

## *Agrobacterium tumefaciens* 공동배양법을 이용한 옥수수 형질전환체 생산

조미애<sup>1</sup>, 박윤옥<sup>1</sup>, 김진석<sup>4</sup>, 박기진<sup>5</sup>, 민황기<sup>5</sup>, 유장렬<sup>3</sup>, Tom Clemente<sup>6</sup>, 최필선<sup>2\*</sup>  
<sup>1</sup>유진텍부설연구소, <sup>2</sup>남부대학교 생약자원학과, <sup>3</sup>한국생명공학연구원 식물세포공학실험실, <sup>4</sup>한국화학연구원,  
<sup>5</sup>강원도옥수수시험장, <sup>6</sup>네브라스카대학

### Production of Transgenic Maize (*Zea mays* L.) Using *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation

Mi Ae Cho<sup>1</sup>, Yun Ok Park<sup>1</sup>, Jin Suck Kim<sup>4</sup>, Ki Jin Park<sup>5</sup>, Hwang Ki Min<sup>5</sup>, Jang Ryol Liu<sup>3</sup>,  
Tom Clemente<sup>6</sup>, Pil Son Choi<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Eugentech Inc, Taejeon 305-606, Korea

<sup>2</sup>Department of Medicinal Plant Resources, Nambu University, Kwangju 506-824, Korea

<sup>3</sup>Plant Cell Biotechnology Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Taejeon 305-606, Korea

<sup>4</sup>Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejeon 305-600, Korea

<sup>5</sup>Maize Experiment Station, Gangwon-do Provincial Agricultural Research and Extension Service, Gwangwon-do 200-150, Korea

<sup>6</sup>Plant Science Initiative, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE. 68588-0665, USA

**ABSTRACT** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated immature embryo transformation was used to produce transgenic maize. Immature embryo of Hi II genotype were co-cultivated with strains *Agrobacterium tumefaciens* (C58C1) containing the binary vectors (pPTN290) carrying with *Ubiquitin* promoter-GUS gene as reporter gene and NOS promoter-*nptII* gene conferring resistance to paromomycin as selective agent. Seven embryogenic callus lines transformed showed the resistance in paromomycin antibiotics. Histochemical GUS assay showed that 7 individual lines transformed with the GUS gene were positive response among the transformants. Southern blot analysis revealed that the *nptII* gene segregated and expressed in their progeny.

**Key words:** *Agrobacterium* strains,  $\beta$ -glucuronidase (GUS), maize, transformation

#### 서 론

옥수수는 세계 곡류생산량에서 벼와 밀 다음으로 많이 재배 되는 중요한 작물이다. 분자유종을 통한 옥수수 형질 전환시스템 개발은 제초제 저항성, 내병성, 내한성 등 유용 유전자 도입을 가능하게 하여 옥수수 신품종 육성을 앞당길 수 있을 것이다. 옥수수형질전환체는 재분화능이

높은 미숙배 또는 배발생켈러스를 이용하여 particle bombardment법 (Gordon-Kamm et al. 1990; Songstad et al. 1996; Pareddy et al. 1997; Frame et al. 2000)과 *Agrobacterium* 공동배양법 (Ishida et al. 1996; Frame et al. 2002)에 의해 개발되어 왔다. 이러한 기 연구에서 *Agrobacterium*공동배양법은 Particle bombardment법보다 외래 유전자의 안정적 도입과 낮은 copy수 (Ishida et al. 1996; Zhao et al. 1998), large size DNA도입 (Hamilton et al. 1996) 및 높은 형질전환율 (Ishida et al. 1996; Zhao et al. 1998) 등 많은 장점이 있다. 옥수수의 안정적 형질전

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

E-mail: cps6546@nambu.ac.kr

환율을 증대시키기 위해 최적 벡터 제조 (Lupotto et al. 1999), 최적 *Agrobacterium* 균주 선정 (Zhao et al. 1999), 최적 공동배양배지 선정 및 고빈도 재분화능을 갖는 type II 켈러스 선발 (Carvalho et al. 1997; Cho et al. 2005) 등 많은 연구가 이루어져 왔다. 현재 이러한 안정된 옥수수 형질전환시스템을 이용한 heat shock protein 유전자 도입, aox 1과 3 유전자 도입, rice actin promoter-*gfp* 발현 시스템, 35S CaMV promoter-*gfp* 발현시스템, *Ubiquitin1* promoter-cyanamide hydratase 유전자 도입 등 많은 연구가 진행되고 있다 (Moose and Clemente 2002). 그러나 이러한 옥수수의 형질전환효율 증진과 신품종 육성을 위한 연구는 지금까지 국외 연구그룹 (Monsanto, Kan Wang lab. Tom Clemente lab.)을 중심으로 진행되어 오고 있고 국내에서는 후대 검증을 통한 외래유전자의 안정발현시스템을 찾아보기 힘든 실정이다.

따라서 본 연구에서는 국내 옥수수 품종에서 형질전환시스템 개발 및 환경친화형 제초제 저항성 형질전환체를 개발할 목적으로 먼저 type II 켈러스를 안정적으로 생산하는 모델계통인 Hi II의 미숙배를 *Agrobacterium*과 공동배양하는 방법으로 형질전환체를 생산하는 시스템을 확보 하였고 보고 하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 식물 재료

옥수수의 type II 켈러스를 형성하는 모델계통 (Hi II) 종자를 네브라스카대학 Tom Clemente 박사로부터 분양 받았다. 옥수수 종자를 1일 동안 암상태에서 침적한 후 거어즈 처리하여 발아 시켰으며, 1 cm 정도 유근이 자랐을 때 토양에 과종하여 성숙한 개체로 생육 시켰다. 성숙한 식물로부터 발달된 이삭에 화분가루를 묻혀 수정한 후 약 10~11일째에 1.5~2.0 mm 크기의 미숙배를 얻어 무균적으로 분리한 후 배양재료로 이용하였다.

### *Agrobacterium tumefaciens* strains

*Ubiquitin1* 프로모터,  $\beta$ -glucuronidase (GUS) 유전자와 NPT II 유전자를 선별표지로 포함하고 있는 pPTN290 벡터 (Figure 1)를 freeze-thaw 방법으로 C58C1에 형질전환하여 균주로 사용하였다 (Jefferson et al. 1987). 50 mg/L kanamycin, 100 mg/L spectinomycin 및 100 mg/L streptomycin이 첨가된 LB 액체배지 50 mL에 colony를 접종하여 28°C로 8시간 이상 배양한 후 대수가 증식기 ( $OD_{650} = 0.6 - 1.0$ )의 균을 사용하였다.

### Paromomycin 저항성 형질전환체 생산

미숙배의 크기가 1.5~2.0 mm로 자란 이삭을 취하여 70% 알코올로 2회 표면 살균한 후 무균작업대에서 미숙배를 분리하였다. Paromomycin 저항성 배발생 켈러스를 선발하기 위하여 MS salt (Murashige and Skoog 1962), Eriksson's vitamins, 1 mg/L 2,4-D, 25 mM proline, 100 mg/L casamino acid, 3 mM MES, 1.7 mg/L AgNO<sub>3</sub>, 100 mg/L carbenicillin, 100 mg/L paromomycin 및 20 g/L sucrose를 조합하여 선발배지 (SM)를 조성하였다. 배지는 7 g/L purified Agar를 첨가하기 전 pH를 5.8로 조정하여 121°C, 1.2기압에서 15분간 고압 멸균 후 직경 0.2 마이크로미터의 필터에 통과시킨 항생제 용액을 첨가하여 잘 섞은 후 90×15 mm 플라스틱 페트리디쉬에 25 mL씩 분주하였다. 미숙배는 페트리디쉬당 10개씩 치상하여 28°C에서 암배양하였다. 치상 후 4일째 미숙배로부터 발달된 유경과 유근 부위를 제거한 후 배반절편을 동일배지에 2주 간격으로 12주간 계대배양하였다. 배반절편으로부터 형성된 배발생 켈러스 (type II)는 선발하여 동일배지상에서 증식시켰다. 선발된 배발생 켈러스로부터 형질전환체를 얻기 위하여 1차 재분화 배지 (MS salts, 0.1 mg/L 2,4-D, 10<sup>-7</sup>M ABA, 2% sucrose, 50 mg/L carbenicillin, 50 mg/L paromomycin, 0.8% purified agar)와 2차 재분화배지 (N6 salts, Eriksson's vitamins, 6% sucrose, 50 mg/L carbenicillin, 50 mg/L paromomycin, 0.35% phytigel)에 2주 간격으로 옮겨면서 광도 46  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 16시간 광주기에서 배양한 후 완전한 식물체를 유도하였다. 선발배지에서 얻은 유식물체는 토양으로 옮겨 온실에서 순화한 후 종자 (T<sub>1</sub>)를 수확 하였다.

### $\beta$ -Glucuronidase (GUS) 발현조사

배발생 켈러스로부터 재분화된 식물체의 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.

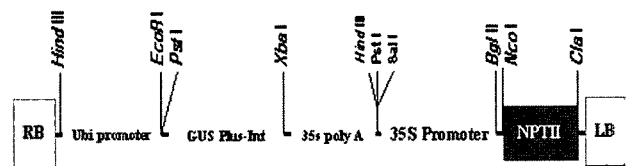


Figure 1. Plant transformation vector (pPTN290) showing restriction sites. T-DNA region of pPTN290 (RB-Right border, GUS plus-Int-GUS gene interrupted with eukaryotic intron, 35S poly A-35S polyAAA tail).

Southern blot분석

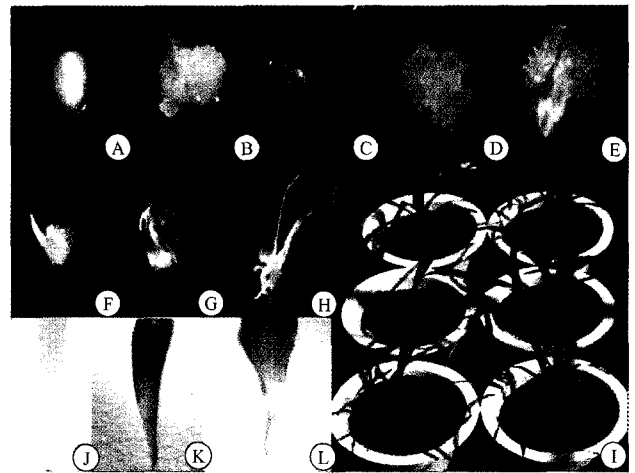
GUS 양성반응을 나타낸 식물체 (T<sub>0</sub> 세대)로부터 종자 (T<sub>1</sub> 세대)를 얻었다. 후대 종자 (T<sub>1</sub> 세대)를 토양에 파종하여 온실에서 생육 시켰다. 파종 후 식물체의 크기가 약 50 cm 이상 되었을 때 GUS 양성반응을 나타낸 식물체의 잎 조직으로부터 genomic DNA를 추출하였다 (Dellaporta et al. 1985). 10 µg의 DNA를 *EcoRI* 제한효소 반응액에 37°C에서 16시간 동안 반응시켜 절단 한 후 0.8% agarose 겔에 전기영동 하였다. Agarose 겔 상의 DNA 밴드를 Zeta<sup>R</sup>-Probe nylon membrane (Bio-Rad, catalog #162-0196)에 옮겨 <sup>32</sup>P-dCTP (Stratagene, catalog #300385)로 표지된 약 0.8 kb *nptII* probe를 이용하여 Southern 분석하였다 (Southern 1975).

결과 및 고찰

*Agrobacterium* 공동배양법에 의한 옥수수 고빈도 형질전환시스템에서는 type II 켈러스를 생산하는 계통을 주로 사용해야 한다 (Ishida et al. 1996; Lupotto et al. 1999; Frame et al. 2002; Moose and Clemente 2002). 특히, A188 x B73 교배로부터 유래되는 Hi II 계통 (Armstrong et al. 1991)의 미숙배 또는 배발생 켈러스는 전형적인 type II 켈러스를 생산하는 계통으로서 (Armstrong et al. 1991) 높은 재분화능과 후대종자 생산능 때문에 (Armstrong 1994) 최근 옥수수 형질전환연구에서 중요한 유전자원으로 알려져 있다 (Songstad et al. 1996; Pareddy et al. 1997; Frame et al. 2002). Hi II 종자를 파종한 후 약 3~4개월 동안 온실에서 생육시켜 성숙한 식물체를 얻을 수 있었다. Hi II 식물체의 화분가루를 이삭에 묻혀 수정한 후 10~11일째에 1.5~2.0 mm 크기의 미숙배를 얻을 수 있었고 (Figure 2A), 이러한 미숙배를 *Agrobacterium*과 공동배양 후 4일째 배로부터 발달된 유경과 유근 부위를 제거한 배반절편을 선발배지에서 2주 간격으로 계대배양한 결과, 배양 4~6주째부터 유경과 유근부위를 잘라낸 배반절단 부위로부터 켈러스를 형성하는 절편 (Figure 2B)과 아무런 변화없이 점차 괴사 또는 백화현상을 나타내는 절편 (Figure 2C)이 관찰되었다. 배양 8주 후 배반절편으로부터 형성된 켈러스는 선발배지에서 점차 증식되기 시작하여 배양 12주째에는 아주 빠른 성장능과 배발생능을 갖는 전형적인 type II 켈러스를 얻을 수 있었다 (Figure 2D). 반면 괴사 또는 백화현상을 보인 절편의 경우 어떠한 켈러스 증식이나 배발생 켈러스도 형성되지 않았다. 배양 12주째 1,158개 미숙배 중에서 7개 (0.60%)로부터 독립적인 배발생 켈러스를 얻을 수 있었다. 이러한 배발생 켈러스를 1차 식물체 전환배지에 옮겨 2주간 배양하였을 때 구형기 체세포배가 발생되었고, 이로 부터 흰색의 뚜

렷한 체세포배가 형성되었다 (Figure 2E). 체세포배를 2차 식물체 전환배지에 옮겨 다시 2주간 배양하였을 때 자엽부위가 점차 녹색으로 변하기 시작하였고 뿌리도 유도되었다 (Figure 2F, G, H). 유식물체의 크기가 약 10 cm 이상 되었을 때 토양으로 순화하여 건강한 식물체를 얻을 수 있었고 (Figure 2I), 이러한 형질전환체 (T<sub>0</sub>)의 잎에서 GUS 유전자가 안정적으로 발현되고 있었고 (Figure 2K, L), 반면 대조군 식물체에서는 발현되지 않음을 확인 하였다 (Figure 2J). 수정 후 식물체로부터 후대종자 (T<sub>1</sub>)를 얻었다.

선발배지에 첨가된 paromomycin은 neomycin phosphotransferase II (*nptII*) 효소작용에 의해 불활성화 됨으로서 형질전환이 일어나지 않은 세포는 괴사 시키고, 형질전환세포는 항생제 저항성을 갖게 한다 (Roa-Rodriguez and Nottenburg 1999). 또한 paromomycin은 단자엽식물인 옥수수의 체세포배발생을 이용한 형질전환과정에서 효과적인 선발마커로서 이용되고 있고 (Roa-Rodriguez and Nottenburg 1999), 콩과 등 주요 작물에서는 그 효과가 낮은 것으로 알려져 있다 (Roa-Rodriguez and Nottenburg 1999). 이와 같이 옥수수 형질전환에서 paromomycin은 효과적인 선발마커로서 가능성을 확인할 수 있었다. 한편 *Agrobacterium* 공동배양법에 의한 형질전환시스템은 높은 형질전환율, 적은 DNA copy 수 및 높은 형질전환율 등 많은 장점이 있다 (Lupotto et al. 1999). 옥수수 (A188) 미숙배에서 *Agrobacterium* 공동배양법에 의한 높은 빈도 (5~30%)의 안



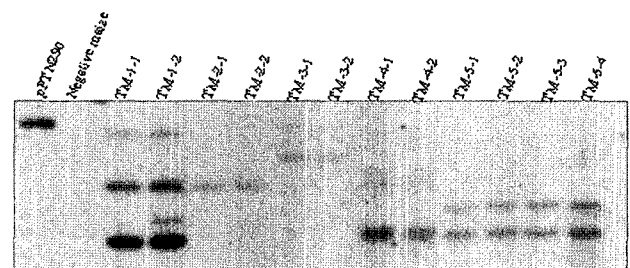
**Figure 2.** Plant regeneration from immature embryo cultures of Hi II genotype transformed with *Agrobacterium tumefaciens* strain (C58C1) carrying *GUS* and *nptII* gene. A: Immature embryo of Hi II genotype; B: Putative transgenic embryogenic callus formation on SM medium with 100 mg/L paromomycin; C: Necrosis of immature embryo on SM medium; D: Paromomycin-resistant type II callus; E: Putative transgenic somatic embryo formation on 1<sup>st</sup> regeneration medium; F, G, H: Germinated somatic embryo on 2<sup>nd</sup> regeneration medium; I: Transgenic maize plant grown in soil; J: GUS-negative leaf of non-transgenic maize; K, L: GUS-positive response leaf of transgenic maize.

**Table 1.** Frequency (%) of GUS gene expression in leaf of putative transgenic plants regenerated from the immature embryo cultures of Hi II genotype by *Agrobacterium*-mediated transformation

Experiments	No. of embryos cocultured	No. of selected callus clones (%)	No. of regenerated to GUS expressed plant (%) /No. of attempted callus
Experiment-1	156	2 (1.3)	2 (1.3)/2
Experiment-2	170	1 (0.6)	1 (0.6)/1
Experiment-3	367	3 (0.8)	3 (0.8)/3
Experiment-4	87	0 (0.0)	-
Experiment-5	178	1 (0.6)	1 (0.6)/1
Experiment-6	200	0 (0.0)	-
Total	1,158	7 (0.60)	7 (0.60)

정적 형질전환시스템이 확립된 이후 (Ishida et al. 1996), 최적 *Agrobacterium* 균주는 C58C1과 EHA101 균주인 것으로 보고 되었다 (Lupotto et al. 1999). 또한 Hi II계통 미숙배 형질전환에서 bialaphos를 선발마커로서 사용하였을 때 약 5.5% 높은 형질전환빈도를 얻을 수 있었고 (Frame et al. 2002), *nptII* 유전자 또한 선발마커로 이용되기도 하였다 (Moose and Clemente 2002). 본 연구에서도 *Agrobacterium* 공동배양법에 의한 옥수수 형질전환체를 생산할 수 있었고, 특히 선발마커로서 *nptII* 유전자를 사용할 수 있음을 확인하였다. 그러나 본 연구에서 얻은 형질전환빈도 (0.6%)는 기 연구의 형질전환빈도 (5.5%)에 비하여 매우 낮기 때문에 향후 형질전환빈도 증진을 위한 최적 *Agrobacterium* 선정, 최적 선발마커 선정, 최적 공동배양조건 및 재분화시스템 등에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각되며, 이러한 형질전환시스템을 이용하여 국내 옥수수 품종 중 type II켈러스와 유사한 배발생켈러스 (YFEC, Cho et al. 2005)를 형성하는 품종 (흑점찰)과 계통 (HW3)을 대상으로 형질전환시스템 확립 및 유용유전자 도입을 위한 연구도 진행 할 것이다.

기내에서 성숙한 유식물체 (약 10 cm)를 토양에 이식하여 성숙 시킨 후 5개의 GUS 양성반응을 나타내는 식물체 (TM-1, TM-2, TM-3, TM-4, TM-5)로부터 후대 종자 (T<sub>1</sub>)를 얻었다. 각 형질전환체로부터 수확한 종자 (T<sub>1</sub> 세대)를 1~5개씩 토양에 파종하여 성숙한 식물체를 얻었고 10주 정도 자란 형질전환체 (12개체)의 잎으로부터 추출한 genomic DNA를 이용하여 Southern분석을 수행한 결과 TM-1-1, TM-4-1, TM-4-2은 3 copy가, TM-1-2는 4 copy가, TM-2-1과 TM-2-2는 1 copy가, TM-3-1, TM-3-2, TM-5-1, TM-5-2, TM-5-3, TM-5-4는 2 copy가 식물체 genome에 삽입되어 있었다 (Figure 3). 일반적으로 기원이 동일한 켈러스클론으로부터 얻어진 형질전환체의 경우 다음세대에서도 동일 copy수가 유전되는 것으로 알려져있다. 그러나 TM-1-1과 TM-1-2의 경우 각각 3 copy와 4 copy로 다르게 나타나 향후 도입유전자에 대한 분자유전학적 고찰이 필요할 것으로 생각된다. 이와같이 옥수수 미숙배에서 *Agrobac-*



**Figure 3.** Southern blot analysis of 12 T<sub>1</sub> progeny of transgenic maize carrying *nptII* gene. Total genomic DNA was digested with *EcoRI*. The 0.8 kb *nptII* probe labeled with <sup>32</sup>P-dCTP was hybridized with genomic DNA of T<sub>1</sub> progeny. Lane 1: Plasmid vector (pPTN290) digested with *EcoRI*, Lane 2: Negative control, Lane 3-14: Progeny of transgenic maize (T<sub>1</sub>).

*terium* 공동배양법에 의해 도입된 *nptII* 유전자가 옥수수 genomic DNA에 삽입된 후 다음 세대에 유전되고 있음을 확인할 수 있었다.

### 적 요

옥수수 미숙배양과 *Agrobacterium tumefaciens* 공동배양법에 의해 형질전환체를 생산하였다. Hi II계통의 미숙배를 *Ubiquitin 1 promoter*-GUS 유전자와 선발마커로서 *nptII* 유전자로 제작된 pPTN290 벡터를 C58C1에 도입한 후 형질전환 균주로 사용하였다. 7개의 *paromomycin* 저항성 배발생켈러스를 얻었으며, GUS 양성반응을 나타내는 7개의 독립적인 식물체를 얻었다. Southern분석법에 의하여 T<sub>1</sub>세대 식물체로부터 *nptII* 유전자가 안정적으로 도입되어 있음을 확인하였다.

### 사 사

본 연구는 바이오그린21사업단과 작물유전체사업단의 지원 하에 수행 되었으며, Hi II계통 종자는 네브라스카 대학 Tom Clemente 박사로부터 공급받아 수행 하였다.

## 인용문헌

- Armstrong CL, Green CE, Phillips RL (1991) Development and availability of germplasm with high Type II culture formation response. *Maize Genet Coop News lett* 65: 92-93
- Armstrong CL (1994) Regeneration of plants from somatic cell culture: Applications for in vitro genetic manipulation. In: *The maize handbook*, Freeling M, Walbot V(eds), New York Springer-Verlag, pp. 663-671
- Carvalho CHs, Bohorova N, Bordallo PN, Abreu LL, Valicente FH, Bressan W, Paiva E (1997) Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. *Plant Cell Rep* 17: 73-76
- Cho MA, Park YO, Kim JS, Park KJ, Min HK, Liu JR, Choi PS (2005) Yellowish Friable Embryogenic Callus (YFEC) Production and Plant Regeneration from Immature Embryo Cultures of Domestic Maize Cultivars and Genotypes (*Zea mays* L.). *Kor Plant Biotechnol* (In press)
- 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, New York, pp 36-37
- Frame BR, Zhang H, Cocciolone SM, Sidorenko LV, Dietrich CR, Pegg SE, Zhen S, Schnable PS, Wang K (2000) Production of transgenic maize from bombarded type II callus: effect of gold particle size and callus morphology on transformation efficiency. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 36: 21-29
- Frame BR, Shou H, Chikwamba RK, Zhang Z, Xiang C, Fonger TM, Pegg SEK, Li B, Nettleton DS, Pei D, Wang K (2002) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. *Plant Physiol* 129: 13-22
- Gordon-Kamm WJ, Spencer TM, Mangano M, Adams TR, Daines RJ, Start WG, O' Brien JV, Chambers SA, Adams WR Jr, Willetts NG (1990) Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell* 2: 603-618
- Hamilton CM, Frary A, Lewis C, Tanksley SD (1996) Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9975-9979
- Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnol* 14: 745-750
- Lupotto E, Reali A, Passera S, Chan MT (1999) Maize elite inbred lines are susceptible to *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Maydica* 44: 211-218
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3907.
- Moose SP, Clemente T (2002) Improved methods of maize *Agrobacterium*-mediated transformation. Final Rep IMBA project 2002-3
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Pareddy D, Petolino J, Skokut T, Hopkins N, Miller M, Welter M, Smith K, Clayton D, Pescitelli S, Gould A (1997) Maize transformation via helium blasting. *Maydica* 42: 143-154
- Roa-Rodriguez C, Nottenburg (1999) *NptII* gene in combination with paromomycin as a selective agent. Patent EP 927765A1
- Songstad DD, Pertersen CL, Hairston WL, Hinchee B (1996) production of transgenic maize plants and progeny by bombardment of Hi II immature embryos. *In Viro Cell Dev Biol Plant* 32: 179-183
- Southern E (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-512
- Zhao ZY, Gu W, Cai T, Pierce DA (1999) Methods for *Agrobacterium*-mediated transformation. United States Patent No. 5,981,840.
- Zhao ZY, Gu W, Cai T, Tagliani LA, Hondred DA, Bond D, Krell S, Rudert ML, Bruce WB, Pierce DA (1998) Molecular analysis of T0 plants transformed by *Agrobacterium* and comparison of *Agrobacterium*- mediated transformation with bombardment transformation in maize. *Maize Genet Coop Newslett* 72: 34-37

(접수일자 2005년 4월 5일, 수리일자 2005년 4월 28일)