

최 종  
연구보고서

## 저온내성 오이품종의 분자육종

Molecular Breeding of Low Temperature-resistant  
Cucumber Plants

연 구 기 관  
전 남 대 학 교

야 림 부



## 최 종 보 고 서

'97년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 저온내성 오이품종의 분자육종에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

- 첨부 : 1. 최종보고서 10부  
2. 최종보고서 디스켓 1매

2001년 10월 27일

주관 연구기관 : 전 남 대 학 교

총괄연구책임자 : 조 백 호 (인)

주관연구기관장 : 전남대학교 총장

직인

농 립 부 장 관 귀 하

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “저온내성 오이품종의 분자유종” 과제의  
최종 보고서로 제출합니다.

2001년 10월 27일

주관연구기관명 : 전 남 대 학 교

총괄연구책임자 : 조 백 호

세부연구책임자 : 조 백 호

세부연구책임자 : 정 갑 채

연 구 원 : 배 동 규

연 구 원 : 백 경 환

# 요 약 문

## I. 제 목

저온내성 오이품종의 분자유종

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

오이는 우리 나라의 시설채소 중에서 가장 많이 재배되고 있으며 정부에서 적극 권장하고 있는 UR 대응 원예작물이다. 오이의 생육은 저온에 의해서 크게 좌우되므로 우리 나라와 같은 온대지역에서는 오이의 생산을 안정화시키기 위한 방법의 모색이 절실히 필요하다. 그러나 우리 나라의 경우, 오이의 생육적온 한계를 확대시키는 유일한 방법으로 혹종호박을 대목으로 이용한 접목재배가 성행하고 있을 뿐, 다른 형태의 시도는 거의 이루어지지 않고 있다.

오이는 아열대 원산으로서 저온에 약한 작물이나 어느 정도 순화는 가능하지만 순화과정이 유도되는 생리적 기작은 아직도 불분명하다. 식물호르몬인 앱식산은 여러 종류의 스트레스와 밀접한 관계를 맺고 있으며 특히, 저온과 수분 스트레스시 식물의 대응반응에 깊게 관여하는 것으로 알려져 있다. 그러나 저온 signal이 어떻게 식물세포에 의해 인식되고 전달되어 저온에 대한 내성이 유도되는지에 대한 구체적인 기작은 아직 밝혀지지 않았다.

현재까지 많은 형질전환 식물들이 발표되었지만, 형질전환 식물의 대부분은 제초제 저항성, 내충성 및 내병성 식물들이며, 실질적으로 농작물 재배에

서 커다란 문제가 되고 있는 저온내성 형질전환 식물에 대한 연구보고는 세계적으로도 극히 미미한 실정이다. 여기에는 여러 가지 원인이 있겠으나 저온에 대한 내성이 다수의 유전자에 의한 복합적인 대사작용의 결과로 획득되기 때문일 것으로 추측된다.

최근에, acyltransferase, fatty acid desaturase 유전자 및 저온 유도성 유전자들의 전사 활성화를 유발하는 trans acting factor인 *CBFI* 유전자 등을 도입하여 저온 내성을 부여하는지에 대한 기능연구가 이루어 졌다. 본 연구는 이러한 정보를 토대로 하여 저온에 내성인 형질을 지닌 우리 고유의 오이 품종을 창출하고자 시도되었다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 제 1 세부과제: 저온내성 관련 유전자의 클로닝 및 특성분석

가. Fatty acid desaturase (FAD) 및 기타 앱식산 유도성 유전자들을 담배에 형질전환하여 저온내성이 유도되는지를 확인해 봄으로써, 저온내성 오이의 분자유종을 위한 유전자원을 확보한다.

나. 저온내성 유전자원으로  $H^+$ -ATPase의 관련성을 확인하고, 호박 FAD유전자의 promoter와 오이 FAD cDNA와의 재조합 유전자가 저온내성 오이의 분자유종 유전자원으로 이용될 수 있는 지를 검정한다.

## 제 2 세부과제: 저온내성 오이품종의 분자유종 및 내성평가

가. 조직배양을 통하여 오이를 재생시키는 방법을 확립하고 저온내성관련 유전자원을 오이에 형질전환 하여 저온내성 오이품종을 창출한다. 이러한 연구목표를 세워 연구를 수행해 오던 중 오이의 형질전환이 잘 이루어지지 않아, 농림기술관리센터로부터 오이의 형질전환을 계속 추진하되 원래의 연구목표를 벗어나지 않는 범위 내에서 벼의 저온내성 형질전환도 추진토록 허락을 받았다.

나. 식물체의 저온내성 평가방법을 확립하고 그 방법에 의하여 원종, 원원종 및 형질전환오이에 대한 생리적 특성 규명 및 포장평가를 수행한다.

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

식물  $\omega$ -3 fatty acid desaturase (*FAD*) 유전자 발현과 저온내성간의 연관성을 확인하고자 *Arabidopsis FAD7* cDNA를 담배에 antisense 방향으로 형질 전환하여 생산된 담배의 생리적 및 분자생물학적인 특성을 검정하였다. Antisense 방향의 *FAD7* gene을 도입하여 형질전환 담배의 *FAD7* 유전자 발현을 억제시킴으로서 막지질의 불포화도 수준이 낮아졌으며, 그 수준이 낮기는 하나 저온에 대한 감수성이 증가하였다. 한편, 저온과 마찬가지로 수분 stress의 원인이 되는 high salt와 drought 조건을 주어 형질전환 담배의 생리적 활성을 검정한 결과, 0.8 % 이상의 염농도에서 대조구에 비해 형질전환체의 생육은 느려지고 2 주일이 지난 후에는 더 이상 생육이 이루어지지 않았다. 또한 2 달 정도 pot에서 자란 형질전환체를 일주일동안 물을 주지 않고 생육시

키면서 관찰한 결과, 대조구에 비해 형질전환체의 경우는 물을 주지 않은지 2-3일 후부터 현저한 위조증상을 나타내었다. 이러한 형질전환체에서 ABA 의존성 transcriptional factor인 ABF4의 활성이 가뭄처리에 의해 감소되었는데 형질전환체의 ABA 함량은 대조구에 비해 차이가 없었다. 이는 ABF4의 ABA-independent 활성이 존재할 가능성을 시사하는 것이다. 한편, 형질전환체에 TMV를 접종하였던 결과, 대조식물에서는 전형적인 HR반응이 나타나 매우 작은 반점들이 출현하였으나 형질전환담배에서는 나타난 반점들의 크기가 확대됨은 물론 병발률도 증가하여 *FAD7* 유전자의 발현이 식물의 바이러스 저항성에도 영향 함을 확인하였다. 이러한 TMV에 대한 저항성이 jasmonic acid (JA)와 연관이 있는지를 조사하기 위하여 Lipoxygenase 및 *PDF 1.2* 유전자의 전사활성을 측정된 결과, 두 유전자 모두 형질전환 식물에서 그 발현이 감소하였고 발현되는 시간 또한 지연되어 JA와 직접 관련됨을 확인하였다. 뿐만 아니라 wound-inducible protein kinase의 발현도 감소하였고 발현되는 시간도 지연되었다. 본 연구에 의해 창출된 형질전환 담배는 ABA와 환경스트레스와의 연계성, 자스몬산과 병원균에 대한 저항성 등을 연구하는 중요한 재료로 이용될 수 있을 것이다.

오이는 저온에 민감한 작물로 지온이 15 °C이하로 떨어질 경우 생장이 중단된다. 이는 오이 뿌리의 기능이 매우 저하되어 있음을 암시한다. 따라서 본 연구는 뿌리 흡수기능과 관련된  $H^+$ -ATPase 기능을 살펴보고 효소의 활성이 저하된 원인을 추적하였다. 호박 뿌리의 경우 효소활성도는 저온 처리군이 대조군보다 높았으나 축적된 mRNA양은 대조군이 보다 높았다. 또한, trypsin 처리와 막 재구성 후 활성도를 조사한 결과 대조군 뿌리의 효소 활성도는 증가한 반면에 저온 처리군에서 활성도의 증가가 보이지 않았다. 이는 호박의 경우 저온기간 동안  $H^+$ -ATPase가 활성화되었다는 것을 의미하며,  $H^+$ -ATPase 활성도 증가는 유전자 발현의 증가 때문이 아니라 효소의



conformational change 또는 막 지질 환경의 변화에 기인함을 의미한다. 반면에 오이뿌리의 경우 저온 처리기간을 연장함에 따라  $H^+$ -ATPase 활성도가 대조군보다 낮게 나타났다. 저온을 9 일간 처리한 오이 뿌리의 원형질막  $H^+$ -ATPase 활성도는 대조군 뿌리 수준으로 회복되지 못하였으나 축적된 mRNA양은 저온 처리군과 대조군간에 분명한 차이는 없었다. Trypsin 처리와 막 재구성 후 ATPase 활성도 조사결과 저온 처리군과 대조군 모두에서 활성도가 증가되었다. 따라서 오이의 뿌리 기능 약화현상을 부분적으로 원형질막  $H^+$ -ATPase의 낮은 활성도로 설명할 수 있을 것이다. 즉, 9 일 이상 저온 처리한 오이 뿌리의 원형질막은 비가역적인 손상으로 인해  $H^+$ -ATPase 활성도가 정상 수준으로 회복되지 않는 것으로 추측할 수 있다. 저온의 경우 막 유동성 회복은 식물 생장에 가장 중요하다. 따라서 막의 유동성을 회복할 수 있는 방안을 마련하면 저온 저항성 오이의 창출이 가능 할 것이며, 이는 *FAD* 유전자를 이용하면 가능할 것이다.

*Arabidopsis*에서 클로닝한 저온내성 관련 유전자인 *CBF1* 및 *FAD7* 유전자를 발현하는 형질전환 오이를 육성하기 위해 지금까지 발표된 국내·국외의 자료를 참조하여 실험을 수행하였다. 다양한 종류의 오이 품종과 오이 절편, 다양한 형질전환 방법과 selection marker 등을 이용하여 형질전환 오이를 육성하기 위해 시도하였으나 분자생물학적인 검정방법으로 확인된 형질전환 오이를 획득하지 못하였다. 최종적으로 형질전환 오이를 획득한 경험이 있는 일본의 생물자원연구소의 Dr. Tabei를 초청하여 (2001년 6월 14일), Dr. Tabei가 제시한 방법을 시도하고 있는 중이다. Dr. Tabei의 방법은 Kanamycin selection marker로 선발하며 multiple shoot를 유도한 후 이들로부터 chimera shoot를 제거하면서 형질전환된 shoot를 선발하는 방법으로서 최소한 1년간의 선발과정이 소요된다. 현재 Kan 선발배지에서 유도된 multiple shoot로부터 형질전환 shoot를 선발하고 있는 중이다.

오이의 형질전환이 난항을 보이자 3 년차부터 *Arabidopsis*의 저온내성 유전자를 발현하는 형질전환 벼를 육성하여 저온에 대한 저항성 검정을 병행해도 좋다는 농림기술센터의 허락을 얻어 *FAD7* 유전자를 발현하는 형질전환 벼를 육성하였다. 최종적으로 7개의 독립적인 형질전환 벼를 획득하였으며, 이들의 발현을 분자생물학적으로 검정하였다. 특이하게 이들 모든 개체에서 *Arabidopsis*의 *FAD7* 유전자 도입에 의해 벼의 *FAD* 유전자발현이 억제되었다. 이들 형질전환 벼는 trienoic fatty acid (18:3) 함량이 감소하였음에도 불구하고 jasmonic acid (JA) 함량이 증대되는 특이한 현상을 보였다. 체내의 JA 함량이 증대됨으로 형질전환 벼는 저항성유전자의 발현이 촉진되었으며, 이로 인한 내병성이 증대됨을 확인할 수 있었다. 그러나 이들 형질전환식물체의 T<sub>1</sub> 생육은 Null segregant (control)에 비해 생육과 수량이 감소되는 경향을 보였다. 본 실험 결과에 의해 벼에서 jasmonic acid가 wild type보다 2 - 3 배 많이 생합성되는 형질전환 벼를 육성함으로써 자스몬산과 병원성과의 연계성 연구 및 자스몬산 합성과 벼의 생육특성과의 관계를 밝히는 중요한 재료로 이용될 수 있을 것이다.

저온내성을 획득시킨 후, 그러한 내성을 항시 식물체가 발현하는 경우보다는 저온이 주어지는 경우에만 "내성 switch"를 작동시키는 것이 보다 이상적일 것이다. 본 연구에서는 그러한 switch의 존재 유무에 따라 저온내성 혹은 감수성을 평가할 수 있는 생리, 생화학적인 방법을 모색하는 데에 중점을 두었다. 실험은 주로 국내에서 종묘회사 및 농촌진흥청에서 분양 받을 수 있는 germplasm을 수집하여 저온내성을 screening하고, 특히 근권과 대기저온을 구분하여 실험하였다. 실험에 따라 상이한 생리적·생화학적인 방법을 사용하였지만, 저온처리 후 ion leakage의 양을 측정하는 전통적인 방법부터 lipoxygenase와 같은 enzyme activity도 조사하였다. 조사한 항목은 ion leakage, stomatal resistance, transpiration, chlorophyll content, photochemical efficiency,

photosynthesis, activated oxygen species related enzyme activities of superoxide dismutase and peroxidase, water potential, xylem sap flow, leaf length, lipoxygenase, and protoplast size 등이다.

수집한 germplasm의 저온내성을 검사한 결과 국내 종묘회사에서 육성한 겨울오이가 가장 강한 특성을 나타냈다. 저온으로 장시간 처리한 후 강한 광에 노출시켜 나타난 피해양상으로 저온에 내성 혹은 감수성인가를 조사하였다. 예상할 수 있는 대로 저온처리 기간과 강한 광에 노출되는 시간이 길어 질수록 피해는 심하였다. 그러나 흥미롭게도 일반적으로 종묘회사에서 파악하고 있는 특성들과 다소 상반된 결과가 나왔다. 즉 일향은 저온내성인 품종이며, 삼척은 전형적인 여름오이로 알려진 저온 감수성인 품종이나 저온에 의한 피해양상은 반대로 나타났다. 또한 저온 처리 후, 온도를 정상으로 회복시키면 광합성 작용은 삼척이 또한 가장 빨리 회복하였다. 한편, 대기저온 처리에 따라 줄기를 통해 상승하는 xylem sap의 절대 양을 측정한 바, 삼척이 가장 민감하게 반응하였으며 저온에 강한 일향은 저온 하에서도 수분수송의 능력을 상대적으로 높게 유지하였다. 그러나 저온처리 후에 엽의 신장 반응 정도를 측정한 결과, 저온에 약한 것으로 알려져 있는 삼척이 일향에 비해서 2 배 정도 신장하였다. 그러나 기공저항을 보면 삼척은 저온에 의해서 크게 변화하지 않았으며 따라서 광합성 량도 더 많았다.

리놀렌산과 같은 불포화 지방산으로부터 lipoxygenase에 의하여 자스몬산이 생합성되는 octadecanoid 대사 경로는 식물체에 가해지는 기계적 스트레스, 병원균의 침입에 의한 스트레스, 해충의 공격에 대한 스트레스 등 다양한 종류의 스트레스에 대한방어작용을 촉발시키는 대사경로이다. 따라서 lipoxygenase의 활성을 오이와 흑종호박에서 측정한 결과 종에 따라 현저한 차이를 보여주어 저온에 대한 marker로서 사용될 수 있을 정도로 민감하게 반응하였다. 또한 저온의 영향을 protoplast 상태에서 조사한 결과, 오이뿌리

에도 저온에 대한 순화능력이 있음을 나타내었고, 뿌리를 저온으로 순화시킨 후 원형질체를 분리하여 저온처리 해 보면 오이는 15℃, 호박은 10℃에서 각각 순화되는 한계온도인 것으로 판단되었다. 한편, Xylem sap flow의 결과에서 암시한 것처럼 저온내성은 water transport protein인 aquaporin과 밀접한 관련이 있을 것으로 추정되었다.

# Summary

## I. Title

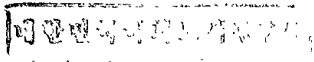
### **Molecular breeding of low temperature-resistant cucumber plants**

## II. Importance and objectives of the research

Cucumber is the most widely cultivated plants in greenhouse and the recommended horticultural species for farmers by Korean government as a possible cash crop. However, the growth of cucumber plants is greatly affected by low temperature and hence any method to stabilize their production during winter is absolutely necessary. At the moment the practical way of avoiding growth limitation occurred by low temperature is grafting onto figleaf gourd.

Cucumber is known to have originated from sub-tropical country and therefore, it is low temperature-sensitive species with little acclimation process. Abscisic acid(ABA), a plant growth hormone, affects various process of plant physiology. It is well known that ABA mediates the low temperature stress responses of plants. However, low temperature signal perception and transduction pathways in plants and the consequent induction of low temperature resistance mechanism are not fully understood.

Up to now, many transformed plants are known but most of them are herbicide-, disease- or insect-resistant plants. Reports on the transformed plants on the low temperature-resistance are scarce. There may be a number of reasons



but it is because many genes are involved in the acclimation process in plants.

Recently, the introduction of acyltransferase and fatty acid desaturase genes, and of a trans-acting factor gene *CBFI* activating the transcriptional activities of low temperature-inducible genes, was tested to find out the possibility of the introduction of low temperature-resistant characteristics in transgenic plants. The present research was carried out to breed low temperature-resistant cucumber varieties through such molecular techniques.

### **III. Research content and scope**

#### **1. Research Part I : Cloning and characterization of the genes involved in resistance to low temperature stress**

1). A fatty acid desaturase(*FAD*) gene and other abscisic acid-inducible genes were transformed into tobacco plants in order to see whether low temperature resistance is acquired and to use those genes for future molecular breeding.

2).  $H^+$ -ATPase activity was tested, and a recombinant gene (the figleaf gourd *FAD* gene promoter/the cucumber *FAD* cDNA) was constructed to see whether those genes could be used as genetic sources for molecular breeding of low temperature-resistant cucumber in the future.

## **2. Research Part II : Molecular breeding of low temperature-resistant cucumber plants and evaluation of the plant physiological characteristics**

1). By the establishment of tissue culture methods for the regeneration of cucumber, low temperature-resistant transgenic cucumber was aimed to be produced by the transformation of resistance genes. However, it was soon noticed that transformation in cucumber plants was not satisfactory. We were allowed to breed low temperature resistant rice by Agricultural Research and Development Promotion Center as long as it is within the original scope of the research

2). Method for the evaluation of low temperature-resistant characteristics will be established and applied to transformed cucumber plants to evaluate the physiological characteristics.

## **IV. Research Results and Application**

The expression of the  $\omega$ -3 fatty acid desaturase gene appears to be related to various environmental stress responses. However, the function of the  $\omega$ -3 fatty acid desaturase gene regulation in response to environmental stress still remains unclear. Here we demonstrate that compared with wild-type plants, transgenic tobacco plants in which trienoic fatty acid content is reduced by antisense expression of the *Arabidopsis FAD7* gene, became significantly more sensitive to dehydration stresses such as drought or high salt conditions, and also

became more susceptible to tobacco mosaic virus (TMV) infection. This study shows a novel physiological characteristic of the  $\omega$ -3 fatty acid desaturase gene expression in plants that so far has not been published in the literature. The mechanism involved in the phenotypic expression by the antisense *fad7* gene expression is discussed as follows.

A wound-inducible *Arabidopsis* plastid  $\omega$ -3 fatty acid desaturase (FAD7) cDNA was obtained. Transgenic tobacco plants were produced by integration of the antisense *FAD7* DNA fragments under the control of a CaMV 35S promoter into the tobacco genome. Two transgenic T<sub>1</sub> lines, AsFAD714 and 716, showed strong expression of the antisense *FAD7* and reduced amounts of linolenic acid compared with control plants. The two T<sub>1</sub> lines were highly sensitive to dehydration conditions, showing growth retardation on the MS medium in the presence of 250mM NaCl and severe wilting under drought condition. The expression of transcriptional factor gene *ABF4* transducing ABA-dependent signal in response to drought stress, was strongly induced in control plants but far less in AsFAD716 line. This suggests that the inhibitory effect of the antisense *fad7* gene expression on the ABF-mediated stress-responsive gene regulation may reduce drought tolerance in the AsFAD716 line. However, no significant difference in the ABA concentration was found between the control and the AsFAD716 line under normal and drought conditions. Expression of the *FAD7* gene was induced by TMV infection on tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) carrying the *N* resistance gene. Necrotic lesions caused by TMV infection developed much earlier and were larger with brown halos in the transgenic tobacco line AsFAD716 expressing antisense *FAD7*. The linolenic acid content was reduced in the antisense *FAD7* plants. Induction of lipoxygenase (*LOX*) and



defensin (*PDF1.2*) gene transcripts by TMV infection were delayed in the AsFAD716 line compared with wild type plants. Expression of the wound-inducible mitogen-activated protein kinase (*WIPK*) gene was also retarded at the mRNA and protein levels in the AsFAD716 line.

Cucumber is a chilling sensitive plant, and this plant stop growing when soil temperature goes down below 15 °C. This fact indicates that the function of cucumber roots gets weakened at low temperature. In this study, we investigated the H<sup>+</sup>-ATPase activity of cucumber and pumpkin root to interpret the root function during chilling. In case of pumpkin roots, plasma membrane (PM) H<sup>+</sup>-ATPase activity of chilled roots was higher than that of control roots. But there was no significant difference in the H<sup>+</sup>-ATPase transcript level of control and chilled roots. Change of the H<sup>+</sup>-ATPase activity was recovered following trypsin treatment and membrane reconstitution with Asolecin. While the enzyme activity of the control roots increased the chilled roots did not increase even after treatments. These results implicated that PM H<sup>+</sup>-ATPase of pumpkin root is activated during chilling, and this activation is caused by conformational changes of the enzyme or by the alteration of membrane lipid-environment, but not caused by the increased gene expression. However, in case of cucumber, H<sup>+</sup>-ATPase activity of the chilled roots decreased to lower level than control, as a length of chilling extended. Enzyme activity of the chilled roots for 9 days did not recovered to the level of control. ATPase transcript level of control and chilled cucumber roots was almost same. Trypsin treatment and membrane reconstitution caused activation of H<sup>+</sup>-ATPase of both control and chilled roots. From these, we might explain the weakened function of cucumber root during chilling with the lower activity of PM-H<sup>+</sup>-ATPase. In other words, it was likely

that chilling treatment of cucumber roots for 9 days or longer damaged plasma membrane irreversibly, and that damage resulted in the decreased APTase activity. Maintenance of membrane fluidity is most important for plant to grow during cold temperature. Therefore, it will be possible to induce the cold resistant cucumber, by using a fatty acid desaturase(*FAD*) gene, which involves in the maintenance of the PM fluidity during cold temperature.

The generation of transgenic cucumber plants expressing *Arabidopsis* cold resistance related genes such as *CBF1* and *FAD7* via *Agrobacterium*-mediated method was underway. Even though several trials and errors were repeated by using techniques reported so far, we still are in the middle of getting transgenic cucumber. Finally, we had invited a japanese scientist Dr. Tabei who works for NIAS (Japan) on June 2001 and learned his method for generating transgenic cucumber. Following his suggestion, we are keep doing for generating transgenic cucumber.

As an alternative way for achieving the goal of this research, we were granted by the evaluation committee of ARPC to develop transgenic rice plants expressing *Arabidopsis FAD7* gene whether *Arabidopsis* cold resistance related gene is also working in monocotyledonous plant rice. Followings are results and achievements by getting the transgenic rice plants. We utilized an *Arabidopsis FAD7* gene and made it to overexpress in rice by way of generating stable transgenic rice. The seven independent transgenic rice plants harboring 1 to 3 copies were generated. The expression level of *FAD7* mRNA was different among independent transgenic lines without regard to copy number. All transgenic plants had shown that the relative contents of trienoic fatty acid (18:3) were less in transgenic plants than that of wild type plant. This data

might proposed that the introduction of *Arabidopsis FAD7* into rice genome caused to cosuppress the endogenous rice FAD expression. The unwounded transgenic rice plants had shown that jasmonate levels were 2 to 4 fold higher than wild type. After wounding, the jasmonate level were higher in some of transgenic lines than in wild-type plant even though there were some transgenic lines showing lower level of jasmonate than that of wild-type plant. The transgenic lines overproducing jasmonate also showed that much more induction of PR1b mRNA jasmonate responsive genes, was observed in response to wounding irrespective of allene oxide synthase induction. Also these transgenic plants seem to be resistant to blast fungus infection. Even though the transgenic plants had less amount of trienoic fatty acid, their relative degrees of cold resistance were not altered when judged by MDA production upon cold treatment. However, the production of T<sub>2</sub> seeds was decreased up to 15 - 25 in transgenic rice when compared with null segregants.

The present study aimed to find out the ways of detecting the sensitive or resistant anatomical, physiological and biochemical aspects to low temperature stress. It was intended to offer easy and fast way of detecting the effect of low temperature stresses. All the possible germplasms collected by Rural Development Administration and Korean seed companies were tested to see any differences in low temperature stress. In addition, figleaf gourd that is used as rootstock for cucumber was also used to see the effect of low root temperature on the plant performance compared to cucumber plant.

As expected, winter-type cucumber varieties showed low temperature-resistant characters when determined by ion leakage after low temperature treatment. However, inconsistent results were frequently obtained, depending on what

parameters were measured, For example, when the effect of activated oxygen species were measured by placing plants in strong light after low temperature treatment, summer-type cucumber variety-Samchuk-showed a rather resistance. However, xylem sap transport measured with sap flow meter clearly distinguished the varieties in terms of sensitiveness to the low temperature. Photosynthesis was again not the guide for the detecting the response.

Lipoxygenase activity, an enzyme that mediates the metabolism of lipid in the membrane, was very sensitive to low temperature. The enzyme activity was regarded as marker enzyme representing the low temperature effect on the plant. By measuring the size of protoplasts isolated from cucumber and figleaf gourd plants, it was concluded that the root system may have some ability to acclimate to low temperature stress.

# CONTENTS

<b>Chapter 1. General introduction .....</b>	<b>24</b>
Section 1. Importance of the research .....	24
Section 2. Background of the research .....	25
Section 3. Frailty of the research .....	28
Section 4. Objectives of the research .....	29
Section 5. Research content and scope .....	30
1. Research Part I : Cloning and characterization of the plant genes involved in resistance to low temperature stress .....	30
2. Research Part II : Molecular breeding of low temperature-resistant cucumber plants and evaluation of the plant physiological characteristics .....	30
<b>Chapter 2. Characterization of the plant genes involved in resistance            to low temperature stress .....</b>	<b>31</b>
Section 1. Plant $\omega$ -3 fatty acid desaturase (FAD) gene .....	31
1. Transformation of a <i>FAD</i> gene into tobacco plants .....	31
2. Antisense expression of an <i>Arabidopsis FAD</i> gene reduces salt/drought tolerance in transgenic tobacco plants .....	34
3. Antisense expression of an <i>Arabidopsis FAD</i> gene enhances the necrotic lesion formation by TMV infection in transgenic tobacco plants .....	57
Section 2. CRT/DRE binding factor 1 (CBF 1), osmotin and dehydrin genes ...	68
1. CBF1 gene .....	68
2. Osmotin gene .....	71

3. Dehydrin gene .....	73
4. References .....	74
<b>Chapter 3. H<sup>+</sup>-ATPase activity, and construction of a chimaeric gene as sources for low temperature resistance in plants .....</b>	<b>76</b>
Section 1. Introduction .....	76
Section 2. Materials and methods .....	78
Section 3. Results and discussion .....	79
1. Cloning of H <sup>+</sup> -ATPase cDNAs from cucumber and figleaf gourd .....	79
2. Plasma membrane H <sup>+</sup> -ATPase gene expression .....	80
3. Plasma membrane H <sup>+</sup> -ATPase activity with trypsin treatment .....	82
4. Plasma membrane H <sup>+</sup> -ATPase activity in the reconstituted membrane .....	83
5. Cloning of FAD3 cDNAs from cucumber and figleaf gourd .....	84
6. <i>FAD3</i> gene expression .....	84
7. 14-3-3 gene expression .....	85
<b>Chapter 4. Molecular breeding of low temperature-resistant cucumber plants .....</b>	<b>88</b>
Section 1. Transgenic cucumber plants produced by transformation of the <i>Arabidopsis FAD</i> and <i>CBF1</i> genes .....	88
1. Materials and methods .....	88
2. Cucumber transformation methods used, and results .....	91
3. References .....	103
Section 2. Transgenic rice plants produced by transformation of the <i>Arabidopsis FAD</i> gene .....	104
1. Materials and methods .....	104
2. Results and discussion .....	113

<b>Chapter 5. Evaluation of low temperature resistance in cucumber plants .....</b>	<b>123</b>
Section 1. Introduction .....	123
Section 2. Screening of cucumber germ plasms for low temperature resistance, and their physiological characteristics in response to low root temperature .....	125
1. Materials and methods .....	125
2. Results and discussion .....	127
Section 3. Physiological characteristics of cucumber varieties in response to low temperature in atmosphere .....	133
1. Introduction .....	133
2. Materials and methods .....	134
3. Results and discussion .....	135
Section 4. Lipoxigenase and peroxidase activities in the cucumber and figleaf gourd roots in response to low root temperature .....	144
1. Introduction .....	144
2. Materials and methods .....	145
3. Results and discussion .....	145
Section 5. Effect of low temperature on the protoplast size of cucumber and figleaf gourd .....	147
1. Introduction .....	147
2. Materials and methods .....	148
3. Results and discussion .....	148
Section 6. General discussion .....	153

# 목 차

제 1 장	서론 .....	24
제 1 절	연구개발의 필요성 .....	24
제 2 절	연구의 배경 .....	25
제 3 절	연구개발의 취약점 .....	28
제 4 절	연구개발의 목적 .....	29
제 5 절	연구개발의 내용 및 범위 .....	30
1. 제 1 세부과제:	저온내성관련 유전자의 클로닝 및 특성분석 .....	30
2. 제 2 세부과제:	저온내성 오이품종의 분자유종 및 내성평가 .....	30
제 2 장	저온내성 관련 식물유전자 개발분야 .....	31
제 1 절	식물 $\omega$ -3 fatty acid desaturase ( <i>FAD</i> ) 유전자 .....	31
1. <i>FAD</i> 유전자의 담배 형질전환 .....	31	
2. Antisense expression of an <i>Arabidopsis FAD</i> gene reduces salt/drought tolerance in transgenic tobacco plants .....	34	
3. Antisense expression of an <i>Arabidopsis FAD</i> gene enhances the necrotic lesion formation by TMV infection in transgenic tobacco plants .....	57	
제 2 절	CRT/DRE binding factor 1 ( <i>CBF 1</i> ), osmotin and dehydrin 유전자 ...	68
1. <i>CBF1</i> 유전자 .....	68	
2. Osmotin 유전자 .....	71	
3. Dehydrin 유전자 .....	73	
4. 인용문헌 .....	74	



제 3 장 H <sup>+</sup> -ATPase 및 저온내성 재조합 유전자 개발분야 .....	76
제 1 절 서 론 .....	76
제 2 절 연구재료 및 방법 .....	78
제 3 절 결과 및 고찰 .....	79
1. 오이와 호박의 H <sup>+</sup> -ATPase cDNA 클로닝 .....	79
2. 원형질막 H <sup>+</sup> -ATPase 유전자 발현 .....	80
3. Trypsin 처리에 의한 원형질막 H <sup>+</sup> -ATPase의 활성 변화 .....	82
4. Asolectin에 의해 재구성된 원형질막 H <sup>+</sup> -ATPase의 활성변화 .....	83
5. 오이와 호박의 FAD cDNA 클로닝 .....	84
6. <i>FAD3</i> 유전자 발현 .....	84
7. 14-3-3 유전자 발현 .....	85
제 4 장 저온내성 형질전환 식물 개발분야 .....	88
제 1 절 <i>Arabidopsis FAD</i> 와 <i>CBF1</i> 유전자를 발현하는 형질전환 오이 육성 .....	88
1. 재료 및 방법 .....	88
2. 오이 형질전환 방법 및 결과 .....	91
3. 참고문헌 .....	103
제 2 절 <i>Arabidopsis FAD</i> 유전자를 과다 발현하는 형질전환 벼 육성 .....	104
1. 재료 및 방법 .....	104
2. 연구결과 .....	113
제 5 장 오이의 저온내성 평가방법 개발분야 .....	123
제 1 절 서 언 .....	123

제 2 절 오이 germplasm의 저온내성 screening과 근권저온에 의한 오이의 생리적인 반응변화 .....	125
1. 재료 및 방법 .....	125
2. 결과 및 고찰 .....	127
제 3 절 대기저온이 오이품종의 생리대사에 미치는 영향 .....	133
1. 서언 .....	133
2. 재료 및 방법 .....	134
3. 결과 및 고찰 .....	135
제 4 절 근권저온이 오이와 호박뿌리의 lipxygenase와 peroxidase 활성에 미치는 영향 .....	144
1. 서언 .....	144
2. 재료 및 방법 .....	145
3. 결과 및 고찰 .....	145
제 5 절 오이와 흑종호박의 protoplast크기에 미치는 저온의 영향 .....	147
1. 서언 .....	147
2. 재료 및 방법 .....	148
3. 결과 및 고찰 .....	148
제 6 절 종합고찰 .....	153

# 제 1 장 서 론

## 제 1 절 연구개발의 필요성

오이는 우리 나라의 시설채소 중에서 가장 많이 재배되고 있는 작물이며, 전국적인 대 일본 수출 전략작목으로 정부에서 적극 권장하고 있는 UR 대응 원예작물이다. 정부 농업 투자의 상당 부분이 시설원예에 집중되고 있고, 고품질의 채소류를 생산하기 위한 정부의 의지도 강하다. 이러한 시설원예의 증가는 불시재배(off-season growing)의 확대를 의미하는데, 즉 작물이 기본적인 생육에 부적절한 기상환경 하에서 재배되는 촉성, 반촉성 및 억제재배의 경우, 오이의 생육기간의 대부분은 악조건이며, 따라서 미래의 품종이 지녀야 할 특성중의 하나는 그러한 환경조건에 내성인 유전정보를 지녀야 할 필요가 있다.

오이의 생육은 저온에 의해서 크게 좌우되므로 겨울동안에 시설 내에서 재배하는 경우에는 적절한 온도의 유지가 가장 중요하다. 그럼에도 불구하고 오이의 생산을 안정화시키기 위한 접근 방법으로 저온에 내성인 오이를 획득코자 하는 시도는 찾아보기 어렵다. 오이의 생육적온 한계를 확대시키는 유일한 방법으로 흑종호박을 대목으로 이용한 접목재배가 성행하고 있을 뿐이다. 그러나 이러한 대목의 사용은 접목 과정에 많은 일손이 필요하기 때문에 경제적 부담이 클 뿐 아니라 생육후기에 품질의 저하 등 많은 문제점을 지니고 있다.

오이는 아열대 원산으로서 저온에 약한 작물이나 어느 정도 순화는 가능하지만 순화과정이 유도되는 생리적 기작은 아직도 불분명하다. 식물호르몬인 앱식산은 여러 종류의 스트레스와 밀접한 관계를 맺고 있으며 특히, 저온

과 수분 스트레스시 식물의 대응반응에 깊게 관여하는 것으로 알려져 있다. 그러나 저온 signal이 어떻게 식물세포에 의해 인식되고 전달되어 저온에 대한 내성이 유도되는지에 대한 구체적인 기작은 아직 밝혀지지 않았다.

현재까지 많은 형질전환 식물들이 발표되었지만, 형질전환 식물의 대부분은 제초제 저항성, 내충성 및 내병성 식물들이며, 실질적으로 농작물 재배에서 커다란 문제가 되고 있는 저온내성 형질전환 식물에 대한 연구보고는 세계적으로도 극히 미미한 실정이다. 여기에는 여러 가지 원인이 있겠으나 저온에 대한 내성이 다수의 유전자에 의한 복합적인 대사작용의 결과로 획득되기 때문일 것으로 추측된다.

우루과이 라운드 체결에 따라 우리 나라의 농업은 큰 위협을 받게 되었으며 사회적으로 우리 농산물 보호운동이 전국적으로 추진되고 있는 실정이다. 이러한 점을 감안할 때 저온에 내성을 갖는 작물을 창출한다면 생산가 절감에 따라 경쟁력 있는 농산물을 생산하여 국외로의 수출이 가능할 것이다. 한 가지 작물에서 이러한 노력이 성공하면 다른 농작물에도 응용되어 농업생산성의 향상에 큰 도움이 될 것이며, 사회적으로도 우리 농가 보호에도 크게 기여할 것이다.

## 제2절 연구의 배경

저온에 대한 식물의 반응 차이는 기본적으로 원산지의 환경조건에 순응한 ecotype의 형태적, 생리적 순화의 결과에 기인한다. 따라서 온대지방에서 유래한 종(species)은 영하의 온도에서도 생존을 하지만 열대나 아열대 원산인 종은 상대적인 고온에서도 동사(凍死)하거나 생육에 피해를 입게 된다. 오이

는 아열대 원산으로서 저온에 약한 작물이나 어느 정도 순화는 가능하다. 즉 12℃에서 4일 동안 생육시킨 후에는 5℃의 환경조건하에도 9일 동안 저온피해가 유발되지 않지만, 열대원산인 종은 장기간 순화처리를 하더라도 저온으로 옮기면 불과 1-2시간 내에 증상을 나타내게 된다. 그러나 이러한 오이의 순화 가능성이 다소 있음에도 불구하고 10℃ 이하의 온도는 오이의 생육 및 수확에 치명적인 결과를 초래한다. 토마토는 일시적인 영하의 온도에서도 죽지 않는다는 것이 오이와는 대조적이다.

식물이 저온에 생존하는 방법은 첫째로 저온을 회피하는 수단을 취한다. 가능한 한 모든 생리대사를 중지하고, 잠을 자는 이를테면 휴면이 전형적인 보기이다. 또 한가지는 저온에 대한 내성을 증진시켜서 적응하는 것이다. 대부분의 온대원산인 식물 종은 저온순화가 가능하며, 이러한 순화가 없으면 결빙온도에서 생존할 수 없게 된다. 여름을 지나 가을이 되면 온도가 점차로 낮아지고 그 과정 중에서 식물체가 순화된다는 것은 자연의 순리일 것이다. 가을철의 저온은 결빙온도가 아니지만 겨울동안에는 결빙온도에 대처하여 식물체가 생존할 수 있는 순화과정을 유도해야 한다. 식물체가 저온에 내성을 나타내는 생리적인 mechanism도 아직은 불분명한 점이 많다. 원형질막의 H<sup>+</sup>-ATPase의 관련성, anti-freezing protein의 생성, respiration의 증가, lipid 조성의 변화 등이 보고되어 있다.

식물의 저온내성과 직접 관련하여 논의된 원형질막 단백질에 대한 보고는 거의 없지만 일반적으로 저온순화 시 막의 인지질과 sterol의 함량이 증가된다. 순화가 일어나는 감자나 겨울 rye에서 엽 조직의 원형질막을 조사한 결과 순화과정에서 불포화 지방산(18:2, linolenic acid)이 증가하였으며, 포화 지방산(16:0, palmitic acid)의 양은 감소되었다. 막 지방성분의 변화는 원형질막 단백질의 양적, 질적인 변화와 밀접한 관계를 맺고 있으며, 막 단백질의 기능을 조절한다고 추측되고 있다. 식물의 acyltransferase cDNA는

chilling-sensitive 식물인 squash와 저항성인 *Arabidopsis thaliana* 등에서 cloning 되어 담배에 도입 발현시켜 chilling-sensitivity를 감소시킨 바 있다. 뿐만 아니라 chloroplast omega-3 fatty acid desaturase 유전자가 도입된 형질전환 담배에서는 저온에 대한 내성이 증가하였다.

식물호르몬들 중에서 앱식산은 여러 종류의 스트레스와 밀접한 관계를 맺고 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 저온과 수분 스트레스시 식물의 대응반응에 깊게 관여하는 것으로 알려져 있다. 그 예로 저온이나 결빙온도 처리시 앱식산의 농도가 3배 이상 증가하였으며, 식물에 앱식산을 처리할 경우, 순화과정에서 일어나는 막 지질의 변화, 막 단백질의 변화 등이 유도된다고 알려져 있다. 그러나 이러한 환경 요인이 어떻게 식물의 세포 내로 전달되어 저온 저항성을 유도하는지에 대한 구체적인 연구는 지극히 초보적인 단계에 머물고 있는 실정이다. 식물에 저온을 처리하면 많은 새로운 mRNA들이 출현하지만 그 중 대부분은 아직 그 기능이 밝혀져 있지 않은 단백질을 암호한다. 현재 세계 도처의 실험실에서 이들 유전자 산물의 기능연구가 수행되고 있다. 저온에 대응하여 *Arabidopsis*에서는 putative kinase regulator인 14-3-3 protein의 합성증가가 관찰되었다. 14-3-3 protein은 포유동물에서 다기능을 가진 protein kinase의 조절에 관련된 단백질로 밝혀졌는데, 식물이 저온에 대응하여 변화하는 여러 가지 대사과정에서 phosphorylation mechanism을 조절하는 중추적인 역할을 수행할 것으로 생각되며, 따라서 cold signal transduction을 이해하는데 크게 도움이 될 것이다.

저온에 내성인 식물의 품종을 개발한 사례로서 캐나다에서 육종된 콩은 매우 잘 알려져 있다. 즉, 캐나다의 Ontario는 저온으로 인한 생육기간의 단축에 의해 1950년대의 콩의 수량은 1.5t/ha에 지나지 않았으나, 일본 북해도에서 도입된 콩을 이용하여 육종한 결과 1990년대에서는 약 2.5t/ha로 증가하였다. 이러한 증가는 콩 품종에 저온내성을 도입한 결과이다. 최근에는

acyltransferase, fatty acid desaturase 및 CBF1 유전자 등을 유전공학에 의해 식물체에 도입함으로써 저온에 내성인 작물들을 창출하기 위한 노력이 이루어지고 있다.

### 제3절 연구개발의 취약점

식물은 주위 환경이 부여하는 여러 가지 스트레스에 효과적으로 적응해야만 생존할 수 있다. 다양한 환경 스트레스 중에서도 식물이 적응해야 할 가장 큰 스트레스는 저온이다. 거의 대부분의 식물은 저온에 대한 적응기작을 갖고 있으며 저온 저항성을 갖게된 식물은 거의 결빙 상태에서도 생존할 수 있는 경우도 있다. 그러나 이러한 환경요인이 어떻게 식물의 세포 내로 전달되어 저온 저항성을 유도하는지에 대한 구체적인 신호전달체계에 관한 연구는 지극히 초보적 단계에 머물고 있는 실정이다. 엽식산에 의하여 저온 순화능이 어떻게 유도되는 지도 아직 알려져 있지 않다. 식물호르몬에 의한 유전자 발현은 호르몬의 수용체를 통하여 조절된다고 추측되고 있으나, 현재까지 정확한 기작은 알려져 있지 않다. 엽식산 뿐만 아니라 다른 식물호르몬의 수용체가 밝혀져 있지 않으며, 따라서 호르몬들에 의한 신호전달체계도 규명되지 않고 있다. 그러나 저온과 식물간의 상호작용은 많은 사람들의 연구대상이 되어 왔고 현재도 진행되고 있으나 아직까지도 그 mechanism을 완전히 이해하기 힘들며 따라서 식물에 저온내성을 부여할 수 있는 유전자원도 결정되지 못하고 있다.

생물공학을 이용한 재배작물의 인위적인 육종으로 유전자 전이에 의한 형질전환 방법이 많은 연구에 의하여 개발되고 있다. 이러한 방법을 이용하여

많은 식물에서 형질전환 식물이 발표되었지만, 형질전환 식물의 대부분은 제초제 저항성, 내충성 및 내병성 식물의 육종에 관심을 두었을 뿐 실질적으로 농작물 재배에서 중대한 문제점으로 부상하는 저온내성 식물을 위한 유전자의 도입에 대한 연구는 거의 보고된 바 없다. 이 방면의 연구가 부진한 면에는 여러 원인이 있겠으나 대표적으로 다음과 같은 점을 들 수 있을 것이다. 첫째, 최근 들어 유전자 조작기술의 발달로 저온 등의 스트레스에 대응하는 유전자들이 밝혀지고 있으나, 그들의 기능이 밝혀져 있지 않기 때문에 저온 순화 과정에서 특정 유전자들의 역할을 이해하지 못하고 있다. 둘째, 식물체 내에서 일어나는 복합적인 대사작용의 결과로 저온순화 능력이 획득될 것으로 추측된다. 따라서 저온내성과 관련된 유전자들에 대한 종합적인 연구가 현 단계에서는 불가능하기 때문이다.

## 제4절 연구개발의 목적

본 연구에서는 가능한 많은 수의 국내 오이 germ plasm을 수집하여, 그 중에서 저온에 내성인 오이를 찾고자 한다. 이 점은 현실적으로 저온내성인 오이를 육성하는데 좋은 방법이 될 것이다. 또한 저온내성에 관련될 가능성이 있는 유전자들을 클로닝하여 유전공학적인 기법을 이용한 형질전환 오이를 창출하려고 한다. 한편, 식물체가 저온에 반응하여 유도 발현되는 많은 유전자들을 확보하려고 한다. 이는 지속적인 연구에 의해 유도 발현되는 산물의 기능이 밝혀지면 식물체가 저온에 순화되는 과정의 signal transduction 및 하류의 생리대사 과정을 밝히는 기초적인 면에서 뿐만 아니라, 저온에 내성인 식물을 분자육종하기 위한 유전자원을 확보할 수 있는 응용적인 측면의 기여도가 있기 때문이다.



## 제5절 연구개발의 내용 및 범위

### 1. 제 1세부과제: 저온내성 관련 유전자의 클로닝 및 특성분석

가. Fatty acid desaturase (FAD) 및 기타 맵식산 유도성 유전자들을 담배에 형질전환하여 저온내성이 유도되는지를 확인해 봄으로써, 저온내성 오이의 분자유종을 위한 유전자원을 확보한다.

나. 원형질막  $H^+$ -ATPase의 활성을 측정하고, 저온내성인 호박 FAD유전자의 promoter와 오이 FAD cDNA와의 재조합 유전자를 만들어 이들이 저온내성 오이의 분자유종 유전자원으로 이용될 수 있는지를 검증한다.

### 2. 제 2 세부과제: 저온내성 오이품종의 분자유종 및 내성평가

가. 조직배양을 통하여 오이를 재생시키는 방법을 확립하고 저온내성관련 유전자원을 오이에 형질전환하여 저온내성 오이 품종을 창출한다. 이러한 연구목표를 세워 년차별 연구를 수행해 왔으나 본 연구의 핵심사항인 오이의 형질전환이 잘 이루어지지 못하여 고심해 오던 중, 농림기술관리센터로부터 오이의 형질전환을 계속 추진하되 원래의 연구목표를 벗어나지 않는 범위 내에서 벼의 형질전환도 추진토록 허락을 얻었기 때문에 연구목표에 저온내성 벼의 형질전환을 포함하였다.

나. 식물체의 저온내성 평가방법을 확립하고 그 방법에 의하여 원종, 원원종 및 형질전환오이에 대한 생리적 특성 규명 및 포장평가를 수행한다.

## 제 2 장 저온내성 관련 식물유전자 개발분야

### 제 1 절 Plant $\omega$ -3 fatty acid desaturase (FAD) 유전자

#### 1. FAD 유전자의 담배 형질전환

Trienoic fatty acid를 포함한 다가 지방산의 높은 함량은 식물의 저온에 대한 적응 능력과 밀접한 상관관계를 갖고 있으며, 따라서 식물세포 내에서 FAD의 중요한 생리적인 기능중의 하나가 저온에 처한 식물에 내성을 부여하는 것으로 밝혀졌다. 막 지질에서 다가불포화 지방산의 증가는 membrane 내에 있는 acyl chain의 packing이 순차적으로 감소함에 의해 membrane fluidity가 증가된다. 저온에서 membrane fluidity의 감소는 membrane permeability를 감소시키므로 지속적인 membrane fluidity를 유지하는 것은 chilling과 freezing temperature에서 식물이 살아남기 위한 필수적인 수단으로 여겨진다. 고등식물의 막지질에 고농도로 포함되어 있는 trienoic fatty acid는  $\omega$ -3 fatty acid desaturase (FAD)에 의해 dienoic fatty acid로부터 만들어진다. *Arabidopsis* genome에서는 3 종류의 FAD 유전자가 밝혀졌는데, FAD3 유전자의 발현산물은 소포체막에, FAD7 과 FAD8 유전자의 발현산물들은 엽록체막에 존재하였다. 고등식물의 생장을 제한하는 가장 중요한 요인중의 하나가 저온이다. 식물세포 내에서 FAD의 중요한 생리적인 기능중의 하나가 저온에 처한 식물에 내성을 부여하는 것으로 밝혀졌다.

본 연구실에서는 differential screening에 의해 *Arabidopsis*로부터 상처 유도성 식물 유전자들을 클로닝해 가던 중, AWI 23 으로 명명한 cDNA 클론을 염기서열 분석한 결과 FAD7 유전자의 full-length cDNA임을 확인하였다 (그림 1).

GAATTCGGTTGCTGTCGGAGAGAGCAGAAGCAAAGTAGAAAACACAAGTTTCTCTCACAC 60  
ACATTATCTCTTTCTCTATTACCACCACCTCATTTCATAACAGAAACCCACCAAAAAATAAA 120  
AAGAGAGACTTTTTCACCTCTGGGGAGAGAGCTCAAGTTCTAATGGCGAACCTGGTCTTATC 180  
M A N L V L S  
AGAATGTGGTATACGACCTCTCCCAGAAATCTACACAACACCCAGATCCAATTTCCCTCTC 240  
E C G I R P L P R I Y T T P R S N F L S  
CAACAACAACAATTCAGACCATCACTTTCTTCTTCTTACAAAACATCATCATCTCC 300  
N N N K F R P S L S S S S Y K T S S S P  
TCTGTCTTTTGGTCTGAATTCACGAGATGGGTTACAGAGGAATGGGCGTTGAATGTGAG 360  
L S F G L N S R D G F T R N W A L N V S  
CACACCATTAAACGACACCAATATTTGAGGAGTCTCCATTGGAGGAAGATAATAAACAGAG 420  
T P L T T P I F E E S P L E E D N K Q R  
ATTTCGATCCAGGTGCGCCTCTCCGTTCAATTTAGCTGATATTAGAGCAGCTATACCTAA 480  
F D P G A P P P F N L A D I R A A I P K  
GCATTGTGGGTTAAGAATCCATGGAAGTCTTTGAGTTATGTCGTCAGAGACGTCGCTAT 540  
H C W V K N P W K S L S Y V V R D V A I  
CGTCTTTGCATTTGGCTGCTGGAGCTGCTTACCTCAACAATTTGGATTGTTTGGCCTCTCTA 600  
V F A L A A G A A Y L N N W I V W P L Y  
TTGGCTCGCTCAAGGAACCATGTTTGGGCTCTCTTTGTTCTTGGTCATGACTGTGGACA 660  
W L A Q G T M F W A L F V L G H D C G H  
TGGTAGTTTCTCAAATGATCCGAAGTTGAACAGTGTGGTCGGTCACTTCTTTCATTCTCTC 720  
G S F S N D P K L N S V V G H L L H S S  
AATTCTGGTCCCATAACCATGGCTGGAGAATTAGTTCACAGAACTCACCACCAGAACCATGG 780  
I L V P Y H G W R I S H R T H H Q N H G  
ACATGTTGAGAAATGACGAATCTTGGCATCCTATGTCGAGAAAATCTACAATACTTTGGA 840  
H V E N D E S W H P M S E K I Y N T L D  
CAAGCCGACTAGATTCTTTAGATTTACACTGCCTCTCGTGTGCTTGCATACCCCTTTCTA 900  
K P T R F F R F T L P L V M L A Y P F Y  
CTTGTGGGCTCGAAGTCCGGGAAAAAGGTTCTCATTACCATCCAGACAGTGAATGTT 960  
L W A R S P G K K G S H Y H P D S D L F  
CCTCCCTAAAGAGAGAAAGGATGTCCTCACTTCTACTGCTTGTGGACTGCAATGGCTGC 1020  
L P K E R K D V L T S T A C W T A M A A  
TCTGCTTGTTTGCTCAACTTCACAATCGGTCCAATTCAAATGCTCAAACPTTATGGAAT 1080  
L L V C L N F T I G P I Q M L K L Y G I  
TCCTTACTGGATAAAATGTAATGTGGTTGGACTTTGTGACTTACCTGCATCACCATGGTCA 1140  
P Y W I N V M W L D F V T Y L H H H G H  
TGAAGATAAGCTTCCTTGGTACCGTGGCAAGGAGTGGAGTTACCTGAGAGGAGGACTTAC 1200  
E D K L P W Y R G K E W S Y L R G G L T  
AACATTTGGATCGTACTACGGATTGATCAATAACATCCATCATGATATTGGAACATCATGT 1260  
T L D R D Y G L I N N I H H D I G T H V  
GATACATCATCTTTTCCGCAGATCCCACATTTATCATCTAGTAGAAGCAACAGAAGCAGC 1320  
I H H L F P Q I P H Y H L V E A T E A A  
TAAACCAGTATTAGGGAAGTATTACAGGGAGCCTGATAAGTCTGGACCGTTGCCATTTACA 1380  
K P V L G K Y Y R E P D K S G P L P L H  
TTTACTGGAAAATCTAGCGAAAAGTATAAAAGAAGATCATTACGTGAGCGACGAAGGAGA 1440  
L L E I L A K S I K E D H Y V S D E G E  
AGTTGTATACTATAAAGCAGATCCAAATCTCTATGGAGAGGTCAAAGTAAGAGCAGATTG 1500  
V V Y Y K A D P N L Y G E V K V R A D \*  
AAATGAAGCAGGCTTGGAGATTGAAGTTTTTTTCTATTTTCAGACCAGCTGATTTTTTGTCTTA 1560  
CTTGATCAATTTATTGTGTCACCCACCAGAGATTAGTATCTCTGAATACGATCGATCAG 1620  
ATGGAACAACAATTTGTTTGGGATACTGAAGCTATATATACCATACATTGCATT

**Fig. 1.** Nucleotide sequence of the *Arabidopsis* chloroplast  $\omega$ -3 fatty acid desaturase(FAD7) cDNA and the derived amino acid sequence.

상기의 *Arabidopsis*  $\omega$ -3 fatty acid desaturase (*FAD7*) cDNA를 담배에 antisense 방향으로 형질 전환하여 생산된 담배의 생리적 및 분자생물학적인 특성을 검정하였다. Antisense 방향의 *FAD7* DNA를 도입하여 형질전환 담배의 *FAD7* 유전자 발현을 억제시킴으로서 막지질의 불포화도 수준이 낮아졌으며, 그 수준이 낮기는 하나 저온에 대한 감수성이 증가하였다. 한편, 저온과 마찬가지로 수분 stress의 원인이 되는 high salt와 drought 조건을 주어 형질전환 담배의 생리적 활성을 검정한 결과, 0.8 % 이상의 염농도에서 대조구에 비해 형질전환체의 생육은 느려지고 2주일이 지난 후에는 더 이상 생육이 이루어지지 않았다. 또한 2달 정도 pot에서 자란 형질전환체를 일주일동안 물을 주지 않고 생육시키면서 관찰한 결과, 대조구에 비해 형질전환체의 경우는 물을 주지 않은지 2-3일 후부터 현저한 위조증상을 나타내었다. 이러한 형질전환체에서 abscisic acid (ABA)의 생합성이 감소될 수 있는 가능성이 확인되었는데 ABA 의존성transcriptional factor인 ABF4의 활성이 가뭄처리에 의해 감소하였기 때문이다. 반면, 형질전환체의 ABA 함량은 대조구에 비해 차이가 없었는데, 이는 ABF4가 ABA에 의존되지 않는 즉 ABA-independent 활성이 존재할 가능성을 시사하는 것이다. 한편, 형질전환체에 TMV를 접종하였던 결과, 대조식물에서는 전형적인 HR반응이 나타나 매우 작은 반점들이 출현하였으나 형질전환담배에서는 나타난 반점들의 크기가 확대됨은 물론 병발률도 증가하여 *FAD7* 유전자의 발현이 식물의 바이러스 저항성에도 영향함을 확인하였다. 이러한 TMV에 대한 저항성이 jasmonic acid (JA)와 연관이 있는지를 조사하기 위하여 Lipoxygenase 및 PDF 1.2 유전자의 전사활성을 측정된 결과 두 유전자 모두 형질전환 식물에서 그 발현이 감소하였고 발현되는 시간 또한 지연되어 JA와 직접 관련됨을 확인하였다. 뿐만 아니라 wound-inducible protein kinase의 발현도 감소하였고 발현되는 시간도 지연되었다. 본 연구에 의해 창출된 형질전환 담배는 ABA 와 환경스트레스와의 연

계성, 자스몬산과 병원균에 대한 저항성 등을 연구하는 중요한 재료로 이용될 수 있을 것이다.

이상의 결과를 2개의 논문으로 만들기 위하여 만든 manuscript를 다음의 2와 3항에 각각 삽입하였다

## 2. Antisense expression of an *Arabidopsis* *FAD* gene reduces salt/drought tolerance in transgenic tobacco plants

### 1) Abstract

A wound-inducible *Arabidopsis* plastid  $\omega$ -3 fatty acid desaturase (*FAD7*) cDNA was obtained. Transgenic tobacco plants were produced by integration of the antisense *fad7* DNA fragments under the control of a CaMV 35S promoter into the genome. Two transgenic T<sub>1</sub> lines, AsFAD714 and 716, showed strong expression of the antisense *fad7* and reduced amounts of linolenic acid compared with control plants. The two T<sub>1</sub> lines were highly sensitive to dehydration conditions, showing growth retardation on the MS medium in the presence of 250mM NaCl and severe wilting under drought condition. The expression of transcriptional factor gene *abf4* transducing ABA-dependent signal in response to drought stress, was strongly induced in control plants but far less in AsFAD716 line. This suggests that the inhibitory effect of the antisense *fad7* gene expression on the ABF-mediated stress-responsive gene regulation may reduce drought tolerance in the AsFAD716 line. However, no significant difference in the ABA concentration was found between the control and the AsFAD716 line under normal and drought conditions.

## 2) Introduction

The plastid membrane in higher plants contains a high concentration of trienoic fatty acids that are converted from dienoic fatty acids by  $\omega$ -3 fatty acid desaturases. The  $\omega$ -3 fatty acid desaturases have been characterized by the isolation of a series of *Arabidopsis* mutants with altered membrane lipid unsaturation (Browse and Somerville, 1991; Ohlrogge and Browse, 1995). Among them, the *fad7* mutant contained reduced levels of linolenic (18:3) and hexadecatrienoic acids (16:3) in the plastid membrane lipids (Browse et al., 1986). This mutation displayed no apparent effect on the growth and development of the plants, but led to a reduction in the average size and a corresponding increase in the number of chloroplasts in leaves grown at elevated temperatures (McCourt et al., 1987). The *Arabidopsis fad7* gene, which encodes the plastid  $\omega$ -3 fatty acid desaturase, complemented alterations in fatty acid desaturation and the chloroplast copy number of the *fad7* mutant (Iba et al., 1993). In *Arabidopsis*, three loci for the  $\omega$ -3 fatty acid desaturases, microsomal *fad3*, plastidal *fad7* and *fad8*, are responsible for the production of trienoic fatty acids (McConn and Browse, 1996).

Plants grown at low temperature tend to contain a higher proportion of trienoic fatty acids. An increase in the level of trienoic fatty acids is observed during cold acclimation in the membrane lipids of plants so that one of the physiological roles of high trienoic fatty acid content is considered to be an adaptation to low temperature (Somerville and Browse, 1991). The  $\omega$ -3 fatty acid desaturase genes were isolated from various plant species and used to modify the trienoic fatty acid content in the membrane lipids in transgenic

plants. Attempts to find a causal relationship between an increase in the 18:3 content by overexpression of the  $\omega$ -3 fatty acid desaturase genes and cold tolerance have been made (Hamada et al., 1998; Kodama et al., 1994). However, there were no discernible differences between the transgenic plants in which *Arabidopsis* microsomal *fad3* gene is overexpressed and the control plants in terms of the ability to tolerate chilling temperature at 1°C and 5°C (Hamada et al., 1998). An elevated trienoic fatty acid level, as a result of overexpression of the *Arabidopsis* plastidial *fad7* gene, displayed only a minor protective effect against chilling-induced damage in transgenic tobacco plants (Kodama et al., 1998). When the genes encoding plastid  $\omega$ -3 fatty acid desaturase were silenced, on the other hand, the transgenic plants contained a lower level of trienoic acids than wild-type plants and were better able to acclimate to higher temperatures (Murakami et al., 2000).

Other roles of trienoic fatty acids in the survival of plants under stress conditions, especially the role of linolenic acid, have been discussed in the literature. For example, linolenic acid is converted to jasmonic acid (JA) by the octadecanoid pathway (Vick and Zimmer, 1984). Accumulation of JA in response to wounding-induced defensive gene expressions is presumed essential in plant defences against insects and pathogen attacks (Martin et al., 1999; McConn and Browse, 1996; Nishiuchi et al., 1997; Vijayan et al., 1998). There have also been reports on the  $\omega$ -3 fatty acid desaturase gene expression in response to either dehydration or another stress-related phytohormone, abscisic acid. High salt conditions induced the plastidial *fad7* and *fad8* gene expressions in roots of maize (Berberich, 1998). The transcript level of the rapeseed microsomal  $\omega$ -3 fatty acid desaturase gene has been induced by abscisic acid application to

microspore-derived embryos (Zou et al., 1995). Hence, the expression of the  $\omega$ -3 fatty acid desaturase gene appears to be related to various environmental stress responses. However, the function of the  $\omega$ -3 fatty acid desaturase gene regulation in response to environmental stress still remains unclear. Here we demonstrate that compared with wild-type plants, transgenic tobacco plants in which trienoic fatty acid content is reduced by antisense expression of the *Arabidopsis fad7* gene, became significantly more sensitive to dehydration stresses such as drought or high salt conditions. This study shows a novel physiological characteristic of the  $\omega$ -3 fatty acid desaturase gene expression in plants that so far has not been published in the literature. The mechanism involved in the phenotypic expression by the antisense *fad7* gene expression is also discussed.

### 3) Materials and Methods

Plasmid construction: A wound-inducible plastid  $\omega$ -3 fatty acid desaturase (*fad7*) cDNA was obtained by differential screening of an *Arabidopsis* cDNA library in our laboratory. The antisense *fad7* DNA (AsFAD7) was synthesized by polymerase chain reaction using two synthetic primers, left 5' GGGGTACC CCACATCATCATCTCCTCTGT 3' (KpnI restriction site underlined) and right 5' CGCGGATCCGCGTTCTCAGACATAGGATGC 3' (BamHI restriction site underlined) and using the *Arabidopsis fad7* cDNA as a template. The PCR amplified product was digested with BamHI and KpnI to produce a 537 base pair fragment. The fragment was subcloned into pBluescript SK (-), digested with BamHI and SacI, and the AsFAD7 was cloned into the predigested binary vector



pBI 121 to substitute the GUS gene. The resulting plasmid contained the AsFAD7 from nucleotides 258 to 793 (see the Arabidopsis *fad7* gene sequence, GenBank accession no. D26019) in an antisense orientation relative to the promoter sequence.

**Plant transformation:** Tobacco plant (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) was transformed by the leaf-disc method (Horsch et al., 1985) using *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 containing the recombinant plasmid. Individual kanamycin-resistant regenerated shoots were selected, rooted in MS medium without growth regulators (Murashige and Skoog, 1962) and then transferred to soil. T<sub>1</sub> seeds resulting from self-pollination were aseptically germinated in continuous light (2,000 lux) at 26°C on MS medium supplemented with 200 g/ml kanamycin. The kanamycin-resistant T<sub>1</sub> seedlings were subjected to further analysis.

**Fatty acid analysis:** One-week-old tobacco seedlings were ground into a powder under liquid nitrogen and the total lipids were extracted according to the method of Ryyppö et al. (1994). About 100 mg of powder was mixed with 5 ml isopropanol. Then, 5 ml of methanol, 20 ml of chloroform and 45 µl of BHT (5 mg/ml chloroform) were added and the suspension was shaken for 90 min at 4°C. After water-soluble contaminants were removed by Folch wash, the total lipids were fractionated into neutral lipids and phospholipids by silica gel chromatography. The phospholipids were converted to methyl esters of fatty acids by adding 2 ml of methanolic NaOH (0.6 M NaOH in methanol) and neutralized with 2 ml of 0.6 M HCl. The methyl esters of fatty acids were extracted twice with 3 ml of hexane and separated on a gas chromatograph (GC-17B, Shimadzu) equipped with a Rtx-1 column

(Resteck) and a flame ionization detector (Shimadzu). The GC was programmed to equilibrate the column at 145°C for 2 min, raise the column temperature from 145 to 160°C at a speed of 5°C /min, remain at 160°C for 1 min and raise the temperature from 160 to 170°C at a speed of 2 C/min, and then remain at 170°C for 90 min. The injector and detector temperatures were 225°C and 275°C, respectively. Electrolyte leakage (EL) analysis: EL test was performed according to the procedures of Hamada et al. (1998). The third leaves from the apex were excised from 4-week-old tobacco plants grown in soil under continuous light (3,000 lux) at 26 C. Each detached leaf was cut in half and the halves were placed in a test tube. Deionized water (100  $\mu$ l) was added to each test tube and leaf segments were fixed closely to the surface of the test tubes. Samples were cooled to -0.5°C for 30 min and then ice formation was achieved by introducing a small piece of ice into the test tubes. After a 40 min equilibration period at -0.5°C, the bath temperature was reduced by 0.5°C decrements every 30 min. The samples were withdrawn from the bath at specified temperatures and placed on ice. Samples were thawed overnight on ice and then incubated with 5 ml of deionized water at 25°C for 1 h. The EL from the frozen samples was measured by using a conductivity meter and the percentages of EL from frozen leaves at the specified temperatures were calculated by the equation of Hamada et al. (1998).

Plant growth and stress tolerance analysis: Wild-type and transgenic seeds were germinated on Murashige and Skoog (MS) agar plates with or without 200 mg/L kanamycin. The kanamycin-resistant T<sub>1</sub> seedlings and the wild-type seedlings were grown on MS agar plates at 25°C under continuous illumination by white

fluorescent lamps at an intensity of 2,000 lux and then transplanted to soil. For cold treatment, the 2-month-old plants were exposed to 0°C for 2 days in a growth chamber under continuous light (2,000 lux). For salt treatment, 10-day-old seedlings were transferred to MS agar plates, containing 50, 100, 150, 200, 250 and 300 mM NaCl and then grown for 2 weeks at 25°C. For drought treatment, water was withheld for 1 week from 3-month-old plants grown in soil in a greenhouse. In some cases, fully expanded leaves of the 3-month-old plants grown in the growth chamber (25°C) were detached and placed on petri dishes. The petioles were then wrapped with wet or dry cotton for approximately 3 hrs at 25°C. After drought treatment, physiological parameters such as leaf temperature and stomatal resistance were measured. Leaf temperature was measured using an infra-red thermometer (Model 510, Everest Interscience, USA) with a 15 field of view. Stomatal resistance and transpiration were measured with a steady state porometer (LI-1600, LI-COR, USA) clamped onto the leaves until a steady state was obtained.

RNA blot analysis: The leaf tissues were ground to a fine powder under liquid nitrogen using mortar and pestle. The total cellular RNA was then extracted by standard procedure (Sambrook et al., 1989). Ten micrograms of total RNA were separated on a 1.2 % formaldehyde/ agarose gel and transferred onto a nylon membrane. Prehybridization was performed in 3X standard saline citrate, 0.5 % (w/v) SDS, 0.5 % (w/v) skim milk powder, 1 mM EDTA, 100 g/ml of salmon sperm DNA and 1 g/ml of polyadenylic acid for 2 hrs at 68 C. Hybridization was performed for 20 hrs at 68°C in a prehybridization solution supplemented with 10 % dextran sulfate and the strand-specific RNA probe. To prepare the specific RNA probe for the

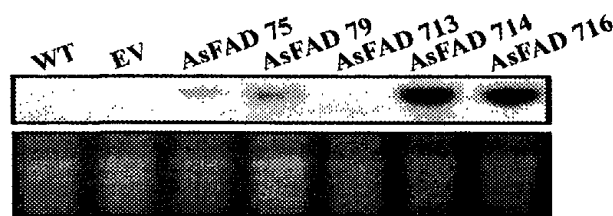
Northern hybridization study, the *Arabidopsis fad7* cDNA in pBluescript SK(-) was transcribed in vitro using T7 RNA polymerase following the manufacturer's instruction (Stratagene).

Determination of abscisic acid content: The 1.0 g of leaf tissues were frozen and ground under liquid nitrogen. The resulting powder was suspended in a solution of acetone and 50 mM citric acid (70:30, v/v). The organic solvent was allowed to evaporate overnight at room temperature. The resulting aqueous solutions were extracted with 3 × 7 ml of diethyl ether. The pooled extracts were then loaded onto solid-phase extraction cartridge (Waters, USA) containing 360 mg of the sorbent aminopropyl. After loading, the cartridges were washed with 10 ml of a solvent mixture of trichloromethane : 2-propanol (2:1, v/v). Bound ABA was eluted with 10 ml of diethyl ether: acetic acid (98:2, v/v). After evaporation of the solvents, ABA was resolved in a solution of 50mM sodium phosphate (pH 6.4) and 0.25 % tween 20. ABA content was then determined using Phytodetecck ABA Kit (Competitive ELISA, AGDIA Co., USA).

#### 4) Results

Transgenic tobacco plants expressing the antisense *Arabidopsis fad7* gene: A 537 bp antisense *fad7* DNA fragment was amplified from an *Arabidopsis* plastid  $\omega$ -3 fatty acid desaturase cDNA in the N-terminal coding region by PCR. The sequence shows approximately 84 % homology with the N-terminal coding region of the tobacco *fad7* mRNA (Hamada et al., 1998). The gene construct driven by the cauliflower mosaic virus 35S promoter was introduced into

tobacco plants and transgenic T<sub>0</sub> plants expressing the selectable marker gene (NPTII) were regenerated. Several different T<sub>1</sub> families, obtained from the kanamycin-resistant T<sub>0</sub> plants, were examined for inheritable genetic transmission of the T-DNA. The T-DNA inheritance was scored by screening T<sub>1</sub> seeds on media containing 200  $\mu$ g/ml kanamycin. Five lines out of the T<sub>1</sub> plants were segregated into 3:1 and designated as AsFAD75, 79, 713, 714 and 716. Integration of a T-DNA in the genome of the transgenic plants was confirmed by PCR for NPT II gene detection and by a genomic Southern blot analysis (data not shown). The expression levels of the antisense *fad7* gene in the leaves of T<sub>1</sub> plants were also analyzed by Northern blot analysis. As shown in Fig. 1, the antisense gene expressions were variable among T<sub>1</sub> lines. Strong transcriptional activities of the antisense gene were observed in the AsFAD714 and 716 plants. Compared with the two T<sub>1</sub> lines, the AsFAD79 and 75 lines showed less transcriptional activities. Wild type plant (designated as WT), the empty vector line (designated as EV, a line of the tobacco plant transformed



**Fig. 1.** Messenger RNA levels of five transgenic tobacco (T<sub>1</sub>) lines compared with the untransformed wild type (WT) and empty vector (EV) lines. The blot was probed with the strand-specific RNA. The RNA probe was transcribed from the *Arabidopsis fad7* cDNA in pBluescript SK(-) using the T7 RNA polymerase.

with the empty vector pBI121 from which the GUS gene is eliminated), and the AsFAD713 did not show any transcriptional activities.

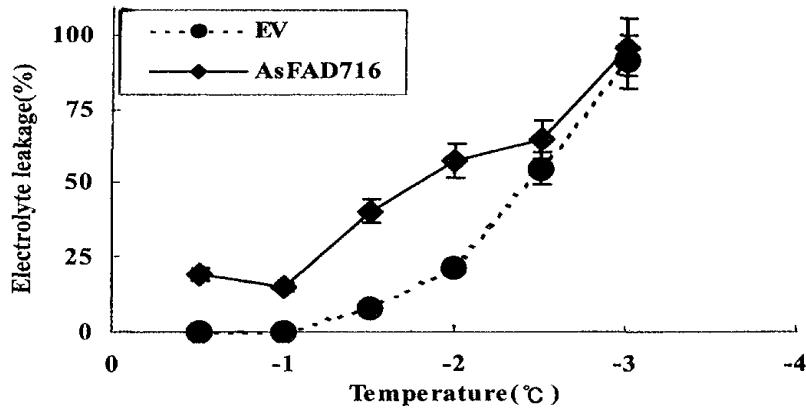
Fatty acid composition in leaves of the T<sub>1</sub> lines: The effects of antisense *fad7* gene expression on lipid composition in the seedlings of the T<sub>1</sub> lines were measured (Table 1). The trienoic fatty acid content of tobacco leaves is generally higher than 40% (Polashock et al., 1992). However, our result indicated that the fatty acids present in tobacco young seedlings were less than 40%. As expected from the results of Northern blot analysis, the EV and the AsFAD713 line showed no significant changes in fatty acid composition. In contrast, the antisense *fad7* gene expression resulted in a significantly reduced accumulation of trienoic fatty acid in the AsFAD714 and 716 lines. The two T<sub>1</sub> lines showed similar responses to various environmental stresses in the preliminary experiment and therefore only AsFAD716 line was used for further study.

**Table 1.** Fatty acid composition in the tobacco seedlings from control and transgenic AsFAD7 plants grown at 25°C. The kanamycin-resistant T<sub>1</sub> seedlings grown on MS medium were transferred to soil and cultured at 25°C with 16 h light/8 h dark cycles. EV, a line of the tobacco transformed with the empty vector (pBI 121 from which the GUS gene is eliminated).

Fatty Acid	EV	AsFAD713	AsFAD 714	AsFAD 716
16:0	33.3 ± 0.5	34.2 ± 0.5	36.1 ± 1.1	35.4 ± 0.6
16:1	0.2 ± 0.2	- <sup>b</sup>	0.7 ± 0.5	-
18:0	8.7 ± 0.3	8.3 ± 0.2	12.0 ± 1.3	8.8 ± 0.4
18:1	1.1 ± 0.3	1.4 ± 0.8	0.9 ± 0.2	1.3 ± 0.5
18:2	26.4 ± 0.5	25.3 ± 0.4	30.5 ± 0.5	31.1 ± 0.1
18:3	30.3 ± 0.1	30.8 ± 0.5	19.8 ± 0.2	23.4 ± 0.3

<sup>a</sup>The values are mol SD(n=5). <sup>b</sup>-, Not detected

Responses of the AsFAD716 line to low temperature: Transgenic tobacco plants that contained an elevated level of trienoic fatty acids were produced by overexpression of an *Arabidopsis* plastidal fatty acid desaturase (*fad7*) gene (Kodama et al., 1994). The transgenic tobacco seedlings showed a minor protective effect against chilling-induced damage (Kodama et al., 1994; Kodama et al., 1995). We have investigated, in the present study, whether the cold tolerance would be reduced in the transgenic tobacco AsFAD716 line. However, no difference was observed in the levels of cold damage between the transgenic and the control plants grown in a growth chamber at 0°C. It was determined that the extent of chilling-induced damage may not have appeared readily at the whole plant level, and therefore electrolyte leakage from leaf tissues of the AsFAD716 line was measured. The percentages of electrolyte leakage from low temperature-treated leaf tissues at specified temperatures are shown in Fig. 2. In the EV line, electrolyte leakage from the leaf tissues increased substantially as the incubation temperature decreased from -1°C to -3°C, and the temperature at which 50 % electrolyte leakage occurred was approximately 2.4°C. In the transgenic AsFAD716 line, however, the electrolyte leakage increased considerably from -1°C, and the temperature at which 50 % electrolyte leakage occurred was about -1.8 C. These results suggest that a decrease in 18:3 content in the membrane lipids by antisense expression of the *fad7* gene reduced cold tolerance in the vegetative tissues of the AsFAD716 line, although the degree of reduction was low. This result coincides well with the results of Kodama et al. (1994).



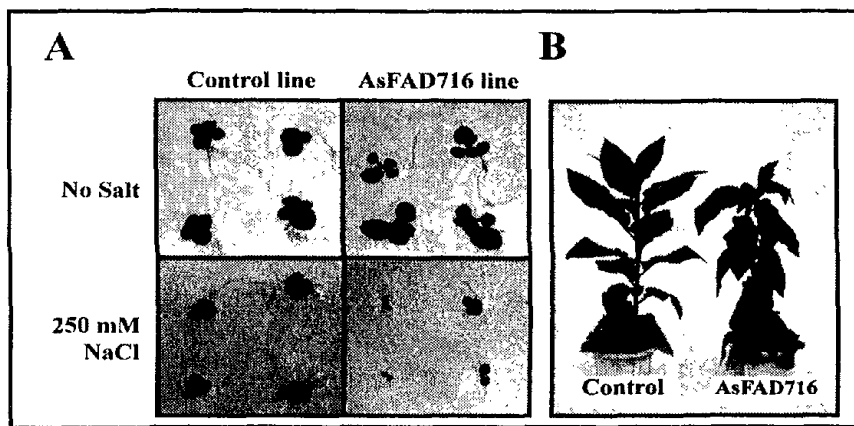
**Fig. 2.** Electrolyte leakages (EL) of the leaves of the AsFAD716 (◆) and EV (●) plants. The third leaves were excised from 4-week-old tobacco plants grown in soil under 16h light/8h dark cycle (2,000 lux) at 26°C. Each detached leaf was cut in half and the halves were placed in test tubes. Deionized water (100  $\mu\text{l}$ ) was added to each test tube and leaf segments were fixed closely to the surface of the test tubes. EL was measured by the method of Hamada et al.<sup>8)</sup> Vertical lines indicate SD (n = 4).

Responses of the AsFAD716 line to high salt and drought: The AsFAD716 line, on the other hand, was significantly more sensitive to dehydration stresses, such as drought and high salt conditions, than to low temperature stress (Fig. 3). The AsFAD716 line did not grow well on the MS medium containing 250 mM NaCl, while the growth of the EV was only slightly inhibited on the same medium. Compared with WT plants, the leaves of the AsFAD716 line were severely wilted under drought condition. Under drought condition, the transpiration rate of the AsFAD716 line decreased down to about one fourth the level of that of the EV line (Table 2). Leaf temperature of the AsFAD716 line under drought condition was also higher than that of the control plants (Table 2). These results indicate that antisense expression of the *fad7* gene may well make the AsFAD716 line more



sensitive to dehydration condition.

Gene expressions in the control and AsFAD716 line under drought condition: Drought and high salinity cause plants to produce high levels of ABA, and the exogenous application of ABA also induces a number of genes that respond to dehydration stress, suggesting that ABA may play an important role in adaptive



**Fig. 3.** High salt (A) and drought (B) sensitivity of the transgenic tobacco line AsFAD716 under stress condition. For salt-stress treatment, 10-day-old seedlings were transferred to MS agar plates containing 250 mM NaCl and then incubated for 2 weeks at 25C. For drought-stress treatment, the 3-month-old plants were grown without water for 1 week.

**Table 2.** Transpiration rate and leaf temperature in control and transgenic tobacco plants under drought condition. Transpiration and leaf temperature were measured with a porometer and infra-red thermometer, respectively.

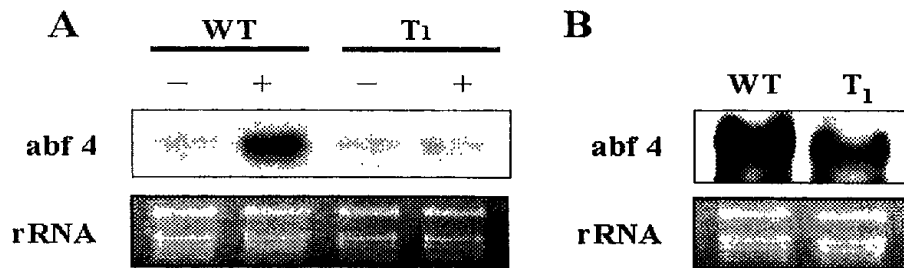
	Watered		Drought	
	EV		EV	AsFAD716
Transpiration ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{s}$ )	40.5 $\pm$ 2.4		11.1 $\pm$ 3.5	2.5 $\pm$ 0.2
Leaf temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	30.8 $\pm$ 0.8		34.7 $\pm$ 1.2	40.2 $\pm$ 0.4

responses involving dehydration-induced gene expression (Bray, 1997; Thomashow, 1999). Several reports have described genes that are induced by dehydration but that do not respond to exogenous ABA treatment, and therefore it has been suggested that separate ABA-independent and ABA-dependent signal transduction cascades exist (Bray, 1997; Thomashow, 1999). Recently, a transcription system that controls ABA-independent gene expression in response to dehydration has been identified (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000). This system includes the DRE/CRT (dehydration-responsive element/C-repeat) cis-acting element and its DNA-binding protein, DREB/CBF (DRE-binding protein/C-repeat binding factor). DREB/CBF controls the expression of various genes involved in stress tolerance and contains two subclasses. DREB1/CBF (Jaglo-Ottosen et al., 1998; Liu et al., 1998) and DREB2 (Liu et al., 1998) are induced by cold and dehydration, respectively. However, a Northern blot analysis showed only a basal level of expression signal of the *dreb2A* gene both in the control and AsFAD716 line under drought condition (data not shown).

Many ABA-responsive genes contain potential ABA-responsive elements (G/ or C/ABREs) in their promoter region (Busk and Pages, 1998). Recently, a family of ABRE binding factor (ABFs) genes were isolated from young *Arabidopsis* plants under stress condition, and among them, *abf4* gene expression appears to be induced specifically by drought stress (Choi et al., 2000). Another kind of ABRE that do not belong to G/ or C/ABREs has also been characterized. Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki (1993) have shown that the expression of the *rd22* gene is induced by the application of exogenous ABA in *Arabidopsis*. Since the promoter region of the *rd22* does not contain a typical ABRE consensus sequence, it was suggested that the gene would be regulated by other than the

ABRE-bZIP protein system under dehydration condition. It was also demonstrated that MYC and MYB proteins function as transcriptional activators in the dehydration- and ABA-inducible expression of the *rd22* gene (Uro et al., 1993; Abe et al., 1997). However, the *myb2* gene expression was induced neither in the control nor in the AsFAD716 plants under drought condition in the present experiment (data not shown).

On the other hand, the expression of the *abf4* gene was strongly induced in the control plants (EV line) but not induced in the AsFAD716 line in response to drought (Fig. 4) when total RNAs were extracted from the detached tobacco leaves wrapped with wet or dry cotton, as described in Materials and Methods. The *abf4* gene expression was also induced in the ASFAD716 line although the induction level was much lower than in the control plants when total RNAs were extracted from the plants grown in soil without water (Fig. 4). Therefore, antisense



**Fig. 4.** Expressions of the *abf4* gene in the wild type and AsFAD716 plants. A: The total RNAs were extracted from expanded leaves of the 3-month-old plants that had been detached, placed in petri-dishes, and whose petioles were wrapped with wet (-) or dry (+) cotton for approximately 3 hrs at 25°C. B: The total RNAs were extracted from the leaves of 3-month-old plants grown in soil without water for 1 week

expression of the *fad7* gene may have affected the ABRE/ABF dependent gene regulation in the transgenic plants.

The endogenous ABA levels were determined in the wild type and AsFAD716 plants, both before and after drought treatment. Figure 5 indicate that ABA levels in the AsFAD716 reached similar levels to the wild type plants under normal and drought conditions. No significant difference in the ABA content between the wild type and AsFAD716 line was found.

## 5) Discussion

An elevated trienoic fatty acid level, as a result of overexpression of the *Arabidopsis fad7*  $\omega$ -3 desaturase gene, plays a minor protective role against chilling-induced damage for transgenic tobacco plants (Kodama et al., 1994). Our results also suggest that a decrease in 18:3 content in the membrane lipids by antisense expression of the *fad7* gene reduced cold tolerance in the vegetative tissues of the AsFAD716 line, although the reduction level was low. While Hamada et al. (1998) failed to induce chilling tolerance by overexpression of microsomal  $\omega$ -3 fatty acid desaturase (*fad3*) gene in transgenic tobacco plants. The *Arabidopsis* triple mutant, *fad3fad7fad8*, which lacks trienoic fatty acids in all membrane, could grow at temperatures as low as 6°C with reduced photosynthetic capacity (MaConn and Browse, 1996). Therefore, it has been suggested that trienoic fatty acids do not play a critical role in low temperature acclimation (Murakami et al., 2000).

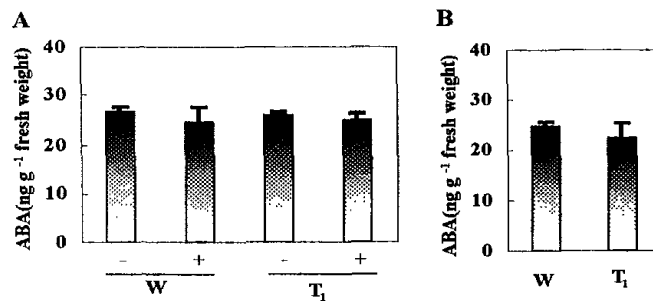
On the other hand, the transgenic plants were significantly more sensitive to dehydration stress, such as drought and high salt conditions, than to low

temperature stress (Fig. 3). Growth of the transgenic tobacco plants was inhibited and eventually ceased on the MS medium in the presence of 250 mM NaCl, while the growth of the control (EV line) plants continued to grow on the same medium, although minor growth retardation was observed. Wilting, reduction in the transpiration rate, and higher leaf temperature in the transgenic plants under drought condition indicate that antisense expression of the *fad7* gene may well make the AsFAD716 line more stress-sensitive.

Studies to improve plant tolerance to drought and high salt conditions have to date achieved only limited success due to the genetic complexity of stress responses (Cushman and Bohnert, 2000). Plants respond to dehydration and low temperature with a number of physiological and developmental changes. Many gene expressions are induced by both dehydration and cold, but some respond either only to dehydration, or only to cold, and several reports have described genes that are induced by dehydration and low temperature but that do not respond to exogenous ABA treatment (Bray, 1997; Ingram and Bartels, 1996; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Thomashow, 1999). Antisense expression of the *fad7* gene reduced the trienoic fatty acid contents in the AsFAD716 plants and this may change the metabolic regulation of the transgenic plants related to drought tolerance. The DREB2A is a major transcriptional factor that controls ABA-independent gene expression in response to dehydration (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000). A Northern blot using the *dreb2A* gene showed only a basal level of expression signal, both in the control and AsFAD716 line under normal and drought conditions. This result may suggest that changes in the trienoic fatty acid content by the antisense expression of the *fad7* gene in the AsFAD716 do not affect the DREB2A dependent gene expressions.

ABA mediates responses to various adverse environmental stresses such as drought and high salinity (Bray, 1997). An ABA-responsive element, bZIP transcription factors (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1993) or ABRE binding factors (ABFs; Choi et al., 2000) may play important roles in ABA-responsive gene expression. On the other hand, MYB and MYC recognition sequences were essential for the ABA- and drought-responsive expression of the *rd22* gene (Urao et al., 1993). ABA-inducible MYB and MYC proteins function cooperatively in the ABA-dependent expression of the *rd22* gene (Abe et al., 1977). *Myb2* and *abf4* genes were selected and their expressions were demonstrated by Northern blot analysis to confirm whether the antisense *fad7* gene expression affects the ABA-dependent gene expression in the AsFAD716 plants. The *abf4* gene expression was markedly induced, both in the control and AsFAD716 plants, but the accumulation of the gene transcript in the transgenic AsFAD716 was much lower than in the control plants (Fig. 4). The *myb2* gene expression, however, was induced neither in the AsFAD716 nor in the control plants. These results suggest that the reduction in the trienoic fatty acid level by antisense expression of the *fad7* gene may affect the ABRE/ABF dependent gene expressions in the transgenic plants. Since the *abf4* gene expression was markedly inhibited in the AsFAD716 line by the antisense *fad7* gene and the plants were severely wilted under drought condition, ABRE/ABF may be the main regulatory system operating in drought condition. Despite the fact that the *abf4* gene expression was inhibited by the antisense *fad7* gene expression, the ABA content of the AsFAD716 line was not markedly different from that of the control plants (Fig. 5). This result suggests that the *abf4* gene expression itself

may not be regulated by ABA. Although the *fad7* gene expression was induced by exogenous ABA treatment, no known ABA-responsive elements have been found in the promoter region of the gene. Therefore, changes in the membrane fluidity by the antisense *fad7* gene expression may have an inhibitory effect on the upstream of the ABRE/ABF-dependent signal transduction pathway leading to the drought sensitiveness of the AsFAD716 line. Further studies on the *abf4* gene regulation, and on the signals inducing drought sensitiveness, are clearly warranted.



**Fig. 5.** Abscisic acid (ABA) concentrations in the wild type (WT) and transgenic tobacco AsFAD716 line (T<sub>1</sub>). A: The ABA was extracted from expanded leaves of the 3-month-old plants that had been detached, placed in petri-dishes, and whose petioles were wrapped with wet (-) or dry (+) cotton for approximately 3 hrs at 25 C. B: The ABA was extracted from the leaves of 3-month-old plants grown in soil without water for 1 week.

## 6) References

Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., and Shinozaki, K. (1997) Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in

- drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9, 1859-1868.
- Berberich, T., Harada, M., Sugawara, K., Kodama, H., Iba, K., and Kusano (1998) Two maize genes encoding  $\omega$ -3 fatty acid desaturase and their differential expression to temperature. *Plant Mol. Biol.* 36, 297-306.
- Bray, E. A. (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant. Sci.* 2, 48-54.
- Browse, J., McCourt, S. L., and Somerville, C. (1986) A mutant of *Arabidopsis* deficient in C18:3 and C16:3 leaf lipids. *Plant Physiol.* 81, 859-864.
- Browse, J. and Somerville, C. (1991) Glycerolipid synthesis: biochemistry and regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 467-506.
- Busk, P. K. and Pages, M. (1998) Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol. Biol.* 37, 425-435.
- Choi, H. I., Hong, J. H., Ha, J. O., Kang, J. Y., and Kim, S. Y. (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J. Biol. Chem.* 275, 1723-1730.
- Cushman, J. C. and Bohnert, H. J. (2000) Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 117-124.
- Hamada, T., Kodama, H., Takeshita, K., Utsumi, H., and Iba, K. (1998) Characterization of transgenic tobacco with an increased  $\alpha$ -linolenic acid level. *Plant Physiol.* 118, 591-598.
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffman, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G., and Fraley, R. T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229-1231.
- Iba, K., Gibson, S., Nishiuchi, T., Nishimura, M., Arondel, V., Hugly, S., and Somerville, C. (1993) A gene encoding a chloroplast  $\omega$ -3 fatty acid desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy number



- of the *fad7* mutant of *Arabidopsis thaliana*. J. Biol. Chem. 268, 24099-24105.
- Ingram, J. and Bartels, D. (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 47, 377-403.
- 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.
- Kodama, H., Hamada, T., Horiguchi, G., Nishimura, M., and Iba, K. (1994) Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast  $\omega$ -3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco. Plant Physiol. 105, 601-605.
- Kodama, H., Horiguchi, G., Nishiuchi, T., Nishimura, M., and Iba, K. (1995) Fatty acid desaturation during chilling acclimation is one of the factors involved in conferring low-temperature tolerance to young tobacco leaves. Plant Physiol. 107, 1177-1185.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki K., and Shinozaki, K. (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. Plant Cell 10, 1391-1406.
- Martin, M., León, J., Dammann, C., Albar, J. P., Griffiths, G., and Sánchez-Serrano, J. J. (1999) Antisense-mediated depletion of potato leaf  $\omega$ -3 fatty acid desaturase lowers linolenic acid content and reduces gene activation in response to wounding. Eur. J. Biochem. 262, 283-290.
- McConn, M. and Browse, J. (1996) The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant. Plant Cell 8, 403-416.

- McCourt, P., Kunst, L., Browse, J., and Somerville, C. R. (1987) The effect of reduced amounts of lipid unsaturation on chloroplast ultrastructure and photosynthesis in a mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 84, 353-360.
- Murakami, Y., Tsuyama, M., Kobayashi, Y., Kodama, H., and Iba, K. (2000) Trienoic fatty acids and plant tolerance of high temperature. *Science* 287, 476-479.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15, 473-497.
- Nishiuchi, T., Hamada, T., Kodama, H., and Iba, K. (1977) Wounding changes the spatial expression pattern of the *Arabidopsis* plastid  $\omega$ -3 fatty acid desaturase gene (*FAD7*) through different signal transduction pathways. *Plant Cell* 9, 1701-1712.
- Ohlrogge, J. and Browse, J. (1995) Lipid biosynthesis. *Plant Cell* 7, 957-970.
- Polashock, J. J., Chin, C. K., and Martin, C. E. (1992) Expression of the yeast  $\Delta$ -9 fatty acid desaturase in *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol.* 100, 894-901.
- Ryyppö, A., Vapavuori, E. M., Rikala, R., and Sutinen, M. L. (1994) Fatty acid composition of microsomal phospholipids and H-ATPase activity in the roots of Scots pine seedlings grown at different root temperatures during flushing. *J. Exp. Bot.* 45, 1533-1539.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning : A Laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 132-162.
- Shinozaki, S. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 115, 327-334.

- Shinozaki, S. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 3, 217-223.
- Somerville, C. and Browse, J. (1991) Plant lipids: Metabolism, mutants, and membranes. *Science* 252, 80-87.
- Thomashow, M. F. (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 50, 571-599.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S., and Shinozaki, K. (1993) An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product bind to the MYB recognition sequence. *Plant Cell* 5, 1529-1539.
- Vick, B. A. and Zimmerman, D. C. (1984) Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiol* 75, 458-461.
- Vijayan, M., Shockey, J., Levesque, C. A., Cook, R. J., and Browse, J. (1998) A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7209- 7214.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1993) The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of *rd22*, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 238, 17-25.
- Zou, J., Abrams, G. D., Barton, D. L., Taylor, D. C., Pomeroy, M. K., and Abrams, S. R. (1995) Induction of lipid and oleosin biosynthesis by (+)-abscisic acid and its metabolites in micropore-derived embryos of *Brassica napus* L. cv Reston. *Plant Physiol.* 108, 563-571

### 3. Antisense expression of an *Arabidopsis FAD* gene enhances the necrotic lesion formation by TMV infection in transgenic tobacco plants

#### 1) Abstract

Expression of a wound-inducible plastid  $\omega$ -3 fatty acid desaturase (*FAD7*) gene was induced by tobacco mosaic virus (TMV) infection on tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) carrying the *N* resistance gene. Necrotic lesions caused by TMV infection developed much earlier and were larger with brown halos in the transgenic tobacco line AsFAD716 expressing antisense *FAD7*. The linolenic acid content was reduced in the antisense *FAD7* plants. Induction of lipoxygenase (LOX) and defensin (PDF1.2) gene transcripts by TMV infection were delayed in the AsFAD716 line compared with wild type plants. Expression of the wound-inducible mitogen-activated protein kinase (*WIPK*) gene was also retarded at the mRNA and protein levels in the AsFAD716 line.

#### 2) Results and Discussion

In higher plants, the chloroplast membrane lipids contain a high proportion of trienoic fatty acids. The conversion of dienoic to trienoic fatty acids is catalyzed by  $\omega$ -3 fatty acid desaturase (FAD) (Somerville and Browse 1991). Two genes, *FAD7* and *FAD8*, have been described encoding two distinct chloroplast  $\omega$ -3 fatty acid desaturase enzymes in *Arabidopsis* (Browse et al. 1986; McConn et al. 1994). One of the proposed roles for the trienoic fatty acids, especially linolenic acid (18:3), is a precursor for fatty acid-derived signaling molecules, such as jasmonic acid (JA) and methyl JA (MeJA) (Farmer 1994; McConn and Browse

1996). Linolenic acid is released in response to wounding and is converted to JA by activation of the octadecanoid pathway (Creelman et al. 1992). JA is a naturally occurring regulator involved in plant development and response to external stimulus such as wounding and pathogen attack. Several reports suggest that the linolenic acid for JA synthesis is derived from plastid membranes (Blée and Joyard 1996; Bowsher et al. 1992; Rustérucci et al. 1999; Vick and Zimmerman 1984). Thus, the expression of the plastid *FAD7* gene may be involved in JA biosynthesis (Nishiuchi and Iba 1998).

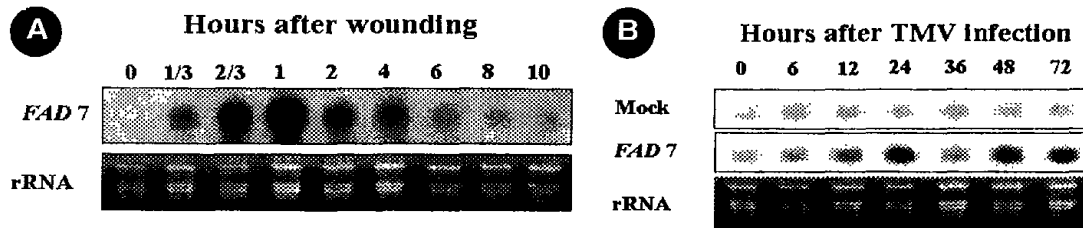
Wound-induced accumulation of JA modulates the expression of many genes including the *FAD7* gene. The *FAD7* gene promoter is activated by wounding and also by the application of MeJA (Nishiuchi et al. 1997). Parsely *FAD7* mRNA accumulated rapidly in elicitor-treated cultured cells and this accumulation was accompanied by an increase in the content of 18:3. Also the gene transcripts markedly accumulate around fungal infection sites (Kirsch et al. 1997).

The *Arabidopsis* *fad3 fad7 fad8* triple mutant contained negligible levels of trienoic fatty acids and was male sterile under normal conditions (McConn and Browse 1996). Exogenous applications of linolenic acid (18:3) or JA to the triple mutant restored fertility, indicating that 18:3 is necessary for normal pollen development. Application of exogenous MeJA substantially complemented the triple mutant plants, reducing the incidence of fungal disease to a level close to that of wild-type controls (Vijayan et al. 1998). Antisense-mediated depletion of potato leaf  $\omega$ -3 fatty acid desaturase (*FAD7*) lowered linolenic acid and JA contents, and reduced wound-inducible gene activation (Martin et al. 1999). In short, the *FAD7* gene expression appears to be closely related with jasmonate

synthesis, and that in turn influences resistance to fungal pathogens.

We find rapid induction of a *FAD7* transcript upon wounding of *Arabidopsis thaliana* (ecotype WS-0). Transcript levels reached a maximum level after 1 h post wounding and thereafter the gene expression was progressively reduced up to 6 h (Fig. 1A). The *FAD7* gene was isolated by differential screening of a cDNA library constructed in our laboratory from plant tissue harvested 1 h after wounding (Kim et al. 1994; Iba et al. 1993). The rapid induction of expression confirmed findings of Nishiuchi et al. (1997) although they reported maximum level of transcript accumulations 4 h after wounding. This difference in timing may be due to the different methods employed for wounding.

Fully expanded leaves of 10-week-old tobacco plants cv. Xanthi were infected with TMV strain U1, at a concentration of 1  $\mu$ g/ml in 50 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing carborundum, developed lesions typical of the hypersensitive response. We found that *FAD7* gene transcripts increased in level between 12 and 72 h after infection (Fig. 1B). Repeated experiments confirmed that the most consistent and greatest activation occurred after 48 h. However, no increase in *FAD7* transcript accumulation above the nontreated tissues was shown in the control (mock treatment using the buffer containing carborundum, Fig. 1B). As shown in Fig. 1A, expected damage by carborundum was negligible from 6 h after wounding. The *FAD7* transcripts often increased in level between 12 and 24 h, declined at 36 h, and then increased again at 48 and 72 h after infection (Fig. 1B). At present we cannot explain the mechanism causing this biphasic gene expression pattern.

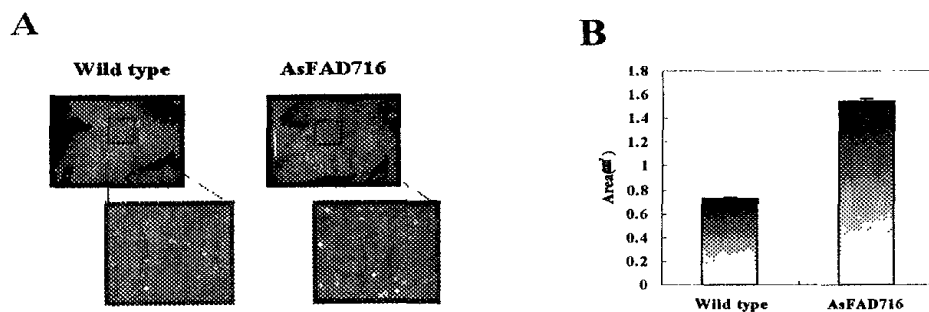


**Fig. 1.** Expression kinetics of a plastid  $\omega$ -3 fatty acid desaturase (*FAD7*) gene in response to wounding (A) or TMV infection (B). A: Ten  $\mu\text{g}$  of total cellular RNA isolated from wounded tissues of *Arabidopsis thaliana* (ecotype WS-O) at the indicated time points after wounding were separated on 1.2 % formaldehyde/agarose gel and transferred to a nylon membrane. The blot was probed with the *Arabidopsis* *FAD7* cDNA clone (Kim et al. 1994) and washed at high stringency. B: Ten  $\mu\text{g}$  of total cellular RNA was isolated from the tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) of 10 week-old plant at indicated time points after infection with TMV. After separation on a 1.2 % formaldehyde/agarose gel and transfer to a nylon membrane, the blot was probed with the *Arabidopsis* *FAD7* cDNA clone and washed at low stringency.

To investigate the role of the *FAD7* gene expression in plant responses to TMV infection, transgenic tobacco line AsFAD716 ( $T_1$ ) was generated by integration of the antisense *FAD7* gene driven by CaMV 35S promoter into the genome. The  $T_1$  line showed strong expression of the antisense *FAD7* transcript and approximately 20 % reduction of the linolenic acid (18:3) content compared with wild type tobacco. This findings agreed with lowered linolenic acid and jasmonate contents observed in potato leaves expressing antisense  $\omega$ -3 fatty acid desaturase (Martin et al. 1999). Our tobacco  $T_1$  line was more sensitive than wild type to dehydration, with growth retardation on MS medium (Murashige and Skoog, 1962) in the presence of 250mM NaCl and severe wilting under drought condition (unpublished data). When the  $T_1$  line was infected with TMV, necrotic lesions appeared much earlier in the  $T_1$  line than in the wild type

tobacco. As the lesion developed, the size and shape of the lesions on the T<sub>1</sub> line differed from those of the wild type. The T<sub>1</sub> line developed larger necrotic lesions (1.55mm<sup>2</sup>) with a brown halo compared with the typical small necrotic lesions (0.73 mm<sup>2</sup>) in the wild type plants (Fig. 2A and B). The average lesion area produced by TMV is correlated with TMV susceptibility or resistance (Enyedi et al. 1992). Therefore, we suggest that the reduction of linolenic acid content by antisense *FAD7* gene expression increases susceptibility of the T<sub>1</sub> line to TMV infection.

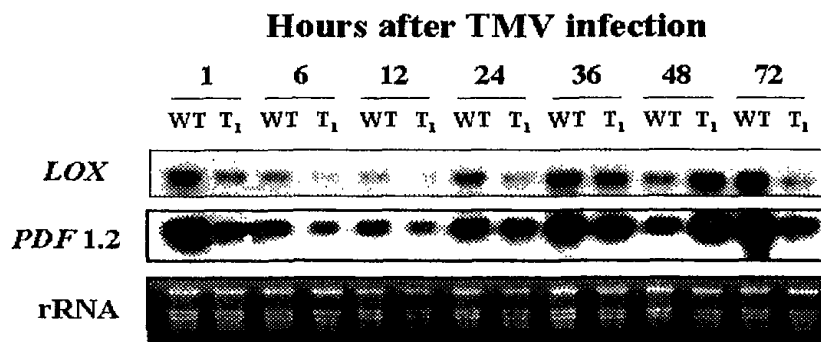
We used analysis of transcript accumulation of genes, LOX and PDF1.2 associated with jasmonic acid to further explore the changes in the plant responses caused by antisense expression of *FAD7*. Lipoxygenase (LOX) mediates the initial step in the conversion of linoleic acid to jasmonic acid (Creelman et al. 1992). The defensin gene *PDF1.2* of *Arabidopsis*, encoding a protein with



**Fig. 2.** A. Necrotic lesions formed on the leaves of the wild type and the transgenic AsFAD716 plants after inoculation with TMV. The upper, fully expanded healthy leaves of 10 week-old tobacco were inoculated using carborundum suspensions. Inoculated plants were incubated at 24°C and the leaves were photographed at 4 days. B. Area of TMV-induced lesions 4 days after inoculation of wild type and antisense mutant AsFAD716. Each bar is the mean of at least 50 lesion measurements ( $\pm$  SE).



antifungal activity, is strongly induced by pathogen challenge and methyl jasmonate, but not by salicylic acid (Penninckx et al. 1996). Accumulation of transcripts for *LOX* and *PDF1.2* gene was reduced in level and delayed in the tobacco T<sub>1</sub> line compared with wild type plants (Fig. 3). Similar to the result of *FAD7* gene expression (Fig. 1B), both genes showed biphasic expression pattern by TMV infection. For example, the *LOX* transcripts increased in level between 24 and 36 h, declined at 48 h, and then increased again at 72 h after infection in wild type plant (WT). In the case of the T<sub>1</sub> line (T<sub>1</sub>), the transcript increased between 36 and 48 h and then declined at 72 h. Strong expression of both *LOX* and *PDF1.2* genes was observed at 1 h in the wild type plants, as an expected response to the carborumdum-mediated wounding.

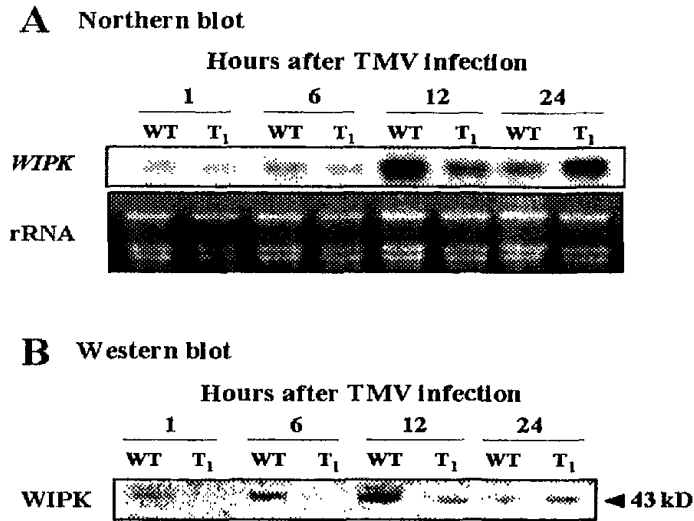


**Fig. 3.** Expression kinetics of the lipoxygenase (*LOX*) and defensin (*PDF1.2*) genes in the TMV-infected wild type (WT) and transgenic AsFAD716 (T<sub>1</sub>) tobacco plants. Ten  $\mu$ g of total cellular RNA isolated from leaves of 10 week-old plant at the indicated time points after infection with TMV were separated on 1.2 % formaldehyde/agarose gel and transferred to a nylon membrane. The blots were probed with probes prepared from the maize lipoxygenase (*LOX*) (kim et al. 1997) and *Arabidopsis PDF1.2* (Penninckx et al. 1996) cDNA clones. The membranes were washed at low stringency.

The jasmonate pathway of gene induction in tobacco involves activation of a wound-inducible mitogen-activated protein (MAP) kinase (Seo et al. 1995; Zhang and Klessig 1998). The accumulation of JA is preceded by activation of tobacco WIPK (Seo et al. 1999; Seo et al. 2001). We observed a rapid increase in accumulation of transcript encoding WIPK in response to inoculation with TMV in the wild type (Fig. 4A). The WIPK gene expression was delayed in the T<sub>1</sub> line. Using an antibody that detected WIPK, we observed that protein accumulation also was delayed in the T<sub>1</sub> line compared with wild type when both were challenged by TMV (Fig. 4B).

Tobacco plants possessing disease resistance *N* gene show a hypersensitive response at the inoculation site and induced resistance systemically upon inoculation with TMV (Hammond-Kosack and Jones 1997). A coat protein of TMV acts as an elicitor to induce the hypersensitive response (Beachy et al. 1990). Analysis of changes in the fatty acid composition of elicitor-treated tobacco leaves show a decline of about 30 % of the linoleic and linolenic acids, with little alteration in other fatty acids early hypersensitive response (Rusterucci et al. 1999). They suggested that the lipoxygenase pathway was involved and that the chloroplasts appeared to be the main source of polyunsaturated fatty acids. We have observed larger lesions and delayed induction of defense related genes and the cellular signaling protein WIPK in the T<sub>1</sub> tobacco plants after TMV challenge. We find also that the T<sub>1</sub> line contained reduced levels of linolenic acid (18:3) (data not published). We summarize from our findings that reduced FAD7 activity in transformed T<sub>1</sub> tobacco limited the synthesis of linolenic acid, that in turn limited jasmonic acid production and reduced the ability of the plants to express the functional defense genes such as defensin.

We speculate that the production of jasmonic acid is an important signaling pathway early in the hypersensitive response.



**Fig. 4.** Transcriptional (A) and translational (B) expressions of the wound-inducible mitogen-activated protein kinase (*WIPK*) gene in TMV-infected wild type (WT) and transgenic AsFAD716 (T<sub>1</sub>) tobacco plants. A: Ten  $\mu$ g of total cellular RNA isolated from leaves of 10 week-old plants at the indicated time points after infection with TMV were separated on 1.2 % formaldehyde/agarose gel and transferred to a nylon membrane. The blot was probed with the pepper *WIPK* cDNA (Shin et al. 2001). The membranes were washed at low stringency. B: About 400 mg of the leaf tissues were powdered under liquid nitrogen, and then dissolved in 150  $\mu$ l of cold protein extraction buffer (50 mM Tris-Cl, pH 6.8, 20 % NP-40, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 8 mM leupeptin). Fifty  $\mu$ g of extracted protein from each samples was separated on 12 % SDS-polyacrylamide gel and electrophoretically transferred onto a nitrocellulose membrane. The membrane was incubated at room temperature for 3 hrs with primary antibody (anti-tobacco *WIPK*) (Seo et al. 1999). Anti-rabbit IgG<sub>s</sub> (Horse radish peroxidase-linked Ab from donkey, Amersham, USA) conjugated to alkaline phosphatase were used as secondary antibodies. The immunoblot was visualized using the ECL kit (RPN 2108, Amersham, USA).

### 3) LITERATURE CITED

- Beachy, R. N., Losech-Fries, S., and Tumer, N. E. 1990. Coat protein mediated resistance against plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28:451-474.
- Blée, E., and Joyard, J. 1996. Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Plant Physiol.* 110:445-454.
- Bowsher, C. G., Ferie, B. J., Ghosh, S., Todd, J., Thompson, J. E., and Rothstein, S. J. 1992. Purification and partial characterization of a membrane-associated lipoxygenase in tomato fruit. *Plant Physiol.* 100:1802-1807.
- Browse, J., McCourt, P., and Somerville, C. 1986. A mutant of *Arabidopsis* deficient in C<sub>18:3</sub> and C<sub>16:3</sub> leaf lipids. *Plant Physiol.* 81:859-864.
- Creelman, R. E., Tierney, M. L., and Mullet, J. E. 1992. Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4938-4941.
- Cushman, J. C., and Bohnert, H. J. 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 117-124.
- Enyedi, A. J., Yalpani, N., Silverman, P., and Raskin, I. 1992. Localization, conjugation, and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2480-2484.
- Farmer, E. E. 1994. Fatty acid signaling in plants and their associated microorganisms. *Plant Mol. Biol.* 26:1423-1437.
- Hammond-Kosack, K. M., and Jones, J. D. G. 1997. Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:575-607.
- Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and

- bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15: 473-497.
- Iba, K., Gibson, S., Nishiuchi, T., Nishimura, M., Arondel, V., Hugly, S., and Somerville, C. 1993. A gene encoding a chloroplast  $\omega$ -3 fatty acid desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy number of the *fad7* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 268:24099-24105.
- Kim, C. S., Kwak, J. M., Nam, H. G., Kim, K. C., and Cho, B. H. 1994. Isolation and characterization of two cDNA clones that are rapidly induced during the wound response of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* 13:340-343.
- Kim, E. S., Back, K., Baik, M., Choi, E., and Han, O. 2001. Sequence of wound-responsive lipoxygenase gene from maize seedlings. *J. Biochem. Mo. Biol.* 43: in press
- Kirsch, C., Takamiya-Wik, M., Reinold, S., Hahlbrock, K., and Somssich, I. E. 1997. Rapid, transient, and highly localized induction of the plastidal  $\omega$ -3 fatty acid desaturase mRNA at fungal infection sites in *Petroselinum crispum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:2079-2084.
- Martín, M., León, J., Dammann, C., Albar, J-P., Griffiths, G., and Snáches-Serrano, J. J. 1999. Antisense-mediated depletion of potato leaf  $\omega$ -3 fatty acid desaturase lowers linolenic acid content and reduces gene activation in response to wounding. *Eur. J. Biochem.* 262:283-290.
- McConn, M., and Browse, J. 1996. The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell* 8:403-416.
- McConn, M., Hugly, S., Browse, J., and Somerville, C. 1994. A mutation at the *fad8* locus of *Arabidopsis* identifies a second chloroplast  $\omega$ -3 desaturase. *Plant Physiol.* 106: 1609-1614.

- Nishiuchi, T., Hamada, T., Kodama, H., and Iba, K. 1997. Wounding changes the spatial expression pattern of the *Arabidopsis* plastid  $\omega$ -3 fatty acid desaturase gene (*FAD7*) through different signal transduction pathways. *Plant Cell* 9:1701-1712.
- Nishiuchi, T., and Iba, K. 1998. Roles of plastid  $\omega$ -3 fatty acid desaturases in defense response of higher plants. *J. Plant Res.* 111:481-486.
- Penninckx, I. A. M. A., Eggermont, K., Terras, F. R. G., Thomma, B. P. H. J., De Samlanx G. W., Buchala, A., Metraux, J-P., Manners, J., and Broekaert, W. F. 1996. Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* 8:2309-2323.
- Rust rucci, C., Montillet, J-L., Agnel, J-P., Battesti, C., Alonso, B., Knoll, A., Bessoule, J-J., Etienne, P., Suty, L., Blein, J-P., and Triantaphylid s C. 1999. Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogin on tobacco leaves. *J. Biol. Chem.* 274:36446-36455.
- Seo, S., Okamoto, M., Seto, H., Ishizuka, K., Sano, H., and Ohashi, Y. 1995. Tobacco MAP kinase: A possible mediator in wound signal transduction pathways. *Science* 270:1988-1992.
- Seo, S., Sano, H., and Ohashi, Y. 1999. Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* 11:289-298.
- Seo, S., Seto, H., Yamakawa, H., and Ohashi, Y. 2001. Transient accumulation of jasmonic acid during the synchronized hypersensitive cell death in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 14:261-264.

- Shin, H. J., Shin, D. H., Kim, K. U., Kim, H. Y., Ohashi, Y., Han, O., Baik, M. G. and Back, K. 2001. Molecular cloning and cultivar specific expression of MAP kinase from *Capsicum annuum*. Mol. Cells 11: (in press).
- Somerville, C., and Browse, J. 1991. Plant lipids: Metabolism, mutants, and membranes. Science 252: 80-87.
- Vick, B. A., and Zimmerman, D. C. 1984. Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. Plant Physiol. 75: 458-461.
- Vijayan, M., Shockey, J., Levesque, C. A., Cook, R. J., and Browse, J. 1998. A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 7209- 7214
- Zhang, S., and Klessig, D. F. 1998. Resistance gene N-mediated de novo synthesis and activation of a tobacco mitogen-activated protein kinase by tobacco mosaic virus infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 7433-7438.

## 제2절 CRT/DRE binding factor 1 (*CBF1*), osmotin and dehydrin 유전자

### 1. *CBF1* 유전자

최근에 미국 미시간 주립대학 Thomashow 교수 팀은 여러 가지 COR (cold-regulated) gene들의 발현을 조절하는 C-repeat/drought-responsive element (CRT/DRE)에 결합하는 trans-acting factor인 *CBF1* 유전자의 cDNA를 형질전환 식물에서 overexpression시킴으로써 강력한 freezing tolerance가 발현됨을 발표하였다(Jaglo-Ottosen et al., 1998). 본 연구에서는 이 *Arabidopsis*의 *CBF1*

유전자를 담배에 도입하여 저온내성이 유도되는지를 알아보고자 하였다.

#### 가. *Arabidopsis CBF1* 유전자의 클로닝

Jaglo-Ottosen 등이 클로닝한 *CBF1* 유전자의 cDNA를 참고하여 제한효소 site를 포함한 2 종의 primer, Bam H I (5' CGGGATCCCGCTTGAAACA GAGTACTCTGA 3' )과 Kpn I (5' GGGGTACCCCGTACAAAAATGGAAA CGACT 3' ) 을 제작하였고 *Arabidopsis* genomic DNA를 template로 하여 PCR반응을 수행하여 약 0.7 Kb의 PCR product를 확보하였다. 이 product를 TOPO™ TA cloning kit (Version E, Invitrogen)를 이용하여 subcloning한 후, M13 reverse primer and T7 primer 와 THERMO sequenase cycle sequencing kit (Amersham) 를 이용하여 염기서열 분석한 결과 full-length cDNA임을 확인하였다. 형질전환 담배에서 이 *CBF1* cDNA의 발현을 위해 식물 형질전환 vector인 pCAMBIA 2300에 정방향으로 삽입하였다.

#### 나. 형질전환 담배에서 *Arabidopsis CBF1* 유전자의 발현

식물 형질전환 vector인 pCAMBIA 2300에 정방향으로 삽입된 *CBF1* gDNA를 *Agrobacterium* 매개에 의해 담배(*Nicotiana tabaccum* L. cv. petit Havana SRI)에 형질전환 하였다. 줄기와 뿌리가 형성된 형질전환체를 무균병에서 1 달 정도 배양 후 상토에 옮겨 온실에서 재배한 결과, 재생된 형질전환 체들의 형태는 대조구와 비교하여 큰 차이를 보이지 않았다. 담배에 *Arabidopsis CBF1* 유전자를 도입시킨 후 형질전환체 선발배지로부터 3:1로 분리되는 11 line을 선발하여 PCR 및 southern blot으로 one copy가 삽입됨을 확인하였다 (그림 1). 도입 유전자의 발현을 알아보기 위해 11 line의 형질전환체로부터 total RNA를 추출하여 *CBF1* DNA를 probe로 하여 northern blot한 결과,



CBF1-7, 40에서는 강한 전사량을 나타내었고, CBF1-5, 14, 19, 20, 25에서는 낮은 수준의 전사량을 나타내었으며 CBF1-2, 11, 28, 38에서는 전사활성이 확인되지 않았다.

강한 전사활성을 나타낸 CBF1-7과 40의 저온에 대한 내성을 측정하기 위하여 2 개월 정도 자란 형질전환 체와 대조구를 0 °C로 저온 처리하여 보았으나 육안으로는 차이를 구별할 수 없었으며, 여러 가지 생리적 특성들이 측정하여 확인하여도 대조구와의 뚜렷한 차이를 구분할 수 없었다.

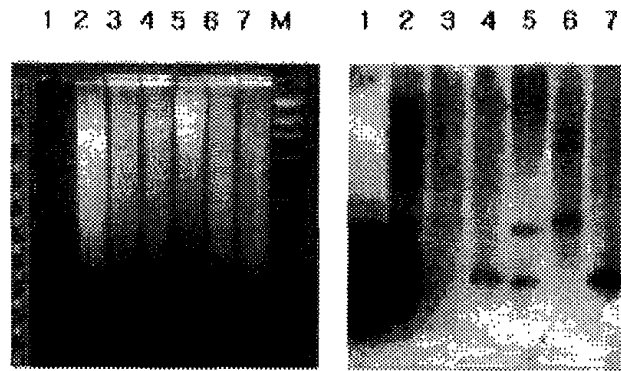


그림. 1. CBF1 형질전환 담배에서 추출한 genomic DNA를 CBF1 cDNA를 probe로 하여 Southern hybridization 한 결과

- lane 1 : positive control (CBF1 PCR products)
- lane 2 : negative control (pBI 121 vector만 도입된 형질전환체 H)
- lane 3 : CBF1-5 (H)    lane 4 : CBF1-5 (E)    lane 5 : CBF1-5 (B)
- lane 6 : CBF1-7 (H)    lane 7 : CBF1-7 (E)    lane 8 : Marker

2 5 7 11 14 18 22 25 28 32 40

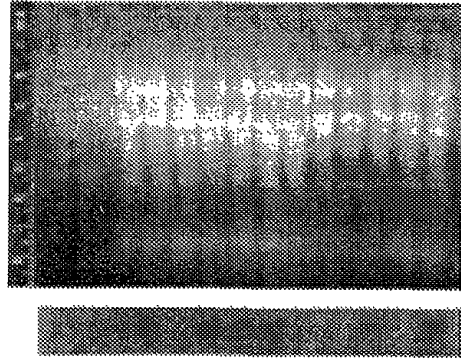


그림 2. CBF1 형질전환 담배에서 total RNA를 추출하여 CBF1 cDNA를 probe로 하여 Northern hybridization 한 그림  
lane 2 : 형질전환 vector만 도입된 형질전환 담배  
lane 5-40 : CBF1이 1 copy 도입된 형질전환 담배

## 2. Osmotin 유전자

Osmotin과 osmotin-like protein은 적어도 6 가지 이상의 member를 가진 multi gene family에 의해 암호화되어 있으며, 그 중 3 가지 유전자의 cDNA가 감자에서 클로닝되어 그 특성이 밝혀졌다(Zhu 등, 1993,1995). NaCl에 적응하기 위한 stress protein 이라는 의미에서 명명된 osmotin은 여러 가지 형태의 environmental stress 및 병원균의 침입에 의해 유도발현 되며 발육상태에 따라서도 발현의 조절이 이루어진다 (Singh 등, 1989). 병원균 감염에 의해 유도 발현되는 담배 osmotin 유전자의 cDNA를 생명공학연구소의 최도일 박사로부터 분양 받아 sense와 antisense 방향으로 osmotin 유전자를 담배에 도입시키고자 하였다. Antisense osmotin 유전자는 제한효소 site가 포함된 OS-L primer(5' GGGGTACCCACGAGCTAAACATGGAATAC 3')와 OS-R primer(5' CGGGATCCCGACTCTTATCCAGGTCCAGAT 3')를 제작하여 PCR한 후 pUC

19에 subcloning하였고, pBluescript SK(+/-)에 삽입된 sense osmotin 유전자는 Bam H I 과 Kpn I 으로 제한효소 소화 후 pUC 19에 subcloning하였다. 이들로부터 식물형질전환 vector인 pBI 121에 삽입시키기 좋은 제한 효소 site (Bam H I 과 Sac I )를 만들어 GUS gene을 제거한 pBI 121 vector에 antisense osmotin을 삽입한 후 재조합 plasmid를 동일한 제한 효소로 소화하여 재조합 여부를 확인하였다. 확인된 재조합 plasmid는 *Agrobacterium* LBA4404에 electrophoration (1.75KV)하여 transformation 한 후 sense와 antisense osmotin은 2 primer를 사용하여 PCR에 의해 형질전환 여부를 확인(그림. 3)하였다. 이를 *Agrobacterium* mediated transformation 방법에 의해 담배에 도입시켰다.

담배 osmotin 유전자를 sense와 antisense방향으로 *Agrobacterium* mediated transformation 방법에 의해 담배에 도입한 후 형질전환체의 저온, 고염 및 가뭄 조건에 대한 저항성과 감수성을 확인하였으나 CBF1과 마찬가지로 대조구와의 뚜렷한 차이를 구분할 수 없었다.

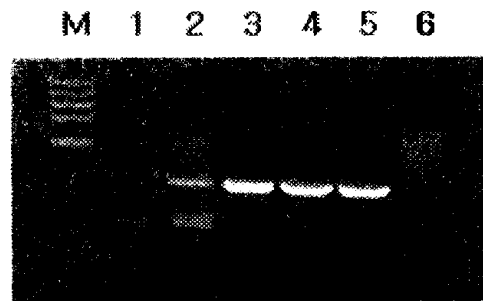


그림 3. Sense와 antisense osmotin DNA가 삽입된 pBI 121 plasmid를 *Agrobacterium* LBA 4404에 형질 전환하여 PCR로 삽입여부를 확인한 그림  
M: Marker  
Lane 1,2,3 : sense osmotin PCR products  
Lane 4,5,6 : antisense osmotin PCR products

### 3. Dehydrin 유전자

저온에 의해 유도 발현되는 여러 가지 식물 유전자들 중에는 late embryogenesis-abundant protein 중의 한 가지 class인 dehydrin protein들이 포함된다 (Huges and Dunn, 1996). 이 dehydrin의 세포내 기능은 아직 알려지지 않았으나 대체적으로 hydrophilic protein이며 다양한 정도의 K segment (lysine-rich repeat)를 포함하고 있다 (Close, 1996). Dehydrin의 세포내 축적이 cold acclimation 혹은 식물에 저온내성을 부여하는 데에 관련될 수 있는 가능성이 여러 연구자들에 의해 논의되어 오고 있다 (Danyluk et al., 1998; Kemp et al., 1997; Welin et al., 1994; Danyluk et al., 1994; Arota et al., 1994; Wolfrain et al., 1993).

*Arabidopsis* dehydrin 유전자의 sequence (Rouse et al, 1994)가 이미 밝혀져 있기 때문에 PCR방법에 의해 cloning하고자 하였다. PCR반응을 위한 template를 얻기 위하여 동일 재료인 *Arabidopsis* (ecotype Lansberg)의 genomic DNA를 관행에 준하여 추출하였다. 식물형질전환 vector에 용이하게 삽입시키기 위하여 pBuescript SK(+/-)에 subcloning하기 위한 primer를 제작하였다. BamH I (5' CGGGATCCCGCCTAAGAAAGAAAAGAGT 3')과 Xba I (5' GCTCTAGAGCCGAAACCAGAAGTAGATA 3') 제한효소 site를 첨가하여 고안한 각각의 primer (20 pmol/20 $\mu$ l)를 한국생공(주)의 PreMix TM-Top 및 genomic DNA(1 pg)와 혼합하여 최종 부피가 20  $\mu$ l가 되게 하였다. PCR반응 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 denaturation한 후 55 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 annealing하여 68 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 extension하였고, 40 cycle을 시행하여 약 0.7 Kb에 이르는 PCR product를 확보하였다. 이 product를 제한효소 Bam HI 과 Xba I 으 로 소화하여 pBluescript 에 subcloning 한 후, T3 and T7 primers 와 THERMO sequenase cycle sequencing kit (Amersham) 를 이용하여 염기서열 분석한 결

과, Rouse 등이 *Xero2* 로 명명한 dehydrin gene을 획득할 수 있었다.

#### 4. 인용문헌

- Close, T. J. (1996) Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol. Plant.* 97, 795-269.
- Danyluk, J., Houde, M., Rassart, E. and Sarhan, F. (1994). Differential expression of a gene encoding an acidic dehydrin in chilling sensitive and freezing tolerant Gramineae species. *FEBS Lett.* 344, 20-24.
- Danyluk, J., Perron, A., Houde, M., Limin, A., Fowler, B., Benhamou, N., and Sarhan, F. (1998). Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell* 10, 623-638.
- Hughes, M. A., and Dunn, M. A. (1996). The molecular biology of plant growth and development. *J. Exp. Bot.* 47, 291-305.
- Hugly, S., and Somerville, C. (1992). A role for membrane lipid polyunsaturation in chloroplast biogenesis at low temperature. *Plant Physiol.* 99, 197-202.
- 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*
- Kemp, R., Brennan, R., Lanham, P. G., Slater, R., and Jones, H. (1997) Cloning of cold-inducible dehydrin-like genes from the blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) using RT-PCR. *Mol. Biotechnol.* 7, 99-102.
- Singh, N. K., Nelson, D. E., Kuhn, D., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A. (1989). Molecular cloning of osmotin and regulation of its expression by

- ABA and adaptation to low water potential. *Plant Physiol* 90, 1096-1101.
- Somerville, C., and Browse, J. (1991). Plant lipids: Metabolism, mutants, and membranes. *Science* 252, 80-87.
- Welin, B. V., Olson, A., Nylander, M., and Palva, E. T. (1994) Characterization and expression of *dhn/lea/rab*-like genes during cold acclimation and drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 26, 131-144.
- Wolfrain, L. A., Langis, R., Tyson, H., and Dhindsa, R. S. (1993) cDNA sequence, expression, and transcript stability of a cold acclimation-specific gene, *cas18*, of alfalfa (*Medicago falcata*) cells. *Plant Physiol.* 101, 1275-1282.
- Zhu, B., Chen, T. H. H., and Li, P. H. (1993) Expression of an ABA-responsive osmotin-like gene during the induction of freezing tolerance in *Solanum commersonii*. *Plant Mol. Biol.* 21, 729-735.
- Zhu, B., Chen, T. H. H., and Li, P. H. (1995) Expression of three osmotin-like protein genes in response to osmotic stress and fungal pathogen in potato. *Plant Mol. Biol.* 28, 17-26.

## 제 3장 $H^+$ -ATPase 및 저온내성 재조합 유전자 개발분야

### 제1절 서 론

아열대성 식물들은 저온에 민감한 식물들로 저온에 의한 손상이 회복되지 않으면 죽음에 도달하게 된다. 저온과 같은 외부환경을 인식하는 일차적 부위는 세포막으로 저온에 의한 손상을 가장 먼저 받는 부위로 알려져 있다 (Hunter et al., 1989; Palta and weiss, 1993). 저온에 의한 막의 상태전위는 이온들의 막 투과성의 변화를 가져와 막 주위의 전위차 감소를 일으켜 결과적으로 막의 기능이 상실된다(Murata and Nishida, 1990). 뿌리의 원형질막 기능 상실은 식물체내로의 물과 양분 흡수 등에 영향을 미치며 이는 식물체 고사를 유발한다.

저온환경에서 식물체뿐만 아니라 박테리아, 동물들은 막 지질의 불포화를 촉진시켜 막의 유동성을 유지함으로써 저온에 의한 막 손상을 방지한다 (Williams et al., 1992; Wada and Murata, 1990; Tiku et al., 1996). 저온에서 막 지질의 불포화는  $\omega$ -3 fatty acid desaturase(fad)에 의해 dienoic fatty acid가 trienoic fatty acid로 변화하는 것이 주 과정이다(Somerville and Browse, 1991). *Arabidopsis*의 경우 3종류의  $\omega$ -3 FADs(FAD3, FAD7 과 FAD8)와 그 효소들의 위치(FAD3는 microsome, FAD7과 FAD8은 plastid membrane) 그리고 유전자들의 위치가 보고 되었다(Arondel et al., 1992; Iba et al., 1993; Gibson et al., 1994). 이 desaturase 활성은 저온, drought, wounding 스트레스에 의해 증가되는데 이는 transcriptional 또는 posttranscriptional regulation 에 의해 조절된

다고 알려져 있다(Tiku et al., 1996; Nishiuchi et al., 1997). *Fad3* 유전자는 뿌리나 종자에서 주로 발현되는 것으로 알려져 있다(Lemieux et al., 1990). 이를 토대로 오이가 지온이 15°C 이하로 떨어질 경우 생장이 중단되는 원인을 저온에 의한 뿌리기능 상실로 볼 수 있을 것이다. 즉 저온에서 *fad3* 유전자 발현으로 원형질막의 기능이 유지되고 막에 위치한 단백질들의 기능 또한 유지 될 수 있다. 특히 원형질막 H<sup>+</sup>-ATPase 효소의 기능 유지는 매우 중요하다. 원형질막 H<sup>+</sup>-ATPase 효소는 여러 이온 및 대사 물질을 운송하는 중요한 역할을 담당하고 있다. *fad3* 유전자 발현에 의한 막의 유동성 유지는 막의 이온 수송 능력이 유지됨을 의미하며 이는 원형질막 H<sup>+</sup>-ATPase 효소의 기능 유지를 의미한다. 이는 저온에서도 뿌리기능이 유지되어 식물이 저온에서 생존할 수 있는 기반을 마련한다라고 추측된다.

본 연구의 내용은 오이와 대조군 호박의 *fad3* 유전자를 클론하고 유전자 발현을 조절하는 promoter의 특성을 비교, 분석하여 오이 뿌리의 저온 민감성 원인을 추적하고자 한다. 또한 원형질막 H<sup>+</sup>-ATPase 활성 조절과정은 완전히 규명되는지 않았지만 a) 유전자 발현 수준에서의 조절 b) trypsin 처리나 인산화에 의한 C-terminal autoinhibitory domain의 변화에 의한 조절 c) 효소의 conformational change에 의한 조절 과정이 보고 되어졌다. 그리고 14-3-3 protein에 의한 ATPase 활성화도 증가가 14-3-3 dimer 와 H<sup>+</sup>-ATPase 간의 complex 형성한다고 보고 되어있다(Vera V. Chelysheva et al., 1999). 이를 토대로 오이와 호박 뿌리에서 저온 처리에 의해 변화하는 원형질막 H<sup>+</sup>-ATPase 활성화에 대한 조절요인을 조사하고자 하였다.



## 제2절 연구재료 및 방법

### 1. RNA gel blot analysis

오이와 호박 뿌리 조직에서 TRIzol solution(Gibco-BRL)에 의해 추출된 total RNA 30  $\mu$ g을 1 % formaldehyde agarose 변성 gel에서 전기영동하여 Zeta probe membrane(Bio-rad)에 blotting시켰다. High stringent 상태(65 $^{\circ}$ C)에서 일반적인 방법으로 20시간 hybridization 한 후 2x SSC/0.1%, 0.5x SSC/0.1% SDS, 0.1x SSC/0.1% SDS 의 순서로 65 $^{\circ}$ C에서 세척한 후 X-ray film에 노출시켰다.

### 2. Western blotting

Protein 20  $\mu$ g에 해당되는 순수 원형질막 시료를 SDS-PAGE방법으로 단백질을 분리하고 Electro transfer (BioRAD) kit를 사용하여 towbin buffer [10 % Methanol, 30 mM Tris (pH 8.0), 192 mM glycine] 상태에서 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. Nitrocellulose membrane 을 10 % 탈지분유로 3시간동안 blocking시킨 후 제조된 anti-H<sup>+</sup>-ATPase 항체를 1:700비율로 희석시켜서 2시간 동안 membrane과 반응시켰다. TBST [100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.9 % NaCl, 0.1 % Tween] 로 15분씩 3회 반복 세척 후 alkaline phosphatase 가 결합되어 있는 토끼 항체에 대한 항체를 1:1000비율로 희석하여 2시간 반응시킨다. TBST로 4회 반복 세척하고 alkaline phosphatase byffer(Bio-Rad)로 씻고 nitrocellulose membrane을 NBT와 BCIP 용액에서 발색하였다.

### 3. Solubilization of H<sup>+</sup>-ATPase

Wash buffer [330 mM sucrose, 1 mM DTT, 5 mM Mes-Tris (pH 6.5)] 에 녹여진 순수한 원형질막을 한시간동안 100,000g로 원심분리하여 생성된 pellet을 buffer A [5 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 10 mM Mes-Tris(pH 6.5)] 에 녹였다. Buffer A에 녹여진 원형질막을 Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside (20 mg/ml)가 첨가된 동량의 buffer A와 섞은후 상온에서 30min 동안 반응시키고 100,000g 에서 45min 동안 원심분리하여 상층액을 사용하였다 (18).

### 4. Membrane Reconstruction

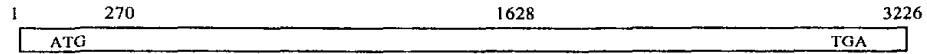
Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside가 처리된 막단백질에 soybean phospholipids (asolectin, sigma,Co)를 사용하여 막을 재구성시켰다. Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside 0.16-5 mg에 대하여 0.25-8 mg의 비율로 asolectin을 실온에서 8분간 반응시킨 후 H<sup>+</sup>-ATPase 활성도를 측정한다. Asolectin 처리된 단백질에 최종농도가 0.04 % 가 되도록 lysophosphatidylcholine을 처리하였다.

## 제3절 결과 및 고찰

### 1. 오이와 호박의 H<sup>+</sup>-ATPase cDNA 클로닝

*Arabidopsis* 와 *Brassica napus*에서 보고된 원형질막 H<sup>+</sup>-ATPase mRNA 염기 서열로부터 제작한 primer를 이용하여 원형질막 H<sup>+</sup>-ATPase 유전자 일부분을 PCR방법으로 1358bp 크기(+270-1628)의 cDNA를 증폭하였다(그림 1). 이를

PM H<sup>+</sup>-ATPase  
(cDNA of *A. thaliana*)



PM H<sup>+</sup>-ATPase  
(cDNA of cucumber)

AAGTTTCTGGGGTTCATGTGGAATCCTTTGTGCATGGGTTATGGAAGCTGCAGCTATTATGGCTA  
TTGCTTTAGCAAAATGGTGGTGGAAAGCTCCAGATTGGGAAGACTTTGTTGGTATTATTTGTTTAT  
TAGTGATCAACTCCACAATCAGTTTCATGAGGAAAATAATGCTGGCAATGCTGCTGCTCTCA  
TGGCTGGCCTTGCCCTAAAAACCAAGGTACTGAGGGATGGTAAATGGAGTGAAGCAGGAGGCTGC  
AATTTTGGTTCCAGGAGATATCGTTAGTGTAAAATTTGGGAGATATTATCCCGCGGATGCTCGTCT  
TCTCGAGGGCGATCCTTTAAAGGTTGACCAATCTGCATTGACTGGAGAGTCACTTCTGTTACTAA  
AAATCCAGGGGATGAAATCTTCTCTGGTTCAACTTGCAACAAGGGGAAATGAAAGCTGTTGTAA  
TTGCCACTGGTGTGCATACTTTCTTTGGAAAAGCAGCACATCTGTAGATAGCACTACCAAGTTG  
GGCATTTCAGAAAAGTGCTTACAGCAATGGGAATTTTGTATTGTTCTATTGCTTTGGGAATGC  
TFATTGAAATCATTTGGCATGTGCCCAATTC AACATCGTAAAATACCGTGACGGAATCGACAATCTCT  
TCGTTCTCTTGATCGGTGGCATACCAATTGCTATGCCTACTGTATTATCTGTGACAATGGCTATTG  
GATCTCACA AACTATCTCAACAAGGCGCCATCACGAAGCGTATGACTGCCATTGAAGAAAATGGCT  
GGTATGGATGTCCTTTGCAGTGATAAAAACAGGAACATTGACTCTAAACAAGCTTAGTGTGATGT  
AAATTTGGTTCGAGGTTTTTGGTAAGGGTGTGGATAACAACATGTTATTTGCTGGCTGCAAGGGC  
TTCTCGAACCAGAAAATCAAGATGCAATGATGCTGCTATTGTAGGAATGCTTGATCCTAAGG  
AGGCACGAGCAGGCATAAGAGAAGTGCATTTCTTCCATTCAATCCTGTGGATAAGAGAAGCTGCA  
TTAACTTACATTGATTCTGTATGGTAATTGGCATCGAGCAAGCAAAGGAGCTCCCGAGCAGATCTT  
AACACTTTGCAACTGCAAAAGAGGATGTCAAGAAGAAGGCTCATGCTGTAATTGATAAAATTTGCAG  
AACGCGGTCTTCGCTCGCTGGCTGTGGGAGACAGGAAGTGCTGAGAAAAAGAAAAGAAAGTCC  
TGGAAGTCCATGGCAGTTTGTGGCTTATGCCCTGTTGATCCTCCAAGGCATGACAGTGGAGA  
AACCATCAAAAAGAGCTCTCAATCTGGGTGTCAATGTCAAGATGATCCTGGT

그림 1. Nucleotide sequence of partial H<sup>+</sup>-ATPase cDNA of cucumber root  
*Arabidopsis*와 *Brassicinapus*에서 보고된 원형질막 H<sup>+</sup>-ATPase mRNA 염기  
서열로부터 제작한 primer를 이용하여 원형질막 H<sup>+</sup>-ATPase 유전자 일부분  
을 PCR방법으로 1358bp 크기(+270-1628)의 cDNA를 증폭하였다. 밑줄 부  
분은 PCR증폭에 사용된 primer이다.

염기서열을 확인한 결과 *Arabidopsis*의 원형질막 H<sup>+</sup>-ATPase cDNA의 염기서  
열과 약 80%이상의 상동성을 나타내는 것으로 확인되었다.

## 2. 원형질막 H<sup>+</sup>-ATPase 유전자 발현

오이와 호박 뿌리 조직에서 저온에 의한 원형질막 H<sup>+</sup>-ATPase 유전자의 발  
현과 저온 내성의 관련성을 조사하기 위해 원형질막 H<sup>+</sup>-ATPase cDNA의 일  
부분을 probe으로 사용하여 Northern hybridization을 실시하였다. 그 결과 오이  
뿌리의 경우, 대조군의 뿌리에 축적된 mRNA양이 저온 1일 처리한 균을 제외  
하고 저온 처리된 뿌리의 mRNA 양보다 약간 증가하였으나 호박 뿌리에서는

대조군에서 축적된 mRNA 양은 성장 시기에 따라 증가되었으나 저온 처리군의 뿌리에 축적된 mRNA는 대조군에 비해 감소되었음을 확인하였다 (그림 2).

오이와 호박뿌리에서 western blot analysis에 의해 확인된 원형질막  $H^+$ -ATPase 효소양은 대조군과 저온처리군 모두 성장 시기에 따라 증가되나 대조군과 처리군간의 차이는 확인되지않았다. 또한 30분간 trypsin을 처리한 군에서 90kDa 크기의 새로운 밴드가 확인됨에 따라 그림 3에 나타난 밴드들이 원형질막  $H^+$ -ATPase임을 확신하였다(그림 3).

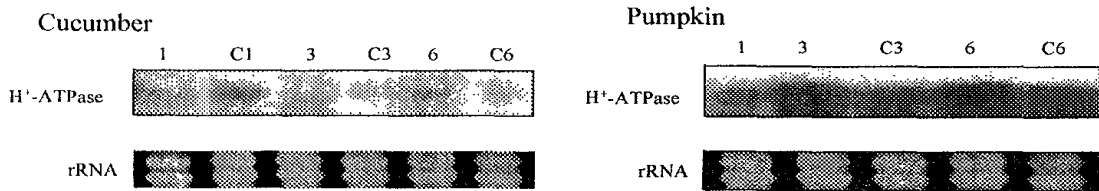


그림 2. RNA gel blot analysis for the  $H^+$ -ATPase gene expression 오이와 호박 뿌리 조직에서 TRizol solution(Gibco-BRL)에 의해 추출된 total RNA 30 $\mu$ g을 1% formaldehyde agarose 변성 gel에서 전기영동하여 zeta probe membrane(Bio-rad)에 blotting시켰다. High stringent 상태(65 $^{\circ}$ C)에서 일반적인 방법으로 20시간 hybridization한 후 2x SSC/0.1%, 0.5x SSC/0.1% SDS, 0.1x SSC/0.1% SDS의 순으로 65 $^{\circ}$ C에서 세척한 후 X-ray film에 노출시켰다. 1,3,6: 대조군, C1.C3.C6:저온 처리군, number:culture period day.

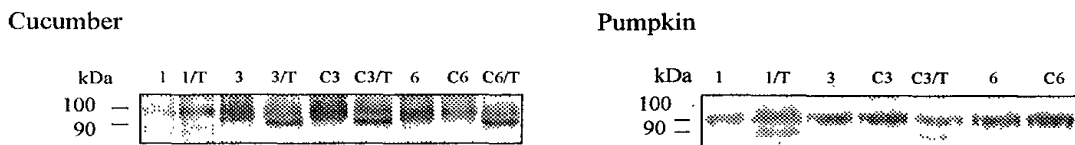


그림 3. Western blot analysis for the  $H^+$ -ATPase Protein Protein 20 $\mu$ g에 해당되는 순수원형 질막 시료를 SDS-PAGE방법으로 단백질을 분리하고 Electro transfer(BioRAD) kit를 사용하여 towbin buffer [10% Methnol, 30mM Tris(pH 8.0), 192mM glycine] 상태에서 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. *Arabidopsis thaliana*  $H^+$ -ATPase에 대한 항체를 사용하였다. 1,3,6:대조군, C1.C3.C6:저온 처리군, number: culture periodday, T:Trypsin treatment.

### 3. Trypsin 처리에 의한 원형질막 H<sup>+</sup>-ATPase 의 활성 변화

저온처리 된 뿌리에서의 효소 활성 변화가 유전자 발현 정도에 의해 기인하는 것이 아니라면 저온처리에 의해 유도된 효소 구조의 conformational change에 의해 조절 되어질거라 예상할 수 있다. 이에 trypsin 처리에 의한 원형질막 H<sup>+</sup>-ATPase 의 활성 변화를 조사하였다. 오이 뿌리의 경우 대조군과 저온처리군 모두 trypsin 처리에 의해 효소 활성이 70%정도 증가하였다. trypsin에 의한 proteolysis가 대조군과 저온처리군에서 완전하게 이루어졌음을 알 수 있다. 호박 뿌리의 경우 대조군에서는 trypsin 처리에 의해 효소 활성도가 증가되었으나 저온 처리군은 trypsin 처리에 의해 효소 활성도가 더 이상 증가 되지않음을 확인하였다. 이는 저온 처리된 호박 뿌리의 H<sup>+</sup>-ATPase가 이미 활성화되었음을 제시하고있다(그림 4).

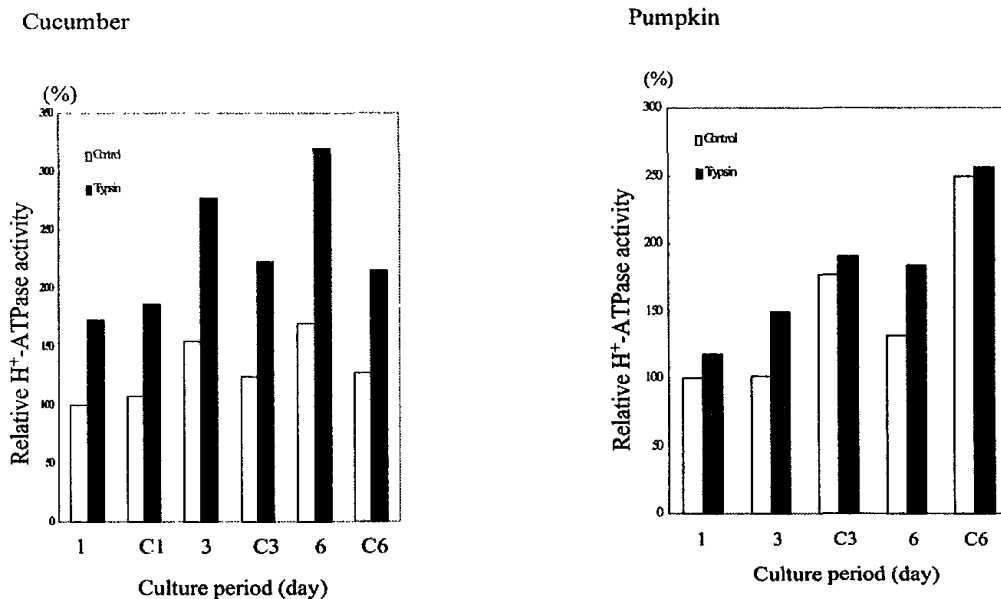
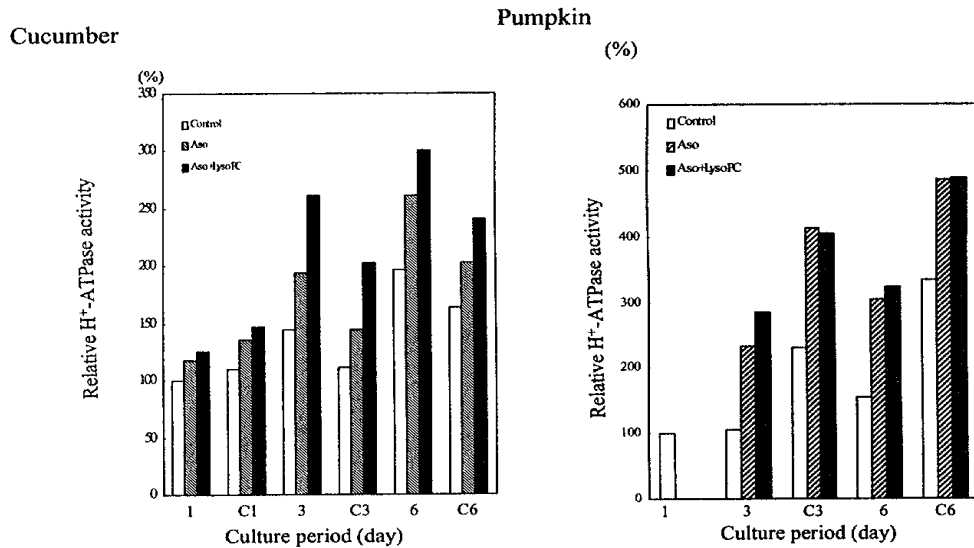


그림 4. Change of H<sup>+</sup>-ATPase activity by Trypsin treatment

1,3,6:대조군, C1,C3,C6:저온 처리군, number.culture period day.

#### 4. Asolectin에 의해 재구성된 원형질막 H<sup>+</sup>-ATPase 의 활성 변화

오이 뿌리의 경우 asolectin에 의한 막 재구성 후 효소 활성은 약간 증가하였고 Lyso-PC (lysophosphatidylcholine) 처리 후 큰 증가폭을 보여주었다. 반면에 호박 뿌리의 경우 Lyso-PC 처리에 의한 효소 활성 증가는 나타나지 않았다(그림 5). 이 결과는 trypsin 처리시의 결과에서 설명되었듯 호박 뿌리의 H<sup>+</sup>-ATPase가 저온 처리에 의해 이미 활성화되었음을 보여준다. 이는 H<sup>+</sup>-ATPase의 C-terminal inhibitory domain과 연관되어 있음을 예측할 수 있다.



**그림 5. Change of H<sup>+</sup>-ATPase activity following membrane reconstitution**  
Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside가 처리된 막단백질에 soybean phosphlipids (asolectin, sigma, Co)를 사용하여 막을 재구성시켰다. Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside 0.16-5mg에 대하여 0.25-8mg의 비율로 asolection을 실온에서 8분간 반응시킨 후 H<sup>+</sup>-ATPase 활성도를 측정한다. Asolectin 처리된 단백질에 최종농도가 0.04%가 되도록 lysophosphatidylcholine을 처리하였다. 1,3,6:대조군, C1.C3.C6:저온 처리군, number: culture period day.

## 5. 오이와 호박의 FAD cDNA 클로닝

저온에 의한  $H^+$ -ATPase 활성도 증가가 원형질막환경의 변화에 의한 것이 라면 막 지질의 변화를 예측할 수 있다. 이에 fatty acid desaturase(*fad3*) cDNA 일부를 PCR방법으로 클로닝하였다(그림 6). *Arabidopsis*와 *Brassica napus*에서 보고된 *fad3* mRNA 염기 서열로부터 제작한 primer를 이용하여 *fad3* 유전자 일부분을 PCR방법으로 305bp 크기(+212-516)의 cDNA를 증폭하였다.

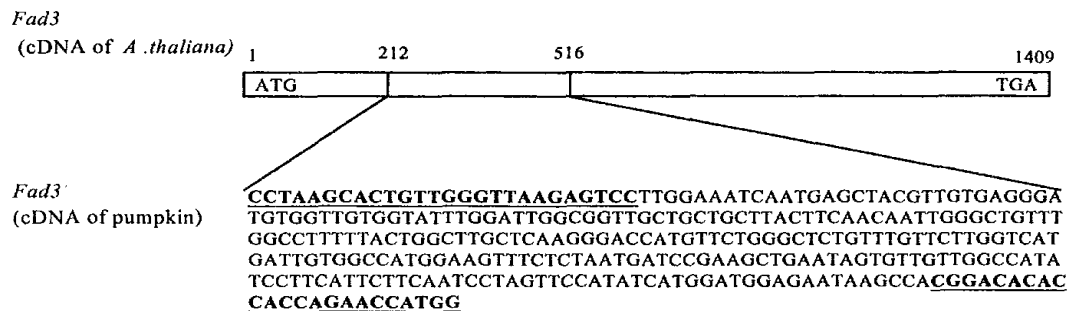


그림 6. Nucleotide sequence of partial *fad3* cDNA of pumpkin root *Arabidopsis*와 *Brassica napus*에서 보고된 원형질막  $H^+$ -ATPase mRNA 염기 서열로부터 제작한 primer를 이용하여 *fad* 유전자 일부분을 PCR방법으로 305bp 크기 (+212-516)의 cDNA를 증폭하였다. 밑줄 부분은 PCR증폭에 사용된 primer이다.

## 6. FAD3 유전자 발현

PCR 방법에 의해 증폭된 *fad3* cDNA 일부를 probe으로 사용하여 RNA gel blot analysis으로 *fad3* 유전자 발현을 조사하였다(그림 7). 오이 뿌리의 경우 대조군의 뿌리에 축적된 mRNA양에 비해 저온 처리한 뿌리의 mRNA양은 처리기간이 길수록 감소하였으나 호박 뿌리에서는 저온 처리군의 mRNA양이

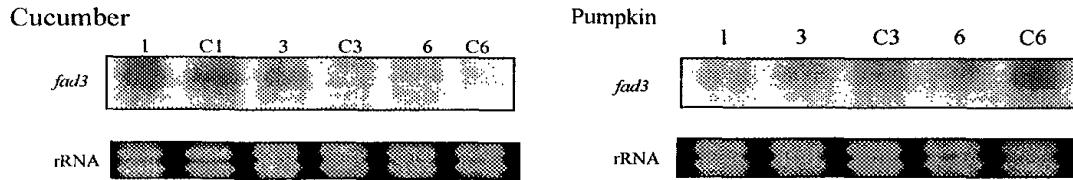


그림 7. RNA gel blotanalysis for the *fad3* gene expression 오이와 호박 뿌리 조직에서 TRizol solution(Gibco-BRL)에 의해 추출된 total RNA 30 $\mu$ g을 1% formaldehyde agarose 변성 gel에서 전기영동하여 Zeta probe membrane(Bio-rad)에 blotting시켰다. High stringent 상태(65 $^{\circ}$ C)에서 일반적인 방법으로 20시간 hybridization한 후 2x SSC/0.1%, 0.5x SSC/0.1% SDS, 0.1x SSC/0.1% SDS의 순서로 65 $^{\circ}$ C에서 세척한 후 X-ray film에 노출시켰다. 1,3,6:대조군, C1.C3.C6:저온 처리군, number:culture period day.

대조군에 비하여 증가한 것을 확인하였다. 이 결과로 원형질막 H<sup>+</sup>-ATPase 활성도와 *fad3* 유전자의 발현이 관련 있음을 알 수 있다. 원형질막 H<sup>+</sup>-ATPase는 식물 뿌리의 기능에 지대한 영향을 미치는 것으로 알려져 있고 효소 기능도 막의 불포화 현상과 관련이 있는 것으로 보고 되었다. 이 결과로 오이 뿌리의 기능의 저하는 곧 원형질막 H<sup>+</sup>-ATPase 기능 저하와 관련되며 이 현상은 저온에서 *fad3* 유전자의 발현이 증가되지 못한 결과로 추측된다.

### 7. 14-3-3 유전자 발현

원형질막 H<sup>+</sup>-ATPase와 complex를 이루어 효소 활성도를 증가시키는 14-3-3 단백질과 저온에 의한 효소 활성도 변화와의 연관성을 조사하기 위해 오이와 호박뿌리에서 RNA gel blot analysis로 14-3-3 유전자 발현을 조사하였다. 사용된 probe는 옥수수의 cDNA library 검색에 의해 얻어진 옥수수의 14-3-3 cDNA의 일부분이다 (그림 8). 오이 뿌리의 경우 저온 처리군 뿌리에 축적된 mRNA양이 대조군 뿌리에 축적된 mRNA양보다 증가된 것을 확인하였다. 호



박 뿌리의 경우에서도 저온 3일 처리군을 제외하고 오이와 같은 결과가 확인되었다(그림 9). 호박의 경우 14-3-3 유전자의 발현 양상이 H<sup>+</sup>-ATPase 활성도 증가 양상과 유사하나 오이의 경우에는 상반되는 양상을 나타냈다.

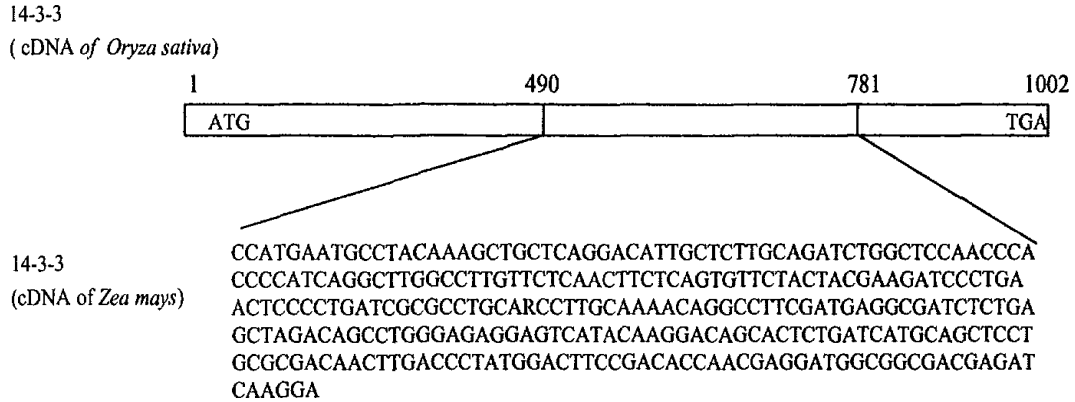


그림 8. Nucleotide sequence of partial 14-3-3 cDNA of *Zea mays* 옥수수 cDNA library 검색에 의해 얻어진 옥수수의 14-3-3 cDNA(282bp)의 일부분을 확인하였다.

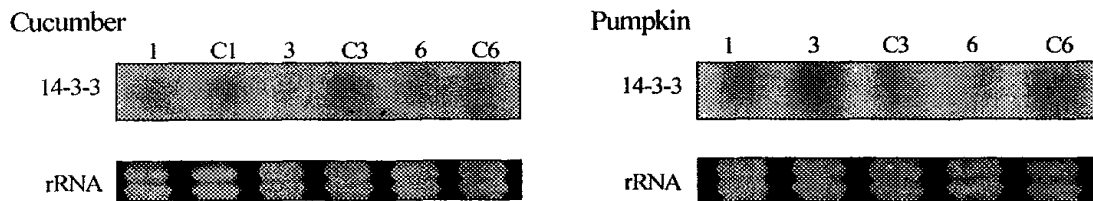


그림 9. RNA gel blot analysis for the 14-3-3 gene expression 오이와 호박 뿌리 조직에서 TRIzol solution(Gibco-BRL)에 의해 추출된 total RNA 30 $\mu$ g을 1% formaldehyde agarose변성 gel에서 전기 영동하여 Zeta probe membrane(Bio-rad)에 blotting시켰다. High stringent 상태(65 $^{\circ}$ C)에서 일반적인 방법으로 20시간 hybridization한 후 2x SSC/0.1%, 0.5x SSC/0.1% SDS, 0.1x SSC/0.1% SDS의 순서로 65 $^{\circ}$ C에서 세척한 후 X-ray film에 노출시켰다. 1,3,6:대조군, C1.C3.C6: 저온 처리군, number:culture period day.

오이 뿌리 기능의 약화는 원형질막 H<sup>+</sup>-ATPase의 낮은 활성화도 때문으로 일부 설명되어질 수 있다. 9일 이상 저온 처리한 오이 뿌리의 원형질막의 비가역적인 손상으로 인해 H<sup>+</sup>-ATPase 활성화도가 정상 수준으로 회복되지 않는 것으로 예측할 수 있다. 그러나, 결과에서 보여 지듯 호박 뿌리에서의 원형질막 H<sup>+</sup>-ATPase 활성화도 증가는 유전자 발현의 증가보다는 원형질막환경의 변화에 기인함을 예측할 수 있다. 현재로써는 호박 뿌리의 원형질막 H<sup>+</sup>-ATPase의 활성화도 증가가 단백질-지질 환경의 변화 또는 효소 구조의 conformational change에 의한 것이라 명확히 결론짓기는 어렵다. 이를 위해서 저온처리 후의 원형질막의 지질성분 변화에 대한 조사 뿐 아니라 ATPase 활성화에 대한 fusicocin과 14-3-3 단백질 효과에 대한 조사가 수행되어야한다.

## 제 4 장 저온내성 형질전환 식물 개발분야

### 제 1 절 *Arabidopsis FAD*와 *CBF1* 유전자를 발현하는 형질전환 오이 육성

#### 1. 재료 및 방법

가. pBI121을 이용한 *Arabidopsis*의 pBI121:CBF/FAD 벡터 조작

*Arabidopsis*의 CBF/FAD가 들어있는 pBluescript KS를 polymerase chain reaction의 template로 삼고 CBF 유전자를 증폭하기 위해 forward primer 5'-d(AGAGGATCCAAACAGAGTACTCTGATC)-3'(BamHI site는 밑줄), reverse primer 5'-d(GGTGGAGCTCTGGAAACGACTATCG)-3'(SacI site는 밑줄)를 이용하였고, FAD 유전자를 증폭하기 위해 forward primer 5'-d(AGAGGATCCTCAAGTTCTAATGGCG)-3' (BamHI site는 밑줄), reverse primer 5'-d(GTGGAGCTCGATCGATCGTATTCAGAG)-3'(SacI site는 밑줄)를 각기 사용하여 표준 PCR 방법을 사용하여 생성물을 획득 후 Bam I /SacI으로 절단한 후 분리하였다. 분리한 *Arabidopsis*의 CBF/FAD를 같은 효소로 절단한 binary vector pBI121에로 ligation하였다.

나. 오이절편(explants) 준비

오이의 종자 (요시나리, F4 자가세대)는 오이연구소 (구례)에서 분양 받았으며, 무균배양을 위해 오이종자가 깨지지 않도록 유의하면서 종자의 종피를 제거한 후 종자를 다음과 같이 살균한다. 70% ethanol의 20 ml에 약 30초 동

안 살균한 다음 1% NaOCl 에 약 2분 30초 동안 살균한다. 그 후 멸균증류수로 여러 번 헹궈준 뒤 약 30분 동안 shaking 시키면서 완전히 씻어낸다. 멸균 filter paper로 종자를 옮겨서 물기를 제거한 후 hormone-free MS medium에 치상하여 암상태에서 하루 배양시킨 후 명상태에서 배양한다. MS 기본 배지에서 6-7일 자란 오이를 blade로 cotyledon은 4등분하여 절편을 만들고 hypocotyl의 stem부위를 0.1-0.2mm만 남기고 절단하고 cotyledon의 일부분을 남겨 절편을 만들며, 18-21일간 자란 오이를 첫째 두 번째 본엽의 petiole을 explants로 만들어 형질전환용으로 사용하였다.

다. *Agrobacterium*을 매개한 오이의 형질전환

Kanamycine이 50  $\mu$ g/ml이 함유된 5ml의 YEP medium에서 *Agrobacterium*을 overnight culture(28 $^{\circ}$ C)한다. Cell titer는 600 nm에서 OD 2.0 정도의 탁도로 준비한다. Cell이 준비되면 5000 rpm으로 3분 동안 원심분리 시켜 상정액은 버리고 pellet은 5 ml의 YEP medium으로 녹인다.

멸균된 Petri dish에 *Agrobacterium*이 녹아있는 5ml의 YEP medium을 준비하고 100  $\mu$ M acetosyringone을 첨가한다. 준비된 explants를 medium과 약 3-5분 co-culture 시킨다. Co-culture가 끝나면 callus에 남아있는 과도한 *Agrobacterium*을 줄이기 위해 멸균 filter paper 위에 explants를 옮겨서 물기를 제거한 후 MS co-culture medium (표1의 재분화 배지 호르몬 조성과 동일)으로 옮겨서 암 상태에서 2-3일간 culture한다. 2-3일간 culture가 끝나면 멸균된 petri dish 에 멸균 증류수를 붓고 explants를 옮겨서 *Agrobacterium*을 제거해준다. Washing이 끝나면 sterile filter paper 위로 explants를 옮겨 물기를 제거하고 건조시킨 후 kanamycine (100 mg/L) 및 cefotaxime (250 mg/L)을 함유한 MS 재분화 배지로 옮긴 후 암 상태에서 3주 동안 또는 명 상태에서 배양시

키며 2주에 한번씩 새로운 배지로 옮기면서 선발한다. 사용한 MS 재분화 배지의 호르몬 조성은 다음 표1과 같다. 암 상태에서 배양한 절편은 3주 후부터 명 상태에서 배양하며 저항성 있는 callus가 형성되면 shoot를 유도한다. shooting이 일어나면 그 개체만을 blade로 떼어내어 hormone이 없는 MS rooting medium (kanamycine 100 mg/L, cefotaxime 250 mg/L)으로 옮겨서 뿌리를 유도시킨다.

#### 라. T0 형질전환 오이로부터 Southern blot 분석

CTAB 및 phenol/chloroform 방법으로 cytosol transgenic line 및 plastid transgenic line들로부터 genomic DNA를 분리한 후 5-10 ug 정도의 gDNA를 EcoRI 혹은 BamHI 제한효소로 절단한 후 0.8% agarose gel에 분리한 후 nylon membrane에 전이하여 상기의 northern blot 분석법에 의거 southern blot를 수행한다.

#### 마. 형질전환체의 Northern blot 분석

형질이 변환된 개체들을 선발하여 이들 total RNA를 추출한 후 다음과 같은 방법으로 northern 분석을 한다. Total RNA를 loading buffer와 섞어 65℃에서 가열하여 denaturation한 후 total RNA 10 $\mu$ g을 formaldehyde agarose gel에 loading하여 전기 영동한 후 10X SSC buffer에서 nylon membrane에 옮긴다. UV cross linking에 의해 RNA를 filter위에 고정한 후 hybridization을 수행한다.

#### 바. 형질 전환체의 RT PCR 분석

분리한 5 $\mu$ g total RNA를 oligo dT 및 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 합

성하고 이들을 template로 이용하여 각각 CBF/FAD gene을 PCR 반응 확인하고자 한다. CBF 유전자를 증폭하기 위해 forward primer 5'-d(AGAGGATCCAAACAGAGTACTCTGATC)-3'(BamHI site는 밑줄), reverse primer 5'-d(GGTGGAGCTCTGGAAACGACTATCG)-3'(SacI site는 밑줄)를 이용하고, FAD 유전자를 증폭하기 위해 forward primer 5'-d(AGAGGATCCTCAAGTTCTAATGGCG)-3'(BamHI site는 밑줄), reverse primer 5'-d(GTGGAGCTCGATCGATCGTATTCAGAG)-3'(SacI site는 밑줄)를 각기 사용하여 annealing 온도를 50℃에서 표준 PCR반응을 한다.

## 2. 오이 형질전환 방법 및 결과

### 가. pBI121을 이용한 *Arabidopsis*의 pBI121:CBF/FAD 벡터 완성

*Arabidopsis*의 CBF/FAD 유전자를 pBI121벡터로 도입하여 벡터에 있는 35S-CaMV constitutive promoter에 의해 발현되도록 하였다. CBF 유전자를 pBI121벡터에 삽입한 것과, FAD 유전자를 pBI121 벡터에 삽입한 2가지 구조를 본 실험에 사용하였다. pBI121은 cauliflower mosaic virus(CaMV) 35S promoter를 GUS 유전자의 upstream 부위에 가지고 있어 GUS유전자 발현을 왕성하게 한다. 따라서 pBI121을 BamHI/SacI 제한 효소로 절단하여 GUS 유전자를 제거하고 CBF/FAD 유전자를 GUS부위에 대체하였다. 2종류의 벡터를 조합 후 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 host strain으로 이입시킨 후 *Agrobacterium*에 이들 plasmid 가 들어 있는지 조사한 결과, 그림 1과 같이 상기의 specific primers들을 이용하여 PCR을 수행한 결과 CBF/FAD insert 가 내재함을 확인 할 수 있게 되었으며, 이들 *Agrobacterium*를 오이 형질 전환 하는데 사용하였다.

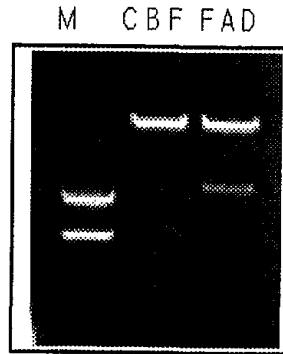


그림 1. PCR에 의한 *Agro* LBA4404에 도입된 CBF/FAD 유전자의 재확인 Lane 1: molecule marker, lane 2: CBF (698 bp), lane 3: FAD (1535 bp).

#### 나. 다양한 조직배양 기법을 이용한 오이 형질전환

지금까지 오이의 형질전환에 성공하였다는 보고는 일본의 Nishibayashi와 미국의 Chee PP등이 *Plant Cell Reports* (1990, 1996)에 보고한 2편의 논문과 Sarmiento GG등이 *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (1992)에 보고한 3편 정도이다. 이들 논문들을 토대로 실험을 2 년에 걸쳐 다양한 오이 절편을 이용하고 품종도 Inbred line 요시나리와 F1 백다다기 품종을 사용하여 반복적으로 수행하였으나 형질전환개체를 확보할 수가 없었다. 이들 방법에 의해 Kanamycin 선발배지로 재분화된 대부분의 오이들이 Northern blot 분석에서 Transgene의 발현을 확인 할 수가 없었다. 아래는 지금까지 수행한 오이의 형질전환방법과 연구결과를 요약하였다. 현재는 마지막 시도로서 오이형질전환을 지금까지 사용한 pBI121:FAD의 Kanamycin 선발대신 FAD유전자를 pCAMBIA binary vector에 삽입하여 (pCAMBIA:FAD), 선발효과와 비형질전환체 출현을(Escape) 줄일 수 있는 Hygromycin 선발을 이용한 오이 형질전환을 수행하고 있다. 또한 일본의 생물자원연구소에서 오이형질전환에 성공한 Dr.

Tabei를 초청하여 세미나 및 오이 형질전환방법 (Tabel et al., 1998)을 전수받아 형질전환방법을 계속하고 있는 중이다.

본 연구에서 형질전환오이를 획득하기 위해 수행하였던 방법들을 요약하면 다음과 같다.

- 1) 방법① : 절편(explant)으로 자엽(cotyledon)을 이용 (Chee EE (1990) Plant Cell Reports 9: 245-248))

#### 1-1). 오이 절편 준비

오이의 종자(요시나리, F4 자가세대)는 구례 오이시험장에서 분양 받아서 사용하였다. 무균배양을 위해 오이종자가 깨지지 않도록 유의하면서 종자의 종피를 제거한 후 종자를 다음과 같이 살균한다. 70% ethanol의 20 ml에 약 30초 동안 살균한 다음 1% NaOCl 에 약 2분 30초 동안 살균한다. 그 후 멸균증류수로 여러 번 행궤준 뒤 약 30분 동안 shaking 시키면서 완전히 씻어낸다. 멸균 filter paper로 종자를 옮겨서 물기를 제거한 후 hormone-free MS medium에 치상하여 배양한다. MS 기본 배지에서 6-7일 자란 오이를 blade로 cotyledon을 4등분하여 절편을 만들어 형질전환용 explant로 사용하였다.

#### 1-2). 오이 형질전환

Kanamycine이 50  $\mu$ g/ml이 함유된 5ml의 YEP medium에서 *Agrobacterium*을 overnight culture(28 $^{\circ}$ C)한다. Cell titer는 600 nm에서 OD 2.0 정도의 탁도로 준비한다. Cell이 준비되면 5000 rpm으로 3분 동안 원심분리 시켜 상징액은 버리고 pellet은 5 ml의 YEP medium으로 녹인다. 멸균된 Petri dish에 *Agrobacterium*이 녹아있는 5ml의 YEP medium을 준비하고 100  $\mu$ M acetosyringone을 첨가한다. 준비된 오이의 절편을 *Agrobacterium*과 약 3-5분



co-culture 시킨다. Co-culture가 끝나면 callus에 남아있는 과도한 *Agrobacterium*을 줄이기 위해 멸균 filter paper 위에 explants를 옮겨서 물기를 제거한 후 MS co-culture medium (표1의 재분화 배지 호르몬 조성과 동일)으로 옮겨서 암 상태에서 2-3일간 culture한다. 2-3일간 culture가 끝나면 멸균된 petri dish 에 멸균 증류수를 붓고 explants를 옮겨서 *Agrobacterium*을 제거해준다. Washing이 끝나면 sterile filter paper 위로 오이 절편을 옮겨 물기를 제거하고 건조시킨 후 kanamycine (100 mg/L) 및 cefotaxime (250 mg/L)을 함유한 MS 재분화 배지로 옮긴 후 암 상태에서 3주 동안 배양시키며 2주에 한번씩 새로운 배지로 옮기면서 선발한다. 사용한 MS 재분화 배지의 호르몬 조성은 표 1과 같다.

암 상태에서 배양한 절편은 3주 후부터 명 상태에서 배양하며 저항성 있는 callus가 형성되면 shoot를 유도한다. shooting이 일어나면 그 개체만을 blade로 떼어내어 hormone이 없는 MS rooting medium (kanamycine 100 mg/L, cefotaxime 250 mg/L)으로 옮겨서 뿌리를 유도시켰다.

표 1. 사용한 MS 재분화 배지의 호르몬 조성 및 호르몬 조성에 따른 재분화 결과

MS medium +(mg/L)					
	BAP	NAA	ABA	2,4-D	재분화 상태
1	2.25	0.56			cotyledone으로부터 callus형성하나 재분화 형태가 비정상적
2	1.12	0.56			1번과 유사한 형태로 callus 형성
3	0.56	0.56			callus형성이 거의 안됨
4	0.56	1.12			3번과 유사
5	2		1		일부 callus 형성하나 재분화율이 낮다.
6	2			1	3번과 유사

BAP/NAA, BAP/ABA, BAP/2,4-D 호르몬 조합에서 약 1주 후에 callus를 얻었으며 4-8주 후에 저항성 있는 잎이 유도됨을 확인할 수 있었다. 이들 조합으로부터 유도된 잎은 정상적으로 분화되지 못하여 계대 배양중 기형 형태의 잎으로 성장하여 이들로부터 shoot형성은 불가능하였다. 호르몬 조합에 따른 shoot 형성 결과는 표 1과 같다. 유도된 잎을 떼어내어 호르몬이 없는 배지에서는 뿌리 유도가 느리나 1mg/L IAA가 들어 있는 MS 배지에서는 1-2주만에 뿌리가 유도되었다. 그러나 100mg/L kanamycin 이 포함된 배지에서 시간이 지날수록 갈변되어갔다.

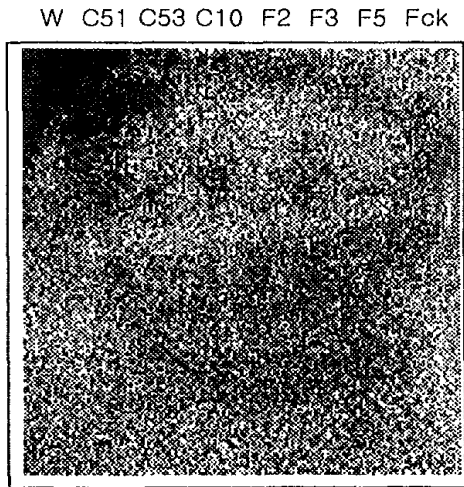
2) 방법② : Petiole만을 이용 (Sarmiento et al. (1992) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31: 185-193)

오이 종자를 소독하는 방법과 *Agrobacterium*과 co-culture 하는 방법은 방법①과 동일시 하였다. MS 기본배지에서 약 20일간 자란 오이의 제 1분엽, 제 2분엽의 petiole을 explants로 만들어 형질전환용에 사용하였다. 배지의 조성 and 형질전환 방법은 상기의 방법①과 동일하게 수행하였다. petiole의 경우 재분화 배지에서 일부 callus 형성과 동시에 잎이 유도되었으나 Kanamycin이 포함된 배지에서 정상적인 생육을 보이지 않고 갈변하면서 죽어갔다. 또한 재분화율이 낮아서 방법③으로 실험을 전환하였다.

3) 방법③ : Hypocotyl만을 이용 (Nishibayashi et al. (1996) Plant Cell Reports 15 : 809-814)

오이 종자는 백침, 흑침 요시나리, 겨우살이 청장, 그리고 백다다기를 이용하였다. MS 기본 배지에서 6-7일 자란 오이의 hypocotyl 상부 2-3mm에 위치한 부분을 사용하였다. 이 부위는 성장점 부위를 도려내고 cotyledon의 일부

분을 남겨 explant로 사용하였다. 이 전과 다르게 식물체에서 ethylene 생성을 억제하기 위해 1mg/L AgNO<sub>3</sub>를 사용하였다. MS co-culture medium(Zeatin 2mg/L)으로 옮겨서 암 상태에서 2-3일간 배양 후 재분화 배지(kanamycin 100mg/L, cefotaxim 250mg/L, Zeatin 2mg/L)로 옮겨주었다. Hypocotyl의 하배축 부근에서 3-4주 계대 배양하였을 때, direct shoot가 형성되었으며 대부분 정상적인 잎으로 분화되었다. 형질이 전환된 개체들을 선발하여 이들 total RNA를 추출한 후 다음과 같은 방법으로 northern 분석을 한다. Total RNA를 loading buffer와 섞어 65°C에서 가열하여 denaturation한 후 total RNA 10μg을 formaldehyde agarose gel에 loading하여 전기 영동한 후 10X SSC buffer에서 nylon membrane에 옮긴다. UV cross linking에 의해 RNA를 filter위에 고정한 후 hybridization을 하였다. CBF, FAD, NPTII gene을 probe로 삼아 60°C에서 hybridization하였다. Nylon membrane은 하루동안 exposure시켜 분석한 결과는 다음과 같다(그림2).



**그림 2.** 선발된 형질 전환체의 Northern blot 분석  
W: 대조구, F: FAD 형질전환체, C: CBF 형질전환체

Northern 분석은 CBF 29개체, FAD 46개체를 가지고 NptII와 각각 유전자를 probe로 삼아 분석하였으나 유전자의 발현을 측정할 수 없었다. 형질전환체를 다시 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 분리한 5  $\mu$ g total RNA를 oligo dT 및 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 합성하고 이들을 template로 이용하여 각각 CBF/FAD gene을 PCR반응을 확인하여 보았다. CBF 유전자를 증폭하기 위해 forward primer 5'-d(AGAGGATCCAAACAGAGTACTCTGATC)-3'(BamHI site는 밑줄), reverse primer 5'-d(GGTGGAGCTCTGGAAACGACTATCG)-3' (Sacl site는 밑줄)를 이용하고, FAD 유전자를 증폭하기 위해 forward primer 5'-d(AGAGGATCCTCAAGTTCTAATGGCG)-3' (BamHI site는 밑줄), reverse primer 5'-d(GTGGAGCTCGATCGATCGTATTTCAGAG)-3' (Sacl site는 밑줄)를 각기 사용하여 annealing 온도를 50°C에서 표준 PCR반응을 하였다. Northern blot 분석에서 NPTII 유전자의 발현을 보지 못했던 lines들로부터 각각 CBF/FAD gene을 확인하기위해 분리한 total RNA를 oligo dT 사용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA로부터 RT PCR 방법을 수행한 결과 다음 그림 3과 같았다.



그림 3. RT PCR에 의한 CBF/FAD gene의 재확인. CBF는 약 700bp이며 FAD는 1.5kb이나 원하는 위치에 band가 나타나지 않았다.

4) 방법④ : 잎이 포함된 petiole을 이용 (Sarmiento et al. 1992)

오이의 종자 (해동백다다기)는 상품화된 F1종자를 사용하였다. 종자를 살균한뒤 hormone-free MS medium에 치상하여 광상태에서 배양하였다. MS 기본 배지에서 10-15일 자란 오이의 제1본엽과 제2본엽의 petiole을 blade로 절단하고 잎이 1/3정도 붙어있게 하여 형질전환용 explant로 사용하였다. Co-culture 2-3주 후 재 분화 배지(kanamycin 30mg/L, zeatin 2mg/L)에서 petiole로부터 shoot가 형성되었으며, 이 shoot를 다시 kamamycin 100mg/L 이 함유된 재분화 배지에서 선발하였다. 선발된 shoot를 root 배지로 옮겨 뿌리를 유도하였으나 식물체의 외형이 비정상적이었으며, 시간이 지날수록 갈변되었고 재분화된 정상적인 개체를 선발할 수 없었다..

5) 방법⑤ : Callus유도와 callus의 suspension culture를 이용한 형질전환

MS 기본 배지에서 3-4일 자란 오이의 자엽을 이용하여 2,4-D가 2mg/L 포함된 배지에서 callus를 유도시켰다. 약 한달 후 callus가 유도되기 시작하였으며, 계대 배양하면서 양질의 callus만을 선발하여 잘게 부수고 2,4-D가 1mg/L와 2mg/L가 들어있는 액체 배지에 넣어 suspension culture를 하였다(그림4). Suspension culture에서 자란 embryogenic callus를 여러 가지 hormone으로 준비된 고체 배지에서 재분화 여부를 확인하였다. 사용한 hormone 조성은 zeatin (2mg/L, 4mg/L, 6mg/L, 8mg/L), BAP:NAA(5:1  $\mu$ M), BAP (5  $\mu$ M/L, 10  $\mu$ M/L)를 각각 사용하였고 대조구로 MS 기본 배지를 사용하여 비교하였다. 대조구로 사용한 MS 기본 배지에서는 chlorophyll이 형성되지 않았으며, hormone이 함유된 배지에서의 callus에서는 chlorophyll이 형성되었으나 2개월의 생육기간에도 shoot가 형성되지 않아 형질전환에 이용하지 못하였다.

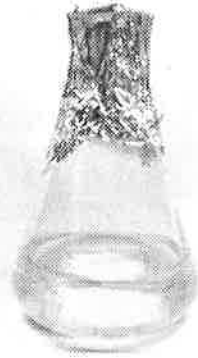


그림 4. suspension culture

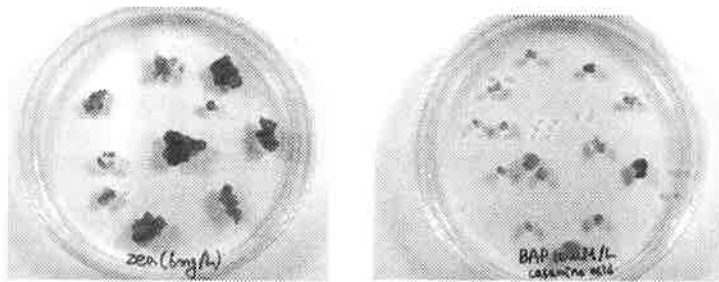


그림 5. embryogenic callus의 재분화

6) 방법⑥ : 생장점 부위를 포함한 hypocotyl을 이용

선발의 효과를 높이기 위해 새로운 binary vector system을 추가 하였다. 지금까지 사용한 Kanamycin선발표지를 가진 pBI121:FAD vector외에 Hygromycin 선발표지를 가진 pCAMBIA1380:FAD를 조제하여 본 실험에 사용하였다. Hygromycin 선발은 Nontransgenic escape 출현율을 줄이고 정상적인 식물체 분화에 도움이 될 것으로 사료되어 사용하고자 한다. 두 vector모두 상기와 같은 방법으로 Agrobacterium을 매개로 하여 형질 전환을 수행하였다. MS 기본 배지에서 3-4일 자란 오이의 hypocotyl 상부 2-3mm에 위치한 부분을 사

용하였다. 이 부위는 cotyledon의 일부분만을 남기고 hypocotyl의 상부 2-3mm 부위를 남기고 절단하여 형질전환에 이용하였다. 공조 배양하여 MS co-culture medium으로 옮겨서 암 상태에서 2-3일간 배양 후 재분화 배지 (hygromycin 20mg/L, cefotaxim 250mg/L, Zeatin 2mg/L)로 옮겨주었다. 일부는 3분 동안 진공상태를 유지시켜 *Agrobacterium*이 효율적으로 감염시킬 수 있도록 한 후 다시 상온에서 약 1시간동안 공조배양하였다.

Hypocotyl을 형질전환 시킨후 1주일 정도 지나 생장점 부위에서 shoot가 유도되었다. pBI121 vector를 사용한 경우 kanamycin100mg/L 사용하여 형질전환체를 선발하였으나 Nontransgenic control 역시 재분화되어 shoot이 일어남으로 kanamycin 선발은 문제가 있는 것으로 사료된다. Kanamycin의 농도를 높일 경우 (200 mg/L) 비정상적 shoot가 생성되어 정상적 식물체로 자라지 못하였다. pCAMBIA1380 : FAD vector를 사용한 경우 hygromycin 50mg/L으로 선발하였으나 살아남은 explant가 없었다. 이는 항생제의 함량이 너무 높은 것으로 사료되어 그 함량을 40mg/L로 낮추어 선발하였다.

Hygromycin 40mg/L에서도 재분화율이 낮아서 항생제의 함량을 더 낮추었다. 공조배양 후 재분화 배지로 바로 옮겨줄 경우 hygromycin을 10mg/L으로 낮추어도 shoot가 형성되지 못하고 모두 죽어서 재분화 과정동안 hygromycin이 없는 재분화 배지에서 배양하였다. Shoot가 형성되면 blade로 shoot를 절단하여 hygromycin 20mg/L가 들어있는 재분화 배지로 옮겨 주었으며, 얼마후 NAA 1mg/L가 들어있는 root induction 배지로 옮겨주었다. Kanamycin을 사용했을때와 재분화된 shoot의 모양과 시기가 차이가 있으며, hygromycin을 사용할 경우 높은 양을 처리할 수 없어서 형질전환체 선발이 좀 느리며, shoot의 모양도 약간 비정상적이고, root 유도 배지에서 뿌리 형성이 느렸으며, 어느 정도 자란 이 후 성장이 멈추면서 갈변하면서 죽어갔다.

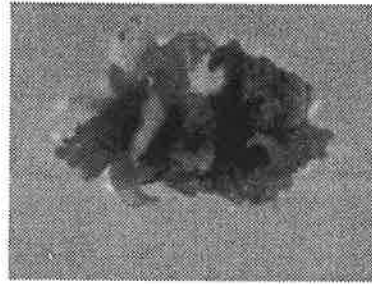


그림 6. hypocotyl로부터 형성된 shoot

7) 방법⑦: 성장점 부위를 이용

오이껍질을 제거하고 2일 동안 물에 침지 시킨 후 소독하여 배지에 하루 동안 배양하였다. 내피를 제거하고 자엽 하나를 떼어내어 남아있는 자엽의 성장점 부위에 바늘로 상처를 주었다. *Agrobacterium*과 공조배양 후 cefotaxim 만 포함된 재분화 배지에 옮겨주었으며, 약 1주일이 지나면 상처부위에서 shoot가 유도되었다. 1-2주동안 계속 배양한 후 shoot가 어느정도 자라면 shoot만을 절단하여 hygromycin이 20mg/L 포함된 배지로 옮겨주었다. 그러나 hygromycin 이 포함된 배지에서 시간이 지날수록 점차 죽어갔다.



그림 7. 성장점 부위에서 shoot 유도



#### 8) 방법⑧: 자엽과 초엽을 절단

MS 기본 배지에서 2-3일 자란 오이를 자엽을 둘다 제거하고 생장점 부위에 초엽을 절단하는 동시에 생장점 부위에 상처를 주었고, 뿌리는 제거하지 않았다. *Agrobacterium*을 먼저 2mL 하룻동안 배양 후 20mL에서 다시 배양하여 *Agrobacterium*의 활력을 증가시켜 주었다. 위와 마찬가지로 공조배양 후 hygromycin 없는 배지에서 약 1주일간 배양하면 상처난 생장점 부위에서 shoot가 형성되었다. shoot만을 따로 분리시키지 않고 오이 절편을 그대로 hygromycin 20mg/L이 포함된 재분화 배지에서 선발하였다. 그러나 co-culture 이후 *Agrobacterium* 제거가 힘들었고 오염 정도가 심해서 다른 방법을 시도하였다.

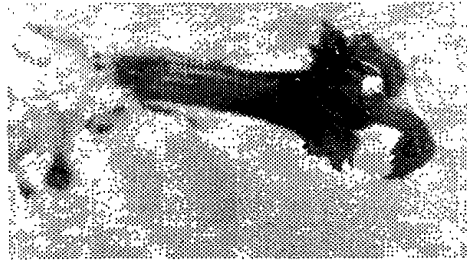


그림 8. 초엽을 제거한 부위에서 shoot 유도

#### 9) 방법⑨ :자엽을 이용 (Tabei et al (1998) Plant Cell Reports)

이 방법에 사용한 품종은 은성 백다다기와 겨우살이 청장을 이용하였고, pCAMBIA1380:Ubiquitin:fad7과, pBI121:CBF를 동시에 사용하였다. 기존의 방법과 달리 오이 종자를 껍질을 제거하고 blade로 뿌리 부분과 자엽의 1/3의 부분을 제거한 나머지 부분을 동일한 방법으로 소독한 후, BA/ABA(2mg/L:1mg/L)이 포함된 MS 배지에 치상하여 3일 후 *Agrobacterium*과 co-culture하였다.

*Agrobacterium*은 하룻동안 배양한 후 원심분리하여 acetosyringone이 포함된 MS 액체 배지에서 1시간 동안 다시 배양후 co-cultuer하는데 이용하였다. 약 2시간 동안 co-culture를 하고, co-culture 배지에 filter paper를 깔고 그 위에 오이 절편을 올려 놓아 *Agrobacterium*이 활력을 갖도록 하였다. co-culture가 끝나고 *Agrobacterium*이 과다하게 자란 것을 제외한 나머지 오이 절편만을 최대한 손상을 덜 받도록 하기 위해서 washing 단계를 없애주었다. 지금까지 co-culture 이후 항생제가 포함된 배지에 옮겨주었으나 재분화율을 높이기 위해서 호르몬만 포함된 재분화 배지에 옮겨주었다. 2-3주가 지나면 일부 shoot가 유도되었으며, 이때 fad7은 hygromycin 10mg/L이, CBF는 Kanamycin 25mg/L이 포함된 배지로 옮겨주었다. 현재 다량의 shoot가 유도된 상태이며 뿌리가 쉽게 유도되지 않아 항생제가 없는 배지로 옮겨 뿌리를 유도하고 있다. 뿌리가 유도되면 항생제 농도를 높여서 형질전환체를 선발할 것이다.

### 3. 참고문헌

- Chee PP (1990) Transformation of *Cucumis sativus* tissue by *Agrobacterium tumefaciens* and the regeneration of transformed plants. 9: 245-248.
- Nishibayashi S, Kaneko H, Hayakawa T (1996) Transformation of cucumber plants using *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration from hypocotyl explants. Plant Cell Reports 15: 809-814.
- Sarmiento GG, Alpert K, Tang FA, Punja ZK (1992) Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and expression of kanamycin resistance in pickling cucumber. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31: 185-193.
- 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

## 제2절 *Arabidopsis FAD7* 유전자를 과다 발현하는 형질전환 벼 육성

본 연구는 2년차 연구결과 수행 중 오이의 형질전환이 매우 어렵다는 사실을 보고하였고 이에 따라 센터에서 오이의 형질전환 연구를 계속적으로 연구하지만, FAD7 유전자를 단자엽 주곡식물인 벼에 도입하여 저온내성 효과를 관찰하기 위한 보조 수단으로 연구를 병행하는 것이 좋겠다는 센터의 의견을 수렴하여 수행한 연구결과를 보고합니다.

### 1. 재료 및 방법

#### 가. pCAMBIA1380:Ubiquitin promoter: FAD7 벡터 조작

벡터 pCAMBIA1380은 CAMBIA 센터(Australia)에서 구입하였으며, 이 벡터는 T-DNA 부위에 hygromycin 저항성 유전자를 가지고 있으며, E.coli로 형질전환 후 선별하기 위한 Kanamycin 저항성 유전자를 가지고 있다. *Arabidopsis* 유전자 FAD7을 벼에 과다발현 시킬 promoter는 벼의 형질전환시 주로 사용되는 maize ubiquitin promoter를 사용하였으며, 이 Ubiquitin promoter는 포항공대 안진홍 교수님으로부터 분양 받은 pGA1611 vector에서 획득하였다. 즉 pGA1611 vector를 BamH1/SacI으로 절단하여 얻은 1.9 kb

ubiquitin promoter를 준비하였다. pBluscript에 있는(pSK-FAD7) FAD7 유전자를 T7 및 RP(BstEII site가 있는 reverse primer)를 이용하여 PCR 생성물을 얻고 이를 다시 SacI/BstEII로 절단하여 1.9 kb의 FAD7을 준비하였다. 이렇게 준비된 Ubiquitin promoter 및 FAD7 단편들을 BamHI/BstEII로 절개된 pCAMBIA1380으로 double ligation방법으로 ligation 하여 pCAMBIA1380:Ubiquitin promoter:FAD7 cassette를 제조하였다

나. pCAMBIA1380:Ubiquitin promoter:FAD7 벡터의 *Agrobacterium*으로 형질 전환

pCAMBIA1380:Ubiquitin promoter:FAD7을 *Agrobacterium* strain LBA4404에로 freeze and thaw 방법으로 형질전환하였다.

다. 벼 종자로부터 캘루스 유도

동진벼(*Oryza sativa*)의 callus가 *Agrobacterium*을 이용한 벼 형질전환에 이용되었다. 먼저 우량한 종자만을 선별하여 깨지지 않도록 유의하여 종피를 벗겨낸 다음, 70% 에탄올의 10mL에 약 30초 동안 표면 살균된 3차 증류수로 잘 헹구어 준 다음 약 50분 동안 10mL의 2% NaOCl에 50분간 침지시켜 살균한다. 이후 멸균증류수 30mL로 약 3-4번 반복해서 세척해주었다. 이 종자는 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)가 2mg/L 함유된 캘루스 유도 배지(2N6)에 치상하여 암상태에서 배양하였다. 배양 후 3-4주가 지나면 벼종자의 배반으로부터 캘루스가 유도되었다. 이렇게 배반으로부터 유도된 캘루스를 활성화하여 균주와 공조배양 시키기 위해 지름이 1-2mm인 둥근 모양의 윤기 있는 캘루스만을 선별하여 같은 배지로 계대 배양하여 3-4일 동안 암상태에서 캘루스를 활성화시켰다.

#### 라. *Agrobacterium* 매개방법에 의한 벼 형질전환

pCAMBIA1380을 가지고 있는 *A. tumefaciens* LBA4404를 5  $\mu$ g/mL kanamycin과 20  $\mu$ g/mL hygromycin이 함유된 YEP 배지에서 하루동안 배양하여 농도가 600mM에서 OD 2.0 정도의 탁도로 준비하였다. 균주가 준비되면 3000rpm으로 10분 동안 원심분리 시켜 상등액은 버리고 펠렛을 acetosyringone이 함유된 5mL의 AA-AS 배지로 녹인다. 멸균된 petri-dish에 *Agrobacterium*이 포함된 위의 AA-AS 배지를 준비하고, 3-4일 동안 암 배양시켜 활성화된 캘루스를 이 배지에서 약 30분간 공조배양 시켰다. 공조배양이 끝나면 캘루스 표면에 남아있는 과다한 *Agrobacterium*을 줄이기 위해 멸균된 여과지위에 캘루스를 옮겨서 물기를 뺀 후 균주가 캘루스내로 침입시 acetosyringone은 반드시 첨가되어야 할 것이므로 1mL의 AA-AS 배지로 포화시킨 멸균된 여과지가 갈려있는 2N6-AS 배지로 공조 배양한 캘루스를 옮겨 암 상태에서 2-3일간 배양한다(28°C).

#### 마. 형질전환 캘루스 선발 및 재 분화

2-3일간 공조배양을 시키면 캘루스 표면에 *Agrobacterium*과다하게 자라있는데 이를 제거하기 위해 30mL의 cefotaxime water(250mg/L)가 담겨있는 삼각플라스크에 캘루스를 옮겨서 3-4회에 걸쳐 흔들어 주면서 캘루스 표면을 씻어주었다. 이 과정에서 대부분의 표면에 붙어있는 *Agrobacterium*은 씻겨져 나와 제거된다. 이 캘루스를 멸균된 여과지위로 옮겨 물기를 제거하고 건조시킨 후 선발배지인 2N6-CH배지로 캘루스를 상처를 주지 않으면서 옮겨 암상태에서 배양하였다. 2주에 한번씩 2회 정도 새로운 2N6-CH 배지로 옮기면서 형질이 전환된 캘루스를 선발하고 이 시기에 형질 전환된 개체들은 왕성하게 분열하면서 살아나며 그렇지 않은 것들은 갈변하여 죽게 된다. 선발과정

에서 살아남은 켈루스 중 살아나는 부분만을 떼어내어 재 분화배지인 MS-BN 배지로 옮겨서 분화과정으로 들어간다. 약 2주에 한번씩 새 배지로 옮겨주며, 배양 후 약 한달 후에는 엽록소가 생성되며 초엽이 다중 분화된다. 잎이 어느 정도 전개되고 뿌리의 발생이 보이면 그 개체만을 떼어내어 MS-RT배지로 옮겨서 뿌리를 유도시켰다. 약 1주일이 지나면 뿌리가 왕성하게 유도되면 각 개체를 원예용 상토와 vermiculite를 1:1로 혼합한 토양을 담은 포트에 이식하여 1주일정도 순화시킨 후 포장에 이식하였다.

표 1. 형질전환에 이용한 배지 조성

Medium	Composition
YEP	10g/L Bacto - peptone, 10g/L Bacto - yeast extract, 5g/L NaCl, 15g/L Bacto - agar.
2N6-basal	N6 salts and vitamins, 5mg/L Fe <sub>2</sub> EDTA, 300mg/L casein enzymatic hydrolysate, 500mg/L proline, 500mg/L glutamin, 30g/L sucrose, 2mg/L 2,4-D, 2.8g/L phytigel, pH 5.8.
2N6-AS	2N6-basal medium(except sucrose) with 10g/L glucose and add acetosyringone (100 $\mu$ M) after autoclaving, 2.8g/L phytigel, pH 5.2.
2N6-C	Autoclaved 2N6 basal medium with 250mg/L cefotaxime, 2.8g/L phytigel, pH 5.2.
2N6-CH	Autoclaved 2N6 basal medium with 40mg/L hygromycin and 250mg/L cefotaxime, 2.8g/L phytigel, pH 5.2.
Shoot I induction	MS salts & vitamins, 2g/L casamino acid, 20g/L sorbitol, 30g/L sucrose, 2mg/L BAP, 1mg/L NAA, 40mg/L hygromycin, 250mg/L cefotaxime, 2.8g/L phytigel, pH 5.8.
Root induction	MS salts & vitamins, 2g/L casamino acid, 30g/L sorbitol, 30g/L sucrose, 2.8g/L phytigel, pH 5.8.
AA	AA macroelements, N6 microelements & vitamins, 5mg/L Fe <sub>2</sub> EDTA, 1mg/L 2,4-D, 20g/L medium sucrose, pH 5.8.
AA-AS	AA medium containing 100 $\mu$ M acetosyringone.

#### 바. 형질전환체의 DNA 추출과 Southern blot 분석

Hygromycin 선발배지에서 재 분화되어 온실에서 재배한 T<sub>0</sub> 세대의 재 분화된 개체 중 7개체와 대조구를 선별하여 그들의 잎으로부터 게놈 DNA를 분리한 후 southern 분석을 수행하였다. Phenol/chloroform 방법을 이용, 게놈 DNA를 분리하여 그 중 5  $\mu$ g을 취하여 digestion buffer가 시료에 잘 스며들도록 4°C에서 2시간 정도 배양한 뒤 제한 효소 Sst I 으로 절단하되 두 번에 걸쳐서 완전히 절단하였다. 절단된 게놈 DNA를 1X TBE에서 0.8% agarose gel을 통해 분리시켜 DNA가 절단된 것을 확인하고 nylon membrane에 전이시킨 후 UV-crosslinker로 고정하였다. 이렇게 준비한 nylon membrane을 약 3시간 동안 hybridization buffer에 포화되도록 하였다. 애기장대의 fad7 gene을 probe로 사용하여 random primer 방법으로 <sup>32</sup>P-dCTP를 표지하여 하루 밤 동안 배양한 다음 2X SSC와 0.1X SSC를 차례로 사용하여 membrane을 세척하고 이를 phosphoimaging analyzer로 분석하였다.

#### 사. 형질전환체의 northern blot 분석

게놈 DNA를 추출할 때와 동일한 계통의 잎을 액체질소에 담아서 곱게 빻은 후 TRi reagent 1mL당 시료 0.1g을 혼합하여 상온에서 약 5분간 방치한 후 13,500rpm으로 10분간 원심분리 시켜 상등액만을 0.2mL의 chloroform과 혼합하여 상온에서 10분간 방치한 후 원심분리 하였다. 이 후 용액부분만을 새로운 튜브에 옮겨 0.5mL의 isopropanol과 잘 섞은 후 상온에서 10분간 방치하고 다시 원심분리를 하여 침전된 펠릿을 diethyl pyrocarbonate-treated water에 녹여 전체 RNA를 준비하였다. 이 중 15  $\mu$ g의 전체 RNA를 취하여 에탄올로 침전시킨 후 6.5% formaldehyde와 505 formamide가 함유된 10×Mops 완충액과 혼합하여 80°C에서 3분간 변성시켰다. 변성된 시료를 1.9%

formaldehyde가 포함된 1×Mops 완충액이 담긴 전기영동 키트에서 0.8% formaldehyde agarose gel을 통하여 전체 RNA를 분리시켰다. 25mM sodium phosphate로 두 번에 걸쳐 젤을 세척한 후 모세관 현상을 이용한 방법으로 전체 RNA를 nylon membrane에 전이시켜 UV-crosslinker로 고정시켰다. Southern hybridization 방법과 동일하게 *fad7* gene을 probe로 사용하여 random primer 방법으로 <sup>32</sup>P-dCTP 표지하여 하루 밤 동안 배양한 다음 2X SSC와 0.1X SSC를 차례로 사용하여 membrane을 세척하고 이를 phosphoimaging analyzer로 분석하였다.

#### 아. Hygromycin 저항성 분석

T<sub>0</sub>세대의 형질전환체의 vectors에 들어있는 항생제 저항성 유전자가 식물내로 도입되었는지 알아보기 위해서 형질전환체 7계통과 대조구의 잎을 일정 크기의 disc를 만들었다. 각 계통 버섯의 disc를 5개씩 얻어 100mg/L Hygromycin 이 포함된 용액에 1주일간 침지시켰다.

#### 자. T<sub>1</sub>종자의 유전력 검정

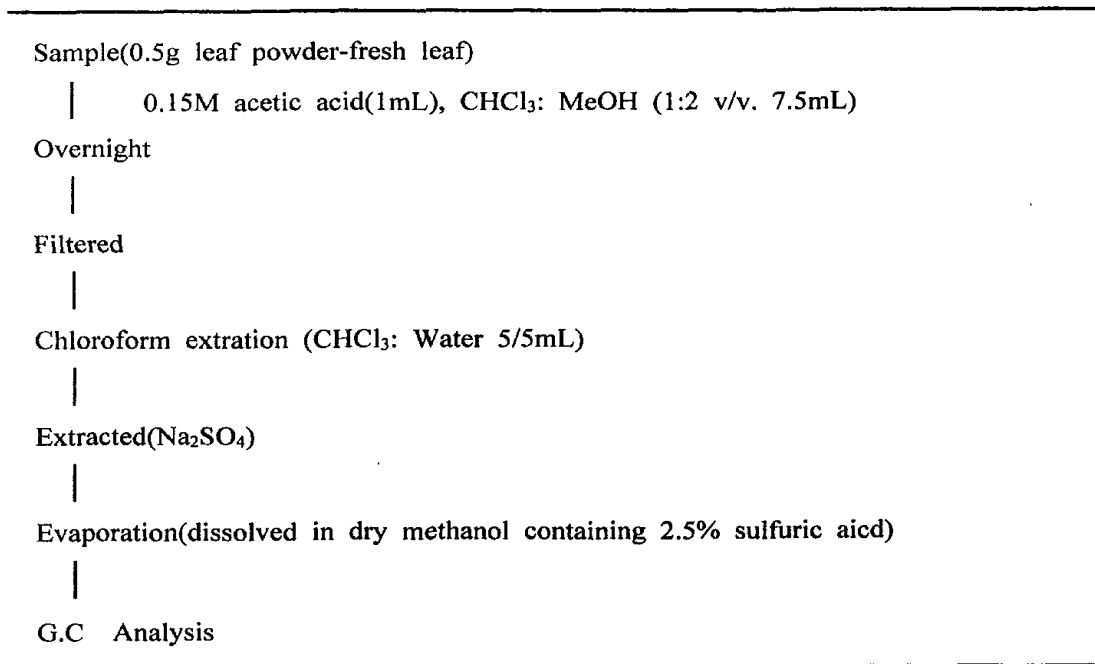
저온 저항성을 갖는 애기장대 *fad7* 외래 유전자가 도입된 자가 수분된 벼에서 수확한 T<sub>1</sub>세대에서의 유전자 전이 유무와 후대 발아 분리비를 알아보기 위해 대조구와 형질전환체 7개 계통을 선발하였다. 종자의 종피를 제거한 후 캘루스를 유도할 때 사용하였던 방법과 동일하게 70% 에탄올과 2% NaOCl로 표면 살균하였다. 이 후 50mg/L hygromycin이 함유된 1/3 MS 배지에 표면 살균된 종자를 치상 하였으며, 약 일주일동안 배양하여 종자의 발아 유무를 검정하여 저항성인 종자와 감수성인 종자의 분리비를 살펴보았다.



#### 차. 지방산 조성 분석

애기장대 *fad7* 유전자에 의해서 형질전환된 벼의 지방산 조성이 변화되었는지를 알아보았다. 지방산 조성 분석을 위해서 T<sub>0</sub>세대의 각 계통의 벼 잎을 취하여 50℃에서 72-96시간동안 건조시킨 후 분말기로 갈아서 파우더를 얻었다. 각 계통의 잎의 파우더 0.5g을 acetic acid가 함유된 메탄올과 chloroform으로 침지 시킨 후 하루동안 냉동 보관하였다. 다음으로 이 용액을 여과시켜서 10mL Chloroform으로 분리시킨 후 지방층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 여과시켜서 물을 제거시킨 후 Chloroform 층만을 수거하여 증발시켰다. 증발된 시료를 다시 황산이 포함된 메탄올로 녹인 후 컬럼에 의해 색소제거 과정을 거쳐 gas chromatography에 의해 지방산 조성 분석을 하였다. 지방산 추출과정과 지방산 분석위한 gas chromatography의 조건은 다음 표3과 같다.

표 2. T<sub>0</sub> 세대로부터 지방산 분석 위한 Fraction scheme



### 표 3. 지방산 분석위한 gas chromatography의 조건

- 
1. column : Rtx-I, 30m × 0.25mm
  2. Temp. (injector) : 225°C, Temp (detector) : 275°C
  3. Temp. program : 145°C (1 min.), 145→260→ (5°C/min.), 260°C (12 min.), 160→170°C (2°C/min.), 170°C (90 min.), 170 →260°C (12 min.)
  4. instrument : GC-17B, shimadzu detector : FID
- 

#### 카. 저온 처리와 Malondialdehyde(MDA) 측정

대조구와 형질전환체를 저온 처리하여 MDA를 측정하였다. 식물이 저온에 노출되어 스트레스를 받으면 불포화 지방산이 과산화되어 MDA로 전환되는데 MDA 함량이 높을수록 저온에 감수성을 나타낸다. 먼저 형질전환체는 50mg/L hygromycin이 포함된 배지에, 대조구는 포함되지 않은 배지에서 각각 배양하여 약 8일 후 포트로 옮겨 심었다. 각각의 벼가 3-4엽기가 되었을 때 포트에 있는 벼를 2일 동안 5°C에 노출시켰다. 각 계통의 벼 잎을 12시간마다 0.1g씩 취하여 -80°C에서 보관하여 MDA 추출하기 위해 준비하였다. 0.5%TBA와 20% TCA 혼합 용액에 준비한 벼 잎을 넣어 분쇄시킨 후 원심 분리하였다. 상등액만을 취하여 100°C에서 25분간 끓인 후 ice에 넣어 식힌 후 다시 원심 분리하였다. 이 상등액을 취하여 spectrophotometer로 440nm, 532nm, 600nm에서 각각 흡광도를 측정하였다.

#### 타. Jasmonic acid 분석

T<sub>1</sub>세대의 형질전환체와 대조구를 가지고 JA를 추출하기 위해서 각 샘플의 잎을 1g씩 취해서 액체질소를 넣어주면서 파우더를 만들었다. 식물에 상처를 입었을 때 JA가 유도됨으로 벼 잎을 상처주지 않은 것과, 벼 잎을 5mm 간격으로 절단하여 상처를 준 후 0.5% glucose 용액에 24시간 동안 침지 시킨

것을 분리하여 JA 함량을 측정하였다. 잎 파우더는 아세톤과 50mM citric acid (70:30V/V)의 용액으로 녹여주었다. 그리고 Dihydro-JA를 internal standard로 이용하였다. 실내온도에서 하루동안 방치하여 organic solvent를 증발시키고 남아있는 용액을 diethyl ether로 7mL씩 세 번 반복하여 추출하였다. 이 추출물을 360mg solvent aminopropyl이 함유된 solid-phase extraction cartridge에 loading하고, 이 cartridge는 trichloromethane:2-propanol의 solvent mixture 10mL가지고 씻어준 후 결합되어있는 JA와 standard는 10mL diethyl ether:acetic acid(98:2,V/V)를 가지고 elution시켰다. 이 용액을 GC-MS로 분석하였다.

#### 파. *OsPR1b* 유전자를 이용한 Northern 분석

*OsPR1b* 유전자를 probe로 삼아 Northern 분석을 하기 위해서 대조구, vector만을 이입한 transgenic control, 그리고 형질전환체중 F10과 F12 line만을 선발하여 실험하였다. 각 샘플의 벼잎을 5mm 간격으로 절단한 후, 24시간 동안 0.5% glucose에 침지시켜 RNA를 분리하였다. Northern 방법은 위와 동일하게 수행하였다.

#### 하. T<sub>2</sub>세대의 수량조사

T<sub>1</sub>세대를 소독 과정을 거쳐서 모판에 파종하여 포장으로 이식한 후 T<sub>2</sub>세대를 수확하였다. T<sub>2</sub>세대에서 *fad7* 유전자가 발현되어 정상적인 생육을 하였는지 알아보기 위해 수량조사를 하였으며, 형질전환체의 leaf disc를 100mg/L hygromycin이 포함된 용액에 침지시켜 열성 유전자를 선발하였다.

## 2. 연구결과

### 가. pCAMBIA1380:Ubiquitin promoter: FAD7 벡터 조작

pCAMBIA1380:Ubiquitin promoter: FAD7 벡터 조작은 다음 그림과 같이 하였다. pCAMBIA1380:Ubiquitin promoter:FAD7 vector cassette가 *Agrobacterium* LBA4404에 호형질 전환되었다.

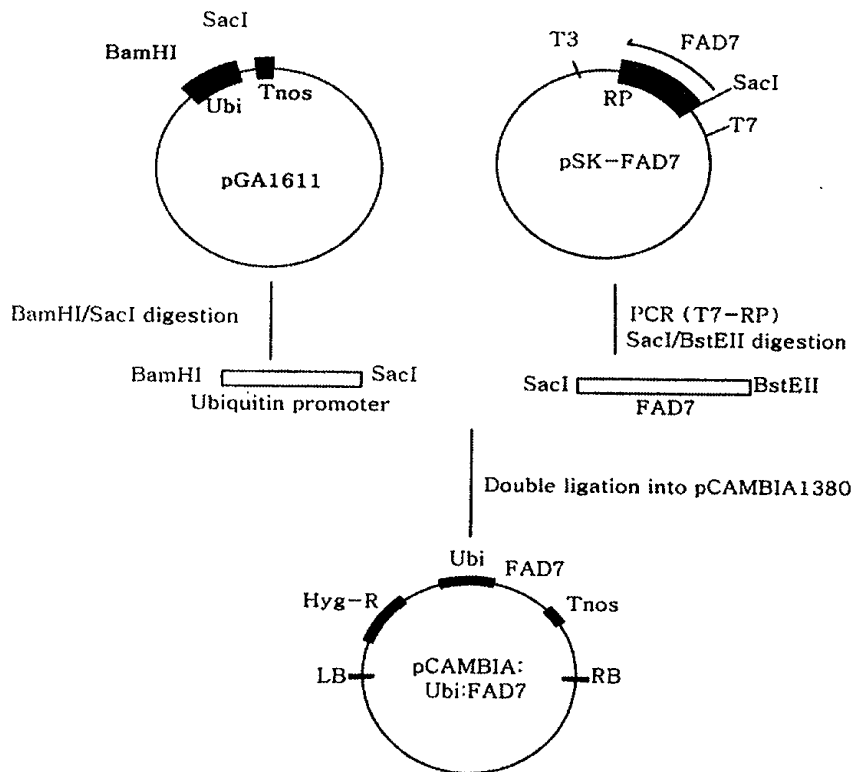


그림 1. pCAMBIA1380:Ubiquitin promoter:FAD7 vector cassette의 제작 모식도

#### 나. *Agrobacterium* 매개방법에 의한 벼 형질전환

동진벼 종자의 배반으로부터 캘루스를 유도하기 위해 2N6 기본배지에서 3-4주간 배양하여 다량의 캘루스가 유기 되었다. 배의 발생을 유도할 수 있는 것으로 짐작되는 캘루스만을 선별하여 형질이 전환된 *Agrobacterium*와 co-culture하여 선발 배지로 옮겼다. 선발 배지인 2N6-CH 배지에서 약 4주 동안 배양하면 계속 분열하면서 살아남는 캘루스와 반면에 형질이 전환이 안된 세포들은 갈변하면서 활력을 잃었으며 마침내는 검게 변하는 캘루스가 관찰되었다. 분열을 계속하는 캘루스를 선발하여 재분화 배지로 옮겨 약 2-3주가 지나면 엽록소가 형성되면서 점차 여러 잎이 유도되었다. 이 때 하나의 캘루스에서 나온 여러개의 개체들은 같은 line으로 취급하였으며, 하나의 군에서는 하나만을 독립된 line으로 인정하였다. 이 후 뿌리가 유도되기 시작하면 호르몬이 없는 MS-RT 배지로 옮겨 주어 약 1주일이 지나면 뿌리가 다량 유도됨을 관찰할 수 있었다. 이 중 19개 line을 선발하여 성장실에서 순화 과정을 거쳐 포장에 이식하여 종자를 얻을 수 있었다.

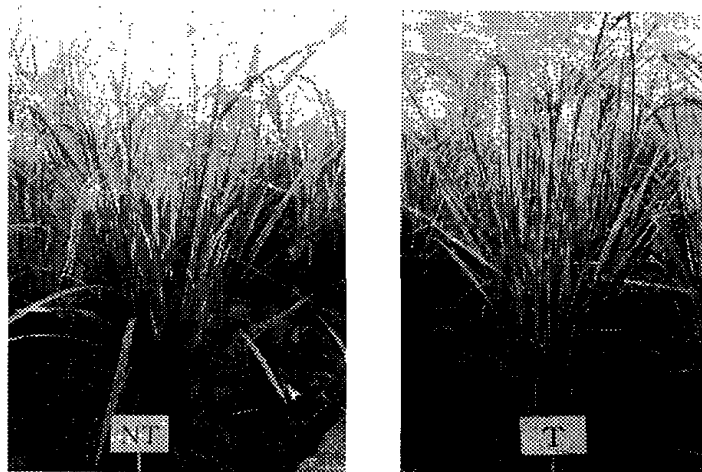


그림 2. 포장에 있는 대조구와 형질전환체

다. 형질전환체의 southern blot 분석

*Arabidopsis*의 FAD 유전자를 형질 전환시킨 7개체를 선발하여 이들 외의 total DNA를 분리하였다. 분리한 total DNA 5 $\mu$ g을 Sst I으로 절단하고 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 nylon membrane에 transfer하였다. UV cross linking에 의해 DNA를 filter위에 고정된 후 hybridization을 수행하였다. FAD gene을 probe로 삼아 60 $^{\circ}$ C에서 hybridization하였으며 nylon membrane을 6일 동안 exposure시켜 분석한 결과는 다음 3과 같다.

그림과 같이 형질전환체에서는 DNA 밴드가 나타나지 않았으며, 형질전환체 모두에서는 DNA 밴드가 나타났다. 이는 모든 형질전환체가 애기장대 fad7을 가지고 있음을 알 수 있으며, F10 line은 3개의 밴드가 나타나 fad7 유전자가 여러개 형질 전환되었음을 알 수 있었다.

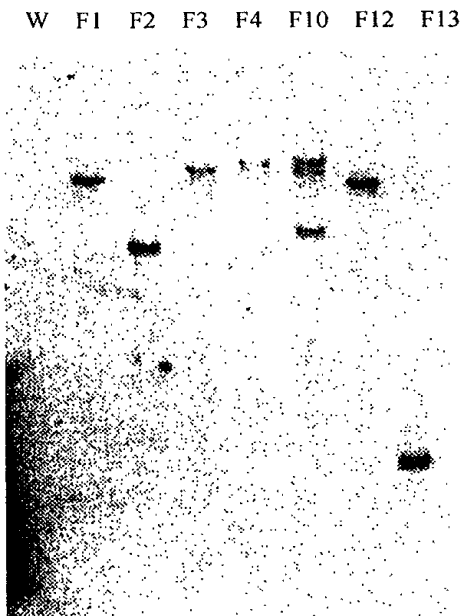


그림 3. 선발된 형질 전환체의 Southern blot 분석  
W: 대조구, F1-F13: 형질전환체

라. 형질전환체의 Northern blot 분석

*Arabidopsis*의 FAD 유전자를 형질 전환시킨 7개체를 선발하여 이들 잎의 total RNA를 Tri reagent 방법(Sigma)을 이용하여 분리하였다. 분리한 Total RNA 10 $\mu$ g을 loading buffer와 섞어 formaldehyde agarose gel에 전기영동하였다. 10X SSC buffer에서 nylon membrane으로 RNA를 옮긴후 UV cross linking에 의해 RNA를 filter위에 고정하고 FAD gene을 probe로 삼아 60 $^{\circ}$ C에서 hybridization하였다. nylon membrane은 하루동안 exposure시켜 분석한 결과는 다음과 같다. Northern blot 분석 결과 대조구에서는 아무런 밴드가 나타나지 않아 Southern blot 분석 결과와 일치하였으며, 형질전환체 모두에서 밴드가 나타나 RNA가 발현됨을 알 수 있었다.

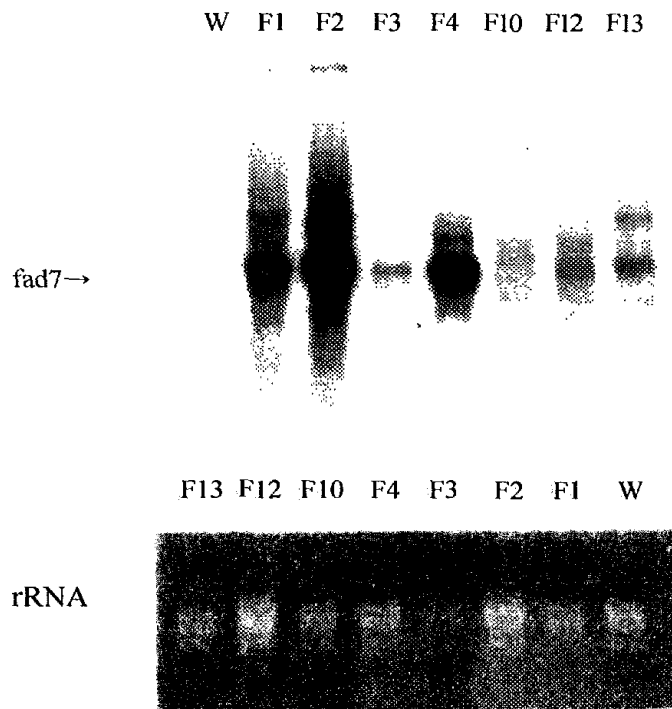


그림 4. 선발된 형질 전환체의 Northern blot 분석  
W: 대조구, F1-F13: 형질전환체

다. Hygromycin 저항성 분석

7개 line의 형질전환체와 대조구의 T<sub>0</sub>세대를 가지고 Hygromycin 저항성 실험을 하였다. 모든 형질전환체 line에서는 50mg/L hygromycin 용액에 1주일간 침지 시켰을 때 대조구와는 달리 아무런 색 변화가 나타나지 않았다. 그러나 hygromycin에 감수성인 대조구의 앞 disc에서는 갈변하면서 타들어가는 현상을 보였다. 이러한 점으로 보아 모든 형질전환된 벼가 hygromycin 저항성 유전자를 가지고 있는 것으로 사료된다.

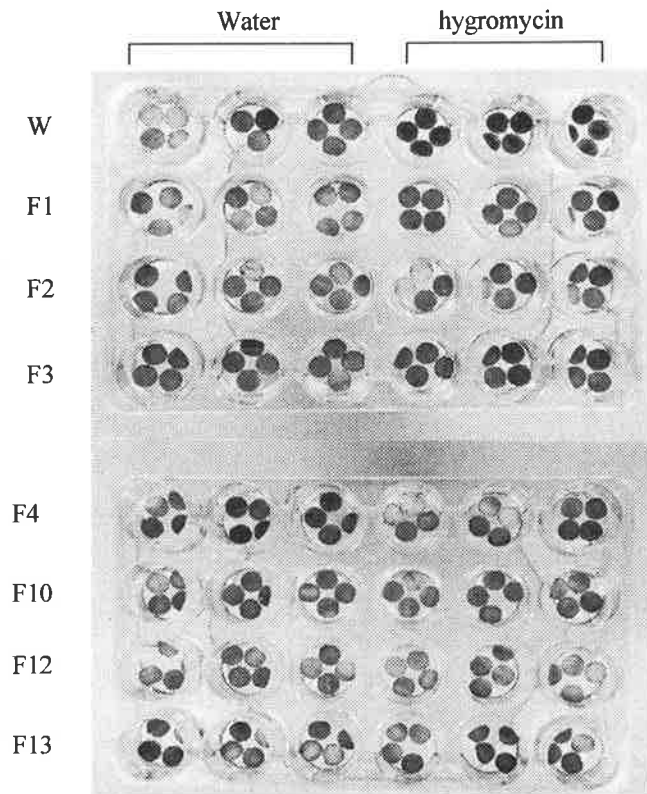


그림 5. Hygromycin 저항성 분석

Water : sterile water, Hygromycin : 100mg /L hygromycin solution.

W: 대조구, F1-F13: 형질전환체



바. T<sub>1</sub>종자의 유전력 검정

애기장대 fad7 유전자가 T<sub>1</sub> 세대의 식물체에서 안정하게 유전되는지 알아보기 위해서 분리비를 조사하였다. 7개 line의 형질전환체 T<sub>1</sub> line의 종자를 50mg/L hygromycin이 포함된 1/3 MS 배지에서 발아시킨 후 약 10일이 지나면 저항성인 종자는 정상적으로 생육을 하지만, hygromycin에 감수성인 종자는 발아는 하지만 정상적으로 자라지 못하였다. F13 line은 멘델의 분리비에 맞게 3:1의 분리비를 보였으나 다른 line에서는 많은 차이를 보였다. 그리고 line F1, F2, F10에서는 알바이노 현상이 나타났다.

표 4. T<sub>1</sub> 세대 분리 비율

	Total seed	Resistant	Susceptible	$\chi^2$ value(3:1)
F1	20	13	7	1.1
F2	20	11	9	4.3
F3	20	12	8	2.4
F4	20	11	9	4.3
F10	20	12	8	2.4
F12	20	14	6	0.3
F13	20	15	5	0

사. 형질전환체의 지방산 분석

T<sub>1</sub>세대의 형질전환체와 대조구를 가지고 전체 지방산 분석을 하였다. 지방산 분석을 세 번 반복한 결과 예상과는 달리 모든 형질전환체의 지방산 조성중 18:3의 비율이 대조구보다 낮게 나타났으며, 18:2의 비율이 더 높게 나타났다.

표 5. T<sub>1</sub> 세대의 전체 지질의 지방산 조성

	C16:0	16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0
NT	30.6	3.60	3.69	2.26	5.61	53.7	0.57
F1	37.0	4.01	4.60	3.51	6.12	44.0	0.74
F2	35.4	3.56	4.87	3.63	7.04	44.8	0.76
F3	29.7	3.06	3.72	3.58	7.11	52.0	0.55
F4	30.5	2.92	4.28	2.89	5.20	53.4	0.81
F10	31.1	3.31	3.41	3.36	11.6	46.5	0.65
F12	36.7	4.24	4.48	1.86	8.94	42.9	0.90
F13	34.9	3.46	3.68	4.05	8.54	44.1	1.40

아. 저온 처리와 MDA 분석

대조구와 4line의 형질전환벼를 가지고 저온 처리하여 MDA 함량을 분석하였다. 5°C에서 48시간 동안 저온 처리한 결과 대조구와 형질전환된 벼의 잎이 상당히 시들었다. 이러한 저온 스트레스 증상이 대조구와 형질전환된 벼가 유사하게 보였으나, 저온 처리된 대조구의 MDA 함량이 형질전환된 벼의 수치보다

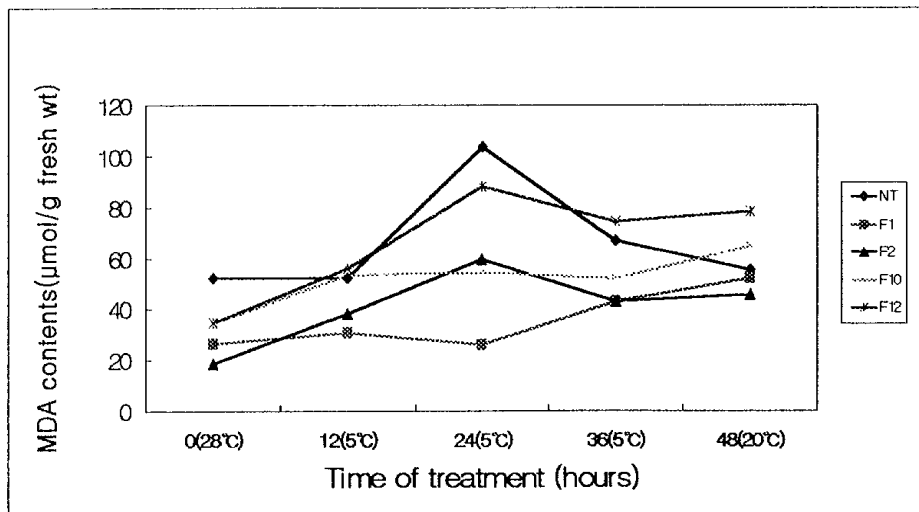


그림 6. Malondialdehyde (MDA) 함량 분석

높게 나타났다. 애기장대 *fad7*을 발현시킨 형질 전환된 벼 중에서 F1과 F10 line은 대조구와 비교했을 때 MDA 함량이 상당히 낮은 것으로 보아 저온에 저항성이 있음을 알 수 있었고, F2와 F12 line은 대조구보다 약간 낮게 나타났다.

#### 자. Jasmonic acid 분석

$\alpha$ -Linolenic acid는 jasmonic acid의 전구체이며 식물에서 상처에 의해 유도되는 유전자를 활성화 시키는데 조절하는 식물 성장 조절제이다. T<sub>1</sub>세대의 형질전환체와 대조구의 잎을 상처를 준 것과 상처를 주지 않은 것을 분리하여 JA 함량을 측정하였다. 상처를 주지 않은 0시간에서는 대조구의 JA 함량보다 형질전환된 벼의 JA 함량이 모두 높게 나타났다. 그리고 24시간 동안 상처를 준 후 대조구의 JA도 물론 증가하였지만 F2와 F12 line에서 현저히 증가함을 알 수 있었다. 그러나 F<sub>1</sub> line에서는 JA 함량이 감소하였다.

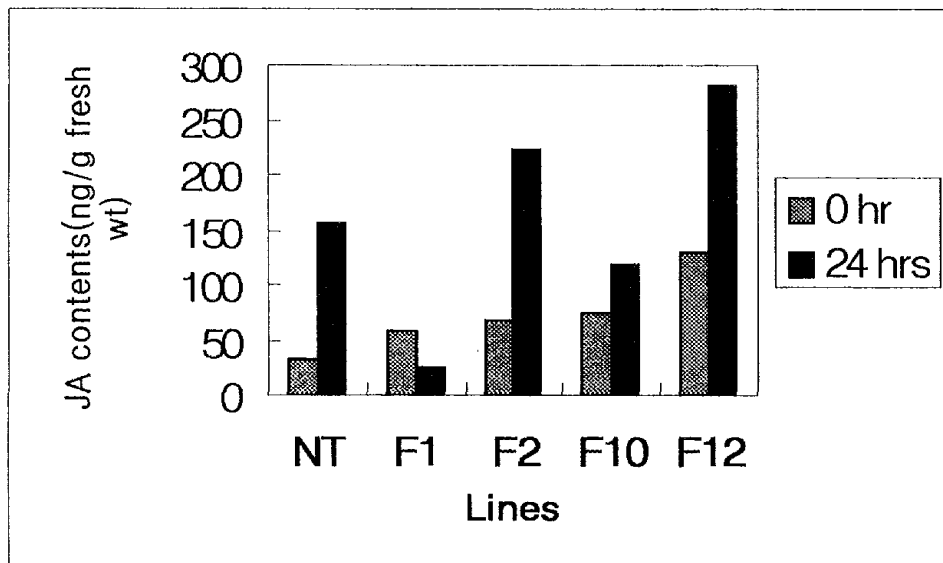


그림 7. Wounding에 의한 Jasmonic acid 함량

#### 차. PR1b 유전자를 이용한 Northern 분석

PR 유전자는 pathogenesis-related(PR) protein을 암호화하며, pathogen의 생육과, multiplication 그리고 spread를 저해하는데 관여한다. PR 유전자는 다양한 biotic/abiotic 스트레스에 의해 발현되며 특히, PR1b 유전자는 jasmonic acid, abscisic acid, salicylic acid, 그리고 kinetin에 의해 발현이 유도된다. 벼에서 OsPR1a(rice acidic PR1), PR1b(rice basic PR)가 cloning 되었으며, 본 실험에서는 fad7 유전자를 발현시킨 형질전환체를 상처를 주었을때 JA 함량이 증가함을 알수 있었으며, 증가된 JA에 의해서 PR1b 유전자가 발현되는지 확인하였다. 상처를 주지 않은 샘플은 PR1b 유전자가 발현되지 않았음을 알수 있었고, 상처를 준 후 24처리한 샘플은 PR1b 유전자가 발현되었고 대조구보다 형질전환체인 F13에서 발현양이 많음을 알 수 있었다.

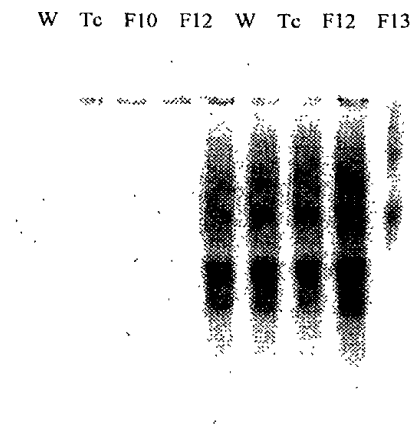


그림 8. OsPR1b를 이용한 Northern 분석

W: 대조구, Tc: transgenic control, F12,F13: 형질전환체

카. T<sub>2</sub>세대의 수량조사

포장에서 수확한 7개 line의 T<sub>2</sub>세대 수량조사 결과는 다음 표4와 같다. Hygromycin 저항성 분석을 통하여 하이그로마이신 저항성개체와 감수성 개체를 분리하였다. T<sub>2</sub> 형질 전환체의 수량 조사 결과 F3, F10, F12를 제외한 우성 형질을 가진 벼의 이삭수가 열성 형질을 가지고 있는 null mutant의 벼보다 저조한 것으로 보이며, 종자의 무게는 F3을 제외한 우성 형질의 벼가 열성 형질을 가진 벼보다 저조하였다. 형질 전환체중 일부 불임인 것도 나타났다.

각 line의 첫째줄을 초장이며 둘째줄은 이삭수, 셋째줄은 개체당 종실중이다. Hygromycin 저항성 분석 결과 열성 형질로 나타난 Nullsegregant 들은 T1 초장 및 이삭수에서 형질전환체 보다 키가 작고, 주당 이삭수가 적었고, T<sub>2</sub> 형질 전환체의 수량 조사 결과 종실중이 null segregant 보다 저조한 것으로 보이며 일부 불임인것도 나타났다 (표 4).

표 4. T1세대의 생육과 T2 종실중

Independent Transgenic lines	Average Height (cm)		Average number of panicles/plant		Average grain Yield (g/plant)	
	Transgenic	Null	Transgenic	Null	Transgenic	Null
T1	96.0 ± 11.0	106.0 ± 2.6	14.0 ± 3.2	20.0 ± 3.2	35.2 ± 18.4	50.4 ± 17.1
T2	93.0 ± 6.5	99.0 ± 5.5	16.5 ± 3.8	23.2 ± 5.6	38.5 ± 19.4	46.4 ± 5.6
T3	82.0 ± 23.0	97.0 ± 8.0	23.1 ± 7.3	16.7 ± 6.0	39.1 ± 14.4	35.4 ± 25.2
T4	91.0 ± 11.0	97.0 ± 11.0	10.1 ± 4.3	26.5 ± 7.2	14.9 ± 14.4	27.0 ± 12.7
T10	98.0 ± 5.4	99.0 ± 5.5	24.5 ± 7.2	24.6 ± 3.2	35.6 ± 11.9	39.3 ± 5.1
T12	98.0 ± 7.0	101.0 ± 5.9	17.0 ± 9.5	18.7 ± 5.0	39.0 ± 24.3	46.3 ± 21.8
T13	86.0 ± 9.3	101.0 ± 3.6	20.8 ± 5.9	19.0 ± 6.9	14.4 ± 6.8	27.6 ± 27.7

## 제 5장 오이의 저온내성 평가방법 개발분야

### 제 1절 서 언

본 세부과제에서는 오이와 흑종호박에 대한 저온내성을 평가하는 방법의 확립에 주안점을 두었다. 이러한 노력을 하는 이유로서는 식물이 저온에 대한 내성을 획득하는 mechanism을 이해하기 위해서이며, 일단 그러한 mechanism이 구명되면 molecular biologist들에 의한 형질전환은 그렇게 어려운 일이 아닐 것으로 생각되기 때문이다. 특히 본 연구진들에게 격려가 되는 사실은 최근호의 Science지에 실린 Michigan State University의 Thomashow group에 의해서 저온내성을 증진시킨 형질전환된 *Arabidopsis*를 발표한 것이다(*Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance*). Thomashow group도 논문에서 지적한 바처럼, 아직까지 작물에 그러한 저온내성을 획득시킨 경우는 보고가 된 바 없으나 앞으로는 멀지 않은 장래에 저온내성을 발현하는 작물이 출현될 것으로 기대된다.

본 연구실에서는 그 동안 오이 및 흑종호박의 근권저온에 대한 내성차이를 집중적으로 연구해 오고 있으며 몇 가지의 중요한 생리적인 mechanism도 발견하였다. 알려진 바와 같이 흑종호박은 겨울동안의 오이 축성재배시에 대목으로 사용되고 있으며 그 이유로서는 병해에 대한 내성을 지니고 있기 때문이었다(Lee, 1994). 그러나 흑종호박이 상대적으로 낮은 근권온도인 14℃ 부근에서 생육이 가장 왕성하다는 사실(Tachibana, 1987)은 오이의 적온인 20℃와는 커다란 차이로 평가된다. 특히 오이 실생주(株)에서는 근권온도가 15℃ 부근이 되면 엽의 광합성이 거의 수행되지 않는다는 사실을 확인하였다(그림 1). 이점은 오이의 축성재배시 근권온도의 중요성이 특히 강조되는 배경

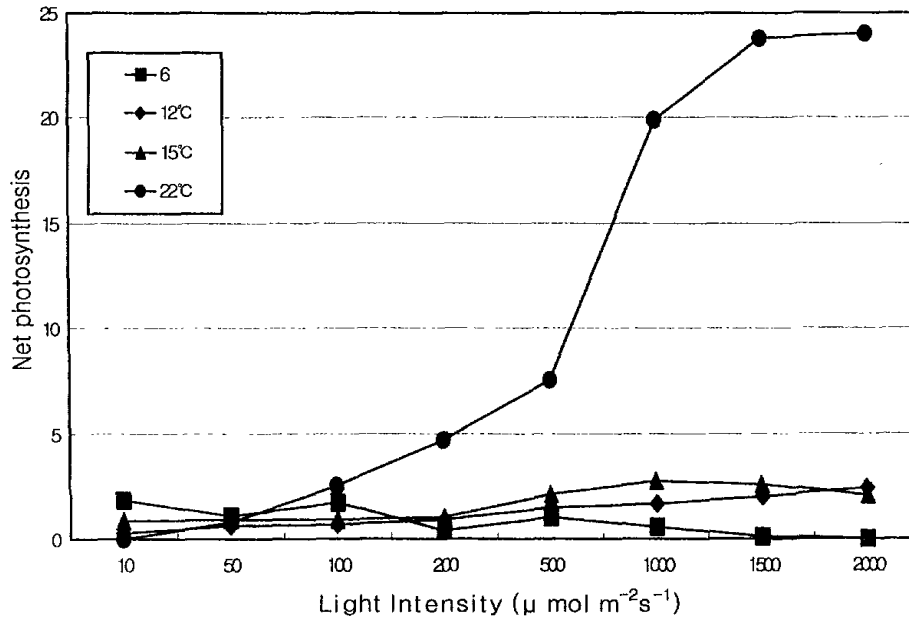


그림 1. 근권온도가 오이엽의 광합성에 미치는 영향. 오이는 각각의 근권온도에서 8일간 생육후 portable Photosynthesis Measurement System (LI-COR 6400, USA)으로 여러가지의 광도에서 측정하여 saturation kinetics를 표현하였음.

이 되는 것이다. 흑종호박이 근권저온에 특히 강하다는 점은 저온하에서도 수분 및 무기양분을 잘 흡수하기 때문이며 (Masuda and Gomi, 1982), 산소흡수(Masuda and Gomi, 1984), 뿌리에서 주로 생성이 되는 cytokinin(Tachibana, 1988), RNA농도(kanda et al., 1994) 등으로 설명된다. 그러나 본 실험실에서는 흑종호박이 근권 저온하에서도 음이온의 흡수가 잘 이루어지며 특히 뿌리 원형질막의  $\text{H}^+$ -ATPase의 활성이 증가된다고 이미 보고한 바 있다(Choi et al., 1995).

이러한 저온 내성 혹은 감수성을 용이하게 평가할 수 있는 방법의 확립은 특히 본 연구진에서 수행한 분자육종의 경우, 형질전환된 식물을 대상으로 정확한 평가를 내려야 한다는 면에서 중요한 의의를 지닌다. 그러나 식물의

형태, 생리, 유전자 발현 등 어느 한가지 현상만이 저온에 민감하게 반응한다고 생각하기에는 어려운 점이 많다. 예를 들면 photosystem II의 photochemical efficiency가 저온에 의해서 민감하게 반응하는 것으로 알려져 있지만, 식물에 의한 반응속도, 식물간의 개체변이, 식물 종에 따른 반응 민감도의 차이 등으로 인하여 일관성이 있는 결과를 나타내지 않는다.

따라서 본 연구에서는 국내에서 얻을 수 있는 가능한 여러 가지의 germplasm을 이용하여 저온에 대한 민감도를 여러 가지 생리적인 반응으로 검사하였으며, 오이의 대목으로 사용되고 있는 흑종호박의 저온내성의 생리적인 현상을 오이와 비교하고자 여러 가지 실험을 시도하였다. 전기한대로 가능한 아주 민감한 생리적인 현상들을 파악하는데 본 연구의 주안점을 두었으며 이러한 배경 하에서 본 연구에서는 다음과 같은 내용의 일련의 실험을 수행하였다.

## 제2절 오이 germplasm의 저온내성 screening과 근권 저온이 미치는 생리적인 반응

### 1. 재료 및 방법

구례의 오이시험장에서 보유하고 있는 germplasm 중에서 지역적인 특성을 지닌 것으로 판단되는 다음 표와 같은 collection을 분양 받았다.

다음의 accession과 우리 나라의 겨울오이와 여름오이의 대표적인 품종인 청장과 흑진주를 근권온도 6°C로 1주일간 처리하여 육안 판정과 엽의 ion leakage를 검정하였다. 육안 판정은 완전히 고사한 주를 0.0으로, 피해가 전혀 없을 때를 5.0으로 하였다.



accession number	영문명	원산지
6	Khira	India
7	Kakri	India
9	PI 169389	Turkey
12	PI 169392	Turkey
30	M - 20	USA
51	Nezhinsky	SUN
54	Bao-dan-khuan	China
57	Khei-khan-gua	China
59	Bilske Nakladacky	Czechoslovakia
60	Melnicke Nakladacky	Czechoslovakia

또한 홍농종묘와 협조하여 분양 받은 오이 2계통 (◆ 일향(일본 도입종) : 저온내성이 강한 취청오이 계통으로 과피색이 녹색, ◆ 삼척(진주 지방종) : 저온내성이 약한 가시오이 계통으로 과장이 길고 주름이 강함)을 공시하여 근권저온(10℃)을 1주일간 처리하고 기공저항(stomatal resistance), 증산량(transpiration), 클로로필 함량, photochemical efficiency of photosystem II (Fv/Fm), half rise time to Fm(t1/2) 및 ion leakage를 경시적으로 측정하였다. 뿌리와는 상이하게 엽이 저온피해를 받는 중요한 mechanism으로서는 oxidative stress에 의한 것으로 알려져 있다 (Anderson et al., 1994 ; Kerdnaimongkol et al., 1997). 식물체는 정상적인 대사과정 중에 superoxide radical, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 hydroxy radical을 생산하지만 superoxidase dismutase, peroxidase 혹은 catalase 등과 같은 방어 효소(defense enzyme)를 지니고 있으므로 활성화 산소(activated oxygen)의 농도를 낮게 유지한다. 그러나 식물체에게 저온이 주어지면 이와 같은 방어기작의 효율성이 낮아짐에 따라 membrane lipid, 단백질 및 핵산 등에 치명적인 영향을 미치게 된다. 이러한 현상 때문에 겨울동안의 혹한기에 오이가 저온에 조우한 경우는 강광(强光)은 식물에 치명적인 영향을 미치게 된다.

따라서 흉농종묘에서 분양받은 일향, 삼척 및 청장오이를 4℃로 조절된 암실에서 24, 72 및 120시간 처리 후, 강광의 조건으로 옮겨서 오이의 반응을 육안으로 측정하였다. 오이는 담액수경재배 방법으로 생육시켰으며 근권의 온도는 수경용기에 heater를 설치하여 20±1℃로 유지함에 따라서 근권온도의 영향을 제거하였다.

## 2. 결과 및 고찰

표 1의 결과를 보면 accession number 30과 51이 비교적 강한 면을 나타냈으나, 특히 겨울오이인 청장이 더욱 근권 저온에 내성을 나타냈다. 표 2의 결과인 ion leakage도 대체적으로 육안판정과 비슷하였으나 청장과 흑진주가 가장 강하였다. 육안 판정과 ion leakage 간에 상이한 결과를 나타낸 것은 ion leakage 측정 시에는 고사한 엽을 포함시키지 않았기 때문이다.

표 1. 육안 판정에 의한 오이 accession의 근권 저온내성의 차이

accession number	엽	뿌리
6	1.0	1.7
7	0.5	1.0
9	2.0	2.3
12	0.6	0.6
30	2.2	4.0
51	2.0	3.7
54	1.0	3.0
57	1.0	2.2
59	1.7	1.7
60	1.2	2.2
청장	3.2	4.0
흑진주	1.7	2.7

표 2. 엽의 ion leakage에 따른 오이 accession의 근권 저온내성의 차이

accession number	대조구(22°C)	처리구(6°C)
6	0.368	1.230
7	0.409	0.365
9	0.313	0.955
12	0.367	1.140
30	0.378	0.670
51	0.323	0.567
54	0.388	1.010
57	0.409	0.442
59	0.435	1.090
60	0.393	0.859
청장	0.385	0.308
흑진주	0.341	0.333

표 3. 근권 저온처리가 오이 품종의 생리적인 특성에 미치는 영향

측정항목 (단위)	일향		삼척		청장	
	대조구	처리구	대조구	처리구	대조구	처리구
기공저항 (s/cm)	0.78	2.07	0.97	1.36	0.29	1.89
증산량 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{s}$ )	24.17	9.19	17.25	15.17	40.64	11.38
클로로필 함량	49.2	45.6	48.6	37.4	46.3	49.0
Fv/Fm	0.697	0.746	0.606	0.753	0.714	0.760
t1/2	38.5	52.0	70.0	37.0	41.0	30.0
Ion leakage (ms/g fw)	0.270	0.301	0.215	0.380	0.345	0.267

근권저온을 7일간 처리한 후 오이 품종의 생리적인 특성에 미치는 영향을 조사하였다.(표 3)

기공저항과 증산량에 있어서는 저온에 약하다고 알려져 있는 삼척이 오히려 일향과 청장보다 강한 면을 보였으나, chlorophyll 함량은 현저하게 낮아졌다. 대기의 저온에 따른 chlorophyll fluorescence는 연구자에 따라서 photo-

chemical efficiency(Fv/Fm)를 사용한 경우(tomato. Walker et al., 1990. 25:334-339), variable fluorescence(Vo)를 사용한 경우(potato. Greaves and Wilson, 1987)를 들 수가 있다. 본 실험에서는 근권 저온 처리를 하였고, 그 결과 Fv/Fm은 세 품종간 차이가 없었으나, 저온에 민감한 삼척이 t1/2의 수치가 크게 감소하였다. ion leakage도 삼척이 가장 크게 증가한 점으로 보아 근권 저온에 따라 생리적인 대사가 서로 다르게 영향을 받은 것으로 고려된다.

전기한 바와 같이 오이 재배시에 근권저온이 생육에 미치는 영향은 지대하다. 그러나 겨울동안의 축성재배시에는 물론 대기의 저온도 중요한 요인이다. 따라서 오이엽의 저온내성을 screenin하기 위하여 포트에 재식된 오이를 4℃의 저온실에 옮겨 처리한 후, 강광의 조건으로 옮겨서 오이의 반응을 육안으로 관찰하였다.

그림 2는 4℃에서 24시간 처리 후 144시간동안 광에 노출시킨 것이나, 전체적인 생육은 다소 감소한 것으로 판단되지만 외형적으로는 저온의 영향을 받



그림 2. 암조건하의 저온처리 후 오이엽에 미치는 광의 영향. 4℃에서 24시간 처리 후, 강광조건으로 옮긴 다음 144시간 동안 광에 노출 시켰음. 왼쪽으로부터 청장, 삼척 및 일향.

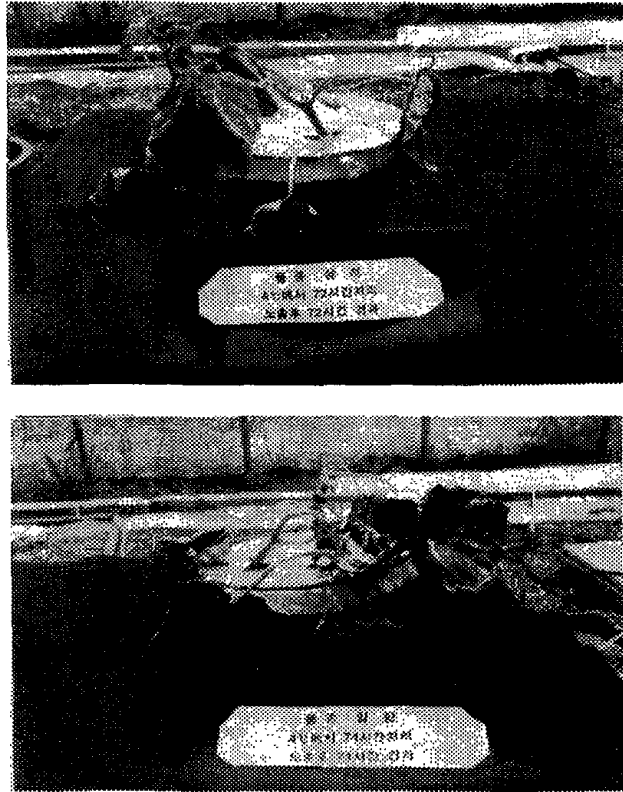


그림 3. 암조건하의 저온처리 후 오이엽에 미치는 광의 영향. 4℃에서 72시간 처리 후, 강광조건으로 옮긴 다음 72시간 동안 광에 노출 시켰음. 상; 삼척 하; 일향.

지 않았다. 144시간 동안이라는 장시간에 걸쳐서 광에 노출시킨 것은 오이의 엽에 영향을 주는 조건이 저온의 강도와 함께 광의 강도가 복합적으로 작용할 것으로 고려하였기 때문이며 24시간 4℃로 처리한 경우는 광의 노출시간에 따라 커다란 영향을 받지 않았다. 그러나 4℃에서 72시간 처리한 오이는 광에 노출 후 시간이 경과할 수록 피해양상이 뚜렷해졌다(그림 3). 특히 저온에 민감하게 반응한 부분은 생장점과 부근의 어린엽으로서 1개주의 피해양상을 대표할 수 있을 정도로 신속한 반응을 보였다. 일향은 일본 도입종으로 저온에 내성이 강한 계통으로 알려져 있고, 반대로 삼척은 우리나라의 여름오이를 대표하는

품종으로서 전형적으로 저온에 약하다고 알려져 왔으나 그림 3에서 보는 바와 같이 일향은 생장점을 포함하여 일부의 오래된 엽에서도 심한 피해 증상을 보였다. 그러나 삼척은 반대로 생장점이 정상적이었고 다소 위조하는 정도를 나타내는데 불과하였다. 그림 4는 4℃에서 120시간 처리 후 240분 광에 노출한 상태의 오이(상)와 120분이 지난 후의 삼척(하)이다. 청장과 일향은 240분이 경과하면 특히 생장점 부분이 고사하였으나 삼척은 크게 영향을 받지 않았으며, 광에 노출되는 시간이 길어질 수록 피해증상은 심해졌다(그림 5).



그림 4. 암조건하의 저온처리 후 오이엽에 미치는 광의 영향. 4℃에서 120시간 처리 후, 강광조건으로 옮긴 다음 240분(상), 및 120분(하) 동안 광에 노출 시켰음.

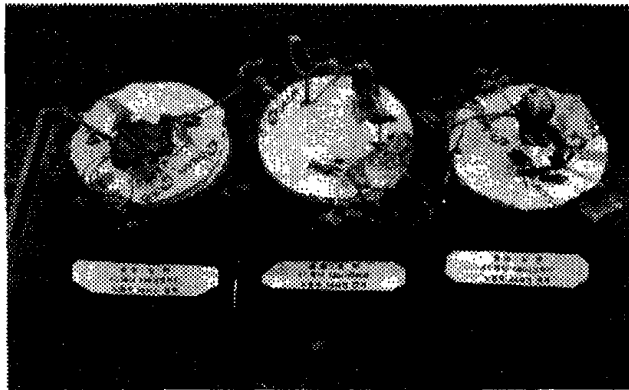


그림 5. 암조건하의 저온처리 후 오이엽에 미치는 광의 영향. 4℃에서 120시간 처리 후, 강광조건으로 옮긴 다음 24시간 동안 광에 노출 시켰음. 왼쪽으로부터 청장, 삼척, 일향.

전기한 대로 저온에 의한 식물체의 피해는 activated oxygen species에 의한 세포내의 단백질, 핵산 및 지질을 강력하게 파괴하는 mechanism으로 해석된다. 본 실험의 결과 흥미로운 점은 일반적으로 종묘회사에서 알고 있는 계통들이 저온내성의 특성과 정반대로 나온 현상이다. 즉 저온내성을 갖고있는 계통으로 알려진 일향이 가장 민감하게 피해증상이 발현되었고, 저온에 약하다는 삼척은 오히려 둔감하였다. 이러한 상반된 현상에 대해서는 아직까지 명확한 해답을 내릴 수는 없으나 오이의 입장에서 “생존”을 위한 전략과 “생육감소”를 위한 전략의 차이일 수도 있다. 즉 chilling temperature의 범위 내에서의 오이의 생육감소는 기존의 알려진 품종들의 저온에 대한 강약이 맞을 수도 있으나, 4℃라고 하는 “near freezing-temperature”에서는 오이는 생존의 차원으로 대처해가고 있는지도 모른다.

### 제3절 대기저온이 오이품종의 생리대사에 미치는 영향

#### 1. 서 언

식물의 생리 및 생태에 미치는 환경 요인 중, 아마도 저온이 가장 강력한 영향력을 발휘할 것이라는 사실은 상당히 설득력을 갖는다. 대부분의 식물이 저온에 의해서 화아분화가 일어난다는 점을 고려하면 진화과정 중에서 저온에 대한 생존 기작들을 개발해온 것으로 생각할 수 있다. 그러나 현재의 우리나라 농업의 특성중의 하나는 불시재배(off-season cultivation) 형태로서 겨울동안의 저온기에 아열대 및 열대 원산지인 각종 작물들을 재배하고 있다. 따라서 작물의 생육과정 중 저온에 의한 생리장애는 중요한 환경적인 요인이 되어 있으며, 난방비의 가중 등으로 저온에 내성인 작물들을 창출할 필요성이 대두되고 있는 것이다. 이러한 저온내성 식물을 창출하기 위한 노력은 전세계적으로 시도되고 있으며 COR(cold-regulated) 유전자를 도입한 저온내성 식물이 이미 보고되어 있다. 그러나 현재까지는 작물에 그러한 저온내성을 발휘하는 유전자를 도입한 경우는 보고된 바 없다.

본 연구실에서는 저온에 대한 식물체의 영향 중, 특히 수분스트레스에 주목하고 있다. 즉 식물이 저온에 조우하면 위조증상을 나타내는 바, 아마도 저온에 내성인 식물체는 저온하에서도 수분흡수를 원활히 수행할 수 있는 능력을 보유하고 있다는 점도 훌륭한 내성mechanism이 될 수 있는 것이다. 따라서 수분potential을 유지하기 위한, 원형질막의  $H^+$ -ATPase와  $H^+$ -pumping에 따른 electrochemical gradient의 확립 등은 중요한 전제조건이 될 수가 있으며 학계에서도 이점을 인정하고 있다.

저온에 대한 식물의 감수성 혹은 내성을 측정하는 방법들을 보면 이러한



수분대사의 영향에 기초를 두고 있다. 즉 생육정도, 전해질 누출(electrolyte leakage)등은 식물체의 수분상태에 따라서 영향을 크게 받으므로 저온에 대한 감수성을 표현하는데 널리 이용되어 왔다. 그러나 저온감수성을 측정하는 것은 가능하면 신속하고 간편해야 한다. 그러한 목적을 달성하기 위해서 본 연구실에서는 각종 기기를 이용하여 오이 품종의 차이 그리고 저온에 비교적 강한 흑종호박을 대상으로 생리적인 차이점을 규명코저 실험을 실시하였다.

## 2. 재료 및 방법

오이의 품종은 홍농종묘로부터 분양 받은 것으로 특성은 아래와 같다.

- 일향 : 저온내성이 강한 취청오이 계통으로 과피색이 녹색
- 삼척 : 저온내성이 약한 가시오이 계통으로 과장이 길고 주름이 강함
- 청장 : 국내에서 육종된 가시오이 계통으로 전형적인 겨울용 오이

본 실험에서 사용한 주요기기는 다음과 같다.

- Porometer : 기공저항과 증산량의 측정
- Water potential measurement system : 엽의 수분포텐셜의 측정
- Photosynthesis measurement system : 엽의 광합성 측정
- Sap flow measurement system : 목부를 통한 수분이동 측정

또한 생화학적인 방법을 이용한 저온감수성의 차이를 파악하기 위하여 antioxidant enzyme인 superoxide dismutase와 guaiacol peroxidase, lipoxygenase activity 등을 측정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

오이의 저온 내성과 관련하여 근권저온에 따른 여러 가지 생리적 영향들을 살펴보았으나 본 연구의 내용은 대기의 저온 처리에 따른 생리적 반응을 살펴본 것이다. 기공저항의 경우 일향과 청장은 처리 1일째 급격히 상승한 후 더 이상 증가하지 않은 반면 삼척은 처리 일수에 따라 서서히 증가함을 보여 주었다.

증산의 경우 일향과 청장은 처리 1일째 증산량이 급격히 감소하였으나, 삼척은 서서히 감소하였다(표 1). 수분 potential의 경우 일향은 처리 일수에 따라 큰 변화가 없었으나 삼척과 청장은 수분 potential이 서서히 감소하는 경향이였다(표 2).

본 실험에서 적용한 8°C는 오이의 생육적온인 25~30°C에 비하면 상당히 낮은 온도이었으나 수분포텐셜의 결과로 보아서는 적어도 5일 동안의 저온 처리는 오이 엽의 “water status”에는 크게 영향하지 않은 것으로 판단되었다. 이러한 결과는 온도가 낮아지면 기공을 폐쇄함에 따른, 즉 표 1에서 기공저항이 크게 증가한 점으로 보아서, 광합성이 감소되는 것을 감수하고서라도

표 1. 대기 저온 처리가 오이 품종의 기공저항과 증산에 미치는 영향

Days	기공저항(s/cm)			증산(mg/cm <sup>2</sup> /s)		
	일향	삼척	청장	일향	삼척	청장
0	0.36	0.15	0.231	16.6	31.0	15.8
1	1.35	0.37	0.53	4.8	11.2	8.6
2	1.28	0.73	1.31	5.4	7.4	5.3
3	1.21	0.54	1.87	5.5	7.0	3.8
4	1.22	0.68	1.59	5.0	6.2	4.3
5	1.26	0.86	1.06	5.2	7.2	6.6

표 2. 대기 저온처리가 오이 품종의 Water potential에 미치는 영향

Days	Water potential(Bars)		
	일향	삼척	청장
0	-15.3	-12.6	-12.7
1	-12.3	-14.0	-15.7
2	-14.3	-15.5	-14.8
3	-12.8	-13.8	-14.2
4	-14.9	-14.0	-18.6
5	-15.7	-15.5	-18.0

water use efficiency를 유지코저 하는 것으로 해석된다. 본 실험에서 특기할 만한 점은 여름오이인 삼척이 오히려 다른 품종에 비하여 기공저항이 낮고 증산량이 다소 높았던 점이다.

대기저온 처리 5일 후 광합성량을 측정한 결과가 그림 1이다. 오이의 경우, 보통 적정 온도에서 자라고 있을 때의 광합성량은 24~25 CO<sub>2</sub> μmol/m<sup>2</sup>/s 정도이며, 광포화점은 1500 CO<sub>2</sub> μmol/m<sup>2</sup>/s 였다. 그러나 세 품종 오이들의 대기 저온처리 5일 후 광합성량을 측정한 결과 적정온도일 때의 1/2수준인 약 7~11 CO<sub>2</sub> μmol/m<sup>2</sup>/s 이었다. 특히, 청장의 경우 광합성량이 가장 높았으며 삼척이 가장 낮았다(그림 1-A). 또 대기 온도를 정상으로 회복시킨 후 측정한 광합성량은 저온에 민감한 “삼척”오이가 광합성의 회복이 가장 빠른 것은 특기할만 하다.

동일한 날에 파종하여 외형상으로는 커다란 생육의 차이가 없음에도 불구하고 ‘청장’의 sap flow의 양이 가장 높았으며 ‘일향’과 ‘삼척’은 ‘청장’의 2/3수준이었다. 그러나 대기의 저온 처리로 인하여 세품종 모두 처리전에 비해 1/2수준으로 떨어졌으며 특히 저온에 민감하다고 알려져 있는 ‘삼척’ 품종이 가장 낮은 flow양을 나타내었다. 처리 4일째 부터는 ‘청장’보다 저온내성이

강한 품종으로 알려져 있는 '일향'의 sap flow양이 더 많은 것으로 보아 이 결과는 그 사실을 뒷받침하는 좋은 근거가 될 것이다. 처리 8일째에 대기를 정상온도(25℃)로 처리한 결과 빠른 속도로 sap flow양이 회복되기 시작하였으며 특히 '일향'과 '청장'이 회복정도가 신속하게 진행됨을 볼 수 있었다.

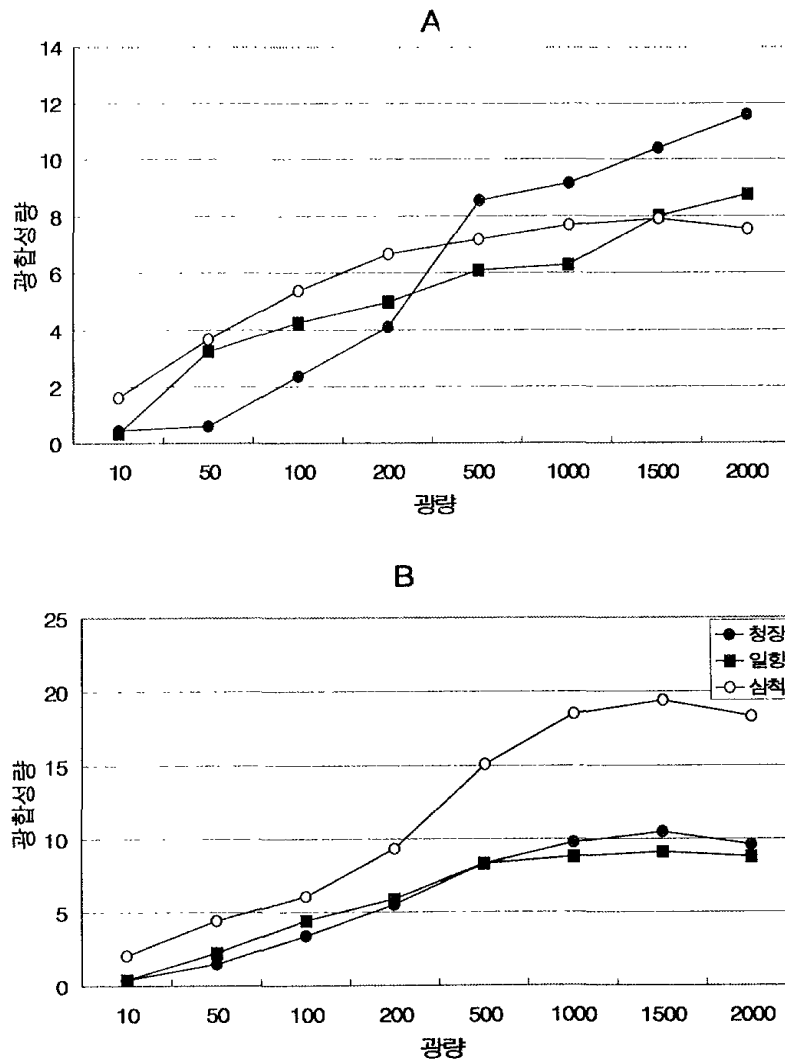


그림 1. 대기 저온처리가 오이 품종의 광합성에 미치는 영향

겨울오이인 '청장'과 일본도입종 '일향', 진주 지방종 '삼척'의 대기 저온처리 (8℃) 5일 동안과 xylem을 통과하는 sap의 양을 측정된 결과가 그림 2이다.

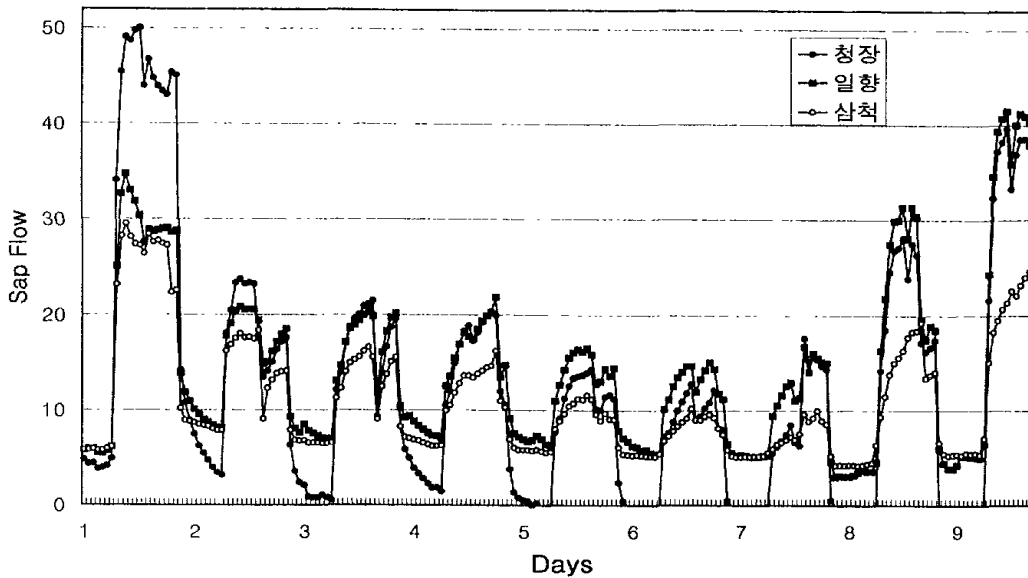


그림 2. 대기 저온처리가 오이 품종의 Sap flow에 미치는 영향

여러가지의 abiotic stress는 activated oxygen species에 의한 2차적인 피해에 의한 것이라는 실험예는 많이 있다. 식물이 저온에 처하게 되면 superoxide radical, singlet oxygen, hydrogen peroxide, hydroxyl radical등에 의한 피해가 나타나며 정상적인 대사과정을 수행하는 식물에서는 superoxide dismutase, catalase, ascorbic acid, glutathione, tocopherol등에 의해서 무독화 되지만, 저온에 조우하면 이러한 무독화과정에 문제가 생기기 때문이다. 이러한 근거하에 세 가지 오이 품종을 저온처리한 후, superoxide dismutase 와 peroxidase의 활성을 측정하였다(표 3). 저온처리시간이 증가함에 따라 잎과 뿌리의 superoxide dismutase 와 peroxidase activity는 증가하는 경향이 뚜렷하였으나 품종간의 저온 내성에 대한 차이를 구분할수 있을 정도의 차이는 없었다. 본 실험의 결과에서 특이한 점은 뿌리에서 enzyme activity가 존재하며, 또한 -추후의 실험에서 자세하게 수행되어야 할 내용이지만- 엽보다도 훨씬 activity의

표 3. 대기 저온처리가 오이 품종의 antioxidant enzyme activity에 미치는 영향

Duration	Superoxide dismutase			Peroxidase( $\Delta A_{470}/\text{mg protein}/\text{min}$ )			
	일향	삼척	청장	일향	삼척	청장	
잎	0	8.2	11.6	8.3	0.2	0.9	1.6
	1	12.1	11.0	9.6	1.2	1.7	0.6
	2	13.4	9.7	6.2	0.6	1.8	0.7
	3	13.1	14.4	9.2	2.1	1.8	3.3
	4	7.7	9.8	5.4	2.8	3.4	2.4
	5	11.1	11.1	8.4	5.6	4.9	3.7
뿌리	0	51.5	24.2	56.7	0.9	0.5	0.4
	1	80.9	70.4	93.0	5.0	18.4	2.0
	2	79.9	72.9	71.1	5.3	17.8	14.2
	3	94.6	66.14	94.8	5.2	14.4	1.7
	4	77.4	69.0	127.9	6.3	18.7	12.0
	5	74.3	71.6	126.7	11.3	13.9	12.5

반응폭이 컸다는 것이다. 광의 존재하에서 abiotic stress의 2차적인 피해를 oxidative stress로 생각한다면, 광이 필요치 않은 뿌리 조직에서 민감한 반응을 나타낸 것은 흥미로운 사항이다. 또한 저온에 약하다고 알려져 있는 삼척의 뿌리에서 enzyme activity의 증가가 현저하였다.

본 실험을 수행하기 위하여 종자를 제공하여 준 홍농종묘 관계자에 의하면 저온에 대한 오이의 반응중 엽면적의 생육이 가장 민감하게 나타난다고 한다. 이러한 사실은 학계에서도 인정이 되어 있으며 광합성, 호흡등의 어떠한 생리대사보다도 세포의 신장이 저온에 의하여 억제된다. 따라서 본 실험에서는 growth chamber 내에서 대기온도를 10℃로 낮추고 오이의 엽장과 엽폭의 신장정도를 매일 측정하여 저온에 의한 엽면적의 생육반응을 확인코자

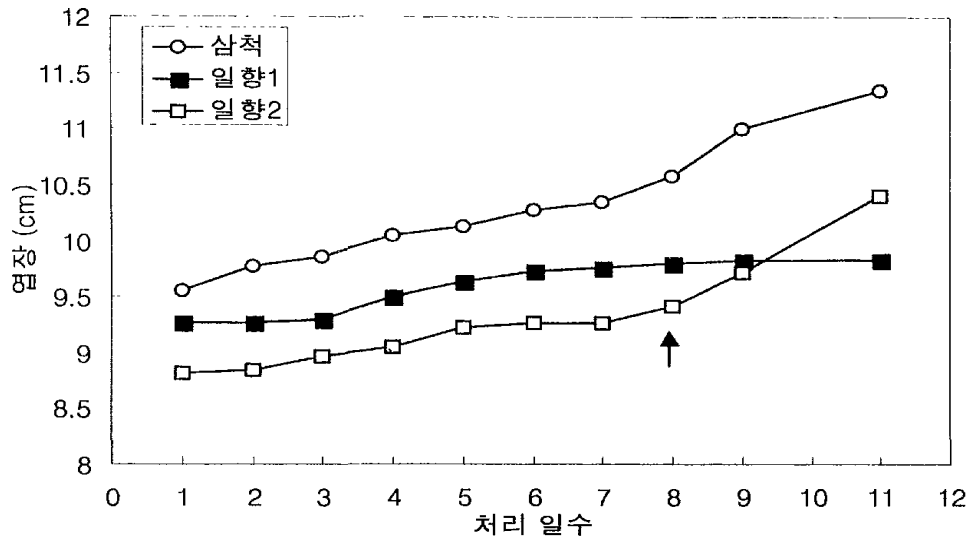


그림 3. 대기 저온이 오이 엽의 엽장신장에 미치는 영향  
(8일째에는 대기 온도를 25°C로 조절하였음)

실시하였다. 또한 stomatal resistance와 광합성도 측정하였으며, 저온 처리 7일 후에는 25°C로 온도를 높여서 회복하는 정도도 파악하였다. 또한 본 실험에서는 저온에 보다 강하다고 하는 “일향2”를 홍농종묘로부터 분양받아 실험재료로 공시하였다.

대기온도를 10°C로 낮춘 후 일주일간의 엽장 성장량을 보면 삼척은 1.025cm, 일향1은 0.54cm, 일향2는 0.6cm로서 저온에 약한 것으로 알려져 있는 삼척이 일향1에 비해서 2배 정도의 신장을 나타냈다. 이러한 점은 전기한 physiological data에서도 얻어진바가 있다. 즉 기공저항과 증산(표 1), 광합성(그림 1) 등에서도 삼척이 오히려 저온에 강한 면을 나타냈다. 8일째에는 정상적인 온도라고 생각되는 25°C의 대기온도를 부여한 후 회복하는 정도를 관찰한 바, 삼척과 저온에 강하다고 알려져 있는 일향2는 신속하게 회복하는

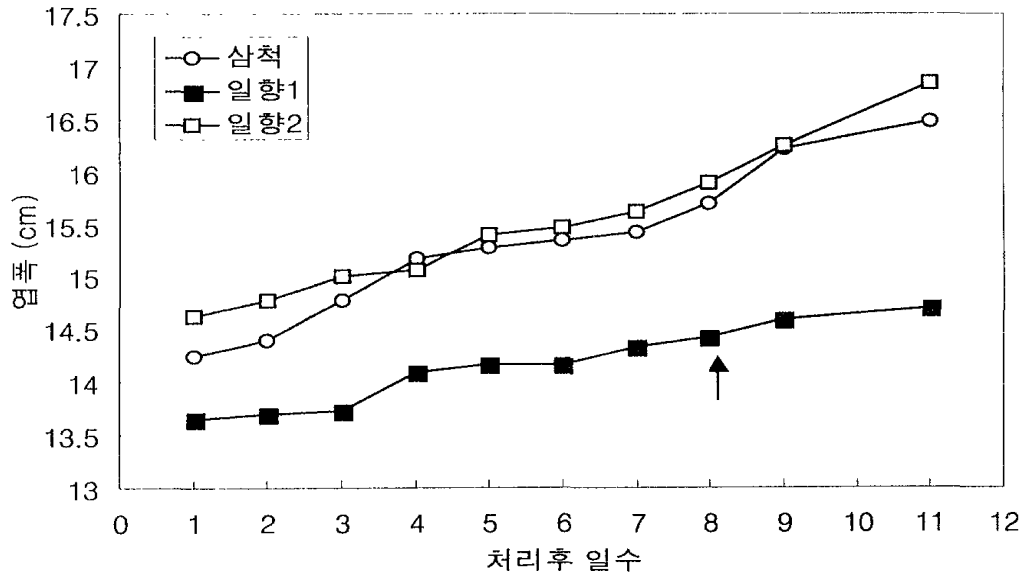


그림 4. 대기 저온이 오이엽의 엽폭 신장에 미치는 영향  
(8일째에는 대기 온도를 25℃로 조절하였음)

경향을 나타냈다. 엽폭 신장에서도 엽장과 거의 동일한 결과를 나타냈다. 즉 삼척과 일향2는 일향1에 비해서 2배 정도의 신장을 보였으며 정상온도로 처리한 경우의 회복 속도도 일향1에 비하여 현저한 차이가 있었다.

그림5에는 세 가지 품종의 증산량을, 그리고 그림 6에는 기공저항을 각각 나타냈다. 엽폭과 엽장 신장에서와 마찬가지로 저온에 약하다고 알려져 있는 삼척이 저온처리 기간 중 증산량이 가장 많고, 기공저항도 가장 낮았다. 또한 저온 처리 후에 정상온도로 회복시킨 경우에도 가장 신속하게 회복되었으며 다른 품종보다 2일 정도 빨리 정상적인 기능을 회복한 것으로 판단된다.

일반적으로 초본류 식물은 abiotic stress가 주어지면 기공을 신속하게 abiotic stress에 처하더라도 기공폐쇄의 정도는 상대적으로 낮으며 따라서 폐



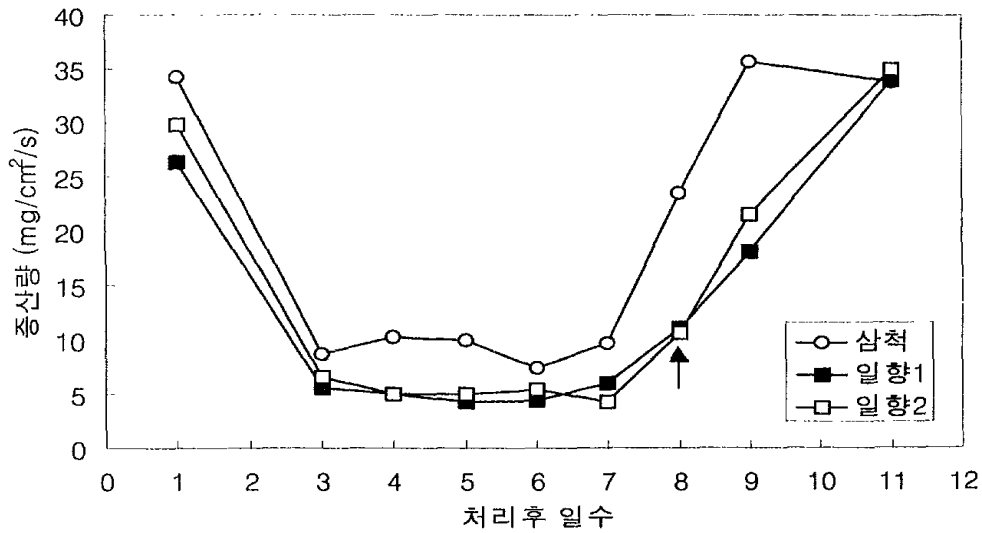


그림 5. 대기 저온이 오이엽의 증산에 미치는 영향  
(8일째에는 대기 온도를 25°C로 조절하였음)

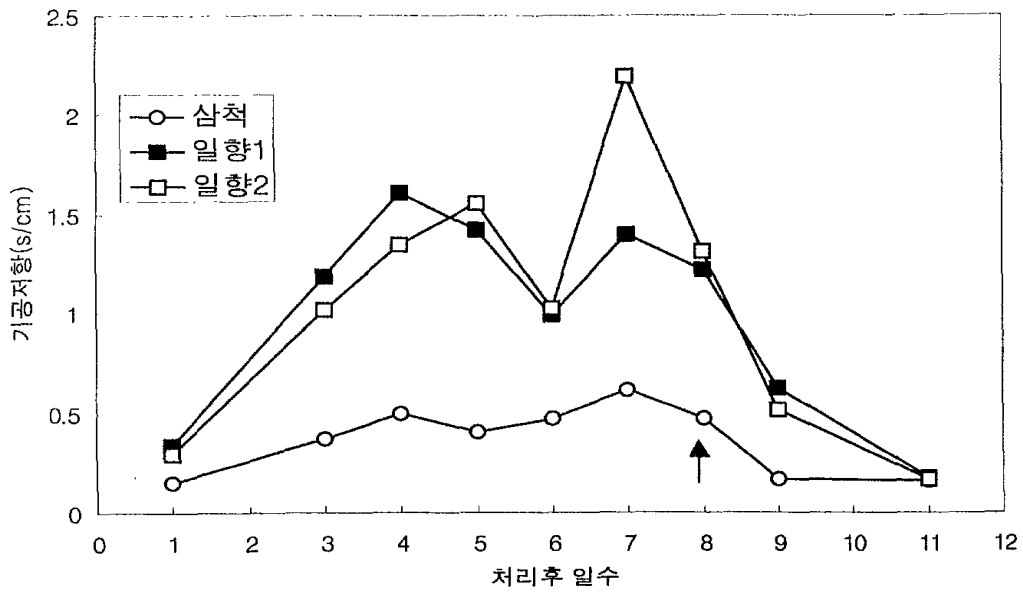


그림 6. 대기 저온이 오이엽의 기공 저항에 미치는 영향  
(8일째에는 대기 온도를 25°C로 조절하였음)

쇄하여 water use efficiency를 상승시키는 경향이 강하다. 그러나 기공이 폐쇄 되면 carbon uptake가 차단되므로 광합성은 감소한다. 반대로 목본류식물은 광합성 작용은 상당히 유지된다. 또한 초본류식물은 정상환경조건으로 회복 되더라도 기공이 열리는 속도가 느리며 광합성이 정상적으로 되는데 lag period가 있게 되며 이러한 period를 “induction period”라고 부른다. 삼척의 기공저항(그림 6)이 저온에 의해서 크게 변화하지 않은 점과 따라서 그림 7에 나타낸 것처럼 광합성량이 많은 것은 전기 한 대로 삼척이 저온내성을 보유하고 있는 실험결과와 일치한다.

삼척의 광합성량인 약  $10 \mu\text{MCO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}$ 에 비하면 일향1과 2는 6이하로서 아주 낮은 수준이며 특히 낮은 광도하에서 포화가 되는 특성을 나타냈다. 그림8은 대기온도를 정상으로 회복시킨 후 4일째에 광합성량을 측정한 것으로 저온에 가장 강하다는 일향2는 삼척 수준으로까지 회복하였으나 일향1은 회복하지 못하였다.

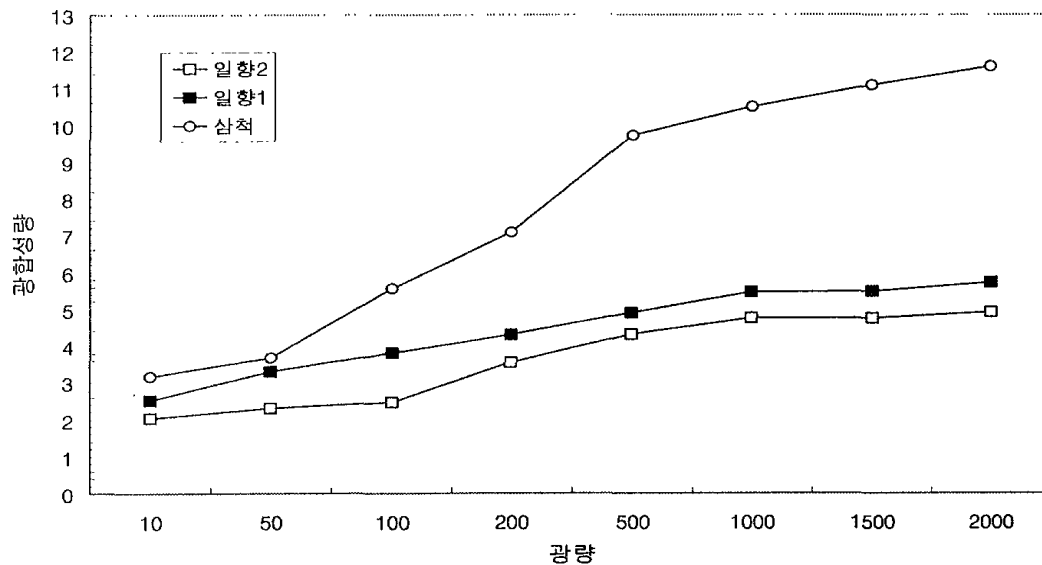


그림 7. 대기저온이 오이엽의 광합성에 미치는 영향.

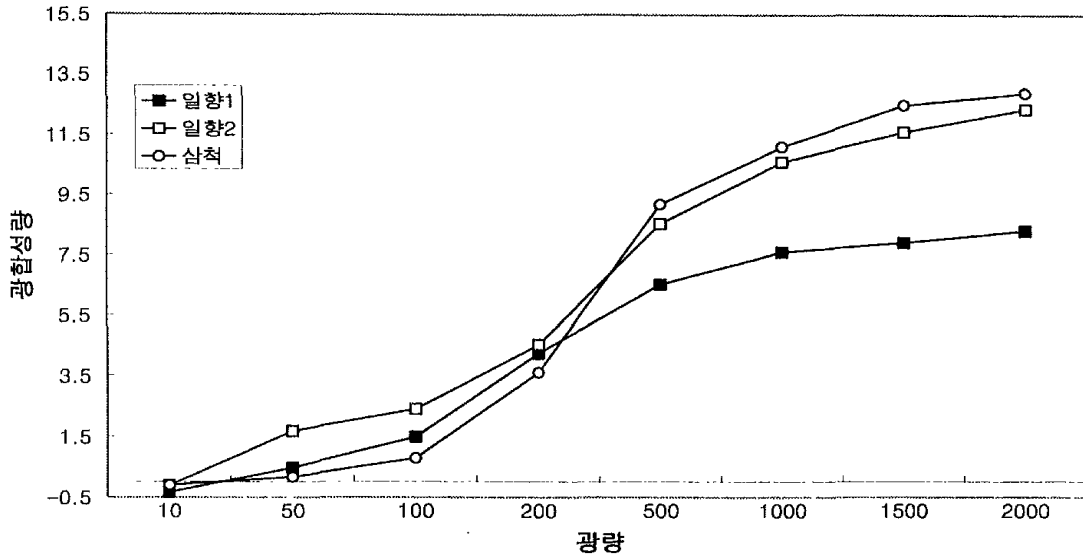


그림 8. 대기저온 처리후 정상온도를 부여한 4일후의 오이엽의 광합성.

## 제4절 근권저온이 오이와 호박뿌리의 lipoxygenase와 peroxidase activity에 미치는 영향

### 1. 서 언

Lipoxygenase(Lox)는 막에 존재하는 polyunsaturated fatty acid의 cis-double bond에 작용하는 효소로서 식물체를 비롯해서 동물, 인간에까지 널리 존재한다. Lox의 기능은 signalling pathway, peroxidation reaction과 mobilization of lipids로 대별된다. Lox는 octadecanoid pathway에 관여하며 병원균, 해충 등의 생물적 스트레스 또는 상처, 수분, 온도 등의 비생물적 스트레스에 대한 식물체의 방어 기작과 밀접하게 관련되어 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 오이와 호박을 대상으로 Lox activity를 측정함으로써 저온 내성

에 대한 차이를 구명코자 실험을 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

Lox의 추출은 50mM K-phosphate buffer(pH6.0)에 0.1% Triton X-100을 첨가하여 뿌리 조직을 homogenation 한 후, filtration과 원심 분리하여 enzyme source로 사용하였다. Substrate buffer의 조성은 0.1M borate(pH9.0), Tween 20, linolenic acid, NaOH등으로 조제하였고 234nm에서 흡광도의 변화추이를 시간 간격을 두고 측정하여 직선의 기울기로서 Lox activity를 조사하였다.

## 3. 결과 및 고찰

오이와 흑종호박을 근권저온으로 처리한 후 24시간 간격으로 시료를 채취하여 Lox의 활성을 조사하였다 (그림 1).

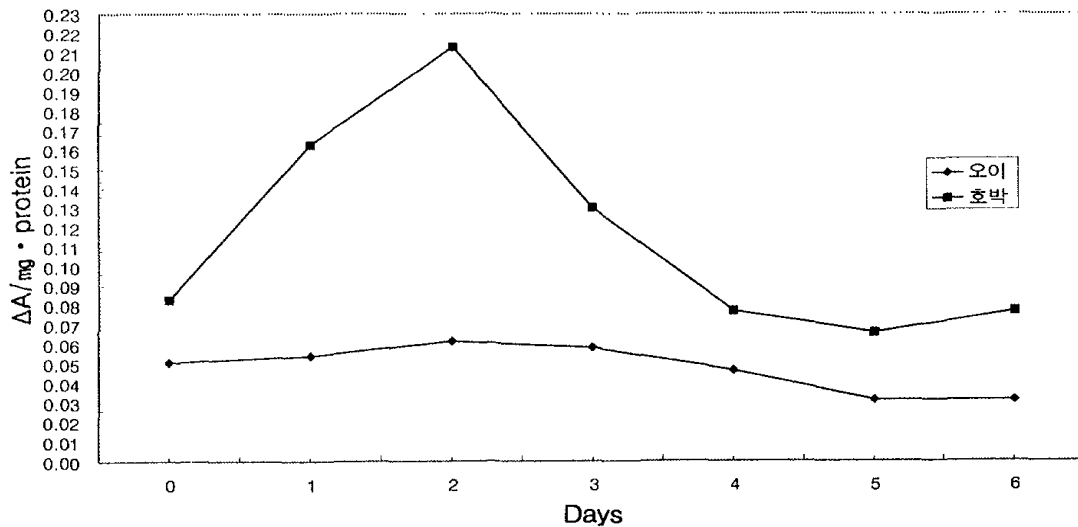
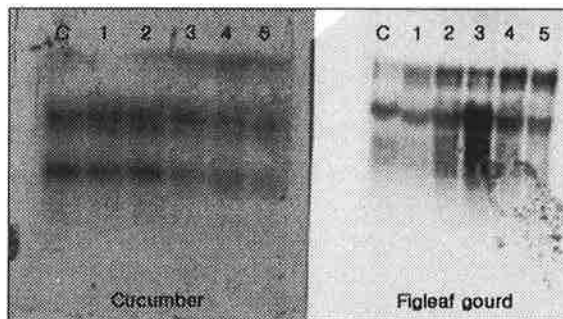


그림 1. 근권저온이 오이와 흑종호박의 Lox의 활성에 미치는 영향

저온에 감수성인 오이는 Lox 의 활성화에 아무런 변화를 나타내지 않았으나 흑종호박의 경우는 저온 처리 직후부터 급격히 활성이 증가하여 처리 2일째에 최대치를 나타낸 후 점차로 감소하였다. 이러한 결과는 반복된 실험에서도 아주 유사하였으며 여러가지 생리적인 특성 중에서도 흥미로운 사항의 하나로 생각된다. 즉 흑종호박은 저온에 노출되면 원형질막의 linolenic acid(C 18 : 3 )가 크게 증가하는 반면 stearic acid(C 18 : 0 )는 현저하게 감소하였다. 따라서 double bond index는 저온 처리에 따라 민감하게 증가하였으며 이러한 점은 membrane fluidity와 연관지어 lipid 대사의 변화를 유추할 수가 있을 것이다. 이러한 결과를 보다 확실하게 규명하기 위하여 Lox의 northern 결과를 그림 2에 나타냈다.

Lox의 활성화에서와 마찬가지로 오이의 경우에는 큰 변화가 없었으나 흑종호박의 경우에는 3일째까지 크게 증가한 점은 그림 1에서의 activity를 확인해주는 결과이다. 더욱 실험을 진전해야 확실한 결론을 내릴 수가 있을 것이지만 학계에서 지금까지 주장해온 membrane fluidity와 연계해서 Lox activity를 고려하면 흥미 있는 결과가 도출된 것이다.



**그림 2.** 저온 처리한 오이와 흑종호박에서 Lox 유전자의 expression kinetics (C : control , 숫자는 저온처리 후 일수).

## 제5절 오이와 흑종호박의 protoplast 크기에 미치는 저온의 영향

### 1. 서 언

식물체에 abiotic stress 즉 건조, 저온, 고온 및 염류농도 등과 같은 환경조건이 주어지면 스트레스의 종류에 상관없이 수분부족의 형태로 나타난다. 예를 들면, 오이 재배시에 근권온도를 저하시키면 염이 위조하게 되는데, 이것은 뿌리로부터의 수분흡수가 낮아지기 때문이며 따라서 저온에 내성인 species는 저온하에서도 수분흡수를 잘하고, 또한 증산에 의한 수분손실을 최소화하는 능력을 갖는 종류일 것으로 판단된다. 식물체에서 수분흡수는 water potential gradient에 의한 단순한 diffusional process로만 알려져 왔으나 최근에는 water transport protein인 aquaporin의 존재가 확인되었다. Aquaporin의 개폐는 calcium signal에 의한 MAP kinase가 활성화되고 phosphorylation의 결과, aquaporin이 열리는 것으로 알려져있다. 즉 식물체에서 aquaporin에 의한 수분흡수는 환경조건에 적응하는 능력을 나타내는 척도일 가능성이 있다. 따라서 본 실험에서는 저온에 감수성인 오이와 내성인 호박을 재료로하여 protoplast를 나출시켜 저온에 의한 protoplast의 크기의 변화를 측정하므로써 저온의 영향을 조사하였다. 또한 저온순화(acclimation)여부가 protoplast의 크기변화에 어떻게 영향하며, water channel blocker인 mercury를 사용하여 protoplast의 크기변화를 연구함에 따라 저온과 수분흡수의 상관관계를 연구하였다.

## 2. 재료 및 방법

오이와 호박을 vermiculite에 파종하여 떡잎이 전개되면 Cooper양액을 함유한 양액재배조에 이식하여 본엽이 2~3매 나올때까지 생육시켜 원형질체 나출을 위한 재료로 사용하였다. 나출방법은 오이와 호박의 뿌리와 엽조직에 따라서 다소간의 차이가 있으나 대체적으로 다음과 같은 순서로 실시하였다. 즉 식물조직을 1~2mm정도의 크기로 세절하여 cellulase와 macerozyme을 포함한 CPW solution에 침지한 후 incubator에서 배양하였다. 45~90  $\mu$ m의 sieve로 걸른 후 800rpm으로 원심분리하여 mannose를 포함한 CPW용액으로 세척한 후 얻어진 원형질체를 재료로 사용하였다. 원형질체의 크기는 현미경하에서 관찰하여 평균25개의 크기를 측정하여 평균치를 계산하였다.

## 3. 결과 및 고찰

오이뿌리와 호박엽으로부터 분리한 원형질체를 sorbitol의 농도가 0.3, 0.4, 0.5, 0.6M인 용액에 2분동안 처리한 후 측정된 원형질체의 크기의 변화(그림 1)를 보면, 농도가 높아질수록 크기는 크게 감소하였다. 특히 오이뿌리에서는 0.4M의 sorbitol농도는 원형질체의 크기를 크게 감소시켰으나 water channel blocker인 50  $\mu$ M mercury를 동시에 처리한 경우는 원형질체의 크기는 변화하지 않았음을 확인하였다. 호박과 오이에 대한 저온의 영향을 파악하기 위하여 분리한 원형질체를 20, 15, 10 및 5 $^{\circ}$ C로 5분동안 처리한 후 크기를 측정하였다(그림 2). 20 $^{\circ}$ C이하의 온도에서는 호박과 오이 모두 크기가 직선적으로 감소하였는데 이러한 결과는 호박은 15 $^{\circ}$ C에서 뿌리의 생육이 더 좋다는 결과와는 다소 상반된 결과이다.

본 연구실에서 수행한 각종실험결과, 오이와 호박의 뿌리는 저온에 순화하는 능력이 있음을 원형질막의 H<sup>+</sup>-ATPase의 활성, 광합성등의 생리적인 결

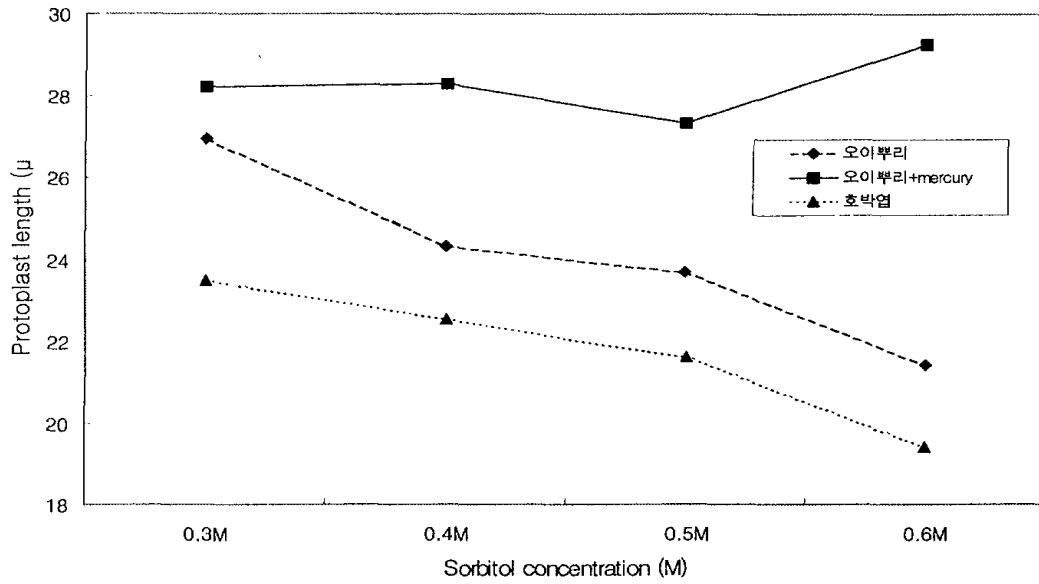


그림 1. 오이뿌리와 호박엽에서 분리한 원형질체 크기에 미치는 sorbitol농도의 영향

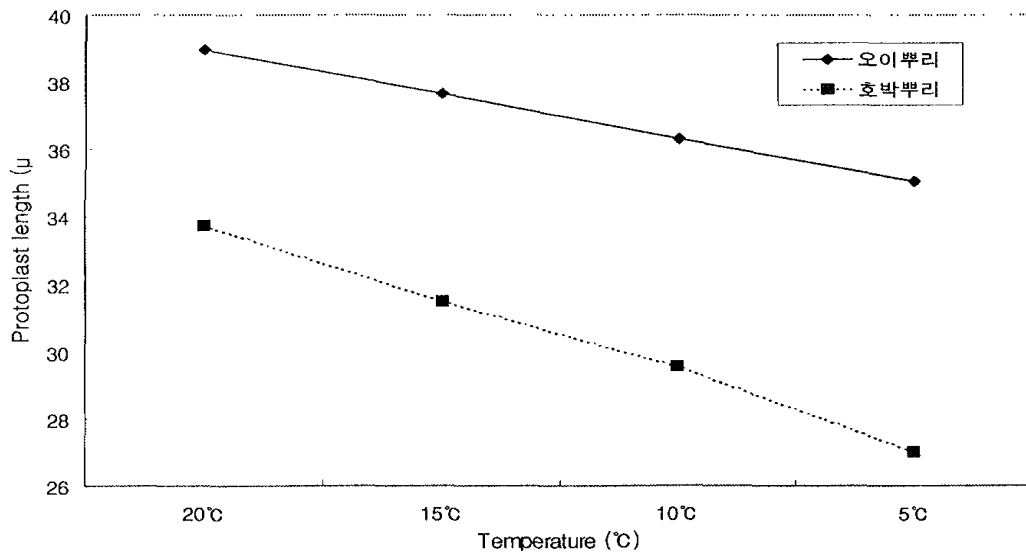


그림 2. 오이뿌리와 호박뿌리에서 분리한 원형질체 크기에 미치는 저온의 영향



과로서 보고한 바 있다. 본 실험에서는 이러한 점에 착안하여 오이와 호박뿌리를 10℃ 및 6℃로 각각 24시간 전처리한 후 저온이 protoplast의 크기에 미치는 영향을 검토하였다(그림3과 4).

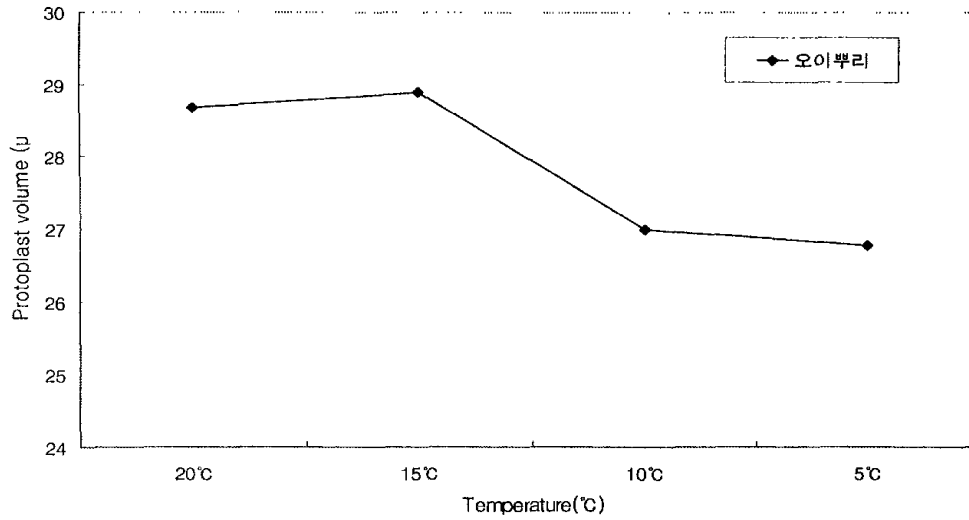


그림 3. 저온순화한 오이뿌리에서 분리한 원형질체의 크기에 미치는 저온의 영향

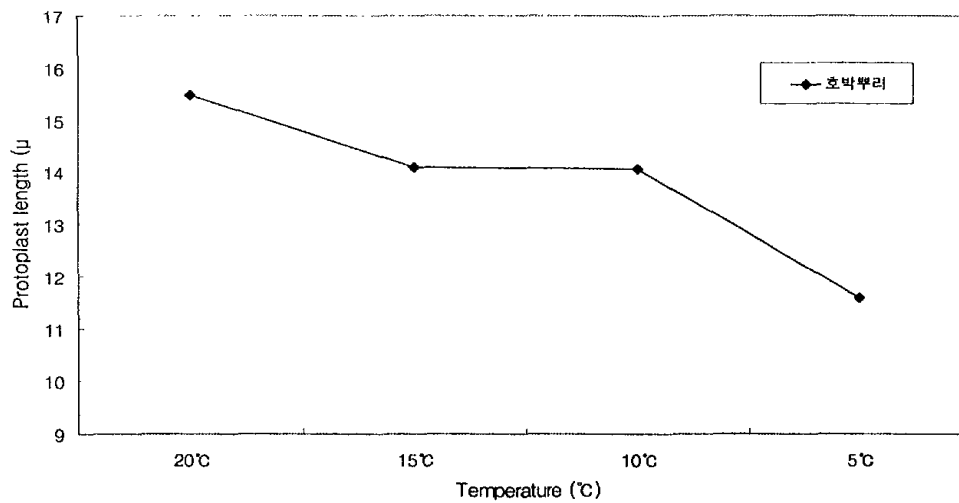


그림 4. 저온순화한 호박뿌리에서 분리한 원형질체의 크기에 미치는 저온의 영향

오이의 경우는 뿌리의 온도가 20℃이하로 내려가면 생리적인 대사가 영향을 받는 것으로 알려져 있으나 10℃로 저온순화시키면 protoplast의 크기는 15℃까지는 유지되었고 호박의 경우는 10℃까지도 저온순화가 가능한 것으로 판단된다. 이러한 결과는 저온에 대한 오이와 호박의 내성차이와 일치하는 내용으로서 흥미로운 결과이다. 즉 원형질막의 H<sup>+</sup>-ATPase의 activation에 미치는 순화온도는 오이가 10℃, 호박이 6℃정도로서 보고된 바 있다. 본 연구진에서는 앞으로 뿌리의 압력을 측정하는 기기인 root pressure probe를 사용하여 저온에 의한 수분흡수의 변화양상을 보다 정밀하게 연구할 계획이다. 또한 aquaporin에 의한 수분흡수조절도 저온내성과 관련지어 조사 할 예정이다.

호박의 Sap flow에 미치는 저온의 영향: 전기한 바와 같이 저온은 결과적으로는 수분흡수에 영향을 준다. 따라서 줄기를 통해서 이동하는 수분의 양(xylem sap)을 측정하여보면 저온에 대한 영향을 용이하게 판단할 수 있을 것이다. 이러한 실험은 전년도에도 실시하였으나 금년도에는 특히 aquaporin

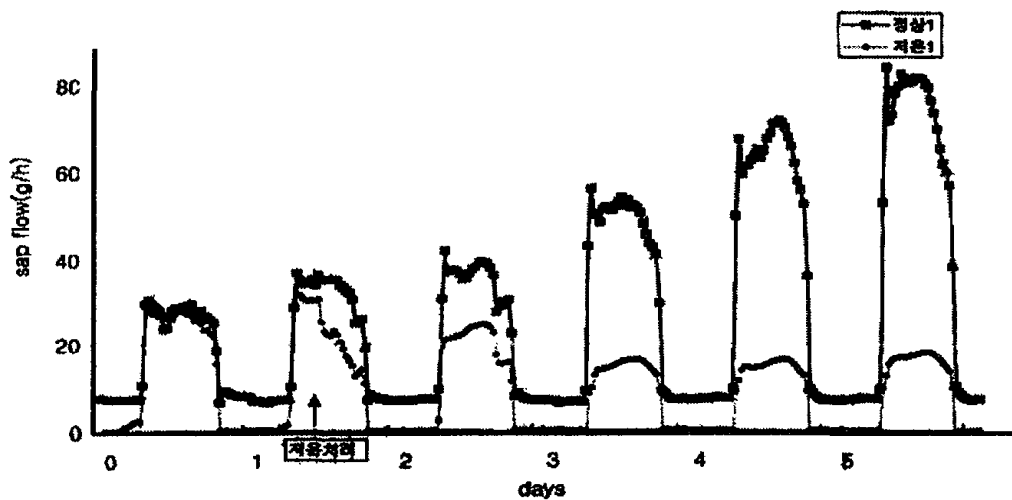


그림 5. 호박의 xylem sap flow에 미치는 저온의 영향

의 역할을 전제조건으로 하여 호박의 water status를 판단코저하였다. 호박을 수경재배하여 줄기의 크기가 10mm정도가 되도록 키운 후, heat-balance sap-flow gauge(Dynagage Flow 32, Dynamax)를 줄기에 부착하여 줄기를 통해서 이동하는 수분의 양을 측정하였다(그림 5). 호박의 근권저온에 의한 수분 흡수의 감소는 처리 후 즉시로 나타났고 처리 후 2일경에 최소로 된 후 3, 4 일경에는 소량이지만 증가하였다. 그러나 대조구는 1시간에 최대 80g정도의 수분을 수송하였으나 저온처리구에서는 17~18g 정도밖에 수송하지 못하였다. 흥미로운 점은 호박엽은 전혀 위조증상을 나타내지 않았다는 점이다. 즉 수분흡수는 현저하게 감소하였음에도 불구하고 위조증상을 나타내지 않은 점은 식물이 저온에 의한 수분흡수의 감소에 적절히 대처할 수 있는 능력이 중요한 점을 암시한다. 아직은 확인하지 못하였지만 water transport protein인 aquaporin의 개폐 기작이 관여하고 있을 가능성을 생각하면 흥미로운 현상으로 해석된다.

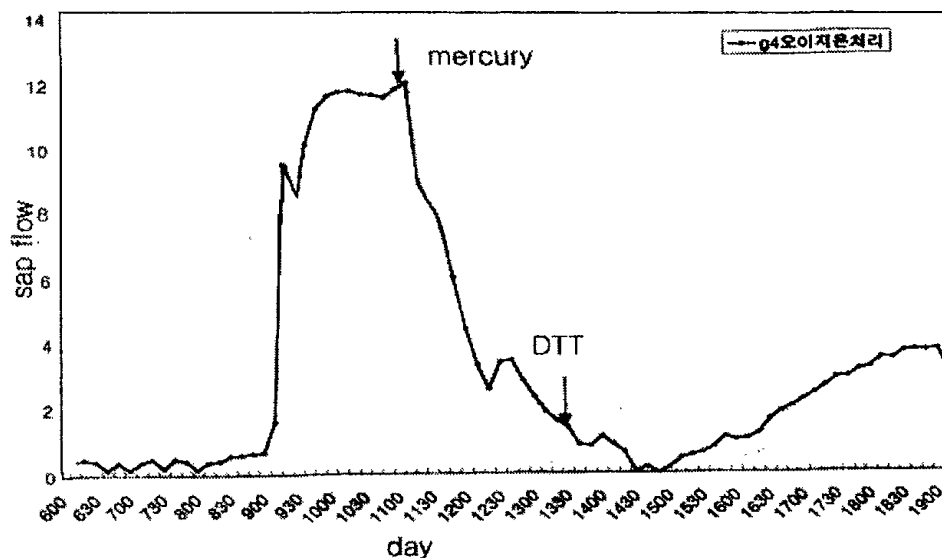


그림 6. Mercury의 첨가가 저온처리한 오이의 xylem sap flow에 미치는 영향

그림6은 저온처리한 오이에 water channel blocker인 mercury를 처리하면 수분흡수가 급격하게 저하하였다. 이러한 결과는 저온의 영향에 따라 water channel의 개폐가 수분이동 및 흡수에 강력하게 작용한 것으로 생각된다.

## 제6절 종합고찰

겨울동안 오이의 반축성 및 축성재배는 우리나라에서 채소류 생산의 중요한 부분을 차지하고 있으며 특히 전남 및 경남지역 비닐하우스의 상당부분은 오이가 재배되고 있다. 최근에는 시설원예의 발달, 난방기기의 사용 등으로 축성재배라고 하더라도 시설물 내의 환경은 많이 개선되었다. 그러나 근본적으로 저온에 내성인 오이를 창출코저 하는 시도는 그리 많지는 않았으며, 전기한 바와 같이 극히 최근예야 Arabidopsis에 CBF1이라는 저온저항성 유전자를 형질전환하여 저온내성을 향상시켰다는 보고가 있다. 더구나 작물에 그러한 저온내성을 획득하였다는 보고는 아직 없다.

저온내성을 획득시킨 후, 그러한 내성을 항시 식물체가 발현하는 경우보다는 저온이 주어지는 경우에만 “내성 switch”를 작동시키는 것이 보다 이상적일 것이다. 즉 늦은 봄에 갑자기 온도가 내려감에 따라 발생하는 막대한 피해를 그러한 switch를 “on” 시켜 회피한 후, 온도가 상승하면 다시 “off”시키는 방법이다. 이러한 현상은 지금까지 알려진 바와 같은 acclimation 혹은 hardening과 같은 단어와 동일하게 사용되어 진다.

본 연구에서는 그러한 switch의 존재 유무에 따라 저온내성 혹은 감수성을 평가할 수 있는 생리적, 생화학적인 방법을 모색하는 데에 중점을 두었다. 실험은 주로 국내에서 종묘회사 및 농촌진흥청에서 분양 받을 수 있는

germplasm을 수집하여 저온내성을 screening 하고, 특히 근권과 대기저온을 구분하여 실험하였다. 실험에 따라 상이한 생리적·생화학적인 방법을 사용하였지만, 저온처리 후 ion leakage의 양을 측정하는 전통적인 방법부터 lipoxygenase와 같은 enzyme activity도 조사하였다. 조사한 항목은 다음과 같다.

- a. Ion leakage
- b. Stomatal resistance
- c. Transpiration
- d. Chlorophyll content
- e. Photochemical efficiency
- f. Photosynthesis
- g. Activated oxygen species related enzyme activities : superoxide dismutase  
와 peroxidase
- h. Water potential
- i. Xylem sap flow
- j. Leaf length
- k. Lipoxygenase
- l. Protoplast size

수집한 germplasm의 저온내성을 검사한 결과 국내 종묘회사에서 육성한 겨울형 오이가 가장 강한 특성을 나타냈다. 저온으로 장시간 처리한 후 강광에 노출시켜 나타난 피해양상으로 저온에 내성 혹은 감수성인가를 조사하였다. 예상할 수 있는 대로 저온처리기간과 강광에 노출되는 시간이 길어질수록 피해는 심하였다. 그러나 흥미롭게도 일반적으로 종묘회사에서 파악하고 있는 특성들과 다소 상반된 결과가 나온 것이다. 즉 일함은 저온내성인 품종

이며, 삼척은 전형적인 여름오이로 알려진 저온 감수성인 품종이나 저온에 의한 피해양상은 반대로 나타났다. 또한 저온 처리 후, 온도를 정상으로 회복시키면 광합성 작용은 삼척이 또한 가장 빨리 회복하였다.

대기저온처리에 따라 줄기를 통해 상승하는 xylem sap의 절대양을 측정한다면, 삼척이 가장 민감하게 반응하였으며 저온에 강한 일항은 저온 하에서도 수분수송의 능력을 상대적으로 높게 유지하였다. 그러나 저온처리 후 엽의 신장 반응 정도를 측정한 결과, 저온에 약한 것으로 알려져 있는 삼척이 일항에 비해서 2배정도 신장하였다. 그러나 기공저항을 보면 삼척은 저온에 의해서 크게 변화하지 않았으며 따라서 광합성량도 더 많았다.

본 연구에서 취급한 lipoxygenase의 활성화는 식물체의 세포막을 구성하는 지질분자의 대사로서 스트레스에 대응하기 위한 방어기구를 작동시키는 핵심 물질을 합성하는 근원을 이루는 것이다. 리놀렌산과 같은 불포화 지방산으로부터 lipoxygenase에 의하여 자스몬산 생합성이 시작되는 octadecanoid 대사 경로는 식물체에 가해지는 기계적 스트레스, 병원균의 침입에 의한 스트레스, 해충의 공격에 대한 스트레스 등 다양한 종류의 스트레스에 대하여 방어 기작을 촉발시키는 대사경로이다. 이러한 근거 하에서 lipoxygenase의 활성을 오이와 흑중호박을 이용하여 측정한 결과 두 가지 species에 따라 현저한 차이를 보여주었다. 저온에 대한 marker로서 사용될 수 있을 정도로 민감하게 반응하였다.

저온의 영향을 protoplast로서 조사한 결과, 오이뿌리에서도 저온에 대한 순화능력이 있음을 나타내었고, 뿌리는 저온으로 순화시킨 후 원형질체를 분리하여 저온으로 처리한 결과를 보면 오이는 15℃, 호박은 10℃에서 각각 순화되는 한계온도인 것으로 판단되었다. Xylem sap flow의 결과에서도 암시한 것처럼 저온내성과 water transport protein인 aquaporin과 밀접한 관련이 있을 것으로 고려된다.