

I. 서론

동물과 달리 이동이 불가능한 식물체들은 외부 병원균들의 공격에 효과적이면서 빠르게 대처하여 극복할 수 있는 방어체계들을 발전시키면서 진화해 왔다. 이런 방어체계에서도 가장 효과적인 것은 저항성 유전자를 매개로 하는 반응이다. 이 반응은 병원균의 공격을 받은 부위의 식물조직이 급격하게 괴사되어 병원균에 감염된 식물세포가 감염초기에 신속히 사멸(program cell death)되는 과민성반응(Hypersensitive response;HR)과 Prf단백질을 과 발현시켜 과민성 반응을 일으키지 않고 식물의 저항성 반응을 유도하는 반응이 있다[Yang 등, 1997; Scheel, 1998; Somssich 과 Hahlbrock, 1998; Martin, 1999; 남재성, 2003]. 강력하고 효율적인 식물체의 병 저항성 반응의 시작은 침입하는 병원균의 병원성 유도물질(pathogenic effect molecules)과 이에 특이적으로 작용하는 식물체의 저항성 단백질의 상호작용에 의해서 식물체가 침입하는 병원균을 인식하는 것이다. 이러한 병원균과 식물체간의 상호작용은 유전학적으로 유전자 대 유전자(gene-for-gene)가설을 이용하여 Flor[1971]에 의해 처음으로 설명되었다[Flor, 1971]. 즉, 여러 곰팡이, 세균, 바이러스등의 병원성과 대항하기 위해 식물체는 유전적으로 저항성 기작을 갖고 있다는 것이다.

사과는 2007년 농림부 과수실태조사에 따르면 국내재배 면적 32,244ha로써

1위였고, 2008년 통계청 자료에 의한 생산금액은 6,977억 원으로 국내에서 생산되는 과수 중 가장 소득이 높았다. 이처럼 사과는 농가 소득의 매우 중요한 작물이다. 국내 사과원에서 살포되는 70%의 살균제가 사과 겹무늬썩음병과 사과 갈색무늬병 방제를 위해 사용되고 있다. 국내 주요생산 품종인 후지 사과는 겹무늬썩음병에 감수성으로 알려져 있다. 사과 겹무늬썩음병은 진균계의 자낭균류인 *Botryosphaeria dothidea*가 1차적으로 사과나무줄기에 기생하여 사마귀 또는 궤양 증상을 나타내며, 이 곳에서 1차 전염원인 자낭포자 및 병포자가 형성된다. 이들 포자는 빗물에 의해 누출, 비산되어 사과표면에 부착, 감염된 후 비교적 긴 잠복기를 거쳐 발병된다[홍연규등, 1989; 김성봉, 1989]. 국내에서 1970년대 말부터 발생한 이래로 사과 병해 중 그 경제적 피해가 가장 크고 방제가 어려워 사과재배농가에 큰 피해를 주고 있다[김호열, 1980; 김승철,1982]. 생산자와 소비자의 다양한 요구에 의하여 과거 50년 주기로 신품종대체가 이루어 졌으나 근래에 와서는 10년 주기로 신품종 대체가 가속화 되었다. 생산량과 질을 유지하고자 하는 데 경작의 초점이 맞추어져 왔던 옛날에 비해 근래에 와서는 인구의 증가와 함께 과도한 농약사용에 대한 우려가 커짐에 따라 고품질 사과의 개발과 다양한 스트레스 저항성과 병 저항성 사과와 같은 사과육종의 필요성이 증대되고 있다. 목본성 영년생 작물인 사과는 체적이 크고 유전적 조성이 잡다 하여 다른 초본성 작물에 비해 새로운 품종을 육성하고

유전양식을 규명하는데 많은 토지와 노력 그리고 최소한 10년 이상의 긴 기간이 요구되는 제한성을 가지고 있다[KIM 등, 2003]. 이런 제한성을 극복하고자 목적형질과 높은 상관성을 보이는 간접적인 형태적 표지나 생화학적 특성을 이용한 조기선발 표지를 이용하기도 하였다. 그러나 이러한 방법들 역시 강하게 연관된 유전자를 분리하지 못하거나 수적인 제한으로 인해 적용에 한계를 보일 수 밖에 없었다[KIM, 2004;]. 최근 분자생물학과 식물 형질 전환 기술의 발달로 식물체에 특정 유전자를 도입하거나 그 활성을 조절하는 것이 가능하게 되었다. 이런 사실은 앞에서 언급하였던 제한성들을 해결할 수 있게 해준다. 분자생물학분야에서도 유전체학(genomics)은 생물체내에 있는 모든 유전자들의 구조와 이의 다양한 기능을 연구하는 학문으로 병원균의 감염으로부터 저항성에 관여하는 유전자들을 알아내기 위해 적용되고 있다. 병원균 감염에 의해 유도되는 유전자를 알아내기 위한 유전자의 발현 양상을 목적으로 하는 방법으로는 suppression subtraction hybridization(SSH), cDNA microarray, differential display reverse transcription-polymerase chain reaction(DDRT-PCR) 등이 있다.

DEG PCR은 PCR의 선택성을 극대화시킨 방법으로 differentially expressed genes(DEG)만을 얻을 수 있고, 다른 방법에 비해 비용과 시간, 안전성 면에서 우수한 특징을 가지고 있고, 비 특이적인 신호가 적다는 장점이 있다[Hwang 등,

2003].

본 연구는 DEG PCR을 이용하여 사과 과실과 줄기에 발생하여 과실의 상품성을 떨어뜨려 농가소득에 큰 피해를 입히는 사과 겹무늬썩음병의 저항성에 관련하는 유전자를 탐색하고, 병 저항성 육종 소재로서 이용하고자 하는 목표로 총 3영역으로 나누어 수행하였다.

첫 번째는 사과에 저항성관련 물질이 있는지를 알아보기 위하여 상처만 낸 사과추출물과 상처에 겹무늬썩음병 병원균을 감염 시킨 사과추출물을 배양 배지로한 dendroid test를 수행하여 저항성 관련 측정 실험법을 확립하였고 사과 부위별 추출용매에 따른 항균활성 효과를 비교 조사하였다.

두 번째로, 사과 겹무늬썩음병 병원균에 의해 사과에서 유도되는 유전자들을 DEG PCR을 통해 분리하고 과 발현된 유전자들의 염기서열을 분석하여 병 저항성 관련을 조사하였다.

마지막으로, 위 연구 결과를 바탕으로 감염 반응 동안 사과 과실에서 과 발현된 유전자 중 저항성 관련 추정 유전자를 분리한 후 E.coli에 발현시켜 생산된 단백질에 의한 사과 겹무늬썩음병원균의 생육저해활성을 Dendroid

test로 확인하고 병 저항성 육종 소재로서의 이용가능성을 확인 하였다.



II. 사과 추출물에 의한 항균활성 검정

1. Abstract

사과 겹무늬썩음병 병원균감염에 의하여 사과과실에서 저항성 관련 물질들이 유도되었는지를 확인하기 위하여 깨끗이 수세한 사과 표면에 상처만 낸 시료와 상처에 병원균을 접종하여 발병을 유도한 시료를 가지고 dendroid test를 수행하였다. 그 결과 상처만 낸 사과보다 상처에 병원균을 접종하여 발병을 유도하였던 시료에서 병원균의 생육이 저해 됨을 확인하였고 dendroid test의 실험방법을 확립할 수 있었다. 시료 부위별 추출용매에 따른 병원균 생육억제 여부를 확인하기 위하여 다시 dendroid test를 수행한 결과 유기용매(Methanol)와 물에 의한 추출물의 차이는 없었고 사과 부위별 차이는 병반과 병반주위의 추출물이 다른 부위에 비해 효과적으로 병원균의 생육을 억제 하였다. 이로써 사과 겹무늬썩음병에 감염된 사과병반과 병반주위에서 사과 겹무늬썩음병 병원균의 생육을 억제하는 저항성관련 물질들이 생성됨을 확인 할 수 있었다.

2. 재료 및 방법

1) 사용시료

사과는 시판되고 있는 후지 품종 사과 (*Malus domestica* cv. Fuji) 를 사용하였고, 자연상태에서 감염된 사과로부터 순수 분리한 사과 겹무늬썩음병 병원균 (*Botryosphaeria dothidea*)을 사용하여 과실에 접종하였다. 기본 실험배지는 Potato Dextrose Agar (PDA; Difco, Co. USA) 와 Potato Dextrose Broth (PDB; Difco, Co. USA)를 사용하였으며 병원균 보관은 PDA 배지를 30mL 분주한 plate 에 streaking 하여 4°C 냉장실에 보관하면서 필요할 때마다 colony 를 5mL PDB 배지에 접종하여 27±1°C, 150rpm 으로 현탁 암 배양하여 사용하였다.

2) 사과추출물의 조제

사과추출물의 준비는 추출과정에 따라 3 부분으로 구분하였다. 공통적으로 사용된 배지는 PDA 이다. 먼저 1L 삼각 flask 를 4 개 준비하여 4 개중 한 개에는 500 ml, 나머지 3 개의 flask 에는 450 ml 되도록 PDA 를 조제하여 분주한 다음 121°C, 15 분 동안 고압 멸균하였다. 멸균이 끝난 flask 중 450 ml인 flask 에 각각 사과 겹무늬썩음병 병원균에 감염시킨 사과, 감염 없이 상처만 낸 사과 그리고 상처도 병원균 감염도 없는 사과의 과즙을 50 ml씩 넣어 plate 에서

균했다.(Fig. 1.) 과즙은 클린벤치 안에서 멸균된 Cork borer 를 사용하여 자른 후 잘린 사과를 믹서기로 갈아서 6um 의 filter paper 로(advantec. 日本, CAT No.1) 여과하여 실험에 사용하였다. 두 번째 부분은 Fig. 2와 같이 각각의 사과 샘플을 샘플의 20 배 양의 메탄올과 함께 분쇄하여 준비하고 4℃, 8,000RPM 으로 20 분간 원심분리하여 상층액만 수거하여 0.45um(advantec. 日本, CAT No. AD.25CS045AS)의 시린지 필터로 여과하고 증발기에서 건조하여 50 ml의 멸균된 증류수에 용해하여 멸균이 끝난 PDA 450 ml에 혼합하여 plate 에 분주하여 균했고, 마지막 부분은 사과 샘플을 동량의 멸균된 증류수에 넣고 분쇄하여 4℃, 8,000RPM 으로 20 분간 원심분리하여 상층액만 수거하고 0.45um(advantec. 日本, CAT No. AD.25CS045AS)의 시린지 필터로 여과하여 멸균이 끝난 PDA 450 ml에 혼합하여 plate 에 분주하여 균한 것을 실험에 사용하였다.

Fig. 1. Infected and non-infected from disease & sampling of the apple.

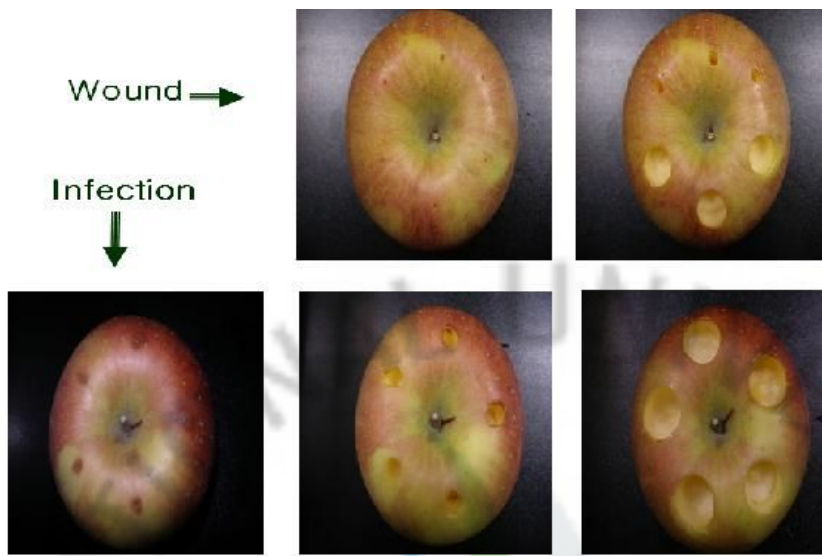
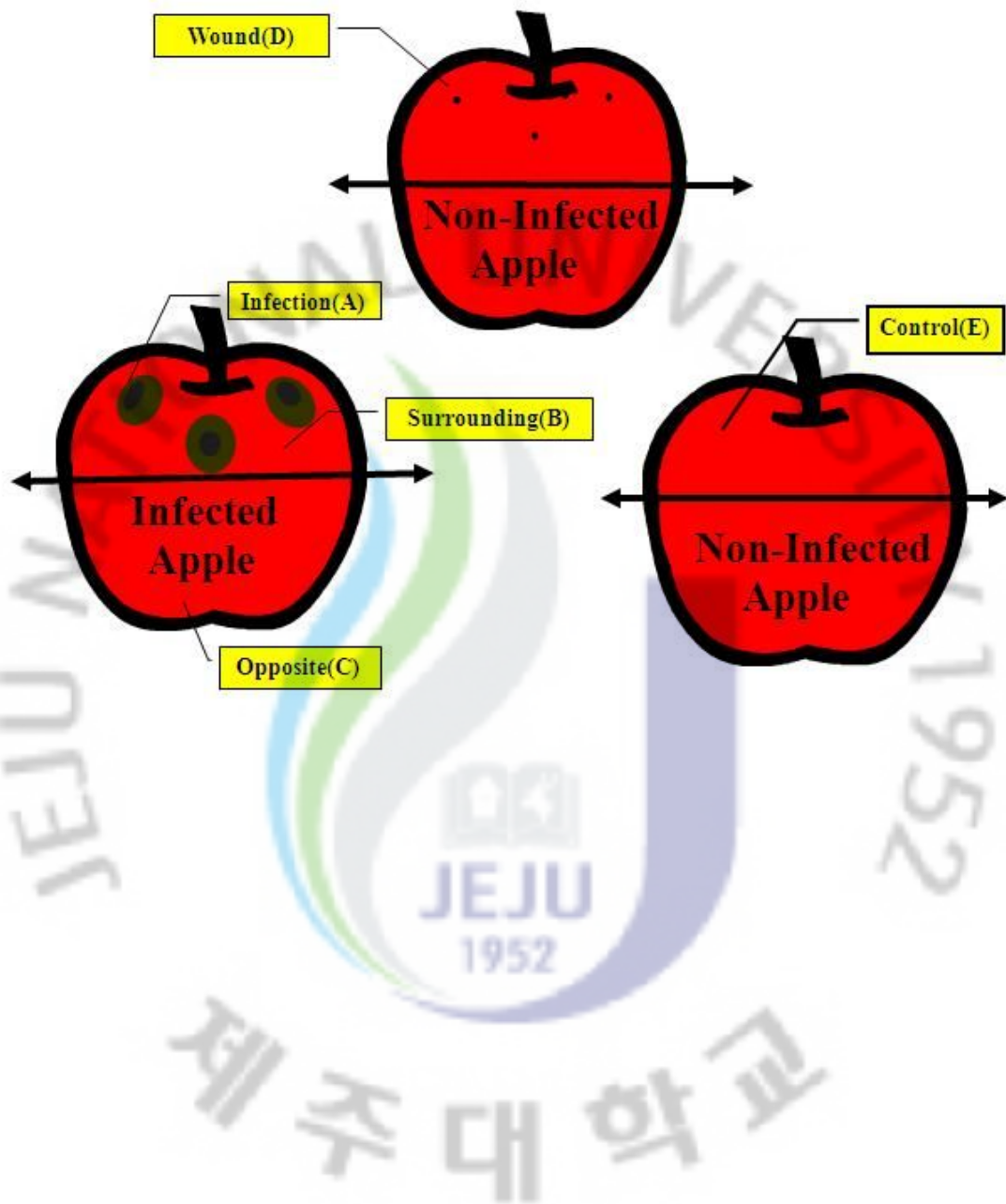


Fig.2. Infection of disease and sampling in the parts of the apple.



3) 감염여부와 사과 과실 부위별 추출용매에 따른 항균활성측정

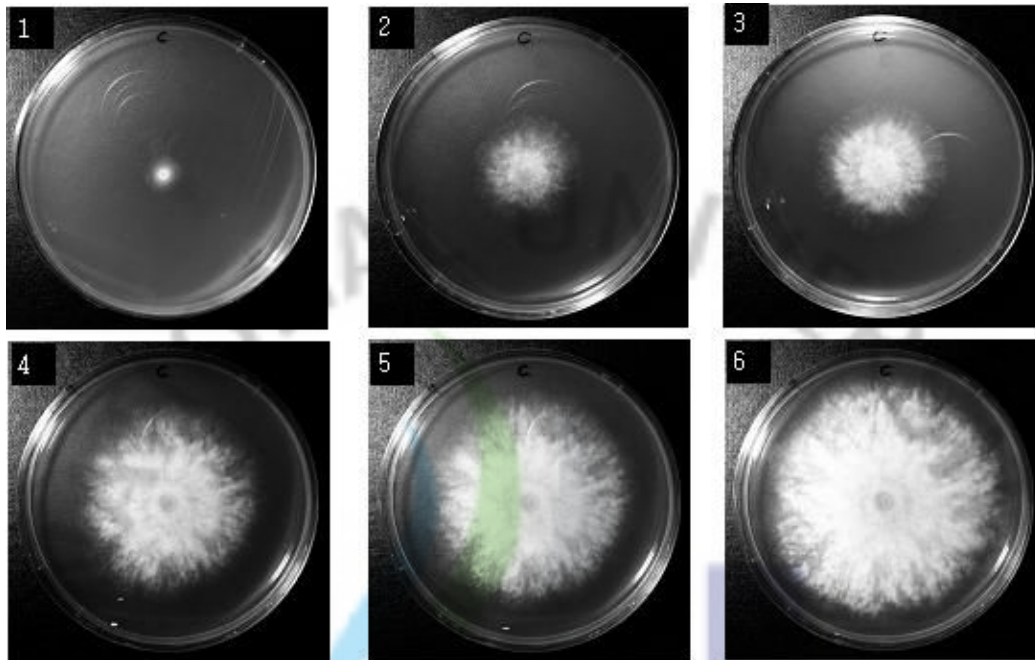
Dendroid test는 여러 경우의 사과 과즙을 넣어 굳힌 PDA배지 plate에 사과 겹무늬썩음병 병원균 현탁액을 적신 paper disc (Whatman, England, CAT No. 2917006)를 올려 놓고 병원균 배양 온도에 맞추어서 ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$) 3~4일간 배양하며 사과 겹무늬썩음병 병원균의 직경을 측정하는 것이다. 사과 겹무늬썩음병 병원균의 감염에 의해 사과에서 유도되는 항균물질의 활성을 조사하기 위해 Dendroid test를 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

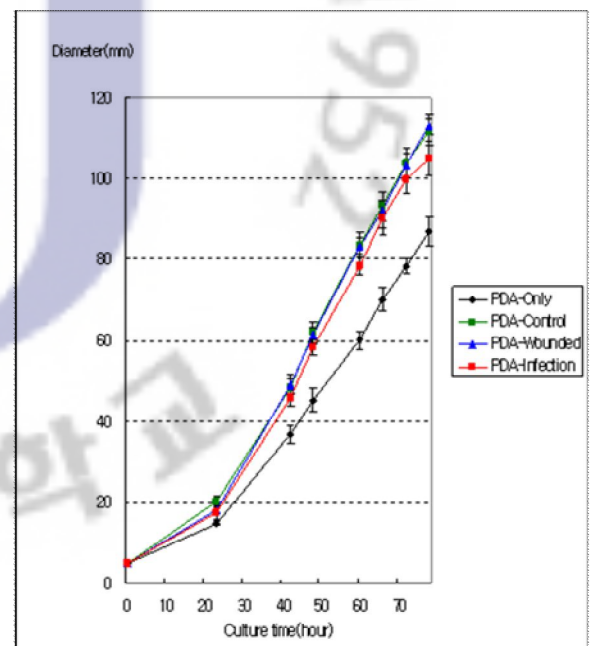
1) 감염여부에 따른 항균활성측정

사과 겹무늬썩음병 병원균(*Botryosphaeria dothidea*)의 감염에 의해 사과에서 저항성 물질이 유도되었는지를 조사하기 위해 Dendroid test를 수행하였다.(Fig. 3.) 샘플은 PDA배지만 넣은 plate, PDA배지에 사과과즙을 섞은 plate, PDA배지에 상처만 낸 사과과즙을 섞은 plate, 그리고 마지막으로 PDA배지에 동일한 상처와 사과 겹무늬 썩음병 병원균(*Botryosphaeria dothidea*)을 감염시킨 사과과즙을 섞은 plate를 준비하여 paper disk에 의한 병원균 배양을 진행한 결과 상처와 사과 겹무늬썩음병 병원균에 감염된 사과과즙이 섞인 plate에서 자란 병원균의 직경이 사과과즙만 섞거나 상처를 낸 사과과즙을 섞은 다른 plate들 보다 병원균(*Botryosphaeria dothidea*)의 직경이 적은 것을 관찰하였다.(Fig. 3.) 이는 병원균(*Botryosphaeria dothidea*)의 감염에 의해 병원균의 성장을 억제하는 물질을 사과가 생산하였으며, 상처만 낸 사과도 대조구로 사용되었으므로 상처가 아닌 병원균의 감염에 의해 저항성 관련 물질들이 생산 되었고 이 물질들은 저항성 관련 유전자에 의해 생산되었을 것으로 추정된다. 실험을 통하여 Dendroid test로 항균활성을 측정방법을 확립할 수 있었고 나중에 저항성 관련 유전자산물의 항균활성 측정에도 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

Fig.3. Culture of White rot from isolated apple fruit and perform dendroid test.



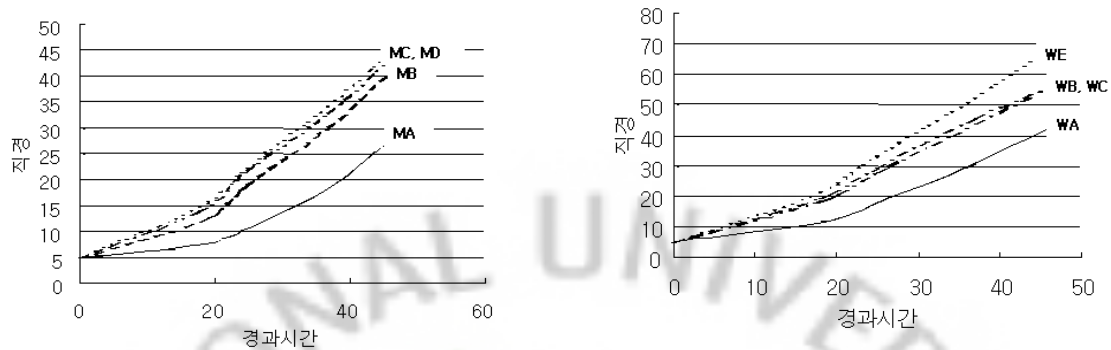
Average diameter				
Sample Time	PDA-Only	PDA-Control	PDA-Wound	PDA-Infection
0	5.00	5.00	5.00	5.00
23	14.75	20.13	18.25	17.38
42	36.88	48.25	48.88	45.75
48	45.25	62.00	61.25	58.38
60	60.13	83.63	83.25	78.38
66	70.13	93.25	92.13	90.25
72	78.25	103.88	103.38	99.63
78	86.88	111.75	113.38	105.00



2) 사과 과실 부위별 추출용매에 따른 항균활성측정

앞선 실험을 통하여 사과 겉무늬썩음병 병원균(*Botryosphaeria dothidea*)의 감염에 의해 병원균(*Botryosphaeria dothidea*)의 생육을 억제하는 물질이 저항성 유전자를 매개로 감염된 사과에서 유도됨을 추정하였다. 이번에는 Fig. 2.에서처럼 부위별로 그리고 추출되는 용매에 따른 Dendroid test를 수행하였다. 유기용매(Methanol)와 물에서 추출된 사과 추출물의 병원균 생육억제 효과를 확인한 결과 Fig. 4.에서 보여지는 것처럼 감염된 사과의 감염부위에서 추출된 사과추출물이 다른 부위에 비해 병원균 생육억제 효과가 높음을 확인 할 수 있었다. 또한 추출용매에 따른 병원균 생육억제 효과는 차이가 없었다. 이로써 사과 추출용매에 따른 저항성 보단 감염된 사과부위에 따른 저항성의 차이를 확인 할 수 있었다. 사과 겉무늬썩음병 병원균(*Botryosphaeria dothidea*)의 생육을 억제하는 저항성관련 물질들은 사과의 병반과 병반주위에서 다른 부위에 비해 더 많이 생성됨을 확인 할 수 있었다.

Fig.4. Dendroid test



MA : Extracted juice from infection of ple by Methanol

MB : Extracted juice from surrounding of apple by Methanol

MC : Extracted juice from opposite apple by Methanol

MD : Extracted juice from wounding of apple by Methanol

ME : Extracted juice from controlled apple by Methanol

WA : Extracted juice from infection of ple by Water

WB : Extracted juice from surrounding of apple by Water

WC : Extracted juice from opposite apple by Water

WD : Extracted juice from wounding of apple by Water

WE : Extracted juice from controlled apple by Water

Ⅲ. 사과 겹무늬 썩음병 감염에 의해 유도되는 유전자 특성

1. Abstract

사과는 재배면적이 32,244ha 로써 국내 재배면적 1 위의 농가소득의 매우 중요한 작목이다. 사과원에서 사용되는 살균제의 70%이상이 주품종인 후지의 겹무늬썩음병과 갈색무늬병을 방제하기 위한 목적으로 살포되고 있다. 음식물의 안정성 요구가 향상되는 요즘 고품질 사과의 개발과 다양한 스트레스 저항성의 개선과 병저항성 사과와 같은 사과육종의 필요성이 증대되고 있다. 이에 분자적관점에서 사과 겹무늬썩음병 저항성에 관련된 유전자의 분석으로 인하여 병저항성 사과의 육종과 분자마커개발을 목적으로 연구가 수행되었다. 사과 겹무늬썩음병에 감수성인 후지사과과육에 *Botryosphaeria dothidea* 를 접종시켜 저항성관련 유전자의 발현을 유도하였다. 발현이 증감된 유전자를 선별하기 위하여 *Botryosphaeria dothidea* 에 의하여 겹무늬썩음병이 발병한 사과과육과 *Botryosphaeria dothidea* 없이 상처만 낸 사과과육에서 RNA 를 추출하여 DEG screening 을 수행하였다. 이 결과 18 개의 up-regulated 유전자와 18 개의 down-regulated 유전자를 분리하였다. 생물정보분석을 통하여 up-regulated 되는 유전자들이 flavonoid glucosyltransferase, PHI-1 protein, metallothionein-like protein, protease-inhibitor, senescence 관련 유전자, chalcone isomerase, chitinase, wounding-induced protein 등과 상동성이

높음을 알 수 있었다. 이러한 유전자들은 외부 스트레스에 반응하여 발현이 유도되는 유전자로서 질병저항성과도 밀접한 유전자들이다. 이들 유전자들이 실제로 사과 겹무늬썩음병에 저항성을 나타내는지를 밝히기 위하여 RT-PCR 을 수행하여 증감여부를 확인하였다.



2. 재료 및 방법

1) 공시재료

사과 겹무늬썩음병 감염에 의해 유도되는 유전자를 분석하기 위하여 시판되고 있는 후기 품종 사과(*Malus domestica* cv. Fuji)를 사용하였고, 자연상태에서 감염된 사과로부터 순수 분리한 사과 겹무늬썩음병원균(*Botryosphaeria dothidea*)을 과실에 접종하였다.

2) 사과 겹무늬썩음병 병원균(*Botryosphaeria dothidea*)에 의한 사과 과일 감염 및 배양

후지 사과의 표면을 수세 후 건조시키고 멸균된 이쑤시개로 1mm깊이의 상처를 내고 *B. dothidea*의 포자 현탁액을 10 μ l 취하여 상처부위에 접종하였다. 접종 후 사과는 10ml의 수증기로 포화된 플라스틱 용기에 넣어 27 \pm 1 $^{\circ}$ C에서 4~7일간 배양하여 샘플을 채취하였다.

3) 사과 과일로 부터의 Total RAN 추출

Total RNA 는 March 등의 방법(2002)에 따라 사과 겹무늬썩음병원균에 감염된 사과과실과 감염 없이 상처만 낸 사과과실로부터 추출하였다. 순수 분리한

total RNA 는 분광광도계를 이용하여 정량 한 후, DEG (Differentially Expressed Genes)탐색 및 RT-PCR 에 사용하였다.

4) First-strand cDNA 합성 과 GeneFishing™ PCR

상처만 낸 사과과실과 사과 겹무늬썩음병원균에 의해 감염된 사과과실에서의 mRNA의 발현차이를 보이는 유전자(DEG)들을 탐색하기 위해 DEG Screening을 수행하였다. 이 실험은 GeneFishing™ DEG kit (Seegene, Seoul, South Korea)를 사용하였으며 총 120개의 프라이머를 사용했다. 과정을 간략히 기술하면 First-strand cDNA를 합성하기 위해 추출한 각각의 Total RNA를 사용하여 역전사 효소(reverse transcriptase)반응을 수행했다. 역전사 효소 반응은 3 μ g의 total RNA에 5 × reaction buffer (Promega, Madison, WI, USA), 5 μ l of dNTPs (each 2 mM), 2 μ l of 10 μ M dT-ACP1 (5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATIII IT(18)-3'), 0.5 μ l RNasin® RNase Inhibitor (40 U/ μ l; Promega), 그리고 1 μ l of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (200 U/ μ l; Promega)등을 섞어 42°C에서 1시간30분간 처리한 후 바로 GeneFishing™ PCR에 사용하였다. Kit를 이용한 실험은 모두 제조사의 지시를 따랐다. 증폭된 PCR 산물들은 2% agarose gel에 전기영동하여 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다 (Hwang등,2004; Kim등,2004;

Kottom와Limper,2004; Pohianvirta,2004).

5) 염기서열 분석

다양하게 발현된 밴드들은 GENE CLEAN® II Kit (Q-BIO gene, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 분리하였고 이를 TOPO TA cloning vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 삽입하여 Cloning 하고 ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 NCBI (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>>)의 blast search 를 이용하여 검색하여 유전자를 확인하였다.

6) RT-PCR

발현된 유전자의 재 검정을 위하여 사과 겹무늬썩음병균을 감염시킨 사과 과실과 병원균의 감염 없이 동일한 상처만 낸 과실로부터 March 등의 방법(2002)에 따라 total RNA를 추출하였고, RT-PCR분석은 AccuPower RT/PCR kit (Bioneer, Korea)로 하였다. 1 μ g의 RNA를 역전사시켜 cDNA를 합성한 후, 각각의 얻어진 염기서열을 이용하여 최적의 PCR primer를 사용하여 유전자의 3-UTR 부분을 공급자 매뉴얼에 따라 증폭하였다. 시료 mRNA양을 보정하기 위한 내부 대조구로서는 18s RibosomalRNA를 사용하였다.

Quantitative RT-PCR을 하기 위하여 $1\mu\text{g}$ 의 totalRNA, 10pmole의 reversePrimer $1\mu\text{l}$ 에 DEPC treated 증류수로 $19\mu\text{l}$ 를 맞추어 70°C 5분 방치 후, 10pmole의 forwardPrimer $1\mu\text{l}$ 를 넣어주고 42°C 한 시간, 94°C 5분, 58°C 30초, 72°C 30초를 개시로 94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 30초의 조건으로 25cycle 반복하고 마지막으로 94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 분을 수행 후 1.5% agarose gel 상에서 전기영동으로 확인하였다.

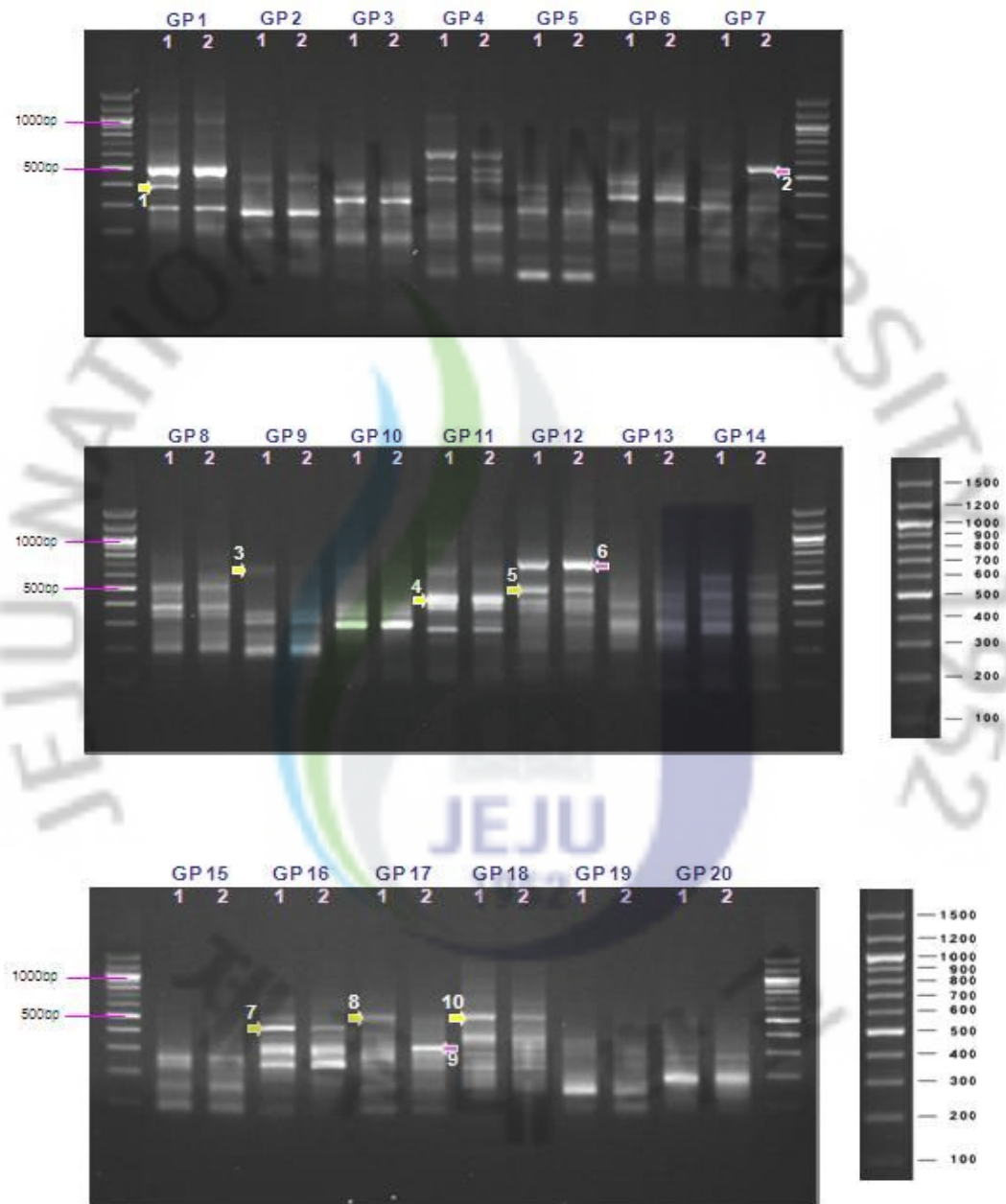


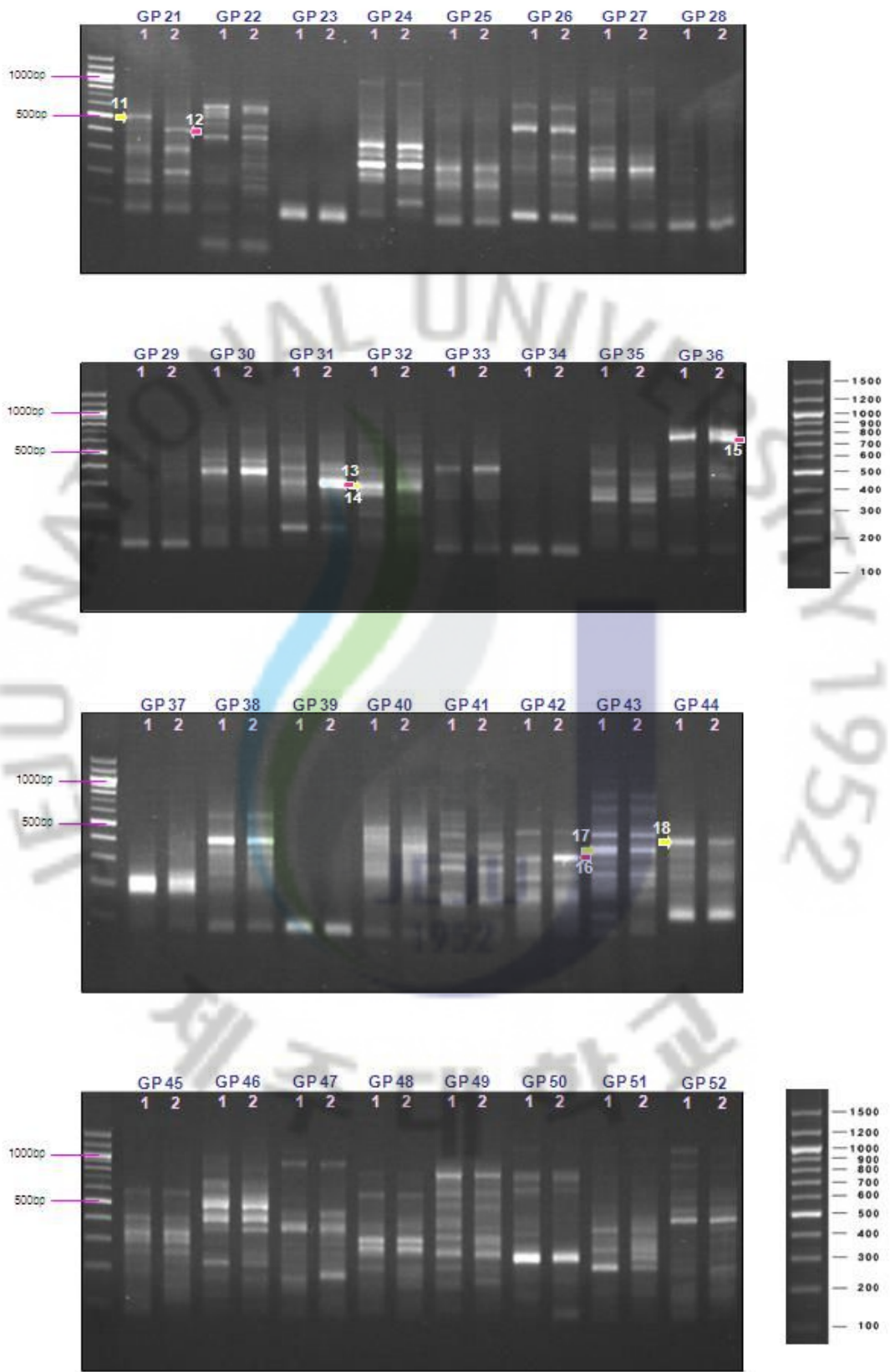
3. 결과 및 고찰

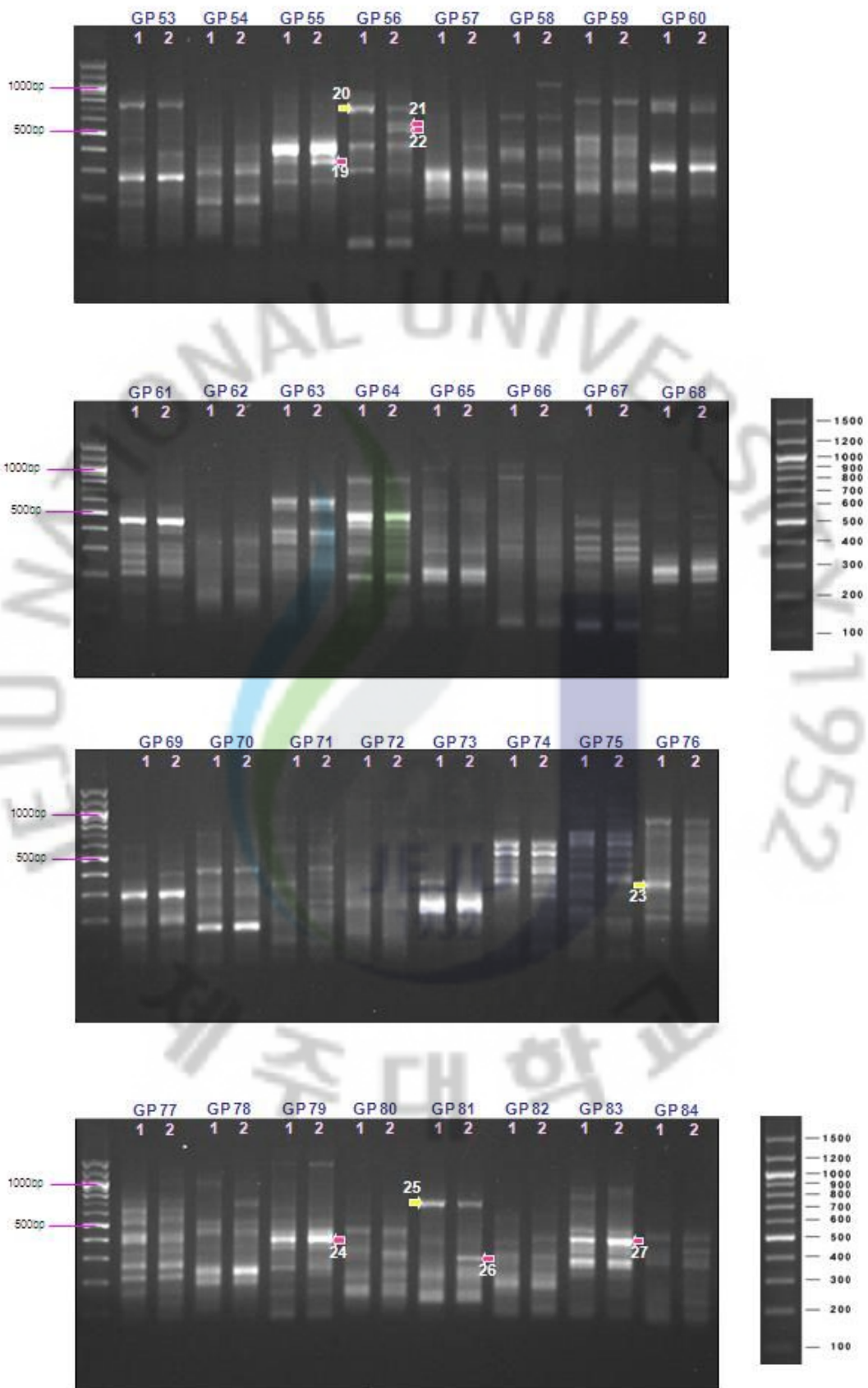
1) DEG screening 을 통한 꺾무늬 썩음병원균 감염에 의해 발현이 유도되는 유전자 분리

본 연구는 사과 꺾무늬썩음 병원균(*Botryosphaeria* spp.) 감염에 의해 유도되는 저항성 유전자를 동정하기 위해 사과표면에 1mm 깊이의 상처를 낸 후 사과 꺾무늬썩음병을 접종 하였고 대조구로서 사과 꺾무늬썩음병원균 접종 없이 표면에 동일하게 상처만 낸 사과를 이용하여 GeneFishing™ DEG screening 방법을 이용하여 발현이 유도된 유전자 군을 분리하였다(Fig 5.). 그 결과 감염에 의해 뚜렷한 발현 차이를 보이는 38 개의 유전자를 확인하였고 이 38 개의 유전자 중 사과 꺾무늬썩음병 감염에 의해 발현이 증가되는 18 개의 유전자를 분리할 수 있었다. 앞에서 기술한 유전자 대 유전자 가설에 의해 발현이 증가된 유전자에서 저항성유전자가 유도되었을 것으로 가정하였다. 그리하여 저항성유전자를 분리하고 분석하기 위해 과 발현된 18 개의 유전자의 염기서열을 결정 하였다(Fig 6.Fig 7.).

Fig.5. DEG screening(Isolation down-regulated, yellow arrow and up-regulated, red arrow by white rot infection.)







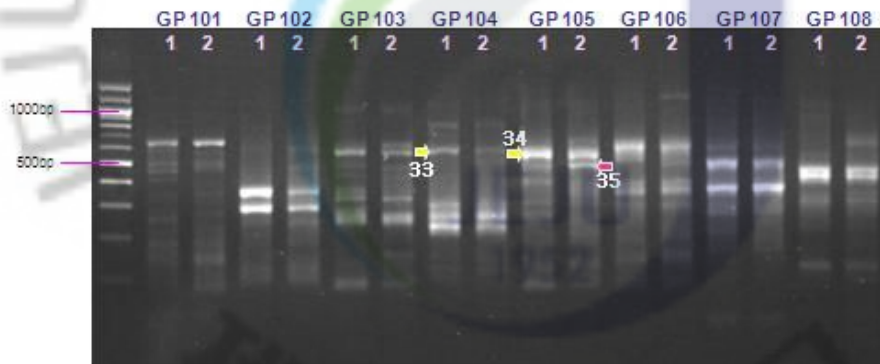
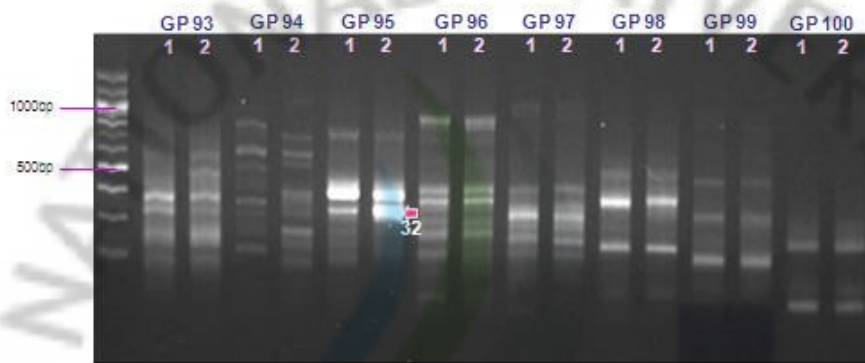
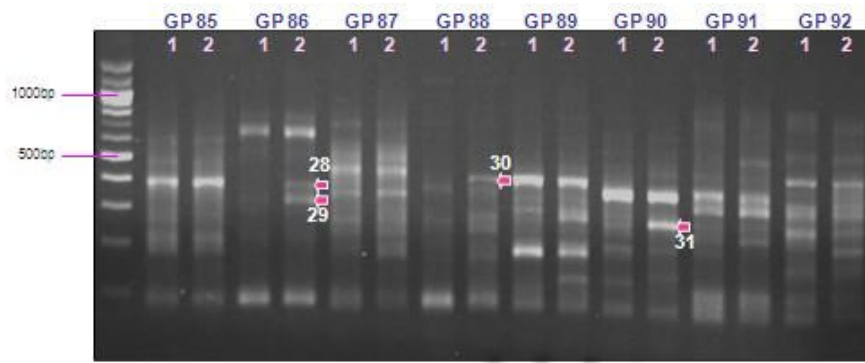




Fig.6. Confitimation of up-regulated genes(regeneration test of DEG PCR)

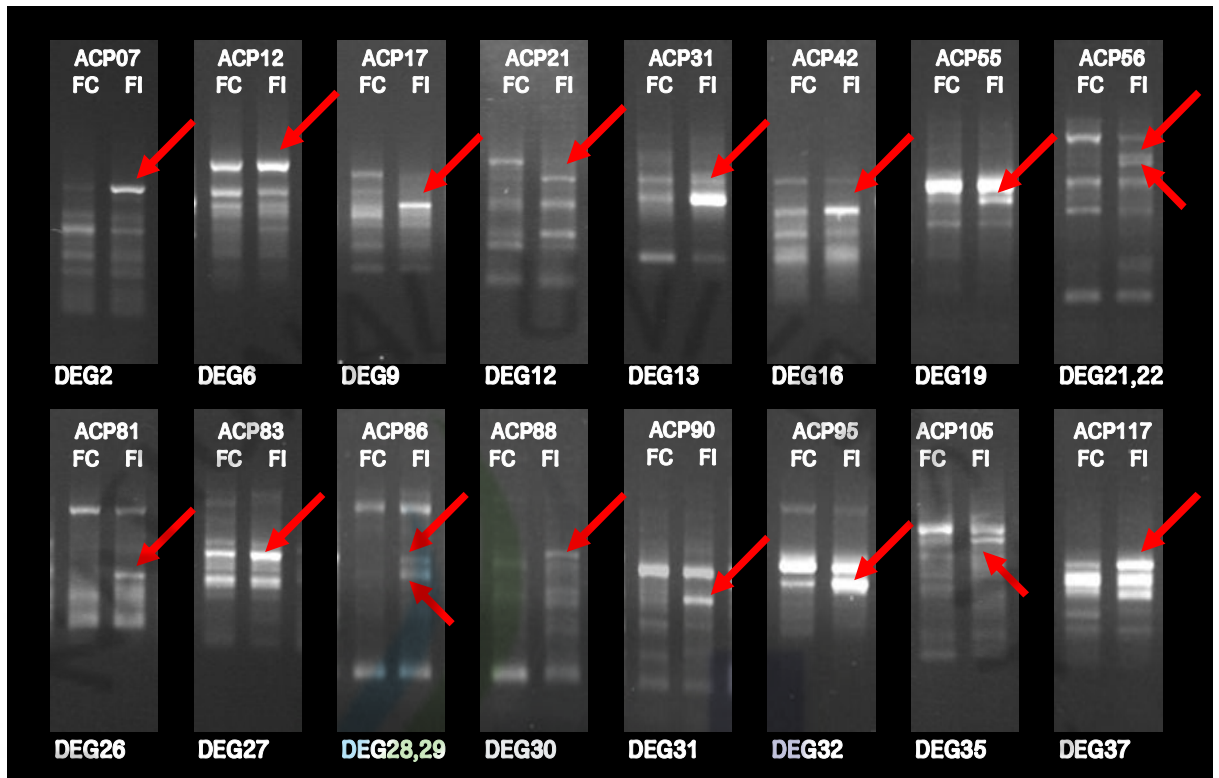


Fig.7. Nucleotide sequences of up-regulated genes by *B.dothidea* infection

DEG2(reverse)

ATCGACGGAAAAGAAATTGCACGTGTTGAATGGATCCGAGAAGGTAGAGTTCCTCTACAAACCATTC
GAGCTAAAATTGATTATTGTTCCCTATGCAGTTCGAACTATCTATGGGGTATTAGGCATCAAAATTT
GGATATTTGTAGACGAGGAATAATAAGAACTTACTTGACTTATATTTAGTTATATCTGGTGGTAAA
ACAAAAATGGCAAACTCTTTCATTCTTTTTCTGGTAGATAATAAAAAAAGAACAATTCTATAA
GGTTGAATAAAAAATTCGATTAATCATTTTGATATAATTGCTATGCTTAGTGTGTGACTCGTTGGTTT
TTTTAGGGTTGGGATTCAAAAAATGGACAGCCATAGTACAACTGATAACTATAGAACTAATAA
CCAACATCACTTCGTGTTATCTGGATAGAAAAGACCAGTCAAGATATGATATATAAGTCATATC
ATTGTAGCAACTGAAATCTTTTTTACATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

DEG6(forward)

GTTTTTGTGGTCCCTACGCCGGCCCCACCTAATGGCCAGAGAGCTATGCCAAGAGACTACGAGGATC
TAAAGGCAGTCTTGCCCGAAGGGTTTCTTGATCGGACGGCTACGGTTGGGAAGGTGATTGGTTGGGC
CCCGAAGCGCAATCCTAGGCCATCCGGCAACCGGAGGGTTTGTATCACATTGCGGGTGGAAATCT
ACGTTGAAAAGTTTATGGAATGGCGTGCCGATCGCCGATGGCCAATGTACGCGGAGCAAAACCTGA
ATGCCTTTCAGTTGGTGGTGTAGTTGGGATTGGCAGTGGAGATTAAGATGGATTATAGGAAGGACA
GCGACGTGGTGGTGTAGTGCAGAAGACATAGAAAAGAGGGATAAAGCAAGTGTATGGAGCTTGACAGTGA
TGTAAGGAAAAGAGTGAAGGAGATGAGTAAAAGAGCAAGAAAGCCTTGGTGGATGGTGGTTCTTC
TACTCTTCATTAGGGCGTTTTATTGATCAAATTTAATTGGGTTGGGGGGGGCTTTTATATTCTC
CTCGCTTATTTTTACGTTATGTAATTTGCAATGTTTGTATTGTAAGTTTTTCGTTGTAATACATAG
TTCAACATATCAAATCTCAAAATCTTGTGGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

DEG9(reverse)

GAGAAGGAGGTCCAAAGTGAACCTGAAATGGAGCAATCAATTGGAGAATTCCTTCAATACCCTCGACA
ATCAGTTCCTGAATTACATGGATGGCTTCTCGGATATTATGGACCCTTTTGGGGGGCAATTGCAAAT
GGAGCAGCAGCAGCCCTACCAGTTGCAGGACATGTACTCCTATCTCCACACCCAATTTAAGCCAAC
TTACAAGGGTACAATTGGAAAATGGCAAGACGGAGAGAACAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

DEG12(reverse)

TTTTTTTTTTTTTTTTTAAATCGGAAAAATGTATCTTTATATATTCTCATATAACAGCGCTACAAA
TTTATAAATTATGAAATATAAATGAATAAAATAAATGAATTTAGTACAATAATAAATGCAAATTC
AAAGCCATAAACACCCCCACTCTACATAACAATGACTGCAGCGAAAACCTCAACAGCTAGAGCTCC

GGCGGCGGAGAACCGATTCAAAACGGCACCGTTAGCAGGAGCGGGAGCATCGGAGGGAGATCCAGAA
CCTGAAGAGGGAACAGTCGCCGCCCGGAGACGACGATGGGGCAGAAGGTGGAGAGTCGGCGACGGG
AGATGTGGAAGGAGAAGCCGATGGTGAAGT

DEG13 (reverse)

GCACCACCGGTGCCAGCTACAATGCCAATGGTGCTAATGGAAGGAAGTACTTGCTTCCTGCACTATA
TAATCCTGCAACTTCATCTTGTGTTTACTTTGGTTTGAACATGAGAGGGACTAATGTATAAGCCTA
ATTAGGTGTTAGATATATTCATTGATTTGTTCAAATTTCTTTTGGTTATGCGGATTGTAATGATA
TAAAAATAGCAAATGCTTCGATTTGCATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

DEG16 (reverse)

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCATAACATCACAAGACCACGAACATGGCGATTATATGACACAATCACA
GAAACATAGTGACAGGTTTTTCACAGACACTACATGTCACTCAACAGACACAAATACTATAAAACAAAC
CAAAGACAAAGCCACAACGTTGTTTTCCACAAACACTTTATTTCGTTTACATCTTTAATTTGGTTG
TATGGGTTTAGTGACCACAGGTGCAGCTCACACATGAGCAGCCTGTGCCACACTTGCACTTTCCGTC
GTGCTCGGCGGCAGGAGCATCC

DEG19 (reverse)

TTTTTTTTTTTTTTTTTATTGTAATATAGCTTATTTTTATAAATAAAATAGAGGATTAACGATAT
TAATTCTCGAAATGACTGCTAAGCTTAAGCGACGAAGGAAGCTACTGCTACTAGTGCGGAGATGAG
CCCAACGAAAGAACCAAGAGTGGTGGTAGTGAGAGATGAAGCATGGGAGGATGATGGTGGAGGAGCC
AACAGAGAANAGGTGGTGGTTGGTGATCCAACGGTGATGATGACTTTTTGGCCTTGCTCGCAGTGGT
TACCAA

DEG21 (forward)

CAAGAACGCCATCTTGGTACCACCGAAGCCAAGCGGAGGTGGTAGCCAGGGCCAGTCGATCACCGGTC
TGCCGATAACGCAAGAACCAAGCCTATCAAGCCTGCATCCAAGTTTCGCAGAGGTCCTCCTGCTTCG
CAGCCACGACCACAGCCGCTAAGCGCAAGAATGCCGTTGTGGTGCCGCCTCCTAAGCCAAGCGGAGG
TGGTAGCAAGTCGATCACCGGCCAGCAGTGACCAAGGAGCCTAGACCAATCAAGCCGCTTCCAAGT
TTTAAGAGGCCGCGAGGGTTGATGGGAAGGGTTTTGAAAGGTGACCAGCTGAAGAGAGGGGTCATAT
AGAGCTGTCTCTGTCTGATTGTAAGGGAGTACACTGCCCTCAGCCGGATAGTAGTTTAGTGTGAGA
TATAAGAAGGCCTACCTGAGGTGGGTTTGAATTAATAGAATCTTTTCACTTCGAAAAAAAAAAAAA
AAAAAA

DEG22 (reverse)

AATATCCTGTCTGCGATGTCAATGCCGGAGCTTGTTTGATGAGCAAGGGCAATCCCTTGGGAGTGAA
GGCATTGAAGCGCACCCCCGCGAAACCCCACTGGGCTGTTGGTGGCGGAAAGAGCAGCAGTGCTTAAG
CAAAACACTCAAGCCTCGATGCAGTGGTTTAAACAAAAGCTAAGAAGGAAGAGACATCCAAGCATTAT
TGATAATCTTCTCCTTCGCTTATCGTTACCGGCGGATTACGCTCTTAATCGTAATTTATATTCCAAG
AAAAGGATTATTTTCAGATGCTGATTTGTATATAGGCCTGTATTTATTATTTATAGCATTGATCAG
TTGAAAGACAATACGTATTGTTGTCAATTTAGCAAATATGCTCTGTAATTGTCATGAATTTGGCA
TTGGCATTATGTAAAGTGCTTCGTTCCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

DEG26 (reverse)

ACATATTTTGAAAATGCACTAGAGTTATCACTAACGCATTTTCCAGACATATCAAACGAACAAAGC
TGTTTCGTCCATTTGGGAACTGAGGGTCCCTCGCCTCCGCTGAGAAGTTCCTTGTTTCATAACAAAACC
ACAGTTAAAACAAACCAAAAAAGTTGGAAACAGATGTAAACTTTCAGTTTATAAGGATAATAGAAG
ATTAACACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

DEG27 (reverse)

CTTACTCAGACCCCTACAGACCGCCACCACCACCTTGGAGTCGTCCTCCTCCATCTTTCTAAGTAATT
AACATACAGCAGCTTTCCTGATATATCTTATTTGTATATGGTCTACGCACGTCGGGACGTTGTATG
CACGAGGAGCGTCTGATCAAGGCTGCTGCTTTAGGAGAAAAAGAAATAAAAAATCATGAGTATAGA
CGTTGTAAACCTTATTCATATTTTGTAGACCCTATTTTTTTCATCATGGGTGTGTACTTTCACGATT
CAGATAATGTAATAATATAATTGCAAGGTAGATAATATATAGTTTGGTTTGGTAAAAAAAAAAAAA
AAAAAA

DEG28 (reverse)

GTGTTTCTCCTGCAGCAAAGCAAAGTTTGCCGCGAGGTTATCCGAATTGTTGAGTGGGTGCAAGGA
ATCTAATGGTGCTGAAGCCGAAATGAAAAAGTGGAGGCATGAAAACCTGAGAGAGGAGAAATAAAA
CTTGAGAGGGATTCTATTCTGTGTTTAGTGAATTTTACATACAATCTATGAAGCTATAGGAAA
GTGCTATGTCTTATTTAATTTAAAGAAAAATGATCATGTTTATGAGAAATATTAGTGTGTATT
GTTATATGTTTAAATCAAATCAACAAATATAGATGTCGATTGGTAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAA

DEG29 (reverse)

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTCATAAACATGATCATTTTTCTTTAAATTAATAAGACATAGC
ACTTTCCTATAGCTTCATAGATTGTATGTAAATAATCACTAAGCACATAACAGGAATCCCTCTCA

AGTTTTATTTCTCCTCTCTCAGTTTTTCATGCCTCCACTTTTTTCATTTCCGGCTTCAGCACCATTAGA
TTCTTGCACCCATTCAACAATTCGATAACCTCGCGGCCAAACTTTGCTTTGCTGCAGGAGAAACA

DEG30(reverse)

GGACCCGGTGTGTGAAAGATATCTCTTCACAGATAAGAGACGGCCTCCTTCAAGGAAGTCGGGTGT
AATGCCGTTACATGGTAAGTAGTGGGAGGCTCGGCATCTTTAAGCTTCCGATGGTTTGTAGCGCGG
TTACGCTAGACTCGAATTTGGGTGTGATTTAGGATCTAAAACAGCGTGGTTAATCTATTGTTGAA
TTATTGGACGTATCGTCACGTATATAATTTTCAGTGTGAGTTTTCTATGCTTGTTTTGGCTTTTTG
AACTGAAGGGTGATGCTTCAACTTTGTAATATAGTCTACAAGTTAATCAAAATATTTGCCCTTT
TTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

DEG31 (reverse)

GTCCAAAACAAGAGCCCCATAAGACAAAAGGAAATACTCAATTGTTCCAGTTCCGGTCCAAGTTGTT
TGCCAAATTTTAAATGTACTCCAACAAAACACCAGAAAATTGCTAATTTGAATTTCCAAAACAAC
AACGGAAGCTTTCTCATCAGAACCCAATTGGTGAAGCACAATCCCAAATTGCAATCAAGAACTCGGT
TAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

DEG32(reverse)

TTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCAAAAATACATATGCATGTTTTATTCAAAGGTAAGGAATGATGC
GTCATCATCCCTAACACACTTTATTATAGTAGTAGCATCAATTGAGGCAGAGAAGTTAATTAGATG
CTGTCCTAATGGATGCACTATAACCGTTGTCATAGAACCTGCTCCAAAGCATAACTCCTCCGTA
TGGGCGAATTCTTAATCGTTGGAAGAACTTGTGACTTGAGAGCGTCAGCAGGAATAAATCCGCCGCT
CGGAGCGGCCTCAGGAG

DEG35(reverse)

TATCAAGGGCATCTGCCCGTCGTACCCTCCACCACCAGAAGTTCAGCAAGGATACAGTACTATAA
CTCAAGGTGGTCCGTATGTTGTTGTTGCACCACCAGTTAATTACCCTATGAAAAGTGATGGACCTCC
AGCTGGATACCCCAAGAGACAGCTCCCTATCAGCAGCAGCAACAGCCACCAAAATTCATCACCAAC
AGAGAGGTGGTGGATTTTGGGCGGGATGTTGTTCTGCCATGTTTTGCTGCTGCCTCTGCGACCTGTG
CTGCTTGCCCTGCGCAGTAGTTTAATCTTAATTCAGAAGATTATGAACTGTTTGTAACTATATTG
ATTTGTATCTGGTTCGTACGTGCACCCACCGTCCCTCAATAATACTTCCTTAATTCTGTGAGAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

DEG37 (reverse)

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAGAAAACACGTCTTTATTGAAATAGAAGAGTACCATAACACGGCT
ACAGCCGCGTCGGGATATGACCAAAAGAGCCTCGACCCCATGGTTACACCCAACACCAGCACACACA
CAAACGAAATTTCAAGAAAAGAAAGAGAAATGAAAAAGCGAGAAAGAAATACGGTAGGATAGGACT
TCGGCAGTTCAGCCATAACGAGTACCGGACAGCCAATGAGGTTATGACACCTCAGCCCCGCTTATT
TAGTAGTATTAGACTCCACTGCACAGGACCGCAGGGGATTAGTGTTATGGCTTTTAGATTGCGAGGA
CA



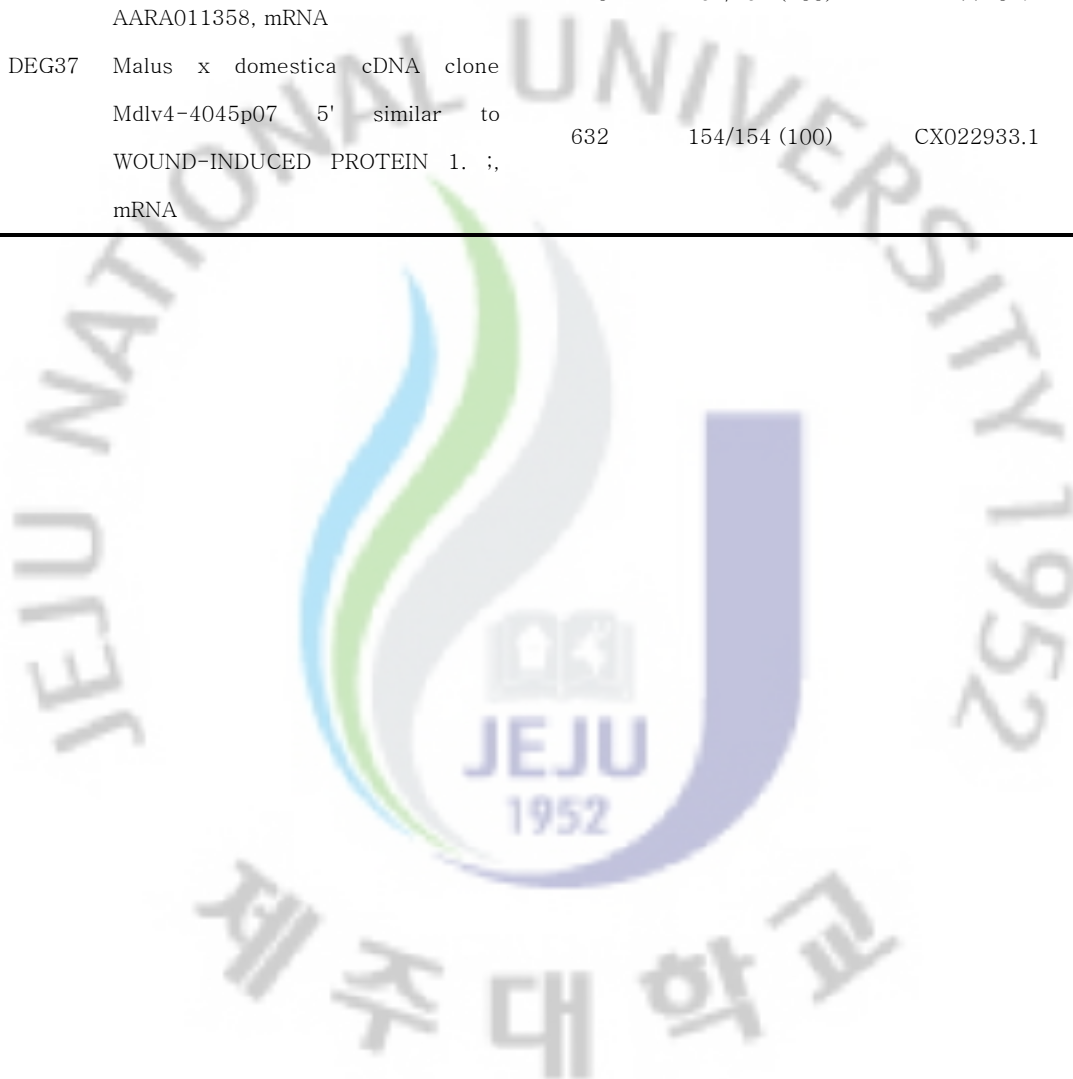
2) 감염에 의한 발현 유도성 유전자의 생물정보 분석

1990 년에 개발되어 DNA 서열을 비교해주는 BLAST(for Basic Local Alignment Search Tool) software 를 이용하여 결정된 염기서열을 분석하였다. GeneFishing™DEGscreening 방법등을 통하여 결정된 유전자들의 염기서열을 BlastX 와 BlastN 프로그램을 통해 NCBI 에 등록된 유전자 정보와 비교하여 각각의 유전자와 높은 상동성을 보이는 유전자 정보를 바탕으로 정리하였다(Table 1). 이 유전자들의 서열을 분석한 결과 각각 flavonoid glucosyl transferase 와 nam-like protein 10, PHI-1 protein, metallothionein-like protein, protease-inhibitor, senescence-related gene, chalcone isomerase, chitinase, 그리고 wounding-induced protein 과 높은 상동성을 보였고, 나머지는 현재까지 알려진 유전자들과 상동성이 없는 유전자였다. 이러한 유전자들을 동정한 뒤, 문헌정보분석을 통해 생리적 기능을 유추하였다. 발현이 유도된 대부분의 유전자는 외부 스트레스에 반응하여 발현이 유도되는 유전자로서 질병저항성과도 밀접한 유전자들이다. 이러한 결과는 DEG screening 의 실험이 제대로 수행되었음을 나타내 주며, 이들 유전자가 molecular marker 로 사용될 수 있는 가능성을 제시해 주었다.

Table 1. Identification of genes differentially expressed and homology of cDNA Fragments by NCBI data base

<i>DEG No.</i>	<i>Sequence homology search</i>	<i>Sequenced bp</i>	<i>Identification (%)</i>	<i>Gene bank access No.</i>
DEG2	Malus x domestica cDNA clone AAAAA004404, mRNA	679	487/491 (99)	CN856417.1
DEG6	Malus x domestica clone 30-4 flavonoid glucosyltransferase mRNA	444	172/187 (91)	AY347790.1
DEG9	Malus x domestica cDNA similar to nam-like protein 10 [Petunia x hybrida], mRNA	593	244/244 (100%)	DR995832.1
DEG12	Malus x domestica cDNA clone AASB004227, mRNA	576	330/344 (95)	CN883837.1
DEG13	Malus x domestica cDNA clone Mdst6011o21 5' similar to PHI-1 PROTEIN. ;, mRNA	394	228/228 (100)	CV627256.1
DEG16	Malus domestica metallothionein-like protein (AMT2) mRNA, complete cds	510	270/270 (100)	MDU61974
DEG19	Malus x domestica cDNA clone AARA014034HT(AA RA) Royal Gala partially senescing leaf Malus x domestica cDNA clone AARA01434 , mRNA	587	141/143 (98)	CN878543.1
DEG21	No significant similarity found.			
DEG22	Malus x domestica cDNA similar to cysteine protease component of protease-inhibitor complex [Zea mays], mRNA	607	428/430 (99)	DR996113.1
DEG26	No significant similarity found.			
DEG27	Malus x domestica cDNA clone Mdfrt3038n23 5', mRNA	347	169/172 (98)	CO541047.1
DEG28	Malus x domestica cDNA similar to chalcone isomerase [Malus sp.], mRNA	571	266/268 (99)	DR991869.1
DEG29	Malus x domestica cDNA similar to chalcone isomerase [Malus sp.], mRNA	793	73/84 (86)	DR991869.1

DEG30	Malus x domestica cDNA clone AASB001429, mRNA	520	335/336 (99)	CN882284.1
DEG31	No significant similarity found.			
DEG32	Malus x domestica cDNA clone Mdfw2031113 5' similar CHITINASE. ;, mRNA	455	398/398 (100)	CN581151.1
DEG35	Malus x domestica cDNA clone AARA011358, mRNA	550	398/398 (100)	CN877405.1
DEG37	Malus x domestica cDNA clone Mdlv4-4045p07 5' similar to WOUND-INDUCED PROTEIN 1. ;, mRNA	632	154/154 (100)	CX022933.1



3) RT-PCR에 의한 과 발현 유도성 유전자의 확인 및 생리적 특성

분리된 유전자들의 발현을 확인하기 위해 사과 겹무늬썩음병에 감염된 사과 과실과 감염 없이 상처만 낸 사과 과실에서 각각 RNA를 추출하여 Quantitative RT-PCR을 수행하였다(Fig.8). 따라서 본 실험을 통해 우리는 분리한 유전자들이 감염 없이 상처만 낸 사과 보다 사과 겹무늬썩음병 병원균에 감염된 사과에서 특이적으로 과 발현 함을 확인하였다. 감염에 의해 발현이 증가된 유전자의 생리적 기능을 살펴보면

DEG6 clone은 Flavonoid glucosyltransferase(FGT)와 높은 상동성을 나타내며 담배잎에서 저 발현 시켰을 때 병 저항성 작용이 약해지는 것을 2002년에 plant cell(Julie Chong et al.2002)에서 확인하였으며 토마토에서도 병 저항성 작용을 확인하였다(Mathilde et al.2005).

DEG9 clone은 nam-like protein 10과 높은 상동성을 보였다. Nam-like protein은 *Phytophthora* 의 감염에 의해 감자잎에서 과 발현하는 유전자로 병원균에 의해 유도되었으며 수평저항성을 나타낸다(tian 등, 2006).

DEG13은 PHI-1 protein과 높은 상동성을 보였고 **DEG22**은 protease-inhibitor와 높은 상동성을 보였다. Protease inhibitor 유전자를 담배, 감자, 딸기 고구마, 쌀 등에 넣어서 발현 시켰을 때 이 형질 전환 식물체들이 벌레등 미생물의 감염에 대한 저항성을 나타냄을 2005년도 Dunaevsky등에 의해 발표된

review지에서 확인할 수 있었다.

DEG16은 metallothionein-like protein 과 일치하였다. Tobacco Mosaic Virus의 감염과 상처에 의해 *Nicotiana glutinosa* L.에서 Metallothionein-like gene이 유도되었고[Choi등, 1996], 이 Metallothionein-like gene은 식물 병 저항성 반응 동안 유도된 유전자라고 할 수 있다.

DEG19clone 과 DEG35clone은 senescence-related gene와 높은 상동성을 보였다.

DEG28clone 과 DEG29clone은 chalcone isomerase 와 높은 상동성을 보였으며 이 chalcone isomerase는 콩에서 *Phakopsora pachyrhizi*에 대한 저항성 실험에서 chalcone synthase2 가 검출되면서 이 chalcone의 기능이 *Phakopsora pachyrhizi*에 대한 방어기능이라고 하였다.

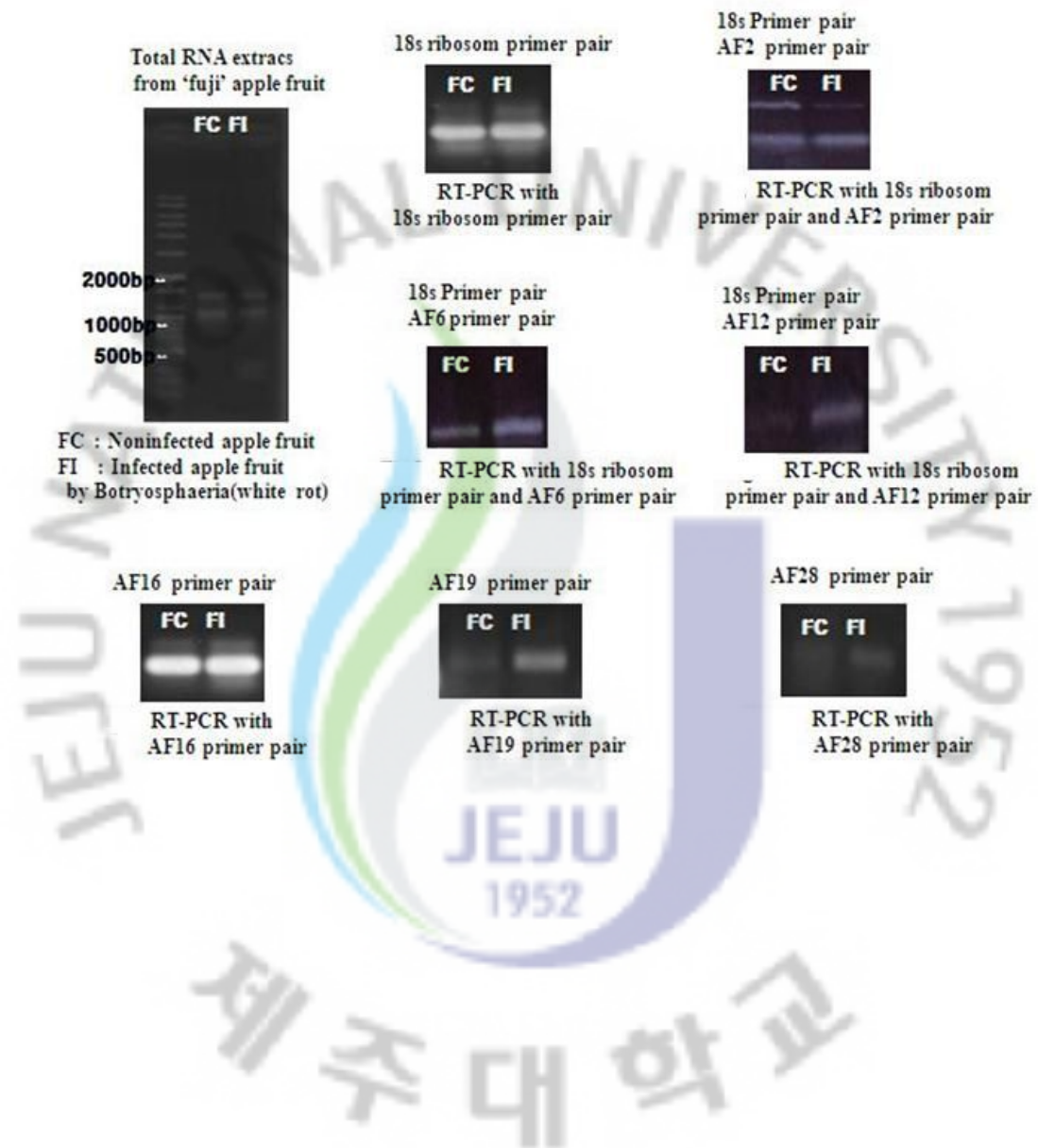
DEG32clone 은 chitinase 와 높은 상동성을 보였다. Fukuda 와 shinshi(1994)는 chitinase gene 이 PR(pathogenesis-related)단백질과 유사하며 병원균의 침입에 의하여 발현이 된다고 했다. 또한 chitinase 는 병원균의 세포벽을 분해하여 항균성을 발휘한다(Schlumberg et al. 1986; Mauch et al. 1988).

DEG37 clone 은 wounding-induced protein 과 높은 상동성을 보였다. 이러한 결과를 통해 사과 겹무늬썩음병균에 감염된 사과가 그렇지 않은 사과에

반하여 과민성 반응을 일으키고 이에 형성된 괴저병반부나 병반주위에 새로이 생성된 과 발현 유전자들은 질병의 침입에 방어하기 위한 수단으로 사과에서 과 발현 된 것이며, 이는 사과 곱무늬썩음병 저항성에 중요한 역할을 수행하고 있는 것으로 추정된다. 이러한 유전자는 생명공학기법을 통해 사과 곱무늬썩음병 저항성 사과를 육종하는데 유용하게 이용될 것으로 사료된다.



Fig. 8. Semi-quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction.



IV. 사과 유래 Amet단백질의 항진균성 측정

1. Abstract

사과겉무늬썩음병 병원균에 의해 감염된 사과에서 과 발현된 유전자들 중에 DEG16 clone을 Genomic PCR 과 RT-PCR로 분리하였다. Genomic DNA서열과 cDNA서열을 GenBank에 등록된 서열들과 비교한 결과 개놈구조는 3개의 exon과 1개의 intron으로 구성되어 있음을 확인 하였고, 66개의 아미노산으로 구성된 작은 분자량의 Metallothionein-like protein type3를 암호화 하고 있음을 알 수 있었다. DEG16 clone에 의한 Metallothionein-like protein type3의 항균활성을 in vitro에서 확인하기 위해 DEG16clone을 대장균에서 발현시켰다. 생산된 단백질은 Amet단백질이라 부르기로 했다. 대장균에 의해 생산된 Amet단백질이 포함된 추출물을 이용해 dendroid test를 수행하여 사과 겉무늬썩음병 병원균에 대한 항균활성 여부를 조사한 결과 Amet단백질 포함된 plate에서 *Botryosphaeria dothidea*의 성장이 억제됨을 확인 할 수 있었다. Amet단백질은 사과 겉무늬썩음병에 대하여 저항성을 가지고 있다고 사료된다.

2. 재료 및 방법

1) 사용시료

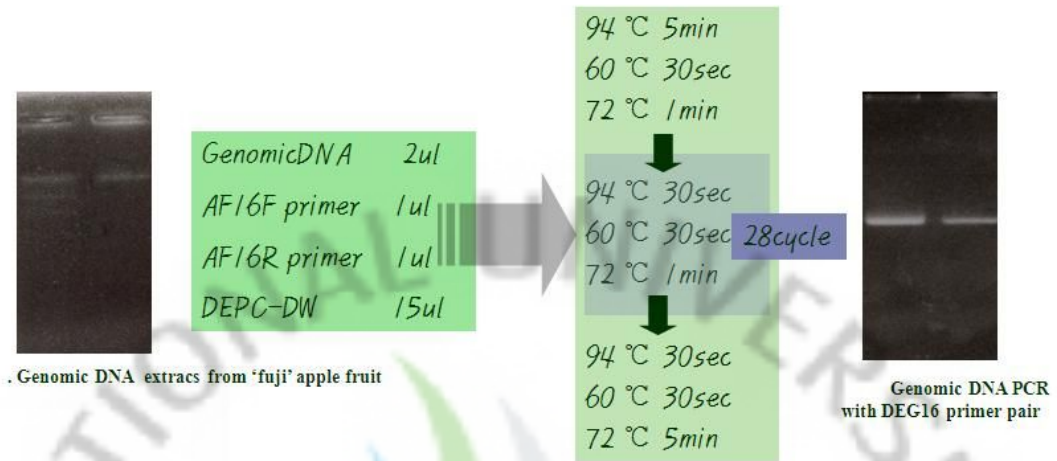
사과는 시판되고 있는 후지 품종 사과 (*Malus domestica* cv. Fuji) 를 사용하였고, 자연상태에서 감염된 사과로부터 순수 분리한 사과 겹무늬썩음병 병원균 (*Botryosphaeria dothidea*)을 사용하여 과실에 접종하였다. 기본 실험배지는 Potato Dextrose Agar (PDA; Difco, Co. USA) 와 Potato Dextrose Broth (PDB; Difco, Co. USA)를 사용하였으며 병원균 보관은 PDA 배지를 30mL 분주한 plate 에 streaking 하여 4°C 냉장실에 보관하면서 필요할 때마다 colony 를 5mL PDB 배지에 접종하여 27±1°C, 150rpm 으로 현탁 암 배양하여 primer[DEG16R]GGT AAT TAA GAG AGC CAA AGC 를 사용하였다.

2) Genomic PCR & RT-PCR ,염기서열 분석 및 계통분류

Genomic PCR을 하기 위한 Template으로는 사과 잎에서 추출한 Genomic DNA를 사용하였고 Primer로는 sense primer[AF16F]TGG GAA GAA CAT GTG TGG, Antisense primer[AF16R]GGC TCG CG ATC TCA TAT CC를 사용하였다. Gnomic DNA추출 방법은 사과 잎을 액체질소상에서 곱게 갈고, DNA isolation buffer를 넣어 60°C water bath에 incubation하고, 동량의 CIAA(24:1)을 넣고 Centrifugation (7,000g,10min,4°C)했다. 여기에

0.7volume의 Isopropanol을 넣어 다시 Centrifugation (5,000g,5min,4℃)을 한 후,DNA를 4ml/g tissue TE buffer에 RNase(20ug/ml)를 넣고 37℃에서 incubation한 후 다시 동량의 Phenol/chloroform넣어 Centrifugation (10,000g,10min,4℃ 또는 RT)후 상층액에 동량의 CIAA넣고 다시 Centrifugation (10,000g,10min,4℃ 또는 RT)하고 상층액에 0.2vol 4.4M ammonium acetate와 0.7vol Isopropanol을 첨가하여 Centrifugation (5,000g,5min,4℃)한 후 pellet을 washing하고, TE buffer(9ml/10g)로 녹여 genomic DNA을 추출 했다. 이 genomic DNA를 Bioneer사의 Accupower PCR PriMix를 사용하여 Fig 9.의 조건으로 Genomic PCR을 수행 하였다. 1.5% agarose gel 상에서 전기영동으로 확인하였다.

Fig. 9. Condition of genomic PCR



. Genomic DNA extracts from 'fuji' apple fruit

Genomic DNA PCR with DEG-16 primer pair



DEG16clone의 cDNA를 분리 하기 위해 먼저 사과 꺾임병균을 감염시킨 사과 과실과 병원균의 감염 없이 동일한 상처만 낸 과실로부터 March등의 방법(2002)에 따라 total RNA를 추출하였고, RT-PCR은 AccuPower RT/PCR kit (Bioneer, Korea)를 사용하였다. Fig 10의 조건에 따라 1 μ g의 RNA를 역전사시켜 cDNA를 합성한 후, 최적의 PCR primer[DEG16F: GCA ACA TGT CGG GGA, DEG16R: GGT AAT TAA GAG AGC CAA AGC]를 사용하여 Fig 11.의 조건에 따라 PCR하여 1.5% agarose gel 상에서 전기영동으로 확인하였다.

Fig. 10. Condition of cDNA synthesis

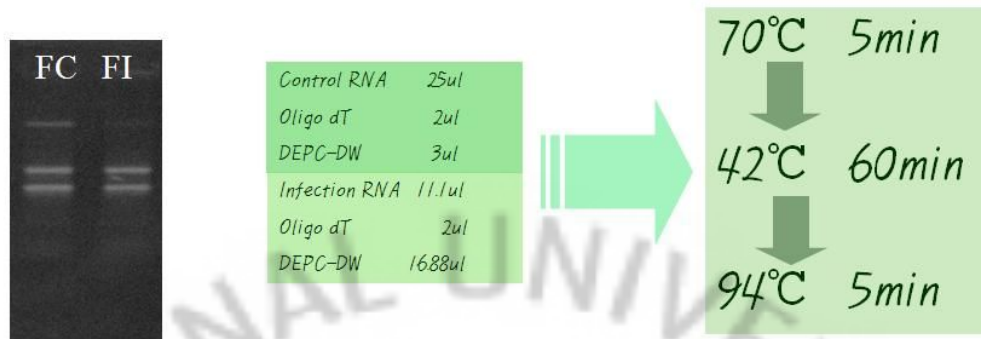
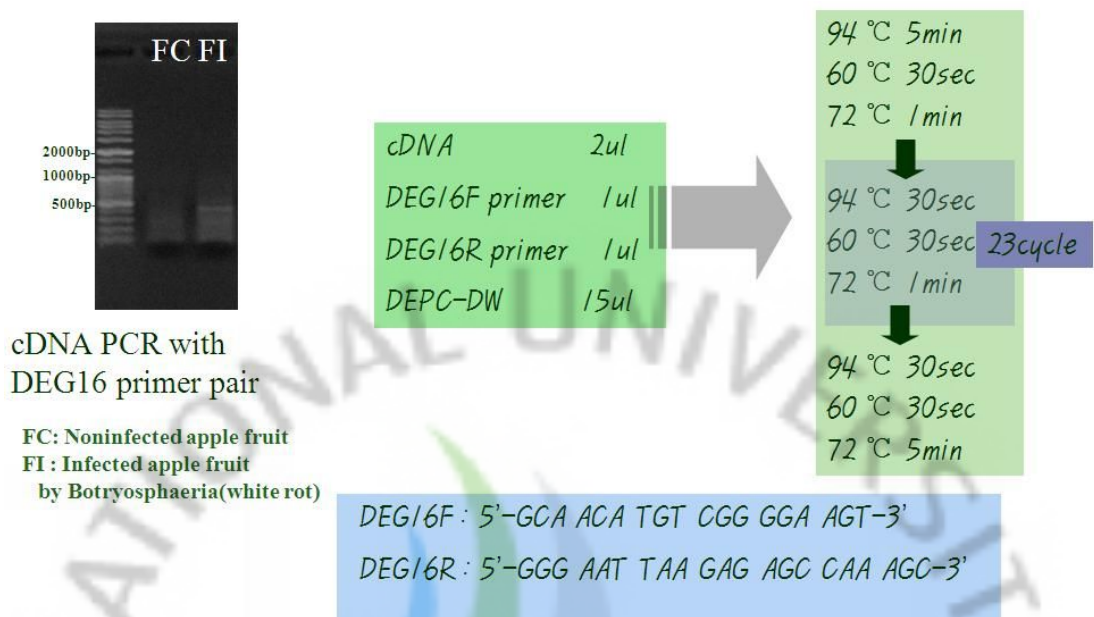


Fig. . Total RNA extracts from 'fuji' apple fruit
FC: Noninfected apple fruit
FI : Infected apple fruit by Botryosphaeria(white rot)

Fig. 11. Condition of cDNA PCR

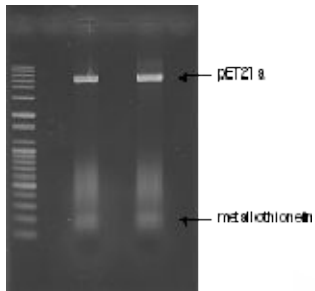


Genomic PCR 과 RT-PCR 로 분리된 DEG16clone 의 밴드를 GENE CLEAN® II Kit (Q-BIO gene, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 정제한 pGEM-T Easy vector(Promega, Madison, USA)에 삽입하여 E.coli DH5a에 형질전환 하였다. 염기서열은 주)제노텍에 의뢰 하여 분석하였다. 분석된 염기서열은 NCBI (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>>)의 blast search 를 통해 National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 database 에 있는 알려진 염기서열들과 비교하였다. DEG 16clone 의 분류학적 위치 및 기능을 유추하기 위해 CLUSTA W 프로그램(version1.81) [Clustal 등,1994]과 neighbor-joining method[Saitou 와 Nei, 1987]를 이용하여 계통수(Phylogenetic tree)를 작성하였다.

3)사용균주 및 발현벡터

E.coli BL21(DE3)은 플라스미드의 형질전환(transformation)과 유전자증대(amplification)을 위해서 사용한 숙주이다. pET21a(inbitrogen)은 발현 벡터이다. 분리한 병 저항성 후보유전자(DEG 16clone)의 산물이 항균활성을 나타내는지를 검정하기 위해 Full로 분리된 저항성 후보유전자(DEG16clone)를 이용하여 대장균에서 발현시켰다. pET21a(inbitrogen)의 NdeI과 XhoI 제한효소 부위에 DEG16clone의 ORF를 삽입하였고 DEG16clone이 발현되도록 재조합된 플라스미드를 *E.coli* BL21(DE3)에 형질전환을 통해 도입하였다. 저항성 유전자가 잘 도입되었는지 확인하기 위해 재조합 플라스미드를 추출하여 제한효소 처리를 통해 삽입여부를 확인하였다(Fig 12.).

Fig. 12. Confirmaion of recombination



4) 추출물의 준비

pET21a vector 에 DEG 16clone 을 sense 방향으로 삽입한 뒤, E.coli BL21(DE3)에 형질전환 한 후, LB agar plate 에 도말하여, 37°C에서 약 10 시간 배양시간 배양하였다. 콜로니를 엠퍼실린이 첨가된 5 ml 액체 LB 배지에 10 시간 정도 배양한 후, 500 ml LB 에 2 ml을 접종하여 37°C에서 3 시간 30 분 배양하였다. Spectrophotometer(Amersham Pharmacia. USA)를 이용하여 A600 흡광도에서 0.6~1.0 정도 자라면 0.2mM isopropyl- β -thiogalactoside(IPTG) (Amresco.USA)를 넣어 단백질 발현을 유도하였다. IPTG 첨가된 후 6 시간에서 배양액 50 ml을 채취하여 50 ml centrifuge tube 에 담아, 12,000rpm 에서 1 분 30 초간 원심분리시켜 상층액을 제거하였다. 남겨진 pellet 을 차가운 phosphate-buffered saline (PBS)로 부유한 후, 5mg/ml lysozyme 및 50 unit 의 DNase I 을 넣은 후에 실온에서 5 분 간 반응하였다. Sonication 을 통해 미생물세포를 파쇄한 뒤, 전체 단백질을 이용하여 항균활성을 조사하였다. 파쇄된 상층액의 일부를 사용하여 4×sample buffer 를 넣고 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 로 단백질 발현유도를 확인하였다.

5) 항진균성측정

DEG 16clone을 삽입한 재조합 대장균과 유전자 없이 vector만 삽입된 재조합한

대장균을 두 개씩 준비하여 각각 하나에는 IPTG넣어 단백질 발현을 유도하고 다른 하나에는 넣지 않았다. Sonication을 통해 대장균을 파쇄한 뒤, 각각의 샘플을 PDA배지와 혼합하여 dendroid test를 진행하였다. 준비된 plate에 사과 겹무늬썩음병 병원균 현탁액을 적신 paper disc (Whatman, England, CAT No. 2917006)를 올려 놓고 병원균 배양 온도에 맞추어서 $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 3~4일간 배양하며 사과 겹무늬썩음병의 직경을 측정하였다



3. 결과 및 고찰

1) 병 저항성 후보 유전자의 분리 및 계통분류

DEG screening에 의해 분석된 여러 개의 병 저항성 관련 후보유전자들 중에서 DEG16clone의 genomic DNA와 cDNA를 분리하기 위해 사용된 genomic PCR과 RT-PCR 결과 Fig 13, Fig 14와 같았다. Genomic DNA서열과 cDNA서열을 분석한 결과 계놈구조는 3개의 exon과 1개의 intron으로 구성되어 있음을 확인 하였고, 66개의 아미노산으로 구성된 작은 분자량 Metallothionein-like protein의 단백질을 암호화 하고 있음도 알 수 있었다. DEG16clone의 염기서열을 CLUSTAL W프로그램을 이용하여 계통발생학적 연관관계를 조사한 결과를 Fig. 15.와 같은 계통수로 나타내었다. DEG16clone은 NCBI O24059로 등록된 유전자와 일치하였다. 1997년 발표된 Suzanne J. Reid와 Gavin S. Ross의 논문에선 사과의 저온 저장 과정 중에 Metallothionein -like protein이 과 발현 되었다고 보고하였다. 또한 metallothioneins의 그룹들은 동물과 식물의 생리적 스트레스와 연관이 있으며 작고 cysteine이 풍부한 단백질이다. 식물에선 metallothionein-like mRNA들의 발현이 금속이온의 첨가에 의해 유도된다[Hsieh 등. 1995, Snowden 등, 1995]. 카드뮴과 아연의 첨가로 메기의 간에서 Metallothionein-like protein이 유도되었다 [Lee 등, 1992]. Metallothionein protein은 수은, 구리, 카드뮴, 아연 같은 중금속에 특히 잘

결합하는 기능이 있고 구리와 아연의 항상성조절, 성장과 발달, 활성산소의 포착[Chubatsu 와 Meneghini 1993, Sato and Bremner, 1993], 독성 중금속과 방사선물질의 이온화 방어 와 같은 많은 세포내 작용에 직. 간접적으로 관여한다[Hamer, 1986;Karin, 1985]. 이러한 기능은 생물 또는 무생물로부터 야기되는 스트레스에 대한 방어 역할을 한다.

Tobacco Mosaic Virus의 감염과 상처에 의해 *Nicotiana glutinosa* L.에서 Metallothionein-like gene이 유도되었다[Choi 등, 1996]. 이는 Metallothionein-like gene이 식물 병 저항성 반응 동안 유도된 유전자라고 할 수 있다. 최근 들어 완두콩(Evans 등, 1990), 옥수수(De Framond, 1991), 애기장대(Zhou 와 Goldsbroun, 1994, 1995), 그리고 엘더베리(Coupe 등, 1995)와 같은 많은 식물계에서 유도 되고 그 특징들이 보고 되고 있다. 애기장대(Zhou 와 Goldsbroun, 1995)와 초파리에서 Metallothionein-like gene이 열 자극 과 산화 스트레스의 반응으로 촉진 된다는 보고도 있다. 키위에선 과일의 발달단계와 익은 과일에서 Metallothionein-like gene의 발현이 관찰 되었다[Ledger 와 Gardner 1994]. 이처럼 Metallothionein-like gene은 범용적으로 스트레스 반응에 의해 유도되는 것으로 사료 되며 사과 겹무늬 썩음병에 대한 저항성 기능을 가지고 있을 것으로 추정된다.

Fig. 13. Isolation of genomic region encoding DEG 16.

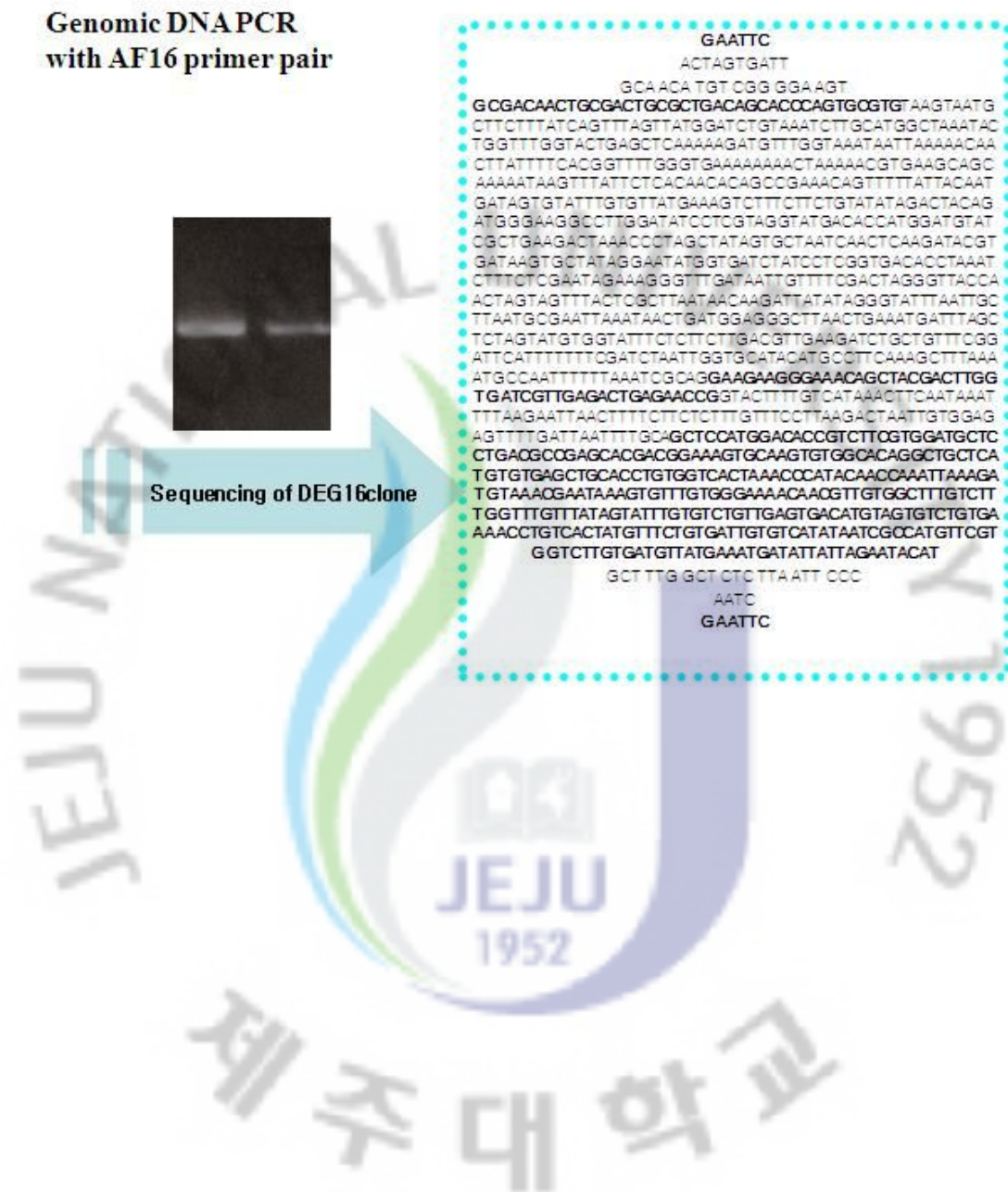


Fig. 14. DEG16 cDNA isolation by RT-PCR.

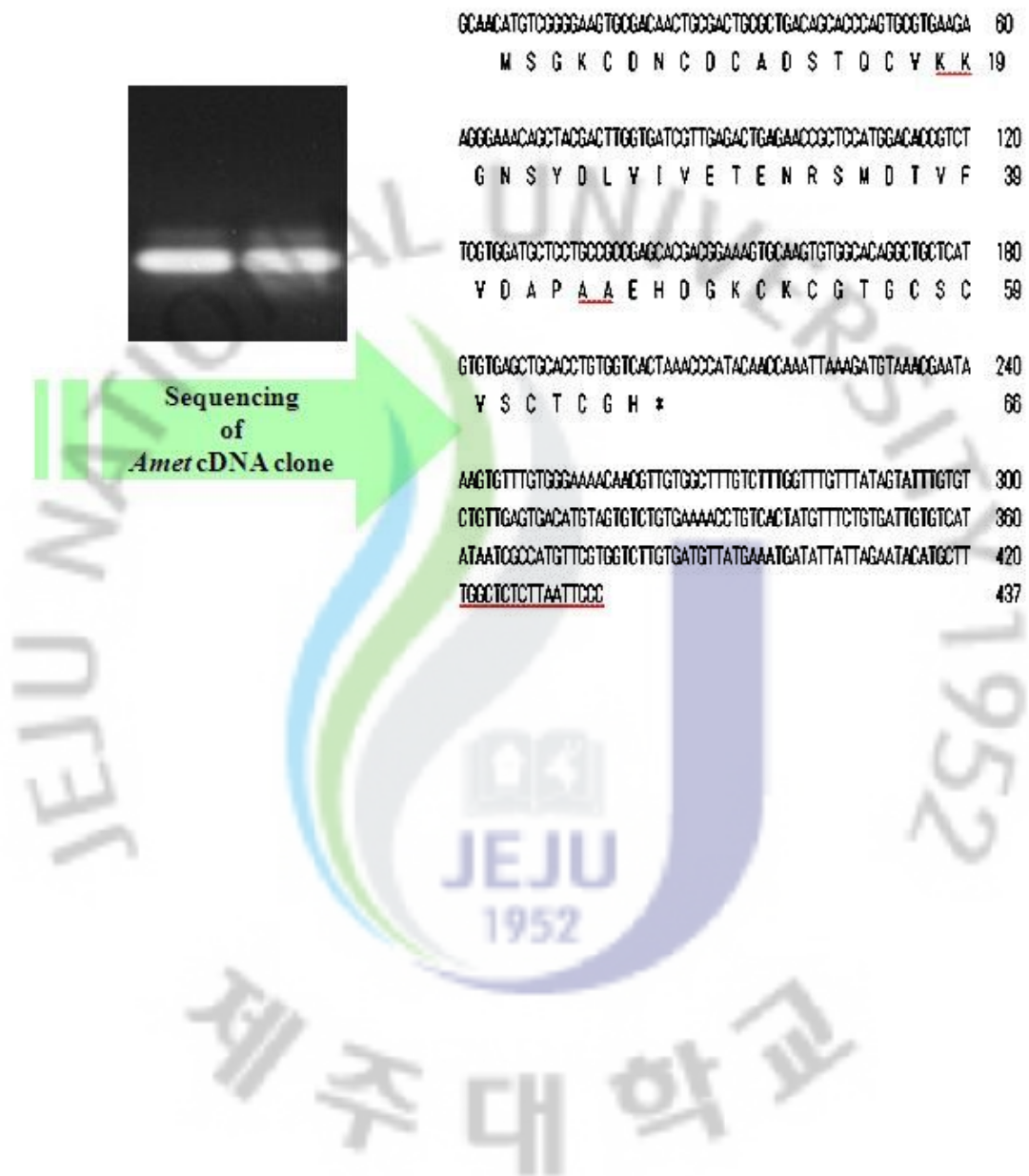
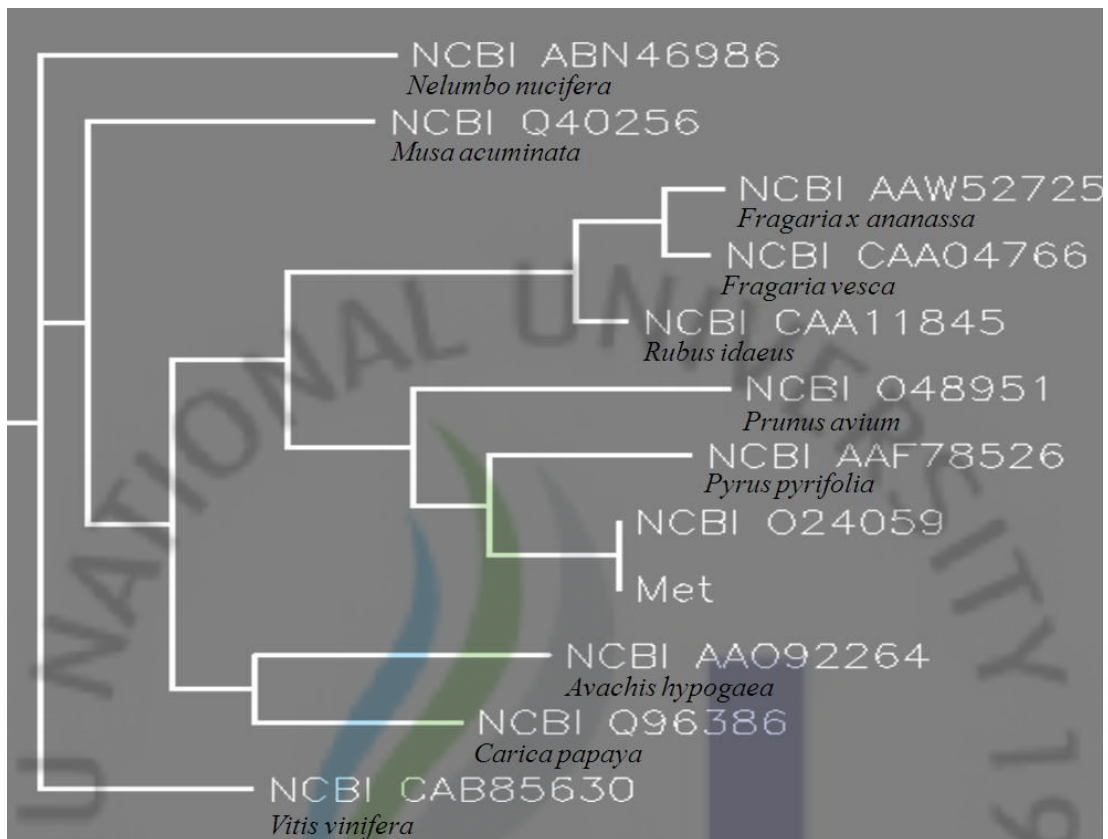


Fig. 15. Phylogenetic tree



2) 항진균성 측정

Full로 분리된 저항성 후보유전자(DEG16clone)를 이용하여 대장균에서 발현시킨 후, 대장균에 단백질이 잘 발현되었는지 SDS-PAGE를 통해 확인한 결과 Fig 15.와 같았다. DEG16clone을 삽입하여 IPTG로 단백질 발현을 유도한 MET O에서 단백질 밴드를 확인 할 수 있었다. 대장균의 추출물을 이용하여 dendroid test를 수행한 결과 사과 겹무늬썩음병 병원균에 대한 저항성 여부는 아래 그래프(Fig 16.)와 같았다. E.coli+ Met+ IPTG=MetO, E.coli+ Met=MetX, E.coli+ IPTG=ConO, E.coli=ConX, PBS+ PDA=PBS 그래프에서 PBS의 직경이 가장 적었고 그 다음으로 MetO였다. 대장균에서 DEG16clone에 의해 발현된 Amet단백질이 사과 겹무늬썩음병 병원균의 성장을 저해 함을 확인할 수 있었다. 이는 DEG16clone에 의해 생성된 Amet단백질이 사과 겹무늬썩음병 저항성에 중요한 역할을 수행하고 있는 것으로 추정된다. 이러한 단백질을 발현하는 DEG16clone은 생명공학기법을 통해 겹무늬썩음병 저항성 사과를 육종하는데 유용하게 이용될 것으로 사료된다.

Fig. 16. SDS-PAGE analysis.

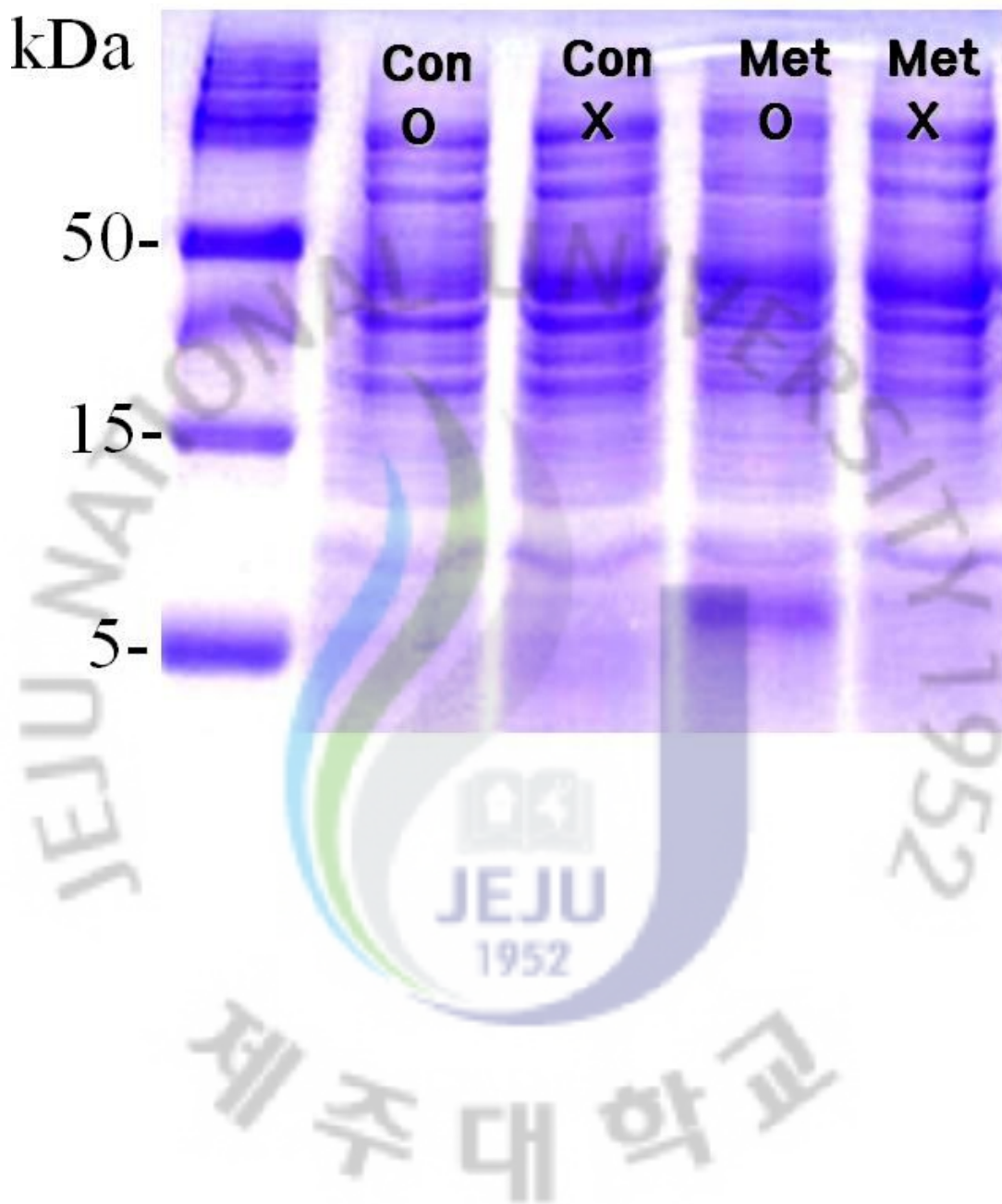
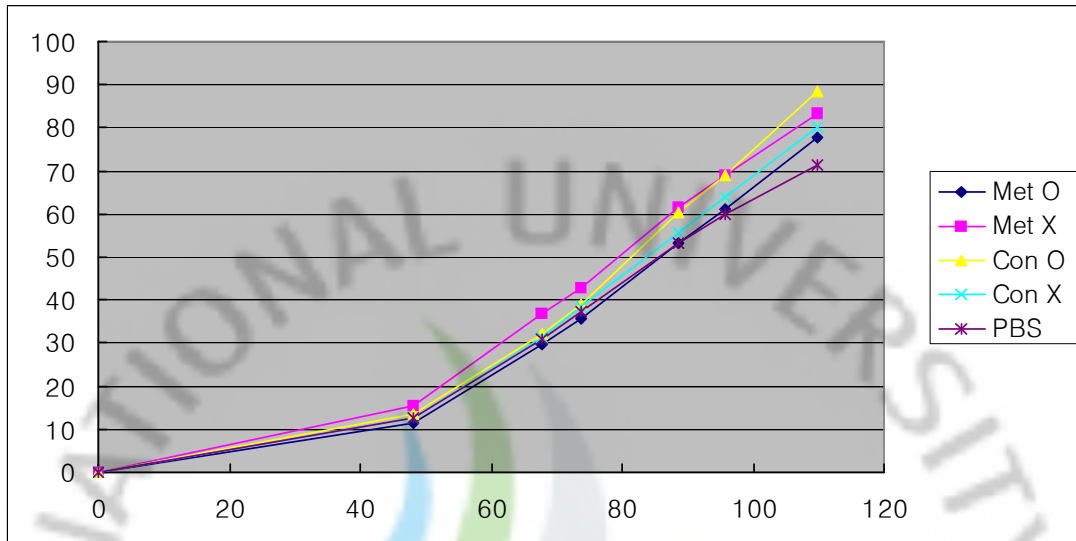


Fig. 17. Screening of antibiotics activity of disease-resistant in Microbial system.



VI. 참고문헌

Annick. J. de Framond. 1991. A metallothionein-like gene from maize(*Zea mays*) Cloning and characterization. Federation of European Biochemical Societies. Volume 290. 103-106.

Carginale. V., G. Maria., C. Capasso., E. Ionata., F. L. Cara., M. Pastore., A. Bertaccini., A. Capasso. 2004. Identification of genes expressed in response to phytoplasma infection in leaves of *Prunus armeniaca* by messenger RNA differential display. *Gene*. 332, 29-34.

Choi. D., H.M. kim., H.K. Yun., J.A. P., W.T. Kim., and S.H. Bok. 1996. Molecular Cloning of a Metallothionein-Like Gene from *Nicotiana glutinosa* L. and Its Induction by Wounding and Tobacco Mosaic Virus Infection. *Plant Physiol.* 112. 353-359.

Chubatsu, L.S., and Meneghini, R. 1993. Metallothionein protects DNA from oxidative damage. *Biochem. J.* 291:193-198.

Coupe S.A., Taylor, J.E., Roberts, J.A. 1995 Characterization of an mRNA encoding a metallothionein-like protein that accumulates during

ethylene-promoted abscissin of *Sambucus nigra* L. leaflets. *Planta* 197:442-227.

Clustal, W., J.D. Thompson, D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, Position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.

De Framond, A.J. 1991. A metallothionein-like gene from maize (*Zea mays*); cloning and characterization. *FEBS Lett* 290:103-106.

Dunaevsky, Y.E., Elpidina, E.N., Vinokurov, K.S., and Belozersky, M.A. 2005. Protease Inhibitors in Improvement of Plant Resistance to Pathogens and Insects. *Molecular Biology*, vol. 39. 4.608-613.

Evans, I.M., Gatehouse, L.N., Gatehouse, J.A., Robinson, N.J., Croy, R.R. 1990. A gene from pea (*Pisum sativum* L.) with homology to metallothionein genes. *FEBS Lett* 262:29-32.

Evans, K.M., J.A. Gatehouse, W.P. Lindsay, J. Shi, A.M. Tommey, and N.J. Robinson. 1992. Expression of the pea metallothionein-like gene *PsMT_A* in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* and analysis of

trace metal ion accumulation: Implications for *PsMT_A* function. *Plant Molecular Biology* 20. 1019–1028.

Flor, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9, 275–296.

Ganal, M., U. W. Stephan., and H. Baumlein. 1998. Structure, expression and chromosomal localisation of the metallothionein-like gene family of tomato. *Plant Molecular Biology* 37. 701–714.

Hong, Y.G., W.H. Ye, C.H. Kim, Y.G. Jo. And U.J. Lee. 1989, Study of pathology and pathohistology in apple trees canker formation by *Botryosphaeria dothidea* infection. *KSPP* 5:151–160.

Hsieh, R.M., Liu, W.K., and Huang, P. C. 1995. A novel stress-inducible metallothionein-like gene from rice. *Plant Mol. Biol* 28: 381–389.

Hwang, I.T., Y.J. Kim, S.H. Kim, C.I. Kwak, Y.Y. Gu, and J.Y. Chun. 2003. Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. *BioTechniques* 35:1180–1184.

Hwang, K. C., X. S. Cui, S. P. Park, M. R. Shin, S. Y. Park, E. Y. Kim, and N. H. Kim. 2004. Identification of differentially regulated genes in bovine

- blastocysts using an annealing control primer system. Mol. Reprod. Dev. 69:43-51.
- Hamer, D.H.1986. Metallothionein. Annu.Rev. Biochem., 55, 913-951.
- Karin, M. 1985. Metallothioneins:proteins in search of function.Cell 41, 9-10.
- Kim, H.Y.1980. Effective control test of apple canker. Natl.Hort. 3 : 583-585
- Kim, S.C. 1982. Studys of the apple trees canker . Kcpa. 3:73-78
- Kim, M.Y., K.J. Song, J.H. Hwang, Y.U. Shin, and H.J. Lee. 2003. Development of RAPD and SCAR markers linked to the Co gene conferring columnar growth habit in apple(*malus pumila* Mill). J. Hort. Sci. Biotechnol. 78:512-517.
- Kim, D.I. and J.H. Hwang. 2004. Inheritance and RAPD marker selection linked to resistance trait of alternaria blotch(*A.mai*) in apples. Kor.J.Hort. Sci.Technol.22(3):315-320.
- Kim, Y. J., C. I. Kwak, Y. Y. Gu, I. T. Hwang, and J. Y. Chun. 2004. Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. BioTechniques 36:424-426, 428, 430
- Kim, S.B. and J.S. Kim. 1989. Study of Ecology and pathology in apple white rot (I).KSHS 30:26-37

Kottom, T. J., and A. H. Limper. 2004. *Pneumocystis carinii* cell wall biosynthesis kinase gene *CBK1* is an environmentally responsive gene that complements cell wall defects of *cbk*-deficient yeast. *Infect. Immun.* 72:4628-4636.

Langlois-Meurinne, M., Gachon, C.M.M., Saindrenan, P., 2005. Pathogen-responsive expression of glucosyltransferase UGT73B3 and UGT73B5 is necessary for resistance to *Pseudomonas syringae* pv *tomato* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139, 1890-1901.

Ledger, S.E., R.C. Gardner. 1994. Cloning and characterization of five cDNAs for genes differentially expressed during fruit development of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*). *Plant Molecular Biology* 25. 877-886.

Lee, S.Y., K.M. Lee., S.S. Suh., Y.H. Song., B.L. Lee. 1992. Induction of Metallothionein-like Proteins and Metallothionein mRNA in Channel Catfish Liver Following Cadmium and Zinc Treatment. *Korean Biochem. J.* Vol 25, No. 1, 48-53.

Liang, P. and A.B. Pardee. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257:967-71.

- Ludy, J.J. and D.V. Shaw. 2001. Dose marker-assisted selection make dollars and sense in a fruit breeding program? *HortScience* 36:316-322
- Martin, G.B. 1999. Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 273-279
- Nybom, H. 1994. DNA fingerprinting: A useful tool in fruit breeding. *Euphytica* 77:59-64.
- Pohjanvirta, R. 2004. Comparison of several hot-start Tag DNA polymerases for detection of differentially expressed genes by GeneFishing. *Biochemica* 2:17-18.
- Reid, S. J., G. S. Ross. 1997. Up-regulation of two cDNA clones encoding metallothionein-like proteins in apple fruit during cool storage. *Physiologia planarum* 100. 183-189.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 2, 406-413.
- Sato, M.A., and Bremner, I. 1993. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic. Biol. Med.* 14:325-337.

Scheel, D. 1998. Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* 305-310

Snowden, K., Richards, K. and Gardner, R. 1995. Aluminium induced genes. *Plant Physiol.* 107:341-348.

Somssich, I.E., and K. Hahlbrock. 1998. Pathogen defence in plants: A paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* 3, 86-90.

Tian, Z.D., Lin, J., Wang, B.L., Xie, C.H. 2006. Screening and expression analysis of *Phytophthora infestans* induced genes in potato leaves with horizontal resistance. *Plant Cell Rep* 25:1094-1103.

Whitelaw, C.A., J.A. Le huquet., D.A. Thurman and., and A.B. Tomett. 1997. The isolation and characterisation of type II metallothionein-like genes from tomato (*Lycopersicon esculentum* L). *Plant Molecular Biology* 33. 503-512.

Yang, Y., J. Shah. and D.F. Klessig. 1997. Signal perception and transduction in plant defence responses. *Genes Dev.* 11, 1621-1639.

Zhou, J. Goldsbrough, P.B. 1994. Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. Plant Cell 6:875-884.

Zhou, J. Goldsbrough, P.B. 1995. Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in *Arabidopsis*. Mol Gen Genet 248: 318-328.

