

형질전환 오이(*Cucumis sativus* L.) 식물체에서 완두 Superoxide Dismutase 유전자의 발현

김재훈 · 오승용 · 이행순 · 조만현¹ · 이은모¹ · 우인식¹ · 광상수*
생명공학연구소 식물생화학 Research Unit, ¹충남농촌진흥원 원예과

Expression of Pea Superoxide Dismutase Gene in Transgenic Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Plants

KIM, Jae-Whune · OH, Seung-Yong · LEE, Haeng-Soon · JO, Man-Hyun¹
LEE, Eun-Mo¹ · WOO, In-Sik¹ · KWAK, Sang-Soo*

Plant Biochemistry Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O Box 115, Yusong, Taejon, 305-600, Korea: and ¹Dept. of Horticulture, Chungnam Provincial RDA, Taejon, 305-313, Korea. *Corresponding author.

To develop the fruits of cucumber (*Cucumis sativus* L.) producing high yields of superoxide dismutase (SOD), the MnSOD cDNA from pea (*Pisum sativum*) under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter was introduced into cucumber using *Agrobacterium tumefaciens* (strain LBA 4404)-mediated transformation. The kanamycin-resistant shoots were selected on the selection medium containing MS basal salt, 1.0 mg/L zeatin, 0.1 mg/L IAA, 300 mg/L claforan, and 100 mg/L kanamycin. After 6 weeks of culture on the selection medium, the shoots were transferred to MS medium containing 0.2 mg/L NAA to induce roots. PCR analysis using the primers for neomycin phosphotransferase (NPTII) gene revealed that three plantlets were transformed. The fruits of one transgenic plant had approximately 3.2-fold higher SOD activity than those of non-transgenic plants. MnSOD isoenzyme band was strongly detected on native gel in fruits of transgenic plants.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, cucumber, fruits, SOD activity.

Superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)는 산소를 소비하는 모든 생물종에 존재하며 산소분자가 환원($2O_2 + 2e^- \rightarrow 2 \cdot O_2^-$)되어 생기는 superoxide anion radical ($\cdot O_2^-$)을 제거하는 효소($2 \cdot O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)이다(McCord and Fridovich, 1969). SOD 작용에 의해 생성된 과산화수소(H_2O_2)는 peroxidase (POD) 또는 catalase에 의해 독성이 없는 물(H_2O)로 변환된다. Superoxide anion radical과 과산화수소는 철 존재하에서 가장 독성이 높은 활성산소종인 hydroxyl radical ($\cdot OH$)을 생성한다. 따라서 SOD는 superoxide anion radical의 제거와 함께 hydroxyl radical의 생성을 예방하는 역할을 하기 때문에 생체방어기구에 관여하는 중요한 항산화효소이다(Bowler et al., 1992; Bowler, 1994).

이러한 효소학적 특성을 지닌 SOD는 환경스트레스에 의

해 생성되는 생체내 활성산소종을 제거하는 환경내성인자로 중요할 뿐만 아니라 의약품, 식품, 화장품 등에 이용될 수 있는 가능성이 제시되고 있다. 특히 SOD는 항염증제로서 관절염, 류마티즈 등에 유효할 뿐 아니라 허혈성 심질환, 방사선 장해방지 등에도 유효성이 인정되어 SOD관련 의약품 개발이 미국, 일본의 제약회사에서 활발히 진행되고 있다(Bannister et al., 1987; Oyanagui, 1989). 이미 국내에서도 노화방지용 SOD함유 화장품이 시판되고 있으나, SOD 활성 유지가 어려운 관계로 SOD를 주성분으로 한 화장품은 거의 출시되고 있지 않은 실정이다. 의약품으로서 SOD 개발에 있어 문제점은 체내로의 이동과 생체내에서의 활성을 유지시키는 것이 관건이 되고 있어 제약회사에서는 SOD를 polyethylene glycol, lecithin 등과 결합시켜 생체내로의 이동을 용이하게 하고 생체내에서의 수명연장에 주안점을 두고

있다(Igarashi, 1993).

SOD 유전자의 식물형질전환 연구는 주로 제초제(methyl viologen 등), 오존, 저온 등 환경스트레스에 대한 내성기구 해석과 환경내성식물 개발에 주안점을 두고 많은 연구가 보고되고 있다(Allen, 1995; McKersie et al., 1993, 1996; Peri et al., 1993; Sen Gupta et al., 1993 a,b; Van Camp et al., 1994, 1996). 그러나 vaccine 유전자를 바나나 등에 도입하여 먹는 백신(edible vaccine)과 같이 SOD를 먹을 수 있는 식물 조직에 과량발현하는 식물생체반응기(plant bioreactor) 시스템을 개발하고자 시도된 예는 없다(Goddijn and Pen, 1995; Dixon and Arntzen, 1997; Mason and Arntzen, 1995).

오이(*Cucumis sativus* L.)는 우리나라에서 재배가 많이 되는 채소작물로 식품으로서 부가가치가 높을 뿐 아니라 오이를 이용한 맛사지용 팩은 영양분의 공급이나 노폐물 및 각질의 제거, 염증에 대한 진증효과, 미백, 보습 등 여러 가지 효능이 있어 많이 이용되고 있으며, 최근에는 자외선에 피해를 입은 피부에 SOD를 바르면 SOD가 피부의 표피속으로 침투되어 손상된 피부가 회복(보호)된다는 보고도 있다(Emerit et al., 1997). 따라서 본 연구는 오이에 SOD 유전자를 과량발현시켜 피부 맛사지용 팩은 물론 신기능성 식품 등으로 이용될 수 있는 SOD 고함유 오이의 개발 가능성을 조사하기 위해 완두의 SOD 유전자를 오이 자엽절편에 도입하여 형질전환체를 만들고자 하였다.

재료 및 방법

자엽절편으로의 SOD 유전자의 도입

오이(*Cucumis sativus* L.) 종자(품종: 조생낙합)를 Kim et al., (1998a)의 방법으로 MS (Murashige and Skoog, 1962) 배지에서 발아시켰다. 발아 7일째 되는 자엽의 기저부(basal part)를 절단한 자엽절편(500개)을 10 μ M acetosyringone을 첨가한 *Agrobacterium* 배양액에 10분 동안 침지시킨 후, 수분을 제거하고 1.0 mg/L zeatin과 0.1 mg/L IAA이 함유된 MS배지(MS-ZI)에 옮겨 약 15 μ mol m⁻² · s⁻¹의 형광빛 아래에서 명 16시간, 암 8시간의 광주기로 4일간 배양하면서 *Agrobacterium tumefaciens* (strain LBA 4404)을 감염시켰다. 형질전환에 사용한 plasmid Bin19 binary 벡터는 완두(*Pisum sativum*)의 MnSOD cDNA (Schake, 1995)와 kanamycin 저항성유전자(neomycin phosphotransferase II, NPTII)를 cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter에 연결한 것으로 Dr. Allen (Texas Tech University)으로부터 분양받은 것이다. 자엽절편을 *Agrobacterium*에 감염시킨 후 MS-ZI배지에 300 mg/L claforan과 100 mg/L kanamycin이 함유된 MS선발배지(MS-ZICK)에 옮겨 형질전환 개체를 선발하였다.

형질전환체의 선발 및 식물체 재분화

선발배지에서 1주 간격으로 계대배양하면서 kanamycin 저항성을 가진 부정아만을 선발하였다. 선발배지에서 6주동안 배양한 후 kanamycin 저항성을 가진 부정아를 0.2 mg/L NAA 단독 또는 0.5 mg/L zeatin이 함께 첨가된 발근배지에 옮겨 뿌리를 유도하였다(Kim et al., 1998a). 식물체는 식물생장조절제가 첨가되지 않은 MS배지에서 키워, 잎이 3-4장 나왔을 때 화분에 이식하여 약 80%의 습도를 유지하면서 완전한 식물체로 생육시켰다.

PCR 분석

Kanamycin에서 선발된 소식물체의 잎조직으로부터 genomic DNA를 분리한 후 NPTII 유전자의 primer를 사용하여 PCR분석을 수행하였다. Sense primer (5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3')와 antisense primer (5'-ATGGGGAGCGGCGATACCGTA-3')를 이용하여 pre-cycling reaction으로 94°C에서 5분간 변성시키고, 94°C에서 60초, 65°C에서 60초, 72°C에서 90초의 순서로 45회 반복한 후 마지막으로 72°C에서 180초 반응시킨 후 종료시켰다. PCR 산물의 확인은 반응액 15 μ L를 1% agarose gel에 전기영동한 후 UV하에서 DNA band를 조사하였다.

SOD 활성

오이 과실의 SOD 활성은 xanthine oxidase (XOD)와 cytochrome c를 이용한 McCord와 Fridovich (1969)의 방법에 따라 측정하였다. 과실 중앙부위의 생체중 1 g을 10% glycerol을 포함한 0.2 M Tris-HCl 완충액(pH 6.8) 1 mL와 함께 얼음 위의 유발에서 마쇄한 후, 8,000 x g로 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 효소액으로 사용하였다. 효소측정을 위한 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) 47 mL의 혼합액을 조제하여 사용함]을 매번 조제하여 사용하였다. 반응액중 cytochrome c의 농도를 일정하게 유지하기 위하여 반응액을 만든 후 sodium dithionite로 매회 보정하였다. 효소반응은 상기반응액 1 mL와 효소액(약 10 μ L)을 큐벳에 넣은 후, 10-4 M EDTA를 포함한 0.05 M 인산완충액(pH 7.8)으로 25배 희석한 XOD 10 μ L를 첨가하여 시작하였다. 효소활성의 1 unit는 25°C에서 반응을 시작하여 2분간 550 nm에서 흡광도 변화를 조사하여 XOD 활성이 50% 억제되었을 때로 정의하였다.

SOD의 native gel 전기영동

SOD의 전기영동은 native gel을 사용하여 Beauchamp와

Fridovich (1971)의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 13% polyacryamide gel을 사용하여 100 V에서 3시간 동안 SOD을 함유한 효소액을 전기영동시켰다. SOD의 검출은 gel을 염색액(50 mM KH₂PO₄, 0.1 mM EDTA, 0.2% TEMED, 0.026 mM riboflavin, 0.25 mM nitroblue tetrazolium의 혼합액)에 30분간 넣고 암상태에서 진탕하는 방법으로 하였다. 단백질 정량은 Bradford(1976) 방법을 사용하였고, 전기영동에는 일정액의 단백질(40 µg)을 loading하였다.

결 과

*Agrobacterium*에 의한 형질전환

완두콩의 MnSOD 유전자를 오이에 형질전환 시키기 위해 발아 7일째의 자엽절편(500개)을 형질전환 재료로 사용하였다. *Agrobacterium*과 4일간 공동배양한 자엽절편을 선발배지에서 약 15일간 배양하였을 때 kanamycin 저항성을 지닌 부정아가 유도되었다(Figure 1A). 자엽절편을 1주 간격으로 동일 선발배지에서 계대배양하여 형질전환된 부정아를 다시 선발하였다. 선발배지에서 6주간 배양하였을 때 약 4%(20개체)의 부정아가 자엽절편에서 유도되었다. 이 비율은 *Agrobacterium*에 감염시키지 않은 자엽절편으로부터 부정아 유도율(11-12%)과 비교하였을 때 현저하게 낮은 빈도였다(Kim et al., 1998a). 배양 6주 후 kanamycin 저항성을 가진 부정아만을 절단하여 발근배지에 옮겨 뿌리를 유도하였다(Figure 1B). 잎의 수가 3-4장 되는 소식물체를 화분에 옮겨 순화시켜 비닐하우스에서 생육시켰고, 형질전환 식물체는 대조식물체와 같이 정상적으로 개화하였으며 형태적으로도 차이점을 발견할 수 없었다(Figure 1C).

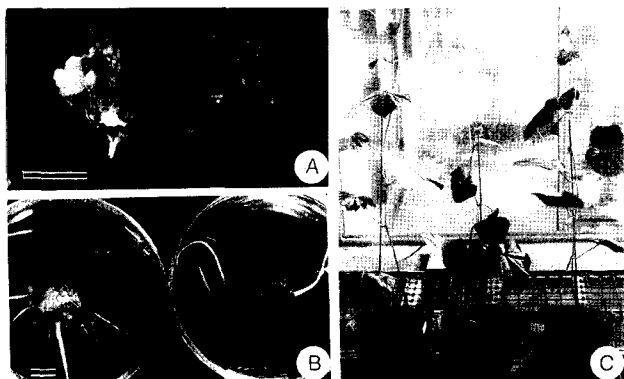


Figure 1. Plant regeneration by organogenesis from cotyledon cultures of cucumber (*Cucumis sativus* L.) transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. A, Shoots induced from cotyledons on selection medium; B, Kanamycin-resistant plantlets with roots and shoots; C, Transformed plants (middle and right plants) and non-transformed control plant (left plant) growing in the green house. Bars = 10 mm.

SOD 유전자의 확인 및 발현

SOD 유전자의 식물체로의 도입은 pBin19의 NPTII 유전자가 형질전환 식물체의 genomic DNA에 삽입되었는가를 PCR로 분석함으로써 확인하였다. Figure 2은 선발된 소식물체중 9개체의 PCR 분석결과를 나타낸 것으로 3개체(No. 1, 2, 3)에서 PCR산물로 0.7 kb의 DNA band가 관찰되었다. PCR 분석에 사용한 모든 소식물체를 순화시킨 후 성장한 식물체의 과실에 함유되어 있는 SOD 활성을 측정하였다. 그 결과 PCR에서 형질전환체로 추정되는 개체(No. 1 ~ 3)에서 SOD 활성이 *Agrobacterium*에 감염시키지 않고 재분화시킨 무처리 개체(C)와 형질전환되지 않은 대조개체(No. 4 ~ 9)에 비해 높았다(Figure 3). 특히 형질전환 개체중 1개(No. 1)는 무처리 개체에 비해 약 3.2배의 SOD 활성을 나타내었다. SOD와 같은 항산화효소인 peroxidase (POD)의 경우는 형질전환체와 무처리개체, 대조개체 모두 비슷한 활성을 나타냈다(Figure 3). 형질전환체에서 얻어진 과실의 SOD 활성을 native gel 전기영동분석한 결과, 형질전환체의

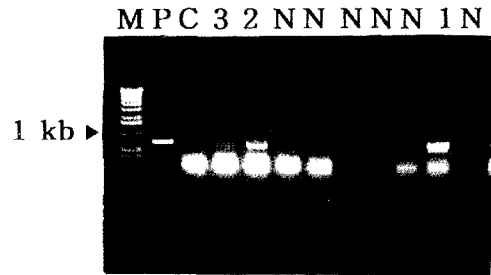


Figure 2. Confirmation of transgenic plant by PCR using NPTII gene primers and genomic DNAs from transformed and non-transformed control plantlets. Lane M, marker DNAs; Lane P, pBin19 binary vector; Lane C, non-transformed control plant; Lanes 1-3, PCR positive plantlets; Lanes N, PCR negative plantlets.

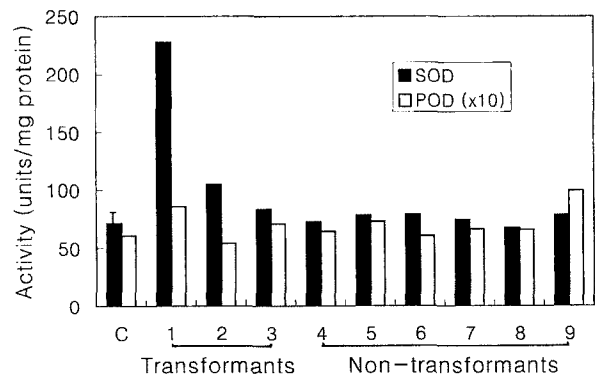


Figure 3. SOD and POD activities in fruits of transformed and non-transformed control plants regenerated from cotyledon cultures. C, non-transformed control plant; 1-3, PCR positive transformed plants; 4-9, PCR negative-transformed plants.



Figure 4. Native gel stained for the SOD activity from the fruits of transgenic and non-transformed cucumber plants. Equal amount of total protein (40 μ g) was loaded to each lane. Lane C, non-transformed control plant; Lanes 1-3, transgenic plants.

과실은 무처리개체에 비해 진한 MnSOD isoenzyme 밴드를 나타내어 완두 MnSOD 유전자가 오이과실에 정확하게 발현되었음을 확인하였다(Figure 4).

고 찰

쌍자엽식물을 *A. tumefaciens*으로 형질전환시킬 경우 첨가된 acetocyringone이 형질전환 효율에 효과가 없는 것으로 알려져 있다(Shimoda et al., 1990). 그러나 오이의 자엽(Chee, 1990), 잎(Sarmiento et al., 1992), 하배축(Nishibayashi et al., 1996) 등을 재료로 사용하여 *A. tumefaciens*와 공동배양할 때 acetocyringone을 첨가하면 형질전환율이 높아지는 것으로 보고되어 있다. 따라서 본 실험에서도 acetocyringone을 첨가하여 공동배양을 실시하였다. NPTII 유전자가 도입되지 않은 식물체는 50-100 mg/L kanamycin이 함유된 배지에서 성장이 거의 이루어지지 않는다고 보고되었다(Chee, 1990; Nishibayashi et al., 1996). 그러나, 본 연구에서는 *Agrobacterium* 감염 후 100 mg/L kanamycin이 첨가된 배지에서 선발된 9개의 형질전환체로부터 뿌리가 유도되었지만 PCR에 의해 NPTII 유전자도입이 확인된 개체가 3개에 불과하여 형질전환체의 선발에는 개선된 방법과 세심한 주의가 요구된다.

Kanamycin이 함유된 선발배지에서 선발되어 온실에서 정상적인 개체로 발달된 식물체에서 얻어진 과실의 SOD 함량은 PCR에서 NPTII 유전자도입이 확인된 3개체에서 정상식물보다 높았으며 특히 한 개체에서 SOD 함량이 정상식물보다 약 3배 높게 나타났다. 그러나 POD의 경우는 형질전환체나 정상식물체 모두 비슷한 활성을 나타냈다. 이것은 도입된 SOD유전자가 도입된 형질전환체의 SOD 활성이 수배에 불과하기 때문에 SOD에 의해서 생성되는 과산화수소를 기질로 이용하는 POD의 활성에는 거의 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 고구마 배양세포유래의 POD cDNA를 도입한 형질전환담배에서 POD 활성이 수배 높았지만 SOD를 비롯한 다른 항산화효소 활성에는 거의 영향을 주지 않은 결과와 일치한다(Huh et al., 1998). 형질전환

체 과실의 MnSOD isoenzyme 밴드는 형질전환체 잎의 NPTII 유전자의 PCR 결과(Figure 2)와 같이 강하였다(Figure 4). 형질전환체와 비형질전환체의 SOD isoenzyme 차이는 관찰되지 않았는데, 이와 같은 현상은 여러종의 식물체에서 분리된 SOD 유전자들의 염기서열은 매우 높은 상동성을 나타내므로 도입된 MnSOD isoenzyme이 오이가 지닌 내생 MnSOD와 발현양상이 같은 것으로 추정된다(Kanematsu and Asada, 1994). 또한 형질전환된 3개체에서 CuZnSOD isoenzyme이 다른 개체보다 강하게 검출되었는데 이에 대한 정확한 규명이 요구된다.

SOD를 과량발현하는 SOD 형질전환체는 일반적으로 오존, 저온, 건조 등 여러 가지 환경스트레스에 내성을 나타내는 것이 보고되고 있다. 특히 오이는 고온, 다습한 비닐하우스에서 대부분 재배되고 있기 때문에 노지재배에 비해 높은 환경스트레스를 받고 있을 것으로 추정되어, 본 연구에서 개발한 SOD 형질전환 오이식물체를 사용하여 여러 가지 환경스트레스조건에서 환경내성 특성을 앞으로 조사할 필요가 있다고 생각된다.

오이 과실의 SOD 활성(약 74 units/mg protein)은 식물배양세포의 활성보다 매우 낮은 것으로 나타나 유전자의 발현기구를 잘 조절하면 오이 과실내에 SOD 함량을 내생 SOD 함량보다 수배 또는 그 이상으로 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다(Kim et al., 1998b). SOD를 고생산하는 카사바와 토마토 배양세포의 활성은 오이 과실의 함량보다 20-40배 높다(You et al., 1996). 본 연구에서는 CaMV 35S promoter를 이용하여 SOD 유전자를 오이에 형질전환시켰으나 오이 과실에 과량으로 외래유전자를 발현시키기 위해서는 과실에서 우세적으로 발현하는 promoter를 사용할 필요가 있을 것으로 사료된다. 이러한 목적으로 저자들은 오이의 과실(외피와 중과피)에서 강하게 발현하는 ascorbate oxidase promoter (Ohkawa et al., 1994; Yoshida et al., 1994)을 사용한 SOD 형질전환연구를 진행중이다.

적 요

Superoxide dismutase (SOD)를 많이 생산하는 신기능성 오이(*Cucumis sativus* L.) 과실을 개발하기 위하여, 발아 7 일째의 자엽절편에 완두콩(*Pisum sativum*) 유래 MnSOD 유전자를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404의 매개로 형질전환시켰다. 1 mg/L zeatin, 0.1 mg/L IAA, 300 mg/L claforan, 100 mg/L kanamycin이 포함된 선발배지에서 부정아를 유도한 후, 1주일 간격으로 계대배양하면서 kanamycin 저항성 형질전환체를 선발하였다. 선발배지 배양 6주 후 kanamycin 저항성을 가진 부정아만을 절단하여 0.2 mg/L NAA가 함유된 발근배지에 옮겨 뿌리를 유도한 후, 화분에서 순화시켰다. 소식물체의 잎에서 DNA를 분리하여 PCR

로 분석한 결과, 3개의 식물체에서 선발마커유전자인 NPTII 유전자가 존재함을 확인하여 SOD 유전자가 오이에 도입됨을 확인할 수 있었다. 이중 한 개체의 과실에서 SOD 함량이 무처리개체에 비해 약 3.2배 높았으며 native gel 전기영동에서 도입한 SOD isoenzyme 밴드가 강하게 검출되었다.

사사 - 본 연구는 농림수산특정연구과제(AG420M)의 연구결과이다. SOD 유전자를 분양하여 준 미국 Texas Tech University의 Prof. Randy D. Allen에 감사한다.

인 용 문 헌

- Allen RD (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol* 10: 1049-1054
- Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G (1987) Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 22: 111-180
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44: 276-287
- Bowler C (1994) Superoxide dismutase in plants. *Crit Rev Plant Sci* 13: 199-218
- Bowler C, Van Montagu M, Inze D (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 83-116
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Chee PP (1990) Transformation of *Cucumis sativus* tissue by *Agrobacterium tumefaciens* and the regeneration of transformed plants. *Plant Cell Rep* 9: 245-248
- Dixon RA, Arntzen CJ (1997) Metabolic engineering in transgenic plants. *Keystone Symposia*, April 6-11, Copper Mountain, Colorado pp 1-27
- Emerit FP, Vassy J, Rigaut JP, Martin E, Freitas J, Fernandes A (1997) Epidermal localization and protective effects of topically applied superoxide dismutase. *Exp Dermatol* 6: 116-121
- Goddijin OJM, Pen J (1995) Plants as bioreactors. *Bio/Technology* 13: 379-387
- Huh GH, Yun BW, Lee HS, Jo JK, Kwak SS (1998) Overproduction of sweet potato peroxidases in transgenic tobacco plants. *Phytochemistry* 47: 695-700
- Igarashi R (1993) Lecithinized SOD. *Bio Industry* 10: 59-64
- Kanamatsu S, Asada K (1994) Superoxide dismutase. In T Fukui, K Soda, eds, *Molecular Aspects of Enzyme Catalysis*, Kodansha, Tokyo pp 191-210
- Kim JW, Oh SY, Lee HS, Kwak SS (1998a) Plant regeneration through organogenesis and somatic embryogenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Korean J Plant Tissue Culture* 25: 125-130
- Kim JW, Yoo SH, Oh SY, Lee HS, Seo JB, Choi KJ, Kwak SS (1998b) Superoxide dismutase activity in various cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivars. *Korean J Biotechnol Bioeng* (submitted)
- Mason HS, Arntzen CJ (1995) Transgenic plants as vaccine production system. *Bio/Technology* 13: 388-392
- McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte protein (Hemocytin). *J Biol Chem* 244: 6049-6055
- McKersie BD, Chen Y, de Beus M, Bowley SR, Bowley 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
- McKersie BD (1996) Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol* 111: 1177-1181
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Nishibayashi S, Kaneko H, Hayakawa T (1996) Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants using *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration from hypocotyl explants. *Plant Cell Rep* 15: 809-814
- 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 expression in transgenic plants. *Plant Cell Rep* 13: 481-488
- Oyanagui Y (1989) SOD and active oxygen modulators: pharmacology and clinical trials. *Nihon-Igakukan, Tokyo* pp 1-859
- Perl A, Perl-Treves R, Galili S, Aviv D, Shalgi E, Malkin S, Galun E (1993) Enhanced oxidative-stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu, Zn superoxide dismutase. *Theor Appl Genet* 85: 568-676
- Sarmento GG, Alpert K, Tang FA, Punja ZK (1992) Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and expression of kanamycin resistance in pickling cucumber. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31: 185-193
- Schake SA (1995) Analysis of pea chloroplastic MnSOD overexpressed in tobacco. MS thesis, Texas Tech University, Lubbock TX
- Sen Gupta A, Heinen JL, Holaday AS, Burke JJ, Allen RD (1993a) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Pro Natl Acad Sci USA* 90: 1629-1633
- Sen Gupta A, Webb RP, Holaday AS, Allen RD (1993b) Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress: Induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants. *Plant Physiol* 103: 1067-1073
- Shimoda N, Toyoda-Yamamoto A, Nagamine J, Usami S, Katayama M,

- Sakagami Y, Machida Y** (1990) Control of expression of *Agrobacterium vir* genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 8467-8471
- Van Camp W, Herouart D, Willekens H, Takahashi H, Saito K, Van Montagu M, Inze D** (1996) Tissue-specific activity of two manganese superoxide dismutase promoters in transgenic tobacco. *Plant Physiol* **112**: 525-535
- Van Camp W, Willekens H, Bowler C, Van Montagu M, Inze D, Reupold-Popp P, Sandermann Jr H, Langebartels C** (1994) Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage. *Bio/Technology* **12**: 165-168
- Yoshida K, Ito T, Nozawa H, Ohkawa J, Shinmyo A** (1994) Sequence requirement of 5'-upstream region of the ascorbate oxidase gene for organ-specific expression in cucumber. *Ann NY Acad Sci* **721**: 245-247
- You SH, Kim SW, Kim SH, Liu JR, Kwak SS** (1996) Selection and isoenzyme analysis of plant cell lines for high yields of superoxide dismutase. *Korean J Plant Tissue Culture* **23**: 103-106

(1998년 3월 13일 접수)