J Plant Biotechnol (2013) 40:37-42
DOI:http://dx.doi.org/10.5010/JPB.2013.40.1.037

Research Article

# 액체배양을 이용한 단기 벼 형질전환 방법

양대화 · 장안철 · 안일평 · 김해정 · 김동헌 · 이효연 · 서석철

# Rapid *Agrobacterium*-mediated genetic rice transformation method using liquid media

**Dae-Hwa Yang · Ahn-Cheol Chang · Il-Pyung Ahn · Hae-Jung Kim · Dong-Hern Kim · Hyo-Yeon Lee · Seok Cheol Suh**

Received: 18 January 2013 / Accepted: 31 January 2013
ⓒ Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** Rice is one of the most important cereal crops as a model plant for functional genomics of monocotyledons and usually transformed using *Agrobacterium tumefaciens*. However, the transformation's process using previous method is still time consuming and uneconomical, low efficiency. In this study, we established a new method by modifying the general *Agrobacterium* protocol especially in the infection and co-cultivation, *Agrobacterium* elimination, infected calli's selection steps using liquid media. We directly inoculated *Agrobacterium* containing a *ZjLsL* gene under the control of constitutive promoter into the 1- to 3-week-old rice calli derived from mature seeds. After 3 days of co-cultivation, the infected calli were transferred onto liquid media of *Agrobacterium* elimination and calli's selection for 3 days. The calli were transferred to calli's growth solid media for 14 days and then the calli transferred to shoot induction and root induction media. Putative transformants were initially selected on the medium containing phosphinothricin, and the PAT protein verified by PAT strip test. This method in this study would lead to reduction of substantial labor and time to generate transgenic plants.

D.-H. Yang · A.-C. Chang · I.-P. Ahn · H.-J. Kim · D.-H. Kim · S. C. Suh (✉)
국립농업과학원 분자육종과
(Molecular Breeding Division, NAAS Department of Agricultural Bio-Resources, Suwon, 441-857, Korea)
e-mail: suhsc@korea.kr

H.-Y. Lee
제주대학교 생명공학부
(Faculty of Biotechnology, Jeju National University, Jeju, 690-756, Korea)

## 서 론

벼(*Oryza sativa* L.)는 주로 아시아에서 주식으로 이용되는 매우 중요한 작물이고, 유전자의 기능 연구 등의 목적으로 단자엽 식물을 대표하는 모델식물로도 이용되고 있다. 최근에는 제초제 저항성과 내병충성, 내재해성, 고기능성, 고수량성 등의 고부가가치의 다양한 신품종 벼가 개발되고 있어 식량문제를 해결 할 수 있다는 측면에서 그 중요성이 점차 커지고 있다.

기존의 전통 육종 방식은 많은 시간이 소요되고, 낮은 효율의 단점을 가지고 있기 때문에 유전공학을 이용한 분자 육종 방식을 적용하여 다양한 신품종이 개발되고 있다. 식물형질전환을 이용한 분자 육종 방식은 전통 육종 방법에 비해 목표하는 유전자를 직접 식물체내로 도입이 가능하고 다양한 유용 유전자를 식물체에 도입할 수 있는 장점이 있다. 식물체내로 목표 유전자를 도입하는 식물형질전환 방법은 원형질체를 이용하는 방법(Datta et al. 1990)과 유전자총을 이용하는 방법(Christou et al. 1991), 아그로박테리움법(Hiei et al. 1994; Toki 1997)등이 있다. 원형질체에 DNA를 직접 형질전환하는 방법은 80년대 후반에 주로 사용되었으며 외래 DNA를 나출된 원형질체에 도입하기 위해 polyethylene glycol(PEG)법과 전기충격법(electroporation)을 이용하였다. 그러나 이들 방법은 원형질체에서 재분화 식물체를 분화시키는 과정이 복잡하고 많은 시간이 소요되며 숙련된 기술이 요구된다는 단점이 있다. 1990년대 이후부터는 유전자총을 이용하는 방법과 아그로박테리움(*Agrobacterium*)을 이용하는 방법이 주로 사용되고 있다. 유전자총 방법은 미세입자로 코팅된 DNA를 유전자 총을 이용하여 식물 세포에 직접 삽입하여 식물형질전환을 수행하는 방법으로 많은

copy 수의 유전자가 식물체 내로 도입된다는 단점이 있다(Makarevitch et al. 2003). 이러한 문제점으로 인하여 최근에는 아그로박테리움을 이용한 형질전환 방법이 주로 사용되고 있다. 아그로박테리움을 이용한 형질전환방법은 토양 병원균인 아그로박테리움이 지니고 있는 Ti(tumor-inducing) 플라스미드 또는 Ri(Root-inducing) 플라스미드 상의 T-DNA 영역이 식물 세포에 전이되는 특성을 형질전환에 이용하는 것이다. 이 방법으로 형질전환 된 식물체의 경우 도입유전자의 copy 수가 적어 유전자총을 이용한 방법으로 얻어진 형질전환체에 비해 도입유전자의 고정이 용이하고 유전자침묵현상 등의 문제점을 줄일 수 있다는 장점이 있으나(Nishimura et al. 2006), 품종이나 계통에 따라 재분화 효율에 등에 차이로 인하여 형질전환 효율이 달라지며, 형질전환체를 얻기 위한 소용되는 시간이 길고, 배양 기간에 따른 변이체가 발생할 수 있다는 단점이 있다(Hirochika et al. 1996; Rachmawati와 Anzai 2006). Rachmawati와 Anzai(2006)는 Rojolele와 Situpatenggang, Menthik, Bulu, Tenggulang의 5개의 자바니카벼(Javanica rice) 품종에서 Rojolele 품종이 재분화 효율이 가장 높았고, 배지나 품종 등에 따라 캘러스 질과 증식효율 등이 차이가 있기 때문이라고 보고하였다. 또한 식물형질전환 과정에서 세포배양기간이 길어질 경우 Tos17과 같은 retortransposon이 활성화되어(Hirochika et al. 1996) 돌연변이가 일어날 수 있기 때문에 아그로박테리움을 이용해 형질전환 할 때 짧은 시간에 성공시키는 것이 중요하다.

아그로박테리움을 이용한 형질전환 효율을 높이기 위해 많은 연구가 진행되어 왔다(Hiei et al. 1994; Toki 1997, 2006; Lee et al. 2011). Toki 등(1997, 2006)는 세포배양에 따른 체세포 변이를 최소화하기 위해 단기간에 형질전환 식물체를 작성하는 방법을 보고하였다. 이러한 아그로박테리움을 이용한 벼 형질전환은 주로 종자로부터 캘러스 유도와 캘러스 증식, 캘러스에 아그로박테리움 감염, 캘러스와 아그로박테리움의 공동배양, 균제거와 캘러스 선발, 캘러스증식, 지상부유도, 뿌리유도의 순서로 수행된다. 이러한 형질전환 전과정에서 소모되는 고체배지를 만드는데 필요한 많은 petri dish와 고체배지로의 캘러스 치상과 계대배양 등의 노동력과 시간 등의 비용이 많이 소모된다.

본 실험은 아그로박테리움을 이용하여 재조합 플라스미드에 포함된 목표유전자를 단기간에 식물세포 내에 도입하고 형질전환에 소모되는 노동력과 시간, 비용을 단축하고자 감염과정부터 공동배양과 균제거와 캘러스 선발 과정까지 액체배양을 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

벼 형질전환을 위해 사용된 벼(*Oryza sativa* L.)는 동진벼이며, 종자로부터 캘러스를 유도하기 위해서 종자의 종피를 제거 후 70% 에탄올로 1 분간 세척하고, 4% sodium hypochlorite 용액을 이용하여 상온에서 10분씩 2회 소독 한 후 멸균수로 10회 이상 세척하여 표면 살균하였다. 표면 살균한 종자를 2 mg/L 2,4-D가 포함된 N6(Chu et al. 1975) 캘러스 유도 고체배지(CI)(Table 1)에 치상하여 32℃ 암상태에서 1~3주 동안 캘러스를 유도하였다. 이러한 캘러스를 아그로박테리움을 이용하여 벼 형질전환을 위한 재료로 사용되었다.

### 식물형질전환 벡터 제작 및 형질전환용 균주

식물 형질전환용 운반체는 전남대학교 김정일 교수로부터 받은 벡터로 pCAMBIA3300을 모벡터로 프로모터를 TP 프로모터로 수정하여 사용하였다. 목표유전자는 *ZjLsL* (*Zoysia japonica Lateral suppressor-like*(*ZjLsL*) (GenBank accession No. AB491742) 유전자를 TP 프로모터에 연결하여 제작하였다. 형질전환된 캘러스 및 식물체의 선발을 위해서는 TP 프로모터에 의해 제어되는 bar 저항성 유전자를 이용하였다. 실험에 사용된 운반체의 모식도는 Figure 1과 같다. 식물 형질전환용 벡터 구축이 확인된 plasmid를 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105에 형질전환 시켰다. 28℃에서 동일한 방법으로 제조된 *Agrobacterium* competent cell EHA105를 얼음에서 녹인 후 plasmid DNA 1 μL와 섞어서 freeze-thaw 방법으로 형질전환을 수행한 후 YEP 배지 1 mL을 주입하여 혼합한 후, 멸균된 시험관에 넣고 28℃에서 200 rpm으로 1시간 동안 배양하였다. 배양액은 kanamycin 100 mg/L과 rifampicin 50 mg/L을 포함한 YEP 고체배지에 200 μL를 도말하고, 28℃ 항온기에서 petri dish에 3~4일 동안 배양하여 colony를 관찰하였다. Colony PCR 방법으로 형질전환여부를 확인하고, 확인된 균주의 배양은 kanamycin 100 mg/L과 rifampicin 50 mg/L이 첨가된 YEP 액체배지에 접종한 후, 1일 동안 28℃ incubator에서 200 rpm으로 배양했다. 배양액은 60% 글리세롤을 동량 첨가하여 초저온 냉동고(-80℃)에 저장하였다.

### 식물체 재분화와 형질전환

벼 형질전환은 벼 종자로부터 캘러스를 유도하여 아그로박테리움 감염과 공동배양, 캘러스 증식, 재분화, 순화 등의 순서로 수행하였고, 식물 형질전환을 위해 사용된 배지조성은 Table 1과 같다. 형질전환을 위해서 아그로박테

**Table 1** Composition of the media used for rice transformation

| Step | Composition of medium | | |
|---|---|---|---|
| CI:<br>callus induction<br>solid medium | sucrose | 30 | g |
| | N6 including Vitamin | 3.98 | g |
| | L-proline | 2.878 | g |
| | casamino acid | 0.3 | g |
| | myo-inositol | 0.1 | g |
| | 2,4-D | 2 | mg/L |
| | gelrite | 4 | g |
| | pH 5.8 | | |
| IFCO:<br>infection and co-cultivation<br>liquid medium | sucrose | 30 | g |
| | N6 including Vitamin | 2 | g (½ N6) |
| | L-glucose | 10 | g |
| | casamino acid | 0.3 | g |
| | 2,4-D | 2 | mg/L |
| | pH 5.4 | | |
| | AS (acetosyringone) | 50 | mg/L |
| CI-CP I:<br>*Agrobacterium* elimination<br>and callus selection<br>liquid medium | sucrose | 30 | g |
| | N6 including Vitamin | 3.98 | g |
| | L-proline | 2.878 | g |
| | casamino acid | 0.3 | g |
| | myo-inositol | 0.1 | g |
| | 2,4-D | 2 | mg/L |
| | pH 5.8 | | |
| | PPT | 1 | mg/L |
| | cefotaxime | 500 | mg/L |
| CI-CP II:<br>callus growth and selection<br>solid medium | CI solid medium | | |
| | PPT | 5 | mg/L |
| | cefotaxime | 300 | mg/L |
| SI-CP:<br>shoot induction and selection<br>solid medium | sucrose | 30 | g |
| | MS including Vitamin | 4.41 | g |
| | D-sorbitol | 30 | g |
| | casamino acid | 2 | g |
| | myo-inositol | 0.1 | g |
| | NAA | 0.2 | mg/L |
| | kinetin | 2 | mg/L |
| | gelrite | 4 | g |
| | pH 5.8 | | |
| | PPT | 4 | mg/L |
| | cefotaxime | 250 | mg/L |
| RI-CP:<br>root induction and selection<br>solid medium | sucrose | 30 | g |
| | MS including Vitamin | 2.2 | g (½ MS) |
| | gelrite | 4 | g |
| | pH 5.8 | | |
| | PPT | 4 | mg/L |
| | cefotaxime | 250 | mg/L |

리움은 초저온냉장고에서 글리세롤 스탁으로 저장되어 있는 아그로박테리움을 꺼내 kanamycin 100 mg/L과 rifampicin 50 mg/L가 포함된 YEP 액체배지에 1일간 증식한 후 감염에 사용할 감염 액체배지에 넣어서 사용하였다. 감염을 위한 최종 접종 농도는 OD600 nm에서 0.02이 되도록 하였다. 본 실험에서는 감염과 공동배양을 한단계로 통합하여 IFCO 액체배지에서 감염 및 공동배양을 수행하였다.

벼 종자로부터 캘러스를 유도하기 위해서 종자를 소독 후 32℃에서 1~3주 암조건으로 배양하여 캘러스를 확보하였다. 아그로박테리움 감염을 위해 총 150개의 캘러스가 유도된 종자가 재료로 사용되였다. 미리 배양된 아그로박테리움이 들어있는 감염용 액체배지(IFCO)를 각 20 ml씩 10개의 새 50 ml 튜브에 분주한 후, 그 튜브안에 캘러스가 유도된 종자를 15개씩 각각 넣어서 감염과 공동배양을 수행하였다. 본 실험에서 28℃ 암조건에서 3일간 공동배양을 수행하였다. 3일간 공동 배양한 캘러스가 유도된 종자를 아그로박테리움을 제거하기 위해 멸균수로 1번 세척한 다음 균제거 및 캘러스선발 액체배지(CI-CP I)로 옮겨 28℃ 암조건 190 rpm으로 3일 동안 배양하여 균제거 및 캘러스선발을 하였다. 그 후 멸균한 필터페이퍼 위에 캘러스가 유도된 종자를 올려놓아 여분의 수분을 간단히 제거한 뒤 균제거 및 캘러스 증식 고체배지(CI-CP II)에 감염된 캘러스가 유도된 종자를 치상한 다음 32℃ 암조건에서 2주 동안 배양하였다. 2주일 후 왕성하게 증식하는 캘러스를 재분화유도 및 선발 고체배지(SI-CP)로 옮겨 식물체의 재분화를 유도하였다. 약 3주일의 배양기간 후 지상부가 재분화된 식물체를 뿌리 유도 및 선발 고체배지(RI-CP) 배지로 옮겨 뿌리 발생을 유도하였으며 순화된 벼 형질전환 식물체를 온실에서 포트에 이식하여 재배하였다.

### 형질전환체의 선발

유전자의 도입여부를 확인하기 위해 형질전환체 및 대조 식물로부터 채취한 0.1 g의 잎은 액체질소를 이용하여 미세하게 분쇄하였고, total DNA의 분리는 GeneAll 사의 GeneAll Exgene Genomic DNA Purification를 이용하였다. *ZjLsL* 유전자의 도입여부를 확인하기 위한 PCR 반응은 50 ng의 주형 DNA를 사용하였고, 아래와 같이 primers를 합성하여 각각 이용하였다. primer set(forward 5'- ATGCT GGGCGCACCAGGCGG -3', reverse 5'- CTACTGCTCCACT GCGGACT -3')으로 94℃에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후 94℃에서 30초간 denaturation, 60℃에서 30초간 annealing, 72℃에서 1분30초간 extension과정을 35 cycles 하였으며, 마지막으로 72℃에서 15분간 extension을 실시하였다. 얻어진 증폭 산물은 1% agarose gel상에 영동하여 band를 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 벡터 제작 및 형질전환용 균주

식물 형질전환용 운반체는 pCAMBIA3300 벡터를 모벡터로 프로모터 부분을 TP 프로모터로 수정하여 사용하였다. TP 프로모터는 기본적인 프로모터의 염기서열을 가지고 있고 국내 특허권을 가지고 있는 기본 프로모터이다. 목표유전자의 발현을 검정하기 위하여 들잔디의 측지유도유전자 *ZjLsL*(*Zoysia japonica Lateral suppressor*-like (*ZjLsL*), (GenBank accession No. AB491742)를 TP 프로모터에 연결하여 제작하였고(Fig. 1), 식물 발현용 vector 구축이 확인된 plasmid를 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105에 형질전환을 수행하여 콜로니 PCR을 수행하여 형질전환 여부를 확인하였다(Fig. 1).

### 식물체 재분화와 형질전환과 선발

일반적인 벼의 형질전환 과정은 종자에서 캘러스를 유도하고 증식해서 감염과, 공동배양, 균제거, 캘러스 선발 및 증식, 지상부유도, 뿌리유도의 순서로 수행되어왔다(Nishimura et al. 2006; Toki 1997; Toki et al. 2006). 본 실험에서는 기존 보고된 것과는 다르게 형질전환을 감염과 공동배양, 균제거 및 캘러스 선발을 액체배지에서 수행하였다(Fig. 1, 2).

벼의 형질전환 방법으로 종자에서 캘러스를 유도하고 그 캘러스를 배양하여 증식한 뒤 그 중 재분화가 잘되는 캘러스를 아그로박테리움과 함께 접종하는 방법이 주로 이용되었으나 캘러스를 유도하고 증식하여 재분화가 잘되는 캘러스를 선발하는데까지 약 3개월정도 소요되고 총 형질전환에 소모되는 시간이 약 5~6개월정도 소요된다. 최근 종자에서 1~3주동안 캘러스를 유도한 후 그 캘러스가 유도된 종자를 아그로박테리움과 함께 접종하는 방법이 보고되었다(Toki et al. 2006). 이 방법은 종자에서 캘러스를 유도한 후 캘러스 증식과 선발없이 바로 아그로박테리움과 함께 접종하기 때문에 시간을 단축할 수 있는 장점이 있고 총 형질전환에 소모되는 시간이 약 3~4개월정도 소모된다.

본 실험에서는 형질전환에 소모되는 노동력과 시간, 비용을 단축하고자 감염과 공동배양, 균 제거 및 캘러스 증식배지까지 액체배양을 시도하였다(Fig. 2). 벼 종자를 캘러스유도(CI) 배지상에서 32℃와 암조건으로 1~3주 동안 배양(Fig. 2A)하여 캘러스가 유도된 종자 15개를 20 mL의 IFCO 액체배지가 담겨있는 튜브에 담가 아그로박테리움 감염과 공동배양의 단계를 한 단계로 통합해서 수행하였다(Fig. 2B). 본 실험은 종자로부터 유도된 캘러스를 감염단계와 공동배양단계를 한단계로 하기 때문에

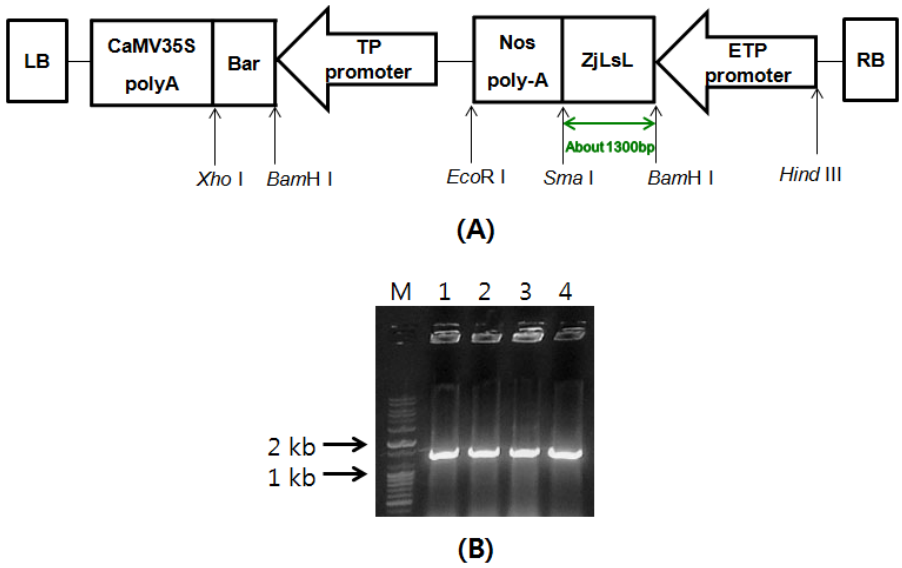


**Fig. 1** T-DNA region of modified pCAMBIA 3300 with *ZjLsL* gene (A) and *Agrobacterium* colony PCR of *ZjLsL* gene (B). (A): RB, right border; LB, left border; TP,TP promoter; ETP, TP promoter contained 2x 35S enhancer; bar, *phosphinotricin acetyltransferase* gene coding region; CaMV35S polyA, CaMV 35S terminator; Nos poly-A, *A. tumefaciens nos* gene terminator; ZjLsL, *Zoysia japonica Lateral suppressor*-like (*ZjLsL*); Arrows indicate directions of transcription. (B): M, size marker; 1 - 4, colony PCR of *ZjLsL* gene

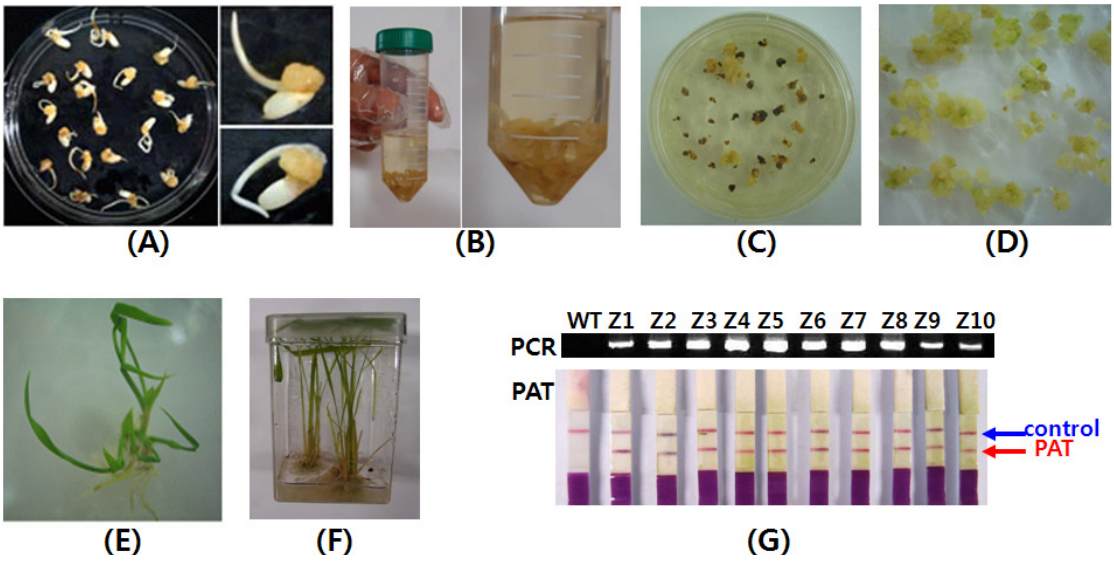


**Fig. 2** Production of transgenic rice with *ZjLsL* gene. (A): calli induced from mature seeds on callus induction medium; (B): *Agrobacterium* infection and co-cutivation in IFCO liquid medium; (C): PPT-resistant calli during selection; (D): green spot of PPT-resistant calli; (E): Shoot formation of PPT-resistant calli; (F): Rooted transgenic plantlets selected with PPT; (G): identification of putative transformants (top) and PAT strip test of PAT protein verification (bottom). Top: PCR of *ZjLsL* gene using genomic DNA, WT: wild-type plant; Z1-Z10: *ZjLsL* transgenic plants

아그로박테리움의 과도한 증식을 예방하기 위해서 최종 감염 농도를 OD600 nm = 0.02로 낮게 조정하여 수행하였다.

Ozawa와 Takaiwa(2010)는 공동배양 배지조성과 형질전환 효율에 대한 영향을 보고 하였는데, 공동배양을 수행할 때 기존 방식의 N6 고체배지를 사용했던 것과는 다르게 N6 액체배지를 사용하였고, 그 공동배양의 배지 조성에 따른 형질전환 효율은 감염된 캘러스의 β-glucuronidase (GUS) 염색 유무를 통하여 확인하였다. 공동배양과정을 N6와 1/2 N6, 1/4 N6의 3가지 액체배지로 공동배양한 것 중에서 1/2 N6 액체배지에서 공동배양을 수행했을 때 GUS 염색된 캘러스의 개수가 가장 많았다(Ozawa와 Takaiwa 2010). 따라서 본 실험에서는 감염 및 공동배양 배지를 1/2 N6 액체배지를 사용하였다. 3일간의 공동배양 후 IFCO 액체배지를 따라 버리고 멸균수로 1번 세척한 다음 균제거 및 캘러스선발 액체배지(CI-CP I)로 옮겨 28℃ 암조건 190 rpm으로 3일 동안 배양하여 균제거 및 캘러스선발을

하였고, 균제거 및 캘러스 증식 고체배지(CI-CP II)에 감염된 캘러스가 유도된 종자를 치상한 다음 32℃ 암조건에서 2주 동안 배양하였다(Fig. 2C). 2주일 후 왕성하게 증식하는 캘러스를 재분화유도 및 선발 고체배지(SI-CP)로 옮겨 식물체의 재분화를 유도하였다(Fig. 2D, E). 약 3주일의 배양기간 후 지상부가 재분화된 식물체를 뿌리 유도 및 선발 고체배지(RI-CP) 배지로 옮겨 뿌리 발생을 유도하였다(Fig. 2F). 종자에서 유도된 캘러스 150개로부터 10개의 형질전환 식물체를 얻었으며, 형질전환체를 확인하기 위해서 genomic DNA PCR과 PAT strip test 방법을 이용하였다.

유전자가 형질전환된 벼 $T_0$ 식물체의 어린잎에서 게놈 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA를 주형으로 하여 *ZjLsL* 유전자를 증폭하도록 디자인된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 단기형질전환 방법을 이용하여 유도된 형질전환체 $T_0$ 10개 PCR한 결과 모두 안정적으로 형질전환된 것으로 확인하였다(Fig. 2G). 또한, 형질전환체 $T_0$ 10개의 PAT 단백질을 확인하기 위해 PAT strip test를 수행한 결과 wild type을 제외한 10개의 형질전환체 모두 PAT 단백질을 확인하여 형질전환체 임을 확인하였다(Fig. 2G). 본 실험은 감염부터 공동배양과 균제거 및 캘러스증식과 선발까지 같은 50 ml 튜브에서 배양을 하기 때문에 이 단계까지는 고체배지를 만드는데 소모되는 많은 플라스틱 petri dish가 필요가 없고, 고체배지에 치상하는데 드는 시간과 노동력이 감소될 것이라 예상된다.

## 적 요

본 연구는 종자로부터 유도된 캘러스를 아그로박테리움을 이용해 감염하여 고체배지에서 배양하는 기존의 방법과 달리, 형질전환에 소모되는 노동력과 시간, 비용을 단축하고자 감염과 공동배양, 균제거와 캘러스 선발까지 액체배양을 시도하였다. 성숙 종자로부터 유도된 캘러스를 바로 아그로박테리움으로 감염함으로써 조직배양으로 인한 체세포 변이의 발생을 최소화하고 감염부터 그 후 캘러스선발까지 총 4단계의 시간과 비용을 최소화하였으며, 감염된 캘러스로부터 재분화 시킴으로써 형질전환 식물체를 얻는 방법을 새롭게 수립하였다. 배양과정 중 감염과 공동배양 기간을 3일로 단축시킴으로써 캘러스의 스트레스를 최소화 하였고, PCR 분석을 통해 원하는 목표 유전자가 형질전환체에 안정적으로 도입이 되는 것도 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때, 본 실험을 통해 얻어진 새로운 액체배양 방법은 우수한 농업적 형질을 가진 벼 품종 개발시 효율적으로 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

## 사 사

본 논문은 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호PJ00863402)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## 인용문헌

Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, BI CV (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen source. Sci Sin 18:659-668

Christou P, Ford T, Kofron M (1991) Production of transgenic Rice (*Oryza Sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. Nature Biotechnol 9:957-962

Datta SK, Peterhans A, Datta K & Potrykus I (1990) Genetically engineered fertile Indica rice recovered from protoplasts. Bio/Technology 8:736-740

Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. Plant J 6:271-282

Hirochika H, Sugimoto K, Otsuki Y, Tsugawa H, Kanda M (1996) Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. Proc Nat Acad Sci USA 92:8149-8153

Lee HJ, Abdula SE, Jee MG, Jang DW, Cho YG (2011) High-efficiency and Rapid *Agrobacterium*-mediated genetic transformation method using germinating rice seeds. J Plant Biotechnol 38:251-257

Makarevitch I, Svitashev SK, Somers DA (2003) Complete sequence analysis of transgene loci from plants transformed via microprojectile bombardment. Plant Mol Biol 52:421-432

Nishimura A, Aichi I, Matsuoka M (2006) A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. Nature Protocols 1:2796-2802

Ozawa K, Takaiwa F (2010) Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of suspension-cultured cell clusters of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Science 179(4):333-337

Rachmawati D, Anzai H (2006) Studies on callus induction, plant regeneration and transformation of Javanica rice cultivars. Plant Biotechnol 23:521-524

Toki S (1997) Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. Plant Mol Biol Rep 15:16-21

Toki S, Hara N, Ono K, Onodera H, Tagiri A, Oka SB, Tanaka H (2006) Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. Plant J 47:969-976