

E35S 프로모터 + AtNDPK2 유전자 도입에 의한 버즈풋 트레포일 (*Lotus corniculatus* L.) 형질전환체 생산

김기용 · 장요순* · 최기준 · 성병렬 · 김원호 · 서 성 · 이병현** · 곽상수***

Production of Transgenic Birdsfoot Trefoil (*Lotus corniculatus* L.) Plants by Introduction of E35S Promoter + AtNDPK2 Gene

Ki Yong Kim, Yo Soon Jang*, Gi Jun Choi, Byung Ryeol Sung, Won Ho Kim, Sung Seo,
Byung Hyun 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 E35S promoter. The expression vector, pEN-K 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 B0i2Y medium. Genomic DNA PCR and Southern blot analysis confirmed the incorporation of *AtNDPK* into the birdsfoot trefoil genome.

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

I. 서 론

여러 가지 환경재해에 저항성을 갖는 목초 및 사료작물을 개발하기 위해, 국내에서는 오래 전부터 농촌진흥청 축산연구소를 중심으로 전통육종 방법을 이용하여 신품종을 육성하는

연구를 지속해 왔으며, 그 동안 육성된 신품종들의 종자생산 및 농가보급을 위해 많은 노력을 기울이고 있다. 특히 육성품종들 중 이탈리아 안 라이그라스(Choi 등, 2000; Choi 등, 2001a; Choi 등, 2001b)와 오차드그라스(Rim 등, 2003; Rim 등, 2004)는 외국에서 종자를 생산하여 국

“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)

** 경상대학교 동물자원과학부 (Division of Animal Sci. & Tech., Gyeongsang Natl. Univ., Jinju 660-701, 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

내에 공급하고 있다. 최근에는 전통육종 방법과 병행하여 유전공학 기술을 도입함으로써, 좀 더 효율적으로 신품종을 육성하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(Kim 등, 2001a; Kim 등, 2001b; Kim 등, 2002; Kim 등, 2005a; Kim 등, 2005b; Lee 등, 1999; Lee 등, 2000; Lee 등, 2001).

1999년 일본 RIKEN 연구소의 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 갖는다(Kasuga 등, 1999)는 연구결과를 발표하여, 분자육종 방법으로 복합재해 내성 식물체의 개발 가능성이 매우 높은 것으로 판단된다. 국내에서도 애기장대로부터 nucleoside diphosphate kinase type 2 유전자인 *AtNDPK2*(AF017640)를 분리하였으며(Yi 등, 1998), 이 유전자의 경우 식물체내에서 과발현시키면 식물체가 다양한 스트레스에 대해 내성을 갖는다고 보고하였다(Moon 등, 2003). 이후 *NDPK2* 유전자를 도입한 형질전환체 개발과 관련된 몇 편의 논문이 보고되어 있다(Tang 등, 2004; Lim 등, 2004).

본 연구에서 식물체에 도입하고자 하는 pEN-K 발현벡터의 *E35S* promoter는 CaMV 35S promoter 2개를 연속적으로 붙인 것으로서, 항상적으로 보다 강하게 작동하는 특징이 있기 때문에 '복합재해 내성 목초 개발'에 유용하게 활용될 것으로 기대된다. pEN-K 발현벡터를 두과목초인 버즈풋 트레포일에 도입하여 복합재해에 내성을 갖는 형질전환체를 개발하고자,

*Agrobacterium*을 매개로 하여 종자 유래의 버즈풋 트레포일 캘러스에 pEN-K를 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 Audewey를 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 배지(Schenk 및 Hildebrandt, 1972)에 2,4-D(2,4-dichlorophenoxy acetic acid)를 3 mg/ℓ 농도로 첨가한 SH-3 배지를 사용하였으며, 본 실험에 사용된 모든 조식배양용 배지는 pH 5.8, 0.8% agar로 조절하였고, 유도된 캘러스는 20일 간격으로 계대배양하며 증식시켰다(Kim 등, 2001a). *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 및 *Agrobacterium* 형질전환

버즈풋 트레포일의 형질전환을 위한 발현벡터 pEN-K는 기본벡터로 pCambia 2300을 사

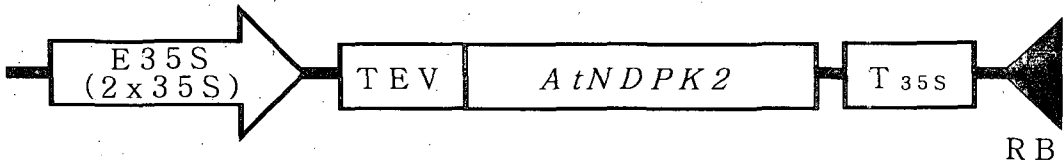


Fig. 1. Plant transformation vector, pEN-K. E35S, enhanced CaMV 35S promoter; TEV, tobacco etch virus 5' -UTR; *AtNDPK2*, Arabidopsis necloside diphosphate kinase 2 gene; T_{35S}, CaMV 35S terminator.

용하여 *AtNDPK2* 유전자 앞에 *E35S* 프로모터 가 오도록 재조합한 벡터이다 (Fig. 1). 재조합 발현벡터는 Freeze-thaw 방법 (Holster 등, 1978) 으로 *Agrobacterium tumefaciens*에 도입하였으며, 이 때 사용된 *Agrobacterium*의 strain은 EHA105이다.

3. 형질전환 버즈풋 트레포일의 재분화

pEN-K 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 (2001a)의 방법으로 실시하였다. 100 µg/ml의 kanamycin과 500 µg/ml의 cefotaxim을 첨가한 SH-kc 배지에서 감염된 캘러스를 배양하면서, 이들 배지에서 살아남는 캘러스를 형질전환 캘러스로 선발하였다. 선발된 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 분석을 실시하였다. PCR 증폭은 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 cycle의 증폭, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 final extension 순으로 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.2% agarose gel 상에서 전기영동하여 ethidium bromide (EtBr) 염색으로 확인하였다.

Southern blot 분석은 Southern (1975)의 방법으로 실시하였으며, 분리한 genomic DNA를 제한효소로 처리 후, 1% agarose gel 상에서 전기영동하여 nylon membrane (Amersham Pharmacia Biotech, USA)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)로 42°C에서 1~2시간 동안 실시하였다. Hybridization 반응은 [³²P] dCTP로 표지된 *AtNDPK2* DNA fragment를 probe로 사용하여 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, 0.1% SSC 및 0.1% SDS 용액으로 65°C에서 15분간 2회 세정한 다음, -70°C에서 2~3일간 X-ray film (Kodak, USA)에 노출시켰다.

III. 결과 및 고찰

1. 형질전환 버즈풋 트레포일 식물체 생산

pEN-K 발현벡터가 도입된 *Agrobacterium*을 배양하여 현탁액을 준비한 다음, 버즈풋 트레포일 캘러스에 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 선발하였

다. *Agrobacterium* 현탁액으로 감염시키지 않은 캘러스는 SH-3-kc 배지에서 전혀 생존할 수 없었다. 따라서 SH-3-kc 배지에서 선발한 캘러스는 pEN-K 발현벡터로 형질전환된 것으로 예상되며, 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 형질전환 식물체를 얻을 수 있었다. Fig. 2는 캘러스 선발부터 재분화까지의 과정을 사진으로 보여주는 것으로서, A는 SH-3-kc 배지에서 선발한 캘러스 사진, B와 C는 재분화배지에서 캘러스를 배양하며 shoot를 유도하는 사진, D는 절단된 줄기에서 뿌리가 형성된 사진, E는 절단된 줄기에서 뿌리가 형성된 사진, F는 절단된 줄기에서 뿌리가 형성된 사진

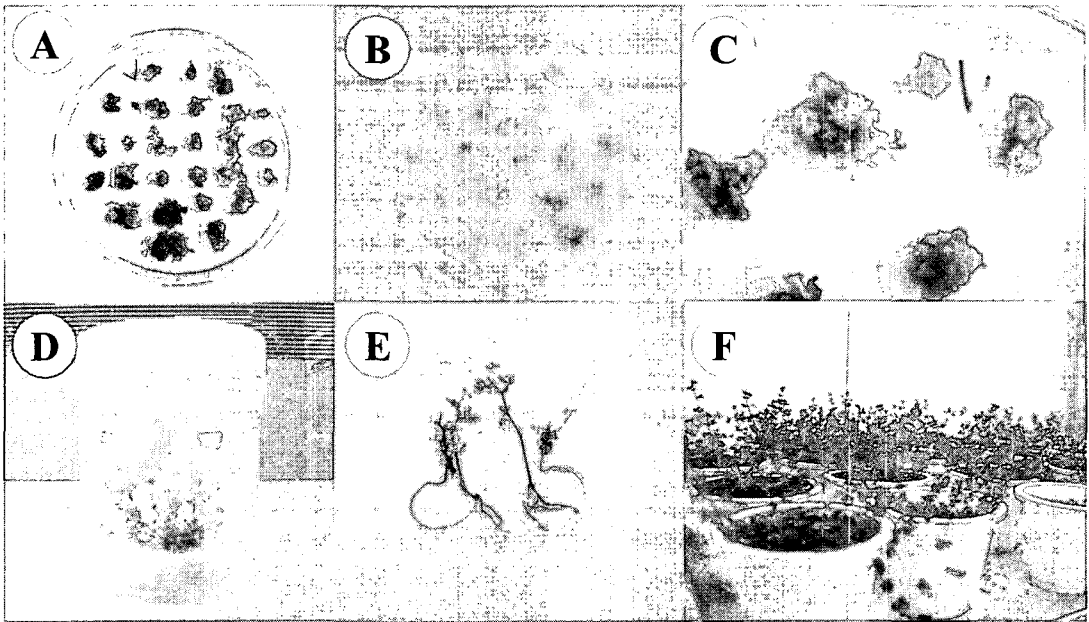


Fig. 2. Plant regeneration from transgenic callus on regeneration medium containing 100 mg/l of kanamycin and acclimation of transgenic plants in a growth chamber. A, Selected Birdsfoot trefoil callus; B & C, Stage of shoot formation; D & E, Stage of root formation; F, Acclimation of regenerated birdsfoot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

진, E는 재분화된 식물체를 화분에 옮겨 심기 위해 배양병에서 꺼낸 식물체 사진이며, F는 화분으로 옮겨 심은 후 온도와 습도가 조절되는 성장실에서 순화재배하는 사진이다.

2. 형질전환 버즈풋 트레포일 식물체 분석

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

AtNDPK2 유전자 및 35S terminator의 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 *E35S::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 하여 분석한 결과, 모든 형질전환 버즈풋 트레포일에서 1~2 copy가 도입되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 3B). 그러나 형질전환시키지 않은 대조구 식물체에서는 어떤 band도 나타나지 않았다. 따라서 본 연구를 통하여 *E35S::AtNDPK2* 단편을 가지고 있는 버즈풋 트레포일 식물체를 다수 확보하였음을 확인하였다.

E35S 프로모터는 CaMV 35S promoter 2개를 연속적으로 붙인 것으로서, 항상적으로 보다 강하게 작동하는 특징이 있기 때문에, 본 연구에서 목표로 하는 ‘복합재해 내성 목초 개발’에 적합한 것으로 판단되어 선택하게 되었다.

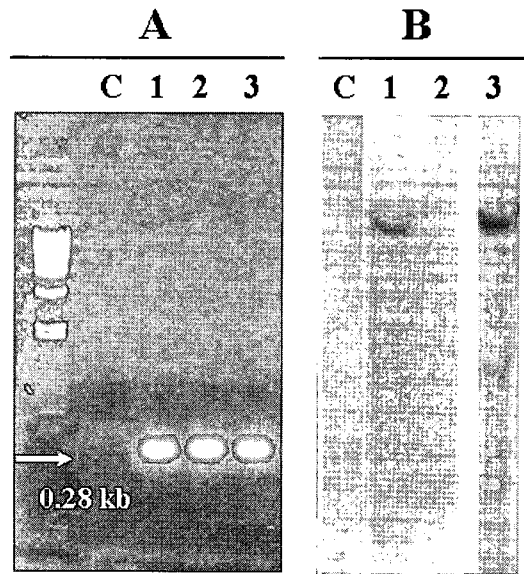


Fig. 3. PCR (A) and Southern blot analysis (B) of genomic DNA prepared from transgenic and non-transgenic birdsfoot trefoil plants. The blot was hybridized with the α -³²P labeled *AtNDPK2* fragment as a probe. C, non-transgenic plants; lanes 1 to 3, pEN-K transformed plants.

Moon 등 (2003)은 *AtNDPK2* 유전자가 과발현된 식물체는 다양한 스트레스에 대해 내성을 갖는다고 보고하였으며, 국내에서도 *AtNDPK2* 유전자를 도입한 형질전환체 개발과 관련된 몇 편의 논문이 보고되어 있다 (Tang 등, 2004; Lim 등, 2004). 따라서 pEN-K 발현벡터가 도입된 형질전환 버즈풋 트레포일은 *AtNDPK2* 유전자가 *E35S* promoter에 의해 식물체내에서 강력하게 발현될 것이므로, 형질전환되지 않은 버즈풋 트레포일에 비해 여러 환경스트레스에 강한 내성을 가질 것으로 예상된다. 이 후의 연구에서는 형질전환 버즈풋 트레포일의 계통을 보존하면서, 인위적인 여러 스트레스에 대한 내성을 조사할 계획이다.

Kim 등 (2005b)은 ‘*SWPA2* 프로모터 +

AtNDPK2 유전자를 이용하여 버즈풋 트레포일을 형질전환한 논문을 발표한 바 있다. 이 논문에서 사용된 *SWPA2* 프로모터는 모든 재해에 의해 발생하는 활성산소종(reactive oxygen species)에 의해 유도되는 산화스트레스 조건하에서 강하게 발현되는 peroxidase의 프로모터로서, *SWPA2*의 RNA 전사체는 식물체 조직에서는 전혀 나타나지 않고 배양세포에서만 관찰되며, 세포가 성장함에 따라 점진적으로 발현량이 증가한다(Kim 등, 1999a). *SWPA2* promoter는 정상적인 재배조건에서는 발현되지 않으나, wounding, chilling 등 각종 환경스트레스 조건에서 하류의 유전자를 유도적으로 발현시키는 데 비해, 본 연구에서 사용한 CaMV 35S promoter는 항상적으로 발현시키는 특징이 있기 때문에, 복합재해 내성 목초를 개발함에 있어 어떤 promoter를 사용하는 것이 유리할지 하는 것은, 형질전환체의 비교시험이 이루어진 후에 판단할 수 있을 것으로 사료된다.

IV. 요약

환경스트레스에 내성을 갖는 버즈풋 트레포일(*Lotus corniculatus* L.) 형질전환체를 개발하기 위하여, *AtNDPK* 유전자가 *E35S* 프로모터에 의해 조절되도록 재조합한 발현벡터 pEN-K를 *Agrobacterium* 형질전환 방법으로 버즈풋 트레포일에 도입하였다. *Agrobacterium*과 공동배양한 버즈풋 트레포일 캘러스를 100 µg/ml의 kanamycin 및 500 µg/ml의 cefotaxim을 첨가한 SH-3-kc 배지에서 배양하며 식물체로 재분화시켰다. 재분화된 버즈풋 트레포일의 genomic DNA를 분리, PCR 및 Southern blot 분석을 실시한 결과, *AtNDPK* 유전자가 도입된 형질전환

체의 경우 agarose gel 전기영동 및 X-ray 필름 상에서 DNA band 및 hybridization signal을 확인할 수 있었으나, 형질전환되지 않은 대조구의 버즈풋 트레포일에서는 DNA band 및 hybridization signal이 관찰되지 않았다.

V. 인용 문헌

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Holsters, M., O.D. Wael, A. Depicker, E. Messens, M.V. Montagu and J. Schell. 1978. Transfection and transformation of *A. tumefaciens*. *Mol. Gel. Genet.* 163:181-187.
6. 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.
7. Kim, K.Y., G.H. Huh, H.S. Lee, S.Y. Kwon, Y. Hur and S.S. Kwak. 1999a. Molecular charac-

- terization of cDNAs for two anionic peroxidases from suspension cultures of sweet potato. *Mol. Gen. Genet.* 261:941-947.
8. 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.
 9. 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. 2001a. Transformation of birdsfoot trefoil by *BcHSP17.6* gene using *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Korean Grassl. Sci.* 21:145-150.
 10. Kim, K.Y., B.R. Sung, Y.W. Rim, G.J. Choi, Y.C. Lim, Y.S. Jang, S. Seo, S.H. Yoon, G.J. Park and J. Jo. 2001b. Transformation of alfalfa by *BcHSP17.6* gene using *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Korean Grassl. Sci.* 21:151-156.
 11. Kim, K.Y., Y.S. Jang, G.J. Choi, Y.W. Rim, G.J. Park, B.H. Lee, D. Son and J. Jo. 2002. Molecular cloning of a cDNA encoding 17.6-kilodalton heat shock protein from *Brassica campestris* and its expression in *E. coli*. *Korean J. Genetics* 24:383-388.
 12. Kim, K.Y., Y.S. Jang, G.J. Park, G.J. Choi, B.R. Seong, S. Seo, J.Y. Cha and D. Son. 2005a. Production of transgenic orchardgrass over-expressing a thermotolerant gene, *DgP23*. *J. Korean Grassl. Sci.* 25:267-274.
 13. Kim, K.Y., Y.S. Jang, M.J. Kim, K.B. Lim, W.H. Kim, S. Seo, S.J. Lee and S.S. Kwak. 2005b. Production of transgenic birdsfoot trefoil plants by introduction of 'SWPA2 promoter + *AtNDPK2* gene'. *J. Korean Grassl. Sci.* 25:281-286.
 14. Lee, B.H., S.H. Won, H. Lee, K.Y. Kim, M.H. Kim, S.J. Eun and J. Jo. 1999. Improvement of forage crop yield and retardation of leaf senescence by introduction of gene for cytokinin synthetase into plants. *J. Korean Grassl. Sci.* 19: 281-290.
 15. Lee, B.H., S.H. Won, H. Lee, K.Y. Kim and J. Jo. 2000. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of alfalfa using secondary somatic embryogenic callus. *J. Korean Grassl. Sci.* 20:13-18.
 16. Lee, H., E. Bae, K.Y. Kim, S. Won, M. Chung and J. Jo. 2001. Transformation of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) with glutathione reductase gene. *J. Korean Grassl. Sci.* 21:21-26.
 17. 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 sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Korean J. Plant Biotechnol.* 31:267-271.
 18. 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.
 19. Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8:4321-4325.
 20. 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.
 21. 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.
 22. Schenk, R.U. and A.C. Hillebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-205.
 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. 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.