

## 비생물학적 스트레스 관련 벼 *Ac/Ds* 삽입 변이체의 선발 및 유전자 발현 분석

정유진<sup>1</sup>, 박슬아<sup>1</sup>, 안병욱<sup>1</sup>, 윤도원<sup>1</sup>, 지현소<sup>1</sup>, 이강섭<sup>1</sup>, 박용환<sup>1</sup>, 서석철<sup>1</sup>, 백형진<sup>2</sup>, 이명철<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부, <sup>2</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농업유전자원센터

### Selection of (*Ac/Ds*) insertion mutant lines by abiotic stress and analysis of gene expression pattern of rice (*Oryza sativa* L.)

Yu-Jin Jung<sup>1</sup>, Seul-Ah Park<sup>1</sup>, Byung-Ohg Ahn<sup>1</sup>, Doh-Won Yun<sup>1</sup>, Hyeon-So Ji<sup>1</sup>, Gang-Sup Lee<sup>1</sup>,  
Young-Whan Park<sup>1</sup>, Seok-Cheol Suh<sup>1</sup>, Hyung-Jin Baek<sup>2</sup>, and Myung-Chul Lee<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Agricultural Bio-resources, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon Gyeonggi-do 441-707, Korea

<sup>2</sup>National Agrobiodiversity Center, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon Gyeonggi-do 441-707, Korea

**ABSTRACT** Transposon-mediated insertional mutagenesis is one of powerful strategy for assessing functions of genes in higher plants. In this report, we have selected highly susceptible and tolerance plant by screening about high salt (3% NaCl) and cold stresses (4°C) from F2 seeds of 30,000 *Ac/Ds* insertional mutagenesis lines in rice (*Oryza sativa* L. cv. Dongjin). In order to identify the gene tagging, insertion of *Ds* element was analyzed by Southern blot and these results revealed that 19 lines were matched genotype of selected lines with phenotype from the first selected 212 lines, and 13 lines have one copy of *Ds* elements. The Flanking Sequence Tags (FSTs) of selected mutant lines showed high similarities with the following known function genes: signal transduction and regulation of gene expression (transpoter, protease family protein and apical meristem family protein), osmotic stress response (heat shock protein, O-methyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and drought stress induce protein), vesicle trafficking (SYP 5 family protein) and senescence associated protein. The expression pattern of 19 genes were analyzed using RT-PCR under the abiotic stresses of 9 class; 250 mM NaCl, osmotic, drought, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100 μM ABA, 100 μM IAA, 0.1 ppm 2,4-D, 4°C cold and 38°C high temperature. Isolated knock-out genes showed the positive response about 250 mM NaCl, drought, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PEG, IAA, 2,4-D, ABA treatment and low (4°C) and high temperature (38°C). The results from this study indicate that function of selected knock-out genes could be useful in improving of tolerance to abiotic stresses as an important transcriptional activators in rice.

#### 서 론

최근 애기장대 및 벼 유전체의 전체 염기서열 분석이 완

료되면서 유전체 염기서열을 바탕으로 다양한 유전자의 기능 분석 및 각 유전자간의 상호작용 등 포스트 게놈 연구인 기능유전체 연구가 활발하게 진행되고 있다 (Meagher 2002, Rensink & Buell 2004, Bevan & Walsh 2005). 식물의 유전자 기능 분석에 많이 사용하고 있는 역유전학 (reverse genetics)에는 화학적 변이원인 EMS 등을 이용한 점돌연변이 유기

\*Corresponding author Tel 031-299-1854 Fax 031-294-6029

E-mail: mclee@rda.go.kr

및  $\gamma$ -ray등을 이용한 결손 변이체 선발에 의한 방법이 많이 사용되어 왔으나 이들 변이체에 대한 유전자 특성 분석은 교배를 통한 map-base cloning을 해야 하는 단점이 있다. 최근 이러한 단점을 극복하고자 전이인자를 이용한 변이체 유 기 및 RNAi 등의 유전자 발현을 제어하는 형질전환체의 선발 등을 이용하고 있다 (Frankel et al. 1985, Takayama et al. 1990, Hayashi et al. 1992, Wilkins et al. 1996). 이 중에서 전이인자 삽입 변이체 육성을 위한 방법은 transfer-DNA (T-DNA)와 *Activator/Dissociation (Ac/Ds)* system을 이용한 방법이 가장 많이 사용되고 있다. (Gierl and Saedler 1992). 이 변이체를 이용할 경우 기능을 가진 유전자에 DNA가 삽입되어 표현형적 변이를 보이는 개체에 대해 유전자의 영향을 바로 추적할 수 있는 장점을 갖고 있으나, 형질전환 과정에서 자체 전이인자들의 활성으로 인해 돌연변이가 유기되어 삽입전이인자에 의한 표현형과의 연관관계를 다시 한번 규명해야 하는 단점이 있다 (Chin et al. 1999; Jeong et al. 2002; Zhao et al. 2006; Park et al. 2007). 벼의 경우 최근 T-DNA 및 *Ac/Ds* 삽입 돌연변이 집단을 대량 육성하여 이들 변이체로부터 다양한 유전자의 기능에 관한 연구가 수행되고 있고, 식물에서는 전이인자 삽입집단을 이용한 기능연구에 있어서 형태적 변이체에 관한 연구뿐만 아니라 다양한 생물학적 및 비생물학적 처리에 의한 관련 유전자의 선발 및 기능규명 연구에 대하여 다양하게 이용되고 있다 (Chin et al. 1999; Han et al. 2002; Jeong et al. 2002; Kim et al. 2004; Park et al. 2006; Koh et al. 2007; Park et al. 2007; Park et al. 2008).

식물은 동물과 달리 비생물학적 스트레스에 노출되면 유전자 발현변화, 세포내 대사작용의 변화 및 비정상적인 생육 등 많은 생리적 장애 요인이 발생되어 생산량에 막대한 영향을 초래한다. 따라서 오래 전부터 육종가들은 작물의 생산성을 높이기 위해 다양한 환경스트레스에 내성이 강하고, 잘 적응하는 새로운 작물을 육성하고자 노력하고 있다.

최근 분자생물학 기술이 농업에 적용되면서부터 비생물학적 스트레스에 의해 직·간접적으로 유도되는 많은 유전자의 특성이 규명되고, 이들 유전자의 도입에 의해 비생물학적 스트레스에 저항성 정도가 증가된 형질전환 식물체가 많이 보고 되었다 (Fowler and Thomashow 2002; Seki et al. 2002b; Rabbani et al. 2003). 이러한 연구를 통하여 지금까지 밝혀진 생리적 분자기구는 수분스트레스 하에서 팽압과 세포질내의 농도 (Lichtentaler 1995, Bray 1997), 광합성과 활성

산소의 변화에 따른 세포사멸 (Demming-Adams and Adams 1992, Smirnov 1993, Allen 1995) 등이 알려져 있으며, 이러한 현상은 삼투압의 불균형 (Munns et al. 1986, Niu et al. 1995, Yeo 1998, Glenn et al. 1999, Yun 2005)과 ABA 함량 증가 (Zeevaart et al. 1988, Smirnov 1993) 등이 초래되어 식물이 정상적인 생육을 하지 못한 것으로 보고되고 있으며, 건조, 저온 및 염 스트레스와 함께 해석하고 있다 (Satake et al. 1983, Patterson et al. 1987, Munns et al. 1988, Trejo et al. 1991, Munns et al. 1993, Griffiths et al. 1996).

본 연구는 동진벼의 *Ac/Ds* 삽입변이집단을 이용하여 저온 및 고염 하에서 동진벼와 비교하여 극감수성 및 저항성 개체를 선발하고 FSTs 분석을 통한 유전자를 분리, 구조 및 발현분석을 통해 저항성과의 관계를 규명하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 스크리닝

본 연구에서 공시한 *Ac/Ds* 삽입 변이 벼 계통은 1999년부터 농촌진흥청에서 육성하고 있는 *Ac/Ds* 전이인자를 동진벼 (*japonica*)에 형질전환 하여 얻어진 *Ac/Ds* 삽입변이집단을 이용하였다 (Chin et al. 1999; Han et al. 2002; Kim et al. 2004; Park et al. 2008).

*Ac/Ds* 삽입 변이집단 중 T<sub>2</sub> 세대 30,000 계통을 6립/계통으로 파종하여 고염 및 저온처리에 의해 대조품종인 동진벼와 비교하여 극감수성 및 저항성에 대해 대량 스크리닝을 실시 하였다. 먼저 고염 처리는 종자를 육묘 상에서 발아시킨 후, 온실에서 본엽 3~4 엽기까지 자란 육묘에 3% 천일염으로 21일간 수행하였다. 또한 저온스트레스는 2007년 1월 기온, 오전 -5°C 이하 오후 0°C ~ 7°C에서 7일 동안 방치한 후 28°C에서 3일간 회복시켜 생존여부에 의해 선발하였다. 일차 스크리닝에서 얻어진 계통에 대해서는 세부검정을 위하여 2차 및 3차 재검정을 실험실내에서 20립/계통에 대해 무균적으로 수행하였으며, 저온처리의 경우 4°C 생육상에서 실시 하였다.

### 선발한 변이체의 *Ds* 삽입여부 및 copy 수 확인

고염 및 저온 하에서 선발한 *Ac/Ds* 삽입 계통으로부터 *Ds* 삽입여부 및 부위 해석을 위해 genomic DNA는 'CTAB-method'를 이용하여 추출하여 (Zheng et al. 1995; Collard et al. 2007)

PCR 분석 및 Southern blot을 실시하였다. *Ds* 삽입여부 확인을 위한 PCR primers는 AC1543a 5'-TTCTTGGTGAAATGCTGCCATAC-3', AC1031 5'-ATAAGATTGGCCAAGTTGATGTC-3'를 사용하였고 (Park et al. 2006), PCR을 위한 온도조건은 95°C에서 3분간 변성 후 94°C 30초, 51°C 30초, 72°C 1분으로 30 cycles, 마지막으로 72°C에서 7분으로 수행하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 증폭산물을 확인하였다. Southern 분석은 전이집단 작성 시 사용된 *GUS* ( $\beta$ -glucuronidase) probe를 사용하여 20 mg DNA를 probe내에 제한효소 사이트가 없는 *EcoRI*로 처리하고, 37°C에서 4시간 동안 처리한 후 분석하였다 (Park et al. 2006).

선발 *Ds* 삽입 변이체통의 knock-out 유전자의 염기서열 결정

고염 및 저온 하에서 선발한 *Ac/Ds* 삽입 계통으로부터 Han (2002) 및 Kim 등 (2002, 2004)이 보고한 방법에 의해 *RsaI*의 제한효소를 이용하여 adaptor를 부착하고 염기서열을 결정하는 adaptor-PCR 방법을 통해 FSTs 분석을 수행하였다. FSTs에 의해 얻어진 염기서열 정보는 Gramene (<http://www.gramene.org/>)을 통하여 벼 전체 염기서열 정보와 상동성 비교에 의

하여 염색체 위치와 knock-out 유무를 분석하였으며, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 기존의 보고된 유전자와 비교 분석하였다.

비생물학적 스트레스 처리에 따른 유전자 발현 분석

고염 및 저온 하에서 선발한 20개의 유전자는 다른 비생물학적 스트레스에서 반응을 알아보기 위해 스트레스 처리 후, 얻어진 조직에서 유전자의 발현 양상을 RT-PCR 분석에 의해 조사하였다. 스트레스의 종류는 100  $\mu$ M Indole-3-acetic acid (IAA), 100  $\mu$ M ABA, drought, osmotic (15% polyethylene glycol (PEG) 6000, 15% PEG6000 + 250 mM NaCl), 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 250 mM NaCl, 0.1 mg/L 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 4°C cold 및 38°C 고온으로 하였다. 처리방법은 종자 발아 후, 14일된 육묘를 이용하여 Yosida 양액 (Yosida et al. 1976)에서 25°C, 상대습도 70~75% 조건의 성장상에서 처리하여 시간대별로 식물 조직의 잎과 뿌리를 채취하였다. Total RNA 추출과 RT-PCR 분석은 easy-spin plant RNA extraction kit과 one-step RT-PCR kit (iNtRON Biotechnology, Korea)를 각각 사용하여 이와 함께 제공된 실험방법에 따라 수행하였다. 각각의 유전자 특이적으로 증폭할 수 있는

Table 1 List of some tagged genes and their description in *Ds* insertional lines

Locus No.	Chromosome no.	Gene Description
LOC_Os01g04380	1	16.9 kDa class I heat shock protein, putative, expressed
LOC_Os04g32200	4	hypothetical protein
LOC_Os03g20880	2	Pyruvate kinase, cytosolic isozyme
LOC_Os08g38400	8	Oligopeptide transporter 5, putative, expressed
LOC_Os03g03720	3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B, chloroplast precursor, putative, expressed
LOC_Os09g38000	9	no apical meristem family protein
LOC_Os03g47870	3	retrotransposon protein, putative, unclassified
LOC_Os03g21230	3	protein kinase, putative, expres
LOC_Os03g22400	3	Ulp1 protease family, C-terminal catalytic domain containing protein, expressed
LOC_Os09g09570	9	expressed protein
LOC_Os03g25650	3	F-box domain containing protein
LOC_Os03g21260	3	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase, putative
LOC_Os08g04590	8	csAtPR5, putative
LOC_Os03g57900	3	Intergenic region, AN1-like Zinc finger family protein, promoter part of expressed
LOC_Os09g39190	9	Copine family protein, expressed
LOC_Os12g10170	12	caffeic acid 3-O-methyltransferase, putative, expressed
LOC_Os03g62410	3	Phospholipase D gamma 3, putative, expressed
LOC_Os03g02939	3	cationic peroxidase 2 precursor, putative, expressed
LOC_Os10g03440	10	U-box domain containing protein 3'

primer들은 유전자의 3'-UTR부위 중심으로 primer 3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi))를 이용하여 GC 함량 비율 등을 고려하여 선정하였으며, 염기서열은 Table 2와 같다. RT-PCR의 반응 조건은 45°C에서 30분, 94°C에서 5분간 역 전사반응을 하고, 94°C에서 20초, 58°C에서 40초, 72°C에서 1분의 단계로 40회 반복하여 실시하고, 72°C에서 5분간 최종 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동 하여 발현 정도를 확인하였다.

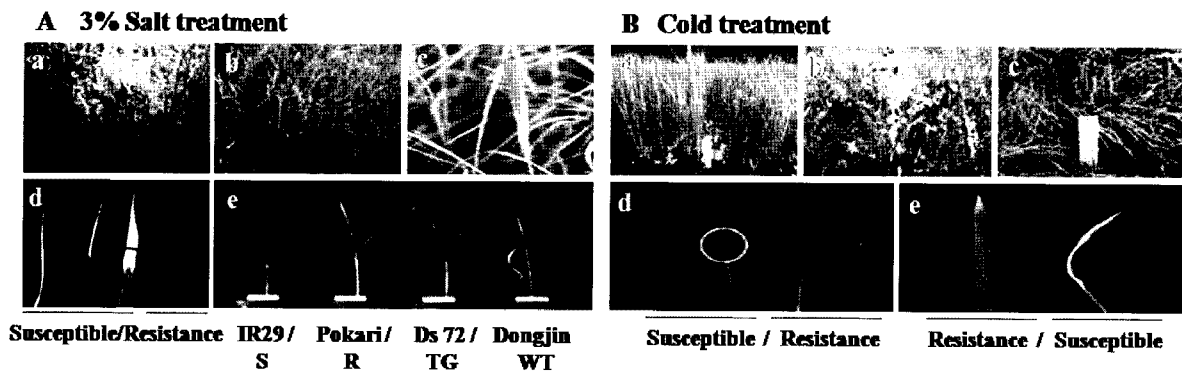
**Table 2** Primers used analysis of gene expression

Primer name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Size (bp)
Oshsp66314	AACGTGTTGACCCCTTCT	ATCTCAATGGCCTTACACCTC	422
Oshpp66335	CACTCCAAGGAATTCATCGAC	CAATTGTA AACACG CCAA AAA	356
OsPKci67553	TTCCTGGGGTTATTGTGGAT	CAAATATTGCCATGGTCTG	517
OsOPT67965	ACCGAAGAGGAGGTAGACGA	GCCACCACATGTAAGGTGAG	514
OsGAPA68806	CTGATCAAGGTCGTCTCCAA	GTGTTGATCACCAGGTCCAC	536
OsNAM69751	AGAAATCGTTCCTTGCCGAGT	ATCCAGGAGTCGTCCTTGTC	526
OsRetp70346	GGGCTGCGGTATAAAATCAT	CAATGAAACCATTTGCCAAG	513
OsPK71472	GTTATGCAGCTTGAGGACGA	ACGCTGATGAGCACAGAAAG	525
OsUlp73434	TAAACCTAGGCACGACGATG	CTCTTGCCTCTCTCCTTCA	548
OsEP73528	GCACAGAGACCTCCTTCTCC	TTTCTGCTGAAGAACCGAAC	503
OsFbox73945	ACTTGGCAGGCATCTAAGGT	CAAGCTGACGGATTGAGATG	526
OsiPGM62183	GTGATGTGTTGGACGGTAGC	ATTCGCCAGACGTTCTCTCT	525
OscsAtPR62487	CTAGCTGTGCCGCTCTTATG	CAGTACCGAGTTGGCAGAAA	513
OsZnfp62621	CGTCGATGAAGCGGAAGT	CTTGGCGATCTGCTCCTT	461
Oscop62845	CTGCAGTTGTTGAGCCTAA	TCAGCATCGATCATCCATT	522
OsOMT63052	GGAGACATGCGTGGAACATA	CTGCTTATTGAACTCAAGAGCATAG	373
OsPLD63772	AGCAGCAGGTAGTGGGAAC	TGGGAACCCCTTACAGAAC	506
OsCPO64646	TACGGGTACAACCTCCAGCAC	CATTGAATTTTGGCCGTTG	469
OsUbx72190	ATCATCGAGGTGTTGGTGAA	TGCAGTGAGCTCCTCCTCTA	541

**결과 및 고찰**

**Ac/Ds 삽입변이체 집단으로부터 고염 및 저온감수성 식물체 선발**

동진벼 유래 *Ac/Ds* 삽입변이체 계통 T<sub>2</sub>세대의 계통들에서 임의로 약 15,000립씩을 선정하여 고염 및 저온 스트레스를 주어 감수성과 내성을 가진 개체를 선발하였다 (Fig. 1 a,



**Figure 1.** Appearance of *Ac/Ds* transgenic plants and wild-type plants after abiotic stresses in rice. A, Growth performance of transgenic in soil containing 3% NaCl for 21 days (a,b). Selection of salt-tolerant transgenic rice (c,d). Representative plants recovered for 3 days after salt stress (3% NaCl for 21 days) are shown (e). B, Cold stress response in winter conditions outdoors for 7days (a,b). Selection of cold-tolerant transgenic rice (c,d and e). Representative plants recovered for 2 days after cold stress (4°C cold for 21 days) are shown (d).

b). 먼저, 3% NaCl 농도에서 21일간 처리하여 생육 및 잎색의 변화유무가 대조구에 비해 극감수성을 보인 계통과 건전하다고 판단되는 식물체는 총 134계통을 1차 선발하였다 (Fig. 1A). 저온의 경우 동진벼에 비해 저온에 민감하게 반응한 식물체와 시들지 않고 잎의 변색되지 않은 식물체는 총 78계통을 1차 선발하였다 (Fig. 1B).

온실 및 실외에서 스크리닝하여 얻어진 1차 선발 계통을 대상으로 계통당 20립씩 개체별로 나누어서 가내에서 2차 검정 및 3차 검정을 통하여 고염 및 저온 관련 감수성 변이체를 각각 11계통, 8계통을 최종적으로 선발하였다.

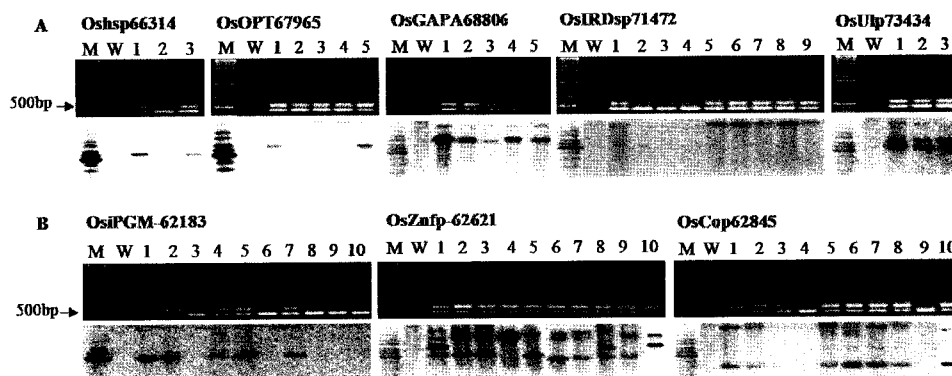
일반적으로 식물체가 고염 및 저온에 노출되면 저항성 및 감수성의 효과를 생육상태 및 잎 색에 의해 쉽게 구분 될 수 있고, 고염 스트레스에선 잎 끝 부위에서 방어기작으로 보이는 현상이 나타난다는 보고와 일치하였다 (Hoshida et al. 2000; Gaxiola et al. 2001; Luo et al. 2006; Kim et al. 2007). 본 실험에서 얻어진 감수성은 염 처리 1시간 후 잎이 심하게 말려 회복하지 못하고 시들은 것과 시일이 경과할수록 잎 끝부분에서 서서히 갈변되는 개체를 선발하였다. 저온 스트레스에선 식물체가 4°C에서 8일간 방치 후 28°C에서 정상으로 회복하지 않은 개체를 감수성으로 선발하였다 (Watada et al. 1966; Wright et al. 1973; Bagnall et al. 1978; Couey 1982). 저항성 개체에서도 고염과 저온 상해를 입은 야생형 동진벼가 시들고 잎색이 갈색으로 변하면서 고사한 것에 비해 시들지 않고, 잎의 변색도 없었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 1 c-e).

**Ds 삽입여부 확인 및 copy수 분석**

고염에서 선발된 11 계통 및 저온에서 선발된 8계통 등

총 19계통의 *Ac/Ds* 삽입 변이체를 *Ds* 전이인자가 homo화된 식물체를 얻기 위하여 한 세대 진전 시켰으며, 세대 진전 과정에서 개체 별로 *Ds* 삽입여부 및 copy 수를 분석하였다. Total DNA를 추출한 후, *Ac/Ds* 특이적으로 증폭 할 수 있는 primers를 이용하여 개체별 PCR 분석을 한 결과 계통 내에서 개체별로 500 bp 이상에서 검출되는 *Ds* 밴드로 *Ds* 삽입 유무를 알 수 있었고, 400 bp 크기에서 검출되는 *Ac* 인자와 비교하여 볼 때 세대진전 과정 중 *Ac*와 *Ds*가 서로 독립적으로 유전하는 양상을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 또한 reporter 유전자인 *GUS* 유전자를 probe로 사용하여 Southern 분석을 수행한 결과, *Ds* 전이인자가 single copy로 도입된 계통의 수는 6 계통이었으며, 2 copy 이상으로 판명된 계통수는 13 계통이었다.

본 실험에서 이들 유전자를 대상으로 FSTs 분석을 수행하여 *Ds* 삽입 부분의 유전자의 기능을 살펴 본 결과는 Table 1과 같다. 염기서열 정보를 이용하여 벼 전체 염기서열 정보와 상동성 비교분석 결과 세포의 신호전달 과정과 조절에 관여하는 유전자 그룹인 transpoter, protease family protein and apical meristem family protein (Lee et al. 2000; Chen et al. 2006; Wong et al. 2008), 삼투압조절에 관여하는 유전자 그룹인 heat shock protein (*Oshsp*), O-methyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*OsGAPA*) and drought stress induce protein (Vernon and Bohnert 1992; Tsunozuka et al. 2005.), 그리고 식물의 소포유동에 관여하는 유전자 SYP 5 family protein 으로 구분할 수 있었다 (Anton et al. 2001; Robatzek 2007), (Fig. 3 and Table 1). 따라서 이들 유전자들이 *Ds*에 의해 유전자의 기능이 상실 되어 염 및 저온에 극감수성을 보이는 것으로 생각되어진다.



**Figure 2.** PCR and Southern blot analysis of *Ds* transposition in *Ac/Ds* insertional lines. A, Analysis of transgenic under 3% salt treatment. B, Analysis of transgenic under 4°C cold treatment. Genomic DNA (5 µg) was digested with *EcoRI*, fractionated on 1.2% agarose gel, and hybridized with *GUS* gene sequence as probe.



**Figure 3.** The genomic structures of selected knock-out gene and *Ds* donor sites. The gene structure was confirmed at Gramene DB (<http://www.gramene.org>) and the arrow is transcription direction. The gene locus consists of transcription unit with exons and introns, respectively.

### RT-PCR 분석에 의한 선발 유전자별 발현 분석

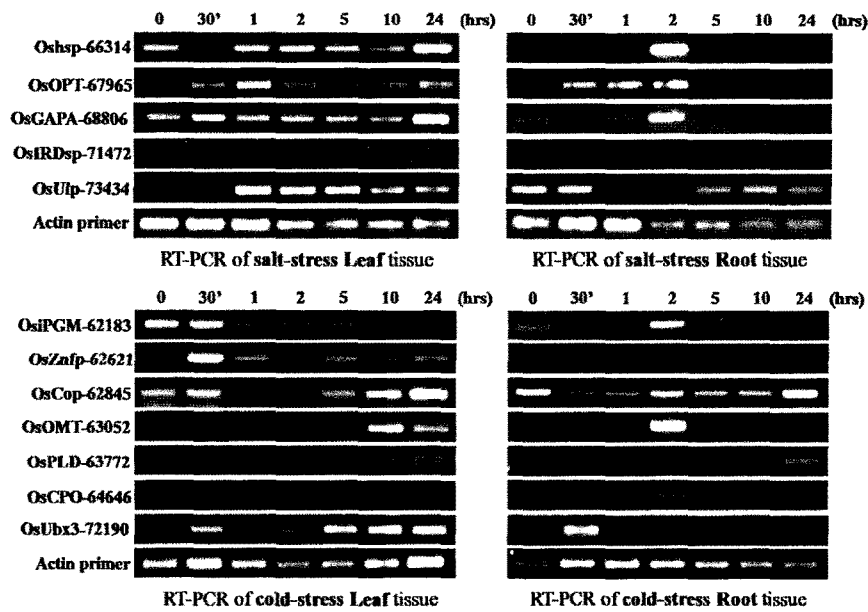
RT-PCR 분석은 고염 및 저온 하에서 선발된 감수성 *Ac/Ds* 삽입 변이체 19계통을 FSTs 분석에 의해 삽입 유전자 동정 및 염기배열 분석을 통해 RT-PCR를 위한 primer를 작성하여 예비로 수행한 RT-PCR의 증폭산물에 대해 염기서열 분석을 수행한 결과 동일 유전자로 밝혀짐에 따라 이를 이용하여 유전자들의 발현 패턴을 조사하였다. 동진비에 250 mM NaCl과 4°C 저온 처리 후 시간 경과에 따른 유전자의 발현 패턴을 조사한 결과 고염에서 선발한 11계통중에서 5계통의 유전자, 저온에서 선발한 8계통 중 7계통의 유전자에서 잎과 뿌리의 발현이 각각 다르게 나타났다 (Fig. 4).

염 및 저온 스트레스 하에서 선발한 유전자들의 발현은 잎 보다 뿌리 조직에서 매우 민감한 반응을 보였다. 뿌리 조직에서 발현 양상을 살펴보면 *Oshsp* 및 *OsOPT* 유전자는 뿌리에서 염처리 후 30분에 발현되기 시작하여 처리 2시간 후에 최대의 발현양을 보였으며 그 후, 경시적으로 감소하면서 24시간까지 지속되었다. 또한 *OsGAPA* 유전자의 경우 염을 처리한 후, 2시간째 발현양이 최대가 되었다가 그 이후에 발현양이 급격히 감소하면서 24시간 후에는 발현하지 않았다. 따라서 *Oshsp* 및 *OsOPT* 유전자는 염에 스트레스를 받았

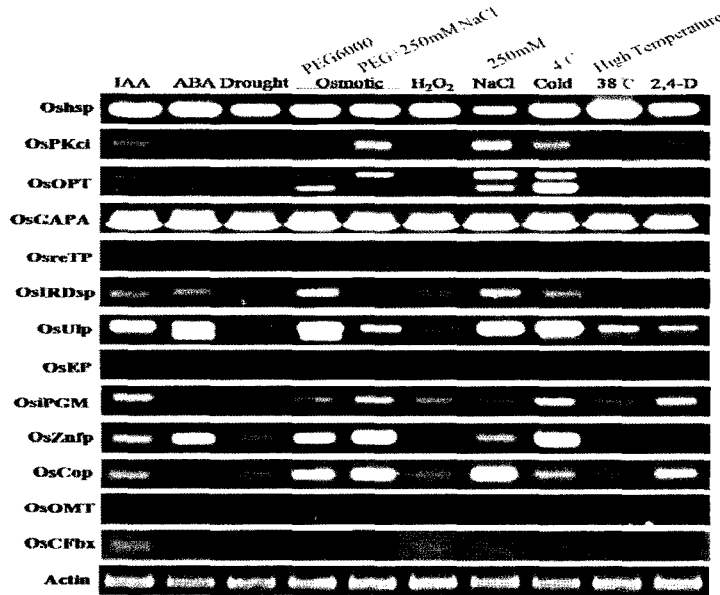
을 경우, 짧은 시간에 염에 응답반응을 보이는 유전자로 생각된다. 이런 결과는 Ouyang 등 (Ouyang et al. 2007)이 보고한 결과와 유사하며, 이들 유전자가 knock-out 상태에서 응답 반응을 일으킬 때 저항능력을 갖는 경우도 있다고 보고되고 있다 (Xiong et al. 2002). 저온 처리시 caffeic acid 3-O-methyltransferase (*OsOMT*) 유전자의 경우 잎 조직에서 처리 후, 10시간부터 발현되기 시작하였으며, 뿌리에서는 처리 2시간 후부터 발현되었다. RT-PCR 결과로부터 선발된 *Ds* 삽입 변이체 유래 유전자들은 고염 및 저온스트레스의 응답 반응에 관여하며, 스트레스를 받은 후 경시적으로 발현 패턴의 변이를 보였다.

### 선발 유전자들의 비생물학적 스트레스 하에서 발현 분석

고염 및 저온 저항성 관련 *Ds* 삽입 변이체 유래 선발 유전자들의 여러 가지 비생물학적 처리시 발현 패턴을 분석하였다 (Fig. 5). 비생물학적 스트레스 IAA, ABA, drought, osmotic (15% PEG6000, 15% PEG6000 + 250 mM NaCl), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2,4-D, 38°C 고온 등 총 8 종류의 처리구에서 발현 패턴은 고염, 건조, 삼투압 등 수분관련 스트레스 시 발현 정도가 높게 나타났던 유전자들이 ABA 처리구에서 더 높게 발현되었



**Figure 4.** Expression pattern of various genes in rice leaves under 3% NaCl and 4°C cold stress respectively. Total RNA was isolated at 0, 6, 18, 24, 48 h (salt) and 0, 8, 24, 48 h (cold) after exposure to stresses. All PCR cycles in RT-PCR assay are 30. The actin gene *Os10g36650* was used to control for the loading amount of RNA templates used in RT-PCR assay.



**Figure 5.** Expression pattern of various genes in rice leaves under abiotic stress of 9 class (salt, osmotic, drought, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100 μM ABA, 100 μM IAA, 0.1 ppm 2,4-D, 4°C cold, 38°C hightemperature), respectively. Total RNA was isolated at 2 h after exposure to stresses.

다. 이는 식물이 수분관련 스트레스로 인해 ABA가 잎으로 이동하여 그 농도가 증가한다 (Zeevaart et al. 1988; Smirnov 1993)는 보고와 건조 및 고염 등의 스트레스에 ABA가 관여한다 (Munns et al. 1988; Trejo et al. 1991; Munns et al. 1993; Griffiths et al. 1996)는 보고와 일치하였다. 또한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 식물의 산화적 스트레스를 주었을 때 식물체는 염색질의 응축, 핵의 응축, 세포의 축소, apoptosis 상태인 세포가

유전자에 의해 제어되어 죽는 것 등이 일어난다 (Patel et al. 1996; Shin et al. 2006). 지속적이 아닌 2시간 정도 처리의 산화적 스트레스는 식물이 저온스트레스 받았을 때 나타나는 현상과 유사하다고 판단하여 고온 스트레스와 함께 처리하여 발현 패턴을 분석한 결과 기타 호르몬 처리구에서와 같이 주목할만한 유사성이 없다고 판단되었다. 따라서 본 연구에서는 벼의 *Ac/Ds* 삽입 변이체로부터 대량 스크리닝을

통해 얻어진 유전자 중 *OsHSP*, *OsOPT*, *OsGAPA*, *OsIRDsp*, *OsUlp*는 고염 스트레스에 관여하는 유전자이고, *OsIPGM*, *OsZnfp*는 저온스트레스에 관여하는 유전자로 추정 되어진다. 마지막으로, 저온스트레스 조건에서 선발된 유전자인 *OsCop*는 다른 비생물학적 스트레스 처리 시 고염과 삼투압 스트레스 시 발현된 것으로 보아 osmotic stress에 관여하는 유전자라고 생각되며, 좀더 많은 기능연구가 필요할 것으로 생각된다. 이들 결과로부터 비생물학적 스트레스의 응답 반응계에 관여하는 유전자들의 발현 패턴은 다양한 변화를 보여 *Ds*에 의해 knock-out 변이체의 염 및 저온 감수성을 이해 하는데 많은 어려움이 있다. 다만 본 연구에서 수행된 유전자 자가 적어도 유전자 발현 시 다양한 비생물학적 스트레스에 대응하여 발현 패턴의 변화가 나타났으므로 이들 유전자를 과발현 시킨 형질전환체의 분석을 통해 보다 정확한 특성 파악이 이루어져야 할 것으로 판단된다 (Patterson et al. 1987; Munns et al. 1988; Smirnov 1993; Griffiths et al. 1996; Bray 2004; Yun 2005.).

## 적 요

식물에서 전이인자를 이용한 삽입 변이체의 유전자 기능 분석 연구가 최근 가장 활발하게 이루어지고 있다. 본 연구에서는 동진벼의 *Ac/Ds* 삽입 변이체인 F2 세대 30,000 계통을 이용하여 고염과 저온에 민감한 계통과 내성이 있는 계통을 대량 스크리닝을 통해 선발하였다. 첫 번째 스크리닝에서 선발한 212 계통을 Southern blot 분석을 통해 *Ds*의 삽입 여부 및 copy 수를 확인하고 표현형과 비교하여 고염과 저온에서 총 19 계통을 선발하였고, 이 중 copy 수가 하나인 계통은 13 계통이었다. 선발한 계통을 FSTs 분석을 통해 *Ds*의 삽입위치 및 knock-out 유전자를 확인하고 염기서열 정보를 이용하여 벼 전체 염기서열 정보와 상동성 비교분석 결과 세포의 신호전달 과정과 조절 관여하는 유전자 그룹인 transpoter, protease family protein and apical meristem family protein, 삼투압조절에 관여하는 유전자 그룹인 heat shock protein, O-methyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and drought stress induce protein 그리고 식물의 소포유통 (vesicle trafficking)에 관여하는 유전자 SYP 5 family protein로 구분할 수 있었다. 선발된 19개 유전자의 발현 분석을 위해 9종류 비생물학적 스트레스 하에서 RT-PCR을 수행한 결과 이들 knock-out 유전자는 비생물학적 스트레스에 각각 다

른 발현 패턴을 보였다. 이 연구의 결과는 삽입 변이체를 통한 유전자의 기능분석에 있어서 비생물학적인 스트레스의 응답 반응계에 관여하는 유전자를 연구하는데 유용할 것이라고 생각된다.

## 사 사

본 연구는 농업생명공학연구원 (NIAB-1010) 및 작물 기능유전체 사업단 (CG171)의 지원에 의해서 수행된 과제임.

## 인용문헌

- Allen RD (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol* 107: 1049-1054
- Anton AS, Valya K, Diane CB, Natasha VR (2001) Interactions between Syntaxins Identify at Least Five SNARE Complexes within the Golgi/Prevacuolar System of the Arabidopsis Cell. *Mol Biol Cell* 2001 12: 3733-3743
- Bagnall DJ, Wolfe JA (1978) Chilling sensitivity in plants. Do activation energies of growth processes show an abrupt change at a critical temperature? *J Exp Bot* 29: 1231
- Bray EA (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci* 2: 48-54
- Bray EA (2004) Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 55(407): 2331-2341
- Bevan M, and Walsh S. (2005). "The Arabidopsis genome: a foundation for plant research." *Genome Res*, 15(12): 1632-42
- Chen CW, Yang YW, Lur HS, Tsai TG, Chang MC (2006) A novel function of abscisic acid in the regulation of rice (*Oryza sativa* L.) root growth and development. *Plant Cell Physiol* 47: 1-13
- Chin HG, Choe MS, Lee SH, Park SH, Park SH, Koo JC, Kim NY, Lee JJ, Oh BG, Yi GH, Kim SC, Choi HC, Cho MJ, Han CD (1999) Molecular analysis of rice plants harboring an *Ac/Ds* transposable element-mediated gene trapping system. *The plant journal* 19: 615-623
- Collard BCY, Das A, Virk PS, Mackill DJ (2007) Evaluation of \_quick and dirty\_ DNA extraction methods for marker-assisted selection in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Breeding* 126: 47-50
- Couey HM (1982) Chilling injury in crops of tropical origin. *Hortiscience* 17: 162
- Demming-Adams B, Adams WWIII (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 599-626



- Fowler, S. and Thomashow, MF (2002) Arabidopsis transcriptome-profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell* 14: 1675-1690
- Frankel W, Potter TA, Rosenberg N, Lenz J, Rajan TV (1985) Retroviral insertional mutagenesis of a target allele in a heterozygous murine cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 6600-6604
- Gaxiola RA, Li J, Undurrag S, Dang LM, Allen GJ, Alper SL, Fink GR (2001) Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H1-pump. *PNAS* 98: 11444-11449
- Gierl A, Saedler H (1992) Plant-transposable elements and gene tagging. *Plant Mol Biol* 19: 39-49
- Glenn EP, Brown JJ, Blumwald E (1999) Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Crit Rev Plant Sci* 18: 227-255
- Griffiths A, Bray EA (1996) Shoot induction of ABA-requiring genes in response to soil drying. *J Exp Bot* 47: 1525-1531
- Han CD (2002) Rice functional genomics by transposon mutagenesis. *Asia Pacific Biotech News* 6: 930-935
- Hayashi H, Czaja I, Lubenow H, Schell J, Walden, R (1992) Phytohormone-independent division of tobacco protoplast-derived cells. *Science* 258: 1350-3
- Hoshida H, Tanaka Y, Hibino T, Hayash Y, Tanaka A, Takabe T, Takabe T (2000) Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. *Plant Molecular Biology* 43: 103-111
- Jeong DH, An SY, Kang HG, Moon SO, Han JJ, Park SH, Lee HS, An KS, An GH (2002) T-DNA Insertional Mutagenesis for Activation Tagging in Rice. *Plant Physiol* 130: 1636-1644
- Kim CM, Park SH, Je BI, Park SH, Park SJ, Piao HL, Eun MY, Dolan L, Han CD (2007) OsCSLD1, a cellulose synthase-like D1 gene, is required for root hair morphogenesis in rice. *Plant Physiology* 143: 1220-1230
- Kim CM, Piao HL, Park SJ, Chon NS, Je BI, Sun B, Park SH, Park JY, Lee EJ, Kim MJ, Chung WS, Lee KH, Lee YS, Lee JJ, Won YJ, Yi GH, Nam MH, Cha TS, Yun DW, Eun MY, Han CD (2004) Rapid, large-scale generation of *Ds* transposant lines and analysis of the *Ds* insertion sites in rice. *Plant J* 39: 252-263
- Kim SH, Kim JY, Kim SJ, An KS, An GH, Kim SR (2007) Isolation of cold stress-responsive genes in the reproductive organs, and characterization of the OsLti6b gene from rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Cell Rep* 26: 1097-1110
- Koh SR, Lee SC, Kim MK, Koh JH, Lee SC, An GH, Choe SH, Kim SR (2007) T-DNA tagged knockout mutation of rice OsGSK1, an orthologue of Arabidopsis BIN2, with enhanced tolerance to various abiotic stresses. *Plant Mol Biol* 65: 453-466
- Lichtentaler HK (1995) Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J Plant Physiol* 148: 4-14
- Liming Xiong, Karen SS, Zhu JK (2002) Cell Signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14: 165-183
- Lee SJ, Winfried B, Jean-Pierre B, Jacqueline P (2000) Signal transduction between a membrane-bound transporter, PtsG, and a soluble transcription factor, Mlc, of *Escherichia coli*. *EMBO J* 18: 5353-5361
- Luo M, Gu SH, Zhao SH, Zhang F, Wu NH (2006) Rice GTPase OsRacB: Potential accessory factor in plant salt-stress signaling. *Acta Biochemica et Biophysica Sinica* 38: 393-402
- Lyons JM (1973) Chilling injury in plants. *Annu Rev Plant Physiol* 24: 445-466
- Markandeya G, Babu PR, Reddy L VB, Alex F F, Andrew HP, Arjula RR (2005) Functional genomics of drought stress response in rice: Transcript mapping of annotated unigenes of an *indica* rice (*Oryza sativa* L. cv. Nagina 22). *Current science* 89: 3-10
- Meagher RB (2002) Post-genomics networking of biotechnology for interpreting gene function. *Curr Opin Plant Biol* 5: 135-140
- Michael B, Sean W (2005) The *Arabidopsis* genome: A foundation for plant Research, 15, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 1632-1642
- Munns R, Termat A (1986) Whole-plant responses to salinity. *Aust J Plant Physiol* 13: 143-160
- Munns R, King RW (1988) Abscisic acid is not the only stomatal inhibitor in the transpiration stream of wheat plants. *Plant Physiol* 88: 703-708
- Munns R, Passioura JB, Milborrow BV, James RA, Close TJ (1993) Stored xylem sap from wheat and barley in drying soil contains a transpiration inhibitor with a large molecular size. *Plant Cell Environ* 16: 867-872
- Niu X, Bressan RA, Hasehawa PM, Pardo JM (1995) Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol* 109: 735-742
- Ouyang S, Zhu W, Hamilton J, Lin H, Campbell M, Childs K, Françoise TN, Renae LM, Lee YD, Zheng L, Orvis J, Haas B, Wortman J, Buell CR (2007) The TIGR Rice Genome Annotation Resource: improvements and new features. *Nucleic Acids Research* 35: 883-887
- Park SA, Jung YJ, Ahn BO, Yun DW, Ji HS, Park YH, Yoon UH, Suh SC, Lee SY, Lee MC (2008) Characterization of *Oszinc626*, knock-out in zinc finger RING-H2 protein gene, in *Ac/Ds* mutant lines of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant biotechnology* 37: 186-189
- Park SJ, Piao HL, Xuan YH, Park SH, Je BI, Kim CM, Lee EJ, Park SH, Ryu BC, Lee KH, Lee GH, Nam MH, Yeo US, Lee MC, Yun DW, Eun MY, Han CD (2006) Analysis of intragenic *Ds* transpositions and excision events

- generation novel allelic variation in rice. *Mol Cells* 21: 284-293
- Park SH, Jun NS, Kim CM, Oh TY, Huang J, Xuan YH, Park SJ, Je BI, Piao HL, Park SH, Cha YS, Ahn BO, Ji HS, Lee MC, Shu SC, Nam MH, Eun MY, Yi GH, Yun DW, Han CD (2007) Analysis of gene-trap Ds rice populations in Korea. *Plant Mol Biol* 65: 373-384
- Patel T, Gores GJ, Kaufmann SH (1996) The role of proteases during apoptosis. *FASEB J* 10: 587-597
- Patterson BD, Mutton L, Paull RE, Nguyen VQ (1987) Tomato pollen development: stages sensitive to chilling and a natural environment for the selection of resistant genotypes. *Plant Cell Environ* 10: 363-368
- Rabbani S, Szyf M, Pakneshan P (2003) DNA demethylation and cancer: therapeutic implications. *Cancer Letters* 211: 133-143
- Rensink WA, Robin BC (2004) Arabidopsis to Rice. Applying Knowledge from a Weed to Enhance Our Understanding of a Crop Species. *Plant Physiology* 135: 622-629
- Richard BM (2002) Post-genomics networking of biotechnology for interpreting gene function. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 135-140
- Robatzek S (2007) Vesicle trafficking in plant immune responses. *Cellular Microbiology* 9: 1-8
- Satake T, Koike S (1983) Sterility caused by cooling treatment at the flowering stage in rice plants. *Jpn J Crop Sci* 52: 207-368
- Seki T (2002) Hippocampal adult neurogenesis occurs in a microenvironment provided by PSA-NCAM-expressing immature neurons. *J Neurosci Res* 69: 772-83
- Shin SH, Kim DS, Kim MJ, Kim SH, Jo SK, Byun MW, Yee ST (2006) Protective effect of a Herbal composition (HemoHIM) against apoptosis induced by oxidative stress of hydrogen peroxide. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 1127-1132
- Sheng W, Niharika N, Audrey M, Srikumar C (1999) Regulation of Rb and E2F by signal transduction cascades: divergent effects of JNK1 and p38 kinases. *EMBO J* 18: 1559-1570
- Smirnov N (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol* 125: 27-58
- Takayama KM, Inouye M (1990) Antisense RNA. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 25: 155-184
- Tiehan Z, Margaret P, Peter L, Manoj P, Andreas G, Paul SL, Thomas K (2006) Mapped Ds/T-DNA launch pads for functional genomics in barley. *The Plant Journal* 47: 811-826
- Trejo CL, Davies WJ (1991) Drought-induced closure of *Phaseolus vulgaris* L. stomata precedes leaf water deficit and any increase in xylem ABA concentration. *J Exp Bot* 42: 1507-1515
- Tsunezuka H, Masayuki F, Tsutomu K, Ko S (2005) Proteome analysis of programmed cell death and defense signaling using the rice lesion mimic mutant *cdr2*. *MPMI* 18: 52-59
- Vernon DM, Bohnert HJ (1992) A novel methyl transferase induced by osmotic stress in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *EMBO J* 11: 2077-2085
- Wang CY (1990) Chilling injury of horticultural crops. Boca Raton FL: CRC313
- Watada AE, Morris LI (1966) Effect of chilling and non-chilling temperatures on snap bean fruits. *Proc Am Soc Hortic Sci* 9: 368
- Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL (1996) Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 13: 19-50
- Wong CE, Prem LB, Harald O, Mohan BS (2008) Transcriptional profiling of the pea shoot apical meristem reveals processes underlying its function and maintenance. *BMC Plant Biol* 8: 73
- Wright M, Simon EW (1973) Chilling injury in cucumber leaves. *J Exp Bot* 24: 400
- Yeo AR (1998) Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J Exp Bot* 49: 915-929
- Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez KA. (1976) Laboratory manual for physiological studies of rice (3eds) Philippines: IRRI. 83
- Yun DJ (2005) Molecular mechanism of plant adaptation to high salinity. *Korean J Plant Biotechnol* 32: 1-14
- Zeevaert JAD, Creelman RA (1988) Metabolism and physiology of abscisic acids. *Annu Rev Plant Physiol* 39: 439-473
- Zhao T, Palotta M, Langridge P, Prasad M, A Graner A, Paul SL, Koprek T, (2006) Mapped Ds/T-DNA launch pads for functional genomics in barley. *The Plant Journal* 47: 811-826
- Zheng K, Huang N, Bennett J, Khush GS. (1995) PCR-based marker assisted selection in rice breeding. IRRI Discussion Paper Series No. 12. International Rice Research Institute, Manila, Philippines
- Xiong L, Karen SS, Zhu JK (2002) Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. *The Plant Cell* 14: 165-183