

형질전환 감자 소괴경의 발달단계에 따른 Patatin Promoter-GUS 유전자의 발현 분석

염정원, 김미선, 이병찬, 강원진, 전재홍, 정 혁, 김현순*
한국생명공학연구원 식물세포공학연구실

Distinct Spatio-temporal Expression Patterns of Patatin Promoter-GUS Gene Fusion in Transgenic Potato Microtubers

Jung-Won Youm, Mi-Sun Kim, Byoung-Chan Lee, Won-Jin Kang, Jae-Heung Jeon,
Hyouk Joung, Hyun-Soon Kim*

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

ABSTRACT This study was carried out to investigate the expression patterns of foreign gene that controlled by tuber-specific patatin promoter in transgenic potatoes. Potato leaf disc cultured *in vitro* were transformed by the *Agrobacterium* strain LBA4404 containing pBI121 or pATGUS from potato cv. Desiree. In order to select the transgenic lines, gene-specific primers deduced from the NPTII were synthesized and used for polymerase chain reaction. The down part of the putative transgenic potatoes was transplanted weekly onto sucrose-enriched medium to accelerate the microtuber formation. RNA gel blot analysis was performed on the total RNAs obtained from tuber that had been harvested at a week interval. Also, histochemical assay was observed in the explants transformed with either pBI121 or pATGUS. Results showed that the transgenic plant containing pATGUS expressed GUS transcripts mainly at the tuber, not in stem, with the highest expression level in 5 weeks-grown microtubers. In contrast to pATGUS plants, the transformed plants with pBI121 showed an equal expression pattern throughout the whole developing stages. Consistent with RNA gel blot analysis, histochemical GUS staining and enzyme activity exhibited pATGUS transcripts were at the highest level in 5 weeks cultures. From these results, we suggest that the best stage to analyze the foreign gene introduced by patatin promoter into potato plants is at 5 weeks cultures after tuber formation.

Key words: CaMV 35S promoter, microtuber, patatin promoter, *Solanum tuberosum* L. cv Desiree

서 론

감자의 괴경은 형성단계에서부터 성숙에 이르기까지 형태학적인 변화뿐만 아니라 호르몬과 전분대사 관련물질과 같은 다양한 내부물질의 변화가 일어나기 때문에 곡류의 저장기관과

더불어 지금까지 훌륭한 연구대상이 되어 왔다. 특히나 patatin 단백질은 감자 괴경의 특이적인 저장 단백질로서 전체 soluble 단백질 중 40%를 차지할 정도로 주요 물질로서 발현양상에서 유전자 발현까지 이미 많은 연구가 되어 왔으며 (Jefferson et al. 1990; Köster-Töpfer et al. 1989), 잎이나 줄기, 뿌리 등 기타 부위에서도 발현은 되지만 그 양이 매우 작고 식물체의 배양조건에 따라 발현 정도가 달라지는 경향을 보인다 (Herman et al. 1989). 이 patatin 단백질의 promoter는 괴경-특이적인 발

*Corresponding author Tel 042-860-4493
E-mail hyuns@kribb.re.kr

현양상으로 인하여 유용유전자의 감자내 발현을 유도하고자 할 때 주로 이용되고 있다. 지금까지 많은 논문들이 patatin promoter를 이용하여 원하는 유전자를 감자에 도입한 후 성공적으로 발현됨을 보고하였는데, 본 실험에서는 이와 같은 실험을 하고자 할 때 patatin이 저장단백질이고 괴경의 전 발달단계에 동일하게 발현하지는 않을 것임을 감안하여, 도입한 유전자의 transcript를 어느 시기에 검출하는가는 확실한 형질 전환체를 선발하는 데 아주 중요한 요인이 될 수 있다고 보았다. 그리하여 CaMV35S promoter와 patatin promoter에 의해 운용되는 GUS 유전자를 감자 소괴경에서 발달단계별로 transcripts를 검출하여 patatin promoter에 의한 GUS 유전자 발현이 최고에 달하는 시기를 알아보하고자 하였다. 또한 소괴경의 발달단계에 따라 GUS의 조직학적 검사와 효소활성 분석을 실시하여 조사항목간 일치성을 보고자 하였다.

재료 및 방법

실험균주

모든 조직에 상시 발현하는 CaMV35S promoter에 의해 GUS의 발현이 조절되는 pBI121 벡터를 대조구로 하고, class I patatin gene (Liu et al. 1991)의 염기서열에 의거해 클로닝한 patatin promoter에 GUS의 발현이 조절되도록 만들어진 pATGUS 벡터를 실험에 이용하였다 (Figure 1). 식물체로의 형질전환을 위해 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 균주를 사용하였다.

식물재료

세균과의 공동배양을 위한 식물체는 기내에서 약 2주 정도 자란 감자(*Solanum tuberosum* L. cv Desiree)의 잎 절편을 사용하였다. 감자줄기의 기내배양은 모본 감자에서 싹을 채취하

여 10% sodium hypochloride 용액에서 10분간 멸균 처리한 다음 기내에서 증식을 유도하였다. 배양조건은 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에 sucrose를 3% 첨가하여 사용하였으며 배양조건은 16시간 일장에 광도 4000 lux, 배양온도 25°C를 유지하였다. 감자 소괴경의 유도를 위하여 2주일 가량 자란 줄기의 아래 부분을 MS 배지에 sucrose를 9% 추가하고 18°C의 배양 조건으로 옮겨 주었다.

감자의 형질전환

형질전환에 사용한 잎들은 대부분 신초에서 가까운 어린 잎들을 사용하였으며 상처부분을 넓게 하여 균과의 접촉 면을 크게 하였다. *Agrobacterium* 균은 적정농도 O.D₆₀₀=0.7로 키운 다음, 감자 잎 절편체와 10분간 공동배양하였다. 멸균지 위에서 건조된 잎 절편을 2.0 mg/L 2,4-D가 포함된 항생제가 없는 배지에서 2일 동안 배양한 후 재분화 배지 (MS 배지+2 mg/L zeatin, 0.01 mg/L NAA, 0.1 mg/L GA3, 1000 mg/L carbenicillin, 100 mg/L kanamycin)로 옮겨 재분화 개체를 유도하였다.

형질전환체의 선발

항생제 kanamycin으로 1차 선발된 재분화 개체들에서 genomic DNA를 추출하여 NPT II 유전자의 삽입 여부를 PCR 반응으로 확인하였다. 이 때 NPT II 유전자의 증폭을 위하여 S primer (5-gaggctattcggtactgct-3)와 AS primer (5-atcgggagcggcgataccgta-3)를 사용하였으며, PCR (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 7200) 조건은 94°C-45초, 57°C-1분, 72°C-1분으로 하였고 총 35회 실시하였다. 선발된 형질전환체는 식물 생장에 따른 외래 유전자의 분석을 위하여 호르몬과 항생제가 없는 MS 배지에서 대량으로 증식하였다.

RNA의 추출과 RNA gel blot 분석

감자 소괴경의 형성 단계별로 시료를 약 1 g 채취한 다음 RNAagents Total RNA Isolation System (Promega Co., USA)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 정제된 RNA를 정량한 뒤 30 µg을 19.8% formaldehyde가 함유된 1% agarose gel에 전기영동하였다. 특별한 전처리 없이 agarose gel에서 positively charged nylon membrane (Roche Co., Germany)으로 Turbo blotter system (Schleicher and Schuell Co., Germany)을 이용하여 전이시킨 뒤, 전이된 DNA 단편들을 고정시키기 위하여 UV crosslink (1200 × µJ/cm²)를 2회 실시하였다. 이 membrane을 DIG easy hybridization solution (Roche Co., Germany)으로 68°C에서 1시간 정도 pre-hybridization 한 후, PCR Dig Labeling Mix (Roche Co., Germany)와 제공된 제작 방법에 따라 만들어진 GUS probe로 50°C에서 6시간 이상

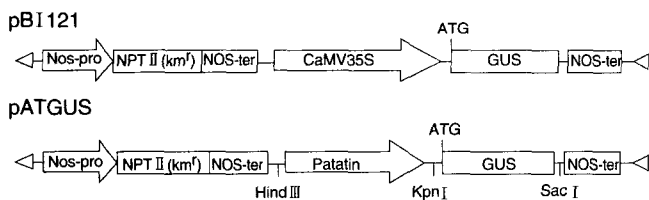


Figure 1. Schematic of gene constructs transferred to plants in binary vectors. 5' NOS, NOS promoter; NPT II, plant-selectable kanamycin marker; 3' NOS: NOS terminator. The constructs carry the left and right borders of the transferred DNA that are incorporated into the plant genomic DNA via *Agrobacterium*-mediated transformation. pBI121 is encoded by the CaMV35S promoter, while pATGUS is transcribed by the patatin promoter for tuber-specific expression.

hybridization하였다. Probe를 만들 때 양 방향의 GUS specific primer를 이용하였으며 PCR 조건은 위에서 언급한 것과 동일하게 하였다. Membrane을 2×SSC, 0.1% SDS의 washing buffer에서 세척한 다음, Dig detection kit (Roche Co., Germany)와 제공된 방법으로 NBT/BCIP에 의한 발색 정도를 관찰하였다.

조직학적 검사 및 GUS 활성 조사

감자 소괴경의 GUS 발현 정도를 알아보기 위하여 염색에 의한 조직학적 검사와 효소의 활성 검사를 실시하였다. 염색에 의한 조직학적 검사는 Jefferson 등 (1987)에 의한 방법을 위주로 하였다. 감자 소괴경의 형성 단계별로 소괴경을 채취하여 증류수로 깨끗이 세척한 다음 칼로 세포의 뒤틀림 없이 절단하였다. 표면의 전분을 증류수로 닦아내고 반응액 (50 mM Na₂HPO₄, pH 7.5; 0.1% Triton X-100; 2 mM 5-bromo-3-indolyl-D-glucuronic acid)에 침지하여 37°C에 16시간 이상 반응시킨 후 발색 정도를 관찰하였다.

GUS 활성의 정량적인 측정은 시료를 액체질소 하에서 미세하게 마쇄한 후 lysis buffer (50 mM sodium phosphate pH 7.0, 10 mM β-mercaptoethanol, 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.1% sarcosyl-N-lauroylsarcosine)를 1 : 5 weight/volume 으로 첨가하여 4°C에서 14,000 ×g로 5분간 원심분리하였다. 상층액 10 μL와 반응액 (50 mM sodium phosphate pH 7.0, 10 mM β-mercaptoethanol, 0.1% Triton X-100, 1 mM p-nitrophenyl glucuronide) 1 mL을 섞어 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 2.5 mM 2-amino-2-methyl- 1,3-propanediol을 0.4 mL 첨가하여 반응을 종결시키고 Spectrophotometer (Shimadzu 1600) 415 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

형질전환체의 생산

감자 소괴경에서의 단계별 GUS 발현을 알아보기 위한 대조구로 pBI121 벡터를 사용하였다. 감자괴경 특이적 발현을 조사하기 위해 클로닝한 class I patatin promoter를 pBI121 벡터의 CaMV35S promoter 자리에 대체 삽입시켰다 (Figure 1). 만들어진 두 종류의 벡터를 *A. tumefaciens*의 한 strain인 LBA4404에 freeze-thaw 방법으로 형질전환시켰으며, T-DNA가 삽입된 LBA4404는 감자의 잎 절편과의 공동배양을 통해 식물세포로 도입되는 과정을 거쳤다. 공동배양된 잎 절편을 형질전환체 선발배지에서 계대배양한 결과 약 10일 후부터 상처부위에서 캘러스가 왕성하게 유기되기 시작하였으며 4주 후부터 신초가 생성되기 시작하였다. 이 때 전체 잎 절편은 항생제 저항성이 없으므로 황백색으로 변하였다. 약 8주 후에

는 대부분의 캘러스에서 재분화 개체가 생성되었으며 20개 이상의 분리 가능한 독립된 줄기를 얻을 수 있었다. 이들의 왕성한 생육을 위해 MS 기본배지로 옮겨준 결과 뿌리와 줄기가 형성된 식물체로 성장하였다. 즉, 완전히 성장된 새로운 재분화 개체는 호르몬을 제외한 항생제 배지에 옮겨 내성을 확인하였는 바, 100 mg/L의 kanamycin이 포함된 배지에서 다시 배양하였을 때 생장에 아무런 저해를 받지 않음으로써 항생제 내성 유전자 (NPTII)의 도입에 따른 형질전환체의 1차 선발 효과가 있었다. 항생제 배지에서 1차 선발한 각 백터별로 20여 개체들에서 Hong 등 (1993)에 의한 방법으로 간편하게 DNA를 추출하여 NPT II 유전자의 PCR 검정을 수행하였다. 그 결과 대부분의 형질전환 개체들에서 약 700 bp의 NPT II 유전자의 증폭을 확인할 수 있었으며, 그로 인해 GUS 유전자를 포함하는 T-DNA의 도입이 잘 이루어졌음을 추론 가능하였다 (Figure 2). 외부유전자의 도입에 의한 형질전환체의 외형적인 변화는 없었으며, 기내배양 양상 역시 다른 차이는 찾을 수 없었다. 감자의 소괴경 형성도 두 식물체 간의 차이는 없었으며 단지 개체 간의 차이만 관찰되었다. 이러한 결과는 본 실험실에서 많은 외부유전자를 도입한 형질전환체들에서 보아왔던 것과 동일한 결과라고 할 수 있겠다 (Choi et al. 1997, 1998). PCR 반응으로 선발한 pBI121 형질전환체와 pATGUS 형질전환체 각각 20여 개체들에서 RNA 분석과 GUS 염색법을 실시하여 발현이 가장 우수한 개체 한 개씩을 선발하여 GUS의 발현양상 분석 실험을 수행하였다.

GUS의 발현양상 분석

기내에서 2주 정도 배양된 감자줄기의 하단 부위에서 소괴경 형성을 유도하였다. 기내줄기를 소괴경 형성용 배지로 옮겨 줄 당시의 상태를 0일로 하고, 소괴경이 형성, 발달되는 단

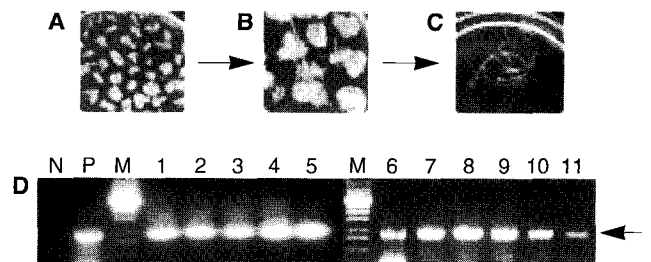


Figure 2. A, Culture of leaf discs after co-cultivation with *Agrobacterium* carrying pBI121 or pATGUS; B, Callus formation and shoot induction at 2 weeks after transformation; C, Transgenic plantlet formation; D, NPT II detection in transgenic potato by PCR. The fragment (700 bp) of NPT II gene was amplified as shown by an arrow. Lane M is a 1 kb DNA ladder (MBI Fermentas). P; Positive control (reaction solution contained 1 ng construct pBI121 DNA), N; Negative control (untransformed potato plant DNA), 1-5; Independent transgenic potato lines containing pBI121, 6-11; Independent transgenic potato lines containing pATGUS.

계에 따라 배양일수 별로 나타내었다. 치상 후 1주일에는 저장줄기가 생성되기 시작하였고, 치상 후 3주경부터는 저장줄기가 부풀어오르기 시작하여 소괴경의 모습을 갖추게 되었으며 치상 후 약 5주까지는 소괴경의 왕성한 생장이 이루어졌다. 그 이후는 성장정도가 서서히 감소하여 성숙단계로 접어든다고 볼 수 있었다 (Figure 3). 본 실험에서는 소괴경 형성을 위한 시료의 배양 시기부터 1주일 간격으로 시료를 채취하여 mRNA 분석 및 GUS 활성 분석을 하였다.

CaMV35S promoter에 의한 GUS의 발현은 소괴경의 전 발달단계에서 고르게 발현되고 있으며 배양 0일에도 감자의 줄기에서 강하게 발현되고 있는 반면, 괴경-특이 promoter인 patatin promoter의 경우 감자 줄기에서는 거의 발현을 볼 수 없었으며 저장줄기가 유도되는 1주일 후에 GUS-mRNA 발현이 나타나며 소괴경 형성이 왕성히 진행되고 있는 5주까지 mRNA의 발현 밴드가 점점 증가하여 5주쯤에 가장 높은 발현 수준을 나타내었다 (Figure 4). 그 이후 소괴경의 성숙단계는 서서히 발현 정도는 감소하나 계속적으로 발현이 유지됨을 알 수 있었다. 또한 소괴경의 전 발달단계 동안 CaMV35S promoter에 비해 patatin promoter에 의한 GUS-specific mRNA의 발현이 더 강함을 알 수 있었고, GUS의 발색 역시 보다 진하게 나타났다. CaMV35S promoter에 의한 GUS 발현은 소괴경의 발달과정 동안 비슷한 발현 양상을 보인 반면, patatin promoter에 의한 GUS의 발현은 배양 5주 후에는 감소하는 것을 볼 수 있었다. GUS의 활성 역시 mRNA 발현 경향과 유사하였는데, 감자 소괴경에서는 전반적으로 patatin promoter가 높게 나타났으며 소괴경의 발달 5주째에는 CaMV35S promoter에 비해 약 3배 정도 높게 나타났다 (Figure 5). CaMV35S에 의한 GUS 유전자의 발현은 전 발달 단계에 앞, 줄기 및 뿌리 등에서 일정하게 나타나고 있는 반면, patatin promoter의 경우 기내줄기 배양단계에서는 GUS의 축적을 볼 수 없었다. 다만 줄기의 경우 매우 미미한 발현 정도를 보이는 것을 관찰하였다. 수확 후 발아 직전 단계의 저

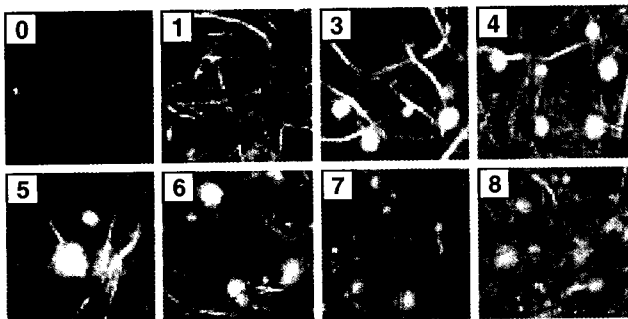


Figure 3. Microtuberization culture system for the sampling of the potato tissues along the tuber developing stage. Each number represents various developmental stages 0; potato shoots for microtuberization conditions, 1; stolon formation after 1 week culture, 3-5; development of microtuber, 6-8; maturation of microtuber.

장 중인 소괴경 내에서도 GUS-specific mRNA의 발현을 확인할 수 있었고, GUS 발색 역시 잘 나타났다.

Patatin은 감자의 주요 저장물질로서 그 조절인자 promoter는 유용인자를 감자괴경에서만 특이적으로 발현시키는 데 아주 유용하게 이용되고 있다. 감자의 patatin과 유사하게 많은 식물들은 기관 특이적이거나 발달 특이적인 promoter들을 가지고 있으며 이들은 실제적으로 외부유전자 도입에 응용된다 (Cho et al. 1999; Oakes et al. 1991; D' Aoust et al. 1999). Globulin은 쌍자엽 식물의 종자 저장 물질로서 그 promoter는 seed-specific promoter로서 GUS reporter 유전자로 실험한 결과, 발달하는 종자에 특이적으로 발현하고 발달 후기에는 발현양이 더 이상 증가하지 않으며 종자가 발아할 때 발아 7일 이후에는 GUS가 검출되지 않는 등 globulin 단백질의 특성을 그대로 보여주는 결과를 보고한 바 있다 (Suni kumar et al.

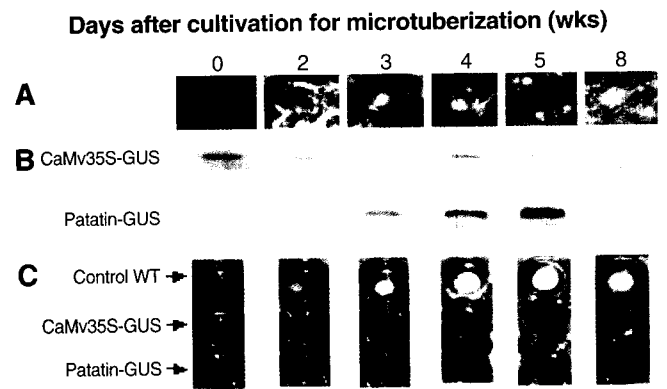


Figure 4. Expression analysis of transgenic potatoes. A, Tubers were obtained from the regenerated plants grown on microtuberization medium at 0 day and days after 2, 3, 4, 5 and 8 weeks cultures; B, RNA gel blot analysis of transgenic plants transformed with pBI121 and pATGUS; C, Histochemical GUS assay in different stages of stably transformed microtuber. Tuber slices were prepared from the plants shown in (A), and incubated in the GUS working solution.

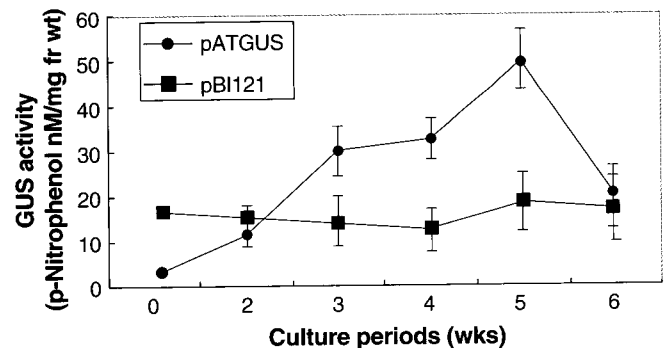


Figure 5. Comparison of GUS activity in different developmental stages of transgenic potato microtuber containing pBI121 or pATGUS. Each numbers of culture periods represents, 0; potato shoots transferred to microtuberization conditions, 1; stolon formation after 1 week culture, 3-5; development of microtuber, 6-8; maturation of microtuber.

2002). 카로티노이드 생합성 관련 promoter들도 기관 특이적, 발달 단계 특이적 발현을 보이는 것으로 알려져 있다 (Giuliano et al. 1993). 토마토의 Phytoene desaturase (Pds)의 mRNA은 개화기 즈음에 발현 양이 약 10배 정도 증가한다 (Corona et al. 2002). 이 때의 카로티노이드 축적양도 최고에 달한다고 한다. Herman 등 (1989)은 patatin promoter clone PS20에 GUS의 coding region을 붙인 다음 괴경 형성 전과 후의 GUS 발현율을 비교하였다. 괴경이 형성되기 전에는 아주 미미한 정도의 GUS 발현만 감지되고, 괴경이 형성된 후 저장줄기와 괴경에서는 71, 250 pmol/hour/ μ g protein 수준으로 각각 발현하였다고 보고한 바 있다.

본 실험에서 의도한 바는, 유용한 유전자를 감자 식물체로 도입하고자 할 때 가장 많이 응용되고 있는 promoter가 patatin promoter임을 감안할 때 괴경의 발달 단계 중 어느 시기에 specific mRNA의 발현이 가장 높은지를 확인함으로써 RNA gel blot에 의한 형질전환체 선별을 보다 확실하게 하고자 하는 것이다. 이상의 본 실험에서 제시한 실험결과에 따르면 기내 소괴경이 형성된 지 5주일경이 가장 뚜렷한 발현 밴드를 나타냄에 따라 그 때가 도입된 유전자 transcript의 분석에 가장 좋은 시기라고 판단되었다.

적 요

본 실험은 감자괴경에 특이적으로 나타나는 patatin promoter에 의한 외부 도입 유전자의 발현 양상을 파악하고자 수행되었다. Patatin promoter에 의하여 GUS 유전자의 발현이 조절되도록 pATGUS 벡터를 제작한 후 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 이용하여 감자의 잎 절편에 형질전환하였다. 대조군으로 GUS 유전자의 상시발현 벡터인 pBI121을 사용하였으며, 항생제를 포함한 재분화 배지에서 개체를 유도한 결과 8주 후부터 싹초를 관찰할 수 있었다. NPT II 유전자의 삽입여부를 PCR로 검정한 후, 선별된 형질전환체의 소괴경 형성을 위해 sucrose 농도를 높인 배지에서 1주일 간격으로 줄기의 하단 부분을 배양하였다. 주별로 시료를 채취한 후, RNA gel blot 분석을 해 본 결과 CaMV35S promoter에 의한 GUS 발현은 소괴경의 전단계에서 고르게 발현되는 반면, 괴경-특이적인 patatin promoter의 경우 감자 줄기에서는 관찰이 어려웠고, 주별 발현율은 1주부터 5주까지는 점점 증가하다가 그 이후부터는 점차 감소함을 알 수 있었다. 또한, GUS의 효소활성 역시 mRNA의 발현율과 비례함을 알 수 있었다. 제시된 실험결과들로 보아 감자 괴경에서의 patatin promoter에 의한 GUS 유전자의 발현은 5주경에 가장 높게 나타났으며, 이러한 결과들로 보아 patatin promoter에 의해 감자 소괴경내로 도입된 외래 유전자의 발현을 확인하기 가장 좋은 시기는 소괴경 형성 후 5주째임을 알 수 있었다.

사사 - 본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업인 자생식물이 용기술개발사업단의 연구비지원 (과제번호 PDC0140213)에 의해 수행되었음.

인용문헌

- Choi KW, Jeon JH, Kim HS, Joung YH, Joung H (1997) Comparison of microtuberization efficiency between normal and herbicide resistant transgenic potatoes cultured *in vitro*. *J Kor Soc Hort Sci* 38: 29-32
- Choi KW, Yang DC, Jeon JH, Kim HS, Joung YH, Joung H (1998) A comparison of microtuberization efficiency between normal and adenosine deaminase transgenic potato plantlets cultured *in vitro*. *Kor J Plant Res* 11: 252-256
- Cho MJ, Choi HW, Buchanan BB, Lemaux PG (1999) Inheritance of tissue-specific expression of barley hordein promoter-*uidA* fusions in transgenic barley plants. *Theor Appl Genet* 98: 1253-1262
- Corona V, Aracri B, Kosturkova G, Bartley GE, Pitto L, Giorgetti L, Scolnik PA, Giuliano G (2002) Regulation of a carotenoid biosynthesis gene promoter during plant development. *Plant J* 9: 505-512
- D'Aoust MA, Nguyen-Quoc B, Le VQ, S. Le, Yelle S (1999) Upstream regulatory regions from the maize *Sh1* promoter confer tissue-specific expression of the β -glucuronidase gene in tomato. *Plant Cell Rep* 18: 803-808
- Giuliano G, Bartley GE, Scolnik PA (1993) Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell* 5: 379-387
- Herman CW, Mignery GA, Fisher LM, Park WD (1989) Analysis of a chimeric class-I patatin-GUS gene in transgenic potato plants: High-level expression in tubers and sucrose-inducible expression in cultured leaf and stem explants. *Plant Mol Biol* 12: 41-50
- Hong W, Qi M, Cutler AJ (1993) A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucl Acids Res* 21: 4153-4154
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3907
- Jefferson R, Goldsbrogh A, Bevan M (1990) Transcriptional regulation of a patatin-1 gene in potato. *Plant Mol Biol* 14: 995-1006
- Köster-Töefer M, Frommer WB, Rocha-Sosa M, Roshal S, Schell J, Willmitzer L (1989) A class II patatin promoter is under developmental control in both transgenic potato and tobacco plants. *Mol Gen Genet* 219: 390-396
- Liu XY, Rocha-Sosa M, Hummel S, Willmitzer L, Frommer WB (1991) A detailed study of the regulation and evolution of the two classes of patatin genes in *Solanum tuberosum* L. *Plant Mol Biol* 17: 1139-1154

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497

Oakes JV, Shewmaker CK, Stalker DM (1991) Production of cyclodextrins, a novel carbohydrate, in the tubers of transgenic

potato plants. *Biotechnology* 9: 982-986

Sunilkumar G, Comell JP, Smith CW, Reddy AS (2002) Cotton α -globulin promoter: Isolation and functional characterized in transgenic cotton, *Arabidopsis*, and tobacco. *Transgenic Res* 11: 347-359

(접수일자 2002년 11월 26일, 수리일자 2003년 2월 12일)