

T-DNA 돌연변이를 이용한 벼 기능 유전체 연구

류학승 · 류나연 · 정기홍 · 안진흥 · 전종성

Rice functional genomics using T-DNA mutants

Hak-Seung Ryu · Nayeon Ryoo · Ki-Hong Jung · Gynheung An · Jong-Seong Jeon

Received: 30 March 2010 / Accepted: 10 April 2010

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Rice (*Oryza sativa*) is a major cereal crop that has been developed as a monocot model species. In past decades rice researchers have established valuable resources for functional genomics in rice, such as complete genome sequencing, high-density genetic maps, a full length cDNA database, genome-wide transcriptome data, and a large number of mutants. Of these, rice mutant lines are very important to definitively determine functions of genes associated with valuable agronomic traits. In this review we summarize the progress of functional genomics approaches in rice using T-DNA mutants.

Keywords Activation tagging, Entrapment tagging, Forward genetics, Functional Genomics, Reverse genetics, Rice, T-DNA

서 론

벼는 전체 염기서열 분석의 완료 및 28,000개 이상의 완전장 cDNA (full-length cDNA) 데이터 베이스의 구축 등

체계적인 분자유전학적 자원이 확보되고 (Harushima et al. 1998; Sakata et al. 2000; Yuan et al. 2000; McCouch et al. 2002; Wu et al. 2002; Yu et al. 2002; Kikuchi et al. 2003; IRGSP 2005), 유전자 기능분석을 위한 형질전환 방법이 확립되었으며 (Hiei et al. 1994; Jeon et al. 2000; Tyagi and Mohanty 2000), 게놈 크기 (380-430 Mb)가 비교적 작아 연구하기 용이하며 (Arumuganathan and Earle 1991), 경제적으로 중요한 작물이기 때문에 단자엽 모델식물로 활용되고 있다 (David 1991). 쌍자엽 모델식물로 알려진 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)에서 규명된 유전자들의 기능정보가 벼 등 작물에서 그대로 적용되지 않는 경우가 다수 보고 되었다. 예로서 *LEAFY (LFY)* 유전자의 경우 애기장대에서는 화아 형성 유전자의 발현조절에 관여하지만, 벼 상동 유전자는 이삭 가지 형성에 관여하는 것으로 밝혀졌다 (Kyozuka et al. 1998). 특히 벼와 보리, 밀, 옥수수 등 곡류는 서로간에 염기서열 유사성이 높아, 상동 유전자들의 기능이 진화적으로 보존될 가능성이 높다 (Gale and Devos 1998). 그러므로 벼 유전자들의 기능을 밝히는 것은 주요 작물에서 응용 가치가 높다.

현재까지 벼 구조 유전체 (structural genomics) 분야의 비약적인 성과에도 불구하고, 대다수 벼 유전자들의 정확한 기능은 밝혀지지 않아 기능 유전체 (functional genomics) 분야의 연구는 여전히 미진하다. 유전자의 기능을 해독하기 위한 방법으로 발달 단계 및 기관 부위 별로 발현 양상이나 다양한 환경에 대한 유전자의 발현을 분석하여 기능을 유추하는 방법이 있다. 최근에 DNA 칩(chip)을 이용한 게놈 규모 유전자 발현을 분석하는 방법이 활용되고 있다 (Brenner et al. 2000; Jeon and Kim 2003). 더 직접적인 방법으로 특정 유전자의 발현이 변화된 돌연변이를 제작하여 다양한 분석을 통하여 해당 유전자의 기능을 규명하는 것이다. 이와 같은 방법으로 벼 유전자 기능 분석을 위하여 T-DNA와 Ac/Ds 혹은 Tos17 전이인자

H.-S. Ryu · N. Y. Ryoo · J.-S. Jeon (✉)
경희대학교 생명공학원
(Graduate School of Biotechnology, Kyung Hee University,
Yongin 446-701, Korea)
e-mail: jjeon@khu.ac.kr

H.-S. Ryu · N. Y. Ryoo · K.-H. Jung · G. H. An · J.-S. Jeon
경희대학교 작물바이오텍 연구소
(Crop Biotech Institute, Kyung Hee University, Yongin 446-701,
Korea)

K.-H. Jung · G. H. An
경희대학교 식물분자시스템 바이오텍 학과
(Department of Plant Molecular Systems Biotechnology, Kyung
Hee University, Yongin 446-701, Korea)

(transposable element)와 같은 특정 DNA를 삽입하거나 물리 및 화학적인 방법을 사용하여 돌연변이를 유발하고 있다 (Gierl and Saedler 1992; Jeon and Kim 2003; Krishnan et al. 2009). 특히, 벼 T-DNA 삽입 돌연변이는 이미 구축된 돌연변이 데이터 베이스 탐색을 통하여 특정 유전자의 돌연변이에 대한 유, 무를 판단할 수 있어 가장 많이 이용되고 있다 (An et al. 2003; Barrett et al. 2005; Krishnan et al. 2009).

본 논문에서는 T-DNA 삽입에 의하여 확립된 돌연변이 집단의 현황과 이를 활용한 벼 유전자의 기능 연구방법에 대한 최근 연구성과를 요약하고자 한다.

1. 벼 T-DNA 돌연변이 생산

고등식물에서는 상동 재조합 (homologous recombination)을 통해 유전자를 치환시킬 수 있는 효과적인 방법이 개발되지 않았다. 이와 같은 이유 때문에 아그로박테리움 (*Agrobacterium*)을 매개로 T-DNA 삽입 돌연변이체를 생산하여 고등식물 유전자들의 기능 연구에 활용하고 있다 (Hiei et al. 1994; Azpiroz-Leehan and Feldmann 1997; Zhang et al. 1997; Jeon et al. 2000; Bouche and Bouchez 2001; Jeong et al. 2002; An et al. 2005b).

T-DNA 삽입 돌연변이 생산의 장점은 첫째 T-DNA가 계놈 내부로 안정적으로 삽입되어 다음 세대에 유전되며, 둘째 T-DNA 삽입에 의해 결손된 유전자가 타 유전자와 기능상 중복 (functional redundancy)이 없다면 동형접합 자손은 형태학적, 생화학적, 혹은 생리학적으로 비정상적인 표현형을 보일 가능성이 높으며, 셋째 T-DNA가 삽입된 위치는 PCR 방법에 의해 쉽게 동정될 수 있다. TAIL-PCR (Thermal asymmetric interlaced PCR) 방법은 T-DNA에 상보적인 프라이머와 degenerate primer를 이용하며, iPCR (inverse PCR) 방법은 T-DNA의 일부분과 인접한 식물의 염기서열을 함께 제한 효소로 자른 후 접합 (ligation)하여 형성된 원형의 DNA 조각을 주형으로 이용하며, adaptor ligation PCR 방법은 추출된 DNA를 제한효

소로 잘라 어댑터 (adaptor)를 접합시킨 뒤 T-DNA와 어댑터에 상보적인 프라이머를 이용해 PCR을 수행하는 방법이다 (Ochman et al. 1988; Liu and Whittier 1995; Siebert et al. 1995; Kim et al. 2010).

현재 애기장대 T-DNA 돌연변이는 22만여 이상의 라인이 확보되어 있다 (Alonso et al. 2003; <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). 벼 돌연변이 라인은 경희대 약 10만 라인을 포함하여 전세계적으로 19만여 라인이 확립되어 기능 유전체 연구에 활용되고 있다 (Table 1). 현재 진행되고 있는 T-DNA 돌연변이를 활용한 벼 기능 유전체 연구의 방법을 요약하고자 한다.

2. 순유전학 (forward genetics) 분석

표현형을 보이는 돌연변이 개체를 선발하여 원인 유전자를 동정하는 전통적 순유전학 (forward genetics) 분석 방법은 표현형과 직, 간접적으로 연관된 유전자의 기능을 밝히는데 효과적인 방법이다. 이 방법은 벼 T-DNA 돌연변이 집단에서 육안으로 관찰하기에 용이한 생장 및 발달 동안에 비정상적인 표현형을 보이는 개체를 주로 분석하여 원인 유전자를 동정하는데 많이 활용되고 있다 (Table 2). 예로서 Jung 등(2003)은 1,995개 T-DNA 돌연변이 집단 중 염색이 변화된 189개의 돌연변이 라인을 찾아 분석하였다. 이들 중에서 T-DNA 내부 표지 유전자인 GUS (*β-glucuronidase*)가 발현되는 라인을 추가 선별한 후에 T-DNA가 삽입된 위치를 결정하였다. 최종 규명된 염색 변이 원인 유전자 중의 하나는 엽록소의 생합성 효소인 magnesium chelatase를 암호화하는 것으로 밝혀졌으며, 해당 돌연변이는 엽록체 틸라코이드막 (thylakoid membrane)이 형성 되지 않아 엽록소 함량이 매우 낮은 것을 알 수 있었다. 또한 꽃 발달이나 종자발달의 이상을 보이는 T-DNA 돌연변이 라인의 분석을 통해 원인 유전자를 밝힌 예도 있다. Jung 등(2005)은 14,000 T-DNA 돌연변이 라인 중에서 GUS가 수술에서 발현되는 270라인을 선별하였다. 이 중 15개 라인에서 불임 표현형을 관찰할 수 있

Table 1 Flanking Sequence Tag (FST) database for T-DNA insertion mutants in rice

Research group	No. of lines ^a / No. of FSTs ^b	Update	Website	Reference
PFG	107,171/67,282	2010	http://signal.salk.edu/cgi-bin/RiceGE http://www.postech.ac.kr/life/pfg/risd	Jeon et al. 2000, Jeong et al. 2002, An et al. 2003, Jeong et al. 2006
Genoplante	29,263/28,324	2007	http://orygenesdb.cirad.fr/	Sallaud et al. 2004
RMD	33,197/33,197	2010	http://rmd.ncpgr.cn	Zhang et al. 2006
SHIP	10,381/10,281	2010	http://ship.plantsignal.cn	Fu et al. 2009b
TRIM	18,024/17,937	2008	http://tdna.bts.asia.edu.tw/	Hsing et al. 2007

^a the number of rice mutant lines generated by *Agrobacterium*-mediated transformation using T-DNA vectors

^b the number of Flanking Sequence Tags

Table 2 Functionally characterized genes via forward genetics approaches using T-DNA mutants in rice

Gene	Reference
<i>DESI</i>	Chi et al. 2009
<i>OsEF3</i>	Fu et al. 2009a
Seed quality related genes	Fu et al. 2009b
<i>Cinnamyl-alcohol dehydrogenase</i>	Li et al. 2009
<i>HTD2</i>	Liu et al. 2009
<i>OsPE</i>	Puri et al. 2009
<i>DH1</i>	Li et al. 2008a
<i>Phytochrome B</i>	Jeong et al. 2007
<i>OsGSK1</i>	Koh et al. 2007
<i>Liguleless gene</i>	Lee et al. 2007a
<i>SPL18</i>	Mori et al. 2007
<i>Rice Immature Pollen 1</i>	Han et al. 2006
<i>Wax-deficient anther1</i>	Jung et al. 2006
<i>OsPPDK</i>	Kang et al. 2005
<i>Heading-delayed mutant</i>	Chen et al. 2004
<i>OsCHLH</i>	Goh et al. 2004
<i>OsCHLH</i>	Jung et al. 2003
<i>Anther-specific gene</i>	Muthukalianan et al. 2003
<i>Rolled-leaf</i>	Shen et al. 2003

었고, 이 중 GUS와 불임 표현형이 공동 분리되는 라인을 발견하였다. TAIL-PCR을 통하여 T-DNA에 인접한 원인 유전자를 동정하여 *UDT1 (Undeveloped Tapetum1)*으로 명명하였으며, *UDT1*은 tapetum 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 확인되었다.

3. 역유전학 (reverse genetics) 분석

역유전학 (reverse genetics) 분석방법은 1995년 애기장대에서 소개된 후 (McKinney et al. 1995), 많은 고등식물 유전자들의 기능 분석에 활용되고 있다 (Vitha et al. 2003; Leonhardt et al. 2004; Li et al. 2004; Adham et al. 2005; Zolman et al. 2008). 벼 전체 유전자의 염기서열이 해독됨에 따라 특정 유전자를 선택하여 해당 돌연변이를 분석하여 기능을 밝히는 ‘유전자로부터 표현형 (from gene to phenotype)’의 방향으로 진행되는 역유전학 분석이 주된 연구방법으로 활용되고 있다 (Table 3). 예로서 *OsATG10b* 유전자의 기능연구를 위하여 T-DNA 돌연변이를 선발하고, 특정 스트레스 상황에서 표현형을 분석하여 해당 유전자의 기능을 규명하였다 (Shin et al. 2009b). *OsATG10b* 기능 결손 돌연변이는 고농도 염분 스트레스나 methyl viologen (MV) 처리시 야생형 (대조구) 보다 더 민감해지는 표현형을 보였으며, 스트레스 처리 후 돌연변이에서 산

Table 3 Functionally characterized genes via reverse genetics approaches using T-DNA mutants in rice

Gene	Reference
<i>Os ABF1</i>	Amir Hossain et al. 2010
<i>OsKu70</i>	Hong et al. 2010
<i>Gibberellin 2-oxidase 6</i>	Huang et al. 2010
<i>OsCPL1</i>	Ji et al. 2010
<i>OsACP6</i>	Kumar et al. 2010
<i>OsRPA1</i>	Chang et al. 2009
<i>Castor Pollux</i>	Chen et al. 2009
<i>OsBCIL family</i>	Dai et al. 2009
<i>Osphot1a</i>	Goh et al. 2009
<i>MIR</i>	Ishimaru et al. 2009
<i>OsOGR</i>	Kim et al. 2009
<i>OsCBT</i>	Koo et al. 2009
<i>Polycomb group</i>	Luo et al. 2009
<i>Erect panicle3</i>	Piao et al. 2009
<i>Aldehyde dehydrogenase7</i>	Shin et al. 2009a
<i>ATG10b</i>	Shin et al. 2009b
<i>OsIAA1</i>	Song et al. 2009
<i>ETR1</i>	Wuriyangan et al. 2009
<i>ABC transporter gene 5</i>	Xu et al. 2009
<i>PAIR3</i>	Yuan et al. 2009
<i>Ososm2</i>	Hu et al. 2008
<i>Light-responsive unique genes</i>	Jung et al. 2008b
<i>Sck and cryIac genes</i>	Li et al.2008b
<i>Peptide deformylase</i>	Moon et al. 2008
<i>RID1</i>	Wu et al. 2008
<i>β-Ketoacyl CoA synthase</i>	Yu et al. 2008
<i>OsSSIIIa/FLO5</i>	Ryoo et al. 2007
<i>OsHMA9</i>	Lee et al. 2007b
<i>OsAGP</i>	Lee et al. 2007c
<i>Constitutively wilted 1</i>	Woo et al. 2007
<i>Glutamate receptor-like gene</i>	Li et al. 2006b
<i>FON1</i>	Moon et al. 2006
<i>Undeveloped Tapetum1</i>	Jung et al. 2005
<i>Chlorophyll a oxygenase genes</i>	Lee et al. 2005
<i>Cysteine protease</i>	Lee et al. 2004

화된 단백질의 양이 증가되는 것을 밝혔다. 즉, *OsATG10b*는 스트레스 상황에서 식물세포에 유해한 물질들의 제거를 위한 자가포식 작용에 관여함을 알 수 있었다. 또 다른 예로서 *ETHYLENE RESPONSE2 (ETR2)*의 기능 상실 T-DNA 돌연변이는 에틸렌에 과민 반응을 보이며 조기 개화 및 전분 축적을 유발하는 표현형을 보였다. 추가 분석 결과, 개화 지연 유전자인 *GIGANTEA*와 *TERMINAL*

FLOWER1/CENTRORADIALIS (RCN1) 및 전분분해 유전자인 *RAmy3D*가 *ETR2*의 기능이 상실됨에 따라 이들의 전사 활성이 감소되어 나타나는 표현형으로 밝혀졌다 (Wuriyangan et al. 2009).

역유전학 연구방법은 주로 다음과 같은 두 가지 방법을 활용한다. 돌연변이 개체를 2차원 및 3차원의 풀(pool)로 조직화하고, 이를 이용하여 PCR을 통해 특정 유전자의 돌연변이를 찾는 방법과, 삽입된 T-DNA의 인접 염기서열을 모든 라인으로부터 분리하여 데이터 베이스로 만들어서 활용하는 방법이다.

3-1. T-DNA 풀 스크리닝 (pool screening)

T-DNA 풀 스크리닝 방법은 *Drosophila*에서 개발된 PCR을 이용한 전략으로 현재는 고등식물의 돌연변이 분리에 활용되고 있다. 원리는 특정 유전자와 T-DNA에 상보적인 프라이머의 조합을 이용하여 T-DNA가 해당 유전자에 삽입된 개체를 찾아내는 것이다 (Lee et al. 2003; Li et al. 2006a). 이중 중합효소연쇄반응 (nested PCR)을 사용하여 특정 유전자의 돌연변이는 큰 풀로부터 작은 풀 순서로 단계적으로 역추적하여 찾아낼 수 있다. 실제 벼 T-DNA 돌연변이 풀의 PCR을 통해 5개의 *OsMADS* 유전자 (*OsMADS27, 30, 33, 55, 57*)의 돌연변이가 성공적으로 분리되었다 (Lee et al. 2003). 전체 돌연변이 라인을 먼저 90개씩의 단위 풀로 묶어 총 235개의 풀을 만들었으며, 잘 보존된 MADS 도메인 염기서열에 상보적인 프라이머를 이용하여 PCR을 이중 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 이와 유사한 방법으로 1,000개의 T-DNA 돌연변이 집단으로 구성된 풀을 PCR 분석하여 *OsAGPS2* 및 *OsALPL2*의 돌연변이를 동정하였다 (Lee et al. 2007c).

3-2. T-DNA FST (flanking sequence tag) 검색

벼는 애기장대에 비해 전체 게놈이 크고 G/C의 비율이 높은 지역이 많아 PCR에 어려움이 있어 풀 스크리닝 방법을 통한 돌연변이 분리는 효율이 낮다 (Yu et al. 2002; Lee et al. 2003; An et al. 2005a). 따라서 벼 T-DNA 돌연변이 연구그룹에서는 효율적인 돌연변이의 동정과 활용을 위해 삽입된 T-DNA에 위치한 벼 염기서열을 분리하여 대규모의 FST (Flanking Sequence Tag; 혹은 Tag End Sequence로 불림) 데이터 베이스를 구축하였다. 벼 FST 정보는 경희대 (Jeon et al. 2000; Jeong et al. 2002; An et al. 2003; Jeong et al. 2006), 중국 기능유전체 컨소시엄 (Wu et al. 2003), 중국 상하이 연구소 (SHIP) (Fu et al. 2009b), 프랑스 Genoplante (Sallaud et al. 2004), 대만 학술원 벼 돌연변이 연구센터 등으로부터 제공되고 있다 (Table 1). 현재까지 T-DNA 돌연변이 라인으로부터 전체 17만 개 이상의 FST가 축적되었다. 이들 정보는 RiceGE ([http://signal.](http://signal.salk.edu/cgi-bin/RiceGE)

[salk.edu/cgi-bin/RiceGE](http://signal.salk.edu/cgi-bin/RiceGE)) 에서 통합관리하고 있어 효과적으로 활용되고 있으며, BLAST 방법을 통하여 유용 돌연변이에 대한 정보를 쉽게 검색할 수 있다.

4. Entrapment 표지법 (tagging)

Entrapment 표지법은 표지 유전자인 GUS 혹은 *green fluorescent protein (GFP)*를 특정 유전자와 융합함으로써 해당 유전자의 발현을 확인하는 방법이다. 이 방법은 크게 enhancer-trap, promoter-trap, gene-trap의 3가지 방법으로 나눌 수 있다. Enhancer-trap은 TATA-box와 전사개시신호를 포함하는 최소 프로모터(minimal promoter)와 표지 유전자를 갖는 T-DNA가 식물체의 enhancer 서열 주위에 삽입될 경우에 표지 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 벼에서 enhancer-trap을 이용한 31,443개의 돌연변이가 생산되었으며, 이 중 1,000여 개의 돌연변이를 사용하여 GUS의 발현을 확인하였다 (Wu et al. 2003). 이와 함께 GAL4-GFP 융합을 이용한 방법도 개발되었다 (Johnson et al. 2005). Enhancer-trap을 이용한 생산된 벼 돌연변이 데이터 베이스가 구축되어 (<http://urgi.versailles.inra.fr/OryzaTagLine/>) 돌연변이들의 표현형이나 표지 유전자의 발현을 검색할 수 있다 (Larmande et al. 2008). Promoter-trap과 gene-trap은 프로모터가 없는 표지 유전자만을 갖는 T-DNA를 게놈에 삽입하는 방법이다. Promoter-trap은 표지 유전자가 엑손(exon)에 삽입되어 정확한 융합 단백질을 형성할 경우에 표지 유전자의 발현 확인이 가능하다. 예로서 Chen 등 (2007)은 *OsRRM* 유전자의 5'-UTR (untranslated region)에 삽입된 T-DNA의 GUS 유전자의 발현 분석을 통하여, 이 유전자가 벼 배유 (endosperm)에만 특이적으로 발현된다는 것을 밝혔다. Gene-trap의 경우에는 다중의 splice donor/acceptor 서열을 갖는 인트론(intron)을 표지 유전자의 앞에 두어, 엑손, 인트론 혹은 UTR에 삽입되는 경우에 해당 유전자와 전사방향성이 일치하면 높은 효율로 표지 유전자의 발현이 가능하다. 이 방법을 이용하여 생산된 돌연변이 집단에서 약 25-59%의 비율로 GUS 유전자의 발현을 관찰하였다 (Chin et al. 1999; Jeon et al. 2000; An et al. 2005b; Chen et al. 2008). Gene-trap 방법을 통하여 벼 cysteine protease 유전자인 *OsCPI*에 대한 해당 유전자의 발현을 분석하였다. *OsCPI*은 벼 약 (anther)에서 발현이 가장 높았으며, T-DNA가 삽입된 돌연변이의 경우 화분 발달이 저해된다는 것을 관찰하였다 (Lee et al. 2004). 광범위하게 사용되는 표지 유전자인 GUS 분석방법은 조직 혹은 기관의 화학 염색반응을 통해서만 관찰이 가능한 단점이 있다. 이런 점을 극복하기 위하여 최근에는 GFP나 luciferase 같은 세포 비파괴적인 표지 유전자를 이용하는 방법을 사용하기도 한다 (An et al. 2005b).

5. 활성 표지법 (activation tagging)

특정 유전자의 기능 상실 돌연변이 (loss-of-function mutant)를 이용하여 해당 유전자의 기능을 알아보는 방법은 일부 단점이 있다. 예로서 동일한 기능을 갖는 유전자가 군(family)으로 존재하여 서로간에 기능이 중복되는 경우에는 단일 유전자의 기능 상실만으로는 표현형이 나타나지 않는다. 벼 염기서열 분석을 바탕으로 상동 유전자들이 다수 존재한다는 것이 밝혀졌고, 이들 유전자들 사이에 기능이 중복되는 예는 많이 발견되고 있다 (Jung et al. 2008b, 2008c). 또 다른 경우는 초기 식물발달에 필수적인 유전자의 경우에 기능 상실이 될 경우 돌연변이 식물이 어린 시기에 죽어 성체를 얻을 수 없는 문제점이 있다.

이런 점을 극복하기 위하여 표현형의 변화를 우성으로 확인할 수 있는 활성 표지법 (activation tagging)이 개발되었다. 활성 표지법은 *CaMV* (cauliflower mosaic virus) 35S transcriptional enhancer를 식물 게놈에 삽입하여 인접 유전자의 전사를 활성화시켜 기능 획득 돌연변이 (gain-of-function mutant)를 생산하는 방법이다 (Marsch-Martinez et al. 2002; Tani et al. 2004; Jeong et al. 2006). 최근까지 애기장대와 벼에서 35S enhancer element를 이용한 기능 획득 돌연변이 집단을 대량 생산하였다 (Weigel et al. 2000; Jeong et al. 2002; Jeong et al. 2006; Mori et al. 2007). 이 방법을 이용하여 생산된 벼 돌연변이 라인의 약 40%에서 35S enhancer element에 의하여 인접 유전자의 전사 활성이 일어났음을 확인하였다 (Jeong et al. 2002; An et al. 2005b). 그러나 증가된 전사 활성이 돌연변이의 형질 변화와 항상 일치하지는 않는 경우가 종종 발견된다. 이것은 35S enhancer element가 특정 유전자 뿐만 아니라 주변의 인접한 타 유전자의 전사를 동시에 활성화 시키거나, 해당 유전자의 promoter가 영향을 받아 전체적인 ectopic 발현 효과를 유발할 수 있는 가능성이 존재하기 때문이다 (Neff et al. 1999; Weigel et al. 2000; Jeong et al. 2002). 또한 기능 획득 돌연변이의 경우 종종 불안정한 경우가 있어 세대가 진전될 경우 획득한 기능을 상실하는 경우도 보고되었다 (Weigel et al. 2000). 이런 일부 단점에도 불구하고 기능 획득 돌연변이를 이용하여 일부 애기장대 및 벼 유전자들의 기능이 규명되었으며, 페튜니아, 토마토 등 다른 식물 종에서도 활용되고 있다 (Zubko et al. 2002; Mathews et al. 2003).

벼 활성표지 돌연변이를 이용하여 *OsATI* (*Oryza sativa* *Acyl-transferase1*) 유전자의 기능을 분석하는데 성공하였다 (Mori et al. 2007). 13,000 여 개의 활성표지 돌연변이 집단으로부터 *Spotted leaf 18* 표현형에 해당하는 lesion mimic 돌연변이체를 선별하였다. 이들로부터 원인 유전자를 TAIL-PCR을 이용하여 동정하였으며, 담배에서 과민반응 (hypersensitive response)에 의해 발현이 증가되는

*Acyl-transferase*와 상동 유전자임을 밝혔다. *OsATI* 유전자의 5'-UTR 부위에 35S enhancer element가 삽입되어 해당 유전자의 전사가 증가되었음을 확인하였다. 추가 분석을 통해 *OsATI*의 전사가 증가됨에 따라 병 저항성 관련 *Pathogenesis-related (PR)* 유전자의 발현증가와 phytoalexin 물질인 momilactone A 및 sakuranetin가 돌연변이 내에서 축적된다는 것을 증명하였다.

연구전망

벼 전체 염기서열 분석의 완료 (IRGSP 2005) 등 구조 유전체 분야의 비약적인 성과를 바탕으로 앞으로 모든 벼 유전자들의 기능 규명을 목표로 하는 기능 유전체 연구가 주 과제로 진행되고 있다. 벼 유전자의 원활한 기능 연구를 위하여 한국, 중국, 대만, 프랑스 등 여러 연구그룹에서 T-DNA 돌연변이를 생산 및 분석하고 있으며, 확립된 T-DNA 돌연변이 집단의 FST 정보는 벼 유용 유전자의 기능 연구에 효과적으로 활용되고 있다.

이와 더불어 최근에 70여 개의 대용량 병렬 염기서열 표식 (Massively Parallel Signature Sequencing) 정보, 250여 개의 키나아제 단백질의 상호작용 정보 및 1,700여 개의 마이크로 어레이 (microarray) 결과가 공개 되어 고효율의 정보 분석이 가능해졌다 (Nakano et al. 2006; Rohila et al. 2006; Jung et al. 2008a; Ding et al. 2009). 특히 마이크로 어레이 정보는 전체 유전자의 발현을 동시에 보여줄 수 있어, 벼 유전자의 기능에 관한 예측 가능한 정보를 제공하는 수단으로 사용될 것으로 기대된다. 예로서 빛의 유무 조건에 따른 유전자들의 발현을 마이크로 어레이를 이용하여 분석하여 2,300여 개의 빛에 반응하는 유전자를 선별하였다 (Jung et al. 2008b). 이 중 발현이 특히 높은 365 개에 대하여 T-DNA 돌연변이 FST 정보를 검색하여 205 개 유전자에 대하여 T-DNA 삽입 돌연변이 라인을 분리하였다. 최종적으로 돌연변이의 분석을 통해 엽록소 합성의 저하 혹은 초기 생장에 중요한 유전자를 규명하였다 (Jung et al. 2008b). 이 결과는 마이크로 어레이 자료의 분석을 통해 후보 유전자를 선별하고 T-DNA 돌연변이 집단의 표현형 분석을 통하여 해당 유전자의 기능을 규명하는 방법이 매우 효과적임을 증명하였다 (Fig. 1). 앞으로 생물정보학 기술을 종합적으로 활용하는 고효율 통합 연구방법이 벼 유전자들의 기능 규명에 폭넓게 활용될 것으로 기대된다.

적 요

주요 작물인 벼 (*Oryza sativa*)는 단자엽 모델식물이다.

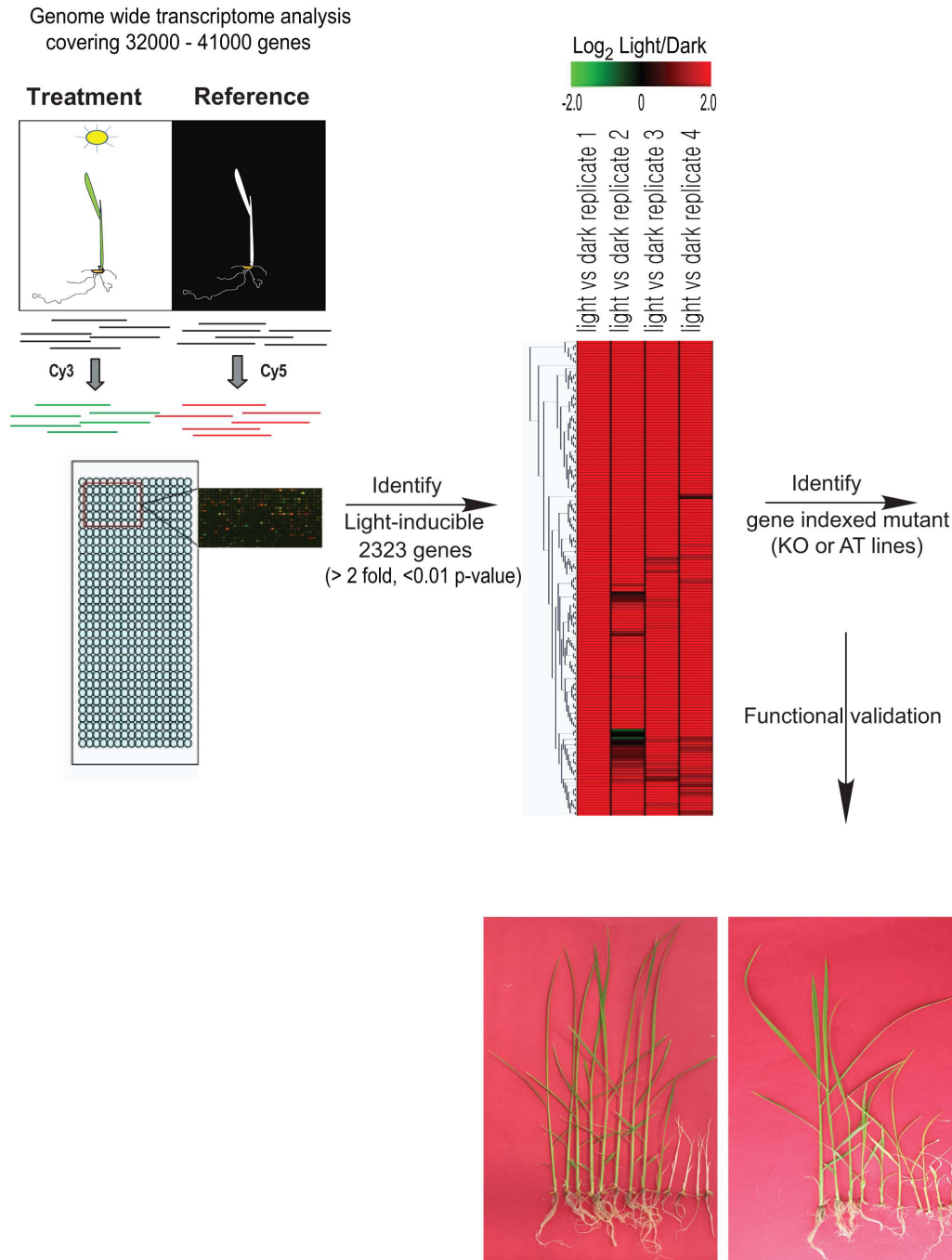


Fig. 1 An integrated high throughput strategy to identify functions of light responsive genes using T-DNA mutants and genome-wide microarray experiments. The NSF rice oligonucleotide microarray represents 90% of annotated rice gene models. Genome-wide transcriptome analysis of light- versus dark-grown seedlings revealed that 2,323 genes showed significant light inducible expression patterns with more than 2 fold change. T-DNA mutants were characterized to determine the functions of selected light-responsive genes

현재까지 벼 연구자들은 전체 염기서열 분석을 완료하였으며, 고밀도 유전자 지도 작성, 전장 cDNA 유전자 은행 구축, 게놈 규모의 유전자 발현 정보 및 대량의 돌연변이 집단을 육성하는 등 기능 유전체 연구를 위한 중요한 재료를 확립하였다. 특히 벼 돌연변이 라인은 유용 농업형

질 유전자들의 기능을 최종적으로 규명하는데 매우 중요하게 사용되고 있다. 본 종설에서는 벼 T-DNA 돌연변이를 사용한 기능 유전체 연구에 대한 최근의 현황을 요약하고자 하였다.

사 사

본 연구는 경희대학교 연구지원 사업(20080784)을 통해 지원 받아 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Adham AR, Zolman BK, Millius A, Bartel B (2005) Mutations in *Arabidopsis* acyl-CoA oxidase genes reveal distinct and overlapping roles in beta-oxidation. *Plant J* 41:859-874
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseeuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301:653-657
- Amir Hossain M, Lee Y, Cho JI, Ahn CH, Lee SK, Jeon JS, Kang H, Lee CH, An G, Park PB (2010) The bZIP transcription factor OsABF1 is an ABA responsive element binding factor that enhances abiotic stress signaling in rice. *Plant Mol Biol* 72:557-566
- An G, Jeong DH, Jung KH, Lee S (2005a) Reverse genetic approaches for functional genomics of rice. *Plant Mol Biol* 59:111-123
- An G, Lee S, Kim SH, Kim SR (2005b) Molecular genetics using T-DNA in rice. *Plant Cell Physiol* 46:14-22
- An S, Park S, Jeong DH, Lee DY, Kang HG, Yu JH, Hur J, Kim SR, Kim YH, Lee M, Han S, Kim SJ, Yang J, Kim E, Wi SJ, Chung HS, Hong JP, Choe V, Lee HK, Choi JH, Nam J, Kim SR, Park PB, Park KY, Kim WT, Choe S, Lee CB, An G (2003) Generation and analysis of end sequence database for T-DNA tagging lines in rice. *Plant Physiol* 133:2040-2047
- Arumuganathan K, Earle ED (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 3:208-218
- Azpiroz-Leehan R, Feldmann KA (1997) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. *Trends Genet* 13:152-156
- Barrett T, Suzek TO, Troup DB, Wilhite SE, Ngau WC, Ledoux P, Rudnev D, Lash AE, Fujibuchi W, Edgar R (2005) NCBI GEO: mining millions of expression profiles--database and tools. *Nucleic Acids Res* 33:D562-566
- Bouche N, Bouchez D (2001) *Arabidopsis* gene knockout: phenotypes wanted. *Curr Opin Plant Biol* 4:111-117
- Brenner S, Johnson M, Bridgham J, Golda G, Lloyd DH, Johnson D, Luo S, McCurdy S, Foy M, Ewan M, Roth R, George D, Eletr S, Albrecht G, Vermaas E, Williams SR, Moon K, Burcham T, Pallas M, DuBridge RB, Kirchner J, Fearon K, Mao J, Corcoran K (2000) Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nat Biotechnol* 18:630-634
- Chang Y, Gong L, Yuan W, Li X, Chen G, Li X, Zhang Q, Wu C (2009) Replication protein A (RPA1a) is required for meiotic and somatic DNA repair but is dispensable for DNA replication and homologous recombination in rice. *Plant Physiol* 151:2162-2173
- Chen C, Fan C, Gao M, Zhu H (2009) Antiquity and function of CASTOR and POLLUX, the twin ion channel-encoding genes key to the evolution of root symbioses in plants. *Plant Physiol* 149:306-317
- Chen SY, Wang AM, Li W, Wang ZY, Cai XL (2008) Establishing a gene trap system mediated by T-DNA (GUS) in rice. *J Integr Plant Biol* 50:742-751
- Chen SY, Wang ZY, Cai XL (2007) OsRRM, a Spn-like rice gene expressed specifically in the endosperm. *Cell Res* 17:713-721
- Chen ZG, Wang J, Zhang ZM, Liu F, Zhu HT, Wan XS, Zhang JL, Zhang GQ (2004) Genetic analysis of a heading-delayed mutant by T-DNA insertion in rice (*Oryza sativa* L.). *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao* 30:75-80
- Chi MH, Park SY, Kim S, Lee YH (2009) A novel pathogenicity gene is required in the rice blast fungus to suppress the basal defenses of the host. *PLoS Pathog* 5:e1000401
- Chin HG, Choe MS, Lee 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. *Plant J* 19:615-623
- Dai X, You C, Wang L, Chen G, Zhang Q, Wu C (2009) Molecular characterization, expression pattern, and function analysis of the OsBC1L family in rice. *Plant Mol Biol* 71:469-481
- David (1991) The world rice economy: Challenges ahead. In: G.S. Khush and G.H. Toenniessen, *Rice Biotechnology*, CAB International and IRRI, Wallingford UK pp. 1-18
- Ding X, Richter T, Chen M, Fujii H, Seo YS, Xie M, Zheng X, Kanrar S, Stevenson RA, Dardick C, Li Y, Jiang H, Zhang Y, Yu F, Bartley LE, Chern M, Bart R, Chen X, Zhu L, Farmerie WG, Gribskov M, Zhu JK, Fromm ME, Ronald PC, Song WY. (2009) A rice kinase-protein interaction map. *Plant Physiol* 149:1478-1492
- Fu C, Yang XO, Chen X, Chen W, Ma Y, Hu J, Li S (2009a) OsEF3, a homologous gene of *Arabidopsis* ELF3, has pleiotropic effects in rice. *Plant Biol (Stuttg)* 11:751-757
- Fu FF, Ye R, Xu SP, Xue HW (2009b) Studies on rice seed quality through analysis of a large-scale T-DNA insertion population. *Cell Res* 19:380-391
- Gale MD, Devos DK (1998) Comparative genetics in the grasses. *Proc Natl Acad Sci* 95:1971-1974
- Gierl A, Saedler H (1992) Plant-transposable elements and gene tagging. *Plant Mol Biol* 19:39-49
- Goh CH, Jang S, Jung S, Kim HS, Kang HG, Park YI, Bae HJ, Lee CH, An G (2009) Rice phot1a mutation reduces plant growth by affecting photosynthetic responses to light during early seedling growth. *Plant Mol Biol* 69:605-619
- Goh CH, Jung KH, Roberts SK, McAinsh MR, Hetherington AM, Park YI, Suh K, An G, Nam HG (2004) Mitochondria provide the main source of cytosolic ATP for activation of outward-

- rectifying K⁺ channels in mesophyll protoplast of chlorophyll-deficient mutant rice (OsCHLH) seedlings. *J Biol Chem* 279: 6874-6882
- Han MJ, Jung KH, Yi G, Lee DY, An G (2006) Rice Immature Pollen 1 (RIP1) is a regulator of late pollen development. *Plant Cell Physiol* 47:1457-1472
- Harushima Y, Yano M, Shomura A, Sato M, Shimano T, Kuboki Y, Yamamoto T, Lin SY, Antonio BA, Parco A, Kajiyama H, Huang N, Yamamoto K, Nagamura Y, Kurata N, Khush GS, Sasaki T (1998) A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F2 population. *Genetics* 148: 479-494
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* 6:271-282
- Hong JP, Byun MY, An K, Yang SJ, An G, Kim WT (2010) OsKu70 is associated with developmental growth and genome stability in rice. *Plant Physiol* 152:374-387
- Hsing YI, Chern CG, Fan MJ, Lu PC, Chen KT, Lo SF, Sun PK, Ho SL, Lee KW, Wang YC, Huang WL, Ko SS, Chen S, Chen JL, Chung CI, Lin YC, Hour AL, Wang YW, Chang YC, Tsai MW, Lin YS, Chen YC, Yen HM, Li CP, Wey CK, Tseng CS, Lai MH, Huang SC, Chen LJ, Yu SM (2007) A rice gene activation/knockout mutant resource for high throughput functional genomics. *Plant Mol Biol* 63:351-364
- Hu JT, Zhang J, Li YY, Fu CY, Zheng J, Chen JB, Hu Y, Li SG (2008) Genetic analysis and mapping of a rice white midrib mutant *Oswm2*. *Yi Chuan* 30:1201-1206
- Huang J, Tang D, Shen Y, Qin B, Hong L, You A, Li M, Wang X, Yu H, Gu M, Cheng Z (2010) Activation of gibberellin 2-oxidase 6 decreases active gibberellin levels and creates a dominant semi-dwarf phenotype in rice (*Oryza sativa* L.). *J Genet Genomics* 37:23-36
- International Rice Genome Sequencing Project (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436:793-800
- Ishimaru Y, Bashir K, Fujimoto M, An G, Itai RN, Tsutsumi N, Nakanishi H, Nishizawa NK (2009) Rice-specific mitochondrial iron-regulated gene (MIR) plays an important role in iron homeostasis. *Mol Plant* 2:1059-1066
- Jeon JS, Kim JK (2003) High-throughput tools for rice functional genomics. *KOGO News* 3:11-15
- Jeon JS, Lee S, Jung KH, Jun SH, Jeong DH, Lee J, Kim C, Jang S, Yang K, Nam J, An K, Han MJ, Sung RJ, Choi HS, Yu JH, Choi JH, Cho SY, Cha SS, Kim SI, An G (2000) T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *Plant J* 22:561-570
- Jeong DH, Lee S, Kim SL, Hwang I, An G (2007) Regulation of brassinosteroid responses by phytochrome B in rice. *Plant Cell Environ* 30:590-599
- Jeong DH, An S, Park S, Kang HG, Park GG, Kim SR, Sim J, Kim YO, Kim MK, Kim SR, Kim J, Shin M, Jung M, An G (2006) Generation of a flanking sequence-tag database for activation-tagging lines in japonica rice. *Plant J* 45:123-132
- Jeong DH, An S, Kang HG, Moon S, Han JJ, Park S, Lee HS, An K, An G (2002) T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. *Plant Physiol* 130:1636-1644
- Ji H, Kim SR, Kim YH, Kim H, Eun MY, Jin ID, Cha YS, Yun DW, Ahn BO, Lee MC, Lee GS, Yoon UH, Lee JS, Lee YH, Suh SC, Jiang W, Yang JI, Jin P, McCouch SR, An G, Koh HJ (2010) Inactivation of the CTD phosphatase-like gene *OsCPL1* enhances the development of the abscission layer and seed shattering in rice. *Plant J* 61:96-106
- Johnson AA, Hibberd JM, Gay C, Essah PA, Haseloff J, Tester M, Guiderdoni E (2005) Spatial control of transgene expression in rice (*Oryza sativa* L.) using the GAL4 enhancer trapping system. *Plant J* 41:779-789
- Jung KH, An G, Ronald PC (2008a) Towards a better bowl of rice: assigning function to tens of thousands of rice genes. *Nat Rev Genet* 9:91-101
- Jung KH, Dardick C, Bartley LE, Cao P, Phetsom J, Canlas P, Seo YS, Shultz M, Ouyang S, Yuan Q, Frank BC, Ly E, Zheng L, Jia Y, Hsia AP, An K, Chou HH, Rocke D, Lee GC, Schnable PS, An G, Buell CR, Ronald PC (2008b) Refinement of light-responsive transcript lists using rice oligonucleotide arrays: evaluation of gene-redundancy. *PLoS One* 3:e3337
- Jung KH, Lee J, Dardick C, Seo YS, Cao P, Canlas P, Phetsom J, Xu X, Ouyang S, An K, Cho YJ, Lee GC, Lee Y, An G, Ronald PC (2008c) Identification and functional analysis of light-responsive unique genes and gene family members in rice. *PLoS Genet* 4:e1000164
- Jung KH, Han MJ, Lee DY, Lee YS, Schreiber L, Franke R, Faust A, Yephremov A, Saedler H, Kim YW, Hwang I, An G (2006) Wax-deficient *anther1* is involved in cuticle and wax production in rice anther walls and is required for pollen development. *Plant Cell* 18:3015-3032
- Jung KH, Han MJ, Lee YS, Kim YW, Hwang I, Kim MJ, Kim YK, Nahm BH, An G (2005) Rice Undeveloped Tapetum1 is a major regulator of early tapetum development. *Plant Cell* 17: 2705-2722
- Jung KH, Hur J, Ryu CH, Choi Y, Chung YY, Miyao A, Hirochika H, An G (2003) Characterization of a rice chlorophyll-deficient mutant using the T-DNA gene-trap system. *Plant Cell Physiol* 44:463-472
- Kang HG, Park S, Matsuoka M, An G (2005) White-core endosperm floury endosperm-4 in rice is generated by knockout mutations in the C-type pyruvate orthophosphate dikinase gene (*OsPPDKB*). *Plant J* 42:901-911
- Kikuchi S, Satoh K, Nagata T, Kawagashira N, Doi K, Kishimoto N, Yazaki J, Ishikawa M, Yamada H, Ooka H, Hotta I, Kojima K, Namiki T, Ohneda E, Yahagi W, Suzuki K, Li CJ, Ohtsuki K, Shishiki T, Foundation of Advancement of International Science Genome Sequencing & Analysis Group, Otomo Y, Murakami K, Iida Y, Sugano S, Fujimura T, Suzuki Y, Tsunoda Y, Kurosaki T, Kodama T, Masuda H, Kobayashi M, Xie Q, Lu M, Narikawa R, Sugiyama A, Mizuno K, Yokomizo S, Niikura J, Ikeda R, Ishibiki J, Kawamata M, Yoshimura A, Miura J, Kusumegi T, Oka M, Ryu R, Ueda M, Matsubara K, RIKEN, Kawai J, Carninci P, Adachi J, Aizawa K, Arakawa T, Fukuda S, Hara A, Hashizume W, Hayatsu N, Imotani K,

- Ishii Y, Itoh M, Kagawa I, Kondo S, Konno H, Miyazaki A, Osato N, Ota Y, Saito R, Sasaki D, Sato K, Shibata K, Shinagawa A, Shiraki T, Yoshino M, Hayashizaki Y, Yasunishi A (2003) Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from japonica rice. *Science* 301:376–379
- Kim SR, Jeon JS, An G (2010) Development of an efficient inverse PCR method for isolating gene tags from T-DNA insertional mutants in rice. *Methods Mol Biol*, in press
- Kim SR, Yang JI, Moon S, Ryu CH, An K, Kim KM, Yim J, An G (2009) Rice OGR1 encodes a pentatricopeptide repeat-DYW protein and is essential for RNA editing in mitochondria. *Plant J* 59:738–749
- Koh S, Lee SC, Kim MK, Koh JH, Lee S, An G, Choe S, 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
- Koo SC, Choi MS, Chun HJ, Shin DB, Park BS, Kim YH, Park HM, Seo HS, Song JT, Kang KY, Yun DJ, Chung WS, Cho MJ, Kim MC (2009) The calmodulin-binding transcription factor OsCBT suppresses defense responses to pathogens in rice. *Mol Cells* 27:563–570
- Krishnan A, Guiderdoni E, An G, Hsing YI, Han CD, Lee MC, Yu SM, Upadhyaya N, Ramachandran S, Zhang Q, Sundaresan V, Hirochika H, Leung H, Pereira A (2009) Mutant resources in rice for functional genomics of the grasses. *Plant Physiol* 149:165–170
- Kumar M, Basha PO, Puri A, Rajpurohit D, Randhawa GS, Sharma TR, Dhaliwal HS (2010) A candidate gene OsAPC6 of anaphase-promoting complex of rice identified through T-DNA insertion. *Funct Integr Genomics* DOI 10.1007/s10142-009-0155-6
- Kyoizuka J, Konishi S, Nemoto K, Izawa T, Shimamoto K (1998) Down-regulation of RFL, the FLO/LFY homolog of rice, accompanied with panicle branch initiation. *Proc Natl Acad Sci* 95:1979–1982
- Larmande P, Gay C, Lorieux M, Perin C, Bouniol M, Droc G, Sallaud C, Perez P, Barnola I, Biderre-Petit C, Martin J, Morel JB, Johnson AA, Bourgis F, Ghesquiere A, Ruiz M, Courtois B, Guiderdoni E (2008) *Oryza* Tag Line, a phenotypic mutant database for the Genoplante rice insertion line library. *Nucleic Acids Res* 36:D1022–7
- Lee J, Park JJ, Kim SL, Yim J, An G (2007a) Mutations in the rice liguleless gene result in a complete loss of the auricle, ligule, and laminar joint. *Plant Mol Biol* 65:487–499
- Lee S, Kim YY, Lee Y, An G (2007b) Rice P1B-type heavy-metal ATPase, OsHMA9, is a metal efflux protein. *Plant Physiol* 145:831–842
- Lee S, Kim JH, Yoo ES, Lee CH, Hirochika H, An G (2005) Differential regulation of chlorophyll a oxygenase genes in rice. *Plant Mol Biol* 57:805–818
- Lee S, Jung KH, An G, Chung YY (2004) Isolation and characterization of a rice cysteine protease gene, OsCP1, using T-DNA gene-trap system. *Plant Mol Biol* 54:755–765
- Lee S, Kim J, Son JS, Nam J, Jeong DH, Lee K, Jang S, Yoo J, Lee J, Lee DY, Kang HG, An G (2003) Systematic reverse genetic screening of T-DNA tagged genes in rice for functional genomic analyses: MADS-box genes as a test case. *Plant Cell Physiol* 44:1403–1411
- Lee SK, Hwang SK, Han M, Eom JS, Kang HG, Han Y, Choi SB, Cho MH, Bhoo SH, An G, Hahn TR, Okita TW, Jeon JS (2007c) Identification of the ADP-glucose pyrophosphorylase isoforms essential for starch synthesis in the leaf and seed endosperm of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol* 65:531–546
- Leonhardt N, Kwak JM, Robert N, Waner D, Leonhardt G, Schroeder JI (2004) Microarray expression analyses of Arabidopsis guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *Plant Cell* 16:596–615
- Li A, Zhang Y, Wu X, Tang W, Wu R, Dai Z, Liu G, Zhang H, Wu C, Chen G, Pan X (2008a) DH1, a LOB domain-like protein required for glume formation in rice. *Plant Mol Biol* 66:491–502
- Li AH, Zhang YF, Wu CY, Tang W, Wu R, Dai ZY, Liu GQ, Zhang HX, Pan XB (2006a) Screening for and genetic analysis on T-DNA-inserted mutant pool in rice. *Yi Chuan Xue Bao* 33:319–329
- Li J, Zhu S, Song X, Shen Y, Chen H, Yu J, Yi K, Liu Y, Karplus VJ, Wu P, Deng XW (2006b) A rice glutamate receptor-like gene is critical for the division and survival of individual cells in the root apical meristem. *Plant Cell* 18:340–349
- Li X, Yang Y, Yao J, Chen G, Li X, Zhang Q, Wu C (2009) FLEXIBLE CULM 1 encoding a cinnamyl-alcohol dehydrogenase controls culm mechanical strength in rice. *Plant Mol Biol* 69:685–697
- Li X, Huang K, Zhu B, Liang Z, Wei L, Luo Y (2008b) Comparative physicochemical properties and structure of rice containing the *sck+cryIAC* genes and its nontransgenic counterpart. *J Food Sci* 73:S64–69
- Li X, Cordero I, Caplan J, Molhoj M, Reiter WD (2004) Molecular analysis of 10 coding regions from Arabidopsis that are homologous to the MUR3 xyloglucan galactosyltransferase. *Plant Physiol* 134:940–950
- Liu W, Wu C, Fu Y, Hu G, Si H, Zhu L, Luan W, He Z, Sun Z (2009) Identification and characterization of HTD2: a novel gene negatively regulating tiller bud outgrowth in rice. *Planta* 230:649–658
- Liu YG, Whittier RF (1995) Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* 25:674–681
- Luo M, Platten D, Chaudhury A, Peacock WJ, Dennis ES (2009) Expression, imprinting, and evolution of rice homologs of the polycomb group genes. *Mol Plant* 2:711–723
- Mathews H, Clendennen SK, Caldwell CG, Liu XL, Connors K, Matheis N, Schuster DK, Menasco DJ, Wagoner W, Lightner J, Wagner DR (2003) Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *Plant Cell* 15:1689–1703

- McCouch SR, Teytelman L, Xu Y, Lobos KB, Clare K, Walton M, Fu B, Maghirang R, Li Z, Xing Y, Zhang Q, Kono I, Yano M, Fjellstrom R, DeClerck G, Schneider D, Cartinhour S, Ware D, Stein L (2002) Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res* 9:199-207
- McKinney EC, Ali N, Traut A, Feldmann KA, Belostotsky DA, McDowell JM, Meagher RB (1995) Sequence-based identification of T-DNA insertion mutations in Arabidopsis: actin mutants act2-1 and act4-1. *Plant J* 8:613-622
- Moon S, Giglione C, Lee DY, An S, Jeong DH, Meinel T, An G (2008) Rice peptide deformylase PDF1B is crucial for development of chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 49:1536-1546
- Moon S, Jung KH, Lee DE, Lee DY, Lee J, An K, Kang HG, An G (2006) The rice FON1 gene controls vegetative and reproductive development by regulating shoot apical meristem size. *Mol Cells* 21:147-152
- Mori M, Tomita C, Sugimoto K, Hasegawa M, Hayashi N, Dubouzet JG, Ochiai H, Sekimoto H, Hirochika H, Kikuchi S (2007) Isolation and molecular characterization of a Spotted leaf 18 mutant by modified activation-tagging in rice. *Plant Mol Biol* 63:847-860
- Muthukalianan GK, Lee S, Yum H, Ku S, Kwun M, Kang HG, An G, Chung YY (2003) Identification of anther-specific gene expression from T-DNA tagging rice. *Mol Cells* 15:102-107
- Nakano M, Nobuta K, Vemaraju K, Tej SS, Skogen JW, Meyers BC (2006) Plant MPSS databases: signature-based transcriptional resources for analyses of mRNA and small RNA. *Nucleic Acids Res* 34:731-735
- Neff MM, Nguyen SM, Malancharuvil EJ, Fujioka S, Noguchi T, Seto H, Tsubuki M, Honda T, Takatsuto S, Yoshida S, Chory J (1999) BAS1: A gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci* 96:15316-15323
- Ochman H, Gerber AS, Hartl DL (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120:621-623
- Piao R, Jiang W, Ham TH, Choi MS, Qiao Y, Chu SH, Park JH, Woo MO, Jin Z, An G, Lee J, Koh HJ (2009) Map-based cloning of the ERECT PANICLE 3 gene in rice. *Theor Appl Genet* 119:1497-1506
- Puri A, Basha PO, Kumar M, Rajpurohit D, Randhawa GS, Kianian SF, Rishi A, Dhaliwal HS (2009) The polyembryo gene (OsPE) in rice. *Funct Integr Genomics* DOI 10.1007/s10142-009-0139-6
- Rohila JS, Chen M, Chen S, Chen J, Cerny R, Dardick C, Canlas P, Xu X, Gribskov M, Kanrar S, Zhu J-K, Ronald P and Fromm ME (2006) Protein-protein interactions of tandem affinity purification-tagged protein kinases in rice. *Plant J* 46:1-13
- Ryoo N, Yu C, Park CS, Baik MY, Park IM, Cho MH, Bhoo SH, An G, Hahn TR, Jeon JS (2007) Knockout of a starch synthase gene OsSSIIIa/Flo5 causes white-core floury endosperm in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep* 26:1083-1095
- Sakata K, Antonio BA, Mukai Y, Nagasaki H, Sakai Y, Makino K, Sasaki T (2000) INE: a rice genome database with an integrated map view. *Nucleic Acids Res* 28:97-101
- Sallaud C, Gay C, Larmande P, Bes M, Piffanelli P, Piegu B, Droc G, Regad F, Bourgeois E, Meynard D, Perin C, Sabau X, Ghesquiere A, Glaszmann JC, Delseny M, Guiderdoni E (2004) High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards in silico reverse genetics. *Plant J* 39:450-464
- Shen GZ, Wang XQ, Yin LQ, Wang J, Li L, Zhang JL (2003) Genetic analysis of a rolled-leaf mutant in rice population of T-DNA insertion. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao* 36:459-464
- Shin JH, Kim SR, An G (2009a) Rice aldehyde dehydrogenase7 is needed for seed maturation and viability. *Plant Physiol* 149:905-915
- Shin JH, Yoshimoto K, Ohsumi Y, Jeon JS, An G (2009b) OsATG10b, an autophagosome component, is needed for cell survival against oxidative stresses in rice. *Mol Cells* 27:67-74
- Siebert PD, Chenchik A, Kellogg DE, Lukyanov KA, Lukyanov SA (1995) An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 23:1087-1088
- Song Y, You J, Xiong L (2009) Characterization of OsIAA1 gene, a member of rice Aux/IAA family involved in auxin and brassinosteroid hormone responses and plant morphogenesis. *Plant Mol Biol* 70:297-309
- Tani H, Chen X, Nurmberg P, Grant JJ, SantaMaria M, Chini A, Gilroy E, Birch PR, Loake GJ (2004) Activation tagging in plants: a tool for gene discovery. *Funct Integr Genomics* 4:258-266
- Tyagi AK, Mohanty A (2000) Rice transformation for crop improvement and functional genomics. *Plant Sci* 158:1-18
- Vitha S, Froehlich JE, Koksharova O, Pyke KA, van Erp H, Osteryoung KW (2003) ARC6 is a J-domain plastid division protein and an evolutionary descendant of the cyanobacterial cell division protein Ftn2. *Plant Cell* 15:1918-1933
- Weigel D, Ahn JH, Blazquez MA, Borevitz JO, Christensen SK, Fankhauser C, Ferrandiz C, Kardailsky I, Malancharuvil EJ, Neff MM, Nguyen JT, Sato S, Wang ZY, Xia Y, Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ, Yanofsky MF, Chory J (2000) Activation tagging in Arabidopsis. *Plant Physiol* 122:1003-1013
- Woo YM, Park HJ, Su'udi M, Yang JI, Park JJ, Back K, Park YM, An G (2007) Constitutively wilted 1, a member of the rice YUCCA gene family, is required for maintaining water homeostasis and an appropriate root to shoot ratio. *Plant Mol Biol* 65:125-136
- Wu C, You C, Li C, Long T, Chen G, Byrne ME, Zhang Q (2008) RID1, encoding a Cys2/His2-type zinc finger transcription factor, acts as a master switch from vegetative to floral development in rice. *Proc Natl Acad Sci* 105:12915-12920
- Wu C, Li X, Yuan W, Chen G, Kilian A, Li J, Xu C, Li X, Zhou DX, Wang S, Zhang Q (2003) Development of enhancer trap lines for functional analysis of the rice genome. *Plant J* 35:418-427
- Wu J, Maehara T, Shimokawa T, Yamamoto S, Harada C, Takazaki Y, Ono N, Mukai Y, Koike K, Yazaki J, Fujii F, Shomura A, Ando T, Kono I, Waki K, Yamamoto K, Yano M, Matsumoto T, Sasaki T (2002) A comprehensive rice transcript map containing 6591 expressed sequence tag sites. *Plant Cell* 14:525-535
- Wuriyangan H, Zhang B, Cao WH, Ma B, Lei G, Liu YF, Wei W,

- Wu HJ, Chen LJ, Chen HW, Cao YR, He SJ, Zhang WK, Wang XJ, Chen SY, Zhang JS (2009) The ethylene receptor ETR2 delays floral transition and affects starch accumulation in rice. *Plant Cell* 21:1473-1494
- Xu XH, Zhao HJ, Liu QL, Frank T, Engel KH, An G, Shu QY (2009) Mutations of the multi-drug resistance-associated protein ABC transporter gene 5 result in reduction of phytic acid in rice seeds. *Theor Appl Genet* 119:75-83
- Yu D, Ranathunge K, Huang H, Pei Z, Franke R, Schreiber L, He C (2008) Wax Crystal-Sparse Leaf1 encodes a beta-ketoacyl CoA synthase involved in biosynthesis of cuticular waxes on rice leaf. *Planta* 228:675-685
- Yu J, Hu S, Wang J, Wong GK, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X, Cao M, Liu J, Sun J, Tang J, Chen Y, Huang X, Lin W, Ye C, Tong W, Cong L, Geng J, Han Y, Li L, Li W, Hu G, Huang X, Li W, Li J, Liu Z, Li L, Liu J, Qi Q, Liu J, Li L, Li T, Wang X, Lu H, Wu T, Zhu M, Ni P, Han H, Dong W, Ren X, Feng X, Cui P, Li X, Wang H, Xu X, Zhai W, Xu Z, Zhang J, He S, Zhang J, Xu J, Zhang K, Zheng X, Dong J, Zeng W, Tao L, Ye J, Tan J, Ren X, Chen X, He J, Liu D, Tian W, Tian C, Xia H, Bao Q, Li G, Gao H, Cao T, Wang J, Zhao W, Li P, Chen W, Wang X, Zhang Y, Hu J, Wang J, Liu S, Yang J, Zhang G, Xiong Y, Li Z, Mao L, Zhou C, Zhu Z, Chen R, Hao B, Zheng W, Chen S, Guo W, Li G, Liu S, Tao M, Wang J, Zhu L, Yuan L, Yang H (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* 296:79-92
- Yuan Q, Liang F, Hsiao J, Zismann V, Benito MI, Quackenbush J, Wing R, Buell R (2000) Anchoring of rice BAC clones to the rice genetic map in silico. *Nucleic Acids Res* 28:3636-3641
- Yuan W, Li X, Chang Y, Wen R, Chen G, Zhang Q, Wu C (2009) Mutation of the rice gene PAIR3 results in lack of bivalent formation in meiosis. *Plant J* 59:303-315
- Zhang J, Li C, Wu C, Xiong L, Chen G, Zhang Q, Wang S (2006) RMD: a rice mutant database for functional analysis of the rice genome. *Nucleic Acids Res* 34:745-748
- Zhang J, Xu RJ, Elliott MC, Chen DF (1997) *Agrobacterium*-mediated transformation of elite indica and japonica rice cultivars. *Mol Biotechnol* 8:223-231
- Zolman BK, Martinez N, Millius A, Adham AR, Bartel B (2008) Identification and characterization of Arabidopsis indole-3-butyric acid response mutants defective in novel peroxisomal enzymes. *Genetics* 180:237-251
- Zubko E, Adams CJ, Machaekova I, Malbeck J, Scollan C, Meyer P (2002) Activation tagging identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active cytokinins in plants. *Plant J* 29:797-808