

최 종  
연구보고서

GOVP1200623737

T00155119

**리폭시지나아제 과다발현에 의한 도열병 저항성 벼  
품종의 유전적 안정성 평가**

Evaluation of genetic stability and environmental  
adaptability of blast-resistant transgenic rice  
overexpressing lipoxygenase gene

연구기관  
전남대학교 농업생명과학대학

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “리폭시지나아제 과다발현에 의한 도열병 저항성 벼 품종의 유전적 안정성 평가” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 5 월 24 일

주관연구기관명	:	전남대학교
총괄연구책임자	:	한옥수
제 1 세부연구책임자	:	한옥수
제 2 세부연구책임자	:	조백호
연구원	:	이영만

# 요 약 문

## I. 제 목

리폭시지나아제 과다발현에 의한 도열병 저항성 벼 품종의 유전적 안정성 평가

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

중화학 및 전기 전자 산업의 급격한 발달과 함께 지구 환경의 전체적인 오염은 생태계의 파괴 등을 야기 시키고 작물의 생산성을 감소시키는 주요 원인이 된다. 생물적 혹은 비생물적 원인에 의한 환경의 악화는 농작물의 생장 과정에서 치명적인 스트레스 인자로 작용함으로써 작물이 지닌 유전적 생산력을 막대하게 제한하고 있다. 농업에 있어서 병해충의 방제는 필수적인 과정으로서 그동안 새로운 농약의 개발이나 고전 육종에 의한 병해충 저항성 품종들이 개발되어 농업 생산성의 증대에 많은 공헌을 하여 왔으나 화학적 방제에 따른 환경의 오염과 고전적 육종법이 지니는 한계성으로 인하여 유전자 조작과 고전 육종의 접목을 통한 광범위 스트레스 내성 품종의 육성이 절실히 요구되고 있다. 실제로 작물에 있어서 병해충 저항성작물의 유전공학적 방법의 시도는 유전자연구의 model 식물인 *Arabidopsis*의 연구를 통한 저항성 유전자 및 방어 기작에 관련된 수 많은 기작들이 알려지면서 실용화되어가고 있으며 옥수수, 담배, 토마토 등으로부터 단일 병원균 종의 저항성에 관련된 유전자 군들이 클론되어 single race에 대한 저항성 작물 및 식물은 이미 개발되어 있는 상태이다. 특히 콩의 리폭시지나아제를 이용한 형질 전환 담배등이 생산은 되었으나 병 저항성등에 관한 상세한 연구는 보고된 바 없다. 본 연구팀은 1999년 11월부터 2002년 10월까지 3 년동안 농업첨단 기술과제 연구사업(과제 관리번호: 첨단299048-3, 과제명: 자스몬산 생합성 경로 조작을 통한 광범위 스트레스 저항성 벼 개발, 연구기간: 1999. 11 -2002. 10)(한옥수, 2002)을 통하여 상처 등의 스트레스에 의하여 발현이 유도되고 특이적으로 dual positional specificity(Fig.

1)를 보여주는 옥수수의 nontraditional lipoxygenase 유전자와 효소를 발견하여 그 특성을 규명하였으며 (Kim *et al*, 2002; Agrawal *et al*, 2003; Kim *et al*, 2003), 그 유전자들을 이용하여 동일 계통의 단자엽 식물인 벼에서 성공적으로 형질전환식물을 개발한 경험이 있다.

리폭시지나아제는 자스몬산 생합성의 초기 단계에 위치하면서 부분적인 속도 결정 단계로 알려져 있어서(Creelman *et al.*, 1997), 이들 효소가 과대 발현된 식물체에서는 자스몬산 및 중간체의 생합성이 증가될 것을 예상할 수 있으며 그 결과 광범위 스트레스 내성 작물의 개발될 수 있는 가능성이 있다. 옥수수의 리폭시지나아제 (GenBank ACCESS No.:AF271894)는 9-LOX와 13-LOX의 활성을 동시에 나타내는 중요한 dual positional specificity를 나타내므로 (Kim *et al*, 2003) 다양한 종류의 병해충에 대한 저항성을 부여할 수 있는 주요한 표적 유전자라 할 수가 있다. 본 연구팀에서 생산하여 확보하고 있는 옥수수의 LOX (AF271894)유전자가 과다발현된 형질 전환 벼(T1 세대)를 사용하여 도열병에 대한 저항성을 시험한 결과 괄목할 만한 성과를 보였다. 그러나 이러한 결과는 실험실 수준에서 검정된 결과 일 뿐 포장에서의 결과는 아니다. 따라서 본 연구에서는 지금까지 확보한 T1 종자로부터 얻어지는 T2 세대와 T3 세대의 벼에 대하여 포장 수준에서 homozygous 도열병 저항성 벼 품종을 육성하고 이들 육성된 품종의 유전적 안정성을 검정하고자 한다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

이중위치특이성을 지닌 nontraditional lipoxygenase 유전자를 이용하여 생산된 형질전환 벼의 유전적 안정성을 평가하고, 도열병, 흰잎마름병, 상처 스트레스, 염 스트레스 등에 대한 저항성을 검정한 본 과제의 세부 내용 및 범위를 요약하면 다음과 같다.

#### 1. Homozygous line 선별 및 유전적 안정성 검증

형질전환 벼에 도입된 옥수수 LOX는 세대를 거치면서 도태되거나 고정되

어진다. 그러므로 옥수수 LOX의 기능연구를 수행하기 위해서는 옥수수 LOX가 안정하게 발현되는 개체 즉 옥수수 LOX 유전자가 고정된 개체를 선별하는 작업이 선행되어야한다. 본 실험에서는 형질전환 벼 모든 T<sub>2</sub>세대들을 대상으로 옥수수 LOX 발현 여부를 Western분석을 통해 확인하고, Western분석을 근거로 옥수수 유전자가 안정하게 고정된 개체 line을 잠정 판단하였다.

SDS-PAGE와 Western 분석을 통해 1A의 T<sub>2</sub> line에서 옥수수 LOX 발현 여부 결과(표 II-1)에 따라 잠정적으로 homozygous와 heterozygous line들을 선별하였다. 특히 heterozygous line 으로 판단된 각 line의 경우 옥수수 LOX 유전자가 안정적으로 멘델의 분리의 법칙에 따라 분리되어 발현되었는지 알아보고자 Chi-square 값을 산출하였다. 그 결과 heterozygous 12개의 line 중 1A13과 1A22만이 옥수수 LOX유전자가 안정적으로 유전되는 것을 확인할 수 있었다. 다른 line에서는 기대했던 빈도수와 차이를 나타냈고 1A9와 1A20의 경우 그 차이가 극심하였다. 이와 같이 예상한 빈도수와 차이를 보이는 것은 외부로부터 도입된 옥수수 LOX 유전자가 불안정하게 다음 세대로 유전되고 있음을 시사한다. 그 외 하나의 line에 속한 모든 개체들이 옥수수 LOX를 발현시키는 1A2, 1A5, 1A12 그리고 1A24 line들을 homozygous line으로 예상되어졌으나 1A2, 1A5 line의 경우 검정된 개체수가 너무 적은 관계로 신뢰도가 떨어져 제외시켰다. 결국, 1A2와 1A24를 homozygous line으로 결정하였고, 각각의 line 별로 표 3-1-2와 같이 종자들을 확보하였다. 또한 T<sub>2</sub> 세대 중 1A24 line의 T<sub>3</sub> 세대에서 옥수수 LOX가 안정적으로 발현되는 것을 SDS-PAGE와 Western으로 확인했다.

표 II-1. Western 분석 결과에 따른 옥수수 LOX 발현 여부 결과.

1A T <sub>2</sub> Lines	검증된 개체 수	옥수수 LOX 발현 여부		Expected ratio	X <sup>2</sup>	잠정적인 판별
		LOX <sup>+</sup>	LOX <sup>-</sup>			
1A2	36	36	0	-	-	+++
1A4	33	28	5	3:1	2.253	-
1A5	2	2	0	-	-	++
1A6	23	20	3	3:1	4.482	-
1A8	46	31	15	3:1	0.290	--
1A9	23	1	22	3:1	442.333	+
1A10	19	16	3	3:1	1.810	-

1A11	12	6	6	3:1	1.333	-
1A12	3	3	0	-	-	+
1A13	42	32	10	3:1	0.013	---
1A17	34	31	3	3:1	17.924	-
1A20	32	31	1	3:1	261.333	+
1A21	45	28	17	3:1	0.610	--
1A22	36	27	9	3:1	0.000	---
1A23	47	37	10	3:1	0.163	--
1A24	78	78	0	-	-	+++

X<sup>2</sup>: Chi-Square, homozygous 확신 정도: +++>+, heterozygous 확신 정도: --->-->-

## 2. 옥수수 LOX가 도입된 형질전환 벼에서 hydroperoxy fatty acid들의 positional specificity 분석

lipid peroxidation 지표물질인 MDA 함량을 측정함으로써 옥수수 LOX가 도입된 형질전환 벼에서는 도입된 옥수수 LOX에 의해 lipid peroxidation이 낙동벼에서 보다 많이 발생하고 있음을 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 옥수수 LOX에 의해 생성된 물질들의 구조를 규명하기 위하여 기질인 linoleic acid와 linolenic acid를 각각 feeding시킨 후, HPLC 방법으로 생성물들의 positional specificity를 규명하였다. 그 결과, 낙동벼의 hydroperoxy linoleic acid와 hydroperoxy linolenic acid 비가 5.4:4.6인 반면, 형질전환벼에서는 2.9:7.1로 결정되었다. 낙동벼에서 hydroperoxy linoleic acid를 feeding 할 경우 9-form의 비가 더 높았으나, hydroperoxy linolenic acid를 feeding 할 경우에는 13-form이 더 높았다. 이는 positional specificity가 기질에 의존함을 나타낸다. 낙동벼에서 linoleic acid가 기질로 사용될 때는 9-LOX 생성물이 얻어지고 linolenic acid가 기질로 사용될 때는 13-LOX 생성물이 얻어짐을 알 수 있었다. 그러나 형질전환 벼에서는 옥수수 LOX에 의해 hydroperoxy linolenic acid 생성물 비가 높게 나타났다. 즉 linolenic acid가 linoleic acid보다 더 많이 생체내에서 이용되고 있음을 보여주고 있다. 또한 hydroperoxy linolenic acid가 기질로 사용될 때는 9-LOX와 13-LOX의 비가 거의 1:1인 반면 hydroperoxy linoleic acid의

경우 3.6:6.4로서 13-LOX 경로가 우세하였다.

### 3. 옥수수 LOX가 도입된 벼 잎의 지방산 조성 분석

MDA 함량과 LOX 반응 생성물들의 비를 연구함으로써 형질전환 벼에서 옥수수 LOX 반응에 의해 lipid peroxidation이 낙동벼 보다 더 많이 이루어지고, 이들 생성물의 비에 많은 변화가 이루어졌음을 연구하였다. 이는 형질전환 벼에서 옥수수 LOX의 반응에 의해 더 많은 기질의 소모가 이루어졌음을 의미한다. 또한 옥수수 LOX의 기질 선호도에 따라 특이적인 지방산이 소모됨으로써 낙동벼의 전체 지방산 조성비가 변화할 수 있음을 의미한다. 실제로 형질전환 벼와 낙동벼의 지방산 조성비의 변화를 알아보기 위해 전체 지질을 추출하여 GC를 통해 각 지방산 조성비를 비교 분석하였다(표 3-2-2). 그 결과, MDA함량 비교 분석을 통하여 형질전환 벼에서는 옥수수 LOX에 의한 lipid peroxidation이 낙동벼 보다 더 많이 이루어지고 있음을 확인하였다. 또한 기질의 feeding에 의한 LOX생성산물들의 positional specificity 결과에서는 옥수수 LOX에 의해 생성물들의 각각의 비가 변화되었음을 관찰하였다. 이는 형질전환 벼에서 옥수수 LOX의 기질이 되는 linolenic acid와 linoleic acid가 낙동벼에서 보다 더 많이 소모됨을 의미한다. 실제로 이를 확인하기 위해 형질전환 벼와 낙동벼의 전체 지질 조성비를 관찰하여 분석하였다. 표 3-2-2에서 나타낸 바와 같이 형질전환 벼는 낙동벼에 비하여 18:2/16:0와 18:3/16:0의 비가 낮았다. 또한 DBI값 역시 형질전환 벼에서 더 낮았다. 이러한 결과는 MDA 함량 분석결과와 일치하며, 형질전환 벼에서 18:2/16:0와 18:3/16:0비 중 18:3/16:0비가 더 낮게 나타난 결과는 기질이 feeding된 형질전환 벼에서 linolenic acid의 소모가 더 많이 일어난 결과와 일치함을 확인 할 수 있었다.

### 4. 형질전환 벼에서 항산화 효소의 활성 측정

LOX 반응 생성산물인 hydroperoxy fatty acids은 산화 스트레스 인자로 항산화 system을 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 옥수수 LOX가 도입된 형질전환 벼에서 축적된 옥수수 LOX 반응 생성산물이 항산화 system을 활성화 시키는지 확인하기 위해 대표적인 항산화 효소인 Superoxide dimutase (SOD), Catalase (CAT), Peroxygenase (POD)와 LOX 반응 산물을 기질로 취하는 Hydroperoxy

lyase (HPL)의 활성을 측정하였다. 형질전환 벼에서 옥수수 LOX에 의해 생성된 hydroperoxy fatty acid들이 항산화 system을 활성화 시키는지 확인한 결과, SOD활성은 형질전환 벼에서 3배정도 높았고, CAT은 2배, CAT은 1.9배 그리고 HPL은 4.7배 더 높았다(표 3-2-3). 이러한 결과는 형질전환 벼에서 옥수수 LOX 반응에 의한 lipid peroxidation 때문에 항산화 system이 더 높게 활성화된 것을 시사하고 있다.

#### 5. 형질전환 벼의 자스몬산 과 Salicylic acid 함량 분석

자스몬산은 식물체에 존재하는 생장조절 물질로(Meyer et al.1984) 상처나 병해충 등의 환경 스트레스에 반응하여 각종 단백질들 생산하는 유전자를 활성화시키는 신호 역할을 한다(Creelman et al. 1992, Farmer & Ryan 1992, Staswick 1992, Mueller et al. 1993). 자스몬산의 생합성은 *g* linolenic acid를 기질로하는 LOX 효소로부터 촉발된다. 따라서 옥수수 LOX가 도입된 형질전환 벼에서는 자스몬산의 함량이 달라질 수 있으므로 자스몬산의 함량을 분석하였다. 또한 본 연구 그룹은 상처입은 벼에서 자스몬산의 함량과 Salicylic acid 함량은 inverse correlation을 보임을 규명한 바 있다. 형질전환 벼에서 자스몬산의 함량과 Salicylic acid 함량을 측정한 결과 형질전환 벼와 낙동벼 사이에 자스몬산 함량의 변화에 큰 차이를 볼 수 없었다(그림 3-2-4, A). 그러나 Salicylic acid 함량이 형질전환 벼에서 감소한 것을 확인하였다 (그림 3-2-4, B).

#### 6. 상처 스트레스에 대한 옥수수 LOX가 도입된 형질전환 벼의 반응

LOX는 식물체의 막에서 유리된 linolenic acid나 linoleic acid와 같은 1,4-pentadiene 구조를 지닌 불포화 지방산을 기질로 하여 hydroperoxidation을 촉매하는 효소로써, 상처, 저온, 염등의 스트레스 반응을 포함한 다양한 종류의 산화 스트레스에 감응하고 자스몬산 생합성에 관여한다. 이중위치 특이적인 옥수수 LOX를 벼에 도입시킨 형질전환 벼는 다양한 산화 스트레스에 대한 옥수수 LOX의 기능 연

구 뿐만아니라 식물체의 방어 기작을 연구하는 중요한 모델 식물이 될 수 있다. 본 연구에서는 형질전환에 상처를 가했을 때 옥수수 LOX의 반응에 의해 유도되는 현상을 연구하고자 식물체 막의 지방산 조성비 변화(DBI 변화), lipid peroxidation 변화(MDA 함량 변화), 항산화 효소들의 활성 변화 그리고 자스몬산과 Salicylic acid 함량 변화를 관찰하였다.

### 1) DBI와 MDA 변화

낙동벼의 DBI값은 상처 후 30분과 6시간에 정점에 도달했고, 형질전환 벼에서는 15분, 1시간, 6시간에 도달했다. 그러나 전체적으로 형질전환 벼와 낙동벼 사이에 상처에 의한 DBI의 변화의 큰차이는 없었다. MDA함량은 낙동벼 보다 형질전환 벼에서 전체적으로 높게 형성되는 것을 확인할수 있었다. 이는 형질전환벼에 도입된 옥수수 LOX의 반응에 의해 지속적으로 lipid가 peroxidation됨을 의미한다.

### 2) 항산화 효소들의 활성변화

낙동벼에서 SOD 활성은 상처 후 6시간까지 낮게 유지되다가 12시간에 정점에 도달하여 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 형질전환 벼에서는 SOD활성이 높게 나타났다가 상처를 입은 후 감소하여 1시간 후에 정점에 도달하여 감소하였고, 24시간 후에 다시 정점에 도달하여 유지되었다. CAT활성은 형질전환 벼에서 높게 형성한 후 상처가 가해지면서 감소하였다가 3시간, 12시간 후에 정점에 도달하였다. 12시간부터 24시간 까지 CAT활성의 감소가 보이다가 24시간 이후에 점진적으로 증가하였다. 그러나 낙동벼에서는 3시간 후에 CAT활성이 정점에 도달하여 6시간 까지 감소하였다가 48시간까지 점진적으로 증가하였다. POD활성은 형질전환 벼에서 높은 활성을 보였으나 상처에 따른 변화가 낙동벼에서의 POD활성 변화와 매우 유사하게 변화되는 것을 확인할수 있었다. 그렇지만 형질전환 벼에서의 POD활성이 낙동벼보다 좀더 높게 나타났다.

### 3) JA와 SA 변화

옥수수 LOX가 도입된 형질전환 벼를 두 달동안 재배한 후 상처를 가하고 자스몬산화과 Salicylic acid함량 변화를 일정 시간별로 측정하였다(그림 3-3-3). 형

질 전환 벼에서 자스몬산은 1시간 후에 정점에 도달했고, 낙동벼는 30분에 정점에 도달했다. 낙동벼에서 Salicylic acid는 상처 후 감소하다가 24 시간 후에 상승하였고, 형질 전환 벼에서는 상처 후 1 시간, 24시간에 최고점에 도달했다.

#### 7. 포장에서 리폭시지나아제 과다발현 형질전환 벼의 도열병 저항성 검증

리폭시지나아제(LOX)는 자스몬산 생합성의 초기 단계에 위치하면서 이들 효소가 과대 발현된 식물체에서는 자스몬산 및 중간체의 생합성이 증가될 것을 예상할 수 있으며 따라서 내병성 작물의 개발에 이용될 수 있는 가능성이 있다. 본 연구팀에서 생산하여 확보하고 있는 옥수수의 LOX (AF271894) 유전자가 과다발현된 형질 전환 벼(T<sub>1</sub> 세대)를 제작하여 도열병에 대한 저항성을 시험한 결과, 온실 수준의 실험조건에서 뚜렷한 도열병 저항성을 보임으로써 LOX AF272894가 도열병에 대한 저항성과 밀접한 관련을 지니고 있음을 명백히 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 LOX AF272894 유전자가 과다 발현된 형질전환벼를 이용하여 포장 수준에서도 도열병에 대한 저항성이 발현되는지의 여부를 알아보려고 하였다. 그 결과, 포장에서 잎도열병은 7월 12일에 낙동벼와 1A2, 1A4, 1A5, 1A6, 1A9, 1A10, 1A20, 1A22, 1A23 line에서 먼저 자연발생되었으며 7월 26일의 조사에서는 시험에 공시된 전 라인에서 발병되었다. 대조구인 낙동벼의 병반면적율이 0.68%(소형병반 20개정도가 고르게 퍼져 있음)로 형질 전환 벼에서는 낙동벼보다는 발병정도가 적었으며 병반면적 0.2% 이하인(소형병반 10개 이내 정도) line은 1A5, 1A11, 1A12, 1A20, 1A21이었다(표 3-4-1). 이삭도열병의 경우, T<sub>2</sub> 세대(2004년도)에는 1A6, 1A17 line에서 가지도열병이 발생되었으나 T<sub>3</sub> 세대(2005년)에는 전 공시 line에서 발병되지 않았다(표 3-4-1). 한편, 7월 21일에 화분에 이양한 AOS T<sub>1</sub>세대 9개 line에서는 8월 17일에 잎도열병이 처음 발생되었으며 8월30일의 조사에서는 대조구인 pCAMBIA vector만 삽입된 개체를 포함하여 모든 line에서 병반면적율 0.02-0.04% 정도로 발생하여 AOS, TP-AOS 유전자의 삽입에 의한 병저항성 형질 발현을 확인할 수 없었다(표 3-4-2, 그림 3-4-1). 이상의 결과를 종합해 보면, 옥수수의 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질전환 벼 T<sub>3</sub>세대 16 line 대부분에서 대조구인 낙동벼보다는 잎도열병에 대한 저항성 형질발현이 인정되었고, 이러한 사실은 리폭시지나

아제 유전자가 도열병에 저항성을 지니는 안정적인 벼품종 개발에 이용될 수 있다는 것을 의미한다.

#### 8. 포장에서 리폭시지나아제 과다발현 형질전환 벼의 흰잎마름병 저항성 검정

낙동벼에 리폭시지나아제 유전자를 도입시킨 형질전환 낙동벼 T<sub>3</sub>세대 34 line과 대조구인 낙동벼에 도열병균을 분무접종하여 형질전환체의 저항성 정도를 온실 및 포장수준에서 조사한 결과, 대부분의 형질전환체가 이병주율 및 병반 면적을 등에서 낙동벼 보다 적어 도열병에 대한 저항성이 현격히 증대되었음을 확인하였다(표 3-4-1). 또한 도열병 검정에 사용한 동일 개체들을 온실수준에서 흰잎마름병균을 가위접종한 결과 형질 전환체 모두가 병반장이 대조구인 낙동벼 보다 반 정도로 짧아 리폭시지나아제 유전자의 도입에 의해 흰잎마름병균에 대한 저항성도 증대되었음을 이미 확인한 바 있다. 따라서 본 연구는 온실 단위에서 이루어진 이러한 흰잎마름병균에 대한 저항성 결과가 포장상태의 벼에서도 동일하게 얻어지는지의 여부를 확인하기 위해 수행되었다. 포장에서 재배되고 있는 수잉기의 형질전환 벼에 절엽접종 시험한 결과, 1A5 line을 제외한 공시 전 개체에서 대조구인 낙동벼보다 K1, K2, K3균에 의한 병반 길이가 더 커져 이병성 반응을 보였다(표 3-4-4). 다만 1A5 line만은 대조구인 낙동벼보다 병반길이가 약 2-3cm 정도 작아져 다소 저항성 반응을 나타내었다. 그러나 최고분얼기에 가위접종하여 벼흰잎마름병의 자연발생을 유도한 다음 호숙기에 병저항성을 검정해 본 결과, 공시한 형질전환 벼 전 개체에서 대조구인 낙동벼보다 감염율이 낮아져 저항성반응을 나타내었다. 한편, 전남지방에서 주로 재배되고 있는 고품질벼의 흰잎마름병에 대한 저항성검정 결과, K1, K2, K3균에 모두 저항성인 품종은 서간벼, 새계화벼, 주남벼, 동진1호, 신동진벼 및 화영벼였으며, K1, K2, K3균에 모두 이병성인 품종은 오대벼와 남평벼였다(표 3-4-5, 그림 3-4-2).

#### 9. 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질전환 벼(T<sub>3</sub>)의 생육분석

작물의 내병성 및 감수성은 생육상태에 따라서도 변화할 수 있기 때문에 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질전환체의 line별 생육정도가 어느 정도 다른지

를 확인하기 위해 본 실험을 실시하였다. 그 결과, 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질전환체 개체간 생육상황의 차이가 있어 비교하기가 쉽지 않았으나 일반적으로 출수기는 8월19일에서 23일 사이로 낙동벼와 비슷하거나 조금 늦은 경향이었으며, 간장은 72-80 cm로 낙동벼(82.2 cm) 보다 작았고, 주당수수는 낙동벼(15.8개) 보다 많았으나 수당입수 및 등숙비율은 낮은 경향으로 대비품종인 낙동벼보다 수량은 많지 않을 것으로 생각되었다(표 3-4-6, 그림 3-4-3).

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 1. 추가 연구의 필요성

본 연구의 결과로 볼때 리폭시지나아제 유전자를 이용하여 특정균의 병원균에 저항성을 지닌 벼를 생산할 수 있었다. 그러나 제 3 장 제 3 절 상처 및 염 스트레스에 대한 형질전환 벼의 반응 연구 결과로 볼때, 과다발현된 리폭시지나아제는 reactive oxygen species (peroxide 등)를 생산함을 알 수 있었고, 그 결과 세포막의 지방산 조성을 변화 시킨다고 사료되며, 세포막의 물질 수송 속도에 있어서 큰 변화가 있음을 알 수 있었다. 따라서, 완벽한 광범위 스트레스 저항성 작물을 개발하기 위해서는 리폭시지나아제 유전자와 다른 종류의 유전자, 예를 들면 물질의 수송과 관련되는 유전자를 병합하여 이용하는 연구가 필요하다고 판단된다. 이러한 맥락에서 리폭시지나아제 유전자와 스트레스관련 유전자(RNA 결합 단백질 유전자, aquaporin 유전자 등)를 병합한 형질전환 벼를 개발하는 연구를 추진중 이다.

### 2. 기업화 추진 계획

현재 추진 중인 리폭시지나아제 유전자와 스트레스관련 유전자(RNA 결합 단백질 유전자, aquaporin 유전자 등)를 이용한 복합재해내성 형질전환 벼를 개발하는 연구에서는 기업체를 협동연구기관으로 하고 있으며, 협동연구기관에서 기업화를 담당하여 추진하고 있다.

## SUMMARY

### INTRODUCTION

Most lipoxygenases (EC 1.13.14.12) harbor non-heme iron, and occur ubiquitously in both animals and plants. Lipoxygenase is a dioxygenase which catalyzes the hydroperoxidation of polyunsaturated fatty acids containing one or more (1Z,4Z)-pentadiene structures in the presence of molecular oxygen. Lipoxygenase-catalyzed reactions are generally both regiospecific and stereospecific. In plants, linoleic acid and/or linolenic acid is oxygenated at the C-9 or C-13 of the hydrocarbon backbone of the unsaturated fatty acid, by 9-LOX or 13-LOX, respectively. The corresponding (9S)-hydroperoxy or (13S)-hydroperoxy derivatives are further metabolized into a variety of biologically active compounds, via seven metabolic branches. The lipoxygenase pathway is responsible for the initiation of the biosynthesis of a number of physiologically important oxylipins, which can function as elicitors of the expression of defense genes, antimicrobial compounds against biotic stresses [7,8], and inducers of hypersensitive cell death. For example, jasmonate biosynthesis is initiated by the 13-LOX pathway, the peroxidation of lipids in the hypersensitivity response is mediated primarily by 9-LOX, and leaf aldehydes are synthesized via either the 9-LOX or 13-LOX pathway. Previous experiments have shown that the orientation of the substrate molecule determines the positional specificity, whereas some recent studies have indicated that the frameshift re-alignment of the substrate may perform an crucial function in both positional and stereo specificity. Interestingly, a few lipoxygenases which have been classified as nontraditional lipoxygenases exhibit a unique dual positional specificity in plants, and some individual lipoxygenases, including the leukocyte-type lipoxygenases of 12-LOX and 15-LOX in animals, synthesize two chiral hydroperoxide products. The metabolic roles and detailed

catalytic mechanisms exploited by these dual positional specific lipoxygenases remain, thus far, unknown.

We previously have produced transgenic rice plants overexpressing nontraditional dual positional specific maize lipoxygenase gene and tentatively proposed that the utilization of the lipoxygenase gene may lead to the possible development of broad-spectral stress-resistant crops. This study examines 1) the genetic stability of the transgenic rice plants overexpressing the dual positional specific maize lipoxygenase, 2) characterization of the transgenic rice plants overexpressing the maize lipoxygenase, 3) responses of the transgenic rice plants overexpressing the maize lipoxygenase on various stress factors, and 4) evaluation of disease-resistance against blast-fungi or *Xanthomonas* of the transgenic rice plants overexpressing the maize lipoxygenase.

## RESULTS AND DISCUSSION

### 1. Selection of homozygous lines and genetic stability of the transgene

The expression of the transgene in 1A T<sub>2</sub> lines was analyzed by SDS-PAGE and Western methods. As seen in Table 3-1-1, the transgene was stably expressed to proteins in 1A2, 1A5, 1A12, 1A13, 1A22, 1A24 lines. However, 1A13 and 1A22 lines were selected as a homozygous lines since other lines did not have enough number of seeds. The genetic stability of 1A13 and 1A22 lines was confirmed at their T<sub>3</sub> lines by SDS-PAGE and Western analysis. Therefore, we successfully produce the transgenic rice plants stably overexpressing the maize lipoxygenase at protein level.

### 2. Positional specificity of the lipoxygenase *in vivo* in transgenic rice plants

The substrate specificity and positional specificity of the lipoxygenase were analyzed by HPLC. Results indicated that the substrate specificity becomes

more favorable for LNA in transgenic plants. Analysis of the positional specificity seemed to depend on the substrate. In wild type, 9-LOX product was favored in LA whereas the 13-LOX product was favored in LNA. However, the ratio of 13-LOX to 9-LOX was higher with LA than that with LNA in transgenic plants. Our results suggest that the 13-LOX with LA pathway becomes the major pathway in transgenic plants. This result is consistent with our previous finding that LA rather than LNA is a better substrate of the maize lipoxygenase (submitted to BBRC).

### 3. Analysis of antioxidative enzyme activities

The lipoxygenase produce hydroperoxy fatty acids, which are known to activate the antioxidant system. The activation of antioxidant system by reactive oxygen species such as hydroperoxides may provide the major mechanism for the broad spectral stress-resistance in transgenic plants. Activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), and hydroperoxide lyase (HPL) were measured. Results showed that activities of all antioxidative enzymes (SOD, CAT, POD) were increase and the remarkable increase of the HPL activity. Our result suggest that the antioxidant system was activated by the overexpressed lipoxygenase in transgenic rice plants.

### 4. Evaluation of disease-resistance of transgenic rice plants overexpressing the maize LOX.

The selected homozygous lines were more resistant to the blast fungi than the Nakdong (WT) both in terms of the area of symptoms and the transmission rate as seen in Table II-2. Our result clearly indicate that the overexpression of the nontraditional dual positional specific maize lipoxygenase increases the resistance to the blast fungi.

Table II-2. Evaluation of blast fungi resistance in the homozygous transgenic rice plants overexpressing the maize lipoxygenase gene

Lines	Earing season	In leaves(%)		In ear
		Area of symptom	Transmission	
Nakdong(WT)	Aug 21	0.68	14.7	0
1A2	Aug 19	0.28	12.0	0
1A5	Aug 22	0.09	3.9	0
1A9	Aug 22	0.31	11.0	0
1A24	Aug 21	0.38	17.4	0

## CONTENTS

Chapter 1. Outlines of Research .....	23
1. Purposes and aims of research .....	24
1. 1. Purpose .....	24
1. 2. Aims .....	25
2. Specific aims and description of research .....	27
2. 1. Specific aims and description of research .....	27
2. 2. Methods and strategies .....	33
Chapter 2. Current status of related research developed in Korea and other countries .....	43
1. Related research status in foreign countries .....	44
2. Related research status in Korea .....	44
Chapter 3. Results of research .....	51
1. Selection of homozygous lines and analysis of genetic stability in transgenic rice plants .....	52
1. 1. Production of MzLOX antibody .....	52
1. 2. Selection of homozygous lines and analysis of genetic stability .....	55
1. 3. Southern analysis .....	60
2. Characterization of transgenic rice plants overexpressing MzLOX .....	62
2. 1. Analysis of LOX activity and quantification of MDA in transgenic rice plants .....	62
2. 2. Analysis of positional specificity of hydroperoxy fatty acids produced in transgenic rice plants .....	65
2. 3. Analysis of lipid composition in transgenic rice plants .....	69
2. 4. Analysis of electrolyte leakage .....	71

2. 5. Analysis of antioxidant enzyme activity in transgenic rice plants .....	73
2. 6. Analysis of quantification of JA and SA in transgenic rice plants .....	75
2. 7. Localization of LOX in transgenic rice plants	78
3. Stress response in transgenic rice plants .....	82
3. 1. Response of transgenic rice plants in wound stress .....	82
3. 2. Response of transgenic rice plants in salt stress .....	89
3. 3. Response of transgenic rice plants in ozone stress .....	94
4. Evaluation of resistance of transgenic rice plants to pathogens in paddy field .....	97
4. 1. Resistance of transgenic rice plants to blast in paddy field .....	97
4. 2. Resistance of transgenic rice plants to blast in dry paddy field .....	101
4. 3. Resistance of transgenic rice plants to bacterial blight in paddy field .....	104
4. 4. Analysis of growth rate of transgenic rice plants in paddy field .....	108
4. 5. Analysis of expression of defense-related genes of transgenic plants .....	111
Chapter 4. Achievements of aims and contribution to related areas	115
1. Achievements of research aims .....	116
1. 1. Aims, evaluation scores and achievements of the first year research .....	116
1. 2. Aims, evaluation scores and achievements of	

the second year research .....	117
1. 3. Overall evaluation on achievements of the research .....	118
2. Contribution to related areas .....	119
2. 1. Technical aspects .....	119
2. 2. Academic aspects .....	119
2. 3. Economical and industrial aspects .....	121
Chapter 5. Application of results .....	123
1. Necessity of continuing researches .....	124
2. Application of results in other researches .....	124
3. Industrialization .....	125
Chapter 6. Information collected from abroad during the research period .....	127
1. Information on jasmonic acid biosynthesis .....	128
2. Information on the production of stress-resistant crops	128
Chapter 7. References .....	131

## 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	23
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요 .....	24
1. 연구개발의 목적 .....	24
2. 연구개발의 필요성 .....	25
제 2 절 연구개발의 목표 및 내용 .....	27
1. 연구개발 목표와 내용 .....	27
2. 연구개발 방법 및 설계 .....	33
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	43
제 1 절 국외 관련 기술의 현황 .....	44
제 2 절 국내 관련 기술의 현황 .....	44
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	51
제 1 절 Homozygous line 선별 및 유전적 안정성 검증 .....	52
1. 옥수수 Lipoxygenase(LOX) 항체 (polyclonal antibody) 제조 .....	52
2. Homozygous line 선별 및 유전적 안전성 검증 .....	55
3. 형질전환 벼의 Southern 분석 .....	60
제 2 절 옥수수 LOX가 도입된 형질전환 벼의 특성 연구 .....	62
1. 형질전환 벼에서의 LOX활성 측정 및 Malondialdehyde (MDA) 함량 분석 .....	62
2. 옥수수 LOX가 도입된 형질전환 벼에서 hydroperoxy fatty acid들의 positional specificity 분석 .....	65
3. 옥수수 LOX가 도입된 벼 잎의 지방산 조성 분석 .....	69
4. Electrolyte leakage .....	71
5. 형질전환 벼에서 항산화 효소의 활성 측정 .....	73
6. 형질전환 벼내의 자스몬산 과 Salicylic acid 함량 분석 .....	75
7. 형질전환 벼에서 LOX의 subcellular localization .....	78
제 3 절 상처 및 염 스트레스에 대한 옥수수 LOX가 도입된 형질전환 벼의 반	

응 .....	82
1. 상처 스트레스에 대한 형질전환 벼의 반응 .....	82
2. 염 스트레스에 대한 형질전환 벼의 반응 .....	89
3. 오존 스트레스에 대한 형질전환 벼의 반응 .....	94
제 4 절 포장에서 리폭시지나아제 과다발현 형질전환 벼의 병 저항성 검정 .....	97
1. 형질전환 벼의 도열병에 대한 포장저항성 검정 .....	97
2. 형질전환 벼의 도열병에 대한 밭못자리 검정 .....	101
3. 형질전환 벼의 흰잎마름병에 대한 포장저항성 검정 .....	104
4. 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질전환 벼(T <sub>3</sub> )의 생육조사 .....	108
5. 형질전환 벼의 방어 및 병저항성 관련 유전자 발현 분석 .....	111
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	115
제 1 절 목표 달성도 .....	116
1. 제 1 차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도 .....	116
2. 제 2 차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도 .....	117
3. 최종평가의 착안점 및 달성도 .....	118
제 2 절 관련 분야에의 기여도 .....	119
1. 기술적 측면에서의 기여도 .....	119
2. 학문 발전에의 기여도 .....	119
3. 경제, 산업적 측면에서의 기여도 .....	121
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	123
제 1 절 추가 연구의 필요성 .....	124
제 2 절 타 연구에의 응용 .....	124
제 3 절 기업화 추진 방안 .....	125
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	127
제 7 장 참고문헌 .....	131



## 제 1 장 연구개발과제의 개요



## 제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발의 목적

중화학 및 전기 전자 산업의 급격한 발달과 함께 지구 환경의 전체적인 오염은 생태계의 파괴 등을 야기 시키고 작물의 생산성을 감소시키는 주요 원인이 된다. 생물적 혹은 비생물적 원인에 의한 환경의 악화는 농작물의 성장 과정에서 치명적인 스트레스 인자로 작용함으로써 작물이 지닌 유전적 생산력을 막대하게 제한하고 있다. 농업에 있어서 병해충의 방제는 필수적인 과정으로서 그동안 새로운 농약의 개발이나 고전 육종에 의한 병해충 저항성 품종들이 개발되어 농업 생산성의 증대에 많은 공헌을 하여 왔으나 화학적 방제에 따른 환경의 오염과 고전적 육종법이 지니는 한계성으로 인하여 유전자 조작과 고전 육종의 접목을 통한 광범위 스트레스 내성 품종의 육성이 절실히 요구되고 있다. 실제로 작물에 있어서 병해충 저항성작물의 유전공학적인 방법의 시도는 유전자연구의 model 식물인 *Arabidopsis*의 연구를 통한 저항성 유전자 및 방어 기작에 관련된 수 많은 기작들이 알려지면서 실용화되어가고 있으며 옥수수, 담배, 토마토 등으로부터 단일 병원균 종의 저항성에 관련된 유전자 군들이 클론되어 single race에 대한 저항성 작물 및 식물은 이미 개발되어 있는 상태이다. 특히 콩의 리폭시지나아제를 이용한 형질 전환 담배등이 생산은 되었으나 병 저항성등에 관한 상세한 연구는 보고된 바 없다. 본 연구팀은 1999년 11월부터 2002년 10월까지 3 년동안 농업첨단 기술과제 연구사업(과제 관리번호: 첨단299048-3, 과제명: 자스몬산 생합성 경로 조작을 통한 광범위 스트레스 저항성 벼 개발, 연구기간: 1999. 11 -2002. 10)(한옥수, 2002)을 통하여 상처등의 스트레스에 의하여 발현이 유도되고 특이적으로 dual positional specificity(Fig. 1)를 보여주는 옥수수의 nontraditional lipoxygenase 유전자와 효소를 발견하여 그 특성을 규명하였으며 (Kim *et al*, 2002; Agrawal *et al*, 2003; Kim *et al*, 2003), 그 유전자들을 이용하여 동일 계통의 단자엽 식물인 벼에서 성공적으로 형질전환식물을 개발한 경험이 있다.

## 2. 연구개발의 필요성

### 1) 기술적 측면

리폭시지나아제는 자스몬산 생합성의 초기 단계에 위치하면서 부분적인 속도 결정 단계로 알려져 있어서(Creelman *et al.*, 1997), 이들 효소가 과대 발현된 식물체에서는 자스몬산 및 중간체의 생합성이 증가될 것을 예상할 수 있으며 그 결과 광범위 스트레스 내성 작물의 개발될 수 있는 가능성이 있다. 옥수수의 리폭시지나아제 (GenBank ACCESS No.:AF271894)는 Fig. 1에서 보여주는 바와 같이 9-LOX와 13-LOX의 활성을 동시에 나타내는 중요한 dual positional specificity를 나타내므로 (Kim *et al.*, 2003) 다양한 종류의 병해추에 대한 저항성을 부여할 수 있는 주요한 표적 유전자라 할 수가 있다. 본 연구팀에서 생산하여 확보하고 있는 옥수수의 LOX (AF271894) 유전자가 과다발현된 형질 전환 벼(T1 세대)를 사용하여 도열병에 대한 저항성을 시험한 결과 Fig. 1과 같이 괄목할 만한 성과를 보였다. 그러나 이러한 결과는 실험실 수준에서 검정된 결과 일 뿐 포장에서의 결과는 아니다.

☞ 따라서 본 연구에서는 지금까지 확보한 T1 종자로부터 얻어지는 T2 세대와 T3 세대의 벼에 대하여 포장 수준에서 homozygous 도열병 저항성 벼 품종을 육성하고 이들 육성된 품종의 유전적 안정성을 검정하고자 한다.

### 2) 경제·산업적 측면

1. 가. 1)에서 밝힌 바와 같이 nontraditional dual positional LOX를 발현시킨 형질 전환벼에서 뚜렷한 도열병 저항성을 보였으므로 LoxAF272894가 도열병등의 병에 대한 저항성과 밀접한 관련을 지니고 있음을 명백히 알 수 있다. 따라서 LoxAF271894 유전자가 과다 발현된 형질전환벼를 이용하여 포장 수준에서 도열병 저항성 벼 품종을 육성하는 본 연구는 농업 현장에 비교적 실용적으로 이용될 수 있을 뿐만 아니라, LoxAF271894 유전자를 이용한 병 저항성 작물의 개발 방법은 벼 이외의 다른 식량 작물에 확대될 수 있으므로 본 연구는 농업 생산성을 향상 시키기 위한 획기적 방안이 될 수 있을 뿐만 아니라 극한 지역인 러시아나 열대 우림 지역인 동남아시아 지역에도 적용 할 수 있는 농작물 개발의 기반을 구축함으로써 작물 생산 기지의

확대에 일조를 할 것이다.

3) 사회·문화적 측면

리폭시지나아제 유전자를 이용한 형질전환 벼는 유전자 조작에 의하여 우려되는 superweed 나 superbug의 출현 가능성이 적다.

## 제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

### 1. 연구개발 목표와 내용

본 연구에서는 1) AF271894 유전자를 과다발현시킨 T1 세대의 형질전환벼 종자를 사용하여 homozygous T2 line을 선발하고, 2) T2 식물체에 대하여 도열병의 저항성을 검정하며, 3) 검정된 개체 가운데 유전적으로 안정한 line을 선발함으로써 도열병에 저항성인 벼 품종을 육성하고자 한다.

리폭시지나아제(LOX, EC 1.13.11.12)는 철을 포함하는 non-heme dioxygenase 로서 cis, cis-1,4-diene 구조를 지닌 polyunsaturated fatty acid (PUFA)의 hydroperoxidation을 촉매한다. 식물의 LOX는 linoleic acid (LA)나 linolenic acid (LNA)를 기질로하여 C-9 이나 C-13 위치를 산화시킴으로서 (9S)-hydroperoxy 혹은 (13S)-hydroperoxy 유도체를 만들어내고 (Fig. 2), 이들 유도체는 다양한 경로를 통하여 자스몬산등 중요한 생리활성 물질로 변환된다.

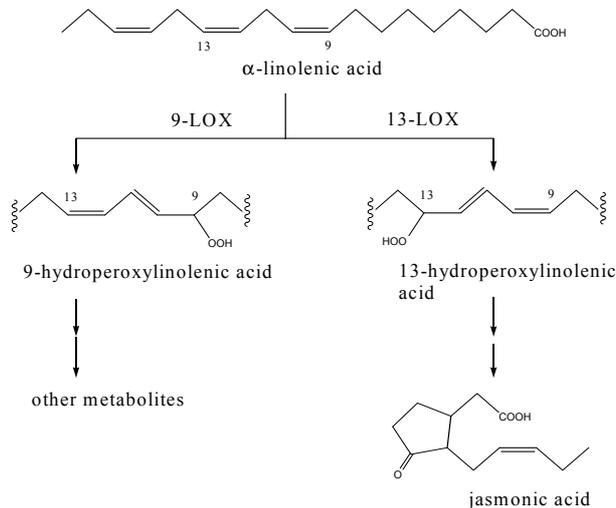


Fig. 2. Metabolic fates of nontraditional dual positional lipoxygenase

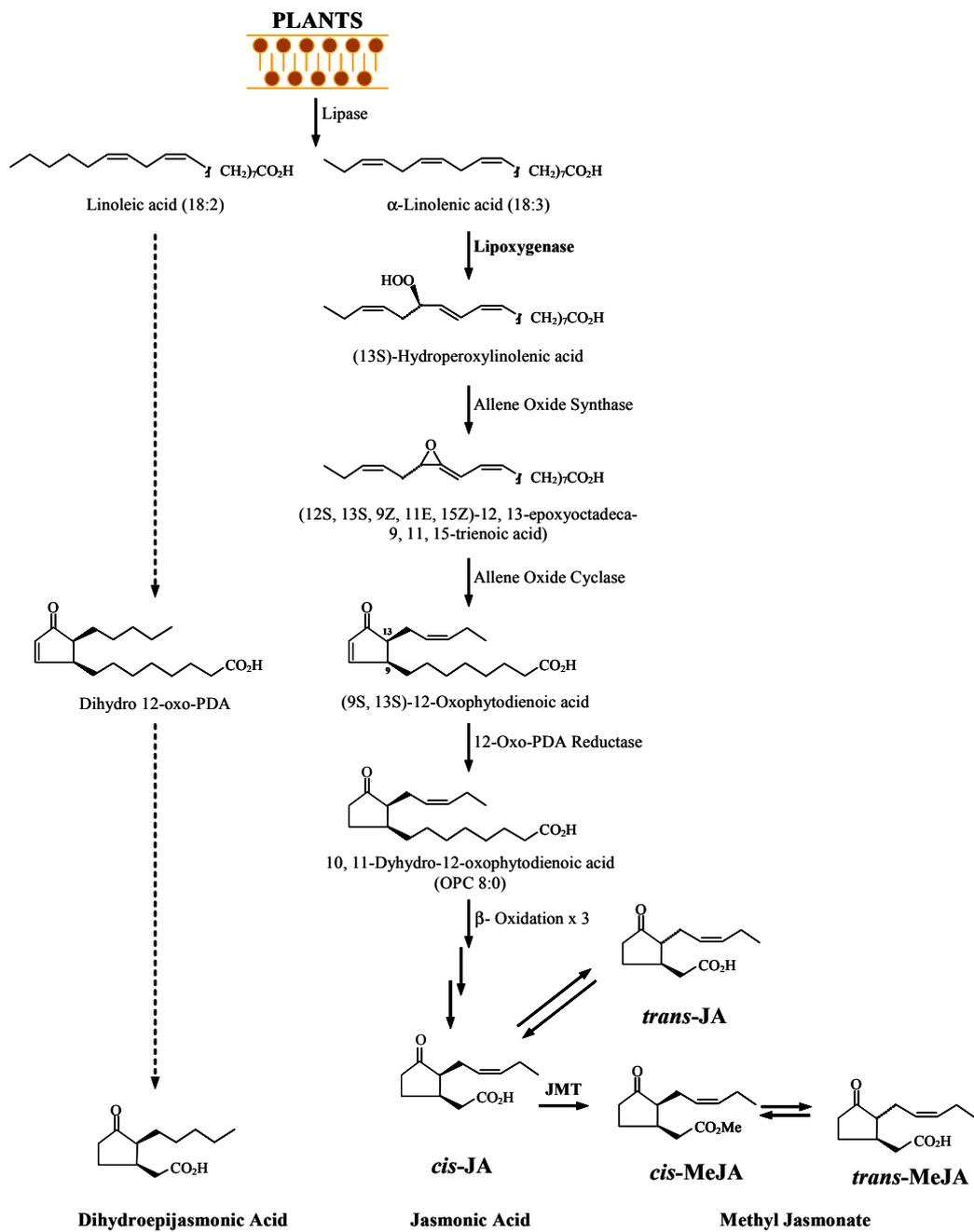


Fig. 3. Stress responsive octadecanoid pathway

식물체에 가해진 생물적 혹은 비생물적 스트레스에 의하여 lipase의 작용으로 세포막으로부터 유리된 LNA는 lipoxygenase(13-LOX), allene oxide synthase(AOS), allene oxide cyclase(AOC), oxophytodienoic acid reductase(OPR), beta-oxidative enzyme들의 반응이 순차적으로 진행되면서 자스몬산이 합성되게 된다 (Fig. 3). 식물체내에서 합성된 자스몬산은 JMT에 의하여 휘발성이 있는 methyl jasmonate로 변화되면서 다른 식물체에 이동될 수 있으므로 주위에 존재하는 다른 식물체에서도 방어기작이 촉발될 수 있게 된다. 그러나, Fig. 1에서와 같이 자스몬산은 13-LOX에 의하여서만 합성될 수 있으므로 9-LOX에 의하여 합성되는 9-hydroperoxy 유도체는 자스몬산 생합성 경로와는 다른 별도의 대사과정을 거치며 이들 또한 중요한 방어물질로 작용하게 된다. LA가 13-LOX의 기질로 사용될 경우에는 LNA의 대사경로와 유사한 경로를 거쳐서 dihydrojasmonic acid가 형성되는 바, dihydrojasmonic acid의 생리적 기능에 대하여는 잘 알려진 바가 없으나 다양한 종류의 식물체에 존재하는 것으로 알려져 있다. 실제 식물체에 존재하는 많은 종류의 LOX는 LA와 LNA를 다같이 기질로 사용한다고 알려져 있다.

LOX1:Zm:1	573	QMLVNAGGIFET <b>TV</b> FPRQYAFEMSSV	598
LOX1:Hv:3	574	GLLINAGGVIEM <b>TV</b> FPKHAMPMSM	599
LOX2:Os:1	566	QTLINGGGIFEM <b>TV</b> FPRNDALAMSSA	591
LOX1:St:2	567	QILVNAGGVLE <b>TV</b> FQSKFAMEMSAV	592
LOX1:Cs:3	584	QVLINANGLIET <b>TH</b> YPSKYSMELSSI	609
LOX1:Zm:1	724	FGQYPYAGYLPN <b>R</b> PSVSRKMPAPGS	749
LOX1:Hv:3	715	FGQYPYSGYHPN <b>K</b> PSASRRPMPVQGS	740
LOX2:Os:1	716	FGQYPYAGYLPN <b>R</b> PSVSRRAMPEPGT	741
LOX1:St:2	718	FGQYPYAGYLPN <b>R</b> PTVSRRFMPEPGT	743
LOX1:Cs:3	735	FGQYPYGGYILN <b>R</b> PTTSRRFMPEVGT	760

**Fig. 4. Amino acid sequence alignments around the active site of nontraditional LOXs including wound-inducible maize LOX. Presumed motifs (R(K)TH /TV) responsible for positional specificities are in bold-face.**

식물체에 존재하는 LOX의 positional specificity는 활성 부위에 존재하는 amino acid들로 이루어진 essential motif들에 의하여 결정된다고 알려져 있다. 13-LOX의 경우 R/TH motif가 필수적으로 요구된다고 알려져 있으며, 9-LOX의 경우 R/TV motif가 요구된다고 알려져 있다. 현재까지 알려진 40 여개의 식물체 LOX는 이들 essential motif의 존재 유무에 따라 positional specificity가 결정된다. 그러나, 지금까지 4 개의 LOX, 특히 단자엽식물로부터 유래된 LOX는 이러한 motif의 존재 유무에 따라 예측되는 positional specificity와 일치하지 않음을 알 수 있으며 이러한 LOX는 nontraditional LOX로 분류되고 있다(Feussner and Westernack, 2002). AF271894에 의하여 encoding되는 단백질의 아미노산 sequence를 이들 알려진 nontraditional LOX들의 아미노산 sequence와 비교한 결과를 Fig. 4에 나타냈다. 그 결과 AF271894 유전자는 R/TV motif가 존재하는 9-LOX로 분류될 수 있었다. 그러나, **Table 1**에서 나타낸 바와 같이 본 연구에서 사용되는 형질전환 벼에 도입된 AF271894 유전자가 coding하는 LOX는 nontraditional LOX의 일종으로서 9-LOX와 13-LOX의 활성을 동시에 지님을 알 수 있었다 (Kim *et al.*, 2003).

**Table 1.** Positional specificities of nontraditional plant LOXs

Plant	LOX Name	Access No.		Phylogenetic Tree Analysis	motif	Observed positional specificity
		DNA	Protein			
barley	LOX1-Hv3	L37358	AAB70865	Type-1/9-LOX	TV/K	13 <sup>a</sup>
rice	LOX1-Os1	X64396	CAA45738	Type-1/9-LOX	TV/R	13 <sup>a</sup>
potato	LOX1-St2	Y18548	CAB65460	Type-1/9-LOX	TV/R	13/9 <sup>b</sup>
cucumber	LOX1-Cs3	X92890	CAA63483	Type-1/9-LOX	TH/R	13/9(84:16) <sup>b</sup>
maize	LOX1-Zm1	AF271894	-----	Type-1/9-LOX	TV/R	13/9(6:4) <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Feussner and Westernack (2002)

<sup>b</sup> Porta and Rocha-Sosa (2002)

<sup>c</sup> This study

AF271894 유전자와 그에 의하여 encoding되는 nontraditional LOX의 특성을 고려하여 볼때, 본 연구의 재료로 사용하고자하는 형질 전환 벼는 도열병 이외의 다양한 병해충에 대하여 광범위한 저항성을 나타낼 수 있음을 예측할 수 있다. 실제 T1 세대의 형질전환벼는 도열병 뿐만 아니라 흰잎마름병에 대하여서도 괄목할 만한 저항성을 보여 주었다(Fig. 5). 그러나 이러한 결과들은 모두 실험실이나 온실에서 얻어진 결과들로서 실제 농업현장에서의 적용 가능성을 알아보기 위해서는 포장실험이 불가피하다.

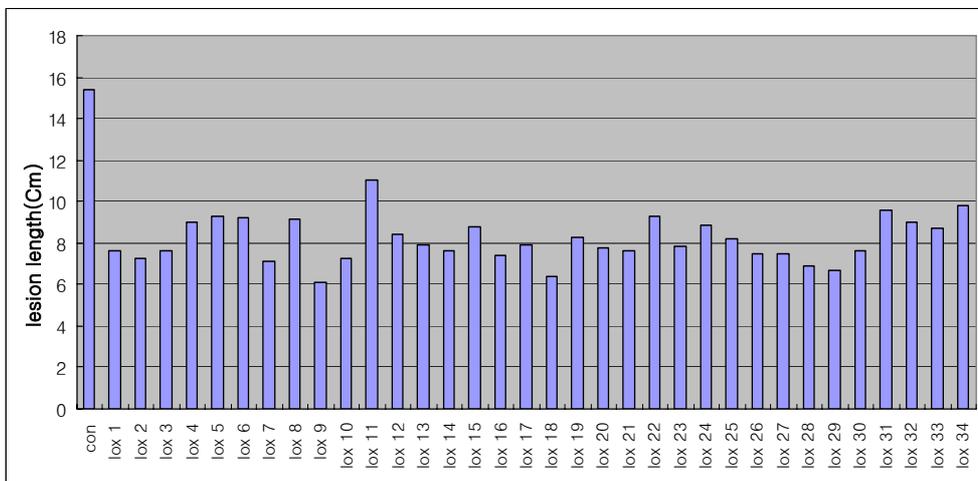


Fig. 5. Lesion length of T<sub>1</sub> transgenic rice plants containing the *lox* gene inoculated with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (HB 01015 K<sub>3</sub> 1114)

## 2. 연구개발 방법 및 설계

### 가. 연구 개발 방법

#### 1) 형질전환 벼의 재배

1A T1 중자 30 line을 line별로 20개씩 상토에 과중한다. 2주간 28~30℃인 배양실에 발아시키킨다. 발아시키는 동안 상토에 수분이 마르지 않도록 유지시키킨다. 2 주짜리 유묘를 포장으로 옮기고 재배한다.

#### 2) 형질전환 벼의 Northern 분석

전체 RNA를 추출하기위해 1)에서 발아시킨 각 line별 벼 잎 0.4 g을 취해 액체질소와 DEPC처리된 막자 사발로 잘게 간 후 멸균된 test tube에 0.1 g 씩 나누어 담아 -70 ℃에 저장하여 전체 RNA를 추출하고자 할때 하나씩 꺼내 사용한다.

전체 RNA는 TRI Reagent(Molecular Research Center, Cincinnati)를 이용하여 분리하고 spectrophotometer로 정량하여 RNA 10 ug를 1.2 % formaldehyde RNA gel에 전기영동한다. capillary 방법으로 RNA를 gel에서 nylon membrane으로 이동시키고 crosslinker로 membrane에 고정시키킨다.

혼성화 병에 10 ml prehybridization solution (7 % SDS, 10 mM EDTA, 0.25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 g BSA)과 RNA가 고정된 membrane를 넣고 60 ℃에서 3~5 시간 진탕시키킨다. 옥수수리 리폭시지나아제 cDNA를 Nco I과 Bam HI 제한 효소로 절단한 단편(953 bp)을 주형으로하여 얻은 P<sup>32</sup>-CTP로 표기된 probe를 혼성화 병에 첨가하여 12시간이상 혼성화 시킨다. 세척액 (2 X SSPE, 0.1 % SDS)으로 상온에서 5분간 1번 씻은 후 60 ℃에서 geiger counter로 background가 거의 없어질 때까지 10 분 간격으로 씻는다. 2 X SSPE에 적신 3 MM paper 위에 membrane을 올려놓고, wrap으로 싸 후 감광판에 24시간 동안 암실에서 노출시켜 phosphoimager로 signal을 검출한다.

#### 3) lipoxygenase 단백질의 제조 및 항체 제조

본 연구실에서 이미 개발된 방법에 따라 이중 발현된 LOX 단백질을 제조하고 (Kim et al., 20003), 정제된 단백질을 AnnihGen에 의뢰하여 polyclonal 항체를 제조한다.

#### 4) 형질전환 벼의 Western 분석

발아후 2 주된 벼 유묘의 잎 0.1 g을 취해 액체질소와 막자 사발로 모두 잘게 간 후 멸균된 test tube에 담는다. lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.2) w/ 1 mmole/L of DTT and 32 mg/L of PMSF) 500 ul 첨가하여 vortexing한다. 4 °C 600 rpm으로 particle들을 제거하고 상층액을 새로운 test tube로 옮겨 담는다. 각각의 test tube의 상층액을 20 ul씩 분주하여 5 X sample buffer (60 mM Tris-HCl (pH6.8) w/ 25% glycerol, 20% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, and 0.0% bromophenol blue) 5 ul첨가하여 끓는 물에 5분동안 변성시킨다. 준비된 샘플 25 ul를가지고 7% SDS-PAGE를 실시한다.

SDS-PAGE가 끝난 후 stacking gel 부위를 제거하고 cathode buffer (25 mM Tris-HCl (pH9.4), 40 mM Glycine, 10% Methanol)에 15분 shaking시킨다. gel 크기의 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane을 100% methanol에 15초, 멸균수에 2분 적신 후 anode buffer II (25 mM Tris-HCl (pH10.8), 10% Methanol)에 10분간 equilibration 시킨다. gel 크기의 3 MM whatman paper 6장을 준비하여 3장은 cathode buffer에 2장은 anode buffer I (300 mM Tris-HCl (pH10.8), 10% Methanol)에 그리고 1장은 anode buffer II에 적신다. semi-dry electroblotter의 anode plate에 anode buffer I이 적신 paper 2장, anode buffer II의 1장, membrane, gel, 그리고 cathode buffer가 적신 3장 순으로 blotter를 결합시킨다. 130 mA, 1시간 동안 단백질을 gel에서 membrane으로 blotting한다. blotting된 membrane를 상온에서 10 ml blocking solution (5 % skim milk, 0.02 % sodium azide, 0.02 % tween 20)에 1시간, primary Ab solution(1:2,000 희석)에 4시간, 1 X PBS solution (8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 1.44 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)에 5분간 3번 씻는다.

상온에서 2 % Bovine Serum Solution에 20분, Secondary Ab solution (1:5,000 희석)에서 1시간, 1 X PBS solution에 10분간 3번 씻은 후 NBT/BCIP solution에서 membrane을 발색시켜 멸균증류수에서 5분간 3번 씻어 말린다.

5) homozygous 형질전환벼 line의 선별

2)와 4)에서 관찰되는 각 line별 Northern과 Western 결과 LOX band 유무 비율을 관찰한다. 각 line별로 20개 모두에서 LOX band가 나타나는 것을 잠정적으로 homozygous line으로 간주한다.

6) homozygous T3 line에서 활성 화합물의 동정

선별된 homozygous T3 line을 2 주동안 재배한 후, LOX 유전자의 발현을 확인하고, 리놀렌산용 포함된 배자로 옮긴다. 리놀렌산을 포함한 배지에서 자란 벼 잎 (1 g)을 취하여 마쇄한 후, 지질을 추출하고 추출물에서 C-6 aldehyde, oxophytodienoic acid (OPDA) 및 자스몬산의 농도를 측정한다. 측정된 물질과 도열병 균의 상호작용을 조사하여 활성 화합물을 결정한다.

## 7) 형질전환 벼의 도열병 포장저항성 검정

### (1) 시험품종

형질전환 대상 벼 품종으로 사용되었던 낙동벼와 옥수수 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질전환 벼 1A T1 종자 30 line과 제 1세부과제에서 선발된 homozygous T2 종자를 line별로 100개씩 상토에 파종하여 2주간 28 ~ 30℃인 배양실에 발아시킨다. 발아시키는 동안 상토에 수분이 마르지 않도록 유지시키며 2 주짜리 유묘를 포장으로 옮기고 재배한다.

### (2) 재배법

낙동벼와 형질전환 벼를 5월 6일 상토에 파종한 후, 발아된 벼를 주당 본수를 3 ~ 4본으로 재식거리는 30 × 15 cm로 하여, 전남 나주시 산포면 전라남도 농업기술원 포장에 6월 5일에 이앙한다. 포장의 시비량은 22-7-8 (N-P-K, kg/10a)로 하여 농촌진흥청 표준 재배법에 준하여 재배한다.

### (3) 조사항목

시험 포장에서 낙동벼와 형질전환 line의 도열병 발생 정도는 20포기 이상을 대상으로 조사한다. 잎 도열병 병반 면적율을 발병 최성기인 7월 하순에 1회 조사하고, 이삭도열병의 이병수율은 출수 5주 후에 조사한다. 포기당 평균 병무늬면적율은 병에 걸린 포기당 병반면적율 합계/조사포기수로 하여 조사한다. 포기당 조사기준은 다음의 기준에 준하여 조사한다.

병무늬 면적율	병에 걸린 정도
0.2%	밑부위 잎에 대형 병무늬 1개와 소형 병무늬 1-2개 또는 소형 병무늬만 10개 이내
0.5%	밑부위 잎에 대형 병무늬 2-3개와 또는 소형 병무늬 20개 정도가 포기전체에 고르게 퍼져 있음
1%	대형 병무늬 4-5개와 주위에 약간의 소형 병무늬가 퍼져있거나 또는 소형 병무늬만 30-40개 정도 퍼져 있음
2%	밑부위 1-2잎이 병무늬로 거의 덮이거나 또는 대형 병무늬 10-15개가 밑위에 퍼져있음
5%	밑부위 2-3매 잎이 반 정도 말라죽거나 또는 대형 병무늬 30-40개가 퍼져 있음
11%	밑부위 2-3매 잎이 완전히 말라죽고 밑에 5-6개 잎에 대형 병무늬가 퍼져 있음
25%	윗부위 잎을 포함하여 7-8매 잎이 완전 또는 부분적으로 말라죽고 모든 잎에 각각 10개 정도의 병무늬가 고루 퍼져 있음
55%	전체 잎 수의 반 이상이 완전히 또는 부분적으로 말라 죽거나 죽지 않은 잎에는 무수한 병무늬가 있음
100%	포기 전체가 주저앉으며 말라 죽음

(4) 형질전환 벼의 수량 및 생육 조사.

생육조사는 6월 19일부터 출수기까지 15일 간격으로 분얼수와 초장을 측정하고, 수량조사는 농촌진흥청 농사시험연구 조사기준 (농촌진흥청, 1995)에 따라 단위면적당 수수, 수당입수, 천립중, 등숙율을 조사한다.

8) 도열병 발못자리 검정

(1) 시험품종 및 재배

형질전환 대상 벼 품종으로 사용되었던 낙동벼와 옥수수외 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질전환 벼 1A T1 종자 30 line과 제 1세부과제에서 선발된 homozygous T2 종자를 line별로 100개씩 전라남도 나주시 산포면 전라남도 농업기술연구원의 발 못자리 검정 포장에 6월 하순 - 7월 상순에 직파한다. 발못자리 검정 시 도열병 발병율을 높이기 위해서 주위에 이병성 품종인 낙동벼를 함께 파종한다. 발못자리 검정 포장의 시비량은 N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O = 24-8-12(kg/10a)로 하고 단, 질소질의

50%는 추비로 파종 후 14일 후에 시용한다.

(2) 조사 시기 및 잎도열병 판정 기준

파종후 30일에 형질전환 벼의 잎도열병 이병정도(0~9)를 조사한다. 잎도열병의 이병정도는 다음과 같은 기준에 의해 조사한다.

0 : 무병반

1 : 바늘끝 같은 작은 갈색반점 병반      2 : 직경 1-2mm의 다소 큰 갈반점이 하위엽에 드물게 있는 것      3 : 2와 동일한 반점으로 그 수가 증가하여 상위엽에 나타나는 것      4 : 전형적 회색의 급성도열병반 1-2cm 길이 전엽면적의 4% 이내 이병      5 : 4-10% 사이의 전형적 병반  
6 : 11-25% 정도 이병된 병반      7 : 잎면적의 26-50% 가 전형적 병반으로 이병  
8 : 전 엽면적의 51-75% 가 전형적 병반으로 이병      9 : 모든 잎이 75% 이상 이병된 것 또는 완전 고사

9) 도열병 race 분포 조사

전라남도 농업기술원 검정포장에서 발생한 이병엽을 채취하여 race 분포를 조사한다.

10) 벼 흰잎마름병 저항성 검정

(1) 시험품종

형질전환 대상 벼 품종으로 사용되었던 낙동벼와 옥수수 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질전환 벼 1A T1 종자 30 line과 제 1세부과제에서 선발된 homozygous T2 종자를 line별로 100개씩 상토에 파종한다. 2주간 28 ~ 30°C인 배양실에 발아시킨다. 발아시키는 동안 상토에 수분이 마르지 않도록 유지시킨다. 2 주 짜리 유묘를 포장으로 옮기고 재배한다.

(2) 재배법

낙동벼와 형질전환 벼를 4월 25일 상토에 파종한 후, 발아된 벼를 주당본수를 1 본으로 재식거리는 30 × 15 cm로 하여 전남 나주시 산포면 전라남도 농업기술원 포장에 6월 1일에 이앙한다. 포장의 시비량은 17-4.5-7.5 (N-P-K, kg/10a)로 하여 농촌진흥청 표준 재배법에 준하여 재배한다.

### (3) 조사항목

**접종 검정:** 접종균계는 농촌진흥청 농업과학기술원 식물병리과에서 분양받은 K1, K2, K3 race를 공시하고, 접종방법은 최고 분얼기 - 수잉기에 형질전환벼를 가위절엽접종하여 병반길이를 조사한다.

**포장 저항성:** 검정방법은 형질전환 벼가 이식된 포장의 주변에 흰잎마름병에 이병성인 품종을 이식하여 검정품종 주변의 이병성 품종에 K1, K2, K3 균계를 최고 분얼기에 가위 절엽접종하여 2차 전염을 유기한다. 수잉기에서 호숙기 사이에 2차 전염 정도(0-9)를 조사한다. 2차 전염 정도의 기준은 다음에 준하여 조사한다.

0 : 무병반

1 : 총 엽면적의 1% 이내가 이병된 상태

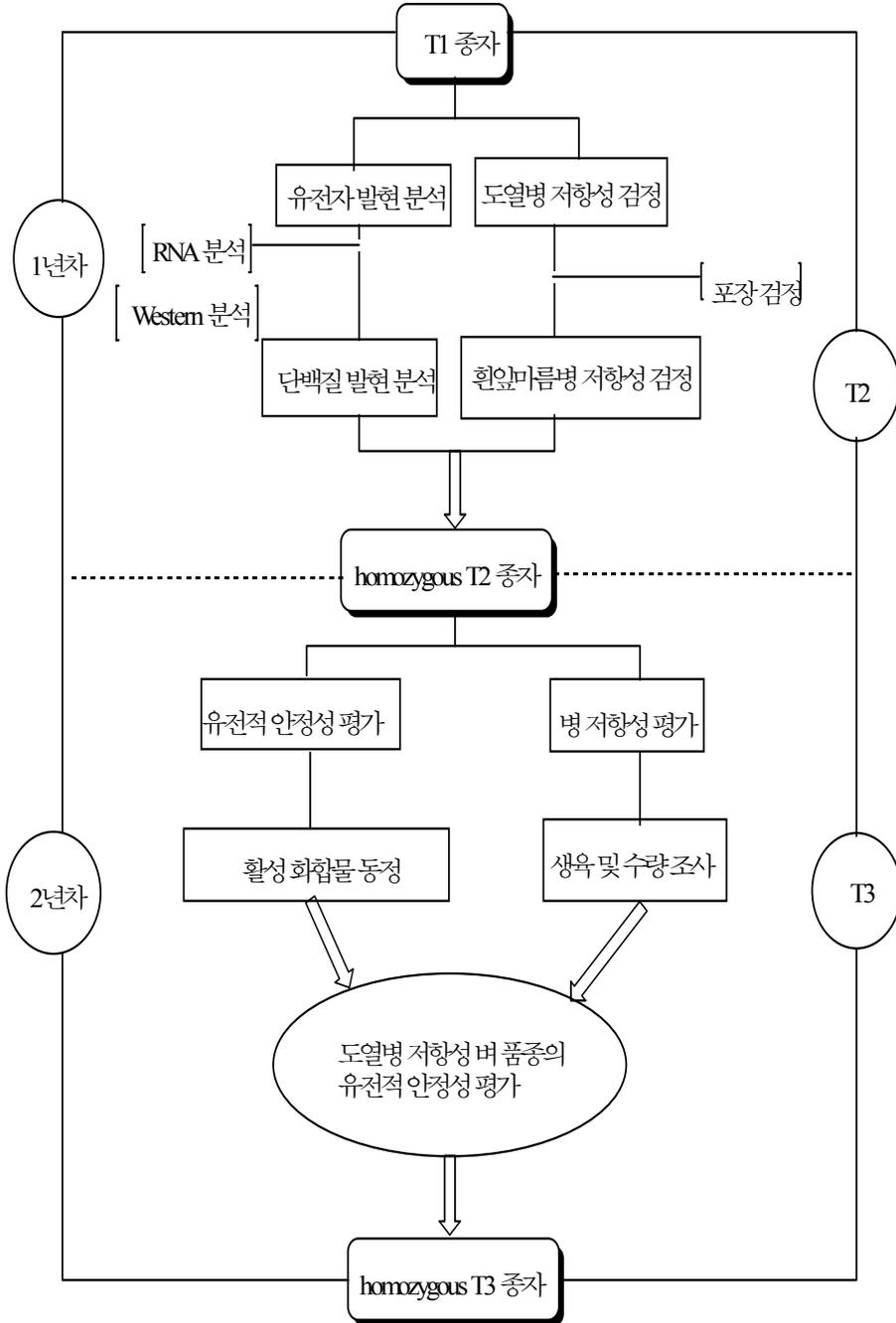
3 : 총 엽면적의 1-5% 이병된 상태

5 : 총 엽면적의 6-25% 이병된 상태

7 : 총 엽면적의 25-50% 이병된 상태

9 : 총 엽면적의 51% 이상이 이병된 상태

나. 연구개발 추진체계





## 제 2 장 국내외 기술 개발 현황



## 제 1 절 국외 관련 기술의 현황

국외에서는 리폭시지나아제가 식물체의 방어 시스템에서 중요한 역할을 담당하고 있으며(Montillet *et al.*, 2002), 노화 및 화학적 저항성 유도 인자에 의하여 활성화 됨이 이미 보고되어 있다(Fukuchi-Mizutani, *et al.*, 2000; Schaffrath *et al.*, 2000). 특히 Xanthomonas(Jalloul *et al.*, 2002), Fusarium (Devi *et al.*, 2000), Aspergillus 와 같은 균들과 밀접하게 상호작용하는 등 다양한 종류의 병원균에 대한 방어기능을 담당한다고 알려져 있다(Kolomiets *et al.*, 2000).

## 제 2 절 국내 관련 기술의 현황

국내에서도 자스몬산의 중요성에 따라 octadecanoid pathway에 대한 연구는 진행되어 왔다(Kim *et al.*, 1992; Ha *et al.*, 1996). 특히 jasmonate methyltransferase (JMT)에 관하여 많은 연구가 이루어지고 있으며(Cheong and Choi, 2003), 이들의 연구결과는 본 연구팀의 연구에 많은 도움과 정보를 제공하여 주고 있다. 그러나 LOX를 이용한 실용적인 병해충 저항성 벼 품종 육성 및 환경 적응성에 관한 연구는 찾아보기 어렵다. 본 과제 수행 이전 지난 몇 년 동안 본 연구팀에서 수행한 관련 연구를 요약하면 다음과 같다.

### (1) 리폭시지나아제와 알렌옥사이드 합성효소 유전자의 구조 분석

상처에 감응하는 옥수수의 리폭시지나아제 유전자와 벼, Arabidopsis, flax seed의 알렌 옥사이드 합성효소 유전자를 분석하였다. 옥수수의 리폭시지나아제의 cDNA는 chloroplast targeting sequence를 포함하고 있지 않은 Type 1, Lox 1 gene family로서 nontraditional positional specificity를 갖는 유전자로 분류될 수 있었다. 리폭시지나아제의 promoter 지역은 상처나 자스몬산에 감응하는 putative cis-element들을 포함하고 있었다. 벼, Arabidopsis, flax seed 의 알렌 옥사이드 합성효소 유전자는 cytochrome P450로서 Arabidopsis만이 chloroplast targeting

sequence를 포함하고 있었다. 이러한 분석 결과로부터 옥수수의 리폭시지나아제 유전자와 Arabidopsis의 알렌 옥사이드 합성효소 유전자를 사용하여 스트레스 저항성 형질 전환 벼를 생산하기 위한 논리적 근거를 마련하였다..

#### (2) 리폭시지나아제와 알렌옥사이드 합성효소 유전자의 발현 기구

상처 및 자스몬산 처리에 대한 리폭시지나아제와 알렌 옥사이드 합성효소 유전자의 발현을 분석하였다. 리폭시지나아제 유전자는 상처에 대하여 신속히 감응하여 발현이 유도됨을 관찰하였고, 메틸 자스몬산에 의하여 유전자의 발현이 이중상으로 유도되었다. 알렌 옥사이드 합성효소의 유전자 역시 상처와 메틸 자스몬산에 대하여 발현이 유도됨을 관찰하였다. 이러한 결과는 리폭시지나아제와 알렌 옥사이드 합성효소의 유전자는 상처등의 물리적 스트레스에 의하여 발현이 유도되며, 리폭시지나아제 유전자의 경우 자스몬산에 의하여 feed-forward activation에 의하여 발현이 조절될 수 있음을 시사하고 있다.

#### (3) 리폭시지나아제와 알렌옥사이드 합성효소 유전자의 이중발현

옥수수의 리폭시지나아제 유전자와 벼 및 Arabidopsis의 알렌 옥사이드 합성 효소 유전자를 각각 대장균에서 이중 발현시켜 이들 유전자의 기능을 확인하였다. 리폭시지나아제와 벼의 알렌 옥사이드 합성효소는 대장균에서 대량 생산 할 수 있었으며, His-tag을 사용한 chromatography를 통하여 순수 분리 할 수 있었다. 이중 발현된 리폭시지나아제와 알렌 합성효소의 단백질적 특성을 검증함으로써 이들 유전자를 이용하여 자스몬산의 생합성 경로를 조작할 수 있는 근거를 마련하였다. 자스몬산 생합성 경로를 효율적으로 조절하기 위하여 리폭시지나아제와 알렌 옥사이드 합성효소를 연결한 fusion protein을 대장균에서 이중 발현 시켰으나, 다량의 inclusion body가 형성됨을 확인하였다.

#### (4) 리폭시지나아제의 반응 특성 규명

대장균에서 이중 발현시킨 리폭시지나아제의 positional specificity를 규명하였다. 그 결과, 리폭시지나아제는 리놀렌산을 기질로 하였을때 C-13 과 C-9 위치에 hydroperoxidation을 6:4 의 비율로 촉매하는 것을 알 수 있었다. 리폭시지나아제의 이러한 dual positional specificity는 유전자에 대한 phylogenetic tree 분석 결과 및 potential active-site에 존재하는 아미노산의 구조 분석 결과와 잘 일치하고 있었다. dual positional specificity를 지니는 리폭시지나아제는 13-LOX pathway를 통한

자스몬산 생합성 조절 뿐만 아니라, 9-LOX pathway를 통한 다양한 종류의 oxylipin 분자들의 합성을 조절할 수 있는 장점을 제공하므로 본 연구에서 사용하는 리폭시지나아제 유전자가 광범위 스트레스 저항성 형질 전환 벼의 생산을 위하여 유용하게 사용될 수 있음을 검증하였다.

(5) 형질 전환체의 생산, 분석 및 선발

dual positional specificity를 지닌 옥수수의 리폭시지나아제 유전자와 Arabidopsis의 알렌 옥사이드 합성효소의 유전자를 Agrobacterium 매개법에 의하여 벼에 도입하였다. chloroplast targeting sequence를 포함하고 있는 알렌 옥사이드 합성효소 유전자의 경우 targeting sequence를 포함한 유전자와 인위적으로 targeting sequence를 절단한 유전자를 각각 벼에 형질전환함으로서 도입된 알렌 옥사이드 합성효소의 발현 장소를 조절하였다. 생산된 형질 전환 벼에 대하여 PCR 분석, southern 분석, northern 분석, SDA-PAGE 분석을 수행하였다. 그 결과 리폭시지나아제가 도입된 형질 전환 벼의 경우 유전자 및 단백질이 성공적으로 발현된 T0 및 T1 line을 선발할 수 있었으며, 알렌 옥사이드 합성 효소의 유전자가 도입된 형질 전환 벼는 도입된 유전자가 성공적으로 발현된 T0 line을 선발할 수 있었다. 이들 목적된 유전자가 성공적으로 발현된 line들을 병해충 저항성의 검정을 위하여 사용하였다.

(6) 자스몬산 처리가 벼 생육에 미친 영향

자스몬산의 뿌리 처리에서 벼 유묘의 생육 변화: 벼 유묘에 자스몬산 0 - 100  $\mu\text{M}$ 을 영양액에 1주일 간 처리하였을 때 자스몬산 농도가 높아 감에 따라 초장, 뿌리 수, 생체중의 감소율이 높았으나 그 정도는 품종에 따라 차이가 있었다. 자스몬산 0 - 30  $\mu\text{M}$ 을 영양액에 처리하였을 때 자스몬산 처리 7일 후 자스몬산의 농도 증가에 따라 생체중은 줄기는 감소하였으나 뿌리는 증가하였고 엽록소와 carotenoid 함량은 무처리와 차이가 없었다. 전기전도도는 줄기는 20  $\mu\text{M}$ 이상에서 무처리보다 현저히 감소하였고 조직 생존력은 모든 농도에서 무처리의 60%이하였다.

자스몬산의 엽면 처리에서 벼 유묘의 생육 변화: 벼 유묘에 자스몬산 0 - 30  $\mu\text{M}$ 을 엽면에 살포하였을 때 초장과 경수가 20  $\mu\text{M}$ 이상에서 감소하였다. 건물중은 처리 7일 후에 주경은 무처리와 거의 같았으나 분얼경은 감소율이 높았고 처리

14일 후에는 주경도 감소하였다. 엽록소와 carotenoid 함량은 모든 처리에서 무처리보다 많았으며 농도간에는 차이가 없었다.

(7) 자스몬산 엽면 처리가 도열병과 흰잎마름병 발병에 미친 영향

자스몬산 처리가 도열병 발병 정도에 미친 영향: 벼 유묘에 자스몬산 0 - 30  $\mu\text{M}$ 을 엽면 살포하여 도열병 검정 포장에 둔 결과 자스몬산 모든 농도에서 무처리보다 발병 정도가 낮았다. 특히 발병정도가 무처리 6.1에 비하여 30  $\mu\text{M}$ 에서는 4.4로 현저한 발병 저지를 나타내었다.

자스몬산 처리가 흰잎마름병 발병 정도에 미친 영향: 벼 7품종의 유묘에 자스몬산 0 - 30  $\mu\text{M}$ 을 엽면 살포하여 흰잎마름병균을 가위접종한 결과 7개 품종의 병반장이 10  $\mu\text{M}$ 과 15  $\mu\text{M}$ 에서는 각각 무처리의 82%와 77%로 발병 저지효과가 있었으나 20  $\mu\text{M}$ 이상에서는 무처리와 같았다.

(8) 자스몬산 처리가 상처 치유에 미친 영향

벼 유묘에 상처로써 스트레스를 가해 주었을 때 자스몬산의 농도에 따른 생육반응의 차이를 알아보기 위하여 낙동벼에 기계적 상처를 가한 후 자스몬산 0, 10, 15, 20, 25 30  $\mu\text{M}$ 를 처리하였다. 벼 유묘에 자스몬산을 처리 하였을 때 농도의 증가에 따라 상처와 무상처 모두 초장, 엽수, 경수, 건물중은 감소하였다. 무상처에서는 15  $\mu\text{M}$ 이하에서는 무처리와 차이가 없었으나 그 이상 농도에서는 감소하고 있는 반면 상처 처리에서는 20  $\mu\text{M}$ 까지 무처리와 차이가 없었다. 식물체 잎의 형광반응에서는 자스몬산 처리 72시간 후에  $F_0$ ,  $F_m$ ,  $qN$ 이 20  $\mu\text{M}$ 이상에서 상처 처리가 무처리 보다 높게 나타나고 있으며  $F_v/F_m$ 은 차이가 없고  $qP$ 는 무처리 보다 낮았다.

(9) 염 스트레스에서 벼(*Oryza sativa* L.) 내염성 품종과 감수성 품종의 발아와 유묘 생육에 대한 자스몬산과 ABA 처리 효과

식물체의 스트레스 내성과 연관된 식물 호르몬 JA와 ABA의 NaCl 내성과의 연관성이 발아 종자에 대한 내염성 품종과 감수성 품종간의 차이에 미치는 영향을 검토 하였다. 발아율은 내염성 품종이 NaCl 13.3 ds/m 에서도 발아에는 영향이 없었지만 감수성 품종은 30 %의 발아 억제를 나타냈으며, JA와 ABA 처리구에서 내염성 품종의 발아는 JA에 영향을 받지 않지만 감수성 품종은 NaCl과 JA 처리 농도의 증가에 따라 발아에 큰 영향을 받았고, ABA는 모든 품종의 발아를 95 %이상 억제하였다. 초장 생육에 대한 영향에서 감수성 품종이 내염성 품종에 비하여 3

0~50 %의 생육 저해를 나타냈으며, JA와 ABA 모두 초장 신장 억제를 가져왔으며, 특히 ABA는 90 %이상의 억제효과를 보였다. 뿌리의 생육에 대한 JA와 ABA의 영향은 발아율과 초장의 생육 저해와 동일하게 ABA에서는 뿌리의 생육을 거의 볼 수 없었으며, 내염성 품종에 비해 감수성 품종에서의 더 많은 생육 억제가 나타났다.

(10) 형질전환체의 병해충 저항성 검정

도열병과 흰잎마름병에 대한 저항성 검정: 낙동벼에 리폭시지나아제 유전자를 도입시킨 형질전환 낙동벼 34개체와 control로 낙동벼에 도열병균을 분무접종하여 형질전환체의 저항성 정도를 조사하였다. 형질전환된 34개체 중에서 9개체는 전혀 발병하지 않았고 나머지 대부분의 개체가 병반 수, 병반 장, 병반 폭, 병반 면적 등에서 낙동벼보다 적어 도열병에 대한 저항성이 현격히 증대되었음을 확인하였다 (Fig. 1). 도열병 검정에 사용한 동일 개체에 흰잎마름병균을 가위 접종한 결과 형질전환체 모두가 병반장이 control인 낙동벼 보다 반 정도로 짧았으며 그 중에서 3개체는 병반장이 매우 짧아 형질 전환체의 흰잎마름병균에 대한 저항성이 증대되었음을 확인하였다.



### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과



## 제 1 절 Homozygous line 선별 및 유전적 안정성 검증

### 1. 옥수수 lipoxygenase 항체 (polyclonal antibody) 제조

#### 가. 서언

옥수수 LOX가 도입된 형질전환 벼에서 옥수수 LOX가 발현되는지 알기 위해서는 전체 단백질을 분리하여 SDS-PAGE와 Western분석을 실시하여야 한다. 이를 위해 대장균에서 옥수수 LOX를 이종발현시켜 정제하였고, 정제된 옥수수 LOX를 토끼에 주사하여 항체를 생산하였다. Western분석에 이 항체를 이용할 수 있는지 검증과 함께 적당량의 항체농도를 결정할 Dot blot 분석을 실시하였다.

#### 나 재료 및 방법

##### 1) 옥수수 Lipoxygenase (LOX) 단백질의 생산 및 항체 제조

항생제(5 ug/ml Ampicillin)가 첨가된 LB broth배지 5 ml에 대장균 BL21(DE3)pLysS/ pRSETB-LOX 균주를 접종하여 37°C에서 overnight 동안 배양했다. 배양된 균주를 동일한 LB broth 배지에 1/100 희석하여 접종하였고, A600 = 0.5 까지 37°C에서 배양한 후 1mM IPTG를 첨가하여 24°C에서 이종발현을 유도하였다. 7시간 후 3,000 rpm, 4°C에서 15 min간 원심분리하여 cell을 회수하고, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 현탁했다. 1 mg/ml lysozyme을 첨가하여 ice에서 30 min 반응시킨 후 1 mM PMSF를 첨가하고, sonication을 실시했다. 13,000 rpm, 4°C에서 1시간동안 원심분리하여 상등액을 얻고, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)로 equilibration된 Ni-column에 옥수수 lipoxygenase (LOX)를 binding시킨 후 Imidazole gradient (0 mM - 500 mM)를 이용해 옥수수 LOX를 정제했다. 정제된 옥수수 LOX로부터 imidazole을 제거하기 위해 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)로 overnight동안 4°C에서 dialysis를 실시했다. 토끼 혈청에서 옥수수 LOX의 항체를 제조하기 위해 2 mg/ml 농도로 농축시켜 AnyGen 회사에 의뢰하였다.

## 2) Dot blot 분석

형질전환 벼(T<sub>1</sub>; 1A1, 1A2, 1A3) 잎을 액체질소와 막자 사발로 잘게 간 후 멸균된 test tube에 담고, lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.2) containing 1 mmole/L of DTT and 32 mg/L of PMSF) 500 ul 첨가하여 현탁시킨 후 전체 단백질을 추출했다. 추출된 전체 단백질의 동일한 양과 부피를 일정한 간격으로 membrane에 blotting 시킨 후 blotting된 membrane를 상온에서 blocking solution (5% skim milk, 0.02% sodium azide, 0.02% tween 20) 10 ml에 1시간 shaking하여 1/100, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/5000배로 희석된 옥수수 LOX 항체 solution에 4시간, 1 X PBS solution (8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 1.44 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)에 5분간 3번 씻었다. 상온에서 2% Bovine Serum Solution에 20분, alkaline phosphatase conjugated secondary antibody solution (1:5,000 희석)에서 1시간, 1 X PBS solution에 10분간 3번 씻은 후 NBT/BCIP solution에서 membrane을 발색시켜 건조시켰다.

### 다. 결과 및 고찰

#### 1) 제조된 옥수수 LOX 항체 (polyclonal antibody) 검증

옥수수 LOX를 정대장균에서 이종발현시켜 정제한 후 옥수수 LOX 항체 제조를 AnyGen 회사에 의뢰하였다. 정제된 옥수수 LOX 와 제조된 옥수수 LOX 항체가 특이적으로 반응이 일어나는지 검증하기 위해 그림 3-1-1과 같이 Western 분석을 실시하였다. 그 결과 정제된 옥수수 LOX의 양이 Western분석의 band intensity와 비례함을 관찰할 수 있었다.

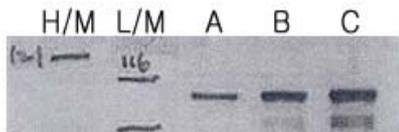


그림 3-1-1. 제조된 옥수수 LOX 항체 검증을 위한 Western 분석. H/M: Higher marker, L/M: Lower marker, A, B, C: 정제된 옥수수 LOX 단백질을 각각 1, 2, 3 ug loading; The horseradish peroxidase conjugated 2nd antibody (1:7500 희석) 사용.

## 2) Dot blot 분석

옥수수 LOX 유전자가 도입된 형질전환 벼(T<sub>1</sub>; 1A1, 1A2, 1A3) 앞에서 전체 단백질을 추출한 후 Western 분석에 사용할 옥수수 LOX 항체 적당량을 결정하기 위해 1/100, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/5000배로 옥수수 LOX 항체를 희석하여 dot blot 분석을 실시하였다. 그 결과 그림 3-1-2에서 형질전환 벼 1A2 line과 정제된 옥수수 LOX에서 강한 발색이 나타났다. 특히 현재 제작 보유한 옥수수 LOX 항체를 1/1,000 또는 1/2,000으로 희석하여 사용할 때 낙동벼에서의 비특이적인 반응없이 형질전환 벼에서 옥수수 LOX 단백질 검출이 가능함을 알수 있다. 이 결과를 근거로 형질전환 벼로부터 옥수수 LOX 단백질의 발현 여부를 관찰하기 위해 확보된 옥수수 LOX 항체를 1/2,000으로 희석하여 실험에 사용하였다.

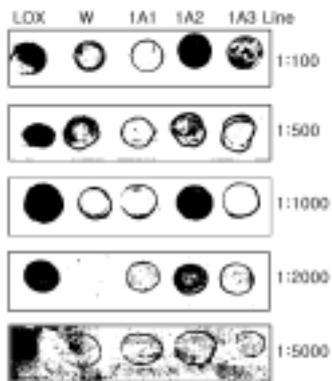


그림 3-1-2. 옥수수 LOX 항체의 적정 사용량 결정을 위한 Dot blotting 분석. The alkaline phosphatase conjugated 2nd antibody (1:5,000 희석) 사용. LOX: 정제된 옥수수 LOX, W: 낙동벼 (negative control), 1A1~1A3: 형질전환 벼 1A T<sub>0</sub>의 progenies.

## 2. Homozygous line 선별 및 유전적 안전성 검증

### 가. 서언

본 연구에서는 이중 위치 특이적인 옥수수 LOX의 생체내 기능 연구와 함께 다양한 스트레스에 대한 반응을 연구하기 위해 유전자 조작기법을 이용하여 옥수수 LOX 유전자를 낙동벼에 도입시켰다. 그러나 형질전환 벼에 도입된 옥수수 LOX는 세대를 거치면서 도태되거나 고정되어진다. 그러므로 옥수수 LOX의 기능연구를 수행하기 위해서는 옥수수 LOX가 안정하게 발현되는 개체 즉 옥수수 LOX 유전자가 고정된 개체를 선별하는 작업이 선행되어야한다. 본 실험에서는 모든 형질전환 벼 T<sub>2</sub>세대들을 대상으로 옥수수 LOX 발현 여부를 Western분석을 통해 확인하고, Western분석을 근거로 옥수수 유전자가 안정하게 고정된 개체 line을 잠정 판단하였다.

### 나. 재료 및 방법

#### 1) 형질전환 벼의 재배

보유하고 있는 모든 개체들의 씨앗들(T<sub>2</sub>; 1A 16 lines)을 각각 암 상태인 32℃ 증류수에서 발아를 유도했다. 발아된 씨앗들은 상토에 파종하여 2주간 28℃ 배양실에서 성장시키고 상토에 수분이 마르지 않도록 유지했다. 2주 후 어린묘를 논으로 옮겨 수확 시기까지 재배했다.

#### 2) 형질전환 벼의 Western 분석

벼 잎 0.1 g을 액체질소와 막자 사발로 잘게 간 후 멸균된 test tube에 담고, lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.2) w/ 1 mmole/L of DTT and 32 mg/L of PMSF) 500 ul 첨가하여 현탁시킨 후 4℃, 600 rpm으로 particle들을 제거하고 상층액을 새로운 test tube로 옮겨 담았다. 각각의 test tube에 상층액 20 ul를 각각 분주하여 5 X sample buffer (60 mM Tris-HCl (pH6.8) w/ 25% glycerol, 20% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, and 0.1% bromophenol blue) 5 ul첨가하고 끓

는 물에 5분 동안 변성시켰다. 준비된 샘플 25 ul를 가지고 8% SDS-PAGE를 실시한 후 stacking gel 부위를 제거하고 cathode buffer (25 mM Tris-HCl (pH9.4), 40 mM Glycine, 10% Methanol)에 15분 shaking시켰다. gel 크기의 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane을 100% methanol에 15초, 멸균수에 2분, anode buffer II (25 mM Tris-HCl (pH10.8), 10% Methanol)에 10분간 순차적으로 equilibration 시킨다. gel 크기의 3 MM whatman paper 6장을 준비하여 3장은 cathode buffer, 2장은 anode buffer I (300 mM Tris-HCl (pH10.8), 10% Methanol), 그리고 1장은 anode buffer II 에 적셨다. semi-dry electroblotter의 anode plate에 anode buffer I 으로 적신 paper 2장, anode buffer II의 1장, membrane, gel, 그리고 cathode buffer 가 적신 3 MM whatman paper 3장 순으로 blotter를 결합시켰다. 130 mA, 1시간 동안 단백질을 gel에서 membrane으로 blotting한 후 membrane를 상온에서 blocking solution (5% skim milk, 0.02% sodium azide, 0.02% tween 20) 10 ml에 1시간, primary antibody solution (1:2,000 희석)에 4시간, 1 X PBS solution (8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 1.44 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)에 5분간 3번 씻었다. 상온에서 2% Bovine Serum Solution에 20분, alkaline phosphatase conjugated secondary antibody solution (1:5,000 희석)에서 1시간, 1 X PBS solution에 10분간 3번 씻은 후 NBT/BCIP solution에서 membrane을 발색시켜 멸균증류수에서 5분간 3번 씻어 건조시켰다.

### 3) Homozygous 형질전환 벼의 line 선별

제조된 옥수수 LOX 항체를 가지고 Western 분석을 실시한 후 각 line별 (T<sub>2</sub>; 1A 16 lines) 옥수수 LOX band 유무를 관찰했다. homozygous line은 실험에 사용된 모든 개체들에서 옥수수 LOX band가 나타나는 line를 잠정적으로 선정했다.

### 4) 유전적 안정성

모든 1A의 T<sub>2</sub>세대들을 Western 분석을 통해 잠정적으로 heterozygous line으로 판명된 경우 Chi-square 값을 산출하여 옥수수 LOX 유전자가 안정적으로 멘델의 분리의 법칙에 따라 분리되어 발현되었는지 알아봤다. 또한 1A의 T<sub>2</sub> 세대에서 잠정적으로 homozygous line으로 판별된 개체들의 씨앗들(T<sub>3</sub> 세대)을 재배하여 옥

수수 LOX가 안정적으로 발현되는지 SDS-PAGE와 Western으로 확인했다.

#### 다. 결과 및 고찰

##### 1) 형질전환 벼에서 옥수수 LOX 발현 여부 검증

위 실험 방법에서 설명한 것과 같이 표 3-1-1에서 제시된 line(T<sub>2</sub>; 1A 16 lines)의 형질전환 벼 511개 씨앗들을 재배하여 각각 전체 단백질을 추출하여 SDS-PAGE를 수행한 후 확보된 옥수수 LOX 항체를 이용하여 Western 분석을 실시하여 옥수수 LOX 발현여부를 판별하였다(그림 3-1-3).

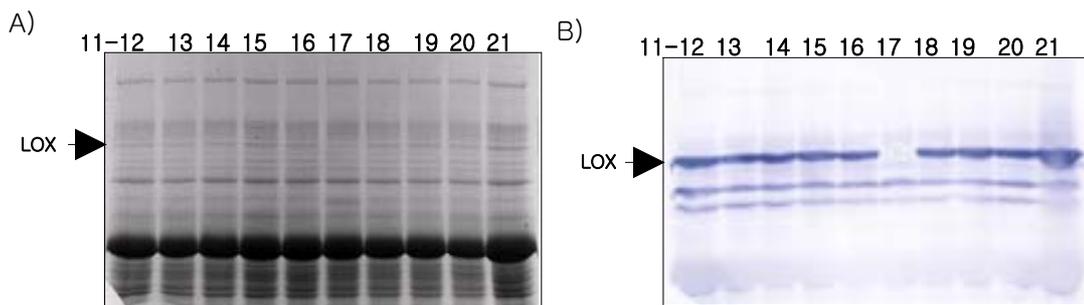


그림 3-1-3. 형질전환 벼 T<sub>2</sub> 세대에서 SDS-PAGE(A)와 Western(B)에 의한 옥수수 LOX 단백질 발현 분석. 11-12~21: 형질전환 벼 1A의 T<sub>2</sub> 세대(1A11 line).

##### 2) Western 분석 결과에 따른 homozygous T<sub>2</sub> line 선별 및 씨앗 확보

SDS-PAGE와 Western 분석을 통해 1A의 T<sub>2</sub> line에서 옥수수 LOX 발현 여부 결과를 표3-1-1에 정리하여 잠정적으로 homozygous와 heterozygous line들을 선별하였다. 특히 heterozygous line 으로 판단된 각 line의 경우 옥수수 LOX 유전자가 안정적으로 멘델의 분리의 법칙에 따라 분리되어 발현되었는지 알아보고자 Chi-square 값을 산출하였다. 그 결과 heterozygous 12개의 line 중 1A13과 1A22만이 옥수수 LOX유전자가 안정적으로 유전되는 것을 확인할수 있었다. 다른 line에서

는 기대했던 빈도수와 차이를 나타냈고, 1A9와 1A20의 경우 심한 차이를 보였다. 이와 같이 예상한 빈도수와 차이를 보이는 것은 외부로부터 도입된 옥수수 LOX 유전자가 불안정하게 다음 세대로 유전되고 있음을 시사한다. 그 외 하나의 line에 속한 모든 개체들이 옥수수 LOX를 발현시키는 1A2, 1A5, 1A12 그리고 1A24 line들을 homozygous line으로 예상되었으나 1A2, 1A5 line의 경우 검증된 개체수가 너무 적어 신뢰도가 떨어져 이 두 line을 제외시켰다. 결국, 1A2와 1A24를 homozygous line으로 잠정적으로 결정하였고, 각각의 line 별로 표 3-1-2와 같이 씨앗들을 확보하였다. 또한 T<sub>3</sub> 세대(1A24 line)에서 옥수수 LOX가 안정적으로 발현되는 것을 SDS-PAGE와 Western으로 확인했다.

표 3-1-1. Western 분석 결과에 따른 옥수수 LOX 발현 여부 결과.

T <sub>2</sub> 1A의 T <sub>3</sub> Lines	검증된 개체 수	옥수수 LOX 발현 여부		Expected ratio	X <sup>2</sup>	잠정적인 판별
		LOX <sup>+</sup>	LOX <sup>-</sup>			
1A2	36	36	0	-	-	+++
1A4	33	28	5	3:1	2.253	-
1A5	2	2	0	-	-	++
1A6	23	20	3	3:1	4.482	-
1A8	46	31	15	3:1	0.290	--
1A9	23	1	22	3:1	442.333	+
1A10	19	16	3	3:1	1.810	-
1A11	12	6	6	3:1	1.333	-
1A12	3	3	0	-	-	+
1A13	42	32	10	3:1	0.013	---
1A17	34	31	3	3:1	17.924	-
1A20	32	31	1	3:1	261.333	+
1A21	45	28	17	3:1	0.610	--
1A22	36	27	9	3:1	0.000	---
1A23	47	37	10	3:1	0.163	--
1A24	78	78	0	-	-	+++

X<sup>2</sup>: Chi-Square, homozygous 확신 정도: +++>+, heterozygous 확신 정도: --->-->-

표 3-1-2. T<sub>3</sub> line의 수확량 조사.

T <sub>2</sub> 1A의 T <sub>3</sub> Lines	개체수	목수/개체	날알수/목	쪽쟁이수/목	날알수/개체	총수확량
1A2	26	21	74.4	23.7	1563	40638
1A4	21	18	66.9	49.1	1204	25284
1A5	2	32	44.6	54.4	1428	2856
1A6	23	21	50.7	15.7	1065	24495
1A8	27	27	30.8	34.4	831	22437
1A9	23	22	27.7	31.4	609	14007
1A10	19	19	46.3	33.6	880	16720
1A11	12	16	65.2	17.6	1043	12516
1A12	3	27	53	46.3	1431	4293
1A13	24	21	69.1	29.6	1451	34824
1A17	21	23	51.6	33.8	1187	24927
1A20	32	30	59.2	45.6	1776	56832
1A21	28	22	57.9	34.2	1274	35672
1A22	24	20	59.6	21.2	1192	28608
1A23	31	23	75.3	20.4	1733	53723
1A24	63	17	89.6	33.2	1523	95949

### 3. 형질전환 벼의 Southern 분석

#### 가. 서언

형질전환벼에서 리폭시지나아제 유전자의 도입 여부와 copy수를 확인하기 위하여 T<sub>0</sub>세대의 형질전환 벼에 대하여 Southern 분석을 수행하였다.

#### 나. 재료 및 방법

T<sub>0</sub>세대 4개 line(1A, 2A, 3A, 4A) 형질전환 벼 잎 0.4 g을 액체질소와 막자사발로 잘게 간 후 멸균된 test tube에 0.1 g씩 나누어 담아 -70℃에 보관하여 genomic DNA를 추출할 때 사용하였다. Genomic DNA는 QIAGEN Plant Miniprep Kit (QIAGEN)를 사용하여 추출한 후 Hind III 제한 효소로 완전히 절단하였다. 절단된 genomic DNA는 0.7 % agarose gel에 전기영동 후 capillary 방법으로 gel에서 nylon membrane (Hybond<sup>TM</sup>-NX, Amershan Pharmacia Biotech, UK)으로 이동시켰고, UV crosslinker (Bio-Link BLX-25A, Vilber Lourmat. com)로 membrane에 genomic DNA를 고정시켰다.

혼성화 병에 10 ml prehybridization solution (250 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> w/ 7 % SDS, 10 mM EDTA, 0.1 g BSA)과 genomic DNA가 흡착된 membrane를 넣고 60℃에서 3~5시간 진탕시켰다. 옥수수의 리폭시지나아제 cDNA를 Nco I과 Bam HI 제한 효소로 절단한 단편(953 bp)을 주형으로하여 얻은 P<sup>32</sup>-CTP로 표기된 probe를 혼성화 병에 첨가하여 12시간 이상 혼성화 시켰다. 세척액 (2 X SSC, 0.1 % SDS)으로 60℃에서 15분간 2번 그리고 새로운 세척액 (0.2 X SSC, 0.1 % SDS)으로 60℃에서 20분간 geiger counter로 background가 거의 없어질 때까지 씻은 후 2 X SSC에 적신 3 MM paper 위에 membrane을 올려놓고, wrap으로 싸 후 감광판에 24시간 동안 암실에서 노출시켜 phosphoimager로 signal을 검출하였다.

#### 다. 결과 및 고찰

T<sub>0</sub>세대 형질전환 벼 내에 옥수수 리폭시지나아제 유전자가 몇 개 도입되었는지 알기위해 4개 개체 (1A, 2A, 3A, 4A)로 부터 genomic DNA를 추출하여 그림 3와 같은 southern 결과를 얻었다. southern 분석을 통해 T<sub>0</sub>세대 중 1A line에서 옥수수 리폭시지나아제 유전자가 1 copy 수로 도입되어있음을 확인했고, 1A line의 개체들만을 다음 실험에 이용하였으며, T<sub>0</sub>에서 리폭시지나아제 유전자가 1 copy로 들어 있음을 확인하였으므로 T<sub>1</sub>세대부터는 Western 분석을 이용하여 단백질 발현을

확인하였다.

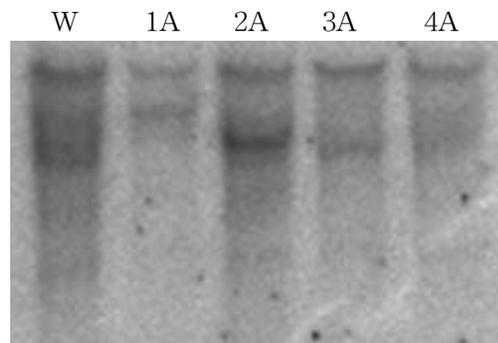


그림 3-1-4. 낙동벼(W)와 TO 형질전환 벼(1A, 2A, 3A, 4A)에서 옥수수 리폭시지나아제 유전자의 southern 분석

## 제 2 절 옥수수 LOX가 도입된 형질전환 벼의 특성 연구

### 1. 형질전환 벼에서 LOX활성 측정 및 Malondialdehyde (MDA) 함량 분석

#### 가. 서언

LOX는 식물체의 생체막을 구성하는 주요성분 linoleic acid와 linolenic acid를 hydroperoxydation시키는 효소로 이들 생성 산물들은 자스몬산 생합성에 이용되거나 다양한 스트레스 반응에 대한 방어기작을 활성화 시킨다. 본 연구에서 사용된 형질전환 벼에서 옥수수 LOX유전자가 발현되어 활성을 가질 경우 기질들과 반응하여 lipid peroxidation이 일어날 수 있다. 이를 확인하고자 LOX 활성과 lipid peroxidation의 지표물질인 MDA함량을 형질전환 벼와 낙동벼에서 측정하였다.

#### 나. 재료 및 방법

##### 1) 형질전환 벼의 재배

보유하고 있는 homozygous seed(T<sub>3</sub>; 1A24)들을 암상태인 32℃ 증류수에서 발아를 유도했다. 발아된 씨앗들은 상토에 파종하여 두달 간 28℃ 배양실에서 성장시키고 상토에 수분이 마르지 않도록 유지했다.

##### 2) LOX 활성 측정

벼 잎으로부터 전체 단백질을 Ali방법(Ali et al. 2005)으로 추출하여 BCA 방법으로 전체 단백질의 농도를 측정하였다(Smith et al. 1985). LOX의 활성은 50 mM Tris-HCl (pH7.2) w/ 0.25 mM linolenic acid에 추출된 전체 단백질량을 0.085 ug, 0.170 ug, 0.255 ug, 0.340 ug과 같이 첨가하여 234 nm( $\epsilon_{234} = 25000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )에서 흡광도를 측정하여 전체 단백질 농도 변화에 따른 효소의 활성을 계산하였다.

##### 3) MDA 함량 측정

1 g 벼 잎에 액체질소를 부어가며 곱게 갈고 5 ml의 100 mM Tris-HCl

(pH 7.4) w/ 1.5% PVP(polyvinyl pyrrolidone)를 첨가하여 혼합하였다. 12,000 g, 30분 동안 원심분리하여 상층액 1 ml을 4 ml의 20% trichloroacetic acid w/ 0.5% thiobarbituric acid에 혼합하였다. 혼합액을 90°C, 30분 가열하여 ice 에 식힌 후 12,000 g, 30분 원심분리하였다. 상층액의 흡광도를 532, 600 nm에서 측정하였다. 532 nm의 흡광도로부터 600 nm의 흡광도를 제한 후 MDA의 extinction coefficient,  $155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 을 이용하여 계산하였다.

#### 다. 결과 및 고찰

옥수수 LOX가 도입된 형질전환 벼에서 이 유전자가 발현되어 활성을 가지는지 확인하기 위해 linolenic acid를 기질로 하여 활성을 측정하였다. 그 결과 그림 3-2-1(A)에서 보듯이 형질전환 벼에서 낙동벼보다 3배 이상 활성이 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 또한 생체 내에서 hydroperoxy linoleic acid와 hydroperoxy linolenic acid의 생성이 이루어지를 연구하기 위해 lipid peroxidation의 지표물질인 MDA함량을 형질전환 벼와 낙동벼에서 측정하였다. 그 결과 그림 3-2-1(B)에서 볼 수 있듯이 형질전환 벼에서 MDA함량이 더 높음을 확인하였다. 이는 형질전환 벼에서 옥수수 LOX에 의한 lipid peroxidation이 일어나고 있음을 보여 주고있다.

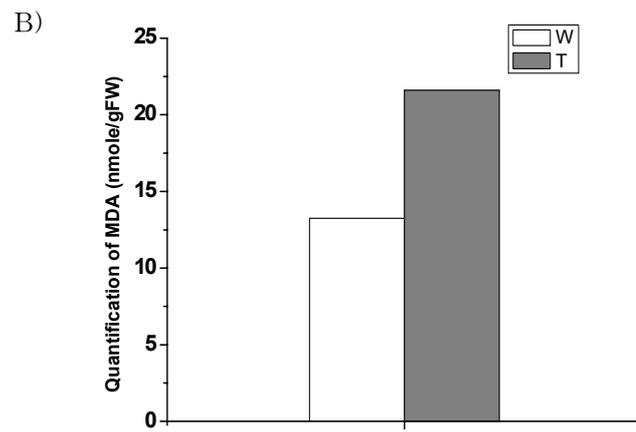
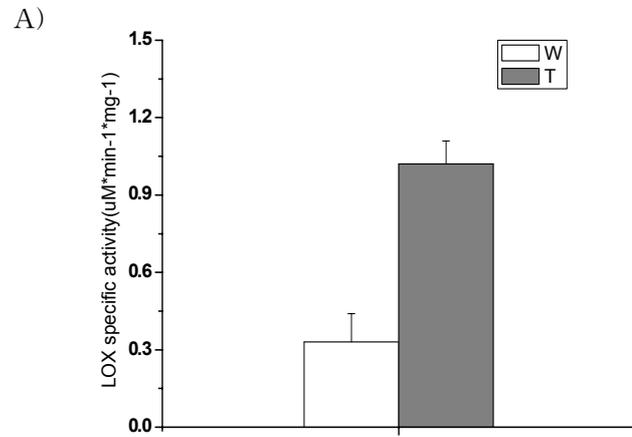


그림 3-2-1. 옥수수 LOX가 도입된 형질전환 벼(T)와 낙동벼(W)에서의 LOX활성(A)과 MDA함량(B) 조사.

## 2. 옥수수 LOX가 도입된 형질전환 벼에서 hydroperoxy fatty acid들의 positional specificity 분석

### 가. 서언

옥수수 LOX가 도입된 형질전환 벼에서 lipid peroxidation 지표물질인 MDA 함량을 측정함으로써 옥수수 LOX에 의해 lipid peroxidation이 낙동벼보다 많이 일어남을 확인했다. 본 연구에서는 옥수수 LOX에 의해 무슨 생성물들이 생성되는지 알아보기 위해 기질인 linoleic acid와 linolenic acid를 각각 feeding시켰고, HPLC를 이용하여 생성산물들의 위치 특이성을 연구하였다.

### 나. 재료 및 방법

#### 1) 형질전환 벼의 재배

보유하고 있는 homozygous(T<sub>3</sub>; 1A24) seed들을 암상태인 32°C 증류수에서 발아를 유도했다. 발아된 씨앗들은 상토에 파종하여 한달 간 28°C 배양실에서 성장시키고 상토에 수분이 마르지 않도록 유지했다.

#### 2) Substrate feeding

벼의 줄기를 절단한 후 50 mM Tris-HCl (pH 7.2) w/ 0.025% Tween20, 50 mM Tris-HCl (pH 7.2) w/ 0.025% Tween20과 0.25 mM linoleic acid, 50 mM Tris-HCl (pH 7.2) w/ 0.025% Tween20과 0.25 mM linolenic acid에 28°C, 10시간 동안 기질을 feeding시켰다. feeding된 0.5 g의 벼 잎을 액체질소를 이용하여 막자사발로 잘게 간 후 acetone: 50 mM citric acid (70:30, v/v) w/ sodium borohydride에 첨가하여 overnight동안 진탕시켰다. 진탕된 샘플을 원심분리기로 상층액만을 수거한 후 rotary evaporator로 acetone를 휘발시켰다. 분별 깔대기에서 3번 반복하여 10 ml diethyl ether로 acetone이 제거된 수용액 샘플과 혼합한 후 ether 부분을 회수하였다. 회수된 ether 용액을 10 ml 유리 주사기로 취해 aminopropyl cartridge에 통과시킨 후 7 ml chloroform: isopropanol (2:1 v/v) 용액으로 cartridge를 세척했다.

10 ml diethyl ether: acetic acid (98:2 v/v) 용액을 cartridge에 통과시켜 LOX 생성 산물들을 추출하였다. 추출물로부터 유기용매를 제거하기 위해 40°C에서 1 ml이하 까지 휘발시킨 후 1 ml glass vial에 옮겨 speed vacuum drier로 완전히 건조시켰다.

### 3) 옥수수 LOX 생성산물의 Positional specificity 분석

위 추출물을 reverse phase solvent(methanol: H<sub>2</sub>O: acetic acid; 80:20:0.1, v/v/v)로 녹인 후 Shimazu HPLC system(Shimazu, Japan)에 주입했다. Shimazu HPLC는 CBM 10A 조절기, SPD 10A VP 검출기, LC10A VP 펌프 그리고 Shim-Pack CLC 컬럼(250 mm x 4.6 ID, 5 ul particle size)이 연결됐고, 유속 0.5 ml/min으로 234 nm에서 LOX 생성 산물을 monitoring 하였다.

#### 다. 결과 및 고찰

옥수수 LOX가 도입된 형질전환 벼에서 lipid peroxidation이 낙동벼보다 더 많이 유도됨을 MDA 함량을 측정하여 확인하였다. 이와 같은 결과가 형질전환 벼에서 옥수수 LOX의 반응에 의해 나타나는지 확인하고자 형질전환 벼에서 LOX의 반응산물들을 추출하여 옥수수 LOX의 반응산물들의 positional specificity를 연구하였다. 그림 3-2-2와 표 3-2-1에서 낙동벼의 hydroperoxy linoleic acid와 hydroperoxy linolenic acid 비가 5.4:4.6인 반면, 형질전환벼에서는 2.9:7.1를 나타냈다. 낙동벼에서 hydroperoxy linoleic acid의 경우 9-form의 비가 더 높았고, hydroperoxy linolenic acid 경우 13-form이 더 높았다. 이는 낙동벼에서 linoleic acid는 9-LOX와 linolenic acid는 13-LOX와 기질 특이적으로 반응하는 것으로 보인다. 형질전환 벼에서는 hydroperoxy linolenic acid 생성물의 비가 hydroperoxy linolenic acid보다 높게 나타났다. 이는 linolenic acid가 linoleic acid보다 더 많이 생체내에서 이용되고 있음을 보여주고 있다. 또한 hydroperoxy linolenic acid의 9-과 13-form 비가 거의 1:1인 반면 hydroperoxy linoleic acid의 경우 9-과 13-form의 비가 3.6:6.4로 나타났다.

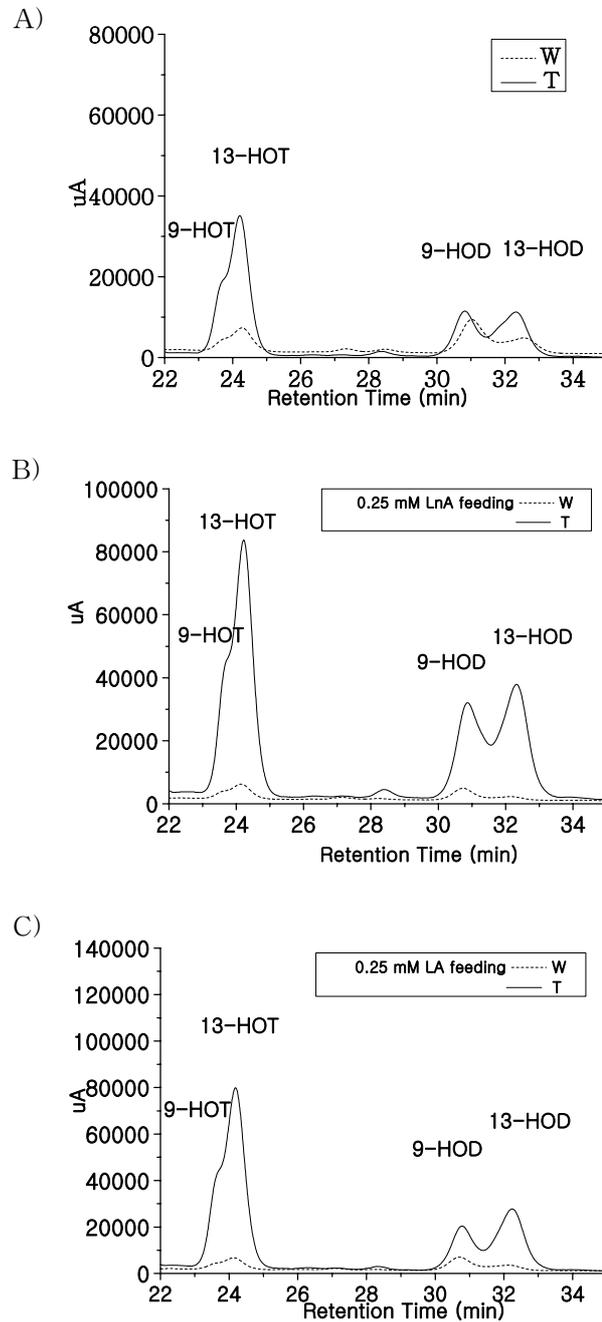


그림 3-2-2. LOX의 기질을 feeding한 형질전환 벼(T)와 낙동벼(W)로부터 Reverse Phase-HPLC에 의한 LOX 반응산물 분석. A) Buffer(50 mM Tris-HCl, pH7.2, w/ 0.025% Tween 20) Feeding, B) Buffer w/ 0.25 mM linolenic acid(LnA) Feeding, C) Buffer w/ 0.25 mM linoleic acid(LA).

표 3-2-1. LOX의 기질을 feeding한 형질전환 벼(T)와 낙동벼(W)로부터 LOX 반응산물의 positional specificity 분석.

반응산물	In vivo					
	낙동벼			형질전환 벼		
	Buffer-feeding	LA-feeding	LnA-feeding	Buffer-Feeding	LA-feeding	LnA-feeding
9-HOD	35.8%	32%	28%	14.7%	16%	11.8%
13-HOD	18.5%	16.3%	12.2%	14.5%	19%	16.1%
9-HOT	17.8%	21%	24%	25.2%	23.2%	25.7%
13-HOT	27.9%	30.7%	35.8%	45.6%	41.8%	46.4%
HOD: HOT	54.3:45.7	48.3:51.7	40.2: 59.8	29.2:70.8	35:65	27.9:72.1
9-:13-HOD	6.6:3.4	6.6:3.4	7.0:3.0	5:5	4.6:5.4	4.2:5.8
9-:13-HOT	3.9:6.1	4.1:5.9	4.0:6.0	3.6:6.4	3.6:6.4	3.6:6.4

### 3. 옥수수 LOX가 도입된 벼 잎의 지방산 조성 분석

#### 가. 서언

MDA 함량과 LOX 반응 생성물들의 비를 연구함으로써 형질전환 벼에서 옥수수 LOX 반응에 의해 lipid peroxidation이 낙동벼보다 더 많이 이루어지고, 이들 생성물의 비에 많은 변화가 나타났다. 이는 형질전환 벼에서 옥수수 LOX의 반응에 의해 더 많은 기질의 소모가 이루어졌음을 의미한다. 즉, 옥수수 LOX의 기질 선호도에 따라 특정 지방산이 소모됨으로써 낙동벼의 전체 지방산 조성비와 차이가 나타날 수 있음을 의미한다. 실제로 형질전환 벼와 낙동벼의 지방산 조성비가 변했는지를 알아보기 위해 전체 지질을 추출하여 GC를 통해 각 지방산 조성비를 표 3-2-2와 같이 비교 분석하였다.

#### 나. 재료 및 방법

##### 1) 형질전환 벼의 재배

보유하고 있는 homozygous T<sub>3</sub>(1A24 line)seed들을 암상태인 32℃ 증류수에서 발아를 유도했다. 발아된 씨앗들은 상토에 파종하여 한달 간 28℃ 배양실에서 성장시키고 상토에 수분이 마르지 않도록 유지했다.

##### 2) 전체 지질 추출

10 mg의 벼 잎을 액체질소를 이용하여 막자사발로 잘게 간 후 5 ml isopropanol, 5 ml methanol, 20 ml chloroform에 순차적으로 혼합하고 255 ug butylated hydroxytoluene을 첨가하였다. 혼합액을 4℃에서 90분간 현탁하고, 10 ml potassium chloride solution(8 g/ 100 ml)을 첨가하여 overnight 동안 4℃에서 진탕시켰다. Folch방법으로 수용액 층을 제거하고 전체 지질을 1 ml chloroform에 추출했다. 이 지질을 0.6 M sodium hydroxide로 methylester화 한 후 0.6 M hydrochloric acid로 중화하였다. methyl ester들을 hexane으로 추출하고 Strabilwax(R)컬럼(30 m x 0.32 mm ID x 0.25 um df, Resteck, USA)과 Flame

Ionization Detector(Shimadzu, Japan)가 장착된 GC(GC-17B, Shimadzu, Japan)로 전체 지질의 지방산 조성을 분석하였다. 지방산 분석을 위해 GC injector와 detector 온도는 225℃, 275℃로 설정하였고, 압력은 50 kpa을 유지하였다. 컬럼온도는 140℃에서 1분, 140-210 ℃에서 2℃/min으로, 그리고 210℃에서 10분간 순차적으로 변화시켰다. Double Bond Index(DBI)는  $[(2 \times \% C18:2) + (3 \times \%C18:3)]/[(\% C16:0) + (\%C18:0) + (\% C18:1)]$ 과 같이 Wismer 공식을 이용하였다.

#### 다. 결과 및 고찰

형질전환 벼에서 옥수수 LOX에 의한 lipid peroxidation이 낙동벼보다 더 많이 이루어 지고있음을 MDA함량 비교 분석을 통해 확인하였다. 또한 기질의 feeding에 의한 LOX 생성산물들의 positional specficity 결과에서는 옥수수 LOX에 의해 생성물들의 각각의 비가 변화되었음을 관찰하였다. 이는 형질전환 벼에서 옥수수 LOX의 기질이 되는 linolenic acid와 linoleic acid가 낙동벼보다 더 많은 소모가 일어났음 의미한다. 실제로 이를 확인하기 위해 형질전환 벼와 낙동벼의 전체 지질 조성비를 관찰하여 확인하였다. 표 3-2-2에서 볼수 있듯이 형질전환 벼의 18:2/16:0, 18:3/16:0 그리고 DBI값이 낙동벼보다 조금 낮음을 확인할 수 있었다. 이는 MDA함량 측정 결과와 일치한다. 특히 18:3/16:0비가 더 낮게 나타난 결과는 기질이 feeding된 형질전환 벼에서 linolenic acid의 소모가 더 많이 일어난 결과와 일치함을 확인할 수 있었다.

표 3-2-2. 지방산의 조성 분석.

	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	18:2/16:0	18:3/16:0	DBI
낙동벼 (%)	17.61	0.09	4.31	1.26	10.17	66.56	0.58	3.78	9.46
형질전환 벼 (%)	21.02	0.12	4.30	1.12	9.57	63.77	0.46	3.03	7.90

#### 4. Electrolyte leakage

##### 가. 서언

형질전환 벼에서 옥수수 LOX가 생체내의 linolenic acid 그리고 linoleic acid와 반응하는 것을 확인하였다. 생체내 옥수수 LOX의 기질로 사용되는 linolenic acid와 linoleic acid는 세포막의 주 성분으로 lipase의 활성화에 의해 세포막에서 떨어져 나온다. 본 연구에서는 형질전환 벼의 옥수수 LOX에 의해 세포막의 주 성분인 linolenic 과 linoleic acid가 소모됨에 따라 세포막의 ion 투과성에 어떠한 영향을 주는지 연구하기 위해 형질전환 벼와 낙동벼의 잎으로부터 전기전도도를 측정하였다.

##### 나. 재료 및 방법

###### 1) 형질전환 벼의 재배

보유하고 있는 homozygous T<sub>3</sub>(1A24 line) seed들을 암상태인 32℃ 증류수에서 발아를 유도했다. 발아된 씨앗들은 상토에 파종하여 한달 간 28℃ 배양실에서 성장시키고 상토에 수분이 마르지 않도록 유지했다.

###### 2) Ion leakage 측정

비형질전환 벼와 형질전환 벼에서 ion leakage 측정은 Conductivity/TEMP Meter C75 (ISTECK, Korea)를 이용하여 다음과 같이 수행하였다. 형질전환 벼와 낙동벼의 잎을 직경 1 cm 간격으로 절단하여 mutiple petridish에 담근 후 3차 증류수 15 ml을 첨가 하였다. 시간에 따른 증류수의 전기전도도를 측정하였고, 벼 잎의 ion leakage는 전기전도도 intensity (uS/g)로 표현하였다.

##### 다. 결과 및 고찰

형질전환 벼에서 MDA함량이 높게 나타나고, hydroperoxy linoleic acid와

hydroperoxy linolenic acid의 비의 차이가 뚜렷했으며, 세포막의 지방산 조성비 중 18:2/16:0, 18:3/16:0 그리고 DBI값이 낙동벼보다 조금 낮음을 전 연구를 통해 확인하였다. 이는 형질전환 벼에서의 산화적 스트레스가 옥수수 LOX의 반응에 의해 유도됨을 의미한다. 식물체 내에서 이러한 옥수수 LOX반응이 ion의 막투과성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 conductivity를 측정하여 보았다. 그림 3-2-3에서 보듯이 형질전환 벼 잎에서 초기에 급격한 ion의 누출이 이루어 지면서 낙동벼 잎보다 빨리 포화상태에 도달하는 것을 확인할 수가 있었다. 잎으로부터 ion leakage를 측정하기 위해 잎을 일정한 간격으로 절단하여 일정한 시간 간격으로 전기전도도를 측정하였다. 즉 잎에 상처를 가해 ion의 누출정도를 측정한 것으로 형질전환 벼에서 빨리 상처에 대한 반응이 이루어 지고있는 것 같이 보인다.

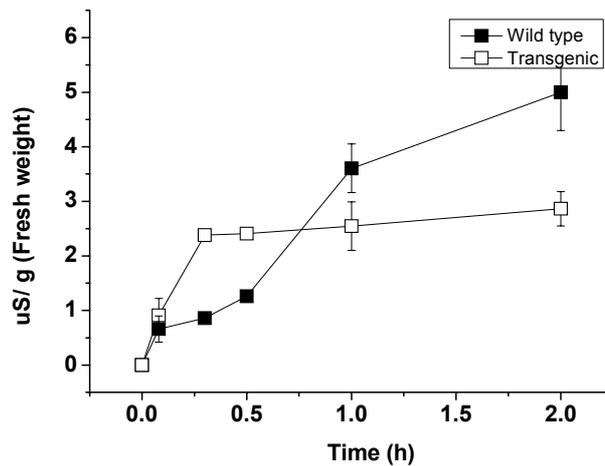


그림 3-2-3. 형질전환 벼(T)와 낙동벼(W) 잎에서의 ion 누출 측정.

## 5. 형질전환 벼에서 항산화 효소의 활성 측정

### 가. 서언

LOX 반응 생성산물인 hydroperoxy fatty acids은 산화 스트레스 인자로 항산화 system을 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 옥수수 LOX가 도입된 형질전환 벼에서 축적된 옥수수 LOX 반응 생성산물이 항산화 system을 활성화 시키는지 확인하기 위해 대표적인 항산화 효소인 Superoxide dimutase(SOD), Catalase(CAT), Peroxygenase(POD)와 LOX 반응 산물을 기질로 취하는 Hydroperoxy lyase(HPL)의 활성을 측정하였다.

### 나. 재료 및 방법

#### 1) 형질전환 벼의 재배

보유하고 있는 homozygous T<sub>3</sub>(1A24 line) seed들을 암상태인 32℃ 증류수에서 발아를 유도했다. 발아된 씨앗들은 상토에 파종하여 두 달 간 28℃ 배양실에서 성장시키고 상토에 수분이 마르지 않도록 유지했다.

#### 2) 항산화 효소 활성 측정

벼 잎으로부터 전체 단백질을 Ali방법(Ali et al. 2005)으로 추출하여 BCA 방법으로 전체 단백질의 농도를 측정하였다(Smith et al. 1985). Superoxide dimutase(SOD) 활성측정은 NADH를 사용하여 nitroblue tetrazolium의 reduction을 monitoring하였다(Beyer and Fridovich 1987). Catalase(CAT) 활성은 50 mM phosphate buffer(pH7.0) w/ 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 초기 감소를 240 nm에서 측정하였다(Aebi 1974). Peroxygenase(POX) 활성은 50 mM phosphate buffer(pH7.0) w/ 20 mM guaiacol과 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 초기 감소를 470 nm에서 측정하였다(Putter 1974). Hydroperoxide lyase(HPL) 활성은 50 mM Tris-HCl(pH7.2) w/ 2.5 mM linolenic acid, soybean LOX, 5 unit alcohol dehydrogenase 그리고 5 mM NADH의 반응액에 전체 단백질을 첨가하여 NADH의 감소를 340 nm에서

monitoring하였다(Vick 1991).

다. 결과 및 고찰

형질전환 벼에서 옥수수 LOX에 의해 생성된 hydroperoxy fatty acid들이 항산화 system을 활성화 시키는지 확인한 결과 형질전환 벼에서 SOD활성은 약 3배, CAT은 2배, POD은 1.9배 그리고 HPL은 4.7배 높았다(표 3-2-3). 이는 형질전환 벼에서 옥수수 LOX 반응에 의한 lipid peroxidation 때문에 항산화 system이 더 높게 활성화된 것으로 보인다.

표 3-2-3. 항산화 효소의 specific activity.

	SOD ( Units*mg <sup>-1</sup> )	CAT (uM*min <sup>-1</sup> *mg <sup>-1</sup> )	POD (uM*min <sup>-1</sup> *mg <sup>-1</sup> )	HPL (uM*min <sup>-1</sup> *mg <sup>-1</sup> )
낙동벼	11.37 ± 0.24	18.37 ± 0.98	455.89 ± 07.15	8.7 ± 0.71
형질전환 벼	39.42 ± 1.9	36.97 ± 3.3	854.51 ± 29.1	41.07 ± 0.41

## 6. 형질전환 벼의 자스몬산과 Salicylic acid 함량 분석

### 가. 서언

자스몬산은 식물체에 존재하는 생장조절 물질로(Meyer et al.1984) 상처나 병해충 등의 환경 스트레스에 반응하여 각종 단백질들 생산하는 유전자를 활성화시키는 signal 역할을 한다(Creelman et al. 1992, Farmer & Ryan 1992, Staswick 1992, Mueller et al. 1993). 자스몬산의 생합성은 LOX가 linolenic acid와 반응함으로써 시작된다. 벼에 옥수수 LOX가 도입됨에 따라 자스몬산의 함량 변화가 있는지 확인하였다. 또한 상처입은 벼에서 자스몬산의 함량변화가 Salicylic acid 함량 변화와 서로 반대되는 현상이 보고되어짐에 따라 자스몬산의 함량과 Salicylic acid 함량을 측정하였다.

### 나. 재료 및 방법

#### 1) 형질전환 벼의 재배

보유하고 있는 homozygous T<sub>3</sub>(1A24 line)세대 씨앗들을 암상태인 32℃ 증류수에서 발아를 유도했다. 발아된 씨앗들은 상토에 파종하여 두달 간 28℃ 배양실에서 성장시키고 상토에 수분이 마르지 않도록 유지했다.

#### 2) 자스몬산 추출

0.5 g의 벼를 액체질소를 이용하여 막자사발로 잘게 간 후 internal standard (100 ug prostagrandin A1)를 첨가하였다. 10 ml acetone: 50mM citric acid (7:3 v/v) 혼합용액을 준비된 샘플에 넣고 12시간, 6시간, 그리고 3시간동안 각각 4℃에서 진탕시켰다. 진탕된 샘플을 원심분리기로 상층액만을 수거한 후 상온에서 하루밤동안 acetone를 휘발시켰다. 분별 깔대기에서 3번 반복하여 10 ml diethyl ether로 acetone이 제거된 수용액 샘플과 혼합한 후 ether 부분을 회수하였다. 회수된 ether 용액을 10 ml 유리 주사기로 취해 aminoprophyl cartridge에 통과시킨 후 7 ml chloroform: isopropanol (2:1 v/v) 용액으로 cartridge를 세척했다. 10 ml

diethyl ether: acetic acid (98:2 v/v) 용액을 cartridge에 통과시켜 자스몬산을 추출하였다. 추출물로부터 유기용매를 제거하기 위해 40°C에서 1 ml이하까지 휘발시킨 후 1 ml glass vial에 옮겨 speed vacuum drier로 완전히 건조시켰다. 유기용매가 완전히 건조된 1 ml glass vial에 20 ul TMS를 첨가하여 85°C에서 5분간 silylation 시켜 GC-MS 분석을 실시하였다.

### 3) Salicylic acid 추출

0.5 g의 벼 잎을 액체질소를 부어가며 곱게 갈고 4 mL의 70 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH7.4)와 1 µg의 internal standard (propyl paraben)를 넣어 vortex했다. deionized water 1 mL, 3 N HCl 1 mL, chloroform 2 mL을 순서대로 넣으며 완전히 섞이도록 하였고 chloroform 층만 취하여 모두 휘발시킨 후 Tri-Sil 20 µL을 넣고 85°C에서 5분간 silylation하여 GC-MS-SIM으로 분석하였다.

### 4) GC-MS 분석 방법

벼로부터 추출된 자스몬산과 salicylic acid를 분석하기 위해 GC-MS (Agilent 19091S-433)를 사용하였다. 20 ul TMS로 silylation된 추출물 1 ul를 GC HP-5MS column (30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 um film thickness)에 주입하였다. 자스몬산과 salicylic acid 분석을 위해 GC injector와 detector 온도는 260°C, 300°C로 설정하였고, column 온도는 100°C에서 1분, 100-160°C에서 20°C/min으로, 160-170°C에서 1°C/min, 170~280°C에서 20°C/min, 그리고 280°C에서 5.5분간 순차적으로 변화시켰다. 벼에서 자스몬산과 salicylic acid만을 선택적으로 각각 분석하기 위해 mass의 SIM (selective ion monitoring) mode를 이용하였다. 자스몬산과 prostangrandin A1을 위해 이들의 mass spectra인 117, 151, 282과 319, 409, 480 m/z을 monitor하였고, salicylic acid와 propyl paraben을 위해서는 193, 252, 267, 282 m/z을 monitor하였다.

## 다. 결과 및 고찰

식물의 스트레스 반응기작의 signal로 작용하는 자스몬산의 생합성은 LOX

의 반응산물인 13(S)-hydroperoxy linolenic acid에 의해 시작되어진다. 본 연구에서 이용된 이중 위치 특이적인 옥수수 LOX는 linolenic acid와 linolenic acid를 각각 기질로 취해 9(R/S)-/13(R/S)-hydroperoxy linolenic acid와 9(R/S)-/13(R/S)-hydroperoxy linolenic acid를 생성시킨다. 옥수수 LOX가 자스몬산 생합성에 직접적으로 관여하는지를 알아보기 위해 형질전환 벼의 자스몬산 함량 변화 관찰하였다. 그 결과 형질전환 벼와 낙동벼 사이에 자스몬산 함량의 변화에 큰 차이를 볼 수 없었다(그림 3-2-4, A). 그러나 Salicylic acid함량은 형질전환 벼에서 감소한 것을 확인하였다 (그림 3-2-4, B).

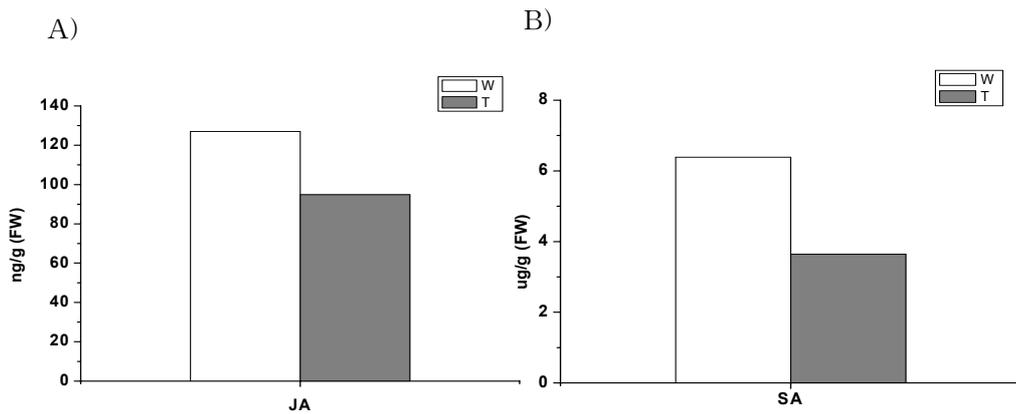


그림 3-2-4. 형질전환 벼(T)와 낙동벼(W)에서 자스몬산(JA)과 Salicylic acid(SA) 함량 분석.

## 7. 형질전환 벼에서 LOX의 subcellular localization

### 가. 서언

형질전환벼에서 도입된 유전자에 의하여 생성되는 리폭시지나아제 단백질의 세포내 존재 위치를 확인하고자 하였다. 대표적인 방법으로 GFP fusion 단백질을 이용하는 방법과 세포내 소기관을 분리하여 리폭시지나아제의 존재 위치를 확정하는 방법을 들 수 있다. 리폭시지나아제 단백질의 분자량(100 kDa)을 고려할 때, GFP fusion에 의한 fusion 단백질의 분자량이 매우 클 것으로 예상되었으며, 벼에서 LOX-GFP fusion 단백질의 생성이 원활하게 이루어질 수 없을 가능성을 배제할 수 없었다. 따라서 본 연구에서는 Sucrose 농도구배에 따른 chloroplast 분리 방법을 이용하였다

### 나. 재료 및 방법

#### 1) Sucrose 농도구배에 따른 chloroplast 분리

T<sub>2</sub>세대 1A24 line의 형질전환 벼에서 chloroplast를 Munne-Bosch의 방법에 따라 다음과 같이 분리했다. 형질전환 벼 잎 5 g에 isolation buffer(10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 0.5 M sorbitol, 50 mM tricine, 1 mM dithiothreitol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, 1 mM BHT and 0.1 % BSA) 20 ml을 첨가한 후 15분간 12,000 g로 homogenization을 실시했다. homogenate (S<sup>1</sup>)을 4겹의 거즈로 필터링 한 후 5분간 3,000 g에서 원심분리하였다 (상층액: S<sup>2</sup>, pellet: P<sup>2</sup>). pellet을 iosolation buffer 10 ml로 현탁 시킨 후 200 g, 5 분간 원심분리하여 상층액을 수거하였다. 수거된 상층액을 3,000 g, 10분간 원심분리하여 세포소기관 분획을 침전시킨 후 iosolation buffer 2 ml로 현탁 시켰다. centrifugation buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, protease inhibitor)에 sucrose(20%~ 60%)의 농도구배를 형성한 후 현탁된 세포소기관 분획을 loading하고. swing bucket rotor을 이용하여 4℃, 16시간, 125,000 g에서 원심분리한 후 2 ml씩 분획하였다.

#### 2) chlorophyll 함량 분석과 immunodetection

sucrose 농도구배에 의해 분리된 fraction에서 chloroplast thylakoid membrane의 marker가 되는 chlorophyll을 Schaller 방법으로 추출하여 분광 광도계로 함량을 측정하였다. 또한 각 fraction 별로 10% SDS-PAGE 실시한 후 제1절에서 수행했던 Western blot analysis를 통해 옥수수 lipoxygenase의 존재여부를 관찰하였다.

### 3) chloroplast로부터 옥수수 lipoxygenase 분리

형질전환 벼에서 옥수수 lipoxygenase가  $Ca^{2+}$ 에 의해, chloroplast membrane에 결합되어 있는지 관찰하기 위해 다음과 같이 실험을 수행했다. 위에서 분리한 chloroplast fraction( $S^3$ )에 1 mM EDTA를 첨가한 후 12,000 g, 1시간 원심 분리하여 상층액( $S^4$ )과 침전물( $P^4$ )을 분리하여 제1절에서와 같이 10% SDS-PAGE 와 Western blot analysis를 수행하였다.

### 4) cytoplasm에서 membrane으로 $Ca^{2+}$ 에 의한 옥수수 lipoxygenase의 translocation

낙동벼의 membrane을 Munne-Bosch의 방법에 따라 다음과 같이 분리하였다. 낙동벼 잎 5 g에 phosphate buffer(10 mM  $KH_2PO_4$ , pH 7.8, 0.5 M sucrose, 1 mM EDTA) 20 ml을 첨가한 후 15분간 10,000 g로 homogenization을 실시했다. homogenate은 4겹의 거즈로 필터링 한 후 10 분간 1,000 g에서 원심분리하였다. 상층액을 12,000 g, 1시간 원심분리하여 membrane을 침전시킨 후 1 mM EDTA로 6 번, PBS buffer로 6번 순차적으로 washing 하였다. PBS buffer 1 ml에 membrane 1 mg을 첨가하여 현탁시킨 후  $CaCl_2$ 를 각각 1 mM, 100 uM, 10 uM, 또는 1 uM 되게 첨가하였다. 각각의 mixture에 정제된 옥수수 lipoxygenase을 첨가하여 5분간 상온에서 shaking 한 후 12,000 g, 30분 원심분리하여 상층액과 침전물을 분리하여 제1절에서와 같이 10% SDS-PAGE와 Western blot analysis를 수행하였다.

## 다. 결과 및 고찰

### 1) 형질전환 벼에서 옥수수 LOX의 localization

형질전환 벼에서 옥수수의 LOX가 그림1-A에서 보는 것과 같이 대부분 세포소기관 분획에 존재함을 확인했다. 옥수수 LOX가 세포소기관 중 엽록체에 존재하는지를 알아보기위해 그림1-B와 C 같이 sucrose density gradient에 의해 분리된 각 fraction들의 chlorophyll 함량과 옥수수 LOX의 양을 각각 비교하였다. 그 결과 chlorophyll 함량과 옥수수 LOX의 양이 서로 일치하는 것을 볼수있다. 또한 그림-D 는 옥수수 LOX가 비가역적으로 엽록체에 결합되어 있음을 보여주고있다. 이는 형질전환 벼에서 옥수수 LOX가 엽록체에 translocation되어 있음을 의미한다.

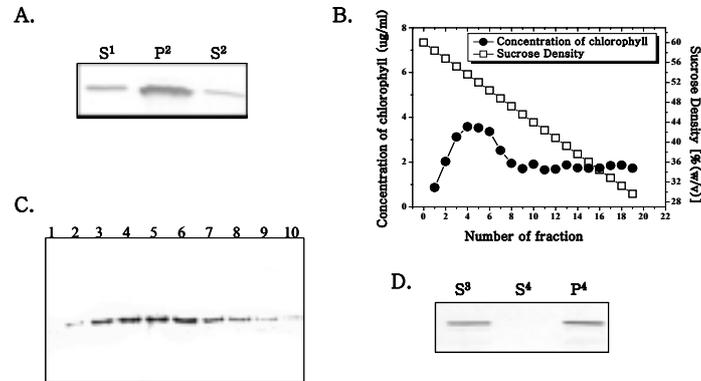


그림 3-2-5. 형질전환 벼에서 옥수수 LOX의 localization

A: Subcellular fractionation by centrifugation, S1:supernatant1, S2:supernatant2, P2: pellet2

B: Subcellular fractionation by sucrose-density gradient

C: Western analysis of fractions from B

D: Association analysis of LOX with chloroplast,

S3:Chloroplast fraction, P4: pellet after addition of EDTA, S4: supernatant after addition of EDTA

## 2) 옥수수 LOX의 domain 분석과 Ca<sup>2+</sup>에 의한 membrane association

LOX는 구조적으로 catalytic domain과 PLAT domain으로 구성되어 있다. PLAT domain은 Ca<sup>2+</sup>에 의해 lipid와 interaction 하는 것으로 알려져 있다. 실제로 옥수수 LOX가 Ca<sup>2+</sup>에 의해 membrane과 interaction하는지 알아보기 위해 그림 2와 같이 CaCl<sub>2</sub> 농도에 따라 옥수수 LOX와 membrane과의 binding을 관찰하였다. 그 결과 옥수수 LOX가 Ca<sup>2+</sup>에 의해 membrane에 binding 하는 것을 확인했다. 또한 옥수수 LOX와, Ca<sup>2+</sup>-binding site가 보고되어 있는 soybean LOX-1의 아미노산 homology를 검사한 결과, 그림 3과 같이 옥수수 LOX에서 3개의 acidic 아미노산 (Asp<sup>48</sup>, Glu<sup>127</sup>, Glu<sup>201</sup>)으로 구성된 하나의 Ca<sup>2+</sup>-binding site가 PLAT domain에 존재함을 확인할 수 있었다.

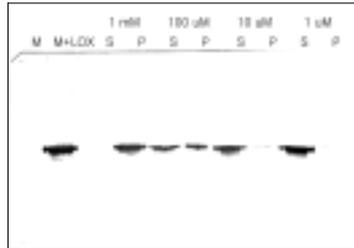


그림 3-2-6. Ca<sup>2+</sup>에 의한 옥수수 LOX와 membrane association M: Chloroplast membrane, LOX: LOX protein expressed in E. coli



그림 3-2-7. soybean LOX-1과 옥수수 LOX의 아미노산 서열 alignment.  
[본 연구 결과는 연구 계획에 포함되지 않았으나, 보완 요구에 따라 추가로 첨가되었음].

## 제 3 절 상처 및 염 스트레스에 대한 옥수수 LOX가 도입된 형질전환 벼의 반응

### 1. 상처 스트레스에 대한 형질전환 벼의 반응

#### 가. 서언

LOX는 식물체의 막에서 유리된 linolenic acid나 linoleic acid와 같은 1,4-pentadiene 구조를 지닌 불포화 지방산을 기질로 하여 hydroperoxidation을 촉매하는 효소로써, 상처, 저온, 염등의 스트레스 반응을 포함한 다양한 종류의 산화 스트레스에 감응하고 자스몬산 생합성에 관여한다. 이중 위치 특이적인 옥수수 LOX를 벼에 도입시킨 형질전환 벼는 다양한 산화 스트레스에 대한 옥수수 LOX의 기능 연구 뿐만아니라 식물체의 방어 기작을 연구하는 중요한 모델 식물이 될 수 있다. 본 연구에서는 형질전환에 상처를 가했을 때 옥수수 LOX의 반응에 의해 유도되는 현상을 연구하고자 식물체 막의 지방산 조성비 변화(DBI 변화), lipid peroxidation 변화(MDA 함량 변화), 항산화 효소들의 활성 변화 그리고 자스몬산과 Salicylic acid 함량 변화를 관찰하였다.

#### 나. 재료 및 방법

##### 1) 형질전환 벼의 재배

옥수수 LOX가 도입된 형질전환된 벼(T<sub>3</sub>:1A24 line)의 씨앗을 소독, 발아시켜 상토에 파종하여 두달간 28℃ 배양실에서 성장시켰다. 상토에는 수분이 마르지 않도록 유지하였다.

##### 2) 상처 처리

두달된 벼의 잎 끝을 가위로 절단하여 상처를 가한 후 5분, 15분, 30분, 1시간, 3시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 후에 샘플링한 잎을 액체질소로 잘게 갈아 -70℃에 보관 하였다. 보관된 샘플로부터 지방산 조성, MDA함량, antioxidant 효소

활성, 자스몬산과 Salicylic acid 함량 변화들을 조사하였다.

#### 다. 결과 및 고찰

##### 1) DBI와 MDA 변화

상처입은 식물체에서 발현되는 LOX의 기질인 linoleic acid와 linolenic acid는 식물체 세포막에서 lipase의 반응에 의해 공급되어진다. 이때 생성된 hydroperoxy linoleic acid와 hydroperoxy linolenic acid들은 순차적으로 여러 효소들과 반응하여 식물체의 방어기작을 활성화 시킨다. 옥수수 LOX가 도입된 형질전환 벼와 낙동벼에 상처가 가해졌을 때 어떠한 현상이 일어나는지를 이해하기 위해 우선 LOX의 기질 공급원이 되는 세포막의 지방산 조성비를 확인하여 DBI값을 산출하였다(그림 3-3-1, A). 또한 상처에 의해 lipid peroxidation이 어떻게 일어나는지 MDA함량 변화를 관찰하였다(그림 3-3-1, B). 낙동벼의 DBI값은 상처 후 30분과 6시간에 정점에 도달했고, 형질전환 벼는 15분, 1시간, 6시간 후에 정점에 도달했다. 그러나 전체적으로 형질전환 벼와 낙동벼 사이에 상처에 의한 DBI의 변화의 큰차이는 없었다. MDA함량은 낙동벼보다 형질전환 벼에서 전체적으로 높게 형성되는 것을 확인할수 있었다. 이는 형질전환벼에 도입된 옥수수 LOX의 반응에 의해 지속적으로 lipid peroxidation이 이루어짐을 의미한다.

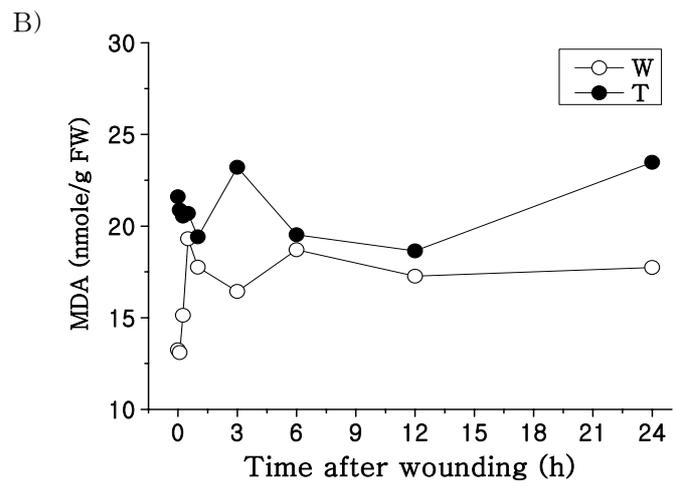
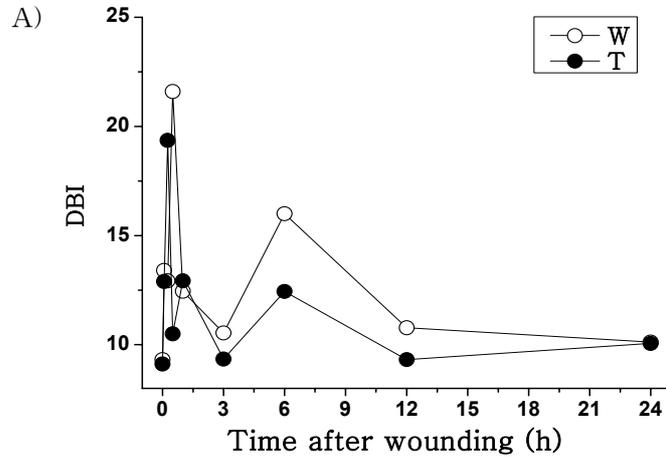


그림 3-3-1. 상처입은 형질전환 벼(T)와 낙동벼(W)에서의 DBI변화(A)와 MDA함량 변화(B).

## 2) 항산화 효소들의 활성변화

식물체가 스트레스를 받았을 때 생성되는 lipid peroxide들은 항산화 관련 효소들의 발현을 유도하여 스트레스에 대한 방어기작을 활성화시킨다. 옥수수 LOX가 도입된 형질전환 벼에 상처를 가했을 때 MDA가 지속적으로 높게 형성되는 것을 확인할수 있었다. 이는 형질전환 벼에서 항산화 관련 효소들의 발현과 함께 활성이 유도될 것임을 짐작가능하게 한다. 실제로 상처입은 형질전환 벼에서도 이러한 현상이 보이는지 낙동벼와 함께 대표적인 항산화 효소인 SOD, CAT, POD의 활성변화를 관찰하여 보았다(그림 3-3-2).

낙동벼에서 SOD 활성은 상처 후 6시간까지 낮게 유지되다가 12시간에 정점에 도달하여 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 형질전환 벼에서는 SOD 활성이 높게 나타 났다가 상처를 입은 후 감소하여 1시간 후에 정점에 도달하여 감소하였고, 24시간 후에 다시 정점에 도달하여 유지되었다. CAT활성은 형질전환 벼에서 높게 형성한 후 상처가 가해지면서 감소하였다가 3시간, 12시간 후에 정점에 도달하였다. 12시간부터 24시간 까지 CAT활성의 감소가 보이다가 24시간 이후에 점진적으로 증가하였다. 그러나 낙동벼에서는 3시간 후에 CAT활성이 정점에 도달하여 6시간 까지 감소하였다가 48시간까지 점진적으로 증가하였다. POD활성은 형질전환 벼에서 높은 활성을 보였으나 상처에 따른 변화가 낙동벼에서의 POD활성 변화와 매우 유사하게 변화되는 것을 확인할수 있었다. 그렇지만 형질전환 벼에서의 POD활성이 낙동벼보다 좀더 높게 나타났다.

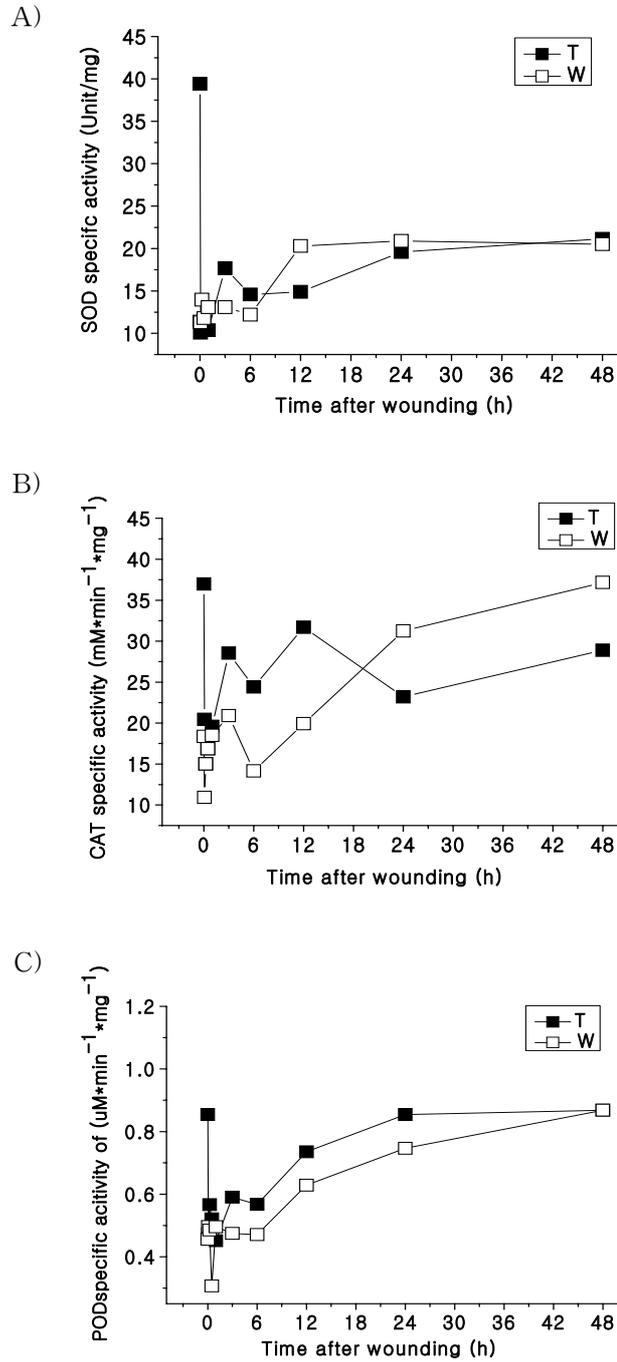


그림 3-3-2. 상처입은 형질전환 벼(T)와 낙동벼(W)에서의 항산화 효소 활성변화  
 A) Superoxide dimutase(SOD) 활성변화, B) Catalase(CAT) 활성변화, C) Perox-  
 ygenase.

### 3) JA와 SA 변화

옥수수 LOX가 도입된 형질전환 벼를 두달간 재배한 후 상처를 가해 자스몬산과 Salicylic acid 함량 변화를 일정 시간대별로 측정하였다(그림 3-3-3). 형질전환 벼에서 자스몬산은 1시간 후에 정점에 도달했고, 낙동벼는 30분에 정점에 도달했다. 낙동벼에서 Salicylic acid는 상처 후 감소하다가 24 시간 후에 상승하였고, 형질전환 벼에서는 상처 후 1 시간, 24시간에 정점에 도달했다.

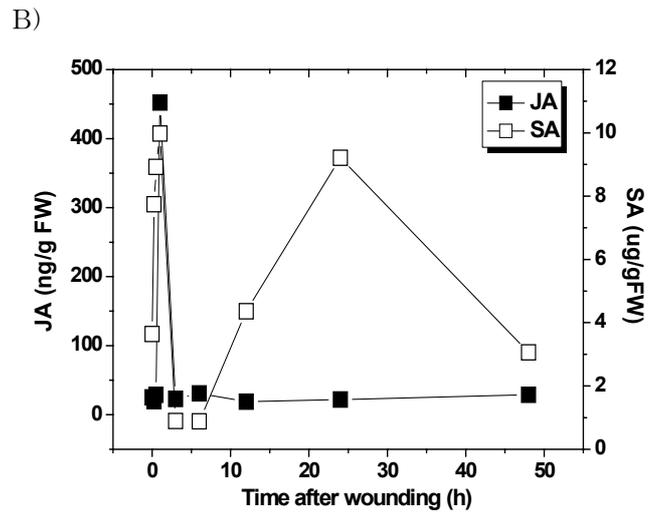
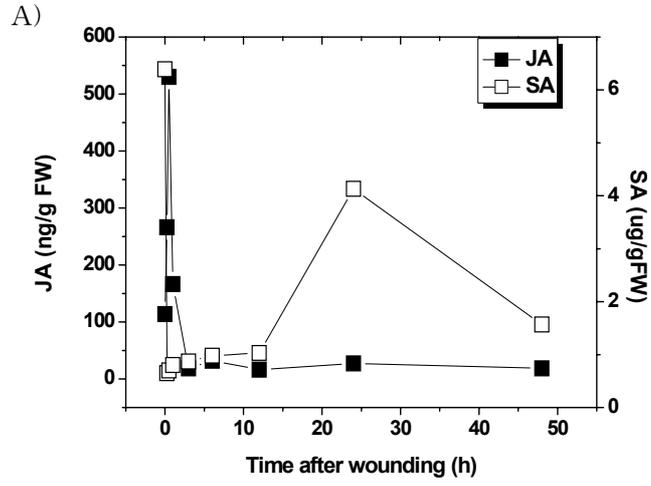


그림 3-3-3. 상처입은 낙동벼(A)와 형질변환 벼(B)에서 자스몬산(JA)과 Salicylic acid(SA) 함량변화.

## 2. 염 스트레스에 대한 형질전환 벼의 반응

### 가. 서언

오늘날 염 스트레스에 대한 식물체의 생리적 반응을 유전적 측면에서 분석하며 식물의 저항성 기작을 연구하고있다. 벼는 염에 약한 작물로 유전적 개선 방법으로 저항성 식물개발을 연구해 오고 있으나 아직 완전히 해결 되지 못한 실정이다. 내염성과 자스몬산이 서로 벼 유모 뿌리 생육에 영향을 주는 것으로 보고되어져 있다. 이는 자스몬산 생합성에 참여하는 LOX가 내염성과 서로 연관이 있음을 말해준다. 이를 근거로 본 연구에서는 LOX와 내염성이 어떤 연관을 갖는지 알아보기 위해 상업적으로 가치가 높은 Japonica 품종인 낙동벼에 옥수수 LOX 유전자를 도입한 형질전환 벼에 염 스트레스를 가해 보았다.

### 나. 재료 및 방법

#### 1) 34 mM NaCl에서 배양된 형질전환 벼의 지방산 분석

옥수수 LOX가 도입된 형질전환된 벼(T<sub>3</sub>;1A24 line)의 씨앗을 소독 한 후 34℃ 암상태에서 발아를 유도한 후 34 mM NaCl이 첨가된 0.6% agar에 2주간 배양하였다. 2주간 염에 배양된 벼잎으로부터 전체 지질을 추출 한 후 GC로 지방산 조성을 분석하였다.

#### 2) 형질전환 벼의 재배 및 염처리

옥수수 LOX가 도입된 형질전환된 벼(T<sub>3</sub>;1A24 line)의 씨앗을 소독, 발아시켜 상토에 파종하여 두달간 28℃ 배양실에서 성장시켰다. 염에 스트레스에 대한 반응을 관찰하기 위해 34 mM NaCl이 첨가된 물에 1, 2, 6, 10일 동안 배양하여 Ion leakage와 phenotype의 변화를 관찰하였다. 10일 후 5일동안 염이 제거된 물에 다시 옮겨 회복을 유도하여보았다.

### 다. 결과 및 고찰

1) 지방산 분석

34 mM NaCl이 첨가된 0.6% agar배지에 2주간 배양된 낙동벼의 경우 표 3-3-1에서 볼 수 있듯이 18:2/16:0와 18:3/16:0의 비가 염이 제거된 벼와 비교했을 때 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 옥수수 LOX가 도입된 형질전환 벼에서는 18:2/16:0의 비는 증가한 반면 18:3/16:0비는 감소하는 것을 관찰하였다. cold 스트레스에 저항성인 호박과 감수성인 오이에 각각 cold stress을 가했을 때 저항성인 호박에서의 지방산들 중 이중결합이 존재하는 지방산들의 비가 증가한다고 발표가 되었다. 이러한 결과와 비교해 볼때 낙동벼 역시 34 mM NaCl에 적응해 자라기 위해서 18:2/16:0와 18:3/16:0의 비가 증가하는 것으로 추측된다. 그러나 형질전환 벼에서는 18:2/16:0은 증가한 반면 18:3/16:0은 감소했다. 옥수수 LOX가 도입된 형질전환 벼에서 기질들을 feeding 시켜 이들 생성산물들을 분석한 결과 linolenic acid가 linoleic acid보다 더 많이 이용되고 있음을 확인할 수 있었다. 즉, 34 mM NaCl이 첨가된 배지에서 자란 형질전환 벼의 경우 18:3/16:0이 감소한 것은 생체내에 있는 linolenic acid들이 옥수수 LOX의 반응에 의해 소모 되었기 때문으로 보인다.

표 3-3-1. 염 스트레스에 대한 지방산 분석.

		16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	18:2/16:0	18:3/16:0	DBI
낙동벼 (%)	water	18.73	0.25	2.51	1.17	20.82	56.52	1.11	3.02	9.32
	34 mM NaCl	15.12	0.19	2.07	1.13	31.36	50.14	2.07	3.32	11.51
형질전환 벼 (%)	Water	19.42	0.23	2.11	1.37	19.61	57.26	1.01	2.95	9.12
	34 mM NaCL	18.61	0.17	1.68	0.84	40.89	37.87	2.20	2.03	9.17

2) Phenotype과 Ion leakage 변화

옥수수 LOX와 염 스트레스와 관계를 연구하기 위해 옥수수 LOX가 도입된 형질전환 벼와 낙동벼에 염 스트레스를 가해보았다. 그림 3-3-4에서 보는 것과 같

이 한달 동안 자란 형질전환 벼와 낙동벼를 34 mM NaCl이 첨가된 물에 10일 간 배양한 후 염이 제거된 물에 5일간 배양했을 때 옥수수 LOX가 도입된 형질전환 벼에서 세포 사멸이 이루어 지는 것을 볼수 있었다. 또한 세포파괴가 어느 정도 일어났는지 알아보기 위해 ion의 누출정도를 검사해 보았다. 그림3-3-5은 형질전환 벼를 10일간 34 mM NaCl에 배양했을 때 낙동벼보다 10배 이상 ion의 누출이 관찰되었다. 이는 형질전환 벼가 염 스트레스에 대해 낙동벼보다 민감함을 보여 주고있다.

많은 식물체는 생물학적 비 생물학적 스트레스에 대해 자신을 보호하기 위한 방어기작을 갖추며 진화해왔다. 특히 식물체가 염이나 활성산소( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ )에 노출되었을 때 생체내에 있는 불포화지방산과 반응하여 lipid peroxy radical이나 lipid hydroperoxide를 형성한다. 이들 물질들은 생체내에 과량 축적 되었을 때 세포 사멸을 유도할 수 있는 독소 물질들이다. 그러나 식물체들은 이들 독소물질들을 제거하면서 스트레스에 대한 방어기작을 활성화시킨다. 형질전환 벼에서 옥수수 LOX 반응에 의해 lipid hydroperoxide들이 생성됨을 전 실험결과에서 확인할 수 있었다. 또한 이들 물질들을 제거 하기 위한 항산화 효소들의 활성이 낙동벼보다 훨씬 높게 나타났다. 이는 형질전환 벼에서는 스트레스 방어기작이 이미 활성화되어 있을 가능성이 높음을 시사한다. 하지만 염 스트레스에 대해서 내성을 나타난 것은 옥수수 LOX의 반응에 의해 lipid hydroperoxide들이 과량 생산됨에 따라 이들 물질들의 충분한 제거하지 못함으로써 일어나는 현상으로 보인다. 실제로 이미 식물체 내에 lipid hydroperoxide이 적당량 생산되어 계획된 세포 사멸이 이루어지는 반면 과량이 생산되었을 때는 식물체의 괴사가 발생된다고 이미 보고되어져 있다.

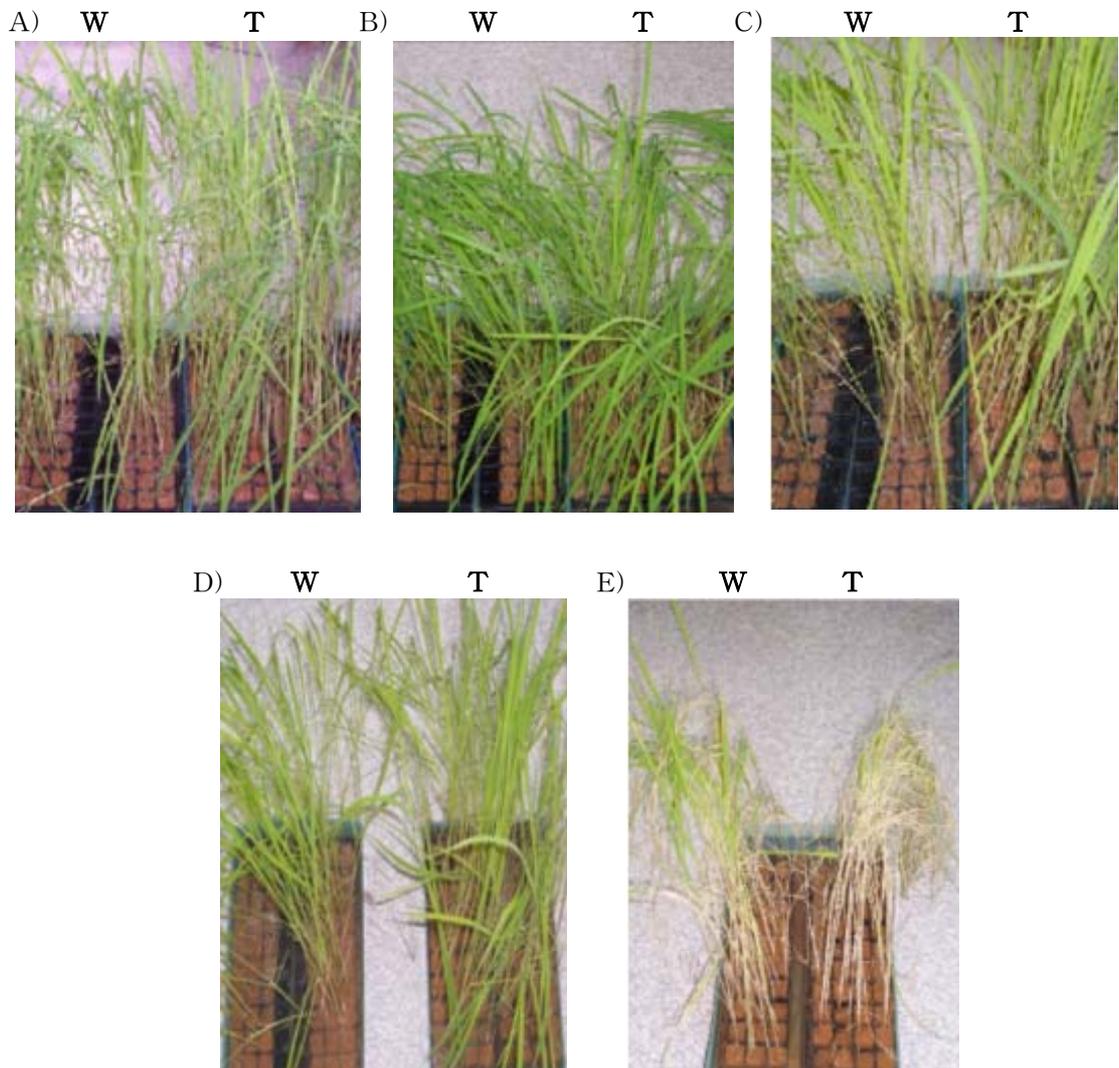


그림 3-3-4.염 스트레스에 대한 형질전환 벼(T)와 낙동벼(W)의 phenotype 관찰. 한달된 형질전환 벼와 낙동벼를 34 mM NaCl이 첨가된 물에 1(A), 2(B), 6(C), 10(D)일 간 배양한 후 NaCl이 제거된 물에 5일간(E) 배양하며 phenotype을 관찰하였다.

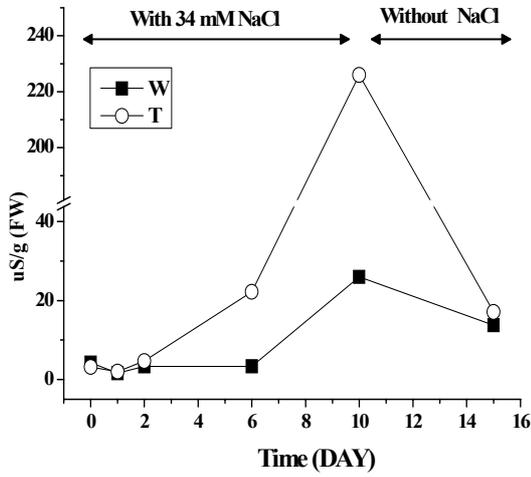


그림 3-3-5. 염 스트레스를 입은 형질 전환 벼(T)와 낙동벼(W)의 ion leakage. 34 mM NaCl이 첨가된 물에 1(A), 2(B), 6(C), 10(D)일 간 배양한 후 NaCl이 제거된 물에 5일간(E) 형질전환 벼와 낙동벼를 배양하며 스트레스 입은 잎의 ion leakage를 측정하였다.

### 3. 오존 스트레스에 대한 형질전환 벼의 반응

#### 가. 서언

도시의 매연에 의한 오존 발생율이 급격히 증가함에 따라 도시근교의 농작물에 대한 피해가 우려 되고 있다. 본 연구에서는 오존의 농도를 조절할 수 있는 배양실을 이용하여 생산된 형질전환벼가 오존 존재하에서 나타내는 생리적 변화와 오존 스트레스에 대한 감응성을 평가하였다.

#### 나. 재료 및 방법

##### 1) 오존 처리

T<sub>3</sub>세대 1A24 line의 형질전환 벼 씨앗을 70% 에탄올로 소독한 후 3차증류수로 3, 4번 씻어 암상태로 3일간 발아를 유도하였다. 물은 하루에 한번씩 갈아주었다. 동일한 크기로 발아된 벼씨앗을 상토에 파종하여 2주간 28℃ 배양실에서 성장시키고 상토에 수분이 마르지 않도록 유지하였다. 2주된 형질전환 벼와 낙동벼를 오존 chamber에서 0, 12, 24시간 동안 0.2 ppm으로 오존 스트레스를 가하였다.

##### 2) Western 분석

오존 스트레스를 입은 벼 잎 0.1 g을 액체질소와 막자 사발로 잘게 간 후 멸균된 test tube에 담고, lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.2) w/ 1 mmole/L of DTT and 32 mg/L of PMSF) 500 ul 첨가하여 현탁시킨 후 4℃, 12,000 rpm으로 particle들을 제거하고 상층액을 새로운 test tube로 옮겨 담았다. 각각의 test tube에 상층액 20 ul를 각각 분주하여 5 X sample buffer (60 mM Tris-HCl (pH6.8) w/ 25% glycerol, 20% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, and 0.1% bromophenol blue) 5 ul첨가하고 끓는 물에 5분 동안 변성시켰다. 준비된 샘플 25 ul를 가지고 8% SDS-PAGE를 실시한 후 stacking gel 부위를 제거하고 cathode buffer (25 mM Tris-HCl (pH9.4), 40 mM Glycine, 10% Methanol)에 15분 shaking 시켰다. gel 크기의 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane을 100% methanol에 15초, 멸균수에 2분, anode buffer II (25 mM Tris-HCl (pH10.8), 10% Methanol)에 10분간 순차적으로 equilibration 시킨다. gel 크기의 3 MM whatman paper 6장을 준비하여 3장은 cathode buffer, 2장은 anode buffer I (300 mM Tris-HCl (pH10.8),

10% Methanol), 그리고 1장은 anode buffer II 에 적셨다. semi-dry electroblotter의 anode plate에 anode buffer I으로 적신 paper 2장, anode buffer II의 1장, membrane, gel, 그리고 cathode buffer가 적신 3 MM whatman paper 3장 순으로 blotter를 결합시켰다. 130 mA, 1시간 동안 단백질을 gel에서 membrane으로 blotting한 후 membrane를 상온에서 blocking solution (5% skim milk, 0.02% sodium azide, 0.02% tween 20) 10 ml에 1시간, primary antibody solution (MzLOX, AOS, APX, SOD or NOMT; 1:20,000 희석)에 4시간, 1 X PBS solution (8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 1.44 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)에 5분간 3번 씻었다. 상온에서 2% Bovine Serum Solution에 20분, peroxidase conjugated secondary antibody solution (1:50,000 희석)에서 1시간, 1 X PBS solution에 10분간 3번 씻은 후 X-ray 필름에 감광시켰다.

#### 다. 결과 및 고찰

오존 스트레스에 대한 형질전환 벼의 반응을 이해하기 위해 스트레스 반응에 관련된 단백질들의 발현을 그림 2와 같이 관찰하였다. maize lipoxygenase(MzLOX)는 오존 스트레스와 관련 없이 일정하게 형질전환 벼에서 발현되는 것을 확인했다. 그러나 allene oxide synthase(AOS), narngenin 7-O-methyltransferase(NOMT) 그리고 ascobate peroxidase(APX)는 낙동벼에서 12시간 동안 오존스트레스를 가했을 때 최대 발현량을 나타낸 반면 형질전환 벼에서는 점진적으로 감소하는 것을 확인했다. 그 외 20kDa의 superoxide dimutase(SOD)의 경우 형질전환벼와 낙동벼 모두에서 감소한 반면 16~17kDa의 SOD의 경우 낙동벼에서 12시간 동안 오존스트레스를 받을 때 정점을 나타낸 반면 형질전환 벼에서는 감소하다가 12시간 이후에는 발현되지 않음을 확인했다.

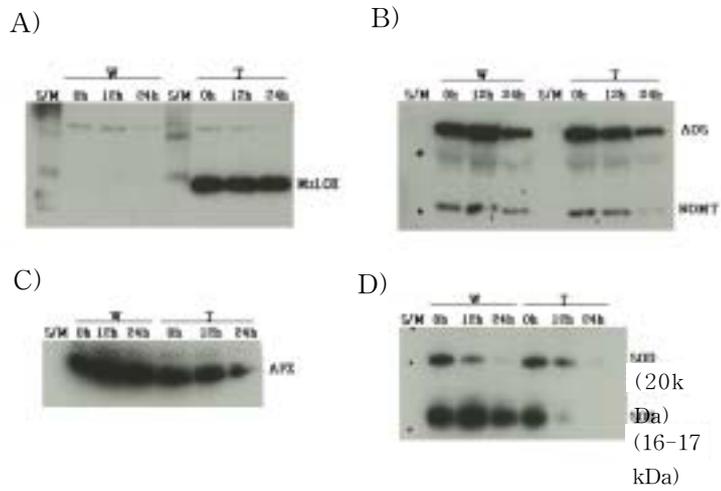


그림 3-3-6. 낙동벼 (W)와 형질전환 벼 (T)에서 오존 스트레스에 의해 발현되는 단백질의 Western 분석 결과. (A) MzLOX: 옥수수 Lipoxygenase, (B) AOS: Allene oxide synthase, NOMT: Narngenin 7-O-methyltransferase, (C) APX: Ascobate peroxidase, (D) SOD:Superoxide dimutase

## 제 4 절 포장에서 리폭시지나아제 과다발현 형질전환 벼의 병 저항성 검정

### 1. 형질전환 벼의 도열병에 대한 포장저항성 검정

#### 가. 서언

리폭시지나아제(LOX)는 자스몬산 생합성의 초기 단계에 위치하면서 이들 효소가 과대 발현된 식물체에서는 자스몬산 및 중간체의 생합성이 증가될 것을 예상할 수 있으며 따라서 내병성 작물의 개발에 이용될 수 있는 가능성이 있다. 본 연구팀에서 생산하여 확보하고 있는 옥수수의 LOX(AF271894)유전자가 과다발현된 형질 전환 벼(T<sub>1</sub> 세대)를 제작하여 도열병에 대한 저항성을 시험한 결과, 온실 수준의 실험조건에서 뚜렷한 도열병 저항성을 보였으므로 LOX(AF272894)가 도열병에 대한 저항성과 밀접한 관련을 지니고 있음을 명백히 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 LOX(AF272894) 유전자가 과다 발현된 형질전환벼를 이용하여 포장 수준에서도 도열병에 대한 저항성이 발현되는지의 여부를 알아보고자 하였다.

#### 나. 재료 및 방법

형질전환 대상 벼 품종으로 사용되었던 낙동벼와 옥수수의 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질전환 벼 T<sub>2</sub>세대 16 line 종자를 5월31일에 상토에 파종하였다. 여기에서 발아된 유묘를 주당 본수 1-2본으로 재식거리는 30\*15cm로 하여 전남 나주시 산포면 전라남도 농업기술원포장에 6월23일에 이앙하였다. 시비량은 22-7-8(N-P-K, kg/10a)로 하여 전남농업기술원 표준 재배법에 준하여 재배하였다. 한편, AOS 혹은 TP-AOS가 삽입된 형질전환 벼 T<sub>1</sub>세대 9 line 종자를 7월 21일에 쫓트에 파종하여 야외에서 관리하였으며 10월 1일부터는 온실에서 관리하였다. 시험 포장에서 대조구인 낙동벼와 형질전환 line의 도열병 발생정도는 잎도열병 발병최성기인 7월 26일에 line 별로 20포기 이상을 대상으로 포기당 평균 병무늬면적율과 이병주

율을 조사하였으며 이삭도열병은 출수 후 30일에 이병주율을 조사하였다.

#### 다. 결과 및 고찰

포장에서 잎도열병은 7월 12일에 낙동벼와 1A2, 1A4, 1A5, 1A6, 1A9, 1A10, 1A20, 1A22, 1A23 line에서 먼저 자연발생되었으며 7월 26일의 조사에서는 시험에 공시된 전 라인에서 발병되었다. 대조구인 낙동벼의 병반면적율이 0.68%(소형병반 20개정도가 고르게 퍼져 있음)로 형질전환 벼에서는 낙동벼보다는 발병정도가 적었으며 병반면적 0.2% 이하인(소형병반 10개 이내 정도) line은 1A5, 1A11, 1A12, 1A20, 1A21이었다(표 3-4-1). 이삭도열병의 경우, T<sub>2</sub> 세대(2004년도)에는 1A6, 1A17 line에서 가지도열병이 발생되었으나 T<sub>3</sub> 세대(2005년)에는 전 공시 line에서 발병되지 않았다(표 3-4-1). 한편, 7월 21일에 풋트에 이양한 AOS T<sub>1</sub>세대 9개 line에서는 8월 17일에 잎도열병이 처음 발생되었으며 8월30일의 조사에서는 대조구인 pCAMBIA vector만 삽입된 개체를 포함하여 모든 line에서 병반면적율 0.02-0.04% 정도로 발생하여 AOS, TP-AOS유전자의 삽입에 의한 병저항성 형질발현을 확인할 수 없었다(표 3-4-2, 그림 3-4-1). 이상의 결과를 종합해 보면, 옥수수의 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질전환 벼 T<sub>3</sub>세대 16 line 대부분에서 대조구인 낙동벼보다는 잎도열병에 대한 저항성 형질발현이 인정되었고, 이러한 사실은 리폭시지나아제 유전자가 도열병에 저항성을 지니는 안정적인 벼품종 개발에 이용될 수 있다는 것을 의미한다.

표 3-4-1. 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질전환 벼 T<sub>3</sub>세대의 잎도열병에 대한 포장저항성 검정결과\*.

형질전환체 (T <sub>2</sub> 세대 1A line의 T <sub>3</sub> lines)	출수기	앞도열병 이병율(%)		이삭도열병
		병반면적율	이병주율	
낙동벼	8월21일	0.68	14.7	0
1A2	8월19일	0.28	12.0	0
1A4	8월21일	0.30	14.3	0
1A5	8월22일	0.09	3.9	0
1A6	8월22일	0.30	16.3	0.01
1A8	8월21일	0.32	14.1	0
1A9	8월22일	0.31	11.0	0
1A10	8월23일	0.50	30.0	0
1A11	8월23일	0.10	3.4	0
1A12	8월23일	0.09	3.8	0
1A13	8월21일	0.23	7.9	0
1A17	8월21일	0.20	7.0	0.01
1A20	8월21일	0.14	23.3	0
1A21	8월22일	0.18	6.2	0
1A22	8월21일	0.48	20.4	0
1A23	8월22일	0.29	11.5	0
1A24	8월21일	0.38	17.4	0

\* 7월 26일에 포장에 식재된 형질전환 벼 Line당 20주의 앞도열병에 대한 병반면적율 및 이병주율을 조사하였음

표 3-4-2. AOS 혹은 TP-AOS가 삽입된 형질전환 벼 T<sub>1</sub>세대의 잎도열병에 대한 저항성 검정 결과\*.

형질전환체	공시종자수(개)	잎도열병 이병율(%)
pCAMBIA	8	0.02
AOS	11	0.02
AOS	20	0.04
AOS	50	0.04
TP-AOS(1)	21	0.03
TP-AOS(2)	3	0.04
TP-AOS(3)	56	0.02
TP-AOS(4)	1	0.03
TP-AOS(5)	2	0.03

\* 7월21일에 Pot에 과종하여 자란 형질전환 벼의 잎도열병에 대한 병반면적율을 8월 30일에 조사하였음.



그림 3-4-1. 형질전환 벼에 나타난 잎도열병 병반.

## 2. 형질전환 벼의 도열병에 대한 발못자리 검정

### 가. 서언

옥수수 리폭시지나아제 유전자가 과다 발현된 형질전환벼를 이용하여 도열병에 대한 저항성을 시험한 결과, 온실 수준의 실험조건에서와 포장 수준에서도 뚜렷한 도열병 저항성을 보였으므로 리폭시지나아제 유전자가 도열병에 대한 저항성과 밀접한 관련을 지니고 있음을 명백히 알 수 있었다. 하지만 내병성은 작물의 상태나 나이 및 환경조건 등에 따라 달라질 가능성이 있기 때문에 본 연구에서는 이들 형질전환벼가 발못자리 상태에서도 도열병에 대한 저항성을 발현하는지의 여부를 알아보고자 하였다.

### 나. 재료 및 방법

형질전환벼 T<sub>3</sub>세대 16라인과 도열병 판별 품종 및 농가 재배품종을 시험품종으로 하여 발못자리 검정포장에 7월 4일에 직파하였으며 이 때 도열병 발병율을 높이기 위하여 주위에 이병성 품종인 낙동벼를 함께 파종하였다. 시비량은 N-P-K=24-8-12(Kg/10a)로 하고 질소질의 50%는 추비로 파종 후 14일 후에 사용하였다. 잎도열병 발병조사는 8월 5일에 실시하였으며 아래의 농촌진흥청 조사기준에 의하여 조사했다.

농촌진흥청의 벼도열병 발못자리검정 조사기준 (0-9)

0: 무병반

1: 바늘끝 같은 작은 갈색반점 병반

2: 직경1-2mm의 다소 큰 갈색반점이 하위엽에 드물게 있는 것

3: 2와 동일한 반점으로 그 수가 증가하여 상위엽에 나타나는 것

4: 전형적 회색의 급성도열병반이 전 엽면적의 4%이내 이병

5: 4-10% 사이의 전형적 병반

- 6: 11-25% 정도 이병된 병반
- 7: 잎면적의 26-50%가 전형적 병반으로 이병
- 8: 잎 전면적의 51-75%가 전형적 병반으로 이병
- 9: 모든잎이 75%이상 이병된 것 또는 완전고사

#### 다. 결과 및 고찰

밭곳자리에서의 벼도열병을 검정하여본 결과, 기존의 벼도열병 저항성 판별 품종인 테텡, 태백벼, 통일벼에서는 저항성 반응을 나타내었으나 유신벼, 관동51호, 농백벼, 진흥벼, 낙동벼 등 Japonica에서는 이병성 반응을 나타내었다(표 3-4-3). 농가에서 많이 재배되는 품종 중 동진벼와 남평벼는 저항성반응을 나타내었고 이병정도가 심한 품종은 호평벼와 오대벼였다(표 3-4-3). 그러나, 기대와는 달리 형질변환 벼의 밭곳자리 검정결과는 공시 전 라인에서 모두 이병정도가 7-9로 고도의 이병성 반응을 나타내었다(표 3-4-3). 이는 대조구인 낙동벼 (이병정도 4)보다 더 심한 이병성 반응으로, 표1의 벼도열병 자연발생 결과와 온실수준의 내병성 결과와 반대로 나타나 차 후 보다 정밀한 시험이 수행되어야 할 것으로 생각된다. 다만 작물의 내병성은 작물의 상태나 나이 및 환경조건 등에 따라 차이가 많은데, 밭곳자리 검정에 사용된 벼는 파종 후 30일 자란 유묘상태의 벼 (5-7 엽기)이기 때문에 성묘상태의 포장저항성 결과(표 3-4-1)와는 차이가 있을 수 있다.

표 3-4-3. 벼도열병 판별품종, 농가 재배품종 및 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질전환벼 T<sub>3</sub>세대의 밭곳자리 잎도열병 검정 결과.

계통 및 품종명	발병정도 (0-9)	형질전환체	발병정도 (0-9)
테텡	1	1A2	9
태백벼	0	1A4	8
통일벼	0	1A5	6
유신벼	4	1A6	7
관동51호	8	1A8	7
농백벼	9	1A9	7
진흥벼	9	1A10	7
낙동벼	4	1A12	8
대산벼	4	1A13	9
동안벼	7	1A17	7
일미벼	6	1A20	8
호평벼	9	1A21	7
동진벼	3	1A22	7
남평벼	3	1A23	7
일품벼	4	1A24	7
오대벼	9		

### 3. 형질전환 벼의 흰잎마름병에 대한 포장저항성 검정

#### 가. 서언

낙동벼에 리폭시지나아제 유전자를 도입시킨 형질전환 낙동벼 T<sub>3</sub>세대 34 line과 대조구인 낙동벼에 도열병균을 분무접종하여 형질전환체의 저항성 정도를 온실 및 포장수준에서 조사한 결과, 대부분의 형질전환체가 이병주율 및 병반 면적을 등에서 낙동벼보다 적어 도열병에 대한 저항성이 현격히 증대되었음을 확인하였다(표 3-4-1). 또한 도열병 검정에 사용한 동일 개체들을 온실수준에서 흰잎마름병균을 가위접종한 결과 형질전환체 모두가 병반장이 대조구인 낙동벼보다 반 정도로 짧아 리폭시지나아제 유전자의 도입에 의한 흰잎마름병균에 대한 저항성도 증대되었음을 이미 확인한 바 있다. 따라서 본 연구에서는 온실 단위에서 이루어진 이러한 흰잎마름병균에 대한 저항성 결과가 포장상태의 벼에서도 동일하게 얻어지는지의 여부를 확인하기 위해 수행되었다.

#### 나. 재료 및 방법

시험품종과 재배법은 벼 도열병저항성 검정에서와 같은 품종 및 동일한 방법으로 수행했으며 공시균으로는 농촌진흥청 농업과학기술원 식물병리과에서 분양 받은 벼흰잎마름병원균 K1, K2, K3 균계를 사용하였다. PSA배지를 시험관에 분주 후, 30℃의 항온기에 3-4일 정도 키운 상기 균주들을 10<sup>9</sup> cfu/ml 정도의 농도로 멸균수에 현탁하였다. 균 현탁액에 접종 가위를 담궜다가 포장에서 재배되고 있는 수잉기의 완전 전개한 잎 끝에서부터 3 cm정도 부위를 가위로 절엽 접종하였고 14일 후에 병반의 길이를 조사하였다. 벼흰잎마름병의 자연발생을 유도하기 위해 형질전환 벼가 이양된 포장 주변에 낙동벼를 심고 최고분얼기에 K1, K2, K3 균계를 각각 가위절엽 접종하여 2차 전염을 유기하였고 호숙기에 자연발병 정도를(0-9) 아래와 같은 등급으로 나누어 조사하였다.

벼흰잎마름병 자연발생 감염을 정도:

- 0: 무병반
- 1: 총엽면적의 1% 이내가 이병된 상태
- 3: 총엽면적의 1-5%가 이병된 상태
- 5: 총엽면적의 6-25%가 이병된 상태
- 7: 총엽면적의 26-50%가 이병된 상태
- 9: 총엽면적의 51% 이상이 이병된 상태

#### 다. 결과 및 고찰

포장에서 재배되고 있는 수잉기의 형질전환 벼에 절엽접종 시험한 결과, 1A5 line을 제외한 공시 전 개체에서 대조구인 낙동벼보다 K1, K2, K3균에 의한 병반 길이가 더 커져 이병성 반응을 보였다(표 3-4-4). 다만 1A5 line만은 대조구인 낙동벼보다 병반길이가 약 2-3cm 정도 작아져 다소 저항성반응을 나타내었다. 그러나 최고분얼기에 가위접종하여 벼흰잎마름병의 자연발생을 유도한 다음 호숙기에 병저항성을 검정해 본 결과, 공시한 형질전환 벼 전 개체에서 대조구인 낙동벼보다 감염율이 낮아져 저항성반응을 나타내었다.

한편, 전남지방에서 주로 재배되고 있는 고품질벼의 흰잎마름병에 대한 저항성검정 결과, K1, K2, K3균에 모두 저항성인 품종은 서간벼, 세계화벼, 주남벼, 동진1호, 신동진벼 및 화영벼였으며, K1, K2, K3균에 모두 이병성인 품종은 오대벼와 남평벼였다(표 3-4-5, 그림 3-4-2).

표3-4-4. 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질전환 벼 T<sub>3</sub>세대의 흰잎마름병에 대한 저항성 검정결과\*.

형질 전환체	병반장(cm)			자연 발병 정도 (0~9)
	K1	K2	K3	
낙동벼	6.7	7.8	8.1	7
1A2	11.3	12.4	10.2	5
1A4	8.9	7.7	9.8	4
1A5	5.2	6.5	5.3	5
1A6	7.1	10.9	8.9	3
1A8	8.1	12.3	12.9	4
1A9	9.6	12.2	10.9	4
1A10	9.7	11.0	9.1	5
1A11	5.4	12.3	10.2	4
1A12	9.0	11.0	9.9	5
1A13	10.4	11.5	12.1	5
1A17	9.9	12.3	10.8	4
1A20	10.3	12.1	17.5	6
1A21	12.1	14.8	11.0	6
1A22	9.1	11.4	9.9	4
1A23	10.4	10.6	11.1	6
1A24	8.6	10.9	11.5	5

표 3-4-5. 전남지방 고품질 벼의 흰잎마름병 저항성검정 결과.

품종별	병반장(cm)			자연발병정도 (0~9)
	K1 (cm)	K2 (cm)	K3 (cm)	
오대벼	10.5	13.8	11.1	1
서간벼	0.7	0.5	0.3	1
새계화벼	0.9	0.4	0.3	1
주남벼	0.5	0.4	0.3	0
호평벼	0.8	13.6	10.2	3
대평벼	0.1	16.7	14.6	5
동진1호	0.7	1.0	1.0	5
신동진벼	0.5	0.5	0.3	1
일품벼	2.6	9.4	0.8	1
일미벼	0.1	11.8	11.3	7
화영벼	0.6	0.3	0.3	1
남평벼	10.5	15.9	9.8	7

\* 8월 24일에 절엽집중하여 9월 20일에 병반장을 조사하였음.



그림 3-4-2. 고품질벼에 흰잎마름병균을 절엽집중하여 나타난 병반

#### 4. 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질전환 벼의 생육조사

##### 가. 서언

작물의 내병성 및 감수성은 생육상태에 따라서도 변화할 수 있기 때문에 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질전환체의 line별 생육정도가 어느 정도 다른지를 확인하기 위해 본 실험을 실시하였다.

##### 나. 재료 및 방법

형질변환벼와 대비품종인 낙동벼를 주당본수 1-2본으로, 재식거리는 30\*15 cm로 하여 6월23일에 전남농업기술원포장에 이양한 후 시비량은 11-7-8(N-P-K, Kg/10a)로 하여 전남농업기술원 표준 재배법에 준하여 재배하였다. 생육조사는 농촌진흥청 조사기준에 따라 20주당 출수기, 간장, 수장, 주당수수, 수당입수, 등숙비율과 천립중을 조사하였다.

##### 다. 결과 및 고찰

리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질전환체 개체간 생육상황의 차이가 있어 비교하기가 쉽지 않았으나 일반적으로 출수기는 8월19일에서 23일 사이로 낙동벼와 비슷하거나 조금 늦은 경향이었으며, 간장은 72-80 cm로 낙동벼(82.2 cm) 보다 작았고, 주당수수는 낙동벼(15.8개)보다 많았으나 수당입수 및 등숙비율은 낮은 경향으로 대비품종인 낙동벼보다 수량은 많지 않을 것으로 생각되었다(표 3-4-6, 그림 3-4-3).

표 3-4-6. 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질전환 벼의 생육상황.

형질 전환체	출수기 (월 일)	간장 (Cm)	수장 (Cm)	주당 수수(개)	수당 입수(개)	등숙 비율(%)	천립 중(g)
낙동벼	8.21	82.2	20.7	15.8	105.9	84.6	19.9
1A2	8.19	80.0	20.6	20.2	95.1	72.2	16.6
1A4	8.21	81.4	20.5	19.8	91.4	85.8	22.1
1A5	8.22	75.8	21.5	15.4	81.5	79.1	18.5
1A6	8.22	80.8	20.9	19.8	80.4	79.0	19.3
1A8	8.21	78.9	21.0	16.2	76.8	83.2	21.2
1A9	8.22	77.4	20.7	21.6	60.6	75.4	19.3
1A10	8.23	77.8	20.1	17.8	83.1	82.6	20.6
1A11	8.23	77.4	19.6	-	-	-	-
1A12	8.23	75.2	21.1	18.8	135.8	82.7	21.6
1A13	8.21	78.8	20.4	19.8	90.4	86.4	21.4
1A17	8.21	80.2	20.4	16.4	82.2	84.7	23.4
1A20	8.21	72.6	18.6	20.6	74.8	68.8	16.8
1A21	8.22	74.8	21.6	14.2	70.0	65.0	16.5
1A22	8.21	76.0	20.6	17.6	90.0	81.8	21.5
1A23	8.22	72.6	20.6	16.2	65.3	60.2	17.5
1A24	8.21	78.0	21.0	18.8	110.5	82.4	20.9

2005년도에 전남농업기술원 시험포장에 재배하였음.



그림 3-4-3. 전남농업기술원 시험포장에 재배한 형질전환 벼의 생육상황.

## P5. 형질전환 벼의 방어 및 병저항성 관련 유전자 발현 분석

### 가. 서언

35S promotor를 사용하여 리폭시지나아제를 과다발현시킨 형질전환벼의 도열병 저항성이 포장에서도 확인됨에 따라, 형질전환벼에서 pathogen-related 유전자의 발현을 마이크로어레이 방법으로 분석하였다.

### 나. 재료 및 방법

#### 1) 형질전환 벼 재배

껍질이 제거된 T<sub>3</sub>세대 1A24 line의 형질전환 벼 씨앗을 70% 에탄올로 소독한 후 3차증류수로 3, 4번 씻어 암상태로 3일간 발아를 유도하였다. 물은 하루에 한번씩 갈아주었다. 동일한 크기로 발아된 벼씨앗을 상토에 파종하여 2주간 28℃ 배양실에서 성장시키고 상토에 수분이 마르지 않도록 유지하였다.

#### 2) 전체 RNA 추출과 마이크로어레이 분석

2주간 배양실에서 자란 형질전환 벼와 낙동벼 잎을 각각 100 mg 취해 막자사발과 액체질소를 이용하여 잘게 잘아 QIAGEN의 RNeasy Plant Mini Kit로 RNeasy Mini Handbook의 지시에 따라 추출하였다. 추출된 RNA는 Nano Drop기기로 정성과 정량분석을 실시하였다. 추출된 RNA 400 ng으로 부터 Agilent사의 Low RNA Input Linear Amp Kit를 이용하여 cDNA를 만들고 Cyanine3 CTP와 Cyanine5 CTP로 표지된 cRNA를 PCR로 증폭시켰다. Nano Drop기기로 표지된 cRNA의 정성과 정량분석을 실시 후 1000 ng을 각각 취해 Agilent사의 In Situ Hybridization Kit Plus의 지시에 따라 rice DNA chip과 60℃ 17시간 6 rpm으로 혼성화한 후 DNA chip을 각각의 buffer로 4번 씻어 질소 가스로 물기를 제거하였다. Genepix scanner에 물기가 제거된 DNA chip을 넣고 Gene Pix Pro 4.0 프로그램으로 스캔한 후 Gene spring 6.0으로 낙동벼와 두배이상 mRNA 전사량의 차이를 나타내는 pathogen-related 유전자들을 분석하여 정리하였다.

#### 3) 자스몬산 관련 유전자 primer제조와 RT-PCR

마이크로어레이 분석결과 형질전환 벼에서 두배이상 mRNA 전사 차이를 나타내는 pathogen-related 유전자 3개를 선별하여 각각의 primer를 표 3-4-7과 같이 제조하였다. 위에서 추출된 전체 RNA 10 ug을 가지고 Stratagene사 StrataScriptFirstStrand Synthesis System kit를 이용하여 RT-PCR를 수행하였다

CR 프로그램 조건은 97도에서 5분간 변형시킨 후 95도 45초, 55도 45초, 그리고 72도 1분간 22번 반복한 후 72도 10분간 증폭시켰다. RT-PCR을 통해 얻은 생성물은 1.5 % 아가로스 젤에 전기영동하여 확인하였다.

표 3-4-7. Primer combinations used for RT-PCR

Forward Primer			Reverse Primer		
Accession (Gene)	Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')	Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')	Product size (bp)
AK107926	RJSR19	AGAAGAGCGACTACGACTACGC	RJSR20	TGGATCAGACACTGACCTGTTT	287
AK108785	RJSR469	CAATGTGATACTCCAGGCTCAA	RJSR470	CATGTCCGTAGGTGGATAAACA	239
AK060867	RJSR21	CATCGAGACCTACGCTTCTCC	RJSR22	TACTATCGCGTACGCATCTGAC	284

#### 다. 결과 및 고찰

마이크로어레이 분석 결과 표 3-4-8과 같이 6개의 pathogen-related 유전자들의 전사가 유도되고, 7개 유전자들이 억제됨을 확인 할수 있었다. 또한 RT-PCR에 의해 형질전환 벼에서 AK107926 (pathogen-related protein 1), AK108785 (wilt disease resistance protein)의 유전자가 유도되고, AK060867 (glucanase)유전자는 억제됨을 재확인하였다(그림 3-4-3).

표 3-4-8. Pathogen-related 유전자들

Description	Gene #	Fold
Spl7b regulating lesion formation	AK064111	7.04
pathogenesis-related protein (PR-1)	AK107926	6.54
wilt disease resistance protein (Ve1)	AK108785	6.28
probenazole-inducible protein (PBZ1)	AK071613	5.52
basic PR-1-type	AK060005	3.41
3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase	AK059247	2.79
putative selenium binding protein	AK071710	-2.28
race-specific resistance to fungus	AK065824	-2.36
RIM2 protein	AK065973	-2.52
pathogenesis related protein	AK109409	-2.66
germin-like protein 2	AK059812	-3.09
putative pathogenesis related protein	AK106037	-3.75
glucanase	AK060867	-4.07

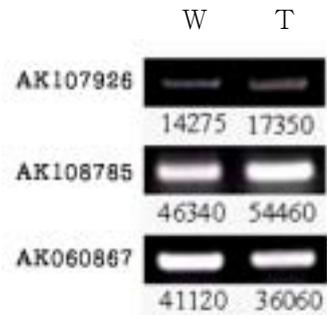


그림 3-4-3. 낙동벼(W)와 형질전환 벼(T)에서 pathogen-related 유전자의 RT-PCR 분석. 유도 유전자: AK107926 (pathogen-related protein 1), AK108785 (wilt disease resistance protein); 억제 유전자: AK060867 (glucanase).

[본 연구 결과는 연구 계획에 포함되지 않았으나, 보완 요구에 따라 추가로 첨가되었음].

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도



## 제 1 절 목표 달성도

연차별 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 목표 달성도를 아래의 1항, 2항, 3항에 나타냈다. 연차별 연구개발 목표들은 대체적으로 연구 계획서의 진도와 일치하게 달성되었으며, 연구의 최종 목표 달성도 역시 3항에 나타낸 바와 같이 계획서의 최종목표를 대체로 달성하였다고 사료된다.

### 1. 제 1 차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발 목표	평가		목표 달성도 (%)	참조부분 (제 3 장)
	평가의 착안점	평가의 척도(%)		
1. T2 형질전환 벼의 유전적 안정성 규명	1. T2 형질전환 벼에서 LOX 유전자 발현의 안정성 검정 여부	30	100	제 1 절
2. 항체의 확보	2. T2 형질전환 벼의 도열병균 race 분포 조사 여부	10	100	제 1 절 제 4 절
3. homozygous T2 형질전환 벼 line의 정립	3. 도열병에 저항성인 T2 형질전환 벼의 포장 선발 여부	10	100	제 2 절 제 4 절
4. homozygous T2 형질전환 벼 line의 종자 확보	4. 흰잎마름병에 저항성인 T2 형질전환 벼의 포장 선발 여부	10	100	제 4 절
5. 도열병 포장 저항성 T2형질전환 벼 line 선발	5. T2 형질전환 벼의 생육 및 수량에 미치는 영향 규명 여부	10	100	제 4 절
6. 형질전환 벼의 생육 및 수량에 미치는 영향 규명	6. homozygous T2 종자를 확보 정도	30	100	제 3 절 제 4 절

2. 제 2 차년도 의 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발 목표	평가		목표 달성도 (%)	참조부분 (제 3 장)
	평가의 착안점	평 가 의 척도(%)		
1. homozygous T3 형질전환 비의 재배	1. homozygous T3 형질전환 비에서 LOX 유전자 발현의 안정성 정도	30	100	제 1 절
2. homozygous T3 형질전환 비의 유전자 발현 검정	2. homozygous T3 형질전환 비에서 대사산물 조사 여부	20	100	제 2 절 제 3 절
4. homozygous T3 형질전환 비의 단백질 발현 분석	3. homozygous T3 형질전환 비의 도열병 저항성의 발못자리 검정 여부	10	100	제 4 절
5. homozygous T3 line 선별	4. 도열병에 저항성인 homozygous T3 형질전환 비의 포장 선발 여부	20	100	제 4 절
6. homozygous T3 line에서 대사산물의 결정	5. 흰잎마름병에 저항성인 homozygous T3 형질전환 비의 포장 선발 여부	10	100	제 3 절 제 4 절
7. 유전적으로 안정한 homozygous T3 종자 확보	6. homozygous T3 형질전환 비의 생육 및 수량에 미치는 영향 규명 여부	10	100	제 3 절 제 4 절
8. homozygous T3 형질전환 비의 도열병 포장 검정 및 race 분포 조사				
19. homozygous T3 형질전환 비의 생육 및 수량 조사				
10. homozygous T3 형질전환 비의 흰잎마름병균 K1, K2, K3 race 집종 및 포장 저항성 검정				

3. 최종 평가의 착안점 및 목표 달성도

평가		목표 달성도 (%)	참조부분 (제 3 장)
평가의 착안점	평 가 의 척도(%)		
1. 도열병에 저항성을 나타내는 homozygous T3 형질전환벼 line을 생산하였는가?	30	100	제 1 절 제 2 절
2. 도열병에 저항성을 나타내는 homozygous T3 line에서 활성 화합물이 동정되었는가?	30	100	제 3 절 제 4 절
3. 도열병에 저항성을 나타내는 homozygous T3 종자를 생산하였는가?	40	100	제 4 절

## 제 2 절 관련 분야에의 기여도

자스몬산은 식물체의 systemic acquired resistance나 local resistance response에 관련하여 상처, 온도 등의 비생물적 스트레스와 병해충등의 생물적 스트레스에 대한 식물체의 방어 기작에 관련되는 중요 물질이다. 본 연구에서는 1) 자스몬산의 생성 과정에서 생합성의 초기 단계에 위치하면서 부분적인 속도 결정 단계로 알려져 있는 리폭시지나아제와 알렌 옥사이드 합성 효소의 유전자의 발현 기작을 분석하였고, 2) 이들 유전자가 encode하는 단백질의 특성을 규명하였으며, 3) 자스몬산 처리에 따른 벼의 스트레스 저항성을 분석하였고, 4) 이들 유전자를 이용하여 형질 전환된 벼를 생산하고, 5) 형질 전환된 벼의 병해충 저항성을 분석하였다. 이러한 연구는 수도작 외에도 농업 생산성을 증대 시킬 수 있는 다른 작물로의 확대 연구가 가능하다.

### 1. 기술적 측면에서의 기여도

본 연구를 통하여 개발된 리폭시지나아제와 알렌 옥사이드 유전자를 이용하여 생산된 형질 전환 벼는 제 2 장 제 14 절에서 기술한 바와 같이 병해충에 대한 저항성을 증대 시킬 수 있음이 확인되었다. 특히 옥수수의 리폭시지나아제를 이용하여 형질 전환된 벼는 우리 농업에서 심각한 문제인 도열병에 대하여 강력한 저항성을 보여주었다. 따라서 리폭시지나아제 유전자를 이용한 광범위 스트레스 저항성 부여 기술은 다양한 종류의 주요 경제 작물에 응용되어 확대 연구될 수 있는 가능성을 열었다고 판단된다.

### 2. 학문 발전에의 기여도

본 연구는 다양한 종류의 스트레스 반응 기작에서 중요한 역할을 하는 자스몬산의 생합성 경로에 관한 연구이며, 식물 호르몬에 의한 작물의 생리 생화학적 측면을 다루고 있으므로 작물학, 식물생리학, 분자 생물학, 생화학 분야의 발전에 기여했다고 판단된다. 본 연구의 결과는 다음과 같이 학술지나 학술대회에서 발표되었

다.

Da-Eun Lee, In-Jung Lee, Oksoo Han, Myung-Gi Baik, Sung-Sook Han, Kyoungwhan Back, Pathogen resistance of transgenic rice plants expressing mitogen-activated protein kinase 1, MK1, from *Casium annuum*, *Mol. Cells* 17 (1), 81-85, 2004. IF=0.979

Ganesh K Agrawal, Shigeru Tamogami, Oksoo Han, Hitoshi Iwahashi, Randeep Rakwal, Rice octadecanoid pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317: 1-15, 2004. IF=2.935

Ayoung Lee, Kyoungwon Cho, Sungkuk Jang, Randeep Rakwal, Hitoshi Iwahashi, Ganesh Kumar Agrawal, Jaehan Shim, and Oksoo Han, Inverse correlation between jasmonic acid and salicylic acid during early wound response in rice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318: 734-738, 2004. IF=2.935

한옥수, 김은선, 헤마르 쿠마르, 리폭시지나아제의 게놈 유전자와 프로모터 및 이의 용도, 출원번호: 10-2001-0077807 (2001년 12월 10일), 등록번호: 0441721 (2004년 7월 15일), 대한민국 특허청.

J. Song, D. E. Lee, S. Jung, H. Kim, O. Han, B. H. Cho, I. J. Lee, and K Back, Characterization of transgenic rice plants expressing an *Arabidopsis* FAD7, *Biologia Plantarum*, 48(3): 361-366, 2004. IF=0.8

조경원, 한옥수, 생물산업의 현황과 발전방향, 전북대학교

Oksoo HAN, Sungkook CHANG, Kyoungwon CHO, Akihiro KUBO, Hitoshi IWAHASHI, Randeep RAKWAL, Ganesh K. AGRAWAL, Stress Response of Transgenic Rice Overexpressing Dual Positional Specific Lipoygenase Gene

under Ozone, APGC Symposium, Tskuba, Japan, 2004. 10. 19-22.

Seung Hee Lee, Sung Ju Ahn, Yang Ju Im, Kyoungwon Cho, Gap-Chae Chung, Baik Ho Cho, Oksoo Han, Differential impact of low temperature on fatty acid unsaturation and lipoxygenase activity in figleaf gourd and cucumber roots, Biochem. Biophys. Res. Commun. 330: 1194-1198, 2005. IF=2.935.

Kyoungwon Cho, Sungkuk Jang, Oksoo Han, Analysis of positional specificity of wound-inducible lipoxygenase from maize and function of its dual positional specificity in plant defense. Asian Symposium on Plant Lipids, 2005. 11. 24-28, Tokyo, Japan.

Jihoon Han, Oksoo Han, Roles of putative chloroplast targeting sequence and PLAT domain in the wound-inducible lipoxygenase from maize. KSBMB Annual Meeting, 2005. 5. 19-20. Seoul, Korea.

Kyoungwon Cho, Oksoo Han, Transcriptional profiling of transgenic rice overexpressing dual positional specific lipoxygenase gene from maize. KSBMB Annual Meeting, 2005. 5. 19-20. Seoul, Korea.

### 3. 경제, 산업적 측면에의 기여도

본 연구의 산업적 효용가치를 고려하여 다음과 같이 특허를 출원하였거나 출원할 예정이다.

한옥수, 조백호, 차광홍, 이영만, 조경원, 병 저항성 작물 개발을 위한 리폭시지나아제 유전자의 이용, 대한민국 특허청, 2006년 00월 00일.

## 제 5 장 연구개발 결과의 활용계획



## 제 1 절 추가 연구의 필요성

본 연구의 결과로 볼때 리폭시지나아제 유전자를 이용하여 특정군의 병원균에 저항성을 지닌 벼를 생산할 수 있었다. 그러나 제 3 장 제 3 절 상처 및 염 스트레스에 대한 형질전환 벼의 반응 연구 결과로 볼때, 과다발현된 리폭시지나아제는 reactive oxygen species (peroxide 등)를 생산함을 알 수 있었고, 그 결과 세포막의 지방산 조성을 변화 시킨다고 사료되며, 세포막의 물질 수송 속도에 있어서 큰 변화가 있음을 알 수 있었다. 따라서, 완벽한 광범위 스트레스 저항성 작물을 개발하기 위해서는 리폭시지나아제 유전자와 다른 종류의 유전자, 예를 들면 물질의 수송과 관련되는 유전자를 병합하여 이용하는 연구가 필요하다고 판단된다. 이러한 맥락에서 리폭시지나아제 유전자와 스트레스관련 유전자(RNA 결합 단백질 유전자, aquaporin 유전자 등)를 병합한 형질전환 벼를 개발하는 연구를 추진중이다.

## 제 2 절 타 연구에의 응용

### 1. 리폭시지나아제 경로와 관련된 생화학적 연구에의 응용

본 연구에서 개발된 리폭시지나아제는 매우 특이적으로 dual positional specificity를 보여준다 (Kim et al., 2001). 리폭시지나아제의 이러한 dual positional specificity는 리폭시지나아제가 광범위 스트레스 저항성 식물체의 육성을 위하여 매우 적절한 유전자임을 잘 반영하고 있다. 따라서 본 연구에서 개발된 리폭시지나아제를 이용한 형질 전환 벼는 리폭시지나아제 경로와 관련되는 많은 생화학적 연구의 모델식물로 사용될 수 있으며, 이러한 모델식물을 이용한 oxylipin 대사물질의 상세한 분석은 매우 흥미로운 연구 결과들을 줄 수 있을 것으로 예상된다.

## 2. 자스몬산 생합성과 관련된 분자 생물학적 연구에의 응용

본 연구에서는 리폭시지나아제 뿐 아니라, 알렌 옥사이드 합성 효소 유전자를 세포질또는 chloroplast에서 조직 특이적으로 발현시킬 수 있는 형질 전환 벼를 생산하였다. 이러한 조직 특이적으로 유전자의 발현이 조절되는 형질 전환 벼는 자스몬산 생합성 경로에 관련되는 분자생물학적 연구를 위한 모델 식물로 사용될 수 있다.

## 제 3 절 기업화 추진 방안

현재 추진 중인 리폭시지나아제 유전자와 스트레스관련 유전자(RNA 결합 단백질 유전자, aquaporin 유전자 등)를 이용한 복합재해내성 형질전환 벼를 개발하는 연구에서는 기업체를 협동연구기관으로 하고 있으며, 협동연구기관에서 기업화를 담당하여 추진하고 있다.

제 6 장    연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술  
정보



## 제 1 절 리폭시지나아제와 스트레스 관련 기술정보

자스몬산이 식물체의 중요 호르몬으로 분류된 이래로 산발적으로 연구되어왔던 리폭시지나아제 관련되는 분자생물학적 연구는 본 연구가 시작되었던 2004년부터 급격히 증가 되어 왔다. 2004부터 2006년 현재까지 3년동안 ISI Web of Science 에 등록된 리폭시지나아제 관련 논문은 1,500 편에 이르고 있다. 이러한 사실은 리폭시지나아제에 대한 학문적, 실용적 중요성을 반영하고 있다. 이들 발표된 논문들은 대체로 과거 병저항성에 주로 관련된다고 알려졌던 자스몬산이 지질의 과산화를 통한 일반적인 산화 스트레스에 깊이 관여하고 있다는 결과들을 일관성있게 제시하고 있다. 따라서, 식물 생리학에 있어서 리폭시지나아제의 역할은 광범위하게 재정립되어가고 있으며 과거 알려졌던 병 저항성과 함께, 염, 저온, 고온, 가뭄 등의 비생물적 스트레스 반응에서도 그 중요성은 현저히 인식되어가고 있다.

## 제 2 절 스트레스 저항성 작물 생산을 위한 기술 정보

제 1 절에서 기술한 바와 같이 리폭시지나아제에 대한 분자 생물학적 연구가 현저히 증가하고 있으나, 이들 축적된 정보들을 이용한 스트레스 저항성 작물의 생산은 초보적인 수준이다. 자스몬산 생합성 변이 종들이 *Arabidopsis* 등에서 알려지면서 리폭시지나아제, 알렌 옥사이드 합성효소, cyclase 등의 유전자와 리놀렌산을 세포막으로부터 유리시키는 phospholipase 를 이용하여 스트레스 저항성 식물체를 창출하려는 노력들이 이루어지고 있으나, 아직 성공한 예는 발표되지 않고 있다.



## 제 7 장   참고문헌



- Agrawal GK, Jwa NS, Shibato J, Han O, Iwahashi H, Rakwal R, 2003, *Biochem Biophys. Res. Comm.* 310, 1081-1090.
- Aldridge DC, Galt S, Giles D, Turner WB, 1971, *J. Am. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1623-1627.
- Andresen I, Becker W, Schluter K, Burges J, Parthier B, Apel K, 1992, *Plant Molecular Biology* 19: 193-204.
- Aydiushiko S, Croft KPC, Brown GC, Jackson DM, Hamilton-Kemp TR, Hildebrand D, 1995, *Plant Physiol* 109: 1227-1230.
- Baldwin IT, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 8113-8118.
- Bartels D, Nelson D, 1994, *Plant Cell Environ.* 17: 659-667.
- Bate NJ, Rothstein SJ, 1998, *Plant J* 16: 561-569.
- Beaudoin N, Rothstein SJ, 1997, *Plant Mol Biol* 33: 835-846.
- Becker W, Apel K, 1992, *Plant Mol. Biol.* 19: 1065-1067.
- Bell E, Creelman RA, Mullet JE, 1995, *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8675-8679.
- Bell E, Mullet JE, 1991, *Mol Gen Genet* 230: 456-462.
- Bell E, Mullet JE, 1993, *Plant Physiol* 103: 1133-1137.
- Benedetti CE, Xie DX, Turner JG, 1995, *Plant Physiol.* 109 : 567-572.
- Berger S, Bell E, Mullet JE, 1996, *Plant Physiol.* 111 : 525-531.
- Bergey DR, Howe GA, Ryan CA, 1996, *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 93: 12053-12058.
- Bohlmann H, Vignutelli A, Hilpert B, Miersch O, Wasternack C, Apel K, 1998, *FEBS Lett* 437: 281-286.
- Brash AR, 1999, *J Biol Chem* 274: 23679-23682.
- Burow GB, Gardner HW, Keller NP, 2000, *Plant Mol. Biol.* 42(5): 689-701.
- Chaudhry B, Mueller-Uri F, Cameron-Mills V, Gough S, Simpson D, 1994, *Plant J.* 6: 815-824.
- Cheong YH, Chang HS, Gupta R, Wang X, Zhu T, Luan S, 2002, *Plant Physiol* 129: 661-677.
- Cheong JJ, Choi YD, 2003, *Trends in Genet.* 19, 409-413.

- Chuan CL, Ching HK, 1996, *Plant Sci.* 114: 121-128.
- Cipollini DF, Redman AM, 1999, *J. of Chem. Ecol.* 25: 271 - 281
- Clerivet A, Alami I, 1999, *Plant Sci.* 148: 105-110.
- Cohen Y, Gisi U, Niderman T, 1993, *Phytopathology* 83: 1054-1062.
- Creelman RA, Mullet JE, 1997, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 355-381.
- Cui H, Takeoka Y, Wada T, 1995, *Jpn. J. Crop Sci.* 64: 593-600.
- Czapski J, Saniewski M, 1992, *J. Plant Physiol.* 139: 265-268.
- Demole E, Lederer E, Mercier D, 1962, *Helvetica Chimica Acta* 45: 675-685.
- Deng W, Grayburn WS, Hamilton Kemp TR, Collins GB, Hildebrand DF, 1992, *Planta* 187: 203-208.
- Devi PUM, Reddy PS, Rani NRU, 2000, *Eur. J. Plant Pathol.* 106(9): 857-865.
- Doares SH, Syrovets T, Weiler EW, Ryan CA, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4095-4098.
- Doares SH, Narvaez-Vasquez J, Conconi A, Ryan CA, 1995, *Plant Physiol.* 108: 1741-1746.
- Droby S, Porat R, Cohen L, Weiss B, Shapiro B, Philosoph-Hadas S, Meir S, 1999, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124(2): 184-188.
- Dubbs WE, Grimes HD, 2000, *Plant Physiol* 123: 1269-1279.
- Ellen Hornung, Matthias Walther, Hartmut Kuhn, Ivo Feussner, 1999, *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4192-4197.
- Epple P, Apel K, Bohlmann H, 1995, *Plant Physiol.* 109: 813-820.
- Fan X, Mattheis JO, 1999, *HortSci.* 34: 310-312.
- Farmer EE, Ryan CA, 1992, *Plant Cell* 4: 129-134.
- Farmer EE, Ryan CA, 1990, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87: 7713-7716.
- Farmer EE, Ryan CA, 1992b, *Plant Physiol.* 98: 995-1002.
- Farmer EE, Caldelari D, Pearce G, Walker-Simmons MK, Ryan CA, 1994, *Plant Physiol.* 106: 337-342.

- Feussner I, Wasternack C, 2002, *Annu Rev Plant Biol* 53: 275-297
- Finch-Savage WE, Blake PS, Clay HA, 1996, *J. Exp. Bot.* 47: 661-667
- Flowers TJ, Reo AR, 1981, *New Phytol.* 88: 363-373.
- Folkard A, Marco C, Wopereis S, 2001, *Field Crops Res.* 127-137.
- Franceschi VR, Grimes HD, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6745-6749.
- Freys B, Benedetti CE, Penfold CN, Turner JG, 1994, *Plant Cell* 6: 751-759.
- Fukuchi-Mizutani M, Ishiguro K, Nakayama T, 2000, *Plant Sci.* 160(1): 129-137.
- Gbel C, Feussner I, Hamberg M, Rosahl S, 2002, *Biochim. Biophys. Acta* 584: 55-64.
- Gregorio GB, Senadhira D, 1993, *Theor. Appl. Genet.* 86: 333-338.
- Griffiths A, Jones HG, Tomos AD, 1997. Applied abscisic acid, root growth and turgor pressure responses of root of wild-type and the ABA-deficient mutant, *Notabills of tomato.* 151: 60-62.
- Grover A, Singla SL, Pareek A, 1996, *Proc. of the Third International Rice Genetics Congress, IRRI, Manila, Philippines.* 894-898.
- Gundlach H, Muller MJ, Kutchan TM, Zenk MH, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 2389-2393.
- Ha M, Kim DK, Kim SY, Kang BG, Oh S, 1996, *J. Biochem. Mol. Biol.* 29: 564-568.
- Harms K, Atzorn R, Brash A, Kuhn H, Wasternack C, Willmitzer L, Pena-Cortes H, 1995, *Plant Cell* 7: 1645-1654.
- Hartmond U, Yuan R, Burns JK, Grant A, Kender WJ, 2000, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125: 547-552.
- Heenan DP, Lewin G, McCaffery DW, 1988, *Aust. J. of Exp. Agric.* 28: 343-349.
- Hildebrand DF, 1989, *Physiol. Plantarum* 76: 249-253.
- Hildmann T, Ebner M, Pena-Cortes H, Sanchez-Serrano JJ, Willmitzer L, Prat S, 1992, *Plant Cell* 4: 1157-1170.
- Jalloul A, Montillet JL, Assigbetse K, 2002, *Plant J.* 32(1):1-12.
- Jensen AB, Poca D, Rigaud M, Freyssinet G, Pages M, 1997, *Plant Mol. Biol.*

- 33: 605-614.
- Johnson R, Narvaez J, An GH, Ryan C, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9871-9875.
- Khan AA, 1968, Plant Physiol. 43: 1463-1465.
- Khan MSA, Hamid A, Karim MA, 1997, J. Agron. 179: 163-169.
- Khatun S, Flowers TJ, 1995, Plant Cell Environ. 18: 61-67.
- Kim E-S, Back K, Baik M, Choi E, Han O, 2001, J Biochem Mol Biol 34: 259-261.
- Kim ES, Kim H, Park R, Lee Y, Han O, 2002, J. Plant Physiol. 159(11): 1263-1265.
- Kim ES, Choi E, Kim Y, Cho K, Lee A, Shim J, Rakwal R, Agrawal GK, Han O, 2003, Plant Mol. Biol. 52(6):1203-1213.
- Kim S, Choi J, Costa MA, An G, 1992, Plant Physiol. 99: 627-631.
- Koch T, Krumm T, Jung V, Engelberth J, Boland W, 1999, Plant Physiol 121: 153-162.
- Koda Y, 1992, Int. Rev. Cytol. 135 : 155-199.
- Kolomiets MV, Chen H, Gladon RJ, 2000, Plant Physiol. 124(3): 1121-1130.
- Lee TM, Lur HS, Lin YH, Chu C, 1996, Plant Cell Environ. 19: 65-74.
- Leon J, Sanchez-Serrano JJ, 1999, Plant Physiol Biochem 37: 373-380.
- Linghe Z, Shannon MC, 2000. Salinity effects on seedling growth and yield components of rice.
- Lopez R, Dathe W, Bruckner C, Miersch O, Sembdner G, 1987, Biochem. Physiol. Pflanzenphysiol. 182: 195-201.
- Lutts S, Kinet, JM, Bouharmont J, 1995, J. Exp. Bot. 46: 1843-1852
- Mass EV, Hoffman GJ, 1977, J. Irrig. Drain. Div., ASCE 103(IR2): 115-134.
- McConn M, Creelman RA, Bell E, Mullet JE, Browse J, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 5473-5477
- McConn M, Browse J, 1996, Plant Cell 8: 403-416.
- Meyer A, Miersch O, Buetter C, Dathe W, Sembdn G, 1984, J. Plant Growth

- Regul. 3: 1-8.
- Montague MJ, 1997, *J. Plant Growth Regul.* 16: 11-19.
- Montillet JL, Agnel JP, Ponchet M, 2002, *Plant Physiol. Biochem.* 40(6-8): 633-639.
- Moons A, Prinsen E, Bauw G, Montagu MV, 1997, *Plant Cell* 9: 2243-2259.
- Mueller MJ, Brodschelm W, Spannagl E, Zenk H, 1993, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90: 7490-7494.
- Narale RP, Subramangam TK, Mukherjee RK, *Agron. J.* 61: 341-343.
- Narayanan K, Krishnaraj K, Sree S, Rangaswamy SR, 1990, In *Rice Genetics II*. IRRI, Los Banos, Laguna, Philippines 167-173.
- Nishiuchi T, Kodama H, Yanagisawa S, Iba K, 1999, *Plant Physiol* 121: 1239-1246.
- Ohita H, Shida K, Peng YL, Furusawa I, Shishiyama J, Aibara S, Morita Y, 1991, *Plant Physiol* 9: 94-98.
- Ohta H, Shirana Y, Tanaka K, Morita Y, Shibata D, 1992, *Eur. J. Biochem.* 206: 331-336.
- Park SH, Pinson SRM, Smith RH, 1996, *Plant Mol. Biol.* 32: 1135-1148.
- Parthier B, 1991, *Biol. Acta* 104: 446-454.
- Pena-Cortes H, Albrecht T, Prat S, Weiler EW, Wilmitzer L, 1993, *Planta* 191: 123-128.
- Penninckx IAMA, Eggermont K, Terras FRG, Thomas BPHJ, De Samblanx GW, Buchala A, Metau JO, Manners JM, Broekaert WF, 1996, *Plant Cell* 8: 2309-2323.
- Raghavendra AS, Bhaskar RK, 1987, *Plant Physiol.* 83: 732-734.
- Rakwal R, Tamogami S, Agrawal GK, Iwahashi H 2002, *Biochem Biophys Res Commun* 295: 1041-1045.
- Rakwal R, Tamogami S, Kodama O, 1996, *Biosc. Biotech. Biochem.* 60(6): 1046-1048
- Reinbothe S, Mollenhauer B, Reinbothe C, 1994, *Plant Cell* 6: 1197-1209.

- Reinbothe S, Reinbothe C, Parthier B, 1993b, *Plant J.* 4: 459-467.
- Reinbothe S, Reinbothe C, Parthier B, 1993c, *J. Biol. Chem* 268: 10606-10611.
- Reinbothe S, Reinbothe C, Heintzen C, Seidenbecher C, Parthier B, 1993a, *EMBO J.* 12: 1505-1512.
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE, 2000, *Plant Cell* 12: 707-719.
- Royo J, Leon J, Vancanneyt G, Albar JP, Rosahl S, Ortego F, Castanera P, Sanchez-Serrano JJ, 1999, *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1146-1151.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989, *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sankhla N, Sankhla D, 1968, *Physiol, Plant.* 62: 553-560.
- Schaffrath U, Zabbai F, Dudler R, 2000, *Eur J. Biochem.* 267(19): 5935-5942.
- Schweizer PA, Buchala P, Silverman M, Seskar I, Raskin J, Mettraux JP, 1997, *Plant Physiology* 114: 79-88.
- Schweizer P, Buchala A, Dudler R, Mettraux J, 1998, *Plant J.* 14: 475-481.
- Sembdner G, Parthier B, 1993, *Annul. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 569-589.
- Seo HS, Song JT, Cheong JJ, Lee YH, Lee YW, Hwang I, Lee JS, Choi YD, 2001, *Proc Natl Acad Sci* 98: 4788-4793
- Siedow JN, 1991, *Annu. Rev. Plant Physiol. Palnt Mol. Biol.* 42: 145-188.
- Weichert H, Kolbe A, Kraus A, Westernack C, Feussner I, 2002, *Planta* 215: 612-619.
- Weichert H, Stenzel I, Berndt E, Westernack C, Feussner I, 1999, *FEBS Lett* 464: 133-137.
- 농촌진흥청. 농사시험조사기준(식물환경편), 1995.
- 한옥수, 이영만, 박노동, 최은영, 박재여, 김해영, 조경원, 이아영, 광범위 기질 특이적 리폭시지나아제 및 이의 용도, 대한민국 특허청: 출원번호: 10-2001-0047600, 2001. 08. 08.
- 한옥수, 농업첨단 최종연구보고서, 자스몬산 생합성 경로 조작을 통한 광범위 스트레스 저항성 벼 개발, 2002.