

## 무선발 형질전환 Bt벼의 도입유전자 구조 분석

우희종 · 이승범 · 임명호 · 권순종 · 이진형 · 신공식 · 조현석

### Transgene structures of marker-free transgenic Bt rice plants

Hee-Jong Woo · Seung Bum Lee · Myung-Ho Lim · Jin-Hyoung Lee · Kong-Sik Shin · Hyun-Suk Cho

Received: 1 April 2013 / Accepted: 26 June 2013  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** A less simple approach developed for generation of marker-free transgenic plants is to select transformants without the use of selective marker genes. Some results about development of marker-free transgenic plants were obtained using a non-selective approach in several crops such as rice, potato and tobacco. However, the study did not provide evidence on detailed characterization of introduced gene on genome, a critical step for confirming the stable integration and transmission of a foreign gene. In this study, we evaluated structure and integration sites of transgene (*mCryIAc*) in the transgenic Bt rice plants which were made via conventional *Agrobacterium*-mediated transformation by non-selective method. Structure and integration sites of transgene in these transgenic plants had similar fashion as those recovered under selection.

**Keywords** Non-selective, Marker-free transgenic rice, *Agrobacterium*-mediated transformation, Transgene, integration site

### 서론

선발마커유전자(Selective marker gene)는 목표유전자와 연결하여, 도입유전자가 형질전환 된 식물체를 선택적으로 선발하는데 사용된다. 통상적으로 *nptII* (가나마이신 내성 유전자), *hpt* (하이그로마이신 내성 유전자)와 같은 항생제 내성 유전자들이나 *bar* (Glufosinate 내성 유전자), *EPSPS*

(Glyphosate 내성 유전자)와 같은 제초제 내성 유전자가 선발마커로 많이 사용되고 있다. 한편, 유전자 형질전환으로 개발된 GM (Genetically Modified) 작물의 상업화로 재배면적과 생산량이 증가하면서 GM작물 개발과정에 사용된 선발마커의 여러 가지 위해성 문제가 제기되고 있다. GM작물에 사용된 선발마커유전자의 위해성 문제는 과학적 견해에 의한 진위여부와 관계없이 GM작물의 성공적인 상업화 요소인 소비자 인식에 부정적 영향을 줄 수 있다. 따라서 대체 선발마커 유전자의 개발 및 무선발 마커(marker-free) 형질전환체 개발을 위한 연구가 꾸준히 추진되고 있다.

무선발 형질전환(non-selective transformation)은 마커프리 형질전환 식물체 개발방법의 하나로 선발마커유전자를 이용하지 않고 목표유전자만을 식물체에 형질전환하여, 형질전환과정 동안의 선발과정 없이 연쇄중합반응(Polymerase Chain Reaction; PCR) 등과 같이 직접 분석방법을 사용해도 도입유전자가 형질전환 된 식물체를 개발하는 방법이다. 무선발 형질전환 방법에 의한 형질전환 식물체 개발은 2003년 최초로 감자를 이용하여 시도된 이후 담배, 트리티케일, 땅콩, 사과, 알팔파 등 다양한 작물을 이용하여 여러 그룹이 다양한 방법으로 마커프리 형질전환체 개발 연구 성과를 발표하였다(De Vetten et al. 2003; Jia et al. 2007; Doshi et al. 2007; Weeks et al. 2008; Li et al. 2009; Bhatnagar et al. 2010; Malony et al. 2010). 그러나 무선발 방법은 선발마커를 사용하지 않고 형질전환과정을 거쳐 생성된 재분화체를 주로 PCR과 같은 직접 분석방법으로 선별하기 때문에, 선발마커를 사용하는 형질전환 방법에 비해 형질전환율이 매우 낮다. 따라서 현재까지 발표되고 있는 무선발 형질전환체 개발에 대한 관심은 주로 작물별 적용 연구 및 형질전환 효율 향상에 관한 방법연구가 대부분이며, 발표된 대부분의 무선발 형질전환체 연구결과는 형질전환체 선발효율 검정 및 T<sub>0</sub>/T<sub>1</sub> 단계 식물체에 PCR

H. J. Woo (✉) · S. B. Lee · M. H. Lim  
J. H. Lee · K. S. Shin · H. S. Cho  
경기도 수원시 농촌진흥청 국립농업과학원  
(National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration (RDA), Suwon 441-707, Korea)  
e-mail: woo001@korea.kr

및 southern blot 방법을 이용한 도입유전자 확인 정도에 그치고 있고 현재까지도 *Agrobacterium* 형질전환 방법에 의한 무선발 형질전환체 개발에 관한 내용은 보고되지 않고 있다.

최근에 국립농업과학원에서는 무선발 형질전환 방법을 이용한 *CryIac* 유전자 형질전환 벼를 개발하였다. 무선발 형질전환체의 도입유전자 특성에 대한 정보는 추후 개발될 많은 무선발 형질전환GM벼 연구 및 상용화를 위해 유용할 것이다. 더욱이 형질전환을 이용하여 개발된 GM작물의 상업화를 위해서는 위해성평가 과정이 선행되어야 하며 도입유전자의 구조 및 도입위치가 규명되어야 한다. 본 연구에서는 무선발 형질전환 Bt벼 4 계통(T<sub>2</sub> 세대 2계통 및 T<sub>4</sub> 세대 2계통)의 T-DNA 도입위치를 확인하고 염색체에 도입된 도입유전자의 구조를 분석하였다.

## 재료 및 방법

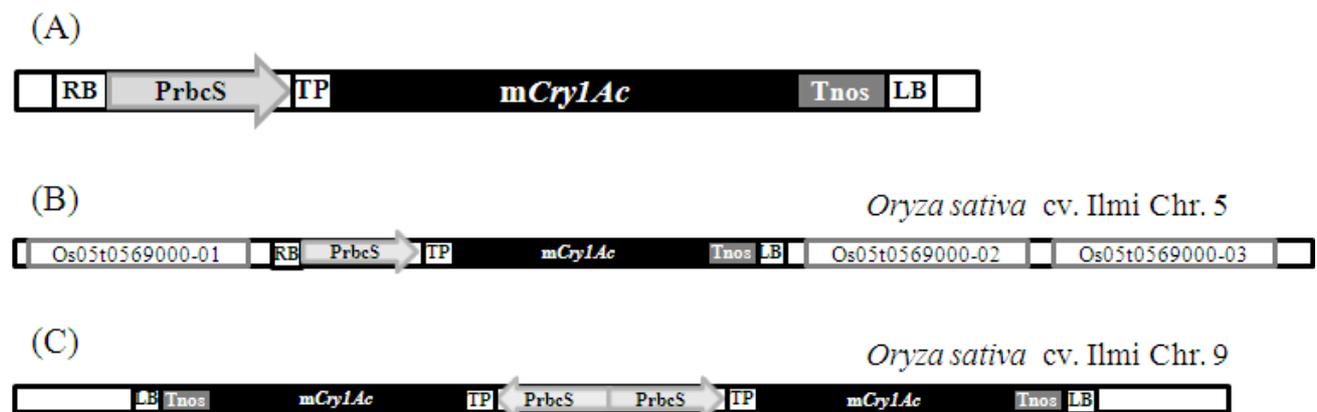
### 식물재료

본 연구에서는 pRDA-RTB 식물형질전환 벡터를 이용하여 T-DNA를 도입한 T<sub>4</sub>세대 형질전환체 2계통(RTB-5와 RTB-11)과 T<sub>2</sub>세대 2계통(RTB-8와 RTB-9)의 형질전환 Bt 벼를 실험재료로 사용하였고, 대조체로는 형질전환 모본인 일미벼(*Oryza sativa* cv. Ilmi)를 활용하였다. 형질전환 벼는 모두 ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit promoter (PrbcS)와 nopaline synthase terminator (Tnos)를 사용하여 *CryIac* 유전자 염기서열 일부를 식물 발현정도 향상을 위해 변형한 m*CryIac* 유전자가 상시 발현되도록 T-DNA를 구성한 식물형질전환 벡터 pRDA-RTB가 사용되었으며(Fig. 1), *Agrobacterium* strain LBA4404를 이용한 *Agrobacterium*-매개 형질전환 방법으로 제조되었다.

### 도입유전자 도입위치 확인

형질전환체에서 total DNA의 추출은 Qiagen 사의 DNeasy Plant mini Kit (USA)를 이용하였으며, 제작사에서 제공하는 실험지침에 따라 실험을 수행하였다. 추출된 total DNA는 NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc. Wilmington, DE, USA)를 이용하여 농도를 측정하고, 260/280 nm 값이 1.8-2.0 사이인 DNA액을 실험에 이용하였다.

형질전환체에서 도입유전자의 삽입위치 확인은 Bugert 등(2001)이 보고한 PCR-walking 방법을 개량하여 사용하였다. 실험에 사용된 primer는 Table 1에 나타내었고 구체적인 실험방법은 다음과 같다. 500 ng의 total DNA는 2 U의 *HincII*, *XceI*, *HaeIII*, *MspI*, *RsaI* 제한효소를 이용하여 각각을 완전절단 시킨 뒤 5 U의 T4 DNA ligase (Takara, Japan)과 50 pmol의 adaptor DNA를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켜 도입유전자 위치 확인을 위한 PCR 주형을 제조하고 두 단계의 PCR을 수행하였다. 일차 PCR은 전체 20 ul pre-mixture 반응물 안에 0.5 pmol의 Ada1과 LB1 또는 RB1 primer를 첨가하여 PTC-200 thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA, USA)를 이용하여 반응시켰다. 일차 PCR 반응조건은 95°C에서 5분간 전 처리한 후, 94°C에서 30초, 67°C에서 1분, 72°C에서 1분간을 기본주기로 하여 총 20회 반복반응하고 72°C에서 10분간 후처리 시켰다. 이차 PCR은 일차 PCR 생성물 5 ul을 주형으로 하여 Ada2와 LB2 또는 RB2 primer를 사용하여 94°C에서 5분간 전 처리한 후 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분간을 반응주기로 전체 40회 반복 반응시킨 후 72°C에서 10분간 후처리 하여 진행하였다. 증폭된 PCR 반응산물은 1% agarose gel에 전기영동시켜 확인하고, 증폭된 DNA 밴드는 HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction Kit (RBC BioScience, Taiwan)를 이용하여 정제하였으며 LB2 또는 RB2 primer를 이용하여 ABI3730XL DNA 분석기(Applied Biosystems, Foster



**Fig. 1** Schematic diagram of the T-DNA region of the vector pRDA-RTB (A), and T-DNA conformations of transgenic rice RTB5 (B) and RTB11 (C) by non-selective transformation method

**Table 1** Sequences of primers used in this study

Primer name	Sequence (5'-3')	Specific gene
Ada1	GCGTAATACGACTCACTATAGCAATTAACC	Adaptor
Ada2	GACTCACTATAGCAATTAAC	
LB1	CGGCTATTGGTAATAGGACACTGG	LB region
LB2	CAACCCTCAACTGAAACGGGCCGGA	
RB1	CTGATACCAGACGTTGCCCGCATAA	RB region
RB2	TCGTAAAACTGCCTGGCACAG	
11TDNA-F	CGGATGCGTTGATAATGCTAGGATGTGT	Flanking region of RTB-11 rice
11TDNA-R	GGGAGTATGTAGTATCCTGGAGTCCAGATGGAT	
5TDNA-F	CCCAGAGGATAACTTCTTCATCTGAATCATTCC	Flanking region of RTB-5 rice
5TDNA-R	TGGACAGAAACCTAGCTATTCCCTGCAAATT	
9TDNA-L	GGTCGTTTTTCGTTGGGACGAAGACGAA	Flanking region of RTB-9 rice
9TDNA-R	CCATGATCTGTTGCTGTAGTTAGCTGATGCT	
Cry-F1	CGACATCTCCTTGTCCTTGACACAGTTTCT	mCryIaC
Cry-R1	AGTCATAGTTCGGGAAGAGAGCCACAATGT	

City, CA, USA)로 염기서열 분석하였다. 분석된 염기서열 정보는 RAP-DB의 BLASTn 프로그램 서치(<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/tools/blast/>)와 NCBI의 Blast 프로그램(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)을 이용하여 분석하였다.

**도입유전자의 구조 확인**

형질전환벼 RTB-11, 5, 9 계통의 도입유전자 삽입위치 정보를 이용하여 LB와 RB 부위와 인접한 벼 계놈 염기서열에 특이적인 primer를 제작하고(Table 1), 도입유전자 부위가 PCR 증폭에 의해 증폭되게 생성되도록 도입유전자를 구성하는 mCryIaC 유전자에 특이적인 Cry-F1 또는 Cry-R1 primer와 Long PCR Enzyme Mix (Fermentas, Germany) 제품을 이용하여 실험 매뉴얼에 따라 PCR 반응을 진행하였다. PCR 증폭산물은 1% agarose gel에 전기영동 하여 확인하였고, pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA)와 ligation하여 *E. coli* strain DH5α competent cell에 heat shock을 주어 형질전환 하였다. PCR 생성물이 삽입된 벡터가 포함된 균주의 선별은 X-gal, IPTG가 포함된 LB (Luria broth) 고체배지에서 white colony를 선별하고 DNA를 추출하여 확인하였다. 추출된 DNA 플라스미드는 일차적으로 M13 forward와 reverse primer를 이용하여 양 방향 염기서열을 분석하였고, 분석된 염기서열 정보를 이용하여 primer를 재합성하여 순차적으로 염기서열 분석에 이용하였다. 염기서열 정보는 Clustal Omega 프로그램(EMBL-EBI, <http://www.ebi.ac.uk>)과 NCBI의 Blast 프로그램을 사용하여 형질전환 벡터의 염기서열과의 비교 및 도입 유전자의 구조를 결정하였다.

**결과 및 고찰**

**유전자 도입위치 확인**

무선발 형질전환방법을 이용하여 4계통의 Bt (mCryIaC) 유전자를 형질전환 시킨 벼가 국립농업과학원에서 개발되었다. 애그로박테리움을 이용한 형질전환 방법(*Agrobacterium*-mediated transformation method)으로 개발된 무선발 형질전환벼 계통들은 세대전계에 따라 각 단계별 세대에서 CryIaC 유전자 부분을 이용한 PCR 분석과 immuno-strip 검정을 이용하여 선별되었고, southern blot과 RT-PCR 분석 등의 방법으로 도입유전자 삽입수(copy number)와 도입유전자인 mCryIaC의 안정적 발현이 확인된바 있다(Kweon *et al.* 2012). 우리는 RTB라고 명명된 4계통의 형질전환벼에 대한 정확한 T-DNA 도입위치를 확인하기 위해 도입유전자 인접염기서열 분석을 수행하였고, RTB-8 계통을 제외한 RTB-5, RTB-9, RTB-11 계통에서 도입유전자의 삽입위치를 확인할 수 있었다. T<sub>4</sub>세대인 RTB-5 계통과 RTB-11 계통의 T-DNA 위치확인 결과, RTB-5 계통에서는 5번 크로모솜의 hypothetical conserved gene (Os05t0569000)을 구성하는 intron 부위에, RTB-11 계통은 9번 크로모솜의 intergenic 부위에 도입유전자가 삽입되었다(Table 2). 이러한 결과로 판단할 때 추후 상업화를 위한 안전성평가 재료로 RTB-5 계통을 활용하기 위해서는 벼 Os05t0569000 유전자의 발현여부 확인 및 기능에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다. T<sub>2</sub> 세대 형질전환 RTB-9 계통 벼의 도입유전자는 Rap-DB 분석으로 6번 크로모솜의 Os06t0259901의 exon 부위에 삽입된 것으로 확인되었다. 벼 Os06t0259901 유전자는 non-protein coding transcript로 구체적인 발현/기능에

**Table 2** Analysis of integration sites of T-DNA insertions in non-selective marker free Bt rice

Lines	Copy number	Number of Chr.	Insertion position (Gene)	Vector backbone integration	Plant generation
RTB-5	1	Chr. 05	Intron (Os05t0569000)	No	T4
RTB-11	2 (1 locus)	Chr. 09	Intergenic	No	T4
RTB-8	1	-	-	Yes (Both borders)	T2
RTB-9	1	Chr. 06	Exon (Os06t0259901)	No	T2

대해서는 알려진바 없어 벼 게놈내에서 이 부분이 실제로 transcription 되는지 여부 등을 확인해 볼 필요가 있을 것으로 판단된다.

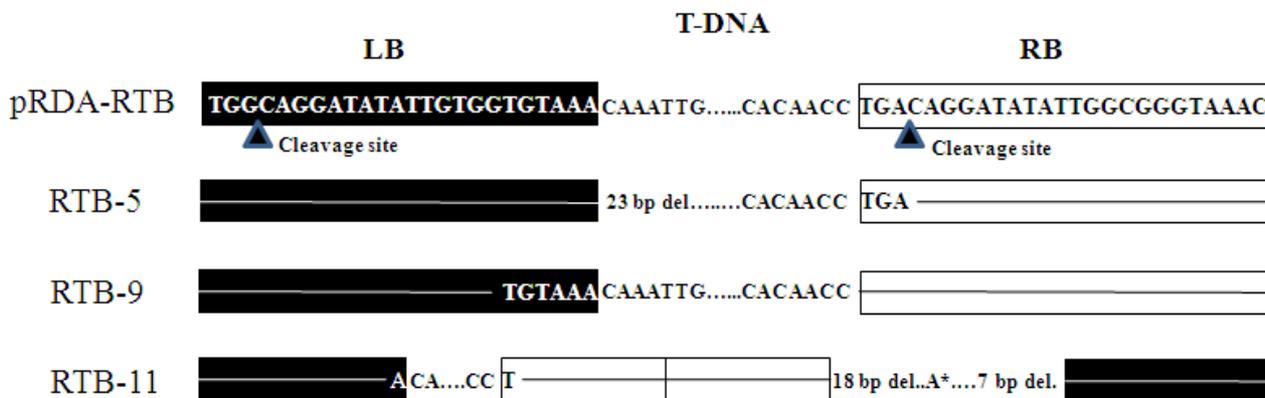
RTB-8 계통에서는 T-DNA의 left border (LB)와 right border (RB) 양쪽 부분에 벡터를 구성하는 backbone DNA가 500 bp 이상 연결되어 있는 것을 확인할 수 있었다. RTB-8 계통에서와 같이 숙주세포의 DNA에 목표유전자와 함께 불필요한 backbone DNA 삽입된 형질전환체의 생성은 GM 작물의 안전성평가를 염두에 둔 상업화과정에서는 backbone DNA 삽입으로 인해 발생할 수 있는 위해성여부를 확인하기 어려워 일반적으로 배제되지만, 애그로박테리움을 이용한 형질전환과정에서 일반적으로 발생하는 현상으로 형질전환 식물체 중 20-70% 정도의 빈도로 발생하며 (Martineau et al. 1994; Kononov et al. 1997), 특히 무선발 형질전환을 이용한 감자에서는 backbone DNA 삽입이 약 60% (60개체/전체 99개체)에 달하는 것으로 보고된바 있다 (De Vetten et al. 2003).

#### 벼 게놈내 도입유전자의 구조 분석

무선발 형질전환 T<sub>4</sub>세대 RTB-5 계통과 RTB-11 계통의 도입유전자 구조를 확인하기 위해 도입 부분의 벼 인접 서열을 포함한 T-DNA에 전체에 대한 염기서열 분석을 실시하고 분석하였다. 염기서열 분석결과 RTB-5 계통은

온전한 1 copy의 T-DNA 도입이 확인된 반면 RTB-11 계통은 2 copy의 T-DNA가 RB를 중심으로 RB-RB 형태의 결합(head-to-head fusion)을 하고 있는 것으로 확인되었다 (Fig. 1). RTB-11 계통과 같이 복수 T-DNA가 한 도입부위(one locus)에 도입되는 현상은 이전에 발표된 통상적 형질전환식물체의 도입유전자 분석결과에서도 빈번히 발생하는 것으로 보고되고 있으며, 주로 RB-RB, RB-LB 형태의 도입이 많이 발견되고 있다 (Krizkova & Hrouda 1998; De Buck et al. 1999; Kumar & Fladung 2000).

형질전환과정으로 많이 발생하는 T-DNA border 부분의 염기서열 결실(deletion)/삽입(insertion) 현상을 분석한 결과 border 내의 염기서열 결실은 계통마다 정도의 차이는 있지만 분석된 3계통 모두에서 확인되었다. 구체적으로는 RTB-5 계통에서는 LB 부분의 23 bp T-DNA 결실이 확인되었고, RTB-11 계통에서는 중첩된 두 T-DNA 사이의 LB부분에서 18 bp의 T-DNA 결실과 하나의 염기서열 구조의 변형(G→A), 그리고 두 번째 T-DNA의 RB 부분에서도 T-DNA가 7 bp 결실이 확인되었다. 그러나 RTB-9 계통은 LB부분에는 6bp의 LB 서열이 남아있는 것으로 확인되었고 RB 부위의 염기서열은 확인되지 않았지만 border 서열 이외의 T-DNA의 결실은 없는 것으로 확인되었다 (Fig. 2). T-DNA 삽입부위에서의 염기서열 결실/변형/재배열 현상은 여러 식물체에서 분석되었으며 염기서열의 결실은 RB 부분보다는 LB 부분에서 빈번한 것으로 보고된



**Fig. 2** Comparison of T-DNA borders and nearby regions in transgenic rice RTB-5, 9, and 11 lines. Sequence of T-DNA borders and nearby regions in the binary vector is shown on top for comparison, and LB and RB regions are presented in black and white box, respectively. The asterisk indicates the site of single nucleotide mutation from G to A

RTB-5 : Chr. 5 genomic DNA

CAGGTGATCAACTGCTGGGCCTCTGTGTCCAATGACACTGAATTTTCAGGTTGTGCACATTAACA	Wild type
CAGGTGATCAACT.....AATTTTCAGGTTGTGCACATTAACA	RTB-5

RTB-11 : Chr. 9 genomic DNA

TTCTTCCTCTTGTGCTTGTGTGGTTGACACAACATCATCTTCTTGTGTGCGG	Wild type
TTCTTCCTCTTGTGCTTGTGT.....CAACATCATCTTCTTGTGTGCGG	RTB-11

RTB-9 : Chr. 6 genomic DNA

AACAGATCATGGCGAGAGCATCACAGTTTCAGCATATACATTACACAGCAGTATAACATGTC	Wild type
AACAGATCATGGCGAGAGCA.....ACATTACACAGCAGTATAACATGTC	RTB-9

**Fig. 3** Nucleotide sequence comparison between the wild type rice (*Oryza sativa* cv. Ilmi) and transgenic rice in the T-DNA inserted region. The deleted nucleotide sequences of T-DNA inserted region on transgenic rice are shown as bold letters

바 있다(Gheysen et al. 1991; Mayerhofer et al. 1991; Nacry et al. 1998).

Kim 등(2003)은 9개의 벼 형질전환체를 분석한 결과 T-DNA 삽입부위에서 0-76 bp 범위의 벼 염색체 DNA의 결실을 보고한 바 있다. 도입위치에서의 무선발마커 형질전환 벼 genomic DNA의 결실은 RTB-5 계통에서는 27 bp, RTB-11 계통은 7 bp, RTB-9 계통에서는 6 bp의 염색체 DNA가 결실 되어, 3계통 모두에서 짧은 단편의 벼 DNA가 결실된 것으로 확인되었다(Fig. 3). T-DNA 삽입위치에서의 벼 게놈 결실 현상은 선발마커를 사용하는 통상적 형질전환의 경우에도 흔히 보고되고 있기 때문에 무선발 형질전환의 결과로 발생된 것으로 판단되지는 않는다.

**적 요**

마커프리 형질전환 식물체 개발 방법의 하나인 무선발 형질전환은 선발마커 유전자를 이용한 도입유전자의 선발과정 없이, 연쇄중합반응(PCR)과 같은 직접 분석방법을 사용해 도입유전자가 도입된 형질전환 식물체를 개발하는 방법이다. 현재까지 감자, 담배, 알팔파, 밀, 땅콩 등 여러 작물에서 무선발 형질전환을 이용한 마커프리 형질전환체가 보고되었다. 그러나 대부분 무선발 형질전환체의 분석이 T<sub>0</sub>/T<sub>1</sub>세대에서의 PCR을 이용한 도입유전자 확인과 후대검정으로 수행되어, 유전자의 안정적 도입 확인을 위한 분자생물학적 특성평가 결과는 보고된 바 없다. 본 연구에서는 4계통의 무선발 형질전환 Bt벼에 대한 도입유전자 특성을 분자생물학적 방법으로 검정하여 유전자도입 위치, 도입유전자의 구조, 벡터 삽입여부 등의 분석 결과를 제시하였다.

**사 사**

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ008545)의 지원에 의해 수행되었습니다.

**인용문헌**

Bhatnagar M, Prasad K, Pooja Bhatnagar-Mathur P, Narasu ML, Waliyar F, Sharma KK (2010) An efficient method for the production of marker-free transgenic plants of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Rep* 29:495-502

Bugert P, Decker S, Klüter H (2001) Improved PCR-walking for large-scale isolation of plant T-DNA borders. *BioTechniques* 30:496-504

De Buck S, Jacobs A, Van Montagu M, Depicker A (1999) The DNA sequences of T-DNA junctions suggest that complex T-DNA loci are formed by a recombination process resembling T-DNA integration. *Plant J* 20:295-304

De Vetten N, Wolters AM, Raemakers K, Van Der Meer I, Ter Stege R, Heeres E, Heeres P, Visser R (2003) A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. *Nat Biotechnol* 21:439-442

Doshi KM, Eudes E, Laroche A, Gaudet D (2007) Anthocyanin expression in marker free transgenic wheat and triticale embryos. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 43:429-435

Gheysen G, Villarroel R, Van Montagu M (1991) Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. *Genes Dev* 5:287-297

Jia HG, Liao MJ, Verbelen JP, Vissenberg K (2007) Direct creation of marker-free tobacco plant from agroinfiltrated leaf discs. *Plant Cell Rep* 26:1961-1965

Kim SR, Lee J, Jun SH, Park S, Kang HG, Kwon S, An G (2003)

- Transgene structures in T-DNA-inserted rice plants. *Plant Mol Biol* 52:761-773
- Kononov ME, Bassuner B, Gelvin SB (1997) Integration of T-DNA binary vector “backbone” sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *Plant J* 11:945-957
- Krizkova L, Hrouda M (1998) Direct repeats of T-DNA integrated in tobacco chromosome: characterization of junction regions. *Plant J* 16:673-680
- Kumar S, Fladung M (2000) Transgene repeats in aspen: molecular characterization suggests simultaneous integration of independent T-DNAs into receptive hotspots in the host genome. *Mol Genet* 264:20-28
- Kweon SJ, Suh SC, An HI, Lim MH, Lee KJ (2012) Development and analysis of GM material for biosafety. Final research report, National academy of agricultural science, Suwon
- Li B, Xie C, Qiu H (2009) Production of selectable marker-free transgenic tobacco plants using a non-selection approach: Chimerism or escape, transgene inheritance, and efficiency. *Plant Cell Rep* 28:373-386
- Malnoy M, Boresjza-Wysocka EE, Norelli JL, Flaishman MA, Gidoni D, Aldwinckle HS (2010) Genetic transformation of apple (*Malus x domestica*) without use of a selectable marker gene. *Tree Gen Gen* 6:423-433
- Martineau B, Voelker TA, Sanders RA (1994) On defining T-DNA. *Plant Cell* 6:1032-1033
- Mayerhofer R, Koncz-Kalman Z, Nawrath C, Bakkeren G, Cramer A, Angelis K, Redei GP, Schell J, Hohn B, Koncz C (1991) T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *EMBO J* 10:697-704
- Nacry P, Camilleri C, Courtial B, Caboche M, Bouchez D (1998) Major chromosomal rearrangements induced by T-DNA transformation in *Arabidopsis*. *Genetics* 149:641-50
- Weeks JT, Ye J, Rommens CM (2008) Development of an in planta method for transformation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Res* 17:587-597