

## 저온 관련 유전자를 이용한 상추 (*Lactuca sativa* L.) 의 형질전환

정재훈 · 양덕춘<sup>1</sup> · 장홍기<sup>2</sup> · 백기엽\*

충북대학교 첨단원예기술개발연구소, <sup>1</sup>한국인삼연구소, <sup>2</sup>전남대학교 응용생물학부

### Transformation of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Using Cold Regulated Gene (*BN115*)

JEONG, Jae Hun · YANG, Deok Chun<sup>1</sup> · JANG, Hong Gi<sup>2</sup> · PAEK, Kee Yoeup\*

Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology, Chungbuk National University,  
Cheongju, 361-763, Korea

<sup>1</sup>Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon, 305-345, Korea

<sup>2</sup>Faculty of Applied Plant Science, College of Agriculture, Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Korea

**ABSTRACT** Explants of lettuce (*Lactuca sativa* L.) were co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101 strain containing nptII gene and cold regulated gene (*BN115*) from *Brassica napus* for transformation. Multiple shoots were obtained from the explants in the selection medium (MS basal medium supplemented with 100 mg/L kanamycin, 500 mg/L carbenicillin, 0.1 mg/L NAA, 0.5 mg/L kinetin) after 3 to 4 weeks of co-culture. The putative transgenic shoots were transferred to rooting medium (1/2 MS basal medium supplemented with 100 mg/L kanamycin and 250 mg/L carbenicillin). The selected shoots were tested with PCR analysis using nptII, *BN115* primers whether cold-regulated gene was introduced to genome of the plants. The *vir G* primers were particularly used to check contamination of *Agrobacterium* during PCR analysis. The nptII and *BN115* primers produced the specific PCR bands in the putative transgenic lines but the *vir G* primers did not. These results confirmed that the PCR products were not the result of contamination with *Agrobacterium*. Additionally the Southern analysis of the PCR products and RT-PCR analysis proved that the cold-regulated gene was successfully integrated and transcribed in the putative transgenic lettuce plants.

**Key words:** *Agrobacterium* contamination, PCR, Transformation, *vir G*

## 서 론

식물은 토양에 고정되어 있는 특성 때문에 변화하는 주위 환경에 많은 영향을 받게되며, 이러한 환경 stress를 극복하고 생존하기 위해서 여러 가지 방어기작들을 발달시켜 왔다. 특히 저온 stress에 대한 식물의 방어기작은 이것이 많은 작물들의 생존과 생산량의 감소에 직결되는 중요한 환경요인이므

로 많은 연구가 진행되고 있다. 주로 ABA, jasmonic acid, 수분, 빛, 온도 등 생리적 측면에서 연구들이 진행되어 왔으며 (Goldstein and Nobel 1994; Gusta et al. 1996; Gray et al. 1997), 최근에는 생화학 및 분자생물학적 연구들이 진행되면서 저온 stress의 신호전달체계에 대한 보고 (Los et al. 1994) 와 *Arabidopsis* (Horvath et al. 1993; Jarillo et al. 1993), 알팔파 (Wolfrim et al. 1993), 유채 (Weretilnyk et al. 1993), 감자 (Berkel et al. 1994) 등 많은 식물체에서 저온 stress에 의해 선택적으로 발현되는 유전자들이 분리되어 연구되고 있다. 또한 저온순화시 발현되는 많은 유전자들이 잠재적으로

\*Corresponding author. Tel 0431-261-2529  
E-mail paekky@cbucc.chungbuk.ac.kr

내한성에 관여하는 효소활성과 밀접한 관계가 있음이 밝혀지고 있으며 (Thomashow 1999) 이러한 유전자들을 식물체에 도입하여 식물에 저온 내성을 증진시키려는 연구들이 보고되고 있다 (Murata 1993; McKersie et al. 1993).

본 실험에 사용된 *BN115* 유전자는 겨울유채 품종인 Jet neuf 식물체를 2°C 조건에서 저온처리한 후 발현되는 유전자를 cloning한 것으로 저온처리 후 24시간 안에 잎에서 발현되는 것으로 보고되고 있다 (Weretilnyk et al. 1993).

공시작물인 상추는 대표적인 샐러드용 채소로써 소득이 향상되면서 연중 소비량이 증가하고 있다. 특히 연중 신선한 채소를 원하는 소비자들의 요구에 의해 겨울철에도 온실에서 재배되고 있는데, 최근 시설재배가 확대됨에 따라 겨울철 채소재배가 늘어나고 있다. 한편, 겨울철 시설재배시 난방비용이 생산단가를 올리는 주된 원인이 되고 있는데 만일 상추에 내한성 유전자가 도입되어 저온에 저항성을 가지게 된다면 겨울철 난방에 드는 비용을 절감할 수 있을 것이며 이는 생산단가를 낮추는 직접적인 효과를 가져 올 수 있다.

따라서 본 실험은 날로 그 소비가 증가하는 대표적 샐러드용 채소인 상추에 저온관련 유전자인 *BN115* gene을 도입하여 저온에 내성을 가지는 상추를 선발하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

상추 (*Lactuca sativa* L. cv. Green Skirt. 청치마) 종자를 70% ethanol로 30초간 처리한 뒤 1% NaOCl에 Tween 20을 넣고 15분간 표면살균하였다. 처리된 종자는 멸균수로 3~5번 수세하여 무기염류농도가 1/2로 조절된 MS배지에 (1/2 MS) 호르몬이 무첨가된 고체배지에 치상하였다. 발아는 광조건에서 실시하였고 16시간 일장, 광도 40 PPF ( $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ ), 온도  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도 70%의 생장상에서 모든 배양을 실시하였다. 절편체는 발아 후 분엽이 2~3매 전개된 시기의 잎절편을 1.0 cm<sup>2</sup> 크기로 절단하여 *Agrobacterium*과의 공동배양에 사용하였다.

### 유전자

본 실험에 사용된 *BN115* 유전자는 Agriculture Canada의 Dr. Singh로부터 분양받은 것으로써 겨울철 *Brassica napus*에서 transcript된 저온관련유전자를 cloning한 것이다 (Weretilnyk et al. 1993). Cloning된 유전자는 binary vector (An 1987)인 pBin19에 재조합하여 disarmed Ti-plasmid를 가지는 *A. tumefaciens* GV 3101에 도입하였으며, 이를 실험에 사용하였다. 공시균주의 배양은 50 mg/L kanamycin이 첨가된 LB 액체배지에 접종한 후 1~2일 동안 28°C 암조건에

서 배양하였다.

### 식물체 재분화

상추 잎절편에서의 식물체 재분화를 위하여 NAA (0.1 mg/L)와 BA (0.25~2 mg/L), kinetin (0.25~2 mg/L)을 혼용 처리한 MS기본배지에 상추 잎절편체를 치상하여 상기 조건에서 배양하며 재분화 조건을 조사하였다. 절편체는 상추분엽을 직경 1.5 cm 크기로 절단하여 치상 후 4주 동안 신초의 생성을 관찰, 조사하였다.

### 형질전환

공동배양은 대수증식기까지 증식시킨 *Agrobacterium* 배양액을 멸균수로 10배 희석하여 잎절편체와 5분 정도 접촉하고 멸균여지를 이용하여 건조시킨 후 공동배양배지 (MS salt + 0.1 mg/L NAA + 0.5 mg/L kinetin) 에서 2일간 암배양하였다. 본 실험에 사용된 공시균주는 표지유전자로써 kanamycin 저항성을 가지므로 형질전환체의 선발은 MS기본 배지에 100 mg/L kanamycin과 균의 제거를 위해 500 mg/L carbenicillin을 첨가한 재분화용 선발배지에서 4~6주간 실시하였다. 선발배지에서 살아남은 신초는 1/2 MS, 100 mg/L kanamycin과 250 mg/L carbenicillin이 첨가된 rooting 배지로 계대하여 완전한 식물체로 재분화시켰으며, 이후 이를 이용하여 형질전환체의 특성검정을 실시하였다.

### 형질전환체의 특성검정

형질전환체로 추정되는 식물체의 유전자 도입 여부를 확인하기 위해 PCR 반응을 수행하였다. 식물체 DNA 추출은 식물체의 잎을 이용하여 Edwards 등 (1991)의 방법에 따라 수행하였으며, 먼저 표지유전자인 *npt II* gene을 확인하고자 500 bp의 PCR 산물을 증폭하는 5' - GTGGAGAGGC TATTCGGCTA - 3'과 5' - CCACCATGATATTCGG CAAG - 3' primer를 제작하여 수행하였다. PCR 반응은 Perkin Elmer PCR 기기를 사용하였으며, 반응조건은 96°C에서 3분간 pre-denaturation 반응을 거친 후 96°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분간 반응을 36회 반복하였으며, 최종 72°C에서 15분간 신장반응을 실시하였다. PCR 반응이 끝난 뒤 생성된 PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동 후 EtBr염색을 하여 UV하에서 확인하였다. 한편, PCR 반응시 *Agrobacterium*의 오염에 의한 일어날 수 있는 잘못된 밴드생성을 확인하기 위해 식물형질전환시 식물체내에 도입되지 않는 *vir G* 유전자를 증폭하여 965 bp의 PCR 산물을 만드는 5' - TTATCTGAGTGAAGTCGTCTCAGG - 3'과 5' - CGTCGCCTGAGATTAAGTGTC - 3' primer를 제조하여 오염여부를 검증하고자 하였다. 또한, 이렇게 선발표지유

전자의 도입이 확인된 식물체에서 저온관련 유전자인 *BN115* 유전자의 형질전환여부를 확인하고자 5' - TCATGGCT ATGTCACTCTCAGG - 3' 과 5' - CTAGGAGTTAAGT GGTGAAGC - 3' *BN115* primer를 제작하여 상기 조건과 동일한 조건에서 PCR 반응을 실시하여 454 bp의 *BN115* 유전자의 PCR 산물을 확인하였다. 부가적으로 이렇게 확인된 PCR 산물이 도입하고자 하는 binary vector인 pBin/*BN115* gene 인지를 확인 하고자 PCR DIG labelling mix kit (Boehringer Mannheim)를 이용하여 *BN115* gene의 probe를 제조하고 이를 이용하여 Southern analysis를 실시하였으며, 도입된 유전자의 발현여부를 확인하기 위해 plant total RNA miniprep system (VIOGENE)을 이용하여 대조식물체와 형질전환체의 total RNA를 추출한 후 (주) Bioneer의 PreMix™-RT/PCR Kit I을 이용하여 RT-PCR을 실시하였다. 반응조건은 먼저 cDNA 합성을 위해 42°C에서 30분간 반응한 후 96°C 3분, 55°C 1분, 72°C 3분간 1 cycle을 수행하고 96°C 30초, 55°C 30초, 72°C 1분간 40 cycle 후 72°C에서 15분 수행하였다.

## 결과 및 고찰

### 식물체 재분화

상추의 잎조직을 이용한 재분화 조건을 확립하기 위해 MS 기본 배지에 NAA 0.1 mg/L 와 kinetin (0.25, 0.5, 1, 2 mg/L) 그리고 BA (0.25, 0.5, 1, 2 mg/L)를 농도별로 혼용처리한 배지에 잎절편을 치상하여 조사한 결과, 치상 후 7일부터 조직이 비대되며 절단면에서부터 캘러스의 생성을 관찰할 수 있었으며, 3주 후부터는 신초의 재분화가 이루어졌다. 한편, BA 첨가구에서는 복수의 신초 (multiple shoot)가 유도되는 경향을 보였으며, 생성된 shoot는 유리화되는 현상을 보였으며, BA의 농도가 높아질수록 조직이 캘러스화되어 재분화가 어려운 경향을 보였다 (결과 미제시). 그러나 kinetin 처리구에서는 0.5 mg/L kinetin 첨가배지에서 왕성한 신초의 생성을 볼 수 있었으며, 특히 생성된 신초는 정상적인 형태를 보였으며 뿌리의 생성도 양호하여 정상적으로 성장하였다. 따라서 상추의 재분화 조건을 NAA 0.1 mg/L와 kinetin 0.5 mg/L으로 확립하였으며, 본 실험에서 공동배양배지와 선발배지의 재분화조건으로써 이용하였다 (Figure 1).

### Kanamycin 저항성 식물체 선발

상추 잎절편은 저온 관련 유전자인 *BN115* gene과 표지유전자로써 kanamycin에 저항성이 있는 npt II gene을 가지는 식물발현용 binary vector pBin19/*BN115*를 가지고 있는 *A. tumefaciens* GV 3101과 공동배양 한 후 항생제 kanamycin

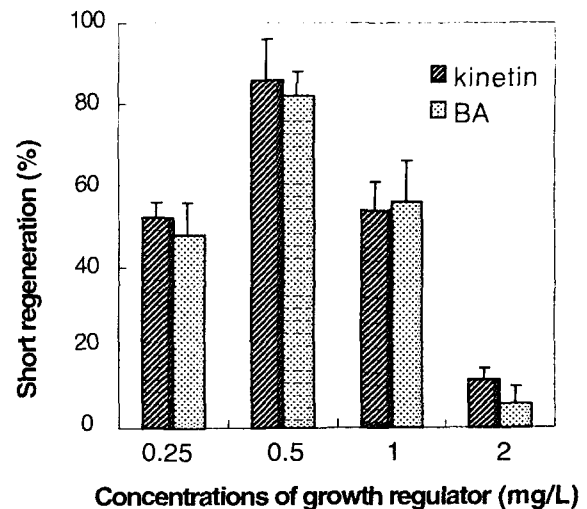


Figure 1. Effect of kinetin and BA on shoot regeneration of lettuce. Leaf explants were cultured on MS medium containing various concentrations of kinetin, BA and 0.1 mg/L NAA. Data were collected after 4 weeks of culture.

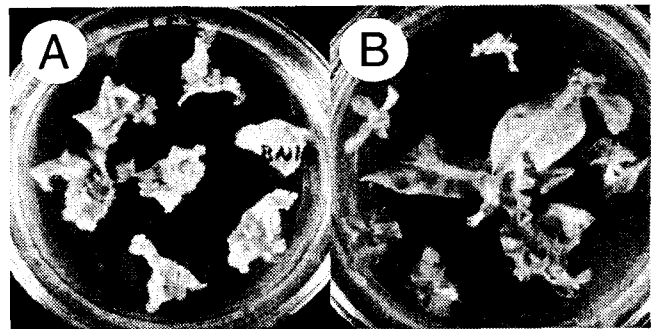


Figure 2. Regeneration of putative transgenic shoots (A) and roots (B) on the selection medium contained 100 mg/L kanamycin.

이 첨가된 선발배지에 치상하여 선발하였다. 항생제 선발조건은 잎절편을 항생제 kanamycin이 농도별 (0, 25, 50, 75, 100 mg/L)로 첨가된 재분화배지에 치상 후 4주가 되는 시기에 생존여부를 조사하였는데, 25 mg/L kanamycin 농도에서부터 절편체가 고사되었다. 따라서 25 mg/L kanamycin 농도를 선발조건으로 할 수 있으나 보다 강력히 발현되는 형질전환체를 선발하고자 100 mg/L kanamycin 농도를 선발조건으로 하여 kanamycin에 저항성을 가지는 shoot를 선발하였다 (Figure 2). 한편, 공동배양한 잎절편체를 선발배지에 치상한 후 4주부터 형질전환체로 추정되는 shoot들이 kanamycin 첨가 배지에서 잎절편체의 절단면에서부터 신초를 유기하며 재분화되기 시작하였으며 (Figure 2A), 이러한 신초는 곧바로 항생제가 첨가된 발근배지로 옮겨져 발근을 유도하였다 (Figure 2B).

### 형질전환체의 특성검정

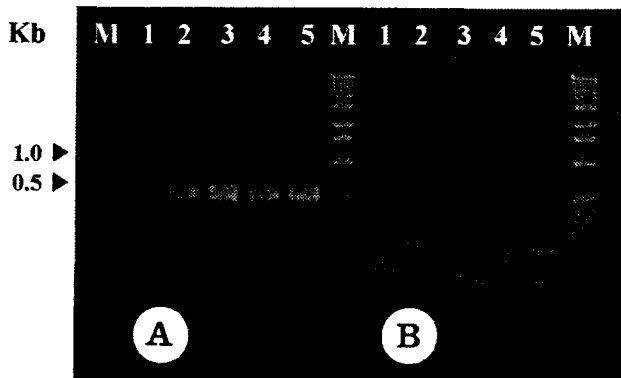
Kanamycin 선발배지에서 생존하여 형질전환체로 추정되

는 식물체들은 PCR 반응을 이용하여 형질전환 여부를 확인하였는데, 먼저 선발배지에서 살아남은 식물체와 정상적인 식물체의 genomic gene을 추출하여 표지유전자인 npt II gene을 증폭하도록 제조된 primer를 이용하여 PCR 반응을 실시하였다. 반응 결과 정상적인 대조식물체는 npt II gene이 증폭되지 않았으나 형질전환체에서는 모두 npt II gene이 증폭되어 500 bp의 밴드가 형성되었다 (Figure 3A). 이는 kanamycin 선발배지에서 생존한 신초에서 추출되어진 DNA에 npt II gene이 존재함을 의미한다. 한편, PCR 반응은 매우 정교하여 극미량의 DNA를 이용하여도 유전자를 확인할 수 있는 장점을 가지는 반면에 미량의 외래 DNA의 혼입, 즉 *Agrobacterium*이 선발과정의 식물체 조직사이에 존재하여 섞이게 된다면 형질전환되지 않은 식물체에서도 PCR 반응결과 특정유전자가 존재하는 것으로 나타나 형질전환 여부가 잘못 판단되어 질 수 있다.

따라서 본 실험에서는 *Agrobacterium*의 Ti-plasmid 내에는 존재하지만 식물체 내로 전이되지 않는 유전자인 *vir G* 유전자를 증폭하여 965 bp의 PCR 산물을 만들도록 제조된 primer를 사용하여 npt II gene이 확인된 식물체를 가지고 PCR 반응을 재 실시하였다. 이 primer를 이용하여 PCR 반응을 실시한다면 *Agrobacterium*이 식물체 내에 존재하여 DNA추출과정에서 섞이게 되었는지를 판단할 수 있을 것이다.

PCR반응은 상기방법과 같게 하였으며, 그 결과 모든 식물체의 DNA에서 *vir G* 유전자의 증폭을 볼 수 없었다 (Figure 3B). 이는 PCR 반응결과가 *Agrobacterium*에서 기인한 DNA의 증폭이 아님을 확인시켜 주는 결과이다. 따라서 kanamycin 선발에 의해 생존한 식물체에는 표지유전자인 npt II gene이 도입되었음을 확인 할 수 있었다.

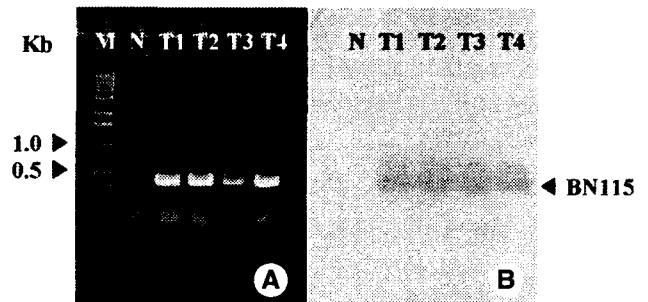
한편, PCR반응에 의해 npt II gene이 확인된 식물체들로부터 저온관련 유전자의 도입여부를 확인하고자 *BN115* gene의 단편을 증폭하도록 제조된 primer를 이용하여 PCR 반응을



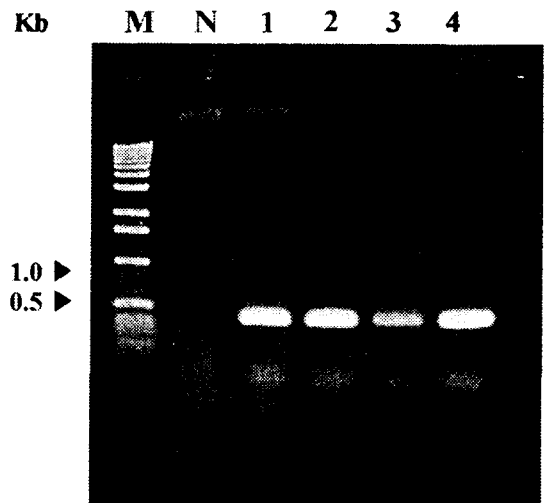
**Figure 3.** Agarose gel electrophoresis. npt II gene (A) and *vir G* gene (B) from transgenic lines by PCR amplification products. M, 1 kb ladder; lane 1, control; lanes 2-5, transgenic lines.

실시한 결과 대조 식물체로 사용한 정상적인 상추식물에서는 특이밴드가 형성되지 않았으나, 형질전환체에서는 454 bp의 유전자 증폭밴드를 확인 할 수 있었다 (Figure 4A). 또한 이러한 454 bp의 PCR 산물이 진정 형질전환시 사용한 binary vector 내에 있는 *BN115* 유전자의 일부분인지를 증명하기 위해 PCR 산물을 전기영동한 후 이를 nylon membrane으로 옮기고 DIG으로 labelling된 *BN115* probe를 이용하여 Southern analysis를 실시하였다. 그 결과 형질전환이 확인된 식물체에서 나타난 PCR 밴드와 동일한 위치에서 밴드의 형성을 확인 할 수 있었다 (Figure 4B). 이와 같은 결과는 선발된 상추식물체에서 도입하고자 하는 저온관련유전자인 *BN115* gene이 성공적으로 도입되었음을 나타내 주는 결과이다.

도입된 *BN115* 유전자의 발현여부의 확인을 위한 RT-PCR 반응 결과 대조식물체의 cDNA에는 *BN115* 유전자의 증폭을 볼 수 없었으나 형질전환체에서는 *BN115* primer에 의한 454 bp의 PCR산물을 확인 할 수 있어 상추 식물체에 도입된 *BN115* 유전자가 안정적으로 발현됨을 확인하였다 (Figure 5).



**Figure 4.** Agarose gel electrophoresis (A) and Southern analysis (B) of PCR products. M, 1 kb marker; N, control; T1-T4, transgenic lines.



**Figure 5.** RT-PCR analysis of transgenic lines introduced *BN115* gene. M, 1 kb marker; lance N, control; 1-4, transgenic lines.

식물의 저온 환경에 대한 반응은 저온순화를 통해 많은 연구가 이루어지고 있다. 식물은 보통 저온순화기간을 거친 후보다 낮은 온도에서도 생존하는데, 이러한 저온순화과정 중 일어나는 식물체의 조직과 세포내에서의 변화에 대한 연구는 식물의 저온에 대한 반응을 연구하는 데 중요한 요인이 된다. 또한, 최근에는 분자생물학적 방법을 이용하여 저온 stress가 어떠한 방법으로 세포 내로 인식되는지에 대한 연구가 진행되고 있는데, Los 등 (1994)은 catalytic hydrogenation 방법을 이용하여 *Cyanobacterium synechocystis* PCC6803의 plasma membrane의 불포화도를 변화시킴으로 저온 처리시 발현되는 유전자인 *desA* 유전자의 발현을 조절 할 수 있었음을 보고하여 *desA* 유전자의 발현이 저온 stress로 인한 것이 아니라 저온조건에 의한 원형질막의 유동성의 감소에 따른 것임을 증명하였다. 또한, Uemura와 Steponkus (1994)는 귀리와 호밀 잎의 원형질막의 지질구성을 비교함으로써 각 식물의 내한성을 비교하였는데, 이들 식물의 원형질막의 지질구성 차이가 내한성과 관계 있음을 보고하였다. 그러나 이러한 결과들은 고등식물체가 저온환경을 감지하는 기작의 일부분으로써 아직 많은 부분이 밝혀져 있지 않다. 따라서 저온 stress에 대한 식물의 반응에 대한 이해와 식물에 저온저항성을 부여하기 위해 저온처리시 식물에서 발현되는 다양한 유전자들이 연구되고 있다. Wolfraim 등 (1993)은 저온 저항성을 가진 알팔파 (*Medicago falcata* cv Anik)의 현탁배양조직에서 분리한 *cas18* (cold acclimation-specific) 유전자가 저온순화시 얻어진 freezing tolerance와 서로 연관이 있음을 보고하였으며, Horvath 등 (1993)은 *Arabidopsis thaliana*에서 cold-regulated gene (*cor78*)을 분리하였다. 또한 McKersie (1993) 등은 superoxide dismutase gene을 도입한 알팔파 (*Medicago sativa* L.) 식물체가 저온 stress에 저항성을 가짐을 확인하였으며, glycerol-3-phosphate acyl-transferase 유전자가 도입된 담배에서도 역시 저온저항성을 확인하였다 (Murata 1993). 한편, *BN115* 유전자는 2°C에서도 약 10주 동안 안정되게 발현된다고 보고되었는데 (Weretilnyk et al, 1993), 이는 겨울철 기간 동안 재배되는 상추의 생육기간이 정식 후 4주에서 6주 정도인 것으로 볼 때 본 *BN115* 유전자가 도입된 형질전환상추는 생육초기의 저온순화에 의해 생육기간 동안 안정적으로 유전자가 발현 될 수 있을 것으로 사료된다.

본 실험은 저온관련 유전자인 *BN115* 유전자를 겨울상추인 청치마 품종에 도입하였으며, 유전자의 도입과 발현여부는 PCR과 Southern analysis 그리고 RT-PCR analysis를 이용하여 확인하였다. 그러나 이렇게 도입된 저온 유도성 유전자인 *BN115* gene이 형질전환체에 어느 정도의 내한성을 부여하는지는 계속적으로 연구되어야 할 것으로 사료된다.

## 적 요

저온관련 유전자인 *BN115* gene과 표지유전자인 *npt II* gene을 함유하고 있는 *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101 균주를 이용하여 겨울상추품종인 청치마의 잎절편과 공동배양하는 방법으로 형질전환 시켰다. 상추의 잎절편을 *Agrobacterium*과 공동배양 후 MS 기본배지에 100 mg/L kanamycin, 500 mg/L carbenicillin, 0.1 mg/L NAA, 0.5 mg/L kinetin을 첨가한 선발배지에 치상하였는데, 치상 후 3~4주부터 절편체로부터 multiple shoot들이 생성되기 시작하였다. 선발배지에서 살아남은 선발체들은 1/2 MS배지에 100 mg/L kanamycin, 250 mg/L carbenicillin이 첨가된 발근배지로 옮겨졌다. 한편, 선발된 shoot들은 PCR 반응을 이용하여 도입유전자의 삽입여부를 확인하였다. PCR 반응은 표지유전자인 *npt II*와 저온관련 유전자인 *BN115* 및 식물에 도입되지 않는 *vir G* 유전자를 각각 특이적으로 증폭하는 primer를 가지고 실시하였다. PCR 반응 결과 대조구로 쓰인 정상 상추식물체에서는 *npt II*와 *BN115* 유전자의 증폭을 볼 수 없는 반면에 형질전환체에서는 두 유전자 모두 PCR 증폭 산물을 확인할 수 있었다. 또한 확인된 식물체의 DNA에서는 *vir G* 유전자가 발견되지 않아 이는 *Agrobacterium*의 혼입에 의한 결과가 아님을 다시 한번 증명하였다. 또한 선발된 형질전환체를 이용하여 Southern analysis와 RT-PCR을 실시한 결과 내한성 유전자가 상추 식물에 안정적으로 도입되어 발현됨을 확인하였다.

## 인용문헌

- An G (1987) Binary Ti vector for plant transformation and promoter analysis. *Methods in Enzymol* 153:292-305
- Berkel JV, Salamini F, Gebhardt C (1994) Transcripts accumulating during cold storage of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers are sequence related to stress-responsive genes. *Plant Physiol* 104:445-452
- Edwards K, Johnston C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19:1349
- Gray GR, Chauvin LO, Sarhan F, Huner NPA (1997) Cold acclimation and freezing tolerance; a complex interaction of light and temperature. *Plant Physiol* 114:467-474
- Goldstein G, Nobel PS (1994) Water relations and low-temperature acclimation for cactus species varying in freezing tolerance. *Plant Physiol* 104:675-681
- Gusta LV, Wilenn RW, Fu P (1996) Low-temperature stress tolerance: the role of abscisic acid, sugars, and heat-stable proteins. *HortSci* 31:39-46

- Horvath DP, McLamey BK, Thomashow MF** (1993) Regulation of *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) *cor* 78 in response to low temperature. *Plant Physiol* **103**:1047-1053
- Jarillo JA, Leyva A, Salinas J, Martinez-Zapater JM** (1993) Low temperature induces the accumulation of alcohol dehydrogenase mRNA in *Arabidopsis thaliana*, a chilling-tolerant plant. *Plant Physiol* **101**: 833-837
- Los DA, Vigh L, Murata N** (1994) Membrane fluidity and gene regulation: triggering the expression of the desaturase gene. Proceeding of the 32rd NIBB conference, "Stress-induced genes of plants with emphasis on their functions", Okazaki Japan. pp 6-8
- McKersie BD, Chen Y, de Beus M, Bowley SR, Bowler C, Inze D, D'Halluin K, Botterman J** (1993) Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol* **103**:1155-1163
- Murata N** (1993) Genetic engineering of chilling sensitivity. Proceeding of the 7th symposium on plant biotechnology, Seoul Korea. pp 107-112
- Thomashow MF** (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanism. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**:571-599
- Uemura M, Steponkus PL** (1994) A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance. *Plant Physiol* **104**:479-496
- Weretilnyk E, Orr W, White TC, Lu B, Singh J** (1993) Characterization of three related low-temperature-regulated cDNAs from winter *Brassica napus*. *Plant Physiol* **101**:171-177
- Wolfrain LA, Langis R, Tyson H, Dhindsa RS** (1993) cDNA sequence, expression, and transcript stability of a cold acclimation-specific gene, *cas18*, of alfalfa (*Medicago falcata*) cells. *Plant Physiol* **101**:1275-1282

(접수일자 1999년 9월 27일)