

토마토 과실에서 Superoxide Dismutase를 과발현하는 형질전환 식물체

박은정 · 이행순 · 권석윤 · 최관삼¹ · 곽상수*

한국생명공학연구원 식물세포공학연구실, ¹충남대학교 농생물학과

Transgenic Tomato Plants That Overexpress Superoxide Dismutase in Fruits

PARK, Eun-Jeong · LEE, Haeng-Soon · KWON, Suk-Yoon · CHOI, Kwan-Sam¹ · KWAK, Sang-Soo*

Plant Cell Biotechnology Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Oun-dong 52, Yusong, Taejeon 305-333, Korea

¹Department of Agricultural Biology, Chungnam National University, Yusong, Taejeon 305-764, Korea

ABSTRACT Superoxide dismutase (SOD) plays an important role in cellular defense against oxidative stress in plants. We have developed transgenic tomato plants overexpressing a cassava SOD in fruits. Three transgenic tomato plants (one from cv. Pink forcer and two from cv. Koko) using a new vector system, ASOp::mSOD1/pBI101, harboring ascorbate oxidase promoter (ASOp) expressing dominantly in cucumber fruits, CuZnSOD cDNA (*mSOD1*) isolated from cultured cells of cassava, and *nptII* gene as a selectable marker were successfully developed. SOD specific activity (units/mg protein) in transgenic fruits of both cultivars was increased with maturation of the fruits. SOD specific activity of well-mature fruits in transgenic Pink forcer and Koko showed approximately 1.6 and 2.2 times higher than control fruits, respectively. The strength of SOD isoenzyme bands well reflected the SOD activity during the fruit maturation. These results suggested that SOD gene was properly introduced into tomato fruits in a fruit-dominant expression manner by ASO promoter.

Key words: Ascorbate oxidase promoter, *Lycopersicon esculentum*, oxidative stress, plant bioreactor, superoxide dismutase

서 론

식물을 포함한 대다수의 호기성 생물은 환경스트레스를 받으면 생체내 산소는 superoxide anion radical ($\cdot O_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot OH$) 등의 반응성이 높은 독성의 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)으로 변하게 된다 (Allen 1995). ROS의 과다 발생은 세포막 분해, 단백질 분해, DNA합성 억제, 광합성 억제, 엽록체 파괴 등 생체 내에 생리적 장애를 주고 심할 경우 세포사멸을 초래한다 (Inze and Van Montagu 1995). 그러나 이러한 ROS는 superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT) 등의 항산화효소와 ascorbic acid, α -toco-

pherol, glutathione 등의 저분자 항산화물질에 의해 효율적으로 제거된다 (Allen 1995; Alischer and Hess 1993).

SOD는 산소를 소비하는 모든 생물에 존재하며 활성산소에 대해 가장 먼저 작용하는 효소로서 산소로부터 발생하는 superoxide anion radical을 과산화수소로 변환시킨다. 과다한 농도의 과산화수소는 세포독성을 나타내며 POD 또는 CAT에 의해 안전한 물로 변환된다. 완전히 제거되지 못한 superoxide anion radical과 과산화수소는 Haber-Weiss 반응에 의해 독성이 강한 hydroxyl radical을 생성한다 (Haber and Weiss 1934). 따라서 SOD는 superoxide anion radical의 소거뿐 아니라 hydroxyl radical의 생성을 예방하는 중요한 생체방어인자이다 (Cohen 1988). SOD는 그들이 가지고 있는 metal cofactor에 따라 CuZnSOD, MnSOD, FeSOD의 3종류가 있다. SOD는 산업적으로 유용한 효소로서 항염증 작용이 있어 류마티스 관절염 등 각종 퇴행성 질병 치료제

*Corresponding author Tel 042-860-4432 Fax 042-860-4608
E-mail sskwak@kribb.re.kr

등의 의약품 소재, 노화방지 화장품의 첨가제 및 기능성 식품 소재로 개발이 활발히 진행되고 있다 (Bannister et al. 1987).

지금까지 형질전환 식물체에서의 SOD 발현은 산화적 스트레스에 대한 내성을 지닌 환경내성 식물 개발이 주를 이루고 있다 (Tepperman and Dunsmuir 1990; McKersie et al. 1993; Perl et al. 1993; Sen Gupta et al. 1993). 그러나 SOD가 효소로서 안정하지 않고 고분자물질로서 생체내 수송의 문제 등으로 산업적 개발에 제약이 되고 있다. 따라서 먹는 백신 (edible vaccine) 바나나 혹은 비타민 A를 첨가시킨 쌀 (golden rice)과 같이 정제과정이 필요 없이 SOD를 이용할 수 있는 식물조직에 과량 발현하는 식물생체반응기 (plant bioreactor)로서 개발의 가능성이 기대된다 (Goddijn and Pen 1995; Mason and Arntzen 1995). 저자들은 모든 조직에 강하게 발현하는 CaMV 35S promoter를 이용하여 SOD를 오이에 과량 발현시킨 형질전환체를 개발한 바 있다 (Kim et al. 1998).

토마토 (*Lycopersicon esculentum* Mill)는 가지과의 다년생 초목으로 리코펜, 플라보노이드, 글루타민산, β -카로틴, 비타민 C와 E, 식이섬유가 풍부한 채소이다. 토마토를 재료로 한 형질전환 연구는 주로 과실의 당도 증가와 병충해 저항성, 저장기간을 늘리기 위한 과숙 억제에 대한 것이다 (Michelmore 1996; Pfizner 1998; Hanson et al. 1999). 본 연구에서는 과실에서 우세하게 발현하는 ascorbate oxidase (ASO) promoter (Ohkawa et al. 1994)를 이용하여 카사바의 CuZnSOD (Lee et al. 1999)를 과실에서 고발현시킨 SOD 함유 토마토를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

토마토 (*Lycopersicon esculentum* Mill) 형질전환에는 대과종인 서광 (Pink forcer, Seminis Korea 흥농종묘)과 소과종 (방울토마토)인 꼬꼬 (Koko, 일본 Takii종묘) 2가지 품종을 사용하였다. 토마토 종자를 1차 증류수로 세척하고 70% 에탄올로 1차 표면소독 후, 1% sodium hypochlorite 용액에 20 분간 담가 2차 표면소독 후 멸균수로 5회 세척하고 물기를 제거하였다. 소독한 종자는 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지에서 약 $15 \mu\text{M}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 의 형광빛에서 16시간, 암 8시간의 광주기, 25°C의 조건으로 발아시키고 1주일 자란 유식물체의 자엽 절편체를 식물체 재분화 및 형질전환 재료로 사용하였다.

형질전환 벡터

카사바 배양세포에서 분리한 cytosolic CuZnSOD cDNA, *mSOD1* (Lee et al. 1999)을 토마토 과실에서 우세적으로 발현시킬 수 있는 ASO 프로모터 (Ohkawa et al. 1994)에 연결시킨 후 neomycin phosphotransferase (*nptII*) 유전자를 선발 표지로 한 식물형질전환 벡터인 pBI101에 도입하여 ASOp::mSOD1/pBI101을 제작하였다 (Figure 1). 이것을 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 도입하여 형질전환에 이용하였다.

식물체 재분화와 형질전환

재분화 조건 확립을 위해 BA (1, 2 mg/L)와 IAA (0, 0.1 mg/L)를 조합한 배지에 7일 동안 발아시킨 서광 유식물체의 자엽절편체를 배양하였다. 배양은 종자발아와 같은 조건에서 약 4주간 하였으며 각각의 배지에서 shoot 발생 빈도를 조사한 후 백분율로 표시하였다.

*Agrobacterium*을 매개로 하여 서광 및 꼬꼬 유식물체의 자엽 절편체를 형질전환하였다. 발아 7일째 유식물체의 자엽 절편체를 MS 기본 액체배지에 넣고 YEP에서 28°C 40시간 생육한 *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404 1 mL을 넣은 후 25°C 암조건에서 48시간 공동배양하였다. 공동배양 후 자엽 절편체를 MS 기본 액체배지로 씻어 선발배지 (MS + 2 mg/L BA + 0.1 mg/L IAA + 300 mg/L claforan + 100 mg/L kanamycin)에서 배양하였다. 선발배지에서 유도된 shoot은 root 유도를 위해 뿌리유도배지 (MS + 1 mg/L IAA, 300 mg/L claforan + 100 mg/L kanamycin)로 옮기고 뿌리가 발생하면 4~5일간 순화시켜 화분으로 옮겨 온실에서 재배하였다. 형질전환체 선발 및 배양은 종자발아시와 같은 조건에서 실시하였다.

Southern blot 분석

Kanamycin 함유배지에 선발되어 PCR로 형질전환이 확인된 토마토 식물체 3개체를 대상으로 Southern분석을 실시하

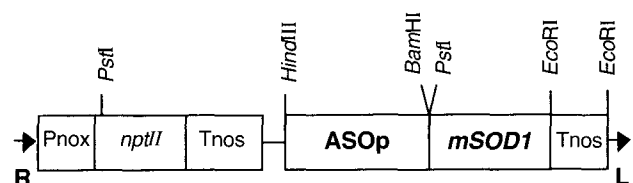


Figure 1. Plant transformation vector. ASOp::mSOD1/pBI101 harboring an ascorbate oxidase promoter (ASOp), a cassava CuZnSOD (*mSOD1*), and *npt II* gene as a selectable marker. L and R indicate left and right border elements of the T-DNA, respectively.

였다. 온실에서 생육중인 토마토 식물체의 잎으로부터의 genomic DNA 분리는 Asemota (1995)의 방법에 따라 수행하였다. 분리한 DNA (30 µg)를 *EcoRI* 및 *HindIII*로 각각 절단하여 0.8% agarose gel에 전기영동한 후, Zeta Probe membrane (Bio-Rad 제품)으로 전이시켰다. Kanamycin 저항성 유전자인 *nptII* 유전자 (700 bp) 및 *mSOD1* 유전자의 특이부분 (260 bp)을 PCR로 합성하여 각각 probe로 이용하였다. DNA를 동위원소 [α - 32 P] dCTP로 labelling시켜 prehybridization용액 (Zeta Probe membrane 용)에 첨가하여 60°C에서 24시간 동안 hybridization시켰다. 반응을 마친 membrane을 세척하고 X-ray 필름에 노출시켜 밴드를 확인하였다.

SOD 활성 및 Native PAGE 분석

서광과 꼬꼬 토마토의 형질전환체 (T_0 세대)와 형질전환시키지 않은 식물체 (이하 대조구로 함)의 열매를 재료로 하여 발달 정도에 따라 익지 않은 녹색 열매 (immature fruit: IM), 익기 시작한 열매 (middle-mature fruit: MF), 완전히 익은 열매 (well-mature fruit: WMF)의 3단계로 분류하였다 (Figure 4A). 토마토 열매 각 0.5 g을 액체질소와 함께 마쇄한 후 50 mM 인산완충액 (pH 7.0)을 넣어 11,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 단백질 정량은 Bradford (1976)의 방법을 사용하여 BSA를 표준단백질로 하였다.

SOD활성은 McCord와 Fridovich의 방법 (1969)에 따라 xanthine oxidase (XOD)와 cytochrome c를 이용하여 측정하였다. 효소 측정에 사용되는 반응액 [10 mM xanthine 2.5 mL, 10 mM cytochrome c 0.5 mL, 0.1 mM EDTA를 포함한 0.05 M 인산완충액 (pH 7.8)]은 매번 조제하여 사용하였다. 반응액을 만든 후 cytochrome c의 농도를 일정하게 유지하기 위해 sodium dithionite로 보정하였다. 효소반응은 상기 반응액 1 mL과 효소액 (10 µL 전후)을 큐벳에 넣고, 0.1 mM EDTA를 포함한 50 mM 인산완충액 (pH 7.8)으로 25배 희석한 XOD 10 µL를 첨가하였다. 효소 활성의 1단위 (1 unit)는 25°C에서 반응을 시작하여 2분 30초간 550 nm에서 흡광도 변화를 조사하여 XOD 활성이 50% 억제된 것으로 정의하였다.

Native gel 전기영동은 Beauchamp와 Fridovich의 방법 (1971)을 사용하였다. 추출한 효소액을 일정액 취해 동일량의 단백질 농도가 되도록 조정된 후, 12.5% acrylamide gel을 사용하여 상온에서 100 V로 4시간 전개시켰다. SOD 검출은 gel을 염색액 (50 mM KH_2PO_4 , 0.1 mM EDTA, 0.2% TEMED, 0.026 mM riboflavin, 0.25 mM nitroblue tetrazolium) 혼합액에 30분 넣고 암상태에서 진탕 후 광조건에서 반응시켰다. SOD isoenzyme의 종류를 구분하기 위하

여 0.12 mM KCN 혹은 88 mM H_2O_2 을 위의 염색용액에 첨가하여 반응시켰다 (Fridovich 1982).

결과 및 고찰

식물체 재분화

발아 7일째 서광 유식물체의 자엽절편체를 BA와 IAA가 조합된 배지에 치상한 다음 4주 후 shoot 발생률을 조사한 결과 2 mg/L BA + 0.1 mg/L IAA 배지에서 shoot 유도율이 35.1%로 가장 높았다. BA 1 mg/L과 IAA 0.1 mg/L 배지의 경우 24.6%, BA 2 mg/L과 IAA 0 mg/L 배지에서 22.2%, BA 1 mg/L과 IAA 0 mg/L 배지에서 17.5%로 나타났다. 즉 토마토 자엽절편체로부터 shoot 유도는 IAA가 첨가된 배지에 BA 농도가 높을수록 더 높은 빈도를 얻을 수 있는 것으로 나타났다. 또한 shoot 유도는 자엽절편의 절단면인 기저부에서 일어났으며 그 이외의 부분에서는 유도되지 않았다. 이것은 Gambley와 Dodd (1991)의 보고와 일치하였다. 따라서 토마토 자엽절편체로부터 식물체 재분화능은 조직부위의 특이성이 있으며 자엽조직에 극성이 있어 기저부가 분열능력이 있는 것으로 생각된다.

SOD 형질전환 식물체 개발

*Agrobacterium*와 공동배양한 자엽절편체는 식물체 재분화 실험에서 얻은 결과에 따라 MS 기본배지에 BA 2 mg/L, IAA 0.1 mg/L, kanamycin 100 mg/L, claforan 300 mg/L 포함된 선발배지에 배양하였다. Kanamycin 저항성을 지닌 shoot은 *Agrobacterium*를 감염시키지 않았을 경우와 거의 비슷한 정도로 약 3~4주 정도 경과되었을 때 유도되었다. 잎이 1~2장 정도 나왔을 때 root 유도 배지로 옮겨 뿌리를 유도하였다. 뿌리는 대부분의 shoot로부터 잘 유도되었으며, 뿌리가 발달된 소식물체를 4~5일간 배양실에서 순화시켰고 원예용 상토 화분으로 옮긴 후 온실에서 재배하여 성숙한 개체로 발달시켜 꽃과 열매를 얻었다. 형질전환된 식물체는 대조구와 비교하여 식물체의 외형과 성장정도, 꽃피는 시기, 열매의 수량 등에 차이가 없는 정상적인 식물체로 성장하였다 (Figure 2).

형질전환 토마토 식물체 분석

Kanamycin 저항성 소식물체를 대상으로 *npt II* 유전자 primer를 사용하여 PCR을 수행하여 형질전환 토마토 식물체를 선별하였다 (결과 미제시). PCR로 형질전환이 확인된 서광식물체 (T1)와 꼬꼬 식물체 (T2와 T3)를 대상으로 Southern 분석을 실시한 결과 대조구 토마토 식물체에서는

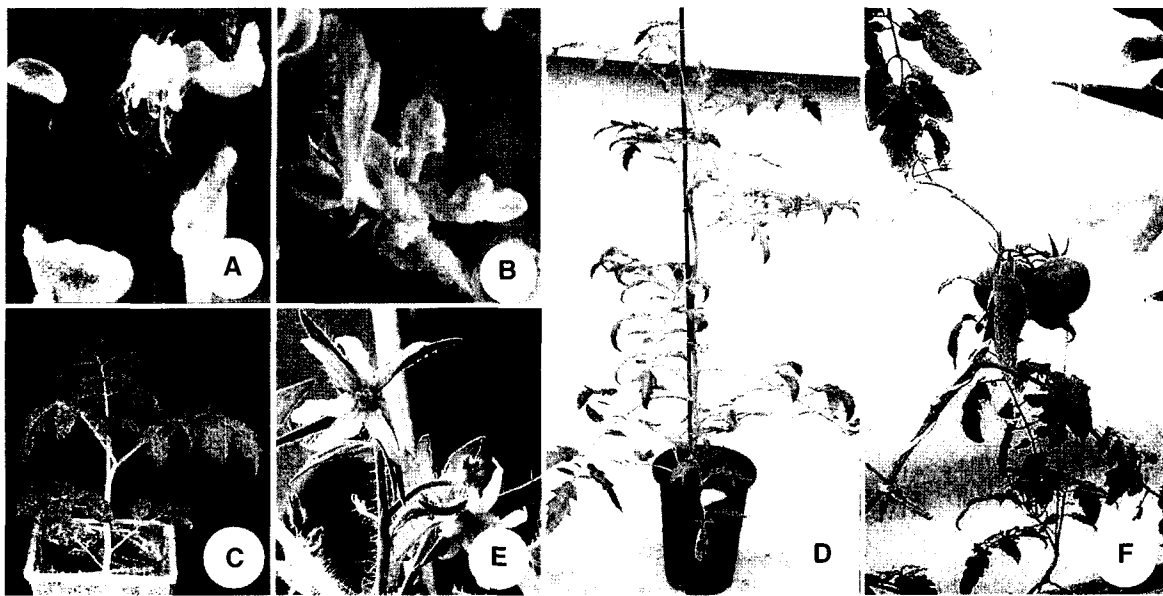


Figure 2. Shoot induction and regeneration from cotyledon explants of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill cv. Pink forcer) transformed with *Agrobacterium*. A, Shoot induction from cotyledon explants on MS medium with 2 mg/L BA, 0.1 mg/L IAA, 300 mg/L claforan and 100 mg/L kanamycin. B, Root induction on MS medium with 1 mg/L IAA, 300 mg/L claforan and 100 mg/L kanamycin; C, Regenerated plant with acclimation in vitro; D and E: Mature plant with flowers in a green house; F, Fruits of mature plant.

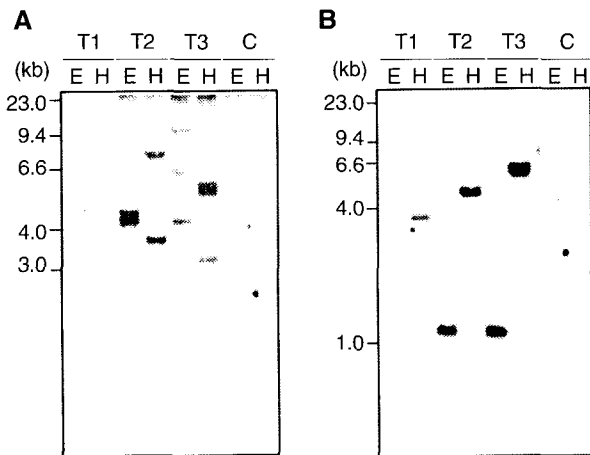


Figure 3. Southern analysis of genomic DNA prepared from SOD transgenic and nontransgenic tomato leaves. Equal amounts (30 μ g) of genomic DNA were digested with the restriction enzymes, electrophoresed in 0.8% agarose gel, and blotted onto a membrane. The blot was hybridized with the 700 bp fragment of *nptII* (A) or 260 bp fragment of *mSOD1* (B) as a probe, respectively. T1: Transgenic tomato plants (cv. Pink forcer). T2 and T3: Transgenic tomato plants (cv. Koko). C: Nontransgenic tomato plant. The positions of molecular weight markers are shown on the left. E and H on the lane represent *EcoRI* and *HindIII*, respectively.

어떤 밴드도 나타나지 않았고 형질전환체에서는 한 개 이상의 밴드가 관찰되었다 (Figure 3). *nptII* 유전자를 probe로 사용하였을 경우 서광 (T1 식물체)은 4.5 kb (*EcoRI*)와 20 kb (*HindIII*)에서 각각 1개씩의 밴드가 존재하였으며, 꼬꼬 (T2와 T3 식물체)는 *EcoRI*와 *HindIII*로 절단시킨 경우 2개 이

상의 밴드가 출현하였다. 그러나 *mSOD1* 유전자의 특이 probe를 사용하였을 경우에는 모든 경우에 한 개의 밴드만이 검출되었는데 그 강도가 각각 달랐다. 즉, 1번 서광의 경우에 비해 2번과 3번의 경우 밴드의 강도가 2배, 3배 강한 것으로 보아 같은 크기의 밴드가 겹쳐져 있는 것으로 생각된다. 따라서 서광은 1 copy, 꼬꼬는 각각 2~3 copy 유전자가 도입되었음이 시사되었다.

과실 성장단계별 SOD 활성

토마토 열매를 익지 않은 녹색 과실 (IF), 익기 시작한 과실 (MF), 완전히 익은 과실 (WMF) 3단계로 나누어 단백질 함량과 SOD 비활성도 (units/mg protein)를 측정하였다 (Figure 4A). 단백질 함량은 서광과 꼬꼬에서 형질전환체와 대조구 모두 익지 않은 녹색 과실에서 완전히 익은 과실로 갈수록 감소하여 완전히 익은 단계에서 가장 낮았다 (Figure 4B). SOD 비활성도는 서광은 익기 시작한 과실 (MF)에서 증가하였으나, 꼬꼬에서는 녹색 과실에서부터 모든 단계에서 대조구보다 높았다 (Figure 4C). 형질전환 서광과 꼬꼬의 완전히 익은 과실의 SOD 비활성도는 각각 약 212 unit와 292 unit로 꼬꼬가 서광보다 약 1.4배 높았다. 완전히 익은 형질전환 토마토 과실의 SOD 비활성도는 대조구에 비해 서광과 꼬꼬는 각각 약 1.6배와 약 2.2배 높았다. 이상으로 과실의 SOD 비활성도가 약 2배 높은 토마토 식물체를 개발할 수 있었다.

그러나 형질전환 토마토의 잎의 SOD 활성은 거의 증가되지 않았는데 그 이유는 도입한 유전자가 과실에서 높게 발현

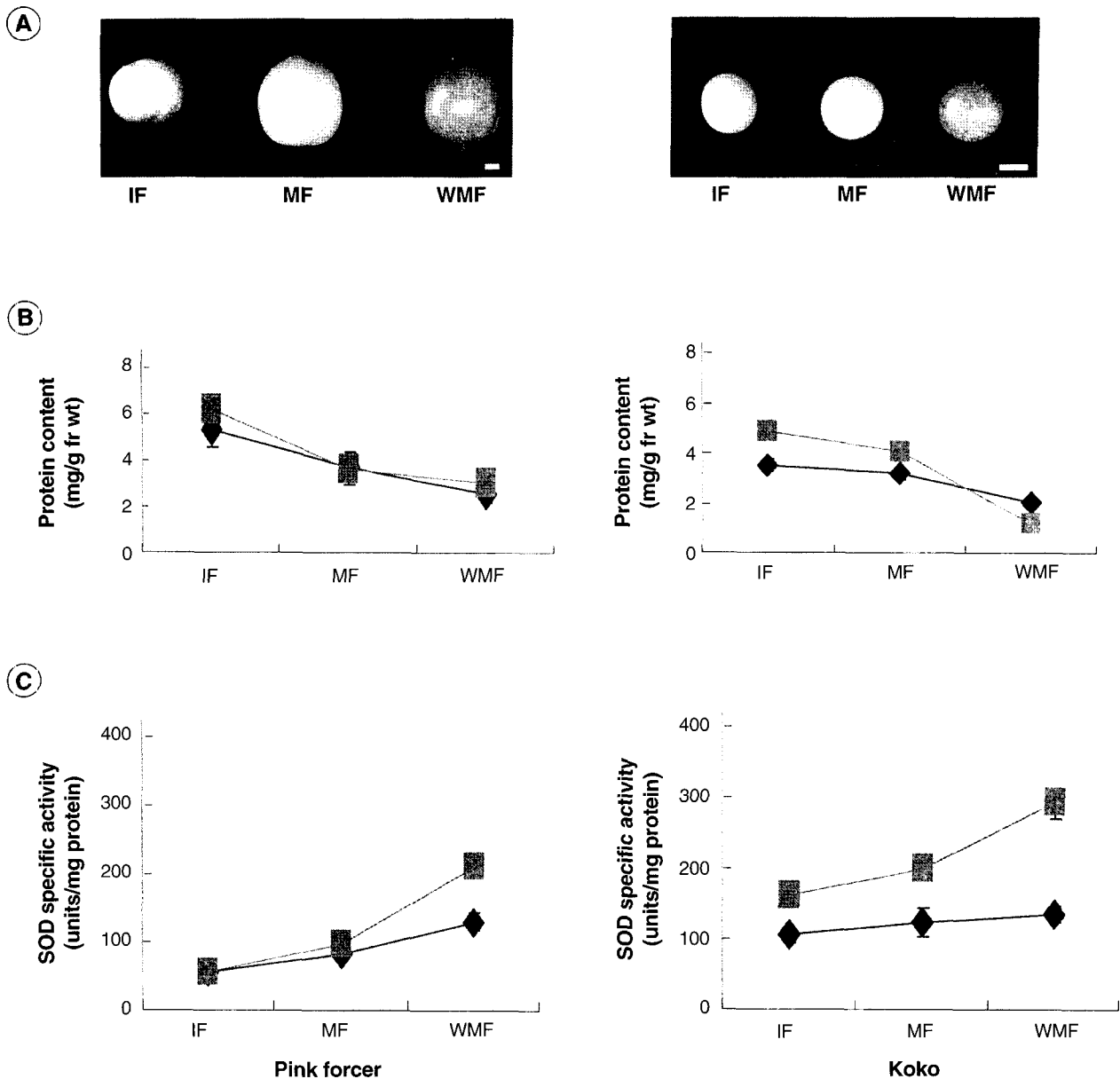


Figure 4. Changes in protein content and SOD specific activity in SOD transgenic and nontransgenic tomato fruits (cvs. Pink forcer and Koko) during maturation. A, Tomato fruits with three maturation stages. Bar (-) represents 1 cm; B, Changes in protein content; C, Changes in SOD specific activity. IF, MF and WMF represent immature fruit, middle-mature fruit, well-mature fruit, respectively. ■ : Transgenic plants. ◆ : Control plants.

하는 프로모터 (Ohkawa et al. 1994)를 형질전환에 이용하였기 때문인 것으로 생각된다 (결과 미제시). 이는 오이에서 분리한 ASO promoter는 오이 과실에 강하게 발현될 뿐 아니라 토마토 과실에도 특이적으로 고발현됨이 시사되어 다른 식물종의 과실에도 활용될 수 있음이 시사되었다.

SOD native PAGE 분석

형질전환된 서광과 꼬꼬의 과실을 SOD 활성 분석시와 같이 성숙단계별로 나누어서 SOD native gel 분석을 하였다 (Figure 5). 두 품종 모두 1개의 MnSOD, 2개의 FeSOD, 2개

의 CuZnSOD isoenzyme 밴드가 나타났다. 대조구와 비교하여 특이하게 다른 밴드는 나타나지 않았으나 서광과 꼬꼬 2 품종 모두 형질전환체는 과실의 익은 정도가 진행될수록 SOD 비활성도 분석 결과와 같이 경향을 나타내었다. 형질전환체에서 CuZnSOD1 밴드가 과실성숙에 따라 점점 더 진한 것으로 보아 이것이 도입된 *mSOD1* 유전자의 밴드로 추정된다. 도입된 카사바 CuZnSOD (*mSOD1*)는 토마토의 CuZnSOD isoenzyme와 중복되었기 때문에 같은 위치에 진하게 발현된 것으로 추정된다. 위의 경우 두 품종 모두 형질전환체와 대조구에서 3개의 SOD isoenzyme이 존재하였는데 증가된 밴드는 관찰되지 않았다 (결과 미제시). 따라서 토

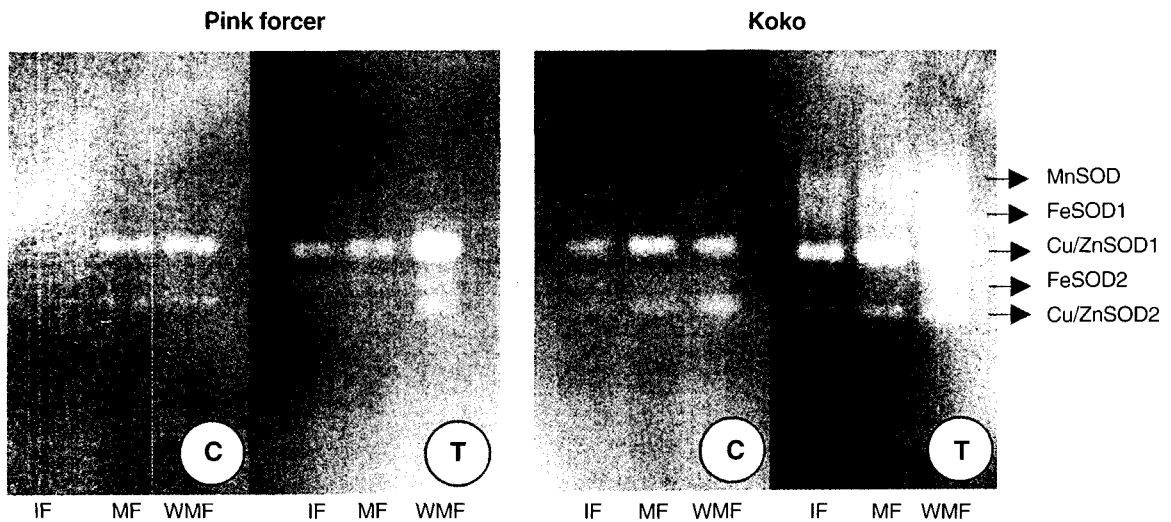


Figure 5. SOD native gel assay in SOD transgenic (T) and nontransgenic control (C) tomato fruits. Each amount of protein (40 μg) was loaded to each lane. CuZnSOD1 represents the introduced *mSOD1* overlapped with endogenous CuZnSOD in tomato. IF, MF and WMF represent immature fruit, middle-mature fruit, well-mature fruit, respectively. CuZnSOD activity is inhibited by KCN, whereas MnSOD and FeSOD are not.

마토의 SOD isoenzyme은 품종간에는 큰 차이가 없고, 과실의 생장에 따라 조절됨을 알 수 있었다.

이상의 결과로서 카사바 유래의 CuZnSOD 유전자가 토마토에 정상적으로 도입되어 발현됨이 확인되었으며, 특히 오이에서 분리된 ASO promoter가 오이과실뿐 아니라 토마토 과실에도 강하게 발현됨이 확인되었다. ASO promoter를 이용하여 SOD 유전자를 오이과실에 과량 발현하는 형질전환체가 개발되고 있다 (저자들의 미발표 자료). ASO promoter는 유용 유전자를 오이, 토마토뿐 아니라 다양한 식물종의 과실에 발현시키고자 할 때 폭 넓게 이용될 수 있는 가능성이 처음으로 시사되었다. 본 연구에서 획득한 SOD 고함유 토마토는 기능성 식품으로서 개발의 가능성이 있기 때문에 제품으로서 용도개발 및 품종육성에 관한 후속연구가 요구된다.

익은 단계에서 가장 낮았다. SOD 비활성도는 형질전환 토마토의 열매의 모든 단계에서 대조구보다 높았으며 완전히 성숙한 과실에서 가장 높았다. 성숙한 형질전환 서광과 꼬꼬 과실에서 SOD 비활성도는 비형질전환의 것보다 각각 약 1.6배와 약 2.2배 높았다. SOD isoenzyme gel 분석에서 도입한 *mSOD1*로 추정되는 CuZnSOD 밴드가 형질전환체에서 과실 성숙에 따라 강하게 발현되었다. 이상의 결과로서 ASO promoter에 의해 SOD 유전자가 토마토 과실에 특이적으로 발현됨이 확인되었다.

사사-본 연구는 농림부 농림기술연구개발사업 (AGM0030015)의 연구결과이다. ASO 프로모터를 제공해 준 K. Yoshida 박사 (NAIST, Japan)에게 감사한다.

적 요

Superoxide dismutase (SOD)를 과실에서 고발현시킨 형질전환 토마토 (서광과 꼬꼬)를 개발하였다. 카사바 배양세포에서 분리한 CuZnSOD (*mSOD1*)를 과실에 우세적으로 발현하는 ascorbate oxidase promoter (ASOp)를 이용하여 ASOp::*mSOD1*/pBI101 벡터를 제작한 후 *Agrobacterium* 매개로 자엽 절편체를 형질전환하였다. Kanamycin 저항성 식물체를 기관발생 경로로 재분화시킨 후 Southern 분석으로 형질전환을 확인하였다. 서광과 꼬꼬 토마토의 형질전환체와 대조구 식물체의 과실을 성숙 단계별로 분류하여 단백질 함량과 SOD 비활성도 (units/mg protein)를 측정된 결과, 단백질 함량은 열매가 익은 단계로 갈수록 점점 감소하여 완전히

인용문헌

- Allen RD (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol* 107: 1049-1054
- Alscher RG, Hess JL (1993) Antioxidants in Higher Plants. CRC Press, Boca Raton, pp 1-174
- Asemota HN (1995) A fast, simple, and efficient miniscale method for the preparation of DNA from tissues of yam (*Dioscorea* spp.). *Plant Mol Biol Rep* 1: 19-21
- Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G (1987) Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem* 22: 111-180.

- Beauchamp C, Fridovich I** (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* **44**:276-287
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254
- Cohen G** (1988) Oxygen radicals and Parkinson,s disease. In *Oxygen Radicals and Tissue Injury* (Halliwell, B., ed). Federation of American Societies for Experimental Biology, Bethesda, MD: 130-135
- Fridovich I** (1982) Measuring the activity of superoxide dismutates: an embarrassment of riches. In LW Oberly, ed, *Superoxide Dismutase*, Vol 1. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 69-77
- Gambley RL, Dodd WA** (1991) The influence of cotyledons axillary and adventitious shoot production from cotyledonary nodes of *Cucumis sativus* L (cucumber). *J Exp Bot* **32**:1131-1135
- Goddijn OJM, Pen J** (1995) Plants as bioreactors. *TIBTECH* **13**: 379-387
- Haber F, Weiss J** (1934) The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc Lond A* **147**:332-351
- Hanson B, Engler D, Moy Y, Newman B, Ralston E, Gutterson N.** (1999) A simple method to enrich an *Agrobacterium*-transformed population for plants containing only T-DNA sequences. *Plant J* **19**:727-34
- Inze D, Van Montagu M** (1995) Oxidative stress in plants. *Curr Opin Biotechnol* **6**:153-158
- Kim JH, Oh SY, Lee HS, Jo MH, Lee EM, Woo IS, Kwak SS** (1998) Expression of pea superoxide dismutase gene in transgenic cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants. *Korean J. Plant Tissue Culture* **25**:201-206
- Lee HS, Kim KY, You SH, Kwon SY, Kwak SS** (1999) Molecular characterization and expression of a cDNA encoding copper/zinc superoxide dismutase from cultured cells of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Mol Gen Genet* **262**:807-814
- Mason HS, Arntzen CJ** (1995) Transgenic plants as vaccine production systems. *TIBTECH* **13**: 388-392
- McCord JM, Fridovich I** (1969) Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (Hemocytin). *J Biol Chem* **244**:6049-6055
- McKersie BD, Chen Y, De Beus M, Bowley SR, Bowler C** (1993) Superoxide dismutase engances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol* **103**:1155-1163
- Michelmore R** (1996) Big news for plant transformation. *Nature Biotechnol.* **14** (13):1653-4
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**:473-497
- Ohkawa J, Ohya T, Ito T, Nozawa H, Nishi Y, Okada N, Yoshida K, Takano M, Shinmyo A** (1994) Structure of the genomic DNA encoding cucumber ascorbate oxidase and its expresion in transgenic plants. *Plant Cell Rep* **13**:481-488
- Perl A, Perl-Treves R, Galili S, Aviv D, Shalgi E, Malkin S, Galun E** (1993) Enhanced oxidative-stress defence in transgenic potato expression tomato Cu, Zn superoxide dismutases. *Theor Appl Genet* **85**:568-576
- Pfizer AJ** (1998) Transformation of tomato. *Methods Mol Biol* **81**: 359-63
- Sen Gupta A, Webb RP, Holaday AS, Allen RD** (1993) Overexpressin of superoxide dismutases protects plants from oxidative stress. *Plant Physiol* **103**:1067-1073
- Tepperman JM, Dunsmuir P** (1990) Transformed plants with elevated levels of chloroplastic SOD are not more resistant to superoxide toxicity. *Plant Mol Biol* **14**:501-511

(접수일자 2002년 1월 19일)