애기장대 유래 뿌리 특이적 프로모터의 동정

김진선 · 임선형 · 강상호 · 김영미* · 이종열*

농촌진흥청 국립농업과학원

Identification of Root-specific Promoters Derived from *Arabidopsis thaliana*

Jin Sun Kim, Sun-Hyung Lim, Sang-Ho Kang, Young-Mi Kim*, and Jong-Yeol Lee*

National Institute of Agricultural Science, RDA, Jeonju, 54874, Korea

Abstract : To identify and apply tissue-specific promoters is one of the major challenges in plants genetic engineering for optimizing efficient expression of interest genes in appropriate tissues. In this research, open-source database information of *Arabidopsis thaliana* was adapted to determine root-specific expressed promoter region. A total seven sequences that might function as a root-specific promoter element were initially isolated from Arabidopsis genomic DNA. Then seven promoters were cloned into pBGWFS7 in which β -glucuronidase (*gus*) and green fluorescent protein (*gfp*) genes were linked. The GUS activities were measured in different tissues of transgenic Arabidopsis by both histochemical GUS staining and fluorescent 4 methylumbelliferyl β -D-glucuronide (MUG) assay. To confirm root-specific expression, GFP-confocal microscope analysis was conducted in Arabidopsis transgenic plant. As a result, the five promoters showed strong GUS activity in the root tissue as compared with the CaMV35S promoter. To test crop application availability as a root-specific promoter, seven promoters were introduced into tomato plants and confirmed transient expression using *Agrobacterium rhizogenes* ARqual root-nodule inducible strain. Two promoters showed that *gus* genes were specifically expressed in roots of transgenic tomato plant. Taken together, the novel seven promoters showed specific activity in root suggesting that it is applicable in crop improvement.

Keywords : Arabidopsis thaliana, GUS, root-specific promoter

서 언

형질 전환은 작물 개량 연구와 유전자 기능 분석을 위한 광범위하게 쓰이는 분석방법이다. 특히 프로모터는 목표 유전자의 발현을 효과적으로 조절하기 위한 필수 요소 중의 하나이며 그 기능에 따라 3가지로 분류 할 수 있다. 목표 유전자의 발현을 식물 모든 조직에서 유도할 수 있는 프로모터, 생물적 또는 비생물적 스트레스 및 외부 자극에 대한 유도성 프로모터, 조직 또는 기관 특이적인 발현을 유도하는 조직 특이발현 프로모터가 있다. 이러한 프로모터의 사용으로 형질 전환을 통한 효과적인 작물 개량 연구가 가능하며, 수년간 다양한 프로모터가 여러 종의 생물체로부터 분리되어 적용되어 오고 있다(Potenza et al. 2004).

식물의 대표적인 전신발현 프로모터로는 콜리플라워 모자이크 바이러스 35S 프로모터(CaMV35S)가 쌍자엽 작물에 많이 사용되고 있다. 단자엽 작물에는 벼 유래 *Actin* 및 옥수수 유래 *Ubiquitin* 같은 프로모터가 광범위적 유전자의 발현을 유도하는데 이용되어왔다(Brisson et al. 1984, Cornejo et al. 1993). 그러나 전신 발현 프로모터들은 조직이나 기관 선택성이 결여되어 있고, 목적유전자의 과다발현으로 인해서 형질 전환 식물에서 화분 발달 장애, 생육 지연, 종자 생산량의 감소 또는 도입 유전자의 silencing 등의 바람직하지 않은 표현형을 보이는 결과가 보고되고 있다(Sinha et al. 1993, Liu et al. 1998, Kasuga et al. 1999, Matzke et al. 2000, Kurek et al. 2002, Cheon et al. 2004, Xu et al. 2006). 이러한 문제점은 조직 특이 또는 유도성 프로모터를 사용하여 특정 조직에서 또는 특정 자극 처리시에만 유전자 발현을 제한하는 것으로 해결할 수 있다.

조직 또는 기관 특이적 프로모터의 예로서, 잎과 광합성 조직에서만 유전자의 발현을 유도하는 벼 및 옥수수 유래의 *rbcs*

*Corresponding Author Y. M. Kim(E-mail: ymikim@korea.kr, Tel: +82-63-238-4616; Fax: +82-63-238-4604

J. Y. Lee(E-mail: jy0820@korea.kr, Tel.: +82-63-238-4616; Fax: +82-63-238-4604)

(Received on October 19, 2017. Accepted on November 20, 2017.)

(ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase small unit) 프로모터(Nomura et al. 2000)와 과실에 특이적으로 발현되는 프로모터에는 토마토 유래의 과실 성숙 특이 발현 유도 *E8* 프로모터(Mehta et al. 2002) 등이 보고 되고 있다.

종자 특이적 프로모터의 경우 벼의 저장 단백질 유전자 유래의 프로모터들로 벼 *glutelin* 유전자의 *GluB1* 프로모터가 단자엽 식물의 종자 특이 발현을 유도하고(Takaiwa et al. 1991), 쌍자엽 식물의 종자 특이 발현을 유도하기 위해서는 콩 유래 *LegA* 프로모터(Shirsat et al. 1989), 배추 유래 *Napin* 프로모터(Josefsson et al. 1987) 등이 사용되고 있다.

뿌리 특이 발현 프로모터로는 단자엽 식물에서는 주로 벼 유래의 *RCc3* 프로모터(Jeong et al. 2010), 쌍자엽 식물에서는 담배 유래의 *TobRB7* 프로모터(Yamamoto et al. 1991)가 주로 뿌리에 특이적으로 특정 유전자를 발현 시키는데 사용되고 있다.

식물에서 뿌리의 역할은 물과 영양분의 흡수, 식물체의 지지, 양분의 저장 및 호흡을 통한 산소와 이산화탄소를 순환시키는 기능을 한다. 실제로, 지하부 뿌리에 문제가 생기면 직접적으로 지상부의 잎과 줄기 등에 영향을 미치기 때문에 작물의 생산성은 건강한 뿌리 시스템에 절대적으로 의존하게 된다. 이러한 문제점들은 토양의 유형이나 pH에 따라 또는 근권 미생물들에 의한 공격에 처해 있는 작물을 뿌리 특이적 프로모터를 보완적으로 사용함으로써 목표 유전자를 발현시켜 생육에 더 적합한 작물개발을 가능하도록 해준다(Potenza et al. 2004, Yamamoto et al. 1991).

조직 특이 프로모터 중 특히 뿌리 특이 프로모터는 가뭄으로부터의 작물 보호, 내염성 증가, 토양 내의 다량 및 미량 영양소의 흡수, 토양 근권 병원체에 대한 내성 증가 등의 다양한 목적에 응용이 가능하다(Potenza et al. 2004). 또한 뿌리털(root hair)과 측근(lateral root)의 형성은 토양 내의 수분 및 양분의 흡수를 위해 표면적을 넓힘으로 가뭄이나 양분 결핍에 의한 환경 스트레스 시 작물의 생육 유지에 중요한 역할을 한다. 현재까지 잘 알려진 뿌리털 특이 발현 프로모터에는 보리 유래 *HvEXPB1*과 벼 유래 *OsEXPB5*(Won et al. 2010)로 각각 뿌리털의 개시와 신장에 밀접하게 관여한다고 보고되었고, 쌍자엽 식물에서는 애기장대 유래의 2개 *EXPA* 유전자인 *AtEXPA7*, *AtEXPA18*(Cho & Cosgrove 2002)의 프로모터가, 토마토 유래의 *LeExt1.1* 프로모터가 알려져 있다(Bucher et al. 2002).

뿌리의 구조는 표피, 피층, 관다발(중심주)의 3가지로 구성되어 있다. 표피는 가장 바깥쪽에 존재하여 뿌리 내부를 보호하고 뿌리털을 형성한다. 피층은 표피 안쪽의 여러 겹의 세포층으로

뿌리 내부의 물이 밖으로의 유출을 방지하는 역할을 한다. 관다발은 중심주(stele) 라고도 명칭하며 내피, 물관과 체관으로 이루어져 양분의 합성 및 저장과 분비의 기능을 담당하며, 식물체를 지지하는 중요한 역할을 한다. 중심주 특이적 발현 프로모터는 아직까지 많이 알려져 있지 않으며, 애기장대 유래의 *AtCRE1* (CYTOKININ RESPONSE 1) 프로모터가 중심주에 특이적으로 많이 발현한다고 보고되었다(Mähönen et al. 2000). 식물의 선충 감염 시 뿌리에 침투하여 뿌리의 신장대(Elongation zone)에 정착한 후 중심주 쪽으로 이동하여 뿌리 발달에 관여하는 경로를 조작하여 거대 세포(Giant cell) 라고 불리는 과정을 유도하여 뿌리혹을 형성시켜 작물의 생육에 피해를 준다. 애기장대 유래 *PINI* 프로모터(Grunewald et al. 2009)와 *LAX3* 프로모터(Lee et al. 2011)의 이용으로 옥신 관련 유전자 돌연변이체의 뿌리혹 형성을 줄였다는 보고가 있었다.

뿌리혹 선충류에 의한 농작물의 피해가 급증하고 세계적으로 피해규모는 약 1500달러, 총 생산량 10%의 감소 원인으로 알려져 있다(Ali et al. 2015). 이러한 피해를 줄이고자 뿌리 조직에서 선충 치사 유전자의 발현을 유도하는 선충 방제용 형질전환체 연구가 진행이 되고 있다. 애기장대 뿌리에서 고구마 뿌리혹 선충인 *Meloidogyne incognita*와 cyst 선충이 감염되었을 때 *CaMV35S* 프로모터하의 *β-glucuronidase(gusA)* 와 *green fluorescent protein(gfp)* 발현이 점진적으로 감소되었다(Goddijn et al. 1993, Urwin et al. 1997). 따라서 선충의 감염 조직에서 도입유전자의 발현이 감염과정 전반에서 안정적으로 지속되는 프로모터의 개발이 필요하다. 반면에 애기장대 유래 *MDK4-20* 프로모터는 선충 감염 시에도 지속적인 발현을 유지함으로 선충 방제에 효과적인 뿌리 특이적인 발현 프로모터임을 보고되었다(Lilley et al. 2011). 따라서 선충 감염 시 선충 치사 유전자가 뿌리 조직에서 특이적으로 높은 발현을 안정적으로 유도하는 뿌리 특이 프로모터를 탐색하고 분석 확인하는 것이 요구된다.

본 연구에서는 애기장대의 공개 생명정보DB site를 활용하여 조직 특이적으로 발현됨이 확인되는 유전자 7종을 선발하였으며, 각각의 유전자들의 상위 2Kb 부위의 프로모터를 클로닝하고 애기장대에 형질 전환하여 각각 프로모터의 특성을 분석 하였다. 조직 화학적 GUS 염색법, 뿌리 조직의 GFP 형광 분석, RT-PCR 및 GUS 활성 분석으로 분리된 7종의 프로모터 형질전환체들의 뿌리 조직 특이적인 발현을 비교 분석하였다. 또한 각각의 프로모터들을 형질전환을 통하여 토마토에 도입하고 뿌리 특이 발현 프로모터로서의 적용 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

뿌리 특이 프로모터 선발 및 클로닝

공개 생명 정보(<https://www.arabidopsis.org/>)를 활용하여 애기장대 유전자의 조직 별 발현 양상을 분석하여 뿌리 특이적 발현을 나타내는 7종의 유전자를 선발하고 해당 유전자의 coding sequence(CDS)를 검색 한 후 각 CDS의 상위 2Kb 프로모터 부분에 대한 프라이머를 제작한 후 애기장대 genomic DNA를 주형으로 PCR을 수행하여 증폭했다. 각 프로모터에 해당되는 프라이머와 사이즈는 Table 1에 기술하였다. 증폭된 프로모터들은 Gateway cloning system(VIB-Ghent University, Ghent, Belgium) 으로 최종적으로 *gfp* 와 *gus* 유전자가 연결된 형태의 리포터 시스템이 내재되어 있는 식물발현용 pBGWFS7 운반체(binary vector) 내로 삽입하였다.

형질 전환 재료 및 생육 조건

제작된 형질전환용 운반체는 아그로박테리아(*Agrobacterium tumefaciens* GV3101)에 Freeze-thaw 방법으로 형질 전환하였다. 파종 후 22°C 생육상(16시간 낮/8시간 밤)에서 약 4주간 생육된 애기장대(*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia-0) 식물체의 일차 꽃대를 제거하여 최소한 3-4개의 이차 꽃대를 유도한 후, 식물 형질전환 운반체가 보유한 아그로박테리아 배양 현탁액에 꽃봉우리를 침지시켜 형질전환하였다. 약 3~5주간 생육 시킨 후 채종된 종자는 다시 파종하여 생육 10일째와, 17일째에 0.3% BASTA를 2회에 걸쳐 살포함으로써 T₁세대의 형질전환체를 선발하였다. T₁ 형질전환 식물체는 완전히 성숙할 때까지 약 2달간 생육 시킨 후 T₂ 종자를 채종하였다.

토마토 형질전환은 Micro-Tom 품종을 이용한 방법을 따라 수행하였다(Guo et al. 2012). 토마토 종자를 소독한 후 MS배지에 파종하여 빛 강도가 60μmol · m⁻² · s⁻¹ 인 25°C 생육상(16시간 낮 / 8시간 밤) 에서 약 10일간 생육된 토마토 식물체의 잎과 줄기를 절단하여 형질전환에 사용하였다. *Agrobacterium* GV3101 균주를 사용하여 각각 7종의 프로모터가 도입된 운반체를 1차적으로 *Agrobacterium*에 형질전환 시켰다. 형질 전환 방법은 LB액체배지에 항생제(Rifampicin+Spectinomycin)를 넣고 *Agrobacterium*를 접종 한 후 3000rpm에서 원심분리하여 *Agrobacterium*를 제외한 상층액을 버리고, 100μM/L acetosyringone이 함유된 1/2MS 액체배지를 사용하여 *Agrobacterium*을 잘 잘 현탁하여 OD₆₀₀값을 0.4~0.6이 되도록 맞춰주었다. 미리 전배양 해둔 토마토 잎과 줄기 조직을 넣고 25분간 침지시켰다. 멸균된

filter paper에 올려서 물기를 제거한 후, 공동배양 배지(MS 배지)에 치상한 후 2일 동안 25°C에서 암배양 하였다. 2일 후, 신초유기배지(MS salt, sucrose 30g/L, phytigel 2g/L, 1.5mg/L Zeatin, IAA 0.02mg/L, phosphinotricin 1mg/L, cefotaxime 250mg/L, carbenicillin 250mg/L, pH5.8) 로 옮기고, 신초가 나오면 뿌리유기배지(MS salt, sucrose 30g/L, phytigel 2g/L, IBA 2mg/L, phosphinotricin 1mg/L, cefotaxime 250mg/L, pH5.8) 로 옮겨서 뿌리를 유도하였다.

토마토 일시 발현 분석

콩과식물의 뿌리혹을 유도하는 근권균인 *Agrobacterium rhizogenesis* ARqual(Quandt et al. 1993)을 이용하여 형질전환 토마토를 파종한 후 뿌리의 끝을 절단하여 토마토 뿌리의 일시적 *gus* 발현 검정을 수행하였다.

GUS 발현 분석

선발한 프로모터로 형질전환 시킨 각각의 애기장대 형질전환체의 T₂ 종자를 파종하여 0.3% BASTA를 처리 후, 큰 화분으로 옮겨 심어 약 3주간 22°C에서 생육하여 식물체의 기관이 분화되었을 때 잎, 줄기, 뿌리, 꽃, 꼬투리 등 조직을 채집하여 GUS 염색을 실시하였다. GUS 활성은 대조구인 비형질전환된 애기장대와 전신발현 프로모터인 CaMV35S로 형질전환한 애기장대와 각각의 프로모터별로 형질전환된 애기장대 T₂ 세대의 2계통을 사용하여 분석하였다. 프로모터의 조직별 활성과 조직 특이성을 확인 하기 위해서 GUS 활성 분석과 조직화학적 염색을 실시하였다. GUS 분석은 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide(MUG)를 이용하여 애기장대 형질전환체의 뿌리, 줄기, 잎, 꽃, 꼬투리를 채취하여 마쇄한 후 추출 용액(50 mM sodium phosphate pH 7.0, 10 mM DTT, 1mM EDTA, 0.1% sodium lauroyl sarcosine, 0.1% Triton X-100) 으로 total 단백질을 추출하였다. 단백질의 양은 Qubit 형광 측정기(Invitrogen)를 사용하여 상층액의 단백질 농도를 측정하였다. 상층액의 GUS 효소 활성도를 형광 기질인 1 mM MU를 사용하여 FluorAceTM β-글루쿠로니다아제 리포터 분석 키트(Bio-Rad)를 사용하여 분석 하였다. 평균은 3회 반복 실험을 통해 계산하였다. 조직화학적 염색은 GUS 분석 용액(X-gluc(cyclohexyl ammonium salt) 20 mM, NaH₂PO₄H₂O 100 mM, NaEDTA 10 mM, Triton X-100 0.1%, pH 7.5)에 침지하여 37°C에서 24시간 처리 후 엽록소 제거를 위해 70% 에탄올에 침지한 후, 현미경으로 관찰하였다(Jefferson 1987).

RNA 분리 및 RT-PCR

gus 유전자의 발현을 확인하고자 애기장대의 잎, 줄기, 뿌리, 꽃, 꼬투리를 채취한 후 액체질소를 이용하여 마쇄한 후 RNeasy Plant Mini Kit(Qiagen)를 이용하여 전체 RNA를 추출하였다. RT-PCR 조건은 5 μ g의 total RNA와 SuperScriptIII(200 units/ μ l)를 이용하여 먼저 first strand cDNA를 합성한 후 1 μ l의 first strand 반응액에 *gus* 특이적인 프라이머(GUS-Forward, 5'- ACC TGC GTC AAT GTA ATG TTC TGC -3'; GUS-Reverse, 5'- CTC CCT GCT GCG GTT TTT CA-3')를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 각 조직별 cDNA의 사용량을 normalization하기 위해서 *EF1 α* (elongation factor 1 alpha) 특이적인 프라이머(EF1 α -Forward, 5'-CCG AGC GTG AAC GTG GTA T-3'; EF1 α Reverse 5'-TAG TAC TTG GTG GTT TCG AAT TTC C-3')를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 2분 preheating 한 후 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분의 cycle로 30 cycles의 PCR 수행 후 1% agarose gel에 전기영동하여 조직 별 유전자발현을 확인하였다.

GFP 형광 분석

각각의 프로모터들이 도입된 형질전환체들은 파종 후 7일째의 식물을 이용하여, 공초점 현미경(Leica TCS SP8)의 아르곤 레이저 488 nm excitation과 505-525 nm emission 파장으로 GFP 형광 분석을 뿌리를 대상으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

뿌리 특이 프로모터 선발

애기장대의 유전체 정보 및 공개되어 있는 생명정보 DB를 활용한 조직 특이 프로모터 중 뿌리에서 특이적인 발현이 예상되

는 애기장대 유래의 7종의 프로모터를 선발하였다.

Fig. 1. Characterization of Arabidopsis F10-94 promoter using transgenic Arabidopsis plants. A: GUS staining. F10-94 (upper panel), Col-0 (middle panel) and CaMV35S (bottom panel). Red arrows indicate roots. B: GFP fluorescence analysis of transgenic Arabidopsis plant roots using confocal microscopy. BF indicates photo taken using bright-field microscopy. C: RT-PCR analysis of *gus* gene in different tissues. L, leaves; F, flowers; St, stems; R, roots; Si, silique.

Table 1. Seven promoter information and list of primers.

Promoter symbol	Gene ID	Forward primer	Reverse primer	Product size(bp)
F10-94	At1g23720	AAAAAGCAGGCTatcgttctcaaaatgatgct	AGAAAGCTGGGggccatgataataaaaccaa	1,935
RA1-66	At1g56320	AAAAAGCAGGCTaatgtctggcaaaactacatt	AGAAAGCTGGGgggagagaaataagcagaga	1,926
Mix19-10	At1g29730	AAAAAGCAGGCTectgtgaatctgcttacgat	AGAAAGCTGGGgaagattgtgtcaagtgat	1,981
ad21	At2g42710	AAAAAGCAGGCTcaatcgtcctctcttctgat	AGAAAGCTGGGttcactcactcgaggttttt	1,957
cd1	At1g14240	AAAAAGCAGGCTaggtgaatcatcttctctgtg	AGAAAGCTGGGggatcgttgcatcaacgtct	1,850
d27-3	At1g12040	AAAAAGCAGGCTttagatccacattcgtga	AGAAAGCTGGGggtcaagaacccaatttta	1,904
RG10-41	At2g24980	AAAAAGCAGGCTgagatcatgctcttctgttat	AGAAAGCTGGGcatggttcttctgagatctca	2,003

뿌리 특이 프로모터들의 GUS 발현 및 GFP 형광 비교분석

애기장대 유래의 7종의 프로모터에 대하여 뿌리 기관별 발현을 확인하기 위해 뿌리조직을 GUS 염색하여 실체현미경에서 분석하였고 GFP 형광은 공초점 현미경으로 분석하였다. 7종의 프로모터가 도입된 형질전환체는 T₂ 세대까지 진전하였으며, 각각 프로모터를 도입한 형질전환체와 비형질전환 애기장대와 전신발현 프로모터 CaMV35S가 도입된 형질전환체로 GUS 염색 결과를 비교분석 하였다.

F10-94 프로모터는 형질전환체의 유식물체에서는 뿌리 특이적으로 *gus*가 발현되었지만, 식물이 성숙할 수록 뿌리에서 GUS 발현이 감소되는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 1-A). 파종 후 7일째 F10-94 프로모터를 도입한 형질전환체 뿌리의 GFP 형광 분석 결과 F10-94 프로모터는 주로 뿌리 세포 분열이 활발히 일어나는 신장대(elongation zone) 에서 발현되는 것으로 나타났다(Fig. 1-B). *GUS* 유전자의 발현을 조직 별로 분석한 결과, F10-94 프로모터는 뿌리에서만 높은 발현을 나타내었다(Fig. 1-C). 현재까지 뿌리 신장대 특이적으로 발현하는 프로모터로는

뿌리혹 선충 감염 시 초기단계에 생성된 뿌리의 거대세포와 신장대에서 강한 *gus* 발현을 보인 담배유래의 *TobRB7*과 애기장대 유래의 *Atcell1* 프로모터가 있다(Yamamoto et al. 1991, Sukno et al. 2006). 이들은 선충 감염 시 거대세포로의 선충 치사 유전자의 발현을 조절함으로써 선충 감염 시 뿌리와의 상호작용에 적극 관여한다고 알려져 있다. 이를 토대로 신장대에 특이적으로 발현되는 F10-64 프로모터가 선충 감염 시 뿌리와의 상호작용을 유도하는 형질전환체 제작 시 유용하게 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

RA1-66과 Mix19-10 프로모터 분석 결과, 유식물체에서는 RA1-66과 Mix19-10 프로모터가 도입된 형질전환체에서 뿌리에서 특이적으로 *gus*가 발현되었지만, 식물체가 성숙할 수록 뿌리에서 발현이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2-A, Fig. 2-D). 공초점 현미경을 이용한 GFP 형광분석 결과, RA1-66과 Mix19-10 프로모터는 뿌리 조직 중 중심주(stele) 조직에서 주로 발현되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2-B, Fig. 2-E). 성숙 식물체의 조직별 RT-PCR 분석 결과에서도, RA1-66과 Mix19-10 프로모터

Fig. 2. Characterization of Arabidopsis RA1-66 and Mix19-10 promoter using transgenic Arabidopsis plants. A: GUS staining. RA1-66 (upper panel), Col-0 (middle panel) and CaMV35S (bottom panel). Red arrows indicate roots. B: GFP fluorescence analysis of transgenic Arabidopsis plant roots using confocal microscopy. BF indicates photo taken using bright-field microscopy. C: RT-PCR analysis of *gus* gene in different tissues. L, leaves; F, flowers; St, stems; R, roots; Si, silique. D: GUS staining. Mix19-10 (upper panel), Col-0 (middle panel) and CaMV35S (bottom panel). E: GFP fluorescence analysis of transgenic Arabidopsis plant roots using confocal microscopy. F: RT-PCR analysis of *gus* gene in different tissues.

모두 뿌리 조직에서 강한 *gus* 유전자의 발현을 확인할 수 있었고 (Fig. 2-C, Fig. 2-F), 현재까지 보고된 중심주 특이적인 발현 프로모터의 연구 내용은 뿌리 내의 옥신 분비를 조절하는 유전자 연구를 통해 보고되었다. 낭종 선충이나 뿌리혹 선충에 의한 감염 시 중심주로 이동하여 그 자리에 거대 세포를 형성하는데, 이때 선충이 옥신 호르몬이 작용하는 뿌리 발달 과정을 이용하여 뿌리의 기능을 약화시켜 작물에 피해를 주게 된다. 여기에 *PIN1*, *PIN4* 유전자의 프로모터 부분이 중심주에 특이적으로 발현이 되고, *PIN4* 유전자는 선충의 감염 부위 호르몬 수준을 안정화시키기 위해 과도한 옥신을 제거하여 뿌리혹의 생성을 감소시킨 보고가 있었다(Kyndt et al. 2016). 중심주 특이적 프로모터는 전신발현 프로모터에 비해 선충 감염 시 중심주 조직에 특이적으로 발현되어 초기에 거대 세포 형성과 비대를 방지할 수 있기 때문에 이용 가치가 높다. 따라서 본 연구의 중심주 특이적 발현 프로모터인 RA1-66과 Mix19-10 프로모터 모두 뿌리내의 병원체에 대해

적용성이 높은 프로모터로 판단된다.

유식물체에서는 *ad21* 프로모터가 도입된 형질전환체에서 뿌리에 특이적으로 *gus*가 발현되었지만, 식물체가 성숙될수록 뿌리에서 발현이 감소되는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 3-A). 파종 후 7일째 *ad21* 프로모터 형질전환체의 GFP 형광 분석 결과와 뿌리털과 중심주에 GFP signal이 관찰되어 *ad21*프로모터는 뿌리 조직에서 전체적으로 발현되는 뿌리 특이 프로모터임을 확인할 수 있었다(Fig. 3-B). 성숙한 식물체의 조직별 RT-PCR 분석 결과에서도 *ad21*프로모터를 도입한 형질전환체에서 뿌리 조직에서만 *gus* 유전자의 발현이 확인되었다(Fig. 3-C). 괴경작물인 감자에서 토마토 유래의 *LeExt1.1* 뿌리털 특이 발현 프로모터를 사용한 형질전환체의 인산의 흡수가 야생형 감자에 비해 형질전환체가 40% 더 늘어났다는 보고가 있었다(Bucher et al. 2002). 중심주와 뿌리털 모두에서 발현되는 *ad21* 프로모터의 경우 선충 감염 시 중심주에서도 발현이 가능하며, 토양 내에서 양분 흡수를 높이기 위한 뿌리털 특이적인 발현이 확인 됨으로 작물개량을 위해 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

Fig. 3. Characterization of Arabidopsis *ad21* promoter using transgenic Arabidopsis plants. A: GUS staining. *ad21* (upper panel), Col-0 (middle panel) and CaMV35S (bottom panel). Red arrows indicate roots. B: GFP fluorescence analysis of transgenic Arabidopsis plant roots using confocal microscopy. BF indicates photo taken using bright-field microscopy. C: RT-PCR analysis of *gus* gene in different tissues. L, leaves; F, flowers; St, stems; R, roots; Si, silique.

Fig. 4. Characterization of *cd1* promoter derived from Arabidopsis. A: GUS staining. Col-0 (left), *cd1* (middle) and CaMV35S (right). Red arrows indicate roots. B: GFP fluorescence analysis of transgenic Arabidopsis plant roots using confocal microscopy. BF indicates photo taken using bright-field microscopy. C: Lateral root GFP fluorescence images of *cd1* promoter controlled transgenic plant. D: RT-PCR analysis of *gus* gene in different tissues. L, leaves; F, flowers; St, stems; R, roots; Si, silique.

cd1 프로모터가 도입된 형질전환체는 비형질전환 애기장대와 비교했을 때 성숙한 식물체의 뿌리 조직에서 *gus*의 발현을 확인하였다(Fig. 4-A). 공초점 현미경을 이용한 GFP 형광분석 결과, cd1 프로모터는 측근(lateral root) 형성 지점과 측근에서 강하게 발현되는 측근 특이 프로모터를 확인 할 수 있었다(Fig. 4-B, 4-C). 성숙한 식물체의 조직 별 RT-PCR 분석 결과에서도 cd1 프로모터 형질전환체에서는 뿌리 조직에서만 *gus* 유전자의 발현을 확인할 수 있었다(Fig. 4-D). 측근 특이 발현 프로모터로는 단자엽 식물에서 벼 유래의 *rRSP1*, *rRSP3*, *rRSP5* 프로모터가 측근에서 강한 *gus* 발현을 보였다고 알려져 있으며, 쌍자엽 식물인 담배의 일시적 발현을 유도한 결과 측근 특이적으로 발현됨이 보고되었다(Huang et al. 2015). 측근의 형성은 토양 내 수분 및 양분의 흡수를 위해 뿌리의 표면적을 넓혀 가뭄이나 양분 결핍 시 작물의 생육 유지에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있는데, cd1 프로모터는 측근과 측근의 형성 지점에서 강한 발현을 보이므로 가뭄저항성 유전자의 발현이나 불량환경 하에서 작물의 생육을 증진시키고자 하는 목적으로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

d27-3 프로모터 분석을 위해, 성숙한 식물체의 뿌리조직에서 d27-3 프로모터 형질전환체와 Col-0 애기장대와 GUS 염색을 비교해 본 결과 뿌리에서 강한 발현을 확인하였다(Fig. 5-A).

공초점 현미경을 이용한 GFP 형광분석 결과, d27-3 프로모터는 근단(root tip)과 뿌리털 조직에 주로 발현되었고(Fig. 5-B), 성숙한 식물체의 조직 별 RT-PCR 분석 결과에서도 뿌리 조직에서만 *gus* 유전자의 발현을 확인할 수 있었다(Fig. 5-C).

RG10-41 프로모터 분석을 위해, 성체의 뿌리조직에서 RG10-41 프로모터 도입 형질전환체와 Col-0 애기장대의 GUS 염색을 비교해 본 결과 뿌리에서 강한 발현을 확인하였다(Fig. 5-D). 공초점 현미경을 이용한 GFP 형광분석 결과 RG10-41 프로모터는 뿌리털 조직에서 발현되었고, 3일째와 7일째 뿌리 조직을 관찰해본 결과, RG10-41 프로모터는 뿌리털이 신장함에 따라서도 GFP signal을 관찰할 수 있었다(Fig. 5-E). 성체 식물체의 조직 별 RT-PCR 분석 결과에서도 뿌리 조직에서만 *gus* 유전자의 발현을 확인할 수 있었다(Fig. 5-F). 뿌리의 표면적을 증가시켜 수분 및 양분의 흡수율을 높이는 기능을 하는 뿌리털은, 식물 세포벽의 loosening 에 전반적으로 관여하는 *EXPANSIN* 유전자들의 프로모터들에 의해 많은 연구가 진행되었다. 뿌리털 특이 프로모터들로는 뿌리털의 신장에 관여하는 *EXPAs*, *EXPBs*가 보고 되었다(Cho & Cosgrove 2002, Won et al. 2010). CaMV35S promoter 조절 하의 *gusA*와 *gfp* 발현이 애기장대 뿌리에서 고구마 뿌리혹 선충과 cyst 선충의 감염 부위에서 지속적으로 유지하지 못하고 점진적으로 감소하는 것으로 나타났다는 보고가 있었

Fig. 5. Characterization of Arabidopsis d27-3 and RG10-41 promoter using transgenic Arabidopsis plants. A: GUS staining of d27-3 promoter. Col-0 (left), d27-3 (middle) and CaMV35S (right). Red arrows indicate roots. B: GFP fluorescence analysis of transgenic Arabidopsis plant roots using confocal microscopy. BF indicates photo taken using bright-field microscopy. C: RT-PCR analysis of *gus* gene in different tissues. L, leaves; F, flowers; St, stems; R, roots; Si, silique. D: GUS staining of RG10-41 promoter. RG10-41 (upper panel), Col-0 (middle panel) and CaMV35S (bottom panel). E: GFP fluorescence analysis of transgenic Arabidopsis plant roots using confocal microscopy. F: RT-PCR analysis of *gus* gene in different tissues.

지만(Goddijn et al. 1993, Urwin et al. 1997), 단자엽 식물에서는 ZmRCP-1 프로모터가 옥수수의 측근과 근관 세포에서 발현되어 선충 저항성이나 선충 치사 유전자의 지속적인 발현을 유지하므로 근관 또는 근단 특이적 프로모터 활성을 제공한다는 것을 증명하였다(Onyango et al. 2016). 쌍자엽 식물에서 MDK4-20 프로모터는 애기장대와 감자에서 선충류 치사 펩타이드의 분비를 지시하여 선충 저항성을 보여주었고, 선충 방제에 효과적인 뿌리 특이적인 발현 프로모터임을 보고하였다(Lilley et al. 2011). 이러한 연구 결과들을 토대로, 근관과 측근 그리고 근모에서 특이적 발현을 보여준 본 연구의 cd1, d27-3, RG10-41 뿌리 특이 프로모터들은 선충 치사 펩타이드 및 선충 치사 유전자 발현을 조절함으로 선충 저항성 작물 개발에 응용 가능성이 높다고 생각된다.

GUS 활성 분석

상기의 7종 뿌리 특이 프로모터에 대하여 3반복으로 MUG 분석을 수행하여 프로모터의 활성강도를 비교한 결과, 본 연구에서 개발된 7종의 뿌리 특이 프로모터 모두 뿌리에서 높은 GUS 활성을 나타내었다. ad21, cd1, d27-3, RA1-66은 CaMV35S 프로모터에 비하여 1~1.5배의 높은 활성을 보였고, F10-94, Mix19-10은 CaMV35S 프로모터 보다 낮은 프로모터 활성을 보였으며, RG10-41 프로모터가 CaMV35S 프로모터 활성의 2.5배 정도로 가장 높은 활성을 보였다(Fig. 6). 중심주에서 특이적 발현을 보여준 Mix19-10 프로모터가 GUS 활성도가 가장 낮았고, 신장대에서 특이 발현을 보여준 F10-94 프로모터가

그 다음으로 낮은 GUS 활성을 보였다. 중심주 특이 발현을 보여준 RA1-66 프로모터와 중심주 및 뿌리털에서 발현을 보여준 ad21 프로모터, 측근 특이적 발현을 보인 cd1 프로모터, 뿌리털 특이적 발현을 보여준 d27-3프로모터는 CaMV35S 프로모터보다 약간 높은 수준으로 GUS 활성을 보여주었다. 반면에, 뿌리털에서 특이적 발현을 보여준 RG10-41 프로모터의 경우 CaMV35S 프로모터 활성보다 2.5배 정도의 높은 활성을 보여 7종의 프로모터 중 가장 높은 GUS 활성을 보였다. 현재까지 보고된 뿌리 특이 프로모터 중 비생물적 스트레스의 경우, RCc3 뿌리 특이 프로모터는 CaMV35S 프로모터 조절 하에서 발현되는 것 보다 *OsNAC10* 유전자가 건조 스트레스 시 식물체에 강한 내성을 부여하였으며(Jeong et al. 2010), 생물학적 스트레스의 경우, 선충 감염 초기 단계에서 토마토의 *SIREO* 프로모터가 강하게 발현하였다는 보고가 있었다(Jones et al. 2008). 이를 토대로 작물의 뿌리 특이적 고발현 프로모터인 애기장대 유래 7종의 프로모터는 가뭄저항성 작물의 유전자 도입 형질전환체 생산 또는 선충 치사 유전자나 기타 뿌리 근권 병원균에 대한 치사 유전자를 도입하는 형질전환 시스템으로 작물의 형질을 개량하는데 이용 가능할 것으로 사료된다.

애기장대 유래 뿌리특이 프로모터의 토마토 적용성 검토

뿌리 특이 프로모터 7종이 실제 작물 뿌리에서 적용 가능한지를 검토하기 위하여 토마토에 일시 발현 검토 및 형질 전환을 수행하였다. 토마토 생산에 영향을 미치는 많은 질병들의 원인 중 하나인 선충을 실험 재료로 선정하였다. 뿌리 매듭 선충류인

Fig. 6. GUS activity comparison of root-specific promoters by MUG analysis. GUS activity was measured in the root, stem, leaf, flower and silique from transgenic Arabidopsis. Fluorometric quantification of GUS activity was different among transgenic lines. The GUS activity is expressed in nmol 4-MU/hr/μg protein. Error bars represent SE within the three replicates.

*Meloidogyne incognita*와 같은 식물 기생 선충류는 뿌리에 감염 후 거대세포 형성으로 뿌리혹이 생기면서 최대 50%의 심각한 수확량 손실을 일으킨다고 보고되고 있다(Darekar and Mhase 1988). 우선, 콩과식물의 뿌리혹을 유도하는 근권균인 *Agrobacterium rhizogenesis* ARqual(Quandt et al. 1993)을 이용하여 토마토 뿌리의 일시적 발현검정을 수행한 결과 7종의 프로모터 모두

토마토 뿌리 조직에서 *gus* 발현을 유도함을 확인하였다(Fig. 7). GUS 염색 결과, 유식물체와 뿌리를 관찰했을 때 7종의 프로모터가 모두 뿌리에서 발현됨을 볼 수 있었지만, F10-94 프로모터의 유식물체에서는 뿌리 뿐만 아니라 상층부에서도 GUS 발현을 볼 수 있었다. 이는 Fig. 1의 애기장대 형질전환체 실험 결과에서와 같이 F10-94 프로모터의 발현이 유식물체에서 성체로 갈수록

Fig. 7. Transient analysis of tomato seedling through infection with *Agrobacterium rhizogenesis* ARqual with root-specific promoters derived from Arabidopsis.

Fig. 8. GUS staining of transgenic tomato plants with RG10-41 and RA1-66 promoter, respectively(T1).

감소되는 현상을 나타내었으며, 토마토의 일시적 발현을 유식물체 단계에서 분석하여 강한 *gus* 발현을 유도함으로써 보이는 현상으로 판단된다.

7종의 뿌리특이 프로모터의 작물 적용성 검정을 위해 토마토에 형질 전환을 실시하였다. 확보된 형질전환체를 *phosphinotricin* 1mg/L가 포함된 MS기본배지에서 발아시켜서 후대 형질전환체를 선발하였다. 7종의 프로모터 중 RG10-41과 RA1-66 프로모터가 도입된 식물체를 BAR strip 검정과 도입유전자의 단백질 발현 여부를 확인하여 형질전환체를 확보하였다. 유식물체를 GUS 염색을 실시해 본 결과 비형질전환체 토마토에서는 GUS 염색이 관찰되지 않았으나, RA10-41 프로모터와 RA1-66 프로모터로 형질전환된 개체에서는 뿌리에서 GUS 염색이 관찰되었다(Fig. 8). 효과적인 선충 억제제를 위해서는 선충 반응성 뿌리 특이 프로모터(nematode responsive-root-specific(NRRS) promoter)의 개발이 필요하며, 지금까지 선충에 대한 저항성을 위해 확인되고 개발된 NRRS 프로모터로는 *TobRB7*, *LEMMI9*, *Hahsp17.7G4*, *Hs1pro1*, *Atcel* 등이 알려져 있다(Yamamoto et al. 1991, Escobar et al. 1999, 2003, Thureau et al. 2003, Sukno et al. 2006). 이러한 결과는 RG10-41 프로모터와 RA1-66 프로모터가 애기장대 이외의 타 작물에서도 뿌리 특이적인 활성을 지님을 시사한다.

적요

목표유전자를 목적 조직에 효율적으로 발현 시키기 위해 조직 특이적 프로모터를 동정하고 적용하는 것은 생명공학을 활용한 작물형질개량 연구의 주요 핵심요소 중 하나이다. 애기장대의 전사체 분석과 공개된 생명정보데이터를 이용하여 뿌리 특이적으로 발현되는 프로모터 7종을 선발하였다. 애기장대 genomic DNA로부터 해당 유전자 CDS의 5' 상류 2kb 영역을 PCR 증폭하고 Gateway cloning system을 이용하여 프로모터 부위를 *β-glucuronidase(gus)*와 *green fluorescent protein(gfp)* 유전자가 연결된 식물형질전환용 프로모터::리포터 운반체인 pBGWFS7에 클로닝하였다. 제작된 운반체들을 각각 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하여 애기장대에 형질전환한 후 T₂ 종자까지 선발, 확보 한 후, T₂ 종자를 발아시킨 후 유식물체부터 성숙식물체까지 잎, 줄기, 뿌리, 꽃, 꼬투리 등 각 기관별로 GUS 염색, RT-PCR, GFP 형광을 뿌리 조직에서 분석하였다. 그 결과 5종의 프로모터가 CaMV35S 프로모터에 비해 뿌리조직에서 강한 발현 유도성을 확인하였다. 이들 뿌리 특이 프로모터가 선충 피해가

큰 작물인 토마토 선충 저항성 작물 육성에의 적용성을 검정하기 위해 토마토 형질전환을 수행한 결과, 2종의 프로모터가 토마토 뿌리에서 특이적으로 활성을 보여주었고, 이는 실제 타 작물에서도 적용 가능함을 시사한다.

사사

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호 : PJ012458) 및 차세대바이오그린21사업(과제번호 : PJ011021, PJ011057) 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

1. Ali MA, Abbas A, Azeem F, Javed N, Bohlmann H. 2015. Plant nematode interactions: from genomics to metabolomics. *Int J Agric Biol* 17: 1071-1082.
2. Brisson N, Paszkowski J, Penswick JR, Gronenborn B, Potrykus I, Hohn T. 1984. Expression of a bacterial gene in plants by using a viral vector. *Nature* 310: 511-514.
3. Bucher M, Brunner S, Zimmermann P, Zardi GI, Amrhein N, Willmitzer L, Riesmeier JW. 2002. The expression of an extensin-like protein correlates with cellular tip growth in tomato. *Plant Physiol* 128: 911-923.
4. Cheon BY, Kim HJ, Oh KH, Bahn SC, Ahn JH, Choi JW, Ok SH, Bae JM, Shin JS. 2004. Overexpression of human erythropoietin (EPO) affects plant morphologies: retarded vegetative growth in tobacco and male sterility in tobacco and Arabidopsis. *Transgenic Res* 13: 541-549.
5. Cho HT, Cosgrove DJ. 2002. Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* 14: 3237-3253.
6. Cornejo M, Luth D, Blankenship KM, Anderson OD, Blechl AE. 1993. Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice. *Plant Mol Biol* 23: 567-581.
7. Darekar KS, Mhase NL. 1988. Assessment of yield loss due to root knot nematode, *M. incognita* race 3 in tomato, brinjal and bitter gourd. *Int Nematol Network Newslett* 5: 7-9.
8. Escobar C, De Meutter J, Aristizabal FA, Sanz-Alferez S, Del Campo FF, Bartels N, Van Der Eycken W, Seurinck J, Van Montagu M, Gheysen G, Fenoll C. 1999. Isolation of the LEMMI9 gene and promoter analysis during a compatible plant-nematode interaction. *Mol Plant Microbe*

- Interact 12: 440-449.
9. Escobar C, Barcala M, Portillo M, Almoguera C, Jordano J, Fenoll C. 2003. Induction of the Hahsp17. 7G4 promoter by root-knot nematodes: involvement of heat-shock elements in promoter activity in giant cells. *Mol Plant Microbe Interact* 16: 1062-1068.
10. Goddijn OJ, Lindsey K, van der Lee FM, Klap JC, Sijmons PC. 1993. Differential gene expression in nematode-induced feeding structures of transgenic plants harbouring promoter-gusA fusion constructs. *Plant J* 4: 863-873.
11. Grunewald W, Cannoot B, Friml J, Gheysen G. 2009. Parasitic nematodes modulate PIN-mediated auxin transport to facilitate infection. *PLoS Pathogens* 5, e1000266.
12. Guo M, Zhang YL, Meng ZJ, Jiang J. 2012. Optimization of factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of Micro-Tom tomatoes. *Genet Mol Res* 11: 661-671.
13. Huang LY, Zhang F, Qin Q, Wang WS, Zhang T, Fu BY. 2015. Identification and validation of root-specific promoters in rice. *J Integ Agri* 14: 1-10.
14. Jefferson RA. 1987. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5: 387-405.
15. Jeong JS, Kim YS, Baek KH, Jung H, Ha S, Choi YD, Kim M, Reuzeau C, Kim J. 2010. Root-specific expression of OsNAC10 improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. *Plant Physiol* 153: 185-197.
16. Jones MO, Manning K, Andrews J, Carole T, Ian B, Thompson AJ. 2008. The promoter from SIREO, a highly-expressed, root-specific *Solanum lycopersicum* gene, directs expression to cortex of mature roots. *Funct Plant Biol* 35: 1224-1233.
17. Josefsson LG, Lenman M, Ericson ML, Rask L. 1987. Structure of a gene encoding the 1.7 S storage protein, napin, from *Brassica napus*. *J Biol Chem* 262: 12196-12201.
18. Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol* 17: 287-291.
19. Kurek I, Stoger E, Dulberger R, Christou P, Breiman A. 2002. Overexpression of the wheat FK506-binding protein 73 (FKBP73) and the heat-induced wheat FKBP77 in transgenic wheat reveals different functions of the two isoforms. *Transgenic Res* 11: 373-379.
20. Kyndt T, Goverse A, Haegeman A, Warmerdam S, Wanjau C, Jahani M, Engler G, Engler JA, Gheysen G. 2016. Redirection of auxin flow in *Arabidopsis thaliana* roots after infection by root-knot nematodes. *J Exp Bot* 67: 4559-4570.
21. Lee C, Chronis D, Kenning C, Péret B, Hewezi T, Davis EL, Baum TJ, Hussey R, Bennett M, Mitchum MG. 2011. The novel cyst nematode effector protein 19C07 interacts with the *Arabidopsis* auxin influx transporter LAX3 to control feeding site development. *Plant Physiol* 155: 866-880.
22. Lilley CJ, Wang D, Atkinson HJ, Urwin PE. 2011. Effective delivery of a nematode-repellent peptide using a root-cap-specific promoter. *Plant Biotechnol J* 9: 151-161.
23. Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, 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 Online* 10: 1391-1406.
24. Mähönen AP, Bonke M, Kauppinen L, Riikonen M, Benfey PN, Helariutta Y. 2000. A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes Dev* 14: 2938-2943.
25. Matzke MA, Mette MF, Matzke AJM. 2000. Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Mol Biol* 43: 401-415.
26. Mehta RA, Cassol T, Li N, Ali N, Handa AK, Mattoo AK. 2002. Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life. *Nat Biotechnol* 20: 613-618.
27. Nomura M, Katayama K, Nishimura A, Ishida Y, Ohta S, Komari T, Miyao-Tokutomi M, Tajima S, Matsuoka M. 2000. The promoter of *rbcS* in a C3 plant (rice) directs organ-specific, light-dependent expression in a C4 plant (maize), but does not confer bundle sheath cell-specific expression. *Plant Mol Biol* 44: 99-106.
28. Onyango SO, Roderick H, Tripathi JN, Collins R, Atkinson HJ, Oduor RO, Tripathi L. 2016. The ZmRCP-1 promoter of maize provides root tip specific expression of transgenes in plantain. *J of Biol Res-Thessaloniki* 23: 4.
29. Potenza C, Aleman L, Sengupta-Gopalan C. 2004. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental

- applications: promoters used in plant transformation. In *Vitro Cell Dev Biol Plant* 40: 1-22.
30. Quandt HJ, Pühler A, Broer I. 1993. Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: A fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact* 6: 699-706.
 31. Sinha NR, Williams RE, Hake S. 1993. Overexpression of the maize homeo box gene, *KNOTTED-1*, causes a switch from determinate to indeterminate cell fates. *Genes Dev* 7: 787-795.
 32. Shirsat A, Wilford N, Croy R, Boulter D. 1989. Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco. *Mol Gen Genet* 215: 326-331.
 33. Sukno S, Shimerling O, McGuiston J, Tsbary G, Shani Z, Shoseyov O, Davis EL. 2006. Expression and regulation of the *Arabidopsis thaliana* cell Endo-1,4- β -glucanase gene during compatible plant-nematode interactions. *J Nematol* 38: 354-361.
 34. Takaiwa F, Oono K, Wing D, Kato A. 1991. Sequence of three members and expression of a new major subfamily of glutelin genes from rice. *Plant Mol Biol* 17: 875-885.
 35. Thureau T, Kifle S, Jung C, Cai D. 2003. The promoter of the nematode resistance gene *Hs1pro-1* activates a nematode-responsive and feeding site-specific gene expression in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 52: 643-660.
 36. Urwin PE, Møller SG, Lilley CJ, McPherson MJ, Atkinson HJ. 1997. Continual green-fluorescent protein monitoring of cauliflower mosaic virus 35S promoter activity in nematode-induced feeding cells in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* 10: 394-400.
 37. Won SK, Kumari S, Choi SB, Cho M, Lee SH, Cho HT. 2010. Root hair-specific *EXPANSIN B* genes have been selected for Gramineae root hairs. *Mol Cells* 30: 369-376.
 38. Xu R, Zhao H, Dinkins RD, Cheng X, Carberry G, Li QQ. 2006. The 73 kD subunit of the cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) complex affects reproductive development in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 61: 799-815.
 39. Yamamoto YT, Taylor CG, Acedo GN, Cheng CL, Conkling MA. 1991. Characterization of cis-acting sequences regulating root-specific gene expression in tobacco. *Plant Cell* 3: 371-382.