

# P71. 야생벼와 잡초성벼의 저온직파적성 관련 단백질 탐색 및 분자표지개발

나형진\*, 성하창, 황철호, 정응기<sup>2</sup>, 서학수<sup>1</sup>

단국대학교 생명자원과학부, 영남대학교 자연과학부<sup>1</sup>, 작물시험장<sup>2</sup>

## 실험목적

야생벼나 잡초성벼로부터 내동성 관련 단백질을 탐색하고 저온관련 유전자로부터 얻은 specific primer를 이용하여 야생벼와 잡초성벼, 재배벼 간에 저온직파적성 정도를 측정하기 위한 분자표지 개발을 목적으로 본 실험을 수행함

## 재료 및 방법

- o 공시재료: 화성벼, *Oryza rufipogon*, 화성벼 X *Oryza rufipogon* F3, 밀양23호, 일품, 추청, 다산, 요경180
- o 저온처리: 10°C/8°C 성장장에서 10/14 hrs(D/N)의 일장조건으로 0, 3, 7, 14일간 저온순화함
- o Apoplast protein추출: 벼 잎조직 으로부터 세포 밖 공간의 단백질을 추출함
- o Ion leakage 검정: 잎 조직을 -2, -6, -8, -14°C에서 결빙하도록 처리하여 유출되는 ion의 양을 spectrometer를 이용하여 260nm에서 측정함
- o SDS-PAGE 분석: 잎조직 Apoplast protein을 이용하여 15% acryl amide gel에 전기영동 함
- o 2-D Analysis: Apoplast protein을 Urea/NP40에 녹인후 단백질의 등전점(pI)에 따라 Iso gel에 1차적 전기영동 후 분자량에 따라 15% acryl amide gel 에 2차적 전기영동분석을 함
- o DD-RT-PCR: hot phenol 방법 (De Vries등, 1998)으로 total RNA를 분리한 후 얻은 total RNA 중 1 µg을 사용하여 1st strand synthesis kit(Boehringer mannheim사)를 이용하여 random priming방법으로 cDNA를 합성하고 CLP(chitinase-like protein)primer를 가지고 PCR을 수행함

## 결과 및 고찰

- o 결빙조건에서 Ion leakage 측정을 통해 내동성을 분석하였을 때, 화성벼는 저온순화에 의한 내동성의 획득이 없었지만 *Oryza rufipogon*에서는 저온순화를 통해 내동성이 증가함을 볼 수 있었다. 또한, 저온순화 없이도 어느 정도의 내동성을 확인할 수 있었음
- o 야생벼(*Oryza rufipogon*)와 잡초성벼(밀양 23호) 그리고 *Oryza rufipogon* X 밀양 23호 F3개체 그리고 화성벼의 apoplastic protein을 SDS-PAGE 분석 결과 야생벼와 잡초성벼에서 세포 밖 공간의 단백질이 화성벼보다 확연히 많이 존재함을 봄
- o *Oryza rufipogon*과 화성벼의 2-D분석 결과 특정한 단백질(pI: 6.30, Mr: 35KDa)이 저온 처리 시 증가하였고, 저온처리 하지 않은 *Oryza rufipogon*에서 발현한 양이 저온처리한 화성벼에서 보다 많이 존재하였다. 저온처리 기간이 길어질수록 특정한 apoplast protein이 점차 축적됨을 확인할 수 있었음
- o CLP primer를 이용하여 벼 품종간에 RT-PCR을 한 결과 *Oryza rufipogon*에서 특정한 band가 확인된 바 야생벼와 재래벼의 교배를 통해 나온 후대 식물체들의 저온직파적성 정도를 측정하는 Marker로 이용할 예정임

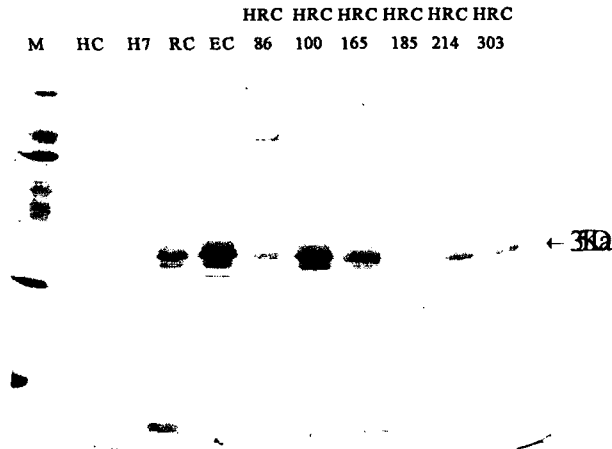


Figure1. SDS-PAGE of apoplast protein from Hwaseongbyeo, *Oryza rufipogon*, Hapcheonaengmi 3 and Hwaseongbyeo X *Oryza rufipogon* F3.

M; Marker H; Hwaseongbyeo R; *O. rufipogon* E; Hapcheonaengmi3 HR; Hwaseongbyeo X *O. rufipogon* F3, C; Non treatment, 7; Days for cold acclimation (14D/10N in 10°C /8°C)

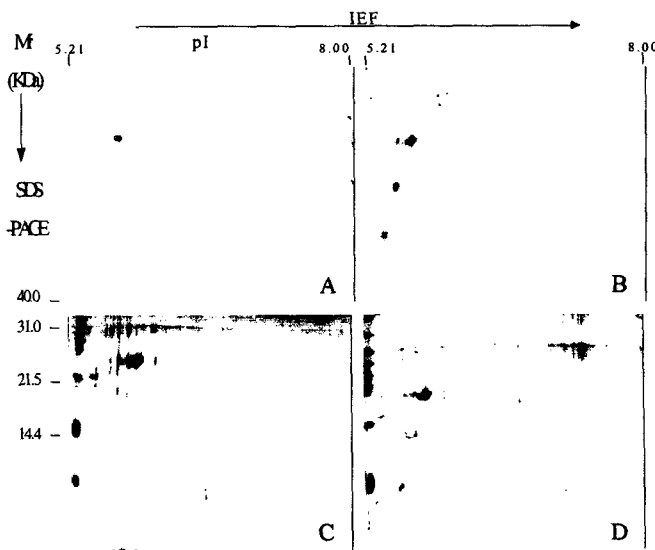


Figure2. 2D-IEF/SDS-PAGE of rice apoplast proteins accumulated after cold acclimation.

A; 25°C/20°C for non cold acclimation in Hwaseongbyeo, B; 10°C/8°C for 14days cold acclimation in Hwaseongbyeo, C; 25°C/20°C for non cold acclimation in *Oryza rufipogon*, D; 10°C/8°C for 14days cold acclimation in wild *Oryza rufipogon*

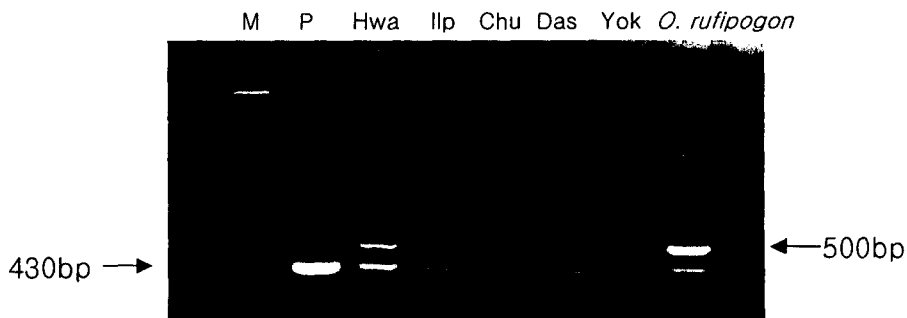


Figure3. Total RNA from nontreated rice leaf and separated 1.5% agarose gel with stained ethidium bromide, RT-PCR patterns obtained with CLP specific primers.

M:marker P: positive control(PG Achiti p.DNA) Hwa: Hwaseongbyeo, Ilp: Ilpumbyeo, Chu: Chuchungbyeo, Das: Dasanbyeo, Yok: Yokyung180, *O. rufipogon*: *Oryza rufipogon*