

최 중
연구보고서

SSH (Suppression Subtractive Hybridization)
방법을 이용한 야생벼 (*O. minuta*) 유래 내병충성
유전자원 확보 및 곰팡이병 저항성 수도계통 육성

Isolation of Stress-Causative Transcripts from
Wild Rices Using SSH and Development of
Transgenic Rice Resistant to Fungal Disease

연구기관

작물시험장 벼유전육종과

고려대학교 생명과학대학

동아대학교 생물자원학부

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “SSH (Suppression Subtractive Hybridization) 방법을 이용한 야생벼 (*O. minuta*) 유래 내병충성 유전자원확보 및 곰팡이병 저항성 수도 계통육성” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 8 월 8 일

주관연구기관명 : 작물시험장 벼유전육종과

총괄연구책임자 : 최 해 춘

연 구 원 : 강 경 호

협동연구기관명 : 고려대학교 생명과학대학

협동연구책임자 : 김 정 국

연 구 원 : 조 성 기

협동연구기관명 : 동아대학교 생물자원학부

협동연구책임자 : 정 영 수

연 구 원 : 신 상 현

요 약 문

I. 제 목

SSH (Suppression Subtractive Hybridization) 방법을 이용한 야생벼 (*O. minuta*) 유래 내병충성 유전자원확보 및 곰팡이병 저항성 수도계통육성

II. 연구개발의 목적 및 필요성

야생벼는 내병충성, 수량성, 미질 관련 유용 유전자원의 보고로 인정되어 재배벼와 야생벼의 중간교잡을 통해 야생벼에 내재되어 있는 유용 유전자를 이전하여 재배벼의 유전자 pool을 확대하기 위한 시도가 이루어져 왔다. 그러나 재배벼와 야생벼간에 존재하는 교잡불화합성으로 인해 중간교잡을 통한 야생벼의 유용 인자를 탐색 및 재배벼로의 이전이 어려운 실정이다. 최근 분자생물학적 기법의 급격한 발전으로 야생벼에 특이적으로 발현되는 유전자원들을 용이하게 그리고 다량으로 발굴하고 이러한 유전자를 재배벼에 이전할 수 있는 가능성이 제기되고 있으나 현재까지 이러한 생명공학적인 기법을 체계적으로 적용하여 야생벼 유용 유전자를 확보한 연구는 없었으며, 재배벼에 직접 도입한 사례도 거의 없었다.

본 연구는 야생벼에서 특이적으로 발현되는 내병충성 유전자들을 확보하여 미래 내병충성 품종 육성을 위한 기초 유전자원 pool을 마련하고, 곰팡이병 유전자를 재배벼에 이전하여 도열병저항성 계통 육성을 그 목표로 하고 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 (i) 병충해 처리시 야생벼에서 특이적으로 발현되는 저항성 유전자들을 suppression subtractive hybridization (SSH)을 이용하여 확보하고, (ii) 발굴된 유전자들의 염기서열 분석, homology search, Southern 및 Northern 분석으로

유전자의 기능과 발현양상 등을 확인하며, (iii) 확보된 유전자와 이미 anti-fungal activity가 보고된 저항성 유전자들을 *Agrobacterium*을 이용하여 재배중에 형질전환 하고, (iv) 우수한 내병충성 계통을 선발하여 저항성 품종 육성을 위한 모본으로 이용할 수 있는 토대를 마련하고자 한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

도열병, 멸구, 상처 등 3가지 종류의 재해가 가해진 *O. minuta*로부터 각각의 subtracted library를 제작하고, microarray 기법을 이용하여 확보된 유전자 단편의 발현양상을 확인하였다. 그리고 상처, fungal elicitor가 처리된 *O. grandiglumis*에서도 subtracted library를 제작하고, microarray를 통해 재해처리에서 발현이 증가 되는 유전자 단편을 선별한 후, 전체염기서열 확보 및 기능분석에 관한 실험을 진행 중에 있다. 또한 확립된 형질전환 기술을 이용하여 국내재배 품종들의 형질전환 정도를 확인하였고, 선발된 재배벼 품종에 저항성 관련 유전자인 LTP를 도입, 도열병 저항성을 검정하고 있다.

야생벼는 아직 본격적으로 연구가 진행되고 있지 않으나, 점차 재배벼에 부족해지는 다양한 종류의 유용유전자를 확보하기 위하여 가까운 미래에는 연구방향이 전환 되리라고 생각한다. Genetic linkage mapping과 Southern blot analysis 등의 방법으로 다수성 관련 유전자 등이 있음을 보고한 바는 있으나 아직까지 야생종에서만 발현되는 cDNA library를 실험한 연구는 없었다. 앞으로 본 실험에서 선발된 야생벼 고유의 유전자에 대한 분자수준에서의 자세한 기능분석이 필요하며, 이를 통해 확보된 유전자들이 단순한 재해 유도성 유전자가 아닌 직접적인 저항성 유전자임을 규명하는 것이 향후 연구목표가 되어야 할 것이다. 비록 연구 목표를 야생벼의 내재해성 유전자에 한정하였지만, 재배벼의 저항성 육종에 직접적으로 도입이 가능하다는 측면에서 과급효과가 클 것으로 사료된다.

SUMMARY

Wild rice is an important source of useful genes such as resistance to diseases and pests, tolerance for biotic and abiotic stresses for rice improvement. Comparative analysis of gene expressions between the cultivated and wild rice is an efficient way to the large-scale gene mining of wild rice. Moreover, collections of resistant gene from wild rices will not only offer materials for molecular breeding but also serve as catalysts for further understandings on the basal mechanism of plant defense systems. In the present study, two wild species with tetraploid genome, *Oryza minuta* (BBCC, $2n = 48$) and *Oryza grandiglumis* (CCDD, $2n = 48$) were used to isolate and characterize useful genes of wild rice origin.

Three kinds of subtracted libraries were constructed from *O. minuta* through biotic (rice blast infection and planthopper infestation) and abiotic (wound) stress treatment. To discriminate the differentially expressed transcripts among the background molecules, microarray was carried out as reverse northern blot, and a total of 1,138 clones were selected by the signal intensity and expression ratio. ESTs produced from three kinds of subtracted libraries showed 68.1% of redundancy, and 46.6% of total clones was matched to GenBank Data Base. Functional categorization showed that categories of subcellular localization, metabolism, and protein fate were enriched in the subtracted libraries.

A set of subtracted library was constructed from *O. grandiglumis* through fungal elicitor and wound treatment. After screening by microarray and sequence analysis, some candidate transcripts were selected including probenazole-inducible gene and PR1 gene involved in resistance mechanism. Currently, molecular characteristics and functions of the selected clones have been analyzed.

A total of 27 Korean japonica varieties were evaluated for their abilities of resistant callus induction and plant regeneration. Transformation efficiency of these varieties varied by genotypes, vector systems and callus source materials.

Considering the efficiency of plant regeneration, seven cultivars including Hwaseongbyeo, Hwajungbyeo, Namyangbyeo, Seojinbyeo, Dongjinbyeo, Anjungbyeo, and Ansanbyeo were found to be most suitable materials for transformation among Korean japonica varieties. Generally, callus derived from anther showed higher regeneration rate than that from seed, and cultivars derived from anther culture showed higher regeneration rate.

A fungal resistant gene derived from sesame, LTP (Lipid Transfer Protein gene) was transformed into Hwaseongbyeo, a representative premium-quality variety in the middle part of Korea. Total 19 plants were produced through transformation using anther-derived calli. Compared with the original parent, Hwaseongbyeo, transformation rices showed inferior performance in all phenotypic traits investigated except panicle size, number of panicle and grains, and especially plant height and fertility were drastically decreased.

Transformation lines of AC2 generation were evaluated for six blast isolates. These lines showed the diverse resistance level to each blast isolate but overall resistance level of transformed lines against six isolates were slightly superior or similar to the original parent, Hwaseongbyeo. However, transformed lines did not show any specific resistance to fungal isolates.

CONTENTS

Chapter I. Introduction	8
Chapter II. Status of research development in the world	13
Chapter III. Experimental strategies and results	16
Chapter IV. Achievement and contribution of the research	82
Chapter V. Application of the results	85
Chapter VI. Research information collected during research progressing	87
Chapter VII. References	91
Appendix	105

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	8
제 2 장	국내외 기술개발 현황	13
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	16
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	82
제 5 장	연구개발결과의 활용계획.....	85
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	87
제 7 장	참고문헌	91
Appendix	105

제 1 장 연구개발과제의 개요

세계인구는 2050년 110억에 이를 전망이다, 인구의 급속한 증가로 인한 식량 부족이 큰 문제로 나타날 것이고, 이의 해결을 위하여 내병충성 및 다수성 식량작물 육성이 절실하다. 현재 기상이변으로 인해 전세계 식량작물의 생산이 큰 영향을 받고 있다. 심각한 식량파동이 일어났던 1972년과 1973년을 극단적인 예로 볼 때, 곡물 생산량이 3% 정도 소폭 감소했음에도 불구하고 쌀의 국제가격이 3배 이상 급등하는 사태가 발생하였던 사례에서 식량자원의 특수성을 실감할 수 있고, 국가 기반 산업으로서의 위치를 확인할 수 있다. 국내 수도재배의 경우, 여름 집중 호우로 인한 농경지 피해, 이상 저온현상과 평균 일조시간의 부족, 수도 병충해의 급증 등으로 매년 많은 수확 감소요인이 발생하여 수도재배에 피해를 입고 있다. 이러한 수확 감소요인은 앞으로도 계속 발생할 수 있고, 이에 대한 대책으로 특히 내병충성 품종의 안정적인 확보가 반드시 필요하다. 하지만 한국을 비롯한 일본, 타일랜드 및 미국 등의 주요국가의 최근 10년 동안 벼 및 주요 작물의 수량지수를 관찰해 보면 거의 변동이 없다는 것을 알 수 있는데, 이는 기존의 식물 육종기법을 통한 수량 증가는 이미 한계점에 도달했다는 것을 의미한다. 더욱이 20세기 식물 육종기술이 발달하면서 재래종들이 소수의 신품종에 의해 빠르게 대체되어 유전적 다양성이 상실되었으며, 환경교란 및 병충해에 취약한 작물생산구조가 형성되었는데, 우리나라도 1970년대 재배면적의 75% 이상을 차지하던 통일형 품종이 냉해와 도열병에 의해 막대한 피해를 입어야 했다. 반면에 1999년 60억을 돌파한 세계인구는 심각한 비균형적 식량 분배로 인하여 8억 2,600만 명이 절대 기아에 허덕이고 있으며, 2025년에는 개발도상국의 폭발적 인구증가로 인하여 85억에 이를 것으로 전망되어 식량은 현재보다 약 50%가 더 많이 요구될 것으로 추정되고 있다. 많은 전문가들은 추가 필요량의 1/5 정도는 경작지 증가로 충당이 가능하나 나머지는 전적으로 토지 생산성 향상으로만 확보 가능할 것으로 예상하고 있다. 여기에 분배의 문제까지 고려한다면 『종자전쟁』으로 표현되는 신기술 및 새로운 재료의 활용에 기초한 신품종 개발에 대한 투자는 세계적인 추세이며, 이미 몇몇 선진국에 의한 지식기반 및 기술적 우점화가 상당히 진행되어 종자의 독과점 현상이 더욱 두드러질 것으로 예상된다.

벼 (*Oryza sativa* L.)는 세계에서 가장 중요한 식량작물이며, 90% 이상이 Asia에서 재배되고 소비된다. 또한 세계인구의 1/3 이상이 주영양소로 벼를 이용하고 있는 실정이다 (Brar and Khush, 1997; Kush, 1997). 두 종류의 재배종이 경작되고 있는데, 전세계적으로 경작되는 재배종은 Asian rice인 *O. sativa*이고, African rice인 *O. glaberrima*의 경우 서부 Africa에 제한적으로 경작되고 있다. 벼는 식물학적으로 화본과에 속해 있는데, 화본과에는 농업적으로 중요한 작물인 옥수수, 밀, 귀리 등을 포함한 1만여종 이상의 식물이 속해 있다 (Ahn and Tanksley, 1993). 재배종이 속해 있는 *Oryza* 속은 기원이 130만년전으로 추정되며, 열대 Asia, Africa, Australia, 그리고 중남미에서 발견되고 있다 (Kush, 1997).

선발을 통한 전통육종은 과거 오랜 기간 적용되어 왔으며, 지난 세기동안 생산량 증대에 지대한 공헌을 해왔다. 거의 대부분의 선발 특성은 복합적인 양적 형질로, 단일 유전자가 아닌 여러 유전자와 환경 등 다른 요인에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 현재까지 거의 모든 선발방법은 관측가능한 phenotype에 의존해 왔는데, 이런 phenotype은 모든 유전적 요인과 환경요인의 축적을 통해 이루어진다. 그러므로, 선발을 위한 고도의 전략 수립과 작물에 대한 적용이 육종과정에서의 genetic performance의 개선을 위한 노력으로 이루어지고 있다 (Decker and Hospital, 2001).

벼는 식량자원으로서의 중요성만이 아니라 식물유전체 연구의 대상으로도 주목받고 있는 상황이다. 화본과에 속해 있는 다른 작물들에 비해 상대적으로 작은 크기의 genome (430 Mbp per haploid genome)을 가지고 있는데, genome colinearity, 즉 유전자 배열 순서와 content 상의 유사성으로 인해 그 중요성이 더욱 강조되고 있는 형편이고 (Gale MD and Devos KM, 1998), 밀, 옥수수와 비교연구 역시 광범위하게 진행되고 있다 (Ahn et al., 1993; Ahn and Tanksley, 1993). 이런 특성을 바탕으로 다양한 연구가 진행되었는데, 고밀도의 유전자 지도가 구축되어 있고, 많은 EST가 database에 집적되어 있으며, BAC, YAC library의 구축, 수량 및 형태에 관한 QTL 분석, T-DNA insertion을 통한 knockout mutation을 이용해 특정 유전자의 기능분석 시도, map-based cloning, 또한 전체염기서열 분석 역시 완료된 상태이다 (Goff et al., 2002; Michel et al., 2001; Yu et al., 2002). 즉 식물 유전자의 기능분석을 위한 model system으로서 기능을 충분히 발휘할 수 있음을 알 수 있다.

벼의 생산량은 염해, 한발, 여러 종류의 pathogen 등에 의해 끊임없이 위협받고 있

다. 또한 병이나 충의 경우 pathotype과 biotype의 급격한 변화를 통해 생산량에 계속 위협을 가하고 있다. 그러므로 이런 다양한 종류의 재해에 대한 극복 체계를 구축하는 것이 시급하며, 이를 실제 육종과정에 도입하는 작업 역시 중요하다고 하겠다.

현대 육종 과정에서 재배벼의 유전적 다양성은 선호유전자의 집적과 고강도의 선발과정에 의해 크게 제한되었는데, 이로 인하여 여러 종류의 재해에 대한 저항성이 떨어져, 결과적으로 수량의 안정성까지도 크게 위협을 받는 실정이다 (Vaughan, 1994; Xiao et al., 1998). 향후 재배벼의 수량증진을 위해 rice gene pool의 다양성 확보는 반드시 필요한데, 이를 위해 *Oryza* genus에 속하는 야생벼의 중요성도 간과할 수 없다. 작물의 근연 야생종의 중요성은 germplasm 수집의 측면에서 강조되어 왔는데, 4천 만년 전부터 분화되기 시작한 벼의 야생종은 근연 재배종에 비해 유전적 다양성, 특히 여러 종류의 stress에 대해 저항성을 보유하고 있는 것으로 알려져 있다 (Khush, 1997).

Oryza genus에는 23개 종이 속해 있고, 9 종류의 genome set (AA, BB, BBCC, CC, CCDD, EE, FF, GG, and HHJJ)이 알려져 있다. 재배벼와의 교배 가능성에 근거를 두어 이들 야생종을 primary, secondary, tertiary gene pool로 구분할 수 있다. Primary gene pool의 경우 AA genome을 가진 야생벼가 속하는 것으로, 재배벼와의 교배가 비교적 용이하다. Secondary pool에는 BB~EE genome의 diploid 개체가 속해 있고, tertiary pool에는 이외의 4배체 genome set이 포함되어 있다 (Ge et al., 1999; Vaughan, 1994).

저항성 유전자와 관련된 연구에서 야생종은 더욱 중요한 가치를 보이게 되는데, *O. officinalis* (CC genome)는 yellow stem borer, brown planthopper, whitebacked planthopper, zigzag leafhopper, and green leafhopper에 대해 저항성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 일반재배벼와 가장 근연관계에 있는 *O. rufipogon* (AA genome)의 경우 비록 외관은 상당히 열등한 것으로 보이지만 염해에 대한 저항성, 세포질적 웅성불임성의 source, 그리고 수량과 같은 농업적으로 유용한 형질의 QTL 등을 내재하고 있는 것으로 알려져 있다. 이런 특성들은 야생 유전자원이 재배벼 및 다른 작물의 생산성증대에 중요한 해법을 제시해 줄 수 있을 것으로 제시하고 있다 (Vaughan, 1994; Xiao et al., 1996; Xiao et al., 1998).

야생종과 재배종간의 wide cross는, 현재 재배되고 있는 품종의 개선과 새로운 우

량 genotype의 개발에 중요한 역할을 할 것으로 보인다. 벼에서는 AA genome을 가진 primary gene pool과의 교배를 통해 *O. stiva* var. *fatua*에서 tillering ability, 저온, 그리고 산성토양에 대해 개선된 효과를 보이는 것으로 확인되었고 (Ting, 1933), *O. nivara*로부터 도입된 single dominant gene (Gs)에 의해 grassy stunt resistance가 부여된 것을 확인되었으며 (Khush, 1977), *O. sativa* f. *spontanea*로부터 세포질적 웅성불임성이 도입된 예가 있다 (Chang, 1979; Shen, 1980). 하지만 AA genome 이외의 genome set에 대해서는 fertilization step 전후에 생길 수 있는 여러 가지 장벽에 의해 중간교잡이나 야생종으로부터의 유전자 도입이 크게 제한되는 형편이다 (Brar and Khush, 1986; Sitch, 1990). 중간교잡에 있어 장벽으로 작용할 수 있는 요인으로는 hybrid sterility, 제한된 homoeologous chromosome pairing, 재배종과 야생종 genome 간의 재조합, 그리고 hybrid breakdown이 있다 (Brar and Khush, 1986; Brar and Khush, 1997). 중간교잡의 장벽을 극복하기 위해 embryo rescue, in vitro pollination, hormone utilization, 그리고 protoplast fusion 같은 다양한 방법이 시도되고 있다 (Brar and Khush, 1992). 원연간의 교잡을 위해, 웅성불임 F1 hybrids를 회복친으로 여교잡시킨 후, embryo rescue를 $2n = 24$ genome set의 가임체로 되기까지 반복시키는 방법이 시도되고 있다. 이렇게 확보된 개체를 introgression line이라 하고, 재해상태에서의 저항성 정도 등을 검정하고, 실제 육종과정에 사용하게 된다 (Brar et al., 1991; Jena and Khush, 1984). 이런 방법이 실제 *O. officinalis* (Jena and Khush, 1990 and 1994), *O. latifolia* (Jena and Kochert, 1991), *O. grandiglumis* (Yu et al., 1997), *O. brachyantha*, *O. granulata* (Brar and Khush, 1997), 그리고 *O. australiensis* (Jena et al., 1990)의 유전자 도입을 위해 사용되고 있다. 재분화 방법의 개선으로 *Agrobacterium*-mediated transformation, particle bombardment, 그리고 the PEG method와 같은 유전공학적 방식도 급속히 발전하고 있다 (Gasser and Fraley, 1989). 이 방식은 앞으로 단순히 외래 유전자의 도입을 위한 기술이 아니라 특정 유전자의 기능을 이해하고 유전자 발현을 조절하는데 필수적인 기술로 이용될 것이다.

본 연구에서는 저항성 인자가 많이 내재되어 있어 꾸준히 육종재료로 간주되어 온 야생벼 2종, *O. minuta* (BBCC, $2n=48$)와 *O. grandiglumis* (CCDD, $2n=48$)에서 저항성 관련유전자를 subtractive hybridization 기법을 사용하여 대량으로 발굴하고, 확보된 유전자의 발현양상을 microarray 기법을 이용하여 확인하며, 선발된

유전자의 특성을 규명하고자 한다. 이와 동시에 향후 확보된 저항성유전자를 도입하기 위한 기초기술로 *A. tumefaciens*를 이용한 형질전환 체계를 확립하고, 형질전환에 대한 국내재배 품종의 반응 정도를 확인, 형질전환 효율이 높은 품종을 선별하며, 기존에 알려진 내재해성 유전자를 선별된 재배벼에 도입하여 저항성 증진 여부를 확인, 육종을 위한 중간모본으로 이용하고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 항 분자육종 기법을 통한 작물의 형질개량

기존 식물 육종기술의 한계를 간파한 미국을 비롯한 선진국에서는 이미 1980년대 초부터 두 가지 기술을 작물육종에 적용하여 분자육종이라는 신개념을 확립하였다. 첫째로 marker technology를 들 수 있는데, Bostein (1980)이 RFLP기법을 개발한 이후 환경변이로부터 독립적인 DNA 인자들을 적극 활용하여 많은 식물유전체에서 세밀한 유전자지도가 제작되었다. 이를 근거로 체계적인 교배조합의 선정뿐만 아니라 양적형질의 유전양상을 구체적이며 세부적으로 이해할 수 있는 근간을 마련하였으며 (QTL analysis), 궁극적으로는 DNA marker를 이용한 목표특성을 효과적으로 선발하는 기법 (MAS; marker-assisted selection)이 가능하게 되었다. 둘째로 1983년 최초로 성공한 식물형질전환 기법의 발전을 들 수 있다. 이로써 종속간의 생물학적 장벽을 극복함은 물론 교잡을 통한 유용유전자 도입에서 가장 고질적으로 문제시되는 linkage drag 현상을 최소화할 수 있는 기술적 기반이 확립되었다. 최근 인간과 *A. thaliana*의 유전체사업이 성공적으로 완료되면서 Genomics, HTS (high-throughput screening), Bioinformatics, Proteomics 등의 신학문 분야가 생명공학의 근본 개념을 바꾸고, 새로운 유전자의 기능정보가 곧바로 지적소유권으로 연결되는 post-genome 혹은 functional genomics의 시대가 도래되었다.

1995년부터 형질전환 작물들이 본격적으로 일반농가에 보급되기 시작하였고, 1999년 현재 3,990만 ha에서 재배되고 있으나, 제초제 저항성이나 내충성 인자 등 극소수의 유전자들에 국한되고 있는 실정이다. 개별 유전자 자체를 육종재료로 사용할 수 있으므로 목적형질을 적극적으로 개량할 수 있는 장점에도 불구하고, 분자육종은 수량 증대와 생물학적 및 환경 스트레스에 대한 재배의 안정성 증대 측면에서 아직도 초기 단계에 머물러 있다. 주된 이유로는 양적형질의 범주에 포함되는 대부분의 농업형질이 소수의 유전자 기작 연구에 의해 유전양상이 구체적으로 설명되기 어려울 뿐더러, 유전자-유전자 및 유전자-환경간의 상호작용이 매우 높아서 특정 형질을 지배하는 개별 유전자 효과를 동시에 관찰하여 이를 산술적으로 표현하는데

많은 어려움이 따른다는 점을 들 수 있다. 또한 우수품종 육성을 위해서는 오랜 진화 과정상 누적된 자연적 유전변이의 수집과 보존은 필수적인데, 20세기에 들어서 소수의 우수 품종들로의 획일화가 급속히 확산되면서 재래종들의 감소 또는 소멸로 인한 유전자원의 소실이 육종재료의 소실로 이어지고 있음을 들 수 있다. 신품종 육성을 위한 다양한 육종 소재의 확보는 다국적 기업간 또는 국가간 선점경쟁이 심화되고 있는 추세로 1999년 현재 미국의 경우 43만점 이상의 유전자원을 확보하였으며, 중국이나 일본도 각각 36만점 및 21만점 이상을 확보하였다. 우리나라도 1997년 말 현재 약 14만점을 확보하여 양적으로는 상당한 우위에 있다. 그러나, 학문적·산업적 국제경쟁력을 확보하기 위해서는 현재 보유하고 있는 각 유전자원의 유용성을 체계적으로 연구함은 물론, 활용성이 높은 유전인자를 발굴하여 육종 재료화하는 과정을 통하여 유전자원의 실질적 가치를 극대화하는 과정이 필수적이다.

제 2 항 차등발현 유전자 탐색

유전자 발현양상이 외부조건에 따라 달라지는 유전자의 기능 및 발현연구는 유전자 연구에 있어서 무척 중요한 의미를 가진다. 차등 발현유전자를 분리하기 위한 많은 방법이 개발되어 왔는데, 다음의 두 가지 방법이 많이 이용되고 있다.

1. Differential display

이 방법은 RT-PCR을 기본으로 하는 기법으로, mRNA를 cDNA로 전환시킨 다음 3'end anchor, 5'end primer를 이용하여 증폭하는 것인데, 일반적으로 10-mer arbitrary primer를 사용하고 있다. 증폭된 산물을 polyacrylamide gel에서 전기영동을 통해 분리시킨 다음, 강도 차이 및 band 유무에 의해 차등발현 여부를 판정, gel에서 분리하여 염기서열 분석 및 기능분석을 실시한다. 이 방법에는 몇 가지 장점이 있다. 우선 2가지 이상의 재료에서의 차등발현 여부를 동시에 확인할 수 있다. 또한 한번의 전기영동에서 발현증가와 감소양상을 동시에 확인할 수 있게 된다. 그리고 PCR을 이용하기 때문에 소량의 total RNA로부터 실험을 할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 하지만 이와 같은 장점에도 불구하고 몇 가지 단점을 내포하고 있어, 실험진행이 용이하지 않다. 짧

은 길이의 random primer를 사용하기 때문에 수많은 false positive band가 생길 수 있고, 실험의 재현성을 확보하기 어려우며, 발현양이 적은 유전자의 경우 민감도가 떨어지게 된다. 또한 많은 노동력을 필요로 한다는 점이 단점이다 (Byers et al., 2000; Carson et al., 2002; Liang and Pardee, 1992; Liang et al., 1993; Rhode et al., 1997).

2. Subtractive hybridization

이 실험기법은 특정 재료에서 발현이 증가되는 유전자 분리에 유용한 방법이다. Subtraction 효율을 높이기 위해 restriction enzyme을 이용하여 cDNA를 자르고, hybridization을 실시하여 준비된 두 재료에서 공통적으로 발현되는 유전자 단편들을 서로 붙이게 된다. 그리고 특정 재료에만 존재하는, 그로 인해 hybridization 되지 않은 유전자 단편만을 분리하여 기능을 분석하게 된다. 비교적 적은 양의 시료를 이용하여 실험을 할 수 있고, 발현양이 적은 차등발현 유전자를 분리해 내기 용이하며, 방사선동위원소를 이용하지 않아도 되고, 비교적 적은 수의 false positive clone을 얻는다는 장점을 가지고 있다. 하지만 이 방법에도 단점이 있는데, 우선 분리된 cDNA 단편의 염기서열 및 기능분석에 노력이 많이 소요되고, 이 재료간에 공통적으로 발현되는 유전자의 제거가 용이하지 않으며, 특정 재료에서의 발현이 5배 이상 증가되는 유전자가 안정적으로 분리될 수 있다 (Byers et al., 2000; Coche, 1997; Schraml et al., 1993; Swaroop et al., 1991).

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 야생벼 내재해성 관련 유전자원의 대량 확보

1. 실험 전략

가. Subtractive hybridization을 통한 차등발현 유전자 확보

1) Suppression subtractive hybridization (SSH)

특정 조건에서 차등발현되는 유전자의 확보에 subtractive hybridization, mRNA differential display, reverse screening 등 여러 가지 방법들이 현재까지 이용되어 왔다. 하지만 위의 방법들은 false positive들이 많으며, 실험을 복잡하게 하고, 실험기간을 장기화하는 단점이 있다. 최근에 개발된 SSH 방법은 이러한 단점이 적으며, 단기간에 많은 유전자를 확보할 수 있는 장점이 있다. 본 실험에서도 SSH법을 이용하여 병충해 처리 야생벼 (tester)와 아무 처리를 하지 않은 야생벼 (driver)를 subtraction하여 야생벼에서 특이적인 병충해 저항성 유전자들을 선별한다.

전반적인 실험 내용을 도식화하였다 (Fig 1). 처리구 (tester)와 무처리구 (driver)에서 각각 mRNA를 뽑아 cDNA를 합성한 후, subtraction 효율을 높이기 위해 cDNA를 제한효소로 절단한다. 절단한 처리구 cDNA를 두 그룹으로 나누어 각기 서로 다른 adaptor를 붙인다. 이때, adaptor 5' 말단의 인산기를 제거하여 처리구 cDNA의 5' 말단에만 붙도록 한다. 1차 hybridization에서, 각기 다른 adaptor를 붙인 처리구 cDNA를 denature시킨 후 denature된 과량의 무처리구 sample을 첨가하면 4가지 형태 (a, b, c, d)의 molecule이 생겨난다. 각각의 molecule 중에서 a, b는 처리구에만 존재하는 형태이고, c는 처리구와 무처리구에서 공통으로 존재하는 형태이고, d는 무처리구가 과량으로 첨가되어 처리구와 결합하지 못한 형태이거나, 무처리구에만 존재하는 형태이다. 2차 hybridization에서, 두 그룹으로 나누어져 있던 처리구 sample을 합친 후에 다시 denature된 과량의 무처리구 cDNA를

첨가한다. 그러면 1차 hybridization의 4가지 형태의 molecule 외에도 새로운 e 형태의 molecule이 생긴다. 이때 생겨난 e 형태의 molecule이 우리가 원하는 처리구에만 존재하는 molecule이다. Hybridization이 끝난 후 e 형태의 molecule만을 증폭하기 위해 hybridization product를 주형으로 하여 PCR을 실시한다. 1차 PCR에서는, 각각의 형태의 molecule에 붙어 있는 adaptor의 바깥부분의 sequence에 상보적인 primer를 만들어서 PCR을 실행하면 a 형태는 primer가 붙고 난 후에 증폭될 수 있는 주형이 없으므로 증폭되지 않고, b 형태는 suppression PCR 효과로 증폭이 되지 않는다. c 형태는 한쪽 가닥만이 계속해서 증폭되고, d 형태는 primer가 붙을 수 있는 자리가 없으므로 증폭되지 않는다. 결국 우리가 원하는 e 형태의 molecule만이 증폭된다. 1차 PCR 후에, 우리가 원하는 e 형태의 molecule만을 더욱 더 증폭하기 위해 각각의 adaptor의 안쪽의 sequence에 상보적인 nested primer를 만들어서 2차 PCR을 수행한다.

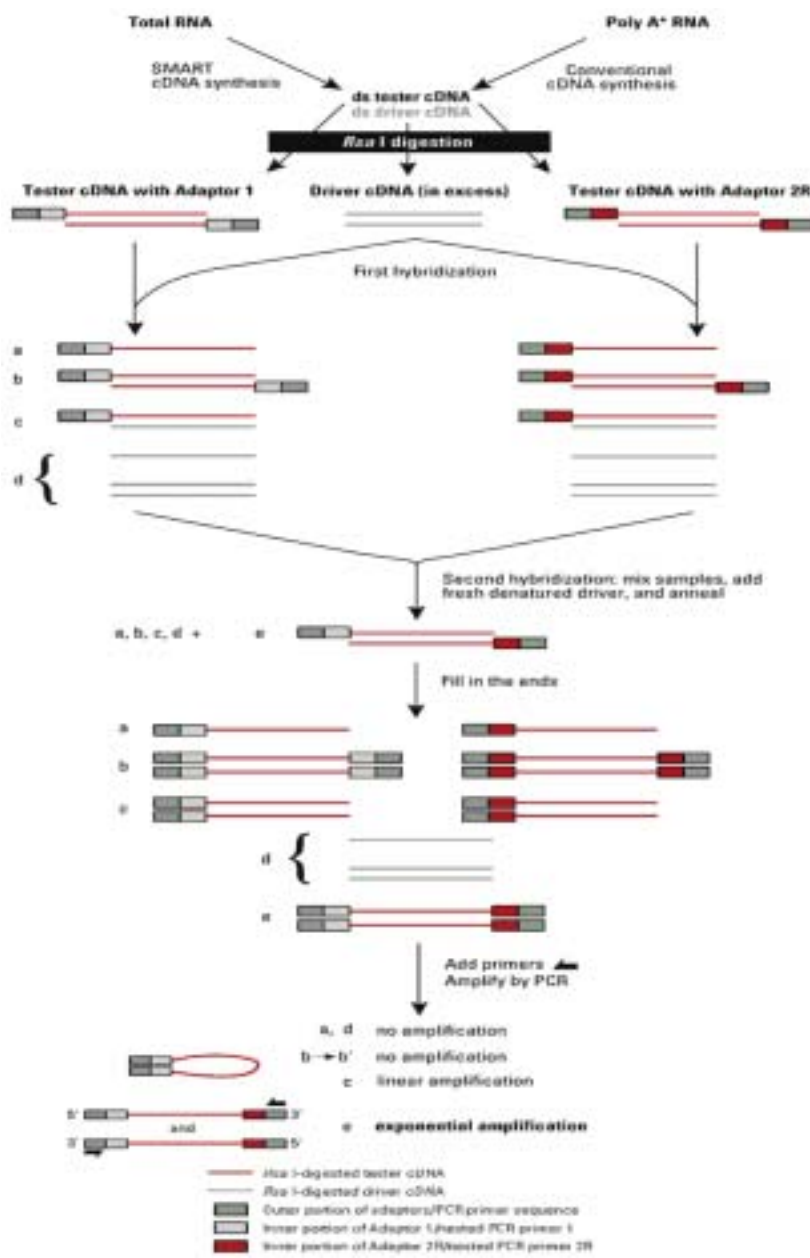


Fig 1. Schematic diagram of suppression subtractive hybridization.

2) Mirror Orientation Selection (MOS)

SSH method는 발현정도가 다른 유전자를 규명하는데 아주 유용한 방법으로 사용되어 왔고, 본 실험실에서도 여러 연구 성과를 배출해 왔다. 하지만 최근 이 방법에서도 Northern blot analysis 결과 유전자 발현이 차별화되지 않는 fragment인 background의 가능성을 강력히 제기한 보고가 있어서 연구 수행 방법을 약간 변형하는 것이 필요하다고 본다. 이 보고에서는 다음의 3가지 경우에 의해 background가 생길 수 있다고 제시하고 있다.

- Non-ligated suppression adapter에서 온 long oligonucleotides가 subtractive hybridization 동안 비특이적으로 annealing되어 증폭될 수 있다.
- Redundant cDNA molecule이 subtractive hybridization을 피할 수 있다.
즉, 워낙 발현양이 많은 경우 tester와 driver간 비율을 조정해도 subtraction되지 않을 수 있다.
- Hybridization 결과 생긴 hybrid중 양쪽에 같은 adapter가 붙은 경우 PCR과정중에 exponential amplification이 가능해진다.

이러한 문제점을 안고 있는 상황에서 MOS라는 새로운 방법이 보고되었고, 이를 이용한 방향으로 연구를 수행하는 것이 유리하다고 생각한다. 다음의 그림에서 이 방법의 원리가 설명되어 있다 (Fig 2). 그림에서 직사각형은 cDNA를 나타내는데, 넓은 직사각형은 double-stranded cDNA이고, 좁은 직사각형은 single-stranded cDNA이다. 노란색은 adaptor A를, 연두색은 adaptor B를 나타낸다. 분홍색은 우리가 원하는 cDNA를, 하늘색은 background cDNA를 표시한다. 그리고, 색의 강도차이는 cDNA의 방향성 (진한 쪽이 5', 옅은 쪽이 3' 말단이다)을 나타낸다. MOS method는 SSH method에서 발생하는 background를 제거하기 위해 수행하는 방법이다. 여러 가지 발생 가능한 background들 중에서 가장 큰 문제라고 할 수 있는 것이, 위의 그림과 같은 형태이다. 즉 우리가 목표로 하는 target이 아님에도 불구하고, 이 background에는 양쪽 말단에 서로 다른 adaptor가 붙어 있게 된다. 하지만 이렇게 형성된 background가 가지게 되는 중요한 특성은 바로 다음과 같다. SSH method에 따라 PCR로 증폭한 산물 중 우리가 원하는 cDNA (target cDNA)는 adaptor가 양 방향 모두 붙을 수 있지만 background는 adaptor가 한쪽 방향으로만 붙는다. 이러한 특성을 이용하여 SSH method 산물의 한쪽 adaptor를 제한효소로

잘라내고 (SSH 수행시 한쪽 adaptor에 미리 제한효소로 잘리는 자리를 만들어 둔다) hybridization을 실시하면, 원하는 target cDNA에서는 adaptor가 복구되어 PCR 과정에서 primer가 붙을 자리가 만들어지고, 이로 인해 exponential amplification을 할 수 있지만, background의 경우 잘려진 adaptor가 복구가 되지 않으므로 PCR 과정에서 primer가 한쪽 adaptor에만 붙어서 증폭, linear amplification을 하게 된다 (SSH method의 c 형태의 molecule과 같음).

이 방법을 이용하게 되면 단순히 background만을 제거하는 효과만이 있는 것이 아니라 redundancy를 감소시켜 서로 다른 target이 cloning되는 효과도 얻을 수 있다고 보고되어 있다.

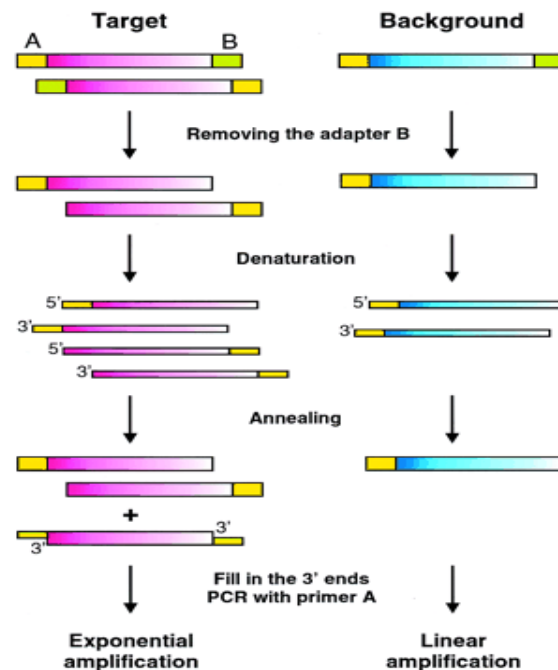


Fig 2. Schematic diagram of Mirror Orientation Selection (MOS).

3) Biotin을 이용한 MOS method의 개선

SSH의 2차 PCR 산물을 이용하여 MOS 실험을 진행하게 되는데, 한쪽 adaptor의 제거가 관건이 된다. 제한효소 *SmaI*을 이용하여 adaptor 1을 자르는 경우, 14bp의 adaptor sequence가 제거되게 된다. 이 과정이 MOS 전체과정에서 무척

중요한데, 14bp밖에 되지 않는 작은 크기의 단편을 확인하는 것이 쉽지 않은 형편이다 (본 실험을 위해 12% non-denaturing acrylamide gel electrophoresis나, denaturing acrylamide gel electrophoresis 이후 silver staining 등을 이용하였으나, 좋은 결과를 얻지 못했다). 이를 극복하기 위한 방안으로, *Sma*I digestion으로 제거될 adaptor 쪽의 nested primer를 5' end biotin labeling으로 변형시켰다. *Sma*I digestion 이후 biotin 신호를 검출하여, adaptor 염기서열의 제거를 확인할 수 있게 된다 (Fig 3). 또한 biotin이 있으면 ligation을 저해하게 되므로, digestion이 제대로 되지 않은 template이 cloning되는 부작용도 막을 수 있게 된다.

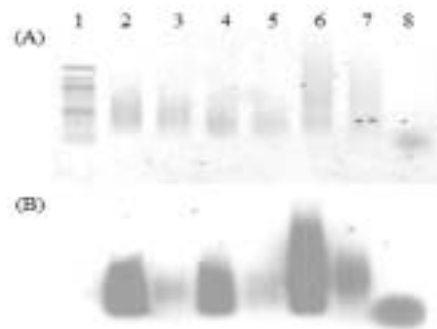


Fig 3. Confirmation of *Sma*I-digestion by detecting biotin-labeled NP1 primer during the MOS procedure. (A) EtBr-stained gel showing the uniform loading of PCR products. (B) X-ray film image exposed for 2 min. Lane 1, 100 bp ladder marker (NEB, USA); lane 2, uncut SSH 2nd PCR product of *omfi*; lane 3, cut SSH 2nd PCR product of *omfi*; lane 4, uncut SSH 2nd PCR product of *omii*; lane 5, cut SSH 2nd PCR product of *omii*; lane 6, uncut SSH 2nd PCR product of *omwi*; lane 7, cut SSH 2nd PCR product of *omwi*; lane 8, biotin-labeled NP1 primer only (50 pmoles loaded). The *Sma*I-digested lane shows the weak signals due to incomplete digestion. These digested PCR products served as a template for MOS.

나. Microarray를 통한 High-throughput screening

1) Microarray 실험의 정의

DNA chip은 기존의 분자 생물학적 지식에 현대에 엄청난 발전을 한 기계 및 전자공학의 기술을 접목해서 만들어졌다. 기계 자동화와 전자 제어 기술 등을 이용하여 적게는 수백개, 많게는 수십만개의 DNA를 아주 작은 공간에 집어넣을 수 있게 만든 것이다. 즉 DNA chip이란 유전자 검색용으로서 엄청나게 많은 종류의 DNA를 고밀도로 붙여 놓은 것을 말한다. 이러한 DNA chip이 대체할 수 있는 기존의 대표적인 유전공학방법으로는 Southern과 Northern blot, 돌연변이 검색 그리고 DNA sequencing 등이 있다. 이와 같은 방법들과 가장 큰 차이점은 동시에 최소한 수백개 이상의 유전자를 빠른 시간 안에 검색할 수 있다는 것이다. 또 하나의 다른 점은 Southern이나 Northern blot의 경우 유전물질을 붙이는 매체로 nitrocellulose membrane을 사용하는데 반하여, DNA chip에서는 nitrocellulose membrane도 사용하지 않고 주로 유리와 같은 고형체를 사용한다는 것이다. 이를 통해 DNA chip은 아주 적은 양의 DNA fragment를 고밀도로 붙일 수 있게 되었고, 또한 동시에 많은 유전자의 발현양상을 한번에 검색할 수 있게 된 것이다. DNA chip은 붙이는 유전물질의 크기에 따라 cDNA chip과 oligonucleotide chip으로 나눌 수 있다.

2) Microarray 기법의 특징

- 분석시간대 실험시간의 비율이 높다.
- 하나의 chip data로부터 많은 data를 얻게 된다.
- Sensitivity가 높다.

3) Microarray 실험 단계

가) Nucleic acids preparation

순도 높은 RNA를 확보할 수 있어야 한다. 신뢰성이 떨어지는 시료를 사용할 경우 전체 data를 오염시켜 차등발현 여부를 왜곡시킬 수 있다. 특히 RNA를 template으로 사용하고자 할 때에는 반드시 nuclease-free state를 유지해야 한다. 또한 충분

한 양의 RNA를 확보할 수 있어야 하는데, animal cell의 경우 RNA amplification 등의 기법을 이용하여 각 유전자의 상대적인 양의 비율을 유지시킨 채 RNA의 양을 늘리는 방법을 사용하기도 한다.

나) Probe labeling

방사선 동위원소를 사용하기도 하지만, 현재는 주로 fluorescent dye를 incorporation시키게 된다. Fluorescent dye의 경우 화학적 구조는 비슷하며 흡광, 발광의 파장대가 다른 dye를 사용한다.

- Direct labeling: 실험초기부터 주로 사용해온 방법으로, hybridization시킬 nucleic acid에 fluorescent tagging한다. 기법이 간단하면서 강한 신호를 낼 수 있는데, 실험단계를 간단히 하여 실험자로부터 생기게 되는 오차를 줄일 수 있게 된다.

- Indirect labeling: Probe 끝에 epitope을 달고, 이 epitope에 달린 단백질을 염색시켜 형광신호를 얻게 된다. 직접표지 방법에 비해 강도는 10-100배나 강하지만, 수행하기가 어렵고, epitope별로 서로 다른 효율을 가지고 있으며, 단백질의 결합력으로 인해 비교분석에서의 정밀도가 떨어진다.

다) Chip 제작 (cDNA microarray)

주로 1×3 inch slide glass에 DNA template을 dotting한다. slide glass를 이용하는 경우 많은 형광물질의 검출이 용이하고, 표면적이 넓어 dotting되는 DNA fragment의 수가 많으며, hybridization등의 실험과정이 쉽고, 가격이 저렴한 편다. 실험 과정에서 특히 slide의 특성이 중요한데, slide glass 자체의 auto-fluorescence가 높을 경우엔 data의 신뢰성에 많은 영향을 미칠 수 있다. Dotting 방법은 주로 pin-type method와 ink-jet injection method 2가지를 사용하게 되는데, 대부분 pin-type method를 사용한다. pin-type method로 제작할 때 dotting이 잘못되면 번지거나 아니면 doughnut type으로 가운데가 비는 모양으로 제작될 수 있고, 이런 경우 상대적인 발현양이 왜곡되어 분석될 수 있다.

라) Scanning

Confocal scanner와 CCD camera를 이용하여 scanning을 하게 되는데, confocal scanner의 경우 고가의 장비를 필요로 하고, 1장의 chip을 scanning하는데 시간이 오래 소요된다. 또한 반복된 scanning 과정 중에 dye의 photo bleaching 현상이 발생하게 된다. 하지만 해상도가 높기 때문에 현재 대부분의 실험에서 사용되고 있다. CCD camera의 경우 저가의 기계를 이용하고, scanning에 소요되는 시간이 짧은 반면에 해상도가 크게 떨어지는 단점이 있다.

마) Scanned data analysis

실험을 통해 얻어진 data는 16 bit image이고, 이를 analysis software를 이용하여 서로 다른 파장대의 신호를 읽어 수치화하게 된다. 이 이후 여러 가지 형태 (\log_{10} , \log_2 , 역수 등)로 data를 변형하게 되는데, 반복되는 실험이나 서로 다른 조건의 실험내용을 비교하기 위해 normalization을 하게 된다.

바) Expression profiling

발현양상을 확인한 다음에는 여러 data를 상호비교하고, 발현양상이 비슷한 유전자들끼리 한데 묶는 clustering을 하게 된다. 이는 주로 기존에 보고되어 있던 통계 기법이 이용되는데, 많이 사용되는 기법으로는 hierarchical clustering, K-means, Self-Organizing Maps (SOM), Principal Component Analysis (PCA) 기법 등이 있다.

2. *O. minuta*의 내재해성 관련 유전자 확보

가. 재료 및 방법

1) 재료 및 재해 처리

수원 작물시험장의 온실에서 발아후 4주 동안 재배한 *O. minuta* (Acc No 101144)를 실험에 이용하였으며, 화성벼에도 같은 조건으로 처리하여 대조구로 삼았다. 처리한 후 미리 지정한 시간 동안 28℃에서 재료를 재배하였다.

도열병 처리를 위해, 4가지 도열병 균주 KJ101 (Isolate No 88-073), KJ201 (Isolate No 90-089), KJ197 (Isolate No. 93-093), KI409 (Isolate No. 93-456)를 5×10^4 conidia/ml의 농도로 전착액과 함께 잎 전체에 동시에 처리하였다. Control은 도열병 균주를 제외하고 전착액만 처리하였다. 처리된 식물체는 온도 (28°C)와 습도(almost 100%)가 일정하게 유지되는 chamber에서 24시간 동안 배양한 후, sampling을 위해 온실로 옮겨졌다. 온실로 옮긴 후에는 비닐 커버로 온도와 습도를 유지하였다. 처리후 6 시간, 24 시간, 72 시간에 sampling하였다.

멸구처리를 위해 벼멸구 (*Nilaparvata lugens*) Korean biotype 1을 처리하였으며, 처리후 0 시간 (untreated control), 6 시간, 24 시간, 그리고 72 시간에 sampling을 실시하였다.

상처처리를 위해 주사바늘로 잎 전체에 상처를 낸 다음, 처리후 0 시간 (untreated control), 3 시간, 6 시간, 24 시간, 그리고 72 시간에 sampling을 실시하였다.

2) RNA 추출 및 subtracted libraries 구축

Subtracted library를 제작하기 위한 total RNA와 mRNA는 각각 TRIZOL reagent (Gibco BRL, USA)와 Dynabeads Oligo (dT)₂₅ (Dynal A.S., Norway)를 이용하여 추출하였다. 처리, 무처리구 시료 각각 2 µg의 poly(A)⁺ RNA를 이용하여 cDNA를 합성하였고, PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit (Clontech, USA)를 이용하여 subtraction을 수행하였는데, Rebrikov et al (2000)의 방법에 따라 MOS를 수행하였고, 실험의 편의성을 위해 약간의 변형을 시도하였다. Reverse Northern을 위한 probe를 제작하기 위해, reverse subtraction도 수행하였다. Biotin-labeled NP1을 제거하기 위해 2차 PCR 산물 150 ng을 *Sma*I 10 U으로 25°C에서 2시간 동안 digestion한 후에, 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 uncut과 *Sma*I-digested PCR product를 Tropilon-plusTM membrane (Tropix, USA)에 고착했다. Southern-StarTM biotin-labeled DNA detection kit (Tropix, USA)를 이용하여 biotin 신호를 확인, digestion 여부를 확인할 수 있었다. *Sma*I-digested PCR product 5 ng을 4× hybridization buffer (200 mM HEPES, pH 8.3 / 2 M NaCl / 0.8 mM EDTA)과 함께 넣어 98°C에서 90초 동안 denaturation시킨 후, 68°C에서 4시간 동안 incubation시켰다. MOS hybridization product를 dilution buffer (20 mM

HEPES, pH 8.3 / 50 mM NaCl / 0.2 mM EDTA) 200 μ l를 넣어 희석하여 MOS PCR을 위한 template로 사용하였다. MOS PCR (72°C 2분 95°C 7초, 62°C 30초, 72°C 2분, 22 cycle)은 20 μ l reaction volume (*Pyrobest* DNA polymerase (TAKARA, Japan) / 1× *Pyrobest* buffer II (Mg²⁺ plus) / 200 μ M dNTP mix / 0.6 μ M NP2Rs primer (5'-GGTCGCGGCCGAGGT-3') / 3 μ l of 2/3 diluted MOS hybridization products)으로 수행하였다. PCR은 모두 GeneAmp PCR system model 9600 (Perkin Elmer, USA)로 수행하였다. A-tailing을 위해 *Taq* DNA polymerase 1.5 U과 dATP 300 μ M을 1시간 동안 PCR 산물과 함께 incubation하였다. QIAquickTM PCR purification kit (Qiagen, Germany)을 이용하여 A-tailed PCR product를 pCR2.1 vector에 넣은 후, Original T/A cloning kit (Invitrogen, USA)을 이용하여 *E. coli* strain TOP10에 transformation하여 3가지 종류의 subtracted library를 구축하였다 (*omfi*, 도열병처리에 의해 발현이 유도된 subtracted library; *omii*, 멸구처리에 의해 발현이 유도된 subtracted library; *omwi*, 상처처리에 의해 발현이 유도된 subtracted library).

확보된 유전자 단편의 크기를 알아보기 위해, colony PCR (*Taq* DNA polymerase 1 U (Neurotics Inc., Korea), 1× reaction buffer, 200 μ M dNTP mix, 0.1 μ M M13R and M13F primer)을 수행하였고, PCR 산물의 일부를 5% non-denaturing acrylamide gel에서 전기영동하였다.

3) Reverse Northern blot analysis

각각의 subtracted library에서 무작위로 94개의 clone을 선별하여 reverse Northern blot을 수행하였다. Template DNA는 T7과 M13R primer를 이용하여 colony PCR 산물을 재증폭하고, 0.4 M NaOH 와 10 mM EDTA solution에 denaturation시킨 후, 100°C에서 10분간 가열하였다. Denatured DNA는 Bio-Dot microfiltration apparatus (Bio-Rad, USA)를 이용하여 Tropilon-plusTM membrane (Tropix, USA)에 transfer하고, UV irradiation을 이용하여 DNA를 membrane에 고정시켰다. Forward와 reverse probe는 2차 PCR (1.5 U *Taq* DNA polymerase (Neurotics Inc., Korea), 1× reaction buffer, 40 μ M each of dATP, dTTP, dGTP, 20 μ M each of dCTP and biotin-dCTP (Tropix, USA), 그리고 1/10로

희석시킨 1차 PCR 산물 1 μ l)로, 1차 PCR 산물에 biotin을 incorporation시켜 제작하였다. 2차 PCR은 94°C에서 10초, 68°C에서 30초, 72°C에서 90초를 1 cycle로 하여 12 cycle 수행하였다. *Rsa*I로 adaptor를 제거하여 background 요인을 줄인 후에, forward와 reverse probe으로 각각 hybridization하고 Southern-StarTM biotin-labeled DNA detection kit (Tropix, USA)을 이용하여 신호를 확인하였다.

4) cDNA microarray 구축 및 실험

cDNA microarray를 제작하기 위해 각각의 subtracted library에서 무작위로 960개의 clone을 선택하여 T7과 M13R primer로 touch-down PCR을 수행하였다 (5 U *Taq* DNA polymerase (Neurotics Inc., Korea), 1× reaction buffer, 200 μ M dNTP mix, 1.0 μ M each of M13F and M13R primers, and 2 μ l colony PCR product) (1.5 min at 95°C followed by 10 cycles of touch-down PCR consisting 15 sec at 94°C, 20 sec at 65°C ($\Delta = -1^\circ\text{C}$), and 1 min at 72°C additional 35 cycles of 15 sec at 94°C, 20 sec at 55°C, and 1 min at 72°C). PCR 산물은 AccuPrepTM PCR purification kit (Bioneer, Korea)을 이용해 정제하였고, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도로 spotting solution (6× SSC)로 녹인 후 HT-ArrayerTM (Bioneer, Korea)를 이용하여 poly-L-lysine coated slide glass에 dotting하였다.

Probe labeling과 hybridization은 Eisen and Brown (1999)의 방법을 약간 변형시켜 실시하였다. 처리구와 무처리구의 poly(A)⁺ RNA 1 μg 에 각각 0.1 mM CyTM5-dUTP와 CyTM3-dUTP (Amersham Pharmacia Biotech, UK)를 incorporation시켰다. Microcon-30 (Millipore, USA)으로 정제시킨 probe를 1.25× ArrayItTM UniHyb solution (TeleChem, USA)에 희석시켜 55°C, 16시간 동안 hybridization시켰다. 1차 washing solution (0.4× SSC, 0.1% SDS)으로 55°C에서 30분간 washing하고, 실온에서 2차 washing solution (0.04× SSC, 0.1% SDS)로 10분간 washing한 후, GenePix 4000B (Axon, USA)로 scanning하였다. 모든 microarray 실험은 3반복으로 수행하였다. Scanning한 다음 data는 SAS package를 이용하여 merge, 신호강도와 발현비율에 의해 정렬시켰다. 우선 영상분석 program인 GenePix Pro 3.0 (Axon, USA)에서 제공하는 'flag' column (이는 신호의 안정성을 보여주는 척도임)을 이용하여 선별하였는데, 3반복 실험 모두에서 안정적인 신호를 내는

clone을 선별하였다. 신호강도에 따라 정렬한 후 4분위수로 나눈 다음, 이 안에서 다시 발현비율 (대표값으로 중위수를 선정함)에 따라 재정렬시켰다. 각각의 제 1, 제 2, 제 3 사분위수에서 발현비율이 1.0 이상인 clone을 차후 실험의 대상으로 선별하였다.

5) 염기서열 분석, 상동성 검색 및 기능군 분류

선발된 clone의 염기서열은 BigDyeTM termination cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems, USA)로 반응시켜서 ABI^{PRISM} 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, USA)을 이용하여 분석하였다. 상동성 검색을 통한 기능 추정은 NCBI의 BLAST Network Service (USA)를 이용하였다 (Altschul et al. 1997). (*P*) value가 10^{-4} 보다 큰 sequence는 no match로 간주하였다. EST는 translated amino acid 서열을 Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS)에 정렬시켜 기능군별로 구분하였다 (Frishman et al. 2001).

6) Northern blot analysis

Northern blot analysis를 위해, total RNA 20 μ g을 1.0% agarose-formaldehyde gel에 전기영동하여 Tropilon-plusTM membrane (Tropix, USA)에 transfer하였다. Probe는 touchdown PCR (*Taq* DNA polymerase (Neurotics Inc., Korea) 1.5 U, 1 \times reaction buffer, 40 μ M each of dATP, dTTP, dGTP, 20 μ M each of dCTP and biotin-dCTP (Tropix, USA), M13F and M13R primer 0.2 μ M, plasmid template 5 ng)로 제작하였다. 정제된 probe를 68 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 hybridization 하고, 강한stringency로 washing한 후 Southern-StarTM biotin-labeled DNA detection kit (Tropix, USA)로 신호를 검출하였다.

7) Southern blot analysis

*O. minuta*와 화성벼의 genomic DNA를 각각 15 μ g 씩 *EcoRV* 또는 *HindIII*를 이용하여 자르고, 0.8% agarose gel에서 전기영동하고, Tropilon-plusTM membrane (Tropix, USA)에 transfer하였다. Northern blot에서 사용한 probe로 65 $^{\circ}$ C에서 hybridization시킨 다음 강한 stringency로 washing한 후, Southern-StarTM biotin-labeled DNA detection kit (Tropix, USA)로 신호를 검출하였다.

나. 결과 및 고찰

1) *omfi* library 구축

MOS PCR의 결과 200 - 900 bp 정도로 subtracted transcripts들이 확보되었고, 중위값은 대략 400 bp 정도로 나타났다. 무작위로 선발된 960개 clone에서 microarray 신호강도와 발현비율을 통해 377개 clone을 선발하였다. 염기서열을 분석한 후, BLASTX (E value cut-off at 10^{-5})를 통한 상동성 검색을 이용하여 확보된 유전자 단편의 기능을 추정하였다. 전체 377개 clone중 약 57%인 214개 clone이 기존에 보고된 유전자와 상동성을 보였다. 확보된 염기서열간의 비교를 통한 contig 확인 결과 총 180 종류의 염기서열이 확보된 것으로 확인되었다. 이중 69개 염기서열이 2개 이상의 clone (redundancy 70.6%)에서 확인되었고, 나머지 111개 clone은 유일하게 하나의 clone에서 확인되었다. 출현빈도가 가장 높았던 10개 염기서열 (전체의 41.1%에 해당함)이 Table 1에 정리되어 있다. 180개 unique sequence중에서 89개 (약 50%)는 GenBank nr DB에서 높은 정도로 상동성을 보였다. GenBank accession number, 추정된 기능, 그리고 MIPS DB와의 비교분석을 통한 기능군 분석 결과를 Appendix 1에 정리해 두었다.

Table 1. The 10 most predominant clones generated in the *omfi*-library. GenBank homologies, hit numbers and percentages are present

BLAST Acc. No ^a	Putative ID	No of hit ^b	Percentage
	No match-009	62	16.4
BAB84007	Ethylene receptor	21	5.6
Q40677	Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplast precursor	19	5.0
NM_112972	Expressed protein	11	2.9
X57952	Ribulose-5-phosphate kinase; phosphoribulokinase	10	2.7
AP002901	Putative glycine dehydrogenase	8	2.1
P25778	Oryzain gamma chain precursor	8	2.1
P09229	Cysteine proteinase inhibitor-1	6	1.6
T03438	Metallothionein-like protein	5	1.3
O24381	Plastidic ATP/ADP-transporter	5	1.3
Sum of Top 10 redundant clones		155	41.1

^a GenBank accession number of the most similar sequence as identified by BLASTX alignment

^b Number of clones assigned to the same GenBank accession

확보된 subtracted library의 기능군 분류에 의하면 전체의 절반 이상 (53.9%)이 unclassified protein으로 분류되었고, subcellular localization (23.4%), metabolism (18.0%), energy (9.0%), protein fate (7.8%), protein synthesis (7.2%), cellular transport/transport mechanisms (6.0%), and cell rescue, defense and virulence (6.0%)의 기능군이 많이 확보된 것으로 확인되었다.

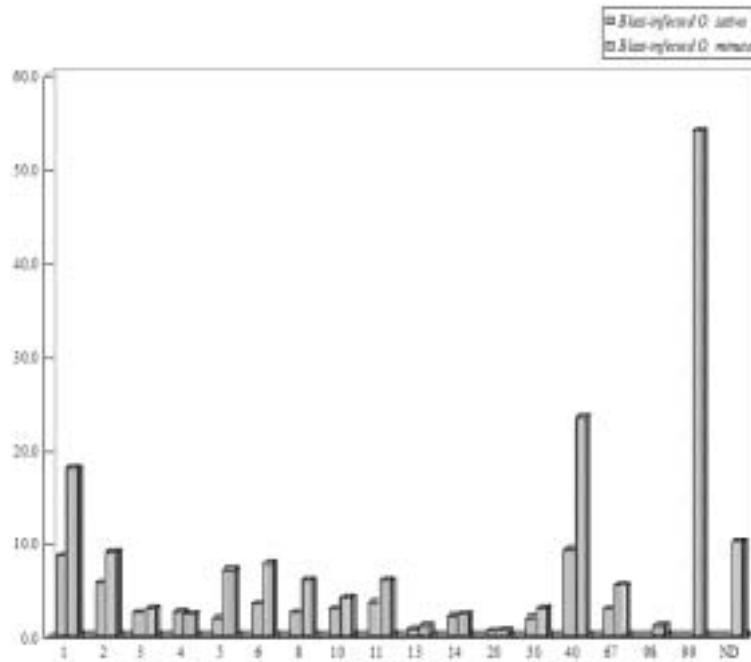


Fig 4. Functional classifications and comparative analysis of the ESTs of *omfi* library and *O. sativa*. One hundred and eighty unique clones from *omfi* library were categorized using the MIPS database of *Arabidopsis thaliana*. The y-axis indicates percentage (%) of ESTs grouped into each category. Numbers indicate the following: 01, Metabolism; 02, Energy; 03, Cell cycle and DNA processing; 04, Transcription; 05, Protein synthesis; 06, Protein fate (folding, modification, and destination); 08, Cellular transport and transport mechanisms; 10, Cellular communication signal transduction mechanism; 11, Cell rescue, defense, and virulence; 13, Regulation of interaction with cellular environment; 14, Cell fate; 20, Systemic regulation of interaction with environment; 30, Control of cellular organization; 40, Transcription; 67, Transport facilitation; 98, Classification not yet clear-cut; 99, Unclassified proteins; ND, not determined.

Transport facilitation (5.4%), cellular communication/signal transduction mechanism (4.2%), 그리고 control of cellular organization (3.0%)의 기능군은 상대적으로 적게 확보되었다. 도열병이 처리된 재배벼에서 보고된 EST의 기능군과 비교 분석한 결과가 Fig 4에 정리되어 있다. 특히 metabolsim (18%)기능군의 비율이 *omfi* library에서 높이나왔는데, 대사와 관련된 유전자들의 비율이 높은 점은 pathogen attack에 대해 저항성을 가지는데 필수적인 요소가 된다. 이는 강화된 대사과정과 저항성유전자의 발현에 의해 재배 저항성을 가질 수 있기 때문이다. 저항성에 관련된 기능군의 경우 도열병이 처리된 재배벼의 EST에 비해 2배 가까이 증가된 점을 확인할 수 있었다.

Microarray data를 Northern blot analysis로 확인하였다. 도열병 처리상태에서의 유전자 발현 양상을 8개 clone에서 확인하였다 (Fig 5). 비록 정확한 발현양상은 microarray data와 Northern blot data가 차이를 보이기는 하지만, 모든 clone이 도열병 처리상태에서 발현이 증가되는 걸 확인할 수 있었다. 특히 *omfi-454, 671, 748, 958* (unknown clone)의 경우 처리에 의한 발현증가가 큰 것으로 나타났다. 기존에 보고된 저항성 관련 유전자, *omfi-394, 462, 499* 역시 발현이 도열병 처리 72시간 후에 증가된 것으로 확인되었다. Protein kinase *Xa21* (*omfi-394*)은 특정 ligand와의 결합을 통해 활성화되어 Ser 또는 Thr residue의 인산화를 일으키게 된다. 활성화된 enzyme은 하위의 저항성 기작을 일으켜 pathogen의 성장을 제한하게 된다. Cysteine protease inhibitor (*omfi-462*)는 cysteine protease의 기능을 저해시키게 되는데, 이는 pathogen infection, 기계적 상처, 해충 피해에 의한 과도한 programmed cell death를 막게 된다 (Solomon et al. 1999). Protein disulfide isomerase (*omfi-499*)는 ER에서 새로 생성된 단백질의 구조 조정에 중요한 역할을 하는데, 환경 stress, apoptosis 등에 의해 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다 (Ko et al. 2002). Fd-GOGAT (*omfi-678*)의 경우 기능군이 metabolism에 해당하며, 염해에서 발현이 증가되는 것으로 연구되었다 (Popova et al. 2002).

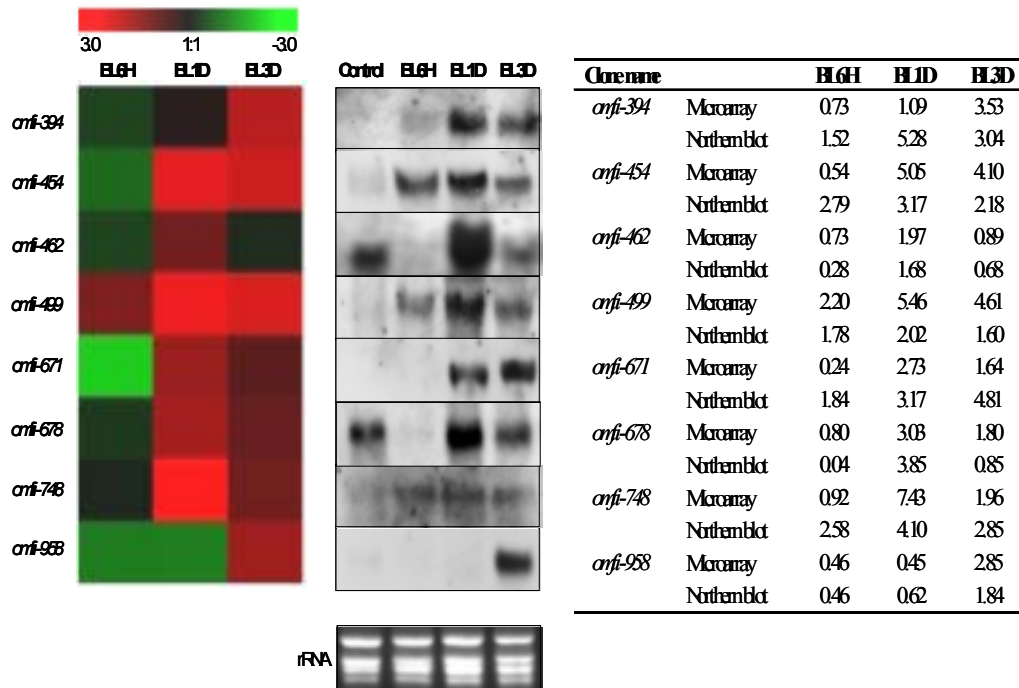


Fig 5. Expression profiles by microarray and Northern analysis of eight different *omfi* clones. Lanes are labeled as follows: Control, no fungal infection; BL6H, 6 h after fungal infection; BL1D, 24 h after fungal infection; BL3D, 72 h after fungal infection. rRNA stained with ethidium bromidewas used as a loading control

2) *omii* library 구축

MOS PCR의 결과 200 - 850 bp size로 증폭되었으며, 중위값은 대략 400 bp 정도로 나타났다. 무작위로 선발된 960개 clone에서 microarray 신호강도와 발현비율을 통해 388개 clone을 선발하였다. 염기서열을 분석한 후, BLASTX (E value cut-off at 10^{-5})를 통한 상동성 검색을 이용하여 확보된 유전자 단편의 기능을 추정하였다. 전체 388개 clone중 약 67%인 261개 clone이 기존에 보고된 유전자와 상동성을 보였다. 확보된 염기서열간의 비교를 통한 contig 확인 결과 총 179 종류의 염기서열이 확보된 것으로 확인되었다. 이중 65개 염기서열이 2개 이상의 clone (redundancy 56.3%)에서 확인되었고, 나머지 114개 clone은 유일하게 하나의

clone에서 확인되었다. 출현빈도가 가장 높았던 10개 염기서열 (전체의 37%에 해당함)이 Table 2에 정리되어 있다. 179개 unique sequence중에서 103개 (약 58%)는 GenBank nr DB에서 높은 정도로 상동성을 보였다. GenBank accession number, 추정된 기능, 그리고 MIPS DB와의 비교분석을 통한 기능군 분석 결과를 Appendix 2에 정리해 두었다.

Table 2. The most prevalent mRNAs found in the *omii*-library

BLAST Acc. No ^a	Putative Identity	Number of hit ^b	Percentage (%)
AF327055	Alpha 1,4-glucan phosphorylase L isozyme	29	7.5
	No hit	22	5.7
AB023498	Starch branching enzyme rbe4	18	4.6
P25778	Oryzain gamma chain precursor	14	3.6
AP004072	Alpha 1,4-glucan phosphorylase Hisozyme	14	3.6
	No hit	13	3.4
P18567	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain C	9	2.3
BAB84007	Ethylene receptor	9	2.3
AF009959	Metallothionein-like protein	8	2.1
D88273	Nicotianamine aminotransferase A	7	1.8
Sum of Top 10 Redundant Clones		143	36.9

^a GenBank accession number of the most similar sequence as identified by BLASTX alignment

^b Number of clones assigned to the same GenBank accession

확보된 subtracted library의 기능군 분류에 의하면 전체의 절반 이상 (58.1%)이 unclassified protein 또는 not determined로 분류되었고, subcellular localization (27.7%), metabolism (14.8%), energy (14.2%)의 기능군이 절반 정도를 차지하는 것으로 확인되었다. *O. minuta*의 normal EST (vegetative stage의 잎)와 비교한 결과 protein fate (12.9%), protein synthesis (7.1%), 그리고 cellular transport/transport mechanisms (6.5%)의 기능군이 2배 이상 많이 확보된 것으로 확인되었다. 또한 cell fate (6.5%), cellular communication/signal transduction mechanism (5.8%), 그리고 control of cellular organization (5.8%)의 기능군 역시 2배 정도 많이 확보되었다 (Fig 6).

Microarray data를 Northern blot analysis로 확인하였다. 멸구 처리상태에서의 유

전자 발현 양상을 11개 clone (*omii-016, 083, 134, 163, 185, 198, 206, 214, 215, 286* and *628*)에서 확인하였다 (Fig 7). 이 중에서 7개 clone들은 기존에 보고된 GenBank DB와 상동성을 보였다 (granule binding starch synthase II precursor, cathepsin B-like cysteine proteinase, cysteine proteinase inhibitor-1, GTP-binding protein tyxA, putative protein, vacuolar targeting receptor bp-80, hypothetical protein R1, and oryzain gamma chain precursor). 발현양상은

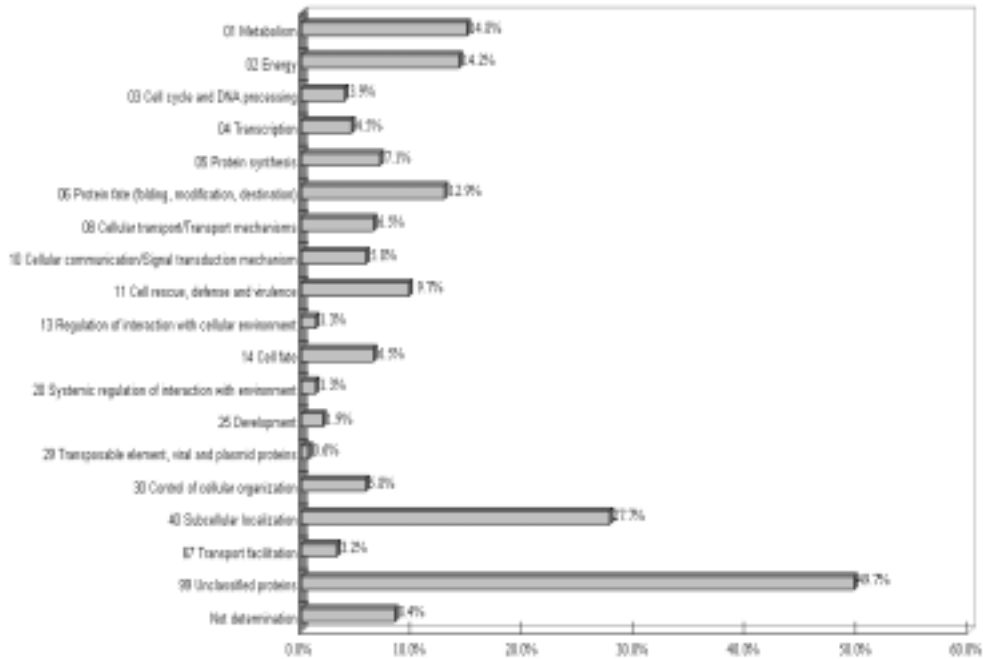


Fig 6. Functional classification of ESTs derived from the *omii* library. One hundred and seventy nine unique clones from planthopper-infested *O. minuta* were categorized using the MIPS database of *Arabidopsis thaliana*. The x-axis indicates percentage (%) of ESTs grouped into each category.

microarray data와 Northern blot data가 서로 비슷한 양상을 보였고, 모든 clone이 멸구 처리상태에서 발현이 증가되는 걸 확인할 수 있었다. 발현강도에서 보이는 약간의 차이는, 실험에 사용된 Cy dye의 물리적, 화학적 특성에 의해 일어날 수 있다.

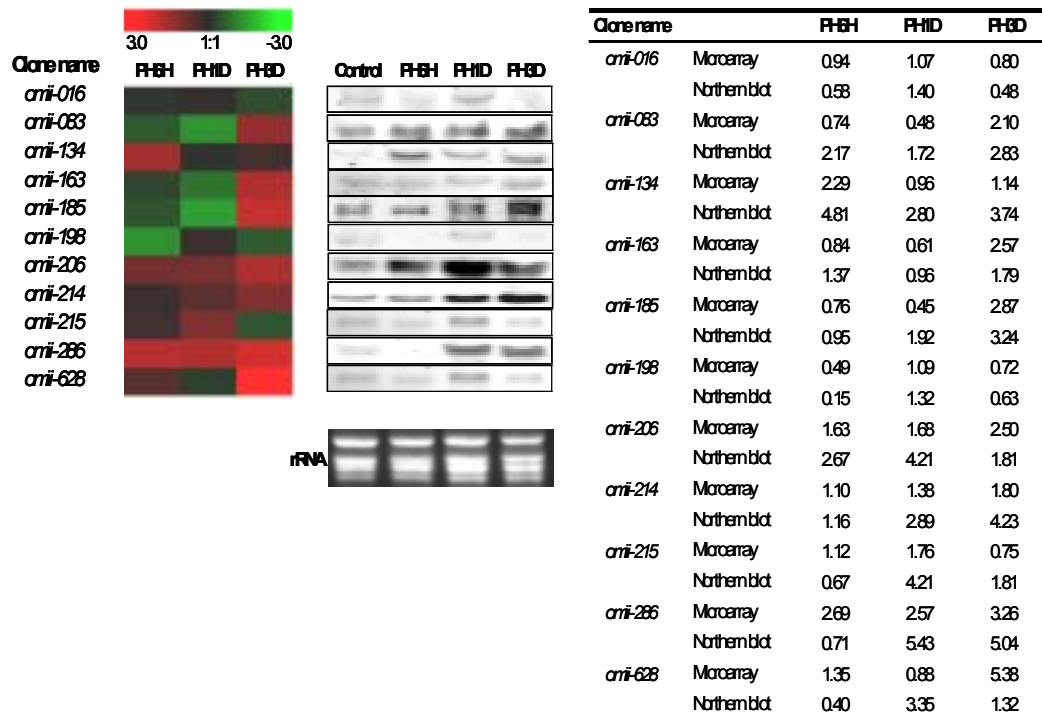


Fig 7. Expression patterns of *omii* clones screened by microarray. Increased expression levels after infestation are presented. Differential expression patterns were presented by microarray and Northern blot analysis. Each transcript is presented by a single row, and each time series is presented by a single column. The expression profiles of these partial transcripts were quite different in the time series (i.e., 6 h, 24 h and 72 h after infestation), all of the tested clones exhibited elevated gene expressions after infestation. rRNA was used as a control to ensure equal loading and the integrity of the Northern blot analysis. Lanes: Control, no insect infestation; PH6H, 6 h after insect infestation; PH1D, 24 h after insect infestation; PH3D, 72 h after insect infestation.

Southern blot analysis를 통해 확보된 clone이 야생벼에 특이적으로 존재하는 것인지, 아니면 재배벼에도 같이 존재하는 것인지 여부를 비교 확인하였다. 확인한 7개 clone, *omii-134* (no match), *163* (putative cathepsin B-like cysteine proteinase), *188*

(putative 4- α -glucanotransferase), 215 (no match), 286 (no match), 592 (no match), and 628 (no match)의 경우 재배벼와 야생벼에 모두 적은 copy수로 존재하는 것으로 확인되었다 (Fig 8). 이를 통해 확보된 유전자가 gene mining의 개념보다 allele mining 쪽으로 고려해야할 것 같으며, 이는 야생벼의 저항성이 야생벼에만 존재하는 특정 유전자의 발현에 의한 것보다 유전자 발현의 차이에 기인한 것으로 추정할 수 있다.

3) *omwi* library 구축

MOS PCR의 결과 200 - 800 bp 정도로 subtracted transcripts들이 확보되었고, 중위값은 대략 350 bp 정도로 나타났다. 무작위로 선발된 960개 clone에서 microarray 신호강도와 발현비율을 통해 371개 clone을 선발하였다. 염기서열을 분석한 후, BLASTX (E value cut-off at 10^{-5})를 통한 상동성 검색을 이용하여 확보된 유전자 단편의 기능을 추정하였다. 전체 371개 clone중 약 72%인 267개 clone이 기존에 보고된 유전자와 상동성을 보였다. 확보된 염기서열간의 비교를 통한 contig 확인 결과 총 212 종류의 염기서열이 확보된 것으로 확인되었다. 이중 75개 종류 (235 clone에 해당함)의 염기서열이 2개 이상의 clone (redundancy 63.2%)에서 확인되었고, 나머지 137개 clone은 유일하게 하나의 clone에서 확인되었다. 출현빈도가 가장 높았던 10개 염기서열 (전체의 30%에 해당함)이 Table 3에 정리되어 있다. 212개 unique sequence중에서 123개 (58%)는 GenBank nr DB에서 높은 정도로 상동성을 보였다. GenBank accession number, 추정된 기능, 그리고 MIPS DB와의 비교분석을 통한 기능군 분석 결과를 Appendix 3에 정리해 두었다.

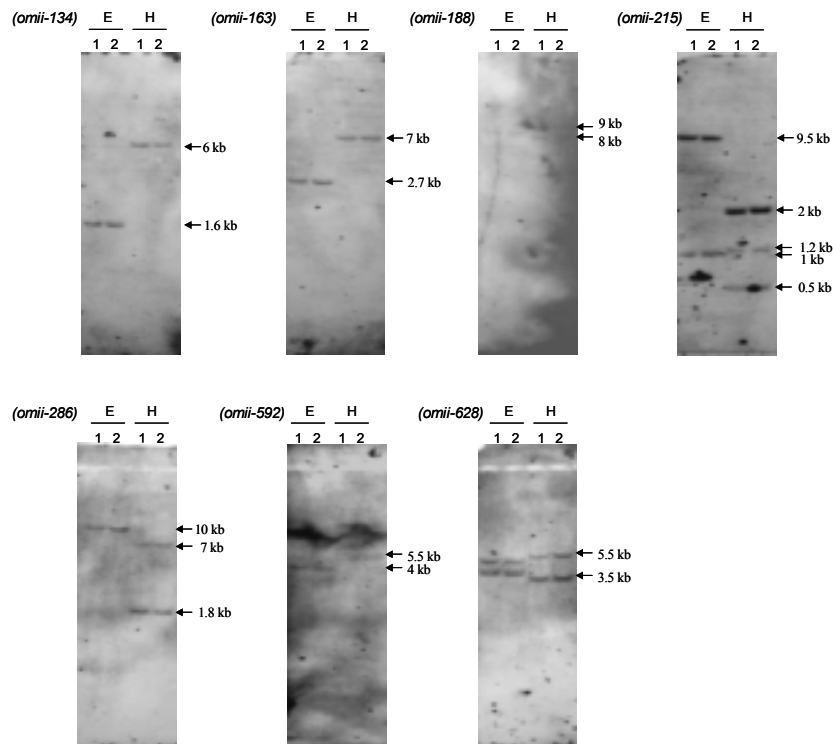


Fig 8. Comparative Southern blot analyses between *O. minuta* (1) and *O. sativa* cv. Hwaseongbyeo (2). Fifteen micrograms of genomic DNA were digested with *EcoRV* (E) or *HindIII* (H).

Table 3. The most prevalent mRNAs found in the *omwi*-library

BLAST Acc. No ^a	Putative Identity	Number of hit ^b	Percentage (%)
AB006704	GTP-binding protein typA	15	4.0
Q40677	Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplast precursor	15	4.0
P18567	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain C	13	3.5
AB049723	Putative senescence-associated protein	13	3.5
AJ309088	Putative translation factor	11	3.0
P25778	Oryzain gamma chain precursor	10	2.7
BAB84007	Ethylene receptor	10	2.7
AP004072	Alpha 1,4-glucan phosphorylase Hisozyme	8	2.2
AB023498	Starch branching enzyme rbe4	8	2.2
AP002901	Putative glycine dehydrogenase	7	1.9
Sum of Top 10 Redundant Clones		110	29.6

^a GenBank accession number of the most similar sequence as identified by BLASTX alignment

^b Number of clones assigned to the same GenBank accession

확보된 subtracted library의 기능군 분류에 의하면 약 60%가 unclassified protein 또는 not determined로 분류되었고, subcellular localization (25.4%), metabolism (19.0%), cell rescue and defense (8.5%), transcription (7.9%)의 기능군도 절반 이상을 차지하는 것으로 확인되었다 (각 유전자가 하나 이상의 기능군에 해당하기 때문에, 전체 합이 100%를 넘게 된다). *O. minuta*의 normal EST (vegetative stage의 잎)와 비교한 결과 protein fate (6.3%), protein synthesis (5.8%), cellular transport/transport mechanisms (5.8%), cellular communication/signal transduction mechanism (4.8%), 그리고 control of cellular organization (4.8%)의 기능군이 상대적으로 많이 확보되었다 (Fig 9).

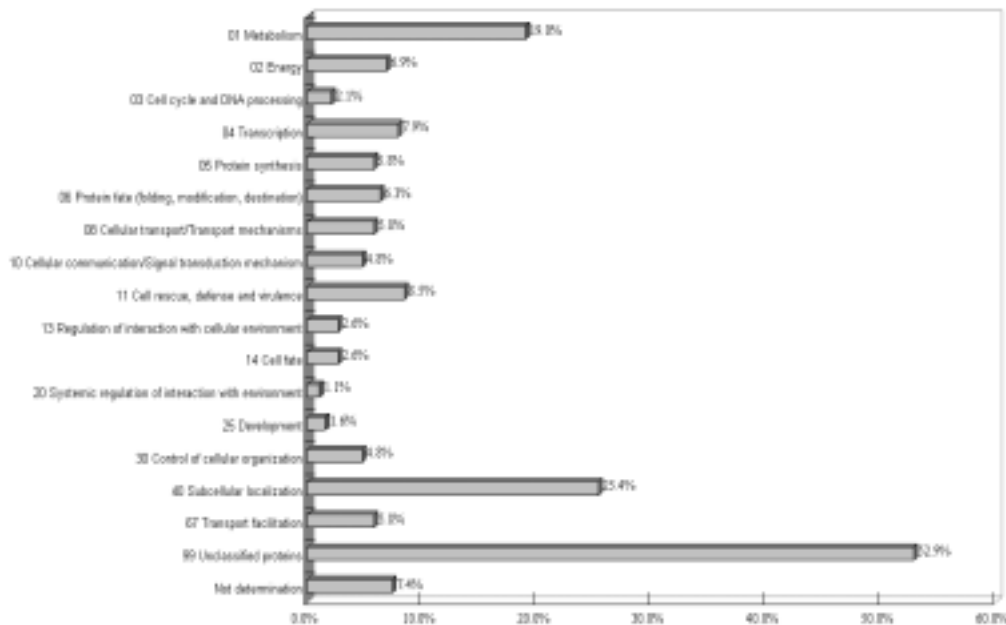


Fig 9. Functional classification of ESTs obtained from the *omwi* library. ESTs were classified based on their biological functions determined by alignment to *Arabidopsis* protein sequences using an E-value cutoff of 10^{-5} . X-axis indicates percentage (%) of ESTs matched with *Arabidopsis* protein DB.

Microarray data를 Northern blot analysis로 확인하였다. 상처 처리상태에서의 유전자 발현 양상을 10개 clone (*omwi-084, 203, 292, 297, 314, 383, 398, 553,*

562, and 945)에서 확인하였다 (Fig 10). 이 중에서 5개 clone들은 기존에 보고된 GenBank DB와 상동성을 보였다 (cysteine proteinase inhibitor-1, light regulated protein precursor, chitinase, granule binding starch synthase II precursor, and GTP-binding protein typA). 발현양상은 microarray data와 Northern blot data에서 약간의 차이를 보였지만, 전반적인 양상에서 유사함을 확인할 수 있었고, 모든 clone이 상처 처리상태에서 발현이 증가되었다. 발현강도에서 보이는 약간의 차이는, 실험에 사용된 Cy dye의 물리적, 화학적 특성에 의해 일어날 수 있다.

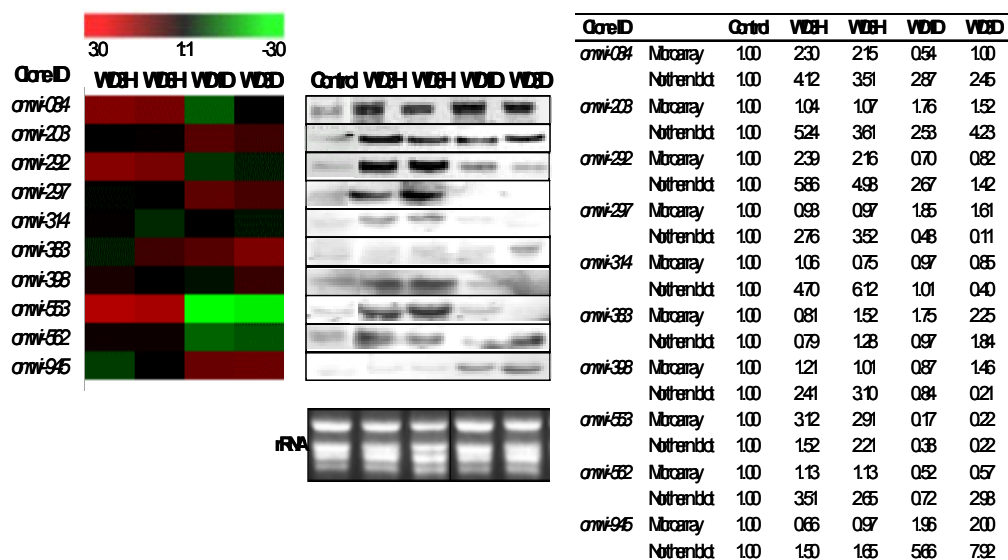


Fig 10. Expression patterns of the *omwi* clones selected by Northern blot analysis. Increased expression levels after wounding are presented. For the graphical presentation of microarray data, the expression levels were transformed by log base 2. The expression profiles of these partial transcripts were quite different in the time series (3 h, 6 h, 24 h and 72 h after the wound treatment), and all of the tested clones exhibited elevated gene expressions after wounding. The relative expression levels of microarray data and northern blot analysis were compiled a table. rRNA was used as a control to ensure equal loading and integrity. Lanes: Control, no wound treatment; WD3H, 3 h after wound treatment; WD6H, 6 h after wound treatment; WD1D, 24 h after wound treatment; WD3D, 72 h after wound treatment.

4) 확보한 유전자의 기능분석 (저항성과 관련하여)

다양한 종류의 stress에 대한 저항성은 cell rescue, defense and signal transduction, 그리고 강화된 metabolic pathway 등에 의해 이루어진다. 확보된 clone들의 기능군 분석 결과 다양한 기능의 유전자들이 *O. minuta*의 내재해성 기작에 관여하는 것으로 밝혀졌다. Metallothionein, cysteine proteinase inhibitor-1, chitinase, serine carboxypeptidase, sesquiterpene cyclase, 그리고 jacalin과 같이 기존에 내재해성과 관련된 것으로 알려졌던 유전자들도 많이 확보되었다. Metallothionein이 많이 확보되었는데, type 1 metallothionein의 경우 노화된 잎과 여러 가지 종류의 스트레스 상태에서 발현이 증가되는 것으로 보고되어 있다 (Ma et al. 2003; Potenza et al. 2001). Proteinase inhibitor는 식물계에 널리 분포되어 있으며, 특히 충해에 대한 저항성에 관련있는 것으로 알려져 있다 (Botella et al. 1996). Chitinase는 곰팡이의 세포벽을 분해시켜, 곰팡이병에 대한 저항성을 부여하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Bishop et al. 2000). Ser/Thr protein kinase and phosphatase에 의한 단백질의 인산화는, 특정 단백질에 대한 posttranslational modification을 통해 많은 신호전달 체계에 중요한 조절역할을 수행하는 것으로 알려져 있다 (Gu et al. 2002; Buchanan et al. 2002). Serine decarboxypeptidase는 상처에 의해 발현이 유도되는 유전자로, brassinosteroid pathway를 통한 신호전달 인자이다. 상처, systemin, 또는 MeJA 처리에 의해 peptidase activity가 증가되는 것으로 연구되어 왔다 (Li et al. 2001; Moura et al. 2001). Sesquiterpene cyclase는 sesquiterpene (일종의 phytoalexin)의 생산에 중요한 역할을 하는 유전자로, 곰팡이병과 충해에 대한 저항성을 위해 발현이 유도되는 것으로 알려져 있다 (Ha et al. 2003; Mandujano-Chavez et al. 2000; Shen et al. 2000). Jacalin은 NBS-LRR type 저항성 유전자와 함께 virus에 대해 저항성을 보이는 것으로 알려져 있다 (Chisholm et al. 2000). Ribulose biphosphate carboxylase, chlorophyll a-binding protein과 같은 housekeeping gene들도 omii library에 확보되었다. 이들 housekeeping gene의 발현증가는 pathogen attack에 대한 반작용에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Scheideler et al. 2002).

2. SSH를 이용한 *O. grandiglumis*의 내재해성 유전자 확보

가. 재료 및 방법

1) 재료 및 재해 처리

*O. grandiglumis*는 수원 작물 시험장에서 50-100 cm 자란 묘를 분양받아 사용하였다. 상처 처리는 paper punch를 이용하여 상처를 냈으며, 처리후 3, 6, 12, 24, 48, 72시간에 sampling하였다. Fungal elicitor 처리는 20% yeast extract 용액을 잎 전체에 분사한 후 같은 시간대별로 수확하였다. 액체질소에 급랭 동결시킨 후 식물 재료로 사용하였다.

2) RNA 추출 및 subtracted library 구축

PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech, USA)를 사용하였으며, 야생벼에 상처와 fungal elicitor 처리를 한 것을 tester로 이용하였다. 처리, 무처리구의 total RNA를 뽑은 뒤 2 µg의 poly (A)⁺ RNA로부터 cDNA를 합성하였다. Tester와 driver cDNA를 *Rsa*I으로 자른 뒤 tester cDNA를 두 부분으로 나누어 서로 다른 adaptor를 붙이고, driver는 아무런 adaptor를 붙이지 않은 채 1, 2차 hybridization하고, PCR로 증폭하였다. 이렇게 증폭된 cDNA를 T/A cloning vector로 subcloning하여 1,200여개의 clone을 확보하였다.

3) Colony array screen for positives (Dot Blot)

PCR-Select™ Differential Screening Kit (Clontech, USA)을 이용하여 차별되게 발현된 cDNA 클론들을 확인하였다. 776 colony들에 대해서 LB-amp 액체 배지 100 µl에 배양시킨 후, LB/amp 고체배지 위에 membrane을 얻고 위에 1 µl 씩 분주하여 다시 배양하였다. 이 membrane을 denaturing 용액 (0.5M NaOH, 1.5M NaCl)에서 4분간, neutralizing 용액 (0.5M Tris-HCl, pH 7.4, 1.5M NaCl)에서 4분간 방치하였다. 이 membrane을 30분간 건조시킨 후, 80°C에 2시간 baking하였다. Forward-subtracted cDNA에 ³²P-labelling된 probe을 사용하여 hybridization하였다. Membrane을 low-stringency washing solution (2×

SSC/0.5% SDS)에서 2회 washing하였으며, high-stringency washing solution (0.2× SSC/0.5% SDS)에서 2회 washing하였다.

4) Northern blot analysis

상처와 fungal elicitor 처리된 식물체로부터 분리된 total RNA 25 μ g을 1.0% agarose-formaldehyde gel에 전기영동 한 후, Hybond-N⁺ filter (Amersam, UK)로 transfer하였다. Northern blot은 biotin-labeled probes (Tropix, USA)를 사용하여 65°C에서 20시간동안 hybridization하였다. membrane을 Sambrook et al (1989) 방법을 이용하여 high stringency로 2회 washing한 후, X-ray film에 노출하였다.

5) DNA sequencing analysis

확보된 유전자 단편의 염기서열은 dideoxy-chain termination 방법에 의해서 AutoCycleTM Sequencing Kit (Amersham, UK)을 사용하여 분석하였다. 전기영동은 ALF^{express} II DNA Analysis System (Amersham, UK)을 사용하여 분석하였다. 상동성 검색은 BLAST Network Service (National Center for Biotechnology Information, USA)을 이용하여 분석하였고, 염기서열과 아미노산 서열은 PC/GENE program (Intelligentics, Switzerland)을 이용하여 분석하였다.

6) Rapid Amplification of cDNA ends (RACE)

MarathonTM cDNA Amplification Kit (Clontech, USA)을 이용하여 전체 염기서열을 확보하였다. Total RNA로부터 Poly(A)⁺ RNA 분리하여 cDNA를 합성하였다. Double-stranded cDNA 양끝에 adaptor를 ligation하여 RACE PCR의 template로 사용하였다. PCR 산물은 Original TA Cloning Kit (Invitrogen, USA)을 이용하여 cloning하였다.

7) Microarray를 통한 screening

Extraction kit for 96 Well Vacuum Block (Bioneer, Korea)를 이용하여 확보된 1,200개의 clone에서 plasmid DNA를 추출하였고, 이들 중 1,152개의 clone를

경상대학교에 의뢰하여 DNA chip을 제작하였다.

가) cDNA clone과 microarray preparation

NH_3^+ 를 가진 primer로 PCR에 의해 증폭된 100 μl 의 cDNA insert를 EtOH로 침전하고, 건조시킨 후 10 μl 의 ddH₂O에 녹여서 384 well microtiter plate에 4 μl 옮기고 여기에 spotting solution (Telechem, USA)을 1:1의 비율로 넣는다 (final conc 150 ng/ μl). 16개의 printing tip을 갖춘 고정밀 gridding robot (Bio Robotics)으로 amine coating slide (TeleChem, USA)에 증폭산물을 dotting한다. UV 1800 StrataLinker를 이용하여 650 mJ의 에너지로 UV crosslink 한 후, 2시간 동안 baking한다. 0.2 % SDS와 H₂O로 2차례 씻어주고, 100°C에서 2분간 denaturation시킨다. 물기를 말린 후 sodium borohydride solution (1g of NaBH₄ dissolved in 300 ml PBS and 100 ml of 100% ethanol)으로 결합하지 않은 DNA를 제거하고, 0.2% SDS와 ddH₂O로 3차례 씻어준 후 원심분리 (1000 rpm/ 2 min)를 통해 건조시킨 후 보관하였다.

나) Hybridization reaction

DNA chip에 prehybridization buffer (6× SSC, 0.2% SDS, 5× Denhardt solution, 1 mg/ml salmon sperm DNA) 15 μl 를 넣고, cover slip을 덮은 후 hybridization chamber에 넣어 2시간 동안 상온에 둔다. 2× SSC, 그리고 0.2× SSC로 2분간 씻고 spin으로 건조시킨다. 무처리, 처리구의 RNA에 각각 Cy3, Cy5 dye를 incorporation시킨 다음, spin column (Millipore, USA)으로 정제하고 EtOH down하여 probe를 준비한다. 준비된 probe에 hybridization solution (6× SSC, 0.2% SDS, 5× Denhardt solution, 0.1 mg/ml salmon sperm DNA) 15 μl 를 넣고 섞은 다음, 95°C에서 2분간 denaturation시킨다. 상등액을 slide 위에 놓고 cover slip을 덮은 후 hybridization chamber에 넣어서 빛이 안 들어가게 하여 65°C에서 16시간 incubation한다. 1차 washing solution (2× SSC, 0.2% SDS)로 60°C에서 30분간 2회 씻고, 2차 washing solution (0.05× SSC)로 상온에서 5분간 씻은 다음, ScanArray 3000 (Packard BioChip Technologies, USA)으로 영상분석을 실시하였다.

다) DNA chip data 정리

DNA chip을 제작하여 분석한 결과, 1차 data에서 시간이 지남에 따라 발현이 증가하는 118개 colony와 발현이 감소하는 163개 colony를 얻었으며, 2차 data에서는 positive true colony 27개를 얻었다. 그리고 3차, 4차, 5차에서는 각각 31개, 12개, 29개의 positive true colony를 확인하였다 (처리에 의해 발현이 증가되는 clone을 Appendix의 Table 5에 정리해 두었다).

8) Functional characterization of PBZ

가) smGFP-PBZ vector 제작

(1) Plasmids와 배양조건

본 연구에 사용된 유전자는 벼에서 분리한 PBZ를 사용하였고, 형질전환을 위한 숙주균주는 *E. coli* DH5 α 를 사용하였으며, cloning을 위한 vector DNA로는 smGFP를 사용하였다. *A. tumefaciens*로는 LBA4404를 사용하였다.

E. coli 배양에는 LB배지 (1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 1% NaCl)를 사용하였다. PBZ를 가진 *E. coli*는 75 $\mu\text{g}/\ell$ ampicillin이 첨가된 LB 액체배지에서, smGFP vector는 100 $\mu\text{g}/\ell$ kanamycin이 첨가된 LB 액체배지에서 37°C 16시간 배양하였다. DH5 α 를 이용해 형질전환된 *E. coli*는 100 $\mu\text{g}/\ell$ kanamycin이 첨가된 LB agar배지에서 선별하였다. *A. tumefaciens*는 100 $\mu\text{g}/\ell$ kanamycin과 25 $\mu\text{g}/\ell$ rifampicin이 첨가된 YEP agar배지(1% bacto-peptone, 1% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl)에서 선별하였다.

(2) PCR 증폭과 Ligation

배양액을 원심분리하여 상등액을 제거한 후, QIAprep[®] Spin Miniprep Kit(Qiagen)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 각각의 양 끝에 *Xba*I과 *Bam*HI을 가진 5' -GGGTCTAGAATGGCTCCGGCCTGCGTCTCC-3' , 5' -GGGGATCCGGGCGT-ACTCGGTAGGGTGAG-3' primer를 이용하여 PCR로 PBZ 유전자를 증폭시켰다

(PCR condition, 94°C, 5 min; 94°C, 45 sec; 55°C, 45 sec; 72°C, 1.5 min; 35 cycle; 72°C, 7 min). 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel 전기영동으로 분석하였다.

증폭된 PCR 산물과 smGFP vector는 *Bam*HI (Roche, German)과 *Xba*I으로 자르고, NucleoTrap[®] Nucleic Acid Purification kit (Clontech, USA)를 사용하여 Gel Elution하였다. Elution 후 vector와 insert의 비율을 4:6으로 하여 T4 DNA ligase (Roche, German)처리하여 16°C에서 overnight하여 ligation시켰다.

(3) *E. coli* transformation과 PCR 분석

Ligation된 smGFP-PBZ vector는 DH5 α 를 이용해 transformation 시켰으며, 100 μ g/l kanamycin이 첨가된 LB agar배지에서 37°C에서 16시간동안 배양하였고, PCR 분석을 하였다. PCR 분석시 35S promoter와 nos terminator의 sequence를 이용하였다 (PCR condition, 94°C, 45 sec; 55°C, 45 sec; 72°C, 1.5 min; 35 cycle). 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel 전기영동으로 분석하였다.

(4) *A. tumefaciens* transformation

완성한 smGFP-PBZ vector는 Gene Pulser (Bio-Rad)를 이용한 electro-transformation을 통해 *A. tumefaciens* LBA4404에 형질전환시켰다. Electro-transformation의 조건으로는 25 μ F, Controller 200, 2.5 kV로 하였으며, 0.2 cm cuvette를 사용하였다. *A. tumefaciens*는 100 μ g/l kanamycin과 25 μ g/l rifampicin이 첨가된 YEP agar배지에서 29°C조건으로 3일간 배양하였고, 35S promoter primer와 nos terminator primer를 이용하여 PCR한 후, 1% agarose gel 전기영동으로 분석하였다.

나) pCAMBI1301-PBZ 및 pBI121-PBZ vector의 제작

PBZ 유전자의 단자엽 및 쌍자엽식물용 형질전환 vector를 제작하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

(1) Plasmids와 배양조건

Cloning을 위한 vector DNA로는 pCAMBIA1301과 pBI121을 사용하였고, *A. tumefaciens* LBA4404를 사용하였다. *E. coli* 배양에는 LB배지 (1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 1% NaCl)를 사용하였다. PBZ를 가진 *E. coli*는 75 $\mu\text{g}/\ell$ ampicillin이 첨가된 LB 액체배지에서, pCAMBIA1301과 pBI121 vector는 100 $\mu\text{g}/\ell$ kanamycin이 첨가된 LB 액체배지에서 37°C 250 rpm조건으로 16시간 배양하였다. DH5 α 를 이용해 형질전환된 *E. coli*는 100 $\mu\text{g}/\ell$ kanamycin이 첨가된 LB agar배지에서 선별하였다. *A. tumefaciens*는 100 $\mu\text{g}/\ell$ kanamycin과 25 $\mu\text{g}/\ell$ rifapicin이 첨가된 YEP agar배지 (1% bacto-peptone, 1% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl)에서 선별하였다.

(2) PCR 증폭과 Ligation

배양액을 원심분리하여 상등액을 제거한 후, QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen)를 이용하여 DNA를 추출하였다. pCAMBIA1310-PBZ vector를 만들기 위해 각각의 양 끝에 *KpnI*과 *SacI*을 가진 5'-CCCGGTACCATGGCTCCGGCCT-GCGTCTCC-3', 5'-CCCGAGCTCTTAGGCGTACTCGGTAGGGTGAG-3' primer를 이용하여 PCR로 PBZ 유전자를 증폭시켰으며, pBI121-PBZ vector를 만들기 위해서는 각각의 양 끝에 *BamHI*과 *SacI*을 가진 5'-CCCGGATCCATGG-CTCCGGCCTGCGTCTCC-3', 5'-CCCGAGCTCTTAGGCGTACTCGGTAGGGT-GAG-3' primer를 이용하여 PBZ 유전자를 증폭시켰다 (PCR condition, 94°C, 5 min; 94°C, 45 sec; 55°C, 45 sec, 72°C, 1.5 min; 35 cycle; 72°C, 7 min). 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel 전기영동으로 분석하였다.

증폭된 PCR 산물과 pCAMBIA1301 vector는 각각 *KpnI* (Roche, German)과 *SacI*으로 자르고, pBI121 vector와 PCR 산물은 각각 *BamHI* (Roche, German)과 *SacI*으로 자른 후, NucleoTrap[®] Nucleic Acid Purification kit(Clontech, USA)를 사용하여 gel elution하였다. Elution 후 vector와 insert의 비율을 4:6으로 하여 T4 DNA ligase (Roche, German)처리하여 16°C에서 overnight하여 ligation시켰다.

(3) *E. coli* transformation과 PCR 분석

Ligation된 pCAMBIA1310-PBZ, pBI121-PBZ vector는 DH5 α 를 이용해 transformation시켰으며, 100 $\mu\text{g}/\ell$ kanamycin이 첨가된 LB agar배지에서 37°C 조건으로 16시간동안 배양하여 선별하였고, PCR 분석을 하였다. PCR 분석시 35S promoter와 nos terminator의 sequence를 이용하였다 (PCR condition; 94°C, 45 sec; 55°C, 45 sec, 72°C, 1.5 min; 35 cycle). 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel 전기영동으로 분석하였다.

(4) *A. tumefaciens* transformation

완성한 pCAMBIA1310-PBZ, pBI121-PBZ vector는 Gene Pulser (Bio-Rad)를 이용한 electro-transformation을 이용하여 *A. tumefaciens* LBA4404에 형질 전환시켰다. Electro-transformation의 조건으로는 25 μF , Controller 200, 2.5 kV로 하였으며, 0.2 cm Cuvettes를 사용하였다. *A. tumefaciens*는 100 $\mu\text{g}/\ell$ kanamycin과 25 $\mu\text{g}/\ell$ rifampicin이 첨가된 YEP agar배지에서 29°C조건으로 3일간 배양하여 선별하였다. 선별된 *A. tumefaciens*는 35S promoter primer와 nos terminator primer를 이용하여 PCR한 후, 1% agarose gel 전기영동으로 분석하였다.

다) pET22(b)-PBZ 및 pET42(a)-PBZ vector의 제작

PBZ (Probenazole Inducible) 유전자의 단백질단계에서의 기능을 알아보기 위하여 본 연구를 수행하였다.

(1) Plasmids와 배양조건

Cloning을 위한 단백질 발현 vector로는 pET22(b)+와 pET42(a)+를 사용하였다. *E. coli* 배양에는 LB배지 (1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 1% NaCl)를 사용하였다. PBZ를 가진 *E. coli*와 pET22(b)+ vector는 75 $\mu\text{g}/\ell$ ampicillin이 첨가된 LB 액체배지에서, pET42(a)+ vector는 100 $\mu\text{g}/\ell$ kanamycin이 첨가된 LB 액체배지에서 37°C 250rpm조건으로 16시간 배양하였다. DH5 α 를 이용해 형질전환된 *E. coli*인 pET22(b)-PBZ vector는 75 $\mu\text{g}/\ell$ ampicillin이 첨가된 LB agar배지에서, pET42(a)-PBZ vector는 100 $\mu\text{g}/\ell$

kanamycin이 첨가된 LB agar배지에서 선별하였다.

(2) PCR 증폭과 Ligation

배양액을 원심분리하여 상등액을 제거한 후, QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 각각의 양 끝에 *Bam*HI과 *Eco*RI을 가진 5'-CCCGGATCCATGGCTCCGGCCTGCGTCTCC-3', 5'-CCCGAATTCGGCG-TACTCGGTAGGGTGAG-3' primer를 이용하여 PCR로 PBZ 유전자를 증폭시켰다 (PCR condition; 94°C, 5 min; 94°C, 45 sec; 55°C, 45 sec; 72°C, 1.5 min; 35 cycle; 72°C, 7 min). 증폭된 PCR 산물은 0.1% agarose gel 전기영동으로 분석하였다.

증폭된 PCR 산물과 pET22(b)+와 pET42(a)+ vector는 *Bam*HI (Roche, German)과 *Eco*RI으로 자르고, Nucleo trap[®] Nucleic Acid Purification kit (Clontech, USA)를 사용하여 gel elution하였다. Elution 후 vector와 insert의 비율을 4:6으로 하여 T4 DNA ligase (Roche, German)처리하여 16°C에서 overnight하여 ligation시켰다.

(3) *E. coli* transformation과 PCR 분석

Ligation된 pET22(b)-PBZ, pET42(a)-PBZ vector는 DH5 α 를 이용해 transformation시켰으며, pET22(b)+ vector는 75 μ g/l ampicillin이 첨가된 LB agar배지에서, pET42(a)+ vector는 100 μ g/l kanamycin이 첨가된 LB agar배지에서 37°C조건으로 16시간동안 배양하여 선별하고, PCR 분석을 하였다. PCR 분석 시 T7 promoter, T7 terminator를 이용하였다 (PCR condition; 94°C, 45 sec; 55°C, 45 sec; 72°C, 1.5 min; 35 cycle). 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel 전기영동으로 분석하였다.

9) GenomeWalker를 이용한 promoter region 확보

가) Genomic DNA 추출

야생벼에 상처와 elicitor를 모두 처리한 후 6시간이 지난 잎과 야생벼에 상처 처

리 후 6시간이 지난 잎을 각각 1 g씩 정량한 후 액체질소로 얼리고 막자사발에 액체질소를 부어 사발을 차갑게 만든 후, 얼린 잎을 넣고 곱게 갈아주었다. CTAB Buffer를 7 ml 첨가하여 잘 섞어준 후, 60°C shaking incubator (100 rpm)에 1시간 30분 동안 두었다. Chloroform : isoamylalcohol (24 : 1)을 7 ml 첨가하여 잘 섞어준 후, 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상층액을 따서 새 tube에 옮겨준 후, total volume의 70%의 Isopropanol을 첨가하였다. 냉동고에서 1시간 이상 보관 후에 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 pellet을 모았다. 상층액을 버리고 pellet을 말리고 여기에 80% ethanol로 세척하고 건조시켰다. TE buffer (pH 7.0) 100 μ l에 DNA를 녹인 다음 RNase를 3 μ l를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 두었다. 1시간 후 phenol/chloroform 0.5 ml을 넣고 천천히 섞은 뒤 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상층액을 새 tube에 옮겨준 후, chloroform 0.5 ml을 넣고 천천히 섞어주었다. 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 새 tube에 옮겨준 후, total volume의 10%의 sodium acetate와 1 ml 100% ethanol을 넣고 잘 섞어주었다. 냉동고에서 20분 이상 둔 후 12,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다. pellet을 말리고 여기에 80% ethanol 1 ml로 세척하고 건조시켰다. 그런 다음 TE buffer (pH 7.0) 100 μ l에 DNA를 녹였다. 야생벼에 상처 처리 후 6시간이 지난 잎의 흡광도 측정결과는 260 nm에서 0.347 AU로써 농도는 1735 μ g/ml, 야생벼에 상처와 elicitor를 모두 처리한 후 6시간이 지난 잎의 흡광도 측정결과는 260 nm에서 0.576 AU로써 농도는 2880 μ g/ml였다. 이 두 가지 재료 중에서 DNA를 추출한 결과 야생벼에 상처와 elicitor를 모두 처리 후 6시간이 지난 잎이 더 깨끗하게 추출되어 이것을 재료로써 사용하였다.

나) GenomeWalker 제작

GenomeWalker 제작을 위해서 Universal GenomeWalker™ Kit (BD BioScience, USA)를 사용하였다. GenomeWalker의 제작에 앞서 genomic DNA의 quality를 알아보기 위하여 먼저 야생벼에 상처 처리 후 6시간이 지난 잎의 DNA와 control Human genomic DNA를 전기영동하여 그 크기를 확인하였다. GenomeWalker를 제작하려면 DNA의 크기가 최소한 50kb 이상이어야 하는데, 야생벼에 wounding 처리 후 6hr이 지난 잎의 DNA의 크기를 확인해 본 결과,

GenomeWalker의 제작에 적합하다는 사실을 알게 되었다.

먼저, *DraI* digestion으로 genomic DNA의 purity를 확인하였다. 0.5 ml reaction tube에 genomic DNA (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 5 μl , *DraI* (10 U/ μl)을 1.6 μl , 10 \times *DraI* restriction buffer 2 μl , ddH₂O 11.4 μl 을 넣어주고, control에는 enzyme처리를 하지 않고, 잘 섞이도록 inverting을 해준 다음 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 overnight 해주었다. *DraI*을 처리한 결과 genomic DNA가 모든 크기에서 고르게 잘 잘려진 것을 확인할 수 있었다. 4가지 enzyme을 사용하여 genomic DNA을 digestion하였다. 4개의 1.5 ml tube에 DL1 (*DraI*), DL2 (*EcoRV*), DL3 (*PvuII*), DL4 (*StuI*)로 표시한 다음 genomic DNA (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 30 μl , restriction enzyme를 8 μl , restriction enzyme buffer를 10 μl , ddH₂O 52 μl 을 넣어준 후 잘 섞이도록 inverting을 해준 다음 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 처리하였다. 처리 후 5-10초간 slow speed로 vortex해준 다음 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 overnight 해주었다.

Genomic DNA digestion한 후 phenol을 이용하여 정제, EtOH down을 실시하였다. 20 μl 의 TE Buffer (pH 7.5)으로 녹여주고 5-10초간 slow speed로 vortex해주었다.

DNA의 정제후에는 GenomeWalker adaptor로 genomic DNA을 ligation을 하였다. 0.5 ml tube에 정제된 DNA를 4 μl , GenomeWalker Adaptor (25 μM)를 1.9 μl , 10 \times ligation buffer을 1.6 μl , T4 DNA ligase (6 U/ μl)을 0.5 μl 을 넣은 후 16 $^{\circ}\text{C}$ 에서 overnight 해주었다. 그런 다음 70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 incubate 한 후, 각각의 tube에 72 μl 의 TE Buffer (pH 7.5)를 첨가하고 10-15초간 slow speed로 vortex 해주었다.

다) GenomeWalker PCR 수행

GenomeWalker PCR시 혼합용액은 다음과 같다. 처음에 PCR 수행시에는 *Tag* polymerase (Bioneer, Korea)를 사용하여 DNA library (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 1 μl , GSP (Gene-Specific Primer) 1 μl , *Tag* polymerase 0.4 μl , 10 \times reaction buffer 5 μl , dNTP (10mM) 4 μl , Mg(OAc)₂ (25mM) 2.2 μl , Adaptor Primer 1 μl , ddH₂O 35.4 μl 을 넣은 후 잘 섞어주어 사용하였다. 후에 실험 결과가 좋지 않아 좀 더 효율이 높은 *Tag* polymerase (SuperBio)를 사용하여 다른 내용물의 양은 같게

하고 *Tag* polymerase는 1 μ l로 ddH₂O는 34.8 μ l로 넣어준 후 잘 섞어 사용하였다 (PCR condition; 94°C, 25 sec; 72°C, 3 min; 7 cycle; 94°C, 25 sec; 67°C 3 min; 32 cycle; 67°C, 7 min).

라) Subcloning 수행

Subcloning을 하기 위한 Gel Purification 과정은 NucleoTrap[®] Nucleic Acid Purification Kit (BD Bioscience, USA)를 사용하였다. Gel Purification후에는 pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Promega, USA)을 사용하여 ligation하였다. 그런 다음 DH5 α TM를 사용하여 transformation하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 염기서열 분석 결과

확보된 776 colony들 중에서 127 colony들에 대해서 염기서열을 분석하였다. EMBL/GenBank DB의 상동성 검색을 이용하여 84개 colony들의 염기서열을 분석한 결과 다른 개체의 유전자와 유사성을 보였고, 이들 클론들 중에 일부는 일차적 metabolism에 관련된 housekeeping 유전자들과 유사성을 보였다 (clone No. 20, 39, 57, 61, 62, 69, 71, 76, 78, 84, 91, 95, 99, 112, 115, 119). 약 23%의 clone들은 *O. sativa*, *A. thaliana*, *H. sapiens* genome DNA와 유사성을 보였으며, 5개 clone들 (clone No. 6, 23, 36, 55, 611)은 스트레스에 의해서 활성을 나타내는 retrotransposons과 높은 유사성을 보였다. Retrotransposon은 식물 방어 유전자와 유사한 *cis*-regulatory sequence에 의해 활성을 띄는 것으로 알려져 있다. 5개 clone들 (clone No. 362, 440, 460, 561, 695)은 pathogen에 대한 저항성과 관련되는 metallothionein과 고도의 유사성을 보였는데, 이 유전자는 높은 농도의 금속이온과 고온의 다양한 스트레스 조건에서 발현이 증가되는 것으로 보고 되었다. Clone 2개는 아미노산 생합성 반응에 관련되었고, clone 4개는 membrane과 transport에 관련되었다. Clone 7개는 신호 전달, 7개 clone들은 DNA, RNA 발현, clone 2개는 세포 분열에 관련된 유전자와 높은 유사성을 보였다.

2) Northern blot analysis

Clone No. 161, 646, 663, 695는 상처와 fungal elicitor 처리에 의해서 유전자의 발현이 증가된 것을 확인하였으며, clone No. 161, 646은 control에서도 발현되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig 11). 그러나 clone No. 663와 695는 control에서 발현되지 않았고, 다른 4개의 clone들에서는 차등발현 양상을 확인할 수 없었다.

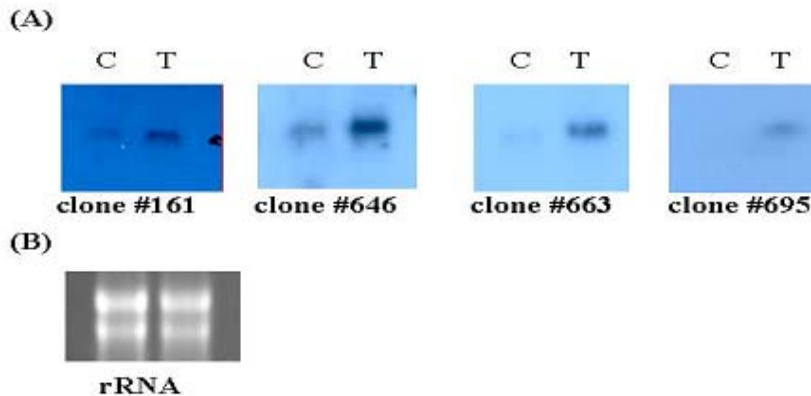


Fig 11. Northern blot analysis of the wound and fungal elicitor induced genes of *O. grandiglumis*. (A) clone No. 161 (Na^+ -D-glucose cotransport regulator); clone No. 646 (pseudo-response regulator 5); clone No. 663 (integral membrane protein); clone No. 695 (endo-1,4,-beta-glucanase); C, control wild rice; T, wound and fungal elicitor treated *O. grandiglumis*. (B) EtBr-stained gel indicated uniform loading and integrity of RNA samples.

3) RACE 기법을 통한 전체유전자 확보

Clone No. 49는 *A. thaliana*의 ABC transporter와 높은 유사성을 나타냈으며, 전체 유전자를 확보하기 위해서 유전자 특이적인 RACE primers (5'-GTCAATACAGTTCTACCGCTTCGCCC-3', for 5' RACE primer; 5'-AGGCGATTTGGGTGGAGACTCAGTA-3' for 3' RACE primer)를 합성하여 PCR을 수행한 후, 3' RACE에서 1440bp의 band를 subcloning 하였고 염기서열 분석 결과 378bp의 3' UTR 지역과 poly(A) tail을 확인할 수 있었다. Clone No. 646는 *A. thaliana*의 pseudo-response regulator 5와 높은 유사성을 보였으며,

전체 유전자를 확보하기 위해서 유전자 특이적인 RACE primers (5'-CCTTAGCTGCCTTGGACACTATGATC-3', for 5' RACE primer; 5'-AAC-TTCGTGTGCTCTGTTCCCTCGTAC-3', for 3' RACE primer)를 합성하여 PCR을 수행한 결과 5' RACE에서 subcloning하였다.

4) 염기서열의 다중검색

상처와 fungal elicitor에서 유도된 clone들을 GenBank DB를 이용하여 검색하였다. Clone No. 39는 *N. tabacum*의 actin (GenBank Acc No. CAA45149)과 높은 유사성을 보였다. Clone No. 44는 ABA와 염해에 반응하는 벼 cDNA (GenBank Acc No. CAA70174)와 높은 유사성을 보였으며, salt-sensitive 와 salt-tolerant indica rice의 뿌리에서 ABA와 염해에 대한 분자적, 생리적인 반응을 나타낸다고 보고되었다. Clone No. 49는 *A. thaliana*의 ABC transporter protein 1-like (GenBank Acc No. BAA97296)와 높은 유사성을 보였으며, putative ATP-binding cassette (ABC) superfamily들은 진균의 병원성에 관여하는 membrane transporter로, host에 대항하는 anti-microbial compounds로 저항성 반응에 관여한다고 알려져 있다. Clone No. 646는 *A. thaliana*의 pseudo-regulator 5 (GenBank Acc No. BAB13743)와 높은 유사성을 나타내었으며, APRR5는 *A. thaliana*의 His-to-Asp phosphorelay system의 구성성분으로, His-to-Asp phosphorelay 기작은 환경 자극에 의해서 식물호르몬 (ethylene and cytokinin)이 분비된다고 보고되었다. *O. sativa*의 enhanced disease resistance 1 (EDR1) gene (GenBank Acc No. AAG31141.1)과 높은 유사성을 보이는 clone의 경우 병에 대한 방어 역할을 한다고 알려져 있고, 소위 HR이라 불리는 programmed cell death와 같은 생리적인 변화를 일으킨다고 보고되었다. SSH에 의해서 상처와 fungal elicitor 유전자에 관계된 방어물질을 조절하는 유전자들과 높은 상동성을 나타내었다.

5) Microarray를 통한 분석 대상 선정 및 기능 분석

가) 야생벼에서 병충해 발생시 특이적으로 발현되는 유전자를 찾기 위해 SSH를

통해 얻은 1,200개의 clone을 가지고 DNA chip을 만들어 분석한 결과 (Table 4), 380개의 positive true colonies를 확보하였다. 380개의 clone 모두 염기서열 분석하여, insert size가 확인된 150여 개의 clone을 상동성 검색을 수행하여 유용 유전자 14개를 선별하였다. Colony No 390 (elicitor and UV light related transcription factor (Elr) mRNA)와 colony No 526 (probenazole-inducible protein PBZ1)의 전체 유전자 서열을 확보하기 위해 RACE 기법을 이용하였다. 하지만 colony No 390의 5' end를 제외한 나머지 RACE는 완전한 증폭이 되지 않았는데, 이는 cDNA가 짧은 단편이거나 *Taq* DNA polymerase의 문제, 혹은 PCR의 조건이 맞지 않기 때문이라고 추측할 수가 있다. RACE PCR의 band가 많이 확인됨에도 불구하고 전체 유전자가 많이 확보되지 않은 이유는 subcloning이 잘 되지 않았거나, subcloning이 잘 되어도 size가 작아 sequence의 증폭이 되지 않은 경우가 있기 때문이다. 따라서 현재 이러한 문제점을 해결하기 위하여 Marathon™ Amplification Kit (Clontech, USA) 대신에 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA)를 사용하고 있고, *Taq* DNA polymerase도 quality가 높은 것을 사용하여 whole gene을 찾기 위한 노력을 하고 있으며, 또한 GenomeWalker로 DNA working을 실시하여 유전자 앞의 genomic DNA sequence를 찾는 작업도 병행 중에 있다.

선별된 colony No 390, colony No 413의 발현양상은 상처와 elicitor처리로 나누어 Northern blot을 통해 확인하였다. colony No 390은 상처와 elicitor 처리 모두 처리후 3시간일 때의 발현이 24시간 후보다 더 많이 되었고, colony No 413은 상처처리일 때 처리후 24시간이 3시간보다 발현이 증가한 반면, elicitor 처리일 때는 처리후 3시간, 24시간에서 발현 정도가 비슷하게 나왔다. colony No 413은 상처 처리일 때 DNA chip 결과와 유사하게 시간이 지남에 따라 발현이 증가하는 것으로 보였다. 하지만 colony No 416은 DNA chip 결과와 상반되게 시간이 지남에 따라 감소하는 양상을 보여 재확인을 필요로 하였다.

흥미로운 것은 probenazole-inducible protein PBZ1으로 추정되는 colony No 526은 도열병에 대한 병저항성 유도 물질로 상처처리보다 fungal elicitor에 의하여 발현된다고 보고 (Yamaguchi et al. 2001)되어 있어, elicitor처리를 한 sample로 Northern blot을 수행하여 확인할 계획이다.

Table 4. Microarray data의 일부

Hyb. Group	Hybridization	Gene ID	Sample ID	LEX.E Raw	LEX.R Raw	LEX.E - BG	LEX.R - BG	LEX.R Norm	Ratio	Flag	Image	Gene Description
1	DAU c-3hr	DAU c-3hr (7-5)	DAU rice 1-11	1p-11	19657	5756	16343	5649	5895	2.77		DAU rice clone
2	DAU c-24hr	DAU c-24hr (7-5)	DAU rice 1-11	1p-11	49875	9858	45095	8982	11328	3.98		DAU rice clone
3	DAU c-3hr	DAU c-3hr (7-5)	DAU rice 1-27	1p-27	14616	6631	11837	6548	6832	1.73		DAU rice clone
4	DAU c-24hr	DAU c-24hr (7-5)	DAU rice 1-27	1p-27	28198	9250	23672	8328	10503	2.25		DAU rice clone
5	DAU c-24hr	DAU c-24hr (7-5)	DAU rice 1-3	1p-3	9379	7954	4951	7205	9086	0.54		DAU rice clone
6	DAU c-3hr	DAU c-3hr (7-5)	DAU rice 1-35	1p-35	11202	4561	7968	4467	4662	1.71		DAU rice clone
7	DAU c-24hr	DAU c-24hr (7-5)	DAU rice 1-35	1p-35	28853	8910	24326	8062	10168	2.39		DAU rice clone
8	DAU c-24hr	DAU c-24hr (7-5)	DAU rice 1-63	1p-63	23143	7020	18939	6157	7765	2.44		DAU rice clone
9	DAU c-3hr	DAU c-3hr (7-5)	DAU rice 1-77	1p-77	9769	14024	5574	13940	14546	0.38		DAU rice clone
10	DAU c-3hr	DAU c-3hr (7-5)	DAU rice 1-78	1p-78	8607	7396	4257	7259	7575	0.56		DAU rice clone
11	DAU c-3hr	DAU c-3hr (7-5)	DAU rice 1-82	1p-82	9245	11933	4939	11790	12302	0.4		DAU rice clone
12	DAU c-3hr	DAU c-3hr (7-5)	DAU rice 1-84	1p-84	14073	4627	9008	4384	4575	1.97		DAU rice clone
13	DAU c-3hr	DAU c-3hr (7-5)	DAU rice 1-86	1p-86	24021	6121	19913	6020	6282	3.17		DAU rice clone
14	DAU c-24hr	DAU c-24hr (7-5)	DAU rice 1-86	1p-86	39080	14128	34020	13266	16730	2.03		DAU rice clone
15	DAU c-3hr	DAU c-3hr (7-5)	DAU rice 1-94	1p-94	13124	17096	8320	16923	17659	0.47		DAU rice clone
16	DAU c-24hr	DAU c-24hr (7-5)	DAU rice 1-94	1p-94	21577	36196	17628	35379	44617	0.4		DAU rice clone
17	DAU c-3hr	DAU c-3hr (7-5)	DAU rice 1-96	1p-96	13852	3930	8928	3682	3842	2.32		DAU rice clone
18	DAU c-24hr	DAU c-24hr (7-5)	DAU rice 1-96	1p-96	25936	6044	22049	5103	6436	3.43		DAU rice clone
19	DAU c-24hr	DAU c-24hr (7-5)	DAU rice 10-11	10p-11	13510	3618	8645	2775	3500	2.47		DAU rice clone
20	DAU c-3hr	DAU c-3hr (7-5)	DAU rice 10-15	10p-15	6473	5447	3273	5331	5563	0.59		DAU rice clone
21	DAU c-3hr	DAU c-3hr (7-5)	DAU rice 10-19	10p-19	6861	7380	3895	7278	7594	0.51		DAU rice clone
22	DAU c-3hr	DAU c-3hr (7-5)	DAU rice 10-29	10p-29	7316	7371	3923	7259	7574	0.52		DAU rice clone
23	DAU c-3hr	DAU c-3hr (7-5)	DAU rice 10-3	10p-3	6750	7826	3526	7692	8027	0.44		DAU rice clone
24	DAU c-3hr	DAU c-3hr (7-5)	DAU rice 10-30	10p-30	6574	6370	3280	6270	6542	0.5		DAU rice clone
25	DAU c-24hr	DAU c-24hr (7-5)	DAU rice 10-36	10p-36	10589	3746	6811	2941	3709	1.84		DAU rice clone
26	DAU c-3hr	DAU c-3hr (7-5)	DAU rice 10-38	10p-38	6382	5223	3037	5110	5332	0.57		DAU rice clone
27	DAU c-3hr	DAU c-3hr (7-5)	DAU rice 10-49	10p-49	6968	8941	4046	8870	9255	0.44		DAU rice clone
28	DAU c-24hr	DAU c-24hr (7-5)	DAU rice 10-49	10p-49	13428	23189	8757	22268	28082	0.31		DAU rice clone
29	DAU c-24hr	DAU c-24hr (7-5)	DAU rice 10-62	10p-62	17148	6068	11849	5145	6488	1.83		DAU rice clone

나) Positive true colony들의 염기서열 분석 및 BLAST search

Data에서 확인된 380 colony들에 대한 염기서열을 제노텍에 의뢰하여 분석하였으며, 380개 중 150여 개의 sequence를 Network Service at National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA)의 BLASTN, BLASTX를 통하여 상동성 검색을 하여, 유용 유전자 14개를 선발하였다.

Table 5. 유용유전자에 대한 상동성 검색 (BLASTN)

Clone No	Putative Identity	Species	Score	expect
166	① carbonic anhydrase 3 mRNA	<i>Oryza sativa</i>	444 bits	e-12
	② chloroplast carbonic anhydrase mRNA	<i>Oryza sativa</i>	444 bits	e-122
390	① elicitor and UV light related transcription factor (Elr)	<i>Oryza sativa</i>	337 bits(170)	3.00E-90
	② Rice mRNA for ubiquitin-conjugating enzyme	<i>Oryza sativa</i>	307 bits(155)	3.00E-81
401	Rice mRNA for oryzain gamma (EC 3.4.22)	<i>Oryza sativa</i>	529 bits	e-148
406	mRNA for reversibly glycosylated polypeptide	<i>Oryza sativa</i>	678 bits(342)	0
413	Glycine-rich cell wall protein (Angrp-1)	<i>Oryza sativa</i>	256 bits	2.00E-65
432	① mRNA for novel protein, osr40c1	<i>Oryza sativa</i>	268 bits(135)	4.00E-69
	② osr40g2 gene	<i>Oryza sativa</i>	250 bits	1.00E-63
485	mRNA for amino acid permease, complete cds	<i>Oryza sativa</i>	515 bits(260)	e-144
523	Genomic DNA, chromosome 7	<i>Oryza sativa</i>	254 bits	6.00E-65
526	① Rice mRNA for probenazole-inducible protein PBZ1	<i>Oryza sativa</i>	151 bits (76)	5.00E-34
	② gene for PBZ1, complete cds	<i>Oryza sativa</i>	151 bits (76)	5.00E-34
	③ pathogenesis-related protein PR-10a (PR10a) gene	<i>Oryza sativa</i>	143 bits (72)	1.00E-31
573	mRNA for asparaginyl endopeptidase	<i>Oryza sativa</i>	488 bits	e-135
625	OsRPT1b mRNA for 26S proteasome regulatory particle triple-A ATPase	<i>Oryza sativa</i>	335 bits (169)	2.00E-89
639	① Rice mRNA for probenazole-inducible protein PBZ1, complete CDs	<i>Oryza sativa</i>	151 bits (76)	5.00E-34
	② gene for PBZ1, complete cds	<i>Oryza sativa</i>	151 bits (76)	5.00E-34
	③ pathogenesis-related protein PR-10a (PR10a) gene	<i>Oryza sativa</i>	143 bits (72)	1.00E-31
657	OsPAE1 mRNA for alpha 5 subunit of 20S proteasome	<i>Oryza sativa</i>	535 bits	e-149
802	① subsp. japonica acidic PR-1 type pathogenesis-related protein PR-1a mRNA	<i>Oryza sativa</i>	228bits (115)	3.00E-57
	② mRNA for PR1a protein	<i>Oryza sativa</i>	228bits (115)	3.00E-57
	③ pathogenesis-related protein 1 mRNA	<i>Oryza sativa</i>	167 bits (84)	1.00E-38

Table 6. 유용유전자에 대한 상동성 검색 (BLASTX)

Clone No	Putative ID	Species	Score	Expect
166	Carbonic anhydrase	<i>Oryza sativa</i>	138 bits	2.00E-32
390	Ubiquitin conjugating enzyme	<i>Oryza sativa</i>	147 bits	6.00E-35
401	Oryzain gamma precursor	<i>Oryza sativa</i>	140 bits	2.00E-33
406	RGP1 protein	<i>Oryza sativa</i>	263 bits	6.00E-70
413	No significant similarity found			
432	r40g2 protein	<i>Oryza sativa</i>	215 bits	1.00E-55
485	Amino acid permease	<i>Oryza sativa</i>	192 bits	1.00E-48
523	similar to transposable element	<i>Oryza sativa</i>	190 bits	3.00E-48
526	Probenazole-inducible protein PBZ1	<i>Oryza sativa</i>	118 bits	2.00E-26
573	Asparaginyl endopeptidase	<i>Oryza sativa</i>	120 bits	3.00E-27
625	26S proteasome regulatory particle triple-A ATPase subunit	<i>Oryza sativa</i>	74.7 bits (182)	3.00E-13
639	Probenazole-inducible protein PBZ1	<i>Oryza sativa</i>	118 bits	2.00E-26
657	Alpha 5 subunit of 20S proteasome	<i>Oryza sativa</i>	210 bits	4.00E-54
802	Acidic PR-1 type pathogenesis-related protein PR-1a	<i>Oryza sativa</i>	210 bits (210)	2.00E-16

다) 선발된 유전자 단편의 전체 염기서열 확보

(1) Colony No 390

(가) Sequence

ACATGTGAGC AATCTCTGGC ACCAACGGGT CATCGGGTT CGGGTCCGTC AGCAGTGAGC AGATTGACAG
GAGGACCTTT GATAITGGTAA GTGCAGGACT CCACTGTTC TTAGGATGT CGAGGCAAAT GCTGCCATTG
CTATTAATGT TTGGGTGGAA AACCTTGGTG CGGAAAGAGA CCTTCGGTGG TTTAAAAGGA TAATCCGGT

(나) Primer

390-5'

GSP 1: TTA AAC CAC CGA AGG TCT CTT TCC GC

GSP 2: CCT CCT GTC AAT CTG CTC ACT GCT GA

390-3'

GSP 1: TCA GCA GTG AGC AGA TTG ACA GGA GG

GSP 2: GCG GAA AGA GAC CTT CGG TGG TTT AA

(다) RACE PCR (390-5' + 390-3' 증폭) - pCR 2.1 topo Vector

(Elr 3') *CTAGAATTC AGCGGCCGCT TTTTTTTTTT TTTTCTTTTT TTTTTTTTGA TAAATATGAT
TTAGGAAACG ACTTAAATAA CAGAACAGTC AGGTAGAGCA GACTACCAGA CTGAAACGGA CTTCAACAAG
TAGGGTACAT ATGAGTTCAA CTGGGCACAA CAGCCCTCAA AAGTCCATTC ATACTTCGTT CGGGGAGGAG
GGTGGTGACT TGATGGTTAT TTAGGTGATA ACGTCGTTGG GTTTGGGGAC ACGTCCACCA GTTTGGCTGG
CTTCAGCCCA TCGCGTACTT CTGCGTCCAG GAGCGAGCGG TGGATTCATA CTTGGCCCTA TCAGTCTTGT
ACATGTGAGC AATCTCTGGC ACCAACGGGT CATCGGGGT CCGGTCCGTC AGCAGTGAGC AGATTGACAG
GAGGACCTTT GATATGGTAA GTGCAGGACT CCACTGTTCC TTGAGGATGT CGAGGCAAAT GCTGCCATTG
CTATTAATGT TTGGGTGGAA AACCTTGGTG CGGAAAGAGA CCTTCGGTGG TTTAAAAGGA TAATCCGGTG
GGAAATGAAT GTTCACCAAG AATACCCAC CAGCAAACGG GCTGTCTGAG GGTCCATAA TGTGGCTTGC
CGATGGAACA TTCCTACCC AAGGACCTGC GTGCAGGAGG TGGAGGTCC TTGCAGGTCC TTCAACTCCT
TCAGGATCCT C* (Elr 5')

[밑줄은 primer, 이탤릭체는 증폭된 부분을 나타낸다.]

(라) Homology research

Elicitor and UV light related transcription factor (Elr) mRNA (Length=576)와 거꾸로 붙어 나왔다. colony No 390-5'은 (Elr) mRNA의 3' 쪽으로 sequence를 모두 확인하였으나, colony No 390-3' ((Elr) mRNA의 5' 쪽)은 152bp만 확인되었고 나머지 134bp는 확보중에 있다.

(2) colony No 526

(가) Sequence

ACTCGGTAGG GTGAGCAACG AGGTAATCCT CGATCATCTT GAGCATGCCG AAGTAGCCAT CGAGGATGAG
CTTCTCCTTC TCCGGTGACA GCGAGCCGCC GTCCTCAAGC TGATACTCCA CCTTTATCTT GGCCAAGCAA
GAGCCTGCAC CGGCGGCCTC GATCTTCGTC TCTGTACAGT GCGACTTGAG CTTGCCACC TTACTTCCGG
CCGGCACATC CAGCA

(나) Primer

526-5'

GSP 1: CAA GTC GCA CGT GAC AGA GAC GAA GAT

GSP 2: GGC TAC TTC GGC ATG CTC AAG ATG ATC

526-3'

GSP 1: GAT CAT CTT GAG CAT GCC GAA GTA GCC

GSP 2: ATC TTC GTC TCT GTC ACG TGC GAC TTG

(다) RACE PCR (526-3' 증폭) - pCR 2.1 TOPO Vector

(PBZ1-3') *CTA GAATTCAGCG GCCGCTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTATTTT*
TTTTTGGCAT ACAACACAA TCACAATTAC TGAATTGTAT TTATTACATA ACCTCAAAGA CAAAATCACT
CTGACAAAAT CAAACACCAC AAGAAATTGG ATTTGTTGNG GCTCACATTA TTTAACTATC TTGCAGCAAA
AATGTGAGGA TGGATGTGTG TGCTATTTTG GTTATGACAT CTTTAGGCGT ACTCGGTAGG GTGAGCAACG
AGGTAATCCT CGATCATCTT GAGCATGCCG AAGTAGCCAT CGAGGATGAG CTTCTCCTTC TCCGGTGACA
GCGAGCCGCC GTCCTCAAGC TGATACTCCA CCTTTATCTT GGCCAAGCAA GAGCCTGCAC CGGCGGCCCTC
GATCTTCGTC TCTGTCACGT GCGACTTGAG CTTGCCACC TTACTTCCGG CCGGCACATC CAGCACTCTT
GACTTGATAA CATGAGCTGC ATTGTCACGT GCCACCACAC GTGTTTTGAA TGTCCCCCA TCCTCGACGG
CAGGGTTGAG CTTTATGGTG GTGACAGTGC CCGCCTCGCC ATCCCCCTCG ACCTCAATGG CGTCGATGAA
GCCGGCACAG ACCTTGGGCA TCGCGGGGGC GTCGGAGAAG ACCTTCCACA CCCGGTCTGC CGACACCGCG
ACGGCGCGCT CGTCGGAGAT GCAGAC (PBZ1-5')

[밑줄은 primer, 이탤릭체는 증폭된 부분을 나타낸다.]

(라) Homology research

염기서열 분석 결과, 본 실험에서 확보된 colony No 526이 현재 재배벼에서 도열병 예방제로 가장 폭 넓게 사용되는 probenazole에 의해 유발되는 유일한 재배벼 유전자에 매우 높은 염기서열 유사성을 나타내는 것을 확인하였고, 이 유전자의 전체 염기서열 확보와 기능 규명을 위한 다양한 실험을 위하여 형질전환 vector와 plasmid를 제작하였다.

라) Northern blot을 통한 DNA chip 선발 유전자의 발현검정

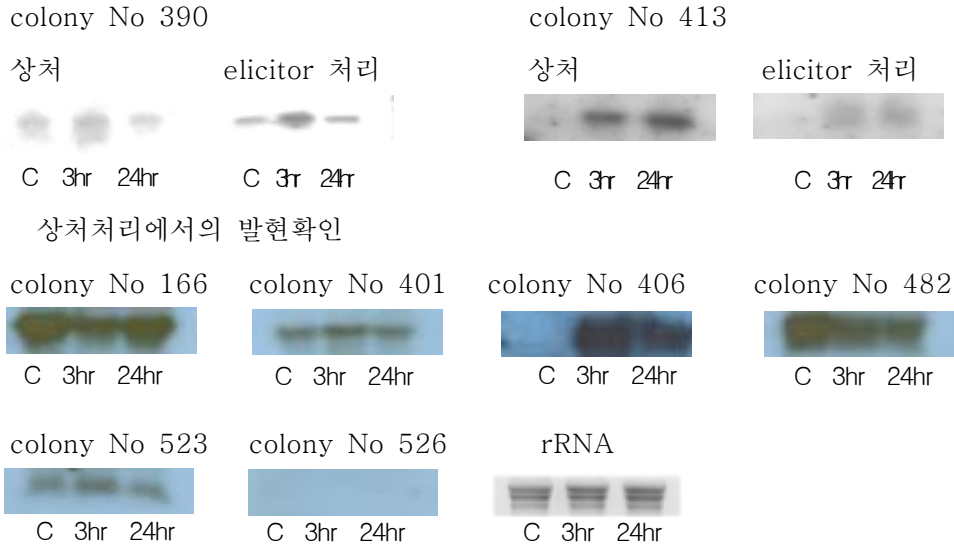


Fig 12. Northern blot analysis

6) PBZ 유전자의 기능 분석

가) 전체염기서열 확보

Colony No. 523 (probenazole-inducible gene)의 전체 유전자를 확보하기 위해서 RACE Kit를 이용하여 5' 유전자의 확보를 위한 RACE PCR을 수행하였다. PCR 결과 500bp fragment 증폭을 확인하였고, TA cloning Kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 증폭된 단편을 subcloning하였다. 염기서열 분석 결과, 전체유전자의 염기서열, 483bp의 ORF와 160개의 amino acid를 확인하였고, 이 유전자는 현재 가장 널리 쓰이고 있는 도열병 예방제제인 probenazole을 처리할 경우 발현이 되는 재배벼의 probenazole-induced 유전자와 71%의 유사성을 나타내었다.

Probenazole-induced 유전자의 DNA 염기서열

atggctccggcctgcntctccgacgagcgcgcgctcgcggtgtcggcagaccgggtgtgg
M A P A C V S D E R A V A V S A D R V W
aaggtcttctccgacgccccgcgatgcccaaggtctgtgccggcttcatcgacgccatt
K V F S D A P A M P K V C A G F I D A I

gaggtcgagggggatggcgaggcgggactgtcaccaccatgaagctcaaccctgcegtc
E V E G D G E A G T V T T M K L N P A V
gaggatggggggacattcaaacacgtgtggtggcacgtgacaatgcagctcatgttacc
E D G G T F K T R V V A R D N A A H V I
aagtcaaggtgctggatgtgccggccggaagt aaggtgggcaagctcaagtcgcacgtg
K S E V L D V P A G S K V G K L K S H V
acagagacgaagatcgaggccgcccgtgcaggtctctgcttggccaagataaaggtggag
T E T K I E A A G A G S C L A K I K V E
tatgagcttgaggacggcggtcgctgtcaccggagaaggagaagctcatcctcgatggc
Y E L E D G G S L S P E K E K L I L D G
tacttcggcatgctcaagatgatcgaggattacctcgttgcctcacctaccgagtagcc
Y F G M L K M I E D Y L V A H P T E Y A
[taa](#)agatgtcataacc

아미노산 서열

M A P A C V S D E R A V A V S A D R V W K V F S D A P A M P K V
C A G F I D A I E V E G D G E A G T V T T M K L N P A V E D G G
T F K T R V V A R D N A A H V I K S E V L D V P A G S K V G K L
K S H V T E T K I E A A G A G S C L A K I K V E Y E L E D G G S L
S P E K E K L I L D G Y F G M L K M I E D Y L V A H P T E Y A Stop

염기서열 alignment 결과

야생버:1 MAPACVSDERAVAVSADR^WKVFS^DAPAMPK^V 180
MAPACVSD^E AVAVSA^{+R}WK^F DA^{+PK} CAG^{+D} I VEG^{+G} GT⁺ TMKLNPA

일반버:1 MAPACVSD^EHAVAVSAERL^WKAFMDASTL^{PK}ACAGL^VDDIAVEGNGGPG^TIYTMKLN^PAA 60

야생버:181 EDGGTFKTRVVAR^DNAAHVIKSEVLDV^PAGSKV^GKLKSHVTETKIEAAGAGSCLAKIKVE 360
G T+KTRV D A+HV+KS+VL+ A SKV^GKLKSH TETK+EA G GSC+AK+KVE

일반버:61 GVGSTYKTRVAVCD^AAASHVLKSDVLE--AESK^VGK^LSHSTETKLEATGDGSCVAKL^KVE 118

야생버:361 YELEDGGSLSPEKEKLILDGYFGMLKMIEDYLVAHPTEYA 480
YELEDG SLSPEKEK I+DGY+GMLKMIEDYLVAHP EYA

일반버:119 YELEDGSSLSPEKEKDIVDGYGMLKMIEDYLVAHPA^EYA 158

나) smGFP-PBZ vector의 제작

PBZ (Probenazole Inducible) 유전자의 cloning 및 형질전환용 vector를 제작하기 위하여 본 연구를 수행하였다. PBZ 유전자의 PCR 증폭 산물과 smGFP vector DNA에 제한효소인 *Bam*HI과 *Xba*I을 처리하여 37°C에서 overnight하여, 1% agarose gel을 사용하여 전기영동한 결과 smGFP vector는 12kb에서 band가 확인되었으며, pCR2.1-PBZ는 0.5kb에서 band가 확인되었다. smGFP vector는 12kb의 band를 잘라내고, pCR2.1-PBZ는 0.5kb의 band를 잘라낸 후, gel elution하여 ligation시켰다. 발현된 colony를 선별하여 35S promoter primer와 nos terminator primer를 이용하여 PCR한 후, 1% agarose gel을 사용하여 전기영동한 결과 PBZ유전자가 cloning되지 않은 smGFP vector는 1.1kb위치에서, PBZ유전자가 cloning된 smGFP-PBZ vector는 PBZ 유전자의 크기만큼 증가된 1.6kb위치에서 확인되었으며, PBZ 증폭 primer를 이용하여 PCR 확인한 결과 0.5kb위치에서 확인되었다. 확보된 colony는 DNA를 추출한 후, 내부 제한효소 지도를 이용하여 enzyme digestion한 결과 *Bam*HI과 *Xba*I을 처리한 DNA는 12kb와 0.5kb위치에서, *Eco*RI과 *Hind*III를 처리한 DNA는 10.4kb와 2.1kb위치에서, *Eco*RI과 *Xba*I을 처리한 DNA는 11.2kb와 1.3kb위치에서 band가 확인되었다. 이는 PBZ유전자가 smGFP vector에 성공적으로 cloning되었음을 보여주는 것이다. 모식도가 다음의 Fig 13에 표시되어 있다. Cloning된 smGFP-PBZ vector는 *A. tumefaciens* LBA4404에 transformation하였다. 발현된 colony를 선별하여 35S promoter primer와 nos terminator primer를 이용하여 PCR 수행 후, 1% agarose gel을 사용하여 전기영동 한 결과 앞의 결과와 마찬가지로 1.1kb와 1.6kb 위치에서 band가 확인되었다.

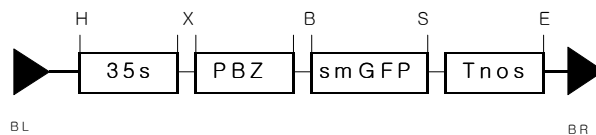


Fig 13. PBZ를 포함한 vector smGFP. BR, right border; BL, left border; 35S, CaMV 35S promoter; PBZ, Probenazole-Inducible; Tnos, terminator of nopaline synthase; B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; S, *Sac*I; X, *Xba*I.

다) pCAMBIA1301-PBZ 및 pBI121-PBZ vector의 제작

PBZ 유전자의 발현을 연구하기 위해서는 발현 vector가 필요하므로, 본 연구에서는 pCAMBIA1301과 pBI121 vector에 PBZ유전자를 도입하여 발현 vector를 만들었다. 이를 위해 먼저 PBZ 유전자를 PCR증폭한 결과 0.5kb위치에서 band가 확인되었다. PBZ 유전자의 PCR 증폭 산물과 pCAMBIA1301 vector DNA에 *KpnI*과 *SacI*을 처리(37°C, overnight)하고, 1% agarose gel을 사용하여 전기영동한 결과 pCAMBIA1301 vector는 12kb에서 band가 확인되었으며, pCR2.1-PBZ는 0.5kb에서 band가 확인되었다. pCAMBIA1301 vector는 12kb의 band를 잘라내고, pCR2.1-PBZ는 0.5kb의 band를 잘라낸 후, gel elution하여 ligation시켰다. PBZ 유전자의 PCR 증폭 산물과 pBI121 vector DNA에는 *BamHI*과 *SacI*을 처리(37°C, overnight)하고, 1% agarose gel을 사용하여 전기영동한 결과 pBI121 vector는 12kb에서 band가 확인되었으며, pCR2.1-PBZ는 0.5kb에서 band가 확인되었다. pCAMBIA1301 vector는 12kb의 band를 잘라내고, pCR2.1-PBZ는 0.5kb의 band를 잘라낸 후, 역시 gel elution하여 ligation시켰다. 발현된 colony를 선별하여 35S promoter primer와 nos terminator primer를 이용하여 PCR한 후, 1% agarose gel을 사용하여 전기영동한 결과 PBZ유전자가 cloning되지 않은 pCAMBIA1301과 pBI121 vector는 각각 1.1kb와 2kb위치에서, PBZ유전자가 cloning된 pCAMBIA1301-PBZ 와 pBI121-PBZ vector는 각각 1.6kb와 1kb위치에서 확인되었으며, PBZ 증폭 primer를 이용하여 PCR 확인한 결과 0.5kb위치에서 확인되었다. 확보된 colony는 DNA를 추출한 후, 내부 제한효소 지도를 이용하여 digestion한 결과 pCAMBIA1301-PBZ vector에 *KpnI*과 *SacI*을 처리한 DNA는 13.5kb와 0.5kb의 위치에서, *HindIII*와 *EcoRI*을 처리한 DNA는 12kb와 2kb의 위치에서, *SacI*과 *XbaI*을 처리한 DNA는 13kb와 1kb의 위치에서 band가 확인되었으며, pBI121-PBZ vector에 *BamHI*과 *SacI*을 처리한 DNA는 11kb와 0.5kb의 위치에서, *HindIII*와 *EcoRI*을 처리한 DNA는 10kb와 1.5kb의 위치에서 band가 확인되었다. 이는 PBZ유전자가 pCAMBIA1301과 pBI121 vector에 성공적으로 cloning되었음을 보여주는 것이다. 다음의 Fig 14에 모식도가 나와 있다. Cloning된 pCAMBIA1301-PBZ, pBI121-PBZ vector는 *A. tumefaciens* LBA4404에 transformation하였다. 발현된 colony를 선별하여 35S promoter primer와 nos

terminator primer를 이용하여 PCR 수행 후, 1% agarose gel을 사용하여 전기영동한 결과 앞의 결과와 마찬가지로 았은 pCAMBIA1301과 pBI121 vector는 각각 1.1kb와 2kb 위치에서, PBZ유전자가 cloning된 pCAMBIA1301과 pBI121 vector는 각각 1.6kb와 1kb 위치에서 확인되었다.

라) pET22(b)-PBZ 및 pET42(a)-PBZ vector의 제작

PBZ 유전자의 단백질 발현을 연구하기 위해서는 단백질 발현 vector가 필요하므로, 본 연구에서는 pET22(b)+, pET42(a)+ vector에 PBZ유전자를 도입하여 발현 vector를 만들었다. 이를 위해 먼저 PBZ 유전자를 PCR증폭한 결과 0.5kb위치에서 band가 확인되었다. PBZ 유전자의 PCR 증폭 산물과 pET22(b)+, pET42(a)+ vector DNA에 *Bam*HI과 *Eco*RI을 처리 (37°C, overnight)하여, 1% agarose gel을 사용하여 전기영동한 결과 pET22(b)+는 5.5kb에서, pET42(a)+

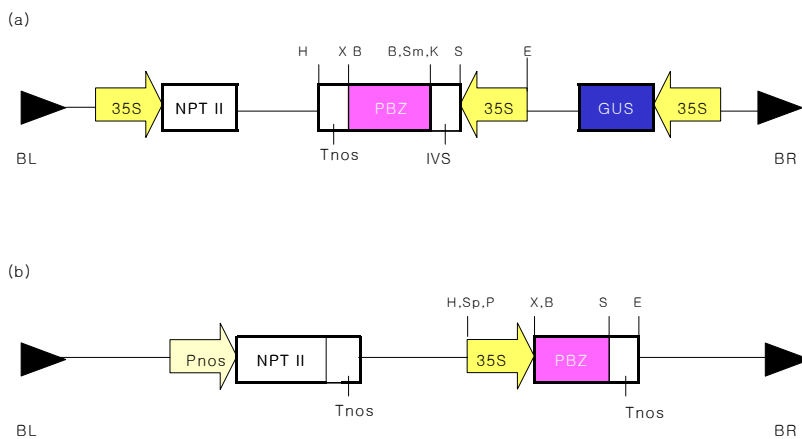


Fig 14. PBZ 유전자를 포함하고 있는 vector pCAMBIA1301과 pb1121 (a) pCAMBIA1301-PBZ (B) pBI121-PBZ. BR, right border; BL, left border; NPT II, neomycin phosphotransferase; Hyg, hygromycin resistance; GUS, β -glucuronidase; 35S, CaMV 35S promoter; Gib, Soybean conglinin promoter; Tnos, terminator of nopaline synthase; Pnos, promoter of nopaline synthase; B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; S, *Sac*I; Sp, *Sph*I; Sm, *Sma*I; X, *Xba*I.

vector는 6kb에서 band가 확인되었으며, pCR2.1-PBZ는 0.5kb에서 band가 확인되었다. pET22(b)+는 5.5kb, pET42(a)+ vector는 6kb의 band를 잘라내고, pCR2.1-PBZ는 0.5kb의 band를 잘라낸 후, gel elution하여 ligation시켰다. 발현된 colony를 선별하여 T7 promoter primer와 T7 terminator primer를 이용하여 PCR한 후, 1% agarose gel에서 전기영동한 결과 PBZ유전자가 cloning되지 않은 pET22(b)+, pET42(a)+ vector는 0.2kb위치에서, PBZ유전자가 cloning된 pET22(b)-PBZ, pET42(a)-PBZ vector는 PBZ 유전자의 크기만큼 증가된 0.7kb위치에서 확인되었으며, PBZ 증폭 primer를 이용하여 PCR 확인한 결과 0.5kb위치에서 확인되었다. 확보된 colony는 DNA를 추출한 후, 내부 제한효소 지도를 이용하여 *Bam*HI과 *Eco*RI을 처리한 결과 pET22(b)-PBZ는 5.5kb와 0.5kb의 위치에서, pET42(a)-PBZ는 6kb와 0.5kb위치에서 band가 확인되었다. 이는 PBZ유전자가 pET22(b)+, pET42(a)+ vector에 성공적으로 cloning되었음을 보여주는 것이다. 다음의 Fig 15에 모식도가 나와 있다.

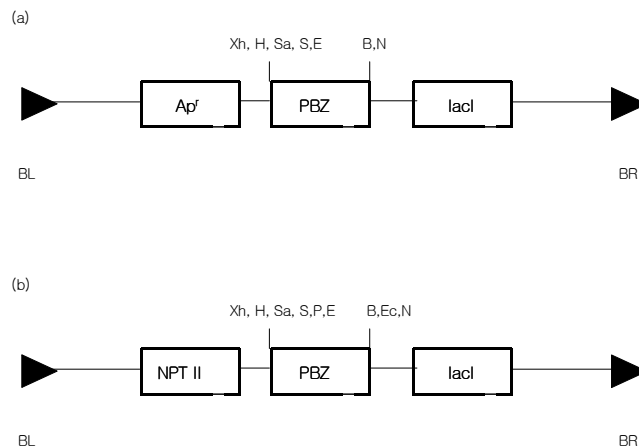


Fig 15. PBZ 유전자를 포함하고 있는 vector pET22(b)+, pET42(a)+. BR, right border; BL, left border; Ap^f, resistance of ampicillin; NPTII, neomycin phosphotransferase; PBZ, Probenazole-Inducible; B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; Ec, *Eco*RV; H, *Hind*III; N, *Nco*I; S, *Sac*I; Sa, *Sa*I; P, *Pst*I; Xh, *Xho*I.

7) Acidic pathogenesis-related protein의 기능 분석

유전자의 염기서열분석 결과, 기존의 병저항성관련 유전자와 높은 상동성을 보이

는 colony No. 11에 대하여 전체 유전자를 찾고 이 유전자의 기능을 규명하기 위한 목적으로 실험을 수행하였다.

Colony No. 11의 염기서열

```
GGTGTGGCGC GACTCGACGG CGATCGGATG CGCCCGCGTC GTCTGCGACA ACAACCTCGG CGTCTTCATC
GCCTGCAACT ACTCGCCGCC GGGCAACTTC ATCGGCCAAT CACCCTACTA ATTAATTAAT AAATTAATTA
TCACACTCAC TAATACGTGT TTATATACGC ATGCTGAGCT GGCCGTGCAT GTATGGACAT GTAGTGTACAT
ATCGTATACG TGTAATATAT ATATATATAC GTATGCTGGT GAGAATAAAC TCGGTCAATA AATAAAGCTG T
```

Multi sequence alignment

```

          *           20           *           40           *           60
Rice : MASSSSRLSCCLVLAATAAA--TAQNSAQDFVDPHNAARADVGVGFVSWDDTVAAYAESYAAQ : 63
clone : ----- : -
Zea : MAP---RLACLALAMAATVVAPCTAQNSPQDYVDPHNAARADVGVGFVSWDDTVAAYAQSYYAAQ : 62
Trit : MQTP--KLAILLALAMSAAVANLSQAQNSPQDYLSPHNAARAAVGVGAVTWSTKIQGFAQSYANQ : 63
      m   l   l   a       aqns qd   phnaara vgvv v w       a sya q

          *           80           *           100          *           120          *
Rice : RQGDCKLEHSDSGGKYGENLFWGSPGCDWTAASAVSAWVSEKQWYDHGSNSCSAPEGSSCGHYTQ : 128
clone : ----- : -
Zea : RQGDCKLIHS--GGPYGENLFWGSACADWSASDAVGSWVSEKQYDHDITNSCA--EGQVCGHYTQ : 123
Trit : RINDCKLQHS--GGPYGENLFWGSAGADWKAADAVNAWVGEKKDYDYGSNTCA--AGKVCGHYTQ : 124
      r   dckl hs   gg ygen fwgs g dw a   av   wv ek   yd   n c       g   cghytq

          140           *           160           *
Rice : VVWRDSTAIGCARVVCDGDLGVFIICNYSPPGNEFVGQSPY : 168
clone : -VVWRDSTAIGCARVVCDNNLGVFIACNYSPPGNEFVGQSPY : 39
Zea : VVWRDSTAIGCARVVCDNNAQVFIICSYNPPGNVVGESPY : 163
Trit : VVWRASTSIGCARVVCNNLGVFIICNYEPRGNLIGQKPY : 164
      vVWRdStAIGCARVVC1n1lGVFI CnY PpGN 6G2sPY
```

RACE PCR을 수행한 결과 500bp band를 확보한 후, TA cloning kit을 이용하여 subcloning을 수행하였으며, 염기서열을 분석하였다. PR1 (acidic pathogenesis-related class 1) 유전자는 504bp의 ORF와 168 아미노산으로 구성되어 있으며, endoplasmic reticulum으로 향하는 hydrophobic signal peptide을 가지고 있으며, consensus I 과 consensus II domain을 포함하고 있다고 한다.

PR1 유전자의 전체 염기서열

```
atggcgagttcgtcgagcaggttatcctgctgcttgctagtgctcgcgcgaggcagccatg
M A S S S S R L S C C L L V L A A A A M
gcggcgacggcgcagaactcggcgaggacttcgtggaccgcacaacgcggcgagggcg
A A T A Q N S A Q D F V D P H N A A R A
gaggtcggggtggggccggtgagctgggacgacacggtggcggcgtacgcgcagagctac
E V G V G P V S W D D T V A A Y A Q S Y
gcggagcagcggcgcgaggcactgcgcgctgcagcactcggactccggcgggaagtacggc
A E Q R R G D C A L Q H S D S G G K Y G
gagaacatcttctggggctccgccggcgaggcactggacggcgaggcagccgtgtcgtcg
E N I F W G S A G G D W T A A S A V S S
tgggtgtcggagaagcagtggtacgaccagcagcaacagctgctcggcgccggagggg
W V S E K Q W Y D H G S N S C S A P E G
cagtcgtcggccaactacacgcaggtggtgtggcgcgactcgacggcgatcggatgcgcc
Q S C G H Y T Q V V W R D S T A I G C A
cgcgtcgtctgcgacaacaacctcggcgtcttcatcacctgcaactactcgccgccgggc
R V V C D N N L G V F I T C N Y S P P G
aacttcgtcggccaatctccctactga
N F V G Q S P Y -
```

아미노산 서열

```
Met A S S S S R L S C C L L V L A A A A M A A T A Q N S A Q D F V D P H N A A
R A E V G V G P V S W D D T V A A Y A Q S Y A E Q R R G D C A L Q H S D S G G
K Y G E N I F W G S A G G D W T A A S A V S S W V S E K Q W Y D H G S N S C S
A P E G Q S C G H Y T Q V V W R D S T A I G C A R V V C D N N L G V F I T C N
Y S P P G N F V G Q S P Y Stop
```

염기서열 alignment 결과 PR1 유전자와 87%의 상동을 보였다.

```
Query: 85 QDFVDPHNAARA E V G V G P V S W D D T V A A Y A Q S Y A E Q R R G D C A L Q H S D S G G K Y G E N I F W G S A 264
          QDFVDPHNAARA+VGVGFPVSWDDTVAAYA+SYA QR+GDC L+HSDSGGKYGENIFWGS
Sbjct: 29 QDFVDPHNAARADVGVGFPVSWDDTVAAYAESYAAQRQGDCKLEHSDSGGKYGENIFWGS 88
```

Query: 265 GGDWTXXXXXXXXXXEKQWYDHGSNSCSAPEGQSCGHYTQVVWRDSTAIGCARVVCDNL 444
GGDWT EKQWYDHGSNSCSAPEG SCGHYTQVVWRDSTAIGCARVVCD +L
Sbjct: 89 GGDWTAASAVSAWSEKQWYDHGSNSCSAPEGSSCGHYTQVVWRDSTAIGCARVVCDGDL 148

Query: 445 GVFITCNYSPPGNFVGQSPY 504
GVFITCNYSPPGNFVGQSPY
Sbjct: 149 GVFITCNYSPPGNFVGQSPY 168

현재 확보된 유전자에 대한 기능분석을 위하여 plasmid 및 쌍자엽과 단자엽식물용 형질전환 vector, 그리고 세포내의 단백질 작용부위를 알기 위한 GFP fusion vector의 제작이 진행중이다.

8) GenomeWalker를 이용한 promotor 부위 확보

Colony No. 646 (pseudo-response regulator, APRR5 (APRR1/TOC1 family) [*A. thaliana*]) 5'의 *StuI*에서 1.2kb 크기의 염기서열 분석 결과는 다음과 같다.

GTAATACGAC TCACATAGG GCACGCGTGG TCGACGGCCC GGGCTGGTAA ATAATCCAAC TTA CTGCATA
ACGTGCTCAG TTTTACCAAG AGTCAATATA TGAGATCTCA CACTTCCGAT CATTCTTGT TCATAGGTAC
AACTGCAGGA CTGCATCATC TTCCGTTGAT GCTGGTGATG CTCAGGCATG TAGCACCTCG GCAACACATA
TAGATCTTGA AAACAAAAT GGAGATTCCA CAGCTCCCTC TCAAGACAAG AGGAAACAA ATCAACCTCC
CATTAGAGTT GTACCATTTC CTGTTCTGT TGGAGGACTC ACATTTGATG GGCAGCCATT CTGGAACGGT
GCACCCGTGG CATCCCTTTT CTTCCACAA TCAGCTCCTC CCATTTGGAA TAGCAAACA TCTACCTGGC
AGGATGCAAC CACACAAGCA ACTTCTCTGC AGCAGANTGG TCCAAAAGAT ACAGATCCTA AGCAGGTTGA
AAATGCAGAA GAACGAACAG CTCGGAGTCA CCAAAGTGCT AATAGGAAGC ATCTCTGCAT TGAAATTCCT
ACAGATGAGC CGCGGCATGT TTCTCCTACA ACTGGTGAAA GCGGGAGCAG CACTGTGCTG AACAGCGTCA
GAAAAACGCT CAGTGGCAGC GTCTGTGACA GCTCTTCCAA TCACATGATT GCCCCTACTG AATCATCAAA
TGTGTTCTT GAAAATCCTA GCTCTGAAGG TTTACGCCAC CTGAGCCAAC GAGAGGCTGC ACTGAACAAG
TTCCGGCTTA AGAGGAAAGA CAGGTGCTTT GAGAAGAAGG TAGGTCACAA GCAACTAATC TTGCCATTTT

ATTCCAATCA ACCTGTCGTA TTGCTGAATA GAAGTAGAAA CCGCGGTTTA CATTATTACT TTCCTGCGCA
 GGTGCGGTAC CAGAGCAGGA AGCTACTCGC GGAGCAGCGA CCGCGGGTTA AGGGCCAGTT TGTTCCGGCAA
 GATCATAGTG TCCAAGGCAG CTAAGGTTGT CCAAAGTCA GGAGATTGCT GTGCAACGGT TATCCAGGTG
 GTCAGTGTCA GATTTTGTGT GAAGAGTGAA AGTATAATTG CACTCGCCTA CGTCAGCAGT GTATGCTGGT
 GATGCATATA TATATATACA AGCTAACTTC GTGTGCTCTG TTCCTCGTAC CTGCCCAGGC GGCCAAGCGT
 GGTGCGGGCC GAGGTCAAGC TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT

(밑줄 부분은 GenomeWalker의 Adaptor Primer부분이며, 이탤릭체 부분은 SSH방법
 으로 찾아 놓은 부분임)

위 유전자는 pseudo-response regulator, APRR5 (APRR1/TOC1 family) [*A. thaliana*]로 보인다. Score는 68.9 bits (167)이며 Expect는 $1e^{-10}$ 이다.

Query: 669 NHMIAPTESSNVVPEPNSSEGLRHLSQREAAALNKFRLKRDRCFEKKVGHKQLILPFYSN 848

NH+ E N + S ++ QREAAAL KFR+KRDRC+EKKV

Sbjct: 591 NHIDQLIEKKNEDGYSLSVGKIQQSLQREAAALTKFRMKRDRCYEKKV----- 638

Query: 849 QPVVLLNRSRNRGLHYFFPAQVRVQSRKLLAEQRPRVKGQFVRQDHSVQ 995

RY+SRK LAEQRPR+KGQFVRQ S Q

Sbjct: 639 -----RYESRKKLAEQRPRIKQGFVRQVQSTQ 665

GenomeWalker를 수행해본 결과 PCR 산물이 명확하게 관찰되지 않고, 끌리는
 듯한 모양을 나타내어 정확성이 떨어졌었다. 하지만 *Taq* polymerase를 바꾸었을
 때에는 band가 선명하게 나타난 것으로 보아, PCR 결과가 좋지 않았던 것의 원인
 은 *Taq* polymerase의 효율이 낮았기 때문인 것으로 사료된다. 또한 *Taq*
*polymerase*의 교체 후 GenomeWalker PCR의 band가 선명하게 확인됨에도 불구
 하고 유전자 확보가 않은 이유는 cloning이 잘 되지 않았기 때문인 것 같다. 이러한
 문제점을 해결하여 야생벼 유전자의 전체 유전자 및 promoter 확보하기 위해, 지금
 사용하고 있는 것보다 효율이 더 높은 *Taq* polymerase를 사용하고, 또한 성공적인
 cloning을 위한 노력이 더 필요할 것으로 사료된다.

제 2 절 형질전환을 통한 곰팡이병 저항성 벼 계통 육성

1. 실험 전략

*Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 곰팡이병 저항성 양질 자포니카 벼를 육성하기 위해 ① *A. tumefaciens*를 이용한 형질전환 체계 확립, ② 확립된 형질전환 기법을 이용하여 국내 자포니카 품종의 형질전환 능력을 살펴보고 형질전환을 위한 최적의 품종 선발, ③ 기존의 곰팡이 저항성 유전자를 확보하여 형질전환을 통해 형질전환 개체 양성하고, 국내에서 가장 문제시되는 곰팡이병인 도열병에 대해 저항성 여부를 검정하여 균계별 저항성 개체에 대해 도열병 저항성 품종육성을 위한 육종소재로 활용한다.

2. 재료 및 방법

가. 형질전환 조건 확립 및 국내 양질 품종의 검정

1) *Agrobacterium* 형질전환 조건 확립

*Agrobacterium*을 이용한 형질전환 조건을 확립하기 위해 니폰바레, 다산벼, 일품벼의 현미 종자를 70% 에탄올에 1분간 침지한 후 2.5% sodium hypochloride (NaOCl)로 20분간 표면살균 하여 멸균수로 3~4회 세척하였다. 이 종자로부터 캘러스를 유도하기 위해 N6D 캘러스유도배지에 치상하여 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 약광 조건에서 4주간 배양하였다, 배양 4주후 이 캘러스를 3일 동안 다시 N6D 캘러스 유도 배지에 치상하여 형질전환을 위해 캘러스를 전처리한 후, 3일전에 미리 AB 배지에서 배양하고 AAM 배지에 $3-5 \times 10^9$ cells/ml 농도로 희석시킨 *A. tumefaciens* 용액에 캘러스를 이전하여 5분 동안 공동배양 하였다. 형질전환후 2N6-AS 배지에 3일간 처리한 다음 200 mg/l cefotaxime, 500 mg/l carbenicillin 으로 *A. tumefaciens*를 제거한 후, 2주 간격으로 1차 선발, 2차 선발배지에서 캘러스를 선발한 후 1차, 2차 재분화를 실시하였다. (본 실험에 사용된 배지 조성은 Table 7에 명기하였다.)

2) 약배양 캘러스를 이용한 국내 자포니카 품종의 형질전환 능력 검정

본 시험에 사용된 공시재료는 국내 대표적인 양질 품종, 직파 적응 품종, 초다수 및 칼버등 특수품종으로 구성된 총 27개 자포니카 품종을 사용하였다. 이 품종들의 약배양을 위해 N6 기본배지에 1 mg/l NAA, 0.2 mg/l 2,4-D, 1 g/l yeast extract, 1% agar가 첨가된 캘루스 유도배지에서 캘루스를 유기하였다. 이 중 24개 품종에 대하여 cointegrate type vector를 가진 super strain LBA4404 (pTOK233), 그리고 binary type vector를 가진 super strain EHA101 (pSMABuba)을 이용하여 *Agrobacterium*-mediated transformation을 실시하였다. 또한 수원 427호, 수원433호, 화성벼 3개 품종을 이용하여 종자와 약에서 유기된 callus의 종류에 따른 형질전환 효율을 비교하였다.

Table 7. 형질전환에 사용된 배지조성

Media	Composition
N6D (for callus induction)	Chu basal salt, <i>myo</i> -inositol 100 mg/ , nicotinic acid 0.5 mg/ , Pyridoxine-HCl 0.5 mg/ , Thiamine-HCl 1 mg/ , 2,4-D 2 mg/ , casamino acids 300 mg/ , glycine 2 mg/ , proline 2878 mg/ , sucrose 30 g/ Gelrite 4 g/ , pH 5.8.
AB (for <i>Agrobacterium</i> culture)	NH ₄ Cl 1 g/ , MgSO ₄ ·7H ₂ O 296 mg/ , CaCl ₂ 10 mg/ , NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O 1.3 g/ , K ₂ HPO ₄ 3 g/ , KCl 150 mg/ , FeSO ₄ ·7H ₂ O 2.5mg/ , glucose 5 g/ , Bacto agar 15 g/ , pH 7.2.
AAM (for <i>Agrobacterium</i> infection)	AA salts and amino acids (Toriyama and Hinata, 1985), MS vitamins (Murashige and Skoog, 1962), casamino acids 0.5 g/ , 100 μM acetosyringone, sucrose 68.5 g/ , glucose 36 g/ , pH 5.2.
2N6-AS (for <i>Agrobacterium</i> infection)	N6D + 2,4-D 2 mg/ + acetosyringone 10 mg/ + glucose 10 g/ , pH 5.2
Selection	
1st	N6D + hygromycin 50 mg/ + carbenicillin 250 mg/ + cefotaxime 200 mg/
2nd	N6D + hygromycin 50 mg/ + carbenicillin 200 mg/ + cefotaxime 100 mg/
Regeneration	MS salt and vitamins, sucrose 30 g/ , sorbitol 30 g/ , casamino acids 2 g/ , kinetine 2 mg/ , NAA 0.02 mg/ , gelrite 4 g/ , pH 5.8, plus antibiotics (1st: hygromycin 50 mg/ + carbenicillin 100 mg/ , 2nd: hygromycin 50 mg/)

3) GUS staining을 통한 형질전환체 확인

Callus를 1% Triton X-100이 포함된 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8)에 침지하여 37°C 1시간 처리를 2회 반복한 다음, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-Gluc) 3 mg, N, N-dimethyl formamide 150 μ l, 850 μ l Solution B (5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0, 0.1 M Triton X-100)와 섞어서 4시간 동안 37°C 반응시킨 후 Methanol로 탈색시킨 다음 발색반응 여부를 확인한다.

나. 곰팡이 저항성유전자를 이용한 재배벼 형질전환

1) 곰팡이 저항성 유전자

본 시험에 사용된 곰팡이 저항성 유전자는 참깨 종자에서 분리된 LTP (Lipid Transfer protein; 고려대 생명과학대학 서미정 박사 제공)를 분양받아 사용하였다.

2) 벼 형질전환용 운반체 제작

추출한 pCAMBIA1301 (Cambia, Australia)과 pMBP1-LTP (for insert)에 *Bam*HI과 *Sac*I (Roche, German)을 처리 (37°C, overnight)하였다. pCAMBIA1301은 13kb, pMBP1-CaLTP은 588bp의 band를 잘라낸 후, NucleoTrap[®] Nucleic Acid Purification kit (Clontech, USA)를 사용하여 추출하였다. Elution 후 vector와 insert의 비율을 4:6으로 섞고, T4 DNA ligase (Roche, German)를 처리 (16°C, overnight)한 다음, competent cell (DH5 α)을 이용하여 transformation시켰다. 선별 배지로는 LB배지에 Kanamycin 100 ppm을 첨가한 배지를 사용하였다. Colony를 선별하여 35S promoter primer와 nos terminator primer와 pCAMBIA1301 primer를 이용하여 PCR (94°C, 30 sec; 50°C, 45 sec; 72°C, 1.5 min; 35 cycle)을 실시하여 확인하였다.

Agrobacterium (LBA4404) competent cell 100 μ l에 DNA 1 μ l를 첨가하여 Gene Pulser (Bio-Rad, USA)를 이용하여 electroporation을 실시하였다. 0.2 cm cuvette을 이용하였고, 25 μ F, Controller 200, 2.5 kV로 하였다. Electroporation 후 S.O.C. 배지 600 μ l를 첨가하여 1시간동안 배양한 다음, 선발배지에서 27°C, 3

일간 배양하였다. Colony를 선별하여 pCAMBIA1301 primer를 이용하여 PCR (94°C, 30 sec; 50°C, 45 sec; 72°C, 1.5 min; 35 cycle)을 실시하여 확인하였다.

다. 곰팡이저항성 유전자 형질전환 및 형질전환 확인

1) 공시재료

본 시험의 공시재료는 우리나라 중부지역의 대표적인 장려품종인 화성벼로서 국내 최초로 약배양을 통해 육성되어 약배양 캘러스 형성과 식물체분화 능력이 매우 우수한 품종으로서 약배양 캘러스를 이용한 국내 자포니카 품종의 형질전환 능력 검정 시험에서도 대단히 양호한 재분화능을 보여주었다. 그러나 이 품종은 도열병에 약한 결함을 가지고 있어서, 형질전환을 통해 저항성계통으로 육성하기 위해 사용되었다.

2) 약배양 캘러스 유도

화성벼로부터 약배양의 캘러스를 이용한 형질전환을 위해 작물시험장 벼유전육종과에 확립된 표준약배양법으로 실시하였으며, 수잉기 벼의 엽이간장이 4-8 cm인 단계의 이삭을 채취하여 12°C, 8일간 저온처리하였고, 약배양에 사용된 배지는 본 실험실에서 개발한 자포니카 품종의 1단계 약배양배지인 CM6배지 (N6 기본배지 + 1 mg/l NAA, 0.2 mg/l 2,4-D, + 1 g/l yeast extract + 1% agar)를 사용하였으며, 식물체분화배지는 RM3-2배지 (MS+NAA 1 mg/l + Kinetin 4 mg/l + Adenine sulfate 40 mg/l + Agar 1.6%)를 사용하였다. 약치상은 본 실험실에서 개발한 진공무균 약치상 장치를 이용하여 치상한 후, 26±1°C, 약광 상태의 배양실에서 4주간 배양하여 캘러스를 유기하였다.

3) 형질전환 식물체 분화 T0세대 양성

형질전환을 위해 화성벼 약배양 캘러스를 AAM배지에 3일간 전배양한 *A. tumefaciens* ($3-5 \times 10^9$ cells/ml)과 1분간 공존배양하였다. 공존배양 후 캘러스를 증류수와 항생제용액 (200 mg/l cefotaxime, 500 mg/l carbenicillin)에 세척하여 균을 제거하였다. 형질전환 저항성 캘러스를 유기하기 위해 50 mg/l hygromycin이 첨가된 선발배지에서 2주 간격으로 2차에 걸쳐 선발하였으며, 식물체 재분화를 위해 50 mg/l hygromycin 첨가된 재분화배지를 사용하였다 (Table 7). 분화된 식

물체는 Yoshida 용액에 수경재배검 경화처리하여 뿌리발달이 왕성하고 충분히 경화된 식물체를 온실에 이양하여 AC1세대 형질전환 개체를 재배하였으며 AC2 세대 종자를 수확하였다.

4) T1세대 형질전환 식물체의 도열병저항성 검정

온실에서 수확한 화성벼 AC2 세대 종자를 50 mg/l hygromycin이 첨가된 1/4 MS 배지에 치상하여 발아시켰으며, hygromycin에 저항성 개체를 포트에 양성하였다. 생존한 각 계통에 대해 도열병저항성을 검정하기위해 화성벼를 침해하는 것으로 알려진 5개 도열병 균주 (KJ101, KJ201, KJ301, KI313, KI409, KI1117)를 선발하여 개체당 2반복으로 punch 접종하였으며 접종 후 2주 후 도열병저항성을 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 형질전환 조건 확립

Agrobacterium 형질전환 조건 확립을 위해 니폰바레, 일품벼, 다산벼의 현미종자로부터 캘러스를 유기하고 GUS와 hygromycin을 가지고 있는 pTOK233 plasmid가 삽입된 LBA4404균주를 이용하여 형질전환하였다. 형질전환 3일 및 4주 후 각각 GUS staining을 실시한 결과, 4주 간의 캘러스 선발과정을 통해 생존, 증식한 캘러스는 형질전환 초기 캘러스 (3일)에 비해 GUS 발색이 현저한 것으로 나타났는데 이로써 비형질전환 캘러스 부분이 소멸되면서 대부분 형질전환 캘러스 부분이 우점함을 알 수 있었다 (Fig 17).

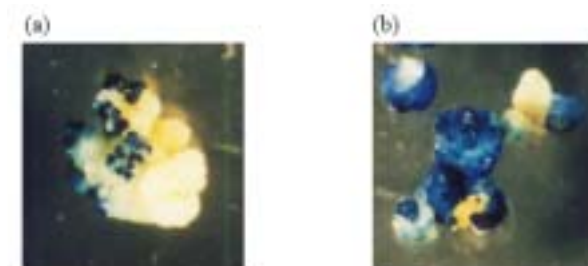


Fig 17. 종자 유래 캘러스의 GUS발현양상. *A. tumefaciens* LBA4404 (pTOK233)으로 공동배양 (a) 3일후 및 (b) 4주후 캘러스의 GUS 발현

나. 국내 자포니카 품종에 대한 형질전환 반응 검토

국내에서 육성된 24개 대표적인 양질 자포니카 품종을 이용하여 형질전환에 대한 반응을 살펴보고, 향후 형질전환에 적절한 재료를 선정하기 위한 기초자료를 얻고자, 형질전환 벡터와 캘러스의 종류에 따른 형질전환 반응을 살펴본 결과, 사용한 품종, 벡터 및 캘러스 종류에 따라 형질전환 반응이 크게 다른 것으로 나타났는데, 벡터에 있어서는 LBA4404 (pTOK233)가 EHA101 (pSMABuba)에 비해 형질전환 저항성 캘러스 생산 및 식물체재분화 효율이 우수한 것으로 나타났는데 (Table 8), LBA4404 (pTOK233)를 사용한 경우 공시품종의 저항성캘러스 출현율의 변이는 4~52%, 식물체재분화율의 경우 0~85%로 나타나 품종에 따라 다른 형질전환 반응이 크게 있음을 알 수 있었는데, 이로써 형질전환을 통한 저항성 캘러스 및 식물체분화는 품종의 유전적 특성에 의해 결정되는 것으로 추측된다. 또한 종자와 약으로부터 캘러스를 유도하여 형질전환의 효율을 살펴본 결과 (Table 9), 약에서 유도된 캘러스를 이용하는 경우 종자 캘러스를 이용한 경우보다 형질전환의 재분화효율이 우수함을 알 수 있었는데 이는 종자유래 캘러스에 비해 약배양 캘러스는 캘러스 유기 시초부터 대단히 부쉬지기 쉬우면서 재분화능이 높은 소질을 가지는 캘러스로서 형질전환 식물체분화에 있어서도 훨씬 우수한 특성을 지니고 있는데 기인하는 것으로 추측되었다.

한편 사용된 24개 공시품종 중에서 저항성캘러스 및 식물체분화효율이 공히 우수하였던 품종은 안중벼, 안산벼, 동진벼, 화중벼, 화성벼, 남양벼, 서진벼로서 이들 품종은 약배양 캘러스를 이용한 형질전환의 재료로서 적절하게 사용될 수 있는 품종들임을 알 수 있었다.

다. 저항성 유전자를 이용한 육종모본의 제작

1) Lipid transfer protein (LTP)

Lipid-protein complex는 여러 가지 대사 과정에 관련되어 있는 것으로 알려져 있으며 신호전달계를 조절하는 것으로도 알려져 있다. 오랜 시간 동안 단백질과 genome상에서의 구조와 진화적 다양성에 관한 연구가 진행되어 왔지만, 정확한 생물학적 기능에 대해 구명되지 못했으나, 최근 식물과 oomycetes로부터 분비되는

lipid binding protein이 식물과 pathogen간의 lipid-mediated dialogue에 중요한 역할을 하는 것으로 제시되고 있어, 저항성 측면의 기능에 관해 주목받고 있다.

작은 Cys-rich lipid binding protein인 LTP는, 단백질 자체의 장축을 따라 큰

Table 8. *Agrobacterium* 형질전환에 대한 국내 24개 재배 품종의 반응 양상

Cultivar	Callus induction (%)	callus (%) ¹		Regeneration (%) ²	
		pTOK233	pSMABuba	pTOK233	pSMABuba
Anjungbyeo	33.6	43.0	32.0	26.0	7.5
Ansanbyeo	10.0	38.8	27.5	75.3	25.0
Cheonmabyeo	12.5	4.0	3.0	5.8	0.0
Chucheongbyeo	18.4	32.0	25.0	7.5	7.7
Dongjinbyeo	39.2	20.7	4.0	37.3	0.0
Duennaebyeo	28.0	7.8	5.6	3.5	0.0
Gurubyeo	24.9	5.0	6.0	1.9	0.0
Guemobyeo	13.1	17.0	12.0	ND	ND
Hwadongbyeo	24.7	24.0	28.0	0.0	0.0
Hwajungbyeo	22.7	43.3	14.0	20.3	0.0
Hwaseonchalbyeo	19.1	12.0	2.0	5.9	0.0
Hwaseongbyeo	21.7	42.0	30.7	26.3	0.0
Iksan435	23.3	4.0	3.0	35.4	2.3
Ipumbyeo	24.5	12.0	0.0	ND	ND
Jinbupalbyeo	14.4	10.0	10.0	ND	ND
Jinbyolbyeo	26.5	21.0	14.0	15.2	0.0
Juanbyeo	24.0	35.6	12.2	6.3	0.0
Namweonbyeo	17.4	19.0	21.0	2.6	0.0
Namyangbyeo	8.8	52.0	10.0	57.5	21.3
Nonganbyeo	10.3	3.0	5.0	ND	ND
Obongbyeo	3.6	28.0	41.0	17.9	0.0
Palgongbyeo	44.1	49.0	32.0	2.6	0.0
Seojinbyeo	26.5	65.0	36.0	85.0	30.0
Shinseonchalbyeo	14.8	48.0	30.0	ND	ND

¹ 800 - 1200 개 callus에서 분석

² 300 - 800 개 callus에서 분석

Table 9. LBA4404 (pTOK233)을 이용한 약과 종자 유래 캘러스의 형질전환 효율 비교

Cultivar	Callus induced from anther		Callus induced from seed	
	callus	Regeneration	callus	Regeneration
Suweon 427	236/800 (29.5%)	202/300 (25.3%)	121/350 (34.6%)	27/200 (13.5%)
Suweon 433	458/800 (57.3%)	124/300 (41.3%)	234/350 (66.8%)	60/250 (24.0%)
Hwaseongbyeo	336/800 (42.0%)	210/800 (26.3%)	156/350 (44.6%)	35/180 (19.5%)

internal tunnel을 가지고 된다. 이 tunnel의 크기는 하나 내지 두개의 monoacyl lipids나 diacylated lipid, 또는 다양한 종류의 hydrophobic molecule을 받아들릴 수 있게 조정되는데, 아마도 tunnel의 plasticity와 hydrophobic molecule의 유연성이 결합에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다 (Blein et al. 2002).

2) 운반체 제작

확보된 LTP 유전자의 형질전환을 위해 제작된 vector는 Fig 18에 나와 있는 구조로 제작되었다.

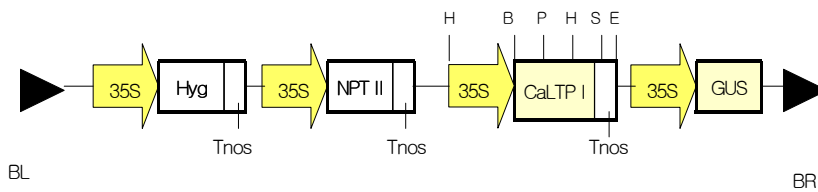


Fig 18. LTP 유전자 형질전환용 벡터(pCambia1301)의 구조; BR, right border; BL, left border; NPT II, neomycin phosphotransferase; Hyg, hygromycin resistance; GUS, β -glucuronidase; 35S, CaMV 35S promoter; Tnos, terminator of nopaline synthase; B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; P, *Pst*I ; S, *Sac*I.

3) 화성벼 LTP유전자 형질전환 계통생산 및 작물학적 특성 변이

국내에서 중부지방의 대표적인 양질 품종인 화성벼에 곰팡이저항성 유전자로 알려진 Lipid Transfer Protein 유전자를 이전하여 도열병저항성 중간모본을 육성하고 육종의 소재로 이용하기위해 화성벼의 약배양캘러스를 이용하여 형질전환을 실시하였다. 4회에 걸쳐 화성벼의 약배양을 실시하였고 이를 통해 얻어진 총 800개의 캘러스를 치상하여 형질전환을 수행한 결과, 총 163개의 hygromycin 저항성 캘러스와 이로부터 53개의 형질전환 식물체를 획득하였다 (Table 10).

획득한 식물체중 반수체를 제외하고 종자수확이 가능한 이배체는 19계통 (35.8%)으로 나타났는데 이들 식물체의 작물학적 특성은 배양모본인 화성벼에 비해 조사된 모든 형질에서 열악한 특성을 나타내었다 (Table 11, Fig 19). 특히 조사된 특성중 간

장과 잎실울에 있어서 뚜렷한 차이가 있어서 화성벼에 비해 형질전환 집단 간의 간장은 평균 68cm로서 화성벼의 81cm에 비해 13cm 단축되었으며, 잎실울은 평균 45%로서 화성벼의 86%에 비해 대단히 열악한 반면, 수장, 수수, 수당립수는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다 (Table 11). 또한 각 작물학적 특성들의 표준편차 및 범위가 대단히 큰 것으로 나타났는데 이것으로 보아 형질전환으로부터 생산된 계통의 작물학적 특성의 변이폭이 대단히 큼을 알 수 있었는데 이로써 형질전환 과정에서 삽입된 유전자가 기존의 다른 작물학적 형질에 관여하는 유전자에 영향을 미치는 형상으로 추측되었다.

한편 이배체로서 종자수확이 가능하였던 19계통에 대해 hygromycin 저항성 분리특성을 살펴보기 위해 1/4 MS + 50 mg/l hygromycin 배지에서 발아시켜 본 바 2계통을 제외한 17계통은 저항성을 나타내었는데, 이들 계통들은 계통내에서도 저항성이 분리하여 유전적으로 고정되지 않은 것으로 나타났다 (Fig 20), 따라서 본 시험에서 유래된 형질전환 이배체들은, 약배양에서 유기된 반수체 캘러스가 배가되어 2배체 캘러스로 된 이후 형질전환이 이루어진 것으로 추측되었다.

벼의 경우 형질전환 계통의 포장특성에 대한 정보는 희박한 실정이나, Caligari et al (1993)은 담배에서 형질전환 집단간 작물학적 특성변이의 차이가 난다고 보고하였다. 'Xanthi' 품종의 경우 원모본에 비해 형질전환 집단내 변이가 적은 반면, 'Samsun' 품종의 경우 단간, 만생, 잎실울 저항 등 작물학적 변화가 큰 것을 보고하였는데, 그 원인으로서 ① Carry-over 효과 ② 배양모본에 내재된 유전적 변이정도 ③ 형질전환 유전자의 다면발현 (pleiotropy) 효과 ④ 체세포변이 ⑤ Insertional mutagenesis로 추정하였으며, Bennett (1993)도 형질전환 절차를 통해서 발생하는 유전적 변화의 결과로서 작물학적 변화가 유발된다고 하였다.

Table 10. 화성벼 약배양 캘러스 이용 LTP 유전자 형질전환에 의한 저항성 캘러스 및 식물체 재분화

치상 회수	치 상 캘루스수	저항성 캘루스분화 개 (%)	식물체 재분화		
			이배체 (2n)	반수체 (n)	계 (%) ¹
1	200	43(21.5)	5	18	23(53.5)
2	200	24(12.0)	1	3	4(16.7)
3	200	57(28.5)	7	7	14(24.6)
4	200	39(19.5)	6	6	12(30.8)
계	800	163(20.4)	19	34	53(32.5)

¹ 저항성캘루스수에 대한 비율임

Table 11. 화성벼 LTP 형질전환집단의 주요 작물학적 특성변이

구 분	LTP 형질전환 계통 ¹		화성벼(CK)
	평균±표준편차	범위	
간장 (cm)	68±13.6	48-81	81±8.8
수장 (cm)	18±3.3	12-22	19±1.9
수수 (개)	7±3.8	3-9	8±1.4
수당립수 (개)	107±23.8	89-132	111±30.7
입실률 (%)	45±27.1	3-93	86±29.8

¹ 이배체 19개체에 대한 성적임



숙기

종자 입형

입실율

Fig 19. 화성벼 LTP 형질전환 집단내 주요작물학적 특성 변이

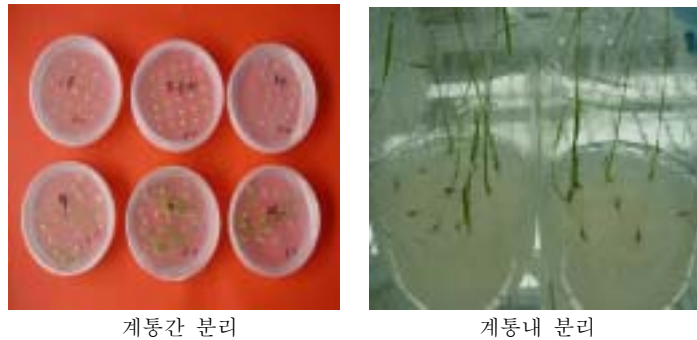


Fig 20. 화성벼 LTP 형질전환 AC2 계통의 hygromycin 선발배지에 대한 저항성 검정

4) 화성벼 LTP유전자 형질전환 계통의 도열병 저항성 반응

곰팡이병저항성 유전자를 화성벼에 이전한 중간모본을 조기에 양성하고자 비교적 양호한 작물학적 특성을 가진 LTP형질전환 15계통에 대해 화성벼를 침해하는 6개 도열병균계를 접종하여 저항성을 검정하였다. 전체적으로 보아서 LTP 형질전환계통은 계통내에서 각 균주에 대해 다양한 저항성 반응을 보여주고 있으며 화성벼에 비교해 볼 때 다소간 저항성이 향상되었거나 유사한 반응을 나타내고 있으나 특정한 도열병 균주에 대해서는 저항성 반응을 나타내지 못하는 것으로 나타났다.

일반적으로 형질전환을 통해 계놈내 외래 유전자의 이전은 임의의 현상으로 알려져 있는바 본 시험에서 육성된 형질전환 계통들은 형태적 특성에 뿐만 아니라 도열병 균계에 대한 저항성변이도 다양하게 나타났는데 이로써 계통내 삽입된 유전자의 수와 위치도 다를 것으로 생각된다. 따라서 형질전환 육종 효율을 높이기 위해서는 대단위의 형질전환 계통을 양성하고 육종가에 의해 목표 유전자가 이전되어 있으면서도 작물학적 특성이 우수한 계통을 선발하는 것이 필수적으로 수반되어야 할 것으로 생각된다.

Table 12. LTR 형질전환 계통(T1)의 도열병 균계에 대한 저항성 반응

계통명	도열병 균주					
	KJ 101	KJ 201	KJ 301	KI 313	KI 409	KI 1117
	R(90-059)	R(90-080)	R(97-057)	R(98-002)	R(93-456)	R(86-228)
HS-LTP 1	2	3	3	4	4	4
HS-LTP 2	4	3	3	4	2	3
HS-LTP 3	2	3	2	4	4	4
HS-LTP 4	3	4	4	3	3	3
HS-LTP 5	4	4	4	3	4	3
HS-LTP 6	4	5	2	4	3	2
HS-LTP 7	3	4	2	2	4	5
HS-LTP 8	4	4	3	5	5	3
HS-LTP 9	2	4	4	4	4	3
HS-LTP 10	4	4	4	5	4	4
HS-LTP 11	3	5	4	3	4	5
HS-LTP 12	5	3	4	4	4	3
HS-LTP 13	5	3	3	3	3	4
HS-LTP 14	3	3	4	3	3	3
HS-LTP 15	5	4	5	5	4	3
화성벼(CK)	4	3	4	5	5	4

* 도열병저항성 반응 : 0-2=resistant; 3=moderately resistant; 4-5=susceptible

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연차별 연구 개발 목표 및 내용

		- <i>O. minuta</i> :
1 (2000 - 2001)	1	- SSH : , wounding - : - anti - fungal protein mRNA cDNA : mRNA - , cDNA , <i>Rsa</i> I - SSH subcloning: cDNA SSH - , PCR subcloning - : - : - : RNA blot
	2	- , - - Anti - fungal protein
	1	- : , - : , - : ,
2 (2001 - 2002)	1	- : - : - : RNA blot
	2	- , - - : Southern GUS
	1	- , - : - 2
3 (2002 - 2003)	1	- : (150 - 300)
	2	- - : 1

2. 평가 착안점

		가			()	
1 (2000 - 2001)	SSH clone		가	가?	30	
			subcloning	가?	50	
				가?	20	
2 (2001 - 2002)			,	가	가?	40
				가?		30
			가?			20
			가?			10
3 (2002 - 2003)	100		가		가?	30
			가	가?		50
			가	가?		20
				가?		40
	가		가	가?		30
			가	가?		30

3. 연구개발 목표의 달성도

가. 야생벼로부터 저항성 관련 유전자 추출

변형된 subtraction 기법인 suppression subtractive hybridization (SSH)와 mirror orientation selection (MOS) 방법을 동시에 사용하여, 도열병, 멸구, 그리고 상처처리가 된 *O. minuta*로부터 3종류의 subtracted library를 구축, 스트레스에 유도되는 유전자를 대량으로 확보하였다. 다른 야생벼인 *O. grandiglumis*에서도 상처와 fungal elicitor를 처리한 후 SSH를 통해 subtracted library를 구축하였다. PCR 과정중에 발생할 수 있는 false positive clone을 제거하고, 스트레스 상태에서의 전반적인 유전자 발현양상을 확인하기 위해 microarray 기법을 이용하였다. 기존의 실험방법인 reverse Northern blot analysis을 이용하는 경우 발현양이 적은 유전자의 발현양을 검출하기 어려운 문제가 있고, Northern blot analysis를 이용하는 경우 각각의 유전자에 대해 실시하기에 많은 시간과 노력이 소요된다. 하지만 본 실험과 같이 microarray 기법을 reverse Northern blot으로 사용하는 경우

한번의 실험을 통해 정확하고 많은 data를 얻을 수 있다는 장점이 충분히 활용된 시도가 할 수 있다.

선별된 유전자 단편의 염기서열을 GenBank DB에 등록을 마친 상태이다 (*O. minuta*에서 제작된 3종류의 subtracted library에서 모두 558개, *O. grandiglumis*에서 제작된 subtracted library에서 108개의 유전자 단편이 등록되었다). 현재 개별 Northern blot analysis를 통해 각각 유전자의 발현양상을 확인하였으며, 이 결과와 상동성 검색 결과를 고려하여 차후 분석 대상을 선정하였다. 분석대상의 전체 염기서열을 확보하고 있으며, 기능분석을 위한 실험, 예를 들어 세포내의 localization 실험, 형질전환을 위한 vector construction 등이 진행되고 있다. 당초 목표했던 바대로 실험이 진행되었으며, 향후 육종에 사용할 수 있는 유용한 유전자 원이 야생벼로부터 확보되었음을 알 수 있다.

나. 형질전환을 통한 곰팡이병 저항성 육종모본 제작

Agrobacterium 형질전환을 통해 국내 양질 품종에 외래의 유전자를 이전한 중간모본을 조기에 양성하고자 국내 27개 품종의 형질전환능력을 검정한 결과 화성벼 등 7개 품종의 형질전환능력이 우수하여 형질전환을 위한 시험에 적절한 품종임을 알 수 있었으며, 약배양켈루스를 사용시 종자유래 켈루스에 비해 형질전환 식물체분화가 우수하였다. 참깨에서 유래된 곰팡이저항성 관련 LTP (Lipid Transfer Protein) 유전자를 확보하여 약배양 켈루스를 이용한 형질전환을 통해 국내 중부지방의 대표적 품종인 화성벼로부터 형질전환 2세대(AC2)의 LTP형질전환 19계통을 양성하였으며 이 중 15계통에 대해 화성벼를 침해하는 6개 도열병균계를 접종하여 저항성을 검정한 결과, 전체적으로 보아서 LTP 형질전환계통은 각 균주에 대해 다양한 저항성 반응을 보여주고 있으며 화성벼에 비교해 볼 때 다소간 저항성이 향상되었거나 유사한 반응을 나타내었으나 특정한 도열병 균주에 대해서는 저항성 반응을 나타내지 못하는 것으로 나타났다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 연구 결과의 활용화 방안

가. 실용화 측면

야생벼의 유전자 발현에 대한 본격적인 연구는 아직 진행되고 있지 않으나, 유용 유전자의 확보를 위하여 가까운 미래에는 연구방향이 전환되리라고 생각한다. Genetic linkage mapping과 Southern blot analysis 등의 방법으로 다수성 관련 유전자 등이 있음을 보고한 바는 있으나, 아직까지 야생종에서만 발현되는 cDNA library를 실험한 연구는 없었다. 본 실험을 통해 얻은 결과를 바탕으로 하여 성과물을 Plant molecular biology 분야의 국제 학술지에 투고하는 것이 가능할 것으로 사료된다. 여러 가지 처리에 대해 각각 수행한 내용을 나누어 투고할 수 있을 뿐만 아니라, 유용한 유전자의 경우 full gene sequencing과 그 유전자의 특성규명 실험을 수행하여 Impact factor가 높은 국제 학술지에 투고할 수 있을 것으로 본다. 그 뿐만이 아니라 유용 야생자원을 이용하고자 하는 시도가 국내외에 확산되어 기술적인 파장효과가 클 것으로 전망된다.

나. 산업화 측면

우리나라는 OECD (경제협력개발기구)의 가입과 WTO/TRIPs 의무규정 이행을 위하여 IUPOV (국제식물 신품종 보호연맹 : International Union for the Protection of New Plant Varieties)에 가입되어 있으며, 이에 따른 국내 종자산업법이 발효되어 있다. 종자산업법은 식물 신품종을 지적재산권과 같은 차원으로 보호하도록 되어 있어, 국내 육종가에게 상업 및 증식에 있어 배타적인 독점권을 인정하여 국제시장에서 이익을 보호받는 측면에서 불이익만 있는 것은 아니지만, 외국산 종자를 국내에 무단으로 들여와 생산할 수 있는 길이 막혀 있는 상황이다. 최근 대기업형 국내 종묘회사는 이미 외국기업에 합병되었으며, 남아 있는 종묘회사는 규모나 시설이 영세하여 독자적인 품종 육성을 몇몇 작물에 국한하고 있고, 분자생물학적 기법을 이용한 품종육성에는 더 많은 어려움을 겪고 있다. 유전자원은 농업분야

에서 가장 가치가 높은 지적소유권이다. 따라서 식량작물을 기점으로 본 연구를 실시하게 되면 채소 및 과수류 등의 국내 종묘산업 육성에 파급효과가 있을 것이다. 또한 지금까지 외국품종에 대해 로열티를 지급하였던 것을 감안한다면 수출 지향적인 농업 산업화를 촉진시킬 수 있어 경제적인 효과가 높다고 생각된다.

2. 추가연구의 필요성

야생벼에서 내재해성 유전자를 발굴하는 실험의 경우, 현재 microarray, 그리고 염기서열 분석 및 상동성 검색 결과를 바탕으로 하여 유전자를 선발하였고, 선발된 유전자 단편의 발현양상을 Northern blot을 통해 확인한 상태이다. 이를 통해 재해 처리에 반응하여 발현이 증가되는 유전자들을 분석대상으로 선정하였다. 이중 도열병 방제제로 사용하는 probenazol에 의해 유도되는 것으로 알려진 벼의 PBZ와 높은 상동성을 보이는 유전자 단편의 경우 전체 염기서열을 확보하기 위한 실험을 진행중이고, 단백질의 특성을 검증하기 위한 발현 vector, 쌍자엽과 단자엽 식물의 형질전환을 위한 vector 등을 제작하여 실질적인 기능을 검증하고자 한다. Genomic DNA에서 유전자 발현에 중요한 역할을 하는 *cis*-element, 즉 promoter 부위에 대한 연구도 진행중에 있다. 확보된 다른 유전자들에 대해서도 이와 같은 실험을 진행할 예정이다. 상위개념의 유전자, 즉 다른 유전자의 발현을 조절하는 유전자로 판단되는 경우, Yeast Hybrid system을 이용하여 상호작용하는 단백질과 염기서열을 확인하고자 한다. 유전자 기능분석을 위해 앞으로 진행될 실험은, 지금까지 진행해온 High Throughput Screening, 즉 대량 확보, 선발 및 검증하는 것과 달리, 위에서 언급한 바와 같은 다양한 방법으로 실제 기능을 규명하는 functional genomics로 전환해야 할 것이다. 비록 소수의 선발된 유전자의 기능을 분석하는 것이지만, 분석을 위한 실험의 종류가 많고, 이를 위한 시간과 인력의 투입이 요구되며, 효율적인 실험수행을 위한 고도의 전략수립도 필요한 실정이다. 기존에 알려진 저항성 관련 유전자의 형질전환을 통한 곰팡이병 저항성 육종모본 확립 실험의 경우, 형질전환 2세대 개체의 저항성 검정 실험이 준비되고 있는데, 형질전환 식물의 유전자 고정 작업, 병저항성 능력의 검정에 적지 않은 시간과 노력이 소요된다.

현재 확보한 기술과 연구 성과물을 발전적으로 이용하기 위해 추가 실험은 필수적이며, 소요될 연구예산 역시 크게 증가되어야 할 것으로 사료된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 항 염기서열 분석의 가속화

지난 1996년 The Arabidopsis Genome Initiative (AGI)가 주도하여 시작한 *A. thaliana*의 전체 유전자 서열이 작년 연말 완료되어 Nature 408, 796 - 815 (2000)에 발표되었다. 전체 125 Mb의 염기서열 중에서 centromeric region을 제외한 115,409,949 bp의 염기서열 분석이 완료된 결과 25,498개 유전자가 11,601개 family의 단백질을 암호화하고 있는 것으로 분석되었고, 이미 분석이 완료된 진핵생물인 *D. melanogaster*와 *C. elegans*와 무척 유사한 것으로 밝혀졌다.

식량작물 가운데서는 일반 재배벼의 전체 유전자 서열의 분석이 우선적으로 진행되고 있다. 전세계 인구의 절반이 주식으로 삼고 있는 중요성과 함께, 전체 genome 크기가 430 Mb 정도로, 이미 밝혀진 *A. thaliana* 보다 3배 가량 더 큰 정도에 지나지 않는다. 지난 1998년 2월에 구성된 국제공동 컨소시엄에 의한 벼 genome 해독 국제공동프로젝트 (IRGSP)와, 이와 별도로 2000년 4월부터 미국 Monsanto사와 2001년 2월부터 Syngenta사에 의해서 *O. sativa* L. ssp. *japonica*, 그리고 중국 Beijing Genomic Institute를 중심으로 벼의 다른 subspecies인 *O. sativa* L. ssp. *indica*의 genome sequence의 초안 (draft sequence)이 전체 genome shotgun 염기서열 분석방법을 통해 완료되어 각각 Science 296, 92-100 (2002)와 Science 296, 79-91 (2002)에 게재되었다. 이 논문에 따르면, indica type의 벼 genome은 466Mb의 염기서열 중에서 46,022개에서 55,615개의 유전자가 있는 것으로 밝혀졌고, genome의 42.2 %가 일정한 20개의 oligomer nucleotide를 가지고 있으며, transposon의 대부분은 intergenic space에 있고, 이 유전자중 오직 49.4%가 *A. thaliana*와 유사성을 가진다고 분석하고 있다. 한편 japonica type은 32,000개에서 50,000개의 유전자를 가지고 있으며, 약 98 %가 이미 보고된 maize, wheat, barley에서의 단백질과 유사성을 가진다고 밝히고 있다. 이 논문에서 japonica type 벼의 euchromatin 부위가 *A. thaliana*보다는 3.7배 크고, *H. sapiens*보다는 6.7배 작은, 420-430 Mbp의 크기를 가지고 있다고 보고하고 있다. 우리 나라에서는 농업생명공학원의 은무영 박사팀이 IRGSP의 정식일원

으로 벼의 1번 염색체 일부에 대한 해독에 참여하였고, IRGSP GeneBank에 등록된 유전자 700개 가운데 192개가 은박사탕이 위치를 확인한 것이다 (2001년 당시). 세계적으로 rice genome project를 통하여 많은 유전자를 확보하기 위한 연구가 경쟁적으로 진행되고 있다. 이런 상황 속에서 GeneBank에는 급속도로 유용한 data들이 집적되고 있다. 기존에 밝혀진 data를 이용할 경우 상동성 비교 분석 등에 있어서 더욱 연구가 유리할 전망이다. 예상보다 빨리 진행된 벼 genome의 염기서열 초안으로 인해, 세계적으로 매년 5억톤이 생산되어 세계인구의 절반이 주 식량원으로 이용하는 벼뿐만이 아니라, 기타 작물들의 개선을 위한 분자생물학적인 기초를 제공할 수 있을 것으로 생각한다.

제 2 항 식물유전체 연구에 있어서 paradigm의 변화

최근 식물분자생물학 분야는 특정개체 대부분의 유전자 기능을 동시에 분석하는 방향으로 paradigm이 변화하고 있다 (Fiehn et al., 2001). 전체 유전자 발현양상의 분석은 식물의 발달에서 외부 환경조건에의 반응 등과 관련된 과정 등을 연구하는데 필수적인 과정으로 인식되고 있다 (Breyne and Zabeau, 2001). 이런 실험기법은 엄청난 분량의 data를 만들어 내는데, bioinformatics 분야의 개발에 의해 profiling strategy가 가능해졌다. Transcript profile을 연구하기 위해 cDNAs 또는 oligonucleotides를 이용한 DNA chip-based approaches과 serial analysis of gene expression (SAGE), large-scale expressed sequence tags or massively parallel signature sequencing 같은 염기서열 분석을 기반으로 한 분석방법, 그리고 arbitrarily primed PCR, cDNA-amplified fragment length polymorphism, subtractive hybridization 방법과 같은 differential-display를 기본으로 한 실험기법 등이 사용되고 있다. 특히 대단위의 microarray 실험은 필수적으로 많은 양의 염기서열 분석 정보와 기능분석 결과를 필요로 한다. 몇몇 관련된 연구 분야의 발전은 microarray 기법을 단순한 실험기법에서, high throughput analysis와 genome 단위의 유전자 발현양상 등 광범위한 범위의 생물학적 의문점을 해결할 수 있는 연구전략으로 바꾸어 놓았다. 우선 대단위의 염기서열 분석 project를 통해 많은 유용한 유전자를 확보할 수 있었고, 작은 크기의 slide 상에 고밀도 집적이 가능한 기술적 발전이 이루어 졌으며, fluorescent dye labeling과 detection systems의 발전을 통해 믿을 수 있는 결과를 얻을 수 있게 되었다 (Eisen

and Brown, 1999; Fiehn et al., 2001; Hughes and Shoemaker, 2001).

Microarray 기법을 이용한 전체유전자 발현양상의 분석은 형태형성 과정이나 발달과정, 그리고 저항성기작과 같이, 많은 유전자의 상호작용에 의한, 복합적인 신호전달 체계로 조절되는 분야의 연구에 중요한 역할을 할 수 있다. 생물학적, 비생물학적 재해에 반응하는 유전자들을 서로 비교함으로써 저항성 유전자의 발현이 서로 교차하는지 여부를 확인하고, 다양한 외부자극에 반응하는 기작을 밝힐 수 있으며, 기존에 밝혀지지 않은 새로운 기작도 밝힐 수 있다. 또한 생화학적, 대사과정과의 연관성을 통해 이 분야의 발전에 새로운 기여를 할 수 있을 것으로 간주되고 있다 (Kawasaki et al., 2001; Kazan et al., 2001; Klok et al., 2002; Ma et al., 2001; Prez-Amador et al., 2001; Reymond, 2001; Rushton and Somssich, 1998 Schaffer et al., 2001; Wang et al., 2000).

Pathogen attack을 받은 식물은 transcriptional reprogramming을 통해 국지적인 방어와 함께 전체 식물체의 방어기작 (SAR)을 유도하게 된다. Maleck et al (2001)의 연구는 14가지 서로 다른 종류의 SAR 유도 또는 억제 조건에서의 유전자 발현양상을 Arabidopsis 전체 유전자의 25-30%에 대해 분석을 시도하였다. 이를 통해 공통적인 조절기작을 받는 유전자군 (regulon)을 구분지을 수 있었고, 이들 유전자군에서 공통적인 promoter element를 발견하기도 했다. Thimm et al (2001)은 Arabidopsis 6,000개 cDNA를 이용하여 철분결핍에 반응하는 뿌리와 싹의 유전자 발현양상을 확인하였다. 철분 결핍상태에서 1, 3, 7일 경과 후 유전자 발현양상을 검정하였고, 문헌 검색을 통해 어느 정도 enzyme activity의 변화가 수반됨을 확인할 수 있었다. 해당작용, TCA cycle, 오탄당인산회로 유전자 발현양상을 분석한 결과 철분 결핍 3일 이내에 유전자 발현양상이 변하는 것으로 밝혀졌는데, 이는 철분결핍에 반응하여 호흡이 증가됨을 의미한다. 뿌리에서의 유전자 발현양상을 분석한 결과, anaerobic respiration에 관련된 유전자의 발현이 증가되는 양상을 확인했으나, 싹에서는 gluconeogenesis, starch degradation, phloem loading등에 관련된 유전자의 발현이 증가됨을 확인할 수 있었다. 이를 통해 철분결핍 상황에서 대사상태를 유지하기 위해 탄소유입과 anaerobic respiration이 증가됨을 알 수 있었다. Desikan et al (2001)은 H₂O₂의 축적과 oxidative stress의 영향을 검정하였는데, H₂O₂는 생물학적, 비생물학적 재해의 신호전달 물질로 간주되고 있다. Oxidative stress에 관여하는 175 종류의

유전자를 확인하였는데, 이중 113 종류는 H₂O₂에 의해 발현이 유도되고, 62 종류의 유전자는 발현이 저해됨을 확인하였다. Chen et al (2002)은 402 종류의 transcription factor만을 선별하여, 재해처리 상태에서 발현양상을 분석하였다. Transcriptional factor의 경우 특정 stress 처리 조건하에서 하위 유전자들의 발현을 증가 또는 감소시키는 조절역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 분석 결과 transcription factor들이 가지고 있는 multifunctional nature에 의해, 여러 가지 다른 종류의 pathogen에 관련되어 있음을 확인할 수 있었으며, stress에 관련된 hormone인 salicylic acid, jasmonic acid, ethylene등에 의해 signaling network를 형성, 상호 조절하고 있음을 확인할 수 있었다. Seki et al (2001)은 한발과 저온재해에서 발현되는 유전자를 확인하기 위해 1,300개 유전자를 이용하였는데, 한발 유도 유전자 44개, 저온 유도 유전자 19개를 밝혔으며, 이중 한발 유도 유전자 30개와 저온 유도 유전자 10개의 경우 이들 재해에서 유도되는 것으로 최초로 밝혀진 유전자들이다. Kawasaki et al (2001)은 내염성이 강한 벼인 Pokkali로부터 높은 농도의 염해에 반응한 transcript regulation을 분석하였다. 염해 처리된 뿌리의 cDNA library에서 1,728개 유전자를 선별하고, 염해 처리 후 15분부터 1주일간의 유전자 발현양상을 검정하였는데, 초기 단계엔 단백질 합성과 turnover에 관련한 유전자의 발현이 증가되었고, 시간이 지남에 따라 기존에 알려진 stress-responsive transcripts들의 발현이 증가되었으며, 그 이후 defense-related transcripts들의 발현이 증가됨을 확인할 수 있었다. 재해상태에서의 유도만이 아니라 발달 단계에 관여하는 유전자 발현에도 실제 이용되고 있다. Girke et al (2000)은 2,600개 seed-expressed gene을 이용하여 Arabidopsis의 종자 발달에 관여하는 유전자를 분석하였다. 이 중에서 1/4에 해당하는 유전자의 발현양이 2배 이상 증가하는 양상을 확인하였고, 10배 이상 증가하는 경우도 10%에 해당하였다.

이러한 microarray 장점을 살려 방대한 양의 data를 분석한다면 효율적이면서 효과적인 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각한다.

제 7 장 참고문헌

- Agrawal GK, Jwa NS, and Rakwal R (2000) A Novel Rice (*Oryza sativa* L.) Acidic PR1 Gene Highly Responsive to Cut, Phytohormones, and Protein Phosphatase Inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 274:157–165
- Akopyants NS, Fradkov A, Diatchenko L, Hill JE, Siebert PD, Lukyanov SA, Sverdlov ED, and Berg DE (1998) PCR-based subtractive hybridization and differenced in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13108–13113
- Ahn SN, Anderson JA, Sorrells ME, and Tanksley SD (1993) Homoeologous relationships of rice, wheat and maize chromosomes. *Mol Gen Genet* 241: 483–490
- Ahn SN and Tanksley SD (1993) Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7980–7984
- Ann M, Guy B, Els P, Montagu MV, and Straeten DVD (1995) Molecular and Physiological responses to Abscisic acid and Salt in roots of salt-sensitive and salt-tolerant indica Rice varieties. *Plant Physiol* 107:177–186
- Aswidinnoor H, Nelson RJ, Dallas JF, McIntyre CL, Leung H, and Gustafson JP (1991) Cloning and characterization of repetitive DNA sequences from genome of *Oryza minuta* and *Oryza australiensis*. *Genome* 34:790–798
- Bennet J. (1993) In: Setlow JK(ed), *Genetic engineering: Genes for crop improvement*. Vol.15, Plenum Press, New York, pp 165–189.
- Blein JP, Coutos-Thevenot P, Marion D, and Ponchet M (2002) From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence. *Trend Plant Sci* 7:293–296

- Blondeau JP (2002) Homologues of amino acid permeases: cloning and tissue expression of XAT1 and XAT2. *Gene* 286:241–248
- Brar DS, Elloran R, and Khush GS (1991) Interspecific hybrids produced through embryo rescue between cultivated and eight wild species of rice. *Rice Genet Newsl* 8: 91–93
- Brar DS and Khush GS (1986) Wide hybridization and chromosome manipulation in cereals. In: *Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 4, Techniques and Applications*, edited by Evans DA, Sharp WR and Ammirato PV. Macmillan Publishing Company, New York and Collier Macmillan Publishers, London, pp 221–263
- Brar DS and Khush GS (1992) Overcoming the barriers in hybridization. *Theor Appl Genet* 16: 47–61
- Brar DS and Khush GS (1997) Alien introgression in rice. *Plant Mol Biol* 35: 35–47
- Bryan GT, Wu K, Farrall L, Jia Y, Hershey HP, McAdams SA, Faulk KN, Donaldson GK, Tarchini R, and Valent B (2000) A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell* 12: 2033–2045
- Buchanan BB, Gruissem W, and Jones RL (2000) *Biochemistry & molecular biology of plants*. American society of plant physiologists, Rockville, Maryland
- Buso GS, Rangel PH, and Ferreira ME (2001) Analysis of random and specific sequences of nuclear and cytoplasmic DNA in diploid and tetraploid american wild rice species (*Oryza* spp.) *Genome /National Research Council Canada = Genome/Conseil National de Recherches Canada* 44:476–494
- Byers RJ, Hoyland JA, Dixon J, and Freemont AJ (2000) Subtractive hybridization genetic takeaways and the search for meaning. *J Exp Path* 81: 391–404

- Caligari PDS, Yapabandara, YMHB, Paul EM, Perret j, Roger P, Dunwell JM (1993) Field performance of derived generations of transgenic tobacco. *Theor. Appl. Genet.* 86:875–879
- Catherine A, Tang D, and Innes RW (2001) Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proc Natl Acad Sci* 98:373–378
- Carson DL, Hockett BI, and Botha FC (2002) Sugarcane ESTs differentially expressed in immature and maturing internodal tissue. *Plant Sci* 162: 289–300
- Chang TT (1979) Hybrid rice. In: *Plant Breeding Perspectives*. PUDOC, Wageningen, pp 173–174
- Charbonnel-Campaa L, Lauga B, and Combes D (2000) Isolation of a type 2 metallothionein-like gene preferentially expressed in the tapetum in *Zea mays*. *Gene* 254: 199–208
- Chauhan RS, Farman ML, Zhang HB, and Leong SA (2002) Genetic and physical mapping of a rice blast resistance locus, *Pi-CO39(t)*, that corresponds to the avirulence gene *AVR1-CO39* of *Magnaporthe grisea*. *Mol Genet Genomics* 267: 603–612
- Chen W, Provart NJ, Glazebrook J, Katagiri F, Chang HS, Eulgem T, Mauch F, Luan S, Zou G, Whigham SA, Budworth PR, Tao Y, Xie Z, Chen X, Lam S, Kreps JA, Harper JF, Si-Ammour A, Mauch-Mani B, Heinlein M, Kobayashi K, Hohn T, Dangl JL, Wang X, and Zhu T (2002) Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor gene suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* 14: 559–574
- Cheong YH, Chang HS, Gupta R, Wang X, Zhu T, and Luan S (2002) Transcriptional profiling reveals novel interactions between wound, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis. *Plant Physiol* 129: 661–677

- Cho SK, Chung YS, Park SJ, Shin JS, Kwon HJ, Kang KH (1998) Efficient transformation of Korean rice cultivars (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Plant Biol* 41:262–268
- Cho SK, Chung YS, Kang KH, Moon HP, Shin JS (1999) Isolation of wild rice (*Oryza grandiglumis*) specific genes using PCR-based subtractive hybridization. General Meeting of The International Program On Rice Biotechnology
- Chomczynski P (1992) One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal Biochem* 201: 134–139
- Cobbett C (2002) Phytochelatin and metallothionein: roles in heavy metal detoxification and hemostasis. *Annu Rev Plant Biol* 53: 159–182
- Coche TG (1997) Subtractive cDNA cloning using magnetic beads and PCR in PCR cloning protocols edited by White BA. Humana Press. New Jersey, pp 371–387
- Coschigano KT, Melo-Oliveira R, Lim J, and Coruzzi GM (1998) Arabidopsis *gls* Mutants and Distinct Fd-GOGAT Genes: Implications for Photorespiration and Primary Nitrogen Assimilation. *Plant Cell* 10: 742–751
- Desikan R, Mackerness S, Hancock JT, and Neill SJ (2001) Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol* 127: 159–172
- Dekker JCM and Hospital F (2001) The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Rev Genet* 3: 22–32
- Diatchenko L, Lau YFC, Campbell Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskya N, Sverdlov ED, and Siebert PD (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6025–6030
- Diatchenko L, Lukyanov S, Lau YFC, and Siebert PD (1999) Suppression

- subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol* 303: 349–380
- Du J, Foissac X, Carss A, Gatehouse AMR, and Gatehouse JA (2000) Ferritin acts as the most abundant protein for snowdrop lectin in the midgut of rice brown planthoppers (*Nilaparvata lugens*). *Insect Biochem and Mol Biol* 30: 297–305
- Eisen MB and Brown PO (1999) DNA arrays for analysis of gene expression. *Methods Enzymol* 303: 179–205
- Feys BJ and Parker JE (2000) Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet.* 16: 449–455
- Gale MD and Devos KM (1998) Plant comparative genetics after 10 years. *Science* 282: 656–659
- Gasser CS and Fraley RT (1989) Genetically engineering plants for crop improvement. *Science* 244: 1293–1299
- Ge S, Sang T, Lu BR, and Hong DY (1999) Phylogeny of rice genomes with emphasis on origins of allotetraploid species. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14400–14405
- Girke T, Todd J, Ruuska S, White J, Benning C, and Ohlrogge J (2000) Microarray analysis of developing Arabidopsis seeds. *Plant Physiol* 124: 1570–1581
- Goff SA, Ricke D, Lan T et al (2002) A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) *Science* 296: 92–100
- Guterman I, Shalit M, Menda N, Piestun D, Dafny–Yelin M, Shalev G, Bar E, Davydov O, Ovadis M, Emanuel M, Wang J, Adam Z, Pichersky E, Lewinsohn E, Zamir D, Vainstein A, and Weiss D (2002) Rose Scent: Genomics Approach to Discovering Novel Floral Fragrance–Related Genes. *The Plant Cell* 14:2325–2338
- Hara K, Yagi M, Koizumi N, Kusano T, and Sano H(2000) Screening of wound–responsive genes identifies an immediate–early expressed gene

- encoding a highly charged protein in mechanically wounded tobacco plants. *Plant Cell Physiol* 41: 684–691
- Hayashi Y, Kyojuka J, and Shimamoto K (1988) Hybrids of rice (*Oryza sativa* L.) and wild *Oryza* species obtained by cell fusion. *Mol Gen Genet* 214:6–10
- He C, Fong SHT, Yang D, and Wang G (1999) BWMK1, a novel MAP kinase induced by fungal infection and mechanical wound in rice. *Mol Plant–Microbe Interact* 12: 1064–1073
- Hertzberg M, Sievertzon M, Aspeborg H, Nilsson P, Sandberg G, and Lundeberg J (2001) cDNA microarray analysis of small plant tissue samples using a cDNA tag target amplification protocol. *The Plant J* 25(5):585–591
- Hiroaki O, Tomohiro M, Yuichi F, and Toshiharu H (1999) Cloning and inactivation of genes encoding Ferredoxin– and NADH–dependent glutamate synthases in the Cyanobacterium *Plectonema boryanum*. imbalances in nitrogen and carbon assimilations caused by deficiency of the Ferredoxin–dependent enzyme. *Plant Physiol* 120: 33–42
- Hsieh HM, Liu WK, and Huang PC (1995) A novel stress–inducible metallothionein–like gene from rice. *Plant Mol Biol* 28(3):381–389
- Huang H, and Kochert G (1994) Comparative RFLP mapping of an allotetraploid wild rice species (*Oryza latifolia*) and cultivated rice (*O. sativa*). *Plant Mol Biol* 25:633–648
- Jena KK and Khush GS (1984) Embryo rescue of interspecific hybrids and its scope in rice improvement. *Rice Genet Newsl* 1: 133–134
- Jena KK, Multani DS and Khush GS (1990) Monosomic alien addition lines of *Oryza australiensis* and alien gene transfer. *Rice Genetics* II. 728
- Jena KK and Kochert GS (1991) Restriction fragment length polymorphism analysis of CCDD genome species of the genus *Oryza* L. *Plant Mol Biol* 16:831–839

- Jena KK, Khush GS, and Kochert G (1994) Comparative RFLP mapping of a wild rice, *Oryza officinalis*, and cultivated rice, *O. sativa*. Genome 37:382–389
- Kamakura T, Yamaguchi S, Saito K, Teraoka T, and Yamaguchi I (2002) A novel gene, CBP1, encoding a putative extracellular chitin-binding protein, may play an important role in the hydrophobic surface sensing of *Magnaporthe grisea* during appressorium differentiation. Mol Plant–Microbe Interact 15: 437–444
- Karunaratne SHPP, Small GJ, and Hemingway J (1999) Characterization of the elevated esterase-associated insecticide resistance mechanism in *Nilaparvata lugens* Stal and other planthopper species. Int J Pest Manage 45: 225–230
- Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Galbraith D, and Bohnert HJ (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. Plant cell 13: 889–905.
- Kessker A and Baldwin IT (2002) Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. Annu Rev Plant Biol 53: 299–328
- Khush GS (1977) Disease and insect resistance in rice. Adv Agron 29: 265–341
- Khush GS (1997) Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. Plant Mol Biol 35: 25–34
- Kim S, Ahn I, and Lee Y (2001) Analysis of genes expressed during rice–*Magnaporthe grisea* interactions. Mol Plant–Microbe Interact 14: 1340–1346
- Lee SJ, Shin JS, Park KW, and Hong YP (1996) Detection of genetic diversity using RAPD-PCR and sugar analysis in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thumb.) Mansf.] germplasm. Theor Appl Genet 92:719–725
- Liang P, Averbouboukh L, and Pardee AB(1993) Distribution and cloning of

- eucaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res* 21: 3269–3275
- Liang P and Pardee AB (2000) Differential display of eucaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967–971
- Lier S and Paululat A (2002) The Proteasome regulatory particle subunit Rpm6 is required for *Drosophila* development and interacts physically with signalosome subunit Alien/CSN2. *Gene* 298:109–119
- Liu G, Lu G, Zeng L, and Wang G (2002) Two broad-spectrum blast resistance genes, *Pi9(t)* and *Pi2(t)*, are physically linked on rice chromosome 6. *Mol Genet Genomics* 267: 472–480
- Lorenz K (1981) Wild rice: the Indian's staple and the white man's delicacy. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 15:281–319
- Makino S, Kiba T, Imamura A, Hanaki N, Nakamura A, Suzuki T, Taniguchi M, Ueguchi C, Sugiyama T, and Mizuno (2000) Genes encoding pseudo-response regulators: insight into His-to-Asp phosphorelay and circadian rhythm in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 41:791–803
- Matsushika A, Makino S, Kojima M, and Mizuno T (2000) Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*: insight into the plant circadian clock. *Plant Cell Physiol* 41:1002–1012
- Michel Delseny, Jrme Salses, Richard Cooke, Christophe Sallaud, Farid Regad, Pierre Lagoda, Emmanuel Guiderdoni, Marjolaine Ventelon, Christophe Brugidou and Alain Ghesquire (2001) Rice genomics: Present and future. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 323–334
- Midoh N and Iwata M (1996) Cloning and characterization of a Probenazole-Inducible Gene for an Intracellular Pathogenesis-Related Protein in Rice. *Plant Cell Physiol* 37(1):9–18
- Moura DS, Bergey DR, and Ryan CA (2001) Characterization and localization of

- a wound-inducible type I serin-carboxypeptidase from leaves of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Planta* 212: 222–230
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and biomass with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Nakamichi N, Matusushika A, Yamashino T, and Mizuno T (2003) Cell autonomous Circadian Waves of the APRR1/TOC1 Quintet in an Established Cell Line of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 44(3):360–365
- Nakashita H, Yoshioka K, Takayama M, Kuga R, Midoh N, Usami O, Horikoshi K, Yoneyama K, and Yamaguchi I (2001) Characterization of PBZ1, a Probenazole-inducible Gene, in Suspension-Cultured Rice Cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 65:205–208
- Niu L and Fallon AM (1999) Retrieval of flanking DNA using a PCR-based approach with restriction enzyme-digested genomic DNA template. *BioTech* 26:630–634
- Nriagu JO and Tser-Sheng L (1995) Trace metals in wild rice sold in the United States. *The Science of The Total Environment* 172:223–228
- Pan L, Kawai M, Yano A and Uchimiyav H (2000) Nucleoside diphosphate kinase required for coleoptile elongation in rice. *Plant Physiol* 122: 447–452
- Park G, Xue C, Zheng L, Lam S, and Xu J (2002) *MST12* regulates infectious growth but not appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant-Microbe Interact* 15: 183–192
- Powell KS, Gatehoues AMR, Hilder VA, and Gatehouse JA (1993) Antimetabolic effects of plant-lectins and plant and fungal enzymes on the nymphal stages of 2 important rice pests, *Nilaparvata lugens* and *Nephotettix cinciteps*. *Entomol Exp Appl* 66: 119–126
- Rakwal R, Tamogami S, Agrawal GK, and Iwahashi H (2002) Octadecanoid signaling component "burst" in rice (*Oryza sativa* L.) seedling leaves upon

- wound by cut and treatment with fungal elicitor chitosan. *Biochem Biophys Res Comm* 295: 1041–1045
- Rao KV, Rathore KS, Hodges TK, Fu X, Stoger E, Sudhakar D, Williams S, Christou P, Bharathi M, Bown DP, Powell KS, Spence J, Gatehoues AMR, and Gatehouse JA (1998) Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *Plant J* 15: 469–477
- Rauyaree P, Choi W, Fang E, Blackmon B, and Dean RA (2001) Genes expressed during early stages of rice infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Pathol* 2: 347–354
- Rebrikov DV, Britanova OV, Gurskaya NG, Lukyanov KA, Tarabykin VS, and Lukyanov SA (2000) Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. *Nucleic Acids Res* 28: e90
- Reddy MK, Suresh Nair, and Sopory SK (2002) A New Approach for Efficient Directional Genome Walking Using Polymerase Chain Reaction. *Anal Biochem* 306:154–158
- Reymond P, Weber H, Damond M, and Farmer EE (2000) Differential gene expression in response to mechanical wound and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 707–719
- Rhode M, Hummel R, Pallisgaard N, Podstufka T, Riedel H, Leffers H, and Strauss M (1997) Identification and cloning of differentially expressed genes by DDRT-PCR in PCR cloning protocols edited by White BA. Humana Press. New Jersey, pp 419–430
- Roberts I, Murray PF, Passeron S, and Barneix AJ (2002) The activity of the 20S proteasome is maintained in detached wheat leaves during senescence in darkness. *Plant Physiol Biochem* 40:161–166
- Sagerstrom CG, Sun BI, and Sive HL (1997) Subtractive cloning: past, present, and future. *Annu Rev Biochem* 66:751–783

- Sassa H, Oguchi S, Inoue T, and Hirano H (2000) Primary structural features of the 20S proteasome subunits of rice (*Oryza sativa*). *Gene* 250:61–66
- Schraml P, Shipman R, Stulz P, and Ludwig CU (1993) cDNA subtraction library construction using a magnet-assisted subtraction technique. *Trends Genet* 9: 70–71
- Schweizer P, Buchala A, Dudler R, and Mettraux J (1998) Induced systemic resistance in wounded rice plants. *Plant J* 14: 475–481
- Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, and Shinozaki K (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* 13: 61–72
- Shen JA (1980) Rice Breeding in China in Rice Improvement in China and other Asian countries. Int Rice Res Inst and College Agric Applied Sci, Los Banos, Philippines, pp. 9–30
- Siebert PD, Chenchik A, Kellogg DE, Lukyanov KA, and Lukyanov SA (1995) An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 23: 1087–1088
- Sitch LA (1990) Incompatibility barriers operating in crosses of *Oryza sativa* with related species and genera in Gene Manipulation in Plant Improvement II edited by Gustafson JP. Plenum Press. New York, pp 77–93
- Small GJ and Hemingway (2000) Differential glycosylation produces heterogeneity in elevated esterases associated with insecticide resistance in the brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stal. *Insect Biochem and Mol Biol* 30: 443–453
- Snowden KC, Richard KD, and Gardner RC (1995) Aluminum-induced genes. *Plant Physiol* 107: 341–348
- Souteyrand E, Cloarec JP, Martin JR, Cabrera M, Bras M, Chauvet JP,

- Dugas V, and Bessueille F (2000) Use of microtechnology for DNA chips implementation. *Applied Surface Science* 164:246–251
- Sun CQ, Wang XK, Yoshimura A, and Iwata N (2000) A study of the genetic diversity of common wild rice (*O. rufipogon* Griff.) and cultivated rice (*O. sativa* L.) by RFLP analysis. *Acta Genetica Sinica* 27:227–234
- Swaroop A, Xu J, Agarwal N, and Weissman SM (1991) A simple and efficient cDNA library subtraction procedure: isolation of human retina-specific cDNA clones. *Nucleic Acids Res* 19: 1954
- Taniuchi K, Nishimori I, Takeuchi T, Ohtsuki Y, and Onishi S (2002) cDNA cloning and developmental expression of murine carbonic anhydrase-related proteins VIII, X, and XI. *Molecular Brain Research* 109: 207–215
- Terol J, BARGUES M, Carrasco P, Perez-Alonso M, and Paricio N (2002) Molecular characterization and evolution of the protein phosphatase 2A B' regulatory subunit family in plants. *Plant Physiol* 129: 808–822
- Theodoulou FL (2000) Plant ABC transporters. *Biochim Biophys Acta* 1465: 79–103
- Thimm O, Essigmann B, Kloska S, Altmann T, and Buckhout TJ (2001) Response of Arabidopsis to iron deficiency stress as revealed by microarray analysis. *Plant Physiol* 127: 1030–1043
- Ting Y (1933) Wild rice of kwangtung and new variety bred from the hybrids of wild rice with cultivated rice. *Sun Yatsen Univ Agron Bull* 3: 1–22
- Toriyama K and Hinata K (1985) Cell suspension and protoplast culture in rice. *Plant Sci* 41:179–183
- Urban M, Bhargava T, and Hamer JE (1999) An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease. *EMBO J* 18:512–521
- Van Loon LC and Van Strien EA (1999) The families of

- pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:85-97
- Vaughan DA (1994) The wild relatives of rice – a genetic resources handbook. IRRI, 3-78
- Williems H (1998) Adaptor PCR for the specific amplication of unknown DNA fragment. *BioTech* 24:26-28
- Xiao J, Grandillo S, Ahn SN, McCouch SR, Tanksley SD, Li J, and Yuan L (1996) Genes from wild rice improved yield. *Nature* 384: 223-224
- Xiao J, Li J, Grandillo S, Ahn SN, Yuan L, Tanksley SD, and McCouch SR (1998) Identification of trait-improving quantitative trait loci alleles from a wild rice relative, *Oryza rufipogon*. *Genetics* 150: 899-909
- Xiong L, Lee M, Qi M, and Yang Y (2001) Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. *Mol Plant-Microbe Interact* 14: 685-692
- Xu D, McElroy, Thornburg RW and Wu R (1993) Systemic induction of a potato *pin2* promoter by wound, methyl jasmonate, and abscisic acid in transgenic rice plants. *Plant Mol Biol* 22: 573-588
- Yang GP, Ross DT, Kuang WW, Brown PO, and Weigel RJ (1999) Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 27(6):1517-1523
- Yang Y, Shah J, and Klessig DF (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes &Development* 11: 1621-1639
- Yu GJ, TS Kwak, KH Kang and HP Moon (1997) Efficiency of backcrossing and ovule culture in an interspecific cross between *O. sativa* L. and *O. grandiglumis* prod. *Korean J Breed* 29: 448-452.
- Yu J, Hu S, Wang J, Wong GK et al (2002) A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) *Science* 296: 79-92
- Zhai (1996) Chinese wild rice. *Food and Chemical Toxicology* 34:924

Zhao GR and Liu JY (2001) Isolation of a cotton RGP gene: a homolog of reversibly glycosylated polypeptide highly expressed during fiber development. *Bioch Biophys Acta* 1574:370–374

APPENDIX

List of Contents

Table A-1. BLASTX alignments of nonredundant clones derived from the *omfi* library and their functional categorizations based on MIPS. Similarities with a probability of $< 10^{-5}$ were regarded as significant

Table A-2. *omii* ESTs and their functional categorizations. Similarities with probabilities of less than 10^{-4} were regarded as significant

Table A-3. *omwi* ESTs and their functional categorizations. Similarities with probabilities of less than 10^{-4} were regarded as significant

Table A-4. List of *ogfi* ESTs

Table A-5. List of up-regulated *ogfi* clones (in microarray data)

Table A-1. BLASTX alignments of nonredundant clones derived from the *omfi* library and their functional categorizations based on MIPS. Similarities with a probability of $< 10^{-5}$ were regarded as significant

Clone ID	Acc. No. ^a	Putative ID	Species	Score	E-value	Functional category ^b
<i>omfi-014</i>	BQ490762	No match				99
<i>omfi-025</i>	BQ490721	No match				99
<i>omfi-037</i>	CD347671	Unknown protein		2036	2.00E-64	ND ^c
<i>omfi-054</i>	BQ490723	Oryzain gamma chain precursor	<i>Oryza sativa</i>	362	5.00E-39	02 06 08 11 40
<i>omfi-128</i>	CD347672	No match				99
<i>omfi-130</i>	BQ490763	Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplast precursor	<i>Oryza sativa</i>	112	5.00E-05	99
<i>omfi-132</i>	CD347673	No match				99
<i>omfi-136</i>	CD347674	Unknown protein		378	1.00E-61	99
<i>omfi-143</i>	BQ490739	Glycine dehydrogenase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1033	1.00E-76	01 40
<i>omfi-144</i>	CD347675	Metallothionein-like protein	<i>Oryza sativa</i>	62	1.00E-15	11
<i>omfi-147</i>	CD347676	Calcium binding EF-hand protein	<i>Hordeum vulgare</i>	616	4.00E-63	98
<i>omfi-156</i>	CD347677	No match				99
<i>omfi-157</i>	BQ490768	No match				99
<i>omfi-158</i>	BQ490761	No match				99
<i>omfi-162</i>	BQ490748	Serine/threonine protein phosphatase PP1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	314	1.00E-66	01 02 03 05 10 11 14
<i>omfi-163</i>	CD347678	No match				99
<i>omfi-164</i>	CD347679	Peroxi redoxin; protein id: A13g26060.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	77	0.51	99
<i>omfi-166</i>	BQ490764	No match				99
<i>omfi-167</i>	CD347680	Hypothetical protein	<i>Oryza sativa</i>	221	5.00E-36	ND
<i>omfi-170</i>	CD347681	No match				99
<i>omfi-172</i>	BQ490758	No match				99
<i>omfi-176</i>	CD347682	A13g20810/MOE17_10		429	2.00E-19	01
<i>omfi-177</i>	CD347683	MAIZE Endo-1,3;1,4-beta-D-glucanase precursor	<i>Arabidopsis thaliana</i>	303	5.00E-42	01 30
<i>omfi-181</i>	CD347684	No match	<i>Zea mays</i>			99
<i>omfi-182</i>	BQ490766	No match				99
<i>omfi-186</i>	CD347686	No match				99
<i>omfi-187</i>	CD347687	No match				99
<i>omfi-191</i>		No match				ND
<i>omfi-197</i>	CD347688	Expressed protein; protein id: A13g20810.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	150	3.00E-09	01
<i>omfi-198</i>	CD347689	No match				99

(continued on next page)

(continued)

Clone ID	Acc. No. ^a	Putative ID	Species	Score	E-value	Functional category ^b
<i>omfi-201</i>		No match				99
<i>omfi-203</i>	CD347691	Hypothetical protein F12B17.160	<i>Arabidopsis thaliana</i>	108	2.00E-04	ND
<i>omfi-205</i>	CD347692	Putative chloroplast inner envelope protein	<i>Oryza sativa</i>	988	2.00E-19	40
<i>omfi-206</i>	CD347693	Plastocyanin precursor	<i>Hordeum vulgare</i>	119	6.00E-06	ND
<i>omfi-211</i>	BQ490716	Inorganic pyrophosphatase - like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	300	3.00E-40	01 02 40
<i>omfi-213</i>	BQ490745	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase	<i>Oryza sativa</i>	169	7.00E-14	ND
<i>omfi-222</i>		No match				ND
<i>omfi-231</i>	BQ490757	No match				99
<i>omfi-242</i>	CD347695	No match				99
<i>omfi-244</i>	CD347696	Putative microtubule-severing protein subunit	<i>Oryza sativa</i>	104	3.00E-04	99
<i>omfi-246</i>	CD347697	Phosphoribulokinase precursor	<i>Oryza sativa</i>	97	0.002	01
<i>omfi-248</i>	BQ490740	Putative protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	236	3.00E-13	01 04 08 10 11 13 40 1
<i>omfi-249</i>	CD347698	No match				99
<i>omfi-262</i>	BQ490749	Thioredoxin in M-type, chloroplast precursor (TRX-M)	<i>Pisum sativum</i>	172	5.00E-25	02 03 06 11 40 67
<i>omfi-263</i>		No match				ND
<i>omfi-265</i>	CD347699	Translation initiation factor eIF-4F isozyme form subunit p82	<i>Triticum aestivum</i> sp	787	8.00E-50	05 40
<i>omfi-266</i>		No match				99
<i>omfi-270</i>		No match				99
<i>omfi-271</i>		No match				99
<i>omfi-274</i>		No match				99
<i>omfi-276</i>	BQ490742	Putative RNA polymerase I subunit	<i>Oryza sativa</i>	126	9.00E-31	03 04 40
<i>omfi-280</i>	CD347701	Unknown protein; protein id: A12g20920.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	334	2.00E-30	ND
<i>omfi-289</i>	CD347702	No match				99
<i>omfi-292</i>		No match				99
<i>omfi-297</i>		No match				99
<i>omfi-298</i>		No match				ND
<i>omfi-304</i>	CD347704	Putative 60S ribosomal protein	<i>Oryza sativa</i>	238	2.00E-53	05 40
<i>omfi-311</i>	CD347706	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit	<i>Oryza sativa</i>	483	8.00E-68	01 05 30 40
<i>omfi-316</i>	CD347707	Extensin-like protein; protein id: A1Hg13340.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	79	6.00E-05	99
<i>omfi-317</i>	CD347708	Mitochondrial F0 ATP synthase D chain	<i>Arabidopsis thaliana</i>	145	7.00E-26	02
<i>omfi-317</i>	CD347709	ABC transporter-like	<i>Arabidopsis thaliana</i>	188	5.00E-14	02 06 40 67
<i>omfi-319</i>	CD347710	No match				99
<i>omfi-327</i>	CD347711	No match				99
<i>omfi-334</i>	BQ490703	Proteasome subunit alpha type 6 (20S proteasome alpha subunit A)	<i>Oryza sativa</i>	246	2.00E-50	01 30
<i>omfi-336</i>	BQ490726	Chlorophyll a-binding protein Psbc	<i>Populus deltoides</i>	473	2.00E-31	02 40 67
<i>omfi-343</i>	CD347712	No match				99

(continued on next page)

(continued)

Clone ID	Acc. No. ^a	Putative ID	Species	Score	E-value	Functional category ^b
<i>omfi-344</i>	BQ490715	Eukaryotic initiation factor (iso4F subunit P82-34 (eIF-(iso)4F P82-34	<i>Triticum aestivum</i>	788	1.00E-14	05 40
<i>omfi-352</i>	BQ490751	Ubiquitin / ribosomal protein CEP52	<i>Oryza sativa</i>	129	1.00E-19	05 06 40
<i>omfi-355</i>	CD347713	Putative photosystem II 10 KD polypeptide	<i>Oryza sativa</i>	237	1.00E-19	ND
<i>omfi-356</i>	CD347714	No match				99
<i>omfi-357</i>		No match				99
<i>omfi-358</i>	CD347715	AT3g19170/MV111_8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1080	3.00E-90	06 14 40
<i>omfi-361</i>	CD347716	Nucleoside diphosphate kinase I (NDK I)	<i>Oryza sativa</i>	149	7.00E-31	01 40
<i>omfi-363</i>	CD347717	No match				99
<i>omfi-364</i>	CD347718	Class III chitinase	<i>Sphenostylis stenocarpa</i>	110	1.00E-04	99
<i>omfi-366</i>	CD347719	Ethylene receptor	<i>Brassica oleracea</i>	78	4.20E-01	99
<i>omfi-367</i>	BQ490750	Translation initiation factor 5A	<i>Oryza sativa</i>	140	2.00E-08	01 05 40
<i>omfi-368</i>	CD347720	Hypothetical protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	269	5.00E-28	ND
<i>omfi-374</i>	CD347721	Omega-3 fatty acid desaturase	<i>Sesamum indicum</i>	447	1.00E-38	01
<i>omfi-375</i>	CD347722	No match				ND
<i>omfi-377</i>	CD347723	No match				99
<i>omfi-381</i>	CD347724	No match				99
<i>omfi-382</i>	CD347725	Alpha 1,4-glucan phosphorylase H isozyme	<i>Oryza sativa</i>	841	2.00E-68	01 02 40
<i>omfi-394</i>	CD347726	No match				10 11 40
<i>omfi-399</i>	CD347727	No match				99
<i>omfi-405</i>	CD347728	No match				99
<i>omfi-414</i>	CD347730	Putative chloroplast inner envelope protein	<i>Oryza sativa</i>	173	3.00E-12	99
<i>omfi-422</i>	CD347731	No match				99
<i>omfi-423</i>	CD347732	Alpha 1,4-glucan phosphorylase L isozyme	<i>Oryza sativa</i>	928	8.00E-84	01 02 40
<i>omfi-424</i>	BQ490738	Coatmer beta subunit (beta-coat protein) (beta-COP)	<i>Oryza sativa</i>	1036	2.00E-44	06 08 40
<i>omfi-431</i>		No match				99
<i>omfi-432</i>	CD347733	Expressed protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	506	2.00E-26	01
<i>omfi-434</i>	CD347734	Heat shock protein hsp70				06 08 11 30 40 67
<i>omfi-439</i>		No match				99
<i>omfi-445</i>		No match				99
<i>omfi-450</i>		No match				98
<i>omfi-454</i>	BQ490756	No match				99
<i>omfi-462</i>	BQ490722	Cysteine proteinase inhibitor-1	<i>Oryza sativa</i>	102	6.00E-19	06
<i>omfi-470</i>	BQ490713	Serine hydroxymethyl transferase, mitochondrial precursor	<i>Solanum tuberosum</i>	518	1.00E-12	01 02 40
<i>omfi-471</i>	CD347737	No match				99
<i>omfi-474</i>	BQ490704	Unknown protein	<i>Oryza sativa</i>	495	8.00E-09	04 06 40

(continued on next page)

(continued)

Clone ID	Acc. No. ^a	Putative ID	Species	Score	E-value	Functional category ^b
<i>omfi-477</i>	BQ490755	No match				99
<i>omfi-491</i>	BQ490746	No match			03 04 06 40	
<i>omfi-499</i>	BQ490729	Protein disulfide isomerase precursor (PDI)	<i>Zea mays</i>	513	6.00E-90	01 02 06 11 40 67
<i>omfi-506</i>	CD347738	No match				99
<i>omfi-510</i>	BQ460708	Elongation factor 1 - alpha	<i>Artemia salina</i>	462	4.00E-18	01 03 05 40
<i>omfi-515</i>	BQ490759	No match				99
<i>omfi-529</i>	BQ490733	ADP-ribosylation factor	<i>Glycine max</i>	178	6.00E-25	06 08 10 30 40
<i>omfi-565</i>	CD347739	No match				99
<i>omfi-578</i>	CD347740	Expressed protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	559	2.00E-30	ND
<i>omfi-583</i>	BQ490705	Beta-adaptin-like protein C	<i>Arabidopsis thaliana</i>	890	9.00E-63	06 08 40
<i>omfi-609</i>	CD347741	No match				99
<i>omfi-623</i>	CD347742	No match				99
<i>omfi-638</i>	CD347743	No match				99
<i>omfi-644</i>	CD347744	No match				99
<i>omfi-647</i>	BQ490743	Thiamin biosynthesis protein	<i>Oryza sativa</i>	628	9.00E-62	99
<i>omfi-648</i>	BQ490720	No match				99
<i>omfi-650</i>	CD347745	No match				99
<i>omfi-659</i>	BQ490734	At1g23310/F26F24_4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	481	9.00E-75	01 10 14 20
<i>omfi-665</i>	CD347746	No match				ND
<i>omfi-668</i>	BQ490744	Triose phosphate/phosphate translocator	<i>Oryza sativa</i>	417	4.00E-78	08 40 67
<i>omfi-671</i>	CD347747	No match				99
<i>omfi-673</i>	BQ490754	Vacuolar ATPase B subunit	<i>Oryza sativa</i>	488	4.00E-72	02 08 13 40 67
<i>omfi-675</i>	BQ490731	Ribosomal protein L23 - maize (fragment)	<i>Zea mays</i>	109	3.00E-27	05 40
<i>omfi-677</i>	BQ490765	No match				99
<i>omfi-678</i>	BQ490769	Fd-GOGAT protein	<i>Oryza sativa</i>	1169	1.00E-49	01
<i>omfi-679</i>	BQ490770	Unknown protein; protein id: At1g79830.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	152	2.00E-09	99
<i>omfi-681</i>	BQ490753	No match				ND
<i>omfi-682</i>	BQ490714	Hypothetical protein; protein id: A13g08830.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	351	2.00E-32	ND
<i>omfi-684</i>	CD347748	Putative protein; protein id: A15g64170.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	123	4.00E-06	ND
<i>omfi-690</i>	CD347750	No match				99
<i>omfi-696</i>		No match				ND
<i>omfi-700</i>	CD347751	No match				99
<i>omfi-708</i>	BQ490747	S-adenosylmethionine decarboxylase	<i>Oryza sativa</i>	398	8.00E-22	01 14 11
<i>omfi-716</i>	BQ490719	Putative nitfU-like protein	<i>Oryza sativa</i>	171	1.00E-15	01
<i>omfi-731</i>	BQ490760	No match				99

(continued on next page)

(continued)

Clone ID	Acc. No. ^a	Putative ID	Species	Score	E-value	Functional category ^b
<i>omfi-748</i>	BQ490741	Putative protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	509	4.00E-88	01 02 40
<i>omfi-764</i>	CD347752	No match				99
<i>omfi-771</i>		No match				ND
<i>omfi-781</i>	CD347753	Carbonate dehydratase - like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	282	3.00E-24	99
<i>omfi-786</i>	BQ490706	No match				01 08
<i>omfi-789</i>	CD347754	No match				99
<i>omfi-796</i>	CD347756	No match				99
<i>omfi-807</i>	BQ490771	No match				99
<i>omfi-809</i>	CD347757	GTP-binding protein typA (tyrosine phosphorylated protein A)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	392	1.00E-117	05 10 40
<i>omfi-821</i>	CD347758	No match				99
<i>omfi-828</i>	CD347759	Cellulose synthase-8	<i>Zea mays</i>	1094	6.00E-67	01 08 40 67
<i>omfi-837</i>	CD347760	No match				99
<i>omfi-838</i>	CD347761	Ubiquinol--cytochrome-c reductase-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	67	5.7	99
<i>omfi-839</i>	CD347762	No match				99
<i>omfi-840</i>	CD347763	No match				99
<i>omfi-842</i>	CD347764	Glycine-rich protein GRP5	<i>Zea mays</i>	100	0.001	99
<i>omfi-843</i>	CD347765	No match				99
<i>omfi-847</i>	CD347766	No match				99
<i>omfi-857</i>	CD347767	No match				99
<i>omfi-859</i>	CD347768	No match				99
<i>omfi-868</i>	CD347769	No match				99
<i>omfi-873</i>	CD347770	No match				99
<i>omfi-879</i>	BQ490727	Plastidic ATP/ADP-transporter	<i>Solanum tuberosum</i>	631	8.00E-43	ND
<i>omfi-880</i>	CD347771	No match				99
<i>omfi-881</i>		No match				ND
<i>omfi-882</i>		No match				99
<i>omfi-885</i>	BQ490736	CER3	<i>Oryza sativa</i>	280	1.00E-53	99
<i>omfi-890</i>	CD347772	No match				99
<i>omfi-931</i>	CD347773	Photosystem II protein D1	<i>Palmaria decipiens</i>	71	1.8	99
<i>omfi-937</i>	CD347774	NBS-LRR type resistance gene	<i>Oryza sativa</i>	1226	4.00E-17	11
<i>omfi-938</i>	BQ490724	Ribulose-5-phosphate kinase; phosphoribulokinase	<i>Triticum aestivum</i>	404	3.00E-48	01
<i>omfi-939</i>	BQ490718	Expressed protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	418	8.00E-57	01
<i>omfi-943</i>		No match				ND
<i>omfi-944</i>		No match				ND
<i>omfi-947</i>	CD347776	Starch branching enzyme rbe4	<i>Oryza sativa</i>	841	1.00E-130	01 02 40

(continued on next page)

(continued)

Clone ID	Acc. No. ^a	Putative ID	Species	Score	E-value	Functional category ^b
<i>omfi-949</i>	CD347777	Unknown protein	<i>Oryza sativa</i>	1045	1.00E-111	05
<i>omfi-954</i>	CD347778	Unknown protein	<i>Oryza sativa</i>		4.00E-07	99
<i>omfi-958</i>	CD347779	No match				99

^aGenBank accession number

^bFunctional categorization was performed by the alignment with the MIPS database. Numbers indicate the following: 01, Metabolism; 02, Energy; 03, Cell cycle and DNA processing; 04, Transcription; 05, Protein synthesis; 06, Protein fate (folding, modification, and destination); 08, Cellular transport and transport mechanisms; 10, Cellular communication signal transduction mechanism; 11, Cell rescue, defense, and virulence; 13, Regulation of interaction with cellular environment; 14, Cell fate; 20, Systemic regulation of interaction with environment; 30, Control of cellular organization; 40, Transcription; 67, Transport facilitation; 98, Classification not yet clear-cut; 99, Unclassified proteins

^cND = not determined

Table A-2. *omii* ESTs and their functional categorizations. Similarities with probabilities of less than 10^{-4} were regarded as significant

Clone ID	Acc. No. ^a	Putative Identity	Species	Score	E-value	Functional Category ^b
<i>omii-007</i>	CD026344	No match				ND ^c
<i>omii-008</i>	CD026345	No match				99
<i>omii-012</i>	CD026346	AT3g19170/MV11_8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1080	3.00E-90	06 14 40
<i>omii-013</i>	CD026347	No match				ND
<i>omii-014</i>	CD026348	HMG1 protein	<i>Zea mays</i>	123	3.00E-11	04 14 40
<i>omii-016</i>	CD026349	Granule binding starch synthase II precursor	<i>Oryza sativa</i>	608	4.00E-49	01 02 06 30 40
<i>omii-017</i>	CD026350	No match				10
<i>omii-022</i>	CD026351	No match				ND
<i>omii-023</i>	CD026352	No match				99
<i>omii-024</i>	CD026353	Structural polyprotein				99
<i>omii-026</i>	CD026354	No match				ND
<i>omii-027</i>	CD026355	No match				99
<i>omii-029</i>	CD026356	Translation factor SUI1 homolog	<i>Salix bakko</i>	113	3.00E-13	05 40
<i>omii-036</i>	CD026357	Putative transketolase	<i>Oryza sativa</i>	743	6.00E-16	01 02 30 40
<i>omii-046</i>	CD026357	Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplast precursor	<i>Oryza sativa</i>	112	5.00E-05	99
<i>omii-047</i>	BQ490761	No match				99
<i>omii-050</i>	CD026359	Putative sesquiterpene cyclase 1	<i>Oryza sativa</i>	547	2.00E-51	ND ^c
<i>omii-052</i>	CD026360	Putative senescence-associated protein	<i>Pisum sativum</i>	282	2.00E-42	14 25
<i>omii-054</i>	CD026361	Cysteine protease	<i>Nicotiana tabacum</i>	360	5.00E-15	ND
<i>omii-057</i>	CD026362	No match				ND
<i>omii-060</i>	CD026363	No match				99
<i>omii-063</i>	CD026364	No match				99
<i>omii-068</i>	CD026365	No match				ND
<i>omii-078</i>	CD026366	No match				99
<i>omii-083</i>	CD026367	Unknown protein	<i>Oryza sativa</i>	120	1.00E-05	99
<i>omii-084</i>	CD026368	No match				99
<i>omii-089</i>	CD026370	Ribulose biphosphate carboxylase small chain C	<i>Oryza sativa</i>	175	7.00E-32	ND
<i>omii-097</i>	CD026371	No match				ND
<i>omii-100</i>	CD026372	No match				ND
<i>omii-115</i>	CD026372	No match				ND

(continued on next page)

(continued)

Clone ID	Acc. No. ^a	Putative Identity	Species	Score	E-value	Functional Category ^b
<i>omii-116</i>	CD026373	Peroxisomal multifunctional protein	<i>Oryza sativa</i>	725	2.00E-64	01 02
<i>omii-117</i>	CD026374	P0435B05.21	<i>Oryza sativa</i>	372	7.00E-35	99
<i>omii-124</i>	CD026375	No match				ND
<i>omii-125</i>	CD026376	Cysteine proteinase 1 precursor	<i>Zea mays</i>	371	1.00E-09	02 06 08 11 40
<i>omii-128</i>	CD026377	Glucose-6-phosphate/phosphate translocator	<i>Oryza sativa</i>	387	4.00E-20	08 40 67
<i>omii-134</i>	CD026378	No match				99
<i>omii-140</i>	CD026379	No match				99
<i>omii-142</i>	CD026380	No match				ND
<i>omii-150</i>	CD026381	Alpha 1,4-glucan phosphorylase H isozyme	<i>Oryza sativa</i>	841	0	01 02 40
<i>omii-157</i>	CD026382	No match				99
<i>omii-163</i>	CD026383	Cathepsin B-like cysteine proteinase	<i>Triticum aestivum</i>	353	9.00E-09	06
<i>omii-166</i>	CD026384	MADS box-like protein	<i>Oryza sativa</i>	228	4.00E-38	04 25 40
<i>omii-172</i>	CD026385	No match				ND
<i>omii-173</i>	CD026385	No match				99
<i>omii-174</i>	CD026386	Putative protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	496	4.00E-28	01 02 25 40
<i>omii-176</i>	CD026387	Nicotianamine aminotransferase A	<i>Hordeum vulgare</i>	461	1.00E-76	01 10 14 20
<i>omii-185</i>	CD026388	Cysteine proteinase inhibitor-1	<i>Oryza sativa</i>	102	2.00E-19	06
<i>omii-187</i>	CD026389	No match				99
<i>omii-189</i>	CD026391	Putative cell death suppressor protein	<i>Oryza sativa</i>	515	2.00E-96	11
<i>omii-193</i>	CD026392	No match				99
<i>omii-199</i>	CD026394	No match				99
<i>omii-206</i>	CD026395	Putative protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	236	3.00E-13	01 04 08 10 11 13 40 67
<i>omii-214</i>	CD026396	Vacuolar targeting receptor bp-80	<i>Triticum aestivum</i>	624	1.00E-102	06 08
<i>omii-215</i>	CD026397	No match				01
<i>omii-217</i>	CD026398	4-alpha-glucanotransferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	955	1.00E-86	ND
<i>omii-222</i>	CD026399	Unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	706	8.00E-14	99
<i>omii-229</i>	CD026400	No match				99
<i>omii-235</i>	CD026401	No match				99
<i>omii-237</i>	CD026402	No match				99
<i>omii-239</i>	CD026403	Starch associated protein R1	<i>Solanum tuberosum</i>	1464	2.00E-83	01
<i>omii-240</i>	CD026404	Unknown protein; protein id: A12g20920.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	334	2.00E-30	ND
<i>omii-243</i>	CD026405	Hypothetical protein	<i>Oryza sativa</i>	530	2.00E-20	10 40
<i>omii-253</i>	CD026407	No match				99
<i>omii-254</i>	No match	No match				ND
<i>omii-256</i>	No match	No match				ND

(continued on next page)

(continued)

Clone ID	Acc. No. ^a	Putative Identity	Species	Score	E-value	Functional Category ^b
<i>omii-259</i>	CD026408	No match				99
<i>omii-264</i>	CD026409	Thylakoid lumen rotamase; protein id: A13g01480.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	119	5.00E-06	ND
<i>omii-265</i>	CD026410	No match				ND
<i>omii-267</i>	CD026411	Phosphoglucomutase	<i>Pisum sativum</i>	626	3.00E-67	01 02 40
<i>omii-269</i>	CD026412	No match				99
<i>omii-273</i>	CD026413	Lon protease homolog 1	<i>Zea mays</i>	885	2.00E-18	03 04 06 40
<i>omii-279</i>	CD026414	Ribulose-5-phosphate kinase	<i>Triticum aestivum</i>	404	3.00E-48	ND
<i>omii-280</i>	CD026415	Putative glutamyl-tRNA reductase	<i>Oryza sativa</i>	76	0.45	99
<i>omii-283</i>	CD026416	No match				99
<i>omii-285</i>	CD026417	No match				99
<i>omii-286</i>	CD026418	Oryzain gamma chain precursor	<i>Oryza sativa</i>	406	2.00E-39	02 06 08 10 11 40
<i>omii-290</i>	CD026419	No match				99
<i>omii-291</i>	CD026420	Alpha-1,4-fucosyltransferase	<i>Lycopersicon esculentum</i>	413	2.00E-73	ND
<i>omii-293</i>	CD026421	No match				ND
<i>omii-295</i>	CD026422	Putative protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	484	3.00E-41	01 06 11 30
<i>omii-298</i>	CD026512	2-oxoglutarate/malate translocator	<i>Zea mays</i>	153	5.00E-13	02 08 40 67
<i>omii-299</i>	CD026423	Jacalin homolog	<i>Hordeum vulgare</i>	304	6.00E-36	11
<i>omii-300</i>	CD026424	No match				99
<i>omii-301</i>	CD026425	No match				99
<i>omii-303</i>	CD026426	No match				99
<i>omii-324</i>	CD026427	Plastocyanin precursor	<i>Oryza sativa</i>	125	3.00E-06	ND
<i>omii-336</i>	CD026428	Magnesium-chelatase subunit chID	<i>Nicotiana tabacum</i>	758	4.00E-55	01 03 40
<i>omii-338</i>	CD026429	No match				ND
<i>omii-340</i>	CD026430	Putative protein; protein id: A15g54540.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	126	7.00E-07	99
<i>omii-348</i>	CD026431	No match				ND
<i>omii-351</i>	CD026432	Translation initiation factor 5A	<i>Oryza sativa</i>	160	3.00E-32	01 05 40
<i>omii-355</i>	CD026433	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase	<i>Oryza sativa</i>	169	1.00E-13	ND
<i>omii-360</i>	CD026434	Translationally controlled tumor protein homolog	<i>Oryza sativa</i>	168	1.00E-22	05 40
<i>omii-363</i>	CD026435	Putative mitochondrial processing peptidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	531	2.00E-53	02 06 14 40
<i>omii-365</i>	CD026436	Ethylene receptor	<i>Brassica oleracea</i>	103	4.00E-04	99
<i>omii-366</i>	CD026436	Ethylene receptor				99
<i>omii-370</i>	CD026437	No match				99
<i>omii-376</i>	CD026438	Nicotianamine aminotransferase	<i>Hordeum vulgare</i>	254	1.00E-21	01 14 20
<i>omii-377</i>	CD026439	No match				02 06 10 14 40
<i>omii-383</i>	CD026440	No match				99

(continued on next page)

(continued)

Clone ID	Acc. No. ^a	Putative Identity	Species	Score	E-value	Functional Category ^b
<i>omii-385</i>	CD026441	No match				ND
<i>omii-393</i>	CD026442	Putative PKC ζ -interacting protein	<i>Oryza sativa</i>	137	4.00E-08	02 03 06 11 67
<i>omii-400</i>	CD026443	No match				99
<i>omii-405</i>	CD026444	No match				99
<i>omii-414</i>	CD026445	Cysteine proteinase AALP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	358	6.00E-09	02 06 08 11 40
<i>omii-427</i>	CD026446	No match				99
<i>omii-435</i>	CD026447	No match				99
<i>omii-447</i>	CD026448	No match				99
<i>omii-458</i>	CD026449	No match				99
<i>omii-467</i>	CD026450	Putative D1 CtpA arboxy-terminal protease	<i>Arabidopsis thaliana</i>	406	3.00E-39	06 30
<i>omii-468</i>	CD026451	Putative protein; protein id: A15g44050.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	121	4.00E-06	11 67
<i>omii-474</i>	CD026452	No match				99
<i>omii-476</i>	CD026453	Profilin 5 (ZmPRO5)	<i>Zea mays</i>	131	3.00E-14	14 30 40
<i>omii-481</i>	CD026454	No match				99
<i>omii-484</i>	CD026455	No match				99
<i>omii-510</i>	CD026456	No match				99
<i>omii-511</i>	CD026457	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase large chain	<i>Hordeum vulgare</i>	503	2.00E-56	01 05 30 40
<i>omii-519</i>	CD026458	No match				99
<i>omii-526</i>	CD026459	Class III chitinase	<i>Sphenostylis stenocarpa</i>	111	6.00E-05	99
<i>omii-527</i>	CD026460	No match				99
<i>omii-528</i>	CD026461	Histone H3.3	<i>Platichthys flesus</i>	116	6.00E-15	03 04 30 40
<i>omii-532</i>	CD026462	Metallothionein-like protein	<i>Oryza sativa</i>	65	1.00E-23	11
<i>omii-533</i>	CD026463	No match				99
<i>omii-538</i>		No match				ND
<i>omii-541</i>	CD026464	Putative 32.7 kDa jasmonate-induced protein	<i>Hordeum vulgare</i>	382	5.00E-36	ND
<i>omii-552</i>	CD026465	No match				99
<i>omii-553</i>		No match				99
<i>omii-555</i>	CD026466	No match				99
<i>omii-571</i>	CD026468	Serine/threonine protein phosphatase PP1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	314	1.00E-66	01 02 03 05 10 11 14 40
<i>omii-573</i>	CD026469	Hypothetical protein R1	<i>Solanum tuberosum</i>	1464	2.00E-54	01
<i>omii-575</i>	CD026470	No match				99
<i>omii-577</i>	CD026471	No match				ND
<i>omii-584</i>	CD026472	Unknown	<i>Arabidopsis thaliana</i>	160	2.00E-10	ND
<i>omii-587</i>	CD026473	Glucose starvation-induced protein	<i>Zea mays</i>	145	4.00E-11	02 06 08 11 40
<i>omii-591</i>	CD026474	No match				99

(continued on next page)

(continued)

Clone ID	Acc. No. ^a	Putative Identity	Species	Score	E-value	Functional Category ^b
<i>omii-592</i>	CD026475	No match				99
<i>omii-594</i>	CD026476	40S ribosomal protein S15	<i>Oryza sativa</i>	133	1.00E-07	05 40
<i>omii-597</i>	CD026477	No match				99
<i>omii-598</i>	CD026478	Putative activator-like transposable element	<i>Oryza sativa</i>	423	1.00E-45	29
<i>omii-600</i>	CD026479	Serine carboxypeptidase-like precursor	<i>Oryza sativa</i>	429	1.00E-09	06 40
<i>omii-604</i>	CD026480	Photosystem II protein D1	<i>Palmaria decipiens</i>	84	0.055	99
<i>omii-608</i>		No match				99
<i>omii-612</i>	CD026481	2-cys peroxiredoxin-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	273	5.00E-57	04 11 13 40
<i>omii-619</i>	CD026483	No match				99
<i>omii-623</i>	CD026484	Carboxyl terminal protease - like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	519	8.00E-40	06 30
<i>omii-628</i>	CD026485	No match				99
<i>omii-629</i>		No match				99
<i>omii-637</i>	CD026486	Putative phosphorylase	<i>Oryza sativa</i>	951	1.00E-57	01 02 40
<i>omii-652</i>	CD026487	No match				06 30
<i>omii-658</i>	CD026488	No match				99
<i>omii-688</i>	CD026489	No match				99
<i>omii-701</i>	CD026490	GTP-binding protein typA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	609	1.00E-102	05 10 40
<i>omii-707</i>	CD026491	No match				99
<i>omii-712</i>	CD026492	Phosphatase 2A regulatory A subunit	<i>Oryza sativa</i>	587	1.00E-27	03 04 05 06 08 14 40
<i>omii-713</i>	CD026493	No match				99
<i>omii-714</i>	CD026494	No match				99
<i>omii-721</i>	CD026495	No match				99
<i>omii-726</i>	CD026496	No match				99
<i>omii-734</i>	CD026497	No match				99
<i>omii-749</i>	CD026499	Ribosomal protein S16	<i>Zea mays</i>	85	1.00E-25	05 40
<i>omii-753</i>	CD026500	No match				99
<i>omii-781</i>	CD026501	No match				99
<i>omii-805</i>	CD026502	No match				ND
<i>omii-832</i>		No match				ND
<i>omii-835</i>	CD026503	Phytochelatin synthetase-like protein	<i>Zea mays</i>	407	2.00E-65	11
<i>omii-836</i>	CD026504	Alpha 1,4-glucan phosphorylase L isozyme	<i>Oryza sativa</i>	928	8.00E-84	01 02 40
<i>omii-843</i>	CD026505	Putative translation factor	<i>Pinus pinaster</i>	113	1.00E-15	05 40
<i>omii-855</i>	CD026506	Putative protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	307	4.00E-46	01 02 40
<i>omii-867</i>	CD026507	No match				99
<i>omii-871</i>	CD026508	No match				ND

(continued on next page)

(continued)

Clone ID	Acc. No. ^a	Putative Identity	Species	Score	E-value	Functional Category ^b
<i>omii-887</i>	CD026509	No match				99
<i>omii-889</i>		No match				99
<i>omii-931</i>	CD026510	Fibrillin homolog CDSP35 precursor	<i>Solanum tuberosum</i>	326	5.00E-28	40
<i>omii-932</i>	CD026511	Putative protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	339	5.00E-47	ND

^aGenBank accession number

^bFunctional categorization was performed by the alignment with the MIPS database. Numbers indicate the following: 01, Metabolism; 02, Energy; 03, Cell cycle and DNA processing; 04, Transcription; 05, Protein synthesis; 06, Protein fate (folding, modification, and destination); 08, Cellular transport and transport mechanisms; 10, Cellular communication signal transduction mechanism; 11, Cell rescue, defense, and virulence; 13, Regulation of interaction with cellular environment; 14, Cell fate; 20, Systemic regulation of interaction with environment; 30, Control of cellular organization; 40, Transcription; 67, Transport facilitation; 98, Classification not yet clear – cut; 99, Unclassified proteins

^cND = not determined

Table A-3. *omwi* ESTs and their functional categorizations. Similarities with probabilities of less than 10^{-4} were regarded as significant

Clone ID	Acc. No. ^a	Putative Identity	Species	Score	E-value	Functional category ^b
<i>omwi-006</i>	CB884240	No match				99
<i>omwi-008</i>	CB884241	Putative senescence-associated protein	<i>Pisum sativum</i>	282	2.00E-42	14 25
<i>omwi-013</i>	CB884242	No match				99
<i>omwi-014</i>	CB884243	OSJNBa0006B20.7	<i>Oryza sativa</i>	129	5.00E-07	99
<i>omwi-016</i>	CB884244	TPR-repeat protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	571	4.00E-55	04 11 14 40
<i>omwi-018</i>	CB884245	Putative YLP	<i>Oryza sativa</i>	230	4.00E-21	06 08 13 40 67
<i>omwi-020</i>	CB884246	Stromal 70 kDa heat shock-related protein	<i>Pisum sativum</i>	706	2.00E-53	06 08 11 30 40 67
<i>omwi-025</i>	CB884247	No match				ND ^c
<i>omwi-027</i>	CB884248	No match				99
<i>omwi-028</i>	CB884249	No match				04 06 40 67
<i>omwi-029</i>	CB884250	No match				99
<i>omwi-034</i>	CB884251	No match				ND
<i>omwi-037</i>	CB884252	Ribulose biphosphate carboxylase small chain C	<i>Oryza sativa</i>	175	6.00E-14	01 02 04 40
<i>omwi-053</i>	CB884253	No match				01
<i>omwi-063</i>	CB884254	No match				ND
<i>omwi-064</i>	CB884255	No match				ND
<i>omwi-071</i>	CB884256	Fructose-biphosphate aldolase, chloroplast precursor	<i>Oryza sativa</i>	112	3.00E-05	99
<i>omwi-074</i>	CB884257	No match				99
<i>omwi-075</i>	CB884258	No match				ND
<i>omwi-077</i>	CB884259	No match				ND
<i>omwi-081</i>	CB884260	No match				99
<i>omwi-082</i>	CB884261	Aspartate--tRNA ligase - like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	558	2.00E-59	05 40
<i>omwi-084</i>	CB884262	Cysteine proteinase inhibitor-I	<i>Oryza sativa</i>	102	6.00E-19	06
<i>omwi-091</i>	CB884263	No match				ND
<i>omwi-107</i>	BQ490763	No match				ND
<i>omwi-109</i>	CB884265	No match				99
<i>omwi-116</i>	CB884266	No match				99
<i>omwi-117</i>	CB884267	Alpha 1,4-glucan phosphorylase H isozyme	<i>Oryza sativa</i>	841	2.00E-68	01 02 40
<i>omwi-123</i>	CB884268	No match				99
<i>omwi-131</i>	CB884269	Hypothetical protein R1	<i>Solanum tuberosum</i>	1464	2.00E-54	01

(continued on next page)

(continued)

Clone ID	Acc. No. ^a	Putative Identity	Species	Score	E-value	Functional category ^b
omwi-133	CB884270	Ribulose-5-phosphate kinase, phosphoribulokinase	<i>Triticum aestivum</i>	404	3.00E-48	01
omwi-139		No match				99
omwi-141	CB884272	Ethylene receptor	<i>Brassica oleracea</i>	103	4.00E-04	99
omwi-151	CB884274	Putative glycine dehydrogenase	<i>Oryza sativa</i>	1033	1.00E-76	01 40
omwi-159	CB884275	No match				99
omwi-167	CB884276	Oryzain gamma chain precursor	<i>Oryza sativa</i>	362	2.00E-39	02 06 08 11 40
omwi-179	CB884277	Putative NADPH:quinone oxidoreductase	<i>Oryza sativa</i>	197	1.00E-29	ND ^c
omwi-185	CB884278	No match				99
omwi-192	CB884279	No match				99
omwi-194	CB884280	No match				99
omwi-197	CB884281	No match				99
omwi-199	CB884282	Ribulosebiphosphate carboxylase	<i>Epigeneium acuminatum</i>	380	3.00E-38	01 02 04 40
omwi-201	CB884283	Starch branching enzyme rbe4	<i>Oryza sativa</i>	841	1.00E-130	01 02 40
omwi-203		No match				99
omwi-205	CB884284	No match				99
omwi-215	CB884285	No match				99
omwi-217	CB884286	Unknown protein	<i>Oryza sativa</i>	250	2.00E-19	06
omwi-219	CB884287	Photosystem II protein D1	<i>Palmaria decipiens</i>	111	7.00E-05	99
omwi-226	CB884288	Jacalin homolog	<i>Hordeum vulgare</i>	304	6.00E-36	11
omwi-227	CB884289	No match				99
omwi-233	CB884290	No match				99
omwi-235	CB884291	No match				99
omwi-238	CB884292	No match				99
omwi-240	CB884293	No match				99
omwi-249	CB884294	No match				ND
omwi-251	CB884295	Prenyltransferases	<i>Arabidopsis thaliana</i>	390	3.00E-88	01 30 40
omwi-261	CB884296	No match				99
omwi-262	CB884297	Expressed protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	768	5.00E-52	03 04 40
omwi-268	CB884298	GTP-binding protein typA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	392	1.00E-117	05 10 40
omwi-271	CB884299	No match				99
omwi-280	CB884300	No match				99
omwi-291	CB884301	Nitrate-induced NOI protein	<i>Zea mays</i>	117	8.00E-06	99
omwi-292	CB884302	Light regulated protein precursor	<i>Oryza sativa</i>	79	0.22	99
omwi-293	CB884303	No match				99
omwi-297	CB884304	No match				99

(continued on next page)

(continued)

Clone ID	Acc. No. ^a	Putative Identity	Species	Score	E-value	Functional category ^b
omwi-299	CB884305	Phosphoglucosyltransferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	623	2.00E-33	01 02 40
omwi-302	CB884306	No match				99
omwi-303	CB884307	Endo-1,4-beta-glucanase Cell	<i>Hordeum vulgare</i>	621	2.00E-91	01 30
omwi-304	CB884308	No match				99
omwi-305	CB884309	No match				99
omwi-308	CB884310	Nicotianamine aminotransferase A	<i>Hordeum vulgare</i>	461	1.00E-76	01 10 14 20
omwi-311	CB884311	Phytochelatin synthetase-like protein	<i>Zea mays</i>	407	4.00E-65	11
omwi-319	CB884313	Alpha 1,4-glucan phosphorylase L isozyme	<i>Oryza sativa</i>	928	8.00E-84	01 02 40
omwi-321	CB884314	No match				99
omwi-326	CB884315	Cysteine proteinase inhibitor-II	<i>Oryza sativa</i>	113	4.00E-05	99
omwi-336	CB884316	No match				04
omwi-340	BQ490764	No match				99
omwi-352	CB884318	Cellulose synthase-7	<i>Zea mays</i>	1086	1.00E-103	01 30
omwi-357	CB884319	No match				99
omwi-361	CB884320	Rhodanese-like domain protein; protein id: At4g27700.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	376	7.00E-50	99
omwi-374	CB884322	Class III chitinase	<i>Sphenostylis stenocarpa</i>	110	5.00E-04	01 11
omwi-376	CB884323	No match				99
omwi-378	CB884324	No match				99
omwi-379	CB884325	No match				99
omwi-383	CB884326	Granule binding starch synthase II precursor	<i>Oryza sativa</i>	608	4.00E-49	01 02 06 30 40
omwi-385	CB884327	No match				99
omwi-388	CB884328	Plastocyanin precursor	<i>Hordeum vulgare</i>	125	1.00E-06	ND
omwi-393	CB884329	No match				99
omwi-395	CB884330	No match				99
omwi-397	CB884331	Acclimation protein 2	<i>Hordeum vulgare</i>	78	1.2	99
omwi-398	CB884332	Unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>		6.00E-15	ND
omwi-399	CB884333	No match				ND
omwi-407	CB884334	No match				99
omwi-414	CB884335	No match				99
omwi-419	CB884336	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit	<i>Triticum aestivum</i>	473	5.00E-13	01 05 30 40
omwi-424	CB884337	No match				99
omwi-425	CB884338	Glycosylphosphatidylinositol-anchored merozoite surface protein	<i>Babesia divergens</i>	70	6	99
omwi-426	CB884339	ADP-ribosylation factor	<i>Glycine max</i>	178	6.00E-25	06 08 10 30 40
omwi-430	CB884340	Lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase	<i>Zea mays</i>	1056	1.00E-102	01 40
omwi-432	CB884341	Putative protein; protein id: At5g64170.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	107	3.00E-04	ND

(continued on next page)

(continued)

Clone ID	Acc. No. ^a	Putative Identity	Species	Score	E-value	Functional category ^b
omwi-443	CB884342	Putative protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	955	1.00E-26	ND
omwi-444	CB884343	No match				99
omwi-446	CB884344	No match				99
omwi-448	CB884345	Putative sesquiterpene cyclase 1	<i>Oryza sativa</i>		6.00E-23	ND
omwi-452	CB884346	No match				99
omwi-453	CB884347	Unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	384	1.00E-23	99
omwi-463	CB884348	No match				ND
omwi-469	CB884349	No match				99
omwi-470	CB884350	No match				99
omwi-478	BQ490721	No match				99
omwi-484	CB884352	No match				99
omwi-493	CB884354	No match				99
omwi-497	CB884355	No match				99
omwi-502	CB884357	Putative thiamin biosynthesis protein	<i>Oryza sativa</i>	628	9.00E-62	01 04 40
omwi-503	CB884358	no match-282				99
omwi-511	CB884359	Putative phosphorylase	<i>Oryza sativa</i>	951	1.00E-28	01 02 40
omwi-514	CB884360	No match				99
omwi-531	CB884361	No match				04 25 40
omwi-532	CB884361	No match				99
omwi-537	CB884363	No match				99
omwi-553	CB884364	No match				99
omwi-561	CB884365	No match				ND
omwi-562	CB884366	No match				99
omwi-569	CB884367	Photosystem I reaction center subunit XI	<i>Hordeum vulgare</i>	131	3.00E-07	99
omwi-571	CB884368	No match				99
omwi-582	CB884369	No match				ND
omwi-604	CB884371	GOS9 PROTEIN	<i>Oryza sativa</i>	139	6.00E-09	99
omwi-605	CB884372	Eukaryotic release factor 3 homolog	<i>Ricinus communis</i>	150	2.00E-52	01 03 05 40
omwi-608	CB884373	No match				ND
omwi-610	CB884374	Hypothetical protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>		2.00E-09	ND
omwi-615	CB884375	Cytochrome C	<i>Oryza sativa</i>		1.00E-08	02 11 40 67
omwi-624	CB884377	No match				04
omwi-625	CB884378	Unknown protein	<i>Oryza sativa</i>	408	2.00E-23	04 40
omwi-649	CB884379	No match				99
omwi-652	CB884380	FER2 ferredoxin [2Fe-2S] I precursor	<i>Oryza sativa</i>	139	7.00E-19	67

(continued on next page)

(continued)

Clone ID	Acc. No. ^a	Putative Identity	Species	Score	E-value	Functional category ^b
omwi-658	CB884381	D1 CtpA, arboxy-terminal protease; protein id: A13g57680.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	536	6.00E-54	06 30
omwi-662	CB884382	No match				99
omwi-663	CB884383	No match				ND
omwi-668	CB884384	Putative translation factor	<i>Pinus pinaster</i>	113	1.00E-15	05 40
omwi-672	CB884385	No match				99
omwi-676	CB884386	No match				99
omwi-679	CB884387	Putative protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	236	3.00E-13	01 04 08 10 11 13 40
omwi-686	CB884388	RP19 gene for chloroplast ribosomal protein CL9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	197	4.00E-41	05 40
omwi-687	CB884389	No match				99
omwi-698	CB884390	No match				99
omwi-699	CB884391	Unknown protein	<i>Oryza sativa</i>	281	1.00E-26	04 10 20 25 40
omwi-700	CB884392	No match				ND
omwi-713	CB884393	Hypothetical 9.7K protein - chloroplast	<i>Oryza sativa</i>	70	6.5	99
omwi-719	CB884394	Cysteine synthase (O-acetylserine sulphydrase)	<i>Capsicum annuum</i>	374	3.00E-23	01 40
omwi-724	CB884395	No match				ND
omwi-726	CB884396	No match				99
omwi-737	CB884397	No match				08 13 40 67
omwi-739	CB884398	No match				99
omwi-744	CB884399	No match				99
omwi-748	CB884400	No match				ND
omwi-764	omwi-764	No match				ND
omwi-766	omwi-766	No match				ND
omwi-768	CB884401	Putative serine/threonine kinase	<i>Oryza sativa</i>	542	1.00E-124	10
omwi-773	CB884402	Hypothetical protein; protein id: A13g31940.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	74	3.1	99
omwi-778	CB884403	No match				99
omwi-782	CB884404	No match				99
omwi-783	CB884405	No match				99
omwi-787	CB884406	No match				ND
omwi-788	CB884407	No match				01
omwi-790	CB884408	Pyruvate dehydrogenase kinase 1	<i>Oryza sativa</i>	363	2.00E-62	01
omwi-806	CB884409	Serine hydroxymethyltransferase	<i>Zea mays</i>	343	8.00E-63	01 02 40
omwi-807	CB884410	Putative sphingosine-1-phosphate lyase	<i>Oryza sativa</i>	557	2.00E-94	01 13 40
omwi-821	CB884411	No match				99
omwi-822	CB884412	Hypothetical 6.6 kDa protein yef9 (ORF 62)	<i>Oryza sativa</i>	130	3.00E-07	40
omwi-824	CB884413	No match				10

(continued on next page)

(continued)

Clone ID	Acc. No. ^a	Putative Identity	Species	Score	E-value	Functional category ^b
<i>omwi-828</i>	CB884414	Unknown protein	<i>Oryza sativa</i>	461	1.00E-20	01 10 11 40
<i>omwi-829</i>	CB884415	Expressed protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	280	1.00E-55	01
<i>omwi-831</i>	CB884416	Putative RNA polymerase I subunit	<i>Oryza sativa</i>	126	9.00E-31	03 04 40
<i>omwi-837</i>	CB884417	Putative ferredoxin-dependent glutamate synthase				01
<i>omwi-839</i>	CB884418	No match				99
<i>omwi-846</i>	CB884419	No match				99
<i>omwi-853</i>	CB884420	Putative triose phosphate/phosphate translocator	<i>Oryza sativa</i>	417	4.00E-78	08 40 67
<i>omwi-857</i>	BQ490761	No match				99
<i>omwi-860</i>	CB884422	Cysteine proteinase 1 precursor	<i>Zea mays</i>	371	6.00E-10	02 06 08 11 40
<i>omwi-861</i>	CB884423	Anti-disease protein 1	<i>Oryza sativa</i>	78	0.26	99
<i>omwi-867</i>	CB884424	Unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	378	1.00E-61	99
<i>omwi-871</i>		No match				ND
<i>omwi-873</i>	CB884425	Aquaporin 2	<i>Allium cepa</i>		6.00E-33	01 08 11 40 67
<i>omwi-874</i>	CB884426	Plasma membrane MIP protein	<i>Zea mays</i>	289	5.00E-61	01 08 40 67
<i>omwi-877</i>	CB884427	No match				ND
<i>omwi-879</i>	CB884428	Expressed protein; protein id: A13g15840.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	107	2.00E-04	ND
<i>omwi-886</i>	CB884429	No match				ND
<i>omwi-891</i>		No match				99
<i>omwi-893</i>	CB884431	Ribosomal protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	244	3.00E-42	05 40
<i>omwi-894</i>	CB884432	Putative protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	263	2.00E-22	99
<i>omwi-895</i>	CB884433	Unknown protein; protein id: A12g20920.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	334	2.00E-30	ND
<i>omwi-898</i>	CB884434	Protein F25C20.9 [imported]	<i>Arabidopsis thaliana</i>	357	3.00E-32	99
<i>omwi-902</i>	CB884435	Fd-GOGAT protein	<i>Oryza sativa</i>	1169	1.00E-54	01
<i>omwi-908</i>	CB884436	No match				ND
<i>omwi-911</i>	CB884437	No match				03 04 06 08 11 14 40
<i>omwi-913</i>	CB884438	No match				ND
<i>omwi-926</i>	CB884439	Metallothionein-like protein	<i>Oryza sativa</i>	62	3.00E-31	11
<i>omwi-929</i>	CB884440	No match				99
<i>omwi-932</i>	CB884441	No match				ND
<i>omwi-946</i>	CB884443	2-cys peroxiredoxin-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	273	5.00E-49	04 11 13 40
<i>omwi-955</i>	CB884445	No match				ND
<i>omwi-957</i>	CB884446	Unknown protein; protein id: At1g33110.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	184	1.00E-13	11 67

^aGenBank accession number

^bFunctional categorization was performed by the alignment with the MIPS database. Numbers indicate the following: 01, Metabolism; 02, Energy; 03, Cell cycle and DNA processing; 04, Transcription; 05, Protein synthesis; 06, Protein fate (folding, modification,

and destination); 08, Cellular transport and transport mechanisms; 10, Cellular communication signal transduction mechanism; 11, Cell rescue, defense, and virulence; 13, Regulation of interaction with cellular environment; 14, Cell fate; 20, Systemic regulation of interaction with environment; 30, Control of cellular organization; 40, Transcription; 67, Transport facilitation; 98, Classification not yet clear-cut; 99, Unclassified proteins

ND = not determined

Table A-4. List of *ogfi* ESTs

Clone ID	Acc. No. ^a	Putative Identity	Species	Score	E-value
<i>ogfi-099</i>	CF075164	Photosystem I reaction center subunit IV, chloroplast precursor	<i>Hordeum vulgare</i>	222	8.00E-18
<i>ogfi-112</i>	CF075165	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A-subunit precursor	<i>Nicotiana tabacum</i>	122	2.00E-06
<i>ogfi-120</i>	CF075166	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase	<i>Oryza sativa</i>	329	2.00E-30
<i>ogfi-136</i>	CF075167	Glycyl tRNA synthetase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	281	1.00E-24
<i>ogfi-142</i>	CF075168	No significant similarity found			
<i>ogfi-162</i>	CF075169	Ribulose biphosphate carboxylase small chain	<i>Aegilops tauschii</i>	100	0.001
<i>ogfi-169</i>	CF075170	Expressed protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	593	9.00E-61
<i>ogfi-186</i>	CF075171	Metallothionein-like protein	<i>Oryza sativa</i>	269	2.00E-23
<i>ogfi-221</i>	CF075173	Carbonic anhydrase 3	<i>Oryza sativa</i>	560	3.00E-57
<i>ogfi-224</i>	CF075174	No significant similarity found			
<i>ogfi-229</i>	CF075175	No significant similarity found			
<i>ogfi-235</i>	CF075176	Photosystem I complex PsaN subunit precursor			
<i>ogfi-246</i>	CF075177	Oxidoreductase, putative	<i>Zea mays</i>	370	1.00E-40
<i>ogfi-268</i>	CF075178	Putative fibrillar associated protein	<i>Pseudomonas putida KT2441</i>	68	5.6
<i>ogfi-277</i>	CF075179	similar to TEA domain family member 2	<i>Actinomyces naeslundii</i>	67	7.3
<i>ogfi-359</i>	CF075180	Putative RNA binding protein	<i>Mus musculus</i>	71	2.4
<i>ogfi-384</i>	CF075181	osr40g3	<i>Oryza sativa</i>	114	3.00E-05
<i>ogfi-394</i>	CF075182	Hypothetical protein	<i>Oryza sativa</i>	155	5.00E-10
<i>ogfi-395</i>	CF075183	Unnamed protein product	<i>Desulfotobacterium hafniense</i>	71	2
<i>ogfi-396</i>	CF075184	40S ribosomal protein-like	<i>Homo sapiens</i>	73	1.4
<i>ogfi-397</i>	CF075185	RNA recognition motif (RRM)-containing protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	306	1.00E-27
<i>ogfi-399</i>	CF075186	No significant similarity found	<i>Arabidopsis thaliana</i>	122	3.00E-06
<i>ogfi-403</i>	CF075187	Putative beta-glucosidase homolog	<i>Oryza sativa</i>	186	1.00E-13
<i>ogfi-404</i>	CF075188	Photosystem II 10 kD polypeptide	<i>Lycopersicon esculentum</i>	82	0.15
<i>ogfi-405</i>	CF075189	Putative 60S ribosomal protein L35	<i>Arabidopsis thaliana</i>	233	3.00E-19
<i>ogfi-408</i>	CF075190	Unknown protein	<i>Sus scrofa</i>	69	4.2
<i>ogfi-409</i>	CF075191	OSJNBb0066123.16	<i>Oryza sativa</i>	282	9.00E-25
<i>ogfi-414</i>	CF075192	No significant similarity found	<i>Caenorhabditis elegans</i>	68	4.7
<i>ogfi-416</i>	CF075193	F32D8.2			
<i>ogfi-418</i>	CF075194	No significant similarity found			
<i>ogfi-420</i>	CF075195	Putative hydroxyproline-rich glycoprotein	<i>Oryza sativa</i>	458	3.00E-45
<i>ogfi-426</i>	CF075196	Putative DNA-binding protein	<i>Streptomyces coelicolor</i>	68	6.3

(continued on next page)

(continued)

Clone ID	Acc. No. ^a	Putative Identity	Species	Score	E-value
ogfi-429	CF075197	Oryzain gamma precursor	<i>Oryza sativa</i>	332	3.00E-32
ogfi-430	CF075198	Hypothetical protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	304	2.00E-27
ogfi-435	CF075199	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit	<i>Oryza sativa</i>	181	3.00E-13
ogfi-437	CF075200	SCO1 protein -related	<i>Arabidopsis thaliana</i>	125	1.00E-06
ogfi-439	CF075201	Expressed protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	232	4.00E-19
ogfi-446	CF075202	Conserved hypothetical protein	<i>Pirellula sp.</i>	72	1.9
ogfi-447	CF075203	No significant similarity found			
ogfi-449	CF075204	similar to KIAA1377 protein	<i>Homo sapiens</i>	66	9.5
ogfi-452	CF075205	OJ1081_B12.15	<i>Oryza sativa</i>	72	2
ogfi-454	CF075206	ABI3-interacting protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	79	0.23
ogfi-458	CF075207	No significant similarity found			
ogfi-459	CF075208	OSJNBa0024J22.9		210	2.00E-16
ogfi-463	CF075209	Putative photosystem II 10 kD polypeptide	<i>Oryza sativa</i>	566	8.00E-58
ogfi-466	CF075210	Putative transmembrane amino acid transporter protein	<i>Narcissus pseudonarcissus</i>	73	1.4
ogfi-470	CF075211	Alpha 1,4-glucan phosphorylase H isozyme	<i>Oryza sativa</i>	494	2.00E-49
ogfi-475	CF075212	K21L19.3-unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	199	3.00E-15
ogfi-484	CF075213	Ribosomal protein S7	<i>Oryza sativa</i>	143	8.00E-09
ogfi-490	CF075214	Cation efflux family member	<i>Caenorhabditis elegans</i>	79	0.32
ogfi-493	CF075215	Similar to disease resistance proteins	<i>Arabidopsis thaliana</i>	183	2.00E-13
ogfi-497	CF075216	No significant similarity found			
ogfi-498	CF075217	Putative thioredoxin	<i>Oryza sativa</i>	302	4.00E-27
ogfi-506	CF075218	No significant similarity found			
ogfi-510	CF075219	No significant similarity found			
ogfi-516	CF075220	Expressed protein		194	1.00E-14
ogfi-519	CF075221	Hypothetical membrane protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	72	1.3
ogfi-527	CF075222	Major vault protein	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	68	4.2
ogfi-530	CF075223	Putative receptor kinase	<i>Leishmania major</i>	75	0.69
ogfi-535	CF075224	No significant similarity found			
ogfi-541	CF075225	Endopeptidase - like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	125	1.00E-06
ogfi-546	CF075226	Hypothetical protein	<i>Oryza sativa</i>	122	3.00E-06
ogfi-548	CF075227	Hypothetical protein	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	66	8.3
ogfi-584	CF075228	Diaminopimelate Epimerase	<i>Chlamydomonada pneumoniae</i>	67	7.8

(continued on next page)

(continued)

Clone ID	Acc. No. ^a	Putative Identity	Species	Score	E-value
<i>ogfi-588</i>	CF075229	Unnamed protein product	<i>Oryza sativa</i>	325	9.00E-30
<i>ogfi-592</i>	CF075230	Putative pyruvate kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	103	4.00E-04
<i>ogfi-595</i>	CF075231	Hypothetical protein	<i>Oryza sativa</i>	335	5.00E-31
<i>ogfi-598</i>	CF075232	No significant similarity found			
<i>ogfi-600</i>	CF075233	No significant similarity found			
<i>ogfi-604</i>	CF075234	Putative phospholipid cytidyltransferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	130	3.00E-07
<i>ogfi-606</i>	CF075235	Hypothetical protein L4325.07	<i>Leishmania major</i>	73	1.4
<i>ogfi-615</i>	CF075236	RNA polymerase beta' chain	<i>Oryza sativa</i>	321	2.00E-29
<i>ogfi-616</i>	CF075237	Alpha-soluble NSF attachment protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	401	1.00E-38
<i>ogfi-630</i>	CF075238	Unknown protein	<i>Oryza sativa</i>	645	1.00E-66
<i>ogfi-636</i>	CF075239	Utative auxin-responsive protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	440	3.00E-43
<i>ogfi-640</i>	CF075240	Hypothetical protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	115	2.00E-05
<i>ogfi-650</i>	CF075241	Photosystem II protein D1	<i>Oryza sativa</i>	314	1.00E-28
<i>ogfi-653</i>	CF075242	CG16903-PA	<i>Drosophila melanogaster</i>	79	0.33
<i>ogfi-661</i>	CF075243	No significant similarity found			
<i>ogfi-663</i>	CF075244	MATE efflux protein family	<i>Arabidopsis thaliana</i>	178	9.00E-13
<i>ogfi-669</i>	CF075245	OJ1029_F04.13	<i>Oryza sativa</i>	89	0.018
<i>ogfi-673</i>	CF075246	Hypothetical protein XP_241134	<i>Rattus norvegicus</i>	68	5.8
<i>ogfi-674</i>	CF075247	OSJNB0056F09.16	<i>Oryza sativa</i>	171	7.00E-12
<i>ogfi-677</i>	CF075248	Unnamed protein product	<i>Mus musculus</i>	80	0.18
<i>ogfi-683</i>	CF075249	P0421H07.19	<i>Oryza sativa</i>	70	3.4
<i>ogfi-695</i>	CF075250	ENSANGP0000021693	<i>Anopheles gambiae</i>	67	7.5
<i>ogfi-701</i>	CF075251	Putative LeOPT1 - oligopeptide transporter	<i>Oryza sativa</i>	135	8.00E-08
<i>ogfi-702</i>	CF075252	Cinnamoyl-CoA reductase family	<i>Arabidopsis thaliana</i>	187	7.00E-14
<i>ogfi-707</i>	CF075253	Putative endoplasmic reticulum membrane fusion protein	<i>Oryza sativa</i>	120	5.00E-06
<i>ogfi-708</i>	CF075254	Actin-related protein 4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	70	3
<i>ogfi-723</i>	CF075255	AT3g15840	<i>Arabidopsis thaliana</i>	137	6.00E-08
<i>ogfi-738</i>	CF075256	P0699H05.18	<i>Oryza sativa</i>	254	1.00E-21
<i>ogfi-742</i>	CF075257	Plastid RNA polymerase sigma factor	<i>Oryza sativa</i>	650	1.00E-67
<i>ogfi-808</i>	CF075258	Putative gag-pol polyprotein	<i>Oryza sativa</i>	324	1.00E-29
<i>ogfi-813</i>	CF075259	Chlorophyll a/b-binding protein CP26 precursor	maize	207	5.00E-16
<i>ogfi-861</i>	CF075260	Light-regulated protein	<i>Oryza sativa</i>	67	7.7
<i>ogfi-862</i>	CF075261	Acidic PR-1 type pathogenesis-related protein PR-1a	<i>Oryza sativa</i>	210	2.00E-16

(continued on next page)

(continued)

Clone ID	Acc. No. ^a	Putative Identity	Species	Score	E-value
<i>ogfi-875</i>	CF075262	Hypothetical protein XP_209633	<i>Homo sapiens</i>	82	0.14
<i>ogfi-882</i>	CF075263	No significant similarity found			
<i>ogfi-926</i>	CF075264	Photosystem II oxygen-evolving complex protein 1 - rice		380	4.00E-36
<i>ogfi-950</i>	CF075265	No significant similarity found			
<i>ogfi-972</i>	CF075266	No significant similarity found			
<i>ogfi-1073</i>	CF075267	Caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase	<i>Oryza sativa</i>	257	7.00E-22
<i>ogfi-1084</i>	CF075268	Putative photosystem II 10 kD polypeptide	<i>Oryza sativa</i>	246	1.00E-20
<i>ogfi-1097</i>	CF075269	No significant similarity found			
<i>ogfi-1150</i>	CF075270	Expressed protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	219	1.00E-17
<i>ogfi-1200</i>	CF075271	OSJNBa0027H06.28	<i>Oryza sativa</i>	468	2.00E-46

^aGenBank accession number

Table A-5. List of up-regulated *ogfi* clones (in microarray data)

Gene ID	3hr	24hr	Gene ID	3hr	24hr	Gene ID	3hr	24hr
DAU rice 01-11	2.77	3.98	DAU rice 04-86		1.66	DAU rice 07-01	2.02	1.99
DAU rice 01-27	1.73	2.25	DAU rice 05-12	2.09	1.77	DAU rice 07-05		1.7
DAU rice 01-35	1.71	2.39	DAU rice 05-15		2.66	DAU rice 07-10	10.55	5.69
DAU rice 01-63		2.44	DAU rice 05-17	4.57		DAU rice 07-20	1.7	
DAU rice 01-84	1.97		DAU rice 05-21	2.5		DAU rice 07-22		2.08
DAU rice 01-86	3.17	2.03	DAU rice 05-29	1.78	1.7	DAU rice 07-26		2.44
DAU rice 01-96	2.32	3.43	DAU rice 05-30		1.98	DAU rice 07-42	2.09	3.19
DAU rice 02-01	3.22	3.9	DAU rice 05-31		1.87	DAU rice 07-43	1.69	
DAU rice 02-03	2.17	2.78	DAU rice 05-32	1.74	1.87	DAU rice 07-54	2.98	2.62
DAU rice 02-16	1.72		DAU rice 05-38	1.64		DAU rice 07-59		1.87
DAU rice 02-24	1.62		DAU rice 05-45	5.26	3.12	DAU rice 07-71	1.84	
DAU rice 02-36	4.1	4.03	DAU rice 05-46		1.83	DAU rice 07-74		1.82
DAU rice 02-48	1.96	1.78	DAU rice 05-47	2.83	1.75	DAU rice 07-75		2.26
DAU rice 02-61	6.56	6.55	DAU rice 05-51	2.61		DAU rice 07-80		2.27
DAU rice 02-66	1.62	1.62	DAU rice 05-53	1.64	1.78	DAU rice 07-86	3.54	2.04
DAU rice 02-70	2.22	2.22	DAU rice 05-62		1.83	DAU rice 07-91		2
DAU rice 02-73	2.11		DAU rice 05-63		1.66	DAU rice 08-01	2.85	2.97
DAU rice 03-17		2.93	DAU rice 05-69	1.7	2.57	DAU rice 08-39	2.14	
DAU rice 03-26	2.31	1.85	DAU rice 05-70		1.78	DAU rice 08-52		2.35
DAU rice 03-29	1.64	1.91	DAU rice 05-86	2.51	1.89	DAU rice 08-66		1.9
DAU rice 03-3	1.78		DAU rice 05-87	4.57	3.28	DAU rice 08-7	1.86	
DAU rice 03-32	3.87	2.03	DAU rice 05-88	2.77	2.06	DAU rice 08-79	1.88	
DAU rice 03-43	2.48	2.57	DAU rice 06-03	2		DAU rice 08-93		2.58
DAU rice 03-54	2.41	3.08	DAU rice 06-12	1.67		DAU rice 08-94	2.84	
DAU rice 03-69		2.62	DAU rice 06-17		1.64	DAU rice 09-15		2
DAU rice 03-85	1.73	2.33	DAU rice 06-21	3	3.8	DAU rice 09-34		1.71
DAU rice 04-63		3.03	DAU rice 06-22	2.35	2.06	DAU rice 09-40		1.91
DAU rice 04-71		5.06	DAU rice 06-79		2.72	DAU rice 09-42		1.69
DAU rice 04-77		1.92	DAU rice 06-90		2.19	DAU rice 09-45		2.05
DAU rice 04-83	1.61		DAU rice 06-93	1.86	1.71			1.93

(continued on next page)

(continued)

Gene ID	3hr	24hr	Gene ID	3hr	24hr	Gene ID	3hr	24hr
DAU rice 09-54		1.81	DAU-110-82	2.05		DAU-112-34		1.62
DAU rice 09-61		1.78	DAU-110-85		1.93	DAU-112-38		2.09
DAU rice 09-72		2.1	DAU-11-09		1.98	DAU-112-43	3.43	2.46
DAU rice 09-78		1.65	DAU-111-01		1.67	DAU-112-48		1.66
DAU rice 09-93	2.26	2.93	DAU-111-06		5.75	DAU-11-25		3.03
DAU rice 09-94		3.37	DAU-11-11		2.69	DAU-112-53		2.34
DAU rice 10-11		2.47	DAU-111-13		1.72	DAU-112-60	3.12	3.16
DAU rice 10-36		1.84	DAU-111-15		1.82	DAU-112-69		1.85
DAU rice 10-62		1.83	DAU-111-18	2.58	2.32	DAU-112-76	2.69	
DAU rice 10-74	1.9		DAU-111-19	1.74		DAU-112-78		
DAU rice 10-86		1.75	DAU-111-27		2.01	DAU-11-28	1.63	1.87
DAU rice 10-94		3.77	DAU-111-31		5.34	DAU-112-82	1.94	
DAU rice 11-02	2.06		DAU-111-37	2.02		DAU-112-89	2.1	
DAU rice 11-12	2.3	1.81	DAU-11-14		2.11	DAU-112-90	3.75	2.96
DAU rice 11-31		1.7	DAU-111-58		1.78	DAU-112-93	1.98	2.2
DAU rice 11-34		1.71	DAU-11-16		3	DAU-112-94	4.76	6.22
DAU rice 11-39	1.69	2.11	DAU-111-61		3.59	DAU-11-39	2.27	
DAU rice 11-57		3.35	DAU-111-69		1.65	DAU-11-58	1.83	1.82
DAU rice 11-60	2.72	2.13	DAU-111-70		1.83	DAU-11-61		1.65
DAU rice 11-64	2.28		DAU-111-73		1.72	DAU-11-66	4.34	1.88
DAU rice 11-69	1.74	3.62	DAU-11-21	1.62	2.6	DAU-11-77	3.16	3.16
DAU rice 12-28		2.28	DAU-112-10	3.87	2.93	DAU-11-80	1.77	1.76
DAU rice 12-78		4.57	DAU-112-14	1.72		DAU-11-86		2.85
DAU rice 12-89	2.1	2.82	DAU-112-17	2.93	1.95	DAU-12-04		1.81
DAU rice 12-92	2	2.32	DAU-112-18		2.1	DAU-12-09	1.81	
DAU rice 12-94			DAU-112-25	1.67	1.73	DAU-12-38		1.67
DAU-110-34		1.65	DAU-112-29		2.79	DAU-12-45	1.78	
DAU-110-40		1.78	DAU-11-23	1.75	1.65	DAU-12-58		1.63
DAU-110-59	2.89		DAU-112-32		1.77	DAU-12-62		1.64
						DAU-12-66		1.7

(continued on next page)

(continued)

Gene ID	3hr	24hr	Gene ID	3hr	24hr	Gene ID	3hr	24hr
DAU-12-70	2.54	2.82	DAU-15-63	5.21		DAU-18-47		1.64
DAU-12-78	1.88	4.93	DAU-15-67		2.21	DAU-18-49		4.02
DAU-12-79		1.9	DAU-15-70	2.69	1.61	DAU-18-55		
DAU-12-80	1.67		DAU-15-82	1.8		DAU-18-82	1.66	1.63
DAU-12-85		1.93	DAU-15-85	3.18	3.25	DAU-18-86	1.86	
DAU-12-89		1.71	DAU-15-91	2.79	1.75	DAU-18-94	1.76	
DAU-13-35	1.65		DAU-16-08	1.64	1.95	DAU-19-07	1.71	
DAU-13-47	1.71		DAU-16-10	3.22	1.74	DAU-19-11	1.62	
DAU-13-49	2.18	2.91	DAU-16-14	1.75	2.82	DAU-19-20	2.2	2.11
DAU-13-54		1.66	DAU-16-15	1.89	1.86	DAU-19-31	4.22	2.05
DAU-13-62		1.65	DAU-16-21	3.66	2.3	DAU-19-55	2.4	
DAU-13-68	2.29	1.8	DAU-16-22	2.69	1.66	DAU-19-58	2.34	1.85
DAU-13-70	1.92	2.27	DAU-16-65		1.62	DAU-19-69		1.61
DAU-13-71		2.96	DAU-16-88	2.69	1.62	DAU-19-77	1.87	1.87
DAU-13-74		1.62	DAU-16-92		2.54	DAU-19-85	1.69	1.69
DAU-13-86	2.15	2.53	DAU-16-94		2.2	DAU-19-86	1.61	1.61
DAU-13-89		1.67	DAU-16-96	2.06		DAU-19-90	1.74	1.74
DAU-14-04		1.77	DAU-17-43	1.67	1.73			
DAU-14-05		1.63	DAU-17-45	1.79				
DAU-14-06	1.65		DAU-17-48	3.34				
DAU-14-12		1.62	DAU-17-50	3.34	3.14			
DAU-14-14	3.34	2.38	DAU-17-52	2.18				
DAU-14-34	1.93	1.94	DAU-17-59	2.04				
DAU-14-62		1.68	DAU-17-69		4.86			
DAU-14-67		2.13	DAU-17-74	1.74				
DAU-14-76	2.58		DAU-17-85	1.61				
DAU-15-21	1.89	1.93	DAU-17-94		5.66			
DAU-15-35	1.82	2.59	DAU-18-14		1.81			
DAU-15-51		3.47	DAU-18-22		1.64			
DAU-15-57	3.36	2.85	DAU-18-39		2.01			

주 의

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