

감자의 형질전환을 위한 표지유전자로서
Phosphinothricin Acetyltransferase 유전자의 이용

정재훈¹ · 양덕춘² · 방극수³ · 한성수¹

Transformation of Potato using the Phosphinothricin
Acetyltransferase Gene as the Selectable Marker Gene

Jeong, J.H.¹, D.C. Yang², K.S. Bang³ and S.S. Han¹

ABSTRACT

This experiment was carried out to produce herbicide resistant potatoes harving only chimeric phosphinothricin acetyltransferase (PAT) genes without using antibiotic selectable marker. The pDY502 vector having only PAT gene was reconstructed for transformation of potato. The reconstructed vector was introduced to *Agrobacterium tumefaciens* MP90 disarmed, and they were used for potato transformation. Hormonal requirement for plant regeneration from leaves and stem explants of potato was investigated. From this experiment, MS medium treated with IBA 0.1 mg/L + BA 0.5 mg/L was the best for potato regeneration, and the ratio of shoot regeneration was 54% for leaf and 46% for stem in that condition. For transformation, explants of potato leaves and stems were cocultured with *A. tumefaciens* MP90 containing reconstructed vector harvoring only PAT gene. When the potato explants were placed on various concentrations of bialaphos and all the potato explants were dead on medium with over 5.0mg/L bialaphos. By this selection methods, the explants cocultured with *Agrobacterium* produced the putative transgenic shoots on medium with 5mg/L bialaphos treatment after 3-4 weeks. Second selection was performed by transferring the shoot tips of putative transgenic to medium containing 20mg/L of bialaphos. The shoot tips grew well on the second selection medium, indicating the production of successful transgenic plants. But normal shoots were dead in same cytotoxic medium. Incorporation of the PAT gene into transgenic potatos were confirmed by PCR analysis of DNA and Southern hybridization. These results show that the PAT gene can serve as a selectable marker and herbicide resistant genes for transformation of potato.

Key words : *Agrobacterium*, PAT(phosphinothricin acethyltransferase) gene, Selectable marker, Potato,

¹ 원광대학교 생명자원과학대학 Wonkwang University, Iksan, Chonbuk, 570-749.

² 한국인삼연초연구원 유전생리부 Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taedok Science Town, Taejon, 305-345.

³ 이리 농공전문대학 원예학과 Iri National College of Agricultural and Technology, Iksan, Chonbuk, 579-749.

* 본 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었습니다. (’98. 6. 22 接受)

서 언

감자(*Solanum tuberosum* L.)는 전세계 130여 개국에서 연간 약 2.8억만톤 정도를 생산하고 있어 인류의 주곡작물로써 중요한 위치를 차지하고 있다. 그러나 작물 재배시 문제되는 것은 잡초에 의한 피해로써, 현재 여러 가지 제초제들이 개발되어 활용되고 있다. 그러나 보다 광범위하고 손쉬운 잡초방제가 가능하도록 하기 위해서는 비선택성 제초제에 대한 저항성 감자를 개발하는 것이 매우 효과적이라 사료된다. 따라서 최근에 발달된 식물형질전환기술을 이용하여 비선택성 제초제에 저항성을 가진 감자를 선발하는 것이 감자 육종에 있어 보다 효과적인 방법이라 기대된다^{2,4,5,10}.

식물형질전환 기술은 형질전환체와 비형질전환체의 선별을 위해 대부분 항생제 내성 표지유전자를 사용하여 선발하고 있다. 그러나 이러한 표지유전자는 식물세포의 증식이나 분화를 저해하는 요인으로 작용하며, 많은 항생제 내성 유전자의 이용으로 인해 환경중에 항생제 내성 유전자의 노출을 배제할 수 없게 되었으며¹¹, 이에 따른 대책이 요구되고 있다.

또한, 최근에는 항생제 표지유전자 사용에 대한 조심스런 우려와 이를 제거하려는 연구들이 계속적으로 이루어지고 있으며, 새로운 표지유전자를 개발하는 연구 또한 진행되고 있다^{3,19,20}. 특히 형질전환체의 선발시 제초제 저항성 유전자를 표지유전자로 사용하려는 시도는 기존의 항생제 선발 기준보다 낮은 제초제의 농도에서도 선발이 가능할 뿐만 아니라 항생제 표지유전자 없이 형질전환체의 선발이 가능하다는 장점을 가지고 있다^{1,13,14,18}.

본 실험에 사용하고자 하는 Phosphinothricin acetyltransferase(PAT) gene은 최근 독일 Hoechst사에서 기존의 *bar* gene이라고 명명된 *Streptomyces hygrosopicus*에서 클로닝된 유전자의^{6,17} GC content(68.6%)를 낮춘 새로운 인공 PAT (GC content, 49%; NCBI Accession NO-A02774)를 합성한 것으로 제초제 bialaphos의 주요 성

분인 phosphinothricin의 NH₂를 acetyl화 하여서 생성기관의 자동독성물질 축적을 방지하므로서 bialaphos에 저항성을 나타내게 된다.

따라서 본 실험의 목적은 환경에 유해성이 적고, 비선택성 제초제인 bialaphos에 내성을 가지는 phosphinothricin acetyltransferase(PAT) gene을 표지유전자로 사용하여 새로운 bialaphos 내성 감자를 개발하고자 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서는 감자(*Solanum tuberosum* L.)의 잎과 줄기를 형질전환 재료로 사용하였으며, 잎은 1cm² 정도를 줄기는 axillary bud를 제거한 0.5-1cm 크기를 예리한 면도날로 절단한 후 절편체로 이용하였으며, 감자의 품종은 Atlantic과 Desiree를 사용하였다. 감자의 재분화조건은 식물생장조절제 IBA 0.1mg/L와 BA 0.5mg/L을 첨가한 MS 기본배지로 하였고, 3% sucrose를 넣고 pH를 5.6으로 맞추었다. 살균은 121℃에서 15분간 하였으며, 살균하기 전에 agar를 0.8%되게 넣었다. 감자의 생육조건은 광도 2,000 Lux, 16h 간 광주기, 25℃의 조건에서 생육시켰다.

2. 제초제 저항성 단일 유전자 함유 vector의 재조합 및 확인

제초제 저항성 유전자인 Phosphinothricin acetyltransferase(PAT) gene을 함유하며, 항생제 표지유전자가 제거된 binary vector pDY502를 재조합한 내용은 다음과 같다.

제초제 저항성 유전자(PAT gene) 및 항생제 표지유전자(NPTⅡ)가 함유된 pBinSyn vector를 *E. coli*로 부터 추출한 후 EcoR I으로 절단하였다. 절단된 산물은 전기영동하여 항생제 표지유전자와 vector를 분리한 후 항생제 표지유전자가 제거된 PAT gene 함유 vector만을 다시 순수분리 정제하였다. 정제된 PAT gene 함유 vector는 self ligation시켜 *E. coli* DH5 α 에 도입하여 NPTⅡ gene의 제거 여부를 확인하였는데,

vector의 확인은 먼저 PCR을 이용하여 NPTII 유전자의 존재여부를 확인하였으며, plasmid추출 후 EcoR I 과 Hind III 및 EcoR I 으로 절단하여 전기영동한 후 크기를 재확인하였다.

3. 제초제 Bialaphos의 농도에 따른 감자 절편체의 감수성 조사

Bialaphos 저항성 유전자인 PAT gene에 의한 감자의 형질전환을 위해 먼저 bialaphos를 농도별(0-10mg/L)로 첨가한 재분화배지에 Atlantic과 Desiree의 잎과 줄기절편을 치상하였으며, 20일간 배양한 후 그 상태를 조사하였다.

4. PAT 유전자를 이용한 감자의 형질전환 및 선발

감자의 형질전환을 위해 상기 실험에서 확인된 pDY502 binary vector를 Tri-parental mating method⁸⁾를 이용하여 disarmed된 *Agrobacterium tumefaciens* MP90에 도입하였다. 도입된 균주는 28℃에서 overnight 배양하여 대수증식기 상태의 균농도(O.D.₆₀₀=0.8)에서 식물절편체와 공동배양하였으며, 공동배양시 100 μM의 acetosyringone (3,5'-dimethoxy-4'-hydroxyaceto-phenone)을 공동배양배지에 첨가하였다. *Agrobacterium* 균과 공동배양된 식물절편체는 bialaphos 5mg/L와 carbenicillin 500mg/L가 첨가된 재분화배지로 옮겨져 재분화시켰으며, 선발된 재분화체는 bialaphos가 20mg/L가 첨가된 2차 선발배지로 옮겨졌다. 선발배지에서의 형질전환체의 선발은 15일 간격으로 계대를 계속하면서 수시로 clean bench내에서 5분정도 petri dish의 뚜껑을 열고 공기를 통하게 하였다.

5. 형질전환체의 특성검정

Bialaphos 20mg/L이 첨가된 2차 선발배지에서 선발된 감자 식물체로부터 도입 유전자의 확인을 위해 PCR 증폭을 실시하였으며, DNA 추출은 Edwards 등의 방법⁹⁾에 따라서 하였다. PCR(Perkin Elmer Cetus, Potodyne Incorporated)의 반응액은 (주)Bioneer의 Pre-mix를 사용하여 DNA 50ng, primer 20pmol을 넣고 3차 멸균수

로 total volume을 20μl로 맞추었으며, 반응 조건은 96℃에서 2분간 pre-denaturation한 후, 94℃에서 30초간 변성, 60℃에서 30초간 annealing, 72℃에서 2분간 증폭을 36회 반복시킨 후 72℃에서 15분간 post-extension 시키는 조건으로 하였다. 이때 사용한 PAT gene primer는 3가지 종류로써 첫째, 357bp의 PCR산물을 합성하는 PAT 1 primer 5'-AGGACAGAGCCACAAACACC-3', 5'-ATGCTTGTATCCAGCTGCG-3'와 500bp의 PCR산물을 합성하는 PAT 2 primer 5'-CTACAGTGAACCTTAGGACAGAGCC-3', 5'-GTAACTGGCCTAACTGGCCTTG-3' 그리고 26mer의 염기를 가져 정확한 유전자의 상동성을 가져야만 300bp의 PCR산물을 합성하는 PAT 3 primer 5'-CGTCTACAGTGAACCTTAGG ACAGAG-3', 5'-CCTATAACAGCAACCACAGACTTAAA-3'를 제조하여 사용하였다.

또한, 형질전환된 감자의 염색체 안에 안정적으로 PAT 유전자가 삽입되었는지를 재확인하기 위해 DIG(Boehringer mannheim)으로 표지된 probe를 사용하여 southern blot 분석을 실행하였다. Southern blot을 위해 감자 식물체의 DNA의 추출은 *Dellaporta* DNA추출법⁷⁾을 변형하여 하였으며, 15 μg의 DNA를 EcoR I 과 Hind III로 절단하였다. 절단된 DNA는 전기영동 후 nylon membrane에 옮겨진 후 DIG system에 의해 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 감자식물체의 재분화

감자식물체는 원형질체와 절편체로부터 식물체의 재분화가 가능하나, 담배나 페튜니아에 비해 매우 적은 재분화율을 가지고 있을 뿐만 아니라 재분화 과정에서 체세포 변이가 자주 일어나는 것이 보고되고 있다¹⁶⁾. 따라서 감자에 유용유전자를 도입시 체세포 변이를 최소화 하기 위하여 배양기간을 단축시키거나, 직접 신초를 유기시키는 방법들이 개발되고 있다^{15,16)}. 본 실험에서는 callus의 형성에 의한 변이를 최소화하기 위해 옥신류가 첨가된 재분

화배지에는 절편체를 짧은 기간(10일) 동안만 치상하고 곧바로 BA 0.5mg/L만 첨가된 배지로 계대하였으며, 또한 낮은 BA 농도 조건에서 분화를 유도하여 체세포변이를 줄이고자 하였다. 이러한 재분화체계는 전 보고에서 보고한 결과¹²⁾에 따라 MS기본배지에 IBA 0.1mg/L와 BA 0.5mg/L를 조합처리한 배지에서 실시하였으며, 재분화율은 잎과 줄기 절편체 각각 54%, 46% 이었다(Fig. 1).

2. pDY502 vector의 재조합 및 확인

항생제 내성 표지유전자를 사용하지 않고 제조체 저항성유전자인 PAT 유전자를 표지유전자로 이용한 형질전환체 선발 체계를 확립하고자 PAT gene만을 함유한 binary vector pDY502를 재조합한 내용은 다음과 같다(Fig. 2). 먼저 제조체 저항성 유전자(PAT gene) 및 항생제 표지유전자(NPT II)를 가지는 식물발현용 vector인 pBinSyn vector에서 항생제 표지유전자인 NPT II 유전자를 제거하기 위해 pBinSyn vector를 *E. coli*로부터 추출한 후 EcoR I으로 절단하여 NPT II 유전자가 없는 PAT gene 함유 vector만을 순수분리 정제하였고 이를 T4 DNA ligase를 사용하여 접합시켜 pDY 502 vector를 재조합하였다(Fig. 2). 재조합된 pDY502 vector의 확인을 위해 NPT II 유전자가 제거된 pDY502

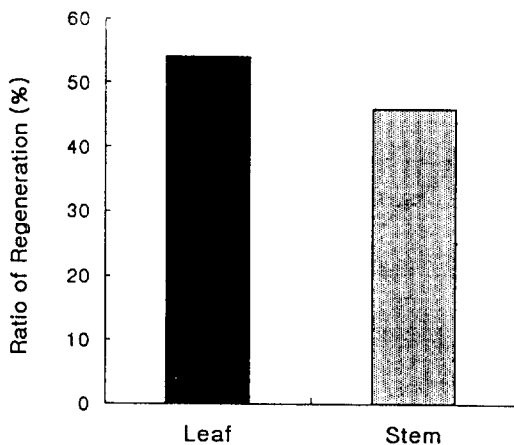


Fig. 1. Ratio of regeneration from leaf and stem of potato on the MS medium with IBA 0.1mg/L and BA 0.5mg/L

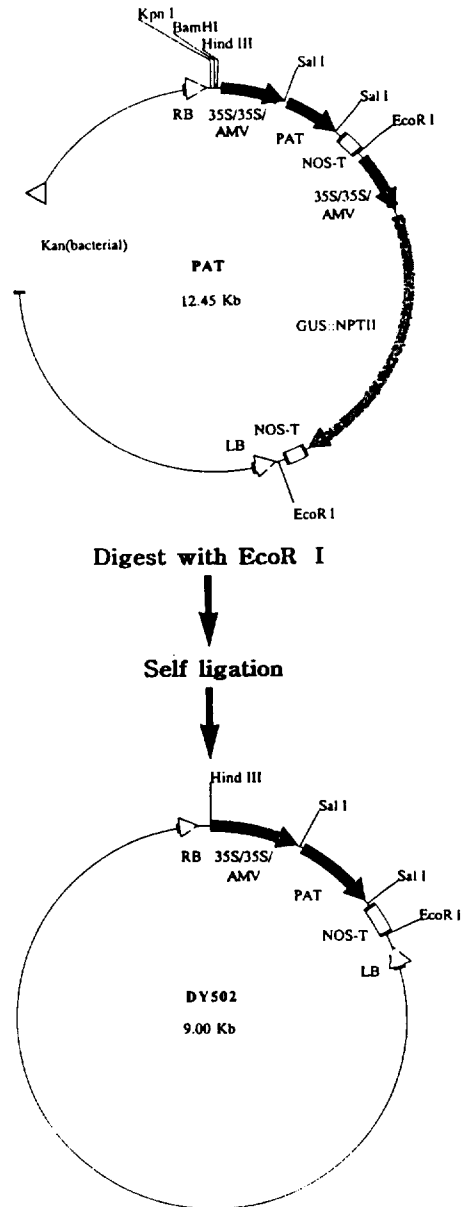


Fig. 2. Scheme for derivation of pDY502. The pDY502 is a binary vector containing only PAT gene which confers resistance against bialaphos. Abbreviations used are : PAT, phosphinothricin acetyl transferase; Tnos, polyadenylation signal of the nopaline synthase gene; 35S-35S, 35S promoter of cauliflower mosaic virus; AMV, alfalfa mosaic virus enhancer sequence; Rb, right border of the T-region; LB, left border of the T-region.

vector와 NPT II gene을 함유하고 있는 BinSyn vector를 추출하여 PCR을 이용하여 확인하였다. 그러나 식물체에서는 NPT II 유전자의 존재 여부를 NPT II 유전자의 primer로써 확인할 수 있으나, 식물용 binary vector에서는 식물로 전이되는 양쪽 border내의 영역이 아닌 다른 부위에서 NPT II 유전자와 유사한 미생물 선발용 유전자가 존재할 가능성이 있어 본 실험에서는 pBinSyn vector의 PAT 유전자와 인접한 NPT II 유전자를 PAT 유전자의 sense primer 5'-CTACAGTGAACCTTTAGGACAGAGCC-3'와 NPT II 유전자의 antisense primer 5'-CCACCA-TGATATTCGCAAG-3'을 사용하여 한 번에 모두 증폭하여 확인할 수 있도록 하여 PCR반응을 실시하였다. 그 결과 BinSyn vector에서는 공히 3.7kb의 유전자의 증폭이 확인되었으나 pDY502에서는 유전자의 증폭을 확인할 수 없어 성공적으로 NPT II 유전자가 제거되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 또한, 재조합된 pDY502 vector는 *E. coli*로부터 추출하여 EcoR I 과 HindIII로 이중 절단 후 전기영동하여 1.5kb의 PAT gene과 7.5kb의 절단된 vector의 크기를 확인할 수 있었으며(Fig. 4-A), EcoR I 단일 제한효소만으로 절단한 결과 9kb의 재조합된 pDY502 vector를 확인할 수 있었다(Fig. 4-B).

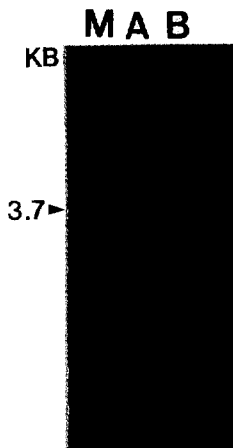


Fig. 3. PCR products of Binsyn and pDY502 vector using the PAT sense primer and NPT II antisense primer. Lanes M : Marker, A : Binsyn vector, B : pDY502 vector.

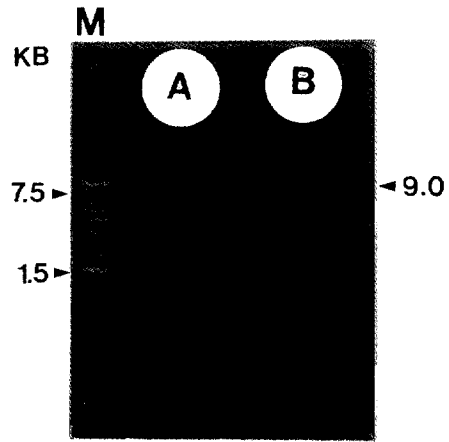


Fig. 4. Digestion of pDY502 vector with EcoR I + HindIII (A) and EcoR I (B) restriction enzymes.

3. 제초제 Bialaphos의 농도에 따른 감자 절편체의 감수성 조사

제초제 bialaphos에 내성을 나타내는 PAT 유전자를 표지유전자로 사용하기 위해서 우선 감자의 생장에 미치는 bialaphos의 영향을 조사하고자 농도를 각각 5, 10 mg/L으로 재분화배지에 첨가하여 정상적인 Atlantic과 Desiree의 잎절편과 줄기를 치상 후 20일간 배양하여 생장을 조사하였으나, 모든 bialaphos처리구에서 고사하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5). 따라서 bialaphos의 농도를 더 낮추어 감자의 생육에 미치는 최저 농도를 조사하기 위해 0, 0.5, 1, 1.5, 2 mg/L을 첨가하여 감자의 성장상태를 조사하였다. 그 결과 bialaphos 1mg/L에 의해서도 감자절편체의 생장에 저해를 주었으나 2mg/L에서 더욱 분명한 선발이 가능하였다(Fig. 6). 그러나 본 실험을 수행하는 데는 좀더 강력한 저항성을 가진 형질전환체를 선발하기 위해 전 실험에서 정상적인 감자의 절편체가 완전히 고사되었던 5mg/L bialaphos 농도를 선발조건으로 선택하였다. 이는 Akama 등¹¹⁾이 *Arabidopsis thaliana*에서 선발한 기준인 bialaphos의 주성분인 phosphinothricin 20mg/L의 농도보다 낮은 농도이었다.

또한, Li 등¹³⁾은 벼의 원형질체를 이용한 형질전환시 sulfonyleurea계 제초제에 저항성을 가

지는 ALS유전자를 표지유전자로 사용하였는데, 항생제 hygromycin의 선발농도보다 10,000배나 낮은 농도의 제초제 chlorosulfuron으로 형질전환체의 선발이 가능하였다고 보고하였다. 따라서 제초제 저항성 유전자를 이용한 형질전환체의 선발은 기존의 형질전환체 선발시 사용해온 항생제 내성유전자를 대체할 수 있으며, 다량의 항생물질에 의한 방법보다 극소량의 선발물질에 의한 형질전환체의 선발이 가능하리라 사료된다.

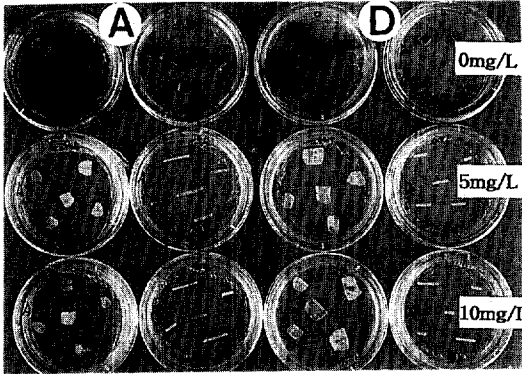


Fig. 5. The effect of bialaphos on the growth of leaf and stem of *Solanum tuberosum* L., Atlantic (A) and Desiree (D).

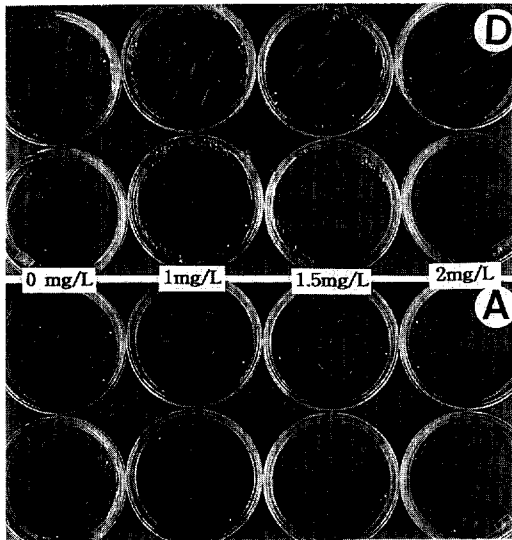


Fig. 6. The effect of low concentration of bialaphos on the growth of leaf and stem of *Solanum tuberosum* L., Atlantic (A) and Desiree (D).

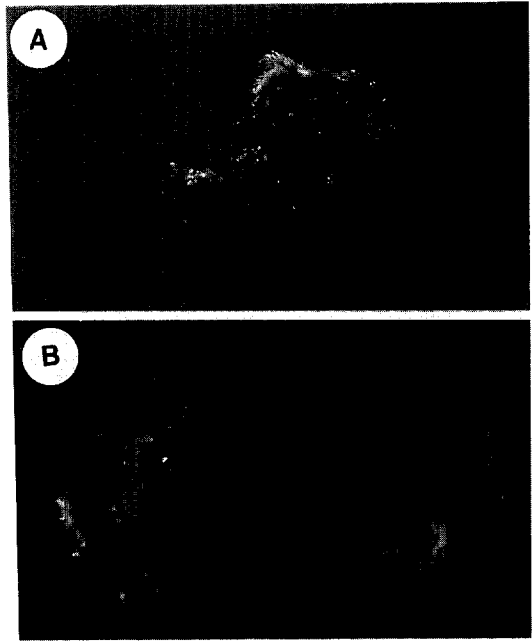


Fig. 7. Transgenic shoot formed from stem explant of potato (A), and growth of non-transgenic (B-left) and transgenic potato (B-right) on medium with bialaphos.

3. Bialaphos 선발배지에서의 제초제 저항성 감자의 선발

감자 절편체는 선발배지에 치상후 10일부터 조직이 비대되며, 4주가 경과되면서 shoot가 형성되어 신장하였다(Fig. 7-A). 줄기절편에서 axillary bud가 완전히 제거되지 않은 경우 초기에는 생육하였으나 계대를 계속할수록 전개된 잎이 완전히 고사되었다. 반면에 선발된 식물체는 전혀 영향을 받지 않고 성장하였다(Fig. 7-B). 선발된 식물체들은 1cm정도의 shoot tip을 잘라 20mg/L 농도의 bialaphos를 첨가한 배지에 치상하여도 생장에 영향을 받지 않았다.

4. 형질전환체의 특성검정

1) Polymerase Chain Reaction(PCR)

2차 선발에서 살아남은 식물체들은 Edwards 등의 방법⁹⁾에 의해 DNA를 추출하여 각각의 유전자를 증폭할 수 있는 primer를 이용하여 PCR반응을 시도하였으며, 유전자의 삽입을 확인하였다.

*Agrobacterium*의 binary vector의 양쪽 border 사이에 PAT 유전자만으로 재조합된 pDY502 vector를 이용하여 형질전환시킨 감자의 확인은 식물체에 따라서는 사용한 primer에 대해 여러 밴드가 나올 수 있어 본 실험에서는 세 가지의 PAT primer를 이용하여 확인하였는데, 대조식물체는 유전자의 증폭을 볼 수 없었으나 형질전환체는 각각 357bp, 500bp, 300bp의 PAT 유전자 절편의 증폭을 볼 수 있었다(Fig. 8). 따라서 형질전환감자에서 PAT 유전자의 존재를 확인할 수 있었다.

2) Southern blot

형질전환된 감자의 염색체 안에 안정적으로 PAT 유전자가 삽입되었는지를 PCR에 의하여 우선 확인하였지만 PCR의 경우 간혹 가짜밴드

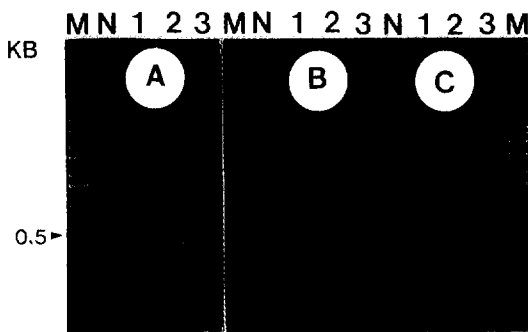


Fig. 8. PCR products of PAT genes from transgenic potatoes. Lanes M : Marker, N : Normal potato, 1-3 : Transgenic potatoes.

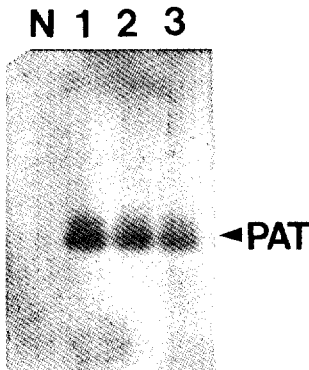


Fig. 9. Southern blot analysis of transformed potato introduced PAT gene. N : Normal potato, 1-3 : Transgenic potatoes.

가 나올 가능성이 있어 형질전환 여부를 재확인하기 위해 PCR DIG labelling mix kit를 이용하여 PAT 유전자의 probe를 조제하고 이를 이용하여 Southern blot을 수행하였다.

그 결과 대조식물체에서는 PAT 유전자의 DNA절편을 확인할 수 없었으나 형질전환체에서는 모두 1.5 kb의 DNA절편을 확인할 수 있었다(Fig. 9). 따라서 20mg/L의 bialaphos가 첨가된 2차 선발배지에서 선발된 식물체 염색체 내에 도입하고자 하는 PAT 유전자가 안정하게 삽입되었음을 알 수 있었다. 따라서 본 실험 결과 제초제 저항성 유전자를 표지유전자로 사용하여 감자의 형질전환이 가능함을 확인함으로써 항생제 내성 유전자에 대해 가지는 조심스런 우려 및 항생제 내성 표지유전자를 사용한 형질전환체에 대한 일반 소비자의 거부감을 해결하는데 도움을 줄 뿐만 아니라 제초제 내성을 가지는 감자를 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

세계적으로 중요한 식량자원인 감자에 제초제 저항성 형질을 도입한다면, 노지재배가 가능하여 노동력과 인건비를 줄일 수 있을 뿐만 아니라 비닐멀칭 방법의 부산물인 페비닐에 의한 환경오염을 줄일 수 있는 매우 효과적인 방법이다. 그러나 형질전환식물체의 선발시 일반적으로 사용해진 항생제 내성 표지유전자는 효과적으로 형질전환체를 선발할 수 있는 장점을 가지나 항생제 내성 표지유전자들이 환경중에 노출되었을 때의 안전성 문제, 그리고 일반 소비자들이 항생제 표지유전자를 이용한 형질전환체에 대해 거부감이 느껴지게 할 수 있다는 문제점이 존재한다. 이러한 문제점들은 항생제 내성 표지유전자를 제거하거나 새로운 표지유전자로 대체하는 방법을 사용하여 해결할 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 본 실험의 목적은 비선택성 제초제 bialaphos에 저항성을 가지는 phosphinothricin acetyltransferase(PAT) gene을 감자에 도입하는데 있어 항생제 표지유전자를

사용하지 않는 선발체계를 개발하고자 하였다. 감자 식물체의 재분화는 IBA 0.1mg/L + BA 0.5mg/L를 첨가한 MS배지에서 하였다. 또한 형질전환을 위해 단독 PAT 유전자만을 가지는 pDY502 vector를 재조합하였으며, 재조합된 vector들은 disarmed 된 *Agrobacterium* MP90에 도입하여 감자의 형질전환에 이용하였다. 형질전환은 감자의 잎과 줄기절편체를 상기 실험에서 재조합된 vector를 함유한 *A. tumefaciens* MP90과 공동배양하는 방법으로 수행하였다. PAT 유전자를 표지유전자로 이용하여 bialaphos에 저항성을 가진 감자를 개발하고자 다양한 농도의 bialaphos를 함유한 재분화배지에 감자 절편체를 치상하여 내성을 조사한 결과 대조구의 감자절편체가 모두 고사하는 bialaphos 5mg/L를 선발조건으로 하였다. 이와 같은 선발 조건에서 *Agrobacterium*과 공동 배양한 절편체를 선발배지에 치상한 후 3-4주 정도가 경과하면 shoot가 유기되었으며, 선발배지에서 유기된 shoot의 정단부위를 1cm정도로 잘라 bialaphos가 20mg/L 첨가된 선발배지로 옮겨 2차 선발을 하였다. 형질전환체의 확인은 2차 선발배지에서 선발된 식물체를 대상으로 하였으며, 먼저 PCR반응을 이용하여 도입 유전자의 증폭을 확인하였고, Southern blot을 실시하여 유전자의 도입을 확인하였다. 따라서 PAT 유전자를 감자 형질전환의 표지유전자로 활용할 수 있었으며, 아울러 항생제 표지유전자가 없는 체초제 저항성 형질전환 감자를 획득할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Akama, K., H. Puchta and B. Hohn. 1995. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the *bar* gene as selectable marker. *Plant Cell Reports* 14 : 450-454.
2. An G. 1987. Binary Ti vector for plant transformation and promoter analysis. *Methods in Enzymol.* 153 : 292-305.
3. Bryant J, and S. Leather 1992. Removal of selectable marker genes from transgenic plant : needless sophistication or social necessity?. *Trends Biotechnol.* 10 : 274-275.
4. DeBlock M. 1988. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Theor. Appl. Genet.* 76 : 767-774.
5. De Block M., and D. DeBrouwer, P. Tenning 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.
6. De Block M., J. Botterman, M. Vandewiele, J. Dockx, C. Thoen, V. Gossele N.R. Movva, C. Thompson, M.V. Montagu and J. Leemans. 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.* 6 : 2513-2518.
7. Dellaorta, 1983. Short protocols in molecular Biology, 2nd edition. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1(4) : 19) 2-9-2-10
8. Ditta G., S. Stanfield, D. Corbin and D.R. Helinski. 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria : Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77 : 7347-7351.
9. Edwards K., C. Johnston, and C. Thompson 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 19 : 1349.
10. Filho E.S.F., L.F.A. Figueiredo and D.C. Monte-Neshich. 1994. Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) cv. Mantiqueira using *Agrobacterium tumefaciens* and evaluation of herbicide resistance. *Plant Cell Reports.* 13 : 666-670.
11. Flavel R.B., E. Dart, R.L. Fuchs, and R.T. Fraley 1992. Selectable marker genes : safe for plant? *Bio/Technol* 10 : 141-144.
12. Han S.S., J.H. Jeong, K.S. Bang and D.C.

- Yang. 1997. Selection of herbicide resistant potatoes transformed with phosphinothricin acetyltransferase gene. *Kor. J. Weed Sci.* 17 (4) : 345-354.
13. Li Z.J., A. Hayashimoto, and N. Murai. 1992. A sulfonyleurea herbicide resistance gene from *Arabidopsis thaliana* as a new selectable marker for production of fertile transgenic rice plants. *Plant Physiol.* 100 : 662-668.
 14. Rathore K.S., V.K. Chowdhury, and T.K. Hodges. 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.
 15. Sherman, S., and M.W. Bevin. 1988. A rapid transformation method for *Solanum tuberosum* using binary *Agrobacterium tumefaciens* vectors. *Plant Cell Reports* 7 : 13-16.
 16. Stiekema, W.J., F. Heidekamp, J.D. Louwerse, H.A. Verhoeven and P. Dijkhuis. 1988. Introduction of foreign genes into potato cultivars Bintje and Desiree using an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector. *Plant Cell Reports* 7 : 47-50.
 17. Thompson C.J., N.R. Movva, R. Tizard, R. Crameri, J.E. Davies, M. Lauwereys and J. Botterman. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces Hygroscopicus*. *EMBO J.* 6 : 2519-2523.
 18. White J., S.Y. Chang, M.J. Bivv. 1990. A cassette containing the *bar* gene of *Streptomyces hygroscopicus* : a selectable marker for plant transformation. *Nucl Acids Res.* 18 : 1062-1065.
 19. Yang D.C., S.S. Han, and E.S. Yoon. 1995. Adenosine deaminase gene : Possible selectable marker for tobacco transformation. *Korean J. Plant Tissue Culture* 22. : 235-240.
 20. Yang D.C., J.C. Park, K.T. Choi, and J.M. Lee. 1995. Expression of mouse adenosine deaminase gene in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L). *Korean J. Plant Tissue Culture* 22. : 195-200.