Agrobacterium* 공동배양법 (Barfield and Pua 1991, Mukhopadhyay et al. 1992) 및 모상근 발생을 통한 형질전환방법 (Christey et al. 1997) 등이 개발되었다 (Zhang

et al. 2000). 이러한 방법은 배추에서 TMV coat단백질 유전자 발현 (Jun et al. 1995), 내충성유전자 발현 (Cho et al. 2001, Jin et al. 2000, Xiang et al. 2000), 오일 생산을 위한 lysophosphatidic acid acyltransferase유전자 발현 (Knutzon et al. 1999), 고염농도 스트레스저항유전자 발현 (Zhang et al. 2001) 등을 가능하게 하였고, 최근 국내에서도 삽입 돌연변이체 생산을 위한 고빈도 형질전환체의 획득방법을 개발하게 되었다 (Lee et al. 2004).

식물형질전환의 선발과정에서 chimeric 형질전환체가 나타나는 현상은 도입유전자의 "escape"에 의해 나타난다. 배추에서도 도입유전자의 "escape"현상은 형질전환빈도를 감소

*Corresponding author Tel 062-970-0161 Fax 062-970-0269
E-mail: cps6546@nambu.ac.kr

시킬 뿐 아니라 재현성에도 영향을 미치기 때문에 (Cardzoa and Stewart 2004) 아직도 최적 배양절편의 조사, 최적 선발마커의 선정, 배추 품종간 *Agrobacterium* 감염성 등의 연구 등을 시도하고 있고 (Lee et al. 2004, Zhang et al. 2000), 이는 배추 뿐 아니라 많은 작물에서도 큰 문제점으로 남아 있다 (Cho et al. 2005a, Gaba 2004).

따라서 본 연구에서는 국내 배추품종에서 안정적이고 효율적인 형질전환방법을 확립하기 위하여 재생능에 대한 품종 선별과 선발배지에 첨가되는 paromomycin 항생제의 선발효과에 대하여 조사 하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

식물 재료

국내에서 재배되는 15개 품종의 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%, 암상태에서 5일 동안 발아시켰다. 배지는 고압 멸균 전 1 N HCl과 1 N KOH로 pH 5.8로 조정하였다. 배양 5일 후 발아된 배추 유식물체로부터 경단분열조직이 포함되지 않게 1 cm 크기의 배측 절편을 절단 한 후 신초발생에 대한 품종 선별과 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환실험에 사용하였다.

식물체분화능에 대한 품종스크리닝

유식물체의 배측을 1.0 cm 크기로 절단한 후 Zhang 등 (1998)이 사용한 생장조절제 조건을 변형한 배지 (MS salt, B5 vitamin, 4 mg/L AgNO₃, 4 mg/L 6-benzyladenine, 3 mg/L alpha-naphthaleneacetic acid, 3% sucrose, pH 5.8)에 치상하여 16시간 광주기하에서 6-8주동안 배양 하였다. 모든 배지는 4 g/L Phytigel을 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 μmol m⁻²s⁻¹의 16시간 광주기에서 배양 하였다. 배양 8주 후 절편당 shoot발생빈도를 조사하여 고빈도 기관발생능 품종을 선정하였다.

Agrobacterium Tunefaciens Strains

CaMV35S프로모터, β-glucuronidase (GUS)유전자와 선발 마커로서 hygromycin-resistance 유전자 (pCAMBIA1301) 또는 paromomycin-resistance 유전자 (pPTN290)를 freeze-thaw 방법

으로 LBA4404에 각각 형질전환 하여 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 (OD₆₅₀ = 0.6-1.0)의 균을 사용하였다

형질전환체 생산

pCAMBIA1301과 pPTN290백터의 각 선발마커인 *hyg* 유전자와 *npt II* 유전자 발현 형질전환체를 얻기 위하여 실험 당 약 200개 배측절편을 25 ml의 *Agrobacterium* 용액에 30분 동안 침지 한 후 공동배양용 배지 (MS salt, MS vitamins, 3% sucrose, 0.5% phyto-agar, 5 mg/L acetosyringone, pH 5.4)에 20개씩 치상하여 3일 동안 공동 배양하였다. 공동배양 후 자엽 절편을 3-5회 멸균수로 수세한 후 신초유도배지 (MS salt, B5 vitamin, 4 mg/L AgNO₃, 5 mg/L acetosyringone, 4 mg/L 6-benzyladenine, 3 mg/L alpha-naphthaleneacetic acid, 3% sucrose, 400 mg/L cefotaxime, 10 mg/L hygromycin (pCAMBIA 1301) or 100 mg/L paromomycin (pPTN290), pH 5.8)에 옮겨 6-8주 동안 2주 간격으로 계대배양 하였다. 형성된 신초를 분리하여 신초신장배지 (1/2MS salt, MS vitamins, 2% sucrose, 100 mg/L cefotaxime, pH 5.8)에 옮겨 신초신장과 부정근을 유도하였다. 선발배지에서 얻은 유식물체는 토양으로 옮겨 온실 하에서 순화하면서 GUS 분석을 통한 형질전환체를 확인한 후 각 형질전환체의 독립line 으로부터 T1 종자를 수확하였다.

β-Glucuronidase (GUS) Assay

*Agrobacterium*과 공동배양된 배측절편으로부터 유도된 유식물체의 잎 절편과 paromomycin 저항성을 갖는 6개의 형질전환체 (T₀)로부터 수확한 각 T₁ 종자를 무작위로 토양에 파종하여 유식물체를 얻은 후 37°C에서 5-bromo-4-chloro-3-indole-glucuronidase 용액에 침지하였다 (Jefferson et al. 1987). GUS 용액에 침지한 모든 시료는 24시간 후 70% 알코올 용액으로 탈색 시킨 후 GUS 양성 반응을 보인 식물체의 빈도를 조사하였다. 대조구로서는 *Agrobacterium*과 공동배양하지 않은 식물체의 잎 절편을 사용하였다.

결과 및 고찰

국내에서 재배 되는 배추 15개 품종의 종자를 5일 동안 무균발아시켜 약 7-10 cm 크기의 유식물체를 얻었다. 유식물체로부터 1 cm 크기의 배측 절편을 잘라 3.0 mg/L NAA와 4.0

Table 1. Screening of 15 domestic cultivars of Chinese cabbage with shoot regeneration on media with 3.0 mg/L NAA and 4.0 mg/L BA.

Cultivars	No. of explants cultured	No. of independent calli with shoots (%)	Morphological characteristics of callus
Olympic	230	1 (0.4)	Compact white and greenish callus
Kuem-jin	200	0 (0.0)	Compact white and greenish callus
Gaenari	210	0 (0.0)	Compact white and greenish callus
Pyeonggang	265	9 (3.4)	Compact white and greenish callus
Maeryok	211	5 (2.5)	Compact pale greenish callus
Norangyee	216	0 (0.0)	Compact pale greenish callus
Seoul	230	21 (9.1)	Yellowish callus
Norangkimjang	200	8 (4.0)	Compact pale greenish callus
Sambok	200	0 (0.0)	Compact greenish callus
Chosaeng	197	0 (0.0)	Compact greenish callus
Norangbom	227	4 (1.8)	Compact pale greenish callus
Jeongsang	256	35 (13.8)	Yellowish callus
Korangji	217	6 (2.8)	Compact white and greenish callus
Satnorang	228	13 (5.7)	Compact pale greenish callus
Samjjin	223	15 (6.7)	Compact pale greenish callus

mg/L BA를 조합 첨가한 MS배지에서 8주 동안 배양 하였다. 배양 2주 후부터 배측 절편 절단부위로부터 캘러스가 형성되기 시작 하였으며, 배양 4-5주에 품종별로 진한 녹색의 단단한 캘러스, 흰색의 단단한 캘러스 및 부드러운 연한 노란색의 캘러스 등 형태적으로 다른 특징을 갖는 캘러스가 형성되었다. 배양 8주째 캘러스 중 부드러운 노란색의 캘러스를 갖는 품종에서 다른 캘러스에 비하여 많은 녹색반점을 갖는 신초 원기가 발생되었다. 스크리닝한 15개 품종 중 평강배추 9개체(3.4%), 올림픽 1개체 (0.4%), 매력배추 5개체 (2.5%), 서울배추 21개체 (9.1%), 노랑김장배추 8개체 (4.0%), 노랑봄배추 4개체 (1.8%), 정상배추 35개체 (13.8%), 고랭지배추 6개체 (2.8%), 셋노랑배추 13개체 (5.7%), 삼진배추 15개체 (6.7%)의 식물체가 발생되어 서울배추와 정상배추의 배측절편이 가장 양호한 것으로 관찰 되었고 나머지 품종에서는 거의 발생되지 않았다 (Table 1). 이러한 결과는 품종 간 식물체발생능에 있어서 차이가 있음을 보여주며, 이는 배양재료의 유전적 또는 생리적차이에 의해 나타난 현상으로 이미 많은 연구에서 보고하고 있다 (Christey et al. 1997, Kamiya et al. 1988, Luhrs and Lorz 1987, Rhodes et al. 1988, Xiang et al. 2000).

식물체발생능에 대한 선별과정에서 선정된 서울배추와 정상배추의 배측절편을 *Agrobacterium*과 3일 동안 공동배양한 후 hygromycin (pCAMBIA1301) 또는 paromomycin (pPTN 290)을 각각 첨가한 선발배지에서 배양하면서 형질전환체 발생빈도를 조사하였다. Paromomycin항생제가 첨가된 선발배지에서는 배양 2주 후 배측절편은 팽창되면서 점차 상처부위

로부터 약간씩 캘러스가 형성되었고, 동일배지에 옮겨 4-6주 동안 계속 배양할 경우 녹색반점을 갖는 캘러스로부터 부정아가 형성되거나 캘러스상태를 유지하기도 하였다(Figure 1 A-C). 부정아 원기는 선발배지에서 노란색 또는 점차 갈변되는 주위 조직과는 뚜렷이 구분 되었으며, 배양 6-8주째 원기로부터 많은 신초가 형성되었다. 건강하게 자란 신초를 분리하여 신초신장배지 (SE)에 옮겨 배양하면서 3 cm 이상 되게 신장 시켰으며 (Figure 1D), 동일배지에서 부정근이 유도된 경우 토양에 옮겨 순화시켜 성숙한 개체를 얻었다 (Figure 1E). 반면 hygromycin 항생제 첨가배지에서는 paromomycin에 비하여 캘러스 형성빈도가 낮고 증식도 현저하게 낮았다. 토양에서 완전하게 순환된 개체로부터 GUS 분석을 수행하여 최종적으로 GUS 양성반응을 보인 개체를 형질전환체로 판정하였으며 (Figure 1G), 온실에서 생육시키면서 T1종자를 수확하였다 (Figure 1H-K). 한편 형질전환체 발생빈도는 '정상' 배추에서 9개체 (0.30%)와 '서울' 배추에서 3개체 (0.06%)를 얻었으며, '정상' 배추의 경우 hygromycin저항성 식물체 3개 (0.15%)와 paromomycin저항성 식물체 6개 (0.7%)를 그리고 서울배추에서 hygromycin저항성 식물체 1개 (0.03%)와 paromomycin저항성 식물체 2개 (0.13%)를 각각 얻어 품종과 선발 마커에 따라 형질전환빈도 차이가 있음을 알 수 있었으며, 특히 2 품종 모두에서 hygromycin 보다는 paromomycin항생제가 첨가된 배지에서 높은 형질전환율을 보여 주었다 (Table 2). 배추 형질전환연구에서 도입유전자의 "escape"현상을 줄이기 위하여 자엽절편 대신에 배측절편을 이용하거나 (Lee et

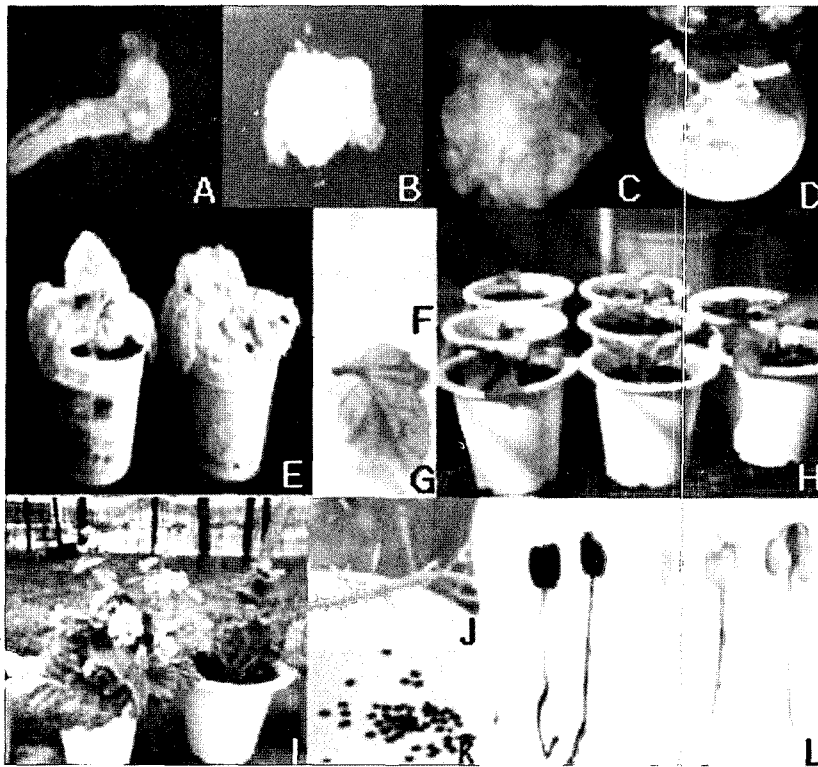


Figure 1. Plant regeneration from hypocotyl of Chinese cabbage transformed with *gus* gene. A, B: Yellowish friable callus formation and proliferation on selection medium with 100 mg/L paromomycin C: Shoot primordia formation from hypocotyl-derived yellowish friable callus; D: Putative transgenic plantlet; E: Paromomycin-resistant plants grown in soil F: GUS- negative leaf of non-transgenic Chinese cabbage G: GUS- positive leaf H: GUS-positive plants grown in soil; I, J, K: Flowering and T₁ seed harvest from transgenic plants (T₀); L: GUS positive response in progeny (T₁).

Table 2. Frequency (%) of GUS expression in Chinese cabbage leaf of putative transgenic plants formed from hypocotyl explants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* carrying with hygromycin resistance gene (pCAMBIA1301) or paromomycin resistance gene (pPTN290).

Cultivars	Vectors	No. of explants cocultured	No. of GUS positive plants (%)
Jeong Sang	pCAMBIA1301	2,068	3 (0.15)
	pPTN290	855	6 (0.70)
	Totals	2,923	9 (0.30)
Seoul	pCAMBIA1301	3,460	1 (0.03)
	pPTN290)	1,561	2 (0.13)
	Totals	5,021	3 (0.06)

al. 2004), hygromycin, kanamycin 및 glufosinate 등 다양한 항생제를 이용하기도 한다 (Cho et al. 2001, Christey et. 1997, Jun et al. 1995, Mukhopadhyay et al. 1992, Takasaki et al. 1997, Zhang et al. 2000). 본 연구에서 사용한 paromomycin 항생제는 kanamycin과 같이 neomycin phosphotransferase II (*npt II*) 효소에 의해 불활성화 됨으로서 형질전환이 일어나지 않은 세포는 괴사 시키고 형질전환세포는 항생제 저항성을 갖게 하여 (Roa-Rodriguez and Nottenburg 1999) 최근 옥수수 등의 형질전환에서 많이 이용되는 항생제로 알려져 있다 (Cho et al. 2005b). 본 연구에서도 비록 낮은 형질전환율 (0.70%)이지만 paromomycin 항생제는 hygromycin 항생제 비하여 안정적으

로 형질전환체를 선별할 수 있었으며, 기 연구에서 kanamycin 항생제 첨가시 나타나는 도입유전자의 “escape” 현상을 (Lee et al. 2004) 최소화 할 수 있었다.

도입유전자의 안정적인 발현을 확인하기 위하여 paromomycin 항생제첨가 배지에서 선별된 6개 정상배추의 형질전환체 (T₀)로부터 각각 수확한 6개의 T₁ 종자를 다시 발아시켜 유식물체를 얻었다. 6개의 형질전환계통에서 무작위로 1개씩 선별하여 GUS 분석을 수행한 결과 모두 안정적으로 발현되고 있음을 확인하였다 (Figure 1L). 따라서 GUS 분석에 의한 결과로 미루어 볼 때 배추 절편 공동배양법에 의해 *gus* 유전자가 배추 genomic DNA에 도입되어 안정적으로 발현하고

있음을 알 수 있었으며, 향후 본 연구에 의해서 얻어진 6개 형질전환계통의 T₁종자를 대상으로 도입유전자의 분리비를 조사하여 세대 전이 동안 안정적 발현과 외래유전자 도입에 의해 나타날 수 있는 형태적 특성에 대하여 조사할 예정이다.

따라서 본 연구에서는 배추를 포함한 많은 식물에서 안정적으로 형질전환방법을 확립하기 위해서는 동일종이라 할 지라도 계통 또는 품종별로 식물체발생능에 대한 연구가 선행되어야 하며, 특히 품종과 항생제 그리고 항생제의 종류에 따른 형질전환빈도를 조사해야 할 것으로 생각된다.

적 요

‘정상’ 배추와 ‘서울’ 배추의 배추절편을 선발마커로서 hygromycin 저항성유전자를 갖고 있는 pCAMBIA1301와 paromomycin 저항성유전자를 갖고 있는 pPTN290으로 각각 형질전환된 LBA4404 또는 EHA101 균주와 공동배양한 후 선발배지에서 배양하면서 형질전환체를 선발하였다. 형질전환빈도는 사용된 항생제와 품종에 따라서 현저하게 차이가 있었으며, 특히 paromomycin은 hygromycin보다 효과적이었고 정상 배추는 서울배추보다 양호 하였다. 가장 높은 형질전환빈도는 (0.70%) 100 mg/L paromomycin이 첨가된 선발배지에서 정상배추의 배추를 배양할 경우 얻어졌다. GUS 양성반응으로 확인 한 결과 정상배추에서 9개체와 서울배추에서 3개체를 각각 얻었으며, 온실에서 생장한 후 T₁종자를 수확하였다. T₁종자를 다시 발아시켜 유식물체를 얻은 후 GUS 양성반응을 확인함으로써 외래유전자가 안정적으로 발현하고 있음을 확인하였다.

사 사

본 연구는 농진청 바이오그린21사업단과 CFGC사업단으로부터 지원 받아 수행하였다.

인용문헌

Barfield DG, Pua EC (1991) Gene transfer in plants of *Brassica juncea* using *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. *Plant Cell Rep* 10: 308-314

Cardoza V, Stewart CN Jr (2004) *Brassica* biotechnology: progress in cellular and molecular biology. *In Vitro Cell Dev- Plant* 40: 542-551

Chi GL, Barfield DG, Sim GE, Pua EC (1990) Effect of AgNO₃ and aminoethoxyglycine on *in vitro* shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotypes. *Plant Cell Rep* 9: 195-198

Cho HS, Cao J, Ren JP, Earle ED (2001) Control of lepidopteran insect pests in transgenic Chinese cabbage

(*Brassica rapa* ssp. *perkinensis*) transformed with a synthetic *Bacillus thuringiensis Cry1C* gene. *Plant Cell Rep* 20: 1-7

Cho MA, Song YM, Park YO, Ko SM, Min SR, Liu JR, Choi PS (2005a) The use of glufosinate as a selective marker for the transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Kor J Plant Biotech* 32: 161-165

Cho MA, Park YO, Kim JS, Park KJ, Min HK, Liu JR, Clemente T, Choi PS (2005b) Production of transgenic maize (*Zea mays* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Kor J Plant Biotech* 32: 91-95

Choi PS, Soh WY, Liu JR (1996) Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotyledonary explant cultures of Chinese cabbage. *Plant Cell Tiss Org Cult* 44: 253-256

Choi PS, Min SR, Ahn MY, Soh WY, Liu JR (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration in immature zygotic embryo, ovule, and anther filament cultures of Chinese cabbage. *Sci Hort* 72: 151-155

Christey MC, Sinclair BK, Braun RH (1997) Regeneration of transgenic vegetable *Brassicaceae* (*Brassica oleracea* and *B. campestris*) via Ri-mediated transformation. *Plant Cell Rep* 16: 587-593

Curtis IS, Nam HG (2001) Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. *longipinnatus* Bailey) by floral-dip method plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency. *Trans Res* 10: 363-371

Gaba V, Zelcer A, Gal-On A (2004) Cucurbitbiotechnology- 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

Jin RG, Liu YB, Tabashnik BE, Borthakur D (2000) Development of transgenic cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) for insect resistance by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*

Jun SI, Kwon SY, Paek KY, Paek KH (1995) *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of fertile transgenic plants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* cv. 'spring flavor'). *Plant Cell Rep* 14: 620-625

Kamiya M, Yamanaka H, Oono K (1988) Intervarietal variations in somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa* L.). *Natl Inst Agrobiol Resources (Japan) Ann Rep* No 4, 127-161

Knutzon DS, Hayes TR, Wyrick A, Xiong H, Davies HM, Voelker TA (1999) Lysophosphatidic acid acyltransferase from coconut endosperm mediates the insertion of laurate at the sn-2 position of triacylglycerols in lauric rapeseed oil and can increase total laurate levels. *Plant Physiol* 120: 739-746

Lee MK, Kim HS, Kim JS, Kim SH, Park YD (2004) *Agrobacterium*-mediated transformation system for large-scale production of transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) plants for insertional mutagenesis. *J Plant Biol* 47: 179-186

- Luhrs R, Lorz H (1987) Plant regeneration in vitro from embryogenic cultures of spring-and winter-type barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties. Theor Appl Genet 75: 16-25
- Mukhopadhyay A, Arumugam N, Nandakumar PBA, Pradhan AK, Gupta V, Pental D (1992) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of oilseed *Brassica campestris*: transformation frequency is strongly influenced by the mode of shoot regeneration. Plant Cell Rep 11: 506-513
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497
- Rhodes CA, Lowe KS, Ruby KL (1988) Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic maize cell cultures. Bio/Technology 6: 56-60
- Roa-Rodriguez C, Nottenburg C (1999) *NptII* gene in combination with paromomycin as a selective agent. Patent EP 927765A1
- Takasaki T, Hatakeyama K, Ojima K, Watanabe M, Toriyama K, Hinata K (1997) Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica rapa* L. Breed Sci 47: 127-134
- Xiang Y, Wong WKR, Ma MC, Wong RSC (2000) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica campestris* ssp. *parachinensis* with synthetic *Bacillus thuringiensis* *Cry1Ab* and *Cry1Ac* genes. Plant Cell Rep 19: 252-256
- Zhang HX, Hodson JN, Williams JP, Blumwald E (2001) Engineering salt-tolerant *Brassica* plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. Proc Natl Acad Sci USA 98: 12832-12836
- Zhang FL, Takahata Y, Watanabe M, Xu JB (2000) *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). Plant Cell Rep 19: 569-575
- Zhang FL, Takahata Y, Xu JB (1998) Medium and genotype factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). Plant Cell Rep 17: 780-786

(접수일자 2006년 9월 4일, 수리일자 2006년 10월 26일)