

최 중
연구보고서

자스몬산 생합성 경로 조작을 통한 광범위 스트레스 저항성 벼 개발

Broad Spectrum Stress Resistant Rice by Manipulation of
Jasmonic Acid Biosynthetic Pathway

연구 기관
전남대학교 농업생명과학대학

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “자스몬산 생합성 경로 조작을 통한 광범위 스트레스 저항성 벼 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002 년 11 월 10 일

주관연구기관명	:	전남대학교
총괄연구책임자	:	한옥수
제 1 세부연구책임자	:	한옥수
제 2 세부연구책임자	:	이영만
연 구 원	:	박노동
연 구 원	:	김영철

여 백

요 약 문

I. 제 목

자스몬산 생합성 경로 조작을 통한 광범위 스트레스 저항성 벼 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

자스몬산을 식물체에 처리하였을 경우, 일반적으로 발아나 광합성등이 억제되는 반면, 저장 단백질 (vegetative storage protein:Vsp)의 형성이 촉진되고, 단백질 가수 분해 효소 저해제 (proteinase inhibitor)등 식물체의 방어에 관련되는 다양한 종류의 단백질이 발현되며, 병이나 해충에 대한 저항성이 증가하게 된다 (Creelman *et al.*,1997). 자스몬산에 의하여 촉발되는 이러한 다양한 생리적 현상의 변화는 각 현상에 관련되는 유전자의 발현이 조절됨으로서 가능하며 자스몬산에 의하여 발현이 조절되는 유전자들로서 Pin2, rbcL, rbcS, Vsp, Lox (lipoxygenase)등이 잘 알려져 있다(Reinbothe *et al.*,1994). Pin2, Lox 등의 유전자들은 상처(wounding)와 같은 스트레스가 식물체에 가해질 경우에도 발현이 증폭되고, Lox 유전자의 발현이 증폭되면서 식물체내 JA의 농도가 증가한다. 그러나 자스몬산은 식물체에서 상처뿐만 아니라 수분 부족 (water deficit)등 다양한 종류의 스트레스에 관여하는 매우 일반적인 스트레스 호르몬으로 보고되고 있다(Semdner *et al.*,1993). 특히 상처 등의 스트레스에 의하여 급격히 발현이 유도되는 Lox는 그림 1-2-2에 나타난 바와 같이 linolenic acid로부터 출발하는 자스몬산 생합성 경로의 첫 단계에 위치하고 Lox에 의하여 형성된 hydroperoxylinolenic acid를 기질로하는 AOS는 Lox에 의한 촉매 작용이 자스몬산의 생합성 경로로 유입되도록 한다.

자스몬산 생합성의 출발 물질인 linolenic acid는 막을 구성하는 인지질이 lipase나 phospholipase에 의한 가수분해로 생성되어 자스몬산의 생합성 경로에 유입된다. 막으로부터 linolenic acid가 공급되는 과정은 상처, 병원균, 곤충 등의 침입에 의한 스트레스 신호가 막에 존재하는 수용체에 작용하고 신호를 받은 수용체에 의하여 lipase나 phospholipase가 활성화되면서 조절될 것으로 추정되지만 관련되는 lipase나 phospholipase의 존재에 대한 증거는 충분하지않다. 그러나 식물체에 linolenic acid를 처리할 경우 과량의 자스몬산이 축적되는 것으로 볼 때(Farmer *et al.*, 1992) 세포내 lipoxygenase 기질의 농도는 자스몬산 생합성의 속도를 결정하는

주요한 인자임을 알 수 있으며, Lox inhibitor를 처리한 식물체에서나(Pena-Cotes *et al.*, 1993), Lox 유전자의 발현을 줄인 형질전환 *Arabidopsis*에서는 자스몬산의 생합성이 현저히 감소하는 것으로 볼 때(Bell *et al.*, 1995), Lox 는 자스몬산 생합성의 필수 단계를 담당하고 있다고 할 수 있다.

본 연구에서는 상처, 수분, 병해충등 다양한 종류의 스트레스 인자에 대한 광범위 스트레스 저항성 작물의 개발을 위하여, 1) 스트레스에 대한 Lox 유전자의 스트레스 감응 발현 기작을 규명하고, 2) Lox 유전자와 AOS 유전자를 발현시킬 수 있는 시스템을 개발하며, 3) Lox와 AOS 유전자가 과대 발현된 형질 전환 벼를 개발함을 주요 목적으로 하였다. 3 년간의 연구를 통하여 저온 스트레스, 상처 스트레스, 병원균의 침입, 각종 산화 스트레스 등에 대한 방어 기작에 공통적으로 관여하는 대표적 물질인 자스몬산의 생합성 경로를 조절함으로써 스트레스 내성 식물체가 개발되면, 차후 2 년간의 연구 연장을 통하여 고전 육종 방법과 접목시킴으로써 유전적, 환경적으로 안정한 광범위 스트레스 내성 식량 작물(벼) 품종을 개발하고자 할 예정이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

자스몬산의 생합성 경로에 존재하는 리폭시지나아제와 알렌 옥사이드 합성효소의 유전자를 이용하여 광범위 스트레스 저항성 벼를 생산하고 자스몬산이 벼의 생육과 스트레스에 대한 저항성에 미치는 영향을 연구한 본 과제의 세부 내용 및 범위를 요약하면 다음과 같다.

1. 리폭시지나아제와 알렌옥사이드 합성효소 유전자의 구조 분석

상처에 감응하는 옥수수의 리폭시지나아제 유전자와 벼, *Arabidopsis*, flax seed의 알렌 옥사이드 합성효소 유전자를 분석하였다. 옥수수의 리폭시지나아제의 cDNA는 chloroplast targeting sequence를 포함하고 있지 않는 Type 1, Lox 1 gen family로서 nontraditional positional specificity를 갖는 유전자로 분류될 수 있었다. 리폭시지나아제의 promoter 지역은 상처나 자스몬산에 감응하는 putative cis-element들을 포함하고 있었다. 벼, *Arabidopsis*, flax seed 의 알렌 옥사이드 합성효소 유전자는 cytochromeP450로서 *Arabidopsis*만이 chloroplast targeting sequence를 포함하고 있었다. 이러한 분석 결과로부터 옥수수의 리폭시지나아제 유전자와 *Arabidopsis*의 알렌 옥사이드 합성효소 유전자를 사용하여 스트레스 저항성 형질전환 벼를 생산하기 위한 논리적 근거를 마련하였다..

2. 리폭시지나아제와 알렌옥사이드 합성효소 유전자의 발현 기구

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

3. 리폭시지나아제와 알렌옥사이드 합성효소 유전자의 이중발현

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

4. 리폭시지나아제의 반응 특성 규명

대장균에서 이중 발현시킨 리폭시지나아제의 positional specificity를 규명하였다. 그 결과, 리폭시지나아제는 리놀렌산을 기질로 하였을때 C-13 과 C-9 위치에 hydroperoxidation을 6:4 의 비율로 촉매하는 것을 알 수 있었다. 리폭시지나아제의 이러한 dual positional specificity는 유전자에 대한 phylogenetic tree 분석 결과 및 potential active-site에 존재하는 아미노산의 구조 분석 결과와 잘 일치하고 있었다. dual positional specificity를 지니는 리폭시지나아제는 13-LOX pathway를 통한 자스몬산 생합성 조절 뿐만 아니라, 9-LOX pathway를 통한 다양한 종류의 oxylipin 분자들의 합성을 조절할 수 있는 장점을 제공하므로 본 연구에서 사용하는 리폭시지나아제 유전자가 광범위 스트레스 저항성 형질 전환 벼의 생산을 위하여 유용하게 사용될 수 있음을 검증하였다.

5. 형질 전환체의 생산, 분석 및 선발

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

6. 자스몬산 처리가 벼 생육에 미친 영향

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

자스몬산의 엽면 처리에서 벼 유묘의 생육 변화: 벼 유묘에 자스몬산 0 - 30 μM 을 엽면에 살포하였을 때 초장과 경수가 20 μM 이상에서 감소하였다. 건물중은 처리 7일 후에 주경은 무처리와 거의 같았으나 분얼경은 감소율이 높았고 처리 14일 후에는 주경도 감소하였다. 엽록소와 carotenoid 함량은 모든 처리에서 무처리보다 많았으며 농도간에는 차이가 없었다.

7. 자스몬산 엽면 처리가 도열병과 흰잎마름병 발병에 미친 영향

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

자스몬산 처리가 흰잎마름병 발병 정도에 미친 영향: 벼 7품종의 유묘에 자

스몬산 0 - 30 μM 을 엽면 살포하여 흰잎마름병균을 가위접종한 결과 7개 품종의 병반장이 10 μM 과 15 μM 에서는 각각 무처리의 82%와 77%로 발병 저지효과가 있었으나 20 μM 이상에서는 무처리와 같았다.

8. 자스몬산 처리가 상처 치유에 미친 영향

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

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

식물체의 스트레스 내성과 연관된 식물 호르몬 JA와 ABA의 NaCl 내성과의 연관성이 발아 종자에 대한 내염성 품종과 감수성 품종간의 차이에 미치는 영향을 검토 하였다. 발아율은 내염성 품종이 NaCl 13.3 ds/m 에서도 발아에는 영향이 없었지만 감수성 품종은 30 %의 발아 억제를 나타냈으며, JA와 ABA 처리구에서 내염성 품종의 발아는 JA에 영향을 받지 않지만 감수성 품종은 NaCl과 JA 처리농도의 증가에 따라 발아에 큰 영향을 받았고, ABA는 모든 품종의 발아를 95 %이상 억제하였다. 초장 생육에 대한 영향에서 감수성 품종이 내염성 품종에 비하여 30~50 %의 생육 저해를 나타냈으며, JA와 ABA 모두 초장 신장 억제를 가져왔으며, 특히 ABA는 90 %이상의 억제효과를 보였다. 뿌리의 생육에 대한 JA와 ABA의 영향은 발아율과 초장의 생육 저해와 동일하게 ABA에서는 뿌리의 생육을 거의 볼 수 없었으며, 내염성 품종에 비해 감수성 품종에서의 더 많은 생육 억제가 나타났다.

10. 형질전환체의 병해충 저항성 검정

도열병과 흰잎마름병에 대한 저항성 검정: 낙동벼에 리폭시지나아제 유전자를 도입시킨 형질전환 낙동벼 34개체와 control로 낙동벼에 도열병균을 분무접종하여 형질전환체의 저항성 정도를 조사하였다. 형질전환된 34개체 중에서 9개체는 전혀 발병하지 않았고 나머지 대부분의 개체가 병반 수, 병반 장, 병반 폭, 병반 면적 등에서 낙동벼보다 적어 도열병에 대한 저항성이 현격히 증대되었음을 확인하였다. 도열병 검정에 사용한 동일 개체에 흰잎마름병균을 가위 접종한 결과 형질 전환체

모두가 병반장이 control인 낙동벼 보다 반 정도로 짧았으며 그 중에서 3개체는 병반장이 매우 짧아 형질 전환체의 흰잎마름병균에 대한 저항성이 증대되었음을 확인하였다.

벼멸구에 대한 저항성 검정: 리폭시지나아제 유전자와 알렌 옥사이드 합성 효소 유전자가 도입된 형질 전환벼를 벼멸구에 접종하여 저항성 발현 정도를 검정한 결과 대부분 개체가 저항성을 나타내지 못하였다. 이러한 결과는 벼멸구가 저작해충이 아닌 흡즙 해충이기 때문으로 보여진다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 육종학자와 연계된 추가 연구의 필요성

3 년으로 계획되었던 본 연구가 성공적으로 이루어지면 육종 학자들과 연계된 2 년동안의 확장 연구를 수행할 것을 연구 계획서 제출시 명시한 바가 있다. 지금까지의 연구 결과로 볼때, 옥수수의 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질전환 벼는 2년의 확장 연구를 통하여 도열병에 저항성을 지니는 안정적인 벼 품종으로의 개발이 가능하리라고 판단된다. 따라서 종묘회사 및 육종학자와 연계된 2 년동안의 추가 연구를 통하여 도열병 저항성 벼를 안정적으로 육성하는 연구가 필요하다고 사료된다.

2. 포장 실험으로 확대의 필요성

본 연구에서 얻어진 형질 전환벼의 스트레스 저항성은 실험실과 온실 단위에서 이루어진 결과이므로 농업 현장에서 이용하기 위해서는 포장 실험이 필수적이다. 그러나, 벼는 세대가 비교적 길어서 개발된 형질 벼를 포장에서 육성하기 위해서는 많은 시간이 요구되므로 포장시험을 포함한 추가 연구가 필요하다고 판단된다.

SUMMARY

INTRODUCTION

Jasmonic acid (JA) is synthesized from (13S)-hydroperoxy linolenic acid by consecutive actions of allene oxide synthase, allene oxide cyclase, reductase, β -oxidative enzymes, and finally converted to methyl jasmonate (MeJA). JA responses to plant pathogens and wounding and stimulates expression of several genes including proteinase inhibitors, vegetative storage proteins, and lipoxygenase (LOX). Various isozymes of LOX are known in plants, but the physiological functions of specific LOX isozymes are not yet clear. Accumulated evidences suggest that expression of the specific isoform of LOX may play important role in providing specific octadecanoid signaling molecules depending on stress factors. On the other hand, the positional specificity of LOX isozyme could be an important factor in JA-mediated wound response since the JA biosynthetic pathway involves only 13-LOX pathway. Several studies examined the biological role of 13-LOX. The LOX promoter in transgenic tobacco and tomato identified *cis*-acting elements required for developmentally regulated expression and MeJA-responsiveness. This study examines 1) characterization of lipoxygenase gene from maize and allene oxide synthase gene from Arabidopsis, 2) gene expressions of lipoxygenase and allene oxide synthase, 3) heterologous expression of lipoxygenase and allene oxide synthase genes, 4) characterization of lipoxygenase reaction, 5) production and analysis of transgenic rice expressing lipoxygenase and allene oxide synthase genes, 6) effect of jasmonic acid on the growth of rice seedling, 7) effect of jasmonic acid on the infection of blast and bacterial blight of rice seedling, 8) effect of jasmonic acid on the mechanically wounded rice seedling, 9) effect of jasmonic acid and ABA on rice (*Oryza sativa* L.) germination and growth of seedling between salt-tolerance and salt-sensitivity varieties under the salt stressed, 10) resistance of transgenic rice plants expressing lipoxygenase and allene oxide synthase to disease and brown plant hopper.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Characterization of lipoxygenase gene from maize and allene oxide synthase gene from Arabidopsis

Sequences of lipoxygenase gene from maize and allene oxide synthase genes from Arabidopsis, rice, flax seed were analyzed. Maize lipoxygenase cDNA was classified as a Type I LOX and Lox 1 gene family without chloroplast targeting sequence. The promoter region of lipoxygenase contained putative wound and methyl jasmonate responsive cis-element. Allene oxide synthase genes were cytochromeP450 and Arabidopsis AOS contained chloroplast targeting sequence. This result indicated that lipoxygenase from maize and allene oxide synthase gene from Arabidopsis were good candidates for developing transgenic rice with stress-resistant transgenic rice plants.

2. Gene expressions of lipoxygenase and allene oxide synthase

Gene expression kinetics of lipoxygenase and allene oxide synthase were analyzed. Expression of lipoxygenase gene was promptly induced by wound and biphasic expression kinetic pattern was observed in methyl jasmonate induced expression. Expression of allene oxide synthase gene was also induced by wound and methyl jasmonate. This result implied that gene expressions of lipoxygenase and allene oxide synthase were induced by wound, and expression of lipoxygenase gene might be regulated by feed-forward activation.

3. Heterologous expression of lipoxygenase and allene oxide synthase genes

Lipoxygenase from maize and allene oxide synthase from Arabidopsis and rice were heterologously expressed in *E. coli*, and their enzyme functions were confirmed. These enzymes were purified and characterized. The fusion protein of lipoxygenase and allene oxide synthase was also heterologously expressed in *E. coli*. however, large amounts of inclusion body was formed. This results rationalized the utilization of lipoxygenase and allene oxide synthase for the regulation of jasmonic acid biosynthetic pathway.

4. Characterization of lipoxygenase reaction

The positional specificity of lipoxygenase was determined. The lipoxygenase catalyzed hydroperoxidations of linolenic acid at C-13 and C-9 with

6:4 ratio. This dual positional specificity of lipoxygenase is consistent with results of phylogenetic tree analysis and amino acid residue in the putative active-site of lipoxygenase. Lipoxygenase with dual positional specificity is an ideal choice for development of broad-spectrum stress-resistant transgenic plants since dual positional specific lipoxygenase can not only regulate the biosynthesis of jasmonic acid through its 13-LOX activity but also produce variety of oxylipin molecules through its 9-LOX activity.

5. Production and analysis of transgenic rice expressing lipoxygenase and allene oxide synthase genes

Lipoxygenase with dual positional specificity was utilized for producing transgenic rice plants. Transgenic rice plants overexpressing allene oxide synthase gene with or without chloroplast targeting sequence were also produced. Transgenic rice plants were analyzed by PCR, southern, northern, SDS-PAGE and correctly transformed transgenic lines were selected. Transgenic seeds of T0 and T1 transgenic lines expressing lipoxygenase or allene oxide synthase were harvested.

6. Effect of jasmonic acid on the growth of rice seedling

Effect of jasmonic acid treated in the nutrient solution on the growth of rice seedling: Rice seedlings were grown in the nutrient solution containing several concentrations of jasmonic acid ranged from 0 to 100 μ M during a week. The reduction rate of plant height, number of roots and fresh weights were increased in the high concentrations of jasmonic acid. However, the degree of reduction rate was different in the varieties. Rice seedlings were grown in the nutrient solution containing several concentrations of jasmonic acid ranged from 0 to 30 μ M during a week. At the seven days after treatment the reduction rates of shoot were increased according to the increasing concentrations, but those of root were higher in all concentrations than that of control. The contents of chlorophyll and carotenoid treated by jasmonic acid were the same as that of control regardless the concentration. Electrics of shoot in the treatments of above 20 μ M of jasmonic acid were greatly decreased compared to that of the control and tissue viabilities in the all concentrations of jasmonic acid were below 60% of that of control.

Effect of jasmonic acid treated spraying on leave on the growth of rice

seedling: Rice seedlings were sprayed on the leaves by several concentrations of jasmonic acid ranged from 0 to 30 μ M. At seven days after spraying shoot lengths and number of tillers in the treatment of above 20 μ M were reduced compared to that of control. Dry weights of main stem treated by jasmonic acid were the same as that of control, however, dry weights of tillers were reduced. It was same at the 14 days after treatment of jasmonic acid. The content of chlorophyll and carotenoid of the all concentrations of jasmonic acid were higher than that of the control and there were not different among concentrations of jasmonic acid.

7. Effect of jasmonic acid on the infection of blast and bacterial blight of rice seedling

Effect of jasmonic acid on the infection of blast of rice seedling: Rice seedlings were sprayed on the leaves with several concentrations of jasmonic acid ranged from 0 to 30 μ M and placed in the field of nursery test for blast in order to be infested naturally. They were scored 0 to 9 according to the degree of infection. The infection score of seedlings sprayed with jasmonic acid were lower than that of control. The score of 30 μ M of jasmonic acid was 4.4, the lowest, compared to that of 6.1 of control. The result revealed that jasmonic acid enhanced resistance to blast disease.

Effect of jasmonic acid on the infection of bacterial blight of rice seedling: Seedlings of seven rice varieties were sprayed on the leaves with several concentration of jasmonic acid ranged from 0 to 30 μ M and inoculated with bacterial blight with scissor cutting method. The average lesion lengths of the 10 and 15 μ M of jasmonic acid were 82% and 77%, respectively, of that of the control. However, The average of lesion lengths of above 20 μ M of jasmonic acid were the same as that of the control.

8. Effect of jasmonic acid on the mechanically wounded rice seedling

Several concentrations of jasmonic acid were sprayed on the rice leaves wounded and not wounded mechanically. Plant heights, number of stems, and dry weights in the not wounded plants were the same as those of the control in the below 15 μ M of jasmonic acid, however, in the wounded plants were the same as those of the control in the below 20 μ M at the 7 and 14 days after treatment with jasmonic acid. The values of F_0 , F_m , and qN were higher in the

wounded plants than in the not wounded plants at 72 hours after treatment with jasmonic acid. However, the values of F_v/F_m of wounded plants were the same as those of not wounded plants.

9. Effect of jasmonic acid and ABA on rice(*Oryza sativa* L.) germination and growth of seedling between salt-tolerance and salt-sensitivity varieties under the salt stress

Jasmonate (JA) and abscisic acid (ABA), plant hormones related with stress-tolerance, have been reported as improving salt tolerance of plant. Petri dish bioassay was conducted to determine effects of JA and ABA on salt tolerance of tolerant and susceptible varieties. Tolerant varieties were germinated at NaCl 23.3 ds/m while germination of susceptible varieties was inhibited. JA alone or combination of NaCl and JA did not affect germination of tolerant varieties whereas salt tolerance of susceptible varieties was significantly improved with increasing of JA concentration. However, ABA inhibited both tolerant and susceptible varieties by 95% compared with untreated control. In the early growth response of rice varieties to NaCl, plant height of susceptible varieties was 30 to 50% more reduced than was tolerant varieties. Single and combination with JA or ABA exhibited complete inhibition in shoot growth of tolerant and susceptible varieties. Effects of JA and ABA on salt tolerance of rice root growth tended varieties to be similar to those of germination or shoot growth. ABA inhibited root growth of both completely at all concentrations. The degree of inhibition greater in susceptible varieties than in tolerant varieties as the concentration progressively increased.

10. Resistance of transgenic rice plants expressing lipoxygenase and allene oxide synthase to disease and brown plant hopper.

Resistance of transgenic rice plants to blast and bacterial blight: Transgenic rice plants containing *lox* gene were inoculated with *Maganporthe grisea*(KI-409). Nine plant among 34 transgenic plants were not infected. Number of lesion, lesion length, lesion width and lesion area of infected transgenic plants except several plants were smaller than that of control. The same transgenic rice plants tested for resistance to blast were inoculated with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*(HB 01015 K₃ 111). The lesion length of all transgenic plants were shorter than that of control plant. This results indicated

that the transgenic plants expressing lipoxygenase were enhanced resistance to blast and bacterial blight.

Resistance of transgenic rice plant to brown plant hopper: Transgenic rice plants containing lox and aos gene were inoculated with brown plant hopper. Most of transgenic plants did not reveal resistance to brown plant hopper.

CONTENTS

Chapter 1. Outlines of Research	21
1. Purposes and aims of research	23
1. 1. Purpose	23
1. 2. Aims	24
2. Specific aims and description of research	26
2. 1. Specific aims and description of research	26
2. 2. Methods and strategies	31
Chapter 2. Current status of related research developed in Korea and other countries	35
1. Related research status in foreign countries	37
2. Related research status in Korea	40
Chapter 3. Results of research	41
1. Analysis of lipoxygenase gene	43
1. 1. Structure of lipoxygenase cDNA (6CO2E12)	43
1. 2. Structure of lipoxygenase genomic DNA and promoter region	48
2. Analysis of allene oxide synthase genes	54
2. 1. Structure of allene oxide synthase genes	54
3. Gene expression of lipoxygenase and allene oxide synthase	60
3. 1. Kinetics of lipoxygenase gene expression induced by wound	60
3. 2. Kinetics of lipoxygenase gene expression induced by methyl jasmonate	61
3. 3. Allene oxide synthase gene expression	62
4. Fusion of lipoxygenase and allene oxide synthase	64
4. 1. Fusion of lipoxygenase gene and allene oxide synthase gene	64
5. Heterologous expression of genes	68
5. 1. Heterologous expression of lipoxygenase	68
5. 2. Heterologous expression and production of allene oxide synthase of rice	70

5. 3. Heterologous expression and production of allene oxide synthase of Arabidopsis	72
6. Characterization of lipoxygenase reaction	74
6. 1. Purification of active lipoxygenase	74
6. 2. Positional specificity of lipoxygenase reaction	75
6. 3. Structural identification of lipoxygenase reaction products	77
7. Production of transgenic plants	79
7. 1. Production of transgenic rice expressing maize lipoxygenase and Arabidopsis allene oxide synthase	79
8. Analysis of transgenic rice plants	82
8. 1. Southern analysis, northern analysis, SDS-PAGE analysis	82
9. Analysis of jasmonic acid in rice	92
9. 1. Kinetic analysis of jasmonic acid level induced by wound	92
10. Effect of jasmonic acid on the growth of rice seedling	95
10. 1. Effect of jasmonic acid treated in the nutrient solution on the growth of rice seedling	95
10. 2. Effect of jasmonic acid treated spraying on leave on the growth of rice seedling	105
11. Effect of jasmonic acid on the infection of blast and bacterial blight of rice seedling	115
11. 1. Effect of jasmonic acid on the infection of blast of rice seedling	115
11. 2. Effect of jasmonic acid on the infection of bacterial blight of rice seedling	119
12. Effect of jasmonic acid on the mechanically wounded rice seedling	121
13. Effect of jasmonic acid and ABA on rice(<i>Oryza</i> <i>sativa</i> L.) germination and growth of seedling between salt-tolerance and salt-sensitivity varieties under the salt stressed	130
14. Evaluation of resistance of transgenic rice plants to disease and brown plant hopper	138

14. 1 Resistance of transgenic rice plant to blast and bacterial blight	138
14. 2 Resistance of transgenic rice plant to brown plant hopper	150
Chapter 4. Achievements of aims and contribuion to related areas	157
1. Acheivements of research aims	159
1. 1. Aims, evaluation scores and achievements of the first year research	159
1. 2. Aims, evaluation scores and achievements of the second year research	160
1. 3. Aims, evaluation scores and achievements of the third year research	161
1. 4. Overall evaluation on achievements of the research	161
2. Contribution to related areas	162
2. 1. Technical aspects	162
2. 2. Academic aspects	162
2. 3. Economical and industrial aspects	163
Chapter 5. Application of results	165
1. Necessity of continuing researches	167
1. 1. Necessity of continuing researches collaborating with plant breeders	167
1. 2. Application in experimental station	167
2. Application of results in other researches	167
1. 1. Biochemical researches related to lipoxygenase pathway	167
1. 2. Molecular biological researches related to the biosynthesis of jasmonic acid	168
3. Industrialization	168
Chapter 6. Information collected from abroads during the research period	169
1. Information on jasmonic acid biosynthesis	171
2. Information on the production of stress-resistant crops	171
Chapter 7. References	173

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	21
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성	23
1. 연구개발의 목적	23
2. 연구개발의 필요성	24
제 2 절 연구개발의 목표 및 내용	26
1. 연구개발 목표와 내용	26
2. 연구개발 방법 및 설계	31
제 2 장 국내외 기술개발 현황	35
제 1 절 국외 관련 기술의 현황	37
제 2 절 국내 관련 기술위 현황	40
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	41
제 1 절 리폭시지나아제 유전자의 구조 분석	43
1. 리폭시지나아제 cDNA (6CO2E12) 의 구조	43
2. 리폭시지나아제 genomic DNA 및 5' -untranslated region의 구조	48
제 2 절 알렌옥사이드 합성효소 유전자의 구조 분석	54
1. 알렌 옥사이드 합성효소 유전자의 구조	54
제 3 절 리폭시지나아제와 알렌옥사이드 합성효소 유전자의 발현 기구	60
1. 상처에 대한 리폭시지나아제 유전자의 발현 기구	60
2. 메틸자스몬산 처리에 대한 리폭시지나아제 유전자의 발현 기구	61
3. 알렌옥사이드 합성효소 유전자의 발현 기구	62
제 4 절 리폭시지나아제 유전자와 알렌 옥사이드 합성효소 유전자의 연결	64
1. 리폭시지나아제 유전자와 알렌 옥사이드 합성효소 유전자의 연결	64
제 5 절 유전자의 이중발현	68
1. 리폭시지나아제의 이중 발현	68
2. 벼 알렌 옥사이드 합성효소의 이중 발현 및 생산	70
3. Arabidopsis 알렌 옥사이드 합성 효소의	

	이종 발현 및 생산	72
제 6 절	리폭시지나아제의 반응 특성 규명	74
	1. 리폭시지나아제의 정제 및 활성 검정	74
	2. 리폭시지나아제의 positional specificity	75
	3. 리폭시지나아제의 반응산물 구조 분석	77
제 7 절	형질 전환체의 생산	79
	1. 옥수수의 리폭시지나아제와 Arabidopsis의 알렌옥사이드 합성효소 유전자를 이용한 형질전환 벼의 생산	79
제 8 절	형질전환 벼의 분석	82
	1. southern, northern, SDS-PAGE에 의한 형질 전환 벼의 분석	82
제 9 절	자스몬산 분석	92
	1. 자스몬산 분석 방법의 확립 및 상처 스트레스에 따른 자스몬산 함량의 변화	92
제 10 절	자스몬산 처리가 벼 생육에 미친 영향	95
	1. 자스몬산의 뿌리처리에서 벼 유묘의 생육 변화 (실험 1)	95
	2. 자스몬산의 뿌리처리에서 벼 유묘의 생육 변화 (실험 2)	105
	3. 자스몬산의 엽면 처리에서 벼 유묘의 생육 변화	110
제 11 절	자스몬산 엽면 처리가 도열병과 흰잎마름병 발병에 미친 영향	115
	1. 자스몬산 처리가 도열병 발병 정도에 미친 영향	115
	2. 자스몬산 처리가 흰잎마름병 발병 정도에 미친 영향	119
제 12 절	자스몬산 처리가 상처 치유에 미친 영향	121
제 13 절	엽 스트레스에서 벼(<i>Oryza sativa</i> L.) 내염성 품종과 감수성 품종의 발아와 유묘 생육에 대한 자스몬산과 ABA 처리 효과	130
제 14 절	형질전환체의 병해충 저항성 검정	138
	1. 형질전환체의 도열병과 흰잎마름병에 대한 저항성 검정	138
	2. 형질전환체의 벼멸구에 대한 저항성 검정	150
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	157
제 1 절	목표 달성도	159

1. 제 1 차년도의 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도	159
2. 제 2 차년도의 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도	160
3. 제 3 차년도의 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도	161
4. 최종평가의 착안점 및 달성도	161
제 2 절 관련 분야에의 기여도	162
1. 기술적 측면에서의 기여도	162
2. 학문 발전에의 기여도	162
3. 경제, 산업적 측면에서의 기여도	163
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	165
제 1 절 추가 연구의 필요성	167
1. 육종학자와 연계된 추가 연구의 필요성	167
2. 포장실험으로 확대의 필요성	167
제 2 절 타 연구에의 응용	167
1. 리폭시지나아제 경로와 관련된 생화학적 연구에의 응용	167
2. 자스몬산 생합성과 관련된 분자생물학적 연구에의 응용	168
제 3 절 기업화 추진 방안	168
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	169
제 1 절 자스몬산 생합성과 스트레스 관련 기술 정보	171
제 2 절 스트레스 저항성 작물 생산을 위한 기술 정보	171
제 7 장 참고문헌	173

제 1 장 연구개발과제의 개요

여 백

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

급속한 산업의 발달과 지구 환경의 오염은 생태계의 파괴 등을 야기 시키고 작물의 생산성을 감소시키는 주요 원인이 된다. 생물적 혹은 비생물적 원인에 의한 환경의 악화는 농작물의 성장 과정에서 치명적인 스트레스 인자로 작용함으로써 작물이 지닌 유전적 생산력을 20 % 정도로 제한한다고 알려져 있다. 병해충등 생물적 스트레스와 가뭄, 냉해 등의 비생물적 스트레스를 극복하기 위하여 신농약이나 고전 육종에 의한 새로운 품종들이 개발되어 농업 생산성의 증대에 많은 공헌을 하여 왔으나 화학적 방제에 따른 환경의 오염과 고전적 육종법이 지니는 한계성으로 인하여 유전자 조작과 고전 육종의 접목을 통한 광범위 스트레스 내성 품종의 육성이 절실히 요구되고 있다.

실제로 작물에 있어서 병해충 저항성작물의 유전공학적 방법의 시도는 유전자연구의 model 식물인 *Arabidopsis*의 연구를 통한 저항성 유전자 및 방어 기작에 관련된 수 많은 기작들이 알려지면서 실용화되어가고 있으며 옥수수, 담배, 토마토 등으로부터 단일 병원균 종의 저항성에 관련된 유전자 군들이 클론되어 single race에 대한 저항성 작물 및 식물은 이미 개발되어 있는 상태이다. 그러나 이들 단일 병원균에 대한 저항성 식물은 년수가 경과함에 따른 병원균의 race 변화 및 유전자 도태압 등으로 저항성이 재빨리 상실될 수 있다는 점에서 실제 응용 가능성은 낮은 편이다. 이의 단점을 보완하여 여러 병해충에 대한 식물 고유의 방어기작을 병해충 침입시 증폭시키는 방법으로서의 접근이 실제로 상업성이 있는 것으로 보고, 연구되어 지고 있는 형편이다. 이와같은 식물의 내생 방어기작에 관련이 있는 기작으로서 systemic acquired resistanceb (SAR), 방어물질 생산 (Phytoalexin), callose 축적에 의한 세포막의 강화 및 부분적괴사(necrosis)등을 유도함으로써 식물의 저항성을 높이는 것으로 보고되어 있으며, 이를 응용하여 산업화에 성공한 예로서 Mosanto의 병충해 저항성 형질전환 감자 (H_2O_2 합성을 높여 식물방어 기작을 증폭), Ciba-Geigy에서 Salicylic acid와 유사한 기능을 가진 Benzothiadiazole (BTH)을 합성하여 이를 식물체에 처리시 식물방어 기작을 촉진시켜 병의 저항성을 향상시킨 무독성 살균제 개발이 대표적 예이다. 본 연구에서는 3 년간의 연구를 통하여 저온 스트레스, 상처 스트레스, 병원균의 침입, 각종 산화 스트레스등에 대한 방어 기작에 공통적으로 관여하는 대표적 물질인 자스몬산의 생합성 경로를 조절함으로써

서 스트레스 내성 식물체를 개발하고 이후 2 년간의 연구 연장을 통하여 고전 육종 방법과 접목시킴으로서 유전적, 환경적으로 안정한 광범위 스트레스 내성 식량 작물(벼) 품종을 개발하고자 한다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

리놀렌산과 같은 불포화 지방산을 기질로 lipoxygenase (Lox)와 allene oxide synthase (AOS)가 순차적으로 작용하면서 시작되는 자스몬산의 생합성 경로는 병원균, 해충, 상처, 수분, 온도 등의 광범위한 스트레스에 대항하는 식물체의 방어 기작과 밀접하게 관련된다. 자스몬산을 식물체에 처리할 경우, 일반적으로 발아나 광합성 등이 부분적으로 억제되는 반면 저장 단백질의 형성이 촉진되고 단백질 가수 분해 저해제를 비롯한 식물체 방어 관련 유전자 및 단백질의 발현이 증가하여 각종 산화스트레스 및 병해충에 대한 저항성이 증가하게 된다. 여러 단계로 이루어진 자스몬산의 생성 과정에서 Lox와 AOS는 생합성의 초기 단계에 위치하면서 부분적인 속도 결정 단계로 알려져 있다 (Creelman *et al.*, 1997). 따라서, Lox 와 AOS 는 자스몬산 생합성을 조절하기 위한 중요 표적으로서 이들 효소가 과대 발현된 식물체에서는 자스몬산 및 중간체의 생합성이 증가될 것을 예상할 수 있으며 그 결과 광범위 스트레스 내성 작물의 개발될 수 있다. 그러나 Lox는 자스몬산과 C6-알데히드 생성의 분지점에 위치하므로 Lox만을 과대 발현 시킬 경우 자스몬산 생합성 보다는 C6-알데히드의 생성만이 증가될 가능성이 높게되며, 콩의 Lox를 이용한 기존의 연구 결과들은 이러한 가능성을 뒷받침하고 있다. 따라서 본 연구에서는 생합성 경로의 분지점에 위치한 Lox의 생성물을 자스몬산의 생합성 경로로 신속하게 유입시키기 위하여 Lox의 다음 단계인 AOS를 Lox 와 동시에 발현시킬 수 있는 시스템을 개발하여 자스몬산의 생합성을 효율적으로 증가시킴으로서 광범위 스트레스 내성 작물을 창출하고자 한다.

나. 경제·산업적 측면

다양한 종류의 스트레스에 대한 내성 작물을 개발하려는 기존의 연구들은 스트레스 인자별로 구분되는 특정한 하나의 스트레스에 대한 저항성 작물들을 개발하려는 방향으로 진행되어 왔다. 그러나 최근 들어 광범위 스트레스에 대한 식물체의 방어 기작에 관련된 정보들이 체계화되고 다양한 종류의 스트레스에 대한 방어 기작에 공통적으로 관여하는 자스몬산의 기능들이 알려 지면서 광범위 스트레스 내성 식물체 개발을 위한 정보들이 충분히 축적되었으며 이를 식량 작물에 실용화 하려는 본 연구는 농업 생산성을 향상 시키기 위한 획기적 방안이 될 수 있을 뿐만 아니라 극한 지역인 러시아나 열대 우림 지역인 동남아시아 지역에도 적용 할 수 있는 농작물 개발의

기반을 구축함으로써 작물 생산 기지의 확대에 일조를 할 것이다.

다. 사회·문화적 측면

자스몬산 생합성 경로가 조절된 식물체는 광범위 스트레스에 대한 일반적 내성을 나타낼 수 있다는 점에서 특정한 약물이나 특정한 병해충에 대한 저항성을 나타내는 기존의 많은 형질전환 식물체와 큰 차이가 있으며, 유전자 조작에 의하여 우려되는 superweed 나 superbug의 출현 가능성이 적다.

제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발 목표와 내용

최종 목표: 상처, 수분, 병해충등 다양한 종류의 스트레스 인자에 대한 광범위 스트레스 저항성 작물의 개발을 위하여

1. 스트레스에 대한 Lox 유전자의 스트레스 감응 발현 기작을 규명하고
2. Lox 유전자와 AOS 유전자를 발현시킬 수 있는 시스템을 개발하며
3. Lox와 AOS 유전자가 과대 발현된 형질 전환 벼를 개발한다.

식물 호르몬의 하나인 자스몬산 (JA:jasmonic acid)은 linolenic acid (LA)로부터 유도되어 생합성되는 cyclopentanone 화합물로서(그림 1-2-1) jasmium의 향료 성분인 methyl jasmonate (MeJA)로서 오래전부터 알려져왔다 (Demole *et al.*, 1980).

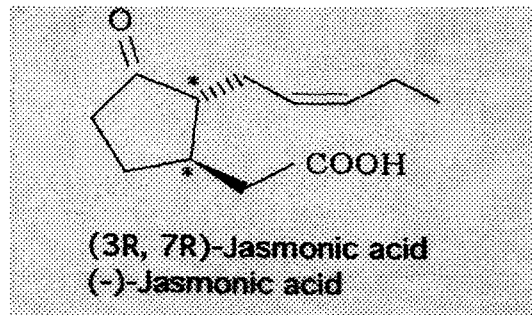


그림 1-2-1. 자스몬산의 구조

그러나 (-)-MeJA가 식물체의 스트레스 감응 물질임이 (Ueda *et al.*, 1980; Aldridge *et al.*, 1971) 보고되면서, 대부분의 식물체와 특정 곰팡이등에서 발견되는 JA나 MeJA는 식물의 생리를 조절하는 물질로서 abscisic acid (ABA), ethylene등과 함께 중요한 식물 호르몬으로 분류되었다.

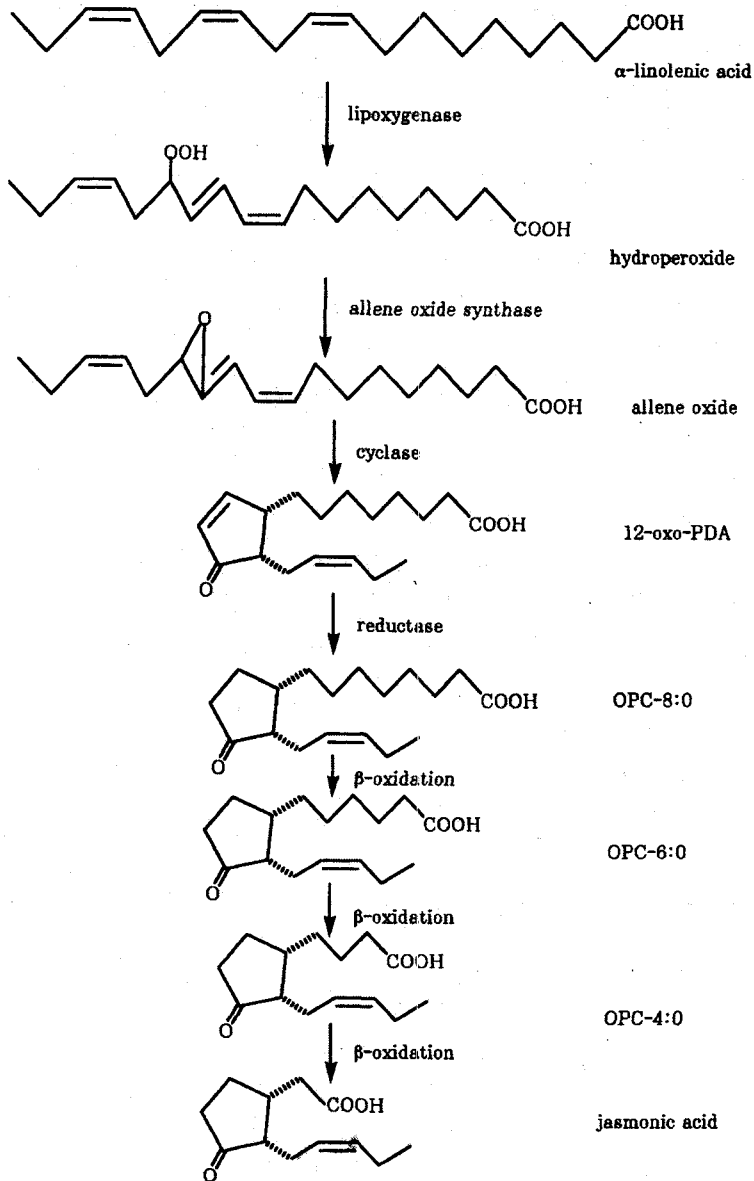


그림 1-2-2. 자스몬산의 생합성 경로

자스몬산을 식물체에 처리하였을 경우, 일반적으로 발아나 광합성등이 억제 되는 반면, 저장 단백질 (vegetative storage protein:Vsp)의 형성이 촉진되고, 단백질

가수 분해 효소 저해제 (proteinase inhibitor) 등 식물체의 방어에 관련되는 다양한 종류의 단백질이 발현되며, 병이나 해충에 대한 저항성이 증가하게 된다 (Creelman *et al.*, 1997). 자스몬산에 의하여 촉발되는 이러한 다양한 생리적 현상의 변화는 각 현상에 관련되는 유전자의 발현이 조절됨으로서 가능하며 자스몬산에 의하여 발현이 조절되는 유전자들로서 Pin2, rbcL, rbcS, Vsp, Lox (lipoxygenase) 등이 잘 알려져 있다 (Reinbothe *et al.*, 1994). Pin2, Lox 등의 유전자들은 상처(wounding)와 같은 스트레스가 식물체에 가해질 경우에도 발현이 증폭되고, Lox 유전자의 발현이 증폭되면서 식물체내 JA의 농도가 증가한다. 그러나 자스몬산은 식물체에서 상처뿐만 아니라 수분 부족 (water deficit) 등 다양한 종류의 스트레스에 관여하는 매우 일반적인 스트레스 호르몬으로 보고되고 있다 (Semdner *et al.*, 1993). 특히 상처 등의 스트레스에 의하여 급격히 발현이 유도되는 Lox는 그림 1-2-2에 나타난 바와 같이 linolenic acid로부터 출발하는 자스몬산 생합성 경로의 첫 단계에 위치하고 Lox에 의하여 형성된 hydroperoxylinolenic acid를 기질로 하는 AOS는 Lox에 의한 촉매 작용이 자스몬산의 생합성 경로로 유입되도록 한다.

자스몬산 생합성의 출발 물질인 linolenic acid는 막을 구성하는 인지질이 lipase나 phospholipase에 의하여 가수 분해되어 생성되어 자스몬산의 생합성 경로에 유입된다. 막으로부터 linolenic acid가 공급되는 과정은 상처, 병원균, 곤충 등의 침입에 의한 스트레스 신호가 막에 존재하는 수용체에 작용하고 신호를 받은 수용체에 의하여 lipase나 phospholipase가 활성화되면서 조절될 것으로 추정되지만(그림 1-2-3), 관련되는 lipase나 phospholipase의 존재에 대한 증거는 충분하지 않다.

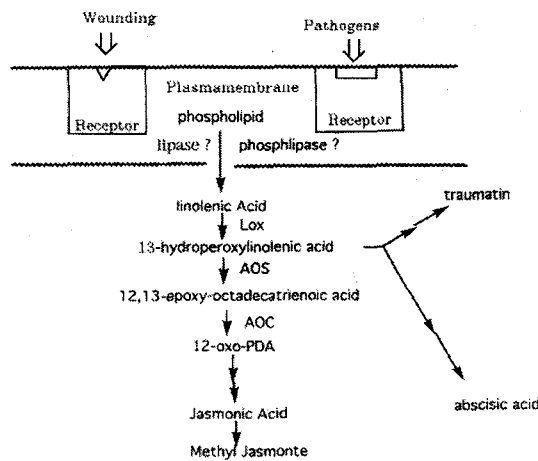


그림 1-2-3. 자스몬산의 생합성 경로와 스트레스 감응

그러나 식물체에 linolenic acid를 처리할 경우 과량의 자스몬산이 축적되는 것으로 볼 때(Farmer *et al.*, 1992) 세포내 lipoyxygenase 기질의 농도는 자스몬산 생합성의 속도를 결정하는 주요한 인자임을 알 수 있으며, Lox inhibitor를 처리한 식물체에서나(Pena-Cotes *et al.*, 1993), Lox 유전자의 발현을 줄인 형질전환 *Arabidopsis*에서는 자스몬산의 생합성이 현저히 감소하는 것으로 볼 때(Bell *et al.*, 1995), Lox는 자스몬산 생합성의 필수 단계를 담당하고 있다고 할 수 있다. 동물의 경우에도 Lox의 주요 기능은 eicosanoid pathway에서 잘 알려져 있으며, 동물 세포에서 Lox는 막이나 기질 분자들과 상호 작용하면서 calcium의 농도를 조절함으로써 prostaglandins, lipoxins, leukotrienes 등의 생합성을 조절하여 trauma, allergy 등의 스트레스에 대응하게 된다.

본인의 연구실에서 확보된 lipoyxygenase 유전자 {pZL1(6CO2E12)}를 probe로 사용하였을 때, Lox 유전자는 상처 등의 스트레스나 MeJA의 처리에 의하여 발현이 유도되지만, MeJA를 처리할 경우 Lox mRNA의 축적에 관한 time course가 상처스트레스를 가하는 경우와는 달리 biphasic함을 알 수 있었다(한옥수, 미발표 연구 결과). 이러한 결과는 MeJA에 의한 Lox 유전자의 발현 과정은 상처에 의한 Lox 유전자의 발현 과정과 다른 어떤 과정을 더 포함하고 있음을 시사하고 있다. 특히, Lox가 JA의 생합성에서 필수적인 초기 단계를 촉매함을 고려할 때, MeJA에 의하여 Lox 유전자의 발현이 증폭됨으로서 linolenic acid 이후에 존재하는 자스몬산 생합성의 중간체들 즉, 13-hydroperoxylinolenic acid, 12,13-epoxyoctadecanoic acid, 12-oxo-PDA 등의 농도가 증가할 것을 예상할 수 있으며, 그 결과 MeJA는 JA의 생합성에 positive feedback effect를 나타낼 수 있으리라 생각된다. 실제 MeJA의 JA 생합성에 대한 positive feedback 효과는 MeJA를 처리한 식물체에서 JA 생합성 경로에 존재하는 효소들의 활성을 측정함으로써 검증될 수 있었다(Avidiushka *et al.*, 1995). 이러한 MeJA의 positive feedback 효과는 다음의 몇 가지 점에서 중요한 의미를 갖는다.

첫째, MeJA의 positive feedback 효과를 위한 Lox 유전자 발현의 유도 과정은 상처와 같은 일반적인 스트레스에 의한 Lox 유전자 발현의 유도 과정과 분리되어 생각될 수 있으며, MeJA에 의한 Lox 유전자의 발현이 biphasic한 결과와 연결된다고 볼 수 있다.

둘째, MeJA에 의한 positive feedback 효과는 식물체에 도달된 MeJA의 농도가 낮을 경우에도 endogenous JA의 합성을 증폭시킬 수 있는 기작을 제공하여 병원균의 침입, 해충의 침입 등의 스트레스에 대한 식물체 상호간의 communication(interplant communication)을 가능하게 한다.

셋째, 자스몬산은 proteinase inhibitor, thionin, RIP60, phytoalexin 등에 대

한 유전자의 발현을 유도함으로써 병해충에 대한 저항성을 증가시키며(Creelman *et al.*, 1997), octadecanoids 로 알려진 Lox 효소의 반응 산물들은 병해충에 대한 일반적인 저항 기작에 관련되는 물질로 알려져 있다(Vick *et al.*, 1987). 따라서, MeJA의 JA생합성에 대한 positive feedback 효과는 식물체의 병해충 저항성을 증가 시킬 수 있는 기작을 제시한다.

자스몬산의 생합성과정에서 초기의 필수 단계를 촉매하는 lipoxygenase는 상처, 병해충, 수분 부족 등의 스트레스에 대하여 유전자의 발현이 급격히 유도되며, 흥미롭게도 자기 자신이 촉매하는 생합성 경로의 최종 산물인 MeJA에 의해서도 유전자의 발현이 유도되고 효소의 활성화(양)가 증가하는 positive feedback 조절을 받는다(Avidishka *et al.*, 1995). 그러나 자스몬산 생합성 경로에서 Lox의 다음 단계에 위치하는 AOS가 적절히 작용하지 않을 경우 국내외 연구 동향에서 언급한 바와 같이 Lox에 의하여 형성되는 hydroperoxylinolenic acid는 C-6 알데히드의 생성 경로로 유입될 가능성이 매우 높다. 따라서 본 연구에서는 Lox와 AOS 유전자를 동시에 발현시킬수 있는 시스템을 개발하고 이들 두 유전자가 과대 발현된 작물을 개발하여 자스몬산의 생합성을 증대시킴으로서 광범위 스트레스 내성을 갖는 작물 (벼)를 생산하기 위하여 다음과 같은 세부 목표를 달성하고자 한다.

- 1) Lox 유전자(6CO2E12)와 AOS 유전자의 특성을 규명하며, 유전자 발현을 위한 특정 프로모터 sequence의 존재 여부를 확인하고, Lox 유전자내에 존재하는 targetting sequence를 규명한다.
- 2) lipoxygenase inhibitors, translation inhibitor, JA 생합성 경로의 차단, bestatin을 이용한 단백질 분해의 차단에 따른 Lox 유전자와 AOS 유전자의 발현 양상을 규명하여, 전기와 후기로 구성된 Lox 유전자의 이중상 발현 기작을 밝힌다.
- 3) Lox와 AOS 유전자를 연결시킨 다음 연결된 유전자의 이중 발현 시스템을 개발한다.
- 4) Lox 유전자와 AOS 유전자를 벼에 도입시키고 Lox와 AOS 가 overexpression된 형질 전환 벼를 생산한다.
- 5) 생산된 형질 전환 벼에서 endogeneous JA의 농도를 분석하고, JA의 농도와 도열병, 상처등의 스트레스에 대한 저항성의 관계를 정립한다. 자스몬산에 의하여 매개되는 신호전달 과정도 하위단계에서는 스트레스 인자에 따라 다른 경로를 거치므로 스트레스 인자에 따른 저항성의 정도를 비교 분석할 것이다.

2. 연구개발 방법 및 설계

가. 연구 개발 설계

1) 옥수수에서 분리한 lipoxygenase 유전자 (6CO2E12)의 특성 규명 및 AOS 유전자의 확보

본인의 연구실에서 확보하고있는 옥수수 lipoxygenase 유전자 (6CO2E12)는 MeJA의 처리에 대하여 옥수수에서 biphasic expression pattern을 보였다. 따라서, 확보된 6CO2E12 유전자의 완전한 sequence를 결정하는 일이 선행되어야한다. 현재까지 약 80 %의 sequence를 완성하였으며, 나머지 20 %의 sequencing을 우선적으로 수행할 것이다. 밝혀진 유전자의 sequence를 기존에 알려진 여러 가지 lipoxygenase 유전자의 sequence와 비교 분석할 것이다. AOS 유전자는 Alan R. Brash 교수 (Vanderbilt University)로부터 분양 받을 예정이다

2) MeJA 처리에 대한 Lox 및 AOS 유전자 발현의 time course

옥수수에서 MeJA의 처리에 대하여 Lox 유전자의 발현은 전기와 후기의 이중상 발현 양상을 보였다. 이러한 발현 양상은 벼에서도 관찰될 것으로 생각된다. 따라서, 벼에서의 이중상 발현 양상을 재확인 할 예정이다. 전기와 후기의 발현 가운데 후기의 발현은 JA의 생합성 경로와 밀접한 관련을 가질 것으로 추측되며 AOS 유전자의 발현 양상과 비교 분석할 예정이다. 본 연구에서는 특히 lipoxygenase inhibitor를 이용한 lipoxygenase 단계의 차단, translation inhibitor를 이용한 단백질 합성의 차단, aspirin을 이용한 JA 생합성의 차단, proteinase inhibitor를 이용한 단백질 분해의 차단이 Lox의 이중상 발현 및 AOS 발현의 time course에 어떤 영향을 주는지 밝힐 예정이다.

3) Lox 유전자 및 AOS 유전자의 대장균에서 이중 발현

6CO2E12 lipoxygenase 와 flax seed AOS 유전자를 pRSET 벡터나 pTrc 벡터 등의 발현 벡터에 삽입하고 대장균에서 대량 발현시킨 후, 충분한 양의 Lox 와 AOS 를 순수 분리하여 얻고 그 특성을 규명할 것이다.

4) Lox 유전자와 AOS 유전자의 연결 및 이중 발현

Lox의 sequence가 알려지면 sequence가 알려진 AOS 유전자와 연결시키고 위에서 정립된 이중 발현 시스템을 이용하여 Lox-AOS fusion protein을 생산하고 그 기능을 확인할 것이다.

5) 식물체 발현 벡터의 제작 및 벼의 형질 전환

벼에서 Lox와 AOS 유전자를 동시에 발현 시키기 위해서는 pCAMBIA 벡터를 사용하고 Agrobacterium-mediated transformation 방법을 사용할 예정이다.

6) 형질 전환 벼의 분석

형질 전환 벼에서 생성되는 endogeneous JA 의 농도를 분석하고 wild type과 비교하여 상처, *Bradysia impatiens*, *Magnaporthe grisea*에 대한 저항성의 정도를 분석할 예정이다.

나. 연구 개발 방법

1) lipoxygenase inhibitor를 이용한 lipoxygenase 단계의 차단.

lipoxygenase inhibitor를 사용하였을 때, MeJA의 후기 expression이 어떤 영향을 받는지 확인할 것이며, 이러한 결과는 MeJA에 의한 후기 expression이 Lox의 activation에 관련됨을 입증할 수 있다. 사용할 lipoxygenase inhibitor로서 eicatechin, piroxicam, salicylhydroxamic acid, indoprofen, phenylbutazone, phenidone를 들 수 있다.

2) translation inhibitor를 이용한 단백질 합성의 차단.

cycloheximide 와 같은 translation inhibitor를 처리하고 MeJA에 의한 전기와 후기의 expression 중 어느 시기의 expression이 영향을 받는지 알아봄으로서 두 가지 expression 가운데 어느 부분에서 단백질의 합성을 요구하느지 알아볼 것이다.

3) aspirin을 이용한 JA 생합성의 차단

aspirin은 JA의 생합성과정에서 Lox 이후에 나오는 allene oxide synthase의 inhibitor로 알려져있다. aspirin을 사용하여 JA의 생합성을 차단하고 Lox의 biphasic expression pattern에 대한 영향을 조사할 예정이다. 이러한 결과는 전기와 후기의 발현 가운데 어느 시기의 발현이 JA의 생합성 과정과 직접적인 관련을 갖는지 밝혀줄 것이다.

4) aminopeptidase inhibitor를 이용한 단백질 분해의 차단

aminopeptidase의 inhibitor인 bestatin은 JA 없이도 Pin2의 발현을 유도한다고 알려져있다 (17). 이러한 결과는 JA에 의하여 유도되는 Lox 유전자의 발현에 단백질 가수분해 효소의 inactivation이나, target protein의 안정화가 주요 역할을 할 수 있음을 시사한다. 따라서, bestatin을 처리하고 MeJA의 biphasic expression pattern이 변화하는 양상을 알아봄으로써 JA에 의한 Lox 유전자의 발현에서 bestatin의 역할을 고찰하여 단백질의 안정화가 Lox 및 AOS의 발현에 어떤 역할을 하는지 알아볼 것이다.

5) Lox 와 AOS 의 물리적 성질 결정

kinetic properties (V_{max} , K_m), isoelectric point 등을 결정하고 6CO2E12 lipoxygenase의 isozymic type을 결정한다.

6) 효소 반응 산물의 구조 결정

linolenic acid 나 linoleic acid를 기질로 하여 정제된 Lox 와 AOS를 연차적으로 반응시켰을 때 얻어지는 반응 산물은 9-hydroperoxy fatty acid 또는 13-hydroperoxy fatty acid, allene oxide 일 것으로 생각되며 nmr 이나 GC/MS를 이용하여 그 구조를 확인할 것이다.

7) Lox 와 AOS 유전자의 조작 및 형질 전환

유전자들의 조작과 벼 형질 전환의 세부적인 방법은 본 인의 연구실에서 그동안 정립된 방법을 따를 예정이다.

다. 연구개발 추진체계

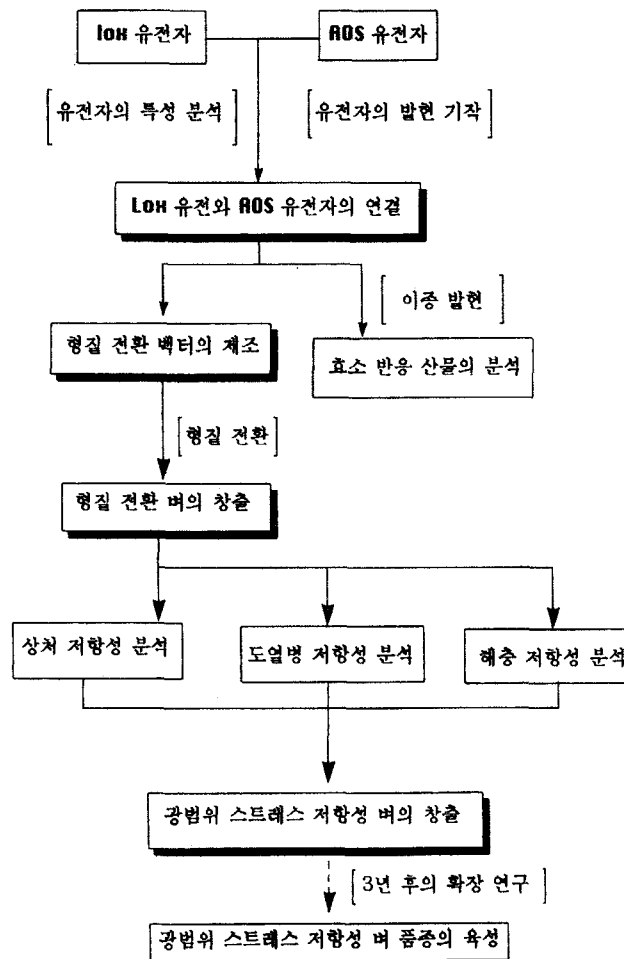


그림 1-2-4. 연구개발 추진체계

여 백

제 2 장 국내외 기술 개발 현황

여 백

제 1 절 국외 관련 기술의 현황

Lox와 AOS가 지질의 oxidative metabolism 및 자스몬산 생합성에서 차지하는 주요 기능이 알려지면서 lipoxygenase pathway 및 자스몬산 생합성 경로를 조절하거나 자스몬산 자체를 처리하여 작물의 생산성을 증대시키려는 시도가 최근에 이루어져 왔다. 본 연구와 관련되어 실용적 이용 가능성에 대한 최근의 연구 결과들의 현황과 문제점은 다음과 같다.

1. AOS의 발현 없이 Lox 유전자만을 이용한 형질 전환 식물체가 광범위 스트레스 내성을 나타내는가?

가. 콩의 Lox를 이용한 형질 전환 담배의 경우

콩과 같은 식품에 있어서 C6-알데히드와 같은 Lox의 대사 산물은 휘발성이 강하고 식품의 향을 결정하는 주요 물질이다. 따라서 soybean의 Lox 유전자는 많은 연구의 대상이 되어 왔으며 실제 콩의 Lox 유전자를 도입시킨 형질 전환 담배가 생산되었다 (Deng *et al.*, Expression of soybean-embryo lipoxygenase in transgenic tobacco, 1992). Lox 유전자를 도입시킨 형질 전환 담배에서는 뚜렷한 phenotype의 변화가 관찰되지 않았지만 많은 양의 C6-알데히드가 생성됨이 관찰되었으며 스트레스에 대한 내성여부는 보고되지 않았다

나. LOX와 AOS의 동시 발현에 의한 자스몬산 생합성의 조절

이러한 결과는 단지 Lox 유전자만을 식물체에 도입할 경우 정상적인 식물체가 생산되기는 하지만 Lox의 반응 산물인 hydroperoxylinolenic acid 가 자스몬산과 C6-알데히드 생합성의 분지점에 위치하여 (그림 2-1-1) AOS로 이어지는 자스몬산 생합성 경로로 유입되지 못하고 hydroperoxide lyase에 의하여 C6-알데히드를 형성하는 경로로 흘러감을 시사하고 있다. 따라서 Lox의 과대 발현에 의한 hydroperoxylinolenic acid가 자스몬산 생합성 경로로 흐르게 하기 위해서는 AOS의 동시 발현이 필수적이다. 본 연구에서는 Lox 유전자와 AOS 유전자가 연결된 Lox-AOS 연결 유전자를 식물체에 도입시켜 Lox의 산물이 자스몬산 생합성에 효과적으로 사용되도록 조절할 것이다.

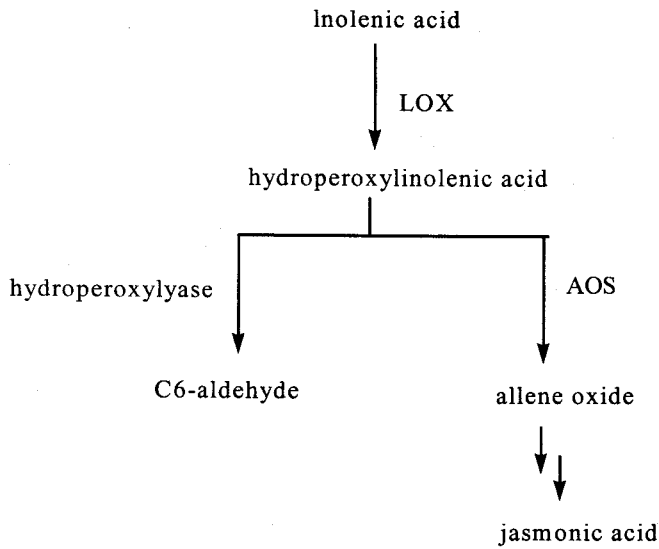


그림 2-1-1. 자스몬산 생합성과 C6-알데히드 형성의 분지점에 위치하는 LOX의 반응 생성물.

2. 자스몬산 및 자스몬산 생합성 중간체들은 식물체에 광범위 스트레스 내성을 실용적으로 부여할 수가 있는가?

가. 자스몬산은 해충에 대한 방어 기작에서 필수적인 역할을 수행한다.

fatty acid desaturase 변이종 (fad3-2fad7-2fad8)을 이용하여 *Bradysia impatiens*에 대한 저항성을 분석한 결과 (McConn *et al.*, Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*, 1997) 자스몬산은 해충에 대한 방어 기작에서 필수적인 역할을 수행함이 밝혀졌다.

나. 자스몬산은 병원균에 대한 방어 기작에서 주요한 역할을 한다.

동일한 fatty acid desaturase 변이종을 사용하여 *Pythium mastrophorum*에 대한 저항성을 분석한 결과 (Vijayan *et al.*, A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*, 1998) 자스몬산은 병원균에 대한 방어 기작에서 핵심적인 신호 물질임이 밝혀졌다.

다. 자스몬산은 phytoalexin 생성에서 주요한 signalling molecule이다.

Rakwal 등 (Role of jasmonic acid as a signalling molecule in copper chloride-elicited rice phytoalexin production, 1996)은 벼에서 다양한 종류의 elicitor에 의하여 생성이 유도되는 phytoalexin의 생합성에서 자스몬산이 중요한 신호 물질임을 밝혔다.

라. 포장에 살포된 자스몬산은 해충의 공격에 대한 저항성을 유도시킨다.

Baldwin 등(Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations, 1998)은 담배 포장에 메틸 자스몬산을 살포하고 해충에 대한 저항성을 분석한 결과, 메틸 자스몬산 처리군에 대한 해충의 공격은 대조군에 비하여 현저히 감소함을 밝혔으며 이러한 연구 결과는 자스몬산 생합성이 증대된 식물체의 광범위 스트레스 내성은 실용적으로 이용될 수 있음을 증명한다.

마. 자스몬산은 저온 스트레스 내성을 유도한다.

자스몬산이 생물적 스트레스 뿐만 아니라 비생물적 스트레스 내성 기작에서도 주요한 역할을 수행함에 착안하여 Droby 등은 (Suppressing green mold decay in grapefruit with postharvest jasmonate application, 1999) 수확후 과채류에 자스몬산을 처리함으로써 냉장 저장에 의한 피해를 현저히 줄일 수 있었다.

제 2 절 국내 관련 기술의 현황

1. jasmonate methyl transferase 유전자를 이용한 국내에서의 연구 현황

국내에서도 자스몬산에 대한 연구는 진행되어 왔다 (Ha *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1992). 특히 jasmonate methyl transferase(JMT)에 대한 연구는 Choi 등의 연구 그룹에서 심도있게 연구되어 왔으며 (Seo *et al.*, 2001), JMT를 이용한 형질전환 벼의 개발도 이루어지고 있는 것으로 알려져 있다. 지금까지 언급된 산발적인 연구 결과들은 해충의 침입, 병원균의 침입 등 생물적 스트레스와 저온 등의 비생물적 스트레스 요인에 대한 광범위 내성을 유발시킬 수 있는 주요 물질임을 나타내고 있으며, Lox 와 AOS의 발현에 의한 자스몬산 생합성의 증대 기술은 실용적인 광범위 스트레스 내성 작물의 창출을 위하여 이용될 수 있음을 강력히 시사하고 있다.

2. 앞으로의 전망

가. 광범위 스트레스 내성 작물 품종 개발로의 확장 연구

지금까지의 연구 결과로 볼때 리폭시지나아제와 알렌옥사이드 합성 효소 유전자를 이용한 광범위 스트레스 내성 벼가 성공적으로 창출되었다고 판단되므로 국내의 육종학자들(농촌진흥청등) 과 협력하여 유전적으로 안정한 품종 개발로 연구를 확장할 것이다.

나. 개발된 스트레스 내성 품종의 이용

유전적 안정성이 확보된 품종에 대하여서는 차기 연구에서 종묘 회사와 연계하여 실제 농가에 개발된 품종을 보급할 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

여 백

제 1 절 리폭시지나아제 유전자의 구조 분석

1. 리폭시지나아제 cDNA (6CO2E12) 의 구조

가. 서언

리폭시지나아제는 식물체의 막에서 유리된 리놀레산이나 리놀렌산과 같은 1,4-pentadiene 구조를 지닌 불포화 지방산을 기질로하여 hydrperoxidation을 촉매하는 효소로서, 상처, 저온, 염등의 스트레스 반응을 포함한 다양한 종류의 산화 스트레스에 감응하는 효소이다. 본 연구의 궁극적인 목적인 광범위 스트레스 저항성 벼를 생산하기 위해서는 자스몬산 생합성 경로에서 주요한 역할을 하는 리폭시지나아제 유전자를 확보하고 유전자의 구조를 규명하며, 유전자가 encode 하는 단백질의 특성을 규명하는 연구가 먼저 이루어 져야한다. 본 연구에서는 광범위 스트레스 저항성 형질 전환벼를 생산할 목적으로 본 연구의 대상인 벼와같이 단자엽식물로서 유전자 발현과 생리적 현상이 유사한 점이 있는 옥수수의 리폭시지나아제를 이용하였으며, 스트레스 인자로는 광범위 스트레스 인자로 생각될 수 있는 상처스트레스를 대표적인 스트레스 인자로 사용하였다.

나. 재료 및 방법

상처에 감응하는 옥수수의 리폭시지나아제 유전자를 찾기 위하여 GenBank database를 이용하였으며, 그 결과 3 개의 putative 리폭시지나아제 유전자를 검색할 수 있었다. 이들 clone은 University of Missouri-Columbia에서 획득하였으며, 3 개의 EST clone 각각을 probe로하여 Northern 분석을 수행하여 상처 스트레스에 대하여 발현이 유도되는 clone을 선별하였다. 선별된 clone은 표준 방법에 따라 유전자의 sequence를 결정하였으며, 이미 알려진 chloroplast target sequence의 criteria를 적용한 컴퓨터 프로그램(ChloroP V1.1)을 통하여 리폭시지나아제의 targeting sequence를 조사하였다.

다. 결과 및 고찰

1) 리폭시지나아제 cDNA의 구조

database에서 탐색된 3 개의 clone 가운데 1 개의 clone (pZL1/LOX (6CO2E12)) 만이 상처에 강력하게 감응함을 알 수 있었다. 상처에 감응하는 유전자

의 sequence를 그림 3-1-1 에 나타냈다. 선별된 6CO2E12 clone은 EST clone 이지만 리폭시지나아제의 완전한 ORF를 포함하고 있었으며, 컴퓨터 프로그램을 이용하여 조사한 결과 LOX 유전자에는 chloroplast targeting sequence로 생각되는 sequence가 발견되지 않았다 (그림 3-1-2).

```

1  tggaccacccgctccgcaaaagccctagygctggaacccgaagatgctgggaaacatcggaaag
62  atccccatcatcggcgaactgacgggcaagcaaacgaatgagccacotcaatggcaactggy
                                M R T S M A T N      6
122  tggctcgtgcycaagacgctgctcgggttggcctccaccgcatcgcggctccctggtc
    M L V R R K T V L G L D V T S I A G S L V      28
182  gacggcatcggcggcttctcctggcgtccctccgggttatcggctcctcctcctcgtcagc
    D B I G E F L G V T C R L I G S S F V D      48
242  cctacaacggcaacccggggaagtggggcgggggggggagcctggagcagctggctgctg
    P N N G N R G K L G A B A S L E Q N L L      68
302  acccgccgcgcgctctctccggcgaaccagctccggctccctcctcctcctcgggaggtg
    N P P P L L S S E N Q P R V T F D W E V      88
362  gaggagcgggcatccgggggcaatcctcctgtaagcaaccaccgctccggcttctc
    E K Q Q D I P G A I I V K N N H A S E F F      108
422  ctcaagaccatccctccacggcgtcccgccacgggaccatgctctcctcctcctcctc
    L E T I T L N D V P G K G T I V F V A N      128
482  tcatggtatcaccggcagctccagctaccgctaccagcgtctctctcctccacgacacg
    S H I Y P Q S K Y R Y N R V F F S N D T      148
542  taactcccaagccagatgcccggcgcctcaagccctaccggcagcagcagcagcagcagc
    Y L P S Q M P A A L K P Y R D D E L R N      168
602  ctgggggggagcagaccggggggccgctccagggagcagcagcagcagcagcagcagcagc
    L R G D D Q Q G P Y Q E H D R V Y R Y D      188
662  gctcaacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
    V Y N D L G L P D S G N P R P V L G S T      208
722  aaggagctaccctaccggggcgtgagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
    K E L P Y P R R C R Y T G R K P T E S D P      228
782  aacggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
    N S E S R L T L V D D D L Y V P R D E R      248
842  ttggccacatcagaagctgggacttctcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
    F B H I K K S D P Y G Y A I K A L V N P      268
902  gctcctccgggaatccgcaactcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
    V I P A I R T Y V V D L S P G E F D S F K      288
962  gacatcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
    D I M K L Y E G G I Q L P E I P A L E D      308
1022  ctgggagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
    L R K D F P L S L V K D V L P V G D D Y      328
1082  ctcccaagctcccaatccgggactcctcaagggagcagcagcagcagcagcagcagcagc
    L L K L P I P Q I I K E D E T G N M T D      348
1142  gaggagcttggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
    E E F G R E I L A G V M P H L V K R L T      368
1202  gggctccctccgggagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
    E P P P R S S L D P S K Y G D H T S T I      388
1262  ggggagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
    R E A D L E N K L E G L T V Q R A L H G      408
1322  aacggctcctacatcctggcaaccacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
    N R L Y I L D H K D N P M P F L V R V N      428
1382  agcctggagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
    S L E G N F I V A T R Y V L F L R G D G      448
1442  accgctgctccggtagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
    T L V P V A I S L S L P E L R D G L T T      468
1502  gccaagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
    A K S T V Y T P K S T T G A E A N V N H      488

```

```

1562  ctggccaggcctaccgcaacgctgaacgaactactgctgycaccgctcctcagccactgy  508
      L A K A Y A N V N D Y C M Q L I S M
1622  ctcaacacccacgcccgtgatggagccgttcgtgatcgcacccacccggaagctcagcgtg  528
      L N T A V M R P F V I A T N R Q L S V
1682  aagggcccccgtgcacaagctcctcctgcccgaactacgctgaccccatgaacatcaactcc  548
      T R P V K L L L P Y R D T M N I N S
1742  aagggcccccagatgctcctcaacgcccggcactctctggagccaccgctcttccggcgc  568
      N A R Q M L V N A G G I F E T T V F P R
1802  cagtaacgcttcgagatgctcctcctcctcctacacaggaatggacottcagagagcggct  588
      Q V A F E M S S V I V K D W N F T E Q A
1862  ctccctgacgaactaatcagagagggcctggygctgcagaccctcgggcccctcaaa  608
      L P D D L I E R G M A V A D P S S P Y K
1922  gtaacgctgctggtggaagctaccacgctcagcgcaggaagggctggaacatctgcaagcc  628
      V R L L V E D Y P V A Q D G L A I W H A
1982  atcagacagtggtggaagctaccacgctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct  648
      I E Q N V T E V L A V Y V P N D G V L R
2042  ggcgacgtgagcctcagggcctggtggaagggcgcgcgcagctgggcaagccgcaactc  668
      A D V E L Q A N M R E A R E V G H A D L
2102  aagggcccccctggtggaacagatgcagagctggcagagctggtcagggcctgcaac  688
      K D G A N N P K M Q T V A E L V R A C T
2162  accatcctctggaatcagcctcagcgcctcaccgcccgtcaacttagggcagctaccgctac  708
      T I I N I A S A L A A V N L G Q Y P Y
2222  gcccgtaccctcccaacccgcccgtctcgtcagcgcggaagcgcctgcccggccggggcaga  728
      A S Y L P N R P F V S R K P M P A P G S
2282  gacagctacgggagctgagcgcggaagagagagagctgctcgttcgcacatcaccagc  748
      D E Y A E L E R E R E E K V F V R T I T S
2342  cagttccagggccctcgtcggcctcctcgtcgtggtgagctcctgctccagccactcctccga  768
      Q P Q A L V G I S L L E I L S S H S S D
2402  agggctaccctcggccagcgcacacacagggagtgccgtcggcagcccaagggcagggag  788
      E V Y L G Q R D T R E W T S D A R A Q E
2462  gggctccagggcttggggcggcgtgacccgagctcaggaacccggcgcacccatgaacgc  808
      A P E R R F G A R L T E I E K R A H H E R
2522  ggcacctcgtcagagaccgcaacggcggcggcggcttccctaccgctgctcctacc  828
      G P S L K N R N G P A E F P Y T L L Y P
2582  aacacctccgcaacgagggcgcgcgcgcctcaccgcccagggccttcccaacagc  848
      N T S D T K G D A A G I T A E S I P N S
2642  atctccatttgagttctgctgctgctgagctgaggaagctacggctcgtcgcactagattgt  852
      I S *
2702  tggcttcccccgtccgctccgctgaagctggttccacttgcggcgttatgtgcaacta  872
      tgcacagtaactccttacagagctcgtcagtgagggcctgtgttaataaggtctattctg
2822  ttctccaatatgagttaccttgttctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagggc  892
      ggcgctctaga

```

그림 3-1-1. 스트레스 감응 옥수수 리폭시지나아제 유전자 및 추정되는 아미노산의 sequence

Neural network based prediction for each query sequence:

Name Length Score Prediction CS-score Pred. CS

LOXSEQUENCE 873 0.472278 NO cTP - -

그림 3-1-2. Targetting sequence 의 존재에 대한 ChloroP V1.1 Prediction Results

2) 리폭시지나아제 cDNA의 phylogentic tree 분석

상기 리폭시지나아제의 아미노산 sequence를 Phylip 3.5 프로그램으로 분석한 결과 (그림 3-1-3), Type-1 리폭시지나아제로서 Lox1 gene family에 속하며, 보리와 오이등에서 유래된 리폭시지나아제와 함께 nontraditional positional specificity를 지니는 리폭시지나아제로 분류될 수 있었다.

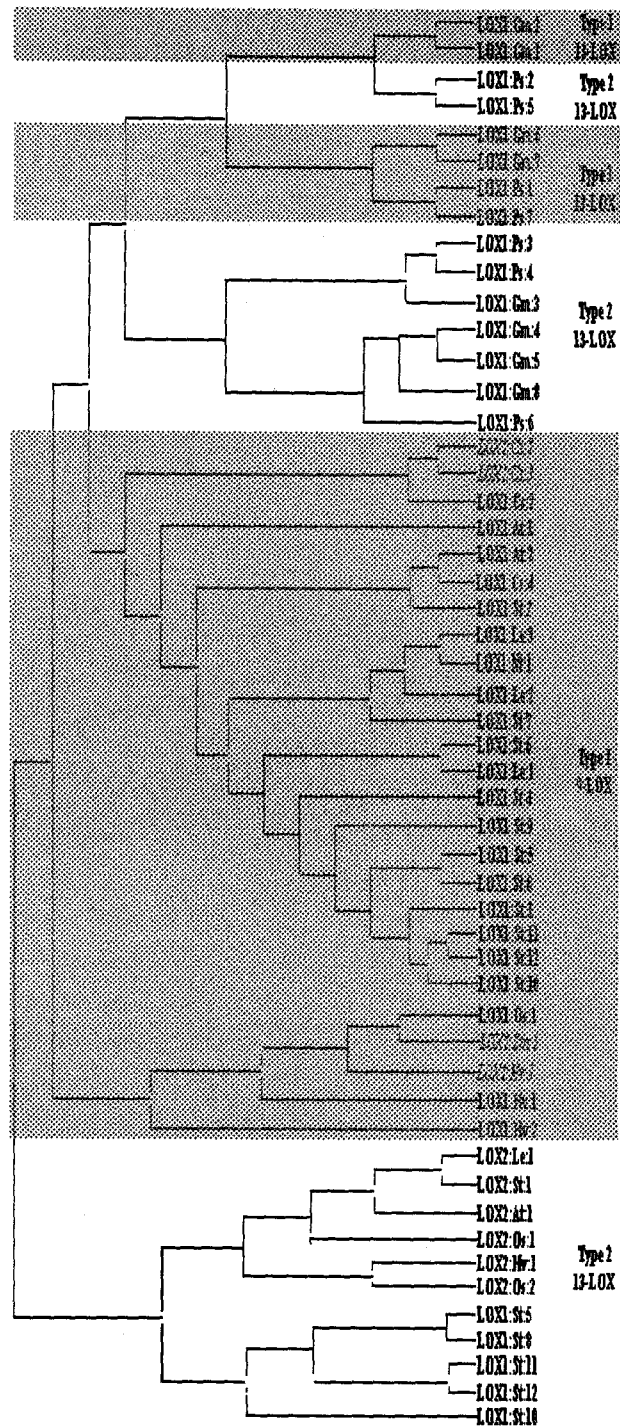


그림 3-1-3. 리폭시지나아제의 Phylogentic tree 분석

2. 리폭시지나아제 genomic DNA 및 5'-untranslated region 의 구조

가. 서언

상기 그림 3-1에 나타낸 리폭시지나아제 cDNA의 genomic DNA를 얻기 위하여 확보된 리폭시지나아제 cDNA를 probe로하여 옥수수 genomic library를 탐색하고 promoter region의 sequence로부터 상처나 메틸 자스몬산에 감응하는 putative cis-element를 검색하였다.

나. 재료 및 방법

1) screening of genomic library

옥수수 genomic library를 Clontech으로부터 구입하였다. 옥수수 리폭시지나아제 cDNA(AF271894)를 Nco I과 BamH I으로 처리하여 얻은 약 1kb의 cDNA fragment를 probe로 사용하여 Southern blotting 방법으로 positive plaque를 얻었다.

2) Cloning

positive plaque에서 insert DNA를 얻기 위해서 제한효소 Sal I으로 처리하여 3개의 DNA fragment를 얻었다. 이 DNA fragment를 각각 Sal I 처리된 pUC19 vector에 cloning한 후에 plasmid DNA를 추출하여 southern blotting하였다. positive signal을 보인 DNA fragment를 염기서열 분석을 하기 위하여 다시 Sma I으로 처리하여 5개의 DNA fragment를 얻었으며 이를 Sma I으로 처리한 pUC19에 subcloning하였다.

3) Sequencing

subcloning한 DNA를 southern blotting하여 positive signal을 보인 DNA fragment를 리폭시지나아제 gene임을 확인하기 위해서 염기서열 분석을 의뢰하였다 (기초과학지원센터 광주 분소). 그리고 나머지 부분도 리폭시지나아제 genomic DNA의 염기서열을 알기 위해서 염기서열 분석을 의뢰하였다 염기서열 분석은 M13 forward primer와 reverse primer 그리고 읽고자하는 부분의 primer를 제작 의뢰 (Bioneer)하여 실행하였다.

다. 결과 및 고찰

1) genomic DNA

positive signal을 보인 DNA fragment의 염기서열 분석 결과 Genebank에 등록된 리폭시지나아제(AF329371)의 cDNA와 100 %의 동일성을 보였고, 약 5 kb의 염기서열을 분석한 결과 본 genomic DNA는 6개의 intron이 삽입된 4514개의 염기로 구성되어 있었다 (그림 3-1-4).

```
ATGCTGAGCGGGATCATCGACGGGCTGACGGGGGCGAACAAGCATGCGCGGC
TCAAGGGCACGGTGGTGGCTCATGCGCAAGAACGTGCTGGACCTCAACGACT
TCGGCGCCACCGTCGTTGACAGCATCAGCGAGTTCCTCGGCAAGGGGGTCC
CTGCCAGTCCATCAGTCCACCCTCGTCGACGCCAGTGAGTACCGCGCCGCG
CCGCCGGCACCTCTCCGATCTGCGCTTCCCCATGTCGATCGATCTCGATCTC
TCTAGGCTCTAGAGCTATAGCTCTCTCGGCCCCACTTTTTACCTTTGCAAG
CATTTTCCCTGCATGCGAAACAAGCGATAGTTTACTATTTGGGCGGCCATG
CTGCTGCTGCTTCGGCTACCTTGCCCTCCGTCATCTTTGACGGGACATGGAAA
GAAAGAAAGAATAGAGAGAGAGACAGAGAGAGAGAGAGAGAGCAAACACCGA
GAAAAAGACAGCAAAGCTAGTTGTAGCCTGGGCGCAGAACACAGCACCAGA
TGCTGGCTAGCTCGTGACAAAGTAAAAAAGAGAGGAACGAACACAGTAG
TACCAAGAGATCAGGGACGAGACCTTCTACTTTGAACTGGATTATATATT
GGATTCTTTATCAGTAACTTACTGCTGCTAGTATACCCCTACCCTAGTCTC
GGGGCGACGTGCCTGCGTGCATGCCCGACGCGTACGAAACACATCGACGGAC
TCACATGGGCCACCGCGCGCGCGTGCCTGCTTTAACTTTTCGCTGTGCAGA
CAACGGCAACCGCGGGCGGGTTCGGGGCGGAGGCGAACCTGGAGCAGTGGCTG
ACGAGCCTGCCGTCGCTGACGACCGGCGAGTCCAAGTTCGGCGTCACGTTCCG
ACTGGGAGGTGGAGAAGCTGGGAGTGCCGGGGGCCGTCGTCGTCAGAACA
ACCACGCCGCCGAGTTCTTCCCTCAAGACAATCACCCCTCGACGACGTGCCCGG
CCGCGGGCGCCGTCACCTTCGTCGCCAACTCCTGGGTCTACCCCGCGGGCAAGT
ACCGCTACAACCGCGTCTTCTTCTCCAACGATGTGAGTCCTTTCTCGATAG
ATCATTATGTTTGTGTTGTTATTTTGTGTTCTTGGTATCATGTAGGCATGTA
GCTAGCCGCCATGTCGTCAGTTGGAGTGCAGTAGGTAGGAAAAAGGACGAC
ATGGGATGGGAGTGGTTAAGAAAATCCATGCAAGTGGGACTAGTGTGTAA
CTGGTAGTATAGCTGAAGAATCTAGTGGTAGAATGATCTTGTACGTGAAT
AATGTTTCTGACGCTGAGCGCTGAGGCTATCCGCAACCGTTAACCCTAAAT
TTTTCCCTCTATATCATTTTTTCTCTATTTTCTCCCTATTTTTTTCATCT
```

CCCGCAGCGGTTCCCCCTAAATACTCCCCCTATATCTCACTACCACTATAAAA
ATATTATTTTCTATACCAATTATCAATTTTTTATCTACTAACAATTACTC
GTGGACCCACAGCACAGTGTTTAGGGTGATGAACAGTGACACGCTAGATCT
GAAGGGAGAGAGAAGGGGACCGACACGTAGGGAGCCTGTAGAGGGCACCGC
TGCGGCCGTAGGGTGCTCCCTACGCGCCGCATACAAGGGGAGGGGGGAGAGG
CAGCGGTAACCGCTGCGCACAGCCTGAGGGCGAGGCATGTGAGTTCACCACG
TGAGTAGCAGCAAAAGGAAACAACCCTTCTTCACCCGGCTATCATCTAACG
TATCGCCCGGAGAAATCAATAACTCTAACGAGATGACGAAAAGTCAAAAA
TAAAGTCGTGTGATGGCCATGAAAGTCAGTCAAGCAAATCAGCTGCTAACA
CGTGTCCCTTATCTACAGGTGTAAGAGAGTAGAGTCTTGTC AATCAACCTG
GGTTGTTTTCTATCTGCGTTTTACCGTCCGTCAGTCAGTCGGCCAACATGC
CACGCTGATCTTTCTGTCTTTTGGTGCCGCCCGATTCCGAACGGCGGGCGCA
GACGTACCTGCCAAGCCAGATGCCGGCGGGCGCTGAAGCCGTACCGCGACGAC
GAGCTCCGCAACCTCCGCGGGCAGCACCAGCAGGGCCCCTACCAGGAGCACG
ACCGCGTGTACCGCTACGACGTCTACAACGACCTCGGCGAGCCCGACGGCGG
CAACCCGCGCCCCATCCTCGGCGGGCTCCGCCGACCACCCGTACCCGCGCGGCT
GCCGCACGGGCCGCAAGCCCACAAAACCGGTGCGTGCGCCGTGCGCGGCTC
TTCTATCTTCTCGGACGCAACATTTGCTGCAGGGCAGAGAGGTTGTTGACG
CTTGACCTGTGACCGCATCGCAGACCCCAACTCGGAGAGCCGACTGTGCTG
GTGGAGCAGATCTACGTGCCGCGGGACGAGCGCTTCGGCCACCTCAAGATGT
CCGACTTCCTGGGCTACTCCATCAAGGCCATCACGCAGGGCATCATCCCGGC
GGTGCGCACGTACGTGGACACCACCCCGGGCGAGTTCGACTCCTTCCAGGAC
ATCATCAACCTGTACGAGGGCGGGATCAAGCTGCCCAAGATCCAGGCGCTCG
AGGACATGCGCAAGCTCTTCCCGCTCCAGCTCGTCAAGGACCTCCTCCCCGC
CGGCGGGGACTACCTGCTCAAGCTCCCCATCCCACAGATCATCCAAGGCACG
TCACGTATAACCGATCGATGTCAGGGGCCGGCTGTTGTCTGGTCTGCATATA
TATATGTGCTCCTATGGTTAACTGTGACTGCGTACGTTTCGCGGAACAGAG
GACAAGAACGCGTGGAGGACCGACGAGGAGTTCGCGCGGGAGGTGCTCGCCG
GCGTCAACCCGATGGTGATCACGCGCCTCACGGTGAGTCACTCACTTTGTGC
AAAATGCGAGACCCGACCCGAGACGGAATGTGCCTGACGCGCTCGATTTAC
AGGAGTTCCCGCCCAAGAGCACGCTGGACCCCAAGTACGGCGACCACAC
CAGCACGATCACGGCGGAGCACATCGAGAAGAACCTCGAGGGCCTCACGGTG
CAGCAGGGCGCTGGACGGCAACAGGCTCTACATCCTGGACCACCACGACCGCT
TCATGCCGTTCTCATCGACGTCAACAACCTGGAGGGCAACTTCATCTACGC
CACCAGGACGCTCTTCTTCTGCGCGGGCAGGCAGGCTCGCGCCCCCTCGCCA

TCGAGCTCAGCGAGCCGTACATCGACGGGGACCTCACCGTGGCCAAGAGCAA
GGTCTACACGCCGGCGTCCAGCGGGCTCGAGGCCTGGGTGTGGCAGCTCGCC
AAGGCCTATGTCCCGTCAACGACTCTGGCTGGCACCAACTCGTCAGCCACT
GGTACGTACGAAGAACTACA ACTACTCCTATATATATGTCCTATATGACAATG
GCATCGCATCGTGTTCATGTCTATGACATCGCCAAATGCATGCGTTGATGGT
CATGATCTATTCTCTGCGTGCCTGTCAGGCTGAACACCCACGCGGTGATGGA
GCCGTTCGTGATCGCGACGAACCGGCAGCTGAGCGTGACGCACCCGGTGCAC
AAGCTCCTGAGCTCGCACTTCCGCGACACCATGACCATCAACGCGCTGGCGC
GGCAGACGCTCATCAACGGCGGGCGGCATCTTCGAGATGACCGTCTTCCCGGG
CAAGTACGCGCTGGGCATGTCTCCGTGGTGTACAAGAGCTGGA ACTTCACC
GAGCAGGGCCTCCCCGCCGACCTCGTCAAGAGGGGCGTGGCGGTGGCGGACC
CGTCCAGCCCGTACAAGGTGCGGCTGCTGATCGAGGACTACCCGTACGCGAG
CGACGGGCTGGCCATCTGGCACGCCATCGAGCAGTGGGTGGGCGAGTACCTG
GCCATCTACTACCCGACGACGGCGCGCTGCGGGGGCAGGAGCTGCAGG
CGTGGTGAAGGAGGTGCGCGAGGTGCGGCACGGCGACCACAAGGACGCGCC
CTGGTGGCCCAAGATGCAGGCCGTGTCGGAGCTCGCCAGCGCCTGCACCACC
ATCATCTGGATCGCGTTCGGCGCTCCACGCCCGCTCAACTTCGGCCAGTACC
CGTACGCGGGGTACCTCCCGAACAGGCCACGGTGAGCCGGCGCCGGATGCC
GGAGCCCGGCAGCAAGGAGTACGAGGAGCTGGAGCGCGACCCGGAGCGCGGC
TTCATCCACACCATCACGAGCCAGATCCAGACCATCATCGGCATCTCGCTCA
TCGAGATCCTCTCCAAGCACTCCTCCGACGAGGTGTACCTCGGCCAGCGCGA
CACCCCGAGTGGACCTCCGACGCCCGGGCGCTGGCGGCGTTCAAGAGGTTC
AGCGACGCGCTGGTCAAGATCGAGGGCAAGGTGGTGGGCGAGAACC GCGACC
CGCAGCTGAGGAACAGGAACGGCCCCGCCGAGTTCCCCCTACATGCTGCTCTA
TCCCAACACCTCTGACCACAGTGGCGCCGCCGAGGGCTCACTGCCAAGGGC
ATCCCCAACAGCATCTCCATCTGAGCGACTGGTACCACTACCACCCAGGAG
TGCTACGTACGAGCTGGTACATGAATAAGCTAATAAAGCAATCGTGTA
CGGGAAGAGAGCGGCCGGCACGAGACGGACCATGTATTTTGCGTAAACGTG
TGGGCTGGTGAATCGAATTACTACCACGTAATAAGTGAAGTGCTTGTGCAA
TCATTGGCCTGCCAGCTTCAAGATTCTTGAGTACTATTCTAGTCGTTTTCG
CAGTGCTCCTCGATCACAACATTTACGAGGTGTTTTATTACAATAATTTGG
AGCTATTCAATTTCAAAGCCTATGTAGAATACTATATGTTGTAGGGACATTA
GTCCCACATAGCT

그림 3-1-4. 리폭시지나아제 유전자의 genomic sequence. red: ORF, black: intron, italic: 3'-UTR

2) 리폭시지나아제 유전자 promoter의 구조

```

attatagccg tacgtcgacg atgaattccc gagagcgatg agttcgccctg tgaacggccc      60
accggacagt ccggtgcacc accggacagt ccggtgcacc accggacagt ccggtgaatt      120
atagccgtac accgcccgtcg aagteccgag agcagccact ttgtcgcagc cagcctggcg      180
caccggacac tgtccggtgc accaccggac agtccggtgc acccagattg agcagctctt      240
ggctgctcga gccatctctt ctccaactcg atttttctg tttccagcac ttaaacacaa      300
tacattagtc cataaaaca tgtactaagt ctgagaaaca tacctttatc cttgatttgt      360
actttgtcca cctttttaca cttaggcact cgtgttggac actaaaccac caaataactt      420
agaataggcc caagggcaca tttcccttc agtatggtgg agcagccag atgggacacc      480
ggctctgttc cccgtagcct gagtcagctc ggggtagggt aatgatggcg cctcctgacg      540
acgtggtcgg tccgtgccct aggtgggtg aggtgaggt cctccgaggt cgaggtcgag      600
tctgtctccc aaggtcgagg tcgagtcogg gccccgggt cggacaagcg ggagaccgtc      660
ggctgagccg gggctgagtc cgagccctgg ggtcggcgca agcggagtc gtcgtccttc      720
ggggctgagc ccgagtccaa gccctgggt cgggcagagc ggagttcgtc gtctccggg      780
gctgagcccg tgtccgagcc atggggtcgg gcgaagcgga gttcgtcgtc ttccggggct      840
gagcccgtgt ccgagcaatg ggtcggggcg gagcgaatt cgtcgtcttc cggggctgag      900
cccgtgtccg agccctgggg tcgggctaag cggagttcgt cgtcttcgg ggctgagccc      960
gtgtccgagc cctggggctg ggcgaagcgg agtttctat gagctctgag gccagacttg      1020
gctgctgtca gccctactct gtcgagtagc tcagcagtcg gagcggagca ggcggcgcg      1080
tcctctgtc agaccggtca gtggagcagc gaagtgactg cgtcacttc ggtttgtcg      1140
actggagggc gtcgtcagg ataaaggtgt cagtccacct ttgcattaaa tgcccctgcg      1200
atttggtcgg ttggcgtggc gatatggcca aggttgcttc ttggtgaaga cttggcctcg      1260
ggcgagccga aggtgtgtcc gttgctggag ggcgagacgt agatcctccg gggcggctg      1320
cccttgctta agactgggct cgggcgagcg atgatcgcat ccctcgaatg gaccgatcct      1380
tgacttaatc gcaccaatca ggcccttgca gctttgtgct gatgggggtt accagctgag      1440
attgaggagc cttgagggta cccctaatta tggccccga taagcaccaa ctatttccc      1500
caaaacacag atgatctttg caagtgtcct tcaatgtata aaataattta atgaagtata      1560
tcgatgatct gcaccataga aattagattt tattttaca attatattgc ttctatttg      1620
tttgagtcac ataaaattt gttattttta ttaattgtgt atttttatag ttgcttaatg      1680
acgcgttga tgaatttttc cttataaaa catcatgttt ttattctaaa taaaagtata      1740
taaaaaaagt tgatgtagcg ctcatgtgat tataaactaa cgataaagat tatgaattgc      1800
agcagataaa gactaacgac agtctacagt atgatcgata acctaacat cgttaggcct      1860
tgttcggttt gaattggatt gaggggtatt agagcggatt aaatcgaatt gttagggtaa      1920
gtagatccag acttaattga gccaacgtcg actagtctc tatagtttac acacggagac      1980
gtgacgcacg ttgtttttca ctaggtccag ccttaattgc ggcgacatcc agtactagta      2040
ctaatacact gtagttggca cacacggaga cgtgtatcac gttgttttat tatttcgaat      2100
catcatgctc aacctcgaca tcttattctt catgaggcgg cagttcgtct cccgctctat      2160
aaatagctgg cctgctcgt catccatcac tcactcactc actcattcac tcacacagca      2220
aataccaca gtcacacgca agaaccgaag atgttcgga acatcggaaa gatcccgatc      2280

```

그림 3-1-5. 본 연구에서 사용하는 옥수수 리폭시지나아제 유전자의 5'-untanslated region. translation start site (**atg**), transcription start site (**a**), 상처 감응 cis-element (**taacaat**), 메틸자스몬산 감응 cis-element (acgtg/cacgt)를 찾아볼 수 있다.

리폭시지나아제 5'-untranslated region의 sequence를 분석한 결과, 그림 3-1-5 에서와 같이 translation start site (atg), transcription start site (a), 상처 감응 cis-element (taacaat), 메틸자스몬산 감응 cis-element (acgtg/cacgt)를 발견할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 사용하고 있는 리폭시지나아제는 자스몬산 생합성 경로조작을 통한 광범위 스트레스 저항성 벼의 생산을 위한 유전자로서 매우 적합한 유전자임을 확신할 수 있었다.

제 2 절 알렌 옥사이드 합성효소 유전자의 구조 분석

1. 알렌 옥사이드 합성효소 유전자의 구조

가. 서언

본 연구의 대상인 벼의 알렌 옥사이드 합성효소 유전자와 형질 전환체에 도입할 예정인 Arabidopsis 또는 flax seed 의 알렌 옥사이드 유전자들을 확보하고 그들의 sequence를 검증하였다.

나. 재료 및 방법

이들 유전자들은 이미 알려진 유전자들로서 벼의 알렌 옥사이드 합성 효소 유전자는 전남대학교 백경환 교수로부터, Arabidopsis 의 알렌 옥사이드 합성 효소 유전자는 독일 Max Plank Institute 의 E. W. Weiler 박사로부터, 그리고 flax seed 의 유전자는 미국 Vanderbilt University 의 A. Brash 박사로부터 입수 하였다. 필요한 경우 컴퓨터 프로그램(ChloroP V1.1)을 통하여 chloroplast targeting sequence의 알려진 criteria를 적용하여 chloroplast transit peptide를 찾았다.

다. 결과 및 고찰

벼와 Arabidopsis, flax seed 의 알렌 옥사이드 합성효소 유전자 sequence 및 추정되는 단백질의 아미노산 sequence를 그림 3-2-1, 그림 3-2-2, 그림 3-2-3 에 각각 나타냈다. AOS-LOX fusion protein을 만들기 위해 사용된 Arabidopsis 알렌 옥사이드 합성효소 유전자(X92510)는 517개의 아미노산으로 되어 있고, N-terminal 에 21개의 chloroplast transit peptide를 갖고 있었다.

1 cccacgcgtccggaacgtgatcgatccaaagaacaacaactcggagcaaacgttagctaac
61 gaagttagttccaacaagctagcttatcgcgattagctagctagaagagagttagcta
121 ggcgccatggagctaggcgtgccactgccacgacggcccgtgcccggtagctacggcgtg
M E L G V P L P R R P V P G S Y G V 18
181 ccggtcgtctcggcgggtcgcgaccgcctcgatttctactacttgcaggggcaggacaag
P F V S A V R D R L D F Y Y L Q G Q D K 38
241 tacttcgagtcgcgccgagaggtacggctccaccgtcgtcgcgatcaacgtcccgcct
Y F E S R A E R Y G S T V V R I N V P P 58
301 ggcccattcattggcgcgacccccgcgtggtggcgtcctcgacgccaagagcttcccc
G P F M A R D P R V V A L L D A K S F P 78
361 gtcctcttcgacgtcgccaaggtcgagaagcgggacgtgttcaccggcacgttcattgccc
V L F D V A K V E K R D V F T G T F M P 98
421 tccacctcctcaccggcggctaccgcgtctgcgcctacctcgaccctccgagcccaac
S T S L T G G Y R V C A Y L D P S E P N 118
481 caccgcaagatcaagcagctgctcctttccctcctggctctctcgcaaggacgccttcgctc
H A K I K Q L L L S L L V S R K D A F V 138
541 ccggtcttcgcctccaacttcggcgcgtcctcgacaccgtccagtcgcagctcggcagc
P V F R S N F G A L L D T V Q S Q L A S 158
601 ggcgcgccaagtcgacttcaccgcctcaacgatgccacctccttcgagttcatcggc
G G G K S D F T A L N D A T S F E F I G 178
661 aaggcgtacttcggcgtcgtccctccgcgtcgagctccctcggcaccggcgggctcgac
K A Y F G V R P S A S S S L G T G G L D 198
721 caaggtcgcctgtggctcctatggcagctcgcgccgctcaccacgctcggcctgcccatg
Q G R L W L L W Q L A P L T T L G L P M 218
781 atcatcgaggatccgctcctccacacgctgccgctgccaccttctcatcagctccgac
I I E D P L L H T L P L P P F L I S S D 238
841 tacaaggcgtgtacgcgtacttcgcccggcggcgtcgcaggcgtcgcagccgccgag
Y K A L Y A Y F A A A A S Q A L D A A E 258
901 ggccctggcctgtcggggaggaggcctgccacaacctgctgttcgagcgggttcaac
G L G L S R E E A C H N L L F A T V F N 278
961 agctacggcggcttcaagctgctgctcccgcagatcctgtcgcgcgtcgcgcaggccggc
S Y G G F K L L L P Q I L S R V A Q A G 298
1021 gagaagctccaccgagaggctcgcggcggagatacgaagcgggtggcccagccggcggc
E K L H E R L A A E I R S A V A D A G G 318
1081 aacgtgacgtggccgctctggagaagatggagctgaccaggtcgggtggtgtgggaggcg
N V T L A A L E K M E L T R S V V W E A 338
1241 ctgcggtggaccgccggctcaggttccagtcggggcgcgccaaggccgacctggagatc
L R L D P P V R F Q Y G R A K A D L E I 358

1301 gagagccacgcgcgctcgttcgcatcaagaagggggagatgctgttcggctaccagccg
 E S H D A S F A I K K G E M L F G Y Q P 378
 1361 tgcgccaccaggaccgcccgggtgttcggcgccacggcgagggagttcgtcggcgaccgg
 C A T R D P R V F G A T A R E F V G D R 398
 1421 ttcgtcggcgaggaggggaggaagctgctgcaatacgtgtactggtcgaatggcgagag
 F V G E E G R K L L Q Y V Y W S N G R E 418
 1481 acggagaaccctagcgttgacaacaagcagtccccggcaagaacctgggtgctcgtc
 T E N P S V D N K Q C P G K N L V V L V 438
 1541 ggaaggctgttgctcgtcgcgactcttccctccggtacgacaccttcaccgccgaggccggc
 G R L L L V E L F L R Y D T F T A E A G 458
 1601 aaaaagggtggtcatcaccgggtcaccaaagcttcaacctccgccgtcaatcgtactgct
 K K V V I T G V T K A S T S A V N R T A 478
 1661 taagccggccatcacttcaggcgtgggtcgtcgcgatcatccactcaaccagctccgtccta
 *
 1721 cgcatatgcaataaagaatactcgtacctgaattcttgcatggctaaacactactaataa
 1781 gtgtatgtattctgtttatttggtcgattccatatttgtaatttggttgtattgtttgc
 1841 tgttgaattacgattgtgtattttacagggctgacagtgcttttaaacacctctaata
 1901 tatcggatc

그림 3-2-1. 벼의 알렌 옥사이드 합성 효소의 유전자 및 아미노산 sequence

1 ctcaatcacaacactcgccactgtttcgaatagatggcttctatttcaacccttttcg
 M A S I S T P F P 9
 61 atttctctccacccaaaaccgtacgatcaaagcgttgaaattccgagttttgaccggt
 I S L H P K T V R S K P L K F R V L T R 29
 121 ccgatcaaagcttccgggtcagaaactcctgatctaaccgtagcgacacgaaccggatcc
 P I K A S G S E T P D L T V A T R T G S 49
 181 aaagatctccgatccgaaacataccgggaaactacggtttaccaatcgtaggaccaatc
 K D L P I R N I P G N Y G L P I V G P I 69
 241 aaagaccgttgggattacttttacgaccaaggagctgaagagttcttcaaatcacgaatc
 K D R W D Y F Y D Q G A E E F F K S R I 89
 301 cgtaatacaactccacgggtgacagagtcaacatgccaccgggagcttttatcggcgag
 R K Y N S T V Y R V N M P P G A F I A E 109
 361 aatccacaagtgcgtggctttactcgacggtaaaagcttccgggttttatcgcgtcgcg
 N P Q V V A L L D G K S F P V L F D V D 129
 421 aaagtcgaaaagaaagatcttttaccggtaacttacatgccgtcaacggaactaacggga
 K V E K K D L F T G T Y M P S T E L T G 149
 481 ggctaccgtatcctctcgtacctcgatccatcggagcctaaacacgaaaagctcaaaaat
 G Y R I L S Y L D P S E P K H E K L K N 169

541 ctccctttcttctctcaagtcatctcgaaaccggatctccctgagtttcaagctact
L L F F L L K S S R N R I F P E F Q A T 189
601 tactccgagcttttctgattctttggagaaagaggctttccctttaagggaaagcggattt
Y S E L F D S L E K E A F P L R E S G F 209
661 cggcgggtccagcgacggaaccgccttttatttcttggtcagctttctacgggacgaa
R R F Q R R N R L L F L G S S F L R D E 229
721 tcccgagatacaagctcaaagccgacgctccgggttgatcactaaatgggttttattc
S R R Y K L K A D A P G L I T K W V L F 249
781 aatctccatccattactctctattgggttaccgagagttatagaagaacctctcatccat
N L H P L L S I G L P R V I E E P L I H 269
841 acatttagtctaccaccggcgttagtcaaattctgattaccagagactctacgagtttctt
T F S L P P A L V K S D Y Q R L Y E F L 289
901 agaatccgggtgagattctcgttgaagccgataaattgggtatctcagagaagaagct
R I R G E I L V E A D K L G I S R E E A 309
961 actcacaatcttctctcgccacgagcttcaacacggtgggtgggatgaagattttgttt
T H N L L F A T S F N T W G G M K I L F 329
1021 ccgaatatgggttaaactatcgggcccggcggatcaatcaagttcataaccgattagcggag
P N M V K R I G P G G H Q V H N R L A E 349
1081 gagattagatctgtgattaaatccaacggcggagaactcagatgggagcggattgagaaa
E I R S V I K S N G G E L T M G A I E K 369
1141 atggagtaaccaaatcagtggtttacgaatgtctccggtttgaaccaccggttacggct
M E L T K S V V Y E C L R F E P P V T A 389
1201 caatacggtagagcgaagaaggatctggttatcgaaagccacgacgcccggctttaaagtc
Q Y G R A K K D L V I E S H D A A F K V 409
1261 aaagccggtgagatgctttacggttatcaaccgttggcgacgagagatccgaagatttt
K A G E M L Y G Y Q P L A T R D P K I F 429
1321 gatcgggcccggatgagtttgtgccggagagatctcgtcggagaagaaggagagaagctttg
D R A D E F V P E R F V G E E G E K L L 449
1381 aggcgatgtgttgggtcgaatggaccggagacggagactccgacggtggggaataaacia
R H V L W S N G P E T E T P T V G N K Q 469
1441 tgcgccggaaggattttgtttgtttgggtggcagggtgtttgtgattgagattttccgg
C A G K D F V V L V A R L F V I E I F R 489
1501 cgatatgattcgtttgatattgaggttggtagctcgcggttaggaagctccgttaatttc
R Y D S F D I E V G T S P L G S S V N F 509
1561 tctcgttaaggaaagctagcttttaggagccaagggtaaatttgaattgtatatgttc
S S L R K A S F - 517
1621 gcacctgtgtagtccatctgttttctgttccagtttctgtaattttgagaaaatgttga
1681 taatctgttgcctctacatgttctgttttttgcataatataaagttcaagctggta
1741 ataagtatttacaaatctgtgagataatttcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

그림 3-2-2. Arabidopsis 알렌 옥사이드 합성 효소의 유전자 및 아미노산 sequence

1 ctctcccatatggtcgacctgcaggcggccgactagtgattatggcttctctgctctc
M A S S A L 5
61 aacaacttggtagcgtcaaccacaacacactctcccatcaccaaaatcaacaccacta
N N L V A V N P N T L S P S P K S T P L 25
121 ccaaacactttctccaacctcgcagagtctccgccttccgtcccattaaagcctctctc
P N T F S N L R R V S A F R P I K A S L 45
181 ttccggtgactctcctatcaaaatcccagggatcaccagccagccccctcttctccgat
F G D S P I K I P G I T S Q P P P S S D 65
241 gaaaccactctccctatccgcagattcctggagactacggtctccctggaattggacct
E T T L P I R Q I P G D Y G L P G I G P 85
301 atccaagatcgtctcgatfacttctacaaccaaggccggaagaattcttcaagtcaagg
I Q D R L D Y F Y N Q G R E E F F K S R 105
361 ctccagaaatcaagtaaccgtctacagagccaacatgcctcctggcccatctatcgct
L Q K Y K S T V Y R A N M P P G P F I A 125
421 tccaatcctogtgcctcctcctcgcagccaagagctttcctgtactcttcgacatg
S N P R V I V L L D A K S F P V L F D M 145
481 tccaaagtgcgagaaggatctctcactggaacttacctgccctctactgagctcacc
S K V E K K D L F T G T Y M P S T E L T 165
541 ggcggttacggtatcctctcctacctcgcaccctccgagcccaatcacaccaagctcaag
G G Y R I L S Y L D P S E P N H T K L K 185
601 caactccttttcaatctcattagaaccgccggatfacgctattcccgaattctcttcc
Q L L F N L I K N R R D Y V I P E F S S 205
661 tctttcaccgacctttgtgaggtcgttgaatcgcacttggctactaaagggaaagcagct
S F T D L C E V V E Y D L A T K G K A A 225
721 ttcaacgacccccggagcaagcagctttcaatttctctcagcgccttctcgggtgc
F N D P A E Q A A F N F L S R A F F G V 245
781 aagccgatcgacactcgttggggaagacgcgcgtccttgatttccaaatgggtcctc
K P I D T P L G K D A P S L I S K W V L 265
841 ttcaaccttgcctccattctcagcgtcggtttgcccaaagaggtggaggaagccactctc
F N L A P I L S V G L P K E V E E A T L 285
901 cactccgtacgcctcccgcgttgcctcgcagaacgatfaccaccgtctctacgaattc
H S V R L P P L L V Q N D Y H R L Y E F 305
961 ttcacctccgcccggatctgtgcttgacgagccgaacagtcgggatctcgcgggac
F T S A A G S V L D E A E Q S G I S R D 325
1021 gaagcttgcataaacatcctctcgcogtgtgttcaactcatggggagggttcaagatc
E A C H N I L F A V C F N S W G G F K I 345
1081 ctgttcccaagcctgatgaagtggatcgggcccagcagattggagctccacaccaagctg
L F P S L M K W I G R A G L E L H T K L 365
1141 gcacaagaatcagatccgcaatccaatcgacggggggagggaaagttacgatggcggcg
A Q E I R S A I Q S T G G G K V T M A A 385
1201 atggaacagatgcccgtgatgaagtctgtggtgtacgaaacgctcgtatcgagccgccc
M E Q M P L M K S V V Y E T L R I E P P 405
1261 gttcgcgtgcagtcagggaaggcgaagaaggatttcatactggaaagccagggcggcg
V A L Q Y G K A K K D F I L E S H E A A 425

```

1321 taccaggtgaaagaaggggagatgctgttcggataccaaccgttcgcgacaaaagaccog
    Y Q V K E G E M L F G Y Q P F A T K D P      445
1381 aagatattgaccgaccggaggagttcgtggcggaccggttcgtcggggaaggggtgaag
    K I F D R P E E F V A D R F V G E G V K      465
1441 ctgatggagtacgtgatgtggtcgaacgggcccggagacggagacgccgagcgtggcgaac
    L M E Y V M W S N G P E T E T P S V A N      485
1501 aagcagtgccgaggaaggatttcgtggtgatggcggcaaggctgtttgtggtggagctg
    K Q C A G K D F V V M A A R L F V V E L      505
1561 tttaaagggtaccgactcgtttgatattgaggtgggaacgtcgctcgctgggtgcttcaata
    F K R Y D S F D I E V G T S S L G A S I      515
1621 accttgacttcgcttaagaggtcaacgttttaatcccggccatggcgccnngagcat
    T L T S L K R S T F - 525
1681 gcgacggtggncccaaac

```

그림 3-2-3. flax seed 알렌 옥사이드 합성 효소의 유전자 및 아미노산 sequence

제 3 절 리폭시지나아제와 알렌 옥사이드 합성효소 유전자의 발현 기구

1. 상처에 대한 리폭시지나아제 유전자의 발현 기구

가. 서언

리폭시지나아제 유전자가 옥수수에서 유래된 것이므로 상처 스트레스에 대한 리폭시지나아제 유전자의 발현 양상을 옥수수의 싹에서 관찰하였다. 선별된 리폭시지나아제가 상처에 감응하는 리폭시지나아제 유전자이므로 상처 스트레스에 대하여 유전자의 발현이 유도될 것을 예상할 수 있으며, 상처스트레스에 대한 시간적인 발현 양상을 상세히 분석하고자 함이 본 실험의 주요 목적이었다.

나. 재료 및 방법

홍농종묘에서 구입한 옥수수 종자(Golden Cross Bantam 70)를 ethanol과 5% calcium hypochlorite 용액으로 소독한 후, 증류수로 씻고 물에 적신 Wattman paper에 놓고 27 °C에서 싹을 틔워 7 일동안 배양하였다. 배양된 옥수수의 싹에서 표준 방법에 따라 RNA를 추출하고 Northern 분석을 수행하였다.

다. 결과 및 고찰

리폭시지나아제 cDNA 의 유전자 sequence 로부터 확보된 putative 리폭시지나아제 cDNA가 리폭시지나아제 유전자임을 확인할 수 있었으므로 리폭시지나아제 cDNA를 probe로하여 상처와 같은 물리적 스트레스에 따른 리폭시지나아제 유전자의 발현 양상을 분석하였다. 그 결과 리폭시지나아제 cDNA가 스트레스에 의하여 발현이 유도됨을 확인하였으며((그림 3-3-1), 리폭시지나아제 효소의 활성화도 스트레스에 따라서 증가함을 확인함으로써 리폭시지나아제 cDNA가 스트레스에 감응함을 증명할 수 있었다. 본 연구에서 사용하고자하는 옥수수 리폭시지나아제 유전자를 probe로 하여 벼에서 상처 스트레스에 대한 유전자의 발현 양상을 시험하여 보았으나 예상한 바와 같이 발현을 관찰할 수 없었다. 이러한 결과는 옥수수의 리폭시지나아제 유전자를 도입하여 만들어지는 형질 전환 벼에서 벼에 존재하는 endogeneous 리폭시지나아제의 발현과 도입된 리폭시지나아제 유전자의 발현을 분리하여 분석할 수 있다는 실험적 증거이다.

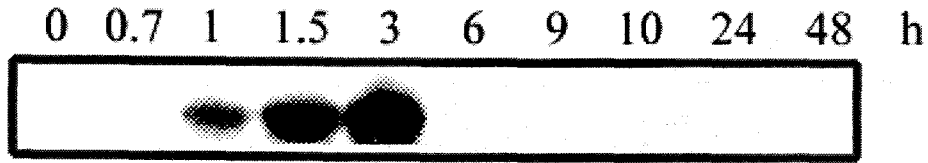


그림 3-3-1. 상처 스트레스에 따른 리폭시지나아제 유전자의 발현 양상

2. 메틸자스몬산 처리에 대한 리폭시지나아제 유전자의 발현 기구

가. 서언

자스몬산의 생합성 경로에 존재하는 리폭시지나아제와 알렌 옥사이드 합성 효소를 조작하여 자스몬산의 생합성을 조절함으로써 광범위 스트레스 저항성 벼를 생산하기 위해서는 자스몬산의 처리에 대하여 이들 유전자의 발현이 어떻게 조절되는지를 분석하여야 한다. 본 실험에서는 메틸자스몬산을 처리하고 리폭시지나아제 유전자의 발현 양상을 분석하였다.

나. 재료 및 방법

홍농종묘에서 구입한 옥수수 종자(Golden Cross Bantam 70)를 ethanol과 5% calcium hypochlorite 용액으로 소독한 후, 증류수로 씻고 물에 적신 Wattman paper에 놓고 27 °C에서 싹을 틔워 7 일동안 배양하였다. 배양된 옥수수의 싹을 11 liter의 bell jar에 옮기고, 132 ul의 메틸자스몬산 stock (10% ethanol 용액)을 bell jar의 천정에 매달아서 메틸 자스몬산을 처리하였으며, 표준 방법에 따라 RNA를 추출하고 Northern 분석을 수행하였다.

다. 결과 및 고찰

자스몬산처리에 따른 리폭시지나아제 유전자의 발현은 시간에 따른 이중상 발현 양상을 보임을 알 수 있었다 (그림 3-3-2). 이러한 이중상 발현 양상은 메틸자스몬산이 리폭시지나아제 유전자의 발현에 있어서 feed-forward regulation하고 있음을 시사하고 있다.

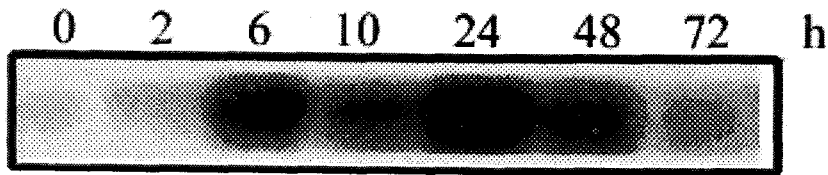


그림 3-3-2. 메틸 자스몬산의 처리에 따른 리폭시지나아제 유전자의 발현 양상

3. 알렌 옥사이드 합성효소 유전자의 발현 기구

가. 서언

알렌 옥사이드 합성 효소의 유전자는 제2절 1 항에서 기술한 바와 같이 벼의 알렌 옥사이드 합성 효소가 알려져 있으므로 벼의 알렌 옥사이드 합성 효소를 probe로하여 벼의 endogeneous한 알렌 옥사이드 합성 효소 유전자의 발현 양상을 분석하였다.

나. 재료 및 방법

낙동벼 종자를 표준 방법에 따라 소독하고 싹을 틔운 후 30일 동안 배양하였다. 배양된 벼의 잎에서 RNA를 추출하고 Northern 분석을 수행하였다.

다. 결과 및 고찰

그림 3-3-3 에서와 같이 벼의 endogeneous한 알렌 옥사이드 합성효소 유전자는 메틸자스몬산 처리에 의하여 발현이 유도됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 알렌 옥사이드 합성효소 유전자도 리폭시지나아제 유전자와 같이 자스몬산에 의하여 feed-forward regulation 받고 있음을 시사하고 있다.

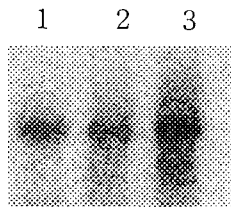


그림 3-3-3. 알렌 옥사이드 합성효소 유전자의 발현 기구. 1: leaf, 2: ethanol 처리
3: 메틸자스몬산처리.

제 4 절 리폭시지나아제 유전자와 알렌 옥사이드 합성효소 유전자의 연결

1. 리폭시지나아제 유전자와 알렌 옥사이드 합성효소 유전자의 연결

가. 서언

리폭시지나아제와 알렌옥사이드 합성효소는 다양한 물질의 생합성 경로로 유입되는 불포화 지질 분자를 자스몬산 생합성 경로로 유도할 수 있는 주요 효소이다. 따라서 본 연구에서는 리폭시지나아제 유전자와 알렌옥사이드 합성효소 유전자를 연결시킨 유전자를 제작하고 연결된 유전자를 이중 발현시켜서 불포화 지질 분자를 자스몬산 생합성 경로에 도입시키고자 시도하였다. 두 유전자를 연결시키는 방법에 있어서 본 연구에서는 아미노 말단 부분에 알렌옥사이드 합성효소를 위치시키고 리폭시지나아제를 카르복실 말단에 위치시키고자 하였다. 두 유전자의 연결 부분에 linker peptide를 encode 하는 유전자를 고려할 수도 있으나 본 연구에서는 산호의 연결 유전자를 참고하여 linker를 생략하기로 하였다. 또한 연결된 유전자가 올바른 활성을 지니는 단백질을 생산할 수 있는 지 확인하기 위하여 대장균에서의 이중 발현을 시도 하였다.

나. 재료 및 방법

리폭시지나아제와 알렌 옥사이드 합성효소를 연결하기 위하여 알렌 옥사이드 합성효소의 종결코돈인 TAG를 GAATTC(EcoRI)로 변형시켜 이를 포함한 프라이머와 리폭시지나아제의 시작코돈 앞부분에 GAATTC를 포함한 프라이머를 제작하고 각각 알렌 옥사이드 합성효소와 리폭시지나아제의 내부의 프라이머를 이용하여 변형된 짧은 DNA 단편을 PCR하여 얻었다. 이렇게 변형된 EcoRI site를 이용하여 알렌 옥사이드 합성효소의 뒷부분에 리폭시지나아제를 연결하였다. 단백질 발현 벡터인 pRSETB (Invitrogen co. USA)에 클로닝된 알렌 옥사이드 합성효소-리폭시지나아제 fusion gene을 *E.coli* BL21-Gold(DE3)pLysS (Stratagene co. USA)에 형질전환 시킨 후 단일 콜로니로부터 플라스미드를 분리하여 BamH I과 EcoR I으로 잘라서 정확한 플라스미드가 도입된 것을 확인하였다. 확인된 단일 콜로니를 100 mg/L의 ampicillin이 들어있는 1 L의 LB broth에 접종하여 25 °C, 150 rpm에서 진탕배양 하면서 A600이 0.3일 때 80 mg의 δ -aminolevulinic acid (Sigma co. USA)를 넣고, 0.5일 때 238 mg의 IPTG (Sigma co. USA)를 넣어주었다. IPTG로 단백질

발현을 유도한 뒤 각 시간대별로 원심분리 (3,000 g, 4 °C, 15 분) 하여 세포들을 모았다. 모아진 세포들을 1 mL의 20 mM Tris · Cl, 1 mM EDTA, 0.2 mM PMSF에 재현탁하여 초음파 분쇄기로 깨뜨린 후 원심분리 (10,000 g, 4 °C, 1 시간)하여 상등액과 침전물을 분리하였다. 그리고, 적절한 단백질의 발현시간과 inclusion body의 생성여부를 알아보기 위해 SDS-PAGE를 수행하였다. 발현된 단백질의 효소활성은 2 mL의 50 mM sodium phosphate [pH7.6], 0.25 % Tween 20과 2.5 mM Linolenic acid에 위에서 준비된 단백질을 넣어주어 효소반응을 시작하였다. 효소반응은 실온에서 실시하였으며, UV spectrophotometer (Perkin Elmer UV/VIS spectrometer Lambda18)를 이용하여 234 nm에서 리폭시지나아제의 산물이자 알렌 옥사이드 합성효소의 기질로 사용되는 13-hydroperoxylinolenic acid의 변화량을 추적하였다. 그리고, 알렌 옥사이드 합성효소 domain의 독립적인 효소활성 측정은 먼저 위와 동일한 조건의 기질에 soybean 리폭시지나아제 (Sigma co. USA)를 이용하여 13-hydroperoxylinolenic acid의 생성이 일정한 수준에 도달했을 때 준비된 단백질을 넣어주어 그 감소량을 위와 동일한 방법으로 추적하였다.

다. 결과 및 고찰

1) 연결된 유전자의 확인

recombinant DNA를 갖고 있는 형질전환체에서 plasmid DNA를 추출하여 제한효소인 NcoI과 EcoRI 그리고 여러 제한 효소로 처리한 결과 N-terminal 쪽에 알렌 옥사이드 합성효소를 C-terminal 쪽에 리폭시지나아제를 갖고 있음을 확인하였다. 또한 PCR을 한 DNA 단편의 염기서열을 결정한 결과 변형시킨 유전자 외에는 변형이 되지 않았음을 확인하였다.

2) 대장균에서의 이종 발현 확인

단백질의 발현량을 시간대별로 조사한 결과 5시간에서 8시간 사이에서 가장 많은 AOS-LOX fusion protein (158 kDa)이 발현되었으며, 시간이 지날수록 단백질의 분해가 일어난다는 것을 확인할 수 있었다 (그림 3-4-1). 그러나 발현된 대부분의 단백질이 inclusion body를 형성하였으며, 형성된 inclusion body는 n-octylglucopyranoside, Tween-20, Emulphogene 등의 다양한 계면활성제에 의해서도 잘 녹지 않는다는 것을 확인하였다 (그림 3-4-2)

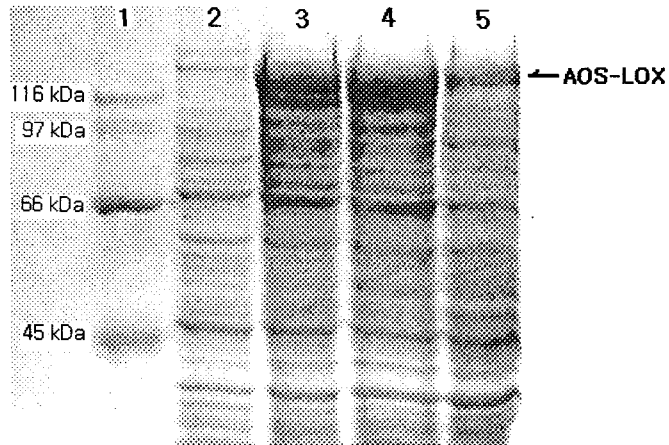


그림 3-4-1. AOS-LOX fusion protein의 시간대별 발현량. lane 1; size marker, lane 2; 단백질 발현 0 시간, lane 3; 단백질 발현 5 시간, lane 4; 단백질 발현 8 시간, lane 5; 단백질 발현 20시간에서의 전체 단백질.

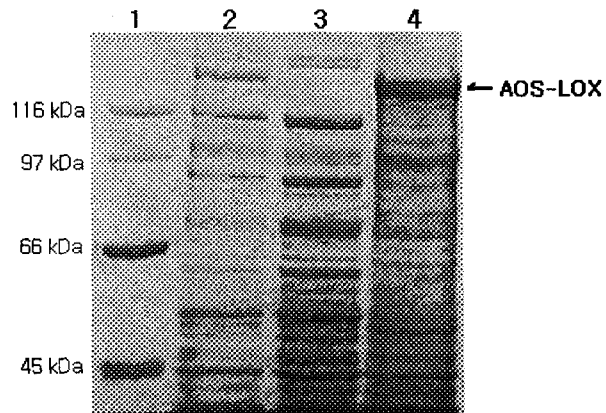


그림 3-4-2 : SDS-PAGE 사진 : inclusion body 생성 관찰
lane 1; size marker, lane 2; total cell protein, lane 3; soluble fraction, lane 4 insoluble fraction

3) AOS-LOX fusion protein의 효소활성 측정 결과

그림 3-4-2에서 관찰된 바와 같이 많은 양의 inclusion body가 형성되는 관계로 AOS-LOX fusion protein의 정제에는 많은 어려움이 있었다. soluble fraction을 이용하여 알렌 옥사이드 합성효소 domain에 대한 활성을 분석한 결과 (그림 3-4-3), 발현된 단백질들이 알렌 옥사이드 합성효소와 리폭시지나아제의 효소 활성을 각각 가지고 있을 것이라는 추정을 할 수 있었다.

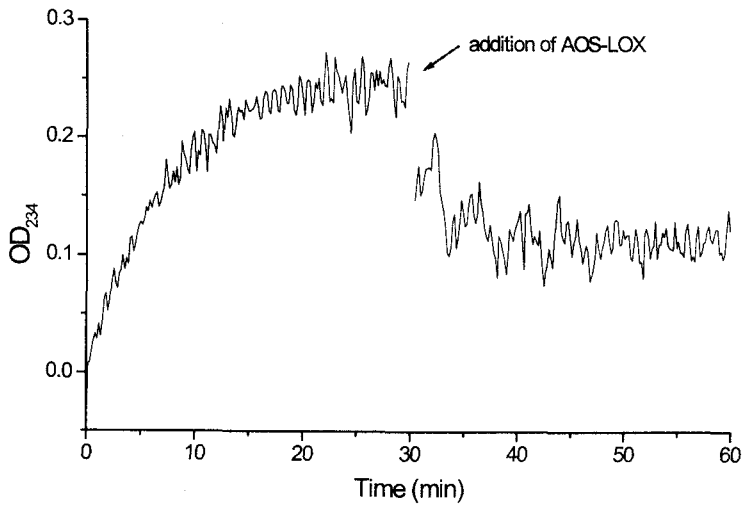


그림 3-4-3. 알렌 옥사이드 합성효소 domain의 효소활성을 나타내는 흡광도의 변화. 알렌 옥사이드 합성효소 domain의 활성을 234 nm에서 흡광도의 감소로 분석하였다.

제 5 절 유전자의 이중발현

1. 리폭시지나아제의 이중 발현

가. 서언

제1절에서 기술된 리폭시지나아제 유전자가 실제 단백질의 활성을 나타낼 수 있는 유전자인지 검증하기 위하여 리폭시지나아제 유전자를 대장균에서 이중 발현 시키고 발현된 단백질을 정제하여 특성을 규명하였다.

나. 재료 및 방법

1) 재조합 리폭시지나아제 유전자의 제조

옥수수 유래의 리폭시지나아제 유전자(pZL1/Lox)가 도입되어있는 *E. coli* 를 37 °C에서 배양한 후 alkaline lysis 방법이나 Plasmid DNA Purification kit (QIAGEN Co., USA)를 이용하여 리폭시지나아제 유전자를 얻었다. 발현벡터에 도입하기 위해 발현벡터 pRSETB와 리폭시지나아제 유전자에 각각 동일한 제한효소 (Bgl II, EcoR I) 를 처리하였다. T4 DNA ligase를 16 °C에서 20시간동안 처리하여 발현벡터와 리폭시지나아제 유전자를 연결하여 리폭시지나아제 유전자가 도입된 발현벡터를 만들었다. 발현에 적합한 균주인 *E. coli* BL21(DE3)pLysS를 0.1 M CaCl₂ 를 ice에서 10분간 처리하여 유전자가 도입되기 쉬운 상태로 만들었다. 만들어진 competent cell에 DNA를 첨가하여 42 °C에서 90초간 heat shock을 주어 리폭시지나아제 유전자를 도입하였다. 리폭시지나아제 유전자가 도입된 균주를 항생제 (Ampicillin)가 들어있는 LB 배지에 평판도말 한 후 37 °C에서 16시간동안 배양하였다. 항생제 저항성을 가진 발현벡터가 도입된 균주가 colony를 형성하면 이 colony 를 선택하여 리폭시지나아제 효소의 발현에 이용하였다.

2) 대장균에서의 리폭시지나아제 효소의 이중발현

발현벡터에 리폭시지나아제 유전자가 도입된 *E. coli* BL21(DE3)pLysS 균주를 적당한 항생제가 들어있는 LB 배지에 접종한 후 37 °C에서 overnight으로 seed culture하였다. 이 seed를 LB 배지에 1/50로 접종한 후 37 °C에서 optical density가 0.5가 될 때까지 배양한 후 1 mM IPTG를 첨가하여 15 °C에서 5-7시간 동안 발현을 유도하였다. 발현유도 1시간 이후부터 리폭시지나아제 효소의 발현이 확인되었고, 20시간이 지나면 리폭시지나아제 효소가 다소 분해됨을 확인하였다.

다. 결과 및 고찰

1) 리폭시지나아제 효소의 이중발현과 대량생산

15 °C에서 1 mM IPTG로 발현유도 시켰을 때 발현유도 2시간 이후부터 리폭시지나아제의 발현이 확인되었고, 20시간이 지난 후에도 발현이 유지되었다 (그림 3-5-1). 리폭시지나아제의 정제를 위해 Ni-column에 crude extract를 binding시킨 후 Imidazole gradient를 이용하여 elution 시켰을 때 350 mM imidazole에서 리폭시지나아제가 elution 되었다 (그림 3-5-2).

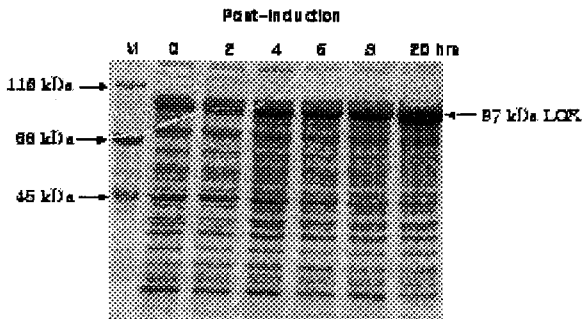


그림 3-5-1. SDS-PAGE 에 의한 리폭시지나아제 효소의 이중 발현 확인.



그림 3-5-2. Ni-column chromatography에 의한 리폭시지나아제의 정제. lane 1: crude extract, lane 2: 정제된 리폭시지나아제.

2. 벼 알렌 옥사이드 합성효소의 이종 발현 및 생산

가. 서언

제2절에서 기술한 벼의 알렌 옥사이드 합성효소 유전자가 실제 단백질의 활성을 나타낼 수 있는 유전자인지 검증하기 위하여 벼의 알렌 옥사이드 합성효소 유전자를 대장균에서 이종 발현 시키고 발현된 단백질 활성을 검증하였다.

나. 재료 및 방법

벼의 알렌 옥사이드 합성효소가 클로닝 되어있는 발현 벡터 pET28b를 *E. coli* strain BL21(DE3)에 도입하여 이종발현 및 알렌 옥사이드 합성효소의 생산에 이용하였다. 이 형질 전환된 *E. coli* BL21(DE3) strain을 항생제 kanamycin (30 ug/ml)이 미리 처리된 LB 배지 5 ml에 접종하여 37 °C에서 12 시간- 16 시간동안 진탕배양한 후, kanamycin이 첨가된 LB 배지 500 ml에 1/100로 재 접종하고 37°C에서 OD₆₀₀ = 0.3 까지 진탕배양한 후 δ-ALA(δ-Aminolevulinic acid) (8 ug/ml)를 첨가하고 OD₆₀₀ = 0.5에서 IPTG (1 mM)를 첨가하여 30 °C로 온도를 낮춘 뒤 7시간 동안 진탕배양하여 벼의 알렌 옥사이드 합성효소의 이종발현을 유도하였다. 알렌 옥사이드 합성효소의 활성은 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 2.5 mM 리놀렌산(50 mM sodium phosphate (pH 7.0), 0.25 % Tween 20)에 10 unit의 soybean 리폭시지나아제를 처리하여 벼 알렌 옥사이드 합성효소의 기질인 hydroperoxide가 생성되어 평형상태에 이르면 정제된 벼 알렌 옥사이드 합성효소를 첨가하여 30 °C에서 반응시켰다. UV-Vis spectrophotometer를 이용하여 234 nm에서 벼 알렌 옥사이드 합성효소의 활성을 확인하였다.

다 결과 및 고찰

1) 이종발현

형질전환된 *E. coli* BL21(DE3)를 30 °C에서 3 시간 동안 진탕배양한 결과 벼의 알렌 옥사이드 합성효소의 이종발현을 유도한지 1시간만에 벼의 알렌 옥사이드 합성효소가 발현됨을 알수 있었다 (그림 3-5-3)

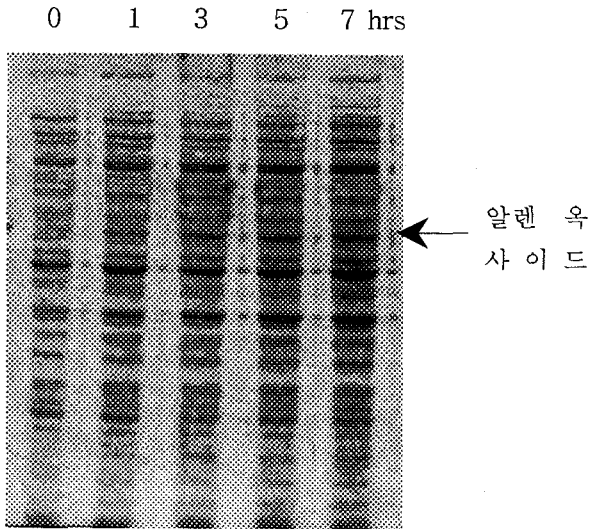


그림 3-5-3. 벼 알렌 옥사이드 합성 효소의 이종 발현

2) 이종 발현된 알렌 옥사이드 합성효소 활성의 검정

리놀렌산에 soybean 리폭시지나아제를 처리하여 생성된 conjugated diene의 생성과 벼 알렌 옥사이드 합성효소에 의한 conjugated diene의 소실을 234 nm에서 분광광도계를 이용하여 활성을 확인한 결과 벼 알렌 옥사이드 합성효소가 활성을 가지고 있음을 확인하였다(그림 3-5-4).

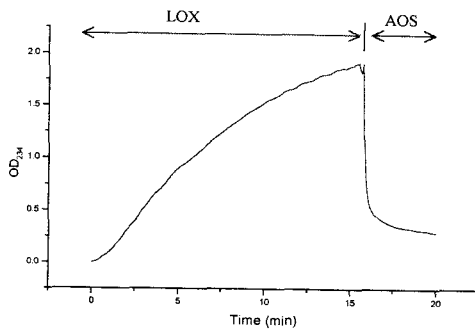


그림 3-5-4. 이종 발현된 알렌 옥사이드 합성 효소의 활성 검정. 리놀렌산과 soybean 리폭시지나아제를 사용하여 hydroperoxylinolenic acid를 제조한 후, 발현 정제된 알렌 옥사이드 합성효소를 첨가하여 234 nm에서의 흡광도 감소를 측정하였다.

3. Arabidopsis 알렌 옥사이드 합성 효소의 이중 발현 및 생산

가. 서언

제2절에서 기술한 Arabidopsis 유래의 알렌 옥사이드 합성효소 유전자가 실제 단백질의 활성을 나타낼 수 있는 유전자인지 검증하기 위하여 알렌 옥사이드 합성효소 유전자를 대장균에서 이중 발현 시키고 발현된 단백질 활성을 검증하였다.

나. 재료 및 방법

Arabidopsis 알렌 옥사이드 합성효소의 유전자(CYP74A)를 대장균에서 이중 발현 시키기 위해 6개의 His 잔기가 있는 pRSETB vector에 제한효소 NcoI과 EcoRI으로 도입 시키고, 42℃에서의 열충격을 이용하여 대장균 BL21(DE3)에 형질 전환 시키고 Ampicillin이 첨가된 5 ml의 LB 액상 배지에 접종하여 37 ℃에서 overnight으로 진탕배양한 후 Ampicillin이 첨가된 500 ml의 LB 액상 배지에 1/100 로 희석하여 37 ℃에서 진탕배양하여 A₆₀₀에서의 값이 0.5가 될 때 온도를 25 ℃로 내리고 δ-ALA(δ-Aminolevulinic acid)와 IPTG를 각각 1 uM과 1 mM이 되게 넣고 25 ℃에서 22시간 동안 진탕배양하고 원심분리하여 cell pellet를 얻어냈다. n얻어진 cell pellet은 sonication을 통하여 cell을 파괴하고 3,000 Xg에서 원심분리하여 cell debris와 supernatant를 분리하고, 그 supernatant는 100,000 g에서 초원심분리하여 알렌 옥사이드 합성효소가 들어있는 pellet을 얻어내어, 그 pellet에 1.5 %의 Triton X-100R이 들어있는 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 현탁하여 얼음에서 30분간 반응시킨후 다시 100,000 g에서 초원심분리하여 Arabidopsis 알렌 옥사이드 합성효소가 들어있는 supernatant를 얻어냈다. 여기에서 얻어진 Arabidopsis 알렌 옥사이드 합성효소가 들어있는 supernatant는 Ni-column를 이용하여 정제를 시도하였다. 알렌 옥사이드 합성효소의 활성은 Linolenic acid를 Soybean 리폭시지나아제와 반응시켜 Arabidopsis 알렌 옥사이드 합성효소의 기질을 합성하여 사용하였으며 A₂₃₄에서의 흡광도의 변화를 이용하여 활성을 측정 하였다.

다. 결과 및 고찰

형질전환된 대장균에서 Arabidopsis 알렌 옥사이드 합성효소를 이중 발현 시킨결과 Arabidopsis 알렌 옥사이드 합성효소가 발현되었으나 다량의 inclusion body를 형성하였다. 그러나 1.5%의 Triton X-100R을 이용하여 soluble한 상태의

Arabidopsis 알렌 옥사이드 합성효소를 얻어낼수 있었다. 또한 1.5% Triton X-100R 이 들어있는 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 추출한 soluble한 Arabidopsis 알렌 옥사이드 합성효소는 A₂₃₄에서의 기질의 감소를 확인, 활성이 있는 것을 알수 있었다 (그림 3-5-5). 그러나 Ni-column을 통한 soluble한 Arabidopsis 알렌 옥사이드 합성효소의 분리는 용이하지 않았다.

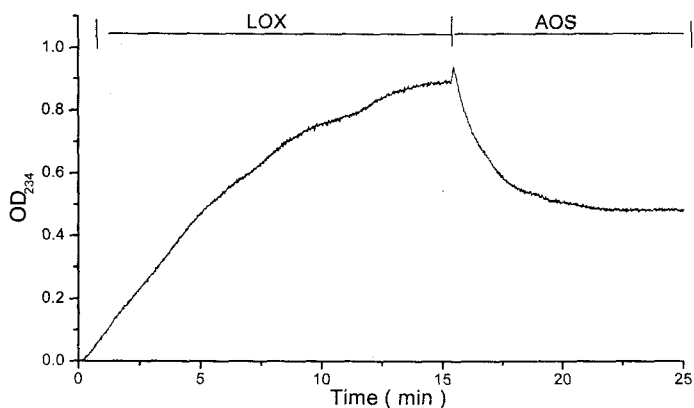


그림 3-5-5. 대장균에서 이중 발현된 Arabidopsis 알렌 옥사이드 합성효소의 활성 검정. 리놀렌산과 soybean 리폭시지나아제를 사용하여 hydroperoxylinolenic acid를 제조한 후, 1.5 % Triton X-100R을 이용하여 추출한 알렌 옥사이드 합성효소의 soluble fraction을 첨가하여 234 nm 에서의 흡광도 감소를 측정하였다.

제 6 절 리폭시지나아제의 반응 특성 규명

1. 리폭시지나아제의 정제 및 활성 검정

가. 서언

제1절 1항에서 기술된 리폭시지나아제의 효소적 특성을 보다 면밀히 알아보기 위하여 이중 발현된 리폭시지나아제 효소를 정제하였으며, 정제된 효소를 사용하여 kinetic property 등을 상세히 분석하였다. 이러한 정보들은 리폭시지나아제 유전자의 변이를 위하여 유용하게 사용될 수 있다.

나. 재료 및 방법

1) 리폭시지나아제 효소의 정제

대장균 BL21(DE3)pLysS 균주 내에서 발현된 리폭시지나아제 효소를 획득하기 위해 3,000 rpm, 4 °C에서 15분간 원심분리를 하여 균주를 모은 후 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.0)에 녹여 1 mM PMSF를 첨가한 후 0 °C에서 2 분간 세포를 초음파 파쇄시켜 crude 상태의 리폭시지나아제 효소를 추출하였다. crude 상태로 얻은 리폭시지나아제 효소를 Ni-column chromatography를 이용하여 정제하였다. 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.5) 로 equilibration 되어있는 Ni-column에 리폭시지나아제 효소를 결합시킨 후 0-500 mM imidazole (pH 6.0) 농도 기울기와 pH 차이를 이용하여 리폭시지나아제 효소를 정제하였다. 350 mM imidazole의 농도에서 리폭시지나아제 효소가 분획되었다.

2) 리폭시지나아제 효소의 반응속도 측정

리폭시지나아제 효소의 기질인 리놀렌산과 리놀레산을 사용하여 기질농도가 2.5 mM이 되게 각각 제조하였다. detergent인 Tween 20(0.5 ml)과 0.1 M Tris-HCl 완충액 (pH 7.0)(10 ml)를 잘 섞은 후 리놀렌산이나 리놀레산 160 ul를 방울방울 떨어뜨리면서 섞어주어 미세한 emulsion을 만들었다. 여기에 1 N NaOH(0.5 ml)를 첨가하여 투명해질 때까지 섞어준 후 90 ml의 0.1 M Tris-HCl 완충액 (pH 7.0)을 첨가하였다. 멸균증류수로 최종 부피를 200 ml로 만들었다. 리놀렌산이나 리놀레산 기질용액 3 ml에 적당량의 리폭시지나아제 효소를 첨가하여 30 °C에서 5 분간 반응시켰다. 반응이 진행되면서 생성되는 반응 산물인 conjugated diene의 양을 UV Spectrophotometer를 이용하여 234 nm에서 반응 0분부터 5분까지

초기의 흡광을 관찰하고, conjugated diene product의 molar extinction coefficient($\epsilon = 25,104 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 이용하여 리폭시지나아제 효소의 반응속도를 측정하였다. 발현벡터인 pRSETB만 발현유도시킨 후 얻은 상등액과 재조합 리폭시지나아제 효소 pRSETB/LOX를 발현유도 시켜 얻은 상등액의 각각의 활성을 비교한 결과 재조합 pRSETB/LOX로 부터 확실한 리폭시지나아제 활성을 확인하였다. 리폭시지나아제 효소의 Michaelis-Menten 상수를 측정하기 위해 기질로 리놀렌산과 리놀레산을 사용하였다. 반응은 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.0) 에서 기질 농도를 다양하게(0-7.5 mM) 하여 적당량의 리폭시지나아제 효소를 첨가하여 30 °C에서 각각 5 분간 반응시켰다. 반응이 진행되면서 생성되는 반응산물인 conjugated diene의 양을 UV Spectrophotometer를 이용하여 234 nm에서 반응 0 분부터 5분까지 초기의 흡광을 관찰하여 효소의 반응속도를 측정하였다.

다. 결과 및 고찰

리폭시지나아제 활성에 대한 pH의 효과를 관찰한 결과 Tween 20을 사용한 경우에는 linolenic acid에 대해서는 pH 6.4 에서, linoleic acid에 대해서는 pH 6.8 에서 최고의 활성을 나타내었다. Tween 20을 사용하지 않은 경우에는 linolenic acid와 linoleic acid에 대해서 모두 pH 6.8에서 최고의 활성을 나타내었다. 리폭시지나아제 에 대한 pH의 효과를 관찰하던 중 pH 5.6 이하의 낮은 pH 에서는 initial burst 현상이 관찰되었고, pH 6.4 이상의 pH 에서는 induction period가 관찰되었다. Lineweaver-Burk plot으로 Km값과 Kcat, Vmax등을 측정한 결과 Tween 20을 사용한 경우에는 linoleic acid에 대해서는 Km은 1.6 mM, Kcat은 830 min^{-1} , Vmax는 $0.094 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$ 이었고, linolenic acid에 대해서는 각각 2.2 mM, 61 min^{-1} , $0.0069 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$ 이었다. Tween 20을 사용하지 않은 경우에는 linoleic acid에 대해서는 Km은 0.11 mM 18 min^{-1} , Vmax는 $0.002 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$ 이었고, linolenic acid에 대해서는 각각 1.3 mM, 22 min^{-1} , $0.0024 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$ 이었다.

2. 리폭시지나아제의 positional specificity

가. 서언

리폭시지나아제는 다양한 종류의 positional specificity를 나타낸다고 알려져 있다. 리놀레산이나 리놀렌산을 기질로 하는 식물의 리폭시지나아제는 일반적으로 9-positional specificity나 13-positional specificity를 나타낸다. 그러나 자스몬산의 생합성 경로에는 13-positional specificity를 지닌 리폭시지나아제 만이 참여한다.

따라서, 본 연구에서 사용하는 리폭시지나아제의 positional specificity를 결정함으로써 본 연구에서 사용하는 리폭시지나아제가 벼에 도입될 경우 자스몬산 생합성 경로외에도 영향을 줄 것 인지 알아보기 위하여 리폭시지나아제 반응의 positional specificity를 결정하였다.

나. 재료 및 방법

기질로써 리놀레산과 리놀렌산을 50 mM sodium phosphate 완충액 (pH 7.0)와 0.25 % Tween-20에 최종 2.5 mM이 되게 녹인 후, 이 기질용액 500 μ l에 0.5 μ g의 정제된 리폭시지나아제를 넣고 상온에서 30 분간 반응시켰다. 반응의 중단과 리폭시지나아제 반응 산물의 hydroperoxide의 환원을 위해서 소량의 sodium borohydride를 넣고 얼음에서 15분간 반응시킨 후 1 M HCl을 이용하여 반응용액의 pH를 3으로 낮춘 후, 반응용액과 동일 부피의 CHCl_3 과 잘 섞은 후 CHCl_3 층을 회수하고, 동일 부피의 증류수로 씻은 후 다시 CHCl_3 층을 회수하여 HPLC 분석 시료로 사용하였다. HPLC column은 Shimazu CLC-ODS (250 x 4 mm, 5 μ m particle size)를 사용하였으며, 용매로는 methanol/water/acetic acid (80:10:0.1, v/v)을 사용하였고 flow rate는 1 ml/min으로 하였다. 13-positional specificity를 보여주는 soybean의 리폭시지나아제를 control로 사용하였다.

다. 결과 및 고찰

리폭시지나아제 반응 산물의 HPLC분석결과 (그림 3-6-1)로 볼때, 13-hydroperoxylinolenic acid와 9-hydroperocylinolenic acid가 6:4 로 형성됨을 확인하였다. 이러한 결과는 제1절 1항에서 기술된 리폭시지나아제의 phylogenetic tree 분석 결과와 잘 일치하고 있다. 따라서, 본 연구에서 사용하는 리폭시지나아제는 리놀렌산을 기질로하였을 때, 9과 13의 dual positional specificity를 나타내는 독특한 특성을 지녔으며, 이러한 dual positional specificity는 광범위한 스트레스 저항성 벼의 생산을 위하여 유용하게 사용될 수 있음을 증명하고 있다.

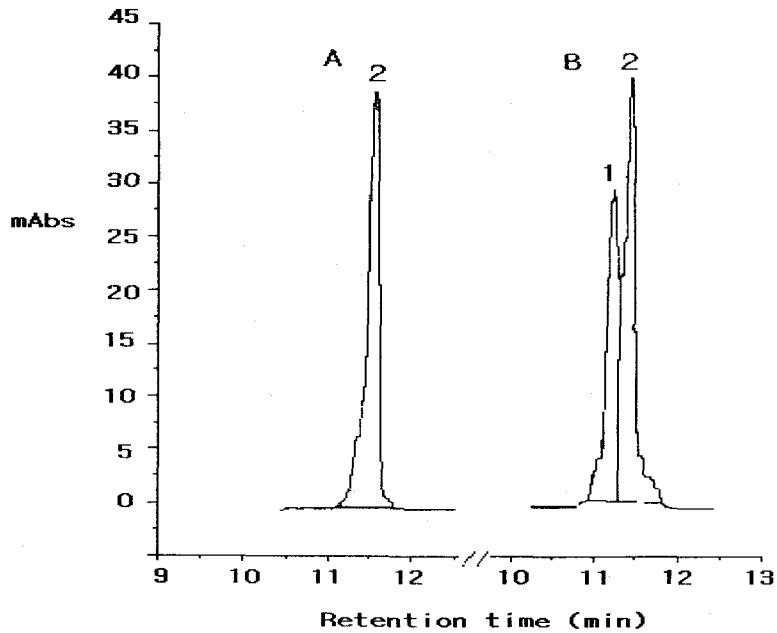


그림 3-6-1. RP-HPLC 에 의한 리폭시지나아제 반응의 positional specificity 결정. A: soybean 리폭시지나아제 에 의하여 생성된 13-hydroperoxylinolenic acid, B: 옥수수의 리폭시지나아제에 의하여 생성된 13-hydroperoxylinolenic acid 와 9-hydroperoxylinolenic acid의 혼합물. peak 1: 9-hydroperoxylinolenic acid, peak 2: 13-hydroperoxylinolenic acid,

3. 리폭시지나아제의 반응산물 구조 분석

가. 서언

그림 3-6-1의 RP-HPLC 실험에서 에서 관찰된 peak 1과 peak 2 가 실제 9-hydroxylinolenic acid 와 13-hydroxylinolenic acid 인지 확인하기 위하여 GC-MS 분석을 수행하였으며, 얻어진 mass spectra로부터 구조를 유추하는 연구를 수행하였다.

나. 재료 및 방법

기질로써 리놀레산과 리놀렌산을 50 mM sodium phosphate 완충액 (pH 7.0)와 0.25 % Tween-20에 최종 2.5 mM이 되게 녹인 후, 이 기질용액 500 μ l에 0.5 μ g의 정제된 리폭시지나아제를 넣고 상온에서 30 분간 반응시켰다. 반응의 중단과 리폭시지나아제 반응 산물의 hydroperoxide의 환원을 위해서 소량의 sodium borohydride를 넣고 얼음에서 15분간 반응시킨 후 1 M HCl을 이용하여 반응용액의 pH를 3으로 낮춘 후, 반응용액과 동일 부피의 CHCl_3 과 잘 섞은 후 CHCl_3 층을 회수하고, 동일 부피의 증류수로 씻은 후 다시 CHCl_3 층을 회수하여 GC-MS 분석에 사용하였다. 위에서 준비된 시료로 부터 CHCl_3 을 완전히 날린 후 20 μ L의 trimethylsilyl chloride를 넣고 85 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5 분간 반응시킨 후 1 μ l의 반응용액을 GC-MS로 분석하였다. GC column은 Rtx-1(0.32 mm X 30 m)을 사용하며, injector와 detector의 온도는 각각 240 $^{\circ}\text{C}$, 그리고 column의 온도 조건은 80 $^{\circ}\text{C}$ --> 180 $^{\circ}\text{C}$ (20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$), 180 $^{\circ}\text{C}$ --> 200 $^{\circ}\text{C}$ (3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$), 200 $^{\circ}\text{C}$ (34 min), 200 $^{\circ}\text{C}$ --> 270 $^{\circ}\text{C}$ (14 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$), 270 $^{\circ}\text{C}$ (10 min)로 하여 남아있는 기질과 반응산물 모두를 분리시키고, gas chromatography상에서 분리된 peak들은 electron impact mode (70 eV)로 mass를 분석하여 리폭시지나아제 반응 산물의 구조를 분석하였다.

다. 결과 및 고찰

Gas Chromatography 분석 결과 13(S)-hydroxylinolenic acid의 retention time은 18.56분 이었으며, 9(S)-hydroxylinolenic acid의 retention time은 18.81분 이었다. 이들 화합물의 MS spectra는 예상되는 fragmentation 양상과 잘 일치하였으며, HPLC 실험에서 분리된 리폭시지나아제의 반응 생성물이 13(S)-hydroperxylinolenic acid 와 9(S)-hydroperxylinolenic acid 임을 증명하여 주었다. Peak area에 의한 두 isomer의 생성비율 산출을 시도했으나, 반응조건에 따른 생성비율의 변화와 반응물 추출 후 고온에서의 trimethylsilylation과정 및 GC 수행과정에서 오는 변화들 때문에 두 isomer의 분리 외에 생성비율 등의 산출은 어려웠다.

제 7 절 형질 전환체의 생산

1. 옥수수의 리폭시지나아제와 Arabidopsis의 알렌옥사이드 합성효소 유전자를 이용한 형질전환 벼의 생산

가. 서언

제 1 절에서 기술된 옥수수의 리폭시지나아제와 제2절 2항에서 기술된 Arabidopsis의 알렌옥사이드 합성효소 유전자를 이용하여 형질 전환 벼를 생산하기로 하였다. 옥수수의 리폭시지나아제는 제6절에서 기술한 바와 같이 dual positional specificity를 나타내므로 9-LOX pathway와 13-LOX pathway를 다 같이 촉매하여 다양한 종류의 스트레스에 저항성을 줄 수 있다는 유익한 점이 있으며, Arabidopsis의 알렌옥사이드 합성효소 유전자는 chloroplast targeting sequence를 지니고 있어서 도입되는 알렌옥사이드 합성효소 유전자를 chloroplast로 targeting 할 수 있다는 장점이 있다. 따라서 본 연구에서는 리폭시지나아제, 알렌 옥사이드 합성효소, TP-알렌 옥사이드 합성효소 유전자를 적절히 변형하여 pCAMBIA1201 벡터에 삽입하고 각각 벼에 도입하여 형질전환 벼를 육성하였다.

나. 재료 및 방법

1) 벼의 형질전환

가) callus 배양

조심스럽게 껍질을 벗긴 벼 종자를 70% EtOH 에서 5 분간 0.2% Lax(3):H₂O(2):0.05% of TritonX-100(2) 에서 40 분간 소독하고, 증류수로 6번 씻어냈다. 소독된 종자를 멸균된 여과지에 올려 물기를 제거하고 25~26℃의 암상태에서 2N6 medium 에 배양하였다. 4주후 scutella로부터 유도된 calli를 2N6 medium에 subculture 하고 25~26℃의 암상태에서 2N6 medium 에 4일동안 배양한다. 활발하게 성장하고 있는 callus를 선별하여 transformation에 이용하였다.

나) cocultivation

1~2mm정도 Calli를 옮긴 다음날 *A.tumefaciens* cell culture를 실시한다. *A.tumefaciens*(with pCAMBIA-Lox gene)는 YEP medium(with 50 mg/l chloramphenicol)에서 28 °C, 3일 동안 키웠다. *Agrobacterium*을 원심분리로 down

시킨 후 AAM medium(containing 100 μ M acetosyringone)을 첨가하여 OD값이 0.8~0.9되게 하였다($3\sim5\times 10^9$ cell/ml). 준비된 callus를 적절한 박터를 포함한 *Agrobacterium* 과 혼합된 AAM배지에 30분 정도 배양하여 filter paper가 깔린 2N6-AS배지에 callus만 치상하여 25~6 $^{\circ}$ C darkness에서 3일 동안 incubation하였다(co-culture). Co-cultivation후 250 mg/l cefotaxime농도로 들어있는 멸균증류수 4 l 로 *Agrobacterium*을 씻어낸 후 2N6-cefotaxime medium에 25~6 $^{\circ}$ C, 암 상태로 3일 동안 배양하였다

다) selection 및 분화 유도

selection 하기 위해 2N6-CH medium으로 옮기고, 4주 동안 배양하되 2주마다 fresh media로 transfer하여 배양하였다. 2N6-CH medium에서 증식하는 callus들은 2주가 지나면서부터 보이기 시작하면, 이들을 모아서 분화를 유도하였다.

라) regeneration

2N6-CH medium에서 증식하는 callus를 MS/CG-CH medium에 옮겨 1주 동안 배양하고 MS-CG medium에서 배양한 callus를 Regeneration medium(MS/SI-CH medium)에 옮겨 25 $^{\circ}$ C, continuous illumination (약 2000 lux) 조건에서 배양하였다. Shooting이 생성된 형질 전환체에 rooting를 유도하고 더 키우기 위해 MS/RI-CH medium에서 배양하였다.

마) 형질 전환체의 재배

성숙한 형질 전환체를 흙으로 옮겨 10일 동안 습도 100%인 곳에서 배양하여 흙에 적응시켰다. 적응된 형질 전환체를 화분으로 옮긴 후 온실에서 배양하여 seed를 얻었다.

다. 결과 및 고찰

1) 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질전환 벼 생산

낙동벼 씨앗에서 유도된 callus에 옥수수 리폭시지나아제 유전자를 삽입시켜 식물 호르몬과 항생제가 첨가된 배지에서 형질전환 세포를 선별하고 재분화시킨 결과 총 5개 (1A~5A)의 형질전환 개체를 얻었다. 5개의 형질전환 개체를 화분으로 옮겨 온실에서 씨앗을 얻을때까지 재배하여 1A에서 308개, 2A 4개, 3A 31개, 그리고 4A에서 3개의 씨앗을 얻었다.

2) 알렌 옥사이드 합성효소 유전자가 도입된 형질전환 벼 생산

Chloroplast targetting sequence를 제거시킨 Arabidopsis의 알렌 옥사이드 합성효소 유전자를 위의 방법과 같이 형질전환하여 총 9개 (1B~9B)의 형질전환 개체를 얻었다. 9개의 형질전환 개체를 온실에서 재배하여 1B에서 16개, 2B 25개, 4B 55개, 5B 54개, 6B 6개, 그리고 7B에서 105개의 씨앗을 얻었다.

3) TP-알렌 옥사이드 합성효소 유전자가 도입된 형질전환 벼 생산

Chloroplast targetting sequence를 가지고 있는 Arabidopsis의 알렌 옥사이드 합성효소 유전자를 위의 방법과 같이 형질전환하여 총 13개 (1C~13C)의 형질전환 개체를 얻었다. 13개의 형질전환 개체를 온실에서 재배하여 2C에서 35개, 3C 15개, 5C 85개, 6C 12개, 그리고 8C에서 13개의 씨앗을 얻었다.

4) 수정율 및 종자 수확율

리폭시지나아제, 알렌 옥사이드 합성효소, 그리고 TP-알렌 옥사이드 합성효소 유전자가 삽입된 형질전환 27 개체중 15개체 (56 %)에서만 수정이 일어나 씨앗을 맺었다. 전체적으로 형질전환된 개체에서 불임율이 44 %정도 나타났고, 수정이 일어난 개체라 할지라도 씨앗 수확율은 wild type에 비하여 현저하게 떨어졌다.

제 8 절 형질전환 벼의 분석

1. southern, northern, SDS-PAGE에 의한 형질 전환 벼의 분석

가. 서언

제 7 절에서 생산된 형질 전환 벼의 T0 또는 T1 세대의 각 개체에 대하여, southern 분석을 통하여 도입된 유전자의 존재 여부 및 copy 수를 확인하였고, northern 분석을 통하여 도입된 유전자의 전사를 확인하였으며, SDS-PAGE를 통하여 도입된 유전자의 단백질 발현을 확인하였다.

나. 재료 및 방법

1) 식물체 재료

낙동벼로부터 유도된 calli와 옥수수의 리폭시지나아제 유전자가 도입된 *Agrobacterium tumefaciens* (LBA 4404)를 동시배양하여 얻은 T0 형질전환 낙동벼 1A, 2A, 3A, 그리고 4A에서 씨앗을 얻은 후 잎을 잘라 -70 °C에 보관하여 T0 형질전환 낙동벼 분석 실험에 사용하였다. T0 다음 세대인 T1 분석을 위해 T0 중 1A와 3A에서 얻은 씨앗들을 이용하였다. T1 시료들을 얻기 위해 1A와 3A 씨앗 껍질들을 제거하여 70 % 에탄올에 3분, 2 % 락스로 30분, 그리고 멸균 증류수로 5번 정도 씻어 소독하였다. 소독된 씨앗들을 50 mg/l hygromycin이 첨가된 1/2 MS 배지에 치상시켜 28 °C에서 16시간 동안 빛에 그리고 8시간 암에 노출 시키며 발아를 유도하였다. 2주 후 발아된 T1들을 흙에 5일 동안 적응시켜 화분으로 옮기고 온실에서 씨앗을 얻을 때까지 배양하였다. 알렌 옥사이드 합성효소 유전자와 TP-알렌 옥사이드 합성효소 유전자에 대하여서도 동일한 방법으로 육성된 T0 형질 전환 벼를 사용하였다.

2) PCR 분석을 통한 유전자의 도입 확인

T0 형질전환 낙동벼 1A, 2A, 3A, 그리고 4A에 옥수수 리폭시지나아제 유전자가 도입되었는지 알아보기위해 -70 °C에 보관 중인 샘플로부터 0.1 g을 취해 액체 질소를 이용하여 막자 사발로 잘게 갈아 QIAGEN Plant miniprep kit (QIAGEN)의 manual에 따라 genomic DNA를 각각 추출하여 이들을 PCR 반응의 주형으로 사용하였다. 옥수수 리폭시지나아제 서열내 +902 bp에서 Forward primer

(5-AGC CCG GCG AGT TCG ACT CC-3)를 그리고 +2111 bp에서 Reverse primer (5-TGA GGA AGA ACT CGG AGG CG-3)를 각각 제작하였다. PCR 반응은 94 °C 5분 후 94 °C 30초, 58 °C 30초, 그리고 72 °C 1분간 30회 반복하였고 마지막으로 72 °C에서 6분간 반응시켰다. PCR 산물은 전기영동을 실시하여 확인하였다. 알렌 옥사이드 합성효소 유전자와 TP-알렌 옥사이드 합성 효소 유전자를 이용하여 육성된 T0 형질 전환 벼에 대해서도 적절한 PCR primer를 사용하여 동일한 방법으로 분석하였다.

3) Southern 분석을 통한 형질전환 낙동벼 분석

T0 형질전환 낙동벼 southern 분석을 위해 -70 °C에 보관 중인 1A, 2A, 3A, 그리고 4A에서 0.4 g씩 취했고, T1 형질전환 낙동벼 분석을 위해서 온실에서 4주정도 자란 1A의 T1 (1A2, 1A3, 1A5, 1A6, 1A7, 1A8)들 앞으로부터 각각 0.4 g씩 얻었다. 각각 얻은 샘플 0.4 g을 액체질소를 이용하여 막자 사발로 잘게 간 후 멸균된 test tube에 0.1 g씩 나누어 담아 -70 °C에 저장하여 genomic DNA를 추출하고자 할때 하나씩 꺼내 사용하였다.

Genomic DNA는 QIAGEN Plant miniprep kit (QIAGEN)를 이용하여 추출하였다. 추출된 genomic DNA 는 Hind III 제한 효소로 완전히 절단하여 0.7 % agarose gel에 전기영동 후 capillary 방법으로 DNA를 gel에서 nylon membrane (HybondTM-NX, Amershan Pharmacia Biotech, UK)으로 이동시켰다. UV crosslinker (Bio-Link BLX-25A, Vilber Lourmat. com)로 membrane에 DNA를 고정시켰다. 혼성화 병에 10 ml prehybridization solution (7 % SDS, 10 mM EDTA, 0.25 M Na₂HPO₄, 0.1 g BSA)과 DNA가 흡착된 membrane를 넣고 60 °C에서 3~5시간 진탕시켰다. 옥수수의 리폭시지니아제 cDNA를 Nco I과 Bam HI 제한 효소로 절단한 단편(953 bp)을 주형으로하여 얻은 P³²-CTP로 표기된 probe를 혼성화 병에 첨가하여 12시간이상 혼성화 시켰다. 세척액 (2 X SSC, 0.1 % SDS)으로 60 °C에서 15분간 2번 그리고 새로운 세척액 (0.2 X SSC, 0.1 % SDS)으로 60 °C에서 20분간 geiger counter로 background가 거의 없어질 때까지 씻은 후 2 X SSC에 적신 3 MM paper 위에 membrane을 올려놓고, wrap으로 싸 후 감광판에 24시간 동안 암실에서 노출시켜 phosphoimager로 signal을 검출하였다. 알렌 옥사이드 합성효소 유전자와 TP-알렌 옥사이드 합성효소 유전자를 이용하여 육성된 T0 형질 전환 벼에 대해서도 동일한 방법으로 분석하였다.

4) Northern 분석을 통한 도입된 유전자의 전사 분석

전체 RNA를 추출하기 위해 -70 °C에 보관 중인 T0 형질전환 낙동벼 1A, 2A, 3A, 그리고 4A 앞으로 부터 0.4 g씩 취했다. T1 형질전환 낙동벼 분석을 위해

서 온실에서 4주정도 자란 1A의 T1 (1A2, 1A3, 1A5, 1A6, 1A7, 1A8)들 잎으로부터 각각 0.4 g씩 얻었다. 각각 얻은 샘플 0.4 g을 액체질소와 DEPC처리된 막자 사발로 잘게 간 후 멸균된 test tube에 0.1 g 씩 나누어 담아 -70 °C에 저장하여 전체 RNA를 추출하고자 할때 하나씩 꺼내 사용하였다.

전체 RNA는 TRI Reagent(Molecular Research Center, Cincinnati)를 이용하여 분리 후 spectrophotometer로 정량하여 RNA 10 ug를 1.2 % formaldehyde RNA gel에 전기영동하였다. capillary 방법을 통해 RNA를 gel에서 nylon membrane으로 이동시켜 crosslinker로 RNA를 membrane에 고정시켰다. 혼성화 병에 10 ml prehybridization solution (7 % SDS, 10 mM EDTA, 0.25 M Na₂HPO₄, 0.1 g BSA)과 RNA가 고정된 membrane를 넣고 60 °C에서 3~5시간 진탕시켰다. 옥수수의 리폭시지나아제 cDNA를 Nco I과 Bam HI 제한 효소로 절단한 단편(953 bp)을 주형으로하여 얻은 P³²-CTP로 표기된 probe를 혼성화 병에 첨가하여 12시간 이상 혼성화 시켰다. 세척액 (2 X SSPE, 0.1 % SDS)으로 상온에서 5분간 1번 씻은 후 60 °C에서 geiger counter로 background가 거의 없어질 때까지 10 분 간격으로 씻었다. 2 X SSPE에 적신 3 MM paper 위에 membrane을 올려놓고, wrap으로 싸 후 감광판에 24시간 동안 암실에서 노출시켜 phosphoimager로 signal을 검출하였다. 알렌 옥사이드 합성효소 유전자와 TP-알렌 옥사이드 합성 효소 유전자를 이용하여 육성된 T0 형질 전환 벼에 대하여서도 동일한 방법으로 분석하였다.

5) SDS-PAGE분석을 통한 옥수수 리폭시지나아제 효소 발현 분석

-70 °C에 보관 중인 T0 형질전환 낙동벼 1A, 2A, 3A, 그리고 4A 잎과 온실에서 T1 형질전환 낙동벼 분석을 위해서 자란 1A의 T1 (1A1~19)들 19 개체로부터 씨앗을 수확한 후 잎을 잘라 액체질소에 얼려 -70 °C에 보관하였다가 액체질소와 DEPC가 처리된 막자 사발로 모두 잘게 간 후 멸균된 test tube에 담아 -70 °C에 저장하였다.

저장된 시료들을 0.3 g 씩 test tube에 나누어 담은 후 1 ml 단백질 추출용액 (25 mM Tris-HCl pH7.5, 0.25 % Tween 20, 15 ul Protease Inhibitor Cocktail, 1 % PVPP)을 각각 첨가하여 혼탁시켜 3분간 초음파 분쇄기로 sonication시킨 후 단백질을 추출하였다. 원심분리를 통하여 상층액을 취한 후 옥수수 리폭시지나아제 효소 발현 관찰하기 위해 SDS-PAGE를 수행하였다.

6) T1 형질전환 낙동벼에서 상처 반응에 따른 옥수수 리폭시지나아제 효소 발현 분석

온실에서 8주 정도 지난 T1 1A2 형질전환 낙동벼 잎에 핀셋으로 일정한 간격으로 상처를 가한 후 0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 그리고 48 h

후 0.3 g 씩 취해 액체질소와 DEPC가 처리된 막자 사발로 잘게 간 후 멸균된 test tube에 0.1 g 씩 나누어 담아 -70 °C에 보관하였다.

상처 반응에 따른 옥수수 리폭시지나아제 효소 발현을 관찰하기 위해 위 4)의 방법으로 전체 RNA를 추출과 northern 분석을 실시하였고, 5)의 방법으로 단백질을 추출하여 SDS-PAGE를 실시하였다.

다. 결과 및 고찰

1) 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질 전환체의 분석 결과

가) PCR 분석을 통한 T0 형질전환 낙동벼의 리폭시지나아제 유전자 도입 검증

옥수수 리폭시지나아제 유전자 서열내 +902 bp와 +2111 bp에 위치한 염기서열 부위로부터 각각 Forward primer와 Reverse primer를 제작하였다. PCR 반응을 통하여 형질전환체에 실제로 옥수수 리폭시지나아제가 도입되었는지 확인하였다. 그림 3-8-1에서 보는 것과 같이 형질전환된 벼에서 모두 리폭시지나아제 유전자의 도입이 확인되었다. 대조군으로 이용된 낙동벼에서도 희미한 리폭시지나아제의 존재가 확인되는 것으로 볼때, 낙동벼에 존재하는 리폭시지나아제의 염기서열과 옥수수의 리폭시지나아제의 염기서열이 약간의 상동성을 지니고 있음을 시사하고 있다.

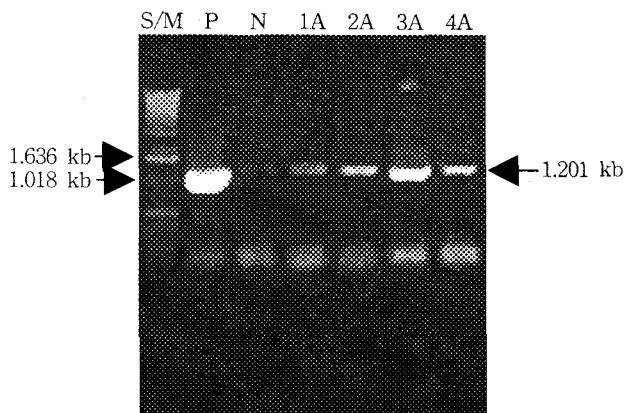


그림 3-8-1. PCR을 통한 리폭시지나아제 유전자 도입의 확인. S/M: 1 kb ladder size marker, P: pCAMBIA/LOX (positive control), N: 낙동벼 (negative control), 1A~4A: T0 형질전환 벼.

나) Hygromycin 저항성에 따른 T1 형질전환 낙동벼 선별

T0 형질전환 낙동벼 1A, 2A, 3A, 4A에서 채종된 씨앗 중 1A의 씨앗 55개와 3A의 씨앗 15개를 소독하여 50 mg/l hygromycin이 들어간 1/2 MS 배지에 배양한 결과 표 3-8-1 과 같이 hygromycin에 대하여 저항성과 감수성이 3:1 비율로 나타났다. 따라서, 1A와 3A의 경우 1 copy수로 옥수수 리폭시지나아제 유전자가 낙동벼내로 도입되었음을 확인할 수 있었다.

표 3-8-1

T1 line	Total assayed	Expected ratio	Hygromycin에 대한 저항성		X ²
			HYG ⁺	HYG ⁻	
1A	55	3:1	42	13	0.055
3A	15	3:1	11	4	0.022
non-transgenic	15	-	0	15	-

다) Southern 분석을 통한 형질전환 낙동벼 분석

T0 형질전환 낙동벼에서 도입된 옥수수 리폭시지나아제 유전자의 copy 수를 알고 도입된 리폭시지나아제 유전자가 T1 세대로 안정적으로 유전되는지 알기 위해 T0 4 개체 (1A, 2A, 3A, 4A)와 T1 6 개체 (1A2, 1A3, 1A5, 1A6, 1A7, 1A8)로부터 genomic DNA를 추출하여 southern 분석을 수행하였다 (그림 3-8-2). T0와 T1의 southern 분석을 통해 T0에 옥수수 리폭시지나아제 유전자가 1 copy 수로 도입되어 있으며, 대체로 안정적으로 T1 세대로 유전되어짐을 보여주었으나, 1A7의 경우 유전자의 재배열로 인한 도태가 이루어짐을 확인했다.

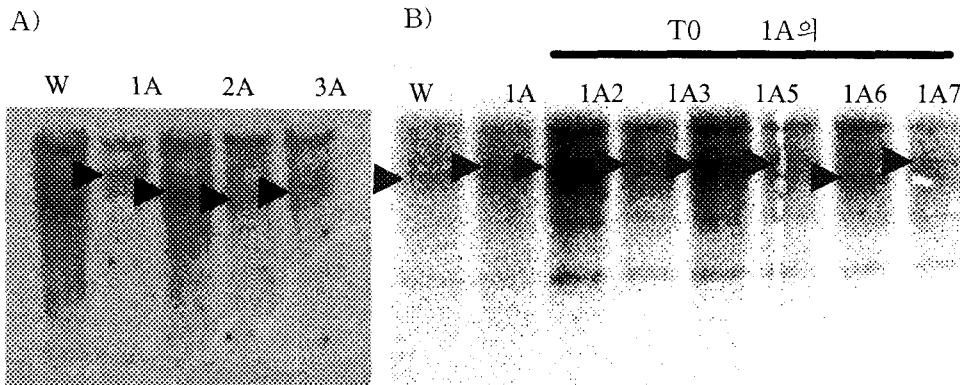


그림 3-8-2. T0와 T1에서 리폭시지나아제 유전자의 southern 분석.

A) W: 낙동벼 (negative control), 1A~4A: T0 형질전환 낙동벼.

B) W: 낙동벼 (negative control), 1A: T0 형질전환 낙동벼, 1A2~1A8: 1A 낙동벼의 T1 형질전환 낙동벼

라) Northern 분석을 통한 옥수수 리폭시지나아제 효소 전사 관찰

형질 전환을 위하여 사용된 pCAMBIA 벡터는 hygromycin 저항성 유전자와 35S promoter를 내재하고 있으므로 hygromycin 저항성을 통하여 선별된 T0와 T1에서는 리폭시지나아제 유전자의 전사가 예상되었다. 이들 line에 대한 Northern 분석결과(그림 3-8-3), T0 세대에서는 1A, 2A 4A line에서 도입된 리폭시지나아제의 전사가 관찰되었고, T1 세대에서는 1A2, 1A3, 1A4, 1A5, 1A6, 1A8 line에서 도입된 리폭시지나아제의 전사가 관찰되었다. 그러나 T0의 3A와 T1의 1A7에서는 hygromycin에 대한 저항성이 있음에도 불구하고 전사가 이루어지지 않음을 확인했다. 이는 낙동벼 내로 도입되어진 옥수수의 리폭시지나아제 유전자가 3A와 1A7에서는 재배열되었음을 시사한다.

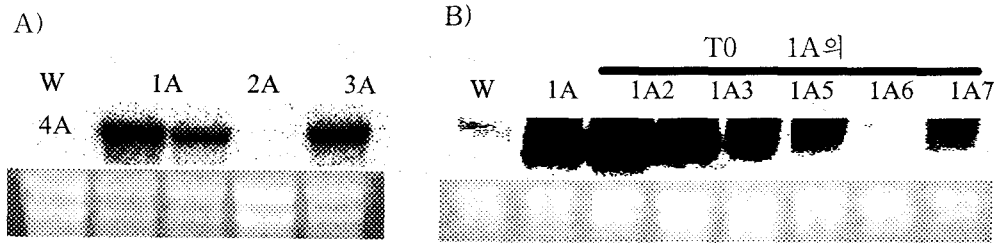


그림 3-8-3. Northern 분석에 의한 도입된 리폭시지나아제의 전사 분석.

A) W: 낙동벼 (negative control), 1A~4A: T0 형질전환 낙동벼.

B) W: 낙동벼 (negative control), 1A: T0 형질전환 낙동벼, 1A2~1A8: 1A 낙동벼의 T1 형질전환 낙동벼.

마) SDS-PAGE분석을 통한 옥수수 리폭시지나아제 효소 발현 관찰

T0와 T1에서 옥수수 리폭시지나아제 효소 발현을 관찰하기 위해 온실에서 재배한 1A의 T1 (1A1~19) 19 개체로부터 씨앗을 수확한 후 잎을 액체질소와 막자사발로 잘게 간 후 단백질 추출 용액 (25 mM Tris-HCl pH7.5, 0.25 % Tween 20, 15 ul Protease Inhibitor Coctail, 1 % PVPP)을 각각 첨가하여 혼탁시켜 초음파 분쇄기로 단백질을 추출하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 그 결과 (그림 3-8-4), 대부분의 T1 line (1A2, 1A3, 1A4, 1A5, 1A6, 1A8, 1A9, 1A10, 1A11, 1A12, 1A13, 1A17, 1A18) 에서 도입된 옥수수의 리폭시지나아제 효소의 발현을 명백히 관찰할 수 있었으나, southern과 northern 분석결과에서 유전자의 재배열이 일어났던 1A7 개체에서만 리폭시지나아제의 발현이 관찰되지 않음을 확인했다. T0 개체 (1A~4A)에서는 2 개체 (1A, 4A)에서 옥수수의 리폭시지나아제가 발현되는 것을 확인했다. 이러한 결과는 도입된 옥수수의 리폭시지나아제가 벼에서 전사와 번역이 비교적 수월하게 이루어지고 있음을 확인할 수 있었다.

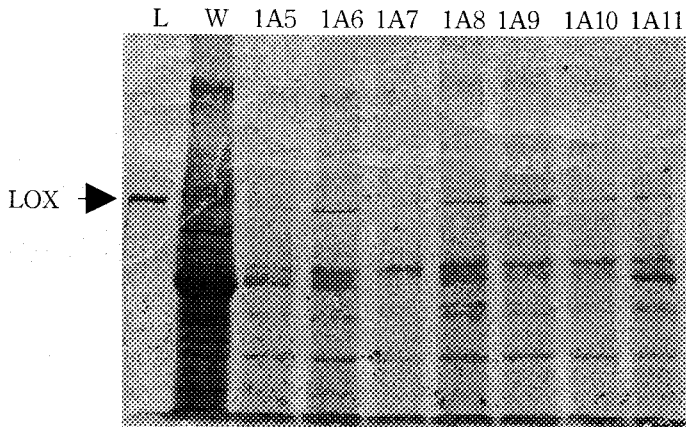


그림 3-8-4. 형질전환벼 T1 세대에서 SDS-PAGE에 의한 리폭시지나아제 단백질의 발현 분석. L: *E.coli*에서 이형발현시켜 정제된 옥수수 리폭시지나아제 (positive control), W: 낙동벼 (negative control), 1A5~1A11: 1A 낙동벼의 T1 형질전환 낙동벼.

바) T1 형질전환벼의 상처 스트레스에 따른 옥수수 리폭시지나아제 유전자 및 효소 발현 분석

T1 세대의 형질전환 낙동벼에서 상처에 따른 옥수수 리폭시지나아제 유전자의 발현 및 단백질의 발현을 분석하기 위하여 온실에서 8주 동안 키운 1A의 T1 1A2 형질전환 낙동벼 잎에 핀셋으로 일정한 간격으로 상처를 가하고 0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h 후 RNA와 단백질을 추출하여 northern 분석(그림 3-8-5)과 SDS-PAGE 분석(그림 3-8-6)을 수행하였다. 그 결과, 도입된 리폭시지나아제 유전자의 전사 수준과 단백질의 발현은 상처 스트레스에 무관하게 일정한 수준으로 발현됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 형질전환 낙동벼에 도입된 옥수수 리폭시지나아제 유전자가 pCAMBIA 벡터에 내재된 35S promoter에 의하여 전사가 조절되고 있음을 의미한다.

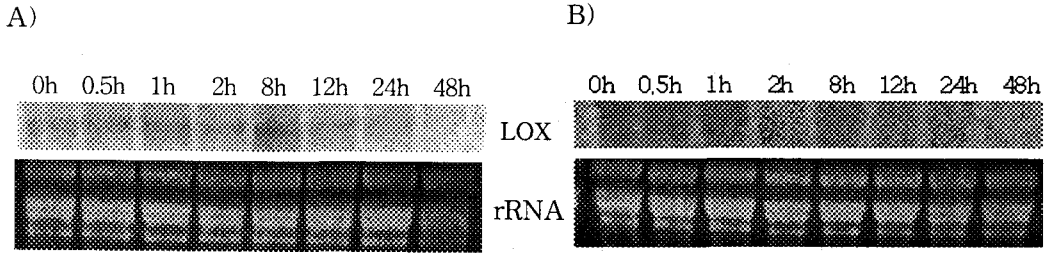


그림 3-8-5. Northern 분석에 의한 T1 형질전환변에서 상처에 따른 리폭시지나아제 유전자의 전사 수준분석.

A) 1A2 (1A의 T1) 형질전환 낙동벼

B) 낙동벼 (negative control).

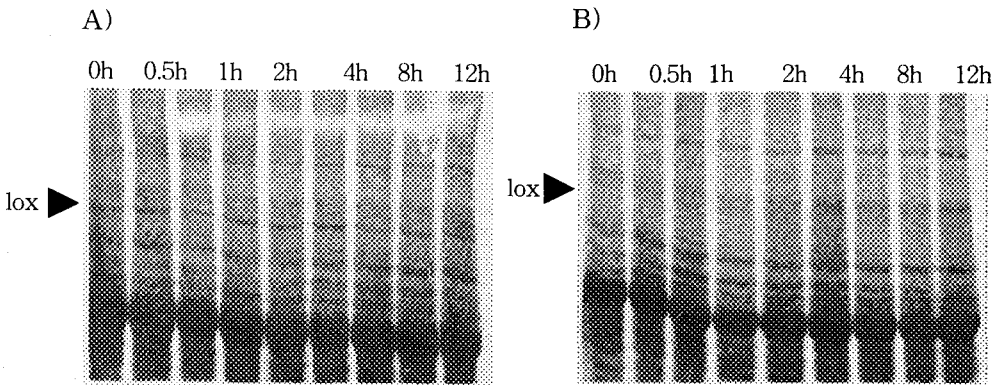


그림 3-8-6. SDS-PAGE에 의한 T1 형질전환변에서 상처에 따른 리폭시지나아제 단백질의 발현 수준 분석.

A) 1A2 (1A의 T1) 형질전환 낙동벼

B) 낙동벼 (negative control).

2) 알렌 옥사이드 합성 효소 유전자가 도입된 형질 전환변의 분석 결과

알렌 옥사이드 합성효소 유전자 또는 TP-알렌 옥사이드 합성효소 유전자가 도입된 형질 전환 변에 대하여서도 T0 세대에서 상기 1 항에 기술한 바와 같이 southern 과 northern 분석을 수행하였다. 분석 결과를 바탕으로 볼때, 알렌 옥사이드 합성효소 유전자를 이용하여 육성된 형질 전환된 벼 (1B-9B) 가운데 1B, 2B,

3B, 4B, 8B개체에서 알렌 옥사이드 합성효소 유전자가 성공적으로 도입 발현되었음을 확인하였고, TP-알렌 옥사이드 합성효소 유전자를 이용하여 육성된 형질 전환된 벼 (1C-13C) 개체 모두에서 TP-알렌 옥사이드 합성효소 유전자가 성공적으로 도입 발현되었음을 확인할 수 있었다.

제 9 절 자스몬산 분석

1. 자스몬산 분석 방법의 확립 및 상처 스트레스에 따른 자스몬산 함량의 변화

가. 서언

벼에 도입되는 리폭시지나아제나 알렌 옥사이드 합성효소 유전자가 형질 전환체에서 적절히 발현되어 적절한 활성을 나타내면 자스몬산의 함량 변화를 예측할 수 있다. 본 연구에서는 wild type의 벼에서 상처 스트레스에 대하여 벼의 자스몬산 함량을 분석하는 방법을 확립하고자 하였다.

나. 재료 및 방법

1) 벼에서 자스몬산 분석 방법의 확립

가) 자스몬산 분석을 위한 internal standard의 제조

벼에서 자스몬산 함량의 분석을 위하여 그림 3-9-1과 같이 diduterio jasmonic acid를 합성하여 GC/MS internal standard로 사용하였으며, 표준 방법에 따라 자스몬산의 함량을 분석하였다.

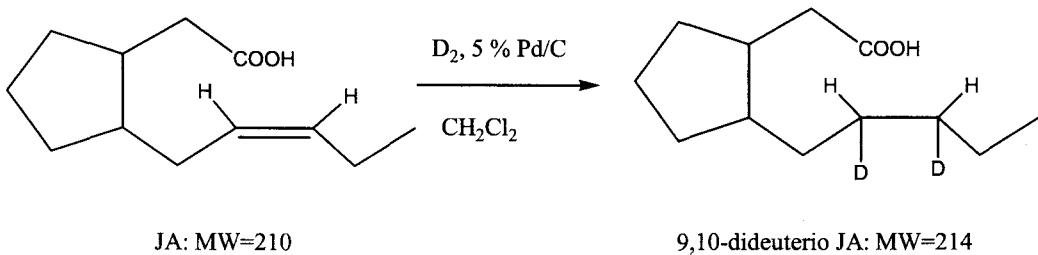


그림 3-9-1. 자스몬산 분석을 위한 internal standard의 제조

나) 벼의 자스몬산 추출 방법

1 g의 벼를 액체질소를 이용하여 막자사발로 잘게 간 후 internal standard를 첨가하였다. 10 ml acetone: 50 mM citric acid (7:3 v/v) 혼합용액을 준비된 샘플에 넣고 12시간, 6시간, 그리고 3시간동안 각각 4 °C에서 진탕시켰다. 진탕된 시료를 원심분리하여 상층액만을 수거한 후 상온에서 하루밤동안 acetone를 증발시켰다.

분별 깔대기에서 3번 반복하여 10 ml diethyl ether로 추출하였다. 회수된 ether 용액을 10 ml 유리 주사기로 취해 aminopropyl cartridge에 통과시킨 후 7 ml chloroform: isopropanol (2:1 v/v) 용액으로 cartridge를 세척했다. 10 ml diethyl ether: acetic acid (98:2 v/v) 용액을 cartridge에 통과시켜 자스몬산을 추출하였다. 추출물로부터 유기용매를 제거하기 위해 40 °C에서 부피가 1 ml 되도록 유기용매를 증발시킨 후 1 ml glass vial에 옮겨 speed vacuum drier로 완전히 건조시켰다. 증발 후 남은 잔여물에 20 ul TMS를 첨가하여 85 °C에서 5분간 silylation시켜 GC-MS 분석을 실시하였다.

다) GC-MS 분석 방법

벼로부터 추출된 자스몬산을 분석하기 위해 GC (Varian STAR 3400cx, USA)와 Mass detector (Varian SATURN 4D, USA)를 사용하였다. 20 ul TMS로 silylation된 추출물 1 ul를 GC Rtx-1 column (30 m x 0.32 mm I.D., 0.25 um film thickness)에 주입하였다. 자스몬산 분석을 위해 GC injector와 detector 온도는 240 °C로 설정하였고, column은 80 °C에서 10분, 80-150 °C에서 35 분(2 °C/min), 150 °C 1 분, 150-270 °C 4.8 분(25 °C/min), 그리고 270 °C에서 9분간 단계적으로 변화시켰다. 벼에서 추출된 여러 물질들로부터 자스몬산만 선택적으로 분석하기 위해 mass의 SIM (selective ion monitoring) mode를 이용하였다. 자스몬산과 internal standard (9,10-²H₂)자스몬산의 기본적 mass spectra인 117, 151, 155, 282, 그리고 286 m/z에서 벼의 자스몬산을 monitor하였다.

다. 결과 및 고찰

1) 생육시기에 따른 JA 분석

벼의 생육시기에 따라 자스몬산의 함량을 분석한 결과 3엽기와 개화기에 가장 많은 양의 자스몬산이 생성됨을 알 수 있었으며 이러한 결과는 세포내 자스몬산의 생합성은 생육시기에 다소 의존함을 보여주고 있다 (그림 3-9-2).

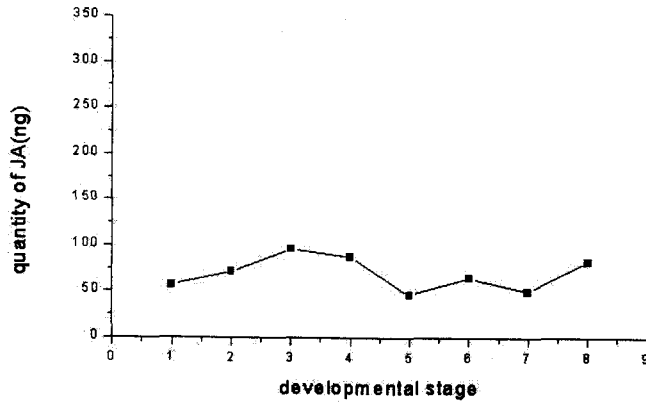


그림 3-9-2. 벼의 생육시기에 따른 자스몬산 함량의 변화

2) 상처 처리 후 시간에 따른 JA 함량 변화

3엽기의 벼에 상처를 주고 시간별로 자스몬산의 함량을 분석한 결과 그림 3-9-3과 같이 초기와 후기로 이루어지는 이중상 패턴을 보여 주었다. 이러한 결과는 자스몬산 생합성이 스트레스에 대하여 빠르게 감응하는 초기와 초기의 반응에 의하여 feedback activation 이 일어나는 후기로 이루어짐을 시사하고 있다.

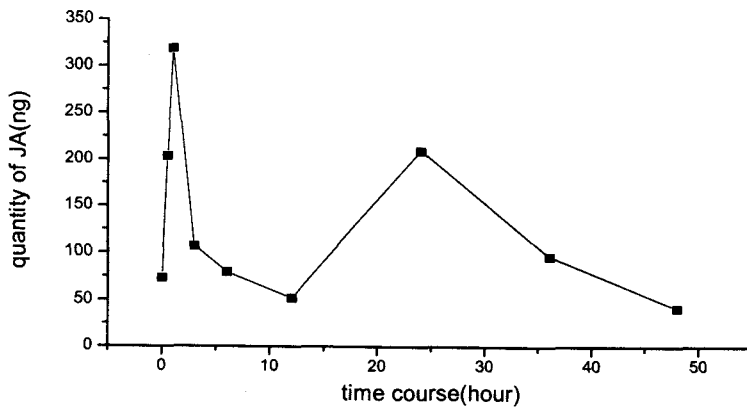


그림 3-9-3. 상처 스트레스에 따른 자스몬산 함량의 변화

제 10 절 자스몬산 처리가 벼 생육에 미친 영향

1. 자스몬산의 뿌리처리에서 벼 유묘의 생육 변화(실험 1)

가. 서언

자스몬산은 식물체의 어디에나 존재하는 생장조절 물질로(Meyer et al 1984) 상처나 병해충 등의 환경 스트레스에 반응하여 각종 단백질을 생산하는 유전자를 활성화 하여 주는 signal의 역할을 한다(Creelman et. al 1992, Farmer & Ryan 1992, Staswick 1992, Mueller et al. 1993). 반면에 자스몬산의 과잉생성은 종자와 화분의 발아를 억제하고(Feys et al. 1994, Finch-Savage et. al. 1996, McConn & Browse 1996) 뿌리의 생장을 저해하는 것으로 알려져 있다(Benedetti & Wallsgrove 1994, Berger & Mullet 1995, Staswick et. al. 1992). 이 외에도 자스몬산은 단백질의 저장 증대(Bell & Mullet 1993, Berher et. al. 1995, Bunker et. al. 1995, Feussner et. al. 1995, Franceschi et al. 1983, Grimes et al. 1992, Huang et. al. 1991, Kato et. al.1993, Mason et. al. 1992, Mason & Mullet 1990, Pena-Cortes et. al. 1995), 광합성 저해(Chaudhry et al. 1994, Reinbothe et. al 1993a, Reinbothe et. al. 1993b, Reinbothe et. al, 1993c), 과실 성숙 촉진과 과실의 부착력 저하(Fan & Mattheis 1999, Hartmond et. al. 2000, Czapski & Saniewski 1992, Lopez et. al. 1987) 등에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. 자스몬산을 처리하여 외부에서 식물체에 흡수시키려면 자스몬산이 어느 농도에서 어느 정도 생육을 저해하는지를 알 필요가 있으나 벼에 대하여 이러한 연구가 이루어져 있지 않다. 본 실험에서는 자스몬산을 고농도와 저농도로 뿌리에 처리하였을 때 벼 유묘의 생육 저해 정도를 알아 보기 위하여 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본 실험에는 Anna purna, CI5309, 낙동벼의 세 품종을 공시하였다. 자스몬산의 식물체내에 흡수시키는 방법으로는 토양처리, 엽면살포, 양액처리 등이 있는데 이 중에서 양액처리 방법으로 실시하였다. 벼 재배용 양액(K_2SO_4 ; 1mM, $MgSO_4$; 2mM, $CaCl_2$; 1mM, NaH_2PO_4 ; 300 μ M, Fe-EDTA ; 100 μ M, $MnCl_2$; 9mM, $(Na)_6Mo_7O_4$; 25 μ M, H_3BO_3 ; 20 μ M, $ZnSO_4$; 1.5 μ M, $CuSO_4$; 15 μ M, $(NH_4)_2SO_4$; 5mM, PH 6.5)에서 벼를 성장시켜 본엽 4~5엽기에 자스몬산 0, 30, 60, 100 μ M을 농도별로 양액에 처리하였다. 자스몬산 처리 1주일 후에 줄기 길이, 뿌리 수 및 뿌리

길이와 생체중을 조사하였다. 자스몬산을 처리한 1주일 후에 자스몬산이 들어가지 않은 영양액에 묘를 옮겨 1주일과 2주일 후에 생육조사를 하였다.

다. 결과 및 고찰

자스몬산은 식물체가 병해충이나 상처 등에 의하여 스트레스를 받았을 때 이에 대응하여 생체 내에서 생성을 하여 필요한 단백질을 생산하는 유전자의 발현을 유도한다. 그러나 이것이 지나치게 생성되면 식물체의 성장을 억제하고 노화를 일으키므로 외부에서 자스몬산을 처리할 때 어느 농도가 적합한지를 알 필요가 있다.

자스몬산을 영양액에 0, 30, 60, 100 μ M로 처리한 1주일 후의 세 가지 품종의 초장은 표 3-10-1과 같다. 세 품종 모두 자스몬산의 농도가 증가함에 따라 초장이 감소하여 자스몬산이 성장을 저해하는 것으로 나타났다.

그러나 초장의 감소 정도가 품종에 따라 차이를 보여 무처리에 비하여 낙동벼가 초장 감소가 가장 컸고 Anna purna가 가장 적었으며 CI 5309는 그 중간을 나타내었다. Anna purna는 100 μ M에서도 무처리의 61%를 나타낸 반면 낙동벼는 30 μ M에서 무처리의 49%를 나타내어 품종간에 차이가 큼을 알 수 있다.

표 3-10-2는 뿌리 수와 뿌리 길이를 나타낸 것으로 초장과 같이 자스몬산의 농도가 높아 감에 따라 감소하는 경향을 보였다. 뿌리 수가 뿌리 길이보다 감소율이 더 높게 나타나고 있다.

뿌리 수와 뿌리 길이의 감소율은 품종간에 큰 차이를 보이지 않고 있다.

표 3-10-1. Shoot length of rice seedlings at 7 days after treatment of jasmonic acid.

Varieties	Concentrations of jasmonic acid(μM)			
	0	30	60	100
Anna purna	10.1 (100)	7.6 (75)	7.0 (69)	6.2 (61)
CI 5309	17.1 (100)	8.8 (51)	8.0 (47)	7.5 (44)
Nakdongbyeo	14.6 (100)	7.1 (49)	5.5 (38)	4.9 (34)

*Numbers in parenthesis are percent of control in each variety.

표 3-10-2. Number of roots and root length of rice seedlings at 7 days after treatment of jasmonic acid.

Varieties	Concentrations of jasmonic acid(μM)							
	0		30		60		100	
	No. of roots	Root length	No. of roots	Root length	No. of roots	Root length	No. of roots	Root length
Anna purna	10.3	12.4	8.7	10.4	7.7	10.2	6.3	9.2
CI 5309	9.1	12.6	7.9	12.5	7.1	9.2	6.4	11.6
Nakdongbyeo	8.5	11.1	8.8	10.0	6.8	9.9	4.9	8.9

자스몬산 처리 1주일 후의 생체중을 나타낸 것이 표 3-10-3과 표 3-10-4이다. 표 3-10-3에서 지상부의 생체중도 초장에서와 같이 자스몬산의 농도가 증가함에 따라 감소하였다. 초장에서와는 달리 품종간에 감소율이 차이가 크지 않아 30 μM 에서 무처리의 65 ~ 76%였으나 60 μM 에서는 59 ~ 65%로 차이가 적어졌으며 100 μM 에서는 53 ~ 59%로 감소율이 품종간에 거의 차이가 없었다.

표 3-10-4의 뿌리의 생체중도 자스몬산의 농도 증가에 따라 감소하는 경향이었으나 지상부 보다 감소율이 적었다. CI 5309가 감소율이 가장 적어 30 μ M에서는 무처리와 같았으며 60 μ M과 100 μ M에서도 무처리의 80%를 나타내었다. 낙동벼는 자스몬산 처리구가 모두 무처리의 75%를 나타내었으며 Anna purna도 60 μ M에서 무처리의 80%, 100 μ M에서 60%를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 자스몬산 처리 1주일 후에 지상부나 지하부 모두 생장이 저해를 받았으나 지상부가 지하부 보다 장애가 더 큰 것으로 나타났으며 품종간에 생장 저해 정도가 차이가 있음을 알 수 있다.

Table 3-10-3. Fresh weight of shoots of rice seedlings at 7 days after treatment of jasmonic acid.

Varieties	Concentrations of jasmonic acid(μ M)			
	0	30	60	100
Anna purna	0.17 (100)	0.13 (76)	0.11 (65)	0.10 (59)
CI 5309	0.26 (100)	0.18 (69)	0.16 (62)	0.15 (58)
Nakdongbyeo	0.17 (100)	0.11 (65)	0.10 (59)	0.09 (53)

*Numbers in parenthesis are percent of control in each variety.

Table 3-10-4. Fresh weight of roots of rice seedlings at 7 days after treatment of jasmonic acid.

Varieties	Concentrations of jasmonic acid(μ M)			
	0	30	60	100
Anna purna	0.05 (100)	0.03 (60)	0.04 (80)	0.03 (60)
CI 5309	0.05 (100)	0.05 (100)	0.04 (80)	0.04 (80)
Nakdongbyeo	0.04 (100)	0.03 (75)	0.03 (75)	0.03 (75)

*Numbers in parenthesis are percent of control in each variety.

1주일간 자스몬산을 영양액에 처리한 후 자스몬산이 들어 있지 않은 영양액으로 생장을 시켰으며 처리 2주 후의 초장을 나타낸 것이 표 3-10-5이다.

자스몬산이 제거되고 1주일 동안 생육한 결과 초장의 감소율은 1주일 전보다 다소 낮아졌다. 특히 CI 5309는 30 μ M의 낮은 농도에서는 1주일 전의 51%이었던 것이 1주일 후에는 무처리의 86%로 급속히 회복되었으며 60 μ M에서도 1주일 전의 47%에서 61%로 향상되었으나 100 μ M의 높은 농도에서는 약간의 증가만 보였다.

이에 비하여 낙동벼는 감소율이 가장 높았으나 1주일 전보다 회복이 빨라 30 μ M에서 1주일전의 49%에서 76%로 향상되었고 60 μ M에서도 38%에서 50%로 높아 갔다. 그러나 100 μ M의 높은 농도에서는 1주일 전과 차이가 없었다.

Table 3-10-5. Shoot length of rice seedlings at 14 days after treatment of jasmonic acid.

Varieties	Concentrations of jasmonic acid(μ M)			
	0	30	60	100
Anna purna	13.3 (100)	10.1 (76)	10.1 (76)	6.6 (50)
CI 5309	22.8 (100)	19.5 (86)	14.0 (61)	11.0 (48)
Nakdongbyeo	24.2 (100)	18.3 (76)	12.0 (50)	7.3 (30)

*Numbers in parenthesis are percent of control in each variety.

표 3-10-6은 뿌리 수와 뿌리 길이를 나타낸 것이다. 뿌리 수는 자스몬산 처리 농도의 증가에 따라 현격하게 감소하고 있다. 세 품종 중에서 CI 5309의 감소율이 가장 낮아 30 μ M에서는 무처리와 차이가 없고 60 μ M에서는 무처리의 80%, 100 μ M에서는 무처리의 66%를 보였다. 반면에 낙동벼는 감소율이 가장 커서 30 μ M에서 무처리의 62%, 60 μ M에서 52%, 100 μ M에서 40%를 보였다. Anna purna는 이 두 품종의 중간 정도였다.

Table 3-10-6. Number of roots and root length of rice seedlings at 14 days after treatment of jasmonic acid.

Varieties	Concentrations of jasmonic acid(μM)							
	0		30		60		100	
	No. of roots	Root length	No of roots	Root length	No. of roots	Root length	No. of roots	Root length
Anna purna	20.3	13.0	16.5	10.5	15.2	10.7	11.5	10.2
CI 5309	16.3	12.0	16.3	11.2	13.1	12.2	10.8	10.8
Nakdongbyeo	26.5	11.2	16.4	9.9	13.7	10.0	10.7	8.6

자스몬산 처리 2주 후의 지상부와 지하부의 생체중을 표 3-10-7과 표 3-10-8에 나타내었다. 표 3-10-7의 지상부 생체중은 1주일 전에 비하여 더욱 더 감소하였다. 가장 감소율이 낮은 CI 5309도 30 μM 에서는 1주일 전과 차이가 없으나 60 μM 에서는 62%에서 45%로 낮아졌고 100 μM 에서는 1주일 무처리의 58%에서 30%로 낮아졌다. Anna purna 와 동진벼는 감소율이 현격하게 커져서 30 μM 에서 무처리의 43 - 56%, 60 μM 에서 31 - 40%, 100 μM 에서 무처리의 18 ~ 19%를 나타내었다. 앞의 초장에서 1주일 전보다 상당한 회복을 보였으나 생체중에서는 오히려 성장 저해가 더 커진 것으로 나타나고 있다.

지하부의 생체중을 표 3-10-8에 나타내었다. 지하부의 생체중도 지상부와 같이 1주일 전보다 감소율이 더 커져 1주일 전에 100 μM 에서도 무처리의 80%를 보였던 것이 30 μM 에서 73%, 60 μM 과 100 μM 에서 55%를 나타내어 자스몬산 처리에 의한 성장저해가 회복되지 않았음을 보여 주었다. 낙동벼는 더욱 더 감소율이 커져서 30 μM 에서 무처리의 38%, 60 μM 과 100 μM 에서는 무처리의 23%를 나타내었고 Anna purna는 낙동벼보다는 다소 높으나 30과 60 μM 에서 무처리의 45%, 100 μM 에서는 무처리의 36%에 지나지 않았다.

Table 3-10-7. Fresh weight of shoots of rice seedlings at 14 days after treatment of jasmonic acid.

Varieties	Concentrations of jasmonic acid(μM)			
	0	30	60	100
Anna purna	0.28 (100)	0.12 (43)	0.11 (40)	0.05 (18)
CI 5309	0.38 (100)	0.28 (74)	0.17 (45)	0.11 (30)
Nakdongbyeo	0.32 (100)	0.18 (56)	0.10 (31)	0.06 (19)

*Numbers in parenthesis are percent of control in each variety.

Table 3-10-8. Fresh weight of roots of rice seedlings at 14 days after treatment of jasmonic acid.

Varieties	Concentrations of jasmonic acid(μM)			
	0	30	60	100
Anna purna	0.11 (100)	0.05 (45)	0.05 (45)	0.04 (36)
CI 5309	0.11 (100)	0.08 (73)	0.06 (55)	0.06 (55)
Nakdongbyeo	0.13 (100)	0.05 (38)	0.03 (23)	0.03 (23)

*Numbers in parenthesis are percent of control in each variety.

자스몬산 처리 3주 후의 초장은 표 3-10-9와 같다. 30 μM 에서는 Anna purna가 무처리의 83%인 것을 제외하면 나머지 두 품종은 무처리와 같아졌다. 그러나 60 μM 에서는 무처리 보다 초장이 짧아 CI 5309가 무처리의 84%였으며 나머지 두 품종은 무처리의 67 ~ 77%였고 100 μM 에서는 세 품종 모두 무처리의 51 ~ 66%를 나타내었다. 이로 보아 자스몬산을 1주일 간 처리한 후 2주일이 경과하였을 때 낮은 농도인 30 μM 에서는 무처리와 같은 정도의 초장으로 회복되었으나 60 μM 이상에서는 회복이 되지 않음을 알 수 있다.

Table 3-10-9. Shoot length of rice seedlings at 21 days after treatment of jasmonic acid.

Varieties	Concentrations of jasmonic acid(μM)			
	0	30	60	100
Anna purna	15.3 (100)	12.7 (83)	11.8 (77)	9.0 (58)
CI 5309	22.1 (100)	22.4 (101)	18.6 (84)	14.6 (66)
Nakdongbyeo	24.2 (100)	25.1 (104)	16.3 (67)	12.3 (51)

*Numbers in parenthesis are percent of control in each variety.

자스몬산 처리 3주 후의 뿌리 수와 뿌리 길이를 나타낸 것이 표 3-10-10이다. 표에서 보는 바와 같이 자스몬산의 농도 증가에 따른 뿌리 수의 감소율은 CI 5309가 가장 적어 60 μM 까지 무처리와 차이가 없었고 100 μM 에서도 무처리의 83%였다. 반면에 Anna purna와 낙동벼는 30 μM 에서 무처리의 76%였고 60 μM 에서는 각각 58%와 62%였으며 100 μM 에서는 무처리의 61%와 45%로 자스몬산에 의한 성장 저해에서 회복이 되지 않았다.

표 3-10-11과 표 3-10-12는 자스몬산 처리 3주 후의 지상부와 지하부의 생체중을 나타낸 것이다. 지상부 생체중은 30 μM 에서 CI 5309와 낙동벼는 무처리의 82 ~ 88%로 상당한 회복을 보였으나 Anna purna는 무처리의 60%로 여전히 성장의 저해가 심하였다. 60 μM 에서는 CI 5309가 무처리의 62%였고 나머지 두 품종은 40 ~ 46%였으며 100 μM 에서는 세 품종 모두 무처리의 31 ~ 36%를 나타내었다.

표 3-10-12의 지하부 생체중은 CI 5309만 30 μM 에서는 무처리와 같았고 60 μM 과 100 μM 에서는 69%를 보인 반면 Anna pur와 낙동벼는 30 μM 과 60 μM 에서 무처리의 35 ~ 41%였으며 100 μM 에서는 Anna purna는 무처리의 35%, 낙동벼는 무처리의 14%로 이 두 품종은 지상부보다 지하부가 더 성장 저해를 나타내었다.

Table 3-10-10. Number of roots and root length of rice seedlings at 21 days after treatment of jasmonic acid.

Varieties	Concentrations of jasmonic acid(μ M)							
	0		30		60		100	
	No. of roots	Root length	No of roots	Root length	No. of roots	Root length	No. of roots	Root length
Anna purna	30.0	16.6	22.7	11.1	17.4	10.3	18.4	10.0
CI 5309	18.3	10.9	17.5	11.8	17.2	11.4	15.2	10.5
Nakdongbyeo	32.0	11.2	25.0	10.6	19.8	8.4	14.4	9.6

Table 3-10-11. Fresh weight of shoots of rice seedlings at 21 days after treatment of jasmonic acid.

Varieties	Concentrations of jasmonic acid(μ M)			
	0	30	60	100
Anna purna	0.35 (100)	0.21 (60)	0.16 (46)	0.11 (31)
CI 5309	0.52 (100)	0.46 (88)	0.32 (62)	0.18 (35)
Nakdongbyeo	0.50 (100)	0.41 (82)	0.20 (40)	0.18 (36)

*Numbers in parenthesis are percent of control in each variety.

Table 3-10-12. Fresh weight of roots of rice seedlings at 21 days after treatment of jasmonic acid.

Varieties	Concentrations of jasmonic acid(μM)			
	0	30	60	100
Anna purna	0.20 (100)	0.07 (35)	0.07 (35)	0.07 (35)
CI 5309	0.13 (100)	0.13 (100)	0.09 (69)	0.09 (69)
Nakdongbyeo	0.22 (100)	0.09 (41)	0.08 (36)	0.03 (14)

*Numbers in parenthesis are percent of control in each variety.

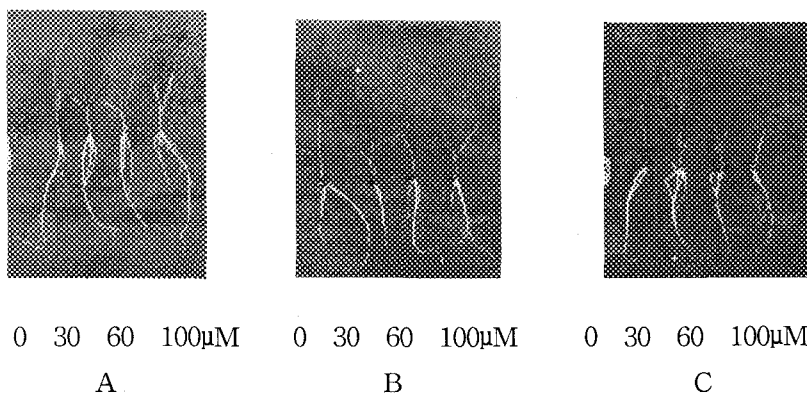


Photo 3-10-1. Seedlings at 7 days after treatment of jasmonic acid
A ; Anna Purna, B ; CI 5309, C ; Nakdongbyeo

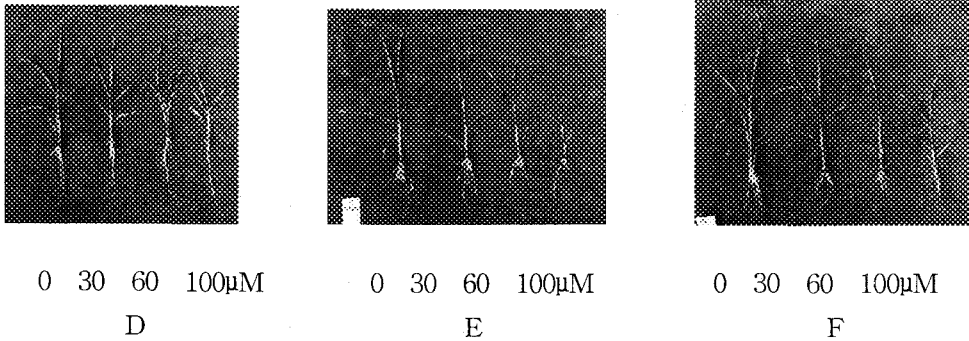


Photo 3-10-2. Seedlings at 21 day after treatment of jasmonic acid
D ; Anna Purna, E ; CI 5309, F ; Nakdongbyeon

2. 자스몬산의 뿌리 처리에서 벼 유묘의 생육 변화(실험 2)

가. 서언

앞의 실험 1에서 자스몬산을 뿌리에 사용하였을 경우 60 μ M와 100 μ M에서는 심한 생육 저해가 나타났다. 또한 1주일간 자스몬산이 들어있는 영양액에서 생육한 후 자스몬산이 없는 영양액에 옮겨 2주일이 경과하여도 회복이 되지 않음을 보았다. 이에 비하여 30 μ M에서는 초기에 약간의 생육 저해가 나타났으나 자스몬산이 들어 있지 않은 영양액에서 1주일을 경과하면 어느 정도 무처리와 거의 같아지고 2주일 경과 후에는 생육이 완전히 회복되었다.

이러한 결과로 보아 자스몬을 뿌리에서 흡수시키기 위하여는 30 μ M이하로 처리하여야 할 것으로 보여졌다. 따라서 30 μ M이하의 농도에서 자스몬산의 처리 농도를 찾을 필요가 있게 된다.

Moons et. al.(1997)은 염 스트레스에 대한 실험에서 벼 8일 묘의 영양액에 자스몬산을 40 μ M까지 여러 가지 농도로 처리하였다. Baldwin(1998)은 *Junipeus* 종의 자연 포장의 토양에 자스몬산을 처리하였다.

본 실험에서는 자스몬산의 처리 농도를 30 μ M 이하로 처리하여 생육량을 측정하고 또한 엽록소 함량과 막 투과성 및 조직 활력을 측정하여 자스몬산의 적정 처리 농도를 알아보기 위하여 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본 실험에는 동진버를 공시하였다. 스티로폴에 구멍을 뚫어 바닥을 철망으로 막아 pot에 띄운 후 최아 종자를 구멍에 파종하여 파종 10일 후에 Hoagland 영양액을 공급하여 온실에서 생육시켰다.

파종 20일 후인 본엽 3 ~ 4엽기에 자스몬산 0, 10, 20, 30 μ M을 영양액에 처리하였으며 처리 7일 후에 생체중, 엽록소 함량, 전기 전도도, 조직 생존력을 측정하였다.

엽록소와 carotenoid 함량은 다음과 같이 측정하였다.

임의 표본 추출한 엽 0.2g을 5ml 95% E-toH 에 첨가하여 80 $^{\circ}$ C에서 20분 간 반응 후 470nm, 648nm, 664nm 에서 spectrophotometer로 측정하여 엽록소와 carotenoid 함량을 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Chl. a} = 13.16 \times A_{664} - 5.19 \times A_{648}$$

$$\text{Chl. b} = 27.43 \times A_{648} - 8.12 \times A_{664}$$

$$1,000 \times A_{470} - 2.14 \times \text{Chl. a} - 97.64 \times \text{Chl. b}$$

$$\text{Carotenoid} = \frac{\quad}{\quad}$$

209

전기 전도도는 잎을 0.5cm 크기로 잘라 0.1g을 증류수 10ml이 들어있는 시험관에 넣어 24hr/30 $^{\circ}$ C 후 EC를 측정(EC₁)하고 121 $^{\circ}$ C/5min 고압 멸균 후 EC를 측정(EC₂)하여 다음 식으로 전기 전도도(Electratic leakage)를 계산하였다.

$$\text{EL} = \frac{\text{EC}_1}{\text{EC}_2} \times 100$$

조직 생존력은 0.1g의 잎을 1cm 크기로 잘라 0.05% tween20이 첨가된 증류수로 수세, 0.05% TTC + 50mMK₂HPO₄(PH 7.0) 5ml/30 $^{\circ}$ C, 암상태 에서 15시간 방치한 후 증류수로 수세, 5ml 94% E-toH/80 $^{\circ}$ C, 5min 동안 추출하여 spectrophotometer를 이용하여 487nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식으로 조직 생존력 (Tissue viability)를 계산하였다.

$$\text{Iv} = \frac{\text{Abs}(\%)}{50\text{mg fresh weight}}$$

다. 결과 및 고찰

자스몬산 처리 7일 후의 벼 유묘의 지상부와 지하부의 생체중은 표 3-10-13과 같다. 지상부 생체중은 자스몬산의 농도가 증가함에 따라 감소하고 있는데 10 μ M에서는 무처리의 91%였으나 20 μ M에서는 86%로 감소하였고 30 μ M에서는 무처리의 73%였다.

뿌리 생체중은 자스몬산 처리에서 어느 농도에서나 무처리 보다 증가하였다. 이러한 결과로 보아 자스몬산의 적은 농도에서도 줄기의 생육을 저해하고 있으나 뿌리에는 영향하지 않은 것으로 보여진다.

Table 3-10-13. Fresh weight of rice seedlings at 7 days after treatment of jasmonic acid.

Concent. of jasmonic acid	Shoot (g)	Percent of control(%)	Root (g)	Percent of control
0	0.56	100	0.21	100
10	0.51	91	0.33	157
20	0.48	86	0.24	114
30	0.41	73	0.30	143

표 3-10-14는 엽록소 a와 b 및 이들의 합인 총 엽록소 함량과 carotenoid 함량을 나타낸 것이다. 엽록소 a는 자스몬산 농도가 증가 하더라도 무처리의 94 ~ 107%를 나타내어 무처리와 거의 같은 양을 보여 주었다. 농도가 가장 낮은 10 μ M에서는 엽록소 a의 함량이 무처리 보다 오히려 7% 증가하였다.

엽록소 b도 자스몬산 처리에서 무처리의 95 ~ 106%를 보여 엽록소 a에서와 같이 무처리와 거의 같았으며 농도가 가장 낮은 10 μ M에서는 무처리 보다 6% 증가하였다.

따라서 엽록소 a와 b를 합한 총 엽록소 양도 무처리의 94 ~ 107%를 나타내어 무처리와 거의 같았다. 이로 보아 자스몬산에 의한 엽록소의 감소는 미미하여 영향이 거의 없으며 낮은 농도에서는 오히려 증가시킨 것으로 나타났다.

Carotenoid 함량도 엽록소와 유사한 경향을 보여 10 μ M에서는 무처리의 111%로 오히려 증가하였고 20과 30 μ M에서는 각각 무처리의 93%와 96%를 보여 무처리와

거의 차이가 없었다.

Table 3-10-14. Chlorophyll and carotenoid content of rice seedlings at 7 days after treatment of jasmonic acid.

Concent. of jasmonic acid	Chl. a	Chl. b	Chl. a+b	Carotenoid
0	7.52 (100)	1.77 (100)	9.29 (100)	1.95 (100)
10	8.08 (107)	1.88 (106)	9.96 (107)	2.11 (111)
20	7.06 (94)	1.68 (95)	8.74 (94)	1.81 (93)
30	7.23 (96)	1.68 (95)	8.91 (96)	1.86 (96)

*Numbers in parenthesis are percent of control.

표 3-10-15는 자스몬산 농도별 전기 전도도를 나타낸 것으로 줄기에서는 10 μ M에서는 무처리의 111%로 증가하였으나 20과 30 μ M에서는 각각 무처리의 68%와 75%를 보여 자스몬산의 영향이 컸다. 뿌리에서는 모든 농도에서 무처리의 약 2배로 증가하였다.

전기 전도도는 물질의 이동 능력을 알 수 있는 막 투과성을 나타내는 것으로 이 수치가 높으면 물질의 이동 능력이 높아진다. 앞에서 생체중이 줄기는 자스몬산의 영향을 받아 무처리 보다 감소하였으나 뿌리는 영향이 없었던 것과 일치하고 있다.

Table 3-10-15. Electratic of rice seedlings at 7 days after treatment of jasmonic acid.

Concent. of jasmonic acid	Shoot	Percent of control(%)	Root	Percent of control
0	8.4	100	34.2	100
10	9.3	111	68.4	200
20	5.7	68	72.8	213
30	6.3	75	62.7	183

표 3-10-16는 조직의 생존력을 나타낸 것으로 줄기는 자스몬산을 처리하였을 때 무처리의 42 ~ 58%를 보여 조직 생존력이 낮아졌으나 뿌리는 무처리의 83 ~ 87%로 줄기보다 높은 수치를 보였다. 이러한 결과는 생체중이 뿌리보다 줄기에서 자스몬산의 영향을 더 받았던 사실과 일치하고 있다.

이상의 결과로 보아 뿌리를 통하여 자스몬산을 흡수시키려면 10 ~ 20 μ M이 적절한 농도로 보여진다.

Table 3-10-16. Tissue viability of rice seedlings at 7 days after treatment of jasmonic acid.

Concent. of jasmonic acid	Shoot	Percent of control(%)	Root	Percent of control
0	0.333	100	0.076	100
10	0.140	42	0.066	87
20	0.169	51	0.063	83
30	0.194	58	0.065	86

3. 자스몬산의 엽면 처리에서 벼 유묘의 생육 변화

가. 서언

앞에서 본 실험 1과 실험 2에서는 자스몬산을 뿌리로 흡수시키기 위하여 영양액에 자스몬산을 처리하였다. 그러나 병해충이나 상처와 같이 대부분의 스트레스가 잎에 직접 영향을 하게 되어 외부의 스트레스를 받게되면 잎에서 자스몬산이 생성된다. 자스몬산을 뿌리에서 흡수를 하였더라도 잎으로의 이행이 잘 되지 않아 스트레스에 대하여 적절히 대처를 하지 못하게 된다. 따라서 자스몬산을 잎에 살포하여 주므로써 잎을 통하여 자스몬산을 흡수시킬 필요가 있다.

Schweizer et. al.(1998)은 상처 받은 벼에서 도열병 저항성을 유기하기 위하여 3엽기에 자스몬산 0.1mg ml^{-1} 를 엽면 살포하여 도열병 발병 정도를 비교하였다. Rakwal et. al.(1996)은 벼의 phytoalexin 생산에서 자스몬산의 역할을 알기 위하여 0.5mM 을 엽면 살포하였고 Clerivet & Alami(1999)는 plane tree의 phytoalexin 축적량을 알아보기 위하여 잎에 자스몬산 $20\mu\text{M}$ 을 잎에 살포하였다.

본 실험에서는 자스몬산을 엽면 살포하였을 때 벼 유묘의 생육 변화를 조사하여 적절한 농도를 찾기 위하여 실시하였다.

나 재료 및 방법

공시품종은 낙동벼로 포트에 최아종자를 파종하여 20일 동안 생육시켰다. 본엽 3 ~ 4엽기에 자스몬산을 0, 10, 15, 20, 25, $30\mu\text{M}$ 별로 잎에 살포하였다. 이 때 전착제로 tween 20을 100ml당 2방울을 넣어 주었다.

자스몬산 처리 7일과 14일 후에 초장, 경수, 엽수, 생체중, 건물중, 엽록소와 carotenoid 함량을 조사하였다. 엽록소와 carotenoid 측정 방법은 시험 2와 같다.

다. 결과 및 고찰

자스몬산을 엽면에 분무 살포하였을 때 살포 후 7일과 14일의 생육 상태는 표 3-10-17과 같다. 초장은 자스몬산 처리 7일 후에는 $15\mu\text{M}$ 까지는 무처리와 같거나 더 컸으나 $20\mu\text{M}$ 이상에서는 무처리의 67 ~ 87%를 나타내었다. 처리 14일 후에도 이런 경향은 동일하여 $15\mu\text{M}$ 까지는 무처리와 같았으나 $20\mu\text{M}$ 이상에서는 무처리의 40 ~ 50%로 7일 전보다 생육 저해가 더 컸다. 이런 현상은 처리 7일 후에는 생육 저해가 초장에 나타나지 않았던 것이 14일에 초장 감소로 나타났기 때문으로 보여진다.

경수도 초장과 유사한 양상을 보여 처리 7일 후와 14일 후 공히 15 μ M까지는 무처리와 차이가 없었으나 20 μ M이상에서는 무처리의 80% 정도였다. 다만 농도가 가장 높은 30 μ M에서 무처리의 109%와 93%를 보인 것은 실험 오차에서 온 것으로 생각된다.

엽수는 처리 7일과 14일 후 20 μ M에서 무처리의 89%와 85%를 보인 것 외에는 모든 처리에서 무처리의 93 ~ 101%를 보여 무처리와 차이가 없었다. 잎은 외부의 지나친 장애가 없으면 일정 시간 간격으로 발생하는데 자스몬산 30 μ M까지의 엽면 살포는 잎 발생 속도를 저해하지 않는 것 같다.

Table 3-10-17. Shoot length, number of tillers and number of leaves at 7 and 14 days after leaf spray of jasmonic acid.

	Shoot length(cm)		No. of tillers		No. of leaves	
	DAT*					
	7	14	7	14	7	14
0	5.5 (100)	5.0 (100)	3.7 (100)	4.3 (100)	5.5 (100)	5.9 (100)
10	5.4 (98)	5.7 (114)	3.7 (100)	3.8 (88)	5.5 (100)	6.0 (101)
15	8.0 (145)	5.2 (104)	3.8 (103)	4.3 (100)	5.3 (96)	6.1 (103)
20	4.3 (78)	2.0 (40)	3.0 (81)	3.3 (77)	4.9 (89)	5.0 (85)
25	4.8 (87)	2.1 (44)	3.0 (81)	3.5 (81)	5.2 (95)	5.5 (93)
30	3.7 (67)	2.5 (50)	3.3 (109)	4.0 (93)	5.4 (98)	5.6 (95)

* Day after treatment

**Numbers in parenthesis are percent of control.

표 3-10-18은 자스몬산 엽면 처리 7일과 14일 후의 생체중과 건물중을 주경과 분얼경으로 나누어 나타낸 것이다. 건물중은 주경에서 처리 7일 후에는 90%이상을 보여 자스몬산에 의한 생육 저해가 시간으로 보아 아직 건물중으로 나타나지 않은

것으로 보이나 처리 14일후에는 건물중의 감소가 현저하게 나타나고 있다. 즉, 15 μ M이하에서는 건물중이 무처리의 70% 정도이었으나 20 μ M에서는 62%, 25 μ M에서는 38% 였다. 다만 가장 높은 농도인 30 μ M에서 무처리의 87%를 나타낸 것은 다소 이해하기 어려운 수치로 이것은 표 3-10-17의 경수에서도 같은 현상을 보였는데 실험의 오차에서 온 것이 아닌가 생각된다.

분얼경에서는 주경보다 감소율이 더 커져서 처리 7일 후에는 25 μ M까지 무처리의 64 ~ 73%로 생육의 저해를 나타내었고 30 μ M에서는 무처리의 46%로 감소율이 더 컸다. 처리 14일 후에는 15 μ M까지는 다소 회복세를 보여 무처리의 80% 이상을 보였으나 20 μ M에서 64%, 25 μ M에서 44% 였다. 분얼경이 주경 보다 건물중의 감소율이 높은 것은 주경 보다 분얼경의 생장이 더 왕성하므로 생육 저해도 더 크게 나타난 것으로 생각된다.

Table 3-10-18. Fresh and dry weights of rice seedlings at 7 and 14 days after leaf spray of jasmonic acid.

	Fresh weight(g)				Dry weight(g)			
	Main stem		Tiller		Main stem		Tiller	
	DAT*							
	7	14	7	14	7	14	7	14
0	1.32 (100)	1.02 (100)	0.78 (100)	0.65 (100)	0.20 (100)	0.45 (100)	0.11 (100)	0.25 (100)
10	1.16 (88)	1.23 (121)	0.49 (63)	1.06 (163)	0.20 (100)	0.31 (69)	0.07 (64)	0.21 (84)
15	1.09 (83)	1.25 (123)	0.50 (64)	0.71 (109)	0.18 (90)	0.33 (73)	0.08 (73)	0.20 (80)
20	1.21 (92)	1.19 (117)	0.48 (62)	0.72 (111)	0.19 (95)	0.28 (62)	0.08 (73)	0.16 (64)
25	1.21 (92)	1.60 (157)	0.41 (53)	0.89 (137)	0.19 (95)	0.17 (38)	0.07 (64)	0.11 (44)
30	1.14 (86)	1.62 (159)	0.27 (35)	0.48 (74)	0.18 (90)	0.39 (87)	0.05 (46)	0.20 (80)

* Day after treatment

**Numbers in parenthesis are percent of control.

자스몬산은 일반적으로 노화를 유도하는 식물호르몬으로 작용하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 어느 일정 농도에서는 노화의 기본적 단위인 엽의 퇴색이 나타날 수 있고 이것은 곧 엽록소 함량의 감소와 연관지을 수 있다. 자스몬산의 분무 살포에 의한 식물체의 엽록소 함량의 변화를 표3-10-19에 나타내었다.

자스몬산 처리 7일 후의 엽록소 a함량은 무처리 보다 현저히 증가하여 모든 처리에서 무처리의 134 ~ 165%를 보였고 엽록소 b함량도 모든 처리에서 무처리의 135 ~ 165%를 보였으며 이 둘을 합한 총 엽록소 양도 무처리의 136 ~ 164%였다.

이러한 경향은 처리 14일 후에는 다소 완화되어 엽록소 a는 15 μ M까지는 무처리와 같아졌으나 20 μ M이상에서는 여전히 무처리 보다 많았다. 엽록소 b도 이것과 같은 경향이였다. 앞의 실험 1에서 자스몬산을 100 μ M과 같이 고농도로 뿌리에 처리하였을 때는 잎이 노화되어 색이 노랗게 변하는 현상을 볼 수 있었으나 실험 2에서 30 μ M이하로 뿌리에 처리하였을 때는 엽록소 양이 무처리와 차이가 없었다. 본 실험에서 30 μ M이하 농도로 엽면에 살포하였기에 뿌리에 처리하였을 때 보다 흡수되는 양이 적을 것으로 생각되어 자스몬산의 흡수량이 적을 때는 오히려 엽록소 함량을 일시적으로 증가시키는 것으로 추정된다.

Carotenoid함량도 엽록소 양과 같은 경향을 보여 처리 7일 후에는 모든 처리에서 무처리의 136 ~ 164%를 보였으나 시간의 경과에 따라 그 차이가 적어져 처리 14일 후에는 15 μ M이하에서는 무처리의 110% 였으며 20 μ M이상에서는 무처리의 120 ~ 152%를 보였다.

Table 3-10-19. Chlorophyll and carotenoid content of rice seedlings at 7 and 14 days after leaf spray of jasmonic acid.

	DAT*							
	7				14			
	Chl.a	Chl.b	Chl.a+b	Carotenoid	Chl.a	Chl.b	Chl.a+b	Carotenoid
0	5.60 (100)	1.44 (100)	7.04 (100)	1.49 (100)	6.24 (100)	1.59 (100)	7.83 (100)	1.78 (100)
10	9.24 (165)	2.37 (165)	11.61 (165)	2.44 (164)	6.34 (102)	1.67 (105)	8.01 (102)	1.92 (108)
15	8.60 (154)	2.23 (155)	10.83 (154)	2.32 (156)	6.55 (105)	1.71 (108)	8.26 (106)	1.96 (110)
20	7.50 (134)	1.94 (135)	9.44 (134)	2.02 (136)	8.67 (139)	2.43 (153)	11.1 (142)	2.42 (136)
25	8.85 (158)	2.19 (152)	11.04 (157)	2.29 (154)	7.15 (115)	1.93 (121)	9.08 (116)	2.13 (120)
30	7.72 (138)	1.99 (138)	9.71 (138)	2.08 (140)	10.54 (169)	2.78 (175)	13.32 (170)	2.70 (152)

* Day after treatment

**Numbers in parenthesis are percent of control.

제 11 절 자스몬산 엽면 처리가 도열병과 흰잎마름병 발병에 미친 영향

1. 자스몬산 처리가 도열병 발병 정도에 미친 영향

가. 서언

자스몬산은 식물체의 어디에나 존재하는 생장조절 물질로(Meyer et al 1984) 상처나 병해충의 공격에 반응하여 signal의 역할을 한다(Creelman et. al 1992, Farmer & Ryan 1992, Staswick 1992, Mueller et al. 1993). 자스몬산은 여러 가지 환경 스트레스에 대응하는 각종 단백질을 생성하는 유전자를 활성화하기에 이에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다.

자스몬산은 식물체의 병해충 저항성 발현에 중요한 역할을 하고 있다. 여러 식물종에서 상처나 병원균으로 유기된 signal로서의 자스몬산이 발견되었고 자스몬에 의하여 활성화된 유전자와 그 유전자가 생산한 물질이 병해충 저항성을 높인다는 사실이 보고되고 있다(Epple et. al. 1995, Penninckx et. al. 1996, Simmons et. al. 1992, Weiss & Bevan 1991, Xu et al. 1996, Zhu et al. 1995, Becker and Apel 1992, Xu et. al. 1994).

Schweizer et. al.(1998)은 벼 유묘 잎에 상처를 만든 것과 자스몬산을 엽면 살포한 것에 도열병균을 접종하여 자스몬산이 도열병에 대한 저항성을 높였음을 보고하였다.

본 실험에서는 자스몬산을 벼 유묘에 엽면 살포하였을 때 포장상태에서 도열병에 어느 정도 저항성을 나타내는지 검토하기 위하여 실시하였다.

나. 재료 및 방법

공시품종은 낙동벼로 최아 종자를 포트에 파종하여 20일 동안 생육시켰다. 자스몬산 처리는 포트를 전남 나주시 전남농업기술원 도열병 검정 포장에 옮겨 24시간 전과 옮겨 직전의 두 가지 방법에서 자스몬산을 각각 0, 10, 15, 20, 25, 30 μ M 별로 잎에 살포하였다.

포트를 검정 포장에 배치하여 도열병의 발병을 유기하였으며 도열병 발병조사는 야외 포장에서 검정을 하였기에 포장검정에서 통상 사용되는 달관조사에 의하여 발병 정도를 국제미작연구소(IRRI)의 판정 기준에 따라 0 ~ 9 로 개체별로 시행하였다.

다. 결과 및 고찰

자스몬산을 엽면에 처리하였을 때 포장상태에서 자스몬산이 도열병 발병을 어느 정도 억제하는지를 알아보기 위하여 자스몬산을 엽면 처리한 묘를 2001년 8월초에 도열병 유묘 검정포에 두었다. 이 시기는 유묘의 도열병의 발병 정도를 검정하기에 가장 적합한 시기로 본 실험이 수행된 검정 포장에서 주변에 있는 낙동벼의 도열병 발병정도가 사진 3-11-1과 같이 급성형 병반과 만성형 병반이 혼재하는 고사상태를 보여주어 본 실험에서 도열병의 발병에는 문제가 없었다.

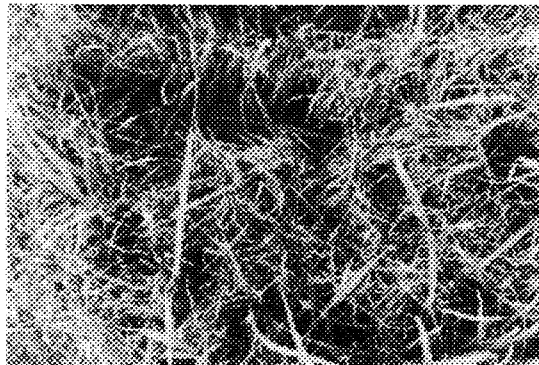


Photo 3-11-1. Degree of blast infection in the field for rice nursery blast test.

도열병의 특정 레이스에 대한 저항성을 검정할 때는 병반 수, 병반 장, 병반 면적 등을 조사하여 발병 정도를 판정하나 야외 포장에서 자연 감염에 의한 발병 정도의 판정은 이러한 항목들을 조사할 수 없다. 자연상태에서는 여러 가지 병반형이 복합적으로 나타나기 때문에 통상 발병 정도를 육안으로 종합적으로 판정하게 된다. 이 경우 표준적으로 사용되는 기준이 국제미작연구소에서 제정한 판정기준으로 여기서는 0 ~ 9의 등급으로 발병 정도를 판정한다.

유묘를 도열병 검정 포장에 두기 24시간 전에 자스몬산을 처리하고 3주일 후에 국제미작 연구소 판정 기준에 따라 조사한 것이 그림 3-11-1이다. 전반적으로 보아 자스몬산을 처리한 것이 도열병 발병 정도가 낮게 나타나고 있다.

무처리가 6.1인데 비하여 20 μ M이하에서는 5.2 ~ 5.5를 나타내었고 25 μ M에서 5.8로 다소 높아졌으나 30 μ M에서 4.9로 가장 낮은 발병 정도를 보였다. 이러한 결과를 보아 자스몬산이 도열병의 발병을 억제한다고 말할 수 있으며 이러한 사실은 기

존 보고와 어느 정도 일치하고 있음을 알 수 있다.

자스몬산을 엽면 살포하고 즉시 검정 포장에 두었을 때의 도열병 발병 정도는 그림 3-11-2와 같다. 여기서도 자스몬산을 처리한 것이 도열병의 발병 정도가 무처리 보다 낮았다. 자스몬산 농도 차이에 따른 발병 정도는 큰 차이가 없으나 특히 30 μM 가 4.4로 앞의 경우와 마찬가지로 다른 처리보다 상당히 낮았다. 이 결과로 보아 자스몬산을 30 μM 이상 처리하면 보다 더 발병이 적어질 것으로 추정된다.

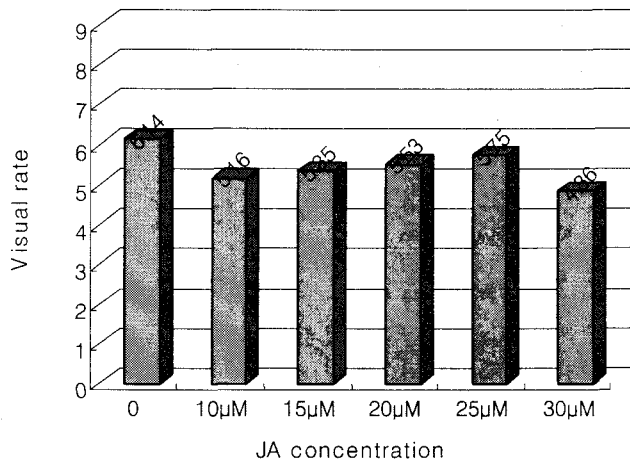


Fig 3-11-1. Infection rate of blast in the nursery test when seedlings were put in the field at 24 hours after jasmonic acid treatment.

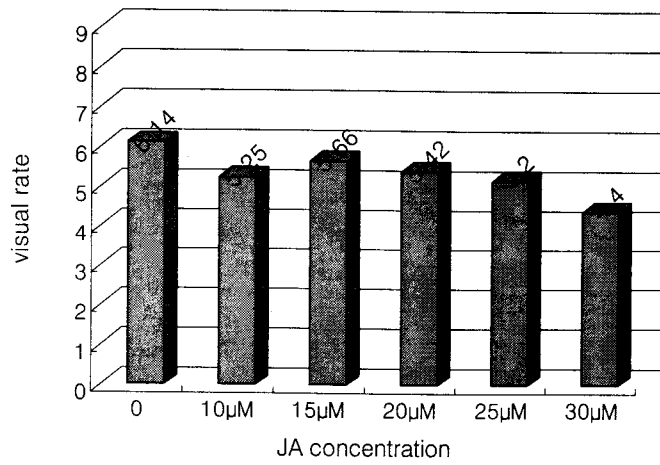


Fig 3-11-2. Infection rate of blast in the nursery test when seedlings were put in the field after jasmonic acid treatment.

2. 자스몬산 처리가 흰잎마름병 발병 정도에 미친 영향

가. 서언

자스몬산이 상처나 병해충과 같은 환경 스트레스를 받았을 때 이에 대응하기 위한 물질을 생산하는 유전자를 활성화시키는 signal로서의 역할이 많이 알려져 있다 (제1절 문헌 참조).

자스몬산이 병원균에 대하여 저항성을 높여 준다는 여러 보고에서 세균병을 대상으로 한 연구는 거의 없다.

흰잎마름병은 벼에 주요한 세균병이며 이 병은 주로 상처를 통하여 침해를 하므로 상처 치유에서의 자스몬산의 역할을 고려할 때 자스몬산이 흰잎마름병에 대한 저항성을 높일 수 있으리라 생각된다.

본 실험에서는 벼 유묘에 자스몬산을 엽면 살포하고 흰잎마름병균을 접종하였을 때 어느 정도 병의 진전을 저지할 수 있을 것인지를 알기 위하여 실시하였다.

나. 재료 및 방법

본 실험에 공시한 품종은 낙동벼, 동진벼, 화성벼, 금오벼, 오대벼, 만금벼, 일품벼의 7개 품종으로 이들의 최아 종자를 40×50×10cm 사각 pot에 품종 당 20입씩 1열로 파종하여 온실에서 생육시켰다.

본엽 4 ~ 5엽기 묘에 자스몬산 0, 10, 15, 20, 30 μ M을 엽면 살포하고 24시간 후에 벼 흰잎마름병균 K₃을 가위 접종하였으며 병 접종 2주 후에 병반의 길이를 측정하였다.

다. 결과 및 고찰

병원균을 문힌 가위로 잎 끝의 3 Cm정도를 절단하여 병원균을 접종하는 가위 접종법으로 7개 품종을 온실에서 흰잎마름병균 K₃를 접종하여 2주 후에 병반의 길이를 측정한 것이 표 3-11-1이다.

병반장이 품종에 따라 차이가 있으나 15 μ M까지는 낙동벼 10 μ M과 화성벼 10 μ M를 제외하면 모두 병반장이 무처리보다 작아서 무처리의 62 ~ 94%를 나타내어 자스몬산이 흰잎마름병의 진전을 저지한 것으로 보여진다.

그러나 20 μ M 이상에서는 금오벼를 제외하고는 무처리와 같거나 무처리 보다 오히려 병반장이 길어 지나친 양의 자스몬산은 생육저해로 인하여 병의 진전을 막지 못하는 것으로 생각된다.

병반장은 품종에 따라 상당한 차이를 보여주고 있는데 금오벼가 자스몬산 처리에서 병반장이 가장 짧아 25 μ M까지 무처리의 62 ~ 65%였고 30 μ M에서도 무처리의 79%였다. 다음으로는 만금벼로 15 μ M까지는 무처리의 64 ~ 79였으며 20 μ M이상에서는 무처리와 같았다.

7개 품종의 평균으로 보면 10 μ M과 15 μ M는 각각 무처리의 82%와 77%로 흰잎마름병의 진전을 저지하는 효과를 보여주고 있으나 20 μ M과 30 μ M에서는 각각 무처리의 107%와 96%로 무처리와 차이가 없어 자스몬산을 벼 잎에 살포할 경우에는 15 μ M이하로 처리하였을 때 발병이나 병의 진전을 저지할 수 있을 것으로 생각된다.

Table 3-11-1. Lesion length of the rice seedling leaf inoculated by bacterial blight.

	0	10 μ M	15 μ M	20 μ M	30 μ M
Nakdongbyeo	5.3 (100)	5.4 (102)	3.9 (74)	7.2 (136)	5.6 (106)
Dongjinbyeo	5.0 (100)	4.4 (88)	3.8 (76)	5.7 (114)	5.0 (100)
Hwaseungbyeo	5.1 (100)	5.7 (112)	3.9 (76)	7.4 (145)	5.3 (104)
Kumobyeo	6.8 (100)	4.3 (63)	4.2 (62)	4.4 (65)	5.4 (79)
Odaibyeo	6.3 (100)	5.2 (83)	5.1 (81)	5.7 (90)	6.4 (102)
Mankumbyeo	6.1 (100)	3.9 (64)	4.8 (79)	6.2 (102)	5.7 (93)
Ilpoombyeo	5.4 (100)	3.7 (69)	5.1 (94)	6.0 (111)	5.4 (100)
Average	5.7 (100)	4.7 (82)	4.4 (77)	6.1 (107)	5.5 (96)

제 12 절 자스몬산 처리가 상처 치유에 미친 영향

1. 서언

식물은 저온, 고온, 건조, 염류 등과 같은 특정 환경에 대한 무생물적 요인과 병해충 등에 의한 생물적 요인에 의해 스트레스를 받았을 때 이에 대응하여 방어하는 체제를 갖추고 있음은 이미 알려진 사실이다. 외부로부터 생물적 무생물적인 스트레스를 받았을 때 식물체는 이에 반응하여 경고 신호의 수단으로 특정 물질을 생성하여 면역에 필요한 단백질을 생산하는 유전자의 발현을 유도하는데 그 물질의 하나가 자스몬산 이다.

자스몬산은 *Jasminum grandiflorum* L. 의 방향유에서 처음 추출되어 분리된 (Demole *et al* 1962; Parthier B. 1991) jasmonic acid와 이것의 methyl ester는 linoleic acid로부터 유도되어 생합성되는 cyclopentanone 화합물(Jose L. & Jose J.S. 1999)로 식물에서의 기계적 상처나 병원균의 침입 같은 환경적 스트레스에 대한 반응(Creelman *et al.*, 1995, Farmer *et al.*, 1990, Sembdner G. and B. Parthier 1993)과 생육의 조절 역할을 한다.(Ueda *et al.*, 1980)

자스몬산은 160개 이상의 식물 과에서 발견되었으며(Serbdner and Parthier 1993) 대부분의 피자식물과 일부 나자식물 및 조류에 존재하며(Parthier B. 1991), 대부분의 고등식물에서 그 함유농도는 10 μ M로 추정되고 있다(Mason *et al.* 1992).

자스몬산은 초기에 성장 지연물질로써 최초로 소개되었으며 외부에서 공급하면 노화를 촉진하거나 병원체에 대하여 저항성을 보여준다(Creelman *et al.* 1997). 그 대표가 되는 증상은 내부적으로는 serine proteinase 억제(Farmer *et al.* 1990), phenylalanine ammonia-lyase, thionin(Andresen *et al.* 1992), leucine aminopeptidase와 threonine deaminase(Hildmann *et al.* 1992), chalcone synthase, 저장 단백질과 proline 다량함유 세포벽 단백질(Creelman & Mullet. 1995)이 합성되고, 외형적 증상으로는 ribulose carboxylase 같은 엽록체 단백질의 감소로 인한 노화(Reinbothe *et al.*, 1993), 발아저해(Creelman *et al.* 1997), 뿌리 성장 저해(Staswick *et al.* 1992), tendril coiling(Weiler *et al.* 1993)등이 있다.

스트레스에 의해 자스몬산은 *Pin2*, *rbcL*, *rbcS*, *Vsp*, *Lox* (Reinbothe & Mollenhauer. 1994)등의 유전자 발현을 조절하는데 토마토에서 자스몬산은 proteinase 억제 유전자(*pin*)의 활성을 이끈다고 보고되었고(Farmer *et al* 1992, Hildmann *et al* 1992), 상처를 가한 감자의 경우 있는 *Pin2* 유전자의 발현을 유도하고 자스몬산의 과축적을 보였다(Harmc *et al* 1995). 또한 콩에서는 *Vsp*(Creelman and Mullet 1997), 벼에서 세균 감염에 대해 PR유사 유전자를 유도한다고 보고된

바 있고(Schweizer *et al.* 1997), LOX 효소의 반응산물들은 병해충에 대한 저항성을 나타내는 것으로 보고되었다(Vick *et al.* 1987).

자스몬산은 preteinase inhibitor, thionin, RIP60, phytoalexin 등의 유전자 발현을 유도함으로서 병해충에 대한 저항성을 증가시키는 것으로(Creelman *et al.* 1997) 알려져 있는데 *Pythium mastrophorum*(Vijayn *et al.* 1998), 토마토와 감자에 침입하는 *Phytophthora infestans*(Cohen *et. al.* 1993), 벼의 도열병균인 *Magnaporthe grisea*(Ohta *et al.* 1991)에 대하여 저항성이 증진되었다는 보고가 있다.

그러나 자스몬산이 상처나 병해충 등의 외부로부터 받는 스트레스에 저항성을 증진시키지만 앞에서 언급한 바와 같이 발아를 억제하고 엽록체 내 특정 단백질의 감소로 노화를 촉진하고 뿌리의 성장을 억제하는 등의 작용도 있어 다량 생성 형질 전환체의 작성을 위하여는 적정 생성량 조절이 필요하다.

본 연구는 벼 잎에 기계적 상처를 준 후에 몇 가지 농도의 자스몬산을 처리하였을 때 나타나는 식물체의 성장 및 형광반응 차이를 알아봄으로서 자스몬산의 상처 처리에 대한 치유효과를 규명하기 위하여 실시하였다.

2. 재료 및 방법

공시품종은 낙동벼를 사용하였으며 종자를 스포탁(0.5ml/1ℓ)으로 24시간 소독한 후에 물에 침종 하였으며 5cm×15cm의 4각 포트에 각각 최아 종자 10립씩 파종한 후 온실에서 생육시켰다.

파종 20일 후 3 ~ 4엽기 묘에 핀셋을 사용하여 직경 1mm 크기의 상처를 주맥 좌우 대각선으로 제 2엽에 6개, 제3~4엽에 각각 10개씩 상처처리를 한 후, 0, 10, 15, 20, 25, 30μM의 자스몬산((±)Jasmonic acid(Sigma))에 전착제 tween20(2drop/100ml)을 첨가하여 분무처리 하였으며 무상처 잎도 같은 농도로 분무처리 하였다.

자스몬산 처리 7일과 14일 경과 후 자스몬산 각 처리 농도에서 6개체들에 대하여 초장, 경수, 건물중을 조사하였다.

엽록소 형광측정은 자스몬산 처리 24 시간과 72 시간 후에 portable chlorophyll fluorometer PAM-2000(WALZ, Germany)을 사용하여 엽록소의 형광을 측정하였다. 식물체를 5분간 암반응을 시켜 광계1과 광계2 사이의 전자 전달체인 plastoquinone을 산화시킨 후 무상처 엽의 경우 최상위엽인 4엽의 말단부위로부터 5cm 부분을 측정하였고, 상처처리 엽은 4엽의 말단부위에 처리된 2개의 상처 사이에서 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

벼 유묘의 잎에 인위적으로 상처를 낸 후에 몇 가지 농도별로 자스몬산을 엽면 살포하였을 때 처리 7일 후와 14일 후의 초장은 표3-12-1과 같다.

무상처 잎에 자스몬산을 처리한 7일 후 초장은 모든 처리 농도에서 무처리에 비해 5~15%의 초장 감소를 나타내었는데 15 μ M까지는 무처리의 91 ~ 95%로 유의적인 차이를 보이고 있지 않으나 20 μ M 이상에서는 무처리의 85 ~ 89%로 유의적인 초장 감소를 나타내었다. 무상처에서 자스몬산 처리 14일 후의 초장도 15 μ M까지는 무처리의 93 ~ 96%로 무처리와 유의적인 차이를 보이고 있지 않으나 20 μ M 이상에서는 무처리의 82~83%로 통계적으로 유의한 초장 감소를 보였다.

Table 3-12-1. Plant heights of wounded and not wounded rice seedlings at the days of 7 and 14 days after treatment with jasmonic acid

Jasmonic acid (μ M)	7 DAT		14 DAT	
	NW*	W*	NW*	W*
0	53.8 (100)	54.3 (100)	58.8 (100)	59.5 (100)
10	49.1 (91)	50.3 (92)	54.8 (93)	55.3 (93)
15	51.5 (95)	52.1 (96)	56.7 (96)	55.3 (93)
20	46.5 (86)	50.7 (93)	48.5 (83)	50.4 (91)
25	48.0 (89)	47.0 (87)	48.1 (82)	50.2 (84)
30	45.9 (85)	44.8 (83)	48.4 (82)	48.2 (81)
LSD(5%)	5.8		5.5	

* NW* : Not wounded W** : Wounded

* Numbers in parenthesis indicate the percentage of control in each concentration of jasmonic acid.

이에 비하여 상처를 가한 후 자스몬산을 처리한 7일 후의 초장은 20 μ M까지 무처리와 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않았으며 25 μ M 이상에서 무처리의 83 ~ 87%로 초장 감소가 컸다. 자스몬산 처리 14일 후의 초장도 동일한 양상을 보여 20 μ M 이하에서는 무처리와 통계적인 유의차가 없었으나 25 μ M 이상에서는 무처리

의 81 ~ 84%로 초장 감소하였다.

자스몬산의 과다 축적은 식물체의 생육 저해를 나타낸다는 보고(Creelman *et al.*, 1997)에서와 같이 본 실험에서도 고농도의 자스몬산 처리에서는 초장 감소를 보였다. 그러나 높은 농도의 자스몬산 처리에서 무상처보다 상처 처리에서 초장 감소가 적은 것은 자스몬산에 의한 상처의 치유효과가 있음을 보여준 것으로 생각된다.

자스몬산은 대부분의 고등식물에서 그 함유량이 10 μ M로 추정되는데(Mason *et al.* 1992) 외부에서 자스몬산을 공급하였을 때 식물체 내에 어느 정도의 자스몬산이 흡수되는지는 보고된 바가 없으며 또한 본 실험에서도 자스몬산의 함량이 측정되지 않아 알 수 없으나 본 실험에서 15 μ M까지 초장 감소가 없는 것으로 보아 Mason *et al.*(1992)의 보고와 유사한 결과로 보여진다.

표3-12-2는 상처 처리와 무 상처 잎에 자스몬산을 처리한 후 7일과 14일 후의 경수를 나타낸 것이다.

Table 3-12-2. Number of stems of wounded and not wounded rice seedling after 7 and 14 days of treatment with jasmonic acid.

Jasmonic acid (μM)	7 DAT		14 DAT	
	NW*	W*	NW*	W*
0	3.7 (100)	4.0 (100)	4.3 (100)	4.0 (100)
10	3.7 (100)	4.5 (113)	3.8 (88)	4.8 (120)
15	3.8 (103)	4.0 (100)	4.3 (100)	4.2 (105)
20	3.0 (81)	4.0 (100)	3.3 (77)	4.5 (113)
25	3.0 (81)	3.3 (83)	3.5 (82)	3.3 (83)
30	3.3 (89)	4.3 (105)	4.0 (93)	4.5 (113)
LSD(5%)	1.3		1.3	

* NW* : Not wounded W** : Wounded

* Numbers in parenthesis indicate the percentage of control in each concentration of jasmonic acid.

경수도 초장에서와 같이 무상처에서 자스몬산 처리 7일 후에 15 μM 까지는 무처리와 차이가 없었으나 20 μM 이상에서는 무처리의 81 ~ 89%로 경수가 적었으며 처리 14일 후에도 동일한 경향을 나타내었다. 이에 비하여 상처 처리에서는 처리 7일 후 25 μM 외에는 무처리와 같거나 더 많았으며 처리 14일 후에는 모든 농도에서 상처처리가 무상처보다 많았다. 이러한 결과는 자스몬산에 의한 상처 치유 효과가 초장보다 경수에서 더 뚜렷하게 나타나고 있음을 보여준다.

자스몬산의 처리 농도가 높은 경우 식물체의 생육이 저해를 받음은 이미 보고 (Creelman et al., 1992, Gundlach et al., 1992, Ecker., 1995)된 사실이 본 실험에서도 나타나고 있어 본 실험에서 앞에서 본 초장에서와 마찬가지로 경수에서도 이러한 현상이 분명하게 나타나고 있음은 기 보고된 내용과 일치하고 있다.

상처 처리와 무상처 외에 몇 가지 농도의 자스몬산을 처리한 7일 후와 14일 후의 건물중은 표 3-12-3과 같다.

Table 3-12-3. Dry weights of wounded and not wounded rice seedling after 7 and 14 days of treatment with jasmonic acid.

Jasmonic acid (μM)	7 DAT		14 DAT	
	NW*	W*	NW*	W*
0	0.31 (100)	0.30 (100)	0.70 (100)	0.45 (100)
10	0.27 (87)	0.28 (93)	0.52 (74)	0.43 (96)
15	0.26 (84)	0.30 (100)	0.53 (76)	0.50 (110)
20	0.27 (87)	0.20 (67)	0.44 (63)	0.67 (124)
25	0.26 (84)	0.20 (67)	0.28 (40)	0.46 (102)
30	0.24 (70)	0.32 (114)	0.50 (89)	0.53 (116)
LSD(5%)	ns		0.5	

* NW* : Not wounded W** : Wounded

* Numbers in parenthesis indicate the percentage of control in each concentration of jasmonic acid.

자스몬산 처리 7일 후에는 처리간에 유의성이 없었으나 처리 농도의 증가에 따라 건물중은 감소하는 경향을 보이고 있다. 이것은 처리 7일후에는 아직 처리에 의한 효과가 건물중에 영향을 미치기에는 시간적으로 짧은데 원인이 있는 것으로 생각된다. 처리 14일 후에는 처리간에 유의 차를 보여 무상처에서는 무처리의 40 ~ 76%로 매우 낮은 반면 상처 처리에서는 20 μM 의 149%를 제외하고는 모두 무처리의 94 ~ 102%로 무처리와 유의적인 차이를 보이지 않아 자스몬산 처리에 의한 상처 치유 효과가 나타나고 있음을 알 수 있다.

잎의 상처와 무상처 처리 후 자스몬산을 농도별로 처리한 24시간과 72시간 후의 엽록소 형광반응을 측정된 결과가 그림 3-12-1 ~ 그림 3-12-6 이다.

그림 3-12-1에서 초기 형광값 F_0 는 빛에너지를 받아들일 수 있는 능력을 의미하는 것으로 엽록소 함량이 많으면 증가하게 되는데 자스몬산 처리 후 24시간 경과시의 F_0 는 상처와 무상처간에 15 μM 까지는 차이가 없었으나 20 μM 이상의 농도에서 상처 처리가 무상처보다 높게 나타나며 농도가 높을수록 그 차이가 더 컸다. 72h 시간 경과 후에는 20 μM 과 25 μM 에서 상처와 무상처 간 차이가 더 커지고 있다.

그림 3-12-2에서 일반적으로 스트레스를 받은 식물에서 감소를 보이는 F_m 은 자

스몬산 처리 24 시간 후에는 상처와 무상처 간에 차이를 보이고 있지 않아 스트레스의 영향이 크게 나타나고 있지 않으나 72시간 경과 후의 F_m 값은 $20\mu\text{M}$ 이상에서 무상처 보다 높으며 특히 $25\mu\text{M}$ 에서는 가장 큰 차이를 보이고 있다.

그림 3-12-3의 식물체의 일반적인 광합성 효율을 의미하는 F_v/F_m 은 광화학 반응에 대한 양자 수율의 최대치 즉, 식물 잎의 광합성 수행 능력의 최대값을 말한다. 이 값은 그림3에서 보는 바와 같이 24시간 경과 후에는 식물체가 상처 스트레스에 대한 반응으로 모든 농도에서 상처 처리가 무상처보다 낮았다. 그러나 72시간 경과 후에는 자스몬산 $20\mu\text{M}$ 이상 처리에서는 무상처와 같아져 자스몬산의 상처 치유 효과를 보여주고 있다. 엽록소 형광물질의 이동과 F_v/F_m 은 자연적인 엽의 노화과정에 따라 달리 해석 될 수도 있다(Bjorkman *et al.*, 1981).

그림 3-12-4의 qP 는 실제적으로 광합성에 이용되는 전자인데 자스몬산 처리 24 시간 후에는 상처 처리에서 무상처 보다 높게 나타났으나 72시간 후에는 $20\mu\text{M}$ 이상에서는 상처 처리가 무상처 보다 적게 나타나고 있다.

그림 3-12-5는 광합성에 이용되지 않고 다른 방향으로 소실되는 전자를 의미하는 qN 은 자스몬산 처리 24시간 후에는 무상처가 상처 처리보다 높거나 거의 같았으며 72시간 후에는 자스몬산의 낮은 농도에서는 무상처가 상처 처리보다 높으나 고농도에서는 상처 처리가 무상처 보다 더 높게 나타나고 있다.

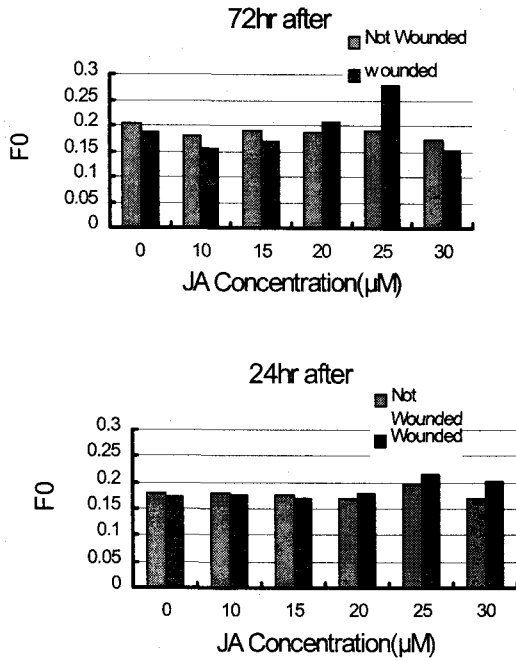


Fig 3-12-1. F_0 value of wounded and not wounded rice seedling at 24hr and 72hr after treatment with jasmonic acid.

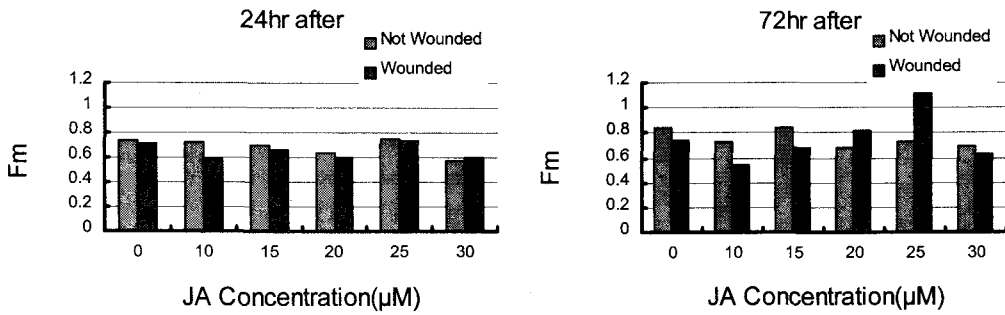


Fig. 3-12-2. F_m value of wounded and not wounded rice seedling at 24hr and 72hr after treatment with jasmonic acid.

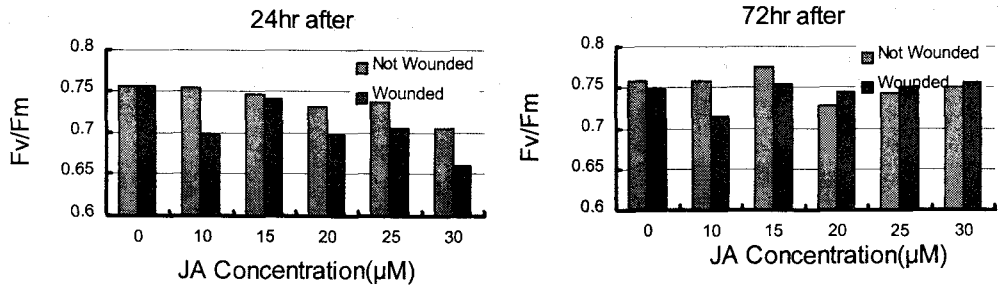


Fig 3-12-3. Fv/Fm value of wounded and not wounded rice seedling at 24hr and 72hr after treatment with jasmonic acid.

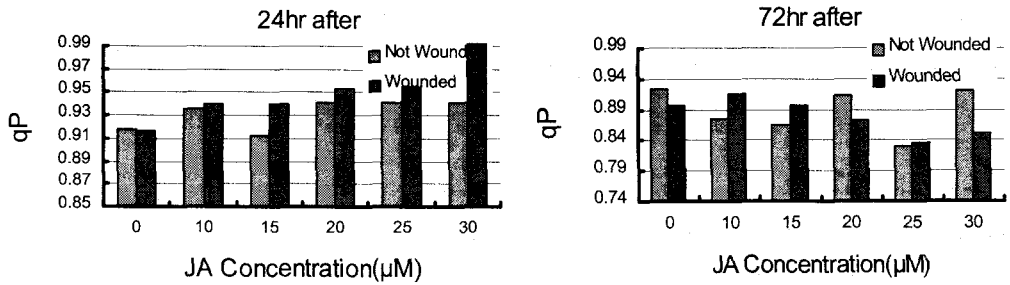


Fig 3-12-4. qP value of wounded and not wounded rice seedling at 24hr and 72hr after treatment with jasmonic acid.

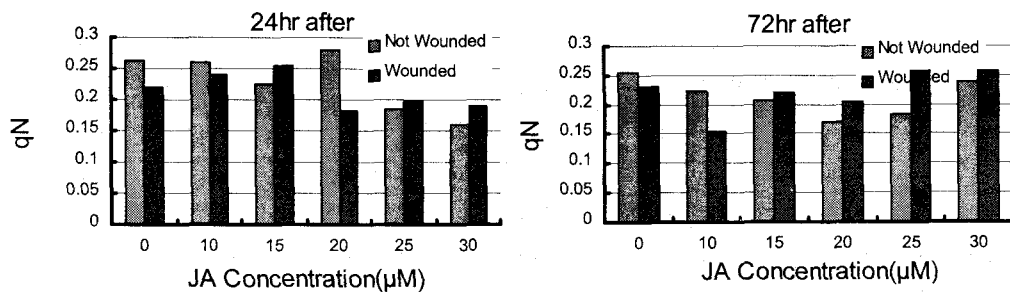


Fig. 3-12-5. Fm value of wounded and not wounded rice seedling at 24hr and 72hr after treatment with jasmonic acid.

제 13 절 염 스트레스에서 벼(*Oryza sativa* L.) 내염성 품종과 감수성 품종의 발아와 유묘 생육에 대한 자스몬산과 ABA 처리 효과

1. 서언

오늘날의 내염성에 대한 연구는 다양한 생리적 반응에 대한 유전적 요인의 규명 측면에서 식물의 저항성 기작을 찾는 방안이 다양하게 시도되고 있다. 벼의 스트레스 내성에 대한 유전적 개선 방법이 연구되어 왔지만 아직까지 완전히 해결되지는 못한 실정이며(Grover et al., 1996) 벼는 일반적으로 염해에 약한 작물로 알려져 있다(Mass et al., 1977; Flowers et al., 1981). Bartels등(1994)은 내염성은 하나의 유전적 요인이 아닌 복수유전자의 상호작용에 의한다고 하며, Lee(1996)등은 Indica 품종들이 Japonica 품종들에 비해 상대적으로 염해에 강한 유전적 특성을 가지고 있지만 상업적인 가치 부분에서 Indica 보다는 Japonica 품종들이 유리하기 때문에 내성을 가지는 Indica 품종에 경제성을 가지는 Japonica 품종의 특성을 가지는 품종의 육성이 필요하다고 하였다. 벼의 내염성에는 품종간 차이가 있음이 보고되고 있다(Yeo et al., 1990; Narayanan et al., 1990).

내염성은 생육단계에 따라서도 반응 정도가 다르고 특히 유묘기에는 매우 민감하게 반응하며(Heenan et al., 1988; Lutts et al., 1995; Cui et al., 1995), 초기 생육단계의 염해에 의해 수량 감소로 이어지지만 발아기에는 다른 생육단계에 비해 염해가 특히 크게 나타나는 것으로 알려져 있다(Narale et al., 1969; Khatun et al., 1995; Linghe et al., 2000). Khan등(1997)은 발아시기에 벼는 16.3ds/m까지는 영향을 받지않고, 22ds/m에서부터 발아 억제를 받는다고 하였고, 발아기에 벼의 염해 저항성은 낮지만 후기 생육 단계에서는 내성이 증가한다고 한다(Heenan et al., 1988; Gundlach et al., 1992). 그러나 Gregorio등(1993)은 발아기에는 염해에 대해 저항성을 가지고 본엽 1~2엽기에는 감수성을 나타낸다고도 하였으며, Chuan(1996) 등은 발아 3일 후 NaCl 50~150mM에서 줄기와 뿌리 생육(생체중, 건물중, 길이)이 감소한다고 하였다. Linghe(2000)등은 4.6ds/m에서 유묘생육이 저해되고 Yeo등(1982)은 3.4ds/m에서 유묘 생존율이 감소하였다고 하였다.

한편, Jasmonic acid(JA)는 기공 개열, 세포분열, 생육, 광합성, 종자발아와 배발생을 억제하고 엽의 노화, 과실 숙성, 엽록소 손실, 색소체 생합성과 단백질 생합성을 유도 하는데(Creelman et al., 1997; Koda 1992; Sembdner 1993) 벼에서의 저온 스트레스에 대한 JA의 영향에 대한 보고가 있다(Lee et al., 1996). Ann등(1997)은 ABA와 JA는 내염성과 연관을 가지는데 벼 유묘 뿌리 생육에 영향을 주는 것으로

보고하였다. 종자에 함유된 ABA는 발아를 억제하며(Khan, 1968, Sankhla et al, 1968) 다른 호르몬들에 비해 발아억제력이 크다고 한다. 또한 염해시 JA는 유묘의 줄기/뿌리 생육에 차이를 주지 않았으며, 저농도의 JA는($\leq 3\mu\text{M}$) 부정근 형성을 촉진하고 ABA는 억제한다고 한다. 외부로부터 공급되는 JA는 ABA와 비슷한 노화를 촉진시키는 것으로 알려져 있다(Raghavendra et al., 1987). 또한 JA는 식물체의 뿌리 생육을 감소시키지만(Berger et al., 1996; Sembdner et al., 1993; Staswick et al., 1992) 줄기 생육에 대한 영향은 아직 명확하지 않은 것으로 알려져 있다. Sembdner(1993)등은 JA가 유묘 생육을 저해시킬수 있다고 하였지만, Montague (1997)는 JA가 길이 성장을 유도한다고 하였다. Griffiths 등(1997)은 ABA가 0.5mmol 이상에서 토마토 유묘의 뿌리 생육이 억제되었다고 하였다.

현재까지 ABA의 발아에 대한 영향의 연구는 많은 보고가 있었지만 JA의 발아에 대한 효과는 아직 미비하다. 따라서 본 연구에서는 식물체의 스트레스 내성과 연관된 식물 호르몬 JA(JA)와 ABA가 NaCl 내성과의 연관성이 발아 종자에 미치는 영향에 대해 알아보려고 실시하였다.

2. 재료 및 방법

본 연구에 사용된 수도(*Oryza sativa* L.) 품종은 국제미작연구소(IRRI)에서 벼 내염성 품종으로 선발한 Anna purna와 감수성 품종으로 IR 28, 본 연구에서 선발한 내염성 품종 CI5309와 염해에 비교적 적응성을 나타낸 동진벼를 공시 품종으로 사용하였다. 4개의 공시품종을 petri dish에 2장의 filter paper를 깔고 10mL의 증류수(PH6.7)에 NaCl 0, 3.3, 6.7, 10.0, 13.3ds/m에 Jasmonic acid(JA)와 Abscisic acid(ABA)를 각각 0, 5, 10, 15 μM 로 처리하였다. 3% Sodium Hypochloride 용액에서 50분간 멸균한 종자를 15립/petri dish, 5반복으로 파종하여 28 $^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, 90% 습도 조건의 growth chamber에서 초기 3일은 암조건, 이후 16시간 광조건, 8시간 암조건에서 실시하였다. 파종 5주일 후 발아율과 임의표본 추출에 의해 10개체에 대한 생육량을 조사하였다.

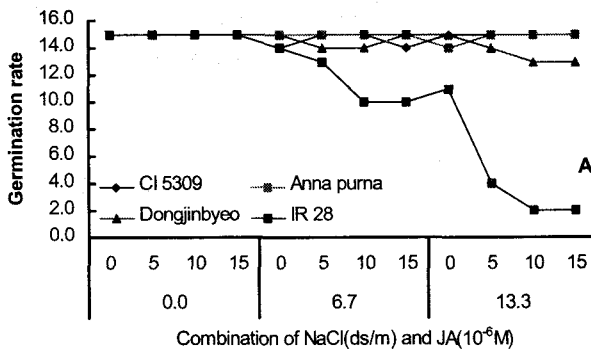
3. 결과 및 고찰

NaCl에 대한 벼 내염성 품종과 감수성 품종간의 식물 호르몬 JA와 ABA의 처리 효과에서 파종 5일 후 발아력과 초장 신장의 결과는 그림 3-13-1과 같다. 발아 시기에 염 스트레스 조건의 벼는 일반적으로 다른 생육단계에 비해 내성이 큰 것으로 알려져 있으며(Khatun et al, 1995, Linghe et al, 2000) 또한 품종간에 있어서도 내성의 차이가 있다고(Yeo et al 1990, Narayanan, 1990) 알려져 있다. NaCl 처리조

건에서 내염성 품종으로 알려진 Anna purua는 13.3ds/m의 농도에서도 발아에는 거의 영향을 받지 않은 것으로 나타났으며 CI5309의 경우에도 동일한 결과를 보였으며 특히 Anna purua에 비해 발아정도가 좋은 것으로 나타났다. 또한 NaCl에 비교적 적응성을 가지고 있는 동진벼에 있어서도 발아에는 어느 정도의 NaCl 영향이 적은 것으로 나타났지만 감수성 품종인 IR28은 NaCl 13.3ds/m 농도에서 무처리에 비해 30%이상 발아 억제 결과를 보여 내성 품종과 큰 차이를 나타냈다.

한편 JA의 발아에 대한 염 스트레스와의 연관성에서 내성 품종인 CI5309와 Anna purua는 NaCl 모든 처리 농도에서 발아에는 아무런 영향을 주지 않은 것으로 나타났지만 동진벼의 경우에는 NaCl 13.3ds/m 처리농도와 JA 10mM 이상 농도에서 무처리에 비해 15%정도의 발아억제를 볼 수 있었다. 그러나 감수성 품종인 IR28은 NaCl과 JA 조합 처리구에서 오히려 많은 발아억제를 나타냈는데 NaCl 6.7ds/m 과 JA 10mM 이상 농도에는 35%이 발아억제를 13.3ds/m에서는 85%이상의 높은 발아 억제를 보였다. 그러나 JA 5mM에서는 상대적으로 발아 억제율이 낮았지만 염 스트레스에 대한 경감효과를 나타내지는 않았다.

한편 ABA의 경우에는 모든 품종들에서 5mM 이상에서 동진벼에서는 80%, IR28에서는 35%이상의 많은 발아 억제를 보였지만 CI5309와 Anna purua는 상대적으로 발아 억제율이 적었는데 CI5309는 ABA 15mM 이상에서 발아에 영향을 받은 것으로 나타났다. NaCl과 ABA의 조합 처리구에서 CI5309를 제외한 다른 품종들은 거의 발아하지 않았다.



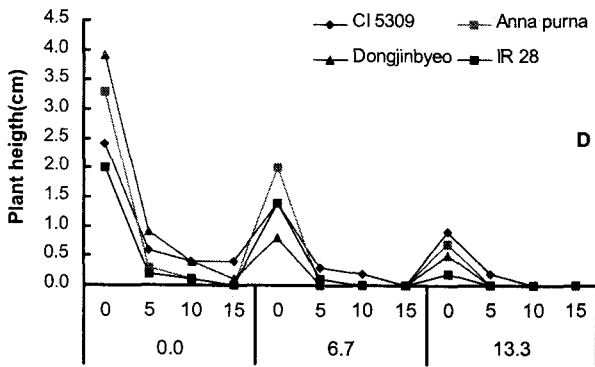
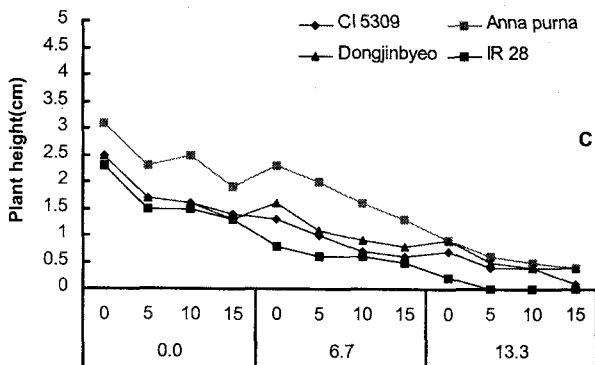
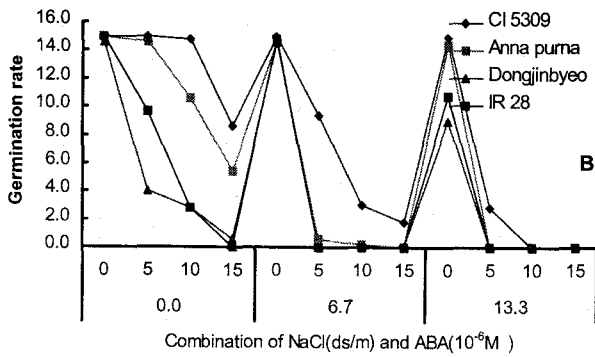
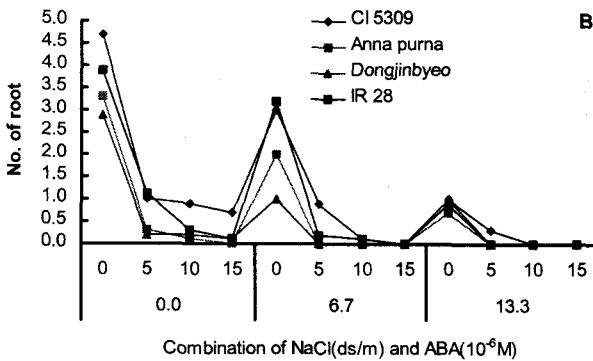
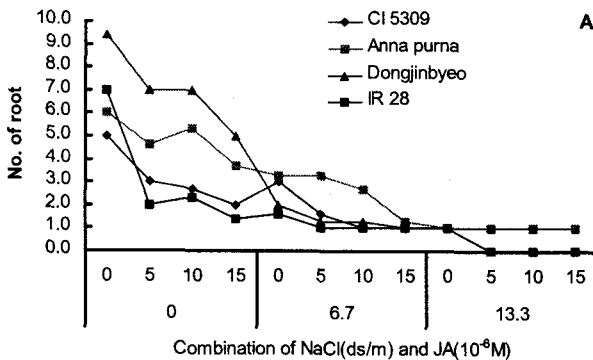


Fig 3-13-1. Effects of rice varieties germination and plant height(cm) at different NaCl and JA, ABA after sowing 5days.

위의 결과로 보아 NaCl에 대한 JA와 ABA의 염 스트레스의 발아에 대한 경감 효과는 적은 것으로 보이며($\geq 5\text{mM}$) JA에 비해 ABA가 벼의 발아에 더 큰 영향을

주는 것으로 보이며 (Khan, 1968., Sankhla et al, 1968) 특히 ABA에 있어서 발아에는 벼의 품종간에 차이가 있는 것으로 사료된다. 염 스트레스에 대한 JA과 ABA의 처리시 초장의 변화에서도 발아의 경우와 비슷한 결과로 ABA이 초장 생육 억제율이 더 크게 나타났다. JA은 모든 품종과 NaCl처리 농도에서 30%(5mM), 35%(10mM), 45%(mM)의 초장 생육억제를 보였으며, ABA의 경우에는 5mM 이상에서부터 80~90%이상의 초장 생육억제를, 특히 NaCl과의 조합처리구에서는 발아 후 초장 신장이 정지된 결과를 보여 JA에 비해 더 많은 피해를 나타냈다.

초장 생육에 대한 JA의 NaCl 피해 경감효과는 내성 및 감수성 품종 모두 5 μ M 농도에서 효과가 있지만 감수성 품종인 IR28의 경우 그 효과는 다른 3개의 품종들에 비하면 30~50% 정도 적은 결과를 보여 NaCl에 대한 JA의 효과는 감수성 품종에 비해 내염성 품종에서 오히려 효과가 있는 것으로 사료되는데 이와같은 결과는 감수성 품종은 NaCl 자체에 피해를 입은 정도가 JA의 효과로 극복할 수 없고, 내염성 품종의 경우에는 JA가 NaCl에 대한 피해를 어느정도까지는 피해정도를 방어하는데 효과를 볼 수 있다는 것으로 사료된다.



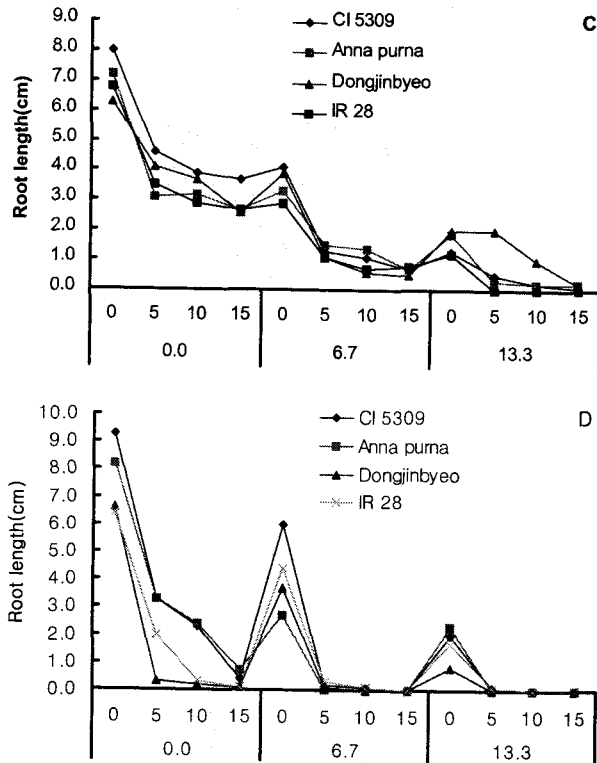
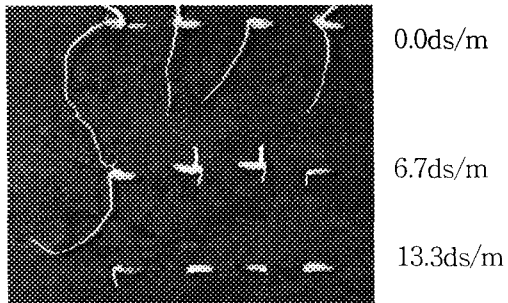


Fig 3-13-2. Effects of rice varieties in root numbers and length(cm) at different NaCl and JA, ABA after sowing 5 days.

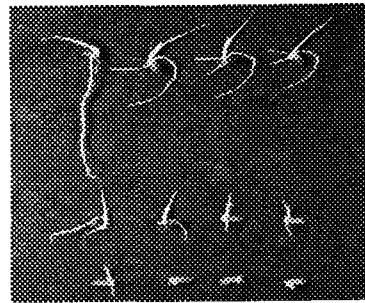
뿌리의 생육에 대한 JA의 효과는 5 μ m 농도에서 뿌리수와 뿌리길이 모두 다른 처리농도에 비해 생육 피해가 적었으며, 뿌리길이에 비해 뿌리수의 감소가 상대적으로 다소 적게 나타났다. 뿌리 생육에 대한 NaCl과 JA, ABA의 효과는 그림 2에서와 같이 발아율과 초장에 대한 효과와 동일한 경향으로 JA보다는 ABA의 뿌리생육 억제율이 더 높게 나타났으며, 뿌리수에 비해 뿌리 길이에 대한 생육 억제율이 더 큰 결과를 보였다. 또한 감수성인 IR28에 비해 내염성인 CI5309와 Anna purna의 생육율이 뿌리수에서는 20%, 뿌리길이에서는 10%이상 높은 결과를 보였다. 또한 그림 3에서와 같이 NaCl과 JA의 조합 처리구에서는 유근의 발생을 전혀 볼 수 없었다.

식물의 스트레스 내성과 관련 있는 JA과 ABA의 염해조건의 벼 발아에 대한 영향에서 NaCl처리에 대한 내성과 감수성 품종간에는 내성품종의 경우 발아에는 NaCl 13.3ds/m 농도에서도 거의 영향을 받지 않았으며 초장과 뿌리 생육에 있어서도 NaCl 처리농도에 따라 감수성 품종보다는 내성 품종의 생육 감소율이 더 적은

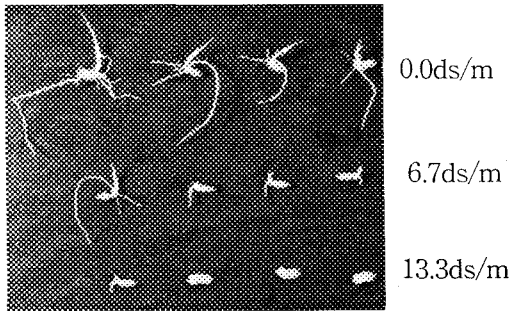
결과를 보였다. JA과 ABA의 발아에 대한 영향은 JA에 비해 ABA의 발아와 초장 뿌리의 생육 억제에 더 큰 영향을 나타냈다.



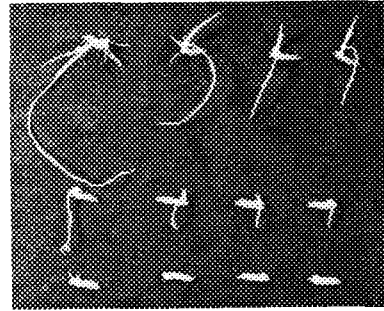
CI 5309



Anna purna



JA con. 0 5 10 15 μ M
Dongjinbyeo



0 5 10 15 μ M
IR 28

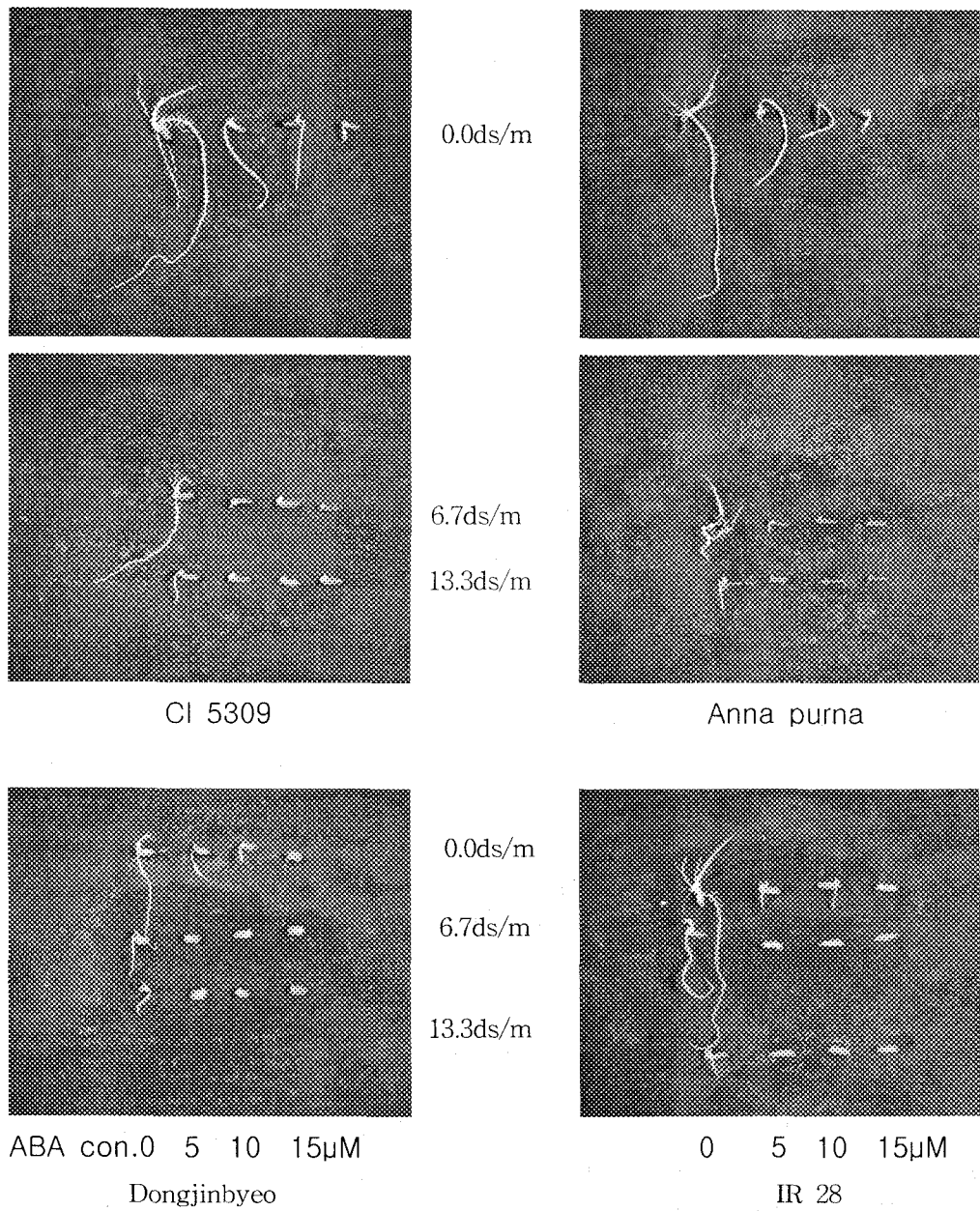


Fig 3-13-4. Effects of rice varieties in germination after 5days at different NaCl and JA, ABA combination concentration.

제 14 절 형질전환체의 병해충 저항성 검정

1. 형질전환체의 도열병과 흰잎마름병에 대한 저항성 검정

가. 서언

외부의 각종 환경 스트레스에 대한 방어 기작의 하나로 linolenic acid로부터 자스몬산을 생성하는데 필수적으로 작용하는 것으로 알려진 lox유전자를 낙동벼에 이 전시킨 형질전환체를 제1과제에서 만들었다. lox유전자는 상처나 병해충 등의 스트레스를 받았을 때 발현되어 스트레스에 대응하는 유전자를 활성화하게 된다(제1절 문헌 참조).

본 연구에서 만든 lox 형질 전환체가 실제로 병해충에 어느 정도 저항성을 높이는지 확인할 필요가 있다.

본 실험은 lox 유전자 형질 전환체가 도열병과 흰잎마름병에 어느 정도 저항성을 나타내는지 알기 위하여 병원균을 접종하여 발병 정도를 조사하였다.

나. 재료 및 방법

1) 도열병에 대한 저항성 검정.

공시계통은 낙동벼와 lox 유전자를 형질 전환한 형질 전환체 34개체를 사용하였다. 최아 종자를 10×15×9cm 사각 pot에 각각 3립씩 파종하여 생육시켰다.

공시 균주는 농촌진흥청에서 분양 받은 KI-409를 사용하였으며, 도열병균을 포자형성 배지인 쌀겨 배지(Rice Polish Agar medium; 쌀겨 20g, sucrose 20g, agar 20g, 증류수 1ℓ)를 직경 9cm에 약 30ml씩 분주후 PDA (potato dxtrose agar)에서 10일 정도 자란 균총 절편을 떼어 올려 놓은 후 26℃ incubator에 14일 정도 배양 후 살균된 고무 부러쉬를 이용하여 기중균사를 제거하고 형광등 30cm 하단에 치상, 7일 정도 빛을 조사 후 분생포자를 형성하였다.

쌀겨배지에 형성된 분생 포자를 멸균수에 Tween 20 1000배액을 부어 끓여낸 후 포자 현탁액을 만들어 2×10^5 spores/ml 농도로 접종원을 만들어 진공 콤프레샤를 이용한 스프레이로 4엽기 완전 전개된 1개체당 10ml 정도를 분무 접종하였다. 접종된 벼는 바로 26℃ Dew chamber에서 48시간 처리 후 온실에 옮겨 놓아 14일 후에 병 걸린 잎 수, 병반수, 병반 면적율, 병반길이, 병반폭을 조사하였다.

2) 흰잎마름병에 대한 저항성 검정

공시 균주로 전남농업기술원에서 분양 받은 HB 01015 K₃ 1114를 사용하였다. 균주를 PSA(Potato Sucrose Agar medium; potato 300 g, Ca(NO₃)₂·H₂O 0.5 g, Na₂HPO₄·2H₂O 2.0 g, Peptone 5.0 g, Sucrose 20.0 g, Agar 20.0 g, 증류수 1 ℓ, pH 6.8 ~ 7.0)를 시험관에 분주 후 30℃ incubator에서 3 ~ 4일 정도 키운 균을 OD₆₀₀ = 1.0(0.8×10⁹ cfu/ml) 정도로 측정된 다음 멸균수로 현탁하였다.

균 현탁액에 접종 가위를 담궈다가 도열병 검정에 사용한 개체에 7엽기 완전 전개한 잎 끝에서부터 3cm 정도를 자른 후 28℃ Dew Chamber에 24시간 처리 후 온실에 옮겼으며 14일 후에 병반 길이를 조사하였다.

다. 결과 및 고찰

1). 형질전환체의 도열병에 대한 저항성 검정

낙동벼 15립, lox transgenic line 34개체를 파종하여 4엽기(20일) 완전 전개된 잎에 KI-409 도열병 균주를 접종하여 14일 후에 조사한 결과는 그림 3-14-1에서 그림 3-14-10과 같다.

그림 3-14-1과 그림 3-14-2에서는 주경과 분얼경을 나누어 병 걸린 잎 수의 총 잎수에 대한 백분율(%)로 나타내었다. 그림 3-14-1의 주경에서는 control인 낙동벼의 60%에 비하여 형질 전환체인 34개체 모두가 40%이하로 이병엽수 비율이 적어 저항성을 보였으며, 특히 lox1, lox5, lox6, lox11, lox17, lox18, lox23, lox31, lox32 개체에서는 병반이 거의 나타나지 않아 강한 저항성을 보였다.

반면에 그림 3-14-2의 분얼경에서는 lox4, lox6, lox16, lox18, lox21, lox31, lox32, lox33, lox34에서는 병반이 전혀 보이지 않았으며 이들을 제외한 나머지 lox 개체들은 control과 비슷하거나 더 많은 병반 엽수율을 나타내었다.

분얼경에서 control보다 병반 엽수 비율이 높은 개체가 많은 것은 lox 형질 전환 개체들이 control에 비해 파종상의 문제로 5일 정도 더 빨리 파종이 되어 이들은 접종 시 이미 분얼이 되고 있는 상태로 직접 병원균이 접종되었으나 control은 아직 분얼이 시작되지 않았기에 직접 접종이 되지 않았으며 도열병의 발병 여건도 주경보다는 분얼경에서 더 쉽게 발병하기 때문으로 생각된다.

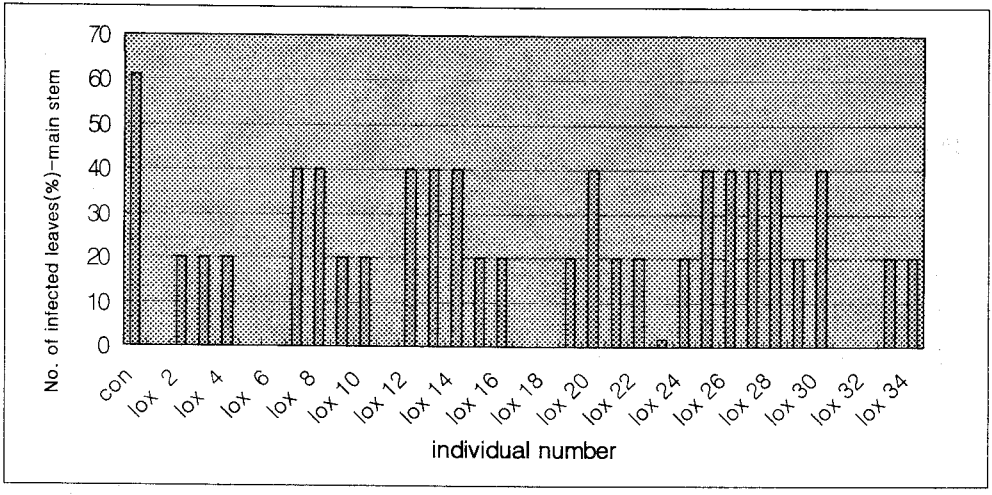


Figure 3-14-1. Number of infected leaves(main stem) of T₁ transgenic rice plants containing the lox gene inoculated by *Maganporthe grisea*.

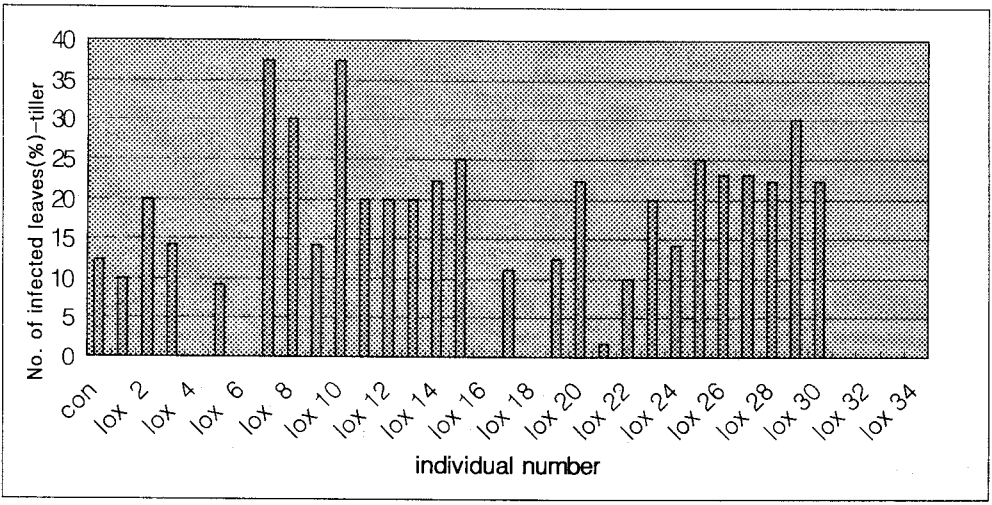


Figure 3-14-2. Number of infected leaves(tillers) of T₁ transgenic rice plants containing the lox gene inoculated by *Maganporthe grisea*.

그림 3-14-3과 그림 3-14-4는 주경과 분얼경으로 나누어 병반 수를 조사한 것이다. 그림 3의 주경에서는 낙동벼가 7개 정도인데 비하여 lox14 와 lox26을 제외하고는 형진전환체가 적은 병반수를 보였으며 특히 lox1, lox5, lox6, lox11, lox17, lox18,

lox31, lox32에서는 병반이 거의 없어 높은 저항성을 나타내었다.

그림 3-14-4의 분얼경에서는 lox4, lox6, lox16, lox18, lox31, lox32, lox33, lox34를 제외하고는 control과 비슷하거나 더 많은 병반수를 나타내었는데 이것은 앞의 병반 엽수 비율에서와 같은 이유에 의한 것으로 보여진다.

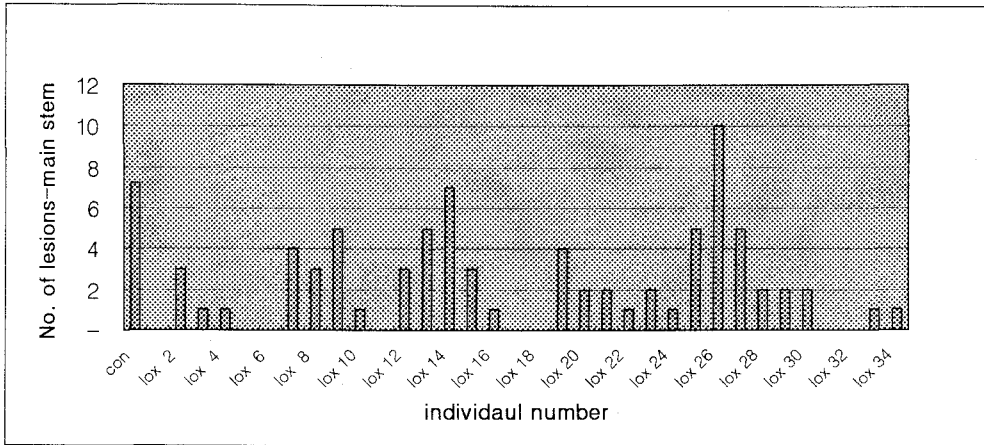


Figure 3-14-3. Number of lesions(main stem) of T₁ transgenic rice plants containing the lox gene inoculated by *Maganporthe grisea*.

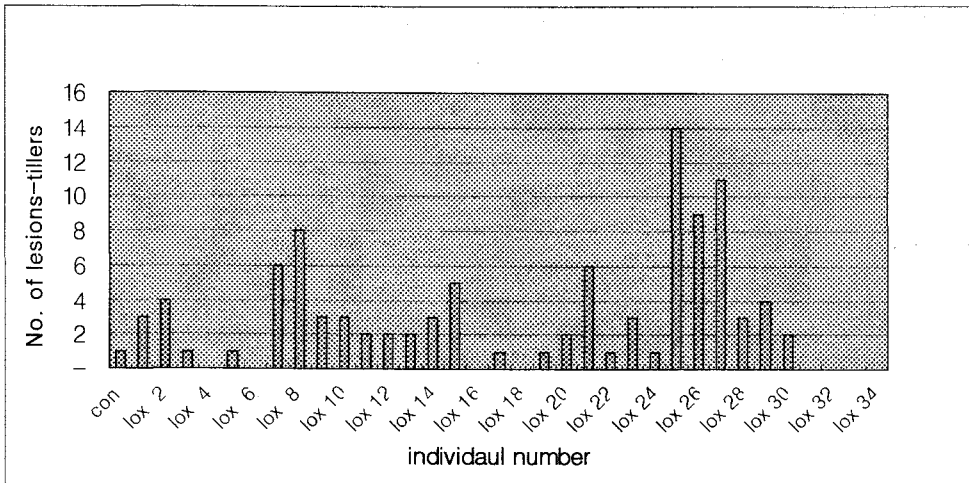


Figure 3-14-4. Number of lesions(tillers) of T₁ transgenic rice plants containing the lox gene inoculated by *Maganporthe grisea*.

그림 3-14-5와 그림 3-14-6은 주경과 분얼경으로 나누어 병반의 길이를 측정한 것이다. 그림 3-14-5의 주경에서 lox1, lox5, lox6, lox11, lox17, lox18, lox31, lox32, lox34 는 병반이 나타나지 않았으므로 병반장도 없다. lox3, lox4, lox9, lox19, lox21, lox22, lox25, lox26 lox28 lox29, lox30 lox33의 12개체는 control보다 병반장이 짧았으며 나머지는 control보다 병반장이 더 길었다.

그림 3-14-6의 분얼경에서 lox4, lox6, lox16, lox 18, lox31, lox32, lox33은 병반이 없었으며 lox1, lox30, lox34만 control 보다 병반장이 짧았고 나머지 개체들은 모두 병반장이 control 보다 길었다. 이러한 현상은 앞에서 언급한 것과 같은 이유로 생각된다. 즉, 파종기의 차이로 control 인 낙동벼가 발병이 잘 되지 않았거나 발병도 병원균의 직접 접종에 의한 것이 아닌데 그 원인이 있는 것으로 보여진다.

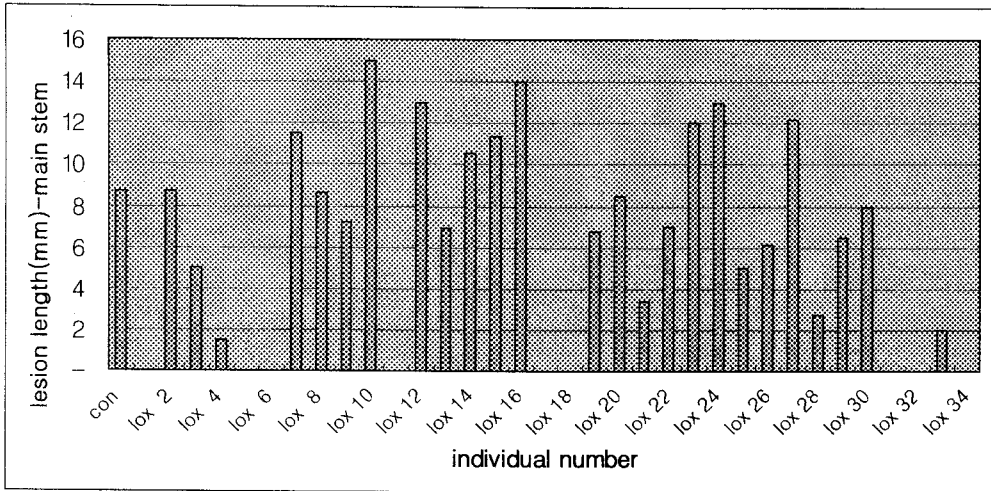


Figure 3-14-5. Lesion length(main stem) of T₁ transgenic rice plants containing the lox gene inoculated by *Maganporthe grisea*.

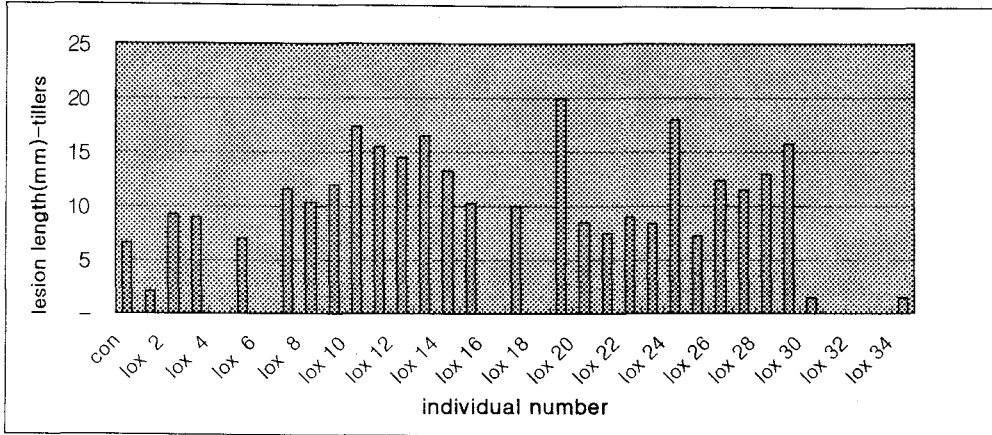


Figure 3-14-6. Lesion length(tillers) of T₁ transgenic rice plants containing the lox gene inoculated by *Maganporthe grisea*.

그림 3-14-7과 그림 3-14-8은 주경과 분얼경으로 나누어 병반 폭을 측정 한 것이다. 그림3-14-7의 병반 폭에서 lox1, lox5, lox6, lox11, lox17, lox18, lox31, lox32, lox34에서는 도열병 병반이 나타나지 않았으며, lox7, lox12, lox14, lox15, lox19의 5 개 개체는 control과 비슷하거나 더 넓은 병반 폭을 나타내었으나 나머지 대부분의 개체들은 control보다 좁은 병반 폭을 나타내었다.

그림 3-14-8의 분얼경에서 lox4, lox6, lox16, lox18, lox31, lox32, lox33은 병반이 나타나지 않았으며 lox7, lox12, lox14, lox15가 control과 거의 같거나 이 보다 넓은 병반을 보였으며 나머지 대부분의 개체들은 control 보다 병반 폭이 좁았다. 앞에서 분얼경에서 control 보다 병반 수가 많고 병반 장이 긴 개체가 많았으나 병반의 폭은 control 보다 좁은 개체가 많은 결과를 보였다.

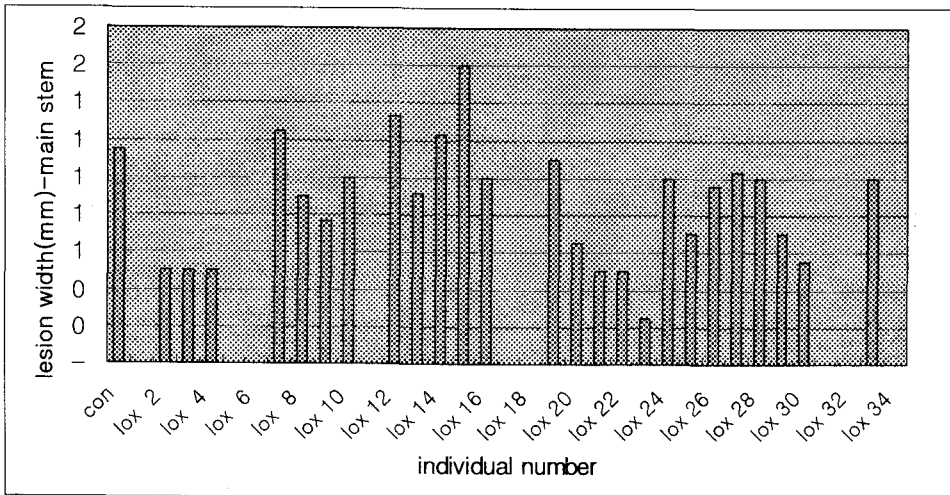


Figure 3-14-7. Lesion width(main stem) of T₁ transgenic rice plants containing the lox gene inoculated by *Maganporthe grisea*.

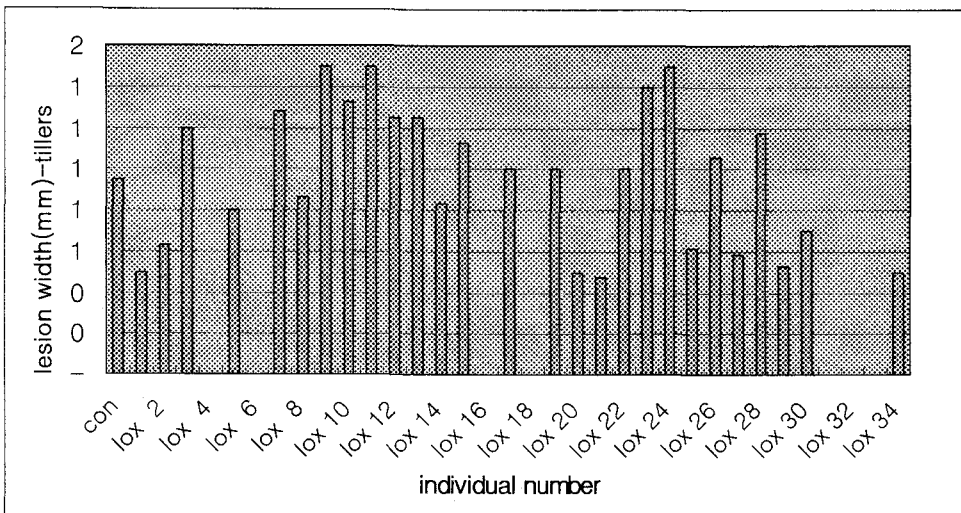


Figure 3-14-8. Lesion width(tillers) of T₁ transgenic rice plants containing the lox gene inoculated by *Maganporthe grisea*.

그림 3-14-9와 그림 3-14-10은 주경과 분얼견으로 나누어 병반 면적을 조사한 것이다. 그림 3-14-9의 주경에서 lox1, lox5, lox6, lox11, lox17, lox18, lox31, lox32, lox34는 병반이 나타나지 않았고 lox7, lox10, lox12, lox14, lox15, lox16, lox23,

lox24, lox27은 control과 비슷하거나 더 많은 병반 면적을 보였으며 나머지 개체들은 control 보다 병반 면적이 적었다. 특히 lox2, lox3, lox4, lox21, lox22, lox25, lox28, lox29, lox30, lox33은 control인 낙동벼가 13mm²인데 비하여 4mm²이하로 매우 높은 저항성을 나타내었다. 이 외 lox8, lox9, lox13, lox19, lox20 lox26도 control의 반 이하의 병반 면적을 보였다.

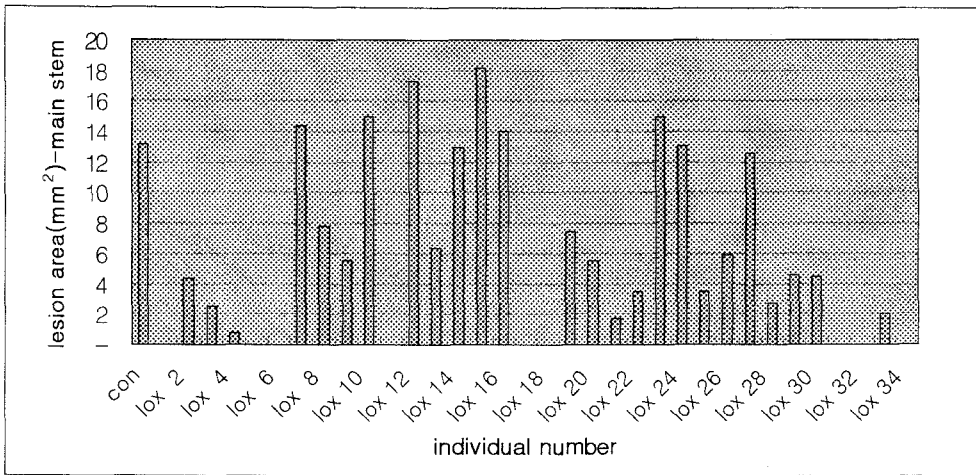


Figure 3-14-9. Lesion area(main stem) of T₁ transgenic rice plants containing the lox gene inoculated by *Maganporthe grisea*.

그림 3-14-10은 분얼경의 병반 면적을 나타낸 것이다. 발병이 되지 않은 lox1, lox4, lox6, lox16, lox18, lox25, lox30, lox31, lox32, lox33, lox34를 제외하였을 때 몇 개체를 제외하면 대부분의 개체들이 control인 낙동벼 보다 면적이 넓은데 이러한 현상은 앞에서 언급한 바와 같이 control의 분얼경에서 발병이 정상으로 되지 않았기 때문이다. 그럼에도 불구하고 lox1, lox2, lox5, lox20, lox21, lox27, lox30, lox34는 control과 거의 같거나 그 보다 적은 병반 면적을 보였다.

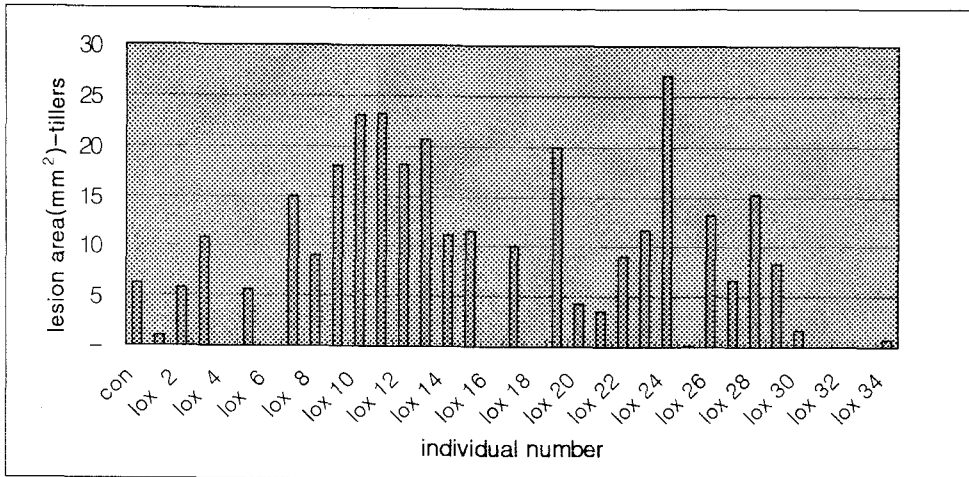


Figure 3-14-10. Lesion area(tillers) of T_1 transgenic rice plants containing the lox gene inoculated by *Maganporthe grisea*.

사진 3-14-1은 negative control(낙동벼)과 lox transgenic T_1 개체에 도열병균을 접종한 24일 후의 발병 상태를 보여주는 사진이다. 1번과 2번은 control인 낙동벼이고, 3, 4, 5, 6, 7번은 lox(T_1) 형질 전환체로 lox transgenic 개체 34개체 중 control에 비해 저항성을 보이는 개체들 중에서 5개체만 나타내었다.

형질전환 34개체 중에서 주경으로 보아 9개체는 전혀 발병이 되지 않아 높은 저항성을 보였으며 나머지 개체들도 대부분 병 수, 병반 장, 병반 폭, 병반 면적 등에서 control보다 적은 수치를 보였고 병반의 형태가 병이 더 진전되지 않고 정지된 양상을 보여 여기에 공시한 대부분의 개체들은 lox유전자의 형질 전환으로 도열병에 대해서 저항성을 제고시킨 것으로 보여진다.

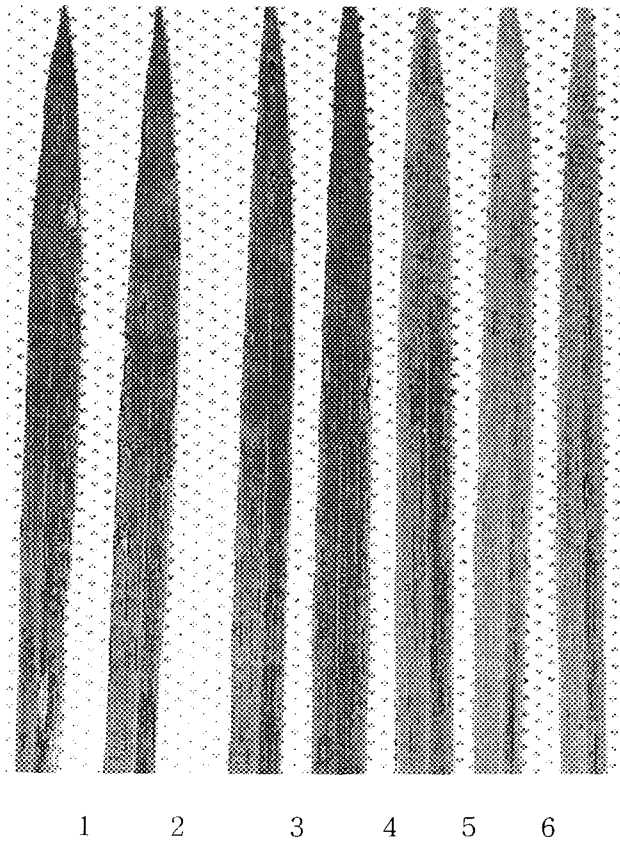


Photo 3-14-1. Resistance to *Maganporthe grisea*(KI-409) conferred by lox gene. Photograph of rice leaves taken 14days after inculation on the leaves with *M. grisea*.

1. Control(Nakdongbyeo)
2. Control(Nakdongbyeo)
- 3 - 7 T₁ transgenic plant containing the lox gene

2). 형질전환체의 흰잎마름병에 대한 저항성 검정

앞에서 lox유전자 형질전환체에 대하여 도열병균을 접종하여 발병 정도를 조사한 후에 이 들 개체를 그대로 생육시켰으며 본엽 7엽기에 흰잎마름병균(*Xanthomonas oryzae.pv.oryzae*) K₃을 가위 접종하여 14일 후에 병반 길이를 조사하였다.

그림 3-14-12는 개체별로 병반장을 나타낸 것이다. 모든 개체가 발병하였으나 모든 lox transgenic 개체들은 control인 낙동벼보다 반 정도 짧았다. 이 중에 특히 lox9, lox18, lox29가 다른 개체들에 비하여 더 짧은 병반장을 보였다.

흰 잎마름병균 중 K₃은 K₁과 K₂에 비하여 병원성이 강하고 병이 신속하게 진전되므로 저항성 유전자가 있는 경우라도 어느 정도의 병반은 나타나게 된다. 이러한 이유로 본 실험에서도 형질 전환체 모두가 어느 정도의 병반을 나타낸 것으로 생각된다.

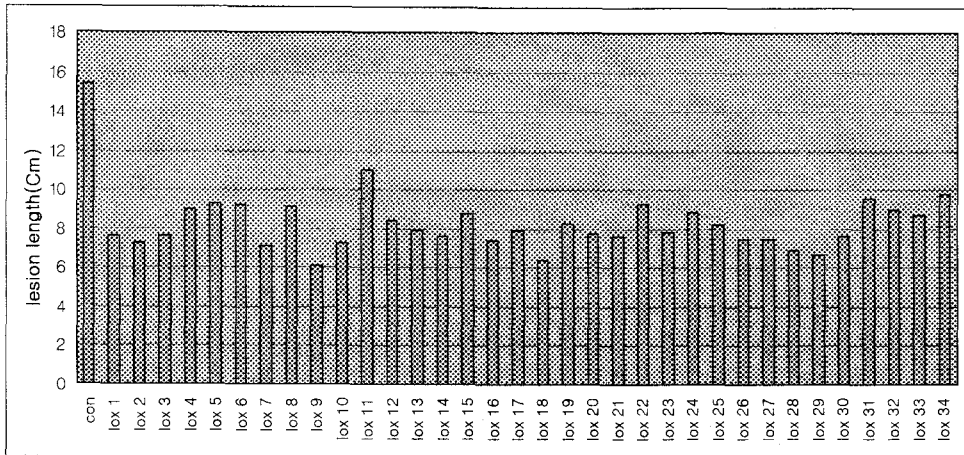


Figure 3-14-12. Lesion length of T₁ transgenic rice plants containing the lox gene inoculated with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (HB 01015 K₃ 1114)

지금까지의 자스몬산의 병에 대한 저항성 제고를 보고한 사례(제1절 문헌 참조)는 대부분이 진균에 대한 것으로 흰잎마름병과 같은 세균에 대한 저항성 연구는 거의 없다. 이것은 진균은 잎 표면을 직접 침투하기에 잎에 상처를 주게되어 자스몬산의 방어가작에 부합하여 저항성 발현을 쉽게 유도할 수 있으나 세균은 상처나 기공을 통하여 침입하므로 인위적으로 상처를 만들어 주지 않으면 저항성 유도를 할 수 없다.

본 실험에서도 가위로 잎 끝을 잘라서 자른 부위에 접종을 하였기에 저항성 발현을 유도할 수 있었다. 실제 포장에서 흰 잎마름병은 태풍이 지난 후 태풍으로 인하여 생긴 상처를 통하여 감염이 되기에 인위적으로 상처를 만들어 접종하는 것이 현실적으로 적합한 방법으로 생각된다.

사진 3-14-2는 흰잎마름병의 발병 상태를 보여주는 것으로 A는 control인 낙동벼이고 B는 lox유전자가 전이된 형질 전환체 이다. A의 낙동벼는 계속하여 병이 진

전되었으나 B의 형질 전환체는 병의 진전이 느리고 병이 진행되고 있는 병반 끝 부위가 푸른 색을 띄어 더 이상 병이 진전되지 않는 것으로 보였다.

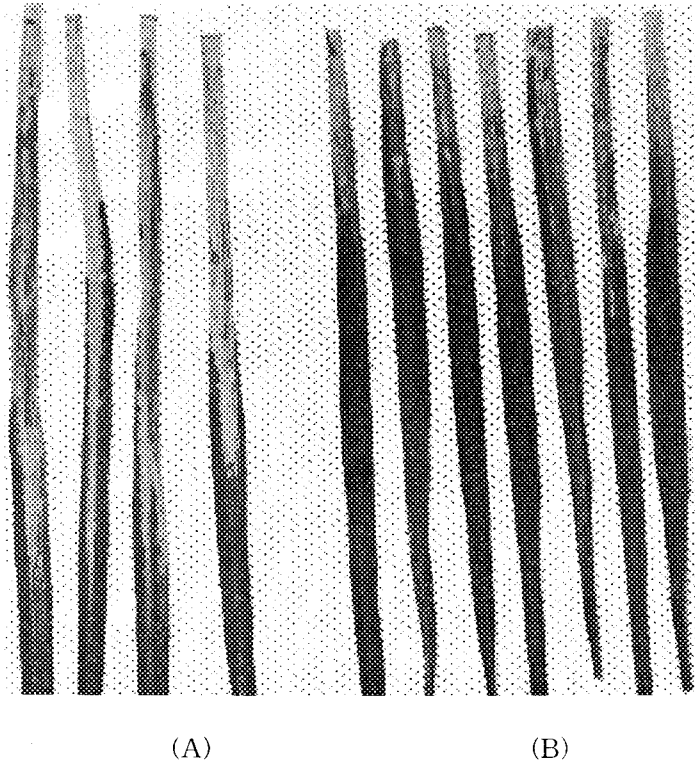


Photo 3-14-2. Resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*(HB 01015 K₃ 111) conferred by the *lox* gene. Photograph of rice leaves taken 14 days after inoculation of leaves with *X. oryzae* pv. *oryzae*.

(A) Control(Nakdongbyeo)

(B) T₁ transgenic plant containing the *lox* gene

2. 형질전환체의 버멸구에 대한 저항성 검정

가. 서언

외부의 각종 환경 스트레스에 대한 방어 기작의 하나로 linolenic acid로부터 자스몬산을 생성하는데 필수적으로 작용하는 것으로 알려진 lox유전자를 낙동벼에 이주시킨 형질전환체를 제1과제에서 만들었다. lox유전자는 상처나 병해충 등의 스트레스를 받았을 때 발현되어 스트레스에 대응하는 유전자를 활성화하게 된다(제1절 문헌 참조).

자스몬산이 해충에 대한 저항성을 높여 준다는 사실이 많이 보고되어 있다 (Cipollini & Redman 1999, Doares et. al. 1995, Doares, Syrovets et. al. 1995, Farmers et. al. 1994, Farmers and Ryan 1990, Farmers and Ryan 1992b, Franceschi 1991, Johnson et. al. 1989, McConn et. al. 1997).

자스몬산의 해충에 대한 저항성은 주로 저작 해충에서 발현되는데 저작은 상처를 내어 주는 것으로 자스몬산이 상처에 대한 방어 기작이 적용되기 때문으로 보여진다(McConn et al. 1997).

본 실험에서는 낙동벼에 lox 유전자를 전이시킨 형질 전환체를 벼의 주요 해충인 버멸구를 접종하여 피해 정도를 조사하였다.

나. 재료 및 방법

1) 실험 1

형질전환 벼 T₁ 개체들에 대한 버멸구 저항성 검정을 위해 2002년 5월 하순 최아 종자를 25~35cm 사각 pot에 1립씩 5개체를 파종하였다. 대비품종으로 낙동벼를 사용하고, Lox 유전자 형질전환 개체와 vector만 삽입된 개체를 공시하였다. 파종 4주 후 벼 포기당 버멸구 10마리와 50마리씩 각각 접종하여 7일후(50마리 접종구)와 4주후(10마리 접종구) 저항성 정도를 조사하였다.

모든 실험과정은 전북 익산시 호남농업시험장 해충방제과와 협의하여 시험장내 유리온실에서 실시하였다.

2) 실험 2

Aos, Lox, TP-Aos 유전자가 삽입된 형질전환 벼 T₁ 개체들의 버멸구 저항성 검정은 2002년 7월 하순~8월 하순에 전남대학교 농업생명과학대학 내 유리온실에서 수행하였다.

대비품종은 낙동벼를 사용하여 Aos 5, Lox 7, TP-Aos 5, vector 5 개체를 공시하

었다.

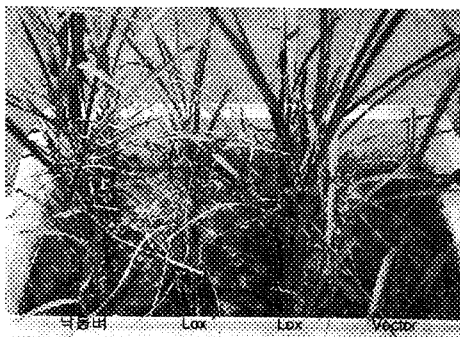
최아종자를 25~35cm 사각 pot에 1립씩 5개체를 파종하여 2주 후 벼 포기당 벼
멸구 10~15마리씩 각각 접종하였다. 벼멸구 접종 후 대비품종인 낙동벼에서 피해
증상이 어느 정도 진전되었을 때 달관조사(1~3 ; 강, 4~6 ; 중, 7~9 ; 약)에 의해
pot별로 조사하였다.

다. 결과 및 고찰

1) 실험 1

파종 4주후 개체당 3~4개의 분얼수를 나타낸 생육기에 10, 50마리의 벼멸구를
접종한 후 7일에 50마리 접종구에서 피해증상이 나타났다(사진 3-14-3). 하엽의 황
화 증상은 대비품종인 낙동벼 보다는 Lox 유전자 형질전환 개체들에서 더 크게 나
타났으며, vector만 삽입된 개체에서는 거의 나타나지 않았다. 그러나 이와 같은 황
화현상은 동일 계통내의 개체들 사이에서도 많은 차이를 나타내었다. 50마리 접종
14일 후 거의 모든 개체들이 고사하였지만 Lox 유전자 형질전환 개체 중 2개체는
50% 정도의 피해율을 보여 어느 정도의 저항성을 가지는 것으로 보였다.

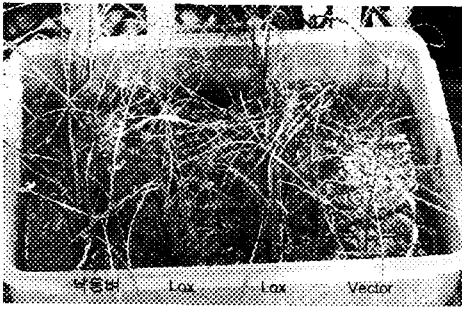
한편, 벼멸구 10마리 접종구에서는 7일후 거의 아무런 피해증상이 나타나지 않았
다(사진3-14-4). 처음 접종된 벼멸구가 1차 산란을 하면서 더 많은 증식이 이루어
진 후 장시간에 걸친 벼멸구에 대한 저항성 여부를 판단코자 하였는데 접종 28일
후에도 거의 모든 개체들의 하엽만이 황화 증상을 보이고 정상적인 생육에는 지장
이 없는 것으로 보였다.



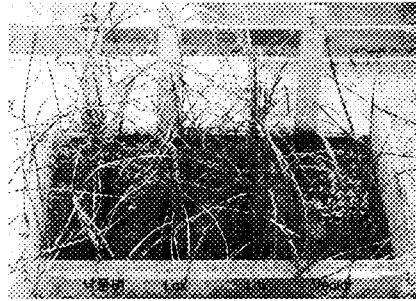
1



2



3

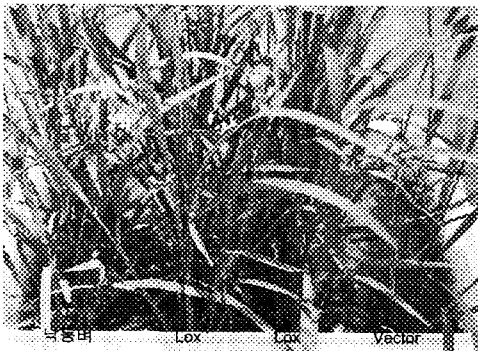


4

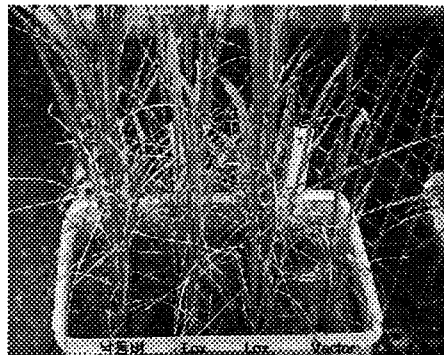
Photo 3-14-3. Rice seedling of transgenic and control inoculated with brown plant hopper.

1 and 2 : seven days after inoculation with brown plant hopper(50 individual)

3 and 4 : fourteen days after inoculation with brown plant hopper(50 individual)



1



2

Photo 3-14-4. Rice seedling of transgenic and control inoculated with brown plant hopper.

1 : 7 days after inoculation with brown plant hopper(10 individual)

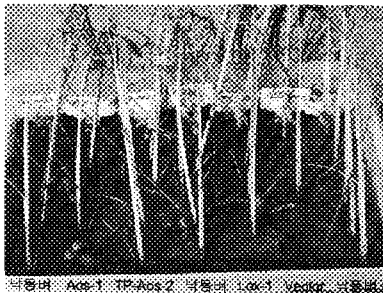
2 : 28 days after inoculation with brown plant hopper(10 individual)

2) 실험 2

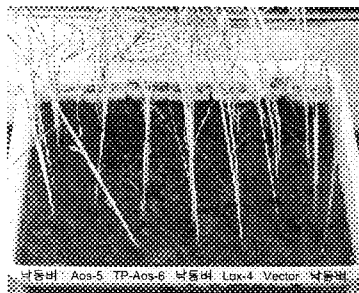
사진 3-14-5은 벼멸구 접종 후 15 - 19일의 상태를 나타낸 것이며 피해 상태를 0 - 9 로 나타낸 것이 표 3-14-1이다. 15일에 조사된 개체들은 낙동벼도 완전히 고사되지 않은 상태였기에 저항성이 발현되었다고 보기가 어려웠다. 접종 16일 후에 조사된 것은 낙동벼나 형질 전환체 모두가 8 - 9를 나타내어 거의 고사 직전의 상태로 형질 전환체가 저항성을 나타내지 못하였다.

접종 17일 후에 조사된 것은 TP-Aos-5의 두 개체가 2를 보였으나 인접한 낙동벼가 2 - 3을 보여 이들이 저항성 개체로 보기는 어렵다. 접종 18일과 19일 후에 조사된 성적도 일부 5 이하를 나타낸 개체가 있으나 control인 낙동벼가 정상적인 피해를 나타내지 않아 이들이 저항성 개체라고 보기 어렵다.

대체적으로 보아 형질 전환체가 벼멸구에 대하여 저항성을 나타내지 못하고 있는 것은 벼멸구가 저작 해충이 아닌 흡즙 해충이기 때문으로 보여진다. 자스몬산에 의한 저항성 제고는 잎을 가해하는 저작 해충에서 나타난다는 사실이 보고되어 있다(Cipollini & Redman 1999, Doares et. al. 1995, Doares, Syrovets et. al. 1995, Farmers et. al. 1994, Farmers and Ryan 1990, Farmers and Ryan 1992b, Franceschi 1991, Johnson et. al. 1989, McConn et. al. 1997).



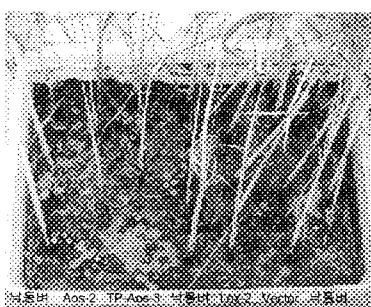
1



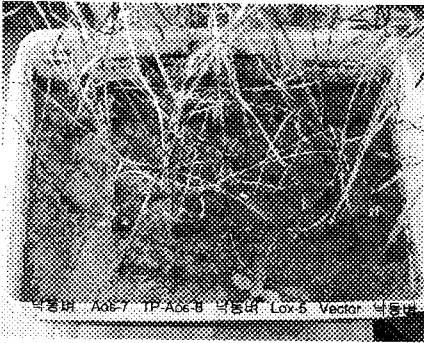
2



3



4



5

Photo 3-14-5. Rice seedling of transgenic and control inoculated with brown plant hopper.

- 1 : 15 days after inoculation with brown plant hopper(10 individual)
- 2 : 16 days after inoculation with brown plant hopper(10 individual)
- 3 : 17 days after inoculation with brown plant hopper(10 individual)
- 4 : 18 days after inoculation with brown plant hopper(10 individual)
- 5 : 19 days after inoculation with brown plant hopper(10 individual)

Table 3-14-1. Score of transgenic seedling and control 15 - 19 days after inoculation with brown plant hopper.

DAI*	Rice lines						
	Nakdong	Aos-1	TP-Aos-2	Nakdong	Lox-1	Vector	Nakdong
15	5	5	5	5	5	4	5
	5	4	5	5	5	5	6
	6	-	6	6	4	-	6
	7	-	6	7	6	-	6
	-	-	-	9(D)	-	-	7
	Nakdong	Aos-5	TP-Aos-6	Nakdong	Lox-4	Vector	Nakdong
16	9	8	5	5	8	8	8
	9	9	9	5	8	8	9
	8	9	9	9	8	8	8
	8	-	9	9	8	8	8
	-	-	9	9	-	-	-
	Nakdong	Aos-4	TP-Aos-5	Nakdong	Lox-3	Vector	Nakdong
17	6	5	2	2	2	3	4
	9(D)	5	2	3	9(D)	4	4
	9(D)	9	-	3	5	3	4
	6	9	-	-	2	4	4
	-	5	-	-	-	5	5
	Nakdong	Aos-2	TP-Aos-3	Nakdong	Lox-2	Vector	Nakdong
18	5	3	8	9(D)	8	5	4
	5	6	5	5	7	6	9
	6	2	7	9(D)	7	9(D)	5
	-	-	-	9(D)	9(D)	6	7
	-	-	-	8	9(D)	6	-
	Nakdong	Aos-7	TP-Aos-8	Nakdong	Lox-5	Vector	Nakdong
19	9(D)	9	6	9	9	9	9
	9(D)	9	9	9	9	9	6
	9(D)	9	9	9	9	4	7
	-	9	9	9	-	4	9
	-	9	6	-	-	-	9

DAI*: Days after inoculation

여 백

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

여 백

제 1 절 목표 달성도

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

1. 제 1 차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발 목표	평가		목표 달성도 (%)	참조부분 (제 2 장)
	평가의 착안점	평가의 척도(%)		
1. Lox 유전자의 구조 규명 및 AOS 유전자의 확보	1. 6CO2E12 유전자의 sequence 를 얻었는가?	20	100	제 1 절
	2. flax seed 의 AOS 유전자를 확보하였는가?	20	100	제 2 절
2. Lox 와 AOS 유전자의 발현 기구 규명	3. MeJA의 처리에 따른 Lox 및 AOS 유전자의 발현 양상을 분석하였는가?	20	100	제 3, 6 절
3. Lox 유전자와 AOS 유전자의 연결	4. Lox 유전자와 AOS 유전자를 성공적으로 연결하였는가?	20	100	제 4 절
	5. 연결된 유전자가 이중 발현 되었는가?	20	100	제 4, 5 절

2. 제 2 차년도 의 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발 목표	평가		목표 달성도 (%)	참조부분 (제 2 장)
	평가의 착안점	평가의 척도(%)		
1. 형질 전환 백터의 제작 2. 형질 전환 벼의 창출 3. 자스몬산의 처리에 따른 스트레스 저항 성 검정	1. pCAMBIA 백터를 적절히 변형하였는가?	10	100	제 7 절
	2. Lox 유전자 및 AOS 유전자를 백터내에 도입하였는가?	20	100	제 7 절
	3. Agrobacterium에 의한 transformation에 성공하였는가?	20	100	제 7 절
	4. 형질 전환벼가 창출되었는가?	20	100	제 7 절
	5. 각종 스트레스에 대한 자스몬산 처리효과가 분석 되었는가?	30	100	제 9, 10, 11, 12 절

3. 제 3 차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발 목표	평가		목표 달성도 (%)	참조부분 (제 2 장)
	평가의 착안점	평가의 척도(%)		
1. 형질 전환 벼의 분석 2. 형질 전환 벼의 스트레스 저항성 비교 분석	1. 상처 스트레스에 대한 저항성을 분석하였는가?	25	100	제 8, 12 절
	2. 도열병에 대한 저항성을 분석하였는가?	25	100	제 11, 14 절
	3. 해충에 대한 저항성을 분석하였는가?	20	100	제 11, 14 절
	4. 저항성 벼 개체를 선별하였는가?	30	100	제 14 절

4. 최종 평가의 착안점 및 목표 달성도

평가의 착안점	평가		목표 달성도 (%)	참조부분 (제 2 장)
	평가의 척도(%)	평가의 척도(%)		
1. Lox 유전자와 AOS 유전자의 발현에 성공하였는가?	30	100	100	제 3 절
2. Lox 유전자와 AOS 유전자를 식물체에 도입에 성공하였는가?	30	100	100	제 7, 8 절
3. 광범위 스트레스 저항성 벼를 창출하였는가?	40	100	100	제 14 절

제 2 절 관련 분야에의 기여도

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

1. 기술적 측면에서의 기여도

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

2. 학문 발전에의 기여도

본 연구에서는 다양한 종류의 스트레스 반응 기작에서 중요한 역할을 하는 자스몬산의 생합성 경로에 관한 연구이다. 따라서 본 연구는 작물학, 식물생리학, 분자 생물학, 생화학 분야의 발전에 기여했다고 판단된다. 본 연구의 결과는 다음과 같이 학술지나 학술대회에서 발표되었다.

가. 학술지

1) Eun-Seon Kim, Haeyoung Kim, Ro-Dong Park, Ypungman Lee, Oksoo Han (2001) Dual positional specificity of wound-responsive lipoxygenase from maize seedlings, *J. Plant Physiol.*, in press.

- 2) Oksoo Han, Eunsun Kim, Eunyong Choi (2001) Methyl jasmonate induces biphasic accumulation of lipoxygenase mRNA in Maize seedlings, FASEB J. 15(4), A194.
- 3) Oksoo Han, Euenyoung Choi, Youngsun Kim (2000) Biphasic Expression of Methyl Jasmonate-Responsive Lipoxygenase Gene in Corn Seedlings, New Frontiers in Plant Science and Plant Biotechnology, Toulouse, France, March 5-9,
- 4) Jangyeol Choi, Sungkuk Jang, Eunsun Kim, Bongchoon Lee, Kwangwhan Back, Oksoo Han (2000) Heterologous Expression of Allene oxide Synthase, 한국 분자생물학회 초록집, H-80.
- 5) Haeyoung Kim, Eunsun Kim, Oksoo Han (2000) Heterologous Expression of Allene Oxide Synthase-Lipoxygenase Fusion Protein in E. coli, 한국 분자생물학회 초록집, H-81, . 10.
- 6) A Young Lee, Eun Joo Park, Oksoo Han (2000) Quantitative analysis of Jasmonic Acid Induced by Wounding in Rice Leaves, 한국 분자생물학회 초록집, H-82.
- 7) Eunyong Choi, Youngsun Kim, Kyungwhan Back, Oksoo Han (2000) Methyl jasmonate induces biphasic accumulation of lipoxygenase mRNA in maize seedling, 한국생화학학회 초록집, G-11.

3. 경제, 산업적 측면에의 기여도

본 연구의 산업적 효용가치를 고려하여 다음과 같이 특허를 출원하였다.

- 1) 한옥수, 이영만, 박노동, 최은영, 박재여, 김해영, 조경원, 이아영, 광범위 기질 특이적 리폭시지나아제 및 이의 용도, 출원번호: 10-2001-0047600, 대한민국 특허청, 2001. 08. 08.
- 2) 한옥수, 김은선, 헤마르 쿠마르, 리폭시지나아제의 계놈 유전자와 프로모터 및 이의 용도, 출원번호: 10-2001-0077807, 대한민국 특허청, 2001. 12. 10.

3) 한옥수, 백경환, 장성국, 스트레스 감응 알렌 옥사이드 합성효소 및 이의 용도, 출원번호: 10-2001-0078008, 2001. 12. 11.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

여 백

제 1 절 추가 연구의 필요성

1. 육종학과 연계된 추가 연구의 필요성

3 년으로 계획된 본 연구가 성공적으로 이루어지면 육종 학자들과 연계된 2 년 동안의 확장 연구를 수행할 것을 연구 계획서 제출시 명시한 바가 있다. 지금까지의 연구 결과로 볼때, 옥수수의 리폭시지나아제 유전자가 도입된 형질 전환 벼는 2년의 확장 연구를 통하여 도열병에 저항성을 지니는 안정적인 벼 품종으로의 개발이 가능하리라고 판단된다. 따라서 가능하다면 종묘회사 및 육종학과 연계된 2 년 동안의 추가 연구를 통하여 도열병 저항성 벼를 안정적으로 육성하는 추가 연구가 필요하다고 사료된다.

2. 포장 실험으로 확대의 필요성

본 연구에서 얻어진 형질 전환벼의 스트레스 저항성은 실험실과 온실 단위에서 이루어진 결과이므로 농업 현장에서 이용하기 위해서는 포장 실험이 필수적이다. 그러나, 벼는 세대가 비교적 길어서 개발된 형질 벼를 포장에서 육성하기 위해서는 많은 시간이 요구되므로 추가 연구가 필요하다고 판단된다.

제 2 절 타 연구에의 응용

1. 리폭시지나아제 경로와 관련된 생화학적 연구에의 응용

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

2. 자스몬산 생합성과 관련된 분자 생물학적 연구에의 응용

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

제 3 절 기업화 추진 방안

2 년 동안의 추가 연구를 통하여 도열병 또는 광범위 스트레스 저항성 작물들이 포장실험에서도 성공적인 결과들을 준다면 종묘회사와 연계하여 품종의 기업화 방안을 고려할 수 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한
 해외과학기술정보

여 백

제 1 절 자스몬산 생합성과 스트레스 관련 기술정보

자스몬산이 식물체의 중요 호르몬으로 분류된 이래로 산발적으로 연구되어왔던 자스몬산 생합성에 관련되는 분자생물학적 연구는 본 연구가 시작되었던 1999년부터 급격히 증가 되어 왔다. 1999부터 2002년 현재까지 ISI Web of Science 에 등록된 자스몬산 생합성 관련 논문은 1,000 편에 이르고 있다. 이러한 사실은 자스몬산의 생합성 경로에 대한 학문적 중요성을 반영하고 있다. 이들 발표된 논문들은 대체로 과거 병저항성에 주로 관련된다고 알려졌던 자스몬산이 지질의 과산화를 통한 일반적인 산화 스트레스에 깊이 관여하고 있다는 결과들을 일관성있게 제시하고 있다. 따라서, 식물 생리학에 있어서 자스몬산의 역할은 광범위하게 재정립되어가고 있으며 과거 알려졌던 병 저항성과 함께, 염, 저온, 고온, 가뭄 등의 비 생물적 스트레스 반응에서도 그 중요성은 현저히 인식되어가고 있다.

제 2 절 스트레스 저항성 작물 생산을 위한 기술 정보

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

여 백

제 7 장 참고문헌

여 백

- Aldridge DC, Galt S, Giles D, Turner WB. 1971, *J. Am. Chem. Soc. Chem. Commun.* pp 1623-1627.
- Andresen I., W. Becker, K. Schluter, J. Burges, B. Parthier, K. Apel. 1992, *Plant Molecular Biology* 19 : 193-204.
- Avdiushiko S, Croft KPC, Brown GC, Jackson DM, Hamilton-Kemp TR, Hildebrand D 1995, *Plant Physiol* 109: 1227-1230.
- Baldwin IT, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 8113-8118.
- Bartels, D. and D. Nelson 1994, *Plant Cell Environ.* 17 : 659-667.
- Bate NJ, Rothstein SJ 1998, *Plant J* 16: 561-569.
- Beaudoin N, Rothstein SJ 1997, *Plant Mol Biol* 33: 835-846.
- Becker, W. and K. Apel. 1992, *Plant Mol. Biol.* 19 : 1065-1067.
- Bell E, Creelman RA, Mullet JE 1995, *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8675-8679.
- Bell E, Mullet JE 1991, *Mol Gen Genet* 230: 456-462.
- Bell E, Mullet JE 1993, *Plant Physiol* 103: 1133-1137.
- Benedetti, C. E., D. X. Xie and J. G. Turner. 1995, *Plant Physiol.* 109 : 567-572.
- Berger, S., E. Bell and J. E. Mullet. 1996, *Plant Physiol.* 111 : 525-531.
- Bergey, D. R., G. A. Howe and C. A. Ryan. 1996, *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 93 : 12053-12058.
- Bohlmann H, Vignutelli A, Hilpert B, Miersch O, Wasternack C, Apel K 1998, *FEBS Lett* 437: 281-286.
- Brash AR 1999, *J Biol Chem* 274: 23679-23682.
- Chaudhry, B., F. Mueller-Uri, V. Cameron-Mills, S. Gough, D. Simpson et. al. 1994, *Plant J.* 6 : 815-824.
- Cheong YH, Chang HS, Gupta R, Wang X, Zhu T, Luan S 2002, *Plant Physiol* 129: 661-677.
- Chuan, C. L., Ching H. K. 1996, *Plant Sci.* 114 : 121-128.
- Cipollini, D. F. and A. M. Redman. 1999, *J. of Chem. Ecol.* 25 : 271 - 281
- Clerivet A. and I. Alami. 1999, *Plant Sci.* 148 : 105-110.
- Cohen, Y., U. Gisi, T. Niderman. 1993, *Phytopathology* 83 : 1054-1062.
- Creelman RA, Mullet JE. 1997, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 355-381.
- Cui, H., Y. Takeoka and T. Wada. 1995, *Jpn. J. Crop Sci.* 64 : 593-600.
- Czapski, J. & M. Saniewski. 1992, *J. Plant Physiol.* 139 : 265-268.
- Demole, E., E. Lederer, D. Mercier. 1962, *Helvetica Chimica Acta* 45 : 675-685.
- Deng W, Grayburn WS, Hamilton-Kemp TR, Collins GB, Hildebrand DF, 1992,

- Planta 187, 203-208.
- Doaeres, S. H., T. Syrovets, E. W. Weiler, and C. A. Ryan. 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 : 4095-4098.
- Doares, S. H., J. Narvaez-Vasquez, A. Conconi and C. A. Ryan. 1995, Plant Physiol. 108 : 1741-1746.
- Droby S, Porat R, Cohen L, Weiss B, Shapiro B, Philosoph-Hadas S, Meir S, 1999, J. Amer. Soc. Hotr. Sci. 124(2), 184-188.
- Dubbs WE and Grimes HD 2000, Plant Physiol 123: 1269-1279.
- Ellen Hornung, Matthias Walther, Hartmut Kuhn, and Ivo Feussner 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96: 4192-4197.
- Epple, P., K. Apel and H. Bohlmann. 1995, Plant Physiol. 109 : 813-820.
- Fan X. & J. O. Mattheis. 1999, HortSci. 34 : 310-312.
- Farmer EE and Ryan CA. 1992, Plant Cell 4: 129-134.
- Farmer EE and C. A. Ryan. 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 87 : 7713-7716.
- Farmer EE and C. A. Ryan. 1992b, Plant Physiol. 98 : 995-1002.
- Farmer EE, D. Caldelari, G. Pearce, M. K. Walker-Simmons, and C. A. Ryan. 1994, Plant Physiol. 106 : 337-342.
- Feussner I, Wasternack C 2002, Annu Rev Plant Biol 53: 275-297
- Finch-Savage, W. E., P. S. Blake, H. A. Clay. 1996, J. Exp. Bot. 47 : 661-667
- Flowers, T. J, and A. R. Reo. 1981, New Phytol. 88 : 363-373.
- Folkard, A., C. S. Marco, Wopereis. 2001, Field Crops Res. 127-137.
- Franceschi, V. R. and H. D. Grimes. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 6745-6749.
- Freys, B. J. F., C. E. Benedetti, C. N. Penfold and J. G. Turner. 1994, Plant Cell 6 : 751-759.
- Gbel C, Feussner I, Hamberg M, Rosahl S 2002, Biochim. Biophys. Acta 584: 55-64.
- Gregorio, G. B, D. Senadhira. 1993, Theor. Appl. Genet. 86 : 333-338.
- Griffiths. A, H. G. Jones and A. D. Tomos. 1997. Applied abscisic acid, root growth and turgor pressure responses of root of wild-tipe and the ABA-deficient mutant, Notabills of tomato. 151 : 60-62.
- Grover, A., S. L. Singla, and A. Pareek. 1996, Proc. of the Third International Rice Genetics Congress, IRRI, Manila, Philippines. pp894-898.
- Gundlach, H., M. J. Muller, T. M. Kutchan, and M. H. Zenk. 1992, Proc. Nati.

- Acad. Sci. USA. 89 : 2389-2393.
- Ha M, Kim DK, Kim SY, Kang BG, Oh S. 1996, J. Biochem. Mol. Biol. 29: 564-568.
- Harms, K. R., A. Atzorn, H. Brash, C. Kuhn, L. Wastemak, Willmitzer and H. Pena-Cortes. 1995, Plant Cell 7 : 1645-1654.
- Hartmond U., R. Yuan, J. K. Burns, A. Grant and W. J. Kender. 2000, J. Amer. Soc. Hort. Sci. 125 : 547-552.
- Heenan, D. P., G. Lewin, D. W. McCaffery. 1988, Aust. J. of Exp. Agric. 28 : 343-349.
- Hildebrand DF. 1989, Physiol. Plantarum 76: 249-253.
- Hildmann, T., M. Ebnet, H. Pena-Cortes, J. J. Sanchez-Serrano, L. Willmitzer, S. Prat. 1992, Plant Cell 4 : 1157-1170.
- Jensen AB, Poca D, Rigaud M, Freyssinet G, Pages M. 1997, Plant Mol. Biol. 33: 605-614.
- Johnson, R., J. Narvaez, G. H. An, C. Ryan. 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 9871-9875.
- Khan, A. A. 1968, Plant Physiol. 43 : 1463-1465.
- Khan, M. S. A., A. Hamid, and M. A. Karim. 1997, J. Agron. 179 : 163-169.
- Khatun, S, and T. J. Flowers. 1995, Plant Cell Environ. 18 : 61-67.
- Kim E-S, Back K, Baik M, Choi E, Han O 2001, J Biochem Mol Biol 34: 259-261.
- Kim E-S, Kim H, Park R-D, Lee Y, Han O 2002, J Plant Physiol, in press.
- Kim SR, Choi J-L, Costa, MA, An G. 1992, Plant Physiol 99: 627-631.
- Koch T, Krumm T, Jung V, Engelberth J, Boland W 1999, Plant Physiol 121: 153-162.
- Koda, Y. 1992. jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development. Int. Rev. Cytol. 135 : 155-199.
- Lee, T. M., H. S. Lur, Y. H. Lin, and C. Chu. 1996, Plant Cell Environ. 19 : 65-74.
- Leon J, Sanchez-Serrano JJ 1999, Plant Physiol Biochem 37: 373-380.
- Linghe, Z. and M. C. Shannon. 2000. Salinity effects on seedling growth and yield components of rice.
- Lopez, R., W. Dathe, C. Bruckner, O. Miersch and G. Sembdner. 1987, Biochem. Physiol. Pflanzenphysiol. 182 : 195-201.
- Lutts, S., J. M. Kinet, and J. Bouharmont. 1995, J. Exp. Bot. 46 : 1843-1852

- Mass, E. V. and G. J. Hoffman. 1977, *J. Irrig. Drain. Div.*, ASCE 103 (IR2) : 115-134.
- McConn M, Creelman RA, Bell E, Mullet JE, Browse J, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 5473-5477
- McConn, M. and J. Browse. 1996, *Plant Cell* 8 : 403-416.
- Meyer, A., O. Miersch, C. Buetter, W. Dathe, and G. Sembdn. 1984, *J. Plant Growth Regul.* 3 : 1-8.
- Montague, M. J. 1997, *J. Plant Growth Regul.* 16 : 11-19.
- Moons, A., E. Prinsen, G. Bauw and M. V. Montagu. 1997, *Plant Cell* 9 : 2243-2259.
- Mueller, M. J., W. Brodschelm, E. Spannagl and M. H. Zenk. 1993, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90 : 7490-7494.
- Narale, R. P., T. K. Subramangam, and R. K. Mukherjee. Influence of salinity on germination, vegetative growth, and grain yield of rice (*Oryza sativa* var. Dular). *Agron. J.* 61 : 341-343.
- Narayanan, K., K. Krishnaraj, S. Sree, and S. R. Rangaswamy. 1990, In *Rice Genetics II*. IRRI, Los Banos, Laguna, Philippines pp167-173.
- Nishiuchi T, Kodama H, Yanagisawa S, Iba K 1999, *Plant Physiol* 121: 1239-1246.
- Ohita, H., K. Shida, Y. L. Peng, I. Furusawa, J. Shishiyama, S. Aibara, Y. Morita. 1991, *Plant Physiol* 9 : 94-98.
- Ohta H, Shirana Y, Tanaka K, Morita Y, Shibata D. 1992, *Eur. J. Biochem.* 206: 331-336.
- Park SH, Pinson SRM, Smith RH. 1996, *Plant Mol. Biol.* 32: 1135-1148.
- Parthier, B. 1991, *Biol. Acta* 104 : 446-454.
- Pena-Cortes H, Albrecht T, Prat S, Weiler EW, Wilmitzer L. 1993, *Planta* 191: 123-128.
- Penninckx, I. A. M. A., K. Eggermont, F. R. G. Terras, B. P. H. J. Thomas, G. W. De Samblanx, A. Buchala, J. O. Metau, J. M. Manners and W. F. Broekaert. 1996, *Plant Cell* 8 : 2309-2323.
- Raghavendra, A. S. and R. K. Bhaskar. 1987, *Plant Physiol.* 83 : 732-734.
- Rakwal R, Tamogami S, Agrawal GK, Iwahashi H 2002, *Biochem Biophys Res Commun* 295: 1041-1045.
- Rakwal R, Tamogami S, Kodama O, 1996, *Biosc. Biotech. Biochem.* 60(6), 1046-1048

- Reinbothe S, Mollenhauer B, Reinbothe C 1994, *Plant Cell* 6: 1197-1209.
- Reinbothe S., C. Reinbothe, and B. Parthier. 1993b, *Plant J.* 4 : 459-467.
- Reinbothe S., C. Reinbothe, and B. Parthier. 1993c, *J. Biol. Chem* 268 : 10606-10611.
- Reinbothe S., C. Reinbothe, C. Heintzen, C. Seidenbecher and B. Parthier. 1993a, *EMBO J.* 12 : 1505-1512.
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE 2000, *Plant Cell* 12: 707-719.
- Royo J, Leon J, Vancanneyt G, Albar JP, Rosahl S, Ortego F, Castanera P, Sanchez-Serrano JJ 1999, *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1146-1151.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989, *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sankhla, N. and D. Sankhla 1968, *Physiol. Plant.* 62 : 553-560.
- Schweizer, P. A., P. Buchala , M. Silverman, I. Seskar, J. Raskin and J. P. Metraux. 1997, *Plant Physiology* 114 : 79-88.
- Schweizer, P., A. Buchala, R. Dudler and J. Metraux. 1998, *Plant J.* 14 : 475-481.
- Sembdner G, Parthier B. 1993, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44:569-589.
- Seo HS, Song JT, Cheong JJ, Lee YH, Lee YW, Hwang I, Lee JS, Choi YD 2001, *Proc Natl Acad Sci* 98: 4788-4793
- Siedow JN. 1991, *Annu. Rev. Plant Physiol. Palnt Mol. Biol.* 42: 145-188.
- Weichert H, Kolbe A, Kraus A, Westernack C, Feussner I 2002, *Planta* 215: 612-619.
- Weichert H, Stenzel I, Berndt E, Wasternack C, Feussner I 1999, *FEBS Lett* 464: 133-137.