

저온 스트레스에 발현이 유도되는 콩의 L-asparaginase 유전자의 분리

박성환 · 김기영 · 진 량 · 이재현*

동아대학교 생명자원과학부

Isolation of cDNA Encoding Low Temperature-inducible L-asparaginase from Soybean (*Glycin max*)

PARK, Seong-Whan · KIM, Kee-Young · CHEN, Liang · LEE, Jai-Heon*

Faculty of Natural Resources and Life science, Dong-A University, 840, Hadan-2 dong, Saha-gu, 604-714, Busan

ABSTRACT Suppression subtractive hybridization (SSH) was used to isolate wound-induced cDNAs from wounded soybean. One of low-temperature-inducible cDNA, *slti182* showed high homology with genes encoding L-asparaginase. The full length cDNA of *slti182*, designated GmASP1, is 1258 bp long and contains an open reading frame consisted of 326 amino acids. GmASP1 protein showed the highest identity (84%) with putative asparaginase from *A. thaliana* (AB012247), but it showed only 55% identity with another isoform of *A. thaliana* (Z34884). The expression of GmASP1 during low temperature stress started to increase 3 hours after treatment, reached the maximum at 6 hour, and then decreased to the initial level at 48 hours. The amount of GmASP1 transcripts increased again when low-temperature-treated plants were transferred to room temperature. The present study suggests that GmASP1 may function to accelerate the protein synthesis which is important in the early response to low temperature.

Key words: Asparagine, cold acclimation, nitrogen metabolism, suppression subtractive hybridization

서 론

식물체는 다양한 환경요인의 변화, 즉 환경 스트레스에 적응하며 살아가야 한다. 저온 스트레스는 식물의 성장 및 생산성에 큰 영향을 미치는 환경요인 중 하나이다. 열대, 또는 아열대 식물들은 저온에 대한 적응성이 약해, 저온에 처했을 때 그에 적응하지 못하고 죽거나 심한 장애를 받는다. 반면에, 온대지역의 식물들은 저온에 처했을 때 다양한 생화학적, 생리적 변화를 통해 저온에 적응할 수 있는 능력을 갖추게 되는데, 이러한 현상을 cold acclimation이라 한다 (Guy 1990). Cold acclimation은 생물학적으로 매우 복잡한 반응으로 지질, 탄수화물, 단백질 조성의 변화, 형태적 변화 등의 다양한 현상을 수반하는데 (Xin and Browse, 1998), 이러한 변화는 저온 스트레스에 따른 유전자 발현의 변화에 기인한다 (Bohnert et al.

1995, Somerville et al. 1995).

Cold acclimation 동안에 수용성 당, 프롤린, 베타인 등의 osmolytes의 축적되는 현상은 많은 식물에서 보고되었는데, 이러한 osmolytes의 축적이 식물체의 저온저항성과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려졌다 (Wanner and Juntilla 1999, Xin and Browse 1998, Kishitani et al. 1994). 애기장대의 *eskimo* 돌연변이체의 경우, 실온에서도 다량의 당 또는 프롤린을 축적하고 있어 cold acclimation 과정을 거치지 않고도 항상 동결스트레스에 대해 저항성을 갖는다고 하였다 (Xin and Browse 1998). 식물체의 저온장애에는 저온처리에 발생하는 활성산소가 주된 역할을 하는 것으로 알려졌다 (Hodges et al. 1997, Pinhero et al. 1997). Scots pine 식물의 cold acclimation 동안에 활성산소를 제거하는 항산화 효소들의 활성이 증가함으로써 저온 저항성이 증가한다고 하였다 (Tao et al. 1998). 페놀화합물 역시 cold acclimation과 밀접한 관련이 있는 것으로 보인다. Winter oilseed 식물을 저온에서 장기간 키웠을 때 페놀화

*Corresponding author Tel 051-200-7592 Fax 051-200-6993
E-mail jhnlee@mail.donga.ac.kr

합물과 안토시아닌의 총 함량이 크가 증가한다고 하였다 (Solecka et al. 1999).

지금까지, 여러 종의 식물에서 저온에 의해 유도되는 다양한 저온유도 유전자들이 클로닝되었고 그들 유전자의 기능에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다 (Hajela et al. 1990, Suttent et al. 1992, Neven et al. 1993, Ferullo et al. 1997, Rorat et al. 1997, Takahashi and Shimozaki 1997, Thomashow 1998, Kim et al. 2001). 저온 유도 유전자들은 대부분 저온뿐 아니라 건조, 또는 염분 스트레스와도 밀접한 관계가 있는 것으로 알려졌다 (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2000, Browse and Xin 2001). 건조 스트레스에 의해 유도되는 많은 유전자들이 저온에 의해서도 역시 유도되며, 건조 및 염분 스트레스에 의해 합성이 유도되는 Abscisic acid (ABA)를 처리하였을 때에도 저온 스트레스 유전자들의 발현이 유도된다고 하였다. 이러한 저온 유도 유전자들은 ABA-의존성 신호전달체계를 통해 발현이 유도된다고 하였으며, 건조 스트레스와는 무관한 ABA-비의존성 신호전달체계가 별도로 존재한다고 하였다.

저온 스트레스 및 저온저항성에 대한 연구는 대부분 애기장대 식물에서 이루어졌기 때문에, 실제 농업적으로 유용한 작물의 저온저항성을 개선하기 위해서는 주요 작물을 대상으로 연구를 확대할 필요가 있다. 본 연구에서는 콩에서 suppression subtractive hybridization (SSH)라는 방법을 이용하여 저온에 의해 유도되는 유전자들을 탐색하고, 그 중 하나인 L-asparaginase 유전자의 전체 유전자를 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

공시재료는 *Glycin max* 신평달 2호 품종으로서, 비닐하우스에서 3주간 키운 식물체를 향온 (25°C) 배양실에서 16시간/일 광조건으로 일주일 동안 키운 후 실험에 사용하였다. 식물 배양실의 온도를 5°C로 낮춰 식물체를 저온 처리한 후 3시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 후에 각각 잎을 채취하여 RNA 추출 전까지 -75°C에서 보관하였다.

Suppression Subtractive Hybridization (SSH)

앞으로부터의 RNA 분리는 Verwoerd 등 (1988)의 방법을 응용하여 수행하였고, RNA로부터 mRNA 분리는 oligotex™ mRNA isolation kit (Qiagen, USA)를 이용하였다. 저온처리한 후 3시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 후에 채취한 잎에서 추출한 RNA를 하나로 합쳐 그로부터 mRNA를 분리하였다. mRNA로부터 합성한 cDNA를 tester로 하고, 아무런 처리도 하지 않은 식물체의 mRNA로부터 합성한 cDNA를 driver로 하여 SSH를 수행하였다. SSH는 PCR-select cDNA subtraction

kit (Clontech, USA)를 이용하여 kit에 제공된 방법에 따라 수행하였다. Advatage-2 PCR kit (Clontech, USA)를 이용하여 subtracted cDNA를 증폭하였으며, PCR 증폭된 cDNA는 original TA cloning kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 클로닝하였다.

염기서열 분석

DNA 염기서열은 ALFexpress (AP biotech) 시스템을 이용하여 결정하였으며, 결정된 염기서열은 PCGENE (IntelliGenetics, Inc., Release 6.60) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 단백질서열의 비교 및 유연관계 분석에는 ClustalX (version 1.81) 프로그램을 이용하였다.

RACE (rapid amplification of cDNA ends)

SSH로부터 얻은 L-asparaginase cDNA 단편의 염기서열을 기초로 oligonucleotide를 제작하고, SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech)를 이용하여 3'-말단의 cDNA를 증폭하였다. 증폭된 cDNA는 pCR2.1 vector (Invitrogen)에 클로닝하고 그 염기서열을 결정하였다. 3'-RACE에 사용된 oligonucleotides의 염기서열은 CACACA AAAACTCAGGGT AGGGCAG이다.

Southern 분석

콩의 어린잎으로부터 Shure 등 (1983)의 방법으로 게놈 DNA를 추출하였고, 10 µg DNA를 *EcoRI* 또는 *HindIII* 제한효소로 절단하였다. 절단된 DNA는 0.8% agarose gel에서 전기영동한 후, Sambrook과 Russell (2000)의 방법에 따라 nylon membrane에 고정시켰다. Probe DNA는 Ladderman™ labeling kit (TaKaRa)를 이용하여 [α -³²P]dCTP로 방사선 표지하였다. Hybridization은 Church와 Gilbert (1984)의 방법에 따라 수행하였으며, hybridization을 마친 필터는 2×SSC/0.1%SDS 용액으로 상온에서 두 번 세척하고 0.1×SSC/0.1%SDS 용액으로 상온에서 한 번, 68°C에서 한 번 세척하였다.

Nothern 분석

각 샘플로부터 분리한 20 µg의 RNA를 1% agarose gel에서 전기영동한 후 nylon membrane에 고정시켰다. Probe DNA 준비와 hybridization, 필터의 세척은 기본적으로 Southern 분석과 동일한 방법으로 수행하였다.

결과 및 고찰

저온 처리한 앞에서 준비한 cDNA를 tester DNA로 하고, 정상온도에서 자란 잎의 cDNA를 driver DNA로 하여 SSH를 수행하였고, 이를 통해 얻어진 subtracted cDNA를 플라스미드 벡터에 클로닝 하였다. SSH를 이용하여 분리한 cDNA들의 염기서열을 분석해본 결과, 그 중 하나인 *stt182* 클론이 L-asparaginase 유전자와 높은 상동성을 보이는 것으로 나타났다. L-asparaginase는 asparagine을 aspartic acid와 ammonia로 분해하는 효소로서 식물체의 질소대사에 중요한 기능을 하는 효소이다 (Siechiechowicz et al. 1988). 많은 식물이 질소의 전이형태로 asparagine을 이용하며, 특히 콩과식물에 있어서 그 역할은 더욱 중요하다고 알려져 있다 (Sodek and Lea 1993). Lupine 식물에서 asparaginase 활성은 질소고정박테리아와 공생관계가 이루어질 때에 현저히 감소하며, 이러한 asparaginase 활성의 감소가 올바른 공생관계 성립에 주요한 요인으로 작용한다고 하였다 (Vincze et al. 1994).

stt182 클론은 480bp 크기로서 L-asparaginase 유전자의 5' 말단부위만을 포함하고 있기 때문에, *stt182*의 3' 말단을 확보하기 위해 RACE PCR 방법을 이용하였다. 저온처리한 앞에서 준비한 mRNA를 cDNA로 전환시킨 다음, *stt182* 염기서열을 기

초로 제작한 oligonucleotide primer와 cDNA 3' 말단에 결합하는 universal primer를 이용하여 전장유전자를 증폭하였다. RACE PCR 결과 1.2 kb의 증폭밴드를 얻었고, 이들을 플라스미드 벡터에 클로닝한 후 GmASP1이라 명명한 전체 염기서열을 결정하였다. 그 결과, GmASP1 유전자는 총 1258 bp로 이루어져 있으며, 개시코돈과 종결코돈을 제대로 갖춘 단일한 open reading frame (ORF)을 포함하고 있었다 (Figure 1). 그 ORF로부터 파생되는 단백질은 326개의 아미노산으로 구성되며 약 34.5 KDa 크기를 가질것으로 예상되었다. 염기서열상의 특이할 만한 점은 5' 비번역 부위 (untranslated region)에 GA가 16번 반복되는 단순반복서열 (simple sequence repeat)이 존재한다는 점이다. 다른 oligonucleotide primer를 이용하여 5' 말단을 증폭하고 그 염기서열을 분석해 본 결과 역시 앞서 얻은 염기서열 결과와 동일하였기 때문에, 이러한 반복서열이 실험상의 인위적인 산물은 아닌 것으로 보여진다. 하지만, 이 반복서열이 유전자의 기능에 영향을 미치는지는 지금까지 알려진 바가 없다.

GmASP1의 예상 아미노산 서열을 기존에 알려진 L-asparaginase 단백질과 비교, 분석하였다 (Figure 2). GmASP1은 애기장대의 putative asparaginase (genbank accession number AB012247)와 가장 높은 84%의 유사성을 보였고, 보

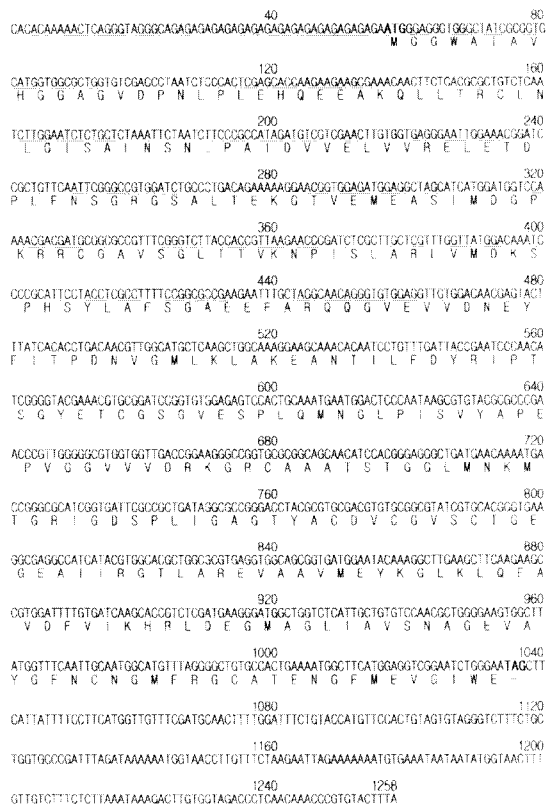


Figure 1. The nucleotide and the derived amino acid sequences of full-length cDNA of *stt182*, GmASP1. The underlined sequence indicates the original *stt182* clones isolated from SSH. The sequences with bold letters indicate the predicted start codon and stop codon.

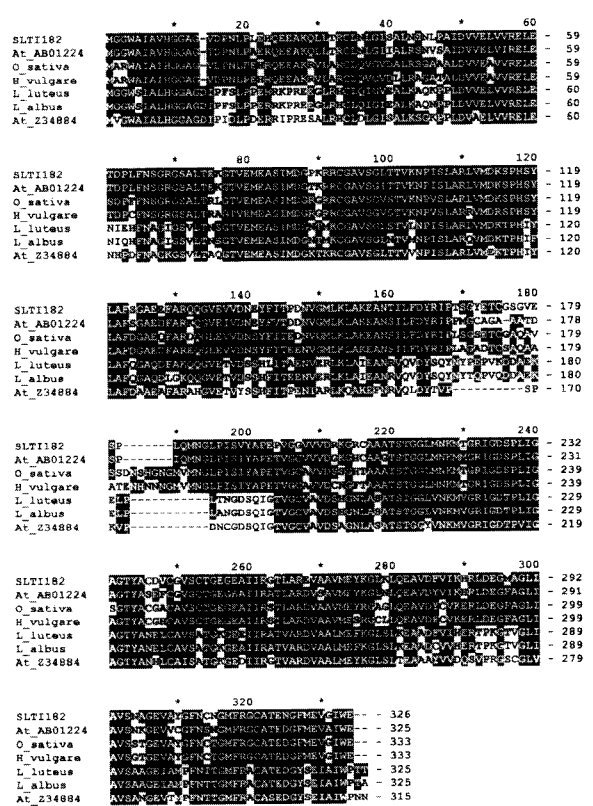


Figure 2. Amino acid alignment of GmASP1 protein sequence (*G. max*, AY096000) with L-asparaginase from *A. thaliana*-1 (AB01224), *O. sativa* (AL442007), *H. vulgare* (AF308474), *L. luteus* (AF112444, Borek et al, 1999), *L. albus* (L19141), and *A. thaliana*-2 (Z34884, Casado et al, 1995).

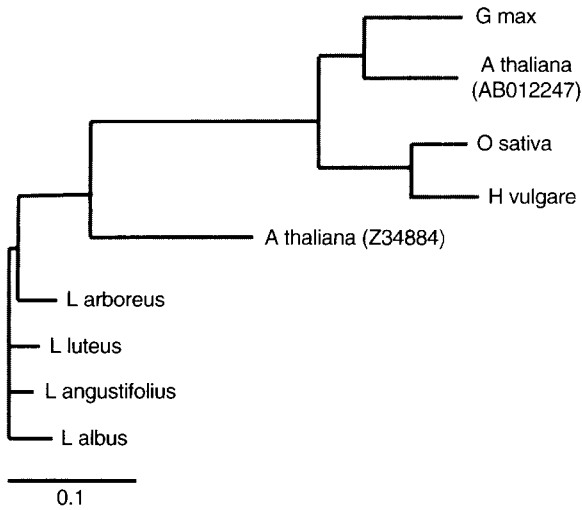


Figure 3. Phylogenetic relationship of plant l-asparaginase. ClustalX (version 1.81) and Treeview (version 1.6.6) programs were used to analyze phylogenetic relationship. The sequences are: *G. max* AY096000, *A. thaliana*-1 AB012247, *O. sativa* AL442007, *H. vulgare* AF308474, *A. thaliana*-2 Z34884, *L. arboreus* X52588, *L. luteus* AF112444, *L. albus* L19141, and *L. angustifolius* X60691.

리 (AF308474)와 벼 (AL442007)의 asparaginase와도 76%, 74%의 유사성을 보였다. 그러나, yellow lupine (AF112444), white lupine (L19141)의 단백질이나 애기장대의 또 다른 isoform (Z34884)은 약 55%의 비교적 낮은 유사성을 보여, 본 연구에서 탐색된 단백질과는 뚜렷이 구분되었다. 식물 asparaginase 간의 유연관계를 분석해본 결과, 크게 두 개의 근연집단으로 분류할 수 있었다 (Figure 3). 애기장대의 두 isoform은 계통도상의 서로 다른 집단에 속했는데, 이는 두 isoform이 서로 다른 세포학적 기능을 가지고 있을 가능성을 시사한다. 또한, 애기장대와 마찬가지로 콩 또는 타 식물에서도 이와 유사하게 기능이 다른 둘 이상의 isoform이 존재할 가능성이 있다. 이를 뒷받침할 만한 연구로서, *Lupinus polyphyllus* 식물의 조직 내에는 두 종류의 asparaginase 효소가 존재하며, 두 단백질은 면역학적 특성이나 칼륨의존성에서 뚜렷이 구분되는 동위효소로 보고된바 있다 (Sodek and Lea 1993).

GmASP1 유전자의 계놈 구조를 살펴보기 위하여 서던 분석을 수행한 결과, *EcoRI*로 제한한 DNA에서는 두 개의 band를 나타냈고, *HindIII*로 제한한 DNA에서는 3개의 band를 나타내었다 (Figure 4). GmASP1 cDNA 내에는 *EcoRI* 제한 부위가 존재하지 않기 때문에, 두 개의 band는 콩 계놈 내에 두 copy의 asparaginase 유전자가 존재한다는 것을 말해준다. *HindIII*의 경우 GmASP1 cDNA 내에 하나의 제한부위가 존재하는데, 두 개의 계놈 copy 중 하나는 이 *HindIII* 제한부위가 없는 restriction fragment length polymorphism을 보이는 것으로 사료된다.

저온처리 동안의 GmASP1 유전자의 발현패턴을 살펴보기 위해 northern 분석을 수행하였다 (Figure 5). 저온처리를 하지

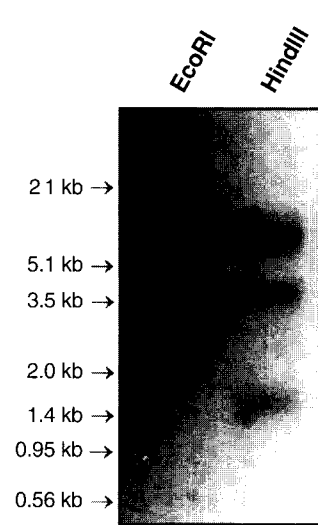


Figure 4. Genomic southern blot analysis of GmASP1. Ten microgram of genomic DNA was digested with *EcoRI* or *HindIII* and loaded on each lane. Size markers are indicated on the left.

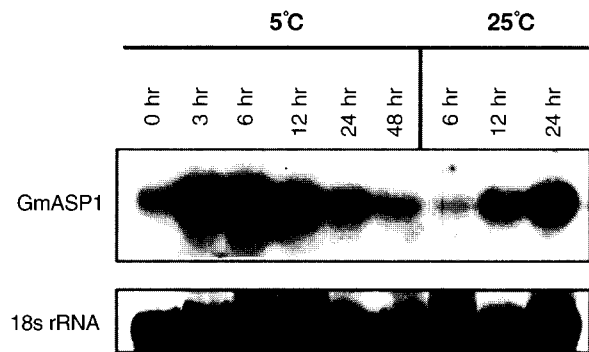


Figure 5. Expression of GmASP1 during low temperature stress (5°C) and following return to normal temperature (25°C). Fifteen microgram of total RNA was loaded on each lane. The membrane was reprobed with 18S rDNA amplified from soybean genomic DNA.

않은 25°C에서 기른 콩의 잎에서는 미약한 발현만을 보였다. 저온으로 식물체를 옮긴 지 3시간째부터 발현이 증가하여 6시간째에 최대 발현량을 나타내었고, 그 이후로 점차 발현이 줄어드는 양상을 보였다. 이틀간 저온처리한 식물체를 다시 상온 (25°C)으로 옮겼을 때, 12시간 이후부터 다시 발현량이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 저온 스트레스 동안에 asparaginase의 활성이 증가하는 현상은 이전에 벼의 seedling에서 보고된바 있으며, asparaginase의 활성이 증가함과 더불어 asparagine과 glycine의 함량의 줄어드는 반면 다른 아미노산의 함량이 증가되는 것으로 보고되었다 (Moon et al. 1989). 알팔파의 *cas15* 유전자나 콩의 *src1* 유전자의 발현은 저온처리 동안에 지속적인 증가를 보이는 데 비해 (Monroy et al. 1993, Takahashi and Shimosaka 1997), GmASP1은 일시적으로 발현량이 증가했다가 48시간 내에 감소하는 경향을 보였다. 이는 asparaginase가 저온 스트레스에 대한 초기반응에 관여하며, 일단 식물체가 저온에 적응하고 난 이후에는 발현되지 않는

다는 것을 의미한다. 저온 스트레스 반응의 초기에는 cold acclimation에 필요한 단백질의 합성이 활발히 이루어져야 한다. 또한, 단백질 합성에 필요한 아미노산의 생합성이 필요할 것이며, asparaginase가 이러한 아미노산의 생합성을 촉진시키는 역할을 할 것으로 생각된다. 저온에서 다시 상온으로 옮겨졌을 때도 역시 새로운 단백질의 합성이 필요할 것이며, 때문에 GmASP1의 발현이 다시 증가하는 것으로 보인다. 아생감자의 경우, translation elongation factor EF-1 α 와 EF-G, ribosomal protein rpl3 등의 단백질 합성관련 유전자가 저온에 의해 유도됨이 보고된바 있다 (Rorat et al. 1997). 그러나, asparaginase의 활성증가가 실제로 단백질 합성을 촉진시키는 지에 대해서는 지금까지 연구된 바가 없다. GmASP1 유전자의 발현유도가 asparaginase 활성을 증가시키며, asparagine 활성의 증가가 식물체에 저온 저항성에 중요한 요인인지에 대해서는 좀더 심도 있는 연구가 진행되어야 할 것이다.

적 요

Suppression subtractive hybridization (SSH)를 통해 저온에 의해 발현이 유도되는 cDNA들을 분리하였고, 그 중 하나인 *slit182*는 asparaginase 유전자들과 높은 유사성을 보였다. *Slit182*의 전체 cDNA인 GmASP1은 1258 bp 길이에 326개 아미노산으로 구성된 긴 Open reading frame (ORF)를 포함하고 있었다. GmASP1 단백질은 애기장대의 putative asparaginase (AB012247)와 84%의 유사성을 보였으나, 애기장대의 다른 isoform (Z34884)와는 55%의 유사성을 나타내었다. GmASP1 유전자는 저온 처리 후 3시간째부터 발현이 유도되어 6시간째에 최대발현을 나타내었고, 이후 점차 감소하여 48시간에는 저온처리전 수준으로 되돌아왔다. 또한, 식물체를 저온에서 48시간 둔 후에 다시 상온으로 옮겨졌을 때, 정상 수준으로 떨어진 GmASP1의 발현이 다시 증가하는 양상을 보였다. 이러한 결과로 볼때, GmASP1이 저온 스트레스에 반응 초기의 단백질 합성 촉진에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

사사-본 논문은 과학기술부 New Frontier 21 프로젝트 작물 유전체연구 사업단 (CG1532) 및 동아대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행되었음을 감사드립니다.

인용문헌

- Browse J, Xin Z (2001) Temperature sensing and cold acclimation. *Curr Opin Plant Biol* 4:241-246
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG (1995) Adaptation to environmental stress. *Plant Cell* 7:1099-1111
- Borek D, Podkowinski J, Kisiel A, Jaskolski M (1999) Isolation and Characterization of cDNA Encoding L-asparaginase from *Lupinus luteus* (Accession No. AF112444). (PGR99-050) *Plant Physiol* 119:1568
- Casado A, Caballero JL, Franco AR, Cardenas J, Grant MR, Munoz-Blanco J (1995) Molecular cloning of the gene encoding the L-asparaginase gene of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 108:1321-1322
- Church GM, Gilbert (1984) Genomic sequencing. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 81:1991-1995
- Ferullo JM, Vezina LP, Rail JR, Laberge S, Nadeau P, Castonguay Y (1997) Differential accumulation of two glycine-rich proteins during cold-acclimation of alfalfa. *Plant Mol Biol* 33:625-633
- Guy CL (1990) Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annu Rev Plant Physiol* 41:187-223
- Hajela RK, Horvath DP, Gilmoure SJ, Thomashow MF (1990) Molecular cloning and expression of cor (cold-regulated) genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 93:1246-1252
- Hodges DM, Andrews CJ, Johnson DA, Hamilton RI (1997) Antioxidant enzyme and compound responses to chilling stress and their combining abilities in differentially sensitive maize hybrids. *Crop Sci* 37:857-863
- Kim JC, Lee SH, Cheong YH, Yoo C-M, Lee SI, Chun HJ, Yun D-J, Hong JC, Lim CO, Cho MJ (2001) A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants. *Plant J* 25:247-259
- Kishitani S, Watanabe K, Yasuda S, Arakawa K, Takabe T (1994) Accumulation of glycinebetaine during cold accumulation and freezing tolerance in leaves of winter and spring barley plants. *Plant Cell Environ* 17:89-95
- Monroy AF, Castonguay Y, Laberge S, Sarhan F, Vezina LP, Dhindsa RS (1993) A new cold-induced alfalfa gene is associated with enhanced hardening at subzero temperature. *Plant Physiol* 102:873-879
- Moon BY, Hong YN, Kwon YM (1989) Changes in the compositions of amino acids in the rice seedlings under low temperature. *Kor J Bot* 32:235-245
- Neven LG, Haskell DW, Hofig A, Li Q-B, Guy CL (1993) Characterization of spinach gene responsive to low temperature and water stress. *Plant Mol Biol* 21:291-305
- Pinhero RG, Rao MV, Paliyath G, Murr DP, Fletcher RA (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
- Rorat T, Rzykowski W, Grygorowicz WJ (1997) Identification and expression of novel cold induced genes in potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Sci* 124:69-78
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol*

3:217-223

- Shure M, Wessler S, Fedoroff N** (1983) Molecular identification and isolation of *Waxy* locus in maize. *Cell* **35**:225-233
- Sieciechowicz KA, Joy KW, Ireland RJ** (1988) The metabolism of asparagine in plants. *Phytochemistry* **27**:663-671
- Sodek L, Lea PJ** (1993) Asparaginase from the testa of developing lupin and pea seeds. *Phytochemistry* **34**:51-56
- Solecka D, Boudet A-M, Kacperska A** (1999) Phenylpropanoid and anthocyanin changes in low-temperature treated winter oilseed rape leaves. *Plant Physiol Biochem* **37**:491-496
- Someville C** (1995) Direct tests of the role of membrane lipid composition in low-temperature-induced photoinhibition and chilling sensitivity in plant and cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**:739-743
- Sutten F, Ding X, Kenefick DG** (1992) LEA gene HVA1 regulation by cold acclimation and deacclimation in two barley cultivars with varying freeze resistance. *Plant Physiol* **99**:338-340
- Takahashi R, Shimozaka E** (1997) cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes in soybean. *Plant Sci* **123**:93-104
- Tao D-L, Oquist G, Wingsle G** (1998) Active oxygen scavengers during cold acclimation of scots pine seedlings in relation to freezing tolerance. *Cryobiology* **37**:38-45
- Thomashow MF** (1998) Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol* **118**:1-7
- Vincze E, Reeves JM, Lamping E, Farnden KJ, Reynolds PH** (1994) Repression of the L-asparaginase gene during nodule development in *Lupinus angustifolius*. *Plant Mol Biol* **26**:303-311
- Verwoerd TC, Dekker BM, Hoekema A** (1989) A small-scale procedure for rapid isolation of plant RNAs. *Nucl Acid Res* **17**:2362
- Wanner LA, Junttila** (1999) Cold-induced freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol* **120**:391-400
- Xin Z, Browse UJ** (1998) *eskimo1* mutants of Arabidopsis are constitutively freezing-tolerant. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:7799-7804

(접수일자 2002년 4월 26일)