

Petunia hybrida 세포내로의 rolC 유전자의 도입

정재동¹ · 김경민* · 남윤연¹ · 김창길² · 정원일³

경북대학교 농학과, ¹경북대학교 원예학과, ²상주대학교 원예학과, ³한국과학기술대 생명과학과

Introduction of rolC gene into Petunia hybrida

CHUNG, Jae Dong¹ · KIM, Kyung Min* · NAM, Yun Yeon¹ · KIM, Chang Kil² · CHUNG, Won Il³

Department of Agronomy, College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea

¹Department of Horticulture, College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea

²Department of Horticulture, Sangju National University, Sangju, 742-711, Korea

³College of Natural Science, Korea Advanced Institute of Science & Technology, Taejon, 305-701, Korea

ABSTRACT These experiments were attempted to introduce *rolC* gene in the *Petunia hybrida* cv. Titan white by *Agrobacterium* mediated. The maximum frequency of shoot regeneration was obtained by 60% on MS medium containing 1.0 mg/L BA, 0.1 mg/L NAA, 200 mg/L kanamycin, 500 mg/L carbenicillin, 30 g/L sucrose, and 8 g/L agar. Kanamycin-resistant calli were selected from petunia leaf discs by cocultivation with *Agrobacterium* suspension cultures on MS medium. The addition of AgNO₃ and KMnO₄ in the medium increased the shoot regeneration by 31.3% from leaf disc as compared with non-treated leaf disc. Among clones exhibiting kanamycin resistance, only 3 clones were confirmed by southern hybridization analysis.

Key words: *Petunia*, *rolC*, transformant, leaf disc

서 론

지난 십여년간 기존의 육종방법으로는 얻기 어려운 정보들을 분자생물학적 기술의 도입으로 가능케 되었으며 그 중 가장 획기적인 발전의 하나는 분리된 외래유전자의 식물체 내로의 직접 도입이며 최초로 얻은 형질전환식물은 *Agrobacterium tumefaciens*를 매개로 한 담배였다 (Horsch et al. 1984). 형질전환에 이용되는 고등식물용 운반체로는, 자연적인 감염기작을 이용한 *Agrobacterium* spp.의 Ti, Ri plasmid (An et al. 1988), Cauliflower mosaic virus, 간단한 세균 플라스미드 등이 있으며 이외 직접도입법에는 polyethylene glycol을 사용하여 원형질체로의 DNA 도입을 촉진하거나 (Potrykus et al. 1985), 전기자극으로 막의 일시적인 변화를 일으켜 DNA를 집어넣는 electroporation법, 최근에는 원형

질체로부터의 식물체 재분화의 어려움을 극복하기 위하여 식물의 조직을 직접 이용하는 particle gun이나 particle bombardment법이 보편화되고 있다 (Prakash and Varadarajan 1992; Krol et al. 1990). 이러한 유전공학적 기법으로 외래유전자를 식물체내로 도입하여 형질전환된 원예작물은 *Brassica* (Guerche et al. 1987), 국화 (Jong et al. 1993), 사과 (Bondt et al. 1994), 카네이션 (White and Nester 1980), 포도 (Martinelli and Mandolino 1994), 튜울립 (Wilmink et al. 1992), 잇꽃 (Ying et al. 1982) 등이 있다. 또한 제초제, 병그리고 해충에 대한 저항성 유전자를 작물에 도입하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 실험에 공시된 *rolC* 유전자를 도입한 예는 atropa, 담배, 감자, 유채 등이 있으며, *rolC* 유전자에 의한 초장의 왜화는 절간 길이가 짧아지고 잎이 쭈글쭈글해지고 정아우세가 상실되는 특징을 갖고 있다 (Oono et al. 1990). 본 실험에서는 *petunia*의 엽조직으로부터 식물체 재분화에 미치는 식물생장조절제의 적정농도 구명과 에틸렌 억제제가 첨가된 형질전환 선발배지에서 형질전환체 분화율을 높이고, 왜화유전자로 알려진 *rolC* 유전자 (Kurioka et al. 1992)

*Corresponding author. Tel 053-950-5711
E-mail kyungminkim@hotmail.com

를 *petunia*의 엽조직에 감염시킨 후 형질전환체를 얻은 것을 보고하는 바이다.

재료 및 방법

식물재료 및 균주준비

Petunia hybrida cv. Titan white의 종자를 살균된 부엽토에 피종하며 일장 16시간, 광도 1,500 lux, 온도 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 70%의 성장상에서 5~7주 동안 생육한 완전 전개된 엽폭 3~4 cm의 건전한 잎을 공시재료로 사용하였다. 공시균주는 *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404를 host strain으로 하고 pGA643의 multicloning site에 *rolC*가 삽입된 (pGA643-*rolC*) 표지유전자로 neomycin phosphotransferase gene II (NPT II)를 Ti-plasmid의 T-DNA border sequence 사이에 가지는 binary vector이다 (Kim et al. 1997). 균주의 배양은 kanamycin 50 mg/L와 tetracycline 25 mg/L가 첨가된 YEP (1% yeast extract, 1% Bacto peptone, 0.5% NaCl) 고체 배지에서 형성된 single colony를 취하여

Table 1. Components of media for transformation of *Petunia hybrida*.

Supplements ^a		Media ^b			
		GM	PM	SM	RIM
Salt*	Vitamin	MS	MS	MS	1/2MS
Sucrose	g/L	30	30	30	30
BA	mg/L	-	1.0	1.0	-
NAA	mg/L	-	0.1	0.1	-
Agar	%	0.80	0.85	0.85	0.8
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8
Kanamycin	mg/L	-	-	200	50
Carbenicillin	mg/L	-	-	500	-

*BA : 6-Benzylaminopurine ; NAA : α -Naphthaleneacetic acid.

^bGM : germination media ; PM : pretreatment media ; SM : selection media ; RIM : root induction media ; MS : Murashige and Skoog media.

kanamycin 25 mg/L와 tetracycline 10 mg/L가 포함된 동일 액체 배지에서 28°C , 암상태로 16~20시간, 150 rpm으로 현탁배양한 후, 동일 조건으로 1회 계대 배양하여 cocultivation에 사용하였다.

식물체 재분화 조건

*Petunia*에 사용된 발아용 배지 및 형질전환을 위한 전처리 배지, 신초 유기용 선발 배지, 뿌리 유기용 배지를 정리하면 table 1과 같다. Leaf disc에서 형성된 callus로부터 식물체 재분화에 미치는 성장조절물질의 영향을 알아보기로 MS배지 (Murashige and Skoog, 1962)에 0.1 mg/L NAA와 0.5~4.0 mg/L 2ip 및 0.5~2.0 mg/L BA를 농도별로 첨가한 배지에 치상하여 배양하였으며 배양 2개월 후 재분화 여부를 조사하였다.

형질 전환

실험에 사용한 binary vector인 pGA643-*rolC*는 식물체의 형질전환시 선발 marker로 kanamycin 저항성을 갖도록 하므로 형질전환된 식물체 선발을 위한 *petunia* 엽절편체의 kanamycin 내성을 검정하기 위해서 0~400 mg/L kanamycine을 첨가한 배지에 배양하였다. 형질전환방법은 *petunia*의 잎을 따서 전착제 (0.1% Tween 20)를 섞은 0.5% NaOCl용액에 15분간 침지시켜 표면살균을 하고 멸균된 증류수로 세 번 세척한 후 멸균된 여과지에 흡습 시킨 후, 엽맥을 중심으로 한 변이 1.0 cm 되게 정사각형으로 잘라서 식물생장조절제와 항생제가 첨가되지 않은 GM배지에 1~2일 정도 치상하였다. 잎의 상표면이 배지에 닿도록 하여 배양한 잎절편을 pGA643-*rolC*를 가진 40 μL *Agrobacterium* 을 5 mL의 MS 액체 배지에 섞어 PM배지를 분주한 샬레 ($\phi 55$ mm)에서 24~48시간 cocultivation하였다 (Kim 1991). Cocultivation 후 잎을 건져 멸균수로 세 번 수세하여 여과지에 흡습시킨 후, 1~5 mg/L AgNO_3 와 1~5 mg/L KMnO_4 를 첨가한 SM 배지에 옮겼다. 배지는 14일마다 새로운 배지로 교환해 주었

Table 2. Effect of growth regulators on callus and shoot formation of *P. hybrida*.

Plant growth regulators (mg/L)				No. of explants cultured (A) ^a	Callus	Shoot (B) ^b	Root	B/A (%)
NAA	0.1	2iP	0.5					
			1.0	35	20	15	2	43
			2.0	35	18	18	-	51
			4.0	35	19	22	2	63
NAA	0.1	BA	0.5	35	23	12	1	34
			1.0	35	18	21	2	60
			2.0	35	17	23	1	66

^aA : Total number of leaf disc.

^bB : The number of leaf disc forming shoots were scored after 8 weeks of culture.

으며 30~45일 후 엽절편 가장자리로부터 callus나 또는 잎이 재분화되는 것을 조사하였다. 1 cm 이상 자란 shoot를 RIM 배지로 이식한 다음 20~40일 후 발근된 개체를 vermiculite와 모래 및 부엽토가 1:1:1로 혼합된 배양토에 이식하여 활착시킨 후 *rolC* 유전자의 형질전환 여부를 조사하였다.

형질전환 여부검정

형질전환 여부 검정을 위하여 SM배지에서 선발된 식물체와 정상식물체의 잎 1g을 이용해서 Murray와 Thompson의 방법 (1980)에 준하여 식물체의 genomic DNA를 추출하였다. Genomic DNA를 제한효소 *EcoR* I과 *Hpa* I으로 double digestion하여 Southern (1975)의 capillary transfer 방법으로 nylon membrane에 옮긴 다음 준비된 probe와 hybridization 하여 X-ray film에 노출시켰다. Probe의 제작은 100 μ L의 competent *E. coli* cell (JM109, $A_{600}=0.8\sim1.0$)과 15 ng의 pGA643-*rolC*를 형질전환하여 그 균을 액체배지 10 mL에 접종하여 37°C에서 12시간 200 rpm으로 키운 후 Alkaline lysis법 (Sambrook et al. 1989)으로 DNA를 분리하여 *EcoR* I과 *Sma* I으로 double digestion하여 이용하였다.

결과 및 고찰

*Petunia hybrida*의 엽조직으로부터 식물체 재분화에 미치는 식물생장조절물질의 효과를 조사한 결과는 table 2에서 보여 주었다. 0.1 mg/L NAA와 4.0 mg/L 2ip의 조합과 0.1 mg/L NAA와 2.0 mg/L BA 조합에서 식물체 재분화율은 각각 63%와 66%로 높으나 선단부위에 다발 측지가 발생하거나 비정상적인 잎이 분화되는 현상을 관찰하였다. 또한 고농도의 2ip가 첨가된 배지에서는 유리화가 발생하였다.

0.1 mg/L NAA와 0.5 mg/L BA 조합에서는 식물체 마디가 굵고 매우 양호하였으나, 신초 유기율은 매우 낮았다 (Figure 1). 0.1 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA의 조합에서 식물체 재분화율은 60%로 높게 나타났으며 식물체도 매우 양호하였다. 본 실험에서와 같이 2.0 mg/L BA에서 비록 shoot 형성이 가장 높다고 하지만 양호한 식물체 재분화는 0.1 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA의 조합이다. 이러한 결과는 Aeom 등이 (1996) *Petunia hybrida* cv. Burpee에서 보고한 0.1 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA의 조합에서 식물체 재분화가 가장 양호하였다고 한 연구결과와 일치하는 경향이였다.

형질전환된 식물체 선발을 위한 kanamycin저항성의 적정 농도를 정하기 위해서 kanamycin을 농도별로 넣은 배지를 만들어 *petunia* 잎을 치상한 결과, 100 mg/L kanamycin농도에서 저해를 받기 시작하여, 200 mg/L kanamycin부터는 치상한 잎들이 완전히 갈변하여 고사하였다 (Table 3). Aeom

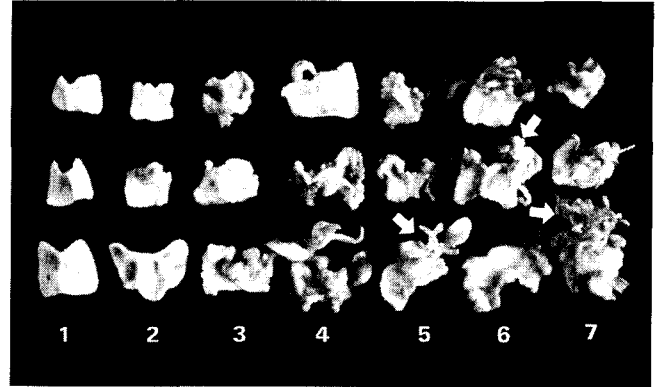


Figure 1. The effect of different combination of phytohormone on shoot regeneration from petunia leaf discs. Total treatment (1: 0.1 mg/L NAA, 0.5 mg/L 2ip ; 2: 0.1 mg/L NAA, 1.0 mg/L 2ip ; 3: 0.1 mg/L NAA, 2.0 mg/L 2ip ; 4: 0.1 mg/L NAA, 4.0 mg/L 2ip ; 5: 0.1 mg/L NAA, 0.5 mg/L BA ; 6: 0.1 mg/L NAA, 1.0 mg/L BA ; 7: 0.1 mg/L NAA, 2.0 mg/L BA). Arrow marks are shoot regeneration.

Table 3. Effect of kanamycin concentration on the survival of petunia leaf disc.

Km conc. (μ L/mL)	Control	15	30	60	100	200	300	400
Survival of leaf disc	+++	+++	+++	++	+	-	-	-

+++ : very good, ++ : good, + : bad, - : dead.

등 (1996)은 *petunia*의 형질전환 선발 marker로 이용된 kanamycin의 농도를 100 mg/L에서 선발하였고, Martinelli와 Mandolino (1994)는 포도 (*Vitis rupestris* S.)의 형질전환체를 100 mg/L kanamycin농도에서 선발하였고, Oono 등 (1990)은 담배의 형질전환 여부를 300 mg/L kanamycin농도에서 선발을 시도한 것으로 볼 때 항생제의 농도는 대상작물과 처리부위에 따라 달라져야 할 것으로 사료된다. 따라서 본 실험에서는 형질전환된 식물체 선발배지의 kanamycin 적정 첨가농도를 200 mg/L로 정하였다.

형질전환 식물체를 획득하기 위하여 $AgNO_3$ 와 $KMnO_4$ 를 함유한 SM배지에 *Agrobacterium*과 엽절편을 24시간 cocultivation한 후 식물체 재분화율을 조사한바 (Table 4), SM배지에 첨가한 에틸렌 억제제인 $AgNO_3$ 와 $KMnO_4$ 의 첨가효과는 고농도로 갈수록 식물체 재분화율이 크게 높아졌으며, $AgNO_3$ 에 비해 5 mg/L $KMnO_4$ 처리구에서 식물체 재분화율이 31.3%로 가장 높게 나타났다. 그러나 $AgNO_3$ 와 $KMnO_4$ 의 고농도 첨가시 다소의 유리화 현상이 발생하였으며 3 mg/L $KMnO_4$ 첨가시 식물체 재분화 효율이 높았다. Kurioka 등 (1992)이 *Atropa belladonna* 엽조직의 CaMV 35S-*rolC* 형질전환시 보고한 6.25% (100 mg/L kanamycin첨가)의 식물체 재분화율을 얻었다고 보고하고 있고, Aeom 등 (1996)은 *petunia*의 형질전환실험에서 선발배지로부터 식물체 재분화율은 33.3%로 보고하고 있어서 본 실험과 유사한 결과를

Table 4. Effect of ethylene inhibitors on shoot regeneration from leaf disc of *P. hybrida*.

Ethylene inhibitors (mg/L)		No. of explants cultured (A)	Callus (B) ^a	Shoot (C) ^b	B/A(%)	C/A(%)
AgNO ₃	1	50	27	1	54.0	2.0
	3	57	49	2	86.0	3.5
	5	41	33	7	80.5	17.1
KMnO ₄	1	45	36	9	80.0	20.0
	3	42	40	12	95.2	28.6
	5	48	37	15	77.1	31.3
Control		80	55	1	68.8	1.3

^aB: The number of leaf disk forming callus were scored after 4 weeks of culture.

^bC: The number of leaf disk forming shoots were scored after 4 weeks of culture.

나타내고 있다. 식물조직배양에서 배지내에 에틸렌 억제제를 첨가하면 배형성이나 식물체 재분화율이 증가되는 것을 알 수 있는데 Roustan 등 (1989)은 당근의 세포현탁배양에서 CoCl₂와 NiCl₂를 첨가하면 배형성이 촉진된다고 하였다. Chraïbi 등 (1991)은 해바라기의 자엽을 20 µM의 AgNO₃가 첨가된 배지에 배양했을 때 식물체 재분화율이 무처리에 비해 크게 증가된다고 하였으며, Chi 등 (1990)은 *Brassica campestris*의 자엽과 하배측배양에서 AgNO₃ (20~30 µM)가 식물체 분화율을 향상시킨다는 것을 보고하였다. 유채 (Kim et al. 1997)의 자엽을 이용한 형질전환시 배지내에 3 mg/L AgNO₃를 첨가하면 식물체 재분화율이 17.5%로 크게 향상시키는 경향이 있음을 보고한 바 있어 이로 미루어 형질전환시 에틸렌 억제제의 배지내 첨가는 식물체의 품종간에 차이는 있으나 비교적 식물체 재분화에 촉진적인 효과가 있는 것으로 나타났다.

재분화된 shoot는 재분화체 선발배지보다 항생제 농도가 낮은 50 mg/L kanamycin이 포함된 RIM배지로 옮기고 2주 후, 뿌리가 왕성하게 자란 개체를 vermiculite에 1/2 MS (sucrose free) 액체배지를 첨가한 배지로 옮겨 순화시킨 후

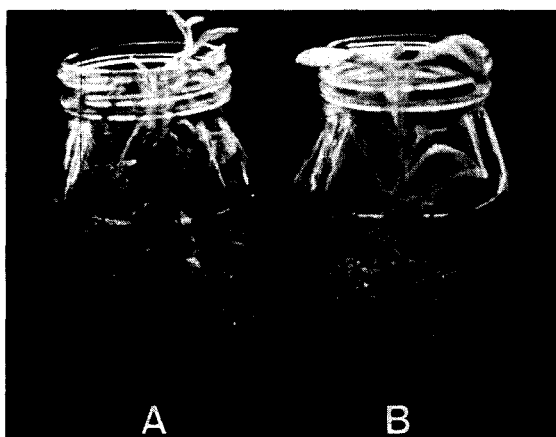


Figure 2. Morphological features of transformed and nontransformed *Petunia hybrida*. A: Transgenic plants, which shows reduced apical dominance. B: Nontransformed plant.

pot로 이식하였다 (Figure 2).

Petunia hybrida cv. Titan white의 엽절편에 CaMV 35S-*rolC* gene의 형질전환한 후 얻어진 식물체 중 kanamycin 저항성이 보이며 뿌리발생이 왕성한 6개체를 선발하였다. 식물체 genome내로의 외래 유전자 삽입 여부를 조사하기 위하여 kanamycin 저항성을 보이는 6개체의 식물체에서 genomic DNA를 분리하여 제한효소 *EcoRI* 과 *HpaI*으로 double digestion처리하고 형질도입에 사용한 binary vector CaMV 35S-*rolC*를 probe로 사용하여 Southern hybridization analysis를 한 결과 1, 3, 5 lane에서 1.0 kilobase의 band가 확인되었다 (Figure 3). 나머지 3개체는 CaMV 35S-*rolC* gene이 함유되지 않은 것으로 생각된다. Kanamycin이 첨가된 배지에서 선발하여 배양하였음에도 재분화된 식물체 모두가 형질전환되지 않은 것은 식물체 재분화에 이용된 엽절편체로부터 식물체로 분화되는 동안 kanamycin 내성을 지닌 세포에서 생성하는 식물호르몬의 양으로 인접해 있는 정상체

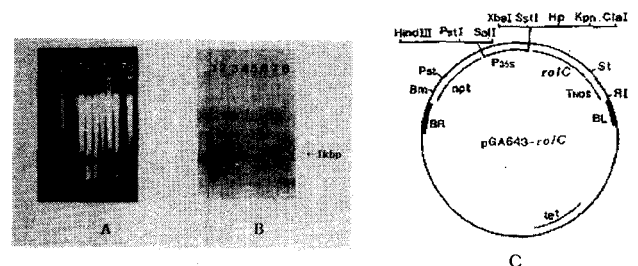


Figure 3. Southern hybridization analysis of DNA from transgenic and nontransgenic plants. A: Total DNA digested with *EcoRI*-*HpaI* (Lane 1~6: kanamycin-resistant plants transformed with pGA 643-*rolC*; Lane 7: probe *rolC*., Lane 8: nontransformational plant). B: Total DNA digested with *EcoRI* and *HpaI* was hybridized with [³²P] labelled probe (Lane 1, 2, 4: transformed with pGA 643-*rolC*; Lane 7: probe *rolC*; Lane 8: nontransformational plant). C: Structure of the expression vector. CaMV 35s promoter; *rolC*, coding region of the ORF 12 gene of *Agrobacterium rhizogenes*; Tnos, nopaline synthase terminator; BR, T-DNA right border; BL, T-DNA left border; NPT, chimeric nos-npt (nopaline synthase-neomycin phosphotransferase) that serves as a selectable marker in plants; Tet, tetracycline resistance gene.

포 즉 형질전환되지 않은 세포가 생육할 수 있다는 보고 (Scoristan and Melcher 1987; Chung et al. 1992; Aeom et al. 1996)와 유사한 현상이 본 실험에서도 나타난 것으로 판단된다. 이상에서 볼 때 Southern hybridization analysis법을 통해 CaMV 35S-*rolC* gene이 식물체내에 삽입된 것으로 확인되었으며, *rolC* gene의 식물체내에서의 생리적, 유전적인 작용을 명확하게 규명하기 위해 후대검정을 통한 세부적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 현재까지 형질전환법에 의해 다양한 식물체의 유전자도입이 실시된 바 있으나 본 연구에서는 *Petunia hybrida*에 *rolC* gene을 도입하여 형질전환체를 얻을 수 있었다.

적 요

쌍떡잎식물체 형질전환에 널리 쓰이는 *Agrobacterium*의 binary vector를 이용하여 왜화성을 나타내는 pGA643-*rolC* gene을 엽절편 transformation방법으로 *petunia*에 도입하였다. *Petunia hybrida*의 재분화에 있어 엽조직으로부터 식물체 재분화에 미치는 생장조절물질의 효과는 0.1 mg/L NAA 와 1.0 mg/L BA의 조합에서 높았고 재분화된 식물체도 양호하였다. 식물체 형질전환 선발배지에 에틸렌 억제제인 AgNO₃와 KMnO₄의 첨가시 형질전환체 재분화율이 높게 나타났으며, AgNO₃에 비해 KMnO₄ 처리구에서 보다 많은 식물체 재분화율을 나타내었으나 AgNO₃와 KMnO₄의 고농도 첨가시 다소의 유리화 현상이 발생하였으므로 3 mg/L KMnO₄ 첨가가 식물체 재분화에 적합한 것으로 생각된다. 항생제 200 mg/L kanamycin, 500 mg/L carbenicylin 과 1.0 mg/L BA, 0.1 mg/L NAA가 첨가된 형질전환 선발배지에서 엽절편으로부터 형질전환 된 것으로 추정되는 식물체들을 일차 선발하였고 기외로 이식한 후 genomic DNA를 분리하여 Southern blot analysis법으로 분석한 결과 외래 유전자가 식물체의 genomic DNA내로 삽입된 것을 확인할 수 있었다.

인용문헌

- Aeom SI, Park SK, Lim YP, Lee CH, Kim HJ, Kim HR, Lee HY (1996) Development of bialaphos-resistant *Petunia hybrida* by introduction of the bar gene using *Agrobacterium tumefaciens*. Kor J Plant Tiss Cult 23:177-181
- An G, Ebert PR, Mitra A, Ha SB (1988) Binary vectors, In : Plant Molecular Biology manual, Gelvin SB, Schilperoort RA, Verma DS (eds). Kluwer Academic Publishers Dordrecht Vol. I A3:1-19
- Bondt AD, Eggermont K, Druart P, Vil MD, Goderis I, Vanderleyden J, Broekaert WF (1994) *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus × domestica* Borkh): An assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. Plant Cell Rep 13:587-593
- Chi GL, Barfield DG, Sim GE, Pua EC (1990) Effect of AgNO₃ and aminoethoxyvinylglycine on *in vitro* shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotypes. Plant Cell Rep 9:195-198
- Chraibi BK, Latch A, Roustan JP, Fallot J (1991) Stimulation of shoot regeneration from cotyledon of *Helianthus annuus* by the ethylene inhibitor, silver and cobalt. Plant Cell Rep 10:204-207
- Chung JD, Kim CK, Kwon MY, Jee SO (1992) Putative GUS(β -glucuronidase) gene transfer into *Petunia hybrida* using *Agrobacterium tumefaciens*. Kor J Plant Tiss Cult 19:7-11
- Guerche P, Jouanin L, Tepfer D, Pelletier G (1987) Genetic transformation of oilseed rape (*Brassica napus*) by the Ri T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* and analysis of inheritance of the transformed phenotype. Mol Gen Genet 206:382-386
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rodgers SG, Fraley RT (1984) A simple and general method for transferring genes into plants. Sci 223:496
- Jong JD, Rademaker W, Van Wordragen MF (1993) Restoring adventitious shoot formation on *chrysanthemum* leaf explants following cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Tiss Org Cult 32:263-270
- Kim HS (1991) Drawf gene transfer into *Petunia hybrida* using vector system. Graduate School of Kyungpook Nat'l Univ pp:1-34
- Kim KM, Sohn JK, Chung JD (1997) Transformation of *Brassica napus* via *Agrobacterium* vector: Plant regeneration and progeny analysis. Kor J Plant Tiss Cult 24:269-272
- Krol A, van Mur DLA, Beld M, Mol JNM, Stuitje AR (1990) Flavonoid genes in *Petunia*: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. The Plant Cell 2:291-299
- Kurioka Y, Suzuki Y, Kamada H, Harada H (1992) Promotion of flowering and morphological alterations in *Atropa belladonna* transformed with a CaMV 35S-*rolC* chimeric gene of the Ri plasmid. Plant Cell Rep 12:1-6
- Martinelli L, Mandolino G (1994) Genetic transformation and regeneration of transgenic plants in grapevine (*Vitis rupestris* S.). Theor Appl Genet 88:621-628
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Plant Physiol 15:473-477
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res 8:4321-4325
- Oono Y, Kanaya K, Vchimiya H (1990) Early flowering in transgenic tobacco plants possessing the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid. Jap J Genet 65:7-16
- Potrykus I, Soul MW, Petruska J, Pazkowski J, Shillito RD (1985) Direct gene transfer to cells of a graminaceous monocot. Mol Gen Genet 199:183-188

- Prakash CS, Varadarajan V** (1992) Genetic transformation of sweet potato by particle bombardment. *Plant Cell Rep* **11**:53-57
- Roustan JP, Latche A, Fallot J** (1989) Stimulation of *Daucus carota* somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis : cobalt and nickel. *Plant Cell Rep* **8**:182-185
- Sambrook JE, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press USA. 10.19-10.26
- Socristan MD, Melchers G** (1987) Regeneration of plants from habituated and *Agrobacterium* transformed single-cell clones of tobacco. *Mol Gen Genet* **152**:111-117
- Southern EM** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**:505-517
- White FF, Nester EW** (1980) Hairy root : plasmid encodes virulence traits in *Agrobacterium rhizogenes*. *J Bacteriol* **141**:1134-1141
- Wilmink A, Van De Ven BCE, Dons JJM** (1992) Expression of the GUS-gene in the monocot tulip after introduction by particle bombardment and *Agrobacterium*. *Plant Cell Rep* **11**:76-80
- Ying M, Dyer WE, Bergman JW** (1992) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cv. 'Centennial'. *Plant Cell Rep* **11**:581-585

(접수일자 1998년 9월 11일)