

형질전환 감자에서 제초제 저항성 유전자인 PAT gene의 간편한 확인

정재훈, 양덕춘¹⁾, 방극수²⁾, 최경화³⁾, 한성수
원광대학교 생명자원과학대학, 한국인삼연초연구원 유전생리부¹⁾,
익산대학²⁾, 생명공학연구소 식물조직배양 R. U.³⁾

The simple assay of phosphinothricin acetyltransferase gene on the transgenic potato

Jae Hun Jeong, Deok Chun Yang¹⁾, Keuk Soo Bang²⁾, Kyung Hwa Choi³⁾, and Seong Soo Han
Wonkwang University, Iksan, Chabuk, 570-749,
¹⁾Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon, 305-345,
²⁾Iksan National College, Iksan, Chabuk, 579-749,
³⁾Plant Tissue Culture Research Unit, KRIBB, Taejon, 305-600, Korea.

ABSTRACT

In this study, three simple methods were established to confirm the transgenic potato plants. The leaf disc was used in the first method. After leaf discs of transgenic and non-transgenic potato were transferred into the liquid MS medium with bialaphos 5mg/l, 25 days, the chlorosis occurred in the non-transgenic leaf discs while it could not find in the transgenic leaf discs, In the second method, shoot tips of potato were transferred into MS medium supplemented with 0.5mg/l bialaphos and 0.6% agar. After 7-10 days, a lot of roots developed from the transgenic shoot tip, but the non-transgenic shoot tip was dead. The third method was using chlorophyll contents. Leaf discs were transferred into the liquid MS medium with bialaphos 0.5 mg/l. After 15 days, the content of chlorophyll A in transgenic plant was at least 2.5 times higher than in non-transgenic plant. In addition, the PAT enzyme activity were detected in the transgenic potato, but not detected in normal potato.

Key words : PAT(phosphinothricin acetyltransferase) gene, potato, bialaphos, chlorophyll

서론

최근 식물 유전자 운반체가 개발되면서 많은 유용유전자를 작물에 도입하고자 하는 식물 형질전환 기술들이 발달되고 있다(An, 1987; DeBlock, 1988;

Han 등, 1997). 이러한 식물형질전환 과정에는 반드시 외래유전자가 도입된 형질전환 세포를 선발하는 과정이 필수적이며, 효과적인 형질전환세포의 선발은 식물 형질전환 체계의 확립에 중요한 역할을 한다. 따라서 형질전환체의 선발을 위해 다양한 선발

Corresponding author: 정재훈, 우.361-763, 충북 청주시 흥덕구 개신동 산 48 충북대학교 첨단원예기술 개발연구센터, E-mail: bio-jeong@hanmail.net

체계가 연구되고 있으며, 주로 항생제 내성 유전자 (Bevan 등, 1983; Herrera-Estrella 등, 1983)와 제초제 저항성 유전자를 선발 표지유전자로 사용하는 방법 (Chaleff 과 Parsons, 1978; Akama 등, 1995; Jeong 등, 1998) 등이 개발되고 있다.

형질전환체내의 유전자 도입여부는 polymerase chain reaction(PCR)반응을 이용하여 도입된 유전자를 선택적으로 증폭하여 확인할 수 있으며(Edwards 등, 1991), visible 표지유전자로써 GUS유전자 등에 의해 형질전환여부를 확인할 수 있다(Jefferson 등, 1987). 또한 최근에 새롭게 개발된 표지유전자인 ADA유전자를 이용할 경우 간편하고 저렴한 확인과정을 거쳐 형질전환여부를 판별할 수 있다(Yang 등, 1996). 그러나 PCR을 이용한 확인 방법은 극소수의 *Agrobacterium*이라도 식물 절편체내에 존재할 경우 외부 유전자의 식물체내로의 도입여부에 상관없이 특정 유전자가 증폭되며, GUS유전자를 이용한 확인 방법에서도 대조 식물 자체가 GUS반응에 양성을 나타내는 경우가 조사되고 있어 이러한 방법을 이용한 형질전환 여부의 확인은 주의를 요한다. 또한, 이러한 방법들은 특별한 기구와 값비싼 시약들이 필요함에 따라 일정한 시설이 갖추어져야 한다. 따라서 선발 배지내에서 형질전환 여부를 초기에 판별할 수 있으며, 보다 저렴하고 간편하게 형질전환체를 선발, 확인 할 수 있는 방법이 개발된다면 식물형질전환시 형질전환체의 선발효율을 높일 수 있으리라 사료된다.

공시약제인 bialaphos는 비선택성 제초제로써 약체처리시 식물체의 글루타민합성효소의 작용을 저해하여 결국 식물체를 고사시킨다. bialaphos는 *Streptomyces hygroscopicus*로부터 생성된 2분자의 L-alanine으로 구성된 tripeptide인데, 이 bialaphos 자체는 활성을 가지고 있지 않으나 식물체내에서 급속히 가수분해되어 식물에 유해한 phosphinothricin(PPT)으로 된다(Wild 과 Ziegler, 1989). PPT는 methionine sulfoximine 및 tabtoxinine- β -lactam과 함께 glutamic acid의 구조적 유사체로 작용하여 글루타민 합성효소와 복합체를 형성하여 효소를 불가역적으로 저해하는 것으로 알려지고 있으며, 또한 글루타민 합성

효소의 저해는 식물체 내에 빠른 암모니아의 축적을 가져와 식물체를 고사시킨다고 하였다(Manderscheid과 Wild, 1986). 그러나 Phosphinothricin acetyltransferase(PAT) 유전자는 제초제 bialaphos의 주요 성분인 PPT의 NH₂를 acetyl화 하여 제초활성이 없는 산물로 만들므로 식물체가 제초제 bialaphos에 저항성을 가지게 된다(Thompson 등, 1987; White 등, 1990).

따라서 본 실험은 제초제 bialaphos에 저항성을 가지는 PAT gene의 특성을 이용하여 보다 간편하고 저렴한 형질전환 확인방법의 개발을 목적으로 공시작물인 감자를 이용하여 실험을 수행하였던 바 그 결과를 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

식물 재료: 본 실험에서 사용한 감자 식물체는 대지리(*Solanum tuberosum* L cv. desiree)로써 제초제 저항성 유전자인 PAT gene이 도입된 형질전환체 (Han 등, 1997)와 비형질전환체를 각각 MS(Mura-shige 과 Skoog, 1962) 기본배지에서 3주간 기내배양하여 다음 실험에 사용하였다.

감자 잎 disc를 이용한 형질전환체의 간편한 확인:

형질전환체와 비형질전환체를 간편히 확인할 수 있는 방법을 확립하기 위해 식물생장조절제 무첨가 MS배지에서 3주간 계대배양하여 잎이 완전히 전개된 감자 식물체의 잎조직을 직경 6mm의 cork borer를 이용하여 잎 disc를 얻었으며, 제초제 bialaphos 농도가 0.5, 5mg/l인 MS 액체배지를 제조하여 멸균 filter paper에 분주하고 그 위에 상기 절편체를 치상한 후 이를 주기적으로 관찰하였다. 한편, 절편체가 마르지 않도록 4일에 한 번씩 같은 농도의 bialaphos 액체배지를 1ml씩 분주하였다.

감자식물체의 뿌리생육을 이용한 형질전환체의 간편한 확인: 형질전환체와 비형질전환체의 줄기 정단 부위를 2cm정도 잘라 bialaphos를 0.05, 0.5mg/l가 되도록 하고 agar농도를 각각 0.3, 0.6, 0.9%가 되도록 첨가하여 각각을 치상한 후 주기적으로 형질전환체와 비형질전환체의 뿌리생육을 관찰하였다.

Chlorophyll 함량차이를 이용한 형질전환체의 간편한 확인: 직경 6mm의 cork borer를 이용하여 감자의 잎 disc를 얻은 후 전 실험에서 기술한 bialaphos 농도보다 낮은 농도인 0.05, 0.5mg/l로 각각 조제된 MS 액체배지에 잎 disc를 치상하고, 광도가 40 PPF($\mu\text{M}/\text{sec}/\text{m}^2$)되는 광조건에서 15일간 배양한 후 형질전환체와 비형질전환체의 chlorophyll 함량을 조사하였다. 감자의 잎에서 chlorophyll 및 carotenoid 함량 측정은 한 처리 당 3개의 잎 disc를 한 sample로 하였으며 이를 3반복 실시하였다. Chlorophyll의 추출은 sampling한 잎을 1.5ml microcentrifuge tube에 넣고 후 85%의 acetone 700 μl 을 넣고 플라스틱 봉을 끼운 드릴을 사용하여 완전히 마쇄한 후 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 동안 하였다. 추출물은 12,000rpm에서 15분간 원심분리한 후 pellet을 남기고 상등액으로 취하였으며, spectrophotometer를 이용하여 각각 452.5nm, 644nm, 663nm에서 흡광도를 측정하였다. Chlorophyll 및 carotenoid의 양은 Roebelen의 방법(1976)에 의하여 계산하였으며 그 식은 다음과 같다.

$$\text{Chlorophyll a} = 10.3 \times E_{663} - 0.918 \times E_{644}(\text{mg/l})$$

$$\text{Chlorophyll b} = 19.7 \times E_{644} - 3.870 \times E_{663}(\text{mg/l})$$

$$\text{Carotenoid} = 4.75 \times E_{452.5} - 0.226 \times \text{Chl.}(a+b)$$

Phosphinothricin Acetyltransferase Assay : PAT assay방법은 D' Halluin 등의 방법(1992)을 변형하여 실시하였다. Plant tissue 0.5g을 1.5ml microcentrifuge tube에 넣고 150 μl 의 extraction buffer(25mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 0.15mg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 50mg/ml polyvinyl polypyrrolidone)을 가한 다음 플라스틱 봉을 드릴에 장착하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 이하에서 10초 간격으로 30초간 미세하게 갈았다. 그 후 vortex를 10초 하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 12,000rpm으로 15분간 원심분리하였으며 상등액 120 μl 를 새로운 tube에 넣고 이를 조효소 추출액으로 사용하였다. 단백질의 정량은 Bradford의 방법(1984)에 준하여 실시하였으며, Bio-Rad의 protein dye reagent를 사용하였다. 효소액의 반응은 PPT(50mM) 용액 20 μl 와 assay buffer {100mM Tris-HCl pH 7.5, 0.4mg/l 5,5'-dithiobis(2-

nitrobenzoic acid)(DTNB), 0.1mM acetyl-CoA} 950 μl 를 섞고, 조효소액 30 μl 를 넣어 반응을 시작하였다. 반응은 37 $^{\circ}\text{C}$ 수조에서 30분동안 시켰으며, 효소반응 후 spectrophotometer를 이용 412nm에서 흡광도를 측정하였다.

PAT에 의해 유리된 CoA는 DTNB와 반응하여, 동량의 자유 5-thio-2-nitro benzoic acid를 생성하며, 이 화합물 1M은 412nm광장에서 13,600의 흡광계수를 가진다. Sample과 PPT를 처리하지 않은 control의 흡광도 차이를 13.6으로 나눈 값은 PPT처리에 의한 DTNB 환원치인 $\mu\text{mole}/\text{min}$ 값과 일치한다. 또한 PAT의 1unit는 37 $^{\circ}\text{C}$ 조건에서 acetylated PPT/min/mg protein의 μmole 값으로 정의 하였다.

결과 및 고찰

감자 잎 disc를 이용한 형질전환체의 간편한 확인 : 본 실험은 제초제 bialaphos를 무독화시키는 PAT gene의 도입여부를 기존의 확인방법보다 저렴하고 간편하게 확인할 수 있는 방법을 찾고자 실시하였으며, 형질전환체와 비형질전환체의 제초제 bialaphos에 대한 내성 차이를 이용하여 실험한 결과는 다음과 같다. 직경 6mm의 cork borer를 이용하여 취한 형질전환체와 비형질전환체의 잎 disc는 치상 후(Fig. 1-A) 15일 정도가 지나면서 bialaphos 5mg/l를 처리한 실험구에서 비형질전환체의 잎이 노랗게 고사되는 것을 관찰할 수 있었으며(Fig. 1-B), 25일이면 완전히 고사되어 형질전환 잎 disc와 비형질전환 잎 disc를 구별할 수 있었다(Fig. 1-C). 한편, Tachivana 등(1986)은 bialaphos처리시 식물체내에 암모니아가 급격히 축적되며, 축적된 암모니아는 틸라코이드에서 일어나는 전자전달을 저해하는 것으로 생각되는 독성물질로 작용하여 광합성을 신속히 저해함으로 식물을 고사시킨다고 보고하였는데, 본 실험 결과에서도 bialaphos 처리구에서 비형질전환 절편체는 광합성 저해현상을 보이며 점차 고사되었으나 형질전환 식물체의 잎 disc에서는 그러한 현상이 보이지 않았다. 이는 완전한 식물체가 아닌 잎 disc 절편체에서도 제초제 저항성 유전자인 PAT 유전자가 성공적으

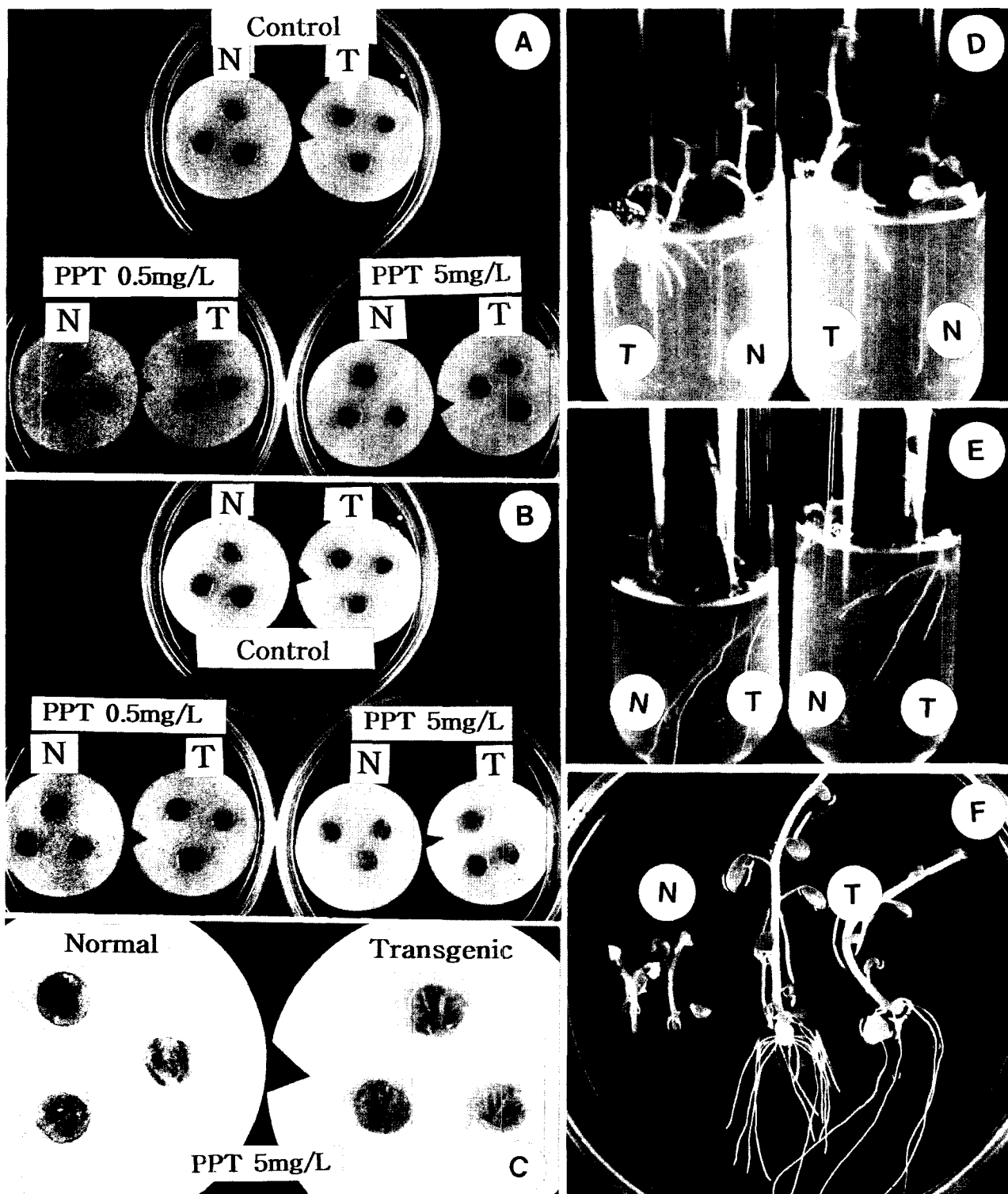


Fig. 1. Leaf disc and root growth of transgenic potato(T) and normal plant(N) on the media with bialaphos, A; 0day after PPT treatment, B; 15day after PPT treatment, C: 25day after PPT treatment, D; 7day after 0.05mg/l bialaphos treatment, E,F; 7day after 0.5mg/l bialaphos treatment.

로 발현하여 식물체의 glutamine synthetase의 저해제로 알려진 제초제 bialaphos의 주성분인 phosphinothricin을 무독화 시킨 결과로 사료된다. 따라서 식물체 잎 disc를 취한 후 bialaphos 5mg/l 농도의 액체배지에 25일간 치상하는 방법을 사용하면 제초제 저항성 유전자인 PAT gene의 식물체 도입여부를 간편하게 확인 할 수 있을 것으로 사료된다.

감자식물체의 뿌리생육을 이용한 형질전환체의 간편한 확인 : 형질전환체의 선발시 선발배지와 직접 접하여 생육저해를 받게되는 뿌리의 생육을 관찰한 결과 0.05mg/l 과 0.5mg/l의 bialaphos 농도 모두 7일정도면 뿌리의 생장으로 형질전환체와 대조식물체를 구별할 수 있었다(Fig. 1-D, E). 이는 잎 disc를 이용한 이전 실험에 비해 현저히 선발기간을 앞당긴 결과이다. 특히 0.5mg/l의 bialaphos 배지에서 각 처리에서 형질전환체는 대조식물체의 뿌리길이 보다 2배 이상의 현저한 차이를 보여 쉽게 형질전환여부를 확인 할 수 있었다(Table 1). 또한 배지의 물리성을 달리하여 배지내에서 식물체의 뿌리발달 차이를 비교하기 위해 agar농도를 달리 처리하였을때에는 뿌리의 생장은 bialaphos 0.5mg/l 농도에서 $0.9 < 0.3 < 0.6\%$ 순으로 형질전환체와 대조구의 뿌리생장 차이가 많이 났다(Table 1). 이는 agar 농도가 높으면 배지내의 물리성이 증가하여 뿌리 생육이 저해받게 되며, agar 농도가 낮은 처리구는 오히려 배지의 물리성이 낮아지면서 배지내의 bialaphos 약제가 쉽게 용출되어 감자의 뿌리 생육에 저해를 끼친 결과로 사료된다. 이러한 결과는 Han 등(1997)이 PAT 유전자

가 도입된 형질전환체의 정단부위를 1cm 가량 절단하여 basta 10mg/l가 첨가된 배지에 옮겨 주었을 때 정상적인 생육을 하였으나 대조구는 7일만에 모두 고사하였다는 결과와 일치하는 것이다. 따라서 간편하고 빠른 형질전환체의 확인을 위해서는 bialaphos 0.5mg/l의 농도에 agar를 0.6% 첨가한 선발배지에 식물체의 정단부위를 치상하여 7-10일간 배양한 후 뿌리의 길이생장 차이를 조사한다면 간편하게 식물체의 형질전환여부를 확인(Fig. 1-F) 할 수 있을 것으로 사료된다.

Chlorophyll 함량차이를 이용한 형질전환체의 간편한 확인 : 형질전환체와 비형질전환체의 간편한 확인방법을 모색하기 위해 감자의 잎 disc를 제초제 bialaphos를 농도별로 처리한 배양액에 침지한 뒤 15일 후 형질전환체와 비형질전환체의 chlorophyll 함량을 조사한 결과는 다음과 같다(Table 2).

Chlorophyll A, chlorophyll B 그리고 carotenoid의 함량을 조사한 결과 형질전환체의 잎 disc가 대조구보다 모두 식물색소 함량이 높아 형질전환체와 비형질전환체를 구별할 수 있었다. 특히 bialaphos 0.5mg/l를 처리한 실험구에서 형질전환체의 chlorophyll A 함량은 대조구에 비해 2.5배 가량 많아 쉽게 형질전환체와 비형질전환체를 구별할 수 있었다(Table 2). 이와 같은 결과로 볼 때 제초제 bialaphos에 저항성을 가지는 형질전환체 선발시 선발배지에서 살아남은 식물체의 잎절편체를 취하여 chlorophyll A 함량을 대조식물과 비교함으로써 간편하고 빠르게 형질전환체를 구별 할 수 있으리라 사료된다.

Table 1. The effect of bialaphos and agar concentration on the growth of potato roots.

Bialaphos	Agar concentration	Normal		Transgenic	
		Root No.	Length of root(cm)	Root No.	Length of root(cm)
0.05mg/l	0.3%	6.5	2.75	4.5	4.70
	0.6%	6.0	2.00	4.0	3.70
	0.9%	4.0	1.75	5.0	4.00
0.5mg/l	0.3%	3.5	0.55	7.5	3.00
	0.6%	5.5	2.25	6.5	5.25
	0.9%	4.5	1.10	6.5	2.60

Table 2. The effects of bialaphos on the content of chlorophyll A, B and carotenode of normal and trangenic potatoes leaves.

Pigment ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	Concentration of bialaphos			
	0.01mg/l		0.5mg/l	
	Normal	Transgenic	Normal	Transgenic
Chlorophyll A	5.28	6.1	3.04	7.22
Chlorophyll B	1.52	1.77	0.95	2.09
Carotenode	1.53	1.82	1.79	1.95

한편, 이와 같은 방법을 이용하여 확인된 식물체는 포장으로 이식되어 정상적인 생육을 보였으며, 제초제 처리시 형질전환체는 저해를 받지 않았으나 대조식물체는 모두 고사되었는데, 이는 이미 보고된 바 있다(Han 등, 1997).

Phosphinothricin Acetyltransferase Assay : 형질전환체와 대조식물체의 조효소 추출액을 이용하여 PAT assay를 시도한 결과 대조식물체에는 PAT 효소의 활성을 볼 수 없었으나 형질전환체 모두 PAT 효소의 활성을 보였다. 특히 형질전환체 4번 line은 PAT 효소활성이 다른 형질전환체보다 강하였는데 (Table 3), 이러한 결과는 외부 유전자를 식물 염색체 내로 도입시 삽입되는 염색체 부위에 따라 유전자의 발현 정도가 다르게 되는 positional effect 때문인 것으로 사료된다.

따라서 본 실험결과 제초제 저항성 유전자인 PAT gene의 도입 여부를 기존의 방법보다 간편하고 저렴하게 선발, 확인할 수 있었으며, 이와 같은 방법은 항생제 내성 유전자와 제초제 저항성 유전자를 이용한

Table 3. PAT enzyme activity in crude extracts prepared from transgenic and normal potato leaves.

Plant No.	activity ($10^6\text{units}/\text{min}/\text{mg protein}$)
1	1470
2	2970
3	1260
4	4360
normal	n.d.

n.d.: not detected.

형질전환체의 선발시 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 또한 이러한 방법을 형질전환식물의 선발 육종에 이용한다면 기내에서 다량의 형질전환체를 선발하여 간편하게 확인 할 수 있어 보다 많은 형질전환체를 포장에 순화시킬 수 있으므로 식물체의 유전육종에 도움을 주리라 사료된다.

적 요

제초제 bialaphos에 저항성인 phosphinothricin acetyltransferase gene이 도입된 형질전환 감자 식물체에서 유전자의 간편한 확인방법을 확립하였다. 먼저 형질전환체와 대조식물체의 잎 disc를 취해 bialaphos 5mg/l를 처리한 액체배지에 치상하였을 때 배양 25일이면 대조식물체의 잎 disc는 완전히 고사되어 형질전환체와 구별이 가능하였다. 감자의 뿌리 생육 비교실험에서는 bialaphos 0.5mg/l의 농도에 agar를 0.6% 첨가한 선발배지에서 식물체의 정단부위를 치상하여 비교하였을 때 7-10일이면 뿌리의 생육차이를 이용하여 간편하게 형질전환여부를 판정할 수 있었다. 또한 감자의 잎 disc를 제초제 bialaphos 0.5mg/l를 처리한 액체배지에 치상하여 15일이 경과한 후 chlorophyll A의 함량을 측정하였을 때 형질전환체는 대조식물체보다 2.5배 정도 많은 chlorophyll A를 가지고 있어 형질전환체의 조기 판별 시 chlorophyll A 함량에 의해 검증이 가능하였다. 한편, 이렇게 형질전환 여부가 확인된 감자 식물체를 이용하여 PAT 효소의 활성을 측정한 결과 대조식물체에서는 PAT 효소의 활성을 보이지 않았으나 형질전환 식물체에서는 모두 효소의 활성이 높았다.

사 사

본 연구 결과는 1996년도 학술진흥재단의 연구비 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

인용문헌

Akama K., Puchta H., and B. Hohn. 1995. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of

- Arabidopsis thaliana* using the *bar* gene as selectable marker. Plant Cell Reports 14:450-454.
- An G. 1987. Binary Ti vector for plant transformation and promoter analysis. Methods in Enzymology 153: 292-305.
- Bevan M.W., Flavell R.B., and M.D. Chilton. 1983. A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. Nature. 304: 184-187.
- Bradford M.M. 1984. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Chaleff R.S., and M.F. Parsons. 1978. Direct selection *in vitro* for herbicide-resistant mutants of *Nicotiana tabacum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75(10):5104-5107.
- DeBlock M. 1988. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. Theor. Appl. Genet. 76:767-774.
- D' Halluin K., De Block M., Denecke J., Janssens J., Leemans J., Reynaerts A., and J. Botterman. 1992. Methods Enzymol. 216:415-426.
- Edwards K., Johnston C., and C. Thompaon. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Res. 19: 1349.
- Han S.S., Jeong J.H., Bang K.S., and D.C. Yang. 1997. Selection of Herbicide resistant potatoes transformed with Phosphinothricin Acetyltransferase Gene. Kor. J. Weed Sci. 17(4):390-399.
- Herrera-Estrella L., De Block M., Montagu M.V., and J. Schell. 1983. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. EMBO. 2:987-992.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., and M.W. Bevan. 1987. GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitivity and versatile gene fusion marker in higher plant. EMBO J. 6:3901-3907
- Jeong J.H., Yang D.C., Bang K.S., S.S Han. 1998. Transformation of potato using the phosphinothricin acetyltransferase gene as the selectable marker gene. Kor. J. of Weed Sci. 18(3):205-213.
- Manderscheid R. and A. Wild. 1986. Studies on the mechanism of inhibition by phosphinothricin of glutamine synthetase isolated from *Triticum aestivum* L.. J. of Plant Physiology. 123 : 135-42.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Plant Physiol 15:473-797.
- Roebbelen A. 1976. Experimenta zur Stoffwechsel-Physiologie der Pflanzen, gerog Ehieme Verlag Stuttgart.
- Tachibana K., Watanabe T., Sekizawa T., and T. Takemutsu. 1986. Action mechanism of bialaphos. II. Accumulation of ammonia in plants treated with bialaphos. J. Pest Sci 11:33-37.
- Thompson C.J., Movva N.R., Tizard R., Cramer R., Davies J.E., Lauwereys M., and J. Botterman. 1987. Characterization of the Herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces Hygroscopicus*. EMBO J. 6:2519-2523.
- Wild A., and C. Ziegler. 1989. The effect of bialaphos on ammonia assimilation and photosynthesis. I. Effect on the enzymes of ammonium assimilation. Zeitschrift fur Naturforschung 44c: 97-102.
- White J., Chang S.Y., and 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.
- Yang D.C., Bang K.S., and K.H. Choi. 1996. Extraction and activity assay of mouse adenosine deaminase from transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Korean J. of Plant Tissue Culture 23:55-60.

(접수일 1999. 5. 20)

(수리일 1999. 10. 20)