



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](#)

碩士學位論文

들잔디(*Zoysia japonica* Steud.)
Lipid Transfer Protein 유전자의
기능적 특성분석



濟州大學校 大學院

生命工學科

申賢淑

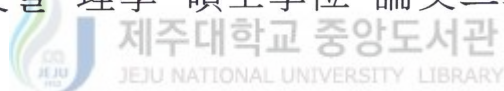
2015年 2月

들잔디(*Zoysia japonica* Steud.)
Lipid Transfer Protein 유전자의
기능적 특성분석

指導教授 李 孝 淵

申 賢 淑

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함



2015 年 2 月

申賢淑의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 정홍규 (인)
委 員 이호연 (인)
委 員 고석민 (인)

濟州大學校 大學院

2015 年 2 月

목 차

초 록	1
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	6
1. 식물 재료 및 배양 조건	6
2. 병원균의 종류와 유지	6
3. EST library로부터 들잔디 <i>LTP</i> 클론의 분리	9
4. 핵산 추출 방법	11
1) Genomic DNA 추출 방법	11
2) Total RNA의 추출과 1쇄 cDNA 합성	11
5. 아미노산 서열 분석	12
1) 아미노산 서열의 특성 분석	12
2) Phylogenetic tree 분석	12
6. Sub-cellular localization assay	12
1) Vector construction	12
2) Particle bombardment	13
7. Transcript 분석	13
1) 발현의 기관 특이성	13
2) Cell-free culture filtrate(CF)처리에 의한 유도적 발현 확인	14
(1) CF준비	14
(2) 식물체 준비	14
(3) CF처리	14
3) 균사체 처리에 의한 유도적 발현 확인	15
(1) 곰팡이 준비	15
(2) 식물체 준비 및 균사 처리	15
(3) Data의 전환	15
4) 비생물적 스트레스처리에 의한 유도적 발현 확인	15

5) PCR 조건	16
8. ZjLTP 단백질의 기능분석	16
1) <i>E. coli</i> 발현 시스템을 이용한 재조합 단백질의 생산	16
(1) Vector construction	16
(2) 배양조건의 최적화	17
2) 균의 대량 배양 및 단백질 정제	17
3) 재조합 단백질의 항균활성 검정	20
4) Lipid Binding assay	20
9. 애기장대 형질전환체 분석	21
1) Vector construction	21
2) 애기장대 형질전환	21
3) 동형접합성 계통의 선발	22
4) 형질전환 애기장대의 내병성 검정	23
(1) 절단된 잎을 이용한 내병성 형질 관찰	23
(2) 식물체를 이용한 내병성 형질 관찰	23
5) 형질전환 애기장대 추출물의 항균활성	23
(1) 식물체 준비	23
(2) Total protein crude 추출	23
(3) 메탄올 추출	24
6) 형질전환 애기장대의 비생물적 스트레스 내성	24
(1) 고온 내성의 확인	24
(2) 염과 건조스트레스 내성의 확인	25
III. 결과 및 고찰	26
1. Sequence 분석	26
1) EST library로부터 들잔디 <i>LTP</i> 클론의 분리	26
2) Phylogenetic tree 분석	30
2. Sub-cellular localization assay	33
3. Transcript 분석	35

1) 발현의 기관 특이성	35
2) Cell-free culture filtrate(CF)처리에 의한 유도적 발현	37
3) 균사체 처리에 대한 유도적 발현 확인	39
4) 비생물적 스트레스처리에 의한 유도적 발현 확인	42
4. Z μ LTP 재조합 단백질의 기능분석	44
1) <i>E. coli</i> 발현 시스템을 이용한 재조합 단백질의 생산	44
2) 재조합 단백질의 항균활성 검정	44
3) Lipid binding assay	46
5. 애기장대 형질전환체 분석	48
1) 애기장대 형질전환과 동형접합성 계통의 선발	48
2) 형질전환 애기장대의 내병성 검정	50
3) 형질전환 애기장대 추출물의 항균활성	53
(1) Total protein crude 추출	53
(2) 메탄올 추출	53
4) 형질전환 애기장대의 비생물적 스트레스 내성	55
(1) 고온스트레스 내성의 확인	55
(2) 염과 건조스트레스 내성의 확인	57
IV. 종합고찰	60
V. 참고문헌	62

List of figures and tables

Table 1. List of fungal pathogens in this study.	8
Table 2. Gene specific primers used in this study.	10
Figure 1. A typical protocol for expression and purification of GST fusion protein.	19
Figure 2. Amino acid sequences of putative <i>Z. japonica</i> LTPs.	27
Table 3. Amino acid sequence analysis of the <i>ZjLTPs</i>	29
Figure 3. Alignment of the amino acid sequence of <i>ZjLTPs</i> with various plant LTPs.	31
Figure 4. Phylogenetic analysis of <i>ZjLTPs</i> and various plant LTPs.	32
Figure 5. Localization of <i>ZjLTP</i> -GFP fusion protein in onion epidermal cell.	34
Figure 6. Organ-specific expression of LTPs by semi qRT-PCR.	36
Figure 7. Effect of Cell-free culture filtrate(CF) on expression of <i>ZjLTPs</i> by semi qRT-PCR analysis.	38
Figure 8. Effect of fungal pathogen inoculation on expression of <i>ZjLTPs</i> by semi qRT-PCR analysis.	40
Figure 9. Densitometric quantification using raw volume of bands was done using the Genetool.	40
Figure 10. Effect of abiotic stresses on expression of <i>ZjLTPs</i> by semi qRT-PCR analysis.	42
Figure 11. Antifungal activity of the recombinant <i>ZjLTP1</i> protein to fungal pathogens.	44
Figure 12. Antifungal activity of the recombinant <i>ZjLTP1,2</i> protein to fungal pathogens by paper disk method.	44
Figure 13. Binding pattern of GST protein, GST- <i>ZjLTP1</i> and GST- <i>ZjLTP2</i> fusion protein.	46
Figure 14. T-DNA construct of binary vector plasmid IG2- <i>ZjLTP</i>	48
Figure 15. Identification of transgenic <i>Arabidopsis</i>	48

Figure 16. Transgenic resistance of <i>Arabidopsis</i>	50
Figure 17. Transgenic resistance of <i>Arabidopsis</i> whole plant expressing <i>ZjLTP</i>	51
Figure 18. Antifungal activity of the total protein crude extract from <i>Arabidopsis</i> transformant to fungi by paper disk method.	53
Figure 19. Antifungal activity of the methanol extract from <i>Arabidopsis</i> transformant to fungi on the medium supplement.	53
Figure 20. Heat stress tolerant phenotype of the transformants.	55
Figure 21. Salt stress tolerant phenotype of the transformants.	57
Figure 22. Drought stress tolerant phenotype of the transformants.	58



초 록

If disease occur on the lawn, that will damage fine view and require additional management, moreover that will make economic loss. So managers and farmers perform chemical pest control, but sprayed excess agrochemicals leads to the social problems such as pesticide residue, environmental pollution. Molecular breeding is an effective way for replace chemical control to protect grass from pathogens.

In order to find available gene source for transformation, carried out characterization *lipid transfer protein(LTP)* genes from zoysia grass(*Zoysia japonica* Steud.). Plant *LTP* is one of Pathogenesis Related(PR) peptide due to they are induced with phytopathogens and their accumulation in the plants of related to plant resistance responses. Some of these proteins exhibit *in vitro* antimicrobial activities.

Five putative *LTP* clones were found in zoysia EST library. Two(*ZjLTP1* and 2) out of five had full ORF and the rest(*ZjLTP3,4* and 5) had partial sequence.

Through performing semi qRT-PCR, analyzed the pattern of organ specific expression, biotic, abiotic stress inducible expression of *ZjLTPs*. Many pathogens attack sheath or root. All *ZjLTPs* were expressed in sheath and stolon, but *ZjLTP4* was the only detectable clone in root. *ZjLTP2* expression was detectable in dormant seeds. Although, the expression pattern of *ZjLTP1* was induced at earlier stage by CF of *R. solani* AG2-2(IV) or hyphae of *R. cerealis*, other *LTPs* were not induced significantly but just reduced steadily. In heat stress treated blade piece, expression of *ZjLTP2* was greatly reduced.

In subcellular localization assay, *ZjLTP1* protein signal was observed in the cytosol and *ZjLTP2* was observed in the peroxisome.

The *ZjLTP1* and 2 recombinant proteins did not show growth inhibition activity in the condition of this study. The PIP strip test result indicated that

ZjLTP1 can bind Phospho-phosphatidil inositide, PA and PS which are famous for the second message transfer molecules in plant.

Arabidopsis were transformed with *ZjLTP1* or *ZjLTP2* harboring T-DNA by *Agrobacterium* mediated transformation and selected homozygote line by segregation assay about Basta resistance. When methanol extract from transgenic *Arabidopsis* were supplied in medium, the growth of *R. solani* AG2-2(IV), AG-1(IA), AG2-2(IIIB) and *R. cerealis* was inhibited compared with WT extract. Transgenic lines over-expressing *ZjLTP2* treated with *R. cerealis* or *F. culmorum* showed a phenotype that grow up slowly and have dark green leaves.

Although, *ZjLTP1* and 2 proteins did not show antifungal activity, it is expected that *ZjLTP1* play a role in signaling pathway which need a transfer PA and *ZjLTP2* involved in lipid metabolic pathway.



I. 서론

공원, 스포츠 경기장, 레포츠 필드, 골프장 등이 증가하면서 이들 공간에 조경 및 피복을 목적으로 사용하는 잔디의 수요도 증가하고 있다. 따라서 잔디 재배농가와 재배면적도 해마다 증가하여 2011년 잔디 생산 면적은 3,056ha로 2001년에 비하여 17.8%가 증가하였다(Korea forest service, 2012). 우리나라의 잔디 소비는 도로사면의 사방용이나 묘지 뗏장용이 차지하는 비중(72.4%)이 크기 때문에 재배되고 있는 잔디도 들잔디류(*Zoysia* spp.)의 난지형 잔디가 95.7%를 차지하나 골프장이나 경기장에 한지형잔디의 사용이 증가하면서 한지형잔디의 년 간 판매량도 증가되고 있다(배 *et al.*, 2013).

공원이나 경기장 뿐 아니라 잔디를 재배하는 농가의 잔디밭에 발생한 병해는 미관을 해치고 추가적인 관리를 야기하거나 생산량을 감소시키는 등의 경제적인 손해를 가져온다. 더욱이 잔디가 주로 뗏장의 형태로 거래되기 때문에 뗏장을 매개로 병원균이 다른 지역으로 확산 될 가능성이 있으며 소비지에 유입됨으로써 소비지에 인위적 피해 확산을 조장하는 등의 2차적인 피해가 나타날 수 있다.

잔디 재배지에서 가장 문제가 되는 질병은 잔디가 patch 형태로 고사하는 *Rhizoctonia* spp.에 의한 마름병이다. 이 기주 잔디와 발병적응이 각각 다르지만 공통적으로 포자를 형성하지 않고 균사나 균핵의 형태로 토양이나 뗏취 층에 서식하면서 적합한 환경이 되면 식물체에 감염하여 고사 시킨다. 들잔디 등의 난지형 잔디에서 *R. solani* AG2-2(IV)에 의하여 발생하는 질병을 Large patch(갈색퍼짐 병)라 하며, 한지형잔디에서 *R. solani* AG-1(IA), AG2-2(IIIB)에 의하여 발생하는 질병을 Brown patch(갈색마름병)로 구분한다. *R. cerealis*에 의하여 난지형 잔디에 발생한 질병은 Spring dead spot(춘고병), 한지형 잔디에는 Yellow patch(황색마름병)로 구분한다. 이외에 *R. zea*, *R. oryzae*에 의하여 일부 잔디에서 발생하는 병을 Leaf and Sheath spot이라고 한다(Tredway and Burpee, 2001; 장 and 이, 2013).

들잔디류를 주로 재배하는 우리나라 잔디 재배지에서 가장 문제가 되는 병은

갈색피집병(배 *et al.*, 2013)이다. 이는 주로 봄이나 가을에 발병하여 원형의 마름 증상을 나타낸다. 병반의 중심부 잔디 잎은 회갈색으로 변하며 병반의 가장자리 진전부위의 잎은 황갈색으로 변하는데 발병면적이 매우 넓다(1m~8m). 골프장에서 갈색피집병이 가장 문제가 되고 있는데 게다가 한지형잔디의 혼식이 증가하면서 한지형잔디에 발병하는 질병 또한 문제가 되고 있어 이른 봄부터 늦가을까지 피해가 심각한 실정이다(이 *et al.*, 2013).

1년 내 내 플레이어에게 경기공간을 제공하여야 하고 미관을 유지해야하는 골프장은 질병의 방제를 위하여 편리하면서도 효과가 좋은 화학적 방제 방법에 의존하고 있다. 실제 코스 잔디의 품질 유지를 위하여 연중 다양한 약제를 살포하는 데 그중 살균제의 항목이 가장 많으며(2012년 기준 총 사용 약제 품목에 대한 살균제의 비율 45.3%) 가장 많은 양이 뿌려지고 있다(2012년 기준 총 사용 약제 성분량에 대한 살균제의 비율 59.1%)(환경부, 2013).

그러나 이러한 집약적인 화학적 방제를 장기간 실시 할 경우 병원균에 대한 살균제의 감수성이 저하되거나 살균제에 대한 저항성을 획득한 병원균들의 출현으로 인하여 방제효과가 낮아져 골프장 관리 비용의 증가, 생태계 교란, 대체농약 개발 비용 증가 등 많은 부작용을 불러일으킬 수 있다(Jo *et al.*, 2008; 장 *et al.*, 2012). 또한 잔류농약에 의한 독성문제, 환경오염 등의 문제로 공원이나 경기장 잔디에 농약을 처리하는 것에 대한 일반인들의 거부감도 높아 이를 대체할 방법의 개발이 필요하다(Shim and Kim, 2000; Uddin and Viji, 2002).

따라서 최근 목초액과 같은 천연물 제제(장 *et al.*, 2013)나 길항미생물(이, 1997)을 이용한 생물적 방제, 저항성 품종의 개발 등 환경친화적 접근 방법에 대한 연구가 활발히 진행 되고 있다. 이중 저항성 품종의 개발은 생물적 방제에 요구되는 천연물의 추출과 살포, 유용 미생물의 생육, 처리, 제어 등의 과정이 필요하지 않으므로 추가적인 질병방제에 소비되는 시간과 비용을 혁신적으로 절감할 수 있을 것으로 기대 할 수 있다. 특히 분자유종 방법을 통한 내병성 잔디의 개발은 보다 효과 높은 내병성유전자를 발굴하고 도입함으로써 내병성 형질이 매우 우수한 품종의 개발을 가능하게 할 것이다(Yevtushenko *et al.*, 2004). 따라서 효과적인 유전자원의 확보를 위하여 들잔디 고유의 내병성 유전자원의 확보가 당연히 요구된다.

식물은 항미생물 활성을 가진 단백질을 합성하는 등 여러 가지 메커니즘을 통하여 침입해오는 병원균으로부터 자신을 보호한다. 그 중 병원균의 침입에 의해 발현이 유도되고 그들의 축적이 식물의 저항 반응과 연관된 단백질 그룹을 Pathogenesis Related(PR) peptide라고 한다. PR-peptide는 Salicylic acid(SA), Jasmonate(JA), Ethylene(ET) 의존한 방어 기작에 관여하며 일부는 기내 환경에서 직접적으로 항미생물 활성을 나타내기도 한다. Lipid transfer protein은 PR-14 그룹에 해당하는 유전자로 그 크기가 PR-2인 Beta-1,3-glucanase(30kDa)나 PR-3,4에 속하는 Chitinase(15~31kDa)에 비하여 작고 효소 활성은 가지지 않으나 Defensin(PR-12), Thionin(PR-13)과 함께 항미생물 활성을 갖는 펩타이드로 분류된다(Sels *et al.*, 2008; Rogozhin *et al.*, 2009).

*Plant Lipid transfer protein*은 작고(7~9kD) 염기성(pI~9)의 단백질로 실험조건에서 세포막사이의 인지질을 이동시키고 지방산의 아실체인과 결합하는 것이 밝혀지면서 이름 붙여졌다. 동물의 *LTP*와는 달리 지방산, acyl-CoA, 인산지질과 그 파생물과도 결합하기 때문에 *non-specific lipid transfer protein(ns-LTP)*라고도 한다(Kader, 1996). *LTP*는 분자량에 따라서(JP *et al.*, 2000) 2개의 메인 그룹으로 분류되는데 공통적으로 8 Cystein Motif(8CM)을 갖고 이것은 4개의 이황화결합으로 연결된다. Family1-*LTP*는 크기가 약 9kD 이며 9~10의 높은 pI 값을 갖는다. 4개의 α -helix motif는 이황화결합으로 연결되면서 소수성의 터널과 같은 구멍구조를 이루며 터널 입구에 위치하는 소수성의 아미노산 잔기(이소류신(I), 발린(V), 류신(L), 알라닌(A))가 지질과 상호작용한다. 5개의 펩타이드로 이루어진 2개의 motif(T/S-X-X-D-R, P-Y-X-I-S)와 마지막 시스테인 motif 뒤로 짧은 펩타이드 단편인 C-말단구조가 존재한다. Family2-*LTP*는 크기가 7kD, family1에 비하여 낮은 pI를 갖으며 Cys3-Cys35, Cys11-Cys25, Cys27-Cys61, Cys37-Cys68이 이황화결합으로 연결되어 삼각형모양의 속이 빈 박스구조를 이룬다. 보존된 motif와 C-말단구조가 존재하지 않고 스테롤분자와 결합할 수 있는 특성을 갖는다(Carvalho and Gomes, 2007).

식물의 *LTP*는 신호전달, 항미생물활성, 큐티클형성, 성장조절자, 알레르겐 등의 기능을 한다. 애기장대의 *Defective in induced resistance1-1(DIR1-1)* 단백질은 신호분자의 장거리 전달자로서 이 유전자가 돌연변이된 애기장대는 SAR(S

systemic Acquired Resistance)반응이 일어나지 않는다(Maldonado *et al.*, 2002). 재조합 담배 LTP단백질 또한 JA(Jasmoic acid)와 결합하며 JA-LTP복합체를 담배에 처리하였을 때 병원균인 *Phytophthora parasitica*에 대한 저항성이 증가하였다는 연구결과에 의하여 신호전달에 관여하는 것으로 예측 되었다(Bohot *et al.*, 2004).

보리(*Hordeum vulgare*), 옥수수(*Zea mays*)의 잎에서 추출한 LTP 단백질은 *Fusarium solani* 등 곰팡이와 박테리아의 성장을 저해(Molina *et al.*, 1993)하였고, 강력한 항균단백질로 알려진 양파(*Allium cepa*)의 종자에서 분리된 LTP (*Ace-AMP1*)는 *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum* 등 12개의 곰팡이, 2개의 그람양성 박테리아의 성장억제활성을 나타낸 것으로 보고되어 있다(Cammue *et al.*, 1995). 이 유전자가 도입된 밀(*Triticum aestivum*)과 버는 *Magnaporthe grisea*, *R. solani*, *Xanthomonas oryzae* 등에 대한 저항성형질을 나타내었다(Roy-Barman *et al.*, 2006; Patker and Chattoo, 2006). 밀의 *Ltp3F1*재조합 단백질은 *Alternaria sp.*, *R. solani*, *Curvularia lunata*, *Bipolaris oryzae* 등에 대하여 항균활성을 나타내었고, 과발현 담배(*Nicotiana tabacum*) 형질전환체가 *Alternaria sp.*, *B. oryzae*에 저항성을 갖도록 하였다(Kirubakaran *et al.*, 2008). 그리고 보리의 LTP 유전자가 도입된 애기장대(*Arabidopsis thaliana*), 담배는 *Pseudomonas syringae*에 대한 저항성이 증가(Molina and García-Omedo, 1997)하는 등 다양한 식물에서 항균활성을 나타내는 LTP가 보고되어 있다. 기내 실험 조건에서 밝혀진 LTP 단백질의 항미생물 작용 기작은 미생물의 세포막을 이루는 지질에 결합함으로써 막을 붕괴시키거나, 막에 구멍을 형성하여 물질이 비선택적으로 유입되거나 유출되도록 함으로써 결국 미생물이 사멸하도록 하는 것이다(Pelegrini *et al.*, 2011, Sun *et al.*, 2008).

또한 LTP는 식물의 표피세포에서 큐틴이나 왁스 등의 큐티클을 이루는 지질을 세포막을 통과하여 세포 밖으로 수송하여 큐티클을 합성한다. 큐티클은 식물의 표면을 싸고 있는 지질층으로 기공을 통하지 않은 수분 손실을 막을 뿐만 아니라 식물에게 해가 되는 물질이나 병원균들의 침입에 대항하는 비특이적인 장벽의 역할을 한다. 또한 몇몇 병원균은 큐티클성분 또는 큐티클-LTP 복합체에 의하여 기주식물을 인식하여 감염과정이 활성화 되기도 한다(Reina-Pinto and Yep

hremov, 2009).

위와 같이 *LTP*는 병원성 미생물에 대하여 1차적 방어장벽을 구축하는데 관여할 뿐만 아니라 병원균을 감지하고 신호를 전달하며 때로는 직접 균의 세포막을 붕괴시키는 등 식물의 방어 체계와 밀접한 관련이 있는 유전자이다. 따라서 내병성 들잔디의 개발을 위한 유전자원으로서의 가치가 높다고 판단된다.

본 연구는 들잔디 EST library로부터 *LTP* 클론을 탐색하고 얻어진 클론의 기능을 분석함으로써 분자유종을 통한 내병성 잔디의 개발을 위한 유전자원으로서의 가치를 규명하기 위해 수행되었다.



II. 재료 및 방법

1. 식물 재료 및 배양 조건

*LTP*유전자의 클로닝을 위하여 한국 들잔디 중 *Zoysia japonica* Steud.(Wild type)를 사용하였다. 식물체는 상토와 모래를 약 5:1로 혼합한 토양에 식재하여 자연채광의 유리온실에서 배양하거나 1/2MS(2.2g/L Murashige and Skoog medium including vitamins(MS, duchefa), 1.5% Sucrose, 0.45% Agar)배지에서 무균 배양 하였다. 4℃에서 보관중인 종자는 파종 전 껍질을 제거한 후 0.02%(v/v) Tween20과 5%(v/v) Sodium hypochloride가 포함된 70%(v/v) Ethanol을 사용하여 표면을 살균하였다. 온도는 25℃, 낮과 밤의 주기가 16h light/ 8h dark로 설정 된 배양실에서 유지하였으며 무균배양 중인 식물체는 2~3주 간격으로 계대배양 하였고 이 때 길게 뻗은 뿌리와 잎은 짧게 잘라 새 잎과 뿌리가 자랄 수 있도록 하였다.

선택한 들잔디 *LTP*유전자의 *in vivo* 활성을 확인하기 위하여 heterologous expression plant로 *Arabidopsis thaliana*(Columbia-ecotype)를 선택하였다. 식물체는 상토와 펄라이트가 4:1비율로 혼합된 토양에 파종한 후 실내온도 22℃, 상대 습도 55%, 낮과 밤의 주기가 16h light/ 8h dark로 설정 된 배양실에서 배양하였다. 파종 전 4℃에 수 일 방치하는 방법으로 춘화처리를 하였고 동형접합성 형질 전환체의 확보를 위한 분리비 분석과, 스트레스 처리를 위하여 종자를 0.003% TritonX-100이 혼합된 70% Ethanol로 소독한 후 1/2MS(2.2g/L MS, 1.5% Sucrose, 100mg/L Cefotaxim, 5mg/L Phosphinothricine, 0.45% Agar)에 파종하여 기내 배양 하였다. 기내배양 환경은 실내온도 25℃, 낮과 밤의 주기를 16h light/ 8h dark로 설정하였다.

2. 병원균의 종류와 유지

병원성 곰팡이로는 *Rhizoctonia solani* AG2-2(IV)(KACC40132), *Rhizoctonia solani* AG-1(I A)(KACC10101), *Rhizoctonia solani* AG2-2(III B)(KACC40151), *Rhizoctonia cerealis*(KACC40153), *Fusarium culmorum*(KACC42099), *Fusarium graminearum*(KACC41041)을 사용하였다(Table 1). 이 중 *Rhizoctonia solani*는 잔디에서 가장 빈번하게 발생하는 *Rhizoctonia* 잎마름병을 일으키는 균주로 AG2-2(IV)는 난지형잔디인 들잔디를 AG-1(I A), AG2-2(III B)는 한지형잔디인 벤프그라스를 기주식물로 한다. *R. cerealis* 또한 잔디의 마름병을 일으키는 병원균으로 난지형잔디에는 봄마름병(춘고병)을, 한지형잔디에는 황색마름병(엘로우패취)을 일으킨다. *Fusarium spp.*는 곡류에서 주로 발병하여 *Fusarium* head blight, foot and root rot을 일으키는 곰팡이들로 세계적으로 밀과 보리의 생산량에 막대한 피해를 주는 것으로 알려져 있다(SCHERM *et al.*, 2013). 이들 곰팡이는 국립농업과학원 농업유전자원센터로부터 분양 받았으며 Potato dextrose agar(PDA(Difco)+ 1.5% Agar)에서 배양 및 유지하였다. 배양온도는 모두 25℃로 설정하였고 약 1달을 주기로 새 PDA배지에 5~8mm 직경의 균사 덩어리를 옮기는 방법으로 계대배양하여 유지하였다.

병원균	KACC number	병명	기주 식물
<i>Rhizoctonia solani</i> AG2-2(IV)	40132	라이족토니아잎마름병(라지 패취)	Zoysiagrass
<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1(I A)	40101	갈색잎마름병(브라운 패취)	Bentgrass, Kentucky bluegrass, Perennialryegrass, Fescue
<i>Rhizoctonia solani</i> AG2-2(III B)	40151		
<i>Rhizoctonia cerealis</i>	40153	봄마름병(춘고병)	Zoysiagrass
		황색마름병(엘로우 패취)	Bentgrass
<i>Fusarium graminearum</i>	41041	fusarium head blight	Wheat, Barley
<i>Fusarium culmorum</i>	42099	foot and root rot, head blight	Cereals, Grasses

Table 1. List of fungal pathogens in this study.

3. EST library로부터 들잔디 *LTP* 클론의 분리

기내배양 중인 4-leaf stage의 들잔디 유식물체로부터 total RNA를 추출하여 만들어진 EST Library Database에서 ‘Lipid transport’, ‘Lipid binding’를 검색하여 나온 염기서열을 다시 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에서 BlastX하여 *LTP*와 상동성이 있는 후보 클론을 확보 하였다. Library data의 염기서열을 토대로 각 클론에 특이적인 프라이머(Table 2)를 제작하였고 이를 이용하여 클로닝하여 염기서열을 확인하였다.



Table 2. Gene specific primers used in this study.

분류	Name	Sequence(5'-3')	Use
<i>LTP1</i>	ZjLTP1cds-1	CGTCAAGTCGCTGAGCAACA	Cloning forward
	ZjLTP13UTRAS	CATAGGTAAGGCAACAGGAG	Cloning reverse
	ZjL1BamS	ggatccATGGCTCGCCAGCTGGTCAT	binary vector construction semi qRT-PCR
	ZjL1SacAS	gagctcCGTACGTAGCTTCGA	binary vector construction semi qRT-PCR
	L1Xba I Mat	tctagaATGGCTCGCCAGCTGGTCATC	ZjLTP1-GFP vector construction
	L1BamHstop	ggatccACAGTTAACCTTGGAGCAGTC	ZjLTP1-GFP vector construction
	L1BamMat	ggatccGCCGAGACGGCCTCCG	Ecoli over expression vector construction
	L1Xhostop	ctcgagTCAGTTAACCTTGGAGCAGTCGACG	Ecoli over expression vector construction
<i>LTP2</i>	L2290S	GACAAAGAGGCCGCGTGCAA	semi qRT-PCR
	L2610AS	ATGGAAGGATACTCTGCTCT	Cloning reverse semi qRT-PCR
	L2Xba I Mat	tctagaAGAATGGCTCGCGCTCAGCTTCTG	ZjLTP2-GFP vector construction
	L2BamHstop	ggatccACAGGCGAGCCTGTTGCAGTC	ZjLTP2-GFP vector construction
	L2BamMat	ggatccGCCATCACCTGCGGCCAGGT	Ecoli over expression vector construction
	L2Xhostop	ctcgagTCAGGCGAGCCTGTTGCAGTC	Ecoli over expression vector construction
	ZjL2BamS	ggatccATGGCTCGCGCTCAGCTTCT	Cloning forward binary vector construction
	ZjL2SacAS	gagctcTCAGGCGAGCCTGTTGCAGT	binary vector construction
ZjβActin	ZjβActinS	GACATGGTACTGGAATGGTC	semi qRT-PCR reference
	ZjβActinAS	AGGATTCAAAGGAGCTTCAG	semi qRT-PCR reference
18S rRNA	18S rRNA S	ATGATAACTCGACGGATCGC	semi qRT-PCR reference
	18S rRNA AS	CCTCCAATGGATCCTCGTTA	semi qRT-PCR reference
<i>LTP3</i>	L3450S	TTTGGAGTCCCTGTCCCCA	Cloning forward semi qRT-PCR
	L3830AS	AAAGCAAATCTCACGCGATT	semi qRT-PCR
<i>LTP4</i>	EST357S1	ATGCCGATCCCCAAGAAC	Cloning forward semi qRT-PCR
	EST357AS	GATGTAGTTCAGGCACGGGT	semi qRT-PCR
<i>LTP5</i>	EST2336S1	CAAGGCCCTCCTCATCTTGG	Cloning forward semi qRT-PCR
	EST2336AS	TAGATCAGCAGGCAGGAAGC	semi qRT-PCR
	dTACP2	CTGTGAATGCTGCGACTACGAT XXXX(T) ₁₅	3'RACE reverse

4. 핵산 추출 방법

1) Genomic DNA 추출 방법

어린 잎을 액체질소를 이용하여 곱게 분쇄하고 3% Cetyltrimethylammonium bromide(CTAB)시약(100mM Tris-HCl, 20mM EDTA, 1.4M NaCl, 3% CTAB)과 vortexing하여 혼합하고 65°C에서 30분 이상 반응시켰다. 실온에서 식히고 혼합액과 동량의 CI(Chloroform:Isoamyl alcohol=24:1)를 넣고 inverting하여 혼합한 후 13000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상층액에 CI를 재처리 하고 얻어진 2번째 상층액에 Isopropanol을 동량 넣고 inverting하여 잘 혼합한 후 20분간 -20°C에 정치하였다. 20분 후 13000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻어진 DNA pellet을 70% Ethanol로 세척하고 최종 5 μ g/ml의 RNase(Ambion)가 혼합되어있는 멸균수에 녹였다. 추출한 DNA는 전기영동과 흡광도 분석을 통해 확인 하였다.

2) Total RNA의 추출과 1쇄 cDNA 합성

Total RNA추출 방법은 사용한 시약인 Trizol(MRC)에서 제공하는 표준 방법을 변형 하여 수행하였다. 조직을 액체질소를 이용하여 곱게 분쇄한 후 Trizol과 vortexing하여 혼합하였다. 실온에 10분간 정치 후 13000rpm에서 10분간 원심분리하여 Trizol에 녹지 않은 조직들을 침전시켰다. 상층액을 새 튜브에 옮겨 Chloroform을 가한 후 강하게 흔들어 섞고, 3분간 실온에 정치한 후 4°C, 15000rpm에서 15분간 원심분리하여 RNA가 포함된 맑은 상층액을 분리하였다. 차가운 Isopropanol을 가하고 -20°C에서 20분 이상 정치한 후 원심분리하여 얻어진 total RNA pellet를 70% Ethanol로 세척하고 건조한 후 0.1%(v/v) Diethyl pyrocarbonate(DEPC)용액에 녹였다. 추출한 total RNA는 전기영동과 흡광도 분석을 통해 확인 하였다. DNA-free kit(Ambion)을 사용하여 섞여있는 DNA를 제거한 2 μ g total RNA에 OligodT primer(dT15)를 0.5 μ g 넣고 70°C 에서 5분간 가열 한 후 얼음에 식히고, RNasin Ribonuclease inhibitor 25unit, RTase 200unit, 5x reaction buffer, dNTP 혼합액을 섞어 42°C에서 90분간 반응시킴으로써 1쇄 cDNA를 합성하였다. RTase는 Promega사에서 판매하는 Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase(M-MLV RT)를 사용하였다.

5. 아미노산 서열 분석

1) 아미노산 서열의 특성 분석

웹상의 분석 프로그램을 이용하여 들잔디 *LTP1*과 2의 아미노산 서열을 분석하였다. ProtComp Version 9.0. (<http://www.softberry.com/cgi-bin/programs/protloc/protcomppl.pl>)과 Plant-mPLOC (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>)을 이용하여 신호서열의 길이와 단백질의 세포내 위치를 예측하였으며, 신호서열이 제거된 성숙한 단백질의 분자량(Molecular weight, Mw)과 등전점(Iso electric point, pI)는 Biology workbench 3.2 - Protein tool(<http://www.workbench.sdsc.edu>)을 이용하여 계산 하였다.

2) Phylogenetic tree 분석

Andre(2007) 등에 의해 발표된 review논문에 실려 있는 단자엽식물과 모델식물인 애기장대, 담배 *LTP* 아미노산서열과 이후 발표된 논문의 *LTP* 아미노산서열을 NCBI로부터 찾아 *ZjLTP1*과 *ZjLTP2*와 상동성을 비교 하였다.

Alignment를 위하여 8시스테인 motif(8CM)를 이루는 시스테인 잔기 중 첫 번째 부터 C-말단의 아미노산 서열을 사용하였으며 BioEdit ver 7.7.0(www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html)의 ClustalW Multiple alignment 알고리즘을 이용하여 비교분석하였다. Alignment 결과를 fasta file로 저장 한 후 MEGA 6.0(www.megasoftware.net/mega.php)에서 불러오기하여 Neighbor joining method를 통해 계통수로 전환하였다.

6. Sub-cellular localization assay

1) Vector construction

유전자의 도입을 위한 벡터의 제작에는 pUC18vector를 backbone으로 35Spro

moter-GFPgene-NOStop Terminator 카세트가 Multiple Cloning Site(MCS) 지역의 *Hind*III와 *Eco*R I 사이에 첨가된 326S-GFP백터가 사용되었다. PCR을 수행하여 개시코돈 앞에 *Xba* I, 정지코돈 앞에는 *Bam*H I 제한효소 인식자리가 첨가된 *LTP* P단편을 만들어 pGEM-Teasy vector에 TA cloning후 염기서열 분석을 통해 염기서열의 변화가 일어나지 않은 플라스미드를 선발하였다. 그리고 선발된 클론과 326S-GFP백터를 각각 *Xba* I, *Bam*H I double digestion 하여 얻은 단편들을 T4 DNA ligase(Takara)를 이용하여 연결함으로써 35S::ZjLTP1-GFP과 35S::ZjLTP2-GFP 백터를 제작하였다. 제작된 백터는 다시 염기서열분석을 의뢰하여 *LTP*와 *GFP*유전자 연결 부분에 정지코돈이 생기지 않았는지, *GFP* coding 서열에 틀이동 돌연변이가 일어나지 않았는지 확인하였다.

2) Particle bombardment

*LTP-GFP*유전자의 transient expression 관찰을 위하여 양과표피를 목적 조직으로 particle bombardment를 수행하였다. Particle은 0.6 μ m(0.6 μ) Gold Microcarrier(BioRad)를 사용하였으며 장비는 Finer(1992)등에 의해 발표된 논문과 동일한 시스템을 갖춘 자체제작 장비를 이용하였다. 싱싱한 양과의 표피를 벗겨 1/2MS (1.5% Sucrose, 0.45% Agar)배지에 양과의 중심을 향한 면이 위로 오도록 올려 놓고 particle을 도입하였다. Gold particle에 DNA를 coating하기 위하여 100 μ l Gold stock(50mg/ml)에 10 μ l DNA(1 μ g/ μ l), 100 μ l CaCl₂(2.5M), 40 μ l Spermidine(0.1M)을 차례로 넣고 vortexing하며 20분간 방치하였다. 그 후 짧게 원심분리하여 gold pellet을 모으고 70% Ethanol로 1회, 100% Ethanol로 1회 세척 한 후 100% Ethanol에 완전히 현탁하여 DNA holder에 로딩하였다. Bombardment 수행 후 25 $^{\circ}$ C 암조건에서 하루 동안 배양하고 형광을 관찰하였다. 세포벽과 세포막의 구분을 위하여 40% Sucrose를 처리하여 원형질분리가 일어나게 한 후 관찰하였다.

7. Transcript 분석

1) 발현의 기관 특이성

온실의 화분에서 배양중인 들잔디의 잎몸(Blade), 잎집(Sheath), 지상경마디(Stolon), 뿌리(Root)를 각각 샘플링하였다. 또한 들잔디의 꽃은 한 개의 꽃에서 암술이 먼저 발생하고 암술이 퇴화하면서 수술이 발생하는데 암꽃과 수꽃에서의 발현을 비교하기 위하여 암술이 발달되어 있는 꽃(♀)과 그것의 꽃대(♀ axis), 수술이 발달되어 있는 꽃(♂)과 그것의 꽃대(♂ axis)를 각각 샘플링하여 total RNA를 추출하였다. 종자는 성숙한 상태에서 수확하여 건조 후 4℃에서 보관하던 것을 종피를 제거하고 사용하였다. 추출한 total RNA로 cDNA를 합성하고 각 유전자의 특이 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다.

2) Cell-free culture filtrate(CF)처리에 의한 유도적 발현 확인

(1) CF준비

직경이 7mm가 되도록 자른 균사체 조각 10개를 30ml Potato dextrose broth(PDB)가 담긴 50ml falcon tube에 넣어 2주간 배양하였다. 배양은 25℃, 암조건에서 이루어 졌으며 shaking하지 않았다. 배양 후 3000rpm에서 15분간 원심분리하여 균사체 덩어리를 침전시킨 후 상층의 배지만 취하여 0.45- μ m Millipore filter를 사용하여 필터링하였다. 필터링한 CF 중 일부를 25℃에서 배양함으로써 균사나 포자가 포함되지 않음을 확인하였다. 실험균주는 *R. solani* AG2-2(IV), *R. solani* AG-1(IA)를 사용하였다(Elsharkawy *et al.*, 2012).

(2) 식물체 준비

100*40 polystyrene petri dish에 1/2MS(2.2g/L MS, 1.5% Sucrose, 0.45% Agar)를 약 100ml 부어 굳힌 후 중앙부는 비우고 배지주변부로부터 식물체를 이식하였다. 이식 할 때에는 기내배양중인 들잔디의 분얼을 나누고 뿌리와 노화 된 잎은 짧게 잘라 새 잎과 뿌리가 자라도록 하였다. 이식된 식물체의 회복을 위하여 1주일간 배양기간을 두었다.

(3) CF처리

식물체의 잎에 직접 접하지 않고 잎집과 뿌리만 접종원이 닿도록 하기 위하여 식물체가 주변부로 심어진 배지 중앙부에 7mm Whatman No.2 filter 페이퍼를 깔고 2ml의 CF를 접종하였다. 실온, 암조건에서 배양하면서 일정 시간별로 식물체 전체를 샘플링하였고 액체질소를 사용하여 신속히 냉각 시킨 후 RNA추출 전

까지 -80°C 에서 보관하였다. 대조군으로 PDB배지를 처리하여 동일한 방법으로 샘플링 하였다.

Trizol을 사용하여 total RNA를 추출하고 cDNA를 합성하여 semi qRT-PCR을 수행하였다.

3) 균사체 처리에 의한 유도적 발현 확인

(1) 곰팡이 준비

100*40 polystyrene petri dish에 1/2MS배지(2.2g/L MS, 1.5% Sucrose, 0.45% Agar)를 약 100ml 부어 굳힌 후, 배지 중앙에 3개의 직경이 7mm인 곰팡이 조각을 치상한 후 배양하였다. 배양은 25°C , 암조건에서 이루어 졌으며 균사체로 완전히 덮일 때까지 배양하였다. 실험균주는 *R. solani* AG2-2(IV), *R. cerealis*를 사용하였고 대조군으로 곰팡이 조각대신 PDA를 치상한 배지를 사용하였다.

(2) 식물체 준비 및 균사 처리

기내배양중인 들잔디의 분얼을 나누고 뿌리와 무성히 자란 잎은 짧게 자른 후 새 1/2MS배지(2.2g/L MS, 1.5% Sucrose, 0.45% Agar)에서 배양하며 회복기를 두었다. 회복기 동안 새로운 뿌리와 잎이 자란 건강한 들잔디를 곰팡이로 완전히 덮인 1/2MS배지(2.2g/L MS, 1.5% Sucrose, 0.45% Agar)로 옮기고 실온, 암조건에서 배양하였다. 일정 시간 별로 식물체의 잎집과 잎몸을 나누어 샘플링하였고 액체질소를 사용하여 신속히 냉각 시킨 후 RNA추출 전까지 -80°C 에서 보관하였다.

Trizol을 사용하여 total RNA를 추출하고 cDNA를 합성하여 semi qRT-PCR을 수행하였다.

(3) Data의 전환

잎집으로부터 추출한 total RNA로부터 합성한 cDNA로 PCR을 수행하고 2% Agarose gel에서 전기영동 후 gel doc을 이용하여 영상화 하였다. 각 밴드 밝기를 Genetool(Syngene) 프로그램을 이용하여 정량화 하였다.

4) 비생물적 스트레스처리에 의한 유도적 발현 확인

기내 배양중인 들잔디의 잎을 4~5cm 절편이 되도록 샘플링하고 3mM 2-(N-m

orpholino)ethanesulfonic acid(MES)가 첨가된 1/2MS(2.2g/L MS, 1.5% Sucrose, 0.35% Agar)배지에 잎의 뒷면이 위로 오도록 뒤집어 치상하였다. 고온과 저온 스트레스에 의한 유전자 발현의 변화를 확인하기 위하여 위와 같이 준비한 배지를 각 45°C 건조기, 0°C 항온챔버에 넣고 0, 1, 3, 12, 24, 48시간 동안 배양한 후 샘플링 하였다.

염 스트레스를 주기 위하여 3mM MES가 첨가된 1/2MS(2.2g/L MS, 1.5% Sucrose, 0.35% Agar)배지에 NaCl을 최종 100mM이 되도록 첨가하였고, 건조스트레스는 Mannitol을 최종 100mM이 되도록 첨가하여 잎절편을 치상하였다. 25°C에서 0, 1, 3, 12, 24, 48시간 동안 배양한 후 샘플링하고 액체질소를 사용하여 급속 냉각하여 RNA추출 전까지 -80°C에서 보관하였다.

Trizol을 사용하여 total RNA를 추출하고 cDNA를 합성하여 semi qRT-PCR을 수행하였다.

5) PCR 조건

Normalization을 위한 reference 유전자로는 들잔디의 β -Actin 유전자(GU290545.1)를 이용하였다. PCR mixture는 AmpONE Taq DNA polymerase(GeneAll) 0.25unit, 10pmol의 정방향, 역방향 프라이머 각 0.3 μ l를 사용하였고 10xbuffer와 dNTP, 6xBBsolution, 멸균수까지 총 반응 부피가 12 μ l가 되도록 혼합하였으며 denaturation 94°C-30sec, annealing 60°C-30sec, extension 72°C-30sec의 조건에서 증폭하였다. 2% Agarose gel에 전량 전기영동 후 G:Box EF gel documentation system(Syngene)을 이용하여 영상화 하였다.

8. ZJLTP 단백질의 기능분석

1) *E. coli* 발현 시스템을 이용한 재조합 단백질의 생산

(1) Vector construction

*E. coli*의 단백질 발현 시스템을 이용하여 재조합 들잔디 LTP단백질을 정제하였다. 발현 및 정제를 위한 벡터로는 GST(Glutathione-S-Transferase)tag을

가지고 있는 pGEX4T-1(Novagen)을 사용하였다. pGEX4T-1의 MCS지역에 5' - *Bam*HI, 3'-*Xho*I 제한효소인식부위를 이용하여 신호서열이 제외된 단백질 부위를 암호화하는 *ZjLTP* 염기서열을 도입하였다. *LTP*단편은 PCR을 통해 양 쪽 말단에 각각의 제한효소인식부위를 부가함으로써 제작하였으며 TA클로닝을 수행하여 염기치환이 없음을 확인 하였다. 염기서열이 확인된 플라스미드와 발현 용 벡터에 각각 제한효소를 처리하여 절단 한 후 전기영동과 Gel Elution(GeneA ll Gel sv mini kit)을 통해 필요한 DNA 단편을 정제하였고 ligation하여 재조합 벡터를 제작하였다. 제작된 벡터는 염기서열 분석을 추가로 의뢰하여 틀 이동 돌 연변이 및 아미노산치환 등 여부를 확인하였다.

완성된 벡터는 *E. coli* DE3균주에 Heat-shock방법을 통해 도입되었으며 벡터 가 도입된 *E. coli*은 100mg/L Carbenicilin이 포함 된 Luria-Bertani(LB) 고체 배 지에서 선발하였다.

(2) 배양조건의 최적화

*E. coli*의 단백질 발현 시스템을 이용하여 단백질을 대량 정제하기 위해서는 배양조건의 최적화가 필요하다. 따라서 프로모터의 작동을 유도하기 위한 Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)를 0.1, 0.3, 0.5, 1mM 농도로, IPTG를 넣는 때를 균농도(OD_{600}) = 0.6, 1.0, IPTG를 넣은 후 배양온도를 15, 28, 37°C로 설정하여 배양한 후 각 조건별로 균을 수확하였다. 수확된 균은 1xPBS(binding buffer, 0.14M NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na_2HPO_4 , 1.8mM KH_2PO_4 , pH7.3)에 재 현탁 한 후 sonication하여 용해, 원심분리하여 상층의 수용성단백질, 하층의 불 용성단백질로 나누었다. 얻어진 단백질 추출물을 SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 수행하여 발현의 유도 및 수용성여 부를 관찰하였다. 겔의 Acrylamide농도는 Stocking gel 3%, Separation gel 12% 로 하였으며 영동 후 0.2% Coomassie brilliant blue R-250(Sigma) 용액으로 염색 하여 단백질을 검출하였다.

2) 균의 대량 배양 및 단백질 정제

앞선 실험에서 검토된 조건에 따라 균을 대량으로 배양하고 수집하여 1xPBS 에 재현탁한 후 Ultrasonication(Sonics & Materials)을 사용하여 용해하였다. 13

000rpm에서 10분간 원심분리하여 불용성의 단백질을 제거하고 상층액으로부터 Glutathione Sepharose 4 Fast flow(GE Healthcare) column을 이용하여 GST가 fusion된 LTP단백질을 정제하였다. 방법은 GST Gene Fusion System Handbook(Amersham Bioscience)를 따랐으며 Elution buffer의 조성은 50mM Tris-HCl, 10mM Reduced glutathione, pH8.0을 사용하였다.

정제한 단백질에서 GST tag를 제거하고 순수한 LTP단백질을 얻기 위하여 정제한 단백질 1mg당 10unit의 트롬빈(thrombin)을 처리 한 후 실온에서 30분, 4℃에서 완전히 절단될 때까지 방치하였다. Glutathione Sepharose 4 Fast flow column을 이용하여 잘린 GST단백질을 제거하였다(Figure 1).



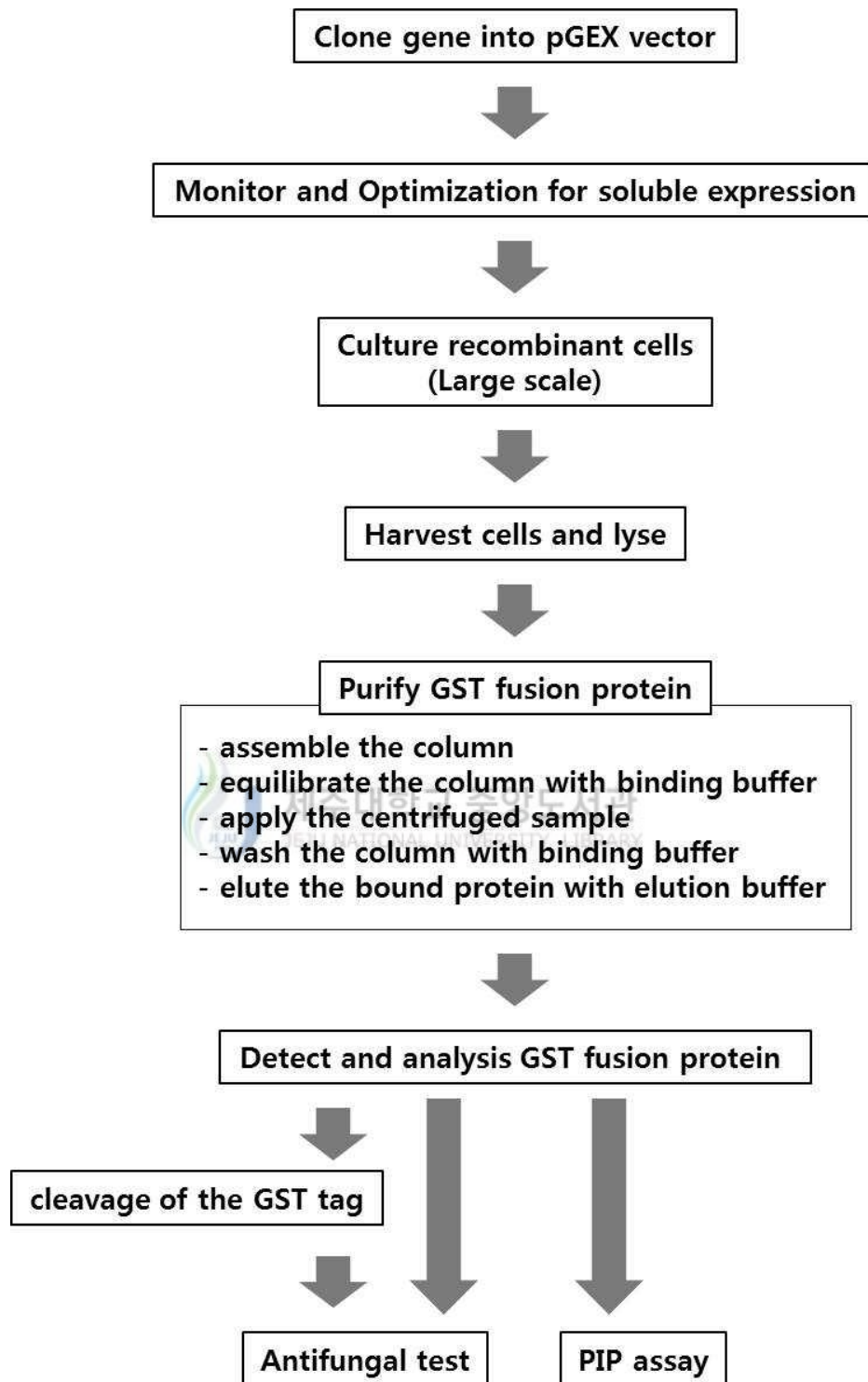


Figure 1. Protocol for expression and purification of GST fusion protein.

3) 재조합 단백질의 항균활성 검정

정제한 재조합 LTP1 단백질의 항균활성을 검정하기 위하여 액체배양조건과 원관확산법을 이용한 고체 배양조건에서 실험을 수행하였다.

정제한 Z/LTP1-GST fusion 단백질에 트롬빈을 처리 한 후 GST단백질을 제거하지 않은 GST, LTP1단백질 혼합액과 정제한 GST단백질 단일 포함용액의 항균활성 정도를 비교하였다. GST 단백질 250 μ g, 500 μ g, GST와 Z/LTP1 혼합단백질 418 μ g, 836 μ g을 총 부피 700 μ l가 되도록 Elution buffer로 희석하고 곰팡이 균사 현탁액 350 μ l과 혼합한 후 25 $^{\circ}$ C에서 암배양하였다. 균사의 생장을 육안과 현미경으로 관찰하였다.

원관확산법을 이용한 항균활성검정을 위하여 PDA배지를 분주하여 균혀 고체 배지를 만들고 종이 디스크를 주변에 치상하였다. 디스크당 80 μ l의 단백질 용액을 점적하였다. 중앙에 시험 균주를 치상하고 25 $^{\circ}$ C에서 암배양하며 균사의 생장을 관찰하였다. Z/LTP2-GST 단백질에 대해서도 동일한 방법으로 실험을 수행하였다.



4) Lipid Binding assay

정제한 들잔디 LTP단백질의 기능과 막지질과의 상호작용을 확인하고자 시판되는 PIP strip을 사용하였다. Strip은 Molecular Probes사에서 판매하는 PIP stripsTM membranes(P23751)를 사용하였으며 검출시약으로는 SuperSignal^RWest Pico Chemiluminescent Substrate(Thermo scientific)를 사용하였다.

Membrane을 3% fatty acid-free BSA(w/v, Bovine serum albumin, Sigma)가 포함된 TBS-T(10mM Tris-HCl, pH8.0, 150mM NaCl, 0.1%(v/v) Tween20)를 이용하여 블로킹하였다. Hybridization bag에서 밀봉된 상태로 약 한 시간 동안 실온에서 반응시킨 후 100 μ g의 정제된 GST fusion 단백질을 첨가하고 4 $^{\circ}$ C에서 낮은 속도로 shaking하면서 overnight반응 하였다. Bag에서 버퍼를 제거한 후 다시 TBS-T + 3% BSA로 1시간 동안 블로킹을 실시하였고 GST fusion 단백질을 첨가하여 6시간 동안 실온에서 반응시켰다. TBS-T + 3% BSA로 2회 세척함으로써 부착되지 않은 과량의 단백질을 제거하였고 TBS(25mM Tris, 0.15M NaCl, pH7.2)에 1:5000으로 희석한 Anti-glutathione-S-Transferase(GST)-Perox

idase(Sigma-Aldrich)를 실온에서 한 시간 동안 처리 하였다. 10%(v/v) Tween20이 첨가된 TBS로 세척한 membrane에 검출시약을 처리한 후 빛을 가린 채 5분 간 정치하고 LAS-4000(Fuji film)을 사용하여 화학발광을 검출하였다.

9. 애기장대 형질전환체 분석

1) Vector construction

들잔디의 *LTP* 유전자가 과발현되는 형질전환 식물체를 제작하기 위한 binary vector로는 변형된 pCAMBIA3301인 IG2가 사용되었다. IG2는 pCAMBIA3301의 MCS부위에 옥수수 유비퀴틴 프로모터(Ubi P) - 애기장대 루비스코 단백질의 종결부위(Arbcs T)카세트가 삽입되어 있다. 이 카세트의 프로모터와 종결부위 사이에 *Bam*H I 과 *Sac* I 제한효소 인식부위를 이용하여 *LTP*유전자를 벡터에 도입하였다. 사용한 프라이머는 표(Table 2)와 같으며 PCR을 통하여 개시 코돈의 5'상위에 *Bam*H I 이, 정지코돈 3'하위에 *Sac*I 인식부위가 첨가된 DNA절편을 제작하였고, 이를 pGEM-Teasy vector에 클로닝하여 염기서열의 변화 여부를 확인 하였다. 확인된 클론과 IG2 vector를 각각 *Bam*H I 과 *Sac* I 을 사용하여 절단하고 전기영동하여 원하는 DNA 절편만 Gel Elution을 수행하였다. 얻어진 단편들을 T4DNA ligase를 이용하여 연결함으로써 IG2-LTP1과 IG2-LTP2 벡터를 제작하였다. 제작된 벡터는 염기서열분석을 의뢰하여 염기서열에 변화가 일어나지 않았는지 재차 확인하였다.

2) 애기장대 형질전환

재조합 유전자를 애기장대(Columbia-0)의 계놈에 도입하기 위하여 아그로박테리움을 매개로한 Floral dipping(S. Clough, 1998)방법을 이용하였다. 제작한 binary vector는 동결-해동 방법을 통해 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105에 도입하였고 100mg/L Kanamycin, 50mg/L Rifampicin, 1.5% Agar 가 첨가된 YEP (10g/L Yeast extract, 10g/L Bacto peptone, 5g/L NaCl)배지에서 선발 및 배양하였다. 형질전환을 위한 애기장대는 꽃대가 약 10cm가 되었을 때 정단부를 잘

라 결가지들이 자라 되도록 많은 수의 꽃이 피어있도록 하였다. 그리고 균을 접종하기 전에 맺혀있던 종자는 잘라서 제거하였다. 접종을 위한 높은 활성의 아그로박테리움을 얻기 위하여 하루 동안 2ml의 YEP액체 배지(YEP + 100mg/L Kanamycin, 50mg/L Rifampicin)에서 소량 배양하던 균배양액을 50ml의 YEP액체 배지(YEP + 100mg/L Kanamycin, 50mg/L Rifampicin)에 접종하여 하루를 더 배양하였다. 3000rpm, 4°C에서 15분간 원심분리하여 균을 수집하였고 배지를 따라 버린 후 0.05%(v/v) Silwet L-77이 포함 된 5%(w/v) Sucrose 용액 50ml에 재현탁하였다. 균현탁액에 애기장대 꽃대를 담가 5분간 방치 후 꺼내고 습도 유지와 빛 차단을 위하여 호일로 씌운 채로 3일간 배양실에서 배양하였다. 접종한 애기장대는 호일을 제거하고 배양실에서 성숙한 종자(T₁)를 수확 할 때까지 재배하였다.

3) 동형접합성 계통의 선발

재조합 T-DNA가 도입된 동형접합성의 독립 계통 애기장대 선발을 위하여 *LTP* 유전자와 공동으로 도입된 *BAR* 유전자에 의한 Basta저항성 형질을 이용하였다. T₁ 종자를 토양에 파종하여 본 잎이 4장이 되었을 때 Basta(Bayer, Glufosinate ammonium 18%)를 0.032%(v/v)로 희석하여 살포하였다. Basta에 대하여 저항성을 나타내는 각 개체를 독립된 계통으로 각각의 종자(T₂)를 수확하였다. 수확한 T₂종자들은 표면 살균한 후에 춘화처리를 위하여 3일 이상 4°C에 방치하였다. 7.5mg/L Phosphinothricin(PPT)가 첨가된 1/2MS(2.2g/L MS, 1.5% Sucrose, 125mg/L Cefotaxim, 0.45% Agar)에 파종하여 발아하여 정상적으로 발달하는 개체(저항성)와 발아는 하지만 발달 하지 못하는 개체(감수성)의 비율을 관찰하였다. 저항성개체와 감수성개체의 비율이 약 3:1로 나타나는 계통에서 저항성 개체를 8개체 씩 토양에 이식하여 종자(T₃)를 수확하고 T₂와 동일한 방법으로 각 개체에 대한 분리비를 관찰하여 모든 자손이 저항성을 나타내는 계통을 선발하였다.

선발된 애기장대의 잎으로부터 genomic DNA를 추출하여 genomic PCR을 수행하였으며, total RNA 추출 후 semi qRT-PCR을 수행함으로써 T-DNA의 삽입여부, 유전자의 정상적 전사 여부를 확인하였다. PCR에 사용한 primer는 표(T

able 2)에 정리하였으며, PCR mixture는 AmpONE Taq DNA polymerase 0.25 U, 10pmol의 정방향, 역방향 프라이머 각 0.3 μ l를 사용하여 총 반응 부피가 12 μ l가 되도록 혼합하였으며 cycle 조건은 denaturation 94 $^{\circ}$ C-30sec, annealing 60 $^{\circ}$ C-30sec, extension 72 $^{\circ}$ C-30sec으로 설정하였다.

4) 형질전환 애기장대의 내병성 검정

(1) 절단된 잎을 이용한 내병성 형질 관찰

1/2MS(2.2g/L MS, 1.5% Sucrose, 0.45% Agar)배지를 두 구역으로 나누어 야생형과 형질전환 애기장대의 잎자루를 날이 잘 드는 가위로 깨끗하게 잘라 잎자루가 배지 중앙을 향하도록 꽂았다. 배지 중앙에 곰팡이 균사 조각을 치상하고 25 $^{\circ}$ C에서 명조건에서 배양하면서 균사가 뺏어나가는 정도와 식물체의 감염 정도를 육안으로 관찰하였다.

(2) 식물체를 이용한 내병성 형질 관찰

① 1/2MS (2.2g/L MS, 1.5% Sucrose, 100mg/L Cefotaxim, 0.45% Agar)배지를 8구역으로 나누어 2구역 씩 야생형과 형질전환 애기장대를 파종하였다. 동일 계통이 서로 마주보도록 배치하여 위치에 의한 감염피해의 차이가 나타나지 않도록 하였다. 본 잎이 4장이 되었을 때 배지의 중앙에 곰팡이 균사 조각을 치상하고 25 $^{\circ}$ C에서 명조건에서 배양하면서 균사가 뺏어나가는 정도와 식물체의 감염 정도를 육안으로 관찰하였다.

② 1/2MS(2.2g/L MS, 1.5% Sucrose, 100mg/L Cefotaxim, 0.45% Agar)배지에 야생형과 형질전환 애기장대를 각 각 파종하고 애기장대의 본 잎이 4장이 되었을 때 배지 중앙에 곰팡이 균사 조각을 치상하였다. 25 $^{\circ}$ C에서 명조건에서 배양하면서 균사가 뺏어나가는 정도와 식물체의 감염 정도를 육안으로 관찰하였다.

5) 형질전환 애기장대 추출물의 항균활성

(1) 식물체 준비

추출을 위한 야생형과 형질전환 애기장대는 동일 날짜에 파종하였고 동일한 배양실에서 재배하였다. 0.1%(v/v) Hyponex를 정기적으로 시비하여 되도록 잎이 크게 자라도록 재배하였고 꽃대가 올라올 때 수확하여 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 식물

체는 막자사발과 액체질소를 사용하여 곱게 분쇄하여 사용하였다.

(2) Total protein crude 추출

분말 10g 당 30ml의 total protein crude extraction buffer(50mM MES, 50mM EDTA, 1mM p-Methylsulphonylfluoride(PMSF))를 사용하였다. Vortexing하여 완전히 혼합하였으며 4시간 동안 4°C에서 shaking한 후 3000rpm에서 15분간 원심분리하여 맑은 상층액을 얻었다. Whatman no.2 filter paper로 1차 filtering하고 Amicon Ultra 3K device-3000NMWL(Millipore)를 이용하여 추출한 단백질 용액의 양이 처음 추출한 것에 비하여 1/10, 1/100이 될 때까지 3000rpm, 4°C에서 원심분리 하였다. Advantec 0.45 μ m filter로 filtering한 후 4°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

원관확산법을 이용하여 야생형과 형질전환 애기장대의 단백질 추출물의 항균 작용을 확인하였다. PDA의 중앙에 일정거리를 두고 8mm 종이 디스크(Advantec)을 치상하고 각 추출물을 80 μ l씩 점적하였다. 중앙에 균사 조각을 치상하고 25°C 암조건에서 배양하면서 균사가 뻗어나가는 모양을 관찰하였다.

(3) 메탄올 추출

추출방법은 강재영 *et al.*(2013)의 방법을 응용하여 수행하였다. 애기장대 분말과 질량 10g당 50ml 부피의 메탄올을 vortexing 하여 완전히 혼합하였다. 80°C에서 10시간 방치 후 다시 동량의 메탄올을 넣고 1시간 방치 하여 추출액을 얻었다. 추출액은 Whatman no.2 filter paper로 거른 후 감압 농축 하여 메탄올을 완전히 휘발 시킨 후 100% Dimethyl Sulfoxide(DMSO)에 녹였다.

PDA를 멸균하여 준비한 후 약 50~65°C까지 식히고 DMSO에 녹인 추출물을 배지 50ml당 2ml씩 혼합한 후 분주하여 굳혔다. 배지 중앙에 약 5mm크기의 균사 조각을 치상하고 25°C 암조건에서 배양하면서 균사가 뻗어나가는 모양을 관찰하였다.

6) 형질전환 애기장대의 비생물적 스트레스 내성

(1) 고온 내성의 확인

형질전환 애기장대의 고온(45°C) 내성을 비교확인 하기 위하여 야생형과 형질전환 애기장대를 하나의 플레이트에 구역을 나누어 파종하였다. 위치에 의하여

스트레스 받는 정도의 차이가 나타나지 않도록 야생형이나 형질전환 각 계통이 마주 오도록 배치하였다. 파종 10일 후 45℃로 예열된 오븐에 플레이트를 15분, 30분, 45분, 60분간 방치 후 꺼내어 배양실에서 일주일 간 회복시켰다.

기내 배양환경이 아닌 토양에서의 표현형을 관찰하기 위하여 화분에 상토와 펄라이트 혼합 흙을 절반가량 채우고 애기장대를 파종하였다. 비교를 용이하게 하기 위하여 하나의 화분에 야생형과 3개의 형질전환 계통을 각각 줄을 맞추어 파종하고 배양하였다. 40일이 지난 식물체를 50℃로 예열된 오븐에 넣은 후 24시간을 두었다. 식물체가 건조스트레스를 복합적으로 받지 않게 하기 위하여 식물체에 물을 뿌리고, 랩으로 밀봉하였으며 화분 받침에도 물을 충분히 주어 흙이 마르지 않도록 하였다.

(2)염과 건조스트레스 내성의 확인

염과 건조스트레스 내성 확인을 위하여 1/2MS(2.2g/L MS, 1.5% Sucrose, 0.45% Agar)배지에 NaCl 또는 Mannitol을 100mM, 200mM이 되도록 각각 혼합하였다. 1/2MS(2.2g/L MS, 1.5% Sucrose, 100mg/L Cefotaxim, 0.45% Agar)배지에서 약 20일 정도 성장한 애기장대를 뿌리가 다치지 않도록 옮긴 후 관찰하였다. 표현형 비교를 용이하게 하기 위하여 야생형과 3개의 형질전환 계통을 하나의 플레이트에 구역을 나누어 심고 배양하였다.

고온내성 실험과 동일한 조건으로 파종한 화분에 40일이 지난 후부터 100mM NaCl 또는 100mM Mannitol을 저면관수 하였으며 용액이 마르지 않게 하였다. 20일이 지난 이후에는 물 받침대를 교체 하고 수돗물을 저면관수 하며 식물체의 변화되는 모습을 관찰하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 아미노산 서열 분석

1) EST library로부터 들잔디 *LTP* 클론의 분리

들잔디 EST library로부터 5개의 *LTP*로 추정되는 클론을 얻을 수 있었다(Figure 2). 검색된 서열을 토대로 각 클론에 대한 프라이머(Table 2)를 제작하고 클로닝하여 염기서열을 확인하였다. 확인된 클론의 아미노산 길이는 각 117, 119, 72, 78, 132amino acid(aa)였으며 이중 2개의 클론은 *LTP*아미노산 서열의 기본 구조인 8개의 시스테인 motif(8 Cystein Motif, 8CM)를 갖추고 있었다. 그리고 이들의 서열을 ProtComp Version 9.0. Identifying sub-cellular location (Plant)로 분석하였을 때 신호서열을 가지고 있는 것을 확인 할 수 있기 때문에 N-말단이 잘려 나가지 않은 온전한 *LTP*로 추정 하였다. 나머지 3개의 클론은 ORF가 확인 되지 않았는데 이중 한 개는 library data 상에는 ORF서열이 존재하였으나 클로닝 과정에서 서로 다른 2개의 유전자가 연결 된 것으로 확인되었다. 나머지 2개의 단편으로 존재하는 클론은 cDNA library 제작과정에서 절단된 것으로 예측된다. ORF를 갖춘 2개의 클론을 각 *ZjLTP1*과 *ZjLTP2*로 하고 나머지 단편 클론도 *ZjLTP3*, *ZjLTP4*, *ZjLTP5*로 이름을 붙였다.

```

ZJLTP1 ~~~~~ MARQ LVIVLAVVVA ALVAAETASA AITCQDVTSS IAPCNGYAMG RSTAPSAQ ~~~ CCQGVKSL SNRASTKQDR 70
ZJLTP2 ~~~~~ MARAQL LAIALIAAVL IAAAPHAVDA AITCQVNSA ISPCIAIYARG TGGPSTA ~~~ CCQGVRSLSAAKSAADK 72
ZJLTP3 ~~~~~
ZJLTP4 ~MPIPKNPR RQLTIKAKER DMAARATALM PVACLLAAVA AAFVASAAAQ SGCCTTLLIS LYPCINIIYISG NVSTPPAS ~~~ CC 78
ZJLTP5 ~~~~ KALLIL ALNLLFLTAA NACGCACGKC PTPSPVVPPP PPPPTPTPS YNKCFVDTLK FGVCTNVLGL ISGEAGKVPT EPCCLLGGGL ADLEAAV ~~~ 93

ZJLTP1 QAACTCLKSM AGRLLGVSMG NAASIPGK ~~~ CGVNVGMPIN PSVDCSKVN 117
ZJLTP2 KAFNCCLKSG AGRVSLKPA NAASIPGK ~~~ CGVSLPYAIS GSTDCIRLA 119
ZJLTP3 ~~~~~
ZJLTP4 ~~~~~
ZJLTP5 ~~~~ CLCTAIK ANVLGVVNI PIKLSGLINY CGKCIPSGYQ ~~~~ CA 132

ZJLTP1
ZJLTP2
ZJLTP3 LAVAALPLAV TAAAGMF 72
ZJLTP4
ZJLTP5

```



Figure 2. Amino acid sequences of putative *Z. japonica* LTPs.

Green boxes indicate 8 cystein motif.

ZjLTP1 유전자의 아미노산의 길이는 117aa, 성숙한 단백질의 분자량(Molecular weight, Mw)은 9.18kD, 등전점(Iso-electric point, pI)은 8.69이고, *ZjLTP2* 유전자는 길이가 119aa, 신호서열을 제외한 단백질의 분자량이 8.90kD, pI 9.06으로 계산되었다(Table 3). 두 유전자는 크기가 약 9kD이고, 8시스테인 motif 중 마지막 시스테인 뒤에 추가되는 몇 개의 아미노산인 C-말단 구조가 존재하며 Family 1에 보존되어있는 pentapeptide motif가 존재하므로 Family 1-*LTP*에 해당한다. *ZjLTP1*은 N말단 쪽 motif(TKGDR)가, *ZjLTP2*는 C말단 쪽 motif(PY AIS)가 보존되어 있다(Figure 3).

신호서열 분석을 위하여 PlotComp와 Plant mPloc 두 개의 소프트웨어를 사용하였다. Plant mPloc은 *ZjLTP1*이 세포막 또는 세포벽에, *ZjLTP2*는 세포벽에 위치하는 것으로 예측하였다.

NCBI data에서 Blastp로 *ZjLTP1*과 2에 상동성이 높은 아미노산 서열을 검색한 결과 *ZjLTP1*은 옥수수(*Zea mays*, ACG43443.1), 보리(*Hordeum vulgare* sub sp. *Vulgare*, BAK025751.1), 밀(*Triticum aestivum*, CAH04986.1)과 약 70%, 69%, 63% 상동성을 나타내었고, *ZjLTP2*는 조(*Sorghum bicolor*, XP_002447774), 옥수수(*Zea mays* subsp. *Parviglumis*, ABA33849), 벼(*Oryza sativa Japonica Group*, ABA96283.1)와 75%, 69%, 69%의 상동성이 있는 것으로 나타났다. *ZjLTP1*과 2 두 아미노산 서열간의 상동성은 54.3%이다(Table 3).

Table 3. Amino acid sequence analysis of the *ZjLTPs*.

	Length	Mw (mature)	pI (mature)	Predicted location		Identity
				ProtComp Version 9.0.	Plant- mPloc	
<i>ZjLTP</i> 1	117aa (SP24)	9.18kD	8.69	Extracellular (Secreted)	Cell membrane, cell wall	63.0% - <i>Triticum aestivum</i> (CAH04986.1) 69.9% - <i>Zea mays</i> (ACG43443.1) 68.5% - <i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>Vulgare</i> (BAK05751.1)
<i>ZjLTP</i> 2	119aa (SP26)	8.90kD	9.06	Extracellular (Secreted) or Nuclear	Cell wall	75.0% - <i>Sorghum bicolor</i> (XP_002442774.1) 68.5% - <i>Oryza sativa Japonica Group</i> (ABA96283.1) 68.5% - <i>Zea mays</i> subsp. <i>Parviglumis</i> (ABA33849.1)
						<i>ZjLTP1</i> vs <i>ZjLTP2</i> : 54.3%

2) Phylogenetic tree 분석

2007년 발표된 리뷰논문(Andre OC *et al.*, 2007)에서 단자엽 식물과 모델식물인 애기장대, 담배의 *LTP* 아미노산 서열을 alignment하고(Figure 3) MEGA 6.0의 Neighbor joining 알고리즘을 이용하여 Phylogenetic tree를 그렸다(Figure 4). *ZjLTP1*과 2는 Family1-*LTP* 그룹에 속해졌다. *ZjLTP1*과는 57.7%, *ZjLTP2*와는 68.8%의 상동성을 나타내는 *Z. mays LTP*는 앞에서 추출되며 *Fusarium solani* 등과 같은 곰팡이와 박테리아에 대하여 항균활성을 나타낸 것으로 알려져 있다(Molina *et al.*, 1993)). 또한 *ZjLTP1*과 평균 50%, *ZjLTP2*와는 평균 60% 정도의 상동성을 갖는 *T. aestivum*의 *LTP*들은 정제한 단백질이 *Sclerotinia sclerotiorum*, *F. graminearum*, *Puccinia graminis* 등의 곰팡이들에 대하여 생장억제 효과를 나타내었다(Sun *et al.*, 2007).



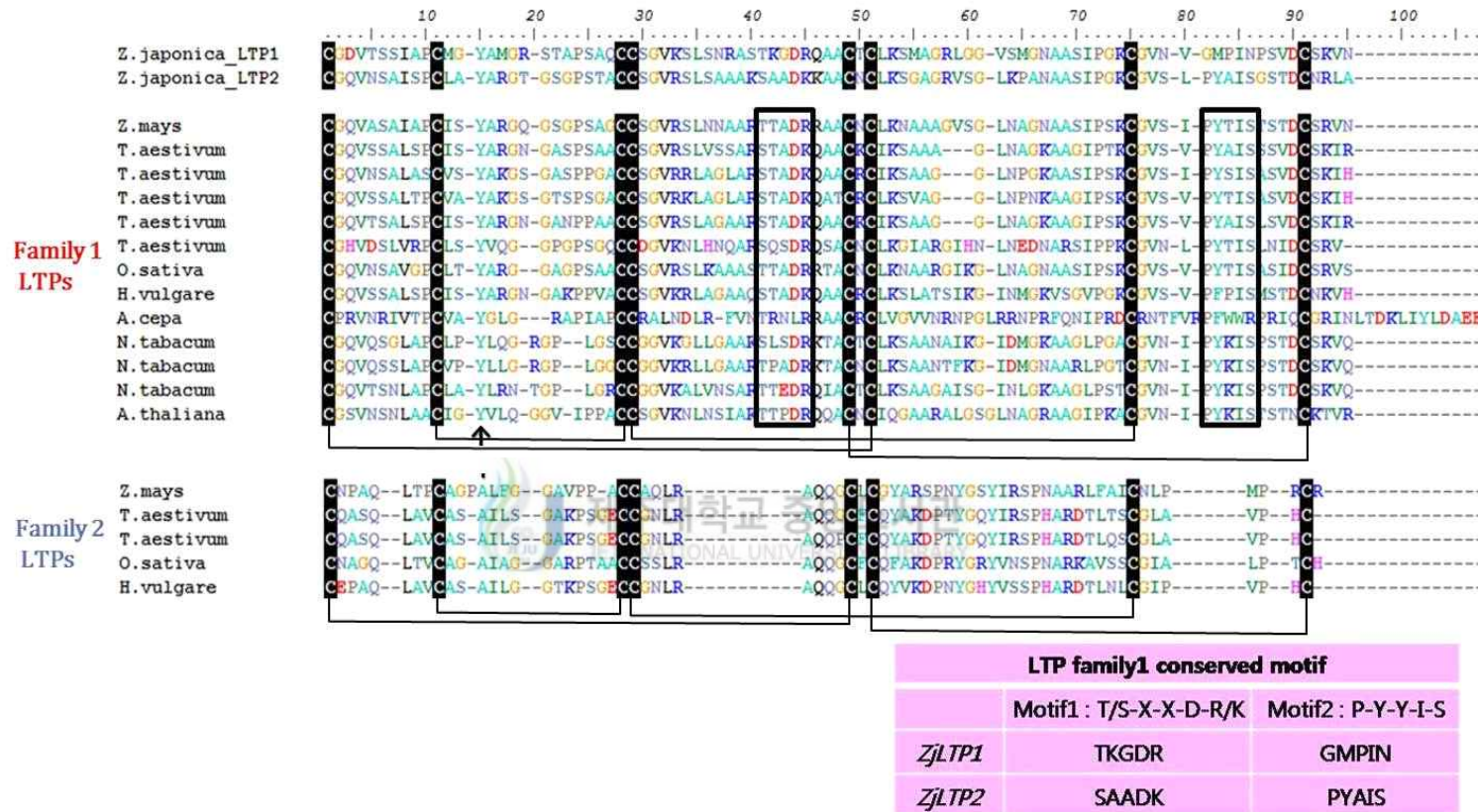


Figure 3. Alignment of the amino acid sequence of *ZjLTPs* with various plant *LTPs*. The conserved cystein residues are marked in black and four putative disulfide bonds were linked by lines. Small allow indicate that conserved Tyrosin(Y) residue in family 1-*LTPs*.

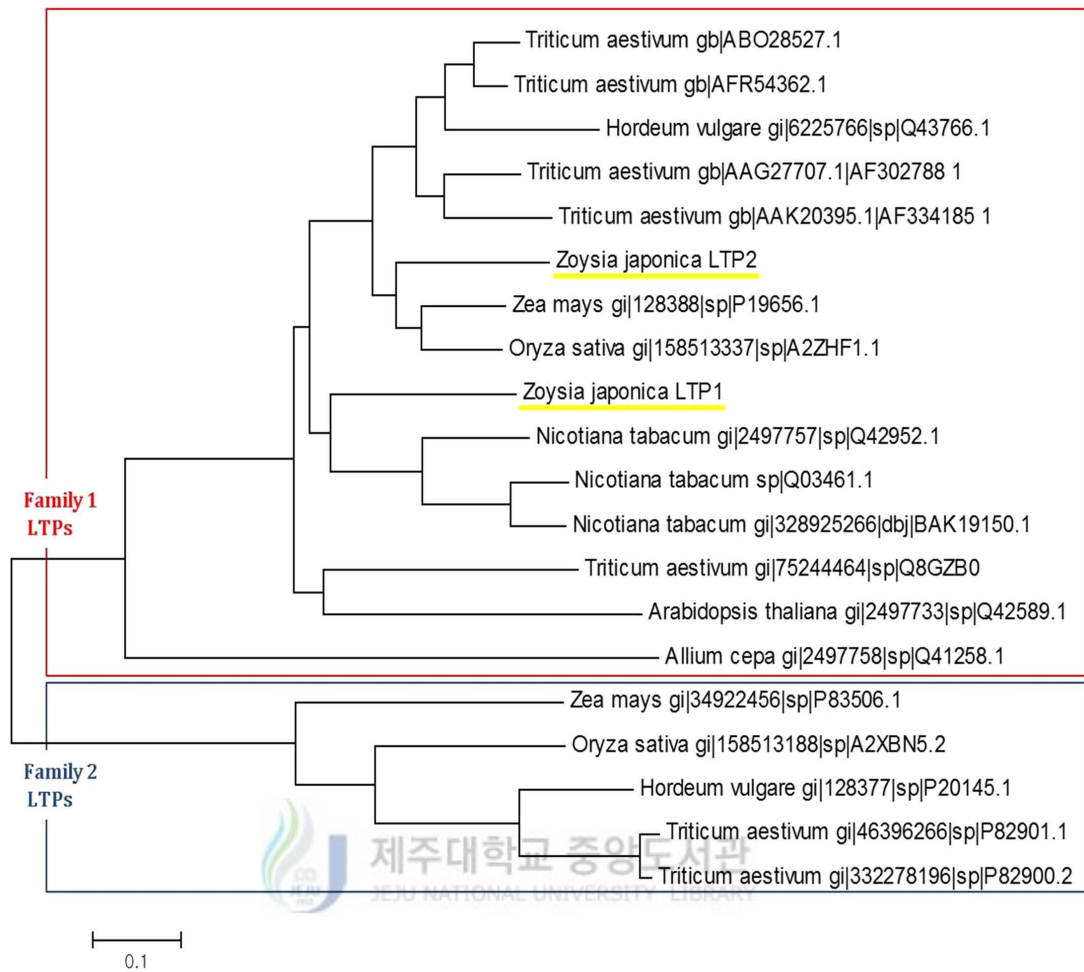


Figure 4. Phylogenetic analysis of *ZjLTPs* and various plant *LTPs*.

Tree was constructed using MEGA6.0 software.

2. Sub-cellular localization assay

Bio-informatics 기반의 PlotComp와 Plant mPloc 두 프로그램을 이용하여 *LT P* 신호서열을 분석한 결과 두 단백질 모두 세포 밖에 존재 할 것으로 예측되었다 (Table 3). 그러나 양파표피세포에서의 단백질 위치를 *ZjLTP*와 fusion 된 GFP 신호를 통해 관찰하였을 때, *ZjLTP1*은 세포 전체적으로 신호가 퍼져 있는 것으로 보아 세포질에, *ZjLTP2*는 다양한 크기의 점과 유사한 모양의 GFP신호가 세포 전체적으로 산재 되어 있는 것으로 관찰된다(Figure 5). 원형질 분리가 일어난 세포에서도 GFP신호가 줄어든 원형질체 내부에 존재하였기 때문에 두 단백질 모두 세포 밖으로 배출되지 않는 것을 알 수 있다.

*ZjLTP2*에서 나타나는 신호는 알려진 퍼옥시좀신호(Choung *et al.*, 2005)와 유사하게 나타난다. 식물 세포에는 미소체(microbody)라는 한 가지 대사과정을 갖도록 특화된 구형의 단일세포막으로 이루어진 세포소기관이 존재하는 데, 광합성 세포에서는 퍼옥시좀(Peroxisome), 종자에는 글리옥시좀(glyoxysome)이 대표적이다. 퍼옥시좀은 독성물질의 분해와 지방산의 산화가 일어나는 기관이고 글리옥시좀은 종자에서 지질의 저장소 역할을 하는 기관이다(전방욱 역, 식물생리학 3판).

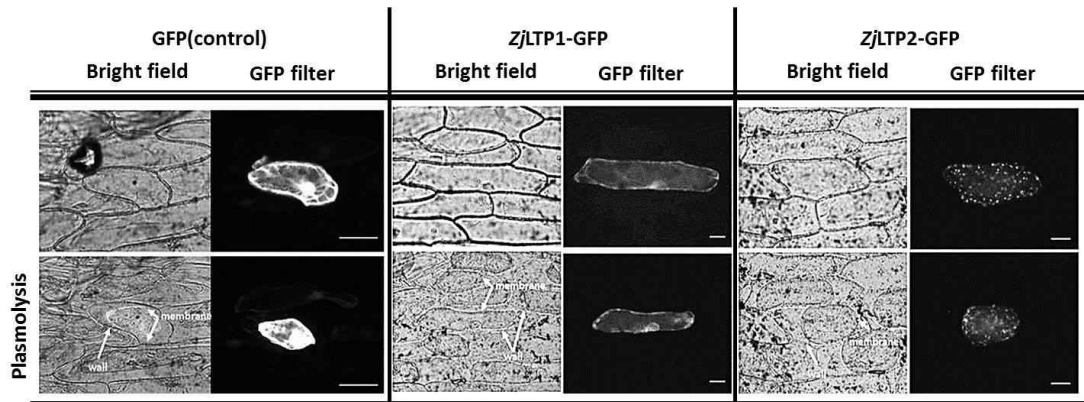


Figure 5. Localization of *ZjLTP*-GFP fusion protein in onion epidermal cell. Bar=0.1mm

3. Transcript 분석

1) 발현의 기관 특이성

β -Actin 유전자의 발현량을 상대로 한 각 유전자의 기관별 발현량의 차이는 그림(Figure 6)과 같이 나타났다. 병원균은 주로 뿌리나 잎집을 통해 감염하는데 병원균에 주로 공격당하는 기관에서 발현하거나 유도되는 *LTP*가 병원균을 인식하거나 대항하는 역할을 하는 유전자일 가능성이 높을 것이다. 5개의 *ZjLTP* 유전자들은 지하부인 잎몸보다 곰팡이에 접촉하는 잎집, 지상경 마디부에서 주로 발현 하였다.. 특히 잎집에서는 모든 *ZjLTP* 유전자들의 발현이 확인 되었으나 뿌리에서는 *ZjLTP4*만 약하게 발현되는 패턴을 나타내었다.



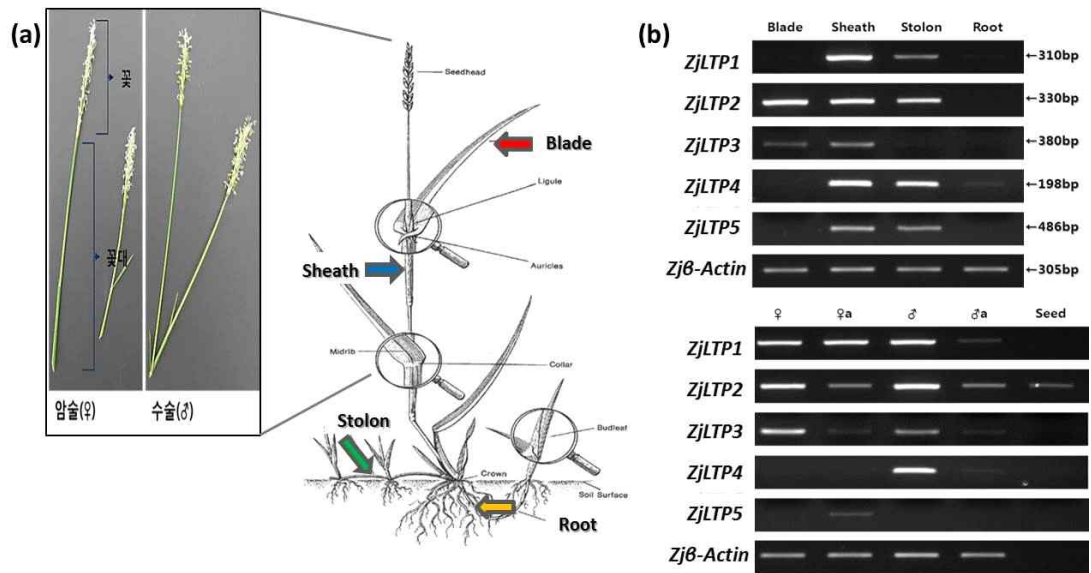


Figure 6. Organ-specific expression of *LTPs* by semi qRT-PCR.
 (a) Structure of zoysiagrass(<http://www.agry.purdue.edu/turf/tool/instructions/instructions.html>). (b) Expression pattern of *ZjLTPs*.

2) Cell-free culture filtrate(CF)처리에 의한 유도적 발현

식물체 전체에서 *R. solani* AG2-2(IV)와 *R. solani* AG-1(IA) CF처리에 대한 각 유전자들의 발현 패턴을 semi qRT-PCR을 통해 확인하였다(Figure 6). CF를 PDA배지에 도말하여 배양하였을 때 곰팡이가 전혀 자라지 않았던 것으로 보아 CF에는 곰팡이의 포자나 균사가 포함되지 않았다는 것을 확인할 수 있다. CF에는 곰팡이가 성장하면서 배출한 노폐물이나 곰팡이 특이적인 물질 등이 포함될 수 있다. *LTP*는 이러한 물질을 인식함(Blein *et al.*, 2002)으로써 식물에서 방어 반응을 촉발 시키는 기능을 한다.

*ZjLTP1*의 발현은 *R. solani* AG2-2(IV)와 *R. solani* AG-1(IA)의 CF처리에 의하여 빠르게 발현이 증가하였다가 감소하는 양상을 나타내었다. *ZjLTP2* 또한 *R. solani* AG-1(IA)에 대하여 발현이 증가하는 듯 보이나 그 차이는 *ZjLTP1*에 비해 크지 않았다. *ZjLTP3*는 *R. solani* AG-1(IA)의 CF에 대하여 발현이 증가하는 양상을 나타내었으며 *ZjLTP4*는 *R. solani* AG2-2(IV)균주에 대해서는 뚜렷하게 발현이 감소하였고 *R. solani* AG-1(IA)균에 대해서는 발현이 증가하는 결과를 나타내었다. *ZjLTP5*는 두 가지 균주 모두에 대하여 발현이 증가하였다 감소하는 양상을 나타내었다.

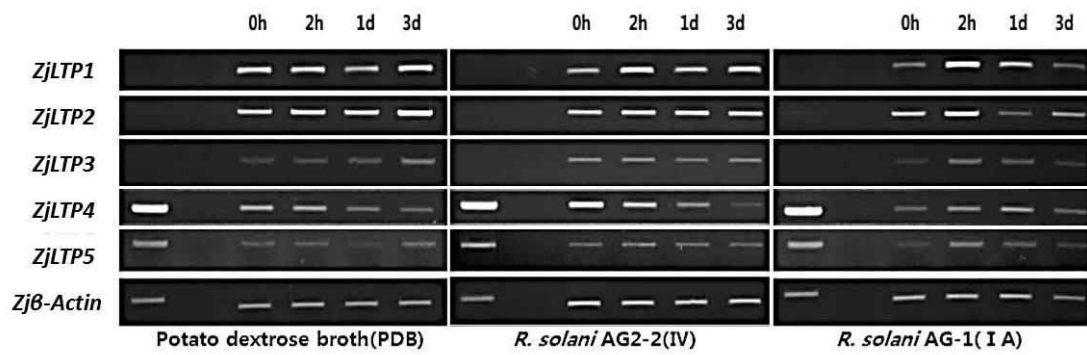


Figure 7. Effect of Cell-free culture filtrate(CF) on expression of *ZjLTPs* by semi qRT-PCR analysis.

3) 균사체 처리에 대한 유도적 발현 확인

R. solani AG2-2(1V)이 자라던 배지에 옴긴 들잔디는 일주일 후 잎집이 완전히 누렇게 변하였으며 어린잎은 완전히 고사 하였고 상대적으로 크고 늙은 잎은 잎집 가까운 부분부터 누렇게 변색되어 있었다. *R. cerealis*의 경우는 잎집과 잎몸에 밀가루를 뿌린 것과 같은 곰팡이 균사가 자라 있었다.

앞서 기관발현 특이성 결과에서 잎몸에서 *ZjLTP2*만 강하게 발현하였는데 균의 감염에 의하여 발현의 조직특이성이 변하는 가를 확인하고자 균에 직접 공격 당하는 기관인 잎집과 병징이 나타나는 기관인 잎몸을 따로 구분하여 샘플링 하였다. 감염 후에도 잎몸에서는 다른 유전자들의 발현 변화를 관찰하기 어려웠다. 특히 *ZjLTP1*은 동일조건에서 전혀 증폭이 일어나지 않았으며 *ZjLTP2*는 발현량이 점차적으로 감소하는 패턴을 나타내었다(Figure 8(b)).

잎집을 주형으로 PCR하여 얻은 전기영동사진(Figure 8(a))의 밴드의 밝기 강도를 Genetool program을 이용하여 정량화 한 후 그래프화 하였다(Figure 9). 침입한 병원균에 대항하여 미생물의 성장억제 작용을 하는 단백질이었다면 발현량이 증가하였을 것이나 *R. cerealis*에 감염된 잎집에서 *ZjLTP1*을 제외하고 5개의 유전자들은 특별히 증가하는 패턴 없이 발현이 점차 감소하는 양상을 나타내었다. 따라서 유전자들은 균의 성장에 대하여 직접적인 방어 기작을 수행하지 않을 것으로 사료된다.

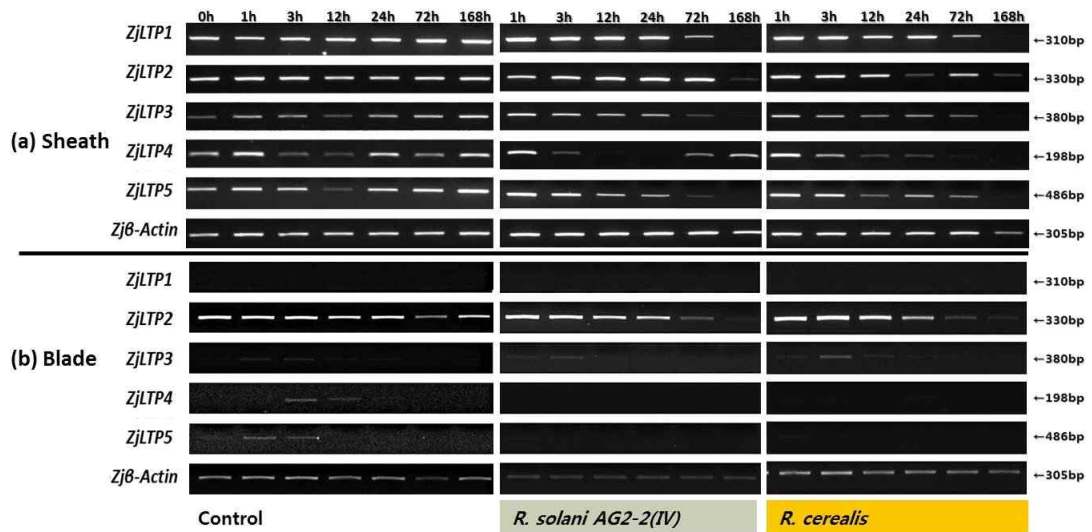


Figure 8. Effect of fungal pathogen inoculation on expression of *ZjLTPs* by semi qRT-PCR analysis. Expression pattern of *LTPs* in inoculated (a) sheath and (b) blade.

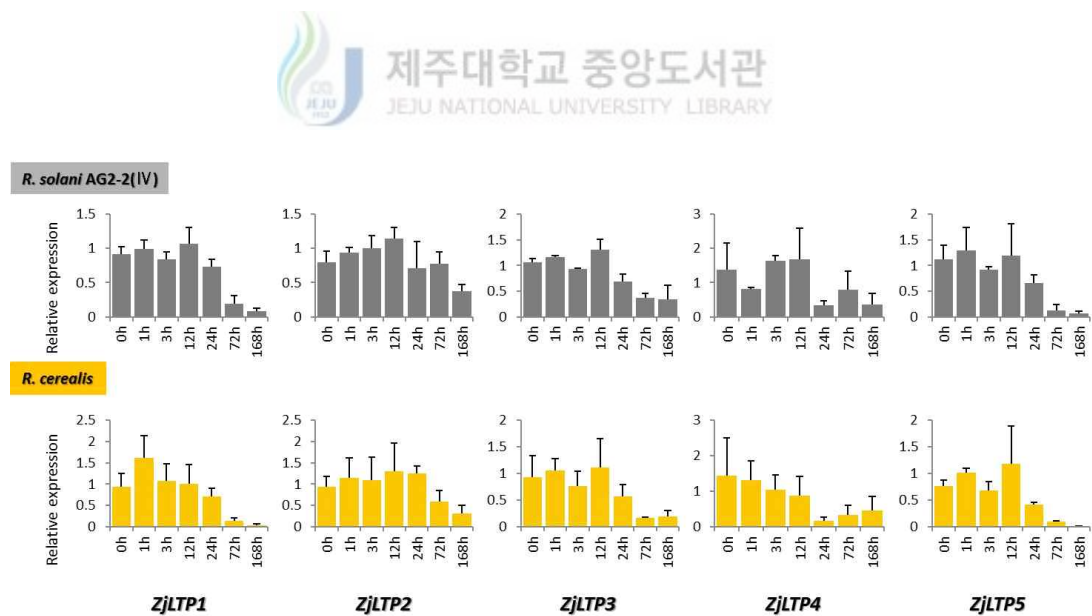


Figure 9. Densitometric quantification using raw volume of bands was done using the Genetool.

4) 비생물적 스트레스처리에 의한 유도적 발현 확인

잎표면에 존재하는 큐티클은 기공을 통하지 않는 수분의 손실을 차단하고 빛을 반사시켜 강한 빛에 의한 피해를 줄이는 역할을 한다(José *et al.*, 2009). 또한 세포가 고온이나 저온에 노출될 때 세포막에 존재하는 막지질이나 콜레스테롤의 함량을 변화시킴으로 세포막의 유동성을 변화시켜 세포의 손상을 줄인다. 또한 스트레스의 전달과정은 많은 부분 공유되기 때문에 따라서 큐티클형성에 관여하고 막지질들과 결합할 수 있는 기능을 가진 *LTP*유전자들이 비생물적 스트레스에 노출되었을 때 발현의 변화를 나타낼 것으로 예상할 수 있다. 들잔디에서 분리한 *LTP*유전자들이 이러한 비생물적 스트레스들에 의해 발현량의 변화가 생기는지 semi qRT-PCR을 수행하여 확인하였다.

들잔디 잎절편을 이용한 실험에서 *ZjLTP1*유전자는 비생물적 스트레스에 대해서도 잎몸에서 발현이 유도되지 않았다. *ZjLTP2*유전자는 고온스트레스에 의하여 발현이 급격히 감소하는 패턴을 나타내었다. *ZjLTP3*유전자는 대조구 0시간에서 기관발현특이성 결과와는 다르게 발현이 높게 나타났는데 이는 잎몸을 절편화 할 때 증가한 것으로 *ZjLTP3*가 상처와 관련된 유전자일 가능성을 나타내며 또한 저온처리구에서 발현이 감소하지 않은 것으로 보아 저온스트레스관련 유전자일 가능성도 있다(Figure 10).

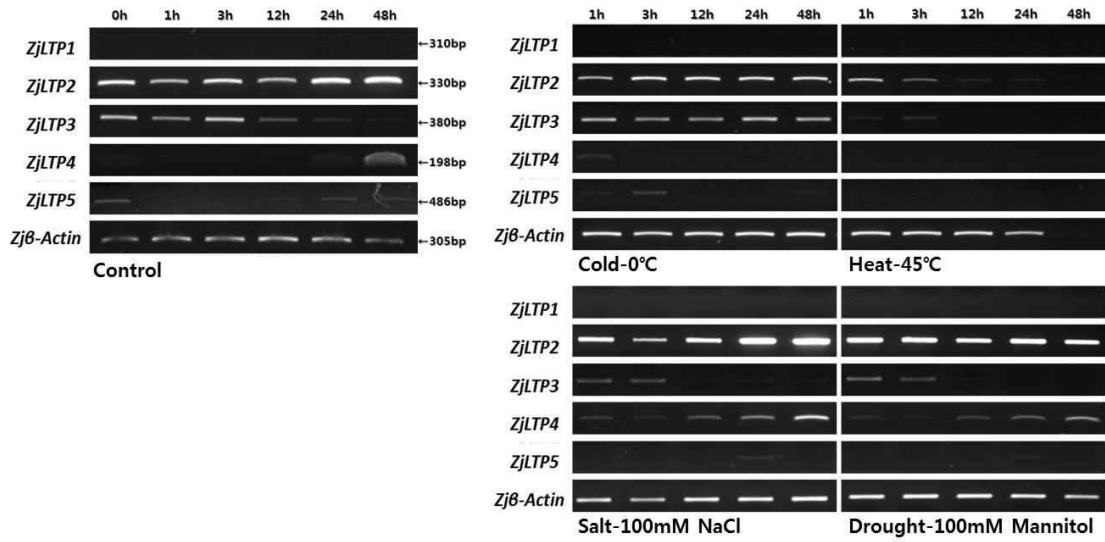


Figure 10. Effect of abiotic stresses on expression of *ZjLTPs* by semi qRT-PCR analysis.

4. ZjLTP 재조합 단백질의 기능분석

1) *E. coli* 발현 시스템을 이용한 재조합 단백질의 생산

정제를 위한 대량배양 조건을 확립하기 위하여 벡터, 균주, 발현 유도 전후 배양시간, IPTG농도 등 여러 가지 인자에 대한 테스트를 수행하였다. 최종적으로 3가지 벡터에 모두 DE3균주를 이용하였으며 pGEX4T-1 공벡터의 경우 37°C에서 OD₆₀₀=0.8까지 자랐을 때 IPTG를 1mM로 넣고 25°C에서 10시간가량 배양하여 정제하였다. pGEX4T-1-LTP1 벡터는 37°C에서 OD₆₀₀=0.8까지 자랐을 때 IPTG를 0.1mM로 넣고 25°C에서 10시간가량 배양 하는 것으로 하였다. pGEX4T-1-LTP2 벡터 또한 DE3균주에 도입하여 37°C에서 OD₆₀₀=1까지 자랐을 때 IPTG를 최종 0.5mM이 되도록 가하고 37°C에서 2시간 동안 추가로 배양하는 것이 가장 높은 수율을 위한 배양조건으로 확인 되었다.

2) 재조합 단백질의 항균활성 검정

정제한 단백질의 항균성을 검정하기 위하여 액체 배양조건에서 실험한 결과 *Fusarium* 두 균주에 대해서는 GST와 LTP1 단백질이 혼합되어 있는 배지에서의 차이가 나타나지 않았다. 그러나 *R. solani* 3가지 균주에 대하여 ZjLTP1 단백질이 혼합된 배양액에서 균사덩어리가 더 조밀하게 형성된 것을 육안으로 확인 할 수 있었다. 현미경을 이용하여 균사 덩어리를 관찰 하였을 때 균사의 길이가 길어지거나 두께가 변하는 등의 표현형은 나타나지 않았다(Figure 11).

원판확산법을 이용한 재조합 ZjLTP1과 ZjLTP2 단백질의 항균활성을 검정하였을 때, 두 단백질 모두 실험조건에서 항균활성을 나타내지 않았다(Figure 12).

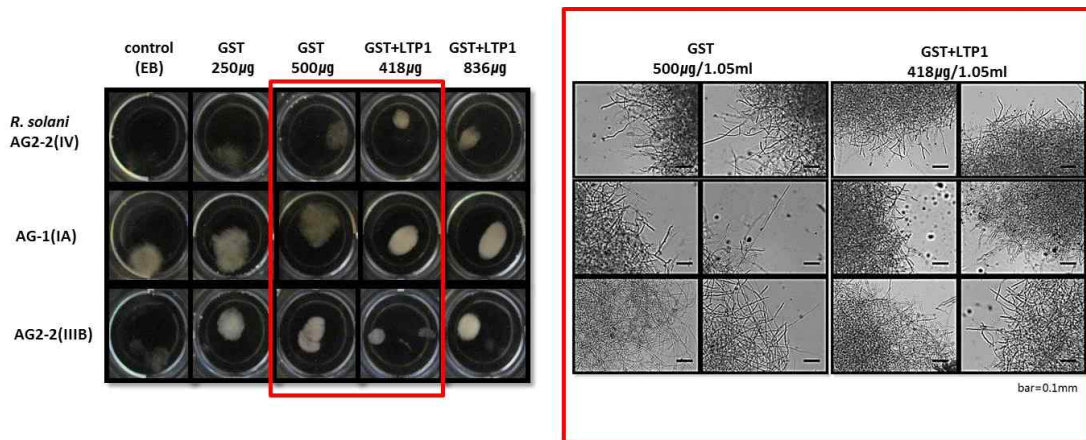


Figure 11. Antifungal activity of the recombinant *ZjLTP1* protein to fungal pathogens.

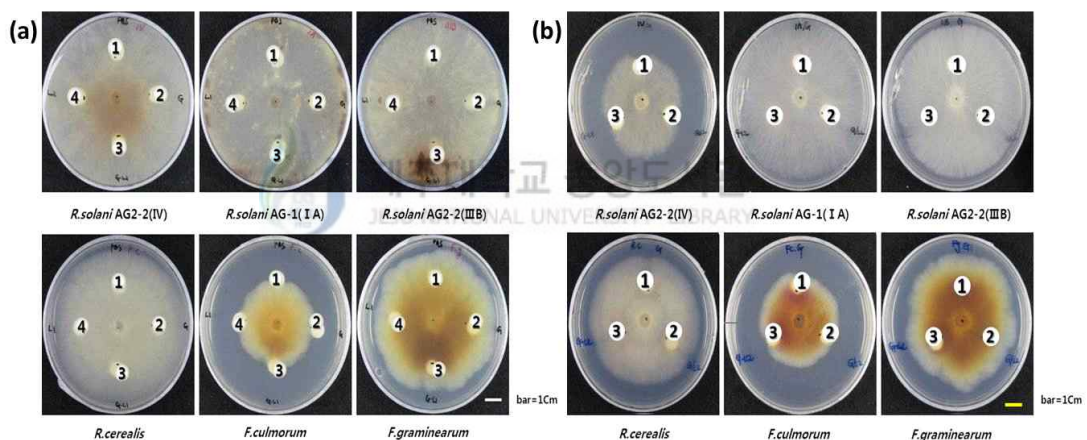


Figure 12. Antifungal activity of the recombinant *ZjLTP1* and *2* protein to fungal pathogens by paper disk method. (a) Recombinant *ZjLTP1* protein treated. 1, 1XPBS buffer; 2, GST(810µg); 3, undigested *GST-LTP1* protein(1070µg); 4, purified *LTP1* protein(220µg); (b) Recombinant *ZjLTP2* protein treated 1, GST(300µg); 2, GST+LTP2(300µg); 3, undigested *GST-LTP2* protein(300µg).

3) Lipid binding assay

LTP단백질의 세포막지질과 상호작용여부를 확인하기 위하여 PIP스트립테스트를 수행하였다. Membrane에는 빈 구역(Blank)을 제외하고 그림(Figure 13)과 같이 15개의 구역에 각각 다른 종류의 인지질이 결합되어 있다. 블로킹 후 GST tag를 가지고 있는 정제된 단백질을 혼성화하고 2차 항체로 Horseradish peroxidase(HRP) conjugated GST antibody를 혼성화하여 최종적으로 HRP 기질을 이용해 검출하면 *in vitro*조건에서 단백질이 결합하는 인지질을 알 수 있다. 실험결과 GST-ZLTP1의 경우는 Phospho-phosphatidylinositol(PtdInsP)와 Phosphatidic Acid(PA), Phosphatidyl Serine(PS)과 결합하였다. 그러나 GST나 GST-ZLTP2의 경우는 어느 것이라도 결합하지 않았다.

GST-LTP1단백질은 비인산화된 PtdIns과 인산화된 PtdIns를 구분하여 결합하는 것으로 보아 인지질의 지방산 꼬리보다 극성머리부분을 인지하는 것으로 예상 할 수 있다. 또한 세포막에 주요 구성성분인 Phosphatidyl Choline(PC)이나 Phosphatidyl Ethanolamine(PE)과는 결합하지 않았으며, Lysophosphatidic Acid(LPA)나 Lysophosphatidyl Choline(LPC)과도 결합하지 않았다. PA는 세포막을 이루는 인지질의 전구물질이지만 세포막에 1-5%정도만 존재하며 호르몬과 같은 외부자극에 대한 세포신호전달과정에서 중요한 신호전달분자로 알려져 있다. PC, PE, LPA, LPC는 신호전달과정에서 PA의 전구물질이 된다. PtdIns 또한 세포의 생리적 작용에 의하여 인산화 되는 중요한 신호전달분자로 알려져 있다(Testerink and Munnik, 2005, XUE *et al.*, 2009, The AOCs Lipid Library).

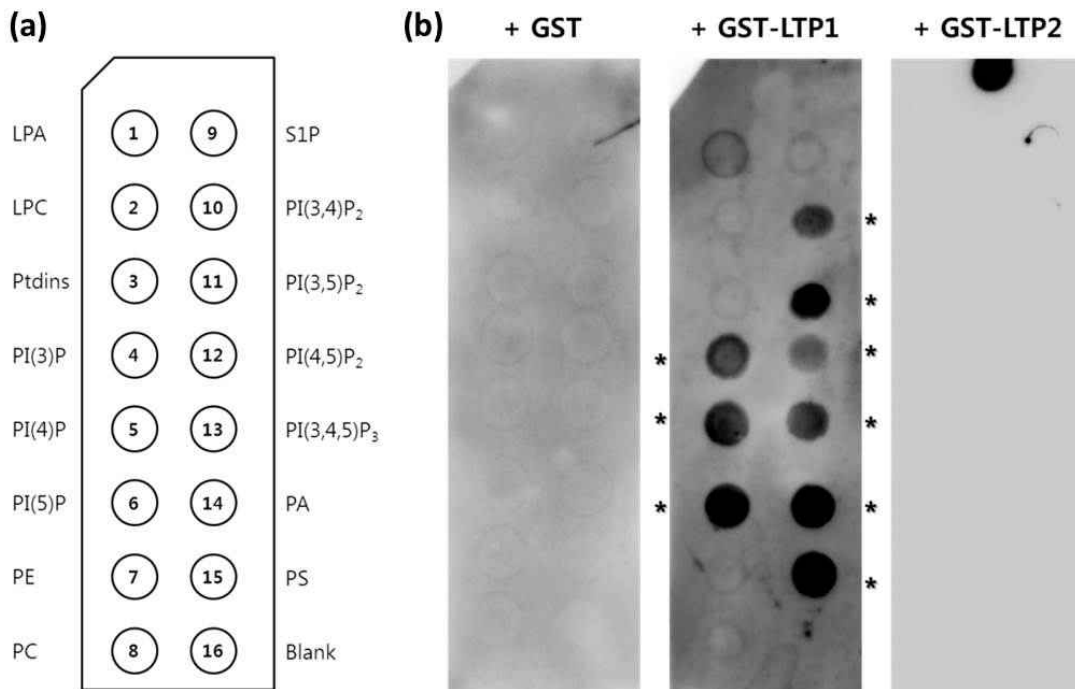


Figure 13. Binding pattern of GST protein, GST-*Zj*LTP1 and GST-*Zj*LTP2 fusion protein. (a)Layout of PIP strips. 100picomoles of lipid per spot. (1:Lysophosphatidic acid, 2:Lysophosphatidylcholine, 3:Phosphatidylinositol(Ptdlns), 4:Ptdlns(3)P, 5:Ptdlns(4)P, 6:Ptdlns(5)P, 7:Phosphatidylethanolamine, 8:Phosphatidylcholine, 9:Spingosine-1-phosphate, 10:Ptdlns(3,4)P₂, 11:Ptdlns(3,5)P₂, 12:Ptdlns(4,5)P₂, 13:Ptdlns(3,4,5)P₃, 14:Phosphatidic acid, 15:Phosphatidylserine, 16:Blank). (b)Binding pattern of GST protein alone and GST-LTP1, GST-LTP2 fusion protein.

5. 애기장대 형질전환체 분석

1) 애기장대 형질전환과 동형접합성 계통의 선발

형질전환에 사용한 벡터의 T-DNA부분은 Figure 14와 같으며 *A. tumefaciens* EHA105를 이용하여 애기장대에 도입하였다. T₁종자를 화분에 파종하고 본 잎이 4장 정도로 자랐을 때 Basta를 살포하여 살아남은 개체에서 각각 종자(T₂)를 받아 Basta 저항성 형질에 대한 분리비를 관찰하였다. T₃세대까지의 분리비 분석을 수행하여 T₂세대에서 3/4이 생존하고, T₃세대에서 파종한 모든 개체가 살아남은 계통을 선발하였다. 결과 *ZjLTP1*가 도입된 것 3개, *ZjLTP2*가 도입된 것 4개의 형질전환 애기장대 독립 계통을 얻을 수 있었다.

선발된 애기장대로부터 genomic DNA를 추출하여 PCR을 통해 T-DNA 도입 여부를 확인하였고, total RNA를 추출하여 semi qRT-PCR을 수행함으로써 도입 유전자가 정상적으로 전사됨을 확인하였다(Figure 14). 형질전환 애기장대는 평상시의 배양조건에서 야생형과 표현형을 비교하여 볼 때, 육안으로 확인 가능한 크기, 색, 노화 속도 등에는 차이가 없었다.



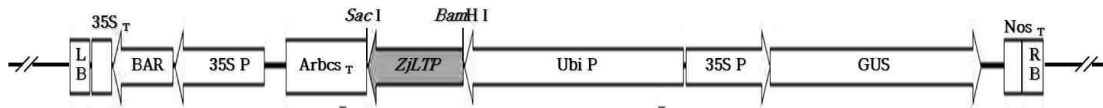


Figure 14. T-DNA construct of binary vector plasmid IG2-*ZjLTP*.

UbiP, Ubiquitin promoter; Arbcs_T, Arabidopsis terminator; 35S_P, CaMV 35S promoter; PPT, Phosphinothricin resistant gene; 35S_T, CaMV terminator; GUS, β-glucuronidase gene; Nos_T, Nopaline synthase terminator; LB, Left border; RB, Right border

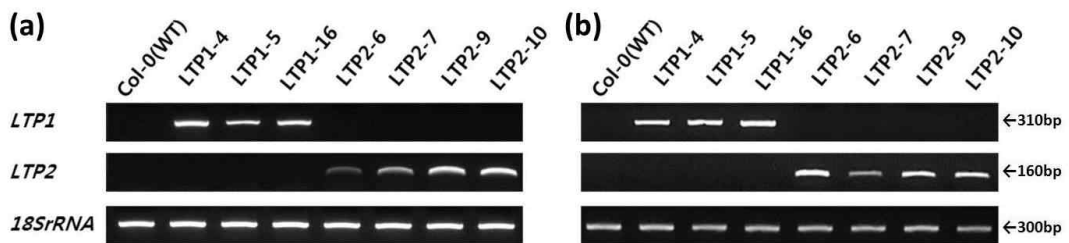


Figure 15. Identification of transgenic *Arabidopsis*. (a) Genomic PCR (b) RT-PCR analysis of *ZjLTPs* and *18S rRNA* genes in wild type and transgenic plants.

2) 형질전환 애기장대의 내병성 검정

1/2MS배지를 2구역으로 나누어 한쪽에는 야생형, 다른 반쪽에는 형질전환체 잎을 따서 꽃고 중앙에 곰팡이조각을 치상하여 균사 또는 감염에 의한 병징이 퍼져나가는 정도를 관찰하였다. 형질전환 애기장대와 야생형 애기장대의 잎이 썩어가는 정도가 다르지 않았으며 곰팡이의 균사가 뻗어나가는 정도도 다르지 않았다(Figure 16(a)).

떨어진 잎이 아닌 식물체 전체에서의 내병성확인을 위하여 실험에서 하나의 배지에 야생형과 형질전환 애기장대를 구역별로 심고 배지 중앙에 곰팡이를 치상하여 관찰 하였다. 이 결과도 감염에 의한 피해 정도나 균사의 성장이 야생형이 과종된 구역과 형질전환체가 과종된 구역에서 다르게 관찰되지 않아(Figure 16(b)) 계획한 실험에서 형질전환 애기장대가 야생형에 비해 내병성이 증가되지 않은 것으로 나타났다.

그러나 야생형과 형질전환 애기장대를 각 각 독립된 배지에 과종하고 실험하였을 때에 *R. cerealis*와 *Fusarium* 두 균주에 노출된 *ZjLTP2* 도입의 애기장대가 야생형에 비하여 생장이 저하되는 표현형을 나타냈다. 특히 *R. cerealis*와 *F. culmorum*에서 그 표현형을 뚜렷하게 관찰 할 수 있는데 잎이 진한 녹색을 띄며 광택도 더 강하게 났으며, 뿌리 부분이 곰팡이와 완전히 접하였을 때 잎자루의 색이 진한 자색을 띄는 것을 관찰 할 수 있었다(Figure 17)

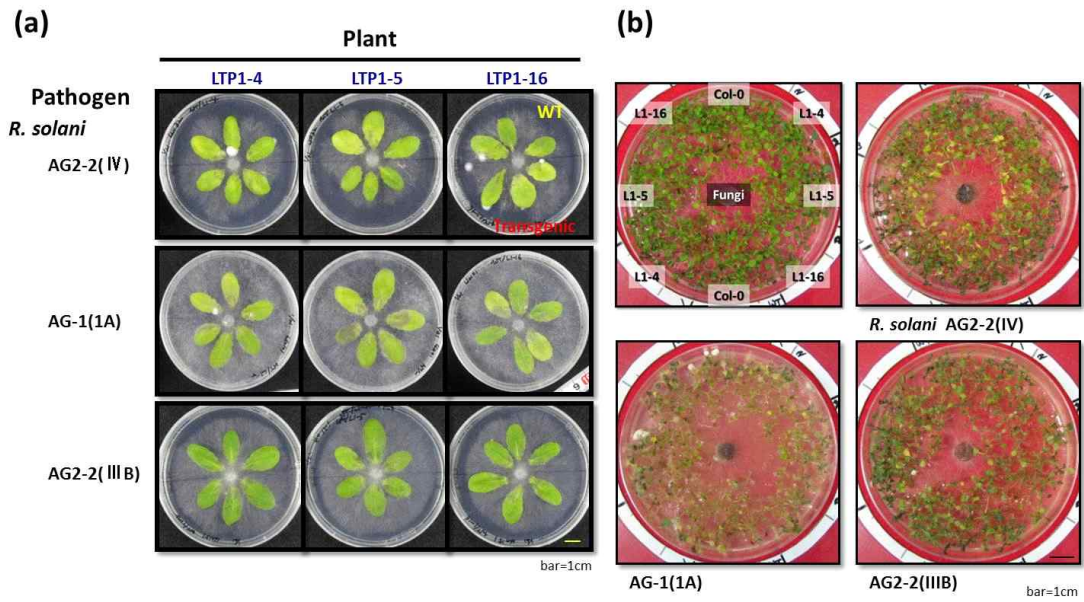


Figure 16. Transgenic resistance of *Arabidopsis* (a) detached leaves (b) whole plants expressing *ZjLTP*.

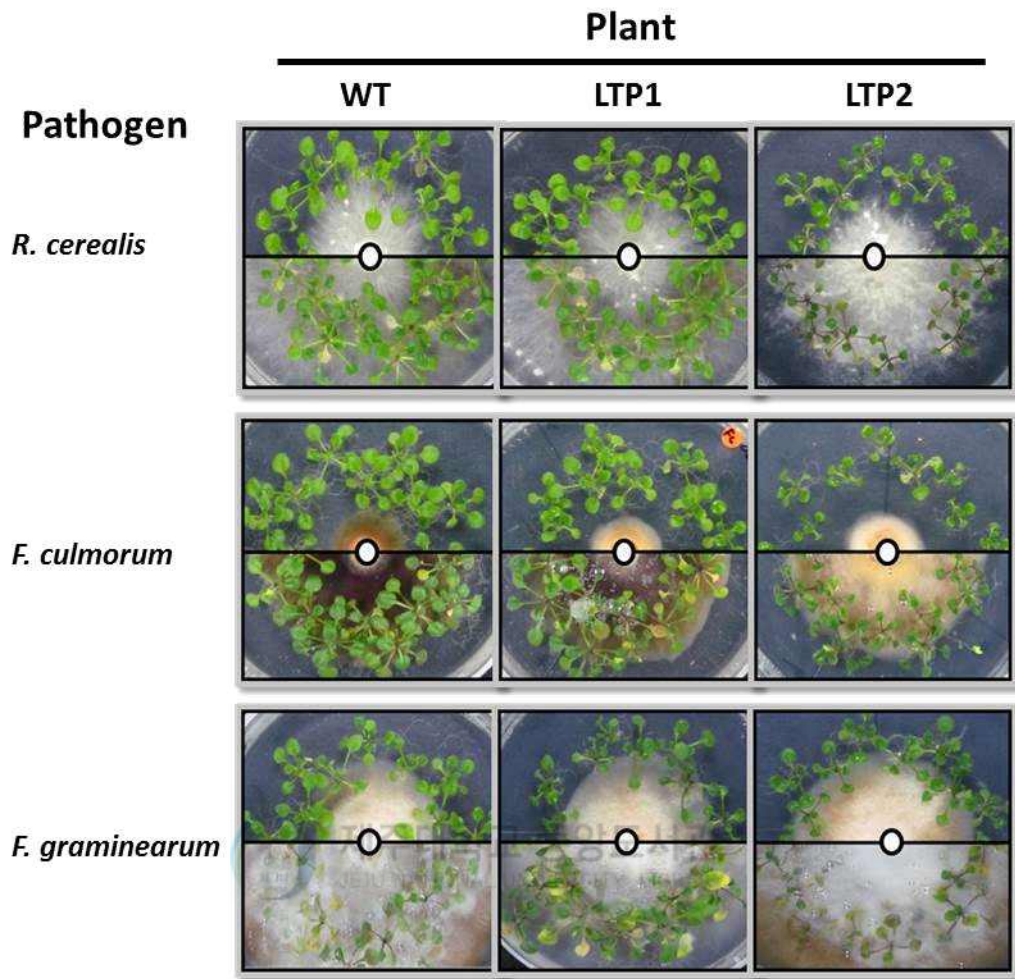


Figure 17. Transgenic resistance of *Arabidopsis* whole plant expressing *ZjLTP*.

3) 형질전환 애기장대 추출물의 항균활성

형질전환체의 표현형에는 특별한 차이가 없으나 도입된 *LTP*가 과발현 됨으로써 다른 항균성 단백질의 발현이 유도될 수 있으며(Roy-Barman *et al.*, 2006), 2차대사 산물의 조성변화(Choi *et al.*, 2012)가 나타날 수 있다. 따라서 형질전환 애기장대로부터 수용성 용매를 사용하여 단백질을 추출하고, 메탄올을 사용하여 지용성 물질을 추출하여 이 추출물들의 항균활성을 검정하였다.

(1) Total protein crude 추출

각 계통별로 단백질을 추출하고 Amicon Ultra 3K device-3000NMWL(Millipore)를 이용하여 처음 추출액의 부피에서 1/10, 1/100이 되도록 3000rpm, 4°C에서 원심분리 하였다. 이 농축된 추출물의 항균활성을 원판확산법을 이용하여 검정하였으나 실험한 6개의 균주 중 *F. graminearum*에서만 약한 억제력을 나타 낼 뿐 눈에 띄는 활성을 나타내지 않았다(Figure 18).

(2) 메탄올 추출

*LTP*가 항균성을 나타내는 지용성물질의 축적에도 관여하는 것으로 알려져 있기 때문에 메탄올을 이용하여 지용성 물질을 추출 한 후 항균활성을 검정하였다.

추출물이 혼합된 배지에서 6개 균주의 성장을 육안으로 관찰 하였을 때, *Fusarium* 두 균주에서는 생장억제 작용이 나타나지 않았으나 *Rhizoctonia*속의 4 균주에 대해서 형질전환체 추출물이 혼합된 경우 야생형의 추출물에 비하여 강한 생장억제 작용이 나타났다. 곰팡이들이 추출물을 녹이는 데 사용한 DMSO에 생장이 억제되어 아무것도 넣지 않은 배지에서 보다는 생장이 둔화 되었지만 동일한 농도로 추출물이 처리된 배지에서 비교할 때, 형질전환체 추출물에 의한 생장억제 효과가 뚜렷하게 나타남을 확인 할 수 있었다(Figure 19).

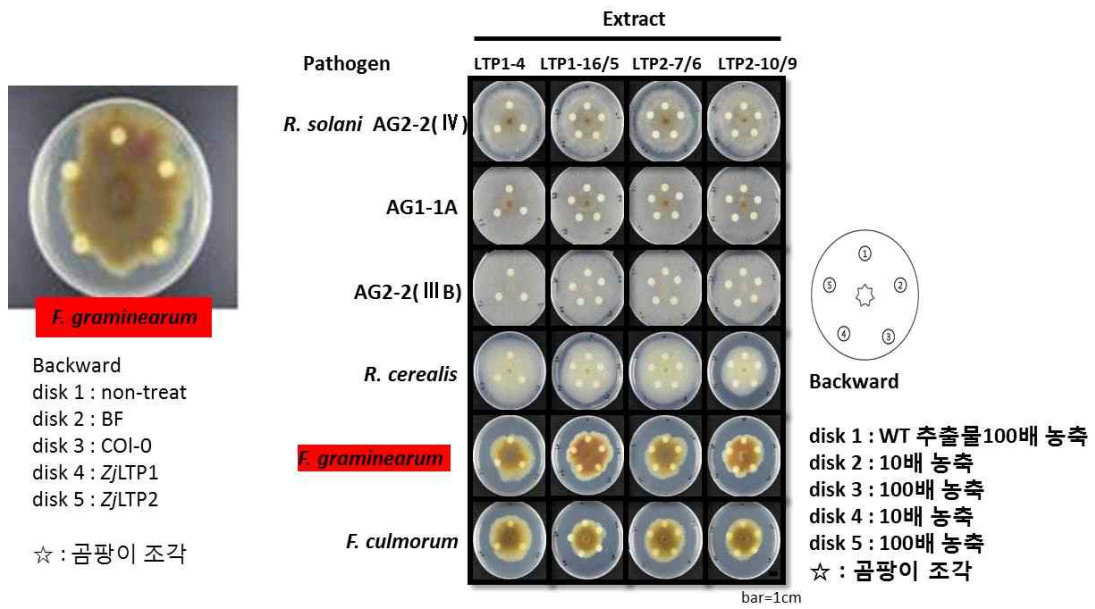


Figure 18. Antifungal activity of the total protein crude extract from *Arabidopsis* transformant to fungi by paper disk method.

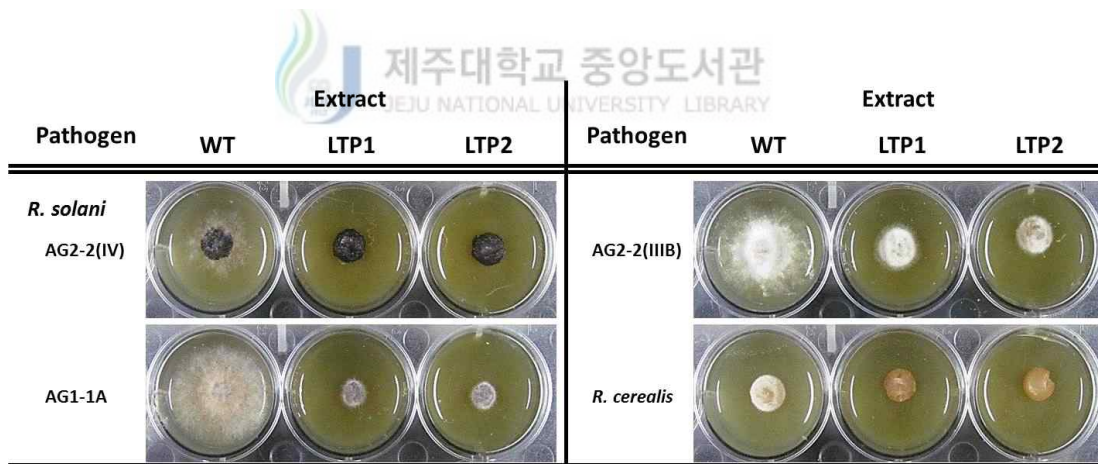


Figure 19. Antifungal activity of the methanol extract from *Arabidopsis* transformant to fungi on the medium supplement.

4) 형질전환 애기장대의 비생물적 스트레스 내성

*LTP*가 비생물적 스트레스와 호르몬 등에 의하여 발현이 유도되고 과발현 형질전환체에서 병원균에 대한 저항성이 증가 하였을 뿐 아니라 고온과 염에 대한 내성을 나타냈다는 보고 된 바 있으므로 제작한 형질전환체를 고온, 염, 건조 스트레스에 노출 시킨 후 표현형을 관찰하였다

(1) 고온스트레스 내성의 확인

들잔디의 *LTP*유전자가 도입된 애기장대의 고온내성 정도를 확인하기 위하여 동일한 플레이트에 구역을 나누어 형질전환 애기장대와 야생형 애기장대를 함께 파종하고 15분 간격으로 45℃에 노출시켰다. 노출 후 다시 배양실로 옮겨 회복시키면서 관찰한 하였으나 형질전환체와 비형질전환체 간의 표현형 차이 없이 고온스트레스에 의해 백화되며 고사였다. 본 실험조건에서 15분, 30분 동안 고온에 노출된 배지의 식물체는 전혀 고온에 노출되지 않은 식물체와 동일한 표현형을 나타내었다. 검은별 표시는 야생형 애기장대 구역을 나타낸다.

파종 후 약40일이 지난 야생형 애기장대와 형질전환 애기장대의 화분조건에서 고온저항성 테스트 수행한 결과 기내배양 조건과 동일하게 표현형의 차이가 나타나지 않았다. 50℃로 설정된 오븐에서 건조스트레스를 동시에 받는 것을 피하기 위하여 더운 바람에 직접 닿지 않도록 랩으로 밀봉하고 많은 양의 물을 저면 관수 하였기 때문에 이 조건에서 건조스트레스의 복합작용은 없는 것으로 볼 수 있다. 애기장대는 사진에서 상하를 기준으로 줄을 맞추어 계통별로 식재하였고 검은별 표시는 야생형 애기장대 구역을 나타낸다(Figure 20).

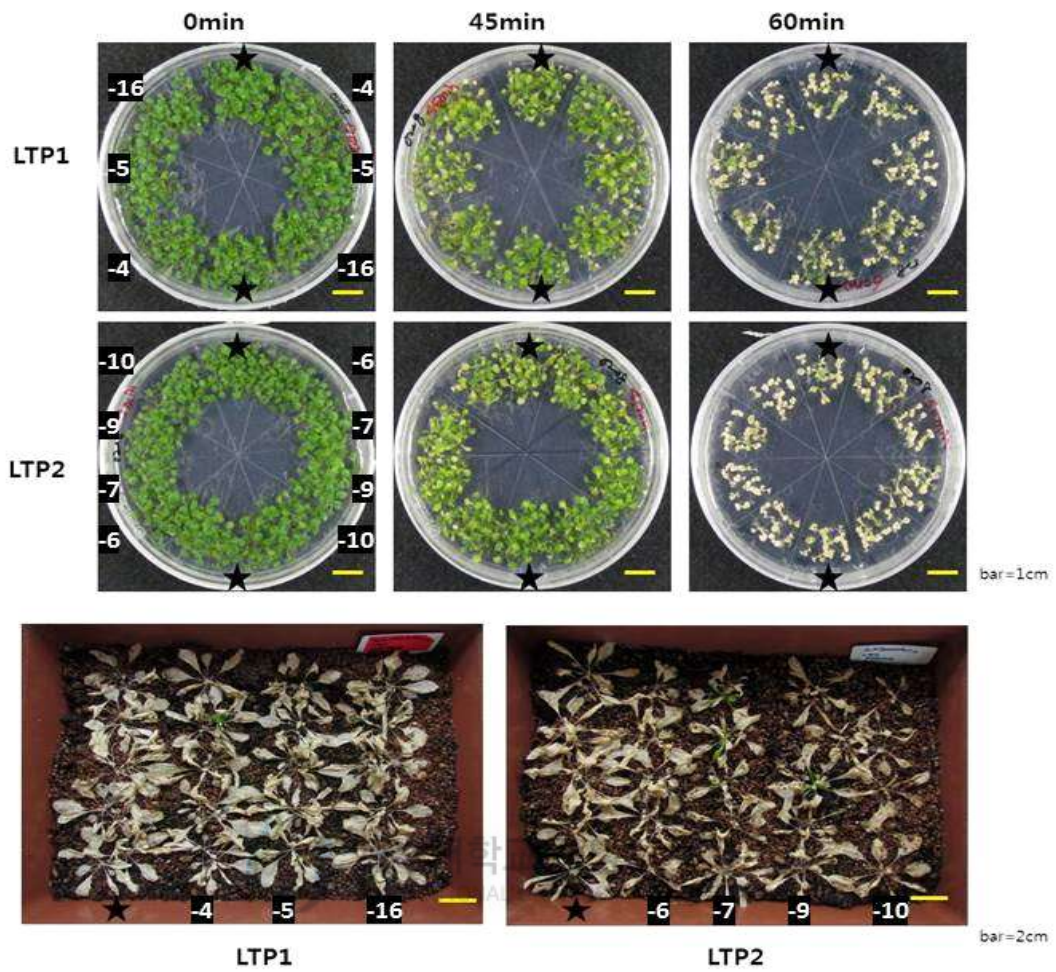


Figure 20. Heat stress tolerant phenotype of the transformants. ★ indicate WT plant. Each number of the independent line is indicated in the figure.

(2) 염과 건조스트레스 내성의 확인

배지조건에서 꽃대가 올라오기 전까지 배양된 성숙한 애기장대를 NaCl이 100 또는 200mM로 혼합된 배지로 옮겨 표현형을 관찰하였다. 야생형이나 들잔디 *LTP1*이 도입된 형질전환체나 *LTP2*가 도입된 형질전환체 3그룹간의 표현형 차이는 나타나지 않았다. 200mM의 NaCl이 포함된 배지에서 식물체는 뿌리를 배지에 깊이 박지 않았으며 성장정도로 불량하고 백화되거나 갈변되며 고사하는 잎이 관찰되었다. 100mM의 NaCl을 저면관수 한 화분에서 애기장대는 흙과 닿아있는 잎부터 백화되며 고사하였고 젊은 잎도 밝은 녹색으로 변하였다, 잎모양을 관찰하여 보면 둥글게 뒤로 말리는 듯하게 자랐다. 이 실험조건에서도 형질전환체와 야생형 애기장대의 표현형 차이는 나타나지 않았다(Figure 21).

내염성 테스트와 동일한 방법으로 Mannitol이 포함된 배지에 야생형과 형질전환 애기장대를 옮기고 표현형을 관찰하였다. 잎의 크기가 현저히 작아졌으며 진 녹색의 투명한 색을 나타내었다. 화분을 이용한 실험에서도 형질전환체는 야생형과 비교할 때 표현형의 차이를 나타내지 않았다(Figure 22).



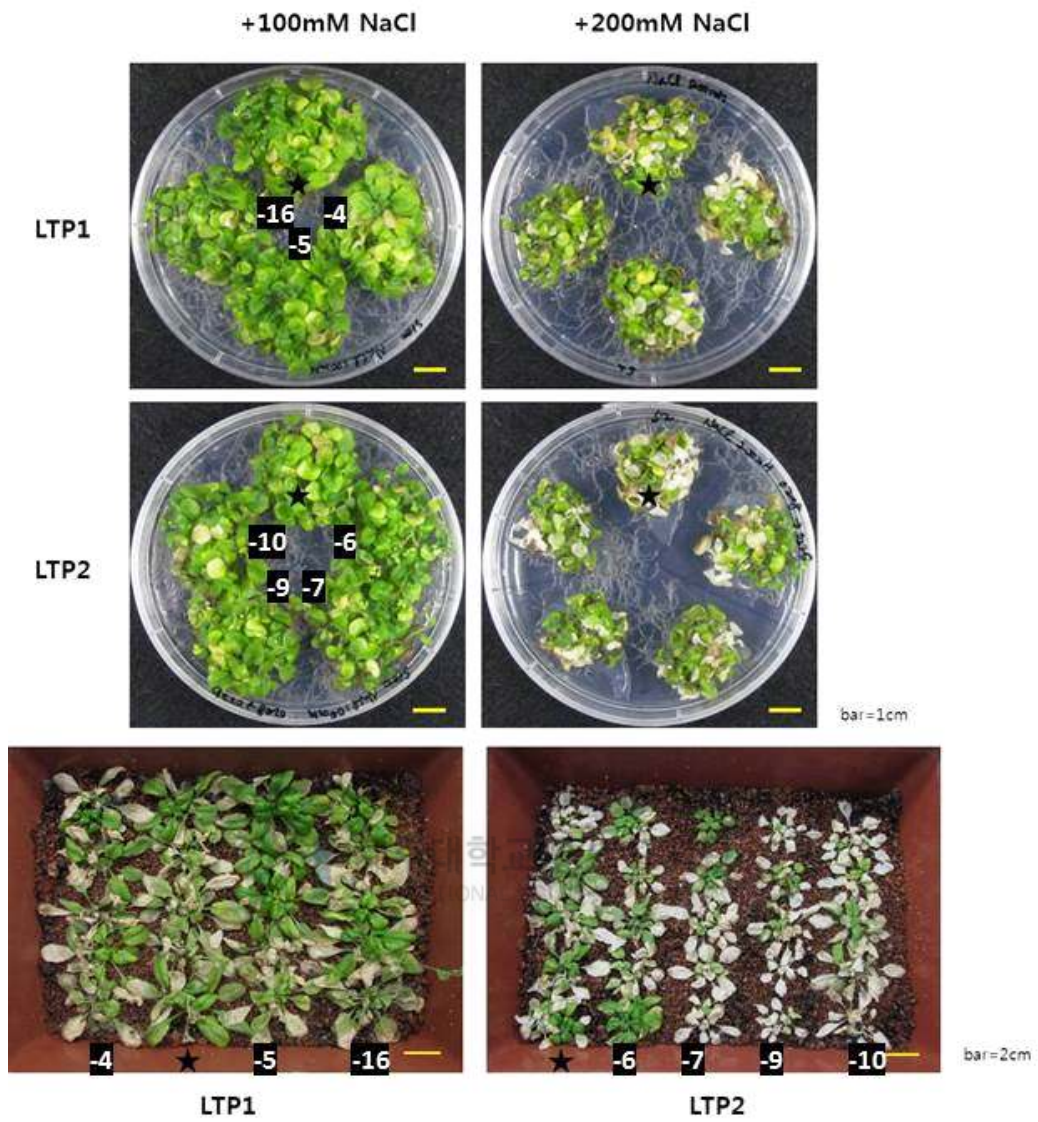


Figure 21. Salt stress tolerant phenotype of the transformants. ★indicate WT plant. Each number of the independent line is indicated in the figure.

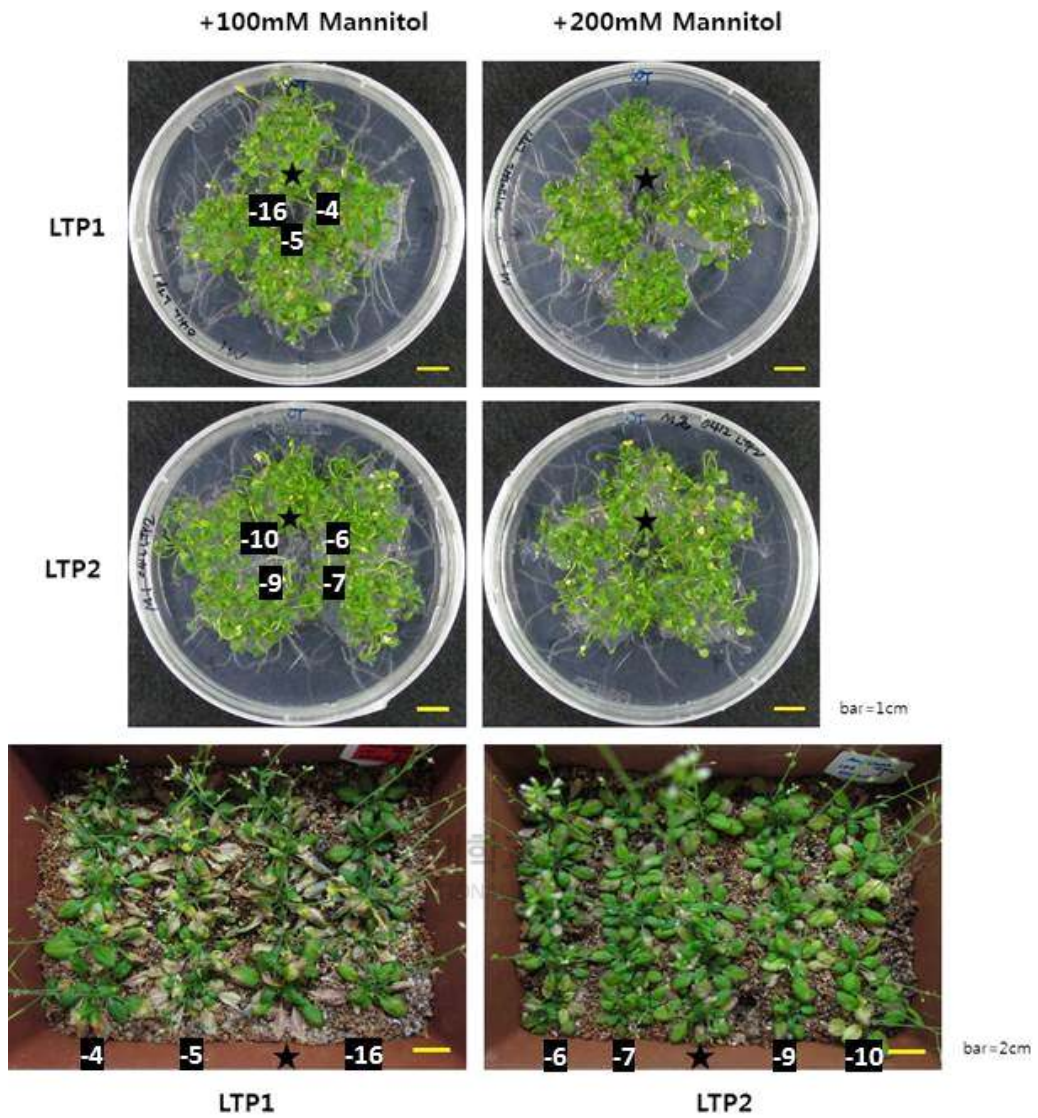


Figure 22. Drought stress tolerant phenotype of the transformants. ★indicate WT plant. Each number of the independent line is indicated in the figure.

IV. 종합고찰

분자육종을 통하여 내병성 들잔디를 개발하기 위해서는 효과적인 내병성 유전자원의 확보가 필수적이다. 또한 다른 생물의 유전자를 도입하는 것 보다 고유의 내병성 유전자원을 사용하는 것이 더 효과적이므로 들잔디로부터 항미생물 활성을 가진 PR peptide중 하나인 *LTP* 유전자를 분리하고 기능 분석을 수행하였다.

들잔디 EST library로 부터 5개의 *LTP* 추정 클론을 찾아 스트레스 조건에서 발현패턴 분석을 수행하였으며 이중 2개의 *LTP* 클론에 대하여 기능분석을 수행하였다.

*ZjLTP1*은 *R. solani* AG2-2(IV)의 CF 또는 *R. cerealis*의 균사에 노출 되었을 때 초기에 발현이 증가하는 패턴을 나타내었으므로 PR-peptide 그룹에 포함될 가능성이 있다고 볼 수 있으나, 재조합 단백질과 과발현 애기장대의 단백질 추출물은 곰팡이에 대하여 성장저해 효과를 나타내지 않았다. 또한 과발현 애기장대의 생물-비생물적 스트레스 조건에서 표현형이 야생형과 다르지 않았다.

그러나 *ZjLTP1*은 곰팡이 배양액을 처리하였을 때 초기의 발현이 증가하고 세포질에 존재하며 재조합단백질이 세포막을 통한 신호전달과정에 중요한 2차 신호전달물질들(PA)과 선택적으로 결합하는 결과를 통하여 세포내에서 신호전달물질의 운반자 역할을 수행 할 것으로 예측 할 수 있다.

애기장대 *LTP* 중 하나인 DIR1-1 단백질은 물관을 통한 G3P의 장거리 운반체로 이 유전자가 녹아웃된 애기장대는 SAR 반응이 유도되지 않는다. 그러나 과발현 되었을 때는 야생형과 다른 표현형을 나타내지 않는데(Chanda *et al.*, 2011) *ZjLTP1*이 이와 유사한 경우일 가능성이 있다.

*ZjLTP2*는 본 실험에서 사용한 병원균의 배양액처리, 균사의 접촉에도 발현이 증가하지 않아 PR-peptide라는 증거가 부족하다. 재조합 단백질 또한 항미생물 활성을 나타내지 않았다. 다른 실험 결과로부터 *ZjLTP2*의 기능을 유추하여 볼 때, 광합성이 일어나는 잎몸과 휴면상태의 종자에서 발현하며 단백질이 퍼옥시좀으로 유도되는 신호서열을 가지고 있는 것으로 나타났기 때문에 지질대사 과정에

서 기능하는 유전자 일 것으로 예상된다. 종자에는 피옥시즘과 유사한 글라이옥시즘이 존재하는데 피마자(*Ricinus communis*) 종자의 LTP가 종자에서 지질의 축적에 관여하는 것으로 보고(Tsuboi *et al.*, 1992)된 바 있다. 과발현 애기장대에서 일반적인 배양조건에서는 표현이 동일하게 관찰되었으나 *R. crealis*, *F. culmolum*의 균체와 함께 배양하였을 때 표현형이 다르게 나타났다. 병원균 접근에 의하여 촉발된 일련의 생리학적변화와 *ZjLTP2*에 의한 지질대사 과정의 변화가 생장이 둔화되고 잎의 녹기가 짙어지며 표면의 광택이 증가하는 표현형을 나타낸 것으로 사료된다.

야생형과 형질전환 애기장대 메탄올 추출물의 항균활성이 크게 차이가 나타난 이유는 *ZjLTP*의 과발현에 의하여 항균성을 가진 지용성물질들이 야생형에 비해 많이 축적되었을 것이기 때문으로 예상된다. 담배에서 담배의 trichome 특이적 발현 LTP유전자가 과발현되었을 때, trichome의 분비물도 증가하였을 뿐아니라 향미생물활성을 가진 대사산물의 분비량도 증가하였다(Choi *et al.*, 2012). 애기장대에서는 낮아졌을 때 표현형에는 차이가 없으나 특정 지질의 함량이 감소(Edstam and Edqvist, 2014)한 경우의 사례가 있으므로 이들 유전자의 정확한 기능 분석을 위해서는 현미경을 통한 관찰과 크로마토그래피와 같이 지질의 성분분석을 수행할 필요가 있을 것으로 사료 된다.

실험조건에서 형질전환 애기장대의 표현형이 야생형과 크게 다르지 않은 다른 원인으로는 실험에 사용한 균주의 기주식물이 주로 들잔디 이었기 때문일 가능성이 있다. 비기주저항성에 의하여 곰팡이가 접근했음에도 불구하고 애기장대의 방어 체계가 유도 되지 않아서 내병성 표현형이 나타나지 않았을 가능성을 생각해 볼 수 있다.

또한 형질전환 시 heterologous plant를 이용할 때 나타나는 문제점이 원인일 수 있다. 보리의 *LTP* 또는 고추의 *LTP*가 도입된 애기장대가 내병성을 나타낸 보고가 있으나(Molina and Garcia-Olmedo, 1997; Jung *et al.*, 2006), 실험한 들잔디의 *LTP*유전자가 애기장대와는 다른 들잔디의 생리적 과정에 관여하는 유전자일 가능성이 있으므로 정확한 기능분석을 위해서 들잔디 형질전환체를 제작하여 분석하는 과정이 추가적으로 요구된다.

V. 참고문헌

- André de Oliveira Carvalho, Valdirene Moreira Gomes(2007) review Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology-A concise review. Peptides. 28:1144-1153
- BABARA SCHERM, VIRGILIO BALMAS, FRANCESCA SPANO, GIOVANNA RANI, GIOVANNA DELOGU, MATIAS PASQULI, QUIRICO MIGHELI(2013) *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. mol plant pathology. 14(4): 232-341
- Bidisha Chanada, Ye Xia, Mihir Kumar Mandal, Keshun Yu, Ken-Taro Sekine, Qing-ming Gao, Devarshi Selote, Yanling Hu, Arnold Stromberg, Duroy Navarre, Aardra Kachroo, Pradeep Kadhroo(2011) Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. Nature Genetics. 43(5):421-427
- Buhot N, Gomés E, Milat M-L, Ponchet M, Marion D, Lequeu J(2004) Modulation of the biological activity of a tobacco LTP1 by lipid complexation. Mol Biol Cell. 15:5047-5052
- Cammue BPA, Thevissen K, Hendriks M, Eggermont K, Goderis IJ, Proost P (1995) A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. Plant Physiol. 109:445-455
- Christa Testerink and Teun Munnik(2005) Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. TRENDS in Plant Science. 10(8):1360-1385
- Dmytro P. Yevtushenko, Vladimir A. Sidorov, Rafael Romero, William W. Kay, Santosh Misra(2004) Wound inducible promoter from poplar is responsive to

- o fungal infection in transgen in potato. *J. Plant Sci.* 167:715-724
- Douliez JP, Michon T, Elomorjani K, Marion D(2000) Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from the cereal kernels. *J cereal Sci.* 32:1-20
- E.A. Rogozhin, T.I. Odintsova, A.Kh. Musolyamov, A.N. Simirnov, A.V. Babakov, Ts.A. Egorov, E.V. Grishin(2009) The Purification and characterization of a novel Lipid Transfer Protein from Caryopsis of Barnyard Grass(*Echinochloa crusgalli*). *Biochemistry and Microbiology* 45(4):363-368
- Edstam MM, Edqvist J.(2014) Involvement of GPI-anchored lipid transfer proteins in the development of seed coats and pollen in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant.* 152(1):32-42
- Hong-Wei XUE, Xu CHEN, Yu MEI(2009) Function and regulation of phospholipid signaling in plants. *Biochem. J.* 421:145-156
- J.C. Kader(1996) Lipid-transfer protein in plants. *Annu, Rev.Plant Physiol, Plant Mol.Biol.* 47:627-654
- Jan Sels, Janick Mathys, Barbara M.A. De Coninck, Bruno P.A. Cammue, Miguel F.C. De Bolle(2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry.* 46:941-950
- Jean-Pierre Blein, Pierre Coutos-Thévenot, Didier Marion, Michel Ponchet (2002) From elicitors to lipid transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *TRENDS in Plant Science.* 7(7):293-296
- Jin-Yue Sun, Denis A. Gaudet, Zhen-Xiang Lu, Michele Frick, Byron Puchalski, André Laroche(2008) Characterization and Antifungal properties of Wheat Nonspecific Lipid Transfer proteins. *MP MI.* 21(3):346-360

- Jo, Y.K., S.W Chang, M. Boehm and G. Jung(2008) Rapid development of fungicide resistance by *Sclerotinia homoeocarpa* on turfgrass. *Phytopathology*. 98:1297-1304
- John J. Finer, Philippe Vain(1992) Development of the particle gun for DNA delivery to plant cells. *plant cell report*. 11:323-328
- José J. Reina-Pinto and Alexander Yephremov(2009) review Surface lipids and plant defense. *Plant Physiology and biochemistry*. 47:540-549
- Jung HW, Kim W, Hwang BK(2006) Identification of pathogen-responsive regions in the promoter of a pepper lipid transfer protein gene(*CALTP1*) and the enhanced resistance of the *CALTP1* transgenic *Arabidopsis* against pathogen and environmental stresses. *Planta*. 221:361-373
- Korea forest service, 2012
- M. M. Elsharkawy, M. Shimizu, H. Takahashi, M. Hyakumachi(2012) Induction of systemic resistance against Cucumber mosaic virus by *Penicillium simplicissimum* GP17-2 in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Pathology* 61:964-976
- Maldonado AM, Doerner P, Dixon RA, Lamb CL, Cameron RK(2002) A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signaling in *Arabidopsis*. *Nature* 419:399-403
- Molina A, Segura A, García-Olmedo F(1993) Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS*. 316:119 - 122.
- Molina. A and Garcia-Olmedo F(1997) Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP 2. *Plant J*. 12:669-675

- Patrícia Barbosa Pelegrini, Rafael Perseghini del Sarto, Osmar Nascimento Silva, Octávio Luiz Franco, Maria Fátima Grossi-de-Sa(2011) review Antibacterial Peptides from Plants: What they are and How they probably work. *Biochemistry Research International*. doi:10.1155/2011/250349
- R.N. Patker, B.B. Chattoo(2006) Transgenic indica rice expressing ns-LTP-like protein shows enhanced resistance to both fungal and bacterial pathogens. *Mol. Breeding*. 17:159-171
- S. Clough(1998) A simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 16:735-743
- S.Isaac Kirubakaran, S. Mubarak Begum, K. Ulaganathan, N. Sakthivel(2008) Characterization of a new antifungal lipid transfer protein from wheat. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46:918-927
- Shim, G.Y. and Kim, H.G.(2000) Control of large patch caused by *Rhizoctonia solani* AG2-2 by combined application of antagonists and chemicals in golf courses. *Kor. Turfgrass Sci*. 13:131-138. (In Korean)
- Simon DX Choung, Nam-Il Park, Michelle C Freeman, Robert T Mullen, Douglas G Muench(2005) The peroxisomal multifunctional protein interacts with cortical microtubules in plant cells. *BMC Cell Biology*. 40(6):1471-2121
- Subhankar Roy-Barman, Christof Soutter, Rharat B. Chattoo(2006) Expression of the lipid transfer protein Ace-AMP1 in transgenic wheat enhances antifungal activity and defense responses. *Transgenic Res*. 15:435-446
- Tredway.L.P and L.L.Burpee(2001) *Rhizoctonia* disease of turfgrass. The plant Health Instructor. DOI:10.1094/PHI-I-2001-1109-01
- Tsuboi S, Osafune T, Tsugeki R, Nishimura M(1992) Nonspecific lipid transfer protein in castor bean cotyledons cell: subcellular localization and a possi

ble role in lipid metabolism. J Boichem. 111:500-508

Uddin, W. and Viji, G. (2002) Biological control of turfgrass disease. pp. 313-314. In: Gnanamanckam (ed.). Biological control of crop diseases. Marcel Dekker, Inc. Barsel, New York. USA.

Yong Eui Choi, Soon Lim, Hyun-Jung Kim, Jung Yeon Han, Mi-Hyun Lee, Yanyan Yang, Ji-Ah Kim and Yun-Soo Kim(2012) Tobacco *NtLTP1*, a glandular-specific lipid transfer protein, is required for lipid secretion from glandular trichomes. The Plant Journal. 70:480 - 491

강재영, 김대호, 이동구, 김인섭, 전민구, 이재득, 김익희, 이상현(2013) 잔디 병해 방제를 위한 약용식물의 항균작용 탐색. Weed Turf. Sci. 2(1):70-75

배은지, 이광수, 김동수, 한은희, 이상영, 이동운(2013) 우리나라 잔디 생산과 재배 관리실태. Weed Turf. Sci. 2(1):95-99

원저자 Lincoln Taiz and Eduardo Zeiger 전방욱 역(2005) 식물생리학 라이프사이언스 17-18

이상명, 김동수, 이광수, 이충규, 이동운(2013) *Rhizoctonia solani* AG2-2 IV에 대한 *Helicosporium sp.* KCTC0635BP의 항균활성. Weed Turf. Sci. 2(2):202-206

이용세(1997) 잔디 토양전염성병원진균의 생물학적 방제. KOSEF : 951-0611-066-2

장석원, 정석우, 김세훈, 박종현, 이지영(2012) 잔디 동전마름병의 발생정도가 다른 골프장 그린 조건에서 살균제 혼용살포에 의한 상승적 방제 효과. Asian J. Turfgrass Sci. 26(2):96-101

장태현, 이승준(2013) 잔디에 *Rhizoctonia* 마름병을 유발하는 *Rhizoctonia spp.*의 침투성 살균제에 대한 반응. Weed Turf. Sci. 2(4):387-394