

## 오이에서 체세포배 발생을 통한 *GUS*유전자의 발현 및 식물체 재생

김현아<sup>1</sup>, 이부연<sup>1</sup>, 전진중<sup>1</sup>, 최동욱<sup>2</sup>, 최필선<sup>1\*</sup>, 세이토 우토모<sup>3</sup>, 이재혁<sup>1</sup>, 강동호<sup>1</sup>, 이영진<sup>1</sup>  
남부대학교 한방제약개발학과<sup>1</sup>, 전남대학교 생물교육학과<sup>2</sup>, 람퐁대학교 농과대학 작물학과<sup>3</sup>

### *GUS* Gene expression and plant regeneration *via* somatic embryogenesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.)

Hyun A Kim<sup>1</sup>, Boo Youn Lee<sup>1</sup>, Jin Jung Jeon<sup>1</sup>, Dong Woog Choi<sup>2</sup>, Pil Son Choi<sup>1\*</sup>, Setyo Dwi Utomo<sup>4</sup>,  
Jae Hyeok Lee<sup>1</sup>, Tong Ho Kang<sup>1</sup>, and Young Jin Lee<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medicinal Plant Resources, Nambu University, Gwangju 506-824 Korea

<sup>2</sup>Department of Biological Education, Jeonnam National University, Gwangju, Korea

<sup>3</sup>Department of Crop Science, College of Agriculture, University of Lampung, Bandar Lampung 35145, Indonesia

**ABSTRACT** One of the limitation for *Agrobacterium*-mediated transformation *via* organogenesis from cotyledon explants routinely in cucumber is the production of chimeric plants. To overcome the limitation, *Agrobacterium*-mediated transformation system *via* somatic embryogenesis from hypocotyl explants of cucumber (c.v., Eunsung) on the selection medium with paromomycin as antibiotics was developed. The hypocotyl explants were inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA101 carrying binary vector pPTN290; then were subsequently cultured on the following media: co-cultivation medium for 2 days, selection medium for 5 x 14 days, and regeneration medium. The T-DNA of the vector (pPTN290) carried two cassettes, *Ubi* promoter-*gus* gene as reporter and 35S promoter-*nptII* gene conferring resistance to paromomycin as selectable agent. The confirmation of stable transformation and the efficiency of transformation was based on the resistance to paromomycin indicated by the growth of putative transgenic calli on selection medium amended with 100 mg/L paromomycin, and *GUS* gene expression. Forty eight clones (5.2%) with *GUS* gene expressed of 56 callus clones with resistance to paromomycin were independently obtained from 928 explants inoculated. Of 48 clones, transgenic plants were only regenerated from 5 clones (0.5%) at low frequency. The histochemical *GUS* assay in the transgenic seeds (T<sub>1</sub>) also revealed that the *gus* gene was successfully integrated and segregated into each genome of transgenic cucumber.

#### 서 론

저온이나 수분손실과 같은 비생물학적 스트레스는 식물의 성장뿐만 아니라 생산성에 영향을 미치는 가장 주요한 요인이 될 수 있다. 오이의 경우 원산지가 인도지역인 열대

성 작물로 특성 및 반 특성 재배를 위한 묘목 생산을 위해서는 저온 기에 파종해야 하며, 파종 시 온도 조절장치를 이용한 보온이 필수적으로 요구된다. 따라서 오이의 고품질 및 최대생산량을 얻기 위해서는 적정온도 조절이 필요하며, 특히 저온이나 고온은 생산량 저하와 오이의 품질을 저하시키기 때문에 난방 시설이 필수적임에도 불구하고 적정 온도 조절을 위해 경제적 비용 부담을 감수하고 있는 실정이다. 따라서 최근 분자 유전학 및 유전자 조작기술의 발달과 함

\*Corresponding author Tel 062-970-0161 Fax 062-970-0165

E-mail: cps6546@hanmail.net

게 새로운 형질을 가지는 식물체의 개발이 경쟁적으로 진행되고 있고, 특히 저온이나 고온과 같은 비 생물학적 스트레스 내성을 갖는 오이 신품종 개발을 위해서 국내외적으로 연구가 진행되고 있다 (Horvath et al. 2007).

오이에서 초기 형질전환은 *Agrobacterium rhizogenes*을 이용하여 확립된 후 (Trulson et al. 1986), *A. tumefaciens* 공동배양법으로 배축, 엽병, 잎 및 자엽 등에서 기관발생을 통한 유전자 도입이 이루어져 왔고 (Chee 1990; Dong et al. 1991; Saramento et al. 1992; Nishibayashi et al. 1996), 특히 최근에는 상업화를 목적으로 오이, 멜론, 수박 등에서 바이러스 저항성 형질전환체가 개발되었다 (Gaba et al. 2004). 그러나 아직도 박과 작물의 형질전환과정에서 가장 큰 문제점은 다세포기원에 의해 유도되는 기관발생과정에서 도입유전자의 “escape” 현상 (Cardzoa and Stewart 2004), 형질전환시스템의 재현성 부족 및 높은 4배체 형질전환체 발생빈도 (Gaba et al. 2004), 선발마커로서 *nptII* 유전자의 한계성 (Cho et al. 2005a; Gaba et al. 2004) 등이 지적되고 있으며, 이러한 문제점을 극복하기 위해 오이에서 선발마커로서 *bar* 유전자의 이용 가능성 및 *Agrobacterium* 균주 간 감염성 비교 연구 (Cho et al. 2005a) 그리고 동일한 박과작물에서 수박 (Kwon et al. 2007), 가지과 작물인 고추 (Lee et al. 2004) 및 화본과 작물인 벼 (Hiei et al. 1994) 등의 식물절편으로부터 직접 기관발생을 거치지 않고 캘러스 형성과정을 거친 후 형질전환체를 생산하는 안정적인 형질전환 시스템이 구축되어 왔다. 그러나 오이의 경우 오래 전에 체세포배 발생을 통한 식물체 재생이 이루어졌지만 (Chee 1990) 배발생 캘러스의 선발과 체세포배로부터 식물체로의 재생과정의 어려움 때문에 단세포기원인 체세포배발생을 통해 형질전환체를 생산한 보고는 거의 찾아볼 수 없다.

따라서 본 연구에서는 궁극적으로 비 생물학적 스트레스 내성 오이 신품종을 개발할 목적으로 먼저 오이의 안정적인 재현성 있는 형질전환방법을 확립하기 위하여 국내 20개의 품종으로부터 체세포배발생이 가능한 “은성” 품종의 배축 절편을 이용하여 형질전환체를 생산하였기에 보고하고자 한다.

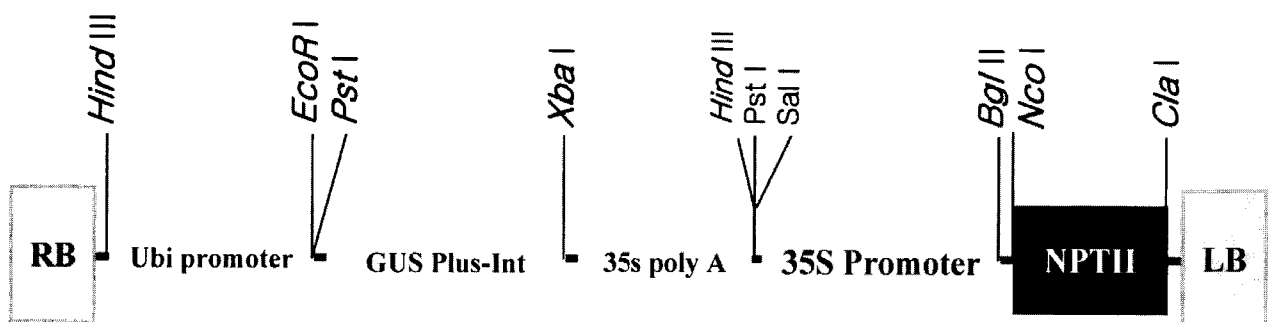
## 재료 및 방법

### 식물 재료

국내 20개 오이 품종 중 체세포배발생능을 갖는 “은성” 종자를 70% 알코올에 1분간, 2% sodium hypochlorite 용액에 15분간 표면 살균 하였다. 2% sucrose와 0.8% agar가 첨가된 MS 기본배지 (Murashige and Skoog 1962)에 페트리디쉬 당 10개의 종자를 치상하고 25°C 암상태에서 10일 동안 발아시켰다. 배양 10일 후 발아된 오이 유식물체로부터 배축절편 (0.7 cm)을 절단 한 *Agrobacterium*과 공동배양하기 위한 재료로 사용하였다.

### *Agrobacterium tumefaciens* strains

*Ubiquitin* 프로모터,  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) 유전자, 선발표지로서 *nptII* 유전자 (pPTN290, Figure 1)를 freeze-thaw 방법으로 EHA101에 형질전환하여 균주로 사용하였다 (Jefferson et al. 1987). 50 mg/L streptomycin과 50 mg/L spectinomycin이 첨가된 YEP액체배지 50 mL에 각각의 colony를 접종하여 28°C로 8시간 이상 배양한 후 대수기 증식기 ( $OD_{650} = 0.6 - 1.0$ )의 균을 사용하였다.



**Figure 1.** Plant transformation vector (pPTN290) showing restriction sites. T-DNA region of pPTN290 vectors (RB-Right border, *GUS* plus-Int- *GUS* gene interrupted with eukaryotic intron, 35s poly A-35s polyAAA tail, *npt II* - neomycin phosphotransferase II gene).

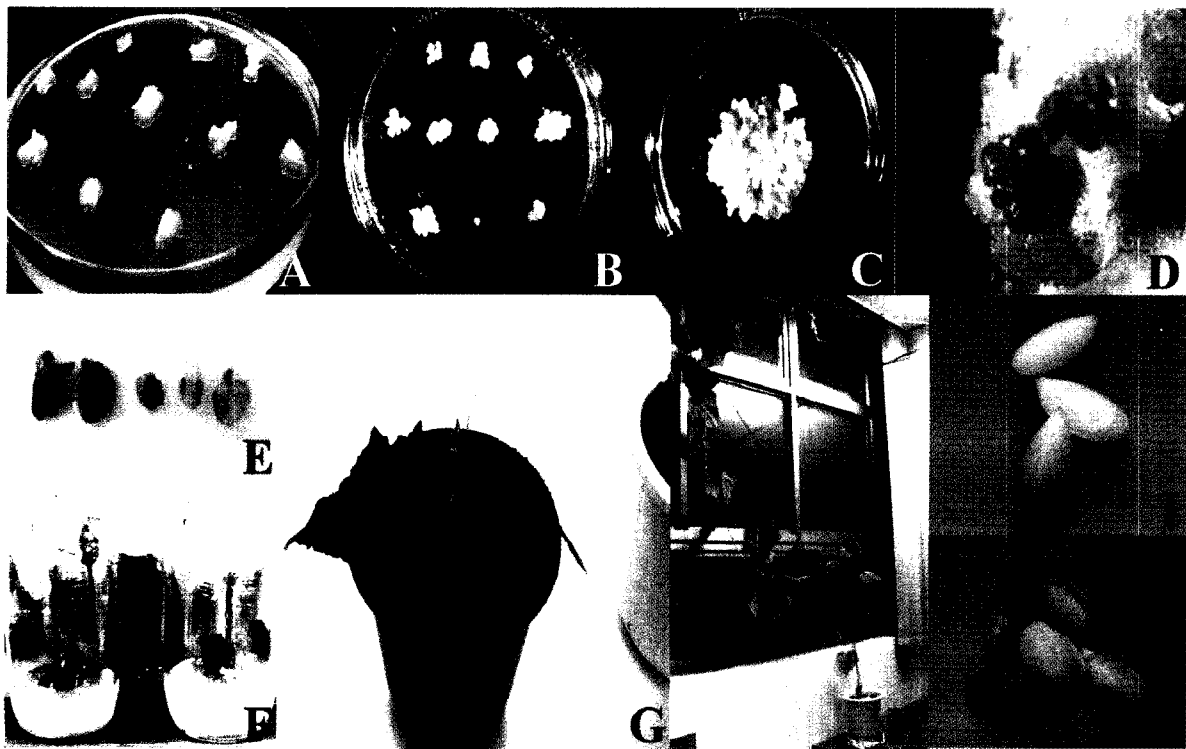
형질전환체 생산

오이 형질전환체를 얻기 위하여 약 928개 배축 절편을 pPTN290벡터로 형질전환시킨 25 mL의 *Agrobacterium* 용액 (EHA101)에 30분 동안 침지한 후 공동배양용 배지 (co-cultivation medium : CM,  $\frac{1}{10}$  MS salt, 20 mM MES, 100 mg/L cysteine, 1 mg/L 2,4-D, 39 mg/L acetosyringone, 3% sucrose, pH 5.4)에 15개씩 치상하여 3일 동안 공동 배양하였다. 공동 배양한 배축절편을 3 - 5회 수세한 후 캘러스 유도배지 (Callus Induction Medium: CIM, MS salt, MS vitamin, 3% sucrose, 1 mg/L 2,4-D, 100 mg/L paromomycin, 50 mg/L ticarcillin, 50 mg/L cefotaxime, 3 mM MES, pH 5.6)에 옮겨 6 - 8주 동안 2주 간격으로 계대배양 하였다. 유도된 캘러스 중 배발생 캘러스를 현미경 하에서 선발하여  $\frac{1}{2}$  MS 기본배지 ( $\frac{1}{2}$  MS salt, 0.5 mg/L GA<sub>3</sub>, 50 mg/L paromomycin, 50 mg/L ticarcillin, 50 mg/L cefotaxime, 3 mM MES, pH 5.6)에 옮겨 유식물체를 얻었다. 모든 배지는 8 g/L Phyto-agar를 첨가하기 전 pH를 조정하여 121°C, 1.2기압에서 15분간 고압 멸균 하였으며, 90 × 15 mm

플라스틱 페트리디쉬에 25 mL씩 분주하여 사용하였다. 배양은 24°C로 조절되는 배양실에서 종자발아와 배발생 캘러스 유도는 암 조건으로 그리고 배발생 캘러스로부터 식물체 유도는 광도 46  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 16시간 광주기에서 배양 하였다. 선발배지에서 얻은 유식물체는 토양으로 옮겨 온실에서 순화 하였다.

$\beta$ -Glucuronidase (GUS) 발현

*Agrobacterium*과 배축절편을 공동배양 한 후 선발배지에 서 6 - 8주 동안 배양 후 얻은 캘러스와 GUS발현 형질전환체 (T<sub>0</sub>)로부터 수확한 T<sub>1</sub>종자를 37°C에서 5-bromo-4-chloro-3-indole-glucuronidase 용액에 침지 시켰다 (Jefferson et al. 1987). 24시간 후 70% 알코올 용액으로 탈색 시킨 후 GUS 양성반응을 나타낸 캘러스의 빈도를 조사하였으며, T<sub>1</sub>종자에서 GUS 유전자의 발현을 확인하였다. 대조구로서는 *Agrobacterium*과 공동배양하지 않은 종자를 사용하였다.



**Figure 2.** Plant regeneration from hypocotyl explant of cucumber transformed with gus and nptII gene. A: Callus formation at edge of hypocotyls explants cocultivated. B: Selection of callus on selection medium with 100 mg/L paromomycin, C: Proliferation of paromomycin-resistance callus on selection medium, D: Somatic embryo formation on the surface of calli, E: Somatic embryo with GUS positive response, F: Plantlet in bottle, G, H: Transgenic plants grown in soil, I: Control seeds, J: T<sub>1</sub> seeds with GUS positive response

## 결과 및 고찰

국내에서 재배되는 20개의 오이품종 종자를 무균 발아시켜 얻은 유식물체의 배축 절편을 1.0 mg/L 2,4-D를 첨가한 MS배지에서 배양한 결과, 배 발생능 캘러스를 형성하는 오이 (은성) 1품종을 선정 하였다 (결과 미제시). 체세포배 발생능을 갖는 은성 배축 절편을 *Agrobacterium*과 공동배양 한 후 paromomycin이 첨가된 선발배지에서 배양한 결과, 배양 2주 후 배축 절편 가장자리가 점차 팽창되어 상처부위로부터 노란색의 캘러스가 형성 되기 시작하였다. 배양 4주 후 배축 가장자리에서 형성된 노란색의 단단한 캘러스 (Figure 2A)를 절편으로부터 분리하여 2주 간격으로 6 - 8동안 배양 하면서 빠르게 성장하는 캘러스 클론을 얻었다 (Figure 2 B). 해부현미경하에서 이러한 캘러스로부터 배발생캘러스를 선발하여 증식시켰으며 (Figure 2C),  $\frac{1}{2}$  MS 기본배지에 옮겨 체세포배를 유도한 후 식물체를 얻었다 (Figure 2D - H). 식물은 품종과 계통에 따라 배 발생 캘러스의 형태 및 식물체 재분화 능이 다를 수 있기 때문에 (Komatsuda 1992; Choi et al. 2002) 실험 목적에 맞는 품종 또는 계통을 선발하여 실험에 이용하는 것이 중요하다 할 수 있다. 특히 오이의 경우는 대부분의 품종에서는 체세포배 형성보다는 기관발생을 통한 식물체 재분화가 쉽게 이루어지기 때문에 (Selvaraj et al. 2007) 체세포배 발생을 통한 형질전환체 생산을 목적으로 할 경우 품종 스크리닝은 필수적이라 할 수 있다. 본 연구에서도 국내에서 유통되는 20여 가지의 품종 중 “은성” 품종의 배축절편으로부터 체세포배 발생이 가능하였으며, 대부분의 품종에서는 기관발생이 잘 이루어졌다 (Cho et al. 2005a).

배양초기 paromomycin이 첨가된 선발배지에서 배축 절편으로부터 캘러스 형성이 대부분 이루어졌으나 선발배지에서 2주 간격으로 계대배양하는 동안 생장이 빠른 캘러스와 느린 캘러스로 구분되었다. 생장이 느린 캘러스의 경우 선발배지에서 점차 백화 현상을 보이면서 생장이 멈췄으며, 빠른 생장을 보인 캘러스의 경우 백화현상은 나타나지 않았으며, 노란색의 단단한 형태로서 배발생 캘러스와 유사하였다 (Figure 2C). 형질전환과정에서 첨가되는 선발제의 종류에 따라 식물세포의 반응은 다양하게 나타난다. 예를 들면 glufosinate는 형질전환이 일어나지 않은 세포의 경우에는 암모니아 축적으로 세포내 인산화과정을 저해시킴으로써 갈변현상을 보이면서 점차 세포를 괴사 시키지만 (Muller et al. 2001;

Cho et al. 2005a), paromomycin은 neomycin phosphotransferase II (*nptII*) 효소 작용에 의해 불활성화됨으로서 형질전환이 일어나지 않은 세포는 백화현상을, 형질전환 세포는 항생제 저항성을 갖게 하여 정상적인 형태로 빠르게 성장할 수 있기 때문에 (Roa-Rodriguez and Nottenburg 1999) 옥수수과 같은 단자엽 식물에서 배발생캘러스 유도를 통한 형질전환체 생산이나 (Cho et al. 2005b) 배추와 무와 같은 십자화과 식물의 배축 절편으로부터 캘러스 형성을 통한 형질전환체를 얻는데 효과적으로 이용되어 왔다 (Cho et al. 2006, 2008). 이와 유사하게 오이와 동일 박과작물인 수박의 형질전환에서도 paromomycin의 선발효과가 확인되었다 (Kwon et al. 2007). 본 연구에서도 paromomycin은 노란색의 단단한 형태를 갖는 빠른 성장을 보이는 캘러스와 성장속도가 느리고 백화현상을 보이는 캘러스로 구분되어 배축절편으로부터 형질전환 캘러스를 선발하는데 효과적임을 알 수 있었다.

*Agrobacterium*과 공동배양 한 928개의 배축절편으로부터 배양 6 - 8주 후 선발된 56개의 캘러스를 대상으로 GUS유전자의 발현빈도를 조사한 결과 실험군간 발현빈도 (2.1% - 9.1%)는 차이가 있었으나 48개의 캘러스에서 GUS유전자가 발현되어 5.2%의 높은 빈도를 나타냈다 (Table 1). 이러한 캘러스로부터 체세포배발생을 통한 식물체 재생은 실험군에서 2개 (0.7%), 실험III 군에서 1개 (0.6%), 실험VI 군에서 2개 (2.1%)를 각각 얻어 총 48개중 오직 5개의 캘러스 클론에서만 식물체가 유도되어 매우 낮은 빈도 (0.5%)를 나타냈다 (Table 1). 체세포배로부터 재생된 5개의 유식물체중에서 오직 1개체에서만 인공수정을 통해 T<sub>1</sub>종자를 수확할 수 있었으며, GUS유전자가 대조군 (Figure 2I)에 비해 안정적으로 발현되고 있음을 확인하였다 (Figure 2J). 초기 오이의 형질전환 연구가 대부분 잎, 배축 및 자엽절편으로부터 기관발생을 통해 이루어진 이후 (Chee 1990; Dong et al. 1991; Saramento et al. 1992; Nishibayashi et al. 1996), 최근까지도 체세포배발생 (Woo et al. 2001)보다는 기관발생을 통한 식물체 재생 및 형질전환 연구가 진행되고 있다 (Lee et al. 2004; Cho et al. 2005a; Vasudevan et al. 2007; Selvaraj et al. 2007). 예외적으로 Woo (2001)등은 배발생캘러스의 현탁배양을 통해 형질전환체 생산을 위한 연구를 시도 하였지만 완전한 형질전환체를 생산하지 못하여 오이의 식물체 재생은 체세포배보다는 기관발생이 훨씬 쉬운 것으로 보고되어 있다. 본 연구에서도 배양절편으로부터 항생제 저항성 캘러스 선발과 도입 유전자 발현까지는 기관발생시 나타나는 chimeric현상이나

**Table 1** Formation of paromomycin-resistance calli and transgenic cucumber from the cultures of hypocotyls explants on selection medium amended with 100 mg/L paromomycin after *Agrobacterium* strain (EHA101) carrying pPTN290 vector cocultivated

Experiments	Hypocotyl explants co-cultured	No. of paromomycin resistance calli (%)	No. of transgenic cucumber by GUS expression assay (%)	
			No. of callus clones with GUS positive response	No. of plantlets regenerated from embryogenic callus clone with GUS gene expression
I	270	18	15 (5.6)	2 (0.7)
II	92	6	6 (6.5)	0 (0.0)
III	163	8	6 (3.7)	1 (0.6)
IV	92	2	2 (2.2)	0 (0.0)
V	64	4	4 (6.3)	0 (0.0)
VI	96	11	8 (8.3)	2 (2.1)
VII	55	5	5 (9.1)	0 (0.0)
VIII	96	2	2 (2.1)	0 (0.0)
Total	928	56	48 (5.2)	5 (0.5)

높은 비 형질전환체 생산빈도 (Gaba et al. 2004)에 비하여 매우 효과적이었다. 그러나 GUS유전자발현이 확인된 항생제 저항성 캘러스로부터 배발생캘러스 선발, 체세포배유도 및 식물체 재생과정은 쉽지 않은 것으로 나타나 향후 오이 형질전환체를 안정적으로 생산하기 위해서는 항생제 저항성 캘러스로부터 식물체 재생에 대한 최적의 배양조건을 확립하는 것이 필수적이라 사료된다. 현재 보다 안정적이고 반복적인 형질전환시스템을 구축하기 위하여 항생제 저항성 캘러스로부터 식물체재분화 빈도를 증가시킬 수 있는 연구를 진행하고 있다.

## 적 요

*Agrobacterium* 공동배양법으로 오이의 기관발생을 통한 형질전환에서 가장 문제점 중 하나는 chimeric 형질전환체의 발생빈도이다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 항생제로서 paromomycin이 첨가된 선발배지에서 “은성” 품종의 배축절편으로부터 체세포배발생을 통한 형질전환시스템을 개발하였다. 배축절편을 pPTN290발현벡터가 도입된 *Agrobacterium* 균주 (EHA101)에 30분간 접촉한 후 2일간 공동배양 하였고, 선발배지에서 2주 간격으로 5회 계대 배양하면서 항생제 저항성 캘러스 선발, 체세포배발생 및 식물체를 유도하였다. pPTN290발현벡터의 T-DNA는 reporter유전자로서 *Ubi* 프로모터에 의해 *gus*유전자가 발현조절 되도록 그리고 항생제로서 paromomycin에 저항성을 갖는 *nptII*유전자가 35S 프로모터에 의해 발현되도록 제조하였다. 안정적 형질전환과 빈도

는 캘러스의 paromomycin항생제 저항성과 GUS유전자의 발현 여부에 의해 조사하였다. *Agrobacterium*과 공동배양한 928개의 배축절편에서 paromomycin에 저항성을 갖는 56개의 캘러스 클론을 얻었고, 이중 48개 캘러스 클론 (5.2%)에서 GUS유전자가 안정적으로 발현되고 있음을 확인하였다. 48개의 캘러스 클론중에서 오직 5개의 캘러스 클론으로부터 식물체를 얻어 낮은 빈도 (0.5%)를 나타냈다. 수확한 T<sub>1</sub>종자에서 GUS양성반응은 *gus*유전자가 오이 계놈에 안정적으로 도입 및 발현되고 있음을 확인 하였다.

## 사 사

본 연구는 농림부 농림기술관리센터 (ARPC)의 지원을 받아 수행 하였으며, 네브라스카대학 Tom Clemente박사로부터 pPTN290벡터를 공급받아 수행하였다.

## 인용문헌

- Cardoza V, Stewart CN Jr (2004) *Brassica* biotechnology: progress in cellular and molecular biology. *In Vitro Cell Dev-Plant* 40: 542-551
- Chee PP (1990) Transformation of *Cucumis sativus* tissue by *Agrobacterium tumefaciens* and the regeneration of transformed plants. *Plant Cell Rep* 9: 245-248
- Cho MA, Park YO, Kim JS, Park KJ, Min HK, Liu JR, Clemente T, Choi PS (2005b) Development of transgenic maize (*Zea mays* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Kor J Plant Biotechnol* 32:

- 91-95
- Cho MA, Song YM, Park YO, Ko SM, Min SR, Liu JR, Choi PS (2005a) The use of glufosinate as a selective marker for the transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Kor J Plant Biotechnol 32: 161-165
- Cho MA, Min SR, Ko SM, Liu JR, Lee JH, Choi PS (2006) Use of paromomycin as a selectable marker for the transformation of Chinese cabbage. Kor J Plant Biotechnol 33: 271-276
- Cho MA, Min SR, Ko SM, Liu JR, Choi PS (2008) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of radish (*Raphanus sativus* L.). Plant Biotechnol 25: 205-208
- Choi PS, Komatsuda T, Kim MH, Choi KM, Choi DW, Liu JR (2002) Screening of soybean recombinant inbred lines for high competence somatic embryogenesis. Korean J Plant Biotechnol 29: 135-138
- Dong JZ, Yang MZ, Jia SR, Chua NH (1991) Transformation of melon (*Cucumis melo* L.) and expression from the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic melon plants. Biotechnol 9: 858-863
- Gaba V, Zelcer A, Gal-On A (2004) *Cucurbit* biotechnology-the importance of virus resistance. In Vitro Cell Dev Biol Plant 40: 346-358
- 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
- Horvath E, Szalai G, Janda T (2007) Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. J Plant Growth Regul 26: 290-300
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J 6: 3901-3907
- Komatsuda T (1992) Research on somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean. Natl Inst Agrobiol Resources (Japan), Ann Rep 7: 1-78
- Kwon JH, Park SM, Lim MY, Shin YS, Harn CH (2007) Genetic transformation of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schard.) by callus induction. J Plant Biotechnol 34: 37-45
- Lee HS, Kwon EJ, Kwon SY, Jeong YJ, Lee EM, Jo MH, Kim HS, Woo IS, Shinmyo A, Yoshida K, Kwak SS (2004) Transgenic cucumber fruits that produce elevated level of an anti-aging superoxide dismutase. Mol Breed 11: 213-220
- Lee YH, Kim HS, Kim JY, Jung M, Park YS, Lee JS, Choi SH, Her JH, Hyung NI, Lee CH, Yang SG, Harn CH (2004) A new selection method for pepper transformation: callus-mediated shoot formation. Plant Cell Rep 23: 50-58
- Muller B, Zumdick A, Schuphan I, Schmidt B (2001) Metabolism of the herbicide glufosinate ammonium in plant cell cultures of transgenic and non-transgenic sugarbeet, carrot, purple foxglove and thorn apple. Pest Manag Sci 57: 46-56
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497
- Nishibayashi S, Kayakawa T, Nakajima T, Suzuki M, Kaneko H (1996) CMV protection in transgenic cucumber plants with an introduced CMV-O cp gene. Theor Appl Genet 93: 672-678
- Roa-Rodriguez C, Nottenburg C (1999) *NptII* gene in combination with paromomycin as a selective agent. Patent EP 927765A1
- Saramento GG, Alpert K, Tang FA, Punja ZK (1992) Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and expression of kanamycin resistance in pickling cucumber. Plant Cell Tiss Organ Cult 31: 185-193
- Selvaraj N, Vasudevan A, Manickavasagam M, Kasthuriangan S, Ganapathi A (2007) High frequency shoot regeneration from cotyledon explants of cucumber via organogenesis. Sci Horti 112: 2-8
- Trulson AJ, Simpson RB, Shahin EA (1986) Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants with *Agrobacterium rhizogenesis*. TAG 73: 11-15
- Vasudevan A, Selvaraj N, Ganapathi A, Choi CW (2007) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Amer J Biotechnol Biochem 3: 24-32
- Woo JW, Jeong WJ, Choi KS, Park HG, Baek NK, Liu JR (2001) Production of herbicide-resistant transgenic plants from embryogenic suspension cultures of cucumber. Kor Plant Tiss Cult 28: 53-58

(접수일자 2008년 9월 23일, 수리일자 2008년 10월 13일)