

*Agrobacterium tumefaciens*에 의한 민들레의 형질전환

여 상 언 · †노 광 수
계명대학교 생물학과

(접수 : 2001. 8. 28., 게재승인 : 2001. 10. 18.)

Transformation of *Taraxacum mongolicum* Hand. by *Agrobacterium tumefaciens*

Sang Eun Yeo and Kwang Soo Roh†

Department of Biology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

(Received : 2001. 8. 28., Accepted : 2001. 10. 18.)

Genetic transformation in dandelion (*Taraxacum mongolicum* Hand.) was studied. We used for transformation by *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 harboring a binary vector pBI121 carrying the CaMV 35S promoter-GUS gene fusion used as a reporter gene and NOS promoter-NPTII gene as a positive selection marker. To obtain transformed plants, leaf explants of dandelion were cocultured with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 for 10 mins, then transferred to MS medium containing 1 μ M IAA, 1 μ M BA, 100 μ g/mL carbenicillin and 50 μ g/mL kanamycin sulfate. After two weeks of subculture of the explants, kanamycin-resistant shoots were formed on explants survived. When subjected to GUS histochemical assay, all of the regenerants showed the GUS-positive responses. Plantlets were be transformed to soil for further growth.

Key Words : *Agrobacterium tumefaciens*, explants, GUS histochemical assay, *Taraxacum mongolicum* Hand, transformation

서 론

Vector system인 Ti plasmid계는 *A. tumefaciens*의 성질을 잘 이용하여 개발된 공동배양에 의한 고등식물의 형질전환 방법으로서, 담배 원형질체의 형질전환에 의하여 최초로 소개되었다(1,2). 이는 형질전환 빈도가 비교적 높고 도입된 유전자의 안정성때문에 가장 널리 사용되고 있으며(3), 어떤 종류의 유전자도 식물세포 내로 도입이 가능하게 되었다(4).

*A. tumefaciens*는 Rhizobiaceae과에 속하는 병원성의 그람 음성 토양 세균으로서, 분자량이 150~250 kb에 해당하는 매우 큰 Ti plasmid를 포함하고 있으며, 이는 종양 형성과 식물세포로 DNA의 전이에 관련되는 두 영역을 갖고 있다. 이들 중 한 영역은 vir 영역으로 종양 형성의 필수 부위이고, 다른 한 부위는 T-DNA 영역으로 식물체에 도입되어 crown gall tumor를 유발한다(5). 이러한 식물세포로의 T-DNA 도입은 *A. tumefaciens*와 plant cell의 상호 작용에 의한 것으로서, vir 유전자가 상처난 식물조직으로부터 형성되는 acetosyringone과 같은 페놀화합물에 의하여 활성화되어 vir 유전자의 T-DNA

의 양쪽 border가 절단되고(6), 절단된 T-DNA는 식물체 DNA의 아데닌과 티민이 풍부한 지역으로 삽입된다(7). 이러한 Ti plasmid의 특성을 이용하여 T-DNA 내부의 oncogene을 제거한 후, 임의의 유전자와 선택표지 유전자가 삽입된 *A. tumefaciens*을 이용하여 식물 염색체에 외래 DNA를 삽입할 수 있다.

외래 유전자 도입에 의한 식물체의 형질전환은 DNA 재조합 기술과 형질전환된 식물체의 재분화를 위한 조직배양 기술의 발달로 인해 기존의 재래육종과 원형질체 융합의 단점을 극복할 수 있기 때문에, 박테리아, 바이러스 등의 유전자를 식물체 내로 안전하게 도입할 수 있게 되었다.

이와 같은 유전자 조작을 통하여 유용한 유전자를 식물체에 도입, 발현시킴으로서 품종의 개량 및 제초제 저항성 식물(8), 내병성, 내충성, 내바이러스성 식물체를 형성할 수 있을 뿐만 아니라 (9), 식물의 2차 대사산물의 대량생산에 유용하게 이용할 수 있다(10). 또한 돌연변이를 이용한 유용 품종의 선별 등의 체계적인 결과를 확립할 수 있다(11).

민들레(*Taraxacum mongolicum* Hand.)는 국화과에 속하는 다년생 초본으로서, 야생 자원의 수집 보존 및 개량이라는 측면에서 뿐만 아니라 민들레가 가지는 약용 성분을 이용할 수 있다는 점에서 그 효용 가치가 매우 높다. 한방에서 민들레는 강장, 해열, 소화 불량, 유방염, 이뇨 작용, 식중독 제거 등의 약재로 쓰이며, 잎과 줄기의 유액은 종기나 손등에 생기는 사

†Corresponding Author : Department of Biology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea
Tel : +82-53-580-5207, Fax : +82-53-580-5164
E-mail : rks@kmu.ac.kr

마귀에 효험이 있다고 알려져 있다. 또한 taraxasterol, inulin, lutein, pectin, vitamin B₁, C, D, glucoside계 화합물이 함유되어 항진균 효과와 진정 작용을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 항암 활성을 지닌 물질이 여러 종 포함되어 있음이 확인되었다.

*A. tumefaciens*를 이용하여 외래유전자를 도입하는 형질전환은 원예작물을 중심으로, 세계적으로는 110여종의 식물이 가능하다고 보고되어 있는(12) 반면에, 국내에는 20여종이 형질전환에 성공한 것으로 보고되어 있다. 그러나 민들레의 형질전환에 대한 연구는 아직 전무한 실정이며, 민들레에 대한 생리 특성이나 약용 성분에 대한 연구 또한 많지 않으므로, 민들레의 품종개량이나 유용한 물질의 생산을 위해 새로운 유전자가 도입된 여러 종의 형질전환 식물체가 요구된다.

따라서, 본 연구에서는 민들레가 *Agrobacteria*에 대한 숙주로서의 가능성을 조사하고, 여러 가지 유용한 유전자를 식물체에 도입시키기 위한 방법을 개발할 목적으로, 민들레의 잎 절편을 공동배양 방법에 의하여 형질전환시킨 후, Km (kanamycin)을 함유한 배지에서 형질전환된 민들레를 선별함으로써 형질전환체의 배양 기술을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

재 료

본 실험의 재료인 민들레 종자는 종묘상사에서 구입하여 사용하였다. CaMV 35S promoter, reporter gene으로서 GUS gene, 그리고 NPTII gene을 선택표지를 포함하고 있는 pBI121을 binary vector로서, 민들레를 형질전환하기 위한 균주로는 disarmed strain인 *A. tumefaciens* LBA4404를 사용하였다.

종자의 발아 및 기내 배양

민들레의 종자를 70% (v/v) 에탄올에 1분, 3% (v/v) 차아염소산나트륨에 1분, 3% (v/v) 과산화수소에 3분간 각각 표면 살균하여 멸균수로 3회 수세하였다. 표면 살균된 종자는 성장 조절 물질을 함유하지 않은 MS 배지(13)에 치상하여 26 ± 1°C의 암처에서 발아시켰다. 발아된 유묘들은 26 ± 1°C의 3,000 lux 형광 하에서 16시간의 광주기와 8시간의 암주기 조건으로 배양하였다.

pBI121의 *A. tumefaciens*로의 형질전환

pBI121 binary vector를 *A. tumefaciens* LBA4404로 형질전환하기 위하여 freeze thaw 방법(14)을 사용하였다. *A. tumefaciens*를 7~8 mL의 LB 배지에 접종하여 28°C, 300 rpm으로 진탕 배양기에서 전배양하였다. 이 배양액중 1~2 mL를 50 mL의 LB 배지에 접종하여 전배양시와 동일한 조건으로 O.D₆₀₀에서 0.5~1의 값을 가질 때까지 배양하였다. 배양액을 얼음 위에 5분간 방치한 후, 4°C, 3,000 × g에서 30분간 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 이 침전물에 4°C에 보관해두었던 CaCl₂ 용액 1 mL를 가하여 현탁시켰다. 재부유된 침전물을 얼음 위에 꽂아두었던 eppendorf tube에 200 µL씩 분주한 후, pBI121 1 µg을 가하여 얼음 위에 30분간 방치하였다가 액화질소로서 1분간 급냉 동결시켰으며, 37°C 항온수조에서 5분간 해동하였다. 각 tube에 1 mL의 LB 배지를 더해서 28°C에서 2시간

동안 배양하였다. 50 µg/mL 농도로 Km이 함유된 LB plate에 도말하여 28°C에서 배양한 후 형질전환된 콜로니를 선별, 보존하였다.

Kanamycin 내성 검정

Km에 내성을 지닌 NPTII gene을 selection marker로 이용하기 위하여, 성장조절 물질을 함유하지 않은 MS 배지에서 기내 배양된 민들레로부터 충분히 전개된 잎만을 수거한 후, 침으로 잎 절편을 자극하였다. 이들을 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µg/mL의 Km이 함유된 MS 배지에 4주간 치상하여 내성을 검정하였다. 4주 후, 잎의 색깔이 탈색되거나 고사한 잎의 수를 계산하여 생존율을 조사하였다.

*A. tumefaciens*에 의한 민들레의 형질전환

pBI121으로 형질전환된 *A. tumefaciens* LBA4404를 50 µg/mL의 Km이 첨가된 LB 배지에서 밀도가 5~10 × 10⁶ cell/mL이 될 때까지 배양하였고, 무균 배양한 민들레의 잎을 1~1.5 cm 크기로 절편을 만들어 공동배양에 사용하였다. 공동배양 시간이 잎 절편의 생존과 재분화율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 잎 절편을 침으로 자극한 후, MS 배지에 현탁한 *A. tumefaciens*와 함께 침적(dipping), 10분, 30분, 1시간 동안 공동배양하였다. 공동배양된 잎 절편에서 여분의 균을 제거한 후, MS 배지로 세척하였다. 잎 절편을 3일 정도 MS 배지에서 전배양한 후, 100 µg/mL Cb(carbenicillin), 50 µg/mL Km, 1 µM IAA 및 1 µM BA가 함유되어 있는 shoot 유도 배지에 옮겨서 계대배양하였다. 1차적으로 NPTII gene에 저항성을 지니는 형질전환체를 선별하였다.

식물체의 재분화와 GUS gene 발현의 확인

Shoot 유도 배지에서 1차적으로 선별된 형질전환체를 MS 배지에 재이식하여 뿌리를 유도하였으며, 2주 간격으로 새로운 배지로 재이식한 후 완전한 식물체로 재분화시켰다. 성장한 형질전환체의 잎을 무작위적으로 절취하여 37°C에서 X-gluc(5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide) 용액에 하룻밤 동안 침치시킨 다음, GUS 양성 반응(15)을 보인 잎 절편을 형질전환된것으로 판정하였으며, 대조구로서는 *A. tumefaciens*와 공동배양하지 않은 잎 절편을 사용하였다.

결 과

pBI121의 *A. tumefaciens*로의 형질전환

항생제 내성을 가지지 않는 *A. tumefaciens* LBA4404를 숙주로 하여 binary vector인 pBI121으로 형질전환된 *A. tumefaciens*를 50 µg/mL Km이 함유된 LB plate에 도말한 후, 형질전환된 콜로니를 선별, 보존하였다. 선별한 콜로니를 배양하여 플라스미드를 분리한 후, EcoRI와 HindIII로 처리하여 전기영동을 실시한 결과, pBI121이 *Agrobacterium* 내로 전이되었음을 확인하였다(Figure 1).

*A. tumefaciens*에 의한 민들레의 형질전환

MS 배지에서 기내 배양된 민들레로부터 충분히 전개된 잎만을 수거하여 침으로 잎 절편을 자극한 후, 농도별로 Km이

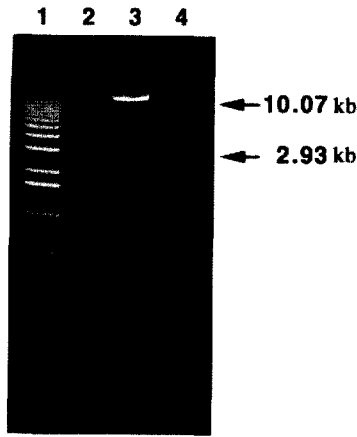


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of pBI121 digested with *Hind*III and *Eco*RI. Plasmid DNA was isolated from the transformed *A. tumefaciens*. Lane 1, 1 kb ladder; lane 2, pBI121 without GUS digested with *Hind*III; lane 3, pBI121 digested with *Hind*III; lane 4, pBI121 digested with *Hind*III and *Eco*RI.

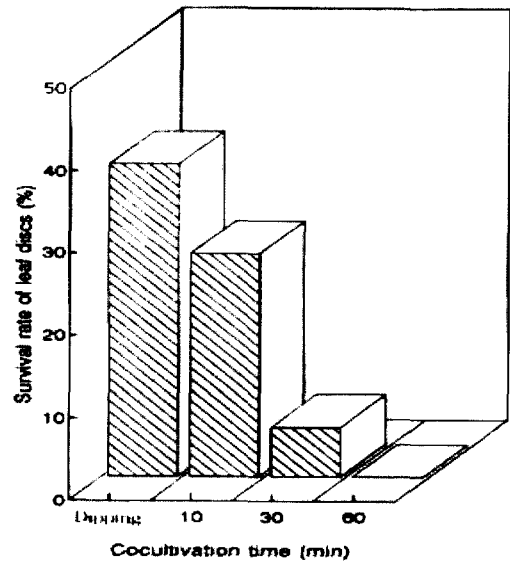


Figure 3. Survival rate of leaf discs on MS medium containing *A. tumefaciens* with various cocultivation time.

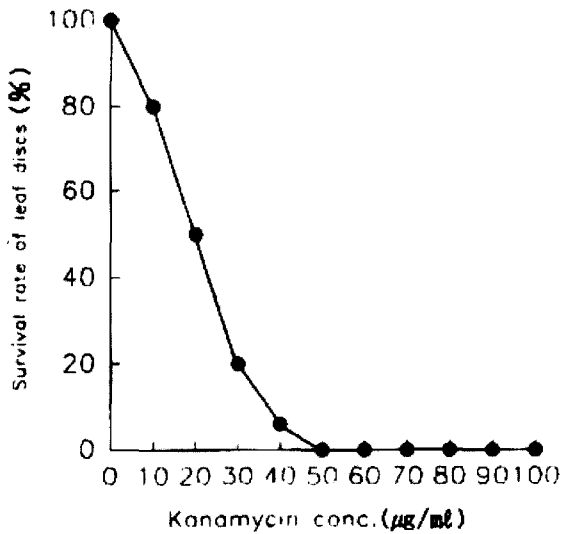


Figure 2. Survival rate of leaf discs on MS medium containing various concentrations of kanamycin.

첨가된 MS 배지에 4주간 치상하여 내성을 검정하였다. 4주 후, 잎의 색깔이 탈색되거나 고사한 잎의 수를 계산하여 생존율을 조사하였다. Km의 농도가 증가할수록 잎 절편의 생존율은 급격히 감소하는 것을 볼 수 있었고, 고농도 Km 처리구에서는 잎조직의 표백화 및 갈변화 현상을 관찰할 수 있었다. 특히, 20 µg/mL 이상의 농도에서는 잎 절편의 생존율이 급격히 감소되었으며, 50 µg/mL에서는 0을 나타내었다(Figure 2). 따라서, Km에 내성을 지닌 NPTII gene을 선택표지로 이용하기 위하여 Km을 농도별로 처리한 후 내성을 조사한 결과, 50 µg/mL을 형질전환체의 일차적 선발 농도로 사용하였다.

무균 배양한 민들레잎 절편과 *A. tumefaciens* LBA4404의 공동배양 시간이 잎 절편의 생존율과 재분화율에 미치는 영향을 조사한 결과, 잎 절편의 생존율은 *Agrobacterium* 배양액에 침적한 경우가 가장 높았으며, 배양 시간이 길수록 잎 절편의 표백화 및 갈변화 현상이 증가됨이 관찰되었고, 생존율

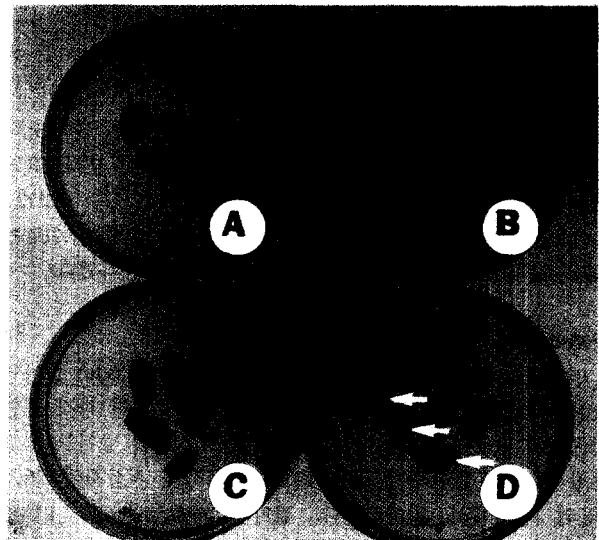


Figure 4. *Agrobacterium*-mediated leaf discs cultured on MS medium with 1 µM IAA, 1 µM BA, 100 µg/mL Cb and 50 µg/mL Km. Transformed leaf discs were selected by Km resistance. A, no cocultivation; B, 10 mins. cocultivation; C, 4 weeks after A; D, 4 weeks after B. The arrow indicates transformed leaf discs.

이 급격히 감소하는 것을 볼 수 있었다(Figure 3). 특히, 공동배양 시간이 10분 이후부터는 잎의 생존율이 급격히 감소하기 시작하여 30분 이후부터는 5% 정도의 생존율을 보였다. 따라서, 줄기의 재분화에 가장 적합한 공동배양 시간은 *Agrobacterium*의 감염을 감안한 10분으로 선택하였다. 이상의 결과를 근거로 하여 10분 동안 공동배양된 잎 절편을 여분의 균을 제거한 후, MS 배지에서 전배양하였다. 3일 경과 후, 100 µg/mL Cb, 50 µg/mL Km, 1 µM IAA, 1 µM BA가 첨가된 shoot 유도 배지로 옮겨서 생장시켰으며, 4주간 배양한 결과 250개의 절편 중에서 66개의 잎 절편이 생존함으로써 형질전환체가 1차적으로 선발되었고(Figure 4), 그 중에서 2개체

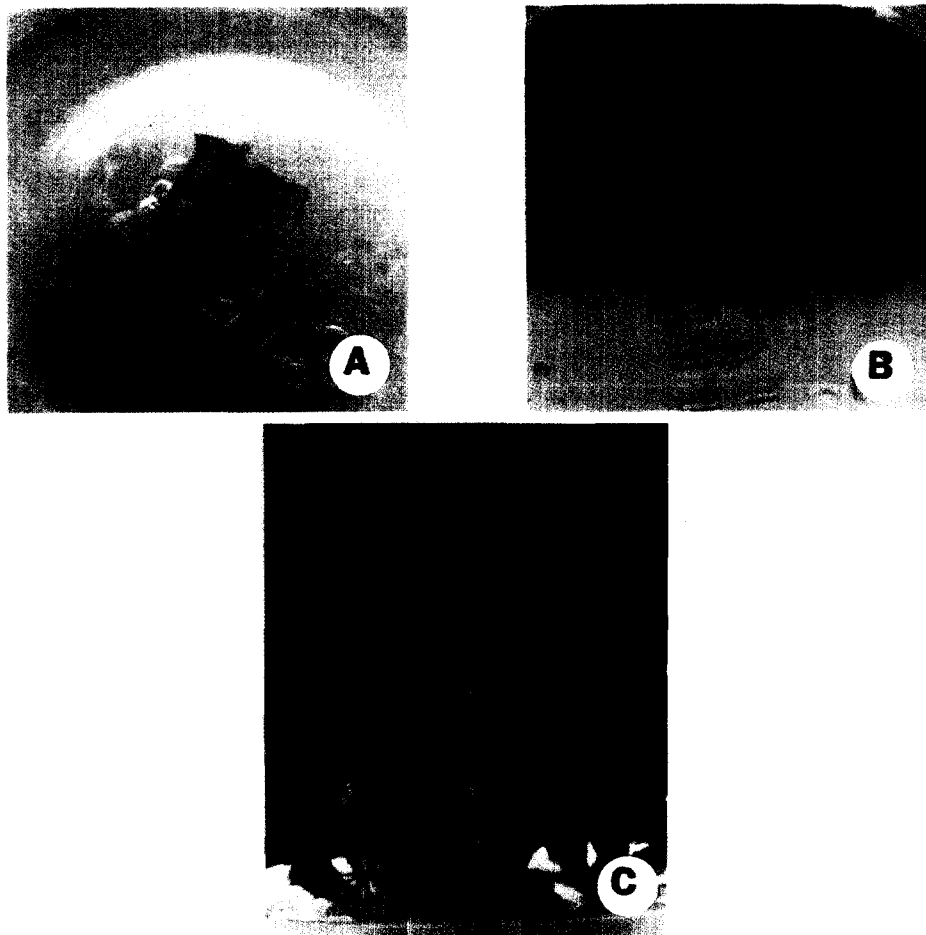


Figure 5. Organogenesis from leaf disc of transformed *Taraxacum mongolicum* Hand. Shoot formation from leaf discs infected by *A. tumefaciens* at 2 weeks (A) at 3 weeks (B) and at 8 weeks (C), respectively. Plantlet inducing medium contained 1 μ M IAA, 1 μ M BA, 100 μ g/mL Cb and 50 μ g/mL Km.

Table 1. Frequency of survival, regeneration and transformation rate after cocultivating leaf discs of *Taraxacum mongolicum* Hand. and *A. tumefaciens*

No. of discs	Survival frequency	No. of regeneration
250 (100%)	66 (26%)	2 (3%)

에서 shoot가 유도되었다(Table 1).

형질전환 민들레의 재분화와 GUS gene 발현의 확인

Shoot가 유도된 개체는 MS 배지로 재이식하여 4주간 배양한 후, 뿌리를 유도하였다. 이 개체를 2주 간격으로 새로운 배지에 재이식하여 성장시켰다(Figure 5). 8주 후 GUS 유전자 도입의 유무를 2차적으로 검증하기 위하여 GUS 활성을 측정하였다. 성장한 개체의 잎 중 상태가 최상인 것을 무작위적으로 선택하여 절취한 후, 37°C에서 X-gluc 용액에 하룻밤동안 침지시켰다. 그 결과, 모두 특이적 청색을 나타내는 GUS 양성 반응을 보였으며, 공동배양하지 않은 잎 절편에서 형성된 식물체는 모두 GUS 음성 반응을 보였다(Figure 6).

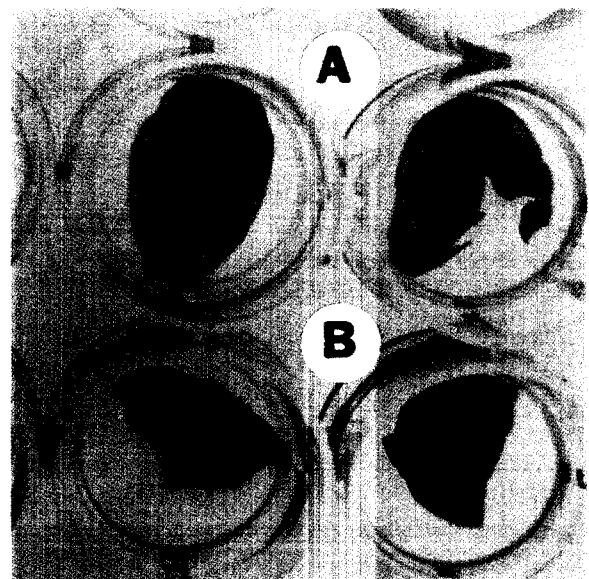


Figure 6. GUS histochemical analysis of leaves excised from control and transgenic *Taraxacum mongolicum* Hand obtained from *A. tumefaciens* LBA4404/pBI121. A, Leaves from control plants (no GUS activity); B, leaves from transgenic plants.

고 찰

형질전환체를 만들어내는 식물 종은 한정되어 있으며, 담배와 같이 형질전환 식물은 유전자 발현의 연구에 중요한 실험 재료로 이용되고 있다. 그러나, *A. tumefaciens*를 이용한 유전자의 식물체 도입에 따르는 여러 제약 조건으로 인해, 유용한 유전자가 클로닝되어도 지금까지 담배, 토마토, 페튜니아, 애기장대 등의 모델 식물 중심으로 연구되어 왔다. 본 실험에서 사용한 binary vector pBI121으로 형질전환된 식물체는 식물 호르몬 생산에 관여하는 유전자 대신 외래 유전자인 GUS gene이 도입되므로, 중앙 형성을 통해 형질전환 여부를 알아볼 수는 없다. 따라서, 여러 가지의 선택 표지 유전자가 필요하며, pBI121에 삽입되어 있는 NPT II 유전자가 식물세포에 도입되어 발현되면 Km에 대하여 식물체는 내성을 갖게 되므로(16) 이를 이용하여 형질전환체를 선발할 수 있었다.

pBI121으로 형질전환된 *A. tumefaciens*를 식물체로 전이하기 위하여 leaf disc 방법을 사용하였다. 작은 원반 모양의 디스크는 *A. tumefaciens*를 포함하고 있는 배지에서 적절한 시간동안 공동배양되어 T-DNA 부분이 식물체로 전이되도록 하였다. 호르몬이 없는 배지에서 2~3일 동안 전배양한 후, 항생제를 포함한 shoot 유도 배지로 재이식하여 형질전환된 디스크를 선별하였다.

식물세포의 형질전환 연구에 있어서 큰 문제가 되고 있는 점은 형질전환체의 선별을 위해서 사용하고 있는 항생제가 식물체의 광합성을 저해함으로써 인하여 형질전환율 및 재분화율이 감소하는 것이다. 이는 식물의 종류와 품종, 사용 부위, *A. tumefaciens*의 종류에 따라서도 매우 다양하게 나타난다(17). 따라서, 낮은 형질전환율과 오랜 시간이 소요되는 문제점을 극복하기 위해서는 페놀화합물을 넣어서 균주를 배양하며(16), 재료 식물의 생리적 상태를 조절하기 위하여 feeder layer(18) 및 전배양(19) 방법을 이용하기도 한다. 본 연구에서는 공기 균주와 10분 동안 공동배양된 잎절편을 성장조절 물질이 첨가되지 않은 MS 배지에 치상하여 2~3일 동안 전배양을 실시함으로써 재분화 시기를 1~2주 단축할 수 있어서 효과적이었다. 당근, 담배, 페튜니아 등은 전배양이 크게 요구되지 않는 반면에, 애기장대, 흰독말풀 등에서는 전배양을 하면 효율이 높아진다는 보고가 있다(20).

Binary vector system을 이용한 형질전환에 영향을 미치는 중요한 요인은 *A. tumefaciens*의 농도와 공동배양 시간, 그리고 Km에서의 선별 시기이며, 그 중에서도 Km에서의 선별 시기가 더욱 중요한 것으로 알려져 있다(21). 따라서, 본 연구에서도 적정 Km 선별 농도를 판정하기 위하여 여러 농도의 Km이 첨가된 줄기 유도 배지에 치상한 결과, 50 µg/mL Km 농도가 적합한 것으로 나타났다. 이 농도는 애기장대 20 µg/mL(22), 포플러 60 mg/L(23), 가지 100 mg/L(24), 옥수수 250 µg/mL(25)의 Km 선별 농도와는 다소 차이가 있었다. 이러한 결과는 식물체의 자체 저항 능력에 의하여 항생제에 대한 고유의 내성을 가지는 식물체가 존재하기 때문이다.

*A. tumefaciens*와의 공동배양 시간은 잎절편의 생존율과 재분화율에 매우 큰 영향을 미쳤으며, 당근 2~3일(20), 담배 1시간(26), 옥수수 2시간(25), 제라늄 10분(27)이 적합하다는 보고가 있다. 본 연구에서 줄기의 재분화에 가장 적합한 공동배

양 시간은 5×10^6 cell/mL 농도로 *A. tumefaciens*의 감염을 감안한 시간인 10분이 가장 효과적인 것으로 나타났다. 이상의 결과로, 식물체의 형질전환율을 높이기 위해서 *A. tumefaciens*의 공동배양은 최소 농도에서 최단 시간 내에 실시하는 것이 바람직한 것으로 생각된다.

1차적으로 NPT II gene의 도입 유무를 검증하고, 형질전환된 개체를 선별하기 위하여 50 µg/mL Km과 100 µg/mL의 Cb이 첨가된 shoot 유도 배지에서 4주 동안 shoot를 유도한 결과, 2개의 소식물체를 선별할 수 있었다. 이는 3%의 형질전환율을 나타내는 것으로 가지 7.6%(24), 산딸기 3%(28), 포플러 32%(23), 담배 0.9%(26), 구기자 0.05%(29)와는 다소 차이가 있었다. 이 결과는 *A. tumefaciens*로 형질전환을 실시한 민들레 잎 절편이 Km 첨가 배지와 접촉하고 있는 잎 절편 부위가 표백화됨으로서, 성장 호르몬과 영양 공급이 차단되거나 형질전환된 세포들이 선택압을 이겨내지 못하기 때문인 것으로 여겨진다. 또한, *A. tumefaciens*의 숙주 범위의 차이에 의하거나 민들레의 식물체 조직이 매우 유연하여 박테리아와의 공동배양 과정에서의 많은 상해를 입었기 때문인 것으로 생각된다(30).

형성된 shoot는 MS 배지로 재이식하여 root를 유도하였으며, 2주 간격으로 새로운 배지로 옮겨 주면서 완전한 식물체로 성장시켰다. 항생제가 첨가된 선별 배지에서 재분화된 multiple shoot들 중에서 외부 유전자가 도입된 형질전환체만을 재선별하기 위하여 재분화된 식물체의 잎으로부터 GUS 활성(15)을 측정된 결과, 모든 형질전환체에서 GUS 양성 반응을 보였으며, 대조구로 사용한 정상식물체의 잎에서는 GUS 음성 반응을 나타냈다. 이상의 결과는 일반적으로 식물 형질전환이 비교적 힘든 것으로 알려져 있는 초본류의 유용 유전자 도입에 효과적으로 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

이러한 본 연구는 외래 유전자의 도입에 의한 형질전환 식물체의 개발에 기초가 될 뿐만 아니라, 식물체의 재분화를 극대화시킬 수 있는 효과적인 방법의 하나로 제공될 수 있을 것이다.

요 약

국화과에 속하는 다년생 초본식물인 민들레가 *Agrobacterium*에 대한 숙주로서의 가능성을 조사하고 여러 가지 유용한 유전자를 민들레로 도입시키기 위해, 민들레 잎 절편을 pBI121으로 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404와 10분 동안 공동배양하여 형질전환시킨 후, 1 µM IAA, 1 µM BA, 50 µg/mL Km과 100 µg/mL Cb이 함유된 MS 배지에서 약 2주 후에 multiple shoot를 유도시켰다. 유기된 shoot로부터 유식물체를 얻었으며, 형질전환을 확인하기 위해 GUS 활성을 측정된 결과 양성 반응을 보였다.

REFERENCES

- Horsch R. B., R.T. Fraley, S.G. Rogers, P. R. Sanders, A. Lloyd, and N. L. Hoffmann (1984), Inheritance of functional foreign genes in plants, *Science*, **223**, 496-498.
- DeBlock M, L. Herrera-Estrella, M. Van Montagu, J.

- Schell, and P. Zambryski (1984), Expression of foreign gene in regenerated plants and their progeny, *EMBO J.*, **3**, 1681-1689.
3. Puonti K. J., P. Stable, and R. J. Erickson (1989), Transformation of pea by *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Cell Rep.*, **8**, 321-324.
 4. Sangwan, R., C. Ducrocq, and B. Sangwan-Norreel (1991), Effect of culture conditions on *Agrobacterium*-mediated transformation in *Datura*, *Plant Cell Rep.*, **10**, 90-93.
 5. Schell, J. S. (1987), Transgenic plants as tools to study the molecular organization of plant genes, *Science*, **237**, 1176-1183.
 6. Yutaka, O. (1993), Effects of the over-expression of the *rol C* gene on leaf development in transgenic periclinal chimeric plants, *Plant Cell Physiol.*, **34**, 745-752.
 7. Gheysen G, M. V. Montagu, and P. Zambryski (1981), Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA involves rearrangements of target plant DNA sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6169-6173.
 8. Anzai H., K. Yoneyama, and I. Yamaguchi (1990), Transgenic tobacco resistant to a bacterial disease by the detoxification of a pathogenic toxin, *Mol. Gen. Genet.*, **219**, 492-494.
 9. Nucifora G, S. Siver, and T. K. Misra (1989), Down regulation of the mercury resistance operon by the most promoter-distal gene *mer*, *Mol. Gen. Genet.*, **220**, 69-72.
 10. Uozumi, N. (1992), Production of artificial seed from horseradish hairy root, *J. Ferment Biol.*, **74**, 21-26.
 11. Walden, R. (1989), Genetic Transformation of Plants, Prentice Hall, New Jersey.
 12. Ellis JR (1993), Plant tissue culture and genetic transformation, In *Plant Molecular Biology*, R. R. D. Cryo, Ed., pp253-285, BIOS Scientific Publishers, UK.
 13. Murashige, T. and F. Skoog (1962), A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue culture, *Physiol. Plant*, **15**, 473-497.
 14. An, G., P. R. Ebert, A. Mitra, and S. B. Ha (1988), Binary vectors, In *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers, A3, 1-19.
 15. Jefferson R. A., T. A. Kavanagh, and M. W. Bevan (1987), GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, *EMBO J.*, **6**, 3901-3907.
 16. An, G., B. D. Watson, and C. C. Chiang (1986), Transformation of tobacco, tomato, potato, and *Arabidopsis thaliana* using a binary Ti vector system, *Plant Physiol.*, **81**, 301-305.
 17. Sheerman, S. and M. W. Bevan (1987), A rapid transformation method for *Solanum tuberosum* using binary *Agrobacterium tumefaciens* vectors, *Plant Cell Rep.*, **7**, 13-16.
 18. Remate, S. and W. Lothar (1988), High efficiency *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* leaf and cotyledon explants, *Plant Cell Rep.*, **7**, 583-586.
 19. Herman W, M. Gregory, and P. William (1989), A rapid and efficient transformation method for the production of large numbers of transgenic potato plants, *Plant Science*, **63**, 79-85.
 20. Pawlick M, R. Sangwan, and B. Sangwan-Norreel (1992), Factors influencing the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of carrot (*Daucus carota* L.), *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **31**, 129-139.
 21. Archilietti T, P. Lauri, and C. Damiano (1995), *Agrobacterium*-mediated transformation of almond leaf pieces, *Plant Cell Rep.*, **14**, 267-272.
 22. Yang, D. C. and S. T. Lee (1990), Transformation of carrot cells using binary vector system, *Kor. J. Biotechnol. Biol.*, **5**, 247-253.
 23. Fillatti J. J., J. Sellmer, B. McCown, B. Haissig, and L. Comai (1987), *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*, *Mol. Gen. Genet.*, **206**, 192-199.
 24. Rotino, G. L. and S. Gleddie (1990), Transformation of eggplant (*Solanum elongena* L.) using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector, *Plant Cell ep.*, **9**, 26-29.
 25. Roh, K. S. and B. J. Kang (1992), Identification of *Agrobacterium tumefaciens* from oil and transformation of maize, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **7**, 191-200.
 26. Kwon, M. S. (1996), Expression of GFP (Green fluorescent protein) gene as reporter gene, M. S. Thesis, Dept. of Biology, Keimyung University, Daegu.
 27. Sankaran, K., Bi. Yong-Mei, and P. K. Saxena (1997), Somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation system for scented geraniums (*Pelargonium sp. 'reshman'*), *Planta*, **201**, 434-440.
 28. Nehra N. S., R. N. Chibbar, K. K. Kartha, R. R. R. Datta, and W. L. Crosby (1990), Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disc regeneration system, *Plant Cell Rep.*, **9**, 293-298.
 29. Park, Y. G., M. S. Choi, B. W. Kim, W. I. Chung, and K. S. Roh (1995), Factors affecting introduction of *rolC* Gene in *Lycium chinense* Mill., *Kor. J. Plant Tissue Culture*, **22**, 329-334.
 30. Orlikowska T. K., H. J. Cranston, and W. E. Dyer (1995), Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and regeneration of the safflower cultivar 'centennial', *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **40**, 85-91.