

최 종
연구 보고서

저온 유도성 유전자 발굴 및 저온 내성

오이작물 육성 기술 개발

Isolation of Cold-Responsive Genes and
Development of Cold-Tolerant Cucumber
Plants

연구기관
전남대학교
(동신대학교)

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “저온 유도성 유전자 발굴 및 저온 내성 오이 작물 육성 기술 개발”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 5 월 24 일

주관연구기관명 : 전남대학교

총괄연구책임자 : 강 훈 승

협동연구기관명 : 동신대학교

협동연구책임자 : 황 성 진

요 약 문

I. 제 목

저온 유도성 유전자 발굴 및 저온 내성 오이 작물 육성 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

오이는 우리나라의 시설 채소 중에서 가장 많이 재배되고 있는 중요한 경제작물의 하나로, 오이의 생육은 저온에 의해 크게 좌우되어 동절기 난방에 소요되는 경제적 비용이 큰 부담으로 작용하고 있다. 따라서 우리나라와 같은 온대 지역에서 오이의 생산성을 최대화하기 위해 저온 하에서도 안정적으로 오이를 생산할 수 있는 기술 개발이 필요하다.

저온 내성 오이 작물을 개발하기 위하여, 오이로부터 저온 유도성 유전자원을 발굴하고 그 기능을 규명하며 저온 반응성 프로모터를 개발하는 연구는 반드시 선행되어야 할 연구 분야이다.

이러한 오이의 저온 관련 문제점을 해결하기 위하여 형질전환을 통한 저온 내성 오이작물을 개발하는 연구가 필요하나, 오이의 형질전환체계가 아직 확실히 확립되어 있지 않아 안정적인 오이 형질전환 체계 개발에 대한 연구가 필요하며, 이러한 연구는 저온 내성을 가진 오이작물의 개발뿐만 아니라 다른 유용한 형질을 가진 새로운 고부가가치 오이작물의 개발을 위해 필요하다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구개발의 내용 및 범위는 크게 두 가지로 구분할 수 있다. 첫째는 오이로부터 저온 유도성 유전자원을 발굴하며 저온에 의해 유도되는 프로모터를 분리하고, 오이의 저온 스트레스 내성 유전자의 발현 및 기능을 조사하는 것이다. 둘째는 저온 내성 유전자 발현 조절을 통하여, 저온내성 오이작물 육성을 위

한 기술을 개발하는 것이다. 이를 위해, 오이 형질전환을 위한 재분화 및 형질전환 체계를 확립하며, 오이의 저온 유도성 프로모터 및 저온 내성 유전자의 발현 조절을 조사하고, 오이의 안정적인 형질전환체계를 구축하는 것이다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

가. 연구결과

1) 저온 유도성 유전자원 발굴

본 연구에서는 오이로부터 저온에 의해 발현이 유도되는 유전자를 다수 분리하였다. 염기서열 분석 결과 kinase, glucose transporter, zinc finger family protein, aldehyde dehydrogenase, anthocyanin-related membrane protein, csp54-51 (unknown protein), csp54-52 (unknown protein), csp54-53 (unknown protein) 등으로 확인되었으며, 이들 유전자들의 저온 유도성을 확인하였다.

2) 분리한 유전자의 스트레스 반응 기능 분석

저온, 가뭄 및 고염분 등 다양한 환경 스트레스에 반응이 조절되는 high mobility group B (MHGB) protein 및 aquaporin 유전자를 분리하여 그들의 스트레스 반응성 및 기능을 조사하였다. HMGB 단백질의 경우 염기서열 분석 및 스트레스 반응성에 대한 연구결과를 국제 논문에 발표하였으며, aquaporin 유전자의 경우 염기서열 분석, 스트레스 반응성 분석 및 형질전환체를 활용한 스트레스 반응성 기능을 조사하였다.

3) 저온 유도성 프로모터 발굴

오이의 저온 유도성 유전자 가운데 kinase 유전자에 해당하는 프로모터를 클로닝하여 그 염기서열을 분석하였다. 또한 이 프로모터의 저온 유도성을 분석하기 위하여 Pkinase-GUS construct를 제작하여 애기장대 형질전환을 통하여 형질전환체를 선별하였다. 형질전환체에서 저온에 따른 GUS의 발현 양상 분석을 통하여 분리한 kinase 프로모터가 저온에 의해 유도됨을 확인하였다.

4) 오이 형질전환 체계 확립 및 형질전환체 확보

안정적인 오이의 형질전환 체계를 확립하였고, 애기장대에서 저온 내성 기능이 확인된 유전자를 오이에 도입한 형질전환체를 확보하였다. 애기장대의 GRP7 (AY84) 유전자가 도입된 오이 형질전환체를 선별하였으며, T1 seeds를 확보하였고 항생제 내성 및 genomic DNA PCR을 통하여 유전자의 도입을 확인하였다.

나. 활용에 대한 건의

오이에서 발현되는 저온 유도성 유전자 및 저온 반응성 프로모터 유전 자원을 확보하는 본 연구의 결과는, 오이의 저온 스트레스에 관련된 유전자를 규명하고 저온 내성 기능을 이해하는데 중요한 기초 자료를 제공할 것이다. 또한 본 연구결과 확립된 오이의 형질전환체계는 저온내성 오이작물의 육성뿐만 아니라 새로운 기능성을 가진 오이품종의 개발에 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 저온 내성을 위한 새로운 개념의 작물 육성 기술의 개발이 가능할 것이며, 오이 외에 다른 작물에도 응용이 가능할 것이다. 저온내성 형질전환 오이품종은 본 연구가 종료된 후 포장 실험 및 검증을 통하여 상품화 가능성을 최종 타진하고, 인근 지역의 시설재배 농가에 보급할 수 있는 방안을 모색하는데 활용할 수 있을 것이다.

SUMMARY

I. Title of the study

Isolation of Cold-Responsive Genes and Development of Cold-Tolerant Cucumber Plants

II. Objectives and significance of the study

Cucumber is one of the most widely cultivated plants in green house, and the growth of cucumber is highly dependent on cold temperatures, which requires lots of energy cost during the winter. Therefore, it is necessary to develop a technology that maximizes the production yield of cucumber plants under the cold temperature conditions.

To develop cold-tolerant cucumber plants, it is prerequisite to isolate and characterize cold-induced genes and promoters that are responsive to cold temperatures in cucumber plants.

The objective of this research is to establish a solid cucumber transformation system, and to provide a way to develop cold-tolerant cucumber plants by genetic transformation of cold-responsive genes. The research would be a valuable step for the development of multi-purpose economic cucumber plants by using cucumber transformation.

III. Goals and scope of the study

The first goal of the study is to isolate and characterize cold-induced genes and cold-responsive promoters in cucumber, and to investigate their expression and functions during cold stress. The second goal of the study is to establish a solid system for cucumber transformation by optimizing

regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation conditions.

IV. Results and proposed application

1. Results

1) Isolation of cold-induced genes

Several cold-induced genes were isolated from cucumber plants, and their nucleotide sequences were analyzed. The isolated genes include kinase, glucose transporter, zinc finger family protein, aldehyde dehydrogenase, anthocyanin-related membrane protein, csp54-51 (unknown protein), csp54-52 (unknown protein), and csp54-53 (unknown protein). The cold-induced expression patterns of these genes were investigated.

2) Stress-related functions of the genes

The functions of the genes encoding high mobility group B (HMGB) protein and aquaporin were investigated under cold, drought, and high salt stress conditions. The results on the nucleotide sequence and stress-responsive expression of HMGB were published in an international journal. The nucleotide sequence, stress-responsive expression patterns, and stress-related functions of aquaporin under a variety stress conditions were investigated.

3) Isolation and characterization of a cold-responsive promoter in cucumber

The promoter corresponding to the expression of kinase was isolated from cucumber and its nucleotide sequence was analyzed. To test the cold responsiveness of the kinase promoter, Pkinase-GUS construct was generated and *Arabidopsis* was transformed with the construct. The transgenic *Arabidopsis* plants expressing Pkinase-GUS were selected, and the expression of GUS was analyzed under normal and cold temperature conditions. Results

showed that the GUS expression was increased under cold temperatures, indicating that the kinase promoter isolated from cucumber is responsive to cold stress.

4) Establishment of cucumber transformation system

A solid cucumber transformation system was established, and the transgenic cucumber plants were obtained expressing an *Arabidopsis* GRP7 (AY84) gene that showed cold tolerance ability in *Arabidopsis*. The T1 seeds were obtained, and the integration of the gene was confirmed by antibiotic resistance and genomic DNA PCR analysis.

2. Proposed application

The results of the study that isolates cold-induced genes and cold-responsive promoter from cucumber provide an important background to understand the roles of cold-responsive genes during stress. The result of establishing the cucumber transformation system by *Agrobacterium*-mediated genetic transformation will be applicable not only to generate cold-tolerant cucumber plants but also to engineer the cucumber plants for the development of multi-purpose economic cucumber plants. The results of the study will also be used to develop other cold-tolerant crops. The growth and stress-responsiveness of the transgenic cucumber plants obtained in this study will be tested further after the completion of the study, and the possibility for the commercialization of the products will be assessed.

CONTENTS

Preface-----	1
SUMMARY (in Korean)-----	2
SUMMARY-----	5
CONTENTS-----	8
CONTENTS (in Korean)-----	9
Chapter 1. Introduction-----	10
Section 1. Objectives and significance of the study-----	10
Section 2. Goals and scope of the study-----	13
Chapter 2. Current Status of Technique Development-----	15
Section 1. Developmental status in other countries-----	15
Section 2. Developmental status in Korea-----	15
Section 3. Contribution of the study to technique development-----	16
Chapter 3. Research Contents and Results-----	18
Section 1. Isolation of cold-induced genes-----	18
Section 2. Analysis of cold-responsiveness of the genes-----	26
Section 3. Isolation of cold-induced promoter-----	29
Section 4. Isolation and analysis of stress-responsive HMGB gene-----	34
Section 5. Isolation and analysis of stress-responsive aquaporin gene-----	44
Section 6. Tobacco transformation and cold-tolerance analysis-----	75
Section 7. Cucumber transformation-----	77
Chapter 4. Achievement and Contribution to Related Fields-----	101
Section 1. Achievement-----	101
Section 2. Contribution to related fields-----	102
Chapter 5. Application Plans of the Results-----	103
Chapter 6. Information on Scientific Development Obtained during the Research-----	104
Chapter 7. References-----	106

목 차

제출문-----	1
요약문-----	2
SUMMARY-----	5
CONTENTS-----	8
목차-----	9
제 1 장 연구개발과제의 개요-----	10
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성-----	10
제 2 절 연구개발의 세부목표 및 내용-----	13
제 2 장 국내외 기술개발 현황-----	15
제 1 절 국내의 기술개발 현황-----	15
제 2 절 외국의 기술개발 현황-----	15
제 3 절 국내외 기술개발에 차지하는 본 연구 결과의 위치 및 기여도-----	16
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과-----	18
제 1 절 저온 유도성 유전자 분리-----	18
제 2 절 유전자의 저온 유도성 분석-----	26
제 3 절 저온 유도성 프로모터 분리-----	29
제 4 절 스트레스 유도성 HMGB 유전자 분리 및 발현 양성 분석-----	34
제 5 절 스트레스 유도성 aquaporin 유전자 분리 및 기능 분석-----	44
제 6 절 담배 형질전환 및 저온 내성 분석-----	75
제 7 절 오이 형질전환-----	77
제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도-----	101
제 1 절 목표 달성도-----	101
제 2 절 관련 분야에의 기여도-----	102
제 5 장 연구개발 결과의 활용계획-----	103
제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학 기술정보-----	104
제 7 장 참고문헌-----	106

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

오이는 우리나라의 시설 채소 중에서 가장 많이 재배되고 있는 중요한 경제작물의 하나로, 시설 재배 시 오이 생육기간의 대부분은 악조건이며 따라서 이러한 환경조건에 내성을 가진 새로운 작물의 개발이 요구된다. 오이의 생육은 저온에 의해 크게 좌우되며, 우리나라와 같은 온대지역에서는 오이의 생산성을 안정화시키기 위해 저온에 대응하는 방법의 모색이 절실히 필요하다. 오이는 아열대 원산으로서 저온에 약한 작물이며, 어느 정도 저온에 대한 순화는 가능하지만 순화과정이 유도되는 분자생물학적 및 생리적 기작은 아직 알려져 있지 않다 (Erez et al., 2002). 현재 오이의 생육적온 한계를 확대시키는 유일한 방법으로 흑종 호박을 대목으로 이용한 접목재배가 성행하고 있을 뿐, 다른 형태의 시도는 거의 이루어지지 않고 있다.

이러한 오이의 저온 관련 중요성을 인식하고 그 문제점을 해결하기 위하여, 형질전환을 통한 저온내성 오이작물을 개발하고자하는 연구가 일부 진행되었지만, 오이의 형질전환체계가 아직 확실히 확립되어 있지 않아 새로운 형질을 가진 오이품종의 개발에 대한 연구는 전 세계적으로 아주 미미한 실정이다. 또한 다른 작물의 경우 많은 형질전환 식물들이 발표되었지만, 형질전환 식물의 대부분은 제초제 저항성, 내충성 및 내병성 관련 식물들이며, 실질적으로 농작물 재배에서 큰 문제가 되고 있는 저온 내성 형질전환 식물에 대한 연구보고는 극히 미미한 실정이다. 최근 저온 신호 전달에 관한 연구가 여러 식물체를 대상으로 많이 진행되고 있고, 관련 유전자의 발현 양상과 그 기능이 조금씩 밝혀지고 있어 저온 내성 작물의 개발이 가능할 것이라는 기대를 낳고 있다 (Seki et al., 2001; Thomashow, 2001; Zhu, 2001). 하지만 오이로부터 저온 유도성 및 저온 반응성 프로모터의 개발과 저온 내성 관련 유전자의 분리 및 기능 규명에 관한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 따라서 오이로부터 저온 유도성 프로모터를 분리하고 저온에 따른 발현 기능을 규명하며, 아직 불확실한 오이의 형질전환체계를 확립하는 연구는, 저온 내성을 가진 오이작물의 개발뿐만 아니라 다른 유익한 형질을 가진 새로운 고부가가치 경제작물의 개발을 위해 꼭 필요한 연구이다.

1) 기술적 측면

오이의 형질전환체계 확립은 저온 내성 작물의 개발뿐만 아니라, 병해충에 내성을 지닌 고부가가치 오이품종의 육성을 위해 반드시 필요한 연구이다. 오이 형질전환에 관한 연구는 미국, 일본, 이스라엘, 인도 등의 외국 연구진과, 두세 곳의 국내 연구진에 의해 이루어졌으나, 형질전환의 효율이 매우 낮고 품종 간 큰 차이가 있으며, 재현성이 검증되지 않아 오이 형질전환체계를 확실히 확립하여 형질전환체를 확보했다고 주장하기 힘든 상태이다.

지온은 오이 뿌리 생장에 직접적인 영향을 주는데, 오이의 생육에 적당한 지온은 20~23℃ 내외로 12~13℃ 이하에서는 생육이 정지된다. 이러한 저온에 의한 피해를 막고 생산량을 증가시키기 위하여, 최근에는 땅속 30-35cm 부위에 연질 PE 필름 (엑셀파이프)을 묻고 온수보일러를 이용하여 40-45℃의 데워진 물을 순환시켜 지온을 상승시키는 지중가온시설을 하는 농가가 증가하고 있다. 이와 함께 저온장해를 받았을 경우 최저 한계온도를 확보하는 것이 가장 중요하며, 야간 온도가 낮아도 뿌리가 깊이 뻗어 활발하게 활동하고 있으면 어느 정도까지는 견딜 수 있기 때문에, 퇴비를 넣고 깊이 갈아서 뿌리의 발달이 원활하게 이루어질 수 있도록 토양조건을 조성하는 등의 노력을 하고 있다. 이러한 환경관리를 통한 생산성의 유지는 한계가 있으며, 많은 시간적 및 경제적 투자가 요구되며, 따라서 형질전환을 통한 저온내성 오이품종의 개발을 위해 형질전환 기술의 개발이 무엇보다도 절실히 필요한 실정이다.

형질전환체계 확립과 함께 중요한 것은, 저온 내성에 관여하는 유전자를 발굴하고 그 기능을 검증하여, 저온 내성 작물을 육성할 수 있는 기술을 개발하는 것이다. 저온은 가뭄, 고염분과 함께 작물의 생산성을 저해하는 가장 주요한 스트레스의 하나로 최근에 생화학, 분자생물학 및 기능 유전체학의 발전에 따라 저온에 의해 유도되는 유전자의 기능이 상당부분 규명되었다. 식물체가 외부환경 스트레스에 노출되면 세포막에 존재하는 신호인지 물질을 통하여 신호가 인지되고, 그 신호는 세포 내 2차 신호로 전달되어 일련의 생화학적 연쇄반응들을 통해 유전자 발현 등을 조절하게 되며, 궁극적으로 환경변화에 적응하기 위한 생리적, 생화학적 변화를 유도하게 된다. 이러한 일련의 반응을 통하여 저온 내성 유전자의 발현이 조절되는데, 유전자 발현의 조절은 전사인자 (transcription factor)를 통한 전사단계의 조절과, 전사된 mRNA의 processing, targeting, turnover,

translation 등 전사 후 단계의 조절로서 이루어진다. 최근의 연구결과, 저온 신호 전달에 관여하는 유전자의 발현 양상과 그 기능이 조금씩 밝혀지고 있으며, 전사 인자 유전자를 형질전환 시킨 식물체가 저온에 내성을 가진다는 보고가 있어 저온 내성 작물의 개발이 가능할 것이라는 기대를 낳고 있다 (Seki et al., 2001; Thomashow, 2001; Zhu, 2001). 하지만 이와 관련된 연구는 아직 초보단계에 있으며, 특히 전사 후 조절을 통한 저온 내성 작물의 개발을 시도한 연구는 전 세계적으로 전무한 실정으로, 저온 내성 관련 유전자의 발굴 및 기능 규명과 이를 이용한 저온 내성 작물을 육성할 수 있는 기술을 개발하는 연구가 절실히 요구된다.

2) 경제·산업적 측면

국내의 오이재배는 안성, 여주, 괴산, 화성, 연천, 포천, 파주군 등의 노지재배와 춘천, 창원, 순천, 고흥, 광양, 구례, 부산, 공주, 부여, 진주, 광주, 무안, 안성 등의 시설재배를 통하여 이루어지고 있다. 오이의 재배는 90년대 중반까지는 국민소득 향상과 식생활 패턴의 변화로 오이 소비량이 계속 증가함에 따라 재배면적과 생산량이 증가추세에 있었으며, 최근 재배면적은 감소추세에 있으나 단수의 증가에 따라 총생산량은 증가하고 있다. 소비형태도 계절소비에서 연중소비로 변화함에 따라, 노지재배에서 시설재배로 재배 양식이 전환되고 있다. 또한 시설재배 기술의 축적으로 시설재배는 매년 단수와 생산량이 계속 증가하고 있다.

오이재배의 적정 온도는 낮 온도 25~28℃와 밤 온도 15~18℃ 이며, 밤 온도 6~7℃, 지온 12~13℃이하에서는 생육이 중지된다. 지온은 오이 뿌리의 생육에 직접적인 영향을 줄 뿐 만 아니라, 양분과 수분의 흡수, 토양미생물의 활동 등에 많은 영향을 미치기 때문에 매우 중요하다. 따라서 저온에 의한 피해를 막고 생산량을 증가시키기 위하여, 지중가온시설을 하거나 토양조건을 좋게 하기 위해 많은 노력과 시간적, 경제적 투자를 하고 있다. 이러한 노동력을 절감하고 재배시설 내의 온도를 유지하기 위해 소요되는 경제적 부담을 덜기 위해서, 형질전환을 통한 저온내성 오이품종의 개발이 무엇보다도 절실히 필요한 실정이다.

본 연구는 식물체의 저온 내성 관련 유전자 발현을 통하여 저온에 근본적으로 내성을 지닌 경제작물을 육성할 수 있는 기술을 개발하는 것으로, 생산성 제고 및 노동력 절감을 통한 농가의 소득향상을 위해 필요하다. 또한 저온뿐만

아니라 가뭄 및 고염분 등 다른 주요 환경스트레스 내성 작물 및 병해충 저항성 작물의 개발을 위한 기술로 응용되어 경제, 산업적 가치를 한층 제고시키는데 필요하다.

3) 사회·문화적 측면

저온 내성작물 육성기술의 개발은 고부가가치 저온 내성 경제작물의 개발로 이어져 국내외적으로 기술을 인정받을 수 있다. 갈수록 거세지고 있는 농업의 개방 압력에 대응하여 독자 개발한 기술을 활용하여 고부가가치 작물의 개발을 가능케 하여, 우리나라 농업의 경쟁력을 높이는데 필요하다. 갈수록 줄어만 가는 농업인구를 고려할 때, 노동절약형 작물의 개발은 상대적으로 중요한 의미를 갖는다. 본 연구는 작물 재배 시 노동력을 절약할 수 있는 기술을 제공하여, 사회적으로도 선진 농업으로 향하는 중요한 발판을 마련한다는 측면에서 필요하다.

제 2 절 연구개발의 세부목표 및 내용

1. 연구개발의 목표

본 연구개발의 내용 및 범위는 크게 두 가지로 구분할 수 있다. 첫째는 오이로부터 저온 유도성 유전자원을 발굴하며 저온에 의해 유도되는 프로모터를 분리하고, 오이의 저온 스트레스 내성 유전자의 발현 및 기능을 조사하는 것이다. 둘째는 저온 내성 유전자 발현 조절을 통하여, 저온내성 오이작물 육성을 위한 기술을 개발하는 것이다. 이를 위해, 오이 형질전환을 위한 재 분화 및 형질 전환 체계를 확립하며, 오이의 저온 유도성 프로모터 및 저온 내성 유전자의 발현 조절을 조사하고, 오이의 안정적인 형질전환체계를 구축하는 것이다. 또한 애기장대에서 저온 내성 기능이 확인된 GRP7 유전자를 오이에 도입한 형질전환체를 확보하여 유전자의 삽입을 확인하는 것이다.

2. 연구개발의 내용 및 범위

상기의 연구 목표 달성을 위해, 오이로부터 저온 유도성 유전자를 분리하여 염기서열을 분석하고 스트레스 반응성을 조사하며, 저온 유도성 프로모터를 분리하여 염기서열을 분석하고 저온에 따른 발현 양상을 분석하는 연구를 수행한다. 또한 저온 내성 유전자의 기능을 조기에 확인하는 목적으로, 애기장대에서 저온 내성 기능이 확인된 유전자를 담배에 형질전환하여 저온 내성 기능을 규명하는 연구를 수행한다. 오이로부터 저온 반응성 유전자 및 저온 유도성 프로모터를 분리하는 연구와 함께, 안정적인 오이 형질전환 체계를 확립하기 위하여 다양한 조직의 이용과 호르몬 조성 변화, *Agrobacterium* 종류, 배양 조건을 달리한 오이 형질전환을 시도하여 오이 형질전환 조건을 최적화하고 오이 형질전환체계를 확립하는 것이다. 오이 형질전환은 애기장대에서 저온 내성 기능이 확인된 GRP7 유전자를 활용하여 시행하며, 오이 형질전환체에서 도입된 유전자의 삽입을 확인하는 연구를 시행한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내의 기술개발 현황

오이로부터 저온 유도성 프로모터 분리 및 저온 내성 관련 유전자의 기능 규명에 관한 연구는 국내외를 막론하고 거의 전무한 상태이다. 오이 형질전환은 다른 작물에 비해 어렵다고 알려져 있으며, 따라서 국내외적으로 오이의 형질전환체계는 아직 확실히 확립이 되어 있지 않고 몇몇 연구진에 의해 형질전환에 성공했다는 연구보고가 있는 실정이다. 국내의 경우, 한국생명공학연구원의 곽상수 박사팀이 ascorbate oxidase promoter, SOD 유전자 및 bar 유전자가 포함된 벡터를 이용한 오이 형질전환에 대한 특허를 등록하였다 (대한민국특허 10-0360339). 또한 (주)넥스젠의 이선교 박사팀이 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 오이 형질전환체의 제조 및 형질전환 오이에 대한 특허를 등록하였다 (대한민국특허 10-0447920). (주)유진텍과 농우바이오 연구소에서 형질전환을 시도하여 오이 형질전환체계를 확립하였다고 발표하였으나, 이러한 시스템을 활용하여 저온 내성 오이 형질전환체를 개발했다는 연구보고서는 아직 없는 실정이며 형질전환 오이를 확보했다는 연구결과는 없다. 전남대학교 조백호 박사팀이 “저온 내성 오이품종의 분자유종”이라는 연구를 농특과제의 연구비로 수행한 적이 있으며, 이 연구에서도 오이의 형질전환체계를 확립하고자 여러 시도를 하였으나 결국 형질전환체계를 구축하는데 실패하였다.

제 2 절 외국의 기술개발 현황

오이로부터 저온 유도성 프로모터 분리 및 저온 내성 관련 유전자의 기능 규명에 관한 연구는 국외에서도 거의 전무한 상태이다. 오이의 형질전환에 관한 연구는 국외의 경우, 지금까지 오이의 형질전환에 성공했다는 보고는 일본의 Nishibayashi와 Tabel, 미국의 Chee 등이 *Plant Cell Report* (1990, 1996, 1998)에 보고한 3편의 논문과, Sarmiento 등이 *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (1992)에 보고한 1편의 논문, Soniya와 Das가 *Indian J. Exp. Biol.*, (2002)에 보고

한 논문 등 총 5편의 논문이 보고되어 있다. 최근 Soniya와 Das가 발표한 논문에 의하면, MS 배지에 benzyladenine (4 mg/L)과 indole propionic acid (1 mg/L)을 함유한 배지에서 callus 상태를 거치지 않고 organogenesis를 유도할 수 있다는 결과가 있었다. 또한, pBI121 벡터와 Agrobacterium tumefaciens LBA4404를 이용하여 오이의 형질전환을 성공했다고 보고하였다.

현재까지의 연구결과, Cucumis 속에 대한 식물체의 재분화와 형질전환과 관련한 연구 모두 극히 미흡하며, Cucumis 속의 기내 (in vitro) 배양을 위한 최적조건이 확보되지 않았으며, Agrobacterium spp. 및 direct gene transfer methods에 의한 확실한 형질전환 연구결과가 거의 없고, particle gun에 의한 형질전환 연구의 경우 효율성이 매우 낮게 나타나고 있다.

오이의 형질전환에 관한 연구 외에, 오이의 생육조건 및 재배조건이 생산성에 미치는 영향을 조사한 생리학적인 연구는 국내에서 다수 진행되었으나, 저온 스트레스 내성 오이작물의 개발을 위한 연구는 국내외를 막론하고 전무한 실정이다. 일반적으로, 작물의 생산성을 증가시키기 위한 연구는 많이 진행되고 있고 여러 가지 형질전환 식물체가 발표되었지만, 지금까지 발표된 형질전환 식물의 대부분은 제초제 저항성, 내충성 및 내병성 식물들이며, 실질적으로 원예작물 재배에서 커다란 문제가 되고 있는 저온 내성 형질전환 식물에 대한 연구보고는 세계적으로 극히 미미하여 최근 몇 가지 연구보고가 되어 있는 실정이다 (Jaglo-Ottosen et al., 1998; Kasuga et al., 1999). 본 연구와 비슷한 저온 스트레스의 경우 본 연구에서 활용하고자 하는 유전자 외에 cold shock protein을 활용하여 식물의 스트레스 내성을 증가시키는 방법에 대한 국제 특허가 몬산토 연구진에 의해 등록되어 (WO 2005/03318 A2) 저온 내성 유전자를 활용한 저온 스트레스 극복 작물의 개발 가능성을 제시하였다.

제 3 절 국내외 기술개발에 차지하는 본 연구 결과의 위치 및 기여도

오이로부터 저온 유도성 유전자원을 발굴하고 저온 반응성 프로모터를 분리한 본 연구는, 오이의 유전자 정보가 미비한 현 상태에서 오이의 저온 내성 오이 작물 개발에 필요한 기초 자료를 제공했다는 측면에서 그 의미가 있다. 오

이로부터 분리한 일부 유전자의 염기서열 정보는 GenBank data에 등록하여 오이에 관한 연구를 수행하고자하는 연구진이 활용할 수 있게 하였다. 또한 안정적인 오이 형질전환 체계를 확립하여 저온 내성 유전자가 도입된 오이 형질전환체를 확보한 본 연구의 결과는 저온 내성 오이 작물을 육성할 수 있는 가능성을 제시한 것으로, 오이 형질전환 연구 분야를 한 단계 높일 수 있는 계기를 마련한 것이다. 국내외적으로 오이 형질전환체 개발에 대한 관심 및 기대가 높아지고 있는 현 시점에서, 오이 형질전환체를 확보한 본 연구는 향후 오이 유전체 연구 및 형질전환을 통한 다양한 기능성 오이 작물 개발을 선도할 수 있는 결과이다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 저온 유도성 유전자 분리

1. **저온 내성 유전자의 분리 및 염기서열 분석:** 오이에서 저온 내성에 관여하는 유전자와 저온에 의해 유도되는 promoter를 분리하기 위하여, degenerate primers를 활용한 PCR 방법과 오이 cDNA library screening을 통한 두 가지 방법을 사용하였다. PCR을 통한 저온 유도성 유전자를 분리하기 위하여, 애기장대 및 다른 식물체에서 저온에 의해 크게 발현이 유도되는 것으로 알려진 RNA-결합 단백질과 cold shock domain protein의 염기서열을 바탕으로 degenerate primers를 제작하였다. RNA-결합 단백질과 cold shock domain protein은 저온 내성에 깊이 관여하는 것으로 최근의 연구 결과 밝혀지고 있는 유전자들로서 이들 유전자 및 그 프로모터의 분리는 활용 가능성이 높을 것으로 기대된다. 표 1은 이들 유전자를 분리하기 위해 제작하여 사용한 degenerate primers의 염기서열을 나타낸다.

표 1. 오이로부터 cold shock domain protein 유전자를 분리하기 위하여 사용된 degenerate primers.

Primers	Sequences (5' to 3')
CSP51	AARGGITWYGGITTYATIWSICC
CSP52	GGITTYATHACICCCIGAYGAYGG
CSP53	AARGGITWYGGITTYATHWCICC
CSP31	CCICCNCCICCNCCIC

이들 primers를 이용하여 오이 cDNA library를 이용한 PCR을 통하여 관련 유전자의 partial sequence를 확보하였다. 분리한 유전자를 probe로 이용하여 해당 유전자의 full-length DNA를 library screening을 통하여 확보하였다.

2. **저온 유도성 유전자 분리 및 염기서열 분석:** 이러한 target gene-oriented screening과 함께 differential display GeneFishing 방법을 이용하여 저온에 의해 발현이 유도되는 유전자의 분리를 시도하였다. 저온 처리한 오이시료와 대조구로부터 total RNA를 추출하여 GeneFishing kit를 이용하여 저온 처리 시 특별히

발현이 유도되는 유전자를 다수 분리하였다. 그림 1은 많은 분석 중의 몇몇 결과를 보여주는 것으로 저온 처리한 오이 시료로부터 화살표로 표시된 유전자의 발현이 크게 유도됨을 알 수 있다. 이들 유전자의 염기서열을 규명하기 위하여, 각 DNA를 gel로부터 용출한 후 pGEM T-easy 벡터에 클로닝한 다음 sequencing 하였다. 이러한 과정을 반복하여 다수의 저온 유도성 유전자를 분리할 수 있었으며 그 결과는 표 2에 정리되어 있다.

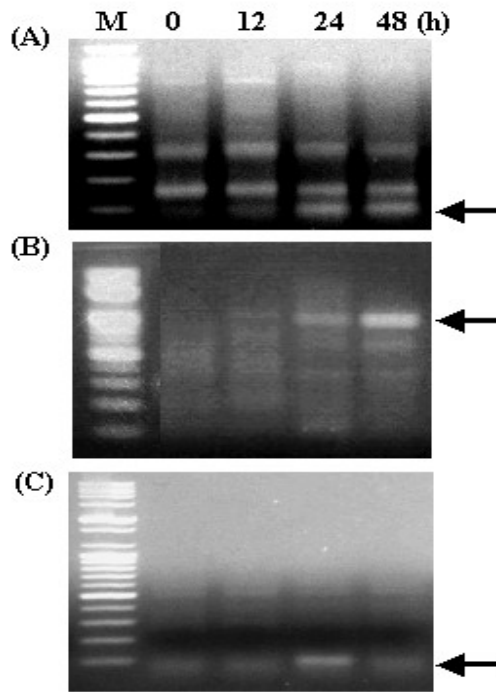


그림 1. 저온 처리한 오이시료로부터 total RNA를 추출하여 GeneFishing kit를 이용하여 저온 처리 시 발현이 유도되는 유전자를 조사한 결과, 화살표로 표시된 유전자들의 발현이 크게 유도됨을 알 수 있었다.

표 2. 오이로부터 분리한 저온 유도성 유전자의 염기서열

(Actin-related protein)
AATTCGGCACGAGGTTAAAGCTTACAGGGTACCTCCGAGAGCTGATGCAACAGAATAATATACATTT
TGAGTCAATGTACTACTGTTTCGTACATTGAAAGAGAATCTATGTTATGTTGCCGAAGACTACGAAGCT
GAATTGACCAAAGATACTCAAGCTCCTATGAAGCTGCTGGAGAAGGTTGGTTTACCCTTTCCAAAGA
GCGATTTCAAACCGGAGAGATCTTATTTACCCACGTATGGGGGGAGTGCGAGCAATGGGGCTGCAC
GAAGCTGTTGCACTTTGCATGGACCATTGCCATGCTGCTGAACTGTCATATGATGATTCTTGGTTCAA
GACTGTGGTTTTGTCAGGTGGCAGTGCTTGTCTTCCAGGACTTGCAGAAAAGGTTGCAGAAGGAACTTT
ATGGGCTTCTTCTCACCATTGTCCAACGGAATCAGAGTCATTCTCCACCATATGGTACAGACACA
GCTTGGTTTGGGGCAAGGCTTATTAGCAATCTAAGTACCTTCCCTAATCATTGGTGTATTACAAAGAA
GCAATTCGACAAAAGTCAAACTCAACCTCATTGGTGATCACCTTTGTCTCGGGTTGTTTGTCT
ATATTGAAAGTTGATGCCATCATTCAAGTCTTGTGTAGCGCTTGACGTATCGGTAAAAATAAAATGAT
AAACAGCCTATATACTCTCCTTGTAGTAAAATAGGTCCTTGAACAAAAGTGATCTGATTAAAAATGAT
TGATGGTAATAAATTAATACGTAGTGAATAAAATTTTGCTTTTATTTGTTTTAGCCTTTTAGGTTAG
TATATTAAGTTTACACCAAAGTACATATCATATAGACATTCTTTACCAACTGTATTATTTCATTGTCTGT
TATCCTCTCATATATTGTAATAGTAAAACCACATTGTATAAGAAAAATATACAAATTTAGTGGGTT
TGATACTTGTGATATAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAGGGGNC

(Receptor-like protein kinase)
CTCTCATAGCCACCACCTCCTACTGGGAACCACTTCTCCGGCGCTATCCCAAGCGATTTCTTTTCTC
TCTTACCCTCCATAAAAAAGGTGTGGCTCTCTCCAACAACCTTCTCCGGGAACATTCCGCACTCTCTGG
CACAACCTCTCATTTGATCGAACTCCACCTTGAGAGCAACCAATTCTCGGGGCCATCCCCACCTC
AAACAGCCTCCATCATAACCTCCCTCAATGTCTCCAACAACAAGCTCGAGGGTCAAATACCGGACA
TCCTCTCAAATTCGACGCGAAGGCATTCGCTGGAATGAAGGCCTCTGCGGAACCCACTTCCCAA
ATCTTGGGGGCCAAATTTCTGAAGATCAGAAAGCCCCCTTCTTACCTCTGGGGAAATCCCAAGGTA
ACATTTCCAAGCTGGTTGTGGCATCCCTGATAGCGGTGACTGTATTTCTGATGGTGTTTCATATTCTG
AGCGCCTCCAAGAGGAGAGAGGATGAGTTCAGCGTGCTGGGGAGGGAGCAGATGGAGGAGGTGGTG
GCTATGAGA

표 2. 오이로부터 분리한 저온 유도성 유전자의 염기서열 (계속)

(Monosaccharide-H⁺ symporter, glucose transporter)
 GTCTACCAGGTATTTCGCTTCATGGGGCCTGCGGGTTGGCTGGTACCTAGTGAAATCTTTC
 CATTGGAGATTCGTTTCAGCTGCACAAAGTGTAACGTGTCAGTGAACATGTTGTTNCAT
 TCATCGTAGCTCAAGTCTTCTTGACAATGCTTTGTCATTTGAAATTTGGGTTGTTTCATT
 TCTTTGCCTTCTTTGTTATACTGATGTCGATATTCATCTTCTTTTTCTTACCGGAGACCAA
 AGGCATTCCAATGAAGAGATGAGTCAAGTTTGAAGAGTCATTGGTATTGGAAAAGGTT
 TGTGCATGACAGTCATTTGGCTAATGGAAAGGGAGGAGTTGAGATGAAAAGCGGGGATA
 TGCATAAAATGGTCATTATAATTGTTGGGAATATATATATTTTGTTTTCTTAGTGAAG
 ATGGATGGACACTATGAACATCACATATCAAATATCAATTTGTCAATTACATTTTAGATT
 GTGTAATTAAGTGTGAAATGATGGAATTTGATTTTATTTATGAAGAACTAGTTGAGATA
 ATGAATNGAATGGACTTTTATGATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAACCCCATCGTAGTC
 GCAGCATTCACA

(Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein / ankyrin repeat)
 AATTCGGCACGAGGTGCAAATGGATGGACTCCCTTGATGGTCGCTCGTTTCATGGCACCGAGACTGGC
 TTGTGAAAATCTTAGCAGAGAAGCAGGAGCAGTAGCGACAAATCTGTCCCTCACCATATTTGAC
 TCTTCCCCTTATGAGCATTGTTAGAATTGCTAGAGAATGTGGATGGAGAAGTTGTGACTCTTTACTTA
 CATGTCAAGATCCATGTGTAGTATGTTTGGAGAGAGAATGCACAGTTGCTGCACAAGGTTGTGATCA
 CGAGTCTGACGAGATGTGCATTGTATCTGTTCACAACTGCACATCATCAGTTTCTCATGGTC
 CGACTGGTTCAATTGCGTGCCCGCTCTGCCGAAATGGCATAGTTTCATTCATTAACCTTCTAGAACG
 AAACCAATTGCCAAAGAGATCACCAGAACCAGTTTATCTTTATCATTCTGCACTTGTCTGGTGAGGC
 ACCAGAGCCTCCACATTAACCACGCCATTATGCAAGCCTGAGTTCACTTGTTCCCGAATCTCTCCAC
 TCGGAGCATCGTTTCGATCCCTTAGCTGTCAGAGGTTTCTTCAGTGAACTGAACTCCAATCTCTGC
 ATGGGAGATCCTCACAGTAGTCTCCTCTTTGGTTCTTGGCATGTTGACAGGAACATGAGGAACC
 ATGTTTCGAGATGCTCAAGATCATCAGGTTTTCGAAGAACAGCATCTGAAGGTAGGAGATCATGGCT
 ATCTGCCTGAATCAGTATGTAACAACCTGGAAGCGGATGCTGATAATCGACTTTGAAGTTCTTTTTT
 CTCTTCAACCTTCATTTTTTCTTTACTTTATTTTCAGTGTCCATACACTTACCCAAAAAAAAAAGA
 AAAAAAGAAAAAAGAAAAAGAAAAAGATAAAAAGGATGATACCCTGAAAATGATCCAAT
 TATATAACCATTTTGATGGTGTGTAATATGTTTCAGCCCCATCCAGATTTATGTTTCGAGCCCTTTTTGG
 CCCTTGTA AAAAGAAAAGAGAATGCTTGAGTTTTGGTGATTTTGATGGATGGTTGTATATATGTGTA
 TGAGAAGTTCAAAGTTTGTACTGGAAGAAAAGTCAAAGTTTCTTCTCTCTATGCAGAGAATTTT
 GTATGAACATGATATGGAAGTTCATAATTATATAAAATGTGTTTTATAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 ACTCGAGGGGGCCCGC

표 2. 오이로부터 분리한 저온 유도성 유전자의 염기서열 (계속)

(Aldehyde dehydrogenase)
 CTACCAGGCCATTTCGCTTCATGGGGGTGCCGGGTCTCGTACTTTTGTGCACGAGCGTGTAC
 ACGAGGAATTTGTCGAAAAGTCNAAGGCACGTGCCCAAAGACGTGTTGTTGGTGACCCTTT
 CAAGAAGGGTGTGAACAGGGTCCCTCAGATTGACTCGGATCAATTTGAAAAAGTCCTAAG
 ATATATCAAATCTGGCATTGAAAGCAATGCTACTTTGGAATGTGGAGGTGGTAGACTTGG
 GCCAAGGGGTACTIONTCATCGAGCCAACAGTTTTTCTCAAATGTTAAGGACGATATGTTGAT
 AGCAAAGGATGAAATCTTTGGTCCAGTACAATCCATCCTGAAATTC AAGGACATTGATGA
 AGTAATTCATAGAGCAAACACTCAACTCGTTACGGTCTAGCATCAGGAATTTTCACATCGAA
 CATCGACACAGCCAACACATTAATACGAGGATTGAGAACGGGACCGTGTGGGTGAATTGC
 TTCGACATCTTCGACGCCGAATACCATTGGCGGGTATAAGATGAGTGGAATAGGAAGGG
 AGAAGGAATTTACAGCCTCCAAACTACTTACAAGTAAAGGCTGTTGTTACACCTCTCA
 AGAATCCNGCATGGTTGTGAGAATTCACCAATGCCAGGTGAAGTACCAAAATGTTTAAT
 TTTGCAAAATCAGTTTTTCTTTTTCTTCTCNCTTTTCTCAAGAATAAAGCAGGGGCCCTT
 GCCTTCTGTTCTGTTGGTGTANAAAAGTTTCANACTTTTATAATAATATCTACCNCTTCN
 TAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

(Anthocyanin-related membrane protein)
 AATTCGGCACGAGGGTCTTTTGAAAATTATGTGCTCTTGGCGCTGTCTATGGGATCACCATGCTTCT
 AGAAGGAAAGCTTTGAAGGCAAAGTGGTATTACTACATACTGCTTGGATTAGTAGATGTAGAGGCCA
 ATTACCTTGTGGTAAAGGCCTACCAATACACATCCATAACAAGTGAATGTTACTTGATTGTTGGGCA
 ATCCCTTGTGTGTTACTATTCACTTGGCTATTTTTGAAAACAAAATATAGACTGAGGAAGATAATCGG
 TGTCGTGATCTGCGTGGCTGGCATCGTCGCGGTATCTTTCGGATGTTTCATGCCGGTGACCGGCCAGGA
 GGAAGCANCCCNNTAAAGGGGATGCACTGGTTATTGCTGGTGCCACCCTTATGCTGTCAGTAATGT
 CAGCGAGGAATTCCTTGTGAAGAATGCTGGTAGAGTTGAATTAATGGCAATGCTTGGTCTCTTTGGCT
 CAATCATCAGTGGAATCCAAATAAGCATAATAGAGCGCAAAGAGTTAAATCAATTAATTGGACACCT
 AAGACAGCACTTCCATTTGTTGGATTCTCAGTGGCTATGTTTCTTTCTACTCATTAGTTCCTGTATTG
 CTTCAGATCAATGGAGCAGCGATGTTGAATCTGTCTTACTTCAGATATGTGGGCTGTTGTAAT
 ACGCATTTTTGCTTATCATGAGAAGGTCGATTGGATATACTTTGTGGCATTGCTGCTGTTGTTGG
 GCTTGTATTATTCAGTGGCTGACAAAGACGAAGATCGCAACCATGGCAATGTTGCCAATGTAGTT
 GCAGATGAGGAAGGAGGTCCAAGAAACCNAAGATGGACGAAAGAATCGTCACTGAAGGCAGTAGT
 AGTAGGCCAGATGGTAATGGTGGTGGTGGCAATGCAAGGATGGAAGGCATTGACAAGAAGGGTGAG
 ATAGCTTTGGTAGAACCAGAATAACTGAAATGGAAAGCTTTAAAAGAAATGTTCCATTAAGGCTAT
 AATTGGTCAATTCAAAGTGAATTAGAAAATGTAGACTATACTTCTGTTGATGCATAAATGAAAA
 ATGTCCATATTTTTATTTGATACAATTCATGTTTCTTTGGAAATGATCTAAATTTAAAGTTCATTTG
 TGGATAGAAAAAAAAAAAAAAAAAACCTCNGGGGGGCCCG

표 2. 오이로부터 분리한 저온 유도성 유전자의 염기서열 (계속)

(csp54-51, unknown)

CCGCCGCCGCCACCGCCTGCAACGCCACAAGGGCCACCGAATCATCGGGAATTACAACAATGGCCAC
CAGCGCCGCAACCAAAATGGGAAGTGCAAGAGAAGCCAAAGCGGAGGGAGAAGAAGCTCGCAACTTT
CTCAAGCAAGCTAAGAAGCCCTAATTCTTCAGCTTTAGAGAAAACCCCTAACTTCTCAATGGAGGAA
AGCGTAAACCCTAATTCCTCCGCTTCGATAACAACCCTGCTTTCTCAACATTGCTAAGAAGCTTTCTT
AGTCTCAAGCTTCTTGAACACATCCACTTCCACATCCTCCGCACTCTCGTAAAAAATTCCAGCTCCAA
ACCATTTCTTCCCAAGCATCGTCGATTTTGTTACCTTCTTCTGAGGGGCCATGGCGAAGATGGTG
AGTGATTGGATCTGGAAGAAGAGAAGGGGCGGCGGGGGGGCGG

(csp54-52, no match)

CCGCCTCCGCCCGCCCATGACCCAGTTCGCCGAGTATGATGGTTGCCGTTGTTGTTGTTGTTGTT
GTGGTTTCCGTTGCTTCTGGGTAAGCCTTGACCGGCCGGTGAGAGGCCATGACCACCGTGGGTAGTT
AAACCGAATCCTCGAAGATACCCATTTTGAGATTCTGTTTATTGGACGAAGGAATCAATTTGGGGTT
GGATTGAAACATGTTTTGAATATCAAAAATTGGGTTTTGCAAATTGCTGCCGCGGAGAAAGTCAAG
GCGACGGAGAAAGAAACGGCGCTTTTGTGCAAATGGTCGGAGAAGGTAAGTCTGTTGTGTGGAATT
AGGTACAACGTCTAAATGTGCAGAAGATGATGTTCTGTTACTACCACCACCCTGAACAGATCAAAT
CTCGCCCCAGCGTTTCTCGTAAACGGAGAAGAAGATGAAGAAGCTGTAAACGGCGGAGCTGGAATT
CCGGTAAATCCTGAACCATAGCACGAAAATTCGTCGTATCCGTCGTTAACACCGTCGTCGGAGCTC
GTCGTGACGCTCTCGGCCGCTTCTTGAGTTTCTACCAGTGTTACCCGACCACCACCACCGCTGGCA
CCGGCGTTGGCACAATTATTAGGAATGTTTTGCAAATCAGTGTGATCAGAGGGAGTGAAGGAATTAG
TAGCGTCAGATGGGTGACTGAAATTGTGGACGGCAGAGTAATTATTAGAAATTGGGGATAAATTGTG
ATCGGTGTTGCAGAATTGGGAGGTGGAGGGTGGAGATCGGAGGGTATTTGGTCGGATCTGACGGTT
CGGGACCAAGCATATCGAGATTGNCGAGTGGGTTTTGATTAGAAAGGTGTGAAGATCGAGGATCA
ATNAANTGGGAGAGAGGATCAAGATGGCGGCGCGGGGGCGAATCCCTAGTGAATCCCGGCNCCT
GCAGNCNACCATTGGGAAANCTCCACNCCTNGGNGCATAGCTTGNGTATCNATAGGGCCNAAAA
NCTNGGCGAANCTGGNCAANCTGTTNCGGGGGAAATTTTTTCC

(csp54-53, unknown, hypothetical)

CCGCCGCCGCCACCGCCACCCACCTTCTCCACCTTCCGTCCTCCAAACCTCGTCCCCCTTCTCTCTACA
AACCAAGAAACGCAACGCAATTGCTGCAGAATGCTGCTGCTGCATTTTTTGCTTCTCATCTCTTCTC
CTCATCGTTGTTGCCGCCCTCGCCCTCGCTCTCTTCTACTCTACGACCCAAAACCTCCCGTCTTC
CACCTCTCGCTTTCCGGATCTCGTCCTTCAAAGTCTCCACCACACCGGACGGGTCGTTCTCTGACTC
GCAAGTGTGATTGAGTGAATTCAAGAATCCAAATGAGAAGCTTTCGATAAAGTATGGTAAGATT
GAGTATGATGTCACGGTGGGGCAGGCGACGGAGTTTGGGAGGAGAGAGTTGGCTGGATTTACGCAG
GGGAGGAGGAGTACAACGACGGTGAAGGCGGAGGCGGGGGCGG

표 2. 오이로부터 분리한 저온 유도성 유전자의 염기서열 (계속)

(Kinase)
CGGCACGAGGAAGAGATGGGTTCTGGTAATGGTTTTATTCCACTAGTGAATTCAATTTGGATGCCA
AATGGTTGATTGATCCTAAGCATCTTTTTGTTGGGCCAAAGATTGGGGAAGGTGCCCATGCCAAGGT
GTATGAGGGAAAATACAAAAATCAGATTGTGGCTATCAAAATGGTGGGTAAAGGAGATACTCCTGA
GAGGATGGCCAGAAGAGAAAGCCCGTTTGCAAGAGAGGTTGCAATGTTGTCCAAAGTGCGACACAA
GAACTTAGTGAAGTTTATTGGCGCTTGCAAGGAACCTATGATGGTTATTGTGACTGAATTACTCACAG
GTGGCACATTGCGCAAATTTCTCTTGAATTTGAGGCCAAGGAGCTTGGAACCTGATGTGGCAATTGG
GTTTGGCGTTGATATTGCTCGCGCAATGGAGTGTTTACTCCCATGGAATTATACACCGTGACCTTA
AACCAGAAACTTGATCTTGACTGCAGACCATAAAACAATTAAGCTTGCTGATTTTGGTTTGGCAAG
AGAAGAATCAGTAACAGAGATGATGACTGCAGAAACAGGAACGTATAGATGGATGGCTCCAGAGCT
CTATAGTACGGTCACTTTAAAGCATGGAGATAAGAAGCATTATAATCACAAAGTTGATGCCTACAGC
TTTGCCATTGTATTGTGGGAGCTCATCCTTAATAGGTTACCTTTTGAAGGCATGTGCAATTTGCAGCC
CGCTATGCAGCTGCTTTAAGAACATGAGGCCAGTGCTGAAAACCTTCCAGAGGACTTAGCTTTAA
TAGTGACATCATGTTGGAGAGAAGATCCAAATACAAGACCAAACCTTCAGCCAGATTATACAGATGCT
ATTGCAGTCCCTTTCTAGAATATCACCACGATCACCTGTGATCCACCTCGGATATGTGCTTCTGAAA
ACGTTGTGATGCCACCCGAATCTCCCTGTACAAATTCCTTGATGGCTGTTAGACATGGCTCAGGGGAA
GCCCCACATGGCATGATCGAAGAAACACCAACAACCTCCTTCTTCTGCTTTAACAAATGTTACTGATC
CAATGCAAGAAAAATCCTAAAAGGCACAGTTTTAACTTTAGTTGTAGTTCTATAAGAATACCCAATAA
GCCAAACCAAGAAATGTAACAGAATTTGGGATTGCTGTCAGCTCAGAAGCTTGAGAATCCTTAAGCTT
TTTTCAACAGATGTGTAGGATCATTGAGTGATGGATGGCTCCACCTTTCCAATAATCAAGAAAATCT
TGGCATGTAATATTTCTGAATTCGTGTGGGAATTAGATAATGAGAAATTCAGTATCATAACATTGTA
AATAAAAAAAAAA AAAAAAAC

제 2 절 유전자의 저온 유도성 분석

1. 오이 kinase 유전자의 스트레스에 따른 발현양상: 식물체를 재배한 후 위에서 설명한 방법으로 저온 스트레스 처리를 한 후 total RNA를 추출하고 관련 유전자의 발현 양상을 real-time RT-PCR 또는 Northern blot을 이용하여 조사하였다. 먼저 저온 유도성 프로모터의 분리에 사용한 kinase에 대한 연구를 집중적으로 수행하였다. 그림 2에서 보는 바와 같이 오이의 kinase는 오이 지놈에 단일 copy로 존재함을 알 수 있었고, 오이의 뿌리와 줄기부분에서 다량 발현됨을 알 수 있었다. 저온 처리에 따른 발현 양상을 조사한 결과 저온 처리 후 12시간 이후부터 48 시간 까지 발현이 크게 증가함을 알 수 있었다.

2. 저온 유도성 유전자 발현 양상: 저온 유도성 유전자의 발현 양상을 자세히 조사하기 위하여, 저온 처리한 식물체로부터 total RNA를 추출하고 관련 유전자의 발현 양상을 RT-PCR을 이용하여 조사하였다. 그림 3에서 보는 바와 같이 오이의 RNA-binding protein (RBP), kinase, zinc finger (ZF) protein 및 J-homolog (JH) 유전자들의 발현이 저온에 의해 증가함을 알 수 있었다. 이들 유전자들의 발현 양상은 저온 내성 기능을 연구하는 자료로 활용하였다.

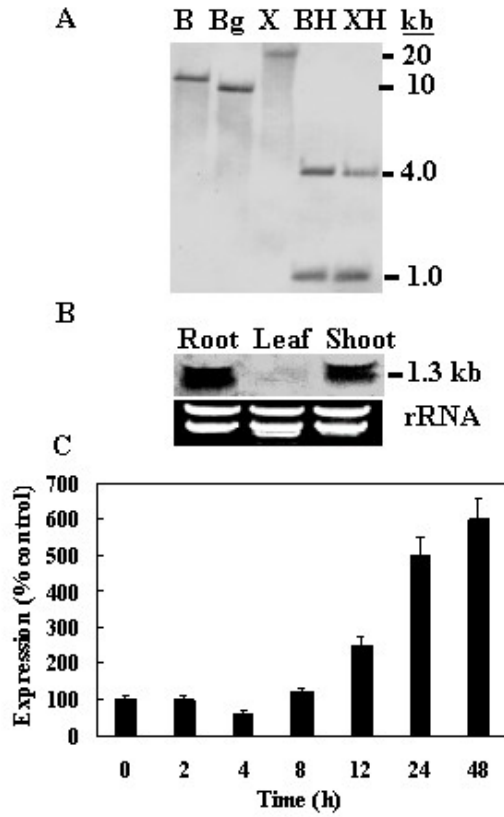


그림 2. 오이로부터 분리한 kinase 유전자의 발현 양상과 저온 스트레스 유도성. (A) Southern 분석 결과 kinase는 single copy로 존재함을 알 수 있었고, (B) Northern 분석 결과 오이의 뿌리와 줄기부분에서 다량 발현됨을 알 수 있었다. (C) real-time RT-PCR 분석 결과 저온에 의해 발현이 크게 증가함을 알 수 있었다.

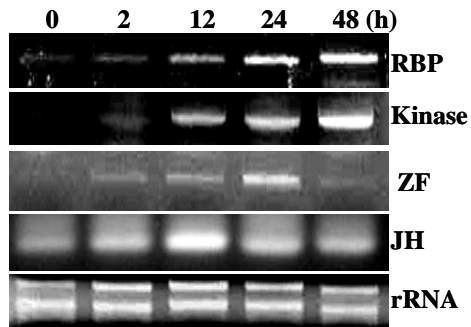


그림 3. 저온 처리한 오이 시료로부터 total RNA를 추출하여 각 유전자의 발현 양상을 조사한 결과 유전자들의 발현이 크게 유도됨을 알 수 있다.

제 3 절 저온 유도성 프로모터 분리

1. 오이의 저온 유도성 프로모터 분리: 저온 스트레스에 의해 발현이 유도되는 것으로 판명된 kinase 유전자의 promoter를 분리하기 위하여, kinase DNA를 probe로 사용하여 오이 EcoRI BAC library filter를 screening 하였다. 그 결과, 8개의 positive clone을 찾아 PCR을 통해 확인하였고, positive BAC clone들을 분리하여 PFGE로 분석함으로써 insert size를 결정하였다 (표 3).

표 3. 오이의 kinase 유전자를 probe로 하여 확인된 BAC clones. Positive BAC clones을 분리하여 NotI 절단과 PFGE로 분석하였다. 괄호안의 숫자는 insert size(kb)를 나타낸다.

No	Positive clones
1	11C17 (100)
2	17E12 (100)
3	17M22 (85)
4	21J21 (100)
5	37K12 (90)
6	44A18 (105)
7	46A17 (90)
8	46F14 (100)

그 중 size가 가장 큰 44A18 clone을 선택하여 분석하였다. 여러 가지 제한효소로 BAC clone을 잘라 전기영동한 후, 앞에서 사용했던 probe로 Southern hybridization을 수행하였으나 제한효소 자리가 별로 없어 DNA fragment 가 너무 크거나 혹은 너무 작아 Southern 실험을 통한 DNA fragment의 subcloning에 성공하지 못하였다. 따라서 cDNA 염기서열로부터 primer를 제작한 다음, BAC clone을 직접 template로 사용하여 sequencing 하였다. 그 결과, starting Met 코돈에서 약 750 bp에 해당하는 upstream region의 염기서열을 결정하였으며, 그 이상의 promoter sequence를 알아내는 sequencing을 계속 진행하였다. 표 4는 kinase promoter의 염기서열로, starting ATG codon으로부터 upstream region으로 약 2.3 kb에 해당하는 염기서열을 나타낸다.

표 4. 오이 kinase 유전자의 프로모터 서열

```

TTTTTATTTTAAAATAAATGATCATATGAGAATTGCTTGATTAGATTTTCTTTTTGCA
ATTTTGATTTGGATTTTTTTTTCTCTTTGGAGTGCACAGTTAAATAAAGTAAGAAATTC
ATTCATAATTCTTAAGACCATTAACATATAATTAATGCTTGAATTAGCTTAAGCTTAGC
GAAAGAAAAATAAATTATTTAAGGGTAGAATATTAATTTTTAGTATTTAAGATTACA
CCATGTTCTAACTTTATAATCATAGTTGGGAGATAGAACTATATTATATGAAAATTTA
ATGTTTAATCAACATCTTAACATCGATAGTTATATTTGTGAAGAAATGATAAAAAATAA
AAAATATATAAATCAATAGATAATTCTTTTATGTTTTAAACATGATTATTATTTTTTT
ATATTCATAATGATTATTTTTCTTACGTTTTGTAAATGTTTTAGGATATAGTTGAAATG
ACTATTTACTATCTCAATATGAAATCTAAAAAATGTATATATATAAAACAAACAAAT
TGTGAAATACTTATTTTCTCTCTAAATAGTTTTTGAAAACAAAGTTTACTTTAGTCAC
ATTCATTAATAATTTGTTAATTCTCTAACGTAATAATAACGTGGATATTTTGATGTTTA
AAATTCAGATTCATCATATTAATATATTGATAAAATAACTAATAAATCTTACTAATTTA
TTCTCTAATTTTTCTACGTCAACACCACACTTGAAATAAATAAAAAATAATAAGAATTAG
TATATGAGTTAAAGAACGTGAAGTAGAATGACAATAAGTCAAAATGGTGATGATCAAAA
TTCCGAAGACAGAGTAACCTTTTAAGTTATTCGATAAAACATCAATTTACCAAATAGTT
TTAATCAAAAATTAACCATATACTATTAAGAGTGGCTTCTTATTTGATAGTCCTA
GTTATTCATATATAGAAAAGTCACATGTGATTCTAGTAAAGTTAACCGAATATTTTAAC
TACAAAAGACTAAAATATACTTATTTTTAAAGTTTTAAAGACTAAAACAAATACTTTTTA
AATAAAAGTTTTAATATCATAGAACATATAAATGAATGCAAACCTATAATAATAAAAAA
CATAGTACAAACGGAAAATGTTTGTAATAAATGATTGTGATTGAATTTTTATTGTAAACT
AATAGGTGTAAATAAAAAATGTTGAGATTATTACTATTAAATATTATTATGAATTGAAA
AAAAGAGAGAGTGTGTTGGTGTACCAAATTAATTTAAAAAGATTAGGGAAAGAAAATAAA
ATGATTGGAGAGATGAATGTTAGAGAATATTAATGTCCAATTTCTATAGAAAAATATT
ATGTAAAATTACGGTATTTAAATTTAACTTCTAATCCAATATTTATTTATAATAAAGTA
TGATAAATGATAGATAGAATAGAAAGAGTAGTGTATGAGGATCACGATTGATTGTAAT
GAGATAGAATACAAATAGTAGTGTATGACGATCAGAAGGATTTGTATAAACGTATTTAT
GTTGATTTAGAAAGAAAAGAAAGGAAGAATTGATAGTCAGAAAAACAAAAATAAAAG
TTGGATTATGAAAGAAGACATTATGAACTTTGTCTCTATCTCTCTCTCTCACACACAC
ACACACTATAAACAAAAACAAAGGGATTGTTTAGTGTTTTCTTAAATAGCAATTTTGGG
CTATGCCAACCTTTGTCCTTATCCATGCATTTGGATTTCCCATTTCTAAACCCCATCGTCTC
TTCTCTCTCTCTCTCTCTTTGTTTTTATTCCTCTATTTTTCTTTTTTTTTGGCATTCAA
GTCAAAATCACGAGACGATGTACAGTGACAATAAACTCACAAAGAAAGGGGAAAAAATA
AAGGGAAAAAAAACCTCTCTTTTGCAGCTTTAAATTGCAGATGGCAACCGCATTCACTTCC
ATACGCGGAGAAGCATCAATTTACACCTCAATTTGTCCCTTCACTTTCATTTTCATTG
CTTTCTCCCATTCATTCCTTATTTGCCTCCCCTGCTTCTGACACTAACTCTTTTTCTGA
TTTCTATTGTTTTTTCTTTTAATATTCTGGGGCTGCTGGATTTGCGTTTTCTACATGTG

```

```
GAGAGGCACTATATTCCTTTTCCCACCAAGCACAGAATCCGTTTCGATTTCTGGATCGGTT
ACCGGGATTTTAGGGATGGGTCTGTTCAGTATCAAACATGGGTTTTTTTTAGTTTTTTTG
TCTTTGGTTTAGTACTTTGTCCGTACCTCTTTGAATCTCTGATGGGTTCTTTTTGGGAAA
GGTTTTTCGTGTGTGAATTGAGAGAAGAAGGAAGTGAGGAAGTGCCTGAAGGTGTTTGA
TAAAAGTCGCGAGTGAAGAGATGGGTTCTGGTAATGGTTTTTATTCCACTAGTGAATTCA
ATTTGGATGCCAAATGGTTGATTGATCCTAAGCATCTTTTTGTTGGGCCAAAGATTGGGG
AAGGTGCCCATGCCAAGGTGTATGAGGGAAAGTACGTTTTCTTTTTTCTGATGTCAATTG
CTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTGTCTGTCTGAGATCAGATATATTAAGGCCTTTCTGTCA
CTCTGTCTCTTTTTAAACTCTCTCTTTCTCCCTTTTCTCAGATACAAAATCAGAT
TGTGGCTATCAAAAATGGTGGGTAAAGGAGATACTCCTGAGAGGATGCCAGAAGGAGCCC
```

2. 오이의 저온 유도성 프로모터 분석: 오이에서 분리한 kinase 프로모터의 저온 유도성 여부를 확인하기 위하여, Pkinase-GUS construct를 제작하였다. 사용한 PCR primer는 위 표4에서 밑줄로 표시한 5' GAGAGTGTTTGGTGTAC 3'와 5' GTCGCGAGTGAAGAG 3'을 이용하였으며, initiation ATG codon으로부터 약 1.1 kb 크기의 DNA를 클로닝하였다. 제작한 Pkinase-GUS 벡터를 애기장대에 형질전환하여 T1 형질전환체를 확보하였다. 그림 4는 형질전환체에 오이 kinase 프로모터의 삽입을 gene-specific primer와 vector-gene specific primer를 활용하여 확인한 것으로, 형질전환체 3, 4, 6 번 라인 중에서 가장 확실한 5번 라인에 대한 분석을 시도하였다. 오이 promoter-GUS가 도입된 애기장대 형질전환체를 3주간 배양한 후 정상적인 조건과 저온 처리를 한 다음 GUS의 발현 정도를 측정하였다. 실험은 4-10°C 등 여러 가지 저온 조건을 처리한 후 GUS의 발현 정도를 측정하였다. 그림 5는 정상적인 조건과 4°C 에서 1일간 저온 처리한 식물체 뿌리에 발현된 GUS의 발현 정도를 비교 분석한 것으로, 정상적인 조건에서 보다 4°C 에서 1일간 저온 처리한 식물체에서의 GUS가 강하게 발현됨을 알 수 있다. 이러한 결과는 오이의 kinase 유전자가 저온에 의해 발현이 유도됨을 암시하는 것이다.

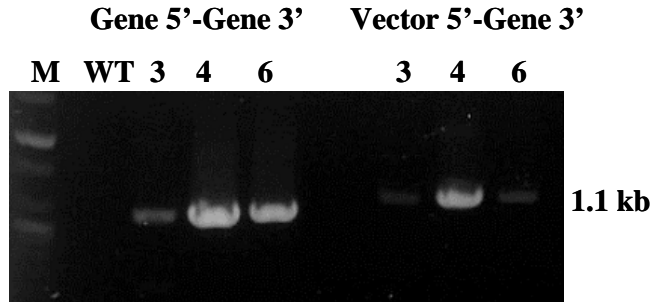


그림 4. 오이 kinase 프로모터가 삽입된 애기장대 형질전환체에서 오이 kinase 프로모터의 삽입을 gene-gene specific primer와 vector-gene specific primer를 활용하여 확인하였다.

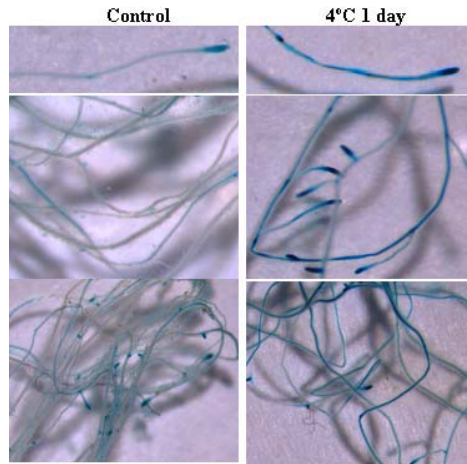


그림 5. 오이 kinase promoter-GUS가 도입된 애기장대 형질전환체를 3주간 배양한 후 정상적인 조건과 저온 처리를 한 후 측정된 GUS의 발현 정도를 비교한 것으로, 정상적인 조건에서 보다 4°C 에서 1일간 저온 처리한 식물체에서의 GUS가 강하게 발현됨을 알 수 있다.

제 4 절 스트레스 유도성 HMGB 유전자 분리 및 발현 양상 분석

오이로부터 저온 유도성 유전자를 분리하는 과정에 다양한 환경 스트레스에 의해 발현이 조절되는 유전자를 동시에 분리할 수 있었으며, 이 가운데 High mobility group B (HMGB) protein의 발현 양상에 대한 분석 결과를 아래의 논문으로 발표하였다.

Molecular cloning of a cDNA encoding a high mobility group protein in *Cucumis sativus* and its expression by abiotic stress treatments

Published in Journal of Plant Physiology (2007) 164, 205-208.

Ji Young Jang, Kyung Jin Kwak, Hunseung Kang

Department of Plant Biotechnology and Agricultural Plant Stress Research Center, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju, 500-757 Korea

Summary

A cDNA encoding a high mobility group B (HMGB) protein was isolated from *Cucumis sativus* and characterized with respect to its sequence, expression, and responses to various abiotic stress treatments. The predicted polypeptide of 146 amino acid residues contains characteristic features of HMGB family proteins including the N-terminal basic region, one HMG-box, and a stretch of acidic amino acid residues at the C-terminus. In vitro nucleic acid-binding assay revealed that the HMGB protein bound to both single-stranded DNA and double-stranded DNA. DNA gel blot analysis indicated that the HMGB gene is a single copy gene in cucumber genome. RNA gel blot analysis showed that the cucumber HMGB was more

abundantly expressed in the roots than in shoots and leaves. Various abiotic stresses, including cold, drought and high salinity down regulated markedly the expression of the HMGB in cucumber. The present report identifies a novel gene encoding HMGB protein in cucumber that shows a significant response to abiotic stress treatments.

Key words: Abiotic stress; Cucumber; *Cucumis sativus*; High mobility group protein; HMG-box

Introduction

High mobility group (HMG) proteins are small and relatively abundant chromatin-associated proteins found in the nuclei of higher eukaryotes. The HMG proteins are subdivided into 3 families: the HMGB (formerly HMG-1/-2) family, the HMGN (formerly HMG-14/-17) family, and the HMGA (formerly HMG-I/Y/C) family (Bustin and Reeves, 1996; Bustin, 2001). HMGB proteins appear to act primarily as architectural facilitators in the assembly of nucleoprotein complexes, which contribute to the regulation of transcription and recombination (Thomas and Travers, 2001; Klosterman and Hadwiger, 2002). The cDNAs encoding HMGB proteins have been cloned from various plant species (Grasser and Felix, 1991; Webster et al., 1997; Yamamoto and Minamikawa, 1998; Wu et al., 2003). Sequence comparison revealed that the plant HMGB proteins contrast to animal counterparts in that plant proteins contain only one HMG-box, whereas animal proteins contain two HMG-boxes (Grasser 1998; Ritt et al., 1998).

Higher plants have a family of HMGB proteins, and the various plant HMGB proteins differ in their chromatin association (Agresti and Bianchi, 2003), DNA interactions (Stemmer et al., 2002), and expression pattern (Stemmer et al., 1999). Plants are somewhat different from other eukaryotes in that plants have a variety of HMGB proteins, whereas other organisms usually express only two closely related HMGB proteins (Grasser, 1998). The

presence of various HMGB proteins in plants implies that they may be adapted to perform a variety of functions in the nucleus. Despite the increasing number of the reports for DNA and protein sequences of HMGB proteins in plants, relatively little is known about the stress-related expression and function of HMGB proteins in plants. Here we report the cloning of a cDNA encoding a HMGB protein in cucumber, and its expression pattern in response to abiotic stress treatments.

Materials and methods

The cucumber (*Cucumis sativus* L.) cDNA library was constructed using a Uni-ZAP II vector according to the manufacture's instructions (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Partial DNA sequence for the HMGB protein was obtained from our massive sequencing analysis of the genes expressed in cucumber roots, and this partial DNA sequence was used as a probe to screen 5×10^6 plaques of the cucumber cDNA library. The cDNA clones hybridized to the probe were subjected to in vivo excision and sequenced by the dideoxy chain termination method using the ABI Prism 3700 DNA sequencer (Perkin Elmer, Boston, MA, USA).

For nucleic acid-binding assay, the DNA sequence encoding HMGB protein was cloned into the pET-22b(+) vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and the labeled proteins were synthesized by coupled transcription-translation (Promega, Madison, WI, USA) in the presence of [³⁵S]methionine. Homoribopolymers [poly(A), poly(U), poly(G), and poly(C)] attached to agarose beads and single-stranded and double-stranded calf thymus DNA attached to cellulose beads were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Nucleic acid-binding assay was performed as described previously (Kim et al., 2005).

DNA gel blot analysis was performed by using the digoxigenin-labeled cucumber HMGB probe that was generated by the PCR method as suggested by the manufacturer (Roche Applied Science, Penzberg, Germany).

For RNA gel blot analysis, ten micrograms of total RNA isolated from roots, leaves, and shoots were fractionated and hybridized with the probe. For the detection of HMGB transcripts in stress-treated samples, the real-time quantification of RNA target was performed as described previously (Kim et al., 2003) in the Rotor-Gene 2000 real-time thermal cycling system (Corbett Research, Sydney, Australia) with the forward primer (5' AATGGAAGTCAATGTCCGACGCTG 3') and the reverse primer (5' CATTCCCTCCCTCCGCAATTCTC 3').

For cold treatment, the two-week-old cucumber plants were incubated with their roots submerged into a hydroponic growth medium (Cooper, 1975) maintained at 8°C in a growth chamber. For high salinity treatment, the cucumber plants were incubated with their roots submerged into the water containing 250 mM NaCl in a growth chamber. For drought treatment, the whole cucumber plants were placed on a filter paper and then placed further in a growth chamber maintained at 22°C.

Results and discussion

Sequence analysis (Fig. 6) showed that the cucumber HMGB insert was 915-bp long and contained a 438-bp open reading frame, flanked by a 157-bp 5'-untranslated region and a 398-bp 3'-untranslated region, including an 22 bp-long poly(A) tail (GeneBank accession no. DQ010042). The ORF encodes a 146-amino acid polypeptide with a predicted molecular mass of 15.9 kD. The deduced protein is basic with an isoelectric point of 8.6. Hydropathy and other motif analyses of the deduced amino acid sequence showed that the cucumber HMGB protein is hydrophilic and contains no N-terminal signal sequence (data not shown). The predicted amino acid sequence of the cucumber HMGB protein has high similarity to other HMGB proteins from *Zea mays* (71% identity), *Nicotiana tabacum* (63% identity), *Arabidopsis thaliana* (75% identity), and *Canavalia gladiata* (75% identity). The cucumber HMGB protein had the characteristic conserved motifs of the HMGB1 and 2 proteins

including N-terminal basic region, one HMG-box, and C-terminal polyacidic region (Bustin and Reeves, 1996). Analysis of nucleic acid-binding property of the cucumber HMGB protein showed that the cucumber HMGB protein bound well to both single-stranded DNA and double-stranded DNA (Fig. 7) in the presence of different NaCl concentrations, indicating that the cucumber HMGB isolated in this study does encode HMGB protein.

DNA gel blot analysis revealed that one band was detected in the DNA digested with HindIII or NcoI that could not cut cucumber HMGB, and two bands were observed in the DNA subjected to double digestion with HindIII and NcoI (Fig. 8A), suggesting a single-copy gene for cucumber HMGB. RNA gelblot analysis showed that the cucumber HMGB was more abundantly expressed in the roots than in shoots and leaves (Fig. 8B).

Figure 9 shows the pattern of HMGB mRNA accumulation over time in the cucumber plants exposed to different abiotic stresses including cold, drought, and high salinity. The transcript levels of HMGB decreased markedly in cucumber by cold, drought, or high salinity stress. The decrease in HMGB expression in cucumber was rapid in that its mRNA level dropped to 50 to 70% of the control level 2 h after cold or drought treatment. After one day of stress treatment, the transcript level of HMGB decreased to 25, 10, or 30% of the control in the cucumber plants subjected to cold, drought, or salt stress, respectively. The transcript level of HMGB further decreased to 2-5% of the control two days after stress treatments.

In summary, the cloning and stress-related expression of a HMGB gene are presented here for the first time from cucumber. HMGB are versatile architectural factors assisting DNA-dependent processes such as transcription and recombination (Thomas and Travers, 2001). However, little is known about the regulation of HMGB itself by environmental factors. The present report not only adds to the database a novel cDNA encoding HMGB protein in cucumber but also provides information about its regulation by various abiotic stresses, including cold, drought, and high salt, which will be useful to further study its function in stress adaptation process in cucumber.

Acknowledgment

This work was supported by a grant from Agricultural R&D Promotion Center, Korean Ministry of Agriculture and Forestry (ARPC Grant 204062-3).

References

- Agresti A, Bianchi M. *Curr Opin Gen Dev* 2003;13:170-78.
- Bustin M. *Trends Biochem Sci* 2001;26:152-53.
- Bustin M, Reeves R. *Progr Nucl Acid Res Mol Biol* 1996;54:35-100.
- Cooper AJ. *Sci Hort* 1975;3:251-58.
- Grasser KD. *Trends Plant Sci* 1998;3:260-65.
- Grasser KD, Felix G. *Nucleic Acids Res* 1991;19:2573-77.
- Kim JS, Kim YO, Ryu HJ, Kwak YS, Lee JY, Kang H. *Plant Cell Physiol* 2003;44:412-19.
- Kim YO, Kim JS, Kang H. *Plant J* 2005;42:890-900.
- Klosterman SJ, Hadwiger LA. *Plant Sci* 2002; 162:855-866.
- Ritt C, Grimm R, Fernández S, Alonso JC, Grasser KD. *Biochemistry* 1998;37:2673-81.
- Stemmer C, Grimm R, Grasser KD. *Plant Mol Biol* 1999;41:351-61.
- Stemmer C, Fernández S, G, Alonso JC, Grasser KD. *Biochemistry* 2002;41:7763-70.
- Thomas JO, Travers AA. *Trends Biochem Sci* 2001;26:167-74.
- Webster CI, Packman LC, Pwee K-H, Gray JC. *Plant J* 1997;11:703-15.
- Wu Q, Zhang W, Pwee KH, Kumar PP. *Gene* 2003;312:103-9.
- Yamamoto S, Minamikawa T. *Biochim Biophys Acta* 1998;1396:47-50.


```

1  ggcaacgagggcacacgcactcaaagccaatctcaaaaccgcatcacacgaacctactata
61  agccataaccaattttttctcctcatatctcactctcacactctttccttattcttcttc
121  ttctttctccaaccctagagttttacaggattcatcatgaagggcgaaaatccaaggg
                                     M K G G K S K G   8

181  ggcgcctaaaaagaccgataccaagttgaaaagcaaaagtgcctggagctagtaagaaatc
      A P K K T D T K L K S K S A G A S K K S   28

241  agcgaaggctgcaaaggatcctaacaagccaagaggcctgctagtgctttcttcgtttt
      A K A A K D P N K P K R P A S A F F V F   48

301  catggaagagttcaggaagcaatacaagaaggaacatcctaacaacaaatccgctcgctgc
      M E E F R K Q Y K K E H P N N K S V A A   68

361  tgttgaaaaggctggtggtgataaatggaagtcaatgtccgacgctgagaaagcacctta
      V G K A G G D K W K S M S D A E K A P Y   88

421  cataaacaaggctgagaaaaggaagactgagtataacaagagcatgcaggcttataataa
      I N K A E K R K T E Y N K S M Q A Y N K 108

481  gagaattgctggagggagggaatggagctgaagaagaagaatcagataaatccaaatcaga
      R I A E G G N G A E E E E S D K S K S E 128

541  agtcaatgatgacgatgaagatgatgatgagagtgaggaggaagatgatgagtaaat
      V N D D D E D D D E S G E D E D D E * 146

601  gtttaggagacgaggaatgatggggtggaagaacaagcgtttaattccttcatagttcgg
661  agctgaaacactcagcaatttagatttttctttattatgtcttgataaatagctacttc
721  ttttttctttttttttttgggtaattaggatagaatgggagaaacgaaatcaaaacaa
781  agggaaggctcgtgtttgatgtagatttcttaagttgacaaggatattgattcaaggaa
841  aaatctgttagtaattgcacaatgattcagttttagttccattattctacgaaaaaaa
901  aaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

Figure 6. The nucleotide and deduced amino acid sequence of cucumber HMGB protein. Numbers of nucleotide and amino acid sequence are indicated on the left and right, respectively.

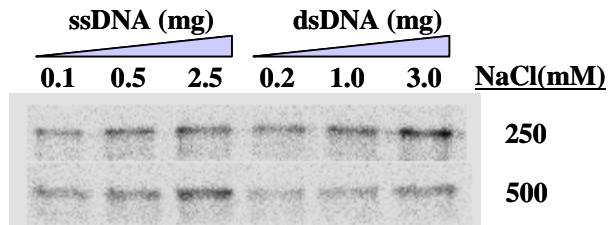


Figure 7. Nucleic acid-binding property of the cucumber HMGB protein. The ³⁵S-labeled HMGB proteins were mixed with various concentrations of ssDNA and dsDNA bound to agarose beads under different NaCl concentrations. Bound proteins were separated by SDS-PAGE and the protein bands were visualized by an Image analyzer.

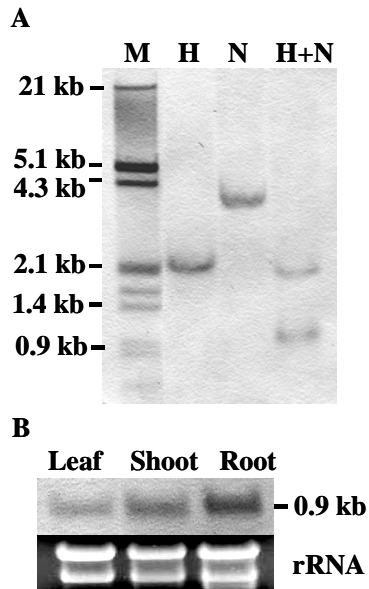


Figure 8. (A) DNA gel blot and (B) RNA gel blot analyses of cucumber HMGB. Genomic DNA (5 ug) digested with either Hind III (H), Nco I (N), or Hind III + Nco I (H+N) was size-fractionated on 0.8% agarose gel, blotted, and hybridized with the probe. For RNA gel blot analysis, ten micrograms of total RNA isolated from roots, leaves, and shoots were fractionated and hybridized with the probe. Ethidium bromide staining of rRNA is presented to show equal loading of the RNA.

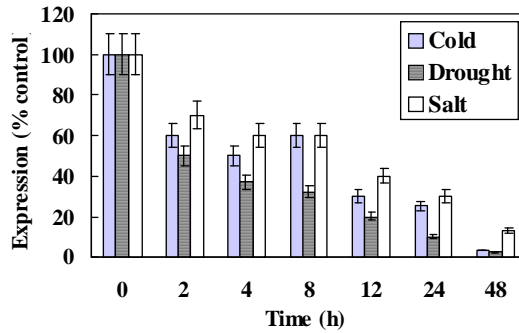


Figure 9. Expression of the cucumber HMGB in response to abiotic stress treatments. Total RNAs were isolated from the root tissues subjected to cold, drought, or salt stress, and 200 ng of total RNA was used for real-time RT-PCR. The transcript levels of HMGB were plotted as the percentages of the non-stressed control. The presented data are averages and standard errors (bars) of three independent experiments.

제 5 절 스트레스 유도성 aquaporin 유전자 분리 및 기능 분석

오이로부터 저온 유도성 유전자를 분리하는 과정에 다양한 환경 스트레스에 의해 발현이 조절되는 유전자를 동시에 분리할 수 있었으며, 이 가운데 aquaporin 유전자의 발현 양상 및 기능 대한 분석 결과를 아래의 논문으로 투고하여 현재 심사 중에 있다.

J. Experimental Botany, submitted (2007)

Transgenic Arabidopsis plants expressing an aquaporin isolated from cucumber and figleaf gourd respond differently to abiotic stresses

Ji Young Jang, Ji Ye Rhee, Dong Gu Kim, Gap Chae Chung, Jeong Hyun Lee and Hunseung Kang

Department of Plant Biotechnology, Agricultural Plant Stress Research Center and Biotechnology Research Institute, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, 300 Yongbong-dong, Buk-gu, Gwangju, 500-757 Korea

Abstract

Plasma membrane intrinsic proteins (PIPs), also referred to as aquaporins, are known to control water transport in the growth, development, and stress responses of plants. Here, we isolated one aquaporin gene, designated CsPIP11, from cucumber and one aquaporin gene, designated CfPIP21, from figleaf gourd, and compare their roles in stress responses. The expression of CsPIP11 was significantly reduced by drought or cold stress, and was marginally elevated by salt stress. By comparison, the levels of CfPIP21

transcript increased markedly by cold or salt stress. To gain insight whether the expression of the aquaporin alters the responses of plants to a variety of stress conditions, we evaluated transgenic *Arabidopsis* plants that constitutively express CsPIP11 or CfPIP21. CfPIP21 expression induced a reduction in water loss and had a positive impact on the growth of *Arabidopsis* under dehydration stress conditions, whereas CsPIP11 expression exerted a negative effect on the growth of *Arabidopsis* under dehydration stress conditions. CsPIP11 or CfPIP21 expression facilitated seed germination under high salt stress conditions but had no influence on the growth of *Arabidopsis* under cold stress conditions. The expression of endogenous *Arabidopsis* PIP members was affected by the expression of CsPIP1;1 or CfPIP2;1 under stress conditions. Our results indicate that the ectopic expression of a foreign aquaporin gene perturbs differently the natural expression patterns of endogenous aquaporin genes depending on particular stress conditions. This implies that the up- and/or down-regulation of aquaporins and their integrated functions are crucial to the maintenance of proper water balance under stress conditions.

Key words: Abiotic stress, aquaporin, cucumber, figleaf gourd, transgenic *Arabidopsis* plants, water transport.

The nucleotide sequences for cucumber aquaporin and figleaf gourd aquaporin are deposited to the GenBank database under the accession number EF202176 and EF202177, respectively.

Introduction

Major intrinsic proteins (MIPs) are membrane proteins that mediate the movement of water across membranes and regulate root hydraulic conductivity in response to changing environmental conditions. The large and

evolutionary conserved family of MIPs has evolved to facilitate the flow of small molecules such as water and/or glycerol across the hydrophobic interiors of the membranes. Plant MIPs can be classified into four subfamilies on the basis of their sequence similarity (Johanson et al., 2001). Two of the subfamilies, namely the plasma membrane intrinsic proteins (PIPs) and tonoplast intrinsic proteins (TIPs), are named in accordance with their primary locations within the cell. The PIPs are thought to be involved in water exchange between the environment and the plant cells, whereas the TIPs are believed to participate in the osmotic equilibrium between the cytosol and the vacuoles. The third subfamily, referred to as either the NOD26-like MIPs (Weig et al., 1997) or the NOD26-like intrinsic proteins (NIPs) (Heymann and Engel, 1999), was initially identified in the membranes of root nodules in soybean (*Glycine max*) (Fortin et al., 1987). The fourth MIP subfamily, referred to as the small basic intrinsic proteins (SIPs) and consisting of relatively small and basic proteins, was first proposed in plants (Johansson et al., 2000; Chaumont et al., 2001). The properties, subcellular localization, primary transport, and regulation of plant aquaporins have been described in detail (Schäffner, 1998; Tyerman et al., 1999; Baiges et al., 2002; Javot and Maurel, 2002; Tyerman et al., 2002; Kaldenhoff and Fischer, 2006; Maurel, 2007).

The water transport activity of some aquaporin genes has been verified both *in vitro*, using a *Xenopus laevis* oocyte system, and *in vivo*, via the expression of an antisense construct of PIPs in *Arabidopsis thaliana* (Kaldenhoff et al., 1998; Martre et al., 2002) and tobacco (Siefritz et al., 2002). The cellular function of specific aquaporin homologues can be inferred on the basis of distinct subcellular localizations or on tissue-specific expression patterns. Investigations into the function of specific isoforms constitute a crucial objective for the implementation of our molecular understanding of water relations in plants. Moreover, the significance of each aquaporin in different parts of plants under various physiological conditions must be verified. The rapid regulation of individual aquaporin genes in response to

salt, drought, or cold stress has been reported in several plant species (Kawasaki et al., 2001; Smart et al., 2001; Jang et al., 2004; Alexandersson et al., 2005; Boursiac et al., 2005; Sakurai et al., 2005; Zhu et al., 2005; Aroca et al., 2006; Yu et al., 2006; Galmes et al., 2007; Secchi et al., 2007). It was demonstrated that aquaporin downregulation is the principal cause of salt-induced reduction in hydraulic conductivity in plants (Carvajal et al., 1999; Martinez-Ballesta et al., 2000, 2003). Recent physiological and genetic studies have provided compelling evidence for a role of aquaporins in the regulation of water transport under stress conditions (Martre et al., 2002; Siefritz et al., 2002; Aharon et al., 2003; Katsuhara et al., 2003; Tournaire-Roux et al., 2003; Lian et al., 2004; Yu et al., 2005; Peng et al., 2007). However, the molecular and cellular mechanisms relevant to the regulation of aquaporin under stress conditions remain to be clearly elucidated. Moreover, the function of each individual aquaporin isoform and the integrated function of the plant aquaporins in a variety of physiological processes remain poorly understood.

To gain further insight into the roles of aquaporins in plants under various physiological conditions, it is important to determine the response and expression of aquaporin genes under different environmental conditions. In particular, isolation, characterization, and expression analysis of the PIPs believed to be involved in water exchange between the environment and plant cells in different plant species are indispensable steps toward our understanding of the functions and relevance of PIPs in the responses of plants to environmental stimuli. Cucumber and figleaf gourd have been used as the model plants in our group to study water relation under stress conditions, and our previous results showed that gating of aquaporins is different in the roots of chilling-sensitive cucumber and chilling-tolerant figleaf gourd under low temperatures (Lee et al., 2005a, 2005b). Herein, as a step toward understanding the functions of aquaporins in the responses of the two plants to environmental stresses, two genes encoding PIP-type aquaporins were isolated from cucumber and figleaf gourd, and their roles in

stress responses were evaluated in transgenic *Arabidopsis* plants.

Materials and methods

Plant materials and stress treatments

Seeds of the cucumber (*Cucumis sativus* L.) and figleaf gourd (*Cucurbita ficifolia* Bouchè) plants were germinated in the dark at 27°C, and four-day-old seedlings were transferred to incubators harboring modified nutrient solution (Cooper, 1975). The cucumber and figleaf gourd plants were grown at 27°C with 60% constant relative humidity with a 13-hr-light/11-hr-dark photoperiod. The 14-day-old seedlings were used for the analyses conducted in this study.

Two-week-old cucumber and figleaf gourd seedlings were subjected to stress treatments. For cold stress treatment, the seedlings were incubated for the indicated time period with their roots submerged in a nutrient solution maintained at 8°C within a growth chamber. For high salinity or dehydration stress treatments, the seedlings were incubated for the indicated time period with their roots submerged in nutrient solutions containing either 100 to 250 mM NaCl or 200 to 400 mM mannitol, respectively, within a growth chamber.

Germination and seedling growth assays under stress conditions

Arabidopsis seeds from individual plants grown under identical environmental conditions were harvested on the same day and used for germination and seedling growth assays. Germination assays were conducted on three replicates of 30 to 60 seeds. The seeds were sown on half-strength Murashige and Skoog (1962) (MS) medium supplemented with 1.5% sucrose, and the plates were kept in darkness at 4°C for 3 days, then transferred to normal growth conditions. *Arabidopsis* was grown at 23°C under long-day conditions (16-hr-light/8-hr-dark photoperiod). To determine the effects of salt or dehydration stress on germination, the medium was supplemented with

various concentrations of NaCl ranging from 50 to 150 mM or mannitol in a concentration range of 200 to 400 mM, respectively. To determine the effect of cold stress on germination, seeds were germinated in an incubator maintained at 11–15°C under white light. A seed was considered to have germinated when the radicle protruded through the seed coat. To determine the effects of salt or dehydration stress on seedling growth, three-day-old seedlings germinated in normal MS medium were transferred to media supplemented with various concentrations of NaCl or mannitol, and seedling growth was monitored for 10 to 20 days. To evaluate the effects of cold stress on seedling growth, the seeds were permitted to germinate fully under normal growth conditions, and the seedlings were then transferred to an incubator maintained at 11 to 15°C. The plates were positioned vertically within a growth chamber, and the lengths of roots were measured under these stress conditions.

Oocyte swelling assay

The cDNAs for CsPIP11 and CfPIP21 subcloned into the *X. laevis* oocyte expression pNBC vector were digested with Not I, and the capped RNA transcripts of CsPIP1 and CfPIP21 were synthesized in vitro using the RiboMAX™ Large Scale RNA Production System (Promega, Madison, WI, USA). The mature oocytes were isolated from adult *X. laevis* and stored in ND96 buffer (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 2.5 mM Na-pyruvate, pH 7.4) containing streptomycin (10 µg/ml). The follicular cell layer was removed via 2 h of incubation with 2 mg/ml of collagenase in ND96 buffer at 25°C with continuous gentle agitation. The defolliculated-oocytes were injected with 50 nl of cRNA (1 mg/ml) or water using an injector. The oocytes were incubated for 3 days at 18°C in ND96 buffer prior to the taking of water permeability measurements. Individual oocytes were transferred from ND96 buffer to a five-fold diluted ND96 buffer with distilled water, and oocyte swelling was characterized under a

microscope at 30 s intervals.

RNA extraction, reverse-transcription PCR, and real-time RT-PCR

Total RNA was extracted from the frozen samples using the Plant RNeasy extraction kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). One microgram of total RNA was used in an RT-PCR system (Qiagen) together with gene-specific primers. The real-time quantification of RNA targets was conducted in aRotor-Gene 2000 real-time thermal cycling system (Corbett Research, Sydney, Australia) using the QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen) as described previously (Kim et al., 2005). The gene-specific primers for the quantification of the RNA transcripts were as follows: for CsPIP1;1, forward primer 5' GGTGGAGCTAACGTTGTGAGCGAC 3' and reverse primer 5' GGCGCTACGTTTAGCATCAGTGG 3' for CfPIP2;1, forward primer 5' CAGAAGGGTCTCTATCATCGCTACG 3' and reverse primer 5' TGGGATCTGTAGCAGAGAAGACAGTG 3'' for ACTIN, forward primer 5' GGTAACATTGTGCTCAGTGGTG 3' and reverse primer 5' AACGACCTTAATCTTCATGCTGC 3'.

Vector construction and plant transformation

The coding regions of CsPIP11 and CfPIP21 cDNA were prepared by PCR and ligated into pGEM T-easy vector (Promega). The vector was then digested with XbaI and BamHI, and the DNA fragment was subcloned into the pBI121 vector linearized via double digestion with the same restriction enzymes. All DNA manipulations were conducted according to the standard procedures (Sambrook et al., 1989), and the PIP-coding regions and junction sequences were verified by DNA sequencing. *Arabidopsis* was transformed according to the vacuum infiltration method (Bechtold and Pelletier, 1998), using *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. The seeds were harvested and plated on kanamycin (50 µg/ml) and carbenicillin (250 µg/ml) selection media

to identify the transgenic plants. After the further selection of transgenic lines with a segregation ratio of 3:1, the T3 or T4 homozygous lines were used for the phenotypic investigations.

Cell pressure probe measurements

The cell pressure probe measurements were conducted essentially as previously described (Lee et al., 2005a). An oil-filled glass capillary tube with a tip diameter ranging from 6 to 8 μm was attached to the probe. The leaves of *Arabidopsis* were fixed on a metal sledge, and the nutrient solution was poured along the leaves during the experiments. The capillary tube was inserted into the midrib cell of the leaf. Hydrostatic pressure relaxations were induced by rapidly moving the meniscus using the micrometer screw of the probe, and maintaining it at the new position until a steady pressure was again achieved. The pressure vs. time curve was recorded, from which the $T_w/2$ was evaluated. When the turgor pressure was stable, 3 to 4 hydrostatic pressure relaxations were induced to measure $T_w^{1/2}$ prior to the exposure of the cells to different conditions, including high salt (100 mM NaCl) or dehydration (100 mM mannitol).

Statistical analysis

Data were square root-transformed prior to analysis, and differences in $T_w/2$ and gene expression levels between the wild-type and transgenic plants were compared by t-test ($p < 0.05$; SigmaPlot software; Systat Software, Inc.).

Results

Isolation and characterization of the genes encoding CsPIP11 and CfPIP21

Both PCR amplification and cDNA library screening were employed to isolate the PIP genes expressed in the cucumber and figleaf gourd. Two cDNAs encoding aquaporin were isolated from the cucumber and figleaf gourd cDNA libraries. The amino acid sequences of the two aquaporins were compared with those of *Arabidopsis* PIP-type aquaporins, and a phylogenetic tree was generated (Fig. 10A). The PIP isolated from the cucumber is a PIP1-type aquaporin, and thus was named CsPIP11, and the PIP isolated from the figleaf gourd belongs to the PIP2-type aquaporin, and was thus named CfPIP21. The nucleotide sequences of CsPIP1;1 and CfPIP2;1 were deposited in the GenBank database under the accession numbers EF202176 and EF202177, respectively. Sequence analysis indicated that the CsPIP11 insert was 1,044-bp long and harbored an 879-bp open reading frame, flanked by a 23-bp 5'-untranslated region and a 142-bp 3'-untranslated region, including a 21 bp-long poly(A) tail. The open reading frame encodes a 293-amino acid polypeptide with a predicted molecular mass of 31.4 kDa. The deduced protein has a predicted isoelectric point of 7.79. The CfPIP21 insert was 1,204-bp in length and harbored an 855-bp open reading frame, flanked by a 36-bp 5'-untranslated region and a 313-bp 3'-untranslated region, including a 19bp-long poly(A) tail. The deduced protein has a predicted molecular mass of 30.1 kDa and a predicted isoelectric point of 8.02.

Water channel activity of CsPIP1;1 and CfPIP21

To determine whether the two PIPs isolated from the cucumber and figleaf gourd do function as water transport channels, the water transport activities were assessed via an *X. laevis* oocyte-swelling assay. Complementary RNAs corresponding to CsPIP11 and CfPIP21 were synthesized in vitro, quantified, and injected into *Xenopus* oocytes. After 2 to 3 days of incubation at 18°C in ND96 solution (200 mosmol), the oocytes were transferred to 5-fold diluted buffer solution, and the changes in the volumes of the oocytes were monitored under a stereomicroscope. The volume of control oocytes injected

with water and the oocytes injected with CsPIP11 remained unchanged, whereas the volume of oocytes injected with CfPIP21 increased noticeably in the 5-fold diluted buffer solution (Fig. 10B). These results indicate that CfPIP21 has water channel activity in an oocyte system. As it was reported that the PIP1 family members tend to exhibit lower or no water channel activity in an oocyte system (Chaumont et al., 2000), it was unsurprising to see that CsPIP1;1 evidenced no water channel activity in the oocytes.

Effect of abiotic stresses on the expression of CsPIP11 and CfPIP21

The tissue-specific expression patterns of CsPIP1;1 and CfPIP2;1 were examined in cucumber and figleaf gourd plants, respectively. As shown in Fig. 11A, CsPIP1;1 was abundantly expressed in the roots as compared to the shoots and leaves, and CfPIP2;1 was expressed more abundantly in the roots and leaves than in the shoots. To determine the effects of various abiotic stresses, including cold, drought, and high salinity on the transcript levels of CsPIP11 and CfPIP21, the plants were subjected to the indicated treatments, and the expression levels of the gene were evaluated via real-time RT-PCR with gene-specific primers. As shown in Figs. 11B and C, drought stress most significantly altered the expression of CsPIP11 the level of CsPIP11 expression was reduced to one-sixth after 24 h of drought stress treatment. By comparison, CfPIP2;1 expression initially increased during the first 4 h of drought stress, and then declined to pre-stress levels. When subjected to cold stress, the level of CsPIP11 expression remained constant during the first 4 h, and then gradually declined to lower levels, while the level of CfPIP21 expression increased gradually during the application of cold treatment. The transcript levels of CsPIP11 and CfPIP21 increased under salt stress, in that CsPIP11 was up regulated twofold and CfPIP21 was up regulated by up to fourfold during the 48 h of salt stress.

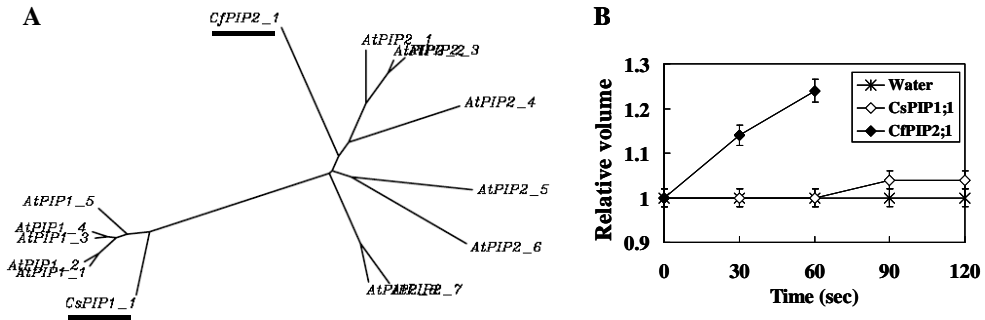


Fig. 10. (A) Phylogenetic analysis of the deduced amino acid sequences of cucumber and figleaf gourd aquaporins with those of *Arabidopsis* PIP-type aquaporins. (B) Assay of water permeability of CsPIP1;1 and CfPIP2;1 in *X. laevis* oocytes. Oocytes were separately injected with 50 ng of CsPIP11 cRNA, CfPIP21 cRNA, or water (control), and the changes in oocyte volume were plotted against time. Values are means \pm SE obtained from five independent experiments.

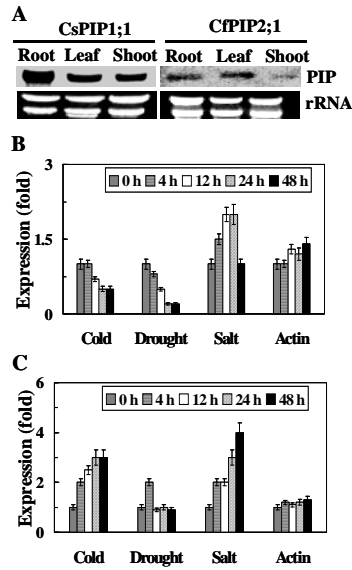


Fig. 11. The expression pattern of CsPIP11 and CfPIP21 in the cucumber and figleaf gourd. (A) CsPIP11 and CfPIP21 expression levels in different tissues of the cucumber and figleaf gourd plants were analyzed by Northern hybridization. Each lane contained 15 g of RNA isolated from roots, leaves, and shoots. The transcript levels of (B) CsPIP11 and (C) CfPIP21 in the plants exposed to cold, drought, or salt stress for 4, 12, 24, and 48 h were plotted as the relative expression (fold) of the non-stressed control. Values are means \pm SE obtained from three independent experiments.

Expression of CsPIP11 or CfPIP21 does not enhance plant vigor under favorable growth conditions

To determine whether the expression of the aquaporins isolated from cucumber and figleaf gourd alters the responses of plants to a variety of stress conditions, we generated transgenic *Arabidopsis* plants that constitutively expressed CsPIP11 or CfPIP21 under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter (35S::CsPIP11 or 35S::CfPIP21 plants), and the expression of CsPIP11 and CfPIP21 in the T3 transgenic plants was verified by RT-PCR analyses (Fig. 12A). To assess the effects of CsPIP11 or CfPIP21 expression on plant growth under favorable growth conditions, we analyzed the seed germination and seedling growth of the wild-type and transgenic plants under normal growth conditions. No significant differences in germination and seedling growth were observed among the wild-type and transgenic lines (Figs. 12B and C). Cell pressure probe measurements supported the notion that CsPIP1;1 and CfPIP2;1 did not affect the growth of transgenic *Arabidopsis* plants under favorable growth conditions; the $T_w^{1/2}$ of midrib cells in the wild-type, 35S::CsPIP1;1 and 35S::CfPIP2;1 plants was approximately 2 s with no significant differences (Table 5). These observations show that the expression of CsPIP11 or CfPIP21 does not enhance plant vigor under favorable growth conditions.

Response of CsPIP11- or CfPIP21-expressing plants to dehydration stress

We then evaluated the effects of CsPIP11 or CfPIP21 expression on the germination and growth of *Arabidopsis* plants under dehydration stress conditions. When the seeds of wild-type, 35S::CsPIP11, and 35S::CfPIP21 *Arabidopsis* plants were germinated in the presence of 25% PEG8000, approximately 70% of the wild-type and 35S::CfPIP21 seeds germinated at day 2, while only 45-55% of the 35S::CsPIP11 transgenic seeds germinated at day 2 (Fig. 13A). To further assess the effects of CsPIP11 or CfPIP21

expression on the growth performance of *Arabidopsis* plants under drought stress, water was withheld from 2-week-old *Arabidopsis* plants, and the phenotypes of the plants were monitored for several days. It was apparent that the 35S::CsPIP11 plants wilted far more quickly and survived for significantly less time than did the wild-type plants, whereas the 35S::CfPIP21 plants survived better than the wild-type plants (Fig. 13B). These observations show that CsPIP11 negatively affects the seed germination and growth of *Arabidopsis*, whereas CfPIP21 positively affects plant growth under drought stress conditions.

Given that CsPIP1;1 or CfPIP2;1 expression in *Arabidopsis* plants induced faster or slower wilting of the plants, respectively, under dehydration stress conditions, we then attempted to determine whether these changes in phenotype are related directly to the water transport activities of aquaporins under dehydration stress conditions. The cell pressure probe measurements were conducted on the leaves of transgenic *Arabidopsis* plants. When osmotic stress was applied to the leaves by the addition of 100 mM mannitol to the medium, the $T_{w1/2}$ of midrib cells in the wild-type plants increased by up to ~11 s, whereas those in the 35S::CsPIP1;1 and 35S::CfPIP2;1 transgenic lines increased to ~15 s and ~25 s (Table 5), respectively. This result indicates that the midrib cells in the 35S::CfPIP2;1 plants lost less water than did the wild-type and 35S::CsPIP1;1 plants under dehydration stress conditions. These results, coupled with the observation that CfPIP2;1 expression exerted a positive impact on plant growth under dehydration stress conditions (Fig. 13B), suggest that CfPIP2;1 may enhance dehydration tolerance by reducing water loss from the leaves to the atmosphere.

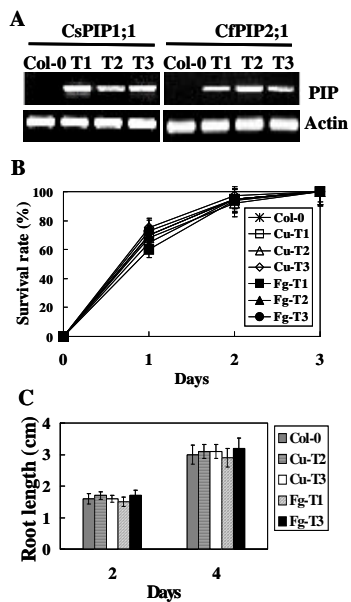


Fig. 12. Confirmation of the transgenic lines and growth of the wild-type and transgenic plants under normal growth conditions. (A) RT-PCR analysis of CsPIP11 and CfPIP21 expression in the wild-type plants and independent transgenic *Arabidopsis* lines (T1, T2, and T3). (B) Germination of the wild-type (Col-0) and transgenic *Arabidopsis* plants (Cu-T1~T3 and Fg-T1~T3) was measured on MS medium. (C) Root lengths were measured on days 2 and 4.

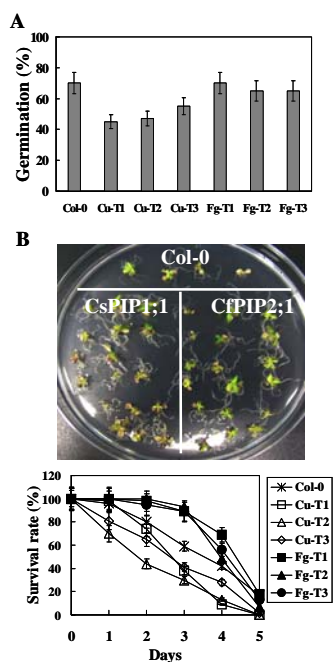


Fig. 13. Growth of the wild-type and transgenic *Arabidopsis* plants under dehydration stress conditions. (A) Germination of the wild-type (Col-0) and transgenic (Cu-T1~T3 and Fg-T1~T3) *Arabidopsis* plants was measured at day 2 on MS medium supplemented with 25% PEG8000. (B) Survival rates of 2-week-old *Arabidopsis* plants subjected to dehydration stress. The wild-type and transgenic *Arabidopsis* seedlings were photographed 2 weeks after transfer to medium supplemented with 300 mM mannitol. Values are means \pm SE obtained from three independent experiments (n = 20-25).

Response of CsPIP11- or CfPIP21-expressing plants to salt stress

The effects of CsPIP11 or CfPIP21 expression on the germination and seedling growth of *Arabidopsis* plants under salt stress conditions were also tested. When the seeds of the wild-type and transgenic plants were permitted to germinate in the presence of 50 to 125 mM NaCl, no significant differences in germination rates were observed between the wild-type and transgenic plants. However, when the seeds were germinated in the presence of 150 mM NaCl, the transgenic plants germinated more effectively than did the wild-type plants (Fig. 14A). These results indicate that CsPIP11 and CfPIP21 enhance the germination of *Arabidopsis* plants under high salt conditions. To determine whether the expression of CsPIP11 or CfPIP21 impacts the growth of *Arabidopsis* under high salt stress conditions, the seeds of wild-type and transgenic plants were allowed to germinate fully on normal MS medium, and the 5-day-old seedlings were transferred to MS medium supplemented with 100 to 200 mM NaCl. No differences in root growth were detected between the genotypes (data not shown), indicating that CsPIP1;1 and CfPIP2;1 affect plant growth only during the germination stage. Cell pressure probe measurements also supported the notion that CsPIP1;1 and CfPIP2;1 did not affect the growth of transgenic *Arabidopsis* plants under salt stress conditions. When high salinity stress was applied to the leaves by the addition of 100 mM NaCl to the medium, the $T_w^{1/2}$ of midrib cells in the wild-type, 35S::CsPIP1;1 and 35S::CfPIP2;1 plants increased to ~ 5 to 7 s with no significant differences (Table 5), indicating that the water transport activities of the three genotypes are similar under salt stress conditions.

Response of CsPIP11- or CfPIP21-repressing plants to cold stress

As cold stress induced a reduction in CsPIP1;1 expression and an increase in CfPIP21 expression, it was expected that CsPIP1;1 and CfPIP21 would have impacts on plant growth and water transport under cold stress conditions. We

assessed this hypothesis by comparing the germination and seedling growth of the transgenic plants with those of wild-type plants under cold stress conditions. At normal growth temperature (23°C), the germination of the wild-type and transgenic *Arabidopsis* plants was initiated at day 1 and completed at day 3 with no noticeable differences (Fig. 12B). When the seeds were incubated at a low temperature (12°C), the seeds of the wild-type, 35S::CsPIP11, and 35S::CfPIP21 plants germinated with nonnoticeable differences (Fig. 14B). To determine whether CsPIP11 or CfPIP21 contributed to the growth of *Arabidopsis* under cold stress conditions, the seeds of the wild-type and transgenic plants were permitted to germinate fully for 3 days at normal growth temperature, and the germinated seedlings were transferred to a low temperature (12 or 15°C). As shown in Figure 14C, no significant differences in seedling growth were detected between the wild-type and transgenic *Arabidopsis* plants under cold stress conditions. These results demonstrate that the expression of CsPIP1;1 or CfPIP2;1 exerts no influence on the germination and seedling growth of transgenic *Arabidopsis* plants under cold stress conditions.

Effect of CsPIP1;1 or CfPIP21 expression on the transcript levels of 13 PIP genes of *Arabidopsis* plants under stress conditions

It is probable that the constitutive expression of a foreign aquaporin in a given plant may disrupt the natural expression patterns of endogenous aquaporin genes, which, in turn, influences the different responses of transgenic plants to various abiotic stresses. Therefore, we attempted to determine, by real-time RT-PCR analysis using the gene-specific primers reported in Jang et al (2004), whether the transcript levels of 13 PIP genes are modulated by the expression of CsPIP11 or CfPIP21 in the transgenic *Arabidopsis* plants, under both normal and stress conditions. As shown in Figure 6, the expression levels of 13 PIPs were altered in different ways by the expression of CsPIP11 or CfPIP21 in *Arabidopsis* plants under various

stress conditions. The transcript levels of 13 PIPs did not vary noticeably in transgenic plants grown in normal MS medium, with the exception of the down regulation of PIP2;4 and the up regulation of PIP2;8 (Fig. 15A). However, it was apparent that the transcript levels of several PIP genes varied more significantly in the transgenic *Arabidopsis* plants when they were subjected to dehydration stress with 200 mM mannitol for 24 h (Fig. 15B). The expression of PIP1;5 and PIP2;2 increased by more than twofold in the 35S::CfPIP2;1 plants compared with the wild-type plants under dehydration stress conditions, whereas the transcript levels of PIP1;5 and PIP2;2 increased only marginally in the 35S::CsPIP1;1 plants as compared with the wild-type plants under dehydration stress conditions. The PIP2;4 expression increased by more than twofold in both the 35S::CsPIP1;1 plants and 35S::CfPIP2;1 plants under dehydration stress conditions, as compared with the wild-type plants. By comparison, the expression levels of PIP2;5 and PIP2;8 were reduced in the transgenic plants under dehydration stress conditions, as compared with the wild-type plants (Fig. 15B). When the transgenic plants were subjected to salt stress, the expression levels of PIP2;2 and PIP2;4 increased in the 35S::CsPIP1;1 plants and 35S::CfPIP2;1 plants, respectively, while the transcript levels of PIP2;5, PIP2;6, and PIP2;7 were reduced in the transgenic plants as compared with the wild-type plants under salt stress conditions (Fig. 15C). These results clearly demonstrated that the ectopic expression of a foreign aquaporin gene disrupts the natural expression patterns of PIP genes in *Arabidopsis* plants under stress conditions.

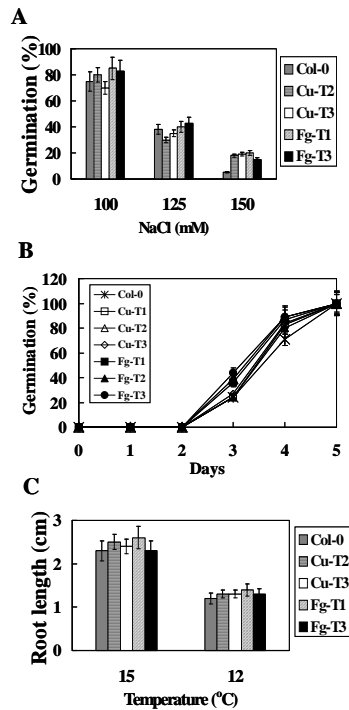


Fig. 14. Growth of the wild-type and transgenic *Arabidopsis* plants under high salt or cold stress conditions. (A) Germination of the wild-type (Col-0) and transgenic *Arabidopsis* plants (Cu-T2, Cu-T3, Fg-T1, and Fg-T3) was assessed on MS medium supplemented with 100 to 150 mM NaCl. (B) Germination of the wild-type (Col-0) and transgenic (Cu-T1~T3 and Fg-T1~T3) *Arabidopsis* plants was measured after incubation at 12°C (C) Root lengths were measured 10 days after incubation at 15°C or 12°C. Values are means \pm SE obtained from four independent experiments (n = 20-25).

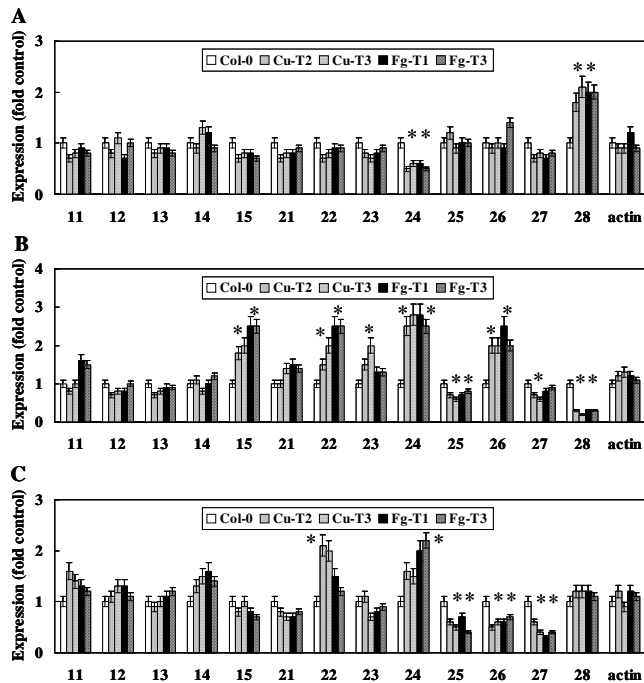


Fig. 15. Effects of CsPIP11 or CfPIP21 expression on the transcript levels of 13 PIP genes in *Arabidopsis* plants under stress conditions. The expressions of 13 PIPgenes in the wild-type (Col-0) and transgenic *Arabidopsis* plants (Cu-T2, Cu-T3, Fg-T1, and Fg-T3) were measured by quantitative real-time RT-PCR, and the plots represent the relative expressions (fold) of each gene in the transgenic plants as compared with their expression in the wild-type plants. The *Arabidopsis* plants were grown in MS medium for 7 days followed by 24-h of further incubation in (A) MS medium, (B) MS medium supplemented with 200 mM mannitol, or (C) MS medium supplemented with 150 mM NaCl. The 11, 12, 13, etc, in x-axis represent PIP1;1, PIP1;2, PIP1;3, etc, respectively. Values are means SE obtained from three independent experiments. Asterisks above the columns indicate values that are statistically different from control Col-0 values ($p \leq 0.05$).

Table 5. Effect of dehydration or high salt stress on hydrostatic and osmotic hydraulic conductivity of midrib cells in the wild-type and transgenic *Arabidopsis* plants.

Plant	Hydrostatic Lp ($T_w^{1/2}$) (s)	Osmotic Lp ($T_w^{1/2}$) (s)	
		NaCl	Mannitol
Wild type	1.5 ± 0.3a	4.6 ± 1.2b	11.2 ± 1.6c
CsPIP1;1-2	1.7 ± 0.3a	6.4 ± 1.2b	14.8 ± 2.7c
CsPIP1;1-3	2.0 ± 0.3a	7.4 ± 1.9b	15.5 ± 2.2c
CfPIP2;1-1	1.8 ± 0.5a	5.2 ± 1.0b	21.4 ± 2.2d
CfPIP2;1-3	1.9 ± 0.3a	5.2 ± 1.2b	28.2 ± 2.6d

Hydrostatic and osmotic hydraulic conductivity of midrib cells were measured in the medium containing 100 mM NaCl or 100 mM mannitol for salt or dehydration stress, respectively. The half-time of water exchange was used as a direct measure of changes in Lp. Values are means ± SD (n = 5), and the different letters in each column indicate statistically significant differences ($p \leq 0.05$).

Discussion

Although the isolation of the genes encoding aquaporin and the analysis of stress-responsive regulation of aquaporins by environmental stimuli have been undertaken in a variety of plant species, there have as yet been only a few reports elucidating the functions of individual aquaporin isoforms in plants under stress conditions. The present results showed that the ectopic expression of a foreign aquaporin gene in a given plant may alter the plant's responses to various environmental stresses. The transgenic *Arabidopsis* plants expressing a PIP-1-type aquaporin gene isolated from the cucumber, or a PIP-2-type aquaporin isolated from the figleaf gourd, displayed different responses to various abiotic stresses, which emphasizes the importance of the expression of different aquaporin types in the regulation of water transport under stress conditions. The observed responses of the transgenic plants to various stress conditions are correlated closely with their expression patterns. The expression of CsPIP11, the expression of which was reduced markedly by drought stress (Fig. 11), delayed seed germination and plant growth under drought stress conditions (Fig. 13), whereas the expression of CfPIP2;1 whose expression was increased by dehydration stress (Fig. 11) resulted in a substantial augmentation of the survival rates of the plants under dehydration stress conditions (Fig. 13). It was also apparent that the expression of CsPIP11 or CfPIP21, the expression of which was increased by salt stress, facilitated the seed germination of the plants under high salt stress conditions. By comparison, the expression of CsPIP1;1 and CfPIP2;1 had no impact on plant growth under normal growth conditions, thereby implying that the two aquaporins are particularly involved in plant-water relation under stress conditions.

Conflicting results were previously reported regarding the effects of overexpression or knockout of a specific aquaporin isoform on plant responses to drought stress. The overexpression of a specific type of aquaporin resulted in either a beneficial effect (Siefritz et al., 2002; Lian et al., 2004; Prudent et

al., 2005; Yu et al., 2005; Guo et al., 2006; Peng et al., 2007) or a harmful effect (Aharon et al., 2003) under drought or dehydration stress conditions. Our present data demonstrated that the expression of CsPIP11 delayed seed germination and plant growth under dehydration stress conditions, while the expression of CfPIP2;1 resulted in a significant augmentation of the survival rates of the plants under dehydration stress conditions. Although we do not know at this stage how CfPIP2;1 influences the growth of *Arabidopsis* plants under dehydration stress conditions, it appears that CfPIP2;1 contributes to a reduction in the degree of water loss from the leaves to the atmosphere during drought stress, as was shown by the lower osmotic hydrolytic conductivity (Table 5). It appears probable that the expression of a foreign aquaporin in a given plant species disrupts the natural expression patterns of endogenous aquaporins within the plant, which results in different responses to various stress conditions. Our analysis of the 13 PIPs in the transgenic *Arabidopsis* plants showed that the expression of other PIP members was modulated by the ectopic expression of CsPIP1;1 or CfPIP2;1. The expression of several PIPs, including PIP1;5, PIP2;2, PIP2;4, PIP2;5, PIP2;6, and PIP2;8, was affected noticeably under dehydration stress conditions (Fig. 15). It was also noted that the expression of PIP1;5, PIP2;2 and PIP2;4, the natural expression of which was markedly down regulated in *Arabidopsis* plants under dehydration stress conditions (Jang et al., 2004), varied most significantly by the ectopic expression of CsPIP1;1 or CfPIP2;1. These results are supportive of the previous notion that the natural expression patterns of aquaporin family members are perturbed by the expression or depression of a particular aquaporin, which implies that aquaporins interact with each other to maintain proper water balance during stressful conditions, and thereby cope with changing environmental conditions.

The effects of the overexpression or knockout of a specific aquaporin isoform on plant responses to salt stress are also controversial, and it has been demonstrated that the overexpression of a specific type of aquaporin resulted in either no beneficial effect (Aharon et al., 2003), a beneficial effect

(Guo et al., 2006; Peng et al., 2007), or a harmful effect (Katsuhara et al., 2003) under salt stress conditions. Exposure to high salinity triggers cell osmotic adjustment and the control of water uptake and loss, and one of the primary responses of plants to salt is the inhibition of their root water uptake capacity. It has been demonstrated in several plant species that the down regulation of aquaporin is the principal cause of salt-induced reduction in hydrostatic hydraulic conductivity (Carvajal et al., 1999; Martinez-Ballesta et al., 2000, 2003). The present results indicated that CsPIP1;1 or CfPIP2;1 expression in *Arabidopsis* plants influences the seed germination, but not the seedling growth of the plant under high salt stress conditions (Fig. 14). The cell pressure probe measurements revealed that the $T_w1/2$ of the 35S::CsPIP1;1 and 35S::CfPIP2;1 plants was quite similar to that of the wild-type plants (Table 5), implying that the water transport activities of the leaves of transgenic plants are similar to that of wild-type plants under salt stress conditions. The expression of several *Arabidopsis* PIPs, including PIP2;2, PIP2;4, PIP2;5, PIP2;6, and PIP2;7, was noticeably affected by the ectopic expression of CsPIP1;1 or CfPIP2;1 in *Arabidopsis* under salt stress conditions (Fig. 15C). Interestingly, the transcript levels of PIP2;2 and PIP2;6, the natural expression of which was most markedly modulated in *Arabidopsis* under salt stress conditions (Jang et al., 2004) varied in the transgenic plants under salt stress conditions as compared with the wild-type plants. These results also indicate that the natural expression patterns of aquaporin family members are perturbed by the expression of a particular aquaporin under salt stress, and the up regulation and/or down regulation of aquaporins and their integrated functions are crucial to the maintenance of proper water balance during salt stress.

Collectively, the isolation, stress-responsive expression analysis, and functional analysis in *Arabidopsis* of the two PIP genes isolated from the cucumber and figleaf gourd constitute an important basis for our enhanced understanding of the physiological roles of aquaporins in a variety of plant species under different environmental stresses. Our results demonstrate that

the ectopic expression of a foreign aquaporin gene in a given plant perturbs differently the natural expression patterns of endogenous aquaporin genes depending on particular stress conditions, implying that the up regulation and/or down regulation of aquaporins and their integrated functions are crucial to the maintenance of proper water balance under stress conditions.

Acknowledgements

This work was supported in part by the SRC program of MOST/KOSEF (R11-2001-092-02007-0) to the Agricultural Plant Stress Research Center of Chonnam National University and by a grant from Agricultural R&D Promotion Center, Korean Ministry of Agriculture and Forestry (ARPC Grant 204062-3).

References

- Aharon R, Shahak Y, Wininger S, Bendov R, Kapulnik Y, Galili G. 2003. Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *Plant Cell* 15, 439-447.
- Alexandersson E, Fraysse L, Sjövall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P. 2005. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Mol Biology* 59, 469-484.
- Aroca R, Ferrante A, Vernieri P, Chrispeels MJ. 2006. Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in *Phaseolus vulgaris* plants. *Annals of Botany* 98, 1301-1310.
- Baiges I, Schäffner AR, Affenzeller MJ, Mas A. 2002. Plant aquaporins. *Physiologia Plantarum* 115, 175-182.

- Bechtold N, Pelletier G. 1998. In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods in Molecular Biology* 82, 259-266.
- Boursiac Y, Chen S, Luu D-T, Sorieul M, van den Dries N, Maurel C. 2005. Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiology* 139, 790-805.
- Carvajal M, Martinez V, Alcaraz CF. 1999. Physiological function of water channels as affected by salinity in roots of paprika pepper. *Physiologia Plantarum* 105, 95-101.
- Chaumont F, Barrieu F, Jung R, Chrispeels MJ. 2000. Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with different aquaporin activity. *Plant Physiology* 122, 1025-1034.
- Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E, Chrispeels MJ, Jung R. 2001. A quaporins constitutes a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiology* 125, 1206-1215.
- Cooper AJ. 1975. Crop production in recirculating nutrient solution. *Scientific Horticulture* 3, 251-258.
- Fortin MG, Morrison NA, Verma DPS. 1987. Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin, is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. *Nucleic Acid Research* 15, 813-824.
- Galmes J, Pou A, Alsina MM, Tomas M, Medrano H, Flexas J. (April 20, 2007). Aquaporin expression in response to different water stress intensities and recovery in Richter-110 (*Vitis* sp.): relationship with ecophysiological status. *Planta* 10.1007/s00425-007-0515-1.
- Guo L, Wang ZY, Lin H, Cui WE, Chen J, Liu M, Chen ZL, Qu LJ, Gu H. 2006. Expression and functional analysis of the rice plasma-membrane intrinsic protein gene family. *Cell Research* 16, 277-286.
- Heymann JB, Engel A. 1999. Aquaporins: phylogeny, structure, and physiology of water channels. *News Physiological Science* 14, 187-193.
- Jang JY, Kim DG, Kim YO, Kim JS, Kang H. 2004. An expression analysis

- of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 54,713–725.
- Javot H, Maurel C. 2002. The role of aquaporins in root water uptake. *Annals of Botany* 90, 301–313.
- Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, Sjövall S, Fraysse L, Weig AR, Kjellbom P. 2001. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiology* 126, 1358–1369.
- Johansson I, Karlsson M, Johanson U, Larsson C, Kjellbom P. 2000. The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465,324–342.
- Kaldenhoff R, Grote K, Zhu J-J, Zimmermann U. 1998. Significance of plasmalemma aquaporins for water transport in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 14, 121–128.
- Kaldenhoff R, Fischer M. 2006. Aquaporins in plants. *Acta Physiologica* 187, 169–176.
- Katsuhara M, Koshio K, Shibasaka M, Hayashi Y, Hayakawa T, Kasamo K. 2003. Over-expression of a barley aquaporin increased the shoot/root ratio and raised salt sensitivity in transgenic rice plants. *Plant Cell Physiology* 44, 1378–1383.
- Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Galbraith D, Bohnert HJ. 2001. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell* 13, 889–905.
- Kim YO, Kim JS, Kang H. 2005. Cold-inducible zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein contributes to the enhancement of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 42, 890–900.
- Lee SH, Chung GC, Steudle E. 2005a. Gating of aquaporins by low temperature in roots of chilling-sensitive cucumber and -tolerant figleaf gourd. *Journal of Experimental Botany* 56, 985–995.

- Lee SH, Chung GC, Steudle E. 2005b. Low temperature and mechanical stresses differently gate aquaporins of root cortical cells of chilling-sensitive cucumber and resistant figleaf gourd. *Plant, Cell and Environment* 28, 1191-1202.
- Lian HL, Yu X, Ye Q, Ding X, Kitagawa Y, Kwak SS, Su WA, Tang ZC. 2004. The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. *Plant and Cell Physiology* 45, 481-489.
- Martinez-Ballesta MC, Aparicio F, Pallas V, Martinez V, Carvajal M. 2003. Influence of saline stress on root hydraulic conductance and PIP expression in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology* 160, 689-697.
- Martinez-Ballesta MC, Martinez V, Carvajal M. 2000. Regulation of water channel activity in whole roots and in protoplasts from roots of melon plants grown under saline conditions. *Australia Journal of Plant Physiology* 27, 685-691.
- Martre P, Morillon R, Barrieu F, North GB, Nobel PS, Chrispeels MJ. 2002. Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiology* 130, 2101-2110.
- Maurel C. (March 15, 2007). Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties. *FEBS Letter* doi:10.1016/j.febslet.2007.03.021.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
- Peng Y, Lin W, Cai W, Arora R. (April 19, 2007). Overexpression of a *Panax ginseng* tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic *Arabidopsis* plants. *Planta* 10.1007/s00425-007-0520-4.
- Prudent S, Marty F, Charbonnier M. 2005. The yeast osmosensitive mutant *fps1?* transformed by the cauliflower *BobTIP1;1* aquaporin withstand a hypo-osmotic shock. *FEBS Letter* 579, 3872-3880.
- Sakurai J, Ishikawa F, Yamaguchi T, Uemura M, Maeshima M. 2005. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant and Cell Physiology* 46, 1568-1577.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schäffner AR. 1998. Aquaporin function, structure, and expression: are there more surprises to surface in water relation? *Planta* 204, 131-139.
- Secchi F, Lovisolo C, Uehlein N, Kaldenhoff R, Schubert A. 2007. Isolation and functional characterization of three aquaporins from olive (*Olea europaea* L.). *Planta* 225, 381-392.
- Siefritz F, Tyree MT, Lovisolo C, Schubert A, Kaldenhoff R. 2002. PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. *Plant Cell* 14, 869-876.
- Smart LB, Moskal WA, Cameron KD, Bennett AB. 2001. MIP genes are down-regulated under drought stress in *Nicotiana glauca*. *Plant and Cell Physiology* 42, 686-693.
- Tournaire-Roux, CM, Sutka M, Javot H, Gout E, Gerbeau P, Luu DT, Bligny R, Maurel C. 2003. Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* 425, 393-397.
- Tyerman SD, Bohnert HJ, Maurel C, Steudle E, Smith JAC. 1999. Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *Journal of Experimental Botany* 50, 1055-1071.
- Tyerman SD, Niemietz CM, Bramley H. 2002. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant, Cell and Environment* 25, 173-194.
- Weig A, Deswarte C, Chrispeels MJ. 1997. The major intrinsic protein family of *Arabidopsis* has 23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group. *Plant Physiology* 114, 1347-1357.
- Yu Q, Hu Y, Li J, Wu Q, Lin Z. 2005. Sense and antisense expression of plasma membrane aquaporin BnPIP1 from *Brassica napus* tobacco and its effects on plant drought resistance. *Plant Science* 169, 647-656.
- Yu X, Peng YH, Zhang MH, Shao YJ, Su WA, Tang ZC. 2006. Water relations and an expression analysis of plasma membrane intrinsic proteins in sensitive and tolerant rice during chilling and recovery. *Cell*

Research 16, 599-608.

Zhu C, Schraut D, Hartung W, Schäffner AR. 2005. Differential responses of maize MIP genes to salt stress and ABA. *Journal of Experimental Botany* 56, 2971-2981.

제 6 절 담배 형질전환 및 저온 내성 분석

1. 담배 형질전환: 오이 형질전환을 통한 저온 내성 오이 작물 개발에 대한 연구와 함께 저온 내성 유전자의 기능을 조기에 확인할 목적으로, 애기장대에서 저온 내성 기능이 확인된 유전자를 담배에 형질전환하여 그 유전자의 저온 내성 기능을 확인하는 실험을 진행하였다. 저온 내성 유전자 가운데 저온 내성 기능이 특히 강한 것으로 판명된 GRP7 유전자를 PBI121 벡터에 클로닝하여 in-frame insertion 여부를 확인하고 *Agrobacterium* strain GV3101을 이용하여 담배 형질전환을 시도하였다. GRP7 유전자가 도입된 담배의 T1 seed를 확보하였고 (그림 16), 스트레스에 따른 형질의 변화를 관찰하는 실험을 진행하였다.

2. 담배 형질전환체의 저온 스트레스 내성: 오이로부터 분리한 저온 유도성 유전자들을 이용한 저온 내성 작물의 개발과 함께, 연구 시간을 최대한 단축시킬 수 있는 방안으로 애기장대에서 이미 기능이 확인된 저온 내성 유전자 (GRP7, atRZ-1a)를 담배 및 오이에 형질전환하는 연구를 수행하였다. 우선 GRP7 유전자를 PBI121 벡터에 클로닝하여 in-frame insertion 여부를 확인하고 *Agrobacterium* strain GV3101을 이용하여 담배 형질전환을 시도하였다. 다수의 형질전환체 가운데 그림 16에서 보는 바와 3개의 형질전환체를 선별하여 유전자의 과발현 여부를 확인하였고, 저온 발아 및 동결내성 실험을 진행하였다. 담배를 -10°C 의 극한 동결상태에서 15-20분 정도 처리했을 때, GRP7 형질전환체의 경우 대조구에 비해 생존율이 크게 증가함을 알 수 있었다. 또한 electrolyte leakage 실험 결과 GRP7 형질전환체의 경우 대조구에 비해 세포막 손상을 덜 받으며, 이는 결국 저온 및 동결 내성과 연관이 있음을 알 수 있었다. 이 유전자는 오이의 형질전환에 그대로 사용하였으며, 이 유전자가 도입된 오이 형질전환체를 확보하였다.

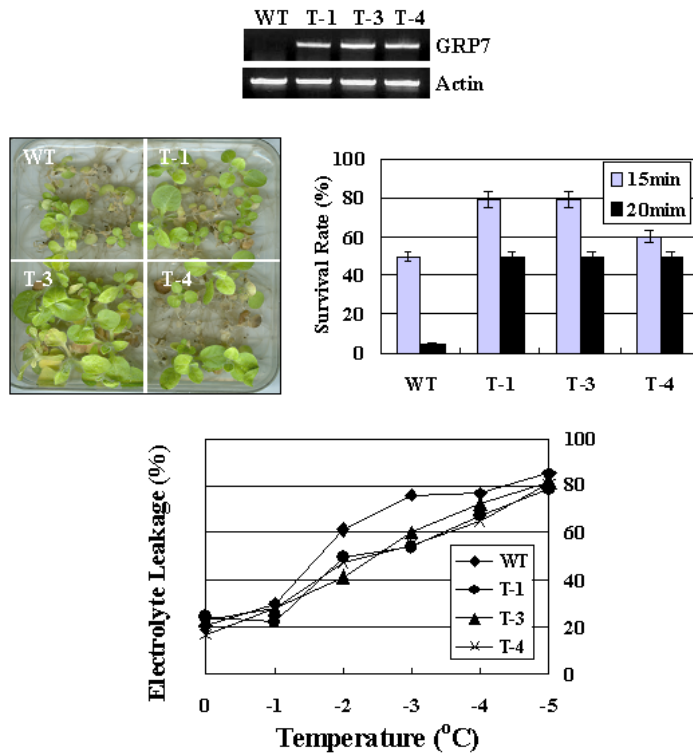


그림 16. 애기장대의 저온 내성 유전자가 도입된 담배에서 GRP7 유전자 발현 분석을 통하여 형질전환체를 확인하였고, GRP7 유전자 발현에 따른 담배 형질전환체의 저온 내성을 확인하였다.

제 7 절 오이 형질전환

1. 오이 조직 절편으로부터 고빈도 식물체 재분화

가. 서론

오이는 전 세계적으로 식용하는 과채류로 수박, 멜론, 호박 등과 함께 박과(Cucurbitaceae) 식물에 속한다. 이들 박과 식물의 품종개량은 재래육종방식을 통해 이루어지고 있으나 중간 또는 속간 자가 불화합성 때문에 많은 어려움을 겪고 있다. 이를 해결하기 위한 방법으로는 유전학적 동질성을 갖는 클론의 대량증식을 위한 조직배양기법과 새로운 형질의 인위적 도입에 필요한 형질전환 기법의 개발을 통해 가능하다. 오이를 비롯한 박과 작물의 경우 그동안 국내외에서 다양한 체세포조직으로부터의 식물체 재분화가 다양하게 시도되어져 왔으나 (Chee and Tricoli, 1988; Kim et al, 1988; Chee et al., 1990a; Punja et al., 1990; Rahajo and Punja, 1994; Jeong et al., 1996; Kim et al., 1998) 실질적인 성과를 얻기 위해 필수적인 체세포조직으로부터의 재분화 효율이 너무 낮은 것이 큰 문제점으로 지적되고 있다. 본 연구에서는 오이의 형질전환에 앞서 국내 재배 장려품종을 중심으로 모식물체의 체세포 조직으로부터 직접 유식물체의 재분화를 고빈도로 유도해 낼 수 있는 조건을 확보하고자 하였다.

나. 연구내용 및 방법

1) 표면살균처리

오이(*Cucumis sativus* L.)의 종자는 (주)홍농종묘로부터 장려품종 3종 (겨울살이 청장오이, 겨울나기 청장오이, 인동 청장오이)을 구입하여 냉장보관 하면서 3개월 이내에 사용하였다. 종자의 표면살균은 70%(v/v) 에탄올에서 5분간 침지 시킨 후 4%(v/v) sodium hypochlorite 용액으로 옮겨 7분간 재 침지하였으며, 이 후 무균수에서 살균액을 제거하기 위해 3회 이상 반복하여 세척하였다.

2) 기내(*in vitro*) 발아

표면살균 처리 후 오이종자는 식물생장 조절물질을 첨가하지 않은 MS(Murashige & Skoog, 1962) 고형배지(0.3% phytagel; pH 5.8)가 들어있는 배양용기에 치상하였다. 종자의 발아는 $15 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 광이 16시간 조사되는 향온 배양실($26\pm 1^\circ\text{C}$)에서 이루어졌다. 이 후 재분화 실험을 위한 시료는 자엽 형성과 잎의 활착 후 등으로 나누어 각 부위별 시료를 clean bench 내에서 무균적으로 절취하여 사용하였다.

3) 오이 식물조직절편으로부터 직접 유식물체의 재분화

오이 조직절편으로부터 유식물체를 직접 재분화 시키기 위한 시료(explants)는 자엽, 잎, 엽병, 줄기, 그리고 뿌리를 사용하였다. 자엽 조직절편은 발아 후 일주일 내에 채취하였으며, 잎과 줄기 뿌리는 2주일 후 성장한 유식물체로부터 절취 하였다. 부정아를 유기하기 위한 기본배지는 MS배지 외 3종의 배지를 사용하였으며, 식물생장조절물질은 IAA와 3종의 옥신류와 BA와 5종의 시토키닌류를 단독 또는 혼합하여 사용처리 하였다. 또한 재분화된 유식물체로부터 발근을 유도하기 위해서는 3종의 옥신(IBA, IAA, NAA)을 기본배지에 농도별(1, 3, 5 mg/L)로 첨가하였다. 모든 배지는 탄소원으로 sucrose(1, 3, 5, 7%)와 0.3% phytagel (Sigma Chem. Co. USA)를 고형제로 첨가하였으며, 배지의 초기 pH는 5.8로 조정된 후 감압멸균기에서 121°C 로 15분간 멸균 후 일회용 페트리쉬(SPL; 110 X 50 mm)에 분주하여 사용 하였다. 모든 재분화 실험은 $15 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 광이 16시간 조사되는 향온 배양실($26\pm 1^\circ\text{C}$)에서 이루어졌으며, 배지에 치상 후 3일 간격으로 부정아의 형성을 확인 하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복하여 시행 하였다.

4) 품종별 유식물체 재분화 조건 탐색

품종 간 재분화 효율의 차이에 대한 비교와 겨울살이 청장오이로부터 얻은 연구 결과에 대한 재현성을 확인하기 위하여 2종의 오이품종을 가지고 추가로 실험을 수행하였다. 모든 실험방법은 동일한 조건으로 3회 이상 반복하여

수행하였다.

다. 연구결과

1) 종자발아

3종의 오이품종은 동일 조건에서 일주일 후 100% 발아율을 나타내었으며, MS배지 하에서 자엽과 발아 유묘의 상태 또한 매우 양호하였다. 그러나 무기염의 농도를 1/2, 1/4로 낮출 경우 발아 후 성장 속도가 낮고 엽록체의 발달이 낮아 이 후 부위별 부정아 형성에 부정적인 영향을 가져왔다.

2) 자엽절편으로부터 부정아의 형성

발아 후 5일째부터 7일째까지 사이에 겨울살이 청장오이의 자엽을 절취하여 3등분 (기저부, 중앙부위, 상층부)한 후 옥신 (IAA, NAA, 2,4-D)과 시토키닌류 (kinetin, zeatin, BA, TDZ)가 단독 또는 혼합하여 농도별 (0.1, 0.5, 1, 2, 3, 6, 10 mg/L)로 첨가된 MS고형배지에 치상한 결과 BA가 단독으로 3 mg/L과 5 mg/L 처리된 실험구에서 6주 후 82%와 87%의 높은 비율로 부정아가 형성되었다.

한편, 전반적으로 저농도 처리구에서는 분화율이 비교적 낮게 나타났으며 옥신과 시토키닌류가 혼합 처리된 실험구 또는 옥신류가 단독으로 첨가된 배지에서는 주로 캘러스화 현상이 나타나고 부정아의 분화는 이루어지지 않았다. 시토키닌류인 kinetin과 TDZ, 그리고, zeatin 처리구에서도 낮은 분화율을 보이거나 전혀 반응을 나타내지 않은 경우가 많았다 (표 6). 한편, 3 mg/L과 5 mg/L의 BA를 B5 배지와 LS 배지에 각기 첨가한 후 치상한 실험구에서 자엽으로부터 부정아의 형성을 은 67%와 53%로 MS 배지 조건에 비해 낮았으며, 부정아의 지속적인 발달에 있어서 적절치 못한 것으로 나타났다 (표 7). 자엽으로부터 부정아의 형성은 모두 엽병에 가까운 기저부에서 이루어졌으며, 중앙부위와 상층부에서는 부정아의 형성이 매우 낮거나 반응을 보이지 않는 경우가 많았다. 특히, 기저부 시료의 경우 자엽절편을 절취하는 과정에서 잎 원기가 포함되지 않는 것

이 부정아의 지속적인 발달을 위해 바람직한 것으로 보였다. 자엽의 채취 시기 또한 종자 발아 후 10일 이내에 채취하여 사용하는 것이 바람직한 것으로 나타났다. 캘러스로부터 체세포배발생 과정을 통한 식물체의 재분화의 경우와 달리 자엽 절편으로부터 직접 부정아 형성에 있어서는 배지 내 탄소원의 농도나 초기 배지의 pH가 유의적인 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다.

한편, 자엽 절편을 절취하여 배지에 치상한 후 곧장 광조건 하에서 배양할 경우 discs의 가장자리 부위에서부터 심한 말림현상을 보여 배지와 접촉면이 줄어들어 가는 경향을 보였다. 그러나 암조건 하에서 1주일 정도 배양한 후 광조건으로 옮길 경우 이와 같은 말림현상이 현저히 줄어들어 배지 내 식물생장조절물질에 대한 영향을 직접적으로 받을 수 있어 효과적일 것으로 사료되었으며, 실제 부정아 형성율에 있어서도 다소 차이를 보여주었다.

☒ 6. Effects of cytokinins on adventitious buds formation from cotyledonary explants of *C. sativus*.

Cytokinins (mg/L)		Adventitious buds formation (%)
kinetin	3	0.0
	5	0.0
BA	3	82.1
	5	87.3
zeatin	3	12.7
	5	0.0
TDZ	3	2.3
	5	7.1

☒ 7. Effects of basal medium on adventitious buds formation from cotyledonary explants of *C. sativus*.

Media	Adventitious buds formation (%)
MS	87.3
B5	67.1
LS	53.0

3) 유묘의 부위별 부정아의 형성을 비교

발아 후 4주가 지난 겨울살이 청장오이의 유식물체로부터 잎, 엽병, 줄기, 그리고 뿌리를 채취하여 시토키닌류와 옥신류가 단독 또는 혼합하여 농도별 (1, 2, 6, 10 mg/L)로 첨가된 MS배지에 치상한 후 광이 조사되는 항온실에서 배양하였다. 자엽에 비해 유식물체의 부위별 조직절편으로부터의 부정아 형성은 약 1주 정도 늦게 이루어졌다. 전체적으로 저농도의 식물생장조절물질 첨가를 통해서 부정아의 형성이 이루어지지 않았다. 저농도로 식물생장조절물질을 첨가한 실험구에서는 캘러스가 형성되거나 전혀 반응을 나타내지 않는 경우가 많았다. 그러나 고농도의 식물생장조절물질을 처리할 경우라도 잎과 엽병의 절취부위에서 대부분 부정아의 형성이 이루어졌을 뿐 줄기나 뿌리 절편으로부터는 모든 처리구에서 부정아를 유도할 수 없었다. 결론적으로 오이의 경우 조직절편으로부터 직접 고농도의 부정아를 유기하기 위해서는 비교적 고농도의 식물생장물질의 처리가 필요함을 확인할 수 있었다. 한편, BA와 NAA, 그리고 BA와 IAA 처리구에서 다소간의 차이를 갖고 잎과 엽병 모두에서 부정아가 형성되었다. 그러나 2,4-D가 첨가된 모든 실험구와 kinetin 처리구, 그리고 옥신이나 시토키닌 단독 처리구등에서는 부정아의 형성을 확인할 수 없었다. 특히, 2,4-D의 경우 단독 처리시 조직의 괴사현상이 일어났으며 IAA나 NAA를 고농도로 단독 처리할 경우 부정근이 형성되었다. 엽병조직절편의 경우 4 mg/L BA와 2 mg/L IAA가 혼합 처리된 MS배지에서 72%의 부정아 형성율을 보여주었다. 동일 조건에서 잎 절편으로부터 68%의 부정아 형성율을 보여주었다. 잎과 엽병으로부터 모두 부정아가 형성된 경우는 다소 차이는 있으나 BA와 IAA가 조합을 이룬 경우에서 대부분 이루어졌다 (표 8). 기본배지를 달리하여 잎과 엽병을 치상하였을 경우 자엽에서와 마찬가지로 MS배지에서 가장 좋은 결과를 가져왔다.

☒ 8. Effects of PGRs on adventitious buds formation from leaf and petiole explants of *C. sativus*.

PGRs (mg/L)				Adventitious buds formation(%) (leaf/petiole)
BA	1	IAA	1	21.0/34.2
			2	0.0/ 0.0
BA	2	IAA	1	0.0/18.3
			2	0.0/11.7
BA	4	IAA	1	43.9/64.1
		IAA	2	68.1/82.4
BA	6	IAA	1	21.3/28.9
			2	0.0/ 0.0
BA	10	IAA	1	0.0/ 0.0
			2	0.0/ 0.0
BA	1	NAA	1	0.0/ 0.0
			2	0.0/ 0.0
BA	2	NAA	1	0.0/ 0.0
			2	23.5/ 0.0
BA	6	NAA	1	0.0/ 0.0
			2	18.3/ 0.0
BA	10	NAA	1	38.4/29.3
			2	0.0/ 0.0

4) 발근

앞과 엽병의 조직절편으로부터 형성된 부정아는 4주 후 모식물체로부터 절취하여 옥신이 농도별로 첨가된 기본배지에 치상하였다. 2주 후 기저부로부터 부정근의 형성이 시작되었으며, 4주 후 각 유묘당 형성된 부정근의 수를 확인 하였다 (표 9). 식물생장조절물질 무 처리 조건에 비해 부정근은 옥신류인 IBA 1 mg/L 처리구에서 98% 발근율을 나타내었으며, 유묘당 11.5개의 부정근이 유기되었다.

표 9. Effects of auxins on adventitious roots formation from shoots explants of *C. sativus*.

Auxins (mg/L)		Adventitious roots formation No. of root/explant (%)
Control		5.7 (87.2)
IAA	1	2.1 (43.1)
	3	- (0.0)
IBA	1	11.5 (98.2)
	3	3.4 (21.8)
NAA	1	- (0.0)
	3	- (0.0)

5) 품종별 부정아 형성비교

겨울살이 청장오이를 가지고 수행한 연구결과를 바탕으로 최적조건 하에서 3종의 오이에 대한 부정아 형성율을 비교 하였다. 품종별 부정아 형성율은 다소 차이를 보여주었다 (표 10). 겨울살이 청장오이 품종에 비해 인동 청장오이와 겨울나기 청장오이 모두 조직부위에 상관없이 조직절편으로부터 부정아의 형성율이 낮게 나타났으며, 겨울나기 청장오이의 경우에는 엽병보다 잎절편으로부터 부정아의 형성율이 높게 나타났다.

표 10. Comparisons of adventitious buds formation rates in various cultivars of *C. sativus*.

Cultivars	Frequency of buds formation (%) cotyledons/petioles/leaf
Gyuwoolsali-chungjang	82.1/82.4/62.1
Indong-chungjang	78.4/81.7/63.4
Gyuwoolnagi-chungjang	68.5/58.1/62.4

* Explants were cultured on MS medium supplemented with 5 mg/L BA.

**Explants were cultured on MS medium supplemented with 2 mg/L IAA plus 4 mg/L BA.

2. 오이 형질전환

가. 형질전환 개요

냉해 저항성을 갖는 오이의 형질전환체를 얻기 위하여, 본 실험에서는 neomycin phosphotransferase (nptII) 유전자 및 저온 내성 유전자인 AY84 (GRP7)를 포함하는 pBI121 벡터를 사용하였고 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 균주를 사용하여 형질전환을 시도하였다. 사용된 오이 재료는 ‘백침’이라는 inbred line의로서 자엽절편을 사용한 형질전환을 시도하였다. 오이의 자엽절편으로부터 식물체의 캘러스 유기 및 신초의 재 분화는 MS 기준배지에 식물 성장조절제인 BAP를 단독으로 처리한 실험구에 비하여 BAP와 NAA를 적정농도로 조합하여 처리한 실험구에서 활발히 이루어졌으며, 신초 형성 최적농도는 5 mg/L BAP와 0.5 mg/L IAA를 첨가한 실험구로 나타났다. 잘 유기된 신초는 신초 신장배지로 계대배양 하여 신초를 신장시키고, 이후 신초가 적어도 2 cm 이상으로 자란 신초만을 취하여 NAA가 0.5 mg/L 함유된 1/2MS 배지에 계대배양 하였다. 발근이 잘 이루어진 완전한 식물체는 화분에 옮겨 순화 및 경화시켰으며, 이들 중 대부분이 건강한 식물체로 발달하였다.

나. Preparation of *Agrobacterium* strains

본 실험에 사용된 *Agrobacterium tumefaciens* 균주 및 저온 내성 유전자 발현 벡터는 표 11에 정리되어 있으며, 여러 가지 예비 실험을 바탕으로 가장 가능성이 있는 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 균주와 AY84를 사용한 실험을 집중적으로 수행하였다. *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 균주를 50 mg/L kanamycin (Sigma) 및 10 mg/L rifampicin (Sigma)이 함유된 LB배지 (Luria-Bertani medium; Sambrook et al. 1989)에서 28°C, 분당 회전수 200으로 하여 24시간 배양한 후, 이를 원심분리하여 위층을 제거하고 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 균주만을 취하여 MS 배지 (Murashige & Skoog, 1962)에서 OD₆₀₀ 값 1.0이 되도록 현탁하여 적정하였다.

표 11. *Agrobacterium tumefaciens* strains harboring various genes used for cucumber transformation

Strains	Genes
<i>A. tumefaciens</i> LBA4404	npt II, GUS, AY84, AY76
<i>A. tumefaciens</i> GV3101	npt II, GUS, AY76, AT02
<i>A. tumefaciens</i> EHA105	npt II, GUS, AY84, AY76, AT02

다. Plant materials and explant preparation

준비된 오이 종자를 70% 에탄올에 5분간 소독한 후, 2%(w/v) 하이포차아 염소산 (NaOCl)에서 5분간 살균하였다. 살균과정이 끝난 종자를 멸균된 증류수를 이용하여 적어도 3회 이상 수세한 후, 3M 흡습지에 두어 남은 물기를 완전히 제거시키고, 이후 MS 기준배지에 치상하여 25°C 암조건 하에서 발아시켰다. 치상 후 약 4일이 지나면 오이종자로부터 하배축이 발아되고, 이어 잘 발아된 오이는 광 조건으로 옮겨 3일간 더 배양하였다. 이후, 이들 유식물체로부터 정단분열 조직 및 하배축을 완전히 제거하고 자엽만을 채취하여 형질전환의 재료로 사용하였다.

라. Co-cultivation

자엽과 *Agrobacterium*의 공조배양은 acetosyringone이 0.2 mM 함유된 MS 기준배지에서 10분 동안 수행하였으며, 이어 미리 준비된 멸균수로 수세한 후 3M 흡습지를 이용하여 물기를 완전히 제거시킨 후 공조배양 배지에 치상하여 1주일간 공조배양 하였다. 공조배양배지는 5 mg/L의 benzylaminopurine (BAP), 0.5 mg/L의 Indole-3-acetic acid (IAA) 및 0.2 mM의 acetosyringone이 포함된 MS 배지를 사용하였으며, 자엽절편은 90 mm x 15 mm 크기의 페트리디쉬에 7개씩 치상하여, 25°C 16/8 의 광주기 및 60 $\mu\text{Mm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 광량으로 배양하였다.

마. Selection and regeneration of transgenic shoots

공조배양이 끝난 자엽절편은 이후 신초유기배지에 계대배양 하였다. 식물생장조절제는 실험을 통하여 최적농도로 확인된 BAP를 5 mg/L 그리고 IAA를 0.5 mg/L 가 되게 하였으며, *Agrobacterium*의 웃자람을 방지하기 위하여 항생제인 cefotaxime을 500 mg/L 가 되게 첨가하였다. 신초 중 형질전환의 유무를 판단하기 위한 선택 마커로는 kanamycin을 사용하였으며, 각각 50, 75 및 100 mg/L 의 농도로 적정하여 실험하였다. 모든 신초유기배지는 25°C 광조건 하에서 배양되었으며, 2주 간격으로 같은 조성의 새로운 배지에 캘러스의 유기 및 신초의 유기가 이루어질 때까지 계대배양 하였다. 모든 배지는 sucrose를 30 g/L 그리고 phytigel을 3 g/L 가 되게 하였으며, pH는 5.8로 적정하였고 광조건 하에서의 배양은 25°C의 16/8의 광주기로 60 $\mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 광량 하에서 배양하였다. 표 12는 다양한 BAP 및 IAA 조건에서 explants의 callus containing shoot premodium의 유도율 및 regenerated-shoots 비율을 나타내며, 그림 17은 형질전환체의 선별 및 재분화 과정을 보여주고 있다.

표 12. 다양한 BAP 및 IAA를 처리한 *Cucumis sativus* explants의 callus containing shoot premodium의 유도율 및 regenerated-shoots 비율

		Callus containing shoot premodium (%) and the ratio of regenerated-shoots (%)		
		IAA (mg/L)		
		0	0.1	0.5
BAP (mg/L)	3	42.9/20.88	23.8/9.09	33.3/ -
	5	- / -	66.7/ -	99.0/27.66

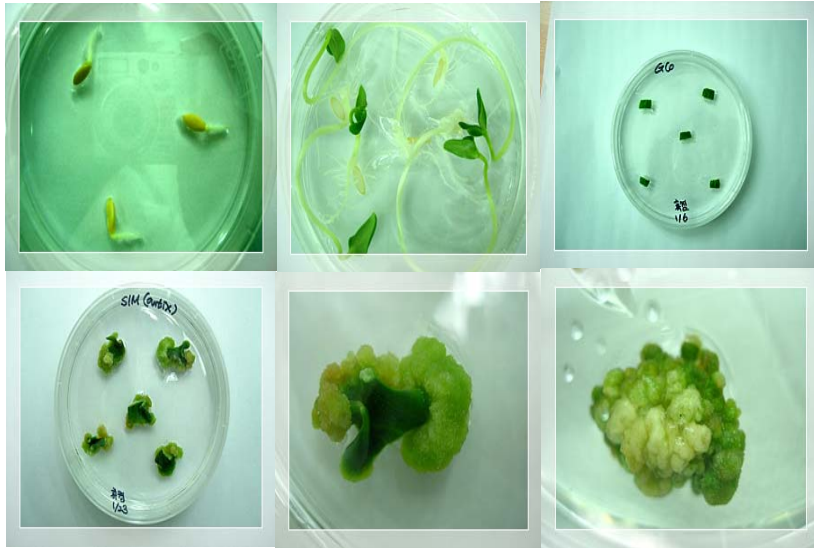


그림 17. Regenerated-shoot induction 체계. 위 왼쪽으로부터 오른쪽으로 seedlings, cotyledo 형성, cotyledon explants, callus induction, callus induction, callus-like shoots premodia를 나타낸다.

바. Shoots elongation, rooting, and hardening

신초를 신장은 신초를 신초유기배지와 동일한 조성의 식물생장호르몬이 첨가된 배지에서 배양하는 것보다 BAP의 농도를 낮추고 IAA를 첨가하지 않은 신초유기배지에서 더욱 활발하게 진행되었다. 따라서 본 실험에서는 신초의 신장을 위하여 신초유기배지를 사용하였으며, 본 배지에 계대배양 후 약 2주가 경과하면 이들 신초 중 약 63% 이상이 발달상태가 양호한 정상적인 신초로 성장됨을 확인하였다. 신초신장배지는 MS 배지에 식물생장조절제인 BAP가 3 mg/L, 그리고 항생제로써 cefotaxime과 kanamycin을 각 500 mg/L 와 100 mg/L 로 적정하여 첨가하였다. 신초신장배지에서 잘 발달된 신초는 발근유도배지를 사용하여 발근을 유도한 결과, 0.54 μ M의 NAA를 함유한 배지에서 약 37%의 발근을 확인하였다. 뿌리를 포함하는 완전한 식물체는 이후 뿌리 및 식물체 표면의 배지를 말끔히 제거하여 질석과 펄라이트 그리고 상토를 각각 1:1:2로 혼합한 화분에 옮겨 순화 및 경화과정을 거쳐 온실에서 재배하였다 (그림 18). 토양에서 재배를 시작한 후 약 30일이 지났을 때 오이의 개화과정을 면밀히 관찰하여 암꽃과 수꽃을 서로 자가 수정시켰다. 자가 수정은 오전 9시 이전에 온도가 약 20°C인 조건에서 수행하였고, 수정 후 암꽃을 밀봉하여 1 주일 정도 지난 후 정상적인 조건에서 재배하였다. 그림 18에서 보는 바와 같이 수정 약 60일 후 과실이 충분히 숙성되어 노란색을 띠는 때 과실을 수확하였다. 수확한 오이 형질전환체는 약 10일 정도 후숙 과정을 유도하였다 (그림 19, 20). 충분한 후숙 과정을 거친 오이 형질전환체를 절개하여 씨앗의 유무를 확인하였고 (그림 21), 모든 종자를 수확하였다 (그림 22). 확보한 T1 종자는 다시 항생제 배지에서 발아시켜 발아 유무를 조사하였고, 정상적으로 발아하는 모든 seedling을 대상으로 유전자 삽입 여부를 다시 확인하였다.



그림 18. 오이의 형질전환 및 형질전환체 제작 과정. 위 왼쪽으로부터 오른쪽으로 adventitious buds regeneration from cotyledons induced by 5 mg/L BAP and 0.5 mg/L IAA on MS medium, roots induced from elongated shoots on 1/2MS medium with antibiotics, acclimation in bottles containing pre-sterilized soil, transgenic plantlets cultured in open-clean room, transgenic plantlets cultured in green house, well-developed T0 transgenic fruit를 나타낸다.



그림 19. 저온 내성 유전자 AY84가 도입된 오이 형질전환체로 약 10일 동안 후숙 기간을 거친 후 절개하여 씨앗을 확보하였다.



그림 20. 저온 내성 유전자 AY84가 도입된 오이 형질전환체로 약 10일 동안 후숙 기간을 거친 후 절개하여 씨앗을 확보하였다.



그림 21. 저온 내성 유전자 AY84가 도입된 오이 형질전환체를 절개한 모양으로 씨앗이 잘 발달되어 있음을 보여주고 있다.



그림 22. 저온 내성 유전자 AY84가 도입된 형질전환 오이의 T1 seeds

사. 항생제 저항성 검정

*Agrobacterium tumefaciens*와 공조 배양한 시료의 형질전환 확인은 100-500 mg/L kanamycin이 첨가된 기본배지에서 대조구와 함께 항생제 저항성 검정을 수행한 결과 오이의 kanamycin에 대한 저항성은 매우 낮게 나타났다. 경과 동조배양이 이루어지지 않은 대조구의 경우 100 mg/L 농도에서 2주 후 자엽과 잎 disc 모두 약간의 시차는 있었으나 모두 엽록소가 파괴되는 현상 즉, 백화현상이 뚜렷하게 확인 되었다. 한편 공조 배양한 시료의 경우 500 mg/L 농도 까지 잎과 자엽에서 78.5%와 93.2%의 저항성을 보여주었다 (표 13). 그러나 이 경우 disc의 크기가 1 cm 이상일 경우에는 형질전환이 이루어지지 않은 중앙부 조직이 kanamycin에 대한 영향으로 색소 침탈현상이 나타났으며, 이로 인해 계대배양과정에서 주변 조직의 사멸을 가져왔으며, 이러한 현상은 형질전환 개체의 형성에 부정적인 영향을 가져올 것으로 판단되었다 (표 14).

표 13. Antibiotics resistance of the leaves and cotyledonary explants transformed with *A. tumefaciens* harboring npt II

Kanamycin (mg/L)	Leaf disc	Cotyledon disc
0	87.2±5.4	93.0±4.3
100	81.2±5.1	87.2±4.4
300	78.2±5.4	84.2±4.2
500	64.2±5.2	82.2±4.4

표 14. Effect of disc size on the selection of antibiotic resistance explants co-cultivated with *A. tumefaciens* harboring npt II

Disc size (cm)	Leaf disc	Cotyledon disc
0.5	78.2±5.4	84.2±4.3
1.0	68.4±5.6	77.6±5.1
1.5	52.2±5.4	64.2±4.2
2.0	44.1±6.1	56.7±5.1

아. 형질전환체의 GUS 발현 분석

저온 내성 유전자 도입을 위한 형질전환 시도와 함께, 형질전환 체계를 조기에 검증하기 위한 수단으로 GUS 유전자를 도입한 형질전환을 시도하였다. 재분화된 형질전환체를 얻은 다음 GUS 활성은 Jefferson 등(1987)의 방법에 따라 수행하였다. 식물체의 잎조직을 2 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-glucuronide을 포함하는 50 mM의 sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 침지 시킨 후 24시간 동안 37°C에서 반응 시켰으며, 이 후 95% 에탄올에서 식물색소를 제거하였다. 그림 23은 GUS 유전자가 도입된 오이 형질전환체와 야생형의 오이에서 GUS activity를 측정된 것으로, 형질전환체에서 강한 GUS activity가 검출되어 본 연구에서 시도한 형질전환 과정이 효과적으로 일어남을 알 수 있었다.

자. 형질전환체의 유전자 도입 분석

본 연구에서 가장 관심을 갖고 수행하였던 저온 내성 유전자의 하나인 AY84 유전자를 이용한 형질전환 실험 결과, 위에서 기술한 여러 단계를 거쳐 다수의 형질전환체를 확보할 수 있었다. 그 가운데 항생제 배지에서 생육이 왕성하고 뿌리 발육이 양호한 유묘를 대상으로 도입한 유전자의 삽입 여부를 조사하였

다. 유전자 삽입 여부를 확인하는 실험에 사용한 primer는 AY84 gene specific primer (5' primer 5'-GCTCTAGAAATGGCGTCCGGTGATG-3; 3' primer 5'-CCGCTCGAGTCGTGACTGAGCCTC-3')와 35S promoter primer (5' primer 5'-GGGATGACGCACAATCCCAC-3')를 동시에 사용하였으며, 유모의 잎을 채취하여 genomic DNA를 분리한 다음 PCR을 통하여 유전자의 존재 여부를 확인하였다. 이러한 genomic DNA PCR 확인 방법은 이후 온실에서 재배한 형질전환체의 분석에도 동일하게 사용하였다. 그림 24는 형질전환 오이에서 genomic DNA PCR을 통한 AY84 유전자의 도입을 확인한 결과이다.

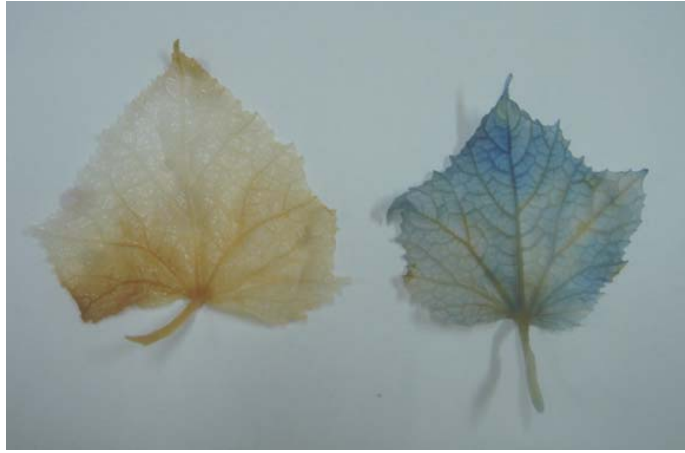


그림 23. 형질전환 오이의 histochemical GUS activity

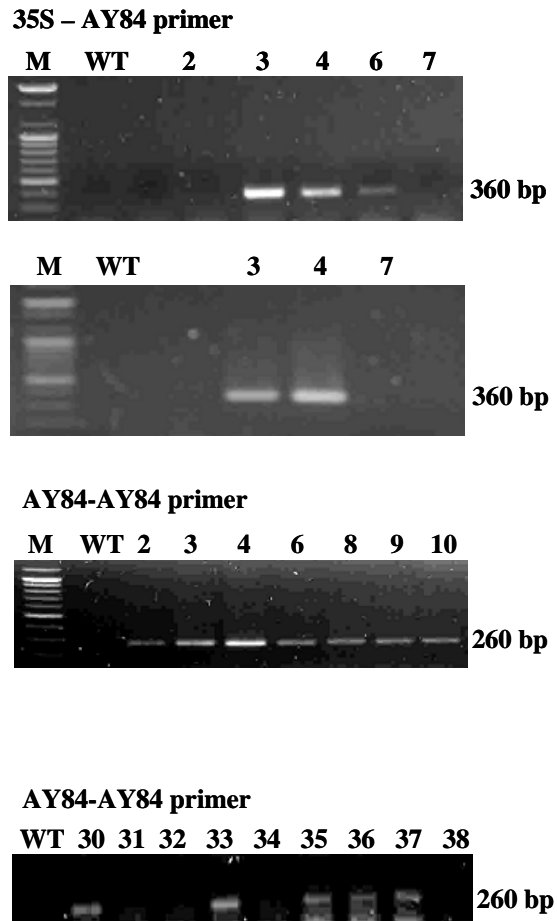


그림 24. 저온 내성 AY84 유전자가 도입된 오이 형질전환체에서 AY84 유전자의 삽입 여부를 genomic DNA PCR을 통해 확인한 결과, AY84 gene specific primer와 35S promoter primer를 이용한 경우 모두 유전자의 삽입이 확인되었다. 위 3개의 그림은 T0 plant에서의 결과이며, 맨 아래 그림은 T1 plant에서의 결과이다.

제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

제 1 절 목표 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
오이 저온 유도성 유전자와 저온 반응성 프로모터 분리 및 스트레스 반응성 조사	<ul style="list-style-type: none"> -오이로부터 저온 유도성 유전자 10개를 분리하여 염기서열을 확인하였고, 각 유전자의 저온 반응성을 확인하였음. -염기서열이 확인된 유전자 가운데 HMGB 및 AQP 유전자를 애기장대에 형질전환하여 스트레스 반응에 대한 기능을 분석하였음. -오이 kinase에 해당하는 저온 유도성 프로모터를 분리하여 염기서열을 확인하였고, promoter-GUS 분석을 통하여 저온 유도성 여부를 확인함. 	100
형질전환 담배를 활용한 유전자의 저온 내성 분석	<ul style="list-style-type: none"> -애기장대에서 저온 내성 기능이 확인된 GRP7 유전자를 담배에 형질전환하여 저온 내성을 관찰한 결과, GRP7 유전자 담배의 저온내성에 관여함을 확인함. -저온에 의해 유도되는 오이 유전자 중 ZF 유전자가 도입된 애기장대 형질전환체를 제작하였고, 저온 및 다양한 스트레스 내성 관련 여부를 조사함. 	100
오이 형질전환	<ul style="list-style-type: none"> -오이의 형질전환 체계를 확립하기 위하여 다양한 조직의 이용과 호르몬 조성 변화, 배양조건을 달리하여 재현성 있는 오이 재분화 및 형질전환을 시도하였으며 안정적인 오이 형질전환체계를 확립함. -애기장대에서 저온 내성 기능이 확인된 GRP7 유전자를 오이에 도입한 형질전환체를 확보하였으며, 유전자의 삽입을 항생제 내성 및 genomic DNA PCR을 통하여 확인하여 현재 T1 seed를 확보하였음. 	100

제 2 절 관련 분야에의 기여도

오이로부터 저온 유도성 유전자원을 발굴하고 저온 반응성 프로모터를 분리한 본 연구는, 오이의 유전자 정보가 거의 없는 현 상태에서 오이의 저온 내성 오이 작물 개발에 필요한 기초 자료를 제공했다는 측면에서 그 의미가 있다. 또한 본 연구를 통하여 확립된 오이의 효과적인 기내 배양 방법, 스트레스 처리 및 유전자 발현 양상 분석 방법, 스트레스 처리에 따른 생리적 변화 관찰 실험 방법 등은 오이를 이용한 관련 연구를 수행하는데 필요한 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구결과가 관련 연구분야에 미칠 수 있는 가장 큰 기여는 안정적인 오이 형질전환 체계를 확립했다는 사실이다. 오이 형질전환 체계를 확립하여 저온 내성 유전자가 도입된 오이 형질전환체를 확보한 본 연구의 결과는 저온 내성 오이 작물을 육성할 수 있는 가능성을 제시한 것으로, 오이 형질전환 연구 분야를 한 단계 높일 수 있는 계기를 마련한 것이다. 국내외적으로 오이 형질전환체 개발에 대한 관심 및 기대가 높아지고 있는 현 시점에서, 오이의 안정적인 형질전환 체계를 확립하고 오이 형질전환체를 확보한 본 연구는 향후 오이 유전체 연구 및 형질전환을 통한 다양한 기능성 오이 작물 개발을 선도할 수 있는 결과로 판단되며 관련 연구분야 활성화에 크게 기여했다고 여겨진다.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

본 연구결과 확보된 저온 반응성 유전자 및 저온 유도성 프로모터는 저온 내성 오이 작물뿐만 아니라 다른 작물을 대상으로 스트레스 내성 작물을 개발하는데 활용할 계획이다. 특히 본 연구에서 확립된 안정적인 오이 형질전환 체계를 활용하여 저온 내성을 갖는 오이 작물뿐만 아니라, 항산화능력이나 피부보호능력이 강화된 새로운 기능성을 가진 오이 작물을 개발하는데 활용할 계획이다. 이러한 활용 가치를 현실화하기 위해서는 유전자의 기능을 완전히 규명하는 연구와 새로운 프로모터를 도입한 벡터 제작에 대한 연구 및 이를 이용한 형질전환체 개발에 대한 추가 연구가 필요하다.

본 연구에서 제시한 저온 내성 유전자를 이용한 저온 저항성 작물 개발에 대한 기술은 다른 작물에도 그대로 활용될 수 있을 것이며, 대상 작물 선정과 함께 추가 연구를 통하여 실용 가능성을 타진할 필요가 있다. 또한 저온뿐만 아니라 가뭄 및 고 염분 등 다른 환경 스트레스 내성 작물을 개발하는 연구분야에도 활용이 가능하다.

본 연구에서 확보한 오이 형질전환체는 본 연구가 종료된 후 세대 검증 및 포장 실험을 통하여 저온 내성 기능을 확인한 후 상품화 가능성을 최종 타진하고, 순천, 고흥, 광양, 광주, 무안 등 전라남도 지역의 시설재배 농가에 보급할 수 있는 방안을 모색할 것이다. 향후 3-5년 동안에 국내의 GMO 관련 법규 및 제반 사항이 정립되어 GMO 작물의 재배 및 판매가 가능하게 되길 기대하며, 환경문제 등을 고려하여 노지재배 보다는 시설재배에 우선 적용하여 활용할 계획이다.

제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학 기술 정보

과제가 진행되는 동안 국내적으로는 오이로부터 특정 유전자 및 프로모터를 분리한 연구결과나 보고는 없었으나, 해외의 여러 연구진에 의해 오이에서 발견되는 유전자들의 염기서열을 분석한 결과들이 NCBI GenBank에 등록되었다. 현재까지 약 100여개 이상의 오이 유전자 염기서열이 등록되어 있으며, 등록된 유전자의 몇 가지 예를 들면 다음과 같다. glutathione reductase mRNA (EF530128), phospholipase D (EF363796), SCAR marker SCE12M50 genomic sequence (DQ472229), putative N-acetylglucosaminyltransferase III (gnT-III gene) (AJ629867), putative pathogenesis-related protein (pr gene) (AJ629866), catalase (EF468517), L-galactosedehydrogenase (EF468516), dehydroascorbate reductase (EF468515), RuBisCO activase (RCA) (EF421974), elongation factor 1-alpha (EF1) (EF446145), ascorbate peroxidase (EF426538), nitrite reductase (NIR) (EF367679), plasma membrane proton pump-like (HA3) (EF375892), vacuolar pyrophosphatase (VP) (EF373538), vacuolar ATPase subunit c (VHA-c) (EF373537). 하지만, 현재까지는 이러한 유전자들의 염기서열만이 등록되어 있을 뿐, 이들 유전자의 스트레스 내성 기능을 규명한 연구결과는 거의 없는 실정이다.

과제가 진행되는 동안 국내에서는 오이 형질전환에 관한 연구결과나 보고는 없었으나, 해외의 연구진에 의해 오이 형질전환에 관한 2개의 연구보고가 발표되었다. Rajagopalan & Perl-Treves (2005)는 modified explant dissection과 selection protocol을 이용한 오이 형질전환을 시도하였으며, Gal-On (2005) 등은 Cucumber fruit mottle mosaic tobamovirus를 억제할 수 있는 유전자를 도입한 오이의 형질전환에 대해 보고하였다. 이러한 형질전환 연구는 특정 오이 품종에 선택적으로 적용할 수 있으며, 본 연구진에서는 그들이 제시한 방법으로는 형질전체를 얻는데 성공하지 못 하였다. 오이를 연구 대상으로 한 것은 아니지만 저온 스트레스 내성 작물 개발에 관한 일반적인 연구가 많이 진행되었으며, 본 연구에서 활용하고자 하는 유전자 외에 cold shock protein을 활용하여 식물의 스

트레스 내성을 증가시키는 방법에 대한 국제 특허가 몬산토 연구진에 의해 등록되어 (WO 2005/03318 A2) 저온 내성 유전자를 활용한 저온 스트레스 극복 작물의 개발 가능성을 제시하였다. 위에서 언급한 오이 형질전환에 관한 최근 연구 결과 보고서는 본 연구에서 목표로 하는 오이 품종에는 적용이 쉽지 않음이 확인되었고, 따라서 재연성이 있고 형질전환 효율이 높으며 국내에서 재배하고 있는 오이 품종에 적용이 가능한 형질전환 체계는 해외에서도 개발이 되지 않은 실정이다.

제 7 장 참고문헌

- Aharon R, Shahak Y, Wininger S, Bendov R, Kapulnik Y, Galili G. (2003) Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *Plant Cell* 15, 439-447.
- Alexandersson E, Fraysse L, Sjövall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P. (2005) Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Mol Biology* 59, 469-484.
- Aroca R, Ferrante A, Vernieri P, Chrispeels MJ. (2006) Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in *Phaseolus vulgaris* plants. *Annals of Botany* 98, 1301-1310.
- Aitken-Christie J, Singh AP & Davies H (1988) Multiplication of meristematic tissue: a new tissue culture system for radiata pine. In *Genetic Manipulation of Woody Plants: Hanover JW & Keathley DE (eds), Plenum Press, New York, London (pp 413-432).*
- Baiges I, Schäffner AR, Affenzeller MJ, Mas A. (2002) Plant aquaporins. *Physiologia Plantarum* 115, 175-182.
- Bechtold N, Pelletier G. (1998) In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods in Molecular Biology* 82, 259-266.
- Boursiac Y, Chen S, Luu D-T, Sorieul M, van den Dries N, Maurel C. (2005) Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiology* 139, 790-805.
- Carvajal M, Martinez V, Alcaraz CF. (1999) Physiological function of water channels as affected by salinity in roots of paprika pepper. *Physiologia Plantarum* 105, 95-101.

- Chaumont F, Barrieu F, Jung R, Chrispeels MJ. (2000) Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with different aquaporin activity. *Plant Physiology* 122, 1025-1034.
- Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E, Chrispeels MJ, Jung R. (2001) Aquaporins constitutes a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiology* 125, 1206-1215.
- Cooper AJ. (1975) Crop production in recirculating nutrient solution. *Scientific Horticulture* 3, 251-258.
- Chee, PP (1990) Transformation of *Cucumis sativus* tissue by *Agrobacterium tumefaciens* and the regeneration of transformed plants. *Plant Cell Reports* 9, 245-248.
- Chee PP, Tricoli DM (1988) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension cultures of *C. sativus* L. *Plant Cell Rep.* 7, 274-277.
- Chee PP (1990) High frequency of somatic embryogenesis and recovery of fertile cucumber plants. *HortSci.* 25, 792-793.
- Chee PP, Slightom JL (1992) Transformation of cucumber tissues by microprojectile bombardment; identification of plants containing functional and non-functional transferred genes. *Gene* 118, 255-260.
- Erez, A., Cohen, E. and Frenkel, C. (2002) Oxygen-mediated cold-acclimation in cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings. *Physiol. Plant* 115, 541-549.
- Fortin MG, Morrison NA, Verma DPS. (1987) Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin, is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. *Nucleic Acid Research* 15, 813-824.
- Gal-On A., Wolf D., Antignus Y., Patlis L., Ryu K.H., Min B.E., Pearlsman M., Lachman O., Gaba V., Wang Y., Shibolet Y.M., Yang J. & Zelcer A. (2005) Transgenic cucumbers harboring the 54-kDa putative gene of Cucumber fruit mottle mosaic tobamovirus are highly resistant to viral infection and protect non-transgenic scions from soil infection. *Transgenic Research* 14, 81-93.
- Galmes J, Pou A, Alsina MM, Tomas M, Medrano H, Flexas J. (April 20, 2007). Aquaporin expression in response to different water stress

- intensities and recovery in Richter-110 (*Vitis* sp.): relationship with ecophysiological status. *Planta* 10.1007/s00425-007-0515-1.
- Guo L, Wang ZY, Lin H, Cui WE, Chen J, Liu M, Chen ZL, Qu LJ, Gu H. (2006) Expression and functional analysis of the rice plasma-membrane intrinsic protein gene family. *Cell Research* 16, 277-286.
- Heymann JB, Engel A. (1999) Aquaporins: phylogeny, structure, and physiology of water channels. *News Physiological Science* 14, 187-193.
- Hammar, S. and Grumet, R. (1990) Regeneration and *Agrobacterium* mediated transformation of cucumber. *HortSci.* 25, 1070.
- Jaglo-Ottosen K.R., Gilmour, S.J., Zarka D.G., Schabenberger, O. and Thomashow, M.F. (1998) *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280, 104-106.
- Jelaska (1986) Cucurbits. In: Y P S Bajaj (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol 2, Crops 1 (pp 371 - -386). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, Tokyo.
- Jeong WJ, Woo JW, Park HG, Choi KS, Liu JR (1999) High frequency plant regeneration in embryogenic cell suspension cultures of cucumber. *Kor. J Plant Tiss Cult.* 26, 289-291.
- Jang JY, Kim DG, Kim YO, Kim JS, Kang H. (2004) An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 54, 713-725.
- Javot H, Maurel C. (2002) The role of aquaporins in root water uptake. *Annals of Botany* 90, 301-313.
- Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, Sjövall S, Fraysse L, Weig AR, Kjellbom P. (2001) The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiology* 126, 1358-1369.
- Johansson I, Karlsson M, Johanson U, Larsson C, Kjellbom P. (2000) The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochimica et*

- Biophysica Acta 1465, 324-342.
- Kasuga M., Liu, Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnol.* 17, 287-291.
- Kaldenhoff R, Grote K, Zhu J-J, Zimmermann U. (1998) Significance of plasmalemma aquaporins for water transport in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 14, 121-128.
- Kaldenhoff R, Fischer M. (2006) Aquaporins in plants. *Acta Physiologica* 187, 169-176.
- Katsuhara M, Koshio K, Shibasaka M, Hayashi Y, Hayakawa T, Kasamo K. (2003) Over-expression of a barley aquaporin increased the shoot/root ratio and raised salt sensitivity in transgenic rice plants. *Plant Cell Physiology* 44, 1378-1383.
- Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Galbraith D, Bohnert HJ. (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell* 13, 889-905.
- Kim YO, Kim JS, Kang H. (2005) Cold-inducible zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein contributes to the enhancement of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 42, 890-900.
- Kim JW, Oh SY, Lee HS, Jo MH, Lee EM, Woo IS, Kwak SS (1988) Expression of pea superoxide dismutase gene in transgenic cucumber plants. *Kor J Plant Tiss Cult.* 25, 501-505.
- Kishimoto K, Nishizawa Y, Tabei Y, Hibi T, Nakajima M, Akutsu K (2002) Detailed analysis of rice chitinase gene expression in transgenic cucumber plants showing different level of disease resistance to grey mold. *Plant Sci.* 162, 655-662.
- Lee SH, Chung GC, Steudle E. (2005a) Gating of aquaporins by low temperature in roots of chilling-sensitive cucumber and -tolerant figleaf gourd. *Journal of Experimental Botany* 56, 985-995.
- Lee SH, Chung GC, Steudle E. (2005b) Low temperature and mechanical

- stresses differently gate aquaporins of root cortical cells of chilling-sensitive cucumber and resistant figleaf gourd. *Plant, Cell and Environment* 28, 1191-1202.
- Lian HL, Yu X, Ye Q, Ding X, Kitagawa Y, Kwak SS, Su WA, Tang ZC. (2004) The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. *Plant and Cell Physiology* 45, 481-489.
- Martinez-Ballesta MC, Aparicio F, Pallas V, Martinez V, Carvajal M. (2003) Influence of saline stress on root hydraulic conductance and PIP expression in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology* 160, 689-697.
- Martinez-Ballesta MC, Martinez V, Carvajal M. (2000) Regulation of waterchannel activity in whole roots and in protoplasts from roots of melon plants grown under saline conditions. *Australia Journal of Plant Physiology* 27, 685-691.
- Martre P, Morillon R, Barrieu F, North GB, Nobel PS, Chrispeels MJ. (2002) Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiology* 130, 2101-2110.
- Maurel C. (March 15, 2007). Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties. *FEBS Letter* doi:10.1016/j.febslet.2007.03.021.
- Murashige T, Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
- Nishibayashi, S., Kanedo, H., Hayakawa, T. (1996) Transformation of cucumber plants using *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration from hypocotyl explants. *Plant Cell Reports* 15, 809-814.
- Peng Y, Lin W, Cai W, Arora R. (April 19, 2007). Overexpression of a *Panax ginseng* tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic *Arabidopsis* plants. *Planta* 10.1007/s00425-007-0520-4.
- Punja ZK, Tang FA, Sarmiento GG (1990) Isolation, culture and plantlet regeneration from cotyledon and mesophyll protoplast of two pickling cucumber genotypes. *Plant Cell Rep.* 9, 61-64.
- Prudent S, Marty F, Charbonnier M. (2005) The yeast osmosensitive mutant

- fps1? transformed by the cauliflower BobTIP1;1 aquaporin withstand a hypo-osmotic shock. FEBS Letter 579, 3872-3880.
- Rahajo SHT, Punja ZK (1994) Regeneration of plantlets from embryogenic cell suspension cultures of pickling cucumber. *In vitro Cell Dev Biol-Plant*. 30, 16-20.
- Rajagopalan P.A. & Perl-Treves R. (2005) Improved cucumber transformation by a modified explant dissection and selection protocol. *HortScience* 40, 431-435.
- Sarmiento, G.G., Alpert, K., Tang, F.A., Punja, Z.K. (1992) Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and expression of kanamycin resistance in pickling cucumber. *Plant, Cell and Organ Culture* 31, 185-193.
- Schulze J, Balko C, Zellner B, Koprek T, Hansch R, Nerlich A, Mendel R (1995) Biolistic transformation of cucumber using embryogenic suspension cultures; long-term expression of reporter genes. *Plant Sci*. 112, 197-202.
- Seki, M., Narusaka M., Abe, H., Kasuga M., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Hayashizaki, Y. and Shinozaki K. (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* 13, 61-72.
- Soniya, E.V. and Das, M.R. (2002) In vitro organogenesis and genetic transformation in popular *Cucumis sativus* L. through *Agrobacterium tumefaciens*. *Indian J. Exp. Biol.* 40, 329-333.
- Sakurai J, Ishikawa F, Yamaguchi T, Uemura M, Maeshima M. (2005) Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant and Cell Physiology* 46, 1568-1577.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schäffner AR. (1998) Aquaporin function, structure, and expression: are there more surprises to surface in water relation? *Planta* 204, 131-139.
- Secchi F, Lovisolo C, Uehlein N, Kaldenhoff R, Schubert A. (2007) Isolation and functional characterization of three aquaporins from olive (*Olea*

- europaea L.). *Planta* 225, 381–392.
- Siefritz F, Tyree MT, Lovisolo C, Schubert A, Kaldenhoff R. (2002) PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. *Plant Cell* 14, 869–876.
- Smart LB, Moskal WA, Cameron KD, Bennett AB. (2001) MIP genes are down-regulated under drought stress in *Nicotiana glauca*. *Plant and Cell Physiology* 42, 686–693.
- Tournaire-Roux, CM, Sutka M, Javot H, Gout E, Gerbeau P, Luu DT, Bligny R, Maurel C. (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* 425, 393–397.
- Tyerman SD, Bohnert HJ, Maurel C, Steudle E, Smith JAC. (1999) Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *Journal of Experimental Botany* 50, 1055–1071.
- Tyerman SD, Niemietz CM, Bramley H. (2002) Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant, Cell and Environment* 25, 173–194.
- Tabel, Y., Kitade, S., Nishizawa, Y., Kikuchi, N., Kayano, T., Hibi, T., Akutsu, K. (1998) Transgenic cucumber plants harboring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Cell Reports* 17, 159–164.
- Tanaka R & Ikeda H (1983) Perennial maintenance of annual *Haplopappus gracilis* (2n=4) by shoot tip cloning. *Jpn. J. Genet.* 58, 65 - 70.
- Thomashow, M.F. (2001) So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiol.* 125, 89–93.
- Wakizuka T&Yamaguchi T (1987) The induction of enlarged apical domes *in vitro* and multi-shoot formation from finger millet. *Ann. Bot.* 60, 331–336.
- Weig A, Deswarte C, Chrispeels MJ. (1997) The major intrinsic protein family of Arabidopsis has 23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group. *Plant Physiology* 114, 1347–1357.
- Yu Q, Hu Y, Li J, Wu Q, Lin Z. (2005) Sense and antisense expression of plasma membrane aquaporin BnPIP1 from *Brassica napus* in tobacco and

- its effects on plant drought resistance. *Plant Science* 169, 647-656.
- Yu X, Peng YH, Zhang MH, Shao YJ, Su WA, Tang ZC. (2006) Water relations and an expression analysis of plasma membrane intrinsic proteins in sensitive and tolerant rice during chilling and recovery. *Cell Research* 16, 599-608.
- Zhu, J.-K. (2001) Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 401-406.
- Zhu C, Schraut D, Hartung W, Schäffner AR. (2005) Differential responses of maize MIP genes to salt stress and ABA. *Journal of Experimental Botany* 56, 2971-2981.