

전사인자 OsNAC58 과발현을 통한 벼 흰잎마름병 저항성 증진 벼

박상렬 · 김혜선 · 이경실 · 황덕주 · 배신철 · 안일평 · 이서현 · 김선태

Overexpression of rice NAC transcription factor OsNAC58 on increased resistance to bacterial leaf blight

Sang Ryeol Park · Hye Seon Kim · Kyong Sil Lee · Duk-Ju Hwang · Shin-Chul Bae · Il-Pyung Ahn · Seo Hyun Lee · Sun Tae Kim

Received: 8 June 2017 / Revised: 18 June 2017 / Accepted: 20 June 2017
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Bacterial blight in rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) greatly reduces the growth and productivity of this important food crop. Therefore, we sought to increase the resistance of rice to bacterial blight by using a NAC (NAM, ATAF, and CUC) transcription factor, one of the plant-specific transcription factors that is known to be involved in biotic/abiotic stress resistance. By isolating the *OsNAC58* gene from rice and analyzing its biological functions related to *Xoo* resistance, phylogenetic analysis showed that *OsNAC58* belongs to group III. To investigate the biological relationship between bacterial leaf blight (BLB) and *OsNAC58* in rice, we constructed a vector for overexpression in rice and generated transgenic rice. The expression analysis resulting from use of RT-PCR showed that *OsNAC58*-overexpressed transgenic rice exhibited higher levels of *OsNAC58* expression than wild types. Further, subcellular localization analysis using rice protoplasts showed that the 35S/*OsNAC58*-SmGFP fusion protein was localized in the nuclei. Thirteen *OsNAC58*-overexpressed transgenic rice lines, with high expression levels of *OsNAC58*, showed more

resistant to *Xoo* than did the wild types. Together, these results suggest that the *OsNAC58* gene of rice regulates the rice disease resistance mechanism in the nucleus upon invasion of the rice bacterial blight pathogen *Xoo*.

Keywords Bacterial blight resistance, NAC transcription factor, *OsNAC58*, Rice, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

서 언

벼는 세계 인구의 반 이상에게 중요한 식량 자원이며, 곡물 중에서도 가장 많이 이용되고 있는 주요 작물에 속한다. 하지만 생육기간 전반에 걸쳐 벼흰잎마름병균, 도열병균, 잎집무늬마름병균 등 세균, 진균, 바이러스와 같은 여러 병원균에 의해 피해를 받고 있다(Dai et al. 2007). 이들 중에서도 우리나라를 비롯한 세계 벼 생산지역에 발병하여 막대한 피해를 주고 있는 벼 흰잎마름병은 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*)에 의해 유발된다(Shin et al. 2011). 또한 벼흰잎마름병 원균 *Xoo*는 기주 식물인 벼와 그 병원균 간의 상호작용 연구에 있어서 모델로 간주되고 있다(Li et al. 2006). 따라서 이 연구에서는 벼흰잎마름병 저항성을 증진하기 위해 식물 특이 전사인자 중의 하나인 NAC 전사인자를 벼에서 분리하고 벼 흰잎마름병 저항성 관련하여 생물학적인 기능을 알아보고자 하였다. NAC (NAM, ATAF and CUC) 전사조절인자는 식물에만 존재하는 것으로 1997년 처음 보고되었다(Aida et al. 1997). 전체 염기서열이 밝혀진 여러 식물의 분석 결과 NAC 전사인자는 가장 큰 식물특이 집단 중의 하나이며, 애기장대에는 117개, 포플러에는 163개, 대두와 담배에는 152개가 존재하는 것으로 조사되었다(Hu et al. 2010; Le et al. 2011). 하

S. R. Park (✉) · H. S. Kim · K. S. Lee · D.-J. Hwang · S.-C. Bae · I.-P. Ahn
농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부 유전자공학과
(Gene Engineering Div., National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Jeonju, 54874, South Korea)
e-mail: srpark@korea.kr

S. H. Lee · S. T. Kim
부산대학교 식물생명과학과
(Department of Plant Bioscience, Life and Industry Convergence Research Institute, Pusan National University, Miryang, 50463, South Korea)

지만, 생물학적 기능이 알려진 유전자는 아직까지 많지 않다. DNA-결합 영역이 단백질의 N-말단 부분에 잘 보존되어 있고 C-말단 영역은 다양하게 이루어져 있으며, 식물의 성장, 발달과 스트레스 저항성 및 노화에 관여한다고 알려져 있다(Ernst et al. 2004; Kleinow et al. 2009; Puranik et al. 2012). NAC family는 5개의 군(I-V)으로 나누어지며 스트레스 관련 여러 NAC 유전자들은 대부분 III군(SNAC)에 속하는 것으로 알려져 있다. (Fang et al. 2008). 벼의 전체 염기서열분석 결과 현재까지 약 151개 정도의 NAC 또는 NAC-유사 유전자들이 알려져 있다(Nuruzzaman et al. 2010; Puranik et al. 2012). 현재까지 벼에서 몇몇 NAC 전사인자가 생물적/비생물적 스트레스 등과 연관되어 있음이 밝혀지고 있다. 벼에서 스트레스-반응에 관여하는 *SNAC1* 유전자가 기공 닫힘을 조절하여 건조 저항성에 관여함을 보고하였고(Hu et al. 2006), *OsNAC6* 유전자는 비생물적 스트레스와 jasmonic acid (JA)와 도열병균에 의해 발현이 유도되고 과발현 시 저항성이 생긴다고 밝혔다(Nakashima et al. 2007). *OsNAC19*가 도열병 감염 시 전사활성인자이고 Methyl Jasmonic acid(MeJA)-매개 신호과정에 관여한다고 알려졌으며(Lin et al. 2007), 벼의 *OsNAC5*가 잎의 노화를 조절하는데 관여한다는 보고를 하였다(Sperotto et al. 2009). *ONAC048 (OsNAC6)*, *ONAC048 (OsNAC111)*, *ONAC122* 과 *ONAC131* 등 6개의 벼 NAC 유전자들이 도열병에 대한 병방어 반응에 관여한다고 보고 하였으며(Nakashima et al. 2007; Sun et al. 2013; Yokotani et al. 2014), *ONAC054 (RIMI)*는 rice dwarf virus 저항성에 부정적 영향을 주고 *ONAC068 (OsNAC4)*은 과민성 세포 죽음에 긍정적 조절 유전자로서 기능을 한다고 보고했다(Yoshii et al. 2009; Kaneda et al. 2009). 벼에서 분리한 전사인자 *OsNAC69*-과발현 형질전환체가 벼 흰잎마름병 저항성을 가져온다는 보고를 하였으며(Park SR et al. 2011), 마이크로 RNA mi164와 연관된 OMTN NAC 전사인자가 벼에서 가뭄 저항성을 음성적으로 조절한다는 보고도 있다(Fang et al. 2014). 여러 가지 바이러스 감염 시 벼의 NAC 전사인자 발현을 분석한 연구가 발표되었으며(Nuruzzaman et al. 2015), 벼에서 NAC 전사인자 family의 많은 유전자가 다양한 비생물적 스트레스와 생물적 스트레스 하에서 발현양상이 겹친다는 것을 보고하였다(Nuruzzaman et al. 2015; Sun et al. 2015). 최근 NAC095는 가뭄과 abscisic acid (ABA)에 의해 발현이 증가하고 저온에 의해 발현이 줄어들며 과발현 시 가뭄 저항성이 증가하고 저온에 약해지는 기능을 한다고 보고 되었다(Huang et al. 2016). 또한, 벼의 *OsANC2*가 비생물적 스트레스반응과 ABA-매개 반응을 조절하고 RNAi로 유전자 발현을 줄인 결과 건조 스트레스 처리 시에 수량 증가에 관여한다고 보고 되었다(Shen et al. 2017). *OsNAC6* 과발현 벼형질전환체와 NAC6 돌연변이체를 이용한 연구에서 이 유전자가 가뭄 저항성에 대한 nicotianamine 생합성과 뿌리 구조 적응에 관여하는 분자 구조를 다중 조절한다고 보고하였다(Lee et al. 2017). 이와 같이 벼에서 여러 NAC 전사인자의 생

물학적 기능들이 지속적으로 밝혀지고 있다. 그럼에도 불구하고, 여전히 생물학적 기능이 밝혀지지 않은 유전자가 많이 남아 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 식물에서 전사인자들이 stress 저항성을 증진시킨다는 보고(Fang et al. 2008; Hussain et al. 2011)를 바탕으로 벼에서 흰잎마름병 관련 연구가 WRKY 전사인자에 비해 상대적으로 미진한 NAC 전사인자에 주목하였다. 형질전환방법에 의해 스트레스 저항성에 관여한다고 알려진 전사인자 중의 하나인 NAC 유전자를 이용하여 벼흰잎마름병 저항성 벼를 육성하고, 벼에서 저항성 반응 조절 연구를 위해 그 중의 하나인 *OsNAC58* 유전자를 분리하여 그 특성을 분석하였으며 생물학적 기능 분석을 시도하였다. 그 결과 유추된 아미노산 서열을 바탕으로 *OsNAC58* 유전자는 NAC family 5개 group 중에서 stress와 많은 관련이 있다고 알려진 group III에 속했으며, 세포 내에서 핵에 위치하는 것으로 조사되었다. 이에 따라 이 유전자의 생물학적 기능을 알아보고자 과발현시킨 벼 형질전환체를 육성하였으며, 이들 형질전환체에서 유전자의 과발현 여부를 확인하였다. 과발현이 확인된 벼형질전환체를 이용하여 흰잎마름병 저항성 증진 여부를 조사한 결과 과발현 형질전환체가 대조구인 동진벼에 비해 흰잎마름병 저항성이 크게 증가하였다.

재료 및 방법

식물 및 병원균 배양

벼(*O. sativa* L. cv. 동진)는 종자 소독하여 발아시킨 후 20~30°C가 유지되는 온실에서 6주간 배양하였으며, *OsNAC58* 과발현 형질전환체는 조직배양실에서 선발된 개체를 순화 후 동진벼와 동일한 온실로 옮겨 6주간 더 배양하였다. 벼 흰잎마름병원균인 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo)는 Peptone Sucrose 한천 배지(Peptone-10g, Sucrose-10g, Na-Glutamate-1g, Agar-15g per 1L)를 이용해 28°C에서 2일간 배양하여 OD₆₀₀=1.0이 되게 10 mM MgCl₂로 희석하여 가위를 희석액에 담근 후 벼 잎을 자르면서 접종하였다(Karganilla et al. 1973).

유전자 선발 및 분리

GENEVESTIGATOR (<https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>)의 digital northern 자료와 식물전사인자database (http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/index.php?sp_id=OSAJ) 자료 등 여러 공개된 분석자료를 참고로 하여 병과 스트레스에 의해 발현이 증대된 *OsNAC58*(LOC_Os03g21060)을 선정하고 이 유전자 분리를 위해 primer를 제작하였다(Table 1). 합성한 동진벼 cDNA로부터 *OsNAC58* 특이 primer(Table 1)를 이용하여 RT-PCR로 분리 후 pGEM-T easy vector (Promega)에 클로닝하고

Table 1 List of primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
OsActin-F	TGCTATGTACGTCGCCATCCAG
OsActin-R	AATGAGTAACCACGCTCCGTCA
OsNAC58-F	ATGGTTCTGTGCGAACCCGGCG
OsNAC58-R	TCAGTTCATCCCCATGTTAGAGTGGAG
OsNAC58-attB1	AAAAAGCAGGCTCGATGGTTCTGTGCGAACCCGG
OsNAC58-attB2	AGAAAGCTGGGTAGTTCATCCCCATGTTAGAGTGGAG
attB1 adaptor primer	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
attB2 adaptor primer	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

염기서열을 분석하여 확인하였다.

RNA 분리 및 RT-PCR

동진벼와 형질전환벼의 잎과 줄기를 채취한 후 액체질소를 이용하여 마쇄한 후 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden)를 이용하여 전체 RNA를 추출하였다. RT-PCR 조건은 5 µg의 total RNA와 SuperScriptIII (200 units/µl)를 이용하여 먼저 First strand cDNA를 합성하였다. 목표 유전자 분리는 1 µl의 First strand 반응액에 *OsNAC58* 특이 primer (Table 1)로 95°C에서 2분 preheating 한 후 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분의 cycle로 35 cycles의 PCR을 수행 하였다. PCR 수행 후 1% agarose gel에 전기영동하여 분석하고 gel에서 DNA를 추출하였다(Sambrook et al. 1989).

벼 원형질체 분리 및 세포내 위치조사

OsNAC58 단백질의 세포내 위치를 조사하기 위해 p35S/*OsNAC58::SmGFP* fusion vector를 제작하고, p35S-*SmGFP*와 NLS-RFP vector를 대조구로 하여 분리한 벼 protoplast에 infection 시킨 후 형광현미경(Leica TCS SP8)으로 관찰하였다(Kim et al. 2007; Zhang et al. 2011).

과발현 벼형질전환체용 Vector 제작

35S 프로모터와 *bar* 표지를 포함하고 있는 pEarleyGate201 벡터에 Gateway system을 이용하여 벼 형질전환용 과발현 vector, pEarleyGate201/*OsNAC58*을 제작하였다(Earley et al. 2006).

벼 형질전환

제작된 pEarleyGate201/*OsNAC58* 벡터를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 에 도입한 다음 벼 종자(품종: 동진)에 감염시켰다(Hiei et al. 1994). 감염시킨 동진벼 종자를 phosphinothricin이 첨가된 callus 유도 배지에서 calli를 유도하였다. 유도된 calli

를 phosphinothricin이 함유된 줄기 유도배지로 옮겨 줄기를 유도였다. 유도된 줄기를 phosphinothricin이 함유된 뿌리유도 배지에 옮겨 발근을 유도하면서 형질전환체를 선별하였다(Murashige and Skoog 1962).

병원균 접종 및 병저항성 측정

과발현 벼 형질전환체를 온실로 옮겨 2주 정도 더 배양 후 0.1 mg/ml의 BASTA를 한 번 더 처리하여 형질전환체를 선발하였다. 4주 더 키운 동진벼와 벼형질전환체에 벼흰잎마름병균을 가위 접종하여 14일간 병징을 관찰 하고 시료를 채취하여 병반의 길이를 측정하여 병저항성 여부를 조사하였다(Kauffman et al. 1973; Mundt et al. 2002).

결과 및 고찰

분리한 *OsNAC58* 유전자(LOC_Os03g21060)는 염기서열을 분석한 결과 392개의 아미노산을 암호화하는 1,179 bp DNA로 이루어져 있었고, NCBI의 protein BLAST를 이용하여 구조를 분석한 결과 N-말단에 NAC 전사인자가 가지는 NAM super family 영역을 갖고 있었다(Fig. 1). 또한 유추된 아미노산 서열을 기반으로 하여 DNAMAN CLUSTAL-W programs을 이용해 유전적 유연관계를 확인해 본 결과, *OsNAC58*은 *Glycine max* NAC domain-containing protein 29-like(*GmNAC*, XM_003518141)와 유전적 유연관계가 제일 가까운 것으로 나타났으며(Fig. 2), NAC family 5개 group 중에서 stress와 관련이 있다고 알려진 GIII에 속했다(Fang et al. 2008). *OsANC58* 단백질이 벼 세포 내 어떤 소기관에 위치하는 지를 알아보기 위해 *OsNAC58::SmGFP* 융합시킨 유전자를 벼 원형질체에 발현시켜 공초점 현미경으로 관찰하였다. 그 결과 이 단백질은 세포내에서 핵에 위치하는 것으로 조사되었으며 핵에서 유전자 발현을 조절할 것으로 생각되었다. 따라서 *OsNAC58*의 병저항성과 관련된 생물학적 기능 분석을 위해 GATEWAY 방법을 이용하여 과발현용 벡터를 제작하고 *Agrobacterium*

```

1      ATGGTTCTGTGAAACCCGGCGATGCTGCCCGGGGTTCCGGTTCCACCCGACGGACGAGGAGTGCATCGTGCACCTACCTCCGCAACCCGGGCGCCTCCTCGCGG
1      M V L S N P A M L P P G F R F H P T D E E L I V H Y L R N R A A S S P
106   TGCCCGTCTCCATCATCGCCGACGTGCACATCTACAAGTTCGATCCGTGGGACCTCCCATCCAAGGAGAATTACGGGGACAGGGAGTGGTACTTCTTCAGCCCG
36   C P V S I I A D V D I Y K F D P W D L P S K E N Y G D R E W Y F F S P
211   AGGGACCGCAAGTACCCGAACGGGATCCGCGCGAACCGCGCGGGCTCCGGCTACTGGAAGGCCACCGGCACCGACAAGCCCATCCACAGCAGCGGGCGCGG
71   R D R K Y P N G I R P N R A A G S G Y W K A T G T D K P I H S S G G A
316   GCGACCAACGAGAGCGTCCGGCTCAAGAAGGCGCTCGTCTTCTACAAGGCCCGCCGCGCAAGGGCACCAAGACCAACTGGATCATGCACGAGTACCGCCTCGCC
106   A T N E S V G V K K A L V F Y K G R P P K G T K T N W I M H E Y R L A
421   GCCGACAGCCGCCACCGCCCAACACCTACCGCCCATGAAGTTCGCGAACACCTCCATGAGGCTGGATGACTGGTGTGTGCCGGATCTACAAGAAGAGCAGC
141   A A D A H A A N T Y R P M K F R N T S M R L D D W V L C R I Y K K S S
526   CACGCTCGCCGCTGGCGTCCCGCTCCGACACGAGCAGGACGAGCGTCCGCGCTGGAGGAGAACGCGCGCTGTACGCGCGCTCGTGTGTGAGCGCC
176   H A S P L A V P P L S D H E Q D E P C A L E E N A P L Y A P S S S S A
631   GCATCCATGATCTTGCAGGGCGTGCAGCGCGGCTCCCGTCCGCTGCACGCGCGCGCGCTACGCGAGGACGGCGATGCAGAAGATCCCTTCCATTTCC
211   A S M I L Q G A A A G A F P S L H A A A A A T Q R T A M Q K I P S I S
736   GACCTGTCAACGAGTACTCGCTGTGCGAGCTTTCGACGACGGCGCGCGCCGCGCGCCCGCCCTGCAGGAGATGGCGAGGCAGCCCGACCCACCACCACC
246   D L L N E Y S L S Q L F D D G G A A A A A P L Q E M A R Q P D H H H H
841   CAACAACAACAACACGCCCTCTTTGGCCACCCCGTCAATGAACATTTTCATCGGAACAACAGCATGGTTCAGCTCGCGCACCTGGACCCGCTCCTCCTGTGCGGCC
281   Q Q Q Q H A L F G H P V M N H F I A N N S M V Q L A H L D P S S S A A
946   GCCTCGACGTCCGACGGCGCGCTCGTGCAGCCCGCGCGCTCACCGGGAAGCGCAAGAGATCATCGGACGGAGGCGAGCCGACGATCCAGGCGCTGCCTCCTGT
316   A S T S A G A V V E P P A V T G K R K R S S D G G E P T I Q A L P P A
1051  GCCGCGCGGCCAAGAAGCCGAACGGTTCATGCGTTGGTGAACCTTCCAAATAGGCAGCGCCTTGCAGGGATCGTCACTGGGACTGAGCCACCAGATGCTGCTC
351  A A A A K K P N G S C V G A T F Q I G S A L Q G S S L G L S H Q M L L
1156  CACTTAACATGGGGATGAACCTGA
386  H S N M G M N *
    
```

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of OsNAC58. Conserved domain of the NAC family was underlined

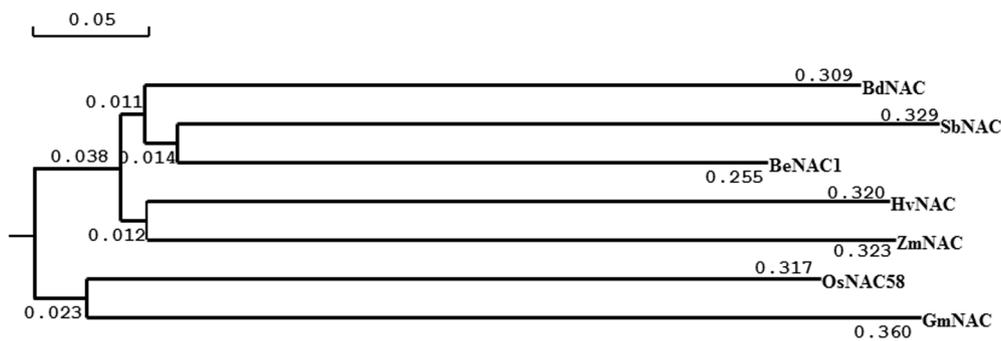


Fig. 2 The phylogenetic tree of the OsNAC58 protein and other related proteins. OsNAC58 sequence was aligned with the *Brachypodium distachyon* NAC transcription factor 29-like (BdNAC29, XM_003557950), *Sorghum bicolor* NAC transcription factor (SbNAC, XM_002465283), *Bambusa emeiensis* NAC transcription factor 1 (BeNAC1, HM626401), *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* NAC transcription factor 023 (HvNAC023, FR821745), *Zea mays* NAC transcription factor (ZmNAC, NM_001158141) and Glycine max NAC domain-containing protein 29-like (GmNAC, XM_003518141) using DNAMAN CLUSTAL-W programs

매개 형질전환방법(Hiei et al. 1994)을 이용하여 이 유전자 과 발현 벡터형질전환체를 제작 하였다. 먼저, OsNAC58 clone으로 과발현 벡터를 작성하기 위해 OsNAC58-attB1과 OsNAC58-attB2 primer (Table 1)로 PCR을 수행하고 이 PCR 산물을 주형으로 다시 attB1과 attB2 primer (Table1)로 2차 PCR을 수행하였다. 이 PCR산물과 BP clonase (Invitrogen)를 이용하여 pDONOR201/OsNAC58 entry clone을 만들었다. 이 entry clone으로부터 식물발현 벡터인 pEarleyGate201에 LR clonase (Invitrogen)를 이용해 식물발현용 벡터 pEarleyGate201/OsNAC58을 만들었다. 이 벡터를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 electroporation으로 도입한 다음 벡(품종: 동진) 종자에 감염

시켜 조직배양을 이용한 형질전환체를 제작하였다. 제작된 벡 형질전환체는 온실로 이동시킨 후 14일간 배양되었으며, 이 후 다시 BASTA를 처리하여 그 중에서 생존한 13 개체만을 선발하였다(Fig. 3; Jiang et al. 2000). 생존한 개체의 RNA를 추출하고 RT-PCR방법으로 *OsNAC58* 유전자의 과발현 여부를 분석하였다. 그 결과 동진벼와 비교하여 발현이 현저하게 증가한 13개체를 선발할 수 있었다(Fig. 4A). 이와 같은 과정으로 선발된 형질전환체를 온실에서 4주간 더 배양한 후 각 개체마다 총 5개의 잎에 *Xoo* KACC10859 균주를 접종하고 14일간 병징을 관찰하고 14일 경과 후 그 병반의 길이를 측정하였다. 형질전환체의 과발현 분석 결과 발현이 현저히

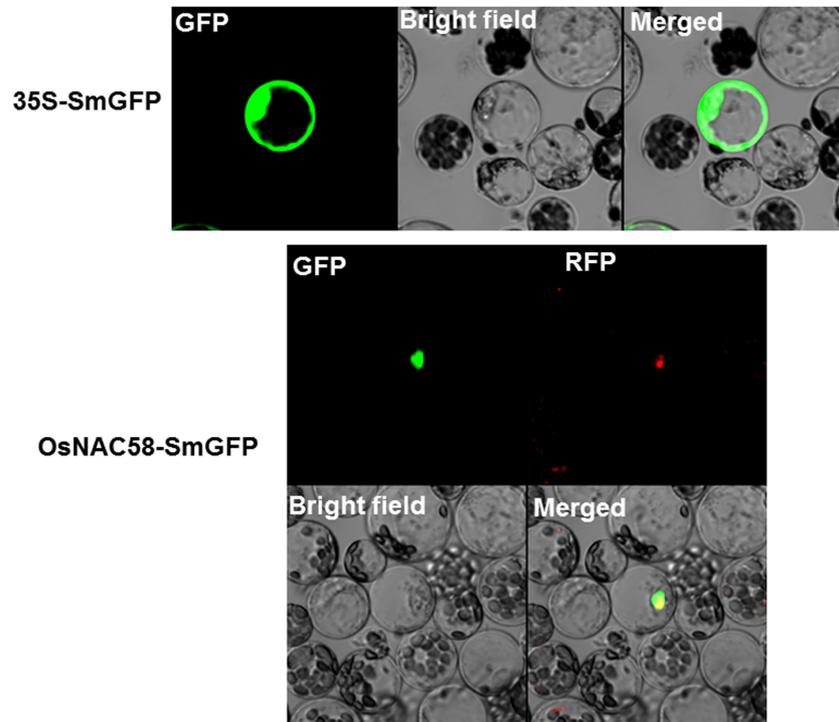


Fig. 3 Subcellular localization of CaMV35S/OsNAC58::SmGFP fusion constructs in rice protoplast. The expression of the introduced proteins was visualized with laser confocal-scanning fluorescence microscopy 48h after infection with PEG

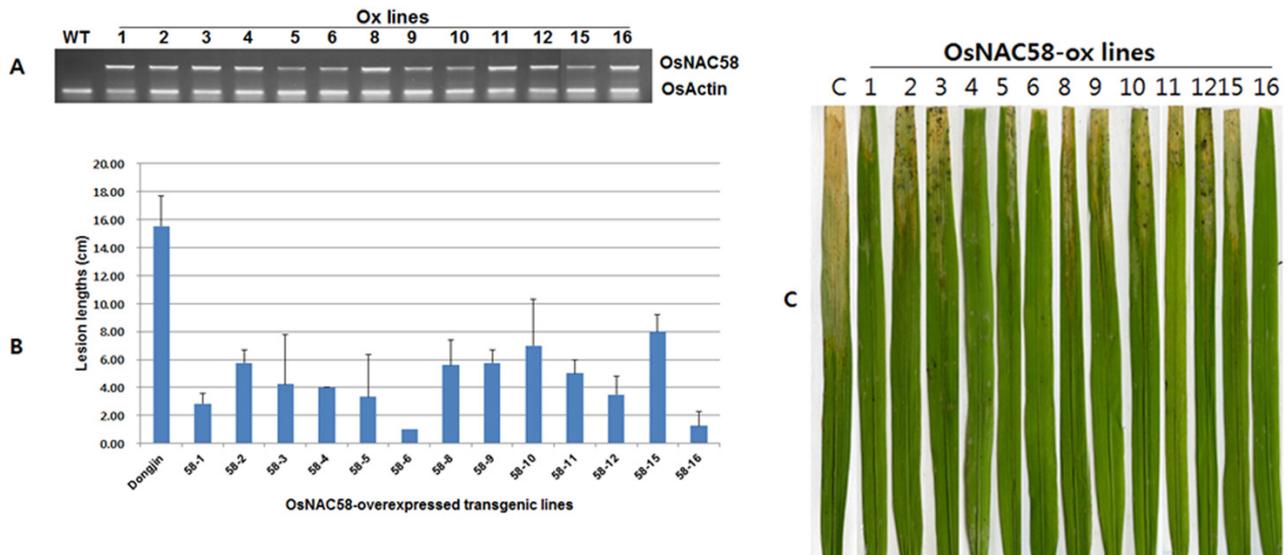


Fig. 4 Expression analysis and disease resistance assay on *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strain KACC10859 of the *OsNAC58*-overexpressing rice and the wild type ‘Dongjin’ rice. A. Expression analysis of *OsNAC58*-overexpressed transgenic rice plants by RT-PCR. *OsNAC58*-overexpressing rice plants (T0) showed high levels of *OsNAC58* expression compared with ‘Dongjin’ rice. B. Average lesion lengths of ‘Dongjin’ and *OsNAC58*-overexpressing T0 rice plants 14 days post-inoculation with Xoo strain KACC10859. *OsNAC58*-overexpressing T0 transgenic rice plants were more resistant than wild rice types. C. Representative leaves showing lesions of ‘Dongjin’ and the *OsNAC58*-overexpressing T0 rice plants 14 days post-inoculation with Xoo strain KACC10859 via the leaf clipping method

증가한 13개의 개체 모두가 대조구인 동진벼에 비해 벼흰잎마름병 저항성이 증가함을 보였다(Fig. 4B). 각 계통별로 병징을 보인 대표적인 잎을 Figure 4C와 같이 나타내었다. 이는 *OsNAC58*의 과발현이 벼흰잎마름병에 대한 저항성 관련 신

호전달체계에 개입하여 그 기작을 조절함으로써 결과적으로 저항성 증진 효과를 이끌어낸 것으로 추정된다. 앞으로 *OsNAC58*이 세포내 핵에 위치하면서 어떤 유전자의 발현에 어떻게 관여하여 저항성을 부여하는 지 그 정확한 기작에 관

한 연구가 추가로 수행되어야 할 것이다.

결론적으로, 분리한 *OsNAC58* 유전자는 세포 내 핵에 위치하는 것으로 조사되었고, NAC 전사인자 family에서도 group III에 속하는 것으로 조사되었다. 또한 이 유전자를 과발현 시켜 발현이 증가한 벼형질전환체는 대조구인 동진벼에 비해 벼흰잎마름병에 대한 저항성이 증가함을 보였다.

적 요

벼는 중요한 식량작물이며 지속적으로 벼흰잎마름병균, 도열병균, 잎집무늬마름병균, 바이러스 등 여러 병원균에 의해 수확량이 영향을 받고 있다. 이들 중 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*)에 의해 유발되는 벼흰잎마름병은 세계 벼 재배지역에 발병하여 막대한 피해를 주고 있어 문제가 되고 있다. 따라서 생물적/비생물적 스트레스 저항성에 관여한다고 알려져 있는 식물 특이 전사인자 중의 하나인 NAC (NAM, ATAF, and CUC) 전사인자를 이용하여 벼의 벼흰잎마름병에 대한 저항성을 증진시키고자 하였다. 본 연구에서는 벼에서 NAC 전사인자 중 하나인 *OsNAC58* 유전자를 분리해 냈으며 아미노산 서열을 바탕으로 분석해 본 결과가 이 유전자는 5개의 NAC 전사인자 group 중에서도 stress와 많은 관련이 있다고 알려진 group III에 속하였다. 또한 세포 내 위치를 확인하기 위해 GFP와 융합한 단백질을 이용해 조사해 본 세포 내에서도 핵에 위치하는 것으로 조사되었다. *OsNAC58* 유전자의 생물학적 기능 분석을 위해 이 유전자를 과발현시킨 벼 형질전환체를 만들었다. 동진벼를 기준으로 보다 발현이 높은 13개 계통을 선발하였으며, 이들 계통에 벼흰잎마름병균을 접종하여 병저항성을 검정한 결과 동진벼에 비해 벼흰잎마름병에 대한 저항성이 크게 증대함을 보였다. 이것은 벼의 *OsNAC58* 유전자가 벼흰잎마름병균 침입 시 숙주인 벼 핵 내에서 벼의 병저항성 기작을 조절하여 나타난 결과로 추정된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ01103802)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M (1997) Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell* 9:841–857

Dai LY, Liu XL, Xiao YH, Wang GL (2007) Recent advances in cloning and characterization of disease resistance genes in

rice. *J Integrative Plant Biol* 49(1):112–119

Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard CS (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J* 45(4):616–629

Ernst HA, Olsen AN, Larsen S, Leggio L (2004) Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors. *EMBO Rep* 5:297–303

Fang Y, You J, Xie K, Xie W, Xiong L (2008) Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice. *Mol Genet* 280(6):547–563

Fang Y, Xie K, Xiong L (2014) Conserved miR164-targeted NAC genes negatively regulate drought resistance in rice. *J Exp Bot* 65(8):2119–2135

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(2):271–282

Hu H, Dai M, Yao J, Xiao B, Li X, Zhang Q, Xiong L (2006) Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:12987–12992

Hu R, Qi G, Kong Y, Kong D, Gao Q, Zhou G (2010) Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biol*. 10:145

Huang L, Hong Y, Zhang H, Li D, Song F (2016) Rice NAC transcription factor ONAC095 plays opposite roles in drought and cold stress tolerance. *BMC Plant Biol* 16(1):203

Hussain SS, Kayani MA, Amjad M (2011) Transcription factors as tools to engineer enhanced drought stress tolerance in plants. *Biotechnology Progress* 27:297–306

Jiang J, Linscombe SD, Wang J, James Oard H (2000) High efficiency transformation of U.S. rice lines from mature seed-derived calli and segregation of glufosinate resistance under field conditions. *Crop Sci* 40:1729–1741

Kaneda T, Taga Y, Takai R, Iwano M, Matsui H, Takayama S, Isogai A, Che FS (2009) The transcription factor OsNAC4 is a key positive regulator of plant hypersensitive cell death. *EMBO J* 28:926–936

Kauffman HE, Reddy APK, Hsieh SPY, Merca SD (1973) An improved technique for evaluation of resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. *Plant Disease Reporter* 57:537–541

Karganilla A, Paris-Natural M, Ou SH (1973) A comparative study of culture media for *Xanthomonas oryzae*. *Philipp Agric* 57:141–152

Kim HS, Park BO, Yoo JH, Jung MS, Lee SM, Han HJ, Kim KE, Kim SH, Lim CO, Yun DJ, Lee SY, Chung WS (2007) Identification of a calmodulin-binding NAC protein as a transcriptional repressor in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 282(50):36292–36302

Kleinow T, Himbert S, Krenz B, Jeske H, Koncz C (2009) NAC domain transcription factor ATAF1 interacts with SNF1-related kinases and silencing of its subfamily causes severe developmental defects in *Arabidopsis*. *Plant Science* 177:360–370

- Le DT, Nishiyama R, Watanabe Y, Mochida K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LS (2011) Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress. *DNA Res* 18:263–276
- Lee D-K, Chung PJ, Jeong JS, Jang G, Bang SW, Jung H, Kim Y S, Ha S-H, Choi YD, Kim J-K (2017) The rice OsNAC6 transcription factor orchestrates multiple molecular mechanisms involving root structural adaptations and nicotianamine biosynthesis for drought tolerance. *Plant Biotechnology Journal* 15:754–764
- Li ZK, Arif M, Zhong DB, Fu BY, Xu JL, Domingo-Rey J, Ali J, Vijayakumar CHM, Yu SB, Khush GS (2006) Complex genetic networks underlying the defensive system of rice (*Oryza sativa* L.) to *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Proc Nat Acad Sci USA* 103(21):7994–7999
- Lin R, Zhao W, Meng X, Wang M, Peng Y (2007) Rice gene OsNAC19 encodes a novel NAC-domain transcription factor and responds to infection by *Magnaporthe grisea*. *Plant Science* 172:120–130
- Mundt CC, Nieva LP, Vera Cruz CM (2002) Variation for aggressiveness within and between lineages of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Pathology* 51:163–168
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Planta* 15:473–497
- Nakashima K, Tran LS, Van Nguyen D, Fujita M, Maruyama K, Todaka D, Ito Y, Hayashi N, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *Plant J* 51:617–630
- Nuruzzaman M, Manimekalai R, Sharoni AM, Satoh K, Kondoh H, Ooka H, Kikuchi S (2010) Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene* 465:30–44
- Nuruzzaman M, Sharoni AM, Kikuchi S (2013) Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Front Microbiol* 4:248
- Nuruzzaman M, Sharoni AM, Satoh K, Karim MR, Harikrishna JA, Shimizu T, Sasaya T, Omura T, Haque MA, Hasan SMZ, Ahmad A, Kikuchi S (2015) NAC transcription factor family genes are differentially expressed in rice during infections with Rice dwarf virus, Rice black-streaked dwarf virus, Rice grassy stunt virus, Rice ragged stunt virus, and Rice transitory yellowing virus. *Front Plant Sci* 6:676
- Park SR, Cha EM, Moon SJ, Shin D., Hwang DJ, Ahn IP, and Bae CH (2011) Generation of bacterial blight resistance rice with transcription factor OsNAC69-overexpressing. *Kor J Breed Sci* 43(5):457–463
- Puranik S, Sahu PP, Srivastava PS, Prasad M (2012) NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends Plant Sci* 17:369–381
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory
- Shen J, Lv B, Luo L, He J, Mao C, Xi D, Ming F (2017) The NAC-type transcription factor OsNAC2 regulates ABA-dependent genes and abiotic stress tolerance in rice. *Scientific Reports* 7:40641
- Shin MS, Kim KY, Park HS, Ko JK (2011) Breeding for resistance to bacterial blight in rice. *Kor J Breed Sci* 43(4):251–261
- Sperotto R, Ricachenevsky F, Duarte G, Boff T, Lopes K, Sperb E, Grusak M, Fett J (2009) Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. *Planta* 230:985–1002
- Sun L, Huang L, Hong Y, Zhang H, Song F, Li D (2015) Comprehensive analysis suggests overlapping expression of rice ONAC transcription factors in abiotic and biotic stress responses. *Int J Mol Sci* 16:4306–4326
- Yokotani N, Tsuchida-Mayama T, Ichikawa H, Mitsuda N, Ohme-Takagi M, Kaku H, Minami E, Nishizawa Y. (2014) OsNAC111, a blast disease-responsive transcription factor in rice, positively regulates the expression of defense-related genes. *Mol Plant Microbe Interact.* 27(10):1027–1034
- Yoshii M, Shimizu T, Yamazaki M, Higashi T, Miyao A, Hirochika H, Omura T (2009) Disruption of a novel gene for a NAC-domain protein in rice confers resistance to Rice dwarf virus. *Plant J* 2009:57(4):615–625
- Zhang Y, Su J, Duan S, Ao Y, Dai J, Liu J, Wang P, Li Y, Liu B, Feng D, Wang J, Wang H (2011) A highly efficient rice green tissue protoplast system for transient gene expression and studying light/chloroplast-related processes. *Plant Methods* 7(1):30