

Agrobacterium을 이용한 고추의 Transient Expression 시스템

성은수¹, 정영희¹, 최도일^{1*}

¹한국생명공학연구원 식물유전체연구소

Development of an *Agrobacterium*-mediated Transient Expression System for Intact Leaves of Chili Pepper

Eun Soo Seong¹, Young Hee Joung¹, Doil Choi^{1*}

¹Plant Genomics Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Oun-dong 52, Yusong, Daejeon, 305-806, Korea

ABSTRACT We established a transient gene expression system in chili pepper leaves based on *Agrobacterium*-mediated transformation of GUS gene. For the best GUS transient expression, two step culture system was adopted. When the *Agrobacterium tumefaciens* cell density of pre-culture was A_{600nm} 0.3, the cells were harvested and diluted to A_{600nm} 0.8 with virulence induction medium after cell harvested. The addition of acetosyringone (200 μ M) in virulence induction step was a key factor for successful transient expression. Additionally, Younger leaves showed more effective transient expression than older leaves. Temporally, the strongest intensity of GUS expression was detected at 2 days after infiltration. These results demonstrate that *Agrobacterium*-mediated transient expression can be used for a simple *in vivo* assays of plant promoters, transcription factors and furthermore provide efficient protocol for chili pepper transformation.

Key words: Acetosyringone (AS), *agrobacterium*-mediated transformation, chili pepper, transient expression

서 론

고추는 여러 식용 형태로 이용할 수 있는 중요한 채소작물 중 하나이다. 전세계적으로 병해충으로 인한 문제가 고추 생산에 적지 않은 피해를 입힐 뿐 아니라, 재배시 견해, 습해, 환경스트레스 등의 많은 문제점을 지니고 있다. 이러한 문제점을 극복하고자 분자 육종을 이용한 품종 개량을 시도하고 있다. 특히, 다른 작물에서도 많이 이용되는 *Agrobacterium*-mediated DNA transfer를 이용해 외래 유전자를 식물에 도입하는 방법이 시도되고 있으며 특히, 고추의 원형질체, 배축, 자엽 등을 이용한 재분화 및 형질전환에 관한 연구가 계속되어 왔다 (Fari et al. 1981; Philips

and Hubstenberger 1985; Liu et al. 1990; Arroyo et al. 1991; Lee et al. 1993; Diaz et al. 1998). 최근에 고추의 형질전환 연구는 고추의 영양액을 이용하거나 (Li et al. 2003) 하배축을 이용하여 OSMADS 유전자가 삽입된 형질전환체를 얻었으며 (Kim et al. 2001), 선발배지에서 유기된 캘러스를 이용하여 형질전환에 성공하였다 (Lee et al. 2004). 그러나 이런 시스템을 이용한 고추형질전환에서 유전자 전이가 제대로 이루어지지 않아 형질전환 식물체를 얻기가 어려워 많은 고추 유전자의 기능을 밝히는데 문제점을 지니고 있다. 또한 고추를 세포나 분자 생물학적 방법으로 이용하는데 가장 문제가 되는 것은 고추내로 외부에서 삽입된 유전자가 안정하게 유지되지 못하고, GUS 유전자를 이용한 연구도 안정한 발현 양상을 보인 결과가 거의 없을 뿐 아니라 발현율도 극히 저조하다는 것이다. 본 실험은 *Agrobacterium*을 이용하여 고추 잎에서 GUS

*Corresponding author Tel 042-860-4340 Fax 042-860-4309
E-mail doil@kribb.re.kr

유전자의 일시적인 발현율을 높일 수 있는 박테리아 농도, 박테리아 감염 시간, acetosyringone 농도 등의 적정 조건을 구명하여 이를 고추 형질전환에 이용하고자 실시하였다. 또한 이런 transient expression은 형질전환의 적정 조건 규명 뿐 아니라 유전자 분석에도 이용하고 있는데 이는 외부 유전자를 형질전환시키지 않고도 일시적으로 발현시켜 빠르게 분석할 수 있는 장점이 있기 때문이다 (Bustos et al. 1991; Leon et al. 1991; Dillen et al. 1995; Kapila et al. 1997).

따라서 완전한 앞에서 transient expression 시스템 구축은 대량의 유전자 기능 연구에도 중요하게 이용되리라고 사료된다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에는 *Capsicum annuum* cv. Bukang을 연구재료로 이용하였다. 상토와 펄라이트를 1:1로 섞은 후 멸균시켜서 핀셋을 이용해 종자를 파종한 다음, 25°C 배양실에서 4주간 자란 식물체를 이용하였다.

Agrobacterium의 배양과 고추 잎의 감염

식물체의 일시적인 발현을 위한 binary vector는 T-DNA 내부에 선발 표지로서 항생제 저항성 유전자인 kanamycin 과 intron을 지닌 GUS를 포함하고 있는 pGUSINT를 이용하였다 (Vancanneyt et al 1990). pGUSINT로 형질전환된 *Agrobacterium* LBA 4404를 YEP 배지에 접종하여 28°C에서 적정농도가 A_{600nm} 0.3, 0.5, 0.8, 1.0, 1.3 이 될 때까지

배양한 후 원심분리하였다. 이렇게 얻어진 각 농도의 박테리아 세포를 SIM 배지 (5.88 g/L citric acid, 20 g/L sucrose, pH 5.2)에 최종 접종 농도를 A_{600nm} 0.3, 0.5, 0.8, 1.0, 1.3으로 되게 희석하여 0, 50, 100, 150, 200, 400, 800 µM acetosyringone과 1 mM proline을 첨가한 후 20°C에서 최소 4시간 이상 현탁배양하였다 (Seong et al. 2003). 준비된 *Agrobacterium*을 1 mL 주사기에 담아서 고추의 완전히 전개된 잎의 세포사이에 있는 공간에 infiltration한 다음 (Yang et al. 2000) 배양실에 방치한 후 감염시간별로 고추 잎을 채취하여 GUS 유전자의 발현을 확인하는데 이용하였다.

조직학적 분석

GUS staining은 일반적으로 응용되는 제퍼슨 방법을 이용하였다 (Jefferson 1987). *Agrobacterium*으로 감염된 잎 부위를 가위로 절단한 절편체를 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolylglucuronide (X-gluc)과 50 mM phosphate (ph 7.0)가 첨가된 염색용액에 넣고 37°C 암상태에서 하룻동안 방치한 다음 destaining 용액 (75% absolute EtOH + 1% glacial acetic acid)을 처리한 후 GUS spot을 관찰하였다.

결과 및 고찰

Agrobacterium의 적정농도 구명

*Agrobacterium*을 이용한 고추의 GUS 유전자 발현 효율에 영향을 미치는 요인중 먼저 박테리아 농도를 조사한 바 (Figure 1), 박테리아의 전처리 배양 농도와 최종 접종 농도

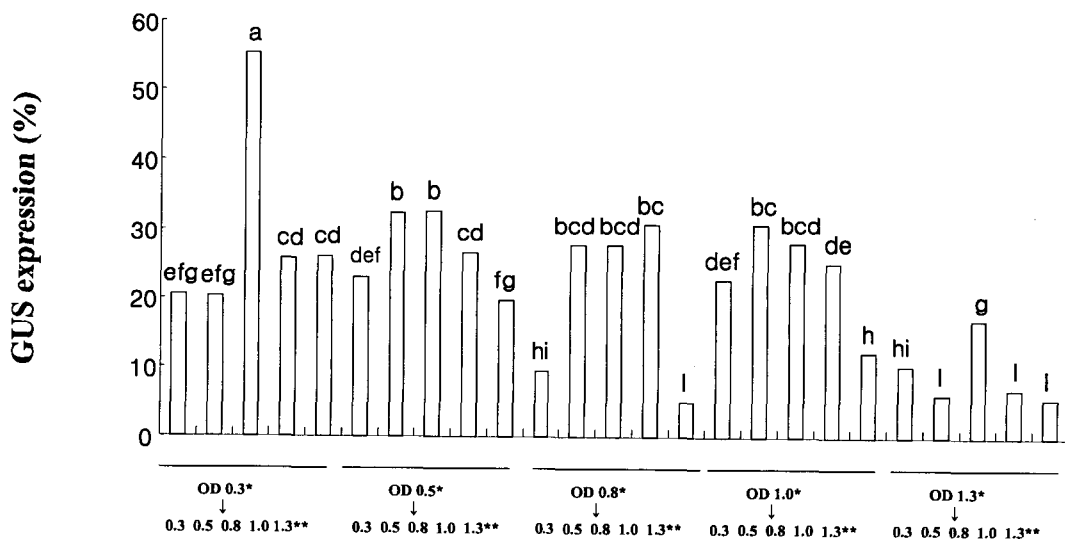


Figure 1. Effect of bacterial density on transient GUS expression in hot pepper leaves. Number of GUS stained spot were scored 4 days after *Agrobacterium* infiltration. Mean values of 6 replicates of 30 explants each. Data values are significantly presented with different at least three independent experiments ($P \leq 0.05$). *: preculture density of bacteria. **: Resuspension culture density of bacteria after centrifuged cells diluted with liquid medium

가 다음과 같은 차이를 나타냈다. 균의 전처리 배양 농도 A_{600nm} 0.3에서 최종 접종 농도를 A_{600nm} 0.8로 희석하여 접종한 조건에서 GUS 유전자 발현율이 55%로 가장 높게 나타났다. 균의 전처리 배양 농도 A_{600nm} 0.5, 0.8, 1.0을 최종 접종 농도 A_{600nm} 0.5, 0.8, 1.0으로 맞춘 조건에서는 상호간에 GUS 유전자 발현율이 20-30%로 나타나 유효차이가 없었다. 하지만 균의 전처리 배양 농도 A_{600nm} 1.3을 최종 접종 농도 A_{600nm} 0.5, 0.8, 1.0으로 맞추어 infiltration 했을 때의 조건에서는 A_{600nm} 1.3을 접종농도 A_{600nm} 0.8로 맞췄을 때 GUS 유전자 발현율이 20%로 나타났고 접종농도 A_{600nm} 0.5와 1.0으로 맞춘 조건에서는 GUS 유전자 발현율이 10% 이하로 나타나 저조한 transient expression 율을 보여주었다. 앞의 결과에 따라 고추의 transient expression 효율을 높이려면 균의 전처리 배양 농도 A_{600nm} 0.3으로 하고 A_{600nm} 0.8로 하여 이용해야 한다는 결론을 얻었다. 따라서 Agrobacterium을 이용한 고추의 transient expression 효율성은 박테리아의 전처리 배양 농도와 최종 접종 농도가 모두 중요하게 작용하는 것으로 나타났다.

Acetosyringone (AS)의 적정농도 조건

Agrobacterium을 이용한 고추의 GUS 유전자 발현에 있어서 병원성 유도 배지내에 첨가되는 acetosyringone (AS)의 영향을 조사한 바 (Figure 2), AS이 첨가되지 않은 것과 50 μM AS를 처리한 실험구에서는 GUS 유전자가 발현되는 절편체를 얻을 수 없었으나, 100 μM 이상의 AS를 병원성 유도 배지에 첨가하였을 경우 GUS 유전자 발현율이 60-95%로 나타났다. 100 μM 의 AS를 병원성 유도 배지에 첨가했을 경우는 GUS 유전자 발현율이 61%로 나타났고 200 μM AS처리했을 때는 95%로 가장 높게 나타났다. 그러나 200 μM 보다 높은 농도의 AS처리에서는 GUS 유전자 발현 효율은 떨어지는 양상을 나타내었다. 따라서 고추의 완전한 잎을 이용한 transient assay 연구시 AS 적정

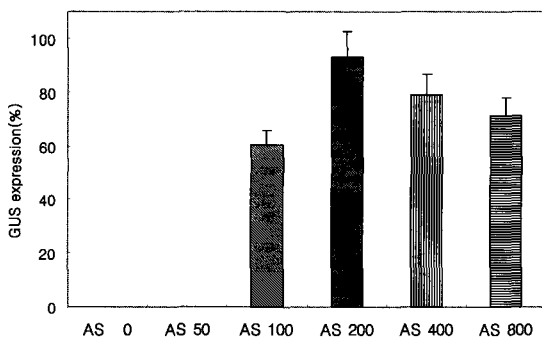


Figure 2. Effect of acetosyringone on transient expression efficiency of mediated by Agrobacterium tumefaciens. Numbers of GUS stained spot were scored. Mean values of 9 replicates of 30 explants each.

농도는 200 μM로 처리해야 효율적임을 알 수 있었다. 아마도 유엽을 이용한 고추의 형질전환 연구에서는 AS의 적정농도가 배양 효율에 아주 중요한 역할을 할 것이라 사료된다.

Agrobacterium을 이용한 고추의 적정 공동배양기간 구명

Agrobacterium을 고추 잎에 감염시킨지 1일 간격으로 조사하여 (Figure 3) 잎의 감염 정도를 조사한 결과, Agrobacterium으로 infiltration 한지 3일 지난후 부터는 잎에 나타나는 균의 병징이 심해져서 외부 유전자의 발현 정도를 연구하기에는 좋지 않은 것으로 생각된다. Agrobacterium으로 감염시킨 시간별로 GUS 유전자의 발현 양상을 조사한 결과 (Figure 3), 고추 잎을 Agrobacterium infiltration 방법으로 감염시킨지 2일 되었을 때 가장 강한 GUS 유전자의 발현 양상을 보이다가 감염시킨지 3일이 지나면서 GUS 유전자의 발현이 다시 약해지는 경향을 보였다. 이 결과는 위의 결과와 일치하는 면을 보여준다. 즉, Agrobacterium의 감염 정도가 고추 잎에서 심해지면 GUS 유전자의 발현 양상도 같이 약해지는 경향을 나타낸다.

또한 Agrobacterium으로 고추 잎에 infiltration 한 시간 대별로 GUS 유전자의 발현율을 조사하였다 (Figure 4). Agrobacterium으로 infiltration 한지 1일째되는 고추잎의 GUS 유전자 발현율은 43% 정도로 나타났으나 발현된 모든 잎의 GUS 유전자의 발현 정도가 약하였다. 하지만 Agrobacterium으로 infiltration 한지 2일째된 고추잎의 GUS 유전자 발현율은 60%로 가장 높게 나타났고 infiltration 한지 3일 지난후 부터는 10% 이하로 급격히 감소하였다. 따라서 고추잎에 Agrobacterium으로 infiltration 하는데 GUS 유전자 발현율을 높이는 최적의 공동배양기간은 2일인 것으로 사료된다. 이는 고추 절편체를 이용한 형질전환 연구에도 공동배양기간의 적정농도 구명에 이용될 수 있을 것으로 보여진다.

Agrobacterium 기법을 이용한 고추의 형질전환에는 배양

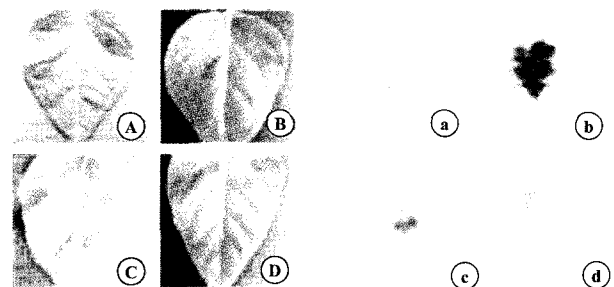


Figure 3. Infectious degrees of intact leaves in hot pepper after Agrobacterium infiltration. A: 1 day, B: 2 days, C: 3 days, D: 4 days after agroinfiltration. Histochemical assay of GUS in Agrobacterium-mediated infectious intact leaves of hot pepper a: 1 day, b: 2 days, c: 3 days, d: 4 days.

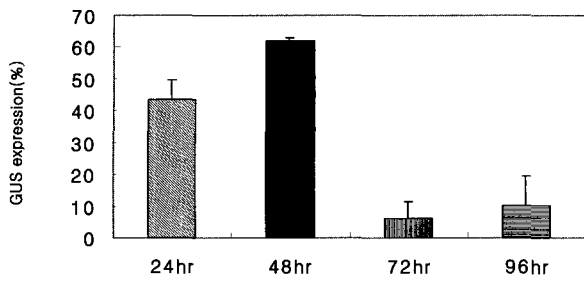


Figure 4. Influence of the period of *Agrobacterium* infiltration in transient expression of pepper. Data after 24 hr, 48 hr, 72 hr, 96 hr of *Agrobacterium* infiltrations were shown. Numbers of GUS stained spot were scored. Mean values of 6 replicates of 30 explants each.

에 이용되는 조직이나 재배종, 배양 배지 조성, 호르몬 종류 및 성장조절제 농도 등 여러가지 요인이 관여하는 것으로 알려져 있다 (Zhu et al. 1996; Javier et al. 2001). 이들 요인중에서 배양에 이용되는 식물체의 조직과 재배종에 따라 형질전환시 재분화율에 미치는 영향이 차이를 보인다는 것이 공통된 결과이다. 고추 품종 중에서 Piquillo, Yolo Wonder, Permagreen, Golden summer 같은 4가지 종류가 재분화율에 있어서 차이를 보이는 것으로 알려져 있다 (Javier et al. 2001). 또한 배양에 이용되는 절편체 조직별 실험에서도 하배측과 자엽보다 유엽을 이용하는 것이 bud 형성에 훨씬 좋은 영향을 미치는 것으로 나타났다 (Zhu et al. 1996). 본 연구에서도 실험결과에 나타내진 않았지만 배양실에서 키운지 4주된 식물체를 이용하였을 때 안정한 GUS 유전자의 발현을 나타냈으므로 형질전환 기법을 이용한 고추 품종 육종시 4주된 식물체의 유엽을 이용하는 것이 매우 유용하게 작용할 수 있을 것으로 사료된다.

T-DNA의 식물체 내로의 전이에 영향을 미치는 요인중 *A. tumefaciens*의 농도가 중요하다고 하는 보고가 있는데 (Humara et al. 1999), 박테리아 농도가 A_{600nm} 에서 1일 때 절편체를 접종하여 실험하면 GUS 유전자의 발현율이 훨씬 높아진다. 이렇듯 A_{600nm} 값의 증가와 감소는 형질전환 효율에 많은 영향을 미친다 (Mondal et al 2001). 차나무의 형질전환에서는 0.8보다 박테리아 농도가 높아지면 형질전환에 적당하지 않고 A_{600nm} 값이 1.0 이상되면 박테리아의 지나친 생장으로 인해 식물조직에 피해를 입힐 수 있다고 보고하였다. *Citrus*의 형질전환에서는 박테리아의 지나친 생장으로 인하여 재분화율이 저하될 수 있고, 공동배양시 박테리아의 과다 생장을 억제하기 어렵다고 했다 (Pena et al. 1995). 고추의 경우에는 이러한 박테리아 농도에 따른 외래 유전자나 GUS 유전자의 발현에 대한 보고가 아직 없다. 본 연구에서 나온 결과로 볼 때 식물의 종류 및 품종에 따라 박테리아 농도가 미치는 영향은 현저하게 차이가 나는 것으로 보아, *Agrobacterium*의 농도도 최적의 농도를 구명

해야 형질전환율을 높일 수 있다고 보여진다. 따라서 본 실험에서 밝힌 박테리아 최적의 농도는 앞으로 유엽을 이용한 고추 형질전환 연구에 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

일반적으로 쌍자엽 식물에서 AS 첨가에 따른 전처리 유도 과정은 유전자 전환 연구에 있어서 단자엽 식물만큼 중요한 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있다. *Pinus pinea L.*의 자엽으로 GUS 유전자 발현을 연구한 결과에서는 AS이 병원성 유도에 그다지 중요하지 않다는 결론을 내렸다 (Humara et al. 1999). 벼와 같은 단자엽 식물은 *Agrobacterium*이 감염될 때 virulence 유전자의 활성을 띠게 하는 페놀 성분인 AS과 α -hydroxy-AS 같은 물질을 발산하지 않기 때문에 이러한 물질을 *Agrobacterium*의 배양이나 공동배양 배지에 첨가하는 것이 형질전환에 필수적이라고 보고 되어 있으며, 그 농도에 따라 형질전환 효율이 아주 상이한 것으로 알려져 있다 (Smith and Hood 1995). *Phalenopsis orchard*의 형질전환에서 공동배양배지에 AS를 첨가했을 때 500 μ M을 첨가했을 때 첨가하지 않은 것보다 형질전환율이 4배 증가되었음을 보고하여서 (Belarmino et al. 2000), 공동배양단계에서 AS 첨가가 형질전환율을 증가시키는데 필수요인임을 나타낸다. 본 연구에서도 AS이 첨가되지 않은 배지에서 GUS 유전자가 발현된 고추 잎을 얻을 수 없었으므로 200 μ M AS 첨가는 고추 유전자 전환 연구에 필수적이라 사료된다. AS은 식물조직이 상해를 입었을 때 분비되어 나오는 페놀물질의 일종으로 *Agrobacterium*의 Ti-plasmid 내의 병원성 유도에 관여하는 유전자 (vir)의 발현 유도에 가장 중요하게 작용하는 요인중의 하나로 알려져 있다. 그러므로 식물의 종과 품종에 따라서 식물조직에 상처를 가했을 때 분비되는 페놀물질의 양과 조성에 있어서의 차이가 공동배양단계에서의 식물체 내로의 유전자전이와도 관계되는 것으로 보아진다. 그러나 이러한 것이 종의 병원성 유도 식물 세포내로의 유전자 전이, 세포의 염색체내 삽입 등의 어떤 과정에서 구체적으로 작용을 미치는지는 분명치 않으며, 이에 대한 상세한 연구가 필요하다고 여겨진다.

유전자 전환 효율을 향상시키는 요인 중 공동 배양 시간에 따른 적정 시간 구명도 중요하다. *P. pinea*의 경우 공동배양 3일째에 GUS 발현율이 가장 높았고, 2일째에는 낮은 GUS 유전자의 발현 양상을 나타냈다 (Humara et al. 1999). 이 결과와 마찬가지로 Sitka spruce의 형질전환된 배세포에서 *gusA* 유전자의 발현을 본 결과, 2일보다 3일 공동배양한 것이 유전자 전이율이 15배 증가한 것으로 나타났다 (Drake et al. 1997). 하지만 고추의 경우는 *Agrobacterium*으로 infiltration 한지 2일째 샘플이 3일 처리한 것보다 GUS staining정도도 더 강한 것으로 나타났다. GUS 유전자 발현율도 2일째에 63 %로 가장 높았고 3일이 지나면서 10 % 이하로 급격히 감소하였다 (Figure 4). 또한 3일이 지나면서 *Agrobacterium*으로 형질전환시키면 감염시킨 대부분 고추 잎의 세포들이 HR을 일으키면서 죽는 부위가 많아

지는 것으로 나타났다. 이 결과로 유추해 볼 때, 고추의 경우 *Agrobacterium*으로 상처낸지 2일 되었을 때 외부 유전자 전환율도 높아지고 재분화율에도 영향을 미칠 것이라 생각된다. 또한 같은 조건이었음에도 불구하고 Figure 2의 90% GUS 유전자 발현율과 Figure 1과 Figure 4의 55-63% GUS 유전자 발현율이 차이가 나는 것은 해당식물의 자라난 stage와도 밀접한 관련이 있다고 사료된다.

Transient expression 시스템은 DNA 전이가 일어난 후 가급적 빠른 시간내에 유전자 발현 양상을 측정할 수 있고 형질전환된 세포가 재분화되기 어려운 경우에 독립적으로 유전자 전이를 분석할 수 있다는 장점을 가지고 있다. Transient expression 분석은 원형질체에도 응용할 수 있다. 하지만 원형질체를 이용한 시스템은 조직특이적으로 조절되는 유전자 발현이나 세포벽과 관련된 과정을 연구하기에는 부적절하다. 그러므로 *Agrobacterium*을 매개로 하여 완전한 잎을 이용하면 많은 양의 샘플을 가지고 실험해도 큰 어려움 없이 빠른 시간에 유전자 발현 양상을 볼 수 있다는 장점이 있다.

적 요

*Agrobacterium*을 이용한 GUS 유전자를 효과적으로 발현 시키기 위하여 수행되어진 실험 결과를 요약하면 다음과 같다. 박테리아 농도별 실험을 수행한 결과 균의 전처리 배양 농도 OD_{600nm} 0.3일때 원심분리한 후 얻어진 균을 희석한 후의 최종 농도는 OD_{600nm} 0.8로 맞춘 실험 처리구에서 GUS 유전자 발현율이 55%로 가장 높게 나타났다. 병원성 유도 배지 내에 Acetosyringone (AS)이 첨가되지 않은 경우 GUS 유전자가 발현된 고추 잎을 얻을 수 없었으나, 200 μM을 첨가했을 때 90%의 가장 높은 GUS 유전자 발현율을 나타내어 많은 수의 GUS spots을 관찰할 수 있었다. *Agrobacterium*에 의한 고추 잎의 감염 정도를 조사한 바 *Agrobacterium*으로 감염시킨지 3일째부터는 박테리아에 의한 감염 정도가 심해져서 GUS 유전자 발현 정도가 약해지므로 *Agrobacterium*으로 감염시킨지 2일째 되었을 때 GUS 유전자 발현이 가장 강하게 나타난 것을 확인하였다. 이 같은 결과는 박테리아에 의한 감염이 일어난지 3일째 부터는 식물체의 감염부위 고사를 일으키는 것과 관련된 것으로 보인다.

사 사

이 연구는 자생식물 이용기술개발 사업단 (PDRC) 및 작물 유전체 기능 연구 사업단 (CFGC)의 연구비 지원으로 수행하였으므로 이에 사의를 표함.

인용문헌

- Arroyo R, Revilla MA (1991) *In vitro* plant regeneration from cotyledon and hypocotyls segments in two bell pepper cultivars. *Plant Cell Rep* 10: 414-416
- Belarmino MM, Mill M (2000) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a phalenopsis orchard. *Plant Cell Rep* 19: 435-442
- Butos MM, Battraw MJ, Kalkan FA, Hall TC (1991) Transient gene expression in electroporated bean cotyledon protoplasts. *Plant Mol Biol Rep* 9: 322-332
- Butos MM, Begum D, Kalkan FA, Battraw MJ, Hall TC (1991) Positive and negative *cis*-acting DNA domains are required for spatial and temporal regulation of gene expression by a seed storage protein promoter. *EMBO J* 10: 1469-1479
- Diaz I, Moreno R, Power JB (1988) Plant regeneration from protoplasts of *Capsicum annum*. *Plant Cell Rep* 7: 210-212
- Dillen W, Engler G, Van Montagu M, Angenon G (1995) Electroporation-mediated DNA delivery to seedling tissue of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean). *Plant Cell Rep* 15: 119-124
- Drake PMW, John A, Power JB, Davey MR (1997) Expression of the *gusA* in embryogenic cell lines of Sitka spruce following *Agrobacterium*-mediated transformation. *J Exp Bot* 48: 151-155
- Fari M, Czako M (1981) Relationship between position and morphogenetic response of pepper hypocotyls explants cultured *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 15: 207-213
- Humara JM, Lopez M, Ordas RJ (1999) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Pinus pinea* L. cotyledons: an assessment of factors influencing the efficiency of *uidA* gene transfer. *Plant Cell Rep* 19: 51-58
- Javier PR, Guy H, Luis C, Rodolphe S, Jesus C (2001) Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explants for *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Tiss Org Cult* 67: 173-180
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 20: 3901-3907
- Kapila J, Rycke Rd, Van M, Agenon G (1997) An *Agrobacterium*-mediated transient expression system for intact leaves. *Plant Sci* 122: 101-108
- Kim SH, Kim SR, An CS, Hong YN, Lee KW (2001) Constitutive expression of rice MADS box gene using seed explants in hot pepper (*Capsicum annum* L.). *Mol Cells* 12: 221-226
- Lee SJ, Kim BD, Paek KH (1993) *In vitro* plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from cotyledon explants of hot pepper. *Korean J Plant Tiss Cult* 5: 289-294
- Lee YH, Kim HS, Kim JY, Jung M, Park YS, Lee JS, Choi SH, Lee JH, Hyung NI, Lee CH, Yang SG, Harn CH (2004) A new selection method for pepper transformation:

- callus-mediated shoot formation. *Plant Cell Rep* (in press; available by on line)
- Leon P, Planckaert F, Walbot V (1991) Transient gene expression in protoplasts of *Phaseolus vulgaris* isolated from a cell suspension culture. *Plant Physiol* 95: 968-972
- Li D, Zhao K, Xie B, Zhang B, Luo K (2003) Establishment of highly efficient transformation system for pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Rep* 21: 785-788
- Liu W, Parrot WA, Hildebrand DF, Collins GB, Williams EG (1990) *Agrobacterium*-induced gall formation in bell pepper (*Capsicum anum* L.) and formation of shoot-like structures expressing introduced genes. *Plant Cell Rep* 9: 360-364
- Mondal TK, Bhattacharya A, Ahuja PS, Chard PK (2001) Transgenic tea *Camellia sinensis* (L.) O. kuntze cv. Kangra Jat plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos. *Plant Cel Rep* 20: 712-720
- Pena L, Cervera M, Juarez J, Ortega C, Pina JA, Duran-Vila N, Navarro L (1995) High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Citrus*. *Plant Sci* 104: 183-191
- Phillips GC, Hubstenberger JF (1985) Organogenesis in pepper tissue cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult* 4: 261-269
- Seong ES, Cha JE, Park SW, Yu CY, Song KJ (2003) The effect of *Agrobacterium* density on transformation efficiency in apple. *Korean J Plant Biotechnol* 30: 215-219
- Smith RH, Hood EE (1995) Review and interpretation: *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. *Crop Sci* 301-309
- Vancanneyt G, Schmidt R, O' Connor-Sanchez A, Willmitzer L, Rocha-Sosa M (1990) Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol Gen Genet* 220: 245-250
- Zhu YX, Ouyang WJ, Zhang YF, Chen ZL (1996) Transgenic sweet pepper plants from *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep* 16: 71-95

(접수일자 2004년 7월 8일, 수리일자 2004년 7월 26일)