

GOVP1200201094

633.189  
L 293 W

19

최 종  
연구보고서

298060-3

병원균 침입기작 연구에 의한  
벼 도열병 방제법 개발

Development of novel strategies to control rice  
blast disease based on the study of infection  
mechanisms of the pathogen

연구기관  
서울대학교

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “병원균 침입기작 연구에 의한 벼 도열병 방제법 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001 년 10 월 1 일

주관연구기관명 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 이 용 환

세부연구책임자 : 이 용 환

# 요 약 문

## I. 제 목

병원균 침입기작 연구에 의한 벼 도열병 방제법 개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

벼 도열병 (Rice blast)은 벼 농사를 짓는 세계 어디에서나 문제가 되는 가장 중요한 병 중의 하나이다. 쌀을 주식으로 하는 한국을 포함한 동남아시아에서는 그 중요도가 어디에서보다 크다고 하겠다. 이 병의 방제를 위해서는 주로 경종적, 육종학적 측면에서의 노력과 화학농약의 사용이 주를 이루었다. 그러나 병원균 레이스의 역전 현상은 오랜 시간 동안의 노력으로 육성된 저항성 품종을 짧은 시간 내에 무너뜨리는 결과를 초래하였다. 또한 환경지속형 농업의 중요성이 날로 증대되고 있어 합성 화학 농약에 의한 도열병의 방제도 점점 더 많은 제약조건을 갖기에 이르렀다. 또한 합성농약의 연용으로 인한 내성균의 출현 또한 새로운 개념의 환경보존형 방제법을 요구하고 있다.

지금까지는 주로 벼 도열병 방제를 위해 전통적인 연구방법들을 이용한 연구들이 수행되었으나 최근 들어 분자생물학의 발달로 식물병리학에서도 새로운 분자생물학 기법을 이용한 연구가 시작되고 있다. 특히 벼 도열병에 대한 분자생물학적 연구는 식물병리학자들뿐만 아니라 분자생물학자들 사이에서도 많은 연구가 진행되고 있으며 현재 미국 및 유럽의 선진국에서 활발히 진행되고 있다. 이는 물론 벼 도열병이 전 세계적으로 심각한 병이라는 점도 있지만 병원균과 기주의 상호작용을 연구하는 중요한 모델 시스템으로 여겨지기 때문이다. 그러나 우리 나라에서는 식량작물로서의 중요도가 가장 큼에도 불구하고 벼 도열병에 대한 연구는 다른 작물병에

비해 상당히 미미한 편이다. 우리나라에서도 채소의 바이러스병에 대한 분자생물학적 연구는 어느 정도 진행되고 있으나 벼 도열병에 대한 연구는 전혀 이루어지지 않고 있는 실정이다. 벼를 재배하는 지역이면 세계 어디에서나 가장 위협적인 병으로 여겨지는 도열병에 대한 연구가 미미하며 특히 분자생물학적 연구는 아직 시작도 못하고 있기 때문에 식량안보 차원에서도 하루 빨리 이루어져야 한다고 생각한다.

본 연구에서는 도열병원균의 침입과정을 생화학적, 분자생물학으로 이해하여 벼 도열병을 효율적으로 방제할 수 있는 새로운 작용점 (target site)을 제시하고자 한다. 아울러 도열병원균의 침입시 벼의 방어기작을 분자생물학적으로 규명하여 벼와 병원균사이의 상호작용 이해를 통한 효율적인 방제법을 개발하고자 한다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

도열병원균 분생 포자의 부착 정도를 측정할 수 있는 방법을 확립하고, 이 부착에 관련된 물질의 생화학적 특성을 파악하며, extracellular matrix protein과 integrin이 포자 부착에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다.

부착기 형성에 관여하는 새로운 신호전달물질로서의 vitamin B1의 역할을 규명하고, 이 vitamin B1이 기존에 알려진 cAMP 또는 calcium 관련 신호전달체계와 어떠한 상호작용을 하는지를 조사하였다. 또한, calcium 관련 신호전달체계의 중요한 매개체인 protein kinase C의 역할을 확인하여 calcium관련 신호전달체계가 부착기 형성에 어떠한 영향을 미치는지 분자생물학적으로 규명하고자 하였다.

도열병원균의 침입시 특이적으로 발현되는 벼 유전자를 이용한 새로운 방제법 개발을 위해서는 먼저 친화적, 비친화적 반응 조합을 확립함으로써

써 저항성 기작 연구를 할 수 있는 system을 개발하고, 친화적인 조합에  
서의 EST 분석을 실시, 방어 관련 유전자를 확보하고 그 발현특성을 분석  
하고자 하였다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### 1. 연구개발 결과

###### 가. 도열병균 분생포자 부착억제를 통한 새로운 방제법 개발

인공 표면인 Gelbond를 이용하여 벼 도열병균의 분생포자 부착정도를 측  
정할 수 있는 새로운 분석방법을 개발하였고, 이를 이용해 벼 도열병균  
분생포자가 어떻게 부착하는지에 대한 기초적 자료를 제공하였다. 열 처  
리와 단백질 분해효소 (protease K)도 또한 벼 도열병균 분생포자 부착과  
부착기 형성을 억제했으며, 실험에 사용한 다른 탄소원과는 달리, 특이적  
으로 galactose만이 분생포자 부착과 부착기 형성을 억제하였다.  
fibronectin항체로도 분생포자 부착과 부착기 형성을 억제하는 것을 확인  
했다. RGD, RGDS, 그리고 RGE5 펩티드들은 분생포자 부착과 부착기 형성  
을 억제하나, GGGG, GRGD, GRGDS, 그리고 GRGDSPK 펩티드들은 벼 도열병  
균의 세포분화에 아무런 억제 효과가 없었다. 이러한 결과로 보아 벼 도  
열병균에서도 세포외부 신호의 인식과 조절이 extracellular matrix  
protein과 integrin으로 알려져 있는 막투과성 당단백질을 통해서 일어난  
다는 것을 유추할 수 있었다.

###### 나. 도열병균 부착기 형성 억제를 통한 새로운 방제법 개발

yeast extract에 의해서 부착기 형성이 억제되는 생화학적 메카니즘을  
이해하기 위해서, yeast extract를 이루고 있는 모든 구성 성분들을 실험  
해보았다. 그 들 중에서, vitamin B<sub>1</sub> (thiamine)과 vitamin B<sub>6</sub>

(pyridoxine)이 처리농도에 비례하여 *M. grisea*의 부착기 형성을 억제하는 것을 발견하였다. 또한, thiamine과 pyridoxine에 의해 억제된 부착기는 cAMP 또는 1,16-hexadecanediol을 첨가하면 다시 형성되었다. 이 결과에 의하면 thiamine과 pyridoxine은 cAMP가 작용하는 위치보다 앞선 위치에서 작용한다는 것을 알 수 있다. 반면에, vitamin은 비유도성 표면에서 부착기 형성을 유도하였고, EGTA, neomycin, w-7에 의해 억제된 부착기를 다시 형성하게 하였다. Vitamin은  $Ca^{2+}$  관련 신호 전달 체계에 관련되어 있다고 가정 할 수 있다.

도열병균에서 Protein kinase C의 역할을 알고자 이 유전자를 클로닝 하였다. 이를 위해 먼저 EST database에 올라있는 염기서열을 근거로 probe를 찾아내고, genomic Southern hybridization을 수행하여 도열병균의 genome내에 PKC 유전자가 1 copy로 존재함을 밝혔다. *MPKC* (*Magnaporthe grisea* PKC)로 명명한 이 유전자는 3895개의 염기쌍으로 이루어져 있으며 1182개의 아미노산으로 이루어진 한 개의 open reading frame을 encode하고 있었다. *MPKC*는 이미 다른 동물이나 다른 곰팡이에서 보고된 유전자와 상당히 유사하고, 이 유전자에서 발현되는 *MPKC*는  $Ca^{2+}$ 에 의해서는 활성화되지 않는 new PKC 그룹에 해당한다는 것을 밝힐 수 있었다. 또한 UPGMA method를 이용하여 phylogenetic tree를 분석하여 본 결과 *MPKC*는 다른 곰팡이에서 밝혀진 PKC 유전자와 한 그룹을 이루고 있음을 알 수 있었다. 이 유전자의 기능을 알아보기 위하여 targeted disruption을 통한 돌연변이체를 찾는 실험을 실시하였으나 돌연변이체를 찾을 수 없었다..

다. 도열병균의 침입시 특이적으로 발현되는 베타 유전자를 이용한 새로운 방제법 개발

벼와 도열병균의 상호작용 시 발현되는 유전자군을 Expressed Sequence Tag이라는 기법을 이용하여 분석하였다. cDNA library는 감수성 벼에 도열병균을 접종한 후 전형적인 감수성 병반이 벼 잎 전체에 발생할 때의 벼 잎에서 추출한 RNA를 사용하여 작성하였다. 총 511개의 cDNA clone을 3 말단으로부터 염기서열을 분석하였고, 이는 296개의 서로 다른 EST를 구성하고 있었다. 293개의 클론에서 유래한 염기서열은 NCBI database에 등록된 유전자와 유사성을 보였는데, 이중 72개는 곰팡이에서 유래한 유전자와, 나머지 221개는 식물의 유전자와 유사성을 보였다. 이들을 EGAD의 분류체계에 근거하여 세포 내에서의 역할을 분석한 결과 32.8%는 대사작용, 18.4%는 유전자/단백질의 발현에 관여하고 있었으며, 29.4%는 방어반응 혹은 병원성과 관련이 있었다. 5개의 벼 유래 방어관련 유전자와 5개의 병원균유래 유전자의 발현을 분석한 결과 이들 모두 상호작용 시 발현이 증가되는 것으로 나타났다. PR protein은 병 저항성을 발현하는 방어반응의 주요한 특징중의 하나이다. PR-1a는 추론된 pI값이 4.5인 acidic PR-1 protein을 encoding하고 있었다. PR-1a는 평소 잎에서 아주 낮은 수준으로 발현이 되는데, 병원균의 침입이나 BTH 처리, 과산화수소수, 황산구리의 처리에 의해 발현이 증가되었다. 도열병균의 처리 시 비친화적인 관계에서 빨리 높은 수준으로 발현되었다.

## 2. 연구개발 결과의 활용계획 및 건의

본 연구에서는 벼 도열병을 모델로 하여 병원균의 침입기작과 병원균의 침입에 대한 벼의 방어 반응을 연구하였다. 이러한 연구 결과는 벼와 벼 도열병원균의 상호작용에 근거한 새로운 도열병 방제 수단을 마련하는데 직접적인 역할을 할 것이다. 즉, 분생포자의 표면 부착만을 저해하는

물질을 대량으로 스크리닝할 수 있는 체계를 확립할 수 있을 것이다. 또한, 병원균의 침입구조를 형성하는데 필요한 신호전달체계를 교란함으로써 식물병을 방제하는 새로운 방제법을 개발할 수 있을 것이다. 현재까지는 임의 검정에 의해 살균제 후보 물질을 도출해 왔으나 앞으로는 병발생에 결정적 역할을 하는 metabolic pathway의 각 단계가 target sites로 이용되어 질 수 있을 것이다. 벼의 방어 반응에 관련된 유전자원 확보를 통해 도열병 저항성 기작을 규명하는데 이용될 수 있을 것이다. 또한, 이러한 유전자들을 이용하여 벼의 저항성을 최적화시키는 물질을 선발하는 방법을 구축할 수 있을 것이다.



## SUMMARY

Conidial adhesion of *Magnaporthe grisea* to rice is an important early event in the infection process. A spore tip mucilage (STM) is expelled from the hydrated conidial apex before the germ tube emergence. However, the chemical properties of STM are not characterized. Treatments of heat and protease K inhibited conidial adhesion and appressorium formation of this fungus. Treatment of galactose specifically inhibited conidial adhesion and appressorium formation, but other carbon sources did not affect. Treatments of human fibronectin or vitronectin antibodies inhibited conidial adhesion and appressorium formation. Furthermore, vitronectin antibody was immunolocalized to conidial apex of *M. grisea*. Recognition and mediation of extracellular signals are via transmembrane glycoproteins known as integrins. They exhibit specific affinities to tripeptide sequence Arg-Gly-Asp (RGD) found in several extracellular matrix components. Treatments of RGD, RGDS, or RGES inhibited conidial adhesion and appressorium formation, but GGGG, GRGD, GRGDS, and GRGDSPK did not inhibit both cell differentiation in *M. grisea*. Elucidation of the mechanism involved in conidial adhesion is not only of biological interest but may also provide the basis for new disease control strategies.

*Magnaporthe grisea*, the rice blast fungus, forms a specialized infection structure, an appressorium, to penetrate its host. Environmental cues and signal transduction systems on appressorium

formation of this fungus have been studied extensively during last decades. Addition of nutrients such as glucose and sucrose did not inhibit appressorium formation on inductive surfaces. However, yeast extract inhibited appressorium formation of *M. grisea* on inductive surface. To understand the biochemical mechanisms underlying the inhibition of appressorium formation by yeast extract, all possible components consisting of yeast extract were evaluated. Among them, vitamin B1 (thiamine) and B6 (pyridoxine) were found to inhibit the appressorium formation of *M. grisea* in a dose dependent manner. This inhibition effect were suppressed by the addition of cAMP or 1,16-hexadecanediol. These data suggest that thiamine and pyridoxine act on the upstream where cAMP acts. On the other hand, both vitamins induced appressorium formation on non-inductive surfaces and recovered appressorium formation inhibited by EGTA, neomycin, or W-7. It is assumed that vitamins are also involved in  $Ca^{2+}$ -dependent signaling pathway in this fungus. Although the precise biochemical mechanisms of these vitamins are unknown, it is evident that vitamin plays significant roles in the regulation of appressorium formation in *M. grisea*.

$Ca^{2+}$ /phospholipid-dependent serine/threonine protein kinases (PKC) are acting as transmitters and amplifiers in signal transduction which evokes a wide variety of responses in various cell types, such as cell proliferation, regulation of gene expression, membrane transport and organization of the cytoskeleton. It was elucidated that  $Ca^{2+}$  and diacylglycerol as known activators

of PKC are implicated in the endogenous signaling pathway leading to appressorium formation in *M. grisea*. To elucidate the role of PKC in infection-related morphogenesis in *M. grisea*, the PKC encoding gene, *MPKC*, was cloned using a PCR-based strategy. DNA blot analysis indicated that *MPKC* is present as a single copy in the haploid genome of *M. grisea*. The entire gene was isolated and subcloned from a subgenomic library and a BAC library. Sequence analysis showed that *MPKC* contains a putative 3895 bp open reading frame with five introns. The deduced amino acid sequence shows high homology to PKCs of other filamentous fungi and all define a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent subgroup of PKC. To determine the function of *MPKC*, a targeted gene disruption strategy was employed. All transformants carried the transforming vector at ectopic site(s) with an intact copy of *MPKC*. It is suspected that the disruption of *MPKC* may be lethal as demonstrated in *Schizosaccharomyces pombe*.

Expressed sequence tag (EST) analysis was applied to identify rice genes involved in defense responses against infection by the blast fungus (*Magnaporthe grisea*) and fungal genes involved in growth within the host during a compatible interaction. A total of 511 clones were sequenced from a cDNA library constructed from rice leaves (cv. Nipponbare) infected with *M. grisea* strain 70-15, to generate 296 non-redundant ESTs. The sequences of 293 clones (57.3%) significantly matched NCBI database entries: 221 showed homologies with previously identified plant genes and 72 with fungal genes. Among the genes with assigned functions, 32.8% were associated with

metabolism, 29.4% in cell/organism defense or pathogenicity, and 18.4% in gene/protein expression. cDNAs encoding a type I metallothionein (*MTs-1*) of rice and a homolog of glucose-repressible gene 1 (*GRG1*) of *Neurospora crassa* were the most abundant representatives of plant and fungal genes, comprising 2.9 and 1.6% of the total clones, respectively. The expression patterns of ten ESTs, five each from rice and *M. grisea*, were analyzed. Five defense-related genes in rice, including four pathogenesis-related genes and *MTs-1*, were highly expressed during *M. grisea* infection. Expression of five stress-inducible or pathogenicity-related genes of the fungus, including two hydrophobin genes, was also induced during growth within the host. Further characterization of the genes represented in this study would be an aid in unraveling the mechanisms of pathogenicity of *M. grisea* and the defense responses of rice. Rice cDNA encoding an acidic type of pathogenesis-related protein -1 (PR-1a) was cloned and characterized. The deduced PR-1a protein consisted of 168 amino acid residues, including 24 hydrophobic signal sequences at the N-terminus. The predicted molecular mass of the PR-1a was 15,728 Da with a theoretical pI of 4.5, an indication of an acidic protein. The PR-1a showed high homology to an acidic PR-1 of *Zea mays* (74%) and a previously identified basic type PR-1 of rice (64%). Both rice PR-1 and PR-1a genes were found to exist as small gene families through Southern blot hybridization analyses. The PR-1 mRNA was accumulated only in leaves, while the PR-1a transcript was accumulated throughout the

plant at a low level. Expression of both PR-1 genes was induced by infections of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*, or the bacterial leaf blight pathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, and the treatment of benzo (1,2,3) thiadiazole-7-carbothioic acid S-ethyl ester, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, or CuSO<sub>4</sub>. The expression of both PR-1 genes was higher and more rapidly induced in an incompatible interaction than in a compatible interaction in the rice *M. grisea* interactions.

# 여 백

## CONTENTS

Development of novel strategies to control rice blast disease based on the study of infection mechanisms of the pathogen	
Chapter 1. Introduction .....	23
Chapter 2. Contents and Results of the Research .....	31
1. Contents of the research .....	31
2. Development of novel control strategy through the inhibition of spore adhesion .....	32
1. Introduction .....	32
2. Materials and methods .....	33
가. Fungal isolates .....	33
나. Spore adhesion assay .....	33
다. Appressorium formation assay .....	33
3. Results and discussion .....	34
가. Characterization of substances related to conidial adhesion of <i>M. grisea</i> .....	34
1) Establishment of conidial adhesion assay system .....	34
2) Characterization of spore tip mucilage .....	37
나. Characterization of the biochemical properties of adhesion substances and the role of integrin .....	43
1) Effect of fibronectin antibody on conidial adhesion and appressorium formation .....	43
2) Effect of RGD- and related peptides on conidial adhesion and appressorium formation .....	47
3. Development of novel control strategy through the inhibition of appressorium formation .....	53
1. Introduction .....	53
2. Materials and methods .....	54
가. Fungal isolates .....	54
나. Appressorium formation assay .....	55

다.	DNA isolation and manipulation .....	55
라.	Fungal transformation .....	55
3.	Results and discussion .....	56
가.	Chemicals affecting appressorium formation in <i>M. grisea</i> ....	56
1)	Effect of vitamin on appressorium formation .....	56
2)	Effect of vitamin on cAMP- or Ca <sup>2+</sup> -dependent signal transduction pathway .....	60
나.	Characterization of the enzyme related to calcium signaling	
1)	Cloning of protein kinase C gene .....	65
2)	Functional analysis of Protein kinase C .....	82
4.	Development of novel control strategy based on the plant defense mechanisms .....	87
1.	Introduction .....	87
2.	Materials and methods .....	89
가.	Plant growth and inoculation .....	89
나.	mRNA isolation and construction of cDNA library .....	89
다.	Plasmid DNA isolation and sequencing .....	90
라.	Sequence analysis .....	90
마.	Treatment of BTH .....	91
바.	Treatment of abiotic stress .....	91
사.	RNA isolation and Northern blot analysis .....	91
아.	DNA isolation and Southern blot analysis .....	92
3.	Results and discussion .....	93
가.	Establishment of compatible or incompatible interactions between the rice and blast fungus .....	93
나.	Construction of cDNA library from a compatible interaction and generation of expressed sequence tags .....	97
1)	Construction of cDNA library .....	97
2)	Generation of expressed sequence tag .....	97
3)	Functional categorization .....	108
4)	Transcript abundance .....	110
5)	Expression analysis of 10 ESTs .....	113
다.	Cloning and expression analysis of defense related gene ..	116



1) Cloning of gene encoding PR-1a .....	116
2) Genomic organization of rice PR-1 genes .....	120
3) Tissue specific expression of PR-1 genes .....	122
4) Induction of PR-1 gene expression against pathogen infection .....	124
5) Induction of defense gene expression by BTH .....	126
6) Induction of defense gene expression by abiotic stress ..	128
 Chapter 3. Accomplishment and contribution of research .....	 130
 Chapter 4. Future application .....	 133
 Chapter 5. References .....	 135

# 여 백

## 목 차

### 병원균 침입기작 연구에 의한 벼 도열병 방제법 개발

제 1 장 서 론 .....	23
제 1절 연구개발의 필요성 .....	23
제 2절 연구개발의 목표 .....	29
제 2 장 연구개발 수행 내용 및 결과 .....	31
제 1절 연구개발 내용 .....	31
제 2절 도열병균 분생포자 부착 억제를 통한 새로운 방제법 개발 .....	32
1. 서론 .....	32
2. 재료 및 방법 .....	33
가. 공시균주 및 배양법 .....	33
나. 포자 부착 검정 .....	33
다. 부착기 형성 검정 .....	33
3. 결과 및 고찰 .....	34
가. 도열병균 분생포자의 표면 부착에 관련된 물질 규명 .....	34
1) 부착정도 측정법 개발 .....	34
2) Spore tip mucilage의 특성 규명 .....	37
나. 부착물질의 생화학적 특성 규명 및 Integrin의 역할규명 .....	43
1) Human fibronectin 및 fibronectin 항체를 이용한 부착억제현상 규명 .....	43
2) Integrin의 역할 규명 .....	47
제 3절 도열병균의 부착기 형성 억제를 통한 새로운 방제법 개발 .....	53
1. 서론 .....	53
2. 재료 및 방법 .....	54
가. 공시균주 및 배양법 .....	54
나. 부착기 형성 검정 .....	55
다. DNA isolation and manipulation .....	55
라. Fungal transformation .....	55
3. 결과 및 고찰 .....	56
가. 도열병균 부착기 형성에 관여하는 물질 .....	56

1) Vitamin이 부착기 형성에 미치는 역할 규명 .....	56
2) Vitamin이 calcium 및 cAMP 대사에 미치는 영향 .....	60
나. 세포내 calcium 대사에 관련된 효소의 역할 및 특성규명 .....	65
1) Protein kinase C 유전자 클로닝 .....	65
2) Protein kinase C의 기능분석 .....	82
제 4절 도열병균의 침입시 특이적으로 발현되는 벼 유전자를 이용한 새로운 방제법 개발 .....	87
1. 서론 .....	87
2. 재료 및 방법 .....	89
가. 식물 재배 및 병원균 접종 .....	89
나. mRNA 분리 및 cDNA library 제조 .....	89
다. Plasmid 분리 및 염기서열 분석 .....	90
라. 염기서열 분석 .....	90
마. BTH 처리 .....	91
바. Abiotic stress 처리 .....	91
사. RNA isolation and Northern blot analysis .....	91
아. DNA 분리 및 Southern blot analysis .....	92
3. 결과 및 고찰 .....	93
가. 친화적 및 비친화적 조합의 확립 .....	93
나. 친화적 조합으로부터 cDNA library 작성 및 expressed sequence tags의 염기서열 분석 .....	97
1) cDNA library 작성 .....	97
2) Expressed sequence tag 염기서열 분석 .....	97
3) Functional categorization .....	108
4) Transcript abundance .....	110
5) Expression analysis of 10 ESTs .....	113
다. 방어 관련 유전자의 클로닝 및 발현 특성 분석 .....	116
1) PR-1a 유전자 분리 및 염기서열 분석 .....	116
2) Genomic organization of rice PR-1 genes .....	120
3) PR-1 유전자들의 조직 특이적 발현 양상 .....	122
4) 병원균의 침입에 의한 PR-1 유전자들의 발현 .....	124
5) BTH에 의한 PR 유전자들의 발현 .....	126
6) Abiotic stress에 의한 PR-1 유전자들의 발현 .....	128

제 3장 연구개발 목표 및 대외기여도 .....	130
제 4장 연구개발 결과의 활용계획 .....	133
제 5장 참고문헌 .....	135

# 여 백

# 제 1 장 서 론

## 제1절 연구개발의 필요성

벼 도열병 (Rice blast)은 벼 농사를 짓는 세계 어디에서나 문제가 되는 가장 중요한 병 중의 하나이다. 쌀을 주식으로 하는 한국을 포함한 동남아시아에서는 그 중요도가 어디에서보다 크다고 하겠다. 도열병은 벼의 특정 생육시기에 만 발병하는 것이 아니라 거의 전 생육 시기를 통해 발병한다고 해도 과언이 아니다. 이앙재배를 주로 하는 우리나라에서는 모판에서부터 발생하기 시작하여 이삭이 여물 때까지 문제가 된다.

이 병의 방제를 위해서는 주로 경종적, 육종학적 측면에서의 노력과 화학농약의 사용이 주를 이루었다. 그러나 병원균 레이스의 역전 현상은 오랜 시간 동안의 노력으로 육성된 저항성 품종을 짧은 시간 내에 무너뜨리는 결과를 초래하였다. 또한 환경지속형 농업의 중요성이 날로 증대되고 있어 합성화학 농약에 의한 도열병의 방제도 점점 더 많은 제약조건을 갖기에 이르렀다. 또한 합성농약의 연용으로 인한 내성균의 출현 또한 새로운 개념의 환경보존형 방제법을 요구하고 있다.

지금까지는 주로 벼 도열병 방제를 위해 전통적인 연구방법들을 이용한 연구들이 수행되었으나 최근 들어 분자생물학의 발달로 식물병리학에서도 새로운 분자생물학 기법을 이용한 연구가 시작되고 있다 (Leong and Holden, 1990). 특히 벼 도열병에 대한 분자생물학적 연구는 식물병리학자들 뿐만 아니라 분자생물학자들 사이에서도 많은 연구가 진행되고 있으며 현재 미국 및 유럽의 선진국에서 활발히 진행되고 있다. 이는 물론 벼 도열병이 전 세계적으로 심각한 병이라는 점도 있지만 병원균과 기주체의

상호작용을 연구하는 중요한 모델시스템으로 여겨지기 때문이다 (Valent, 1990). 식물 병원균과 기주 식물체의 상호 관계를 연구하는데 시급적이 된 Flor의 유전자 대 유전자설이 벼와 도열병균 사이에서도 운용되고 있음이 최근에 증명되었다 (Sulie et al, 1992). 또한 벼 도열병균이 분자 생물학자들 사이에서 주목을 받고 있는 또 다른 이유는 인공 배지에서의 배양이 용이하다는 점과 짧은 시간 내에 인공배지 상에서 분생포자를 대량 생산할 수 있어 세대간의 변이를 빨리 알 수 있다는 것이다. 또한 최근 들어 2개의 교배형이 발견되어 서로간의 교배를 통해 고전적인 유전학적 접근이 가능하고 형질도입 (transformation) 실험법이 개발되어 분자 생물학적 연구도 가능하다는 장점이 있기 때문이다.

그러나 우리나라에서는 식량작물로서의 중요도가 가장 큼에도 불구하고 벼 도열병에 대한 연구는 다른 작물병에 비해 상당히 미미한 편이다. 우리나라에서도 채소의 바이러스병에 대한 분자생물학적 연구는 어느 정도 진행되고 있으나 벼 도열병에 대한 연구는 전혀 이루어지지 않고 있는 실정이다. 벼를 재배하는 지역이면 세계 어디에서나 가장 위협적인 병으로 여겨지는 도열병에 대한 연구가 미미하며 특히 분자생물학적 연구는 아직 시작도 못하고 있는 것은 식량안보 차원에서도 하루 빨리 이루어져야 한다고 생각한다.

본 연구에서는 도열병원균의 침입과정을 생화학적, 분자생물학으로 이해하여 벼 도열병을 효율적으로 방제할 수 있는 새로운 작용점 (target site)를 선별하여 새로운 개념의 환경친화적 방제 수단을 강구하고자 한다. 아울러 도열병원균의 침입시 벼의 방어기작을 분자생물학적으로 규명하여 벼와 병원균사이의 상호작용 이해를 통한 효율적인 방제법을 개발하고자 한다.



## 1) 기술적 측면

위에서 언급했듯이 식물병을 방제하기 위한 노력은 크게 화학 합성농약의 이용과 저항성 품종의 육성이 주를 이루고 있다. 식물병을 방제하기 위한 신농약의 개발은 자연에 존재하는 미생물의 대사산물이나 천연물로부터 병원균에 대해 길항작용을 나타내는 물질을 동정하여 보다 효과적으로 그 기능을 향상시키기 위해 이러한 물질들을 변환시키는 과정을 반복하고 있다. 이러한 물질들은 실제 포장에서 그 효과를 검증하기 위하여 온실 실험과 포장시험을 거치는 과정에서 거의 대부분이 탈락하고 있어 심지어는 1/50,000이라는 확률론까지 대두되고 있다. 또한 많은 물질들을 검정하기 위해서는 대규모의 시설과 인력 및 시간이 필요로 하기 때문에 이러한 생물학적 검정 방법을 최소화하려는 시도는 많이 있었다. 이러한 방법 중에서 가장 많이 이용되었고 현재도 어느 정도 이용되고 있는 것이 실험실 내에서 대상 병원균의 균사생장 억제 정도를 검정하는 것이었다. 그러나 균사생장 억제 정도와 실제 포장에서의 방제효과와는 높은 정의 상관관계가 발견되지 않아 많은 문제점을 나타내고 있다. 이는 단순한 균사생장 억제가 이러한 병원균들이 실제 병을 일으키는데 특이적으로 억제하지 못함을 제시하고 있다. 이러한 문제점들을 생각하면 병원균이 병을 일으키는 정확한 과정을 이해하고 병 발생에 결정적인 역할을 하는 과정을 억제할 수 있는 물질 선발 방법을 모색하는 것은 신농약의 개발에서 가장 절실히 요구되는 부분이라 할 수 있다. 이러한 작용점 특이적 물질들은 그 이외의 대상이나 대사에는 큰 영향을 미치지 않기 때문에 보다 나은 환경친화형 및 저독성 물질이 될 것이다. 이러한 요구를 충족시키기 위해서는 무엇보다도 먼저 병원균이 기주 식물체를 침입해서 병을

일으키는 일련의 과정을 이해해야 하는 것이 선결과제라 할 수 있다.

이러한 이유로 본 실험에서는 도열병균의 분생포자가 기주 식물의 표면에 부착하는 과정의 이해 및 이에 관련된 물질들을 동정하여 보다 효과적으로 도열병을 방제할 수 있는 방법을 개발하고자 한다. 또한 부착기 형성에 관여하는 신호전달체계를 이해하여 이들의 대사를 억제할 수 있는 물질들을 선발할 수 있는 체계를 구축하려고 한다. 이렇게 작용점 특이적 방제법은 새로운 개념의 병방제 수단일 뿐만 아니라 저독성으로 환경보전형 농업에 부응할 것이다.

다른 한편으로는 최근 들어 환경보전형 농업이 대두되면서 농약의 사용에 대한 규제가 한층 더 심화되고 있어 저항성 품종에 의한 병 방제가 그 어느 때 보다도 절실히 요구되어지고 있다. 도열병원균에 대해 강한 저항성을 나타내는 새로운 품종이 얼마 지나지 않아 병원균의 레이스 역전에 의해 쉽게 무너지는 것을 관찰해 왔다. 그러나 어떤 요인이 품종 저항성 발현에 관련되어 있고, 어떤 요인에 의해 저항성이 깨어지는지에 대한 정확한 규명은 불가능하였다. 일반적으로 집단 수준에서 병원균이 저항성 식물에 의해 도태압을 받게 되면 저항성 식물체를 침해할 수 있는 새로운 레이스로 변한다고 알고 있었을 정도였다. 그러나 최근 식물-병원균의 상호작용을 이해하는데 시금석이 된 Flor의 gene-for-gene 가설이 벼와 도열병원균간에 적용됨이 밝혀졌으며, 분자생물학적 연구기법이 이 분야의 연구에 적용되어짐에 따라 분자생물학적 수준에서의 규명이 시도되고 있다. 특히 최근 들어 한국, 일본, 미국 등에서 rice genome project가 대대적으로 수행되어 많은 벼 유전자가 클로닝 되었다. 그러나 병저항성과 관련된 유전자의 확보는 아직 미미한 수준이기에 이들 연구와 병행하여 병저항성에 관여하는 유전자들에 대한 연구가 절실히 요구되어진다.

본 연구에서는 벼-도열병균의 상호작용에서 비친화적 조합과 친화적 조합을 확립하여 저항성을 나타내는데 관여하는 벼 유전자를 확보하여 그들의 특성을 규명함으로써 저항성 품종의 육성을 위한 기초자료를 제공하고 자 한다.

## 2) 경제·산업적 측면

벼는 전세계적으로 가장 중요한 식량작물이며, 지구상 인구의 절반이 주곡으로 쌀을 이용하고 있다. 이러한 주곡작물의 안정적 확보는 국가경제 안정에 필수 불가결한 전제조건으로 여겨진다. 특히 최근 들어 WTO에 의한 국제교역이 의무화됨에 따라 그 중요도는 더욱 커지고 있다. 우리나라의 경우 많은 노력으로 1970년대 후반부터 이루어진 쌀의 자급은 우리나라 경제의 밑거름이 되었으며 공업화로 갈 수 있는 터전을 마련하였다. 그러나 1970년대 후반 통일계 품종 벼의 도열병에 대한 극심한 피해는 정부에서 재배 농민들에게 수백억원의 피해 보상을 해야하는 상황을 초래하였다. 최근 들어 벼 재배면적의 급속한 저하는 식량을 자급해야 하는 실정을 감안 할 때 그 어느 때 보다 다수확을 확보하기 위한 노력이 진행되어야 한다. 이러한 상황을 고려할 때 도열병 등과 같은 고질적이고 위협적인 병들로부터 벼를 보호해야만 극복 수 있다.

## 3) 사회·문화적 측면

식량의 자급은 국가경제의 원동력이 될 뿐 아니라 근래에 들어서는 국가안보에도 직결되는 아주 중요한 이슈로 자리잡고 있다. 현재 우리 나라

의 식량 자급율이 30%에도 잘 미치지 못하지만 그래도 다행인 것은 주곡인 쌀만은 자급자족 할 수 있기 때문이다. 이러한 면을 고려하면 쌀의 안정적 생산은 경제적 측면에서의 중요성 못지 않게 국민정서의 안정에 미치는 영향도 매우 크다. 또한 현재 우리 나라는 분단되어 있지만 통일 후의 상황을 대비하여 쌀 생산을 고려해야 한다. 위에서 열거한 여러 이유를 보더라도 쌀의 안정적 생산이 우리 사회에 미치는 영향은 대단하다. 이를 이루기 위해서는 벼를 도열병 등과 같은 고질적 위협으로부터 보호해야 한다는 당위성이 제기 된다.

## 제 2절 연구개발의 목표

벼 도열병균의 침입 과정 및 벼의 방어기작 이해를 통한 새로운 방제법을 개발하고자 한다. 이러한 최종 연구목표를 달성하기 위한 구체적인 연구 목표는 다음과 같다.

1. 벼 도열병균 분생포자의 기주식물 표면 부착 억제를 통한 병 방제 수단 개발
2. 벼 도열병균의 침입구조 (appressorium) 형성에 관련된 신호전달체계 교란을 통한 병 방제 수단 개발
3. 도열병 저항성에 관련된 벼 유전자의 확보, 특성 규명 및 병방제에 활용

# 여 백

## 제 2 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제1절 연구개발 내용

본 연구에서는 병원균의 침입기작 이해를 통한 벼 도열병 방제법 개발을 위해 다음의 실험을 수행하였다.

1. 도열병균 분생포자 부착억제를 통한 새로운 방제법 개발
  - 가. 도열병균 분생포자의 표면 부착에 관련된 물질 규명
  - 나. 부착물질의 생화학적 특성 규명 및 Integrin 의 역할 규명
  
2. 도열병균 부착기 형성 억제를 통한 새로운 방제법 개발
  - 가. 도열병균 부착기 형성에 관여하는 물질 규명
  - 나. 세포내 calcium 대사에 관련된 효소의 역할 및 특성 규명
  - 다. 부착기 형성에 관여하는 신호전달체계 간의 상관관계 규명
  
3. 도열병균의 침입시 특이적으로 발현되는 벼 유전자를 이용한 새로운 방제법 개발
  - 가. 저항성 기작연구 system 개발 및 cDNA library 작성
  - 나. Expressed sequence tags의 염기서열 분석
  - 다. Induced genes 확보 및 병저항성 관련 특성 규명

## 제 2절 도열병균 분생포자 부착 억제를 통한 새로운 방제법 개발

### 1. 서론

도열병균의 침입은 분생포자가 식물세포의 표면에 부착한 뒤 발아하고, 부착기를 만들어 침입함으로써 일어난다. 이중 포자의 부착은 침입을 하기 위한 가장 초기의 단계이며, 포자의 분산이나 형태발생, 기주식물과의 신호전달 등을 위해서 아주 중요한 단계라 할 수 있다. 도열병균의 포자가 벼 잎 표면 등 어떤 표면에 부착하는데는 포자가 수화된 뒤 포자 끝이 터지면서 나오는 spore tip mucilage (STM)에 의해 매개된다고 알려져 있다. 그러나, 포자의 부착에 관한 생화학적 메카니즘은 아직 잘 밝혀지지 않고 있다. 두꺼운 세포벽으로 둘러싸인 곰팡이 포자가 어떻게 식물의 표면이나 다른 기질을 인지하여 신호를 전달할 수 있는가 하는 점은 많은 과학자들의 관심거리가 되어왔다. 세포외부의 신호를 받아들이고 전달하는 메카니즘이 포자의 부착에도 관여되어 있을 것이라고 추정할 수 있으며, microtubule이나 F-actin cytoskeleton, G-protein, cAMP, mechanosensitive ion channel 등의 관련 여부에 관해 많은 연구가 되어왔다. 또한 세포의 부착에는 세포외부 점질물이 많은 영향을 주기 때문에, Extracellular matrix protein이 관여되어 있을 것이라고 추정할 수 있다. 본 연구에서는 이러한 도열병균의 포자 부착을 측정할 수 있는 방법을 확립하고, 포자 부착을 매개하는 세포외부의 단백질이 어떤 성질을 띠고 있는지 파악하며, ECM들이 포자부착에 어떤 연관을 가지는지 조사하였다.



## 2. 재료 및 방법

### 가. 공시 균주 및 배양법

전체 실험을 통하여 도열병균 (*Magnaporthe grisea*) strain 70-15를 공시균주로 사용하였다. 귀리한천배지에 streaking하여 계대배양을 하며 균주를 유지하였고, 동시에 포자를 준비하였다. 실험에 사용할 포자는 귀리한천배지 표면에 생긴 포자를 멸균된 Eppendorf tube끝으로 긁은 후 4 겹의 가아제로 거른 후  $1 \times 10^5$  conidia/ml로 맞추어 준비하였다.

### 나. 포자 부착 검정

도열병균의 포자 부착 검정 실험은 FMC사에서 나온 Gelbond의 소수성 또는 친수성 표면을 사용하여 실시하였다. 먼저 Gelbond 표면에 지름 2.5 mm의 원을 표시한 후, 농도가  $5 \times 10^5$  conidia/ml인 포자현탁액을 5  $\mu$ l 떨어뜨리고 chemical 5  $\mu$ l를 첨가하여 습도가 유지되는 플라스틱 상자에 넣어 25°C에 두었다. 일정 시간이 지난 후 현미경하에서 포자수를 모두 세고, 살균수로 부착되지 않은 포자를 씻어내었다. 그리고, 남아있는 포자를 다시 세었다. 포자의 부착율은 전체 포자수에 대한 살균수로 씻은 후의 포자수의 비율로 측정하였다. 각 실험구마다 200개 이상의 포자를 세었고, 모든 실험은 세 번 이상의 반복실험을 실시하였다.

### 다. 부착기 형성 검정

부착기 형성 검정도 FMC사의 Gelbond의 표면을 이용하여 수행하였다. 포자 부착율 검정에서와 마찬가지로 Gelbond 표면에 포자를 처리한 후 2시간이 지나 포자가 확실히 표면에 부착하고 난 후 chemical을 처리하여 14시간을 더 배양하였다. 이렇게 함으로써 각 chemical들이 특이적으로

부착기 형성에만 미치는 영향을 확인할 수 있었다. 포자 부착 검정에서와 마찬가지로 세 반복씩 두었고, 각 반복마다 200개 이상의 포자를 세었다. 각 실험은 세 번 이상의 반복 실험을 수행하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 도열병균 분생포자의 표면 부착에 관련된 물질 규명

##### 1). 부착정도 측정법 개발

도열병균의 포자부착에 대한 기초적인 조사를 수행하였다. 먼저 부착에 필요한 시간 및 표면성질과 부착능에 대한 상관관계를 조사하여 포자의 부착정도를 측정할 수 있는 실험법을 확립하였다.

먼저 시간에 따른 도열병균 분생포자의 발달상황을 관찰하였다. 포자현탁액을 Gelbond표면에 떨어뜨려 두면 30분 정도 지나서 발아관이 나오기 전에 먼저 표면에 부착하는 것이 관찰되었다. 이러한 발아관이 나오기 전의 포자의 부착을 Immediate adhesion이라 명명하였는데, 90분이 지나면 완료되는 것으로 나타났다 (그림 1). 2시간 정도 지나면 발아되기 시작하고, 곧 부착기를 형성하여 6시간정도 뒤에는 대부분의 발아관에서 부착기가 형성되었고, 8시간 정도 지난 뒤에는 대부분의 부착기에서 멜라닌이 집적되어 성숙한 부착기가 되는 것으로 확인되었다 (그림 2). 따라서 이후 포자의 부착능 검정은 포자현탁액을 떨어뜨린 후 두 시간 이내에 관찰하였다.

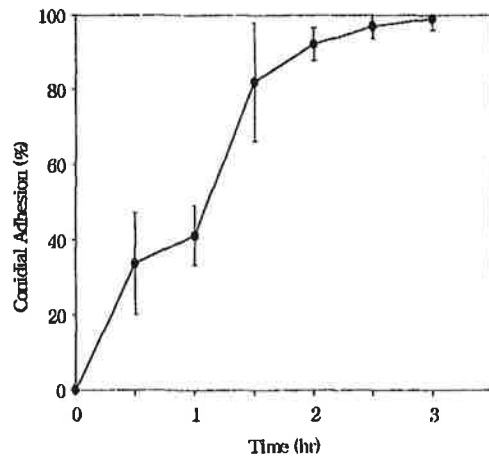


Fig.1. Time-course of conidial adhesion by *M. grisea* on hydrophobic surface of Gelbond film. Conidial adhesion rate was determined by assessing approximately 200 conidia by a method as described in Materials and Methods. Results are at least three separate experiments with three replicates per treatment.

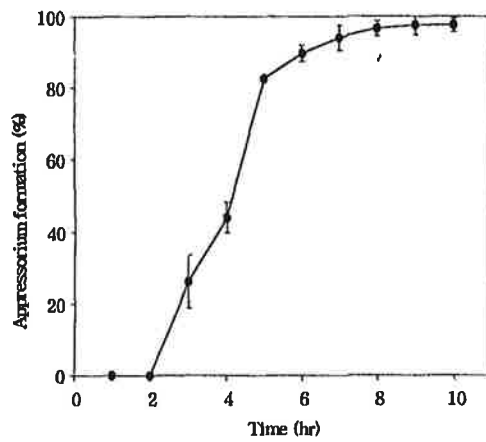


Fig. 2. Time-course of appressorium formation by *M. grisea* on hydrophobic surface of Gelbond film. Appressorium formation rate was also determined by assessing approximately 200 conidia by a method as described in Materials and Methods. Results are at least three separate experiments with three replicates per treatment.

## 2) Spore tip mucilage의 특성 규명

포자의 부착에 관련된 물질이 단백질인지 아닌지를 확인하기 위해 열처리, Proteinase를 처리하였다. Proteinase K를 처리한 결과 포자의 부착과 부착기 형성 모두 억제되었고, 이 현상은 처리한 Proteinase K의 농도와 정비례하였다. 이로써 포자 부착에 관련된 물질이 단백질임을 확인할 수 있었다.

또한, 포자를 상온, 37℃, 65℃에서 2시간, 121℃에 20분 처리한 후 부착능, 부착기 형성능을 확인하였다. 상온과 37℃ 처리에서는 포자의 부착과 부착기 형성능 모두 영향을 받지 않았으나 65℃, 121℃ 처리에서는 포자의 부착이 감소되었고, 부착기는 형성되지 않았다 (그림 3). 열처리를 한 포자는 대조구에 비해 약 50% 정도의 부착능을 가지고 있었는데, 이 결과는 포자의 부착관련 물질이 단백질과 함께 다른 물질로 이루어져 있음을 암시하고 있다. 그 중의 하나로 당 성분을 생각할 수 있기 때문에, 여러 가지 당을 competitor로 사용하여 포자의 부착과 부착기 형성에의 영향을 조사하였다. 표 1에서와 같이 50 mM 농도로 처리하였을 때 galactose만이 포자의 부착과 부착기 형성을 억제하였다. galactose는 1 mM 이상의 농도에서는 처리농도에 비례하여 포자의 부착과 부착기 형성을 억제하였다 (그림 4). galactose에 의하여 억제된 포자의 부착과 부착기 형성은 모두 cutin monomer인 1,6-hexadecanediol에 의해 회복되었다 (표 2). 그러나, cAMP와 IBMX는 galactose에 의한 저해를 회복시키지 못하였다. 이 결과로 보아 포자의 부착과 발아관의 부착에 의한 부착기 형성에 관여하는 물질이 galactose를 포함하는 당단백질일 가능성이 높다는 것을 알 수 있었고, 이 galactose는 식물체의 화학신호물질로 작용하는 cutin monomer의 수용체와 연관이 있을 가능성이 있다는 가정을 할 수 있었다. 또한, 부착기 형성에 있어 cAMP 관련 신호전달체계는 cutin monomer에 의

해 자극이 되는 신호전달체계와는 다르다는 가정을 할 수 있었다

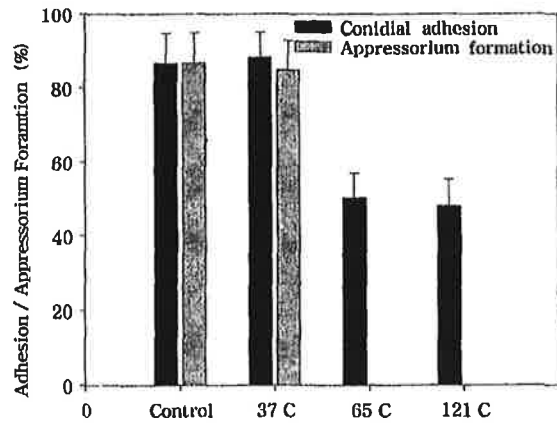


Fig. 3. Effect of heat treatment on conidial adhesion and appressorium formation by *M. grisea* 70-15. A control (25°C) condition was at room temperature, warm-heating condition (37°C and 65°C) was used with water-bath, autoclaving temperature was 121°C. All experiments were at least three independently tested, each experiments has three replicates.

Table 1. The effect of various sugar sources on conidial adhesion and appressorium formation by *M. grisea*.

Treatment <sup>a</sup>	Conidial adhesion <sup>b</sup>	Appressorium formation <sup>b</sup>
Galactose	53.0 ± 6.0	10.0 ± 10.2
Lactose	75.0 ± 10.0	70.0 ± 2.0
Dextrose	73.0 ± 6.6	80.0 ± 4.6
Fructose (+)	75.0 ± 7.3	75.0 ± 3.0
Fructose (-)	78.0 ± 5.9	63.0 ± 3.1
Mannitol	74.1 ± 8.8	73.7 ± 7.0
Sorbitol	75.4 ± 2.6	73.0 ± 6.2
Sucrose	76.2 ± 8.4	80.7 ± 8.8
Control	71.0 ± 1.5	75.0 ± 3.0

a. What was the concentration of 50mM

b. mean and standard deviation

Experiments were done on hydrophobic surface of gel bond. Data show the results of three experiments which has three replications each.



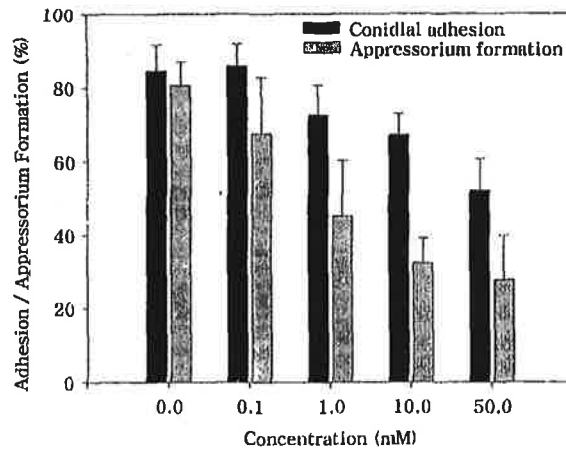


Fig. 4. Effect of galactose on conidial adhesion and appressorium formation by *M. grisea* 70-15 in dosage dependent manner. A control treatment was only distilled water of same volume instead of galactose solution. All experiments were at least three independently tested, each experiment has three replicates.

Table 2. The effect of cAMP, IBMX, and Diol on conidial adhesion and appressorium formation inhibited by galactose in *M. grisea*.

Treatment	Conidial adhesion <sup>a</sup>	Appressorium formation <sup>a</sup>
Control <sup>b</sup>	95.8 ± 1.6	97.9 ± 0.8
galactose 50mM	52.1 ± 8.6	27.7 ± 12.1
galactose 50mM + cAMP <sup>c</sup> 10mM	56.3 ± 1.2	37.9 ± 2.6
galactose 50mM + IBMX <sup>d</sup> 2.5mM	61.7 ± 4.2	40.6 ± 4.7
galactose 50mM + Diol <sup>e</sup> 0.01mM	84.3 ± 8.9	93.6 ± 3.5

- a. mean and standard deviation
- b. phosphate buffer (10mM, pH5.8) of same volume
- c. cAMP is cyclic adenosine monophosphate
- d. IBMX is 3-isobutyl-methylxanthine
- e. Diol is 1,16-hexadecanediol

Experiments were done on hydrophobic surface of gel bond. Data show the results of at least three experiments which has three replications each.

나. 부착 물질의 생화학적 특성 규명 및 integrin의 역할 규명

1) Human fibronectin 및 fibronectin 항체를 이용한 부착 억제 현상 규명

지금까지 Extracellular matrix proteins (ECMs)이 부착현상과 관련이 있는지를 조사하기 위해서는 주사전자현미경이나 fluorescein isothiocyanate-conjugated antibody를 이용한 flow cytometry를 사용하였다. 본 연구에서는 ECM중의 하나인 fibronectin에 대한 항체를 처리하여 포자의 부착과 부착기 형성이 저해되는지 조사하였다. 1/100 농도에서 포자의 부착과 부착기 형성이 저해되었고, 저해 정도는 처리농도에 비례하였다 (표 3). Human fibronectin 항체에 의해 저해된 포자 부착과 부착기 형성이 cAMP 또는 cutin monomer에 의해 회복되는지를 조사하였다. 1/50 농도에서 저해된 포자 부착과 부착기 형성 모두 cutin monomer인 1,6-hexadecanediol에 의해서는 회복이 되었으나 cAMP에 의해서는 회복되지 않았다 (표 4, 그림 5). 이상의 결과로 도열병균의 포자 부착과 부착기 형성에 인간의 extracellular matrix protein인 fibronectin과 유사한 물질이 관여함을 알 수 있었다. 또한, 이러한 extracellular matrix protein이 식물의 화학 신호 (cutin monomer)에 의한 신호전달체계를 매개하는 역할을 한다고 가정할 수 있었다.

Table 3. The effect of fibronectin antibody on conidial adhesion and appressorium formation by *M. grisea* 70-15 in dosage dependent manner.

Treatment <sup>a</sup>	Conidial adhesion <sup>b</sup>	Appressorium formation <sup>b</sup>
Control <sup>c</sup>	95.8 ± 1.6	97.9 ± 0.8
1/50	44.4 ± 4.2	22.0 ± 3.8
1/100	55.0 ± 7.2	37.7 ± 1.1
1/250	88.5 ± 0.1	79.9 ± 0.3
1/500	91.0 ± 2.8	88.6 ± 2.2

- a. What was the concentration of diluted human fibronectin antibody
- b. mean and standard deviation
- c. distilled water of same volume

Experiments were done on hydrophobic surface of gel bond. Data show the results of three experiments which has three replications each.

Table 4. The effect of cAMP and Diol on conidial adhesion and appressorium formation inhibited by fibronectin antibody in *M. grisea* 70-15.

Treatment	Conidial adhesion <sup>b</sup>	Appressorium formation <sup>b</sup>
Control <sup>c</sup>	95.8 ± 1.6	97.9 ± 0.8
1/50 <sup>a</sup>	44.4 ± 4.2	22.0 ± 3.8
1/50 <sup>a</sup> +cAMP <sup>d</sup> 10mM	55.0 ± 7.2	37.7 ± 1.1
1/50 <sup>a</sup> +Diol <sup>e</sup> 0.01mM	88.5 ± 0.1	79.9 ± 0.3

- a. What was the concentration of diluted human fibronectin antibody
- b. mean and standard deviation
- c. distilled water of same volume
- d. cAMP is cyclic adenosine monophosphate
- e. Diol is 1,16-hexadecanediol

Experiments were done on hydrophobic surface of gel bond. Data show the results of three experiments which has three replications each.



Fig. 5. The microscopic photographs of results in appressorium formation inhibited by fibronectin antibody.

Germinated conidia of *M. grisea* formed appressoria on hydrophobic surface of GelBond (A). Germinated conidia of *M. grisea* did not form Appressorium on hydrophilic surface of GelBond (B). Appressorium formation of hydrophobic surface was inhibited by 1:50 diluted fibronectin antibody (C). Appressorium formation inhibited by fibronectin antibody was restored by cAMP (D). Ratio of microscopy was  $\times 100$ . CO : conidia, GT : germ tube, AP : appressorium

## 2) Integrin의 역할 규명

도열병균의 포자 부착과 부착기 형성에 당 단백질인 extracellular matrix protein이 관여한다는 것을 확인하였다. 일반적으로 세포 외부의 신호를 인지하여 세포 내부로 전달하는데 integrin이라고 알려진 transmembrane glycoprotein이 작용하는 것으로 알려져 있다. 이렇게 세포 외부의 신호를 인지하는 integrin의 수용체는 extracellular matrix protein에서 흔히 발견되는 Arg-Gly-Asp (RGD) peptide와 친화성이 높으며, 인공합성된 RGD peptide를 처리함으로써 그 기능이 억제된다는 것이 밝혀졌다. 도열병균에서도 integrin이 포자의 부착과 부착기 형성에 어떤 역할을 하는지를 RGD와 관련 peptide를 처리하여 조사하였다. 표 3에서와 같이 RGD, RGDS, RGES peptide들은 포자의 부착을 억제하였다. 이 peptide들은 또한 부착기 형성도 억제하였다. GRGDSPK peptide도 부착기 형성을 억제하였다. 이 peptide의 경우 고농도로 처리하였을 때 포자 부착도 억제하였다. 반면, GGGG, GRGD, GRGDS등은 포자 부착과 부착기 형성 모두 영향을 주지 않았다. 또한 처리한 모든 peptide들은 포자의 발아에는 아무런 영향을 주지 않았다 (표 5).

처리한 peptide중에서는 RGD peptide가 가장 효과적으로 포자 부착과 부착기 형성을 억제 하였는데, 이 억제 효과는 처리 농도에 비례하였다. 부착기 형성 억제 효과는 0.5 mM ~ 2 mM에서 확실하였으며, 포자 부착 억제는 2 mM이상 처리하였을 때 확실하였다 (그림 6).

RGD peptide에 의한 포자 부착과 부착기 형성 억제가 어떠한 신호전달 체계를 따르는지 알아보기 위하여 cAMP, IBMX, 1,6-hexadecanediol을 처리하였다. RGD peptide에 의해 억제된 포자 부착과 부착기 형성 모두 위 세 가지 처리에 의해서 회복되었다 (표 6, 그림 7). 이 결과로 보아 도열병균의 포자 부착과 부착기 형성에 모두 integrin이 외부의 신호를 매개

하며, 이러한 신호전달에는 cAMP 관련 신호전달체계와 cutin monomer에 의한 신호전달체계 모두 관련되어 있다는 것을 알 수 있었다.



Table 5. The effect of various phosphate buffered (10mM, pH 5.8) peptides on conidial adhesion and appressorium formation by *M. grisea*.

Treatment <sup>a</sup>	Conidial adhesion <sup>b</sup>	Appressorium formation <sup>b</sup>
Control <sup>c</sup>	78.7 ± 5.6	80.7 ± 5.8
GGGG	85.3 ± 7.3	78.2 ± 5.2
GRGD	73.3 ± 5.1	77.4 ± 7.3
GRGDS	63.9 ± 10.7	68.4 ± 12.2
GRGDSPK	63.0 ± 5.5	35.8 ± 8.0
RGD	47.1 ± 8.4	23.4 ± 8.8
RGDS	54.5 ± 15.9	19.8 ± 5.1
RGES	54.7 ± 8.8	22.6 ± 7.5

a. What was the concentration of 2mM

b. mean and standard deviation

c. The phosphate buffer (10mM, pH5.8) alone was used as a control

Experiments were done on hydrophobic surface of gel bond. Data show the results of three experiments which has three replications each.

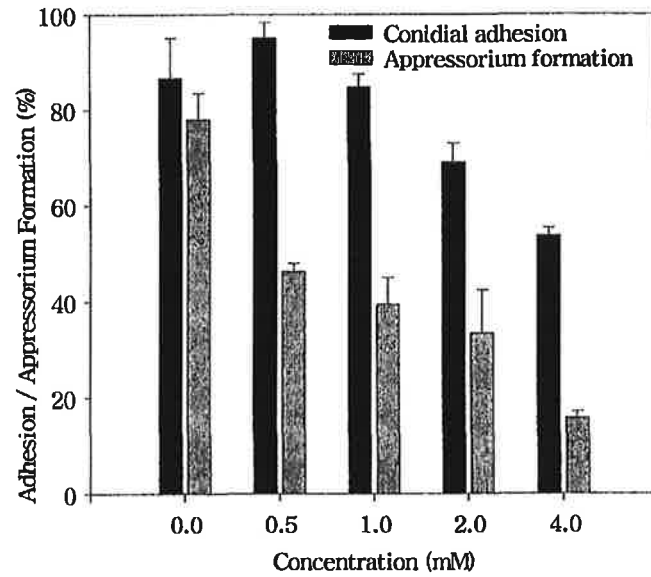


Fig. 6. Effect of RGD peptide on conidial adhesion and appressorium formation by *M. grisea* 70-15 in dosage dependent manner. A control treatment was only phosphate buffer (10mM, pH5.8) of same volume instead of diluted RGD peptide.

Table 6. The effect of cAMP, IBMX, and Diol on conidial adhesion and appressorium formation inhibited by RGD peptide in *M. grisea*.

Treatment	Conidial adhesion <sup>a</sup>	Appressorium formation <sup>a</sup>
Control <sup>b</sup>	95.8 ± 1.6	97.9 ± 0.8
RGD 2mM	69.0 ± 4.0	33.3 ± 9.0
RGD 2mM +cAMP <sup>c</sup> 10mM	86.6 ± 1.1	64.5 ± 6.2
RGD 2mM +IBMX <sup>d</sup> 2.5mM	88.4 ± 3.5	68.8 ± 2.4
RGD 2mM +Diol <sup>e</sup> 0.01mM	88.2 ± 4.6	76.9 ± 2.8

a. mean and standard deviation

b. phosphate buffer (10mM, pH5.8) of same volume

c. cAMP is cyclic adenosine monophosphate

d. IBMX is 3-isobutyl-methylxathine

e. Diol is 1,16-hexadecanediol

Experiments were done on hydrophobic surface of gel bond. Data show the results of three experiments which has three replications each.

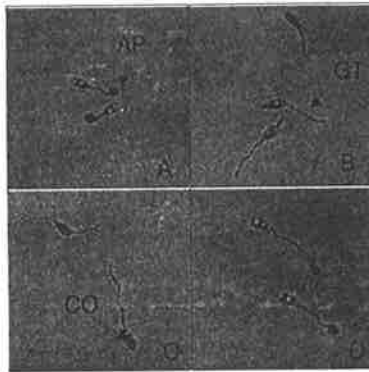


Fig. 7. Germinated conidia of *M. grisea* formed appressoria on hydrophobic surface of GelBond (A). Germinated conidia of *M. grisea* did not form Appressorium on hydrophilic surface of GelBond (B). Appressorium formation of hydrophobic surface was inhibited by RGD peptide 2mM (C). Appressorium formation inhibited by RGD peptide in *M. grisea* was restored by cAMP (D). Ratio of microscopy was  $\times 100$ . CO: conidia, GT: germ tube, AP: appressorium

### 제 3절. 도열병균 부착기형성 억제를 통한 새로운 방제법 개발

#### 1. 서론

벼 도열병균의 분생포자는 기주표면에 단단히 부착한 뒤 발아관을 내어 발아한다. 발아관의 길이가 약 20 mm 정도 되면 식물체를 침입하기 위해 부착기 (appressorium)를 형성한다. 도열병균을 인공배지상에서 배양하면 발아관은 계속 영양 성장을 해 군사체를 형성하는 반면 기주 식물체에서는 이렇게 침입구조 (부착기)로 분화한다. 다른 식물 병원균들처럼 도열병균 또한 기주 식물체에서뿐만 아니라 비기주 식물, 심지어는 인공 표면 위에서도 부착기를 형성한다. 도열병균의 부착기 형성을 유도하는 요인들을 알아보기 위해 여러가지 종류의 인공 표면에서 부착기 형성을 유도한 결과 표면의 물리 화학적 성질에 기인한다고 보고되었다. 특히 본 연구자들에 의해 접촉 표면의 소수성이 도열병균의 부착기 형성에 충분한 요인임이 밝혀졌다. 부착기 형성을 유도하는 요인들로는 물리적 성질 (접촉 표면의 소수성 정도) 이외에 화학적인 요인들이 있다. 여기에는 식물체 표면의 cutin monomer가 포함된다.

접촉 표면의 소수성 정도가 부착기 형성을 유도하는 요인으로 작용하기 위해서는 소수성 표면의 인식이 세포 내로 전달 되어야하고 세포 내에서도 형태적인 변화를 유발하기 위해서는 일련의 작용이 이루어져야 한다. 일반적으로 이러한 작용들을 신호전달체계 (Signal transduction)라고 한다. 식물병원균에서의 이러한 연구는 거의 진행되지 않았다. 최근 도열병균의 부착기 형성과 관련한 일련의 연구가 이 분야의 시초라고 하겠다.

앞에서 언급했듯이 부착 표면의 소수성이 부착기 형성을 유도한다고 알려져 있다. 그러나 친수성 표면에서도 외부에서 cAMP를 첨가하면 부착기가 형성되었다. 또한 cAMP의 유도체들을 첨가했을 때도 같은 결과를 얻을 수 있었다. 이러한 현상은 세포내의 cAMP의 고농도화가 부착기 형성에 관여한다는 증거를 제시하였다. 따라서 메카니즘을 일반화시키기 위해 여러 화분과 작물 및 잡초로부터 분리한 20여 균주를 사용하여 실험해 본 결과 cAMP는 벼 뿐만 아니라 다른 기주로부터 분리한 균주에서도 운용됨이 밝혀졌다. 최근 도열병균 부착기 형성에서의 cAMP의 역할을 유전자 수준에서 알아보기 위해 도열병균 cAMP-dependent protein kinase (PKA)의 catalytic subunit 유전자를 클로닝하여 그 역할을 규명한 결과 세포내의 cAMP 대사는 도열병 발생에 결정적 역할을 한다는 것이 밝혀졌다. 또한 본 연구실에서는 cAMP 이외의 second messenger로서 calcium의 역할을 규명하였다.

보다 구체적인 역할을 규명하기 위해서는 이들간의 연관관계를 규명함이 요구된다. 본 연구에서는 도열병균의 부착기 형성에 관련된 새로운 신호전달물질을 찾고 cAMP 또는 calcium 관련 신호전달체계와는 어떻게 연관되어 있는지를 조사하였고, calcium 관련 신호전달체계의 중요한 매개체인 protein kinase C의 역할을 규명하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 공시 균주 및 배양법

전체 실험을 통하여 도열병균 (*Magnaporthe grisea*) strain 70-15를 공시균주로 사용하였다. 귀리한천배지에 streaking하여 계대배양을 하며

균주를 유지하였고, 동시에 포자를 준비하였다. 실험에 사용할 포자는 귀리한천배지 표면에 생긴 포자를 멸균된 Eppendorf tube끝으로 긁은 후 4 겹의 가아제로 거른 후 포자농도를  $1 \times 10^5$  conidia/ml로 맞추어 준비하였다.

#### 나. 부착기 형성 검정

준비된 포자 현탁액을 Gelbond 표면에 떨어뜨리고, 습실상에서 하룻밤 동안 배양한 다음 관찰하였다. 각 시약은 처리농도의 10배 stock으로 만든 후 전체 처리 양의 1/10을 처리하였다.

#### 다. DNA isolation and manipulation

도열병균의 genomic DNA를 추출할 때는 Rogers and Bendich의 방법을 이용하였고, plasmid 분리, 제한효소 처리, blotting, Southern hybridization 모두 일반적인 방법에 따라서 실시하였다.

Sequencing은 BigDye terminator kit를 이용하여 반응시키고, ABI 377 DNA sequencer를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

#### 라. Fungal transformation

곰팡이의 형질전환은 protoplast를 이용하였다. 포자를 이를 키운 균사로부터 protoplast를 만들고  $5 \times 10^7$  protoplast/ml 농도로 맞추었다. Knock-out vector plasmid 5  $\mu$ g을 준비하여 CaCl<sub>2</sub>와 PEG법으로 형질전환 시켰다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 도열병균 부착기 형성에 관여하는 물질

##### 1) Vitamin이 부착기 형성에 미치는 역할 규명

Beckerman 등의 연구결과에 의하면 yeast extract가 mating type specific하게 부착기 형성을 억제하는 것으로 보고되었다. 그러나, yeast extract의 어떤 성분이 부착기 형성 억제에 관여하는지 밝혀지지 않았기 때문에 각 구성성분이 부착기 형성에 어떠한 영향을 미치는지 그 생화학적인 메커니즘을 조사하였다. 주 영양소인 glucose나 sucrose, casamino acid는 부착기 형성에 영향을 미치지 않았다. 그러나, 2%의 Peptone과 Tryptone을 처리하였을 때 부착기 형성이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다 (표 7).

미량원소의 처리에서는 비타민 B1과 B6가 부착기 형성에 영향을 주는 것으로 나타났다 (그림 8, 9). 두 가지 성분 모두 dual effect를 나타내었는데, 소수성 표면에서는 50 mM 이상에서 부착기 형성을 억제하였고 친수성 표면에서는 50 mM 이하에서 부착기 형성을 유도하였다.



Table 7. Effect of different media on appressorium formation in *Magnaporthe grisea*

Treatment	Conidia germination (ave $\pm$ sd)	Appressorium formation (ave $\pm$ sd)
2% Yeast extract	98.0 $\pm$ 0.0	8.0 $\pm$ 0.0
2% Casamino acid	99.0 $\pm$ 0.0	96.3 $\pm$ 3.8
2% Peptone	99.0 $\pm$ 0.0	9.0 $\pm$ 1.0
2% Tryptone	98.7 $\pm$ 0.6	41.0 $\pm$ 24.6
2% Sucrose	95.3 $\pm$ 0.6	96.7 $\pm$ 1.2
Water	98.0 $\pm$ 1.0	92.3 $\pm$ 8.1

A conidial suspension in an appropriate media was placed on the hydrophobic side of Gelbond film and incubated in a moistened box at 25°C for 18 h.

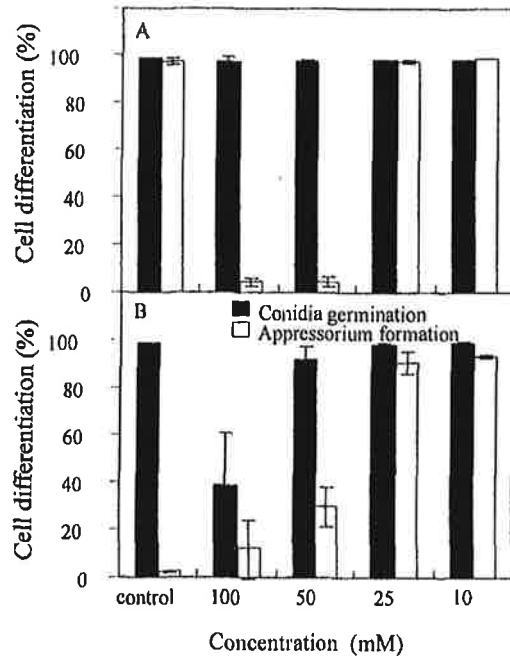


Fig 8. Effect of thiamine-HCl dosage on appressorium formation in *Magnaporthe grisea*.

A. Hydrophobic surface. B. Hydrophilic surface.

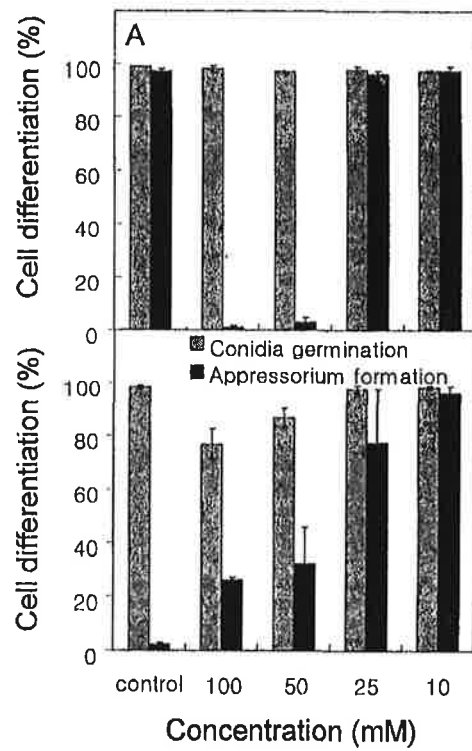


Fig. 9. Effect of pyridoxine-HCl dosage on appressorium formation of *Magnaporthe grisea*.

A. Hydrophobic surface, B. Hydrophilic surface

## 2) Vitamin이 calcium 및 cAMP 대사에 미치는 영향

도열병균에서는 외부의 신호를 전달하여 부착기 형성을 유도하기 위해서 cAMP와 calcium 관련 신호 전달 체계가 관여함이 밝혀졌다. 따라서, vitamin이 이러한 신호전달체계에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다.

먼저 yeast extract에 의해 억제되었던 부착기 형성이 cAMP나 cutin monomer에 의해 회복되는지를 확인하기 위하여 2% yeast extract와 cAMP, IBMX, 1,6-hexadecanediol을 함께 처리하였다. 그 결과 yeast extract에 의해 억제되었던 부착기 형성이 cAMP를 첨가함으로써 회복되었다. 그러나 IBMX는 부착기 형성을 회복시키지 못하였다. Cutin monomer인 1,6-hexadecanediol도 yeast extract에 의해 억제된 부착기 형성을 어느 정도 회복시켰다 (표 8).

이러한 현상은 yeast extract의 성분인 Vitamin B1 (Thiamine)과 B6 (Pyridoxine) 처리에 의한 부착기 형성을 회복시키는 실험에서도 동일한 결과를 나타내었다 (표 0).

이러한 결과로 미루어 보아 Vitamine B1과 B6는 도열병균의 부착기 형성에 있어 cAMP 관련 신호전달체계에 영향을 주는 것으로 보인다. 그 정확한 작용점은 아직 알 수 없으나, cAMP를 생성하는 adenylyate cyclase보다 상위에 작용하여 세포 내에 cAMP가 만들어지지 못하게 하는 negative regulator로 작용하는 것으로 생각된다.

Table 8. Complementation of appressorium formation by cAMP, IBMX, and 1,16-hexadecanediol inhibited by 2% yeast extract

Treatment	Conidia germination (ave $\pm$ sd)	Appressorium formation (ave $\pm$ sd)
2% Yeast extract	98.7 $\pm$ 0.6	3.7 $\pm$ 1.2
+ 10 mM cAMP	98.7 $\pm$ 0.6	98.7 $\pm$ 0.6
+ 2.5 mM IBMX	99.0 $\pm$ 0.0	1.7 $\pm$ 1.2
+ 1,16-hexadecanediol (10 $\mu$ M)	99.0 $\pm$ 0.0	29.3 $\pm$ 12.5
Water	99.0 $\pm$ 0.0	98.3 $\pm$ 0.6

A conidial suspension in an appropriate media was placed on the hydrophobic side of Gelbond film and incubated in a moistened box at 25°C for 18 h.

Table 9. Complementation of appressorium formation inhibited by treatment of 50 mM thiamine-HCl or 50 mM pyridoxine-HCl.

Treatment	Conidia germination	Appressorium formation
50 mM Thiamine-HCl	99.0 ± 0.0	2.3 ± 0.6
+ 10 mM cAMP	98.3 ± 0.6	98.3 ± 1.2
+ 2.5 mM IBMX	20.0 ± 3.5	6.7 ± 2.1
+ 10 μM 1,16-hexadecanediol	98.0 ± 0.0	27.7 ± 3.5
50 mM Pyridoxine-HCl	98.3 ± 0.6	12.0 ± 4.0
+ 10 mM cAMP	98.0 ± 1.0	96.0 ± 1.0
+ 2.5 mM IBMX	92.7 ± 4.9	22.0 ± 6.1
+ 10 μM 1,16-hexadecanediol	97.0 ± 1.0	86.0 ± 10.5
Control	99.0 ± 0.0	96.0 ± 1.0

A conidial suspension in an appropriate media was placed on the hydrophobic side of Gelbond film and incubated in a moistened box at 25°C for 18 h.

Calcium 관련 신호전달체계에 vitamin이 영향을 미치는지를 조사하기 위하여 calcium chelator인 EGTA, Phospholipase C의 inhibitor인 neomycin, calmodulin antagonist인 W-7에 의해 억제된 부착기가 vitamin 처리에 의해 회복되는지를 조사하였다. 두 가지 vitamin 모두 10 mM 농도에서 effector chemical에 의해 억제된 부착기 형성을 유도하였다 (표 10). 이러한 결과로 Calcium관련 신호전달체계에 vitamin이 어떠한 식으로든 영향을 미치고 있다고 생각할 수 있었다.

Table 10. Complementation of appressoria by 10 mM thiamine-HCl or 10 mM pyridoxine-HCl in the effect of appressorium-formation inhibitory chemicals.

Treatments	Conidia germination (Percent $\pm$ SD)	Appressorium formation (Percent $\pm$ SD)
Neomycin 1 mM	88.7 $\pm$ 5.9	7.3 $\pm$ 2.1
Neomycin 1 mM + thiamine 10 mM	98.3 $\pm$ 0.6	94.0 $\pm$ 2.7
Neomycin 1 mM + pyridoxine 10 mM	98.3 $\pm$ 0.6	96.7 $\pm$ 1.5
EGTA 10 mM	86.3 $\pm$ 4.2	4.3 $\pm$ 1.5
EGTA 10 mM + thiamine 10 mM	98.3 $\pm$ 0.6	97.0 $\pm$ 1.0
EGTA 10 mM + pyridoxine 10 mM	98.3 $\pm$ 0.6	94.0 $\pm$ 1.7
DMSO control	97.7 $\pm$ 0.6	50.7 $\pm$ 6.0
w-7 10 $\mu$ M	97.7 $\pm$ 0.6	16.7 $\pm$ 2.1
w-7 10 $\mu$ M + thiamine 10 mM	98.7 $\pm$ 0.6	98.3 $\pm$ 0.6
w-7 10 $\mu$ M + pyridoxine 10 mM	98.3 $\pm$ 0.6	97.7 $\pm$ 0.6
Water		
Hydrophobic	98.7 $\pm$ 0.6	95.3 $\pm$ 1.5
Hydrophilic	97.7 $\pm$ 0.6	1.0 $\pm$ 0.0

A conidia suspension containing these chemicals was placed on the hydrophobic surface of Gelbond film and incubated in a moistened box at 25°C. Appressorium formation was determined as described in Materials and Methods.



나. 세포내 calcium 대사에 관련된 효소의 역할 및 특성 규명

1) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase C 활성화 연구

Protein Kinase C (PKC)는 Serine/Threonine protein kinase의 한 종류로서 다양한 세포에서 세포 분열, 특정 유전자의 발현등을 조절하는 신호전달체계에 연관되어 있다고 알려져 있다. 최근, PKC 활성을 조절하는 칼슘이온과 diacylglycerol이 도열병균의 부착기 형성을 조절한다고 보고되어 PKC의 중요성이 더욱 부각되었다. 도열병균이 침입시 형성하는 부착기로 분화할때의 PKC 효소의 역할을 구명하기 위하여 먼저 부착기로 분화할 때의 PKC 활성을 측정하였다. 부착기가 유도되는 조건과 분화되지 않는 조건의 세포에서 전체 단백질을 분리한 후 non-radioactive protein kinase C assay를 한 결과 이러한 방법으로는 명확한 결론을 내리기가 어려웠다. 그래서, 좀더 직접적으로 protein kinase C를 encoding하는 유전자를 클로닝하여 이 유전자를 disruption함으로써 그 역할을 밝히는 유전적인 접근을 수행하였다. 이를 위해 먼저 EST database에 올라있는 염기서열을 근거로 probe를 찾아내고, genomic Southern hybridization을 수행하여 도열병균의 genome내에 PKC 유전자가 1 copy로 존재함을 밝혔다 (그림 11). 이때, probe를 찾기 위한 sequence는 Genbank accession number AF056142였으며, nitrogen-starved mycelial culture에서 나온 EST sequence이다. 여기에서 primer를 제작하였는데, PKCF, 5'-CCATCAAAGTCCTCAAGAAGG-3'; PKCR, 5'-GAGGTCGCGCTAAATGACACC-3'의 한 쌍이다. 이 primer를 이용하여 도열병균의 genomic DNA를 주형으로 PCR반응을 수행하고, 그 결과 나온 DNA 조각을 pGEM-T Easy vector에 클로닝하였다. 전체 유전자를 클로닝하기 위해서 먼저 BamHI으로 자른 genomic

DNA를 이용하여 subgenomic library를 제조한 후 위 primer로 정확한 클론을 PCR sib-selection법으로 screening하였다 (그림 12). 하지만 이렇게 찾은 클론은 전체 full ORF를 가지고 있지 않았기 때문에, BAC library를 다시 탐색하여 full ORF를 가진 클론을 찾아내고, 염기서열을 분석하였다. 이렇게 MPKC (*Magnaporthe grisea* PKC)로 명명한 이 유전자는 3895개의 염기쌍으로 이루어져 있으며 1182개의 아미노산으로 이루어진 한 개의 open reading frame을 encode하고 있었다 (그림 13). MPKC는 이미 다른 동물이나 다른 곰팡이에서 보고된 유전자와 상당히 유사하고, 이 유전자에서 발현되는 MPKC는  $Ca^{2+}$ 에 의해서는 활성화되지 않는 new PKC 그룹에 해당한다는 것을 밝힐 수 있었다 (그림 14, 15). 또한 UPGMA method를 이용하여 phylogenetic tree를 분석하여 본 결과 MPKC는 다른 곰팡이에서 밝혀진 PKC 유전자와 한 그룹을 이루고 있음을 알 수 있었다 (그림 16).

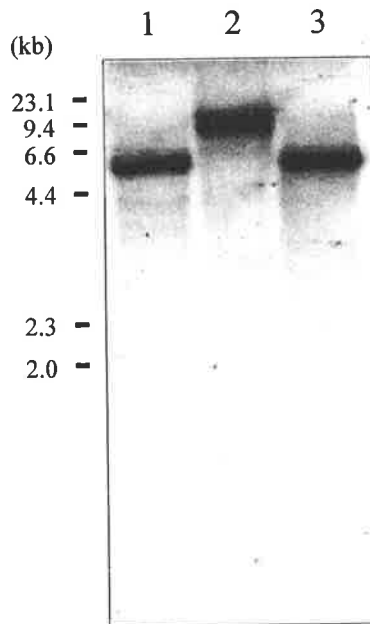
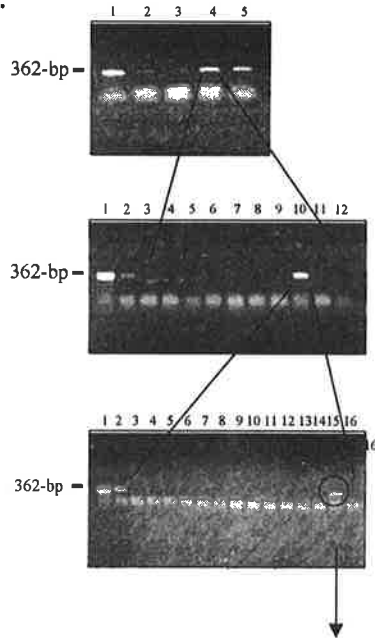


Fig. 11. Southern hybridization analysis of *M. grisea* wild-type strain 70-15 .

Genomic DNA was digested with *Bam*HI (lane 1), *Eco*RI (lane 2), or *Hind*III (lane 3), electrophoresis on a 0.8 % agarose gel, transferred to a nylon membrane and probed with pPKC362 under low-stringency conditions. The presence of a single hybridizing band indicates that *mpkc* exists as a single copy in the genome. Numbers at left indicate the size of DNA.

**A.**



The First PCR

- Lane 1 : Positive control
- Lane 2, 3, and 4 : Pool of 144 clones
- Lane 5 : Pool of 141 clones

The Second PCR

- Lane 1, 2 : Positive control
- Lane 3-12 : Pool of 16 clones

The Third PCR

- Lane 1, 2 : Positive control
- Lane 3-16 : single clone

**B.**

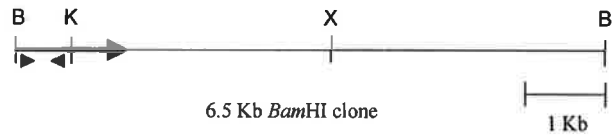
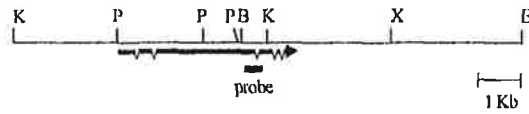


Fig. 12. Series of PCR on Subgenomic Library.

(A) Subgenomic library covering between 4.0- and 6.5-kb *Bam*HI region of *M. grisea* 70-15 genomic DNA was screened by series of PCR using PKCF and PKCR primers. The first PCR was performed on the 4 pools divided from total 573 clones, and the predicted 362-bp fragments were amplified in three pools (Lane 2, 4 and 5). Positive control indicates the use of genomic DNA as template DNA for PCR. Groups of 16 clones from one of three positive pools, the third pool, were subjected to PCR and only one group exhibited 362-bp band (Lane 10). At third PCR, individuals of this group were subjected to PCR and only one clone was determined and designated as pKCH001.

(B) Restriction map of an 6.5-kb *Bam*HI fragment (pKCH001) covering the only 3' region of the corresponding region of other PKC genes. B, *Bam*HI; K, *Kpn*I; X, *Xba*I.

A.



B.

```

- 882                GGCTTGGGCAGGACTTGGTGAATTGAATCCTACCTTACATCA
- 840    CCTAAGTACTCACCTGCATGTTTGTCTATCTAACGTTACCTGCTGTCTGTCAAAAAGCTA
- 780    TCCGACAATAGGTAACACTGCAACAAAGCGTCTGCAATTGCTTACCACAGCAACCATTCT
- 720    TGTCAGTCCGAAACCATTATCCCCTCCTGGTCTAAACGGTTGGTTCATGTTCCATTGGTC
- 660    CGACTGTCCATCCTAACTCCCTATCACTGGGTTATGGTTTTTTTTCTTGTTCCTTTTCAT
- 600    GTTTTTCATCCTCCTTTTCTTTTCTCATTTTTTTTTCTAGTCCACTTTGCTGCTCCTTT
- 540    CCTTGGACCTTGGATGGCTTGTACTGGCAAAACCCGCCCTGCTTGTCTACCTACCCCAAGT
- 480    CAGTCCACGGGCTCCACCACATAATAACGCCGAACTTGGACTTGTGCCCAAATGTGCC
- 420    TCTGTCTGCAATTGTGCGTCTGCACTTACTGACAACCTTACTGGCTCCTCAGAACAAAGT
- 360    CCTCCAACCTCCCGATATTTTCAGCCGTCACCATTTCTACAACCGAGGCTTCTGCCGAG
- 300    TGTGCGGTGTGAGAGCGGGGGGCAACAGATTAGCTCTGTATAGACTTGTTCAGAAAGCA
- 240    ACCCTTTCACAGGCGCGGATTTTTCGAACCACAACAACCCCGGTTTCACTGTGCGGTTG
- 180    ACGCCATTGTTTCAGCCTGGTTCCTCCTCAACAGTCGGTTCATTCAAGGCAGGGGCGGACTG
- 120    ACTGTCGATCTAGAAGCAGTCCACGGCAAACGTCCTCAAGACATTGCAGGTCTTGGGAATT
- 60    TTAGTGAATGAACATTTTCGAGATCCGAAACCGACCGTCTTAGGCTTGAAGTGCAGTGC
1 - ATGGATGACAGGATACAAGACATTTACAAAAGATCGAGCGGAGAAAGCTTTGATAAAT - 60
    M D D R I Q D I Y K K I E R E K A L I N
61 - GCTGCCAACTTGATGCGACAGCAGACCAACAATGATGCCGTCCGATCCAAGCTCGACACC - 120
    A A N L M R Q Q T N N D A V R S K L D T
121 - CAGATGCGCGAGGGCCCGCAACCTCGAGTTCCTTTGAAGGGACACTGCGGAAATGCAG - 180
    Q M R E G R R N L E F F E G T L R E M Q
181 - ATGCGCAGTATGGGTCAAGGAATGACAAACCTGAGCATCGGCGGTCCACCCTTGCCTGCC - 240
    M R S M G Q G M D N L S I G G S T L A A
241 - AGCGCCTCCTTTCCTCCGCCCCGCAAGTGCCTGAGGAAGATGCCCCATGCCTCCT - 300
    S A S S S S R P R S A V E E D G P M P P
301 - CCTAAAGATGGGGGATATGGCGCTGGTGGCGACGGCTATGCCAAACGCAATACAGTCAG - 360
    P K D G G Y G A G G D G Y G Q T Q Y S Q
  
```

361 - ATCGGCGAGCATGGCGATCTGATGCCGCCTCGAGGTCCTTTCCGCAACCAAGGCCAGGG - 420  
           I G E H G D L M P P R G P F A N Q G P G  
 421 - AGCCATATTCAAAAACAAGACCAAACCTTACAAAGCTGGgtgagtcgaccggttgcaat - 480  
           S H I P K T R P N F T K L D  
 481 - aactagcggcaatgtaaacatcataagattccctagcigacaactgcaatttgatcgcg - 540  
   Intron I  
 541 - acagATCTGATCAAATACGACACGCCATACCTTGGCCCCGGATTCAGCTCATGCTGTCG - 600  
           L I K Y D T P Y L G P R I Q L M L S  
 601 - CAAATTC AATTC AACTCAATGTTGAGGAACAGTATCTGAAAGGCATCGAAAAGATGGTA - 660  
           Q I Q F K L N V E E Q Y L K G I E K M V  
 661 - CAGTTGTATCAGATGGAGGGTGATAAGAAGAGCAGAGCCGATGCAGCCGCCCGTCGGGT - 720  
           Q L Y Q M E G D K K S R A D A A A R R V  
 721 - GAGAGCAAGCAAAAATCCTACTATTGAAACAGGCTTTGCGAAGATACGAAGAATTGCAT - 780  
           E S K Q K I V L L K Q A L R R Y E E L H  
 781 - ATAGACATTGACTCGGGAGATTACCCGGATGgtaagcatttggcgctggaaggtcactac - 840  
           I D I D S G D S P D D  
 841 - ccctctgggctcaattacagtaacctgctaacacttttactttcccgagATGATAGTATC - 900  
   Intron II  D S I  
 901 - AACATGCCCAACCTCCGGAAGCCCTTACCGGTCAATTATCGATTGAGTCATTGCCATC - 960  
           N M P N L R K P L T G Q L S I R V I A I  
 961 - AAAGATGTCGACCACGCTCCGACAGGCGCTTTGCCCGAGGCCCCGACACTTTCGTGGCG - 1020  
           K D V D H A P T G R F A R G P D T F V A  
 1021 - ATCAAGGTGGAAGACAATATAGTGCCTTACCGAGTATCTCGAACAGACAGGTGGGAG - 1080  
           I K V E D N I A A R T R V S R T D R W E  
 1081 - AACGAGTATCACAACGTCGAGGTCGACAAGGCAACGAAATTGAGCTCACCGTTTACGAC - 1140  
           N E Y H N V E V D K A N E I E L T V Y D  
 1141 - AAACCCGGAGAGCACTCAATCCCATCGGGATGCTTTGGGTCAGAATATCTGATATCGCT - 1200  
           K P G E H S I P I G M L W V R I S D I A  
 1201 - GAAGAGCTGCGAAGGAAGAAGATCGAAGCGGAAACTAATAGTCTGGGCTGGGTGTCAGCG - 1260  
           E E L R R K K I E A E T N S L G W V S A  
 1261 - GACCGCATGGGCGACGTGAACCCCTGCTGCCAGAGTTCGCCCTCCGCAATCCCAATGAAC - 1320  
           D R M G D V N P A A R V P P P Q F P M N  
 1321 - ACTCAGCAGCGGACGCTGGTGGTCCAGTATCCCCGGCATCCAGGGCCAGCAGCAAGGG - 1380  
           T Q Q R Q P G G P V S P G I Q G Q Q Q G  
 1381 - TATGGTCAACCGGGGATCCGCAACCGGGTCAGCAAGGTGAGATGGGACAGGTTGAG - 1440  
           Y G Q P G D P Q Q P G Q Q G Q M G Q V Q

1441 - GAACCTATTACAGGCTGGTTAACCTCGAGCTTACTGGCTCCATTAGCTCAGCTTGAAC - 1500  
E P I T G W F N L E L T G S I O L S L N  
1501 - TTCTCAAACAGAGCAAGGACCGTCGCCCTGTGGACTTGGGTCTTGGACGCAAGGGCGCC - 1560  
F F K Q S X D R R P V D L G L G R K G A  
1561 - ATCCGCCAACGCAAGGAGGAGGTTACGAGATGTATGGACACAAGTTTGTGGAGCGCCAG - 1620  
I R Q R K E E V H E M Y G H K F V E R Q  
1621 - TTCTACAACATCATGCGCTGCGCTCTCTGCGGAGACTTCCTCAAGGGCGGATCGGGGATG - 1680  
F Y N I M R C A L C G D F L K G G S G M  
1681 - CAGTGCAGGATTGCAAGTACACTTGCATATCAAGTGTACAGAGCGTGGTCAACAAA - 1740  
Q C E D C K Y T C H I K C Y T S V V T K  
1741 - TGCATCAGCAAATCCAACGCTGAAACTGATCCGGATGAGGAGAAGATCAACCACCGGATT - 1800  
C I S K S N A E T D P D E E K I N H R I  
1801 - CCTCACAGATTTCGGCATTCTCTAACCTCACTGCTAATTGGTGTCTACTGCGGTTAC - 1860  
P H R F V A F S N L T A N W C C H C G Y  
1861 - CTATTGCCATTTCGAAAGAAAACTGCAGAAAATGCAGCGAGTGTCAAATGGCGGCCCAT - 1920  
L L P F G K K N C R K C S E C Q M A A H  
1921 - GCTGGCTGTGTACATCTGGTCCCTGACTTTTGGCGGTATGTGATGGCTGTGCGAATCAA - 1980  
A G C V H L V P D F C G M S M A V A N Q  
1981 - ATTCTCGAGGGTATCAGGTCACAGAAACAACGCCAGCAAAGGCAAGCTCTATGAGTGAC - 2040  
I L E G I R S Q K Q R Q Q K A S S M S D  
2041 - CGCACGTTGCGAGTGGAAAAATGAGCCCGCTGGCTCCGGGCATGCCTCATCGGCATCA - 2100  
R T L R S G K M S P P G S G H A S S A S  
2101 - TTCTCTCAGGGCATGGGATCAAGCTACGGTCAGGCATCTCCTGAAGCCACGGAAGCTGCC - 2160  
F S Q G M G S S Y G Q A S P E A T E A A  
2161 - AAATTCATGTACTCTAGCCAAACTTCACCTCAGCGGATCACCTCCCCAGACAGGACATCA - 2220  
K F M Y S S Q T S P Q R I T S P D R T S  
2221 - AGCTCGTCACAAAGCTGCGGCTGCGGCAACGGCTGCTATGACCGGCTGCGGGAGCCATG - 2280  
S S S Q A A A A T A A M T G L P G A M  
2281 - TCTTCTCAGCCTGGACGACAAGGACAGCAGCCAATAACTGACTACGGTTTCGGCCAGCGGG - 2340  
S S Q P G R Q G Q Q P I T D Y G S A S G  
2341 - GGTGCTATGGTTCGTATGGTCCGCACGATGATCCATACGCACAGCCACAGCAATCGCCA - 2400  
G R Y G S Y G P H D D P Y A Q P Q Q S P  
2401 - CCGCCGCAACAGCAAGCGGCTTACGGACAGCCTCAGCAGCGAAAGTACAACCCCGCGGAC - 2460  
P P Q Q Q A A Y G Q P Q Q R K Y N P A D  
2461 - TATGCCAACATCAGCGGGGATACGGCAGTCAGCCGAGATGGCTCAGCAACCGCAGCAA - 2520  
Y A N I S G G Y G S Q P Q M A Q Q P Q Q



2521 - GCTCGGCCCAACAGCAGCAGCAACAGCCGTTGTACTCTCCACAGCAGCACGCATCCCAA - 2580  
 A R P Q Q Q Q Q Q P L Y S P Q Q H A S Q  
 2581 - GCTCAGCAACCCCTGTACCTGTAAAGCAGCAGCATCAGGAACAACAATCATCTCACCG - 2640  
 A Q Q P L S P V K Q Q H Q E Q Q I I S P  
 2641 - ACTGCAGGAACCGTCATTCCGACATCTGCGAGGAGGCCTTTCCTTCAGCCACGGATCCT - 2700  
 T A G T V I P T S A R R P L P S A T D P  
 2701 - GGTACAGCCAGCGTATCGGGCTTGACCACTTCAACTTCTTGGCTGTGCTTGGAAAAGGGC - 2760  
 G T G Q R I G L D H F N F L A V L G K G  
 2761 - AATTCGCAAGGTCATGCTTGCAGAAATCCAAGAAGACTAGGAACTCTATGCCATCAA - 2820  
 N F G K V M L A E S K K T R K L Y A I K  
 2821 - GTCCTCAAGAAGGAGTTCATTATCGAGAACGACGAGGTTGAGAGCATCCGCTCAGAGAAG - 2880  
 V L K K E F I I E N D E V E S I R S E K  
 2881 - CGGGTGTTCCTCATCGCCAACAGGGAACGCATCCATTCTCACCAACCTGCACGCCTGT - 2940  
 R V F L I A N R E R H P F L T N L H A C  
 2941 - TTCCAGACCGAGACGCGTGTATACTTCGTGGAAGAATACATTAGTGGTGGAGATTTGATG - 3000  
 F Q T E T R V Y F V E E Y I S G G D L M  
 3001 - TTGCACATTCAACGAGGACAGTTCGGCACCCGTAGGGCCCAgtaagttacaaaaccaca - 3060  
 L H I Q R G Q F G T R R A Q  
 3061 - gtggccctgccacaccgtgaaagttttcaatgacactccgtagATTCTATGCTGCCGAA - 3120  
 Intron III F Y A A E  
 3121 - GTTGTCTGGCTCTCAAGTACTTCCACGAGAACGGTGTATCTACCGTATCTCAAGCTC - 3180  
 V C L A L K Y F H E N G V I Y R D L K L  
 3181 - GACAACATCCTTCTCACTCTTGACGGTACATCAAGATTGCCGACTATGGTCTTTGCAAG - 3240  
 D N I L L T L D G H I K I A D Y G L C K  
 3241 - GAAACATGTGGTACGGCTCTACCACGAGCACETTCTGCGGTACCCCGAGTTTATGGCA - 3300  
 E D M W Y G S T T S T F C G T P E F M A  
 3301 - CCAGAAGtaagcaaatatggccccctagcttttgaccagtaacigacttgcgcgcgagA - 3360  
 P E Intron IV I  
 3361 - TTTTGTGACAAGAAGTATGCCCGAAGCACTGACTGTTGGCGTTTGGCGTTTGTATCT - 3420  
 L L D K K Y G R A V D W W A F G V L I Y  
 3421 - ACCAGATGCTTCTCAGCACTCGCCTTTCAGAGGTGAAGACGAAGATGAGATCTACGAGC - 3480  
 Q M L L Q Q S P F R G E D E D E I Y D A  
 3481 - CCATTCTGGCGGACGAGCCGCTGTATCCTATTACATGCCGCGACTCTGTTTCGATCT - 3540  
 I L A D E P L Y P I H M P R D S V S I L  
 3541 - TGCAGAAGCTGCTCACCAGGAACCGGACCAGCGTCTGGGAAGTGGCCCGACTGATGCC - 3600  
 Q K L L T R E P D Q R L G S G P T D A Q

3601 - AGGAGGTCATGTCGCAGCCCTTCTCCGCAACATCGTCTGGGATGACATCTACCACAAGC - 3660  
           E V M S Q P F F R N I V W D D I Y H K R  
 3661 - GCGTGGCCACCCTTCTGCGCAGATCAAGAGTGCACGGACACGAGTAACCTTACT - 3720  
           V A P P F L P Q I K S A T D T S N F D S  
 3721 - CAGAGTTACTAGTGTACGCCTGTCTGACGCCAGTCCAATCAGGtaagtagccaaggc - 3780  
           E F T S V T P V L T P V Q S V  
 3781 - cgtatgacgaactgctttgatatcagcaactaaccagtatcttctcaatagagTTCTGTC - 3840  
   Intron V  L S  
 3841 - CCAAGCGATGCAGGAGGAGTTCGCGGCTTTTCGTACACGGCAGACTTTGATTGAGATTG - 3900  
           Q A M Q E E F R G F S Y T A D F D .  
 TTCATGGAACTGCAACAAAAATTACTTGTGTCAGCTTAACAAGCGCCAAACGTCATGACC - 3960  
 CCAGGGAGCCACATGTAGGAATAGTCCGTGGGATATTTGTACGCATGTTGATATGAATC - 4020  
 CCTCGGCATGGCTTTCCTGCTGGTGGATTAATCTGCTGGGAACCCGAGCGATTACAGAG - 4080  
 AAAGAATCTTGGATTCTCCACAGCAACGATCGAACATGTGCTTGGAAAGATCAGAACCAGA - 4140  
 ATGCGCGAAGATACTATTTCGCGTCTACGGTTGACTGAGTCAGCTTTTGGGGATGGAC - 4200  
 CGGAGATGTTGGTCGAGCCATAACTTTTGCCTACTACTTCTCCTCAGTATACCCCTTCAC - 4260  
 TCGTTTTAACCAATAGCGAACGAGTGGCATTGATAGATGTAATGATACAAAGCGAGGTA - 4320  
 TGAGTGTGAGCTGGAGAGTATCCATCATCCAGACGTGATTACATTGGTGGTCTATGCA - 4380  
 TGGTGCCCTCTTGGATGTCTAATTCGAAATCATATAATATACAAAAAACACAGTATGT - 4440  
 ACTTGGCGTGAAGGTGCCAGTTGGCCATGTTTTGACACGGCCACCTCAATTCCTCACCA - 4500  
 GCAAGGCGAACGCACCGGCGAAAATTACTGCTCCAGCCAGGGCACCCCTTAGTGCATGA - 4560  
 TGGAAACCTCACGCATTGTAAGGTCGATCCTCCGCTCACTGTACAGGCTGTAGAGAACTG - 4620  
 GGCCCCACAGCTTCGGATCTACGATAACCTCAGTCCAGGGCTGGGGAGGGGGAGAGCTAG - 4680  
 GCTCAGGGTCAGTTCGGCTATGACAACAACCTCGTCAGGGCCCGTACCGACGACCTCGA - 4740  
 CTTGGTCTACAAACGCTTGCCTGATGACAGCGCAGGGCTCAGCAGCAGGGGTTGCTTGA - 4800  
 CAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTTCTCAAACGCAGCCAGGGCGCCCTGACAG - 4860  
 CCTCGAGCTCCTGCTTGAACCTCATCCATCATGGGCTTCTCGCCCTCGGCGATGCTCCTGA - 4920  
 CCAGCCTGCGGCGCCTCCACGGCTCGGCGACGAACTGCA - 4959

Fig. 13. Genome structure and DNA Sequence of *MPKC* and Its Predicted Translation Product

A. Genomic structure of *MPKC*. The large arrow indicate the direction of transcription and the length of the ORF, introns are indicated by hooks. Solid underbar indicates the probe, or pKCH362. K, *KpnI*; P, *PstI*; B, *BamHI*; K, *KpnI*, X, *XbaI*.

B. Translation start point and intron positions are presumed based on alignment with previously sequenced PKC genes and the matching of the intron splice signals with similar sequence in other filamentous fungi. Gray boxes indicate putative TATA motif and CAAT motif, respectively. The nucleotide sequence has been numbered with the "A" of the ATG start codon as +1. Five putative introns are presented in lowercase letters and 5' and 3' splice sites and the possible consensus lariat sequences are underlined. Period indicates the termination codon. GenBank accession number is AF136600.

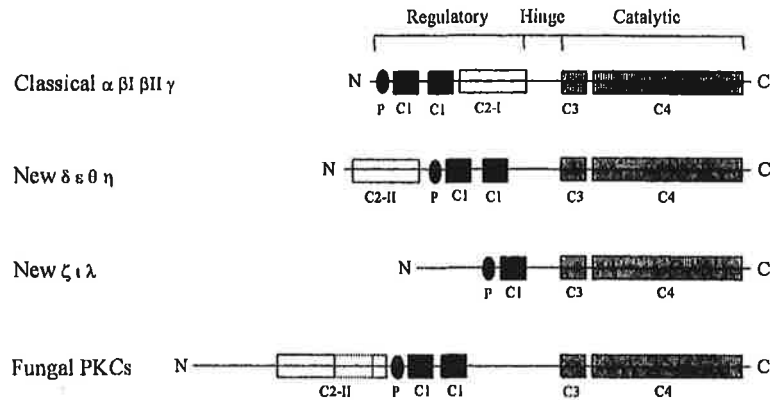


Fig. 14. Schematic representation of the primary structure of the PKC isozymes in comparison to fungal PKCs.

The structure of fungal PKCs is a result of a multiple alignment of *A. niger* (AC Q00078), *C. albicans* (AC P43057), *C. heterostrophus* (AC Y15839), *M. grisea* (AF136600), *N. crassa* (AC Y12002), *S. cerevisiae* (AC P24583), *S. pombe* (AC P36582 and AC P36583) and *T. reesei* (AC Q99014). Members of each isozyme subclass are listed at the left. N, amino terminus; C, carboxyl terminus; P, pseudosubstrate site; C1, cysteine-rich domain for binding DAG; C2-I, calcium regulated C2 domain; C2-II, not calcium regulated C2 domain; C3 and C4, catalytic domain for binding ATP and substrate.

A

Mj_MFC	GLRGRVGRSEMEML	RFVCFNIM	N	GEIRKFGC	ET	KYR	IT	MSWIKCSKSNVEI
Nc_HFC	RLRGRVGRSEMEML	RFVCFNIM	N	GEIRKFGC	ET	KYR	IT	MSWIKCSKSNVEI
Tc_RCL	GLRGRVGRSEMEML	RFVCFNIM	N	GEIRKFGC	ET	KYR	IT	MSWIKCSKSNVEI
Ss_RCSs	GLRGRVGRSEMEML	RFVCFNIM	N	GEIRKFGC	ET	KYR	IT	MSWIKCSKSNVEI
Rf_HFC	ALRGRVGRSEMEML	RFVCFNIM	N	GEIRKFGC	ET	KYR	IT	MSWIKCSKSNVEI
An_HCA	GLRGRVGRSEMEML	RFVCFNIM	N	GEIRKFGC	ET	KYR	IT	MSWIKCSKSNVEI
Ch_HCL	GLRGRVGRSEMEML	RFVCFNIM	N	GEIRKFGC	ET	KYR	IT	MSWIKCSKSNVEI
Sp_ICO2	GLRGRVGRSEMEML	RFVCFNIM	N	GEIRKFGC	ET	KYR	IT	MSWIKCSKSNVEI
Sp_ICO1	GLRGRVGRSEMEML	RFVCFNIM	N	GEIRKFGC	ET	KYR	IT	MSWIKCSKSNVEI
Sc_HCL	GLRGRVGRSEMEML	RFVCFNIM	N	GEIRKFGC	ET	KYR	IT	MSWIKCSKSNVEI
Oa_RCL	GLRGRVGRSEMEML	RFVCFNIM	N	GEIRKFGC	ET	KYR	IT	MSWIKCSKSNVEI

Mj_MFC	EKINRIL	REVESLQNN	I	SLLRGRKSNCR	SE	DM	FC	MLMEL	EM
Nc_HFC	EKINRIL	REVESLQNN	I	SLLRGRKSNCR	SE	DM	FC	MLMEL	EM
Tc_RCL	EKINRIL	REVESLQNN	I	SLLRGRKSNCR	SE	DM	FC	MLMEL	EM
Ss_RCSs	EKINRIL	REVESLQNN	I	SLLRGRKSNCR	SE	DM	FC	MLMEL	EM
Rf_HFC	EKINRIL	REVESLQNN	I	SLLRGRKSNCR	SE	DM	FC	MLMEL	EM
An_HCA	EKINRIL	REVESLQNN	I	SLLRGRKSNCR	SE	DM	FC	MLMEL	EM
Ch_HCL	EKINRIL	REVESLQNN	I	SLLRGRKSNCR	SE	DM	FC	MLMEL	EM
Sp_ICO2	EKINRIL	REVESLQNN	I	SLLRGRKSNCR	SE	DM	FC	MLMEL	EM
Sp_ICO1	EKINRIL	REVESLQNN	I	SLLRGRKSNCR	SE	DM	FC	MLMEL	EM
Sc_HCL	EKINRIL	REVESLQNN	I	SLLRGRKSNCR	SE	DM	FC	MLMEL	EM
Oa_RCL	EKINRIL	REVESLQNN	I	SLLRGRKSNCR	SE	DM	FC	MLMEL	EM

B

	I	II	III	IV
Mg_MPCK	RIGLDHFNFLAVIGGKHEGKVMLAESKKTREKLYA	IKLKKKEFI	ENDEVESIRSEKRVFLI	ANRERHFFLTNLHACFQTE
Nc_PKC	RIGLDHFNFLAVIGGKHEGKVMLAETKRSKRLYA	IKLKKKEFI	ENDEVESIRSEKRVFLI	ANRERHFFLTNLHACFQTE
Tr_PKC1	RIGLDHFNFLAVIGGKHEGKVMLAETKRSKRLFA	IKLKKKEFI	ENDEVESIRSEKRVFLI	ANRERHFFLTNLHACFQTE
Sa_PKCSa	RIGLDHFNFLAVIGGKHEGKVMLAETKRSKRLYA	IKLKKKEFI	ENDEVESIRSEKRVFLI	ANRERHFFLTNLHACFQTE
Df_PKC	RIGLDHFNFLAVIGGKHEGKVMLAETKQTKLYA	IKLKKKEFI	ENDEVESTREKRVFLI	ANRERHFFLTNLHACFQTE
An_PKCA	RIGLDHFNFLAVIGGKHEGKVMLAETKSTKRLYA	IKLKKKEFI	ENDEVESTREKRVFLI	ANRERHFFLTNLHACFQTE
Ch_PKC1	RIGLDHFNFLAVIGGKHEGKVMLAETKTTKLYA	IKLKKKEFI	ENDEVESTREKRVFLI	ANRERHFFLTNLHACFQTE
Sp_PCK2	RIGLEDFTLAVIGGKHEGKVMLAELKSEKQLYA	IKLKKKEFI	ENDEVESTREKRVFLI	ANRERHFFLTNLHACFQTE
Pc_PCK1	RVTLDDFTFLAVIGGKHEGKVMLAEKYKSKKPYA	IKLKKKEFI	ENDEVESTREKRVFLI	ANRERHFFLTNLHACFQTE
Sc_PKC1	KVSLDNFVLLKVLGKHEGKVMILSKSMTDRLCAL	IKLKKKEFI	ENDEVESTREKRVFLI	ANRERHFFLTNLHACFQTE
Ca_PKC1	KVGLDQFPLAVIGGKHEGKVMLAESRHTSKLCA	IKLKKKEFI	ENDEVESTREKRVFLI	ANRERHFFLTNLHACFQTE

	V	VI	VII
Mg_MPCK	TRVYFVMEYISGGDILGHIQRGQFGTRRAQFYAAE	VCLALKYFHENGVI	TRDGLDGLLLTLDGHIKIADYGLCKEDHWY
Nc_PKC	TRVYFVMEYISGGDILGHIQRGQFGTRRAQFYAAE	VCLALKYFHENGVI	TRDGLDGLLLTLDGHIKIADYGLCKEDHWY
Tr_PKC1	TRVYFVMEYISGGDILGHIQRGQFGTRRAQFYAAE	VCLALKYFHENGVI	TRDGLDGLLLTLDGHIKIADYGLCKEDHWY
Sa_PKCSa	TRVYFVMEYISGGDILGHIQRGQFGTRRAQFYAAE	VCLALKYFHENGVI	TRDGLDGLLLTLDGHIKIADYGLCKEDHWY
Df_PKC	TRVYFVMEYISGGDILGHIQRGQFGTRRAQFYAAE	VCLALKYFHENGVI	TRDGLDGLLLTLDGHIKIADYGLCKEDHWY
An_PKCA	TRVYFVMEYISGGDILGHIQRGQFGTRRAQFYAAE	VCLALKYFHENGVI	TRDGLDGLLLTLDGHIKIADYGLCKEDHWY
Ch_PKC1	TRVYFVMEYISGGDILGHIQRGQFGTRRAQFYAAE	VCLALKYFHENGVI	TRDGLDGLLLTLDGHIKIADYGLCKEDHWY
Sp_PCK2	TRVYFVMEYISGGDILGHIQRGQFGTRRAQFYAAE	VCLALKYFHENGVI	TRDGLDGLLLTLDGHIKIADYGLCKEDHWY
Sp_PCK1	TRVYFVMEYISGGDILGHIQRGQFVSRRAQFYAAE	VCLALKYFHENGVI	TRDGLDGLLLTLDGHIKIADYGLCKEDHWY
Sc_PKC1	NRVYFVMEYISGGDILGHIQRGQFVSRRAQFYAAE	VCLALKYFHENGVI	TRDGLDGLLLTLDGHIKIADYGLCKEDHWY
Ca_PKC1	NRVYFVMEYISGGDILGHIQRGQFVSRRAQFYAAE	VCLALKYFHENGVI	TRDGLDGLLLTLDGHIKIADYGLCKEDHWY

	VIII	IX	X
Mg_MPCK	GSTTSFVGGTTFEFAPEILLDKKYGRAVDWNAFGVLI	YQMLLQSSPFRGEDEE	IYDAILLADEPLYPIMPRDSVSI LQK
Nc_PKC	GSTTSFVGGTTFEFAPEILLDKKYGRAVDWNAFGVLI	YQMLLQSSPFRGEDEE	IYDAILLADEPLYPIMPRDSVSI LQK
Tr_PKC1	GSTTSFVGGTTFEFAPEILLDKKYGRAVDWNAFGVLI	YQMLLQSSPFRGEDEE	IYDAILLADEPLYPIMPRDSVSI LQK
Sa_PKCSa	GSTTSFVGGTTFEFAPEILLDKKYGRAVDWNAFGVLI	YQMLLQSSPFRGEDEE	IYDAILLADEPLYPIMPRDSVSI LQK
Df_PKC	GSTTSFVGGTTFEFAPEILLDKKYGRAVDWNAFGVLI	YQMLLQSSPFRGEDEE	IYDAILLADEPLYPIMPRDSVSI LQK
An_PKCA	GATTSFVGGTTFEFAPEILLDKKYGRAVDWNAFGVLI	YQMLLQSSPFRGEDEE	IYDAILLADEPLYPIMPRDSVSI LQK
Ch_PKC1	GSTTSFVGGTTFEFAPEILLDKKYGRAVDWNAFGVLI	YQMLLQSSPFRGEDEE	IYDAILLADEPLYPIMPRDSVSI LQK
Sp_PCK2	DNITTAIVGGTTFEFAPEILLEQQYTRSDWNAFGVLI	YQMLLQSSPFRGEDEE	IYDAILLADEPLYPIMPRDSVSI LQK
Sp_PCK1	GNITTSFVGGTTFEFAPEILLEQQYTRSDWNAFGVLI	YQMLLQSSPFRGEDEE	IYDAILLADEPLYPIMPRDSVSI LQK
Sc_PKC1	GNRTSFVGGTTFEFAPEILKEQYTRSDWNAFGVLI	YQMLLQSSPFRGEDEE	IYDAILLADEPLYPIMPRDSVSI LQK
Ca_PKC1	KSTTSFVGGTTFEFAPEIVAGKAYDRSDWNAFGVLI	YQMLLQSSPFRGEDEE	IYDAILLADEPLYPIMPRDSVSI LQK

Fig. 15. Comparison of the predicted *M. grisea* MPKC with other fungal PKCs .

Sequences were obtained from the GenBank: Nc\_PKC, *Neurospora crassa* PKC (CAA72731); Tr\_PKC1, *Trichoderma reesei* PKC1 (AAA97432); Ss\_PKCSs, *Sporothrix schenckii* PKCSs (AAD22633); Bf\_PKC, *Botryotinia fuckeliana* (CAB59301); An\_PKCA, *Aspergillus niger* (AAA97433); Ch\_PKC1, *Cochliobolus heterostrophus* PKC1 (CAA75801); Sp\_PCK2, *Schizosaccharomyces pombe* PCK1 (BAA03268); Sp\_PCK1, *S. pombe* PCK1 (BAA03267); Ca\_PKC1, *Candida albicans* PKC1 (CAA57048). Sequences are aligned using the CLUSTAL W program.

(A) A pseudosubstrate site containing a juxtaposition of basic residues around alanine which is involved in autoregulation of PKC activity and found in all cPKCs, aPKC and nPKCs is shown by open box (House and Kemp, 1987). Tandem repeats of a cysteine-rich motif, H-X12-C-X2-C-X11,13\_C-X2-C-X4-H-X2-C-X7-C, involved in diacylglycerol and phorbol ester binding is shown by gray box (Burns and Bell, 1991).

(B) Elven conserved subdomains of catalytic domain are indicated by Roman numbers. The consensus G-G-X-G-(X) n-K in subdomains I and II constitutes the ATP-binding site and is also present in most other kinases. The invariant lysine is involved in phosphorylation reaction. The highly conserved motifs GGDLM, YRDLKLDN and TFCGTP in subdomain V, VI and VIII, respectively are specific in all PKC isoforms

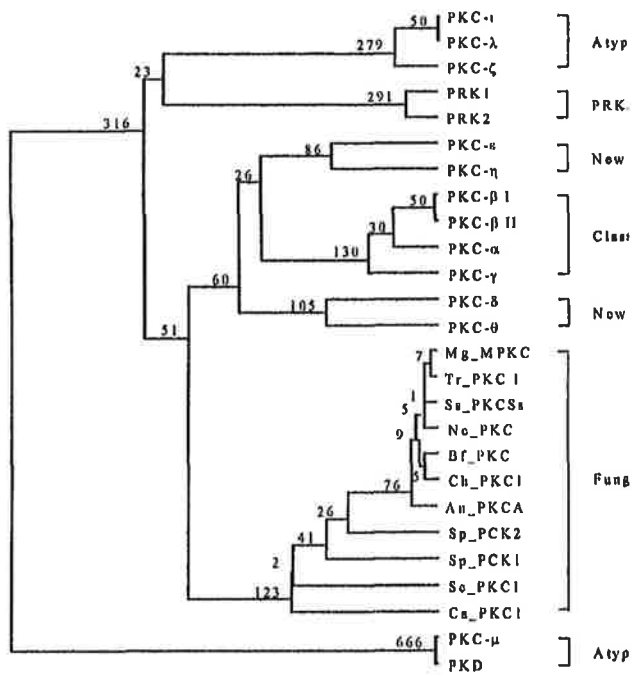




Fig. 16. Phylogenetic tree based on a sequence comparison of PKC superfamily.

A tree was constructed by the UPGMA method using Genetyx program (Software Development, Tokyo, Japan). The number above horizontal line is the frequency with which a given branch appeared in 1000 bootstrap replications. Total 191 amino acid sequences involving the catalytic subdomain I, II and III (Fig. ) were compared. GenBank accession number of each fungal PKCs is shown in the legend of Fig. . PKC-(CAA36718.1), PKC- I(P05771), PKC- II(KIBOC2), PKC-(P05697), PKC-(P24723), PKC-(CAA46388), PKC-(KIRTCB), PKC-(A45416), PKC-(A53758), PKC-(AAA60171), PKC-(P09217), PKC-(Q15139), PKD(NP\_032884.1), PRK1(I53327), PRK2(AC50208).

## 2) *MPKC*의 기능 분석

이 유전자의 기능을 알아보기 위하여 targeted disruption을 통한 돌연변이체를 찾는 실험을 시도하였다. Knock-out vector는 두 가지 방법으로 준비하였다. 먼저, pKCH007은 *MPKC*의 ORF의 일부분을 hygromycin resistance gene으로 대체하여 double crossing over에 의한 gene deletion이 일어날 것으로 기대하였고 (그림 17), pKCH008은 ORF의 일부분을 HPH cassette를 가지는 vector에 삽입하여 single cross over에 의한 insertion이 일어날 것으로 기대하였다 (그림 18).

형질전환체들을 먼저 PCR로 HPH cassette의 유무를 확인하였고, Southern hybridization으로 knock-out mutant를 screening하였다. 그러나, 두 가지 방법 모두 형질전환체들은 ectopic integration pattern만을 보였고, knock-out mutant는 찾을 수 없었다. 이렇게 knock-out mutant를 찾기 어려운 것은 아마도 PKC가 knock-out된 mutant는 lethal이기 때문일 것으로 생각된다. 실제로, 효모균에서 *pkc1*이 deletion된 세포는 YPD media에서 살지 못하였고, 삼투안정제를 넣은 배지에서만 생존하는 것으로 보고되었다. Fission yeast인 *Schizosaccharomyces pombe*에서는 두 가지의 PKC 유전자가 발견되었는데, 각각을 knock-out시키면 생존하지만, 둘 다 한꺼번에 knock-out시키면 살지 못하였고 이들은 삼투안정제로 회복되지 못하였다. 또한, *Cochliobolus heterostrophus*에서도 PKC1 유전자를 knock-out한 mutant를 찾지 못하여 lethal일 것이라 추정하였다. 이러한 결과로 보아 곰팡이의 PKC유전자는 세포의 viability에 필수적인 기능을 하고 있는 것으로 생각된다. 또한, 도열병균에서 PKC 유전자의 기능을 정확히 규명하기 위해서는 knock-out이외 다른 방법을 사용하여야 할 것으로 보인다.

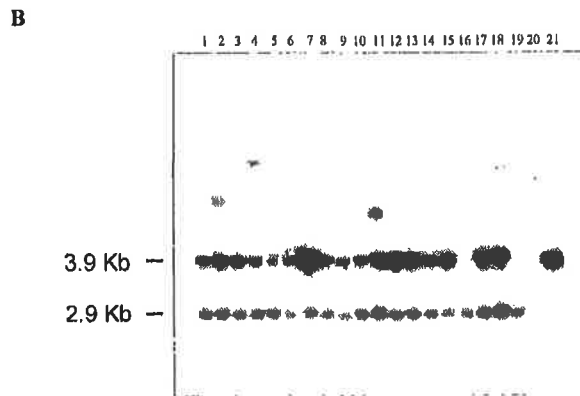
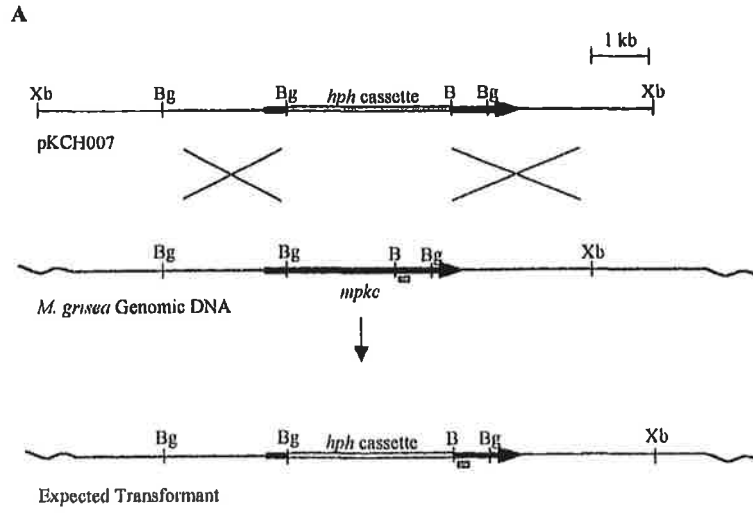


Fig. 17. Strategy for targeted deletion of *MPKC* gene in *M. grisea*

(A) Deletion plasmid pKCH002 contains the hygromycin resistance gene (*hph*) cassette flanked by border sequences from *mpkc*. At left (2.2-kb *Bgl*III fragment from pKCH002) and right (3.5-kb *Bam*HI-*Xba*I fragment from pKCH001) are fragments from *mpkc* that were introduced into compatible restriction sites of pAN7-1 to flank the *hph* gene cassette and produce pKCH007. The result of expected transformation is that the central region of *mpkc* was replaced by the *hph* cassette  
Xb, *Xba*I; Bg, *Bgl*III; B, *Bam*HI.

(B) Gel blot analysis of hygromycin resistant. All genomic DNA samples were digested with *Bgl*III. The blot was probed with pKCH362 indicated as a solid underbar in (A). Wild-type 70-15 (lane 20) and deletion vector (lane 21) show the 2.9-kb and 3.9-kb, respectively. All transformants exhibited hybridization bands at both 2.9- and 3.9-kb or several bands, which indicates that ectopic or multiple integration had occurred. The higher intensity of 3.9-kb band compared to that of 2.9-kb also indicates the multiple integration of transforming vector (lane 7).

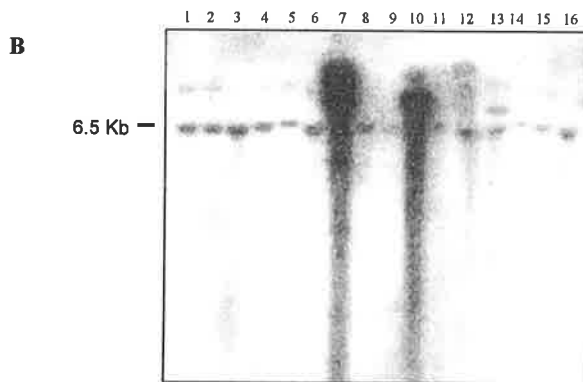
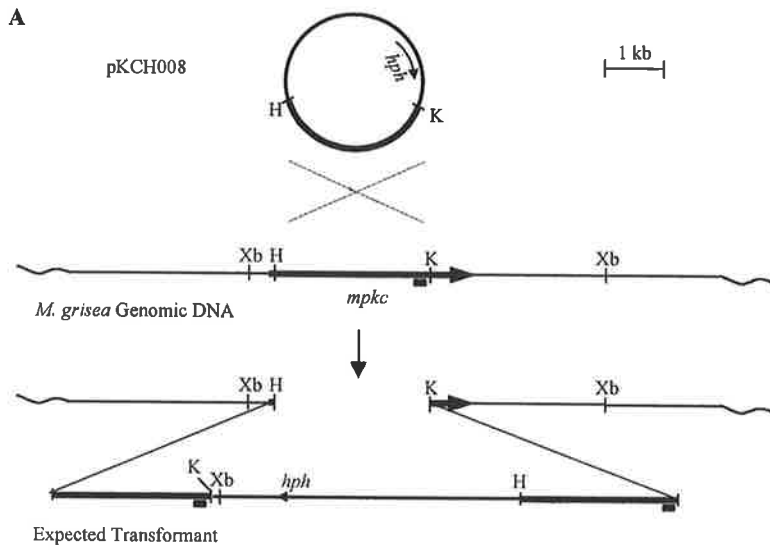


Fig. 18. Strategy for Targeted Disruption of *mpkc* Gene in *M. grisea*

(A) Integration plasmid pKCH008 was constructed by inserting a 3.2-kb *Hind*III fragment from a pKCH002 into *Hind*III site of pAN7-1.

(B) Gel blot analysis of hygromycin resistant. All genomic DNA samples were digested with *Xba*I. The blot was probed with pKCH362 indicated as a solid underbar in (A). The expected transformant which has the disrupted *mpkc* is supposed to show both 3.5- and 9.8-kb hybridization band instead of 6.5-kb. But all transformant contains the 6.5-kb band, which indicates that ectopic or multiple integration had occurred.

## 제 4절. 도열병균의 침입시 특이적으로 발현되는 벼 유전자를 이용한 새로운 방제법 개발

### 1. 서론

식물은 미생물의 침입에 대해 매우 정교한 방어 반응을 나타낸다. 여기에는 과민성 반응 (hypersensitive reaction: HR)으로 알려진 침입 주위 세포의 처사, 미생물에 항생력을 나타내는 phytoalexin의 합성, lignin이나 hydroxyproline-rich glycoproteins 축적 등에 의한 세포벽의 강화, chitinase나 glucanase와 같은 미생물 세포벽 분해효소나 proteinase inhibitor의 분비 등이 포함되며, 그 외에 정확한 기능은 알려지지 않았지만 많은 pathogenesis-related (PR) protein이 식물의 방어 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다. 식물의 방어반응을 최적화시키는 방제법 또한 특이적인 작용점을 가지는 살균제와 함께 환경친화적인 미래형 농약으로 각광받고 있다.

식물의 방어 반응의 특이성은 기주식물과 병원균이 가지고 있는 유전적 요인에 의해 결정된다. 기주식물이 서로 다른 품종은 서로 다른 병원균의 레이스에 대해 특이적인 반응을 나타낸다. 이러한 품종-race간의 특이적인 반응에 대한 유전분석으로부터 기주식물의 방어반응도 기주식물에 우성인 저항성 유전자 (Resistance gene: R gene)가 있으면 병원균에도 그에 상보적인 비병원성 유전자가 존재한다는 gene-for-gene 가설을 따르고 있음을 알 수 있었고, 벼와 도열병과의 관계에서도 유전자 대 유전자 가설이 운용되고 있음이 최근에 밝혀졌다. 저항성 유전자의 개수에 관계없이 이들의 조합에 따라 친화적 관계 (compatible interaction)와 비친화

적 관계 (incompatible interaction)가 결정된다. 비친화적 관계에서는 병원균의 침입을 받은 초기에 기주 식물이 이를 인지하여 빠르고 효과적으로 방어반응을 유도한다. 그러나, 친화적인 관계에서는 이러한 방어반응이 느리게 일어나 병의 진전을 저지하지 못한다.

이러한 방어반응은 방어관련 유전자들의 전사를 시작으로 일어난다. 지난 수십년간 전세계적인 연구의 결과 많은 방어 관련 유전자들이 클로닝되었고, 이들의 발현과 병저항성에 관련된 세포내의 조절 메카니즘 및 신호전달체계에 대한 분자 유전학적인 연구가 쌍자엽 식물을 중심으로 많이 수행되어 왔다. 벼와 벼 도열병은 각각 경제적 중요성 뿐만 아니라 여러 가지 분자 유전학적인 연구를 수행하는데 있어서의 장점으로 인하여 모델 시스템으로서 많은 연구가 전세계적으로 진행되어 오고 있다. 특히, 일본의 벼 유전체 연구의 결과 40,000개 이상의 EST sequence가 등록되어 있고, 1997년에는 국제 consortium이 구성되어 벼 유전체 sequencing을 진행하고 있다. 하지만, 벼의 방어반응에 대한 연구는 가지과 작물을 대상으로 한 연구에 비해 아주 미미한 수준이다. 따라서, 이번 연구에서는 벼 도열병을 모델로 하여 저항성 기작 연구 시스템을 구축하고, 벼의 방어 관련 유전자를 대량 확보하며, 이들의 발현특성을 분석하였다.



## 2. 재료 및 방법

### 가. 식물 재배 및 병원균 접종

벼는 최아시킨 후 수도용상토가 담긴 25구의 플라스틱포트에 심어 온실에서 재배하였다. 도열병균은 귀리한천배지에 streaking하여 22℃ 형광등하에서 배양하여 포자형성을 촉진하였다. 도열병균 포자를 250 ppm Tween 20을  $2 \times 10^5$  conidia/ml로 준비하여 4-5엽기의 벼잎에 스프레이 접종하였다. 이를 25℃ 습실상에 24시간 방치한 후 온실로 옮겨 병진전을 관찰하였다. 벼 흰잎마름병균은 peptone sucrose media에 접종한 후 28℃에서 배양하고, 0.85% sodium chloride와 250 ppm Tween 20으로 구성된 solution으로 묽어  $5 \times 10^9$  CFU/ml로 맞추었다. 가위에 세균현탁액을 묻힌 후 벼 잎 (품종 낙동벼)끝을 가위로 잘라 접종하였다. 접종한 벼를 25℃ 습실상에 24시간 처리한 후 온실로 옮겨 병진전을 관찰하였다. 도열병균의 균사에서 RNA를 분리하기 위해서는 먼저 포자를 complete media에 접종하여 25℃에서 4일 동안 160 rpm으로 진탕배양한 후, 질소원이나 탄소원이 빠진 complete media, 또는 complete media에 옮기고 16시간을 더 배양하여 수거하였다.

### 나. mRNA 분리 및 cDNA library 제조

cDNA library 제조를 위해서는 벼 품종 Nipponbare에 도열병균 70-15를 접종한 후 84시간 이후 120시간까지 전형적인 병반이 보이는 잎을 수거하였다. Total RNA는 guanidinium thiocyanate를 이용하여 single step RNA isolation 방법으로 분리하였고, oligo(dT) cellulose chromatography를 이용하여 Poly(A)+ RNA를 순화하였다. 이후 Stratagene사에서 나온 λZAP XAR bacteriophage vector를 이용하여 cDNA library를

제조하였다. Mass in vivo excision을 실시하여 나온 phagemid clone들을 384 well의 microtiter plate에 옮겼다. 384 well plate에는 100 ppm의 ampicillin이 든 LB broth를 60  $\mu$ 씩 분주하여 두었고, 하룻밤 정치배양한 다음 30% glycerol을 잘 섞어 -70°C에 보관하며 이후 large scale sequencing에 이용하였다.

#### 다. Plasmid 분리 및 염기서열 분석

하룻밤 배양한 1 ml 배양액으로부터 hot alkaline lysis법을 약간 변형시켜 대량의 plasmid를 분리하였다. 이를 ABI 사의 ABI PRISM BigDye terminator kit를 이용하여 sequencing 반응을 시키고, 서울대학교의 농업과학공동기기센터에서 소장하고 있는 ABI Model 377 automatic DNA sequencer를 이용하여 염기서열을 분석하였다. M13 universal primer를 이용하여 cDNA clone의 3' 말단의 염기서열을 분석하였다. 각각의 sequence는 Perkin Elmer사의 Sequencing Analysis Software를 이용하여 quality를 check하고, 잘못 지정되거나 모호한 염기를 지정하였다.

#### 라. 염기서열 분석

모든 염기서열은 vector sequence와 끝부분의 모호한 sequence를 일일이 잘라내었고, 평균길이 416 bp 정도되는 sequence를 가지고 database search를 수행하였다. 먼저 NCBI database를 대상으로 유사한 sequence를 찾는 BLASTX, BLASTN search를 수행하였다. Expect value (E)에 따라 highly significant ( $E \leq e^{-19}$ ), moderately or weakly significant ( $e^{-2} \leq E \leq e^{-19}$ ), not significant ( $E \geq e^{-2}$ ) match로 분류하였다. significant match로 나온 클론들에 대해서는 그 유전자가 세포 내에서 어떤 역할을 하고 있는지를 The Institute for Genomic Research (TIGR, Rockville,

MD, USA)에서 개발한 Expressed Gene Anatomy Database의 cellular role classification scheme에 따라 분류하였다. not significant match로 나온 클론들에 대해서는 NCBI에 등록된 dbEST를 대상으로 BLASTN search를 따로 수행하였다. 또한, ATGC (Software Development, Tokyo, Japan)라는 software를 이용하여 각 클론들의 중복성 여부를 검사하였다.

#### 마. BTH 처리

Novartis사의 5% (w/w) wettable powder로 제조된 BTH를 1 mM 현탁액으로 만든후 여기에 벼 포트를 4시간 동안 담가두어 처리하였다. 이후 물로 옹기고, 0, 4, 6, 7, 8일 후 벼잎을 수거하였다.

#### 바. Abiotic stress 처리

Oxidative stress처리를 위해서는 벼 잎을 잘라서 30  $\mu$ M methyl viologen이나 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 50  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O solution에 20시간동안 담가두었다. Heat shock 처리를 위해서는 42°C shaking water bath에 3시간, cold shock을 위해서는 4°C에서 5일간 처리하였다. UV 조사를 하기 위해서는 3엽기의 벼잎을 잘라 평평하게 고정시키고, 300-400 nm의 UV를 15분간 조사하고, 24시간이 지난 후 수거하였다.

#### 사. RNA isolation and Northern blot analysis

Total RNA는 Davis와 Ausubel의 방법에 의거하여 액체질소로 동결된 시료로부터 phenol/chloroform extraction, lithium chloride precipitation을 거쳐 분리하였다. 각 10  $\mu$ g의 total RNA를 1.5% formaldehyde agarose gel에 fractionation하고, Hybond N+ nylon membrane에 blotting하였다. 동량의 RNA가 loading되었다는 것은 gel을

Ethidium bromide로 염색하여 확인하였다. Hybridization 반응은 6×SSPE, 50% formamide가 들어있는 hybridization solution으로 42℃에서 수행하였고, 2×SSC로 washing한 후 expose하였다.

#### 아. DNA 분리 및 Southern blot analysis

벼잎에서 Genomic DNA를 Rogers and Bendich의 방법에 의거하여 분리하였다. 1μg의 genomic DNA를 BamHI, EcoRI, HindIII, EcoRV, BglII, KpnI등의 제한효소로 절단한 후, 0.7% agarose gel에 전기영동하고 Hybond N+ nylon membrane에 blotting하였다. 이를 좌등의 방법에 의거 Southern hybridization을 수행하였다. Probe는 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP를 이용하여 labelling하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 친화적 및 비친화적 조합의 확립

먼저 우리나라에서 판별품종으로 쓰이는 8개의 벼품종과 화청벼를 대상으로 실험실에서 보유하고 있는 도열병균 균주를 접종하여 그 반응을 확인하였다.

그중 화청벼에 도열병균 strain KJ201을 접종하면 전형적인 감수성 병반을 나타내었고, KJ401 균주는 접종 후 48시간만에 까만색 반점 (Hypersensitive response)을 형성하며 전형적인 저항성 반응을 보였다 (그림 19). 이를 접종 후 시간 경과에 따른 병의 진전을 조사하였다. 화청벼에 KJ201을 접종하였을 때, 접종 후 3일 뒤부터 눈에 보이는 병징이 나타나기 시작하였고, 이는 시간이 지날수록 더욱 커졌다. 반면, KJ401을 접종하면 36시간 또는 48시간이 지나면 까만색의 반점이 나타나지만 이 반점은 더 커지지 않고 그대로 유지되었다 (그림 20). 이 두 조합에서의 병징부위를 현미경으로 관찰하였다. 친화적 조합에서는 병반 주위의 세포에 병원균의 군사가 자라고 있음을 볼 수 있었고, 비친화적 조합에서는 부착기 주위의 식물 세포에 병원균 군사는 보이지 않았고, 괴사한 식물세포를 관찰할 수 있었다 (그림 21). 따라서, 화청벼-KJ201을 친화적 조합으로, 화청벼-KJ401 조합을 비친화적 조합으로 확립하여 이후의 실험에 이용하였다.

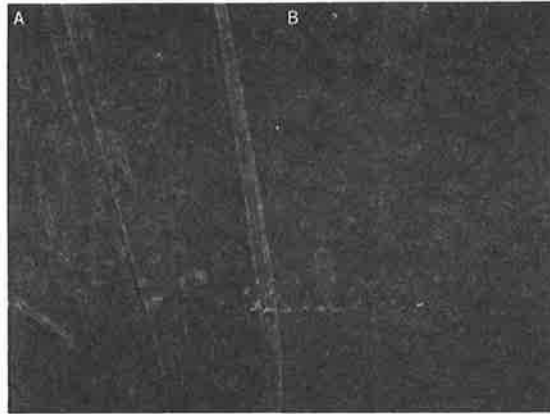


Fig. 19. Disease symptoms of rice blast. A. Symptoms caused by the compatible isolate of *Magnaporthe grisea* KJ201. B. Hypersensitive response raised by the incompatible isolate of *M. grisea* KJ401. Photos were taken 7 days after inoculation.

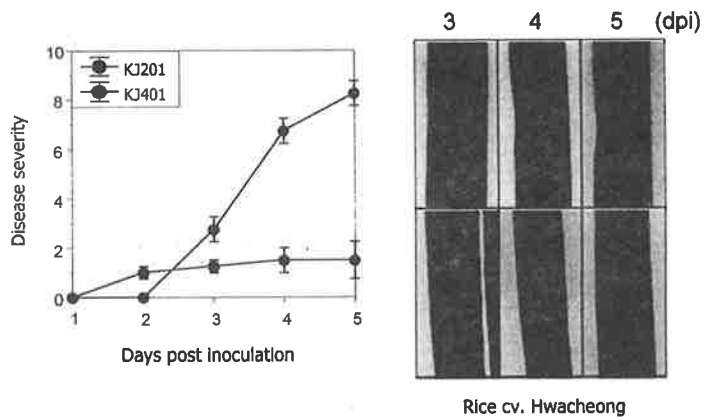


Fig. 20. Disease progress curve and symptom development caused by the blast fungus *Magnaporthe grisea*.

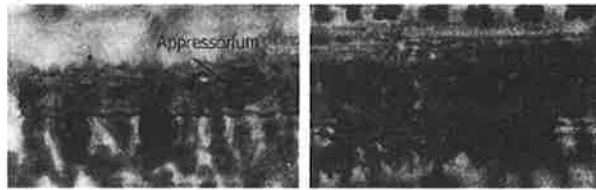


Fig. 21. Microscopic observation. Left: Invasive mycelia of compatible isolate KJ201. Right: Hypersensitive response caused by the incompatible isolate KJ401 on rice cv. Hwacheong.



## 나. 친화적 조합으로부터 cDNA library 작성 및 Expressed sequence tags의 염기서열 분석

### 1) cDNA library 작성

이상의 연구결과를 바탕으로 벼 품종 Nipponbare와 도열병균 strain 70-15간의 관계를 cDNA library 작성을 위한 친화적 조합으로 선발하였다. 도열병균을 접종한 후 84, 96, 120시간이 지나 전형적인 감수성 병반이 벼 잎 전체에 나타날 때, 벼 잎을 수거하여 total RNA를 분리하였다. 이 RNA로부터 polyA(+) RNA를 분리하고, cDNA library를 bacteriophage vector인 λZAP XAR를 이용하여 제조하였다. 친화적 조합을 택한 이유는 벼의 방어관련 유전자와 함께 도열병균의 병진전 관련 유전자도 한꺼번에 찾을 수 있다는 가정을 했기 때문이다.

### 2) Expressed Sequence Tag 염기서열 분석

총 511개의 클론을 무작위 선발하여 sequencing을 하였고, vector sequence를 잘라내고 난 평균길이 416bp의 염기서열을 대상으로 분석하였다. 이들을 NCBI database를 대상으로 BLASTX search를 수행한 결과 57.3%에 해당하는 293 clone이 이미 등록된 유전자와 유사성을 보였고, 나머지 218 clone은 database에 등록된 유전자와는 homology를 보이지 않았다 (표 11). 또한 이 511개의 sequence를 ATGC software를 이용하여 contig analysis한 결과 296개의 nonredundant EST로 구성되어 있었다. 이 실험에 사용한 library에는 도열병균의 유전자와 벼의 유전자가 섞여 있을 것이라고 가정하였기 때문에 각 EST들의 origin을 database에 등록된 유전자와 유사성을 보이는 293 clone에 대하여 분류하였다. 39개의 nonredundant EST를 구성하는 72 clone이 이미 알려진 곰팡이 유전자와

homology를 보였고, 식물의 유전자와 homology를 보이는 221 clone은 106개의 nonredundant EST를 구성하였다. 곰팡이 유전자와 match되는 39 nonredundant EST중 22개는 사상성 진균의 유전자와, 17개는 효모의 유전자와 유사성을 보였다 (표 12). 즉, 약 25% 정도는 병원균의 유전자일거라고 추정할 수 있었다. 이러한 결과로 보아 친화적 조합에서의 EST 분석으로 병원균의 병원성 관련 유전자와 식물의 방어 관련 유전자를 함께 찾을 수 있을 거라는 가정이 맞다는 것을 확인할 수 있었다. 식물의 유전자와 유사성을 보이는 106개의 nonredundant EST중 51개는 벼의 유전자와 가장 높은 homology를, 55개는 다른 식물의 유전자와 가장 높은 homology를 보였기 때문에 아직 벼에서는 밝혀지지 않은 새로운 유전자를 찾을 가능성도 보여주었다.

Table 11. Sequence similarities between translations of ESTs and the best match in the NCBI database as determined using BLASTX

Database matches <sup>a</sup>	Number (percentage) of cDNAs		
	Fungal genes	Plant genes	Total
Significant matches	72 (100)	221 (100)	293 (57.3)
High	39 (54.2)	154 (69.8)	193 (37.8)
Moderate or weak	33 (45.8)	67 (30.2)	100 (19.5)
Not significant matches			218 (42.7)
Total			511 (100)

<sup>a</sup> The database sequence matches were divided into highly significant ( $E \leq e^{-20}$ ), moderately or weakly significant ( $e^{-3} \leq E \leq e^{-19}$ ), and not significant ( $E \geq e^{-2}$ ) classes according to the Expect (E) values.

Table 12. Summary of expressed sequence tags isolated from the *Magnaporthe grisea*-infected rice cDNA library

EST <sup>a</sup>	Accession	Putative identification <sup>b</sup>	Source of comparison <sup>b</sup>	BlastX <sup>c</sup>
<b>ESTs homologous to fungal gene</b>				
<b>I. Cell Division</b>				
mgir1F07	AT003344	Histone H2B	<i>E. nidulans</i> (sp P23754)	8e-19
<b>II. Cell Signalling/Cell Communication</b>				
<b>III. Cell structure/Cytoskeleton</b>				
mgir2H08	AT003354	Actin	<i>C. gloeosporioides</i> (AF112537)	7e-07
<b>IV. Cell/Organism defense/Pathogenesis</b>				
mgir1A10	AT003335	Cryparin	<i>E. parasitica</i> (sp P52753)	9e-17
mgir1I01	AT003350	Glucose-repressible gene 1	<i>N. crassa</i> (sp P22151)	1e-16
mgir3G17	AT003878	BLI-3 PROTEIN	<i>N. crassa</i> (sp Q01358)	4e-07
mgir3M08	AT003366	Nitrogen starvation -induced gene	<i>C. gloeosporioides</i> (U94182)	2e-39
mgir3M23	AT003367	Hydrophobin (MPG1)	<i>M. grisea</i> (sp P52751)	8e-29
<b>V. Gene/Protein expression</b>				
mgir1A06	AT003334	Ribosomal protein 40S, S12	<i>B. graminis</i> (gi 3114615)	3e-40
mgir1B05	AT003339	Ribosomal protein 60S, L34	<i>S. cerevisiae</i> (sp P04649)	3e-22
mgir1C05	AT003340	Ribosomal protein 40s	<i>S. pombe</i> (PID el168591)	1e-41
mgir1F09	AT003345	Ribosomal protein 40S, S4	<i>S. cerevisiae</i> (sp P25443)	2e-41
mgir1F12	AT003346	Proteasome component SUN4	<i>S. cerevisiae</i> (sp P53616)	9e-13
mgir1F15	AT003482	Elongation factor 1-alpha	<i>A. capsulatus</i> (sp P40911)	6e-47
mgir1G09	AT003348	Elongation factor 1-alpha	<i>N. crassa</i> (sp Q01372)	5e-38
mgir2J04	AT003765	Ribosomal protein S28	<i>A. niger</i> (AJ249691)	7e-61
mgir3D14	AT003357	Small subunit rRNA gene	<i>M. grisea</i> (gi 3044188)	3e-53
mgir3E04	AT003359	Ribosomal protein 40s, S13	<i>S. pombe</i> (sp P28189)	7e-14
mgir3G20	AT003361	Ribosomal protein 60S, L18A	<i>S. cerevisiae</i> (sp P47913)	1e-19
mgir3I09	AT003363	Ribosomal protein S28	<i>S. cerevisiae</i> (sp P32827)	6e-47

mgir3K11	AT003364	Transl. initiat. factor 3	<i>S. pombe</i> (e1285373)	4e-08
mgir3K15	AT003365	Ribosomal protein L43A	<i>S. cerevisiae</i> (NP015368)	4e-11
mgir3P23	AT003369	Ribosomal protein 40s, S28	<i>N. crassa</i> (sp143105)	4e-29

#### VI. Metabolism

mgir1A14	AT003337	Cytochrome c oxidase	<i>S. pombe</i> (PIDe1334472)	4e-18
mgir1D15	AT003341	Guanosine-diphosphatase	<i>S. cerevisiae</i> (sp1P32621)	7e-28
mgir1F19	AT003347	Formate dehydrogenase	<i>N. crassa</i> (sp1Q07103)	7e-23
mgir1H08	AT003349	Acetyl-CoA acyltransferase	<i>Y. lipolytica</i> (sp1Q05493)	6e-31
mgir2F14	AT003353	Cytochrome C	<i>N. crassa</i> (sp1P00048)	1e-11
mgir2J10	AT003355	Succinate-aldehyde dehydrogenase	<i>S. pombe</i> (AL136078)	2e-16
mgir3A10	AT003356	Enolase	<i>C. herbarum</i> (sp1Q12560)	1e-39
mgir3D17	AT003358	Peroxisomal Co-A synthetase	<i>S. cerevisiae</i> (sp1P38137)	9e-07
mgir3G23	AT003757	IMP dehydrogenase	<i>S. cerevisiae</i> (sp1P50094)	1e-04
mgir3H20	AT003362	C-14 sterol reductase	<i>N. crassa</i> (sp1P38670)	1e-04
mgir3O03	AT003368	Glutamate synthase (NADPH)	<i>N. crassa</i> (emb1CAB92626.1)	1e-44

#### VII. Unclassified

mgir1A12	AT003336	Hypothetical 17.5 KD	<i>S. cerevisiae</i> (sp1Q03799)	5e-17
mgir1A22	AT003338	Mg-SINE	<i>M. grisea</i> (gb1U35313)	2e-91
mgir1D19	AT003342	Hypothetical protein	<i>P. chrysogenum</i> (AAF00009)	1e-08
mgir1F05	AT003343	ARP2/3 complex 20kd	<i>S. cerevisiae</i> (sp1P33204)	3e-53
mgir1H04	AT003483	Hypothetical protein	<i>N. crassa</i> (AL391572)	2e-11
mgir2C17	AT003352	Non-LTR retrotransposon MGL	<i>M. grisea</i> (gb1AF018033)	2e-06

#### ESTs homologous to plant gene

##### I. Cell Division

mgir1H22	AT003396	Chromatin str. protein	<i>A. thaliana</i> (gi13337352)	4e-16
----------	----------	------------------------	---------------------------------	-------

##### II. Cell Signalling/Cell Communication

mgir3M15	AT003470	14-3-3-like protein	<i>O. sativa</i> (sp1Q06967)	7e-45
----------	----------	---------------------	------------------------------	-------

##### III. Cell structure/Cytoskeleton

##### IV. Cell/Organism defense

mgir1A04	AT003370	Putative cytochrome P450	<i>A. thaliana</i> (gi12760837)	7e-07
----------	----------	--------------------------	---------------------------------	-------

mgir1A24	AT003372	Pathogenesis-related protein 1	<i>Z. mays</i> (gi 3290004)	3e-61
mgir1B06	AT003373	ABA- and stress-inducible	<i>O. sativa</i> (gb AF039573)	e-151
mgir1F08	AT003386	Probenazole-inducible protein 1	<i>O. sativa</i> (gnl d1007947)	3e-78
mgir1G04	AT003389	Salt-inducible-like protein	<i>A. thaliana</i> (gi 3193306)	1e-04
mgir1G16	AT003391	Glutathione s-transferase	<i>A. thaliana</i> (gi 3894171)	1e-40
mgir1H23	AT003397	Thaumatococcus-like protein	<i>O. sativa</i> (gi 2062387)	1e-08
mgir1I05	AT003399	Superoxide dismutase-2	<i>O. sativa</i> (sp P28757)	3e-63
mgir1I16	AT003767	Cysteine proteinase	<i>Z. mays</i> (pir S60456)	7e-06
mgir1N23	AT003406	GST7 protein	<i>Z. mays</i> (emb CAB38121.1)	2e-13
mgir2I01	AT003420	Metallothionein	<i>H. vulgare</i> (dbj D50641)	1e-12
mgir3A09	AT003432	Glutathione S-transferase	<i>A. squarrosa</i> (gi 2190992)	4e-08
mgir3A19	AT003434	Cinnamyl alcohol dehydrogenase	<i>A. cordata</i> (sp P42495)	3e-15
mgir3B07	AT003435	Salt-stress induced protein	<i>O. sativa</i> (sp P24120)	2e-22
mgir3B21	AT003436	Carbonic anhydrase	<i>O. sativa</i> (PID d1032914)	3e-25
mgir3B23	AT003437	Chitinase (EC 3.2.1.14)	<i>C. tulipa</i> (pir JE0183)	5e-28
mgir3C18	AT003439	COL2	<i>A. thaliana</i> (gi 1507699)	2e-04
mgir3D04	AT003440	Metallothionein	<i>O. sativa</i> (gb AF001396)	0.0
mgir3E10	AT003442	Copper homeostasis factor	<i>A. thaliana</i> (gi 3168840)	7e-05
mgir3F12	AT003446	Carbonic anhydrase	<i>O. sativa</i> (dbj BAA31.953)	6e-53
mgir3G01	AT003447	Amino acid selective channel protein	<i>H. vulgare</i> (emb CAA09867)	4e-54
mgir3G03	AT003448	Metallothionein	<i>O. sativa</i> (sp Q40633)	0.0
mgir3H04	AT003452	Thaumatococcus-like protein	<i>O. sativa</i> (sp P31110)	2e-20
mgir3I17	AT003459	Pathogenesis-related protein 1	<i>O. sativa</i> (gi 1888551)	4e-90
mgir3N05	AT003474	Metallothionein type 2	<i>O. sativa</i> (sp P94029)	e-135

#### V. Gene/Protein expression

mgir1B02	AT003480	Ribosomal protein 40S, S2	<i>U. caupo</i> (U30454)	2e-09
mgir1B09	AT003374	Ribosomal protein 40s, S3A	<i>O. sativa</i> (sp P49397)	1e-40
mgir1E18	AT003384	MADS transcriptional factor	<i>S. tuberosum</i> (gi 2735764)	2e-21
mgir1H24	AT003398	Ribosomal protein 60s L11B	<i>A. thaliana</i> (sp P42796)	2e-53
mgir1K12	AT003403	Ribosomal protein 60S	<i>A. thaliana</i> (sp O23290)	2e-10
mgir2A17	AT003408	EF-1 alpha	<i>O. sativa</i> (D63582)	9e-15

mgir2C11	AT003411	Cyclophilin	<i>A. thaliana</i> (gb AF192490)	8e-10
mgir2F17	AT003415	Cyclophilin 2	<i>O. sativa</i> (gb L29470)	8e-04
mgir2H01	AT003418	Ribosomal protein 60S	<i>C. arietinum</i> (sp 065729)	7e-08
mgir2H18	AT003419	Transl. init. factor 5A	<i>O. sativa</i> (gb AF094773)	1e-06
mgir2I24	AT003422	Ubiquitin conjug. enzyme	<i>A. thaliana</i> (gb AC012562)	2e-36
mgir2J20	AT003424	26S rRNA 3', 18S rRNA	<i>S. cereale</i> (gb M37231)	e-145
mgir3A05	AT003430	EIF-2B-epsilon subunit	<i>A. thaliana</i> (gi 3033392)	7e-05
mgir3H11	AT003454	Ribosomal protein 50s, L31	<i>M. sativa</i> (gi 3885513)	2e-13
mgir3I05	AT003458	Ribosomal protein 40s, S4	<i>Z. mays</i> (sp 022424)	5e-30
mgir3L13	AT003466	Peptidylprolyl isomerase	<i>T. aestivum</i> (sp Q43207)	2e-08
mgir3M22	AT003473	Ribosomal RNA 40s	<i>O. sativa</i> (gb M11585)	e-123

#### VI. Metabolism

mgir1A11	AT003371	Chloroplast photosystem I	<i>H. vulgare</i> (gb L12707)	e-134
mgir1B10	AT003375	Fructose-1,6-bisphosphatase	<i>O. sativa</i> (dbj AB007193)	1e-23
mgir1B17	AT003376	CabIR	<i>O. sativa</i> (emb X13908)	0, 0
mgir1D02	AT003377	23 kDa polypeptide of PS II	<i>O. sativa</i> (gi 4079798)	4e-47
mgir1D08	AT003378	Photosystem I F subunit	<i>O. sativa</i> (gi 3885892)	4e-59
mgir1D09	AT003379	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	<i>S. oleracea</i> (gnl e330370)	5e-18
mgir1D22	AT003381	Glycolate oxidase	<i>O. sativa</i> (gi 2570515)	9e-15
mgir1F01	AT003385	CAB binding protein	<i>O. sativa</i> (gi 3075488)	1e-40
mgir1F13	AT003387	Methionine sulfoxide reductase	<i>A. thaliana</i> (sp P54150)	2e-17
mgir1G03	AT003388	Rubisco small subunit C	<i>O. sativa</i> (sp P18567)	7e-56
mgir1G17	AT003392	CAB binding protein	<i>O. sativa</i> (gi 3789952)	6e-28
mgir1H14	AT003394	Farnesyl pyrophosphate synthase	<i>O. sativa</i> (gnl d1020643)	8e-14
mgir1J18	AT003401	Hydroxynitrile lyase	<i>A. thaliana</i> (gnl e326849)	6e-29
mgir1J24	AT003402	Protein phosphatase 2A	<i>O. sativa</i> (gb U49113)	6e-87
mgir2C08	AT003410	Cytochrome c (OsCc-1) gene	<i>O. sativa</i> (gb M63704)	3e-30
mgir2F08	AT003414	PS I subunit XI	<i>H. vulgare</i> (sp P23993)	3e-15
mgir2F19	AT003416	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>O. sativa</i> (sp Q42977)	6e-14
mgir2K08	AT003426	NADH-ubiquinone oxidoreductase	<i>N. tabacum</i> (sp 024143)	3e-20
mgir2L06	AT003427	ADP-glucose	<i>C. melo</i> (gb AF030383)	1e-08

pyrophosphorylase				
mgir2L08	AT003428	Vacuolar ATP synthase	<i>O. sativa</i> (sp Q40635)	1e-21
mgir3A12	AT003433	Rubisco	<i>O. sativa</i> (emb CAA59218)	3e-47
mgir3C06	AT003438	CAB apoprotein CP26	<i>Z. mays</i> (gi 733454)	3e-24
mgir3F02	AT003445	Transaldolase (PotTal 1)	<i>S. tuberosum</i> (gi 2078350)	1e-47
mgir3G07	AT003449	Serine carboxypeptidase	<i>A. thaliana</i> (gi 1931640)	2e-07
mgir3G09	AT003450	Photosystem I chain II	<i>N. sylvestris</i> (pir S37380)	2e-13
mgir3G21	AT003451	Cab2R	<i>O. sativa</i> (emb X13909)	1e-54
mgir3H05	AT003453	Sedoheptulose-1,7 -biphosphatase	<i>T. aestivum</i> (sp P46285)	1e-09
mgir3H16	AT003456	Cab26	<i>O. sativa</i> (gi 3789954)	1e-14
mgir3K12	AT003463	PSII 22 kDa protein	<i>O. sativa</i> (dbj D8392)	4e-09
mgir3K18	AT003464	Aldolase	<i>O. sativa</i> (gi 1207279)	3e-19
mgir3L18	AT003467	RCABP89	<i>O. sativa</i> (gi 13126854)	1e-30
mgir3L22	AT003468	Malate dehydrogenase	<i>Z. mays</i> (gi 2286153)	1e-16
mgir3M06	AT003469	PSII 10 kDa polypeptide	<i>O. sativa</i> (gb U86018)	1e-64
mgir3M16	AT003471	LHCPII type1	<i>O. sativa</i> (sp P12331)	3e-60
mgir3O20	AT003478	Rubisco small subunit	<i>O. sativa</i> (sp P05347)	1e-21

#### VII. Unclassified

mgir1D18	AT003380	N7 protein	<i>M. truncatula</i> (el308274)	2e-08
mgir1E14	AT003481	Unknown protein	<i>A. thaliana</i> (AB026657)	2e-51
mgir1E16	AT003383	NifU-like protein	<i>A. thaliana</i> (P1D el249663)	1e-32
mgir1G10	AT003390	PAC clone:P0667A10	<i>O. sativa</i> (dbj AP0667A10)	e-167
mgir1H11	AT003766	Unknown protein	<i>L. esculentum</i> (AF261140)	4e-19
mgir1H12	AT003764	Repetitive element(pRG3)	<i>O. sativa</i> (gb L36557)	2e-99
mgir1H16	AT003395	Receptor kinase-like	<i>O. longistaminata</i> (2586083)	8e-05
mgir1I14	AT003400	Hypothetical protein	<i>A. thaliana</i> (AL035602)	7e-44
mgir1L21	AT003404	NifU-like protein	<i>A. thaliana</i> (AL021712)	1e-12
mgir1M05	AT003405	Ran	<i>O. sativa</i> (dbj AB015287)	0.0
mgir1P01	AT003407	Bundle sheath defective protein 2	<i>Z. mays</i> (AF126742)	2e-21
mgir2B04	AT003409	Chromosome 1, P0038F12	<i>O. sativa</i> (P0038F12)	0.0
mgir2C24	AT003412	Aminocyclopropane-1- carboxylate synthase	<i>N. tabacum</i> (emb X65982)	2e-12
mgir2E22	AT003413	Adh1-adh2 region	<i>O. sativa</i> (gb AF172282)	1e-05
mgir2I17	AT003421	Putative protein	<i>A. thaliana</i> (AL035523)	9e-09



mgir2J11	AT003423	Late embryogenesis-like protein	<i>P. arineniaca</i> (gi 3264769)	5e-27
mgir3A07	AT003431	F26F24.9	<i>A. thaliana</i> (gb AAF87020)	7e-20
mgir3E17	AT003444	Protein induced upon tuberlization	<i>S. demissum</i> (PID e247412)	1e-08
mgir3G06	AT003715	Putative protein klnase	<i>A. thaliana</i> (AC002340)	1e-15
mgir3H12	AT003455	Putative proteIn kinase	<i>A. thaliana</i> (gi 3763932)	1e-15
mgir3H18	AT003457	Hypothetical protein	<i>A. thaliana</i> (el248730)	3e-11
mgir3I23	AT003460	Sm protein F isolog	<i>A. thaliana</i> (gi 2281089)	3e-35
mgir3J23	AT003461	CPI2	<i>N. tabacum</i> (e243962)	9e-10
mgir3L08	AT003465	Rice (YK426) MRNA	<i>O. sativa</i> (dbj D83527)	0.0
mgir3N10	AT003475	Unknown	<i>A. thaliana</i> (gi 687677)	9e-29
mgir3O01	AT003476	p-SINEI-r3 gene	<i>O. sativa</i> (dbj D10672)	2e-37
mgir3P10	AT003479	P54 protein	<i>P. sativum</i> (emb Y11207)	6e-09

- a A single representative clone is given for those cases where multiple cDNAs were identified.
- b Putative identification and source of comparison generally indicate the best match to a sequence in the NCBI nonredundant protein database. However, in those cases where the best match was to an unidentified open reading frame, NCBI nucleotide sequence is shown.
- c Expect values greater than  $e^{-2}$  are considered not statistically significant.

NCBI nonredundant database search에서 homology를 보이지 않은 클론들의 origin을 찾기 위해서 NCBI dbEST database를 대상으로 BLASTN search를 수행하였다 (표 13). 218개중 48.9%에 해당하는 107개가 식물에서 나온 EST와 match되었고, 16개는 도열병균의 부착기 형성단계의 cDNA library에서 나온 EST와, 4개는 도열병균을 접종한지 48시간째 만든 cDNA library에서 나온 EST와 match되었다. 91 clone은 여전히 database에 등록된 sequence와 아무런 homology도 보이지 않았다.

Table 13. Summary of dbEST search of no significant matches using BLASTN

Source of EST	Number (percentage) of cDNAs matched to dbEST entries
dbEST matches	127 (58.3)
Plant	107 (49.1)
Fungi <sup>a</sup>	16 (7.4)
Mixed <sup>b</sup>	4 (1.8)
No matches	91 (41.7)
Total	218 (100)

<sup>a</sup> dbEST entries that were generated from the *M. grisea* appressorium stage cDNA library (registered by R. A. Dean).

<sup>b</sup> dbEST entries that were generated from a rice blast infection stage cDNA library constructed with rice leaves 48 h after inoculation with *M. grisea* strain 70-15 (registered by R. A. Dean).

### 3) Functional categorization

BLASTX search 결과 database와 match된 293클론에 대하여 세포내에서 이 유전자들이 담당하고 있는 역할이 무엇인지를 Expressed Gene Anatomy Database의 cellular role classification scheme (White and Kerlavage, 1996)에 근거하여 분류하였다. 전체적으로 보면 여러 가지 대사과정에 관련된 것들이 32.8% (96 clones), 단백질 합성에 관련된 효소들이 18.4% (54 clones)로 대부분을 차지하였다 (표 14). 특히 주목할 것은 cell/organism defense 또는 병원성에 관련된 유전자들이 29.4% (86 clones)나 차지하고 있다는 것이다. 곰팡이 유전자와 유사성을 보이는 72 clone중 가장 많은 부분을 차지하는 것은 유전자 또는 단백질의 발현에 관련된 것이었다. 이로부터 병원균이 기주식물내에 성공적으로 정착하기 위해서는 새로운 단백질의 합성이 활발히 일어난다고 생각할 수 있었다. 5개의 nonredundant EST를 구성하는 19 clone은 cell/organism defense or pathogenicity로 분류할 수 있었다.

식물의 유전자와 유사성을 보이는 221 clone중 가장 많은 부분을 차지하는 것은 metabolism으로 분류되었다. 67 clone은 cell/organism defense로 분류되었는데, 이들은 25개의 nonredundant EST를 구성하고 있었다 (표 12). 이중 13 nonredundant EST는 벼가 아닌 다른 식물의 유전자와 가장 높은 homology를 보였기 때문에 아직 벼에서는 밝혀지지 않은 새로운 유전자를 찾을 가능성을 보여주었다. 이 연구에서 6가지의 pathogenesis-related protein이 밝혀졌다. 이들은 acidic, basic PR-1, acidic PR-5 두 가지, probenazole-inducible gene 1 (PBZ1: PR-10), class III chitinase (PR-8)등이다.

Table 14. Classification of ESTs according to putative biological function

Functional group <sup>a</sup>	Number (percentage) of cDNAs homologous to		Total
	Fungal genes	Plant genes	
	Cell division	1 (1.4)	
Cell signaling/ cell communication	0 (0)	1 (0.4)	1 (0.3)
Cell structure/motility	1 (1.4)	0 (0)	1 (0.3)
Cell/organism defense	19 (26.4)	67 (30.4)	86 (29.4)
Gene/protein expression	27 (37.5)	27 (12.2)	54 (18.4)
Metabolism	17 (23.6)	79 (35.7)	96 (32.8)
Unclassified	7 (9.7)	46 (20.8)	53 (18.1)
Total	72 (100)	221 (100)	293 (100)

<sup>a</sup> Protein matches from the BLASTX searches were assigned to one of seven functional categories following the EGAD cellular role classification scheme.

#### 4) Transcript abundance

ATGC software를 사용하여 511 clone들의 중복성을 확인하였다. 184 clone은 solitary로, 나머지 112 clone은 2번에서 15번까지 나타났다 (그림 22). 따라서 총 296개의 nonredundant clone을 찾을 수 있었다. 이중 5번 이상 나온 clone들을 표 5로 정리하였다. 가장 많이 나온 유전자 (15번)는 벼의 type I metallothionein으로 전체의 2.9%를 차지하였다. 그 외 PBZ1이나 PR-1, type2 metallothionein-like protein들이 5번이상 나타났다. 곰팡이 유전자중에서는 *Neurospora crassa*의 glucose repressible gene1의 homolog가 5번 이상 sequencing되었다 (표 15).

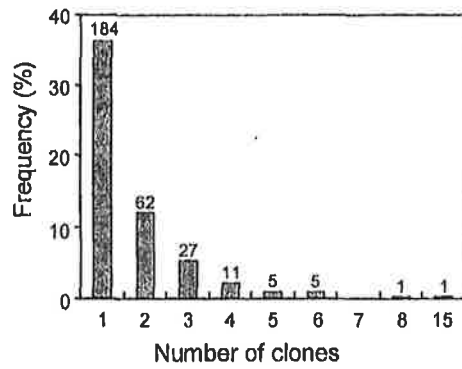


Fig. 22. Assessment of EST redundancy in *Magnaporthe grisea*-infected rice cDNA library by contiguous sequence assembly analysis. Contigs that consist of one sequence are considered singletons, whereas those with two or more sequences are classified as redundant ESTs. Numbers above bars indicate the number of cDNA clones.

Table 15. List of redundant cDNA clones occurring more than 5 times

EST	Putative identification	Number of cDNAs	% <sup>a</sup>	Origin <sup>b</sup>
mgir3D04	Metallothionein Type 1	15	2.9	P
mgir1I01	Glucose repressible gene 1	8	1.6	F
mgir1C20	Unidentified	6	1.2	U
mgir1F08	Probenazole-Inducible Protein 1	6	1.2	P
mgir3M06	Photosystem II 10 kDa polypeptide	6	1.2	P
mgir3N05	Metallothionein-like Protein Type 2	6	1.2	P
mgir3O20	Rubisco (RICRUBPC1)	6	1.2	P
mgir1A24	Pathogenesis-Related Protein 1	5	1.0	P
mgir3K18	Aldolase	5	1.0	P
mgir3A10	Enolase	5	1.0	F
mgir3A12	Rubisco (RICRUBPC2)	5	1.0	P
mgir3M16	CAB Binding Protein of LHCII Type I	5	1.0	P

a Percentage was calculated based on 511 cDNA clones analyzed.

b Putative origin of the ESTs was indicated based on the best match to a sequence in the NCBI nonredundant database. P, plant gene; F, fungal gene; U, unidentified.

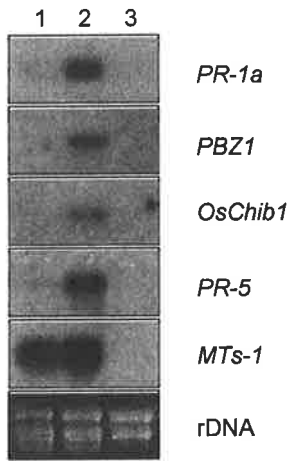


#### 5) Expression analysis of 10 ESTs

위의 EST중 식물의 방어관련 유전자 5개와 병원균의 stress-inducible 또는 병원성 유전자 5개를 선발하여 그 발현 양상을 Northern blot을 이용하여 분석하였다 (그림 23). 식물의 방어관련 유전자로는 옥수수의 acidic PR-1 homolog (*PR-1a*라고 명명함), *Cornus tulipa*의 classIII chitinase의 homolog (*Oschib1*이라고 명명함), PBZ1, PR-5, typeI metallothionein (*MTs-1*)을 선발하였다. 네 가지 PR 유전자는 건전한 식물에서는 거의 발현이 안 되는 데 반해 도열병균이 접종된 잎에서는 발현이 되었다. *MTs-1*은 건전한 잎에서도 발현이 되는 유전자인데, 병원균의 침입에 의해 그 발현 정도가 더 높아졌다.

병원균의 유전자도 모두 식물체에 침입한 후 발현정도가 더 높아지는 것으로 나타났는데, *MPG1*은 문헌상의 보고와 마찬가지로 nitrogen starvation condition에서 발현이 증가하였다. *N. crassa*의 *Bli-3* homolog (*PEG1: in Planta Expressed Gene 1* 이라고 명명함)는 식물체내에서 그 발현정도가 굉장히 높은데 반해 nitrogen starvation condition에서는 발현이 억제되었다. *Cryphonectria parasitica*의 cryparin homolog는 *MHP1 (Magnaporthe hydrophobin 1)*이라고 명명하였는데, 식물체 내에서만 발현하는 것으로 나타났다. *Colletotrichum gloeosporioides*의 nitrogen-starvation induced gene과 유사성을 보이는 유전자 (*PEG2*)는 식물체내에서는 발현이 증가되었고, nitrogen starvation에서는 발현이 억제되는 것으로 나타났다. *GRG1* homolog (*PEG3*)는 in planta에서는 발현이 증가되었고, nitrogen starvation에서도 발현이 증가되었다.

**A**



**B**

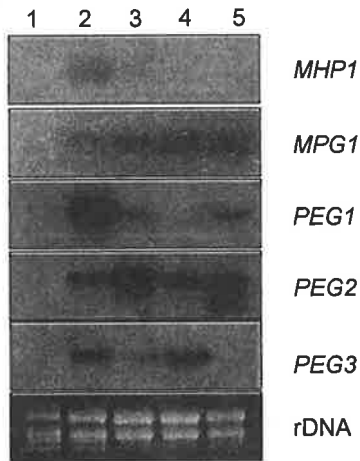


Fig. 23. Northern blot hybridization of interaction-induced genes. A, Plant defense-related genes. *PR-1a*, encoding an acidic PR-1; *PBZ1*, probenazole-inducible protein 1; *Oschib1*, a class III chitinase; *PR-5*, thaumatin-like protein; *MTs-1*, type I metallothionein. B, Fungal stress-inducible or pathogenicity genes. *MHP1*, a class II hydrophobin of *M. grisea*; *MPG1*, a class I hydrophobin of *M. grisea*; *PEG1*, a homolog of *BLI-3* of *N. crassa*; *PEG2*, a homolog of the nitrogen starvation-induced gene of *C. gloeosporioides*; *PEG3*, a homolog of *Grg-1* of *N. crassa*. Total RNA was isolated from uninfected rice leaves (lane 1), rice leaves infected with *M. grisea* 120 h after inoculation (lane 2), *M. grisea* mycelia grown in complete medium (lane 3), mycelia grown under nitrogen starvation conditions (lane 4), and mycelia grown under carbon starvation (lane 5). Ten micrograms of total RNA was fractionated in 1.5% formaldehyde gels and transferred to Hybond N+ membranes. The blots were hybridized using the indicated cDNAs as probes.

#### 다. 방어 관련 유전자의 클로닝 및 발현 특성 분석

식물은 병원균의 침입에 대해 매우 정교한 방어시스템을 가동시킨다. 이러한 방어 반응에는 세포벽의 강화나 phytoalexin과 같은 길항 이차대사 산물의 축적, pathogenesis-related (PR) protein의 발현 등이 있다. PR protein은 abiotic stress나 여러 가지 병원균의 침입에 의해 유도되는 식물의 단백질이다. 현재까지 알려진 14종류의 PR 단백질 중 PR-1은 병원균의 침입이나 salicylic acid나 methyl-2,6-dichloroisonicotinic acid (INA), benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothioic S-methyl ester (BTH)등에 의해 발현이 유도된다. 또한 이 PR-1의 발현은 담배나 애기장대와 같은 쌍자엽 식물에서 전신 유도 저항성 (SAR)의 표지로 널리 사용되고 있다. 그러나, 단자엽에서 PR-1의 발현과 식물마다 조금씩 다른 특성을 보인다. 많은 식물에서 PR protein은 small gene family로 구성되어 있다. 벼에서는 PR-1 sequence가 단지 하나만 database에 등록되어 있을 뿐, 더 이상의 characterization이 되어 있지 않다. 따라서 이 연구에서는 위 EST 분석에서 밝혀진 새로운 PR-1 유전자의 특성을 파악하고 그 발현 양상을 분석하였다.

##### 1) PR-1a protein을 encoding하는 벼 cDNA 분리 및 염기서열 분석

EST 분석에서 두가지의 PR-1 유전자가 분리되었는데, 그중 하나는 옥수수에서 분리된 acidic PR-1과 가장 높은 homology를 보였다. 이것은 아직 벼에서는 보고된적이 없는 바, 이 cDNA의 전체 염기서열을 분석하고, PR-1a로 명명하였다.

PR-1a의 총 염기서열은 792bp로 168개의 아미노산을 encoding하는 하나

의 ORF를 내포하고 있었다 (그림 24). 이 단백질은 N-말단에 전형적인 signal peptide를 가지고 있어, 세포 외부로 분비되는 단백질임을 알 수 있었다. Mature PR-1a 단백질의 예상 분자량은 15,728 Da으로, PR-1의 분자량 15,263 Da과 비슷하였다. 그러나, PR-1a의 이론적인 pI는 4.5로 acidic protein임을 알 수 있었는데, PR-1의 이론적인 pI는 8.4로 basic protein이었다. 지금까지 작물에서 분리된 PR-1 protein들은 대부분 basic protein이었기 때문에, PR-1a는 옥수수의 ZmPR1-2 다음으로 두 번째로 분리된 acidic protein이라고 생각된다. 벼에서 분리된 두 가지 PR-1 protein들은 서로 68%의 homology를 가지고 있다. PR-1a는 옥수수의 ZmPR1-2와 74%의 가장 높은 homology를 보였다. 그리고, 쌍자엽 식물의 PR-1 protein들 보다 단자엽 식물에서 분리된 PR-1 protein들과 더 유사성이 높고, 진화적으로도 더 가까운 유연관계를 보인다 (그림 25). PR-1a protein sequence에는 PR-1 protein들에 잘 보존된  $\alpha$ -helix와  $\beta$ -strand를 이루는 structural element들도 발견되었다.

```

1      TCGATCTCCATCATCTCTTCTCGTCTACTAACAAAGTTATAATATCAA
47     ATTAAGGTATATATATATATATATAGTAGCTAGCTCAATTAATGGCG
1      M A
95     AGTTCGTGAGCAGGTTATCCTGCTGCTTGGTGCFCGCGGCGGGCG
3      S S S S R L S C C L L V L A A A
143    GCCATGGCGCGACGGCGCAGACTCGGCECAGSACTTCGTGGACCCG
19     A M A A T A Q N S A Q D F V D P
191    CACAACGCGGCGAGGGCCGACCTCGGGGTGGGGCCGTTGACTGGGAC
35     H N A A R A D V G V G P V S W D
239    GACACGGTGGCGCGTACGCGGAGAGCTACGCGGCCAGCGGCAAGGGC
51     D T V A A Y A E S Y A A Q R Q G
287    GACTGCAAGCTGAGCACTCGGACTCGGGCGGAAGTACGGCGAGAAC
67     D C K L E H S D S G G K Y G E N
335    ATCTTCTGGGGCTCCCGCGGCGGACTGGACGGCGGCGAGCGCCCTG
83     I F W G S P G G D W T A A S A V
383    TCGGCGTGGGTGTCGGAGAAGCAGTGGTACGACCAGCGAGCAACAGC
99     S A W V S E K Q W Y D H G S N S
431    TGCTCGGCGCGGAGGGGAGCTCGTGCGGGCACTACAGCAGGTGGTG
115    C S A P E G S S C G H Y T Q V V
479    TGGCGGCACTCGACGGCGATCGGCTCGGCGCGGCGTCTGCGGACGGC
131    W R D S T A I G C A R V V C D G
527    GACCTCGGCGTCTTCATCACCTGCAACTACTCGCGCGGGCAACTTC
147    D L G V F I T C N Y S P P G N F
575    GTCGGCCAATCTCCCTACTGATTAATTAATTAATTAATTAATTAATCACT
163    V G Q S P Y *
623    CACTAATTAATCATATCGTATGCTATGCTACGTGTTTATGCAATGTATG
671    GACATGTAGTGTATATGGTATATATATATATATATATATATATATATAG
719    GTACGTATGCTGGTGGATAAAATCCGATGAAATAAATAAATAAAGCTG
767    TACTGTACGCCGTAATTGCTTAGTGT

```

Fig. 24. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the rice PR-1a gene. The N-terminal signal peptides, thought to be cleaved after the alanine residue at position 24, are shown in italics. Putative polyadenylation signals are underlined. The nucleotide sequence has been deposited to the GenBank under the accession number AF251277.

PR-1a	--MASSSSRLSCCLL--VLAAMAAA--T	SWDDTVA	54
ZmPR1-2	--MAP---RLACLLA--LAMAATVVPCT	SWDDTVA	53
HvPR1-1	--MQTP--KLAILLA-LAMAAA-MVNLSQ	SWSTKIQ	54
TaPR1-1	--METP--KLAVLLA-LAMAAA-MVNLSQ	SWSTKIQ	54
ZmPR1	--MEASN--KLAVLLWLVMAAATAVHPSY	TRWSTKIQ	57
PR-1	--MEVS--KLAIALA---MVAA-MALPSQ	TWDTSQ	52
AtPR1-4	MNETGYSR--FLIVFVALVGAALVPS-K	QWDERVA	56
NtPR1a	MGFVLFSQLPSFLLVSTLLELVISHSCR	TWDDQVA	60
	:	:	:
PR-1a	AYAESYAAQRGGDCKLEHSDSGCKYGENI FWGSPGGDWTAAASAVSAWVSEKQYDHDGSNS		114
ZmPR1-2	AYAQSYYAQRGGDCKLIHS--GGPYGENLFWGSAGADWSASDAVGSWVSEKQYDHDGNS		111
HvPR1-1	AFAQNYAQRINDCKLQHSGGF--YGENI FWGSAGADWKAADAVNSWVSEKQYDHDGNS		112
TaPR1-1	GFAQNYAQRINDCKLQHSGGF--YGENI FWRSAGADWKAADAVKLWVDEKQYDHDGNS		112
ZmPR1	QFAEKYAAQRAGDCRLQHSGGF--YGENI FWGSAGDWAADAVRSWVDEKQYDHDGNS		115
PR-1	AFAENYASQRSGDCSLIHSNRNNGENLFWGSAGGDWTAASAVQSVGVEKSDYDVAASNS		112
AtPR1-4	AYARSYAEQLRGNCLIHSGGF--YGENLAWGSG--DLGVSAVNMWVSEKANYDVAANT		112
NtPR1a	AYAGNYASQLAADCNLVHSHGG--YGENLAEGSGD-FMTAAKAVEMWVDEKQYDHDGNS		117
	:	:	:
PR-1a	CSAPEG	CDGDLGVFITCNYSPPGNFVGSQSPY	168
ZmPR1-2	C--AEG	CDNNAGVFIIICSYNPPGNVVGESPY	163
HvPR1-1	C--AAG	CNNNRGVFITCNYEPRGNIIGQKPY	164
TaPR1-1	C--AGG	CNNNRGVFITCNYEPAGNVVQKPY	164
ZmPR1	C--AAG	CRDNRGVFITCNYEPRGNIAGMKPY	167
PR-1	C--AQG	CSNNGRVFITCNYKPNAGNFVGSQSPY	164
AtPR1-4	CN--G	CNNG-GTIIICNYDPRGNYVNEKPY	161
NtPR1a	CS--QG	CNNG-GYVWSCNYDPPGNVRESQSPY	168
	:	:	:

Fig. 25. Comparison of the predicted amino acid sequence of PR-1a with those of other PR-1 proteins. ZmPR1-2, acidic PR-1 from maize (Morris *et al.*, 1998); HvPR1-1, TaPR1-1, ZmPR-1, and PR-1; basic PR-1 proteins from barley (Muradov *et al.*, 1993), wheat (Molina *et al.*, 1999), maize (Casacuberta *et al.*, 1991), and rice (U89895), respectively. AtPR1-4 and NtPR1a, PR-1 proteins from dicot plants, Arabidopsis (Uknes *et al.*, 1992) and tobacco (Pfitzner and Goodman, 1987), respectively. The arrow marks the predicted cleavage site. Residues that are identical, or conserved in all sequences of the alignment, are shown in asterisks. : indicates conserved substitutions, and . indicates semi-conserved substitutions. Gaps are introduced to maximize homology by hyphens.

## 2) Genomic organization of rice PR-1 genes

벼에서의 PR-1 gene들의 genomic structure를 조사하기 위하여 Southern blot analysis를 수행하였다. PR-1, PR-1a 두 가지 유전자 모두에 대하여 Southern blot을 실시한 결과, 각각은 multiple genomic fragment에 교잡되는 것으로 보아 벼에서도 다른 식물에서와 마찬가지로 PR-1 유전자는 small multigene family로 구성되어 있다는 것을 알 수 있었다 (그림 26).



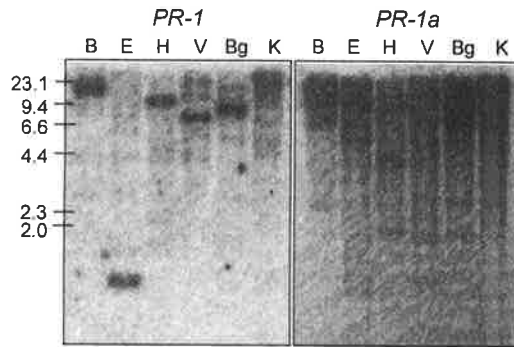


Fig. 26. Southern blot analyses of PR-1 and PR-1a genes. One microgram of genomic DNA was digested with restriction endonucleases, fractionated in a 0.7% agarose gel, and blotted onto the Hybond N+ membrane. The membrane was hybridized with [<sup>32</sup>P]-dCTP-labeled cDNA of PR-1 or PR-1a gene. Lane 1, *Bam*HI; lane 2, *Eco*RI; lane 3, *Hind*III; lane 4, *Eco*RV; lane 5, *Bgl*II; lane 6, *Kpn*I.

### 3) PR-1 유전자들의 조직 특이적 발현양상

벼에서 분리한 두 가지 PR-1 유전자들의 조직 특이적 발현 양상을 살펴보기 위하여 잎, 뿌리, 옆초에서 total RNA를 분리하여 Northern blot 분석을 실시하였다. PR 유전자들의 특성상 건전한 식물에서의 발현이 거의 미미하여, 오랫동안 (10일간) expose한 후에야 signal을 관찰할 수 있었다. PR-1a의 mRNA는 세 조직 모두에서 미미하게 발현되는 반면, PR-1 transcript는 잎에서만 발현되었다 (그림 27). 건전한 식물에서 아주 낮은 수준의 발현은 밀의 PR1.2, 옥수수 PR1-2에서도 관찰된 바 있다.

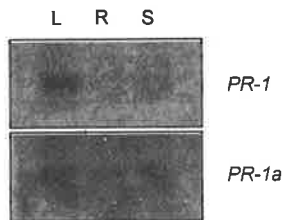


Fig. 27. Expression of two rice PR-1 genes in different tissues of rice. Total RNA was extracted from leaves (L), sheath (S), and roots (R). Ten microgram of total RNA was fractionated in 1.5% formaldehyde-agarose gel and blotted onto the Hybond N+ membrane. The membranes were hybridized with [ $^{32}$ P]-dCTP-labeled cDNA of the indicated genes.

#### 4) 병원균의 침입에 의한 PR-1 유전자들의 발현

병원균의 침입에 의한 PR-1 유전자들의 발현양상을 알아보기 위하여 도열병균과 벼 흰잎마름병균을 접종한 후 Northern blot analysis를 수행하였다 (그림 28). 도열병균 race KJ401은 화청벼에 HR 반응을 일으키는데 (비친화적 조합), HR이 눈에 보이기 전인 접종 후 24시간 만에 PR-1 유전자들의 발현이 induction되었다. 반면, 친화적 조합인 KJ201을 접종하였을 때는 60-72시간 후, 병반이 눈에 보이기 시작할 때 PR-1 유전자의 발현이 최고조에 달했다. 이러한 결과로 볼 때, 친화적 조합에서 보다 비친화적 조합에서 방어 관련 유전자들의 발현이 굉장히 빨리 일어난다는 것을 알 수 있었다. 이는 식물의 저항성을 결정하는 것은 방어 유전자의 종류가 다른 것이 아니라 얼마나 빨리 효율적으로 방어 유전자들을 발현시키는가 하는 것이라는 가설들과 일맥상통하는 결과들이다. 따라서, 벼의 두 PR-1 유전자들은 방어반응의 훌륭한 indicator로 사용할 수 있을 것으로 판단된다. 이 두 유전자들은 벼 흰잎마름병균인 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*를 접종했을 때도 발현이 되었다.

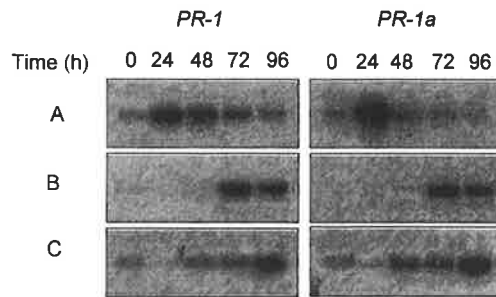


Fig. 28. Expression of two rice PR-1 genes in response to pathogen infections. Total RNA was extracted from rice (cv. Hwacheong) leaves at 0, 24, 48, 72, and 96 h after inoculation with *M. grisea* KJ201 and KJ401, or from leaves cv. Nakdong inoculated with *X. oryzae* pv. *oryzae*. Northern blots were prepared and subsequently hybridized as described in Fig. 4. A, Incompatible interaction with *M. grisea* KJ401; B, Compatible interaction with *M. grisea* KJ201; C, Compatible interaction with *X. oryzae* pv. *oryzae* KX021.

#### 5) BTH에 의한 PR 유전자들의 발현

PR 유전자들이 chemical SAR activator인 BTH에 의해 발현되는지를 조사하였다. 1 mM BTH를 관주 처리한 잎에서 total RNA를 분리하여 Northern blot analysis를 수행한 결과 처리 후 8일째 PR 유전자들의 발현이 유도되었다 (그림 29). 이는 쌍자엽 식물들에서 BTH 처리 후 수시간 내에 PR 유전자들이 발현되는 것과는 대조적이다. 하지만 peroxidase 유전자인 POX22.3이나 PBZ1도 8일째 발현이 되었다. 이로 보아 토양의 특성에 따른 흡수율이나, 상대적으로 고농도로 처리한 것, 토양관주 처리법 등에 따른 차이가 아닐까 하고 생각한다.

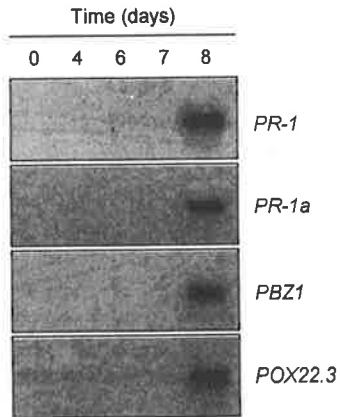


Fig. 29. Expression of defense-related genes in response to BTH. Total RNA was extracted from rice leaves at 0, 4, 6, 7, and 8 d after a soil-drench application of 1mM BTH. Northern blots were prepared and subsequently hybridized with two PR-1 genes, *PBZ1* (Midoh and Iwata, 1996) and *POX22.3* (Chittoor *et al.*, 1997), as probes.

#### 6) Abiotic stress에 의한 PR-1 유전자들의 발현

PR protein들은 병원균의 침입이나 abiotic stress에 의한 과민반응과 관련이 깊다고 알려져 있다. 두 가지 PR-1 유전자들이 oxidative burst를 일으키는 abiotic stress에 의해 어떻게 반응하는지를 조사하였다. 두 유전자 모두 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>나 50 μM CuSO<sub>4</sub>에 의해서 발현되었고, 30 μM methyl viologen이나 UV light 조사, heat, cold shock에 의해서는 발현되지 않았다 (그림 30). 과산화수소는 활성산소의 일종으로 oxidative burst를 일으키는 물질이고, 식물의 과민반응을 유도한다고 알려져 있다. 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하였을 때 벼잎에서는 까만 반점이 나타났고, peroxidase activity가 증가하였으며, phenolic compound들이 축적되는 현상을 보여 과산화수소는 화청벼에서 과민반응을 유도하는 것으로 생각된다. 중금속들도 고농도에서 급속한 세포괴사를 유도하며 식물세포에서 oxidative burst를 일으키는 것으로 보고되었다. methyl viologen이나 UV light, heat or cold shock들도 모두 활성산소를 매개로 세포 반응을 나타내는 것으로 알려져 있으나 벼에서는 PR 유전자의 발현을 유도시키지는 못하였다.



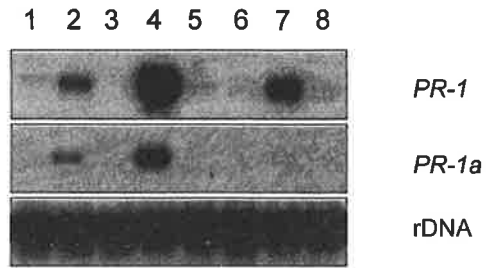


Fig. 30. Expression of two rice PR-1 genes in response to abiotic stresses. Rice plants were treated with H<sub>2</sub>O (lane 1), 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (lane 2), 30 M methyl viologen (lane 3), 50 M CuSO<sub>4</sub> (lane 4), heat shock (lane 5), UV light irradiation (lane 6), *M. grisea* infection (lane 7), and cold shock (lane 8) as described in Materials and Methods. Northern blots were prepared and subsequently hybridized as described in Fig. 4.

### 3장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도

본 연구과제에서 설정한 최종 연구목표인 “벼 도열병균의 침입과정 및 방어기작 이해를 통한 새로운 방제법 개발”을 달성하기 위해 연구내용을 크게 3부분으로 나누어 추진하였다. 이는 병원균의 침입기작을 이해하기 위한 부분과, 도열병균의 침입시 기주 식물의 방어기작에 대한 이해라는 두 가지 측면을 담고 있다.

도열병균의 침입 기작에서 가장 첫 번째 단계인 포자의 부착 검정체계를 확립하였고, 이러한 부착 검정체계를 이용하여 포자의 부착에 관여된 물질의 특성을 생화학적으로 파악할 수 있었다. Proteinase K, 열처리, 여러 가지 당분 처리를 통해 부착 물질은 당단백질로 이루어져 있음을 밝힐 수 있었다. 또한 fibronectin, fibronecton 항체, RGD peptide등을 처리한 실험결과, extracellular matrix protein과 세포 외부의 신호를 받아 전달한다고 알려진 integrin이 포자의 부착과 부착기 형성에도 관여되어 있음을 알 수 있었다. 여기에 부착기 형성 유도 물질을 처리하여 complementation 함으로써, 어떤 신호전달체계를 따르는지도 예측할 수 있었다. 이상의 연구 결과, 포자 부착의 생화학적 특성을 파악할 수 있었고, 이로써 목표지향적인 살균제 개발에 있어 새로운 작용점을 제공할 수 있을 것이라고 기대된다.

도열병균의 침입시 가장 중요한 단계인 부착기 형성을 유도하는 물리적 (접촉 표면의 소수성), 화학적 (cutin monomer)요인이 밝혀졌고, 이러한 외부의 신호를 인지하여 세포내로 전달하는 신호전달체계에 관해서 지난 10여년간 많은 연구가 이루어져 왔다. 그 결과 cAMP와 calcium이 부착기 형성을 유도하는 세포내의 신호전달 물질로 작용한다는 것이 밝혀졌다. 본 연구에서는 부착기 형성에 관련된 새로운 신호전달 물질을 찾고자

하였는데, 세포내에서 많은 단백질의 조효소로 작용하는 vitamin B1이 부착기 형성에도 관련하고 있음을 밝힐 수 있었다. 또한, 이 vitamin B1은 cAMP-dependent pathway에서 cAMP보다 상위에 작용하며, calcium-dependent pathway와도 관련되어 있음을 밝힐 수 있었다. calcium-dependent pathway의 중요한 매개체인 protein kinase C 유전자도 클로닝할 수 있어, 이 유전자의 기능을 밝히면 calcium관련 신호전달 체계가 부착기 형성에 관여하는 정확한 역할을 규명할 수 있을 것이다.

식물은 침입하는 병원균에 대해 매우 정교한 방어반응을 나타낸다. 이러한 식물의 방어반응에 관련된 유전자와, 방어반응을 유도하는 신호전달 체계에 관해서 벼에서는 아직 연구수준이 미미하다. 본 연구에서는 도열병에 걸린 벼 잎에서 발현되는 유전자를 profiling하여 방어 반응에 관련된 유전자를 찾고, 그 유전자들의 발현양상을 살펴보았다. 500여개의 cDNA중에서 약 25%정도는 도열병균에서 유래된 유전자이며, 벼 유래 유전자의 약 30%정도가 방어반응에 관련된 것으로 나타났다. 이러한 방어 반응에 관련된 유전자는 실지로 건전한 식물에서는 그 발현 수준이 미미하나, 병원균의 침입으로 발현이 유도되는 것으로 나타났고, 아직 벼에서는 밝혀지지 않은 유전자들을 상당부분 새로이 밝힐 수 있었다. 이러한 유전자들은 앞으로 벼의 방어반응과 저항성 반응을 이해하는데 이용될 수 있을 것이라 생각된다. 또한 친화적 관계에서의 EST cataloging은 아직 시도된 바가 없었기 때문에 본 연구 결과는 이 분야에 많은 영향을 미칠 것으로 기대된다. 이러한 결과는 SCI에 등재된 잡지에 출판되었다.

본 연구를 통해 병원균의 침입기작에 대한 이해를 넓혔고, 이는 새로운 살균제 개발을 위한 새로운 target site로 작용할 수 있을 것이다. 또한, 병원균의 침입에 대한 벼의 방어 관련 유전자가 많이 확보되었기 때문에, 앞으로 저항성을 나타내는 기작 및 신호전달체계 연구가 뒤따라야

할 것이다.

## 제 4장 연구개발 결과의 활용계획

본 연구의 결과는 벼와 벼 도열병원균의 상호작용에 근거한 새로운 도열병 방제 수단을 마련하는데 직접적인 역할을 할 것이다. 구체적으로는

가. 벼 도열병원균 분생포자의 표면 부착 저해를 이용한 새로운 bioscreening 체계 확립

새로운 농약을 선발하기 위해 합성화합물이나 천연물질을 screening하기 위해 기존의 무작위 검정체계에서 탈피하여 병원균 포자의 표면 부착만을 저해하는 새로운 물질을 biorational screening 체계를 확립할 수 있을 것이다.

자. 벼 도열병원균 부착기 형성 억제를 통한 새로운 방제법 개발

또한 새로운 살균제 개발을 위해 식물병원균의 침입구조 형성을 특이적으로 억제할 수 있는 물질을 선발할 수 있다. 식물병원균이 형성하는 침입구조는 성공적으로 병을 일으키기 위한 필수 불가결한 세포분화 현상이다. 이러한 침입구조를 형성하는데 필요한 신호전달체계를 교란함으로써 식물병을 방제하는 새로운 방제법을 개발할 수 있을 것이다. 현재까지는 임의 검정에 의해 살균제 후보 물질을 도출해 왔으나 앞으로는 병발생에 결정적 역할을 하는 metabolic pathway의 각 단계가 target sites로 이용되어 질 수 있을 것이다.

다. 도열병 방어에 관련된 벼 유전자 확보 및 방어 유전자를 이용한 도열병 방제 물질 선발체계의 확립

벼의 방어 반응에 관련된 유전자원 확보를 통해 도열병 저항성 기작을 규명하는데 이용될 수 있을 것이다. 또한, 이러한 유전자들을 이용하여 벼의 저항성을 최적화시키는 물질을 선발하는 방법을 구축할 수 있을 것이다.

## 제 5장 참고문헌

- Adachi, K., and Hamer, J. 1988. Divergent cAMP signaling pathways regulate growth and pathogenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 10:1361-1373.
- Alexander, D., Goodman, R. M., Gut-Rella, M., Glascock, C., Weymann, K., Riedrich, L., Maddox, D., Ahl-Goy, P., Luntz, T., Ward, E., and Ryals, J. A. (1993) Increased tolerance to two Oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7327-7331.
- Alvarez, M. E., Pennell, R. I., Meijer, P., Ishikawa, A., Dixon, R. A., and Lamb, C. J. (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92, 773-784.
- Asiegbu, F. O. 2000. Adhesion and development of the root rot fungus (*Heterobasidion annosum*) on conifer tissues : effects of spore and host surface constituents. *FEMS Microbiology Ecology* 33:101-110.
- Azzi, A., Boscoboinik, D., Hensey C. 1992. The protein kinase C family. *Eur. J. Biochem.* 208:547-557.
- Beckerman, J., and Ebbole, D. 1996. MPG1, a gene encoding a fungal hydrophobin of *Magnaporthe grisea*, is involved in surface recognition. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:450-456.
- Berridge, M.J. 1993. Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* 361:315-324.
- Brown, N. H., Bloor, J. W., Dunin, B. O., and Martin-Bermudo, M. D. 1993. Integrin and morphogenesis. *Development Suppl* 0:177-183.
- Burns, D.J., Bell., R.M. 1991. Protein kinase C contains two phorbol ester binding domains. *J. Biol. Chem.* 266:18330-18338.
- Carpenter, C. E., Mueller, R. J., Kazmierczak, P., Zhang, L., Villalon, D. K., and van Alfen, N. K. 1992. Effect of a virus on accumulation of a tissue-specific cell-surface protein of

- the fungus *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. Mol. Plant-Microbe Interact. 4:55-61.
- Casacuberta, J. M., Puigdomenech, P., and Segundo, B. S. (1991) A gene coding for a basic pathogenesis-related (PR-like) protein from *Zea mays*. Molecular cloning and induction by a fungus (*Fusarium moniliforme*) in germinating seeds. Plant Mol. Biol. 16, 527-536.
- Chen, Z., Silva, H., and Klessig, D. F. (1993) Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. Science 262, 1883-1886.
- Chittoor, J. M., Leach, J. E., and White, F. F. (1997) Differential induction of a peroxidase gene family during infection of rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Mol. Plant-Microbe Interact. 10, 861-871.
- Choi, W., and Dean, R. 1997. The adenylate cyclase gene *MAC1* of *Magnaporthe grisea* controls appressorium formation and other aspects of growth and development. Plant Cell 9:1973-1983.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162:156-159.
- Clark, E. A., Brugge, J. S. 1995. Integrin and signal transduction pathway : the road taken. Science 268:233-239.
- Clement, J. A., Martin, S. G., Porter, P., Butt, T., and Beckett, A. 1993. Germination and the role of extracellular matrix in adhesion of urediospores of *Uromyces viciae-fabae* to synthetic surfaces. Mycological Research 97:585-593.
- Correa, A., Staples, Jr., R. C., and Hoch, H. C. 1996. Inhibition of Thigmostimulated Cell Differentiation with RGD-peptides in *Uromyces* germlings. Protoplasma 194:91-102.
- Costigan, C., Gherung, S., and Snyder, M. 1992. A synthetic lethal screen identifies SLK1, a novel protein kinase homolog implicated in yeast cell morphogenesis and cell growth. Mol. Cell. Biol. 12:1162-1178.



- David, E.C. 1995. Calcium signaling. *Cell* 80:259-268.
- Davis, K. R. and Ausubel, F. M. (1989) Characterization of elicitor-induced defense responses in suspension-cultured cells of *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2, 363-368.
- de Jong, J.C., McCormack, B.J., Smirnoff, N., and Talbot, N.J. 1997. Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* 389:244-245.
- de Waard, M. A., Georgopoulos, S. G., Hollomon, D. W., Ishii, H., Leroux, P., Ragsdale, N. N., and Schwinn, F. J. 1993. Chemical control of plant diseases: Problems and prospects. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31:403-421.
- Dean, R. A. 1997. Signal pathways and appressorium morphogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35:211-234.
- Dekker, L.V., Palmer, R.H., and Parker, P.J. 1995. The protein kinase C and protein kinase C related gene families. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:396-402.
- Devecha, N. and Irvine, R.F. 1995. Phospholipid signaling. *Cell* 80:269-278.
- DeZwaan, Y.M., Carroll, A.M., Valent, B., and Sweigard, J.A. 1999. *Magnaporthe grisea* Pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *Plant Cell* 11:2013-2030.
- Dickman, M.B., Buhr, T.L., Warwar, V., Truesdell, G.M., and Huang, C.X. 1995. Molecular signals during the early stages of alfalfa anthracnose. *Can. J. Bot.* 73:S1169-1177.
- Eberle, J., and Russo, V. E. S. 1994. *Neurospora crassa* blue light-inducible gene *bli-3*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 34:737-744.
- el-Azizi M. Khardori N. 1999. Factors influencing adherence of *Candida* spp. to host tissues and plastic surfaces. *Indian J. Exp. Biol.* 37(10):941-51.
- Elibert, F., Thines, E., Sterner, O., and Anke, H. 1999. Fatty acids and their derivatives as modulators of appressorium formation in *Magnaporthe grisea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63:879-883.

- Epstein, L., Laccetti, L. B., Staples, R. C., and Hoch H. C. 1987. Cell-substratum adhesive protein involved in surface contact responses of the bean rust fungus. *Physiol Mol Plant Pathol* 30:373-388.
- Fecke, W., Nehls, U., and Weiss, H. An antisense RNA expression vector for *Neurospora crassa*.
- Foyer, C. H. and Mullineaus, P. M. (1994) Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Friedrich, L., Lawton, K., Ruess, W., Masner, P., Specker, N., Rella, M. G., Meier, B., Dincher, S. S., Staub, T., Uknes, S., Metraux, J. -P., Kessmann, H., and Ryals, J. A. (1996) A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J.* 10, 61-70.
- Gale, C., Finkel, D., Tao, N., Meinke, M., McClellan, M., Olson, J., Kendrick, K., and Hostetter, M. 1996. Cloning and expression of a gene encoding an integrin-like protein in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:357-361.
- Gil, M. L., Penalver, M. C., Lopez-ribot, J. L., Oconnor, J. E., and Martinez, J. P. 1996. Binding of extracellular matrix protein to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect. and Immun*:5239-5247.
- Gilbert, R.D., Johnson, A.M., and Dean, R.A. 1996. Chemical signals responsible for appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 48:335-346.
- Gorlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K. -H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E. R., Kessmann, H., and Ryals, J. A. (1996) Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 6, 629-643.
- Gustafson, K. S., Vercellotti, G. M., Bendel, C. M., and Hostetter, M. K. 1991. Molecular mimicry in *Candida albicans* : role of an integrin analogue in adhesion of the yeast to the human

- endothelium. *J. Clin. Invest* 87:1896-1902.
- Hamer, J. E., Howard R.J., Chumley, F. G., and Valent, B. 1988. A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. *Science* 239:288-290.
- Hammond-Kosack, K. E. and Jones, J. D. G. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8, 1773-1791.
- Hanks, S., Quinn, A.K., and Hunter, T. 1988. The protein kinase C family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241:42-52.
- Hoch, H. C., Staples, R. C. 1984. Evidence that cAMP initiates nuclear division and infection structure formation in the bean rust fungus, *Uromyces phaseolus*. *Exp. Mycol.* 8:37-46.
- Hoch, H. C., Staples, R. C. 1985. The microtubule cytoskeleton in hyphae of *Uromyces phaseoli* germling : its relationship to the region of nucleation and to the F-actin cytoskeleton. *Protoplasma* 124:112-122.
- Hoch, H.C., and Staples, R.C., and Bourett, T. 1987. Chemically induced appressoria in *Uromyces appendiculatus* are formed aerially, apart from the substrate. *Mycologia* 79:418-424.
- Hokin, L.E. 1985. Receptors and phosphoinositol-generated second messengers. *Annu. Rev. Biochem.* 54:205-235.
- Hostetter, M. K., Tao, N-J., Gale, C., Herman, D. J., McClellan, M Sharp, P. L., and Kendrick, K. E. 1995. Antigenic and functional conservation of an integrins I-domain in *Sacchomyces cerevisiae*. *Biochem. Mol. Med.* 55:122-130.
- House, C. and Kemp, B.E. 1987. Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototype in its regulatory domain. *Science* 238:1726-1728.
- Howard, R. J., and Valent, B. 1996. Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:491-512.
- Jwa, N. S., Park, S. G., Park, C. H., Kim, S. O., Ahn, I. P., Park

- S. Y., Yoon, C. H., and Lee, Y. H. (2000) Cloning and expression of a rice cDNA encoding a *Lis1* homologue of maize. *Plant Pathol. J.* 16, 151-155.
- Hubbard, S.R., Bishop, W.R., Kirschmeier, P., George, S.J., Cramer, S.P., and Hendrickson, W.A. 1991. Identification and characterization of zinc binding sites in protein kinase C. *Science.* 254:1776-9.
- Hynes, R. O. 1987. Integrins : a family of cell surface receptors. *Cell* 48: 549-554.
- Hynes, R. O. 1992. Integrins : versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25.
- Jellito, T.C., Page, H. A., and Read, N.D. 1994. Role of external signals in regulating the pre-penetration phase of infection by the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Planta* 194: 471-477.
- Karganilla, A., Paris-Natural, M., and Ou, S. H. (1973) A comparative study of culture media for *Xanthomonas oryzae*. *Philipp. J. Agric.* 57, 141-152.
- Juliano, R. L. and Haskill, S. 1993. Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell. Biol.* 120:577-585.
- Kaminskyj, S. G. W. and Heath, I. B. 1995. Integrin and spectrin homologues, and cytoplasm-wall adhesion in tip growth. *J. Cell. Sci.* 108:849-856.
- Kang, M. K., Park, K. S., Choi, D. (1998) Coordinated expression of defense-related genes by TMV infection or salicylic acid treatment in tobacco. *Mol. Cells* 8, 388-392.
- Kang, S., Chumley F.G., and Valent, B. 1994. Isolation of the mating-type genes of the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea* using genomic subtraction. *Genetics* 138:289-296.
- Kauffman, H. E., Reddy, A. P. K., Hsieh, S. P. Y., and Merca, S. D. (1973) An improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. *Plant Dis. Rep.* 57, 537.
- Kelemu, S., and Collmer, A. 1993. *Erwinia chrysanthemi* EC16 produces a second set of plant-inducible pectate lyase isozymes. *Appl.*

- Environ. Microbiol. 59:1756-1761.
- Keon, J., Bailey, A., and Hargreaves, J. 2000. A group of expressed cDNA sequences from the wheat fungal leaf blotch pathogen, *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*). Fungal Genet. Biol. 29:118-133.
- Kershaw, M.J., and Talbot, N.J. 1998. Hydrophobins and repellents: Proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. Fungal Gen. Biol. 23:18-33.
- Kim, S., Ahn, I. P., Park, C., Park, S. G., Park, S. Y., Jwa, N. S. and Lee, Y. H. 2001. Molecular characterization of the cDNA encoding an acidic isoform of PR-1 protein in rice. Mol. Cells 11:115-121.
- Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. 1980. Activation of calcium and phospholipid dependent protein kinase by diacylglycerol: its possible relation to phosphatidyl inositol turnover. J. Biol. Chem. 255: 2273-2276.
- Kleczkowski, L. A. (1993) Inhibitors of photosynthetic enzyme/carriers and metabolism. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45, 339-367.
- Kogel, K. -H., Beckhove, U., Dreschers, J., Munch, S., and Romme, Y (1994) Acquired resistance in barley. Plant Physiol. 106, 1269-1277.
- Kwon, Y. H., Hoch, H. C., and Aist, J. R. 1991. Initiation of appressorium formation in *Uromyces appendiculatus* : organization of the apex, and the response involving microtubules and apical vesicles. Can. J. Bot. 69:2560-2573.
- Kwon, Y. H., Hoch, H. C., and Staples, R. C. 1991. Cytoskeletal organization in *Uromyces* urediospore germling apices during appressorium formation. Protoplasma 165:37-50.
- Lau, G.W. and Hamer, J.E. 1996. Regulatory genes controlling *MPGI* expression and pathogenicity in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Plant Cell 8: 771-781.
- Lawton, K., Fredrich, L., Hunt, M. D., Weymann, K., Delany, T.,

- Kessmann, H., Staub, T., and Ryals, J. A. (1996) Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J.* 10, 71-82.
- Lee, B. -H., Won, S. -H., Lee, H. -S., Miyao, M., Chung, W. -I., Kim, I. -J., and Jo, J. (2000) Expression of the chloroplast-localized small heat shock protein by oxidative stress in rice. *Gene* 245, 283-290.
- Lee, K.S., Irie, K., Gotoh, Y., Watanabe, Y., Araki, H., Nishida, E., Matsumoto, K., and Levin, D.E. 1993. A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signaling by protein kinase C. *Mol. Cell. Biol.* 13:3067-3075.
- Lee, S. C., Kang, S. H., and Lee, Y. H. 1998. Factors affecting appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Korean J. Plant Pathol.* 14 : 413-417.
- Lee, S.C., and Lee, Y.-H. 1998. Calcium/calmodulin-dependent signaling for appressorium formation in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecules and Cells* 8:698-704.
- Lee, Y.-H., and Dean, R. 1993. cAMP regulates infection structure formation in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 5:71-76.
- Leung, H., Borromeo, E.S., Bernardo, M.A., and Notteghem, J.L. 1988 Genetic analysis of virulence in rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Phytopathology* 78:1227-1233.
- Leung, H., Lehtinen, U., Karjalainen, R., Skinner, D., Tooley, P., Leong, S., and Ellingboe, A. 1990. Transformation of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* to hygromycin B resistance. *Curr. Opin. Genet.* 17:409-411.
- Levin, D.E. and Bartlett-Heubusch, E. 1992. Mutants in the *S. cerevisiae* *PKC1* gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J. Cell Biol.* 116:1221-1229.
- Levin, D.E., Fields, F.O., Kunisawa, R., Bishop, J.M., and Thorner, J. 1990. A candidate protein kinase C gene, *PKC1*, is required

- for the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Cell* 62: 213-224.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., and Lamb, C. J. (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79, 583-593.
- Liscovitch, M. 1992. Crosstalk among multiple signal activated phospholipases. *Trends Biochem. Sci.* 17:393-399.
- Liu, S., and Dean, R. 1997. G protein  $\alpha$  subunit genes control growth, development, and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:1075-1086.
- Liu, Z.-M., and Kolattukudy, P.E. 1999. Early expression of the calmodulin gene, which precedes appressorium formation in *Magnaporthe grisea*, is inhibited by self-inhibitors and requires surface attachment. *J. Bacteriol.* 180:5144-5150.
- Luna, E. J. and Hitt, A. J. 1992. Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science* 258:955-964.
- Magalhaes, B.P., Wayne, R., Humber, R.A., Shields, E.J., and Roberts, D.W. 1991. Calcium-regulated appressorium formation of the entomopathogenic fungus *Zoophthora radicans*. *Protoplasma.* 160:77-88.
- Manandhar, H. K., Mathur, S. B., Smedegaard-Petersen, V., and Thordal-Christensen, H. (1999) Accumulation of transcripts for pathogenesis-related proteins and peroxidase in rice plants triggered by *Pyricularia oryzae*, *Bipolaris sorokiniana* and u.v. light. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55, 289-295.
- Mazzei, G.J., Schmid, E.M., Knowles, J.K.C., Payton, M.a., Maundrell, K.G. 1993. A Ca<sup>2+</sup>-independent protein kinase C from fission yeast. *J. Biol. Chem.* 268:7401-7406.
- McCafferty, H. R. K., and Talbot, N. J. 1998. Identification of three ubiquitin genes of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*, one of which is highly expressed during initial stages of plant colonization. *Curr. Genet.* 33:352-361.
- McNally, M. T., and Free, S. J. 1988. Isolation and characterization of a *Neurospora* glucose-repressible gene. *Curr. Genet.*

14:545-551.

- Midoh, N. and Iwata, M. (1996) Cloning and characterization of a probenazole-inducible gene for an intracellular pathogenesis-related protein in rice. *Plant Cell Physiol.* 37, 9-18.
- Mitchell, T., and Dean, R. 1995. The cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is required for appressorium formation and pathogenesis by the rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 7:1869-1878.
- Molina, A., Gorch, J., Volrath, S., and Ryals, J. A. (1999) Wheat genes encoding two types of PR-1 proteins are pathogen inducible, but do not respond to activators of systemic acquired resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12, 53-58.
- Money N.P., Howard R.J. 1996. Conformation of a link between fungal pigmentation, turgor pressure, and pathogenicity using a new method of turgor measurement. *Fungal Genet. Biol.* 20:217-227.
- Morris, S. W., Vernooij, B., Titatarn, S., Starrett, M., Thomas, S. Wiltse, C. C., Frederiksen, R. A., Bhandhufalck, A., Hulbert, S., and Uknes, S. (1998) Induced resistance responses in maize. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11, 643-658.
- Muradov, A., Petrasovits, L., Davidson, A., and Scott, K. J. (1993) A cDNA clone for a pathogenesis-related protein 1 from barley. *Plant Mol. Biol.* 23, 439-442.
- Neiman, A.M. 1993. Conservation and reiteration of a kinase cascade *Trends Genet.* 9:390-394.
- Niderman, T., Genetet, I., Bruyere, T., Gees, R., Stinzi, A., Legrand, M., Fritig, B., and Mosinger, E. (1995) Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal: isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.* 108, 17-27.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides



- and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10, 1-6.
- Nishizuka, Y. 1986. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233:305-312.
- Nishizuka, Y. 1988. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature* 334:661-665.
- Nishizuka, Y. 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258:607-614.
- Oeser, B. 1998. *PKC1*, encoding a protein kinase C, and *FAT1*, encoding a fatty acid transporter protein, are neighbors in *Cochliobolus heterostrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 165:273-280.
- Oh, S. -K., Cheong, J. -J., Hwang, I., and Choi, D. (1999) Similarities of tobacco mosaic virus-induced hypersensitive cell death and copper-induced abiotic cell death in tobacco. *Plant Pathol. J.* 15, 8-13.
- Ohno, S., Akita, Y., Konno, Y., Imajoh, S., and Suzuki, K. 1988. A novel phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC, distantly related to the protein kinase C family. *Cell* 53:731-741.
- Orbach, M. J., Chumley, F. G., Valent B. 1996. Electrophoretic karyotypes of *Magnaporthe grisea* pathogens of diverse grasses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:261-271.
- Ou, S. H. 1985. *Rice Diseases*, 2nd ed., Commonwealth Mycological Institute, Kew, England.
- Paravicini, G., Cooper, M., Friedli, L., Smith, D.J., Carpentier, J.-L., Klig, L.S., and Payton, M.A. 1992. The osmotic integrity of the yeast cell requires a functional *PKC1* gene product. *Mol. Cell. Biol.* 12:4896-4905.
- Paravicini, G., Mendoza, A., Antonsson, B., Cooper, M., Losberger, C., and Payton, M.A. 1996. The *Candida albicans PKC1* gene encodes a protein kinase C homolog necessary for cellular

- integrity but not dimorphism. *Yeast* 12:741-756.
- Park, S. G., Kim, S. O., Koh, H. J., and Lee, Y. H. (2000) A blast lesion mimic mutant of rice: in *Advances in Rice Blast Research*, Tharreau, D. Lebrun, M. H. Talbot, N. J., and Notteghem, J. L. (eds.), pp. 79-85, Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
- Paul, J. H. and Jeffrey, W. H. 1985. Evidence for separate adhesion mechanism for hydrophilic and hydrophobic surface in *Vibrio proteolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*:431-437.
- Pfitzner, U. M. and Goodman, H. M. (1987) Isolation and characterization of cDNA clones encoding pathogenesis-related proteins from tobacco mosaic virus infected tobacco plants. *Nucleic Acids Res.* 15, 4449-4465.
- Pierschbacher, M. D. and Ruoslahti, E. 1984. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309:30-33.
- Pieterse, C. M. J., Riach, M. B. R., Bleker, T., van den Berg-Verthuis, G. C. M., and Govers, F. 1993. Isolation of putative pathogenicity genes of the potato late blight fungus *Phytophthora infestans* by differential hybridization of a genomic library. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 43:69-79.
- Punt, P.J., Oliver, R.P., Dingemans, M.A., Pouwels, P.H., and Van den Hondel, C.A.M.J.J. 1987. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56:117-124.
- Pytela, R., Pierschbacher, M. D., Argraves, S., Suzuki, S., and Ruoslahti, E. 1987. Arginine-glycine-aspartic acid adhesion receptors. *Methods Enzymol.* 144:475-489.
- Qutob, D., Hraber, P. T., Sobral, B. W. S., and Gijzen, M. 2000. Comparative analysis of expressed sequences in *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.* 123:243-253.
- Ravid, S., and Spudich J.A. 1992. Membrane-bound *Dictyostelium* heavy chain kinase: a developmentally regulated substrate-specific

- member of the protein kinase C family. Proc Natl Acad Sci USA 89:5877-5881.
- Reimmann, C., Rignli, C., and Dudler, R. (1992) Complementary DNA cloning and sequence analysis of a pathogen-induced putative peroxidase from rice. Plant Physiol. 100, 1611-1612.
- Rogers, S. O. and Bendich, A. J. (1985) Extraction of DNA miligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Mol. Biol. 5, 69-76.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. -Y., and Hunt, M. D. (1996) Systemic acquired resistance. Plant Cell 8, 1809-1819.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual., 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Sasaki, T., and Burr, B. 2000. International rice genome sequencing project: the effort to completely sequence the rice genome. Curr. Opin. Plant Biol. 3:138-141.
- Sassone- Corsi, P. 1995. Transcription factors responsive to cAMP. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 11:355-377.
- Schaffrath, U., Freydl, E., and Dudler, R. (1997) Evidence for different signaling pathways activated by inducers of acquired resistance in wheat. Mol. Plant-Microbe Interact. 10, 779-783.
- Schweingruber, A. M., Dlugonski, J., Edenharter, E., and Schweingruber, M. E. Thiamine in *Schizosaccharomyces pombe*: dephosphorylation, intracellular pool, biosynthesis and transport. Curr Genet 19: 249-254.
- Schweizer, P., Buchala, A., and Metraux, J. -P. (1997) Gene-expression patterns and levels of jasmonic acid in rice treated with the resistance inducer 2,6-dichloroisonicotinic acid. Plant Physiol. 115, 61-70.
- Schweizer, P., Schlagenhauf, E., Schaffrath, U., and Dudler, R. (1999) Different patterns of host genes are induced in rice by *Pseudomonas syringae*, a biological inducer of resistance, and

- the chemical inducer benzothiadiazole (BTH). *Eur. J. Plant Pathol.* 105, 659-665.
- Sela-burlage, M. B., Epstein, L., and Rodriguez, R. L. 1991. Adhesion of ungerminated *Colletotrichum musae* conidia. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39:345-352.
- Shortle, D., Haber, J.E., and Botstein, D. 1982. Lethal disruption of the yeast actin gene by integrative DNA transformation. *217:371-373.*
- St. Leger, R.J., Butt, T.M, Staples, R.C., and Roberts, D.W. 1990. Second messenger involvement in differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Gen. Microbiol.* 136:1779-1789.
- Staples, R.C. and Hoch, H.C. 1987. Infection structures-form and function. *Exp. Mycol.* 11:163-169.
- Staples, R. C., Hoch, H. C. 1989. Cyclid AMP, cyclic GMP and bean rust uredospore germlings. *Exp Mycol* 13:100-104.
- Staves, M. P. and Wayne, R. O. 1993. The touch-induced action potential in Chara: inquiry into the ionic basis and mechanoreceptor. *Aust. J. Plant. Physiol.* 20:471-488.
- Swiegar, J.A., Chumley, F.G., and Valent, B. 1992. Disruption of a *Magnaporthe grisea* cutinase gene. *Mol.Gen. Genet.* 232:183-190.
- Talbot, N. J. 1995. Having a blast: exploring the pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Trends Microbiol.* 3:9-16.
- Talbot, N. J., Ebbole, D. J., and Hamer, J. E. 1993. Identification and characterization of *MPG1*, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 5:1575-1590.
- Talbot, N.J., Kershaw, M., Wakley, G., de Vries, O., Wessels, J.G.H. and Hamer, J.E. 1996. *MPG1* encodes a fungal hydrophobin involved in surface interactions during infection related development by *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 8:985-989.
- Talbot, N.J., McCafferty, H.R.K., Ma, M., Moore, K., and Hamer, J.E. 1997. Nitrogen starvation of the rice blast fungus *Magnaporthe*

- grisea* may act as an environmental cue for disease symptom expression. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 50:179-195.
- Talbot, N. J., and Tongue, N. 1998. High level expression of the *Magnaporthe grisea* mitochondrial small sub-unit rRNA during rice leaf colonisation and rapid down-regulation prior to the onset of disease symptoms. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 52:335-352.
- Tenhaken, R., Levine, A., Brisson, L. F., Dixon, R. A., and Lamb, C. J. 1995. Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4158-4163.
- Terhune, B. T. and Hoch, H. C. 1993. Substrate hydrophobicity and adhesion of *Uromyces* urediospores and germling. *Exp. Mycol.* 17:241-252.
- Thines, E., Eibert, F., Sterner, O., and Anke, H. 1997. Signal transduction leading to appressorium formation in germinating conidia of *Magnaporthe grisea*: Effect of second messengers diacylglycerol, ceramides and sphingomyelin. *FEMS Microbiol. Lett.* 156:91-94.
- Toda, T., Shimanuki, M. and Yanagida, M. 1993. Two novel protein kinase C-related genes of fission yeast are essential for cell viability and implicated in cell shape control. *EMBO J.* 12:1987-1995.
- Tucker, B. E., Hoch, H. C., and Staples, R. C. 1986. The involvement of F-actin in *Uromyces* cell differentiation : the effects of cytochalasin E and phalloidin. *Protoplasma* 135:88-101.
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S. C., Dincher, S. S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E. R., and Ryals, J. A. 1992. Acquired resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* 4, 645-656.
- Urban, M., Bhargava, T., and Hamer, J. E. 1999. An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease. *EMBO J.* 18:512-521.
- van den Ackerveken, G., Dunn, R., Cozijnsen, A., Vossen, J., van den

- Broek, H., and de Wit, P. 1994. Nitrogen limitation induces expression of the avirulence gene *avr9* in the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Mol. Gen. Genet.* 243:277-285.
- van Loon, L. C. and van Strein, E. A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55, 85-97.
- van Loon, L. C., Pierpoint, W. S., Boller, T., and Conejero, V. (1994) Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* 12, 245-264.
- Wang, N., Buttler, J. P., and Ingberg, D. E. 1993. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 260:1124-1127.
- Ward, E. R., Uknes, S. J., Williams, S. C., Dincher, S. S., Wiederhold, D. L., Alexander, D. C., Ahl-Goy, P., Metraux, J.-P., and Ryals, J. A. (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3, 1085-1094.
- Warwar, V., Dickman, M.B. 1996. Effects of calcium and calmodulin on spore germination and appressorium development in *Colletotrichum trifolii*. *Appl. Env. Microbiol.* 62:74-79.
- Watt, F. M., Kubler, M. D., Hotchin, N. A., Nicholson, L. J., and Adams, J. C. 1993. Regulation of keratocyte terminal differentiation by integrin extracellular matrix interactions. *J. Cell. Sci.* 106:175-182.
- Wayne, R. Staves, M. P., and Leopold, A. C. 1992. The contribution of the extracellular matrix to gravisensing in characean cells. *J. Cell. Sci.* 101:611-623.
- White, O., and Kerlavage, A. R. 1996. TDB: New databases for biological discovery. *Methods Enzymol.* 266:27-40.
- Woo, S.S., Gill, B.S., Paterson, A.H., and Wing, R.A. 1994. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor*. *Nucleic Acids Res.*

22:4922-4931.

- Wyatt, J. K. and Carpita, N. C. 1993. The plant cytoskeleton-cell-wall continuum. *Trends, Cell. Biol.* 3:413-417.
- Xiao, J.Z., Ohshima, A., Watanabe, T., Kamakura, T., and Yamaguchi, I. 1994. Studies on cellular differentiation of *Magnaporthe grisea*. Physico-chemical aspects of substratum surfaces in relation to appressorium formation. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 44:227-336.
- Xiao, J., Ohshima, A., Kamakura, T., Ishiyama, T., and Yamaguchi, I. 1994. Extracellular Glycoprotein(s) Associated with Cellular Differentiation in *Magnaporthe grisea*. *MPMI* 7:639-644.
- Xu, J.-R., Staiger, C., and Hamer, J. 1998. Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:12713-12718.
- Xu, J.R., and Hamer, J.E. 1995. Assessment of *Magnaporthe grisea* mating type by spore PCR. *Fung. Genet. Newsl.* 40:80.
- Xu, J.R., and Hamer, J.E. 1996. MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes Dev.* 10:2696-2706.
- Yamamoto, K., and Sasaki, T. 1997. Large-scale EST sequencing in rice. *Plant Mol. Biol.* 35:135-144.
- Yang, Y., Shah, J., and Klessig, D. F. 1997. Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* 11:1621-1639.
- Yelton, M.M., Hamer, J.E., and Timberlake, W.E. 1984. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a trpC plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1470-1474.
- Zhu, H., Choi, S., Johnston, A.K., Wing, R.A., and Dean, R.A. 1997. A large insert (130 kbp) bacterial artificial chromosome (BAC)

library of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: Genome analysis, contig assembly and gene cloning. Fungal Gen. Biol 21:337-347.