

오이의 배발생 현탁 배양세포로부터 제초제 저항성 형질전환 식물체 생산

우제욱 · 정원중 · 최관삼¹ · 박효근² · 백남권³ · 유장렬*

생명공학연구소 식물세포공학연구실, ¹충남대학교 응용생물화학식품학부, ²서울대학교 원예학과, ³중앙종묘(주)

Production of Herbicide-resistant Transgenic Plants from Embryogenic Suspension Cultures of Cucumber

WOO, Je Wook · JEONG, Won Joong · CHOI, Kwan Sam¹ · PARK, Hyo Guen² ·
BAEK, Nam Kwon³ · LIU, Jang Ryol*

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. box 115, Yusong, Daejeon, 305-333, Korea

¹Department of Applied biology, Chungnam National University, Yusong, Daejeon, 305-764, Korea

²Department of Horticulture, Seoul National University, Suwon, 441-744, Korea

³Choogang Seed Co. Ltd, Osan Breeding Institute, 14 Bangkyo, Dongtan, Hwasung, Kyounggi, 445-811, Korea

ABSTRACT To develop herbicide-resistant cucumber plants (*Cucumis sativus* L. cv Green Angle) embryogenic suspension cultures were co-cultured with *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 carrying a disarmed binary vector pGA-*bar*. The T-DNA region of this binary vector contains the nopaline synthase/neomycin phosphotransferase II (*npt* II) chimeric gene for kanamycin resistance and the cauliflower 35S/phosphinothricin acetyltransferase (*bar*) chimeric gene for phosphinothricin (PPT) resistance. After co-cultivation for 48 h, embryogenic calli were placed on maturation media containing 20 mg/L PPT. Approximately 200 putatively transgenic plantlets were obtained in hormone free media containing 40 mg/L PPT. Northern blot hybridization analysis confirmed the expression of the *bar* gene that was integrated into the genome of five transgenic plants. Transgenic cucumber plants were grown to maturity. Mature plants in soil showed tolerance to the commercial herbicide (Basta) of PPT at the manufacturer's suggested level (3 mL/L).

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, *Cucumis sativus* L., herbicide-resistance, somatic embryogenesis, transformation

서 론

오이 (*Cucumis sativus* L.)는 전세계 106개국에서 연간 약 1960만 톤 (FAO 1995)이 생산되는 과채류로서 오이, 수박, 멜론, 호박 등과 함께 박과 (*Cucurbitaceae*)식물에 속한다 (Jeffrey 1980). 이들 박과 식물의 품질 및 생산량의 개선은

전통적인 육종을 통하여 이루어지고 있지만 중간 또는 속간의 강한 자가불화합성 (self-incompatibility)이 큰 장애가 되고 있다 (Deakin et al. 1971). 현재까지의 오이 재분화는 다양하게 보고 (Chee and Tricoli 1988; Kim et al. 1988; Chee et al. 1990a; Punja et al. 1990; Rahajo and Punja 1994; Kim et al. 1998; Jeong et al. 1999)되어 있으며, 여러 가지 형질전환 기법을 이용한 외래유전자의 도입은 최근까지 *npt* II (Chee et al. 1990b), Chitinase (Raharjo et al. 1996), SOD (Kim et al. 1998) 등에서 보고되었다. 한편 외래유전자의 식물체내로의 형질전환시 나타나는 일반적인 문제점인 낮은 형질전환 효율,

*Corresponding author. Tel 042-860-4430

E-mail jrlu@mail.kribb.re.kr

장기간의 기내배양, 외래 유전자의 여러 copy 도입에 의한 gene silence, 형질전환시 기술적 어려움 등이 있다. 현탁배양을 통하여 빠르게 분열하며 재분화능이 우수한 배발생 캘러스와 *Agrobacterium*과의 공동배양으로 위에서 언급한 여러 가지 문제점을 해결할 가능성을 보여주고 있으며, 현재까지는 벼 (Hiei et al. 1994), 포도 (Perl et al. 1996), 대두 (Trick and Finer 1997; 1998), cherry rootstock (Machado et al. 1995) 등에서 보고되어 있다.

비선택적 제초제 중 한가지인 bialaphos의 주성분인 phosphinothricin (PPT)은 glutamine synthase의 작용 부위에 강한 affinity로 선점하여 glutamine 합성을 저해함으로써, 식물체내에 암모니아 (NH_4^+)농도가 증가하여 식물체가 갈변되며 고사한다. 한편 화상병균인 *Streptomyces hygroscopicus*에서 자신이 생산한 PPT를 무독화하는 효소인 PAT (phosphinothricin acetyltransferase)의 유전자 (*bar*)가 클로닝되었다 (Thompson et al. 1987). 이후 *bar* 유전자는 형질전환시 selectable marker로서 또는 phosphinothricin을 함유한 제초제의 저항성 식물체 개발에 많이 이용되고 있다. 지금까지 *bar* 유전자 도입을 통한 제초제 저항성 작물의 보고 사례로는 담배 (De Block et al. 1987), 대두 (Casae et al. 1993), 옥수수 (Spencer et al. 1992), 보리 (Wan et al. 1994), 밀 (Weeks et al. 1993; Vasil et al. 1993), 벼 (Datta et al. 1992), 사탕무 (Hall et al. 1996) 등이 있다. 국내에서는 담배에서 처음 보고되었다 (Lee et al. 1994).

본 연구에서는 안정적으로 유지되는 오이 배발생 캘러스의 현탁배양계와 *Agrobacterium*과의 공동 배양법으로 *bar* 유전자를 도입하여 제초제 저항성 오이를 대량생산하는 효율적인 형질전환 시스템을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

체세포 배발생세포의 항생제 감수성 조사

F₁ 잡종 오이 (*Cucumis sativus* L. cv Green angle)에서 유래한 배발생 현탁배양세포 (Jeong et al. 1999; Kim et al. 1998)를 1주일 간격으로 1 mg/L 2, 4-D가 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962) 액체배지 (MS1D)에서 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

형질전환된 배발생 캘러스를 선별하기 위하여 항생제 내성 유전자가 사용되는데, 먼저 이들 항생제에 대한 오이 배발생 캘러스의 생육저해 정도를 조사하였다. 이를 위해 각각 kanamycin 0, 50, 100, 500, 1,000 mg/L, geneticin 0, 3, 10, 30, 100 mg/L, PPT 0, 2, 10, 20, 100 mg/L 농도로 항생제가 첨가된 배지 20 mL을 150 mL Erlenmeyer flask에 넣고, 오이 배발생 캘러스 5 mL (v/v)를 첨가하여 1주일간 배양 후 시험관에 옮겨 관찰하였다.

체세포 배발생세포의 형질전환

본 실험에 사용된 *bar* 유전자를 가진 binary vector (pGA-*bar*)는 충남 대학교 임용표 교수에게서 분양받아 사용하였다. YEP agar 배지에서 2일간 배양하여 콜로니를 선별하고, 동일한 액체배지에서 2일 동안 배양하여 접종원으로 사용하였다. 형질전환을 위해 3일째 배양중인 배발생 캘러스 현탁액 40 ml (v/v)에 0.1 M의 β -hydroacetosyringone 20 μ L과 *Agrobacterium* 200 μ L를 첨가하여 gyratory shaker에서 40 rpm으로 48 시간 동안 25°C에서 공동 배양하였다.

형질전환체의 재분화

*Agrobacterium*과 48시간 공동 배양한 오이 배발생 현탁배양 세포를 *Agrobacterium*을 제거하는 항생제인 cefotaxime이 800 mg/L이 첨가된 액체배지 (MS1D)로 1회 세척한 후, 점차 cefotaxime 농도를 낮추어 주면서 2~3회 세척하였다. cefotaxime 300 mg/L이 첨가된 액체배지 (MS1D)에서 3일간 현탁배양 후, 액체 선발배지 (MS + 1 mg/L 2, 4-D + 300 mg/L cefotaxime + 100 mg/L kanamycin + 20 mg/L PPT)에서 1주일 간격으로 계대배양하였다. 2주간 선발하여 고사하지 않고 왕성하게 분열하는 배발생 현탁배양 세포를 2, 4-D가 제거된 동일한 고체배지에 평판 배양하여 체세포배를 유도하였다. 현미경하에서 제초제에 저항성을 가지는 체세포배를 선별하여 성숙배지 (1/2 MS + ABA 1 mg/L + GA₃ 0.1 mg/L + cefotaxime 300 mg/L + PPT 20 mg/L + gelrite 6 g/L)에서 2주간 광조건으로 배양하고, 발아배지 (1/2 MS + cefotaxime 300 mg/L + PPT 40 mg/L + gelrite 6 g/L)에서 소식물체를 재생하였다. 멸균된 토양에서 순화하여 뿌리를 발달시킨 후 포장에 이식하였다.

Northern blot 분석

앞에서의 total RNA 분리는 guanidinium isothiocyanate (GIBCO, BRL)를 이용한 Chomaczynski과 Sacchi (1987) 방법을 약간 변형하여 추출하였고, 그 양을 spectrophotometer로 측정하였다. 20 μ g의 total RNA를 agarose gel 상에서 전기 영동하여 전개하고 Nytran membrane에 capillary transfer 방법으로 전이시켰다. 이때 *bar* 유전자의 probe는 random priming 방법 (Maniatis et al, 1989)으로 [α -³²P] dCTP로 표지하였다. Membrane에 probe를 첨가하여 60°C에서 16시간 동안 반응하였다. Membrane을 60°C에서 3회 세척한 후 -70°C에서 8시간 동안 X-ray film에 노출하였다.

온실재배 시험

bar 유전자의 도입 및 발현이 확인된 오이 순화개체를 중

양종묘 오산 연구소에서 온실시험을 하였다. 온실에서 빠르게 성장하는 형질전환 오이 식물체에 농가에서 사용되는 상업적 제초제 (Basta; 경농) 3 mL/L를 1개월 간격으로 전신에 2회 살포하였다. 약제처리 10일 이후 제초제 저항성 유무를 관찰하였다.

결 과

오이 배발생캘러스의 항생제 감수성 조사

현탁배양 중인 오이 배발생 캘러스에 kanamycin, geneticin과 phosphinothricin을 처리하여 성장저해 정도를 조사하였다. kanamycin 처리에는 형질전환 세포를 구별하기 위한 고사현상이 전체 처리구에서 나타나지 않았다. 대조구에 비해 1,000 mg/L 처리에서 약 70%의 증식저해만 나타났을 뿐 다른 처리구에서는 뚜렷한 변화가 나타나지 않았다. 다만 대조구와 달리 모든 처리구에서 배지의 점성이 감소하여 시험관에 옮긴 후 세포의 침전이 처리농도에 따라 차이를 나타냈다. 대조구의 경우 24시간 이상 방치하여도 침전되지 않았으며 50 mg/L 농도에서 대조구와 가장 유사하였고, 500과 1,000 mg/L에서는 수 분 내로 빠르게 침전되었다 (Figure. 1A). Geneticin 처리에는 모든 처리구에서 배발생 캘러스의 증식이 강력히 저해되었다. 가장 낮은 농도인 3 mg/L에서는 대조구에 비해 48%의 증식을 나타내었다. 10 mg/L 이상의 처리구에서는 증식되지 않고 흰색을 나타내며 고사되었다 (Figure. 1B).

PPT 처리에는 다른 항생제의 처리보다 낮은 농도의 처리구에서도 배발생 캘러스의 증식이 강하게 저해되었으며, 처리구 중 가장 낮은 2 mg/L에서도 배발생 캘러스가 거의 증식되지 않아서 대조구의 14.6%를 나타내었다 (Figure. 1C). 전체 처리구에서 배발생 캘러스의 갈변과 증식의 저해가 뚜렷하게 관찰되었다.

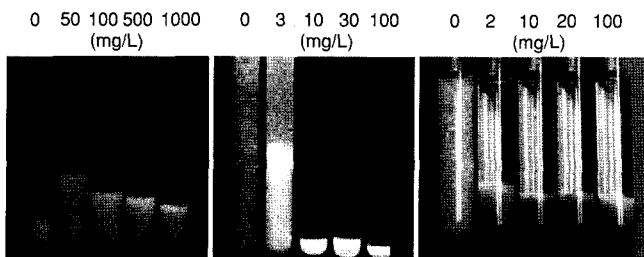


Figure 1. Sensitivity of embryogenic suspended cells of cucumber (*Cucumis sativus* L.) in different selection agents. Suspended cells were observed after culturing with selection agents for one week. A, Kanamycin; B, Geneticin; C, Phosphinothricin.

형질전환 캘러스의 선발 및 재분화

*Agrobacterium*과 2일간 공동배양 후 캘러스의 색이 초기 접종시보다 연한 노란색으로 바뀌고 선발배지에서 배양 1일 이후부터 캘러스가 연한 갈색으로 갈변되었다. 배양 7일째에는 대조구에 비해서 증식속도는 낮았으나 일부 노란색의 캘러스가 독립적으로 또는 갈변된 캘러스와 혼합된 상태로 발생하였다. 따라서 선발 배지에서 배양 7일째부터 형질전환 유무를 잠정적으로 확인할 수 있었다. 액체 배지 내에서 선발된 배발생 캘러스를 2, 4-D가 첨가되지 않은 고체배지에 평판배양 후, 4주부터 캘러스의 표면에서 체세포배가 발생하였다 (Figure. 2A, B). 제초제 저항성을 나타내는 체세포배는 1 mg/L ABA와 0.1 mg/L GA₃가 첨가된 성숙배지에서 안정적으로 성숙하여 광 조건 하에서 녹색의 소식물체로 발달하였다 (Figure. 2C). 형질전환하지 않은 대조구의 배발생 캘러스는 20 mg/L PPT가 첨가된 배지에서 아무런 증식이 나타나지 않고 갈변하였다 (사진 미제시). 소식물체는 PPT를 40 mg/L로 높은 배지에서도 뿌리와 줄기가 정상적으로 발달하였다 (Figure. 2D).

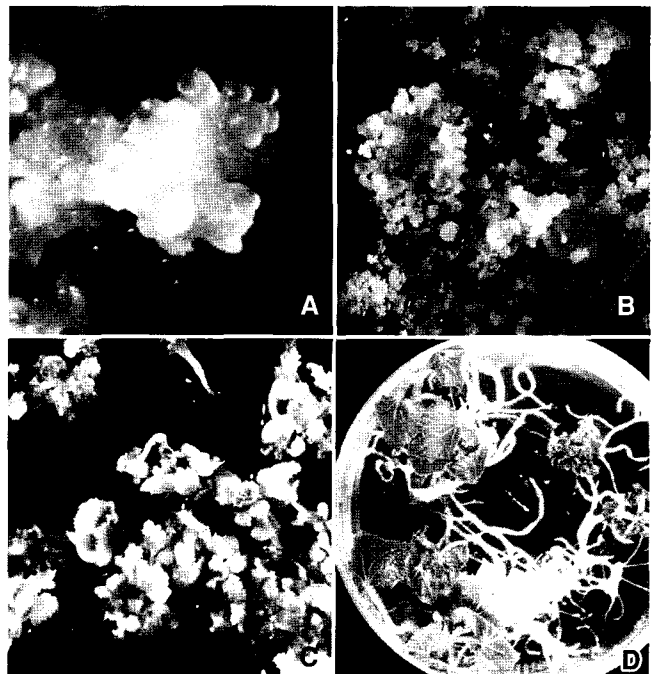


Figure 2. Development of PPT resistant cucumber plantlets using embryogenic cells transformed with *Agrobacterium* harboring *bar* gene. A, Appearance of somatic embryos on selection medium with 20 mg/L PPT; B, Discoloration of PPT resistance green cell and somatic embryos in light condition on selection medium with 20 mg/L PPT; C, Plantlet regenerated from somatic embryos on selection medium with 20 mg/L PPT; D, Green plantlets with rooting on MS basal medium containing 40 mg/L PPT.

bar 유전자 확인 및 발현

순화과정 이후 포장에서 3개월 이상 성장한 잎 절편 재료에서 DNA를 분리하고 PCR 분석을 실시한 결과, pGA-bar 벡터를 주형으로 증폭한 것과 동일한 위치에 *bar* 와 *npt II* 유전자의 band가 확인되었다. PCR 증폭산물이 *bar* 유전자임을 Southern blot 분석을 통하여 재확인하였다(사진 미제시).

이 후 형질전환 식물체에서 *bar* 유전자의 발현을 조사하기 위하여 *bar* probe를 이용하여 northern blot 분석을 실시한 결과, 대조구를 제외한 5개의 형질전환 오이 개체 전체에서 예상되는 약 0.5 Kb 위치에 *bar*-mRNA 밴드가 표지되어 있음을 확인하였다(Figure. 3).

단백질의 활성을 확인하기 위하여 인공 배양실에서 자라는 대조구와 형질전환 오이에 bialaphos 또는 PPT가 함유된 상업적으로 판매되는 제초제(Basta; 경농)를 3 mL/L 농도로 처리한 결과, 대조구는 처리 3일 이후부터 갈변되면서 고사하는 현상이 나타났으나 *bar* 유전자가 도입된 형질전환 오이는 제초제 2회 살포에서도 저항성을 보이며 왕성하게 성장하였다(Figure. 4). 이후 온실로 옮긴 형질전환 오이는 열매를 맺으면서 정상적으로 성장하였다.

고 찰

현재까지 식물체에 외래 유전자 도입을 위한 형질전환 기술이 개발되어 왔으나 그 중 대부분은 NPT II 유전자로 형질전환체를 선발하였다. 기존에 보고된 오이 형질전환 연구에서도 동일한 선발유전자를 이용하였고 선발물질로서는 kanamycin만을 사용하였다. 본 연구에서 사용된 오이 배발생 캘러스는 kanamycin에 의한 증식저해는 크게 나타나지 않았다. 이는 현탁배양 중인 벼 캘러스에 다양한 항생물질을 처리하여 생육저해정도를 조사한 Dekeyser 등 (1989)의 결과와 매우 유사하며, 벼를 포함하는 화본과 식물체는 이미 kanamycin에 높은 저항성을 나타내고 있다는 점이 보고된 바 있다(Hauptmann et al. 1988). 또한 오이의 형질전환체를 생산하기 위하여 Rahrjo 등 (1996)은 kanamycin이 함유된 배지에서 장기간의 배양에 의해서 선발하였으나 선발된 배발생

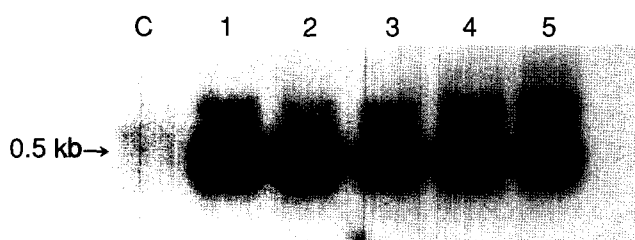


Figure 3. Northern blot analysis of transgenic cucumber plants. Total RNA was hybridized with *bar* DNA fragment labelled with 32 P-dCTP. C; non-transformed plant; Lane 1-5, transgenic plantlets.

캘러스가 재분화능이 감소하는 것을 보고하였다.

이와 같이 오이의 형질전환에서는 kanamycin 사용에 의해 배발생을 및 재분화율의 감소를 야기하는 것보다는 단기간에 선발이 가능한 5~10 mg/L의 PPT이 사용이 적절할 것으로 보여진다. 한편 10~20 mg/L의 geneticin의 사용도 가능할 것이다.

형질전환체 선발에 PPT를 이용하는 방법은 PPT가 낮은 농도에서도 형질전환되지 않은 세포 및 식물체를 체내 암모니아(NH $_4^+$) 축적에 의해서 고사시키기 때문에 효과적인 selection agent로 알려져 있다(Shan et al. 1986; Akama et al. 1995). 따라서 식물형질전환시 세포의 종류, 세포의 성장 단계, 처리시기 그리고 처리 농도와 처리 물질의 선택을 고려하여야 할 것이다.

현재까지 배발생 캘러스를 형질전환 재료로 사용한 실험은 대부분 직접적인 DNA 도입 (particle bombardment, electroporation, PEG-transformation 등) 방법을 사용하였다. 반면에 배발생 캘러스에 *Agrobacterium*의 T-DNA 전이과정을 이용한 형질전환 기술은 최근까지 벼(Hiei et al. 1994), 포도(Perl et al. 1996), 대두(Trick and Finer 1997; 1998) 등이 보고되어 있다.

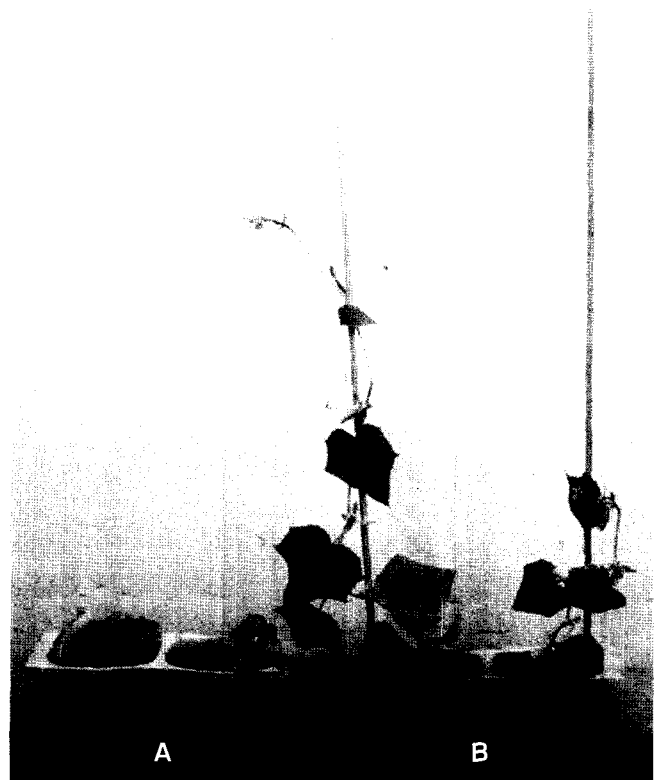


Figure 4. Herbicide resistance in transgenic cucumber plants. Non-transformed (A) and transgenic plants (B) were sprayed with Basta at a concentration of 3 mL/L. Control plants were killed within 10 days, while transgenic plants were grown normally.

본 연구 방법을 통해 생산된 형질전환 오이에서 *bar* 유전자가 전사 수준에서 발현되고 있음을 RNA 분석을 통하여 확인하였으며, 또한 포장에서 제초제의 저항성을 나타냄으로써 단백질 수준에서도 정상적으로 작용함을 확인하였다. 한편 오이의 형질전환을 위하여 현탁배양계를 이용하고 한 flask 내에서 *Agrobacterium*의 접종 및 선발과정을 동시에 수행한 방법은 보고되어 있지 않다. 이와 같이 분열능과 재분화능이 강한 배발생 캘러스의 현탁배양계에 직접 *Agrobacterium* 접종을 통한 형질전환 방법은, 기존의 배발생 캘러스를 이용한 particle bombardment 방식의 형질전환 및 배발생 캘러스의 원형질체를 이용한 형질전환 방법에서 나타나는, 낮은 형질전환 효율, 외래 유전자의 여러 copy 도입에 의한 gene silence, 형질전환시 기술적 어려움 등의 문제점을 보완할 것으로 보여진다.

한편 본 제초제 저항성 오이는 교배를 통한 육종에서 F₁ 잡종종자 확인에 지표 유전자로 이용이 가능하므로 순도향상에 사용될 수 있을 것이다.

적 요

제초제 저항성 오이 (*Cucumis sativus* L. cv Green angel)를 생산하기 위하여 배발생 현탁배양세포와 binary vector pGA-*bar*을 지닌 *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404)를 공동배양하였다. 형질전환 벡터의 T-DNA 부분에는 kanamycin에 저항성을 나타내는 neomycin phosphotransferase (*npt II*) 유전자와 phosphinothricin (PPT)에 저항성을 나타내는 phosphinothricin acetyltransferase (*bar*) 유전자를 지니고 있다. 48 시간의 공동배양 후 배발생 캘러스는 20 mg/L PPT가 함유된 성숙배지에서 배양하였다. 약 200개체의 형질전환 유식물체를 40 mg/L PPT가 첨가된 호르몬이 없는 배지에서 생산하였다. 5개의 오이 형질전환 식물체의 염색체에 *bar* 유전자가 도입되어 발현되는 것을 northern blot 분석을 통하여 확인하였다. 형질전환 오이 식물체가 토양에서 성숙되었다. 성숙한 오이 식물체는 PPT가 함유된 상업적 제초제 (Basta)를 일반적인 사용 농도 (3 ml/L) 처리시에도 저항성을 나타내며 성장하였다.

사사 - 이 논문은 농림부과제 (AG970W)의 연구 결과이다. pGA-*bar* 벡터를 제공해 준 임용표 교수에게 감사한다.

인용문헌

- Akama K, puchta H, Hohn B (1995) Efficient *Agrobacterium* - mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the *bar* gene as selectable marker. *Plant Cell Rep* **14**:450-454
- Casas AM (1993) Transgenic sorghum plants via microprojectile bombardment. *PNAS* **90**:11212-11216
- Chee PP, Tricoli DM (1988) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension cultures of *Cucumis sativus* L. *Plant Cell Rep* **7**:274-277
- Chee PP (1990a) High frequency of somatic embryogenesis and recovery of fertile cucumber plants. *HortSci* **25**:792-793
- Chee PP (1990b) Transformation of *Cucumis sativus* tissue by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transformed plant. *Plant Cell Rep* **7**:245-248
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**:156-159
- Datta SK, Datta K, Potrykus I (1992) Herbicide-resistance indica rice plants from IRRI breeding line IR72 after PEG-mediated transformation of protoplast. *Plant Mol Biol* **20**:619-629
- Deakin JR, Bohn Gw, Whitaker TW (1971) Interspecific hybridization in *Cucumis*. *Econ. Bot* **25**:196-211
- De Block MD, Bitterman J, Thompson C, Van Montagu M, Leemans J (1987) Engineering herbicide resistance in plant by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO* **6**:2513-2518
- Dekeyser R, Claes B, Marichal M, Van Montagu M, Caplan A (1989) Evaluation of selectable markers rice transformation. *Plant physiol* **90**:217-223
- Hall RD, Krens FA (1996) A high efficiency technique for the generation of transgenic sugar beets from stomatal guard cells. *Nature Biotech* **14**:1133-1138
- Hauptmann RM, Vasil V, Ozias-Akins P, Vasil IK (1988) Evaluation of selectable markers for obtaining stable transformants in the Graminae. *Plant Physiol* **86**:602-606
- 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 Journ* **6**:271-282
- Jeffrey C (1980) A review of the *Cucurbitaceae*. *Bot. J. Linn. Soc.* **81**:233-247
- Jeong WJ, Woo JW, Park HG, Choi KS, Liu JR (1999) High frequency plant regeneration in embryogenic cell suspension cultures of cucumber. *Kor J Plant Tiss Cult* **26**:289-291
- Kim JW, Oh SY, Lee HS, Jo MH, Lee EM, Woo IS, Kwak SS (1998) Expression of pea superoxide dismutase gene in transgenic cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plants. Kor J Plant Tiss Cult* **25**:501-505
- Kim JW, Oh SY, Lee HS, Kwak SS (1998) Plant regeneration through organogenesis and somatic embryogenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Kor J Plant Tiss Cult* **25**:501-505
- Kim SG, Chang JR, Cha HC, Lee KW (1988) Callus growth and plant regeneration in diverse cultivars of cucumber (*Cucumis*

- sativus* L.). Plant Cell Tiss Org cult **12**:67-74
- Kim SW, In DS, Joeng WJ, Woo JW, Jung M, Liu JR** (1998) Plant regeneration from cryopreserved embryogenic cell suspension cultures of cucumber. Kor J Plant Tiss Cult **25**:501-505
- Lee HY, Nou IS, Kim JH, Liu JR, Kim HJ, Kameya T** (1994) Development of bialaphos resistance transgenic tobacco plant by pollination and utilization of fertilization cycle. Kor J Plant Tiss Cult **21**:99-103
- Lim YP, Kim HR, Park JY, Cho YH** (1995) Transformation and genetic analysis of herbicide resistance tobacco and tomato by transformation of modified *bar* gene using directed mutagenesis method. RDA J Agri Sci **37**:45-53
- Machado AC, Puschmann M, Machado MLC** (1995) Somatic embryogenesis of *Prunus subhirtella autumnosa* and regeneration of transgenic plant after *Agrobacterium* -mediated transformation. Plant Cell Rep **14**:335-340
- Maniatis** (1989) Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant **15**:473-497
- Perl A, Lotan O, Holland D** (1996) Establishment of an *Agrobacterium* -mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.). The role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions. Nature Biotech **14**:624-628
- Punja ZK, Tang FA, Sarmiento GG** (1990) Isolation, culture and plantlet regeneration from cotyledon and mesophyll protoplast of two pickling cucumber (*Cucumis sativus* L.) genotypes. Plant Cell Rep **9**:61-64
- Raharjo SHT, Punja ZK** (1994) Regeneration of plantlets from embryogenic suspension cultures of pickling cucumber (*Cucumis sativus* L. cv Endeavor). In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant **30**:16-20
- Raharjo SHT, Hernandez MO, Zhang YY, Punja ZK** (1996) Transformation of pickling cucumber with chitinase encoding gene using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep **15**:591-596
- Shan DM, Horsch RB, Klee HJ, Kishore GM, Winter JA, Turner NE, Hironaka CM, Sanders PR, Gasser SC, Aylkint S, Seigel NR, Rogers SG, Fraley RT** (1986) Science **233**:479-481
- Spencer TM, Gordon-Kamma WJ, Daines RJ, Start WG, and Lemaux PG** (1990) Bialaphos selection of stable transformation from maize cell culture. Theor Appl Genet **79**:625-634
- Thompson CJ, Movva NR, Tizard R, Crameri R, Davies JE, Lauwereys M, Botterman J** (1987) Characterization of the herbicide resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. EMBO **6**:2519-2523
- Trick HN and Finer JJ** (1998) Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max* L. Merrill) embryogenic suspension culture tissue. Plant Cell Rep **17**:482-488
- Vasil V, Srivastava V, Castillo AM, Fromm ME, Vasil IK** (1993) Rapid production of transgenic wheat plant by direct bombardment of cultured immature embryos. Bio/Tech **11**:1553-1558
- Wan Y, Lemaux PG** (1994) Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. Plant Physiol **104**:37-48
- Weeks JT, Anderson OD, Blechl AE** (1993) Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). Plant Physiol **102**:1077-1084

(접수일자 2000년 2월 5일)

