

분자육종에 의한 장미 신품종 최근 개발 동향

오명진 · 김종현 · 안명숙 · 유장렬 · 김석원

Recent advances in development of commercial rose by molecular breeding

Myung Jin Oh · Jong Hyun Kim · Myung Suk Ahn · Jang R. Liu · Suk Weon Kim

Received: 10 November 2010 / Accepted: 18 November 2010
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract This report describes recent advances in tissue culture, genetic transformation of commercial rose (*Rosa hybrida*) and in development of new rose cultivars by molecular breeding. Rose is one of major cut-flowers in global horticulture industry. Successful progresses were made in development of new cultivars for pathogen resistant, environmental stress resistant and petal color modification by molecular breeding. New cultivars, however, has not reported yet in Korea, although lots of progresses were achieved in each field of conventional breeding, tissue culture and genetic transformation. Cooperation in these research fields will promote screening of useful genes to have specific traits on rose and exploiting of processes to improve in the efficiency of tissue culture and genetic transformation of rose, therefore, we hopefully expect that new rose cultivars by molecular breeding will be released in the near future.

서론

장미는 세계 3대 화훼작물중의 하나로써 분류학적으로 장미과 (Rosaceae), 장미속 (*Rosa*)에 속하는 다년생 화훼목 본식물이다. 국내 장미 재배면적은 2007년에는 658 ha 로

서 전체 절화 재배면적의 28%, 생산액은 1,353억원에 달해 절화류 총생산액의 36%를 차지하고 있는 제1의 화훼작물이다. (농림수산식품부 2008). 현재 전세계에서 재배하고 있는 장미 품종들은 미국장미협회에 등록된 것만 해도 12,000 품종 이상이며, 또한 상업적으로 재배되고 있는 장미품종은 전통육종법에 의해 얻어진 교배종들이며 국내에 재배되고 있는 장미 품종은 대부분 외국산이다. 이러한 전통적인 육종에 의해 개발된 장미는 화훼선진국의 품종 선점 및 식물신품종보호국제협약이 적용됨으로써 로열티 지급 대상이 되고 있다. 이는 국내 장미 재배농가에 큰 부담으로 작용되어 국내장미 시장은 더욱 위축되고 있다. 따라서 로열티 대응 장미 품종 국산화를 위한 첨단 생명공학 기술을 이용한 장미 신품종 개발이 시급한 실정이다.

장미는 유성생식 또는 무성번식을 통해 개체 증식이 이루어지는 유전적으로 매우 복잡한 배수성 식물이다. 따라서 교배육종을 통한 우량 장미 신품종을 얻기 위해서는 오랜 시간과 많은 경비가 요구되며, 아울러 장미는 전 세계적으로 매우 큰 시장성에도 불구하고 현재까지 장미의 genomics 및 유전자 수준의 연구, 분자 육종 등은 전 세계적으로 거의 이루어지지 않은 수준에 머물러 있어 향후 관련기술의 세계시장 선점이 매우 유력한 분야이다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 화훼선진국에서는 오래전부터 생명공학 기법을 이용한 장미 품종 개발의 필요성이 제기되어 왔다. 최근 식물 분자생물학의 발달로 인하여 외래유전자의 구조와 기능에 대한 연구가 확립되고, 이들의 생리적 효과와 활성을 형질전환 식물체를 통하여 연구하는 시도들이 많이 이루어지고 있으며 생명공학적인 기법을 이용한 작물개량을 통한 21세기형 농업이 추진되고 있다. 화훼산

M. J. Oh · J. H. Kim · M. S. Ahn · J. R. Liu
식물시스템연구센터, 한국생명공학연구원
(Plant Systems Engineering Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), 111 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon, 305-806, Korea)

S. W. Kim (✉)
한국생명공학연구원 생물자원센터
(Biological Resources Center)
e-mail: kimswo@kribb.re.kr

업 분야에서도 실제로 네덜란드, 미국, 일본, 호주 등 화훼선진국에서는 이미 청색 카네이션과 장미, 오렌지색 페튜니아 등 자연계에 존재하지 않는 화색을 가진 화훼 품종을 개발한 바 있다. 국내에서도 화훼선진국과의 기술력 차이가 비교적 적은 식물조직배양과 형질전환방법을 이용해서 새로운 품종을 창출하는 것이 단기간 내에 신품종 개발이 가능한 방법이라 판단되어 생명공학 기술을 접목하여 장미 품종 개발 연구가 진행되고 있다.

최근 기후 온난화, 난개발에 따른 환경파괴 등 지구 환경변화에 따른 농업분야의 능동적인 대처 방안이 핵심과제로 제기되고 있다. 화훼산업 분야에서도 이러한 대처 방안으로 환경스트레스 저항성, 병 저항성 식물 및 화색 조절 신품종 개발 등이 이루어지고 있다. 아직까지 식량작물의 경우 외래 유전자 도입에 따른 유전자 전환 농산물의 안정성 문제가 꾸준히 제기되고 있지만 화훼작물의 경우 이러한 안정성 문제에 대해서는 한걸음 비켜나 있는 실정이다. 현재 장미의 국내 육종기술은 선진국과 유사한 기술력을 가지고 있으며 국내 신품종 개발이 보고되고 있다. 그러나 화훼류의 경우 국내에서 품종육성이 아직 초보적인 단계이며 농가의 로열티 지급은 경제적 부담으로 작용하고 있다. 이러한 우리 농업의 현실을 고려한다면 분자유육종을 통해 보다 다양한 장미 품종 (화색, 화형, 환경 및 병해충 내성 등)의 개발이 시급히 이루어져야 할 것으로 사료된다. 따라서 본 논문에서는 장미의 분자유육에 요구되는 핵심 기술요소 (조직배양 및 형질전환) 및 분자유육을 통한 장미 신품종 개발에 관한 국내외 현황 및 전망을 고찰하고자한다.

장미 조직배양 연구동향

분자유육종을 이용한 장미 신품종 개발 연구에 있어 핵심 선행기술요소는 무엇보다도 효율적인 장미의 조직배양체계 확립이다. 식물조직배양 기술은 식물의 다양한 발생생리학적 연구는 물론 우량종묘 생산, 고부가가치 유용물질 생산, 유용 유전자 도입을 통한 저항성 및 기능성 신품종 개발, 더 나아가 멸종위기 식물의 현지 외 보존 수단으로 이용되는 식물 연구 분야의 중요한 기반기술이다. 그러나 식물조직배양 기술에 의한 식물체 재분화는 연구에 사용되는 식물종은 물론 품종, 배양 조직의 종류, 식물생장조절물질과 배지의 무기염류의 종류와 농도 등 여러 요인에 의해 그 효율성이 변화된다.

장미의 조직배양에 관한 연구는 Hill (1967)이 *Rosa hybrida*

Tea Rose로부터 adventitious shoot primordium의 기내배양을 보고하면서 시작되었으며 1990년대 중반에 이르러 장미의 잎, 어린잎과 줄기 절편, 화사, 엽병과 뿌리, 그리고 미성숙배 및 부정근 등 다양한 조직에서 체세포배발생을 통한 식물체 재생이 보고되었다 (Table 1). De Wit 등 (1990)은 *R. hybrida* cvs. Domingo와 Vicky Brown의 잎 절편으로부터, Rout 등 (1991) *R. hybrida* cv Landora의 미성숙 잎 절편과 줄기 절편에서 유도된 캘러스로부터 체세포배를 유도하여 식물체를 재생하였다. 이후 Arene 등 (1993)은 *R. hybrida* cv Meirutal의 잎과 뿌리에서에서 캘러스를 거치지 않고 shoot 형성을 통해 식물체 재생이 가능함을 보고한 바 있다. 또한 Hsia와 Korban (1996)은 TDZ와 GA₃를 첨가하여 *R. hybrida*와 *R. chinensis minima*의 줄기절편으로부터 유도된 캘러스에서 shoot (3.3%)와 체세포배 (6.6%)가 동시에 발생됨을 보고한 바 있다. 또한 Visessuwan 등 (1997)은 기내 배양종인 *R. hybrida* cv. Carl Red와 *R. carnina*의 잎과 줄기 조직으로부터 배발생캘러스의 유도를 통해 식물체 재생이 가능함을 보고 하였다. 아울러 식물체 재생 효율을 증가시키기 위하여 AgNO₃의 사용을 통해 *R. hybrida* 잎 조직배양시 shoots의 형성율이 증가되어 재분화율이 향상됨을 보고한 바 있다 (Ibrahim and Debergh 2000). Li 등 (2002a)은 *R. hybrida* cv. Grand Gala의 잎절편을 이용하여 organogenesis를 통해 식물체를 재생하였다.

장미의 잎, 줄기 외에도 뿌리, 엽병 등의 다른 조직에서도 식물체 재생이 보고된 바 있다. Marchant 등 (1996)은 *R. hybrida* cvs. Trumpeter과 Glad Tidings의 엽병과 뿌리에서 식물체 재분화 체계를 보고하였다. 본 연구팀에서도 (Kim et al. 2009a) *R. hybrida* cv Charming의 뿌리 조직으로부터 체세포배발생과 기관분화를 통한 식물체 재생체계를 보고한 바 있다 (Fig. 1) 고농도의 2,4-D 처리구에서 캘러스를 유도하여 체세포배의 형성을 유도한 다음 embryonic tissue를 BA 첨가배지에서 배양하여 shoot의 형성 및 발근을 유도하여 완전한 식물체로 재분화시켜 토양순화 체계를 확립함으로써 다양한 상업용 장미 품종에 적용될 수 있는 식물체 재분화 체계를 확립하였다. *R. hybrida* (Dubois and de Vries 1995), *R. multiflora* (Canli 1997)와 *R. damascena* (Pati et al. 2004)의 경우 엽병에서 shoot를 분화함으로써 엽병 조직이 장미과 식물의 조직배양과정에서 재분화 능력이 높은 조직임을 보고한 바 있다 (Antonelli and Druart 1990; Cousineau and Donnelly 1991; Escalettes and Dosba 1993). 그 외 조직으로는 *R. hybrida*의 immature seeds (Arene et al. 1993; Kim et al. 2003b; Kunitake et al. 1993; Burger et

Table 1 Summary of plant regeneration system of *Rosa* species

Route of plant regeneration	Plant	Explants	Plant growth regulators	Shoot elongation	References
Organogenesis	<i>R. hybrida</i> , <i>R. chinensis minima</i>	stem	2,4-D	TDZ, GA ₃	Hsia and Korban 1996
	<i>R. hybrida</i> cv. charming	root	2,4-D	BA, 2iP	Kim et al. 2009a
	<i>R. hybrida</i> L.	immature embryo	BA, NAA	BA, NAA	Burger et al. 1990
	<i>R. hybrida</i> cv. Grand Gala	leaf	2,4-D	TDZ, BA, GA ₃	Li et al. 2002a
Somatic embryogenesis	<i>R. hybrida</i> cv. Domingo and Vicky Brown	leaf	kinetin, NAA, NOA	kinetin, NAA, NOA	De Wit et al. 1990
	<i>R. hybrida</i> cv. Landora	leaf, stem	BA, NAA, 2,4-D	BA, NAA, GA ₃	Rout et al. 1991
	<i>R. hybrida</i> cv. Royalty	filament	2,4-D, zeatin	NAA, 2,4-D, zeatin,	Noriega and Sondahl, 1991
	<i>R. hybrida</i> cv. Arizona	petal	BA, Kinetin, Dicamba	NAA	Murali et al. 1996
	<i>R. hybrida</i> cv. Trumpeter and Glad Tidings	petiole, root	2,4-D	ABA, IBA	Marchant et al. 1996
	<i>R. hybrida</i> cv. Carl Red, <i>R. canina</i>	leaf, stem	NAA	BA, TDZ	Visessuwan et al. 1997
	<i>R. hybrida</i> Heritage × Alister Stella Gray	root	2,4-D	BA	Sarasan et al. 2001
	<i>R. hybrida</i> cv. sympathy	zygotic embryo	2,4-D, BA		Kim et al. 2003b
	<i>R. rugosa</i>	zygotic embryo, cotyledon, radicle	2,4-D		Kim et al. 2009b
<i>R. chinensis</i> cv. Old Blush	leaf	NAA, GA ₃ , BA	IBA, BA, GA ₃	Vergne et al. 2010	

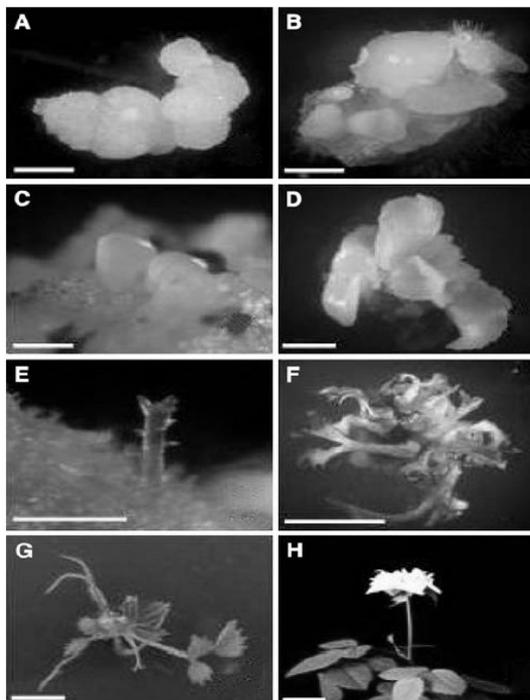


Fig. 1 Plant regeneration from root explants culture of *R. hybrida* L. cv. Charming. A: Callus formation from root explants; B: Embryonic tissue formation from root-derived callus; C: Globular somatic embryos on embryonic tissue; D: Cotyledonary somatic embryos on embryonic tissue; E: Shoot formation from embryonic tissue explant; F: Multiple shoots formation from embryonic tissue explant; G: Regenerated plantlets; H: Flowering plant developed from embryonic tissue explant. Scale bars 2 mm (A-E), 1 cm (F-H).

al. 1990)와 *R. rugosa*의 zygotic embryo (Kim et al. 2009b)로부터 체세포배발생을 통한 식물체 재생이 보고되었다. 또한 *R. hybrida*의 뿌리 (Arene et al. 1993; Marchant et al. 1996; van der Salm et al. 1996; Sarasan et al. 2001), 화사 (Noriega and Sondahl 1991), 꽃잎 (Murali et al. 1996) 등 다양한 조직으로부터 체세포배발생을 통하여 식물체로 재생이 가능성이 보고 되었다. 최근 본 연구팀에서는 *R. hybrida* Marssia의 잎을 저농도의 NAA에 배양하여 체세포배 유사구조 및 캘러스 형성을 유도하였으며 유도된 체세포배는 정상적인 단기간에 식물체로 재생이 가능함을 조사한 바 있다 (Fig. 2). 이 과정에서 암배양 처리 기간의 장단에 따라 체세포배의 형성율이 변화됨을 알 수 있었다. 현재 동일한 방법이 다양한 장미 품종에 적용될 수 있는지 여부를 조사중이다.

원형질체 배양은 외래 유전자의 도입은 물론 체세포 변이를 이용한 다양한 변이체 선발에 매우 유용한 연구 수단이다. 이와 같은 원형질체 배양을 통한 식물체 재생은 장미에서도 적용이 가능하다. 본 연구팀에서는 장미의 배 발생세포주로부터 원형질체 배양과정을 통하여 식물체 재생이 가능함을 보고한 바 있다 (Kim et al. 2003a). 그러나 원형질체 분리 및 배양과정에 요구되는 복잡성으로 인해 많은 후속 연구가 보고되고 있지 않은 실정이다.

이상의 장미 조직배양에 관한 국내외 연구 결과를 통해

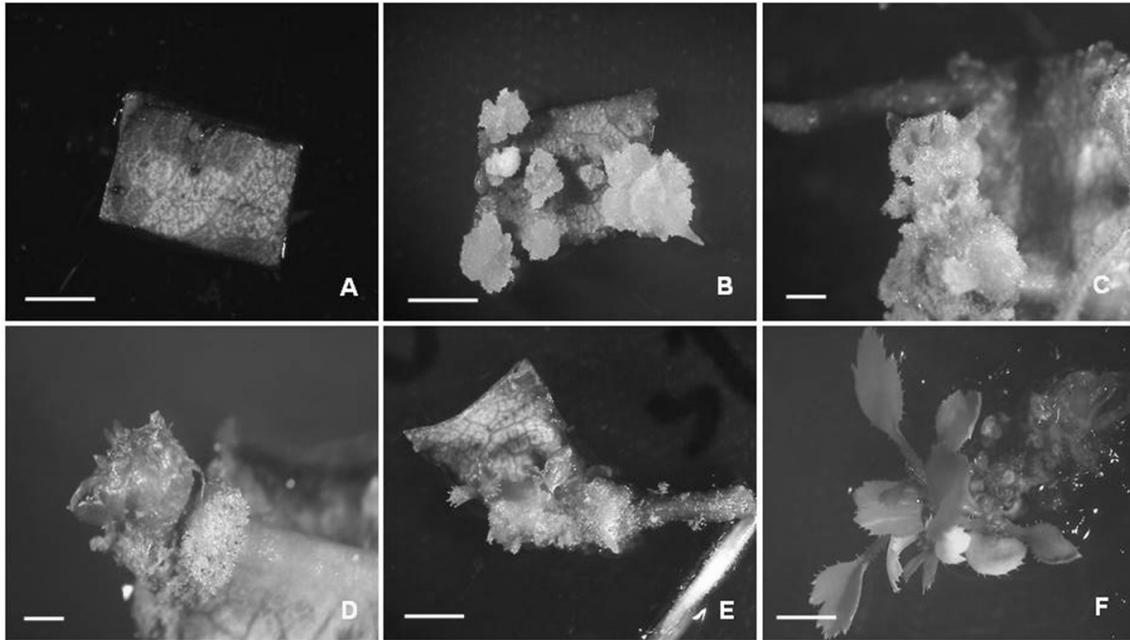


Fig. 2 Plant regeneration from leaf explants culture of *R. hybrida* L. cv. Marssia A: Culture of leaf explants; B: Embryonic tissue and white structure formation from leaf explants; C-D: Early stage somatic embryo formation from leaf explants; E: Shoot formation from somatic embryo F: Multiple shoots formation from somatic embryo. Scale bars represent 5 mm (A, B, E, F), 1 mm (C, D), respectively.

보듯이 장미 조직배양은 node, leaf, immature leaf, stem, filament, ovule, petiole 등의 여러 조직이 사용되고 있다. 그러나 장미는 종과 품종간의 유전적 차이가 크고 배양에 사용되는 조직과 식물체 재생방법이 매우 다양해서 genotype에 영향을 받지 않고 모든 품종에 공통적으로 적용될 수 있는 식물체 재생 방법의 개발이 어렵다 (Marchant et al. 1996). 현재까지 기내 식물체 재생체계가 확립된 장미 품종은 배양이 용이한 몇몇 품종에 한정되어 있으며 아직까지 상업적 유용성이 높은 대다수의 장미품종에서는 기내 식물체 재생체계가 확립되어 있지 않다. 캘러스가 형성되더라도 배발생캘러스의 유도가 어렵고 이들 캘러스에서 shoot를 유도하는 것과 식물체를 얻는데 까지 걸리는 시간이 다른 작물에 비해 길다는 어려운 점이 있다. 따라서 분자유전종을 위한 형질전환 효율을 높이기 위해서는 현재 수준 보다 재생률이 높은 기내배양체계의 확립이 선행되어야 한다.

장미 형질전환 방법 개발

장미는 중요한 경제 작물로 생명공학 기법을 이용하여 새로운 품종을 개발하기 위한 시도는 많이 이루어져왔다. 최초 장미 형질전환은 Firoozabady 등 (1991)이 장미의 filament 배양으로부터 유도된 friable embryogenic tissue로

부터 형질전환 식물체를 획득함으로써 이루어졌다. 현재까지 장미의 분자유전종을 위한 외래 유전자 도입 방법으로 형질전환을 위해 사용된 방법에는 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 방법 (Firoozabady et al. 1994; van der Salm et al. 1996; Dohm et al. 2001; Li et al. 2002b; Kim et al. 2004; Chen et al. 2010; Vergne et al. 2010)과 particle gun을 이용한 bombardment 방법 (Marchant et al. 1998a, b) 등이 보고되고 있다. *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 방법은 가장 경제적인 기법으로 genome 내에 1~2 copy의 적은 copy 수로 도입되며, 특히 비교적 분자량이 큰 gene 도 안정적으로 도입이 가능한 효율적 형질전환 기법 중 하나이기에 장미의 형질전환 식물체 개발에 주로 이용되고 있다. 그러나 *Agrobacterium* 매개 형질전환 방법은 효율이 낮고 재분화 과정까지 긴 시간이 요구된다는 단점이 있다. 안정적인 형질전환 식물체를 획득하는데 *Arabidopsis*의 경우 최소 3~4개월 (Zhang et al. 2006), 담배 2~3 개월 (Clemente 2006)이 소요되는데 비해 장미의 경우 9~12 개월 (Dohm et al. 2001; Marchant et al. 1998a) 로 오랜 시간이 소요된다. 이에 반하여 bombardment 형질전환방법은 고가의 장비를 요구하고 식물체의 genome 내에 복수의 copy 수로 도입유전자가 삽입된 결과 유전자의 과다도입으로 인한 gene silencing 발생, 도입유전자의 크기에 따른 제한, 염색체의 재배치, 유전성의 복잡성 등으로 인해 그 사용이 제한되고 있다.

Firoozabady 등 (1991)의 최초 장미 형질전환 보고 이후 동 그룹에서는 *R. hybrida* cv. Royalty의 배발생세포주로부터 *A. tumefaciens* LBA 4404 (pNos NPTII/p35sLUC)와 *A. rhizogenes* 15834 (pnos NPTII/p35sGUS)를 사용하여 GUS 및 NPTII 유전자가 도입된 형질전환 장미를 보고하였다 (Firoozabady et al. 1994). 이후 Mathews 등 (1991)은 *R. persica* × *Xanthina*의 배발생캘러스로부터 원형질체를 나출시켜 *A. tumefaciens* LBA 4404와 공동배양하여 hygromycin 선발을 통해 형질전환체를 획득하였으며 형질전환된 캘러스의 GUS 발현을 확인하였고 식물체의 재분화가 이루어짐을 보고하였다. Van der Salm (1996) 등은 *R. hybrida* cv. Moneyway의 rootstock의 줄기 절편으로부터 분화된 뿌리와 *A. tumefaciens* GV3101를 공동배양하여 *nptII*와 *rol* gene이 도입된 형질전환 식물체를 개발하였다. 김 등 (2004)은 *R. hybrida* cv. Tineke의 배발생캘러스를 *A. tumefaciens* LBA4404를 공동배양하여 장미에서 GFP 발현 형질전환체를 처음으로 획득하였다 (Table 1).

Marchant 등 (1998a)은 particle bombardment 기술을 이용하여 *R. hybrida* cv. Glad Tiding의 배발생캘러스를 이용 형질전환을 수행하였고, Marchant 등 (1998b)은 chitinase 유전자 도입에 의한 흑반병에 저항성을 가진 장미 식물체를 개발하여 흑반병이 13~43% 감소되는 것을 확인함으로써 병저항성 장미 신품종 개발의 가능성을 보였다. 현재까지 *Agrobacterium*을 이용하거나 bombardment 방법을 이용하여 다양한 장미의 형질전환 연구들이 보고되고 있으나 아직 그 효율은 높지 않다. 따라서 형질전환 효율을 보다 증가시키기 위한 다양한 후속 연구들이 수행되고 있다.

장미 형질전환 효율 제고

장미의 형질전환 효율에 미치는 요인으로 무엇보다도 *Agrobacterium*과 공동 배양 단계 및 이 과정에서 식물조직의 생리적 상태가 중요하다. Dohm (2001)은 형질전환 효율에 있어서 *Agrobacterium*의 전배양 (preculture) 과정이 중요한 요인으로 작용하며, YEP 배지에서 single colony를 접종하여 overnight 로 배양한 후 1:20의 비율로 재희석 시켰을 때 minimal A 배지에서 희석한 것이 YEP 배지 보다 형질전환 효율이 높게 나타난다고 주장하였다. 또한 이들은 재희석 시 2시간 배양한 것이 24시간 동안 장기적 배양한 것보다 형질전환 효율이 높아 재희석액의 장시간 배양은 형질전환 효율을 감소시킨다고 보고 하였다.

형질전환 효율에 미치는 또 다른 중요 요인은 식물의

방어기작에 대한 이해이다. Ming 등 (2007)은 *R. hybrida* cv. Nikita의 절간 조직과 잎 조직을 cystein과 acetosyringone의 농도를 달리하여 *Agrobacterium*과 공동배양을 한 후 형질전환 효율을 비교한 결과 *Agrobacterium*을 통한 형질전환 시 병원균 침입이나 상처에 대한 식물의 방어기작으로 조직의 갈변과 괴사가 일어나게 됨을 규명한 바 있다. 이와 같은 식물의 방어기작은 polyphenol oxidases (PPOs)와 peroxidases (PODs)의 활성을 통한 페놀계 산화작용에 따른 반응으로 cystein은 polyphenol oxidases (PPOs)와 peroxidases (PODs), enzymatic browning, thiol-group의 반응을 직간접적으로 억제하여 그 결과로 cystein은 식물체의 상처와 병원균 침입에 의한 반응을 감소 시켜서 T-DNA의 안정적인 도입을 증가시키고 아울러 감염된 세포의 생존력을 증가시켜 궁극적으로 *Agrobacterium* 감염 능력을 향상시키게 된다고 주장하였다. 특히 식물의 특정한 페놀릭 화합물은 *Agrobacterium* 병원성 유전자의 발현을 유도하여 acetosyringone을 *Agrobacterium* 배양 배지나 공동배양 배지에 첨가한 경우 형질전환 효율이 증가됨은 여러 식물에서도 입증된 바 있으며 장미의 경우도 cystein과 acetosyringone을 첨가한 경우 GUS의 발현률이 증가됨이 보고 되었다 (Ming et al. 2007).

항생제의 종류나 농도 또한 장미의 형질전환 효율에 영향을 준다. Li 등 (2002b)은 항생제의 종류와 농도가 세포의 성장과 식물체 재분화에 영향을 미쳐 궁극적으로 형질전환 효율에 영향을 준다고 보고하였다. *R. hybrida* cv. Carefree Beauty의 잎, 캘러스와 배발생캘러스를 대상으로 형질전환 연구를 수행한 결과 carbenicillin의 첨가는 shoot의 재분화를 억제하였으며 고농도의 cefotaxime 처리 역시 잎 조직으로부터 캘러스의 형성을 억제하였다. 현재까지 장미의 형질전환 효율 제고를 위해 공동배양 조건 개선, 식물의 방어 기작 모방, 항생제 선별 등 다양한 요인 분석이 이루어지고 있다. 이와 같은 요인들을 최적화함으로써 장미의 형질전환 효율이 한층 증가되면 보다 다양한 형질을 보유한 장미 품종의 개발이 더욱 가속화 될 수 있을 것으로 예상된다.

분자 육종을 통한 장미 신품종 개발

분자육종을 이용한 농작물의 신품종 개발 노력은 최근의 지구 온난화 등 지구 환경 변화와 밀접한 관련이 있다. 유용유전자의 도입을 통하여 내염성, 내한성 등 지구 환경 스트레스나 병해충 등 생물학적 스트레스에 강한 내병성 품종 개발을 통하여 열악한 환경조건에서도 다수확이 가

능한 품종을 통하여 식량 산업의 안정을 도모하고 있다. 이러한 연구추세는 화훼산업 분야의 경우도 예외는 아니다. 주요 화훼작물인 장미의 경우도 유용유전자의 도입을 통하여 내병성, 내염성, 내한성, 꽃의 발달과 노화조절을 통한 수명연장, 꽃의 향기 조절 및 화색 조절(Tanaka et al. 2005) 등 다양한 신품종 개발을 위한 노력이 지속적으로 이루어지고 있다 (Table 2). 최근 분자생물학의 기술 발달 및 스트레스에 대한 식물의 방어 기작에 대한 이해의 폭이 넓어지고 있어 이와 같은 신품종 개발 연구는 더욱 가속화되고 구체화될 것으로 예상된다.

병 저항성 증대

장미는 화훼산업은 물론 천연 향료산업에서도 중요한 재료이다. 이와 같은 산업적 중요성으로 인해 장미의 육종은 16세기부터 현재에 이르기 까지 지속적으로 이루어지고 있다. 장미는 전통적인 육종 및 돌연변이주 선발을 통해 신품종의 개발이 이루어져 왔다. 병해충에 의한 생산성 저하를 최소화하기 위하여 장미에서도 내병성 품종의 개발이 이루어져 왔으나 전통 육종방법에 의한 내병성 장미의 개발은 장미 품종간의 염색체 수의 차이 때문에 분명한 한계를 가지고 있다. 이를 극복하기 위한 수단으로 병저항성 유전자의 도입에 의한 장미 품종 개발 연구가 시도되고 있다.

장미의 대표적인 질병인 흑반병 (blackspot disease)은 자낭균 (*Diplocarpon rosae*)에 의해 발생되며 가장 광범위하고 치명적인 병을 일으킨다. *D. rosae*는 낙엽위에서 conidia 형태로 acervuli 표피하에 형성되어 겨울을 보내게 되며 성장기간 동안 장미의 새잎이 감염되면서 흑반병이 발병하게 된다. 감염된 잎은 검은 점형태의 병반이 생기며 chlorosis와 잎의 조기 낙엽이 수반되어 작물의 생산성이 저하된다 (Smith et. al 1988). Marchant 등 (1998b)은 particle bombardment 기술을 이용하여 *R. hybrida* cv. Glad Tidings의 배발생캘러스에 chitinase 유전자를 도입함으로써 대조구에 비해 13~43% 감소된 흑반병에 저항성을 가진 형질전환 장미 식물체를 개발하였다. 이후 Dohm 등 (2001)은 *Rosa hybrida* cv. Heckenzauber와 Pariser Charme 품종의 체세포배와 *Agrobacterium* 공동배양을 통해 80개의 형질전환 식물체를 얻었다. 이들 형질전환식물체의 체세포 변이와 흑반병에 대한 저항성 분석 결과 대조구에 비해 60%가 흑반병에 대한 저항성을 보여 흑반병에 저항성을 가진 형질전환 장미 식물체를 성공적으로 개발하였다.

또한 Dohm 등 (2002) *in vitro* 형질전환 실험과 *in planta* infiltration 실험을 통해 곰팡이 병에 대한 저항성을 보이는 장미 식물체를 개발하였다. Li 등 (2003)은 흰가루병 저항성을 보이는 장미 품종을 개발하기 위하여 *R. hybrida* cv. Carefree Beauty의 배발생캘러스를 이용하여 Ace-AMP1 (antimicrobial protein gene) 유전자를 *Agrobacterium* 매개로 형질전환 연구를 수행하였다. 그 결과 형질전환 식물체 500개중 62%가 *npt II* 유전자와 Ace-AMP1 두 개의 유전자가 삽입된 것을 확인하였으며 흰가루병을 접종한 결과 형질전환 식물체는 저항성을 보임을 보고한 바 있다. 이와 같은 병저항성 유전자 도입을 통한 내병성 장미 품종의 개발은 장미의 생산성 향상에 도움을 줄 것으로 사료된다. 향후 내병성 관련 분야의 연구를 토대로 목표 유전자의 다양화 및 도입 유전자의 발현 증대 및 안정화 연구가 수반되면 다양한 병해충에 저항성을 가진 상업용 장미 품종의 개발이 가능 할 것으로 사료된다.

환경 스트레스 저항성 증대

병충해 등의 생물적 스트레스 뿐만 아니라 온도, 수분, 무기염류, 중금속 등의 물리 화학적 환경 스트레스는 장미의 성장, 발육, 수확에 영향을 주어 생산성 감소를 초래한다. 최근 Chen 등 (2010)은 장식용으로 많이 쓰는 china rose에 내동성 유전자를 도입하여 내동성 장미 식물체를 개발하였다. china rose는 꽃이 크고 붉은 색으로 낮은 온도에서는 건조가 빨리 일어나서 꽃의 유통기한이 짧아져 한대지방에서는 장식용으로 적합하지 않은 단점이 있다. Chen 등 (2010)은 *Medicago truncatula*에서 분리해낸 MtDREB1C 유전자를 *A. tumefaciens* GV3101과 공동배양하여 내동성 china rose 식물체를 개발하였다. 형질전환 된 식물체를 2°C에서 10일 처리 후 -6°C에서 1~4일 동안 시간을 달리 하여 저온처리를 한 결과 대조구는 모두 동사하였으나 형질전환체는 73.3%의 생존율을 보이며 저온 처리 후에도 정상적인 성장과 개화가 이루어짐을 보고함으로써 내동성 장미 식물체 개발이 가능함을 보고하였다. 본 연구팀에서는 노화를 지연시키는 cytokinin 생합성에 관여하는 IPT 유전자를 *R. hybrida* Charming의 embryogenic callus에 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 실험을 수행하여 형질전환체를 획득하였으며 유전자 도입에 따른 분자생물학적 기능 분석을 수행 중에 있다. 아직 다양한 환경스트레스 저항성 장미 품종 개발에 대한 연구는 많지 않으나 최근 기후변화 등 지구 환경 변화에 대한 관심이 고조 되고

있어 관련 분야의 연구가 증가할 것으로 예상된다. 특히 스트레스에 대한 식물의 생리적 현상 규명 및 관련 유전자의 기능 규명이 이루어지면 이들 연구 결과를 토대로 환경스트레스 저항성을 가진 신품종 개발 연구가 가속화될 것으로 예상된다.

화색 조절

화색은 수분 매개 곤충이나 새를 유혹하여 정상적인 수분이 이루어져 종자의 생산, 병원균 침입과 UV light의 피해에 대한 보호 작용을 하고 있으며 또한 화훼산업에서도 꽃의 색상은 매우 중요하여 대표적인 육종의 목표가 되고 있다. 식물의 화색은 flavonoids, carotenoids, betalains 등의 대표적인 색소 화합물과 flavones, flavonols 등의 보조 색소, 색소의 complex polymers 형성을 도와주는 금속이온, 세포내 pH, 세포의 모양 및 세포내 색소의 위치 등 복합적인 요인에 의해 orange/red에서 violet/blue까지 화색의 결정이 이루어진다 (Goto 1987; Holton and Cornish 1995; Davies and Schwinn 1997; Forkmann and Heller 1999; Tanaka and Brugliera 2006). 이들 화색 결정인자들의 작용 기작에 관해서는 비교적 자세한 연구 들이 보고되어 있다. 장미의 주요 색소인 안토시아닌의 경우 안토시아닌이 위치해 있는 액포내의 pH에 따라 색상은 약산성이나 중성의 pH에서는 푸른색을 띠고 산성에서는 붉은 색을 보인다. 보조 색소인 flavones과 flavonols는 다량의 안토시아닌이 존재하는 bathochromic shift에 의해 일어나며 (Goto and Kondo 1991), 금속 이온에 의해 복합체가 형성되면 푸른색을 띠게 된다 (Kondo et al. 1992; Yoshida et al. 2003; Shiono et al. 2005; Shoji et al. 2007). 대부분의 바이올렛이나 청색 계통의 화색의 경우 하나 또는 그 이상의 aromatic acyl moieties가 변형된 delphinidin-based 안토시아닌을 함유한다 (Honda and Saito 2002).

장미의 화색 결정에 영향을 미치는 색소화합물인 안토시아닌과 플라보노이드의 생합성에 대해서는 광범위하게 연구 되어왔다 (Forkmann and Heller 1999; Grotewold 2006; Tanaka and Brugliera 2006). 플라보노이드의 생합성 기작은 일반적으로 고등식물에서 공통적으로 보존되었다 (Fig. 3). 각 식물종은 제한된 안토시아닌의 종류를 축적하고 생합성 유전자의 시간적, 공간적 조절 또는 특정 효소의 특수 기질, 생합성 유전자의 특정 발현에 의해 제한된 화색이 표현된다 (Tanaka et al. 2005; Tanaka and Brugliera 2006). 따라서 화색의 전체 스펙트럼을 가지고 있는 단일종은 적지

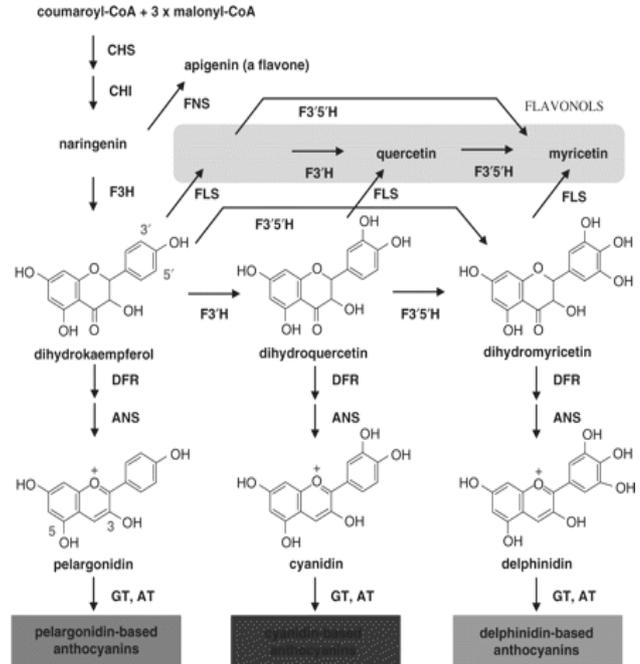


Fig. 3 Generalized flavonoid biosynthetic pathway relevant to flower color. Native rose petals only accumulate pelargonidin and cyanidin-based anthocyanins, mainly pelargonidin and cyanidin 3,5-diglucoside. Lack of delphinidin-based anthocyanins, which is attributed to deficiency of F3'5'H, has hampered the generation of rose flowers having blue and violet hues. The expression of a heterologous F3'5'H gene in rose is expected to generate delphinidin and, thus, a novel flower color with a blue hue. CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomerase; F3H, flavanone 3-hydroxylase; F3'5'H, flavonoid 3',5'-hydroxylase; FLS, flavonol synthase; FNS, flavone synthase; DFR, dihydroflavonol 4-reductase; ANS, anthocyanidin synthase; GT, anthocyanidin glucosyltransferase; AT, anthocyanin acyltransferase (Katsumoto Y et al. 2007)

만 화훼 육종가들은 항상 새로운 화색을 찾았다. 예로 장미, 카네이션, 국화는 중요한 화훼작물이지만 delphinidin-based 안토시아닌의 축적을 못하기 때문에, 즉 delphinidin 생합성에서 중요한 효소인 flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H)의 결핍에 의해 violet/blue 계통의 화색이 존재하지 않는다 (Holton and Tanaka 1994). 반대로 페튜니아와 심비디움은 dihydroflavonol 4-reductases (DFRs)는 dihydrokaempferol에 대한 기질 특이성의 차이로 pelargonidin-based 안토시아닌이 적기 때문에 red/orange 품종이 적다 (Forkmann and Heller 1999; Johnson et al. 1999).

최근의 분자생물학과 식물형질전환 기술의 개발은 안토시아닌 생합성 기작의 대사조절을 통하여 새로운 색상의 꽃을 개발할 수 있게 되었다. 플라보노이드 생합성 기작을 조절하여 형질전환에 적용된 종은 페튜니아와 담배에서 (Meyer et al. 1987; Van der Krol et al. 1988) 이루어졌

고 그 이후 카네이션, 국화, 거베라, 장미 등에서 시도되었다. 장미는 화훼시장에서 가장 중요한 꽃으로 오랜 시간 화훼 육종가들은 푸른 장미를 만들기 위해 노력하였으나 핑크나 연한 자줏빛의 꽃만 만들었다. 장미 꽃잎은 pelargonidin/cyanidin 3-glucoside 혹은 3,5-diglucoside (Biolley and Jay 1993; Mikanagi et al. 2000)와 carotenoids (Vries et al. 1974)를 함유하며, delphinidin 생합성의 주요효소인 F3'5'H를 가지고 있지 않아 delphinidin-based anthocyanin이 부족하여 자연계에서는 푸른색 장미가 없다. 또한 장미 꽃의 표피세포의 vacuolar pH는 3.69~5.78로 산성이(Biolley and Jay 1993)기 때문에 근본적으로 violet/blue 계통의 화색을 가진 꽃을 만들기 위한 요소들이 부족하다. 이와 같은 이유로 전통육종법으로는 푸른색 장미를 얻을 수 없기 때문에 생명공학 기법을 이용한 푸른색 장미의 개발이 시도되었다. 최근 Katsumoto 등 (2007)은 flavonoid 생합성경로를 조절하여 delphinidin이 축적된 푸른장미를 개발하였다. Katsumoto 등 (2007)은 장미 재배종의 flavonoid를 분석하고 꽃잎의 pH를 측정하여 flavonoid 축적정도, 액포의 pH가 높은 것, F3'H의 활성이 없는 것, cyanicidin보다 pelargonidin의 정도가 높은 품종을 선별하여 형질전환을 수행하였다. 배발생캘러스와 *Agrobacterium*을 공동배양하여 *viola*에서 분리한 F3'5'H 유전자가 도입된 푸른색 장미를 개발하였다. 또한 이들은 푸른색을 더욱 강화하기 위하여 rose DFR gene의 down-regulation 시키고, iris의 DFR 유전자와 *viola* F3'5'H 유전자를 동시에 도입 후 과잉발현 시켜서 더 효과적이고 특정한 delphinidin 계열의 푸른색 장미를 개발하였다. 이처럼 F3'5'H 유전자 DFR 유전자의 동시 도입을 통한 화색 조절 전략은 페튜니아 DFR 유전자와 *viola*의 F3'5'H 유전자를 함께 도입하여 푸른색 카네이션 품종 (Holton 1996; Fukui et al. 2003), *Antirrhinum majus*의 DFR 유전자와 *Matthiola incana*의 anthocyanidin synthase (MiANS) 유전자를 함께 도입하여 bronze-orange 색 개나리속 (*Forsythia x intermedia* cv. 'pring Glory') 식물의 개발 (Rosati et al. 2003) 등의 연구에서도 성공적으로 작용됨이 보고된 바 있다.

안토시아닌 생합성의 조절은 생합성 경로에 직접 작용하는 구조 유전자와 이들 구조 유전자들의 발현을 조절하는 전사 조절인자들에 의해 이루어지는데 전사 조절인자는 구조 유전자들 발현을 활성화 또는 억제하여 효과적인 생합성을 조절 시키는 기능을 하며 염기서열 특이적인 DNA 결합과 단백질-단백질 상호작용을 통한 전사의 증대 혹은 감소를 조절한다. 안토시아닌 생합성은 Myb 전사 조절인자 (TF), basic helix-loop-helix (bHLH) 전사 조절

인자와 WD-repeat 단백질(MYB-bHLH-WD40, "MBW" complex)의 복합체에 의해 발현 조절이 이루어지는 것으로 알려져 있다 (Baudry et al. 2004). 최근 장미의 화색 조절을 위해 안토시아닌 생합성 기작의 전사조절 유전자를 이용하여 품종 개발이 이루어지고 있다. Lin-Wang 등 (2010)은 Rosaceae에서 R2R3 MYB 전사조절인자가 안토시아닌 생합성 경로에 관여된다는 것을 밝혀내고 꽃 조직에 특이적인 안토시아닌 조절을 위해 상업적으로 중요한 장미과 식물에서 MYB10 전사조절인자를 분리하여 bHLHs와 공동 발현 되었을 때 담배와 딸기에서 안토시아닌 합성 조절을 통한 화색 변화가 가능함을 보고한 바 있다. 본 연구팀에서는 현재 장미 꽃 형태형성 및 화색 조절에 관여하는 small RNA pool을 탐색하여 유용 small RNA를 활용한 장미 형질전환 식물체 개발을 위한 기반 연구를 수행하고 있다. small RNA 도입 검증 체계 확립을 위해 *R. Rugosa*와 *R. hybrida* Charming 현탁배양 세포주로부터 분리된 원형질체를 이용하여 통해 *gfp* 유전자 발현체계를 확립하였다 (Fig. 4). 확립된 장미 원형질체 transient assay는 다양한 유용 small RNA 도입을 통한 장미의 형질전환 검증 도구로 활용이 가능할 것으로 기대된다. small RNA(micro RNA, siRNA 등)의 개화유도, 꽃기관 발달, 화색 결정 등에 대한 주요 조절 기능은 이미 애기장대 등의 모델식물 및 페튜니아 등에 대한 연구를 통하여 밝혀져 왔으며 향후 이에 대한 연구가 급속히 증가할 것으로 예상된다. 따라서 화훼시장에서 매우 중요한 장미의 꽃 발달을 조절할 수 있

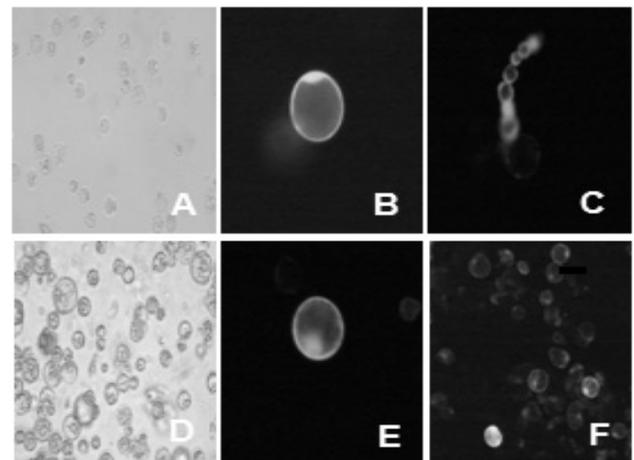


Fig. 4 Establishment of protoplast transformation system by PEG from cell suspension. A: protoplasts isolated from the suspension culture of *R. Rugosa*; B-C: The transient expression of GFP in transfected protoplasts; D: protoplasts isolated from the suspension culture of *R. hybrida* Charming; E-F: The transient expression of GFP in transfected protoplasts

는 small RNA를 발굴하고 이를 활용할 수 있는 기반을 마련하게 되면 국가적 농업 경쟁력 향상에 크게 기여할 수 있을 것이다. 산토리는 지난 14년간 300억원을 투자하여 유전자 변형 푸른색 장미를 개발하였다. 푸른색 장미는 기존장미에 비해 고가에 판매되며 2조원이 넘는 장미시장에서 약 20%의 매출규모를 차지하게 될 것이라는 전망이다. 따라서 국내의 연구환경도 장기적 안목에서의 투자와 지속적인 지원을 통해 국내 연구자의 협력 연구가 진행된다면 분자유종을 통하여 국제적 경쟁력을 가지는 화훼 품종의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

결론

본 연구에서는 분자유종에 의한 장미 신품종 개발에 요구되는 장미의 조직배양, 형질전환 방법, 분자유종을 통한 장미신품종의 개발에 관한 국내외 연구 동향을 살펴보았다. 장미는 세계 3대 화훼작물중의 하나로 화훼산업의 대표 작물이다. 선진국에서는 질병, 환경 스트레스 저항성 및 화색 조절을 통한 신품종 작물 개발에 많은 연구가 이루어지고 있다. 그러나 국내의 분자 육종을 통한 품종 개발 연구는 아직 미미한 실정이다. 육종 국내 전통 육종기술은 세계적 경쟁력을 확보하고 있으며 조직배양 및 형질전환 기술 또한 국제적 경쟁력을 가지고 있다. 따라서 전통 육종 방법으로는 도입이 어려운 형질을 목표로 유용 유전자 발굴, 조직배양 및 형질전환 효율 증대 등 기술적 인프라가 강화되면 국내에서도 분자 육종을 통한 장미 신품종 개발이 멀지 않아 성공적인 열매를 맺을 수 있을 것으로 기대된다.

사사

본 연구는 바이오그린 21사업, 한국생명공학연구원 기관 고위사업의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용 문헌

Antonelli M, Druar, PH (1990) The use of a brief 2,4-D treatment to induce leaf regeneration on *Prunus canescens*. *Bois Acta Hortic* 280:45-50

Arene L, Pellegrino C, Gudini S (1993) A comparison of the somaclonal variation level of *Rosa hybrida* L. cv Meirutral plants regenerated from callus or direct induction from

different vegetative and embryonic tissues. *Euphytica* 71:83-90

Baudry A, Heim MA, Dubreucq B, Caboche M, Weisshaar B, Lepiniec L (2004) TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 39:366-380

Biolley JP, Jay M (1993) Anthocyanins in modern roses: chemical and colorimetric features in relation to the colour range. *J. Exp. Bot.* 44:1725-1734

Burger DW, Liu L, Zary KW, Lee CI (1990) Organogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Rosa hybrida* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 21:147-152

Canli FA (1997) Separation of Rose Chimeras Into Their (*Rosa sp.*) Consistent Genotypes *in vitro* Master Thesis. University of Illinois at Urbana-Champaign, USA

Chen JR, Lu JJ, Liu R, Xiong XY, Wang TX, Chen SY, Guo LB, Wang HF (2010) DREB1C from *Medicago truncatula* enhances freezing tolerance in transgenic *M. truncatula* and China Rose (*Rosa chinensis* Jacq.). *Plant Growth Regul* 60:199-211

Clemente T (2006) *Nicotiana* (*Nicotiana tabacum*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana glauca*). In: Wang K (ed) *Agrobacterium* protocols, 2nd edn. Humana press, New Jersey, pp 143-154

Cousineau JC, Donnelly DJ (1991) Adventitious shoot regeneration from leaf explants of tissue cultured and green house grown raspberry. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 27:249-255

Davies KM, Schwinn KE (1997) Flower colour. In: Geneve RL, Preece JE, Merkle SA eds, *Biotechnology of ornamental Plants*, pp 259-94. CAB International, Wallingford

De Wit JC, Esendam HF, Honkanen JJ, Tuominen U (1990) Somatic embryogenesis and regeneration of flowering plants in rose. *Plant Cell Rep* 9:456-458

Dohm A, Ludwig C, Schiling D, Debener T (2001) Transformation of roses with genes for antifungal proteins. *Acta Hort* 547:27-33

Dohm A, Ludwig C, Schiling D, Debener T (2002) Transformation of roses with genes for antifungal proteins to reduce their susceptibility to fungal diseases. *Acta Hort* 572:105-111

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

Escalettes V, Dosba F (1993) *In vitro* adventitious shoot regeneration from leaves of *Prunus* spp. *Plant Sci* 90:201-209

Firoozabady E, Lemieux CS, Moy YS, Moll B, Nicholas JA, Robinson KEP (1991) Genetic Engineering of Ornamental Crops. *In Vitro* 27:96A

Firoozabady E, Moy Y, Courtneygutterson N, Robinson K (1994) Regeneration of transgenic rose (*Rosa hybrida*) plants from embryogenic tissue. *Biotechnology* 12:609-613

Forkmann G, Heller W (1999) Biosynthesis of flavonoids. In: Sankawa U. ed. *Comprehensive Natural Products Chemistry*, pp 713-48. Elsevier, Amsterdam

Fukui Y, Tanaka Y, Kusumi T, Iwashita T, Nomoto K (2003) A rationale for the shift in colour towards blue in transgenic

- carnation flowers expressing the flavonoid 30,50-hydroxylase gene. *Phytochemistry* 63:15-23
- Goto T (1987) Structure, stability, and color variation of natural anthocyanins. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Edited by Herz W, Grisebach H, Kirby GE, Tamm C pp 113-58. Springer-Verlag, New York
- Goto T, Kondo T (1991) Structure and molecular stacking of anthocyanins flower color variation. *Angew Chem Int Ed Engl* 30:17-23
- Grotewold E (2006) The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu Rev Plant Biol* 57:761-80
- Hill GP (1967) Morphogenesis of shoot primordia in cultured stem tissue of a garden rose. *Nature* 216:596-597
- Holton TA (1996) Transgenic plants exhibiting altered flower colour and methods for producing same. WO/1996/036716
- Holton TA, Cornish EC (1995) Genetic and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* 7:1071-083
- Holton TA, Tanaka Y (1994) Blue roses-a pigment of our imagination? *Trends Biotechnol* 12:40-42
- Honda T, Saito N (2002) Recent progress in the chemistry of polyacylated anthocyanins as flower color pigment. *Heterocycles* 56:633-92
- Hsia C, Korban S (1996) Organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* and *Rosa chinensis minima*. *Plant Cell Tiss Org Culture* 44:1-6
- Ibrahim R, Debergh PC (2000) Improvement of adventitious bud formation and plantlet regeneration from in vitro leaf explants of *Rosa hybrida* L. *Acta Hort* 520:271-280
- Johnson ET, Yi H, Shin B, Oh BJ, Cheong H, Choi G (1999) Cymbidium hybrida dihydroflavonol 4-reductase does not efficiently reduce dihydrokaempferol to produce orange pelargonidin-type anthocyanins. *Plant J* 19:81-85
- Katsumoto Y, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Brugliera F, Holton TA, Karan M, Nakamura N, Yonekura-Sakakibara K, Togami J, Pigeaire A, Tao GQ, Nehra NS, Lu CY, Dyson BK, Tsuda S, Ashikari T, Kusumi T, Mason JG, Tanaka Y (2007) Engineering of the Rose Flavonoid Biosynthetic Pathway Successfully Generated Blue-Hued Flowers Accumulating Delphinidin. *Plant Cell Physiol* 48:1589-1600
- 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 Tiss Org Cult* 78:107-111
- Kim SW, Oh SC, In DS, Liu JR (2003a) Plant regeneration of rose (*Rosa hybrida*) from embryogenic cell-derived protoplasts. *Plant Cell Tiss Org Cult* 73:15-19
- Kim SW, Oh SC, Liu JR (2003b) Control of direct and indirect somatic embryogenesis by exogenous growth regulators in immature zygotic embryo cultures of rose. *Plant Cell Tissue and Organ Cult* 74:61-66
- Kim SW, Oh MJ, Liu JR (2009a) Plant regeneration from the root-derived embryonic tissues of *Rosa hybrida* L. cv. Charming via a combined pathway of somatic embryogenesis and organogenesis. *Plant Biotechnol Rep* 3:341-345
- Kim SW, Oh MJ, Liu JR (2009b) Somatic embryogenesis and plant regeneration in zygotic embryo explant cultures of rugosa rose *Plant Biotechnol Rep* 3:199-203
- Kondo T, Yoshida K, Nakagawa A, Kawai T, Tamura H, Goto T (1992) Structural basis of blue-colour development in flower petals from *Commelina communis*. *Nature* 358: 515-518
- Kunitake H, Imamizo H, Mii M (1993) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature seed-derived calli of rose (*Rosa rugosa* Thunb). *Plant Sci* 90:187-194
- Li XQ, Krasnyanski SF, Korban SS (2002a) Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in *Rosa*. *J. Plant Physiol.* 159. 313-319
- Li XQ, Krasnyanski SF, Korban SS (2002b) Optimization of the uidA gene transfer into somatic embryos of rose via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol Biochem* 40: 453-459
- 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
- Lin-Wang K, Bolitho K, Grafton K, Kortstee A, Karunairatnam S, McGhie TK, Espley RV, Hellens RP, Allan AC (2010) An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae. *Plant Biology* 10:2-17
- 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 Science* 120:95-105
- Marchant R, Power JB, Lucas JA, Davey MR (1998a) Biolistic transformation of rose (*Rosa hybrida* L.). *Ann Bot* 81: 109-114
- Marchant R, Davey MR, Lucas JA, Lamb CJ, Dixon RA, Power JB (1998b) Expression of a chitinase transgene in rose (*Rosa hybrida* L.) reduces development of blackspot disease (*Diplocarpon rosae* Wolf.). *Mol. Breeding* 4: 187-194
- Mathews D, Mottley J, Horan I, Roberts AV (1991) A protoplast to plant system in roses. *Plant Cell Tiss Org Cult* 24: 173-180
- Meyer P, Heidmann I, Forkmann G, Saedler H (1987) A new *Petunia* flower color generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature* 330:667-678
- Mikanagi Y, Saito N, Yokoi M, Tatsuzawa F (2000) Anthocyanins in flowers of genus *Rosa*, sections Cinnamomeae (¼ *Rosa*), Chinenses, Gallicanae and somemodern garden roses. *Biochem Syst Ecol* 28:887-902
- Ming OC, Wen AS, Sinniah UR, Xavier R, Sreeramanan S (2007) Cysteine and acetosyringone are the two important parameters in *Agrobacterium*-mediated transformation of rose hybrid, Nikita. *Asian J Plant Sci* 2:387-397
- Murali S, Sreedhar D, Lokeswari TS (1996) Regeneration through somatic embryogenesis from petal-derived calli of

- Rosa hybrida* L. cv. Arizona (hybrid tea). *Euphytica* 91: 271-275
- Noriega C, Sondahl MR (1991) Somatic embryogenesis in hybrid tea roses. *Biotechnology* 9:991-993
- Pati PK, Sharma M, Sood A, Ahuja PS (2004) Direct shoot regeneration from leaf explants of *R. damascena* Mill. In *Vitro Cell Dev Biol Plant* 40:192-195
- Rosati C, Simoneau P, Treutter D, Poupard P, Cadot Y, Cadic A, Duron M (2003) Engineering of flower color in forsythia by expression of two independently transformed dihydroflavonol 4-reductase and anthocyanidin synthase genes of flavonoid pathway. *Mol. Breed* 12:197-208
- Rout GR, Debata BK, Das P (1991) Somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* L. cv Landora. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 27:65-69
- Sarasan V, Roberts AV, Rout GR (2001) Methyl laurate and 6-benzyladenine promote the germination of somatic embryos of a *hybrid* rose. *Plant Cell Rep* 20:183-186
- Shiono M, Matsugaki N, Takeda K (2005) Structure of the blue cornflower pigment. *Nature* 436:791
- Shoji K, Miki N, Nakajima N, Momonoi K, Kato C, Yoshida K (2007) Perianth bottom-specific blue color development in tulip cv. Murasakizuisho requires ferric ions. *Plant Cell Physiol* 48:243-251
- Smith IM, Dunez J, Phillips DH, Lelliott RA, Archer SA (1988) *European Handbook of Plant Diseases*. Blackwell Scientific, Oxford, UK
- Tanaka Y, Brugliera F (2006) Flower colour. In *Flowering and its Manipulation*. Edited by Ainsworth, C. pp 201-239. Blackwell, Oxford
- Tanaka Y, Katsumoto Y, Brugliera F, Mason J (2005) Genetic engineering in floriculture. *Plant Cell Tiss Organ Culture* 80:1-4
- Van der Salm TPM, van der Toorn CJG, Hanischten cate CH, Dons HJM (1996) Somatic embryogenesis and shoot regeneration from excised adventitious roots of the root stock *Rosa hybrida* cv Money Way. *Plant Cell Rep* 15: 522-526
- Van der Krol AR, Lenting PE, Veenstra J, van der Meer IM, Gerats AGM, Mol JNM, Stuitje AR (1988) An antisense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature* 333:866-869
- Vergne P, Maene M, Gabant G, Chauvet A, Debener T, Bendahmane M (2010) Somatic embryogenesis and transformation of the diploid *Rosa chinensis* cv Old Blush. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 100:73-81
- Visessuwan R, Kawai T, Mii M (1997) Plant regeneration systems from leaf segment culture through embryogenic callus formation of *Rosa hybrida* and *R. canina*. *Breed Sci* 47:217-222
- Vries DP, Keulen HA, Bruyn JW (1974) Breeding research on rose pigments. 1. The occurrence of flavonoids and carotenoids in rose petals. *Euphytica* 23:447-457
- Yoshida K, Toyama-Kato Y, Kameda K, Kondo T (2003) Sepal color variation of *Hydrangea macrophylla* and vacuolar pH measurement with proton-selective microelectrode. *Plant Cell Physiol* 44:262-268
- Zhang X, Henriques R, Lin S, Niu Q, Chua N (2006) *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip. *Nat Protoc* 1:1-6
- 농림수산식품부 (2008) 2007 화훼재배현황