

# 고효율의 아그로박테리움 형질전환법을 이용한 제초제저항성 나리 식물체 개발

김종보

## High-efficiency development of herbicide-resistant transgenic lilies via an *Agrobacterium*-mediated transformation system

Jong Bo Kim

Received: 18 April 2023 / Revised: 25 April 2023 / Accepted: 25 April 2023 / Published: 28 April 2023  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** Transgenic lilies have been obtained using *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1) with the plant scale explants, followed by DL-phosphinothricin (PPT) selection. In this study, scales of lily plants cv. “red flame” were transformed with the pCAMBIA3301 vector containing the *gus* gene as a reporter and the *blpR* gene as a selectable marker, as well as a gene of interest showing herbicide tolerance, both driven by the CaMV 35S promoter. Using a 20-minute infection time and a 5-day cultivation period, factors that optimized and demonstrated a high transformation efficiency were achieved. With these conditions, approximately 22-27% efficiency was observed for *Agrobacterium*-mediated transformation in lilies. After transformation with *Agrobacterium*, scales of lilies were transferred to MS medium without selective agents for 2 weeks. They were then placed on selection MS medium containing 5 mg/L PPT for a month of further selection and then cultured for another 4-8 weeks with a 4-week subculture regime on the same selection medium. PPT-resistant scales with shoots were successfully rooted and regenerated into plantlets after transferring into hormone-free MS medium. Also, most survived putatively transformed plantlets indicated the presence of the *blpR* gene by PCR analysis and showed a blue color indicating expression of the *gus* gene. In conclusion, when 100 scales of lily cv. “red flame” are

transformed with *Agrobacterium*, approximately 22-27 transgenic plantlets can be produced following an optimized protocol. Therefore, this protocol can contribute to the lily breeding program in the future.

**Keywords** *Agrobacterium*, Herbicide-resistant, Lily, Monocot, Transformation

### 서론

나리(*Lilium* spp.)는 *Liliaceae*과, *Lilium* 속에 속하는 직립성 다년생 단자엽식물이며, 유럽, 북미 및 동아시아를 포함한 북반구 전역으로 약 100종이 분포하고 있으며, 화형이 크며 다양한 화색, 그리고 긴 절화 수명으로 지난 50년 동안 상업적 가치가 있는 구근 및 절화 식물로 여겨졌다(Ahn et al. 2017; Kole 2011; Robinson and Firoozabady 1993; van Tuyl and Arens 2010). 또한 해외 및 국내에서 절화로 인기가 많은 구근류의 하나이며, 2021년 기준 국내 화훼재배현황을 따르면 나리는 전체 77 ha 면적에서 1,400만본이 생산된다. 또한 판매량은 101.04억원으로 국내 화훼류에서 3위를 차지하고 있는데, 그 중 오리엔탈 하이브리드, *Longiflorum* 하이브리드 및 아시아틱 하이브리드가 주로 재배된다(Ministry of Food, Agriculture, Forestry and Fisheries 2021). 이러한 나리는 최근 다양한 소비자의 기호를 만족하고 기후변화에 따른 작물생육저하 그리고 재배에 있어서 질병 및 잡초발생 등 여러 문제를 해결하기 위해 다양한 육종방법을 통해 우량 나리품종이 개발되어 왔다.

나리의 새로운 화색, 화형, 바이러스 저항성 및 환경 스트레스 내성과 같은 농업적으로 유용한 형질의 개량을 위해 나리의 효율적인 형질전환 시스템의 확립이 요구되어 왔다

J. B. Kim (✉)  
건국대학교 글로벌캠퍼스 의료생명대학 생명공학과  
(Department of Biotechnology, College of Biomedical & Health Sciences, Glocal Campus, Konkuk university, Choong-Ju, 27478, Korea)  
e-mail: jbhee1011@kku.ac.kr

(Hoshi et al. 2004). 또한 나리 형질전환은 위 형질 외에도 환경스트레스나 제초제 저항성의 형질을 발현하는 목적을 충족하는데도 사용되어져 왔다(Liu et al. 2014). 외래 유전자를 나리에 도입하기 위해서 많은 노력들이 이루어졌는데, 최초로 나리에 식물형질전환기법이 Cohen과 Meredith(1992)과 Langeveld 등(1995)에 의해 처음으로 보고된 이후, 유전자총(Irifune et al. 2003; Kamo and Han 2008; Kim 2017; Watad et al. 1998) 그리고 아그로박테리움(Azadi et al. 2010; Chen et al. 2023; Hoshi et al. 2004; Liu et al. 2011; Mercuri et al. 2003; Ogaki et al. 2008; Wang et al. 2012; Yan et al. 2019)이 주로 사용되어져 왔다. 다양한 식물형질전환 기술들 중 유전자총 대신 *Agrobacterium*-매개 형질전환법이 널리 사용된 이유는 도입 유전자가 안정적으로 도입되며(Hiei et al. 2000), 비교적 안정성과 재현성이 높고 유전자 copy수가 적은 장점을 가지고 있기 때문이다(Hiei et al. 1997).

나리속에서 *Agrobacterium*-매개 형질전환법을 이용하여 Cohen과 Meredith(1992)에 의해 처음 시도한 이래로 Mercuri 등(2003)은 FEC (friable embryogenic calli)에 *A. tumefaciens* 균주 LBA4404를 이용하여 0.8% 효율의 형질전환체를 획득했다고 보고되었으며, 오리엔탈 하이브리드 백합 'Acapulco'와 *Lilium × formolongi*의 형질전환체를 대상으로 아그로박테리움 형질전환을 수행하여 각각 3% (Hoshi et al. 2004) 및 13% (Ogaki et al. 2008)의 형질전환 효율을 얻었다고 보고되었다. 이러한 아그로박테리움 형질전환 실험을 효과적으로 수행하기 위해서는 여러 가지 조건들이 최적화 되어야 하는데 이러한 요인들 중 아그로박테리움의 농도와 접종시간 요인이 알스트로메리아(Kim et al. 2007), 황마(Pushyami et al. 2011), 오리엔탈나리(Chen et al. 2023) 등의 보고에서도 중요하다고 기술했고 그리고 공동배양기간 요인 역시 알스트로메리아(Kim et al. 2007), 백합(Azadi et al. 2010; Hoshi et al. 2004; Ogaki et al. 2008) 형질전환에서 중요한 요인이라고 보고되었다.

따라서 본 연구에서는 여러 형질전환 기법들 중 효율이 우수하다고 알려진 아그로박테리움을 이용하여 접종시간 및 공동배양기간 등의 형질전환 조건을 최적화 하고 이를 이용하여 제초제 저항성 형질을 나타내는 나리 형질전환 체계를 확립하고자 본 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

본 연구에 재료로 사용된 나리 식물체는 국립원예특작과학원 화훼과에서 육성한 '레드플레임' 품종(제04-0005-726호; *Lilium Asiatic* '01-78' X *L. Asiatic* 'Rodrigo')의 기내식물체에서 인편을 분리해서 MS basal salts (Murashige and Skoog 1962)

with vitamins 4.41 g/l, plant agar 7.0 g/l (Duchefa, Haarlem, The Netherlands), sucrose 30 g/l이 첨가되고 pH는 5.8로 조절된 MS 배지에 치상하였다. 이 배양체들은 4주 간격으로 계대배양하였고, 증식한 인편조직들을 형질전환 재료로 사용하였다. 모든 기내 배양은  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 16시간 광주기에 광도는 약 2,000 lux 조건 하에서 수행하였다.

### Bacteria strain

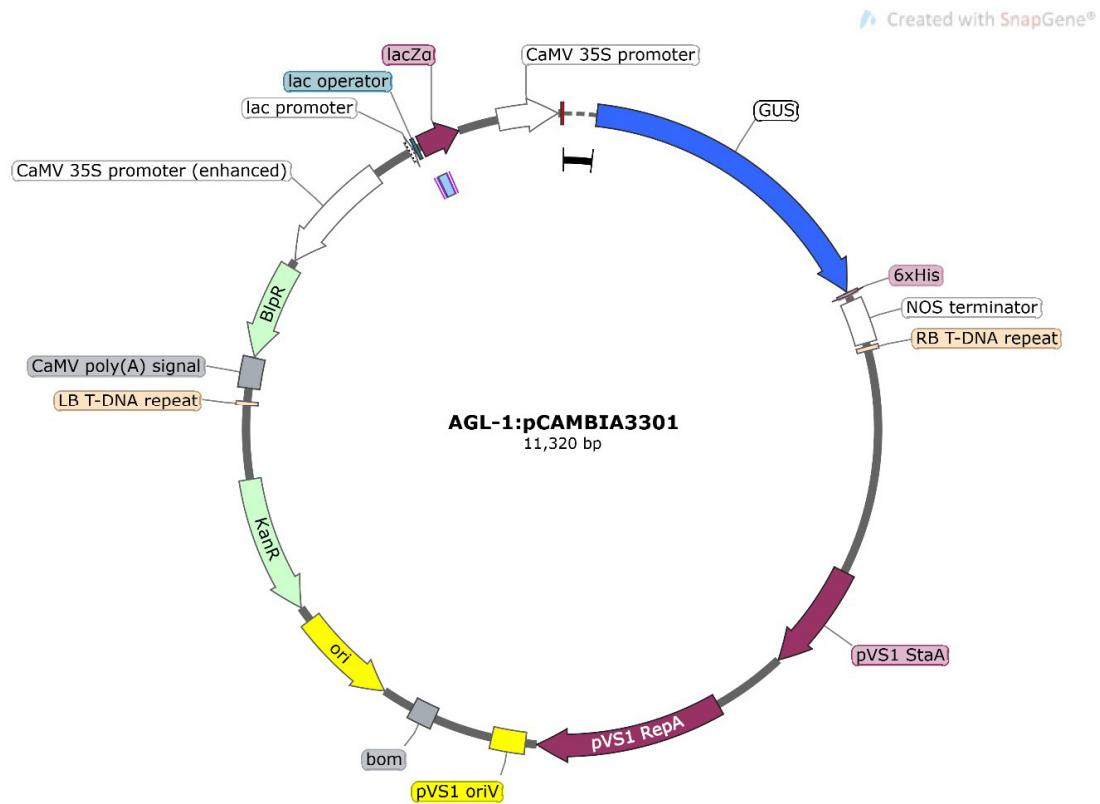
*Agrobacterium*-매개 형질전환의 접종을 하기 위한 균주로는 35S cauliflower mosaic virus 프로모터의 조절을 받고 인트론이 포함된  $\beta$ -glucuronidase (GUS) gene과 35S cauliflower mosaic virus (enhanced) 프로모터의 조절을 받는 *BlpR* 유전자가 있는 pCAMBIA3301 벡터(Cambia, Australia - Fig. 1 참고)가 함유한 AGL-1 균주를 사용하였다. *GUS*와 *BlpR* 유전자는 각각 reporter 및 selection 마커 유전자로 사용된다.

### 아그로박테리움 형질전환 조건확립 및 형질전환체 선발

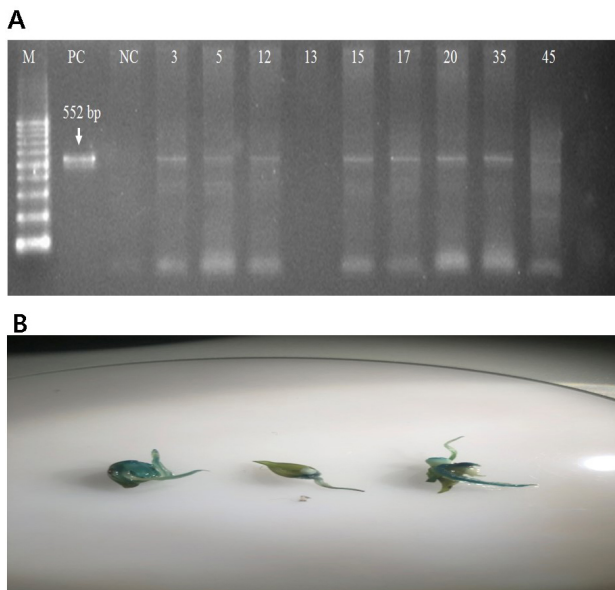
박테리아는 30 ml 액체 YEP(yeast extraction NaCl, pH 7.5)와 kanamycin (Duchefa, Haarlem, The Netherlands), rifampicin (Duchefa, Haarlem, The Netherlands)과 같은 선택적 항생제를 포함한 배지에  $120\text{--}130\text{ rpm min}^{-1}$ ,  $28^\circ\text{C}$  조건으로 회전 진탕기에 배양한다. Optical density (OD)가 0.3 ~ 0.5에 도달한 박테리아를 2,800 RPM으로 centrifuge 시켜 suspension을 얻고 접종배지(MS medium containing 100  $\mu\text{M}$  acetosyringone (AS). Duchefa, Haarlem, The Netherlands)로 resuspended시킨다. 60개의 인편들이 있는 petri dish (SPL, Republic of Korea)에 이 현탁액을 첨가해서 서로 다른 시간(5, 10, 20, 30 min)동안 접종을 시켜주고 나서 공동배양배지(0.7% plant agar)에 1, 3, 5, 7일간 암 배양한다. 공동배양 후 *agrobacterium*을 제거하기 위해 MSW1 (MS medium containing 1 mM cefotaxime [Duchefa, Haarlem, The Netherlands])와 MSW2 (MS medium containing, 0.5 mM cefotaxime)으로 각각 5시간 동안 수세작업을 수행하였다. 그리고 나서 2주동안 CRM (MSW2 + 0.7% plant agar)에서 휴식배양을 시키고 나서, CPT5 (CRM containing 3 mg/L phosphinothricin [Duchefa, Haarlem, The Netherlands] with 0.7% plant agar)에서 8주간 선발 배양하였다. 선발 배양이 끝나고 herbicide-free MS medium에 치상하여 재분화를 위해 약 4주간 배양하였다. 형질전환 실험이 끝난 인편은 Kim (2017) 등의 연구와 같이 PPT 5 mg/l이 첨가된 배지에서 8주간 선발과정을 거친다.

### 형질전환체 선발, GUS 및 PCR분석

선발과정이 끝난 백합 형질전환 개체(Fig. 3A)에서 *gus* 분석을 위하여 좀 더 증식을 하고 신초를 형성시킨 후 *gus* 발현 재

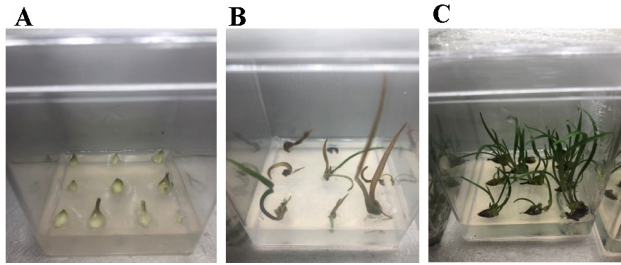


**Fig. 1** Schematic diagram of AGL-1::pCAMBIA3301 harboring the *gus* and *blpR* genes in T-DNA region. Annotations were graphically depicted using SnapGene (v. 6.0.7) (<http://www.snapgene.com/>). (*GUS*:  $\beta$ -glucuronidase, *blpR*: PAT (Phosphinothricin acetyl-transferase), NPTII (neomycin phosphotransferase); NOS: nopaline synthase promoter; TNOS: 3' signal of nopaline synthase; 35S: Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S promoter



**Fig. 2** Molecular analysis of *blpR* gene and *gus* analysis of transgenic lily plants A: *blpR* gene (552 bp) (M: marker, PC: positive control, NC: negative control (water), C: control (non-transformed plants), lane 3-45: transgenic lily lines; B: *gus*-stained explants from *in vitro* transgenic lily plants)

료로 사용하였다(Fig. 2B 참조). *GUS* 염색은 Jefferson(1987)의 방법에 준하여 실시하였다. 선발이 끝난 형질전환체의 잎을 2 mM 5-bromo-4-chloro-3-indoyl glucuronide (X-gluc)가 함유된 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) 염색용액에 침지하여 37°C 조건 하에서 overnight 처리하였다. 처리 후 ethanol을 이용하여 엽록소를 제거하는 탈색작업을 한 뒤, 잎의 *gus* 발현 여부를 관찰하였다. 또한 *blpR* 유전자의 PCR 분석을 위해 채취한 잎으로부터 DNA를 추출한 후 막자사발에서 액체질소를 이용하여 분쇄하고 HiYield Genomic DNA kit (Real Biotech Corporation, Taiwan)을 이용하여 DNA를 추출하였다. *blpR* gene (552 bp)에 대한 PCR분석을 진행하기 위해 Master mix (Accupower Taq PCR Master mix, Bioneer) 25  $\mu$ l에 앞에서 추출한 gDNA와 forward primer (5'-ATGAGCCCAGA ACGACGCCC-3'), reverse primer (5'-TCAAATCTCGGTGAC GGGCAGG-3')를 넣은 후 총량이 50  $\mu$ l이 되도록 맞춰준다. PCR 조건은 pre-denaturation은 94°C에서 5분, denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 64°C에서 15초, extension은 72°C에서 30초간 33 cycles 반복 진행 후, last extension은 72°C에서 7분간 반응시켰다. 증폭된 DNA는 1.5% agarose gel에서 100 v 조건 하에서 30분간 전기영동을 실시하여 도입유전자를 확인하였다.



**Fig. 3** Production of transgenic lily plants via *Agrobacterium* A: scales after transformation via *Agrobacterium*, B: selection and propagation of putative transgenic lily plantlets; C: growth of putative transgenic shoots with roots)

형질전환체 재분화, 순화 및 개화

PPT 3 mg/l에서 4주 간격으로 계대배양 후, 8-12주 이상 선발 과정을 거쳐 신초가 다수 형성된 형질전환 나리 인편들을 PPT가 첨가되지 않는 증식 MS 고체배지로 옮겨 발근 및 추가 생육을 유도하였다. 생육이 우수하고 발근이 우수한 개체들을 기외 상태에서 1-2주간 순화과정을 거쳐 혼합상토가 들어있는 직경 10 cm 화분으로 이식하여 증식 및 활착 하였다.

통계처리

모든 처리구는 각 60개씩 백합 인편을 사용하였으며, 아그로박테리움 조건실험은 5 반복 수행하였다. 모든 통계처리는 SPSS (window version)으로 ANOVA 검정 후 던컨다중검정 (DMRT)을 수행하였다.

결과 및 고찰

아그로박테리움 접종 농도 및 공동배양기간

나리 형질전환 기술을 적용 시 유전자 총 같은 직접적인 유전자 도입방법과 비교해서 도입유전자를 식물체놈에서 전

사가 잘 이루어지는 지역으로 도입할 수 있고, 낮은 유전자 copy 수 및 안정적인 삽입이 가능하다는 장점이 있다(Liu et al. 2014). 1990년대 이후 20여년간 알스트로메리아(Kim et al. 2007), 아가판더스(Suzuki et al. 2001), 무스카리(Suzuki and Nakano 2002), 마늘(Kondo et al. 2000), 아스파라거스(Kisaka and Kameya 1998), 양파(Eady et al. 2000) 등의 단자엽 식물에 아그로박테리움이 형질전환방법으로 사용되었다.

아그로박테리움 형질전환 실험에서 다양한 조건들의 확립이 중요한데 이들 요인들 중 본 연구에서는 아그로박테리움 접종시간 그리고 공동배양기간 조건을 확립하고자 실험을 수행하였다. 그 결과 본 연구에서는 접종시간은 30분 접종 시 ppt 저항성 인편이 24.3개정도 형성되었으며 신초까지 형성된 개체도 19.6개정도임이 관찰되었다(Table 1). 이러한 결과는 알스트로메리아 형질전환 결과(Kim et al. 2007)에서 30분 접종시간이 가장 좋은 것으로 나타난 것과는 다소 차이가 났으나, 다른 나리 형질전환 연구에서는 본 연구결과와 비슷하게 20분정도가 제일 형질전환 효율이 높은 것으로 나타났다(Chen et al. 2023; Yan et al. 2019). 접종시간의 경우 아그로박테리움을 이용한 형질전환에 있어서 박테리아 농도와 더불어 중요한 요인들인데 접종시간이 너무 짧으면 식물 조직과 아그로박테리움이 충분히 접촉하지 못하게 되고 반대로 너무 긴 접종시간은 식물조직이 박테리아 공격에 취약하게 되는 경향이 있다(Yan et al. 2019).

공동배양 기간의 경우에는 본 연구에서 5일 공동배양한 경우 ppt 저항성 인편이 100개의 접종한 인편 중 27.2개가 저항성을 나타내었으며, 신초까지 형성된 인편은 100개 중 22.7개가 형성되었다(Table 2). 이러한 결과는 알스트로메리아(Kim et al. 2007)와 그리고 Wang 등(2012)이 보고한 7일 공동배양시 가장 효율이 높은 것과 상이한 결과를 보여주었으며, 3일의 공동배양기간이 가장 효율이 좋다고 보고된 Chen 등(2023) 및 Yan 등(2019)의 보고와 다른 결과가 나타났다. 다른 작물의 경우 벼에서도 공동배양기간이 3일인 경우 효율이 좋았다고 보고된 경우도 있었으며(Toki et al. 2006), 장미는 2일(Vergne et al. 2009), 심지어 글라디올러스에서는 12일

**Table 1** Effect of infection time on the transformation efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation in scales of *Lilium longiflorum* ‘red flame’

Infection time (min)	# of PPT resistant scales /100 inoculated scales*	# of putative transgenic scales with shoots /100 inoculated scales**
5	8.1 ± 0.7c	2.8 ± 0.7c
10	11.2 ± 2.9c***	10.1 ± 2.9c
20	24.3 ± 4.2a	19.6 ± 3.7a
30	23.5 ± 5.3ab	19.1 ± 4.7ab

\*Data were collected 4 weeks after transformation.

\*\*Data were collected 8 weeks after transformation.

\*\*\*Values are means ± standard deviation (n = 5). Means followed by the same letters in each column are not significantly different (p < 0.05) using DMRT (Duncan’s Multi Range Test).

**Table 2** Effect of co-cultivation period on the transformation efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation in scales of *Lilium longiflorum* 'red flame'

Co-cultivation period (days)	# of PPT resistant scales /100 inoculated scales*	# of putative transgenic scales with shoots /100 inoculated scales**
1	6.2 ± 0.4***c	3.8 ± 0.5c
3	18.3 ± 3.9c	12.1 ± 1.5c
5	27.2 ± 4.8a	22.7 ± 3.9a
7	21.2 ± 7.2b	23.3 ± 3.6b

\*Data were collected 4 weeks after transformation.

\*\*Data were collected 8 weeks after transformation.

\*\*\*Values are means ± standard deviation (n = 5). Means followed by the same letters in each column are not significantly different (p < 0.05) using DMRT (Duncan's Multi Range Test).

간의 공동배양에서 제일 좋은 형질전환 효율을 보여주었다 (Wu et al. 2015). 이러한 다양한 공동배양 기간에서의 형질전환 효율차이는 아그로박테리움 균주의 병원성 차이, 식물품종 및 절편체 종류 그리고 접종농도 및 시간에 따른 다양한 변수 등이 작용한다고 판단된다.

#### PCR 검정에 의한 유전자도입 확인, GUS 발현 및 형질전환체 증식

본 연구에 사용된 pCAMBIA3301 벡터에 포함된 *blpR* 유전자 (Fig. 1 참고)는 PAT (phosphinothricin acetyltransferase) 단백질을 암호화하여 Bialaphos 또는 PPT (phosphinothricin) 성분을 가진 제초제에 저항성을 가진다. *blpR* 유전자는 그람 양성 토양 박테리아 *Streptomyces hygroscopicus* SF1293에서 분리된 유전자로 형질전환식물의 형질전환 여부와 재분화를 확인하기 위한 선발 표지로 널리 사용되며, 이 *blpR* 유전자는 PAT 단백질을 암호화하고 있다. PAT 단백질은 제초제 glufosinate ammonium의 제초활성성분인(bialaphos 또는 PPT)을 불활성 시켜서 제초제에 저항성을 가지기 때문에 선발마커로 사용되는 유전자이다.

8주에서 12주 정도 선발과정을 거친 형질전환 나리 소식물체로부터 유엽을 채취해서 DNA 추출 후, 선발유전자이자 목적유전자인 *blpR* 유전자가 도입되었는지 여부를 PCR 검정으로 확인한 결과, Fig. 3B에서처럼 선발과정을 거친 백합 식물체 중 무작위로 9계통을 선발하여 검정하였다. 그 결과 그 중 7계통에서 *blpR* (552 bp) 유전자 밴드가 관찰되었으며 (Fig. 2A), 이 중 3계통을 다시 선발하여 *gus* 유전자가 발현 여부를 확인한 결과, Fig. 2B처럼 GUS 유전자가 청색으로 발현되었음을 확인되었다. 이렇게 유전자 도입이 확인된 나리 식물체는 기내에서 증식하였고 활착율은 90% 이상을 보여주었다 (Fig. 3C). 이 후 순화과정을 거쳐 10 cm 포트에 옮겨 이식하였다.

상기 실험에서 PCR 검정을 통해 유전자 도입이 확인 안된 계통은 온전하게 나리 계놈으로 삽입이 부분적으로 되었거

나 선발 및 증식과정 중에 escape 발생된 것으로 추정된다. 본 연구 수행 결과, 아그로박테리움을 이용하여 형질전환 나리 14계통 145 개체가 생산되어 증식 중에 있고, 추가 증식과정을 통하여 향후 기내 및 기외 상태에서 형질전환 및 비형질전환 나리 식물체들 간의 변이발생 여부조사를 포함하는 생육 및 배수체 검정이 이루어져야 할 것으로 판단된다.

#### 적 요

35S cauliflower mosaic virus 프로모터의 조절을 받고 인트론이 포함된  $\beta$ -Glucuronidase (*gus*) gene과 35S cauliflower mosaic virus (enhanced) 프로모터의 조절을 받는 *blpR* 유전자가 있는 pCAMBIA3301 벡터가 포함된 AGL-1 균주를 사용하였다. 아그로박테리움을 이용한 형질전환 체계와 PPT (D-L-phosphinothricin) 선발을 통하여 나리 인편조직으로부터 형질전환 식물체가 획득되었다. 본 연구에서 나리 레드플레임' 품종의 인편조직에 선발 및 목적유전자로 바스타 제초제저항성 유전자인 *blpR* 유전자를 도입하였다.

상기 실험 결과, 20분의 접종시간과 5일간의 아그로박테리움과의 공동배양이 100개의 접종된 인편개체에서 각각 24, 27개의 높은 PPT 저항성 개체가 관찰되었고 신초까지 형성된 인편을 19.6 및 22.7개를 생산하는 우수한 형질전환 결과를 보여주었다. 이렇게 제초제를 이용하여 선발되었을 뿐만 아니라 도입된 reporter 유전자인 *gus*도 발현되었음을 확인하였고 선발유전자이자 목적유전자인 *blpR* 유전자도 PCR 검정을 통해 도입되었음을 확인하였다. 12주 이상의 선발과정을 거치고 *gus* 및 PCR 검정을 거친 형질전환 개체들은 발근 배지를 거쳐 순화 후 화분으로 이식하여 높은 활착율을 보여주었다. 결론적으로 본 연구에서 확립한 프로토콜을 이용하면 평균 20% 이상의 형질전환 효율을 나타내고 본 연구에 기술된 아그로박테리움 매개 형질전환 체계에 향후 보완이 필요하지만, 우수 품종개발을 위한 나리 육종 프로그램에 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

## 사 사

이 논문은 건국대학교 2020년 KU 학술연구비 지원에 의한 논문임.

## References

- Ahn YJ, Hwang YJ, Younis A, Sung MS, Ramzan F, Kwon MJ, Lim KB (2017). Investigation of karyotypic composition and evolution in *Lilium* species belonging to the section martagon. *Plant Biotech Rep* 11:407-416
- Azadi P, Chin PD, Kuroda K, Khan SR, Mii M (2010) Macro elements in inoculation and co-cultivation medium strongly affect the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation in *Lilium*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 101:201-209
- Chen Y, Hou X, Zheng Y, Lyu Y (2023) The establishment of a genetic transformation system and the acquisition of transgenic plants of oriental hybrid lily (*Lilium* L.). *Int J Mol Sci* 24:782
- Cohen A, Meredith CP (1992) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lilium*. *Acta Hort* 325:611-318
- Eady CC, Weld RJ, Lister CE (2000) *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and transgenic-plant regeneration of onion (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Rep* 19:376-381
- Hiei Y, Komari T, Ishida Y, Saito H (2000) Development of *Agrobacterium*-mediated transformation method for monocotyledonous plants. *Breed Res* 2:205-213
- Hiei Y, Komari T, Kubo T (1997) Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol* 35:205-218
- Hoshi Y, Kondo M, Mori S, Adachi Y, Nkano M, Kobayashi H (2004) Production of transgenic lily plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep* 22:359-364
- Irifune K, Morimoto Y, Uchiyama M (2003) Production of herbicide resistant transgenic lily plants by particle bombardment. *Jpn Soc Hort Sci* 72:511-516
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plant: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5:387-405
- Kamo K, Han BH (2008) Biolistic-mediated transformation of *Lilium longiflorum* cv. Nellie white. *Hortscience* 43(6): 1864-1869
- Kim JB (2017) Optimization of a protocol for the production of transgenic lily plants via particle bombardment. *J Plant Biotechnol* 44: 82-88
- Kim JB, Raemakers CJJM, Jacobsen E, Visser RGF (2007) Efficient production of transgenic *Alstroemeria* plants by using *Agrobacterium tumefaciens*. *Ann Appl Biol* 151: 401-412
- Kisaka H, Kameya T (1998) Fertile transgenic asparagus plants produced by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Biotechnol* 15:177-181
- Kole C (Ed.) (2011) Wild crop relatives: Genomic and breeding resources: Plantation and ornamental crops. Springer Science & Business Media
- Kondo T, Hasekawa H, Suzuki M (2000) Transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by *Agrobacterium* mediated gene transfer. *Plant Cell Rep* 19: 989-993
- Langeveld SA, Gerrits MM, Derks Anton FLM, Boonekamp PM, Bol JF (1995) Transformation of lily by *Agrobacterium*. *Euphytica* 85:97-100
- Liu J, Zhang J, Xu B, Jia C, Zhang J, Tan G, Jin Z (2011) Regeneration and production of transgenic *Lilium longiflorum* via *Agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 47:348-356
- Liu X, Gu J, Wang J, Lu Y (2014) Lily breeding by using molecular tools and transformation systems. *Mol Biol Rep* 41:6899-6908
- Mercuri A, De Benedetti L, Bruna S, Bregliano R, Bianchini C, Foglia G, Schiva T (2003) *Agrobacterium*-mediated transformation with *rol* genes of *Lilium longiflorum* Thunb. *Acta Hort* 612:129-136
- Ministry of Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (2021) Statistics of floriculture cultivation in 2021
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Planta* 15:473-497
- Ogaki M, Furuichi Y, Kuroda K, Chin DP, Ogawa Y, Mii M (2008) Importance of co-cultivation medium pH for successful *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lilium*. *Plant Cell Rep* 27: 699-705
- Pushyami B, Beena MR, Sinha MK, Kirti PB (2011) In vitro regeneration optimization of conditions for *Agrobacterium* mediated transformation in jute, *Corchorus capsularis*. *J Plant Biochem Biotechnol* 20:39-46
- Robinson K, Firoozabady E (1993) Transformation of floriculture crops. *Sci Hort* 55:83-99
- Suzuki S, Nakano M (2002) *Agrobacterium*-mediated production of transgenic plants *Muscari armeniacum* Leichtl. *Ex Bak. Plant Cell Rep* 20:835-841
- Suzuki S, Supaibulwatana K, Mii M, Nakano M (2001) Production of transgenic plants of *Liliaceae* ornamental plant *Agapanthus praecox*ssp. *orientalis* (Leighton) Leighton via *Agrobacterium* mediated transformation of embryogenic calli. *Plant Sci* 161:89-97
- Toki S, Hara N, Ono K, Onodera H, Tagiri A, Oka S, Tanaka H (2006) Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *Plant J* 47:969-976
- Van Tuyl JM, Arens P (2010). *Lilium*: Breeding history of the modern cultivar assortment. In II International Symposium on the Genus *Lilium* 900 pp. 223-230
- Vergne P, Maene M, Gabant G, Chauvet A, Debener T, Bendahmane M (2009) Somatic Embryogenesis and transformation of a diploid *Rosa chinensis* cv Old Blush. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 100:73-81
- Wang Y, van Kronenburg B, Menzel T, Maliepaard C, Shen X, Krens F (2012) Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of multiple lily cultivars. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 111:113-122

- Wataid AA, Yun DJ, Matsumoto T, Niu X, Wu Y, Kononowicz AK, Bressan RA, Hasegawa PM (1998) Microprojectile bombardment-mediated transformation of *Lilium longiflorum*. *Plant Cell Rep* 17:262-267
- Wu J, Liu C, Seng S, Khan MA, Sui J, Gong B, Liu C, Wu C, Zhong X, He J (2015) Somatic embryogenesis and Agrobacterium-mediated transformation of *Gladiolus hybridus* cv. 'Advance Red'. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 120:717-728
- Yan R, Wang Z, Ren Y, Li H, Liu H, Sun H (2019) Establishment of efficient genetic transformation systems and application of CRISPR/Cas9 genome editing technology in *Lilium pumilum* SC. Fisch. and *Lilium longiflorum* White Heaven. *Int J Mol Sci* 20:2920