

발간등록번호

11-1543000-000239-01

# 신개념 방제전략 개발을 위한 식물병원성 곰팡이의 전사조절 유전자의 기능분석

(Functional roles of transcription factor genes in a  
phytopathogenic fungus for development of strategies for  
disease control and prevention)

강원대학교 산학협력단

농림축산식품자료실



0000666

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “신개념 방제전략 개발을 위한 식물병원성 곰팡이의 전사조절 유전자의 기능분석”  
과제의 보고서로 제출합니다.

2013 년 11 월 5 일

주관연구기관명 : 강원대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 김 경 수

연 구 원 : 한 준 희

연 구 원 : 이 혜 민

연 구 원 : 김 준 태

연 구 원 : 이 지 애

연 구 원 : 신 중 환

# 요 약 문

## I. 제 목

신개념 방제전략 개발을 위한 식물병원성 곰팡이의 전사조절 유전자의 기능분석

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목적은 AT-hook motif를 갖는 특정 전사조절인자의 기능을 모델생물체로 부상한 벼도열병균(*Magnaporthe oryzae*)을 이용하여 규명하는 것이다. 따라서 유전자결실돌연변이체를 만들어 그 유전자의 기능을 벼도열병균의 발달과 병발생과정에서 밝히는 것이다. 이는 우리의 궁극적인 목표인 식물병원성 곰팡이가 어떻게 발병, 확산, 생존하는가에 대한 이해증진과 신개념의 식물병 방제전략 개발에 기여할 수 있다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

### 1. 상세분석을 위한 유전자 선발

- Bioinformatics tools을 이용한 유전자 선발
- 벼도열병균의 발달 단계별 RNA 추출
- qRT-PCR을 이용한 유전자 발현 조사

### 2. 유전자결실돌연변이체 생성

- 벼도열병균의 원형질체 제작
- 결실돌연변이체를 생성하기 위한 construct 제작
- Multiplex PCR을 이용한 결실돌연변이체 screening
- Southern blot과 RT-PCR

### 3. 유전자복원형질전환체 생성

- 복원형질전환체를 생성하기 위한 construct 제작
- PCR을 이용한 복원형질전환체 screening
- Southern blot과 RT-PCR
- 표현형 검정

### 4. 유전자의 기능 분석

- 균사생장, 포자형성, 발아관형성, 부착기형성 검정
- 감염균사생장과 병원성 검정

#### IV. 연구개발결과

선행연구로 수행한 microarray 분석을 통해서 벼도열병균의 생활사 중에서 발현의 변화가 많은 유전자를 동정하였다. 그리고 특이적 발현양상을 보인 AT-hook motifs를 동정하였다. 그리고 벼도열병균의 게놈 데이터베이스에서 총 23개의 AT-hook motif를 갖는 전사조절인자를 인코딩하는 유전자를 분리하였다. 그리고 23개 유전자의 발현 양상을 벼도열병균의 생활사에서 언제 어디서 어느 정도 발현하는지를 조사하여 유전자의 기능이 포자형성과 더불어 다른 단계의 발달에도 영향을 미치는지를 예측하였다. 군사성장, 포자생성, 포자발아, 부착기형성, 발병 등에서 각각 RNA를 추출하고 cDNA로 전환한 다음, 유전자 특이적 프라이머(gene-specific primers)와 각 단계별 발현에 큰 변화가 없는 house keeping gene의 프라이머를 제작하고 qRT-PCR를 이용하여 조사하였다. 이들 중에서 우리는 유전자 2개에 대한 결실돌연변이체를 생성하여 심화되고 상세한 분석을 통해 그 기능을 밝히고자 하였다. 유전자 결실돌연변이체를 생성하여 유전자 선발은 qRT-PCR로 확인된 유전자 발현 양상과 Conserved Domain Database, InterPro Domain Search 방법으로 유전자가 코딩하고 있는 단백질의 sequence에 존재하는 motif나 domain에 근거하여 그 기능을 예측하여 선정하였다. 최종 선정된 유전자는 총 6개로 도메인 AT-hook motif만 가지고 있는 MoATH08, MoATH11, MoATH13 유전자와 추가적으로 다른 도메인을 가지고 있지만 비교적 연구가 되지 않은 다른 도메인을 가지고 있는 MoATH07(Fungal zn(2)-cys(6) binuclear cluster), MoATH17(JmjC), MoATH22(Cupin)를 선발하여 총 6개 유전자에 대한 결실돌연변이체 생성을 시도하였다.

유전자결실돌연변이체는 homology-dependent gene replacement 방법에 의해서 특정 유전자를 hygromycin cassette로 특이적으로 치환하는 방식으로 만들었다. 본 연구에서는 한국에서 분리한 벼도열병균인 KJ201의 protoplast를 만들고 polyethylene glycol를 사용하여 형질전환 함으로써 유전자결실돌연변이체를 만들었다. 유전자결실돌연변이체로 추정되는 형질전환체(transformant)는 최종적으로 반수체(haploid)인 포자(conidium) 한 개만을 분리하여 정제한 후, southern blot과 reverse transcriptase PCR (RT-PCR)로 확인하였다. 그 결과  $\Delta MoATH08$ ,  $\Delta MoATH07$  유전자결실돌연변이체를 생성하였다.

만들어진 유전자결실돌연변이체의 표현형 결함(phenotypic defect)이 결실유전자 때문인지를 확인하기 위해서 현재 유전자복원형질전환체를 만들고 있는 중이다. 각각의 유전자결실돌연변이체로부터 protoplast를 만들어 여기에 다른 항생제 마커(예, G418)와 결실된 유전자를 다시 삽입시키고, 두 개의 항생제(hygromycin과 G418)가 첨가된 배지에서 형질전환체를 유도하였다. 선택배지에서 자란 형질전환체는 southern blot, RT-PCR 방법에 의해 유전자의 삽입과 발현을 다시 확인할 것이다.

유전자 결실돌연변이체를 이용하여 해당 유전자의 기능을 벼도열병균의 생활사에서 분석하였다. 유전자결실돌연변이체  $\Delta MoATH08$ 은 군사 생장은 V8 영양배지와 MMA 최소영양배지에서 wild-type과 비교하여 조금 느리게 자라긴 하지만 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 포자의 생성이 wild-type과 비교하여 감소하는 것을 보였으며, 발아를 하는 속도에서 차이를 나타내었다. 병원성에 중요한 부착기의 형성에서는 큰 차이를 보이지 않았지만 벼 잎에 군사접종과 포자현탁액 접종 실험결과 병원성이 줄어드는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 식물세포의 침입과 식물세포에서의 감염군사 생장에 영향을 준 것이라 판단되었다. 유전자결실돌연변이체  $\Delta MoATH07$ 은 군사성장 측면에서  $\Delta MoATH08$ 와 반대로 V8 영양배지

및 MMA 최소영양배지에서 wild-type에 비교하여 조금 빠르게 자라는 특징을 보였으며, Melanization에 의한 색상의 변화가 거의 없는 것으로 확인되었다. 그리고 만들어 내는 포자의 수도 줄어드는 것을 확인하였으며, 소수성 표면위에서 부착기를 만들어 내지 못하는 것을 확인하였다. 따라서 MoATH07유전자는 벼도열병균의 발달과 병원성에 중요한 역할을 할 것이라 예상되었다.

두 결실돌연변이체에 근거한 기능분석 결과 AT-hook motif는 Transcription factor로써 유전자들을 조절하여 생활사에 꼭 필요한 중요한 역할을 하는 유전자이며, 이는 세계 최초로 식물병원성 곰팡이에서 AT-hook motif 전사 인자가 포자생성에 영향을 미치며 벼도열병균의 생활사에서 발달하고 생존하는데 있어서 중요한 역할을 한다는 것을 유전자결실돌연변이체를 이용하여 분자생물학적, 유전학적으로 분석하였다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

식물병원성 곰팡이를 포함한 대부분의 진핵생물에서 AT-hook motif 전사 인자에 대한 연구는 국내, 국외에서 전무한 상태이다. 따라서 모델 생물체로 급부상한 벼도열병균의 AT-hook motif 전사 인자가 어떻게 포자생성에 영향을 미치며 벼도열병균의 생활사에서 발달하고 생존하는가에 대하여 분자생물학적, 유전학적으로 분석하였다. 그리고 연구 결과를 바탕으로 학회발표 5회, 학부 3명, 석사 3명의 인력 양성 성과를 거두었다. 앞으로 학회발표 1회 및 SCI 논문 1편에 사사할 예정이며 데이터 정리 및 추가실험으로 SCI급 논문 1편을 게재할 예정이다.

최종적으로는 본 과제를 통해서 새로운 개념의 병 억제와 방제 기법 개발을 위한 기초로 활용될 수 있다고 기대된다. 또한, 벼도열병에 국한되는 것이 아니라 식물병원성 곰팡이에 대한 이해증진과 지식축적을 통한 생명과학의 발달에 기여하며 대학원생의 분자생물학적 연구기법 숙지와 생명과학에 대한 이해증진, 그리고 국제적 경쟁력 제고에 도움이 될 것이다.

## SUMMARY

*Magnaporthe oryzae* is one of the most destructive fungal pathogens to rice. It has emerged as a model organism for the characterization of molecular mechanisms relevant to pathogenic development in host plants. Similar to other pathogenic fungi, conidiation plays a central role in initiation of *M. oryzae* infection and spread over a large area. However, relatively little is known regarding the molecular mechanisms that underlie conidiation in *M. oryzae*. As a first step to understand conidiogenesis in this fungus, we measured genome-wide gene expression profiles during conidiation using a whole genome oligonucleotide microarray. At a two-fold expression difference, approximately 4.42% and 4.08% of genes were upregulated and downregulated, respectively, during conidiation.

Transcriptional regulation is an important process for development and pathogenicity in response to environmental factors. Therefore, transcription factors (TFs) is critical for understanding regulation of fungal development and pathogenicity. In *M. oryzae*, 481 transcription factors (TFs) were identified from fungal transcription factor database, but only about 24 TF genes were functionally characterized.

AT-hook motif-containing DNA-binding proteins have not been characterized in fungi. The AT-hook is a small DNA-binding protein motif which was first described in the high mobility group non-histone chromosomal protein HMG-I(Y). The AT-hook binds to the minor groove of adenine-thymine (AT) rich DNA. Recently, we identified 23 AT-hook motif genes (MoATH01 to MoATH23) in the genome of *M. oryzae*. The first, qRT-PCR was performed to investigate the expression levels of the 23 AT-hook motif genes in the life cycle of *M. oryzae*. As a result, we selected 6 genes (MoATH08, MoATH11, MoATH13, MoATH07, MoATH17, MoATH22) among 23 AT-hook motif genes. A deletion mutant for MoATH08, MoATH07 were made via homology-dependent replacement method. The  $\Delta MoATH08$  mutant showed slightly reduced mycelial growth, conidiation, germination rate. However  $\Delta MoATH08$  showed a remarkable reduction in pathogenicity by hyphae and conidia inoculation. These data indicate that  $\Delta MoATH08$  play a role in cell development and pathogenic development in *Magnaporthe oryzae*. Also, functional analysis of the other  $\Delta MoATH07$  mutant are in progress.

# CONTENTS

Summary .....	2
Chapter 1. Introduction .....	9
Section 1. Purpose and Requisite of the research .....	9
Section 2. Contents and scope of research .....	11
Chapter 2. Current situation and problems in domestic foreign technology	14
Section 1. Current situation in domestic technology .....	14
Section 2. Current situation in foreign technology .....	14
Chapter 3. Research contents and results .....	15
Section 1. Analysis of gene selection .....	15
Section 2. Make a knockout mutant .....	27
Section 3. Make a complement .....	44
Section 4. Functional analysis of Gene .....	44
Chapter 4. Attainability of research goal and contribution to related field ..	50
Chapter 5. Application of research results .....	51
Chapter 6. Collect information .....	52
Chapter 7. equipment status .....	53
Chapter 8. References .....	54

# 목 차

요 약 문 .....	2
제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	9
제 1 절 연구개발의 목적과 필요성 .....	9
1. 연구개발의 목적 .....	9
2. 연구개발의 필요성 .....	11
제 2 절 연구개발의 내용 및 범위 .....	13
1. 최종연구목표 .....	13
2. 연구개발의 내용 .....	13
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	14
제 1 절 국내 연구 현황 .....	14
제 2 절 국외 연구 현황 .....	14
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	15
제 1 절 상세분석을 위한 유전자 선별 .....	15
1. Bioinformatics tools을 이용한 유전자 선별 .....	15
2. qRT-PCR을 이용한 유전자 발현 조사 .....	20
제 2 절 유전자결실돌연변이체 생성 .....	27
1. 도열병균 KJ201의 원형질체 제작 .....	27
2. 결실돌연변이체를 생성하기 위한 construct 제작 .....	28
3. homology-dependent gene replacement 방법에 의한 형질전환 .....	29
4. 결실돌연변이체 screening .....	32
제 3 절 유전자복원 형질전환체 생성 .....	44
제 4 절 유전자의 기능 분석 .....	44
1. MoATh08의 기능 분석 .....	44
2. MoATh07의 기능 분석 .....	48
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	50
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	51



제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	52
제 7 장 연구시설·장비 현황 .....	53
제 8 장 참고문헌 .....	54

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적과 필요성

### 1. 연구개발의 목적

쌀은 전 세계인구의 절반정도가 의존하는 매우 중요한 식량자원으로 6억 명의 빈민을 포함하고 있는 아시아에서 90% 이상의 쌀이 소비되고 있다.<sup>1)</sup> 국내의 쌀 재배 면적은 점차 감소하는 추세이며(그림 1), 이로 인한 소비자의 부담이 증가하고 있는 실정이다.<sup>2)</sup>

전국적인 쌀 재배 면적 감소뿐만 아니라, 재배 기간 동안의 극심한 기상조건으로 안정적인 쌀 생산에 취약하며, 이는 가격 상승으로 이어져 농가의 피해와 주식으로서 가계 부담이 우려되고 있다. 그리고 농가의 쌀 생산비는 매년 지속적으로 상승하여 농가의 부담이 가중되고 있다(그림 2). 농약가격의 지속적인 상승과 대체 방법의 결여로 인해 농가의 생산 비용 증가 및 소득 감소, 그리고 소비자 부담 증가 등의 악순환이 지속되고 있다(그림 3). 그리고 병해충 방제를 위한 농약비용이 쌀 생산에 있어 높은 비중을 차지하고 있다. 벼의 병해충에 의한 피해 중에서 도열병에 의한 피해가 극심한 것으로 나타나고 있으며, 일부 벼도열병 저항성 품종이 보급되면서 피해가 줄고 있지만, 새로운 레이스 출현에 의한 피해 발생은 항상 우려되는 상황이다.

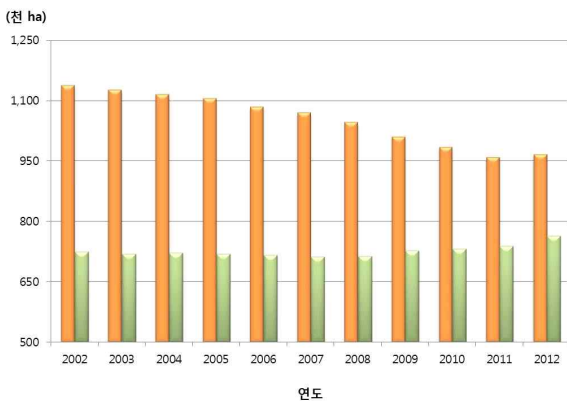


그림1. 연도별 벼 재배 면적 감소 추세.

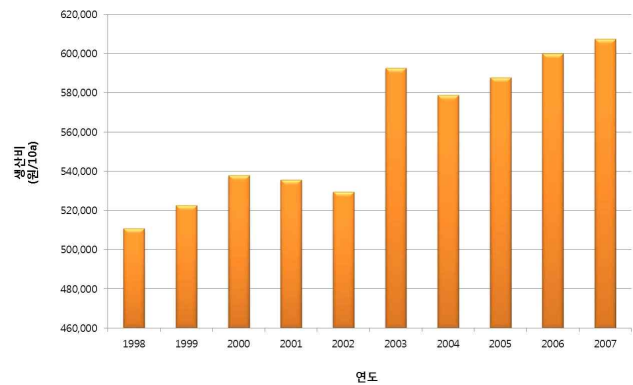


그림2. 연도별 벼농사 생산비의 증가.

우리나라에서는 벼도열병 방제를 위해서 살균제의 무분별한 사용이 계속되고 있어 생산 비용 뿐 만 아니라, 약제 저항성에 의한 문제가 우려되고 있다. 벼도열병에 대한 피해는 화학농

1) Rice Today, 2013

2) 한국농촌경제연구원 2012

약 살포로 인해 줄어드는 것처럼 보이지만, 방제를 소홀히 했을 경우에는 큰 피해를 가져올 수 있는 중요한 병이다. 지금도 세계 쌀 수확량의 10% 정도가 도열병 때문에 줄어드는 것으로 보고되고 있으며, 이는 전 세계 6,000 만 명을 먹여 살릴 수 있는 엄청난 양에 해당한다. 이어 농약은 고온 다습한 기후로 인한 높은 병해충 발생과 연중재배, 집약생산 등의 특성으로 인하여 많은 양이 사용되고 있는 실정이다.

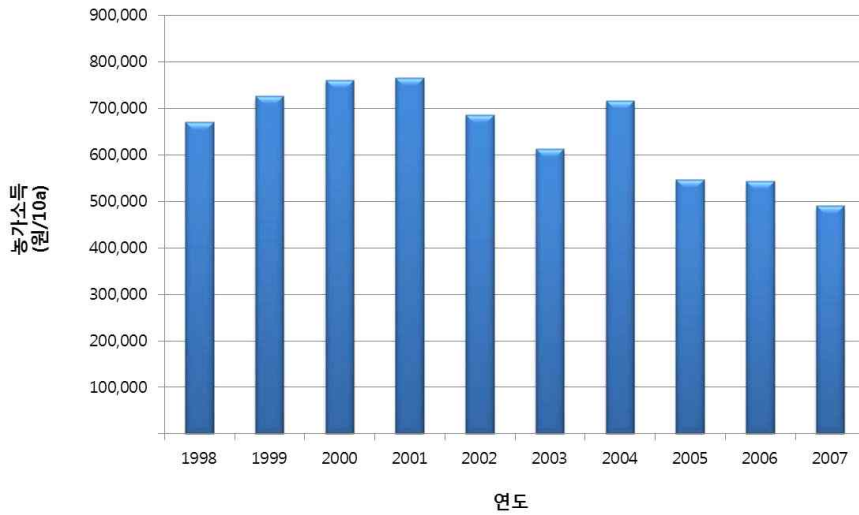


그림 3. 연도별 벼 생산 농가소득의 감소.

최근에는 친환경농자재의 사용으로 화학농약 사용량이 다소 줄고 있지만(그림 4), 친환경 농자재의 가격이 고가(화학농약의 3.5배)이기 때문에 농가의 생산비는 오히려 늘고 있는 실정이다. 그리고 기후 변화에 의한 돌발 병해가 발생하고 있으며, 특히 잎집무늬마름병과 이삭마름병, 키다리병, 깨씨무늬병에 대한 피해가 확산되고 있는 것으로 나타나고 있다.

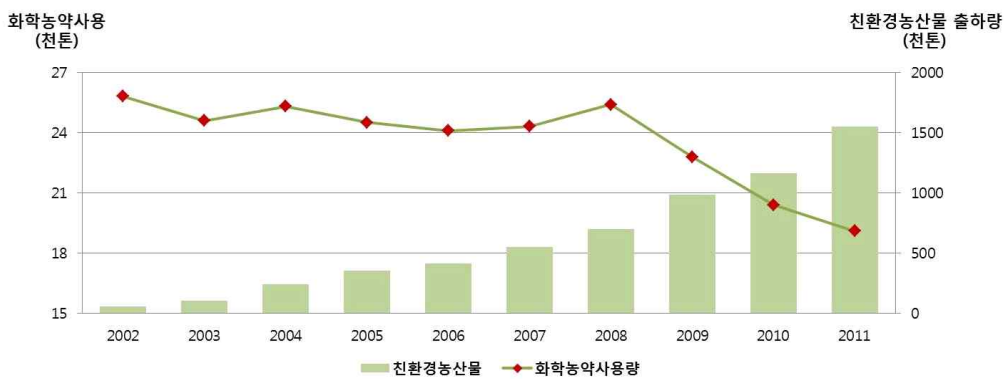


그림 4. 연도별 화학농약사용 감소추세와 친환경 농산물의 증가.

따라서 이와 같은 심각한 병을 일으키는 식물병원성 곰팡이에 대한 분자생물학, 유전학적인 이해가 필요하며 새로운 개념의 병 억제제 및 방제 기법이 필요할 것으로 사료된다.

## 2. 연구 개발의 필요성

- 전 세계 작물 생산량의 33.7%가 병·해충에 의해서 손실이 되며, 그 중에서도 식물병원성 진균은 가장 심각한 원인으로 식물병의 85%를 일으키는 주범임
- 따라서 식물병원성 진균에 대한 연구는 작물 보호와 병 방제를 위해서 소요되는 막대한 비용을 절감을 위해서 반드시 필요함
- 벼는 전 세계인구가 소비하는 칼로리의 약 20%를 차지하는 가장 중요한 에너지원으로(FAO, 2004), 벼를 주된 식량으로 하는 아시아와 아프리카의 지속적인 인구 증가로 식량부족에 대한 문제가 대두되고 있음
- 세계 식량 통계에 의하면 2000년 이후 벼 생산량이 소비량보다 줄어들기 시작했으며, 인구 증가 비율은 쌀 소비감소 비율을 초과하여 심각한 식량난을 초래할 것이라고 예측됨
- 벼도열병균(*Magnaporthe oryzae*)은 식물병원성 진균(fungi)으로, 벼를 가해하여 치명적인 피해를 입히는 벼도열병(rice blast)의 원인균임
- 연간 피해는 총 벼 생산량의 15%에 해당하며, 이는 약 6천만 명이 먹을 수 있는 양에 해당함(Ou, 1985)
- 현재 우리나라에서는 벼도열병 방제를 위해 막대한 비용이 지속적으로 소모되고 있으며, 후진국에서는 고가의 방제 비용 때문에 무방제로 인한 막대한 생산량 손실을 감수하고 있음
- 따라서 벼도열병균은 사회적 경제적 중요성에 기인하여 식물 병원성곰팡이 중에서 최초로 게놈 염기서열이 밝혀진 병원균이며, 이는 연구 수행에 있어 수월성을 제시함
- 벼도열병균이 속해있는 자낭균류에는 *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Powdery mildews*, *Cercospora*, *Botrytis*, *Cochliobolus*와 같은 매우 중요한 식물병원균들이 속해 있어 본 연구를 통한 결과는 자낭균류의 다른 식물병원성 곰팡이를 이해하는 데 기여할 것으로 사료됨
- 벼도열병균은 주된 감염원(inoculum)으로서 역할을 하는 무성포자(asexual conidia; 이하 ‘포자’로 통칭)를 생성하여 발병과 병을 확산시킴
- 그러나 포자 생성에 대한 연구는 주로 비병원성 곰팡이(nonpathogenic fungi)인 *Aspergillus*

*nidulans*와 *Neurospora crassa*를 대상으로 많은 연구가 진행되어 왔지만, 아직까지 식물병원성 곰팡이를 대상으로 수행된 연구는 매우 부진한 실정임

○ 세계적으로 그동안의 많은 연구는 부착기라는 침입구조에 대한 연구가 집중되어 온 실정이며 아직까지 병이 발생하는데 있어서 중요한 포자의 생성과 확산에 대한 연구는 미흡한 수준

○ 따라서 벼도열병균이 어떻게 포자를 만들어 병을 확산하고 식물체를 감염시켜 생산량의 감소를 초래하는 지에 대한 연구는 생물학적 이해 증진 뿐 만 아니라, 안정적인 식량자원 생산과 시대의 요구에 부응하는 새로운 병 방제 기법을 개발하는데 있어 매우 중요함

○ 본 연구자는 벼도열병균의 포자생성과 관련된 유전자의 동정으로 cDNA microarray 연구를 통해서 벼도열병균의 포자생성 과정에서 발현이 증감하는 유전자를 분석하였음

○ 포자생성 과정에서 발현이 2배 이상 증가하는 605개의 유전자를 동정하였으며, 이들 중 284개의 유전자는 4배 이상 증가하는 양상 보였으며, 반면 558개의 유전자가 2배 이상 감소하는 것으로 분석되었음

○ 포자생성 과정 중에서 특이적으로 발현이 증가하는 AT-hook motif를 지닌 전사조절인자를 동정하고 본 과제를 통하여 세계 최초로 벼도열병균의 포자생성 관련 유전자인 AT-hook motif를 지닌 전사조절인자에 대한 분석과 knock-out mutant를 만들어 그 기능을 알아봄으로써 새로운 개념의 병 억제와 방제 기법 개발의 기초자료로 활용하고자함

## 제 2절 연구개발의 내용 및 범위

### 1. 최종연구목표

AT-hook motif를 갖는 특정 전사조절인자의 기능을 벼도열병균(*Magnaporthe oryzae*)을 이용하여 규명하여 신개념의 식물병 방제전략 개발에 기여하는 것임

### 2. 연구개발의 내용

표 1. 연구개발의 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2012년~2013년	상세분석을 위한 유전자 선발	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bioinformatics tools을 이용한 유전자 선발</li> <li>• 벼도열병균의 발달 단계별 RNA 추출</li> <li>• qRT-PCR을 이용한 유전자 발현 조사</li> </ul>
		유전자결실돌연변이체 생성	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 결실돌연변이체를 생성하기 위한 construct 제작</li> <li>• Multiplex PCR을 이용한 결실돌연변이체 screening</li> <li>• Southern blot과 RT-PCR</li> <li>• 유전자의 기능 분석</li> </ul>
		유전자복원형질전환체 생성	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 복원형질전환체를 생성하기 위한 construct 제작</li> <li>• Multiplex PCR을 이용한 복원형질전환체 screening</li> <li>• Southern blot과 RT-PCR</li> <li>• 표현형 검정</li> </ul>
		유전자의 기능 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 유전자의 기능을 벼도열병균의 생활사에서 분석</li> </ul>

## 제 2 장 국내외 연구개발 현황

### 제 1 절 국내 연구 현황

국내의 벼도열병균에 대한 연구는 오래전부터 주로 기주 식물체인 벼의 품종개발이나 주변 환경에 따른 영향 등이 연구되고 있다. 농촌진흥청 등에서 벼도열병의 발생피해의 해석과 방제에 대해 영농활용자료 및 현장 컨설팅 등으로 활용되고 있으며 농림부에서 영농활용자료로 벼도열병균의 방제 지침이 마련되었다. 반면에 벼도열병균을 대상으로 분자생물학적으로 접근하는 연구는 세계적으로 비교하여 극소수에 불과하다. 서울대학교에서 벼도열병균 KJ201에 대한 염기서열이 재분석되고 부착기와 관련한 유전자에 대한 연구가 진행되고 있으며 경상대학교에서 벼와 상호 작용에 대한 Proteomics 접근 연구가 진행되고 있다. 따라서, 벼도열병의 원인균인 벼도열병균에 대한 보다 자세한 분자생물학, 유전학적 연구가 필요할 것이라고 사료된다.

### 제 2 절 국외 연구 현황

국제적으로 벼도열병균은 식물병원성 곰팡이 중에서 모델 생물체로 부상하고 있으며, 게놈 수준에서의 비교생물학적 연구가 활발히 진행 중이다. Kansas State University에서는 벼도열병균의 분비단백질 이동과 관련한 연구가 진행중이며, North Carolina State University에서는 부착기와 관련한 트랜스크립토에 대한 연구가 진행중이다. University of Exeter에서는 벼도열병균의 침입구조 및 세포주기에 대한 연구가 진행중이다. 아직까지 병이 발생하는데 있어서 중요한 포자의 생성과 확산에 대한 연구는 미흡한 수준이다. 그리고 아직까지 인간을 포함한 식물병원성 곰팡이의 AT-hook motif 전사 인자에 대한 연구는 전무한 상태이다.

표 2. 국내외 연구개발 현황

구분	연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
국 내	경상대학교	벼와 도열병균의 상호작용에 관한 연구	논문, 특허
	농촌진흥청 농림부	벼도열병의 발생피해 해석 및 방제 벼도열병균의 방제 지침 마련	영농활용자료, 현장 컨설팅 영농활용자료
	서울대학교	한국 벼도열병균의 염기서열 재분석 벼도열병균의 부착기 관련 유전자 연구	논문, 특허
	강원대학교	벼도열병균의 포자 생성 관련 연구	논문, 특허
국 외	Kansas State University	벼도열병균의 분비단백질 이동 관련 연구	논문
	North Carolina State University	벼도열병균의 부착기 관련 트랜스크립토	논문, 특허
	University of Exeter	벼도열병균의 침입구조 및 세포주기 연구	논문, 특허

# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

## 제 1 절 상세분석을 위한 유전자 선별

### 1. Bioinformatics tools을 이용한 유전자 선별

#### 가. 도벼열병균의 포자생성과 관련된 유전자의 동정

최근에 cDNA microarray 방법을 통해 벼도열병균의 포자생성 과정에서 발현이 증감하는 조절 유전자를 동정하였다. 포자생성 이전단계의 균사(NCMY; 그림 5)와 포자를 생성하고 있는 균사(CNMY)로부터 RNA를 뽑아 cDNA를 합성하고 이를 각각 cyanine 3 와 cyanine 5로 labeling 하였다. Labeling된 cDNA를 *M. oryzae* GenChip (G2519F-015060, Agilent Technologies)에 hybridization시켰으며, GeneSpringGX 7.3(Agilent)을 이용하여 발현 정도를 분석하였다(그림 5). 그 결과, 포자생성 과정에서 발현이 2배 이상 증가하는 605개의 유전자를 동정하였으며, 이들 중 284개의 유전자는 4배 이상 증가하는 양상을 보였다(그림 6). 반면에 558개의 유전자가 2배 이상 감소하는 것을 알 수 있었다. “그림 6”은 포자생성 과정에서 몇 개의 유전자가 어느 정도 발현 증감을 보이는지를 보여주고 있다. 그리고 이중에서 특이적으로 발현이 증가하는 AT-hook motif를 지닌 전사조절인자가 동정되었다.

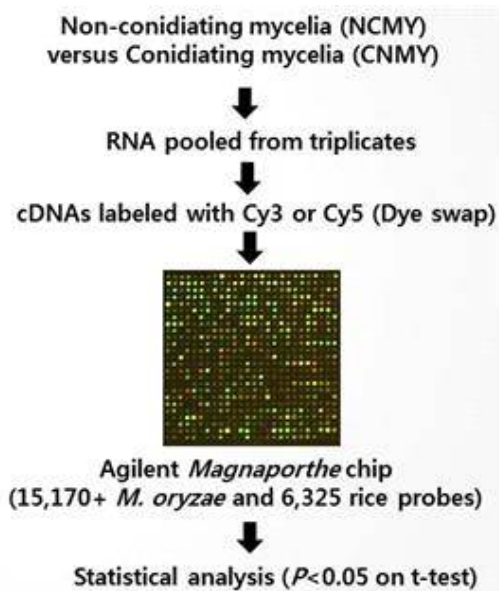


그림 5. cDNA microarray를 통한 포자생성 과정에서의 유전자 발현 연구.

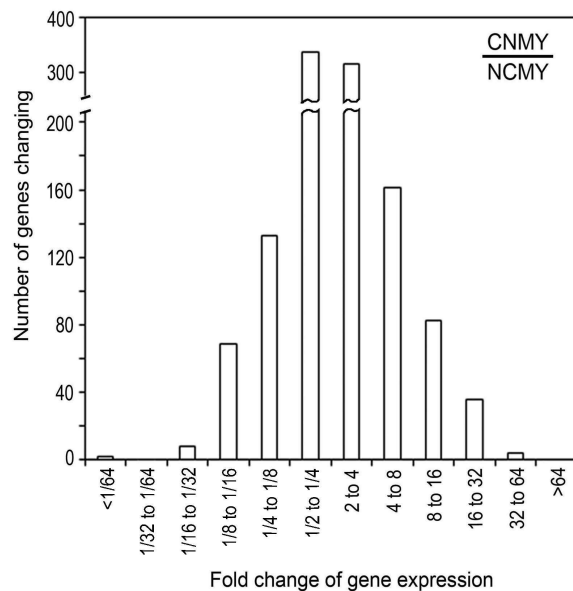


그림 6. 포자생성 과정에서 발현증감 정도별 유전자 개수.



나. AT-hook motif를 갖는 전사조절인자를 인코딩하는 유전자 동정

포자생성 과정 중 특이적으로 발현이 증가된 AT-hook motif를 갖는 전사조절인자를 연구하기 위하여 벼도열병균 지놈 데이터베이스<sup>3)</sup>에서 23개 유전자를 동정하였다. 그 결과, ‘AT-hook motif’를 지닌 전사조절인자(transcription factor)를 인코딩하는 총 23개의 유전자를 동정하였고 그들을 각각 *MoATH01* ~ *MoATH23*으로 명명하였다(그림 7). 일부 MoATH 유전자는 AT-hook motif 이외에 다른 도메인을 포함하고 있었다. MoATH 유전자간에는 AT-hook motif의 개수에서도 차이를 보였는데, AT-hook motif가 1개인 유전자는 7개이며, 이 중 다른 도메인을 가지는 유전자는 2개였

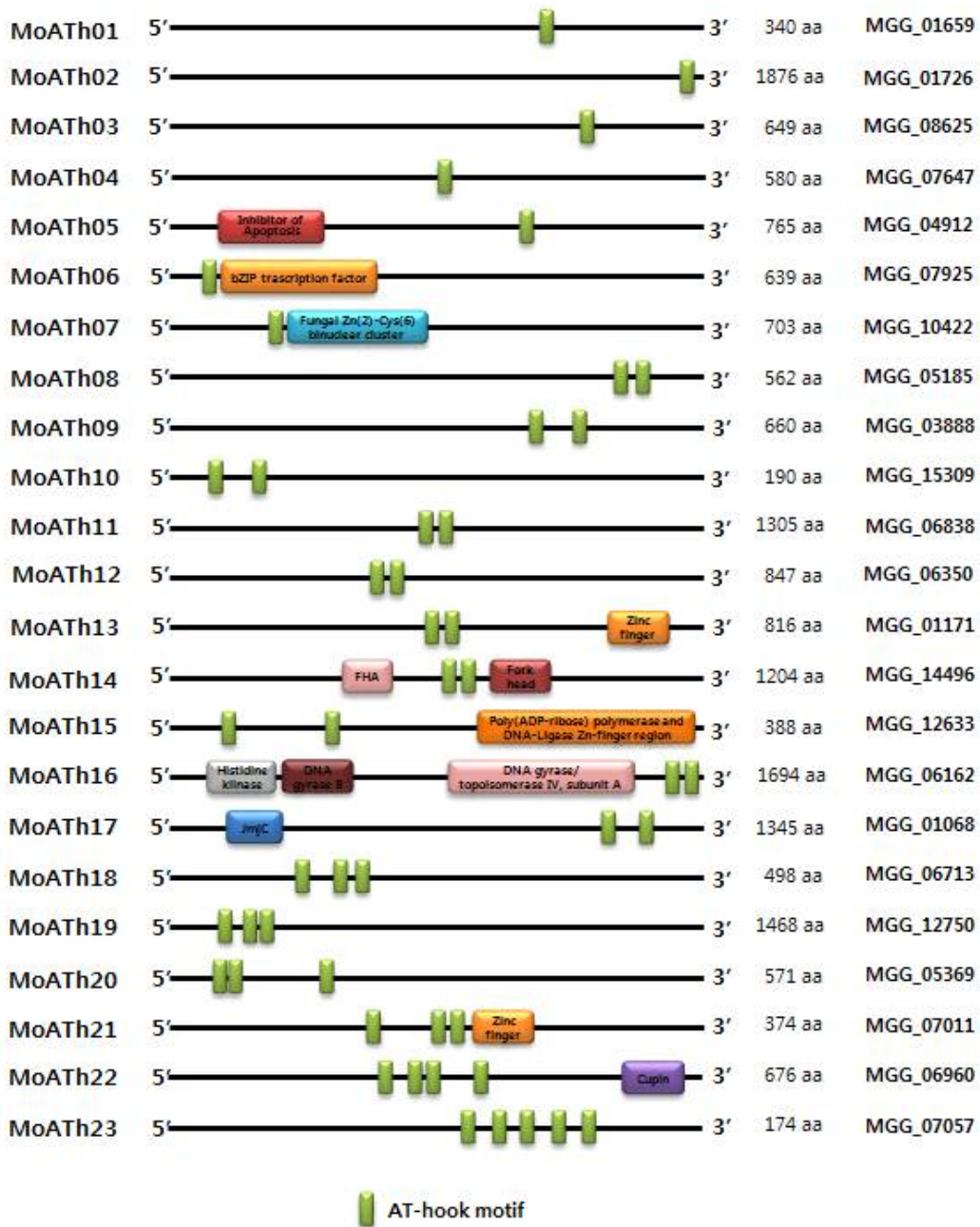


그림 7. 벼도열병균의 AT-hook motif를 갖는 유전자(MoATH)의 도메인 구조.

3) [http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/magnaporthe\\_grisea/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/magnaporthe_grisea/MultiHome.html)

다. 그리고 2개의 motif를 가지는 유전자는 10개로 이 중 다른 도메인을 가지는 단백질은 4개로 나타났다. 3개의 motif를 가지는 유전자는 4개로 다른 도메인을 갖는 유전자는 1개가 있었다. 그리고 4개와 5개의 motif를 갖는 유전자는 1개씩으로 4개의 motif를 갖는 유전자에서 1개의 도메인을 가지고 있었다. 그리고 MoATH 유전자에는 보존적인 아미노산 염기서열로 알려진 RGRP(ARG-Gly-ARG-Pro)가 AT-hook motif 내에 존재하는 것을 확인하였다(그림 8).

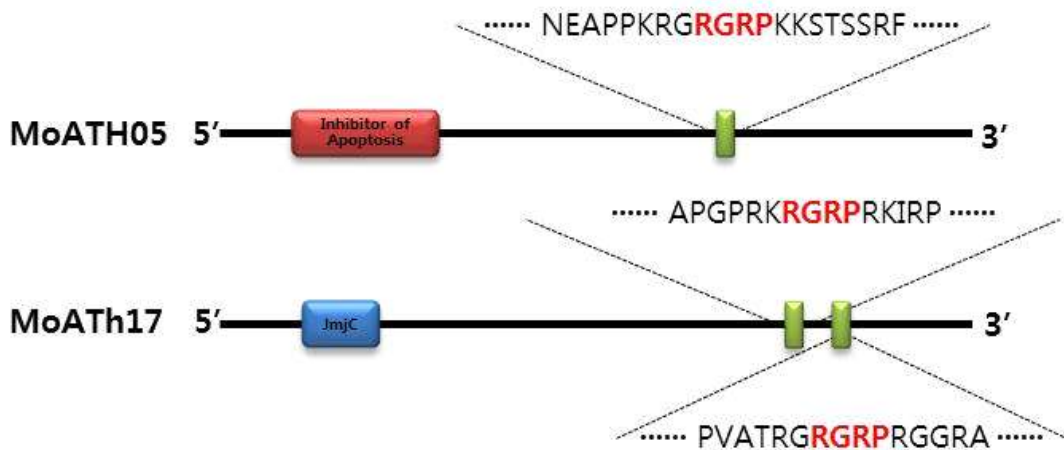


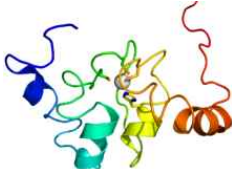
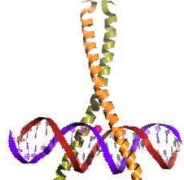
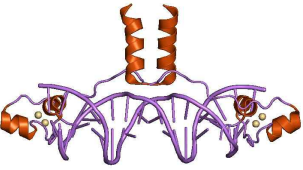
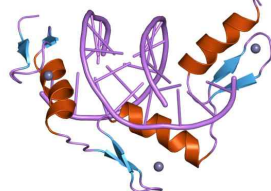
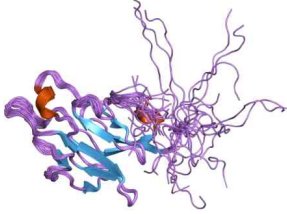
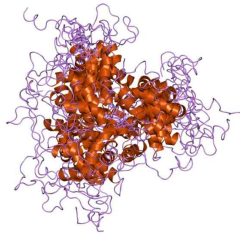
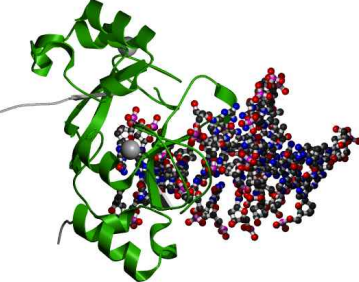
그림 8. MoATH의 AT-hook motif에 존재하는 특이적인 보존 아미노산 염기서열(RGRP).

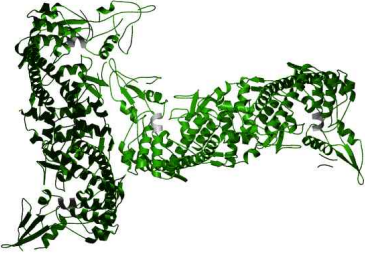
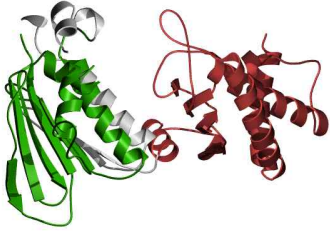
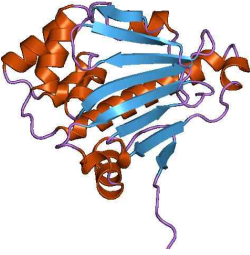
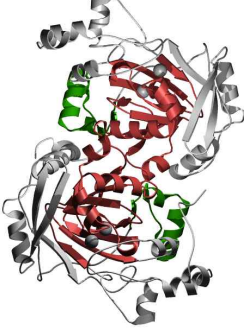
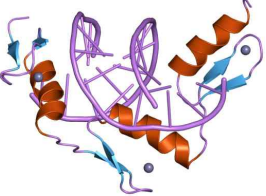
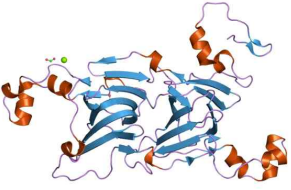
다. AT-hook motif 유전자에 존재하는 다른 motif나 domain에 근거한 기능 예측

‘AT-hook motif’를 지닌 전사조절인자(transcription factor)를 인코딩하는 총 23개의 유전자 GenBank에 blasting을 수행하여 homolog domain을 찾았다. 그리고 Conserved Domain Database와 InterPro Domain Search 방법으로 유전자가 코딩하고 있는 단백질의 sequence에 존재하는 motif나 domain에 근거하여 그 기능을 예측하여 보았다.

그 결과, MoATH05(MGG\_04912)에 포함되어 있는 Inhibitor of apoptosis domain은 세포 사멸이나 사이토카인 생산, 염색체 분리 등에 관련된 단백질들에서 발견되는 구조적인 motif였다. MoATH06(MGG\_07925)에 존재하는 bZIP domain은 진핵생물의 DNA의 결합 단백질에서 발견되는 도메인으로 일부분은 DNA의 결합에 관여하는 서열을 가지며, Leucine zipper 부분은 2개의 DNA 결합 지역을 함께 묶어주는 역할을 하며 전사를 조절한다. MoATH07(MGG\_10422)의 Fungal Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster domain은 한 개 혹은 두 개 이상의 zinc 이온을 포함하고 있는 도메인으로 많은 단백질들의 구조적인 motif이며 특히 transcription factor에서 자주 발견된다. MoATH13(MGG\_01171)이 가지고 있는 Zinc finger, C2H2 type의 도메인은 zinc ion을 바인딩하는 2개의 히스티딘 잔기와 2개의 시트레인 잔기와 상호작용 하며 전사조절인자에서 많이 발견된다. MoATH14(MGG\_14496)의 FHA domain은 포스포펩타이드 인식 도메인이며 많은 조절 단백질에서 발견된다. 포스포트레오닌 함유 에피토프에 특이적이며 포스포타이로신에도 상당한 특이성을 보인다. 그리고 Fork head domain도 전사인자에서 발견되는 도메인으로 DNA에 결합한다. MoATH15(MGG\_12633)의 Poly(ADP-ribose) polymerase and DNA-Ligase Zn-finger

표 3. AT-hook motif를 갖고 있는 유전자가 코딩하고 있는 다른 domain

MoATH (Locus)	Putative structure	domain name	InterPro database
MoATH05 (MGG_04912)		Inhibitor of apoptosis domain (human BIRC2 protein)	IPR001370
MoATH06 (MGG_07925)		bZIP domain (CREB-1 binding to DNA)	IPR011616
MoATH07 (MGG_10422)		Fungal Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster domain (CD2-Gal4)	IPR001138
MoATH13 (MGG_01171)		Zinc finger, C2H2 type (ZIF268)	IPR007087
MoATH14 (MGG_14496)		FHA domain (Ubiquitin ligase protein RNF8)	IPR000253
		Fork head domain (Genesis - Protein Domain)	IPR001766
MoATH15 (MGG_12633)		Poly(ADP-ribose) polymerase and DNA-Ligase Zn-finger region (Human parp-1 zinc finger 2)	IPR001510

		DNA gyrase/topoisomerase IV, subunit A	IPR002205
MoATH16 (MGG_06162)		DNA gyrase B (ParE subunit)	IPR013506
		Histidine kinase-, DNA gyrase B-, and HSP90-like ATPase (HSP90)	IPR003594
MoATH17 (MGG_01068)		JmjC domain	IPR003347
MoATH21 (MGG_07011)		Zinc finger, C2H2 type (ZIF268)	IPR007087
MoATH22 (MGG_06960)		Cupin domain (Oxalate decarboxylase OxdC (YvrK))	IPR006045

region은 Poly(ADP-ribose) polymerase 는 DNA의 피해에 대한 세포반응의 중요한 조절적인 역할을 한다. Poly(ADP-ribose) polymerase의 amino-terminal 지역에는 2개의 PARP-type zinc finger가 있는데 이 지역은 DNA 절단 센서 역할을 한다. MoATH16(MGG\_06162)가 가지고 있는 DNA gyrase/topoisomerase IV, subunit A는 DNA를 분리하고 positive supercoil을 느슨하게 한다. DNA gyrase B는 *E.coli*에서 닫힌 원형 이중 가닥 DNA를 negative supercoil을 이루게 만들어 준다. Histidine kinase-, DNA gyrase B-, and HSP90-like는 진화적으로 보존적인 단백질 도메인으로 일부 ATP-binding 단백질에서 발견된다. MoATH17(MGG\_01068)가 가지고 있는 JmjC domain은 Cupin superfamily에 속하며, 히스톤 modification을 촉매하는 hydroxylase로 작용한다고 예상되어 진다. 마지막으로 MoATH22(MGG\_06960)의 Cupin domain은 보존적인 barrel domain을 포함하며 큰 그룹으로 되어있는 단백질이다(표 3).

공통적으로 AT-hook motif가 포함하고 있는 다른 motif 혹은 domain들은 DNA에 바인딩하거나 구조적인 변화를 통하여 전사를 조절하는 인자로의 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 이는 AT-hook motif와 함께 복합적으로 특정 유전자들의 전사를 조절할 것이라 예상되었다.

## 2. qRT-PCR을 이용한 유전자 발현 조사

선발된 AT-hook motif를 갖는 유전자(MoATH) 23개의 발현 양상을 벼도열병균의 생활사에서 언제 어느 정도 발현하는 지를 조사하기 위하여 23개 유전자에 대한 qRT-PCR을 수행하였다. 이 연구를 수행하기 위하여 그림 9에 나와있는 벼도열병균의 생활사를 대표할 수 있는 군사생장, 포자생성(CO), 포자발아(GR), 부착기형성(AP), 발병(IP) 단계에서 각각 RNA를 추출하였다.

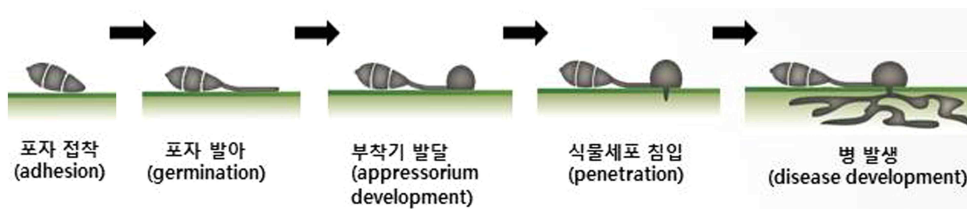


그림 9. 벼도열병균의 생활사.

### 가. 벼도열병균의 발달 단계별 RNA sampling

#### (1) 군사생장 단계에서의 RNA sampling

CM broth (Sucrose 10 g, Yeast extract 6 g, Casamino acid 6 g, 증류수 1 L)에 세균 오염을 없애기 위하여 ampicillin (working solution 100 µg/ml)을 첨가하였다. 그리고 벼도열병균 KJ201 strain을 접종하여 3~4일간 25°C, 200 rpm으로 진탕배양하였다. 군사체가 일정수준 자라면 멸균한 깔대기에 거즈를 얹어 군사체만 획득하였다. 그리고 거즈를 분리하고 페이퍼 타올 위에 올려놓아 물기를 흡수 및 제거시켰다. 충분히 물기가 제거되었으면 호일에 건조된 군사를 감싸서 labeling한 후 액체질소에 넣고 급냉동 시킨뒤 -80°C deep freezer에 보관하고 RNA sample로

사용하였다.

#### (2) 포자생성 단계에서의 RNA sampling

벼도열병균을 Oat Meal Agar(Oat Meal 50 g, Agar 20 g, 증류수 1L)배지에 접종하여 8일 동안 빛조건에서 배양하고 unsealing을 통하여 포자생성을 유도하였다. 포자가 충분히 배양된 9cm plate에 멸균수 10ml을 넣고 e-tube의 뾰족한 부분 또는 cell spreader를 이용하여 포자만 살살 긁어 획득하였다. 획득한 포자현탁액은 Miracloth로 걸러 한데 모아주었다. 50ml tube에 액체질소를 넣고 고농도로 모은 포자현탁액을 pipet으로 한방울씩 drop하여 바로 급냉동 시킨 뒤 남은 액체질소를 모두 기화시키고 뚜껑을 닫아 -80°C deep freezer에 보관하고 RNA sample로 사용하였다.

#### (3) 포자발아 단계에서의 RNA sampling

벼도열병균을 Oat Meal Agar(Oat Meal 50 g, Agar 20 g, 증류수 1L)배지에 접종하여 8일 동안 빛조건에서 배양하고 unsealing을 통하여 포자생성을 유도하였다. 포자가 충분히 배양된 9cm plate에 멸균수 10ml을 넣고 e-tube의 뾰족한 부분 또는 cell spreader를 이용하여 포자만 살살 긁어 획득하였다. 포자 현탁액을 hydrophobic plate에 30~50 $\mu$ l 씩 골고루 분주하고 습실처리를 통하여 상온에서 발아를 유도하였다. 1~2시간 후 현미경으로 확인하고 발아가 진행 되었으면 분주한 포자 현탁액을 회수하여 filter system인 steri cup에 filtering 하여주었다. 물기가 제거된 steri cup membran을 칼로 잘라내어 호일에 감싸서 액체질소에 넣어 급냉동 시켰다. 이 후 -80°C deep freezer에 보관하고 RNA sample로 사용하였다.

#### (4) 부착기 생성 단계에서의 RNA sampling

벼도열병균을 Oat Meal Agar(Oat Meal 50 g, Agar 20 g, 증류수 1L)배지에 접종하여 8일 동안 빛조건에서 배양하고 unsealing을 통하여 포자생성을 유도하였다. 포자가 충분히 배양된 9cm plate에 멸균수 10ml을 넣고 e-tube의 뾰족한 부분 또는 cell spreader를 이용하여 포자만 살살 긁어 획득하였다. 포자 현탁액을 hydrophobic plate에 30~50 $\mu$ l 씩 골고루 분주하고 습실처리를 통하여 상온에서 발아를 유도하였다. 6시간 후 현미경으로 확인하고 부착기가 형성되었으면 포자 현탁액을 회수하여 filter system인 steri cup에 filtering 하여주었다. 물기가 제거된 steri cup membran을 칼로 잘라내어 호일에 감싸서 액체질소에 넣어 급냉동 시켰다. 이 후 -80°C deep freezer에 보관하고 RNA sample로 사용하였다.

#### (5) 발병 단계에서의 RNA sampling

벼도열병균을 Oat Meal Agar(Oat Meal 50 g, Agar 20 g, 증류수 1L)배지에 접종하여 8일 동안 빛조건에서 배양하고 unsealing을 통하여 포자생성을 유도하였다. 포자가 충분히 배양된 9cm plate에 멸균수 10ml을 넣고 e-tube의 뾰족한 부분 또는 cell spreader를 이용하여 포자만 살살

굽어 획득하였다. 벼도열병균의 포자현탁액을 miracloth로 거르고 농도를  $1 \times 10^5$  spores/ml 로 맞추었다. 그리고 250ppm 농도의 Tween20를 섞어 3~4주 가량 키운 벼(품종: 낙동벼)에 골고루 spray접종하고 23°C, 70% 이상 고습도의 식물배양기에서 day-16 hr, dark-8 hr의 주기로 하여 발병을 유도하였다. 접종 후 약 6일 후 병징이 관찰되면 멸균된 가위로 발병부위만 잘라내어 은박지에 싸서 액체질소에 넣고 급냉동 시킨뒤 -80°C deep freezer에 보관하고 RNA sample로 사용하였다.

## 나. RNA의 추출 및 cDNA합성

### (1) RNA의 추출

각 단계별로 얻어진 RNA sample을 이용하여 RNA를 추출하였다. RNA의 추출방법은 easy-spin™(DNA free) Total RNA Extraction Kit (Intron, Korea)에 기술된 방법에 따라 다음과 같이 수행하였다. 막자사발과 스푼에 RNase-away 처리하고 증류수로 헹구어 다른 RNA의 오염으로부터 방지하였다. 그리고 물기를 완전히 제거하여 냉동실에 넣어두었다. 그리고 준비된 RNA sample tissue를 막자사발에서 액체질소를 넣어가며 갈아주었다. 그리고 잘 갈린 tissue powder는 2ml tube에 넣고 Lysis buffer 1ml을 넣고 vortex하였다. 이 후 Chloroform 200 $\mu$ l 넣고 vortex 한 뒤 4°C, 13,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하고 나온 상층액 700~800 $\mu$ l를 새 1.5ml tube로 옮겨주었다. 그리고 400 $\mu$ l의 binding buffer를 넣고 2~3번 inverting하여 잘 섞어주고 1분 간 실온에 두었다. 그리고 column으로 800 $\mu$ l만 옮겨 13,000 rpm에 30초 동안 원심분리하여 밑에 빠져나온 용액은 버려주었다. 그리고 한 번 더 돌려 말려주었다. Washing buffer A 700 $\mu$ l를 column에 넣고 4°C에서 13,000rpm으로 30초 동안 원심분리하여 빠진 용액은 버리고, Washing buffer B 700 $\mu$ l를 column에 넣고 동일조건으로 원심분리하여 빠진 용액은 제거하였다. 그리고 한번 더 1~2분 동안 13,000 rpm으로 원심분리를 하여 membran을 건조시켜 주었다. 건조시킨 column을 새 1.5ml tube로 옮기고 50 $\mu$ l의 elution buffer를 membran위에 넣어주고 1분 동안 기다린 뒤 4°C, 13,000rpm에 1분동안 원심분리하여 RNA를 얻었다. 얻어진 RNA는 농도 및 purity를 확인하고 labeling하여 -80°C deep freezer에 보관하며 연구에 사용하였다.

### (2) cDNA의 합성

qRT-PCR을 진행하기 위하여 각 단계별 cDNA를 합성하였다(그림 10). cDNA의 합성은 SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, USA)을 사용하였다. 먼저 각 단계별로 얻어진 RNA를 5  $\mu$ g의 농도와 oligo(dT)20 Primer 1  $\mu$ l, 10 mM dNTP mix 1  $\mu$ l, DEPC-treated water up to 10  $\mu$ l로 맞추고 잘 섞어준 다음 65 °C에서 5분 동안 반응한 뒤 최소 1분 동안 얼음에 넣어주었다. 그리고 그 Mixture에 10X RT buffer 2  $\mu$ l, 25mM MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ l, 0.1 M DTT 2  $\mu$ l, RNaseOUT™(50U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, SuperScriptR III RT(200 U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l를 넣고 잘 섞은 뒤 간단히 spin-down 시켰다. 그리고 50°C에서 50분, 85°C에서 5분 동안 반응시킨 뒤 바로 얼음으로 옮겨 식혀주었다. 그리고 간단히 spin-down 해준뒤 1  $\mu$ l의 RNase H를 넣어 37°C에서 20분 동안 반응시켰다. 이렇게 합성된 cDNA는 -20°C로 냉동보관하며 연구에 사용하였다.

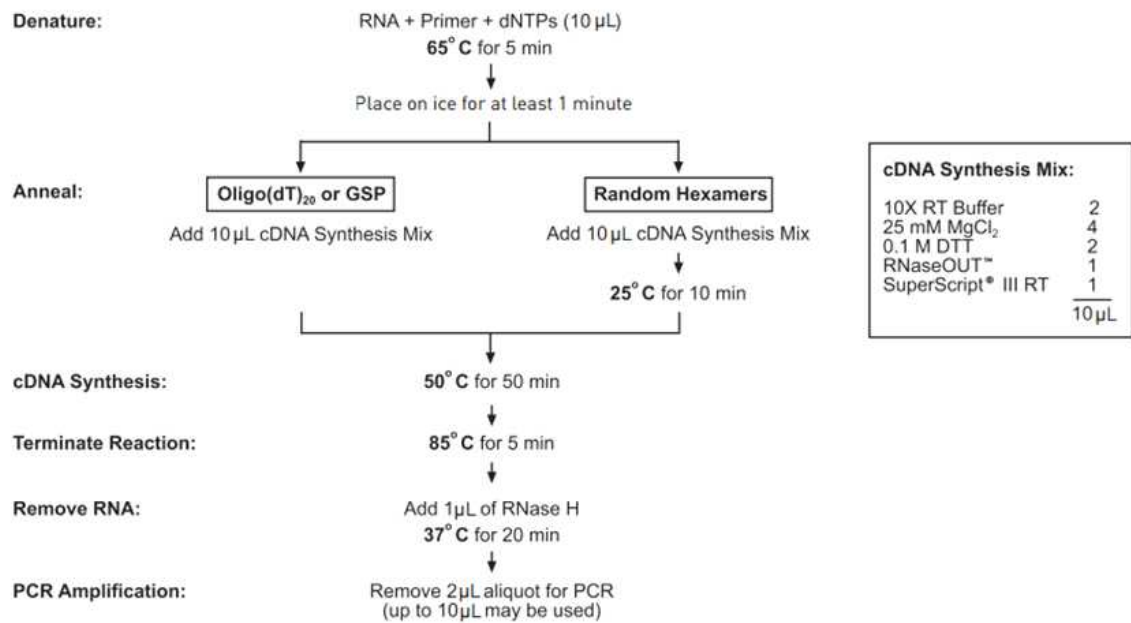


그림 10. SuperScript® III First-Strand Synthesis System을 이용한 cDNA 합성.

(3) quantitative real-time RT-PCR을 이용한 유전자 발현 조사

벼도열병균의 각 4단계, 군사생장, 포자생성(CO), 포자발아(GR), 부착기형성(AP), 발병(IP) 단계에서 동정된 23개의 AT-hook motif를 갖는 전사조절인자를 인코딩하는 유전자들의 발현 양상을 알아보기 위하여 qRT-PCR을 수행하였다. 먼저 각 유전자별로 gene-specific primer와 각 단계별 발현에 큰 변화가 없는 house keeping gene으로  $\beta$ -tubulin primer를 제작하였다. 그리고 qRT-PCR은 Rotor-Gene®Q (Qiagen, USA)를 사용하였으며, Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied biosystems, USA)의 SYBR green을 사용하였다. PCR 조건은 95°C에서 10분 초기 Denaturation을 진행하고 Denaturation 95°C에서 15초, Annealing 55°C에서 15초, Extension 72°C에서 15초의 조건으로 40 cycles 동안 실행하였다(표 4). 그리고 threshold cycle(Ct) 평균값에서  $\beta$ -tubulin의 Ct 평균값을 빼주고 군사 생장 단계의 Ct값을 기준으로 놓아 이에 대한 상대적인 값으로 유전자 발현양을 비교하였다.

표 4. 유전자 발현 양상 비교를 위한 quantitative real-time RT-PCR 조건

Step	Hold	PCR		
		40 cycles		
		Denature	Anneal	Extend
Temp.	95°C	95°C	55°C	72°C
Time	10 min	15 sec	15 sec	15 sec
Volume	15 µl			



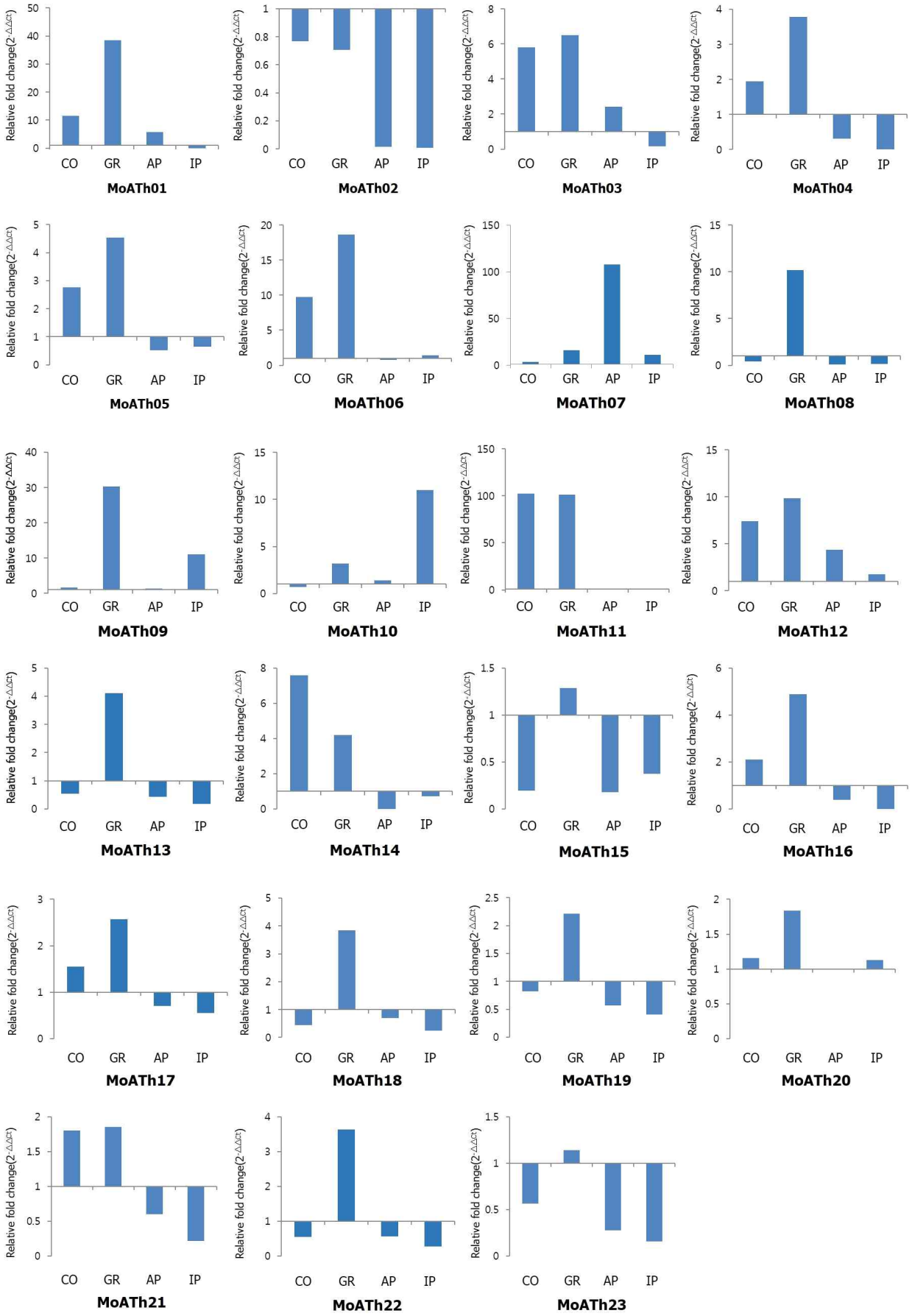


그림 11. 벼도열병균 23개의 AT-hook motif를 갖는 유전자의 발현양상.

표 5. quantitative real-time RT-PCR 분석에 사용된 primer 목록

Oligo NAME	Scale	Purification	SEQUENCE (5' --> 3')
MoAth01_qRTF	25 nmole	Bio-RP	CAGTCAGTTGCGGCTAGG
MoAth01_qRTR	25 nmole	Bio-RP	CCACTCACAGGGCGATTT
MoAth02_qRTF	25 nmole	Bio-RP	CATCGACTCCCAGGCTTTTC
MoAth02_qRTR	25 nmole	Bio-RP	CACGTCTCCAGCGTCATC
MoAth03_qRTF	25 nmole	Bio-RP	GAGGAGGGACAACGGAATG
MoAth03_qRTR	25 nmole	Bio-RP	CAGCTGTGCTCGCTTGA
MoAth04_qRTF	25 nmole	Bio-RP	CACCACCTCACAGCTCATATC
MoAth04_qRTR	25 nmole	Bio-RP	GAGCCAGTAGCTCGACTTTC
MoAth05_qRTF	25 nmole	Bio-RP	CGCCACCATCGTCAAGAA
MoAth05_qRTR	25 nmole	Bio-RP	TGATAGACGGGCGGGATAG
MoAth06_qRTF	25 nmole	Bio-RP	CCACTTCTTACCGACACATTCT
MoAth06_qRTR	25 nmole	Bio-RP	CAGGATTCATGTGCCCAACTA
MoAth07_qRTF	25 nmole	Bio-RP	CTCGCCGATAATGCCCTATAC
MoAth07_qRTR	25 nmole	Bio-RP	GATCTGCAGAGACTCGTTGAC
MoAth08_qRTF	25 nmole	Bio-RP	ACAAATAGCAGACCCGACATAC
MoAth08_qRTR	25 nmole	Bio-RP	GCAGCCACCTCCCAATC
MoAth09_qRTF	25 nmole	Bio-RP	CCCAGAGCAAAGCCTAAA
MoAth09_qRTR	25 nmole	Bio-RP	CGGCAGAGTCGTTCTCTAATATG
MoAth10_qRTF	25 nmole	Bio-RP	CCCAGAGCAAAGCCTAAA
MoAth10_qRTR	25 nmole	Bio-RP	CGGCAGAGTCGTTCTCTAATATG
MoAth11_qRTF	25 nmole	Bio-RP	GTCGCTTGTGTCCTACCTAAA
MoAth11_qRTR	25 nmole	Bio-RP	CGCAGACTCGGGATCAAC
MoAth12_qRTF	25 nmole	Bio-RP	AGCCTGGTCCGGTATCTC
MoAth12_qRTR	25 nmole	Bio-RP	GATCGAGGCCCATGTTGTC
MoAth13_qRTF	25 nmole	Bio-RP	GATGGTGCCGAGGAAGATG
MoAth13_qRTR	25 nmole	Bio-RP	CTGATCTTGATGGGTTTGAGGA
MoAth14_qRTF	25 nmole	Bio-RP	GGAAGCGCTGGTTCTCTC
MoAth14_qRTR	25 nmole	Bio-RP	CCCTCTGCCTGCTCAATC
MoAth15_qRTF	25 nmole	Bio-RP	CCCAGAGTCGAGGAAGATA
MoAth15_qRTR	25 nmole	Bio-RP	CTTCTGCCGTCGGTCTTT
MoAth16_qRTF	25 nmole	Bio-RP	GGCGACTACGACTACCTTCTA
MoAth16_qRTR	25 nmole	Bio-RP	GCCTCGAGCTGCTTCTTC
MoAth17_qRTF	25 nmole	Bio-RP	CTGTCTCGTCTAGTTCCGTTTC
MoAth17_qRTR	25 nmole	Bio-RP	GGGACCTGGGTTAGCTTTG
MoAth18_qRTF	25 nmole	Bio-RP	GCGCGGTCATGGAAGAA
MoAth18_qRTR	25 nmole	Bio-RP	GTCATCCTGTCTCTTGGAATG
MoAth19_qRTF	25 nmole	Bio-RP	CGACGCGCACGTTTAATG
MoAth19_qRTR	25 nmole	Bio-RP	CTGGCGAAGTGAGGATGAG
MoAth20_qRTF	25 nmole	Bio-RP	GCAAGGTTGTAGCGTCAAATG
MoAth20_qRTR	25 nmole	Bio-RP	CTGTGGCTGTTCCCTTGATAG
MoAth21_qRTF	25 nmole	Bio-RP	CAGGTGACGCCTTGATAAA
MoAth21_qRTR	25 nmole	Bio-RP	CGCTGTTGTCTCCATCCTC
MoAth22_qRTF	25 nmole	Bio-RP	GAGGGCGAGGACGTAGTA
MoAth22_qRTR	25 nmole	Bio-RP	TCCAGTTCCAAAGAAGGGTAAG
MoAth23_qRTF	25 nmole	Bio-RP	AGAGGACGATGACGAGGAG
MoAth23_qRTR	25 nmole	Bio-RP	CATCGAGGAGTGAATCGATGG

23개의 AT-hook motif를 갖는 전사조절인자를 인코딩하는 유전자들의 발현 양상을 비교해본 결과 공통적으로 포자가 식물에 접촉하여 발아하는 초기에 대부분 유전자들의 발현이 증가하는 양상을 보였다. 이들 중 포자 생성과정에서 발현이 크게 증가한 유전자는 MoATH11, MoATH21 유전자가 있었다. 발아과정에서 발현이 크게 증가하는 유전자는 MoATH09, MoATH13, MoATH16, MoATH17, MoATH18, MoATH22 유전자가 있었다. 그리고 MoATH10 유전자는 감염된 식물 단계에서의 발현이 크게 증가하는 특이적인 결과를 보였다(그림 11). 이들 중에서 AT-hook motif의 기능과 다른 도메인들과의 연관성을 알아보기 위하여 AT-hook motif만 가지고 있는 MoATH08, MoATH11, MoATH13 유전자와 추가적으로 다른 도메인을 가지고 있지만 비교적 연구가 되지 않은 다른 도메인을 가지고 있는 MoATH07(Fungal zn(2)-cys(6) binuclear cluster), MoATH17(JmjC), MoATH22(Cupin)를 선발하여 총 6개 유전자에 대한 결실돌연변이체 생성을 시도하였다.

## 제 2 절 유전자결실돌연변이체 생성

### 1. 베타열병균 KJ201의 원형질체 제작

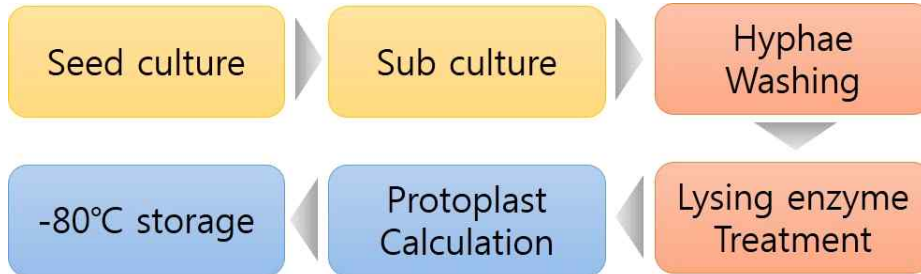


그림 12. 베타열병균 KJ201의 원형질체 제작의 모식도.

베타열병균 AT-hook motif를 갖는 23개의 유전자 결실돌연변이체를 생성하기 위하여 원형질체(protoplast)를 제작하였다. 먼저 OMA plate에 베타열병균 KJ201을 접종하여 포자유도 배양하였다. 포자가 자라면 멸균수를 첨가하여 포자를 긁어 포자 현탁액을 만들고 거즈로 걸러 주었다. 거른 포자현탁액은 ampicillin이 첨가된 CM broth 배지에서 암조건으로 25C, 200 rpm에서 2~3일간 배양하였다. 2~3일간 자란 균사현탁액을 새로만든 CM broth 배지에 잘게 갈아 재접종하여 주고 25C, 200 rpm, 암조건에서 1-2일 배양하였다. 배양된 균사현탁액에서 mesh에 걸러 균사를 얻고 20% sucrose로 2~3차례 washing하여 주었다. 20% sucrose 10ml에 Lysing enzyme (from *Trichoderma harzianum*, Sigma, USA) 1g을 미리 녹여놓고 washing된 균사체에 넣고 2~4 시간동안 천천히 shaking incubation하였다(그림 12).

배양 2시간째부터 현미경 관찰을 통하여 protoplasting상태를 관찰하였으며, 80% 이상이 진행되었을 때 원심분리를 통해 protoplast를 얻고 1×STC buffer (sucrose 20%, 1M Tris-HCl 100 ml, 1M CaCl<sub>2</sub> 100 ml, 증류수 1L) 10 ml에 녹여주었다. 그리고 다시 한 번 거즈로 걸러 깔끔하게 진행된 protoplast만 얻을 수 있었다. 이 후에 hemocytometer를 이용하여 5 x 10<sup>7</sup> protoplast/ml 농도(그림 13)로 맞추고 -80°C deep freezer에 보관하여 이 후 연구수행에 사용하였다.

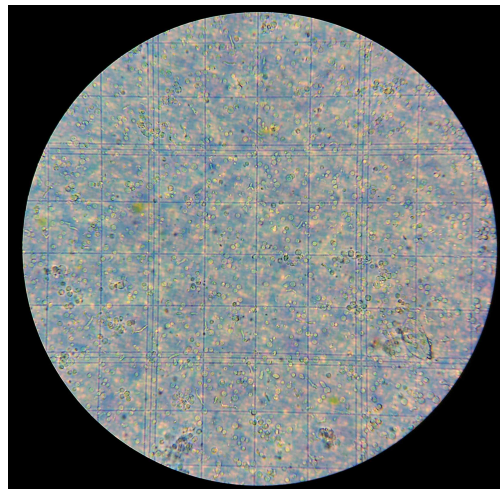


그림 13. 제작된 protoplast. (×400)

## 2. 결실돌연변이체를 생성하기 위한 construct 제작

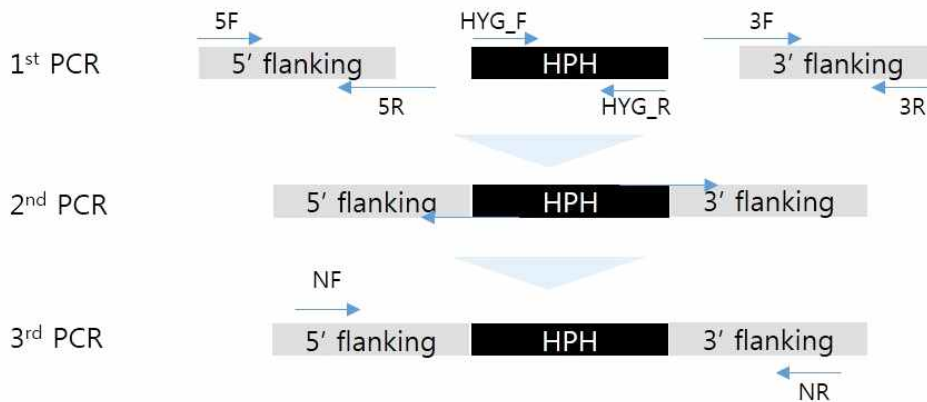


그림 14. 결실돌연변이체를 생성하기 위한 construct 제작.

결실돌연변이체를 생성을 위하여 6개의 선발된 유전자들의 construct을 제작하였다. 먼저 1<sup>st</sup> PCR을 진행하였다(그림 14). 대상 유전자 왼쪽에 약 1~1.5 kb의 5' flanking sequence와 오른쪽에 약 1~1.5 kb의 3' flanking sequence를 증폭하고 pBCATPH에 있는 hygromycin cassette인 HPH유전자를 각각 5F~5R, 3F~3R, HYG\_F~HYG\_R primer를 이용하여 증폭하였다. 증폭된 산물을 전기영동하고 Gel elution을 통해 DNA를 정제하였다(그림 15). Gel elution은 MEGAquick-spin™ Total Fragment DNA Purification Kit (iNtRON, Korea)을 사용하였으며, 매뉴얼 방법에 따라 실험을 진행하였다. 그리고 overlapping PCR 방법을 이용하여 5' flanking - HPH - 3' flanking의 construct을 만들어주었다. 각 3개의 eluted DNA 산물을 한 tube에 넣고 표 6와 같은 조건으로 2<sup>nd</sup> PCR을 진행하였다. 다음 3<sup>rd</sup> PCR은 Nested PCR로 construct을 NF~NR 프라이머로 대량 증폭하여 형질전환에 이용할 수 있는 농도를 만들어 준다. 마지막으로 Gel elution을 통하여 purification해주었다. 이 실험에서 PCR polymerase는 Pfu Plus 5x PCR Premix (elpis, Korea)를 이용하여 PCR에서 생길 수 있는 error율을 낮추었다.

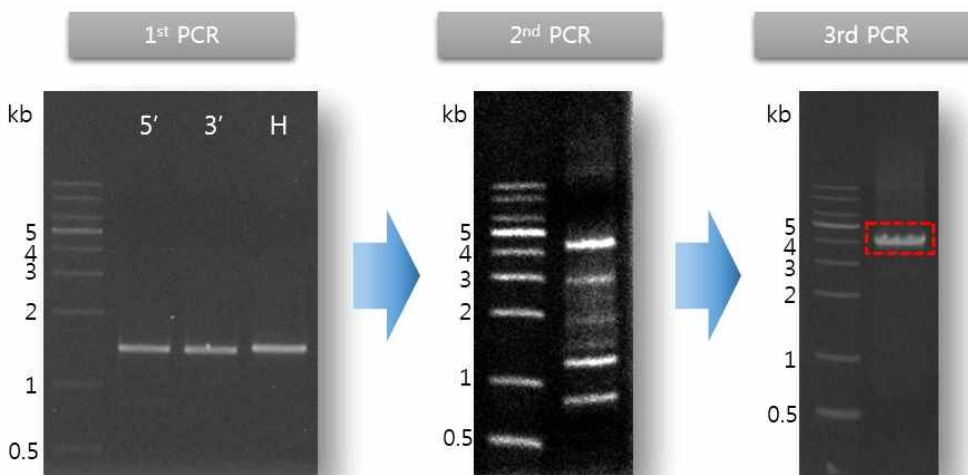


그림 15. 결실돌연변이체를 생성하기 위한 construct 제작을 위한 PCR과정.

표 6. construct 제작에 사용된 PCR 조건

Step		Pfu polymerase Hold	PCR		
			30 cycles		
			Denature	Anneal	Extend
1 <sup>st</sup> PCR	Temp.	95°C	95°C	55°C	72°C
	Time	3 min	20 sec	20 sec	1 min
	Volume	20 µl			
2 <sup>nd</sup> PCR	Temp.	95°C	95°C	52°C	72°C
	Time	3 min	20 sec	20 sec	20 sec
	Temp.	-	95°C	52°C	72°C
	Time		20 sec	20 sec	3 min
	Volume	20 µl			
3 <sup>rd</sup> PCR	Temp.	95°C	95°C	55°C	72°C
	Time	3 min	20 sec	20 sec	3 min
	Volume	50 µl			

3. homology-dependent gene replacement 방법에 의한 형질전환

결실돌연변이체를 생성하기 위하여 homology-dependent gene replacement 방법을 사용하였다(그림 16). 이 방법은 대상 유전자를 hygromycin cassette로 특이적으로 치환하는 방법으로 먼저 제작된 construct 5 µg과 같은 양의 2×STC buffer (sucrose 40%, 1M Tris-HCl 100 ml, 1M CaCl<sup>2</sup> 100ml, 증류수 up to 1L)를 섞고 만들어놓은 protoplast를 넣어 25°C에서 10분 동안 반응시킨다. 그리고 Poly ethylene glycol을 넣고 25°C에서 20분 동안 반응시켜 형질전환을 유도하였다. 이 후에 TB3 broth (sucrose 10 g, yeast extract 6 g, casamino acid 6 g) 배지를 첨가한 뒤 6시간 동안 천천히 shaking incubation하였다. 6시간 후에 굳지않은 0.8% TB3 agar (sucrose 10 g, yeast extract 6 g, casamino acid 6 g, agar 8 g)에 hygromycin B (CALBIOCHEM®, Germany) 400 ppm과 형질전환 중인 protoplast를 넣고 잘 흔들어 분주하여 굳혀주었다. 3-4일 후에 TB3-hyg agar 선택배지에서 자라는 candidate colony들을 확인하고 새로운 TB3-hyg agar 배지로 옮겨주었다.

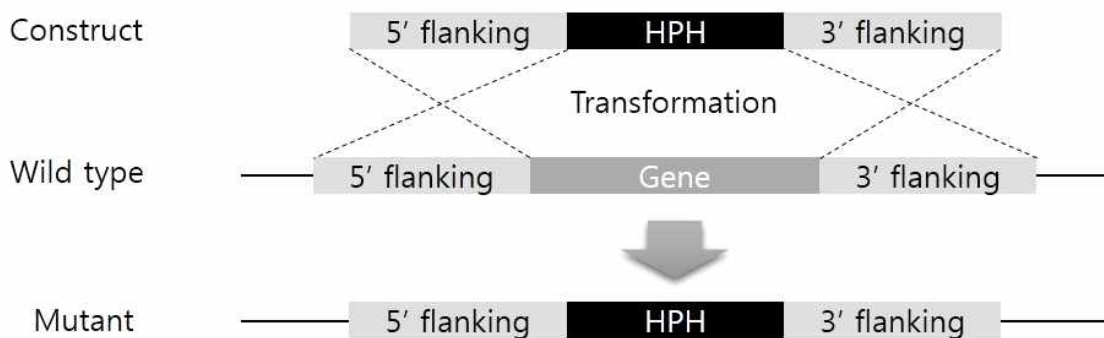


그림 16. homology-dependent gene replacement 방법에 의한 형질전환.

표 7. AT-hook motif를 갖는 유전자들의 결실돌연변이체 생성에 사용된 primer 목록

Oligo NAME	SEQUENCE (5' --> 3')
MoATh07_5F	CCCTGTTCCATAGACTCACCTGAA
MoATh07_5R	CCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCCGGGAGGACAACCTGCTCAGTTATAGA
MoATh07_3F	GTTGGTGTGCGATGTCAGCTCCGGAGGTTTCATTCATCAACGGTCGTCTCG
MoATh07_3R	ACTTATGCGACCGAGATGGTGGAT
MoATh07_NF	TTGGCATCTCCATTCTTGTGCAGC
MoATh07_NR	TGAGTTTCGAGCATCCATCAGCCT
MoATh07_SF	CCTAGTCTGTAAACACCGCCAGT
MoATh07_SR	TGGTCAATTCCACCTTGCCACGA
MoATh07_PF	CCTGAATGCACGTCGAGTAG
MoATh07_PR	GGATTGGCCCAACCTGATAG
MoATh13_5F	AAGCTGCAGATCAAGGTCGACAAC
MoATh13_5R	CCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCCTGGTTTCGGTGACCAAGAAATGGC
MoATh13_3F	GTTGGTGTGCGATGTCAGCTCCGGAGTACGCCTTCACATTGTCTCGCTCT
MoATh13_3R	TGCCCATGCTGTGGACAGGAAATA
MoATh13_NF	CAACACCGATATCGCCAACAACCT
MoATh13_NR	TTGCCGAGCCTCCTTGATAGGAAA
MoATh13_SF	AGGAGCTTTCTCACCAGGGTCAAT
MoATh13_SR	CTGGCTGGAGGGCTAATAATCTGA
MoATh13_SF(2)	CGAGGTGCCTGTTGTGATGCAAAT
MoATh13_SR(2)	TGACCTCCAGAGGCATGAAACGAT
MoATh13_PF	TGCGGCTAACAGCGTTCAAGT
MoATh13_PR	ACGCGAGCCATTTGCATCACAA
MoATh13_PF(2)	CAGTACTGCCGATGGCTTAT
MoATh13_PR(2)	GCTCCTGTGGGTCTTTCTATC
MoATh08_5F	CGTCCTCAGTGAGCGGTTTCATATT
MoATh08_5R	CCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCCTGCCAGTTGATTGGATCGAGAGA
MoATh08_3F	GTTGGTGTGCGATGTCAGCTCCGGAGAACAACGGTCATTGTGCGTGATGC
MoATh08_3R	AGGATGTGCGATCGATAGGACGCA
MoATh08_NF	AATACACAGCAGCGAAAGGTCGGT
MoATh08_NR	AACCCAAGCAACCAAGGTCCTAAC
MoATh08_SF	GAATTCCTGGCGTGTAATGGGAG
MoATh08_SR	TGCCCTAAATCAGGTCATGTGGCT
MoATh08_PF	TCGGAGTTCAACTGCTCGATCCAA
MoATh08_PR	TAACCCAGGTAAGCCGTTCAACCA

MoAth11_5F	GGTTGCAGATGATGCTACAAATG
MoAth11_5R	CCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCCCAACATCTGATGCGACTATAGGG
MoAth11_3F	GTTGGTGTGCGATGTCAGCTCCGGAGTATCGCGGAAGGGAGAGAAA
MoAth11_3R	GCGGGGAAGAGAACAATCTCG
MoAth11_NF	GGTTGCAGATGATGCTACAAATG
MoAth11_NR	CGCCAAATCCTCCAGAACAA
MoAth11_SF	CCACACCACCTAGACCTACTAA
MoAth11_SR	CCCGGAGTTCGGGAAATAATC
MoAth17_5F	CCCAGAGGTCATTGATGGTG
MoAth17_5R	CCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCCTGGTACGGAGTACGACTTGA
MoAth17_3F	GTTGGTGTGCGATGTCAGCTCCGGAGTAATGAGGAAAGCCGGACTATG
MoAth17_3R	GTTATGGCGCCACTTGAATAAA
MoAth17_NF	CATAGGGAACCCAGGACTTTG
MoAth17_NR	CACCATTCTCCCTTTCATCTT
MoAth17_SF	ATCCGATTGTCAAGTCGTAICT
MoAth17_SR	CATAGTCCGGCTTTCCTCATT
MoAth17_PF	GCCGTATTGTGACCTGAAA
MoAth17_PR	CAAGGAGGACCTGCTCAATAAG
MoAth22_5F	AAGAACCGCTCCAGCTTT
MoAth22_5R	CCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCCGCTCGTGATTGCAAGGTATTG
MoAth22_3F	GTTGGTGTGCGATGTCAGCTCCGGAGGTTGGTCTGGTTGACGGATAA
MoAth22_3R	AGTCAAGTACAGCATCGGATTT
MoAth22_NF	CCTGTGCGTTGAGGTTGTA
MoAth22_NR	TCTGGCCCTCCCTCATTAT
MoAth22_SF	GACTGTTGTTCTCGCGTAGG
MoAth22_SR	GGTAAACAAGAATTGGGCGTAAA
MoAth22_PF	TTTGTTACTATTTCTCCTGGCA
MoAth22_PR	TGCAAGGTATTGTCGCAA
MoAth07D_5F	CCATTTGCAGTTTGGTGACATTT
MoAth07D_5R	CCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCCCTCCAAAGTCCATGTTCCATGAT
MoAth07D_3F	GTTGGTGTGCGATGTCAGCTCCGGAGGATGCTTTGTCAGATCCTCGAA
MoAth07D_3R	CATGCACTACCTAAAGCCTCTC
MoAth07D_NF	CCAAGGTAGGTACACACTTCTT
MoAth07D_NR	GAAAGAGAAAGAGAGAAAGCCAAG
MoAth07D_SF	CCGATCAACACAAGCATCAAC
MoAth07D_SR	GGTGATGAAGGAGAGGAAAGAC
MoAth07D_PF	CCTATGCTACGTACCTCCACTA
MoAth07D_PR	TGATCTTCATCCGAGTCCAAAC



#### 4. 결실돌연변이체 screening

##### 가. Mutant candidate quick DNA extraction

형질전환을 하여 TB3-hyg agar 배지에서 자란 candidate colony 유전자결실돌연변이체를 screening primer를 이용하여 Multiplex PCR로 검정하였다. PCR을 진행하기 위해서 수백개의 candidate colony들의 DNA를 추출하였다(그림 17). 균체가 들어있는 tube에 DNA extraction buffer (1M Tris-HCl pH8.0 10%, 0.5M EDTA pH8.0 2%, KCl 74.5 g, 증류수 1 L) 500 $\mu$ l를 넣고 갈아준다. 그리고 5,000 rpm에 10분 원심분리를 하고 상층액을 새 tube에 옮겨 isopropanol 300  $\mu$ l를 넣고 inverting한 뒤 -20 $^{\circ}$ C에서 20분 이상 놓아둔다. 이후에 4 $^{\circ}$ C에 10,000 rpm, 10분 동안 원심분리를 진행하면 tube 밑에 DNA pellet이 관찰된다. 상층액은 따라 버리고 70 % EtOH로 washing을 한 뒤 말려준다. 그리고 TE buffer (10 mM Tris-Hcl pH 7.5, 1 mM EDTA)를 50  $\mu$ l를 넣고 65  $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 두거나 4  $^{\circ}$ C에서 overnight하여 pellet을 잘 녹여준다. 잘 녹은 DNA는 Multiplex PCR에 사용하였으며 사용한 polymerase는 고감도, 고효율성을 위하여 TaKaRa Ex Taq(Takara, Japan)을 사용하였다.

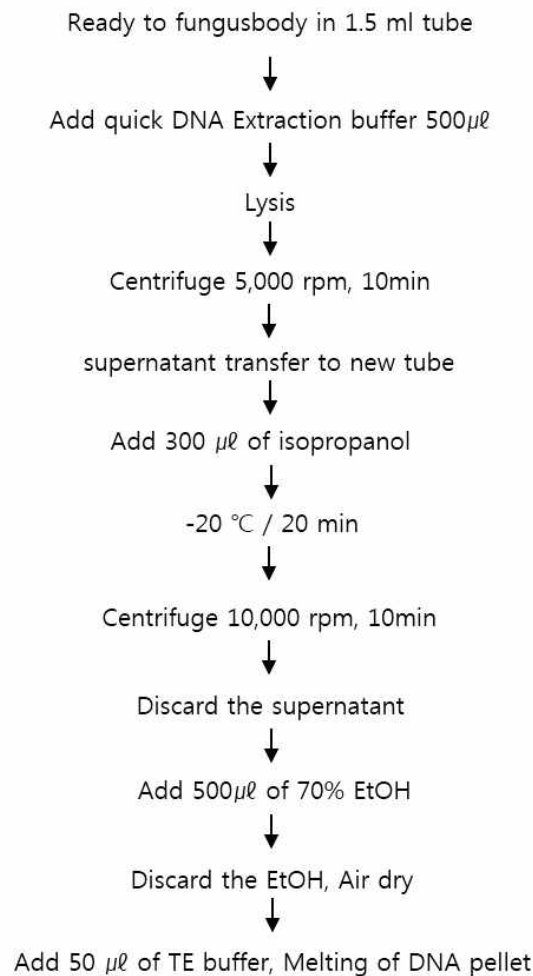


그림 17. quick DNA extraction method.

나. Multiplex PCR을 이용한 결실돌연변이체 screening

(1) MoA<sub>Th07</sub>(MGG\_10422)

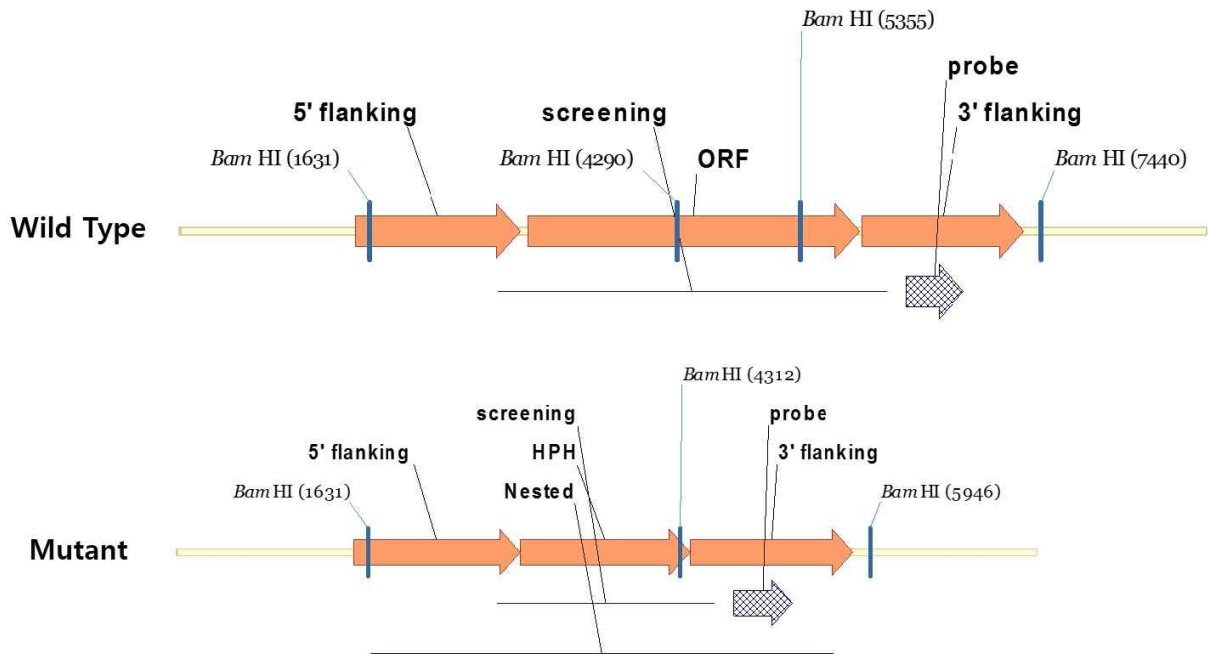


그림 18. MoA<sub>Th07</sub> 유전자의 wild-type과 mutant construct.

MoA<sub>Th07</sub>(MGG\_10422)의 결실돌연변이체 생성을 위하여 표 7의 프라이머를 이용하여 construct을 제작하고 총 4번의 형질전환을 하였다(그림 18). 그리고 약 500 여개의 candidate의 DNA를 추출하였다. 그리고 screening primer를 이용하여 Multiplex PCR을 진행하였다(그림 19). 그 결과 2개의 Mutant candidate을 찾아내어 반수체(haploid)인 포자를 한 개 분리하여 southern blotting을 진행하였다.

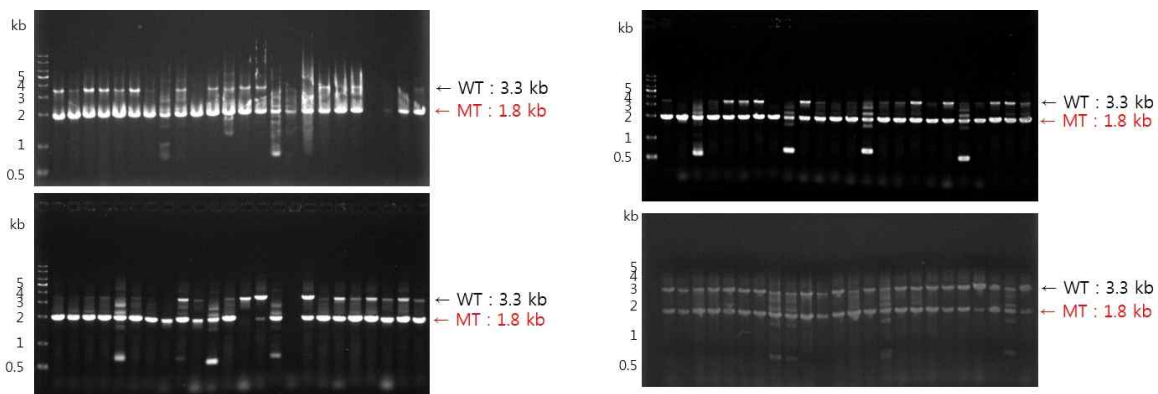


그림 19. MoA<sub>Th07</sub> mutant candidate의 Multiplex PCR Screening.

(2) MoATh08(MGG\_05185)

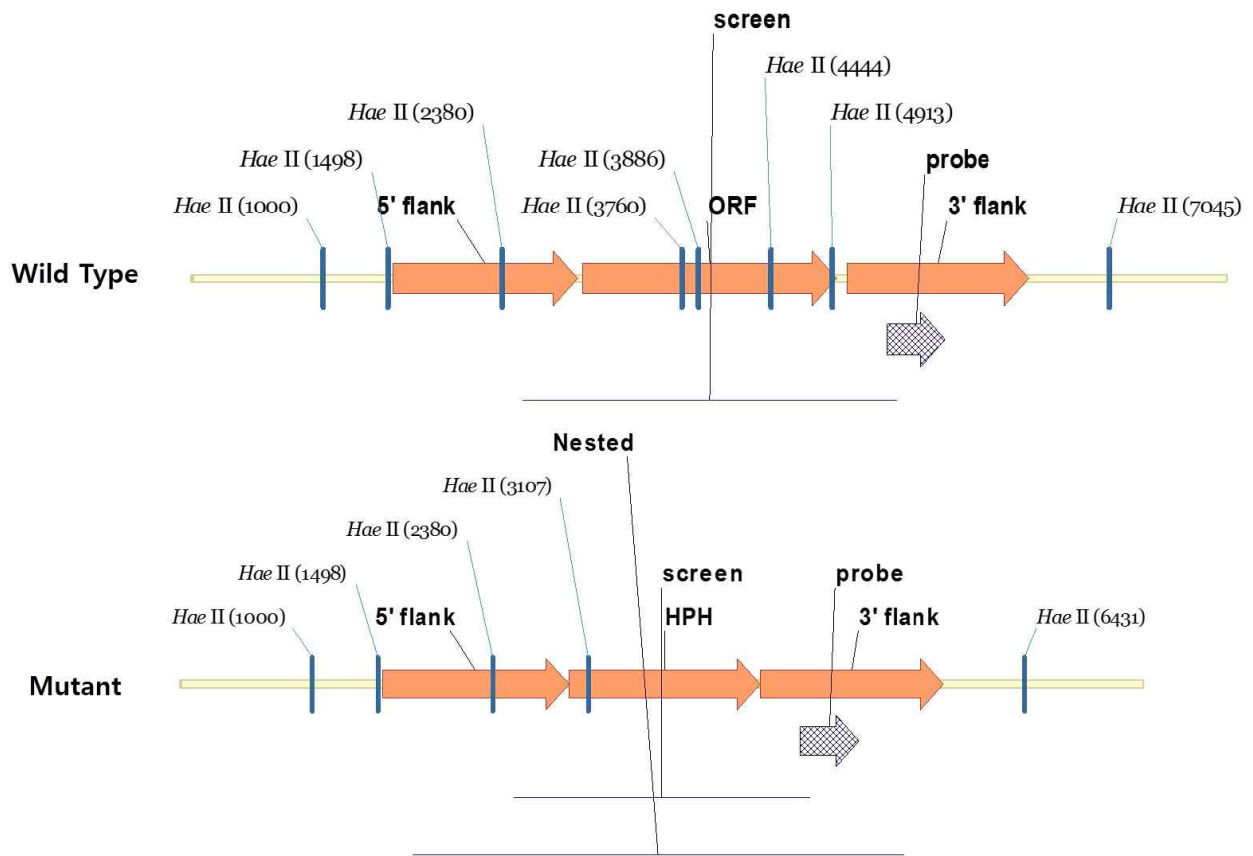


그림 20. MoATh08 유전자의 wild-type과 mutant construct.

MoATh07(MGG\_10422)의 결손돌연변이체 생성을 위하여 표 7의 프라이머를 이용하여 construct을 제작하고 총 4번의 형질전환을 하였다(그림 20). 그리고 약 500 여개의 candidate의 DNA를 추출하였다. 그리고 screening primer를 이용하여 Multiplex PCR을 진행하였다(그림 21). 그 결과 1개의 Mutant candidate을 찾아내어 반수체(haploid)인 포자를 한 개 분리하여 southern blotting을 진행하였다.

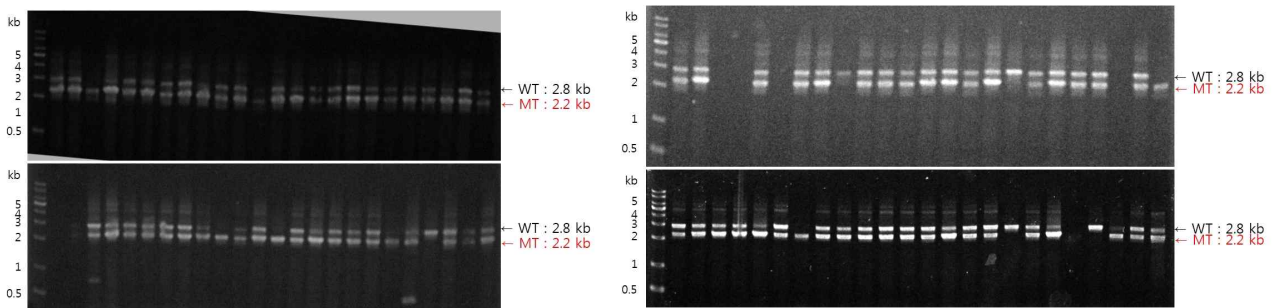


그림 21. MoATh08 mutant candidate의 Multiplex PCR Screening.

(3) MoATh11(MGG\_06838)

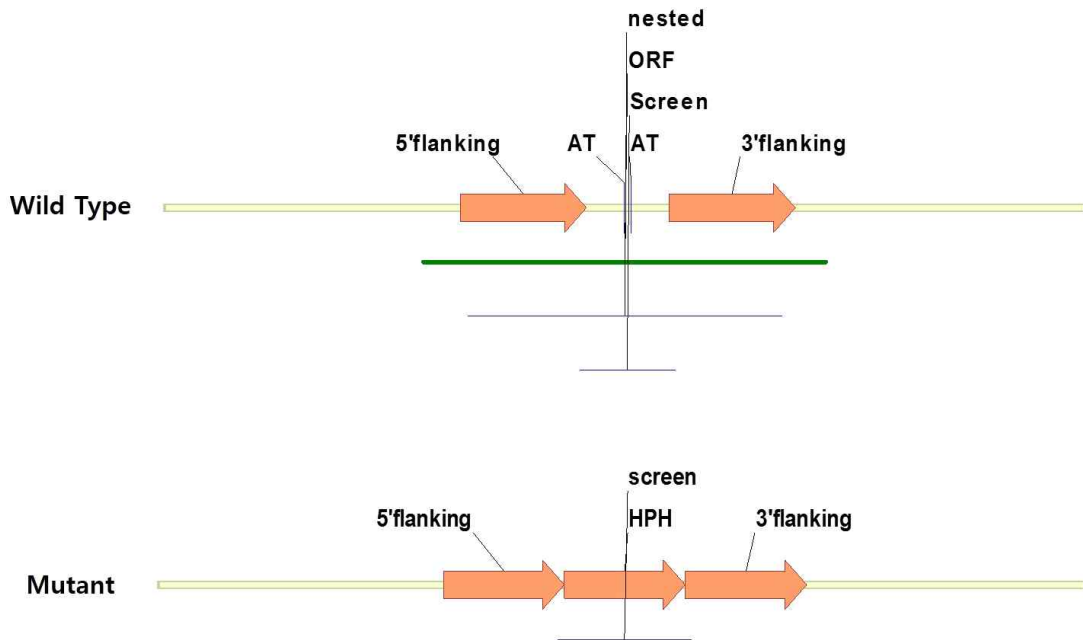


그림 22. MoATh11 유전자의 wild-type과 mutant construct.

MoATh11(MGG\_06838)의 결손돌연변이체 생성을 위하여 표 7의 프라이머를 이용하여 construct을 제작(그림 22)을 하려고 시도하였으나, 1차 PCR의 5' flanking과 3' flanking 약 1.5 kb 정도의 원하는 size의 band를 얻을 수 없어서 더 이상 진행을 할 수 없었다(그림 23). 프라이머를 재주문하여 시도할 예정이었으나, 다른 유전자들의 candidate이 나와서 추후 연구에 진행하기로 하였다.

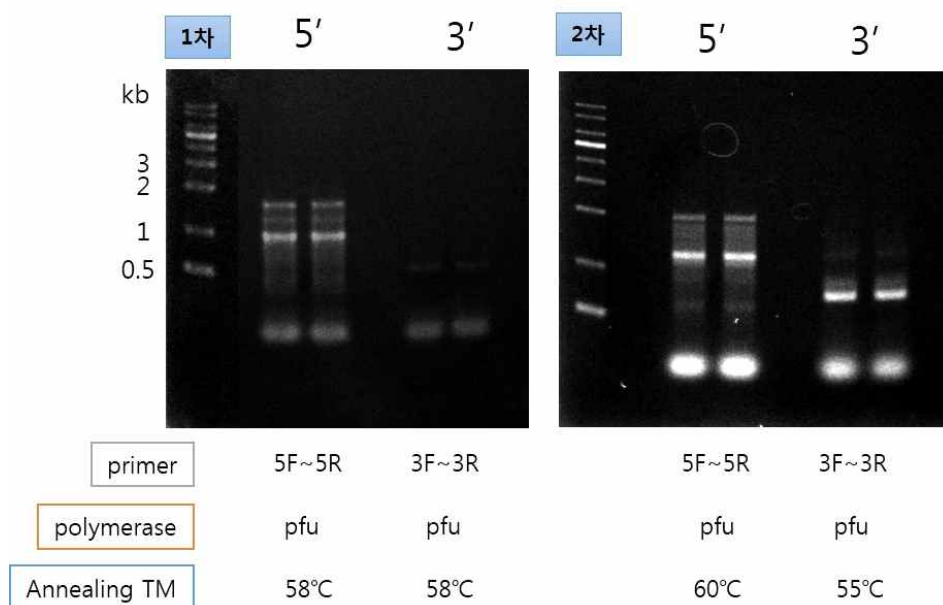


그림 23. MoATH11의 2번에 걸친 1<sup>st</sup> PCR결과.

(4) MoAth13(MGG\_01171)

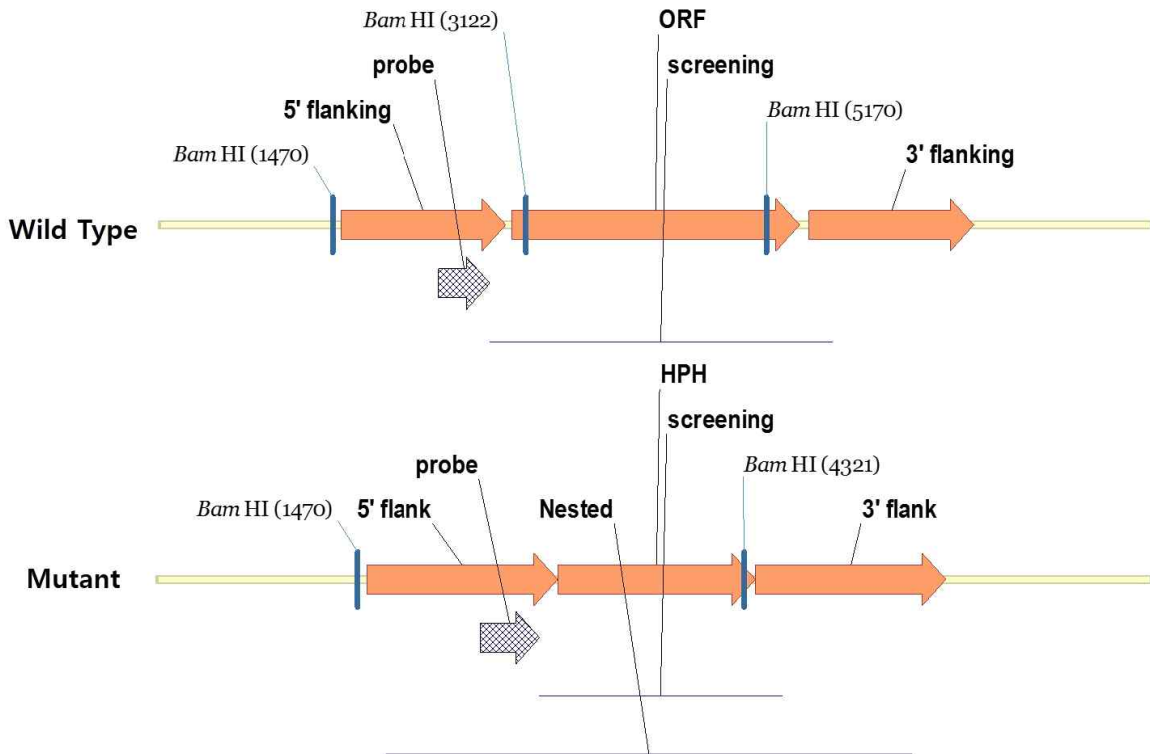


그림 24. MoAth13 유전자의 wild-type과 mutant construct.

MoAth13(MGG\_01171)의 결손돌연변이체 생성을 위하여 표 7의 프라이머를 이용하여 construct을 제작하고 총 5번의 형질전환을 하였다(그림 24). 그리고 총 800 여개의 candidate colony의 DNA를 추출하여 Multiplex PCR로 screening을 진행하였다(그림 25). 그 결과 3개의 Mutant candidate을 찾아내어 반수체 (haploid)인 포자를 한 개 분리하여 southern blotting을 진행하였다.

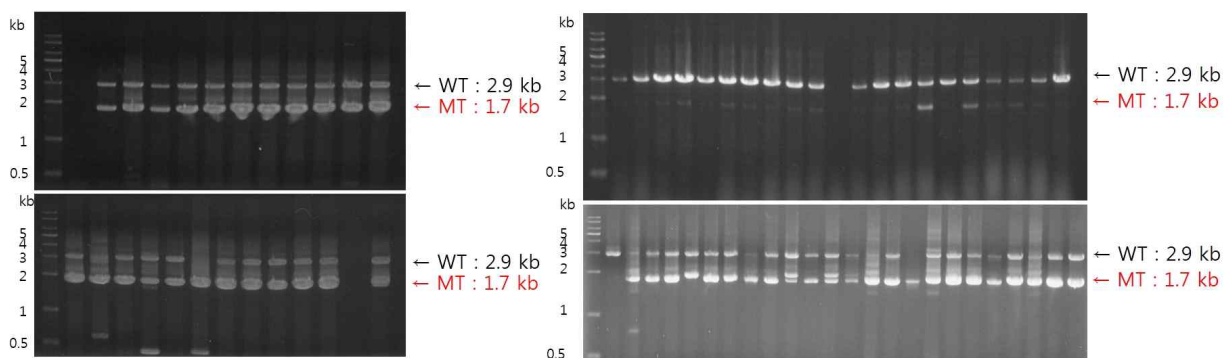


그림 25. MoAth13 mutant candidate의 Multiplex PCR Screening.

(5) MoA<sub>Th</sub>17(MGG\_01068)

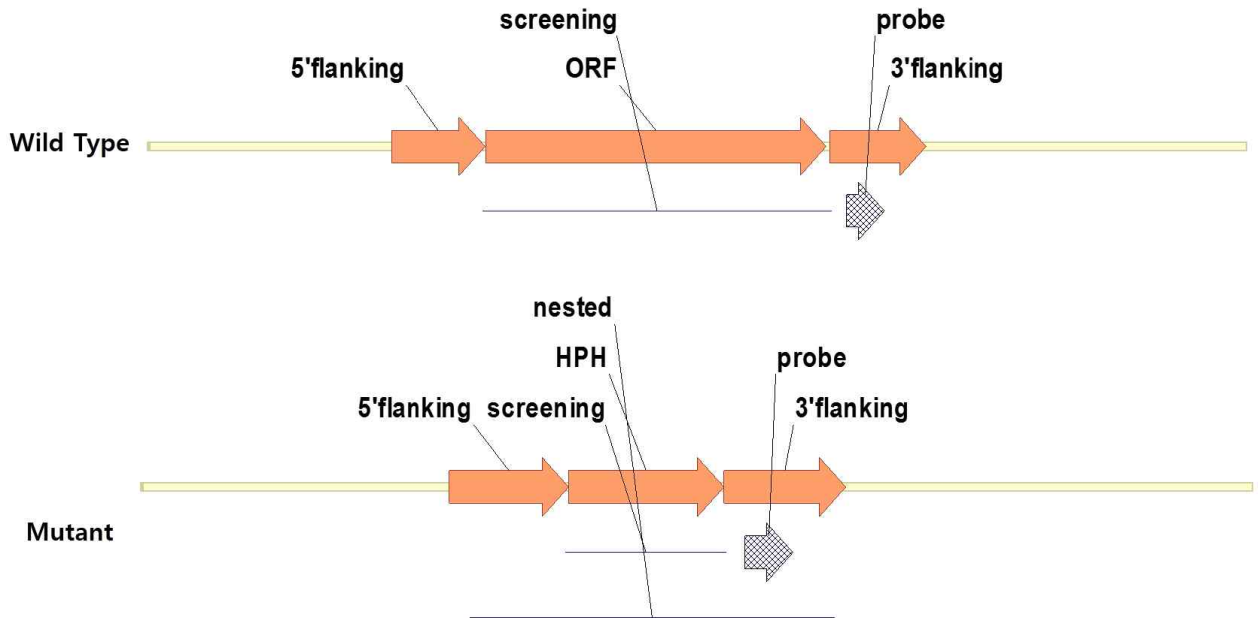


그림 26. MoA<sub>Th</sub>17 유전자의 wild-type과 mutant construct.

MoA<sub>Th</sub>17(MGG\_01068)의 결손돌연변이체 생성을 위하여 표 7의 프라이머를 이용하여 construct을 제작하고 총 3번의 형질전환을 하였다(그림 26). 그리고 총 400 여개의 candidate colony의 DNA를 추출하여 Multiplex PCR로 screening을 진행하였다(그림 27). 그 결과 아직까지 Mutant candidate을 찾지 못하였다. 따라서 추가적으로 형질전환을 진행 중에 있다.

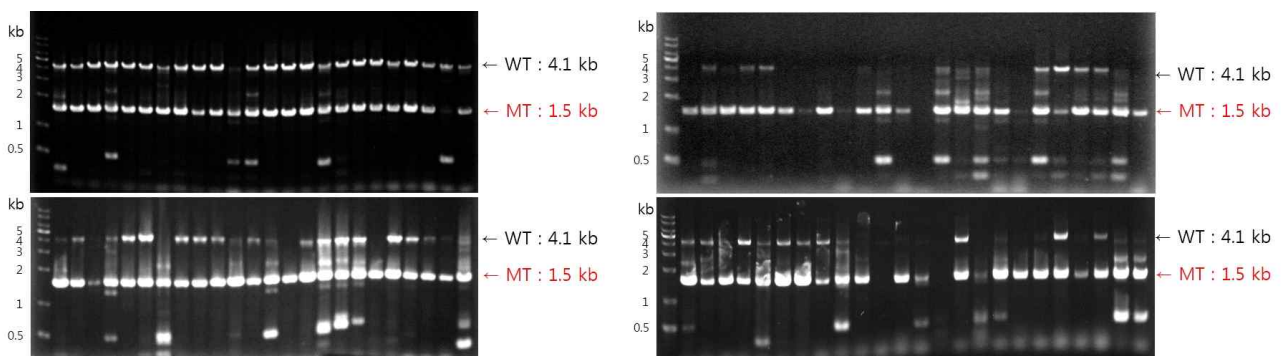


그림 27. MoA<sub>Th</sub>17 mutant candidate의 Multiplex PCR Screening.

(6) MoA<sub>Th22</sub>(MGG\_06960)

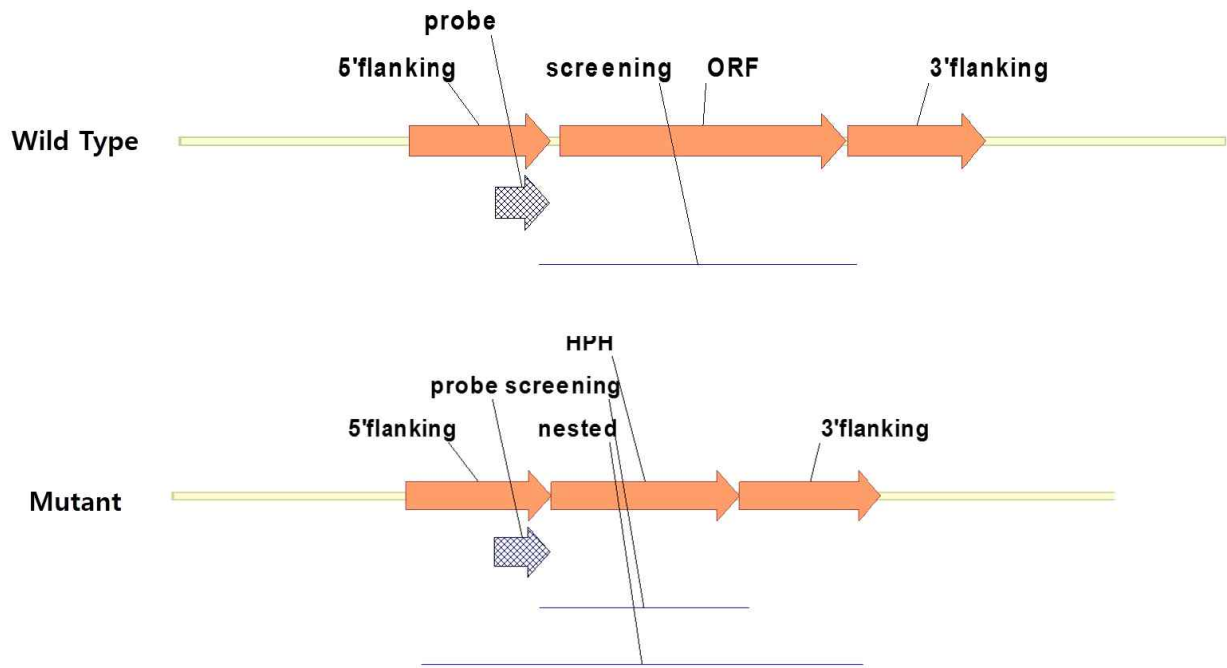


그림 28. MoA<sub>Th22</sub> 유전자의 wild-type과 mutant construct.

MoA<sub>Th22</sub>(MGG\_06960)의 결손돌연변이체 생성을 위하여 표 7의 프라이머를 이용하여 construct을 제작하고 총 2번의 형질전환을 하였다(그림 28). 그리고 총 400 여개의 candidate colony의 DNA를 추출하여 Multiplex PCR로 screening을 진행하였다(그림 29). 그 결과 3개의 Mutant candidate을 찾아내어 반수체 (haploid)인 포자를 한 개씩 분리하여 southern blotting을 진행하였다.

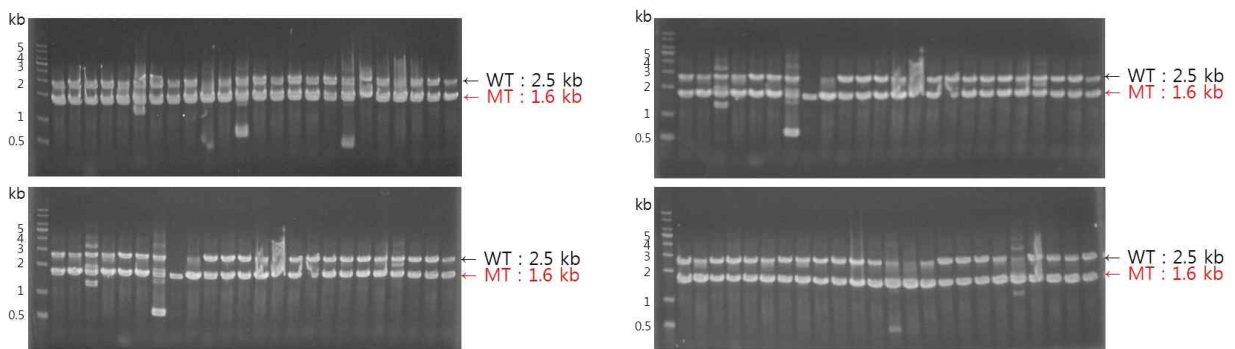


그림 29. MoA<sub>Th22</sub> mutant candidate의 Multiplex PCR Screening.

(7) MoATh07(MGG\_10422) domain deletion

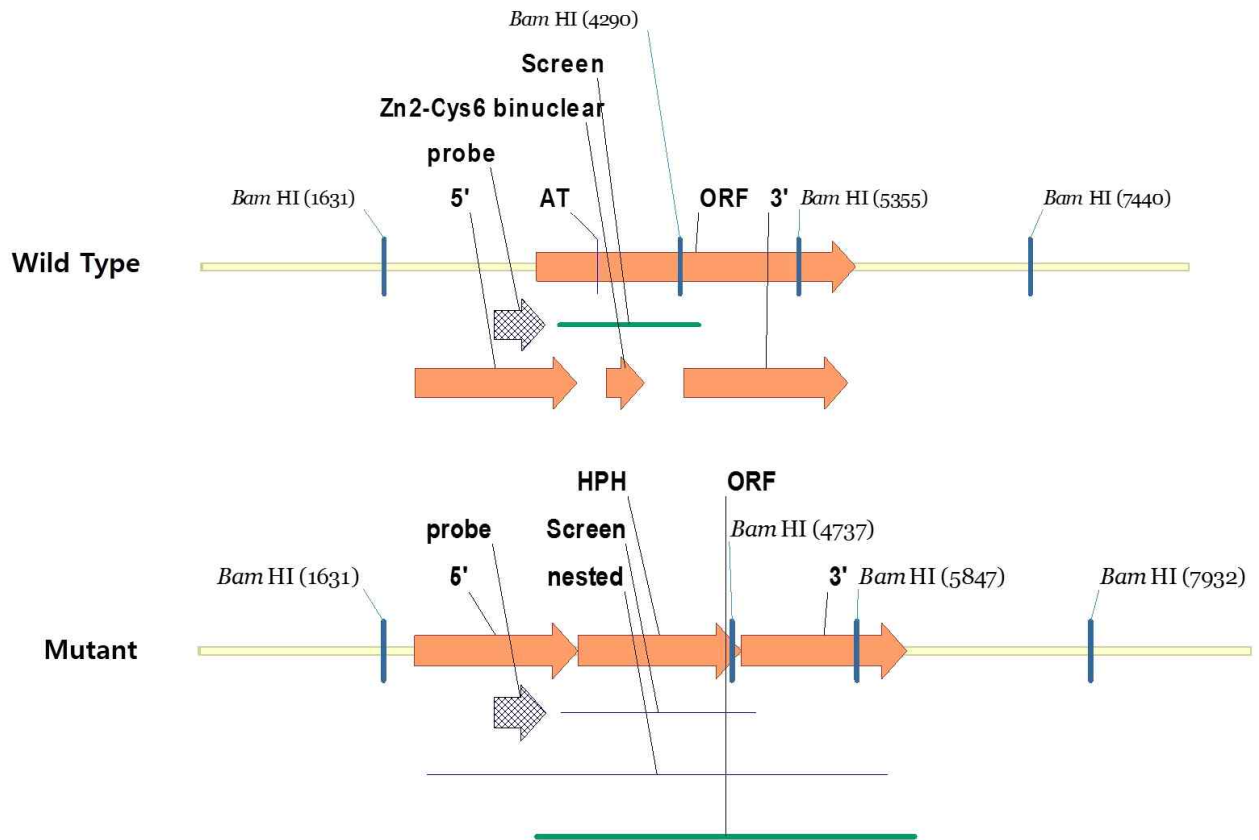


그림 30. MoATh07 Domain deletion의 wild-type과 mutant construct.

AT-hook motif를 갖는 전사인자의 candidate mutant를 얻기가 쉽지 않았다. 따라서 ORF 전체가 아닌 AT-hook motif와 추가 도메인 Zn2-Cys6 binuclear를 knock-out하는 전략으로 결손 돌연변이체 생성을 진행하였다(그림 30). MoATh07(MGG\_10422) domain deletion 결손돌연변이체 생성을 위하여 표 7의 프라이머를 이용하여 construct을 제작하고 총 2번의 형질전환을 하였다. 그리고 총 400 여개의 candidate colony의 DNA를 추출하여 Multiplex PCR로 screening을 진행하였다(그림 31). 그 결과 2개의 Mutant candidate을 찾아내어 반수체(haploid)인 포자를 한 개씩 분리하여 southern blotting을 진행하였다.

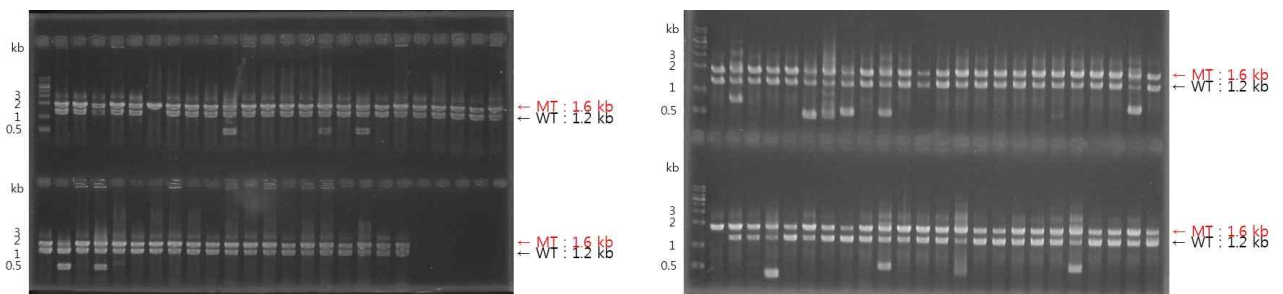


그림 31. MoATh07 Domain deletion mutant candidate의 Multiplex PCR Screening.



나. Southern blotting을 이용한 결실돌연변이체 screening

Multiplex PCR로 확인된 mutant candidate들의 copy 수 및 ectopic 여부를 알아보기 위하여 southern blotting을 진행하였다(그림 32). 본 연구에서는 P-32 방사선 동위원소를 이용한 표지화합물의 사용을 자제하여, 잠재적인 위험성을 제거하고 P-32를 대체하여 비방사선 화합물인 biotin을 이용하여 핵산표지(probe labelling)을 수행하였다(그림 33). 먼저 southern용 gel을 제작하여 제한효소로 처리된 wild-type과 mutant candidate의 DNA를 전기영동하고 겔상에 존재하는 DNA를 membrane으로 옮겨주었다(그림 34). 그리고 바이오틴과 probe를 결합시키고 hybridization과정을 거쳐 chemiluminescence에서 노출시켜 확인하였다.

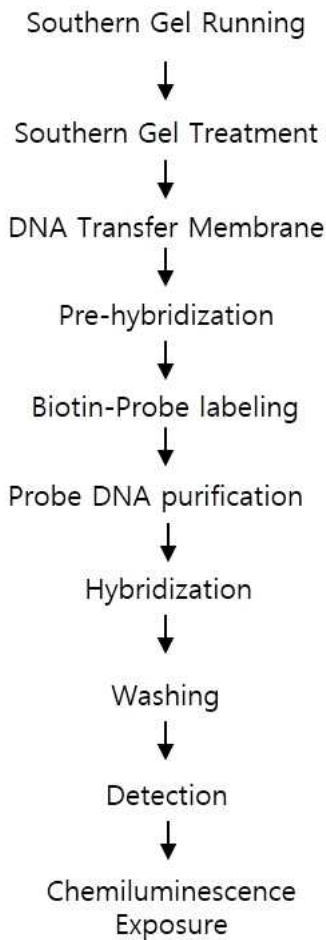


그림 32. southern blotting 과정.

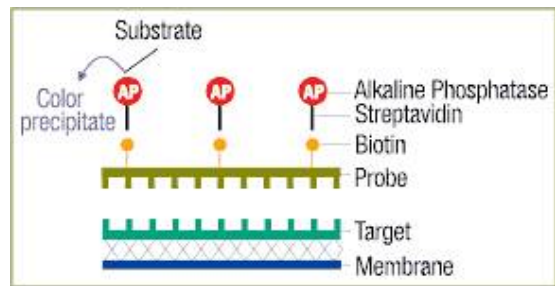


그림 33. Chromogenic detection of a biotin-labeled probe.

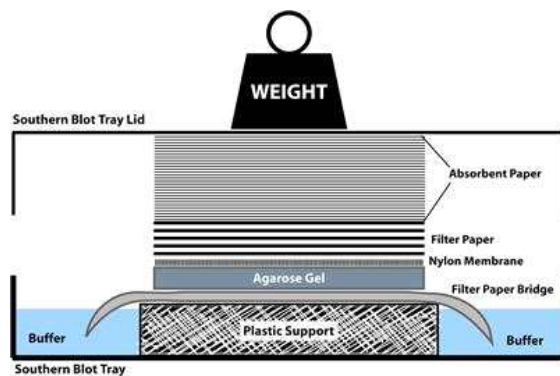


그림 34. southern blotting을 이용한 DNA transfer 과정.

(1) MoATh07(MGG\_10422)

MoATh07 유전자의 multiplex PCR로 screening된 mutant candidate 2개에 대하여 southern blotting을 실시하였다. 그 결과 wild-type과 mutant size가 모두 발견이 되고 다른 non-specific band들이 관찰이 되어 최종적으로 mutant가 아닌 것으로 결정하였다(그림 35).

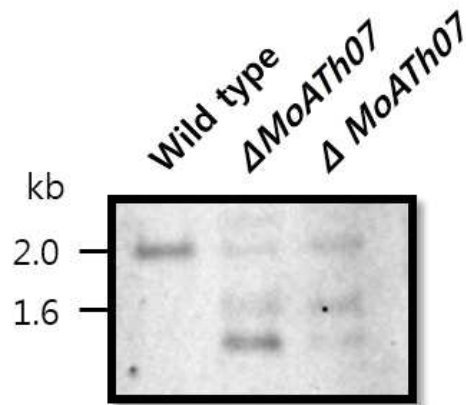


그림 35. MoATh07 mutant candidate의 southern blot 결과.

(2) MoATh08(MGG\_05185)

MoATh08 유전자의 multiplex PCR로 screening된 mutant candidate 1개에 대하여 southern blotting을 실시하였다. 그 결과 mutant construct이 원하는 size에 1 copy 들어간 것을 확인하여 결손돌연변이체 생성에 성공하였다(그림 36).

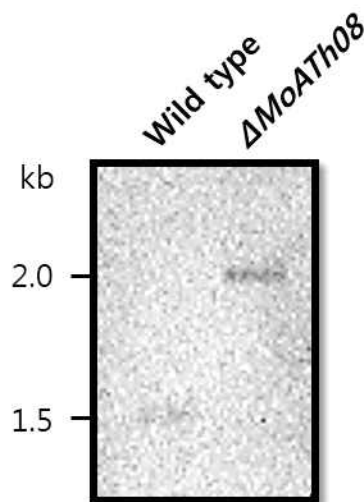


그림 36. MoATh08 mutant candidate의 southern blot 결과.

(3) MoATh13(MGG\_01171)

MoATh13 유전자의 multiplex PCR로 screening된 mutant candidate 3개에 대하여 southern blotting을 실시하였다. 그 결과 wild-type과 mutant size가 모두 발견이 되고 다른 non-specific band들이 관찰이 되어 최종적으로 mutant가 아닌 것으로 결정하였다(그림 37).

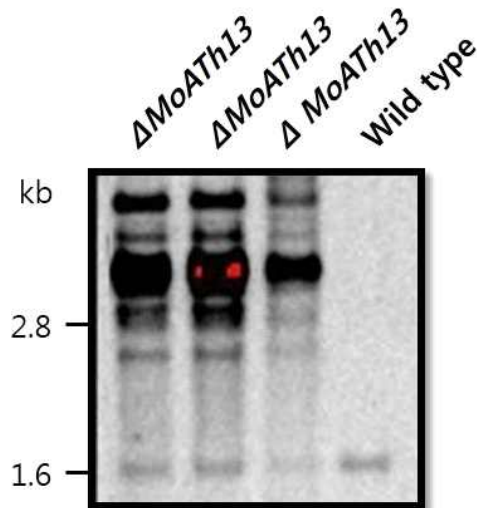


그림 37. MoATh13 mutant candidate의 southern blot 결과.

(3) MoATh22(MGG\_06960)

MoATh22 유전자의 multiplex PCR로 screening된 mutant candidate 3개에 대하여 southern blotting을 실시하였다. 그 결과 3개 중 1개의 ectopic을 얻을 수 있었으나 원하는 부분 이외에도 knock-out 되었기 때문에 최종적으로 mutant가 아닌 것으로 결정하였다(그림 38).

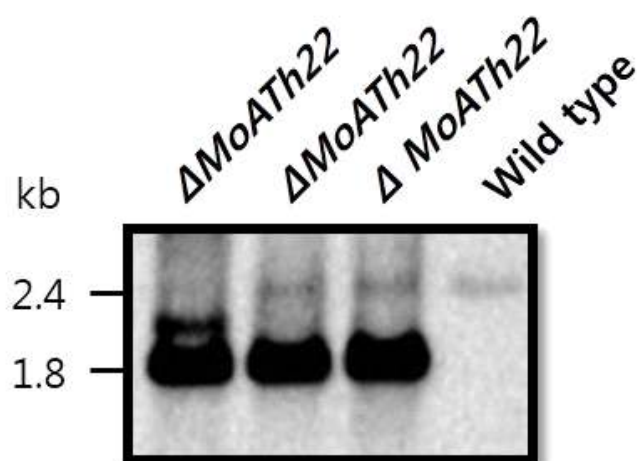


그림 38. MoATh22 mutant candidate의 southern blot 결과.

(5) MoATh07(MGG\_10422) domain deletion

MoATh07 domain deletion 유전자의 multiplex PCR로 screening된 mutant candidate 2개에 대하여 southern blotting을 실시하였다. 그 결과 mutant construct이 원하는 size에 1 copy 들어간 것을 확인하여 결손돌연변이체 생성에 성공하였다(그림 39).

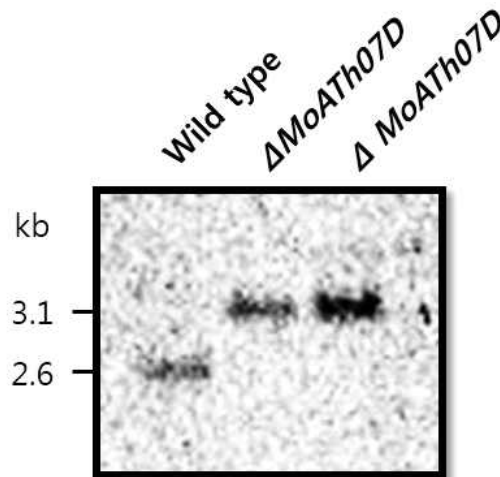


그림 39. MoATh07 domain deletion mutant candidate의 southern blot 결과.

다. RT-PCR을 이용한 결실돌연변이체 screening

최종적으로 결실돌연변이체로 확인된 두 개의  $\Delta MoATh08$ ,  $\Delta MoATh07$  domain deletion mutant에 대하여 이들 유전자의 발현 유무를 Reverse Transcription-PCR을 확인하고자 하였다. 실험은 mutant의 균사체를 CM broth배지에서 2~3일간 키우고 RNA를 추출한 뒤 이를 cDNA로 합성하여 RT-PCR 프라이머를 사용하여 wild-type cDNA와 함께 PCR을 진행하는 과정이다(그림 40). 대조구로 항시 발현 유전자인 b-tubulin 유전자를 사용하였다. 본 실험이 결과는 결실 돌연변이체를 최근에 생성하였기 때문에 현재 진행 중에 있다.

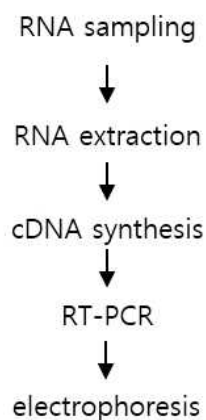


그림 40. 결손돌연변이체의 유전자 발현 확인을 위한 RT-PCR 과정.

### 제 3 절 유전자복원 형질전환체 생성

현재 결실돌연변이체로 확인된 두 개의  $\Delta MoA_{Th08}$ ,  $\Delta MoA_{Th07}$  domain deletion mutant에 대하여 유전자복원 형질전환체를 생성 중에 있다. 복원형질전환체를 생성하기 위하여 construct을 제작하고 각각의 유전자결실돌연변이체로부터 protoplast를 제작하여 다른 항생제 마커 (G418)와 결실된 유전자를 다시 삽입시켰다. 두 개의 항생제(hygromycin과 G418)가 첨가된 배지에서 복원 형질전환체를 유도하였다. 형질전환을 통해 얻은 candidate 복원형질전환체를 특이적인 screening primers를 이용하여 Multiplex PCR로 확인하고 있다. 그리고 복원형질전환체로 추정되는 형질전환체(transformant)는 최종적으로 반수체(haploid)인 포자(conidium) 한 개만을 순수할 것이다. 분리하여 정제된 복원형질전환체는 southern blot과 reverse transcription PCR (RT-PCR)을 통해 확인하여 볼 것이다. 그리고 유전자 재삽입이 된 복원형질전환체의 표현형 결합을 야생형(wild type)과 유사한 수준으로 복원하는 지를 벼도열병균의 생활사에서 검정할 것이다.

### 제 4 절 유전자의 기능 분석

해당 유전자의 기능을 분석하기 위하여 결실돌연변이체를 이용하여 균사생장, 포자형성, 발아관 형성, 부착기 형성 등의 발달과정에서의 기능을 알아보고 식물세포 침입, 식물세포에서의 감염균사 생장 등을 확인하여 유전자의 병원성 기능을 분석하고자 하였다.

#### 1. MoA<sub>Th08</sub>의 기능 분석

##### (1) 균사생장

$\Delta MoA_{Th08}$ 의 벼도열병균의 생활사에서 그 기능을 알아보기 위하여 균사생장을 wild-type과 비교하여 보았다. V8 agar 영양배지와 MMA 최소 영양배지 조건(표 8)에서 균사생장을 비교하였다. 그 결과  $\Delta MoA_{Th08}$ 가 wild-type에 비교하여 두 배지 조건하에서 느린 성장을 나타내었다(그림 41). 그리고 melanization에서 큰 차이가 없는 것으로 보여졌다(그림 42).

표 8. 균사생장 비교를 위한 영양배지(V8) 및 최소영양배지(MMA)의 조성표

MMA (1L)		Trace element solution (100ml)		V8 (1L)	
Sucrose	30.0 g	citric acid	5 g	V8 juice	80 ml
NaNO <sub>3</sub>	2.0 g	ZnSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5 g	10N	310 μl
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0 g	Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1 g	NaOH	15 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	250 mg	Agar	
KCl	0.5 g	MnSO <sub>4</sub>	50 mg		
Agar	20.0 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Boric acid)	50 mg		
Trace element solution	0.1 ml	Ma <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	50 mg		

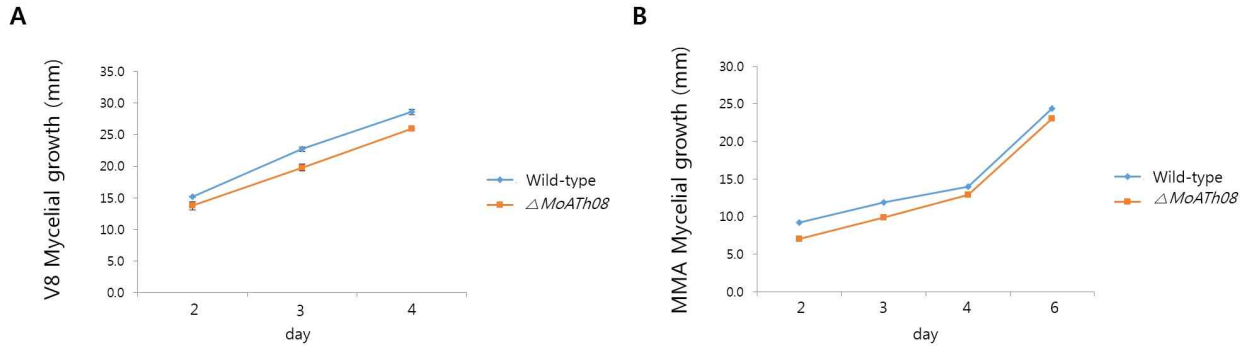


그림 41.  $\Delta MoATH08$ 의 V8 agar 배지 및 MMA배지의 균사생장 비교.

A : V8 agar 영양배지, B : MMA 최소 영양배지

## (2) 포자형성

벼도열병을 포함한 대부분의 식물병원성 곰팡이는 포자를 생성하여 병을 일으키고 확산시킨다. 따라서 포자 생성에 대한 메커니즘을 이해하는 것이 중요하다. MoATH08 유전자의 포자생성에서의 기능을 알아보기 위하여 wild-type과  $\Delta MoATH08$ 를 V8배지에서 6일간 포자형성을 유도하였다. 그리고 포자현탁액을 만들어 hemocytometer로 그 수를 측정하였다. 그 결과 wild-type은 평균  $5.9 \times 10^5$  conidia/ml,  $\Delta MoATH08$ 의 포자수는 평균  $5.1 \times 10^5$  conidia/ml으로 조금 줄어드는 표현형을 나타내었다(그림 43A).

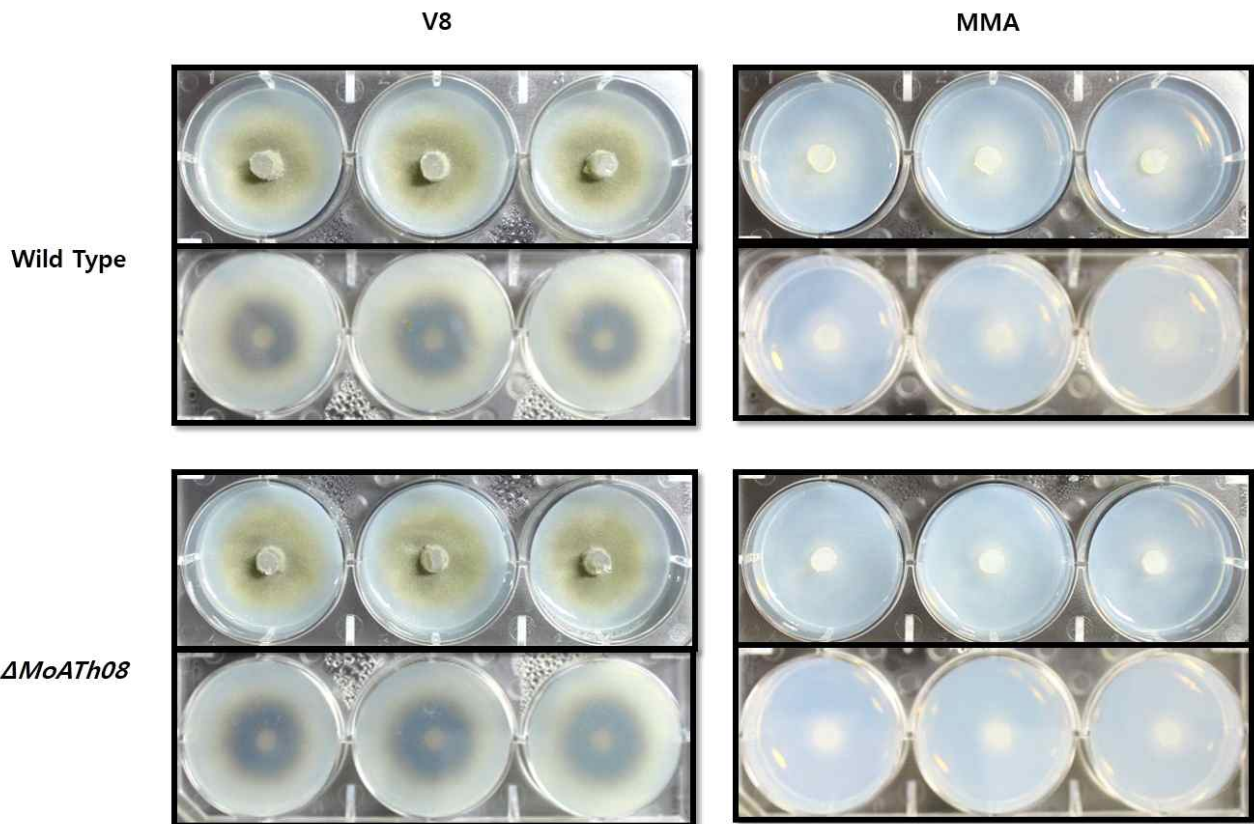


그림 42.  $\Delta MoATH08$ 의 V8 agar 배지 및 MMA배지의 균사생장 및 Melanization 비교.

### (3) 발아관형성

식물체에 포자가 접촉하면 발아관을 형성하여 식물체를 인지하고 병을 일으킬 준비를 한다. 따라서 MoA $Th08$  유전자의 발아관 형성에서의 기능을 알아보았다. wild-type과  $\Delta MoA $Th08$ 의 포자현탁액을 hemocytometer를 사용하여  $5 \times 10^4$  conidia/ml 농도로 맞추고 hydrophobic slide에 습실 처리하여 올려놓고 발아관의 형성을 유도하였다. 2시간이 지난 뒤 발아관이 형성된 수를 측정하여 비율로 본 결과 wild-type은 94.7%,  $\Delta MoA $Th08$ 은 81.3%가 발아관을 형성하였다(그림 43B). 그러나 6시간이 경과되었을 때는  $\Delta MoA $Th08$  또한 95% 이상으로 발아관을 형성하였다. 이 결과로  $\Delta MoA $Th08$ 은 발아관이 형성되는 시간이 지연되어 영향을 미친 것을 알 수 있었다.$$$$

### (4) 부착기 형성

식물체 표면에 발아관을 형성하면 부착기(appressorium)를 형성하여 식물표면을 뚫고 들어가게 된다. 따라서 wild-type과  $\Delta MoA $Th08$ 의 포자현탁액을 hemocytometer를 사용하여  $5 \times 10^4$  conidia/ml 농도로 맞추고 hydrophobic slide에 습실 처리하여 올려놓고 발아관 형성 이후에 부착기 형성을 유도하였다. 8시간이 지난 뒤 부착기가 형성된 비율을 측정하였다. 그 결과 wild-type은 93.0%,  $\Delta MoA $Th08$ 은 92.3%로 부착기의 형성에는 크게 차이가 나지 않는 결과를 얻을 수 있었다(그림 43C).$$

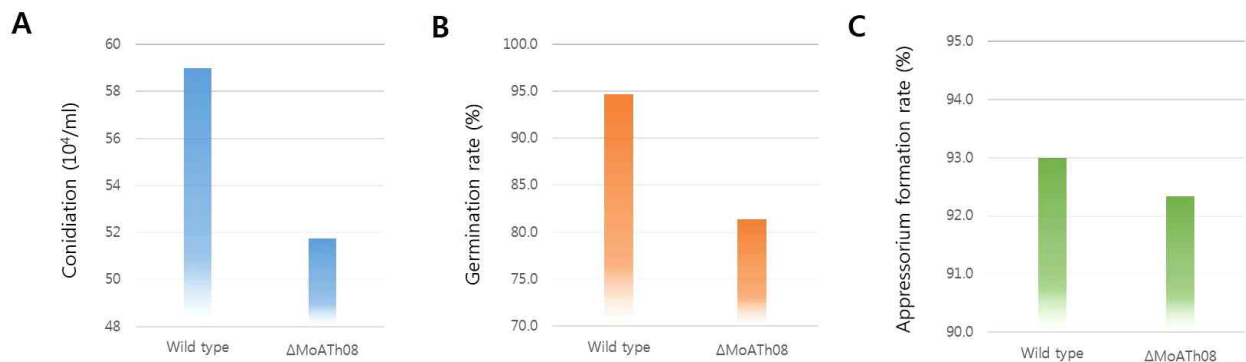


그림 43.  $\Delta MoA $Th08$ 의 포자, 발아관, 부착기 형성 표현형 검정.$

### (5) 병원성 검정

벼도열병균은 정상적인 부착기를 형성하여 식물체내에 침입 및 감염균사 생장을 통해 병을 퍼뜨리게 된다. 따라서 MoA $Th08$  유전자의 식물체 침입 및 감염균사의 성장 기능을 알아보기 위하여 병원성을 검정하였다. 먼저 식물체 표면 위에서 정상적인 부착기를 형성하는지 알아보기 위해 양과 껍질에 wild-type과  $\Delta MoA $Th08$ 의 포자 현탁액을 올려놓고 20hr 후에 DIC 현미경을 통해 관찰하였다. 그 결과 wild-type과  $\Delta MoA $Th08$  모두 정상적으로 부착기를 형성하였다. 그러나 wild-type의 부착기에서 melanization을 통하여 식물체 표면을 뚫고 들어가기 위한 팽압을 형성하는 포자들이 많았으나,  $\Delta MoA $Th08$ 의 포자에서는 초기 부착기 형태를 띠는 모습을 확인할 수 있었다(그림 44).$$$

Onion 20hr

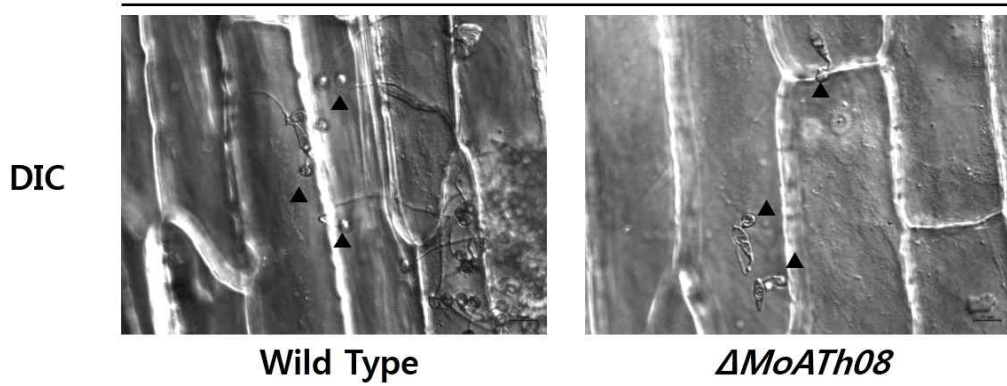


그림 44. 식물체 표면 위의 wild-type과  $\Delta MoATH08$  포자의 DIC 현미경 사진.

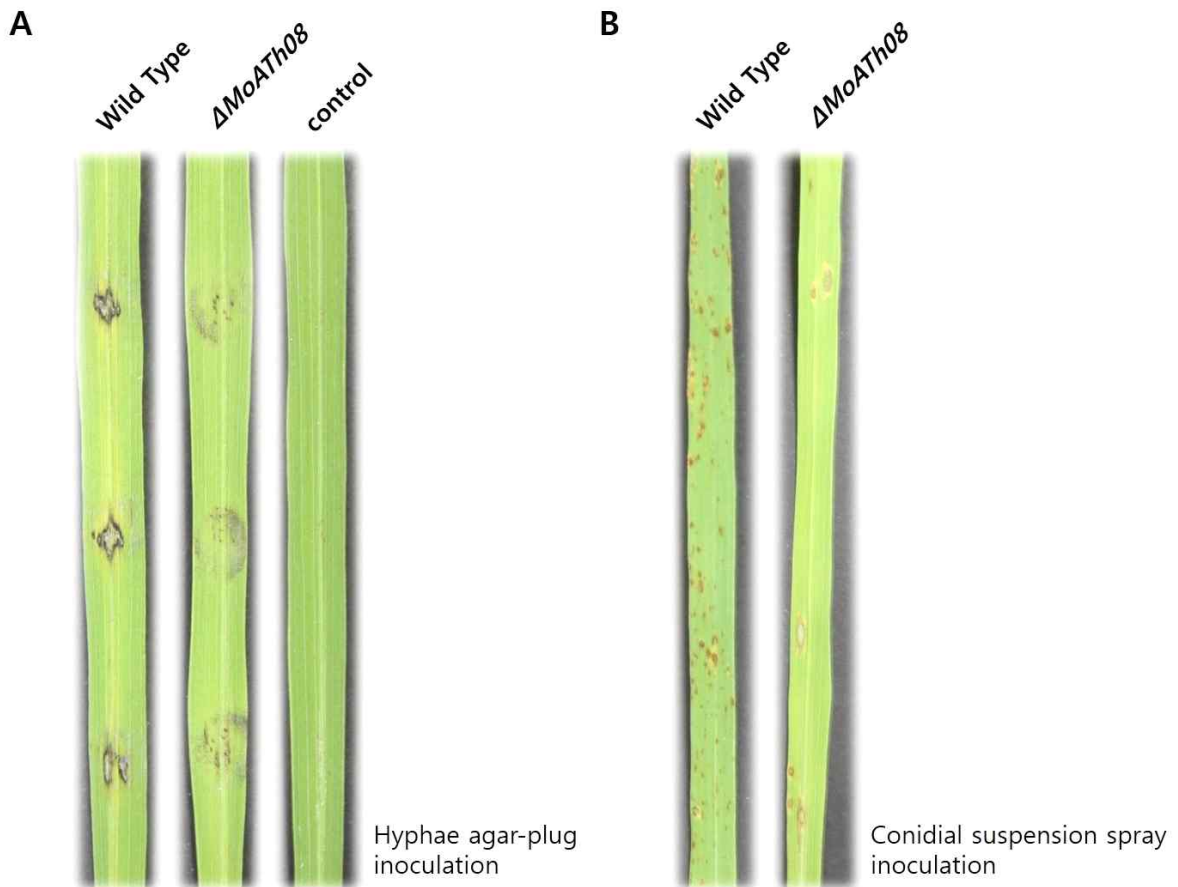


그림 45. 병원성 검정을 위한 A.균사와 B.포자 접종 test.

감염 균사 생장에 영향을 주는지 알아보기 위하여 wild-type과  $\Delta MoATH08$ 를 각각 CM agar 배지에서 키운 뒤 벼 잎에 상처를 내어주고 5 mm의 agar-plug를 올려놓아 습실 처리하였다. 5 일 뒤 관찰한 결과 wild-type은 식물체에 2차 감염균사를 많이 퍼뜨려 갈색의 병반을 형성한 것을 확인할 수 있었다. 그러나  $\Delta MoATH08$ 는 agar-plug 자국 이외에 병이 나타나지 않은 것을



보아 2차 감염균사 성장에 영향을 주는 기능을 한 것이라 생각되었다(그림 45A). 그리고 포자 현탁액을 만들어 스프레이 접종을 한 결과 wild-type은 잎 끝고루 병이 퍼진 반면에  $\Delta MoAth08$ 에서는 드물게 병반이 있지만 병원성이 급격히 줄어든 것을 알 수 있었다. 따라서 MoAth08 유전자의 기능은 생활사 전반에 걸쳐 역할을 하지만 병원성에 중요한 역할을 하는 유전자라는 것을 알 수 있었다(그림 45B). 앞으로 반복 실험 및 추가적인 기능 분석 실험을 통하여 AT-hook motif에 대한 기능 및 메커니즘을 이해하고자 한다.

## 2. MoAth07의 기능 분석

### (1) 균사성장

$\Delta MoAth07$ 의 벼도열병균의 생활사에서 그 기능을 알아보기 위하여 균사생장을 wild-type과 비교하여 보았다. V8 agar 영양배지와 MMA 최소 영양배지 조건(표 8)에서 균사생장을 비교하였다. 그 결과  $\Delta MoAth07$ 가 wild-type에 비교하여 두 배지 조건하에서 조금 빠른 성장을 나타내었다. 그리고 melanization에서 wild-type에 비교하여 많이 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. (그림 46).

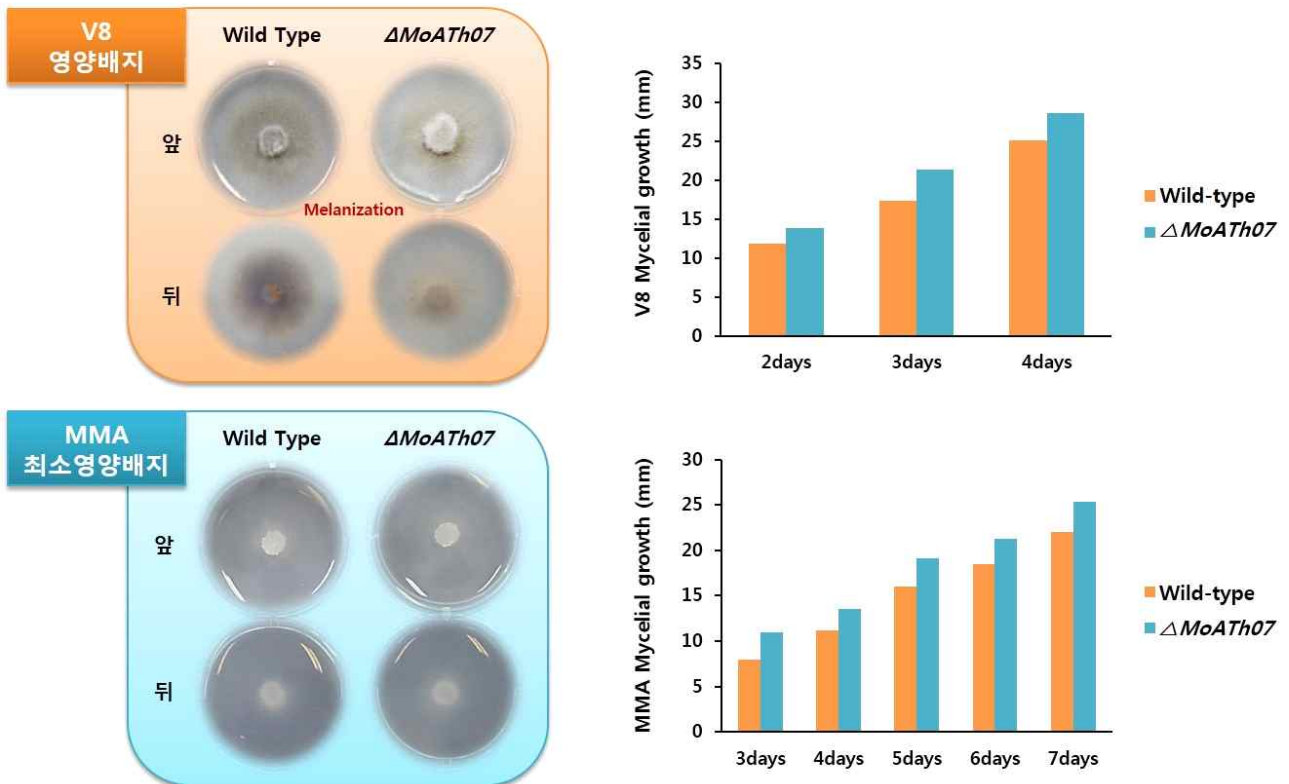


그림 46.  $\Delta MoAth07$ 의 V8 agar 배지 및 MMA배지의 균사성장 및 Melanization 비교.

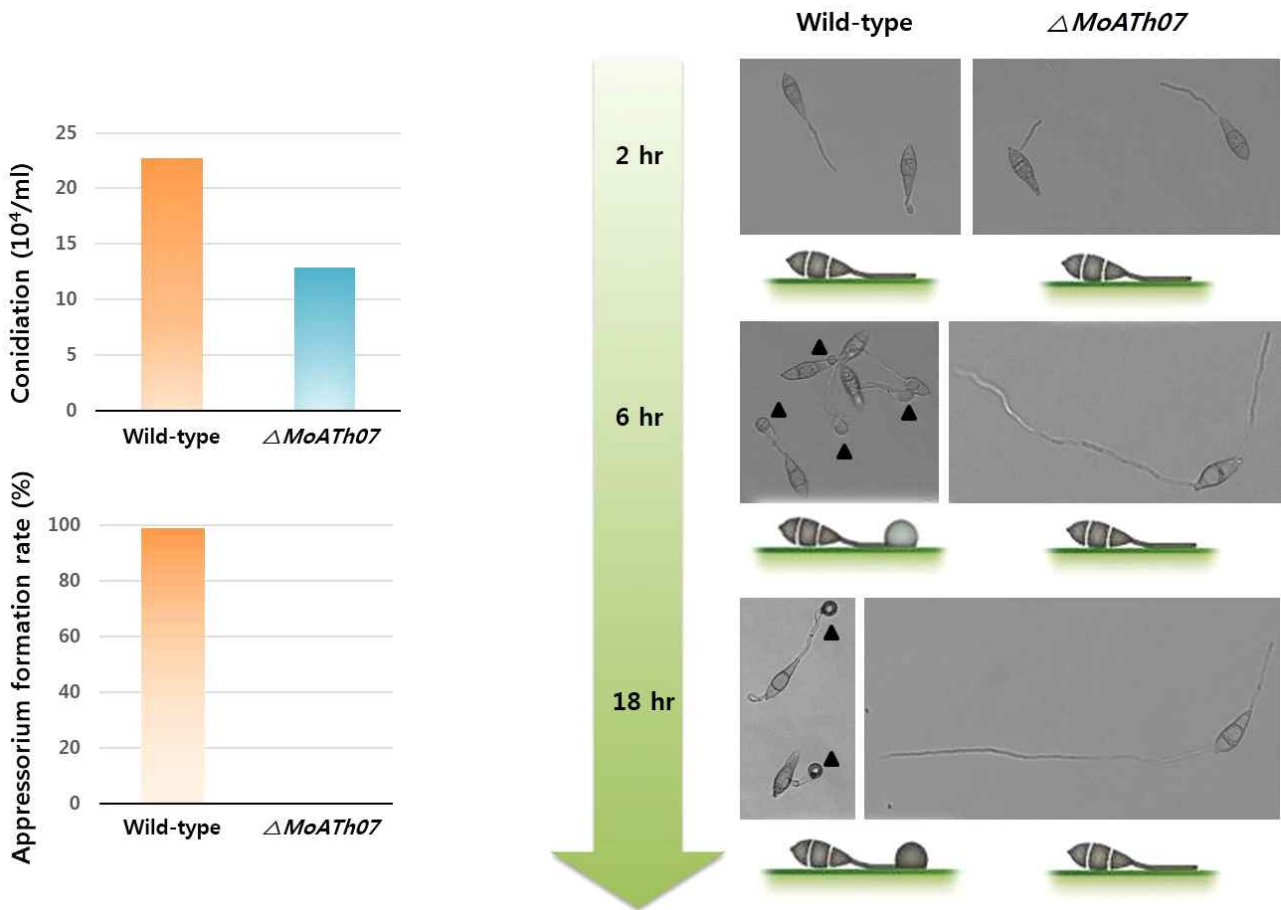


그림 47.  $\Delta MoAth07$ 의 포자 및 부착기 형성 표현형 검정.

### (2) 포자형성

벼도열병을 포함한 대부분의 식물병원성 곰팡이는 포자를 생성하여 병을 일으키고 확산시킨다. 따라서 포자 생성에 대한 메커니즘을 이해하는 것이 중요하다. *MoAth07* 유전자의 포자생성에서의 기능을 알아보기 위하여 wild-type과  $\Delta MoAth07$ 를 V8배지에서 6일간 포자형성을 유도하였다. 그리고 포자현탁액을 만들어 hemocytometer로 그 수를 측정하였다. 그 결과 wild-type은 평균  $2.3 \times 10^5$  conidia/ml,  $\Delta MoAth07$ 의 포자수는 평균  $1.3 \times 10^5$  conidia/ml으로 절반가까이 포자를 못 만드는 것을 확인할 수 있었다(그림 47).

### (3) 부착기 형성

식물체 표면에 발아관을 형성하면 부착기(appressorium)를 형성하여 식물표면을 뚫고 들어가게 된다. 따라서 wild-type과  $\Delta MoAth07$ 의 포자현탁액을 hemocytometer를 사용하여  $5 \times 10^4$  conidia/ml 농도로 맞추고 hydrophobic slide에 습식 처리하여 올려놓고 발아관 형성 이후에 부착기 형성을 유도하였다. 8시간이 지난 뒤 부착기가 형성된 비율을 측정하였다. 그 결과 wild-type은 99.0%,  $\Delta MoAth08$ 은 0%로 부착기의 형성에 중요한 역할을 하는 유전자라는 것을 알 수 있었다(그림 47). 따라서  $\Delta MoAth07$ 은 벼도열병균의 발달과 병원성에 중요한 역할을 할 것이라는 것을 시사한다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

세부연구개발 목표	달성도
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 상세분석을 위한 유전자 선발</li> </ul>	100%
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bioinformatics tools을 이용한 유전자 선발</li> <li>- 벼도열병균의 발달 단계별 RNA 추출</li> <li>- qRT-PCR을 이용한 유전자 발현 조사</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 유전자결실돌연변이체 생성</li> </ul>	100 %
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 결실돌연변이체를 생성하기 위한 construct 제작</li> <li>- Multiplex PCR을 이용한 결실돌연변이체 screening</li> <li>- Southern blot과 RT-PCR</li> <li>- 유전자의 기능 분석</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 유전자복원형질전환체 생성</li> </ul>	70 %
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 복원형질전환체를 생성하기 위한 construct 제작</li> <li>- Multiplex PCR을 이용한 복원형질전환체 screening</li> <li>- Southern blot과 RT-PCR</li> <li>- 표현형 검정</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 유전자의 기능 분석</li> </ul>	100 %
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 유전자의 기능을 벼도열병균의 생활사에서 분석</li> </ul>	

본 연구에서는 cDNA microarray 방법을 통해 벼도열병균의 포자생성 과정에서 발현이 증감하는 조절유전자 중에 특이적 발현을 보인 유전자를 선발하여 그 기능을 알아보았다. 그동안의 연구는 부착기(appressoria)라는 포자에서 유래된 침입구조에 대한 연구가 주로 진행되어 왔기 때문에, 주된 감염원(inoculum)인 포자 생성에 관한 연구는 미흡하다. 아직까지 인간을 포함한 진핵생물에서 AT-hook motif 전사 인자에 대한 연구가 국내·외에서 많이 되지 않았다. 따라서 본 연구를 통하여 AT-hook motif 전사 인자의 벼도열병균의 포자생성에 관하여 어떻게 미생물이 환경을 인지하여 발달과 생존하는지를 분자생물학적, 유전학적으로 이해 할 수 있었으며 본 과제의 연구 결과는 세계 최초로 식물병원성 곰팡이의 AT-hook motif 전사 인자에 대한 연구와 새로운 개념의 병 억제, 방제 기법 개발을 위한 기초로 활용될 수 있다고 기대된다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### ○ 연구개발 성과

본 과제에서는 식물병원성 곰팡이를 포함한 대부분의 진핵생물에서 AT-hook motif 전사 인자에 대한 연구는 국내, 국외에서 전무한 상태이다. 따라서 모델 생물체로 급부상한 벼도열병균의 AT-hook motif 전사 인자가 어떻게 포자생성에 영향을 미치며 벼도열병균의 생활사에서 발달하고 생존하는가에 대하여 분자생물학적, 유전학적으로 분석하였다. 그리고 연구 결과를 바탕으로 학회발표 6회를 진행 하였고 학부 3명, 석사 3명의 인력 양성 성과를 거두었다. 현재 SCI급 논문 1편이 심사 중이며, SCI급 논문 1편을 작성 중에 있다.

### ○ 성과활용 계획

#### <기술적 측면>

- 본 연구는 식물병원균의 발병과 분화에 대한 지식축적과 이해증진에 기여하며, 이를 통한 생명과학과 생물학의 발전 뿐 만 아니라, 경제적으로 막대한 피해를 입히는 식물병원균을 특이적으로 억제할 수 있는 새로운 개념의 억제전략 개발에 기초자료가 된다.
- SCI급 국제·국내 학술지에 논문 발표, 학술 활동, 연구 기술 개발 등에 기여한다.
- 벼도열병균은 국제적으로 중요한 모델 생물체로 부상하였기 때문에 다른 식물병원균을 연구하는 분야에 적용되거나 과급될 수 있다.
- 식물병원성 곰팡이에 대한 이해증진과 지식축적을 통한 생명과학 발달에 기여한다.
- 많은 식물병원성 진균들은 포자에 통해서 병원균의 확산과 발병을 일으키기 때문에, 본 과제의 연구 결과는 새로운 개념의 병 억제와 방제 기법 개발에 기초자료로 활용이 가능하다.
- 벼도열병균의 포자생성에 관한 연구는 어떻게 미생물이 환경을 인지하여 발달과 생존하는지를 분자생물학적, 유전학적으로 이해하는 것으로 학문적 가치가 높다.
- 미생물이 진화해 온 과정을 해석하는데 중요한 기초자료가 된다.

#### <경제·산업적 측면>

- 대두되고 있는 식량자원 위기에 대비한 안정적인 생산과 친환경적 농법 개발에 기여한다.
- 병 확산과 발병에 관한 연구는 병 확산 및 방제를 위한 기초자료를 제공한다.
- 연구 활성화를 통한 생명과학 산업의 발달과 직업창출에 기여함
- 병 확산 억제 기법은 농가 생산비 절감에 기여할 수 있다.

#### <교육·인력 양성 효과>

- 국내 연구자의 연구능력 고취에 기여하며, 다양한 국제 학술 교류와 협력 기여함
- 대학원생의 분자생물학적 연구기법 숙지와 생명과학에 대한 이해증진에 도움이 된다.
- 대학원생의 연구력 증진과 창의력 개발에 도움이 된다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

대다수의 다른 식물병원성 곰팡이와 마찬가지로, 벼도열병균은 주된 감염원(inoculum)으로서 역할을 하는 무성포자(asexual conidia; 이하 ‘포자’로 통칭)를 생성하여 발병과 병을 확산시킨다. 특히 벼도열병균은 벼 생육기간 동안 여러 차례에 걸쳐 무수히 많은 포자를 생성하여 연속적으로 병을 확산시켜, 벼도열병 대발생을 초래하는 매우 치명적인 병원균이다. 적당한 환경 조건에서 새로운 포자를 생성하는데 걸리는 시간은 불과 3~5일 정도이다(Park *et al.*, 2010). 그러므로 벼도열병균이 어떻게 포자를 생성하는 지에 대한 연구는 병 발생과 확산의 억제 측면에서 무엇보다도 중요한 의미를 갖는다. 하지만 그동안의 연구는 부착기(appressoria)라는 포자에서 유래된 침입구조에 대한 연구가 주로 진행되어 왔기 때문에, 주된 감염원(inoculum)인 포자 생성에 관한 국내·외 연구는 아직까지 미흡하다.

벼도열병균의 포자생성 과정을 살펴보면, 균사가 성장하다가 여러 환경인자(light, aeration, humidity, temperature, nutrients, etc)들을 인지하여 분생포자병(conidiophore)을 형성하고 신장하게 된다. 그리고 포자병 말단에 첫 번째 포자가 형성되고 이후 지그재그형태로 두 번째와 세 번째의 포자들이 순차적으로 생성된다. 포자 생성에 대한 연구는 주로 비병원성 곰팡이(nonpathogenic fungi)인 *Aspergillus nidulans*와 *Neurospora crassa*를 대상으로 많은 연구가 진행되어 왔지만, 아직까지 식물병원성 곰팡이를 대상으로 수행된 연구는 매우 부진하다. 벼도열병균의 포자 생성 과정은 *A. nidulans*와 *N. crassa*와는 구조적 또는 형태학적으로 확연한 차이를 보일 뿐 만 아니라, 유전학적, 생리학적인 측면에서도 많은 차이점을 나타내고 있다. 이러한 차이점은 그동안 비병원성 곰팡이를 연구하여 축적한 지식이 벼도열병균을 포함한 병원성 곰팡이를 이해하는데 그대로 적용될 수 없음을 시사한다. 따라서 벼도열병균의 포자 생성에 관한 연구는 다른 비병원성 곰팡이의 연구와 차별된다. 최근에는 벼도열병균의 병환에서 두 개의 전사유전자(transcription factor), *COS1*과 *MoHOX2*가 포자생성과정에서 각각 포자병(conidiophore)형성과 포자형성에 필요한 인자(factor)라는 것이 밝혀졌다. 이와 같은 연구는 전사조절 유전자가 각 단계별 구조물 발달에 핵심 역할을 한다는 것을 의미한다. 벼도열병균의 게놈 분석에 의하면, 약 400여개의 전사조절 유전자가 예측되고 있지만, 지금까지 불과 몇몇 전사조절 유전자들의 기능만이 밝혀진 실정이다. 아직까지 인간을 포함한 진핵생물에서 AT-hook motif 전사 인자에 대한 연구가 국내·외에서 많이 되지 않았다.

## 제 7 장 연구시설·장비 현황

도입·개발한 연구시설·장비 없음

## 제 8 장   참고문헌

- Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO): Food and Population: FAO Looks ahead, 2004.
- Hamer JE, Valent B and Chumley FG (1989) Mutations at the *smo* genetic locus affect the shape of diverse cell types in the rice blast fungus. *Genetics* **122**: 351-361.
- Kim S, Park S-Y, Kim KS, et al. (2009) Homeobox transcription factors are required for conidiation and appressorium development in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Genet* **5**: e1000757.
- Ou SH 1985 Rice Diseases. Kew, England: Commonwealth Mycological Institute. pp 97.184.
- Park S-Y, Chi M-H, Milgroom MG, Kim H, Han S-S, Kang S, Lee Y-H (2010) Genetic stability of *Magnaporthe oryzae* during successive passages through rice plants and on artificial medium. *Plant Pathol J* **26**: 313-320.
- Shi Z, Christian D, Leung H (1998) Interactions between spore morphogenetic mutations affect cell types, sporulation, and pathogenesis in *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 199-207.
- Zhou Z, Li G, Lin C, He C (2009) Conidiophore stalk-less1 encodes a putative zinc-finger protein involved in the early stage of conidiation and mycelial infection in *Magnaporthe oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 402-410.
- Jiang SY, Cai M, Ramachandran S (2005) The *Oryza sativa* no pollen (Osnop) gene plays a role in male gametophyte development and most likely encodes a C2-GRAM domain-containing protein. *Plant Mol. Biol.* **57**: 835-853.
- Lorrain S, Lin B, Auriac MC, Kroj T, Saindrenan P, Nicole M, Balagué C, Roby D. (2004) Vascular associated death1, a novel GRAM domain-containing protein, is a regulator of cell death and defense responses in vascular tissues. *Plant Cell* **16**: 2217-2232.
- Roxström-Lindquist K, Faye I. (2001) The *Drosophila* gene Yippee reveals a novel family of putative zinc binding proteins highly conserved among eukaryotes. *Insect Mol Biol.* **10**: 77-86.