



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

궁천조생 (*C. unshiu* Marc. Cv. Miyagawa)
에서 Mevalonate Diphosphate Decarboxylase
유전자의 분리 및 발현 분석

제주대학교 대학원

생명공학과

이성훈

2011년 2월

궁천조생 (*C. unshiu* Marc. Cv. Miyagawa)
에서 Mevalonate Diphosphate Decarboxylase
유전자의 분리 및 발현 분석

지도교수 김 인 중

이 성 훈

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2011년 2월

이성훈의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

제주대학교 대학원

2011년 2월

**Isolation and Expression Analysis of Mevalonate
Diphosphate Decarboxylase Gene from Miyagawa
wase (*C. unshiu* Marc. Cv. Miyagawa)**

Seong-Hun Lee

(Supervised by professor In-Jung Kim)

**A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the
degree of Master of Science**

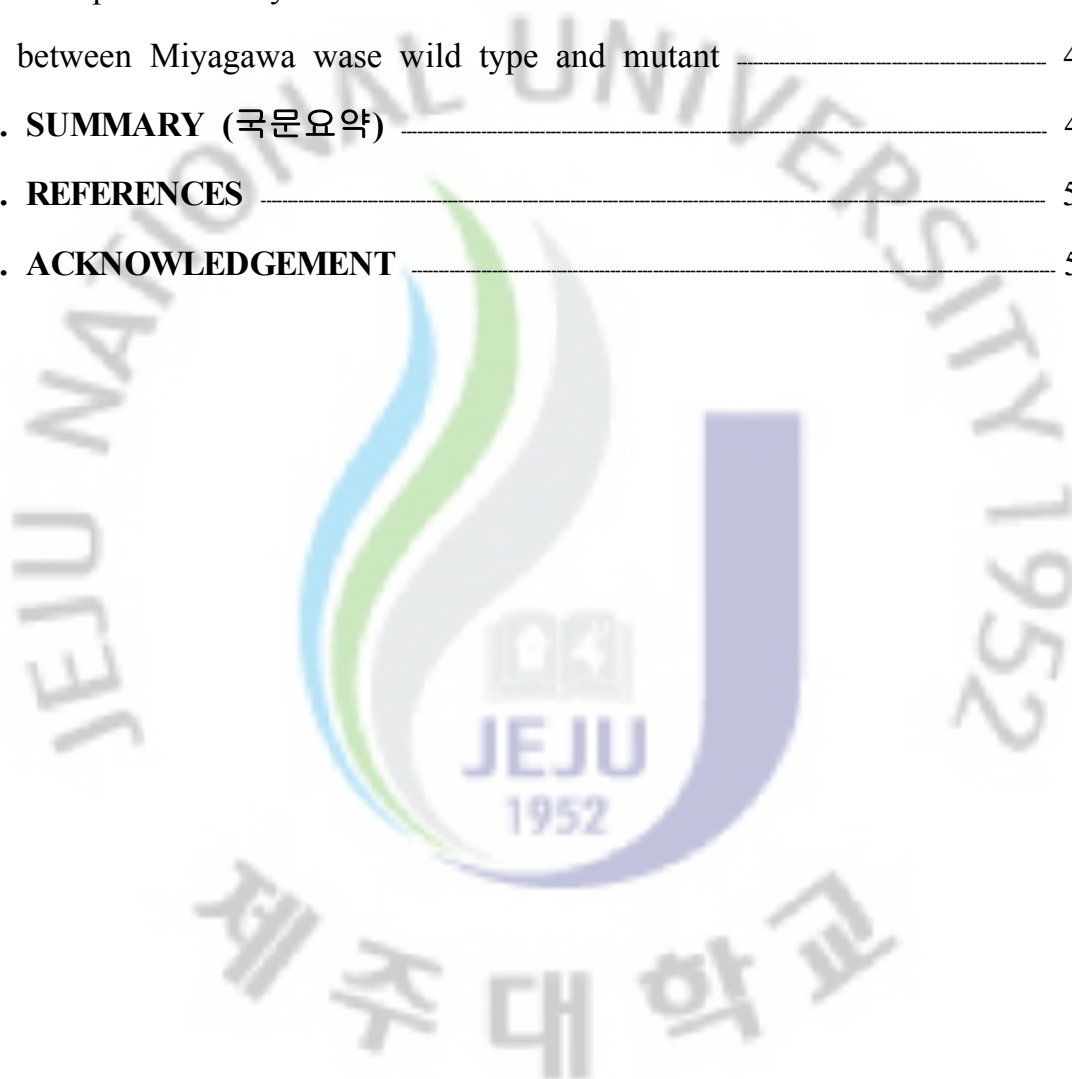
**Department of Biotechnology
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY**

February, 2011

CONTENTS

CONTENTS	i
ABBREVIATION	iii
LIST OF TABLES	iV
LIST OF FIGURES	V
SUMMARY	Vii
I. INTRODUCTION	1
II. MATERIALS AND METHODS	8
1. MATERIALS	8
2. METHODS	9
1) Total RNA extraction of citrus fruits	9
2) The Citrus 300K Microarray	11
(1) Probe design	11
(2) Practical method	13
(3) Data analysis	15
3) MDDX cloning from citrus fruits	16
4) Quantitative real-time PCR analysis	17
5) Northern blot analysis	18
6) The extraction of genomic DNA and southern blot analysis	19
7) Comparison of fruit characteristics between Miyagawa wase wild type and mutant	20
III. RESULTS AND DISCUSSION	21
1. The Citrus 300K Microarray analysis	21
2. MDDX molecular cloning and sequence analysis	

of Miyagawa wase	35
3. Quantitative real-time PCR analysis	41
4. Northern blot analysis	43
5. Southern blot analysis	45
6. Comparison analysis of fruit characteristics between Miyagawa wase wild type and mutant	47
IV. SUMMARY (국문요약)	49
V. REFERENCES	52
VI. ACKNOWLEDGEMENT	58



ABBREVIATION

DMAPP: dimethylallyl pyrophosphate

EST: expressed sequence tag

GO: gene ontology

HMGR: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase

IPP: isopentenyl 5-phosphate

MDDX: Mevalonate diphosphate decarboxylase

MEP: methylerythritol-4-phosphate

MVA: mevalonic acid

ORF: often reading frame

qRT-PCR: quantitative real-time PCR

TF: transcription factor

LIST OF TABLES

Table 1. List of primers used for experiments.

Table 2. Significantly changed genes classification.

Table 3. Gene ontology analysis.

Table 4. Gene ontology category classification.

Table 5. Molecular pathway analysis.

Table 6. Transcription factor analysis

Table 7. Comparison analysis of fruit characteristics between Miyagawa wase wild type and mutant.

Table 8. Comparison analysis of fruit hunter color values of peel and pulp between Miyagawa wase wild type and mutant.

LIST OF FIGURES

- Fig. 1.** The mevalonate diphosphate decarboxylase biosynthetic pathway.
- Fig. 2.** Overview of isoprenoid metabolic pathways localized to the cytosol and to plastids in plants, with an emphasis on the metabolism of chlorophylls, carotenoids, and sterols.
- Fig. 3.** External of Miyagawa wase wild type and mutant fruits during development and maturation.
- Fig. 4.** The Citrus 300K Microarray probe design.
- Fig. 5.** Comparison of signal distribution between repeats.
- Fig. 6.** Hierarchical clustering.
- Fig. 7.** MDDX genomic DNA and cDNA fragment subcloning.
- Fig. 8.** Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence for the MDDX cDNA clones isolated from Miyagawa wase.
- Fig. 9.** Nucleotide sequence for the MDDX genomic DNA clone of Miyagawa wase.

Fig. 10. Alignment of deduced amino acid sequences of MDDX isolated from various species.

Fig. 11. Total RNA extraction from Miyagawa wase fruits.

Fig. 12. Variation of cycle threshold (2^{-C_T}) of MDDX genes in wild type fruit and mutant of Miyagawa wase.

Fig. 13. Northern blot analysis of MDDX gene expression wild type and mutant.

Fig. 14. Genomic Southern blot analysis of MDDX wild type and mutant.

SUMMARY

Genetic transformation method and biotechnology is available in the early stage selection and breeding of fruits, Shorten the period of fruit breeding and money savings of the fruit industry can expect a breakthrough. Using such biotechnology, the technical development from which a target gene can be introduced into the excellent existence citrus varieties selectively first and securement of the various useful genes which can be used for developed technology are needed to bring the citrus varieties breeding of the excellent function and quality.

In higher plans, isoprenoids have essential role in membrane structure (sterols), rebox chemistry (plastoquinone, ubiquinone), growth regulation (gibberellins, cytokinins, brassinosteroids and abscisic acid), defence mechanism (phytoalexins) and free radical scavenging (carotenoids and tocopherols). Despite their functional and chemical diversity, all isoprenoids are related biosynthetically by a common C₅ precursor, isopentenyl diphosphate (IPP). Mevalonate diphosphate decarboxyase (MDDX) catalyzes the ATP dependent decarboxylation of mevalonate 5-diphosphate (MVAPP) to form isopentenyl 5-diphosphate (IPP).

In this study, in order to expression patterns of the MDDX gene to key enzyme in isoprenoids biosynthesis for Miyagawa wase (*C. unshiu* Marc. Cv. Miyagawa) were performed quantitative real-time PCR and northern blot analysis. For the securement of the useful genes for the citrus transformation were performed MDDX gene ORF sequence analysis using on genomic DNA and cDNA subcloning. In addition, in order to MDDX gene copy number were performed southern blot analysis.

1. As the result of The Citrus 300K Microarray analysis, In a comparison of Wild type Miyagawa wase to Mutant ripening fruit, the 583 genes, in total, were 2 folds up-(515) or down-(67) regulated. The 407 genes were matched to *Arabidopsis thaliana*. The 382 and 25 genes form up- and down-regulated genes, respectively have orthologues in *Arabidopsis thaliana* genes. Of these, mevalonate diphosphate decarboxylase gene of the catalyze the synthesis of isorenoids was identified about 2.5 fold over expression.

2. MDDX gene of Miyagawa wase recognized 420 amino acids and coding region was 1,263bp. The size of the separated genomic clone was 3,731bp, This gene consisted of 10 exon and 9 intron. The deduced amino acid sequences were compared between Miyagawa wase and other organisms. The sequence of MDDX has the highest homology with *Hevea brasiliensis* (81%) (GenBank accession number AF429386).

3. By performing qRT-PCR analysis of wild type and mutant fruit was confirmed expression patterns of MDDX gene. Approximately 2.4 fold over expression of MDDX gene was identified day after flowering mutant type fruit in about 150 days compared with wild type in Miyagawa wase coloring.

4. As the result of northern blot analysis, expression patterns of MDDX gene was identified day after flowering 30, 150, 180 and 220 days. MDDX gene expression for day after flowering 30 days was identified for wild type and mutant respectively. 60, 90, 120 days hardly expression, day after flowering 150 days to mutant was expression first. in the study, we was identified in mutant fruit to difference to ripening stage expression patterns of MDDX gene.

5. For the confirmation MDDX gene copy number were performed southern blot analysis. as the result, when processing it in restriction enzyme *HindIII*, it was possible to conclude that one copy exists in a MDDX gene in the genome by showing band in about 3,600bp, 700bp respectively.

6. Pigmentation of pulp and peel of fruit to use the chroma meter Miyagawa wase wild type and mutant were measured. as the result, Mutations in the pulp and the peel was a more reddish color. Because of fresh fruit varies depending on the color preferences of consumers, so if Miyagawa wase mutant fruits compared with wild type culminated with a more red fruit, can be seen as more attractive.



I. INTRODUCTION

감귤은 타 과실에 비해서 풍부한 과즙, 독특한 향미 및 고유한 색택을 가지고 있을 뿐만 아니라 고기능성 성분들의 보고로 잘 알려져 있다 (Lee *et al.*, 2009). 우리나라 과수 생산량 290 만 톤 중에 단일 과수에서 가장 큰 26%를 차지하는 감귤은 과실 그 자체로 식용될 뿐만 아니라 주스, 통조림 등 가공제품으로 널리 이용되고 있다 (Chung *et al.*, 2000). 특히, 감귤 과실은 성숙 (ripening) 과정을 거쳐 그 자체의 생리적, 형태적 특성을 나타내며, 잎 등 일반 조직에서는 관찰되지 않는 색깔, 향미 및 당도 등 형질 변화가 나타나는 시기를 특징적으로 가지고 있다 (Biale, 1964).

최근 건강에 대한 관심이 높아지면서 기능성 물질의 함유 여부가 품질의 주요 인자가 되고 있다. 감귤의 주요 성분인 정유 성분, carotenoids, flavonoids 및 식이 섬유 등은 인간에게 필요한 vitamin A 및 retinol의 전구체로 사용되는 필수적인 영양소이며, 암 억제, 항산화 작용은 물론 성인병 예방에 탁월한 효과가 있다는 것이 알려지면서 이들 물질들에 대한 관심이 크게 증가하고 있다 (Hasunuma *et al.*, 2010; Rodriguez, 2010). 이러한 이유 때문에 carotenoids, flavonoids 같은 물질 등의 성분과 함량을 제어하여, 생리활성이 높은 특정 물질을 다량 생산하려는 연구가 시도되고 있다 (Namitha and Negi, 2010). 생화학과 분자생물학의 발전으로 인하여 가용성 고형물, 유기산, carotenoids 및 flavonoids 계 등의 생합성 대사 경로가 미생물 및 식물에서 밝혀지면서, 특정 식물에서 생합성과정에 관여하는 주요 유전자들의 분리와 발현 제어가 가능해졌으며, 이를 통하여 경제적으로 가치가 높은 물질을 생산하거나, 가용성 고형물과 유기산 등의 함량을 제어한 식물도 개발할 수 있게 되었다 (Enfissi *et al.*, 2005).

감귤의 품종육성에 있어서 가장 널리 사용되고 있는 교배 육종의 경우 교배에서 개화 결실에 이르기 위해서는 긴 유묘기간이 필요하고, 육종세대진전의 제약이 크므로 품종육성에 적어도 10년 이상의 긴 시간이 필요하게 된

다. 또한 바람직한 형질을 갖춘 개체를 얻기 위해서 많은 수의 후대 실생 개체를 확보해야 한다. 따라서 기존 품종과 동일한 특성을 가지면서 경쟁적인 선택과 향미, 인간 건강에 이로운 높은 항산화 물질을 함유하고 있는 우수한 품종을 육성하기 위해서는 새로운 육종 기술의 도입이 필요하다. 그 일환으로 생명공학을 이용한 형질전환 방법이 많이 시도되고 있다. 형질전환방법과 생명공학기술은 과수의 조기선발 및 품종개량에 이용할 수 있으며, 과수 육종 년 한의 단축과 경비의 절약으로 과수산업의 비약적인 발전을 기대할 수 있다. 이러한 생명공학기술을 이용하여 고기능, 고영양성의 감귤 품종을 육성하기 위해서는 먼저 우수한 기존 품종에 목적유전자를 선택적으로 도입할 수 있는 기술개발과 개발된 기술에 이용할 수 있는 다양한 유용 유전자의 확보가 필요하다.

이에 본 연구에서는 감귤의 고기능, 고영양성 품종육성을 위한 대사공학 및 생명 공학적 기초자료를 확보하기 위하여 궁천조생 나무의 가지변이로 기존 궁천조생 과실 보다 더욱 붉은 색을 발현하는 경쟁적인 과피를 가지고 있는 자연발생적 돌연변이 과실을 획득하여 The Citrus 300K Microarray 분석을 수행하고, 궁천조생 아조변이 과실에서 유전자의 발현량 차이를 알아보았다. 이 중에서 특이적으로 carotenoids, sterols 등의 전구체인 isoprenoids를 합성하는 mevalonate 대사 경로 상에 있는 mevalonate diphosphate decarboxylase (MDDX) 유전자가 돌연변이 성숙 과실에서 약 2.5배 과 발현됨을 확인하였다.

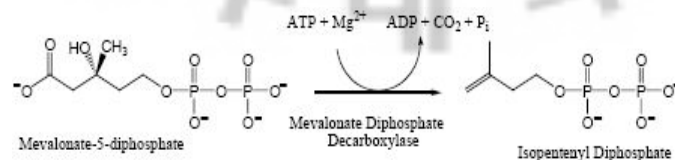


Fig. 1. The mevalonate diphosphate decarboxylase biosynthetic pathway (Voynova *et al.*, 2008).

Mevalonate diphosphate decarboxylase (MDDX)는 isoprenoids 와 sterols 생합성 경로에서 key 효소이다 (Helene *et al.*, 1999). MDDX는 isopentenyl 5-diphosphate 생합성에 작용하는 효소로 mevalonate 5-diphosphate를 ATP와 Mg^{2+} 에 의존하여 탈카르복실화를 촉매 한다 (Fig. 1). 세포의 생존능력과 polyisoprenoid 및 sterol 생합성에서 MDDX가 중요하다는 것은 많은 실험과 연구를 통하여 밝혀져 있다 (Voynova *et al.*, 2008). MDDX는 효모의 생존에 필수적인 효소이며 (Berges *et al.*, 1997), *Streptococcus pneumoniae*에서 MDDX 유전자의 파괴는 pathogenic bacteria의 성장을 억제 시킨다 (Wilding *et al.*, 2000). 또한 MDDX 효소의 차단은 ras-transformed 동물 세포의 증식을 억제 시킨다 (Cuthbert *et al.*, 1995). 고등 식물에서 이소프렌 (isoprene: C_5) 구조를 가지는 isopentenyl 5-diphosphate (IPP)와 dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP) 물질을 기본 단위로 만들어지는 isoprenoids는 약 22,000개가 넘는 다른 종류의 화합물이 있으며, 자연 생산물의 가장 큰 종류를 구성하고 있는 것 중 하나로 잘 알려져 있다 (Harborne and Tomas, 1991). Isoprenoid는 막 구조 (sterols), 산화 환원 반응 (plastoquinone, ubiquinone), 생장 조절 (gibberellins, cytokinins, brassinosteroids, abscisic acid), 방어 기작 (phytoalexins) 그리고 자유 라디칼 제거 (carotenoid, tocopherols) 등의 필수적인 역할을 수행 한다 (Enfissi *et al.*, 2005; Ha *et al.*, 2003). Isopentenyl 5-diphosphate를 생합성하는 경로는 고등 식물에서 두 가지로 구분되어지는데 하나는 mevalonate 경로로 acetyl-CoA 로부터 mevalonic acid (MVA) 를 통해서 isopentenyl 5-diphosphate 를 생합성하며, 이 경로는 세포기질 (cytosol)과 소포체 (endoplasmic reticulum)에서 일어나고, phytosterols, ubiquinone 등의 생합성에 관여한다 (McGarvey and Croteau, 1995). 또한 aromatic terpenoids나 천연 고무 같은 다양한 2차 대사 산물도 MVA 경로를 통하여 생성 된다 (Bach, 1995; Chappell, 1995). 또 다른 하나의 isoprenoids를 생합성 하는 경로는 색소체 (Plastid) 에서 일어나며, methylerythritol -4-phosphate (MEP) 경로를 통해서 chlorophylls, plastoquinones 및 tocopherols 결사슬과 carotenoids가 생성된다. 이렇게 IPP 합

성은 2개의 경로로 구분되지만, 색소체 (plastid) 외막을 통하여 대사 간 경로의 관계를 연구한 결과 (Fig. 2) 에서 보는 바와 같이 isoprenoids의 형성에 서로 상호협력 한다는 증거가 보고되어 있다 (Ganjewala *et al.*, 2009; Laule *et al.*, 2003).

또한 isoprenoids는 대사공학 및 건강과 관련하여 굉장히 중요한 물질로 알려져 있으며, carotenoids와 tocopherols는 인간 건강의 이익과 관련하여, 암, 황반의 변성 및 심장혈관 질환 같은 만성 질병을 줄여 주고, phytosterols는 cholesterol의 장 흡수를 줄여 주고, plasma lipid profiles에 호의적인 효과가 있다고 보고되어 있다 (Sies and Krinsky, 1995). 이러한 isoprenoids의 기능 때문에 isoprenoids의 성분 및 함량을 높이기 위한 대사공학적 방법이 집중적으로 연구 되고 있으며, 모델 식물체인 토마토 경우 기존 carotenoid의 성분을 다른 carotenoid 성분으로 대사경로를 shifting하는 유전공학의 연구 결과 β -carotene, lycopene 및 zeaxanthin 양의 증가가 보고되어 있다 (Dharmapuri *et al.*, 2002; Fraser *et al.*, 2002; Romer *et al.*, 2000; Rosati *et al.*, 2000). 또한 cytosol의 MVA 경로의 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMGR)를 과 발현 시킨 형질전환 식물체에서 phytosterol 함량의 증가가 보고되어 있다 (Chappell *et al.*, 1995; Schaller *et al.*, 1995).

따라서 본 연구에서는 isoprenoids 생합성에 중요한 효소 중 하나인 MDDX 유전자의 발현 특징을 알아보고, 감귤 형질전환을 위한 유용 유전자를 확보 하기 위하여 성숙 과정에 따른 시기별로 quantitative real-time PCR 및 northern blot 분석을 수행 하였으며, 게놈 DNA와 cDNA를 분리하여 MDDX 유전자의 Open Reading Frame (ORF) 염기서열을 분석 하였다. 그리고 MDDX 유전자의 게놈 내에 copy 수를 알아보기 위하여 southern blot 분석을 수행 하였다.

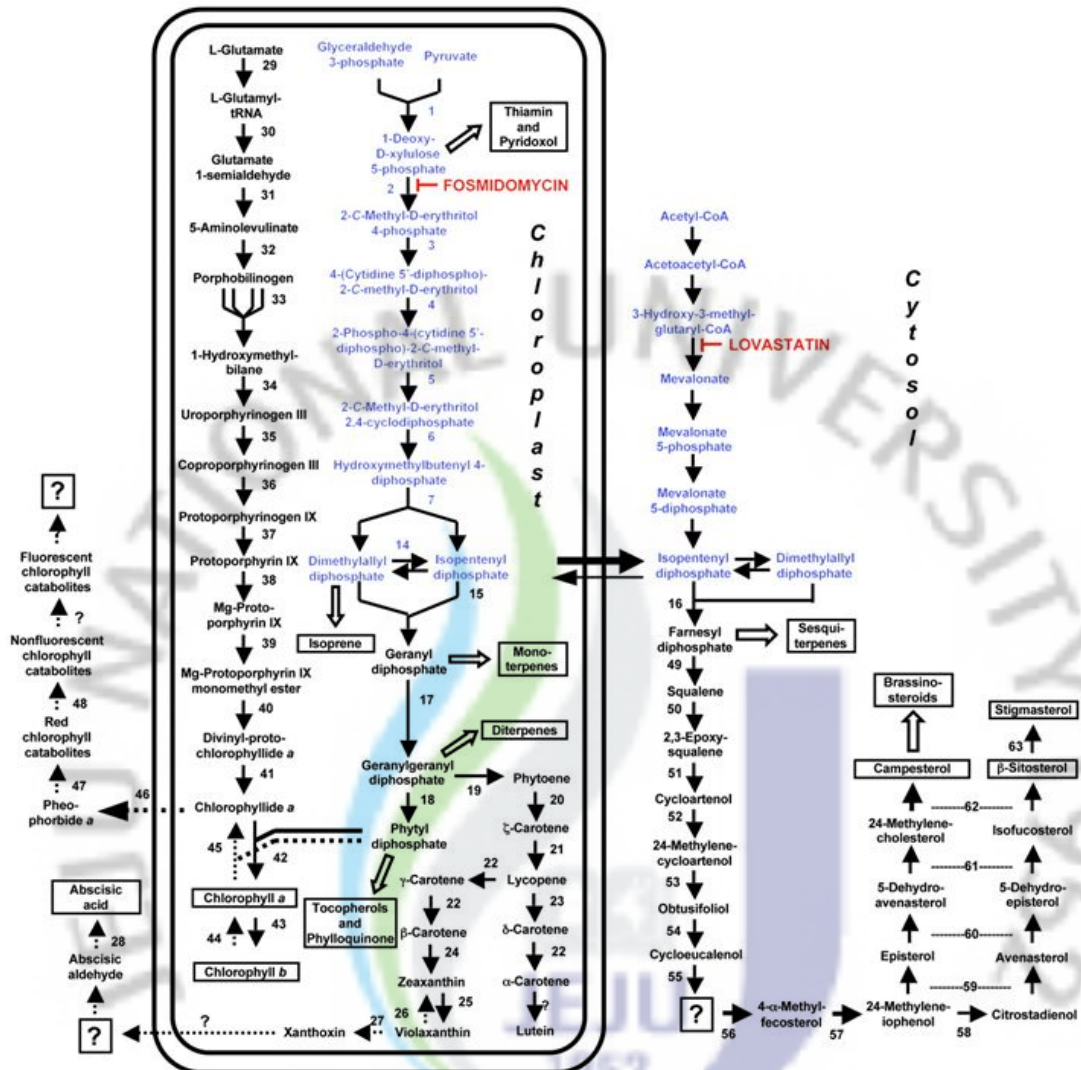
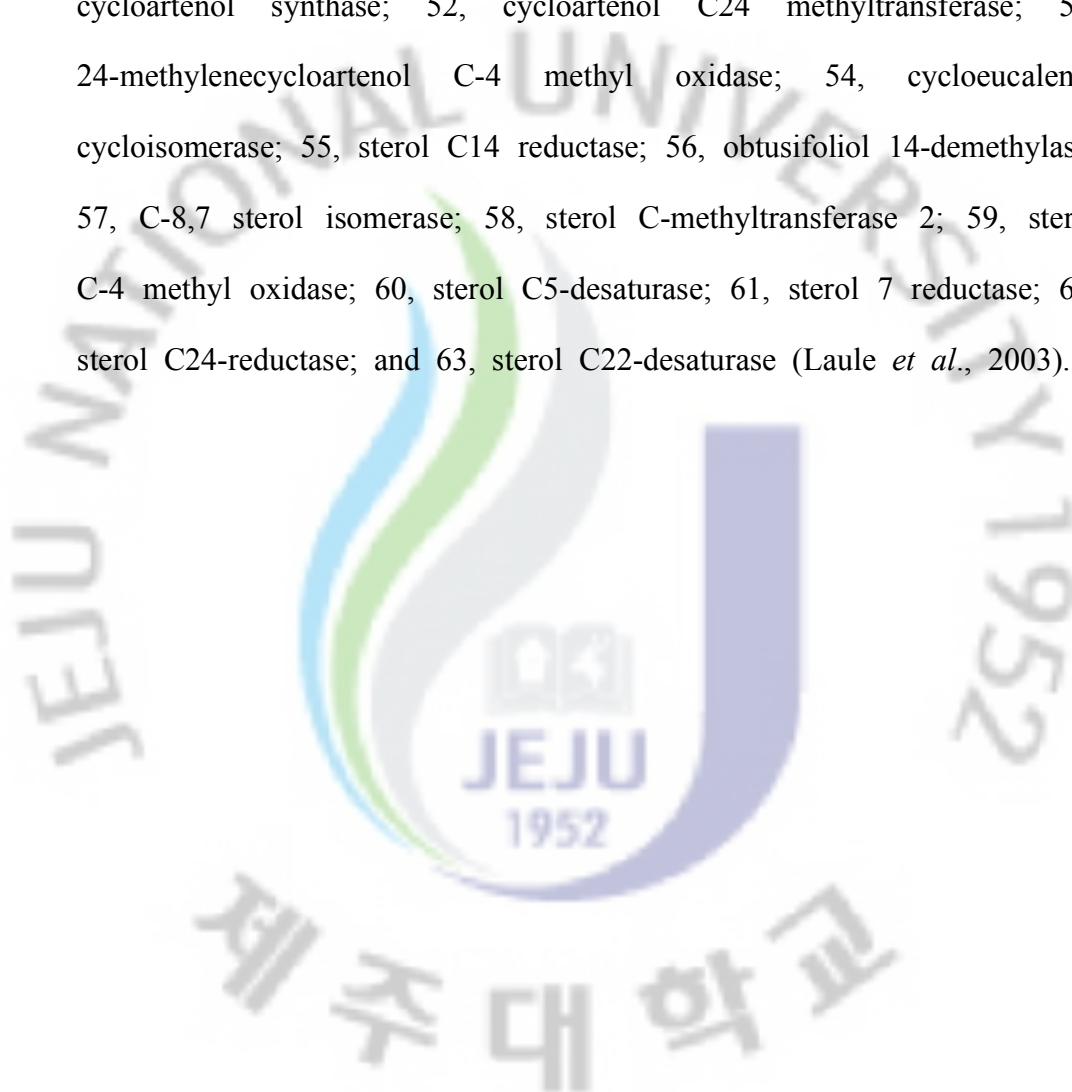


Fig. 2. Overview of isoprenoid metabolic pathways localized to the cytosol and to plastids in plants, with an emphasis on the metabolism of chlorophylls, carotenoids, and sterols. The symbol for anabolic reactions is a solid arrow, and catabolic reactions are indicated by arrows with dotted lines. Open arrows depict multiple enzymatic steps, and key metabolites are boxed. Known enzymes involved in isoprenoid metabolism are numbered, and question marks indicate steps for which an enzymatic activity has not yet been demonstrated. Evidence for the

branching of the plastidial MVA-independent pathway to yield IPP and dimethylallyl diphosphate independently has recently been reported (27). The following enzymes are represented: 1, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase; 2, DXR; 3, 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase; 4, 4-(cytidine 5-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase; 5, 2,4-C-methyl-D-erythritolcyclo-diphosphate synthase; 6, 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-phosphate synthase; 7, 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-phosphate reductase; 8, acetoacetyl-CoA thiolase; 9, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase; 10, HMGR; 11, MVA kinase; 12, phospho-MVA kinase; 13, MVA diphosphate decarboxylase; 14, IPP: dimethylallyl diphosphate isomerase; 15, geranyl diphosphate synthase; 16, farnesyl diphosphate synthase; 17, geranylgeranyl diphosphate synthase; 18, geranylgeranyl reductase; 19, phytoene synthase; 20, phytoene desaturase; 21, -carotene desaturase; 22, lycopene -cyclase; 23, lycopene -cyclase; 24, -carotene hydroxylase; 25, zeaxanthin epoxidase; 26, violaxanthin de-epoxidase; 27, epoxy-carotenoid (neoxanthin) cleavage enzyme; 28, abscisic aldehyde oxidase; 29, glutamyl tRNA synthetase; 30, glutamyl tRNA reductase; 31, glutamate 1-semialdehyde aminotransferase; 32, aminolevulinic acid dehydratase; 33, porphobilinogen deaminase; 34, uroporphyrinogen synthase; 35, uroporphyrinogen decarboxylase; 36, coproporphyrinogen III oxidase; 37, protoporphyrinogen IX oxidase; 38, Mg-protoporphyrinogen IX chelatase; 39, Mg-protoporphyrinogen IX methyltransferase; 40, protoporphyrinogen cyclase (enzyme activity not yet characterized in plants); 41, protochlorophyllide reductase; 42, chlorophyll synthetase; 43, chlorophyll

a oxygenase; 44, chlorophyll *b* reductase (gene not cloned yet); 45, chlorophyllase; 46, de-chelatase (gene not cloned yet); 47, pheophorbide *a* oxygenase (gene not yet cloned); 48, red chlorophyll catabolite reductase; 49, squalene synthase; 50, squalene monooxygenase; 51, cycloartenol synthase; 52, cycloartenol C24 methyltransferase; 53, 24-methylenecycloartenol C-4 methyl oxidase; 54, cycloeucalenol cycloisomerase; 55, sterol C14 reductase; 56, obtusifoliol 14-demethylase; 57, C-8,7 sterol isomerase; 58, sterol C-methyltransferase 2; 59, sterol C-4 methyl oxidase; 60, sterol C5-desaturase; 61, sterol 7 reductase; 62, sterol C24-reductase; and 63, sterol C22-desaturase (Laule *et al.*, 2003).



II. MATERIALS AND METHODS

1. MATERIALS

궁천조생 일반 과실과 가지변이 되어 붉은색을 띄는 자연발생적 돌연변이 과실을 남원읍 신흥2리 재배농가에서 만개 시기인 2009년 5월 12일 부터 30 일 간격으로 12월까지 한그루의 성목에서 각각 수확 하였다 (Fig. 3). 궁천조생 일반 과실과 돌연변이 과실에서 total RNA를 추출하여 cDNA 제작을 위한 재료로 사용 되었으며, 잎과 과실에서 추출된 genomic DNA와 total RNA는 microarray, southern blot 및 northern blot 분석에 사용되었다. 재료는 각각 시기별로 수확하여 즉시 액체질소로 냉동 후 -70℃에 저장하여 필요에 따라 사용하였다.

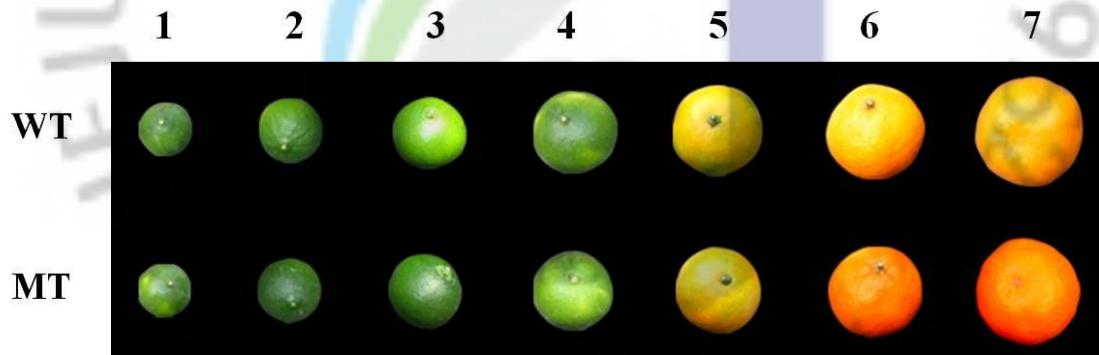


Fig. 3. External of Miyagawa wase wild and mutant fruits during development and maturation. Numbers from 1 to 7 correspond to the sampling stages used for the experiments, and the seven stages are 30, 60, 90, 120, 150, 180, and 220 days after flowering (DAF) respectively.

2. METHODS

1) Total RNA extraction of citrus fruits

궁천조생 품종에서 일반 과실과 돌연변이 과실을 만개 후 약 30일 간격으로 수확하여 Verwoerd 등 (1989)의 방법을 변형하여 total RNAs 을 추출하였다. 궁천조생 과실 30g을 막자사발에서 액체질소를 넣어주며 녹지 않게 충분히 마쇄하고, extraction buffer (1M Tris-HCl (pH 9.0), 5M NaCl, sodium diethyl-dithiocarbamate, 14.3M 2-mercaptoethanol) 40ml과 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1, v/v/v) 40ml을 넣고 잘 혼합 한 뒤 12,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 상정액을 취하였다. 2 volume의 95% 에탄올과 0.1 volume의 3M NaOAc를 넣고 inverting 후에 -70°C에 30분간 보관 하였다. 12,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 상정액을 버리고 pellet만 남긴 뒤 70% 에탄올로 washing 한 후에 suspension buffer (1M Tris-HCl (pH9.0), 5M NaCl, 10% SDS)를 넣고 완전히 녹였다. 동일 볼륨의 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1, v/v/v) 넣고 잘 혼합 한 뒤 12,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 상정액을 취하였다. 2 volume의 95% 에탄올과 0.1 volume의 3M NaOAc를 넣고 inverting 후에 -70°C에 30분간 보관 하였다. 12,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 상정액을 버리고 pellet만 남긴 뒤 70% 에탄올로 washing 후에 TE buffer (pH 9.0)을 넣고 pellet을 완전히 녹여 주었다. 8M LiCl를 동일 볼륨 넣고 살며시 inverting 후에 ice bath에 넣고 5시간 냉장고에 보관 하였다. 12,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 상정액을 버리고 pellet만 남긴 뒤 70% 에탄올로 washing 후에 TE buffer (pH 9.0)을 넣고 pellet을 완전히 녹여 주었다. 2 volume의 95% 에탄올과 0.1volume의 3M NaOAc을 넣고 -70°C에서 30분간 보관 하였다. 12,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 상정액을 버리고

pellet만 남긴 뒤 70% 에탄올로 washing 후에 TE buffer (pH 9.0)을 넣고 pellet을 완전히 녹여 주었다. Spectrophotometer를 이용하여 260nm, 280nm에서 흡광도를 측정하였고 추출된 total RNAs는 사용하기 전까지 -70℃에 보관 하였다.



2) The Citrus 300K Microarray

(1) Probe design

발현 profiling은 The Citrus 300K Microarray로 실시하였으며, *Citrus clementina*, *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis*, 및 *Citrus unshiu* 4개의 주요 citrus 종에서 probe 디자인을 하였다. 전체 174,228개의 Expressed Sequence Tag (EST)들은 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene>)에서 다운로드 하였고, CAP3 (<http://genome.cs.mtu.edu/cap/cap3.html>)에서 클러스터 되었다. 67,881개의 unigenes 가운데 54,335개의 방향성이 알려져 있었으며 이 유전자들은 4개의 probes로 디자인 되었고, 13,682개는 방향성이 밝혀지지 않았으며 sense와 anti-sense 방향으로 4개의 probes로 각각 디자인 되어, 총 326,876개의 probes로 디자인 되었다 (Fig. 4). 이 Probes의 평균 길이는 60 nt 이며, 75~85°C로 T_m값을 가진다. Microarray는 Nimblegen inc (<http://www.nimblegen.com>)에서 생산되었고, green fluorescence protein, fluorometric assay β -glucuronidase, Hygromycin 및 kanamycin 같은 selection marker를 포함하고 있다. 또한 혼성화 효율 및 4개의 가장자리에 기준적 통제 (225)를 감시하는 무작위 GC probes (40, 000)는 이미지의 그리드에 오버레이 하는 것을 보조하기 위해서 포함되어 있다.

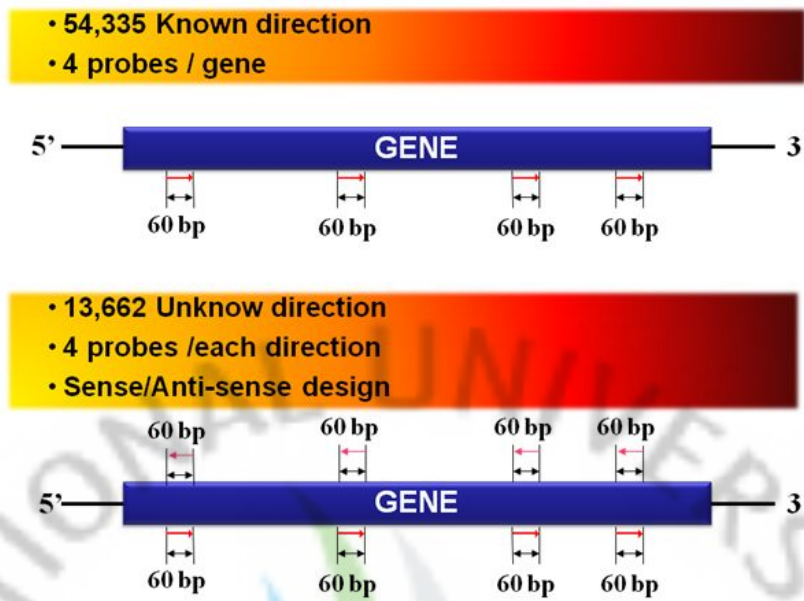


Fig. 4. The Citrus 300K Microarray probe design.

(2) Practical method

Microarray 분석의 재현성을 평가하기 위해서, 독립적으로 준비된 total RNAs로 3반복 실험을 수행하였다. 돌연변이 성숙과실과 일반 과실 (2008년 11월 2일)의 total RNA를 각각 추출한 후 cDNA를 합성하기 위하여 RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Lithuania)를 사용하였다. 1 μ l의 oligo dT primer (100 μ M)와 10 μ g의 total RNA를 PCR tube에 넣고 heat block에서 5분 동안 70°C에서 denaturation 하고, ice bath에 보관하였다. First strand DNA를 합성하기 위하여, ice에 보관한 denaturation 시킨 산물에 4 μ l의 5 \times first strand buffer, 1 μ l의 RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor, 2 μ l의 10mM dNTP mixture 및 1ml의 RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase 효소를 넣고 1시간 동안 42°C에서 반응 시킨후, 70°C에서 10분간 처리하여 합성을 중지 시켰다. Second strand DNA를 합성하기 위하여, 66.7 μ l의 nuclease free water, 0.2 μ l (5U/ μ l)의 10 \times reaction buffer (Fermentas, Lithuania), 5 μ l의 10 \times T4 DNA ligase buffer (TakaRa, Japan), 3 μ l (10U/ μ l)의 DNA Polymersase I (Fermentas, Lithuania), 0.2 μ l (5U/ μ l)의 Ribonuclease H (Fermentas, Lithuania) 및 0.1 μ l (350U/ μ l)의 T4 DNA ligase (TAKARA, Japan)를 First strand 된 반응 산물에 추가로 넣어주고 2시간 동안 15°C에서 반응 시켰다. Double strand cDNAs는 MinElute Reaction Cleanup Kit (QIAGEN, U.S.A.)를 사용하여 정제 하였다. Cy3-labeled target DNA 단편들을 합성하기 위하여 30 μ l의 Cy3-9mer primers (Sigma-Aldrich, U.S.A.)와 1 μ g의 double strand cDNA를 잘 섞어 준 후 10분 동안 98°C에서 denaturation을 수행 하였고, 10 μ l의 50 \times dNTP mix (10mM each), 8 μ l의 ddw, 및 2 μ l의 Klenow fragment (50U/ μ l, TAKARA, Japan) 넣어준 후 2시간 동안 37°C에서 반응 시켰다. 반응 시킨 DNA에 11.5 μ l의 5M NaCl과 110 μ l의 isopropanol을 추가한 후 12,000 \times g에서 원심 분리를 수행하였다. 침전된 samples에 13 μ l의 ddw로 rehydration을 수행하였다. Samples의 농도는 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 10 μ g의 DNA를 microarray 혼성화에 사용 하였으며, samples는 19.5 μ l의 2 \times

hybridization buffer (Nimblegen, U.S.A.)와 $39\mu\text{l}$ 의 ddw를 넣고 잘 섞어 주었다. Microarray 혼성화는 MAUI chamber (Biomiro, U.S.A.)에서 16~18시간 동안 42°C 로 수행하였다. 혼성화 후에 Microarray를 MAUI hybridization station 으로부터 제거하고, 즉시 250ml wash I (Nimblegen, U.S.A.)에 10-15초간 42°C 에서 담가 씻어주고, 새로운 Wash I에 2분 동안 담가 씻어주었다. Wash II와 Wash III에 1분 동안 순차적으로 담가 씻어주었다. Microarray는 $500\times\text{g}$ 에서 1분 동안 원심 분리 하고, 잘 말린 후에, Genepix scanner 4,000B (Axon, U.S.A.)를 이용하여 스캔하였다.



(3) Data analysis

Microarray는 5um 해상도로 미리 조정해 놓은 Genepix 4,000B로 Cy3 신호를 스캔하였다. 신호들은 디지털화 되어 NimbleScan (Nimblegen, U.S.A.)로 분석하였다. 그리드는 칩 디자인 파일, NDF 파일과 이미지 정렬되었고, 정렬은 그리드의 가장자리의 이미지를 오버레이 함으로써 확인하였다. 이것을 프로그램에서 균일 값에 의해 확인하였다. Cy3 channel의 염기서열, probe 및 신호 강도정보를 local background estimator를 이용하여 데이터베이스 background를 빼내고 배열에 있어서 높은 배경 신호에 의해 배수 변화 견적을 개선하기 위해서 실행하였다. 데이터는 표준화 되어서, 칩 사이의 신호의 종류를 조정하기 위해서, 입방의 스플라인 표준화 정도를 이용해서 처리하였다. NimbleScan에서 중위수 다듬기 알고리즘을 사용하여 Robust Multi-Chip Analysis (RMA)에 의해 probe-level을 요약하고 파일을 만들어 사용하였다. 감도 및 재현성 microarray 결과의 향상 위한 이 방법은 보고된 유전자 발현 수준의 감소가 특정 유전자와 그 outliers 으로 기여에 대한 측정 표현식의 전반적인 행동에 outliers probe를 식별 한다. 다중 분석 연구 컴퓨팅 환경에서 limma 패키지에서 선형 모델과 microarray 실험에 차등 표현식을 평가하기 위하여 Bayes 방법으로 수행 되었다. 유전학과 분자 생물학에서 패키지 lmFit과 eBayes에 의해 구현 Bayes 통계에 의한 구현 선형 모델링 접근법을 채택하였다. 그 중 P. Value가 0.05 이하 수집된 추가하는 유전자 표현에 대해 선택한 유전자 stage1 에서 그에 비해 한 단계 이상에서 1 또는 -1 미만으로 표시 하였다. 주요 구성 요소 분석 클러스터링으로 복수 변수 통계 테스트 및 다차원 스케일링은 Acuity 3.1 (Axon, U.S.A.)로 수행하였다. 계층적 클러스터링은 제곱 유클리드 상관관계 및 평균결합 클러스터링을 기반으로 유사 통계로 수행이 되었으며, 유전자의 거리를 계산하는데 사용되었다. Microarray 분석의 전 과정은 GreenGene Bio Tech에 의뢰하였다 (Copyright(c) 2000~2008 GreenGen Bio Tech Inc., All rights reserved).

3) MDDX Cloning from citrus fruits

궁천조생의 MDDX 유전자를 분리하기 위하여 궁천조생 일반 과실과 돌연변이 성숙 과실 (2009년 6월 13일)과 잎에서 genomic DNA와 total RNA를 각각 분리하였다. PCR Thermal cycler Dice TP600 (TAKARA, JP)반응은 MDDX-F, MDDX-R primer (table. 1)를 사용하여 94°C에서 5분 동안 초기 denaturation을 행한 뒤, 94°C에서 1분 (denaturation step), 47°C에서 1분 (annealing step), 72°C 2분 (extension step) 24회 반복 하였다. 마지막으로 72°C에서 5분 동안 반응을 시켰다. 증폭된 PCR 산물은 1× TAE 완충액을 사용하여 1.2% agarose gel에 50분간 50V로 전기영동하고, ethidium bromide 로 염색하여 증폭된 DNA 단편들을 확인 하였다. Gel Extraction Kit-spin Kit (NucleoGen, KR)를 사용하여 증폭된 DNA 단편들을 분리 하였다. PCR로 분리 되어진 MDDX DNA 단편들은 pGEM[®]-T Easy Vector System II Kit (Promega, U.S.A)를 사용하여 cloning을 수행 하였다. 이것들을 다시 JM109 competent cells (*E. coli*) 속으로 형질전환 시켰다. 형질전환 된 *E.coli* 로부터 plasmid purification kit (NucleoGen, KR) 를 사용하여 분리 하였다.

4) Quantitative real-time PCR analysis

Quantitative Real-time PCR(qRT-PCR)은 iQTM SYBR[®] Green Supermix (BIO-RAD, U.S.A)를 사용하고 MDDX-F, MDDX-R primer를 이용하여 PCRMiniOpticon Real-time PCR Detection system (BIO-RAD, U.S.A)로 증폭하였다. 이때 사용된 PCR의 조건은 94℃에서 10분 동안 초기 denaturation을 행한 뒤, 94℃에서 1분 (denaturation step), 50℃에서 1분 (annealing step), 72℃에서 1분 (extension step)으로 하여 40회 반복하였다. 마지막으로 72℃에서 10분 동안 반응을 시켰다. 여기서 나온 값은 Opticon MonitorTM Software (BIO-RAD, U.S.A)를 이용하여 분석 하였다. 유전자의 mRNA 발현량은 elongation factor 1- α (table. 1) 의 발현량으로 정량 · 비교 분석 하였다.

5) Northern blot analysis

각 시기별로 추출되어진 Total RNAs 5 μ g를 1.4% formaldehyde agarose gel에서 4시간 동안 45V에서 전기영동하고 ethidium bromide에 염색하여 total RNAs를 확인 하였다. 20 \times SSC 사용하여 nylon membrane (Roche, Indianapolis, IN)으로 transfer하고, RNA blotted nylon membrane을 UV crosslinker 사용하여 고정 하였다. Cloning 된 pMDDXc clon을 MDDXn363-F, MDDXn891-R primer (Table. 1) 에 PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Indianapolis, IN)을 사용하여 PCR 증폭을 수행하고 Probe에 digoxigenin-dUTP를 labeling 하였다. 이때 사용된 PCR의 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 초기 denaturation을 행한 뒤, 94 $^{\circ}$ C에서 1분 (denaturation step)간, 47 $^{\circ}$ C에서 1분 (annealing step), 72 $^{\circ}$ C 2분 (extension step) 24회 반복 하였다. 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 반응을 시켰다. 1 \times TAE 완충액을 사용하여 1.2% agarose gel에 50분 간 50V로 전기영동하고, ethidium bromide 로 염색하여 증폭된 DNA 단편을 확인 하였다. RNA blotted nylon membrane에 DIG-labeled MDDXc RNA probe을 12시간 동안 48 $^{\circ}$ C에서 hybridization을 수행 하였다. RNA blotted membranes에 2 \times SSC, 0.1% SDS을 상온에서 5분 간 두 번, 0.1 \times SSC, 0.1% SDS에 68 $^{\circ}$ C에서 15분 간 두 번 washing 하였다. Washing buffer (DIG Wash and Block Buffer set)을 사용하여 상온에서 5분 간 washing 하고, blocking solution으로 상온에서 2시간 동안 blocking 하고, 1 μ l의 Anti-DIG-AP (Roche, Indianapolis, IN)를 포함하고 있는 10ml의 blocking solution 용액을 사용하여 상온에서 30분 간 반응 시켰다. Washing buffer로 상온에서 15분 간 두 번 washing 한 후에, detection solution으로 상온에서 10분간 반응 시키고, detection solution 1ml에 5 μ l의 CDP-Star (Roche, Indianapolis, IN)를 첨가한 용액을 사용하여 상온에서 10분간 반응 시켰다. Membrane을 10~15분간 X-ray film(Fuji photo film Co., Tokyo, Japan)을 반응 시키고 film을 현상하였다.

6) The extraction of genomic DNA and southern blot analysis

궁천조생 일반 과실과 돌연변이 과실 식물체에서 어린 잎 1g을 채취하고 DNeasy[®] Plant Maxi Kit (Qiagen, U.S.A)를 사용하여 genomic DNA를 각각 분리하였다. 추출된 genomic DNA 45 μ g을 제한효소 *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*으로 각각 처리하여 완전히 절단 하였다. 제한효소 처리된 genomic DNA들을 0.8% agarose gel에서 12시간 동안 25V로 전기영동한 뒤, 15분 간 0.25M HCl에서 depurination 하고, 30분 간 0.5M NaOH, 1.5M NaCl에서 denature한 다음, 30분 간 0.5M Tris-HCl(pH 7.5), 1.5M NaCl에서 Neutralization 한 후, 20 \times SSC 사용하여 nylon membrane (Roche, Indianapolis, IN)으로 transfer한 뒤, DNA blotted nylon membrane을 UV crosslinker를 사용하여 고정 하였다. Cloning 된 pGMDDX clon을 MDDXs433-F, MDDXs975-R primer (Table. 1)와 PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Indianapolis, IN)을 사용하여 digoxigenin-dUTP를 labeling 하였다. DNA blotted nylon membrane에 DIG-labeled GMDDX DNA probe을 12시간 동안 42 $^{\circ}$ C에서 hybridization을 수행 하였다. DNA blotted membranes에 2 \times SSC, 0.1% SDS을 상온에서 5분 간 두 번, 0.1 \times SSC, 0.1% SDS에 68 $^{\circ}$ C에서 15분 간 두 번 washing 하였다. Washing buffer (DIG Wash and Block Buffer set)을 사용하여 washing buffer로 상온에서 5분 간 washing 하고, blocking solution으로 상온에서 2시간 동안 blocking 하고, 1 μ l의 Anti-DIG-AP (Roche, Indianapolis, IN)를 포함하고 있는 10ml의 blocking solution 용액을 사용하여 상온에서 30분 간 반응 시켰다. Washing buffer로 상온에서 15분 간 두 번 washing 한 후에, detection solution으로 상온에서 10분간 반응 시키고, detection solution 1ml에 5 μ l의 CDP-Star (Roche, Indianapolis, IN)를 첨가한 용액을 사용하여 상온에서 10분간 반응 시켰다. Membrane을 10~15분간 X-ray film을 반응 시키고 film을 현상하였다.

Table 1. List of primers used for experiments.

Primer name	Base sequence	Usage
MDDX-F	5'-GAA TTT TTT TTC ATA ACG ATG GC-3'	Genomic and cDNA cloning
MDDX-R	5'-AGT GAA AAT TAA TCT ACT CT-3'	
MDDXs433-F	5'- TTG AAG GAA ATT CGG AGT CG -3'	Southern probe
MDDXs975-R	5'- ACA AGC ACT GCC TGA ACC TT -3'	
MDDXn363-F	5'-GAC GGC CGC TGG ATT GGC TT-3'	Southern probe
MDDXn891-R	5'-CCT GAG ATC CCA CGG AAC GA-3'	
EF1-F	5'-ATT GAC AAG CGT GTG ATT GAG C-3'	qRT-PCR house keeping gene
EF1-R	5'-TCC ACA AGG CAA TAT CAA TGG TA-3'	

7) Comparison analysis of fruit characteristics between Miyagawa wase wild type and mutant

궁천조생 성숙 일반 과실과 돌연변이 과실의 종경, 횡경, 및 과피 두께 Vernier calipers (mitutoyo, JP)를 이용하여 측정 하였고, 가용성 고형물 및 유기산 함량은 당산도 분석기 (HORIBA, JP)을 사용하여 측정하였다. 과육의 색도는 과육 양낭속의 사양 중간면을 색차계 (Minolta, JP)를 사용하여 L (명도), a (적녹도), b (황청도) 및 a/b 값을 측정하였으며, 과피는 감귤의 적도면을 색차계로 측정하였다.

III. RESULTS AND DISCUSSION

1. The Citrus 300K Microarray analysis

궁천조생 품종의 가지변이에 의한 자연발생적 돌연변이에 유전자의 발현량 차이를 알아보기 위해서 성숙 과실 (2008년 11월 2일)에서 The Citrus 300K Microarray 분석을 수행한 결과 (Fig. 5), 발현량의 차이가 2배 이상, P-value 값이 0.05 미만인 유전자들이 583개였으며, 515개의 유전자가 발현이 증가 되었고, 67개의 유전자가 발현이 감소하였다 (Table. 2, Fig. 6). *Arabidopsis thaliana* TAIR9를 기반으로 하여 감귤유전자와 match된 유전자 수는 총 15,594개이며, GOMINER (Ashburner *et al.*, 2000; Zeeberg *et al.*, 2003)로 유의한 GO term을 분석하였다. GOMINER는 GO term과 expression mode (Under, Over, Change) 에 따라 각 유전자를 분류하였다. One-sided Fisher의 유의성 검정방법으로 P-value를 계산하였고, 100개를 무작위로 취해서 False discovery rate (FDR) 값이 0.05미만인 GO term을 추출하였다. 이 중 *Arabidopsis thaliana* 유전자와 상보성을 보이는 407개의 유전자들 중에 382개의 유전자가 발현이 증가 되었고 25개의 유전자가 억제 되었다 (Table. 3). GOMINER는 biological processes, cellular component, 및 molecular function 의 3가지 category로 분류하였다 (Table. 4). GO analysis에서 유의하게 분류된 유전자를 *Arabidopsis thaliana* 데이터베이스와 연계하여 KEGG (<http://www.genome.ad.jp/kegg>)로 분류하였다. 그 결과 대사 경로와 관련 된 유전자들로 biosynthesis of purine nucleotides (AT1G74260) 경로의 phosphoribosylformylglycinamide synthase (CITRUS0034752), Acyl-CoA synthetase pathway (AT2G04350.2) 경로의 long-chain-fatty-acid-CoA ligase (CITRUS0043345), 및 Mevalonate pathway (AT2G38700.1) 경로의 mevalonate diphosphate decarboxylase (CITRUS0036402) 3개의 유전자가 발현이 증가 한 것을 확인 하였다 (Table. 5). 이 중에서 carotenoids, sterols 등의 전구체인

isoprenoid를 합성하는 mevalonate 경로 상에 있는 Mevalonate diphosphate decarboxylase (MDDX) 유전자가 약 2.5배 과 발현됨을 확인하였다. TF(Transcription factor) 분석에서는 15개의 유전자 중에서 돌연변이 성숙 과실에서 11개의 유전자가 발현이 증가 하였으며, 4개의 유전자가 발현이 감소하였다 (Table. 6).

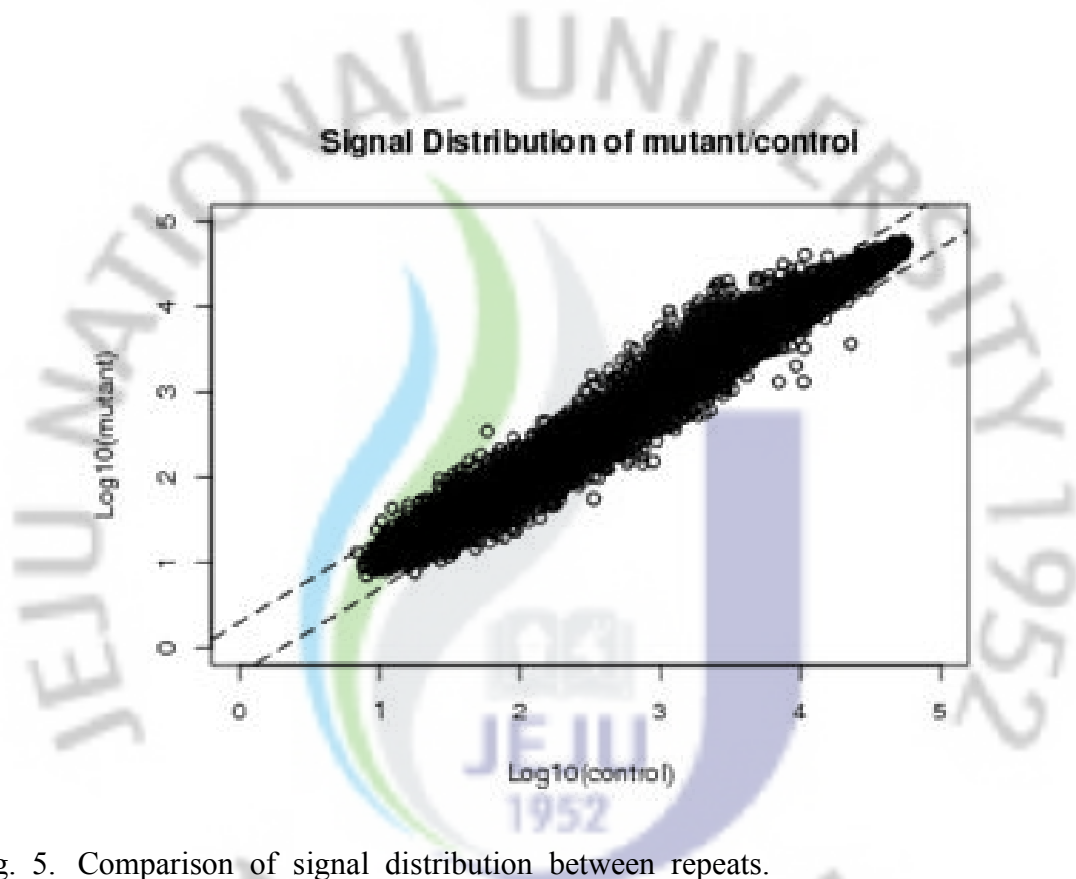


Fig. 5. Comparison of signal distribution between repeats.

Table 2. Significantly changed genes classification.

Miyagawa wase	Up regulation	Down regulation	total useful genes
Wild type			
Mutant type	515	67	583

P value < 0.05, fold change: > 2fold.

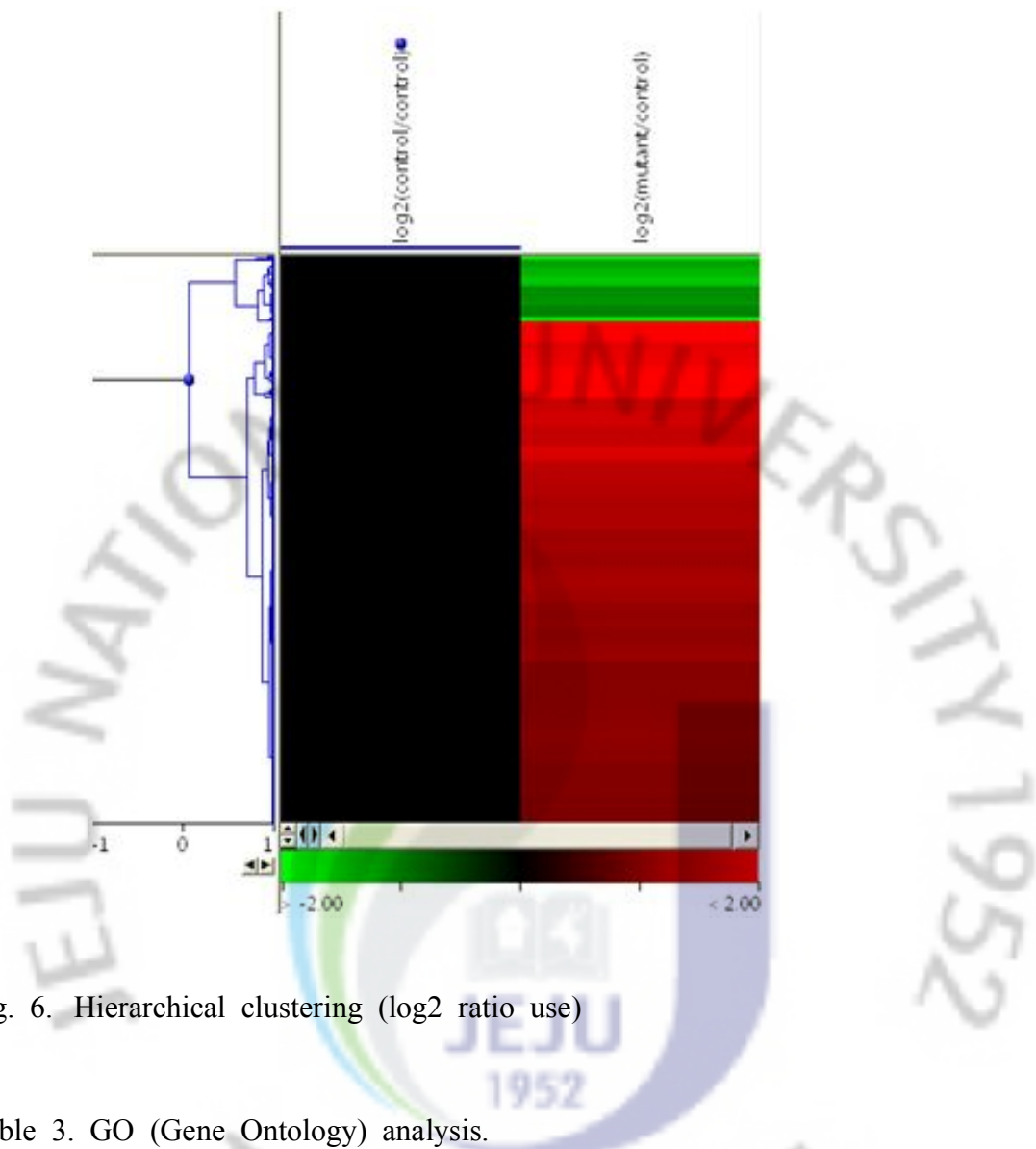


Fig. 6. Hierarchical clustering (log2 ratio use)

Table 3. GO (Gene Ontology) analysis.

Miyagawa wase	Up regulation	Down regulation	total useful genes
Wild type			
Mutant type	382	25	407

P value < 0.05, fold change: > 2fold, False discovery rate (FDR) < 0.05.

Table 4. GO category classification.

Miyagawa wase	Biological preprocess	Cellular component	Molecular function	Total
Wild type				
Mutant type	226	65	87	378

(1) Biological process

GO ID ^z	Total ^y	Under ^x	Over ^w	Change ^v	Term
GO:0007205	10	0	3	3	activation of protein kinase C activity
GO:0006020	11	0	3	3	inositol metabolic process
GO:0006066	208	0	26	26	alcohol metabolic process
GO:0015988	5	0	2	2	energy coupled proton transport, against electrochemical gradient
GO:0044255	387	0	22	22	cellular lipid metabolic process
GO:0044237	5252	7	168	175	cellular metabolic process
GO:0044264	96	2	5	7	cellular polysaccharide metabolic process
GO:0008610	270	0	15	15	lipid biosynthetic process
GO:0007097	3	0	3	3	nuclear migration
GO:0006006	86	0	18	18	glucose metabolic process
GO:0008152	6268	8	193	201	metabolic process
GO:0006091	186	0	20	20	generation of precursor metabolites and energy
GO:0006098	27	0	7	7	pentose-phosphate shunt
GO:0000742	4	0	3	3	karyogamy during conjugation with cellular fusion
GO:0051716	65	0	6	6	cellular response to stimulus
GO:0007059	36	1	3	4	chromosome segregation
GO:0009206	31	0	5	5	purine ribonucleoside triphosphate biosynthetic process
GO:0008202	52	0	5	5	steroid metabolic process
GO:0006754	29	0	5	5	ATP biosynthetic process
GO:0009970	5	0	3	3	cellular response to sulfate starvation
GO:0044403	34	0	4	4	symbiosis, encompassing mutualism through parasitism
GO:0006084	22	0	5	5	acetyl-CoA metabolic process
GO:0005975	583	2	30	32	carbohydrate metabolic process
GO:0006935	11	1	2	3	chemotaxis
GO:0051704	387	1	18	19	multi-organism process
GO:0006810	1395	2	53	55	transport
GO:0030163	219	0	14	14	protein catabolic process
GO:0006402	17	0	3	3	mRNA catabolic process
GO:0044260	2423	5	78	83	cellular macromolecule metabolic process
GO:0015986	28	0	5	5	ATP synthesis coupled proton transport
GO:0043255	7	0	2	2	regulation of carbohydrate biosynthetic process
GO:0009267	34	0	4	4	cellular response to starvation
GO:0034220	30	0	5	5	transmembrane ion transport
GO:0009259	52	0	6	6	ribonucleotide metabolic process
GO:0042743	11	0	3	3	hydrogen peroxide metabolic process
GO:0045143	6	0	3	3	homologous chromosome segregation
GO:0046490	7	0	2	2	isopentenyl diphosphate metabolic process
GO:0006696	5	0	3	3	ergosterol biosynthetic process
GO:0044248	524	1	44	45	cellular catabolic process
GO:0048015	16	0	3	3	phosphoinositide-mediated signaling
GO:0042744	5	0	3	3	hydrogen peroxide catabolic process
GO:0006767	77	0	16	16	water-soluble vitamin metabolic process
GO:0019852	11	0	3	3	L-ascorbic acid metabolic process

GO ID ^z	Total ^y	Under ^x	Over ^w	Change ^v	Term
GO:0009416	252	1	18	19	response to light stimulus
GO:0006950	1102	4	58	62	response to stress
GO:0006099	10	0	3	3	tricarboxylic acid cycle
GO:0046165	34	0	6	6	alcohol biosynthetic process
GO:0006635	27	0	6	6	fatty acid beta-oxidation
GO:0009141	35	0	5	5	nucleoside triphosphate metabolic process
GO:0048284	23	0	5	5	organelle fusion
GO:0019751	36	0	4	4	polyol metabolic process
GO:0006163	56	0	6	6	purine nucleotide metabolic process
GO:0016036	16	0	3	3	cellular response to phosphate starvation
GO:0042542	31	0	5	5	response to hydrogen peroxide
GO:0009260	51	0	6	6	ribonucleotide biosynthetic process
GO:0000746	20	0	3	3	conjugation
GO:0051327	43	2	3	5	M phase of meiotic cell cycle
GO:0019318	116	0	19	19	hexose metabolic process
GO:0046365	80	0	16	16	monosaccharide catabolic process
GO:0000747	20	0	3	3	conjugation with cellular fusion
GO:0048869	240	1	12	13	cellular developmental process
GO:0007067	39	0	5	5	mitosis
GO:0042724	7	0	2	2	thiamin and derivative biosynthetic process
GO:0016485	31	0	4	4	protein processing
GO:0009611	87	1	7	8	response to wounding
GO:0042364	40	0	8	8	water-soluble vitamin biosynthetic process
GO:0033674	13	0	3	3	positive regulation of kinase activity
GO:0006629	508	0	22	22	lipid metabolic process
GO:0007200	12	0	3	3	G-protein signaling, coupled to IP3 second messenger (phospholipase C activating)
GO:0019395	29	0	6	6	fatty acid oxidation
GO:0046500	4	0	2	2	S-adenosylmethionine metabolic process
GO:0006733	48	0	8	8	oxidoreduction coenzyme metabolic process
GO:0030473	3	0	3	3	nuclear migration, microtubule-mediated
GO:0015985	28	0	5	5	energy coupled proton transport, down electrochemical gradient
GO:0051321	54	2	3	5	meiotic cell cycle
GO:0009199	32	0	5	5	ribonucleoside triphosphate metabolic process
GO:0016052	100	0	17	17	carbohydrate catabolic process
GO:0006740	28	0	7	7	NADPH regeneration
GO:0043648	56	0	5	5	dicarboxylic acid metabolic process
GO:0051603	195	0	11	11	proteolysis involved in cellular protein catabolic process
GO:0009165	77	0	7	7	nucleotide biosynthetic process
GO:0044257	208	0	13	13	cellular protein catabolic process
GO:0009142	33	0	5	5	nucleoside triphosphate biosynthetic process
GO:0010324	42	1	4	5	membrane invagination
GO:0019853	11	0	3	3	L-ascorbic acid biosynthetic process
GO:0042331	8	1	2	3	phototaxis
GO:0031669	36	0	4	4	cellular response to nutrient levels
GO:0005976	102	2	6	8	polysaccharide metabolic process
GO:0005996	137	0	19	19	monosaccharide metabolic process
GO:0046034	30	0	5	5	ATP metabolic process
GO:0046356	10	0	3	3	acetyl-CoA catabolic process
GO:0019941	194	0	11	11	modification-dependent protein catabolic process
GO:0000070	14	0	3	3	mitotic sister chromatid segregation
GO:0000289	3	0	2	2	nuclear-transcribed mRNA poly(A) tail shortening
GO:0006818	56	0	8	8	hydrogen transport
GO:0015992	56	0	8	8	proton transport
GO:0043085	20	0	3	3	positive regulation of catalytic activity
GO:0006007	77	0	16	16	glucose catabolic process
GO:0009409	132	1	12	13	response to cold
GO:0009152	49	0	6	6	purine ribonucleotide biosynthetic process
GO:0009060	16	0	3	3	aerobic respiration

GO ID ^z	Total ^y	Under ^x	Over ^w	Change ^v	Term
GO:0019752	552	0	27	27	carboxylic acid metabolic process
GO:0007626	20	1	3	4	locomotory behavior
GO:0009109	13	0	4	4	coenzyme catabolic process
GO:0042594	39	0	5	5	response to starvation
GO:0046173	9	0	4	4	polyol biosynthetic process
GO:0006995	11	0	4	4	cellular response to nitrogen starvation
GO:0009225	21	1	3	4	nucleotide-sugar metabolic process
GO:0009056	544	1	46	47	catabolic process
GO:0019362	39	0	7	7	pyridine nucleotide metabolic process
GO:0006096	50	0	8	8	glycolysis
GO:0051647	4	0	3	3	nucleus localization
GO:0044272	29	0	4	4	sulfur compound biosynthetic process
GO:0007129	6	2	0	2	synapsis
GO:0007610	32	1	3	4	behavior
GO:0009605	206	2	14	16	response to external stimulus
GO:0051187	22	0	4	4	cofactor catabolic process
GO:0044262	277	2	24	26	cellular carbohydrate metabolic process
GO:0015931	20	0	3	3	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid transport
GO:0009408	96	0	14	14	response to heat
GO:0030258	35	0	6	6	lipid modification
GO:0032787	246	0	12	12	monocarboxylic acid metabolic process
GO:0019538	2354	3	75	78	protein metabolic process
GO:0043170	3957	6	116	122	macromolecule metabolic process
GO:0051347	14	0	3	3	positive regulation of transferase activity
GO:0044419	34	0	4	4	interspecies interaction between organisms
GO:0009145	31	0	5	5	purine nucleoside triphosphate biosynthetic process
GO:0043562	11	0	4	4	cellular response to nitrogen levels
GO:0043285	271	1	18	19	biopolymer catabolic process
GO:0000302	38	0	5	5	response to reactive oxygen species
GO:0019953	70	0	7	7	sexual reproduction
GO:0009205	32	0	5	5	purine ribonucleoside triphosphate metabolic process
GO:0006732	125	0	16	16	coenzyme metabolic process
GO:0046395	32	0	6	6	carboxylic acid catabolic process
GO:0042330	13	1	2	3	taxis
GO:0006164	54	0	6	6	purine nucleotide biosynthetic process
GO:0009062	28	0	6	6	fatty acid catabolic process
GO:0009201	31	0	5	5	ribonucleoside triphosphate biosynthetic process
GO:0033554	54	0	6	6	cellular response to stress
GO:0009628	653	3	42	45	response to abiotic stimulus
GO:0044275	99	0	17	17	cellular carbohydrate catabolic process
GO:0044267	2333	3	74	77	cellular protein metabolic process
GO:0006021	7	0	3	3	inositol biosynthetic process
GO:0046164	82	0	16	16	alcohol catabolic process
GO:0000743	3	0	3	3	nuclear migration during conjugation with cellular fusion
GO:0032147	10	0	3	3	activation of protein kinase activity
GO:0008204	5	0	3	3	ergosterol metabolic process
GO:0007010	203	2	10	12	cytoskeleton organization and biogenesis
GO:0016114	45	0	5	5	terpenoid biosynthetic process
GO:0006624	4	0	3	3	vacuolar protein processing
GO:0042816	5	0	2	2	vitamin B6 metabolic process
GO:0016042	45	0	7	7	lipid catabolic process
GO:0006720	104	0	8	8	isoprenoid metabolic process
GO:0008203	4	0	2	2	cholesterol metabolic process
GO:0051656	18	0	3	3	establishment of organelle localization
GO:0044238	5152	7	160	167	primary metabolic process
GO:0007017	120	1	8	9	microtubule-based process
GO:0006694	36	0	4	4	steroid biosynthetic process
GO:0055085	39	0	6	6	transmembrane transport
GO:0009240	7	0	2	2	isopentenyl diphosphate biosynthetic process

GO ID ^z	Total ^y	Under ^x	Over ^w	Change ^v	Term
GO:0009453	8	1	2	3	energy taxis
GO:0016054	32	0	6	6	organic acid catabolic process
GO:0044242	41	0	7	7	cellular lipid catabolic process
GO:0019320	79	0	16	16	hexose catabolic process
GO:0051179	1449	2	54	56	localization
GO:0015672	98	0	10	10	monovalent inorganic cation transport
GO:0006739	29	0	7	7	NADP metabolic process
GO:0009110	50	0	8	8	vitamin biosynthetic process
GO:0009051	6	0	3	3	pentose-phosphate shunt, oxidative branch
GO:0009117	125	0	14	14	nucleotide metabolic process
GO:0040023	4	0	3	3	establishment of nucleus localization
GO:0006772	7	0	2	2	thiamin metabolic process
GO:0051234	1404	2	53	55	establishment of localization
GO:0006457	198	1	15	16	protein folding
GO:0008299	75	0	7	7	isoprenoid biosynthetic process
GO:0000819	15	0	3	3	sister chromatid segregation
GO:0009415	86	1	6	7	response to water
GO:0006753	125	0	14	14	nucleoside phosphate metabolic process
GO:0006979	179	0	16	16	response to oxidative stress
GO:0009314	264	1	18	19	response to radiation
GO:0042723	7	0	2	2	thiamin and derivative metabolic process
GO:0045132	13	0	3	3	meiotic chromosome segregation
GO:0009414	83	1	6	7	response to water deprivation
GO:0000741	17	0	5	5	karyogamy
GO:0006073	77	2	5	7	glucan metabolic process
GO:0006119	51	0	5	5	oxidative phosphorylation
GO:0009228	6	0	2	2	thiamin biosynthetic process
GO:0006511	194	0	11	11	ubiquitin-dependent protein catabolic process
GO:0051186	199	0	19	19	cofactor metabolic process
GO:0006401	19	0	3	3	RNA catabolic process
GO:0042221	895	2	37	39	response to chemical stimulus
GO:0000288	5	0	2	2	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, deadenylation-dependent decay
GO:0015980	33	0	6	6	energy derivation by oxidation of organic compounds
GO:0051258	17	0	4	4	protein polymerization
GO:0006082	553	0	27	27	organic acid metabolic process
GO:0006556	3	0	2	2	S-adenosylmethionine biosynthetic process
GO:0006113	5	0	2	2	fermentation
GO:0006769	35	0	7	7	nicotinamide metabolic process
GO:0034440	29	0	6	6	lipid oxidation
GO:0006997	30	0	7	7	nuclear organization and biogenesis
GO:0050896	1853	5	80	85	response to stimulus
GO:0009991	58	0	5	5	response to extracellular stimulus
GO:0007127	27	2	3	5	meiosis I
GO:0006766	87	0	16	16	vitamin metabolic process
GO:0006695	3	0	2	2	cholesterol biosynthetic process
GO:0009266	231	1	25	26	response to temperature stimulus
GO:0006508	531	0	26	26	proteolysis
GO:0055086	153	0	15	15	nucleobase, nucleoside and nucleotide metabolic process
GO:0009144	32	0	5	5	purine nucleoside triphosphate metabolic process
GO:0009987	6637	12	210	222	cellular process
GO:0000956	14	0	3	3	nuclear-transcribed mRNA catabolic process
GO:0043632	194	0	11	11	modification-dependent macromolecule catabolic process
GO:0044265	323	0	32	32	cellular macromolecule catabolic process
GO:0000087	39	0	5	5	M phase of mitotic cell cycle
GO:0042819	5	0	2	2	vitamin B6 biosynthetic process
GO:0045860	13	0	3	3	positive regulation of protein kinase activity
GO:0045333	22	0	4	4	cellular respiration
GO:0009250	36	0	4	4	glucan biosynthetic process

GO ID ^z	Total ^y	Under ^x	Over ^w	Change ^v	Term
GO:0009411	40	0	5	5	response to UV
GO:0010224	21	0	4	4	response to UV-B
GO:0006108	12	0	4	4	malate metabolic process
GO:0009057	355	1	34	35	macromolecule catabolic process
GO:0006721	73	0	6	6	terpenoid metabolic process
GO:0007126	43	2	3	5	meiosis
GO:0031667	50	0	5	5	response to nutrient levels
GO:0009150	49	0	6	6	purine ribonucleotide metabolic process

^zInterquartile range(IQR) of raw signal intensity

^yTotal gene number to Go term

^x2fold Down regulatied gene number to correspond GO term

^w2fold Up regulatied gene number to correspond GO term

^v2fold Up or Down regulation regulatied gene number to correspond GO term



(2) Cellular component

GO ID ^z	Total ^y	Under ^x	Over ^w	Change ^v	Term
GO:0005737	4034	7	160	167	cytoplasm
GO:0031143	6	1	2	3	pseudopodium
GO:0031252	10	1	2	3	leading edge
GO:0005816	13	0	4	4	spindle pole body
GO:0005945	7	0	2	2	6-phosphofructokinase complex
GO:0005886	365	1	16	17	plasma membrane
GO:0005881	11	0	3	3	cytoplasmic microtubule
GO:0044424	5359	11	182	193	intracellular part
GO:0005828	3	0	3	3	kinetochore microtubule
GO:0044446	1514	5	51	56	intracellular organelle part
GO:0005829	441	3	23	26	cytosol
GO:0033178	10	0	4	4	proton-transporting two-sector ATPase complex, catalytic domain
GO:0016020	2252	4	76	80	membrane
GO:0044422	1515	5	51	56	organelle part
GO:0043227	4391	4	145	149	membrane-bounded organelle
GO:0005759	46	0	5	5	mitochondrial matrix
GO:0016469	35	0	7	7	proton-transporting two-sector ATPase complex
GO:0005783	302	1	23	24	endoplasmic reticulum
GO:0000932	6	0	2	2	cytoplasmic mRNA processing body
GO:0005635	53	0	5	5	nuclear envelope
GO:0008540	13	0	3	3	proteasome regulatory particle, base subcomplex
GO:0031980	46	0	5	5	mitochondrial lumen
GO:0005622	5652	11	187	198	intracellular
GO:0000922	21	0	4	4	spindle pole
GO:0044430	151	2	11	13	cytoskeletal part
GO:0005739	801	0	47	47	mitochondrion
GO:0005758	6	0	2	2	mitochondrial intermembrane space
GO:0044437	61	0	8	8	vacuolar part
GO:0043234	983	1	35	36	protein complex
GO:0031224	626	2	29	31	intrinsic to membrane
GO:0045261	8	0	4	4	proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)
GO:0005856	174	2	13	15	cytoskeleton
GO:0005777	63	0	10	10	peroxisome
GO:0016021	463	2	22	24	integral to membrane
GO:0043226	4786	8	153	161	organelle
GO:0044444	3670	5	142	147	cytoplasmic part
GO:0031090	656	0	27	27	organelle membrane
GO:0005887	33	0	4	4	integral to plasma membrane
GO:0005880	3	0	3	3	nuclear microtubule
GO:0005623	8831	20	245	265	cell
GO:0005827	4	0	3	3	polar microtubule
GO:0031226	35	0	4	4	intrinsic to plasma membrane
GO:0031967	295	0	14	14	organelle envelope
GO:0045259	13	0	4	4	proton-transporting ATP synthase complex
GO:0043231	4387	4	145	149	intracellular membrane-bounded organelle
GO:0005753	8	0	4	4	mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex
GO:0031975	295	0	14	14	envelope
GO:0005773	100	0	12	12	vacuole
GO:0045298	13	1	7	8	tubulin complex
GO:0005874	42	1	8	9	microtubule
GO:0005838	28	0	4	4	proteasome regulatory particle
GO:0005815	26	0	4	4	microtubule organizing center
GO:0031970	7	0	2	2	organelle envelope lumen
GO:0022624	28	0	4	4	proteasome accessory complex

GO ID ^z	Total ^y	Under ^x	Over ^w	Change ^v	Term
GO:0015630	122	1	10	11	microtubule cytoskeleton
GO:0044464	8831	20	245	265	cell part
GO:0044425	917	2	39	41	membrane part
GO:0042579	63	0	10	10	microbody
GO:0005884	8	1	2	3	actin filament
GO:0043229	4786	8	153	161	intracellular organelle
GO:0044429	208	0	12	12	mitochondrial part
GO:0005819	49	0	5	5	spindle
GO:0005876	9	0	3	3	spindle microtubule
GO:0005774	58	0	8	8	vacuolar membrane
GO:0000275	6	0	4	4	mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)

^zInterquartile range(IQR) of raw signal intensity

^yTotal gene number to Go term

^x2fold Down regulated gene number to correspond GO term

^w2fold Up regulated gene number to correspond GO term

^v2fold Up or Down regulation regulated gene number to correspond GO term

(3) Molecular function

GO ID ^z	Total ^y	Under ^x	Over ^w	Change ^v	Term
GO:0008233	439	1	21	22	peptidase activity
GO:0015078	78	0	8	8	hydrogen ion transmembrane transporter activity
GO:0003924	47	0	6	6	GTPase activity
GO:0000287	39	0	6	6	magnesium ion binding
GO:0015075	450	1	19	20	ion transmembrane transporter activity
GO:0016872	9	0	3	3	intramolecular lyase activity
GO:0017111	441	0	24	24	nucleoside-triphosphatase activity
GO:0008135	131	0	10	10	translation factor activity, nucleic acid binding
GO:0048040	7	1	1	2	UDP-glucuronate decarboxylase activity
GO:0016903	58	0	5	5	oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors
GO:0008234	92	1	8	9	cysteine-type peptidase activity
GO:0016614	124	0	16	16	oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors
GO:0016652	6	0	4	4	oxidoreductase activity, acting on NADH or NADPH, NAD or NADP as acceptor
GO:0004345	6	0	3	3	glucose-6-phosphate dehydrogenase activity
GO:0004470	7	0	4	4	malic enzyme activity
GO:0016818	471	0	25	25	hydrolase activity, acting on acid anhydrides, in phosphorus-containing anhydrides
GO:0016740	2110	2	66	68	transferase activity
GO:0004096	3	0	3	3	catalase activity
GO:0050661	6	0	2	2	NADP binding
GO:0032555	757	1	30	31	purine ribonucleotide binding
GO:0017022	8	1	2	3	myosin binding
GO:0003872	7	0	2	2	6-phosphofructokinase activity
GO:0045182	132	0	10	10	translation regulator activity
GO:0016746	182	1	11	12	transferase activity, transferring acyl groups
GO:0032553	757	1	30	31	ribonucleotide binding
GO:0016830	96	1	6	7	carbon-carbon lyase activity
GO:0050897	3	0	2	2	cobalt ion binding
GO:0030554	624	1	24	25	adenyl nucleotide binding
GO:0016615	15	0	4	4	malate dehydrogenase activity
GO:0046912	15	0	3	3	transferase activity, transferring acyl groups, acyl groups converted into alkyl on transfer
GO:0004681	12	0	3	3	casein kinase I activity
GO:0046527	80	0	6	6	glucosyltransferase activity
GO:0004616	8	0	3	3	phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating) activity
GO:0016853	154	1	13	14	isomerase activity
GO:0051082	102	0	14	14	unfolded protein binding
GO:0004420	3	0	2	2	hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH) activity
GO:0003746	31	0	6	6	translation elongation factor activity
GO:0050284	4	0	4	4	sinapate 1-glucosyltransferase activity
GO:0008324	326	1	17	18	cation transmembrane transporter activity
GO:0004021	3	0	3	3	alanine transaminase activity
GO:0003824	6084	10	195	205	catalytic activity
GO:0004473	5	0	2	2	malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating) (NADP+) activity
GO:0016831	54	1	5	6	carboxy-lyase activity
GO:0032559	587	1	24	25	adenyl ribonucleotide binding
GO:0004108	4	0	3	3	citrate (Si)-synthase activity
GO:0004802	3	0	2	2	transketolase activity
GO:0016624	13	0	3	3	oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, disulfide as acceptor
GO:0005524	578	1	24	25	ATP binding

GO ID ^z	Total ^y	Under ^x	Over ^w	Change ^v	Term
GO:0004743	12	0	3	3	pyruvate kinase activity
GO:0004619	4	0	2	2	phosphoglycerate mutase activity
GO:0004739	5	0	2	2	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) activity
GO:0005507	91	0	7	7	copper ion binding
GO:0016462	469	0	25	25	pyrophosphatase activity
GO:0003988	3	0	2	2	acetyl-CoA C-acyltransferase activity
GO:0022890	156	1	9	10	inorganic cation transmembrane transporter activity
GO:0017076	795	1	30	31	purine nucleotide binding
GO:0003723	347	1	17	18	RNA binding
GO:0016868	9	0	4	4	intramolecular transferase activity, phosphotransferases
GO:0004512	3	0	3	3	inositol-3-phosphate synthase activity
GO:0003979	4	0	2	2	UDP-glucose 6-dehydrogenase activity
GO:0016597	21	0	4	4	amino acid binding
GO:0015077	100	0	9	9	monovalent inorganic cation transmembrane transporter activity
GO:0046933	26	0	8	8	hydrogen ion transporting ATP synthase activity, rotational mechanism
GO:0010178	7	0	3	3	IAA-amino acid conjugate hydrolase activity
GO:0004222	39	0	4	4	metalloendopeptidase activity
GO:0016653	7	0	2	2	oxidoreductase activity, acting on NADH or NADPH, heme protein as acceptor
GO:0008237	72	0	6	6	metallopeptidase activity
GO:0004478	4	0	2	2	methionine adenosyltransferase activity
GO:0016491	951	1	35	36	oxidoreductase activity
GO:0004175	195	0	12	12	endopeptidase activity
GO:0004618	3	0	2	2	phosphoglycerate kinase activity
GO:0016817	473	0	26	26	hydrolase activity, acting on acid anhydrides
GO:0016787	2075	4	69	73	hydrolase activity
GO:0005515	1695	1	60	61	protein binding
GO:0016887	364	0	17	17	ATPase activity
GO:0003958	4	0	2	2	NADPH-hemoprotein reductase activity
GO:0016616	103	0	14	14	oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor
GO:0035251	45	0	5	5	UDP-glucosyltransferase activity
GO:0004738	6	0	2	2	pyruvate dehydrogenase activity
GO:0016866	24	0	4	4	intramolecular transferase activity
GO:0004680	19	0	3	3	casein kinase activity
GO:0016651	55	0	7	7	oxidoreductase activity, acting on NADH or NADPH
GO:0004143	9	0	3	3	diacylglycerol kinase activity
GO:0003997	7	0	2	2	acyl-CoA oxidase activity
GO:0043176	21	0	4	4	amine binding
GO:0005200	39	2	10	12	structural constituent of cytoskeleton
GO:0016860	28	0	4	4	intramolecular oxidoreductase activity

^zInterquartile range(IQR) of raw signal intensity

^yTotal gene number to Go term

^x2fold Down regulatied gene number to correspond GO term

^w2fold Up regulatied gene number to correspond GO term

^v2fold Up or Down regulation regulatied gene number to correspond GO term

Table 5. Molecular pathway analysis.

Seq-id	TAIR	UP-Down	pathway	EC	Enzyme name
CITRUS 0034752	AT1G 74260	1	biosynthesis of purine nucleotides	6.3.5.3	phosphoribosylformylglyc inamidine synthase
CITRUS 0036402	AT2G 38700	1	mevalonate pathway	4.1.1.33	mevalonate diphosphate decarboxylase
CITRUS 0043345	AT2G 04350	1	acyl-CoA synthetase pathway	6.2.1.3	long-chain-fatty-acid-CoA ligase



Table 6. TF(Transcription factor) analysis.

TF up regulation

SEQ ID	pfam ID	pfam abb.	Description
CITRUS 0000948	pfam09310	PD-C2-AF1	POU domain, class 2, associating factor 1
CITRUS 0005000	pfam03514	GRAS	GRAS family transcription factor
CITRUS 0018319	pfam00447	HSF_DNA-bind	HSF-type DNA-binding
CITRUS 0019973	pfam04684	BAF1_ABF1	BAF1 / ABF1 chromatin reorganising factor
CITRUS 0022779	pfam08347	CTNNB1 _binding	N-terminal CTNNB1 binding
CITRUS 0023906	pfam05368	NmrA	NmrA-like family
CITRUS 0024966	pfam02365	NAM	No apical meristem (NAM) protein
CITRUS 0030871	pfam03514	GRAS	GRAS family transcription factor
CITRUS 0045222	pfam05624	LISCH7	LISCH7. This family consists of mammalian LISCH7 protein homologues.
CITRUS 0050278	pfam02309	AUX_IAA	AUX/IAA family
CITRUS 0051321	pfam07777	MFMR	G-box binding protein MFMR

TF down regulation

SEQ ID	pfam ID	pfam abb.	Description
CITRUS 0017825	pfam03514	GRAS	GRAS family transcription factor
CITRUS 0022854	pfam09310	PD-C2-AF1	POU domain, class 2, associating factor 1
CITRUS 0044530	pfam05764	YL1	YL1 nuclear protein
CITRUS 0066144	pfam01398	Mov34	Mov34/MPN/PAD-1 family

2. MDDX Molecular cloning and sequence analysis of Miyagawa wasse

궁천조생 일반 과실과 돌연변이 과실의 Molecular cloning을 통해 전체 open reading frame (ORF) 를 포함하는 유전자를 확보하였다 (Fig. 7). 염기서열 분석 결과 일반 과실과 돌연변이 과실의 MDDX 유전자 상동성이 일치 하였으며, 궁천조생의 MDDX 유전자는 coding region 이 1,263bp 이며, 420개의 아미노산을 coding 하였다 (Fig. 8). MDDX 유전자의 게놈 내에서의 구조를 분석하기 위해 게놈 유전자은행으로부터 해당 DNA를 분리하여 염기서열을 분석하였다. 분리된 게놈의 크기는 3,731 bp로서, 크기가 210bp, 199bp, 64bp, 64bp, 81bp, 87bp, 158bp, 49bp, 125bp, 226bp 인 10개의 exon과 양말단의 인접 부위가 GT/AG 규칙에 일치하는 186bp, 130bp, 164bp, 96bp, 642bp, 313bp, 88bp, 687bp, 162bp인 9개의 intron으로 이루어진 유전자로 구성 되어있었다 (Fig. 9). MDDX 유전자의 염기서열은 *Hevea brasiliensis* (AF429386), *Arabidopsis thaliana* (AK228357), *Panax ginseng* (GQ455989), *Solanum lycopersicum* (EU216564), *Arnebia euchroma* (DQ631830), *Ginkgo biloba* (AY757921) 등의 MDDX 유전자와 nucleotide level 에서 각각 81, 80, 78, 75, 74, 73% 동일하였으며, amino acid level 에서도 역시 같은 수치의 유사성을 나타냈다 (Fig. 10). 감귤에서 MDDX 유전자는 아직까지 전체 게놈이 밝혀지지 않았으며, 본 연구에서 처음으로 MDDX 유전자의 게놈 genomic clone과 cDNA clone을 확보하였다. 이러한 결과는 앞으로 sense 및 antisense MDDX 유전자를 제작하여 이를 감귤 세포내로 도입함으로써 isoprenoids를 과 발현 또는 억제 시키는 형질 전환 감귤 식물체를 만드는데 중요한 기초자료가 될 것이라 생각된다.

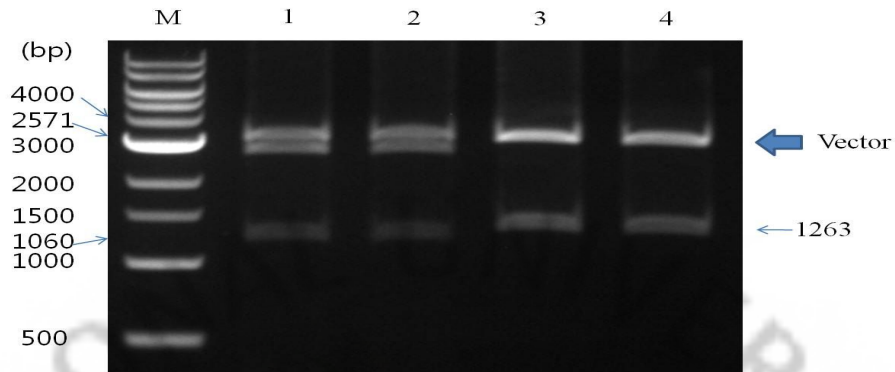


Fig. 7. MDDX genomic DNA and cDNA fragment subcloning. The PCR products of MDDX were subcloned into pGEM-T easy vector. The plasmids for MDDX digested with *EcoRI*, and then electrophoresed onto agarose gel. Lane: 1. Control MDDX genomic DNA clone. 2. Mutant MDDX genomic DNA clone. 3. Control MDDX cDNA clone. 4. Mutant MDDX cDNA clone.

1 ATGGCGGCGGAGAAATGGGTAAGTACTGATGGTGACGGCGCAGACGCCGACGAACATAGCTGTG
M A A G L T V L M V T A G T P T A I A V
61 ATAAAGTACTGGGGGAAGCGAGACGAAACCCTAATTTTGCCTGTCAATGATAGCATCAGC
I L T T G L A A G T L I L P V A A S I S
121 GTCACCCTTGATCCCGATCACCTCTGTACTACCACGACCGTTGCCGTCAGTCCTAGCTTT
V T L A P A H L C T T T T V A V S P S P
181 GACCAAGATCGTATGTGGCTCAATGGCAAAGAAATTTCTCTTGGAGGGGGAAGGTACCAG
A G A A M T L A G L G T S L G G G A T G
241 AATTGTTTGAAGGAAATTCGGAGTCGTGCTTGTGATGTTGAGGACAAGGAGAAAGGGATC
A C L L G I A S A A C A V G A L G L G I
301 AAGATTGAGAAGAAGGACTGGCAGAAATTGCATTTACACATTGCTTCGTTAACAATTTT
L I G L L A T G L L H L H I A S P A A P
361 CCGACGGCCGCTGGATTGGCTTCCTCTGCTGCTGGTTTTTGCCTGCCTGTTTTTTCCTG
P T A A G L A S S A A G P A C L V P S L
421 GCTAAGCTGATGAATTTGAAAGAAAATCAGAGCCAGCTTTCTGCTATAGCTAGGCAAGGT
A L L M A L L G A G S G L S A I A A G G
481 TCAGGCAGTGCTGTGCTAGTCTGTTTGGTGGATTGTCAAGTGGATAATGGGAAAAGAA
S G S A C A S L P G G P V L T I M G L G
541 GGAAATGGAAGTGACAGCCTTGCAGTTCAACTTGTGATGAAGAGCACTGGAATGATCTT
G A G S A S L A V G L V A G G H T A A L
601 GTTATTATTATTGCTGTGGTGAAGTTCACGGCAGAAGGAAACAAGTAGCACCACAGGAATG
V I I I A V V S S A G L G T S S T T G M
661 CGTGAGAGTGTGAAACAAGTTTGTCTTTACAACATAGAGCAAAGGAAGTTGTGCCAAAA
A G S V G T S L L L G H A A L G V V P L
721 CGGATAGTACAAATGGAAGAAGCCATCCAAAATCATGATTTTTCGCTCTTTGCACAATTG
A I V G M G G A I G A H A P S S P A G L
781 ACCTGTGCTGATAGTAATCAATTTTCATGCGTTTGTGCTGGATACATCTCCCAATATTT
T C A A S A G P H A V C L A T S P P I P
841 TACATGAATGATACATCCCACAGAATTATCAGCTATGTTGAAAGATGGAATCGTTCCGTG
T M A A T S H A I I S T V G A T A A S V
901 GGATCACCTCAGGTGGCATATACTTTTGTGCTGGGCCTAATGCTGTTCTGATCGCTCGT
G S P G V A T T P A A G P A A V L I A A
961 AATAGAAAGATTGCTACCGAATTGCTTCAGAGGCTACTTTTCTTTTCCACCAAATCA
A A L I A T G L L G A L L P P P P P A S
1021 GAAACAGACCTGAACAGTTATGTTCTTGGTGATAAATCAATCCTACGTGATGCTGGTATT
G T A L A S T V L G A L S I L A A A G I
1081 GATGGGATGAAAGATATAGAAGCTTTGCCACTACCTCTGAAATTAACAACATATCAGCG
A G M L A I G A L P L P P G I A A I S A
1141 CAGAAATATTCAGGGGATGTCAATTATTTTATCTGTACAAGACCAGGTGGAGGTCTGTT
G L T S G A V A T P I C T A P G G G P V
1201 TTGCTTTCTGATGACAGTAAGGCTCTTCTCAACCCAAAAGTGGTTTGCCTAAGGAAGCT
L L S A A S L A L L A P L S G L P L G A
1261 TAG

★

Fig. 8. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence for the MDDX cDNA clones isolated from Miyagawa wase.

1 ATGGCGGCGG AGAAATGGGT ACTGATGGTG ACGGCGCAGA CGCCGACGAA CATAGCTGTG
61 ATAAAGTACT GGGGGAAGCG AGACGAAACC CTAATTTTGC CTGTCAATGA TAGCATCAGC
121 GTCACCCTTG ATCCCGATCA CCTCTGTACT ACCACGACCG TTGCCGTCAG TCCTAGCTTT
181 GACCAAGATC GTATGTGGCT CAATGGCAAA gtataat ttt tacgctatat ttactat ttt
241 ttcgacattt tttat tttat ttaaacatt tcggaaattg tgataattta aaaatttaa
301 ttaaattaaa ttaacttttt ttaaaaaatt ttttgctcgg taacttaata tggatcttag
361 cttgtagatt aacctgtga ttgctgatta gcgt agGAAA TTTCTCTGG AGGGGAAGG
421 TACCAGAATT GTTTGAAGGA AATTCGGAGT CGTGCTGTG ATGTTGAGGA CAAGGAGAAA
481 GGGATCAAGA TTGAGAAGAA GGA CTGGCAG AAATTGCATT TACACATTGC TTCGTTAAC
541 AATTTTCCGA CGGCCGCTGG ATTGGCTTCC TCTGCTGCTG GTTTTGCCTG CCTTgtaat
601 attgttgatt ttattaacca aatgctatct atttatgat ttataagctt ttgtttcaaa
661 agaaagt ttt tagggattat cgtggtatat tgttctttt ttttctttt ttgggtttta
721 tgcagTTTT TCACTGGCTA AGCTGATGAA TTTGAAAGAA AATCAGAGCC AGCTTTCTGC
781 TATAGCTAGg taattagat gtctggttta attggcataa ctttcttct ttcgagttgc
841 ttgatctgaa atggtatttg tgtgatttg atcttgatc atcatagcat ccatataaca
901 gagaatcaag aatgctagt gttcatatat atat tttcct ttttctgatc cagGCAAGGT
961 TCAGGCAGTG CTTGTCGTAG TCTGTTGGT GGATTGTCA AGTGGATAAT GGGAAAAgta
1021 tgttatatat atatgtatat atagctatgt tcagtcctgc ttttgaggtt tattttcacg
1081 tagetaatgt tagtgccttc tcaacatctc cagGAAGGAA ATGGAAGTGA CAGCCTTGCA
1141 GTTCAACTTG TTGATGAAGA GCACTGGAAT GATCTTGTTA TTATTATTGC TGTGgtatgt
1201 acttatgatc ttgttattgt tattgcttct agtgetgtaa tttatttate ttttctaaaa
1261 tacgaacagc catagcattt ttaagtggg tttaggttgt tctgttcccc tcttcaatt
1321 gcattttttg attgcattct gaagtgttta cttgattcac tggtagaaag cttttgaatt
1381 tattatgtgg atcatccagc gatagctgta ctttat tttc ttagaaactg agacacagtg
1441 aactttaatg gaccctaaa tgtaggttat gttgatccta atgtgttggg ccaacactgc
1501 aactgacat gattcaagtt agatatgtgc agtcaattta ttattgctat tctgtcttgt
1561 tttgacctat tgatttgatg aggttgctaa gtgtttgctg cgagaacagc tcaaataca
1621 atat ttttac aaaatattta atgttgtaat tcgtaataat gctattgatt tgatgaggtt
1681 gctaagtgtt tgctgcaact acagcttcaa atataatatt tttacaaaat atttaagtgt
1741 ataattcgta ataagcagtt catgtggaac ctttctgtt atggttcttc tgtgcccctt
1801 taactttgtg ctcttatttt attttttcg ttttagGTGA GTTCACGGCA GAAGGAAACA
1861 AGTAGACCA CAGGAATGCG TGAGAGTGTG GAAACAAGTT TGCTTTTACA ACATAGAGCA
1921 AAGgtacaat ttctcatcct gagtgattgt cttgaagata ttggcagttg ctacaacaac
1981 tgaggtgttt gggttcaaga agtgcaggc tcatttcttg taatcattcg agataatgat
2041 ataatgaaat tccaggtgt tcttggtggg aaagt tttct gcaaattat tttttattt
2101 ttctat tttt ttattttggt ctttttctt gaggccattt tttcttttaa cttaattatt
2161 tatcgaaact ttagt tttgt tcaaaagtgt tttattgtct gtgatgattt cttttgtgct
2221 ttggaccata atat agGAAG TTGTGCCAAA ACGGATAGTA CAAATGGAAG AAGCCATCCA
2281 AAATCATGAT TTTTCGTCTT TTGCACAATT GACCTGTGCT GATAGTAATC AATTCATGC
2341 GGTTTGCTTG GATACATCTC CCCC AATATT TTACATGAAT GATACATCCC ACAGgt aagt
2401 cctaatgtat gtttgtttgt ttattcgctt attcatcttc ttcactactt tggttgatta
2461 ttgatttgca aacttgtttc agAATTATCA GCTATGTTGA AAGATGGAAT CGTCCGTGG
2521 GATCACCTCA Ggtttgttca ttttttgcaa cgttatctgg gaggtgttat gaattctgtc

2581 atttaaaaca ttttttggtt ctgtctatct tgagtgcttc cgccagagaa aattcttata
2641 tatcctttcc ctgaaagttg cctcatatgg ctttctcatt ctatctcaat ttgttttcaa
2701 taatgaattt gtacctctgt ggctaatact ttcccacca atcagaagag aagatagtaa
2761 gttgatgttg aattagaaaa tcattttctg ggattggatt gagctctctc acgtaagtcc
2821 aagatttgag ttgagtgatt atgccctttg gcatgtatca agtggccaag ggtttattcc
2881 cccttggggc cacctactct ggatataata tctcgttatt gttgtcatgg atactgagat
2941 gataggatct ggtaatagcc ctcaatttca cactttgtta actcccaaga aaggctaggg
3001 gtcttgagat tgaagaaaa agagagttga gctcgccgc ctggcccatc atcaacataa
3061 tgtaaatata ctagcttcac tatcattttt cattttgttt cctctgtata gatattagat
3121 aagtagttat atagaaatcc agtgcctgaa aattgatatg tgctcgaaat tatgctggtt
3181 attgaaatat tttgacttag acaaaataaa tcttatagGT GGCATATACT TTTGATGCTG
3241 GGCCTAATGC TGGTCTGATC GCTCGTAATA GAAAGATTGC TACCGAATTG CTTCAGAGGC
3301 TACTTTTCTT TTTCCACCA AACTCAGAAA CAGACCTGAA CAGgt aattg gtatttggtt
3361 gttaaagtct tgagagaata cagcactggt ctttaacagt acaagatata ttaaagggat
3421 ttgggtgcat catccttttg gataacttat ttcagtgtat tttcttctaa tcatttgcgt
3481 tttcatttac tttcttatg tctagTTATG TTCTTGGTGA TAAATCAATC CTACGTGATG
3541 CTGGTATTGA TGGGATGAAA GATATAGAAG CTTTGCCACT ACCTCCTGAA ATTAACAACA
3601 TATCAGCGCA GAAATATTCA GGGGATGTCA ATTATTTTAT CTGTACAAGA CCAGGTGGAG
3661 GTCCTGTTTT GCTTTCTGAT GACAGTAAGG CTCTTCTCAA CCCCAAAAGT GGTTTGCTA
3721 AGGAAGCTTA G

Fig. 9. Nucleotide sequence for the MDDX genomic clone of Miyagawa
wase.

```

Solanum_lycopersicum --MAEQSKKWLIMVTAQTPNTIAV IKYWGKRDENLILAINDSISVTLDP AHLCTTTTVA
Arnebia_euchroma ---MGQGENWILMVT AQTPNTIAV IKYWGKRDESLILPINDSISVTLDP SHLCTTTTVS
Panax_ginseng -----MAESWVIMVTAQTPNTIAV IKYWGKRDETLILPINDSIRVSLDPDHLCTTTTVS
Hevea_brasiliensis -----MAESWVIMVTAQTPNTIAV IKYWGKRDEKLILPINDSISVTLDP AHLCTTTTVA
Arabidopsis_thaliana -----MAEEKWVIMVTAQTPNTIAV IKYWGKRDEVRILPINDSISVTLDPDHLCTTTTVA
Ginkgo_biloba MSGQRELNWVIMVTAQTPNTIAV IKYWGKRDEKLILPINDSISVTLDPDHL SATTTVA
Citrus -----MAAGLTVLMVTAGTPTAIAVILTTGLAAGTLILPVAASISVTLAP AHLCTTTTVA
          **** * **** * ** * * * * *

Solanum_lycopersicum VSPSFQQRDMWLNKKEISLDGARYQNCLREIRARANDYEDEKKG I KISKNDWQNLHVHID
Arnebia_euchroma VSPSFQQRDMWLNKKEISLDGARYQNCLREIRARANDYEDEKKG I KISKNDWQNLHVHIA
Panax_ginseng VSPSFQQRDMWLNKKEISLDGARYQNCLREIRARANDYEDEKKG I KISKNDWQNLHVHIA
Hevea_brasiliensis VSPSFQQRDMWLNKKEISLDGARYQNCLREIRARANDYEDEKKG I KISKNDWQNLHVHIA
Arabidopsis_thaliana VSPSFQQRDMWLNKKEISLDGARYQNCLREIRARANDYEDEKKG I KISKNDWQNLHVHIA
Ginkgo_biloba VSPSFQQRDMWLNKKEISLDGARYQNCLREIRARANDYEDEKKG I KISKNDWQNLHVHIA
Citrus VSPSPGAAAMTLAGLGTSLGGGATGACLLGISAACAVGALGLGILGLLATGLLHLHIA
          * * * * *

Solanum_lycopersicum SYNPFPTAAGLASSAAGFACLVFSLAKLMNVQEDNG-RLSAIARQSGSACRSLFGGFVK
Arnebia_euchroma SYNPFPTAAGLASSAAGFACLVFSLAKLMNVQEDNG-QLSAIARQSGSACRSLFGGFVK
Panax_ginseng SYNPFPTAAGLASSAAGLACFVFLAKLLTLQEDNG-QLSAIARQSGSACRSLFGGFVK
Hevea_brasiliensis SYNPFPTAAGLASSAAGFACLVFSLAKLMNVQEDNG-ELSAIARQSGSACRSLFGGFVK
Arabidopsis_thaliana SHNPFPTAAGLASSAAGFACLVFSLAKLMNVQEDPS-QLSAIARQSGSACRSLFGGFVK
Ginkgo_biloba SHNPFPTAAGLASSAAGFACLVFSLAKLMNVQEDPS-QLSAIARQSGSACRSLFGGFVK
Citrus SPAAPPTAAGLASSAAGFACLVFSLAKLMNVQEDPS-GLSAIARQSGSACRSLFGGFVK
          * * * * *

Solanum_lycopersicum WVMGKEEDGSDSIAVPLADEKHWDLVIIIAVVSROKETSSTSGMRETVVTSALIDHRA
Arnebia_euchroma WVMGKEEDGSDSIAVPLADEKHWDLVIIIAVVSROKETSSTSGMRETVVTSALIDHRA
Panax_ginseng WIMGKEENGSDSIAVPLADEKHWDLVIIIAVVSROKETSSTSGMRETVVTSALIDHRA
Hevea_brasiliensis WVMGKEEDGSDSIAVPLADEKHWDLVIIIAVVSROKETSSTSGMRETVVTSALIDHRA
Arabidopsis_thaliana WVMGKEEDGSDSIAVPLADEKHWDLVIIIAVVSROKETSSTSGMRETVVTSALIDHRA
Ginkgo_biloba WDMGKERDSDSIAVPLADEKHWDLVIIIAVVSROKETSSTSGMRETVVTSALIDHRA
Citrus TIMGLGGAGSASLAVGLVAGGHTAALVIIIAVVSROKETSSTSGMRETVVTSALIDHRA
          * * * * *

Solanum_lycopersicum KEVVPKRIVQMEEAIQNRDFTFAQLTCSDSNQFHAVCMDTSPPIFYMNDTSHRVIISCVE
Arnebia_euchroma KEVVPKRIVQMEEAISNRDFTFAHLTCSDSNQFHAVCLDTSPPIFYMNDTSHRIISLVE
Panax_ginseng KEVVPKRIQMEDAIEKRDFPFAFLACADSNQFHAVCLDTSPPIFYINDTSHKIIISCVE
Hevea_brasiliensis KEIVPKRIVQMEESAIKNRDFTFAHLTCSDSNQFHAVCMDTSPPIFYMNDTSHRIISCVE
Arabidopsis_thaliana KEVVPKRIQMEEAISNRDFTFAHLTCSDSNQFHAVCMDTSPPIFYMNDTSHRIISLVE
Ginkgo_biloba QEVVPKRIVQMEEAIAHNDFAFARITCVDSNQFHAVCLDTSPPIFYMNDTSHRIISLVE
Citrus LGVVPKRIVQMEEAIAHNDFAFARITCVDSNQFHAVCLDTSPPIFYMNDTSHRIISLVE
          * * * * *

Solanum_lycopersicum KWNRAEGTPQVAYTFDAGPNAVLIARNRKAATLMLQRLLFHFPNSDSDLDSYVIGDKSI
Arnebia_euchroma KWNRAEGTPQVAYTFDAGPNAVLIARNRKAATLMLQRLLFHFPNSDSDLDSYVIGDKSI
Panax_ginseng KWNRSVGTQVAYTFDAGPNAVLIARDRKAALLRRLLFHFPNSDSDLDSYVIGDKSI
Hevea_brasiliensis KWNRSVGTQVAYTFDAGPNAVLIARNRKAATLMLQRLLFHFPNSDSDLDSYVIGDKSI
Arabidopsis_thaliana KWNRSVGTQVAYTFDAGPNAVLIARNRKAATLMLQRLLFHFPNSDSDLDSYVIGDKSI
Ginkgo_biloba KWNRSVGTQVAYTFDAGPNAVLIARNRKAATLMLQRLLFHFPNSDSDLDSYVIGDKSI
Citrus ATAAVSGSPGVATPAAGPAVLIATAALATGLLQALLPPPPASGTALASTVLGALSI
          * * * * *

Solanum_lycopersicum LKDAGIKDLNDIEALPPPEIKDKVPAQKCKGEISYFICTRPGRGPVLLPDESQALLCLE
Arnebia_euchroma LKEAGVGTMDNDIALAPPPELTSVPAQRKGDVSYFICTRPGRGPVLLPDESQALLCLE
Panax_ginseng LQDVGVDTKDIEALPPPEIKDNIPAKNSGQVSYFICTRPGRGPVLLPDESQALLCLE
Hevea_brasiliensis LKDAGIKDLNDIEALPPPEIKDAP---RYKGDVSYFICTRPGRGPVLLPDESQALLCLE
Arabidopsis_thaliana VKEAGLEG-----ELPOGKDKIGSQDQKGEVSYFICTRPGRGPVLLPDESQALLCLE
Ginkgo_biloba LGEIQLKSMKDVESL IAPPEFRSQNSSIHPGEVDYFICTRPGRGPVLLPDESQALLCLE
Citrus LAAAGIAGMLAIGALPLPP-GIAAI SAGLTS GAVATP ICTAPGGGPVLLSAASLALLAPL
          * * * * *

Solanum_lycopersicum TGLPK----
Arnebia_euchroma TGLPK----
Panax_ginseng TGLPK----
Hevea_brasiliensis TGLPK----
Arabidopsis_thaliana TGLPK----
Ginkgo_biloba TGFPFRISET
Citrus SGLPLGA---
          * *

```

Fig. 10. Alignment of deduced amino acid sequences of MDDX isolated from various species. Multiple sequence alignment was done with cDNA encoding MDDX, including *Hevea brasiliensis* (AF429386), *Arabidopsis thaliana* (AK228357), *Panax ginseng* (GQ455989), *Solanum lycopersicum* (EU216564), *Arnebia euchroma* (DQ631830), *Ginkgo biloba* (AY757921). Names are GenBank accession numbers. Stars (*) represent the perfectly matched amino acids. This alignment was generated by Clustal W.

3. Quantitative real-time PCR analysis

MDDX 유전자의 시기별 발현 특성 연구를 위해 궁천조생 일반과실과 돌연변이 과실을 발달 단계별로 total RNA를 추출하였고(Fig. 11), qRT-PCR 분석을 수행하여 Mevalonate diphosphate decarboxylase (MDDX)의 발현 차이를 확인하였다 (Fig. 12). 돌연변이 과실에서 유전자의 시기별 발현량의 차이가 일반 과실과 비교하여 cycle threshold (2^{-C_T}) 값이 최소 0.0005에서 최대 0.18까지 증가하는 것으로 확인되었다. C_T 값이 증가하는 것은 유전자의 발현이 작은 것을 의미한다. 돌연변이 과실에서 MDDX 유전자의 발현량은 만개 후 30일, 60일, 90일, 120일, 150일, 180일, 210일에 각각 0.8배, 0.9배, 1.3배, 1.4배, 2.4배, 1.3배, 1배 많았으며 궁천조생이 착색되는 시기인 개화 후 약 150일에 돌연변이에서 일반과실과 비교하여 MDDX 유전자가 과 발현됨을 확인하였다. 본 실험의 결과를 바탕으로 이후 궁천조생의 일반 과실과 돌연변이 과실의 MDDX 유전자의 시기별 발현 변화를 확인하기 위하여 Northern blot 분석을 수행하였다.

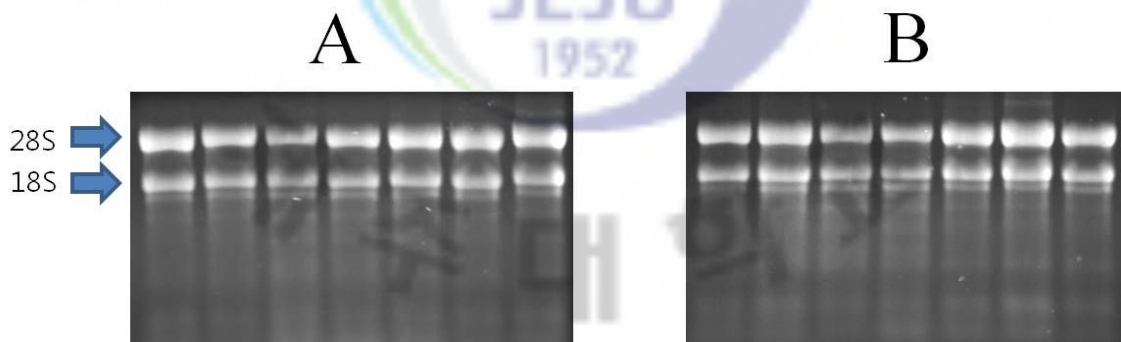


Fig. 11. Total RNA extraction from Miyagawa wase fruits. A: wild type, B: mutant type

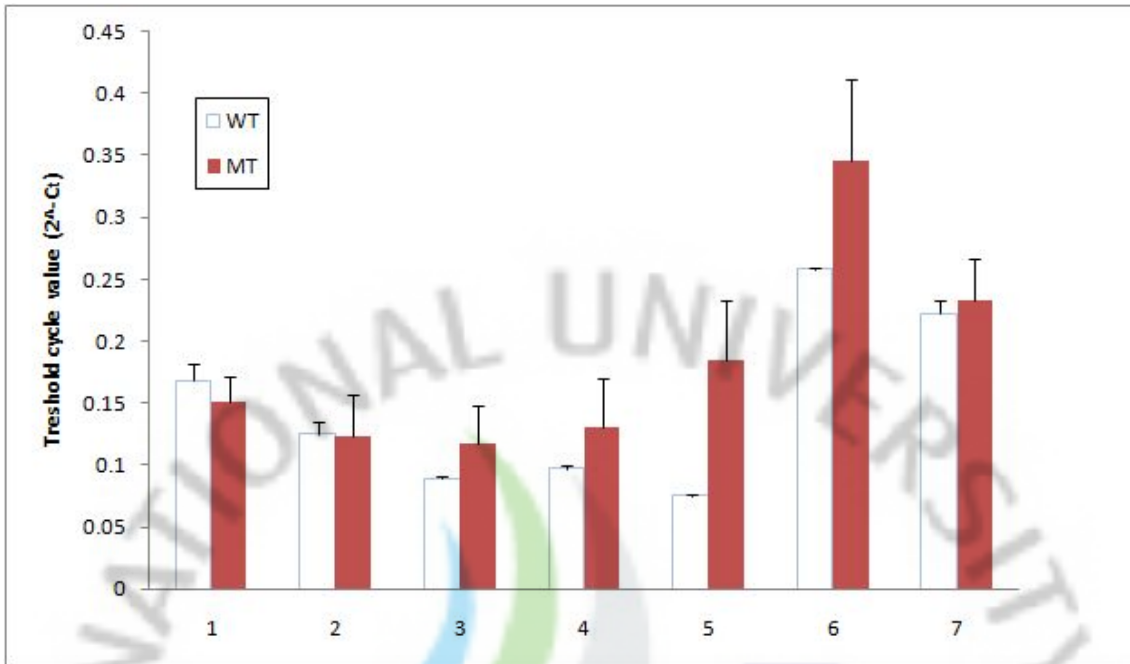


Fig. 12. Variation of cycle threshold (2^{-C_T}) of MDDX genes in wild type fruit and mutant type fruit of Miyagawa wase. Lane 1~7: The seven stages are 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 Day after flowering (DAF). Bar mean is standard deviation.

4. Northern blot analysis

MDDX 유전자의 발현 특성 연구를 위해 궁천조생 과실의 발달 단계별 total RNA를 추출하고 DIG-labeled MDDX DNA probe를 사용하여 northern blot 분석을 해본 결과 (Fig. 13) 에서 보는 바와 같이 MDDX 유전자는 만개 후 30일, 150일, 180일, 220일에서 발현이 되는 것을 볼 수가 있었다. 만개 후 control와 mutant에서 30일에 각각 MDDX 유전자가 발현 되었으며, 150일 전까지는 거의 발현 되지 않다가 150일경에 mutant에서 먼저 MDDX가 발현 되었고, control에서는 180일부터 발현되기 시작하였다. MDDX 유전자가 돌연변이 과실에서 성숙 단계별 유전자의 발현량이 다른 것을 확인 하였다. 감귤 과피는 생육초기인 6월에 가장 두꺼우며, 그 이후 점진적으로 감소 하다가 9월에 제 2의 극대치를 보인다. 제 2의 극대치를 나타내는 것은 7,8월 고온기에 세포분열에 의해 다시 증가 하고, 이후 과피가 점점 얇아진다 (Kim *et al.*, 1999). 정유 성분 또한 과피의 두께에 따라 함량이 변화 하며, MDDX 유전자의 발현량도 정유 성분의 함량 변화와 일치 하였다. 이는 효모에서 MDDX 유전자의 발현량이 증가 하면 sterols의 양이 증가 한다는 보고와 일치 하였으며 (Voynova *et al.*, 2008), 또한 고등 식물에서 MDDX 유전자의 발현량이 증가 하면 sterols, aromatic terpenoids 및 천연 고무의 양이 증가 한다는 보고로 보아 (Bach, 1995; Chappell, 1995) 돌연변이 궁천조생에서 약 30일 먼저 발현한 MDDX 유전자가 isoprenoids 먼저 합성 시켜 정유 성분 및 향기 성분 물질이 먼저 합성 되어 과피와 과육에 다량 축적되어 있을 것으로 생각된다. 일반적으로 감귤의 경우 색상이 붉어질수록 고향기의 감귤이 만들어 지는데 이는 시각적으로 좀 더 경쟁적으로 보일 수 있을 뿐만 아니라, 기존 궁천조생 보다 고향기의 고품질 감귤로 평가 받을 수 있을 것이다. 또한 정유 성분은 감귤 과피 flavedo층에 함유되어 있는 방향성분으로, 살균 (Dabbah and Edward, 1970), 살충 (Donpedro, 1996) 효과 등 생물활성을 가지고 있을 뿐만 아니라, 향료, 의약품 등에 이용 되고 있다 (Shaw, 1977). 정유의 주요 구성

성분인 d-limonene은 *Aspergillus parasiticus*의 성장과 aflatoxin 생성을 억제 한다고 보고되어 있다 (Alderman and Marth, 1976). 이러한 정유 성분의 전구체인 isoprenoids를 합성하는 MDDX 유전자의 과 발현은 정유 성분의 물질 함유량을 높일 수 있을 것으로 생각된다.

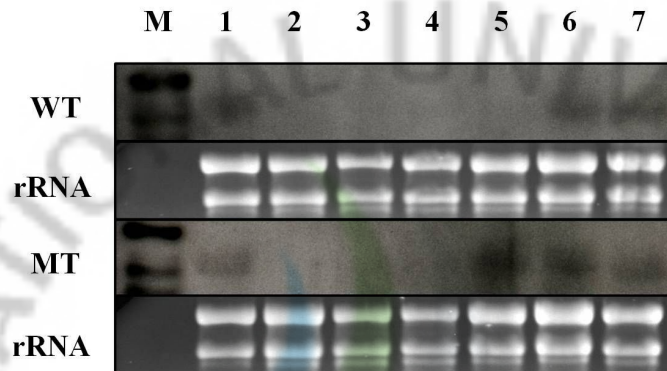


Fig. 13. Northern blot analysis of MDDX gene expression wild type and mutant. Lane 1~7: The seven stages are 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 Day after flowering (DAF).

5. Southern blot analysis

궁천 조생의 MDDX 유전자가 계놈 내에 존재하는 copy 수를 알아보기 위하여 southern blot 분석을 수행 하였다. MDDX 유전자는 *Hind*III 제한효소 위치는 646bp, 1369bp, 3,569bp, 및 3,725bp에 총 5개의 제한효소 구역을 가지고 있고, *Eco*RI 제한효소 위치는 2,572bp에 1개를 가지고 있으며, *Bam*HI 제한효소 구역은 가지고 있지 않다. *Eco*RI, *Hind*III 및 *Bam*HI 제한효소로 각각 처리된 궁천조생 일반 genomic DNA 와 돌연변이 genomic DNA에 433bp 부터 975bp까지 542bp로 디자인 되어진 southern probe를 혼성화 시킨 결과, MDDX 유전자가 646bp와 1,369bp *Hind*III 제한효소 구역이 잘리면서 probe가 3,600bp, 700bp 2개의 band로 나타났고, *Eco*RI과 *Bam*HI에서는 band가 1개만 나타난 것은 궁천조생의 MDDX 유전자는 계놈 내에 오직 한 개가 존재한다고 결론 내릴 수 있었으며, 계놈에서 일반 궁천조생과 돌연변이 궁천조생의 copy수는 차이가 없음을 알 수 있었다 (Fig. 14).

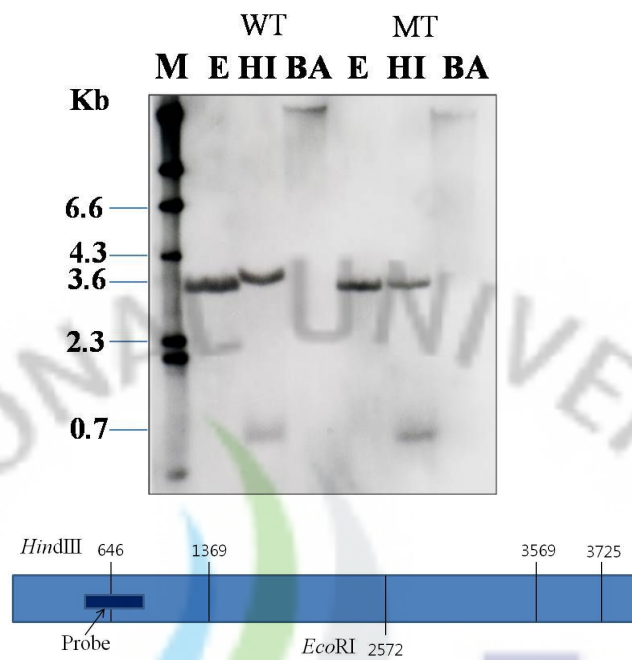


Fig. 14. Genomic Southern blot analysis of MDDX wild type and mutant. E: *Eco*RI. HI: *Hind*III, BA: *Bam*HI. Lane: 1~3 control, 3~6 mutant. Size marker (bp) are indicated on the left. Bar

6. Comparison analysis of fruit characteristics between Miyagawa wase wild type and mutant

궁천조생 일반과실과 돌연변이 성숙 과실의 외형 및 내형적 특성을 분석한 결과 (table. 7) 과실의 횡경, 종경, 무게, 과피 두께, 가용성 고형물 및 유기산 함량은 유의차 ($P < 0.025$)가 없었다. 과실의 과피와 과육의 착색도를 색차계를 사용 하여 궁천조생 일반 과실과 돌연변이 과실을 측정 한 결과 과육에서 L 값이 46.5 와 49.2 로 돌연변이 과실이 2.7 낮았으며, a값은 9.2와 7.0으로 2.2 높게 나타났고, b값은 22.6 과 16.0 으로 6.6 높게 나타났다 (table. 8). 과피의 L값은 60.9와 68.3으로 돌연변이 과피에서 7.4 낮게 나타났고, a값이 41.0 과 27.7로 13.3 높게 나타났고, b값은 57.3과 68.2로 10.9 낮게 나타났다. 과육과 과피의 값에 대하여 둘 간에 유의차가 있는지 검증하기 위해 t-test 분석을 해본 결과 과육의 a/b 값을 제외한 나머지는 모두 유의성이 있는 것으로 나타났다. 과피와 과육의 색도는 L값이 높을수록 더 밝고, a값이 높을수록 적색을 띄며, b값이 높을수록 황색을 띤다. 생과인 경우 색상에 따라 소비자의 선호도가 달라지기 때문에 , 궁천조생 돌연변이 과실의 경우 일반 과실에 비하여 좀 더 빨간색을 띄고 있으므로 일반 과실에 비하여 좀 더 경쟁적으로 보일 수 있을 것으로 생각 된다.

Table 7. Comparison analysis of fruit characteristics between Miyagaw wase wild type and mutant.

	Fruit height (mm)	Fruit width (mm)	Fruit weight (g)	Peel thickness (mm)	Soluble solids content (°Brix)	Titrateable acidity (%)
Muant	47.6±4.9	55.8±3.9	77.0±16.4	1.8±2.4	10.2±0.3	0.9±2.3
Control	44.5±3.0	54.9±4.3	73.1±16.7	2.4±0.2	10.0±0.3	1.4±0.1
t-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns

P<0.025(*), P<0.005(**), P<0.0005(***), ns: not significant.

Table 8. Comparison analysis of fruit hunter color value of peel and pulp between Miyagawa wase wild type and mutant.

	Pulp				peel			
	L	a	b	a/b	L	a	b	a/b
Mutant	46.5±2.2	9.2±1.3	22.6±2.7	0.4±0.0	60.9±1.6	41.0±3.0	57.3±1.2	0.7±0.0
Control	49.2±1.8	7.0±1.4	16.0±2.8	0.4±0.0	68.3±1.3	27.7±1.0	68.2±1.5	0.4±0.1
t-test	**	***	***	ns	***	***	***	***

P<0.025(*), P<0.005(**), P<0.0005(***), ns: not significant.

IV. SUMMARY (국문요약)

형질전환방법과 생명공학기술은 과수의 조기선발 및 품종개량에 이용할 수 있으며, 과수 육종 년 한의 단축과 경비의 절약으로 과수산업의 비약적인 발전을 기대할 수 있다. 이러한 생명공학기술을 이용하여 우수한 품질의 고기능, 고영양성의 감귤 품종을 육성하기 위해서는 먼저 우수한 기존 품종에 목적유전자를 선택적으로 도입할 수 있는 기술개발과 개발된 기술에 이용할 수 있는 다양한 유용 유전자의 확보가 필요하다.

고등 식물에서 이소프렌 (isoprene: C₅) 구조를 가지는 isopentenyl 5-phosphate (IPP)와 dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP)물질을 기본 단위로 만들어지는 isoprenoids는 약 22,000개가 넘는 다른 종류의 화합물이 있으며, 자연 생산물의 가장 큰 종류를 구성하고 있는 것 중 하나로 잘 알려져 있다. Isoprenoid는 막 구조 (sterols), 산화 환원 반응 (plastoquinone, ubiquinone), 성장 조절 (gibberellins, cytokinins, brassinosteroids, abscisic acid), 방어 기작 (phytoalexins) 그리고 자유 라디칼 제거 (carotenoid, tocopherols) 등의 필수적인 역할을 수행 한다. MDDX는 isopentenyl 5-diphosphate 생합성에 작용하는 효소로 mevalonate 5-diphosphate를 ATP와 Mg²⁺에 의존하여 탈카르복실화를 촉매 한다.

본 연구에서는 isoprenoids 생합성에 중요 효소인 MDDX 유전자의 발현 특성을 알아보고, 감귤 형질전환을 위한 유용 유전자를 확보하기 위하여 성숙 과정에 따른 시기별로 quantitative real-time PCR 및 northern blot 분석을 수행 하였으며, 게놈 DNA와 cDNA를 분리하여 MDDX 유전자의 open reading frame (ORF) 염기서열을 분석 하였다. 그리고 MDDX 유전자의 copy 수를 알아보기 위하여 southern blot 분석을 수행 하였다.

1. 궁천조생 품종의 가지변이에 의한 자연발생적 돌연변이에 유전자의 발현량 차이를 알아보기 위해서 성숙 과실에서 The Citrus 300K Microarray 분석

을 수행한 결과, 583개의 유전자들이 발현량에 차이를 보였으며, 515개의 유전자가 발현이 증가 되었고, 67개의 유전자가 발현이 감소하였다. 이 중 *Arabidopsis thaliana* 유전자와 상보성을 보이는 407개의 유전자들 중에 382개의 유전자가 발현이 증가 되었고 25개의 유전자가 억제 되었다. 이 중에서 Carotenoids, Sterols 등의 전구체인 isoprenoid를 합성하는 mevalonate 경로 상에 있는 Mevalonate diphosphate decarboxylase (MDDX) 유전자가 약 2.5배 과 발현됨을 확인하였다.

2. MDDX의 분석을 통해 유전자 간의 특징을 확인하고자 하였다. 궁천조생 일반 과실과 돌연변이 과실의 molecular cloning을 통해 전체 ORF를 포함하는 유전자를 확보하였다. 염기서열 분석 결과를 보면 일반 과실과 돌연변이 과실의 MDDX 유전자 상동성이 일치 하였으며, 궁천조생의 MDDX 유전자는 coding region이 1263bp 이며, 420개의 아미노산을 coding 하였다. MDDX 유전자의 게놈 내에서의 구조를 분석하기 위해 게놈 유전자는행으로부터 해당 DNA를 분리하여 염기서열을 분석 하였다. 분리된 게놈의 크기는 3,731 bp로서, 크기가 210bp, 199bp, 64bp, 64bp, 81bp, 87bp, 158bp, 49bp, 125bp, 226bp인 10개의 exon과 양말단의 인접 부위가 GT/AG 규칙에 일치하는 186bp, 130bp, 164bp, 96bp, 642bp, 313bp, 88bp, 687bp, 162bp인 9개의 intron으로 이루어진 유전자로 구성 되어 있었다. MDDX 유전자 염기서열의 상동성은 *Hevea brasiliensis* (AF429386), *Arabidopsis thaliana* (AK228357), *Panax ginseng* (GQ455989), *Solanum lycopersicum* (EU216564), *Arnebia euchroma* (DQ631830), *Ginkgo biloba* (AY757921) 등의 MDDX 유전자와 nucleotide level 에서 각각 81, 80, 78, 75, 74, 73% 동일하였으며, amino acid level 에서도 역시 같은 수준의 유사성을 나타냈다

3. MDDX 유전자의 시기별 발현 특성 연구를 위해 궁천조생 일반과실과 돌연변이 과실을 발달 단계별로 total RNA를 추출하고, qRT-PCR 분석을 수행

하여 Mevalonate diphosphate decarboxylase (MDDX) 의 발현 차이를 확인 하였다. 돌연변이 과실에서 MDDX 유전자의 발현량은 만개 후 30일, 60일, 90일, 120일, 150일, 180일, 210일에 각각 0.8배, 0.9배, 1.3배, 1.4배, 2.4배, 1.3배, 1배 많았으며 궁천조생에 착색되는 시기인 개화 후 약 150일에 돌연변이 과실이 일반과실과 비교하여 MDDX 유전자가 과 발현됨을 확인 하였다.

4. Northern blot 분석을 해본 결과 MDDX 유전자는 만개 후 30일, 150일, 180일, 220일에서 발현이 되는 것을 볼 수가 있었다. 만개 후 control과 mutant에서 30일에 각각 MDDX 유전자가 발현 되었으며, 150일 전까지는 거의 발현 되지 않다가 150일경에 mutant에서 먼저 MDDX가 발현 되었고, control에서는 180일부터 발현되기 시작하였다. MDDX 유전자가 돌연변이 과실에서 성숙 단계별 유전자의 발현량이 다른 것을 확인 하였다.

5. 궁천조생의 MDDX 유전자의 게놈 내 존재 copy수를 확인하기 위하여 Southern blot 분석을 수행한 결과 궁천조생의 MDDX 유전자는 게놈 내에 single copy로 존재 하는 것을 확인 하였다.

6. 궁천조생 일반 과실과 돌연변이 성숙 과실의 외형 및 내형적 특성을 분석한 결과 과실의 횡경, 종경, 무게, 과피 두께, 가용성 고형물 및 유기산 함량은 유의차 ($P < 0.025$)가 없었다. 과실의 과피와 과육의 착색도를 색차계를 사용하여 궁천조생 일반 과실과 돌연변이 과실을 측정 한 결과는 과육에서 L값은 46.5 와 49.2 로 돌연변이 과육이 2.7 낮았으며, a값은 9.2와 7.0으로 2.2 높게 나타났고, b값이 22.6 과 16.0 으로 6.6 높게 나타났다. 과피에서 L값이 60.9와 68.3으로 돌연변이 과피가 7.4 낮게 나타났고, a값이 41.0 과 27.7로 13.3 높게 나타났고, b값은 57.3과 68.2로 10.9 낮게 나타났다. 과육과 과피의 값에 대하여 둘 간에 유의차가 있는지 검증하기 위해 t-test 분석을 해본 결과 과육의 a/b 값을 제외한 나머지는 모두 유의성이 있는 것으로 나타났다.

V. REFERENCES

- Alderman GG, Marth EH. (1976) Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* by citrus oil. Z. Lebensm Unters Forsch. 160:353-358.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel TL, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet. 25:25-29.
- Bach TJ. (1995) Some new aspects of isoprenoids biosynthesis in plants: a review. Lipids. 30:191-202.
- Berges T, Guyonnet D, Karst F. (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* mevalonate diphosphate decarboxylase is essential for viability, and a single Leu-to-Pro mutation in a conserved sequence leads to thermosensitivity. J Bacteriol. 179:4664-4670.
- Biale JB. (1964) Growth, maturation, and senescence in fruit. Science. 146:880-888.
- Chappell J. (1995) Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. Plant Physiol Plant Mol Biol. 46:521-547.

- Chappell J, Wolf F, Proulx J, Cuellar R, Saunders C. (1995) Is the reaction catalysed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase a rate limiting step for isoprenoid biosynthesis in plants. *Plant Physiol.* 109:1337–1343.
- Chung SK, Kim SH, Choi YH, Song EY, Kim SH. (2000) Status of citrus fruit production and view of utilization in Cheju. *Food Industry and Nutrition.* 5:42-52.
- Cuthbert JA, Lipsky PE. (1995) Suppression of the proliferation of Ras-transformed cells by fluoromevalonate, an inhibitor of mevalonate metabolism. *Cancer Res.* 55:1732-1740.
- Dabbah R, Edward VM. (1970) Antimicrobial action of some citrus fruit oils on selected foodborne bacteria. *Appl. Microbiol.* 19:27-31.
- Dharmapuri S, Rosati C, Pallara P, Aquilani R, Bouvier F, Camara B, Giuliano G. (2002) Metabolic engineering of xanthophyll content in tomato fruit. *FEBS Lett.* 519:30-34.
- Donpedro KN. (1996) Fumigant toxicity of citrus peel oils against adult and immature stages of storage insect pests. *Pesticide Sci.* 47:213-223.
- Enfissi EM, Fraser PD, Lois LM, Boronat A, Schuch W, Bramley PM. (2005) Metabolic engineering of the mevalonate and nonmevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnol J.* 3:17-27.

Fraser PD, Romer S, Shipton CA, Mills PB, Kiano JW, Misawa N, Drake RG, Schuch W, Bramley PM. (2002) Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. Proc. Natl Acad. Sci. 99:1092-1097.

Ganjewala D, Kumar S, Luthra R. (2009) An account of cloned genes of Methyl-erythritol-4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. Curr Issues Mol Biol. 11:35-45.

Harborne JB, Tomas B. (1991) Recent advances in the ecological chemistry of plant *Terpenoids*. Oxford Clarendon. 399-426.

Ha SH, Kim JB, Park JS, Ryu TH, Kim KH, Hahn BS, Kim JB, Kim YH. (2003) Carotenoids Biosynthesis and Their Metabolic Engineering in Plants. Korean J. Plant Biotechnology. 30:81-95.

Hasunuma T, Kondo A, Miyake C. (2010) Metabolic engineering by plastid transformation as a strategy to modulate isoprenoid yield in plants. Methods Mol Biol. 643:213-27.

Helene C, Francis K, Thierry B. (1999) Heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding mevalonate diphosphate decarboxylase. Plant Molecular Biology 39:953-967.

- Kim YK, Hyun SW, Ko YH. (1999) Analysis of Essential Oils from the Peel of Mandarin (Citrus unshiu Marc. Var. Okitsu). Korean J. Food Sci. Technol. 31:1178-1183.
- Laule O, Furholz A, Chang HS, Zhu T, Wang X, Heifetz PB, Gruißem W, Lange BM. (2003) Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 6866-6871.
- Lee JH, An HJ, Lee SY, Choi YH, Lim BS, Kang YJ (2009) Changes in Quality Characteristics of 'Setoka' (Citrus spp.) Using Different Storage Methods. Korean J. Food Preserv. 16:644-649.
- McGarvey DJ, Croteau R. (1995) Terpenoid metabolism. PlantCell 7:1015-1026.
- Namitha KK, Negi PS. (2010) Chemistry and biotechnology of carotenoids. Crit Rev Food Sci Nutr. 50:728-760.
- Rodriguez CM. (2010) Supply of precursors for carotenoid biosynthesis in plants. Arch Biochem Biophys. 504:118-122.
- Romer S, Fraser PD, Kiano JW, Shipton CA, Misawa N, Schuch W, Bramley PM. (2000) Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants. Nat. Biotechnol. 18:666-669.

Rosati C, Aquilani R, Dharmapuri S, Pallara P, Marusic C, Tavazza R, Bouvier F, Camara B, Giuliano G. (2000) Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit. *Plant J.* 24:413-419.

Schaller H, Grausem B, Benveniste P, Chye ML, Tan CT, Song YH, Chua NH. (1995) Expression of the *Hevea brasiliensis* (H.B.K.) Mull. Arg. 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase 1 in Tobacco Results in Sterol Overproduction. *Plant Physiol.* 109, 761-770.

Shaw PE. (1977) In: *Citrus Science and Technology. Essential oils.* 1:430-435.

Sies H, Krinsky NI. (1995) Antioxidants, vitamins and β -carotene in disease prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* 62:1299-1540.

Verwoerd TC, Dekker BM, Hokema A. (1989) A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* 17:2362.

Voynova NE, Fu Z, Battaile KP, Herdendorf TJ, Kim JJ, Mizioroko HM. (2008) Human mevalonate diphosphate decarboxylase: characterization, investigation of the mevalonate diphosphate binding site, and crystal structure. *Arch Biochem Biophys.* 480:58-67.

Wilding EI, Brown JR, Bryant AP, Chalker AF, Holmes DJ, Ingraham KA, Iordanescu S, So CY, Rosenberg M, Gwynn MN. (2000) Identification, evolution, and essentiality of the mevalonate pathway for isopentenyl diphosphate biosynthesis in gram-positive cocci. *J Bacteriol.* 182: 4319-4327.

Zeeberg BR, Feng W, Wang G, Wang MD, Fojo AT, Sunshine M, Narasimhan S, Kane DW, Reinhold WC, Lababidi S, Bussey KJ, Riss J, Barrett JC, Weinstein JN. (2003) GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biol.* 4(4):R28.



ACKNOWLEDGEMENT

오랜 시간 동안 학문적인 것은 물론이고 개인적인 문제에 이르기까지 늘 한결 같은 마음으로 부족한 저를 관심과 가르침으로 이끌어주신 김인중 지도 교수님께 마음깊이 감사드립니다. 바쁜 와중에서도 시간을 내어 미흡한 논문을 다듬어 주신 김찬식 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 학부시절부터 석사과정까지 많은 충고와 가르침을 주신 유장걸 교수님, 류기중 교수님, 고정삼 교수님, 이효연 교수님, 김소미 교수님, 김재훈 교수님께 감사드립니다.

또한 끊임없는 가르침을 주시고 학위 논문 심사에서 조언을 아끼지 않으신 이동훈 박사님께 진심으로 감사드립니다. 저에게 석사논문연구 뿐만 아니라 보다 폭넓은 연구 분야를 접할 수 있도록 도와주시고, 실험수행에 있어 많은 토론과 물심양면으로 도움을 주신 국립원예특작과학원 감귤시험장 고상욱 연구관님, 최영훈 연구관님, 윤수현 박사님, 채치원 박사님 그리고 오현우 선생님께도 특별히 감사드립니다.

한 가족처럼 함께했던 유전공학 실험실에 송승협 선배님, 후배 오승규, 배성우를 비롯한 업무상 바쁜 와중에서도 대학원 생활과 연구소 생활을 힘든 일없이 할 수 있도록 챙겨주던 강길용, 김현우 조교에게도 감사드립니다. 그리고 제가 평소 존경하고, 저를 아껴주시던 주위의 모든 분들께 감사의 마음을 전합니다. 그러한 믿음과 기대에 보답하기 위해 앞으로 더욱더 노력하는 연구자가 되겠습니다.

끝으로 지금까지 한결같은 믿음과 사랑으로 보살펴주신 부모님과 가족들 그리고 항상 바른 길을 갈 수 있게 큰 용기와 힘이 되어주던 친구 장형훈, 현재원에게 고마움을 전하며 오늘의 이 논문을 바칩니다.

2010년 12월

이 성 훈