GM작물의 선발표지 유전자 제거기술

선발표지 제거방법은 이제까지 검증된 항생제 내성 유전자를 선발표지로 사용하되 작물의 형질 전환 과정이 완료된 후 선발표지 유전자를 제거하는 방법으로 현재까지 활발한 연구성과가 보고되고 있다.

우희종 연구사 woo001@rda.go.kr

조현석 연구관 hscho@rda.go.kr

국립농업과학원 농업생명자원부 생물안전성과

세계적인 기후환경의 변화, 식량부족, 곡물가 상승에 대응하기 위해 GM작물의 재배 및 상업화는 해가 갈수록 증가하고 있다. 하지만 GM작물의 재배가 증가할수록 시민단체 등에서는 GM작물의 안전성을 사회적 이슈로 제기하고 있다. 이에 본고에서는 식물생명공학기술의 안전성 확보 일환으로 GM 작물의 개발에 사용되고 있는 선발표지 유전자의 종류와 이를 제거할 수 있는 기술에 대해 살펴봄으로써 GM작물의 올바른 이해를 돕고자 한다.

01 식물형질전환과 선발표지 유전자

식물생명공학 분야에서 연구목적으로 애기장대, 담배, 페츄니아 등에 한하여 제한적으로 이루어졌던

초기 식물형질전환이 현재는 다양한 식물체에서 가능해짐에 따라 제초제내성 · 저항성 등 여러 목적형질을 지닌 GM(유전자변형, Genetic Modified)작물이 개발, 상업화되어 전세계적에서 재배되고 있다. 식물형질전환 연구의 급속한 발전은 새로운 배지나 형질전환 방법의 개발이 빠르게 이루어졌기 때문이기도 하지만 항생제내성 유전자를 사용한 선발표지 시스템이 식물형질전환 방법에 적용되었기 때문에 가능했다.

일반적으로 식물체 내에 목적유전자를 도입(Transformation)하기 위해서는 운반체라는 DNA 구성물을 사용한다. 목적유전자와 함께 항생제내성 유전자와 같은 선발표지 유전자를 운반체에 연결하여 토양미생물인 아그로박테리움(*Agrobacterium*)의 감염기작 등을 이용해 식물체 세포(핵) 내로 도입하게 된다. 하지만 아그로박테리움(*Agrobacterium*)의 감염에 의해 운반체 내의 외래유전자가 도입된 세포는 보통 매우 적은 비율로 나타나며, 유전자가 도입되지 못한 식물세포와 혼재하게 된다. 이때 재분화 유도 배지에 항생제를 첨가하면 목적유전자와 연결된 특정 항생제내성 유전자가 정상적으로 도입된 식물체만이 반응, 재분화가 유도되어 목적유전자가 도입된 식물체를 쉽게 얻을 수 있다.

현재까지 식물형질전환을 위해 통상적으로 가장 많이 사용되고 있는 선발표지 유전자는 가나마이신 내성 유전자(*npt*II)이며 *npt*II의 선발효과가 높지 않은 벼, 배추 등의 식물체에서는 하이그로마이신 내성 유전자가 많이 사용되고 있다. 한편 항생제내성 유전자뿐 아니라 제초제내성 유전자가 선발표지로 효과적으로 사용될 수 있다. 포스피노트리신(phosphinothricin) 내성 유전자인 *pat(bar)*나 글라이포세이트(glyphosate) 내성 유전자인 *EPSPS*를 사용하면 다른 항생제내성 유전자를 사용하지 않아도 선발이 가능하고 특정 제초제에 내성을 지닌 식물체를 개발할 수 있어 매우 유용하다(표 1).

표 1. 미국에서 포장시험이 신청된 GM작물의 선발표지 유전자 종류

선발표지 유전자	기록 횟수(2001년~2002년)
가나마이신 내성 유전자(*npt* II)	949
하이그로마이신 내성 유전자(*hpt*)	65
제초제(Phosphinothricin)내성 유전자(*pat*)	327
제초제(Glyphosate)내성 유전자(*EPSPS*)	507
기타 (gus, gfp 등)	122

출처 : Miki & McHugh 2004

GM작물의 상업화로 인간과 가축의 식용 작물로서 사용이 늘어나면서 GM작물에 대한 여러 가지 위해성 여부 논란이 시민단체를 중심으로 제기되었다. 그 중 한 가지는 GM작물 개발과정에서 선발표지로 사용된 항생제내성 유전자의 위해성 여부이다. 물론 형질전환시 이용된 선발표지 유전자가 포유동물 세포로 전이되어 안정적으로 유지·발현된다는 보고나 인체나 가축에 노출되어 위해성을 보인다는 증거는 현재까지 없다. 그럼에도 불구하고 현재까지 과학계의 일반적 결론은 식물 생명공학 분야에서 임상적으로 사용되는 항생제에 대해 내성을 보이는 유전자의 선발표지로서의 사용은 적당한 대체기술이 개발되면 없어져야 한다는 것이다 (National Research Council 2000; Royal Society 1998).

02
선발표지 유전자 제거기술

식물생명공학기술의 진보 속도로 추정해 볼 때 향후 가까운 시일내에 모든 식물체에서 형질전환이 가능해지고 효율 또한 높아질 것이다. 그러나 현시점에서 선발표지 유전자로 사용되는 항생제내성 유전자의 편리성과 효율성을 대체할 만한 기술은 많지 않아 보인다. '선발표지 제거방법'은 이제까지 검증된 항생제내성 유전자를 선발표지로 사용하되 작물의 형질전환 과정이 완료된 후 선발표지 유전자를 제거하는 방법으로 현재까지 활발한 연구성과가 보고되고 있다.

선발표지 제거방법은 위해성 논란이 되는 항생제내성 유전자를 식물체 내에서 제거할 수 있을 뿐 아니라 여러 가지 장점을 가지고 있다. 항생제내성 유전자를 제거하여 소비자의 GM식물에 대한 인식을 향상시킬 수 있다는 점 이외에 선발표지 제거방법이 가진 장점을 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

첫째, 선발표지 유전자로 인한 식물체내 생리적 영향을 최소화 할 수 있다. 일반적으로 선발과정의 효율을 높이기 위해 선발표지 유전자는 항시발현 프로모터를 통해 발현을 유도하게 된다. 왜냐하면 식물체가 선발된 후에도 발현이 계속 유도되면 식물체 내의 생리기능에 영향을 미칠 수 있기 때문이다.

둘째, GM식물체의 개발 및 상업화 과정에서의 노력과 비용을 줄일 수 있다. 항생제내성 유전자를 다른 선발표지 유전자로 대체하기 위한 여러 시도들이 있어 왔다. 그러나 다른 대체 선발표지 유전자를 이용하는 경우 작물체에 따른 대체 선발표지 유전자의 형질전환 적용 연구가 필요하며, 개발 작물의 상업화 과정에서도 선발표지 유전자의 발현 및 인체위해성에 관한 자료도 생성해야 한다. 선발표지 제거기술을

사용하면 작물의 상업화 과정 절차에서 선발표지 유전자 사용으로 발생할 수 있는 실험과 자료 생산을 줄일 수 있어 시간과 비용을 절감할 수 있다.

셋째, 적용범위가 넓고 비교적 간편하다. 선발표지 제거기술은 식물체 선발과정에서 기존에 계속 사용되어 왔던 항생제내성 유전자를 선발표지 유전자로 사용하는 방법으로 외래유전자가 식물체 내로 삽입된 개체를 선발한 후 식물체의 재분화(Regeneration) 과정을 다시 수행하거나 또는 자식세대의 유전자 분리(Segregation)에 의해 선발표지가 제거된 개체를 선발하는 방법으로 진행된다. 따라서 형질전환 및 재분화가 가능한 대부분의 식물체에 적용할 수 있다. 물론 실험의 간소화 측면에서 바라볼 때 선발표지 제거과정의 세대 분리와 재분화의 추가실험은 불편함으로 작용할 수 있지만 상업화를 위한 안전성평가가 통상적으로 최소 GM작물의 4~5세대까지 이루어져야 한다는 점 등으로 생각해볼 때 실험의 연속과정으로도 간주할 수 있을 것이다.

식물체에서 선발표지 제거기술을 사용하여 무선발표지(Marker-free) 형질전환 식물체를 만드는 방법은 전위인자 이용(Transposon-based) 선발표지 제거방법, 이중형질전환(Co-transformation)에 의한 선발표지 제거방법, 위치-특이적 재조합 매개(Site-specific recombinase mediated) 선발표지 제거방법으로 나누어 볼 수 있다. 이 세가지 방법 중 이중형질전환 방법과 위치-특이적 재조합 매개에 의한 방법이 넓은 적용범위와 편리성으로 인해 많이 사용되고 있다.

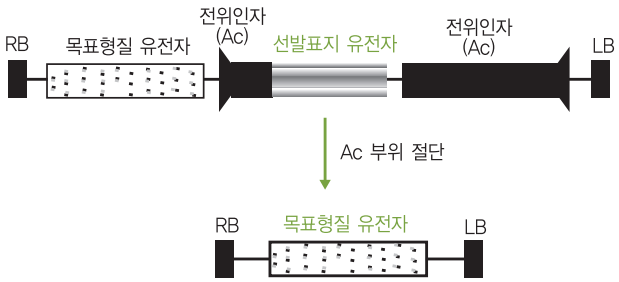
가) 전위인자를 이용한(Transposon-based) 선발표지 제거방법

전위인자는 1940년대 옥수수에서 바바라 맥클린톡(Barbara McClintock)에 의해 처음 발견되었다. 맥클린톡은 옥수수에서 불안정한 색깔의 표현형이 전위인자의 이동에 의해 생기는 현상이라는 결론을 얻었다(Griffiths et al., 2005). 현재 가장 많이 연구된 전위인자[1]로는 과일파리(*Drosophila melanogaster*)의 P element가 있다(Pierre-Henri *et al.*, 2002).

1) 전위인자는 염색체 상에서 한곳에 고정되어 있지 않고 위치를 이동할 수 있는 성질을 가지고 있다. 또한 적어도 하나의 단백질을 암호화 할 수 있는 수백에서 수천 베이스(base) 길이의 DNA 서열로 자기복제가 가능하다. 이러한 전위인자 유전자의 이동은 다른 유전자에 영향을 줄 수 있어 자연적인 돌연변이의 원인이 되며 유전적 다양성 및 진화의 중요한 요인이 된다.

전위인자의 이동성을 이용하여 무선발표지(Marker-free) 형질전환 식물체의 제조 방법이 개발되었다(그림 1). 전위인자를 사용하여 선발표지 유전자를 제거하기 위해서는 다음과 같은 과정을 거치게 된다. 1) 선발표지 유전자를 전위인자 내에 삽입시켜 목표형질 유전자와 함께 식물체 내에서 형질전환하고, 2) 선발표지 유전자를 이용하여 형질전환

그림 1. 전위인자를 이용한 선발표지 유전자 제거 시스템의 기본구조



식물체 선발하고 3) 전위인자의 이동성에 의해 전위인자가 다른 염색체로 선발표지 유전자와 함께 이동하면, 4) 자식세대의 염색체 분리 현상을 이용하여 전위인자와 함께 선발표지 유전자를 제거하여 목표형질 유전자만이 삽입된 개체를 선발해 무선발표지 형질전환 식물체를 개발한다.

그러나 전위인자를 이용한 선발표지 유전자 제거방법은 종에 따라 전위효율이 달라지고 교잡과 선발시간 비용이 많이 필요하며, 선발표지 제거효율이 낮고 절단이 부정확하여 유전적으로 불안정한 점 등의 단점이 있어 선호되지 않고 있다.

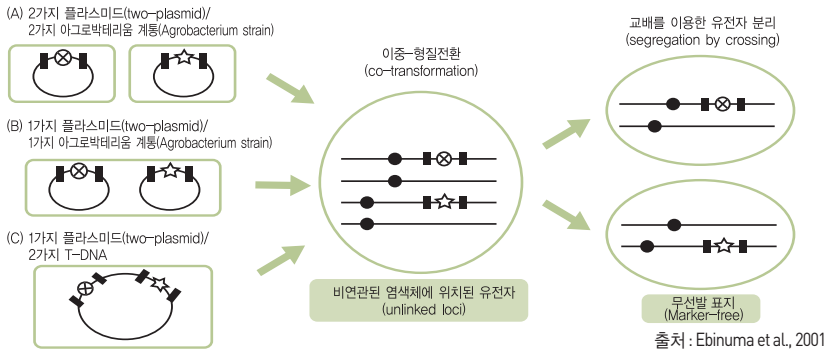
나) 이중-형질전환에 의한 선발표지 제거방법

이중-형질전환(Co-transformation)은 선발표지 유전자와 발현시키고자 하는 목표 유전자를 별도의 분리된 운반체로 만들어 아그로박테리움(*Agrobacterium*)법이나 유전자총(Biolistics)법을 이용하여 식물체에 도입(형질전환)하고, 다음 세대에서 연쇄중합반응(Polymerase chain reaction, PCR) 등의 기법을 사용하여 목표유전자만을 가진 식물체를 골라내 선발표지가 제거된 형질전환 식물체를 만드는 방법이다.

이중-형질전환은 1) 두 T-DNA[2]를 다른 아그로박테리움 계통(*Agrobacterium strain*)을 이용하여 도입하는 방법, 2) 두 플라스미드(Plasmid)를 유전자총을 이용하여 도입하는 방법, 3) 다른 복제원점(Replicon)을 가진 두 T-DNA를 같은 아그로박테리움 계통을 이용하여 도입하는 방법, 4) 같은 복제원점을 가진 두 T-DNA를 같은 아그로박테리움 계통으로 도입하는 방법으로 사용된다(Gelvin 2003; Afolabi *et al.*, 2005). 이러한 방식으로 식물의 게놈(Genome)내로 도입된 선발표지 유전자의 제거는 식물체에서 세대 분리(Segregation)과정을 이용하거나, 유성생식을 하는 식물체의 경우 자식세대(Progeny)의 선발을 통해서 분리해낼 수 있다(그림 2).

2) T-DNA(전이 DNA, transfer DNA)는 토양세균인 아그로박테리움의 Ti-플라스미드의 일부로 기주식물체의 게놈에 삽입되는 부분이다. T-DNA 부위는 RB(right border)와 LB(left border)라는 좌우경계서열에 의해 결정되며 좌우경계 사이의 DNA가 기주식물의 게놈에 삽입된다.

그림 2. 이중-형질전환에 의한 선발표지 유전자 제거방법



출처 : Ebinuma et al., 2001

⊗: 선발표지 유전자,
☆: 목표형질 유전자,
■: T-DNA border sequence.

* 두개의 다른 T-DNA로 선발표지 유전자와 목표형질 유전자를 서로 연관되지 않게 한 상태로 식물체에 도입하여 목표형질 유전자만을 가진 식물체의 교배를 통해 분리해 낼 수 있음.

이 방법에서 좀더 진보된 형태는 선발표지 유전자가 포함된 T-DNA 내에 음성 선발표지 유전자를 같이 포함시켜 선발표지 유전자가 제거된 형질전환 식물체만을 선택적으로 선발하는 방법이다. 대표적인 음성 선발표지 유전자로 *cod*A(cytosine deaminase), *ipt*(isopentenyl transferase) 등이 사용되는데, *cod*A 유전자의 경우 비독성인 5-fluorocytosine 화합물을 독성 5-fluorouracil로 변환시킨다. 따라서 서로 다른 두가지의 T-DNA를 함께 도입한 형질전환 식물체의 종자를 5-fluorocytosine 화합물이 첨가된 배지에서 발아시키면 선발표지와 음성 선발표지 유전자가 같이 포함된 T-DNA가 삽입된 식물체들은 생육이 지연되거나 괴사하게 되고, 세대분리 과정으로 목적유전자만이 분리된 식물체들은 영향을 받지 않고 발아하여 육안으로도 구분이 가능해 손쉽게 선발할 수 있다. 이러한 음성 선발표지 유전자를 이용하여 선택적으로 선발표지 유전자가 제거된 식물체만을 선발하는 방법은 이중-형질전환에 의한 선발방법뿐 아니라 위치-특이적 재조합효소에 의한 선발표지 제거방법에서도 적용하여 사용할 수 있어 매우 편리한 실험방법이다. 그러나 이중-형질전환 방법의 단점을 보완하기 위한 여러 실험적 진전에도 불구하고 이중-형질전환 방법은 무성번식 식물(Vegetatively propagated plant)과 나무와 같이 긴 생식세대를 갖는 식물에서는 사용하기 힘들며(Scutt *et al.*, 2002), 시간 소모가 다소 많고 같이 형질전환된 두 DNA가 염색체상에 연관되게 위치되면 분리되기 힘들다는 단점을 가진다(Konig 2003; Holger 2003).

다) 위치-특이적 재조합효소 매개 선발표지 제거방법

단일 효소에 의해 특정 목표 서열에 작용할 수 있는 여러 종류의 재조합 시스템이 박테리아, 효모 등에서 발견되어 식물에 적용되었다(Ow, 2002). 재조합 시스템의 인식부위 서열은 짧은 역반복(Inverted) 서열로 되어 있는 회문구조(palindrome)의 형태로 이루어져 있다. 예를 들어 설명하면 FLP/*FRT* 위치-특이적 재조합 시스템에서는 인식부위 DNA 서열인 *FRT*가 13bp의 DNA가 역방향 반복서열로 이루어져 있으며, 이 인식부위에 두개의 FLP 재조합효소가 결합해서 인식부위의 방향성과 위치에 따라 유전자의 절단과 삽입이 이루어지게 된다(그림 3).

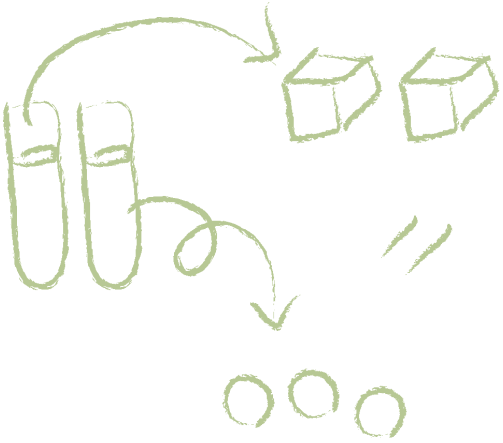
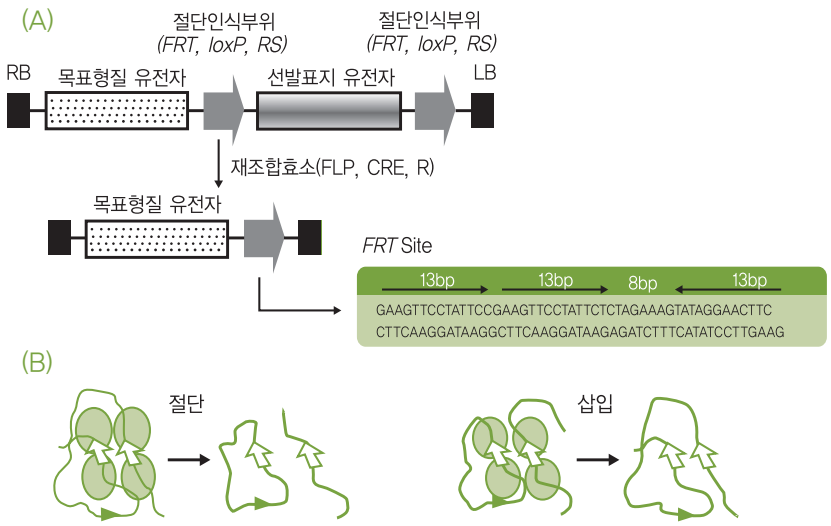


그림 3. 선발표지 유전자 제거를 위한 위치-특이적 재조합효소 시스템의 기본구조(A)와 위치-특이적 재조합효소에 의한 유전자의 절단 및 삽입과정(B)



위치-특이적 재조합 시스템들 가운데 선발표지 제거 목적으로 식물체 형질전환 연구에 많이 사용된 세가지 시스템은 박테리오파지 P1(bacteriophage P1)로부터 발견된 Cre/*loxP* 재조합 시스템과 *Saccharomyces cerevisiae* 유래의 FLP/*FRT* 재조합 시스템, *Zygosaccharomyces rouxii*의 R/RS 재조합 시스템이다. 이러한 시스템에서 선발표지 유전자의 제거는 형질전환 식물체에서 위치-특이적 재조합효소가 특이적 인식부위를 절단할 수 있다는 원리에 기초하고 있다.

재조합효소 시스템을 이용한 선발표지 유전자의 제거과정은 1) 목표형질 유전자와 재조합효소가 인식하는 두개의 인식부위 사이에 삽입된 선발표지 유전자를 가지는 T-DNA 운반체를 식물체에 형질전환하고, 2) 선발표지 유전자를 이용하여 T-DNA가 식물체의 게놈내에 삽입된 식물체를 선발한 후, 3) 재조합효소 유전자가 발현되는 식물체와 교배하거나 또는 재조합효소 유전자를 다시 형질전환 한다. 그 결과 식물체 내의 선발표지 유전자는 재조합효소에 의한 인식부위의 절단으로 식물체 내에서 분해되며, 이때 선발표지 유전자의 제거를 위해 사용된 재조합효소 유전자가 식물체 내의 목표형질 유전자 자리와 같은 염색체상에 있지 않다면 자식세대에서 일어나는 염색체의 유전자 분리과정에 의해 제거될 수 있다.

한편 자가-절단(Auto-exicion) 방법은 선발표지 유전자를 제거한 후 재조합효소를 제거하기 위한 세대 진전에 따른 유전자분리 과정의 번거로움과 시간을 줄이기 위해

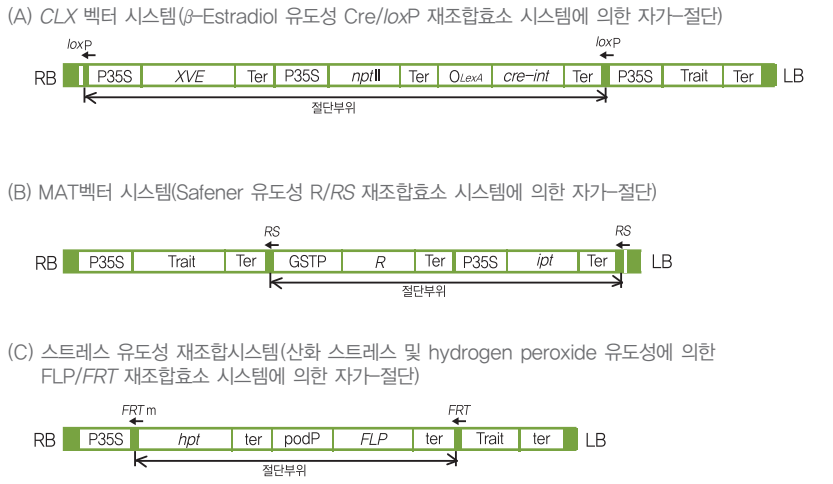
개발된 방법이다. 자가-절단 방법은 재조합효소 유전자를 목표유전자 및 선발표지 유전자와 같은 T-DNA에 위치시켜 재조합효소가 발현되도록 만드는 방법으로 재조합효소에 의해 선발표지 유전자와 함께 재조합효소 유전자도 함께 제거됨으로 기존방법에서 선발표지 유전자 제거 후 재조합효소 유전자를 없애기 위한 단계를 생략할 수 있고 감자와 같은 영양번식 식물에도 적용 가능하여 효과적이다.

자가-절단 방법에 의한 선발표지 유전자 제거기술은 최근에 효율성 향상을 위한 여러 연구 성과들로 인해 많은 진전을 이루고 있다. 위치-특이적 재조합효소를 이용한 자가-절단 방법이 개발된 초기에는 식물체에서 재조합효소의 발현목적으로 꽃양배추 모자이크 바이러스 유래의 항시발현 프로모터(CaMV 35S Promoter)가 많이 사용되었으나 재조합효소가 항시발현 프로모터에 의해 같은 양으로 계속 발현이 유도되면 식물체에서 비정상적인 표현형인 키메라 현상(chimerism)[3] 등의 문제가 발생할 수 있다(Coppoolse *et al.*, 2003).

이에 최근에는 이를 해결하고자 특정 화합물 처리에 의해 선택적으로 발현을 유도할 수 있는 프로모터를 이용하는 등 재조합효소를 발현시키는 시스템에 대한 연구가 활발히 추진되고 있다. 선택적 시기에 위치-특이적 재조합효소를 발현시켜 선발표지 유전자와 재조합효소 유전자를 함께 제거할 수 있는 유도성 자가-절단 시스템에는 CLX 벡터 시스템(Zuo *et al.*, 2001)과 MAT 시스템(Sugita *et al.*, 2000)이 대표적이며, 최근에는 스트레스 유도성 시스템(Woo *et al.*, 2009) 등이 보고된 바 있다(그림 4).

3) 키메라 현상은 한 식물체가 두 가지 이상의 표현형을 가지고 있음을 나타내는 용어로 식물체내의 기관 또는 조직(tissue) 내에 선발표지 유전자가 제거된 세포와 선발표지 유전자가 제거되지 않고 남아있는 세포가 혼재되어 있음을 말한다. 그러므로 선발표지 유전자에 대해 키메라 현상을 보이는 식물체에서의 선발표지 유전자 분리비는 맨델의 법칙과 일치되지 않는 현상을 보인다.

그림 4. 선발표지 유전자 제거를 위해 개발된 위치-특이적 재조합효소 매개에 의한 자가-절단 시스템



라) 선발표지 유전자 제거기술을 활용한 유전자이동 방지기술

GM작물에서 야생종 및 일반재배 작물로의 유전자이동 중 혼입경로는 화분과 종자를 통해서 이루어지게 된다. 그렇기 때문에 화분의 이동 등을 통해 자연계에 노출된 GM 작물의 외래유전자가 야생의 근연식물체로 이동하는 '유전자이동(Gene flow)' 문제는 GMO 안전성 분야의 가장 큰 화두 중의 하나이다. 선발표지 제거기술을 통해 종자와 화분에 의한 유전자이동을 방지할 수 있는 연구가 개발되고 있는데, 대표적인 연구 방법은 'gene-deletor' 라는 이름 붙여진 '위치-특이적 재조합효소 매개 방법' 이다.

이 시스템을 간단히 소개하면 종자와 화분에서만 발현되는 특이 프로모터에 의해 FLP 재조합효소가 발현되어 재조합효소의 특이적 인식부위가 절단되어 종자와 화분에 들어있는 외래유전자의 제거가 일어나게 되는데, 매우 특이한 점은 재조합효소의 인식부위로 *FLP* 재조합효소의 인식부위인 *FRT*를 사용하는 것보다 *lox*P-*FRT* fusion 서열을 사용하면 최대 100%까지 제거효율이 증가된다는 점이다(Luo *et al.*, 2007). 이러한 연구결과는 향후 선발표지제거 GM작물의 개발 및 유전자 이동 방지 연구에 매우 유용하게 이용될 수 있을 것이라 생각된다.

03

결론 및 전망

식량생산의 불균형으로 우리나라도 안전성평가 승인을 받은 제초제저항성 콩과 해충저항성 옥수수와 같은 유전자변형농산물이 수입되어 식품의 원료로 사용하고 있으며, 국내 연구자들을 중심으로 유전자변형(GM) 작물의 상업화를 추진하고 있다. 그러나 GM작물의 대중적 인식은 긍정적이지 못한 실정이다. GMO에 대한 좋지 않은 인식은 단순히 GM작물의 안전성 때문에 생긴 문제가 아니며, 대중매체 등을 통한 정확하지 못한 지식전달이 일반인에게 GM작물에 대한 막연한 거리감과 잘못된 인식형성에 영향을 미쳤을 것이라고 생각된다. 이러한 GM작물에 대한 오해는 관련 전문가의 활발한 홍보와 연구자의 연구개발 의지로 풀어갈 수 있을 것이다.

GM작물 개발의 흐름을 살펴보면 초기에 제초제저항성과 해충저항성과 같은 재배자 선호 위주의 특성을 지닌 작물들이 개발되었고, 현재는 두가지 이상의 특성을 지니는 GM작물이 다수를 차지하고 있다. 이러한 흐름으로 짐작하건데 미래의 GM작물은 소비자 선호 위주의 특성을 지닌 식물들이 차지하게 될 것이다. 소비자 선호 위주의 GM작물 개발은 단순히 소비자가 원하는 목적형질뿐 아니라 무선발표지(Marker-free) 제조와 같은 기술이 적용된 형태가 될 것이라 생각되며, 선발표지 제거방법은 현재의 기술수준에서는 이러한 요구에 부합하는 가장 효율적이며 활용도 높은 방법이라고 판단된다.

참고문헌

- Afolabi AS, Worland B, Snape J, Vain P (2005) Multiple T-DNA co-cultivation as a method of producing marker-free (clean gene) transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plant. African J Biotechnol 4:531-540.
- Coppoolse ER, Vroomen MJ, Roelofs D, Smit J, van Gennip F, Hersmus, BJM, Nijkamp HJJ, van Kaaren MJJ (2003) Cre recombinase expression can result in phenotypic aberrations in plants. Plant Mol Biol 51:263-279.
- Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Yamakado M (1997) Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2117-2121.
- Gelvin SB (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "Gene-Jockeying" tool. Microbiol Mol Biol Rev 67:16-37.
- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM (Eds.) An Introduction to Genetic Analysis, 8th edn., Freeman, San Francisco 2005, pp. 424-450.
- Holger P (2003) Marker-free transgenic plants. Plant Cell Tissue Org. Cult. 74: 123-134.
- Konig A (2003) A framework for designing transgenic crops - science, safety and citizen' s concerns. Nat. Biotechnol 21:1274-1279.
- Luo K, Duan H, Zhao D, Zheng X, Deng W, Chen Y, Stewart CN Jr, McAvoy R, Jiang X, Wu Y, He A, Pei Y, Li Y. (2007) 'GM-gene-deletor': fused *lox*P-*FRT* recognition sequences dramatically improve the efficiency of FLP or CRE recombinase on transgene excision from pollen and seed of tobacco plants. Plant Biotechnol J. 5:263-274.
- Miki B, McHugh S (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. J. Biotechnol. 107:193-232.
- National Research Council, Genetically modified pest-protected plants: science and regulation. National Academy Press, Washington, D.C. 2000.
- Ow, D.W. (2002) Recombinase-directed plant transformation for the post-genomic era. Plant Mol Biol. 48:183-200.
- Pierre-Henri G, Jean-Pierre H, Jacques A (Eds.) Gene avatars: The neo-darwininan theory of evolution, Kluwer Academic, New York 2002, pp. 174-175.
- Royal Society, Genetically modified plants for food use. The Royal Society, London 1998.
- Scutt CP, Zubko E, Meyer P (2002) Techniques for the removal of marker genes from transgenic plants. Biochimie 84:1119-1126.
- Sugita K, Kasahara T, Matsunaga E, Ebinuma H (2000) A transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency. Plant J. 22:461-469.
- Woo HJ, Cho HS, Lim SH, Shin KS, Lee SM, Lee KJ, Kim DH, Cho YG (2009) Auto-excision of selectable marker genes from transgenic tobacco via a stress inducible FLP/FRT site-specific recombination system. Transgenic Res. Epub ahead of print.
- Zuo JR, Niu QW, Moller SG, Chua NH (2001) Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. Nat. Biotechnol. 19:157-161.