

*Agrobacterium*을 이용한 Phosphinothricin Acetyl Transferase의 도라지로의 형질전환

윤종선*[†] · 박재성* · 김익환* · 홍의연* · 윤 태* · 이철희* · 정재훈** · 양덕춘***

*충북농업기술원, **전남도립 남도대학 약용자원원예개발과, ***경희대학교 생명과학부

Agrobacterium-mediated Transformation of PAT into *Platycodon grandiflorum* A. De. candolle

Jong Sun Yun*[†], Jae Seong Park*, Ik Hwan Kim*, Eui Yon Hong*, Tae Yun*, Cheol Hee Lee*,
Jae Hun Jeong**, and Deok Chun Yang***

*Chungbuk Agricultural Research & Extension Service, Cheongwon 363-883, Korea.

**Dept. of Medicinal Resources & Horticulture Development, Namdo Provincial College,
Damyang, Jeonnam 517-802, Korea.

***College of Life Sciences, Kyunghee University, Suwon 449-701, Korea.

ABSTRACT : This study was conducted to introduce phosphinothricin acetyl transferase (PAT) gene, resistant to basta which was non-selective herbicide, into balloon flower (*Platycodon grandiflorum* A. De. candolle). Seeds were germinated on MS medium, and 10-day-old immature cotyledon explants and 30-day-old leaf explants were cocultured with *Agrobacterium tumefaciens* strain MP 90 (pBinSyn) on 1/10 MS medium for 48 hours in the dark at 25 °C. The cultures were transferred for selection of kanamycin-resistant shoots to the MS medium supplemented with 0.2 mg/l NAA, 1.0 mg/l BA, 3% sucrose, 100 mg/l kanamycin, 500 mg/l carbenicillin. Shoots were obtained from 10-day-old immature cotyledon explants after 4 weeks of culture. The shoots were subcultured twice every 4 weeks on the same medium for growth of transgenic shoots. Successful transformation was confirmed by histochemical GUS assay, PCR analysis, RT-PCR analysis, 10 mg/l phosphinothricin treatment and 0.3% basta spray. The basta-resistant transgenic plants flowered normally.

Key Words : *Platycodon grandiflorum*, *Agrobacterium*, PAT, transformation

서 언

도라지 (*Platycodon grandiflorum* A. De. candolle)는 우리나라의 산과 들에서 흔히 자라는 초롱꽃과의 다년초로서 초세가 매우 강하여 우리나라의 어느 지역에서나 재배할 수 있으며, 뿌리를 길경(桔)이라 하여 진해, 거담, 기관지염 등에 효능이 있어 약용으로 널리 이용되며 또한 식용으로도 널리 이용되는 작물이다. 도라지의 뿌리에는 platycodin과 platycoside라는 사포닌이 함유되어 있고 (Saeki *et al.*, 1999), 활성 산소를 제거하는 SOD 활성이 있고, 폐놀성 화합물이 다량 함유되어 있다 (Lim *et al.*, 2004).

도라지의 재배에 있어서 입모을 향상 (Kang *et al.*, 2002)과 질소 비료의 시비 방법 (Seong *et al.*, 2004) 등의 재배법 개선으로 수량을 증대하고 품질을 향상시킬 수 있지만, 연간

4회 정도의 제조작업을 해야 하기 때문에 이에 따른 인건비가 많이 소요되어 순소득이 낮아지는 요인이 되고 있다. 제조제 저항성 형질전환 도라지를 개발하면 제조제를 1회 살포하는 것으로 제조작업을 마치게 되므로 제조 노력을 크게 줄일 수 있을 것이다.

제조제 저항성 형질전환 작물을 개발하기 위해서 bar gene 이라고 명명된 *Streptomyces hygrosopicus*에서 클로닝된 유전자 가 많이 사용되어 왔으나 (Woo *et al.*, 2001; Yang, 2001; Ha *et al.*, 2003; Cho & Kim, 2004), 본 연구에서는 bar 유전자의 GC함량이 68.6% (White *et al.*, 1990)인 것을 49%로 낮춘 인공 합성 PPT 저항성 유전자 (NCBI GenBank, Nucleotide Accession Number A02774)를 사용하였다.

본 연구에서 사용한 제조제는 bialaphos로서 ‘바스타’란 상품명으로 판매되고 있으며, 비선택성이면서 살포 후 제조 효

[†]Corresponding author: (Phone) +82-43-220-8493 (E-mail) jsyun135@cbares.net
Received July 15, 2007 / Accepted August 2, 2007

과가 빨리 나타나고 땅에 떨어지면 분해가 가능한 제초제이다. 본 연구는 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하여 도라지에 PAT 유전자를 도입하고, 유전자의 삽입과 발현, 기내와 기외에서 형질전환체의 제초제 저항성 검정 등을 통하여 ‘바스타’에 저항성을 가지는 형질전환 도라지를 개발하는 기술을 확립하기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

1. 식물 재료

도라지 종자를 70% 에탄올에 30초간 침지하여 기포를 제거하고 멸균수에 2분간 세척한 후 3% 차아염소산 나트륨에 15분간 침지하여 소독하고 멸균수로 2분, 5분 및 15분간 3회 세척한 후 MS 배지에 파종하여 무균적으로 발아시켰으며 파종 후 10일 된 미성숙 자엽과 성숙엽을 형질전환 재료로 사용하였다.

2. 형질전환용 PAT 유전자 및 *Agrobacterium* 배양

본 연구에서 사용된 제초제 저항성 유전자는 bar 유전자의 GC 함량이 68.6%인 것을 49%로 낮춘 인공 합성 PPT 저항성 유전자 (NCBI GenBank, Nucleotide Accession Number A02774) 즉, phosphinothricin acetyltransferase 유전자 (이하 ‘PAT 유전자’ 표기)이다.

PAT 유전자는 35S-35S 프로모터와 Tnos 사이에 위치하며, 선발 표지 유전자로 NPT와 GUS 유전자가 포함된 binary vector인 pBinSyn (Fig. 1)을 경희대학교 양덕춘 교수로부터 분양받아 *Agrobacterium tumefaciens* MP 90에 도입한 후

50% 글리세롤에 넣어 -80°C에 보관하였다.

Agrobacterium tumefaciens MP 90을 YEP 고체배지 (10 g/l trypton, 10 g/l yeast extract, 5 g/l NaCl, 2 g/l D-glucose, pH 7.2; 1.2% agar, 25 µg/ml kanamycin, 25 µg/ml gentamycin)에 접종하여 28°C에서 3일간 배양한 후 단일 콜로니를 YEP 액체배지 (10 g/l trypton, 10 g/l yeast extract, 5 g/l NaCl, 2 g/l D-glucose, pH 7.2; 25 µg/ml kanamycin, 25 µg/ml gentamycin) 5 ml에 접종하여 28°C에서 200 rpm으로 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 *Agrobacterium* 500 µl를 1/10 MS 액체배지 (3% 설탕) 20 ml에 희석하여 형질전환용으로 사용하였다.

3. 도라지 형질전환 및 형질전환체 선발

도라지 종자를 MS 배지에 파종하여 발아된 미성숙 자엽과 성숙엽의 절편을 각각 400개씩 *Agrobacterium* 용액에 넣고 몇 번 흔들어 준 후 15분간 침지하였다. *Agrobacterium*으로 접종된 도라지 잎의 절편을 멸균된 여과지에 살짝 대어 액체를 제거한 후 1/10 MS 고체배지에 올려 놓고 25°C에서 암상태로 48시간 동안 공동 배양하였다.

공동배양이 끝난 자엽과 성숙엽의 절편을 멸균된 여과지에 살짝 대어 아그로박테리움을 닦은 후 부정이 유도를 위해 MS 선발배지 (0.2 mg/l NAA, 1.0 mg/l BA, 3% 설탕, pH 5.8; 3 g/l gelrite, 100 mg/l kanamycin, 500 mg/l carbenicillin)에 치상하였다. 잎 절편을 20개씩 1회용 petri-dish에 치상하였으며, 25°C로 유지되는 배양실에서 3,000 lux로 16시간 배양하였다. 선발배지에서 형성된 부정은 새로 조제한 선발배지로 2회 옮겨서 선발하였고, 선발배지에서 생존한 싹을 뿌리 형성용 MS 배지(0.1 mg/l)로 옮겨 뿌리의 형성을 유도하였다.

4. 형질전환체 분석

(1) β-glucuronidase (GUS) 분석

GUS 유전자의 도입 및 발현은 Jefferson (1987)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 일반 도라지와 형질전환체의 잎을 100 ml X-Gluc 용액 (250 µg/ml X-GlcA, 13.8 mg/ml NaH₂PO₄, 0.05% Triton X 100, 20% Methanol, pH 7.0)에 침지하고 37°C에서 24시간 반응시킨 후 청색이 잘 보이도록 95% 에탄올에 24시간 담가서 엽록소를 제거하고, 사진을 촬영하였다.

(2) PCR 및 RT-PCR 분석

도라지 형질전환체의 게놈 내에 PAT, NPT 및 GUS 유전자가 삽입되었는지를 확인하기 위하여 중합효소 연쇄 반응을 수행하였다. GUS 반응에서 양성으로 확인된 형질전환 도라지와 일반 도라지의 잎을 취해 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Cat. number 69104)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다.

PCR은 TGradient Thermocycler (Biometra사)를 사용하였고,

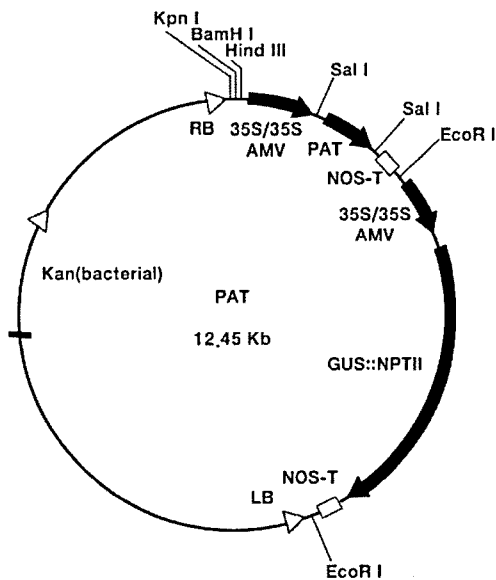


Fig. 1. Structure of the T-DNA regions of pBinSyn.

Table 1. Primer pairs designed to amplify internal PAT, NPT, and GUS fragments by PCR and RT-PCR

Primer	Sequence (5' → 3')	Fragment size (bp)
PAT	Forward CTACAGTGAACCTTTAGGACAGAGCC	371
	Reverse GTAAGTGGCCTAACT GGCCTTG	
NPT II	Forward GAGGCTATTCGGCTATGACTG	700
	Reverse ATCGGGAGCCGC GATACCGTA	
GUS	Forward CCGCCAACGTCTGCTATC	515
	Reverse TTGCAAAGTCCCG CTAGTG	

HotStart PCR PreMix (Bioneer Cat. number K-5050)에 20 ng DNA (2 µl), forward와 reverse 프라이머 각각 20 pmole (2 µl) 및 멸균수 14 µl를 첨가하여 총량 20 µl로 하였다.

사용된 primer의 sequence는 Table 1과 같다. PCR 조건은 95°C에서 15분간 HotStarTaq DNA Polymerase를 활성화시킨 후, 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분간 반응을 35회 반복하였으며, 72°C에서 10분간 증폭시켰다. PCR 반응이 끝난 후 생성된 산물 3 µl를 1.2% 또는 1.5% agarose gel에서 100 V로 45분간 전기영동하고, Syto 60 (Molecular Probes Catalog No. S11342)으로 30분간 염색한 후 증류수에 15분간 담가서 탈색하고, Odyssey (LI-COR의 Infrared Imaging System)로 사진 촬영하여 유전자의 삽입 여부를 확인하였다.

DNA에 담겨있는 유전정보가 발현되기 위해서는 RNA로 전사된 후 그 유전정보가 단백질로 번역되는 과정을 거치게 된다. DNA가 RNA로 전사되었는가를 확인하기 위하여 RT-PCR 방법을 이용하였다.

GUS 반응에서 양성으로 확인된 형질전환체와 일반 도라지 (대조구)의 잎을 취해 RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Cat. number 74903)를 사용하여 Total RNA를 추출하였다. RT-PCR은 RT/PCR Premix (Bioneer Catalog No. K-2055)를 사용하여 하나의 tube내에서 one-step으로 수행되었다.

먼저 4 ng의 주형 RNA (4 µl)와 reverse 프라이머 20 pmol (2 µl)을 멸균된 tube에 혼합한 후, 이 혼합액을 70°C에서 5분간 반응시켜 한 가닥의 꼬여 있는 RNA를 펴주고, 얼음에 5분간 잠겨두었다. 혼합액 6 µl와 forward 프라이머 20 pmol (2 µl)을 RT-PCR Premix tube에 넣고, 0.1% DEPC water 12 µl를 넣어 총량 20 µl로 맞췄다.

One-Step RT-PCR 조건은 47°C에서 30분간 역전사 반응 (cDNA를 합성) 후, 94°C에서 5분간 RTase를 불활성화시키고, 94°C에서 30초, 60°C에서 15초, 72°C에서 45초간 반응을 총 30회 반복하였으며, 72°C에서 5분간 증폭시켰다. PAT 유전자를 증폭하기 위해 사용된 primer의 sequence는 PCR 반응에 사용된 것과 같다. RT-PCR이 끝난 후 생성된 산물 3 µl를

1.2% agarose gel에 loading하고, 100 V로 45분간 전기영동한 후, Syto 60 (Molecular Probes Catalog No. S11342)으로 30분간 염색하고 증류수에 15분간 담가서 탈색하여 Odyssey (LI-COR의 Infrared Imaging System)로 사진을 촬영하였다.

5. 제초제 저항성 검정

GUS 분석 등을 통하여 형질전환이 확인된 도라지에서 PAT 유전자가 안정적으로 발현되고 있는지를 확인하기 위하여 기내 배양 단계와 온실재배 단계에서 제초제 저항성을 검정하였다.

기내배양 단계에서는 450 ml 배양병에 MS 배지를 100 ml 분주하여 멸균한 후 10 mg/l phosphinothricin(Duchefa Cat. number P0159)와 250 mg/l carbenicillin를 첨가한 후 형질전환 도라지와 일반 도라지를 함께 배지 내에 이식하고, 3주간 배양하면서 제초제 처리에 따른 경시적 변화를 조사하였다. 온실재배 단계에서는 형질전환 도라지와 일반 도라지를 화분에 심은 후 0.3%의 '바스타'를 식물체 전면에 살포하고 7일 후 조사하였다.

결과 및 고찰

도라지 종자를 MS 배지에 파종한 후 미성숙 자엽 또는 성숙엽의 절편에 PAT 유전자를 포함하고 있는 *Agrobacterium tumefaciens* MP 90을 접종하고 공동배양한 후 선발배지에 치상하였다. 선발배지에서 4주간 배양한 결과 성숙엽의 절편에 *Agrobacterium*을 접종한 경우 모든 절편이 선발 배지에서 갈변되어 전혀 형질전환이 이루어지지 않았으며, 미성숙 자엽의 절편에 *Agrobacterium*을 접종한 경우에는 3개의 자엽 절편의 절단면에서 형질전환체로 추정되는 부정아가 형성되었다 (Fig. 2). 이러한 부정아를 새로 조제한 선발배지에 4주 간격으로 2회 계대배양하여 선발하는 과정을 거쳤으며, 부정아는 선발배지에서 왕성하게 성장하여 각각 10개 이상의 신초로 증식되었다.

자엽은 분화의 정도가 낮고 세포 활성이 높기 때문에 콩의 조직배양 (Komatsuda & Ohyama, 1988; Kim *et al.*, 2004) 및 동백의 조직배양 (Kim *et al.*, 2005) 등의 재료로 많이 이용되어 왔다. 본 연구에서 도라지의 성숙엽을 형질전환에 이용한 경우 전혀 형질전환이 되지 않았으나 미성숙 자엽을 이용한 경우 형질전환이 된 것을 고려할 때 도라지의 형질전환에는 성숙엽보다 자엽을 이용하는 것이 더 유리할 것으로 판단되었다.

1. 도라지 형질전환체의 유전자 분석

(1) GUS 분석

GUS 유전자의 도입 및 발현을 확인하기 위해 선발배지에서 선발된 형질전환체와 일반 도라지의 잎을 사용하여 GUS 활

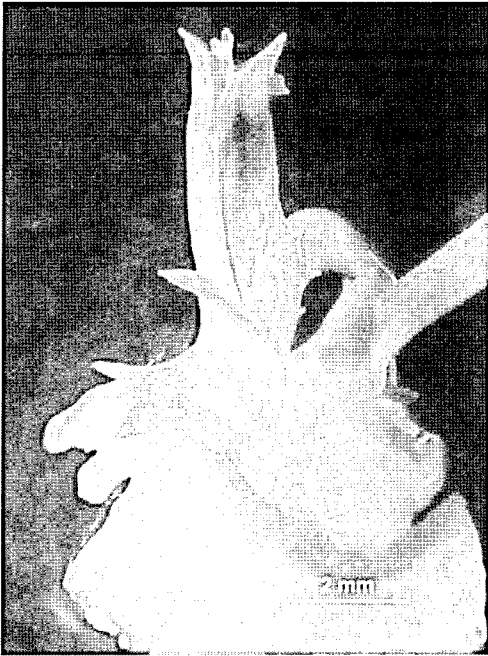


Fig. 2. Putative transgenic shoots formed from immature cotyledon explant of balloon flower on MS medium with 100 mg/l kanamycin and 500 mg/l carbenicillin.

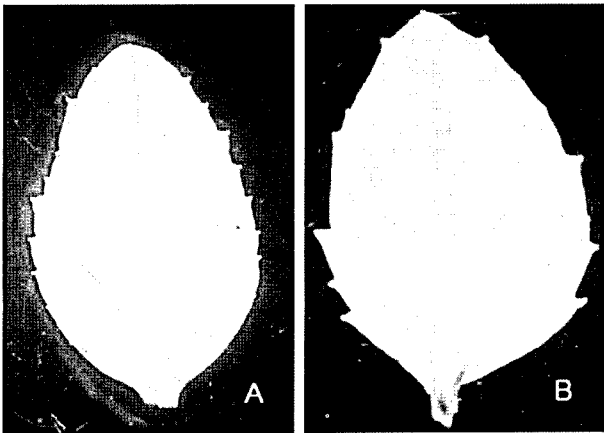


Fig. 3. GUS expression in balloon flower leaves. A: Non-transgenic leaf, B: Transgenic leaf.

성을 조사하였다. GUS 유전자 분석은 형질전환체를 선발하기 위해 많이 사용되는 방법으로, 본 연구에서 일반 도라지의 잎에서는 청색 반응이 전혀 일어나지 않았으나, 선발배지에서 선발된 도라지는 강한 청색 반응을 보였다 (Fig. 3). 이러한 결과는 유전자가 잘 도입되어 발현되었음을 의미하는 것으로, GUS 양성 반응을 보인 식물체들이 형질전환체임을 증명하는 것이다 (Hoshino *et al.*, 1998; Belarmino & Mii, 2000; Tsukazaki *et al.*, 2002). 선발배지에서 선발된 신초를 GUS 분석한 결과 대부분이 양성 반응을 보였다.

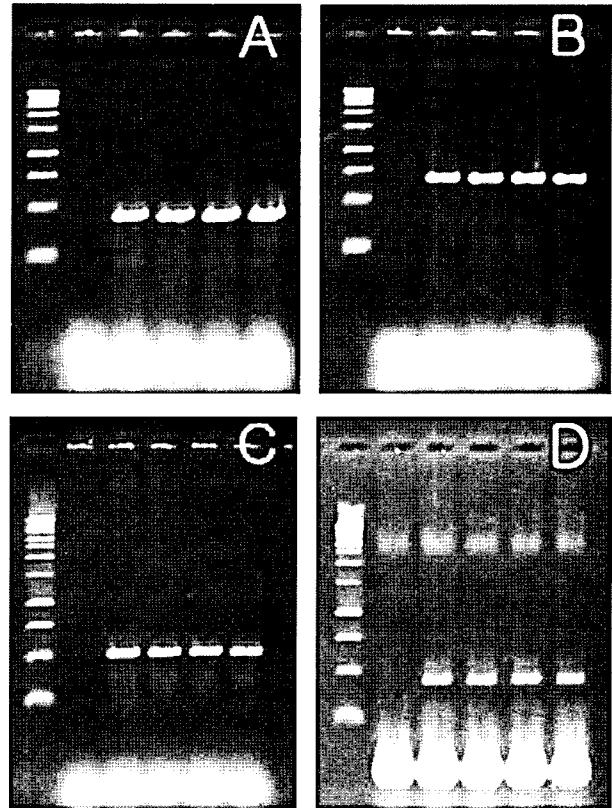


Fig. 4. PCR and RT-PCR analyses of basta-resistant balloon flower plants. PCR products of PAT (A), NPT (B) and GUS (C) were 371 bp, 700 bp and 515 bp, respectively. RT-PCR product of PAT (D) was 371 bp. M: 1 kb DNA ladder. Lane 1: Nontransgenic plant, Lanes 2 to 5: Transgenic plants.

(2) PCR 및 RT-PCR 분석

도라지 형질전환체와 일반 도라지의 잎에서 genomic DNA를 추출한 후 PAT 유전자에 대한 PCR 분석을 실시하였다. 형질전환 도라지에서는 모두 PAT 유전자의 PCR 밴드를 확인할 수 있었으나, 일반 도라지에서는 밴드가 없었다 (Fig. 4, A). 또한 PAT 유전자와 같은 운반체에 들어 있으며, 표지 유전자로 사용된 NPT 유전자와 GUS 유전자를 PCR로 분석하였다. 형질전환 도라지에서는 700 bp에서 NPT 유전자의 PCR 밴드가 형성되었고 (Fig. 4, B), 515 bp에서 GUS 유전자의 PCR 밴드가 형성 되었으나, 일반 도라지에서는 밴드가 없었다 (Fig. 4, C). 이상의 결과에서 형질전환 도라지의 염색체 안에 도입하고자 하는 유전자가 잘 삽입되었음이 확인되었다.

DNA에 담겨있는 유전정보가 발현되기 위해서는 RNA로 전사된 후 그 유전정보가 단백질로 번역되는 과정을 거치게 된다. DNA가 RNA로 전사 되었는가를 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행한 결과 GUS 반응에서 양성으로 확인된 형질전환 도라지에서는 모두 371 bp에서 PAT 유전자의 밴드가 형성 되었으나, 일반 도라지에서는 밴드가 형성되지 않았다 (Fig. 4,



Fig. 5. Response of non-transgenic (left) and transgenic (right) balloon flower plants on MS medium with 10 mg/l phosphinothricin and 250 mg/l carbenicillin after 3 weeks of culture.

D). 이러한 결과는 외부 유전자인 PAT 유전자가 DNA에서 RNA로 전사되었음을 의미하는 것으로, PAT 유전자가 도라지에 성공적으로 도입되었음을 확인하는 것이다.

2. 제초제 저항성 검정

GUS 유전자 분석 등을 통하여 형질전환이 확인된 도라지에서 제초제 저항성 PAT 유전자가 안정적으로 발현되고 있는지를 확인하기 위하여 phosphinothricin이 투입된 배양병 내에서 제초제 저항성을 검정하였다.

본 연구에서 사용된 제초제는 bialaphos로서 '바스타'란 상품명으로 판매되고 있는 비선택성 제초제이다. Bialaphos는 *Streptomyces hygroscopicus*로부터 생성된 2분자의 L-alanine으로 구성된 tripeptide이고 phosphinothricin으로 알려진 glutamic acid와 유사물질이다 (Kondo *et al.*, 1973). Bialaphos의 peptidase 기작에 의해 유출된 phosphinothricin은 glutamine의 생합성을 강력히 억제하며, glutamine의 생합성이 억제되면 식물체는 glutamine의 생성이 어렵게 되고 질소대사에 지장이 초래되며 식물체 내에 암모니아가 축적되어 결국은 고사하게 된다 (Tachibana *et al.*, 1986). 그러나 phosphinothricin acetyltransferase (PAT) 유전자는 phosphinothricin의 NH₂를 아세틸화하여 독성물질의 축적을 방지함으로써 제초제인 '바스타'에 저항성을 나타내게 된다.

배양병에 이식한 후 6일경부터 일반 도라지는 잎의 약 30%가 갈색으로 변하였으며, 이식 3주후에는 잎과 줄기가 100%가 갈색으로 변하여 완전히 고사하였으나, 형질전환 도라지는 아무런 피해없이 정상적인 생장을 계속하여 새로운 잎이 전개되고 뿌리의 생장이 관찰되었으며, 형질전환 도라지가 phosphinothricin에 저항성임을 확인하였다 (Fig. 5).

기내에서 선발된 형질전환 도라지를 화분에 심고 초장이

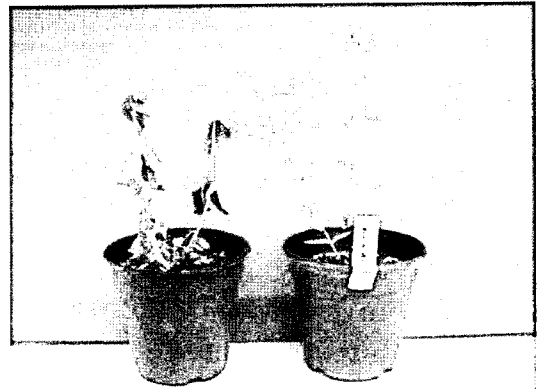


Fig. 6. Response of non-transgenic (left) and transgenic (right) balloon flower plants applied with 0.3% basta.

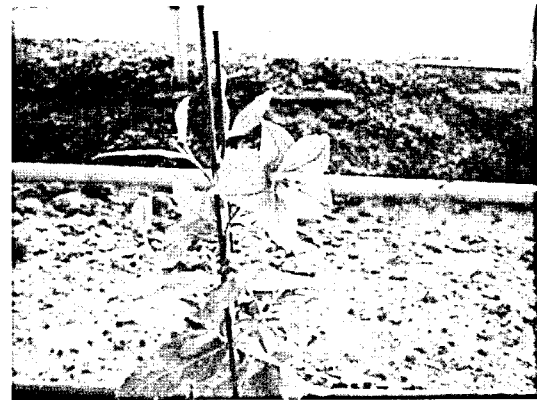


Fig. 7. Flowering of basta-resistant balloon flower plant under plastic house.

15 cm 정도로 자란 후 분무기를 사용하여 0.3%의 '바스타'를 식물체 전면에서 살포하였다. '바스타'를 살포하고 7일이 경과한 후 일반 도라지는 잎과 줄기가 대부분 갈색으로 변하여 거의 고사하였으나, 형질전환 도라지는 피해를 입지 않고 정상적인 생육을 계속하였으며 (Fig. 6), 이 식물체를 비닐하우스로 옮겨 재배한 결과 정상적으로 개화하였다 (Fig. 7).

이러한 형질전환된 도라지가 농가에서 재배된다면 손 제초작업 대신에 제초제 '바스타'를 1회 살포하는 것으로 제초작업을 마치게 되므로 노동력을 절감할 수 있을 것이며, '바스타'는 토양에서 쉽게 분해되기 때문에 환경 오염에도 큰 영향을 미치지 않을 것으로 기대된다.

적 요

본 연구는 *Agrobacterium*을 매개로 도라지에 PAT 유전자를 도입하여 '바스타'에 저항성을 가지는 형질전환 도라지를 개발하는 기술을 확립하기 위하여 수행되었다. 종자를 무균적으

로 받아시킨 후 10일 된 미성숙 자엽과 성숙엽에 *Agrobacterium*을 접종하고 1/10 MS 배지에서 48시간 동안 공동 배양하였다. 공동배양 후 부정아 유도를 위해 MS 선발배지 (0.2 mg/l NAA, 1.0 mg/l BA, 3% 설탕, pH 5.8; 3 g/l gelrite, 100 mg/l kanamycin, 500 mg/l carbenicillin)에 치상하여 배양한 결과 미성숙 자엽의 절편에서 형질전환체로 추정되는 부정아가 형성되었고, 선발배지에 2회 계대배양하여 형질전환 추정체를 선발하였다. 이러한 형질전환 추정체는 GUS, PCR 분석 및 RT-PCR 분석에 의하여 형질전환체로 확인되었다. 또한 10 mg/l 의 phosphinothricin이 함유된 배지에서 배양하여 형질전환 여부를 확인하였고, 순화재배 후 0.3% '바스타'를 살포한 결과 형질전환 도라지는 제초제에 저항성을 보였다. '바스타'에 저항성을 보인 도라지 식물체는 정상적인 생육을 계속하여 개화하였다.

LITERATURE CITED

- Belarmino MM, Mii M** (2000) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a phalaenopsis orchid. *Plant Cell Rep.* 19:435-442.
- Cho JH, Kim YW** (2004) Molecular and cytogenetic analysis of transgenic plants of rice (*Oryza sativa* L.) produced by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Kor. J. Plant Res.* 7(1):39-46.
- Ha YM, Kim JC, Lee SW, Lee SW, Kim ZH** (2003) Expression and inheritance of *bar* gene in *Petunia hybrida* transformed with *Agrobacterium*. *Kor. J. Plant Biotech.* 30(2):143-149.
- Hoshino Y, Zhu YM, Nakano M, Takahashi E, Mii M** (1998) Production of transgenic grapevine (*Vitis vinifera* L.) plants by co-cultivation of embryogenic calli with *Agrobacterium tumefaciens* and selecting secondary embryos. *Plant Biotechnology* 15(1):29-33.
- Jefferson RA** (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mole. Biol. Rep.* 5(4):387-405. Cambridge, England.
- Kang JH, Shim YD, Jeon BS** (2002) Seed treatment procedure to promote seedling emergence of *Platycodon grandiflorum*. *Kor. J. Med. Crop Sci.* 10(2):75-81.
- Kim KS, Hwang SJ, Pyo BS, Kim SM** (2005) Adventitious bud induction and plant regeneration from cotyledon explants of *Camellia japonica* L. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 13(3):105-108.
- Kim YJ, Park TL, Kim HS, Park HG, Chon SU, Yun SJ** (2004) Factors affecting somatic embryogenesis from immature cotyledon of soybean. *J. Plant Biotech.* 6(1):45-50.
- Komatsuda T, Ohyama K** (1988) Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean *Glycine max.* *Theor. Appl. Genet.* 75:695-700.
- Kondo T, Shomura T, Ogawa Y, Watanabe H, Totsukawa K, Suzuki T, Moriyama C, Toshida J, Inouye S** (1973) Studies on a new antibiotic SF-1293. Isolation and physico-chemical and biological characterization of SF-1293 substance. *Sci. Rep. Meiji Seika Kaisha* 13:34-41.
- Lim JD, Yu CY, Kim MJ, Yun SJ, Lee SJ, Kim NY, Chung LM** (2004) Comparison of SOD activity and phenolic compound contents in various Korean medicinal plants. *Kor. J. Med. Crop Sci.* 12(3):191-202.
- Saeki T, Koike K, Nikaido T** (1999) A comparative study on commercial, botanical gardens and wild samples of the roots of *Platycodon grandiflorum* by HPLC analysis. *Planta Medica* 65:428-431.
- Seong JD, Kim GS, Kim HT, Park CB, Kim SM** (2004) Effect of split application of nitrogen fertilizer on growth and yield in *Platycodon grandiflorum* A. DC. *Kor. J. Med. Crop Sci.* 12(6):437-441.
- Tachibana K, Watanabe T, Sekizawa T, Takemutsu T** (1986) Action mechanism of bialaphos. . Accumulation of ammonia in plants treated with bialaphos. *J. Pest. Sci.* 11:33-37.
- Tsakazaki H, Kuginuki Y, Aida R, Suzuki T** (2002) *Agrobacterium*-mediated transformation of a doubled haploid line of cabbage. *Plant Cell Rep.* 21:257-262.
- White J, Chang SY, Bivv MJ** (1990) A cassette containing the *bar* gene of *Streptomyces hygroscopicus*: a selectable marker for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 18:1062-1065.
- Woo JW, Jeong WJ, Choi KS, Park HG, Baek NK, Liu JR** (2001) Production of herbicide-resistant transgenic plants from embryogenic suspension cultures of cucumber. *Kor. J. Plant Tiss. Cult.* 28(1):53-58.
- Yang KJ** (2001) Genetic transformation of *Panax ginseng* with herbicide resistant gene. *Kor. J. Plant Tiss. Cult.* 28(6):353-357.