

구기자나무(*Lycium chinense* Mill.)로의 *rolC* 유전자 도입에 미치는 요인

박용구* · 최명석 · 김병원¹ · 정원일² · 노광수³

경북대 임학과, ¹김천전문대 임상병리학과, ²한국과학기술원 생명공학과, ³계명대 생물학과

Factors Affecting Introduction of *rolC* Gene in *Lycium chinense* Mill.

Young Goo PARK*, Myung Suk CHOI, ¹Byung Won KIM, Won Il CHUNG², and ³Kwang Soo NOH

Kyungpook National University, Taegu, 702-701; ¹Dept. of Clinical Pathology, Kim Chun College, 740-200;

²Dept. of Life Science, KAIST, Taejon; and ³Dept. of Biology, Kiemyung University, Taegu, 704-701. *Corresponding author.

Transformation system of *rolC* gene, dwarf gene in *Lycium chinense* Mill. established by using system. Pin-punctured leaves induced numerous adventitious buds in abaxial side when cultured on 3/2 MS medium containing 2.0 mg/L zeatin. Survival rate and shoot regeneration frequency of leaf explants decreased as kanamycin sulfate level increased. Shoot buds were not regenerated on 3/2 MS medium containing 10 mg/L kanamycin sulfate and 2.0 mg/L zeatin. Of the level tested, 10 mg/L of kanamycin sulfate was optimum in selection of kanamycin sulfate resistant plant. Co-culture time of bacteria and leaf explants was affected at the frequency of shoot regeneration and survival of leaf explants. Leaf explants co-cultivated during above 48 hr severely decreased survival rate and shooting rate. Best result on survival rate and shooting rate were obtained when exposed for 24 h. 80 explants of 105 leaf explants survived on 3/2 MS medium containing 2.0 mg/L zeatin, and 10 mg/L kanamycin sulfate, and 15 shoots was regenerated on the same medium. To select kanamycin sulfate resistant plant, regenerant as cultured on 3/2 MS medium containing 10 mg/L kanamycin sulfate, and obtained 5 kanamycin resistant plants. Southern blot analysis conformed that the *rolC* gene was incorporated into the genomic DNA of kanamycin resistant plants.

Keywords: *Lycium chinense* Mill., pin-punctured leaves, transformation, *rolC* gene, regeneration

조직배양을 이용한 식물의 육종법으로는 체세포 변이체 선발법(Karp and Bright, 1985), 형질전환법(MeGranaham et al., 1990) 등이 있다. 배양조건을 달리하거나 배양과정 중에 유전자의 증폭, 재배열 및 돌연변이 등에 의해 특정 유전자가 활성화된 것을 선발하는 방법은 매우 우발적이고, 재현성이 매우 낮기 때문에 우량형질의 선발에 효율적이지 못하다(Scowcroft et al., 1987). 그러나 형질전환법을 통한 우량 개체선발법은 유전적으로 안정하고 조절이 용이하여 신품종 육성 및 유용이차대사산물 생산 등에 사용될 수 있을 것으로 전망된다.

유용외래 유전자를 식물체내로 도입시키는 방법으로는 *Agrobacterium* 벡터를 이용한 T-DNA 전이법(Fraley et al., 1986), 외래 DNA를 화학적인 방법을 통하여 식물체내로 직접 도입시키거나 흡수시키는 방법(Fromm et al., 1986), 원

형질체를 이용한 electroporation법(Crossway et al., 1986) 및 microprojectile법(Klein et al., 1987) 등이 있다. 그 중에서도 그람음성세균인 *Agrobacterium tumefaciens*와 *A. rhizogenes*의 T-DNA를 식물의 염색체 게놈 내로 삽입하는 방법이 많이 이용되고 있다(Klee and Rodgers, 1989). 이 방법은 형질전환 빈도가 비교적 높고, 도입된 유전자가 안정하다는 장점이 있기 때문에 형질전환에 매우 효과적인 것으로 알려져 있다(Puont-Kaerlas et al., 1989).

*Agrobacterium rhizogenes*에 관한 연구는 Hildebrand (1934)가 쌍자엽식물에서 모상근이라는 병을 유발시킨다고 보고한 이후 많은 연구가 이루어져 왔다. Moore (1979)는 모상근의 발생에는 Ri-plasmid가 관여한다고 밝혔고, Chilton (1982)은 Ri-plasmid의 T-DNA가 식물세포내로 전환됨으로써 유전적 형질전환이 이루어진다고 하였다. 형질전환된 조

직에서 opine 물질의 검출은 1975년 Waston에 의해 이루어졌고, Petit (1983)도 opine type에 따라 *A. rhizogenes*계통을 세가지 형으로 분류한 바 있다.

*Agrobacterium rhizogenes*의 TL-DNA에는 모상근 형성에 관여하는 *rol* A, B, C, D 유전자(Capone et al., 1989)가 있으며, 이들은 오옥신과 사이토키닌의 생합성에 관여하는 것이 아니라 오옥신 감수성을 증가시키는 역할을 한다(Schmulling et al., 1988). Ri-plasmid에 의해 형질전환된 모상근조직은 식물체로의 재분화가 가능할 뿐만 아니라 형질발현이 식물체의 일부분(지하부)에서만 일어나기 때문에 식물의 형질개량과 유용이차대사산물 등에 매우 유용하게 이용되어질 수도 있다(Parr et al., 1988). 또한 *rolC* 유전자는 식물을 소형화시키며, 잎과 꽃의 형태를 변화시키고(Schmulling et al., 1988), 자신의 프로모터 조절 하에서 사부조직에서만 유전자를 발현하는 특징을 가지고 있다(Sugaya and Uchimiya, 1992).

일반적으로 목본류의 형질전환은 적절한 재분화 체계가 확립되어 있지 않고, 형질전환에 적합한 조건이 확립되어 있지 않기 때문에 매우 힘든 것으로 알려져 있다. 본 연구의 재료인 구기자나무는 한국, 일본, 중국 등에 걸쳐 널리 분포하며, 과실은 강장제 등의 민간 한약제로, 소목은 식용, 관상용으로 사용되어지는 유용한 수종일 뿐만 아니라 가지 과 목본 식물이기 때문에 기내배양이 비교적 용이한 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 구기자나무의 엽절편으로부터 발근과 왜성형질을 지배하는 것으로 알려져있는 *rol C* 유전자를 도입하는 효과적인 형질전환 체계를 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

경북 임업시험장 포장에 식재된 5년생된 구기자나무 (*Lycium chinense* Mill.)의 종자를 채취하여 70%(v/v) 에탄올에 1분, 3%(v/v) 차아염소산나트륨에 1분, 3%(v/v) 과산화수소에 3분간 표면살균한 후 이것을 멸균수로 3회 수세하였다. 표면살균된 종자는 성장조절제를 함유하지 않은 MS (Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에 종자를 치상하여 25°C의 암소에서 발아시켰다. 발아된 유묘의 대량증식과 줄기신장은 Park 등(1993)의 방법으로 행하였으며, 이때 모든 배양조건은 3,000 lux 형광 하에서 16시간의 광주기로 해주었다.

Bacterial Strain

형질전환 실험에 사용된 helper strain은 *Agrobacterium*

tumefaciens LBA4404이며, pGA 643의 multicloning site에 CaMV 35S-*rol C* 유전자와, selection maker로서 NPT II가 삽입된 binary 벡터를 제작하여 사용하였다(Fig. 1).

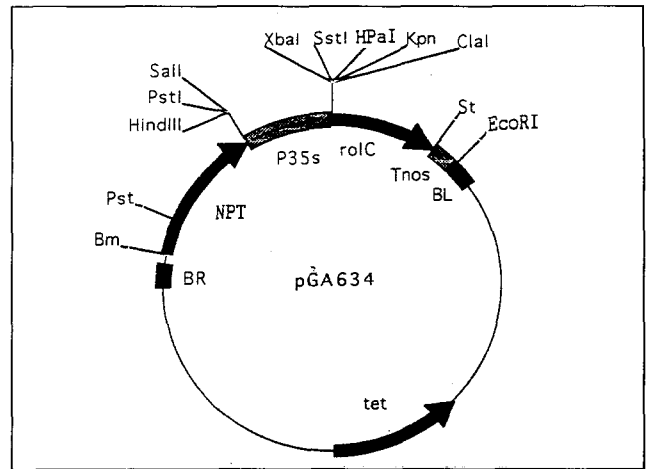


Figure 1. Structure of expression vector. P35S, 35S promoter; *rolC*, coding region of the ORF 12 genes of *Agrobacterium rhizogenes*; Tnos, nopaline synthase terminator; BR, T-DNA right border; npt, a chimeric nos-npt (nopaline synthase-neomycin phosphotransferase) that serves as a selectable marker in plants; tet, tetracycline resistance gene.

Kanamycin에 대한 내성검정

적정 kanamycin sulfate 선별농도를 조사하기 위하여 계대 배양한지 4주된 엽절편을 침으로 자극한 후 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mg/L의 kanamycin sulfate와 2 mg/L zeatin이 함유된 3/2 MS배지에 각각 4주간 치상하여 엽절편으로부터 유도된 줄기의 수를 조사하였다.

Agrobacterium에 의한 형질전환

MS고체배지에서 유지된 *Agrobacterium*은 50 mg/L kanamycin sulfate가 첨가된 YEP 액체배지에 접종하여 5×10^6 cell/mL 밀도로 맞추어 공동배양에 사용하였다. 공동배양 시간이 엽절편의 생존과 재분화율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기내에서 증식된 1-1.5 cm 크기의 엽절편을 침으로 10~20회 자극한 후 3/2 MS 기본배지에 박테리아 함께 24, 48, 72 시간 동안 공동배양 하였다. 공동배양된 엽절편은 멸균된 4겹의 거즈 위에 blot하여 여분의 균을 제거한 후 성장조절제가 들어있지 않은 3/2 MS배지에 옮겨 2~3일간 배양하였다. 그 후 엽절편은 500 mg/L carbenicillin이 첨가된 3/2 MS배지에서 2~3일 동안 배양하여 박테리아를 제거하였고, 10 mg/L kanamycin sulfate, 2 mg/L zeatin이 함유된 3/2 MS배지 25 mL가 든 페트리디쉬에 105개의 엽절편을 4주간 배양하여 잎의 색깔이 흰색으로

변하거나 고사한 잎수를 세워 생존율을 조사하였으며, 엽절편으로부터 유도된 줄기의 수를 조사하였다. 유도된 줄기는 형질전환 여부를 조사하기 위해 10 mg/L kanamycin sulfate가 첨가된 3/2 MS에 4주간 배양하여 살아남은 개체를 선발하였다.

Southern Blot 분석

Kanamycin sulfate가 첨가된 배지에서 선발된 식물체들만을 골라 Murray와 Tomson의 방법(1976)으로 핵 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA는 제한 효소 *EcoRI/HpaI*을 사용하여 digestion한 후, 0.8% agarose gel 상에 얹어 overnight 전기영동을 시행하였다. 분리된 DNA는 Nylon membrane으로 옮기고, 즉시 cross link시킨 후 probe와 hybridization을 시행하였다. 사용된 probe는 약 2.6 kb의 NPTII와 1 kb의 *rolC* coding sequence를 사용하였으며, 그 후 X-ray 필름에 노출시켜 밴드들을 확인하였다.

결과 및 고찰

침으로 자극된 엽절편을 2.0 mg/L zeatin이 함유된 3/2 MS배지에 배양하였을 때 잎표면으로부터 줄기가 재분화되었다(Fig. 3. A). 그러나 여러 농도의 kanamycin sulfate와 2.0 mg/L zeatin이 함유된 배지에 엽절편을 배양하였을 때는 kanamycin sulfate의 농도가 증가할수록 유도된 줄기수가 감소하는 것을 볼 수 있었다(Figure 2). 특히 Kanamycin sulfate 고농도 처리구에서는 엽조직의 표백화현상이 일어났으며, 이러한 엽조직에서는 줄기 재분화가 관찰되지 않았다. 특히 4.0 mg/L 이상의 농도에서는 줄기유발율이 급격히 감소되었으며, 10 mg/L에서는 줄기가 유도되지 않았다.

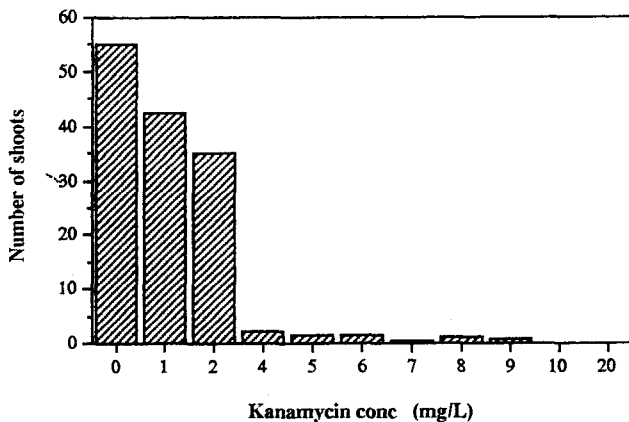


Figure 2. Number of adventitious shoots that formed on leaf explants of *L. chinense*. Explants were punctured with sharp pin and cultured on 3/2MS medium with 2.0 mg/L zeatin and various concentrations of kanamycin. Data were collected after 4 weeks of culture.

공시균주와 24시간동안 공동배양된 엽절편은 10 mg/L kanamycin sulfate와 2.0 mg/L zeatin이 함유된 줄기유도배지에 4주간 배양했을 때 엽표면으로부터 줄기가 유도되었다(Fig. 1B). 엽절편은 공동배양 시간에 따라서 생존율과 줄기 재분화에 매우 큰 영향을 미쳤다(Fig. 1). 엽절편의 생존율은 박테리아 용액에 dipping할 경우가 가장 높았으며, 배양 시간이 길수록 엽절편의 백색화가 관찰되었고, 생존율이 급격히 감소하는 것을 볼 수 있었다. 특히 48시간 이후는 생존율이 급격히 감소하기 시작하여 72시간 후에는 15% 정도의 생존율을 보였다. 줄기의 유도율은 48시간까지는 커다란 차이를 보이지 않았으며, 72시간 이후에는 재분화가 관찰되지 않았다. 줄기재분화에 가장 적합한 공동배양 시간은 24시간으로 나타났다.

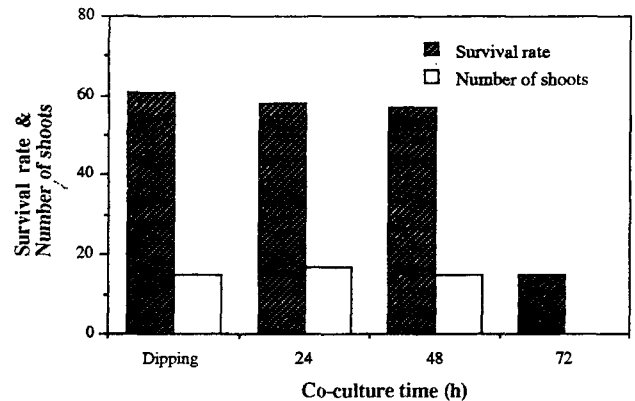


Figure 3. The survival rate of leaf explants and number of shoots formed on the explants of *L. chinense* after 4 weeks of culture.

Table 1. Frequency of survival, regeneration and transformation rate after co-cultivating *L. chinense* leaf explants and *A. tumefaciens*.

No. of explants	Survival frequency (%)	No. of regeneration	No. of kanamycin resistant plants
105	80	15	5(0.05%)

공시균주와 24시간 동안 공동배양된 엽절편을 10 mg/L의 kanamycin sulfate와 2.0 mg/L zeatin이 함유된 줄기유도배지에 배양한 결과, 105개의 엽절편 중 80개의 엽절편이 생존하였으며, 그 중에서 15개의 재분화된 줄기를 얻었다(Table 1). 재분화된 줄기들은 형질전환여부를 판명하기 위해 1차적으로 10 mg/L kanamycin sulfate가 함유된 배지에 옮겨 4주간 배양한 결과, 항생제 저항성을 가진 5개의 식물체를 선발할 수 있었다. 항생제 저항성을 가지는 식물체는 생장조절물질이 함유되어 있지 않은 MS배지로 옮겨 주었을 때 정상식물체와 같은 양상으로 줄기와 잎의 확장이 이루어졌다(Fig. 3D).

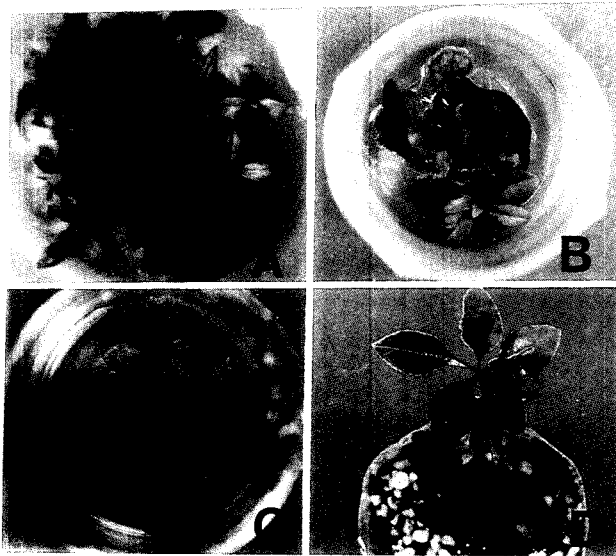


Figure 4. Transformation of rol C gene of *Lycium chinense* Mill. A: Shoot formation on punctured leaf explants cultured on 3/2 MS medium with 2.0 mg/L zeatin, B: Shoot formation on leaf explants cocultivation with *A. tumefaciens* in 3/2 MS medium with 10 mg/L kanamycin sulfate, and 2.0 mg/L zeatin, C: Selection of kanamycin resistant plant, left: kanamycin resistant plant, right: non transgenic plant, D: Transformed plants transplanted to potting soil.

2차적으로 *rolC*(약 1 kb) 유전자와 NPTII(약 2.6 kb) 유전자 도입의 유무를 검증하기 위하여 Southern Blot 분석을 실시한 결과, kanamycin sulfate 내성식물체에서 *rolC* probe의 coding sequence와 동일한 것으로 생각되는 1 kb 위치와 NPTII probe의 coding sequence와 동일한 것으로 생각되는 2.6 kb 위치에서 각각의 band를 확인할 수 있었다(Fig. 5). 이 개체는 perlite와 peatmoss가 1:1로 함유된 인공토에 옮겨 순화 중이며, 차대검정을 행할 예정이다.

약용식물에서 외래 유전자의 안정된 도입과 발현은 식물 유래 유용성분에 대한 유전적 조절 가능성을 제시해 주는데, 이러한 목적 달성을 위하여 *Agrobacterium* Ti 또는 Ri plasmid를 이용한 유전자 전이 기술은 매우 유용한 기술이라 할 수 있다(Saito et al., 1990). 그러나 목본류에서 유용유전자의 형질전환은 초본류에 비해 비교적 힘든 것으로 알려져 있다(Park et al., 1990, 1991). 본 연구에서 사용된 방법은 포플러, 가중나무, 아카시나무 등 목본류에서도 효과적으로 사용되어온 방법으로 실험이 비교적 간단하고, 캘러스로부터 기관발생이나 체세포 배발생을 이용하는 것보다 짧은 시일이 소요되는 등의 이점이 있다(Park and Son, 1988; Park et al., 1991).

적정 kanamycin sulfate선택 농도를 판정하기 위하여 여러 농도의 kanamycin sulfate가 첨가된 줄기 유도배지에 엽절편을 치상한 결과, 10 mg/L kanamycin sulfate농도가 적합한 것으로 나타났다. 이 농도는 *Populus* NC-5339의 경우 60 mg/L의 kanamycin sulfate농도에서(Fillatti et al., 1987),

Solanum melongena L.(egg plant)의 경우 100 mg/L의 kanamycin sulfate농도에서(Rotino and Gleddie, 1990) 행한 것 보다는 매우 낮은 것이다.

공동배양 배지에 여러 가지 농도(10^6 - 10^8 cell/mL)의 *Agrobacterium*를 첨가는 형질전환 빈도에는 큰 영향을 미치지 않았으며, 수종에 따라 다소 차이는 있었다. *Agrobacterium*의 첨가는 대체로 최소 농도로 첨가하는 것이 바람직한 것으로 알려져 있으며(An et al., 1986), 목본류인 *Populus*의 경우에서도 $5-10 \times 10^8$ cell/mL이 적당하다는 보고한 바 있다(Fillatti et al., 1987). 본 연구에서 사용한 $5-10 \times 10^6$ cell/mL 박테리아 농도는 다른 종에서 보고되어진 농도보다 낮은 농도이다.

박테리아의 농도보다 더 중요한 것은 공동배양 시간으로 나타났다. 본 연구에서는 엽절편을 박테리아 배양액에 dipping 해주었을 때 엽절편의 생존율이 가장 높았으며, 재분화율은 공동배양 시간에 따른 차이가 없었으나 24시간 배양이 가장 효과적인 것으로 나타났다. 이상과 결과로 보아 형질전환이 용이하지 않은 목본류에서 형질전환 효율을 높이기 위해서는 박테리아의 밀도를 낮추고, 공동배양 시간을 길게 하는 것이 양호할 것으로 사료된다.

엽절편을 *Agrobacterium*과 공동배양 한 후 kanamycin sulfate가 함유되지 않은 줄기 유도배지에서 전배양(pre-culture)은 형질전환 빈도를 높이는 것으로 알려져 있다(Nehra, et al., 1990). 본 실험에서도 공시균주와 24시간 동안 공동배양된 엽절편을 성장조절제가 첨가되지 않은 3/2 MS배지에 치상하여 2-3일간 전배양 하였다. Kanamycin sulfate첨가 배지에서 엽절편체가 고사하거나 줄기재분화율이 낮은 이유는 배지와 접촉하고 있는 엽절편 부위가 표백화 됨으로서 성장호르몬과 영양공급이 차단되기 때문이거나, 형질전환된 단일 세포들이 선발압(selection pressure)을 이기지 못하기 때문인 것으로 생각된다. 본 연구에 사용한 엽절편의 전배양은 앞서 언급한 문제점들을 어느 정도 극복할 수 있을 것이다.

1차적으로 NPTII 유전자의 도입 유무를 검증하기 위하여 재분화된 줄기들을 10 mg/L의 kanamycin sulfate가 함유된 배지에 옮겨 4주간 배양한 결과, 항생제에 대해서 저항성을 가진 5개의 소식물체를 선발할 수 있었다. 이러한 결과는 *Solanum melongena* L. (egg plant)의 경우 195개의 엽절편 중 7.6%의 형질전환율 보고(Rotino and Gleddie, 1990), strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) cv redcoat의 경우 340개의 엽절편 중 50 µg/mL의 kanamycin sulfate농도에서 형질전환 식물체를 선발하였을 때 3%의 형질전환율을 보였다는 보고(Nehra et al., 1990b), *Populus*의 경우 60 mg/L의 kanamycin sulfate농도에서 32%의 형질전환율을 보였다는 보고(Fillatti et al., 1987)와는 다소의 차이가 있었다. 이것은 *Agrobacterium*의 숙주범위의 차이에 의하거나, 구기자 식물체의 조직이 매우 유연하여 박테리아 공동배양 과정에서

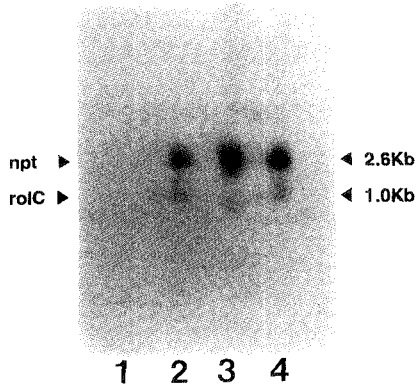


Figure 5. Southern blot analysis of *rolC* negative regenerants and *rolC*-positive of *Lycium chinense* Mill. Lane 1: *rolC* negative regenerant, lanes 2 and 4: transformed plants 1 and 2, lane 4: positive control (*rolC*-3'NOS and NPT II digested with

EcoRI and *HpaI*).

많은 해를 입었기 때문에 사료된다.

형질전환 유무를 생화학적으로 확인하기 위해 Southern blotting을 행한 결과 선발된 kanamycin 내성식물체에서 약 1 kb의 *rolC* 유전자의 coding sequence와 동일한 것으로 생각되는 1 kb위치의 밴드를 확인할 수 있었으며, 2.6 kb의 NPT II 유전자의 sequence로 생각되는 밴드가 확인되어 형질전환 식물체임을 확인할 수 있었다. 이상의 결과는 일반적으로 식물 형질전환이 비교적 힘든 것으로 알려져 있는 목본류의 유용유전자 도입에 효과적으로 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

사 사 - 이 논문은 1992년 학술진흥재단 연구비의 일환으로 수행 되었으며, 이에 감사한다.

적 요

효과적인 형질전환 시스템을 이용하여 왜화유전자인 *rolC* 유전자를 구기자나무로의 형질전환 시스템을 확립하였다. 침으로 자극된 엽절편을 2.0 mg/L zeatin이 함유된 3/2 MS배지에 배양하였을 때 엽표면으로부터 줄기재분화가 되었다. 그러나 여러 농도의 kanamycin sulfate와 2.0 mg/L zeatin이 함유된 배지에 엽절편을 배양하였을 때는 kanamycin sulfate의 농도가 증가할수록 줄기 유발수가 감소하는 것을 볼 수 있었으며, 적정선발농도는 10 mg/L이었다. 엽절편은 공동배양 시간에 따라서 생존율과 줄기재분화에 매우 큰 영향을 미쳤다. 엽절편의 생존율은 dipping할 경우가 가장 좋았으며, 배양시간이 길수록 엽절편의 백색화가 관찰되었고, 생존율이 급격히 감소하는 것을 볼 수 있었다. 줄기재분화에 가장 적합한 공동배양 시간은 24시간으로 나타났다. 공시균주와 24시간 동안 공동배양한 엽절편을 10 mg/L의 kanamycin sulfate와 2.0 mg/L zeatin이 함유된 줄기 유도배지에 배양한 결과, 105개의 엽절편 중 80개의 엽절편이 생존하였으며, 그 중에서 15개의 재분화된 줄기를 얻었

다. 재분화된 줄기들은 형질전환여부를 판명하기 위해 1차적으로 10 mg/L kanamycin sulfate가 함유된 배지에 옮겨 4주간 배양한 결과, 항생제에 대해서 저항성을 가진 5개의 식물체를 선발할 수 있었다. 2차적으로 *rolC* 유전자와 NPT II 유전자 도입의 유무를 검증하기 위하여 Southern 분석을 행한 결과, 구기자의 형질전환 식물체에서 *rolC* 유전자 probe의 coding sequence와 동일한 것으로 생각되는 1kb위치와 NPT II probe의 coding sequence와 동일한 것으로 생각되는 2.6kb 위치에서 각각의 밴드를 확인할 수 있었다.

인 용 문 헌

- An G, Watson BD, Chiang CC (1986) Transformation of tobacco, tomato, potato, and *Arabidopsis thaliana* using a binary Ti vector system. *Plant Physiol* 81: 301-305
- Capone I, Spano L, Cardarelli M, Bellincampi D, Petit A, Constantio P (1989) Induction and growth properties of carrot roots with different complements of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *Plant Mol Biol* 13: 43-52
- Chilton MD, Tepfer DA, Petit A, Delvert F, Tempe J (1962) *A. rhizogenes* inserts T-DNA into the genome of the host plant root cell. *Nature* 295: 432-434
- Crossway A, Oakes JV, Irvine JM, Ward B, Knauft VC, Shewmaker CK (1986) Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Mol Gen Genet* 202: 179-185
- Fillatti JJ, Sellmer J, McCown B, Haissig B, Comai L (1987) *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. *Mol Gen Genet* 206: 192-199.
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB (1986) Genetic transformation in higher plants. *Critical reviews in Plant Sciences* 4: 1-46
- Fromm ME, Taylor LP, Walbot V (1986) Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature* 319: 791-793
- Hildebrand EM (1934) Life history of the hairy root organism in relation to its pathogenesis on nursery apple trees. *J Agric Res* 48: 857-885
- Karp A, Bright SWJ (1985) On the cause and origins of somaclonal variation. *Oxford Survey Plant Mol Cell Biol* 2: 199-234
- Klee HJ, Rodgers SG (1989) Plant transformation systems based on the use of *Agrobacterium tumefaciens*. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plant* 6: 1-23
- Klein TM, Wolf E, Wu R, Sanford JC (1987) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327: 70-73
- MeGranahan GH, Charles AL, Sandra LU, Abhaya MD (1990) Improved efficiency of the walnut somatic embryo gene transfer system. *Plant Cell Rep* 8: 512-516
- Moore L, Warren G, Strobel G (1979) Involvement of a plasmid in the

- hairy root disease of plants caused by *Agrobacterium rhizogenes*. Plasmid 2: 616-626
- Murashige T, Skoog F** (1962) Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Nehra NS, Chibbar RN, Kartha KK, Datla RSS, Crosby WL** (1990) Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system. *Plant Cell Rep* 9: 293-298
- Park YG, Son SH** (1988) In vitro organogenesis and somatic embryogenesis from punctured leaf of *Populus nigra* x *P. maximowiczii*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 15: 95-105
- Park YG, Shin DW, Kim JH** (1990) Factors affecting *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus nigra* x *P. maximowiczii*. *J Korean For Soc* 79: 278-284
- Park YG, Shin DW, Choi MS, Moon EP, Kim HJ** (1991) Transformation of Cab gene into hybrid poplar (*Populus koreana* X *P. nigra*) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Korean J Plant Tissue Culture* 18: 323-330
- Parr AJ, Peerless ACJ, Hamill JD, Walton NJ, Robins RJ, Rhodes MJC** (1988) Alkaloid production by transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep* 7: 309-312
- Petit AC, David G, Dahl J, Ellis P, Guyon F, Casse-Delvar, Tempe J** (1983) Further extension of the opine concept: plasmid in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol Gen Genet* 190: 204-214
- Puonti-Kaerlas J, Stable P, Erickson EJ** (1989) Transformation of Pea (*Pisum sativum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 8: 321-324
- Rotino GL, Gleddie S** (1990) Transformation of eggplant (*Solanum melongena* L.) using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Plant Cell Rep* 9: 26-29
- Saito K, Kaneko H, Yamazaki M, Yoshida M, Murakoshi I** (1990) Stable transfer and expression of chimeric genes in licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) using an Ri plasmid binary vector. *Plant Cell Rep* 8: 718-724
- Scowcroft WR, Bretell IS, Ryan SA, Davis PA, Pallotta MA** (1987) Somaclonal variation and genomic flux. In CE Green, DA Somers, WP Hackett, DD Biesboer, eds, *Plant Tissue and Cell culture*. Vol 3. Alan R Liss, Inc pp 275-286
- Schmulling T, Schell J, Spina A** (1988) Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. *EMBO J* 7: 2621-2629
- Sugaya S, Uchimiya H** (1992) Deletion analysis of the 5'-upstream region of the *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid rol C gene required for tissue specific expression. *Plant Physiol* 99: 464-467

(1994년 11월 10일 접수)