

국내 옥수수 순계주에서 CP4 5-Enol-Pyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase 유전자의 발현

조미애¹, 권석윤², 김진석³, 이병규⁵, 문추연⁴, 최필선^{1*}

¹남부대학교 한방제약개발학과, ²한국생명공학연구원 (KRIBB), ³한국화학연구원 (KRICT), ⁴경운대학교, ⁵작물과학원 환경생명공학과

Expression of CP4 5-Enol-Pyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase Transgene in Inbred Line of Korean Domestic Maize (*Zea may* L.)

Mi-Ae Cho¹, Suk-Yoon Kwon², Jin-Seog Kim³, Byoung-Kyu Lee⁵, Choo-Yeun Moon⁴, and Pil-Son Choi^{1*}

¹Department of Oriental Pharmaceutical Development, Nambu University

²Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB)

³Korea Research Institute of Chemical Technology (KRICT)

⁴Kyung Woon University

⁵National Institute Crop Science

ABSTRACT This study was conducted to develop herbicide-resistance domestic maize plants by introducing the CP4 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (CP4 EPSPS) gene using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated immature embryo transformation. Immature embryos of five genotypes (HW1, KL103, HW3, HW4, HW7) were co-cultivated with strains *Agrobacterium tumefaciens* (strain C58C1) containing the binary vector (pCAMBIA2300) carrying Ubiquitin promoter-CP4 EPSPS gene and Cauliflower mosaic virus 35S (CaMV35S) promoter-*nptII* gene conferring resistance to paromomycin as a selective agent. The presence and expression of CP4 EPSPS transgene were confirmed by PCR, RT-PCR and Northern blot analysis, respectively. Also, the resistance to glyphosate in the transgenic maize (T₁) was analyzed by shikimate accumulation assay. The frequency (%) of paromomycin-resistance callus was 0.37, 0.03, 2.20, 2.37, and 0.81% in pure lines HW1, KL103, HW3, HW4 and HW7, respectively. EPSP transgene sequences were amplified in putative transgenic plants that regenerated from paromomycin-resistance calli of two inbred lines (HW3, HW4). Of them, RT-PCR and Northern blot analyses revealed that the transgene was only expressed in two transgenic events (M266, M104) of HW4 inbred line, and a mild glyphosate resistance of transgenic event (M266) was confirmed by the lower shikimate accumulation in leaf segments. These results demonstrate that transgenic maize with herbicide-resistance traits in Korean genotype can be genetically obtained.

*Corresponding author Tel 062-970-0161 Fax 062-970-0269

E-mail: cps6546@hanmail.net

서론

옥수수는 전 세계적으로 벼와 밀 다음으로 많이 재배 되는 중요한 작물로서 전분, 단백질 및 지방이 주 성분이고, phytate, 미네랄, 비타민 등의 미량영양소가 함유되어 있어 가축 사료 및 식용으로 이용되어 왔을뿐 아니라 최근 에탄올 생산을 위한 바이오에너지 자원으로서 이용되고 있기 때문에 국외에서는 분자유종방법을 통한 신품종개발연구를 매우 활발히 진행하여 왔다 (Ishida et al. 1996, Frame et al. 2002, Heck et al. 2005). 초기 연구에서 *Agrobacterium*이나 Particle bombardment 방법을 통한 옥수수 형질전환방법이 확립되어 (Ishida et al. 1996; Zhao et al. 1998; Gordon-Kamm et al. 1990) 제초제 저항성 등 농업적으로 새로운 형질을 갖는 신 품종 개발이 가능해져 농작물재배시 제초작업으로 인한 많은 노동력과 환경오염을 줄이기 위한 “환경친화형 잡초방제기술”로서 점차 확립되어 현재 제초제 저항성 작물로 판매되고 있거나 품종화를 위한 최종단계 시험 중에 있다. 이 중 CP4 EPSPS 유전자를 옥수수에서 발현시킴으로서 glyphosate 저항성 작물을 개발하게 되었다 (Heck et al. 2005). Glyphosate는 식물세포에서 방향족 아미노산 대사과정에 필요한 단백질합성 전구물질의 결핍과 대사과정으로부터 파생되는 유도체, 중간산물 (오옥신, 리그난, 플라보노이드, 안토시아닌) 등의 생합성과정을 저해시켜 제초효과를 나타내며, 이러한 glyphosate의 효과는 EPSPS 효소 유전자를 식물세포에 도입/안정적으로 과대발현시킴으로서 제초제에 대한 저항성을 갖게하는 것으로 보고되어 있다 (Ruff et al. 1991). 그러나 이러한 연구는 노란색의 부드럽고 분얼능이 높은 type II 켈러스 (Armstrong et al. 1991)를 생산할 수 있는 국외 품종 (A188, B73, Hi II)에서 주로 이루어져 왔을 뿐 아니라 (Ishida et al. 1996; Frame et al. 2002), 제초제저항성 유전자와 같은 유용유전자 도입을 통한 신 품종 개발연구 (Heck et al. 2005)의 대부분은 국외 연구그룹 (Monsanto, Kan Wang lab. Tom Clemente lab.)에 의해서 이루어져 왔기 때문에 국내의 옥수수 유전자원을 이용한 분자유종연구가 시급한 실정이다.

최근 Cho 등 (2005a, b)은 7개의 국내 옥수수 유전자원을 대상으로 type II 켈러스와 유사한 특징을 갖는 ‘노란색의 부드러운 배발생 켈러스’를 생산하는 순계주를 선발하여 고빈도 식물체 재분화체계를 확립하였을 뿐 아니라 (Cho et al. 2005a) 이러한 순계주의 미숙배 배양을 통한 *Agrobacterium* 공동배양법으로 유전자 도입과 후대검증을 통한 안정적 형

질전환방법을 확립한 바 있다 (Cho et al. 2005b). 따라서 본 연구에서는 기 연구에서 사용한 5개의 순계주를 미숙배 공동배양을 통한 형질전환방법을 이용하여 glyphosate 저항성 CP4 EPSPS 유전자를 발현시켰기에 보고 하고자 한다.

재료 및 방법

식물 재료

국내 옥수수 순계주 (HW1, KL103, HW3, HW4, HW7) 등 5계통 종자를 강원도 옥수수 시험장으로부터 분양 받았다. 모든 옥수수 종자를 1일 동안 암상태에서 증류수에 침적한 후 발아 시켰으며, 1 cm 정도 유근이 자랐을 때 토양에 파종하여 성숙한 개체로 생육 시켰다. 성숙한 식물체를 자가수분시켜 수분 후 약 10 - 11일째에 1.5 - 2.0 mm 크기의 미숙배를 얻어 무균적으로 분리한 후 배양재료로 이용하였다.

Agrobacterium Tumefaciens Strains

Ubiquitin1 프로모터, CP4 EPSPS 유전자와 CaMV35S 프로모터, neomycin phosphotransferase II (NPT II) 유전자를 선발 표지로 포함하고 있는 pCAMBIA2300 벡터 (Figure 1)를 freeze-thaw 방법으로 C58C1에 형질전환하여 균주로 사용하였다

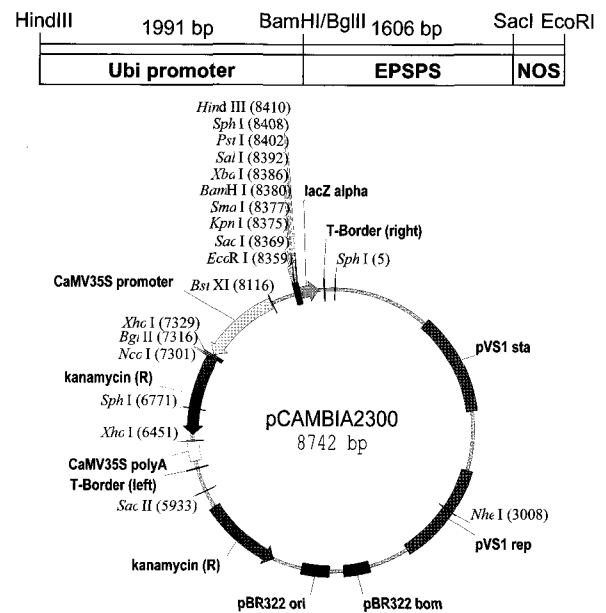


Figure 1. Plant transformation vector (pCAMBIA2300) showing restriction sites. T-DNA region of pCAMBIA2300 (RB-Right border, Ubi promoter-CP4 EPSPS).

(Jefferson et al. 1987). 50 mg/L kanamycin이 첨가된 LB액체 배지 50 ml에 colony를 접종하여 28°C로 8시간 이상 배양한 후 대수기 증식기 ($OD_{650} = 0.6 - 1.0$)의 균을 사용하였다.

EPSPS 유전자 발현 식물체

미숙배의 크기가 1.5 - 2.0 mm로 자란 이삭을 취하여 70% 알코올로 2회 표면 살균한 후 무균작업대에서 미숙배를 분리하여 사용하였으며, *Agrobacterium*과 미숙배 공동배양방법, paromomycin항생제를 이용한 형질전환체선발과정 및 토양 순화과정은 Cho 등 (2005b)의 방법에 의하여 수행하였다. 토양에서 순화된 식물체는 온실에서 생육시킨 후 종자 (T_1)를 수확 하였다.

PCR, RT-PCR 및 Northern Blot 분석

Paromomycin 첨가배지에서 일차적으로 선발된 재분화 식물체를 PCR로 확인하였다. PCR에 의한 *npII* 유전자를 확인하기 위하여 염기서열 forward, 5'-GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG-3'와 reverse, 5'-ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA-3'의 primer를 이용하여 94°C에서 1분, 65.6°C에서 30초, 72°C에서 1분조건으로 30회 증폭하였다. PCR로 확인된 옥수수 식물체를 대상으로 CP4 EPSPS 유전자 발현을 확인하기 위하여 RT-PCR과 Northern 분석을 수행하였다. 온실에서 생육중인 옥수수 식물체의 어린잎으로부터 30 µg의 RNA를 추출하였다. RT-PCR은 total RNA 10 µg을 template로 하여 SuperScript™ II (Invitrogen, USA)를 이용하여 first-strand cDNA를 합성하였다. Second strand amplification은 forward, 5'-AGA CGC CGA CGC CGA TCA CCT ACC-3'과 reverse, 5'-GGC GGC GGC GAC AGC GAG AAT-3' primer를 이용하였고, Taq polymerase (GeneClone Co., Korea)을 이용하여 GeneAmp PCR system (Perkin Elmer Applied Biosystem, USA)에서 통상의 방법으로 수행하였다. Northern blot 분석은 30 µg의 RNA를 5.1% formaldehyde agarose gel에서 전기영동한 후 nylon membrane (Zeta-Probe GT genomic tested blotting membranes; Bio-Rad, USA)에 이동, 고정시켰다. Probe는 500 bp 크기의 PCR fragment를 [³²P]dCTP (Random Primed DNA Labeling kit; Boehringer Mannheim, Germany)로 표지하여 사용하였으며, Prehybridization과 hybridization은 0.25M sodium phosphate 용액 (pH 7.2)과 7% SDS 용액으로 65°C에서 수행하였다. Membrane은 20 mM sodium phosphate (pH 7.2)

와 5% SDS 용액으로 동일 온도조건에서 10분동안 세척한 후 X-ray film에서 현상하였다.

제초제 저항성 검정

CP4 EPSPS 발현 옥수수계통에서 shikimic acid 축적 반응 검정을 통한 제초제 저항성을 확인 하기 위하여 Northern 분석에서 확인된 계통 (M266, M104)을 파종한 후, 주간 평균 온도 30°C 야간 평균 온도 20°C 인 조건의 온실에서 재배하였다. 제4분엽이 20-40% 전개되고 있는 상태의 옥수수 유묘 제4분엽을 절취한 후 증류를 제거한 다음 4 x 4 mm의 절편을 만들었다. 이를 제초제 용액에 치상한 후 28°C 연속 명조 조건 (오슬람 램프, 150 µmol m⁻² s⁻¹)에 27시간 두었다. 제초제 작용에 의해 CP4 EPSPS가 저해되면 절편체 내에 shikimate가 축적되고 높은 저항성을 나타내는 경우는 shikimate 축적이 거의 일어나지 않는다. Shikimate 축적 정도의 조사는 Kim 등 (2006)의 방법으로 수행하였고, shikimate 정량은 사전에 작성된 shikimate standard curve를 이용하여 행하였으며, 실험 결과는 glyphosate 처리에 의해 새롭게 축적된 shikimate 량으로 나타내었다.

결과 및 고찰

Agrobacterium 공동배양법과 particle bombardment법에 의한 옥수수의 분자유종은 type II 캘러스를 생산하는 계통을 사용하여 진행하여 왔다 (Frame et al. 2002, Ishida et al. 1996, Lupotto et al. 1999, Moose and Clemente 2002). 특히 A188 × B73 교배로부터 유래되는 Hi II 계통 (Armstrong et al. 1991)의 미숙배 또는 배발생캘러스는 전형적인 type II 캘러스를 생산하는 계통으로서 (Armstrong et al. 1991) 높은 재분화능과 후대종자 생산능 때문에 (Armstrong 1994) 옥수수의 분자유종연구에 있어서 중요한 유전자원으로 사용되어 왔다 (Frame et al. 2002, Paredy et al. 1997, Songstad et al. 1996). 국내의 대표적인 5개 순계주 종자를 파종한 후 약 3-4개월 동안 온실에서 생육시켜 성숙한 식물체를 얻었으며, 각 순계주를 자가수분시켜 1.5 - 2.0 mm 크기의 미숙배를 얻었다. Cho 등 (2005b)의 방법에 따라 미숙배를 *Agrobacterium*과 공동배양한 후 항생제 저항성 캘러스와 식물체를 얻었다. 항생제 첨가배지에서 2주간격으로 계대배양하면서 선발하였으며, 배양 4주째부터 배반절편으로부터 형성된 캘러스는 점차 증식되기 시작하여 8주째부터 아주 빠른 성장능을 갖

는 항생제저항성 캘러스를 얻을 수 있었다 (Figure 2A-C). 배양 12주째 각 순계주로부터 형성된 항생제 저항성캘러스의 빈도는 HW1 (0.37%), KL103 (0.03%), HW3 (2.20%), HW4 (2.37%) 및 HW7 (0.81%)로 나타났으며, 특히 HW4 (2.37%)와 HW3 (2.20%)순계주로부터 비교적 높은 항생제저항성 캘러스가 형성되었다 (Table 1). 5개의 순계주로부터 얻은 항생제저항성캘러스의 경우 계통에 따라 특징은 노란색의 단단한 체세포배가 직접 팽창되는 것과 (HW1, KL103)과 노란색의 단단한 배발생캘러스가 증식되는 (HW3, HW4, KW7) 2가지 그룹으로 분류할 수 있었다. 이러한 특징은 이미 이전 연구 (Cho et al. 2005a)에 보고한 것과 일치하였고, 국외 품종에서 발생하는 전형적인 type II형태의 배발생캘러스보다는 약간 단단한 노란색의 배발생 캘러스의 특징을 보였다.

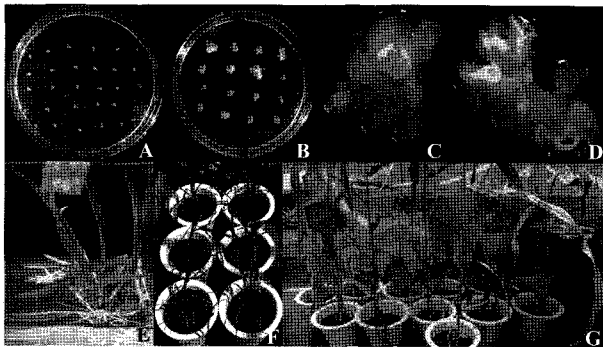


Figure 2. Plant regeneration from immature embryo cultures of HW4 inbred line transformed with *Agrobacterium tumefaciens* (strain C58C1) carrying CP4 EPSPS and *nptII* gene. A: Immature embryo of HW4 genotype co-cultivated with *Agrobacterium*; B: Putative transgenic embryogenic callus formation on SM medium with 100 mg/L paromomycin; C: Paromomycin-resistant calli; D: Putative transgenic somatic embryo formation on 1st regeneration medium; E: Germinated somatic embryo on 2nd regeneration medium; F: Putative transgenic maize plant grown in soil; G: Seed harvested (T₁) after self-fertilization.

각 순계주로부터 얻은 항생제저항성 배발생캘러스와 체세포배는 1차와 2차 식물체 전환배지에서 흰색의 뚜렷한 체세포배를 거쳐 식물체로 분화하였고 (Figure 2D, E), 토양 순화 후 온실에서 T1종자를 수확하였다 (Figure 2F, G). 일부 재분화개체에서 키가 작거나, 화분형성의 억제 또는 암술의 조기성숙 등 배양과 형질전환과정에서 나타나는 전형적인 변이식물체가 발생되어 후대종자를 얻을 수 없었다.

국내 5개 순계주로부터 선발된 paromomycin저항성캘러스로부터 분화과정을 거쳐 얻은 각 식물체를 온실에서 생육시킨 후 자가수분을 통하여 후대종자 (T₁)를 각각 얻었다. 각 계통에서 무작위로 5개의 종자를 선발하여 토양발아시킨 후 유식물체에 대하여 PCR, RT-PCR 및 Northern분석을 수행하여 transgene의 도입과 발현을 조사하였다. 각 순계주로부터 얻은 식물체중 (T₁세대)에서 HW4에서 29계통 (0.99%)과 HW3에서 14계통 (0.67%)에서 *npt II*유전자에 대한 PCR fragment가 증폭되었고, HW1, KL103 및 HW7순계주에서는 어떤 계통에서도 PCR fragment를 증폭되지 않아 *npt II*유전자의 도입은 HW3와 HW4계통에서만 이루어진 것으로 추측할 수 있었다 (Figure 3A). HW3와 HW4계통에 대한 RT-PCR과 Northern분석을 수행한 결과 HW4순계주로부터 얻은 M104와 M266 형질전환계통에서 CP4 EPSPS유전자가 안정적으로 발현되고 있음을 확인하였다 (Figure 3B, C). 또한 이들 형질전환계통의 glyphosate에 대한 저항성을 확인하기 위하여 shikimate축적 정도를 조사한 결과, 형질전환체 M266은 비형질전환체에 비하여 shikimate 축적량이 낮은 경향이고 이는 처리된 glyphosate 양에 비례하는 특성을 보였다. 이는 도입된 EPSPS 유전자가 발현되고 있지만 처리된 glyphosate에 대해 뚜렷한 저항성 반응을 보일 만큼의 충분한 양으로 발현되지 못하고 있음을 시사한다. 따라서 본 결과로 보아 M266 계통은 실용적 차원의 제초제 저항성 옥수수 품종으

Table 1. Production of transgenic maize plants on the selection medium containing with 100 mg/L paromomycin and their molecular analysis by PCR, RT-PCR and Northern blotting

Korean domestic inbred lines	Immature embryos co-cultured	No. of paromomycin resistance calli (%)	No. of transgenic maize plants confirmed by molecular analysis (%)		
			PCR analysis by CP4 EPSPS primer	RT-PCR analysis by CP4 EPSPS primer	Northern blotting
HW1	1365	5 (0.37)	0 (0.00)	-	-
KL103	3124	1 (0.03)	0 (0.00)	-	-
HW3	2101	46 (2.20)	14 (0.67)	-	-
HW4	2902	69 (2.37)	29 (0.99)	2 (0.07)	2 (0.07)
HW7	1976	16 (0.81)	0 (0.00)	-	-

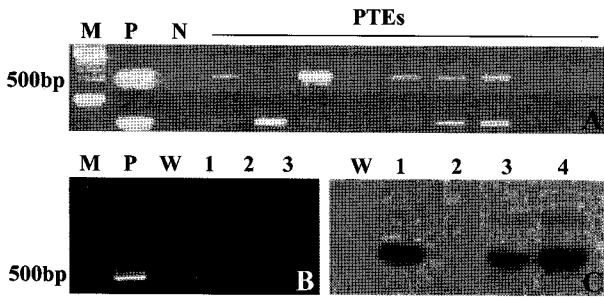


Figure 3. PCR analysis (A) for paromomycin-resistant plants, and RT-PCR (B) and Northern blot analysis (C) for T₁ progeny of transgenic maize carrying CP4 EPSPS gene. A: M (size marker), P (pCAMBIA2300 vector), Wt (wild type), PTE (putative transgenic events), B: M (size marker), P (pCAMBIA 2300 vector), Wt (wild type), 1 (M266-1), 2 (M266-2), 3 (M104), C: Wt (wild type), 1 (M104-1), 2 (M104-2), 3 (M266-1), 4 (M266-2).

로 이용하기에는 미약한 제초제 저항성을 나타낸다고 여겨진다 (Figure 4). M104계통의 경우 Northern 분석에서는 발현되는 것으로 확인 되었지만 glyphosate를 처리 하였을 경우 저항성이 거의 나타나지 않은 것으로 나타났다. 일반적으로 glyphosate가 처리된 식물세포는 방향족 아미노산 대사과정에 필요한 단백질합성이 저해되거나 그러한 대사과정으로부터 유도되는 오옥신, 리그난, 플라보노이드 등의 여러가지 필수적인 유도체의 생합성이 저해되어 제초효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 따라서 식물세포에 glyphosate에 대해 내성을 가지는 CP4 EPSPS 효소 유전자를 충분히 발현시킬 경우, 해당 제초제에 대한 내성을 보유할 수 있으며 (Ruff et al. 1991), 따라서 본 연구는 국내 옥수수 순계주를 대상으로 제초제저항성 유전자를 발현시킴으로서 국내 고유의 제초제저항성 옥수수를 개발할 수 있는 기반을 제시하였을 뿐 아니라, 향후 분자유종을 통한 신품종 옥수수 개발연구에 큰 도움을 줄 것으로 생각된다.

적 요

국내 옥수수 순계주에서 *Agrobacterium* 공동배양으로 CP4 5-Enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (CP4 EPSPS) 유전자가 도입된 제초제저항성 식물체를 개발하였다. 5개의 순계주 (HW1, KL103, HW3, HW4, HW7)의 미숙배를 *Ubiquitin* promoter-CP4 EPSPS 유전자와 CaMV35S promoter-nptII 유전자가 발현되도록 제조된 pCAMBIA2300 벡터를 C58C1 *Agrobacterium*에 형질전환하여 공동배양하였다. 항생제로

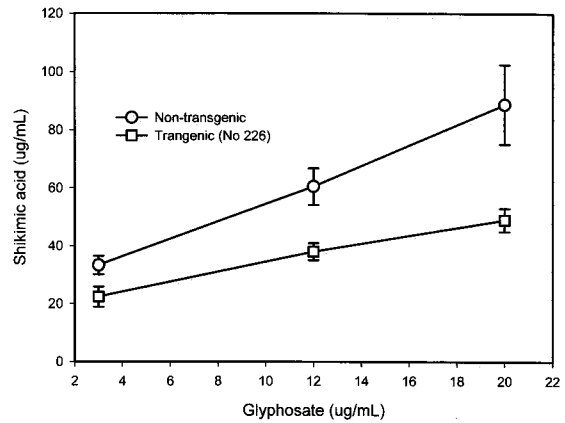


Figure 4. Shikimic acid accumulation analysis in leaf segments of non-transgenic and putative transgenic maize event (M266). Leaf segments were obtained from the youngest leaf of plants at the four-leaf stage and incubated in test solutions for 24 h at 25°C under continuous light.

paromomycin이 첨가된 배지에서 선발된 옥수수 형질전환체를 PCR, RT-PCR 및 Northern 분석을 통하여 유전자의 도입과 발현을 확인하였다. 또한 형질전환 식물체의 glyphosate 처리에 따른 shikimate 축적반응을 확인하였다. Paromomycin 저항성 캘러스 형성빈도는 옥수수 각 순계주 HW1, KL103, HW3, HW4, HW7에서 각각 0.37%, 0.03%, 2.20%, 2.37%, 0.81%로 나타났으며, PCR 분석을 통하여 최종적으로 2개의 옥수수 순계주 (HW3, HW4)의 paromomycin 저항성 캘러스로부터 분화된 식물체에서 확인하였다. 이러한 형질전환체 중에서 RT-PCR 및 Northern blot 분석을 통하여 CP4 EPSPS 유전자가 발현되는 2개의 계통 (M266, M104)을 선발하였고, shikimate 축적반응을 통하여 glyphosate에 대한 저항성을 갖는 계통 (M266)을 최종적으로 선발하였다. 이러한 결과는 국내 옥수수 순계주에서 제초제저항성을 갖는 옥수수 형질전환체를 개발할 수 있음을 시사한다.

사 사

본 연구는 바이오그린21사업단 (과제번호 20050301-034-466-077-01-00)의 지원 하에 수행 되었으며, 국내 옥수수 순계주 종자는 강원도 옥수수 시험장으로부터 공급받아 수행 하였다.

인용문헌

Armstrong CL, Green CE, Phillips RL (1991) Development and availability of germplasm with high Type II culture

- formation response. *Maize Genetics Cooperative Newsletter* 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
- Cho MA, Park YO, Kim JS, Park KJ, Min HK, Liu JR, Choi PS (2005a) 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.* 32: 117-121
- Cho MA, Park YO, Kim JS, Park KJ, Min HK, Liu JR, Clemente T, Choi PS (2005b) Production of transgenic maize (*Zea mays* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Kor Plant Biotechnol* 32: 91-95
- 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
- Heck GR, Armstrong CL, Astwood JD, Behr CF, Bookout JT, Brown SM, Cavato TA, DeBoer DL, Deng MY, George C, Hillyard JR, Hironaka CM, Howe AR, Jakse EH, Ledesma BE, Lee TC, Lirette RP, Mangano ML, Mutz JN, Qi Y, Rodriguez RE, Sidhu SR, Silvanovich A, Stoecker MA, Yingling RA, You J (2005) Development and characterization of a CP4 EPSPS-based, glyphosate-tolerant corn event. *Crop Sci* 44: 329-339
- 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: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3907.
- Kim JS, Lee BH, Kim SH, Min SK, Choi JS (2006) An improved method to determine corn (*Zea mays* L.) plant response to glyphosate. *Kor Plant Biotechnol* 33: 57-63
- Moose SP, Clemente T (2002) Improved methods of maize *Agrobacterium*-mediated transformation. Final Report IMBA project 2002-3
- 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
- Ruff T, Eichholtz DA, Re DB, Padgett SR, Kishore GM (1991) Effects of amino acid substitutions on glyphosate tolerance and activity of EPSPS. *Plant Physiol. Suppl.* 96: 94
- Songstad DD, Pertersen CL, Hairston WL, Hinchee B (1996) production of transgenic maize plants and progeny by bombardment of Hi II immature embryos. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 32: 179-183
- 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 2007년 10월 29일, 수리일자 2007년 11월 27일)