

***Agrobacterium tumefaciens*을 이용한 대두 형질전환체 개발**

조미애¹, 최동욱¹, 유장렬², Tom Clemente³, 최필선^{1,4*}

¹(주)유진텍 부설연구소, ²한국생명공학연구원, ³네브라스카대학, ⁴남부대학교 생약자원학과

Development of Transgenic Soybean Using *Agrobacterium tumefaciens*

Mi Ae Cho¹, Dong Woog Choi¹, Jang Ryol Liu², Tom Clemente³, Pil Son Choi^{1,4*}

¹Eugentech Inc., Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), 52 Oun-dong, Yusong-gu Daejeon 305-606, Korea

²Plant Cell Biotechnology Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), 52 Oun-dong, Yusong-gu, Daejeon 305-606, Korea

³Plant Science Initiative, University of Nebraska-Lincoln, NE, USA

⁴Department of Medicinal Plant Resources, Nambu University, Wealkye-dong, Kwangsan-gu, Kwangju 506-824, Korea

ABSTRACT *Agrobacterium tumefaciens*-mediated cotyledonary node transformation was used to produce transgenic soybean. Cotyledonary node explants of three cultivars and one genotype were co-cultivated with strains *Agrobacterium* (LBA4404, GV3101, EHA101, C58) containing the binary vectors (pCAMBIA3301 and pPTN289) carrying with CaMV 35S promoter-GUS gene as reporter gene and NOS promoter-bar gene conferring resistance to glufosinate (herbicide Basta) as selectable marker. There was a significant difference in the transformation frequency depend on bacteria strain. The EHA101 strain of the bacterial strains employed gave the maximum efficiency (3.6%). One hundred-six lines transformed showed the resistance in glufosinate. Histochemical GUS assay showed that at least 11 plants transformed with the GUS gene were positive response. The soybean transformants were obtained from the Thorne (5 plants), 1049 (5 plants) and Bakun (1 plant), respectively. Southern blot analysis and leaf painting assay revealed that the GUS and bar gene segregated and expressed in their progeny.

Key words: *Agrobacterium* strains, β -glucosinidase (GUS), *Glycine max* L., transformation

서 론

대두의 고효율 형질전환 기술 개발은 새로운 대두 신품종 개발을 더욱 촉진 시킬 수 있을 뿐 아니라 functional genomics 연구를 수행하기 위한 insertion mutant line 생산에 서도 필수적으로 이용될 수 있을 것이다. 대두 형질전환시스템은 미숙 배 배양으로 부터 체세포 배발생이나 (Cahoon et al. 2000; Hazel et al. 1998) 자엽절과 배축 절편을 이용한

기관발생을 (Clemente et al. 2000; Xing et al. 2000; Meurer et al. 1998) 통한 *Agrobacterium* 공동배양법 (Hinchee et al. 1988)과 particle bombardment법 (McCabe et al. 1988) 으로 대두 형질전환체를 생산하여 왔다. 이 후 대두의 형질 전환율을 증대시키기 위한 벡터의 최적화 (Hadi et al. 1996), 최적 선발마커 개발 (Zhang et al. 1999) 및 고빈도 재분화 능을 갖는 품종 선별 (Simmonds and Donaldson 2000; Choi et al. 2002) 등 많은 연구가 이루어져 왔다. 이러한 기 연구를 바탕으로 대두에서 바이러스 저항성 (Di et al. 1996), 제초제 저항성 (Padgett et al. 1995), 해충 저항성 (Stewart et al. 1996) 및 lysine 함량증가 (Falco et al.

*Corresponding author Tel 062-970-0161 Fax 062-970-0165

E-mail cps6546@nambu.ac.kr

1995) 등 많은 형질전환체를 개발하였다. 그러나 이러한 대부분의 형질전환효율 증진과 신품종 육성을 위한 연구가 진행되어 왔음에도 불구하고 아직까지 Monsanto, Tom Clemente 실험실 등 제한된 소수 연구 그룹에서 성공 하였을 뿐 국내에서는 아직까지 어려운 작물로 분류되어 있고, 형질전환체의 후대 검증을 통한 외래유전자의 발현을 확인한 바 없다.

따라서 본 연구에서는 자엽 절 아그로박테리움 공동배양법 (Zhang et al. 1999)으로 재분화능이 높은 #1049와 국내의 3개 품종을 대상으로 *Agrobacterium* 균주에 따른 형질전환과 후대 검증을 통한 안정적 형질전환시스템을 확보 하였기에 보고 하고자 한다.

재료 및 방법

식물 재료 : 1,000개 genotypes 으로부터 선발된 기관 발생능이 높은 계통 (1049, unpublished 데이터)과 국내의 3 품종 (백운, 무안, Thorne) 종자를 12 N 염산가스 노출법 (Di et al. 1996)으로 2일간 표면 살균하였다. 2% sucrose와 0.8% agar가 첨가된 MS기본배지 (Murashige and Skoog 1962)에 페트리디쉬 당 10개의 종자를 치상하고 16시간 광주기하에서 5일 동안 발아시켰다. 배지는 autoclave 전 1 N HCl과 1 N KOH로 pH 5.8로 조정하였다. 배양 5일 후 발아된 유식물체로부터 약 5 mm의 배축이 포함되게 배축과 뿌리부위를 제거한 후 다시 자엽과 자엽사이를 종단으로 절단 하여 2개의 절편을 얻었다. 자엽사이에 있는 유조직을 해부현미경 하에서 제거하고 *Agrobacterium*과 공동배양하기 위한 절편으로 사용하였다.

Agrobacterium tumefaciens strains

CaMV35S프로모터, β -glucuronidase (GUS)유전자와 bar 유전자를 선발표지로 포함하고 있는 pCAMBIA3301과 pPTN289백터를 freeze-thaw방법으로 LBA4404, EHA101, GV3101 및 C58에 각각 형질전환 하여 균주로 사용하였다 (Jefferson et al. 1987). 50 mg/L streptomycin과 50 mg/L spectinomycin이 첨가된 LB액체배지와 50 mg/L kanamycin (pPTN289)과 50 mg/L rifampicin이 첨가된 LB액체지 (pCAMBIA3301) 각 50 ml에 colony를 접종하여 28°C로 8 시간 이상 배양한 후 대수기 증식기 ($OD_{650} = 0.6 - 1.0$)의 균을 사용하였다.

형질전환체 생산

약 30 - 40개 자엽 절 절편을 25 ml의 *Agrobacterium* 용액에 30분 동안 침지한 후 공동배양용 배지 (1/10 B5 salt, 20 mM MES, 100 mg/L cysteine, 1.67 mg/L BA, 0.25 mg/L GA3,

39 mg/L acetosyringone, 3% sucrose, pH 5.4, CM)에 5개씩 치상하여 3일 동안 공동 배양하였다. 공동 배양한 자엽 절 절편을 3 - 5회 수세한 후 shoot유도배지 (B5 salt, B5 vitamin, 3% sucrose, 1.67 mg/L BA, 5 mg/L glufonsinate, 50 mg/L ticarcillin, 50 mg/L cefotaxime, 50 mg/L vancomycin, 3 mM MES, pH 5.6, SI)에 옮겨 6 - 8주 동안 2주 간격으로 계대배양 하였다. 형성된 shoot를 분리하여 shoot 신장배지 (MS salt, B5 vitamin, 1 mg/L zeatin, 0.1 mg/L IAA, 0.5 mg/L GA3, 3% sucrose, 100 mg/L pyroglutamic acid, 50 mg/L asparagine, 3 mM MES, pH 5.6, SE)에 옮겨 3 cm 이상 신장시켰으며, 부정근유도배지 (1/2 MS salt, B5 vitamin, 2% sucrose, 0.5 mg/L NAA, 50 mg/L asparagine, 100 mg/L pyroglutamic acid, 3 mM MES, pH 5.6, RI)에 옮겨 유식물체를 얻었다. 모든 배지는 Zhang's 등의 방법 (1999)에 따라 조정 하였으며, 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 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 16시간 광주기에서 배양 하였다. 선발배지에서 얻은 유식물체는 토양으로 옮겨 온실 하에서 순화 한 후 종자를 수확 하였다.

β -Glucuronidase (GUS) 활성조사

Zhang's방법 (1999)에 따라 선발된 유식물체로부터 잎 절편을 채취한 후 37°C에서 5-bromo-4-chloro-3-indole-glucuronidase 용액에 침지 시켰다 (Jefferson et al. 1987). 24시간 후 70% 알코올 용액으로 탈색 시킨 후 GUS 양성 반응을 보인 식물체의 빈도를 조사하였다. 대조구로서는 *Agrobacterium*과 공동배양하지 않은 식물체의 잎 절편을 사용하였다.

Leaf painting 및 Southern 분석

GUS 양성반응을 나타낸 식물체 (T0 세대)로부터 종자 (T1 세대)를 얻었다. 후대 종자 (T1 세대)를 토양에 파종하여 온실에서 생육 시켰다. 파종 후 식물체의 크기가 30 cm 이상 되었을 때 1차 잎 표면에 0.1% 바스타 (Aventis Inc.)를 솜으로 처리 하였다. 5일 후 제초제에 대한 내성을 나타낸 식물체의 잎 조직으로부터 genomic DNA를 추출하였다 (Dellaporta et al. 1983). 10 μg 의 DNA를 Hind III 제한효소 반응액에 37°C에서 16시간 동안 반응시켜 절단 한 후 0.8% agarose 겔에 전기영동 하였다. Agarose 겔 상의 DNA 밴드를 Zeta^R-Probe nylon membrane (Bio-Rad, catalog #162-0196)에 옮겨 ³²P-dCTP (Stratagene, catalog #300385)로 표지된 약 1.5 kb bar probe를 이용하여 Southern 분석 하였다 (Southern 1975).

결과 및 고찰

국내 원자력연구소와 일본유전자은행으로부터 수집한 1,000개 이상의 genotype에 대한 기관발생능을 0.1 mg/L NAA와 3.2 mg/L 사이토키닌 (BA, tidiazuron, zeatin, kinetin)을 각각 조합 첨가한 MS배지에서 조사 하여 45% 이상 기관발생능을 갖는 1 계통 (#1049)을 선정 하였다 (unpublished 데이터). #1049와 3개 품종을 자엽 절 공동배양법 (Zhang et al. 1999)으로 형질전환을 시도한 결과, 배양 2주 후 상처를 받은 자엽 절 부위에서 측아가 발생하여 형성된 것으로 추측되는 shoot가 발생하였으나 chimeric일 가능성 때문에 제거 하였다. 배양 2주째 형성된 shoot를 배측 부위와 함께 제거하고 탈분화된 자엽 절 절편을 다시 동일배지에 옮겨 4 - 6주 동안 배양할 경우 녹색반점을 갖는 많은 부정아 원기가 형성되었다. 부정아 원기는 선발배지에서 탈분화되거나 검은색으로 점차 갈변되는 주위 조직과는 뚜렷이 구분 되었으며, 배양 6 - 8주째 이러한 원기로부터 2 - 3 mm 크기의 multiple shoot를 얻을 수 있었다 (Figure 1 A,B). 배양 6 - 8주후 건강하게 자란 shoot를 분리하여 shoot신장배지 (SE)에 옮겨 배양하면서 3 cm이상 되게 신장 시켰다 (Figure 1C). 신장된 shoot를 부정근유도배지에서 뿌리를 유도 하였으며, 이후 토양에 옮겨 순화시켰다 (Figure 1D). 일반적으로 5 mg/L glufosinate가 첨가된 선발배지에서 대두의 배양절편은 갈변되면서 점차 괴사 된다 (Zhang et al. 1999). 이러한 현상은 glufosinate가 상처를 받은 배양절편의 목부와 사부조직으로 흡수 되어 (Shelp et al. 1992) 형질전환이 일어나지 않은 세포의 경우 암모니아 축적으로 세포내 인산화과정을 저해시킴으로서 괴사현상이 나타나고, 형질전환이 일어난 세포의 경우 phosphinothricin acetyl transferase (PAT)효소를 합성함으로써 세포내로 흡수된

glufosinate를 불활성 형태로 전환시킴으로 저항성을 갖게 한다 (Muller et al. 2001). 따라서 배양기간 동안 나타나는 자엽 절 갈변현상과 괴사현상은 배지에 첨가된 glufosinate에 의해 나타난 현상이며, 새롭게 형성된 multiple shoot의 경우는 T-DNA의 bar유전자가 대두 genome에 도입 되어 발현됨으로서 저항성을 갖게 된 것으로 생각된다.

5 mg/L glufosinate가 첨가된 선발배지에서 1,412개의 자엽 절 절편으로부터 106개의 glufosinate 저항성 유식물체를 얻을 수 있었으며, 이중 GUS 양성반응을 나타낸 식물체는 11개체로 낮은 형질 전환율 (0.77%)을 나타내었다 (Fig. 1E, F). 그러나 각 품종에서 얻어진 GUS 양성반응 식물체를 보면 #1049에서 5개체 (1.8%), 백운콩에서 1개체 (0.46%), Thorne에서 5개체 (1.72%)를 각각 얻을 수 있었으며, 무안콩에서는 얻지 못하였다. 이와 같이 계통 또는 품종에 따라 형질전환 빈도의 차이를 볼 수 있었으며, 특히 이전 1,000 계통 스크리닝으로부터 높은 기관발생능을 보인 #1049계통은 미국에서 대두 형질전환 품종으로 사용하는 Thorne품종과 유사한 형질전환 빈도를 보였다. 이러한 결과는 형질전환빈도가 품종의 기관발생능과 밀접한 관계에 있다는 연구 결과 (Simmonds and Donaldson 2000)와 일치되며, 이는 옥수수에서 식물체 재분화능과 형질전환에 있어서 A188 계통의 중요성이 확인 된 후 (Green 1982), 세포배양과 원형질체 배양을 통한 식물체재생 (Rhodes et al. 1988a) 및 electroporation법에 의한 형질전환식물체 생산 등에서도 확인 되었다 (Rhodes et al. 1988b). 이와 같이 대두 뿐 아니라 많은 식물에서 계통 또는 품종의 선발과정은 안정적 형질전환시스템 확립에 중요한 요인이 될 수 있다. 특히 대두와 같이 계통 간 또는 품종 간 식물체 재분화능에 있어서 현저한 차이가 있고, 기내 배양이 어려운 종일수록 형질전환을 위한 최적 품종을 선별하기 위해서는 광범위한 스크리닝 연구가 필수적이라 할 수 있다.

Agrobacterium 균주에 따른 형질전환율을 비교해 보면 pCAMBIA3301백터가 도입된 LBA4404에서 3.1%, GV3101에서 1.6% 그리고 C58에서 0.0%의 GUS 양성반응을 보였

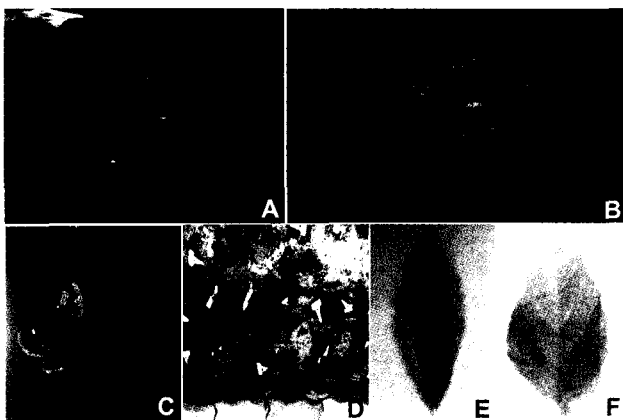


Figure 1. Plant regeneration from cotyledonary node explant of soybean transformed with *GUS* and *bar* gene. A, B: Putative transgenic shoots formation on SI medium with 5 mg/L glufosinate. C: Glufosinate-resistant plants. D: Transgenic soybean grown in soil. E: GUS-negative leaf of non-transgenic soybean. F: GUS-positive leaf of transgenic soybean.

Table 1. Frequency (%) of GUS expression in soybean leaf formed from cotyledonary node explants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* strains.

<i>Agrobacterium</i> strains (vectors)	Percentage (%) of GUS expression
LBA4404 (pPTN289)	0.00 ± 0.00
LBA4404 (pCAMBIA3301)	3.10 ± 0.12
GV3101 (pPTN289)	0.00 ± 0.00
GV3101 (pCAMBIA3301)	1.60 ± 0.10
C58 (pPTN289)	0.00 ± 0.00
C58 (pCAMBIA3301)	0.00 ± 0.00
EHA101 (pPTN289)	3.60 ± 0.53
EHA101 (pCAMBIA3301)	0.00 ± 0.00

고, pPTN289이 도입된 EHA101 균주에서는 3.6%의 GUS 양성반응을 보였다 (Table 1). 그러나 pPTN289이 도입된 균주 (LBA4404, GV3101, C58)와 pCAMBIA3301이 도입된 EHA101에서는 아직 형질전환체를 얻지 못하였다. 이러한 결과는 대두의 형질전환 연구에서 *Agrobacterium* 균주 (A281, C58, ACH5)의 감염성이 품종과 *Agrobacterium*의 종류에 따라 다르게 나타날 수 있다는 연구 결과 (Simmonds and Donaldson 2000)와 아주 잘 일치하고 있으며, 이는 13개의 벼 품종과 pTOK233 벡터를 포함하는 LBA4404의 감염성을 조사 하였을 때 동진벼, 화영벼 및 낙동벼는 높은

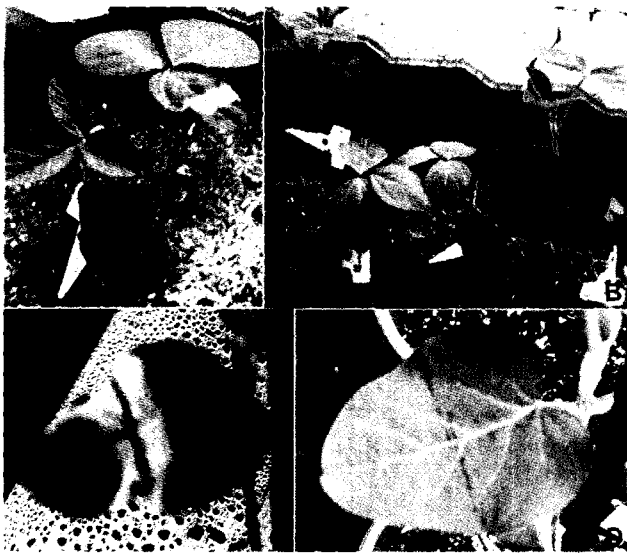


Figure 2. Leaf painting assay with basta herbicide in leaf of transgenic soybean (T₁). A, C: Transgenic soybean, B, D: Non-transgenic soybean.

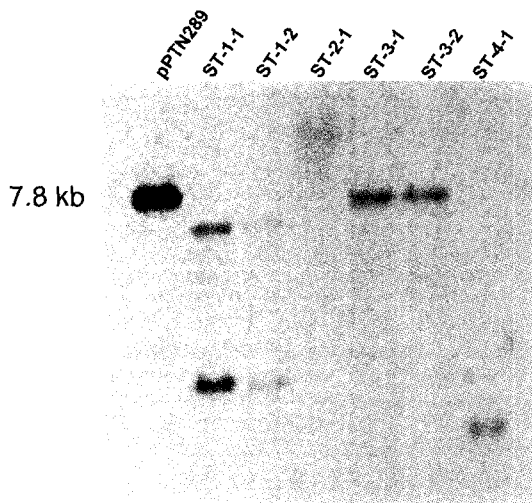


Figure 3. Southern blot analysis of 6 T₁ progeny of transgenic soybean carrying *bar* gene. Total genomic DNA was digested with *Hind* III. The 1.5 kb *bar* probe labeled with ³²P-dCTP was hybridized with genomic DNA (10 μg) of T₁ progeny. Lane 1 : Plasmid vector (pPTN289) digested with *Hind* III, Lane 2-7 : Progeny of transgenic soybean (T₁).

감염성이 그리고 밀양 23호, 낙동벼 및 삼강벼에서는 낮은 감염성을 나타낸 연구 (Lee et al. 1999)와 *Coleus blumei*에서 C58C1, GV3101, A281보다 B6S3 균주가 높은 감염성을 나타낸 연구 (Bauer et al. 2002) 등에서도 확인되었다. 이와 같이 *Agrobacterium* 균주의 감염성은 그 균주의 종류에 따라 그리고 식물의 계통, 품종 및 종에 따라서도 다르게 나타나기 때문에 안정적 그리고 고효율 형질전환 시스템을 확보하기 위해서는 최적 품종 및 *Agrobacterium* 선정 과정이 필수적이라 할 수 있다.

기내에서 성숙한 유식물체 (약 3 cm)를 토양에 이식하여 성숙 시킨 후 4개의 GUS양성반응을 나타내는 식물체 (ST-1, ST-2, ST-3, ST-4)로부터 후대 종자 (T₁)를 얻었다. 각 형질전환체로부터 수확한 종자 (T₁ 세대)를 1 - 5개씩 토양에 파종하여 성숙한 식물체를 얻었고 3주정도 자란 식물체의 1차엽에 바스타 (basta)처리를 하여 제초제에 대한 저항성을 조사한 결과 ST-1계통의 5개체 중 4개체에서, ST-2계통 5개체 모두, ST-3계통에서 1개체에서, ST-4계통 4개체 모두에서 저항성이 갖는 것으로 나타났다. 그러나 대조군의 경우 basta를 처리 하였을 때 3일째부터 잎이 갈변되면서 점차 괴사되어 저항성이 없는 것으로 나타났다 (Figure 2). 제초제 저항성을 갖는 형질전환체의 잎 (6개체)으로부터 추출한 genomic DNA를 이용하여 Southern분석을 수행한 결과 ST-1-1과 ST-1-2에서는 2 copy가, ST-3-1, ST-3-2, ST-4-1에서는 1 copy가 식물체 genome에 삽입되어 있었고, ST-2-1에서는 확인 할 수 없었다 (Figure 3). 따라서 자엽 절 공동배양법에 의해 도입된 *bar*유전자가 대두 genomic DNA에 삽입된 후 다음 세대에 안정적으로 유전되고 있음을 확인 할 수 있었다.

적 요

*Agrobacterium*과 자엽절 공동배양으로 대두 형질전환체를 생산하였다. 대두 배양재료는 3개의 품종과 1개의 genotype의 자엽절 절편을 사용하였으며, *bar*유전자와 GUS유전자로 제작된 pPTN289와 pCAMBIA3301 벡터를 LBA4401, GV3101, EHA101, C58에 각각 형질전환하여 공동 배양하였고 모든 형질전환 방법은 약간 변형된 Zhang 등(1999)의 방법에 따라 수행 하였다. 형질전환빈도는 아그로박테리움의 종류에 따라 현저한 차이가 있었으며, 특히 사용한 균주 중 EHA101에서 3.6%로 최대치를 보였다. Glufosinate가 첨가된 선발매지에서 106개의 식물체를 얻었으며, 이중 Thorne에서 5개체, 1049에서 5개체, 백운콩에서 1개체 등 모두 11개로부터 GUS양성반응을 확인하였다. Southern분석과 basta검정법에 의하여 T₁세대 식물체로부터 GUS유전자와 *bar*유전자가 발현되고 있음을 확인하였다.

사 사

본 연구는 과학기술부 작물유전체기능연구사업단 과제(CG2121)로부터 지원받았으며, 네브라스카대학 Tom Clemente 박사로부터 대두(Throne)품종과 pPTN289 벡터를 공급 받아 수행하였다.

인용문헌

- Bauer N, Levanic DL, Mihaljevic S, Jelaska S (2002) Genetic transformation of *Coleus blumei* Benth. using *Agrobacterium*. Food Technol Biotechnol 40: 163-169
- Cahoon EB, Marillia EF, Stecca KL, Hall SE, Taylor DC, Kinney AJ (2000) Production of fatty acid components of meadowfoam oil in somatic embryos. Plant Physiol 124: 243-251
- Choi PS, Komatsuda T, Kim MH, Choi KM, Choi DW, Liu JR (2002) Screening of soybean recombinant inbred lines for high competence somatic embryogenesis. Korean J. Plant Biotech 29: 135-138
- Clemente TE, LaVallee BJ, Howe AR, Conner-Ward D, Rozman RJ, Hunter PE, Broyles DL, Kasten DS, Hinchee MA (2000) Progeny analysis of glyphosate-selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation. Crop Sci 40: 797-803
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1985) Maize DNA miniprep. In: Malmberg R, Messing J, Sussex (eds), Molecular Biology of Plants: A laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. pp 36-37.
- Di R, Purcell V, Collins GB, Ghabrial SA (1996) Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene. Plant Cell Rep 15: 746-750.
- Falco SC, Guida T, Locke M, Mauvais J, Sanders C, Eard RT, Webber P (1995) Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. Bio/Technology 13: 577-582
- Green CE (1982) Somatic embryogenesis and plant regeneration from the friable callus of *Zea mays*. In: Fujiwara A (ed), Plant Tissue Culture, Maruzen, Tokyo. pp 107-108
- Hadi MZ, McMullen MD, Finer JJ (1996) Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. Plant Cell Rep 15: 500-505
- Hazel CB, Klein TM, Anis M, Wilde HD, Parrott WA (1998) Growth characteristic and transformability of soybean embryogenic cultures. Plant Cell Rep 17: 765-772
- Hinchee MAW, Connor-Ward DV, Newell CA, McDonnell RE, Sato SJ, Gasser CS, Fischhoff DA, Re DB, Fraley RT, Horsch RB (1988) Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated gene transfer. Bio/Technol 6: 915-922
- 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
- Lee SH, Shon YG, Lee SI, Kim CY, Koo JC, Lim CO, Choi YJ, Han CD, Chung CH, Choe ZR, Cho MJ (1999) Cultivar variability in the *Agrobacterium*-rice cell interaction and plant regeneration. Physiologia Plantarum 107: 338-340
- McCabe DE, Swain WF, Martinell BJ, Christou P (1988) Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. Bio/Technol 6: 923-926
- Meurer CA, Dinkins RD, Collins GB (1998) Factors affecting soybean cotyledonary node transformation. Plant Cell Rep 18: 180-186.
- Muller B, Zumdick A, Schuphan I, Schmidt B (2001) Metabolism of the herbicide glufosinate ammonium in plant cell cultures of transgenic and non-transgenic sugarbeet, carrot, purple foxglove and thorn apple. Pest Manag Sci 57: 46-56
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15 : 473-497
- Padgett SR, Kolacz KH, Delannay X, Re DB, LaVallee BJ, Tinius CN, Rhodes WK, Otero YI, Barry GF, Eicholtz DA, Peschke VM, Nida DL, Taylor NB, Kishore GM (1995) Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. Crop Sci 35: 1451-1461
- Rhodes CA, Lowe KS, Ruby KL (1988a) Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic maize cell cultures. Bio/Technology 6: 56-60
- Rhodes CA, Pierce DA, Mettler IJ, Mascarenhas D, Detmer JJ (1988b) Genetically transformed maize plants from protoplasts. Science 240: 204-207
- Shelp BJ, Swanton CJ, Hall JC (1992) Glufosinate (Phosphinothricin) mobility in young soybean shoots. J Plant Physiol 139: 626-628
- Simmonds DH, Donaldson PA (2000) Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of short-season soybean genotypes. Plant Cell Rep 19: 485-490
- Southern E (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98: 503-512
- Stewart CN, Adang MJ, All JN, Boerma HR, Cardineau G, Tucker D, Parrott WA (1996) Genetic transformation, recovery and characterization of fertile soybean transgenic for synthetic *Bacillus thuringiensis cryIc* gene. Plant Physiol 112: 121-129
- Xing AQ, Zhang Z, Sato S, Staswick P, Clemente TE (2000) The use of the two T-DNA binary system to derive marker-free transgenic soybeans. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 36: 456-463
- Zhang Z, Xing A, Staswick P, Clemente TE (1999) The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. Plant Cell Tiss Org Cult 56: 37-46

(접수일자 2004년 9월 22일, 수리일자 2004년 10월 25일)