

박 자엽조직을 이용한 효율적인 식물체 분화와 *Agrobacterium*에 의한 형질전환

김수윤 · 안윤균 · 허윤찬 · 이혜은 · 김도선

Efficient shoot regeneration using cotyledon explants and *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of bottle gourd (*Lagenaria siceraria* Standl.)

Soo-Yun Kim · Yul-Kyun Ahn · Yun-Chan Huh · Hye-Eun Lee · Do-Sun Kim

Received: 6 August 2014 / Revised: 15 September 2014 / Accepted: 22 September 2014

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract This study were carried out for selection of proper transformation variety and development of efficient regeneration and transformation methods. The number of shoot in commercial varieties of gourd plant were 0 ~ 7.3. and *fusarium wilt* resistant pure lines were 2.0 ~ 6.5 per dish containing on MS medium supplemented with 3 mg/L BA. The shoot regeneration frequency of *fusarium wilt* resistant pure lines were wide variation on the deviation. The expression of GFP was high 67% and 100% at the co-cultivation with *Agrobacterium*. The effective shoot regeneration plant hormone were combination BA and 2,4-D. The number and elongation condition of shoot was good after 4 weeks change with MS medium supplemented with 1 mg/L BA. Effective callus production plant hormone were combination of 3 mg/L BA and 0.1 mg/L 2,4-D.

서론

박은 아프리카 대륙이 원산지로서 아시아로 전래 되었으며 원래 단단한 껍질을 갖는 박과 식물의 과실을 통칭하는 말로도 사용되어 왔는데 현재는 bottle gourd를 의미한다 (Erickson et al. 2005). 수박은 저온에 민감하여 장해를 입기 쉬우며 수박과일 썩음병, 세균점무늬병 및 덩굴쪼김병 등 토양 전염성 병원균 감염에 의한 피해가 크다(Lee

1989, 1994). 토지 집약적 재배를 해야 하는 우리나라에서는 접목이 수박재배에 보편적으로 이용되기 시작하면서 대목용 박이 상업적으로 중요하게 생산되고 있다. 박과 작물에서 대목의 이용은 고품질 박과 작물 재배를 위한 주요한 육종 기술로 병해충 저항성 및 저온 신장성, 내건성 및 내습성 등의 특성 개량을 위하여 이용되고 있다 (Lee 1994; Edelstein et al. 1999; Park et al. 2005) 최근에는 접목기술을 이용하는 작물에서 대목을 형질전환 재료로 사용하면서 접수에서 수확하는 과실은 형질전환체가 아니라 형질전환 기술을 이용하되 최종산물은 형질전환체가 아니라 소비자에게는 거부감이 없어서 새로운 육종 기술로 주목 받고 있다(Victor et al. 2012). 박 대목의 형질전환에서의 문제점은 형질전환 효율이 아주 낮은 것이며, 또한 형질전환 재료로 이용되고 있는 박 G5 품종은 직접적으로 대목으로 이용하기에는 농업적인 특성이 좋지않은 문제점을 가지고 있다(Han et al. 2005).

본 연구에서는 대목용으로 이용되는 박의 형질전환 효율을 높이고 농업적 특성이 우수하여 접목에 이용 가능한 대목용 박 대목 품종인 국립원예특작과학원에서 개발한 덩굴쪼김병 저항성이 있는 순계계통과 상용품종을 이용하여 실험을 수행하였다. 또한 재분화 효율을 증진시킬 수 있는 성장조절제를 선발하고자 하였으며, 선발된 성장조절제를 가지고 형질전환을 통하여 형질전환 효율을 검정하였다. 형질전환 효율을 높이기 위한 방법으로 캘러스 단계를 통해 신초를 유도할 수 있는 성장조절제 조합을 선발하였다.

S.-Y. Kim · Y.-K. Ahn (✉) · Y.-C. Huh · H.-E. Lee · D.-S. Kim
농촌진흥청 국립원예특작과학원 채소과
(Vegetable Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Department of Life Sciences, RDA, Suwon 441-440, Korea)
e-mail: aykyun@korea.kr

재료 및 방법

식물재료 및 종자파종

실험재료는 국립원예특작과학원에서 육성한 덩굴쪄김병 저항성 순계계통 5종('3381', '3385', '747', '756', '789') 및 시판품종 3종('FR-단토스', '동장군', '불로장생')이 사용되었으며 대조구로 린네계통의 G5가 사용되었다. 종자는 칼날을 이용하여 종피를 제거하였고 70% 에탄올에 1분 30%락스에 20분 소독한 후 멸균수를 이용하여 5회 세척한 후 멸균한 필터 페이퍼 위에서 수분을 제거하였다. 수분이 제거된 종자를 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지에 3%의 sucrose와 0.8 g의 agar를 첨가하여 장일인 광 조건에서 발아를 유도하였으며 유근이 출현된 자엽을 절편체로 이용하였다. 파종 후 4일 된 자엽을 3등분 횡절단 하여 절편체를 캘러스 형성에 사용하였다. 절편은 식물생장조절제의 처리에 따라 페트리디쉬(SPL, South Korea)에 5개씩 치상하고 3 반복으로 하여 싹 수를 조사하였다.

박 재분화 배지조건

박 재분화 효율을 높이기 위하여 G5 절편체를 MS 기본배지(MS Powder 4.4 g, 3% sucrose, 0.5 mg/L의 AgNO₃, pH 5.8)에 0.5, 2, 5 mg/L 농도의 사이토카이닌의 호르몬인 zeatin과 kinetin을 각각 첨가하여 7조합의 호르몬 배지에서 3반복으로 검정하였다. 박 대목용 품종 선발을 위하여 시판품종 'FR-단토스', '동장군', '불로장생'과 덩굴쪄김병 저항 계통의 종자 5종을 MS 기본배지에 BA (6-benzylaminopurine) 3 mg/L를 첨가한 배지에서 3반복하여 검정하였다(Table 1). 또한 BA배지 실험에서 선발된 순계계통 및 시판 품종 박을 2 mg/L zeatin 배지에 2반복으로 치상하여 싹 발생을 비교하였다. 간접 싹 유도를 위한 배지조

합을 위하여 1, 3, 5 mg/L의 BA가 첨가된 배지에 2,4-D를 0, 0.1, 0.5, 1 mg/L 를 각각 첨가하여 12조합의 배지를 만든 후 페트리디쉬에 5개씩 치상하고 3반복으로 실험하였다.

박 형질전환

파종 후 4일 된 자엽 절편체를 운반체가 도입된 아그로박테리움(GV3101)에 침지한 후 3 mg/L BA와 2 mg/L zeatin이 첨가된 MS배지에서 공동 배양한 후 기본배지 250 mg/L의 cefatoxime이 공통적으로 포함된 배지에 3 mg/L BA와 10 mg/L hygromycin, 2 mg/L zeatin과 10 mg/L hygromycin, 3 mg/L BA와 50 mg/L kanamycin과 2 mg/L zeatin과 50 mg/L kanamycin이 첨가된 배지에서 선발하였다. 싹이 분화되면 싹을 분리하여 호르몬이 없는 싹유도 배지(MS Powder 4.4 g, 3% sucrose, 0.5 mg/L의 AgNO₃, pH 5.8, 250 mg/L cefotaxime)에 옮겨서 싹을 유도한 후 싹을 발근 배지에 이식하였다.

형광분석(GFP 및 gus 분석)

GFP (green fluorescence protein)의 발현을 조사하기 위해 *agrobacterium* 접종 6일 후에 분석기기(model: Ez capture, Atto)를 이용하여 GFP 발현을 조사하였다. Gus분석은 박 형질전환체의 싹 조직을 gus 침지액(5 mM EDTA, 0.1% Triton x-100, and 1 mg/ml X-Gluc in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0)에 담구어 37°C에서 16시간 반응시켰다. 염색이 끝난 조직은 70% 에탄올을 이용하여 염록체를 완전히 제거한 후 관찰하였다.

결과 및 고찰

사이토카이닌 종류가 재분화에 미치는 영향

형질전환에 일반적으로 사용되는 G5 품종의 자엽 절편체를 이용하여 다양한 재분화 배지에서 싹 형성율을 조사하였다. 각각 3가지 농도의 zeatin 또는 kinetin 배지에 절편체를 치상한 후 싹이 형성된 절편의 숫자를 조사하였다. 4주 후 싹형성 정도를 조사하였을때 3 mg/L BA 처리구에서는 9.5개의 싹이 분화되었으며 zeatin 처리구에서는 농도에 따라 0.5~9.5개의 싹이 분화되었고 kinetin 처리구에서는 싹분화 없이 뿌리만 분화하였다(Table 1). 이 결과는 싹의 재분화 효율이 호르몬의 농도와 종류에 따라서도 영향을 받는다는 오이의 연구결과와 일치한다(Jang et al. 2011). Zeatin 2 mg/L가 첨가된 배지의 싹 수는 기본배지(BA 3 mg/L)와 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 zeatin 2 mg/L배지에서 유도된 싹

Table 1 Shoot regeneration frequency of gourd plant variety G5 on various cytokininine medium^z

Hormons (mg/L)	No. of shoots	No. of roots
3 BA	9.5 ± 2.5 ^y	-
0.5 Zeatin	0.5 ± 0.7	0.3 ± 0.5
2 Zeatin	9.5 ± 2.1	6 ± 1
5 Zeatin	7 ± 2.8	1.3 ± 0.6
0.5 Kinetin	0	11 ± 3.6
2 Kinetin	0	10.3 ± 2.1
5 Kinetin	0	14 ± 1

^zBasal medium : MS medium. Values are means of three replicates. Each replicates includes five cotyledonary explants per a culture dish.

^yData represent mean values ± S.E.

초는 줄기 신장유도 단계 없이 신초를 발근 배지에 이식하는 것이 가능할 정도로 빠르게 신장하였다. 박 대목으로 사용되는 품종을 이용하여 재분화 효율을 검정하고자 순계 6계통과 상용품종 3품종의 재분화 실험을 수행하였다. 6 종류의 덩굴쪄김병 저항성 순계계통 중 3종은 식물체가 재분화 되지않았다. 덩굴쪄김병 저항성 순계 계통의 재분화율은 품종간 편차가 상용품종에 비하여 컸으며 다양한 작물에서 보고된 바와 같이 품종에 따른 재분화율 차이가 있었다(Han et al. 2004). 순계계통 중에서는 '747'과 '756'이 각각 9개와 6.5개의 절편체에서 신초가 분화되어 가장 높은 효율을 보였으며 시판 품종에서는 '블로장생'과 '동장군'이 각각 6.5개와 5.5개의 절편체에서 신초가 분화되어 높은 재분화 효율을 보였다. 덩굴쪄김병 저항성 순계 계통의 재분화 효율은 G5보다 낮았지만 시판 품종 보다는 높은 효율을 보였다. Zeatin을 첨가한 재분화 배지에서 대조 구인 G5품종은 신초형성 수가 증가하지 않았지만 신초형성 정도는 3.5~9개로 '블로장생'을 제외하고 4개 품종의 신초형성 수가 증가하였다 (Table 2). Zeatin이 포함된 배지에서 재분화된 순계 및 시판품종에서 유래한 신초는 4주 후 발근배지 이식이 가능할 정도로 신장하였고 발근 배지에서 정상적으로 뿌리가 유도되었다.

박의 형질전환 효율 검정

재분화 실험에서 선발 된 zeatin 재분화 배지를 이용하여 박의 형질전환 효율을 검정하기 위하여 hygromycin과 kanamycin으로 선발되는 두 벡터 pCAMBIA1304과 pCAMBIA2301이 도입된 아그로박테리아를 이용하여 형질전환을 수행하

Table 2 Comparison of shoot regeneration frequency of commercial varieties, inbred lines and *fusarium wilt* resistant of gourd plant^z

Variety	No. of shoots	
	3 mg/L BA	2 mg/L Zeatin
G5	9.5 ± 2.50	9.5 ± 2.12
747	7.3 + 0.95	9 ± 1.41
756	5.3 ± 0.95	6.5 ± 0.7
Bulrojangsaeng	6.5 + 2.64	5.5 + 0.7
Dongjangun	5.3 ± 4.03	6.5 ± 2.1
Dantos	2.0 ± 1.4	3.5 ± 0.7

^zExplants were placed on MS medium containing 3 mg/L BA or Zeatin 2 mg/L. ^yValues are means of three replicates. Each replicates includes five cotyledonary explants per a culture dish ^yData represent mean values ± S.E.

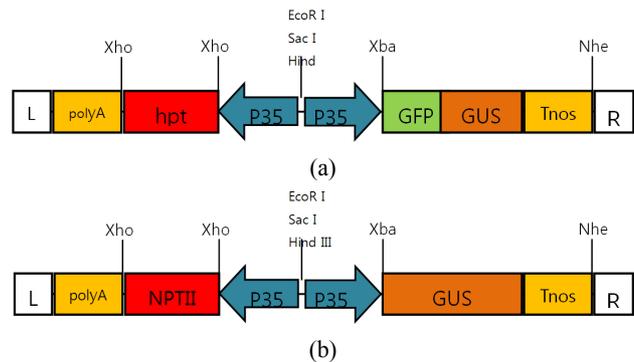


Fig. 1 T-DNA region of the binary vector harboring T-DNA region of the binary pCAMBIA1304(a) and pCAMBIA2301(b) vector. The hpt and nptII genes were driven by cauliflower mosaic virus 35S promoter. LB: left border, nptII: neomycin phosphotransferase II gene, hpt: hygromycine phosphotransferase, 35P: cauliflower mosaic virus 35S promoter, gus: glucuronidase, Tnos: nopaline synthase promoter and terminator. RB: right border

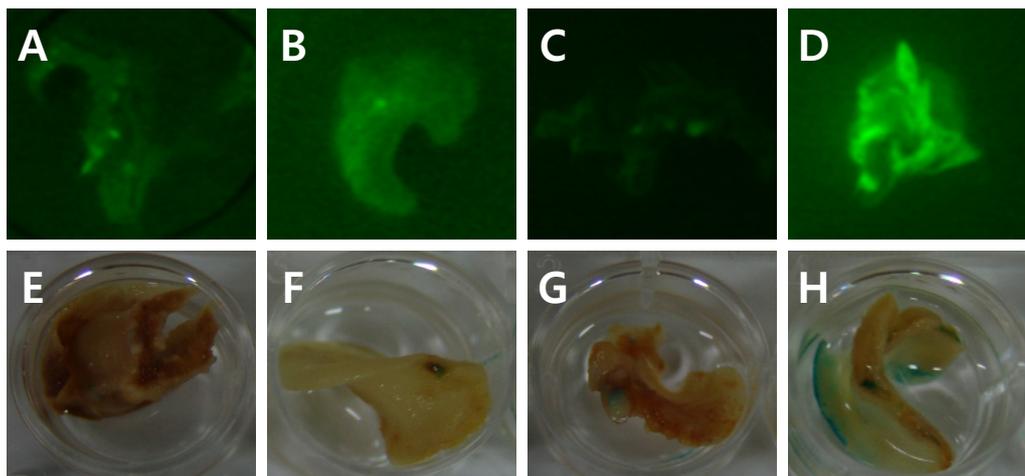


Fig. 2 Reporter gene expression of cotyledonary explants of gourd plant. Explants were co-cultured with *agrobacterium* containing reporter vector and investigated reporter gene expression after 6 days. A-D: *GFP* expression of transformed with pCAMBIA1304. E-H: *GUS* expression of transformed with pCAMBIA1303. A-B and E-F: Gourd plant variety of 747. C-D and G-H: Gourd plant variety of G5, A, C, F, G: co-cultivated on the 2mg/L zeatin containing medium. B, D, F, H: explants co-cultivated on 3mg/L containing BA medium

Table 3 Shoot regeneration frequency of *fusarium wilt* resistant inbred lines and pure line of gourd plant

Variety	Vector	Hormones (mg/L)	Antibiotics	No. of explants analyzed gfp or gus(a)	No. of explants expressed GFP or gus(b)	GFP or gus rate (%) ^y
747	pCAMBIA2301	Zeatin (2 mg/L)	Hygromycin	66	4	6
747	pCAMBIA2301	BA (3 mg/L)	Hygromycin	49	4	8
G5	pCAMBIA2301	Zeatin (2 mg/L)	Hygromycin	105	7	7
G5	pCAMBIA2301	BA (3 mg/L)	Hygromycin	112	6	5
747	pCAMBIA1304	Zeatin (2 mg/L)	Kanamycin	3	2	67
747	pCAMBIA1304	BA (3 mg/L)	Kanamycin	3	2	67
G5	pCAMBIA1304	Zeatin(2 mg/L)	Kanamycin	8	7	88
G5	pCAMBIA1304	BA (3 mg/L)	Kanamycin	5	5	100

^zExplants were placed on MS medium containing 3 mg/L of BA or 2 mg/L of zeatin.

^yGFP or gus rate: No. of explants expressed GFP or gus(b) x 100/ No. of explants(a)

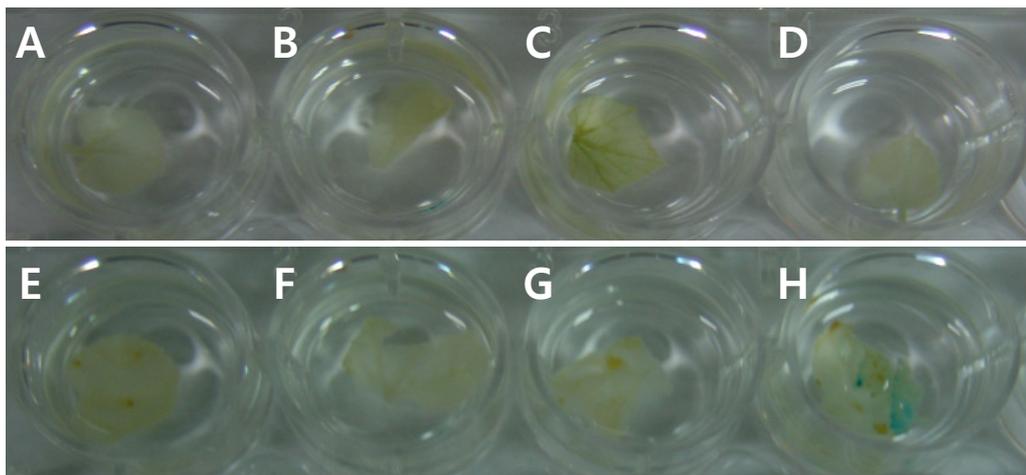


Fig. 3 Reporter gene expression of shoots of gourd plant. Shoots transformed with pCAMBIA2301 were regenerated on regeneration medium after 8 weeks

였다(Fig. 1). pCAMBIA1304 벡터로 형질전환된 절편체는 도입된 세포와 조직에서 *GFP*와 *gus* 유전자를 동시에 발현하게 되므로 *agrobacterium* 접종 6일 후에 분석기기를 이용하여 *GFP* 발현을 조사하였다. 3 mg/L BA와 2 mg/L zeatin 공동배양 배지에서 공동배양된 절편체에서 *GFP* 발현을 확인하였다(Fig. 2). 선발배지에 옮겨서 2주마다 계대배양을 하면서 8주째에 신초발생을 조사하였으나 hygromycin에 치상한 절편체에서는 신초가 발생하지 않았다. pCAMBIA2301 벡터로 형질전환된 절편체는 도입 세포나 조직에서 *gus* 유전자만 발현하므로 형질전환한 절편체의 일부를 이용하여 *gus* 발현을 조사하였다. 한치리 구에서 형질전환한 절편체 중 105개를 *gus* 용액에 침지한 결과 7개의 절편체의 절단면에서 GUS 발현을 확인할 수 있었다(Table 3, Fig. 3). 2주마다 계대 배양하면서 신초 발생을 조사한 결과 4주부터 절단면에서 신초가 활발하게 분화되기 시작하였다. BA가 첨가된 선발배지에서 분화된 신초는 페트리디쉬 아래면에서 분화되는 것을 확인할 수 있었고

zeatin 선발배지에서 분화된 신초는 신장하여 배지 위로 성장하였다. 6주 후 zeatin이 첨가된 배지에서 분화된 신초는 빠르게 신장하여 발근 배지에서 발근을 유도하였으며 BA가 첨가된 배지에서 분화된 신초는 신장유도 배지로 옮겨져 신초신장을 유도하였다. 8주 후 BA배지와 zeatin 배지에서 각각 분화된 8개와 6개의 절편체에서 분화된 신초의 잎을 *gus* 염색한 결과 zeatin에서 분화된 1개의 신초에서 *gus* 염색이 확인되어 안정적으로 유전자가 도입된 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 볼 때 박 대목의 형질전환에서 재분화 배지에 2 mg/L zeatin을 첨가하는 것이 형질전환체를 획득하는 시간을 단축시킬 수 있었다.

캘러스 유도를 이용한 박 재분화 방법 확립

형질전환에서 형질전환 효율이 매우 낮거나 유전자가 도입되지 않고 선발배지에서 재분화 되는 신초에 관련된 결과는 형질전환이 어려운 작물에서 많이 보고되고(Ahn

Table 4 Shoots formation of gourd plant on BA and 2,4-D combination medium

BA (mg/L)	No of shoots			
	2,4-D 0 mg/L	2,4-D 0.1 mg/L	2,4-D 0.5 mg/L	2,4-D 1 mg/L
1	14.5 ± 0.7	0	0	0
3	9.5 ± 2.5	0	0	0
5	7 ± 2.8	1 ± 1.4	0	0

²Basal medium : MS medium. Values are means of three replicates. Each replicates includes five cotyledonary explants per a culture dish

³Data represent mean values ± S.E.



Fig. 4 Shoots formation of gourd plant cotyledon tissue on containing different concentration of BA and 2,4-D combination medium, A: BA 1 mg/L containing medium after 4 weeks, B, BA 3 mg/L containing medium after 4 weeks, C: BA 5 mg/L containing medium after 4 weeks, D: BA 1 mg/L and 2,4-D 0.1 mg/L containing medium after 4 weeks, E: BA 1 mg/L and 2,4-D 0.1 mg/L containing medium after 8 weeks

et al. 2013) 있다. 자엽을 이용한 형질전환 방법은 형질전환체를 빨리 획득할 수 있는 장점이 있지만 목적 유전자가 도입되지 않은 신초가 발생하는 단점이 있다(Han et al. 2004). 비교적 안정적인 형질전환 방법이 확립되어 있는 배추와 마늘 오이 등에서는 캘러스 유도를 통한 간접적 신초유도 방법을 사용하는데(Ahn et al. 2009; Jang et al. 2011), 이 방법은 형질전환 효율을 높일 수 있는 방법으로 생각한다. 캘러스 유도를 통한 간접적 신초유도 방법으로 박과작물의 경우 배축을 이용한 방법은 수박(Comptom and Gray 1993; Lee et al. 2003) 및 오이(Mohiuddin et al. 1997)에서 보고되어왔으며, 뿌리를 이용한 방법은 멜론에서 보고된 바 있다(Rekha et al. 1994). 박 대목의 경우 뿌리와 배축 조직을 이용하여 사이토키닌과 옥신을 이용하여 재분화를 시도하였지만 캘러스가 발생되지 않았다(데이터 미제시). BA와 2,4-D를 혼용처리한 배지에서 자엽의 절단부위에서 신초가 발생하였으며 4주 후 BA를 단독으로 1 mg/L 처리한 배지에서 발생한 신초 수는 14.5 개로 대조 구(9.5개)에 비하여 높았으며 한 개의 절편체에서 발생하는 신초의 수 및 신장도 매우 양호하였다(Table 4). 옥신류 성장조절제인 2,4-D를 BA와 혼용했을 때 신초발생은 신초가 발생하지 않거나 1개로 더 낮아졌다. 사이토키닌과 옥신을 혼합하여 처리했을 때 옥신이 신초형성을 억제하는 결과는 수박의 결과와 일치한다(Comptom and Gray 1993). 캘러스의 발생은 신초의 발생이 좋았던 1 mg/L BA 조건에 2,4-D를 0.1 mg/L 첨가한 배

지에서 가장 활발하게 분화하였으며 1 mg/L BA 및 3 mg/L BA 조건에 2,4-D를 0.1 mg/L 첨가한 조합에서 분화된 캘러스를 2주마다 계대배양 하면서 신초 발생을 조사한 결과 13주 후에 신초로 분화하여 박에서 캘러스 과정을 통한 간접적 신초발생 가능성을 보여주었다(Fig. 4).

적 요

본 연구는 대목용으로 이용되는 박에 있어서 형질전환에 이용 가능한 품종을 선발하고 재분화 효율 및 형질전환 효율을 높이기 위하여 수행되었다. 3 mg/L BA가 첨가된 MS배지에서 덩굴마름병 저항성 순계계통의 평균 신초형성 수는 0~7.3개였으며 3종류의 상용 품종의 신초형성 수는 2.0~6.5개였다. 덩굴마름병 저항성 순계 계통의 재분화율은 품종 간 편차가 상용품종에 비하여 컸다. 형질전환 효율을 검정하기 위해 GFP와 gus발현을 조사한 결과 공동배양 과정 중에 GFP가 67%와 100%로 높은 일시적인 발현을 보였다. 식물체 재분화는 BA와 2,4-D를 조합한 배지조합에서 자엽의 절단부위에서 신초가 발생하였으며, 4주 후 BA를 단독으로 1 mg/L 처리한 배지에서 한 개의 절편체에서 발생하는 신초의 개수 및 신초의 신장도 좋았다. 캘러스의 발생은 1 mg/L BA와 2,4-D를 0.1 mg 첨가한 배지에서 가장 활발하게 분화하였다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 국립원예특작과학원(과제번호: PJ008638032014)에 의해 지원되었습니다.

References

- Ahn YK, Kim DS, Yoom MK (2009) Plant regeneration from callus derived root of northern type in garlic (*Allium sativum* L.). J Plant Biotechnol 36:403-406
- Ahn YK, Yoon MK, Jeon JS (2013) Development of an Efficient *Agrobacterium*-Mediated Transformation System and Production of Herbicide-Resistant Transgenic Plants in Garlic (*Allium sativum* L.) Mol Cells 36:158-162
- Comptom ME, Gray DJ (1993) Shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid, triploid and tetraploid watermelon. J Am Soc Hortscience 118:151-157
- Curuk S, Ananthakrishnan G, Singer S, Xia X, Elman C, Nestel D, Certiner S, Gaba V (2003) Regeneration in vitro from the hypocotyls of *Cucumis* species produces almost exclusively diploid shoots, and does not require light. HortScience 38:105-109
- Edelstein M, Cohen R, Burger Y, Shriber S (1999) Integrated management of sudden wilt in melons, caused by *Monosporascus cannonballus*, using grafting and reduced rates of methyl bromide. Plant Dis 83:1142-1145
- Erickson DL, Smith BD, Clarke AC, Sandweiss DH, Tuross N (2005) An Asian origin for a 10,000-year-old domesticated plant in Americas. Proc Natl Acad Sci USA 102:18. 315-320
- Gambley RL, Dodd WA (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
- Han JS, Oh DG, Mok IG, Park HG, Kim CK (2004) Efficient plant regeneration from cotyledon explants of bottle gourd (*Lagenaria siceraria* Standl.). Plant Cell Rep 23:291-296
- Han JS, Kim CK, Park SH, Hirschi KD, Mok IG (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation of bottle gourd (*Lagenaria siceraria* Standl.). Plant Cell Rep 23:692-698
- Jang HA, Kim HA, Kwon SY, Choi DW, Choi PS (2011) The use of cotyledonary-node explants in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.). J Plant Biotechnol (2011) 38:198-202
- Lee JM (1989) On the cultivation of grafted plants of cucurbitaceous vegetables. J Kor Soc Hort Sci 39:169-179
- Lee JM (1994) Cultivation of grafted vegetables. 1. Current status, grafting methods and benefits. HortScience 29:235-239
- Lee YK, Chung WI, Ezura H (2003) Efficient plant regeneration via organogenesis in winter squash (*Cucubita maxima* Duch.) Plant Sci 164:413-418
- Mohiuddin AKM, Chowdhury MKU, Abdullah-Zaliha C, Napis S (1997) Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber in vitro shoot regeneration. Plant Cell Tissue Organ Cult 51:75-78
- Murashige T, Skoog FA (1962) Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497
- Park SM, Lee JS, Jegal S, Jeon BY, Jung M, Park YS, Han SL, Shin YS, Her NH, Lee JH, Lee MY, Ryu KH, Yang SG, Harn CH (2005) Transgenic watermelon rootstock resistant to CGMMV (cucumber green mottle mosaic virus) infection. Plant Cell Rep 24:350-356
- Rekha K, Bhatnagar SP, Bhojwani SS (1994) Plant regeneration from the callus derived from root explants of *Cucumis melo* L. cv. Pusa sharbati. Plant Science 96:137-142
- Victor MH, Mark WS, Hakan A, Javier LB, Mar JO, Cecilia LCH, John ML, Alan BB, Ann LTP (2012) Mobility of transgenic nucleic acids and proteins within grafted rootstocks for agricultural improvement. Plant Science 3:1-12