

배추의 배축절편으로부터 캘러스와 뿌리 발생을 통한 안정적 형질전환

조미애¹, 김춘해¹, 민성란², 고석민³, 유장렬², 최필선^{1*}
¹남부대학교, ²한국생명공학연구원, ³주유진텍부설연구소

Stable Transformation *via* Callus Formation and Rhizogenesis from the Cultures of Hypocotyl Explant of Chinese Cabbage

Mi Ae Cho¹, Choon Ae Kim¹, Sung Ran Min², Suck Min Ko³, Jang Ryol Liu², and Pil Son Choi^{1*}

¹Department of Medicinal Plant Resources, Nambu University, Kwangju 506-824 Korea

²Plant Cell Biotechnology Laboratory, ³Eugenetech Inc., Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Taejeon 305-606 Korea

ABSTRACT Hypocotyl explants of Chinese cabbage (cvs. "Jeong Sang") produced transgenic calli on callus induction medium (MS salt, B5 vitamin, 5 mg/L acetosyringone, 1 mg/L 2,4-D, 3% sucrose, 400 mg/L cefotaxime, 100 mg/L paromomycin, pH 5.8) after cocultivation with strains of *Agrobacterium tumefaciens* (EHA101, LBA4404, GV3101) harboring the pPTN290 containing paromomycin-resistance gene as a selectable marker, and then they transferred to root induction medium (¹/₂MS salt, MS vitamins, 2% sucrose, 100 mg/L paromomycin, 100 mg/L cefotaxime, pH 5.8) and shoot induction medium (MS salt, B5 vitamin, 4 mg/L AgNO₃, 4 mg/L 6-benzyladenine, 3 mg/L alpha-naphthaleneacetic acid, 100 mg/L paromomycin, 100 mg/L cefotaxime, 3% sucrose, pH 5.8) in order. There was a significant difference in the frequency of transgenic calli depending on *Agrobacterium* strains. In particular, the highest frequency (6.1%) of transgenic calli was obtained from the hypocotyls cocultivated with EHA101 strains. Also, the frequency (%) of transgenic root and plants from each transgenic callus clone were obtained with 60.7% and 38.2% in EHA101, with 8.3% and 0% in LBA4404, with 20.5% and 85.7% in GV3101 strains, respectively. They were grown to maturity in a greenhouse and normally produced T₂ seeds. GUS histochemical assay for progeny (T₂) revealed that the transgenes was expressed in the plant genome, and progeny analysis from 7 independent transgenic events demonstrated that the transformants transmitted the transgene as a single or multiple functional locus.

서 론

배추는 우리나라에서 김치의 주 원료가 되는 중요한 국내 채소작물이다. 1970년대 초반까지는 전체 채소 재배면적의 약 30%를 차지 하였으나, 봄배추, 여름배추, 가을배추 등 다양한 품종 개발에 따라 재배면적 및 생산량도 점차 증가

하고 있다. 배추의 신품종 개발은 전통육종과 분자육종에 의하여 개발되고 있으며, 특히 분자육종의 핵심기술인 기관 발생이나 체세포배발생을 통한 식물체 재분화방법 확립 (Chi et al. 1990, Choi et al. 1996, 1998, Zhang et al. 1998)과 *Agrobacterium* 공동배양법에 의한 형질전환 기술은 (Barfield and Pua 1991, Mukhopadhyay et al. 1992) 유용유전자인 TMV coat단백질 유전자 발현 (Jun et al. 1995), 내충성유전자 발현 (Cho et al. 2001, Jin et al. 2000, Xiang et al. 2000), 오일 생산

*Corresponding author Tel 062-970-0161 Fax 062-970-0269
E-mail: cps6546@nambu.ac.kr

을 위한 lysophosphatidic acid acyltransferase 유전자 발현 (Knutzon et al. 1999), 고염농도 저항성유전자 발현 (Zhang et al. 2001) 등 많은 가능성을 보여 주었다. 그러나 이러한 기 연구의 대부분은 자엽, 잎 및 배축절편체로부터 직접 신초를 유도하여 형질전환체를 얻는 방법으로서 도입유전자의 escape 현상이나 형질전환체의 chimeric현상 때문에 (Cardzoa and Stewart 2004, Zhang et al. 2000) 안정적인 형질전환 시스템이 구축되어 있지 않았을 뿐 아니라 그 재현성도 문제점으로 남아 있다.

최근 이러한 문제점을 해결하고 좀더 안정적이고 재현성 있는 형질전환시스템을 개발하기 위하여 다른 작물에서는 배양절편체로부터 직접 신초를 유도하지 않고 캘러스를 거쳐 형질전환체를 생산하거나 (Kusano et al. 2003, Lee et al. 2004), 배양절편체로서 뿌리절편의 이용 (Valvekens et al. 1988), 또한 *Agrobacterium rhizogenes*에 의한 모상근 발생을 거쳐 형질전환체를 생산하는 연구가 진행되어 왔다 (Choi et al. 2004c). 배추의 배축절편은 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 배지에서 탈분화된 캘러스가 쉽게 얻어나 그러한 캘러스로부터 신초발생은 쉽지 않다. 그러나 특별한 호르몬 처리없이 캘러스로부터 부정근발생은 쉽게 이루어지며, BA와 같은 사이토키닌이 첨가 배지에서 그 뿌리 절편으로부터 쉽게 신초가 발생하는 특징을 갖고 있다 (Noda et al. 1987).

따라서 본 연구에서는 기 연구들의 문제점을 해결하고 안정적이고 효율적인 형질전환방법을 확립하기 위하여 *Agrobacterium* 과 배축 절편을 공동배양한 후 캘러스 → 부정근 → 신초를 유도하는 방법으로 형질전환시스템을 확보하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

식물재료

국내 재배품종인 “정상배추” 종자를 70% 알코올에 1분간, 2% sodium hypochlorite 용액에 15분간 표면 살균 하였다. 2% sucrose와 0.8% agar가 첨가된 MS기본배지 (Murashige and Skoog 1962)에 페트리디쉬 당 10개의 종자를 치상하고 25°C, 암상태에서 5일 동안 발아시켰다. 배지는 고압 멸균 전 1 N HCl과 1 N KOH로 pH 5.8로 조정하였다. 배양 5일 후 발아된 배추 유식물체로부터 경단분열조직이 포함되지 않게 1 cm 크기의 배축 절편을 절단 한 후 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 실험에 사용하였다.

Agrobacterium Tumefaciens Strains

CaMV35S프로모터, β -glucuronidase (GUS)유전자와 선발 마커로서 paromomycin-resistance 유전자 (pPTN290)를 freeze-thaw 방법으로 EHA101, LBA4404 및 GV3101 균주에 각각 형질전환 하였다 (Jefferson et al. 1987). 50 mg/L streptomycin과 50 mg/L spectinomycin이 첨가된 LB액체배지 50 ml에 각각의 colony를 접종하여 28°C로 8시간 이상 배양한 후 대수기 증식기 ($OD_{650} = 0.6-1.0$)의 균을 사용하였다

형질전환체 생산 및 후대검증

pPTN290 벡터의 선발마커인 *nptII* 유전자 발현 형질전환체를 얻기 위하여 실험 당 약 200개 배축절편을 25 ml의 *Agrobacterium* 용액에 30분 동안 침지 한 후 공동배양용 배지 (MS salt, MS vitamins, 3% sucrose, 0.5% phyto-agar, 5 mg/L acetosyringone, pH 5.4)에 20개씩 치상하여 3일 동안 공동 배양하였다. 공동배양 후 배축절편을 3-5회 멸균수로 수세한 후 캘러스 유도배지 ($1/2$ MS salt, B5 vitamin, 5 mg/L acetosyringone, 1 mg/L 2,4-D, 3% sucrose, 400 mg/L cefotaxime, 100 mg/L paromomycin, pH 5.8)에 옮겨 6-8주 동안 2주 간격으로 암상태에서 계대배양 하면서 캘러스를 충분히 증식한 후 1차 GUS 분석을 수행하여 형질전환 캘러스를 선별하였다. GUS 양성 반응을 보인 캘러스를 호르몬이 첨가되지 않은 뿌리유도배지 ($1/2$ MS salt, MS vitamins, 2% sucrose, 100 mg/L paromomycin, 100 mg/L cefotaxime, pH 5.8)에 옮겨 다시 암상태로 4주 동안 2주 간격으로 계대배양하면서 부정근을 유도하였으며, 형성된 부정근의 일부를 취하여 2차 GUS 분석을 수행하여 뿌리배양체의 형질전환 여부를 판단하였다. GUS 양성 반응을 보인 뿌리를 5 mm 크기로 만들어 신초유도배지에 (MS salt, B5 vitamin, 4 mg/L $AgNO_3$, 4 mg/L 6-benzyladenine, 3 mg/L α -naphthaleneacetic acid, 100 mg/L paromomycin, 100 mg/L cefotaxime, 3% sucrose, pH 5.8) 옮겨 6-8주 동안 2주 간격으로 16시간 광주기 조건 ($46 \mu mol m^{-2} s^{-1}$)으로 배양하였다. 형질전환 뿌리절편체로부터 형성된 신초원기를 분리하여 신초신장 배지 ($1/2$ MS salt, MS vitamins, 2% sucrose, 100 mg/L cefotaxime, pH 5.8)에 옮겨 유식물체를 얻었으며, 이때 잎절편의 일부에서 3차 GUS 분석을 수행하여 최종적으로 형질전환체를 확인 하였다. 형질전환식물체는 토양으로 옮겨 온실에서 순화한 후 각각 T₂ 종자를 수확하였다. 7개의 독립 형질전환계통 (T₁) 으로부터 얻은 T₂ 세대에 대한 후대 검증은 종자를 발아시켜 얻은 유식물체에서 GUS 반응을 수행하였다. 각 형질전환 계

통으로부터 얻은 T₂종자 일부를 무작위로 선발하여 24시간 동안 증류수에 침적한 후 2일 동안 거즈 처리를 하여 발아시켰다. 유식물체가 1 cm 이상 자랐을 때 GUS분석을 수행하여 GUS양성반응 개체와 음성반응 개체의 멘델의 분리법칙에 의한 분리비를 조사하였다.

β-Glucuronidase (GUS) Assay

*Agrobacterium*과 공동배양된 배축절편으로부터 유도된 캘러스 (T₁), 부정근 (T₁) 및 유식물체 (T₂)을 취하여 37°C에서 5-bromo-4-chloro-3-indole-glucuronidase용액에 침지하였다 (Jefferson et al. 1987). GUS용액에 침지한 모든 시료는 24시간 후 70% 알코올 용액으로 탈색 시킨 후 GUS 양성 반응을 보이는 식물체의 빈도를 조사하였다. 대조구로서는 *Agrobacterium*과 공동배양하지 않은 식물체의 잎 절편을 사용하였다.

결과 및 고찰

배추의 형질전환은 잎, 자엽, 배축절편을 공동배양한 후 선발배지에 직접 신초를 유도하는 방법으로 진행하여 왔다 (Cho et al. 2001, Jin et al. 2000, Jun et al. 1995, Knutzon et al. 1999, Xiang et al. 2000, Zhang et al. 2001). 그러나 많은 작물에서 배양절편체로부터 신초발생은 형성층이나 유관속 주위 세포로부터 발생되는 다세포기원에 의하여 신초발생이 이루어지기 때문에 (Choi et al. 2004a, b) *Agrobacterium*과 공동배양된 배양절편체로부터 신초발생과정에서 유전자의 escape현상 또는 형질전환체의 chimeric현상의 원인이 될 수 있어 (Cardzoa and Stewart 2004, Zhang et al. 2000) 보다 안정적인 새로운 형질전환방법의 개발이 필요하다. “정상배추”의 종자를 5일 동안 무균발아시켜 약 7-10 cm 크기의 유식물체를 얻었다. 1 cm크기의 배축 절편을 잘라 *Agrobacterium*과 공동배양한 후 paromomycin항생제가 첨가된 캘러스 유도배지에서 6-8주동안 배양하였다. 배양 2주 후부터 배축 절편 절단 부위로부터 캘러스가 형성되기 시작 하였으며, 배양 6-8주에 공동배양한 배축절편의 2.4-6.1%에서 부드러운 노란색 또는 갈색의 형질전환 캘러스를 얻을 수 있었다. 형질전환캘러스 클론 (102개)을 호르몬이 첨가되지 않은 뿌리유도배지에 옮겨 4주 동안 암상태로 배양 할 경우 *Agrobacterium*균주에 따라 8.3%-60.7%까지 부정근이 발생되었으며, 이러한 부정근으로부터 형질전환식물체는 최대 85.7%에서 얻을 수 있었다 (Figure 1). 반면 선발배지에서 생장을 하지 않거나 점차 갈변되

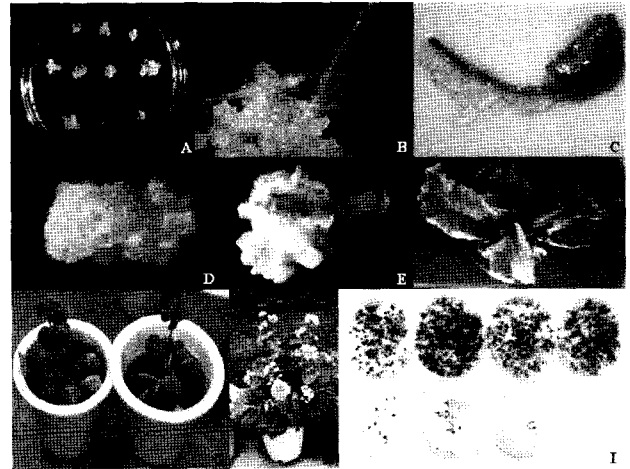


Figure 1. Plant regeneration from hypocotyl of Chinese cabbage transformed with *gus* gene. A: Yellowish friable callus induction and proliferation on selection medium with 100 mg/L paromomycin; B: Rhizogenesis from transgenic callus; C: GUS positive response of adventitious root; D, E: Transgenic callus induction and shoot primordia formation from root explants; F: Plantlet; G, H: Flowering of transgenic plants grown in soil; I: GUS positive response in progeny (T₂).

면서 괴사되는 배축절편의 경우 캘러스 클론을 얻지 못하였다.

Paromomycin항생제는 옥수수 (Cho et al. 2005a) 및 sorghum (Howe et al. 2006) 등의 작물에서 효과적인 선발마커로 확인 되었으며, 특히 배추에서도 kanamycin이나 hygromycin에 비하여 paromomycin은 효과적인 것으로 이미 보고된 바 있다 (Cho et al. 2006). 본 실험에서도 paromomycin이 첨가된 선발 배지에서 배축절편으로부터 형질전환 캘러스와 비 형질전환 캘러스의 성장률은 뚜렷하게 구분할 수 있었으며, 이는 형질 전환이 어려운 작물로 알려진 벼, 잔디, 고추 등에서도 확인 되었다 (Hiei et al. 1994, Kusano et al. 2003, Lee et al. 2004, Rashid et al. 1996). 또한 1/2MS기본배지에서 GUS양성반응을 나타낸 형질전환캘러스로부터 부정근은 쉽게 유도할 수 있었으며, 그러한 부정근 절편으로부터 최대 85.7%의 신초가 발생되는 것으로 보아 배추의 배양 절편체로서 뿌리 절편이 매우 효과적이라는 기 연구 등 (Choi et al. 2004c, Christey et al. 1997, Noda et al. 1987, Valvekens et al. 1988)과 일치되고 있음을 보여 주었다. 따라서 배추의 형질전환은 배축절편으로부터 직접 신초발생을 유도하는 배양 시스템을 이용하는 것 보다는 캘러스유도 → 뿌리유도 → 형질전환체 생산 등의 배양과정을 이용하는 것이 매우 효율적이며, 특히 이러한 방법은 각 단계에서 도입유전자의 발현을 확인 함으로서 도입유전자의 “escape”나 “chimeric”현상을 초기에 차단하여 안정적이고 재현성 있게 형질전환체를 생산할 수 있는 방법임을 알 수 있었다.

Agrobacterium 균주에 따른 형질전환캘러스 발생빈도를 비교해 보면 EHA101에서 6.1%, LBA4404에서 2.4% 그리고 GV3101에서 4.7%의 GUS 양성반응을 보였고, 이러한 캘러스로부터 부정근은 각각 60.7%, 8.3%, 20.5% 그리고 부정근으로부터 형질전환체는 각각 38.2%, 0%, 85.7%의 발생빈도를 나타냈다 (Table 1). 이와 같이 *Agrobacterium* 균주에 따라 형질전환캘러스, 부정근 및 형질전환체의 발생빈도는 뚜렷한 차이를 보였으며, 특히 EHA101 (6.1%), LBA4404 (2.4%) 및 GV3101 (4.7%)의 경우 이전 본 연구진에 의해 보고된 배축절편체로부터 직접 신초형성을 통한 최대 형질전환체 발생빈도 (0.7%)보다 훨씬 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 많은 작물의 경우 *Agrobacterium* 균주에 따라 감염성이 다를 수 있으며 (Simmonds and Donaldson 2000, Lee et al. 1999), 특히 오이와 멜론에서도 다른 균주에 비하여 EHA101 균주가 가장 높은 감염성을 보여준 연구 결과 (Cho et al. 2005b,c)와 잘 일치하고 있었으며, 이는 형질전환빈도를 높이기 위한 연구에서 *Agrobacterium* 균주가 매우 중요한 요인이 될 수 있음을 시사한다.

GUS유전자의 안정적 발현과 후대에서의 분리비를 확인하기 위하여 7개의 독립적인 형질전환체로부터 얻은 T₂종자를 발아시킨 후 유식물체에서 GUS유전자의 발현빈도를 조사하여 X²-검정에 따라 멘델의 분리비를 조사한 결과 EB018-05, EB022-07, EB026-36, EB005-21-1의 경우는 3:1분리법칙에 따

라 유전되고 있으나, EB005-21-2, EB005-21-3, EB013-86은 기대치에서 크게 벗어나고 있음을 보여 주었다 (Table 2, Figure 1I). 이는 각 형질전환체통의 genome에 *gus* 유전자가 single 또는 multiple copy로 삽입되어 유전되고 있음을 추측할 수 있다.

적 요

‘정상’ 배추의 배축절편을 선발마커로서 paromomycin 저항성 유전자를 갖고 있는 pPTN290으로 각각 형질전환된 EHA101, LBA4404, GV3101 균주와 공동배양한 후 캘러스 유도배지에서 형질전환캘러스를 얻은 후, 뿌리 유도배지에서 부정근을 그리고 신초 유도배지에서 신초를 각각 순차적으로 유도하였다. 형질전환캘러스 형성은 *Agrobacterium* 균주에 따라 차이가 있었으며, 특히 EHA101 균주에 공동배양된 배축절편으로부터 최대 6.1%까지 얻어졌다. 또한 각각의 형질전환캘러스 클론으로부터 형질전환 부정근과 신초 발생은 EHA101 균주에서 60.7%와 38.2%, LBA4404에서 8.3%와 0%, GV3101에서 20.5%와 85.7%까지 각각 얻을 수 있었다. 형질전환식물체는 특별한 형태적 이상 없이 온실에서 정상적으로 자라 T₂ 종자를 얻을 수 있었다. GUS 방법으로 7개의 후대 유식물체를 분석한 결과 *gus* 유전자가 안정적으로 발현하고 있음을 확인하였고, 배추 genome에 single 또는 multiple copy로 전달되고 있음을 추측할 수 있었다.

Table 1. Frequency (%) of GUS expression in transgenic calli, root and plants formed from hypocotyl explants of Chinese cabbage mediated by *Agrobacterium tumefaciens* carrying with paromomycin resistance gene

Cultivar	Agro. strains	No. of hypocotyl explants cocultured	No. of GUS positive calli	No. of GUS positive root from the transgenic callus events (%)	Transgenic plants from the root explant events (%)
Jeong Sang	EHA101	913	56 (6.1)	34 (60.7)	13 (38.2)
	LBA4404	510	12 (2.4)	1 (8.3)	0 (0.0)
	GV3101	716	34 (4.7)	7 (20.5)	6 (85.7)

Table 2. Progeny analysis of transgenic cabbage by histochemical GUS assay

Transgenic events	GUS assay in progeny			Chi-square ^a (3:1 ratio)
	Total plants (T ₁)	positive	negative	
EB018-05	14	12	2	0.86
EB022-07	2	1	1	0.67
EB026-36	11	10	1	1.48
EB005-21-1	11	11	0	3.67
EB005-21-2	116	116	0	38.67*
EB005-21-3	128	128	0	42.67*
EB013-86	92	92	13	8.92*

^aA 3:1 ratio was used for chi-square ($p=0.05$ with d. of f.=1). Those marked an asterisk show a significant difference from the expected value.

사 사

본 연구는 2006년도 남부대학교 학술연구비와 농진청 바이오그린21사업단으로부터 지원 받아 수행하였다.

인용문헌

- Barfield DG, Pua EC (1991) Gene transfer in plants of *Brassica juncea* using *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. *Plant Cell Rep* 10: 308-314
- Cardoza V, Stewart CNJ (2004) *Brassica* biotechnology: progress in cellular and molecular biology. *In Vitro Cell Dev-Plant* 40: 542-551
- Chi GL, Barfield DG, Sim GE, Pua EC (1990) Effect of AgNO₃ and aminoethoxyglycine on *in vitro* shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotypes. *Plant Cell Rep* 9: 195-198
- Cho HS, Cao J, Ren JP, Earle ED (2001) Control of lepidopteran insect pests in transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *perkinensis*) transformed with a synthetic *Bacillus thuringiensis Cry1C* gene. *Plant Cell Rep* 20: 1-7
- Cho MA, Min SR, Ko SM, Liu JR, Lee JH, Choi PS (2006) Use of paromomycin as a selectable marker for transformation of chinese cabbage. *Kor J Plant Biotechnol* 33: 271-276
- Cho MA, Park YO, Kim JS, Park KJ, Min HK, Liu JR, Clemente T, Choi PS (2005a) Production of transgenic maize (*Zea mays* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Kor J Plant Biotech* 32: 91-95
- Cho MA, Song YM, Park YO, Ko SM, Min SR, Liu JR, Choi PS (2005b) The use of glufosinate as a selective marker for the transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Kor J Plant Biotech* 32: 161-165
- Cho MA, Song YM, Park YO, Ko SM, Min SR, Liu JR, Lee JH, Choi PS (2005c) Production of transgenic melon from the cultures of cotyledonary-node explant using *Agrobacterium*-mediated transformation. *Korean J Plant Biotechnology* 32: 257-262
- Choi PS, Cho DY, Soh WY (2004a) Plant regeneration from immature embryo cultures of *Vigna unguiculata*. *Biological Plantarum* 47: 305-308
- Choi PS, Cho DY, Soh WY (2004b) Shoot organogenesis from immature zygotic embryo cultures of *Ginkgo biloba*. *Biological Plantarum* 47: 309-312
- Choi PS, Kim YD, Choi KM, Chung HJ, Choi DW, Liu JR (2004c) Plant regeneration from hairy-root cultures transformed by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep* 22: 828-831
- Choi PS, Min SR, Ahn MY, Soh WY, Liu JR (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration in immature zygotic embryo, ovule, and anther filament cultures of Chinese cabbage. *Sci Hort* 72: 151-155
- Choi PS, Soh WY, Liu JR (1996) Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotyledonary explant cultures of Chinese cabbage. *Plant Cell Tiss Org Cult* 44: 253-256
- Christey MC, Sinclair BK, Braun RH (1997) Regeneration of transgenic vegetable *Brassicac* (*Brassica oleracea* and *B. campestris*) via Ri-mediated transformation. *Plant Cell Rep* 16: 587-593
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* 6: 271-282
- Howe A, Sato S, Dweikat I, Fromm M, Clemente T (2006) Rapid and reproducible *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum. *Plant Cell Rep* 25: 784-791
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3907
- Jin RG, Liu YB, Tabashnik BE, Borthakur D (2000) Development of transgenic cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) for insect resistance by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*
- Jun SI, Kwon SY, Paek KY, Paek KH (1995) *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of fertile transgenic plants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* cv. 'spring flavor'). *Plant Cell Rep* 14: 620-625
- Knutzon DS, Hayes TR, Wyrick A, Xiong H, Davies HM, Voelker TA (1999) Lysophosphatidic acid acyltransferase from coconut endosperm mediates the insertion of laurate at the sn-2 position of triacylglycerols in lauric rapeseed oil and can increase total laurate levels. *Plant Physiol* 120: 739-746
- Kusano M, Tohyama K, Bae CH, Riu KZ, Lee HY (2003) Plant regeneration and transformation of Kentucky Bluegrass (*Poa pratensis* L.) via the plant tissue culture. *Kor J Plant Biotechnol* 30: 115-121
- Lee MK, Kim HS, Kim JS, Kim SH, Park YD (2004) *Agrobacterium*-mediated transformation system for large-scale production of transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) plants for insertional mutagenesis. *J Plant Biol* 47: 179-186
- Lee SH, Shon YG, Lee SI, Kim CY, Koo JC, Lim CO, Choi YJ, Han CD, Chung CH, Choe ZR, Cho MJ (1999) Cultivar variability in the *Agrobacterium*-rice cell interaction and plant regeneration. *Physiol Plant* 107: 338-340
- Mukhopadhyay A, Arumugam N, Nandakumar PBA, Pradhan AK, Gupta V, Pental D (1992) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of oilseed *Brassica campestris*: transformation frequency is strongly influenced by the mode of shoot regeneration. *Plant Cell Rep* 11: 506-513

- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Noda T, Tanaka N, Mano Y, Nabeshima S, Ohkawa H, Matsui C (1987) Regeneration of horseradish hairy roots incited by *Agrobacterium rhizogenes* infection. *Plant Cell Rep* 6: 283-286
- Rashid H, Yokoi K, Toriyama K, Hinata K (1996) Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in Indica rice. *Plant Cell Rep* 15: 727-730
- Simmonds DH, Donaldson PA (2000) Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of short-season soybean genotypes. *Plant Cell Rep* 19: 485-490
- Valvekens D, Montagu VM, Lusebettens MV (1988) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proc Natl Acad Sci* 85: 5536-5540
- Xiang Y, Wong WKR, Ma MC, Wong RSC (2000) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica campestris* ssp. *parachinensis* with synthetic *Bacillus thuringiensis* *Cry1Ab* and *Cry1Ac* genes. *Plant Cell Rep* 19: 252-256
- Zhang HX, Hodson JN, Williams JP, Blumwald E (2001) Engineering salt-tolerant Brassica plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12832-12836
- Zhang FL, Takahata Y, Watanabe M, Xu JB (2000) *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). *Plant Cell Rep* 19: 569-575
- Zhang FL, Takahata Y, Xu JB (1998) Medium and genotype factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). *Plant Cell Rep* 17: 780-786

(접수일자 2007년 3월 12일, 수리일자 2007년 6월 7일)