

## MeJA처리후 념성을 회복하는 논벼세포질수성불녀계통 <423A>에서 자스몬산합성유전자들의 전사활성변화

박학성, 김은향, 김현철

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《농업부문에서는 종자문제를 중요한 고리로 틀어쥐고 종자문제해결에 선차적인 주목을 돌려야 합니다.》

수성불녀계통에 식물호르몬을 처리하여 념성을 회복할수 있으면 농작물1대잡종종자생산에서 그 의의가 매우 크다. 고등식물들에서 식물호르몬인 자스몬산(jasmonic acid, JA)은 꽃가루발육과 꽃가루집터치기를 비롯한 수성생식기관발육에서 중요한 역할을 한다.[1-3]

우리는 논벼세포질수성불녀계통 <423A>에 메틸자스몬산(MeJA)을 처리한 후 념성이 회복된 계통들에서 반정량PCR(RT-PCR)와 정량PCR(qRT-PCR)방법으로 자스몬산합성유전자들의 발현을 전사수준에서 분석하였다.

### 재료와 방법

#### 1) 재료

연구재료로는 논벼(*Oryza sativa* L.)의 세포질수성불녀계통 <423A>, 유지계통 <423B>와 <423A>에 MeJA를 처리한 후 념성이 회복된 선발계통들을 리용하였다.

#### 2) 연구방법

실험재료 MeJA를 처리하여 념성을 회복할수 있는 수성불녀계통들에서 MeJA처리후 3일과 7일때의 꽃들을 취하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

RNA분리와 cDNA합성 실험시료를 리용하여 트리졸법[2]으로 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA의 순도와 농도는 자외선분광광도계(UV-2450, 《Shimdin》)를 리용하여 흡수파장 260, 280nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 두오리cDNA는 cDNA합성시약키트(Takara M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit)를 리용하여 합성하였다.

자스몬산합성유전자들의 프라이머설계 논벼에서 자스몬산합성유전자의 염기배열은 생명정보자료기지(NCBI)로부터 내리적재하였으며 프라이머설계프로그램 Primer Premier 5.0을 리용하여 프라이머를 설계하였다. 대조유전자로는 식물체의 모든 조직에서 같은 량으로 발현되는 *OsActin*을 리용하였다.

자스몬산합성유전자들의 발현검증에 리용된 프라이머배열과 PCR조건은 표 1과 같다.

RT-PCR분석 실행방법[2]에 기초하여 표 1에서 제시한 프라이머와 PCR조건들을 리용하여 목적DNA토막들을 증폭하였다. RT-PCR산물은 1.2% 아가로즈겔전기영동을 진행하

표 1. 자스몬산합성유전자발현검증에 리용된 프라이머배열과 PCR조건

논벼유전자이름 (유전자은행번호)	프라이머 이름	프라이머배열(5'→3')	PCR산물의 크기/bp	PCR조건 (아닐링온도/순 환수)
<i>OsActin</i> (AY212324)	OsACTIN-1	AGCCCTCTTTCATCGGTAT	314	51°C/30
	OsACTIN-2	TGGACCCGACTCATCATAC		
<i>OsAOC</i> (Os03g32314)	OsAOC-1	TTCGGGCGTCGCTGTTCT	148	58°C/28
	OsAOC-2	GCGTTCTCCGTCGTGCTTGG		
<i>OsAOS</i> (Os03g55800)	OsAOS-1	TCGTCGGAAGGCTGTTGC	119	54°C/28
	OsAOS-2	ACGATTGACGGCGGAGGT		
<i>OsOPR7</i> (Os08g0459600)	OsOPR7-1	GAAGGTGGTGGATGCTGTT	208	51°C/28
	OsOPR7-2	TTTAGGATACTTGCCATAGGAG		

*OsActin*: *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) actin (Act) mRNA, complete.

*OsAOC*: *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) mRNA for allene oxide cyclase (aoc gene).

*OsAOS*: *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) allene oxide synthase (AOS) mRNA, complete cds.

*OsOPR7*: *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) Japonica Group Os08g0459600 mRNA, complete cds.

여 비교하였다.

실시간정량PCR에 의한 유전자의 발현연구 실시간정량PCR를 위한 프라이머쌍으로는 119~314bp사이에서 유전자에 특이적인 프라이머로 작성하였다. 실시간정량PCR의 주형으로 되는 한오리cDNA는 대략 2μg의 RNA가 포함된 20μL의 반응액에서 cDNA합성시약키트인 prime Script™ reverse transcriptase(《TAKARA》)를 리용하여 합성하였다. *OsActin*의 상류프라이머(5'-AGCCCTCTTTCATCGGTAT-3')와 하류프라이머(5'-TGGACCCGACTCATCATAC-3')는 Genbank Accession 등록번호 AY212324에 따라 설계되었다. 실시간정량PCR를 리용한 증폭은 전문적인 실시간정량PCR기(icycler Iq thermocycler (《Bio-Rad》))와 SYBR Green시약키트(《TAKARA》)를 리용하여 진행하였다.[1, 5]

## 결과 및 론의

### 1) MeJA처리후 념성을 가지는 계통들의 형질특성

우리는 논벼세포질수성불념계통 <423A>에 MeJA를 처리하였을 때 념성을 가지는 계통들의 형질특성을 보았다.(표 2)

표 2. 논벼세포질수성불념계통 &lt;423A&gt;에 MeJA를 처리하였을 때 념성을 가지는 계통들의 형질특성

계통명	대 길이/cm	받을잎길이/cm	받을잎너비/cm	녀성회복률/%
<423A>	69.3±2.5	36.2±2.1	1.8±0.2	0.01
<J9-16-31>	66.5±3.2	36.9±2.1	1.7±0.1	6.2
<J9-4-3>	69.8±5.2	34.8±2.2	1.7±0.1	13.4
<J9-1-21>	67.9±7.1	35.8±2.2	1.8±0.2	15.6
<J9-9-33>	70.1±3.7	37.6±2.1	1.9±0.1	23.9
<J9-16-10>	70.3±3.7	38.9±2.1	1.9±0.1	24.8
<J9-4-45>	71.2±3.7	37.9±2.3	1.8±0.1	26.3
<423B>	68.6±2.5	37.2±2.1	1.8±0.1	98.6

N=30개체, 3반복,  $p<0.05$

표 2에서 보는것처럼 논벼세포질수성불념계통 <423A>에 MeJA를 처리한 후 념성을 가지는 선발계통들은 념성이 회복되어 여분물이 6.2%와 26.3%사이에서 변하였을뿐 대길이와 받을길길이, 받을이너비를 비롯한 외적형질들에서는 대조인 불념계통 <423A>와 차이가 인정되지 않았다. 이것은 MeJA처리가 념성회복외에 다른 형질들에는 영향을 주지 않는다는 것을 보여준다.

## 2) 자스몬산합성유전자들에서 cDNA증폭토막의 크기

자스몬산합성유전자들에 대한 RT-PCR분석을 위한 프라이머를 설계하고 <J9-4-3>에 MeJA를 처리한 후 3일되는 꽃시료들에 대한 RT-PCR를 진행하여 프라이머설계의 정확성을 확인하였다.(그림 1)

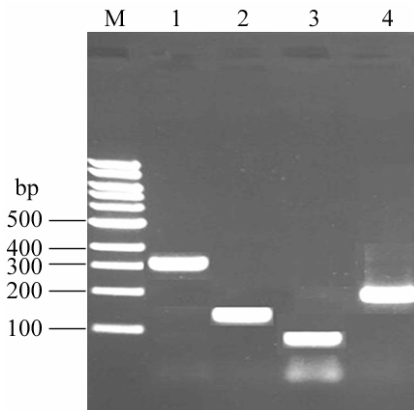


그림 1. 계통 <J9-4-3>의 꽃시료들에서 RT-PCR에 의한 프라이머의 확인

M-1kb DNA표식자, 1-*OsActin*(314bp), 2-*OsAOC*(148bp), 3-*OsAOS*(119bp), 4-*OsOPR7*(208bp)

그림 1에서 보는것처럼 계통 <J9-4-3>의 꽃시료에서 분리한 RNA를 리용하여 프라이머로 합성한 PCR산물의 분자크기를 확인한 결과 대조유전자 *OsActin*은 314bp, *OsAOC*는 148bp, *OsAOS*는 119bp, *OsOPR7*은 208bp의 크기를 가진다는것을 알수 있다.

## 3) 자스몬산합성유전자들의 RT-PCR분석

우리는 논벼세포질수성불념계통 <423A>, 유지계통 <423B>와 MeJA를 처리하였을 때 념성을 가지는 계통 <J9-16-31>, <J9-4-3>, <J9-16-10>, <J9-4-45>의 MeJA처리후 3일 및 7일 되는 꽃에서 자스몬산합성유전자들의 RT-PCR분석을 진행하였다.(그림 2)

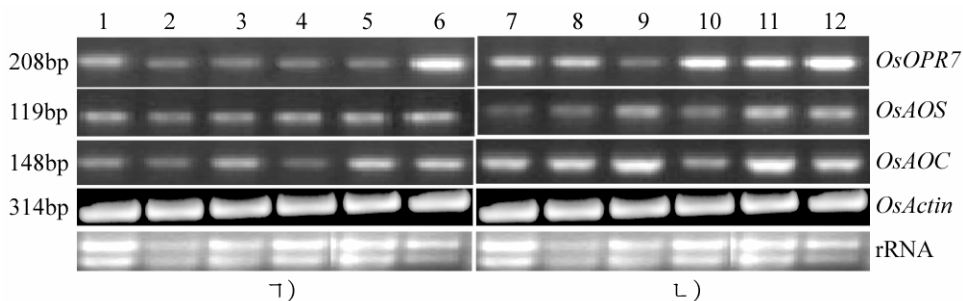


그림 2. 자스몬산합성유전자들의 RT-PCR산물에 대한 아가로스겔전기영동상

7) 3일되는 꽃에서 수성불념계통 <423A>, 유지계통 <423B>와 MeJA를 처리하였을 때 념성을 가지는 계통들에서의 유전자발현상, 8) 7일 되는 꽃에서 수성불념계통 <423A>, 유지계통 <423B>와 MeJA를 처리하였을 때 념성을 가지는 계통들에서의 유전자발현상;  
1과 7은 수성불념계통 <423A>, 2-5와 8-11은 MeJA를 처리하였을 때 념성을 가지는 계통들(<J9-16-31>, <J9-4-3>, <J9-16-10>와 <J9-4-45>), 6과 12는 유지계통 <423B>

그림 2에서 보는것처럼 수성불념계통 <423A>, 유지계통 <423B>와 MeJA를 처리하였을 때 념성을 가지는 계통들에서 MeJA처리후 3일과 7일 되는 꽃에서 자스몬산합성과정에 순차적으로 발현되는 *OsAOC*, *OsAOS*, *OsOPR7*의 발현상은 차이난다. 대조유전자인 *OsActin*은

3일과 7일 되는 꽃에서 변화가 없지만 수성불념계통 <423A>, 유지계통 <423B>와 MeJA를 처리하였을 때 념성을 가지는 계통들에서 7일 되는 꽃에서 *OsAOC*, *OsOPR7*의 발현은 3일 되는 꽃에서보다 높아지고 *OsAOS*의 발현은 3일과 7일 되는 꽃에서 변화가 없었다. 특히 수성불념계통 <423A>, 유지계통 <423B>에서 자스몬산합성에 참가하는 *OsAOC*, *OsAOS*, *OsOPR7*의 발현이 명백한 차이를 나타내며 유지계통 <423B>에서 이 유전자들의 전사수준상 발현은 수성불념계통 <423A>에 비하여 높다.

수성불념계통 <423A>, 유지계통 <423B>와 MeJA를 처리하였을 때 념성을 가지는 계통들에서 자스몬산합성의 네번째 단계에 참가하는 *OsAOC*[4]를 보면 3일에 비하여 7일 되는 꽃에서 <J9-4-3>, <J9-4-45>와 유지계통 <423B>에서의 유전자발현이 강화되고 다섯번째 단계에 참가하는 *OsOPR7*을 보면 3일에 비하여 7일 되는 꽃에서 <J9-16-31>, <J9-16-10>, <J9-4-45>와 유지계 <423B>에서의 유전자발현이 강화되었다.

이러한 연구결과는 MeJA를 처리하였을 때 념성을 가지는 계통인 <J9-34-3>에서는 *OsAOC*의 발현이, <J9-16-31> 및 <J9-16-10>에서는 *OsOPR7*의 발현이, <J9-4-45>에서는 *OsAOC*와 *OsOPR7*의 발현이 다같이 강화되어 념성이 회복되었다는것을 보여준다.

#### 4) 자스몬산합성유전자들의 실시간정량PCR분석

앞에서 우리는 RT-PCR분석을 통하여 논벼세포질수성불념계통 <423A>, 유지계통 <423B>와 MeJA를 처리하였을 때 념성을 가지는 계통들에서 자스몬산합성과정에 순차적으로 발현되는 *OsAOC*, *OsOPR7*의 발현차이에 의하여 념성회복이 일어나며 논벼세포질수성불념계통 <423A>의 념성회복에서 자스몬산합성유전자들이 중요한 작용을 한다는것을 알게 되었다.

우리는 수성불념계통 <423A>, 유지계통 <423B>와 MeJA를 처리하였을 때 념성을 가지는 계통들에서 자스몬산합성과정에 순차적으로 발현되는 *OsAOC*, *OsAOS*, *OsOPR7*의 발현수준을 더 정량적으로 평가하기 위하여 실시간정량PCR분석을 진행하였다.

수성불념계통 <423A>, 유지계통 <423B>와 MeJA를 처리하였을 때 념성을 가지는 계통들에서 *OsActin*, *OsAOC*, *OsAOS*, *OsOPR7*에 대한 실시간정량PCR분석을 진행하였다.(그림 3)

그림 3에서 보는바와 같이 대조유전자인 *OsActin*은 3일과 7일 되는 꽃에서 변화가 없지만 수성불념계통 <423A>, 유지계통 <423B>와 MeJA를 처리하였을 때 념성을 가지는 계통들에서 *OsAOC*, *OsOPR7*유전자들의 발현은 3일 되는 꽃보다 7일 되는 꽃에서 높아졌다.

정량적으로 보면 3일 되는 꽃에 비하여 7일 되는 꽃에서 <J9-16-31>, <J9-4-3>, <J9-4-45>와 유지계통 <423B>에서의 *OsAOC*발현이 각각  $2^{1.82}$ ,  $2^{1.79}$ ,  $2^{3.22}$ ,  $2^{3.22}$ 배 높아지고 *OsOPR7*의 경우에는 3일 되는 꽃에 비하여 7일 되는 꽃에서 수성불념계통 <423A>, <J9-16-31>, <J9-16-10>, <J9-4-45>와 유지계통 <423B>에서의 유전자발현이 각각  $2^{1.93}$ ,  $2^{3.98}$ ,  $2^{3.69}$ ,  $2^{3.11}$ ,  $2^{3.69}$ 배 높아졌다.(유전자발현량은  $2^{-\Delta\Delta CT}$ 에 의하여 계산된다.)

이러한 연구결과는 앞서 진행한 반정량PCR분석결과와 일치하며 이것은 논벼세포질수성불념계통 <423A>가 세포질수성불념이지만 꽃피는 시기에 자스몬산을 처리하면 불념계통으로부터 념성이 회복되는 계통을 얻을수 있다는것을 보여준다.

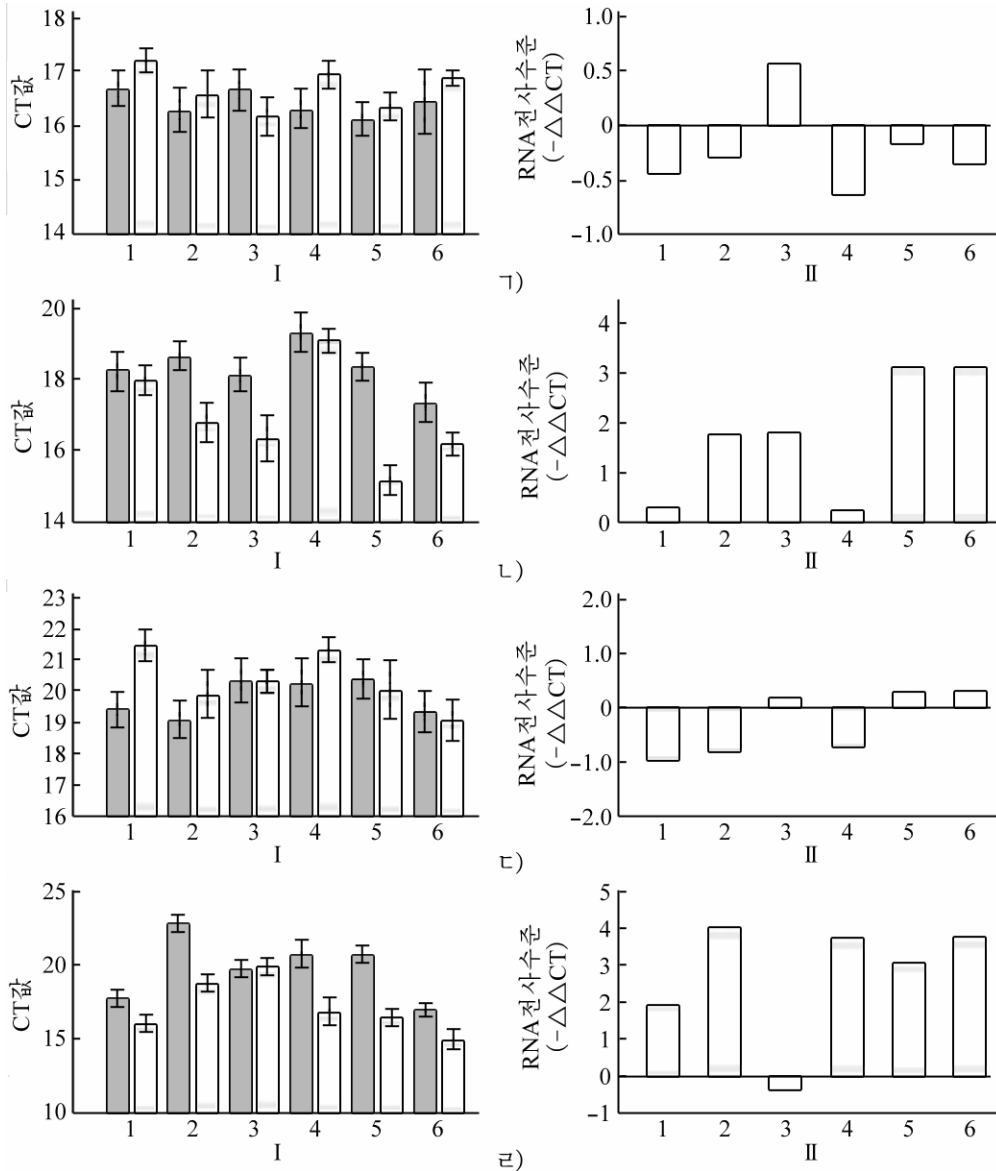


그림 3. 수성불염계통 <423A>, 유지계통 <423B>와 MeJA를 처리하였을 때

염성을 가지는 계통의 꽃에서 여러가지 유전자들의 발현차이

ㄱ) *OsActin*, ㄴ) *OsAOC*, ㄷ) *OsAOS*, ㄹ) *OsOPR7*, I - CT값(■-3일 되는 꽃, □-7일 되는 꽃), II - 3일 되는 꽃에 비한 7일 되는 꽃에서의 전사수준(-ΔΔCT), 1-<423A>, 2-<J9-16-31>, 3-<J9-34-3>, 4-<J9-16-10>, 5-<J9-4-45>, 6-<423B>

## 맺는 말

1) 논벼세포질수성불염계통 <423A>에 MeJA를 처리하는 경우 염성을 회복하는 선발계통들의 염성회복률은 6.2~26.3%이다.

2) 논벼세포질수성불염계통 <423A>에 MeJA를 처리하면 염성을 회복하는 계통들에서 *OsAOC*와 *OsOPR7*의 발현은 처리후 3일에 비하여 7일에 3.5~8.2배 높아진다.

## 참 고 문 헌

- [1] P. Haksong et al.; *Planta*, **228**, 234, 2009.
- [2] P. Haksong et al.; *Journal of Integrative Agriculture*, **15**, 60345, 2016.
- [3] Tomoyuki Tani et al.; *Planta*, **227**, 517, 2008.
- [4] C. Wasternack et al.; *Annals of Botany*, **111**, 1021, 2013.
- [5] M. K. Udvardi et al.; *Plant Cell*, **20**, 1736, 2008.

주체105(2016)년 12월 5일 원고접수

**Transcriptional Activity Change of Jasmonic Acid Synthetic Genes  
in Cytoplasmic Male Sterile (CMS) Line ‘423A’ Restored  
by Spraying Methyl Jasmonate (MeJA) Solution**

*Pak Hak Song, Kim Un Hyang and Kim Hyon Chol*

In the cytoplasmic male sterile (CMS) line ‘423A’ restored by spraying methyl jasmonate (MeJA) solution, the restoration rate of selected lines is about 6.2~26.3%, and in these lines after 7 days the expression of *OsAOC* and *OsOPR7* can be increased 3.5~8.2 times than 3 days later.

Key words: methyl jasmonate (MeJA), restoration, transcriptional activity