

***Agrobacterium tumefaciens*에 의한 *RAG25* 유전자의 더덕 (*Codonopsis lanceolata*)으로의 도입**

신준혜 · 박민철*
가톨릭대학교 생명과학부

Introduction of *RAG25* gene into *Codonopsis lanceolata* by *Agrobacterium tumefaciens*

SHIN, Jun Hye · PARK, Min Chul*
School of Life Sciences, The Catholic University of Korea

ABSTRACT A *RAG25* gene regulating flowering time was introduced into *Codonopsis lanceolata* through high efficiencies (ca. 90%) of plant regeneration. The leaf explants were immersed in YEP media containing *Agrobacterium tumefaciens* (pGA1209) harboring *RAG25* gene, and cocultivated for 3 days. After cocultivation, they were cultured in shoot inducing media (SIM), N2B2 (NAA 2 mg/L, BA 2 mg/L and kanamycin 20 mg/L) and N2B4 (NAA 2 mg/L, BA 4 mg/L and kanamycin 20 mg/L), and the putative transformants were regenerated. The introduction of *npt II* and *RAG25* gene into *Codonopsis lanceolata* was confirmed by 0.7 kb and 0.6 kb bands from polymerase chain reaction and reconfirmed by Southern hybridization using PCR product of *RAG25* gene.

Key words: AgNO₃, *Agrobacterium*, *Codonopsis lanceolata*, Organogenesis, *RAG25* gene, Somatic embryogenesis

서 론

더덕 (*Codonopsis lanceolata*)은 도라지과에 속하는 덩굴성 다년생 초본식물로 인도와 동아시아에 약 40종이 분포하며 우리나라에는 약 4종이 자생하고 있다. 더덕은 식용, 관상용, 약용으로 쓰이는 방향성 식물로 최근에는 관상용 식물로서 재배되고 있어 수요가 증가하는 추세이다. 더덕의 연구는 1992년에 Min 등에 의해 체세포 배발생을 통한 더덕의 재분화에 성공한 이후 Choi 등 (1994)이 더덕의 자엽을 이용하여 기관분화에 의한 재분화를 보고하였으며, 1996년에는 최 등이 더덕의 형질전환에 관한 연구를 보고하였다. 그러나 더덕의 형질전환 연구의 경우 reporter gene인 GUS유전자의 도

입 정도만 보고되어 있으며 (최 등 1996) 최근까지도 유용 유전자의 도입은 이루어져 있지 않다.

쌍자엽 식물의 연구에서 꽃기관의 발달은 MADS domain을 함유하는 조절인자의 한 그룹에 의해 조절되어진다고 밝혀졌는데 (Sommer et al. 1990; Mandel et al. 1992; Schwarz-Sommer et al. 1990), 이러한 유전자의 그룹을 MADS box gene family라고 하며 본 연구에서 사용된 *RAG25*유전자도 이 유전자그룹에 속한다. 이 유전자들은 식물에서 뿐만 아니라 동물 그리고 효모에서도 다양한 발생단계의 조절에서 중요한 역할을 수행한다 (Ma 1994; Norman et al. 1988; Yanofsky et al. 1990). 최근에 이 유전자를 이용한 담배의 형질전환실험에서, 형질전환된 식물체의 이른 개화와 왜성 표현형의 유도를 보고한 바 있다 (An 1994; Chung et al. 1994).

본 연구에서는 캘러스 유도 배지를 통한 배양 기간을 생략하고 더덕의 잎절편체를 재분화배지에 직접 치상함으로써 신

*Corresponding author. Tel 032-340-3353
E-mail mcpark@www.cuk.ac.kr

초를 유도하는 방법을 이용하여 배양기간을 단축시키고자 하며, 이러한 재분화체계를 바탕으로 더덕에 *RAG25* 유전자를 도입하였을 때 유전자의 발현양상을 연구하여 이 유전자에 의한 왜성형질의 유도에 효과적인 형질전환체계를 연구하고자 한다.

재료 및 방법

식물재료 및 발아조건

더덕종자를 8시간 동안 물에 침지시킨 후 70% EtOH로 1분간 소독하고 1% sodium hypochlorite를 이용하여 5분 동안 멸균하였다. 다음 멸균 증류수로 3~4회 세척한 후 종자를 3% sucrose, 0.7% agar가 첨가된 MS 배지 (Murashige and Skoog 1962)에 치상하였다. 종자는 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 3000 lux, 16/8h 광주기의 배양실에서 약 6~8주 동안 발아시켰다.

식물체 재분화 조건 확립

약 6~8주 정도 자란 유식물체의 잎을 절편체로 사용하며 이를 여러 가지 농도의 NAA와 BA, 그리고 $4 \mu\text{M}$ 의 AgNO_3 가 첨가된 SIM (MS, 3% sucrose, 0.7% agar)에 치상한 후 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 3000 lux, 16/8h 광주기의 배양실에서 싹을 유도하여 재분화에 최적인 NAA와 BA의 농도 조합을 선별하였다. 그 후 MS 배지 (3% sucrose, 0.7% agar)에 BA 0.0025 mg/L가 첨가된 shoot elongation medium (SEM)으로 옮겨 싹의 신장을 유도하였고 신장된 싹은 MS 배지 (3% sucrose, 0.7% agar)로 옮겨 뿌리를 유도한 후 순화과정을 거쳐 화분으로 옮겨 심었다. 또한 앞서 확립된 NAA와 BA의 조합구에 여러 가지 농도의 AgNO_3 를 첨가했을 때의 재분화율을 비교함으로써 AgNO_3 의 최적농도를 조사하였다.

식물의 형질전환

형질전환에는 개화시기 조절유전자인 *RAG25* 유전자가 함유된 pGA1209가 삽입된 *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404)를 이용하였다. 이러한 *A. tumefaciens*를 kanamycin (Km) 50 mg/L가 첨가된 YEP 액체배지에 접종시켜 250 rpm, 28°C 에서 약 2일 동안 배양하여 사용하였다. NAA 2 mg/L, BA 2 mg/L 그리고 NAA 2 mg/L, BA 4 mg/L가 각각 첨가된 두가지 종류의 SIM (이하 각각 N2B2, N2B4로 표기함)에서 2일 동안 preculture한 더덕의 잎절편체를 *A. tumefaciens* 배양액에 5분 동안 담그고 나서 이것을 다시 SIM으로 옮겨 3일 동안 공조배양하였다. 또 다른 한가지 방법으로 preculture된 절편체를 *A. tumefaciens* 배양액에 넣고 2일 동안 현탁배양함으로써 공조배양을 실시하여 두 가지 방

법에 대한 효과를 비교하였다. 이 절편체들을 Km 20 mg/L와 claforan (Cf) 250 mg/L가 첨가된 N2B2 그리고 N2B4 배지로 옮겨주어 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 3000 lux, 16/8h 광주기의 배양실에서 4주 동안 배양하였다.

Polymerase chain reaction (PCR)에 의한 분석

PCR 실험은 *npt II* 유전자와 *RAG25* 유전자로부터 유래된 두가지 oligonucleotides를 primer로 사용하였다. primer의 염기서열은 다음과 같다;

5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3', 5'-ATCGGGAGCGGCGATACCGTA-3' (이상 *npt II* 유전자) 5'-AGTTCCTCCAGCTCATCATGC-3', 5'-AGCCGGATGGGATGTGTTCA-3' (이상 *RAG25* 유전자).

Genomic DNA는 Edwards 등 (1991)의 방법과 Murray와 Thompson (1980) 그리고 Saghai-Marooif 등 (1984)의 방법을 응용하여 추출하였다. 50 μl 의 PCR 반응용액에 genomic DNA를 약 0.1 μg 을 넣어주고, 25 pmol의 primer, 200 μM dNTP 그리고 2 units의 *Taq* DNA polymerase를 첨가하였다. PCR은 Biometra의 Personal CyclerTM를 이용하였으며 PCR산물은 0.8% agarose gel로 전기영동하여 확인하였다.

PCR 산물을 이용한 Southern hybridization

PCR 산물로 Southern hybridization을 수행하기 위하여 PCR 방법을 이용하여 biotin으로 표지된 *RAG25* 탐침을 획득하였다. *RAG25* 유전자에 대한 PCR산물을 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 band를 확인 후 DNA를 nylon membrane (Hybond-N+, Amersham)으로 전이시켰다. 이 membrane을 UV하에서 5분간 처리하여 고정시키고 이러한 membrane을 전혼성화용액 (50% formamide, 5xSSC, 5xDenhardt's solution, 0.1% SDS)에 넣어 42°C 에서 1시간 동안 전혼성화시킨 후 탐침 DNA를 첨가하여 42°C 에서 16시간 혼성화를 수행하였다. 혼성화반응이 끝난 다음 2xSSC, 0.1% SDS용액과 0.1xSSC, 0.1% SDS용액으로 각각 2회씩 세척하였다. 세척된 membrane은 0.5% BSA용액에서 30분간 처리 후 streptavidin-alkaline phosphatase conjugate를 1:5000으로 첨가하여 반응시켰다. 30분 후 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl용액으로 15분간 2회 세척하고 western blue (Promega)를 처리하여 반응시켰다.

결과 및 고찰

재분화조건 확립과 재분화 양상

약 6~8주 동안 발아시킨 유식물체에서 절취한 잎을 여러

가지 농도의 NAA, BA 그리고 4 μM 의 AgNO_3 가 첨가된 SIM에 치상한 후 2~4주 경과되었을 때 신초가 출현하였는데, 절편체의 표면에 얇은 캘러스층이 형성되면서 그 표면에 녹화가 나타나고 이 부분에서 신초 원기가 형성되었다. 절편체에 callus의 발달이 증가되면 신초의 발생이 감소되는 현상이 관찰되었으며 체세포배가 형성되었다. 더덕의 신초 분화양상은 담배의 재분화 양상과 유사하여 한 절편체에서 많은 신초를 형성하였다 (Figure 1A). 그러나 AgNO_3 를 첨가하지 않을 경우, 이러한 양상은 나타나지 않았으며 신초가 거의 형성되지 않았다. 배양한 지 4주 후의 재분화율을 조사한 결과 (Table 1), 대부분의 조합구에서 30% 이상의 높은 재분화율을 보였으며 특히 NAA 2 mg/L, BA 2 mg/L (N2B2)가 첨가된 SIM에서 90% 이상의 높은 재분화율을 보였다. 다음으로 재분화 효율이 높은 조합구인 N2B6의 경우, 고농도의 BA의 영향으로 인해 비정상적인 multiple shoots가 형성되어졌기 때문에 재분화 배지로의 사용이 부적합하였다. 따라서 최종적으로 N2B2와 N2B4 조합구를 재분화배지로 사용하였다. 그리고 이 실험에서 1 mg/L의 NAA를 첨가한 조합구보다 2 mg/L의 NAA를 첨가한 조합구에서 재분화율이 훨씬 높게 나타났는데 이러한 결과로 미루어 볼 때 더덕의 잎을 절편체로 사용하는 경우에는 고농도의 오옥신 처리가 효과적임을 알 수 있었다. 또한 NAA를 단독처리한 배지에서는 신초가

유도되지 않았으며 NAA 단독 처리구의 경우 다중의 흰색 캘러스가 형성되었고, NAA의 농도가 증가할수록 캘러스와 부정근의 형성률이 증가하였다. BA 단독 처리구의 경우에는 부정근과 캘러스는 형성되지 않고 절편체에서 직접적으로 신초가 유도되었는데 재분화 효율은 낮게 나타났다. 호르몬을 처리하지 않은 MS 배지에 치상된 절편체에서는 캘러스, 신초 그리고 부정근은 유도되지 않았고 갈변되어 고사하였다. 그리고 이러한 실험을 통해 선별된 두가지의 호르몬 조합구 (N2B2, N2B4)를 이용해 최적의 AgNO_3 농도를 조사한 결과, 임의로 첨가했던 4 μM 의 농도가 식물체 재분화에 가장 효과적인 것으로 나타났다 (Table 2). SIM에 5 μM 의 AgNO_3 를 첨가한 경우 N2B2 조합구에서는 AgNO_3 4 μM 이 첨가됐을 때에 비해 재분화 효율이 약 30% 정도 감소되어졌고 절편체의 갈변현상도 나타났다 (Table 2). 따라서 더덕의 잎절편을 이용한 식물체 재분화와 형질전환시 4 μM 의 AgNO_3 가 첨가된 N2B2, N2B4 배지를 사용하였다. 이러한 재분화 조건을 통해 유도된 신초는 SEM으로 옮겼을 때 신초신장이 촉진되었고 (Figure 1B), MS 배지에서 2주 내에 뿌리가 유도되었다 (Figure 1C).

재분화 실험에서 특이할 만한 점은 NAA와 BA의 조합구에 치상된 절편체에서 두 가지의 신초 분화경로가 동시에 나타난 점이다. 비록 절편체에서 신초는 주로 기관분화경로를 통해 형성되었지만 동시에 체세포배 발생과정도 관찰되었다. 이러한 체세포배는 절편체 표면에 캘러스가 매우 잘 발달되어 비대해진 경우에 주로 형성되었으며 한 부위에 집중되어 체세포배 집단을 형성하는 경향을 나타냈고 하나의 캘러스에서도 여러 단계의 체세포배가 관찰되었다 (Figure 2A, B). 이

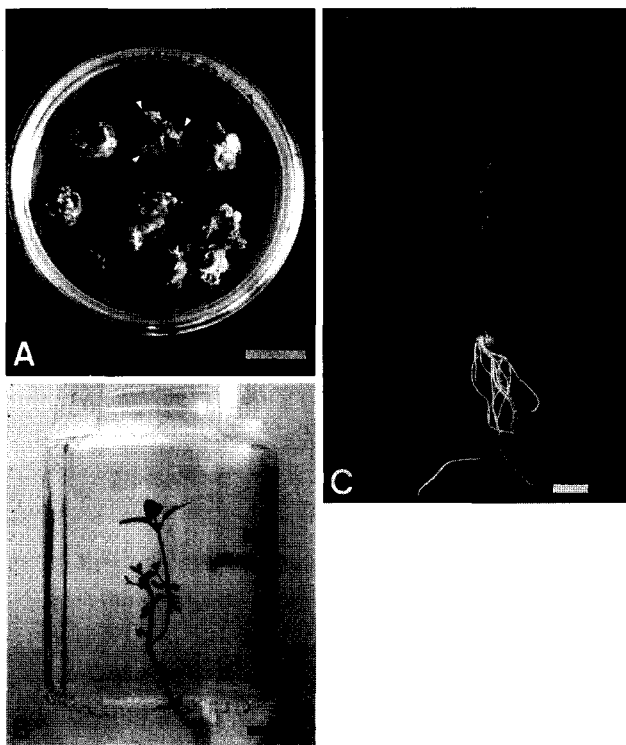


Figure 1. Plant regeneration in leaf explant culture of *Codonopsis lanceolata* through organogenesis. (A) Many adventitious shoots (arrow head) formed on callus (bar = 1 cm). (B) A shoot transferred to SEM (bar = 1 cm). (C) Root induction from shoot on MS medium (bar = 1 cm).

Table 1. Effects of NAA and BA on shoot regeneration from leaf explants of *Codonopsis lanceolata*

BA (mg/L)	Shoot formation (%)		
	NAA (mg/L)		
	0	1	2
0	0.0	0.0	0.0
2	37.5	40.0	90.9
4	12.5	30.0	85.9
6	6.3	71.4	87.5

Table 2. Effects of AgNO_3 on shoot regeneration from leaf explants of *Codonopsis lanceolata* on SIM

AgNO_3 (μM)	Shoot formation (%)	
	N2B2	N2B4
2	72.2	33.3
3	77.8	83.3
4	94.4	83.3
5	66.6	66.7

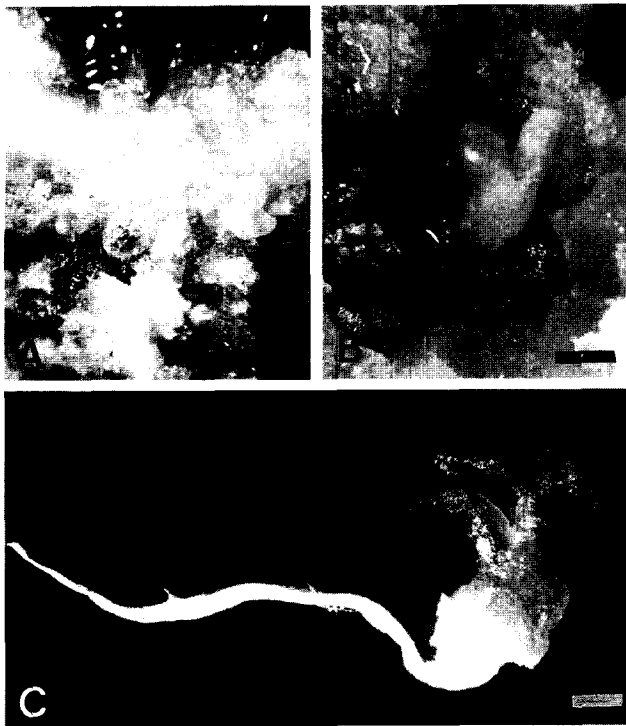


Figure 2. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Codonopsis lanceolata*. (A), (B) Somatic embryos formed on callus (bars = 0.1 cm). (C) Germination of somatic embryo (bar = 0.1 cm).

러한 체세포배 중에서는 완전한 식물체로 발달되는 것도 있었으나 (Figure 2C) 대부분은 배 발생과정과 신장이 중지되어 고사하였다. 본 연구에 사용된 배지조성은 기관분화를 유도하기 위한 목적으로 구성되었으며, 형성된 대부분의 캘러스들은 쉽게 부서지며 흰색을 띠고 있는 등 비배발생캘러스의 특징에 더 가까운 것으로 관찰되었으나 특이하게 체세포배도 형성되었다. 이러한 현상에 대한 원인으로 몇 가지를 추측할 수 있는데, 첫 번째는 이러한 캘러스가 증식함에 따라 표면까지 오옥신의 수송이 어려워지거나 캘러스가 놓인 배지 부분의 오옥신 농도가 낮아졌을 때 그러한 부위에 존재하고 있던 배발생캘러스 부위에서 발생되어진다는 정 (1995)의 결과로 여겨진다. 두 번째는 배지에 첨가된 $AgNO_3$ 의 영향에 기인한 것으로 볼 수 있다. Roustan 등 (1989)의 연구에서 당근의 배양 시 에틸렌 억제제로 작용하는 $CoCl_2$ 와 $NiCl_2$ 가 첨가되었을 때 체세포배 발생을 촉진하였으며 에틸렌의 농도가 증가함에 따라 체세포배의 수가 감소됨을 보고하였다. 이는 체세포배 발생이 에틸렌에 의해 억제됨을 의미한다. 본 실험에서 사용된 재분화 배지에도 에틸렌 억제제로 알려져 있는 $AgNO_3$ 가 함유되어 있어 이것이 기내의 에틸렌 농도를 감소시켜 체세포배 발생을 다소 촉진했을 것으로 여겨진다. 그러나 본 연구에서 발생된 체세포배의 경우 주로 초기단계에서 생장이 중지된 것은 오옥신의 억제에 의한 것으로 보인다. 이러한 결과는 비록 체세포배 발생의 개시가 저농도의 오

옥신 존재 하에서도 가능하지만 오옥신의 영향으로 인해 심장형단계 이상으로는 발달하기 어렵다는 Borkird 등 (1986)의 보고와 일치한다. 또한 식물조직배양에서 에틸렌 억제제의 사용은 체세포배 발생 촉진은 물론 기관분화 과정도 촉진하는 것으로 알려졌다 (Purnhauser et al. 1987; Roustan et al. 1989; Chi et al. 1990; Palmer 1992). 더덕의 재분화 실험에서도 $AgNO_3$ 를 첨가하였을 때 높은 재분화율을 얻을 수 있었으며 $AgNO_3$ 를 첨가하지 않은 경우에는 신초의 형성이 억제되었는데, 이 결과로 미루어 볼 때 더덕의 경우에서도 에틸렌의 감소가 절편체의 재분화 효율을 증가시켰음을 알 수 있었다.

형질전환 식물체의 재분화

위와 같은 재분화 조건을 바탕으로 형질전환을 실시하였다. YEP 배지에서 현탁배양한 *A. tumefaciens* 배양액에 2일 동안 SIM에서 preculture되어진 절편체를 5분 동안 접종하고 3일 동안 공조배양하였다. 그 결과 Km 20 mg/L과 Cf 250 mg/L이 첨가된 N2B2 배지와 N2B4 배지에서 약 32.4%와 36.3%의 재분화율을 보였으며 (Table 3) 신초의 성장속도는 일반적인 재분화에 비해 매우 떨어졌다.

Preculture되어진 절편체를 *A. tumefaciens* 배양액과 함께 2일 동안 현탁배양하였을 때, 위의 방법보다 재분화율도 약 1/2로 감소되어 N2B2 배지의 경우 11.1%, N2B4 배지의 경우 16.7%로 나타났으며 커다란 캘러스가 형성되는 특징을 나타냈다. 이러한 결과는 *Agrobacterium*에 대한 절편체의 과도한 감수성에 기인된 것으로 보여진다. *Agrobacterium* 배양액에서의 접종시간이 증가될수록 절편체가 이질적인 *Agrobacterium*에게 받는 stress도 증가하므로 감수성이 높아져 그 결과 절편체의 재생력을 감소시켜 절편체의 갈변, 고사 또는 비정상적으로 비대해진 callus의 발생 등이 나타나는 것으로 생각된다. Donaldson과 Simmonds (2000)는 *Agrobacterium*에 과민성인 식물품종의 경우에 형질전환율의 감소가 일어남을 보고한 바 있다.

이상의 과정에서 형성된 신초는 일반적인 재분화 과정과 동일하게 배양되었으며 최종적으로 화분에 옮겨졌다 (Figure 3A, B, C). 화분에 옮겨져 성장된 더덕 개체 중 두 개체에서

Table 3. Frequencies of shoot formation from leaf explants of *Codonopsis lanceolata* on selection media after cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*

Treatment (mg/L)	Shoot formation (%)			
	The repetition number of experiments			Means
	1	2	3	
N2B2	34.3	37.5	25.5	32.4
N2B4	41.7	44.4	22.9	36.3

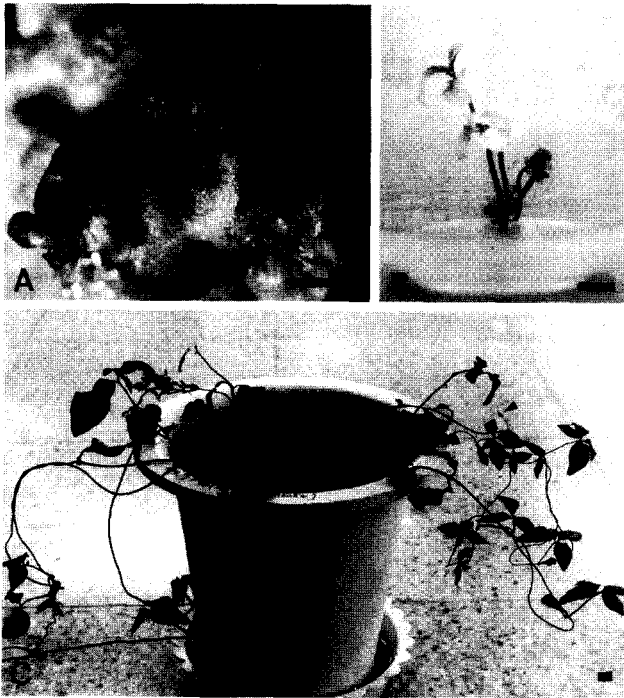


Figure 3. Regeneration procedures of putative transformant. (A) Shoots formed on callus (bar = 0.1 cm). (B) Shoot was transferred to SEM (bar = 1 cm). (C) The transformant was potted in soil. An arrow head indicates floral bud (bar = 1 cm).

화아가 형성되었는데 (Figure 3C) 시간이 경과되어도 개화되지 않고 화아 상태가 지속되는 현상이 관찰되었다. 이 현상은 형질전환 개체마다 RAG25 유전자의 발현양상의 차이에 따른 결과로 여겨진다. 즉, RAG25 유전자의 발현에 의해서 shoot meristem이 floral meristem으로 전환되어지기는 하였지만 이러한 작용을 억제하는 어떠한 내생의 인자에 의해서 더 이상 꽃의 발달이 진행되어지지 않거나 또는 RAG25 유전자의 ectopic expression 결과 꽃 형성과정에 작용하는 물질이나 단계를 변화시켰을 것이라 생각된다.

형질전환 식물체내 RAG25 유전자의 도입 확인

성장한 식물체의 잎에서 더덕의 genomic DNA를 추출하여 PCR을 수행하였다. 이 실험에서 0.7kb의 *nptII* 유전자와 0.6kb의 RAG25 유전자가 확인됨으로써 더덕의 genomic DNA상에 외래 유전자가 도입되었음을 확인하였다 (Figure 4A, B). 또한 이렇게 PCR을 수행하여 얻어진 RAG25 유전자에 대한 PCR 산물을 nylon membrane으로 전이시키고 biotin으로 표지된 RAG25 유전자의 탐침과 membrane을 혼성화하여 Southern blot 분석을 실시한 결과 동일한 위치 (0.6kb)에서 band를 확인할 수 있었다 (Figure 4C).

이상의 결과를 통해 더덕의 잎절편을 이용한 조직배양 조건을 확립하였으며 잎절편 배양시 에틸렌 억제제인 AgNO₃가 재분화에 효과적임을 알 수 있었다. 또한 *A. tumefaciens*

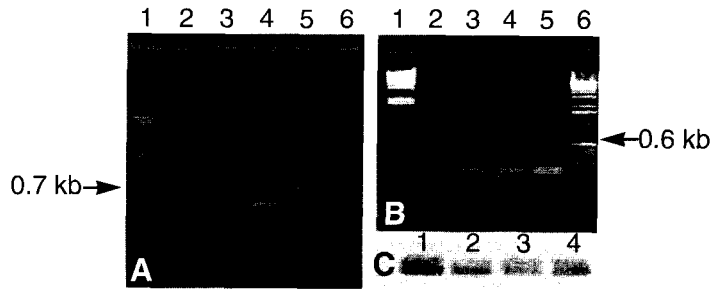


Figure 4. Agarose gel electrophoresis of PCR amplification products from putative transformants and Southern hybridization. (A) PCR of *nptII* gene. lane 1, 1 kb ladder (Gibco BRL co.); lane 2, blank; lane 3-5, transformants; lane 6, negative control. (B) PCR of RAG25 gene. lane 1, λ HindIII marker (Stratagene); lane 2-4, transformants; lane 5, negative control; 6, 1 kb ladder. (C) Southern hybridization of RAG25 PCR products (lane 1-4).

와의 공조배양을 통해 더덕의 형질전환을 시도하여 유전자의 도입을 확인할 수 있었는데 앞으로 더덕에서 RAG25 유전자의 발현연구를 통해 이 유전자가 도입되었을 때 나타나는 발현특징인 왜성 형질과 개화시기의 단축현상을 밝히고자 한다.

적 요

더덕의 효과적인 재분화조건 (약 90%의 재분화율)을 바탕으로 개화시기 조절유전자인 RAG25유전자의 도입을 시도하였다. 더덕의 잎 절편을 *Agrobacterium*과 3일 동안 공조배양하였으며 NAA 2 mg/L, BA 2 mg/L (N2B2)와 NAA 2 mg/L, BA 4 mg/L (N2B4)가 첨가된 shoot inducing media (Km 20 mg/L와 Cf 250 mg/L가 첨가됨)에서 배양하였을 때 형질전환 신초가 형성되었다. 획득된 신초에서 genomic DNA를 추출하고 *nptII*와 RAG25 primer를 이용한 PCR을 수행하여 각각 0.7 kb와 0.6 kb의 band를 확인하였다. RAG25 유전자에 대한 PCR 산물을 이용하여 Southern hybridization을 수행한 결과 PCR과 동일한 위치에서 band가 검출되어져 이 유전자의 도입을 재확인하였다.

사사 - 본 연구는 1999년도 가톨릭대학교 교비 연구비 지원에 의해 수행되었으며 RAG25 유전자를 제공해주신 포항공대 안진홍 박사께 사의를 표합니다.

인용문헌

정재동 (1995) 최신생물공학. 경북대학교출판부. pp174-175
 최필선, 민성란, 유장렬, 소용영 (1996) *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 더덕의 고빈도 형질전환과 체세포배 발생경로를 통한 식물체 재분화. 식물조직배양학회지 23:239-242

- An GH** (1994) Regulatory genes controlling flowering time or floral organ development. *Plant Mol Biol* **25**:335-337
- Borkird C, Choi CH, Sung ZR** (1986) Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on the expression of embryogenic program in carrot. *Plant Physiol* **81**:1143-1146
- 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
- Choi PS, Kim YS, Liu JR, Soh WY** (1994) Genetic transformation and plant regeneration of *Codonopsis lanceolata* using *Agrobacterium*. *Korea J Plant Tissue Culture* **21**:315-318
- Chung YY, Kim SR, Finkel D, Yanofsky MF, An G** (1994) Early flowering and reduced apical dominance result from ectopic expression of a rice MADS box gene. *Plant Mol Biol* **26**:657-665
- Donaldson PA, Simmonds DH** (2000) Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean. *Plant Cell Rep* **19**:478-484
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* **19**:1349
- Ma H** (1994) The unfolding drama of flower development: recent results from genetic and molecular analysis. *Genes Devel* **8**:745-756
- Mandel MA, Brown CG, Savidge B, Yanofsky MF** (1992) Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature* **360**:273-277
- Min SR, Yang SG, Liu JR, Choi PS, Soh WY** (1992) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of *Codonopsis lanceolata*. *Plant Cell Rep* **10**:621-623
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**:473-497
- Murray MG, Thompson WF** (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* **8**:4321-4325
- Norman CR, Pollock M, Treismann R** (1988) Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the *c-fos* serum response element. *Cell* **55**:989-1003
- Palmer CE** (1992) Enhanced shoot regeneration from *Brassica campestris* by silver nitrate. *Plant Cell Rep* **11**:541-545
- Purnhauser L, Medgyesy M, Czeko PH, Marton L** (1987) Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. tissue culture using the ethylene inhibitor AgNO₃. *Plant Cell Rep* **6**:1-4
- 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
- Saghai-Maroo MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW** (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**:8014-8018
- Schwarz-Sommer Z, Huijser P, Nacken W, Saedler H, Sommer H** (1990) Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science* **250**:931-936
- Sommer H, Beltran JP, Huijser P, Pape, H, Lonig WE, Saedler H, Schwarz-Sommer Z** (1990) *Deficiens*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*. The protein shows homology to transcription factors. *EMBO J* **9**:605-613
- Yanofsky MF, Ma H, Bowman JL, Drews JN, Feldmann KA, Meyerowitz EM** (1990) The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* **346**:35-39

(접수일자 2000년 12월 12일)