

## 저온저항성 유전자가 도입된 국화 형질전환체 특성

최인영<sup>1\*</sup>, 한수곤<sup>1</sup>, 강찬호<sup>1</sup>, 송영주<sup>1</sup>, 이왕휴<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>전라북도농업기술원, <sup>2</sup>전북대학교 생물자원과학부

### The characterization of transgenic Chrysanthemum under low temperature condition

In-Young Choi<sup>1\*</sup>, Soo-Gon Han<sup>1</sup>, Chan-Ho Kang<sup>1</sup>, Young-Ju Song<sup>1</sup>, and Wang-Hyu Lee<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Jeollabuk-do Agricultural Research and Extension Services, Iksan 570-704, Korea

<sup>2</sup>Department of Agricultural Biology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

**ABSTRACT** Previous studies on genetic transformation of chrysanthemum using cold regulated gene (BN115) have been conducted and the PCR and Real-Time PCR based method to determine the presence of the transferred cold regulated gene in the chrysanthemum was established. To check whether over-expression of BN115 gene in transgenic chrysanthemum will enhance their tolerance to cold stress, the transgenic chrysanthemum were grown under low temperature condition and several cold signalling including growth characteristics, stoma size and shape, SPAD value and Ion leakage test were investigated. The transgenic chrysanthemum in the low temperature growth chamber grow much faster in term of the height, number and size of the leaves than those of wild-type plants and damage of transgenic plant caused by the low temperature was much less than that of wild-type plants. The stoma type and size of transgenic plant leaves grown at 5°C were much similar to of wild-type plant cultured on 25°C. It has been found that SPAD value of transgenic plants was much higher than those of wild-type, but the EC density being lower under low temperature condition.

#### 서 론

내한성 숙근초의 하나인 국화는 세계적으로 200여종이 분포하고 있으며, 한국, 중국, 일본 등 동양권을 중심으로 재배면적과 생산량 등에서 3대 화훼작물에 속한다. 국화 형질전환은 재래육종의 문제점인 불화합성이나 염색체의 배수성 등을 보완하고자 시도되었으나 최근에는 내병성, 내충성, 수명연장, 화색변환, 노화방지 등을 목표로 하고 있다 (Robinson and Firoozabady 1993). 따라서 저온에 강한 유전자를 국화에 도입한다면 겨울 재배시 난방비를 현재보다 절감시킬 수 있고 고

품질 국화를 생산함으로써 농가 소득증대에 기여할 수 있다.

저온에 의한 식물체 피해로 식물체의 생육에 지장을 초래하는 凍害의 일차적인 장소는 원형질막으로 알려져 있다 (Levitt 1980, Steponkus 1984). 조직의 결빙원인은 세포외부가 내부의 세포질에 비해 결빙온도가 낮아 먼저 얼음이 형성되고, 세포 외부공간의 water potential이 낮아 주변세포로부터 물이 급격하게 이동하여 결국 탈수로 이어지기 때문이다 (Steponkus 1984; Steponkus et al. 1993b). 또한 세포 외부공간에서 형성된 얼음이 주변 원형질막 또는 세포벽에 흡착하여 세포를 물리적으로 파괴하는 경우도 있다 (Olien and Smith 1977). 그러나 저온저항성 식물은 지질조성의 변화로 (Steponkus et al. 1993a) 구성지방산의 불포화도가 증가하여 일

\*Corresponding author Tel 063-634-7384 Fax 063-634-7386

E-mail: iychoi@jbares.go.kr

정한 정도의 저온에서도 원형질막 유동성이 보장되어 막의 파괴를 막거나, betaine, proline, glycine, soluble sugars 등과 같은 compatible solute 이 저온순화 기간에 축적되어 결빙에 의한 막의 손상을 억제하는 작용을 한다 (Anchordoguy et al. 1987, Fu et al. 1999, Strauss and Hauser 1986). 이와 관련하여 저온저항성 유전자가 도입된 담배의 경우 glycine 물질의 축적에 의해 저온 및 내염에 내성이 증가되었다고 보고된바 있으며 (Holmström et al. 2000), 세포 외부공간의 얼음과 주변 세포벽과의 직접 접촉에 의한 손상을 막기 위해서 당 함량을 높이거나 (Livingston and Henson 1998), 세포 자체를 보호하기 위해 세포내에 proline 같은 삼투조절제의 합성과 축적으로 결빙에 의한 탈수에 저항하는 기작 등이 있다 (Rudolph and Crowe 1985). 이와 같이 동해 또는 냉해는 작물의 수확 및 품질저하에 큰 영향을 미치므로 작물의 내성을 높이는 연구는 우리 농업의 중요한 목표중의 하나이다. 본 실험에 사용된 BN115 gene은 겨울유채 품종인 Jetneuf를 2°C에서 저온처리 후 발현되는 유전자를 cloning한 것으로, 저온처리 후 24시간 이내에 잎에서 유전자가 발현된다고 보고되고 있다 (Weretilnyk et al. 1993). 또한 저온저항성 연구로 *Arabidopsis*, 밀, 시금치, 호밀, alfalfa 등에서 분리한 *cor* (cold responsive), *cas* (cold acclimation-specific), *lti* (low temperature induced), *csp* (cold shock protein) 등에 대한 기능이 밝혀지고 있다 (Hwang 1994).

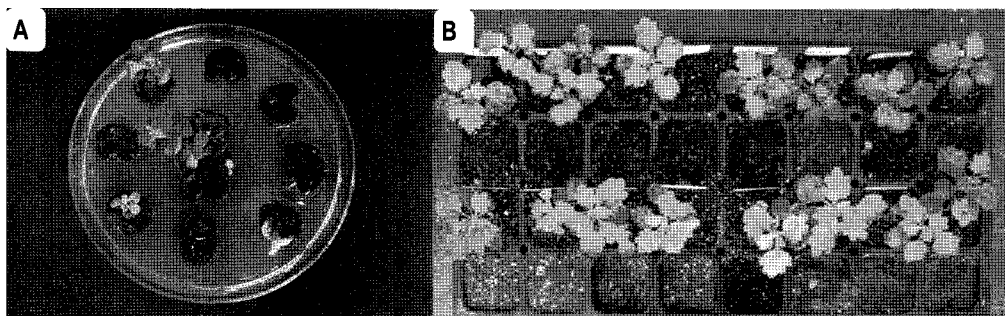
이전 연구를 통해 우리는 국화 형질전환체를 저온저항성 BN115 gene과 표지유전자로 kanamycin에 저항성 있는 *npt II* gene을 가지고 있는 식물발현용 binary vector pBin19/BN115가 도입된 *A. tumefaciens* MP90을 국화잎과 공동배양 한 후 5 mg/L kanamycin이 함유된 MS 기본배지에 4~6주 동안 배양하여 1차 선발하였다. 또한 목적으로 하는 유전자가 식물체에 안정적으로 도입되어 발현됨을 PCR 및 Real-Time PCR

로 확인하였다(Han et al. 2006). 따라서 본 연구는 저온저항성 유전자가 도입된 국화 형질전환체의 생육특성을 조사하고자 처리온도별 생육상황 및 저온 조건하에서의 기공형태, 엽록체 함량, 전기전도도 등을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 형질전환체 육성

국화 (*Dendranthema grandiflorum*)는 Puma품종을 *Agrobacterium*으로 형질전환시킨 뒤 5 mg/L kanamycin이 함유된 MS 기본배지에서 4~6주 동안 배양하여 1차 선발하였다 (Figure 1). 형질전환용 식물체 양성은 sucrose가 3%(w/v) 첨가된 MS 기본배지에서 배양하였다. Callus 형성 및 공동배양은 3% sucrose가 첨가된 MS기본배지에 1.0 mg/L BA와 0.3 mg/L 2,4-D 생장조정제를 첨가하여 재조합한 후 0.8~1.0 cm<sup>2</sup> 잎 절편을 핀으로 상처 접종하였다. 공동배양을 위한 *Agrobacterium*은 LB와 MM(Minimal Media)에서 각각 12시간, IM(Induction Media)+As(Acetosyringone)에서 6시간 배양하여 국화잎에 접종하였다. 형질전환에 사용된 저온관련 유전자 BN115는 *Brassica napus*에서 분리된 것으로 binary vector에 도입하여 pBin19::BN115로 재조합한 다음 disarmed Ti-plasmid를 함유하고 있는 *A. tumefaciens* MP90에 도입한 것을 경희대학교로부터 분양받아 사용하였다 (Choi et al. 1996, Fu et al. 1999; Jeong et al. 2000, Weretilnyk et al. 1993, White et al. 1994). 1차 선발배지에서 재분화된 형질전환체는 PCR 및 Real-Time PCR을 이용하여 최종 형질전환체(T2, T56, T63, T96, T111)로 선발하였다. *npt II* gene의 증폭을 위한 PCR primer는 700 bp의 산물을 증폭하는 forward primer ATGGGGAGC



**Figure 1.** Cold regulated gene (BN115) successfully transferred and callus formation on the selection medium containing 5 mg/L of kanamycin (A) and cold regulated transgenic chrysanthemum is growing on pot (B).

GGCGATACCGTA와 reverse primer GAGGCTATTCGGCTA TGACTG를 사용하였다. 또한 Real-Time PCR은 Real-Time PCR 7500 system(Applied Biosystems, USA)을 이용하였으며, PCR 반응을 위한 TaqMan BN115 probe는 Applied Biosystems에서 합성하였다 (Han et al. 2006).

#### 형질전환체 온도별 생육

최종 선발된 형질전환체의 온도별 생육과 저온에서의 상해정도를 관찰하여 유전자 발현에 따른 저항성 정도를 검토하였다. 온도별 생육관찰은 5, 10, 15, 25°C 등으로 나누어 2,000 lux, 광 16시간과 암 8시간으로 설정된 growth chamber에서 30일 동안 생육하여 조사하였다. 이때 growth chamber 내의 각 처리별 식물체는 MS+3% sucrose 기본배지의 유리 배양병에서 생육중인 형질전환체를 사용하였다. 저온처리에서의 상해정도는 위에서 각기 다른 온도별로 30일 동안 생육된 형질전환체를 또다시 2°C에서 4일간 처리하여 관찰하였다. 이때 상해정도 관찰은 배지가 제거된 식물체를 멸균수가 절반정도 채워진 음료수형 종이컵에 고정하여 유지하였다.

#### 저온조건하에서의 기공형태, 엽록체 함량, Ion leakage test

국화 형질전환체가 저온처리 조건에서 외부환경요인에 적응하기 위하여 어떻게 반응하는지 식물체 잎 기공의 형태를 SEM (scanning electron microscopy)으로 관찰하였다. SEM 관찰을 위해서는 형질전환체와 비형질전환체를 5°C, 2000 lux, 광 16시간과 암 8시간으로 설정된 growth chamber에서 30일 동안 생육하였다. 한편 형질전환체의 생리적 특성을 조사하고자 식물체내의 엽록소 함량변화를 SPAD (soil plant analysis development, Minolta, spad-502) meter를 사용하여 측정하였다. 엽록체 함량 측정은 형질전환체를 각각 온도별로 30일 동안 배양한 후 잎의 상, 중, 하를 각각 3반복씩 조사하였다. 또한 저온처리에서의 세포내 상해정도를 조사하고자 Ion leakage test를 수행하였다. Ion leakage test를 위한 저온처리 방법은 형질전환체를 5°C에서 7일, 0°C에서 3일간 배양한 후 25°C에서 12시간 다시 배양하였다. 또한 0.5 cm 크기의 잎 절편 1,000 mg을 만들어 50 ml 시료병에 넣고 20 ml의 멸균증류수를 첨가하여 200 rpm에서 3시간 동안 흔든 후 전기전도도 (EC)를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 형질전환체 온도별 생육

최종 선발된 형질전환체 (T2, T56, T63, T96, T111)의 온도별 생육관찰은 5, 10, 15, 25°C에 2,000 lux, 광 16시간과 암 8시간으로 설정된 growth chamber에서 30일 동안 생육하여 비형질전환체의 생육과 비교하였다. 형질전환체의 처리 온도별 생육은 비형질전환체의 생육보다 우수한 경향을 보였다. 특히 선발된 형질전환체의 초장, 생체중, 엽수 등의 평균을 비형질전환체의 평균과 비교할 때 선발된 형질전환체의 생육이 5°C를 비롯하여 10°C, 15°C, 25°C에서 모두 우수한 생육을 나타냈다. 그러나 형질전환체와 비형질전환체의 평균치간의 차이를 비교할 때 예상했던 저온에서의 생육이 고온에서의 생육보다 더 큰 차이를 보이지는 않았다 (Table 1). 또한 2°C에서 4일간 처리하여 상해정도를 육안으로 관찰한 결과 형질전환 되지 않은 식물체는 수침상으로 흑색~녹색을 띄며 상하엽 구분 없이 피해정도가 심했다. 그러나 형질전환체는 피해정도가 비형질전환체보다 경미하게 나타났으며, 다만 하엽 부위에서 비형질전환체와 비슷한 수침상의 피해가 나타났을 뿐이었다 (Figure 2).

### 형질전환체 기공형태

국화의 형질전환체가 저온의 외부환경요인에 적응하여 어떻게 반응하는지를 조사하기 위하여 저온에서 배양된 형질전환체와 비형질전환체의 잎의 기공구조를 주사전자현미경 (SEM)으로 관찰하였다 (Table 2, Figure 3). 5°C에서 30일 동안 저온 처리한 후 관찰된 기공의 크기는 형질전환체의 외부가 43.2~64.4  $\mu\text{m}$  × 40.3~54.8  $\mu\text{m}$ , 내부가 28.8~52.8  $\mu\text{m}$  × 19.2~24.0  $\mu\text{m}$ 이었다. 비형질전환체의 기공 크기는 외부가 30.0~50.8  $\mu\text{m}$  × 25.3~33.3  $\mu\text{m}$ 이었으며, 내부가 13.3~38.0  $\mu\text{m}$  × 3.3~8.0  $\mu\text{m}$ 이었다. 따라서 기공형태의 크기는 형질전환체의 기공의 크기가 비형질전환체의 기공크기에 비해 더 큰 모양이었으며, 특히 외부보다 기공내부의 크기에서 더욱 큰 것으로 측정되었다. 또한 형태는 저온에서 닫고 있는 비형질전환체와 달리 형질전환체는 開口된 모양을 유지하고 있었다. 이와 같은 결과는 비형질전환체의 경우 저온처리에 따른 growth chamber내의 송풍으로 세포 내부의 수분이 대기중으로 방출되는 것을 방지하기 위하여 대부분의 기공을 닫고 있거나 물리적 자극에 의한 세포의 손

**Table 1.** The growth characterization of cold regulated transgenic chrysanthemum on different temperatures for 30 days

Temperature (°C)	Transgenic plant <sup>a</sup>	Plant length (cm)	Plant weight (g)	Number of plant leaf (no.)
5	T2	2.8	1.3	7.5
	T56	3.3	1.8	8.0
	T63	3.5	1.3	9.3
	T96	2.6	1.6	7.0
	T111	2.7	1.5	7.7
	Mean	2.9	1.5	7.9
	WT	2.5	1.4	7.2
10	T2	3.1	2.1	9.5
	T56	3.7	2.8	10.5
	T63	3.7	2.4	8.5
	T96	2.7	2.0	9.7
	T111	3.2	2.0	9.7
	Mean	3.2	2.2	9.5
	WT	3.1	2.0	9.3
15	T2	5.8	3.6	10.5
	T56	5.3	3.6	10.8
	T63	5.6	3.3	10.0
	T96	5.1	3.5	9.8
	T111	5.1	3.2	11.3
	Mean	5.3	3.4	10.4
	WT	5.2	3.2	10.2
25	T2	5.7	5.5	12.5
	T56	6.5	5.0	12.3
	T63	6.8	5.2	11.3
	T96	4.6	3.7	11.5
	T111	6.1	4.8	11.7
	Mean	5.9	4.8	11.8
	WT	5.5	4.8	11.3

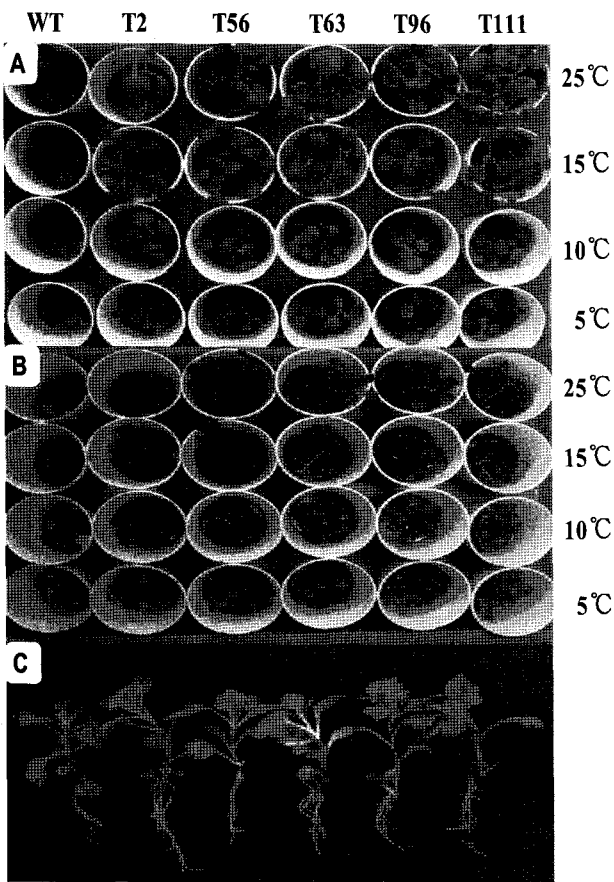
<sup>a</sup> Transgenic plants were selected by PCR and Real-Time PCR and grown in growth chamber room which has been set 2000 lux for 30 days; WT = wild-type control plant; T = transgenic plant.

**Table 2.** The compare to stoma size on transgenic and wild-type chrysanthemum leaves using scanning electron microscope

Temperature (°C)	Outside (μm)		Inside (μm)	
	Length	Width	Length	Width
Wild-type at 5°C	30.0~50.8	25.3~33.3	13.3~38.0	3.3~8.0
Transgenic plant at 5°C	43.2~64.4	40.3~54.8	28.8~52.8	19.2~24.0
Wild-type at 25°C	32.4~50.9	27.7~31.0	19.4~46.2	5.5~11.1

상을 막기 위하여 생육과정에서 발육을 억제한 것으로 판단된다. 그러나 형질전환체의 기공의 크기는 오히려 25°C에서 생육한 wild type과 비슷한 형태와 크기를 유지하였는데, 이는 형질전환체가 저온저항성 기작에 의해 세포내 지질조성의 변화로 지방산의 불포화도가 증가하여 일정한 수준의 저온에서도 막 유동성을 보장함으로 막의 파괴를 막거나 세포를 보호하기위해 세포내에 proline 등의 다양한 삼투조절제의 합성과 축적을 통해 결빙에 의한 탈수에 저항한 원인으로 짐작해 볼 수 있다. 이와 관련하여 Fu 등 (1999)은 저온순

화식물은 inorganic pyrophosphate에 의해 유도 합성된 sucrose 함량의 증가로 결빙에 적응하며, 특히 결빙기간 동안 soluble sugar에 의해 cytoplasm과 membrane structures가 보호되는 것으로 보고했다. 또한 Yun (2005)도 세포가 외부의 삼투압 변화에 의하여 반응하는 가장 공통된 현상은 compatible solute이라고 하는 대사산물 (osmolyte)을 축적하는 것이라고 볼 수가 있다고 보고했다. 이들은 sucrose, fructose 등과 같은 sugar류, glycerol, methylated inositol 등과 같은 sugar alcohol 류, trehalose, raffinose, fructans 등과 같은 complex sugar류, 그



**Figure 2.** *In vitro* growth of transgenic chrysanthemum cultured in the growth chamber set different temperatures. A, Growth on different temperatures at 2000 lux for 30 days; B, Growth on 2°C for 4 days after grown on different temperatures for 30 days; C, Growth characterization on 5°C; WT = wild-type control plant; T = transgenic plant.

리고 glycine betaine, dimethyl sulfonium propionate (DMSP), proline, ectoine 등과 같은 charged metabolites 들이다.

### 엽록소 함량 및 Ion leakage test

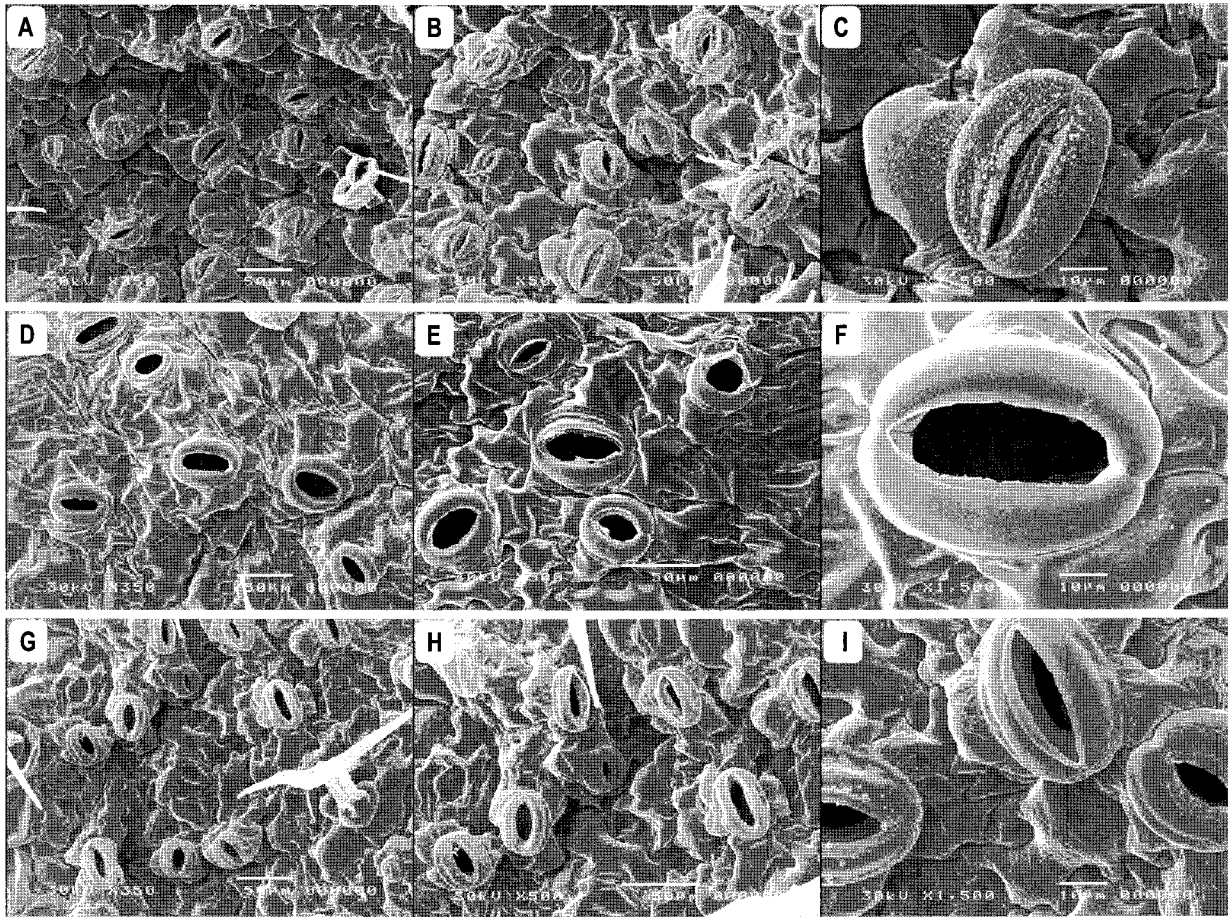
저온처리 조건에서 형질전환체의 생리적 특성을 조사하고자 엽록소 함량 및 전기전도도를 측정하였다. 형질전환체의 엽록소 함량은 5, 25°C에서 비형질전환체와 비교하여 SPAD value 값에 큰 차이를 보이지 않고 형질전환체간  $\pm 1.9$  (평균 +0.1), -3.2 (평균 -1.1)이내 이었으나 10, 15°C에서는 최대 +5.7 (평균 +3.0), +9.7 (평균 +5.7)로 상대적인 높은 수치를 나타냈다. 그러나 온도별 형질전환체의 개체간의 차이는 일정한 경향을 보이지 않았다 (Table 3). 이와 같은 결과는 처리온도 중 가장 낮은 5°C에서는 저온저항성 유전자가

국화잎의 엽록소 함량변화에 큰 영향을 미치지 못한 것으로 생각되지만 저온처리별로 저온저항성 유전자가 국화잎의 엽록소 함량변화에 어떤 영향을 미치는지에 관한 연구는 앞으로 더욱 필요하다고 생각된다. 한편, 25°C에서의 형질전환체내의 저온저항성 유전자가 잎의 엽록소 함량변화에 큰 영향을 미치지 못한 것은 본 실험에 사용된 BN115 gene이 겨울유채 품종인 Jetneuf 식물체를 2°C 조건에서 저온처리한 후 발견되는 유전자를 cloning한 것이기 때문이다. 엽록소 함량과 관련하여 식물체는 각기 다른 광주기, 조사량에 따라 개화나 식물생육, 발육, chlorophyll 양 등에 영향을 미치며, 잎의 주요 기능은 동화작용과 식물생육에 필요한 에너지원을 공급함으로써 잎을 이용한 광합성 능력의 측정은 식물체의 발육정도를 알 수 있으며, 식물체의 SPAD 수치를 측정하여 광합성량과 상관관계가 있다는 보고도 있다 (Lee et al. 2001, Yoon et al. 1997).

또한 Ion leakage test 결과 형질전환체의 EC 농도 (ds/m)가 비형질전환체에 비해 1.29~1.97배 낮은 수치를 보였다 (Figure 4). 이는 저온처리과정에서 비형질전환체에 비해 저온저항성 유전자가 도입된 형질전환체의 세포가 외부환경에 안정적으로 적응하여 세포내 파괴나 damage를 받지 않은 원인으로 여겨지며, 비형질전환체의 경우는 저온처리 영향으로 세포내 파괴가 일어났거나 삼투압 기능의 저하로 염농도가 높아진 것으로 생각된다. 전기전도도 (EC)가 비형질전환체보다는 낮았지만, 형질전환체에서도 약간의 수치를 나타낸 것은 저온처리 후 Ion leakage test를 위해 잎 절편을 만드는 과정에서 파괴된 세포에 의한 영향으로 생각된다.

### 적 요

PCR 및 Real-Time PCR 검정으로 확인된 국화 형질전환체는 저온저항성 BN115 gene과 표지유전자로 kanamycin에 저항성 있는 npt II gene을 가지고 있는 식물발현용 binary vector pBin19/BN115가 삽입된 *A. tumefaciens* MP90을 국화잎에 공동 배양함으로써 유전자가 도입되었다. 최종 선발된 형질전환체의 온도별 생육은 형질전환체가 비형질전환체에 비해 초장, 생체중, 엽수 모두 우수하였다. 또한 저온에서의 상해정도 관찰에서도 수침상정도가 비형질전환체보다 경미하였다. 저온의 외부환경에 따른 국화잎의 기공모양은 닫고 있는 비형질전환체와 달리 형질전환체는 개구된 모양을 유지하고 있었으며, 크기는 형질전환체의 크기가 비형질전환

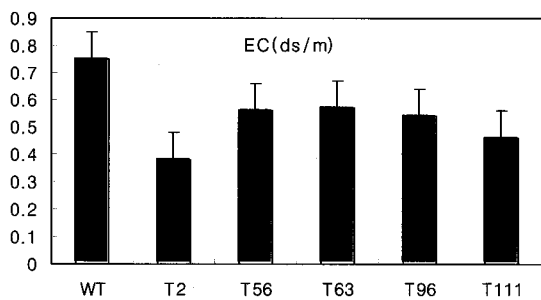


**Figure 3.** The shape and size of stoma on chrysanthemum leaves with cold regulated gene (BN115) at different temperatures. A~C, wild-type control plant at 5°C for 30 days; D~F, transgenic chrysanthemum at 5°C for 30 days; G~I, wild-type control plant at 25°C for 30 days.

**Table 3.** The SPAD chlorophyll value on transgenic and wild type chrysanthemum leaves using chlorophyll meter

Temperature (°C)	WT	T2	T56	T63	T96	T111
5	28.0	27.2(-0.8)	28.8(+0.8)	29.8(+1.8)	29.0(+1.0)	26.1(-1.9)
10	31.4	37.1(+5.7)	36.9(+5.5)	27.9(-3.5)	36.1(+4.7)	34.1(+2.7)
15	24.6	34.3(+9.7)	30.0(+5.4)	27.8(+3.2)	29.1(+4.5)	30.5(+5.9)
25	26.9	26.2(-0.7)	25.8(-1.1)	26.5(-0.4)	26.6(-0.3)	23.7(-3.2)

WT = wild-type control plant; T = transgenic plant.



**Figure 4.** Ion leakage test on transgenic and wild-type chrysanthemum leaves using EC meter (Istec, Korea).

체보다 더 큰 것으로 측정되었다. 저온조건에서의 형질전환체 엽록소 함량은 5, 25°C에서는 비형질전환체와 비교하여 SPAD value 값에 큰 차이가 없었지만, 10, 15°C에서는 최대 +5.7 (평균 +3.0), +9.7 (평균 +5.7)로 상대적으로 높은 함량을 나타냈다. 또한 Ion leakage test 결과 저온저항성 유전자가 도입된 형질전환체의 세포가 외부환경에 안정적으로 적응하여 세포내 파괴나 상해를 받지 않으므로 형질전환체의 EC 농도 (ds/m)가 비형질전환체에 비해 1.29~1.97배 낮은 수치를 보였다.

## 인용문헌

- Anchordoguy TJ, Rudolph AS, Carpenter JF, Crowe JH (1987) Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* 24: 324-331
- Choi KH, Yang DC, Jeon JH, Kim HS, Joung YH, Joung H (1996) Expression of cold-regulated gene in transgenic *Solanum tuberosum* L. *Korean J Plant Tissue Culture* 23: 311-315
- Fu P, Singh J, Keller W, McGregor I (1999) Sucrose content and freezing tolerance of *Brassica napus* canola (rapeseed) seedlings over expressing an *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase. 10th international rapeseed congress, Australia
- Han SG, Choi IY, Kang CH, Ko BR, Lee WH (2006) Genetic transformation of chrysanthemum with cold regulated gene (BN115). *Korean J Plant Biotechnol* 33: 19-25
- Holmström KO, Somersalo S, Mandal A, Palva ET, Welin B (2000) Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *Journal of Experimental Botany* 51: 177-185
- Hwang CH (1994) Cold-induced genes of plants with emphasis on their function. *Molecular Biology News* 6: 57-59
- Jeong JH, Yang DC, Jang HG, Paek KY (2000) Transformation of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) using cold regulated gene (BN115). *Korean J Plant Tissue Culture* 27: 7-12
- Lee BJ, Won MK, Lee DH, Shin DG (2001) Changes in SPAD chlorophyll value of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) by photoperiod and light intensity. *Kor J Hort Sci & Technol* 19: 555-559
- Levitt, J (1980) Responses of Plants to Environmental Stresses, Vol. 1 (2nd ed). New York NY: Academic Press
- Livingston DP III, Henson CA (1998) Apoplastic sugars, fructans, fructan exohydrolase, and invertase in winter oat: responses to second-phase cold hardening. *Plant Physiol* 116: 403-408
- Olien CR, Smith MN (1977) Ice adhesions in relation to freeze stress. *Plant Physiol* 60: 499-503
- Robinson KEP, Firoozabady E (1993) Transformation of floriculture crops. *Sci. Hort.* 55: 83-99
- Rudolph AS, Crowe JH (1985) Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology* 22: 367-377
- Steponkus PL (1984) Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annu Rev Plant Physiol* 35: 543-584
- Steponkus PL, Uemura M, Webb MS (1993a) A contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring oat-two species that widely differ in their freezing tolerance and plasma membrane lipid composition. In *Advances in Low-Temperature Biology*, Edited by Steponkus, P.L. 2: 211-312
- Steponkus PL, Uemura M, Webb MS (1993b) Membrane destabilization during freeze-induced dehydration. *Curr Top Plant Physiol* 10: 37-47
- Strauss G, Hauser H (1986) Stabilization of lipid bilayer vesicles by sucrose during freezing. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2422-2426
- Weretilnyk E, Orr W, White TC, Lu B, Singh J (1993) Characterization of three related low-temperature-regulated cDNAs from winter *Brassica napus*. *Plant Physiol* 101: 171-177
- White TC, Simmonds D, Donaldson P, Singh J (1994) Regulation of BN115, a low-temperature-responsive gene from winter *Brassica napus*. *Plant Physiol* 106: 917-928
- Yoon YH, Isoda A, Nojima H (1997) Changes in SPAD value and photosynthetic rate during grain filling of *Oryza glaberrima* strains and *Oryza sativa* cultivars. *Korean Journal of Crop Science* 42: 759-765
- Yun, DJ (2005) Molecular mechanism of plant adaption to high salinity. *Korean J Plant Biotechnol* 32: 1-14

(접수일자 2007년 7월 11일, 수리일자 2008년 3월 19일)