

애기장대 *Nit*유전자 발현 오이 형질전환체 개발

장현아 · 임가민 · 김현아 · 박연일 · 권석윤 · 최필선

Development of transgenic cucumbers expressing *Arabidopsis Nit* gene

Hyun A Jang · Ka Min Lim · Hyun A Kim · Yeon-Il Park · Suk Yoon Kwon · Pil Son Choi

Received: 24 October 2013 / Accepted: 10 November 2013
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract To produce transgenic cucumber expressing *Nit* gene conferring abiotic resistance, the cotyledonary-node explants of cucumber (cv. Eunsung) were inoculated with *A. tumefaciens* transformed with pPZP211 or pCAMBIA2300 carrying *Nit* gene, that has cis-acting element involved in resistance to various abiotic environmental stresses. After co-cultivation, the procedures of selection, shoot initiation, shoot elongation, and plant regeneration were followed by cotyledonary-node transformation method (CTM, Jang et al. 2011). The putative transgenic plants were selected when shoots were grown to a length greater than 3 cm from the cotyledonary-node explants on selection medium supplemented with 100 mg/L paromomycin as a selectable agent. The confirmation of transgenic cucumber was based on the genomic PCR, Southern blot analysis, RT-PCR, and Northern blot analysis. A 105 shoots (4.12%) selected from the selection mediums were obtained from 2,547 explants inoculated. Of them, putative transgenic plants were only confirmed with 45 plants (1.77%) by genomic PCR analysis.

Transgenic plants showed that the *Nit* genes integrated into each genome of 39 plants (1.53%) by Southern blot analysis, and the expression of gene integrated into cucumber genome was only confirmed at 6 plants (0.24%) by RT-PCR and Northern blot analysis. These results lead us to speculate that the genes were successfully integrated and expressed in each genome of transgenic cucumber.

Keywords Abiotic gene, *Agrobacterium*, *Nit* gene, Transgenic cucumber

서론

오이는 미국, 아시아 및 유럽을 중심으로 열대와 아열대 지방에서 재배되는 주요 박과 작물로 식용과 피부 미용에 이용되는 중요한 경제 작물이며, 생육온도에 매우 민감하여 주간에는 25 ~ 28°C, 야간에는 14 ~ 15°C 정도를 유지해야 하며 하므로 동절기에는 주로 온실재배와 함께 난방시스템이 필요하다. 최근 *Agrobacterium* 공동배양법을 이용한 유용 유전자 도입 기술은 오이 신품종 개발에 대한 가능성을 제시 하였고(Gaba et al. 2004), 이는 우리나라를 비롯한 선진국을 중심으로 환경스트레스 내성(Abiotic 또는 Biotic) 오이품종 연구뿐 아니라 바이러스 저항성, 간염바이러스항체 발현, CMV발현(Gal-on et al. 2005) 등 다양한 유전자를 도입하여 새로운 오이 품종개발을 위한 소재개발 연구를 시도하고 있다.

식물은 비생물학적(Abiotic) 환경스트레스에 지속적으로 노출되어 있어 식물의 발아, 성장, 발달, 생산성에 크게 영향을 미치고(Boyer, 1982), 특히 저온 스트레스를 받을 경우 잎의 신장 감소, 시듦, 황백화 현상을 동반하여

K. M. Lim · P. S. Choi (✉)
남부대학교 한방제약개발학과 약용식물형질전환연구소
(Department of Oriental Pharmaceutical Development, Nambu University, Wealkye-dong, Gwangsan-gu, Gwangju 506706, Korea)
e-mail: cps6546@hanmail.net

H. A. Jang · H. A. Kim · S. Y. Kwon (✉)
한국생명공학연구원 식물시스템공학연구센터
(Plant Systems Engineering Research Center, KRIBB, Daejeon 305-806, Korea)
e-mail: sykwon@kribb.re.kr

H. A. Jang · Y. I. Park
충남대학교 생물학과
(Department of Biology, Chungnam National Univ., Daejeon, 305-606, Korea)

조직의 괴사 원인이 되기도 한다(Guy 1990). 이는 저온 스트레스에 의한 세포의 신호 전달 수용체를 통하여 세포 내로 전달되는 phospholipase C (PLC)를 활성화시켜 전사인자 유전자(*CBF*, *DRE*)가 발현됨으로서 다양한 스트레스에 대한 내성을 갖게 한다(Ma et al. 2006; Gupta et al. 2012). 최근 애기장대로부터 저온과 건조에 내성을 갖는 환경스트레스 내성유전자, *Nit*유전자를 클로닝 하였으며, 이 유전자는 355개의 아미노산으로 구성되어 있고, 특히 저온이나 건조 조건에서 발현됨으로서 식물에 내성기능 갖게 하는 것으로 알려졌다(Lee 2008).

일반적으로 오이 형질전환은 다 배체 또는 chimeric출현 등 다양한 문제점이 제기되어 어려운 것으로 알려져 있으나 국내에서는 자엽절편 및 체세포배 발생을 통한 형질전환 방법의 개선(Cho et al. 2005; Kim et al. 2008), 선발마커로서 *bar*유전자의 이용(Cho et al. 2005) 등 도입유전자의 안정적 발현을 위한 기술이 점차 개선되어 왔고, 최근 대두에서 가장 많이 이용되고 있는 자엽절 절편을 이용한 형질전환 기술(Cotyledonary-node Transformation Method, CTM)이 오이에서도 개발되어(Jang et al. 2011) 유용 유전자 도입 및 발현 연구가 진행되고 있다. 또한 국외에서도 벼 유래 chitinase (Kishimoto et al. 2002) 및 단맛(Szwacka et al. 2007) 관련 유전자 등 다양한 유용유전자가 발현되는 오이를 개발하여 새로운 품종 소재로 이용 가능성을 제시하고 있다. 이와 같이 유럽, 미국 및 아시아 국가에서 오이 형질전환 방법을 개선하기 위한 노력과 그러한 방법을 이용하여 병 저항성 및 환경스트레스 내성 등의 연구가 이루어지고 있으나 아직은 초기 단계라 할 수 있고, 형질전환체에 대한 분자 수준의 구체적인 동반연구가 이루어지지 않아 신품종으로의 개발이 지연되고 있다.

따라서 본 연구에서는 애기장대로부터 유래한 저온 및 건조 스트레스에 내성을 갖는 *Nit*유전자를 안정적 오이 형질전환방법, 즉 자엽절 절편을 이용한 형질전환 방법(CTM, Jang et al. 2011)으로 오이 형질전환체를 개발 하였고 이에 보고 하고자 한다.

재료 및 방법

식물 재료

국내 오이 품종 중 재분화 능이 높은 오이(cv. Eunsung) 종자(Cho et al. 2005)를 70% 알코올에 1분간, 2% sodium hypochlorite용액에 15분간 표면 살균 하였다. 2% sucrose가 첨가된 MS기본 고체배지(Murashige and Skoog 1962)에 펠트리디쉬 당 10개의 종자를 치상 하고 25°C 암 상태에서 7~8일 동안 발아시켰다. 발아된 오이 유식물체로부터 자엽과 자엽 사이를 종단으로 절단한 후 해부현미경

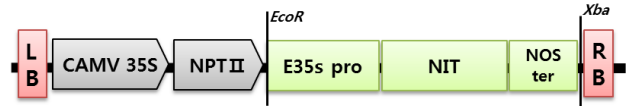


Fig. 1 T-DNA region of the binary vectors. pCAMBIA2300 and pPZP211 vectors harboring *nptII* and *Nit* genes. The genes were driven by CaMV 35S promoter. LB: left border, RB: right border

하에서 자엽 사이에 있는 유경 조직을 제거하여 *Agrobacterium*과 공동배양하기 위한 재료로 사용하였다(Jang et al. 2011).

유전자 발현벡터

pCAMBIA2300과 pPZP211에 각각 CaMV 35S 프로모터에 선발마커로서 *nptII*유전자와 저온저항성 *Nit*유전자가 발현되도록 제작하였으며(Fig. 1), pCAMBIA2300발현벡터는 freeze-thaw방법으로 EHA105에, pPZP211발현벡터는 EHA101에 각각 형질전환하여 균주로 사용하였다(Jefferson et al. 1987). 50 mg/L kanamycin (pCAMBIA2300) 또는 50 mg/L spectinomycin (pPZP211)이 각각 첨가된 LB액체배지 25 mL에 각각의 colony를 접종하여 28°C로 8시간 이상 배양 후 대수기 증식기($OD_{650} = 0.6 - 1.0$)의 균을 사용하였다.

오이 형질전환 생산

형질전환체를 얻기 위하여 자엽절 절편을 각 발현벡터로 형질전환시킨 25 ml의 *Agrobacterium*용액(EHA101 또는 EHA105)에 30분 동안 침지한 후 공동배양용 배지(Jang et al. 2011)에 6개씩 치상 하여 3일 동안 공동 배양하였다. 공동배양 후 자엽절 절편으로부터 초기 2주 동안에 유도된 부정아의 제거, 항생제 저항성 부정아 유도, 부정아로부터 부정근 유도 및 유식물체 순화 등 모든 실험방법 및 배지 조성은 Jang 등(2011)의 방법에 따라 수행하였다. 형질전환체를 선발하기 위하여 배지에 100 mg/L paromomycin을 첨가하여 선발배지로 사용하였으며, 모든 배지는 8 g/L Phyto-agar를 첨가하기 전 pH를 조정하여 121°C, 1.2기압에서 15분간 고압 멸균 하였다. 배지는 90 × 15 mm 플라스크 펠트리디쉬에 25 ml씩 분주하여 사용하였으며, 배양은 24°C로 조절되는 배양실에서 광도 46 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 16시간 광주기에서 배양 하였다. 선발배지에서 얻은 유식물체는 토양으로 옮겨 온실에서 순화 하였으며, 크기가 50 cm이상 자란 유식물체를 대상으로 분자수준의 분석을 실시하였다.

PCR, Southern blot, RT-PCR, Northern blot분석

Paromomycin을 첨가한 선발배지에서 저항성을 나타내는

유식물체를 토양으로 순화하여 성숙한 개체로 생육시켰다. PCR분석을 위하여 *Nit* (Forward: 5'-CTACAAGGACC-CATCACC-3', Reverse: 5'-GGTGAGAGGGAAGAGGAT-3' (305 bp)의 특정 염기서열을 primer로 사용하였다. PCR분석에서 확인된 오이식물체를 대상으로 *Nit* 유전자의 도입 여부를 확인하기 위하여 Southern 분석을 실시하였으며, 또한 RT-PCR과 Northern 분석을 통해 도입 유전자의 발현을 확인하였다. Southern 분석을 수행하기 위해서 온실에서 50 cm 이상 자란 성숙한 식물체로부터 어린 잎 조직을 취하여 genomic DNA를 추출하였다(Dellaporta et al. 1985). EcoR I 제한효소로 약 50 µg의 DNA를 37°C에서 16시간 동안 반응시켜 절단 하였으며, 0.8% agarose 겔에 전기영동 하였다. Agarose 겔 상의 DNA 밴드를 Zeta^R Probe nylon membrane (Bio-Rad, catalog #162-0196)에 옮겨 ³²P-dCTP (Stratagene, catalog#300385)로 labelling한 약 305 bp 크기의 *Nit* probe로 65°C에서 hybridization하여 Southern 분석을 실시하였다(Southern 1975). 또한 *Nit* 유전자의 발현 여부를 확인하기 위해서 온실에서 생육 중인 오이 식물체의 어린잎으로부터 30 mg의 RNA를 추출하였다. RT-PCR은 total RNA 10 mg을 template로 하여 SuperScriptTM II (Invitrogen, USA)를 이용하여 first-strand cDNA를 합성하였고, Second strand amplification은 *Nit* primer, Taq polymerase (NEB)을 이용하여 GeneAmp PCR system (Perkin Elmer Applied Biosystem, USA)에서 통상의 방법으로 수행하였다. Northern blot 분석은 30 µg의 RNA를 5.1% formaldehyde agarose gel에서 전기영동한 후 nylon membrane (Zeta-Probe GT genomic tested blotting membranes; Bio-Rad)에 이동, 고정시켰다. Probe는 305 bp 크기의 PCR fragment를

[³²P]dCTP (Random Primed DNA Labeling kit; Boehringer Mannheim)로 표지하여 사용하였으며, Prehybridization과 hybridization은 0.25M sodium phosphate 용액 (pH7.2)과 7% SDS 용액으로 65°C에서 수행하였다. Membrane은 20 mM sodium phosphate (pH7.2)와 5% SDS 용액으로 동일 온도 조건에서 10분 동안 세척한 후 X-ray film에서 현상하였다.

결과 및 고찰

*Agrobacterium*을 이용한 오이의 형질전환체 생산은 자엽, 배축 및 잎 절편으로부터 기관발생과 체세포배 발생 시스템을 이용하고(Chee 1990; Dong et al. 1991), 최근 대두에서 주로 사용하고 있는 자엽절 절편법을 이용하기도 한다(Jang et al. 2011). 또한 선발마커로는 *nptII* (Trulson et al. 1986; Chee 1990; Dong et al. 1991)와 *bar* 유전자(Cho et al. 2005)를 이용하기도 한다. 본 연구에서는 가장 최근 보고된 자엽절 절편으로부터 기관발생과 선발마커로서 *nptII* 유전자를 이용하여 형질전환체를 생산하기 위하여 국내 오이 품종인 “Eunsung” 유식물체의 자엽절 부위를 공동배양 한 후 선발배지에서 2주 간격으로 6주 동안 계대 배양하였고, 그 기간 동안에 자엽절 절편으로부터 발생하는 모든 부정아를 제거 함으로서 chimeric 가능성을 줄였다. 배양 8주째부터는 완전히 새롭고 빠르게 성장하는 2~3 mm 크기의 진한 녹색을 띠는 부정아 원기를 선발하여 신장배지에 옮겨 putative shoots를 유도하였다. 신장된 부정아를 부정근 유도배지에서 뿌리를 유도한 후 토

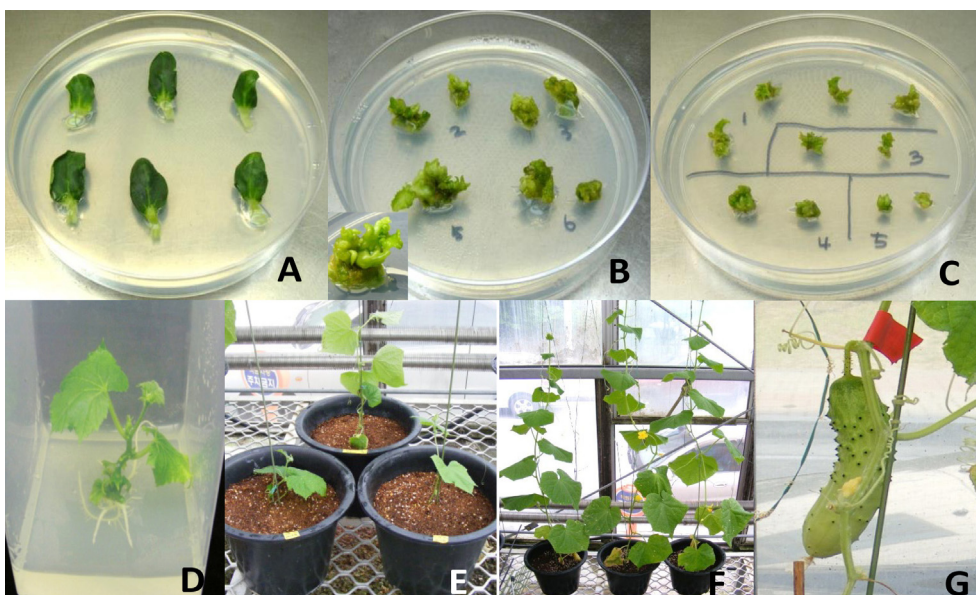


Fig. 2 Plant regeneration from cotyledonary-node explants of cucumber transformed with *Nit* gene. A: Cotyledonary-node explants inoculated. B: Resistance-shoot formed from selection medium supplemented with selective agents at 8 weeks of culture. C: Elongation of shoots with paromomycin-resistance. D: Putative transgenic cucumber grown in rooting medium. E, F: Growth of transgenic cucumbers. G: Growing fruit after pollination

양에 옮겨 순화시켰으며, 온실에서 건강하게 자라는 오이의 암술과 수술을 이용하여 인공 수정 후 후대 종자를 수확하였다(Fig. 2). 이와 같이 자엽절 절편 공동배양법(Jang et al. 2011)으로 putative 오이 형질전환체를 얻는 데는 어려움이 없었으며, 배측 절편으로부터 체세포배 발생을 통한 형질전환이나(0.5%, Kim et al. 2008) 자엽 절편으로부터 기관발생 방법을 통한 형질전환빈도(0.35%, Cho et al. 2005)에 비해 많은 형질전환체를 얻을 수 있었다.

pCAMBIA2300-*Nit*발현벡터의 경우 공동 배양한 자엽절 절편(1,312개)으로부터 27개(2.06%)의 paromomycin저항성 유식물체를 얻을 수 있었으며, 이중 11개체(0.84%)에서 genomic PCR분석으로 통해 *Nit* PCR product (305 bp)를 검출할 수 있었다(Fig. 3A). 또한 PCR product를 검출한 paromomycin 저항성 식물체를 대상으로 Southern분석을 수행한 결과 9개체(0.68%) genome에서 *Nit*유전자가 안정적으로 도입되어 있음을 확인하였고, 이중 6개체(0.46%)에서 *Nit*유전자가 안정적으로 발현되고 있음을 RT-PCR과 Northern blot 분석을 통해 확인하였다. 반면 pPZP211-*Nit*발현벡터의 경우 접종된 자엽절 절편 1,235개로부터 78개체(6.31%)에서 paromomycin저항성을 나타냈고, 이중 34개체(2.75%)로부터 PCR product가 검출되었다. Southern분석을 통해 최종적으로 *Nit*유전자 도입을 30개체(2.42%)에서 확인 할 수 있었으나 도입된 *Nit*유전자의 발현은 어느 개체에서도 확인 할 수 없었다(Table 1).

이와 같이 *Nit*유전자의 경우 발현벡터에 따라 오이 genome으로의 안정적 도입 빈도는 발현벡터에 따라 0.68~2.42% (Southern분석 기준)로 큰 차이를 보였고, *Nit*유전자가 안정적으로 도입되었다 할 지라도 발현은 다른 양상을 보였다. 특히 pCAMBIA2300발현벡터로 형질전환된 9개체 중에서 오직 6개체에서만 발현되는 것으로 나타나 육종소재로 이용할 형질전환개체로 선정하기 위해서는 도입 유전자의 안정적 발현 여부를 확인하는 것이 필수적임을 보여 주었다(Fig. 3B). 식물의 형질전환빈도는 매우 다양한 요인, 즉 작물의 품종과 *Agrobacterium*의 종류(Simmonds and Donaldson 2000), 선발 마커(Cho et al. 2005), 배양절편의 종류(Jang et al. 2011) 및 연구자의 숙련도(Gaba et al. 2004) 등에 의해 다르게 나타날 수 있다. 특히 배양재료로서 오이 자엽절 절편을 이용한 경우 항생제 저항성 기준 4.01%의 높은 형질전환 빈도를 보여준 결과(Jang et al.

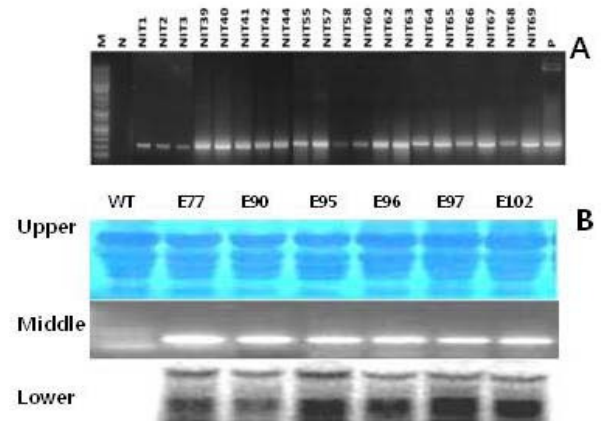


Fig. 3 PCR, RT-PCR, and Northern blot analysis of transgenic cucumber carrying *Nit* gene. **A:** Genomic PCR analysis of transformants by specific primer designed from *Nit* gene. PCR products were run in 1% agarose gel by electrophoresis. **B:** *Upper level* is total RNA that isolated from transgenic cucumbers (E77, E90, E95, E96, E97, E102) transformed with pCAMBIA2300-*Nit* gene and wild type (WT). *Middle level* is constitutive expression of *Nit* gene in above same transgenic cucumber by RT-PCR analysis. *Lower level* is expression of *Nit* gene in above same transgenic cucumber by Northern blot analyses. Total RNA extracted from transgenic cucumber plants (T_0 generation). The RNA (30 μ g) was separated in 1% agarose gel in each lane and subjected to Northern hybridization. The 305 bp *Nit* PCR product was labeled with [32 P]dCTP and then used as probe

2011)와 비교해서 4.12%로 유사한 경향을 보였고, 이는 배양재료로서 자엽 절편이나(0.35%, Cho et al. 2005)와 배측 절편에(0.5%, Kim et al. 2008) 비해서 높게 나타나 자엽절 절편이 매우 효과적임을 보여 주었다. 한편 EHA105/pCAMBIA2300의 경우 2.06%의 항생제 저항성 개체발생빈도를 보여주어 EHA101/pPZP211발현벡터(6.31%)에 비해 훨씬 낮은 것으로 나타났으나 도입유전자의 발현은 오히려 EHA105/pCAMBIA2300-*Nit*발현벡터에 의해 생산된 개체에서만 확인 됨으로써 벡터와 유전자의 도입빈도와 안정적 발현이 달라질 수 있음을 보여주었다. 이와 같이 본 연구를 통해서 개발된 *Nit*유전자 도입 및 발현 개체(6개체)는 향후 수정을 통해 T1종자를 확보한 후 후대에서도 발현여부를 조사할 필요가 있으며, 이중 안정적으로 발현되는 개체를 대상으로 저온 및 건조 조건에서 내성 정도를 확인하여 오이 새로운 품종 육성을 위한 소재로 이용하는 데 사용할 수 있을 것이다.

Table 1 Analysis of molecular level for transgenic cucumber carrying *Nit* gene by *Agrobacterium*-mediated transformation using cotyledonary-node explants on selection medium

Gene	<i>Agro</i> -strain carrying with vectors	No. of explants inoculated	No. of plantlets regenerated (%)	gDNA-PCR analysis (%)	Southern blot analysis (%)	RT-PCR analysis (%)	Northern analysis (%)
<i>Nit</i>	EHA101-pPZP211	1,235	78 (6.31)	34 (2.75)	30 (2.42)	0 (0.00)	0 (0.00)
	EHA105-pCAMBIA2300	1,312	27 (2.06)	11 (0.84)	9 (0.68)	6 (0.46)	6 (0.46)
	Total	2,547	105 (4.12)	45 (1.77)	39 (1.53)	6 (0.24)	6 (0.24)

적 요

환경스트레스 저항성 오이 형질전환체 생산을 위해서 오이 “Eunsung” 품종의 자엽절 절편을 *Nit* 유전자를 포함하는 pPZP211와 pCAMBIA2300 발현벡터로 각각 형질전환된 *Agrobacterium*과 공동 배양하였다. 공동배양 후 형질전환체 선발, 형질전환체 유도, 신장, 유식물체 생산 등은 자엽절 절편을 이용하는 CTM방법(Jang et al. 2011)에 따라 수행하였다. 발현벡터에 따라 선발배지에 100 mg/L paromomycin을 첨가하여 선발과정을 거쳤으며, 선발배지에서 3 cm크기의 shoot를 유도한 후 PCR, Southern, RT-PCR 및 Northern분석을 통해 형질전환 여부를 확인하였다. 공동배양 한 2,547개의 자엽절 절편으로부터 105개체(4.12%)가 선발배지로부터 얻어졌으며, 그들 중 45개체(1.77%)만이 *Nit* 유전자의 PCR product를 얻을 수 있었다. 오이 genome에 *Nit* 유전자의 도입여부를 확인하기 위하여 45개체에 대한 Southern분석을 수행한 결과 각각 39개체(1.53%)서 확인할 수 있었으며, 이 중 오직 6개체(0.24%)에서만 *Nit* 유전자가 안정적으로 발현되고 있음을 RT-PCR과 Northern분석을 통해 확인하였다. 이러한 결과는 *Nit* 유전자가 오이 genome에 안정적으로 도입 및 발현되고 있음을 보여 주고 있음을 알 수 있었다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(식물분자육종사업단 과제번호: PJ008103)의 지원에 의해 이루어진 것이다.

References

- Boyer JS (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218:443-448
- 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, Song YM, Park YO, Ko SM, Min SR, Liu JR, Choi PS (2005) The use of glufosinate as a selective marker for the transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Kor J Plant Biotechnol* 32:161-165
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) Maize DNA miniprep. In: Malmberg R, Messing J, Sussex (eds), *Molecular Biology of Plants: A laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York pp:36-37
- 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
- Gal-On A, Wolf D, Antignus Y, Patlis L, Ryu KH, Min BE, Pearlsman M, Lachman O, Gaba V, Wang Y, Shibolet YM, Yang J, Zelcer A (2005) Transgenic cucumbers harboring the 54-kDa putative gene of Cucumber fruit mottle mosaic tobamovirus are highly resistant to viral infection and protect non-transgenic scions from soil infection. *Transgenic Res* 14:81-93
- Gupta N, Rathore M, Goyary D, Khare N, Anandhan S, Pande V, Ahmed Z (2012) Marker-free transgenic cucumber expressing *Arabidopsis cbf1* gene confers chilling stress tolerance. *Biol Plant* 56:57-63
- Guy L (1990) Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Ann Rev Plant Physiol* 41:187-223
- 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.). *Kor J plant Biotechnol* 38:198-202
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6:3901-3907
- Kim HA, Lee BY, Jeon JJ, Choi DW, Choi PS, Utomo SD, Lee JH, Kang TH, Lee YJ (2008) GUS gene expression and plant regeneration via somatic embryogenesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Kor J Plant Biotech* 35:275-280
- Lee MS (2008) Identification and functional analysis of a *Arabidopsis* NIT1 gene in abiotic stress tolerance. A master's thesis, Chonnam national university
- Ma S, Gong Q, Bohnert HJ (2006) Dissecting salt stress pathways. *J Exp Bot* 57:1097-110
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Kishimoto K, Nishizawa Y, Tabei Y, Hibi T, Nakajima M, Akutsu K (2002) Detailed analysis of rice chitinase gene expression in transgenic cucumber plants showing different levels of disease resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Sci* 162:655-662
- Simmonds DH, Donaldson PA (2000) Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of short-season soybean genotypes. *Plant Cell Rep* 19:485-490
- Southern E (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503-512
- Szwacka M, Krzymowska M, Osuch A, Kowalczyk ME, Malepszy S (2002) Variable properties of transgenic cucumber plants containing the thaumatin II gene from *Thaumatococcus daniellii*. *Acta Physiol Plant* 24:173-185
- Trulson AJ, Simpson RB, Shahin EA (1986) Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants with *Agrobacterium rhizogenes*. *TAG* 73:11-15