

‘SWPA2 프로모터 + AtNDPK2 유전자’ 도입에 의한 버즈풋 트레포일 형질전환체 생산

김기용[†] · 장요순* · 김맹중 · 임근발 · 김원호 · 서 성 · 이상진 · 광상수**

Production of Transgenic Birdsfoot trefoil Plants by Introduction of ‘SWPA2 Promoter + AtNDPK2 Gene’

Ki-Yong Kim[†], Yo-Soon Jang*, Meing Jooung Kim, Keun Bal Lim, Won Ho Kim, Sung Seo,
Sang Jin Lee and Sang-Soo Kwak**

ABSTRACT

To develop transgenic birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) plants tolerant to environmental stress, Arabidopsis NDPK gene (*AtNDPK*) was introduced into birdsfoot trefoil plants using Agrobacterium-mediated transformation and expressed powerfully under the control of the *SWPA2* promoter. The expression vector, pCAMBIA2300 was used for introduction of *AtNDPK* gene into birdsfoot trefoil plants. The transformed calli were selected on kanamycin containing medium and then regenerated. The transformed birdsfoot trefoil plants were cultivated for 4 months on BOi2Y medium. Genomic DNA PCR and Southern blot analysis confirmed the incorporation of *AtNDPK* into the birdsfoot trefoil genome.

(Key words : *AtNDPK* gene, Birdsfoot trefoil, Environmental stress, *SWPA2* promoter, Transgenic plant)

I. 서 론

우리나라에서 재배 이용되고 있는 대부분의 목초 및 사료작물은 외국으로부터 도입된 품종이기 때문에, 우리나라의 기후나 토양조건에서는 재배하는 데에 많은 어려움이 따르고 생산성 또한 낮은 실정이다. 이러한 이유로 국내 축산연구소에서는 전통육종 방법을 이용하여 이탈리아 라이그라스 (Choi 등, 2000; Choi 등, 2001a; Choi 등, 2001b) 및 오차드그라스 (Rim 등, 2003; Rim 등, 2004) 신품종을 육성 보급하고 있다. 하지만 전통육종 방법에 의한 신품

종 육성은 많은 시간과 노력, 그리고 넓은 포장에 요구될 뿐만 아니라, 이렇게 고정된 품종의 내성은 한계가 있기 때문에, 최근에는 좀더 강한 내성 품종을 효율적으로 육성하기 위해 유전공학 기술을 도입하기 시작하였다.

지금까지 스트레스 연구는 건조 등 특정 스트레스에 대한 내성유전자의 분리 및 이를 이용한 스트레스 내성 식물체 개발에 관한 연구가 주류를 이루고 있으나, 복합스트레스에 강한 내성을 갖는 목초 및 사료작물 개발에 관한 연구는 초보단계에 머물고 있다. 최근 스트레스 유도성 유전자의 전사조절인자를 이용한 형질

“이 논문은 농촌진흥청 바이오그린21사업 연구비 지원에 의하여 수행된 결과임.”

축산연구소 (National Livestock Research Institute, Chonan 330-801, Korea)

* 한국해양연구원 (Korea Ocean Research & Development Institute, Ansan 425-744, Korea)

** 한국생명공학연구원 (Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-806, Korea).

[†] Corresponding author : Ph. D. Ki-Yong Kim, National Livestock Research Institute, Chonan 330-801, Korea.

Tel: +82-41-580-6751, Fax: +82-41-580-6779, E-mail: kimky77@rda.go.kr

전환체가 여러 가지 스트레스에 내성을 갖는다는 흥미로운 보고가 있는데, 일본 RIKEN 연구소의 K Shinozaki 연구팀은 건조에 반응하는 cis-acting promoter element인 dehydration responsive element (DRE)를 분리하였으며, 이 DRE에 특이적으로 결합하는 전사조절인자 (DREB1A)를 stress-inducible promoter인 rd29에 연결시켜 애기장대에 도입한 결과, 식물체가 건조, 고염 및 동해에 강한 스트레스 내성을 보여주고 있음을 발표하여, 분자유종에 의해 복합재해 내성을 갖는 농작물의 개발 가능성을 시사하고 있다 (Kasuga 등, 1999).

본 연구에서 식물체에 도입하고자 하는 pCAMBIA2300/SWPA2::*AtNDPK2* 발현벡터에서 SWPA2 (AF109124)는 고구마의 배양세포로부터 분리한 peroxidase promoter로서 정상적인 재배조건에서는 발현되지 않으나, 각종 재해를 받았을 때 CaMV 35S promoter 보다 강하게 작동하는 특징이 있기 때문에 (Kim 등, 1999a) ‘복합재해 내성 목초 개발’에 유용하게 활용될 것으로 기대되며, *AtNDPK2* (AF017640)는 애기장대로부터 분리한 nucleoside diphosphatase kinase type 2의 유전자로서 (Yi 등, 1998), 이 유전자의 경우 식물체내에서 과발현시키면 식물체가 다양한 스트레스에 대해 내성을 갖도록 된다고 보고되었다. (Moon 등, 2003). 국내에서도 *NDPK2* 유전자를 도입한 형질전환체 개발과 관련된 몇 편의 논문이 보고되어 있다 (Moon 등, 2003, Tang 등, 2004; Lim 등, 2004).

본 연구에서는 *AtNDPK2* 유전자가 SWPA2 promoter에 의해 강하게 발현되도록 재조합한 발현벡터 pCAMBIA2300/SWPA2::*AtNDPK2*를 두과목초인 버즈풋 트레포일에 도입하여 복합재해에 내성을 갖는 형질전환체를 개발하고자, *Agrobacterium* 을 매개로 하여 종자 유래의 버즈풋 트레포일 캘러스에 pCAMBIA2300/SWPA2::*AtNDPK2*를 도입하고, 이로부터 식물체를 재분화하여 형질전환체를 생산한 다음, PCR 및 Southern blot 분석을 통해 버즈풋 트레포일의 형질전환 여부를 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료 및 사용배지

식물재료로는 버즈풋 트레포일 (*Lotus corniculatus* L.) 품종 중 Empire를 사용하였으며, Kim 등 (1999b)의 방법으로 종자로부터 캘러스를 유도하였다. 종자소독은 70% 에탄올에서 1분, 0.1% SDS/HgCl₂ 용액에서 15분, 1% NaOCl 용액에서 5분간 소독한 다음, 멸균수로 2회 씻어내었다. 종자로부터 직접 캘러스를 유도하고 증식시키기 위한 배지로는, SH (Schenk 및 Hildebrandt, 1972) 배지에 3 mg/ℓ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) 농도로 첨가한 SH-3 배지를 사용하였으며, 본 실험에 사용된 모든 조직배양용 배지는 pH 5.8, agar는 0.8%로 조절하였고, 유도된 캘러스는 20일 간격으로 계대배양하면서 증식시켰다 (Kim 등, 2001).

*Agrobacterium*은 YEP 배지 (0.5 % beef extract, 0.1 % yeast extract, 0.5 % peptone, 0.5 % sucrose, pH 7.2)에서 28℃로 유지하며 약 2일간 배양하였다.

2. 발현벡터 분양 및 *Agrobacterium* 형질전환

버즈풋 트레포일의 형질전환을 위한 발현벡터 pCAMBIA2300/SWPA2::*AtNDPK2*는 기본벡터로 pCAMBIA 2300을 사용하여 *AtNDPK2* 유전자 앞에 SWPA2 프로모터가 오도록 재조합한 벡터이다 (Fig. 1). 발현벡터 pCAMBIA2300/SWPA2::

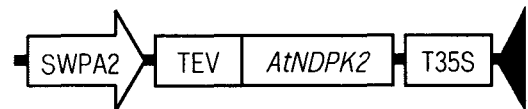


Fig. 1. A schematic diagram of plant expression vector, pCAMBIA2300/SWPA2::*AtNDPK2*, for the transformation of birdsfoot trefoil. SWPA2, sweetpotato peroxidase promoter; *AtNDPK2*, arabidopsis nucleoside diphosphate kinase 2 gene; TEV, tobacco etch virus 5'-UTR; T_{35S}, CaMV 35S terminator.

*AtNDPK2*는 Freeze-thaw 방법 (Holster 등, 1978)으로 *Agrobacterium tumefaciens*에 도입하였으며, 이때 사용된 *Agrobacterium*의 strain은 EHA105이다.

3. 형질전환 버즈풋 트레포일의 재분화

pCAMBIA2300/*SWPA2::AtNDPK2* 벡터로 형질전환된 *Agrobacterium*을 YEP 배지에서 2일간 배양하여 준비한 *Agrobacterium* 현탁액에 버즈풋 트레포일 캘러스를 3~10분간 담구었다가 멸균수로 2회 세척하고, 항생제가 첨가되지 않은 SH agar plate에서 2일간 공동배양하여 감염을 유도하였다.

형질전환된 캘러스의 선발 및 식물체 재분화는 Kim 등 (2001)의 방법으로 실시하였다. 100 µg/mg의 kanamycin과 500 µg/ml의 cefotaxim을 첨가한 SH-kc 배지에서 감염된 캘러스를 배양하면서, 이들 배지에서 살아남는 캘러스를 형질전환 캘러스로 선발하였다. 선발한 캘러스는 Kim 등 (1999b)의 방법대로 BOi2Y 배지 (Bingham 등, 1975)에서 20일 간격으로 지속적으로 계대배양하여 완전한 식물체로 재분화하였다.

4. PCR 및 Southern blot 분석

재분화된 식물체의 형질전환 여부를 확인하기 위해 Murray 및 Thompson (1980)의 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여, PCR 분석 및 Southern blot 분석 (Southern, 1975)을 실시하였다.

PCR 증폭은 주문 합성한 *AtNDPK2* 유전자의 특이 primer와 ExTaq polymerase (Takara, Japan)를 사용하여 Personal Cycler (Biometra, Germany)로 실시하였으며, PCR 반응은 95°C에서 1분간 변성, 95°C에서 1분간 35 cycle, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 final extension 순으로 실시하였다. 증폭한 PCR 산물은 1.2% agarose gel 상에서 전기영동하여 ethidium bromide (EtBr) 염색으로 확인하였다.

Southern blot 분석에는 genomic DNA를 분리

하여 이용하였으며, 제한효소로 처리한 genomic DNA를 1% agarose gel 상에서 전기영동하여 nylon membrane (Amersham pharmacia biotech)으로 DNA를 전이시켰다. Prehybridization 반응은 prehybridization buffer (50% formamide, 5x SSPE, 5x Denhardt's solution, 0.1% SDS 및 0.1 mg/ml denatured salmon sperm DNA)에서 42°C, 1~2 hr 동안 실시하였다. Hybridization 반응은 [α -³²P] dCTP로 표지된 *AtNDPK2* DNA fragment를 probe로 이용하여 하루 밤 동안 실시하였다. Hybridization 후, membrane은 2x SSC 및 0.1% SDS 용액으로 실온에서 10분간 2회, 1x SSC 및 0.1% SDS 용액으로 65°C에서 15분간 1회, 0.1x SSC 및 0.1% SDS 용액으로 65°C에서 15분간 2회 washing한 다음, -70°C에서 2~3일간 X-ray film (Kodak)에 노출시켰다.

III. 결과 및 고찰

1. 형질전환 버즈풋 트레포일 식물체 생산

pCAMBIA2300/*SWPA2::AtNDPK2* 발현벡터가 도입된 *Agrobacterium*을 배양하여 현탁액을 준비한 다음, 버즈풋 트레포일 캘러스를 감염시킨 후, 캘러스를 100 µg/ml의 kanamycin 및 500 µg/ml의 cefotaxim을 첨가한 SH-3-kc 배지에 치상하여 2개월 동안 약 20일 간격으로 계대배양하면서 살아남는 캘러스를 형질전환된 캘러스로 추정하여 선발하였다. *Agrobacterium* 현탁액으로 감염시키지 않은 캘러스는 SH-3-kc 배지에서 전혀 생존할 수 없었다. 따라서 SH-3-kc 배지에서 선발한 캘러스는 pCAMBIA2300/*SWPA2::AtNDPK2* 발현벡터로 형질전환된 것으로 예상되어 이 캘러스들을 SH-3-c 배지로 옮겨 약 20일 간격으로 계대배양하며 충분히 증식시켰다.

항생제 첨가배지에서 선발한 캘러스로부터 버즈풋 트레포일 식물체를 재분화하기 위해, 광조건하에서 BOi2Y 배지에서 2개월 이상 배양하여 재분화를 완성하였다. Fig. 2는 캘러스 선

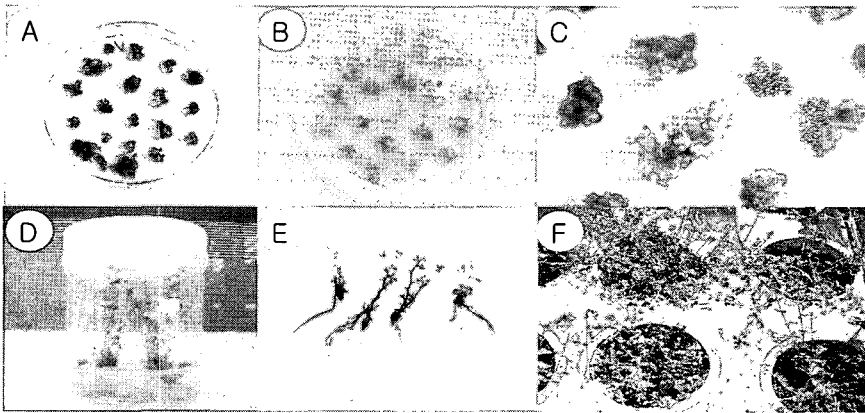


Fig. 2. Plant regeneration from transgenic callus on regeneration medium containing 100 mg/l of kanamycin and acclimation of transgenic plants in a growth chamber. A, Selected Birdsfoot trefoil callus; B & C, Stage of shoot formation; D & E, Stage of root formation; F, Acclimation of regenerated birdsfoot trefoil plants.

발부터 재분화까지의 과정을 사진으로 보여주는 것으로서, Fig. 2에서 A는 SH-3-kc 배지에서 선발한 캘러스 사진, B와 C는 재분화배지에서 캘러스를 배양하며 shoot를 유도하는 사진, D는 절단된 줄기에서 뿌리가 형성된 사진, E는 재분화된 식물체를 화분에 옮겨 심기 위해 배양병에서 꺼낸 식물체 사진이며, F는 화분으로 옮겨 심은 후 온도와 습도가 조절되는 생장실에서 순화재배하는 사진이다.

2. PCR 및 Southern blot 분석

버즈풋 트레포일의 형질전환 여부를 확인하기 위해 재분화된 버즈풋 트레포일의 잎조직에서 genomic DNA를 분리하여 PCR 분석 및 Southern blot 분석을 실시하였다.

AtNDPK2 유전자의 염기서열 및 35S terminator의 염기서열에서 특이 primer를 각각 합성하여 genomic DNA를 PCR 증폭 후, agarose gel 상에서 전기영동하여 분석한 결과, 형질전환하지 않은 control에서는 특이 band가 나타나지 않았으나, 형질전환체의 경우 특이 band가 관찰되었으므로 (Fig. 3A), 재분화된 버즈풋 트레포일은 *SWPA2::AtNDPK2* 단편을 가지고 있는 것으로 확인되었다.

한편 genomic DNA를 제한효소 *EcoRI* 으로 절단 후 전기영동을 실시한 다음, membrane에

transfer하여 Southern blot 분석을 실시하였다. α -³²P 방사능으로 표지한 *AtNDPK* 단편을 probe로 해서 분석한 결과, 모든 형질전환 버즈풋 트레포일에서 probe에 대응하는 band가 나타난 것으로 보아서 재분화된 버즈풋 트레포일은 *AtNDPK* 유전자로 형질전환되었음이 확인되었다(Fig. 3).

본 연구에 사용된 *SWPA2* 프로모터는 모든 재해에 의해 발생하는 활성산소종 (reactive oxygen species)에 의해 유도되는 산화스트레스 조건하에서 강하게 발현되는 peroxidase의 프로모터이다. *SWPA2*의 RNA 전사체는 식물체 조직에서는 전혀 나타나지 않고 배양세포에서만 관찰되

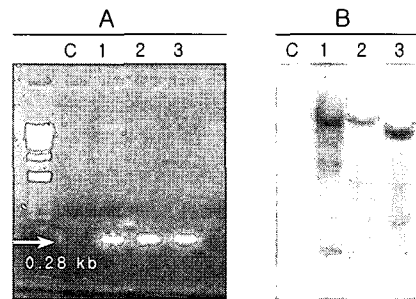


Fig. 3. Confirmation of transgenic plants by PCR (left) and Southern blot analysis (right) of genomic DNA prepared from wild-type control (C) and transgenic plants using *AtNDPK2* gene as a probe (1, 2 & 3).

며, 세포가 성장함에 따라 점진적으로 발현량이 증가한다 (Kim 등, 1999a). *SWPA2* promoter에 대해서는 국내 및 국제특허가 출원되어 있으며 (2001년 10월), 그 후로 *SWPA2* promoter와 관련된 여러 편의 논문을 발표되었다 (Kim 등, 1999a; Kim 등, 2000; Kim 등, 2003; Jang 등, 2004; Wang 등, 2005). *SWPA2* promoter는 정상적인 재배조건에서는 발현되지 않으나, wounding, chilling 등 각종 환경스트레스 조건에서 CaMV 35S promoter 보다 강하게 작동하는 특징이 있기 때문에, 본 연구에서 목표로 하는 ‘복합재해 내성 목초 개발’에 적합한 것으로 판단되어 선택하게 되었다.

또한 *NDPK* 유전자에 관한 연구는 매우 많이 보고되어 있는데 (Pollack 등, 2002; Moon 등, 2003; Bosnar 등, 2004; Shin 등, 2004; Shen 등, 2005), Moon 등 (2003)은 *AtNDPK2* 유전자가 과발현된 식물체는 다양한 스트레스에 대해 내성을 갖는다고 보고하였다. 국내에서도 *AtNDPK2* 유전자를 도입한 형질전환체 개발과 관련된 몇 편의 논문이 보고되어 있으며, 여러 가지 인위적인 스트레스 조건에서 내성을 갖는다는 결과들이 발표되고 있다 (Moon 등, 2003; Tang 등, 2004; Lim 등, 2004).

따라서 pCAMBIA2300/*SWPA2::AtNDPK2* 발현벡터가 도입된 형질전환 버즈풋 트레포일은 *AtNDPK2* 유전자가 *SWPA2* promoter에 의해 식물체내에서 강력하게 발현될 것이므로, 형질전환되지 않은 버즈풋 트레포일에 비해 여러 환경스트레스에 강한 내성을 가질 것으로 예상된다. 우리는 이후의 연구에서 형질전환 버즈풋 트레포일의 계통을 보존하면서, 인위적인 여러 스트레스에 대한 내성을 조사할 계획이다.

IV. 요약

환경스트레스에 내성을 갖는 버즈풋 트레포일(*Lotus corniculatus* L.) 형질전환체를 개발하기 위하여, *AtNDPK* 유전자가 *SWPA2* 프로모터에 의해 조절되도록 재조합한 발현벡터 pCAMBIA 2300 /*SWPA2::AtNDPK2*를 *Agrobacterium* 형질

전환 방법으로 버즈풋 트레포일에 도입하였다. *Agrobacterium*과 버즈풋 트레포일 캘러스의 공동배양한 캘러스를 100 µg/ml의 kanamycin 및 500 µg/ml의 cefotaxim을 첨가한 SH-3-kc 배지에서 배양하며 형질전환된 캘러스를 선발한 다음, BOi2Y 배지에서 2개월 이상 배양하며 식물체로 재분화시켰다. 재분화된 버즈풋 트레포일의 genomic DNA를 분리, PCR 및 Southern blot 분석을 실시한 결과, *AtNDPK* 유전자를 도입한 형질전환체의 경우 agarose gel 전기영동 및 X-ray 필름상에서 DNA band 및 hybridization signal을 확인할 수 있었으나, 형질전환되지 않은 대조구의 버즈풋 트레포일에서는 DNA band 및 hybridization signal이 관찰되지 않았다.

V. 인용 문헌

- Bingham, E.T., L.V. Hurley, D.M. Katz and J.W. Saunders. 1975. Breeding alfalfa which regeneration from callus tissue in culture. *Crop Sci.* 15:719-721.
- Bosnar M.H., J. de Gunzburg, R. Bago, L. Brecevic, I. Weber and J. Pavelic. 2004. Subcellular localization of A and B Nm23/NDPK subunits. *Exp. Cell Res.* 298:275-284.
- Choi, G.J., Y.W. Rim, K.Y. Kim, S.H. Choi, B.R. Sung, W.H. Kim, D.E. Shin and Y.C. Lim. 2000. A cold-tolerant and high-yielding italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) new variety "Hwasan 101". *J. Korean Grassl. Sci.* 20:1-6.
- Choi, G.J., Y.W. Rim, Y.C. Lim, K.Y. Kim, B.R. Sung, M.J. Kim, G.J. Park and S.R. Kim. 2001a. Growth characters and productivity of new Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) variety "Hwasan 102". *J. Korean Grassl. Sci.* 21:157-162.
- Choi, G.J., Y.W. Rim, Y.C. Lim, K.Y. Kim, B.R. Sung, S.H. Choi and G.J. Park. 2001b. Growth characters and productivity of new Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) variety "Hwasan 103". *J. Korean Grassl. Sci.* 21:163-168.
- Holsters, M., O.D. Wael, A. Depicker, E. Messens, M.V. Montagu and J. Schell. 1978. Transfection and transformation of *A. tumefaciens*. *Mol. Genet.* 163:181-187.

7. Jang, I.C., S.Y. Park, K.Y. Kim, S.Y. Kwon, J.G. Kim and S.S. Kwak. 2004. Differential expression of 10 sweetpotato peroxidase genes in response to bacterial pathogen, *Pectobacterium chrysanthemi*. *Plant Physiol. Biochem.* 42:451-455.
8. Kasuga, M., Q. Liu, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat. Biotechnol.* 17:287-291.
9. Kim, K.Y., G.H. Huh, H.S. Lee, S.Y. Kwon, Y. Hur and S.S. Kwak. 1999a. Molecular characterization of cDNAs for two anionic peroxidases from suspension cultures of sweet potato. *Mol. Gen. Genet.* 261:941-947.
10. Kim, K.Y., Y.W. Rim, K.J. Choi and B.R. Sung. 1999b. Callus Induction from Seeds of Birdsfoot trefoil and Plant Regeneration on BOi2Y Medium. *J. Korean Grassl. Sci.* 19:303-308.
11. Kim, K.Y., H.K. Kwon, S.Y. Kwon, H.S. Lee, Y. Hur, J.W. Bang, K.S. Choi and S.S. Kwak. 2000. Differential expression of four sweet potato peroxidase genes in response to abscisic acid and ethephon. *Phytochemistry.* 54:19-22.
12. Kim, K.Y., B.R. Sung, Y.W. Rim, G.J. Choi, Y.C. Lim, Y.S. Jang, E.S. Chung, W.H. Kim and J.G. Kim. 2001. Transformation of birdsfoot trefoil by BcHSP17.6 gene using *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Korean Grassl. Sci.* 21:145-150.
13. Kim, K.Y., S.Y. Kwon, H.S. Lee, Y. Hur, J.W. Bang and S.S. Kwak. 2003. A novel oxidative stress-inducible peroxidase promoter from sweetpotato: molecular cloning and characterization in transgenic tobacco plants and cultured cells. *Plant Mol. Biol.* 51:831-838.
14. Lim, S., K.S. Yang, S.Y. Kwon, K.Y. Paek, S.S. Kwak and H.S. Lee. 2004. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and plant regeneration of sweetpotato (*Ipomoea batatas*). *Korean J. Plant Biotechnol.* 31:267-271.
15. Moon, H., B. Lee, G. Choi, D. Shin, D.T. Prasad, O. Lee, S.S. Kwak, D.H. Kim, J. Nam, J. Bahk, J.C. Hong, S.Y. Lee, M.J. Cho, C.O. Lim and D.J. Yun. 2003. NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:358-363.
16. Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8:4321-4325.
17. Pollack, J.D., M.A. Myers, T. Dandekar and R. Herrmann. 2002. Suspected utility of enzymes with multiple activities in the small genome *Mycoplasma* species: the replacement of the missing "household" nucleoside diphosphate kinase gene and activity by glycolytic kinases. *OMICS.* 6:247-258.
18. Rim, Y.W., G.J. Choi, B.R. Sung, Y.C. Lim, M.J. Kim, G.J. Park, K.Y. Kim, J.W. Chung and N.G. Park. 2003. Growth characteristics and productivity of new orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) variety "Jangbeol 101". *J. Korean Grassl. Sci.* 23:207-210.
19. Rim, Y.W., G.J. Choi, B.R. Sung, Y.C. Lim, M.J. Kim, G.J. Park, K.Y. Kim, J.W. Chung and S.B. Go. 2004. Growth characteristics and productivity of new orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) *J. Korean Grassl. Sci.* 24:261-264.
20. Schenk, R.U. and A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-205.
21. Shen, Y., J.I. Kim and P.S. Song. 2005. NDPK2 as a signal transducer in the phytochrome-mediated light signaling. *J. Biol. Chem.* 280:5740-5749.
22. Shin, D.H., J.G. In, Y.P. Lim, K. Hasunuma and K.S. Choi. 2004. Molecular cloning and characterization of nucleoside diphosphate (NDP) kinases from Chinese cabbage (*Brassica campestris*). *Mol. Cells.* 17:86-94.
23. Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
24. Tang, L., S.Y. Kwon, D.J. Yun, S.S. Kwak and H.S. Lee. 2004. Selection of transgenic potato plants expressing NDP kinase 2 gene with enhanced tolerance to oxidative stress. *Korean J. Plant Biotechnol.* 31:191-195.
25. Wang, F.Z., Q.B. Wang, S.Y. Kwon, S.S. Kwak and W.A. Su. 2005. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *J. Plant Physiol.* 162:465-472.
26. Yi, H., P.S. Song and G. Choi. 1998. Cloning and characterization of nucleoside diphosphate kinase 2 from *Arabidopsis thaliana* (Accession No. AF017640). *Plant Physiol.* 116:1604-1611.