

Oligopeptide transporter 관여 유전자 도입 형질전환벼의 고온스트레스 내성 증진

정은주 · 송재영 · 유달아 · 김미선 · 정유진 · 강권규 · 박수철 · 조용구

Overexpression of an oligopeptide transporter gene enhances heat tolerance in transgenic rice

Eun-Ju Jeong · Jae-Young Song · Dal-A Yu · Me-Sun Kim · Yu-Jin Jung · Kwon Kyoo Kang · Soo-Chul Park · Yong-Gu Cho

Received: 21 September 2017 / Revised: 24 September 2017 / Accepted: 25 September 2017
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Rice (*Oryza sativa*) cultivars show an impairment of growth and development in response to abiotic stresses such as drought, salinity, heat and cold at the early seedling stage. The tolerance to heat stress in plants has been genetically modulated by the overexpression of heat shock transcription factor genes or proteins. In addition to a high temperature-tolerance that has also been altered by elevating levels of osmolytes, increasing levels of cell detoxification enzymes and through altering membrane fluidity. To examine the heat tolerance in transgenic rice plants, three *OsOPT10* overexpressing lines were characterized through a physiological analysis, which examined factors such as the electrolyte leakage (EL), soluble sugar and proline contents. We further functionally characterized the *OsOPT10* gene and found that heat induced the expression of *OsOPT10* and P5CS gene related proline biosynthesis. It has been suggested that the expression of *OsOPT10* led to elevated heat tolerance in transgenic lines.

Keywords Oligopeptide transporter, Heat stress, Tolerance, Transgenic rice

서 언

식물은 성장하면서 다양한 환경스트레스에 노출되며 작물의 생장, 발달, 수확량 등에 영향을 미친다. 온도는 모든 생물의 생존에 영향을 미칠 수 있는 가장 중요한 요소 중의 하나로서 작물의 생육과 발달에 주요한 원동력으로 작용한다 (Kropff et al. 1995). 지구온난화로 인해 온도 상승에 따른 고온 스트레스는 전세계 많은 지역에서 농업적으로 문제가 되고 있다. 고온 스트레스란 식물의 생장과 발달에 비가역적인 영향을 일으키는데 충분한 정도의 일정 시간과 기준 이상의 온도 상승에 노출되었을 때 식물이 받는 스트레스를 의미한다 (Wahid et al. 2007). 식물의 고온에 의한 직접적인 영향으로는 단백질의 변성, 집적, 세포 막 지질의 유동성 증가 등을 포함한다. 간접적인 손상으로는 엽록체와 미토콘드리아의 효소가 불활성화되고, 단백질 합성이 저해되며 합성된 단백질이 분해되고 세포막 손상을 일으킨다 (Howarth. 2005).

벼(*Oryza sativa*)는 여러 작물 중 전세계적으로 주요한 식량 작물로서 수년간 모델 식물로 많은 연구가 이루어지긴 했으나 고온의 영향에 대한 연구는 아직 미흡한 단계이다 (Nagai and Makino, 2009). 고온 스트레스는 식물의 발달, 생장 및 생산량 등 거의 모든 면에서 불리한 영향을 주는 요소로, 고온으로 인한 벼의 생산 피해가 크게 나타나고 있다 (Ahuja et al. 2010). 온도가 높은 환경조건뿐만 아니라 다양한 비생물학적(abiotic) 스트레스 환경에서 생존 및 적응하기 위해서는 식물은 생리적 및 유전적인 변화를 통해서 반응한다. 불량한 환경에서 내성을 가진 식물들은 세포 내에 수분을 유지

†First two authors equally contributed.

E. J. Jeong[†] · J. Y. Song[†] · D. A. Yu · M. S. Kim · Y. G. Cho (✉)
충북대학교 식물자원학과
(Department of Crop Science, Chungbuk National University,
Cheongju 28644, Korea)
e-mail: ygcho@cbnu.ac.kr

Y. J. Jung · K. K. Kang
국립한경대학교 원예생명과학과
(Department of Horticultural Life Science, Hankyong National
University, Ansung, Gyeonggi-do 17579, Korea)

S. C. Park
국립농업과학원 GM작물개발사업단
(The National Center for GM Crops, Rural Development
Administration (RDA), Wanju-gun 55365, Korea)

시킴을 위해 수분스트레스에 의한 팽압과 세포내의 농도 (Lichtentaler 1995; bray 1997), 삼투 스트레스의 완화(Kishor et al. 1995) 등 세포질 내에 다양한 유기물을 축적하며 불량환경에 따른 유전자 발현을 조절하게 된다. Proline은 염분과 건조스트레스와 같은 다양한 환경 스트레스에 피해를 입는 많은 식물에 있어서 osmoprotector로서 삼투압 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Delauney and Verma 1993; Pollard and Wyn Jones, 1979). 비생물학적 스트레스에 대한 방어 기작으로 proline 외에도 주요 물질로서 sugar alcohols 및 glycinebetaine 등이 보고된 바 있다(Csonka and Hanson, 1991). 펩타이드(Peptide)는 일반세균에 있어서 주요 질소원의 공급원으로서 생육에 필수적인 중요한 영양성분이다. 펩타이드의 세포 내 전달은 펩타이드의 길이에 따라 각각 다른 전달체를 이용하여 세포 내로 전달되는데 현재까지 di-, tri-, oligopeptide permease system을 통하는 것으로 보고되고 있다(Foucaud, C. 1995). 펩타이드 수송(Peptide transport)은 세포가 펩타이드 또는 펩타이드 유도체를 에너지-의존적인 방식(energy-dependent manner)으로 막(membranes)을 가로 질러 운반하는 것으로 보고된 바 있다(Lubkowitz et al. 1997; Stacey et al. 2006). 펩타이드 전달체(Peptide transporters)는 3가지 그룹으로 분류되는데, 첫 번째, ATP 결합 카세트 전달체(ATP-binding cassette transporters, ABC family) (Higgins, 1992), 두 번째, 펩타이드 수송체 (peptide transporters, PTR family)(Paulsen and Skurray. 1994; Steiner et al. 1995), 그리고 올리고펩타이드 수송체(Oligopeptide transporters, OPT family) (Lubkowitz et al. 1997; Hauser et al. 2001) 등 세 그룹으로 나눌 수 있다. 최근 애기장대의 *AtOPT6* 도입된 형질전환체가 세포분화, 증식 및 세포 사멸을 비롯한 수많은 세포과정에 중요한 역할을 하는 항산화 물질로 알려진 글루타티온(Glutathione, GSH), 활성이 높아진 사례가 있었다(Cagnac et al. 2004). 현재까지 OPT에 관한 연구는 주로 애기장대 식물에서 이루어졌으며 최근에 OPT 유전자를 도입한 작물이 생육하기 어려운 높은 염 조건의 환경에서 적은 물 사용으로 물과 영양분을 획득하여 비생물적 스트레스인 건조, 염 스트레스에서 살아남은 연구 사례가 있다(Jung et al. 2010). 따라서 본 논문에서는 올리고펩타이드 전달체 관련 유전자(*OsOPT10*)가 도입된 형질전환벼에서 고온 스트레스 저항성 계통을 선발하고, 이들과 관련된 다양한 유전자 발현양상에 대한 분자적 특성에 대해 기술하고자 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

식물 재료

벼 유래 *OPT10* (Oligopeptide transporter 10) 유전자를 *Agrobacterium* 방법으로 도입하여 형질전환 벼를 육성하였으며 그 형질전환벼들을 이용하여 T₁, T₂ 및 T₃ 계통을 육성

하였으며 고온 스트레스에 대한 내성 형질전환체를 선발 및 분자적 특성을 조사하는데 식물 재료로 사용하였고(Jung et al. 2010), *OsOPT10* 유전자 형질전환 벼의 분석에는 모품종인 동진벼(*Oryza sativa*, *Japonica*)를 대조구로 이용하였다.

형질전환체 확인 및 분자학적 특성

재분화 식물체를 대상으로 벼 게놈 상에서 *OsOPT10* 유전자의 도입을 확인하기 위해 재분화된 잎으로부터 게놈의 DNA를 분리하여 35S 프로모터부위와 도입유전자 *OsOPT10* 유전자 특이 증폭용 프라이머를 이용하여 PCR 분석을 수행하였다. 다음과 같이 프라이머를 제작하여 35S-Fw (5'-TTCGCAA GACCCTTCCTCTA-3')와 *OsOPT10*-Rv (5'-TCAGGAAGAA CTGCAGCCT-3') 95°C에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후, 95°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 과정을 30 cycles하였으며, 마지막으로 72°C에서 10분간 extension을 실시하여 분석하였다. 도입 유전자의 single copy 여부를 확인하기 위하여 Taq-Man probe real-time PCR 분석을 수행하였다. 추출한 주형 DNA 30 ng에 2 x brilliant II QPCR master mix(Roche, Switzerland) 10 µl, 20 x Tublin (reporter VIC, Quancher TAMRA) 1 µl, 20 x Nos (reporter FAM, Quancher none) 1 µl를 PCR tube에 3반복으로 넣었으며, 양성 대조군은 검증된 homo 계통 형질전환체의 DNA를 이용하였고, 음성 대조군은 동진의 DNA를 사용하였다. 반응액을 Stepone™ real-time PCR system (Life technologies, USA)기기를 이용하여 Taq-Man PCR을 수행하였으며, 반응 조건은 95°C에서 10분간 pre-denaturation 시킨 후, 95°C에서 15초간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing으로 40 cycle을 설정하였다.

Real-time PCR 분석

정량적 실시간 PCR 실험을 위해, SYBR® Green Realtime PCR Master Mix (Toyobo, JAPAN)와 Light Cycler (Bio-Rad CFX96™ real-time PCR detection system) 기기를 사용하였다. *OsOPT10* (Fw: 5- TCAAGGAGCATGTGCTCATCA -3', Rv: 5- TCAGG AAGAACTGCAGCCT -3') 프라이머를 이용하여 qRT-PCR 수행하였다.

qRT-PCR 반응조건은 95°C에서 3분간 pre-denaturation 시행한 후, 95°C에서 10초간 denaturation, 55°C에서 20초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension하고, scanning하는 과정을 50회 반복하였으며, PCR 산물의 melting curve 분석은 65 ~ 95°C에서 0.5°C씩 5초간 시행하였다.

형질전환 벼의 고온 스트레스 저항성 검정

형질전환벼 및 모품종(WT) 동진벼(*Oryza sativa* cv Dongjin)

종자를 1/2MS + phosphotricin (2 ppm) 배지와 1/2 MS 고체 배지에 각각 치상하여 28°C의 명조건 성장상에서 10일간 생육시켰다. 생존한 형질전환체와 대조구 품종을 토양으로 이식한 후, 28~30°C의 온실(16시간 명/8시간 암 주기)에서 3엽기까지 생육 후 한 포트 (10.5 × 10.5 × 11 cm) 당 20개체씩 3반복이 되도록 이식하였다. 42°C 고온 스트레스를 유도하기 위해, 식물 성장상(습도: 50%, 온도: 42°C, 16시간 명/8시간 암 주기)에서 14일간 고온에서 생육시켰다.

생리활성 분석

전해질 누출(Electrolyte leakage) 측정

식물체의 잎 0.1 g을 5 mm 간격으로 잘라서 10 ml의 증류수와 함께 50 ml tube에 담았다. 32°C로 설정된 증탕기에서 2시간 처리 후 Multi-range EC meter (Hanna instruments, Romania)로 수치를 측정하는데, 이 때의 측정값이 EC₁이다. 이후 autoclave로 20분간 고온 고압 처리하고 다시 상온이 되었을 때, 한번 더 EC meter로 수치를 측정하여 EC₂ 값을 얻었다. 구해진 EC₁과 EC₂로 EL 값을 구하고 스트레스 처리 전과 처리 11일 후 측정치인 EL₁과 EL₂ 값을 측정 비교하였다(Dionisio-Sese and Tobita 1998).

가용성 당 함량(Soluble sugar content) 분석

모품종 동진벼와 *OsOPT10* 형질전환체를 가지고 가용성 당 함량을 분석하였으며, 유묘기 단계인 고온 스트레스 2일차로 실험을 하였으며, 총 당 함량은 페놀 황산법을 이용하여 3 반복으로 측정하였다. 시약은 9% (v/v) phenol을 사용하였다. 실험 방법은 시험관에 표본으로부터 잘라낸 잎 0.1 g과 멸균수 8 ml를 혼합한 후, 항온수조에서 100°C 30분간 2번 가열하였다. 추출물 (약 500 µl)을 새로운 micro-tube에 옮겨준 후, 멸균수 1.5 ml, 9% phenol 1 ml, sulfuric acid 5 ml를 넣고 실온에 30분간 두고 485 nm에서 흡광도를 spectrophotometer Optizen Series (Model 2120UV)로 측정하였다.

Proline 함량 분석

모품종 동진벼와 *OsOPT10* 형질전환체를 실험재료로 하여, 유묘기 단계에서 고온 스트레스 2일차로 실험을 진행하였다. 표본 0.1 g의 잎을 채취하여 액체질소로 마쇄한 후, 추출용액 MCW (MeOH: Chloroform: Water = 12:5:1) buffer 1 ml를 넣어주고 10,000 rpm 속도로 4°C 10분동안 원심분리 하였다. 원심분리 후 2개의 E-tube에 1.5 ml씩 추출하여 10,000 rpm 속도로 4°C 5분 동안 한번 더 원심분리 하였다. 상등액 1 ml (4배 희석: 상등액 0.25 ml + MCW buffer 0.75 ml)에 acetic acid 3 ml,

ninhydrin reagent (ninhydrin (g): acetic acid (ml): 6 M phosphoric acid (ml) = 1.25: 30: 25) 1 ml를 첨가하였다. 그리고 100°C 45분간 증탕시킨 후, 얼음에서 20분간 식힌 후 Toluene 1 ml를 첨가하여 vortexing을 30분 한 다음 520 nm에서 OD 값을 측정해 주었다. 표준 용액은 L-Proline을 사용하였고 proline 함량 분석은 MCW buffer (1 ml) × 1/sample (0.1 g) × OD 값 (µg/ml) × 희석 4배를 하여 값을 얻어냈다.

결과 및 고찰

OsOPT10 유전자도입 형질전환 벼 육성

벼 유래 *OPT10* 유전자는 식물의 모든 조직에서 발현을 유도하는 CaMV 35S 프로모터에 의해 제어되도록 Ti-plasmid vector에 구축하여 형질전환 실험을 수행하였다. 형질전환체의 분자적 특성 및 발현 분석은 Jung 등(2010)에 의해 보고된 바와 같다. 그 후 형질전환 벼 16개체를 얻어 유전자 도입 여부를 PCR로 검정하여 그 개체의 후대를 육성하였으며, T₁ 세대에서 35S 프라이머와 *OsOPT10* 유전자 프라이머를 이용하여 도입 여부를 확인하였다. 16개의 후대를 분석한 결과 7개의 후대에서 유전자가 안정적으로 도입되어 발현되고 있음을 확인하였다(Fig. 1A). *OsOPT10* 유전자의 발현을 확인한 결과, *OsOPT10-4*, 8 형질전환체에서 발현량이 가장 높았고 다음 순으로 *OsOPT10-2*, 7, 5, 1, 16순이었으며, 대조 품종인 동진에서는 발현되지 않았다(Fig. 1B). 벼 게놈 내에 *OsOPT10* 유전자의 single copy 도입 여부를 확인하기 위하여 수행한 copy number assay 결과는 single, two copy 및 multiple copy로 도입된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1C).

고온스트레스 내성 검정 및 생리활성 분석

모품종 동진을 포함하여 *OsOPT10-1*, 2, 4, 5, 7, 16 계통을 고온 스트레스 처리 후 저항성 검정을 하였다. *OsOPT10*의 과발현이 벼에서 고온 스트레스 내성과 관련 있는지를 조사하기 위해, 형질전환 벼 유묘기 식물 및 대조구(WT, 동진)를 고온(42°C) 스트레스에 노출시켰다(Fig. 2). 처리 후 6일차까지 고온의 의한 피해 증상이 큰 변화는 없었으나 7일차부터 식물체들이 고온에 의한 피해 증상이 나타났다. 시들음과 같은 조직의 손상과 잎 말림 현상 및 엽록소 감소 같은 위조 증상을 보였다. 처리 10일 후에, 형질전환체 *OsOPT10-1*, 7, 16 계통은 대조구(WT)와 *OsOPT10-2*, 4, 5 계통에 비해 피해 수준 및 저항성 정도가 차이가 있었으나 큰 차이는 보이지 않았다. 그래서, 스트레스에 의한 세포막 피해 정도를 알아보기 위해 대표적인 표시자로 알려진 전해질 누출(electrolyte leakage) 분석을 하여 세포막 피해 정도를 비교하고자 하였다(Allen et al. 1997). 일반 환경조건에서는 모품종(WT) 및

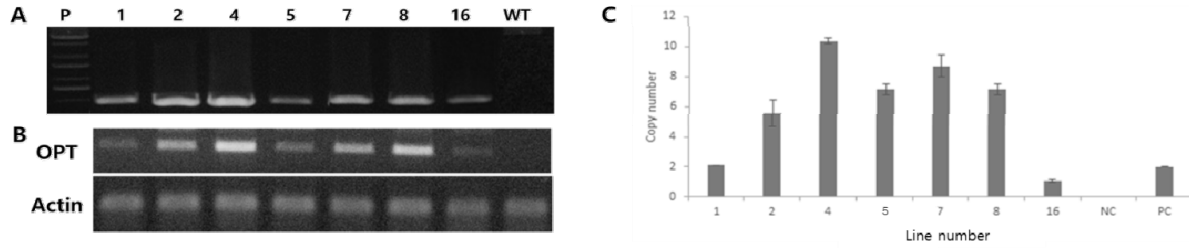


Fig. 1 Confirmation of the *OsOPT10* transgenic rice lines. (A), PCR amplification of *OsOPT10* transgene by 35S forward and *OsOPT10* reverse specific primers transgenic rice lines. (B), expression of the *OsOPT10* gene in transgenic plants by RT-PCR analysis. WT, wild type Dongjin; *OsOPT10* transgenic lines (1, 2, 4, 5, 7, 8 and 16). (C), copy number assay of transgenic rice using TaqMan PCR analysis

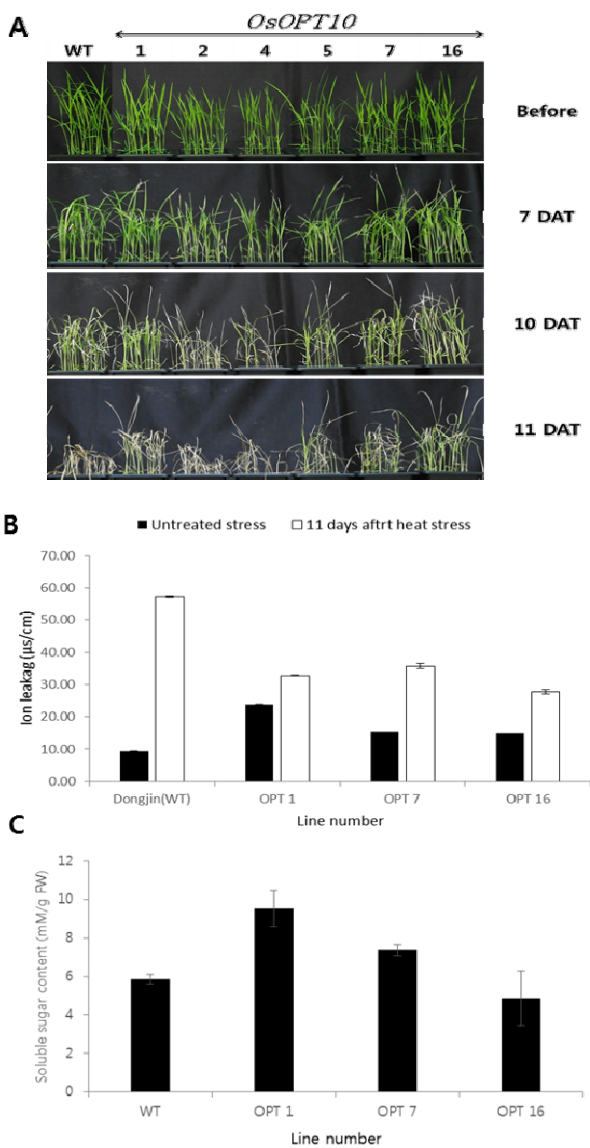


Fig. 2 The responses of the *OsOPT10* transgenic plants and WT plant to heat stress. (A), the photograph of rice seedlings kept at 42°C for 2 weeks. (B), electrolyte leakage after heat treatment for 10 days and (C), soluble sugar contents after heat treatment for 2 days in *OsOPT10* overexpressing lines and WT

OsOPT10-1, 7, 16 계통의 전해질 누출(EL) 정도에 차이는 보이지 않았으나, 10일 고온 처리 후 WT의 EL 값은 형질전환 벼 3 계통에 비해 높게 나타났다. 대조구와 비교시, 형질전환 벼 3 계통, *OsOPT10*-1, 7, 16, 은 전해질 누출(EL)이 40% 정도 보다 낮게 나타났다(Fig. 2B). 대부분의 식물에서 건조 또는 염(NaCl) 스트레스에 대한 반응으로 sucrose와 같은 가용성 당의 축적이 보고되고 있다(Popp and Smirnov, 1995). 또한, 저온순화식물에서 수용성 당류의 축적이 일어나며, 삼투조절제(osmoregulator), 신호분자로서 역할을 하는 것으로 보고되어 있다. 당류는 탈수기간에 지질분자에서 수소결합을 유지하는데 물 분자를 대체하여 식물세포막을 보호하고, 활성산소종의 제거하는 역할을 함으로써 막의 안정성을 증가시키는 데 기여하는 것으로 알려져 있다(Theocharis et al. 2012). 본 실험에서 고온 처리에 의한 가용성 당 함량의 변화는 *OsOPT10*-16 형질전환체를 제외하고 *OsOPT10*-1와 *OsOPT10*-7 계통이 WT 보다 당 함량이 높게 나타났다(Fig. 2C). 모품종 동진에 비해 형질전환 벼 계통의 EL 값이 낮게 나타난 것과 가용성 당 함량이 비슷하거나 높게 나타난 것으로 보아 *OsOPT10* 형질전환체가 고온 스트레스에서 저항성 반응을 나타내는 것으로 보인다.

고온 스트레스 처리 후 *OsOPT10* 발현 양상

올리고펩타이드 전달체 관련 유전자(*OsOPT10*)가 도입된 형질전환 벼에서 고온 처리 후 이 유전자의 발현 양상을 확인하기 위하여, WT과 *OsOPT10*형질전환 벼 계통을 이용하여 정량적 실시간 PCR (Real time PCR) 분석하여 비교한 결과는 Figure 3과 같다. 대조구는 고온 처리 시간별 *OsOPT10* 유전자의 발현차이를 보이지 않았으나, 형질전환 벼 3계통, *OsOPT10*-1, -7, -16은 고온 6시간 처리후에 높게 발현량을 보였고, 이 후 고온 24시간 처리 조건에서는 점차 발현량이 감소하는 현상을 보였지만, 대조구에 비해 *OsOPT10* 형질전환 벼가 여전히 높은 발현 양상을 나타냈다.

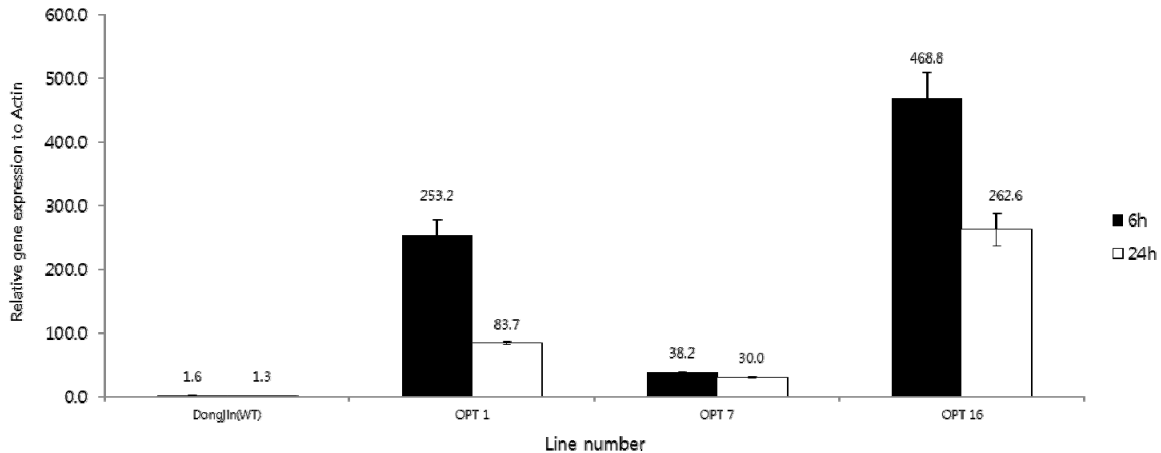


Fig. 3 Expression of the wild type Dongjin and *OsOPT10* transgenic plants by qRT-PCR after heat stress for 6 and 24 h

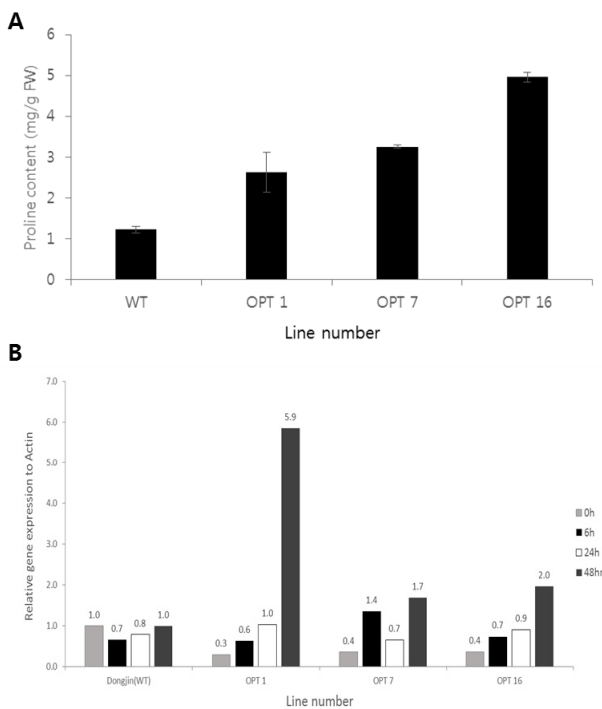


Fig. 4 The effects of heat stress on the contents of proline in the wild type Dongjin and *OsOPT10* transgenic seedlings. (A), proline level of transgenic rice seedling overexpressing *OsOPT10* and WT plant after receiving a heat treatment for 2 days. (B), expression of proline (*P5CS*) in WT and *OsOPT10* transgenic lines by real-time PCR

Proline 함량 분석 및 *P5CS* 유전자 발현 양상

Proline은 환경 스트레스를 받는 식물에서 이온불균형, 이온 독성 및 생리적 수분 스트레스로부터 삼투보호 작용이 있는 것으로 보고되고 있다(Igarashi et al., 1997). 고온 처리 후 proline 함량의 변화를 살펴보기 위해, WT과 *OsOPT10* 형질전환 변

를 3 엽기 단계에서 고온 스트레스를 2일 처리하여 proline 함량을 3반복으로 측정하였고 그 결과는 Figure 4(A)와 같다. WT의 proline 함량이 1.23 mg/g FW인 반면에, 형질전환체인 *OsOPT10*-1, -7, -16 계통은 각각 2.64, 3.26, 4.96 mg/g FW으로 WT에 비해 약 2~4배 정도 높은 함량을 보였다.

일반적으로 식물에서 proline 전구체로서는 glutamate와 ornithine 이 보고되고 있고, 식물에서 glutamate로부터의 합성 과정에는 두 개의 효소 즉, Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (*P5CS*)와 Δ 1-pyrroline-5-carboxylate reductase (*P5CR*)이 관여하는데, 염분과 건조와 같은 환경 스트레스 하에서 proline 생합성의 촉진은 *P5CS*와 *P5CR* mRNA 발현의 증가와 관련되어 있다(Roosens et al. 1999; Song et al. 2007). 또한, proline이 과발현 되었을 때, 잎의 삼투포텐션이 증가하여 수분 스트레스 시 삼투조절이 용이해진다는 보고가 있다(Kavi Kishor et al. 1995). 삼투압 조절과 관련된 유전자중 proline 합성에 관여하는 *P5CS* 유전자를 이용하여 대조구와 형질전환 변 3 계통간 전사체 발현 양상을 알아보기 위하여, 고온 처리 후(42°C, 0 h, 6 h, 24 h, 48 h) 대조구와 *OsOPT10*-1, -7, -16 계통간 발현양을 비교하였다(Fig. 4B). 그 결과, 대조구는 고온처리에 의해 *P5CS* 유전자의 발현차이를 보이지 않았으나, 형질전환 변인 *OsOPT10* 계통은 모두 무처리와 비교했을 때 보다 작게는 4배 크게는 20배 이상 발현을 나타내었다. 고온 처리 시간에 따라 점차 proline 함량이 증가하는 현상을 보였다. 환경 스트레스하에서 proline, glycine betaine, polyols 과 같은 화합물들의 생합성 또는 흡수가 증가하여 삼투압보호 역할을 하여 스트레스에 의한 손상을 줄이며, 세포질에 수분흡수를 용이하게 함으로써 삼투 포텐셜을 감소시켜 단백질 구조를 안정화시켜 세포를 보호하는 것으로 알려져 있다(Yancey, 2001). 지금까지 명확한 기능이 알려지지 않았던 *OsOPT10* 유전자는 고온 스트레스 환경 조건에서 고온 저항성 향상 기작에 대해서도 역할을 하고 있는 것으로 판단된다.

적 요

지구온난화로 인해 온도 상승에 따른 고온 스트레스는 전세계 많은 지역에서 농업적으로 문제가 되어 세계 3대 곡물인 벼의 생산에 피해가 크게 나타나고 있다. 식물은 성장하면서 다양한 환경스트레스에 노출되며, 이러한 스트레스는 작물의 성장, 발달, 수확량 등에 영향을 미친다. 본 연구는 벼의 안정적인 생산성을 높이기 위해 벼 유래 *OsOPT* 유전자를 이용한 형질전환 후대에서 고온 조건하에서도 생육이 가능한 계통을 선발하여 그 특성을 살펴보았다. 먼저, *OsOPT10* 유전자 도입 형질전환 벼를 이용하여 고온 처리에 따른 저항성 계통을 선발하고, 선발된 계통의 생리적 특성을 분석하였으며, 분자적 특성을 qRT-PCR을 통해 유전자의 발현 양상을 분석하였다. 고온 스트레스에 의한 세포막 피해 정도를 알아보기 위해 전해질 누출(electrolyte leakage), 삼투조절제 역할을 하는 수용성 당 및 proline 함량 분석을 하여 대조구와 비교 분석 하였다. 본 실험에서 고온 처리에 의한 가용성 당 함량의 변화는 *OsOPT10-16* 형질전환 벼를 제외하고 *OsOPT10-1*와 *OsOPT10-7* 계통이 WT 보다 당 함량이 높게 나타났다. 모 품종 동진에 비해 형질전환 벼 계통의 EL 값이 낮게 나타난 것과 가용성 당 함량이 비슷하거나 높게 나타난 것으로 보아 *OsOPT10* 형질전환 벼가 고온 스트레스에서 저항성 반응을 나타낸 것으로 판단하였다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제명: 유용 유전자가 도입된 GM작물의 조기 기능검정 시스템 구축, 세부과제 번호: PJ01191601)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Ahuja I, Vos RC, Bones AM, Hall RD (2010) Plant molecular stress responses face climate change. *Trends Plant Sci* 15:664-674
- Allen RD, Webb RP, Schake SA (1997) Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. *Free Rad Biol Med* 23:473-479
- Bray EA (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci* 2:48-54
- Cagnac O, Bourbonloux A, Chakrabarty D, Zhang MY, Delrot S (2004) *AtOPT6* Transports Glutathione Derivatives and Is Induced by Primisulfuron. *Plant Physiology* 135:1378-1387
- Csonka LN, Hanson AD (1991) Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annual Review of microbiology* 45:569-606
- Delauney AJ, Verma DPS (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J* 4:215-223
- Dionisio-Sese ML, Tobita S (1998) Antioxidant response of rice seedlings to salinity stress. *Plant Sci* 135:1-9
- Foucaud C, Kunji ER, Hagting A, Richard J, Konings WN, Desmazeaud M, Poolman B (1995) Specificity of peptide transport systems in *Lactococcus lactis*: evidence for a third system which transports hydrophobic di- and tripeptides. *Journal of bacteriology* 177(16):4652-4657
- Hauser M, Narita V, Donhardt AM, Naider F, Becker JM. (2001) Multiplicity and regulation of genes encoding peptide transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular membrane biology*, 18:105-112
- Higgins CF (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual review of cell biology* 8:67-113
- Howarth CJ (2005) Genetic improvements of tolerance to high temperature. *Abiotic stresses: plant resistance through breeding and molecular approaches*. Howarth Press Inc., New York.
- Igarashi Y, Yoshida I, Yamaguchi-Shinozaki K, Wada K, Shinozaki K (1997) Characterization of the gene for delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the statement of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa* L. *Plant Mol Biol* 33:857-865
- Jung YJ, Lee IH, Han KH, Son CY, Cho YG, Lee MC, Kang KK (2010) Expression analysis and characterization of rice oligopeptide transport gene (*OsOPT10*) that contributes to salt stress tolerance. *Journal of Plant Biotechnology* 37(4): 483-493
- Kavi Kishor PB, Zonglie H, Miao GH, Hu CA, Verma DPS (1995) Overexpression of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology* 108(4):1387-1394
- Kishor P, Hong Z, Miao G, Hu C, Verma D (1995) Overexpression of [delta]-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.* 108:1387-1394
- Kropff MJ, Mathews RB, Vanlar HH, Tenberge HFM. (1995) 'The rice model ORYZA1 and its testing', in: R.B. Mathews et al. (eds.), *Modeling the Impact of Climate Change on Rice production in Asia*. IRRI and CAB International. Wallingford, pp 27-50
- Lichtenthaler HK (1995) Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J PlantPhysiol* 148:4-14
- Lubkowitz MA, Hauser L, Breslav M, Naider F, Becker JM (1997) An oligopeptide transport gene from *Candida albicans*. *Microbiology* 143:387-396
- Nagai T and Makino A. (2009) Differences between rice and wheat in temperature responses of photosynthesis and plant growth. *Plant Cell Physiol* 50:744-755
- Paulsen IT, Skurray RA (1994) The POT family of transport proteins. *Trends Biochem Sci* 10: 404
- Pollard A, Wyn Jones RG. (1979) Enzyme activities in concentrated solutions of glycinebetaine and other solutes. *Planta* 144:291-298
- Popp M, Smirnov N. (1995) Polyol accumulation and metabolism during water deficit, p. 199-215. In: *Environment and Plant Metabolism : Flexibility and Acclimation* (Smirnov, N. ed.).

- Bios Scientific oxford
- Roosens NH, Willem R, Li Y, Verbruggen I, Biesemans M, Jacobs M (1999) Proline metabolism in the wild-type and in a salt tolerant mutant of *Nicotiana glauca* studied by ¹³C-nuclear magnetic resonance imaging. *Plant Physiol* 121:1281-1290
- Song JY, Kim DS, Lee G-J, Lee IS, Kang KK, Yun SJ, Kang S-Y (2007) Characterization of Salt Tolerant Rice Mutant Lines Derived from Azetidine-2-Carboxylic Acid Resistant Cell Lines Induced by Gamma Ray Irradiation. *J Plant Biotechnol* 34:61-68
- Stacey MG, Osawa H, Patel A, Gassmann G, Stacey G (2006) Expression analysis of *Arabidopsis* oligopeptide transporters during seed germination, vegetative growth and reproduction. *Planta* 223:291-305
- Steiner HY, Naider F, Becker JM (1995) The PTR family: a new group of peptide transporters. *Molecular microbiology* 16: 825-834
- Theocharis A, Clément C, Barka EA. (2012) Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta*. 235: 11091-1105
- Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad MR (2007) Heat tolerance in plants: An overview. *Environ. Exp. Bot.* 61:199-223
- Yancey PH (2001) Water Stress, Osmolytes and Proteins. *Amer. Zool* 41:699-709