시토신 탈메틸화 관련 *NtROS2a* 유전자 도입 형질전환벼의 건조스트레스 내성 증진

최장선 · 이인혜 · 조용구 · 정유진 · 강권규

Overexpression of *NtROS2a* gene encoding cytosine DNA demethylation enhances drought tolerance in transgenic rice

Jang Sun Choi · In Hye Lee · Yong-Gu Cho · Yu Jin Jung · Kwon Kyoo Kang

Received: 27 September 2016 / Revised: 27 September 2016 / Accepted: 29 September 2016
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract DNA methylation regulates gene expression, thus having pivotal roles in a myriad of physiological and pathological processes. In this study, the morphology and stress tolerance of transgenic rice overexpressing *NtROS2a* were determined. Transgenic plants exhibited less and shorter lateral shoots. Under various treatments, rice overexpressing *NtROS2a* showed alleviation of damage symptoms with higher survival rate. After drought and re-watering treatment, transgenic rice seedlings restored their normal growth. However, wild type plants could not be rescued. These findings indicate that overexpression of *NtROS2a* gene in rice seedlings can increase their tolerance to drought stresses.

Keywords DNA demethylation, *NtROS2a* transgenic rice, drought stress

서 언

식물은 생물적 및 비생물학적 스트레스에 노출되면 유전자 발현변화, 세포내 대사작용의 변화 및 비정상적인 생육 등 많은 생리적 장애 요인이 발생되어 생산량에 막대한 영향을 초래한다. 지구의 온난화와 사막화로 식물은 건조한 환경뿐만 아니라 다양한 스트레스 환경에서 생존하기 위해 수분스트레스에 의한 팽압과 세포질내의 농도(Lichtenthaler 1995; bray 1997), 광합성과 활성 산소의 변화에 따른 세포사멸(Demming-Adams and Adams 1992; Smirnov 1993; Allen 1995), 삼투 스트레스의 완화(Kishor et al. 1995), 효소활성의 안정화(Gill and Tuteja 2010) 등의 다양한 물질의 축적 및 각종 스트레스에 따른 유전자발현을 조절하면서 진화해왔다(Gomes et al. 2010; Dawood et al. 2014). 식물의 비생물학적 스트레스와 관련하여 후성유전학적 해석은 DNA 글리코실라제(DNA glycosylase) 활성을 갖는 단백질인 ROS1과 ROS2a는 건조 및 염과 산화스트레스에 관여하는 유전자의 발현을 조절하는 것으로 보고된 바 있다(Gong et al. 2002; Lee et al. 2015).

후성유전학(epigenetics)은 DNA 염기서열 변화는 수반하지 않고 DNA의 메틸레이션(methylation) 및 히스톤(histone) 단백질의 아세틸화(acetylation) 등의 후천적인 수식에 의해 유전자발현이 제어되고, 그 현상이 후대에까지 유지되는 현상을 말하며, 기존의 유전학으로는 설명하기 어려웠던 생명현상을 해석하기 위한 주요 학문 분야로 대두되고 있다. 이는 DNA의 메틸레이션과 같은 DNA 수식(DNA modification), DNA와 히스톤의 결합 위치를 변화시키는 염색질 리모델링(chromatin remodeling), 히스톤 수식화(histone modification)의 변화 등에 의해 초래된다(Sano et al. 1990; Zhang et al. 2006; Choi et al. 2016). 식물에는 동물에 존재하는 대부분의 주요 단백질들의 구조와 기능이 잘 보존되어 있을 뿐만 아니라 후성유전학적 기작이 존재하며, 유전자 발현 조절 메카니

I. H. Lee · Y. J. Jung (✉) · K. K. Kang (✉)
국립한경대학교 원예생명과학과
(Department of Horticultural Life Science, Hankyong National University, Ansong, Gyeonggi-do 17579, Korea)
국립한경대학교 유전공학연구소
(Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University, Ansong 17579, Korea)
e-mail: yuyul216@hknu.ac.kr, kykang@hknu.ac.kr

J. S. Choi[†]
농촌진흥청 국립원예특작과학원 채소과
(Vegetable Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Wanju 55365, Korea)

Y. G. Cho
충북대학교 식물자원학과
(Department of Crop Science, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea)

즘(mechanism) 규명에 중요한 단서를 제공해 오면서 진핵생물의 후성유전학적 비교 연구에 유용하게 활용되고 있다.

식물에서 DNA 메틸화 기작은 동물과 유사하나, 이를 제거하는 DNA 탈메틸화(DNA demethylation) 기작은 동물의 기작과는 상이한 것으로 알려져 있다(Li et al. 1992; Reik et al. 2001; Law and Jacobsen 2010). 식물에는 동물과 다르게 5mC를 직접 제거할 수 있는 유전자가 존재하여 효율적인 DNA 탈메틸화 시스템을 갖추고 있으며, DNA 탈메틸화는 수동적 탈메틸화와 능동적 탈메틸화로 구분되어 진다(Wu and Zhang 2010). DNA의 반보존적 복제를 통해 메틸화 수준이 줄어드는 것을 수동적 탈메틸화(passive DNA demethylation)라고 하며, DNA 복제를 수반하지 않고 메틸화가 제거되는 현상을 능동적 탈메틸화(active DNA demethylation)라고 하는데 이러한 과정에는 반드시 탈메틸화 효소(DNA demethylase)가 존재해야 한다고 보고되었다(Aguis et al. 2006; Morales-Ruiz et al. 2006). 이와 같이 후성유전은 실질적으로 염기서열의 변화에 기인하지 않더라도 유사분열 또는 감수분열을 통하여 세 포세대 또는 개체 간 안정적으로 특정 유전자나 형질의 변형 발현이 유지되기도 한다(Goldberg et al. 2007; Feng et al. 2010).

이전에 본 연구팀은 식물이 다양한 환경 스트레스의 적응 과정에서 후성유전학 조절이 매우 중요하다고 생각하여 담배에서 알루미늄이나 염분 및 저온 스트레스 처리에 의해 glycerophosphodiesterase-like protein (NtGPDL) 유전자의 탈메틸화를 유도하는 것을 보고하였다(Choi and Sano 2007). 또한 담배유래 탈메틸화 관련 유전자(*NtROS2a*) 분리, 발현 특성 및 기능분석을 수행한 결과 *NtROS2a* 유전자는 삼투와 염분 스트레스에 의해 DNA 과메틸화(DNA hypermethylation)를 유도하는 것으로 보고하였다(Lee et al. 2015). 따라서 본 연구에서는 시토신 탈메틸화 관련 효소로 알려져 있는 *NtROS2a* 유전자가 도입된 형질전환 벼에서 건조 스트레스 내성 및 분자적 특성에 대해 기술하고, 이들 관련 다양한 유전자 발현 양상에 대해 고찰하고자 한다.

재료 및 방법

플라스미드 벡터 구축

담배로부터 분리된 시토신 탈메틸화 관련 *NtROS2a* (*Nicotiana tabacum* Repressor Of Silencing 2a) 유전자를 벼(*Oryza sativa* L. cv Dongjin)에 과발현시키기 위하여 pGWB5 벡터를 이용하여 클로닝 하였다(Lee et al. 2015). 유전자의 발현 조절을 위한 프로모터는 CaMV 35S를 사용하였고, 식물 발현용 vector 구축이 확인된 plasmid의 형질전환을 위하여 *Agrobacterium tumefaciens* competent cell LBA4404를 얼음에서 녹인 후 plasmid DNA 1 µl와 섞어서 electroporation cuvette에 주입한 다음 1,440 V로 전기충격을 가한 뒤 SOC 배지 1 mL을 혼합한 후, 멸균

된 시험관에 넣고 28°C에서 200 rpm으로 1시간 동안 배양하였다. 배양액은 kanamycin 50 mg/L을 포함한 AB agar 배지에서 선발하였으며, 확인된 배양액은 50 % glycerol을 동량 첨가하여 초저온 냉동고(-80°C)에 저장하였고 일부는 식물형질전환에 사용하였다. 형질전환된 식물체의 선발을 위해서는 CaMV 35S 프로모터에 의해 제어되는 HPT (hygromycin 50 ppm) 유전자를 이용하였고, HPT와 *NtROS2a* 유전자 프라이머를 이용하여 형질전환 여부를 확인하였다.

형질전환체 육성 및 확인

형질전환 벼 육성을 위하여 동진 벼 종자를 2 mg/L 2,4-D가 포함된 N6 액체배지에 침종하여 30°C 암상태에서 24 시간 동안 발아시켜, 배 부분이 부풀어 오르기 시작한 종자를 15 mL의 *Agrobacterium* 현탁액이 담겨있는 튜브에 담가 약 20 분간 접종한 다음 멸균한 필터페이퍼 위에 종자를 올려놓아 여분의 *Agrobacterium*을 제거하였다. *Agrobacterium*을 접종한 종자를 1 mM dithiothreitol (DTT), 3 mg/L silver nitrate (AgNO₃), 0.5% gelrite가 포함된 2N6-AS 배지 위에 필터페이퍼를 놓고 치상하여 25°C 암조건에서 3 일간 공동 배양하였고, 그 후 배지 성분의 영향력을 높이기 위해 필터페이퍼를 제거한 배지에 치상하여 25°C 암조건에서 4 일간 공동 배양하였다(Lee et al. 2011; Jung et al. 2014). 형질전환실험에서 얻어진 재분화 식물체를 대상으로 벼 게놈 상에서 *NtROS2a* 유전자의 도입을 확인하기 위해 재분화된 잎으로부터 게놈의 DNA를 분리하여 도입유전자 HPT 및 *NtROS2a* 유전자 특이 증폭용 프라이머를 이용하여 PCR 분석을 수행하였다. Table 1

Table 1 List of primers used in this study

Primers	Sequence (5'-3')
NtROS2a F	TCAAGATGGCAGGAACCTC
NtROS2a R	ACAATGGGCTCTGGTGTTC
actin - F	ATGGTTGGTATGGGGCAGAAGG
actin - R	AGTTGTACGTCCACTGGCATAC
Hyg F	ATGAAAAAGCCTGAACCTACCCG
Hyg R	CTATTCTTTGCCCTCGGACGA
AB035125.1 F	GGAGGAAATTCTGCCTTAGA
AB035125.1 R	ATGACAAGAGCCACAATCAG
EB102893.1 F	GATCCAAGAACAGGGAAATC
EB102893.1 R	CCAACCTCTTATCAGCCTTT
BP128744.1 F	CCCAGGCTTTATTGAAAAAT
BP128744.1 R	ATAGATCAAAATCGGGTCGT
BP532469.1 F	AATCCTCCTACTGGCTTCAC
BP532469.1 R	CTCGCTTAAATTTTTCGATA
DV161917.1 F	AAATCCCGAGGTAGAAGTTG
DV161917.1 R	AAAACAGCAGCAACAGAAGA

과 같이 프라이머를 제작하여 95°C에서 6 분간 pre-denaturation 시킨 후, 94°C에서 30 초간 denaturation, 58°C에서 30 초간 annealing, 72°C에서 1 분간 extension 과정을 30 cycles 하였으며, 마지막으로 72°C에서 5 분간 extension을 실시하여 분석하였다. 도입 유전자의 single copy 여부를 확인하기 위하여 DIG PCR Probe Labeling Kit (Poche)에서 제공하는 방법에 따라 계놈 DNA를 주형으로 하여 *NtROS2a* specific 영역을 증폭한 PCR 산물을 probe로 사용하였고, 5 µg의 genomic DNA를 *EcoRI* 제한효소로 digestion 하여 Southern blot 분석을 수행하였다.

RT-PCR 및 qPCR 분석

Total RNA는 RNase H-Reverse Transcriptase (Gibco BRL, Rockville, MD, USA) protocol에 따라 RNA 추출 및 이후 실험을 수행하였으며, RT-PCR에 의한 표적 분석을 위해, cDNA 합성 시스템 (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 제조자의 지시에 따라 이용하였다. PCR 산물을 Primer Designer 4 software (Sci-ed Software, Durham, NC)를 이용하여 디자인된 프라이머를 이용하여 증폭하였다. RT-PCR을 각각 최종 농도 10 pM의 프라이머 쌍 및 주형으로서 cDNA 2 µl (총 RNA 500ng)를 이용하여 수행하였다. PCR을 95°C 10 분에 이은 94°C 30 초, 57°C 30 초 및 68°C 1분의 20 ~ 25 사이클을 수행하였다. 증폭된 산물을 2% 아가로스 겔에서 분리하였다. RT-PCR 결과를 입증하기 위해, 독립적으로 제조된 총 RNA를 이용하여 2회 실험을 반복하였다. 또한 정량적 실시간 PCR 실험을 위해, SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR system (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하였다. PCR 반응을 위해, 반응 성분의 마스터 믹스를 Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA)에 대한 제조자의 프로토콜에 따라 제조하였다. Thermocycling 및 형광 검출을 Stratagene Mx3000p Real-Time PCR machine (Stratagene, La Jolla, CA)을 이용하여 수행하였다. PCR을 95°C 10분에 이은 94°C 30초, 57°C 30초 및 68°C 1분의 20 ~ 25 사이클을 수행하였다. qPCR 결과를 입증하기 위해, 3회 실험을 반복하였다 (Livak & Schmittgen 2001).

생장기에 건조 스트레스 처리

형질전환 및 비형질전환(WT) 벼(*Oryza sativa* cv Dongjin) 종자를 4일간 28°C의 암 배양실에서 1/2 MS 고체 배지에서 발아시키고, 토양으로 이식한 후, 28 ~ 30°C의 온실(16시간 명/8시간 암 주기)에서 키웠다. 각 형질전환 및 비형질전환 라인 유래의 18개의 유묘를 건조 스트레스 실험을 하기 전에 4주간 포트(3 x 3 x 5 cm; 포트당 1개 식물)에서 키웠다. 건조 스트레스를 유도하기 위해, 4주된 형질전환 및 WT 유묘를 3주간 물을 주지 않은 후에 2주간 물을 주어 회복시켰다. 그 후 생존하거나 계속 성장하는 식물의 수를 기록하였다.

결과 및 고찰

NtROS2a 유전자도입 형질전환 벼 육성

담배로부터 분리된 DNA glycosylase domain을 갖는 시토신 탈메틸화 관련 *NtROS2a* (*Nicotiana tabacum* Repressor Of Silencing; accession numbers; AB281588) 유전자가 도입된 형질전환 벼를 육성하기 위하여 CaMV 35S 프로모터에 의해 제어되는 hygromycin (HPT) 유전자가 삽입된 식물 발현 벡터를 구축하여 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환시켜 벼 캘러스에 도입하였다(Fig. 1A and B). 그 후 형질전환 15개체를 얻어 유전자 도입여부를 PCR로 검정하여 그 후대를 육성하였으며, T₁ 세대에서 HPT 프라이머와 *NtROS2a* 유전자 프라이머를 이용하여 도입여부를 확인하였다 (Fig. 1C and Table 1). 8개의 후대를 분석한 결과 6개의 후대에서 유전자가 안정적으로 도입되어 발현되고 있음을 확인하였다 (Fig. 1E). 벼 계놈내에 *NtROS2a* 유전자의 single copy 도입여부를 확인하기 위하여 수행한 Southern blot 결과는 single 또는 two copy로 도입된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1D).

NtROS2a 도입 형질전환 후대 계통의 생육 특성

NtROS2a 유전자가 도입되고 안정적으로 발현하는 식물체로부터 T₁ 종자를 이용하여 hygromycin 50ppm이 포함된 MS 배지에 파종하여 발아 및 생육과정을 살펴본 결과 파종 후 다음날 발아되기 시작하여 파종 7일째 지상부가 2 cm 까지 성장한 wild type (WT)과 비교하여 탈메틸화 관련 유전자인 *NtROS2a*가 도입된 형질전환 후대에서는 7일 이후부터 발아되기 시작하여 파종 11일째 까지 WT에 비하여 매우 성장속도가 느리게 측정되었다(Fig. 2A and B). 그러나 형질전환체는 파종 20일 이후부터는 급속하게 성장하여 순화 후 포트로 이식하여 생육을 관찰한 결과 분얼기와 출수기, 성숙기에 이르러서는 WT보다 신장이 높게 나타났다(Fig. 2C and D). 이와 같이 생육초기에 DNA 탈메틸화가 일어나면 세포 분열에 영향을 주어 성장하는 동안 가역적으로 변하는 특성을 갖고 있다고 알려져 있다(Zhang et al. 2006; Zhu et al. 2008). 그러므로 같은 개체 내에서도 조직이나 세포마다 DNA 메틸화 패턴과 관련된 유전자의 발현 양상은 각각 다를 수 있고, 같은 계놈에 수많은 후성유전체(epigenome)가 존재할 수 있어서 DNA 메틸화나 탈메틸화로 인하여 다양한 표현형도 나타낼 수 있게 된다(Choi and Sano 2007). Huh 등 (2008)은 애기장대의 종자 연구에서 밝혀진 DEMETER (DME) 유전자는 DME에 변이가 생길 경우 종자 발달에 중요한 현상 중의 하나인 유전자 각인현상(gene imprinting)이 정상적으로 이루어지지 않으며, 결과적으로 종자가 퇴화되는데, 이러한 유전자 각인이 DME에 의해서 직접적으로 조절된다고 하였다. 또한 DME의 목표 유전자인 MEDEA (MEA)는

Fig. 1 (A) Strategy used to overexpress *NtROS2a* in rice using Ti-plasmid vector to overexpress *NtROS2a* gene. 35s, Cauliflower mosaic virus 35S-promoter; NPTII, kanamycin resistance gene; HPT, hygromycin resistance gene; Nos P, nos gene promoter; Nos t, nos gene terminator; RB, right border; LB, left border. (B) Dongjinbyeo (*Oryza sativa* L.) plants transformed with pGWB5 vector containing *NtROS2a* gene. a, callus formation; b–e, multi-shoot differentiation; f, regenerated plants in rooting medium. (C) PCR amplification of transferred genes (HPT, *NtROS2a*) in transgenic rice lines. Amplified products were subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis. Lane M, DNA ladder; Lane WT, PCR generated from the DNA template of the wild type plant; Lane P, PCR product generated from the DNA template of the pGWB5 plasmid that contains the *NtROS2a*; Lane 1–8, PCR products generated from the DNA template of independent transgenic lines. (D) Southern blot analysis for the presence of *NtROS2a* gene in PCR positive rice plants. Genomic DNA of eight transgenic lines and control plant were digested with *EcoRI*, separated by 0.8% agarose gel electrophoresis, and hybridized with *NtROS2a* fragment probe. M, 1kb DNA ladder; WT, wild type control plant 1–8 transgenic lines. (E) Analysis of *NtROS2a* expression in transgenic rice lines by reverse transcription polymerase chain reaction. Total RNA was isolated from each plant and 0.5 µg of RNA was reverse transcribed and used as template to amplify *NtROS2a* using specific primers. As a loading control, samples were also amplified with specific primers of rice actin gene. Lane M, DNA-ladder; Lane WT, PCR generated from the cDNA template of wild type plant; Lane 1–8, PCR products generated from cDNA template of independent transgenic lines

Fig. 2 Characterization of rice overexpressing *NtROS2a*. (A) Growth of wild-type and T_1 plants overexpressing *NtROS2a* (TG). (B) Shoot growth of rice and the expression of *NtROS2a*. (C and D) Growth and development pattern in transgenic T_1 plants overexpressing *NtROS2a*

MEA 프로모터의 메틸화 레벨이 DME에 의해서 감소되어 정상적인 DME가 존재할 때에만 발현이 된다고 보고되었

다(Gehring et al. 2006). 따라서 본 연구에서 사용한 시토신 탈메틸화 관련 *NtROS2a* 유전자가 벼 세포에 발현하여 다양한 유전자들을 탈메틸화 시켜 다양한 변화를 일으켰다고 할 수 있다.

NtROS2a 형질전환 후대로부터 건조스트레스 내성 검정

*NtROS2a*의 과발현이 벼에서 스트레스 내성과 관련되는지를 조사하기 위해, 4주된 형질전환 식물 및 WT 대조구를 건조 스트레스에 노출시켰다(Fig. 3A). WT 식물은 건조한 환경 유도로 형질전환체보다 초기 단계에 엽록소 감소와 함께 잎 롤링 및 시들음과 같은 조직의 손상과 가시적으로 잎의 위조 증상을 보여주기 시작했다. 형질전환 식물은 또한 다시 물을 공급 시 WT 식물보다 더 빨리 회복하였다. 그러나 동일한 생육 상태에서 건조스트레스에 노출시킨 결과 WT보다 형질전환체에서 2배 높은 생존율을 나타내어 건조스트레스에 내성이 있음을 확인 할 수 있었다(Fig. 3B).

건조스트레스 관련 유전자의 발현 양상 분석

이전의 형질전환 담배연구(Choi et al. 2016)에서 *NtROS2a*의

Fig. 3 (A) Effect of *NtROS2a* expression levels on rice responses to cold and drought stresses. The photograph of the upper panel showing rice seedlings kept at 4°C for 3 weeks followed by transfer to room temperature (25 ~ 28°C) for recovery. The bottom of the picture showing rice seedlings without being watered for 3 weeks followed by re-watering for 2 weeks. The photograph was taken during stress (almost all the leaves of one group in the pot became completely rolled and some leaves died). They were then transferred to room temperature (25 ~ 28°C) for recovery. (B) Survival rates of WT and transgenic rice lines. Data are presented as means $\pm$ SE from three independent experiments. Significant difference was considered when *P* value was less than 0.05

과발현 및 RNAi 식물에 의해 상향 조절되는 유전자를 동정하기 위해, 정상적인 생장 조건하의 WT 대조구와 비교하여 형질전환체의 발현 프로파일링을 수행하였다. 마이크로레이(microarray)를 이용한 발현 프로파일링은 정상적인 생장 조건하에 키운 형질전환 식물 및 WT 대조구의 14일된 잎으로부터 추출된 RNA 시료를 이용하여 수행하였다. 각 데이터 세트는 3가지 생물학적 반복으로부터 얻었다. One-way ANOVA를 이용한 각 데이터의 통계학적 분석으로 WT 식물에서보다 형질전환 식물에서 3배 이상($P < 0.05$) 유도되는

Fig. 4 Results of qRT-PCR analysis showing the expression levels of five candidate genes identified by microarray analysis in rice plants overexpressing *NtROS2a* or wild type rice controls under drought stress for 3 weeks

*NtROS2a*에 의해 상향 조절되는 85개 유전자를 동정하였다. 마이크로레이 데이터에 기초하여, 37개 공통 표적 유전자 중에서 5개의 스트레스 유도성 유전자를 선발하였으며, RT-PCR에 의해 정상적인 생장 조건하에 이의 *NtROS2a*의 존성 발현 패턴을 증명하였다. *NtROS2a*가 도입되어 건조스트레스 내성을 보인 형질전환 식물체를 이용하여 이전에 선발한 5개 스트레스 유도성 유전자의 발현양상을 조사하였다. 선발된 스트레스 유도성 유전자 AB035125.1, EB102893.1, BP128744.1, BP532469.1 및 DV161917.1의 발현량은 WT과는 다르게 형질전환체들이 건조한 환경에 노출되었을 때 그 발현이 매우 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4 and Table 2). 따라서 탈메틸화 관련 유전자가 도입되어 발현되면 식물의 생장과 발육과정, 병 저항성, 스트레스 저항성 등과 같은 환경 자극에 의해 일어나는 빠른 신호전달 과정상의 유전자 발현에 영향을 미치며, 이에 수반되는 DNA 메틸레이션과 같은 후성적(epigenetic) 조절에 매우 중요한 역할을 담당한다고 하였다(Choi and Sano 2007, Boyko et al. 2010). 본 연구는 탈메틸화 관련 *NtROS2a* 유전자를 도입하여 안정적으로 발현하는 형질전환체에서 건조스트레스 내성 및 분자적 특성에 대해 기술하였으나, 차후 RNA-sequence 등의 지속적인 연구를 통해 탈메틸화에 따른 다양한 유전자 발현양상을 구명함에 따라 후성유전현상을 작물육종 분야에 적극 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

Table 2 List of five up-regulated genes encoding stress-induced proteins obtained by microarray analysis based on previous studies

Accession number	Systematic	Normalized	Description
AB035125.1 F	A_95_P005446	24	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein(LTP) family protein
EB102893.1 F	A_95_P125477	22	CobN/Magnesium Chelatase; This family contains a domain common to the cobN protein and to magnesium protoporphyrin
BP128744.1 F	A_95_P036483	25	PREDICTED: Brachypodium distachyon protein TONSOKU-like (LOC100824294), mRNA
BP532469.1 F	A_95_P027676	11	Rattus norvegicus coiled-coil domain containing 77 (Ccdc77)
DV161917.1 F	A_95_P118847	10	flavonoid reductase (FR), extended (e) SDRs contains FRs of the extended SDR-type and related proteins. these FRs act..

적 요

DNA methylation은 무수히 많이 발생하는 생리적 및 병리적 측면의 과정에서 관련 유전자의 발현을 조절함으로써 중추적인 역할을 가지고 있다. 본 연구에서는 *NtROS2a*가 과발현된 형질전환 벼를 육성하고, 그들의 형태적 측면을 관찰하고 스트레스 내성을 검토하였다. 형질전환 식물체는 WT에 비하여 신초의 신장이 작게 나타났다. 저온 스트레스 처리 하에서 *NtROS2a* 형질전환 벼는 스트레스로 인한 생육 불량을 보였으나 건조 스트레스 처리 하에서는 WT보다는 높은 비율로 회복하여 생존하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 *NtROS2a* 유전자의 과발현으로 인해 벼가 건조 스트레스에 노출되면 내성을 증진시킨 것으로 생각된다.

사 사

본 성과물은 농촌진흥청 연구사업(세부과제명: 벼 미색관련 유전자의 표적 돌연변이체 육성 및 이용, 세부과제번호: PJ01119202)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Aguis F, Kapoor A, Zhu JK (2006) Role of the *Arabidopsis* DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:11796–11801
- Allen RD (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant physiol* 107:1049–1054
- Bray EA (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci* 2:48–54
- Boyko A, Kovalchuk I (2010) Transgenerational response to stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav* 5:995–998
- Choi CS, Hiroshi Sano (2007) Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Mol. Genet. Genomics* 277(5):589–600
- Choi JS, Lee IH, Jung YJ, Kang KK (2016) DNA microarray analysis of RNAi plant regulated expression of *NtROS2a* gene encoding cytosine DNA demethylation. *J Plant Biotechnol* 43:231–239
- Dawood M, Taie H, Nassar R, Abdelhamid M, Schmidhalter U (2014) The changes induced in the physiological, biochemical and anatomical characteristics of *Vicia faba* by the exogenous application of proline under seawater stress. *S. Afr. J. Bot.* 93:54–63
- Demming-Adams B, Adams WWIII (1992) Photoprotection and other response of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bio* 43:599–626
- Feng S, Jacobsen SE, Reik W (2010) Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science* 330:622–627
- Gehring M, Huh JH, Hsieh TF, Penterman J, Choi Y, Harada JJ, Goldberg R, Fischer RL (2006) DEMETER DNA glycosylase establishes *MEDEA* polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell* 124:495–506
- Gill S, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48:909–930
- Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E (2007) Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 128:635–638
- Gomes F, Oliva M, Mielke M, Almeida A, Aquino L (2010) Osmotic adjustment, proline accumulation and cell membrane stability in leaves of *Cocos nucifera* submitted to drought stress. *Sci. Hortic.* 126:379–384
- Gong Z, Morales-Ruiz T, Ariza RR, Roldan-Arjona T, David L, Zhu JK (2002) ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell* 111:803–814
- Huh JH, Bauer MJ, Hsieh TF, Fischer RL (2008) Cellular programming of plant gene imprinting. *Cell* 132:735–744
- Jung YJ, Nou IS, Kang KK (2014) Overexpression of *Oshsp16.9* gene encoding small heat shock protein enhances tolerance to abiotic stresses in rice. *Plant Breed. Biotech.* 2(4):370–379
- 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
- Law JA, Jacobsen SE (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals.

- Nat. Rev. Genet. 11:204-220
- Lee HJ, Abdula SE, Jee MG, Jang DW, Cho YG (2011) High-efficiency and Rapid *Agrobacterium*-mediated genetic transformation method using germinating rice seeds. J Plant Biotechnol 38:251-257
- Lee IH, Choi JS, Marjohn N, Cho YG, Kang KK, Jung YJ (2015) Regulation of abiotic stress response through *NiROS2a*-mediated demethylation in tobacco. Plant Breed. Biotech. 3(2):108-118
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. Cell 69:915-926
- Lichtentaler HK (1995) Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. J Plant Physiol 148:4-14
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Methods 25:402-408
- Morales-Ruiz T, Ortega-Galisteo AP, Ponferrada-Marin MI, Martinez-Macias MI, Ariza RR, Roldan-Arjona T (2006) DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:6853-6858
- Reik W, Dean W, Walter J (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. Science 293:1089-1093
- Sano H, Kamada I, Youssefian S, Katsumi M, Wabiko H (1990) A single treatment of rice seedlings with 5-azacytidine induces heritable dwarfism and under methylation of genomic DNA. Molecular Genetics and Genomics 220:441-447
- Smirnoff N (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. New Phytol 125:27-58
- Wu SC, Zhang Y (2010) Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. Nat Rev Mol Cell Biol. 11:607-620
- Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SW, Chen H, Henderson IR, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen SE et al. (2006) Genome-Wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. Cell 126:1189-1201
- Zhu J, Jeong JC, Zhu Y, Sokolchik I, Miyazaki S, Zhu JK, Hasegawa PM, Bohnert HJ, Shi H, Yun DJ, Bressan RA (2008) Involvement of *Arabidopsis* HOS15 in histone deacetylation and cold tolerance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:4945-4950