

## 인공합성 Phosphinothricin Acetyltransferase 유전자에 의한 Basta 내성 연초식물체의 개발

양덕춘, 민병훈<sup>1)</sup>, 강태진<sup>2)</sup>, 우인식<sup>2)</sup>, 박은경  
한국인삼연초연구원 유전생리부, <sup>1)</sup>배재대학교 원예학과, <sup>2)</sup>충남농촌진흥원

## Development of Basta Resistant Tobacco Using Artificial Phosphinothricin Acetyltransferase Gene

Deok Chun Yang, Byung Hoon Min<sup>1)</sup>, Tae Jin Kwang<sup>2)</sup>, In Sik Woo<sup>2)</sup> and Eun Kyung Park  
Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea  
<sup>1)</sup>Department of Horticulture, Paichai University, Taejon 302-735, Korea  
<sup>2)</sup>Chungnam Provincial RDA, Taejon 305-313, Korea

### ABSTRACT

This experiment was conducted to introduce phosphinothricin acetyl-transferase(PAT) gene, resistant to basta and non-selective herbicide, into tobacco(*Nicotiana tabacum* cv. BY4). For shoot formation, tobacco leaf disks were placed on the MS medium supplemented with 2.0mg/L BA and 0.1 mg/L NAA. In this medium condition, tobacco leaf discs were cocultivated with *A. tumefaciens* MP90 containing NPT II and PAT resistant to kanamycin and Basta, respectively. Shoots were obtained in the medium containing antibiotics, and those were transferred to rooting medium supplemented with 0.1mg/L NAA and antibiotics. The plants obtaining roots were transplanted into soil. Phenotype of transgenic tobacco plant was mostly as normal plant. However, about 5% was abnormal plant, which did not set seeds. PCR analysis and southern blot were performed to determine transformation. As the results, it was confirmed that PAT gene was stably integrated into tobacco genome. When herbicide, basta, was sprayed to the plants confirmed by PCR, the transgenic plants showed normal growth, whereas normal plants died. Therefore, the results of this experiment show that tobacco transformation for the resistance to basta, non-selective herbicide, was successful because PAT gene was stably integrated into tobacco.

**Key words:** *Agrobacterium*, PAT, PCR, southern blot, transformation

### 서 언

농작물에서 잡초로 인한 수확량 감소는 가장 문제가 되어왔고 또한 이를 제거하기 위하여 손제초 또는 토양 보온 덮개를 이용하게 되었다. 그러나 최근 인건비의 상승으로 인하여 제초제의 사용은 불가피하게 되었기 때문에 동물과 환경에 효과적이고 안전한 새로운 제초제를 찾게 되었다. 그러나 대부분의 제초제는 토양오염 및 독성을 야기시켜서 토양 잔류

성이 적은 제초제의 사용이 급선무이지만 이러한 제초제는 주로 비선택성이어서 사용이 제한되어 왔다. 따라서 제초제에 대한 내성 식물체를 만들어 사용함으로써 이런 문제점을 보완하고자 많은 식물체에서 여러 종류의 제초제저항성 유전자에 의해서 식물형질전환기법을 이용 저항성품종을 개발하고자 하는 연구가 수행되었으며(D' Halluin 등, 1992; Spencer 등, 1990; Vasil 등, 1992)), 형질전환식물체의 임성 및 후대검정까지 수행한 바 있다(Fromm 등, 1990; Gordon-Kamm 등, 1990). 본 실험에서 사용하고자 하는 제초

제는 bialaphos로서 “Basta”란 상품명으로서 판매되고 있으며 강력한 비선택성 제초제이다(Tachibana 등, 1986). Bialaphos는 *Streptomyces hygroscopicus*로부터 생성된 2분자의 L-alanine으로 구성된 tripeptide이고 phosphinothricin(PPT)으로 알려진 glutamic acid와 유사물질이다(Kondo 등, 1973). Bialaphos의 peptidase 기작에 의해 유출된 PPT는 glutamine synthetase의 강력한 억제물질이다(Thompson 등, 1987). 따라서 glutamine synthetase가 억제되면 식물체는 glutamine의 생성이 어렵게 되고 질소대사에 지장을 초래하게 되며, 또한 암모니아가 축적하게 되어 결국은 고사하게 된다(Tachibana 등, 1986). 그러나 Phosphinothricin acetyltransferase(PAT) 유전자는 PPT의 NH<sub>2</sub>를 acetyl화하여서 생성기관의 자동독성물질 축적을 방지함으로써 제초제인 basta에 저항성을 나타내게 된다. 이러한 PAT 유전자를 클로닝함으로써 형질전환 식물체를 개발하려는 연구가 진행되어 왔으며 주로 bar gene이라고 명명된 *Streptomyces hygroscopicus*에서 클로닝된 유전자를 사용하여 왔으나(De Block 등, 1989; Thompson 등, 1987; Rathore 등, 1993), 독일 Hoechst사에서 기존의 bar 유전자의 GC content(68.6%, white 등, 1990)를 낮추어 새로운 인공 PAT(GC content, 49%; NCBI Accession NO-A02774)를 합성하였다.

본 실험은 비선택성이며 살포 후 제초효과가 빨리 나타나고 땅에 떨어지면 분해가 가능한 제초제인 Basta에 저항성을 가지는 연초를 생산할 목적으로 독일 Hoechst사가 합성한 인공 PAT 유전자를 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하여 연초에 도입하고, 안정하게 발현되는지 여부를 확인하며, 또한 토양에서 제초제를 직접 살포하여 형질전환된 연초가 저항성을 나타내는지 확인할 목적으로 수행하였다.

## 재료 및 방법

식물재료 및 균주: 본 실험의 식물재료로서는 연초 (*Nicotiana tabacum* cv BY4)가 사용되었으며, 잎절편을 재분화배지(MS/B5 + 2.0 mg/L BA + 0.1 mg/L NAA)에 치상하여 형성된 신햄를 발근배지(1/2 MS/B5 + 0.1 mg/L NAA)가 함유되어 있는 Magenta GA-7(Sigma) 용기에서 유지시키면서 계속적으로 재료로 사용하였다. 실험에 사용된 제초제 저항성 유전자는

독일 Hoechst사에서 인공합성한 phosphinothricin acetyltransferase(PAT) 유전자를 사용하였으며(NCBI Accession NO-A02774). 본 유전자는 선발 marker인 NPT II gene(카나마이신 내성 유전자)와 35S-35S-AMV-PAT gene-Tnos로 이루어져 있고, 식물형질전환용 binary vector에 재조합되었다. 본 재조합 vector는 캐나다 식물유전공학연구소의 Dr. Keller로부터 공여받았으며, disarmed Ti-plasmid (Hoekema 등, 1986)를 함유하고 있는 *Agrobacterium tumefaciens* MP90에 tri-parental mating 방법 (Dietta 등, 1980)에 의하여 도입하여 사용하였다.

연초의 형질전환: PAT 유전자를 함유하고 있는 *A. tumefaciens* MP90/PAT 균주를 kanamycin 25µg/mL, gentamycin 25µg/mL가 함유된 AB배지(An, 1987)에서 균농도가 OD<sub>600</sub>=0.7이 될 때까지 배양한 후 형질전환을 위해서 연초의 잎절편과 공동배양에 사용하였다. 공동배양을 위한 *Agrobacterium*은 대수기로 증식시킨 후 원심분리하여 상등액을 버리고 호르몬 무침가 MS/B5 액체배지에 동량으로 희석하였다. 여기에 연초의 잎 disk를 10분동안 침지하였으며 이를 멸균된 여과지에서 10분간 건조시켰다. 건조된 절편은 공동배양배지(MS/B5 + 2,4-D 2mg/L)에서 2일간 배양한 후 재분화 선발배지(MS/B5 + BA 2.0mg/L + NAA 0.1mg/L + kanamycin 100µg/mL + carbenicillin 500µg/mL)에서 6주간 배양하여 신햄을 형성시켰다. 형성된 신햄을 발근배지(1/2 MS/B5 + NAA 0.1mg/L + kanamycin 50 µg/mL)에서 뿌리를 유도한 후 토양에 이식하였다.

형질전환체의 유전자 분석: 항생제에 의해 선발된 형질전환 연초는 계놈내에 NPT II 및 PAT 유전자가 삽입되었는지를 확인하기 위하여 Polymerase Chain Reaction (PCR)을 수행하였다. 선발배지에서 재분화된 연초의 잎으로부터 DNA를 추출하였으며(Edwards 등, 1991), PCR은 thermal cycler(Perkin Elmer Cetus)를 사용하였고, PCR Premix(Bioneer, Korea)에 DNA 50ng, primer 20pmol을 첨가하여 총량을 20 l로 하였다. PCR 반응조건은 우선 96°C에서 2분간 pre-denaturation 한 후, 96°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 2분간 증폭을 36회 반복시킨 후 72°C에서 15분간 post-extension 시키는 조건으로 하

였다. PCR 반응시 사용한 primer는 NPT II 유전자의 증폭을 위하여 5'-GTGGAGAGGCTATTCGGCTA-3', 5'-CCACCATGATATTCGGCAAG-3' 을 사용하였고, PAT 유전자의 증폭을 위하여 5'-AGGACAGAGCCACAAACACC-3', 5'-ATGCTTGATCCAGCTGCG-3' 로서 각각 500bp와 357bp의 DNA를 합성하였다. 합성된 DNA밴드는 1.2% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. Southern blot는 PCR에 의하여 형성된 DNA 밴드를 DNA labeling and detection kit(BM Cat.No. 1093 657)를 사용하여 확인하였으며 사용방법은 BM에서 지시한 대로 하였다.

형질전환체의 토양이식: 포장시험을 위하여 형질전환된 식물체를 토양에 옮겨 심고 생육상태와 형태적 특성을 조사하였으며, 제초제 저항성 유전자가 제

대로 도입되었을 뿐만 아니라 또한 안정적으로 발현되고 있는지를 확인하기 위하여 제초제 살포 실험을 하였다. 잡초인 바랭이와 명아주에 Basta액제(경농)를 구입하여 농가에서 사용하는 300mL/10a 농도로 살포한 후 2주후 생육상태를 조사하고, 또한 형질전환된 연초와 대조구로서 정상연초에 제초제를 동량 살포하여 비교, 확인하였다.

## 결과 및 고찰

연초의 형질전환 및 선발: 연초 조직을 제초제 저항성인 PAT 유전자가 포함된 *Agrobacterium tumefaciens* MP90/PAT에 의하여 형질전환시키기 위하여 leaf disk를 이용하여 공동배양방법에 의하여 형질전환을 유도하였다. 2,4-D가 첨가된 공동배양배지에서 2일간

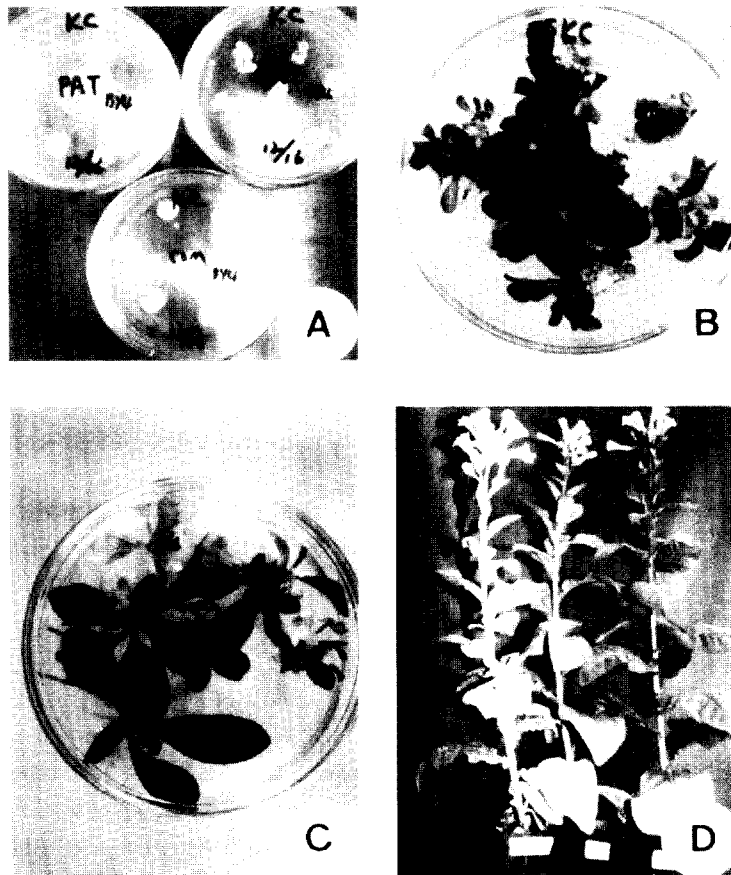


Fig. 1. Formation of herbicide-resistant transformed tobacco plants. A, leaf disks placing on the medium containing 100 $\mu$ g/ml kanamycin; B, shoots and C, roots obtained from the medium containing kanamycin; D, transgenic matured plants.

배양한 후 정상조직은 모두 고사하는 kanamycin 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  와 carbenicillin 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 첨가된 재분화배지에서 배양하였던 바, 배양 30일 후에는 잎절편의 여러부위에서 많은 돌기와 어린 신초가 형성되었으며(그림 1-A), 60일 후에는 거의 90% 이상의 잎절편에서 성숙된 신초가 형성되었다(그림 1-B). 이러한 항생제 배지로부터 형성된 신초를 분리하여 다시 kanamycin이 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  함유된 발근배지에 옮겼던 바, 20일 후에는 토양에 이식할 정도의 뿌리가 형성되었다(그림 1-C). 또한 뿌리가 유도된 형질전환 식물체를 agar를 제거한 후 토양에 이식하였던 바, 정상적으로 생육이 가능하였다(그림 1-D). 연초는 일반적으로 재분화가 매우 잘된 식물로서 본 실험에서와 같이 고농도의 항생제배지에서 매우 높은 분화율을 보였다. 그러나 뿌리의 분화는 다소 더딘 경향이 있어 형질전환체로 확인된 연초를 다시 항생제의 함량을 낮춘 농도에서 배양한 결과 매우 많은 뿌리를 가진 식물체를 생산할 수 있었으며, 이 과정에서도 뿌리의 발육이 낮은 식물체는 사전에 제거함으로써 진정 형질전환체를 재선발할 수 있었다. 또한 Eliseu 등(1994)도 kanamycin을 포함하는 배지에서 뿌리의 형성이 어려우므로 발근배지에서는 재분화배지에서보다도 kanamycin이 적게 함유된 배지를 사용한 바 있다.

연초의 형질전환체의 유전자분석: 연초형질전환시 표지유전자로 사용된 NPT II 유전자의 발현에 의해서 1차적으로 고농도의 항생제(kanamycin) 배지에서 생존한 식물체를 선별하여 우선적으로 NPT II 유전자가 연초의 게놈내에 안정되게 삽입되었는지를 확인하였다. NPT II 유전자의 염기서열을 확인하여 primer를 제작한 후 PCR에 의해서 분석을 수행한 결과 형질전환 연초식물체에서 모두 500 bp의 NPT II 유전자의 DNA 절편을 확인할 수 있었지만(그림 2-A-T), 대구조로 사용한 정상 식물체에서 전혀 아무 절편도 형성되지 못하였다(그림 2-A-N). 이는 표지유전자로 사용한 NPT II 유전자가 핵내에 삽입되어 있음을 의미하며, 따라서 같은 운반체에 들어 있는 PAT 유전자도 형질전환체에 삽입되어 있을 것으로 사료된다. 그러나 확실한 확인을 위해서 다시 PAT 유전자의 염기서열을 중심으로한 primer를 작성하여 역시 같은 방법에 의해서 PCR로 확인해 본 결과 형질전환체에서는 357 bp의 PAT 유전자 밴드가 확인되었지

만(그림 2-B-T), 대구조로 사용된 정상 연초 식물체에는 DNA 증폭이 일어나지 않아서 밴드가 나타나지 않았다(그림 2-B-N). 한편 PCR의 경우 간혹 확인하고자하는 밴드가 진정이 아닌 가짜 밴드가 나올 가능성도 있으므로, 본 실험에서도 형성된 PCR밴드가 진정 PAT 유전자 절편인지를 확인하기 위해서 Southern blot에 의해서 확인한 결과 틀림없는 PAT 유전자 절편임을 확인할 수 있었다(그림 2-C). 이러한 결과로 미루어보아 외부 유전자인 PAT이 연초에 성공적으로 도입되어 형질전환되었다는 것을 확인할 수 있었다.

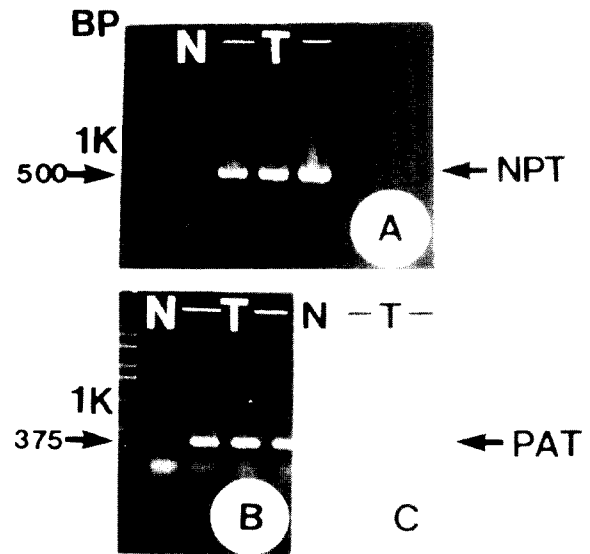


Fig. 2. Analysis NPT II and PAT genes by PCR(A and B), and Southern blot(C) from control plants(N) and transgenic tobacco plants(T). PCR products of NPT II(A) and PAT(B and C) genes were 500 bp and 375 bp respectively.

연초의 형질전환체의 토양이식: PAT 유전자에 의해서 형질전환이 확인된 연초식물체를 토양에 옮겨 심고 대구조와 비교하여 생육을 관찰한 결과 약 95%는 정상적인 생육을 하였으나(그림 1-D), 5%가량은 비정상적인 상태로 생육하였다. 특히 비정상적으로 성장한 형질전환 연초의 경우에는 잎의 형태가 매우 차이가 있었는데 잎이 완전히 발육을 하지 못하고 구부러져 있는 상태로 성장하였다(그림 3-A). 또한 정상적인 형질전환체의 경우에는 개화가 가능하였고 씨방도 정상적으로 발육을 하여 종자도 획득할 수 있었으나, 비정상적인 형질전환체에서는 개화는 가

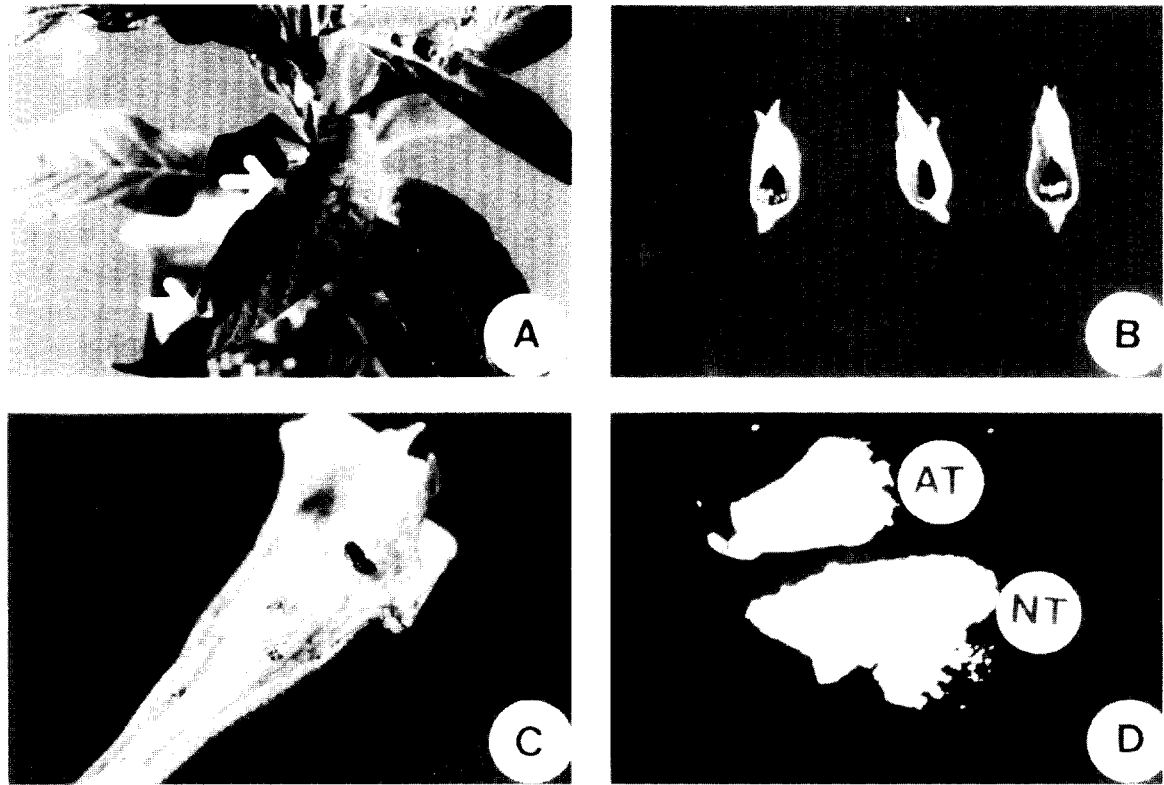


Fig. 3. Phenotype of transgenic plant(A) with curved leaf(arrows), ovary(B), stamen(C) and pollen grains(D) from abnormal-type transformant(AT) and normal-type transformant(NT) with PAT gene.

능하였으나 전혀 씨방이 발육을 하지 못해 종자를 맺지 못했다(그림 3-B). 따라서 비정상적인 형질전환체의 수술상태를 조사한 결과 수술의 발육이 정상적으로 되지 않아 암술보다 길이가 작았으며(그림 3-C), 또한 수술속에 들어있는 꽃가루도 거의 발육이 되어 있지 않았다.

본 실험의 목적인 basta 내성 연초식물체를 획득하기 위해서 비선택성인 제초제인 Basta를 300 mL/10a의 농도로 사용하여 우선 잡초인 병아리(그림 4-A)와 바랭이(그림 4-B)에 살포하여 2주후 관찰한 결과 완전히 고사하였다. 따라서 동일 농도의 Basta를 역시 PAT이 도입된 형질전환된 연초와 대조구로 사용된 정상연초의 잎에 솜으로 도포한 후 생육상태를 조사하였던 바, 처리 5일 후에 영향이 나타나 형질전환체는 전혀 이상이 없었으나, 대조구인 정상식물체는 피해를 입었다(그림 4-C). 또한 정상적인 살포방법에 의해서 동량의 Basta를 형질전환체와 정상식물체에 살포한 결과 대조구로 사용된 연초는 2주

일이 경과되면서 완전히 고사하는 반면(그림 4-D-N), 형질전환된 연초는 아무런 피해없이 건강한 식물체로 성장하였다(그림 4-D-T). 이는 농가에서 사용하는 Basta농도인 300 mL/10a를 연초에 살포하였을 때 잡초는 모두 고사하는 반면 PAT이 도입된 연초에는 아무런 생육장애없이 자라날 수 있는 것으로 확인되었다.

포장에서 작물재배시 가장 문제가 되고 있는 것은 잡초와의 경쟁에 의한 생산량의 감소라고 할 수 있는 바, 생산성의 증가를 위해서는 제초를 하는 것이 불가피하여 현재 주로 순제초에 의존하고 있으며 작물에 따라서는 제초제를 사용하고 있다. 현재 주로 사용되고 있는 화학제초제들은 대부분 잡초들뿐만 아니라 재배하고자 하는 유용작물까지 죽이기 때문에 사용에 많은 제한요인이 있다. 본 실험에서 사용한 Basta도 토양잔류성이 낮아 토양의 오염 및 독성 등에 영향이 없어 사용가치가 있는 제초제이지만 비선택성 제초제이기 때문에 처리방법에 따라 목적으

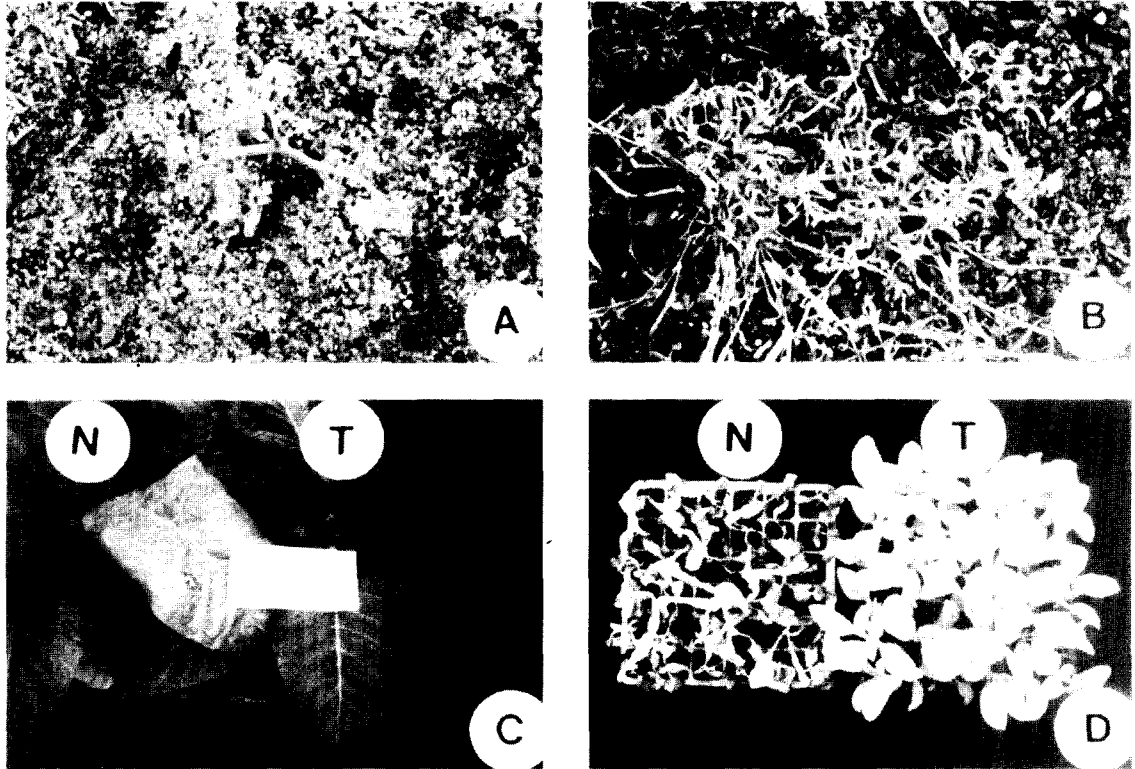


Fig. 4. Bioassay of Digitaria(A), Chenopodium(B), control tobacco (C, D-N) and transformed tobacco(C, D-T) plants after five days(C) and two weeks(D) treatment with 300 mL/10a basta.

로 하는 작물까지 동시에 고사시킬 수 있다.

따라서 본 실험의 목적과 같이 Basta 내성연초식물체가 육성된다면 매우 효율적으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 그동안 Basta내성 유전자로 bargene을 사용하여 여러 실험실에서 성공적으로 발현됨을 보고하였으나, 본 실험에서 사용한 합성된 PAT 유전자를 사용하여 연초에서 성공적으로 발현된 것은 보고되지 않았다. 그러나 본 시험결과 연초에서도 합성된 PAT 유전자에 의해서 성공적으로 발현됨이 확인되었으며 토양에서 제초제처리시 생장이 가능함이 확인되었다. 따라서 이러한 형질전환된 연초가 농가에서 사용된다면 손제초 대신 제초제를 살포하여 노동력감소로 인한 생산비를 감소할 수 있을 뿐만 아니라 형질전환된 연초에는 제초제에 대한 생육장애가 없으므로 생산량의 증가 역시 기대된다. 또한 제초제 Basta는 토양에서 쉽게 분해되기 때문에 환경오염에도 큰 영향을 미치지 않을 것으로 여겨진다. 다만 재분화된 식물체중에서 약 10%정도가 비정상적

인 식물체로 성장하였는데 이런 식물체의 특성이 PAT 유전자 때문인지, 혹은 *Agrobacterium*을 매개로 하였을 때, 외부유전자가 무작위로 도입되기 때문에 형질전환시 유전자가 도입될 때 옆의 형태와 관련된 유전자부위에 본 유전자가 삽입되어 나타나는 현상인지에 대해서는 추후 검토를 해야 할 것으로 생각된다.

## 적 요

본 실험은 비선택성 제초제인 basta에 저항성인 PAT 유전자를 연초(*Nicotiana tabacum* cv BY4)에 도입하고자 실시하였다. 연초의 leaf disk는 재분화를 위하여 BA 2.0 mg/L와 NAA 0.1 mg/L가 포함된 MS/B5배지를 사용하였다. 이러한 배지 조건에서 연초의 잎절편을 항생제인 kanamycin에 저항성인 NPT II 유전자와 제초제 저항성인 PAT 유전자를 가진 binary vector를 함유한 *A. tumefaciens* MP90에 공동배양하였다.

약 6주후 항생제가 포함된 배지에서 신초가 형성되었고 이를 NAA 0.1 mg/L과 항생제가 포함된 발근 MS/B5배지로 옮겼다. 약 20일 후 뿌리가 형성된 식물체는 포장에 이식하였다. 형질전환체의 형태적인 특성은 대부분 정상적이었으나 약 5% 가량은 비정상적으로 성장하였으며 정상적인 형질전환체와는 달리 전혀 종자를 맺지 못했다. 선발된 식물체의 형질 전환 여부를 조사하기 위해서 PCR분석과 southern blot을 수행한 결과 연초의 게놈에 안정되게 PAT 유전자가 삽입되었음이 확인되었다. 확인된 식물체는 포장에서 제초제인 Basta를 살포한 결과 대구조로 사용한 정상 연초는 모두 고사하였으나 형질전환체는 모두 정상적인 생육을 보였다. 따라서 본 실험결과 PAT 유전자를 연초에 안정되게 도입함으로써 비선택성 제초제인 Basta에 저항을 나타내는 연초의 형질 전환체를 획득하는데 성공하였다.

## 인 용 문 헌

- An G., Watson, B.D., Chiang, C.C. 1986. Transformation of tobacco, tomato, potato and *Arabidopsis thaliana* using a binary Ti vector system. *Plant Physiol* 81: 301-305.
- DeBlock M., De Brouwer D., Tenning P. 1989. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the bar and neo genes in the transgenic plants. *Plant Physiol* 91: 694-701.
- Diatta G., Stanfield S., Corbin D., Helinski D.R. 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium melioidi*. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 7347-7351.
- D' Halluin K., Bossut M., Bonne E., Mazur B., Leemans J., Botterman J. 1992. Transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) and evaluation of herbicide resistance in transgenic plants. *Bio/technology* 10: 309-314.
- Edwards, K.C., Johnson C., Thompson C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19: 1349.
- Eliseu S., Figueiredo L.F.A., Monte-Neshich D.C. 1994. Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) cv Mantiqueira using *Agrobacterium tumefaciens* and evaluation of herbicide resistance. *Plant Cell Rep* 13: 666-670.
- Fromm M.E., Morrish F., Armstrong C., Williams R., Thomas J., Klein T.M. 1990. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio/technology* 8: 833-839.
- Gordon-Kamm W.J., Spencer T.M., Mangano M.L., Adams T.R., Daines R.J., Start W.G., O' Brien J.V., Chambers S.A., Adams Jr. W.R., Willetts N.G., Riche T.B., Mackey C.J., Krueger R.W., Kausch A.P., Lemaux P.G. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell* 2: 603-618.
- Hoekema A., Van Haaren M.J.J., Felinger A.J., Hooykaas P.J.J., Schiperoort R.A. 1986. Non-oncogenic plant vectors for use in the *Agrobacterium* binary vector system. *Plant Molecular Biology* 5: 85-89.
- Kondo T., Shomura T., Ogawa Y., Watanabe H., Totsukawa K., Suzuki T., Moriyama C., Toshida J., Inouye S., Niidat. 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.
- Rathore K.S., Chowdhury V.K., Hodges T.K. 1993. Use of bar as a selectable marker gene and for the production of herbicide-resistant rice plants from protoplasts. *Plant Mol Biol* 21: 871-884.
- Spencer T.M., Gordon-Kamma W.J., Daines R.J., Start W.G., Lemaux P.G. 1990. Bialaphos selection of stable transformants from maize cell culture. *Theor Appl Genet* 79: 625-634.
- Tachibana K., Watanabe T., Sekizawa T., Takemitsu T. 1986. Action mechanism of bialaphos. II. Accumulation of ammonia in plants treated with bialaphos. *J Pest Sci* 11: 33-37.
- Thompson C.J., Mova N.R., Tizard R., Cramer R., Davice J.E., Lauwereys M., Botterman J. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J* 6: 2519-2523.
- Vasil V., Castillo A.M., Fromm M.E., Vasil I.K. 1992. Herbicide resistance fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerative embryogenic callus. *Bio/technology* 10: 667-674.
- White J., Chang, S.Y., Bivv, M.J. 1990. A cassette containing the bar gene of *Streptomyces hygroscopicus*: a selectable marker for plant transformation. *nucl acids Res* 18: 1062-1065.