

Agrobacterium 공동 배양을 통한 자엽절 절편 배양으로부터 멜론 형질전환체 생산

조미애¹, 송윤미¹, 박윤옥¹, 고석민¹, 민성란², 유장렬², 이준행³, 최필선^{3*}
¹㈜유진텍부설연구소, ²한국생명공학연구원, ³남부대학교

Production of Transgenic Melon from the Cultures of Cotyledonary-Node Explant Using *Agrobacterium*-Mediated Transformation

Mi Ae Cho¹, Yun Mi Song¹, Yun Ok Park¹, Suck Min Ko¹, Sung Ran Min², Jang Ryol Liu², Jun Haeng Lee³,
Pil Son Choi^{3*}

¹Eugentech Inc., Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Taejeon 305-606, Korea

²Plant Cell Biotechnology Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Taejeon 305-606, Korea

³Department of Medicinal Plant Resources, Nambu University, Kwangju 506-824, Korea

ABSTRACT *Agrobacterium tumefaciens*-mediated cotyledonary-node explants transformation was used to produce transgenic melon. Cotyledonary-node explants of melon (*Cucumis melo* L. cv. Super VIP) were co-cultivated with *Agrobacterium* strains (LBA4404, GV3101, EHA101) containing the binary vector (pPTN289) carrying with CaMV 35S promoter-*gus* gene as reporter gene and NOS promoter-*bar* gene conferring resistance to glufosinate (herbicide Basta) as selective agent, and the binary vector (pPTN290) carrying with Ubiquitin promoter-GUS gene and NOS promoter-*nptII* gene conferring resistance to paromomycin as selective agent, respectively. The maximum transformation efficiency (0.12%) was only obtained from the cotyledonary-node explants co-cultivated with EHA101 strain (pPTN289) on selection medium with 5 mg/L glufosinate and not produced a transgenic melon from the cotyledon or cotyledonary-node co-cultivated with other strains. Finally, five plants transformed showed the resistance in glufosinate antibiotic and the GUS positive response in leaf (T₀), flower (T₀), seeds (T₁) and plantlet (T₁). Southern blot analysis revealed that the *gus* gene integrated into each genome of transgenic melon.

Key words: *Agrobacterium* strains, β -glucuronidase (GUS), transgenic melon

서 론

멜론의 형질전환연구는 모자이크 바이러스 (CMV) 및 zucchini yellow 모자이크 바이러스 (ZYMV, Boyhan et al. 1992; Nishibayashi et al. 1996) 등 주요 박과작물의 생산성을 감소시키는 원인을 분자유종학적으로 극복할 수 있을 뿐 아니라 환경스트레스유전자 (CBF, TPSP)와 같은

유용유전자 도입을 가능하게 함으로서 신 품종육성과 멜론의 생산량 증대를 기대할 수 있을 것이다.

최근 유용유전자 도입에 의한 멜론의 신품종 개발 연구 (Tricoli et al. 2002; Gaba et al. 2004)를 위하여 그동안 새로운 선발마커의 이용 (Dong et al. 1991), 배양절편의 물리적상처방법 개선 (Fang and Grumet 1990; Curuk et al. 2005) 및 체세포배발생 (Gray et al. 1993; Choi et al. 1994)에 대한 연구가 진행되어 왔고, 대부분의 연구에서는 배양재료로서 자엽절편이나 잎절편을 공동배양한 후 kanamycin이 첨가된 선발배지에서 형질전환체를 생산하여

*Corresponding author Tel 82-62-970-0161 Fax 82-62-970-0165
E-mail: cps6546@nambu.ac.kr

왔다. 그러나 형질전환체는 유전학적으로 4배체 (> 70%)이거나 chimeric 특성을 갖고 있어 학술적, 농업적 이용가치가 낮은 단점을 가지고 있고 (Guis et al. 2000), 아직까지도 낮은 형질전환빈도와 genotype 의존성 때문에 매우 까다로운 작물로 알려져 있을 뿐 아니라 (Curuk et al. 2005), 대부분의 경우 국외 연구그룹을 중심으로 이루어지고 있기 때문에 (Fang and Grumet 1990; Guis et al. 2000; Curuk et al. 2005) 국내에서 새로운 멜론의 형질전환방법의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

식물형질전환이 어려운 작물의 경우 일반적으로 선발마커의 최적화, 배양재료의 선택, *Agrobacterium*의 최적공동배양조건 및 항산화제 등과 같은 형질전환효율을 증가시키기 위한 연구가 더욱 요구된다 (Olhoft and Somers 2001; Somers et al. 2003). 가장 대표적인 예로서 대두에서는 여러 가지 중요한 요인 중 배양재료로서 자엽절편이나 미숙 배가 아닌 자엽절 절편을 이용하여 성공적으로 형질전환방법을 확립되었고 (Zhang et al. 1999; Clemente et al. 2000; Olhoft and Somers 2001; Cho et al. 2004), 이러한 방법은 현재 체세포배발생을 통한 형질전환방법 (Finer and Finer 2000)과 더불어 대두의 기능유전체 연구와 신 품종 육성연구에 중요하게 이용되고 있다. 그러나 자엽절 절편 공동배양법은 배양기간을 단축하여 배양환경으로부터 받는 스트레스를 최소화함으로써 형질전환체의 불임성을 줄일 수 있고, 선발마커로서 *bar* 유전자를 사용함으로써 자엽절 절편으로부터 발생된 많은 신초 중 형질전환체를 안정적으로 얻을 수 있는 장점이 있는 반면, 연구자의 숙련도와 제한된 genotype에서만 이루어지는 단점이 있기 때문에 (Meurer et al. 1998; Paz et al. 2004) 아직도 해결 해야 할 문제점이 남아 있다.

따라서 본 연구에서는 본 연구팀이 이미 확보하고 있는 대두 자엽절 절편 공동배양법 (Cho et al. 2004)을 국내 재배 품종인 “슈퍼VIP” 멜론 품종에 적용하여 멜론의 자엽절 절편 공동배양법에 의한 형질전환방법을 확립하고자 수행하였다.

재료 및 방법

식물 재료

국내에서 재배되고 있는 멜론 (VIP 품종) 종자를 Cho 등 (2005a, b)의 방법에 따라 표면 살균 하였다. 2% sucrose와 0.8% agar가 첨가된 MS 기본배지 (Murashige and Skoog 1962)에 10개의 종자를 치상하고 25°C 암상태에서 10일 동안 발아시켰다. 배양 5-10일 후 발아된 멜론의 유식물체로부터 절단한 자엽절편과 자엽과 자엽사이를 종단으로 절단하여 자엽사이에 있는 유경조직을 해부현미경하에서 제거하여 얻은 자엽절 절편을 *Agrobacterium*과 공동배양하기 위한 재료로 사용하였다.

Agrobacterium tumefaciens strains

CaMV 35S 프로모터, β -glucuronidase (GUS) 유전자, 선 발표지로서 *bar* 유전자를 freeze-thaw 방법으로 LBA4404, EHA101 및 GV3101에 각각 형질전환하여 균주로 사용하였다 (Jefferson et al. 1987). 50 mg/L streptomycin과 50 mg/L spectinomycin이 첨가된 LB 액체배지 50 mL에 각각의 colony를 접종하여 28°C로 8시간 이상 배양한 후 대수기 증식기 ($OD_{650} = 0.6 - 1.0$)의 균을 사용하였다.

멜론 형질전환체 생산

멜론 형질전환체를 생산하기 위하여 1회당 약 50개 자엽절편과 자엽절 절편을 pPTN289 벡터로 형질전환시킨 25 mL의 *Agrobacterium* 용액 (LBA4404, GV3101, EHA101)에 30분 동안 침지한 후 공동배양용 배지 (Cho et al. 2005a, b)에 6개씩 치상하여 3일 동안 공동 배양하였다. 공동 배양한 절편을 3-5회 수세한 후 신초 유도배지 (Cho et al. 2005a, b)에 옮겨 6-8주 동안 2주 간격으로 계대배양 하였다. 형성된 신초를 분리하여 신초 신장배지 (Cho et al. 2005a, b)에 옮겨 3 cm 이상 신장시켰으며, 뿌리 유도배지 (Cho et al. 2005a, b)에 옮겨 유식물체를 얻었다. 한편, pPTN290 벡터를 이용할 경우, 위의 모든 배지에서 5 mg/L glufosinate 대신 100 mg/L paromomycin을 첨가하여 수행하였다. 모든 배지는 8 g/L Phyto-agar를 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 온실에서 순화 하였다.

β -Glucuronidase (GUS) 발현

*Agrobacterium*과 공동배양한 자엽절 절편으로부터 유도된 유식물체의 잎 절편과 토양에서 순화시킨 성숙한 식물체의 화기 및 후대 유식물체를 채취한 후, 37°C에서 5-bromo-4-chloro-3-indole-glucuronidase 용액에 침지 시켰다 (Jefferson et al. 1987). 24시간 후 70% 알코올 용액으로 탈색시킨 후 GUS 양성 반응을 보인 식물체의 빈도를 조사하였다. 대조구로서는 *Agrobacterium*과 공동배양하지 않은 성숙한 식물체의 잎, 화기를 사용하였다.

Leaf painting 및 Southern 분석

유식물체의 잎에서 GUS 양성 반응을 나타낸 식물체를 토양에 순화 한 후 온실에서 성숙한 개체로 생육시켰다. 식물체의 크기가 50 cm 이상 되었을 때 1차 잎 표면에 0.1% 바

스타 (Aventis Inc.)를 솜으로 처리 하였다. 5일 후 제초제에 대한 내성을 나타낸 식물체의 잎 조직으로부터 genomic DNA를 추출하였다 (Dellaporta et al. 1985). 약 10 µg의 DNA를 *EcoR* I 제한효소로 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 labelling한 약 2.0 kb *gus* probe로 hybridization하여 Southern분석을 실시하였다 (Southern 1975).

결과 및 고찰

국내 재배품종인 “슈퍼VIP” 종자를 5일동안 무균발아시켜 유식물체를 얻었다. 자엽과 자엽사이에 있는 유경조직과 액아를 메스 (No. 15)로 조심스럽게 제거한 후 자엽절 부위를 10-15회 상처를 주었다. 이와 같이 준비된 자엽절 절편을 공동배양재료로 사용하였으며, 형질전환방법은 Zhang 등 (1999)과 Cho 등 (2005a, b)의 방법에 따라 수행하였다. 공동배양 2주 후 상처를 받은 자엽 절 부위에서 완전히 제거되지 않은 측아 원기로부터 싹초가 발생하였으나 chimeric일 가능성 때문에 다시 제거 하였다. 배양 2주째 형성된 shoot를 배측 부위와 함께 제거하고 탈분화된 자엽 절 절편을 다시 동일배지에 옮겨 4-6주 동안 배양할 경우 점차 부정아 원기가 형성되기 시작하였으며, 자엽절 뿐 아니라 자엽기부에서도 발생하였고, 동시에 캘러스 형성도 이루어 졌다. 6-8주째 이러한 원기로부터 2-3 mm 크기의 싹초가

발생하였으며, 주위 조직은 점차 갈변되었다 (Figure 1A, B). 배양 6-8주후 녹색을 띄는 싹초를 분리하여 싹초신장배지 (SE)에 옮겨 배양하면서 3 cm이상 되게 신장 시켰다 (Figure 1C). 신장된 싹초를 부정근유도배지에서 뿌리를 유도한 후 토양에 옮겨 순화시켰다 (Figure 1D). 그러나 자엽절 절편을 pPTN290백터로 형질전환 한 후 100 mg/L paromomycin이 첨가된 선발배지에서 배양하였을 때 자엽절편의 괴사 현상은 좀처럼 관찰 할 수 없었고 캘러스 형성과 싹초 발생이 왕성하게 일어나 동일 박과작물인 오이와 수박 (Cho et al. 2005a, b)에서와 거의 동일한 현상을 보였다. 공동배양된 멜론의 자엽절 절편 (7,545개)으로부터 오직 5개의 *glufosinate*저항성 식물체를 얻었으며 (Figure 1F), 이들 형질전환체 (T₀)의 잎과 화기에서 그리고 후대종자 (T₁)와 유식물체 (T₁) 모두에서 GUS양성반응을 확인하였다 (Figure 1H, J, L, M, N). 그러나 공동배양재료로서 자엽절편을 사용하였을 경우 *glufosinate*선발배지에서는 항생제 저항성을 갖거나 GUS양성반응을 나타내는 형질전환체는 얻지 못하였다 (Table 1). 선발마커로서 첨가된 5 mg/L *glufosinate*는 상처를 받은 배양절편의 통도조직에 흡수되어 (Shelp et al. 1992) 비 형질전환 세포에 암모니아를 축적시킴으로서 독성을 유발시켜 세포를 괴사시키고, 반면 형질전환 세포에서는 phosphinothricin acetyl transferase (PAT)효소를 합성함으로써 *glufosinate*를 불활성화시켜 저항성을 갖게 한다 (Muller et al. 2001). 따라서 배양기간 동안 나타나는 자엽 절 갈변현상과 괴사현상은 배지에 첨가된 *glufosinate*에 의해 나타난 현상이며, 새롭게 형성된 multiple shoot의 경우는 T-DNA의 *bar*유전자가 멜론 genome에 도입되어 발현됨으로서 저항성을 갖게 된 것으

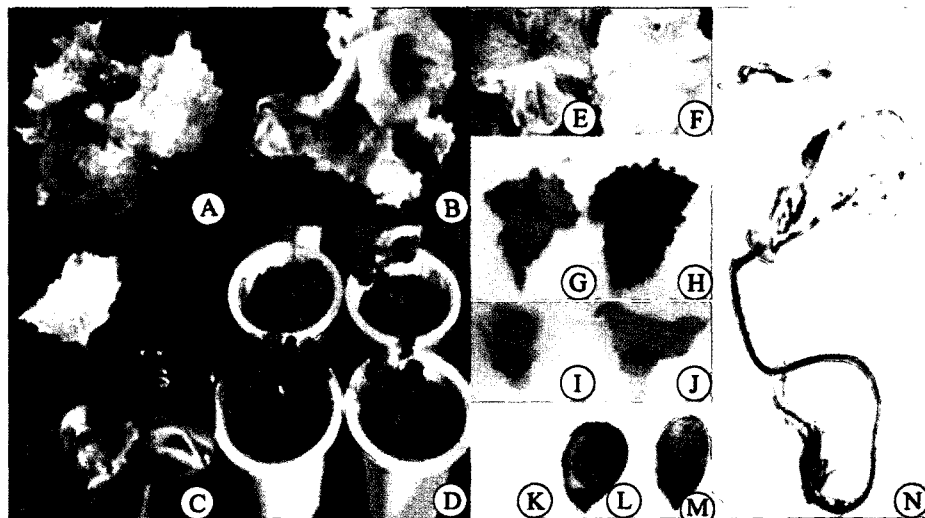


Figure 1. Plant regeneration from cotyledonary-node explant of melon transformed with *Agrobacterium* containing *gus* and *bar* gene
 A, B: Putative transgenic shoots formation on SI medium with 5 mg/L glufosinate. C: Glufosinate-resistant plants. D: Transgenic melons grown in soil. E: Herbicide-sensitive of non-transgenic melon. F: Herbicide-resistance of transgenic melon. G, I : GUS negative response of non-transgenic leaf and flower (T₀). H, J: GUS positive response of transgenic leaf and flower (T₀). K: GUS negative response of non-transgenic seed (T₁). L, M, N: GUS positive response of transgenic seeds and plantlet (T₁).

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

Explants	Vectors	<i>Agrobacterium</i> strains	No. of explants cocultured	No. of GUS expression (%)
Cotyledon	pPTN289	EHA101	5989	0 (0.00)
		GV3101	851	0 (0.00)
Cotyledonary-node	pPTN289	LBA4404	647	0 (0.00)
		EHA101	3,225	5 (0.16)
	pPTN290	GV3101	421	0 (0.00)
		LBA4404	550	0 (0.00)
		EHA101	1,851	0 (0.00)

로 생각된다. 반면 선발마커로서 paromomycin첨가배지는 많은 식물체를 얻을 수 있지만 GUS유전자가 발현되는 식물체를 얻지 못하였기 때문에 선발마커로서 적당하지 않음을 알 수 있었다.

Glufosinate가 첨가된 선발배지에서 공동배양된 자엽절 절편 (7,545)중에서 GUS 양성반응을 나타낸 식물체는 5개체였으며, 특히 선발마커로서 bar유전자를 포함한 pPTN289 벡터로 형질전환된 EHA101균주에서만 얻을 수 있었다 (Table 1). 그러나 본 연구에서 공동배양한 자엽절 절편의 수에 있어서 균주별로 차이가 있기 때문에 정확한 빈도 측정을 위해서는 더 많은 배양재료를 사용해야 할 것으로 판단된다. *Agrobacterium* 균주 (A281, C58, ACH5)의 감염성이 작물의 품종과 *Agrobacterium*의 종류에 따라 다르게 나타날 수 있다 (Simmonds and Donaldson 2000). 예로서 버의 형질전환연구에서 품종 간 LBA4404균주의 감염성이 달라지며 (Lee et al. 1999), *Coleus blumei*에서 C58C1, GV3101, A281보다 B6S3 균주의 감염성이 높은 것으로 알려져 있다 (Bauer et al. 2002). 그 뿐만 아니라 본 연구팀은 동일 박과작물인 오이와 수박의 형질전환에서 GV3101

(pPTN289), LBA4404 (pPTN289), EHA101 (pPTN289), GV3101 (pPTN290), LBA4404 (pPTN290), EHA101 (pPTN290) 등을 자엽절편과 공동배양하여 균주간 형질전환빈도 차이를 보고 하였으며, 특히 EHA101균주의 높은 감염성을 강조한 바 있다 (Cho et al. 2005a, b). 이와 같이 *Agrobacterium* 균주의 감염성은 그 균주의 종류에 따라 그리고 식물의 계통, 품종, 배양재료 및 종에 따라서도 다르게 나타나기 때문에 안정적 형질전환 시스템을 확보하기 위해서는 최적 *Agrobacterium* 선정 과정이 필수적이라 할 수 있다.

배양병에서 생육시킨 유식물체를 토양에 순화시킨 후 5개의 GUS양성반응을 나타내는 식물체 (TM-1, TM-2, TM-3, TM-4, TM-5)의 잎 절편으로부터 genomic DNA를 추출하여 Southern분석을 수행하였다. TM-1을 제외한 나머지 형질전환체의 genome에 gus유전자가 안정적으로 도입되어 있음을 확인 하였다 (Figure 2). 따라서 GUS발현과 Southern 분석 결과로 미루어 볼 때 자엽절 절편공동배양법에 의해 gus유전자가 멜론 genomic DNA에 삽입되어 안정적으로 발현되고 있음을 확인 하였고, 특히 glufosinate를 선발배지로 이용할 경우 paromomycin보다 더 효율적임 확인 함으로서 멜론의 형질전환에서 자엽절 절편의 이용 가능성을 제시할 수 있었다. 그러나 아직까지는 형질전환빈도에 있어서 매우 낮기 때문에 향후 연구자의 숙련도를 높이고, 더 많은 genotype스크리닝에 대한 연구가 진행되어져야 할 것으로 기대된다.

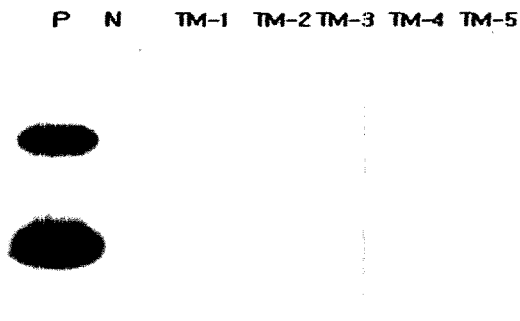


Figure 2. Southern blot analysis of 5 transgenic melons carrying gus gene. Genomic DNA was digested with *EcoRI* and hybridized with 2.0 kb gus probe DNA labeled with ³²P-dCTP. P: Plasmid vector (pPTN289) digested with *EcoRI*; N: Non-transgenic cucumber; TM1-5: Regenerated melon.

적 요

*Agrobacterium*과 자엽절 공동배양으로 대두 형질전환체를 생산하였다. 멜론 (슈퍼VIP품종)의 자엽절 절편은 선발마커로서 bar와 reporter로서 gus유전자가 포함된 pPTN289 또는 선발마커로서 nptII유전자와 reporter로서 gus유전자로 제작된 pPTN290벡터를 LBA4401, GV3101, EHA101에 각각 형질전환하여 공동 배양하였다. 최대 형질전환빈도 (0.16%)는 EHA101 (pPTN289)균주로 공동배양한 자엽절

절편을 glufosinate가 첨가된 선발배지에서 얻을 수 있었으며, 최종적으로 glufosinate 저항성과 잎 (T_0), 화기 (T_0), 종자 (T_1) 및 유식물체 (T_1)에서 GUS 양성 반응을 나타내는 5 개체를 얻었다. Southern 분석에 의하여 GUS 유전자가 멜론 genomic DNA에 도입되어 있음을 확인하였다.

사 사

본 연구는 과학기술부 작물유전체기능연구사업단 (Crop Functional Genomics Center, CFGC)과 바이그린21사업단 (BioGreen21)로부터 지원 받아 수행하였으며, pPTN290과 pPTN289백터를 공급해준 네브라스카대학 Tom Clemente 교수에게 감사한다.

인용문헌

- Bauer N, Levanic DL, Mihaljevic S, Jelaska S (2002) Genetic transformation of *Coleus blumei* Benth. using *Agrobacterium*. Food Technol Biotechnol 40: 163-169
- Boyhan GJ, Norton D, Jacobsen BJ, Abrahams BR (1992) Evaluation of watermelon and related germplasm for resistance to zucchini yellow mosaic virus. Plant Dis 76: 251-252
- Cho MA, Choi DW, Liu JR, Clemente T, Choi PS (2004) Development of transgenic soybean using *Agrobacterium tumefaciens*. Kor J Plant Biotechnol 31: 255-259
- Cho MA, Song YM, Park YO, Ko SM, Min SR, Liu JR, Choi PS (2005a) The use of glufosinate as a selective marker for the transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Kor J Plant Biotechnol 32: 161-165
- Cho MA, Song YM, Liu JR, Choi PS (2005b) Production of transgenic watermelon by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Kor J Plant Biotechnol (submitted)
- Choi PS, Soh WY, Cho DY, Liu JR (1994) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in seedling explant cultures of melon (*Cucumis melo* L.). Kor J Plant Biotechnol 21: 1-5
- Clemente T, LaValle BJ, Howe AR, Ward DC, Rozman RJ, Hunte PE, Broyles DL, Kasten DS, Hinchee MA (2000) progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybean derived from *Agrobacterium*-mediated transformation. Crop Sci 40: 797-803
- Curuk BS, Cetiner S, Elman C, Xia X, Wang Y, Yeheskel A, Zilberstein L, Perl-Treves R, Watad AA, Gaba V (2005) Transformation of recalcitrant melon (*Cucumis melo* L.) cultivars is facilitated by wounding with carborundum. Eng Life Sci 5: 169-176
- 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
- Dong JZ, Yang MZ, Jia SR, Chua NH (1991) Transformation of melon (*Cucumis melo* L.) and expression from the cauliflower mosaic virus 35s promoter in transgenic melon. Bio/Tech 9: 858-863
- Fang G, Grumet R (1990) *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of muskmelon plants. Plant Cell Rep 9: 160-164
- Finer KR, Finer JJ (2000) Use of *Agrobacterium* expressing green fluorescent protein to evaluate colonization of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation-treated soybean cotyledons. Lett Appl Microbiol 30: 406-410.
- Gaba V, Zelcer A, Gal-On A (2004) *Cucurbit* biotechnology- the importance of virus resistance. In Vitro Cell Dev Biol Plant 40: 346-358
- Gray DJ, McColley DW, Compton ME (1993) High frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of *Cucumis melo* cultivars. J Am Soc Hort Sci 118: 425-432
- Guis M, Ben Amor M, Latche A, Peche JC, Roustan JP (2000) A reliable method for the transformation of Cantaloupe Charentais melon (*Cucumis melo* L. var. *cantalupensis*) leading to a majority of diploid regenerants. Sci Hort 84: 91-99
- 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. Physiol Plant 107: 338-340
- 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
- Nishibayashi S, Kayakawa T, Nakajima T, Suzuki M, Kaneko H (1996) CMV protection in transgenic cucumber plants with an introduced CMV-O cp gene. Theor Appl Genet 93: 672-678
- Olhoft PM, Somers DA (2001) L-cysteine increase *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. Plant Cell Rep 20: 706-711
- Paz MM, Shou H, Guo Z, Zhang Z, Banerjee AK, Wang K (2004) Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. Euphytica 136: 167-179
- 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
- Somers DA, Samac DA, Olhoft PM (2003) Recent advances in legume transformation. *Plant Physiol* 131: 892-899
- Southern E (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-512
- Tricoli DM, Carney KJ, Russell PF, Quemada HD, McMaster RJ, Reynolds JF, Deng RZ (2002) Transgenic plants expressing DNA containing a plurality of genes to impart virus resistance. US patent 6,337,431
- 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 2005년 10월 4일, 수리일자 2005년 11월 14일)