

최 중
연구보고서

내재해성 벼를 위한 유용유전자의 기능규명
Functional analysis of useful genes for
stress-tolerant rice

연구기관

전남대학교 농업생명과학대학

농림수산식품부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “내재해성 벼를 위한 유용유전자의 기능규명” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008년 4월 24일

주관연구기관명 : 전남대학교
총괄연구책임자 : 조 백 호
세부연구책임자 : 김 철 수
협동연구기관명 : 식물보호기술(주)
협동연구책임자 : 정 수 진
위탁연구기관명 : 전남 농업기술원
위탁연구책임자 : 김 선 곤

요 약 문

I. 제 목

내재해성 벼를 위한 유용유전자의 기능규명

II. 연구개발의 목적 및 필요성

이동할 수 없는 식물은 성장하면서 다양한 환경 스트레스에 노출되며, 이러한 스트레스는 식물의 생장, 발달 및 생산성 등에 큰 영향을 미친다. 스트레스는 다른 생물체에 의해 일어나는 생물적 (병.충해, 바이러스 등) 스트레스와, 물리적 또는 화학적 환경의 변화에 의해 일어나는 비생물적 (냉해, 가뭄, 건조, 염해, 공해물질 등) 스트레스가 있다. 이러한 스트레스에 대한 식물의 반응은 유전자 발현의 변화와 이에 의한 세포 대사작용의 변화를 통하여 생장을 또는 생산성의 변화를 가져오기 때문에 (Boyer, 1982), 식물의 생산성을 높이기 위해서는 다양한 복합 환경 스트레스에 내성이 강한 새로운 작물의 개발이 필수적이다.

세계적으로 형질전환을 이용하여 제초제 저항성, 바이러스 저항성, 해충 저항성, 진균병 저항성 및 재해 저항성 작물들이 개량되어져 왔으나, 아직까지도 성공 사례는 매우 드물다. 주곡작물인 벼의 자급자족을 위협하는 가장 큰 요인 중의 하나가 병해이지만, 환경보전형 농업의 필요성이 대두되면서 농약의 사용에 대한 규제가 심화되고 있어 생물적 방제 혹은 저항성 품종에 의한 병방제가 절실히 요구되고 있는 상황에서 벼의 다수확을 안정적으로 확보하기 위해서는 특히 도열병, 흰잎마름병, 벼알마름병 등에 대해 내병성을 보이는 새로운 벼 품종의 분자육종이 필요하다. 이를 달성하기 위해서는 가능한 많은 종류의 식물유전자들의 기능을 분석함으로써 내병성 유전자원을 발굴해야 한다.

또한 작물의 경작지의 지속적인 감소에 대체하는 방법으로 간척지와 같은 고염 축적 토양을 이용한 토양 이용의 극대화를 꾀하기 위해서는 염해에 내성을 가진 작물의 육종이 시급하다 하겠다. 염해 스트레스는 Na^+ 와 Cl^- 의 농도가 원인이 되어 과도한 이온 또는 hyper-osmotic 스트레스를 받음으로써 결국은 식물체를 죽게 만든다 (Blumwald, 2000; Zhu, 2001). 염해를 받은 식물은 생장이 감소하고 cell division과 expansion이 억제되며 death가 촉진된다. 또한 membrane disorganization, 활성산소종, metabolic toxicity, 광합성 억제 등의 효과를 나타낸다 (Hasegawa et al., 2000; Zhu, 2002). 이러한 환경 스트레스 조건 하에서 작물이 생장 또는 발달하기 위해서는 염 이온의 항상성 기작을 밝혀내어 빠르게 주변 환경에 적응하는 것이 무엇보다도 필요하다. 그러한 기초적인 염

해 내성 기작을 밝힌다면 염해 내성 작물의 이용이 가능하리라 생각한다. 또한 병해와 같은 생물적 스트레스와 염해같은 비생물적 스트레스 사이에는 상호 연관된 신호 전달체계를 공유하고 있다. 이렇듯 병해 및 염해에 대한 내성 유전자들을 발굴해 상호 특성을 밝히는 연구개발은 복합적인 환경 스트레스에 대한 유용한 작물의 창출에 필요하리라 생각한다. 식량자원이 무기화되며 국제 곡물가격이 연이어 상승하고 있는 요즘 내병성 및 내염해성이 뛰어난 작물의 신품종 연구개발은 위기에 처한 국내의 농업에 있어 새로운 활력소가 될 것으로 생각한다.

특히 곡물의 배유는 현재 가장 간단한 식량 자원으로서, 경제적으로 가장 중요한 생물학적 구조이다. 또한 배유는 식물의 중복수정으로 인한 생산물로서 아주 특이한 기작에 의해 발생되어진다. 특히 배유의 독특한 가치는 식량 자원으로써 뿐만 아니라, 배유의 grain-filling pathway로 일련의 진화 과정을 엿볼 수 있는 중요한 잣대가 될 수 있다. 즉, 배유에는 starch 와 저장 단백질 생합성을 할 수 있는 유일한 구조이기 때문이다. 그러나 현재 이렇게 유전학적 중요함 모델이 될 수 있는 배유에서 환경스트레스에 대한 분자 생물학적 및 생화학적 지식 기반이 상당히 부족한 실정이다. 따라서 본 연구를 통하여 배유에서 환경스트레스에 대한 내성 유전자를 분리하여 기능을 밝히고자한다. 결론적으로 본 과제는 새로운 내병성 및 염해 내성 유전자들을 분리하여 그 기능을 규명함으로써 차후 전통적인 식물육종 방법에 의해 내재해성인 벼를 창출할 수 있는 분자육종 유전자원을 얻고자 함이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

분자생물학, 생리학 및 유전공학적 방법을 이용하여 식물의 병해 및 염해 스트레스 적응에 핵심적인 역할을 하는 유전자들을 확보하여 이들의 병해 및 염해 내성관련 기능을 밝히기 위해 병해 및 염해 내성관련 신호전달 체계를 분석하며, 형질전환에 의해 이들 유전자를 식물에 도입하여 그 기능을 분석함으로써 병해 및 염해 내성 식물을 생산할 수 있는 유전자원에 대한 연구를 수행한 본 연구과제의 내용 및 범위를 요약하면 다음과 같다.

1. 벼에서 병원균에 반응하는 MAPK 신호전달체계의 내병성 기능분석

Arabidopsis 와 담배와 같은 쌍자엽 식물에서는 활발한 연구 덕분에 여러 MAPK들이 분리되어 특성화 되었다. 그러나 경제적으로 중요한 벼에서는 그에 대한 연구가 미흡하여 단지 몇 개의 MAPK가 분리되었으며 그 생리학적 기능에 대한 정보 또한 미흡한 상태이다. 그래서 본 연구에서는 병원균 관련

OsBWMK1나 OsBIMK1를 각각 인산화 시켜주는 upstream MAPK kinase을 분리한 후 재조합 단백질을 순수 정제하여 *in vitro* protein phosphorylation 실험을 통해 병저항성에 관여하는 벼의 MAPK cascade를 부분적으로 밝혔다. 또한 담배의 NtMEK2^{DD}와 NtMEK2^{KR} 유전자를 벼에 형질전환 시켜 쌍자엽식물(담배)과 단자엽식물(벼)에서의 MAPK cascade가 보존되어 있으며 벼에서도 병저항성 관련 MAPK pathway가 과산화수소의 과다생산에 관련되어 있으며 최종적으로 과민감 반응을 보인다는 사실을 밝혔다. 즉 벼의 OsMAPKK를 분리하여 내병성 관련 MAPK pathway의 기능에 대해 연구를 수행하였다. 본 연구에 의해 개발된 벼 형질전환체는 차후에 병저항성 관련 MAPK의 기질이나 전사 조절인자 또는 하위의 병저항성에 관련된 여러 유전자들을 선발할 수 있는 좋은 재료가 될 수 있으리라 생각한다.

2. 염해 내성관련 유전자의 분리 및 기능분석

종자 배유 내염성 유전자 발굴 및 기능 분석을 하기 위하여 배유로부터 yeast system을 이용해 염해에 대한 내성 유전자를 분리 및 확보하며 과다발현 형질전환 식물체를 통한 유전자의 내염성 기능을 분석 하였다. 본 연구의 내용을 살펴보면 제작된 배유 cDNA library로부터 염해 내성 배유 유전자 분리 및 확보를 위해 yeast screening을 통하여 염해 내성 유전자를 확보하였고 염 내성 유전자들 중 SAT79 유전자의 분자적 기능을 살펴보기 위해 애기장대로부터 SAT79 유전자의 상동유전자 (AtSAT79)를 분리하여 과다발현 형질전환체들을 제작한 후, 유전자의 기능을 살펴보기 위해 우수 형질 순종 라인을 확보하였다. 또한 AtSAT79 유전자의 염해에 대한 분자적 기능을 살펴보기 위해 과다발현 형질전환체들로부터 염해 처리 후, 뿌리 길이 생육을 조사하였을 뿐만아니라 EGFP를 이용한 형질전환체를 제작한 후, 우수 순종 라인을 분리하였고, Confocal microscopy를 이용하여 AtSAT79 단백질의 세포내 위치를 탐색하였다. 본 연구 과제를 통해 발굴되어 그 기능이 분석된 종자 배유 내염성 SAT79 유전자를 이용한 차후 염해 내성 작물의 창출이 가능하리라 생각하며 염해 내성 신호전달 체계에 대한 이해를 높여 주었다 생각한다.

3. 내재해성 유전자의 벼 형질전환 개체 육성

식물체의 기초연구 뿐 아니라 생명공학을 이용한 품종육성에 가장 큰 제약은 효과적인 형질전환 방법 및 homo line 생산까지의 긴 시간적 문제이다. 또한 품종과 사용되는 조직, vector, *Agrobacterium* strain 등 조건에 따라 재분화시 배지 및 성장조절 물질의 조건이 다르고 형질전환 효율이 다른 것으로 알

려져 있다. 벼의 조직배양에서는 공통적으로 재분화의 성공률이 낮고 배양기간이 길고 복잡하여 긴 시간의 소요로 유전자의 형질을 알고자하는데 많은 제약이 따르고 있다. 그래서 본 연구과제를 통해 조밀하고 잘 건조된 최상의 캘러스를 선별하는 방법을 통해 재현성이 높고 고효율의 안정적인 벼 형질전환 시스템을 확립하였다.

4. 형질전환 벼의 병해 포장저항성 및 내염성 평가

생물학적 또는 비생물학적 스트레스에 대한 식물의 반응은 유전자 발현의 변화와 이에 의한 세포 대사작용의 변화를 통하여 생장을 또는 생산성의 변화를 가져오기 때문에, 식물의 생산성을 높이기 위해서는 다양한 복합 환경 스트레스에 내성이 강한 새로운 작물의 개발이 필수적이다. 그러나 복합 환경 스트레스에 반응하여 내성을 보이는 기능을 가진 유전자를 이용하여 새로운 작물을 창출하더라도 형질전환체가 환경의 조건이 변화가 없고 일정한 온실이나 식물 생장상에서는 외래 유전자의 기능을 충분히 수행하지만 환경의 변화가 심한 포장에서는 그 기능을 충분히 발휘하지 못하여 실질적인 분자육종을 위한 유전자원으로써 그 가치를 다하지 못하고 있는 실정이다. 그래서 본 연구과제에서는 내병성 및 내염성을 목적으로 창출되어진 형질전환 벼를 직접 유묘상태에서 포장과 실내에서 그 능력을 평가하여 실질적인 분자육종 자원으로 이용될 수 있는지 여부를 확인하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구를 통해 개발된 벼 형질전환체로부터 쌍떡잎 식물과 외떡잎 식물간의 병저항성 관련 MAPK가 보존되어 있음을 밝혔으므로 이와 관련 연구결과를 활용한다면 그동안 축적된 쌍떡잎의 MAPK 연구를 중요한 식량 자원인 벼와 같은 외떡잎 작물에 응용할 수 있으리라 생각한다. 또한 유전체학의 microarray 및 proteomics 방법을 이용한다면 벼의 신호전달체계에 중요한 MAPK cascade의 기질로 사용되는 단백질 또는 전사조절인자와 같은 유용한 유전자원을 분리할 수 있으리라 생각해 이에 대한 연구개발 활용이 필요하리라 생각한다.

본 연구에서 얻어진 염해 내성 배유 유전자들은 벼뿐만 아니라 다른 작물에도 활용이 가능하리라 생각한다. 현재까지의 연구 결과로 볼 때 이러한 유전자들이 다른 작물에서도 환경스트레스 내성을 유도할 수 있는 능력을 보여줄 것으로 추정되어 추후 연구를 통해 새로운 환경스트레스 내성 유전자들의 형질전

환을 시도하여 봄으로써 여러 가지 환경에 저항성을 가지는 안정적인 작물 품종 개발이 가능하리라고 판단된다. 따라서 종묘회사 및 육종학자와 연계된 추가 연구를 통하여 환경 내성 작물을 육성하는 연구가 필요하다고 본다.

또한 내병성 및 스트레스 내성 형질전환체의 창출과 관련된 연구는 여러 실험실에서 수행하고 있으나 대부분의 실험을 온실과 같은 불량 환경이 제어된 상태에서 형질전환체의 특성이 조사되고 있는 실정이다. 본 연구에서도 일부 유묘상태에서 포장저항성을 확인해 보았으나 병원균 및 환경스트레스 내성 효과는 주로 실험실과 온실에서 이루어졌다. 이를 농업 현장에서 실질적으로 이용하기 위해서는 더 많은 형질전환체의 확보와 실제 재배 환경 조건하에서 실시되는 포장 실험에 활용이 필요하리라 생각한다.

SUMMARY

I. Title

Functional analysis of useful genes for stress-tolerant rice

II. Importance and objectives of the research

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade is a major and evolutionally conserved signaling pathway by which extracellular stimuli are transduced into intracellular responses in eukaryotic cells (Widmann et al., 1999). NtMEK2, a tobacco (*Nicotiana tabacum*) MAPKK, is known to activate both salicylic acid-induced protein kinase (SIPK) and wound-induced protein kinase (WIPK). Ectopic expression of NtMEK2^{DD}, a constitutively active mutant of NtMEK2, was found to induce HR-like cell death and defense-related gene expression, as well as to promote the generation of H₂O₂ in chloroplasts in tobacco (Yang et al., 2001 Liu et al., 2007). Extensive studies have been conducted to evaluate the functional understandings of many MAPK genes and their upstream kinases in dicotyledonous plants such as Arabidopsis, alfalfa, tobacco, tomato and parsley (Jonak et al., 2002; Mishra et al., 2006). To date, a total of 17 MAPK genes have been identified, and several of these have been characterized in rice (Agrawal et al., 2003 Rohila and Yang, 2007). However, little is known about the interactions between components of MAPK and upstream MAPK kinase in rice. Therefore, a more detailed study is necessary to identify upstream kinases and downstream target proteins to better understand the MAPK-mediated pathways in rice.

To understand the MAPK cascade associated with disease resistance in rice, we transformed rice plants with the tobacco NtMEK2^{DD} or NtMEK2^{KR}, which encodes the constitutively active mutant or the inactive mutant of NtMEK2, respectively, under the control of a steroid inducible promoter. In NtMEK2^{DD} transgenic rice, activation of the endogenous 48-kDa MBP kinase leads to HR-like cell death, which is preceded by the generation of hydrogen

peroxide. Furthermore, expression of the NtMEK2^{DD} gene in transgenic rice plants induced the expression of several downstream MAPKs and defense-related genes. Taken together, these results suggest that NtMEK2 is functionally interchangeable with a rice MAPKK and also a useful tool for evaluating the MAPK pathway involved in signaling pathways that lead to defense responses in rice.

As our largest single primary food source, the cereal endosperm is among the most economically important structures in biology. The product of double fertilization, it is also among the most novel. The unique value of the endosperm of cereal grains as a food source can be traced directly to the subsequent evolution of the major grain-filling pathways, namely starch and storage protein biosynthesis, within this novel structure. The endosperm displays the basic themes of organ formation in plants, but with a simpler structure than other major organs. Hence, the central issues in endosperm development are directly relevant to other plant organs. Key issues includes regulation of the cell cycle, partitioning of growth between cell division and cell expansion, regulation of cell expansion and terminal differentiation, cell-to-cell signalling, and determination of cell fate. The high growth rate and grain filling processes place extraordinary demands on cellular metabolism and metabolic regulation making the endosperm an excellent model for biochemical genetics. However the basis of the biological and biochemical significance in endosperm is not well understood. The endosperm study will be discovered a number of crop genes that are a key determinant for environment stress tolerance and crop productivity.

III. Research content and scope

1. Functional analysis of pathogen-responsive MAPK cascade in rice

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade is a major and evolutionally conserved signaling pathway by which extracellular stimuli are transduced into intracellular responses in eukaryotic cells. MAPK cascades are composed of three protein kinase modules. MAPK, the last kinase in the three-kinase cascade, is activated by dual phosphorylation of Thr and Tyr

residues in a TXY motif by MAPK kinase (MAPKK). MAPKK, in turn, is activated by MAPKK kinase (MAPKKK). Extensive studies have been conducted to evaluate the functional understandings of many MAPK genes and their upstream kinases in dicotyledonous plants such as Arabidopsis, alfafa, tobacco, tomato and parsley. So far, a total of 17 MAPK genes have been identified, and several of these have been characterized in rice. However, little is known about the interactions between components of MAPK and upstream MAPK kinase in rice. The OsBWMK1 and OsBIMK1 were pathogen-responsive MAPK genes in rice but no study in MAPK cascade with those genes so far. OsBWMK1 has been induced by infection and wounding of blast pathogen (*Magnaporthe grisea*), while OsBIMK1 were induced by BTH, chemical inducer of systemic resistance. In this study, upstream MAPK kinase genes related to phosphorylation of OsBWMK1 and OsBIMK1 were isolated and cloned. Expressed MAPK kinase protein was purified to detect *in vitro* protein phosphorylation and its relationship with the disease resistance of rice. In addition, OsMEK3 transgenic rice plants will be a useful tool for the identification of downstream substrates utilized by rice MAPK, which will help understand disease resistance in rice.

2. Expression of an active tobacco mitogen-activated protein kinase kinase is involved in multiple defense responses in transgenic rice plants

It is known that NtMEK2, a tobacco MAPK kinase, is the upstream kinase of both salicylic acid-induced protein kinase and wounding-induced protein kinase. Expression of NtMEK2^{DD}, a constitutively active mutant of NtMEK2, induced multiple defense responses in tobacco. To determine if a similar MAPK cascade was involved in disease resistance in rice, transgenic rice plants that contained an active or inactive mutant of NtMEK2 under the control of a steroid inducible promoter were generated. The expression of NtMEK2^{DD} in transgenic rice plants resulted in HR-like cell death, which was preceded by the activation of endogenous 48-kDa MBP kinase. That MAPK is also activated by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), the bacterial blight pathogen of rice. In addition, prolonged activation of the MAPK induced the generation of hydrogen peroxide and up-regulated the expression of subset of MAPKs and defense-related genes including the

pathogenesis-related genes, peroxidase and glutathione S-transferase. These results demonstrate that NtMEK2 is functionally interchangeable with rice MAPK kinase in inducing the activation of the downstream MAPK, which in turn induces multiple defense responses in rice.

3. Mitogen-activated protein kinase cascade in signaling polyamine biosynthesis in plants

Expression of NtMEK2^{DD}, a constitutively active mutant of NtMEK2, activates endogenous SIPK and WIPK and leads to several stress/defense responses in tobacco. In this study, we used ACP (annealing control primer)based differential display RT-PCR to isolate the downstream effectors mediated by the NtMEK2-SIPK/WIPK cascade. Arginine decarboxylase gene (ADC), which is involved in plant polyamine biosynthesis, was one of 10 differentially expressed genes. When compared with NtMEK2^{KR} plants, NtMEK2^{DD} transgenic plants exhibited a significant increase in ADC, ODC and MPO1 transcript levels, as well as in the putrescine and spermine content following SIPK/WIPK activation. Taken together, these results suggest that the NtMEK2-SIPK/WIPK cascade regulates polyamine synthesis, especially putrescine synthesis, through transcriptional regulation of the biosynthetic genes in plants.

4. Isolation of the SAT79 gene by yeast screening

It has been suggested that a single salt tolerance mechanism is common to all eukaryotes. We therefore screened a maize kernel cDNA library for salt tolerance by functionally overexpressing it in yeast. The cDNA library was generated from maize kernels 15 - 25 days after pollination using the phagemid vector pAD-GAL4-2.1 (Stratagene, LaJolla, CA, USA). After transformation with the maize cDNA library, yeast cells were selected for their ability to tolerate salt stress. We isolated SAT79 salt-tolerance (SAT) clone, which, based on previous publications, included not only nutrient stress responsive gene but also factor involved in UV stress.

5. Salt tolerance in Arabidopsis overexpressing AtSAT79

To compare salt tolerance in Arabidopsis and AtSAT79-overexpressing yeast cells, we constructed AtSAT79-overexpressing transgenic Arabidopsis lines. Using Kanamycin-resistance segregation and Northern analysis, we selected plants homozygous for AtSAT79. The AtSAT79-overexpressing line seeds were exposed to 100 mM NaCl and primary root length was measured after 7 d. Seeds expressing AtSAT79 showed a higher salt tolerance than wild-type (Col-O) seeds. These data suggest that AtSAT79 seems to confer very effective salt tolerance in plant cells. To determine AtSAT79 protein localization, a CaMV35S promoter-driven fusion gene (35S-AtSAT79-GFP) of the AtSAT79 cDNA and GFP was constitutively expressed in Arabidopsis. In the root cells of the transgenic seedlings, the GFP signal appeared as diffused structure that might be cytosol. To understand the salt tolerance molecular mechanism of AtSAT79 in plants, we compared RNA expression of stress response genes during salt stress. We found that ERD15 expression was not significantly different. Transcripts of RD29A, RD22 and RD29B, however, accumulated more in AtSAT79-overexpressing lines than in wild-type in response to salt stress.

6. Production of transgenic rice with agronomically useful genes

It has been known that rice tissue culture is very difficult because of low regeneration rate, long cultivation period, complicated cultivation method. Therefore, we try to find out to selection method of the best callus with high density and well-dried, in order to establish effective rice transformation system with good repeatability.

7. Evaluation of disease resistance and salinity tolerance in transgenic rice

High rice yield is required to develop novel crop, resistant to various environmental stresses. Although crop carrying stress-resistant gene is produced, its function is effective at green house but not in field with hard environmental condition. Thus, transformed rice carrying disease or salt resistant gene was studied its function in both green house and field with the

raising seedling and confirmed whether it could be the practical molecular breeding resource or not.

CONTENTS

Chaper 1. Outlines of research.....	9.....	1
Section 1. Purposes and aims of research.....	1	2
Section 2. Content and scope of research.....	3	2
Chaper 2. Current status of related research developed in Korea and other countries.....	7.....	2
Section 1. Related research status in Korea and other countries....	9	
Section 2. Position of research in related area.....	1	3
Chaper 3. Results of research.....	3.....	3
Section 1. Functional analysis of pathogen–responsive MAPK cascade in rice.....	5.....	3
Section 2. Expression of an active tobacco mitogen–activated protein kinase kinase is involved in multiple defense responses in transgenic rice plants.....	34	
Section 3. Mitogen–activated protein kinase cascade in signaling polyamine biosynthesis in plants.....	8	
Section 4. Isolation and characterization of salt–tolerant gene.....	17	
Section 5. Production of transgenic rice with agronomically useful genes.....	2... 8	8
Section 6. Evaluation of disease resistance and salinity tolerance in transgenic rice.....	0	9
Chaper 4. Achievement of aims and contribution to related areas	9	
Section 1. Achievements of research aims.....	7	9
Section 2. Contribution to related areas.....	100	
Chaper 5. Application of results	103	
Section 1. Necessity of continuing researches.....	105	
Section 2. Application of results in other researches.....	106	
Section 3. Industrialization.....	106	

Chaper 6. Information collected from aboard during the research period...	107
Section 1. Information on plant defense signal transduction against pathogen.....	109
Section 2. Information on appication of functional genimics through Mu-TAIL.....	110
Chaper 7. References.....	111

목 차

제 1 장 연구개발의 개요.....9.....	1
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성.....1	2
제 2 절 연구개발의 범위.....3.....	2
제 2 장 국내·외 기술개발 현황.....7.	2
제 1 절 국내·외 연구동향.....9	2
제 2 절 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치.....	3
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과.....3..	3
제 1 절 벼에서 병원균에 반응하는 MAPK 신호전달체계의 내병성 기능분석.....5.....	3
제 2 절 활성화된 NtMEK2 유전자가 형질전환된 벼 식물체가 여러 가지 병 방어 작용에 관여함.....3	4
제 3 절 식물에서 폴리아민 생합성에 MAPK 신호체계가 관여함....	58
제 4 절 염해 내성관련 유전자의 분리 및 기능분석.....	17
제 5 절 내재해성 유전자의 벼 형질전환 개체 육성.....	28
제 6 절 형질전환 벼의 병해 포장저항성 및 내염성 평가.....	9
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....5	9
제 1 절 연도별 연구목표 달성도.....7..	9
제 2 절 관련분야에의 기여도.....	100
제 5 장 연구개발의 활용계획.....	103
제 1 절 추가 연구의 필요성.....	105
제 2 절 타 연구에의 응용.....	106
제 3 절 기업화 추진 방안.....	106
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	107
제 1 절 병원균에 대한 식물 방어 신호 전달 기작에 대한 기술정보..	109
제 2 절 Mu-TAIL에 의한 기능 유전체 응용에 대한 기술 정보.....	110

제 7 장 참고문헌..... 111

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

생명체란 생명현상을 보이는 모든 구조물의 총칭으로서, 생명현상은 자기복제를 하며 환경에 대응하여 지속적으로 적응할 수 있는 능력을 가진 현상을 말한다. 이상기온 현상의 발현이 잦은 최근의 기상재해를 고려해 볼 때, 이러한 불량 환경은 모든 생명체의 생육과 발달에 치명적인 영향을 미칠 것이며, 특히 이동할 수 없는 식물체의 경우에는 불량 환경에 대한 지속적인 적응 능력 저하로 인하여 생장을 또는 생산성의 감소를 초래 할 것이다. 생물적 혹은 비생물적 재해에 의한 농업 환경의 악화는 농작물의 성장 과정에서 치명적인 스트레스 인자로 작용함으로써 작물이 지닌 유전적 생산력을 20% 이하로 제한한다고 알려져 있다. 환경스트레스에 의한 식물의 피해가 세계적으로 200조원이 넘을 뿐만 아니라, 병 방제를 위한 과다한 농약의 사용으로 인해 생태계의 심각한 오염을 야기 하였으며 더 나아가 인간에게도 영향을 미쳐 소비자와 농민들에게 동시에 경제적인 피해가 가중되고 있다.

21 세기 식물 생명공학이 큰 기대와 전망 속에서 빠르게 발전하고 있는 이유는 장기적으로 식량 문제, 의료, 보건, 환경 문제 등을 해결할 수 있는 잠재력을 지니고 있기 때문이다. 2010년이 되면 세계 작물종자의 약 80%가 유전자 변형 작물 종자로 대체될 전망이다. 이러한 식물 생명공학의 핵심에는 환경스트레스에 대한 내성 유전자를 발굴하고 그 기능을 연구하는데 있다. 스트레스에 대한 식물의 반응은 유전자 발현의 변화와 이에 의한 세포 대사 작용의 변화를 통하여 생장을 또는 생산성의 변화를 가져오기 때문에, 식물의 생산성을 높이기 위해서는 다양한 복합 환경 스트레스 내성과 관련된 유전자원을 확보한 후 그 기능을 규명한 다음 그 유전자를 이용해 생물적 혹은 비생물적 환경 스트레스에 강한 새로운 작물의 개발이 필수적이다. 이에 본 과제는 새로운 내병성 및 염해내성 유전자들을 분리하여 그 기능을 규명함으로써 차후 전통적인 식물육종 방법에 의해 내재해성인 작물을 창출할 수 있는 분자육종 유전자원을 얻고자 하였다.

본 연구개발은 아래와 같은 기술적, 경제·산업적 및 학문적인 필요성을 가지고 있다.

1) 기술적 측면

세계적으로 형질전환 기법을 이용하여 제초제 저항성, 바이러스 저항성,

해충 저항성, 진균병 저항성 및 재해 저항성 작물들이 개량되어져 왔으나, 아직 까지도 성공 사례는 매우 드물다. 우리나라의 주곡작물인 벼의 자급자족을 위협하는 가장 큰 요인 중의 하나가 병해이지만, 환경보전형 농업의 필요성이 대두되면서 농약의 사용에 대한 규제가 심화되고 있어 생물적 방제 혹은 저항성 품종에 의한 병방제가 절실히 요구되고 있는 실정이다. 이러한 시대의 기대에 부흥하기 위해서는 도열병, 흰잎마름병, 벼알마름병 등에 대해 내병성을 보이는 새로운 벼 품종의 분자유종이 필요하며 이를 달성하기 위해서는 가능한 많은 종류의 식물유전자들의 기능을 분석함으로써 내병성 유전자원을 발굴하여 그 기능 연구를 수행하여야 한다.

작물의 경작지의 지속적인 감소에 대체하는 방법으로 간척지와 같은 고염 축적 토양을 이용한 토양 이용의 극대화를 피하기 위해서는 염해에 내성을 가진 작물의 육종이 시급한 실정이다. 염해 스트레스는 Na^+ 와 Cl^- 의 농도염해는 Na^+ 와 Cl^- 의 농도가 원인이 되어 과다한 이온 또는 hyper-osmotic 스트레스를 받음으로써 결국은 식물체를 죽게 한다. 염해를 받은 식물은 생장이 감소하고 cell division과 expansion이 억제되며 death를 촉진시킨다. 또한 membrane disorganization, 활성산소종, metabolic toxicity, 광합성 억제 등의 효과를 나타낸다. 이러한 염해 환경 스트레스 조건 하에서 작물이 성장 또는 발달하기 위해서는 염 이온의 항상성 기작을 밝혀내어 빠르게 주변 환경에 적응할 수 있는 형질 전환체의 개발이 필요하다.

2) 경제·산업적 측면

수입개방에 대응한 벼의 생산비 절감은 생력화가 기본적으로 요구되는데, 분자유종기술을 이용한 내병성 및 내염성 품종의 개발이 노동력과 농자재의 투입을 최소화하면서 친환경적 농업을 구현시킬 수 있을 것이며 병해와 염해 스트레스에 내성을 부여할 수 있는 새로운 유전자들이 발굴되면 기능성 유전자 특허 출원 및 다른 유용 작물들의 창출에 응용될 수 있을 것이다. 또한 벼나 옥수수로부터 환경 스트레스에 대한 내성 유용 작물 유전자를 대량 확보함으로써 국제적 경쟁력을 확보할 수 있기 때문에 필요하다 하겠다..

3) 학문적 측면

병해와 같은 생물적 스트레스와 염해같은 비생물적 스트레스 사이에는 상호 연관된 신호 전달체계를 공유하고 있다. 이렇듯 병해 및 염해에 대한 내성 유전자들을 발굴해 상호 특성을 밝히는 연구개발은 병해 및 염해에 대한 내성 유전자들의 상호 특성을 밝힘으로써 작물간의 진화적 측면 이해 및 식물병리학,

식물생리학, 분자생물학과 같은 기초 학문 연구에 초석이 될 수 있으며, 이로 인하여 식물 분자유종학의 학문 발달에도 기여할 수가 있으리라 생각한다.

제 2 절 연구개발의 범위

1. 벼에서 병원균에 반응하는 MAPK 신호전달체계의 내병성 기능분석

단백질 인산화와 탈인산화는 식물저항성 반응 과정에 있어 신호 전달 체계에 중요한 역할을 한다. 그 중 MAPK(mitogen-activated protein kinase)는 GA, ABA, ethylene, osmotic stress, wounding, auxin, pathogen, SA, 그리고 세포의 신장을 조절하는 요소 등에 의해 유발된 신호를 세포 내부로 전달해 주는 역할을 한다. MAPK는 MAPKK에 의해 TXY motif에 있는 threonine과 tyrosine 두개의 잔기에 인산화가 됨으로써 활성화 된다. Arabidopsis 와 담배와 같은 쌍자엽 식물에서는 활발한 연구 덕분에 여러 MAPK들이 분리되어 특성화 되었다. 그러나 경제적으로 중요한 벼에서는 그에 대한 연구가 미흡하여 단지 몇 개의 MAPK가 분리되었으며 그 생리학적인 기능에 대한 정보 또한 미흡한 상태이다. 벼에서 병저항성과 관련되어 분리된 MAPK에는 blast pathogen (*Magnaporthe grisea*) 감염과 상처에 의해 유도되는 OsBWMK1와 전신저항성을 유도하는 화학 물질인 BTH에 의해 유도되는 OsBIMK1 등이 있는데 그들의 MAPK cascade에 대한 연구는 전혀 되지 못하고 있다. 그래서 본 연구에서는 먼저 OsBWMK1나 OsBIMK1를 각각 인산화 시켜주는 upstream MAPK kinase을 분리한 후 재조합 단백질을 순수 정제하여 *in vitro* protein phosphorylation 실험을 통해 병저항성에 관여하는 벼의 MAPK cascade를 부분적으로 밝혔다. 또한 담배의 NtMEK2^{DD}와 NtMEK2^{KR} 유전자를 벼에 형질전환 시켜 쌍자엽식물(담배)과 단자엽식물(벼)에서의 MAPK cascade가 보존되어 있으며 벼에서도 병저항성 관련 MAPK pathway가 과산화수소의 과다생산에 관련되어 있으며 최종적으로 과민감 반응을 보인다는 사실을 밝혔다. 즉 벼의 OsMAPKK를 분리하여 내병성 관련 MAPK pathway의 기능에 대해 연구를 수행하였다. 본 연구에 의해 개발된 벼 형질전환체는 차후에 병저항성 관련 MAPK의 기질이나 전사 조절인자 또는 하위의 병저항성에 관련된 여러 유전자들을 선발할 수 있는 좋은 재료가 될 수 있으리라 생각한다.

2. 염해 내성관련 유전자의 분리 및 기능분석

효모 시스템을 이용하여 작물의 고염 스트레스 내성에 핵심적인 역할을

하는 유용 작물 유전자 확보 및 유전자 은행을 구축하고, 복합스트레스에 반응하는 식물체의 신호전달 체계를 이해 분석하며, 염해스트레스 내성을 가진 벼를 개발하여 농업 생산성 향상을 도모하고자 하였다. 또한, 최종적으로 고염 스트레스에 내성을 가진 벼의 생리적인 변화 양상을 이해, 분석 및 작용 기작을 규명하고자 하였다. 따라서 본 연구의 범위로는 고염스트레스에 대한 yeast 저항성 클론 및 작물유전자 분리, 고염스트레스 저항성 작물유전자의 염기서열 결정 및 확보, 고염스트레스 저항성 작물유전자의 발현양상 조사, 고염스트레스 저항성 작물유전자의 상관관계를 조사하였고 또한 Arabidopsis로부터 고염스트레스 저항성 유전자 분리, 고염스트레스 하에 유전자의 발현양상 조사, 고염스트레스 저항성 형질전환 Arabidopsis 제작, 고염스트레스 저항성 형질전환 Arabidopsis 선발 및 우수 순종 라인 확보하였으며 과다발현 형질전환체로부터 다양한 환경스트레스 처리 후 종자발아율 조사하고 스트레스 마커 유전자를 이용한 Northern 분석을 통해 과다발현 형질전환체로부터 복합 환경스트레스에 대한 생리적 반응 조사한 후 최종적으로 환경스트레스 저항성 형질전환 벼 제작하는 것이다.

3. 내재해성 유전자의 벼 형질전환 개체 육성

식물체의 기초연구 뿐 아니라 생명공학을 이용한 품종육성에 가장 큰 제약은 효과적인 형질전환 방법 및 homo line 생산까지의 긴 시간적 문제이다. 또한 품종과 사용되는 조직, vector, *Agrobacterium* strain 등 조건에 따라 재분화시 배지 및 성장조절 물질의 조건이 다르고 형질전환 효율이 다른 것으로 알려져 있다. 벼의 조직배양에서는 공통적으로 재분화의 성공률이 낮고 배양기간이 길고 복잡하여 긴 시간의 소요로 유전자의 형질을 알고자하는데 많은 제약이 따르고 있다. 그래서 본 연구과제를 통해 조밀하고 잘 건조된 최상의 캘러스를 선별하는 방법을 통해 재현성이 높고 고효율의 안정적인 벼 형질전환 시스템을 확립하였다. 따라서 본 연구개발에서는 현재 육성되고 있는 벼의 우수계통에 효과적으로 형질 전환하는 방법을 확립하여 육성시간을 단축하고, 병해 및 고염 스트레스에 내성을 가지는 우수한 형질전환체를 선발 육성하였다.

4. 형질전환 벼의 병해 포장저항성 및 내염성 평가

생물학적 또는 비생물학적 스트레스에 대한 식물의 반응은 유전자 발현의 변화와 이에 의한 세포 대사작용의 변화를 통하여 생장을 또는 생산성의 변화를 가져오기 때문에, 식물의 생산성을 높이기 위해서는 다양한 복합 환경 스트

레스에 내성이 강한 새로운 작물의 개발이 필수적이다. 그러나 복합 환경 스트레스에 반응하여 내성을 보이는 기능을 가진 유전자를 이용하여 새로운 작물을 창출하더라도 형질전환체가 환경의 조건이 변화가 없고 일정한 온실이나 식물 성장상에서는 외래 유전자의 기능을 충분히 수행하지만 환경의 변화가 심한 포장에서는 그 기능을 충분히 발휘하지 못하여 실질적인 분자유종을 위한 유전자원으로써 그 가치를 다하지 못하고 있는 실정이다. 그래서 본 연구과제에서는 내병성 및 내염성을 목적으로 창출되어진 형질전환 벼를 직접 유효상태에서 포장과 실내에서 그 능력을 평가하여 실질적인 분자유종 자원으로 이용될 수 있는지 여부를 확인하였다.

제 2 장 국내외 기술 개발 현황

제 1 절 국내·외 연구동향

전 세계적으로 유전공학 기술을 응용한 GMO 작물의 종자 시장 규모는 2000년 42억5000만 달러에 머물렀으나, 2010년에는 250억달러에 달할 것으로 예측되고 있다. 이는 작물의 상당 부분(80%)이 생명공학 작물로 대체될 것임을 시사하고 있다. 이에 비해 국내 채소 종자 시장은 현재 약 1,500억원(1억달러) 규모로 세계 시장의 0.5% 정도이다. 세계 추세대로 간다면 2010년 국내 작물의 생명공학 종자 시장 규모는 2,000억원으로 예상되나 자체 기술 개발이 수행되지 않을 경우에는 이를 전량 수입에 의존할 수밖에 없다. 우리나라의 경우 제초제 저항성 잔디 등 GMO 작물 연구개발사례는 있으나, 실용화 단계를 거쳐 제품화가 이루어진 경우는 없다. 그러나 현재 농촌진흥청을 중심으로 기업 및 대학, 연구소에서 제초제와 병, 각종 재해에 대한 저항성을 높이거나 또는 기능을 강화한 벼·감자·콩·고추 등 20여개 작물의 다양한 GMO 식물을 개발 중에 있다. 국내의 경우는 그동안의 연구를 통해 제초제에 저항성을 갖게 만들어진 벼와 바이러스 저항성 감자가 실용화를 목전에 두고 있으며, 최근에는 서울대 농생명과학대 최양도 교수팀의 한발 및 냉해에 저항성이 향상된 트레할로스 벼를 개발, 세계의 주목을 받은 바 있으며, 또한 트레할로스 생합성 유전자 2개를 융합 이식시킴으로써 보습성이 뛰어난 트레할로스의 생합성이 가능했고 그 결과 뛰어난 농업적 특성이 향상돼 기존 품종에 비해 평균 20% 정도의 생산성 향상을 기대할 수 있다. 이렇듯 유전공학적인 기법을 이용한 기능을 지닌 형질전환체의 생산은 국외의 경우는 활발하게 연구가 진행되고 있으나 우리나라의 경우는 아직도 걸음마 단계라고 생각해도 과언은 아닐 것이다.

식물은 성장하는 과정에 생물학적 혹은 비생물학적인 여러 가지 형태의 스트레스에 노출되며 이러한 스트레스는 이동할 수 없는 식물의 성장, 발달 및 생산성 등에 큰 영향을 미친다. 식물이 어떻게 스트레스를 인지하고 내성을 가지게 되는 기작은 아직도 많은 부분이 밝혀져 있지 않지만 최근 그와 관련된 여러 연구들이 활발하게 진행되고 있다. 특히 식물이 병원균에 침입을 받으면 병원균을 인지하는 시스템이 가동되고 식물 세포내에서 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 및 calcium-depent protein kinase (CDPK)와 같은 신호전달체계가 수분 이내로 활성화 되어진다. 이러한 세포내의 변화로 활성산소, 산화질소, 에칠렌, 자스몬산, 살리실산과 같은 신호 물질이 만들어져 신호전달체계가 증폭된 후 전사조절인자의 활성화로 이어져 병저항성에 관련된 수 많은 유전자들의 발현이 유도되어지고 최종적으로 식물은 병에 대해 저항성을 획득하게 된다 (Yang et al., 1997; Zhang et al., 1998).

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade는 진핵세포에서 외부 자극을 세포내의 반응으로 전달해 주는 역할을 하는 중요한 신호전달체계로 여러 가지 스트레스에 의해 활성화되어진다 (Kyriakis and Avruch, 1996). 이러한 외부의 신호를 세포 내부로 전달하는 중요한 신호전달체계인 MAPK pathway에 대한 연구는 주로 쌍떡잎 식물에서 많이 연구가 진행되었다 (Jonak et al., 2002; Mishra et al., 2006). 그러나 벼와 같은 외떡잎 식물에서의 MAPK pathway에 대한 연구는 미국의 Dr. Yang 그룹과 중국, 일본 그리고 한국의 몇 개 그룹에서 진행되고 있으나 아직도 극히 미비한 상태이다 (Agrawal et al., 2003 Rohila and Yang, 2007). 특히 벼에서 MAPK cascade의 상호 연관성에 관련된 연구는 전혀 되어있지 않는 상태이다. 따라서 본 연구과제의 벼에서 MAPK pathway에 관련된 유전자의 기능 연구를 통해 MAPK cascade에 대한 연구는 큰 의미가 있다 하겠다.

염해는 Na^+ 와 Cl^- 의 농도가 원인이 되어 과다한 이온 또는 hyper-osmotic 스트레스를 받음으로써 결국은 식물체를 죽게 한다 (Blumwald, 2000; Zhu, 2001). 염해를 받은 식물은 생장이 감소하고 cell division과 expansion이 억제되며 death를 촉진시킨다. 또한 membrane disorganization, 활성산소종의 증가, metabolic toxicity, 광합성 억제 등의 효과가 나타난다 (Hasegawa et al., 2000; Zhu, 2002). 이러한 환경스트레스 조건 하에서 작물이 생장 또는 발달하기 위해서는 염 이온의 항상성 기작을 밝혀내어 빠르게 주변 환경에 적응하는 것이 무엇보다도 필요하다. 따라서 본 과제는 염해 또는 osmotic 스트레스 내성 기작을 밝혀내기 위하여, yeast system을 이용하였다. Yeast는 여러 환경 스트레스에 대한 식물의 내성 기작 연구에 훌륭한 모델 시스템으로 많이 이용되어 지고 있으며 (Posas et al., 2000; Serrano and Rodriguez-Navarro, 2001), 실제 식물과 yeast간의 고염 내성에 관련된 이온 채널의 항상성 기작 (Shi et al., 2002; Zhu, 2001, 2002), 그리고 ABA-dependent and independent osmotic stress 신호전달 (Kang et al., 2002; Liu et al., 1998; Nakashima et al., 2000) 및 여러 sodium transporters와 protein kinases 등 osmotic stress 반응에 관련된 유전자들의 기능이 아주 유사하다고 보고된 바 있다 (Apse et al., 1999; Hirt, 1997; Taji et al., 2002). 이렇듯 yeast 시스템을 이용하여 염해 반응 유전자들을 선별하려는 연구과제는 독창적이라 자평할 수 있다.

제 2 절 연구결과의 국내·외 기술개발현황 위치

벼와 같은 외떡잎 식물에서의 MAPK pathway에 대한 연구는 미국의 일부 그룹과 주로 중국, 일본 그리고 한국의 몇 개 그룹에서 진행되고 있으나 벼 형질전환 생산까지의 시간이 Arabidopsis와 같은 식물에 비해 많이 소요될 뿐만 아니라 한 세대의 기간이 너무 길어 아직도 극히 미비한 상태이다. 또한 벼의 전체 게놈이 밝혀졌다고 하나 유전자의 기능에 대한 연구를 하는 그룹이 다른 식물을 연구하는 그룹에 비해 상대적으로 적어 유전자의 정보를 아직도 Arabidopsis 연구에 많이 의존하고 있는 실정이다.

국내·외 많은 연구자들이 과산화 및 고염 스트레스에 대한 식물의 반응 조사를 연구하고 있다. 거기에는 첨단 기술을 이용하는 방법 (cDNA micro-array analysis, Kehoe D.M. et. al., 1999; DNA chip technology, Cho R.J. et. al., 1998), 스트레스에 유도되는 EST 대량 확보 또는 genomic DNA sequencing 방법, mutant screening, salt stress molecular marker 개발 등 여러 가지 연구 방법을 토대로 유용 작물에 환경 스트레스 대한 내성을 부여하고자 노력하고 있다. 그러나 이러한 방법들은 많은 정보를 얻을 수 있다는 점과 스트레스에 관련된 유전자 은행을 구축할 수 있다는 점은 장점이나, 그러한 결과를 얻기까지는 많은 연구비 및 시간이 소요된다는 점에서 볼 때 한계가 있으리라 본다. 더군다나 기능이 밝혀있지 않은 유전자들을 분석하고자 할 때에는 또 다른 연구 노력이 필요하다.

벼의 조직배양 및 형질전환 기술은 많이 개선이 되고 있지만 상대적으로 다른 식물에 비해 국내외 공통적으로 재분화의 성공률이 낮고 배양기간이 길고 복잡하여 긴 시간의 소요로 유전자의 형질을 알고자하는데 많은 제약이 따르고 있다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제1절 벼에서 병원균에 반응하는 MAPK 신호전달체계의 내병성 기능분석

1. 서언

경제적으로 중요한 벼에서는 병원균 관련 신호전달체계인 MAPK pathway에 대한 연구가 미흡하여 단지 몇 개의 MAPK가 분리되었으며 그 생리학적 기능에 대한 정보 또한 부족한 상태이다. 그래서 본 연구에서는 병원균 관련 벼 MAPK를 인산화 시켜주는 upstream MAPK kinase을 분리하여 병저항성에 관여하는 벼의 MAPK cascade를 밝히고자 한다. 본 연구에 의해 개발된 벼 형질전환체는 차후에 병저항성 관련 MAPK의 기질이나 전사 조절인자 또는 하위의 병저항성에 관련된 기능성 유전자들을 선발할 수 있는 재료가 될 것이며 결국 내병성 형질전환체의 창출에 기여할 것이다.

2. 연구 결과 및 고찰

가. OsMAPKK 과 OsMAPK의 클로닝 및 상호 연관 관계 확인

병원균에 의해 유도되는 MAPKK의 클로닝을 위해 벼에 흰잎마름병원균인 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* K3을 접종한 후 total RNA를 추출하여 이를 template로 사용하고, 보존된 NtMEK2 domains 로부터 degenerated primer를 제작하여 RT-PCR를 통하여 NtMEK2 ortholog인 벼의 OsMEK1, OsMEK2 및 OsMEK3 등의 3개 유전자의 full-length cDNA를 pGEM T-easy vector에 클로닝을 하여 염기서열을 결정하여 확인하였다. OsMEK1, 2, 3의 염기서열을 기초로 아미노산 서열을 결정한 결과 모두 Serine/Threonine kinase domain을 가졌다. 또한 NtMEK2와 비교해 본 결과 아미노산 수준에서 OsMEK1, 2, 3 각각 69%, 68%, 74%의 상동성을 보였으며 MAPKK kinases에 의해 인산화 되어지는 보존된 S/TXXXS/T 잔기가 NtMEK2와 일치함을 확인 할 수 있었다 (그림 1).

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130
NtMEK2  MRPLPPPPAARITSSSTTASPhPPPSRNRRRRRTD...DLTLPPQRDAP--PALAVPLPLP---PTSPASSSSSSSSSPL-----PPLNFELELRIRRVGSGAGGTVMVVRHRPTGRLYALKV
OsMEK1  MRAGDMGRGARRRP-----DLTLPPQRDAPTSLAVPLPLP-----PAAITTTISAPPAGAMHPLASAGAAPP---PPLLEELKRVRVGSGAGGTVMVVRHRPTGRLYALKV
OsMEK2  MRAGDMGRGARRRP-----DLTLPPQRDAPTSLAVPLPLP-----PAAITTTISAPPAGAMHPLASAGAAPP---PPLLEELKRVRVGSGAGGTVMVVRHRPTGRLYALKV
OsMEK3  NRP--GGPPSLRGLQQQQQQPPTGR--SRKRP-----DLTLPPQRD...TSLAVPLPLPLPPSSAPSTSSGSSSLGGVPTPNSVGSAPPAPPLSELELRIRRVGSGAGGTVMVVRHRPTGRLYALKV
Consensus  NRP...PP...a.....a...aPgr...rRP...DLTLPPQRD...TSLAVPLPLP...p.saPss.ssssssp1.....p.p...sELELR!r!GSGAGGTVMVVRHRPTGr.YALKV

131     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240     250     260
NtMEK2  LYGNHDSVRLQHCRETEILRDVDPNVVVRCHDMFDHNGEIQVLEFHDKGSLGTHPKESALDQLTRQVLSGLYLRHRKIVHRDIKPSMLINSRREVKIADFVGSVRLAQTHDPCNSSVGTIAYMS
OsMEK1  LYGNHDDAVRRQIAREIATLRTAEHPAVVVRCHDMYERGGELQTLLEYADGSLDGRRIADERFLADVVRQVLSGIAYLHRKIVHRDIKPSMLLDSARRVKIDFVGRILNQTHDPCNSSVGTIAYMS
OsMEK2  LYGNHDDAVRRQIAREIATLRTAEHPAVVVRCHDMYERGGELQTLLEYADGSLDGRRIADERFLADVVRQVLSGIAYLHRKIVHRDIKPSMLLDSARRVKIDFVGRILNQTHDPCNSSVGTIAYMS
OsMEK3  LYGNHDAVRrQi.REIaTLRta#hPaVVRCHdM%#.GEIQ.LLEZHDGSL#GrIa.E.FLaDvaRQVLSGiAYLHRKIVHRDIKPSMLLI#S.RrVKIADFVGrILNQTHDPCNSSVGTIAYMS
Consensus  LYGNHDAVRrQi.REIaTLRta#hPaVVRCHdM%#.GEIQ.LLEZHDGSL#GrIa.E.FLaDvaRQVLSGiAYLHRKIVHRDIKPSMLLI#S.RrVKIADFVGrILNQTHDPCNSSVGTIAYMS

261     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360     370     380     390
NtMEK2  PERINTLDNGDYDYGVDIHSFGVLSILEFYGRPF--SVGRSGDHSILCAITCSQPPAPANSREFRDFIACLQROPARRAHIVQLLRHPTIQNSPATTIGNHPLPQVHQPAHQLLPPPPP
OsMEK1  PERINTLDNGDYDYGVDIHSFGVLSILEFYGRKFFGENLGGKGDHARLCAITCYSQPPAPAVSPEFRSFVGYCLQKNPKRPSARLQHPFVAGPQPQPLAPPSS
OsMEK2  PERINTLDNGDYDYGVDIHSFGVLSILEFYGRKFFGENLGGKGDHARLCAITCYSQPPAPAVSPEFRSFVGYCLQKNPKRPSARLQHPFVAGPQPQPLAPPSS
OsMEK3  PERINTLDNGDYDYGVDIHSFGVLSILEFYGRFPLEGENLGGKGDHARLCAITCYSQPPAPPNSPEFRSFVGYCLQKNPKRPSARLQHPFVAGPQPQPLAPPSS
Consensus  PERINTLDNGDYDYGVDIHSFGVLSILEFYGrFFgenLgkqGDHARLCAITCYSQPPpPpPanaSpEfrsf!cCLQk#P#R#PsaRQLLhP#f!agppq.....p.p...p.....

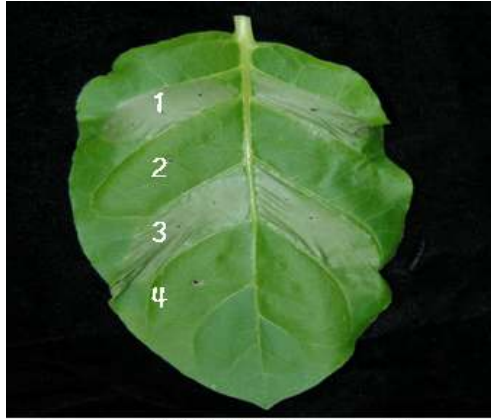
391
I-I
NtMEK2  FSS
OsMEK1
OsMEK2
OsMEK3
Consensus  ...

```

그림 1. 클로닝된 OsMEK1, OsMEK2 그리고 OsMEK3의 아미노산 서열을 NtMEK2와 비교한 결과

또한 OsMEK1, 2, 3의 기질로 이용되는 OsMAPKs를 클로닝 하기 위해 위에서 사용했던 template를 이용하여 RT-PCR 방법을 통해 OsBIMK1 (AF332873), OsBWMK1 (AF17792), 그리고 OsBWMK2 (AY588939)등을 역시 클로닝하여 염기서열을 결정하였다. 각각의 OsMEK1, 2, 3을 site-directed mutagenesis 방법을 이용하여 보존된 S/TXXXS/T 잔기내에 있는 Thr(T)을 Asp(D)로, Ser(S)을 Asp(D)로 치환하여 활성화된 형태인 OsMEK1^{DD}, OsMEK2^{DD}, OsMEK3^{DD} 돌연변이체를 각각 어떤 OsMEK가 진정한 NtMEK2의 ortholog인지를 확인하고자 하였다. 또한 OsMEK의 기질로 이용되는 OsMAPK을 찾기 위해 OsMAPKs를 autophosphorylation 활성이 결여된 [(Lys(K)-Arg(R))] 돌연변이체를 만들어 protein expression vector인 pET-28a(+) vector에 subcloning하여 BL21(DE3)에 형질전환 시킨 후 0.5mM IPTG를 이용하여 단백질의 발현을 유도하였다. 발현된 histagged 재조합 단백질을 nickel columns을 이용해서 순수분리 하여 다음 실험에 이용하였다.

pTA7002에 subcloning된 NtMEK2^{DD} 와 OsMEK1^{DD}, OsMEK2^{DD}, OsMEK3^{DD} constructs을 *Agrobacterium*-mediated transient transformation 한 후 dexamethasone를 처리해 담배에서 과민감 반응을 확인한 결과 OsMEK3^{DD}이 접종된 부분에서 NtMEK2^{DD}이 접종된 부분과 같이 세포 괴사 현상이 나타났다 (그림 2). 이 결과는 OsMEK1^{DD}, OsMEK2^{DD}, OsMEK3^{DD} constructs들 중 OsMEK3이 진정한 NtMEK2의 ortholog임을 입증해 주었다고 할 수 있겠다.



	Constructs	HR
1	NtMEK2 ^{DD}	++
2	OsMEK1 ^{DD}	-
3	OsMEK3 ^{DD}	+
4	OsMEK2 ^{DD}	-

그림 2. pTA7002에 subcloning된 NtMEK2^{DD} 와 OsMEK1^{DD}, OsMEK2^{DD}, OsMEK3^{DD} constructs을 *Agrobacterium*-mediated transient transformation 한 후 dexamethasone를 처리해 *in planta* 활성을 확인한 결과

또한 NtMEK2^{DD} 와 OsMEK1^{DD}, OsMEK2^{DD}, OsMEK3^{DD} constructs을 *Agrobacterium*-mediated transient transformation 한 부분에서 DEX를 처리한 후 각각 3시간, 8시간, 24시간 뒤에 샘플링을 한 다음 단백질을 추출한 후 western 및 in-gel kinase을 수행한 결과 DEX가 처리된 모든 샘플에서 모든 샘플에서 단백질을 확인할 수 있었으나 위의 결과와 동일하게 OsMEK1^{DD} 와 OsMEK2^{DD}이 접종된 부분에서는 어떠한 MAPK의 활성이 보이지 않았다. 그러나 NtMEK2^{DD} 와 OsMEK3^{DD}가 접종된 부분에서는 SIPK와 WIPK가 활성화 된 것을 확인 할 수 있었다 (그림 3). 다만 OsMEK3^{DD}가 접종된 부분에서는 매우 약하게 WIPK가 활성화 된 것을 확인할 수 있었는데 이는 위의 과민감 반응의 표현형이 OsMEK3^{DD}가 접종된 부분에서 약하게 나타난 결과와 동일함을 알 수 있었다.

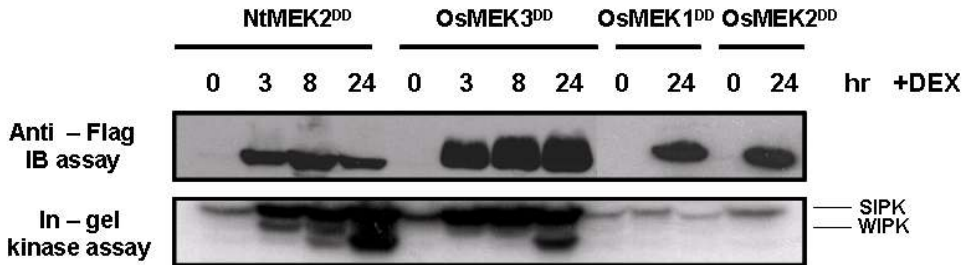


그림 3. NtMEK2^{DD} 와 OsMEK1^{DD}, OsMEK2^{DD}, OsMEK3^{DD} constructs을 *Agrobacterium*-mediated transient transformation한 후 DEX를 처리한 샘플에서 western으로 단백질을 확인한 결과 (윗 그림). NtMEK2^{DD} 와 OsMEK3^{DD} constructs이 접종된 담배에서 SIPK를 강하게 활성화 시키는 것을 in-gel kinase assay를 수행해 확인 한 결과 (아랫 그림)

OsMEK3이 진정한 NtMEK2의 ortholog임을 확인한 후 OsMEK3의 WT인 OsMEK3^{WT}과 지속적인 활성을 가진 OsMEK3^{DD} 돌연변이체와 불활성화된 OsMEK3^{KR} 돌연변이체를 제작한 후 pET-28(a) 벡터에 subcloning하여 BL21(DE3)에 형질전환하여 histagged 재조합 단백질을 순수분리 하였다 (그림 4A). 순수분리된 재조합 단백질을 centricon으로 농축시킨 후 각 OsMEK들의 kinase 활성을 알아보기 위해 순수분리한 재조합 단백질을 이용하여 in-solution kinase assay를 수행하였다. Autophosphorylation의 결과 OsMEK3^{WT}과 OsMEK3^{DD} 돌연변이체 재조합 단백질에서는 kinase의 활성을 확인할 수 있었으나 불활성화된 OsMEK3^{KR} 돌연변이체에서는 재조합 단백질에서는 kinase의 활성을 확인할 수 없었다 (그림 4B).

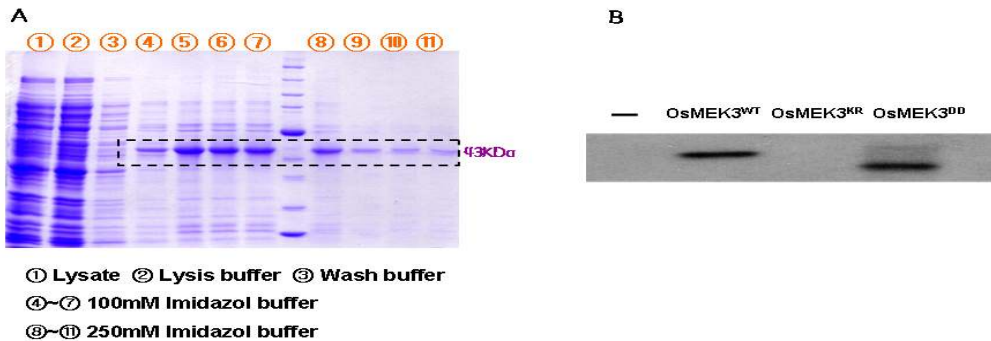


그림 4. OsMEK3의 지속적으로 활성을 가진 돌연변이체 유전자가 subcloning된 pET-28(a)+벡터 construct를 BL21(DE3)에 형질전환 후 IPTG로 유도한

다음 histagged 재조합 단백질을 nickel columns을 이용해서 순수분리 하여 SDS-PAGE한 결과(A). OsMEK3의 WT, 불활성화된 돌연변이체인 KR과 지속적으로 활성을 가진 돌연변이체인 DD등 각각의 재조합 단백질을 이용한 autophosphorylation의 결과(B).

재조합 단백질을 이용한 kinase의 활성 결과를 재확인해 보고자 OsMEK3^{WT}, OsMEK3^{DD}, OsMEK3^{KR} constructs을 *Agrobacterium*-mediated transient transformation한 후 DEX를 처리한 샘플에서 western으로 단백질을 확인한 결과, DEX를 처리한 샘플에서 단백질이 확인되었으나 오직 OsMEK3^{DD} constructs이 접종된 샘플에서만 강력한 SIPK와 약한 WIPK의 활성이 확인되었음을 알 수 있었다 (그림 5).

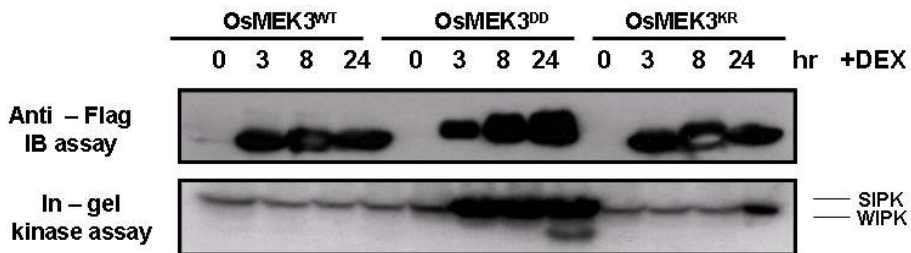


그림 5. OsMEK3^{WT}, OsMEK3^{DD}, OsMEK3^{KR} constructs을 *Agrobacterium*-mediated transient transformation한 후 DEX를 처리한 샘플에서 western으로 단백질을 확인한 결과 (윗 그림). OsMEK3^{DD} constructs이 접종된 담배에서 SIPK를 강하게 활성화 시키는 것을 in-gel kinase assay를 수행해 확인한 결과 (아랫 그림)

벼에서 병저항성과 관련된 MAPK들 중 OsBWMK1과 OsBIMK1의 연구가 많이 진행되어져 왔다. 그러나 아직까지 이들의 upstream kinase에 대한 연구는 전혀 되지 않고 있다. 벼에서 병저항성에 관련된 신호 전달 체계를 알아보기 위해 OsBWMK1, OsBIMK1 그리고 OsMAPK4를 각각 클로닝하고 그들의 불활성 돌연변이체를 만들어 본 실험에서 사용하고 있는 벼의 MAPK kinase들과 상호 관계를 in-solution kinase assay를 이용해 확인해 본 결과 OsMEK3가 OsBIMK1의 upstream kinase의 역할을 수행하고 있는 것으로 여겨진다 (그림 6).

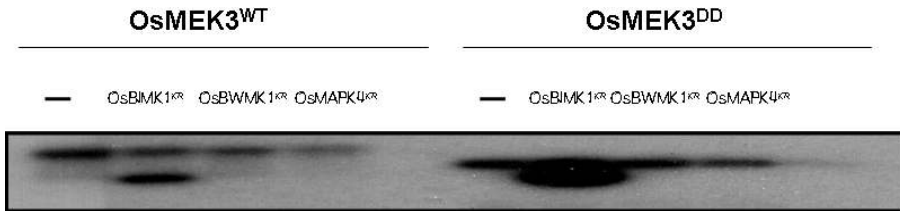


그림 6. OsBWMK1, OsBIMK1 그리고 OsMAPK4의 불활성 돌연변이체를 이용한 벼의 upstream kinase인 OsMEK3와의 상호 관계를 확인한 결과

나. OsMEK3가 형질전환된 벼 식물체 확인 및 외래단백질의 발현 확인

형질전환용 binary 벡터에 subcloning된 construct들을 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환한 후 총 20개 line의 형질전환체를 확보하였다. 협동과제로부터 형질전환체들을 인계받아 binary 벡터의 primer를 forward로 유전자의 특이적인 부분을 reverse로 PCR product가 약 500bp가 되도록 primer를 제작하였다. 각 형질전환체로부터 genomic DNA PCR를 수행하여 gel에 전기영동한 결과 모두 PCR product를 확인 할 수 있었다. positive 대조구로 유전자가 포함된 plasmid를 이용하였으며 negative 대조구로 형질전환용 벼의 wild type인 동진을 이용하였다 (그림 7).

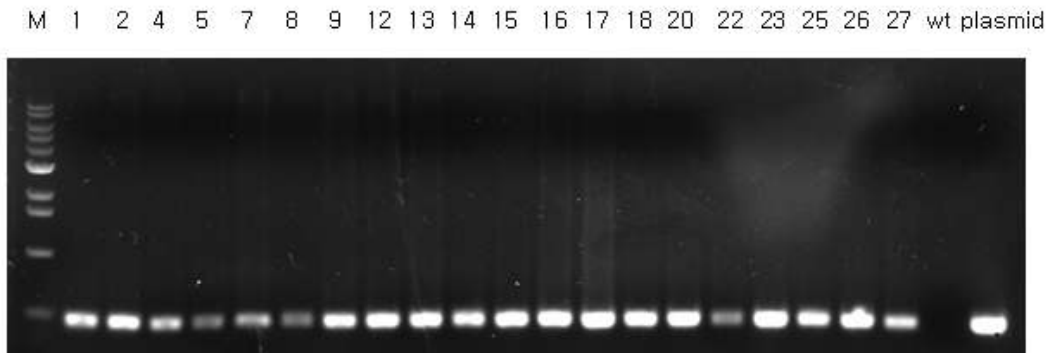


그림 7. 각 형질전환체로부터 genomic DNA PCR를 수행하여 PCR product를 확인

확인된 형질전환체들의 잎을 자른 후 dexamethosone 용액에 담근 후 샘플로부터 단백질을 정제하여 anti-flag antibody를 이용하여 western 분석을 수행하였다. Binary 벡터를 만들 때 유전자의 5' 쪽에 단백질의 발현을 detection 하기 위해 flag tag를 붙여 놓았기 때문에 western 분석을 통해 형질전환체로부터 단백질의 발현을 확인 할 수 있다. 최종적으로 얻은 OsMEK3^{WT} 3개 line, OsMEK3^{DD} 5개 line, OsMEK3^{KR} 8개 line의 형질전환된 벼중에서 대표로 8개의 OsMEK3^{KR} line으로부터 western 분석 결과를 아래 그림에서 확인할 수 있다. OsMEK3^{KR} -8 line을 제외한 7개 line에서 단백질의 발현을 확인 하였다. 또한 야생종인 동진에서는 OsMEK3 단백질을 확인 할 수 없었다 (그림 8).

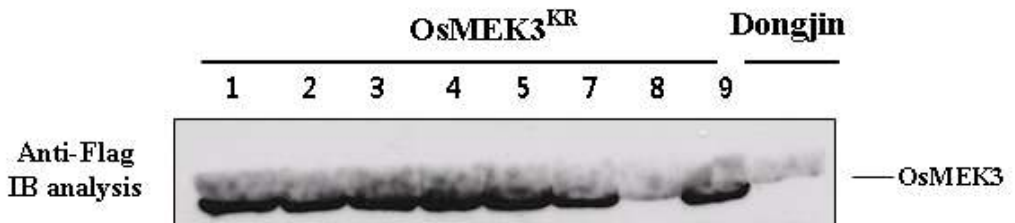


그림 8. Anti-flag 항체를 이용해 형질전환체로부터 외래단백질인 OsMEK3 단백질의 발현을 확인한 결과

외래단백질인 OsMEK3의 발현을 확인한 형질전환체들로부터 OsMEK3 단백질이 하위의 MAPK 활성화와 어떠한 관련이 있는지 여부를 in-gel kinase 방법을 이용해 확인해 보았다. OsMEK3^{DD}-7 line의 경우는 벼의 48-kDa MAPK 활성화에 약하게 작용하지만 나머지 형질전환 line들은 DEX에 의해 외래단백질인 OsMEK3의 발현이 유도된 후 벼의 48-kDa MAPK를 강력하게 활성화 시켜 줌을 확인 할 수 있었다. 또한 대조구로 사용된 OsMEK3^{KR}-1 line에서 48-kDa MAPK 활성화가 OsMEK3^{DD}-7 line의 경우처럼 약하게 나타남을 확인 하였다 (그림 9). 현재 OsMEK3^{WT}, OsMEK3^{DD}, OsMEK3^{KR} line의 형질전환된 벼는 T₁ 세대 종자를 얻기 위해 온실에서 배양중이어서 T₁ 종자가 얻어지면 병원균 저항성에 관련된 연구를 수행할 수 있으리라 생각한다. 그래서 NtMEK2^{DD} 와 NtMEK3^{KR} 유전자가 형질전환된 벼에서 DEX를 처리해 벼의 병저항성 관련 신호전달체계를 활성화 시킨 후 (제 2절 그림 1 참조) 하루 뒤에 흰잎마름병원균인 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* K3을 접종하여 내병성 여부를 확인 하였다. *Xoo* 균을 침적종 방법을 이용하여 일주일 뒤에 병증을 확인할 수 있었다.

NtMEK2^{DD} 가 형질전환된 벼에서는 접종된 부분에서 갈색의 저항성 반응이 보이거나 병증이 약하게 진전되는 내병성 현상을 보인 반면 NtMEK2^{KR} 유전자가 형질전환된 벼에서는 전형적인 흰잎마름병증을 확인 할 수 있었다 (그림 10). 이 결과는 담배의 NtMEK2^{DD} 단백질에 의해 벼의 하위 MAPK가 활성화된 후 병저항성에 관련된 방어 유전자들의 발현을 촉진해 흰잎마름병에 대한 저항성을 보였음을 의미한다 하겠다.

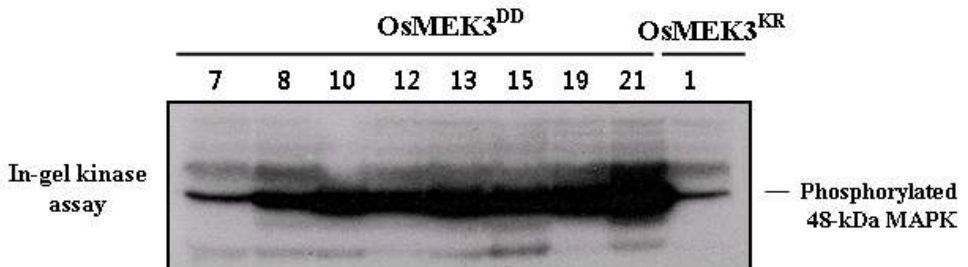


그림 9. In-gel kinase 방법을 이용해 형질전환체로부터 OsMEK3 단백질의 발현에 의한 벼의 하위 MAPK 활성화를 확인한 결과

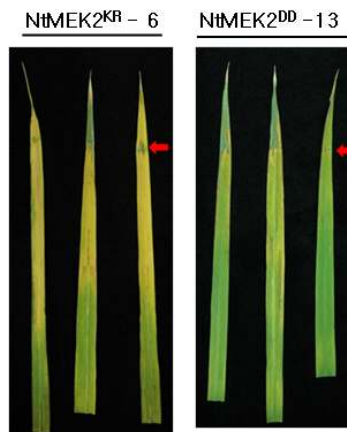


그림 10. DEX를 처리한 NtMEK2^{KR} 와 NtMEK2^{DD} 형질전환 벼에 흰잎마름병원균인 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* K3을 접종하여 내병성 여부를 확인한 결과. 화살표는 침접종한 부위를 표시함.

제 2절 Expression of an active tobacco mitogen-activated protein kinase kinase is involved in multiple defense responses in transgenic rice plants

1. Introduction

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade is a major and evolutionally conserved signaling pathway by which extracellular stimuli are transduced into intracellular responses in eukaryotic cells (Widmann *et al.*, 2001). MAPK cascades are composed of three protein kinase modules. MAPK, the last kinase in the three-kinase cascade, is activated by dual phosphorylation of Thr and Tyr residues in a TXY motif by MAPK kinase (MAPKK). MAPKK, in turn, is activated by MAPKK kinase (MAPKKK) (Zhang and Klessig, 2001 MAPK Group, 2002). Recently, a complete plant MAPK cascade that functions downstream of the flagellin receptor, FLS2, which is a leucine-rich-repeat (LRR) receptor kinase, was identified using an *Arabidopsis thaliana* protoplast system. Activation of this MAPK cascade was shown to confer resistance to both bacterial and fungal pathogens, which suggests that signalling events initiated by diverse pathogens converge into a conserved MAPK cascade (Asai *et al.*, 2002). NtMEK2, a tobacco (*Nicotiana tabacum*) MAPKK, is known to activate both salicylic acid-induced protein kinase (SIPK) and wound-induced protein kinase (WIPK). Ectopic expression of NtMEK2^{DD}, a constitutively active mutant of NtMEK2, was found to induce HR-like cell death and defense-related gene expression, as well as to promote the generation of H₂O₂ in chloroplasts in tobacco (Yang *et al.*, 2001 Liu *et al.*, 2007). In addition, Ren *et al.* demonstrated that tobacco NtMEK2 was functionally interchangeable with AtMEK4 and AtMEK5, two *Arabidopsis* MAPKKs, for activation of the downstream MAPKs in *Arabidopsis* (Ren *et al.*, 2002). Furthermore, StMEK1^{DD}, the constitutively active mutant of the potato ortholog of tobacco, NtMEK2, has been shown to activate SIPK and WIPK and induce the transcript accumulation of defense genes (Katou *et al.*,

2003). Moreover, it has been shown that StMEK1^{DD} transgenic potato plants driven by a pathogen-inducible promoter have resistance to the early blight pathogen, *Alternaria solani*, as well as to *Phytophthora infestans* (Yamamizo et al., 2006).

Extensive studies have been conducted to evaluate the functional understandings of many MAPK genes and their upstream kinases in dicotyledonous plants such as *Arabidopsis*, alfalfa, tobacco, tomato and parsley (Jonak et al., 2002; Mishra et al., 2006). To date, a total of 17 MAPK genes have been identified, and several of these have been characterized in rice (Agrawal et al., 2003 Rohila and Yang, 2007). However, little is known about the interactions between components of MAPK and upstream MAPK kinase in rice. Therefore, a more detailed study is necessary to identify upstream kinases and downstream target proteins to better understand the MAPK-mediated pathways in rice.

To understand the MAPK cascade associated with disease resistance in rice, we transformed rice plants with the tobacco NtMEK2^{DD} or NtMEK2^{KR}, which encodes the constitutively active mutant or the inactive mutant of NtMEK2, respectively, under the control of a steroid inducible promoter. In NtMEK2^{DD} transgenic rice, activation of the endogenous 48-kDa MBP kinase leads to HR-like cell death, which is preceded by the generation of hydrogen peroxide. Furthermore, expression of the NtMEK2^{DD} gene in transgenic rice plants induced the expression of several downstream MAPKs and defense-related genes. Taken together, these results suggest that NtMEK2 is functionally interchangeable with a rice MAPKK and also a useful tool for evaluating the MAPK pathway involved in signaling pathways that lead to defense responses in rice.

2. Materials and methods

Generation of transgenic rice lines

The NtMEK2^{DD} and NtMEK2^{KR} constructs were used to generate transgenic rice (Yanget al., 2001). Each construct was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 by electroporation using a cell-porator (Life Technologies, Rockville, USA) according to the manufacturer's instructions, with slight modification (Hiei et al., 1994; Lee et al., 2002).

Briefly, calli from the mature embryos (*Oryza sativa* L. cv. Dongjin) were co-cultured with *A. tumefaciens* EHA105 that harbored constitutively active mutants or the inactive mutants of NtMEK2 gene for 3 days. Next, the calli were washed 10 times in distilled water and then placed on pre-selection medium for 10 days. Several calli were then selected for additional growth on MS medium containing 50 mg/ L hygromycin for 1 month. The calli were then regenerated on shooting medium for 2 months, after which they were transferred to rooting MS medium containing 250 mg/ L carbenicillin for 2 weeks. For regeneration, the temperature of the tissue culture room was maintained at 25°C with a 16 h light/8 h dark photoperiod. The regenerated transgenic plants were then moved into soil and maintained in a greenhouse until seed harvest (Supplementary data Fig. 1). Next, the T₁ seeds of the transformants were selected on MS medium containing 50 mg/L hygromycin and used for the following experiments after being moved into soil.

Inoculation with the rice bacterial pathogen

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (*Xoo*) strain K3 inoculum was used after suspending bacteria grown in NB (Nutrient broth, 5g peptone, 5g NaCl, 2g Yeast extract, 1g Beef extract per 1 liter) in 10 mM MgCl₂ buffer. Plant inoculation was performed using the leaf clip method. Briefly, the uppermost leaf of the rice plants were cut at the tip (1–2 cm) with scissors that had been dipped into bacterial inoculums (OD₆₀₀ of 1) (Kauffman et al., 2003). The *Xoo*-infected leaves were then collected at 48 hr after inoculation.

Preparation of protein extracts, immunoblot analysis and in-gel kinase activity assay

Total protein was extracted from rice leaf tissue by grinding the leaves with small plastic pestles in extraction buffer. After centrifugation at 18,000×g for 40 min, the supernatants were transferred into clean tubes, quickly frozen in liquid nitrogen, and then stored at –80 °C until analyzed. The concentration of the protein extracts was determined using a Bio – Rad protein assay kit. Immunoblot analysis of Flag-tagged proteins was conducted as described previously (Yang et al., 2001). Next, the in-gel kinase activity assay was performed using myelin basic protein as a substrate as described previously (Yang et al., 2001). Prestained size markers (Bioneer, Daejeon, KOREA) were

used to calculate the size of the kinases.

Histochemical detection of hydrogen peroxide

The production of hydrogen peroxide was detected by the in situ histochemical staining procedure using 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) solution (Thordal-Christensen et al., 1997). Briefly, the detached 6-week-old rice leaves that had been treated with DEX were placed in a solution containing 1 mg/ml DAB (pH 4.2) for 8h. The leaves were then boiled in ethanol (96%) for 20 min to remove the chlorophyll.

Reverse transcriptionPCR and Quantitative real-time PCR analyses

The expression of the OsMPKs and defense-related genes was analyzed by extracting RNA samples from NtMEK2^{DD} and NtMEK2^{KR} transgenic rice leaves that were treated with 100 μ M DEX using the RNeasy plant mini kit. Following DNase treatment, reverse transcription was performed for 1.5 h at 42 °C in a final reaction of 20 μ l containing 3 μ g of the purified total RNA. The first-strand was then used as a template for PCR amplification, which was conducted using 12.5 pmol of each primer set (supplemental Table 1). Next, the RT-PCR products were separated by gel electrophoresis in agarose gel and the bands were visualized by staining with ethidium bromide. Quantitative RT-PCR analysis was also performed using SYBR-Green PCR master mix (Qiagen, Germany) and a Rotor-GeneTM 6000 real-time PCR system (Corbett, Sydney, Australia) according to the manufacturer's instructions. After normalization to rice 18s rRNA, the relative gene expression was calculated. The primers used to amplify the OsMAPKs were obtained from Reyna and Yang (2006).

Results and Discussion

Generation of NtMEK2^{DD} rice transgenic plants and expression of transgene

Transgenic rice plants that contained an active or inactive mutant of the NtMEK2 gene were generated and examined to determine whether tobacco MAPK kinase was functionally interchangeable with rice MAPK kinase. Although the glucocorticoid-inducible system has been characterized

extensively in dicotyledonous plants, to date, it has not been tested extensively in rice or other monocotyledons. However, Ouwerkerk et al. adapted the glucocorticoid-inducible system for specific use in rice (Ouwerkerk et al., 2001). In this study, rice plants were transformed with constitutively active mutant (NtMEK2^{DD}) or inactive mutant (NtMEK2^{KR}) of the NtMEK2 gene under the control of a steroid inducible promoter (Yang et al., 2001). In this system, a Flag tag was added to the N-terminus of the transgene to enable detection of transgene expression using an anti-Flag antibody. The integration of the transgene into putative T₀ transgenic plants was detected through polymerase chain reaction using NtMEK2 specific primers (data not shown). The expression of the transgene in T₀ transgenic plants was tested by treating detached leaves with DEX (100uM in water). Briefly, detached 10-week-old rice leaves were soaked in water containing DEX for 24h in conical tubes that had been sealed with parafilm to prevent dehydration. Leaf discs were then collected and the transgene expression was checked by immunoblot analysis and an in-gel kinase assay. The HR-like cell death phenotype was determined between 48h and 72h following DEX treatment. As shown in Table 1, transgene induction was detected in 9 out of 13 NtMEK2^{DD} lines and 6 out of 8 NtMEK2^{KR} lines following DEX treatment. Only the NtMEK2^{DD} lines with detectable transgene expression were found to have the HR-like cell death phenotype. No cell death phenotype was observed in transgenic lines that contained the NtMEK2^{KR} gene, even transgene expression was detected. Most of the putative transgenic lines showed a normal growth rate and set seeds (Supplementary data Fig. 1). Three independent T₁ NtMEK2^{DD} transgenic rice lines (NtMEK2^{DD} -5, NtMEK2^{DD} -10, and NtMEK2^{DD} -13) and two independent T₁ NtMEK2^{KR} transgenic rice lines (NtMEK2^{KR} -3 and NtMEK2^{KR} -6) were selected at random for further analysis.

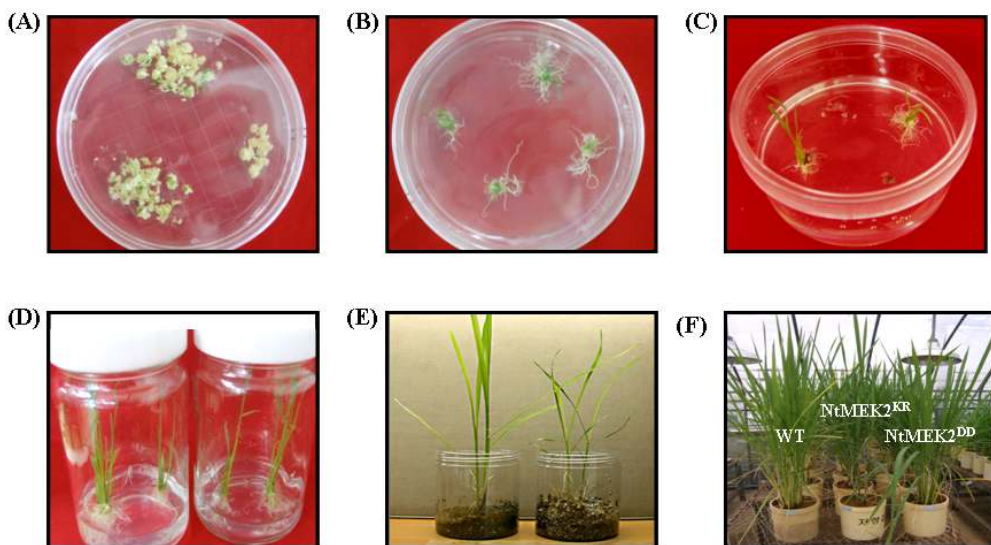
constructions	Total lines generated ¹	Line showed transgene inducibility ²	Line showed HR – like cell death ³
NtMEK ^{DD}	13	9	9
NtMEK ^{KR}	8	6	0

Table 1. Correlation between the inducibility of NtMEK2^{DD} expression and HR like cell death in T₀ transgenic rice plants

¹Transgenic rice plants were generated by Agrobacterium– mediated transformation and selected on MS medium containing hygromycin.

²Transgene inducibility was detected in leaves collected 24h after DEX (100μM) treatment by immunoblot analysis and in–gel kinase assay.

³HR–like cell death phenotype was determined between 48h and 72h after DEX treatment of detached rice leaves. Detached leaves were treated by soaking them in water containing DEX.



Supplementary Fig. 1. Construction of NtMEK2 transgenic rice plants
Callus from Dongjinbyeo (*Oryza sativa* L.) were cocultured with *A.*

tumefaciens EHA105 that harbored either the active or the inactive mutant of the NtMEK2 gene, respectively. (A) Proliferating calli were transferred to MS medium containing 50 mg L⁻¹ hygromycin. (B) and (C) Hygromycin resistant shoots were obtained from the calli on selection medium. (D) The putative transgenic shoots were then transferred to rooting MS medium containing 250mg L⁻¹ carbenicillin and 50 mg L⁻¹ hygromycin. (E) Transgenic plants were cultivated in plastic pots for 3 weeks for hardening. (F) The hardened transgenic plants were transferred to pots. Wild type (*Oryza sativa* L. Dongjin), T₀ NtMEK2^{KR} transgenic rice plants and T₀ NtMEK2^{DD} transgenic rice plants were grown in the greenhouse.

Expression of NtMEK2^{DD} activates 48 kDa MBP kinase in NtMEK2^{DD} transgenic rice plants

The selected 6-week-old T₁ plants were collected 24h after DEX treatment (100 μM). The transgene expression was then evaluated by immunoblot analysis and the activation of endogenous MAPK(s) by an in-gel kinase assay. The expression of transgene in two T₁ NtMEK2^{KR} and three T₁ NtMEK2^{DD} transgenic rice lines was detectable at the protein level. Interestingly, NtMEK2^{DD} proteins showed an up-shift in the SDS-PAGE when compared with the NtMEK2^{KR} proteins (Fig. 1A). The activation of an endogenous 48-kDa MBP kinase was observed in all three T₁ NtMEK2^{DD} transgenic lines. Conversely, no endogenous 48 kDa-MBP kinase activation was observed in the T₁ NtMEK2^{KR} transgenic lines (Fig. 1B). The molecular mass of the 48 kDa MBP kinase in the T₁ NtMEK2^{DD} transgenic lines was calculated by simultaneously conducting SDS-PAGE using proteins extracted from transgenic NtMEK2^{DD} tobacco plants following DEX treatment (30 μM) (data not shown, Jin et al., 2003). To determine if the rice 48-kDa MBP kinase activated by the expression of NtMEK2^{DD} was involved in the defense responses of rice, proteins from bacterial pathogen-treated rice leaves were extracted and analyzed using an in-gel kinase assay. Activation of the same 48-kDa MBP kinase was also observed in rice leaves treated with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), the bacterial blight pathogen of rice (Fig. 1B).

A detailed time-course study of transgenic lines after DEX treatment was

performed. Immunoblot analysis revealed that weak expression of the transgene in both the NtMEK2^{KR}-6 and the NtMEK2^{DD}-13 line occurred after 12 hr of DEX treatment and was maintained for 48 hr after DEX treatment. However, rice 48-kDa MBP kinase activation occurred only in the NtMEK2^{DD}-13 line. In addition, when HR-like cell death began to appear 48 hr after the induction of NtMEK2^{DD} expression, the activation of a 45-kDa and a 40-kDa MBP kinases was also detected (Fig. 1C). This result indicates that long-lasting activation of the 48-kDa MBP kinase is sufficient to induce HR-like cell death and that another MBP kinase may play a role in accelerating the cell death process. This data is consistent with the results of a study conducted by Zhang and Liu (2001) in which treatment with SIPK alone was found to be sufficient for the activation of several defense responses, including HR-like cell death. To date, a total of 17 rice MAPK genes have been identified and characterized, with their functions being found to occur primarily at the transcriptional level. The mRNA level of OsMAPK6 (also known as OsSIPK and OsMPK1) and the OsMAPK6 protein level remained constant in response to sphingolipid elicitor however, rapid induction of the kinase activity, which was found to have a molecular mass of 48-kD in the activation assay, was observed. This indicates that OsMAPK6 is posttranslationally activated by a sphingolipid elicitor in a rice cell culture. Therefore, we conducted quantitative RT-PCR analysis using primers specific for 10 MAPK genes that are known to be involved in defense response. The mRNA level of OsMAPK6 was not changed in either of these rice lines after DEX treatment, whereas the mRNA level of other rice MAPKs was significantly induced in the NtMEK2^{DD} transgenic rice lines (Fig. 3A). Taken together, these results suggest that NtMEK2, a tobacco MAPK kinase, activates endogenous rice 48-kDa MBP kinase in stably transformed rice. This 48-kDa MBP kinase, which might be OsMAPK6, is involved in pathogen infection and defense responses in rice.

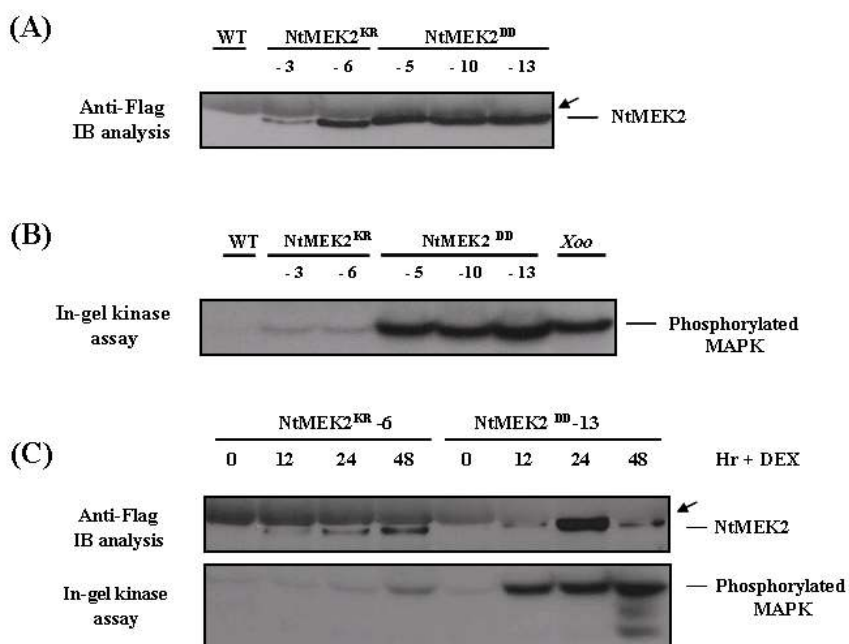


Figure 1. Expression of NtMEK2^{DD} activates endogenous 48-kDa MBP kinase following DEX treatment in NtMEK2^{DD} transgenic rice plants

(A) T₁ transgenic NtMEK2^{KR} and NtMEK2^{DD} rice plants were collected 24 h after DEX treatment and transgene expression was then determined by immunoblot analysis using anti-Flag antibody. Arrows indicate the rubisco subunit as the background. (B) The activation of endogenous 48-kDa MBP kinase in T₁ transgenic NtMEK2^{DD} rice plants was determined by an in-gel kinase assay using MBP as a substrate. Protein extracts from bacterial pathogen-treated leaves were also collected and analyzed by an in-gel kinase assay. The 48-kDa MBP kinase activated by the expression of NtMEK2^{DD} is analogous to rice MBP kinase activated by the rice bacterial pathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*). (C) A detailed time-course analysis was performed. Detached leaves treated with DEX were collected during the indicated time period and protein extracts were prepared. After 48 hr of DEX treatment, HR-like cell death and the activation of three MBP kinases was observed in NtMEK2^{DD} rice plants. Arrows indicate that the rubisco subunit was the background. All experiments were repeated three times with similar results.

Expression of NtMEK2^{DD} induces HR-like cell death associated with hydrogen peroxide production in NtMEK2^{DD} transgenic rice plants

The relationship between the expression of the active mutant and the HR-like cell death in T₁ plants was evaluated. Although the transgenes were expressed in both NtMEK2^{DD} and NtMEK2^{KR} transgenic rice, only the NtMEK2^{DD} transgenic lines showed the activation of endogenous 48-kDa MBP kinase and HR-like cell death. Interestingly, we found black speckled lesions in the NtMEK2^{DD} transgenic lines within 48 hr of DEX treatment, prior to the HR-like cell death, and dehydration of the tissue was eventually observed in the plants (Fig. 2A and 2B). To determine if H₂O₂ production is involved in the HR-like cell death induced by activation of the endogenous 48-kDa MBP kinase pathway in NtMEK2^{DD} transgenic rice, DAB (3, 3'-diaminobenzidine) staining was performed. DAB is converted into an insoluble brown oxidation product by H₂O₂ in the presence of endogenous peroxidase (Thordal - Christensen et al., 1997), and the results of this study indicated that H₂O₂ generation occurred in NtMEK2^{DD} transgenic rice plants treated with DEX (Fig. 2C). However, no H₂O₂ generation was observed in transgenic rice plants that expressed NtMEK2^{KR}. In addition, the expression of antioxidant genes, such as peroxidase and glutathione S-transferase, was significantly increased in only the NtMEK2^{DD} transgenic rice (Fig. 3B). Elevated levels of H₂O₂ in transgenic rice leads to cell death and enhanced resistance to bacterial and fungal pathogens (Kachroo et al., 2003). Taken together, these results indicate that H₂O₂ production is associated with the activation of the 48-kDa MBP kinase, which may directly contribute to the HR-like cell death process.

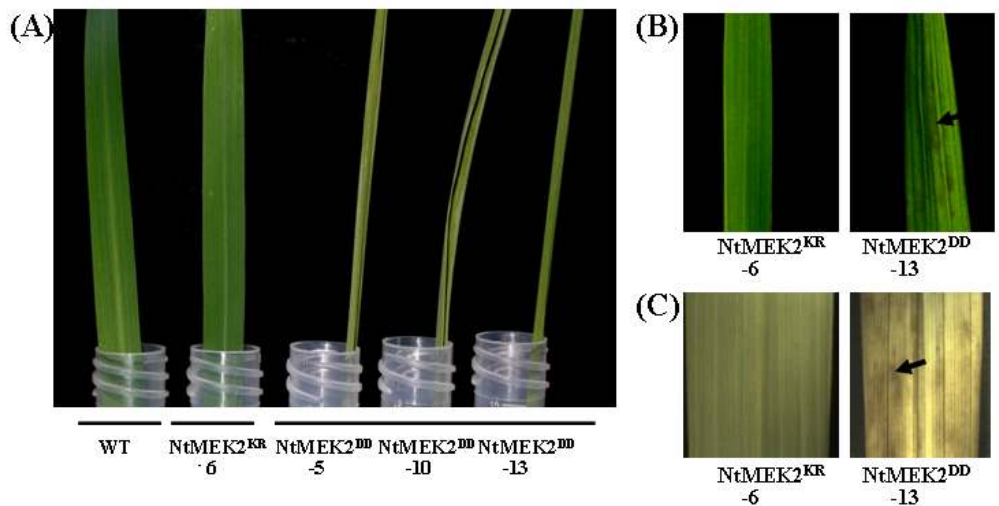


Figure 2. Hydrogen peroxide production precedes the HR-like cell death induced by NtMEK2^{DD} in transgenic rice plants.

Detached leaves from the T₁ transgenic rice plants, the NtMEK2^{KR} -6 line and the NtMEK2^{DD} -5, -10, and -13 lines as well as a wild type (*Oryza sativa* L. Dongjin, used as a control) were treated with DEX (100μM). (A) Dehydration of the tissues was only observed in the NtMEK2^{DD} transgenic rice lines that were treated with DEX. The photo was taken 72h after DEX treatment. (B) H₂O₂ production was observed as black speckled lesions in the NtMEK2^{DD} transgenic rice line (arrowed). (C) H₂O₂ production was detected by immersing the leaves in DAB solution (1 mg/ml, pH 4.2) for 8h followed by boiling the leaves in ethanol (96%) for 20 min to remove the chlorophyll. H₂O₂ production was then observed as a dark brown coloration only in the NtMEK2^{DD} transgenic lines (arrowed). The photo was taken 48h after DEX treatment. All experiments were repeated three times with similar results in both the T₀ and T₁ transgenic lines.

Activation of endogenous 48-kDa MBP kinase by NtMEK2^{DD} expression induces the expression of downstream MAPKs and a subset of defense genes in transgenic rice

The expression of defense-related genes was confirmed by comparing the NtMEK2^{DD}-13 transgenic line to the NtMEK2^{KR}-6 transgenic line using RT-PCR (Fig. 3B). However, the expression pattern of the rice MAPKs gene showed poor sensitivity when RT-PCR was conducted. Therefore, real-time quantitative RT-PCR was conducted to evaluate the expression of the rice MAPKs gene. According to the results of several previous studies, OsMPK2, OsMAPK4, OsMPK5, OsMPK7, OsMPK8, OsMPK12, OsMPK13, OsMPK15, and OsMPK17 are induced by the rice blast fungus (*Magnaporthe grisea*) or defense signal molecules such as SA, JA, or H₂O₂ at the mRNA level (Rohila and Yang, 2007). Expression of OsMPKs (OsMPK4, OsMPK5, OsMPK7, OsMPK12) was significantly induced in the NtMEK2^{DD}-13 transgenic line when compared to the NtMEK2^{KR}-6 transgenic line following DEX treatment. However, expression of OsMPK6 and other OsMPKs (OsMPK2, OsMPK8, OsMPK13, OsMPK15, OsMPK17) was not induced following DEX treatment, or no differences were observed between both transgenic lines (Fig. 3A and data not shown). Furthermore, expression of defense-related genes, including pathogenesis-related (PR) genes and PBZ1 (encodes probenazole-inducible protein), POX genes (encodes peroxidase genes that plays a role in oxygen metabolism), the PAL gene (encodes phenylalanine ammonia lyase, a key enzyme involved in the production of phytoalexin) and GST genes (encodes glutathione S-transferases, an enzyme involved in cellular detoxification), were dramatically induced in the NtMEK2^{DD}-13 transgenic line. As shown in Fig. 3B, the PR-1a, PBZ1, PAL and GST genes (GSTTU4 and GSTTU12) were highly induced in the NtMEK2^{DD} line within 12h of treatment with DEX. In addition, the induction of POX2 and PR-3 were very high at 12h and 72h after DEX treatment, respectively. However, the PR-5 and POX3 induction were much lower than that of other genes (Fig. 3B). Defense-related genes evaluated in this study, which included peroxidase, glutathione S-transferase and PAL, were also up-regulated in rice infected with bacterial leaf blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Induction of the ROS scavenging system and glutathione-mediated detoxification may be responsible for hypersensitive cell death in the resistant cultivar upon bacterial infection

(Kottapalli et al., 2007). These results indicate that the expression of NtMEK2^{DD} in rice leads to the activation of some OsMPKs and several groups of defense genes. These data are consistent with the results of previous studies that have found that activation of SIPK and WIPK by NtMEK2^{DD} leads to the induction of HMGR and PAL, as well as Osmotin, PR-1a, PR-1b, PR-2b, and PR-3b in tobacco (Yang et al., 2001, Kim & Zhang, 2004). In addition, Agrobacterium-mediated transient expression of the constitutively active mutant of OsMEK2, which is the rice ortholog of tobacco NtMEK2, induces HR-like cell death and activates SIPK in tobacco plants (Yoo et al., in preparation). Taken together, these results suggest that a conserved downstream pathway mediated by NtMEK2 exists in both monocot and dicot plant systems.

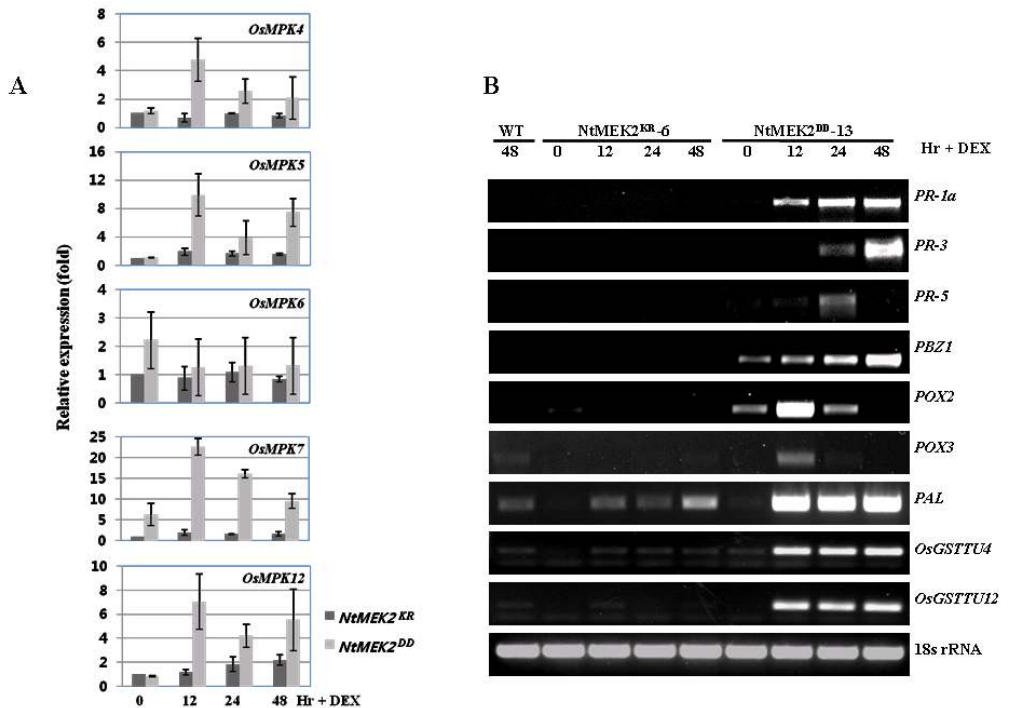


Figure 3. Induction of NtMEK2^{DD} expression leads to the activation of downstream MAPKs and several groups of defense genes. Total RNA was isolated from samples from NtMEK2^{KR}-6 and NtMEK2^{DD}-13 transgenic rice plants collected at the indicated times following DEX treatment. (A) The expression levels of each OsMAPK gene were confirmed by quantitative real-time PCR analysis. The expression levels of the 18S rRNA transcript were used to normalize other samples and the data shown is relative to NtMEK2^{KR}-6 plants that were not treated with DEX. (B) Reverse transcription-PCR analysis for expression of defense-related genes was performed using primers specific for the genes. The bottom gels show reverse transcription PCR of the housekeeping gene, 18s rRNA, which was used as a loading control (B). The experiment was repeated three times with similar results.

In summary, the results of this study demonstrate that NtMEK2 is functionally interchangeable with rice MAPK kinase for activating the downstream MAPK pathway involved in multiple defense responses in rice (Fig. 4). In addition, the results of this study indicate that NtMEK2 transgenic rice plants will be a useful tool for the identification of downstream substrates utilized by rice 48-kDa MBP kinase, which will help understand disease resistance in rice.

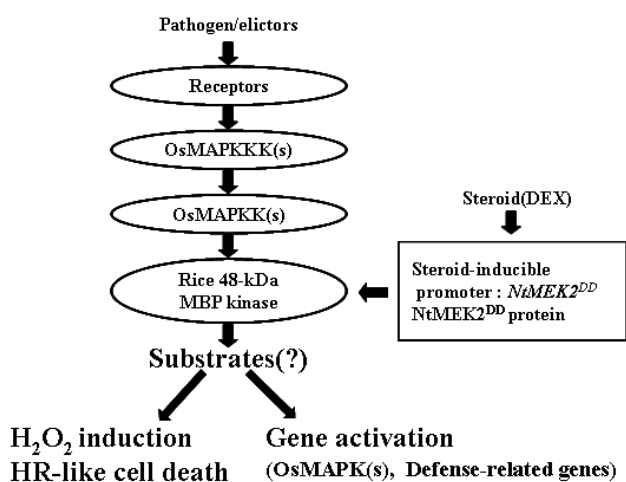


Figure 4. A model depicting the tobacco MAPK kinase, NtMEK2, functionally activates the rice endogenous 48-kDa MBP kinase and leads to downstream defense responses.

제 3절 Mitogen-activated protein kinase cascade in signaling polyamine biosynthesis in plant

1. Introduction

The active defense mechanisms of plants against pathogens include rapid production of reactive oxygen species, induction of rapid cell death, activation of defense genes, and production of antimicrobial phytoalexins (Yang et al. 1997 Zhao et al. 2005). In addition, it has been reported that successful pathogen or elicitor recognition in plants triggers activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade, and two tobacco MAPKs, SIPK and WIPK, are known to be involved in signaling plant defense response to various pathogens. Recently, NtMEK2, a tobacco MAPK kinase that is upstream kinase of SIPK and WIPK, was identified by the dexamethasone (DEX)-inducible gain-of-function transgenic system. Expression of NtNEK2^{DD}, a constitutively active mutant of NtNEK2, activates endogenous SIPK and WIPK and leads to HR-like cell death, indicating that the NtMEK2-SIPK/WIPK cascade controls defense responses in tobacco (Yang et al. 2001 Jin et al. 2003). However, little is known about the downstream target substrates or defense-related genes that are regulated by this cascade.

Polyamines in plants are involved in various physiological and developmental processes including abiotic and biotic stress responses to conditions such as high osmotic stress, high salinity, hypoxia, low temperature or pH and pathogen attack (Bouchereau et al. 1999 Walters 2003). However, the signaling pathway(s) leading to the accumulation of polyamine under stress conditions are poorly understood. In plants, three polyamines (putrescine, spermidine and spermine) are biosynthesized from L-arginine (via L-ornithine) and L-methionine by a series of five interdependent enzyme reactions (Fig. 1). The first step in polyamine biosynthesis is decarboxylation of ornithine or arginine, which is catalyzed by ornithine- or arginine decarboxylases (ODC or ADC), respectively, to yield the putrescine. Spermidine and spermine are then formed by the sequential addition of

aminopropyl groups to putrescine and spermidine, respectively, via the activity of spermidine synthase (SPDS) and spermine synthase (SPMS). (Smith et al. 1985; Bagni and Tassoni et al. 2001; Kusano et al. 2007). Apart from biosynthesis, polyamines are primarily catalyzed by two amine oxidases, diamine oxidase (DAO) and polyamine oxidase (PAO) (Fig. 1). DAO catalyzes the oxidation of putrescine to give pyrroline, which results in the release of ammonia and hydrogen peroxide. In tobacco, putrescine receives the methyl group of S-adenosylmethionine (SAM) to form N-methylputrescine, which is later oxidized to pyrroline via methylputrescine oxidase (MPO) (Katoh et al. 2007). The pyrroline is then further metabolized to γ -aminobutyric acid (GABA) by pyrroline dehydrogenase (Cona et al., 2006). PAO catalyzes the conversion of spermidine and spermine using hydrogen peroxide to pyrroline and 1-(3-aminopropyl)-pyrroline, respectively, along with 1,3-diaminopropane in plants (Martin-Tanguy 2001; Liu et al. 2007).

Here, we report that the MAPK cascade, NtMEK2-SIPK/WIPK, regulates polyamine synthesis through transcriptional regulation of the biosynthetic genes in tobacco.

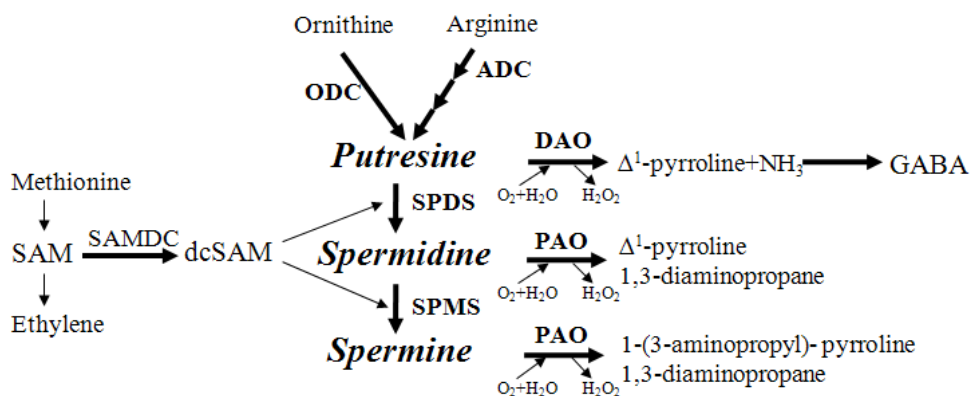


Fig. 1 Polyamine biosynthetic and catabolic pathway in plant.

2. Materials and Methods

Plant growth and treatments

Transgenic plants were grown at 22°C in a growth room programmed for a 14-h-light cycle. Fully expanded leaves of 5~8-week-old tobacco plants were used for all experiments. Transgene expression was induced by spraying or infiltrating the leaves with dexamethasone (DEX, 30 µM). Samples for protein and RNA preparation were then collected at various times after DEX treatment, quick-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until use.

Five to six-week-old tobacco [*N. tabacum* cv. Xanthi nc (NN)] plants were used for all treatments. The third to fifth tobacco leaves from the top were inoculated by rubbing them with wet carborandum plus either TMV or buffer (mock). For the salicylic acid (SA; 1 mM) and water treatments, each solution was sprayed onto the surface of the tobacco leaves.

Protein extraction, immunoblot analysis, and in gel kinase activity assay

Total protein was extracted from the leaf tissue and stored at -80°C until use. Protein concentration was then determined using a Bio-Rad protein assay kit with bovine serum albumin standard. Immunoblot analysis of Flag-tagged proteins was then conducted as described previously (Yang et al. 2001). Next, an in-gel kinase activity assay was performed using myelin basic protein as a substrate for kinase as described previously (Yang et al. 2001).

Reverse transcription PCR

Total RNA extracted from the samples was used for the synthesis of first-strand cDNA by reverse transcriptase after DNase treatment. Reverse transcription was then performed for 1.5 h at 42°C in a mixture with a final reaction volume of 20µl that contained 3µg of the purified total RNA, 4µl of 5X reaction buffer, 5µl of dNTPs, 2µl of 10 µM oligo dT, 0.5µl of RNaseOUT (40 U/µl), and 1ul of SuperScript II reverse transcriptase (200 U/µl; Invitrogen, Carlsbad, USA). Eighty µl of ultra-purified water for PCR was then added to the first-strand cDNA to dilute it, after which it was stored at -20°C until use. The first-strand cDNA (50ng) was then used as a template for PCR amplification, which was conducted using 12.5 pmol of each pair of

the primers. The primer pairs are listed in Supplemental Table 1. The RT-PCR products were then separated by gel electrophoresis on a 1.5% agarose gel in TAE buffer and the bands were then visualized by staining with ethidium bromide.

ACP-based DDRT-PCR

Differentially expressed genes were screened using GeneFishing™ DEG kits (Kim et al., 2004). Briefly, second-strand cDNA synthesis was conducted at 50°C during one cycle of first-stage PCR in a mixture with a final reaction volume of 20 µl that contained the following: 3–5 µl (about 50 ng) of diluted first-strand cDNA, 1 µl of dT-ACP2 (10 µM), 1 µl of 10 µM arbitrary ACP, and 10 µl of 2Master Mix (Seegene, Seoul, Korea). The PCR conditions for second-strand synthesis were as follows: one cycle at 94°C for 1 min, followed by 50°C for 3 min, and 72°C for 1 min. After second-strand DNA synthesis was completed, the following protocol was used for the second-stage PCR amplification: 40 cycles of 94°C for 40 s, 65°C for 40 s, 72°C for 40 s, and a 5 min final extension at 72°C. The amplified PCR products were then separated by electrophoresis in a 2% agarose gel, stained with ethidium bromide and cloned into a pGEM T Easy cloning vector. The cloned plasmids were then sequenced.

Polyamine analysis

Samples of plant material were powdered with liquid nitrogen using pre-cooled mortars and pestles. The polyamines were then extracted by homogenizing the powdered plant samples with 5 % cold perchloric acid (PCA, v/v) at a ratio of 100 mg fresh mass as described by Tiburcio et al. (1985) and Marcé et al. (1995). The homogenates were then incubated in an ice bath for 30 min, after which they were centrifuged at 27,000 x g for 20 min. The pellet was then resuspended with an equal volume of 1 M NaOH. Next, aliquots (200 µl) of the suspension were mixed with an equal volume of 12 M HCl in a reflux glass vial and heated to 110 °C for 16 to 18 hr. The samples were then filtered through glasswool (to eliminate carbonized material) and dried under a vacuum. Next, the dried material was resuspended in 5 % PCA (200 µl). Finally, the following three fractions were obtained: the non-hydrolysed PCA supernatant (S: free polyamines), the

hydrolysed PCA supernatant (SH: polyamines liberated from the PCA-soluble conjugates) and the hydrolyzed pellet (PH: polyamines liberated from the PCA-insoluble conjugates). Dansylation of the polyamines was then conducted using the method described by Marcé et al (1995), with some modifications. Briefly, aliquots (200µl) of the S, SH and PH fractions were mixed with 400 µl of dansyl chloride (5mg/ml in acetone) and 200µl of a saturated Na₂CO₃ solution to produce an alkaline condition. The samples were then vortexed for 5 min, after which, they were incubated in a darkroom for 1 hr at 60°C. The reaction was then stopped by the addition of 100µl of a proline solution (100 mg/ml in H₂O) followed by incubation for 30 min in a darkroom. The dansylated polyamines in the supernatant were then extracted from the alkaline solution by adding 500µl of toluene and vortexing intensively for 30s. Next, the dansylamines were separated on a TLC plate using 4:1 (V/V) chloroform/triethylamine as the developing solvent (Tiburcio et al. 1985).

3. Results and Discussion

The selection of NtNEK2^{DD} and NtNEK2^{KR} transgenic plants using anin-gel kinase assay and immunoblot analysis

The expression of NtNEK2^{DD}, which is an active mutant of NtMEK2, is known to induce multiple defense responses such as defense gene activation and HR-like cell death (Yang et al. 2001). Therefore, NtNEK2^{DD} and NtNEK2^{KR} tobacco transgenic plants were used to identify the downstream effectors mediated by the NtMEK2-SIPK/WIPK cascade (Jin et al. 2003). Transgene inducibility in T₁ transgenic plants was examined by treating detached leaves with dexamethasone (DEX, 30 µM). NtNEK2^{DD} transgenic plants showed HR-like cell death 24h after DEX treatment. Because transgenic plants containing an inactive mutant of NtMEK2, NtNEK2^{KR}, did not show HR-like cell death, NtNEK2^{KR} transgenic plants was evaluated by immunoblot analysis using anti-Flag antibody against a Flag tag attached to the N-terminus of the transgene. Based on the results of the immunoblot analysis, the NtNEK2^{DD} -5 line and NtNEK2^{KR} -3 line were selected for further study.

A detailed time-course analysis conducted on the selected transgenic

plants revealed expression of the NtNEK2^{DD} transgene at the protein level at 3h, 8h and 24h after DEX treatment, whereas the NtNEK2^{KR} transgene was only detected at 8h and 24h after DEX treatment. The activation of NtMEK2 in selected transgenic plants was then evaluated by an in-gel kinase assay using myelin basic protein (MBP) as a substrate. As shown in Fig. 2A, endogenous SIPK and WIPK activations only occurred in the NtNEK2^{DD} plants.

Isolation of differentially expressed genes (DEGs) mediated by the NtMEK2-SIPK/WIPK cascade using DDRT-PCR

The ACP-based differential display reverse transcription polymerase chain reaction (DDRT-PCR) technique, which has been used to identify differentially expressed genes (DEGs) in several organisms, was used to screen for downstream effectors or defense genes mediated by the NtMEK2-SIPK/WIPK cascade in NtNEK2^{DD} transgenic tobacco. DDRT-PCR technique is employed for its special primers which specifically anneal to the template for amplifying only genuine products and eliminating false-positive products (Hwang et al. 2003 Kim et al. 2004).

Ten DEGs were identified in the total RNA of NtNEK2^{DD} transgenic tobacco plants using 40 arbitrary ACP primers. Sequence analysis of the PCR products conducted using the basic local alignment search tool (BLAST) revealed that 8 of the 10 DEGs were involved in plant defense response (data not shown). As shown in Figure 2B, the differentially expressed cDNA band was identified as arginine decarboxylase (ADC). In addition, the activation of SIPK and WIPK by NtNEK2^{DD} was able to regulate other DEGs including 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMGR), Pathogenesis-related protein (PR-1b), pepsin A, universal stress protein (USP), and biotic cell death-associated protein gene, etc. These results are consistent with previous studies that demonstrated that activation of SIPK and WIPK by NtNEK2^{DD} leads to the induction of HMGR and Osmotin, PR-1a, PR-1b, PR-2b, and PR-3b in tobacco (Yang et al., 2001, Kim and Zhang, 2004).

Induction of NtNEK2^{DD} expression leads to the activation of polyamine biosynthetic and oxidase genes

Polyamines are involved in various physiological and developmental

processes in plants including abiotic and biotic stress responses to conduction such as high salt, hypoxia, low temperature or pH and pathogen attack (Bouchereau et al. 1999 Walters 2003). However, the signaling pathway(s) that lead to the accumulation of polyamines under stress conditions are poorly understood. Therefore, the expression of six polyamine related genes, arginine decarboxylase (ADC), ornithine decarboxylase (ODC), spermidine synthase (SPDS), polyamine oxidase (PAO), methylputrescine oxidase1 (MPO1), methylputrescine oxidase2 (MPO2), in NtNEK2^{DD} and NtNEK2^{KR} transgenic tobacco plants was compared to determine if the MAPK cascade was involved in the production or degradation of polyamines (Fig. 2C). The 18s rRNA, housekeeping gene was used as a control. NtNEK2^{DD} transgenic plants exhibited a significant increase in ADC, ODC and MPO1 transcript levels at 8h and 24h after SIPK/WIPK activation when compared with NtNEK2^{KR} plants. In addition, the MPO2 gene was slightly induced, but the PAO and SPDS genes were slightly reduced in NtNEK2^{DD} transgenic plants after SIPK/WIPK activation. In support of our findings in tobacco, the expression of ADC1 and ADC2 in NtNEK2^{DD} transgenic Arabidopsis was rapidly induced after DEX treatment. Furthermore, the expression of these genes was partially compromised in NtNEK2^{DD}/mpk3 and NtNEK2^{DD}/mpk6 mutants following DEX treatment, suggesting the requirement of downstream MAPKs in the gain-of-function MAPKK transgenic plants (Jang et al. in preparation). Taken together, these data indicate that the NtMEK2-SIPK/WIPK MAPK cascade regulates the putrescine biosynthetic genes in tobacco.

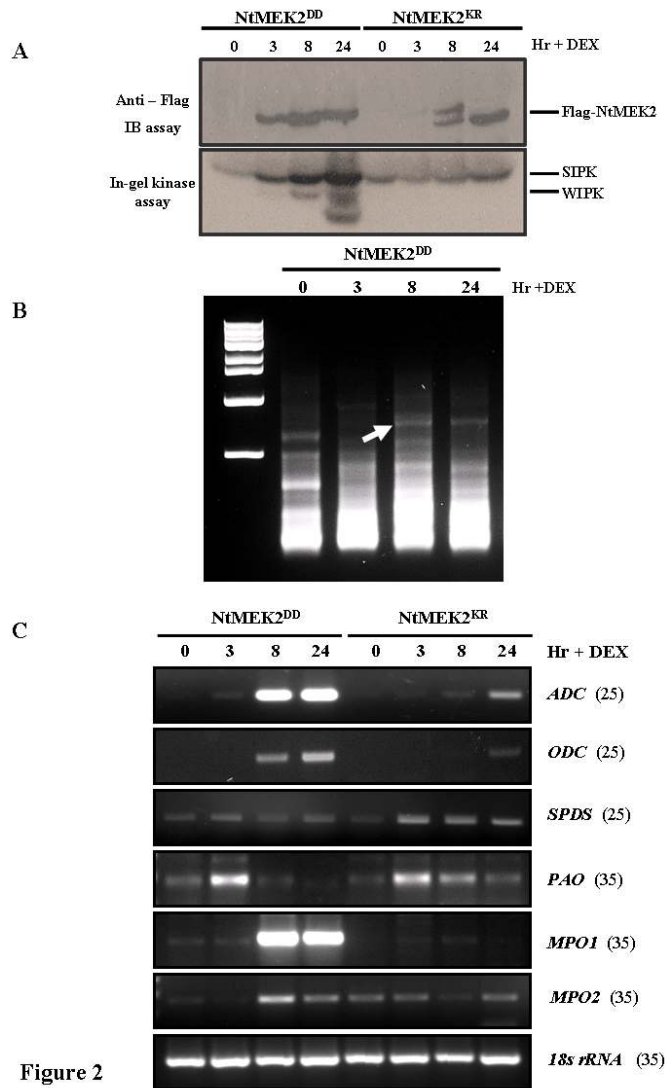


Figure 2

Fig. 2 ACP-based DDRT-PCR and RT-PCR analysis of transgenic NtNEK2^{DD} and NtNEK2^{KR} tobacco plants. (A) Transgenic NtNEK2^{DD} and NtNEK2^{KR} tobacco plants were treated with DEX (30 μ M) and the levels of NtMEK2 expression were then determined by immunoblot analysis using anti-Flag antibody (Upper). In addition, the endogenous SIPK and WIPK activities were detected using an in-gel kinase assay with MBP as the substrate (Lower). (B) ACP-based DDRT-PCR analysis of NtNEK2^{DD} tobacco transgenic plants. The arrow indicates a cDNA fragment that was identified as arginine

decarboxylase (ADC) through sequencing analysis (GeneBank accession No. AF321137). (C) RT-PCR analysis of NtNEK2^{DD} and NtNEK2^{KR} transgenic plants to observe the expression patterns of six polyamine biosynthetic and oxidase enzymes in tobacco. The 18s rRNA gene was used as a positive control to ensure the integrity of the RNA samples. The amplified cDNA products were separated by electrophoresis in 1.5% agarose gels and then stained with EtBr. Numbers in parentheses indicate that the number of cycles for PCR product. The experiment was repeated three times with similar results.

Differential expression patterns of polyamine biosynthetic genes upon SA treatment and TMV inoculation

Salicylic acid (SA) is a defense-related signal compound and a major regulator of plant defense reactions against pathogens in plants (Durner et al. 1997). To determine if SA, which activates SIPK (Zhang and Klessig, 1997), induces polyamine biosynthetic genes, we treated tobacco plants with 1mM SA or water and the RNA was then extracted and analyzed by reverse transcription-PCR. As shown in Figure 3A, SA treatment resulted in a significant increase in the expression of ADC expression after 3h of treatment, however, the ODC and SPDS transcript levels in tobacco were not changed by SA treatment. Taken together, these data indicate that expression of the ADC gene is associated with the SA-mediated defense response.

The NtMEK2-SIPK/WIPK cascade in tobacco carrying the N resistance gene is activated by the tobacco mosaic virus (TMV) (Zhang and Klessig 1998; Jin et al. 2003). As a result, we also examined the expression of polyamine biosynthetic genes in TMV-infected plants. RNA was extracted from tobacco leaves that had been inoculated with TMV or buffer. RT-PCR analysis was then conducted to determine if the polyamine biosynthetic genes (ADC, ODC, and SPDS) were involved in the N gene-mediated resistance response (Fig. 3B). Expression of the ODC gene was strongly induced between the first and third day following TMV-inoculation of the TMV-resistant tobacco. However, the ADC and SPDS genes were slightly induced following TMV inoculation. Interestingly, although ADC expression was strongly induced by SA, ODC expression was more strongly induced by

TMV inoculation (Fig. 3A and 3B). These results are consistent with a study conducted by Yoo et al. (2004), in which the CaODC1 gene was specifically induced during TMV mediated but SA-independent resistant response. These results indicate that the ODC gene is associated with the N gene-mediated resistance response.

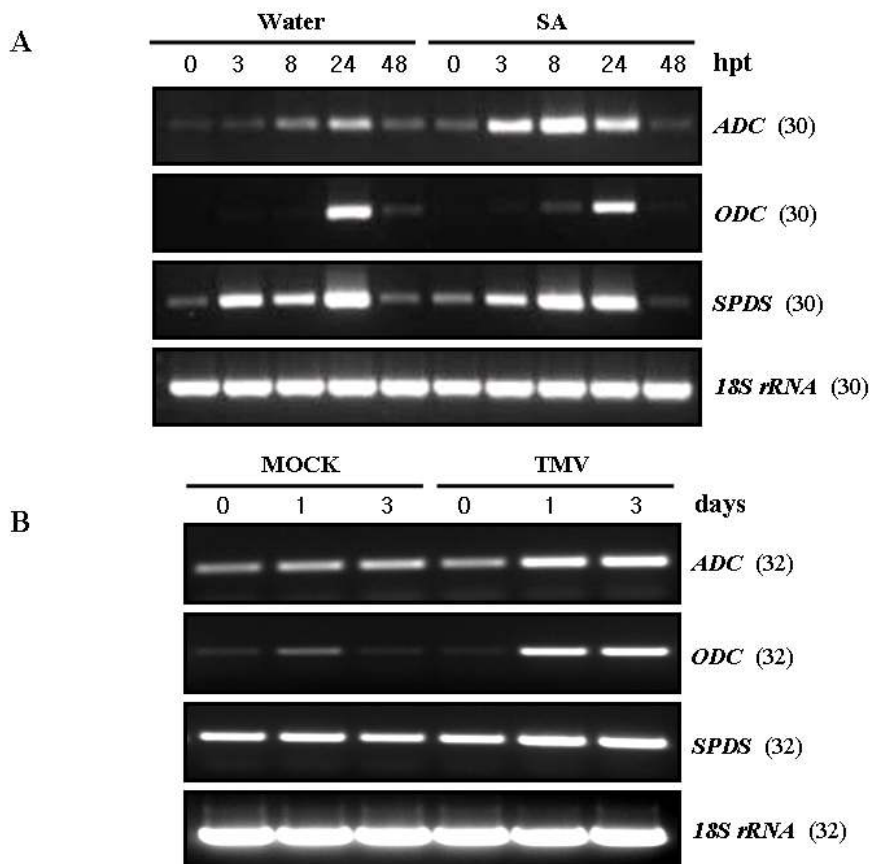


Fig. 3 RT-PCR analysis to evaluate the expression pattern of polyamine biosynthetic enzymes in tobacco leaves that were (A) subjected to SA treatment or (B) TMV inoculation. Five to 6-week-old tobacco plants were sprayed with or without 1mM SA. Leaf discs were taken at the indicated times in hr posttreatment (hpt). For TMV inoculation (U1 strain, 1 μ g/ml in 10mM sodium phosphate buffer, pH 7.0), tobacco plants carrying the N resistance gene [*N. tabacum* cv. Xanthi nc (NN)] were infected with TMV or

buffer only (mock) and then maintained at 30°C for 48 h. Discs from the infected leaves were then collected at the indicated times after the plants were shifted back to 25°C. Leaf samples were harvested at the indicated times and their total RNA was then isolated and analyzed by RT-PCR. The 18s rRNA gene was used as a control to confirm the integrity of the RNA samples. The amplified cDNA products were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gels and then stained with EtBr. Numbers in parentheses indicate that the number of cycles for PCR product. The experiment was repeated two times with similar results.

Production of putrescine and spermine in NtNEK2^{DD} transgenic plants after DEX treatment

Because the NtMEK2-SIPK/WIPK MAPK cascade was found to regulate polyamine biosynthetic genes in tobacco (Fig. 2C), polyamine from NtNEK2^{DD} and NtNEK2^{KR} transgenic tobacco plants was extracted before and after DEX treatment and then separated by TLC analysis. The fluorescent spots were then visualized under UV exposure and those corresponding to putrescine, spermidine and spermine were identified by comparison with dansylated standards (Fig. 4). The NtNEK2^{DD} transgenic plants were found to have a significantly higher putrescine content than the NtNEK2^{KR} plants within 24h after SIPK/WIPK activation. In addition, the spermine in the NtNEK2^{DD} plants was slightly higher than that of the NtNEK2^{KR} within 24h after SIPK/WIPK activation (Fig. 4). It has been shown that transgenic rice plants that express ADC produce a much higher level of putrescine under drought stress than wild type plants, which in turn leads to higher levels of spermidine and/or spermine and improved drought tolerance (Capell et al. 2004). In addition, barley leaves infected with powdery mildew have been found to contain increased levels of polyamines and exhibit increased ADC or ODC expression (Walters 1985). Furthermore, the free and conjugated putrescine and spermidine contents were found to be high in TMV-infected tobacco plants in necrotic areas (Torrighiani 1997). Taken together these results suggest that the pathogen-responsive MAPK cascade, NtMEK2-SIPK/WIPK, regulates the synthesis of polyamines, especially putrescine, in tobacco.

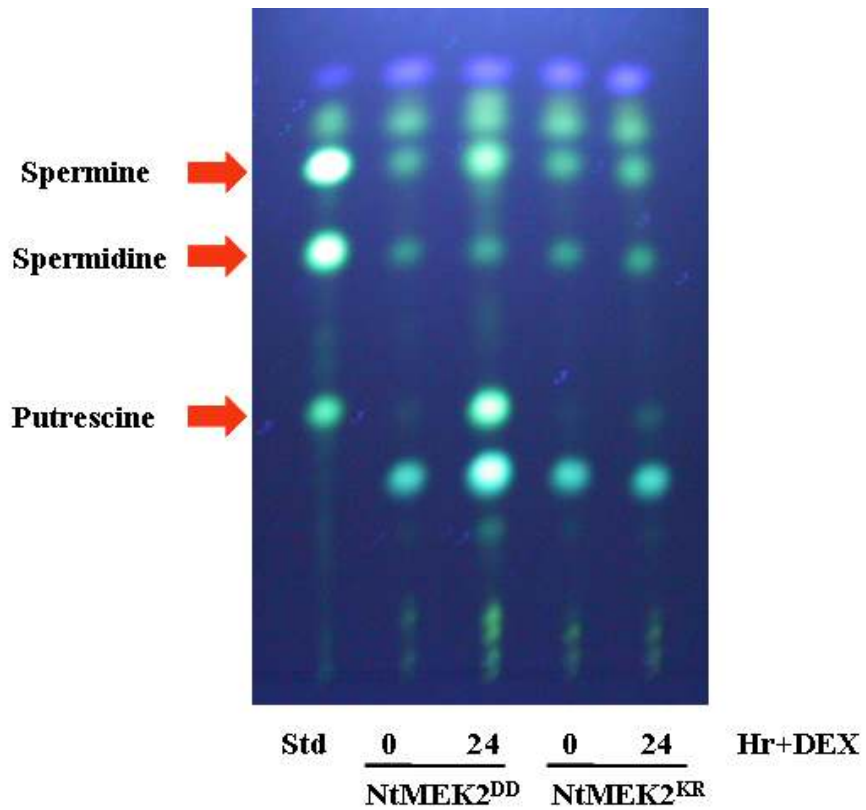


Fig. 4 Elevated putrescine and spermine levels in NtNEK2^{DD} transgenic plants after DEX treatment. Leaf discs were collected 0 and 24h after DEX (30 μ M) treatment of NtNEK2^{DD} and NtNEK2^{KR} transgenic plants. Three different dansylated polyamines were then separated and evaluated by thin-layer chromatography (TLC) after being developed using a chloroform/triethylamine solvent system (4:1, v/v) with polyamine standards that included putrescine, spermidine, and spermine. The experiment was repeated three times with similar results.

Figure 5 shows the proposed plant defense pathway triggered by pathogens (elicitors) or abiotic stresses (sensors) via the NtMEK2–SIPK/WIPK MAPK cascade, which leads to polyamine biosynthesis. In this study, the ADC gene was isolated using ACP– based DDRT–PCR and are currently studied to evaluate their relationship with the NtMEK2–SIPK/WIPK pathway. NtNEK2^{DD} transgenic plants exhibited a significantly greater amount of putrescine, but only slightly more spermine than NtNEK2^{KR} plants within 24h after SIPK/WIPK activation. Taken together, these data suggest that most of the induced putrescine might be degraded through MPO1 and MPO2 pathway and only a small amount of putrescine is converted into spermine. Based on the results of this study, the MAPK cascade, NtMEK2–SIPK/WIPK, regulates polyamine synthesis in tobacco via transcriptional regulation of polyamine biosynthetic genes such as ADC and ODC.

In future studies, the substrate(s) utilized by SIPK/WIPK should be identified so that the mechanism underlying the accumulation of putrescine during SIPK/WIPK activation can be better understood.

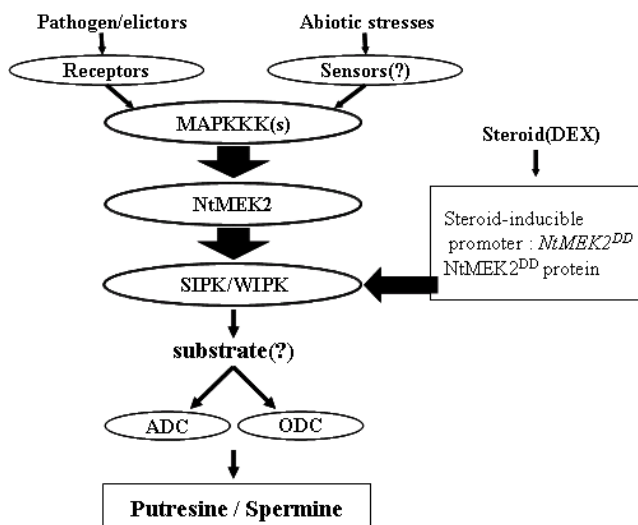


Fig. 5 A model depicting the involvement of the NtMEK2–SIPK/WIPK cascade in regulation of polyamine biosynthetic genes in plants.

제 4 절 염해 내성관련 유전자의 분리 및 기능분석

1. 재료 및 방법

가. 식물재료, 성장 조건 및 스트레스 처리

식물체들은 22 °C, 60 % 상대습도 및 light (16 hr)/ dark (8 hr) 상태의 성장실에서 키웠다. 고염스트레스는 2 주된 *Arabidopsis* 유식물체에 125 mM NaCl 농도의 용액을 처리하였다. 염 처리 시간은 0, 0.5, 1, 3, 6 및 9 시간을 처리 하였다.

Sucrose 처리는 식물배지에 2 % 당을 첨가하거나 혹은 첨가하지 않은 배지에 종자를 파종한 후, 2주 된 *Arabidopsis* 유식물체를 사용하였다.

나. 표현형 분석 및 스트레스 실험

염해 스트레스에 대한 표현형을 분석을 위하여, MS 식물배지에 종자를 뿌린 6 일 후 발아된 식물체들을 100 mM 혹은 125 mM NaCl 첨가된 새로운 MS 식물배지로 옮겨 10 일 후에 primary 뿌리 길이를 조사하였다. 실험은 3 반복하였으며, 반복 당 50 개 종자를 가지고 실험을 실시하였다.

Sucrose (Suc) 스트레스에 대한 표현형을 분석을 위하여, 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 및 0.5 % Suc가 첨가된 MS 식물배지에 종자를 뿌린 8 일 후 뿌리 길이를 조사하였다. 실험은 3 반복하였으며, 반복 당 100개 종자를 가지고 실험을 실시하였다.

다. mRNA 추출, cDNA library 구축 및 염해 내성 스크리닝

수정 후 16 일째의 옥수수 종자로부터 CsCl 밀도 구배 방법으로 total RNA를 추출하였다. 이러한 total RNA로부터 Poly(A) Quik mRNA kit (Stratagene, LaJolla, CA)에 의해 mRNA를 분리하였고 HybriZAP-2.1 two-hybrid cDNA kit를 통해 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 HybriZAP 2.1 vector의 Eco RI 및 Xho I site에 클로닝하여 Gigapack III Gold cloning kit에 의해 package 되어졌다. *E. coli* MRF' cell에 infection 시킨 후, 1 차적으로 4×10^6 클론들을 확보하였다. 이러한 library를 재 증폭하여 최종적으로 8×10^9 pfu · mL⁻¹ library를 구축하였다.

염해 내성 유전자를 발굴하기 위하여 구축된 cDNA library를 리튬에 의한 형질

전환 방법으로 yeast strain Y190 (MATa gal4 gal80 his3 trp1-901 ade2-101 ura-52 leu2-3 leu2-112 + URA3::GAL>>lacZ LYS2::GAL(UAS)>>HIS3cyc^r)에 형질전환 하였다. 형질전환 yeast들은 1.5 M NaCl이 포함된 leucine이 없는 synthetic dextrose (SD) 배지에 도말하였다. 30 °C 배양기에 4 일 동안 키운 후, 저항성이라고 여겨지는 클론을 분리하였다.

분리된 클론 중 salt-tolerance 79 (SAT79) 이라는 클론의 유전자를 분리하기 위해서 colony PCR을 실시하였다. PCR 반응은 Forward I primer (5'-CTATCTATTCGATGATGAAG-3') 와 Reverse I primer (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')를 이용하였다. 증폭된 PCR 산물은 pGEM T-easy 벡터에 클로닝 한 후 DNA 염기서열을 분석하였다.

라. Arabidopsis SAT79 (AtSAT79) 유전자 클로닝 및 형질전환체 제작

Arabidopsis 잎으로부터 Trizol reagent 시약으로 인해 total RNA를 추출한 후, Reverse transcription PCR (RT-PCR)을 이용, full-length AtSAT79 cDNA를 확보하였다. 확보된 cDNA는 pGEM T-easy 벡터에 클로닝 한 후 DNA 염기서열을 분석하였다.

Primer (Forward) 5'-GCTCTGGAGCATGGCGCAGACATTAATG-3' 및 Primer (Reverse) 5'-CGAGCTCGTCAAACCTTCAGAAGGAG-3'를 이용, plant expression vector pBI121 plasmid의 Xba I 및 Sac I site에 클로닝하였다. Agrobacterium strain GV3101을 이용, in planta vacuum infiltration 방법으로 AtSAT79 과다발현 형질전환 Arabidopsis 식물체를 제작하였다. T3 세대에서 22 개의 서로 다른 homozygous 형질전환체들을 선발하였고 그 중 2 lines (35S::AtSAT79-7 및 35S::AtSAT79-15) 만을 가지고 스트레스에 대한 각종 실험을 실시하였다. 선발된 이 2 개의 형질전환체들은 T2 세대에서 kanamycin 저항성 실험을 통하여 single locus에 의한 과다발현 식물체임을 알 수 있었다.

세포내 AtSAT79 단백질의 위치를 알아보하고자 GFP 결합 construct를 제작하였다. 플라스미드 제작은 For primer

5'-GAATTCATGGCGCAGACATTAATGGCG-3' 및 Rev primer 5'-GGATCCTCAAACCTTCAGAAGGAGT-3'를 이용, plant expression vector pEGAD plasmid의 Eco RI 및 Bam HI site에 클로닝하였다.

마. RNA gel blot 분석을 위한 유전자 클로닝

사용한 primers 들은 다음과 같다:

– for the construction of RD29B, upstream
 5'–GTGAAGATGACTATCTCGGTGGTC–3' and downstream
 5'–GCCTAACTCTCCGGTGTAACCTAG–3'
 – for the construction of RD29A, upstream
 5'–GATAACGTTGGAGGAAGAGTCGGC–3' and downstream
 5'–CAGCTCAGCTCCTGATTCCTACTACC–3'
 – for the construction of RD22, upstream
 5'–ACGTAGGAGTCGGTAAAG–3' and downstream
 5'–CGAACCAAGTCCTTCTCCAA–3'
 – for the construction of ERD15, upstream
 5'–CCAGCGAAATGGGGAAACC–3' and downstream
 5'–ACAAAGGTACAGTGGTGGC–3'
 – for the construction of HXK1 (At4g29130), upstream
 5'–ATGGGTAAAGTAGCTGTTGGAGCG–3' and downstream 5'–
 TTAAGAGTCTTCAAGGTAGAGAGA–3'.

Total RNA (2 µg) was used in a first-strand reaction containing oligo-p(dT)₁₅ primer and SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Gaithersburg, MD) in a total volume of 20 µL. The mixture was incubated at 42 °C for 60 min. Two microliters of the reaction mixture were then used in a 50 µL-PCR containing 200 ng of each primer and 1 U Taq polymerase (Invitrogen, Gaithersburg, MD). The following conditions were used: 35 cycles of 30 sec at 94 °C, 30 sec at 55 °C, and 1 min at 72 °C.

바. RNA gel blot 분석

RNA gel blot 분석 실험은 유식물체로부터 total RNA를 추출하였고, 추출된 RNA는 formaldehyde가 포함된 1.2 % (w/v) agarose gel electrophoresis에 의해 분리되어진 후, positively charged nylon membranes (Roche, Indianapolis, IN) 으로 transfer하였다. Hybridization and washes were performed under high stringency conditions according to standard procedures, using ³²P-radiolabeled probes.

2. 연구 결과 및 고찰

가. Salt tolerance 79 (SAT79) encodes a homologue of E. coli Bol A protein

염해 내성 유전자들을 발굴하기 위하여 옥수수 종자로부터 cDNA library를 제작한 후, yeast screening을 통해 염해 내성 유전자들을 발굴하였다. 분리된 유전자 중 SAT79 클론은 control yeast cell 보다는 염해 스트레스에 대해 내성을 유도하였다. 분리된 SAT79 유전자는 partial cDNA이었으며 현재까지 기능이 밝혀지지 않은 Arabidopsis unknown 유전자 (AtSAT79)의 C-terminal 부분과 60 %의 높은 상동성을 보였다 (그림 1). AtSAT79 유전자는 원핵생물들 사이에서 conserved하게 존재하는 Bol A 단백질과 매우 유사하였으며 이들 단백질들은 E. coli 혹은 효모에서 UV 스트레스, DNA damage response 및 nutrient stress에 관련이 있다고 보고되어져 왔다. 또한 Bol A domain은 세포 크기 및 모양에 중요한 역할을 할 것으로 추정되어져 오고 있다.

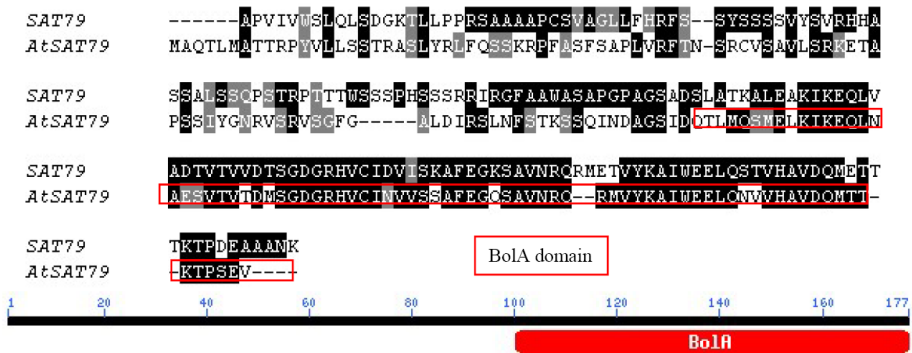


그림 1. 옥수수 SAT79와 AtSAT79 유전자의 아미노산 서열 비교. 아미노산 서열 비교는 ExPASy Proteomics Server (<http://cn.expasy.org>) 프로그램을 이용하였다.

나. Expression of AtSAT79 gene after salt treatment

Arabidopsis 식물체에 염해 스트레스를 처리 한 후 AtSAT79 유전자의 RNA 집적을 살펴보기 위하여 RT-PCR을 통해 AtSAT79 probe를 제작한 후 Northern 분석을 실시하였다. 그림 2에서 나타났듯이 AtSAT79 유전자의 전사량은 염해

처리 후 0.5 시간 만에 증가되어 peak를 이루었으며, 9 시간 이후에는 slightly 전사량이 감소함을 알 수 있었다. 이러한 RNA gel blot 실험 분석을 통해 AtSAT79 유전자는 염해 스트레스에 대해 반응하는 유전자임을 알 수 있었다.

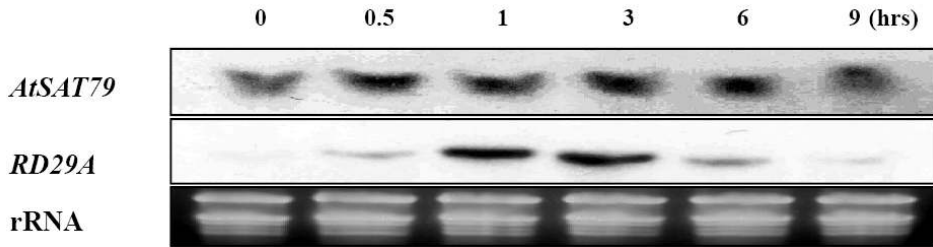
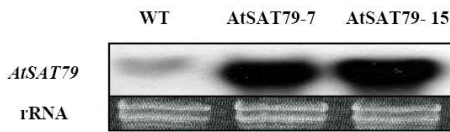


그림 2. 염해 처리 후 AtSAT79 유전자의 전사 양상 비교. 식물체에 염해 스트레스를 처리 한 후, Northern에 의한 AtSAT79 유전자의 발현 속도 조사. 종자 파종 후, 7일된 Arabidopsis 유식물체에 125 mM NaCl 용액을 0 - 9 시간을 처리 하였다. RD29A는 염해 처리에 대한 control 유전자 발현 분석임. Northern 분석은 P³²-labeled probes를 이용하였고 Ethidium bromide-stained rRNAs는 loading control로 사용되어졌다.

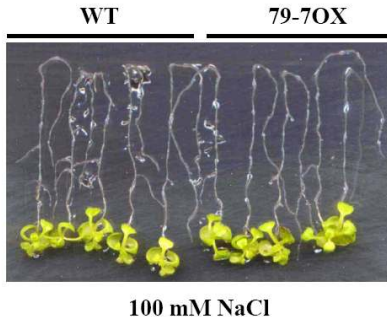
다. Overexpression of AtSAT79 confers salt stress tolerance to Arabidopsis

AtSAT79의 기능을 살펴보기 위하여, 35S promoter를 이용한 AtSAT79 과다발현 형질전환체를 제작하였다. T3 세대에서 22 개의 서로 다른 homozygous 형질전환체들을 선발하였고 그 중 2 lines (35S::AtSAT79-7 및 35S::AtSAT79-15) 만을 가지고 스트레스에 대한 표현형 분석 실험을 실시하였다 (그림 3A). 이러한 AtSAT79 과다발현 형질전환체들은 normal condition에서 wild-type과의 생장 및 발달을 비교 관찰한 결과 차이가 나지 않았다.

A



B



C

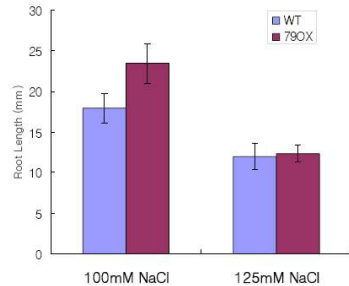


그림 3. 염해스트레스에 대한 AtSAT79 과다발현 형질전환체들의 염해 내성 분석. (A) Expression levels of MBF1a in wild-type (WT) and transgenic lines (35S::AtSAT79-7 및 35S::AtSAT79-15) determined by RNA gel blot analysis. Ethidium bromide-stained rRNAs were used as a loading control (bottom section). (B) Elevated salt tolerance in AtSAT79-overexpressing Arabidopsis (79-7OX). Six-day-old Arabidopsis seedlings with 10-mm roots were transferred from vertical agar plates to plates supplemented with or without 100 mM NaCl and allowed to grow upside down for seven days. The photograph shows that 79-7OX seedling has better primary root development than the wild-type (WT) under salt stress. (C) Primary root elongation of 79OX and wild-type seedlings was measured to quantify NaCl sensitivity. Data shown are primary root elongation measurements 10 days after the transfer to the NaCl plates. Values shown are means of data from three independent experiments (n = 50 each); error bars indicate standard deviations.

AtSAT79 과다발현 형질전환체들의 염해 내성을 분석하기 위하여 6 일된 wild-type과 AtSAT79 과다발현 형질전환 (79OX) 유식물체를 100 mM NaCl MS 식물 배지로 옮긴 4 일 후 뿌리 생장 길이를 조사하였다 (그림 3B 및 C). 그림 3B 및 3C에서 나타났듯이 wild-type과 비교 분석한 결과 79OX 형질전환체

들이 100 mM NaCl 농도 하에서 적응 능력이 뛰어난을 알 수 있었다. 또한 wild-type 뿌리 생장 길이는 각 과다발현 형질전환체들의 뿌리 생장 길이에 비해 75 % 미만에 도달하였다 (그림 3C). 그러나 125 mM NaCl 농도 하에서는 WT 및 형질전환체 간의 뚜렷한 차이는 볼 수 없었다 (그림 3C). 이러한 데이터는 AtSAT79 과다발현 형질전환체들은 염해 농도에 따라 반응하는 내성 정도가 다를 수 있었다. 또한, 이러한 결과는 스트레스 내성 유전자들의 전사 발현 양상의 차이가 있을 가능성을 제시한다. 이러한 가능성을 조사하기 위하여 염해 스트레스, dehydration 및 cold/ABA스트레스 반응 관련 내성 유전자, RD29A, RD22, ERD15, RD29B 유전자, 들을 클로닝한 후 RNA gel blot 분석을 실시하였다 (그림 4). 그림 4에서 나타났듯이, 염해 처리 후 시간별 Northern 분석 결과, RD29A, RD22, 및 RD29B 유전자의 전사 수준이 wild-type 보다는 AtSAT79 과다발현 형질전환체들에서 더욱 더 많이 집적됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 AtSAT79 유전자는 이러한 스트레스 반응 유전자들을 조절함을 알 수 있었다. 특히 ERD15 유전자는 AtSAT79 과다발현 형질전환체들에서 염 처리 1 시간 후 전사량이 최대 peak로 유도되어 그 후 바로 감소됨을 알 수 있었다. 즉 ERD15 유전자 발현은 실험에 사용하였던 dehydration 반응 유전자와는 다른 조절 기작으로 조절됨을 암시한다.

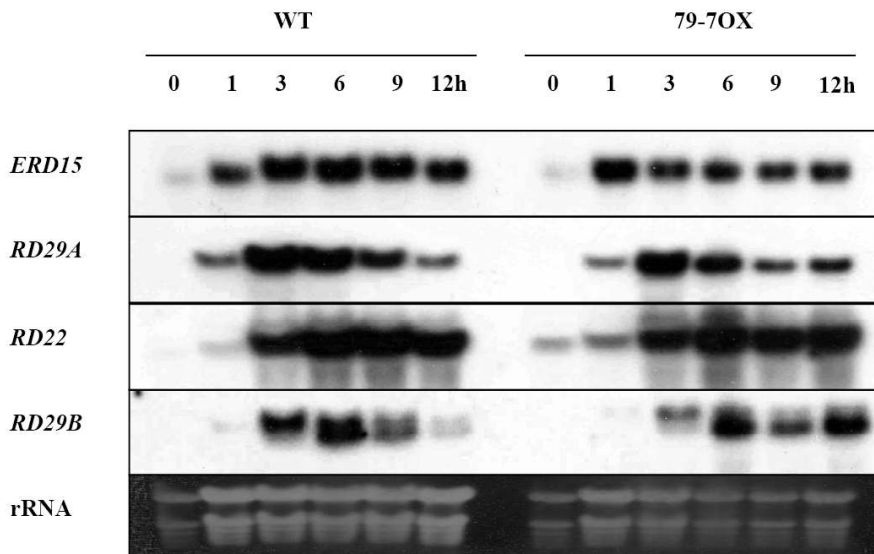


그림 4. Expression of stress-regulated genes in 35S::AtSAT79-7 (79-7OX)

plants. RNA levels of dehydration- and drought-regulated genes were determined by Northern hybridization using total RNA isolated from 2-week-old seedlings. For the salt treatment, the plant roots were submerged in 125 mM NaCl for 0–12 h with gentle shaking. Ethidium bromide-stained rRNAs were used as a loading control (bottom section).

라. Arabidopsis plants overexpressing AtSAT79 show increased insensitivity to sucrose

AtSAT79 과다발현 형질전환체 (79-7OX)들의 당에 대한 뿌리 생육 반응을 알아보기 위하여, 저농도 sucrose (Suc) 하에서 파종 2 주 후, 뿌리 길이를 조사하였다. 그림 5에서 보여주듯이 0, 0.1 및 0.2 % Suc 농도 하에서의 WT 및 79-7OX 식물체의 뿌리 길이는 큰 차이가 나지 않는 반면, 0.3, 0.4 및 0.5 % Suc 농도 하에서는 AtSAT79 과다발현 형질전환체의 primary root가 WT 보다 더 길어짐을 알 수 있었다 (그림 5B). 이러한 결과는 AtSAT79 유전자가 sucrose-triggered developmental root growth 과정에 필요한 인자임을 말해준다.

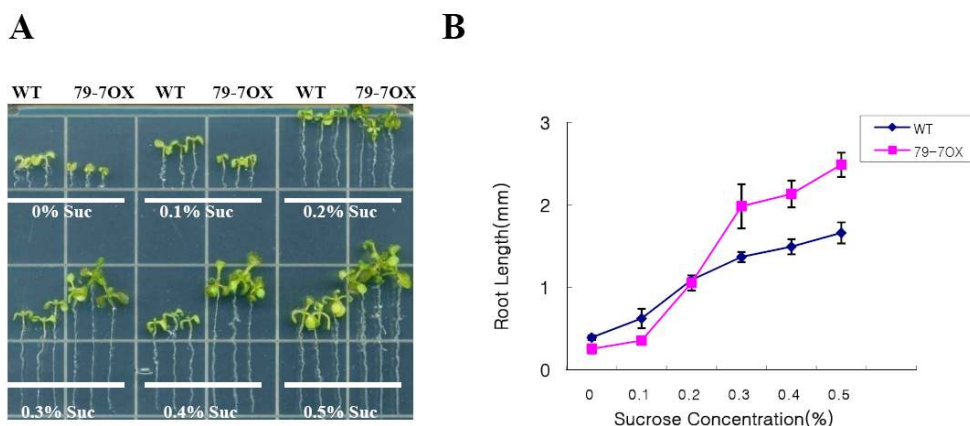


그림 5. AtSAT79 과다발현 형질전환체로부터 sucrose에 대한 뿌리 길이 조사. (A) Transgenic lines overexpressing AtSAT79 were germinated on MS agar medium (0% sucrose) or MS agar supplemented with 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 % Suc and grown for 2 weeks. Representative lines 35S::AtSAT79 (79-7OX) is shown next to wild-type (WT) data. (B) Sucrose effect on primary root

length. Seeds were germinated on MS medium without or with 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 % Suc for 2 weeks, and root length were measured (triplicates, n = 100 each). Error bars represent standard deviations.

AtSAT79 유전자가 carbohydrate transporter (CT)와 관련이 있는지 Northern을 수행하였다. 그림 6에서 보여 주듯이, sucrose를 처리하지 않았을 때 AtSAT79 과다발현 형질전환체 (79-9OX)에서 CT gene transcript 양이 약간 감소함을 관찰 할 수 있었다. 이러한 결론은 Arabidopsis에서 AtSAT79 유전자가 sucrose-triggered 과정에 필요한 인자임을 말해준다.

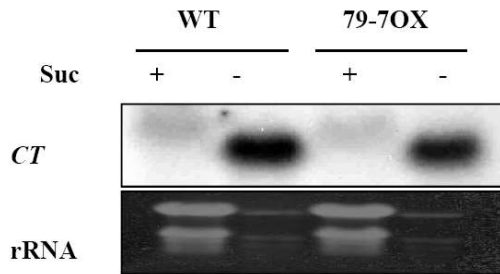


그림 6. Sucrose 처리 전·후, carbohydrate transporter (CT) 유전자의 전사 양상 비교. Sucrose가 첨가되지 않은 식물 MS 배지, 혹은 2% sucrose가 첨가된 MS 배지에 종자 파종 후, 2 주된 Arabidopsis 유식물체로부터 total RNA를 추출하였음. Northern 분석은 P³²-labeled probes를 이용하였고 Ethidium bromide-stained rRNAs는 loading control로 사용되어졌다.

마. AtSAT79 유전자의 세포내 위치 탐색

AtSAT79 단백질의 세포내 위치를 탐색하기 위하여 EGFP를 이용한 형질전환체를 제작한 후, 우수 순종 라인을 분리하였고, Confocal microscopy를 이용하여 AtSAT79 단백질의 세포내 위치를 탐색하였다. EGFP::AtSAT 79 형질전환체의 뿌리 세포를 살펴본 결과, 그림 7에서 보여주듯이, AtSAT 79 단백질은 세포질에 위치함을 알 수 있었음.

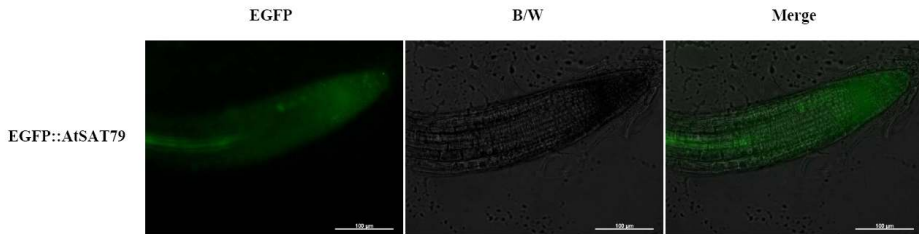


그림 7. EGFP::AtSAT 79 형질전환체로부터 AtSAT79 단백질의 세포내 위치 분석. 종자 파종 후, 7 일째의 EGFP::AtSAT 79 형질전환체 뿌리 세포 관찰.

3. 결론

가. Salt tolerance 79 (SAT79) 유전자는 AtSAT79 유전자와 homolog 임.

Yeast screening을 통해 발굴된 염해 내성 유전자 partial cDNA SAT79 클론은 현재까지 기능이 밝혀지지 않은 Arabidopsis unknown 유전자 (AtSAT79)의 C-terminal 부분과 60 %의 높은 상동성을 보였다

나. AtSAT79 유전자는 염해 스트레스에 대해 반응하는 유전자 임.

AtSAT79 유전자의 전사량은 염해 처리 후 0.5 시간 만에 증가되어 peak를 이루었으며, 9 시간 이후에는 slightly 전사량이 감소함을 알 수 있었다. 이러한 RNA gel blot 실험 분석을 통해 AtSAT79 유전자는 염해 스트레스에 대해 반응하는 유전자임을 알 수 있었다.

다. AtSAT79 과다발현은 Arabidopsis에서 염해 내성을 유도함.

염해 내성을 분석하기 위하여, 염해 처리 후 뿌리 성장 길이를 조사한 결과 AtSAT79 과다발현 형질전환체들이 100 mM NaCl 농도 하에서 wild-type 보다 적응 능력이 뛰어난 것을 알 수 있었다. 또한 wild-type 뿌리 성장 길이는 과다발현 형질전환체들의 뿌리 성장 길이에 비해 75 % 미만에 도달하였다. 그러나 125 mM NaCl 농도 하에서는 WT 및 형질전환체 간의 뚜렷한 차이는 볼 수 없었다. 이러한 데이터는 AtSAT79 과다발현 형질전환체들은 염해 농도에 따라 반응하는

내성 정도가 다름을 알 수 있었다.

라. AtSAT79 과다발현 형질전환체들은 sucrose에 대해 비감수성임.

AtSAT79 과다발현 형질전환체들의 당에 대한 뿌리 생육 반응을 알아보기 위하여, 저농도 sucrose (Suc) 하에서 뿌리 길이를 조사하였다. 0, 0.1 및 0.2 % Suc 농도 하에서의 WT 및 AtSAT79 과다발현 식물체의 뿌리 길이는 큰 차이가 나지 않는 반면, 0.3, 0.4 및 0.5 % Suc 농도 하에서는 AtSAT79 과다발현 식물체의 primary root가 WT 보다 더 길어짐을 알 수 있었다. 이러한 결과는 AtSAT79 유전자가 sucrose-triggered developmental root growth 과정에 필요한 인자임을 말해준다.

마. AtSAT79 단백질은 세포질에 존재함.

AtSAT79 단백질의 세포내 위치를 탐색하기 위하여 EGFP::AtSAT 79 형질전환체의 뿌리 세포를 살펴본 결과, AtSAT 79 단백질은 세포질에 위치함을 알 수 있었음.

앞서 말한 데이터들을 분석해 볼 때, 세포질에 존재하는 AtSAT79는 sucrose-response signal transduction pathway에 관련하여 염해 스트레스에 대한 저항성 작물 개발에 사용할 수 있는 유전자임을 시사한다.

제 5 절 내재해성 유전자의 벼 형질전환 개체 육성

1. 서언

형질전환 벼의 기능연구의 어려움은 벼 조직배양 및 형질전환 기술이 긴 시간을 요구함으로써 유전자의 형질을 알고자하는데 많은 제약이 따르고 있다. 따라서 벼의 성공적인 형질전환을 위해 조직배양에서 배양기간에 따른 callus 형성과 식물체 재생의 효율, 배양조건을 확립하고 다양한 형질전환의 방법을 시도해 볼 필요가 있다. 벼 형질전환에 주로 이용되는 *Agrobacterium* 매개 형질전환법은 *Agrobacterium tumefaciens*나 *Agrobacterium rhizogenes*에 유용유전자를 포함하는 유전자 운반체를 도입한 후 식물 절편체나 callus 와의 공동배양(cocultivation)으로 식물 세포의 형질전환을 유도한다. 이 후 형질전환된 세포로부터 기관형성이나 체세포배형성 경로를 거쳐 형질전환 식물체(transgenic plant)를 재생시키게 된다. 식물의 형질전환 과정에 있어서는 식물체 재생의 적정 조건을 기본으로 하여 *Agrobacterium*과 식물 절편체와 callus와의 접촉에 있어서 접촉시간과 *Agrobacterium*의 농도, 공동배양 기간, *Agrobacterium*의 virulence를 증대하는 acetosyringone의 농도, 그리고 *Agrobacterium*과 유전자운반체의 종류 등이 형질전환 효율에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 효율적인 형질전환을 위해서는 식물체 재생 및 형질전환 과정에 영향을 미치는 다양한 요인의 최적화가 전제되어야 하며 이를 바탕으로 할 때 유용 유전자가 도입된 형질전환체가 빠르게 창출될 수 있으며 최종적으로 신품종 개발이 이루어 질 수 있을 것이다.

2. 연구내용 및 결과

가. 벼 종자로부터 callus 형성 및 callus stock 유지

형질전환을 위한 동진벼의 Callus 유도에는 2mg/L의 2,4-D가 포함된 2N6 배지와 N6배지 두가지 종류의 배지를 사용하였으며, 그 결과 2mg/L의 2,4-D가 함유된 N6배지에서 배양된 캘러스가 같은 농도의 2,4-D가 포함된 2N6배지에서 보다 분열이 왕성하였으며, 성상 또한 밝은 노란빛을 띤 균일한 양상을 보여 주어, 이를 캘러스의 지속적인 유지를 위한 배지(N6CI 배지)로 사용하였다(Table 1). 그러나 캘러스의 분화가 진행될수록, 배양기내에서의 습도상승 및 에틸렌가스의

축적으로 인하여 캘러스가 급격하게 유리화(vitrification)될 뿐만 아니라, 갈변화가 진행되어 더 이상 형질전환에 사용할 수 없는 상태에 이르렀다. 이를 극복하기 위한 방법으로 본 실험에서는 반투명비닐의 sealing film (Whatman) 대신 micropore sealing tape (3M)을 사용하였으며, 그 결과 유리화 및 갈변화율이 현저히 감소되었을 뿐만 아니라, 더욱 조밀하고 잘 건조된 최상의 캘러스를 선별할 수 있었다 (그림 1). 더욱 최상의 조건의 캘러스를 선별하여 형질전환에 이용하기 위하여 본 실험에서는 캘러스를 3주 간격으로 동일한 조성의 새로운 배지에 계대배양 하여 증식함으로써 이후의 모든 실험에 사용하였다.



그림 1. 반투명비닐의 sealing film (윗 그림) 대신 micropore sealing tape (아랫 그림)을 사용하여 캘러스를 유지 및 증식한 결과

표 1. *Agrobacterium* 및 캘러스와 신초의 형성에 사용한 배지 조성

Culture medium	Composition
Agrobacterium culture(ABKR)	K ₂ HPO ₄ 3g ⁻¹ , NaH ₂ PO ₄ 1g ⁻¹ , NH ₄ Cl 1g ⁻¹ , MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.3g ⁻¹ , KCl 0.15g ⁻¹ , CaCl ₂ 10mg ⁻¹ , FeSO ₄ ·7H ₂ O 2.5mg ⁻¹ , glucose 5g ⁻¹ , agar 15g ⁻¹ , Kanamycin 25mg ⁻¹ , Rifampicin 10mg ⁻¹
Callus induction and propagation (N6CI)	N6 salt 3.96g ⁻¹ , casamino acids 1g ⁻¹ , sucrose 30g ⁻¹ , 2,4-D 2mg ⁻¹ , phytigel 3g ⁻¹
Agrobacterium infection(AAM)	KCl 2.95g ⁻¹ , CaCl ₂ ·2H ₂ O 15mg ⁻¹ , MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5g ⁻¹ , NaH ₂ PO ₄ 56mg ⁻¹ , MnSO ₄ ·4H ₂ O 10mg ⁻¹ , H ₃ BO ₃ 3mg ⁻¹ , ZnSO ₄ ·7H ₂ O 2mg ⁻¹ , KI 0.75mg ⁻¹ , Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 0.25mg ⁻¹ , CuSO ₄ ·5H ₂ O 0.038mg ⁻¹ , CoCl ₂ ·6H ₂ O 0.025mg ⁻¹ , glutamine 0.44g ⁻¹ , aspartic acid 0.13g ⁻¹ , arginine 0.14g ⁻¹ , glycine 0.038g ⁻¹ , nicotinic acid 0.5mg ⁻¹ , pyridoxine 0.5mg ⁻¹ , thiamine HCl 0.1mg ⁻¹ , Na ₂ EDTA 37.3mg ⁻¹ , FeSO ₄ ·7H ₂ O 27.85mg ⁻¹ , myo-inositol 100mg ⁻¹ , casamino acids 0.5g ⁻¹ , sucrose 68.5g ⁻¹ , glucose 36g ⁻¹ , acetosyringone 100uM
Co-cultivation (N6CO)	N6 salt 3.96g ⁻¹ , casamino acids 1g ⁻¹ , sucrose 30g ⁻¹ , glucose 10g ⁻¹ , 2,4-D 2mg ⁻¹ , acetosyringone 100uM, phytigel 3g ⁻¹
Callus Selection (N6CS)	N6 salt 3.96g ⁻¹ , casamino acids 1g ⁻¹ , sucrose 30g ⁻¹ , 2,4-D 2mg ⁻¹ , cefotaxime sodium 250mg ⁻¹ , phosphinotricin 6mg ⁻¹ , hygromycin 50mg ⁻¹ , phytigel 3g ⁻¹
Embryogenic callus induction(N6PR)	N6 salt 3.96g ⁻¹ , casamino acids 2g ⁻¹ , sucrose 30g ⁻¹ , sorbitol 30g ⁻¹ , 2,4-D 1mg ⁻¹ , 6-benzyladenine 0.5mg ⁻¹ , cefotaxime sodium 250mg ⁻¹ , phosphinotricin 6mg ⁻¹ , hygromycin 50mg ⁻¹ , phytigel 3g ⁻¹
Plant Regeneration and rooting(MSR)	MS salt 4.4g ⁻¹ , casamino acids 2g ⁻¹ , sucrose 30g ⁻¹ , sorbitol 20g ⁻¹ , 6-benzyladenine 0.5mg ⁻¹ , naphthaleneacetic acid 1mg ⁻¹ , cefotaxime sodium 250mg ⁻¹ , phosphinotricin 6mg ⁻¹ , hygromycin 50mg ⁻¹ , phytigel 3g ⁻¹

나. *Agrobacterium* 을 이용한 벼의 형질전환

형질전환에 사용할 *Agrobacterium*은 유전자가 삽입된 벡터를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404가 사용되었다. *Agrobacterium*은 항생제가 포함된 AB plate 배지(ABKR)에서 28°C, 암조건 하에서 3일간 배양한 후, 이를 100µM의 Acetosyringone이 함유된 AAM 배지(표 1)에서 OD₆₀₀ 값 1.5가 되도록 희석하여 벼의 캘러스와 함께 공조배양 하였다. 형질전환에 이용할 캘러스는 캘러스 유도배지에서 3주간 잘 증식된 캘러스를 대상으로 하여, 지름이 약 3~5mm 크기의 맑은 노란빛을 띤 잘 건조되고 조밀한 캘러스군집 만을 취하여 너무 건조되어 마르지 않도록 미리 준비된 AAM 배지에 선별하여 옮긴 후, 이를 미리 OD₆₀₀ 값 1.5로 적정된 *Agrobacterium* 균주와 함께 진탕배양 하였다. 진탕배양은 상온의 진탕배양기에서 rpm(분당 회전수) 90으로 하여 30분간 수행하였다. 진탕배양이 끝난 후 캘러스는 동일한 배지로 3회 수세작업을 거쳐 멸균된 3M paper를 사용하여 남은 물기를 제거한 후, 공조배양 Agar 배지(N6CO)에 치상하였다(표 1). *Agrobacterium*과 캘러스의 공조배양은 25°C, 암조건 하에서 진행되었으며, 배양 2일 후 캘러스 주위에 맑은 우유빛으로 *Agrobacterium*이 자라나는 것이 보일 때 까지 공조배양 하였다.

다. 항생제 저항성 캘러스 선별

형질전환 유무를 판단하기 위하여 먼저 항생제를 이용하여 캘러스를 선별하였다. 캘러스의 선별에 사용된 항생제는 *hpt*유전자에 특이적으로 작용하는 phosphinotricin(PPT)과 hygromycin 두 종류이며, 각각 6mg/L, 50mg/L의 농도로 각각 또는 조합하여 배지에 첨가하였다. 실험 결과, PPT 만을 선별마커로 사용한 실험구의 경우, 캘러스의 생존율은 약 90.2%로 매우 높게 나타났으며, hygromycin 만을 선별마커로 사용한 실험구의 경우, 캘러스의 생존율은 약 42.1%로 나타났다. 반면, PPT와 hygromycin을 조합하여 처리한 실험구에서의 캘러스 생존율은 약 28.6%로 현저히 감소되어 나타났다. 이러한 결과는 PPT 단일 항생제의 처리만으로는 캘러스의 선별이 불가능하며, 또한, hygromycin을 단일로 하여 처리하는 것보다 PPT와 hygromycin을 조합하여 처리함으로써 원활한 저항성 캘러스의 선별이 가능함을 보여주고 있다(표 2, 그림 2). 이후, 항생제 저항성을 갖는 캘러스는 배발생유도배지 (N6PR)에 계대배양 하여 25°C, 암조건 하에서 2주간 배양하였다(표 1).

Table 2. PPT 와 Hygromycin을 이용한 저항성 캘러스 선발

antibiotics	total callus	alive	resistance(%)
PPT	1,141	1,029	90.18
Hygromycin	679	286	42.12
PPT + Hygromycin	612	175	28.59

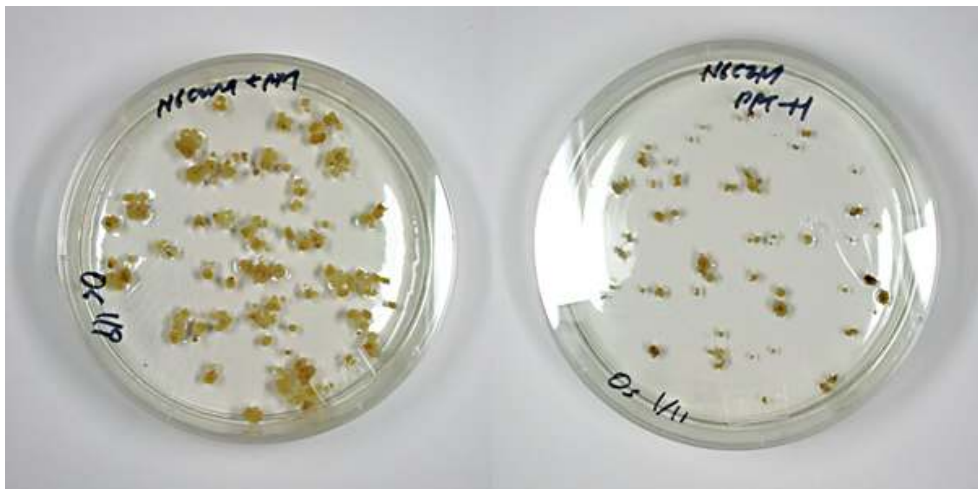


그림 2. PPT와 hygromycin을 조합하여 저항성 캘러스의 선별이 가능함을 보여주고 있는 결과

라. 신초의 형성 및 발근

신초를 유도하기 위하여 N6PR 배지에서 2주간 배양한 캘러스는 이후, 신초형성배지(MSR)에 계대배양 하여 25°C, 낮과 밤의 주기를 16:8로 하여 60 μ M m⁻²s⁻¹의 광조건 하에서 배양하였다(표 1). MSR 배지로 옮겨진 캘러스는 약 1주일 후 녹색의 분열조직이 관찰되었으며, 이후 1 - 2주가 더 경과되면 이들 녹색의 캘러스로부터 신초들이 형성되었다(그림 3). 뿐만 아니라, 신초 중의 약 91% 이상이 뿌리와 동시에 유기되어 나타나 이들 신초가 Embryogenic callus (배발생캘러스)로부터 유기되고 있음을 보여주었다(표 3).

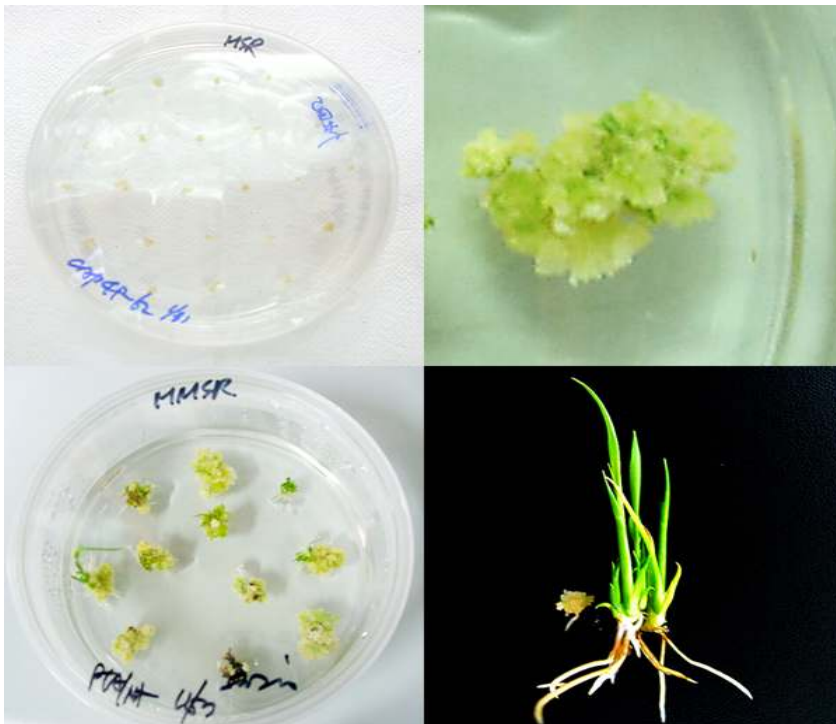


그림 3. 녹색의 캘러스로부터 신초들이 형성되면서 동시에 뿌리가 유기되어 나타난 결과

캘러스의 유기 및 증식은 2,4-D의 영향을 지배적으로 받는 반면, 신초의 형성은 일반적으로 싸이토카인(cytokinin)에 의해 이루어지는데, 본 실험에서도 마찬가지로 BAP에 의해 신초의 형성이 활발히 진행되었다. BAP의 농도는 선행된 실험에서 최적으로 판명되었던 2mg/L로 적정하였으며, NAA 1mg/L와 조합하여 처리하였다. 그 결과 캘러스로부터 신초의 형성율은 약 36.1%로 나타났으며, 이들 중 91%가 뿌리와 함께 형성되었다(표 3, 그림 3).

표 3. BAP 2mg/L, NAA 1mg/L에서의 신초 및 뿌리의 형성

Callus	Shoots(%)	Roots(%)
277	100(36.1)	91(91)

마. 형질전환체의 순화 및 경화

뿌리를 포함하는 잘 유기된 신초는 이후, 질석과 펄라이트 및 상토를 1: 1: 2로 혼합한 토양에 이식하고, 봉지를 씌워 습도를 유지하며 약 1주일 간의 순화과정을 거친 후, 못자리용 상토로 옮겨 온실에서 경화시킨다 (그림 4).



그림 4. 뿌리 형성이 된 형질전환체의 순화 및 경화

바. 유전자에 따른 형질전환 효율

벼의 형질전환에 사용된 유전자는 NtMEK2^{DD}, NtMEK2^{KR}, OsMEK3^{WT}, OsMEK3^{DD} 그리고, OsMEK3^{KR} 등이며, 각각의 유전자를 동진벼에 형질전환 하였을 때, 이들 유전자에 따라 형질전환 효율도 큰 차이를 보였다. 상대적으로 높은 형질전환율을 나타낸 NtMEK2^{DD} 및 NtMEK2^{KR} 유전자는 다른 유전자를 삽입한 실험구에 비하여 hygromycin에 저항성을 갖는 캘러스의 형성율이 월등히 높은 것으로 보아, 벼의 형질전환율은 형질전환체 선발의 초기 과정인 hygromycin에 저항성을 갖는 캘러스의 형성율이 최종적인 형질전환율에 미치는 영향이 큰 것으로 보여진다.

사. PBS1 유전자 클로닝

저항성과 관련하여 putative serine-threonine kinase인 PBS1 유전자를 클로닝하였다. PBS1 유전자는 protein kinase 로 Arabidopsis에서 *P. syringae* pv. *phaseolicola* 로 부터의 AvrPphB 단백질이 식물체에 인식하는데 관련있는 유전자로 알려져 있다. Arabidopsis 로부터 homology 조사를 시행하여 벼에서 PBS1 유전자 (GeneBank XM_465954)을 클로닝하여 형질전환 벼에서 이 유전자의 발현 양상을 확인 하였다.

제 6 절 형질전환 벼의 병해 포장저항성 및 내염성 평가

1. 서언

복합 환경 스트레스에 반응하여 내성을 보이는 기능을 가진 유전자를 이용하여 새로운 작물을 창출하더라도 형질전환체가 환경의 조건이 변화가 없고 일정한 온실이나 식물 성장상에서는 외래 유전자의 기능을 충분히 수행하지만 환경의 변화가 심한 포장에서는 그 기능을 충분히 발휘하지 못하여 실질적인 분자육종을 위한 유전자원으로써 그 가치를 다하지 못하고 있는 실정이다. 그래서 본 연구과제에서는 내병성 및 내염성을 목적으로 창출되어진 형질전환 벼를 직접 포장에서 그 능력을 평가하여 실질적인 분자육종 자원으로 이용될 수 있는지 여부를 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 형질전환 벼 도열병 발못자리 검정 및 흰잎마름병 저항성 포장 검정

분양받은 내병성 및 내염성 형질전환 벼를 이용해 발못자리 검정을 통해 도열병(*Magnaporthe grisea*)에 대한 포장검정을 실시하였다. 발못자리 검정 시 도열병 발병율을 높이기 위해서 주위에 이병성 품종인 낙동벼를 함께 파종하였다. 발못자리 검정 포장의 시비량은 $N-P_2O_5-K_2O = 24-8-12$ (kg/10a)로 하고 단, 질소질의 50%는 추비로 파종 후 14일 후에 사용하였다. 파종후 36일과 45일이 지난 시기에 벼의 잎도열병 이병정도 (0에서 9까지)를 조사하였다. 특히 homozygous가 선발되었고 많은 종자가 확보되어 있는 형질전환 벼의 경우는 포장에서 벼흰잎마름병 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)의 자연발생에 따른 포장 검정을 실시하여 병반면적을 조사기준에 의거하여 조사하였다.

나. 형질전환 벼의 생육 및 수량 조사

분양 받은 형질전환체 8계통과 대조구로써 동진벼를 포장에서 관행 재배한 후 주당 수수, 간장 길이, 수장 길이, 등숙 비율, 정조천립중을 조사하였다.

다. 형질전환 벼의 내염성 평가

내염성을 목적으로 제작한 형질전환체 3계통과 내병성을 목적으로 제작하였으나 복합 환경 스트레스에 관여되는 것으로 확인된 형질전환체 2계통을 분양 받아 유묘 상태에서 염농도별로 발아율과 내염성을 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 형질전환 벼 도열병 발못자리 검정 및 흰잎마름병 저항성 포장 검정

벼 도열병 발못자리 검정 시험결과 형질전환체 8계통 (J1-51, J1-52, ACC-7, ACC-15, ACC-19, ACC-27, GolS-105, GolS-136) 모두 이병정도 (7-9)을 보였다. 또한 형질전환 벼를 포장에서 관행 재배하면서 벼흰잎마름병원균 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)의 자연발생에 따른 포장 검정을 조사한 결과 형질전환벼의 흰잎마름병 포장검정결과 J1-51 계통이 병반면적율 3.6%로 동진벼에 비교적 좋은 결과를 나타냈으며, 그 외 7계통도 동진벼보다 병반면적율이 약간 적었음을 알 수 있었다 (표 1). 그러나 형질전환체와 대조구인 동진에 인위적으로 벼흰잎마름병원균 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) K3를 가위 접종을 한 후 저항성을 확인해 본 결과 형질전환체에서도 동진벼에 비해 큰 차이없이 이병성을 확인할 수 있었다 (그림 1).

표 1. 형질전환벼 흰잎마름병 포장검정

계통	병반면적율 (0-9) ¹
동진벼(WT)	5.7
J1-51	3.6
J1-52	4.7
ACC -7	4.1
ACC -15	4.4
ACC -19	4.1
ACC -27	4.9
GolS-105	4.6
GolS-136	5.0

¹병반면적율 조사기준 - 0: 무발생, 1: 병반면적율 1% 미만, 3: 1~5%, 5: 6~25%, 7: 26~50%, 9: 51%이상(주당 상위 3엽 평균)



그림 1. 형질전환 벼에 벼흰잎마름병원균 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)을 가 위 접종을 한 후 이병성을 확인한 결과

나. 형질전환 벼 생육 및 수량 조사

각 형질전환벼들의 주당 수수나 간장과 수장 길이, 등숙비율, 및 천립중 등에서 모두 대조구인 동진벼와 비슷한 것으로 나타남으로써 형질전환체의 생육에는 특별한 문제점이 없는 것으로 생각되어진다 (표 2).

표 3. 형질전환벼 계통별 수량 조사

계통	주당 수수(개)	간장(cm)	수장(cm)	등숙비율(%)	정조천립중(g)
동진(WT)	13	61	15.8	90.2	28.5
J1-51	19	57.7	16.1	81.7	24.2
J1-52	22	63.6	19.4	92.6	26.2
ACC-7	12	60.7	17.7	92.7	27.2
ACC-15	15	55.8	15.7	94.0	26.6
ACC-19	21	61	17.3	78.9	24.4
ACC-27	16	54.5	15.3	85.5	24.4
GolS-105	14	57	14.5	88.7	26.3
GolS-136	15	59.5	15	78	19.8

다. 형질전환 벼의 내염성 평가

형질전환 벼의 염해 내성을 확인하기 위해 실내에서 내염성 조건을 확립하였다. 각 형질전환 벼 계통의 원종인 동진벼를 대상으로 각 염의 농도별로 종자 발아 실험을 실시하였다. 본 실험에서는 50mM에서 400mM까지의 NaCl을 상토에 처리하고 동진벼를 파종한 후 2주간 28 - 30℃인 배양실에 발아시켰다. 발아시키는 동안 상토에 수분이 마르지 않도록 유지시키면서 발아율을 조사하였다. 상토에 종자를 파종 후 배양실에서 발아시킨 결과 98%의 무처리와 비교하여 50 mM부터 150 mM까지의 NaCl 농도에서는 약 90%의 발아율을 나타내었다 (그림 2). 형질전환 벼 내염성 저항성 검정 시험결과 200mM의 염농도에서도 GolS-136 line은 생육이 느리고 엽신 변색과 하엽이 약간 마르고 등글게 말리는 현상을 보였지만 동진에 비해 생리장애가 거의 없는 것으로 나타났다 (표 4). 유도상태에서 이루어진 이러한 결과를 토대로 내염성을 유도하는 외래 유전자의 기능 및 형질전환 벼의 특성을 밝히는 연구를 수행한 후 간척지와 같은 실질적인 포장에서의 실험을 수행해야 하리라 생각한다.

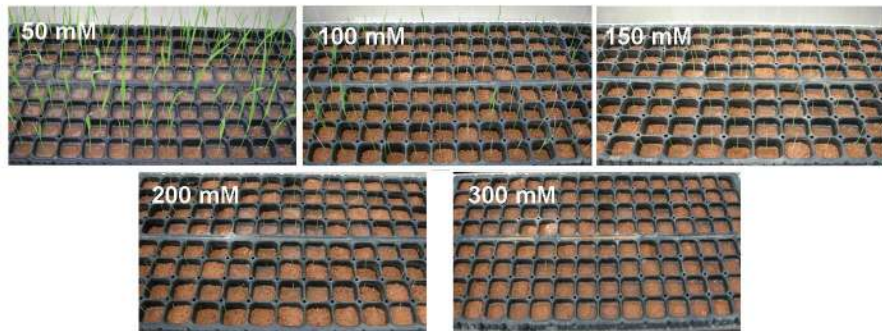


그림 2. 내염성 조건을 확립하기 위해 염 농도별로 동진벼의 발아율 조사

표 4. 형질전환벼 염 농도별 저항성 검정(1-9)

계통	50mM	100mM	150mM	200mM
동진벼(WT)	3	5	9	9
J1-51	5	7	9	9
J1-52	5	7	9	9
GolS-105	5	7	9	9
GolS-136	3	5	7	9

※ 조사기준 : 1, 유묘 생육 정상, 잎 증상 없음; 3, 생육 약간 더딤, 잎끝 약간 변색, 하엽 약간 마름; 5, 생육 느림, 엽신 변색, 하엽이 마르고 잎이 둥글게 말림; 7, 생육정지, 대부분 잎 변색 및 고사중; 9, 유묘 고사 또는 고사중

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연도별 연구목표 달성도

연차별 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 목표 달성도를 아래의 나타냈으며 연차별 연구 개발 목표들은 대체적으로 연구 계획서의 진도와 일치하여 달성되었다고 생각한다.

1. 제 1 차년도의 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발 목표	평가		목표달성도 (%)	참조부분
	평가의 착안점	평가의 척도 (%)		
MAPK kinase 클로닝	OsMEK3를 베틀로부터 클로닝하였으며 또한 OsMEK3의 기질로 이용되리라 생각하는 베틀 MAPK 유전자들을 클로닝함.	35	100	3장 1절
MAPK kinase 돌연변이체 제작	OsMEK3의 지속적인 돌연변이체와 활성을 잃은 돌연변이체를 site-directed mutagenesis방법을 통해 제작함.	30	100	3장 1절
MAPK kinase 돌연변이체 선별	만들어진 돌연변이체의 재조합 단백질을 <i>E. coli</i> 에서 발현 시킨 후 Affinity column를 이용해 순수분리하였으며 in-solution kinase assay를 통해 가장 활성이 강한 돌연변이체를 선별함.	35	100	3장 1절
내염성 유전자 분리	Yeast screening을 통해 옥수수 내염성 SAT79 유전자를 분리하였으며, 유전자 기능 연구를 위하여 애기장대로부터 AtSAT79 상동유전자를 확보하였음.	35	100	3장 4절
유전자의 전사활성 조사	염해 처리 후, 유전자의 전사 발현 양상을 분석하였음.	35	100	3장 4절
형질전환용 벡터 제작	과다발현 및 GFP 결합 형질전환체들을 제작하였음.	30	100	3장 4절
callus 형성을 비교	품종별 종자로 부터의 callus 형성을 비교 및 조건 확립	30	100	3장 5절
벼의 재분화 조건 확립	callus로부터 재분화단계를 거쳐 식물체로 성장에 따른 적정 조건 확립	35	100	3장 5절
벼의 형질전환 적정조건 확립	확립된 재분화 조건에 따른 형질전환 수행	25	100	3장 5절
PBS1 유전자 클로닝	PCR을 통한 유전자 클로닝	10	100	3장 5절

2. 제 2 차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발 목표	평가		목표달성도 (%)	참조부분
	평가의 착안점	평가의 척도 (%)		
형질전환용 binary 벡터 제작	RT-PCR를 통해 클로닝된 OsMEK3 유전자를 형질전환용 binary 벡터에 subcloning하여 제작	25	100	3장 1절
형질전환체 확인 및 외래 유전자의 발현 확인	Genomic DNA PCR을 통해 형질전환체를 확인하고 western 분석을 이용하여 외래 단백질의 발현 확인	40	100	3장 1절, 2절
형질전환체의 MAPK cascade의 기능분석	In-solution kinase 이나 in-gel kinase assay를 통해 OsMEK3와 OsMAPK간의 신호 전달 체계를 <i>in vitro</i> 에서 확인함.	35	100	3장 1절
내염성 형질전환체 제작	과다발현 형질전환체 우수 순종 라인을 분리하였음.	50	100	3장 4절
내염성 유전자의 기능 규명	우수 순종 라인들로부터 염 스트레스에 대해 내성을 증가시킴을 조사하였음.	50	100	3장 4절
형질전환 조건 확립	캘러스의 최적의 배양조건의 수립 및 <i>Agrobacterium</i> 과 캘러스의 공조배양조건의 확립	50	100	3장 5절
유전자 형질전환의 확인	캘러스 선발배지에서 유기된 신초만을 대상으로 한 PCR 분석을 통한 유전자 형질전환 여부의 확인	50	100	3장 5절
내병성 유묘검정	벼의 도열병, 흰잎마름병 저항성 유묘 검정	50	100	3장 6절
내염성 검정	벼의 내염성 평가 조건 확립	50	100	3장 6절

3. 제 3 차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발 목표	평가		목표달성도 (%)	참조부분
	평가의 착안점	평가의 척도 (%)		
형질전환체의 선발	외래 유전자의 발현 정도가 강하게 확인된 형질전환체로부터 <i>in vivo</i> 상태에서 벼 MAPK cascade의 기능을 분석함.	50	100	3장 1절, 2절
형질전환체의 내병성 조사	벼의 MAPK pathway가 강력하게 활성화된 형질전환체를 이용하여 벼흰잎마름병에 대한 내병성을 확인함.	50	100	3장 1절
형질전환체 내염성 분석	과다발현 형질전환체로부터 스트레스 유도 유전자들의 전사 발현 양상을 조사하였음.	35	100	3장 4절
Sucrose에 대한 AtSAT79 유전자의 기능 분석	Sucrose에 대해 과다발현 형질전환체들은 비감수성을 보임.	35	100	3장 4절
AtSAT79 유전자의 세포내 위치 탐색	AtSAT79::GFP 형질전환체로부터 단백질의 위치 조사한 결과 세포질에 위치함을 확인	30	100	3장 4절
형질전환 식물체 분석	온실에서 T ₀ 세대의 형질전환체부터 Genomic DNA를 추출해 형질전환체임을 확인함.	40	100	3장 1절, 2절
내염, 내병성 발현 및 기능검정	T ₁ 세대 형질전환체를 제1세부과제와 함께 내병성을 검정함.	40	100	3장 1절
형질전환체 온실 실험	온실에서 T ₀ 세대로부터 종자를 확보해 항생제가 첨가된 MS배지에서 T ₁ 세대를 형질전환체를 확보함.	20	100	3장 1절, 2절
내병성 유묘검정	제1세부과제로부터 분양받은 형질전환체를 이용해 발묘자리 검정과 본답에서 흰잎마름병 내병성을 검정함.	50	100	3장 6절
내염성 검정	제1세부과제로부터 분양받은 형질전환체를 이용해 내염성을 검정함	50	100	3장 6절

제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

본 연구를 통해 개발된 벼 형질전환체는 병원균 및 비생물학적 스트레스에도 반응하는 MAPK pathway가 활성화된 상태이다. 이 형질전환체로부터 벼의 신호전달체계에 중요한 한 부분인 MAPK cascade의 기질로 사용되는 단백질 또는 전사조절인자와 같은 유용한 유전자원을 분리하는 재료로 이용될 수 있을 것이다. 또한 아직까지 벼에서 병원균 및 비생물학적 스트레스에도 반응하는 MAPK pathway간의 상호 관계가 밝혀지지 않은 상태이어서 본 연구 결과는 외떡잎 식물의 MAPK pathway에 대한 이해의 폭을 넓혀 주리라 생각한다. 이러한 결과는 쌍떡잎 식물과 외떡잎 식물의 MAPK pathway의 유전적인 관계를 이해하는데 크게 기여하리라 생각한다. 또한 본 연구를 통해 개발된 효모 시스템을 이용한 염해 내성 종자 배유 유전자 발굴은 현재까지 알려지지 않은 새로운 내성 유전자들이 포함되어 있어 식물의 새로운 염해 내성 기작을 밝히는 중요한 이론을 창출 할 수가 있을 것이다. 염해 내성 종자 배유유전자들의 기능별 분류표 구축은 환경스트레스에 대한 종자내의 세포내 기작을 이해하는데 큰 도움을 줄 것이다.

1. 기술적 측면에서의 기여도

본 연구를 통해 벼에서 병원균 및 비생물학적 스트레스에도 반응하는 MAPK pathway가 밝혀짐으로써 벼의 생체 방어 기작에 대한 연구가 활발히 이루어질 수 있으며 벼의 MAPK 신호 전달 기작이 확립될 것이며 더 나아가서는 병 방제에 대한 새로운 전략이 수립되는 기초가 될 것이다. 이러한 신호전달 체계 확립은 식물 병리학 뿐만 아니라 생명과학 전반에 응용 가능하므로 여러 분야 학문의 발전에도 기여하게 될 것이다. 또한 벼 형질전환 기법을 위한 재분화 최적 조건이 본 연구를 통해 확립됨으로써 기존에 많은 시간과 많은 노동력이 소모되는 벼 형질전환 기술이 효율적으로 이용될 수 있을 것이다. 이러한 조직배양 및 형질전환 기술의 확립은 단지 벼의 경우에 국한 되지 않고 다른 작물의 조직배양과 형질전환으로 응용될 수가 있어 농작물이나 산업적으로 가치가 높은 작물의 형질전환에 이 기술이 활용될 수 있으리라 생각한다.

식물의 기관 발생의 근간인 배유의 구조는 식물의 다른 기관보다도 굉장히 간단하며, 거기에는 중요한 여러 세포 기작이 발생한다. 예를 들면, cell cycle 조절 기작이나 cell expansion 조절 기작, cell terminal differentiation 조절 기작, cell-to-cell signaling, cell fate determination 등을 들 수 있다. 더군다나

벼 배유의 빠른 성장율과 grain filling 절차는 세포의 대사 과정 또는 대사 조절 연구에 중요한 모델이 될 수 있다. 본 연구에 사용되었던 yeast screening 통해 분리한 염해 내성 유전자 pool은 분자 생물학, 생리학, 분자 유전학 및 유전 공학 적 방법을 통하여 분석함으로써 종자 구조에 핵심적인 역할을 하는 배유 유전자 들의 기능 기작을 밝혀 낼 수 있을 것이다. 또한 작물 육종 기술이 증대 되어지 며 배유 유전자들의 상호 특성을 밝힘으로써 작물간의 진화적 측면 이해 및 기 작 연구에 초석이 될 수 있고, 종자내의 sugar metabolism이나 carbohydrate change, water pressure 등을 규명함으로써 작물 생리적 과정 변화를 이해할 수 있을 것이다.

2. 경제·산업적 측면에서의 기여도

본 연구로부터 벼의 병원균 및 비생물학적 스트레스에 대한 신호 전달 기작의 확립을 바탕으로 창출된 형질전환 벼가 성장이나 생산량에 해가 되지 않고 병저항성을 보여 줌으로 인해 지속적인 농업에 도움이 될 것으로 생각한다. 연구개발 수행 내용 및 결과에서 볼 수 있듯이 형질전환벼가 벼에서 도열병과 함께 생산량 감소에 큰 영향을 미치고 있는 벼흰잎마름병에 대한 내병성을 보여 줌으로써 그 가능성을 보여주었다고 할 수 있다. 또한 병해 및 염해 내성 관련 신호전달체계 하위의 특이적 발현 유전자 발굴은 여러 유용 작물들의 창출에 응용될 수 있으리라 생각한다.

현재 가장 간단한 식량 자원으로서, 곡물의 배유(endosperm)는 경제적으로 가장 중요한 생물학적 구조이다. 또한 배유는 식물의 중복수정으로 인한 생산 물로써 아주 특이한 기작에 의해 발생되어지며, 특히 벼 배유(endosperm)의 독특한 가치는 식량 자원으로써 뿐만 아니라, 배유의 grain-filling pathway로 일련의 진화 과정을 엿볼 수 있는 중요한 잣대가 될 수 있다. 배유 특이적 발현 유전자 발굴은 기능성 유전자 특허 출원 및 유용 작물들을 창출할 수가 있을 것이고, 농업 생산성 향상을 도모할 수가 있으며, 작물의 개발로 인한 농업 경쟁력의 확보에 크게 도움이 될 것이다. 또한 벼 배유 유용 작물 유전자를 대량 확보함으로써 국제적 경쟁에 크게 도움이 될 수 있을 것이라고 본다. 더불어 작물 선택의 다양성 확보 기반을 마련 할 수가 있을 것이다.

3. 인력 양성 측면에서의 기여도

분자생물학, 세포생물학, 분자병리학, 유전체학을 기본으로 하는 생명공학 기술은 국가 첨단기술 산업의 하나로 급속도로 발전하는 현대사회에서 식량

문제를 해결해 줄 수 있을 뿐만 아니라 21세기에 다양한 고부가가치 신산업을 창출할 수 있는 원동력이 될 것이다. 그래서 생명공학 기술을 가진 고급 인력에 대한 양성은 국가 경쟁력 확보 차원에서 필수적이다. 본 연구 과제를 수행하는 동안 박사 1 명, 석사 4 명, 학사 2 명이 생명공학을 이해하는 연구자로 양성이 되었으며 그들은 연구에 대한 열정은 여러 학회지와 학술대회에서 발표되었다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 추가연구의 필요성

1. 다른 작물에서의 응용을 위한 육종학자와 연계된 추가 연구

본 연구를 통해 개발된 벼 형질전환체로부터 유전체학의 microarray 나 proteomics 방법을 이용한다면 벼의 신호전달체계에 중요한 MAPK cascade의 기질로 사용되는 단백질 또는 전사조절인자와 같은 유용한 유전자원을 분리할 수 있으리라 생각해 이에 대한 추가 연구를 계획 중이다. 또한 흰잎마름병에 대한 내병성을 형질전환체에 대한 심도있는 추가연구가 수행된다면 벼의 생산성에 막대한 영향을 주고 있는 흰잎마름병 방제에 대한 새로운 전략이 수립될 수 있으리라 생각한다. 본 연구에서 얻어진 염색 내성 배유 유전자들을 활용하기 위하여 벼뿐만 아니라 다른 작물에도 응용할 계획이다. 현재까지의 연구 결과로 볼 때 이러한 유전자들이 다른 작물에서도 환경스트레스 내성을 유도할 수 있는 능력을 보여줄 것으로 추정되며 현재 이들 유전자들을 벼에 형질전환하고 있는 중이다. 추후 확장 연구를 통해 새로운 환경스트레스 내성 유전자들의 형질전환을 시도하여 봄으로써 여러 가지 환경에 저항성을 가지는 안정적인 벼 품종 개발이 가능하리라고 판단된다. 따라서 종묘회사 및 육종학자와 연계된 추가 연구를 통하여 환경 내성 벼를 육성하는 연구가 필요하다고 본다.

2. 포장 실험 확대

내병성 및 스트레스 내성 형질전환체의 창출과 관련된 연구는 여러 실험실에서 수행하고 있으나 대부분의 실험을 온실과 같은 불량 환경이 제어된 상태에서 형질전환체의 특성이 조사되고 있는 실정이다. 본 연구에서도 일부 유묘 상태에서 포장저항성을 확인해 보았으나 병원균 및 환경스트레스 내성 효과는 주로 실험실과 온실에서 이루어졌다. 이를 농업 현장에서 실질적으로 이용하기 위해서는 더 많은 형질전환체의 확보와 실제 재배 환경 조건하에서 실시되는 포장 실험이 필수적이라 본다.

제 2 절 타 연구에의 응용

본 연구를 통해 얻어진 MAPK cascade의 신호전달체계에 대한 정보는 식물병리학은 물론이고 분자생물학과 세포생물학의 발전에 응용될 수 있으리라 생각한다. 식물이 병원균과 환경스트레스를 접하게 되면 이를 극복하기 위해 MAPK 신호전달체계와 같은 고유의 능력이 발휘된다. 그러한 과정은 과산화수소, 살리실산, 에칠렌, 앱식산, 폴리아민과 같은 여러 2차 신호전달 물질과 깊은 관련이 있게 된다. 그러므로 MAPK에 대한 연구의 결과물은 여러 파급 효과가 있다 하겠다.

본 연구의 결과물은 종자 배유의 세포 주기, 세포 분화 및 세포간 신호 전달의 기작 연구에 도움이 될 수 있으며, 배유 유전자 발굴은 유전자들의 상호 특성을 밝힘으로써 작물간의 진화적 측면 이해 및 기작 연구에 초석이 될 수 있다고 본다. 종자 돌연변이체 연구는 종자내의 sugar metabolism이나 carbohydrate change, water pressure 등 작물 생리적 과정 변화를 이해하는데 중요한 모델이 될 수 있을 것이다.

제 3 절 기업화 추진 방안

며 형질전환체를 이용해 저항성 유전자를 분석하는 과정에서 내병성에 대한 새로운 전략을 세울 수 있는 유전자의 분리는 유전자원 특허 및 기술이전을 가능하게 해 줄 것이다. 또한 종자 돌연변이체에 대한 기능 분석을 통해서 종자 배유 유용 단백질의 질적 향상을 높일 수 있는 연구 및 환경스트레스에 대한 유용 단백질의 안정화 강화 연구를 밀바탕으로 사료 작물의 고영양화, 바이오 에너지 고생산성 및 기능성 유용 배유 단백질을 이용한 노화 피부 방지 제품화하는 기업 방안을 모색 중이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 병원균에 대한 식물 방어 신호 전달 기작에 대한 기술 정보

전세계적으로 식물 병원균에 대한 식물 방어 신호전달 기작에 대한 연구에 지대한 관심을 가지고 있다. 그런데 최근에 미국 미주리대학의 Dr. Zhang 그룹에서 식물에 병원균의 침입이 일어나면 식물체는 일부의 에너지를 이용하여 병원균과 싸울 수 있도록 2차 대사물을 생산하게 된다는 연구결과를 최초로 밝혔다. 모델 식물인 *Arabidopsis*을 이용해 병원균의 침입을 받으면 병원균을 인지하고 복잡한 신호전달체계를 거쳐 2차 대사산물인 phytoalexin인 camalexin을 생산하게 된다는 것이다. 아직까지 *Arabidopsis*내에서 camalexin이 활성화 되는 정확한 신호전달 체계에 대한 연구 결과는 거의 없었다. 그러나 이번 연구 결과물은 잣빛곰팡이 병을 일으키는 *Botrytis cinerea*에 의해 활성화되는 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 신호전달체계에 의해 식물 질병에 저항성을 일으키는 camalexin의 생산이 조절된다는 것이다. 특히 특정한 MAPKKKa/MEKK1-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 신호전달체계의 gain-of-function 방법과 phytoalexin deficient (PAD) 돌연변이체의 lose-of-function 방법을 이용한 유전적인 분석을 통해 이 MAPK cascaded가 camalexin의 생산과 밀접한 관계가 있음을 확인하였다. 또한 camalexin이 생합성 되기 위해서는 anthranilate synthase α 와 β (ASA와 ASB), phosphoribosylanthranilate transferase (PAT), indole-3-glycerolphosphate synthase (IGPS), tryptophan synthase α 와 β (TSA와 TSB), CYP79B2, CYP79B3, CYP71A13와 CYP71B15 등과 같은 효소를 암호화하는 여러 유전자가 관여하게 되는데 이러한 유전자들이 MAPKKKa/MEKK1-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 신호전달체계의 하류에서 조절되어 지고 있음을 확인하였다. 이 연구 결과는 벼와 같은 여러 작물로 응용화될 수 있으리라 생각되어 병 방어 저항성 작물의 개발에 큰 도움이 될 수 있는 자료로 생각된다.

제 2 절 Mu-TAIL에 의한 기능 유전체 응용에 대한 기술 정보

최근 미국에서 Dr. McCarty, Dr. Larkins, Dr. Hannah, Dr. Koch, Dr. Messing 및 Dr. Becraft 그룹이 옥수수 종자 돌연변이체에 대한 uniform transposon tagging population (Uniform-Mu)을 제작하였으며 효율적인 Mu insertion sites 추출 방법을 고안하여 Mu-TAIL PCR에 대한 특성 파악에 주력하고 있다. 또한 transposon mutagenesis 된 것을 Mu-TAIL probes를 이용, 직접 microarray를 시도하고 있다. 이러한 방법은 일반적인 library를 이용하는 것 보다 매우 효율적인 데이터가 나올 것으로 기대되어진다. 한편 미국 애리조나 대학교, Dr. Galbraith 그룹은 종자 배유 유전자 6,500 cDNA를 목표로 하여 microarray를 제작하고 있다. Dr. Messing 팀은 더군다나 자가 수정 후, 4-6 DAP 종자 배유 cDNA library를 제작하여 EST 데이터베이스를 구축하고 있다. 또한 이 그룹은 27-kD zein promoter-GFP reporter gene을 형질전환된 식물체로부터 Uniform-Mu populations 구축을 시도하고 있다. 이러한 연구 결과들은 산업적으로 이용하는 데도 중요한 자료가 될 것으로 사료된다.

제 7 장 참고문헌

- Agrawal, G. K., Iwahashi, H., Rakwal, R. (2003) Rice MAPKs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302: 171–180.
- Apse, M. P., Aharon, G. S., Sneddeb, W. A. and Blumwald, E. (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in Arabidopsis. *Science* 285: 1256–1258.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chi, W. L., Gomez–Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M., Sheen, J. (2002) MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* 415: 977–983.
- Bagni, N. and Tassoni, A. (2001) Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* 20: 301–317.
- Blumwald, E. (2000) Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 431–434.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larther, F., Martin–Tanguy, J. (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci.* 140: 103–125.
- Boyer, J. S. (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218: 443–448.
- Capell, T., Bassie, L. and Christou, P. (2004) Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 101: 9909–9914
- Cho, R. J., Mindrinos, M., Richards, D. R., Sapolsky, R. J., Anderson, M., Drenkard, E., Dewdney, J., Reuber, T. L., Stammers, M., Federspiel, N., Theologis, A., Yang, W., Hubbell, E., Au, M., Chung, E. Y., Lashkari, D., Lemieux, B., Dean, C., Lipshutz, R. J., Ausubel, F. M., Davis, R. W., and Oefner, P. J. (1998) Genome–wide mapping with biallelic markers in Arabidopsis thaliana. *Nat Genet.* 23: 203–207.
- Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R. and Tavladoraki, P. (2006) Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends Plant Sci.* 11: 80–88.
- Durner, J., Shah, J. and Klessing, D. F. (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 2: 266–274.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K. and Bonnert, H. J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 463–499.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., Kumashiro, T., (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T–DNA. *Plant J.* 6: 271–282.

- Hirt, H. (1997) Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends Plant Sci.* 2: 11–15.
- Hwang, I. T., Kim, Y. J., Kim, S. H., Kwak, C. I., Gu, Y. Y. and Chun, J. Y. (2003) Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. *Biotechniques* 35: 1180–1184.
- Jin, H., Liu, Y., Yang, K. Y., Kim, C. Y., Baker, B. and Zhang, S. (2003) Function of a mitogen-activated protein kinase pathway in N gene-mediated resistance in tobacco. *Plant J.* 33: 719–731.
- Jonak, C., Okresz, L., Bogre, L., Hirt, H. (2002) Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 415–424.
- Kachroo, A., He, Z., Patkar, R., Zhu, Q., Zhong, J., Li, D., Ronald, P., Lamb, C., Chattoo, B. B. (2003) Induction of H₂O₂ in transgenic rice leads to cell death and enhanced resistance to both bacterial and fungal pathogens. *Transgenic Res.* 12: 577–586.
- Kang, J. Y., Choi, H. I., Im, M. Y. and Kim, S. Y. (2002) Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell* 14: 343–357.
- Kato, A., Shoji, T. and Hashimoto, T. (2007) Molecular cloning of N-methylputrescine oxidase from tobacco. *Plant Cell Physiol.* 48: 550–554.
- Katou, S., Yamamoto, A., Yoshioka, H., Kawakita, K., Doke, N. (2003) Functional analysis of potato mitogen-activated protein kinase kinase, StMEK1. *J. Gen. Plant Pathol.* 69:161–168.
- Kauffman, H. E., Reddy, A. P. K. Hsieh, S. P. Y. Merca, S. D. (1973) An improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae* (bacterial blight). *Plant Dis. Rep.* 57: 537–541.
- Kehoe, D. M., Villandband, P. and Somerville, S. (1999) DNA microarrays for studies of higher plants and other photosynthetic organisms. *Trends Plant Sci.* 4: 38–41.
- Kim, C. Y. and Zhang, S. (2004) Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco. *Plant J.* 38: 142–151.
- Kim, Y. J., Kwak, C. I., Gu, Y. Y., Hwang, I. T. and Chun, J. Y. (2004) Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. *BioTechniques* 36: 424–434

- Kottapalli, K. R., Rakwal, R., Satoh, K., Shibato, J., Kottapalli, P., Iwahashi, H., Kikuchi, S. (2007) Transcriptional profiling of indicarice cultivar IET8585 (Ajaya) infected with bacterial leaf blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Plant Physiol. Biochem.* 45: 834–850.
- Kusano, T., Yamaguchi, K., Berberich, T. and Takahashi, Y. (2007) Advances in polyamine research in 2007. *J. Plant Res.* 120: 345–350.
- Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (1996) Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *BioEssays* 18: 567–577.
- Lee, K., Jeon, H., Kim, M. (2002) Optimization of a mature embryo-based in vitro culture system for high-frequency somatic embryogenic callus induction and plant regeneration from japonica rice cultivars. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 71: 237–244.
- Liu, J. H., Kitashiba, H., Wang, J., Ban, Y., Moriguchi, T. (2007) Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotechnol.* 24: 117–126
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell* 10: 1391–1406.
- Liu, Y., Ren, D., Pike, S., Pallardy, S., Gassmann, W., Zhang, S. (2007) Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade. *Plant J.* 51: 941–954.
- MAPK Group. (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci.* 7: 301–308.
- Marce, M., Brown, D. S., Capell, T., Figueras, X. and Tiburcio, A. F. (1995) Rapid high-performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues. *J. Chromatogr.* 666: 329–335.
- Martin-Tanguy, J. (2001) Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regul.* 34: 135–148.
- Mishra, N. S., Tuteja, R., Tuteja, N. (2006) Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives Biochem. Biophys.* 452: 55–68.
- Nakashima, K., Shinwari, Z. K., Sakuma, Y., Motoaki, S., Miura, S., Shinozaki,

- K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000) Organization and expression of two Arabidopsis DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Mol. Biol.* 42: 657–665.
- Ouwerkerk, P.B., de Kam R. J., Hoge, J. H., Meijer, A. H. (2001) Glucocorticoid-inducible gene expression in rice. *Planta.* 213: 370–378.
- Posas, F., Chambers, J. R., Heyman, J. A., Hoeffler, J. P., Nadal, E. and Arino, J. (2000) The transcriptional response of yeast to saline stress. *J. Biol. Chem.* 275: 17249–17255.
- Ren, D., Yang, H., Zhang, S. (2002) Cell death mediated by mitogen-activated protein kinase pathway is associated with the generation of hydrogen peroxide in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 277: 559–565.
- Reyna, N. S., Yang, Y. (2006) Molecular analysis of the rice MAP kinase gene family in relation to *Magnaporthe grisea* infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19: 530–540.
- Rohila, J. S., Yang, Y. (2007) Rice mitogen-activated protein kinase gene family and its role in biotic and abiotic stress response. *J. Integrative Plant Biol.* 49: 751–759.
- Rotem, N., Shemesh, E., Peretz, Y., Akad, F., Edelbaum, O., Rabinowitch, H. D., Sela, I. and Kamenetsky, R. (2007) Reproductive development and phenotypic differences in garlic are associated with expression and splicing of LEAFY homologue gaLFY. *J. Exp. Bot.* 58: 1133–1141.
- Serrano, R. and Rodriguez-Navarro, A. (2001) Ion homeostasis during salt stress in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 399–404.
- Shi, H., Quintero, F. J., Pardo, J. M. and Zhu, J. K. (2002) The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell* 14: 465–477.
- Smith, M. A. (1985) Polyamines. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 117–143.
- Taji, T., Ohsumi, C., Luchi, S., Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2002) Important roles of drought and cold-induced genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 29: 417–426.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., Collinge, D. B. (1997) Subcellular localisation of H₂O₂ in plants, H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive responses during barley-powdery mildew interaction. *Plant J.*

- 11: 1187–1194.
- Tiburcio, A. F., Kaur–Sawhney R. and Ingersoll, R.B., Galston, A.W. (1985) Correlation between polyamines and pyrrolidine alkaloids in developing tobacco callus. *Plant Physiol.* 78: 323–326
- Torrigiani, P. (1997) Polyamine synthesis and accumulation in the hypersensitive response to TMV in *Nicotiana tabacum*. *New Phytol.* 135: 467–473.
- Walters, D. R. (1985) Relative changes in levels of polyamines and activities of biosynthetic enzymes in barley infected with the powdery mildew fungus, *Erysiphe graminis* D.C. ex *Merat f. sp. hordei* Marchal. *New Phytol* 101: 695–705.
- Walters, D. R. (2003) Polyamines and plant disease. *Phytochemistry* 64: 97–107.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., Johnson, G. L. (1999) Mitogen-activated protein kinase: Conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* 79: 143–180.
- Yamamizo, C., Kuchimura, K., Kobayashi, A., Katou, S., Kawakita, K., Jones, J. D., Doke, N., Yoshioka, H. (2006) Rewiring mitogen-activated protein kinase cascade by positive feedback confers potato blight resistance. *Plant Physiol.* 140: 681–692.
- Yang, K. Y., Liu, Y., Zhang, S. (2001) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:741–746.
- Yang, Y. F., Shah, J., Shah, J. F., Klessig, D. F. and Klessig, D. F. (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* 11: 1621–1639
- Yang, Y., Shah, J., and Klessig, D. F. (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes & Dev.* 11: 1621–1639.
- Yoo, T. H., Park, C. J., Kim, K. J., and Paek, K. H. (2004) Ornithine Decarboxylase Gene (CaODC1) is Specifically Induced during TMV-mediated but Salicylate-independent Resistant Response in Hot Pepper. *Plant Cell Physiol.* 45: 1537–1542.
- Zhang, S. and Klessig, D. F. (1997) Salicylic acid activates a 48 kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* 9: 809–824.
- Zhang, S. and Klessig, D. F. (1998) Resistance gene N-mediated de novo

- synthesis and activation of a tobacco mitogen-activated protein kinase by tobacco mosaic virus infection. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 95: 7433–7438.
- Zhang, S., and Klessig, D. F. (1998) The tobacco wounding-activated MAP kinase is encoded by SIPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7225–7230.
- Zhang, S., Du, H., and Klessig, D. F. (1998) Activation of tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell* 10, 435–449.
- Zhang, S., Liu, Y. (2001) Activation of salicylic acid-induced protein kinase, a mitogen-activated protein kinase, induces multiple defense responses in tobacco. *Plant Cell*. 13: 1877–89.
- Zhang, S., Klessig, D. F. (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.* 6: 520–527.
- Zhao, J. F., Davis, L. C., Davis, L. F., Verpoorte, R. and Verpoorte, R. (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 23: 283–333.
- Zhu, J. K. (2001) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6: 66–71.
- Zhu, J. K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 53: 247–273.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.