

## 배발생 캘러스를 이용한 아그로박테리움 매개형질전환 장미 식물체 획득

이수영 · 이정림 · 김원희 · 김성태 · 이은경

### Acquirement of transgenic rose plants from embryogenic calluses via *Agrobacterium tumefaciens*

Su Young Lee · Jung Lim Lee · Won Hee Kim · Seung Tae Kim · Eun Kyung Lee

Received: 12 October 2010 / Accepted: 27 October 2010  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** The process to acquire intron-GUS gene-expressed transformants from somatic embryos (including embryogenic calli) of *Rosa hybrida* cv. ‘Sweet Yellow’ using *Agrobacterium*-mediated transformation method was reported in this study. Somatic embryos including embryogenic calluses were infected with *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 strain (O.D = 0.7~1.6) including intron-GUS gene for 30 min, and were co-cultured for 3 days. After co-cultivation, they were cultured on embryo germination medium (EGM) supplemented with 250 mg·L<sup>-1</sup> cefotaxim at 4°C for 7 days. Then, transient GUS gene expression was observed. Shoots were regenerated from the shoot primordia induced from the intron-GUS gene-transferred either somatic embryos or embryogenic calli cultured on EGM supplemented with both cefotaxim 250 mg·L<sup>-1</sup> and ppt 2 mg·L<sup>-1</sup>. Before induction of rooting from shoots cultured on shoot growing medium supplemented with both cefotaxim 250 mg·L<sup>-1</sup> and ppt 2 mg·L<sup>-1</sup>, the shoots were cultured on multi-shoot induction medium supplemented with both cefotaxim 250 mg·L<sup>-1</sup> and ppt 2 mg·L<sup>-1</sup> to induce multi-shoots. When expression of the gene from a part of the multi-shoots was identified by GUS transient assay, the putative transgenic multi-shoots were transferred to rooting medium supplemented with cefotaxim 250 mg·L<sup>-1</sup>. After the formation of healthy roots, transgenic plantlets were transferred to the greenhouse after acclimatization. The expression rate of the intron-

GUS gene in the multi-shoots was 100%.

**Keywords** rose, somatic embryogenic callus, explants,  $\beta$  glucuronidase (GUS), transformation

#### 서론

장미를 포함한 주요 화훼작물들의 신품종은 주로 품종간 또는 종간교잡 기술을 이용하여 개발되고 있다. 품종간 또는 종간교잡 등 교잡육종 기술은 신품종을 개발하는 주요 수단이지만 유전자원들이 보유하지 않은 특성을 가진 품종을 개발하는 것은 불가능하며, 설사 유전자원들이 보유하고 있는 특성이라도 유전자원들간에 교잡화합성이 없을 경우에는 그 특성을 가진 품종을 개발하기가 불가능한 한계점이 있다. 이러한 교잡육종의 한계점을 극복할 수 있는 방법이 형질전환 기술이다. 세계 3대 절화류의 하나인 장미의 경우, 형질전환체를 획득하기 위하여 선행적으로 수행되는 수많은 재분화 연구에 대한 보고가 있지만 형질전환에 관한 연구로는 미국 DNA Plant Technology사의 Firoozabady 등 (1994)에 의해 최초로 보고된 이후 최근까지 세계적으로 3~4개의 연구팀에 의해서 몇몇 연구만이 보고되었다 (Derk et al. 1995; Kim et al. 2004; Li et al. 2002, 2003; Marchant et al. 1998a, 1998b; Souq et al. 1996; Van der Salm et al. 1997, 1998). 그러나 2006년 말경 일본의 Suntory사에서 개발되어 2009년 말 상업화된 푸른색 장미 형질전환체를 획득하였다는 보고와 같이 최근까지 벼나 콩 등 주곡작물에서만 주요 육종기술로 이용되었던 형질전환 기술이 장미의 품종 육성을 위한 기술로서 이용될 수 있는 가능성이 제시되었지만 현재까지 장미의 형질전환체를 획득하는 것은 쉽지 않은

S. Y. Lee (✉) · J. L. Lee · W. H. Kim · S. T. Kim · E. K. Lee  
농촌진흥청 국립원예특작과학원 화훼과  
(National Institute of Horticultural & Herbal Science, Rural  
Development Administration, Suwon 441-440, Korea)  
e-mail: lsy8542224@korea.kr

것으로 알려져 있다. Suntory사의 Tanaka (2009) 보고를 포함하여 위에서 제시되어 있는 장미 형질전환체 획득에 성공하였다는 국외 보고의 대다수는 절편체로 기내 잎 (엽병포함) 및 줄기 단편으로부터 유도된 캘러스 또는 체세포배발생캘러스를 이용하여 아그로박테리움이나 유전자총을 매개로 하여 유전자의 도입을 시도하였으나 효율이 낮고 극히 일부 품종에 국한되어 연구되었다. 국내에서도 장미 형질전환에 관한 연구로는 한국생명공학연구원에서 1996년부터 2000년까지 4년간 장미 체세포배발생캘러스의 유도 및 형질전환 기술을 개발하고자 시도하였고, Kim 등 (2004)이 Castillón 과 Kamo (2002)가 ‘Tineke’로부터 유도한 체세포배발생캘러스를 절편체로 이용하여 GFP유전자가 도입된 형질전환체를 획득하였다는 보고가 있으나 국내의 경우 본 연구팀을 제외하고는 장미 체세포배발생캘러스 유도 기술조차도 개발하지 못한 실정이다.

본 연구팀은 2008년도에 특허출원하여 실험실에서 유지 보존하고 있는 기내 뿌리 유래 체세포배 (배발생캘러스 포함)를 절편체로 이용하여 콩, 옥수수 등 몇몇 작목에서 성공된 바 있는 유전자총 매개에 의해서 보다는 보편적으로 유전자전이에 효율적이라고 알려져 있는 아그로박테리움 매개에 의한 형질전환 기술을 이용하여 장미 형질전환체를 대량 획득하고자 하였다. 그런데 본 연구팀의 연구결과에 의하면 아그로박테리움 매개에 의한 체세포배 (배발생캘러스 포함) 유래 형질전환체를 획득하고자 할 때, 절편체로의 효율적인 유전자전이과정과 더불어 중요한 과정이 유전자가 전이 된 체세포배 (배발생캘러스 포함)로부터 기내식물체의 발근까지인데 대다수의 연구에서는 유전자 전이 이후의 과정에 대해 상세한 설명부분이 미진하다. 이에 본 연구에서는 국내에서 육성된 품종으로부터 유도된 체세포배 (배발생캘러스)로의 유전자전이 식물체를 획득하기까지의 과정을 보고하고자 하였다.

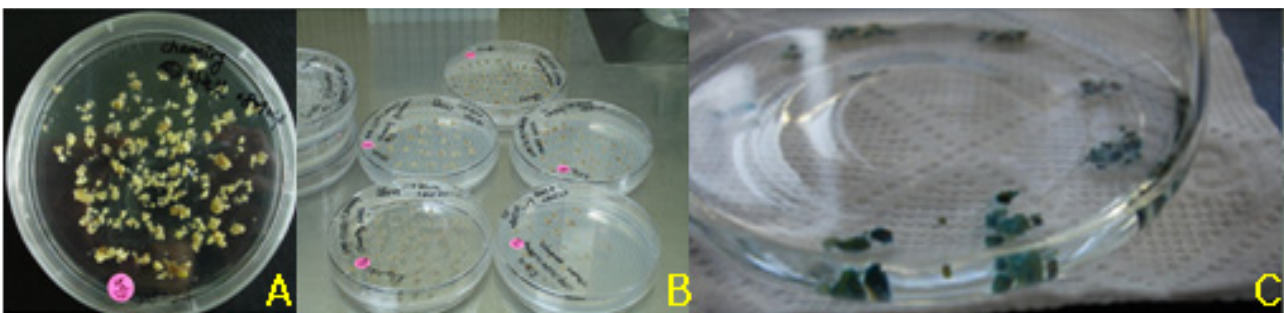
## 재료 및 방법

### 실험 재료

Lee 등 (2008)에 의해 보고된 것처럼 국립원예특작과학원에서 육성된 장미 품종 ‘Sweet Yellow’의 기내 식물체 뿌리를 2,4-D 5 또는 11 mg·L<sup>-1</sup>가 첨가된 Schenk & Hildebrandt (SH) 배지 (Schenk and Hildebrandt 1972)에서 2~8주 배양한 후 식물생장조절제가 첨가되지 않은 SH배지를 경유하거나 직접 Marchant 등 (1996)에 의해 보고된 배발생 및 2차 배발생캘러스유도 배지에서 배양하여 획득된 후 계대배양중인 체세포배발생캘러스로부터 Figure 1A와 같이 체세포배 (배발생 캘러스 포함) (이하 시료로 칭함)를 선별하여 재료로 사용하였다.

### 아그로박테리움 매개 GUS유전자 전이

유전자는 특정 작물의 형질전환 기술을 확립하고자 할 때 표식유전자로서 널리 이용되고 있는 intron-GUS (이하 GUS로 칭함) 유전자를 Han 등 (2005)으로부터 pCambia 3301 벡터에 삽입되어 *Agrobacterium tumefaciens* AgL1내 삽입되어 있는 균주 상태로 분양받아 증식 후 사용하였다. -70°C 냉동고에서 보관중인 균주 저장액 1 mL을 50 mg·L<sup>-1</sup> kanamycin과 50 mg·L<sup>-1</sup> rifampicin이 첨가된 Luria-Bertani (LB) 액체배지 (tryptone 10 g·L<sup>-1</sup>, yeast 5 g·L<sup>-1</sup>, NaCl 10 g·L<sup>-1</sup>)에 첨가 후 28°C 회전 인큐베이터에서 170~200 rpm의 속도로 O.D<sub>600</sub>=0.7~1.6 정도가 될 때까지 배양하였다. 배양된 균은 6,000 rpm으로 7분간 원심분리하여 배양 배지와 분리한 후 균 침강 덩어리를 acetosyringone 50 μM을 첨가한 SH 액체 배지와 균질하게 섞은 균 현탁액에 미리 준비된 시료 10 mL을 30분간 감염시켰다. 멸균된 filter paper 상에서 시료에 묻어 있는 균액을 제거한 후 acetosyringon,



**Fig. 1** Somatic embryos (including embryogenic calluses) of *Rosa hybrida* cv. ‘Sweet Yellow’ before (A) and after (B) co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens* AgL1 including intron-GUS gene, and identification of the intron-GUS gene transfer into those by GUS transient assay (C)

50  $\mu\text{M}$  2,4-D 3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , sucrose 30  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , L-proline 300  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  등이 첨가되고 phytigel 2.5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 로 고형화된 SH배지 (pH 5.2)로 옮겨  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 암상태로 3일간 공동배양하여 유전자가 시료로 전이되도록 하였다.

### GUS유전자 도입 확인

GUS 유전자를 전이시키고자 균과 공동배양된 시료를 cefotaxim 250  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 이 첨가된 SH 액체배지로 세척 후 멸균된 filter paper상에서 시료에 묻어 있는 세척액을 제거하여 Figure 1B에서 보는 것과 같이 cefotaxim 250  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 이 첨가된 체세포배 발아배지 (SH component + IBA 0.1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + BAP 1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + maltose 30  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  + agarose 4  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 5.7)로 옮겨,  $4^\circ\text{C}$ 에서 7일간 암배양하였다. 그 후 명배양조건으로 옮겨 시료의 일부를 Jafferson 등 (1987)에 따라 GUS transient assay에 의해 유전자 도입여부를 확인하였다.

### GUS유전자 전이 식물체 획득

GUS유전자의 전이가 확인된 시료는 그 상태에 따라 체세포배 발아배지나 체세포배 성숙배지 (SH component + 2,4-D 1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + ABA 1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + BAP 1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + GA3 0.3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + sucrose 30  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  + agarose 4  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 5.7)로 옮겨 신초원기를 유도하였고 그 원기로부터 신초를 재분화시켰다. 재분화된 신초의 건실한 지상부 성장을 위해 신초생장 (MS component + BAP 2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + NAA 0.1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + sucrose 30  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  + agar 8  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 5.8) 및 다신초유도 (MS component + BAP 1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + IBA 0.001  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + sucrose 30  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  + agar 8  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 5.8) 선발배지에 배양한 다음 일부 신초를 떼어 유전자 도입 확인할 때와 같은 방법으로 도입 유전자의 발현 여부를 조사하였다. 도입 유전자의 발현이 확인된 다신초는 발근유도 선발배지 (MS component + NAA 0.3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + sucrose 30  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  + agar 8  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 5.8)에서 2~3주 배양하여 발근시킨 후 순화하였다. 모든 배지는 cefotaxim 250  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 이 단독 첨가되거나 ppt 2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 와 혼합첨가되었고, 계대 배양은 3~4주 간격으로 이루어졌다.

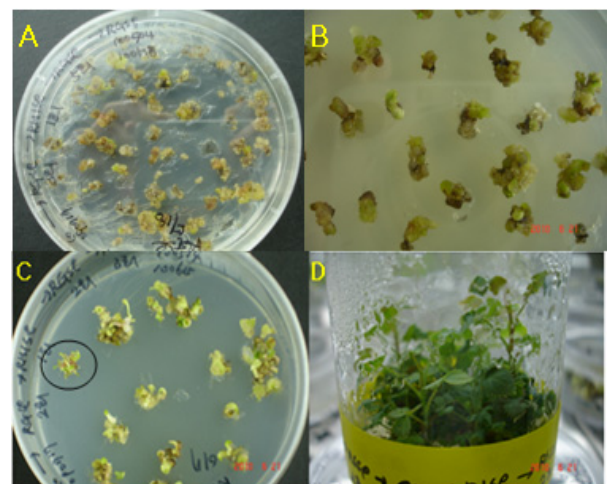
### 결과 및 고찰

체세포배 (체세포배발생 캘러스 포함)로의 GUS유전자 전이 확인

아그로박테리움 매개에 의해서 GUS유전자가 전이된 장미 식물체를 획득하기 위하여 10 mL의 시료를 GUS유전

자를 포함하고 있는 아그로박테리움과 공동배양한 후  $4^\circ\text{C}$ 에서 7일간의 저온처리를 거쳐 cefotaxim 250  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  첨가 체세포배발아 배지에서 배양중인 시료들 중의 일부를 GUS transient assay한 결과, Figure 1C에서 볼 수 있는 바와 같이 시료의 대부분이 GUS활성을 보였다. 이는 균 내 삽입되어 있었던 유전자가 균에 감염된 시료로 전이되었음을 말해주는 것이라 할 수 있다. 체세포배는 배 외곽 부분에 주로 GUS 유전자의 활성을 보여주었고, 균과 현탁배양되면서 체세포배에 붙어있다 분리된 배발생캘러스는 캘러스 전체에서 GUS유전자의 활성을 확인할 수 있었다. 아그로박테리움 공동배양이나 유전자총을 매개로 하여 유전자가 전이된 장미 형질전환 식물체를 획득하고자 할 때 가장 빈번하게 이용되었던 절편체는 체세포배발생캘러스이었다. 이는 체세포배발생캘러스를 구성하고 있는 각각의 세포가 독립적으로 행동하여 세포 하나하나가 체세포배로 발달할 수 있고, 기관분화나 조직으로부터 분화된 캘러스로부터 얻은 식물체와는 다르게 식물체 일부분만이 유전자전환이 되는 키메라 형질 전환체를 획득할 가능성이 낮기 때문이다 (Li et al. 2002).

그런데 아그로박테리움과의 공동배양된 시료의 대다수가 GUS활성을 보여준 본 것은 Li 등 (2002)에 의해서 언급된 유전자전이 대상 절편체로서 체세포배발생캘러스가 가진 장점에 유전자전이 효율이 높다는 또 하나의 장점을 추가 할 수 있는 연구결과라 할 수 있다. 또한 체세포배발생캘러스의 유전자전이 절편체로서 추가될 수 있는 또 다른 장점은 Figure 2A와 같이 유전자가 전이된



**Fig. 2** The process to induce multi-shoots from intron-GUS gene-transferred either somatic embryos or embryogenic calli of *Rosa hybrida* cv. 'Sweet Yellow' (A) germination, (B) induction of shoot primordia, (C) shoot elongation, and (D) multi-shooting

체세포배발생캘러스가 2차 배발생캘러스를 분화시킬 수 있어 수많은 형질전환체를 획득할 수 있다는 점이다. 본 연구에 있어서도 아그로박테리움과 공동배양된 직후 시료를 3~5 mm 간격으로 배양한 선발배지의 plate (100 mm x 20 mm) 수가 3개인데 선발과정에서 도태된 시료를 제외하고 신초유도 선발배지로 계대배양된 시료의 배양 palte 수가 15개로 4~5배 정도 늘어났다. 이는 형질전환체를 대량으로 획득할 수 있다는 가능성을 보여준 결과라고 할 수 있다.

#### 유전자가 전이 된 체세포배 (배발생캘러스 포함)로부터 신초 및 다신초 유도

유전자가 도입되지 않은 절편체로부터 신초 유도가 잘 되었던 배양조건으로 유전자가 전이된 절편체를 배양하였을 때 재분화 신초를 유도하는 것이 쉽지 않은 것으로 알려져 있기 때문에, 유전자가 전이된 식물체를 획득하고자 할 때 유전자를 전이시키고자 하는 대상 절편체로의 유전자 전이의 성공에 못지않게 중요한 과정은 유전자가 전이된 절편체로부터 신초를 재분화시키는 것이라 할 수 있다. GUS 유전자의 전이가 확인된 시료로부터 신초를 유도하기 위해서 시료의 생육상태를 고려하여 cefotaxim 250 mg·L<sup>-1</sup>이 첨가된 체세포배발아 배지에서 2회 계대배양한 후 Figure 2A에서 볼 수 있는 바와 같이 연초록색을 띤 후 신초원기가 출현할 때까지 체세포배발아 선발배지에서 배양하였다. 시료의 상태에 따라 체세포배발아 선발배지로 옮기기 전에 체세포배 성숙 선발배지에서 배양되기도 하였다. 이와 같이 시료의 상태에 따라 항생제 등이 첨가되지 않고 아그로박테리움의 생장을 막기 위한 cefotaxim만이 첨가된 선발배지에서 배양하는 것은 Firoozabady 등 (1994)과 Li 등 (2002)의 보고에서도 확인할 수 있었다. 신초 원기가 눈으로 확인된 시료는 신초의 모습으로 성장될 때까지 신초유도 선발배지로 옮겨 (Fig. 2B) 8~10회 계대배양하였으며, 신초의 건실한 성장을 위해 신초생장 선발배지로 옮겨 초장이 1~1.5 cm 되도록 2~3회 계대배양하였다 (Fig. 2C). 본 연구에서 intron-GUS 유전자의 전이가 확인된 시료로부터 유도된 신초원기로부터 신초 획득까지 소요된 기간은 24~35주로 사용된 유전자 및 선발배지가 다르기는 하지만 8주 소요되었다는 Firoozabady 등 (1994)의 연구 보고보다는 3~5배 더 소요된 것이고, 반면, 신초를 1.5 cm 정도로 신장시키는데 8~12주 소요되었다고 보고한 Firoozabady 등 (1994)의 연구 보고보다는 2주 정도

짧게 소요된 것이다. 이는 획득된 신초를 신장선발배지로 옮기는 신초 상태에 대한 연구자의 판단에 차이가 있을 수 있고, 사용한 유전자 및 선발배지가 다르므로 해서 발생된 차이일 수도 있을 것으로 생각된다. 발근전 식물체의 지상부 생육을 건실하게 하기 위해 다신초 유도 선발배지로 옮겨 Figure 2D에서 볼 수 있는 것처럼 다신초가 형성되도록 5~6회 계대배양하였다. Marchant 등 (1996) 또는 Castillón과 Kamo 등 (2002)의 연구 등을 포함하여 기존에 보고된 장미 재분화 및 형질전환에 관한 대다수 연구 보고에서는 신초 유도 선발배지를 거쳐 발근배지로 옮기는 것에 대해서만 언급되어 있었다. 그러나 본 연구에서 확인한 결과 신초유도 및 성장 후 다신초를 유도하지 않을 경우 발근선발배지에서 고사되는 경우가 많아 발근전에 다신초유도 선발배지를 경유하는 것이 애써 획득한 유전자전이 식물체가 고사되지 않도록 하기 위해 반드시 필요한 과정임을 알 수 있었다. 이는 장미의 경우 고풍성 작물이기 때문에 지상부 생육이 미약할 경우 사이토키닌류의 호르몬이 첨가되지 않는 발근배지에서 발근되기 전까지 식물체 자체를 유지하기 어렵기 때문에 발근전 식물체의 지상부 생육이 건실하도록 배양하는 과정이 필요한 것으로 추정된다.

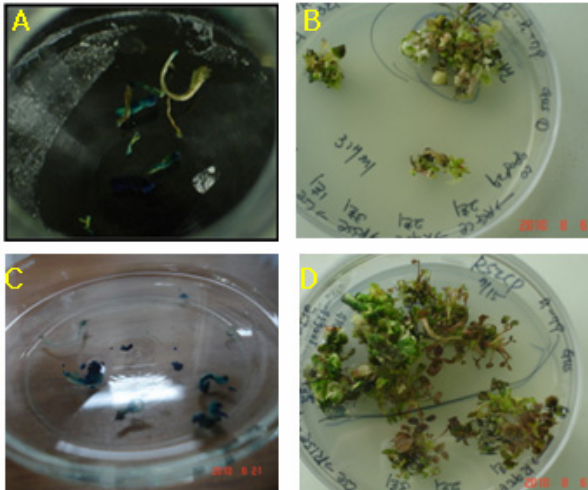
#### 신초로부터 도입 유전자 발현 확인 및 발근 후 운실 순화

GUS 유전자의 전이가 확인된 후 다신초 유도 선발배지에서 생육중인 식물체들 중 무작위로 8개체의 일부를 떼어 GUS transient assay 분석을 실시한 결과, 8개체 모두에서 GUS 유전자의 발현을 확인할 수 있었다 (Table 1). 더욱이 검정한 신초원기 전체에서 도입 유전자인 GUS 유전자의 발현을 확인 할 수 있었는데 (Fig. 3A, C), 이와 같이 선발 식물체의 전체에서 도입 유전자가 발현되는 것은 유전자를 전이하고자 하는 재료로서 체세포배 (배발생캘러스 포함)를 이용하는 장점을 그대로 보여준 결과라 할 수 있다. 도입된 유전자의 발현이 확인된 8개체 중 4개체는 발근유도 선발배지로 옮겨 (Fig. 4A) 지상부가 6~7 cm 정도의 발근묘가 되도록 30일간 배양한 후 2~3주간의

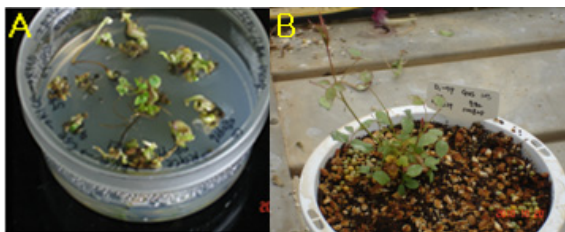
**Table 1** Identification of intron-GUS gene expression from shoots obtained from Intron-GUS gene-transferred somatic embryo (including embryogenic calluses)

No. of analyzed shoots	No. of GUS gene-expressed shoots	Transient expression of GUS gene (%)
8	8	100





**Fig. 3** Intron-GUS gene expression (A and C) in a part of shoots (B and D) which were cultured for the induction of multi-shooting from shoots regenerated from the intron-GUS gene-transferred either somatic embryos or embryogenic calluses of *Rosa hybrida* cv. ‘Sweet Yellow’



**Fig. 4** Intron-GUS gene-expressed plants (A and B) growing in the green house through acclimation after roots were taken from shoots regenerated from the intron-GUS gene-transferred either somatic embryos or embryogenic calluses of *Rosa hybrida* cv. ‘Sweet Yellow’

순화를 거쳐 온실로 옮겼고, 온실로 옮긴 일주일 후 꽃봉오리가 맺혀 개화 중이다 (Fig. 4B).

본 연구는 장미에 있어서 체세포배 (배발생캘러스)를 이용한 형질전환체의 획득에 관한 연구보고로는 국내 최초이기도 하지만 재료로서 국내 육성 품종 ‘Sweet Yellow’ 유래 체세포배 (배발생 캘러스 포함)를 이용하였다는 점에서 획기적이라고 할 수 있다. 특히 체세포배를 이용하여 유전자의 전이 효율을 획기적으로 증진시킬 수 있었으며, 유전자 전이 후, 선발배지에서 획득된 신초를 다신초 개체가 되었을 때 발근시켜야 유전자가 전이된 개체의 고사를 막을 수 있음에 관한 보고로서 장미에 있어서 형질전환체의 획득하는데 성공할 수 있는 중요한 정보를 제공하였다. 2008년도에 보고된 장미의 효율적인 체세포배발생캘러스 유도 방법을 이용하여 체세포배발생캘러스를 유도한 후 본 연구에서 보고된 효

율적인 유전자 전이 방법을 이용한다면 전통적인 육종 방법으로 도입하기 힘든 특성을 가진 장미 품종을 육성하는데 성공할 수 있으리라 기대된다.

**적 요**

아그로박테리움 매개에 의한 형질전환 기술을 이용하여 국내에서 육성된 품종 ‘Sweet Yellow’로부터 유도된 체세포배 (배발생캘러스 포함)로 intron-GUS유전자가 전이된 식물체를 획득하기까지의 과정이 제시되었다. Intron-GUS 유전자를 포함하고 있는 *Agrobacterium tumefaciens* AgL1 (O.D=0.7~1.6)에 30분 감염시켜 3일간 공동배양 한 후 4°C에서 7일간의 저온처리를 거친 후 cefotaxim 250 mg·L<sup>-1</sup> 첨가 체세포배발아 배지에 배양된 체세포배 (배발생캘러스 포함)들 대부분으로 유전자가 전이된 것을 GUS transient assay에 의해 확인하였다. Intron-GUS유전자가 전이된 체세포배 (배발생캘러스 포함)로부터 신초원기를 유도한 후 신초를 재분화시켰고, 재분화된 신초로부터 다신초가 형성되도록 하였다. 다신초로부터 신초의 일부를 떼어 GUS transient assay 분석을 실시하여 intron-GUS 유전자의 발현을 확인한 후 발근시켜 순화 후 온실로 옮겼다. GUS transient assay에 의해 확인된 유전자 발현율은 100%였다.

**사 사**

본 연구는 농촌진흥청 농업과학기술개발 공동연구개발 사업 (과제번호: 2007030103601102)의 지원으로 수행되었습니다.

**인용문헌**

Castillón J, Kamo K (2002) Maturation and conversion of somatic embryos of three genetically diverse rose cultivars. *hortscience* 37:973-977

Derk FHM, van Dijk AJ, Hanisch ten Cate ChH, Florack DEA, Dubois LAM, de Vries DP (1995) Prolongation of vase life of cut roses via introduction of genes coding for antibacterial activity, somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation. *Acta Hort.* 405:205-209

Firozabady E, Moy Y, Courtneygutterson, N, Robinson K (1994) Regeneration of transgenic rose (*Rosa hybrida*)

- plants from embryogenic tissues. *Bio/Technology* 12: 609-613
- Han JS, Kim CK, Park SH, Hirschi KD, Mok IG (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation of bottle gourd (*Lagenaria siceraria* Standl.) *Plant Cell Rep.* 23:692-698
- Jafferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in high plants. *EMBO J* 6:39.1-39.7
- Kim CK, Chung JD, Park SH, Burrell AM, Kamo KK, Byrne DH (2004) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Rosa hybrida* using the green fluorescent protein (GFP) gene. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 78:107-111
- Lee SY, Jung JH, Kim JH, Han BH (2008) In vitro multiple shoot proliferation and plant regeneration in rose. *J. Plant Biotechnol.* 35:223-228
- Li X, Gasic K, Cammue B, Broekaert W, Korban SS (2003) Transgenic rose lines harboring an antimicrobial protein gene, Ace-AMP1, demonstrate enhanced resistance to powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa*). *Planta* 218: 226-232
- Li X, Krasnyanski S, Korban SS (2002) Optimization of the uidA gene transfer into somatic embryos of rose via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol Biochem* 40: 453-459
- Marchant R, Davey MR, Lucas JA, Power JB (1996) Somatic embryogenesis and plant regeneration in floribunda rose (*Rosa hybrida*L.) cvs. Trumpeter and Glad Tidings. *Plant Sci* 120:95-105
- Marchant R, Davey MR, Lucas JA, Lamb CJ, Dixon RA, Power JB (1998a) Expression of a chitinase transgene in rose (*Rosa hybrida* L.) reduce development of blackspot disease (*Diplocarpon rosae wolf*). *Mol. Breed* 4:187-194
- Marchant R, Power JB, Davey MR (1998b) Biolistic transformation of rose (*Rosa hybrida* L.) *Ann Bot* 81:109-114
- Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50:199-204
- Souq E, Coutos-Thevnot P, Yean H, Delbard G, Maziere Y, Barbe JP, Boulay et M (1996) Genetic transformation of roses, 2 examples: one on morphogenesis, the other on anthocyanin biosynthetic pathway. *Acta hort* 424:381-388
- Tanaka Y (2009) Flower colour modification by genetic engineering. 2009 PlantScience Conference: 9
- Van der Salm TPM, Bouwer R, van Dijk AJ, Keizer LCP, Hänisch ten Cate ChH, van der Plas LHW, Dons HJM (1998) Stimulation of scion bud release by *rol* gene transformed rootstocks of *Rosa hybrida* L. *J Exp Bot* 49: 847-852
- Van der Salm TPM, van der Toorn CJG, Bouwer R, Hänisch ten Cate ChH, Dons HJM (1997) Production of *rol* gene transformed plants of *Rosa hybrida* L. and characterization of their rooting ability. *Mol Breed* 3:39-47