

Apoptosis 관련 Bcl-2유전자의 도입을 통한 곰팡이 저항성 형질전환 상추의 육성

서경순 · 민병환

Fungal pathogen protection in transgenic lettuce by expression of a apoptosis related Bcl-2 gene

Kyung Sun Seo · Byung Whan Min

Received: 26 July 2011 / Accepted: 19 August 2011
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Transgenic lettuce plants were successfully obtained from hypocotyl explants inoculated with *Agrobacterium tumefaciens*, which harbored a binary vector plasmid with Bcl-2 gene, related to apoptosis. After culture and selection on MS medium a number of kanamycin-resistant plantlets were regenerated. Polymerase chain reaction, Southern blot analysis and Northern blot analysis were used to identify and characterize the transgenic plants with the integrated Bcl-2 gene. Over 100 transgenic plants have been established in soil and flowered in the greenhouse. T1 progeny of 100 transgenic lettuce inbred lines were inoculated with *Sclerotinia sclerotiorum*. Expression of the Bcl-2 peptide in transgenic lettuce plants provides high levels of field resistance against *Sclerotinia sclerotiorum*, causal agent of the agronomically important fungal disease of lettuce.

서론

Eukaryotic organism은 biotic 또는 abiotic stress에 의해서 세포가 죽기도 하지만 식물이나 동물 모두 정상적으로 성장하고 발육하기 위해서는 일부의 세포가 필수적으로 죽어야 한다. 이와 같은 세포의 죽음이 어떤 mechanism에 의하여 유기되고 제어되는 것을 programmed cell death 또는 apoptosis라고도 한다 (Dickman et al. 2001; Pan et al. 2001). 식물의 경우 세포의 죽음에는 senescence와 programmed cell

death 의 2종류가 있는데 senescence는 비교적 천천히 일어나고 수명이 되어서 조직이 죽거나, 노화조직의 세포 구성 성분이 규칙적으로 분해되거나 생존하려는 식물체 일부분의 영양분 회복을 위해서 일어나는 생리작용인 반면 apoptosis는 이러한 senescence 현상과는 확연하게 다르다 (Greenberg 1996). 과민반응 (hypersensitive response)과 관련된 apoptosis 유전자는 빠르게 발현되고 조직을 분해하는 것이 아니라 용해시키는 것이다. 예를 들면 올챙이 꼬리의 소실이나, 포유동물의 융합된 손의 조직을 용해시켜 손가락을 분리시키는 것 등이다. 식물에서는 megagametogenesis에서 4개의 megaspores 중에 3개가 소멸되는 현상이나, 종자가 발아하는 과정 중에 내배유의 소멸, *Monstera deliciosa*의 잎의 부분적인 소멸, 조직 내에 형성된 공동세포의 형성 등 이다. 또한 과민반응과 연관된 apoptosis 유전자는 병균에 의하여 세포가 감염되었을 때 즉각 반응하여 세포 스스로가 병이 감염된 세포를 국부적으로 죽임으로써 병원균에게 공급되는 영양분을 차단하게 되어 병균은 죽고 식물은 그 병에 대한 저항성을 갖게 한다 (McLellan et al. 2009; Hofius et al. 2009). 따라서 세포를 스스로 죽이는 유전자의 발현을 유도하거나 억제시키면 abiotic또는 biotic stress에 내성을 갖는 식물체의 유기가 가능할 뿐만 아니라 식물체의 생육기간 연장도 가능할 것이다 (Kurihara Y et al. 2004). 선행연구의 사례를 보면 인간의 Bcl-2 유전자를 담배에 도입하여 균형병균을 접종한 결과 정상의 담배는 DNA가 laddering 현상이 일어나 세포가 죽으나 형질전환체는 접종부위의 세포만을 국부적으로 죽여서 병의 확산을 방지하며 DNA의 laddering 현상이 일어나지 않았으며 (Dickman et al. 2001; Li et al. 2004), 나아가 담배를 55°C로 20분 처리하였을 때 정상식물체는 고사하였고 DNA laddering 현상이 일어났으나, 형질전환된 식물체는 생존하였고 -20°C 30분간 처

K. S. Seo · B. W. Min (✉)
경북대학교 생태환경대학 생태환경시스템학부 식물자원환경전공
(Division of Ecological & Environmental System, Kyungpook
National University)
e-mail: minbw@knu.ac.kr

온 처리에서도 이와 동일한 결과를 얻었다. 또한 수분스트레스를 주었을 때도 형질전환체는 수분스트레스에서도 저항성을 나타내었다 (Dickman et al. 2001; Li et al. 2004; Xu et al. 2004). 요즘 건강에 대한 인식이 높아지면서 소비자들의 기호는 채소를 선호하는 등 다양하게 변화되고 있다. 이와 같은 변화에 따라 복합내병성 채소의 개발이 시급한 것으로 사료된다. 최근 분자생물학의 발달로 유전자를 클로닝할 수 있게 됨에 따라 획득된 다양한 유전자를 상추에 도입하려는 연구가 활발히 진행되었다 (Jung et al. 1999). 오존내성 유전자, 저온내성 관련 유전자, 저장단백질 유전자 등이 형질전환 기법을 이용하여 상추에 도입하였다는 연구보고가 있다 (Tirres et al. 1993; Chung et al. 1998a; Jeong et al. 2000; Kim and Kim 2000; Kim et al. 2001). 기존의 단일유전자의 도입을 통한 내병성 및 내재해성 작물의 육성은 결과적으로 한계점에 봉착하고 있으며 내병성의 경우 바이러스병에 대해 coat protein 유전자를 도입한 경우에만 저항성을 나타내었으나 이 경우에도 세대가 진전될수록 저항성의 정도가 불안정하게 나타났고, 특히 곰팡이병의 경우에는 단일유전자의 도입으로 내병성작물을 육종하는 것은 지금까지의 경험으로 비추어 볼 때 어려운 것으로 사료 된다. 본 실험에서 사용된 Bcl-2 family에 속하는 유전자는 apoptosis의 조절에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다 (Dickman et al. 2001; Li et al. 2004; Xu et al. 2004). 나아가 이 유전자들은 식물의 발달과정에 중요한 역할을 하며 특히 세균, 곰팡이 및 바이러스와 같은 병원균과 식물체간의 상호기작에 크게 관여하는 것으로 보고되고 있다 (Dangl and Jones 2001; Yin et al. 2004; Xu et al. 2004). 본 실험은 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환을 통하여 내병성 형질을 가진 상추의 육성을 목적으로 하였다. 내병성 상추의 개발을 위하여 apoptosis에 관련하는 유전자인 Bcl-2 유전자를 상추에 형질전환하였으며 유전자가 도입된 상추에 균핵병균 (*Sclerotinia sclerotiorum*)을 접종하여 저항성을 나타내었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

식물재료

형질전환에 사용한 상추종자는 농우바이오 시판종인 연산홍 적측면 (*Lactuca sativa* L. cv. Yeonsanhong) 종자를 분양 받아 사용하였다. 종자는 70% 에탄올에 30초간 담근 후 2%의 sodium hypochlorite 용액에 15분간 소독을 하였다. 소독을 마친 종자는 무균수로 3번 씻어준 후 호르몬이 첨가되지 않은 1/2 MS 기본배지 (Murashige and Skoog 1962)에 파종 후 광조건 (25±1°C, 16시간 명/8시간 암)에서 발아시켰다.

유전자 cloning 및 형질전환용 vector제작

본 실험에 사용된 0.7 kb 크기의 Bcl-2 유전자는 배재대학교 민병훈박사로부터 제공받아 사용하였다. 상추의 형질전환을 위하여 벡터의 *EcoR* I과 *Nco* I site에 TEV-leader를 클로닝하고 이어서 *Nco* I과 *Xba* I site에 Bcl-2 유전자를 연결하였다. 마지막으로 CaMV 35S promoter의 조절하에 항생제 선별마커인 *nptII* 유전자를 클로닝하여 binary 벡터 pPTN161을 구축하였다. 구축된 binary 벡터는 *Agrobacterium tumefaciens* 균주 GV3101에 도입하였으며 YEP medium (10 g/L yeast extract, 10 g/L peptone, 5 g/L NaCl, pH 7.0)에 배양하여 상추형질전환에 사용하였다 (Fig. 1).

식물체 재분화 및 형질전환

형질전환을 위해 O.D600 = 0.7 정도까지 잘 자란 *Agrobacterium* 현탁액 20 ml을 원심분리시킨 뒤, 전처리 액체배지 (MS 3%, 0.5 mg/L BAP, 0.1 mg/L NAA, pH 5.8) 20 ml에 *Agrobacterium* pellet을 희석시켜 만든 *Agrobacterium* 현탁액에 발아 후 3일 된 상추의 엽병이 약간 포함된 자엽 절편체와 함께 15분간 공동배양 하였다. 공동배양배

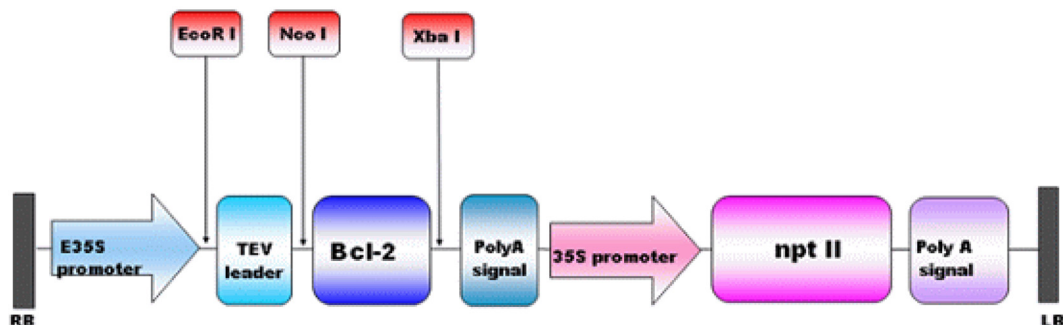


Fig. 1 T-DNA regions of the binary vector pPTN161. LB: Left border, RB: Right border, NPTII: neomycin phosphotransferase gene, P35S: CaMV 35S promoter, nos 3': termination signal of nopaline synthase

지 (MS 3%, 0.5 mg/L BAP, 0.1 mg/L NAA, pH 5.2)에 치상하고 암 상태에서 48시간 배양하였다. 본 실험에 사용된 균주의 선발마커로 kanamycin 저항성 유전자가 삽입되어 있으므로 형질전환체 선발은 100 mg/L kanamycin과 *Agrobacterium*의 제거를 위하여 300 mg/L lilacillin (penicillin-sulfate sodium)이 함께 첨가되어있는 선발배지에 4주 정도 배양한 후, 동일한 배지에 다시 계대배양하여 형질전환체를 선발하였다. 선발배지에서 살아남은 식물체들은 100 mg/L kanamycin, 200 mg/L lilacillin이 첨가된 배지에서 신장시킨 뒤, 100 mg/L lilacillin이 첨가된 MS배지에서 발근을 유도하였다.

Kanamycin 선발 조건의 규명

상추 자엽 절편체의 형질전환체 선발조건을 규명하기 위해서 kanamycin 내성정도를 검정하였다. 각기 다른 농도의 kanamycin (0, 30, 50, 70, 100, 150 mg/L)으로 처리한 재분화 배지에 상추 절편체를 치상하여 kanamycin 내성 여부를 검정하였다.

형질전환체 검정

형질전환체로 추정되는 식물체를 순화시켜 본엽이 2~4매 되었을 때 새로 나온 잎 100 mg을 채취하여 genomic DNA를 뽑아 Bcl-2 유전자 specific primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. 반응조건 94°C에서 7분, 94°C 1분, 55°C 1분 그리고 72°C에서 1분 동안 35 cycle을 반복 실행하였다. 최종 마지막 단계에서 72°C 5분 동안 신장반응을 실시하였다. PCR반응이 끝난 뒤 생성된 PCR 산물은 0.8% agarose gel에서 전기영동 후, EtBr 염색을 하여 UV하에서 확인하였다. PCR 검정된 형질전환 상추는 Southern blot 분석을 위해 온실에서 순화시킨 뒤, 잎 1 g정도를 채취하여 genomic DNA를 CTAB법으로 추출하여 DNA를 제한효소 *Bam*HI로 절단한 뒤 0.8% agarose gel상에서 0.5 × TAE buffer 400 ml을 넣고 30 V로 12~16 시간 정도 전기영동을 시킨 후 gel을 0.25 N HCl 용액에 넣고 20~30분동안 천천히 흔들여 주었다. 다시 0.4 N NaOH가 들어있는 변성액에 한 시간 동안 진탕시킨 후, nylon membrane에 전이시켰다. 전이된 membrane을 2× SSC, 0.2 M Tris.HCl에서 30분동안 고정시켰다. Hybridization solution (5× SSC, 5× Denhart's reagent 0.5% SDS, 100 µg/ml denaturated fragmented salmon sperm DNA)에 membrane을 넣고, labelling된 probe (Bcl-2 gene, ³²P-dCTP)를 넣어 65°C에서 진탕하면서 overnight 시켰다. 2× SSC, 0.1% SDS가 들어있는 세척액에 넣고 65°C에서 30분 내지 한시간 동안 두세번 씻어준다. 카세트위에 랩을 놓고 그 위에 membrane을 올리고 물기를 제거한 후, 다시 랩으로 감싼 다음 X-ray film을 올려서 -70°C에 24시간 감

광시켰다.

Northern blot 분석

Northern blot hybridization을 위한 형질전환 상추 식물체의 어린잎으로부터 total RNA의 추출은 Logemann 등 (1987)의 방법에 준하여 하였으며 전기영동은 1.2% formaldehyde agarose gel상에서 수행하였고, Sambrook et al (1989)의 방법에 준하여 Bcl-2 cDNA의 0.7 kb절편을 ³²P-dCTP로 labeling하여 probe로 사용하였다. Hybridization은 50% formamide, 5 X SSC, 0.05 M phosphate buffer, Denhardt's solution을 이용하여 42°C에서 수행하였다.

균핵병균 (*Sclerotinia sclerotiorum*)의 접종실험

형질전환상추에 대한 내병성 실험을 하기위하여 균핵병의 원인균인 *Sclerotinia sclerotiorum*를 현탁배양하여 현탁액에 멸균된 귀리종자를 침전한 후 귀리종자를 대조구와 형질전환상추의 잎에 치상하여 접종하였다. 실험에 사용한 식물체는 25°C, 16시간의 광주조건하에서 온실에서 3주 정도 기른 후 접종실험을 수행하였다. 접종실험은 동일한 방법으로 3번의 반복실험을 하여 정확한 결과를 유도하였다.

결과 및 고찰

Kanamycin 농도에 의한 선발조건 확립

항생제 선발조건은 자엽 절편체를 재분화배지에 kanamycin 농도별 (0, 30, 50, 70, 100, 150 mg/L)로 처리하여 4주 후에 생존여부를 조사한 결과, 70 mg/L의 농도에서 고사되는 절편체가 관찰되었다. 100 mg/L와 150 mg/L 농도에서는 절편체가 대부분 고사하였다 (Fig. 2). 이는 50 mg/L Kanamycin의 농도로 형질전환체를 선발했다는 보고보다는 높은 Kanamycin 내성을 나타내었다 (Chung 등 1998a; Chung 등 1998b). 본 실험에서 100 mg/L Kanamycin의 처리농도에서 대부분의 절편체들이 전혀 반응이 없었고, 보다 강력하게 발현되는 형질전환체들을 선발하고자 100 mg/L의 농도로 형질전환체를 선발하였는데 이는 Paek 등 (2000)의 보고와 일치한 결과이다.

상추의 형질전환

상추 자엽 절편체는 내병성을 증진시키는 Bcl-2 유전자와 표지유전자로써 kanamycin에 저항성이 있는 nptII gene을 포함하는 식물발현용 binary vector pPTN161을 가지는

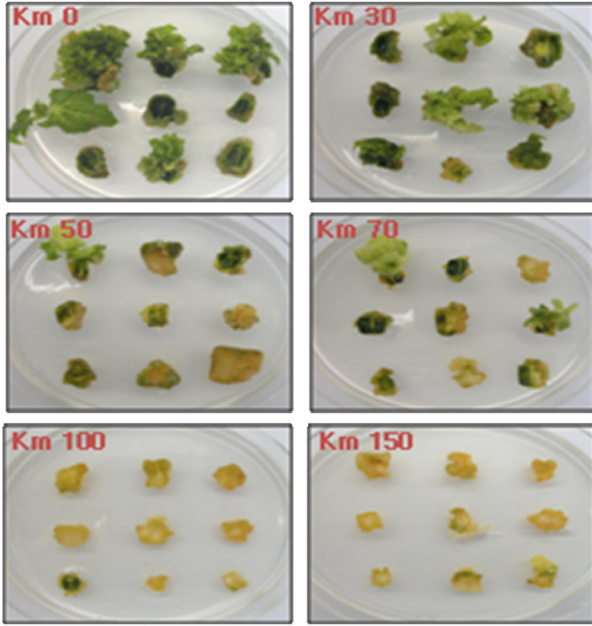


Fig. 2 The effect of various kanamycin concentration on shoot growth

Agrobacterium tumefaciens GV3101과 공동배양 한 후, 100 mg/L kanamycin과 300 mg/L lilacillin이 첨가된 선발배지에 치상하여 선발하였다. 배양 1-2주부터 자엽 끝부분에 callus가 형성되기 시작되었고 (Fig. 3A), 3주 정도 지나면서 callus에서 신초가 유기된 절편체들을 확인할 수 있었다 (Fig. 3B). 이러한 신초들은 4주정도 지난 후에 자엽 절편체와 분리하여 다시 선발배지에 계대배양을 해주어 확실한 항생제 내성을 가진 식물체들을 선발하고자 하였다 (Fig. 3C). 그리고 발근배지에 kanamycin이 첨가되는 경우는 뿌리의 형성이 어려우므로 재분화 배지에 비해 발근배지의 kanamycin의 양을 줄이는 것이 발근에 효과적이라는 보고 (Lyu, 등2001; Eliseu 등 1994; Yang 등 1998)를 근거로 200 mg/L lilacillin과 50 mg/L의 kanamycin의 양으로 뿌리를 유기 시키거나, 아니면 선발배지에서 두 번에 걸친 계대배양으로 선발되었다고 가정이 되는 식물체들은 200 mg/L lilacillin만 들어있는 배지에서 발근을 유도하였다 (Fig. 3D). 선발된 식물체는 4주의 순화과정을 거쳐 토양에 이식한 후 온실에서 배양하였다 (Fig. 3E). 상추의 형질전환율을 조사해본 결과 전체 3,828 절편체를 접종하여 식물체를 재분화시키고 PCR을 수행하여 96 식물체에서 유전자가 도입되었음을 확인하였으며 2.4%의 형질전환율을 보였다 (Table 1). 이러한 형질전환율은 일반적으로 형질전환율이 어렵다고 보고된 오이 (0.2%), 배추

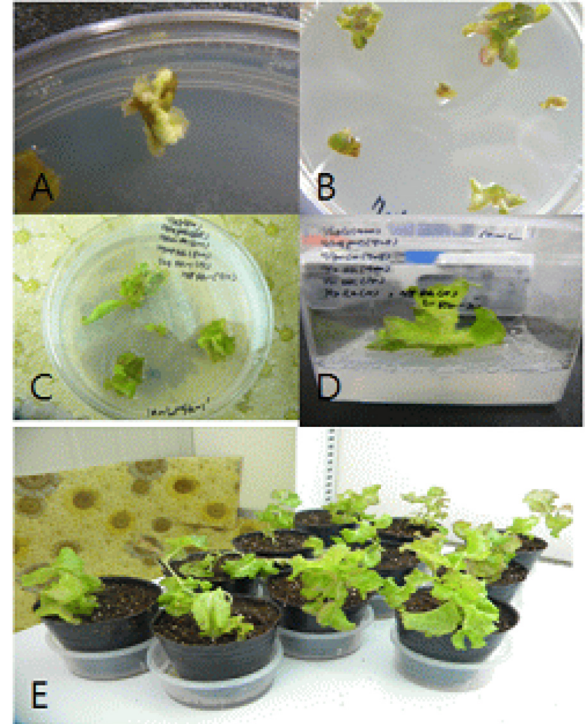


Fig. 3 Developmental stages of lettuce transformed by *Bcl-2* gene. A: Callus formation stage (2 weeks after culturing) from cotyledons. B: Shoot formation stage (6 weeks after culturing). C: Elongation stage (8 weeks after culturing). D: Acclimation stage (3 months after culturing). E: Development of flower stalk

(0.8%), 컬리플라워 (1.2%) 보다 높게 나타나 상추가 앞으로 형질전환의 모델식물로서 이용가치가 있다고 사료된다.

형질전환체 검정

상추 genome 내로 *Bcl-2* 유전자의 도입을 확인하기 위해서, 선발배지에서 살아남은 식물체와 정상적인 식물체의 genomic DNA를 추출하여 0.7 Kb의 *Bcl-2* 유전자 단편만이 증폭되도록 제조된 primer를 이용하여 PCR을 수행하여 형질전환 여부를 확인하였다. 반응결과 정상적인 식물체에서는 유전자 단편의 증폭이 전혀 이루어지지 않았고, kanamycin이 첨가된 선발배지에서 생존하여 유기된 식물체들은 예상크기인 0.7 Kb의 *Bcl-2* 유전자 단편 밴드가 뚜렷하게 나타나 유전자가 정상적으로 상추의 genome 내에 도입되었음을 확인하였다 (결과 미제시). 또한 PCR 검정을 통하여 *Bcl-2* 유전자의 도입을 확인한 식물체의 genomic DNA를 분리한 후 pPTN 161백터의 유일한 cutting site인 *BamH* I으로 절단하고 *Bcl-2* 유전자를 probe로 Southern

Table 1 Transformation efficiency of lettuce selected by kanamycin

| Gene | No. of explants tested | No. of transformed plants | Transformation efficiency (%) |
|--------------|------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| <i>Bcl-2</i> | 3,828 | 92 | 2.4 |

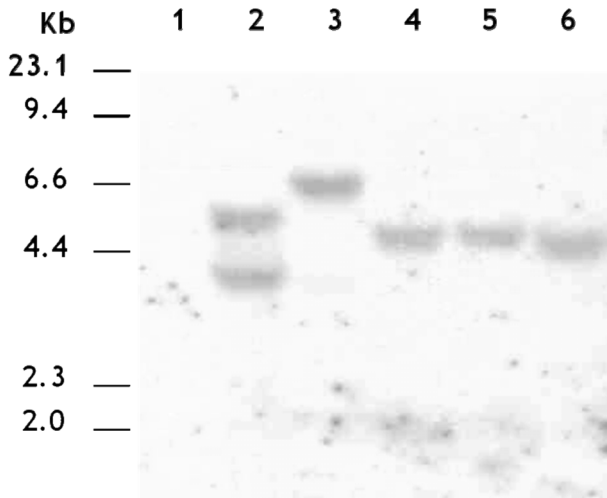


Fig. 4 Southern blot analysis of lettuce transformed by Bcl-2 gene. Ten microgram of genomic DNA was digested with *BamH* I and blotted on nylon membrane. The blot was hybridized with the 0.7 kb Bcl-2 coding region labeled with ³²P-dCTP as a probe. 1: nontransformed control plants, 2-6: transgenic plants

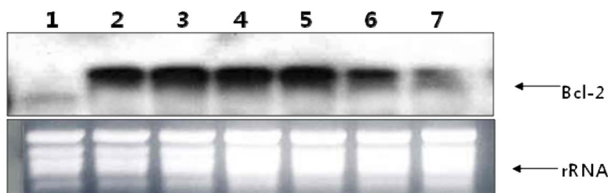


Fig. 5 RNA gel blot analysis of transgenic lettuce plants. For each lane, 2 µg of mRNA was fractionated on a formaldehyde-containing agarose gel and blotted on nylon membrane. The membrane was hybridized with a [³²P]-labeled 0.7kb Bcl-2 fragment. 1: Nontransgenic plant, 2-7: Transgenic plants

blot 검정을 수행하였다. 그림4에서 보는 바와 같이 예상 하였던 4.0kb 이상의 크기를 가진 1개 또는 2개의 밴드가 강하게 나타났다. 따라서 Bcl-2 유전자가 genome내 안정적으로 도입되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 4). Bcl-2 유전자가 상추의 genome에 도입되어 발현되었음을 확인하기 위하여 m-RNA를 분리하여 Northern blot 분석을 수행해본 결과 대조구로 사용된 식물체에 band가 나타나지 않는데 비해 형질전환식물체는 모든 lane에 0.7kb 크기의 band가 확인되었다 (Fig. 5). 형질전환이 확인된 상추는 순화과정을 통하여 정상적으로 생육하였다.

형질전환 상추의 내병성 검정

형질전환이 확인된 20 line의 형질전환체로부터 T1종자를 채종하여 각 line별로 50개의 식물체를 파종하여 본엽이 5~6매 시기에 균핵균을 접종하여 전체 1000개의 식물체로부터 저항성 line을 선발하였다. 접종 후 1주일이 경과한 후 총 20 line중 2개의 line (line 135, 151)에서 균핵

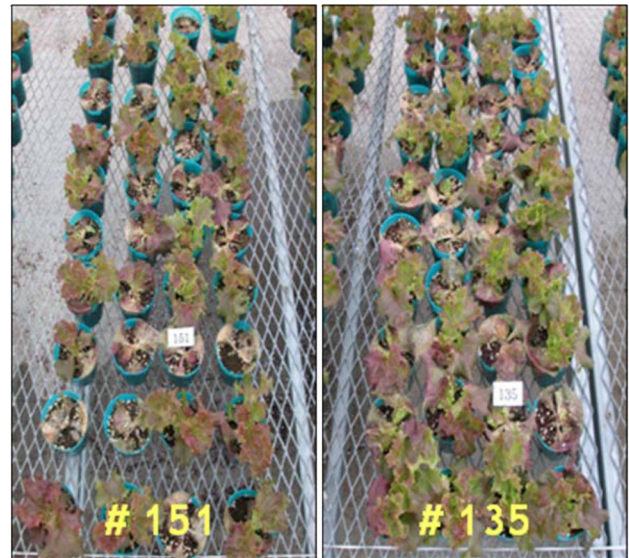


Fig. 6 The segregation ratio between transgenic and non-transgenic was ca. 3:1, a simple Mendelian segregation ratio in the T₁ generation



(A) Nontransgenic plants (B) Transgenic plants

Fig. 7 Plant inoculation and disease resistance assays of T₁ plants

병에 대한 강한 저항성을 보인 반면 (Fig. 6) 나머지 18개의 line에서는 전부 이병성을 나타내었다. 선발된 2개의 line 135와 151에서 균핵병에 대한 저항성과 이병성 개체를 조사해본 결과 멘델의 분리비와 일치하는 3 : 1의 비율을 나타내었다. 그림 7에서 보는 바와 같이 형질전환체와 비형질전환체에 동시에 접종한 결과 비형질전환식물체가 5일 이내에 전부 이병성을 나타낸 것에 비해 형질전환체는 강력한 내성을 나타내었음을 볼 수 있다. 식물체의 병징을 관찰해 본 결과 토양 가까이의 잎의 엽병과 지면에 접해 있는 잎의 뒷면에서 발병하는 경우가 많았으며 초기에 수침상의 병반이 확대되고 담갈색으로 변하면서 연화되었다. 이러한 잎은 대부분 지면에 수직으로 있었고 이병엽을 뒤집어 보면 백색의 균사가 보였고

병세가 진전되면 내부에까지 발병하고 연화 부패해서 잎의 사이 등에도 백색의 균사가 보였다. 병이 더욱 진전되면 흑색의 균핵을 형성하였고 처음에는 식물체의 지제부가 담갈색으로 물러 썩고, 진전되면 흰 균사가 자라면서 그루 전체가 썩는 현상이 관찰되었다.

적 요

본 실험에서는 상추 연산홍에 apoptosis 관련 유전자인 Bcl-2 유전자를 도입하여 내병성 상추의 육성을 하기 위한 목적으로 형질전환을 수행하였다. 상추의 자엽조직을 NPTII-35S Promoter와 Bcl-2 유전자가 삽입된 *Agrobacterium* GV 3101과 공동배양 한 후 0.1 mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP, 100 mg/L Kanamycin, 300 mg/L Lilacillin이 첨가된 MS 배지에서 식물체가 유기되었다. Kanamycin 내성을 가진 식물체들을 PCR, Southern blot 분석을 통해 Bcl-2 유전자가 안정적으로 식물체 genome 안에 삽입되었음을 확인하였다. 100개의 형질전환식물체가 확인되었으며 T1 식물체를 채종하였다. T1 종자를 파종하여 *Sclerotinia sclerotiorum*. 균주를 접종하여 내병성 검정을 실시하였고 그 중 2개의 line에서 내병성을 확인하였다. 이러한 결과를 통하여 인간의 apoptosis에 관련하는 유전자가 식물체 내에서 안정된 발현을 통하여 내병성을 증가시켰음을 밝혔다.

인용문헌

- Chung JD, Kim CK, Kim KM (1998a) Expression of chinese cabbage glutathione reductase gene in lettuce (*Lactuca sativa* L.). Korea J Plant Tissue Culture 25:267-271
- Chung JD, Kim CK, Kim KM (1998b) Expression of glucuronidase (GUS) gene in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) and its progeny analysis. Korea J Plant Tissue Culture 25:225-229
- Dangl JL, Jones IDG (2001) Plant pathogens and integrated defense responses to interaction. Nature 411:826-833
- Dickman MB, Park YK, Oltersdorf T, Li W, Clemente T, French R (2001) Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. Proc Natl Acad Sci 98:6597-6962
- Eliseu S, Figueiredo LFA, Monte-Neshich DC (1994) Transformation of potato (*Solanum tuberosum* cv Montiqueira) using *Agrobacterium tumefaciens* and evaluation of herbicide resistance. Plant Cell Rep 13:666-670
- Greenberg JT (1996) Programmed cell death: a way of life for plants. Proc Natl Acad Sci 93:12094-12097
- Hofius D, Schultz-Larsen T, Joensen J, Tsitsigiannis DI, Petersen NH, Mattsson O, Jorgensen LB, Jones JD, Mundy J, Petersen M (2009) Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in arabidopsis. Cell 137(4):773-783
- Joeng JH, Yang DC, Jang HG, Paek KY (2000) Transformation of lettuce (*Lactuca sativa* L.) using cold regulated gene (BN115). Korea J Plant Tissue Culture 27(1):7-12
- Jung M, Woo JW, Jeong WJ, Liu JR (1999) High frequency organogenesis and plant regeneration in tissue culture Lettuce seedling explants. Korea J Plant Tissue Culture 26(3):219-222
- Kim TG, Kim YS (2000) Heterologous expression of AmA1 gene encoding storage protein of Amaranthus in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.). J Kor Soc Hor Sci 41:495-498
- Kim SH, Nou IS, Choi CS, Kang KK (2001) Transformation of lettuce (*Lactuca sativa* L.) using iron storage protein ferritin gene. Korea J Plant Tissue Culture 28(3):147-151
- Kurihara Y, Watanabe Y (2004) A TMV-cg mutant with a truncated coat protein induced cell death resembling the hypersensitive response in Arabidopsis. Mol Cell 17:334-339
- Li W, Dickman MB (2004) Abiotic stress induces apoptotic-like features in tobacco that is inhibited by expression of human BCL-2. Biotechnology Letters. 26:87-95
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissue. Anal Biochem 163:16-20
- Lyu JA, Kim CK, Lee HS, Choi KB, Yang DC (2001) Transformation of PAT gene into lettuce (*Lactuca sativa* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. Kor J Plant Tissue Culture 28:197-200
- McLellan H, Gilroy EM, Yun BW, Birch PR, Loake GJ (2009) Functional redundancy in the arabidopsis cathepsin B gene family contributes to basal defence, the hypersensitive response and senescence. New Phytol 183(2):408-418
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497
- Paek KY, Joeng JH, Yang DC, Jang HG (2000) Transformation of lettuce (*Lactuca sativa* L.) using cold regulated gene (BN115). Kor J Plant Tissue Culture 27:7-12
- Pan L, Kawai M, Yu LH, Kim KM, Hirata A, Umeda M, Uchimiya H (2001) The *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein can function as a dominant suppressor of Bax-induced cell death of yeast. FEBS Letters 508:375-378
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Tirres AC, Cantliffe DJ, Laughter B, Bieniek M, Nagata R, Ashraf M, Ferl RJ (1993) Stable transformation of lettuce cultivar South Bay from cotyledon explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34:279-285
- Xu P, Rogers SJ, Roossinck MJ (2004) Expression of antiapoptotic genes bcl-2 and ced-9 in tomato enhances tolerance to viral-induced necrosis and abiotic stress. Proc Natl Acad Sci 101(44):15805-15810
- Yang DC, Min BH, Kwang TJ, Woo IS, Park EK (1998) Development of basta resistant tobacco using artificial phosphinothricin acetyl transferase gene. Korea J Plant Tissue Culture 11:188-194
- Yin Z, Hennig J, Szwacka M, Malepszy S. (2004). Tobacco PR-2d promoter is induced in transgenic cucumber in response to biotic and abiotic stimuli. J Plant Physiol 161(5):621-629