

잡초성벼의 superoxide dismutase cDNA cloning과 재배벼로의 형질전환

박상규* · 박종석¹⁾ · 이승인^{1)a)} · 서석철¹⁾ · 김병극²⁾ · 조윤래²⁾ · 서학수³⁾

대구대학교 생명환경학부, ¹⁾농업과학기술원 생물자원부, ²⁾영남대학교 생물산업공학부, ³⁾생물자원학부
(2002년 5월 6일 접수, 2002년 5월 14일 수리)

Isolation of Superoxide Dismutase cDNAs from an Weedy Rice Variety and Transformation of a Cultivated Rice Variety

Sang-gyu Park*, Seung-In Lee¹⁾, Jong-Suk Park¹⁾, Suk-Chul Suh¹⁾, Byung-Keuk Kim²⁾, Youl-Lae Jo²⁾, and Hak-Soo Suh³⁾ (Department of Agricultural Chemistry, Daegu University, Gyungbuk 712-714, Korea, ¹⁾Division of Bioresources, NIAST, Suweon, Gyunggi do 441-707, Korea, ²⁾Department of Applied Microbiology, ³⁾Agronomy, Yeungnam University, Gyungbuk 712-749, Korea)

ABSTRACT: Two different cDNA clones for superoxide dismutase (SOD) were isolated from an weedy rice variety (*Oryza sativa*, cv. Bhutan14Ad) and were introduced into a cultivated rice variety (*Oryza sativa*, cv. Nakdong) in order to develop the environmental stress-resistant rice plants. Sequence analysis of the cloned cDNAs indicated that the deduced amino acid sequence of SOD-A is 88.4% identical to that of SOD-B. Furthermore, the nucleotide sequence of SOD-A is 99.3% identical to that of a Cu/Zn SOD gene of *Oryza sativa* (GenBank accession No. L36320). The nucleotide sequence of SOD-B was identical to that of the previously published SOD gene (Accession No. D01000). A cultivated rice variety, Nakdong-byeo, was transformed with chimeric SOD genes containing a actin promoter of rice and *pin2* terminator using a particle bombardment technique. Transformed calli were selected on an selection medium containing phosphinothricin (PPT). Transgenic rice plants were regenerated from the PPT-resistant calli. PCR analysis with genomic DNAs from transgenic plants revealed that transgenes are introduced into rice genome.

Key words: superoxide dismutase, reverse transcriptase-PCR, weedy rice variety, phosphinothricin

서 론

식물은 온도의 변화, 빛의 강도, 한발 등과 같은 무생물학적인 환경요인이나 병원성 미생물, 곤충 등과 같은 생물학적인 환경요인에 의해 야기되는 각종 스트레스에 대해 적응하면서 성장한다. 즉 식물은 외부로부터의 각종 스트레스를 인지하고, 이것을 전달하는 신호체계 그리고 그것에 대응하는 능력을 가지고 있다¹⁾. 온대지방의 많은 작물은 초기 성장 동안에 낮은 온도와 한발에 의해 스트레스를 받는다. 특히 발아 시기나 초기 어린 식물체의 경우 그 정도는 성장한 식물체에 비해 심하게 영향을 받는다. 낮은 온도에 의한 스트레스는 활성산소종인 superoxide radical, hydroxy radical, singlet

oxygen, 과산화수소 (H_2O_2) 등에 의해 매개된다²⁾. 이러한 활성산소종의 생성은 성장과 발달과정에 있어서 흔한 현상이다³⁾. 정상적인 성장과 발달 동안에 식물체는 한발, 열, 추위, 오염물질, 자외선 등의 여러 가지 형태의 스트레스에 노출되어 있다. 그리고 활성산소종은 이러한 조건에서 일반적으로 생산된다⁴⁾. 활성산소종은 그것들의 화학적 성질에 의해 막 지질, 단백질, 엽록소, 핵산 등에 피해를 주며 생물체의 항상성을 파괴한다⁵⁾. 이러한 각종 외부의 무생물학적 스트레스에 대해 저항성이 뛰어난 식물체를 육종하기 위해 이들 스트레스 조절기구에 관련된 유전자들을 선발하고 최근에는 이들 유전자들을 유용한 식물체에 도입하여 환경스트레스에 저항성을 가진 식물체를 육성하고 있다.

식물체는 활성산소종에 의한 피해를 막거나 줄이기 위해 자연적인 항산화제인 ascorbic acid (vitamin C), α -tocopherol 등을 이용하거나 superoxide dismutase (SOD), catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase 등의 항산화 효소들을 이용하여 제거한다⁶⁾. 항산화 효소들은 식물체에 존재하며 저온, 자외선,

*연락처:

Tel: +82-53-850-6750 Fax: +82-53-850-6759

E-mail: sgpark@daegu.ac.kr

^{a)} 현소속: 국립종자관리소

오존 등에 대한 적응으로 항산화 효소들의 동위 효소들이 변화하거나 스트레스를 받으면 상대적인 양이 변화한다^{6,7)}. 또한 SOD 유전자를 식물체에 과량 발현시켰을 때 활성산소에 의한 스트레스를 잘 견뎠다고 한다⁸⁻¹¹⁾. 이에 따라 본 연구에서는 추위나 한발에 잘 견디는 잡초성벼에서 SOD 유전자를 분리하여 재배벼에 도입시켜 재배벼의 항산화 능력을 높여 추위에 대한 스트레스에 저항성을 갖는 벼를 개발하려 하였다. 또한 제초제 bialophos 저항성 유전자 (*bar*)¹²⁾를 SOD 유전자와 함께 벼에 도입시켜 환경 스트레스 저항성 및 제초제 저항성을 나타내도록 시도하였다.

재료 및 방법

식물 재료

잡초성벼인 Bhutan계열 (Bhutan14Ad)¹³⁾로부터 total RNA를 분리하였고 재배벼인 낙동벼는 재조합 DNA를 도입시키기 위한 재료로 이용하였다.

RNA 분리

10 cm 유효를 4°C에서 48시간 처리한 후 20°C에서 24시간 지난 후 잎에서 total RNA를 Prescott와 Martin의 방법¹⁴⁾에 따라 분리하였다. 분리한 total RNA는 100 µL의 DEPC-처리한 멸균수로 용해시킨 후 분광광도계로 RNA 농도와 순도를 측정하였다. Total RNA로부터 mRNA의 분리는 Promega의 mRNA isolation system을 이용하여 제공한 manual에 따라 수행하였다.

Reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) 및 cDNA 합성

Reverse transcriptase-PCR을 위한 primer들은 GenBank에 등록되어 있는 벼의 Cu-Zn superoxide dismutase 유전자 염기서열¹⁵⁻¹⁷⁾을 이용하였던 바, 5' 말단은 벼에의 sub-cloning을 위해 제한효소자리인 EcoRI (5'-GAATTC-3')을 부가한 5'-CCG GAA TTC ACA TA/TA/G ACA ATG GTG AAG GCT G-3'의 31-mer와 3' 말단은 제한효소자리인 BamHI (5'-GGATCC-3')을 첨가한 5'-GCC GGA TCC TGT AIG TTG GAA AGT TGA GAC GTC-3'의 33-mer를 제조하였다. 합성된 first strand cDNA는 sodium acetate 용액과 에탄올로 침전시키고 진공건조 후 멸균수로 용해하였다. PCR은 Takara사의 LA Taq DNA polymerase를 사용하였다. PCR 반응 조건은 다음과 같다. Takara LA Taq (5 units/µL) 0.5 µL, 10X LA PCR buffer 5.0 µL, 25 mM dNIP mixture (2.5 mM each) 8.0 µL, template cDNA, 5'-primer 10 pmol, 3'-primer 10 pmol에 멸균수를 첨가하여 전체 50 µL로 하였다. 혼합액을 95°C에서 2분간 반응시킨 후, 98°C 10초 (denaturation), 55°C 30초 (annealing), 72°C 40초 (polymerization)의 순환과정을 25~40 cycle 반복한 후 4°C가 되도록 하였다. 합성된 PCR 산물은 sodium acetate 용액과 ethanol로 침전시키고 진공건조 후 멸균수로 용해하였다.

Subcloning, 염기서열분석, 식물형질전환 벡터로의 도입

RT-PCR 산물의 벡터로의 subcloning은 Sambrook 등¹⁸⁾의 방법에 따라 수행하였다. EcoRI /BamHI으로 절단한 pBluescript SK(+)에 ligation한 후 *E. coli* XL1에 형질전환하여 plasmid를 분리하였다. DNA의 ligation 여부는 분리한 plasmid DNA를 제한효소로 절단한 후 1% agarose gel 전기영동으로 확인하였다. ABI 377 자동염기서열 분석기를 이용하여 DNA 염기서열을 결정하였다. 분리한 SOD-A와 SOD-B cDNA를 식물형질전환용 벡터에 삽입하기 위하여 벼에서 특히 발현을 증대시킨다고 알려진 rice actin 유전자 (*Act1*)의 promoter에 SOD 유전자를 결합하고 terminator는 식물 형질전환에 일반적으로 이용하는 potato proteinase inhibitor II 유전자 (*pin2*)의 terminator를 결합하여 *Act1-SOD-pin2*의 재조합 유전자를 제조하였다. 재조합 유전자의 연결부위의 염기서열을 결정하여 제대로 재조합 유전자가 제조되었는지 확인하였다. 본 실험에 이용한 식물 형질전환용 벡터 (pARI7)는 제초제 bialophos 저항성 유전자 (*bar*)¹²⁾를 함유하고 있으며 농업과학기술원에서 벼의 형질전환에 이용했던 것을 분양 받아 이용하였다.

벼의 형질전환 및 재분화

벼의 형질전환은 유전자 총을 이용하는 방법^{19,20)}으로 실시하였다. 형질전환체의 1차 선발을 위해 phosphinothricin (PPT)가 500-1,000 mg/l 들어있는 배지에서 형질전환된 캘러스를 선발하였다. 유전자총을 이용한 벼의 형질전환은 Bio-Rad의 Particle Delivery System (PDS-1000)을 사용하였다. 그 조건은 다음과 같다. 진공은 28 inches Hg, 목적물과의 거리는 9 cm, 헬륨 압력은 1,100 psi, microcarrier 입자의 크기는 1.0 µm 금이었다. 유전자총의 목적물은 낙동벼를 기내 배양하여 얻은 캘러스를 이용하였으며, 금 입자에 코팅한 재조합 DNA 5 µL (1 µg/µL)을 미량원심분리관에 가하여 microcarrier 입자에 코팅하여 일반적으로 사용하는 방법에 따라 실시하였다. 형질전환 낙동벼의 재분화는 발표된 bialophos 저항성 형질전환 벼의 개발 방법²¹⁾에 따라 시행하였다.

벼 genomic DNA 분리 및 PCR

벼의 genomic DNA 분리는 Park과 Ryu²²⁾의 방법에 따라 수행하였으며 PCR 반응조건은 상기 RT-PCR 방법과 동일하였다. PCR primer의 염기서열은 *actin* promoter 부위의 5'-TGC AGC CTC GTG CCG AGC TTT-3'과 *pin2* terminator 부위의 5'-GAC CCT AGA CTT GTC CAT CTT-3'이며, PCR 산물은 1% agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

결과 및 고찰

냉해 저항성이 강한 잡초성벼인 Bhutan14Ad¹³⁾의 SOD cDNA를 RT-PCR을 이용하여 두 종류의 cDNA clone을 획득하여 SOD-A와 SOD-B로 각각 명명하였고 염기서열은 Fig. 1과 같다. 두 클론의 핵산염기 서열의 상동성은 84.4%이었고

85

gaattcacattaacaATGGTGAAGGCTGTTGTTGTGCTTGGTAGCAGTGAGATTGTTAAGGGCACTATCCACTTTGTCCAAGAGG
 gaattcacattaacaATGGTGAAGGCTGTTGTTGTGCTTGGTAGCAGTGAGGGTGTCAAGGGCACTATCTTTTTCTCCAAGAGG

170

GAGATGGTCCCACCCTGTGACTGGAAGTGTCTCTGGCCTCAAGCCTGGTCTCCATGGGTTCCATATTCATGCACTTGGTGACAC
 GAGATGGTCCGACCTCTGTGACGGGAAGTGTCTCTGGGCTCAAGCCAGGGCTCCATGGATTCCATGTGCACGCGCTCGGTGACAC

255

CACCAATGGTTGCATGTCAACTGGGCCACACTACAATCCTGCCGAAAGGAGCATGGAGCACCAGAAGATGAGACCCGCCATGCT
 CACTAATGGCTGCATGTCAACTGGACCACACTCAATCCTACTGGGAAGGAACATGGGGCACCACAAGATGAGAACCCGCCATGCC

340

GGTGATCTTGAAATGTACCCTGGAGAGAGTGGTGTGCTAATATCCATGTTGTTGACAGTCAGATCCACTTACTGGACCAA
 GGTGATCTTGAAATATAACAGCTGGAGCAGATGGTGTGCTAATGTCAATGTCTCTGACAGCCAGATCCCCTTACTGGAGCAC

425

ATTCATCATTGGCAGAGCCGTGTTGTGCATGCCGATCCTGATGATCTTGGAAAGGGTGGGCACGAGCTGAGCAAGACCACCGG
 ACTCCATCATTGGCCGAGCTGTTGTTGTCCATGCTGATCCTGATGATCTTGGCAAGGGTGGGCAATGAGCTTAGCAAGACCACTGG

502

AAAAGCTGGTGGCCGIGTTGCTTGCGGGATCATCGGACTTCAAGGCTGAaacctggagggtgaactcaccggaatcc
 AAAATGCTGGGGCCGAGTTGCTTGCGGAAATCATCGGACTCCAGGGTTAGaagctcaattctccaacatacagatcc

Fig. 1. Comparison of nucleotide sequences of SOD-A (upper line) and SOD-B (lower line). Different nucleotides between two sequences are underlined.

염기서열로부터 추측되는 아미노산 서열의 상동성은 88.4%이었다. SOD-A cDNA는 벼의 Cu/Zn SOD mRNA의 염기서열 (GenBank Accession No. L36320)²³과 99.3% 동일하였고, SOD-B는 또다른 Cu/Zn SOD mRNA의 염기서열 (Accession No. D01000)¹⁹과 100% 동일하였다. 따라서 잡초성벼의 SOD 유전자도 일반 재벼의 SOD 유전자와 별다른 차이가 없음을 알 수 있다. 또한 잡초성벼 Bhutan14Ad는 일반 벼와 높은 염기서열 상동성을 갖는 SOD 유전자가 두 종류이상 존재할 것으로 예상된다.

벼는 두 종류의 Mn-SOD (I 과 II) 동위효소, 네 종류의 Cu/Zn-SOD 동위효소를 함유하나 Fe-SOD 동위효소 활성은 보고되지 않았다.²⁴ 그러나 최근에 Fe-SOD mRNA의 염기서열이 보고되었으며,²⁵ Mn-SOD와 Cu/Zn-SOD mRNA들의 염기서열¹⁵⁻¹⁷은 이미 알려져 있는바, 세 종류의 SOD 유전자 모두가 존재할 것으로 판단된다. Cu/Zn-SOD는 한 종류의 엽록체 관련 SOD¹⁷와 세 종류의 세포질 관련 SOD¹⁵ 유전자가 존재하는데 잡초성벼에서 분리한 SOD-A와 SOD-B는 세포질 관련 cDNA이며 이것들 외에 다른 SOD 유전자도 잡초성벼에 존재할 것으로 짐작된다.

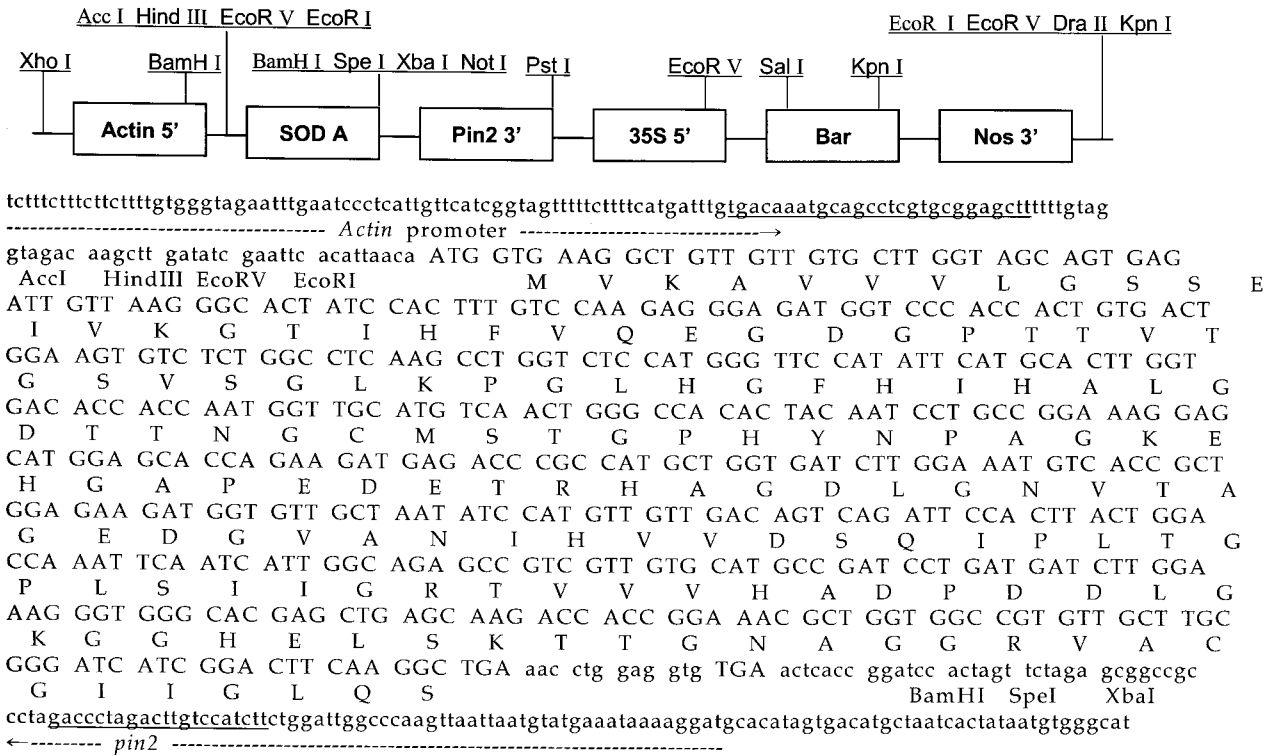
외래 유전자의 식물체내 과다발현에 일반적으로 이용되는 cauliflower mosaic virus 35S (CaMV 35S) promoter는 형질 전환 벼의 모든 세포에서 활성을 띄지 못한다고 알려져 있다.²⁶ 따라서 단자엽 식물인 벼에서 SOD 유전자의 과다 발현을 위해 벼의 actin 1 (*Act1*) promoter를 이용하였는데 벼의 *Act1* promoter는 옥수수의 alcohol dehydrogenase 1 (*Adh1*) promoter 보다 5~10 배나 형질전환 벼 세포에서 활성을 나타낸다고 알려져 있다.²⁷ *Act1* promoter를 함유하고 있는 형질전환 벼인 pARP7을 농업과학기술원 생물자원부로부터 분양

받아 이용하였던 바, pARP7은 제초제 bialophos 저항성 유전자 (*bar*)¹²를 함유하고 있어서 형질전환식물체 선발에 이용하였다. *Act1*-SOD-*pin2*의 재조합 DNA를 제조하고 연결부위는 염기서열 분석에 의해 확인하였다. Terminator는 식물형질전환에 일반적으로 이용하는 감자의 proteinase inhibitor II (*pin2*)²⁸ 유전자의 3' 부위를 함유하고 있다 (Fig. 2).

일반적으로 벼의 형질전환은 원형질체를 이용하는 방법²⁹이 *Agrobacterium*을 이용하는 방법²¹ 및 particle gun을 이용하는 방법^{19,20}보다 안정적인 것으로 알려져 있어서(이승인과 서석철, 미발표) 원형질체를 이용하는 방법을 따를 계획이었으나 원형질체로부터 식물체로의 재분화의 어려움이 있으므로 유전자 총을 이용하는 방법을 시도하였다. 재배벼 중 낙동벼가 유전자 총에 의한 형질전환에 적합하여서 (이승인, 미발표 자료) 낙동벼의 잎조직으로부터 N6 캘러스 유도배지 (참고문헌 21의 N6 callus induction 배지)에서 캘러스를 유도하였고 (Fig. 3A), 캘러스를 배지의 중앙에 모아 재조합 DNA를 코팅한 금 입자를 캘러스에 발사하였고 (Fig. 3B), 적절한 배지 (참고문헌 21의 MS regeneration 배지)에서 shoot를 유도한 후 (Fig. 3C) 식물생장조절제가 없는 배지에서 뿌리를 유도하였다 (Fig. 3D). 캘러스로부터 적절한 영양배지를 이용하여 식물체를 재분화 시켰다.

형질전환 여부를 확인하기 위하여 재분화 중에 있는 벼 잎의 genomic DNA를 분리하여 *actin* promoter의 염기서열과 *pin2* terminator의 염기서열로 구성된 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. *Actin* promoter의 primer 염기서열은 5'-TGC AGC C1C GTG CCG AGC TTT-3'로 Figure 2에 표시된 *actin* promoter 염기서열에 위치하며, *pin2* terminator의 primer 염기서열은 5'-GAC CCT AGA CTT GTC CAT

A



B

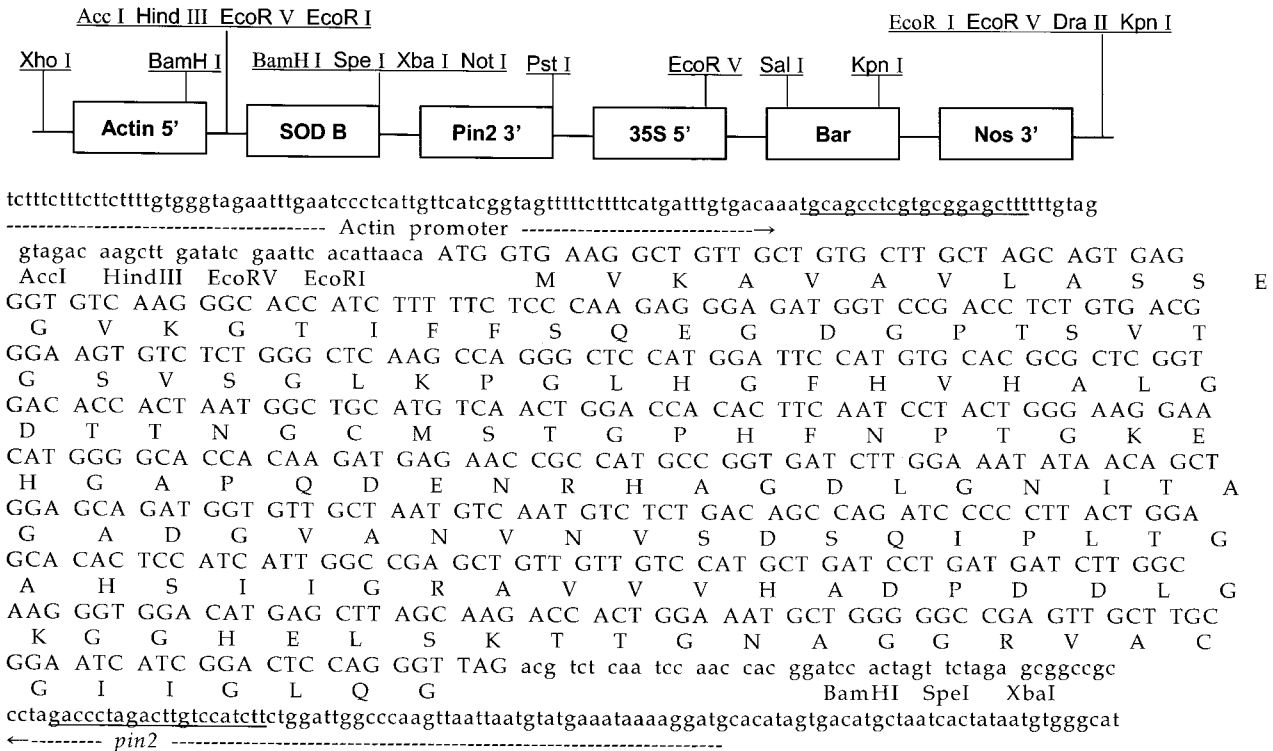


Fig. 2. Constructs used for rice transformation. A, The construct with the Bhutan14Ad SOD-A cDNA; B, The construct with the Bhutan14ad SOD-B cDNA. Nucleotide sequences of SOD coding regions are in capital letters and deduced amino acid sequences are shown in one letter abbreviation. 35S, bar, and nos stand for CaMV 35S promoter, bialophos resistant gene, and nopaline synthase terminator, respectively. Primers used for the PCR analysis of transgenic rice were underlined

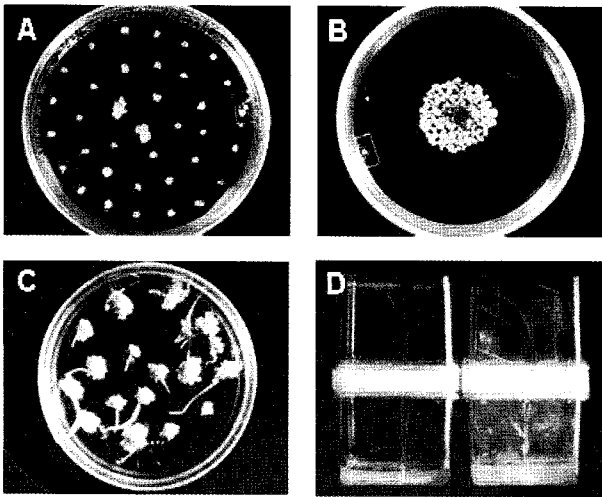


Fig. 3. Transformation of rice plant with chimeric genes containing SOD cDNAs. Callus induction from Nakdong-byeco variety (A). After bombardment of calli (B), rice plantlets were regenerated from the bialophos resistant calli on a selection media (C). Regenerated rice plants growing in jars (D).

CIT-3'과 같다. 형질전환된 벼의 경우 594 염기쌍 크기의 PCR 산물을 생성하는데 그 결과는 Fig. 4와 같다. 여섯 개의 시료에서 예측한 크기의 PCR 산물을 생성하였으며 형질전환하지 않은 벼 잎의 genomic DNA는 PCR 산물을 생성하지 않았다. 이 결과는 재분화 중인 벼가 *actin1-SOD-pin2*의 construct를 함유하고 있다고 판단된다. 따라서 재분화한 벼의 환경 스트레스 저항성 검정은 토양에 옮긴 후 냉해 및 한발 저항성 잡초성벼를 선발한 과정을 따라서 실시하려 한다.

요 약

냉해나 한발등의 환경스트레스에 대해 저항성을 유발하는 유전자를 환경스트레스에 강한 잡초성벼로부터 선발하고 이들 유전자를 재배벼에 도입하여 도입유전자 산물의 과량 발현을 통해 냉해나 한발 등에 대한 저항성이 향상된 벼를 선발하고자 하였다. 잡초성벼인 Bhutan 14Ad로부터 냉해 및 한발 저항성 유전자로 알려진 superoxide dismutase (SOD) cDNA를 분리하고자 mRNA를 분리하고 이 분리된 mRNA를 이용해 reverse transcriptase PCR방법으로 SOD cDNA를 cloning 하였다. 그 결과 2종의 SOD cDNA가 cloning되어 SOD-A, SOD-B로 명명하였다. 이들 cDNA의 염기서열을 결정된 결과 이들은 아미노산 서열 상동성이 88.4%를 나타내었으며, SOD-A는 *Oryza sativa* 계열의 Cu/Zn SOD유전자인 GenBank accession No. L36320와 99.3% 동일하였으며, SOD-B는 accession No. D01000과 100% 동일하였다. 이들 SOD-A와 SOD-B cDNA를 재배벼인 낙동벼에 형질전환하여 형질전환체 벼를 선발하였으며, 이들 형질전환체 벼의 냉해저항성 및 한발저항성 검정을 통해 저항성이 향상된 형질전환체 벼를 선발하고 있다.

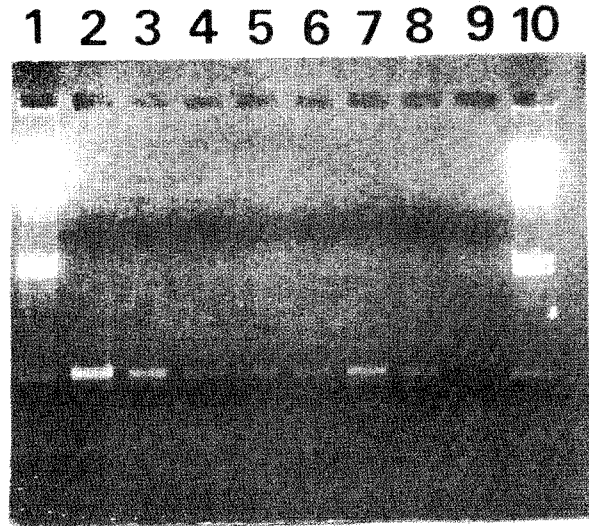


Fig. 4. PCR analysis of genomic DNAs from transgenic rice plants. PCR products were separated on an 1% agarose gel. The individual lanes represent six independent transgenic rice plants (lanes 3-8) in comparison to a nontransformed control plant (lane 9) and plasmid DNA from SOD-A cDNA (see Fig. 2A). Lanes 3~5 and 6~8 were from transgenic plants containing SOD-A and SOD-B, respectively. HindIII-digested lambda DNA were run in Lanes #1 and #10 as molecular size markers. Marker sizes are 23, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0, and 0.56 kb.

감사의 말

본 연구는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구비 지원에 의해 수행된 과제로서 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Fowdon, L., Mansfield, T., and Stoddart, J. (1993) *In Plant Adaptation to Environmental stress*, CHAPMAN & HALL, N.Y.
2. Wise, R. R. and Naylor, A. W. (1987) Chilling-enhanced photooxidation; The peroxidative destruction of lipids during chilling injury to photosynthesis and ultrastructure, *Plant Physiol.* **83**, 272-277.
3. MaKersie, B. D. and Leshem, Y. Y. (1994) *In Stress and stress coping in cultivated plants*. p383. Kluwer academic publishers, Dordrecht.
4. Rao, M. V., Paliyath, G., and Ormrod, D. P. (1996) Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzyme of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol.* **110**, 125-136.
5. Scandalios, J. G. (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases, *Plant Physiol.* **101**, 7-12.
6. Anderson, M. D., Prasad, T. K. and Stewart C. R. (1995)

- Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings, *Plant Physiol.* 109, 1247-1257.
7. Asada, K. and Tsuji, H. (1995) Changes in organelle superoxide dismutase isozyme during air adaptation of submerged rice seedlings; differential behavior of isozymes in plastids and mitochondria, *Planta* 196, 606-613.
 8. Sen Gupta, A., Heinen, J. L., Holaday, A. S., Burke, J. J. and Allen, R. D. (1993) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 1629-1633.
 9. McKersie, B. D., Chen, Y., Debeus, M., Bowley, S. R., Bowler, C., Inze, D., D'Halluin, K. and Botterman, K. (1993) Superoxide dismutase enhances tolerance to freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.), *Plant Physiol.* 103, 1155-1163.
 10. Allen, R. D. (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants, *Plant Physiol.* 107, 1049-1054.
 11. Pinhero, R. G., Rao, M. V., Paliyath, G., Murr, D. P. and Fletcher, R. A. (1997) Changes in activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings, *Plant Physiol.* 114, 695-704.
 12. Mullineaux, P. M. (1992) Genetically engineered plants for herbicide resistance. In *Plant Genetic Manipulation for Crop Protection*. Gatehouse, A. M. R., Hilder, V. A., and Boulter, D. eds., p.75-107. CAB International, Wallingford.
 13. Suh, H. S., Suh, J. P., Ahn, S. N., and Moon, H. P. (1999) QTL analysis on cold tolerance at seedling stage of Korean weedy rice, *Korean J. Breeding* 31, 434-439.
 14. Prescott, C and Martin, M (1987) A rapid method for the quantitative assessment of levels of specific mRNAs in plants, *Plant Mol. Biol. Rep.* 5, 222-234.
 15. Sakamoto, A., Ohsuga, H. and Tanaka, K. (1992) Nucleotide sequences of two cDNA clones encoding different Cu/Zn-superoxide dismutases expressed in developing rice seed (*Oryza sativa* L.), *Plant Mol. Biol.* 19, 323-327.
 16. Fitch, W. M. and Ayala, F. J. (1994) The superoxide dismutase molecular clock revisited, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 6802-6807.
 17. Kaminaka, H., Morita, S., Yokoi, H., Masumura, T. and Tanaka, K. (1997) Molecular cloning and characterization of a cDNA for plastidic copper/zinc-superoxide dismutase in rice (*Oryza sativa* L.), *Plant Cell Physiol.* 38, 65-69.
 18. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) In *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 19. Klein, T. M., Knowlton, S. and Arentzen, R. (1991) Gene transfer by particle bombardment. In *Plant Tissue Culture Manual*, pp D1:1-12, Lindsey, K. ed., Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
 20. Heiser, W. (1992) Optimization of biolistic transformation using the helium-driven PDS-1000/He system, *Bio-Rad Bulletin.* 1688, 1-7.
 21. Lee, H. Y., Lee, C. H., Kim, H. I., Han, W. D., Choi, J. E., Kim, J. H., and Lim, Y. P. (1998) Development of bialaphos-resistant transgenic rice using *Agrobacterium tumefaciens*, *Kor. J. Plant Tissue Culture.* 25, 283-288.
 22. Park, S. and Ryu, J. B. (1998) Clone identification of *Cudraria tricuspidata* and *Hibiscus syriacus* by using PCR and Southern hybridization, *Agric. Chem. and Biotech.* 41, 42-46.
 23. Pan, S. M. and Huang, G. B (1994) Cloning and expression of CuZnSOD from rice, (unpublished GenBank Accession No. L36320)
 24. Kanematsu, S. and Asada, K. (1989) Cu-Zn-superoxide dismutase in rice: occurrence of an active, monomeric enzyme and two types of isozyme in leaf and non-photosynthetic tissue, *Plant Cell Physiol.* 30, 381-391.
 25. Kaminaka, H., Morita, S., Tokumoto, M., Yokoyama, H., Masumura, T., and Tanaka, K. (1999) Molecular cloning and characterization of a cDNA for an iron-superoxide dismutase in rice (*Oryza sativa* L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 302-308.
 26. Tereda, R. and Shimamoto, K. (1990) Expression of CaMV 35S-GUS gene in transgenic rice plants, *Mol. Gen. Genet.* 220, 389-392.
 27. McElroy, D., Zhang, W., Cao, J., and Wu, R. (1990) Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation, *Plant Cell*, 2, 163-171.
 28. Park, S. and Thornburg, R. W. (1996) Loss of specific sequences in a natural variant of potato proteinase inhibitor II gene results in a loss of wound-inducible gene expression, *Agric. Chem. and Biotechnol.* 39, 104-111.
 29. Wen, F., Peng, J. Lister, R. M., and Hodge, T. K. (1991) A procedure for regenerating Japonica and Indica varieties of rice from protoplasts, *Plant Mol. Biol. Rep.* 9, 308-321.