

## 잎 절편의 재분화에 의한 참박 형질전환

조송미, 문선진<sup>1</sup>, 정수진<sup>1</sup>, 김광상<sup>1\*</sup>, 김미성, 김영철, 양광열,  
최용수<sup>2</sup>, Kumar Sapkota<sup>3</sup>, 조백호  
전남대학교 농업생명과학대학, <sup>1</sup>식물보호기술(주), <sup>2</sup>전남과학대학, <sup>3</sup>조선대학교

### Transformation of Gourd through Leaf Explant Regeneration

Song-Mi Cho, Sun-Jin Moon<sup>1</sup>, Soo-Jin Chung<sup>1</sup>, Kwang-Sang Kim<sup>1\*</sup>, Mi-Seong Kim,  
Young-Cheol Kim, Kwang-Yeol Yang, Yong-Soo Choi<sup>2</sup>, Kumar Sapkota<sup>3</sup> and Baik-Ho Cho  
Chonnam National University, Gwangju 500-757, <sup>1</sup>Phytocare Ltd., <sup>2</sup>Chunnam Techno College Jeonnam,  
<sup>3</sup>Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

**Abstract** - In order to develop a disease-resistant root stock for the growth of watermelon, an efficient regeneration system of the gourd (*Lagenaria leucantha* Duch.) inbred line GO701-2 via organogenesis was established in this experiment. Using proximal parts of cotyledon explant excised from germinated seedling *in vitro*, maximum adventitious shoot formation (39%) was achieved on MS medium where cytokinin (BA) and auxin (IAA) were added at a concentration of 3mg/L and 0.1mg/L, respectively. Roots of the elongated shoots were successfully formed on MS medium without adding any plant growth regulators. The cucumber *CsGolSI* gene known as a resistance gene against biotic and abiotic stresses, was constructed into the binary vector pBI121 under the control of CaMV 35S promoter. When the gene was introduced into the genome of gourd by *Agrobacterium*-mediated transformation, putative transgenic plants were obtained with the transformation efficiency of approximately 20 percent.

**Key words** - Root-stock, Transformation, Watermelon, Regeneration

## 서 언

박과(Cucurbitaceae) 작물인 박(*Lagenaria leucantha* Duch.)의 기원은 인도와 아프리카지역이지만 현재는 열대, 온대지방을 포함하여 전 세계적으로 고루 분포되어 있다. 우리나라에서 참박은 주로 수박이나 스쿼시의 겨울철 그린하우스 재배 시 대목으로 널리 이용되고 있는데 그 이유는 참박이 특히 저온신장성이 좋으며 민할병(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*) 등과 같은 토양병원균에 대해 강한 내병성을 나타내기 때문이다. 뿐만 아니라, 최근에는 점박이 응애 불이에 대한 저항성원으로서의 박 대목 활용도 연구되고 있다. 그러나 근년에 주로 대목용 박의 종자에서 전파된 것으로 밝혀진 *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV)에 의한 피수박의 발생과 대목용 참박을 기주로 하는 검은점뿌리썩음병 (*Monosporascus cannonballus* Poll and Uecker.)에 기인한 수박의 급성 위조증상으로 인하여 대목용 참박에 의해 수박을 안전하게 재배할 수 있다는 믿음이 줄어들어 추세이다(농업기술연구소 시험연구보고서 2000; 박 등, 1994). 이에 대한 한 가지 해결방안으로 기내배양을 통한 병 저항성 형질전환 대목용 참박의 분자육종을 생각할 수 있다.

형질전환기술의 발달은 작물의 형질을 개량하기 위해 필수적이며,

성공적인 형질전환을 위해서는 해당 식물체의 기내 재분화 조건의 확립이 필수적이다. 여러 가지 박과작물, 즉 겨울 스쿼시(*Cucurbita maxima*; Lee *et al.*, 2003), 오이(*Cucumis sativus*; Curuk *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 1988; Mohiuddin *et al.*, 1997), 멜론 (*Cucumis melo*; Dirks and van Buggenum 1989; Ezura *et al.*, 1992), 수박 (*Citullus vulgaris*; Compton 1999; Dong and Jia 1991), 그리고 조롱박(*Lagenaria siceraria* Standl.)에서 기내 배양을 통한 재분화에 관한 연구가 진행되었다(Han *et al.*, 2004). 이러한 연구를 바탕으로 유용 박과작물에 target 유전자를 전달할 수 있는 형질전환 연구도 진행되어, 멜론의 genome에 바이러스 coat protein 유전자를 도입한 형질전환체가 식물바이러스에 보호효과가 있다고 보고(Gonsalves *et al.*, 1994) 되었고, 벼 chitinase 유전자가 도입된 오이 형질전환체가 잿빛 곰팡이병균에 내성이 유발된다고 보고(Tabei *et al.*, 1998) 되었다. 그러나 종이나 유전자형에 따라 재분화 조건이 달라질 수 있으며 더욱이 박(*Lagenaria leucantha* Duch.)의 재분화 및 형질전환에 대해서는 그 정보가 매우 미미한 실정이다. 따라서 본 연구의 목적은 복합스트레스 내성 유전자로 알려진 오이 *CsGolSI* 유전자(Kim *et al.*, 2006 in press)를 참박에 도입함으로써 1차적으로 참박의 조직배양 및 형질전환 체계를 확립하고 궁극적으로는 병저항성 수박대목용 참박의 분

\*교신저자(E-mail) : skwang@hanmail.net

자육종을 목표로 하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 배양조건

본 실험의 재료인 참박 inbred line GO701-2은 뉴서울종묘(주)에서 분양받아 사용하였다. 종자는 종피를 제거하고 70% EtOH에 1분간 침지 후 2% NaOCl에 5분간 멸균하여 표면 살균하였다. 이를 멸균 증류수로 5회 세척한 후 10분간 멸균한 필터페이퍼(110mm Dia, Whatman, USA) 위에서 수분을 제거하였다. 수분이 제거된 종자를 MS(Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에 3% sucrose와 0.5g 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid(MES), 그리고 3g/L의 phytigel(Sigma, USA)을 첨가하여 26°C 배양기 내 암조건 하에서 발아를 유도하였다. 발아 후 7일 된 유묘의 자엽은 1×0.5cm 정도로 2등분 횡절단하였고, 배축은 0.5cm간격으로 절단하여 절편체로 재분화에 사용하였다. 절편은 식물생장조절제의 처리에 따라 petri-dish(SPL, South Korea)당 15개씩 각각 치상하였고 26±2°C, 16시간 광주기, 2000 Lux광도의 배양실에서 배양하였다.

### 생장조절제 처리

기본 배지는 MS기본배지에 30g/L sucrose, 3g/L phytigel을 첨가하였으며 pH는 5.8로 조정하였다. 생장조절제는 조직배양에서 많이 사용되는 옥신과 사이토키닌을 사용하였다. 옥신으로는 IAA를 사용하였으며 사이토키닌으로는 BA(6-benzylaminopurine), zeatin을 사용하였다. 신허 분화에 미치는 생장조절제의 종류 및 농도를 규명하기 위하여 옥신과 사이토키닌의 조합은 1.0, 2.0, 3.0mg/L BA, zeatin과 0.1, 0.2, 0.3mg/L IAA를 각각 사용하였다. 배양 4주 후에 분화된 shoot의 수를 조사하였으며 분화된 식물체는 생장조절제로 1mg/L BA를 단용한 배지에 계대 배양하여 신허를 신장시켰으며 배양병(SPL, Korea)에서 증식하였다. 신허가 3cm이상 증식된 개체를 생장조절제를 첨가하지 않은 MS 배지에 배양하면서 뿌리생성을 유도하였다. 뿌리가 형성된 개체는 멸균된 인공배양토(perlite: 부토, 3:1 v/v)에 이식하여 토양 순화하였다.

### 운반체 재조합 및 *Agrobacterium*에 도입

식물세포 형질전환용 binary vector는 항생제 CaMV 35S promoter와 항생제 kanamycin을 selection marker로 쓸 수 있는 NPTII 유전자를 포함하고 있는 pBI121을 사용하였다. 참박 형질전환에 사용할 *Agrobacterium*은 disarmed Ti-vector를 가지고 있는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 균주를 사용하였다. 복합 스트레스 내성 유전자로 오이 galactinol synthase 유전자(*CsGolS1*)를 binary vector에 재조합하여 *Agrobacterium*에 도입한 후 참박 형질전환에 이용하였다.

### 재조합 운반체의 참박에 도입 및 확인

참박의 형질전환을 유도하기 위해서 *CsGolS1* 유전자를 포함한 pBI121 vector가 도입된 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 균주를 25 µg/ml rifampicin과 50 µg/ml kanamycin이 첨가된 YEP(10g of yeast extract and 20g of Bacto peptone) 액체 배지에서 2일간 배양한 후, 7일된 참박 유묘의 자엽절편과 공동배양하였다. 식물 생장조절체가 첨가되지 않은 MS배지에서 2일간 공동배양된 참박의 자엽 절편을 250 µg/ml cefotaxime과 다양한 농도의 생장조절제를 첨가한 배지에 옮겨 배양하였다. 오이 galactinol synthase 유전자가 형질전환된 참박은 50 µg/ml kanamycin 배지에서 생장이 가능하였고 이러한 형질전환체의 genomic DNA를 분리하여 PCR 및 southern blot analysis에 의해 유전자 도입여부를 확인하였다. PCR analysis를 위해서 binary vector내의 CaMV 35S promoter 부위의 left primer(5'-AGAAAGAATGCTAACCCACAG-3')와 오이 GolS 유전자의 특정부위에서 right primer(5'-GGGGTACCGGAA TATTTATTTGTC-3')를 제작하여 사용하였다. PCR 수행 조건은 Taq polymerase가 첨가된 PCR premix(Bioneer, Korea)를 이용하여 최초 95°C에서 5분간 pre-denaturation 후 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 2분 30초간 30회 반응시킨 후 최종적으로 72°C에서 5분간 post-extension시켜 PCR를 종료하였다. PCR product를 Southern blot analysis를 위하여 0.7% agarose gel에서 전기영동하였다. Sambrook과 Russell(2000)의 방법에 따라 nylon membrane에 이동시켜 blot을 만든 후 DNA probe를 <sup>32</sup>P로 표지하여 20시간 혼성화하였다. 혼성화 반응이 끝난 후 membrane을 2×SSC/0.1% SDS 용액으로 상온에서 10분간 두번 세척하고 0.1×SSC/0.1% SDS 용액으로 60°C에서 10분간 2번 세척한 다음 X-ray 필름에 노출 후 현상하였다.

## 결 과

### 참박의 재분화 조건 확립

참박의 재분화를 위하여 발아 후 7일과 10일 된 유묘의 자엽과 배축 절편을 이용하였다. 자엽 부위 중 식물 중심부에서 가까운 전반 부위(proximal)와 후반 부위(distal)를 나누어 사용하였다(Table 1). 재분화율을 조사한 결과, 10일째 된 유묘보다 7일째 된 유묘에서 재분화율이 높았다. 그리고 자엽부위 중에서 전반부가 재분화율이 가장 높게 나타났으며(30%) 그 다음이 자엽의 후반부위로 나타났다(13.1%). 배축부위는 가장 낮은 재분화율을 보였다(5.5%). 이와 같이 자엽의 전반부위에서 재분화율이 높게 나타나는 것은 오이, 스쿼시, 조롱박에 보고된 결과와 일치하였다(Mohiuddin *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2004). 참박 자엽 전반부 절편으로부터 재분화시 생장조절제의 효과를 알아보기 위하여 사이토키닌으로 BA(1.0, 2.0, 3.0mg/L)와 zeatin(1.0, 2.0, 3.0mg/L) 그리고 옥신으로 IAA(0.0, 0.1, 0.2, 0.3mg/L)를 단독 또는 혼용처리하여 암조건에서 배양하였

Table 1. Comparison in the efficiency of adventitious shoot regeneration among different plant parts excised from cotyledon of the gourd inbred line GO701-2<sup>1</sup>

Seedling age (days)	Explant part	Shoot regeneration frequency (%) <sup>2</sup>
7	Proximal (cotyledon)	30.0±3.0
7	Distal (cotyledon)	13.1±1.0
7	Hypocotyl	5.5±0.2
10	Proximal (cotyledon)	7.1±1.0
10	Distal (cotyledon)	4.5±0.5
10	Hypocotyl	0.0±0.0

<sup>1</sup>Each explant was cultured on MS medium supplemented with 3mg/L BA and 0.1mg/L IAA, and the regeneration frequency was evaluated 4 weeks after cultivation.

<sup>2</sup>Values are means of five replicates ± standard error. Each replicate includes ten explants per a petri dish.

다(Table 2, Fig. 1). 신초 형성율은 3.0mg/L BA와 0.1mg/L IAA를 혼합한 처리구에서 39% 로 가장 높았으며 그 다음으로 2.0mg/L BA 와 0.1mg/L IAA를 혼합한 처리구가 33%이었다. Zeatin 이나 BA 모두 0.25mg/L이하 조건과 4.0mg/L 이상의 조건에서는 거의 신초가 형성되지 않았다. 이를 종합하여 보면, 참박은 다른 작물에 비해 재분화율이 높지 않으며 사이토키닌으로는 경제적인 면이나 효율면에서 BA가 더 효과적이었고 사이토키닌 단독처리구보다는 옥신으로 IAA를 혼합한 처리구에서 더 높은 재분화율을 얻을 수 있었다(Table 2). 이렇게 재분화가 일어나 형성된 신초를 1.0mg/L BA가 단독으로 처리된 MS 배지에서 계대배양하면 shoot의 생장이 일어남을 관찰할 수 있었다(Fig. 1B). 신초가 3cm 이상 형성되면 그 부위를 절단하여 기본 MS 배지에 생장조절제가 전혀 첨가되지 않은 배지에서 계대배양 하였을

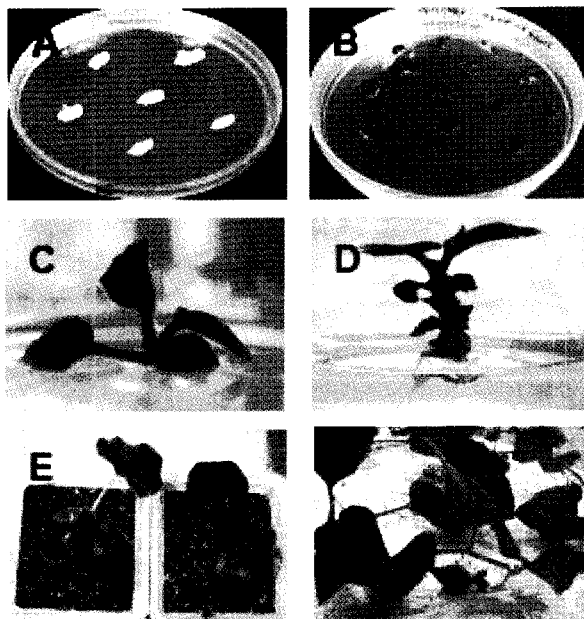


Fig. 1. Shoot regeneration from cotyledon explant of the gourd inbred line GO701-2. A, Seed germination. B, Adventitious shoot regeneration from proximal part of cotyledon cultured on MS medium supplemented with 3mg/L BA and 0.1mg/L IAA. C, Elongated shoot cultured on MS medium supplemented with 1mg/L BA. D, Rooted plantlet on MS medium without plant growth regulator. E, Acclimatized plants grown in plastic magenta box. F, Fruit setting on a regenerated plant grown in greenhouse.

때 뿌리 형성이 가장 잘 됨을 확인하였다(Fig. 1C). 계대배양 후 얻은 재분화된 식물체를 멸균된 인공 배양토에 이식하여 습실처리를 해주

Table 2. Effect of plant growth regulators on adventitious shoot regeneration of the guard inbred line GO701-2. Proximal cotyledon explants of 7-day-old seedlings were cultured on MS medium, and the efficiency was evaluated 4 weeks after cultivation

Treatment (mg/L)		Shoot formation (%)	Treatment (mg/L)		Shoot formation (%)
Zeatin	IAA		BA	IAA	
1.0	0.0	24.0±3.9	1.0	0.0	20.0±0.5
	0.1	13.0±0.2		0.1	2.3±0.2
	0.2	1.0±0.5		0.2	7.4±1.8
	0.3	19.0±5.0		0.3	19.0±7.0
2.0	0.0	17.0±0.2	2.0	0.0	14.0±3.1
	0.1	2.0±0.5		0.1	16.0±4.6
	0.2	30.0±5.0		0.2	10.0±0.1
	0.3	33.0±7.0		0.3	28.0±4.0
3.0	0.0	3.0±1.0	3.0	0.0	18.0±5.1
	0.1	28.0±1.5		0.1	39.0±3.0
	0.2	15.0±2.3		0.2	24.0±5.6
	0.3	21.0±0.2		0.3	14.0±0.2

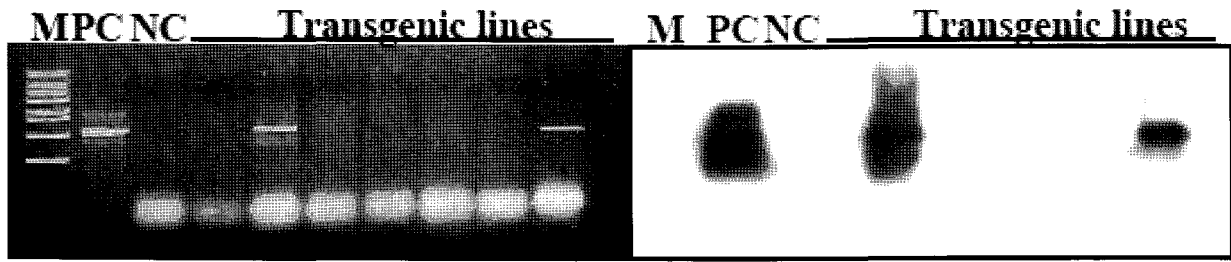


Fig. 2. Genomic DNA PCR and Southern blot analysis in transformants. The introduced *CsGolSI* gene of transgenic gourd plants was amplified by genomic DNA PCR using the gene specific primer set (figure in the left), and the target gene is confirmed by Southern blot analysis using a <sup>32</sup>P-labeled cDNA probe (figure in the right). M, size marker (1 kb ladder, NEB). PC, positive control (pBI121 plasmid). NC, negative control (non-transgenic plant). Putative transgenic plants by *Agrobacterium*-mediated transformation were selected in MS medium containing 50mg/L kanamycin.

면서 배양실 조건에서 생장시키며 관찰하였던 결과 90% 이상의 생존율을 나타냈다(Fig. 1D). 1차적으로 pot에 옮겨 온실에서 배양하여 꽃이 핀 것을 확인하고 인공적으로 수분시켜 T1 종자를 확보하였다.

### 오이 *CsGolSI* 유전자의 참박 도입 및 확인

재료 및 방법에 기술한 바와 같이 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404/*CsGolSI* 균주를 참박유묘와 공동배양하여 형질전환을 유도하였다. 재조합된 binary vector가 도입된 형질전환체에서 제대로 발현되는지 여부를 조사하였던 결과, *CsGolSI* 유전자가 도입된 참박은 50 µg/ml kanamycin이 첨가된 배지에서 생장이 가능하였으며, PCR analysis에 의해 유식물체 10개체 당 2개체에서 band가 형성되어 약 20%의 형질전환 효율을 나타내었다. 또한 PCR 산물의 southern blot 분석방법에 의해서 정확한 사이즈(1 kb)의 band를 확인함으로써 *CsGolSI* 유전자가 참박의 genome에 삽입되었음을 재차 확인할 수 있었다(Fig. 2).

## 고 찰

박과작물은 재분화시 절편체의 사용부위에 따라 혹은 유묘의 생장 시기에 따라 재분화율에 많은 영향을 미치며 특히 자엽의 전반부위가 신초형성에 가장 효과적이라고 알려져 있다(Rhonda and Willam 1990). 본 연구에서도 수박이나 스쿼시 대목용으로 쓰이는 참박의 inbred line G0701-2를 가지고 실험해 본 결과, 7일째 된 유묘 자엽의 전반부위가 후반부위보다 재분화율이 더 높음을 확인하였고 이는 같은 박과 작물인 조롱박이나 수박, 스쿼시에서도 유묘자엽의 전반부위가 재분화에 가장 효과적이라는 보고와 일치하였다(Srivastava *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2004). 뿐만 아니라, 박과작물의 종이나 유전자형에 따라 신초 형성 시 첨가되는 식물 성장조절물질의 종류와 농도가 캘러스 및 신초분화에 효과가 다르게 나타난다고 알려져 있다. 오이의 경우 5 µM BA와 0.5 µM NAA가 수박에서는 5.0mg/L BA와 0.5mg/L IAA를 첨가된 배지에서 가장

신초형성율의 빈도가 높다고 알려져 있다(Kim *et al.*, 1988; Dong *et al.*, 1991). 그러나 조롱박이나 멜론의 경우 성장조절제로 사이토키닌인 BA를 단독처리하는 경우에 가장 높은 신초분화율을 나타낸다고 하였다(Dirks and van Buggenum 1989; Han *et al.*, 2004). 본 실험에서도 성장조절제로서 BA나 zeatin 농도에 따라 재분화율이 달라졌으며 참박의 경우 cytokinin을 단독 사용하는 것보다 옥신으로 IAA를 혼용처리하는 것이 신초 형성에 더 효과적임을 관찰하였다.

참박 inbred line G0701-2에 오이 galactinol synthase 유전자를 형질전환 하였던 결과, 형성된 대부분의 신초가 kanamycin 선발과정에서 갈변되어 고사하였다. 그러나 kanamycin에 의해 고사되지 않은 형질전환체로부터 genomic DNA를 추출하여 PCR analysis하였을 때 약 20%의 개체에서 예상했던 크기(1 kb)의 PCR 밴드가 확인되었다. 이러한 형질전환체를 기본 MS 배지에 성장조절제가 전혀 첨가되지 않은 배지에서 계대배양 하여 뿌리가 형성되었으며 이 재분화된 식물체를 멸균된 인공 배양토에 이식하여 순화함으로써 T1 종자를 확보할 수 있었다. 그러나 본 실험의 궁극적인 목적인 내병성 형질전환 대목을 개발하기 위해서는 몇 가지 문제점을 보완할 필요가 있다. 첫째, 본 실험에서 가장 효과적인 재분화 효율이 39%로 낮기 때문에 이를 높일 수 있는 방안을 개발해야 할 것이다. Han *et al.* (2004)은 신초 분화의 효율을 높이기 위해 에틸렌 작용 억제제인 silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>)를 사용하였다. 에틸렌은 오이와 같은 작물에서는 세포나 조직배양 시 낮은 재분화율의 원인이 되며 유전형에 따라 차이가 있지만 특히 배축이나 자엽의 재분화율이 낮은 원인으로 알려져 있다(Mohiuddin *et al.*, 1997). 그러나 본 연구에서는 0.5-1mg/L의 silver nitrate를 사용하여 보았으나 참박 G0701-2 line의 경우 재분화 효율이 30-33%에 그쳐 효과가 없었다(결과 미제시). 차 후 Aminoethoxyvinylglycine (AVG)와 같은 에틸렌 합성 억제제의 사용이나 또 다른 방안의 모색이 필요할 것이다. 둘째, 박과작물의 경우 kanamycin의 선발효율이 떨어지기 때문에 선발 마커의 다양화를 모색해 볼 필요가 있다. 셋째, 유전

형에 따른 차이가 크므로 다양한 품종에 대한 재분화 및 형질전환 효율의 재고가 필요하다.

앞선 연구에 따르면 오이 galactinol synthase 1 (*CsGolSI*) 유전자는 rhizobacteria가 colonized된 오이 뿌리에서 곰팡이성 leaf spot인 *Corynespora cassiicola*를 감염시켰을 때 초기에 유도 발현되는 유전자들 중 하나로 보고되었다(Kim *et al.*, 2006, in press). 식물의 galactinol synthase (*GolS*) 유전자는 다양한 식물 중에서 raffinose나 stachyose와 같은 Raffinose family oligosacchrides (RFOs)의 생합성에 관여하는 효소이다. 식물에서 이러한 RFO는 일반적으로 종자에 풍부하게 함유되어 있으나 최근 여러 보고에서 desiccation이나 dehydrate와 같은 스트레스 tolerance에 관여한다고 알려지고 있다(Blackman *et al.*, 1992; Brenac *et al.*, 1997). 특히 애기장대에서 밝혀진 *GolS* 유전자는 drought와 high salinity에 유도 발현된다고 알려져 있으며 이 유전자가 과다 발현할 수 있는 형질전환 식물체에서 galactinol과 raffinose의 level이 증가되어 drought tolerance를 보인다고 하였다(Taji *et al.*, 2002). 본 실험에서 참박의 형질전환에 이용한 오이 galactinol synthase 1 (*CsGolSI*) 유전자의 내병성기능은 이를 과다 발현하는 담배 형질전환 식물체가 잭빛 곰팡이병원균인 *Botrytis cinerea*와 무름병원균인 *Erwinia carotovora*에 대해 강한 저항성을 나타내었기 때문에 밝혀졌다(Kim *et al.*, 2006, in press). 이 저항성 반응은 jasmonic acid (JA) reporter 유전자인 *VSP* 유전자나 *pdf1.2* 유전자의 발현증가와 *jar1-1* 돌연변이 식물체를 통하여 JA dependent한 신호전달체계의 induced systemic resistance (ISR) 기작을 야기하였다(Kim *et al.*, 2006, in press). 따라서 오이 *CsGolSI* 유전자가 가뭄 및 고염과 같은 비생물적 스트레스 이외에도 곰팡이나 세균성병원균과 같은 생물적인 스트레스 내성에도 관련되어져 있어 복합적인 환경스트레스 내성 참박 대목개발에 이용가치가 높을 것으로 사료된다.

## 적 요

수박의 대목으로 사용되고 있는 참박의 재분화 조건을 확립함으로써 병저항성 형질전환 식물체를 얻어 보고자 본 실험을 실시하였다. 참박의 자엽을 잘라 재분화에 미치는 식물생장조절물질의 효과를 조사하였고 오이 galactinol synthase (*CsGolSI*) 유전자를 참박에 형질전환하였던 결과는 다음과 같다. 참박 신초의 재분화는 7일째 된 유묘의 자엽부위 중 전반부위에서 가장 높은 효율을 나타내었고, cytokinin으로 BA나 zeatin을 단용처리하는 것보다 옥신으로 IAA를 혼용처리하는 것이 신초 분화에 더 효과적이었다. 복합스트레스 내성 유전자인 오이 *CsGolSI* 유전자를 pBI121 binary vector에 재조합하여 아그로박테리움을 이용, 참박에 형질전환하였던 결과, 형질전환체는 kanamycin이 첨가된 배지에서 성장하였고 PCR 및 Southern blot 분석에 의해 유식물체의 20% 정도가 형질전환체임을 확인할 수 있었다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 Biogreen 21 사업단 연구 지원금에 의해서 수행되었으며 이에 대해 심심한 감사를 표하는 바이다.

## 인용문헌

- Blackman, S.A., R.L. Obendorf and A.C. Leopold. 1992. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. *Plant Physiol.* 100: 225-230.
- Brenac, P., M. Horbowicz, S.M. Downer, A.M. Dickerman, M.E. Smith and R.L. Obendorf. 1997. Raffinose accumulation related to desiccation tolerance during maize (*Zea mays* L.) seed development and maturation. *J. Plant Physiol.* 150: 481-488.
- Compton, M.E. 1999. Dark pretreatment improves adventitious shoot organogenesis from cotyledons of diploid watermelon. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 58: 185-188.
- Curuk, S., G. Ananthakrishnan, S. Singer, X. Xia, C. Elman, D. Nestel, S. Cetiner and V. Gaba. 2003. Regeneration *in vitro* from the hypocotyls of *Cucumis* species produces almost exclusively diploid shoots, and does not require light. *HortSci.* 38: 105-109.
- Dirks, R. and M. van Buggenum. 1989. *in vitro* plant regeneration from leaf and cotyledon explants of *Cucumis melo* L. *Plant Cell Rep.* 7: 626-627.
- Dong, J.Z and S.R. Jia. 1991. High efficiency plant regeneration from cotyledons of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.) *Plant Cell Rep.* 9: 559-562.
- Ezura, H., H. Amagai, K. Yoshioka and K. Oosawa. 1992. Highly frequent appearance of tetraploidy in regenerated plants, a universal phenomenon, in tissue culture of melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Sci.* 85: 209-213.
- Gambley, R.L. and W.A. Dodd. 1990. An *in vitro* technique for the production de novo of multiple shoots in cotyledon explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 20: 177-183.
- Gonsalves, C., B. Xue, M. Yepes, M. Fuchs, K. Ling and S. Namba. 1994. Transferring cucumber mosaic virus-white leaf strain coat protein gene into *Cucumis melo* L. and evaluating transgenic plants for protection against infection. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 119: 345-355.
- Kim, M.S., J.S. Chung, Y.J. Im, S.M. Cho, H. Hwangbo, Y.C. Kim, C.M. Ryu, K.Y. Yang, K.Y. Kim, G.C. Chung, M.Y. Eun and B.H.

- Cho. 2006. Galactinol as a novel priming component on plant innate immunity elicited by *Pseudomonas chlororaphis* O6 . Plant Cell 18: in press.
- Kim, S.G., J.R, Chang, H.C. Cha and K.W. Lee. 1988. Callus growth and plant regeneration in diverse cultivars of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant Cell Tissue Organ Cult. 12: 67-74.
- Lee, Y.K., W.I. Chung and H. Ezura. 2003. Efficient plant regeneration via organogenesis in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.). Plant Sci. 164: 413-418.
- Mohiuddin, A.K.M, M.K.U. Chowdhury, C. Abdullah-Zaliha and S. Napis. 1997. Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber *in vitro* shoot regeneration. Plant Cell Tissue Organ Cult. 51: 75-78.
- 박경석, 남상현, 김충희. 1994. 수박대목용 참박에 발생한 *Mono-sporascus cannonballus*에 의한 검은점뿌리썩음병(黑点根腐病). 한국식물병리학회지. 10(3): 175-180.
- 박잔우, 천정욱, 최홍수. 2000. 종자전염바이러스 발생생태 및 방제에 관한 연구. 수원 농업기술연구소 작물바이러스 관리기술 연구보고서.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2000. Molecular cloning: A laboratory manual Ed 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Srivastava, D.R., V.M. Andrianov and E.S. Piruzian. 1989. Tissue culture and plant regeneration (*Citrullus vulgaris* Schrad, cv, Melitopolski). Plant Cell Rep. 8: 300-302.
- Taji, T., C. Ohsumi, S. Inchi, M. Seki, M. Kasuga, M. Kobayashi, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki. 2002. Important roles of drought- and cold inducible genes for galactinol synthesis in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 29: 417-426.
- Tabei, Y., S. Kitade, Y. Nishizawa, N. Kikuchi, T. Kayano, T. Hibi and K. Akutsu. 1998. Transgenic cucumber plants harboring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*), Plant Cell Rep. 17: 159-164.

(접수일 2006.9.18 ; 수락일 2006.10.13)