

최 종
연구보고서

고질적 작물병의 유전공학적 방제 기술 개발
Development of Genetically Engineered Control
Measures of Chronic Crop Diseases

연구기관

주 관 연 구 기 관 고려대학교
제 1 협동연구기관 농업생명공학연구원
제 2 협동연구기관 충남대학교
위 탁 연 구 기 관 농업생명공학연구원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “고질적 작물병의 유전공학적 방제 기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 8 월 2 일

주관연구기관명 : 고려대학교
총괄연구책임자 : 황 병 국
주관제1세부연구책임자 : 황 병 국
주관제2세부연구책임자 : 신 정 섭
제1협동연구기관명 : 농업생명공학연구원
제1협동연구책임자 : 변 명 옥
제2협동연구기관명 : 충남대학교
제2협동연구책임자 : 김 홍 기
위탁연구기관 : 농업생명공학연구원
위탁연구책임자 : 박 동 석

요 약 문

I. 제 목

고질적 작물병의 유전공학적 방제 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

작물생산에서 가장 위협적이고 고질적인 작물병에 대한 안정적인 저항성을 가지는 작물을 육성, 재배하는 것이 가장 경제적이고 환경친화적인 작물병의 방제수단이다. 이러한 병저항성작물을 육성하기 위하여 전통적인 교잡육종 방법과 함께 강력하고 넓은 스펙트럼을 지닌 새로운 식물병방어관련유전자를 탐색하여 이들 유전자의 기능을 파악, 이들 유전자를 이용하는 형질전환 병저항성식물의 제조기술개발이 절실하게 필요하다. 식물병방어유전자를 탐색하여 이를 이용, 고질적 작물병의 유전공학적 방제 기술이 절실하게 요청되는 식물병으로는 한국의 채소작물 중에서 재배 생산량 규모가 가장 큰 고추의 역병, 탄저병, 세균성점무늬병 등이며 식량 작물로서 먹거리를 책임지고 있는 벼의 수량 감소의 주요 원인인 도열병, 세균에 의한 흰잎마름병 등이다. 특히 최근 국제적으로 지적소유권이 강화됨에 따라 우리의 첨단생명공학기술이 적극적으로 개발되어야한다. 새로운 식물병 방어관련 유전자개발 및 이를 이용한 기술개발이 시급히 요구되고 있으며, 벼 국제 genome project에서 벼 genome의 sequencing이 완료되었으며 벼 유전자의 기능분석만이 특허권을 취득할 수 있으므로 이를 대비하기 위한 병방어관련 유전자의 분리, 기능분석이 시급한 실정이다. 실제 콩, 옥수수, 면화, 유채, 벼 등의 형질전환작물이 1996년 이후로 상업화되어 10년이 되는 2005년에는 전 세계적으로 4억 ha, 21개 국가, 850만의 농민이 재배하고 있다(James 2005). 2005년 Cropnosis가 예측한 형질전환작물의 세계시장가치는 52억 5천만 \$이며 340억 2천만 \$에 달하는 세계 작물보호제 시장의 15%, 그리고 300억 \$에 달하는 세계 종자시장의 18%를 차지한다.

고질적인 작물병들은 조기진단 실패나 부정확한 진단으로 인하여 효과적인 방제 시스템 개발에 어려움이 있어 왔다. 또한 기존의 고전적인 방법으로는 형태적 변이가 심한 병원균이나 초기 병징이 유사한 병의 경우 정확한 동정이나 조기 진단이 불가능하기 때문에 이를 해결할 수 있는 개선된 새로운 진단시스템의 개발이 시급한 실정이다. 고질적 토양병원 고

추억병과 토마토 시들음병, *Alternaria* 병인 인삼점무늬병과 배검은무늬병 및 사과점무늬낙엽병, 세균병인 채소무름병 등은 대표적인 방제하기 어려운 식물병으로서 이들의 조기진단을 위하여 토양, 공기 및 기주식물 등의 환경에서 병원균의 동태를 추적할 수 있는 분자생물학적 monitoring 기술개발이 필요하다. 분자생물학적 기법인 DNA 검정 기술은 고도의 민감성과 신속성 및 단순성을 특징으로 하며 이를 활용한 DNA의 profile에 근거하여 병원균의 분류 및 진단에 관한 database가 특정 병원균에서만 일부 구축되어 있지만 국내에는 아직까지 고질적 작물병에 대한 체계적인 연구가 이루어지지 못하고 있다. 정확한 병 진단 시스템의 확립과 병원균의 분류나 특성 분석 및 진일보한 분자생물학적 연구를 위하여 각종 genetic marker의 개발이 필요하다. 개발된 진단 시스템을 농업기술센터 등에 보급하여 진단기술을 첨단화시킴으로써 우리나라 농업기술 발전에 새로운 도약의 기회를 마련할 수 있다. DNA 검정법에 의한 진단기술의 정기적인 workshop을 통해 농업인도 이용 가능하게 하여 농업연구자와 농부들 사이의 거리감 해소와 융합을 통해 현장농업연구의 기틀을 이루게 할 수 있다. 또한 이들 신속, 정확한 병원균의 분자적 진단 및 동정기술은 농산물개방화에 따른 중요성이 더 없이 강조되고 있는 식물검역에도 활용될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 고질적 작물병의 유전공학적 방제기술을 개발하기 위하여 채소작물로서 고추와 식량작물로서 벼에서 식물병방어유전자를 분리하여 이들 유전자의 분자적 기능을 분석하고 형질전환 병저항성작물제조기술을 수립하는데 연구목적을 두고 있다. 부가하여 방제하기 어려운 고질적인 작물병들은 조기진단하기 어렵고 부정확한 진단으로 효율적인 방제 시스템의 개발이 어려우므로 본 연구에서 주요 작물병의 새로운 분자생물학적인 진단시스템을 개발하려 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구개발에서는 채소작물로서 고추, 식량작물로서 벼를 이용하여 식물병방어(저항성) 유전자를 분자적으로 크로닝하여 이들 식물방어관련유전자가 식물방어반응에서 시간적, 공간적으로 어떻게 발현되는지 분자유전학적, 면역세포학적 측면에서 *in situ* hybridization, cDNA chip 분석, yeast-two-hybrid system등을 이용하여 functional genomics, proteomics를 심도있게 분석한다. 또한 주요 식물방어(저항성)유전자의 promoter, transcription factor 등을 cDNA, genomic DNA 수준에서 연구하고 이들 유전자의 신호전달(signal transduction)체계를 규명하며 가장 유망한 식물방어유전자를 형질전환 병저항성 식물제조

에 이용하고 작물유전육종가들에게 제공할 병저항성유전자원을 확보한다.

벼, 토마토, 담배, 애기장대(*Arabidopsis*)의 형질전환 기술을 최적화하고 본 연구에서 분리한 유용 식물병방어(저항성)유전자를 이용하여 형질전환 작물을 개발한다. 이들 형질전환 식물체에서 종자를 확보하여 방어유전자 발현 및 벼의 도열병, 흰잎마름병, 그리고 토마토, 담배, 애기장대의 여러 가지 진균병, 세균병에 대한 병저항성을 온실시험을 통해 검정한다.

우리나라의 대표적 고질적 난방제성인 고추, 감자, 인삼, 박과 작물에 극심한 피해를 주는 역병 *Phytophthora* 속 균과 인삼, 사과, 배 등 주요 농작물에 피해를 주는 *Alternaria* 속 균의 동태 추적용, 진단, 분류동정, 그리고 특성을 분석하기 위한 분자생물학적 진단시스템을 개발한다. 이들 식물병원균의 신속 정확한 진단을 위해 진단용 DNA Kit를 개발하고 토양 및 식물조직내 등 농업 주변 환경에서의 병원균의 동태를 파악하기 위한 monitoring 기술을 개발한다. 더 나아가서 주요 작물병원균(*Phytophthora* spp., *Trichoderma* spp., *Pseudomonas* spp.)의 DNA profile database 구축 및 web 기반의 관련정보검색시스템을 개발하고 주요 작물병원세균(*Pectobacterium* spp., *Xanthomonas* spp.)의 종특이적 검출 DNA marker를 이용하여 조기진단 Kit를 개발한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1) 연구개발 결과

주관 제 1 세부과제에서는 “채소병방어유전자개발 및 functional genomics”에 대한 연구개발을 성공적으로 수행하여 고추식물에서 유용한 식물병방어(저항성)유전자를 분리하여 그 특성을 면밀하게 분석하였다. 고추식물에서 병저항성반응 과정에서 관여하는 유전자들을 획득하기 위해 고추 세균성 점무늬병균에 감염된 고추 잎으로부터 추출한 mRNA를 사용하여 cDNA library를 제작, 사용하여 differential hybridization 방법으로 다양한 병방어관련 유전자들을 분리하였다. 고추식물에서 식물병방어(저항성)반응에 유용하다고 평가되는 유전자 *CACYPI* (cyclophilin 유전자), *CACBPI* (chitin-binding protein 유전자), *CAOSMI* (osmotin-like protein 유전자), *CADC1.2* (DC1.2 유사유전자), *CAZFP1* (Cys2/His2 zinc-finger transcription factor 유전자), *CaPIMP1* (세포막위치단백질 유전자)의 full-length clone을 성공적으로 분리하여 이들 유전자의 기능을 면밀하게 규명할 수 있었다. 이들 고추병 방어관련유전자들의 병 감염, 화학적인 elicitor 처리 및 환경 스트레스 중의 시간적인 mRNA 발현이 뚜렷하게 일어났으며 이들 유전자 mRNA가 유관속(vascular bundle)의 사부세포(phloem cell)에 위치하

고 있음을 확인할 수 있었다. 식물병 방어유전자의 *CABPR1*, *CAZFP1*, *CaPIMP1*, *CADC1.2* 유전자의 프로모터가 분리되어 특성을 분석한 결과 병감염과 신호전달물질처리시 뚜렷하게 프로모터가 활성화를 보여 작물형질전환에 유용하게 이용 가능할 것이다. 그 기능이 알려져 있지 않은 PR-1 family에 속하는 유전자인 *CABPR1*와 Cys2-His2 type의 zinc-finger transcription factor 단백질을 코딩하는 *CAZFP1*를 이용하여 *Arabidopsis*를 형질 전환시켜 고추 식물에서 유래한 이들 병방어관련유전자들이 병저항성에 기능적으로 중요한 역할을 하고 있음을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 얻어진 다수의 병저항성관련유전자는 형질전환병저항성식물개발연구를 위해 제2세부과제연구팀에게 분양되었다.

제 1 협동과제에서는 “**식량작물 병방어유전자의 개발 및 functional genomics**”에 대한 연구를 우리나라의 주요 식량작물로서 벼를 이용하여 수행한 연구결과로 벼에서 병저항성관련유전자 *OsDRP*(disease resistance protein 유전자), *OSLZIP*(leucine zipper protein 유전자), *OsMyb*(Myb-like protein 유전자), *OsNDR/HIN*(NDR/HIN 유전자)를 벼흰잎마름병이 감염된 벼의 cDNA library에서 microarray, yeast-two-hybrid screening 방법을 이용하여 선발하였다. 이들 병저항성관련유전자는 Northern blotting과 RT-PCR을 이용한 발현분석에서 감염된 벼에서, 특히 병저항성반응에서 더 강하게 발현됨을 확인할 수 있었다. 이들 저항성관련유전자중에서 *OsDRP* 유전자는 *NBS-LRR* class의 R gene으로 추정되며 이 단백질은 도열병균의 병원성인자로 알려진 CYP1 (cyclopilin 1) 단백질과 상호작용하는 것으로 yeast-two-hybrid 실험을 통하여 확인하였고 *OsDRP*의 upstream 1381 bp 부위의 프로모터가 병원균감염시 유전자발현을 증진시키는 조절부위로 확인되었다. 이들 병저항성관련유전자를 이용하여 과발현하는 형질전환 벼와 담배식물을 제조하거나 RNAi를 이용하여 knock-down 형질전환벼를 제작하여 병저항성발현여부를 시험하였다. 본 연구개발과제는 대량 유용 유전자 분리를 위한 특이 발현 유전자 은행 제작, microarray를 이용한 대량 유전자 발현 분석, 각 유전자의 병원균에 대한 반응 검정, 유전자 기능 분석을 위한 suppression과 overexpression, 병원균 특이 발현 promoter의 기능 분석, 신호전달 기작연구를 위한 yeast-two-hybrid system 구축 등을 완수하여 벼유전자의 functional genomics 연구 시스템을 구축할 수 있었다.

주관 제 2 세부과제 “**방어유전자를 이용한 형질전환 병저항성 작물개발**”에 대한 연구에서는 고추병 저항성 혹은 신호전달에 관련된 유전자를 담배, 토마토, 애기장대 등의 식물에 도입하여 형질전환병저항성식물제조기술을 개발하였다. 따라서 본 연구에서는 주

관 제 1 세부과제 연구팀에서 개발되어 제공된 고추의 *CAPOAI*(ascorbate peroxidase, *CABPRI*(basic PR-1 protein), *CALTP1*(lipid transfer protein 1)과 *CALTP2*(lipid transfer protein 2) 유전자를 이용하여 담배, 애기장대(*Arabidopsis*), 토마토를 형질전환하여 도입유전자의 발현을 검정하였고, 난균류(oomycete)병원균과 병원세균 등 생물학적 스트레스에 대한 저항성과 건조, 염 등 비생물학적 스트레스에 대한 내성(tolerance)를 평가하였다. 이의 연구결과로써 병원균 및 중금속에 대한 저항성을 보이는 *CABPRI* 과 발현형질전환 담배, 병원균 및 산화적 스트레스 저항성 *CAPOAI* 형질전환 담배, 병원균 및 비생물학적 스트레스 저항성 *CALTP1* 및 *CALTP2* 형질전환 담배 및 애기장대를 개발할 수 있었고 병 저항성을 보이는 *CABPRI* 및 *CAPOAI* 형질전환 토마토를 개발하여 형질전환 병저항성작물제조기술을 확립하였다.

제 2 협동과제와 위탁과제에서는 “**주요 작물병의 진단시스템 개발**”에 대한 연구에서는 우리나라의 대표적 고질적 난방제성인 작물병인 역병 *Phytophthora* 속 중에서 *P. capsici* 종 특이적 primer는 염기서열분석과 RFLP 및 RAPD 분석을 통해 제작하였고 검출 가능성을 PCR 및 southern hybridization을 통해 확인하였다. 종 특이성을 분석하기 위하여 *P. capsici*와 그 외의 주요 *Phytophthora* 속 균과 다른 병원균들을 공시하여 특이적 검출과 동정을 실시하여 본 연구에서 *P. capsici* 종 특이적 primer인 CSP23A/CSP23B(693 bp)가 조기진단 Kit로 개발되어 토양, 작물체와 포장에서 신속, 정확한 진단이 확인되었다. 또한 인삼, 사과, 배 등 주요 농작물에 피해를 주는 *Alternaria* 속 중 *A. panax*와 *A. gaisen* 균의 검출,동태 추적용, 진단, 분류동정, 그리고 특성을 분석하기 위하여 최적 종 특이적 primer로 PanaxF/PanaxR와 AG-F/AG-R이 분자생물학적 진단 Kit로 개발되었다. 부가하여 주요 작물병원균(*Phytophthora* spp., *Trichoderma* spp., *Pseudomonas* spp.)의 DNA profile database 구축 및 web 기반의 관련정보검색시스템을 개발하고 주요 작물병원세균의 특유의 염기서열, 주로 “Orphan gene”을 찾을 수 있는 프로그램의 개발에 중점을 두어 그로부터 구축된 database를 이용하여 각 병원균을 완벽하게 검출해낼 수 있는 다양한 primer들이 만들어졌다. 개발된 프로그램을 통해 선발된 종 특이적 primer는 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and *Pectobacterium atrosepticum*를 포함하는 병원성 세균의 검출과 동정을 명확히 할 수 있었다. 그 결과 생물정보학(bioinformatics)과 유전학이 조합된 PCR에 기초한 이 기법의 진일보한 정보를 식물병

진단에 제공할 수 있음이 입증되었다. 주요 작물병의 DNA profile은 다양한 분야에서 병원균에 관한 유용한 기초 정보를 제공할 수 있으며 이중에서 비 중복성 정보인 nrDB(non-redundant database)를 이용하여 생물특이서열 정보를 발굴하는 알고리즘 및 프로그램을 개발하여 관련 정보를 DB로 구축하였다.

2) 연구개발 결과의 활용

다양한 종류의 병방어관련 유용유전자 *CACYPI* (cyclophilin 유전자), *CACBPI* (chitin-binding protein 유전자), *CAOSMI* (osmotin-like protein 유전자), *CADC1.2* (DC1.2 유사유전자), *CAZFP1* (Cys2/His2 zinc-finger transcription factor 유전자), *CaPIMP1* (세포막위치단백질 유전자)들이 채소작물인 고추로부터, 또한 벼에서 병저항성관련유전자 *OsDRP*(disease resistance protein 유전자), *OsLZIP*(leucine zipper protein 유전자), *OsMyb*(Myb-like protein 유전자), *OsNDR/HIN*(NDR/HIN 유전자)들이 성공적으로 분리되었고 이들 유전자의 기능을 면밀하게 규명하여 특허를 출원, 등록하여 새로운 저항성유전자원으로 타 연구자나 국내외 생명공학 종묘회사에 제공되어 병저항성 형질전환작물을 생명공학적으로 개발하는데 활용될 수 있을 것이다.

고추와 벼에서 병방어유전자의 크로닝을 위해 이번 연구에서 사용된 생명공학기술이 효과적이었음이 입증되었다. 병방어유전자크로닝을 위하여 효율적으로 사용되어졌던 cDNA library 합성방법, microarray, differential hybridization 방법, RT-PCR, yeast-two-hybrid screening 방법 등을 본 연구팀에서 확립하여 병저항성유전에 대하여 연구하려는 타 연구자에게 제공할 수 있고 병저항성의 신호전달경로에 대한 분자적 기작 연구 등의 타 연구에 효율적으로 활용될 수 있을 것이다.

고추병 방어유전자의 조절기작을 규명하기 위해 *CABPRI*, *CAZFP1*, *CaPIMP1*, *CADC1.2* 유전자와 벼 저항성관련유전자 *OsDRP*의 promoter가 분리되어 면밀하게 특성을 분석함으로써 작물형질전환체를 개발하려는 타 연구자나 종묘회사, 그리고 형질전환체 개발을 위한 추가 연구에 유용한 promoter로서 활용할 수 있을 것이다. 또한 벼 promoter를 담배에서 기능을 분석한 결과 단자엽식물의 promoter가 쌍자엽 식물인 담배에서도 발현되어 단자엽식물의 형질전환에서 이들 promoter를 활용할 수 있을 것이다.

제 1 세부과제 연구팀에서 분리, 기능이 분석된 고추의 *CAPOAI*(ascorbate peroxidase, *CABPRI*(basic PR-1 protein), *CALTP1*(lipid transfer protein 1)과 *CALTP2*(lipid transfer protein 2) 유전자가 제 2 세부과제로 양도, 병저항성 형질전환작물체 개발을 위한 분자육종의 재료로 이용되어 담배와 토마토의 형질전환 및 재분화기

술개발기술을 확립함으로써 종묘회사에 상업적인 병저항성형질전환작물체의 개발기술을 제공, 활용될 수 있을 것이다.

방제하기 어려운 *Phytophthora*, *Alternaria*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Pectobacterium* 등에 의해 발생하는 고질적인 작물병을 조기 진단하여 그 피해를 줄일 수 있는 DNA검정 marker가 손쉽고 간단하게 이용할 수 있게 진단 Kit가 개발되어 국내의 각종 농업관련 기관과 농업현장에 실질적으로 그 기술의 보급이 가능해질 것이다. 농산물개방화에 따른 농산물 수출입이 증가하고 있는 상황에서 방제가 까다롭고 병 발생 피해가 큰 외래 병원균에 대해 신속 정확한 병진단 및 동정이 요구되는 현시점에서 본 연구에서 개발된 이러한 식물병진단 Kit는 식물 검역에 매우 유용하게 활용될 수 있을 것이다. 이러한 병원균 DNA검정marker를 이용하여 각종 토양 전염성 병원균들의 분포, 밀도, 변이를 조사하여 이를 토대로 효과적 방제체계 도출이 가능할 것이다. 특히 DNA검정 marker, 균 동정을 위한 DNA profile의 D/B 와 유전자들은 지적 소유권 획득을 위하여 특허출원, 등록되어 관련회사 등에 기술이 전수되어 제품화시킬 수 있을 것이다. 또한 이번 발굴된 marker 정보는 모든 미생물 진단, 동정 및 탐색 분야에 까지 산업화 및 실용화 하는데 진일보하는 계기를 만들었으며 이는 실제 농촌현장에서 고질적 식물병을 사전에 진단함으로써 효과적인 병 방제에도 기여할 수 있을 것이다. 이러한 종 특이적 primer를 이용한 진단용 Kit을 사용한 값이 싸면서도 빠르고 정확하며 손쉬운 고질적 난방제성 주요 식물병원균의 검출과 동정 및 병해진단 방법은 앞으로 농가에 보급되어 농민의 소득 창출에 크게 기여할 것이다.

3) 농업실용화 및 향후 활용계획

본 연구팀에서 병저항성작물을 분자적으로 육종하기위하여 위에서 기술한 고추와 벼에서 얻어진 여러 종류의 저항성관련유전자를 국내외 생명공학회사나 작물분자유종가에게 제공할 계획이다. 그러나 병저항성작물을 개발하여 농업에 실용화시키기 위하여 가까운 시일내의 고질적인 작물병에 대한 저항성을 보이는 형질전환작물의 농업실용화는 어려우나 산, 학, 연의 공동의 끊임없는 노력으로 육성되어 재배가 가능할 것이다.

병원균의 조기진단 및 신속 정확한 탐색을 통하여 병 발생의 사전 예방 및 효과적인 종합적 방제 차원에서 농업실용화를 위해 개발된 고추 역병균에 대한 종 특이적 진단 Kit는 본 과제 수행 중에 이미 일부 농가포장에서 실용적으로 활용된바 있다. 이러한 경험을 바탕으로 관련 내용을 홍보도 병행하면서 직접 농민들을 대상으로 이제부터 좀 더

많은 수의 농가에 개발된 이 진단기법을 현장에 활용하고자 한다.

도 농업기술원 및 시군 농업기술센터 등 농업관련 기관을 통해 개발된 진단Kit의 유용성을 널리 홍보하여 대농민 지원사업에 보다 더 다양하게 적극 활용할 계획이다. 그리고 대농민 교육이나 연구기관의 세미나 발표 시 본 연구진들의 참여를 통해 관련 내용을 적극 홍보할 예정이다.

보급 및 판매에 관심을 보이는 회사를 물색하여 보다 효율적으로, 그리고 경제적으로 활용이 가능한 진단Kit를 개발하는 방법을 모색 중에 있다. 또한 인삼 점무늬병과 와 다른 주요 작물병의 진단 Kit는 특허등록이 완료되는 즉시 상업화하여 농업현장적용에 투입할 예정이다. 그리고 언론매체를 통하여 농민들에게 작물병의 진단Kit의 유용성을 적극 홍보하여 효율적인 작물병방제에 이용할 수 있도록 활용할 계획이다.

SUMMARY

Breeding and cultivation of crop cultivars which are durably resistant to the destructive plant diseases is one of the most environment-sound measures for the control of chronic crop diseases in nature. Together with the conventional breeding system, development of strategies for generation of the transgenic crops genetically modified using new broad-spectrum defense-related genes are urgently necessary to practically cultivate stable disease resistant crop cultivars. In particular, the acceptable production levels of rice (*Oryza sativa* L.), a major cereal crop in Korea, as well as pepper (*Capsicum annuum* L.), an economically important vegetable, will be achieved by the genetically engineered measure, such as the use of resistant crop cultivars, for the effective control of blast (*Magnaporthe grisea*) and bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) diseases of rice and Phytophthora blight (*P. capsici*) and bacterial spot (*X. campestris* pv. *vesicatoria*) of pepper. In 2005, the global market value of genetically modified (GM) or transgenic crops, estimated by Cropnosis, was \$ 5.25 billion representing 15% of the \$ 34.02 billion global crop protection market in 2005 and 18% of the \$30 billion 2005 global commercial seed market (James 2005).

Failure of the rapid and accurate diagnosis of plant diseases in Korea has brought a variety of difficulties in creating the control strategies effective against the chronic crop diseases in the field. The use of existing conventional techniques dose not accurately identify the pathogens with diverse morphological characteristics, or the plant diseases similar to one another in the early symptoms. Thus, such a current status of diagnosis of plant diseases in Korea requires the immediate development of newly jmproved molecular diagnostic systems. Diagnosis kits of major crop diseases developed using DNA genetic markers are available for the reliable, rapid identification and molecular monitoring of plant pathogens. For commercial purposes, the DNA diagnostic methods are practically being used not only in the field by farmers, but also for plant quarantines.

The objectives of the research project are 1) to isolate and characterize the

defense-related genes from the vegetable crop, pepper, and the cereal crop, rice, 2) to develop the strategies for creating genetically modified (GM) or transgenic disease-resistant crops, often called biotech crops, using the defense-related genes, and 3) to develop the diagnosis DNA kits using species-specific primers of pathogens causing chronic crop diseases. The results obtained in this study are follows.

Pepper resistance(defense)-related genes *CACYPI* (cyclophilin), *CACBPI* (chitin-binding protein), *CAOSMI* (osmotin-like protein), *CADC1.2* (DC1.2 protein), *CAZFP1* (Cys2/His2 zinc-finger transcription factor), and *CaPIMPI* (pathogen-induced membrane protein) were isolated and functionally characterized from pepper leaves inoculated with an avirulent strain Bv5-4a of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* using a macro cDNA array method. These pepper defense-related genes were strongly induced in the incompatible interaction of pepper with *X. campestris* pv. *vesicatoria* and *Phytophthora capsici* and their transcripts were localized to the phloem cells of the vascular bundle in the pepper tissues. We also isolated and functionally characterized the promoter regions of the *CABPRI*, *CAZFP1*, *CaPIMPI* and *CADC1,2* genes in tobacco leaves to identify the *cis*-acting regulatory sequences that are involved in the defense gene expression. Constructs harboring the 5'-serially deleted promoter regions, which was fused to the GUS gene, were evaluated for their promoter activity in the tobacco leaves. These promoters were differentially activated by either pathogen infection or treatment with signal molecules, such as ethylene, salicylic acid, jasmonic acid, etc. The CAZFP1 protein is a nuclear targeting protein, which functions as a transcriptional regulator. Overexpression of the *CAZFP1* and *CABPRI* genes in the transgenic Arabidopsis plants conferred enhanced resistance against infection by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. A number of pepper defense genes functionally characterized in this study have been provided to use for the generation of disease-resistant transgenic plants of rice, tomato, tobacco and Arabidopsis in our other research teams.

To use for creating transgenic rice plants resistant against infection by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Magnaporthe grisea*, we have cloned rice disease defense (resistance) genes from the infected rice leaves, following microarray analysis

and yeast two-hybrid screening. Among these isolated defense genes, the *OsDRP* (disease resistance protein), *OsLZIP* (leucine zipper protein), *OsNDR/HIN*, and *OsMyb* genes were strongly induced by pathogen infection, as confirmed by Northern blot and RT-PCR analyses. Expression of the *OsDRP* gene in rice was preferentially pronounced during the incompatible interaction with *Magnaporthe grisea*, as well as upon treatment with the signal chemicals such as BTH, ethephon and SA. Yeast-two-hybrid analysis revealed that OsDRP physically interacted with CYP1 (cyclophilin) protein known as a virulence determinant of *Magnaporthe grisea*. LRR domain of OsDRP interacted with BD-CYP1. To define the promoter region essential for regulating OsDRP gene expression, four promoter fragments 2471, 1381, 981 and 525 bp upstream of the *OsDRP* gene were cloned and introduced into the pBI101 binary vector to link to the GUS gene. The agroinfiltration and transient assay showed that the induction of GUS activity in tobacco leaves was driven by the activation of the promoter fragment 1,381 bp following the infection by *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. To clarify the function of these defense genes, plant overexpression and RNAi vectors were constructed and introduced into rice plants and tobacco plants by *Agrobacterium*. The data of pathogenicity test for *Phytophthora nicotianae* infection in transgenic tobacco plant indicated that overexpression of the *OsMyb* and *OsLZIP* genes confers increased disease resistance.

To determine the role of ascorbate peroxidase, an antioxidant enzyme, in the cellular responses to pathogens, transgenic tobacco plants were generated, using the pepper ascorbate peroxidase-like 1 gene (*CAPOAI*). High levels of *CAPOAI* gene expression were observed in the transgenic tobacco plants, with a 2-fold increase in total peroxidase activity. The *CAPOAI*-overexpressing plants exhibited increased tolerance to methyl viologen-mediated oxidative stress, as well as enhanced resistance to the oomycete pathogen, *Phytophthora nicotianae*. However, the transgenic plants were found to be susceptible to the bacterial pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, but were weakly resistant to *Ralstonia solanacearum*. Overexpression of *CABPR1* in tobacco plants enhanced tolerance not only to heavy metal stresses, but also to the oomycete pathogen *Phytophthora nicotianae* and the bacterial pathogens *Ralstonia solanacearum*

and *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. RT-PCR analysis revealed that the *CABPRI* transgene increased the expression of *PR-Q* and glutathione S-transferase genes, but decreased the expression of *PR-1a* and *thaumatin* genes. and abiotic stresses.

Lipid transfer protein is known to play a role in the intercellular trafficking of lipid molecules (phospholipids, fatty acid, acyl-CoA and waxes) from the endoplasmic reticulum to the other cellular components. This transportation, however, is known to reinforce the cell wall or cuticle and is regarded a defense response to a diverse array of phytopathogens. In the present study, the overexpression of pepper lipid transfer protein 1 (*CALTP1*) and 2 (*CALTP2*) in tobacco plants strengthened the cuticle region and enhanced tolerance to an oomycete pathogen *Phytophthora nicotianae* and two bacterial pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* and *Ralstonia solanacearum*. The defense mechanisms of *CALTP1* and *CALTP2* were different each other. *CALTP1* regulated the salicylic acid (SA)-mediated defense pathway to activate pathogenesis-related genes. *CALTP2* overexpression accumulated high concentration of H₂O₂, which may trigger tolerance responses to biotic stresses, leading to resistance to the diverse array of pathogens. Enhanced growth of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in *CALTP1* and *CALTP2*-silenced pepper plants suggested that *CALTP1* and *CALTP2* play an important role in defense signaling. Grafting analysis showed that lipid transfer protein may be involved in the long distance systemic signaling.

The potential role of two pathogen-induced pepper genes, encoding basic pathogenesis-related protein 1 (*CABPRI*) and ascorbate peroxidase-like 1 (*CAPOA1*), in tolerance against phytopathogens was examined in transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. House Momotaro) plants. PCR and RT-PCR analyses using gene-specific primers revealed that the pepper *CABPRI* and *CAPOA1* genes were integrated into the tomato genome. The constitutive expression of *CABPRI* and *CAPOA1* in the tomato did not exhibit any morphological abnormalities. However, these transgenic tomato plants showed enhanced tolerance to the oomycete pathogen *Phytophthora capsici*, but very weak resistance to the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. These results suggest that overexpression of *CABPRI* and

CAPOA1 in tomato plants conferred their resistance responses to pathogenic attack.

Species-specific primers for rapid and accurate identification and detection of *Phytophthora capsici*, causing severe blight disease in pepper, Korea, were developed to create the kits for reliable diagnosis of this disease. *P. capsici* specific-primers were designed using the sequences of *P. capsici*-specific region of ITS and of *P. capsici*-specific band obtained by RFLP and RAPD analysis. In the tests for identification and detection of *P. capsici*. *P. capsici*-specific primer pair CSP23A/CSP23B produced PCR product of 693bp only in genomic DNA of *P. capsici*, but not in that of *Phytophthora* species. Specificity of this primer pair was highly sensitive, detecting as little as 1 spore of *P. capsici* in 1g of soil. A modified DNA extraction method for PCR detection was available. The detection kit based on modified method and specific primer developed in this study enabled us the rapid detection and accurate identification of *P. capsici* in soil and crops.

For rapid and accurate identification and detection of *Alternaria panax* and *A. gaisen*, species-specific primers also were designed using the sequences of *A. panax* -specific band obtained by URP-PCR analysis and those of *A. gaisen*-specific band obtained by AFLP analysis. In the tests for identification and detection of *A. panax* and *A. gaisen*. *A. panax*-specific primer pair PanaxF/PanaxR produced PCR product of 1200 bp only in genomic DNA of *A. panax* but not in that of other fungi. The sensitivity of *A. panax*-specific primer was 5 pg of *A. panax* total genomic DNA used. *A. panax*-specific primer pair PanaxF/PanaxR detected *A. panax* when using DNA from rapid extraction procedure. *A. panax* DNA was detected in inoculated ginseng leaves by PCR using the specific primers. *A. gaisen*-specific primer pair AG-F/AG-R produced PCR product of 266 bp and the primer sensitivity was 50 pg from pure template of *A. gaisen* total genomic DNA. *A. gaisen*-specific primer pair AG-F/AG-R could detect *A. gaisen* from the mixture of other species of *Alternaria* when using DNA from rapid extraction procedure. PCR amplification of DNA from infected ginseng leaves using the detection kits led to the rapid detection and identification of *A. panax* and *A. gaisen*

The advent of genomics and bioinformatics has greatly facilitated genomic analyses

of microorganisms, provides enhanced capability to characterize and classify strains, and facilitates research to assess the genetic diversity of populations. The diversity of large populations can be assessed in a more efficient manner using URP(Universal Rice Primer)–PCR–based genomic fingerprinting methods, especially when combined with computer–assisted pattern analysis. DNA profiles of economically important plant pathogens can provide a framework to better understand their taxonomy, population structure, and dynamics. Gene mining technology for species– or pathovar–specific genes provides a high resolution framework to devise sensitive, specific, and rapid methods for pathogen detection, plant disease diagnosis, as well as management of disease risk. Specific primers developed using unique gene mining technology have been adopted to enhance both the detection and identification of phytobacteria including *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and *Pectobacterium atrosepticum*. PCR–based protocols, combined with computer–based analysis and genomics, have provided novel fundamental knowledge of the ecology and population dynamics of bacterial pathogens for basic and applied studies in plant pathology.

CONTENTS

Chapter 1. Overview of the research project-----	36
Chapter 2. Internal and abroad status of technologies related to the research and development-----	40
Chapter 3. Research contents and results-----	46
Part 1. Development and functional genomics of disease defense genes of vegetable crops-----	46
1. Research methods and contents-----	46
1.1 Growth of pepper, tobacco and Arabidopsis-----	46
1.2 Pathogen inoculation procedures, and environmental stress and abiotic elicitor treatment-----	46
1.3 Synthesis of cDNA library-----	47
1.4 Differential hybridization-----	47
1.5 Nucleotide sequence analysis-----	48
1.6 RNA extraction and Northern blot hybridization-----	48
1.7 <i>In situ</i> hybridization -----	48
1.8 Isolation and analysis of promoters of defense genes-----	49
1.9 Transformation of Arabidopsis using vegetable defense genes-----	49
1.10 Assay of transgenic Arabidopsis for disease resistance and stress tolerance-----	50
2. Research results and discussion-----	50
2.1 Differential screening and nucleotide sequencing of vegetable defense genes-----	50
2.2 Characterization of the <i>CACYPI</i> gene-----	52
2.2.1 Nucleotide sequencing-----	52
2.2.2 Expression of the <i>CACYPI</i> gene by pathogen infection-----	52
2.2.3 Expression of the <i>CACYPI</i> by abiotic elicitor treatment-----	53
2.2.4 <i>In-situ</i> subcellular localization of the <i>CACYPI</i> gene-----	54
2.3 Characterization of the <i>CACBPI</i> gene-----	62

2.3.1 Nucleotide sequencing-----	62
2.3.2 Expression of the <i>CACBP1</i> gene by pathogen infection-----	62
2.3.3 Expression of the <i>CACBP1</i> by abiotic elicitor treatment-----	63
2.3.4 <i>In-situ</i> subcellular localization of the <i>CACBP1</i> gene -----	63
2.4 Characterization of the <i>CAOSMI</i> gene-----	68
2.4.1 Nucleotide sequencing-----	68
2.4.2 Expression of the <i>CAOSMI</i> gene by pathogen infection-----	68
2.4.3 Expression of the <i>CAOSMI</i> gene by abiotic elicitor treatment-----	69
2.4.4 Expression of the <i>CAOSMI</i> gene by environmental stress-----	69
2.4.5 <i>In-situ</i> subcellular localization of the <i>CAOSMI</i> gene-----	70
2.5 Characterization of the <i>CAZFP1</i> gene-----	77
2.5.1 Nucleotide sequencing-----	77
2.5.2 Subcellular localization of the <i>CAZFP1</i> gene -----	77
2.5.3 Expression of the <i>CAZFP1</i> gene by pathogen infection-----	78
2.5.4 Expression of the <i>CAZFP1</i> gene by abiotic elicitor treatment-----	78
2.5.5 Expression of the <i>CAZFP1</i> gene by environmental stress-----	79
2.5.6 <i>In-situ</i> subcellular localization of the <i>CAZFP1</i> gene-----	79
2.5.7 Isolation and analysis of promoter of the <i>CAZFP1</i> gene-----	79
2.5.8 Activation of the <i>CAZFP1</i> promoter by bacterial infection, methyl jasmonate and ethylene-----	79
2.5.9 Generation of the <i>CAZFP1</i> transgenic Arabidopsis-----	80
2.5.10 Disease resistance of the <i>CAZFP1</i> transgenic Arabidopsis-----	81
2.5.11 Drought tolerance of the <i>CAZFP1</i> transgenic Arabidopsis-----	81
2.6 Characterization of the <i>CADC1.2</i> gene-----	95
2.6.1 Nucleotide sequencing-----	95
2.6.2 Expression of the <i>CADC1.2</i> gene by pathogen infection-----	95
2.6.3 Expression of the <i>CADC1.2</i> gene by abiotic elicitor treatment-----	96
2.6.4 <i>In-situ</i> subcellular localization of the <i>CADC1.2</i> gene-----	96
2.6.5 Isolation and analysis of promoter of the <i>CADC1.2</i> gene-----	96
2.7 Characterization the <i>CaPIMP1</i> gene-----	105

2.7.1 Nucleotide sequencing-----	105
2.7.2 Subcellular localization of the CaPIMP1 protein-----	105
2.7.3 Expression of the <i>CaPIMP1</i> gene by pathogen infection-----	106
2.7.4 Expression of the <i>CaPIMP1</i> gene by abiotic elicitor treatment-----	106
2.7.5 Expression of the <i>CaPIMP1</i> gene by environmental stress-----	106
2.7.6 <i>In-situ</i> subcellular localization of the <i>CaPIMP1</i> gene-----	107
2.7.7 Activation of the <i>CaPIMP1</i> promoter by bacterial infection and elicitor treatment-----	107
2.7.8 Generation of the <i>CaPIMP1</i> transgenic Arabidopsis -----	107
2.8 Characterization of the <i>CABPRI</i> gene-----	114
2.8.1 Isolation of the <i>CABPRI</i> promoter-----	114
2.8.2 Activation of the <i>CABPRI</i> promoter by bacterial infection-----	114
2.8.3 Activation of the <i>CABPRI</i> promoter by signal compounds-----	115
2.8.4 Activation of the <i>CABPRI</i> promoter by environmental stress-----	116
2.8.5 Generation of the <i>CABPRI</i> transgenic Arabidopsis-----	116
2.8.6 Disease resistance of the <i>CABPRI</i> transgenic Arabidopsis-----	117
2.8.7 Resistance to high salinity of the <i>CABPRI</i> transgenic Arabidopsis-----	117
2.5.8 Drought tolerance of the <i>CABPRI</i> transgenic Arabidopsis-----	118
2.5.9 Abscisic acid sensitivity of the <i>CABPRI</i> transgenic Arabidopsis-----	118
2.5.10 Oxidative stress response of the <i>CABPRI</i> transgenic Arabidopsis-----	119
Part 2. Development and functional genomics of disease defense genes of rice crop-----	133
1. Research methods and contents-----	133
1.1 Construction of rice cDNA library related to disease resistance-----	133
1.2 Screening for defense genes using Northern blotting and RT-PCR-----	132
1.2.1 Plant, bacteria and chemicals-----	134
1.2.2 Isolation of total RNA-----	134
1.2.3 RNA gel electrophoresis and blotting-----	134
1.2.4 Probe preparation by random hexamer labelling-----	134
1.2.5 Northern hybridization-----	135

1.2.6 RT-PCR-----	135
1.3 Nucleotide sequencing-----	135
1.4 cDNA chip construction for microarray-----	136
1.5 Isolation and nucleotide sequencing of defense genes by microarray-----	136
1.6 Functional analysis of defense genes-----	137
1.6.1 Transformation of rice and tobacco using rice defense genes-----	137
1.7 Isolation and analysis of promoters of disease resistance genes-----	138
1.7.1 Promoter isolation-----	138
1.7.2 Promoter analysis-----	138
1.8 Analysis of defense-mediated genes by yeast-two-hybrid system-----	139
1.8.1 Construction of yeast-two-hybrid cDNA library-----	139
1.8.2 Construction of bait vectors-----	139
1.8.3 Yeast cotransformation-----	140
1.8.4 Screening for the clones interacting with OsDRP protein-----	139
1.8.5 Yeast-two-hybrid screening-----	141
1.9 Assay for disease resistance of transgenic plants-----	141
1.9.1 Assay for bacterial disease resistance-----	141
1.9.2 Assay for Phytophthora resistance-----	141
2. Research results and discussion-----	142
2.1 PCR and cDNA chip analysis for screening of rice defense genes-----	142
2.2 Screening and sequencing of rice defense genes-----	143
2.3 Microarray analysis data-----	152
2.4 Characterization of rice <i>OsDRP</i> (disease resistance protein) gene-----	156
2.5 Characterization of rice leucine zipper-coding <i>OsLZIP</i> gene-----	161
2.6 Characterization of rice <i>OsNDR/HIN</i> gene-----	163
2.7 Characterization of rice <i>OsMyb</i> (myb-like protein) gene-----	164
2.8 Characterization of rice <i>OsWRKY</i> gene encoding WRKY-DNA binding protein-----	166
2.9 Functional analysis of genes using yeast-two-hybrid system-----	168
2.9.1 Construction of yeast-two-hybrid rice cDNA library-----	168

2.9.2 Construction of bait vectors-----	168
2.9.3 Yeast cotransformation-----	169
2.9.4 Screening for the clones interacting with OsDRP protein-----	170
2.9.5 Yeast–two–hybrid of OsDRP with CYP1 of <i>Magnaporthe grisea</i> -----	170
2.9.6 Construction of yeast–two–hybrid Arabidopsis cDNA library-----	172
2.10 Transformation of rice and tobacco using rice defense genes-----	173
2.10.1 Construction of overexpression vectors-----	173
2.10.2 Construction of RNAi knock–down mutants-----	174
2.10.3 Generation of transgenic plants-----	174
2.10.4 Analysis of transgenic plants-----	175
2.11 Assay for disease resistance in transgenic plants-----	177
2.12 Promoter analysis of the <i>OsDRP</i> gene-----	179
2.12.1 Isolation of promoters-----	179
2.12.2 Promoter assay -----	180
Part 3. Development of disease resistant crops using defense genes-----	181
1. Research methods and contents-----	181
1.1 Genes provided by collaborators-----	181
1.2 Construction of vectors expressing defense genes-----	181
1.3 Vector construction of <i>CASLPI</i> , <i>CABPRI</i> , <i>CALTPI</i> , <i>CAPOA1</i> and <i>CALRR</i> -----	181
1.3.1 Preparation of inserts and vectors-----	181
1.3.2 Digestion and purification of inserts and pMBP1-----	182
1.3.3 Ligation and transformation of <i>E. coli</i> -----	182
1.4 Agrobacterium transformation of defense gene–expressing vectors-----	182
1.4.1 Preparation of <i>Agrobacterium</i> competent cells-----	182
1.4.2 Transformation of cloned vectors into <i>Agrobacterium</i> -----	184
1.5. Tobacco transformation -----	184
1.6 Genomic DNA and RNA extraction, PCR and Northern analysis-----	185
1.7 Integration of defense genes by established tobacco transformation system-----	187

1.8	Characterization of transgenic plants-----	191
1.8.1	Analysis of peroxidase activity-----	191
1.8.2	Analysis of oxidative stress tolerance-----	191
1.8.3	Analysis of salt and osmotic stress tolerance-----	191
1.8.4	Pathogen inoculation-----	191
1.8.5	Transformation and regeneration of tomato-----	192
2.	Research results and discussion-----	193
2.1	Establishment and identification of <i>CAPOA1</i> -overexpressing tobacco transgenic plants-----	193
2.1.1	Confirmation of gene introduction by PCR-----	193
2.1.2	Generation and analysis of transgenic plants-----	193
2.2	Characterization of <i>CAPOA1</i> -overexpressing tobacco transgenic plants-----	193
2.2.1	Morphology and growth-----	193
2.2.2	Analysis of peroxidase activity-----	194
2.2.3	High tolerance of transgenic plants to oxidative stress-----	194
2.2.4	Disease resistance-----	194
2.2.5	Subcellular localization of <i>CAPOA1</i> -----	195
2.3	Discussion on <i>CAPOA1</i> -overexpressing tobacco transgenic plants-----	195
2.4	Establishment and identification of <i>CABPRI</i> -overexpressing tobacco transgenic plants-----	204
2.4.1	Confirmation of gene introduction by PCR-----	204
2.4.2	Generation and analysis of transgenic plants-----	204
2.5	Results and discussion on <i>CABPRI</i> -overexpressing tobacco transgenic plants-----	204
2.5.1	Disease assay of <i>CABPRI</i> transgenic plants-----	204
2.5.2	High tolerance to heavy metal ions-----	207
2.5.3	Expression patterns of PR genes and ascorbate peroxidase gene-----	211
2.5.4	Reduction of peroxidase activity-----	211
2.6	Establishment and identification of <i>CALTP1</i> - and <i>CALTP2</i> -overexpressing tobacco and <i>Arabidopsis</i> transgenic plants-----	211

2.6.1 Confirmation of gene introduction by PCR-----	211
2.6.2 Generation and analysis of transgenic plants-----	214
2.7 Results and discussion on <i>CALTP1</i> - and <i>CALTP2</i> -overexpressing transgenic plants-----	214
2.7.1 Phenotypes of transgenic T ₃ plants-----	214
2.7.2 Cell wall analysis by TEM-----	215
2.7.3 Enhanced resistance to salt and osmotic stress of transgenic tobacco-----	215
2.7.4 Changes in concentration of Na ⁺ , K ⁺ and Ca ²⁺ ions-----	215
2.7.5 Expression patterns of salt- and osmotic stress-related genes-----	216
2.7.6 2-DE analysis of Arabidopsis proteins during salt and osmotic stress----	223
2.7.7 Enhanced resistance to bacterial and oomycete pathogens-----	224
2.7.8 Expression patterns of PR genes in transgenic plants-----	229
2.7.9 Enhanced SA and H ₂ O ₂ concentration in transgenic plants-----	229
2.7.10 Analysis of gene expression in VIGS plants-----	229
2.7.11 A role in long distance systemic signaling-----	233
2.7.12 2-DE analysis of Arabidopsis proteins in bacteria-infected plants-----	233
2.8 Establishment and identification of <i>CABPRI</i> - and <i>CAPOAI</i> -overexpressing tomato transgenic plants-----	236
2.9 Results and discussion on <i>CABPRI</i> - and <i>CAPOAI</i> -overexpressing tomato transgenic plants-----	236
Part 4. Development of diagnosis kits of major crop diseases-----	242
1. Research methods and contents-----	242
A. Development of diagnosis kits of <i>Phytophthora capsici</i> -----	242
1.1 Fungal isolates-----	242
1.1.1 Collection and isolation of <i>Phytophthora</i> spp.-----	242
1.1.2 Identification of fungal isolates-----	245
1.2 Genomic DNA extraction-----	245
1.2.1 Fungal genomic DNA extraction-----	245
1.2.2 DNA extraction in solution culture-----	246
1.2.3 DNA extraction in soil-----	246

1.2.4 DNA content measurement of <i>P. capsici</i> spores-----	246
1.3 Species-specific primer selection and application-----	247
1.3.1 <i>P. capsici</i> species-specific primer selection-----	247
1.3.2 Southern analysis-----	248
1.3.3 CSP23A/CSP23B primer application-----	249
1.3.4 Species-specific application for detection of pathogens from solution culture and soil-----	254
1.3.5 Field assay of detection kits developed-----	254
B. Development of diagnosis kits of <i>Alternaria</i> spp.-----	255
1.1 Fungal isolates-----	255
1.2 Morphological and cultural characterization-----	259
1.3. DNA extraction-----	259
1.4. Development of species-specific primer-----	260
1.4.1 DNA markers for identification and detection of <i>A. panax</i> -----	260
1.4.2 DNA markers for identification and detection of <i>A. gaisen</i> -----	262
1.5 DNA amplification of species-specific primers-----	264
1.5.1 Primer specificity and sensitivity-----	264
1.5.2 PCR of DNA from the rapid extraction procedure-----	264
1.5.3 Detection assay from infected ginseng leaves-----	265
1.5.4 Field test of detection kits-----	265
C. Establishment of database of species-diverse DNA profiles of major crop pathogens and development of detection kits-----	266
1.1 Bacterial strains and cultural conditions-----	266
1.2 Extraction of total DNA-----	266
1.3 Blastn program analysis for specific base sequencing-----	266
1.4 PCR amplification-----	266
1.5 Detection of pathogens from lesions-----	267
2. Research results and discussion-----	267
A. Development of detection kits of <i>P. capsici</i> -----	267
2.1 Classification of <i>Phytophthora</i> . spp. in Korea-----	267

2.2 Measurement of DNA content in a single spore for detection of pathogens-----	268
2.2.1 DNA content of a single zoospore-----	268
2.2.2 DNA content of a single oospore-----	269
2.3 Development of species-specific DNA markers for identification of pathogens-----	271
2.3.1 Species-specific probe DNA selection for genetic analysis of <i>P. capsici</i> ---	271
2.3.2 Design of species-specific primer for identification of <i>P. capsici</i> -----	276
2.4 Fabricative property and application of selected species-specific primers-----	280
2.4.1 PCR amplification property of species-specific primer set CSP23A/CSP23B-----	280
2.4.2 PCR amplification property of species-specific primer set CSP23A/CSP23B for <i>P. capsici</i> -----	290
2.4.3 Selection and application species-specific primer for <i>P. infestans</i> and <i>P. nicotianae</i> -----	298
2.4.4 Application test of the detection kits for pathogens-----	300
B. Development of diagnosis kits of <i>Alternaria</i> spp.-----	303
2.1 Morphological and cultural characterization of <i>Alternaria</i> -----	303
2.1.1 Morphological characterization-----	303
2.1.2 Cultural characterization-----	309
2.1.3 Pathogenicity test-----	309
2.1.4 URP-PCR analysis of <i>Alternaria</i> -----	309
2.2 Species-specificity of <i>Alternaria panax</i> -----	310
2.2.1 Specificity and sensitivity of 3405F/3405R primer-----	312
2.2.2 Specificity and sensitivity of PanaxF/PanaxR primer-----	315
2.2.3 Field test of detection kits-----	319
2.3 DNA markers for identification and detection of <i>A. gaisen</i> -----	322
2.3.1. Conversion of the AFLP markers into a SCAR-----	322
2.3.2. Specificity and sensitivity of <i>A. gaisen</i> -----	322
2.3.3 Detection of specific band from DNA mixture of <i>A. gaisen</i> and other <i>Alternaria</i> spp.-----	327

2.3.4. PCR with DNA from the rapid extraction procedure-----	327
C. Establishment of database of species-diverse DNA profiles of major crop pathogens and development of detection kit-----	329
2.1. Establishment of database of DNA profile of major crop pathogens and search system for related information on Internet-----	329
2.1.1 URP-PCR fingerprint standard fiducial mark of <i>Phytophthora</i> spp.-----	329
2.1.2 Preparation of URP-PCR profile of <i>Trichoderma</i> spp. and database establishment-----	331
2.1.3 Preparation of URP-PCR profile of <i>Pseudomonas</i> spp. and database establishment-----	332
2.1.4 Establishment of DNA profile DB and development of searching system on Internet-----	337
2.2 Development of diagnosis markers of major crop bacterial pathogens-----	338
2.2.1 Species-specific detection of <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> ---	338
2.2.2 Species-specific detection of <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> -----	342
2.2.3 Species-specific detection of <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> -----	351
2.2.4 Species-specific detection of <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> -----	358
2.2.5 Species-specific detection of <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> -----	361
2.2.6 Species-specific detection of <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> -----	366
2.2.7. Species-specific detection of <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> -----	371
2.3 Development of diagnosis kits for crop pathogens-----	377
2.3.1 Development of DNA extraction kit widely used for pathogen diagnosis-----	377
2.3.2 Development of DNA diagnosis kits for crop pathogenic bacteria-----	378
Chapter 4 Achievement on research goals and contributions to related fields-----	380
Chapter 5 Future application of research results-----	385
Chapter 6 Abroad scientific information-----	389
Chapter 7 References-----	394

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요-----	36
제 1 절 연구개발의 필요성-----	36
제 2 절 연구개발의 목적 및 범위-----	38
제 2 장 국내외 기술개발 현황-----	40
제 1 절 국내 기술개발-----	40
제 2 절 국외 기술개발-----	42
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과-----	46
제 1 절 채소병 방어유전자의 개발 및 functional genomics (주관 제 1 세부과제)-----	46
1. 연구개발 수행방법 및 내용-----	46
가. 고추, 담배, Arabidopsis 식물의 생육-----	46
나. 병원균 접종, 환경 스트레스 처리 및 비생물적인 elicitor 처리-----	46
다. cDNA library의 합성-----	47
라. Differential hybridization-----	47
마. Nucleotide sequence 분석-----	48
바. RNA 추출 및 Northern blot hybridization-----	48
사. <i>In situ</i> hybridization-----	48
아. 식물병방어유전자의 프로모터 분리 및 분석-----	49
자. 채소병방어유전자를 이용한 Arabidopsis 식물의 형질전환-----	49
차. 형질전환 Arabidopsis 식물체의 병저항성 및 환경 스트레스 내성 검정-----	50
2. 연구개발 수행결과 및 고찰-----	50
가. 채소병방어관련유전자의 differential screening과 염기서열분석-----	50
나. <i>CACYPI</i> 유전자의 특성 분석-----	52
1) 염기서열분석-----	52
2) 병감염에서 <i>CACYPI</i> 유전자의 발현-----	52
3) 화학적 elicitor 처리에 의한 <i>CACYPI</i> 유전자의 발현-----	53
4) <i>CACYPI</i> 유전자의 조직학적 <i>in situ</i> 발현-----	54

다. <i>CACBP1</i> 유전자의 특성 분석-----	62
1) 염기서열 분석-----	62
2) 병감염에서 <i>CACBP1</i> 유전자의 발현-----	62
3) 화학적 elicitor 처리 의한 <i>CACBP1</i> 유전자의 발현-----	63
4) <i>CACBP1</i> 유전자의 조직학적 <i>in situ</i> 발현-----	63
라. <i>CAOSMI</i> 유전자의 특성 분석-----	68
1) 염기서열 분석-----	68
2) 병감염에서 <i>CAOSMI</i> 유전자의 발현-----	68
3) 화학적 elicitor 처리에 의한 <i>CAOSMI</i> 유전자의 발현-----	69
4) 환경 스트레스에 의한 <i>CAOSMI</i> 유전자의 발현-----	69
5) <i>CAOSMI</i> 유전자의 조직학적 <i>in situ</i> 발현-----	70
마. <i>CAZFP1</i> 유전자의 특성 분석-----	77
1) 염기서열 분석-----	77
2) <i>CAZFP1</i> transcription factor의 세포내 위치-----	77
3) 병감염에서 <i>CAZFP1</i> 유전자의 발현-----	78
4) 화학적 elicitor 처리 의한 <i>CAZFP1</i> 유전자의 발현-----	78
5) 환경 스트레스에 의한 <i>CAZFP1</i> 유전자의 발현-----	79
6) <i>CAZFP1</i> 유전자의 조직학적 <i>in situ</i> 발현-----	79
7) <i>CAZFP1</i> 유전자의 프로모터 분리 및 분석-----	79
8) 병원세균 감염, methyl jasmonate와 ethylene에 의한 <i>CAZFP1</i> 프로모터의 활성화-----	79
9) <i>CAZFP1</i> 발현 형질전환 Arabidopsis의 제조-----	80
10) <i>CAZFP1</i> -형질전환 Arabidopsis의 병저항성-----	81
11) <i>CAZFP1</i> -형질전환 Arabidopsis의 건조 스트레스 내성-----	81
바. <i>CADC1.2</i> 유전자의 특성 분석-----	95
1) 염기서열 분석-----	95
2) 병감염에서 <i>CADC1.2</i> 유전자의 발현-----	95
3) 화학적 elicitor 처리 의한 <i>CADC1.2</i> 유전자의 발현-----	96
4) <i>CADC1.2</i> 유전자의 조직학적 <i>in situ</i> 발현-----	96
5) <i>CADC1.2</i> 유전자의 프로모터 분리 및 분석-----	96
사. <i>CaPIMP1</i> 유전자의 특성 분석-----	105
1) 염기서열 분석-----	105

2) CaPIMP1 단백질의 세포내 위치-----	105
3) 병감염에서 <i>CaPIMP1</i> 유전자의 발현-----	106
4) 화학적 elicitor 처리 의한 <i>CaPIMP1</i> 유전자의 발현-----	106
5) 환경 스트레스에 의한 <i>CaPIMP1</i> 유전자의 발현-----	106
6) 유전자의 프로모터 분리 및 분석-----	106
7) 병원세균 감염 및 화학적 elicitor에 의한 <i>CaPIMP1</i> 프로모터의 활성화-----	106
8) <i>CaPIMP1</i> 유전자를 이용한 형질전환 <i>Arabidopsis</i> 의 제조-----	106
아. <i>CABPR1</i> 유전자의 특성분석-----	114
1) <i>CABPR1</i> 유전자의 프로모터 분리-----	114
2) 병원세균 감염에 의한 <i>CABPR1</i> 프로모터의 활성화-----	114
3) 식물방어신호물질에 의한 <i>CABPR1</i> 프로모터의 활성화-----	115
4) 환경 스트레스에 의한 <i>CABPR1</i> 프로모터의 활성화-----	116
5) <i>CABPR1</i> -형질전환 <i>Arabidopsis</i> 의 제조-----	116
6) <i>CABPR1</i> -형질전환 <i>Arabidopsis</i> 의 병저항성-----	117
7) <i>CABPR1</i> -형질전환 <i>Arabidopsis</i> 의 고 염류 스트레스 내성-----	117
8) <i>CABPR1</i> -형질전환 <i>Arabidopsis</i> 의 건조 스트레스 내성-----	118
9) <i>CABPR1</i> -형질전환 <i>Arabidopsis</i> 의 abscisic acid에 대한 반응-----	118
10) <i>CABPR1</i> -형질전환 <i>Arabidopsis</i> 의 oxidative stress에 대한 반응-----	119
제 2 절 식량작물병 방어유전자 개발 및 functional genomics(제 1 협동과제)-----	133
1. 연구 개발 수행 방법 및 내용-----	133
가. 벼에서 병저항성 반응 cDNA library 제작-----	133
나. Northern 및 RT-PCR로 방어유전자 선별-----	133
1) 식물, 세균 및 시약-----	134
2) Total RNA 분리-----	134
3) RNA gel 전기영동과 capillary blotting-----	134
4) Random hexame labelling에 의한 probe 제조-----	134
5) Northern hybridization-----	135
6) RT-PCR-----	135
다. Nucleotide sequence 분석-----	135
라. Microarray를 위한 cDNA chip 제작-----	136
마. Microarray에 의한 방어유전자 분리, 염기서열 분석-----	136
바. 방어유전자의 기능분석-----	137

1) 벼 병 방어유전자를 이용한 벼와 담배 형질전환-----	137
사. 병 저항성유전자의 promoter 분리, 분석-----	138
1) promoter 분리-----	138
2) promoter 분석-----	138
아. Yeast-two-hybrid system을 이용한 병방어 조절유전자 분석-----	139
1) Yeast-two-hybrid cDNA library 제작-----	139
2) Bait 벡터 제작-----	139
3) Yeast cotransformation-----	140
4) <i>OsDRP</i> 유전자와 상호작용하는 클론 선발-----	140
5) Yeast-two-hybrid screening-----	141
자. 형질전환 식물체의 병저항성 검정-----	141
1) 세균병 저항성 검정-----	141
2) 역병 저항성 검정-----	141
2. 연구 개발 수행 결과 및 고찰-----	142
가. 벼 방어유전자 탐색을 위한 PCR 수행 및 cDNA chip 분석-----	142
나. 벼 병 방어관련 유전자의 screening과 염기서열 분석-----	143
다. Microarray 분석 결과-----	152
라. 병저항성 단백질을 코딩하는 벼 <i>OsDRP</i> 유전자의 특성 분석-----	156
마. Leucine zipper를 코딩하는 벼 <i>OsLZIP</i> 유전자의 특성 분석-----	161
바. NDR/HIN을 코딩하는 벼 <i>OsNDR/HIN</i> 유전자의 특성 분석-----	163
사. Myb like 단백질을 코딩하는 벼 <i>OsMyb</i> 유전자의 특성 분석-----	164
아. WRKY-DNA binding protein을 코딩하는 벼 <i>OsWRKY</i> 유전자의 특성 분석-----	166
자. Yeast-two-hybrid를 이용한 유전자 기능 분석-----	168
1) Yeast-two-hybrid rice cDNA library 제작-----	168
2) Bait 벡터 제작-----	168
3) Yeast cotransformation -----	169
4) <i>OsDRP</i> 유전자와 상호작용하는 클론 선발-----	170
5) <i>OsDRP</i> 와 <i>Magnaporthe grisea</i> 의 CYP1과의 Yeast-two-hybrid-----	170
6) Yeast-two-hybrid Arabidopsis cDNA library 제작-----	172
차. 벼 병방어유전자를 이용한 벼와 담배의 형질전환-----	173
1) Overexpression vector 제작-----	173
2) RNAi를 이용한 knockout mutant 제작-----	174

3) 형질전환 식물체 제작-----	174
4) 형질전환 식물체 확인-----	175
카. 형질전환 식물체의 병 저항성 검정-----	177
타. <i>OsDRP</i> 유전자의 promoter 분석-----	179
1) Promoter 분리-----	179
2) Promoter assay-----	180
제 3 절 방어유전자를 이용한 형질전환 병저항성 작물개발 (주관 제 2 세부과제)-----	181
1. 연구 개발 수행 방법 및 내용-----	181
가. 타 세부과제로부터 제공받은 유전자-----	181
나. 병저항성 유전자 발현 벡터 제작-----	181
다. <i>CASLPI</i> , <i>CABPRI</i> , <i>CALTP1</i> , <i>CAPOA1</i> , <i>CALRR</i> 의 vector construction-----	181
1) insert와 vector의 준비-----	181
2) insert 및 pMBP1 digestion과 purification-----	182
3) ligation과 <i>E. coli</i> transformation-----	182
라. 병저항성 유전자 발현 벡터를 <i>Agrobacterium</i> 에 도입-----	182
1) <i>Agrobacterium</i> competent cell 제조-----	182
2) Cloning한 vector를 <i>Agrobacterium</i> 에 transformation-----	184
마. 담배, 토마토, 애기장대 형질전환-----	184
바. Genomic DNA, RNA 추출, PCR 및 Northern 분석-----	185
사. 확립된 형질전환 시스템을 이용한 저항성 유전자의 도입-----	186
아. 형질전환체의 특성 검정-----	191
1) Peroxidase 활성 분석-----	191
2) 산화적 스트레스 내성 정도 분석-----	191
3) 염과 삼투 스트레스 저항성 분석-----	191
4) 병원균의 접종-----	191
5) 토마토 형질전환 및 재분화-----	192
2. 연구 개발 수행 결과 및 고찰-----	193
가. <i>CAPOA1</i> 유전자 도입 담배 형질전환체 확립 및 발현 검정-----	193
1) PCR을 통한 유전자 도입의 확인-----	193
2) 형질전환식물체의 생산 및 유전자 과발현 확인-----	193
나. <i>CAPOA1</i> 유전자 도입 형질전환체의 특성 분석 결과-----	193
1) 형태적 특성과 성장속도-----	193
2) <i>CAPOA1</i> 의 과다발현은 peroxidase 활성을 증가-----	194

3) 형질전환체의 산화적 스트레스에 높은 내성-----	194
4) 병원균에 대한 저항성-----	194
5) CAPOA1의 subcellular localization-----	195
다. <i>CAPOA1</i> 실험 결과에 대한 고찰-----	195
라. <i>CABPR1</i> 유전자 도입 담배 형질전환체 확립 및 발현 검정-----	204
1) PCR을 통한 유전자 도입의 확인-----	204
2) 형질전환식물체의 생산 및 유전자 과발현 확인-----	204
마. <i>CABPR1</i> 유전자 도입 형질전환체의 특성 분석 결과 및 고찰-----	204
1) <i>CABPR1</i> transgenic 식물을 이용한 병 진단 실험-----	204
2) <i>CABPR1</i> 담배 형질전환체의 중금속에 대한 내성 증대-----	207
3) 형질전환 식물체 내에서의 PR 유전자들, 중금속 스트레스 관련 유전자 및 ascorbate peroxidase 유전자의 발현 양상 확인-----	211
4) <i>CABPR1</i> 형질전환체내 peroxidase 활성 감소-----	211
바. <i>CALTP1</i> 와 <i>CALTP2</i> 유전자 도입 담배 및 애기장대 형질전환체 확립 및 발현 검정-----	211
1) PCR을 통한 유전자 도입의 확인-----	211
2) 형질전환식물 내에서의 유전자 발현의 확인-----	214
사. <i>CALTP1</i> 와 <i>CALTP2</i> 형질전환체의 특성 분석 결과 및 고찰-----	214
1) 형질전환체 T ₃ 계통의 표현형-----	214
2) TEM 전자현미경을 이용한 세포벽의 분석-----	215
3) 과다발현 담배에서 엽과 삼투 스트레스 저항성 증가-----	215
4) Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ 이온 농도의 변화-----	215
5) 형질전환 <i>Arabidopsis</i> 에서의 엽과 삼투스트레스 관련 유전자들의 발현 양상-----	216
6) 엽과 삼투스트레스 처리 <i>Arabidopsis</i> 의 2-DE 분석-----	223
7) 형질전환체의 박테리아와 oomycete에 대한 저항성의 증가-----	224
8) 형질전환체에서의 PR 유전자들의 발현 양상-----	229
9) 형질전환체에서의 SA와 H ₂ O ₂ 의 증가-----	229
10) VIGS 식물체 이용한 발현 검증 실험-----	229
11) Long distance systemic signaling에 관여-----	233
12) 형질전환 <i>Arabidopsis</i> 에 <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> 를 감염 후 2-DE 분석-----	233
아. <i>CABPR1</i> 과 <i>CAPOA1</i> 유전자 도입 토마토 형질전환체 확립 및 발현 검정-----	236

자. <i>CABPR1</i> 과 <i>CAPOA1</i> 유전자 도입 토마토 형질전환체의 특성 분석 결과 및 고찰-----	236
제 4 절 주요 작물병의 진단시스템 개발 (제 2 협동과제)-----	242
1. 연구개발 수행방법 및 내용-----	242
A. 고추역병균 진단 kit 개발-----	242
가. 공시균주-----	242
1) <i>Phytophthora</i> spp.의 수집 및 분리-----	242
2) 분리균의 동정-----	245
나. Genomic DNA 분리-----	245
1) 곰팡이 genomic DNA 분리-----	245
2) 양액에서의 DNA 분리-----	246
3) 토양에서의 DNA 분리-----	246
4) <i>P. capsici</i> 의 변식기관의 DNA 함량조사-----	246
다. 종 특이적 primer 선발 및 활용-----	247
1) 고추역병균 종 특이적 primer 선발-----	247
2) Southern 분석-----	248
3) CSP23A/CSP23B primer 활용-----	249
4) 양액 및 토양으로부터 병원균 검출을 위한 종특이적 primer의 활용-----	254
5) 시제품 진단 kit의 포장 검정-----	254
B. <i>Alternaria</i> 속 병원균 진단 kit 개발-----	255
가. 공시균주-----	255
나. 형태적, 배양적 특성 조사-----	259
다. DNA extraction-----	259
라. 종 특이적 primer의 제작-----	260
1) <i>A. panax</i> 의 동정 및 검출기술 개발-----	260
2) <i>A. gaisen</i> 의 동정 및 검출기술 개발-----	262
마. 종특이적 primer의 DNA 증폭-----	264
1) Primer 특이성 및 민감도-----	264
2) 신속한 추출방법을 이용한 DNA의 PCR-----	264
3) 인삼잎에서 병원균 검출기술-----	265
4) 진단 Kit의 포장검정-----	265
C. 작물 주요병원균의 종 다양성 DNA profile의 database 구축 및 조기진단 Kit 개발---	266
가. Bacterial strain과 배양 조건-----	266

나. Total DNA의 추출-----	266
다. 특이 염기서열 정보 탐색을 위한 blastn 프로그램 이용 분석-----	266
라. PCR 증폭 반응-----	266
마. 병조직으로 부터 병원균 검출-----	267
2. 연구개발 수행결과 및 고찰-----	267
A. 고추역병원균 진단 Kit 개발-----	267
가. 국내 발생 주요 <i>Phytophthora</i> spp.의 분류학적 특성-----	267
나. 병원균의 정량적 검출을 위한 단일세포내 DNA 함량 조사-----	268
1) 단일 유주자 DNA 농도 정량-----	268
2) 단일 난포자 DNA 농도 정량-----	269
다. 식물병원균 동정용 종특이적 DNA marker 개발-----	271
1) <i>P. capsici</i> 유전분석용 종특이적 probe DNA 선발-----	271
2) <i>P. capsici</i> 동정용 특이 primer 제작-----	276
라. 선발된 종특이적 primer의 제반 특성 및 활용-----	280
1) 종 특이적 primer set CSP23A/CSP23B의 PCR 증폭 특성-----	280
2) 종 특이적 primer CSP23A/CSP23B의 <i>P. capsici</i> 에 대한 PCR 증폭 특성-----	290
3) <i>P. infestans</i> 와 <i>P. nicotianae</i> 종특이적 primer의 선발 및 활용-----	298
4) 병진단 kit을 이용한 실제 적용 시험-----	300
B. <i>Alternaria</i> 속 병원균 진단 kit 개발-----	303
가. <i>Alternaria</i> 의 균주수집 및 특성 조사-----	303
1) 형태적 특징-----	303
2) 배양적 특징-----	309
3) 병원성 검정-----	309
4) <i>Alternaria</i> 의 종 특이적 밴드 탐색을 위한 URP-PCR-----	309
나. <i>Alternaria panax</i> 종 특이성-----	310
1) 3405F/3405R primer의 특이성과 민감도-----	312
2) PanaxF/PanaxR primer 의 특이성과 민감도-----	315
3) 진단Kit의 포장검정-----	319
다. <i>A. gaisen</i> 동정을 위한 DNA markers-----	322
1) AFLP markers 의 SCAR로 전환-----	322
2) <i>A. gaisen</i> 의 특이성과 민감도-----	322
3) <i>A. gaisen</i> 과 다른 <i>Alternaria</i> spp.의 DNA에서 특이 band의 검출-----	326
4) 신속한 추출방법을 이용한 DNA의 PCR-----	327

C. 주요 작물병원균의 종 다양성 DNA profile의 database 구축 및 조기진단 Kit 개발-----	329
가. 주요 작물 병원균의 DNA profile database 구축 및 웹기반의 관련 정보 검색 시스템 개발-----	329
1) <i>Phytophthora</i> spp.의 URP-PCR 핵산지문 표준지표-----	329
2) <i>Trichoderma</i> spp.의 URP-PCR profile 작성 및 database 구축-----	331
3) <i>Pseudomonas</i> spp.의 URP-PCR profile 작성 및 database 구축-----	332
4) DNA profile DB 구축 및 web을 통한 검색 시스템 개발-----	337
나. 주요 작물 병원세균의 진단 마커 개발-----	338
1) PCR primer를 이용한 <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> 특이검출---	338
2) PCR primer를 이용한 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> 특이검출-----	342
3) PCR primer를 이용한 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> 특이검출-----	351
4) PCR primer를 이용한 <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> 특이검출-----	358
5) PCR primer를 이용한 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> 특이검출-----	361
6) PCR primer를 이용한 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> 특이검출-----	366
7) PCR primer를 이용한 <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> 특이검출-----	371
다. 주요 작물 병원균의 진단 Kit 개발-----	377
1) 작물병원균 진단을 위한 범용 DNA 추출 Kit 개발-----	377
2) 주요 작물 병원 세균의 진단을 위한 DNA진단 Kit 개발-----	378
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도-----	380
제 1 절 연구개발목표의 달성도-----	380
제 2 절 관련분야에의 기여도-----	383
제 5 장 연구개발결과의 활용계획-----	385
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보-----	389
제 7 장 참고문헌-----	394

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

우리나라의 작물생산에서 가장 위협적이고 고질적인 작물병에 대한 저항성을 가지는 작물을 육성, 재배하는 것이 가장 경제적이고 환경친화적인 식물병의 방제수단이다. 그러나 전통적인 교잡육종방법을 이용하여 육종, 재배되고 있는 많은 작물품종은 병원균의 새로운 레이스가 출현하여 저항성이 붕괴됨으로써 더 이상 이들 품종을 재배할 수가 없고 새로운 품종으로 대체하여야 한다. 그러므로 새로운 밀레니엄을 맞아 현대농업에서 이들 새로운 레이스에 대처하여 안정된 수량을 가져올 수 있는 지속적인 병저항성을 지닌 품종을 육성, 재배하는 것이 가장 바람직하다. 이러한 목표를 위하여 전통적인 교잡육종 방법과 함께 강력하고 넓은 스펙트럼을 지닌 새로운 식물병방어관련유전자를 탐색하여 이들 유전자의 기능을 파악, 형질전환 병저항성 식물제조기술이 절실하게 필요하다.

식물병방어유전자를 탐색하여 이를 이용, 고질적 작물병 방제 기술을 개발하려는 식물병으로는 한국의 채소작물 중에서 재배 생산량 규모가 가장 큰 고추의 역병, 탄저병, 세균성점무늬병 등이며 우리나라의 식량 작물에서 먹거리를 책임지고 있는 벼의 수량 감소의 주요 원인인 도열병, 세균에 의한 흰잎마름병의 유전공학적 방제기술개발이 절실하게 요청되고 있다. 최근 국제적으로 지적소유권이 강화됨에 따라 우리의 첨단생명공학기술이 적극적으로 개발되어야 하며 새로운 식물병 방어관련 유전자개발 및 이를 이용한 기술개발이 시급히 요구되고 있으며, 벼 국제 genome project에서 벼 genome의 sequencing가 완료되었으며 벼 유전자의 기능분석만이 특허권을 취득할 수 있으므로 이를 대비하기 위한 병방어관련 유전자의 기능분석이 시급한 실정이다.

작물의 형질전환 기술은 분자생물학적인 연구결과를 실제로 응용, 가능하게 하는 기술로서 본 연구에서도 반드시 극복하여야 할 과제이다. 식물의 형질전환에 중요한 세가지 요인은 1) 식물체가 외부 유전자를 받아들이고 재분화하는 최적 조건의 개발, 2) 유전자의 매개체, 3) 이전된 유전자의 형질전환 식물체에서의 발현이며 이중에 3)의 경우가 중요시 되고 있다. 본 연구진은 형질전환된 유전자의 식물체내에서 안정적 발현을 위한 연구를 통하여 높은 수준의 외부 유전자 발현 기술을 보유하고 있다. 본 연구과제는 형질전환 기술을 이용하여 전에는 불가능하였던 식물 병에 강한 벼, 고추, 토마토, 담배의 생산은 병에 의한 경제적 손실을 줄일 수 있으며 더불어 농약살포의 감소로 환경오염 방지 및 농가경제의 부담을 덜어주는 중요한 연구, 개발 과제이다.

고질적인 작물병들은 조기진단 실패나 부정확한 진단으로 인하여 효과적인 방제 시스템 개발에 어려움이 있어 왔다. 또한 기존의 고전적인 방법으로는 형태적 변이가 심한 균이나 초기 병징이 유사한 병의 경우 정확한 동정이나 조기 진단이 불가능하기 때문에 이를 해결할 수 있는 개선된 새로운 진단시스템의 개발이 시급한 실정이다. 고질적 토양병인 고추역병과 토마토 시들음병, *Alternaria* 병인 인삼점무늬병과 배검은무늬병 및 사과점무늬낙엽병, 세균병인 채소 무름병 등은 대표적인 방제하기 어려운 식물병으로서 이들의 조기진단을 위하여 토양, 공기 및 기주체 등의 환경에서 균의 동태를 추적할 수 있는 분자생물학적 monitoring 기술개발이 필요하다. 분자생물학적 기법인 DNA 검정 기술은 고도의 민감성과 신속성 및 단순성을 특징으로 하며 이를 활용한 DNA의 profile에 근거하여 병원균의 분류 및 진단에 관한 database가 특정 병원균에서만 일부 구축되어 있지만 국내에는 아직까지 고질적 작물병에 대한 체계적인 연구가 이루어지지 못하고 있다. 정확한 병 진단 시스템의 확립과 병원균의 분류나 특성 분석 및 진일보한 분자생물학적 연구를 위하여 각종 genetic marker의 개발이 필요하다.

새로운 밀레니엄을 맞아 농산물의 수입개방이 가속화됨에 따라 무공해, 고품질의 농작물생산이 절실히 요청되고 있다. 안정적인 농산물의 생산에서 식물병방제를 위해 사용되고 있는 농약 사용량이 증대되어 식물병에 대한 저항성품종의 재배가 가장 경제적이다. 식물의 방어기작을 정확하게 이해하여 식물병 방어관련 유전자를 이용한 형질전환 작물의 개발은 대부분 수입에 의존적인 농약을 사용하지 않고 식물병을 방제하여 환경오염을 줄일 수 있는 유일한 식물병 방제 수단이다.

국내의 주요 작물인 벼, 고추, 토마토, 담배 등의 병저항성품종을 육성하여 재배농가의 소득증대와 종자산업의 육성에 본 연구가 크게 필요하다. 병저항성 형질전환 작물의 재배는 농약 사용과 같은 화학적 방제의 빈도를 줄일 수 있다. 식물병에 의한 작물의 피해를 줄이기 위하여 농약사용은 농가의 경제적인 부담을 초래함과 아울러 환경오염을 가중시키고 있다. 따라서 농약사용량을 감소시키며 환경오염을 줄일 수 있는 생명공학기법에 의한 신품종의 수요는 폭발적으로 증가하여, 병 저항성 작물종자시장은 연간 약 200억불에 이를 것으로 추산된다. 이러한 병 저항성 신품종을 개발하기 위한 국가간 기업간의 경쟁은 매우 심하며 미국에서 만도 20여 개에 이르는 생명공학벤처기업들이 분야 연구에 집중하고 있다.

벼 도열병과 벼 흰잎마름병에 의한 감수는 년 평균 2,500억원에 달하며 기타 병에 의한 벼 감수는 연간 1조 2,400여억 원에 달한다. 고추, 토마토, 배, 사과, 인삼을 비롯한 농작물은 우리나라의 대표적 농산물로써 매년 각종 병해에 의해 막대한 피해를 입고 있어 체계적인 새로운 진단 시스템의 개발이 필요하다.

식물병의 오진은 농약의 오용, 남용을 초래하고 농산물의 농약 잔류량 증가로 수출에 장애가 될 수 있으므로 이를 해결하기 위해서는 정확한 조기 진단법 개발에 의한 병 방제 시스템의 도입이 필요하다. 분자생물학적 새로운 진단 시스템은 병진전 이전단계에 조기진단이 가능하므로 낮은 밀도 수준에서 적은 비용과 노력으로 방제할 수 있어 경제적 이득이 외에 환경 친화적 농업구현에도 필요하다. 선진국에서 특수유용미생물의 진단을 위해 DNA 검정 Kit가 제품화되어 다양한 분야에서 이용되고 있는 것처럼 국내 고질적 작물병에 관여하는 특정 작물병원균검출 Kit 개발의 산업화가 절실하게 필요한 실정이다.

현재 우리나라의 환경문제는 매우 심각하여 농약에 의존하는 작물생산보다는 환경친화적인 식물병저항성 품종을 이용한 고품질작물생산은 소비자에게 매우 매력적이다. 식물병 방어유전자를 이용하여 개발한 형질전환 병저항성 작물품종의 재배는 안정된 작물생산을 가져와서 농산물의 가격 안정화와 소비자에게 양질의 농산물을 공급할 수 있을 것이다. 농업인구의 고령화 및 무공해식품에 대한 소비자의 관심이 증대됨에 따라 농약살포를 기피하는 경향이 있으며, 채소작물의 재배에서 생력화 기술개발이 필요하다. 분자생물학적 기법에 의한 진단 시스템 개발은 난방제성 고질적 병해의 조기진단 및 정확한 진단에 의해 저농약방제가 가능하게 되므로 우리 농산물에 대한 소비자의 불신을 해소할 수 있다.

개발된 진단 시스템을 농업기술센터 등에 보급하여 진단기술을 첨단화시킴으로써 농업 연구의 외부적 홍보와 함께 우리나라 농업기술 발전에 새로운 도약의 기회를 마련할 수 있다. DNA 검정법에 의한 진단기술의 정기적인 workshop을 통해 농업인도 이용 가능하게 하여 농업연구자와 농업인간의 거리감 해소와 융합을 통해 현장농업연구의 기틀을 이루게 할 수 있다.

제 2 절 연구개발의 목적 및 범위

본 연구개발에서는 1) 채소작물로써 고추, 식량작물로써 벼를 이용하여 식물병방어(저항성)유전자를 분자적으로 크로닝하여 이들 식물방어관련유전자가 식물방어반응에서 시간적, 공간적으로 어떻게 발현되는지 분자유전학적, 번역세포학적 측면에서 *in situ* hybridization, cDNA chip 분석, yeast-two-hybrid system등을 이용하여 functional genomics, proteomics를 심도있게 분석한다. 또한 주요 식물방어(저항성)유전자의 promoter, transcription factor 등을 cDNA, genomic DNA 수준에서 연구하고 이들 유전자의 신호전달(signal transduction)체계를 규명하며 가장 유망한 식물방어유전자를 형질전환 병저항성 식물재조에 이용하고 작물유전육종가들에게 제공할 병저항성유전자원을 확보한다.

2) 벼, 토마토, 담배, 애기장대(*Arabidopsis*)의 형질전환 기술을 최적화하고 본 연구에서 분리한 유용 식물병방어(저항성)유전자를 이용하여 형질전환 작물을 개발한다. 이들 형질전환식물체에서 종자를 확보하여 방어유전자 발현 및 벼도열병, 흰잎마름병, 토마토, 담배, 애기장대의 여러 가지 진균병, 세균병에 대한 병저항성을 온실시험을 통해 검정한다.

3) 우리나라의 대표적 고질적 난방제성인 고추, 감자, 인삼, 박과 작물에 극심한 피해를 주는 역병 *Phytophthora* 속 균과 인삼, 사과, 배 등 주요 농작물에 피해를 주는 *Alternaria* 속 균의 동태 추적용, 진단, 분류동정, 그리고 특성을 분석하기 위한 분자생물학적 진단시스템을 개발한다. 이들 식물병원균의 신속 정확한 진단을 위해 진단용 DNA Kit를 개발하고 토양 및 식물조직내 등 농업 주변 환경에서의 병원균의 동태를 파악하기 위한 monitoring 기술을 개발한다.

4) 더 나아가서 주요 작물병원균(*Phytophthora* spp., *Trichoderma* spp., *Pseudomonas* spp.)의 DNA profile database 구축 및 web 기반의 관련정보검색시스템을 개발하고 주요 작물병원세균(*Pectobacterium* spp., *Xanthomonas* spp.)의 종특이적 검출 DNA marker를 이용하여 조기진단 Kit를 개발한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 기술개발

국내에서 병저항성 형질전환 식물의 제조에 이용할 수 있는 식물병방어유전자를 식물에서 분리하여 현재 분자육종에 이용되고 있는 유전자원은 미비한 실정이다. 본 연구 총괄책임자 황병국 교수(고려대)는 30 여 년 동안 식물병 저항성에 대해 생리생화학적, 분자생물학적 연구를 수행하며 현재 식물병방어관련유전자를 고추에서 분리하여 이들 유전자의 functional genomics을 연구하여 형질전환병저항성작물개발에 이용하기 위한 유전자원을 개발하고 있다. 본 연구의 세부연구책임자 변명옥 박사(농업생명공학연구원)와 신정섭 교수(고려대)는 20 여년 간의 풍부한 연구경험을 가지고 작물의 병저항성, 환경스트레스에 대한 내성을 지닌 벼, 토마토, 감자, 담배 등의 형질전환작물개발을 지속적으로 수행하고 있다.

농우바이오연구소의 한지학 박사는 우리나라에서 재배되는 고추, 배추, 박과작물 등의 주요 채소 작물에 대한 병저항성 형질전환 작물체를 상업적으로 유용하도록 개발 중에 있다. 금호생명환경과학연구소 김영순 박사는 고추의 병방어유전자를 분리하고 이를 이용한 형질전환 저항성고추 개발을 보고하고 있다. 생명공학연구원 최도일박사연구팀, 고려대학교 백경희 교수는 바이러스병등 주요 식물병에 대해 저항성을 보이는 형질전환 담배 및 고추 등을 개발하고 있다. 현재 국내에서 대학교, 기업연구소 및 생명공학연구소 등에서 다양한 병저항성 작물의 개발이 시도되고 있으나, 아직까지 실용화 사례는 없는 실정이다.

농업과학기술원에서 벼 도열병에 의해 유도되는 병 방어관련 유전자 탐색 및 전신획득 저항성유전자를 대량 분리하여 그 기능을 밝히고자 연구를 수행하고 있다. OsRacB GTPase가 벼 병저항성에 있어서 강력한 negative regulator로 작용한다고 보고하였다 (Jung et al., 2006). 서울대 이용환 교수 (농생명공학부)는 벼 도열병 병원균 컨소시엄 (국제연구팀)에 참여, 공동연구를 벌인 결과 벼 도열병을 일으키는 병원진균 *Magnaporthe grisea*의 유전체 염기서열을 완전히 해독하는 데 성공했다고 2005년 4월 20일 밝혔다. 벼 도열병 병원균의 염기서열이 완전 해독됨에 따라 앞으로 도열병에 대한 저항성이 높은 벼 품종 개발이 가능해지고 환경오염을 줄이면서 효과적으로 벼 도열병을 방제할 수 있는 첨단생명공학기술 개발이 한층 쉬워질 전망이다 (Dean et al., 2005). 그러나 국내에서 병저항성 형질전환 식물의 제조에 이용할 수 있는 식물병방어유전자를 식물에서 분리하여 현재 분자육종에 이용되고 있는 유전자원은 미비한 실정이다.

외국에서는 더욱 새로운 PCR기법에 의한 작물병원균의 진단기술이 개발되어 거의 모든 미생물 연구의 근간을 이루고 있으나 국내에서는 지극히 미미한 실정이다. 특히 식물병원세균에 대한 적용례는 거의 없어 실용화를 위한 관련 연구 개발이 더욱 요망된다. 본 연구 세 부책임자 김홍기 교수(충남대)가 *Alternaria*속을 비롯한 주요 식물병원진균의 분류, 동정, 유연관계 분석에 RAPD 및 PCR 기법들을 활용하여 연구를 수행 중에 있다(Kang et al. 2000; Kim 2000; Kim et al. 1997, 1998). 벼 반복서열(repeat sequence)로부터 20mer의 URP(Universal Rice Primer)를 개발하여 작물병의 종간, 종내 변이주의 특이적 검출에 성공, 실용화 기술도 추진되어 1999년에 SRILS UniPrimer Kit 제품명으로 산업화되었다(Kang et al. 1998, 2000). DNA반복배열 probe를 이용한 RFLP분석을 이용하여 MGR probe에 의한 국내도열병균의 유전형분포를 확인(Han 1996)하였고 유연관계분석, 변이분석, *Fusarium*속균의 분류가 행해졌다(Chung et al. 1997; Kim 2000; Kim 1997). 미토콘드리아 DNA의 RFLP 분석을 토대로 우리나라와 세계 여러 지역에서 분리한 고추 역병균의 유전적 변이를 분석하였고(Hwang et al. 1991), 벼 도열병균 레이스의 변이(Ko et al. 1993)와 고추 세균성점무늬병균의 변이(Hwang et al. 1995; Chung et al. 1997)등을 RFLP 분석으로 지역적 유연관계를 보고하였다.

*Fusarium*속 균의 분류를 위한 유용 probe를 작성하여 그 이용 가능성을 제시한 바 있고(Kim et al. 1994), 병원균의 유전변이나 유연관계를 분석하였으며(Kim et al. 1996) 병원성 관련 유전자 탐색이나 염색체 DNA 관련 연구를 통해 본 연구와 관련된 분자생물학적 기법은 이미 개발되어 있다. 세균의 DNA profile의 database 구축 및 이용에서 rDNA의 16S 영역을 이용한 세균의 Ribotyping의 database에 의해 미생물의 진단 시스템이 개발되어 실용화되고 있고 국내에서는 *Erwinia* spp. 등의 16S rDNA의 분석이 실시된 바 있으나(Kwon 등, 1997), 독자적인 database 구축은 알려진 바 없다. 진균의 DNA profile의 database 구축 및 이용연구에서 세계적으로 rDNA의 ITS 염기배열의 GenBank 내에 D/B 구축이 국부적으로 진행되고 있으나 국내에서는 RAPD, rDNA 및 RFLP를 이용한 작물 병원균의 유연 관계 연구가 진행되고 있을 뿐 database에 의한 종합적인 진단 시스템 개발이 알려진 바 없다. 선진국에서는 분류부터 방제에 이르기까지 병원균에 관한 거의 모든 분야에서 폭넓게 분자생물학적 기법을 활용하고 있는데 반해 국내에서는 극히 제한된 균이나 분야에 대해서만 극소수의 연구가 이루어지고 있어 진일보한 관련연구 및 활용이 요망된다(남 2002; Kang et al., 2003; Lee, 2005). 이들 연구는 추후 활용 및 발전 가능성이 매우 크지만 이 분야 전문가는 극소수에 불과한 실정이다. 또한 난 방제성 고질적 병해의 효과적인

방제를 위해서는 반드시 신속, 정확한 특정 병원균 검출용 중 특이적 primer의 개발이 하루 속히 필요하며 나아가 이를 활용한 병 진단 Kit의 개발도 시급한 실정이다.

현재 우리나라에는 형질전환 병저항성 식물의 개발 및 평가, 검정방법이 확립되지 않아 형질전환 여부를 정확하게 평가할 수 있는 기술개발이 시급한 실정이다. 형질전환 병저항성 식물을 성공적으로 분자적 육종을 하기 위해서는 고질적 식물병을 효과적으로 방제할 수 있는 훌륭한 방어유전자의 확보가 절실하게 필요하므로 이들 식물병방어유전자의 검정기술이 또한 필요하다. 더욱이 선진국에서는 주요 작물병의 분류, 진단시스템 개발에서 이 분자생물학 기법을 활용하고 있는데 반해 국내에서는 극히 제한된 식물병원균에 대해서만 극소수의 연구가 이루어지고 있어 진일보한 첨단 진단기술연구 및 활용이 필요하다.

제 2 절 국외 기술개발

식물병 저항성 형질전환 연구는 전 세계적으로 대기업과 정부차원의 연구소에서 활발히 진행되고 있다. 식물병 저항성 형질전환 식물을 육성하기 위해 집중적으로 투자하고 있는 대기업으로는 Dupont, Mogen International, Calgene, Dow Chemical, Rohm & Hass, Novatis, Monsanto, Drop Genetics, DNA Plant Technology, Ecofer, Mycoger, Tinger, Ecoscience, Neogen 등이 있고 독일 Max-Planck 식물 육종 연구소, 영국 John Innes 연구소등이 알려져 있다. 외래유전자를 도입하여 새로운 형질을 가지는 형질전환 식물체개발 기술은 차세대 농업의 방향을 결정할 중요 기술로 부각되고 있다. 1986년에 Dr. Beachy가 피복유전자(coat protein)를 이용한 바이러스 저항성 담배의 성공적 개발이후 바이러스에서 다른 유전자를 이용하여 이미 많은 작물에서 성공사례가 입증되고 있고, 1995년 AsGrow Company에서 여러 coat protein 유전자를 도입한 바이러스 저항성 작물을 시판하기 시작하였다. 또한 병저항성 유전자를 주요작물에 도입하여 식물병을 방제하려는 시도가 대학, 연구소, 기업체에서 활발히 수행되고 있다. 네덜란드 Mogen International사에서의 식물 chitinase를 이용하여 *Fusarium* 병에 저항성이 증진된 토마토의 개발이 보고되었다. 식물의 자체 방어기작에 관련된 단백질의 유전자 (ribosomal inactivating protein, small GTP-binding protein, thionin 등)를 작물에 도입하여 바이러스, 세균, 곰팡이 및 곤충에 저항성을 유도한 결과도 보고되었다.

고추는 재배국이 주로 아시아권이어서 선진국에서의 형질전환 체계 및 이를 이용한 병 저항성 작물 개발에 대한 연구 결과가 보고 된 바 없으며, 벼의 경우에도 선진국에서 재배하는 line들과 국내에서 재배하는 line들이 다르므로, 선진국에서 국내 품종을 이용하여 병

저항성을 보이는 벼의 개발은 보고 된 적이 없다.

1993년 이후 10년간 다른 식물 중에서 40개 이상의 병저항성유전자가 cloning 되어오고 있으며 이들 R gene들은 6개의 class로 구분되며 가장 흔한 것은 NBS-LRR 유전자들이라고 보고되어 있다 (Martin et al., 2003). 1996년 벼 흰잎마름병 R gene *Xa21*이 보고되었고 (Wang et al., 1996), 2004년에는 벼 흰잎마름병 R gene 인 LRR receptor-like kinase *Xa26*을 cloning하였다 (Sun et al., 2004). 이 유전자의 형질전환체가 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*에 저항성을 보였다. 25개 이상의 도열병 관련 R gene이 현재까지 밝혀졌으며 이들 중 NBS-LRR class에 속하는 *Ptb* 유전자가 보고되었다 (Wang et al., 1999). 2006년 broad-spectrum 도열병 저항성 유전자인 *P9*를 map-based cloning하였으며 이 유전자도 NBS-LRR 단백질을 암호화하는 것으로 밝혀졌다 (Liu et al., 2002). 최근 인도의 타밀나두 농과대의 Krishnan Kalpana와 그의 동료들은 높은 생산성을 가진 인도형 벼 품종인 ADT38, ASD16, IR50, 그리고 Pusa Basmati1 (PB1)을 벼의 *tlp* 유전자와 함께 형질전환하여 잎집무늬마름병에 저항성이 강한 품종을 개발하려고 시도하였다. *Tlp* 유전자는 pathogenesis-related (PR) 단백질을 발현하는데, 이 단백질은 과다 발현되었을 때 식물 저항성을 높여주어 형질전환된 벼가 그렇지 않은 식물들과 비교할 때 더 *R. solani*에 저항성을 보인다고 보고하였다. 그리고 이러한 저항성은 *tlp*가 또 다른 병저항성 단백질로 알려져 있는 키틴분해효소를 발현시키는 유전자인 *chi11*과 함께 벼에 도입되었을 때 더욱 강화되었다. *Tlp* 혹은 *chi11* 형질전환종자들은 잎집무늬마름병 외에도 벼잎집썩음병 (*Sarocladium oryzae*)에도 저항성을 보였다 (Krishnan et al., 2006).

1993년 Alexander 등은 PR-1a 담배 형질전환물체가 *Peronospora tabacina*와 *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* 2종의 난균류 (oomycete) 병원균 감염시 그 병증이 크게 감소됨을 확인하였고, 1993년에 Sela-Burlage 등은 염기성의 PR 단백질이 산성의 PR 단백질보다 강한 항곰팡이 성질을 가지고 있음을 확인하였다. 그리고 Neuhaus (1999)는 식물내 곰팡이, 박테리아 및 바이러스의 공격에 대하여 강하게 발현이 증가되는 PR 단백질의 일종인 chitinase (PR-Q)를 분리, 동정하였다. 2003년 남아프리카의 Carstens 등은 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)로부터 chitinase를 추출하여 담배 형질전환체의 제조, 병 저항성 여부 실험을 실시하여 곰팡이균인 *Botrytis cinerea*에 대해 강한 저항성을 획득함을 확인하였다. 이처럼 이종 간에 유사성을 가지는 유전자를 이용해서도 식물의 병저항성 실험이 많이 이루어지고 있다. 2000년 Way 등은 식물 peroxidase가 병원균 균주와는 상관없이 식물 방어기작에 관여하고, 이 유전자를 과다 발현시킨 형질전환체는 다양한 생물적 또는 비

생물학적 스트레스에 대해 강한 내성을 가짐을 확인하였다. 1997년 스페인의 Molina와 Garcia-Olmedo는 보리로부터 지질 수송 단백질 2 (*LTP2*)를 추출하여 담배에 형질 전환시켰을 때, 박테리아인 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*의 공격으로부터 정상 식물체보다 강한 내성을 보임을 밝힌 바 있고, 2002년 미국 Salk 연구소의 Maldonado 등은 식물이 병원균의 공격을 받으면, 그 부위에 1차적으로 국부적인(local) 세포 괴사가 일어나고, 이러한 세포 괴사가 다음 2차적으로 공격받은 부위 이외의 지역에 신호를 전달해 전신획득 저항성 (SAR, systemic acquired resistance)을 가지게 되며 이러한 SAR 반응에 지질 수송 단백질이 중요하게 작용하고 있음을 규명하였다. 2005년 미국의 Tang 등은 고추의 병해충과 냉해에 관련해 기능을 하는 전사 조절인자인 *CaPFI* (Yi 등, 2004)을 이용하여 소나무 (*Virginia pine*) 형질전환체를 제조하였고 이를 이용하여 실험한 결과, *CaPFI*을 과다발현하는 형질전환 소나무가 각종 증금속을 비롯한 병해충 (*Bacillus thuringiensis*와 *Staphylococcus epidermidis*)에 대해 강한 내성을 획득함을 확인하였다.

최근 식물 병원균의 분류에 분자생물학적 방법이 도입되면서 형태적 분류의 문제점을 해결하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 분자생물학적 방법은 균의 성장 단계나 환경 등에 영향을 받지 않아 안정적으로 이용할 수 있으며 전통적인 종의 동정 방법인 형태적 특징에 비하여 빠르고 정확한 유전적 정보를 제공할 수 있다. (Moritz and Hillis 1996). 종 특이적 분자적 진단은 기존의 방법으로는 구별하기 곤란한 다수의 식물병원균류 (*Cylindrocarpon*, *Monilinia*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Alternaria* 등)에 대해 보다 특이적이고 민감한 진단기법으로서 유용하게 사용되어 지고 있다 (Fulton and Brown 1997 ; Brown *et al.*, 1998 ; Niessen *et al.*, 1998 ; Howard and Paul, 2000 ; Roberts *et al.*, 2000). Genomic DNA의 hybridization에 의하여 종 특이적인 DNA 염기서열을 확인하였다 (Zeze *et al.*, 1996; Plyler *et al.*, 1999). rDNA의 ITS영역이나 IGS 영역의 종 특이적인 염기서열을 이용한 종 특이적인 primer의 개발이 활발하게 이루어지고 있다 (Förster *et al.*, 2000). RAPD 또는 microsatellite로부터 얻은 종 특이적인 밴드의 염기서열을 바탕으로 SCARs (sequence characterized amplified regions) primer를 이용한 다양한 식물 병원균 (*Epichloe*, *Trichoderma*, *Phytophthora* 등)의 동정 및 검출을 가능하게 하였다 (Groppe *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999; Winton and Hansen, 2001). AFLP는 종 특이적인 밴드를 쉽게 확인을 할 수 있었고 식물 병원균뿐만 아니라 곤충의 동정 및 검출을 위해 이들 밴드의 염기 서열을 바탕으로 한 SCARs primer가 개발되었다 (Behura *et al.*, 1999; Vandemark *et al.*, 2000; Hermosa *et al.*, 2001). 이러한 PCR 기법은 다른 균에 대해서도 적용되어

(Maria and Rafael, 2003) Vandermark 등 (2000)은 *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*와 *Aphanomyces eufeiches*의 동정에 각각 활용한 바 있으며 Förster와 Adaskaveg (2000)도 *Monillinia* 속에 특이적인 primer를 개발하여 양앵두의 조기감염을 검출해 내기도 하였다. 또한 본 연구에서 활용한 종 특이적인 SCAR 마커를 개발해 토양병원균에 대해 유용길항균인 *Trichoderma* 속 균의 검출을 시도하였다(Hermosa *et al.*, 2001). 뿐만 아니라 세균의 종 특이적 검출에서도 PCR기법에 근거한 방법이 면역학적 방법보다 훨씬 더 빠르고 민감하다는 점이 밝혀졌다(He'lias *et al.*, 1998; Chiterra *et al.*, 2002). 이처럼 선진 외국에서는 PCR 기법을 활용하여 토양과 물에 오염되어 있는 병원균을 정확하게 검출해 낼 수 있는 기술을 보유하고 있다. 병원균의 유전정보를 모르는 상태 하에서도 진단용 primer에 의해 손쉽게 분류, 검출 및 감염경로 분석에 널리 활용되고 있고, 유사 종간의 유연관계를 분석하고 그 병원학적 특성을 밝혀내고 있다. 종 특이적 genetic marker에 의해 토양 및 감염조직으로부터 특정 병원균만을 특이적, 정량적으로 검출하고, 조상 균주를 추적하여 병저항성 품종 육성에 필수적인 자료를 제공하는 기술에 이르게 되었다. 이렇게 많은 관심과 연구가 진행되어 왔음에도 불구하고 값싸고 단시간에 효과적으로 병원균을 검출해 낼 수 있는 종 특이적 primer Kit을 성공적으로 제작했다는 보고는 거의 없는 것이 현실이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 채소병방어유전자의 개발 및 functional genomics (주관 제1세부과제)

1. 연구 개발 수행 방법 및 내용

가. 고추, 담배, Arabidopsis 식물의 생육

고추 (*Capsicum annuum* cv Hanbyul) 종자를 받아시켜서 토양(원예용토:모래:진흙)에 파종하였고, 26 ± 2 °C, 16 시간 광주조건에서 생육하였다. 4 엽기의 고추 식물을 10x5x15 cm의 화분에 이식하였고, cDNA library 제작 및 고추 식물에서의 유전자 발현을 위해 병접종 및 스트레스 처리에 사용하였다. 담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc)의 종자를 토양(원예용토:모래:진흙)에 파종하였고, 26 ± 2 °C, 16 시간 광주조건에서 생육하였다. *Arabidopsis thaliana*의 야생형 Col-0의 종자를 원예용토에 파종하고 주간 24 °C, 야간 19 °C에 12 시간 광주기로 생육하였다. 형질전환 *Arabidopsis* 식물체를 선발하기 위하여 종자를 70 % 에탄올에서 2 분간 세척한 후, 2 % NaOCl를 6 분간 처리하여 살균하고, 이를 다시 살균수로 5-6 회 세척하였다 (Hong and Hwang, 2005). 살균된 *Arabidopsis* 종자는 100 µg/ml kanamycin, 1 % sucrose가 첨가된 MS 배지에 파종하였다 (Murashige and Skoog, 1962). 파종한 종자를 4 °C에서 이틀간 처리하여 균일한 종자 발아를 유도하였다. 이틀 후에 종자를 식물 생육상으로 옮겨서 10 일간 생육시킨 후 포트에 이식하였다.

나. 병원균 접종, 환경 스트레스 처리 및 비생물적인 elicitor 처리

고추 한별 품종에 대하여 세균성 점무늬병원균 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*의 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a를 YN 액체 배지에 접종하여 28 °C에서 하루 동안 배양하고, 고추식물에 접종하기 위하여 세균현탁액을 제조하여 10^8 cfu/ml로 농도를 맞추었다. 완전히 전개된 6 엽기의 고추 식물의 잎의 뒷면에 vacuum으로 세균 현탁액을 infiltration하고, 습실에서 하루 동안 배양하였다 (Lee and Hwang, 1996). 고추 잎 탄저병원균 *Colletotrichum coccodes* 2-25 균주를 oat meal agar 배지에서 키위 분생포자 현탁액을 5×10^5 농도로 만들어 4 엽기와 8 엽기의 고추 식물의 엽면에 스프레이로 분무 접종하였다 (Hong and Hwang, 1998). 고추 열매 탄저병원균 *Colletotrichum gloeosporioides*의 CHC2 균주를 potato dextrose agar 배지에서 배양하

여 포자 현탁액을 준비한 후 고추의 푸른 열매와 붉은 열매에 접종하였다 (Kong et al., 2001). *Phytophthora capsici*의 병원성 균주 S197과 비병원성 균주 CBS178.26의 유주자를 생성시켜 6 엽기 고추 식물의 줄기를 접종하였다 (Kim and Hwang, 1994). 접종 후 시간별로 시료를 채취하여 액체 질소에 얼리고 사용할 때까지 -70°C 에 보관하였다.

NaCl 처리를 위해 6 엽기의 고추 식물을 포트로부터 조심스럽게 취하여 200 mM NaCl 용액에 담갔다. 농도별 처리를 위해서는 1, 10, 100, 200 mM의 NaCl 용액에 담가 18 시간동안 처리하였다. 건조처리는 고추 식물에 물을 주지 않음으로 처리하였고, 저온 처리는 고추 식물을 4°C 의 저온실에 두어 처리하였다. 상처 처리를 위해서는 고추 잎을 바늘로 찔렀다 (Hong et al., 2004).

비생물적인 elicitor들은 5 mM salicylic acid, 100 μM methyl jasmonate, 10 $\mu\text{l/l}$ ethylene의 농도로 6 엽기 고추 잎에 처리하였다. Abscisic acid (ABA)를 처리하기 위해 6 엽기의 고추 식물을 포트에서 조심스럽게 뿌리를 뽑아 100 μM ABA 용액에 담갔다 (Hong et al., 2004)..

다. cDNA library의 합성

채소병방어유전자를 획득하기 위해 세균성 점무늬병원 세균인 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*의 비병원성 strain Bv5-4a를 접종한 고추 식물(한별 품종)의 잎으로부터 접종후 1, 2, 6, 12, 18 시간이 경과한 후 총 RNA를 추출하였다. 이들 RNA를 합친 0.5 mg의 총 RNA로부터 mRNA를 추출하고 5 μg 의 mRNA를 주형으로 cDNA library를 제작하였다. 위의 cDNA library를 제작하기 위한 실험을 위해 Poly(A) Quik mRNA Isolation Kit, ZAP-cDNA Synthesis kit 및 ZAP-cDNA Gigapack III gold Cloning Kit (Stratagene)를 사용하였다 (Jung and Hwang, 2000).

라. Differential hybridization

cDNA library로부터 병방어 후보유전자들의 plasmid를 분리하고, 이를 이용하여 96 well dot-blot kit를 이용하여 두 장의 DNA panel을 제조하였다. 건전한 식물과 저항성 반응을 보이는 감염된 식물에서 제조한 cDNA에 digoxigenin으로 라벨링한 probe를 이용, 고추 cDNA library의 differential hybridization을 수행하였다 (Jung and Hwang, 2000). 건전한 식물에서는 발현이 없거나 미미하지만 저항성 반응을 나타내는 식물에서는 뚜렷한 발현을 보이는 plasmid clone들을 선발하여 5'-말단의 염기 서열을 분석하였다.

마. Nucleotide sequence 분석

Differential hybridization 방법을 통하여 선발한 고추 유전자 clone들의 염기서열 분석을 하기 위하여 T3 primer를 사용하여 sequencing 반응 PCR을 수행하였다 (BigDye Terminator Cycle Sequencing V2.0 Ready Reaction, ABI PRISM, PE Biosystem). 염기서열을 가지고 「National Center for Biotechnology Informatio(NCBI)」 웹사이트의 BlastN과 BlastX 프로그램을 이용하여 염기서열을 분석하였다.

바. RNA 추출 및 Northern blot hybridization

고추 식물 조직 1 g을 액체 질소로 처리하여 급속 냉동시킨 후 막자사발에서 갈고, guanidine isothiocyanate 추출 buffer (Chomczynski and Sacchi, 1987) 10 mL을 첨가하여 잘 섞어준 후 50 mL polypropylene tube에 옮겼다. 여기에 2 M sodium acetate (pH4.0), water-saturated acidic phenol, chloroform-isoamylalcohol (49:1)을 각각 1, 10, 2 mL 씩 처리하고 세게 흔든 후 얼음에 꽂아 30분 처리하여 상등액과 phenol 층이 분리되도록 하였다. 12000 g, 4°C 에서 15분간 원심분리하고 상등액을 새 tube로 옮겼다. 이 상등액과 동일 부피의 ice-cold isopropanol을 넣고 -20 °C에서 1 시간 이상 처리하였다. 원심분리 후 RNA pellet을 4 mL의 TNE buffer로 재 현탁하고 4 M LiCl를 4 mL 넣어주어 최종 2 M의 농도가 되도록 하였다. 원심분리 후 RNA pellet을 80 % ethanol로 세척하고 pellet을 건조하고 최종 DEPC-treated 물 500 µL에 녹였다. RNA gel blot 분석을 위해 20 µg의 total RNA를 formaldehyde가 첨가된 1.5 % denaturing agarose gel에서 전개시키고 nylon membrane에 옮긴 후 자외선을 조사하여 RNA를 membrane에 교차 결합시켰다. 0.25 M sodium phosphate, pH 7.2, 7 % sodium dodecyl sulfate (SDS) (w/v), 1 mM EDTA, and 5 % dextran sulfate의 조성의 hybridization 용액에 membrane을 넣고 4 시간동안 prehybridization을 수행한 후 ³²P-dCTP로 random-labeling하여 준비한 probe를 넣고 밤새 65 °C에서 hybridization 하였다. 동량의 RNA loading을 확인하기 위해 gel을 ethidium bromide에 염색하여 ribosomal RNA를 확인하였다.

사. In situ hybridization

고추역병, 탄저병 등의 곰팡이 병원균에 감염된 식물의 잎이나 열매를 일정한 크기로 절단하여 PBS(pH 7.0)에 embedding하였다. 이들 embedding된 sample을 microtome으로 절단한 후 digoxigenin (DIG)-labeled DNA probe를 이용하여 *in situ* hybridization을 수

행하였다 (Lee et al., 2000; Hong and Hwang, 2002). DIG-labeled probe는 DIG-High Prime kit를 이용하여 합성하였다. Hybridization signal은 anti-DIG-alkaline phosphatase conjugate로 detection되었으며, 이는 NBT와 BCIP의 혼합액을 이용한 발색 반응으로 나타났고, 최종적으로 현미경을 이용하여 관찰하였다.

아. 식물병방어유전자의 프로모터 분리 및 분석

발현 조절 기작을 상세히 연구하기 위해 프로모터의 기능 분석이 필수적이다. 유전체로부터 프로모터의 분리를 위해 고추 식물체로부터 genomic DNA를 추출하고 고추 genomic DNA의 각 aliquot을 각각 blunt-end를 형성시키는 *DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *StuI* 등의 여러 가지 제한효소로 잘라주었다. Genome Walker Kit (clontech)에서 제공되는 adapter를 제한효소로 잘려진 DNA의 양 말단에 ligase를 이용하여 붙이고, 이를 주형으로 하여 프로모터를 분리하기 위해 PCR과 nested PCR을 수행하였다. PCR에 사용되는 프라이머는 adaptor에 존재하는 염기서열에 근거한 kit에서 제공된 프라이머(AP1, AP2)와 프로모터를 분리하고자 하는 병방어관련유전자에 특이적인 염기서열을 근거로 작성한 두 개의 reverse 프라이머로 구성되었으며 이로부터 증폭된 PCR 산물을 pCR2.1-TOPO vector(Invitrogen)에 크로닝하여 염기서열을 밝혀 병방어관련유전자의 프로모터를 획득하였다 (Hong et al., 2005; Jung et al., 2005).

이들 병방어관련유전자의 프로모터를 적절한 크기로 잘라 각 deletion 조각을 프로모터가 없는 GUS reporter 유전자가 있는 binary vector의 GUS 상위에 삽입하여 deletion constructs를 제작하고, 이들을 *Agrobacterium tumefaciens*에 도입하였다. 각각의 deletion construct를 가지고 있는 *Agrobacterium*을 담배 잎에 infiltration한 후, 병원균 감염이나 환경 스트레스, 병방어관련 elicitor의 외부적인 처리에 의한 담배 잎에서의 각 유전자의 프로모터 활성을 측정하였다 (Yang et al., 2000).

자. 채소병방어유전자를 이용한 Arabidopsis 식물의 형질전환

병방어유전자를 pBIN35S binary vector에 도입하기 위해 pBluescript SK(-) vector에 삽입되어 있는 이 유전자를 제한효소 *BamHI*과 *KpnI*으로 절단하여 분리 한 후 pBIN35S vector에 ligation 하였다. 이 vector construct를 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 strain에 electroporation을 이용하여 도입한 후 rifampicin과 kanamycin이 포함된 YEB 배지에서 형질 전환된 EHA105 strains을 선발하였다. 이 *Agrobacterium*을 배양한 후 Floral dipping 방법을 통하여 Arabidopsis를 형질 전환하였다 (Clough and

Bent, 1998). T1 종자를 수확하여 kanamycin이 포함된 MS 배지에 과종하여 형질전환 식물체를 선발하였다. 대부분의 실험은 T₂ 또는 T₃ 종자를 가지고 수행되었다.

차. 형질전환 Arabidopsis 식물체의 병저항성 및 환경 스트레스 내성 검정

Pseudomonas syringae pv. *tomato* DC3000 균주를 King's B 배지에서 배양한 후 수거하여 10⁴ cfu/ml로 세균 현탁액을 준비하였다. 바늘이 없는 1 ml 짜리 주사기를 이용하여 야생형과 형질전환 Arabidopsis 식물체의 잎의 뒷면에 세균 현탁액을 infiltration 하였고, 식물을 습실 상에서 생육하여 병 진전을 관찰하였다. 접종한 잎을 취하여 10 mM MgCl₂로 간 후 serial dilution한 용액을 KB 배지에 도말하여 식물 잎 조직 내에서의 세균의 성장을 monitoring하였다 (Hong and Hwang, 2005).

Arabidopsis 종자를 250 mM NaCl, 600 mM mannitol, 100 μM methyl viologen을 포함한 MS 배지에 과종하여 매일 발아율을 측정하였다. 유묘 검정을 위하여 일주일간 생육된 Arabidopsis 유묘를 NaCl, methyl viologen 용액으로 옮겨 식물의 스트레스 정도를 관찰하였다. NaCl과 methyl viologen에 의해 받는 스트레스는 분해된 chlorophyll의 함량을 측정하여 나타내었다 (Lichtenthaler, 1987).

2. 연구개발수행 결과 및 고찰

가. 채소병방어관련유전자의 differential screening과 염기서열분석

cDNA Library의 clones들을 대량으로 *E. coli* SOLR strain에 형질전환 시킨 후 이 들로부터 plasmid를 분리하였다. cDNA Library로 얻은 plasmid를 nylon membrane에 cross-linking시키고, 이와 동일한 membrane을 한 장 더 제조하였다. Differential hybridization을 위한 probe를 제조하기 위해 건전한 고추 식물과 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*의 비병원성 strain Bv5-4a를 접종한 고추식물의 잎에서부터 RNA를 추출하였다. 이 RNA를 주형으로 reverse-transcriptase AMV를 사용하여 역전사(reverse transcription)를 행하였고 이 과정 중에 생성되는 단일가닥 DNA에 digoxigenin(DIG)이 labeling되도록 반응시켰다.

동일한 plasmid가 loading된 두 장의 membrane에 대해 위에서 제조한 DIG labeling 된 DNA를 사용하여 하루 밤 동안 65 °C에서 hybridization을 수행하였다. Hybridization 결과 건전한 고추 잎에서는 거의 발견되지 않으나 세균성점무늬병균이 감염된 경우 그 발현 양이 증가한 200 여개의 clone들을 선발하여 부분적으로 염기서열을 밝혔으며(Fig. 1-1), Table 1-1에는 고추점무늬세균병원균의 감염에 대해 그 발현양이 뚜렷하게 증가하

여 집중적으로 본 연구에서 사용한 대표적인 고추 유전자들을 정리하였고 이들 고추 유전자들을 대상으로 다양한 병감염 및 스트레스 반응에서의 발현을 검정하였다.

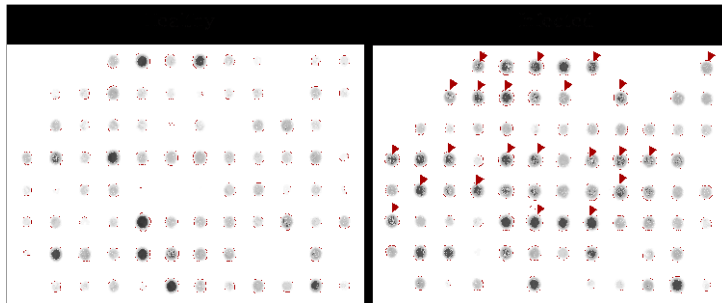


Fig. 1-1. Differential hybridization of a cDNA library from pepper leaves infected with avirulent strain Bv5-4a of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Randomly selected cDNAs on the nylon membrane were hybridized with DIG-labeled cDNA probes that were synthesized from total RNA of healthy and bacteria-infected leaves with AMV reverse transcriptase. Clones hybridizing strongly or preferentially with cDNA probes from infected leaves are indicated by arrows.

Table 1-1. Differential expressed genes from pepper leaves infected by avirulent strain of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* used in this study

Gene	Putative identification	Accession no.
<i>CACYPI</i>	Cyclophilin	AF291180
<i>CACBPI</i>	Chitin-binding protein	AF112867
<i>CAOSMI</i>	Osmotin-like protein	AY262059
<i>CAZFP1</i>	Cys2/His2 zinc-finger transcription factor	AF539746
<i>CADC1.2</i>	DC1.2 homologue	
<i>CaPIMPI</i>	Integral membrane protein	
<i>CABPRI</i>	Basic pathogenesis-related protein	AF053343

나. Cyclophilin을 코딩하는 고추 *CACYPI* 유전자의 특성 분석

1) 염기서열분석

CACYPI 유전자는 3' 말단의 untranslated region의 33 bp를 포함하여 695 bp로 구성되어 있다 (Fig. 1-2). Open reading frame는 498 bp로 이루어져 있으며, 653 bp 위치에 AATAAG의 polyadenylation signal이 존재하였다. DNA 염기서열을 근거로 *CACYPI* 유전자가 합성할 단백질의 아미노산 서열을 추정하였고, 이를 근거로 GenBank에 등록되어 있는 여러 식물체에서 유래한 cyclophilin들의 아미노산 서열과 비교한 결과, 토마토 (76.6%), 감자 (76%), 콩(72%), Arabidopsis (67.8%)에서 유래한 cyclophilin들과 구조적으로 높은 유사성을 볼 수 있었다 (Fig. 1-3). Cyclophilin은 immunophilin이라 불리우는 immunosuppressant binding 단백질로서 기능을 하는 항서 존재하는 단백질로 알려져 있다. 식물체에서 cyclophilin은 열, 저온, 염류, 빛, 상처, 화학적 elicitor, 병원균 감염에 의해 유도됨이 알려져 있다. Cyclophilin은 스트레스 조건에서의 신호 전달체계, 단백질의 folding과 assembly에 중요한 역할을 하리라 생각된다. 감염 식물에서 cyclophilin은 chaperon-like 분자로서 스트레스 중에 단백질이 분해되거나 aggregation되는 것을 피하기 위한 것일 수 있다 (Marivet et al., 1994). 스트레스를 받은 식물체에서, 많은 양의 cyclophilin이 이러한 folding 단계를 가속화시키기 위하여 필요할 수 있다.

2) 병감염에서 *CACYPI* 유전자의 발현

세균 감염에 대한 반응으로 고추 잎 조직에서 발현되는 채소병방어관련유전자의 발현을 조사하기 위하여 *X. campestris* pv. *vesicatoria*의 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a에 접종된 고추 잎에서 시간에 따른 채소병방어관련유전자의 mRNA의 발현을 Northern blot 분석을 통하여 점검하였다 (Fig. 1-4).

건강한 고추 잎 조직에서 *CACYPI* mRNA가 약간 유도되었다. 친화적인 반응에서, 병원성 균주 Ds1을 접종한지 12 시간에 *CACYPI* mRNA가 상당히 유도되었다가 24 시간 이후에는 점점 그 발현이 감소되었다. 불친화적인 반응에서는 과민성 반응이 나타나는 접종 후 18 시간에 *CACYPI* mRNA의 유도가 급격하게 증가하였다. 접종 후 24 시간에 *CACYPI* mRNA의 발현 수준은 뚜렷하게 증가하였다. 과민성 반응 동안 나타나는 *CACYPI* 유전자의 강한 발현과 집적은 *CACYPI* cyclophilin이 HR 세포 사멸에 있어 고추의 gemomic DNA의 붕괴에 관여하고 있을 가능성을 보여 주었다 (Montague et al., 1997). 최근 식물 세포내에 존재하는 cyclophilin 단백질에 의해서 비병원성 세균인

Pseudomonas syringae pv. *tomato* DC3000(*avrRpt2*)에서 분비된 AvrRpt2 effector 단백질이 활성화되어 온전한 단백질 분해 효소(protease)의 역할을 할 수 있으며, 이러한 AvrRpt2 단백질의 단백질분해효소 활성화로 Arabidopsis 식물의 RIN4 단백질의 분해가 나타나는 것이 밝혀졌다 (Coaker et al., 2005). 이는 고추 식물의 CACYP1 cyclophilin 단백질의 병저항성 반응 중의 기능에도 실마리를 제공해 주었다. 고추 식물에서의 고추 *X. campestris* pv. *vesicatoria*의 비병원성 균주 Bv5-4a를 아래 잎에 접종하고 접종하지 않은 잎 앞에서 전신적으로 나타나는 CACYP1 mRNA의 발현을 조사하였다 (Fig. 1-5). 세균에 의해 접종되지 않은 잎이나 10 mM MgSO₄를 처리한 아래 잎에서는 CACYP1 mRNA의 약간의 발현을 볼 수 있었다. 비병원성 균주 Bv5-4a를 접종한 아래 잎에서 강한 국부적인 CACYP1 mRNA의 발현이 나타났다. 접종 후 20 시간 후에는 접종하지 않은 2 엽에서 높은 수준으로 CACYP1 mRNA 가 검출되었다. 다양한 식물병저항성 기작 중에 전신획득저항성 (systemic acquired resistance, SAR)이 있다. 이 SAR은 일차적인 병원균 감염에 대하여 유도된 식물병저항성이 감염 부위와 떨어진 다른 부위에서의 이차적인 병원균 감염에 대한 저항성을 증진 시키는 현상을 말한다 (Ryals et al., 1996). 이러한 현상은 다양한 범위의 병원균 감염에 대하여 효과적임이 나타났으며, 대개의 경우 SAR은 병방어관련유전자의 발현과 밀접한 연관이 있다. CACYP1 유전자의 전신적인 발현은 CACYP1 유전자가 국부적인 병저항성 뿐만 아니라 전신적인 획득 저항성 기작에도 관련되어 있음을 시사하였다.

전신적인 CACYP1 mRNA 발현은 접종한 국부적인 접종 잎으로부터 고추의 푸른 열매와 붉은 열매에서의 *C. gloeosporioides* 감염에 의한 CACYP1 mRNA의 발현을 관찰하였다 (Fig. 1-6). 탄저병균이 접종되지 않은 고추 열매에서 CACYP1 mRNA는 거의 나타나지 않았다. 푸른 열매에서 접종 후 24 시간에 transcript의 축적이 상당히 높게 나타났으며, 그 이후 점차로 감소하였다. 이에 반해, 감염된 붉은 열매에서의 CACYP1 mRNA는 접종 후 24 시간에 그 축적이 강하게 나타났으며 그 이후 약간의 수준으로 지속되었다.

3) 화학적 elicitor 처리에 의한 CACYP1 유전자의 발현

Salicylic acid, ethylene, methyl jasmonate와 같은 신호 전달 물질들을 식물에 외부적으로 처리하였을 때, 식물의 방어반응들을 상호 조절 하는 것으로 알려졌다. CACYP1 mRNA의 발현은 건전한 고추 식물의 잎에서 낮은 수준으로 나타났다 (Fig.1-7). 그러나 몇몇 비생물적인 elicitor의 처리로 CACYP1 mRNA의 양이 증가되었

다. Salicylic acid와 methyl jasmonate의 처리로 고추 잎에서는 *CACYP1* transcript의 양은 강하게 유도되었다. 이에 반해 ethylene의 처리는 처리하지 않은 고추 잎에서의 낮은 수준보다 어느 정도 증가하였다.

4) *CACYP1* 유전자의 조직학적 *in situ* 발현

*C. gloeosporioides*의 감염에 따라 나타나는 고추의 푸른 열매와 붉은 열매에서의 *CACYP1* mRNA의 발현을 *in situ* hybridization을 통해 시간적, 공간적으로 조사하였다 (Fig.1-8). 강하고 진한 hybridization signal이 병원균 접종 후 24 시간에 푸른 열매의 체부 세포에서 나타났다. 감염 후 48 시간과 72 시간에 *CACYP1* mRNA는 푸른 열매 조직에서 점차 감소하였다. 붉은 열매에서는 감염 후 12 시간에 처음으로 *CACYP1* mRNA가 발현되었다. 이의 축적은 24 시간에 증가하였으며 48 시간과 72 시간에 낮은 수준으로 유지되었다. 많은 종류의 병방어관련 유전자들이 병원균 감염 기관의 유관속 조직에 상당히 많은 양이 축적됨이 보고되었다 (Breda et al., 1996; Lee et al., 2000). *CACYP1* 유전자의 발현 또한 탄저병균 감염 고추 열매의 유관속 조직에서 활발히 일어남을 알 수 있었다.

```

gcacgaggaatttctagagagaaaaagaga  ATG GCA AAT CCA AAG GTT TTC TTT 56
      M  A  N  P  K  V  F  F
GAC CTC ACC ATC GGC GGC CAA CCG GCC GGA CGC GTC GTG ATG GAG ATG 104
D  L  T  I  G  G  Q  P  A  G  R  V  V  M  E  L
TTC GCC AAC GAT GTT CCT AAG ACG GCG GAA AAC TTC CGT GCA CTC TGC 152
F  A  N  D  V  P  K  T  A  E  N  F  R  A  L  C
ACC GGC GAG AAG GGC GTC GGA AGG ATG GGT AAG CCT TTG CAC TAC AAA 200
T  G  E  K  G  V  G  R  M  G  K  P  L  H  Y  K
GGC TCC ACC TTC CAC CGT GTG ATG CCA GGG TTC ATG TGT CAA GGA GGT 248
G  S  T  F  H  R  V  I  P  G  F  M  C  Q  G  G
GAT TTC ACC GCC GGA AAC GGT ACT GGA GGA GAA TCG ATT TAC GGC GCT 296
D  F  T  A  G  N  G  T  G  G  E  S  I  Y  G  A
AAG TTT GCT GAT GAA TCT TTC AGA GGA AAG CAC ACC GGA CCT GGG GTT 344
K  F  A  D  E  S  F  R  G  K  H  T  G  P  G  V
CTA TCC ATG GCT ATT GCT CCT GGA ACC AAC GGT TCA CAA TTC TTC ATC 392
L  S  M  A  N  A  G  P  G  T  N  G  S  Q  F  F
ATC TGC ACT GCT GAG ACT GAA TTG CTT GAT CGA AAA GCC GTT GTT TTT 440
I  C  T  A  E  T  E  L  L  D  R  K  A  V  V  F
GGT CAG GTT GTT GAA GGA TTT GAT GTG ATT TCT AGT GTT ATT ATC AGT 488
G  Q  V  V  E  G  F  D  V  I  S  S  V  I  I  S
CCT AAT ATT TGA gtacgccgttttaggcctttgttttaatttaattctatgtttact 547
P  N  I  *
gtttggttgggttgggtcgggttgaagggctagggtttttgctgtaattggtattggtttgg 610
cttgtagcagtttatgttttaattcctaagactactacaattaaaataagataatagatttccat 673
ctaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 695

```

Fig. 1–2. DNA and deduced amino acid sequences of pepper *CACYPI* cDNA that codes for pepper cyclophilin. The deduced amino acid sequences are given below the nucleotide sequences. Putative polyadenylation sequences are underlined. The transcriptional start sites are shown in bold type and the termination codon of the coding sequence is marked by an asterisk (*). Nucleotide sequence of *CACYPI* cDNA has been submitted to Genbank database under accession number (AF291180).

Pepper <i>CACY1</i>	MANPKVFFDLTIGGQAPGRVVMELFANDV PKTAENFRALCTGEKGVGRMG	50
Tomato	MANPKVFFDLTIGGAPAGRVVMELFADTT PKTAENFRALCTGEKGVGKMG	50
Potato	MAN R VFFDLTIGGAPAGRVVMELFADTT PKTAENFRALCTGEKGVGKMG	50
Bean	MPNPKVFFDMTIGGQAPGRITV MELYADVT PKTAENFRALCTGEKGVGRSG	50
<i>Arabidopsis</i>	MSHPKVFFDMTIGGQAPGKI V MELYTDKT PKTAENFRALCTGEKGVGRSG	50
Pepper <i>CACY1</i>	KPLHYKGSTFHRVIPGFMCQGGDFTAGNGTGGES IYGA FADE S FRGKHT	100
Tomato	KPLHYKGSTFHRVIPGFMCQGGDFTAGNGTGGES IYGA F N DE N FVKKHT	100
Potato	KPLHYKGSTFHRVIPGFMCQGGDFTAGNGTGGES IYGA F K DE N FVKKHT	100
Bean	KPV H EKGSI F HRVIPN F MCQGGDFTAGNGTGGES IYGA FADE N FVKKHT	100
<i>Arabidopsis</i>	KPL H EKGSS F HRVIPN F MCQGGDFT K NGTGGES IYGA F E DE N FERKHT	100
Pepper <i>CACY1</i>	GPGVLSMANAGPGTNGSQFFICTA E TE L LD R KA V VFGQVVE G FDV I SSVI	150
Tomato	GPGILSMANAGPGTNGSQFFICTA K TE W L N GKH V VFGQVVE G MDV I KKAE	150
Potato	G T GILSMANAGPGTNGSQFFICTA K TE W L D GKH V VFGQVVE G L D V I KKAE	150
Bean	GPGILSMANAGPGTNGSQFFICT T TE W L D GKH V VFGQVVE G L D V V KDIE	150
<i>Arabidopsis</i>	GPGILSMANAGPGTNGSQFFICT V K T D W L D GKH V VFGQVVE G L D V V KAIE	150
Pepper <i>CACY1</i>	ISPNI	155
Tomato	AVGSSSGRCSKPVVIADCGQL (76.6 %)	171
Potato	AVGSSSGRCSKPVVVADCGQL (76.0 %)	171
Bean	KVGSSSGRCSKPVVVADCGQLS (72.0 %)	172
<i>Arabidopsis</i>	KIGSSSGKPTKPVVIADCGEISS (67.8 %)	174

Fig. 1–3. Amino acid sequence alignment of *CACY1* cDNA encoding a putative pepper cyclophilin with several cyclophilins from tomato (accession number: P21568: Gasser et al., 1990), potato (accession number: AAD22975: Godoy et al., 2000), bean (accession number: BAA25755: Kinoshita et al., 1999) and *Arabidopsis* (accession number: Saito et al., 1995). The numbers of amino acids are shown in the ends of sequences. Amino acids colored black indicate sequence identity.

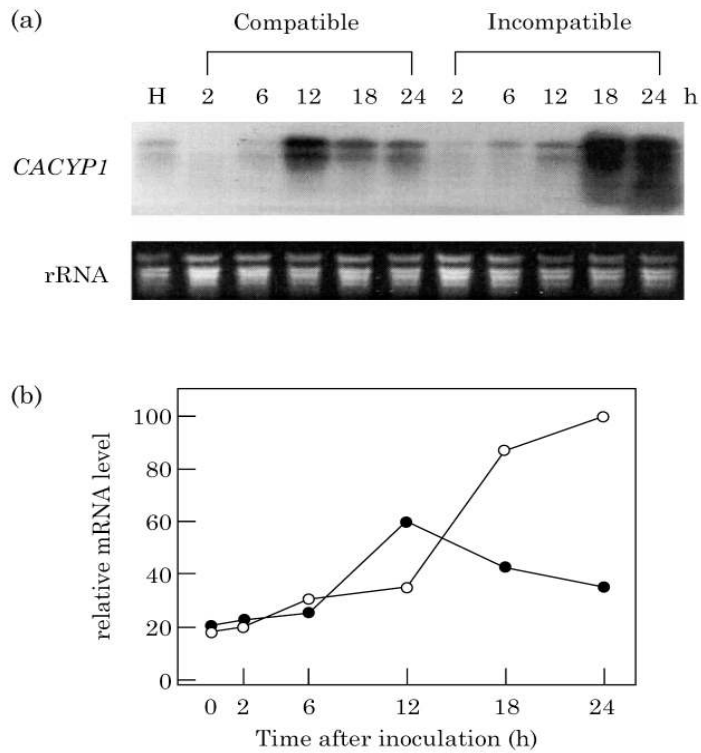


Fig. 1-4. Temporal accumulation of *CACYPI* mRNA in leaves of pepper plants in the compatible and incompatible interactions after inoculation with virulent strain Ds1 or avirulent strain Bv5-4a of *X. campestris* pv. *vesicatoria*, respectively. (a) Northern blot analysis of *CACYPI* mRNA in the compatible and incompatible interaction at various times after inoculation. (b) Densitometric comparison of *CACYPI* mRNA levels between compatible (●) and incompatible (○) interactions. Total RNA (20 µg) was loaded in each lane of 1.2% formaldehyde agarose gels. The putative pepper *CACYPI* cDNA insert in pBluescript SK (-) was labelled and used as a probe. The equivalence of RNA loading among lanes of agarose gel was demonstrated by ethidium bromide staining of RNA on the gel. H: healthy leaves, h: hours after inoculation. equivalence of RNA loading among lanes of agarose gel was demonstrated by ethidium bromide staining of RNA on the gel.

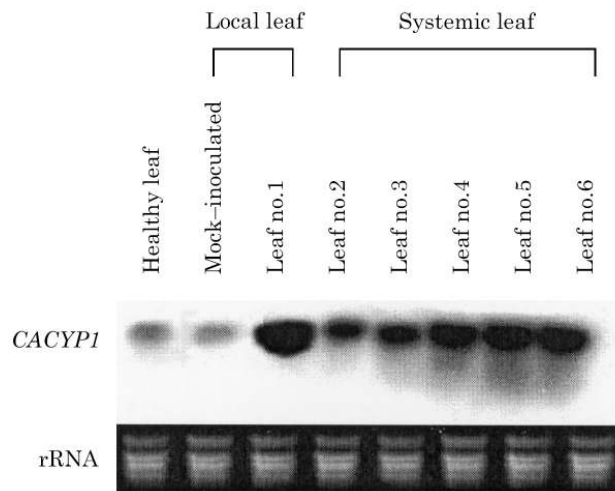


Fig. 1–5. Northern blot analysis of *CACYPI* mRNA systemic expression in lower first (local) infected leaves and upper (systemic) uninfected leaves after inoculation with avirulent strain Bv5–4a (10^8 cfu/ml) of *X. campestris* pv. *vesicatoria* on the lower first leaves of pepper plants at the six–leaf stage. The lower first leaves were mock–inoculated with 10 mM $MgSO_4$. Total RNA (20 μ g) was loaded in each lane of 1.2% formaldehyde agarose gel. The putative pepper *CACYPI* cDNA insert in pBluescript SK (–) was labelled and used as a probe. The equivalence of RNA loading among lanes of agarose gel was demonstrated by ethidium bromide staining of RNA on the gel.

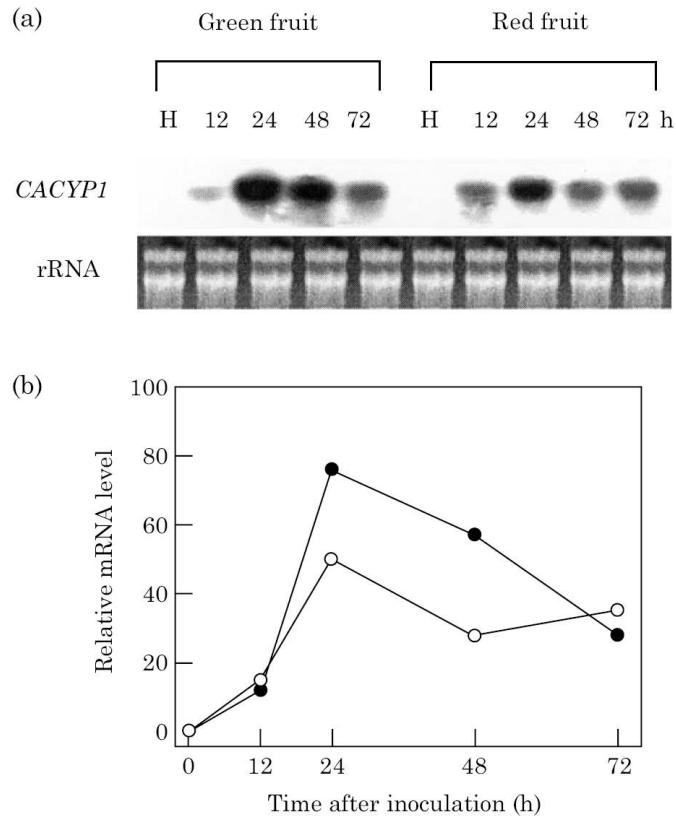


Fig. 1–6. Temporal accumulation of *CACYPI* mRNA in pepper green (unripe) and red (ripe) fruits inoculated with *C. gloeosporioides*. (a) Northern blot analysis of *CACYPI* mRNAs at various times after inoculation. (b) Densitometric comparison of *CACYPI* mRNA levels between pepper green (●) and red (○) fruits. Total RNA (20 µg) was loaded in each lane of 1.2% formaldehyde agarose gel. The putative pepper *CACYPI* cDNA insert in pBluescript SK (–) was labelled and used as a probe. The equivalence of RNA loading among lanes of agarose gel was demonstrated by ethidium bromide staining of RNA on the gel. H: healthy green or red fruits, h: hours after inoculation.

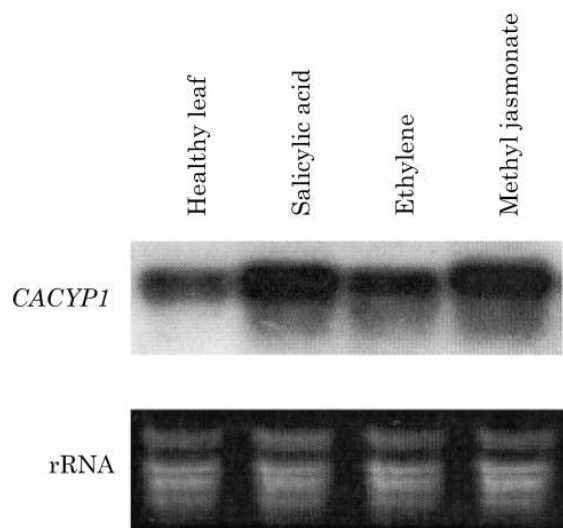


Fig. 1–7. Northern blot analysis of *CACYP1* mRNA expression in pepper leaves in response to abiotic elicitors. Total RNA was isolated from pepper leaves 24 h after treatment with each of SA (5 mM), ethylene (100 μ L) and MeJA (100 μ M). Total RNA (20 μ g) was loaded in each lane of 1.2% formaldehyde agarose gel. The putative pepper *CACYP1* cDNA insert in pBluescript SK (–) was labelled and used as a probe. The equivalence of RNA loading among lanes of agarose gel was demonstrated by ethidium bromide staining of RNA on the gel.

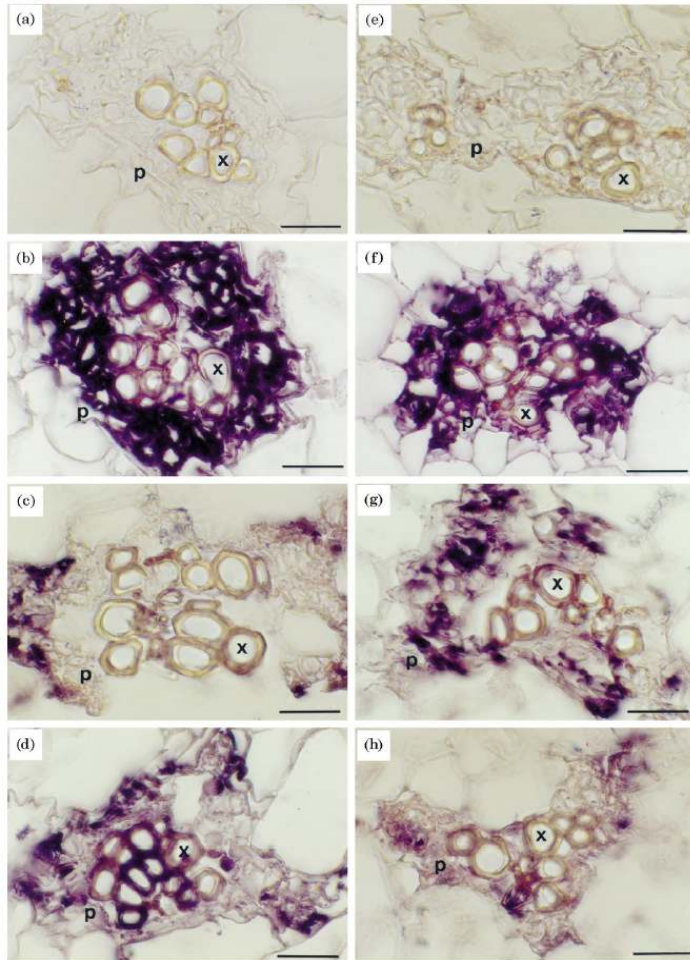


Fig. 1–8. In situ localization of *CACYPI* mRNA in green (unripe) and red (ripe) fruit tissues of pepper plants after infection by *C. gloeosporioides*. (a)–(d) green fruits and (e)–(h) red fruits. (a and e) Cross–sections of uninoculated fruit tissues. (b and f) Cross–sections of fruit tissues at 24 h after infection. In the green fruit, the labelling is very strong and dense in all phloem cells of the vascular bundles. In red fruit tissues, *CACYPI* transcripts started to accumulate somewhat strongly in phloem cells. (c and g) Cross–sections of fruit tissues at 48 h after infection. In green fruits, *CACYPI* mRNAs were abundant in phloem cells of the vascular bundles. In red fruit tissues, transcripts are seen in phloem cells. (d and h) Cross sections of fruit tissues at 72 h after infection. In the green fruit, the accumulation of *CACYPI* mRNA declined, compared to the labelling level in green fruits at 24 h after infection. In red fruit tissues, the labelling is maintained at the level similar to that at 48 h after infection. Abbreviations used in all Figs: P: phloem ; X : xylem. Bar size represents 30 μm in all Figs.

다. *CACBP1* 유전자의 특성 분석

1) 염기서열 분석

CACBP1 유전자의 분석은 PCGENE 프로그램을 통해 이루어 졌다. Open reading frame은 212 개의 아미노산으로 구성되어 있으며 N-terminal의 22개의 아미노산은 진핵 생물의 분비 신호 서열을 이루고 있다. 212 개의 아미노산에 의해 질량 22,265 Da과 pI 7.99의 성질을 가지는 단백질이 만들어 질 것으로 생각되었다. 아미노산 서열을 다른 식물에서 유래한 chitin binding protein 들의 아미노산 서열과 비교하였다 (Fig. 1-9). *CACBP1*은 토마토의 LEUPR4와 80.3%, 감자의 Win2와 83.1%, Win1과는 86.5%, 담배의 cbp20-52과는 82.6%, cbp20-44와는 84.4%의 상동성을 나타내었다. 식물은 chitin을 구성하는 affinity matrices에 가역적으로 결합할 수 있는 다양한 종류의 단백질을 합성한다. 모든 종류의 chitin-binding 단백질들은 그들의 아미노산 서열 중에 시스테인과 글리신을 가지고 있는 30-43 개의 아미노산으로 구성된 구조적인 motif를 가지고 있다고 알려져 있다 (Suetake et al., 2000). 식물체에서의 chitin-binding 단백질들의 생물학적인 특성은 아직 많은 부분에서 밝혀지지 않고 있다.

2) 병감염에서 *CACBP1* 유전자의 mRNA의 발현

X. campestris pv. *vesicatoria*의 감염에 의해 고추 식물의 잎 조직에서 *CACBP1* mRNA의 뚜렷한 증가가 나타났다 (Fig. 1-10). *CACBP1* mRNA의 양은 병진전 동안 상당히 증가하였다. 친화적 상호작용동안 접종 후 18 시간에 *CACBP1* mRNA의 수준이 증가하기 시작하였다. 24 시간 후의 *CACBP1* mRNA의 증가는 괄목할만하였고 30 시간에 최고조를 이루었다. 불친화적 상호작용동안 *CACBP1* mRNA는 6-12 시간에 증가하기 시작하였다. *CACBP1* mRNA 발현은 접종 후 18 시간에 매우 두드러졌다. 발현은 접종 후 24 시간에 최고조를 이루다가 30 시간에 감소하였다. 불친화적 반응에서 *CACBP1* mRNA의 발현은 친화적 반응에서보다 더 빠르고 강하게 나타났다. 식물과 병원균과의 상호 반응에서 병원균에 대한 식물의 저항성은 그 발현의 속도와 강도로 결정된다. 불친화적인 반응에서의 *CACBP1* 유전자의 빠른 반응 또한 병원균 침입의 초기에 병진전을 억제하려는 고추 식물의 저항성 기작으로 보인다.

RNA gel blot 분석이 또한 역병원 *Phytophthora capsici*의 병원성 균주 S197과 비병원성 균주 CBS178.26에 감염된 고추식물의 줄기 조직에 대해 수행되었다. *CACBP1* 유전자는 건전한 고추 줄기 조직에 약간 발현되나 역병원균의 감염으로 상당히 증가하였다. 친화적 반응에서 접종 후 1일에 *CACBP1*이 증가되기 시작하였으며 접종 후 2일에 최고

조로 발현되었으며 그 이후로 점차로 줄어들었다. 불친화적 반응에서 *CACBP1*의 발현은 접종 후 1일에 증가하였으며 접종 후 3일에 최고가 되며 4일째는 줄었다. 불친화적 반응에서 *CACBP1* mRNA의 발현은 친화적 반응에서보다 더 높은 수준으로 나타났다.

CACBP1 유전자의 발현의 수준이 *Colletotrichum coccodes*와 4엽기, 8엽기의 고추 식물과의 상호작용에서 분석되었다. *CACBP1* mRNA는 건진 상태의 4엽기와 8엽기의 고추 식물의 잎에서는 발현되지 않았다. 4엽기 식물의 잎 조직에서 접종 48 시간 후에 전사체들이 높은 수준으로 축적되었으며 72 시간에 감소하였다. 8엽기에서 접종 24 시간 후에 전사체들이 축적되기 시작하였으며 72 시간까지 높은 수준의 발현이 유지되었다.

항진균 활성을 가지고 있는 chitin-binding 단백질들이 다른 식물에서 분리, 보고되어 있다 (Nielson et al., 1997). 고추의 *CACBP1* 단백질이 항진균 및 항세균 활성이 있는지 여부는 더욱 연구되어야 할 것이다.

3) 화학적 elicitor 처리 의한 *CACBP1* 유전자의 발현

CACBP1 mRNA의 발현은 고추 식물의 잎에서 나타나지 않았다. 그러나 ethephon과 methyl jasmonate 등의 비생물적인 elicitor의 처리로 *CACBP1* 유전자의 발현양이 증가되었다. 특히 methyl jasmonate의 처리에 의해서 매우 낮은 농도에서도 *CACBP1* 유전자의 발현이 뚜렷하게 증가하였다. 고추 잎에 상처를 주었을 때 낮은 수준으로 어느 정도 증가하였다 (Fig. 1-11).

4) *CACBP1* 유전자의 조직학적 *in situ* 발현

*C. coccodes*의 감염에 따라 나타나는 4엽기와 8엽기의 고추 식물에서의 *CACBP1* mRNA의 발현을 *in situ* hybridization을 통해 시간적, 공간적으로 조사하였다 (Fig. 1-12). 강하고 진한 hybridization signal이 병원균 접종 후 24 시간에 4엽기 식물 잎 조직의 사부(phloem) 세포에서 처음으로 나타났다. 8엽기 식물에서는 감염 48 시간 이후 *CACBP1* mRNA는 잎 조직에서 계속 축적되었다.

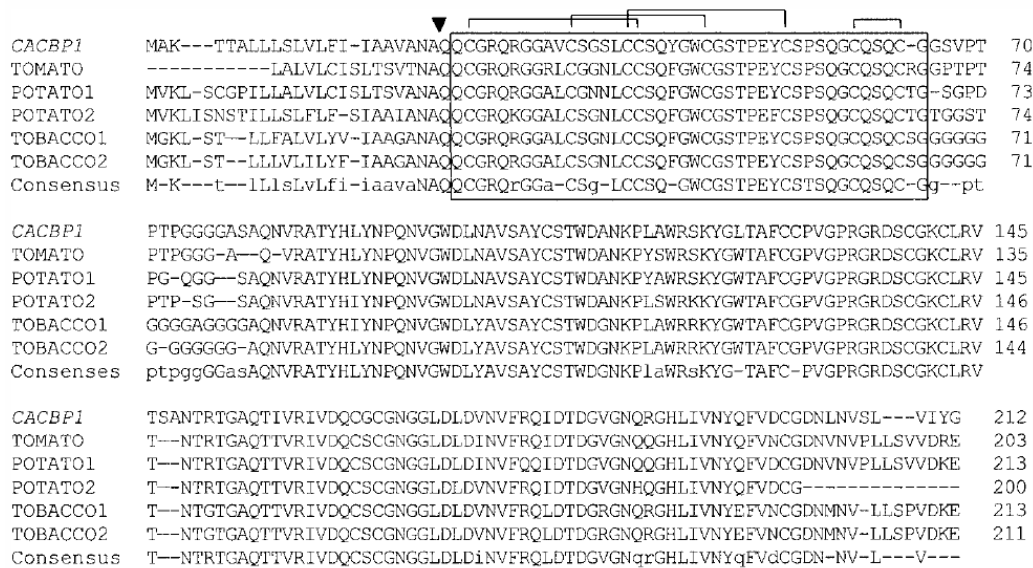


Fig. 1–9. Comparison of amino acid sequences of pepper *CACBP1* (GenBank accession no. AF112867) with other chitin binding proteins (CBP) from other organisms. The deduced amino acid sequences of *CACBP1* from pepper are aligned with the sequences of CBP from tomato (LEUPR4, GenBank accession no. U89764, Harris et al. 1997), potato1 (Win2, GenBank accession no. P09762, Stanford et al. 1989), potato2 (Win1, GenBank accession no. P09761, Stanford et al. 1989), tobacco1 (cbp20–52, GenBank accession no. S72425, Ponstein et al. 1994) and tobacco2 (cbp20–44, GenBank accession no. S72424, Ponstein et al. 1994). Amino acids marked in black boxes indicate sequence identity. Gaps introduced for alignment of homologous regions are indicated by dashes.

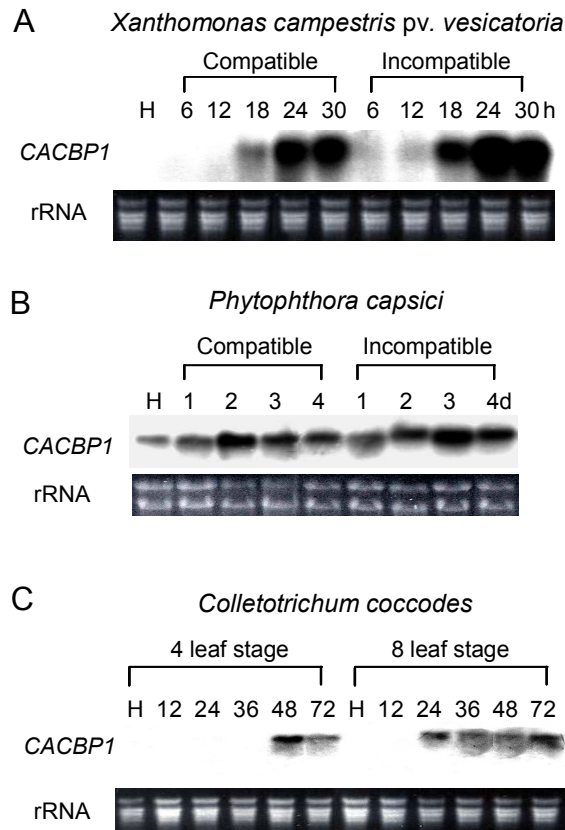


Fig. 1–10. Time courses of accumulation of transcripts of *CACBP1* cDNA gene in pepper tissues during the compatible and incompatible interaction of pepper with *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* or *Phytophthora capsici*. A, Northern blot analysis of *CACBP1* mRNA in pepper leaves at various times after inoculation with virulent strain Ds1 and avirulent strain Bv5–4a of *X. campestris* pv. *vesicatoria*. B, Northern blot analysis of *CACBP1* mRNA in pepper stems at various times after inoculation with virulent isolate S197 and avirulent isolate CBS178.26 of *P. capsici*. Total RNA (30 µg) from the samples at various time intervals after inoculation was loaded in each lane. The *EcoRI/XhoI* fragment of putative pepper *CACBP1* cDNA insert in pBluescript SK(–) was labeled and used as a probe. A duplicate gel was stained with ethidium bromide as a control for RNA loading. d : days after inoculation, H : healthy, h : hours after inoculation.

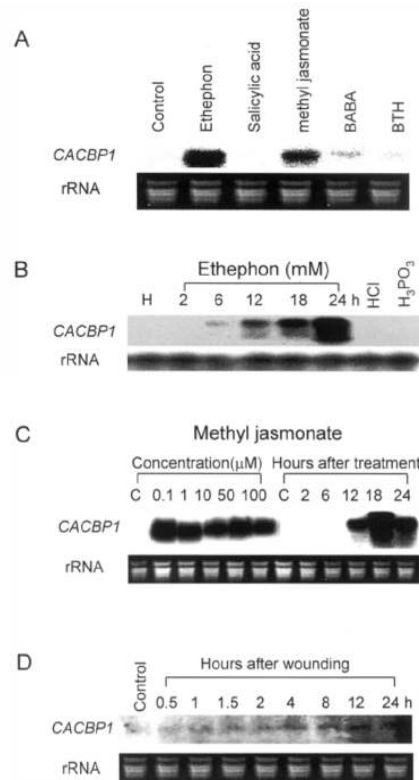


Fig. 1-11. Northern blot analyses of *CACBP1* mRNA expression in the pepper leaves in response to various abiotic elicitors. Total RNA (30 g) from each sample was loaded in each lane. The *EcoRI/XhoI* fragment of putative pepper *CACBP1* cDNA insert in pBluescript SK(-) was labeled and used as a probe. A duplicate gel was stained with ethidium bromide as a control for RNA loading. A, *CACBP1* mRNA expression in leaf tissues at 24 h after treatment with each of ethephon(10 mM), salicylic acid(5 mM), methyl jasmonate(100 M), DL- β -amino-n-butyric acid(19.4 mM) and benzothiadiazole CGA245704(95.2 M). B, *CACBP1* mRNA expression in leaf tissues at different time intervals after treatment with ethephon, hydrochloric acid or phosphoric acid. C: control, h: hours after treatment. C, *CACBP1* mRNA expression in leaf tissues at 12 h after treatment with methyl jasmonate at various concentrations, and at various times after treatment with 100 M methyl jasmonate. C : control. D, *CACBP1* mRNA expression in leaf tissues at different time intervals after wounding.

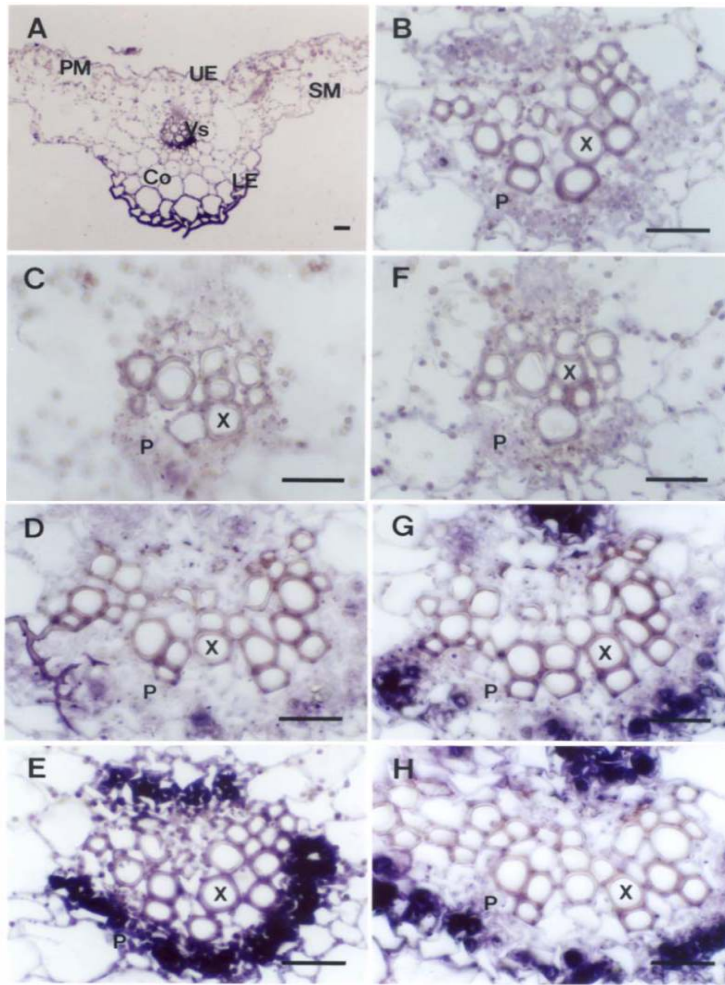


Fig . 1-12. *In situ* localization of *CACBP1* mRNAs in midribs of pepper leaves infected by *Colletotrichum coccodesat* 4-leaf and 8-leaf stages. Leaves were sampled from pepper plants at the indicated time intervals. (A) Cross-sections of pepper leaf tissues at 48 h after inoculation. (B) Negative control of *in situ* hybridization. C and F: uninoculated leaf tissues, D and G : 24 h, E and H : 48 h after inoculation. Thin sections were hybridized with digoxigenin-labelled pepper *CACBP1* cDNA (purple). Co, collenchyma cell; LE, lower epidermis; P, phloem; PM, phallisade mesophyll; SM, sponge mesophyll; UE, upper epidermis; X, xylem; Vs, vascular bundle. Scale bar = 25 m. (B) to (E), leaf tissues at 4-leaf stage, and (F) to (H), leaf tissues at 8-leaf stage.

라. CAOSMI 유전자의 특성 분석

1) 염기서열 분석

CAOSMI 유전자는 osmotin-like protein을 코딩하는 것으로 생각된다. CAOSMI 아미노산 서열을 GenBank에서 다른 식물에서 유래한 osmotin-like protein들의 아미노산 서열과 비교해 본 결과, 타 작물에서 유래한 osmotin-like proteins인 감자 PA35, 담배 PR-5D, 토마토 NP24, 담배 AP24와 77.2-96%의 상당한 유사성을 나타내었다 (Fig. 1-13). 그러나 zeamatin 같은 다른 family의 PR-5과는 상대적으로 낮은 유사성을 나타내었다. 예상되는 pI는 5.91로 산성 단백질을 형성할 것으로 생각되어지며, 16 개의 cysteine이 발견되는데 이는 많은 종류의 antifungal protein에서 전형적으로 발견되는 특성이다 (Broekaert et al., 1997). C-terminus에 단백질의 액포 targeting을 위한 23개의 아미노산이 발견되는 것으로 보아 CAOSMI의 세포내 위치가 액포로 추정 할 수 있다 (Melchers et al., 1993). 기존의 다른 식물에서 알려진 osmotin-like 단백질 또는 유전자들은 바이로이드, 바이러스, 세균, 진균 등의 식물 병원균의 감염이나 고 염류, 저온 등의 환경 스트레스에 의해 발현이 유도되어 진다고 알려져 있다 (Jia and Martin, 1999; Newman and Duman, 2000).

2) 병감염에서 CAOSMI 유전자의 발현

세균 감염에 의해 유도되는 CAOSMI 유전자의 mRNA 축적은 각각 친화적, 불친화적 반응에서 차별적으로 나타났다 (Fig. 1-14a). CAOSMI의 유전자는 친화적 반응에서 접종 후 6 시간부터 발현되기 시작하여 18시간이 되면 그 발현 양이 증가한다. 이 발현은 접종 후 30 시간 까지 유지되었다. 불친화적 반응에서 CAOSMI 유전자의 발현은 친화적 반응에서처럼 접종 후 6 시간부터 나타나지만 이미 그 발현 양이 친화적 반응에서보다 상당히 증가된 상태에 도달한다. 아마도 불친화적 반응에서의 CAOSMI 유전자의 발현은 6 시간 이전에 나타나는 것으로 생각되었다. 접종 후 12 시간이 되면 그 발현이 상당히 증가하고 이 시간까지 mRNA의 축적량은 친화적 반응에서의 mRNA 축적량보다 훨씬 많다. 접종 후 18 시간이 되면 불친화적 반응에서는 비병원성 세균의 감염에 의해 고추식물의 잎 조직에서 과민성 반응(hypersensitive response)이 나타난다. 이때 CAOSMI 유전자의 발현은 잎 조직의 괴사와 시간을 같이하여 줄어들었다. CAOSMI 유전자는 친화적 반응에서보다 불친화적반응에서 더욱 빠르고 강하게 발현되었고, 이는 식물-병원균 상호 작용에서 나타나는 병방어관련유전자의 전형적인 발현 양상을 보여주었다.

고추 잎 탄저병균 *Colletotrichum coccodes* 감염에 따라 4 엽기와 8 엽기의 고추 식물의 잎 조직에서 *CAOSMI* 유전자의 발현이 나타났다. 4 엽기의 고추 잎 조직에서 접종 후 12 시간에 약하게 발현된 *CAOSMI* 유전자는 36-72 시간에 점차 그 발현양이 증가되었다. 8 엽기의 고추 잎 조직에서도 12 시간에 처음으로 *CAOSMI* 유전자의 발현이 검색되었는데, 그 발현양은 4 엽기에서보다 많았다. 24 시간 이후에 유전자 발현양은 계속적으로 증가하였다(Fig. 1-14b).

고추 역병 감염에 따라 *CAOSMI* 유전자가 고추 줄기에서 발현되었다. 고추 줄기에서의 *CAOSMI* 유전자의 발현은 접종 후 12 시간에 친화적 반응에서 더 빠르게 나타났으며, 24 시간 이후로는 친화적 반응과 불친화적 반응 사이의 유전자 발현은 크게 차이가 없었다 (Fig. 1-14c).

CAOSMI 유전자의 단백질 산물이 어떻게 병저항성 기작에 관여하는지 기능적인 분석을 위하여 이 유전자를 overexpression시킨 형질전환식물체에 대한 특성 분석이 이루어져야 할 것이다 (Liu et al., 1994; Fagoago et al., 2001).

3) 화학적 elicitor 처리에 의한 *CAOSMI* 유전자의 발현

식물병방어관련 유전자들의 발현은 다양한 병원균과 비생물적인 스트레스에 의해서 유도되는데, 이 과정에 salicylic acid, jasmonic acid, ethylene, nitric oxide와 같은 병방어 신호전달 물질들이 연관되어 있음이 보고되고 있다 (Bolwell, 1998; Dong, 1998). *CAOSMI* 유전자는 ethylene 처리 후 2시간에 발현된 후 18 시간에 가장 강하게 발현되고 24시간이 되면 그 발현이 약간 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 1-15). Methyl jasmonate에 의해서 *CAOSMI* 유전자는 2시간에 발현 후 6시간부터 24시간까지 강한 발현을 나타내었다. Abscisic acid에 의해서 *CASOMI* 유전자가 잎 조직에서는 발현되지 않았지만 줄기에서는 1시간 후부터 강하게 발현되어 18 시간까지 지속되고 24시간에 약간 감소하였다. Osmotic stress에 의한 osmotin-like 유전자들의 발현이 ABA signaling 경로를 통하여 이루어진다는 보고가 있으나 (Grillo et al., 1995), 고추 식물에서의 잎, 줄기에서 차별적으로 나타나는 *CAOSMI* 유전자의 발현에 대한 조절 기작은 더 연구해야 할 것이다.

4) 환경 스트레스에 의한 *CAOSMI* 유전자의 발현

NaCl, 물 부족, 홍수, 냉해, 고온 해 등이 식물에 osmotic stress를 일으키는데, 이로 인하여 식물체 내에는 생리적으로 물질대사적으로 많은 변화들이 일어난다. 특히 많은

수의 식물 유전자들이 osmotic stress에 의해 발현이 유도 된다. 이 연구에서는 병방어 관련유전자의 발현이 단지 병 감염에 의해서만 유도되는 것이 아니라 다양한 환경 스트레스에 의해서도 가능하다는 것을 발견하였다. 이러한 발견으로 병방어관련유전자가 병 저항성작물의 분자육종의 재료로 이용될 수 있을 뿐만 아니라 이들 유전자들을 이용하여 제조된 형질전환작물이 환경 스트레스에 대해서 내성을 가질 가능성을 시사하였다.

고추에서 분리된 *CAOSMI* 유전자의 mRNA 발현을 대표적인 환경스트레스인 염류, 건조, 저온, 상처에 대해 조사하였다 (Fig. 1-16). 200 mM NaCl의 처리동안 처리 후 12 시간에 *CAOSMI*의 mRNA가 잎 조직에서 발현되었다. 24 시간동안 관찰한 잎 조직에서의 *CAOSMI*의 발현은 100-200 mM의 고농도의 NaCl 처리에서만 나타났다. *CAOSMI*의 발현은 고추 식물의 잎 조직에서보다 줄기 조직에서 매우 강하게 발현되었다. 처리 후 1 시간 만에 발현이 되어 24 시간까지 매우 강한 발현을 보이며 급격하게 증가하였다. 24 시간동안 물만 처리한 고추 식물의 줄기 조직에서도 이 유전자가 발현되었는데, 이는 물 처리만으로도 *CAOSMI* 발현을 위한 충분한 osmotic stress가 됨을 알 수 있었다. Freezing tolerance동안의 야생형의 감자 *Solanum commersonii*에서 osmotin-like 유전자가 발현되는가 하면 (Zhu et al., 1993, 1995), 다른 종류의 야생형 감자인 *Solanum dulcamara*에서 분리한 cryoprotective 단백질이 osmotin-like 단백질로 동정되기도 하였다 (Newton and Duman, 2000). 이러한 결과들은 고추 *CAOSMI* 유전자의 발현이 고추 식물의 내냉성 및 내동성에 관련되어 있음을 보여주는 것이다. 1-200 mM의 NaCl 처리로 인해서 강한 발현이 유도되었다. 고추 식물에 물을 주지 않은 채로 식물 생육 상에 두면 7일 만에 처음으로 위조 증상이 나타나는데 이를 시작으로 4 일 동안 *CAOSMI* 유전자의 발현을 잎과 줄기 조직에서 검색하였다. 잎에서는 건조 4일 만에 약한 발현을 보였으나 줄기 조직에서는 위조 된지 1-3일 동안 매우 강한 발현을 나타내다가 4일째 되어서는 약간 그 유전자의 발현이 줄어들었다. 4°C의 저온에 고추 식물을 두었을 때 잎과 줄기에서 *CASOMI* 유전자가 활성화되었다. 잎에서의 유전자 발현이 18 시간에 일시적으로 나타났다 24시간에 줄어드는 반면, 줄기에서는 이 유전자의 발현이 처음 1 시간에 나타나 꾸준히 증가하여 24 시간까지 강한 발현을 나타내었다. *CAOSMI* 유전자의 mRNA가 상처에 의해서도 잎에 축적되었으며 이의 발현은 상처를 받은 제 1엽보다 상처를 입지 않은 제 2엽에서 강하게 나타났다.

5) *CAOSMI* 유전자의 조직학적 *in situ* 발현

CAOSMI 유전자는 Northern blot 실험 결과 건전식물의 기관에서 잎, 줄기, 꽃, 뿌

른 열매에서는 발현하지 않았는데 *in situ* hybridization 결과에서도 마찬가지로 조직의 어느 부위에서도 mRNA는 검출되지 않았다 (Fig. 1-17). 뿌리와 붉은 열매에서는 건전 조직에서 *CAOSMI* 유전자가 항상 발현하고 있음을 Northern blot을 통하여 알 수 있었다. *in situ* hybridization을 통하여 건전 뿌리와 붉은 열매에서의 mRNA 발현이 vascular bundle을 중심으로 하여 주로 관찰되었다. 건전 잎 조직에서는 관찰되지 않았으나 고추탄저병균(*Colletotrichum coccodes*)의 감염에 의해서 강하게 발현되었는데 *in situ* hybridization을 통한 결과 *CAOSMI* 유전자의 mRNA가 주로 병 감염에 대해서도 잎 조직의 vascular bundle에 축적됨을 알 수 있었다.

CAOSM1	MGHLTTCLVFFLLAFVYTYASGVFEVHNNCPYTVWAAATPVGGGKLLER	50
PA35	MSHLTTCLVFFLLAFVYTYASGVFEVHNNCPYTVWAAATPIGGRRRLER	50
PR-5d	MSHLTTFLVFFLLAFVYTYASGVFEVHNNCPYTVWAAATPVGGRRRLER	50
NP24	MGYLTSSVFLFLLCVYTYAA-TIEVRNNCPYTVWAASTPIGGRRRLNR	49
AP24	MGNLRSSVFFLLALVYTYAA-TIEVRNNCPYTVWAASTPIGGRRRLDR	49
CAOSM1	GQSWWFWAPPGTKMARIWGRTNCNFDGAGRGWCQTGDCGGVLECKGWGKP	100
PA35	GQSWWFWAPPGTKMARIWGRTNCNFDGAGRGWCQTGDCGGVLECKGWGKP	100
PR-5d	GQSWWFWAPPGTKMARIWGRTNCNFDGAGRGWCQTGDCGGVLECKGWGKP	100
NP24	GQTWVINAPRGTKMARIWGRTGCNFNAAGRGCQTGDCGGVLQCTGWGKP	99
AP24	GQTWVINAPRGTKMARVWGRTNCNFNAAGRGCQTGDCGGVLQCTGWGKP	99
CAOSM1	PNTLAEYALNQFSNLDWFWDISVIDGFNIPMSFGPTKPGPGKCHPIQCVAN	150
PA35	PNTLAEYALNQFSNLDWFWDISVIDGFNIPMSFGPTNPGPGKCHPIQCVAN	150
PR-5d	PNTLAEYALNQFSNLDWFWDISVIDGFNIPMSFGPTKPGPGKCHGIQCTAN	150
NP24	PNTLAEYALDQFSNLDWFWDISLVDGFNIPMTFAPTTPSGGKCHAIHCTAN	149
AP24	PNTLAEYALDQFSGLDFWDISLVDGFNIPMTFAPTNPSSGGKCHAIHCTAN	149
CAOSM1	INGECPGSLRVPGGCNPCTTFGGQQYCCTQGPGPTDLSRFFKQRCFDA	200
PA35	INGECPGSLRVPGGCNPCTTFGGQQYCCTQGPGPTDLSRFFKQRCFDA	200
PR-5d	INGECPGSLRVPGGCNPCTTFGGQQYCCTQGPGPTLSRFFKQRCFDA	200
NP24	INGECPRALKVPGGCNPCTTFGGQQYCCTQGPGPTLSKFFKRCFDA	199
AP24	INGECPRELVRVPGGCNPCTTFGGQQYCCTQGPGPTFFSKFFKQRCFDA	199
CAOSM1	YSYPQDDPTSTFTCQSWTTDYKVMFCPYGSTHNETSSFPLELPTSTHEVA-	250
PA35	YSYPQDDPTSTFTCQSWTTDYKVMFCPYGSTHNETTNFPLEMPTSTLEVA-	250 (96.0%)
PR-5d	YSYPQDDPTSTFTCTSWTTDYKVMFCPYGSAHNETTNFPLEMPTSTHEVAK	251 (95.2%)
NP24	YSYPQDDPTSTFTCPGGSTNYRVVFCPNGVAD---PNFPLEMPASTDEVAK	247 (77.2%)
AP24	YSYPQDDPTSTFTCPGGSTNYRVIFCPNGQAH---PNFPLEMPGS-DEVAK	246 (77.2%)

Fig. 1–13. Amino acid sequence alignments of *CAOSM1* cDNA encoding a putative pepper osmotin-like protein (GenBank accession no. AY262059) with other osmotin-like proteins, PA35 from wild potato (*Solanum commersonii*, accession no. S56708, Zhu et al. 1995), PR-5D from tobacco (*Nicotiana tabacum*, accession no. P25871), NP24 from tomato (*Lycopersicon esculentum*, accession no. P12670, King et al., 1988), and AP24 from tobacco (*Nicotiana tabacum*, accession no. X65700, Melchers et al., 1993). Gaps indicated by dashes (-) are introduced for optimal alignment. The residues identical to *CAOSM1* sequence are shaded in grey. The predicted N-terminal signal sequence cleavage site is indicated by an arrow. Carboxyl-terminal signal sequences are marked with an upper line. The dots represent the conserved cysteine residues of osmotin-like proteins.

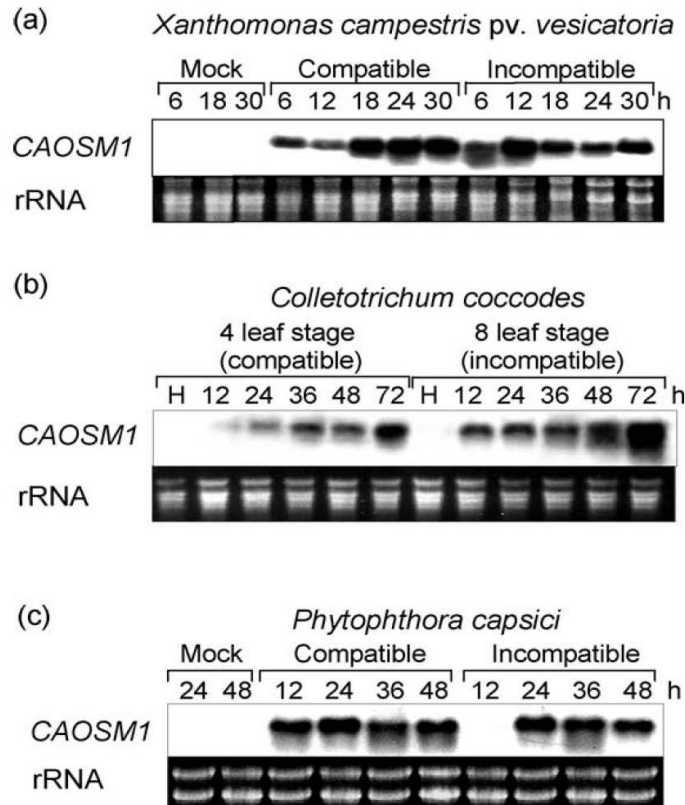


Fig. 1-14. Time courses of the expression of *CAOSM1* mRNA in pepper plants during compatible and incompatible interactions with pathogens. (a) Temporal *CAOSM1* mRNA induction in leaves of pepper plants inoculated with virulent (Ds1) and avirulent (Bv5-4a) strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* at the six-leaf stage. (b) Temporal *CAOSM1* mRNA accumulation in leaves of pepper plants inoculated with *Colletotrichum coccodes* isolate 2-25 at the four- (compatible interaction) and eight-leaf (incompatible interaction) stages. (c) Temporal *CAOSM1* mRNA induction in stems inoculated with virulent (S197) and avirulent (CBS178.26) isolates of *Phytophthora capsici* at the six-leaf stage. Each lane was loaded with 20 mg of total RNA from the healthy or infected tissues at various time intervals. Ribosomal RNA was stained with ethidium bromide to ensure equal loading of the RNA samples. Results presented are from representative experiments, which were repeated four times with similar results. H, uninoculated healthy pepper tissues; h, hours after inoculation.

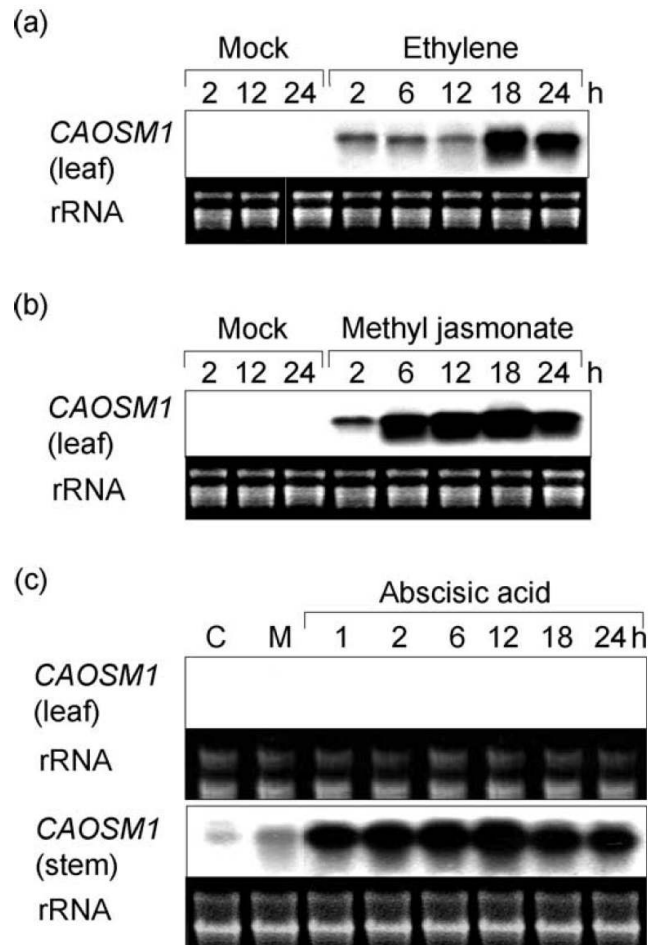


Fig. 1–15. Time courses of the *CAOSM1* mRNA expression in leaf and stem tissues of pepper plants treated with (a) 5 ml lK1 ethylene, (b) 50 mM methyl jasmonate, and (c) 100 mM abscisic acid. Each lane was loaded with 20 mg of total RNA from treated tissues at various time intervals. Ribosomal RNA was stained with ethidium bromide to ensure equal loading of the RNA samples. Results presented are from representative experiments, which were repeated four times with similar results. C, untreated pepper plants; M, mock, water-treated pepper plants; h, hours after treatment.

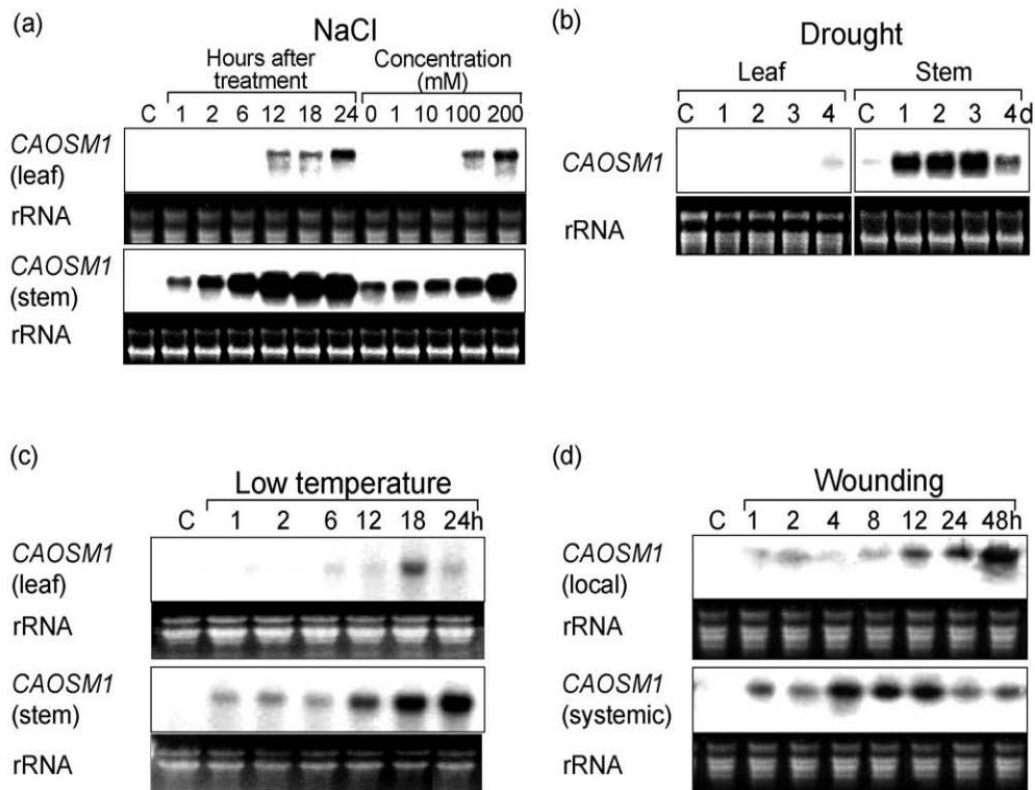


Fig. 1-16. Time courses of the *CAOSM1* mRNA expression in leaf and stem tissues of pepper plants treated with (a) sodium chloride, (b) drought, (c) low temperature and (d) wounding. Leaf or stem tissue was harvested at different time intervals after treatment. Ribosomal RNA was stained with ethidium bromide to ensure equal loading of the RNA samples. Results presented are from representative experiments, which were repeated four times with similar results. C, untreated pepper plants; d, days after wilting; h, hours after inoculation.

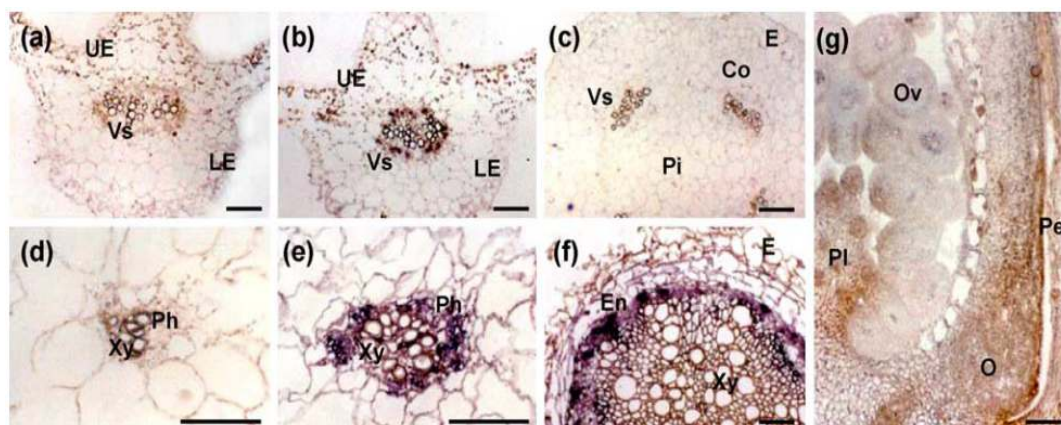


Fig. 1–17. In situ localization of *CAOSMI* mRNA in various organs of healthy pepper plants and *Colletotrichum coccodes*-infected leaf tissue of pepper plants. Cross-sections of (a) healthy and (b) infected leaf tissues at 24 h after inoculation of *C. coccodes*. Cross-sections of (c) stem, and (d) green fruit, (e) red fruit tissue and (f) root. Longitudinal section of (g) flower tissue. Each thin section was hybridized with digoxigenin-labeled pepper osmotin cDNA. The transcript signals are in colored purple. Bars=100 μm. Co, cortical layer; E, epidermis; En, endodermis; LE, lower epidermis; O, ovary; Ov, ovule; Pe, petal; Ph, phloem; Pi, pith; Pl, placenta; UE, upper epidermis; Vs, vascular bundle; Xy, xylem.

마. CAZFP1 유전자의 특성 분석

1) 염기서열 분석

CAZFP1 유전자는 pI 8.39, MW 28kDa의 단백질을 구성하리라 생각된다. CAZFP1 단백질은 다양한 구조적인 특징을 가지고 있다. 두개의 Cys2/His2을 가지는 zinc-finger type의 transcription factor motif가 38개의 아미노산을 거리로 두고 존재하였다. 이러한 서열은 동물에서 DNA 결합 활성화에 중요한 부위라고 알려져 있다 (Desjarlais and Berg, 1992; Kubo et al., 1998). 또한 단백질의 핵으로의 이동에 관여하는 신호 peptide가 존재하며, 단백질-단백질 상호작용에 관여하리라 생각되는 L-box와 DLN-box가 관찰된다. 기존에 보고되어 있는 다른 종류의 zinc-finger protein들과 비교하면 38-77%의 유사성을 가지고 있으며 위에서 언급한 단백질의 다양한 특징들을 나타내는 아미노산 영역은 상당히 보존되어 있음을 알 수 있다 (Fig. 1-18).

최소한 Myb, ethylene-responsive-element binding factors (ERF), basic-domain leucine-zipper (bZIP), WRKY, homeodomain 단백질 등 다섯 부류의 식물 transcription factor들이 병방어 반응의 조절에 참여한다고 알려져 있다 (Rushton and Somssich, 1998). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*의 비병원성 균주에 의해 발현이 유도되는 *Arabidopsis* Myb 유전자는 *Arabidopsis* lesion mimic 돌연변이체에서의 세포 사멸 (programmed cell death)와 연관이 있었다 (Kranz et al., 1998; Daniel et al., 1999). 토마토와 담배의 ERF 유전자들은 *Pseudomonas syringae* (Zhou et al., 1997), TMV (Horvath et al., 1998), *Cladosporium fulvum* (Durrant et al., 2000) 감염에 의해 유도되었다. 다양한 종류의 Cys2/His2 type의 zinc-finger transcription factor가 식물에서 보고되었다. 이 중에서 대두에서 분리된 SCOF-1은 abscisic acid responsive element (ABRE)에 의해 매개되는 저온 스트레스 관련 방어 유전자의 positive regulator로 역할을 하며, 단백질-단백질 상호작용을 통하여 내병성을 증가시키는데 역할을 한다 (Kim et al., 2001).

2) CAZFP1 transcription factor의 세포내 위치

병원균 감염에 대한 식물의 방어 반응에 관련된 신호전달의 연쇄 반응 동안, 다양한 방어 신호들은 최종적으로 식물의 핵 안으로 전달되어 병방어유전자들의 전사 (transcription)를 활성화 시킨다 (Yang et al., 1997). 병방어유전자들의 발현은 DNA에 결합하는 transcription factor의 활성의 변화에 의해 매개된다. 그러므로 transcription factor의 세포질에서 핵으로의 translocation은 단백질의 post-translational control에서

매우 중요한 단계이다 (Laskey and Dingwall, 1993). 대부분의 transcription factor 단백질들은 핵으로의 이동을 유도하는 nuclear localization signal (NLS)를 그들의 아미노산 서열 중에 가지고 있어서 선택적인 단백질의 이동을 이루어 낸다 (Raikhel, 1992). CAZFP1 transcription factor 유전자의 아미노산 서열을 분석하여 보면 N-말단 부위에 arginine과 lysine이 풍부하게 위치하는 NLS를 가지고 있음을 알 수 있었다. 어떤 종류의 transcription factor들은 세포질에서 핵으로 이동하기 위하여 elicitor의 처리 등의 특별한 외부적인 신호를 요구하기도 한다 (Lee et al., 2001). 그러나 CAZFP1 transcription factor의 경우, 이러한 외부적인 신호 없이 자체적인 NLS 만으로 핵으로의 이동이 충분히 이루어지고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 1-19).

3) 병감염에서 *CAZFP1* 유전자의 발현

병방어관련유전자 *CAZFP1*의 발현 또한 세균 병 감염에 대하여 친화적, 불친화적 반응에서 차별적으로 나타났다 (Fig. 1-20). 이 유전자의 발현은 위에서 언급한 *CABPR1* 유전자보다도 매우 빠르게 유도되어 접종 후 30 분이면 나타났다. 특히 친화적 반응에서의 발현이 접종 후 30 분에서 30 시간까지의 병발생시간동안 매우 적게 나타나는 반면, *CAZFP1* 유전자의 발현은 빠르고 강하게 나타나 기존의 병방어관련유전자들의 발현 양상과 뚜렷한 차이를 나타내었다. 병 감염에 의해 나타나는 이렇게 빠른 반응성은 transcription factor를 코딩하는 유전자들에서 전형적으로 나타나는 현상이며, 병반응 초기에 나타나는 이들 유전자들의 발현은 생체 방어신호전달체계 (defense signal transduction)에서 하위에 존재하는 관련된 많은 유전자들의 발현을 유도하기 위한 기작으로 설명되었다.

4) 화학적 elicitor 처리 의한 *CAZFP1* 유전자의 발현

CAZFP1 유전자는 여러가지 elicitor에 의하여 상이한 발현 경향을 나타내었다 (Fig. 1-21). Ethylene에 의해서 처리 1시간에 강하게 발현되다가 그 후 약간 감소하고 12시간 부터 다시 증가하였다. Methyl jasmonate에 의해 2시간에 강하게 발현되고 6시간에 약간 감소한 후 그 발현이 현저히 줄어들었다. Abscisic acid 처리에 의해 1시간부터 약하게 발현되고 점차 증가하여 12-24 시간에 이르러 그 발현이 증가하였다. salicylic acid, benzothiadiazole, DL-amino-n-butyric acid, hydrogen peroxide등의 처리에서도 처리후 앞시간에서 크게 *CAZFP1* 유전자가 발현되기 시작하였다.

5) 환경 스트레스에 의한 *CAZFP1* 유전자의 발현

CAZFP1 유전자도 환경적인 스트레스에 의해 빠른 시간에 발현하였다. 상처에 의해 상처 30분후에 강하게 발현되고 6시간까지 점점 줄어 12 시간이후에는 그 발현이 약하여졌다 (Fig. 1-22). 저온처리에 의해서는 빠른 발현이 나타나지 않아 저온 처리에 의해서 *CABPR1* 유전자의 발현과 같이 18시간을 전후 하여 나타났다. 200 mM 농도의 NaCl에 의한 염류 처리에 의해 *CAZFP1* 유전자가 30분에 발현되고 1시간에 약간 줄어든 후 12 시간 이후에는 발현이 일어나지 않았다. 이에 반해 *CABPR1* 유전자는 같은 농도의 NaCl 처리에 의해 18-24 시간에 발현되어 *CAZFP1* 유전자의 발현이 일반적인 병방어관련유전자보다 매우 빠르게 반응하여 발현됨을 알 수 있었다.

6) *CAZFP1* 유전자의 조직학적 *in situ* 발현

CAZFP1 유전자의 mRNA 발현을 *in situ* hybridization를 수행하였다 (Fig. 1-23). 건전한 기관에서 잎과 뿌리의 vascular bundle에 mRNA가 축적되었으며 꽃 조직에서는 배주와 태반에서 주로 관찰 되었다. *CAZFP1* mRNA가 건전한 잎 조직에서 발현되지 않으나 고추탄저병 접종이나, ethylene, abscisic acid의 처리에 의해 잎의 vascular bundle에서 관찰되었다 (Fig. 1-24).

7) *CAZFP1* 유전자의 프로모터 분리 및 분석

Transcription factor 유전자인 *CAZFP1* 유전자의 프로모터를 분리하여 분석하였다 (Fig. 1-25). *CAZFP1* 유전자의 시작 코돈 ATG의 upstream으로 999 개의 염기서열을 증폭하여 획득하였다. 이 염기서열을 (-999), (-685), (-485) 그리고 (-250) 염기 길이의 조각으로 deletion하고 이를 pBI101 vector의 GUS reporter 유전자 앞 부분에 위치하도록 vector를 제작하였다. 각 constrcut를 사용하여 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 감염과 methyl jasmonate의 처리에 의한 *CAZFP1* 유전자의 프로모터 활성을 담배 잎에서 확인하였다. Transcription factor 유전자의 발현을 연구하기 위해 3 시간과 18시간에 프로모터의 활성을 조사하여 일반적인 병방어유전자의 프로모터 활성과 차별화 하였다.

8) 병원세균 감염, methyl jasmonate와 ethylene에 의한 *CAZFP1* 프로모터의 활성화
접종 후 3 시간에 담배들불병균에 의해 4 개의 *CAZFP1* 프로모터 constructs가 활성화되었다 (Fig. 1-26). 특히 (-999) 영역에서는 매우 높은 활성화를 관찰 할 수 있었으며, 그 이후 절단체인 (-685) 에서는 이 활성이 급격하게 감소되어 (-999)에서 (-685) 사

이의 영역에서 담배들불병에 반응하는 강력한 element들이 존재한다고 생각된다. 접종 후 18 시간에는 3 시간에서와는 매우 다른 양상을 관찰 할 수 있었다. 세균 감염에 의해 높은 (-999) construct에서의 활성이 유지 되었으나 3 시간에서의 매우 높은 활성이 1/2 내지 1/3로 격감하였다. 이에 반해, (-685), (-485), (-250) constructs에서는 3 시간째 보다 그 활성이 증가되었으며, 특히 (-685) construct에서의 활성은 3 시간에서보다 5 배 이상 증가하였다. Methyl jasmonate에 의하여 *CAZFP1* 프로모터의 활성이 관찰되었다 (Fig. 1-27). 이 또한 3 시간과 18 시간에서 construction 별로 차이를 나타내었다. MeJA에 의해서 (-999)와 (-685) construct가 활성화되었다. MeJA 처리 후 3 시간에 활성화된 (-999) construct는 18 시간이 지난 후에도 지속되었으나, (-685) construct의 활성은 현저히 줄었다. (-485) construct는 3 시간에는 반응하지 않았으나 18 시간에는 약간의 반응을 보였다.

9) *CAZFP1* 발현 형질전환 *Arabidopsis*의 제조

선행 연구 결과에서 고추에서 분리된 유전자 *CAZFP1*이 병감염 및 환경 스트레스에 반응하여 고추 식물에서 발현됨을 관찰하였으며, 연구 기간 동안 이 유전자의 프로모터 부위를 분리하여 분석한 결과, 병감염 및 환경 스트레스에 의한 *CABPR1* 유전자의 발현이 병발생 후 빠른 시간에 일어나는 프로모터의 활성화로 기인함을 관찰하였다. *CAZFP1* 유전자가 다른 작물에 도입되어 사용될 분자적인 재료로서의 효과를 검증하기 위해 우선적으로 모델 식물인 *Arabidopsis*에 도입하여 병저항성 및 환경 스트레스 내성을 검증하였다.

CAZFP1 유전자를 pBIN35S binary vector에 도입하기 위해 pBluescript SK(-) vector에 삽입되어 있는 이 유전자를 제한효소 BamHI과 KpnI으로 절단하여 분리 한 후 pBIN35S vector에 ligation하였다. 이 vector construct를 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 strain에 electroporation을 이용하여 도입한 후 rifampicin과 kanamycin이 포함된 YEB 배지에서 형질 전환된 EHA105 strains을 선발하였다. 이 *Agrobacterium*을 배양한 후 Floral dipping 방법을 통하여 *Arabidopsis*를 형질 전환하였다 (Fig. 1-28). T1 종자를 수확하여 kanamycin이 포함된 MS 배지에 과종하여 형질전환 식물체를 선발하여 고추 *CAZFP1* 유전자가 건전한 *Arabidopsis* 식물에서 발현됨을 확인하였다. 대부분의 실험은 T2 또는 T3 종자를 가지고 수행되었다. *CAZFP1* 유전자로 형질전환된 *Arabidopsis* 식물체는 wild type 식물보다 초기 유묘 생장이 느릴 뿐만 아니라 최종적으로는 성체 식물에서 왜화 증상 (dwarfism)을 나타내었다. Transcription factor 유전자를

포함한 일부 식물 유전자들중에 식물에 overexpression 되었을 경우, 식물의 왜화 증상을 초래하는 유전자들이 보고되었다. AP2 type의 transcription factor 유전자를 Arabidopsis에 overexpression 시켰을 경우, 지베렐린 생합성이 억제되어 식물의 왜화 증상을 초래한다. 게다가 이러한 형질전환식물체의 경우 염류 스트레스에 반응하는 유전자의 발현이 강하게 나타났으며, 염류 저항성의 형질을 나타내었다 (Magome et al., 2004). 아마도 transcription factor처럼 다른 유전자의 발현을 조절하는 유전자들은 스트레스 방어 반응 뿐 아니라 다양한 식물 생리적인 변화에 관련하고 있음을 알 수 있다.

10) *CAZFPI*-형질전환 Arabidopsis의 병저항성

형질전환 식물체의 세균병에 대한 저항성을 검증하기 위해 Arabidopsis Col-0 ecotype에 병원성인 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000을 wild type과 *CAZFPI*-형질전환식물체에 접종하였다. 접종 후 1, 3, 5일의 시간별로 식물 잎 조직 내에서의 세균의 개체수를 측정하였다. 접종 후 병진전이 됨에 따라 wild type에 비해 형질전환식물체에서의 병원성 세균의 개체수는 10 배 정도의 감소를 보였다. 접종 5일 후 wild type 식물 잎에서만 황화 현상이 나타나는 전형적인 병반이 발생하였으며, 형질전환식물체는 건전한 상태의 잎을 유지하고 있었다 (Fig. 1-29).

일반적으로 PR-1, PR-2, PR-5 같은 병방어관련유전자들의 발현이 salicylic acid-dependent 하게 이루어지고, PDF1.2 유전자의 발현은 jasmonic acid-dependent 하게 이루어진다 (Penninckx et al., 1998). 식물체 내에서의 인위적인 transcription factor의 overexpression이 down-stream에 존재하는 유전자들의 발현을 활성화 시킨다 (Kim et al., 2001; Qin et al., 2004; Wang et al., 2004). Arabidopsis 식물체에서의 고추 *CABPR1* 유전자의 발현이 Arabidopsis 내에 있는 병방어관련 유전자들의 발현에 영향을 미치는지 알아보기 위해 RT-PCR 분석을 수행하였다. 네 가지의 독립된 형질전환체 line에서 *AtPR1*, *AtPR2*, *AtPR5*, *AtPDF1.2* 등의 발현을 검정 한 결과 스트레스를 주지 않은 건전한 형질전환식물체에서 발현되지 않음을 관찰하였다. 이러한 현상은 Arabidopsis *NHL* 유전자의 overexpression의 경우에 나타났는데, DC3000 접종에 대하여 저항성을 부여하지만 병방어관련 유전자의 발현에는 관여하지 않았다 (Varet et al., 2003). *CAZFPI* 유전자의 overexpression 자체로 병저항성을 부여하기에 충분함은 분명하였으나, 네 가지 병방어관련 유전자 *AtPR1*, *AtPR2*, *AtPR5*, *AtPDF1.2* 외에 다른 병방어관련유전자들이 관여 할 가능성을 배제할 수는 없다.

11) *CAZFP1*-형질전환 *Arabidopsis*의 건조 스트레스 내성

CAZFP1 유전자가 기능적으로 건조 스트레스 내성에 관여하고 있는지 알아보기 위하여 형질전환 *Arabidopsis* 식물체를 대상으로 건조 스트레스 내성 실험을 수행하였다 (Fig. 1-29). Wild type과 형질전환식물체에 관수하지 않은 채로 식물을 관찰한 결과, 5주된 성체식물에서 건조 스트레스 내성이 나타남을 관찰하였다. *CAZFP1* 유전자와 유사한 종류인 *petunia zinc-finger protein*인 *ZPT2-2*와 *ZPT2-3*을 *petunia*에 overexpression 시켰을 때 건조 스트레스에 대한 저항성을 증진시킴이 보고되었다 (van der Krol et al., 1999; Sugano et al., 2003). *CAZFP1* 유전자 또한 병저항성과 건조 스트레스 내성 양쪽 모두 positive regulator로 작용함을 알 수 있었다.

CAZFP1	MALEALNSPTG-TPTPPP---FOFESDGGQOLRYTEN-WR KGKR SK	40
Petunia hybrida	MALEALNSPTTTTPPS-----FOFENNG--LKYLES-W KGKR SK	38
Drooturango	MALEALNSPTTATPV-----PHY-DDPSLNYLLEP-W KGKR SK	37
Soybean	MALEALNSPTTAPS-----FPP-DDF---TI-P-W KKR SK	33
Alfalfa	MALEALNSPTTATPT-P---EEEPN---LSYLETPTW KKR SK	37
Arabidopsis	MALEALTSPRLASPIP-P---L-PE-DSSVPHGVEH-W KGKR SK	38
Tobacco	MTLEALKSPATAATPTL-P---PRYEDD-DEIHNLDS-W KGKR SK	39
Turnip	MALETLSPTSATASARPLLRREMEPEPNI--EQ-W KKR RTK	41
NLS		
CAZFP1	RSRSMEHQP--TEEEYLALCLIMLARSGGSVNHQR--SLPP---P	78
Petunia hybrida	RQRSMERQC--TEEEYLALCLIMLARSDGVSNNR--SLPPPPLP	79
Drooturango	RTR-LDSPH--TEEEYLAFCLIMLAR-GRVASANR--RDSD---	73
Soybean	RSRDHP----TEEEYLALCLIMLARGGTTVNNRHVSPPP---	69
Alfalfa	RSRMDQSSC--TEEEYLALCLIMLARSGNN-NDKK--SDSV---	73
Arabidopsis	RSRSDPHHQLTTEEEYLAFCLMLLARD---NRQP--PPPPAV--	75
Tobacco	RPR-IDAPP--TEEEYLALCLIMLARSGTGTTRTGL-TDATTSQPP	80
Turnip	RQRFDNQETAPS EE YLALCLMLLAR--GSAV-QS--PLPP---	77
L BOX		
CAZFP1	-APVMK LH APSSSSAA EEEE KEK MVYK CSVCGK GF GSYOALGGHKA	122
Petunia hybrida	PSVPVTSQINAT---LLE-QKNLYK CSV CGK GF GSYOALGGHKA	119
Drooturango	-----SSIQ IQ PEATTSATK VS YK CSV CDK AF SSYOALGGHKA	111
Soybean	LQP---QP PT -Q IQ PPDPSTK LS YK CSV CDK SF SSYOALGGHKA	100
Alfalfa	ATP---LTTV-----K LSH K CSV CN KA FFSSYOALGGHKA	104
Arabidopsis	-----E KL SYK CSV CDK TF SSYOALGGHKA	100
Tobacco	ADKKTAELPPVHKKEVATEQAEQ SYK CSVCDK AF SSYOALGGHKA	125
Turnip	-SS-----SSDHRG YK CTVCGK SF SSYOALGGHKT	106
ZINC FINGER □		
CAZFP1	SHR K----LVP-GGDDOSTTSTTTNATGTTTSVNGNGNRSGRTH	161
Petunia hybrida	SHR K----LVSMGGDEOSTTSTTTNVTGTS-SANVNGN--GRTH	156
Durango root	SHR K----LA-GGEDOSTSFATTNSATVTTTA-SGGG-GRSH	147
Soybean	SHR K----LAG-AAEDQPP--TTSSAAA-TSSA-SG--KA--H	135
Alfalfa	SHR K----AVM-SATTAEDQITTTSSAVTT-SSASNGKNT--H	140
Arabidopsis	SHR KNLSQ-TLGGGDDHSTSSATTTSAVTTGSGKS-----H	136
Tobacco	SHR KTTT-ATAASDDNNPSTSTSTGA-V-NISAL-NPT--GRSH	164
Turnip	SHR KPASNVNVEINQE-QSNNSHSNSNGGSVAINGNGVSGSKIH	150
CAZFP1	ES ICHKCFPTGOALGGH KRCH YDGGIG-NGNA---NSGVS-ASV	201
Petunia hybrida	ES ICHKCFPTGOALGGH KRCH YDGG---NNGV---NGSV--SV	193
Durango root	ES ICHKSFPTGOALGGH KRCH YEGSIGGNSIHHNNNTTNS-GSN	191
Soybean	ES ICHKSFPTGOALGGH KRCH YEG---NNGNNGNNNSN---SV	172
Alfalfa	ES ICHKSFPTGOALGGH KRCH YEGSVGAGAGA-----GSN	176
Arabidopsis	V TI CNKSPFGGOALGGH KRCH YEG---NIN---INTS-S-VSN	172
Tobacco	V SI CHKAFPTGOALGGH KRCH YEGKLGNSRDLGSGGGHGSV	209
Turnip	T SI CFK SF SSGOALGGH KRCH YDAGINGNNGSSNSVEV---V	192
ZINC FINGER □		
CAZFP1	GVTS-SEG-VGS-----TVS--H-R FD LNI PA LPEFWLGF G -S	234
Petunia hybrida	GVTS-SEG-VGS-----TIS--H RD FDLNI PA LPEFW PG FG-S	228
Durango root	GMMS-MTSEVGS---THTVSHSH-R FD LNI PA LPEFRSN FF IS	230
Soybean	-VTVASEG-VGS---THTVSHGH RR DFD-N IP AF PD FS TK VG--	208
Alfalfa	AVTA-SEG-VGL-----SHSH RR FDLNI PA FP DF SK KF --	209
Arabidopsis	-----SEG-AGS---TSHVSS SH -R FD LNI PP IE PF -SMV--N	204
Tobacco	LTT--SDG-GAS-----THT--L-R FD LNI MP AS PE L QL GLS ID	242
Turnip	GG--SDGNYVDDERSSEQ SAT GD NR FDLNI LP ADQ VAV VIS KR	243
DLN BOX		
CAZFP1	G-----EDEVES PH PA-K KS R RL CL PP K Y EL FO H	261
Petunia hybrida	GA-----EDEVES PH P--K KS R RL SL PP K LE LF K GL	256
Durango root	G-----DDEVES PH PAL K PR I -L-M K	250
Soybean	-----LEDEVES PH PM K PR LF VI K IE IP Q F Q	237
Alfalfa	-----VDEVES PL PA AK PC LF K LE IP SH Y	235
Arabidopsis	G-----DDEVMS PM PA-K K PR FD FP V K L Q L	228
Tobacco	CGRKS QL LM VQ EVES PM PA-K K PR LL FS L G	272

Fig. 1–18. Comparison of the deduced amino acid sequence of the pepper (*Capsicum annuum* L.) zinc-finger protein CAZFP1 with zinc finger proteins from petunia hybrida (Accession no. D26086, Takatsuji et al., 1994), durango root (*Datisca glomerata*, Accession no. AAD26942, Okubara and Berry, 1999), soybean (*Glycine max*, Accession no. T09602, Kim et al., 2001), alfalfa (*Medicago sativa*, Accession no. CAB77055, Frugier et al., 2000), *Arabidopsis thaliana* (Accession no. AAF24959), tobacco (*Nicotiana tabacum*, Accession no. T01985) and turnip (*Brassica rapa*, Accession no. T14409). The two zinc finger motifs, the putative nuclear localization signal (NLS), L-Box and DLN-Box are boxed-in. Bold characters accentuate the Cys(C) and His(H) residues in the zinc finger motif. The gaps introduced to maximize alignment are indicated by dashes (-). Shade shows the same amino acid residues in eight zinc finger proteins.

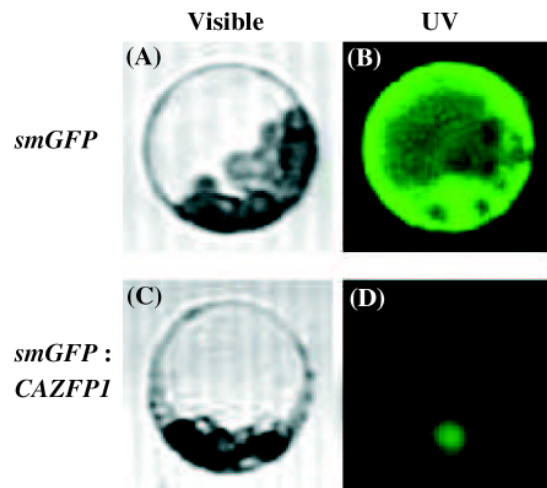


Fig. 1–19. Nuclear localization of CAZFP1 protein. Arabidopsis protoplasts expressing smGFP (A) and (B). or smGFP::CAZFP1 (C) and (D). Cells expressing the smGFP or a smGFP:CAZFP1 fusion proteins were analyzed 36 h after transformation under a Bio–Rad MRC–1024 confocal laser scanning microscope (Bio–Rad, CA).

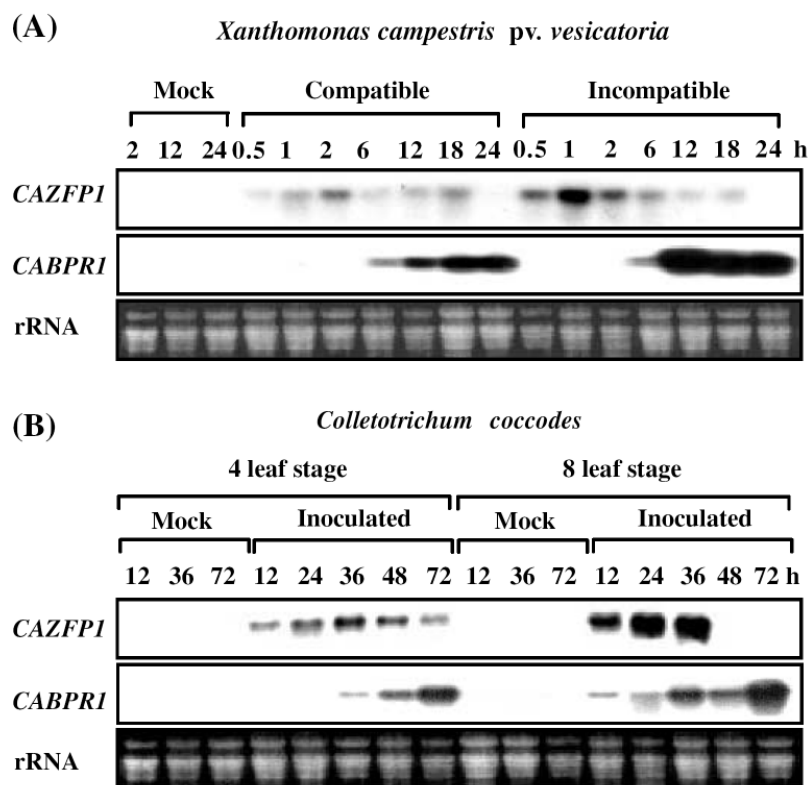


Fig. 1–20. RNA gel blot analyses of *CAZFPI* and *CABPRI* gene expressions in pepper leaves infected with (A) *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and (B) *Colletotrichum coccodes*. The lower primary leaves were mock-inoculated with 10 mM MgSO₄. Twenty micrograms of total RNA was loaded in each lane. The blots were hybridized with probes of pepper full length cDNA clones of the zinc-finger protein (*CAZFPI*) and basic PR-1 protein (*CABPRI*) genes. Ethidium bromide-stained rRNA is shown as a control for loading.

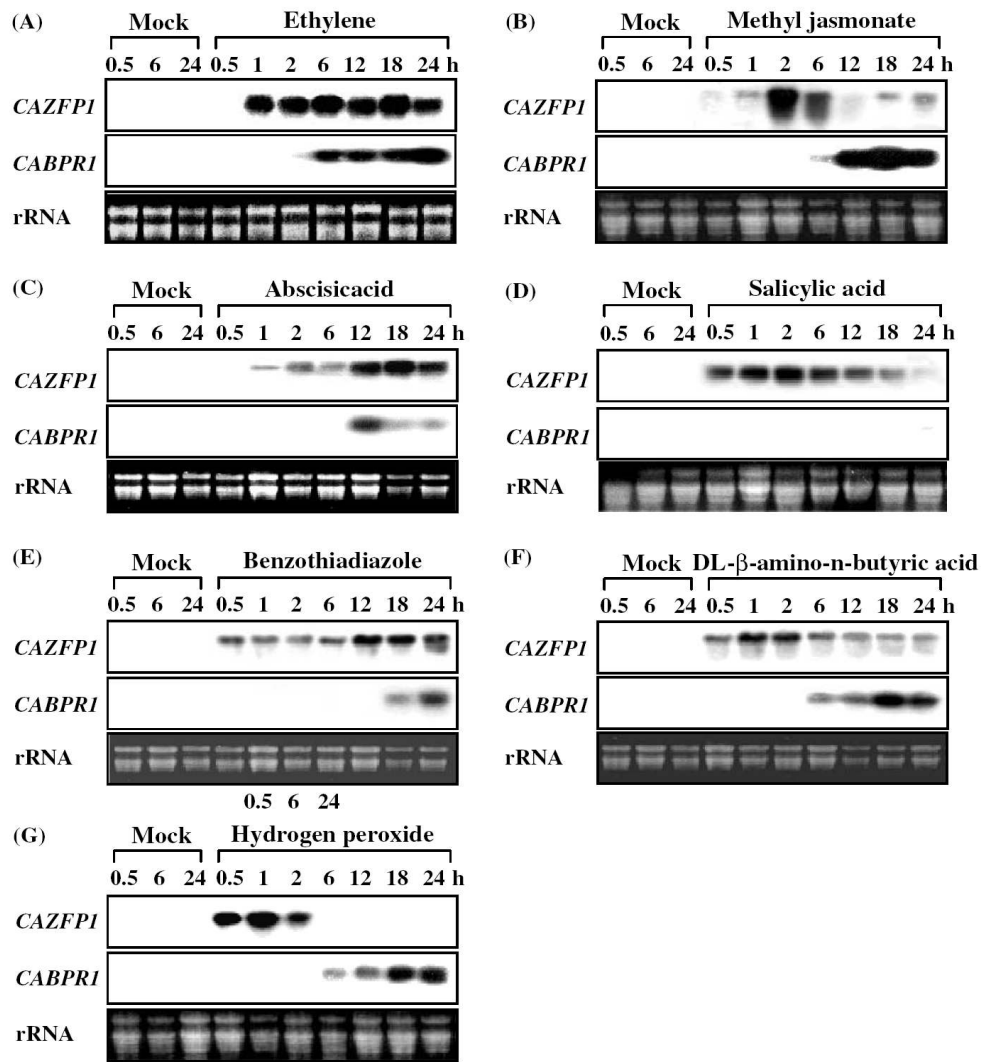


Fig. 1-21. RNA gel blot analyses of *CAZFPI* and *CABPRI* gene expressions in pepper leaves at various time intervals after treatment with: (A) ethylene, (B) methyl jasmonate, (C) abscisic acid, (D) salicylic acid, (E) benzothiadiazole, (F) DL- β -amino-n-butyric acid and (G) hydrogen peroxide. Twenty micrograms of total RNA was loaded in each lane. The blots were hybridized with probes of pepper full length cDNA clones of the zinc-finger protein (*CAZFPI*) and basic PR-1 protein (*CABPRI*) genes. Ethidium bromide-stained rRNA is shown as a control for loading.

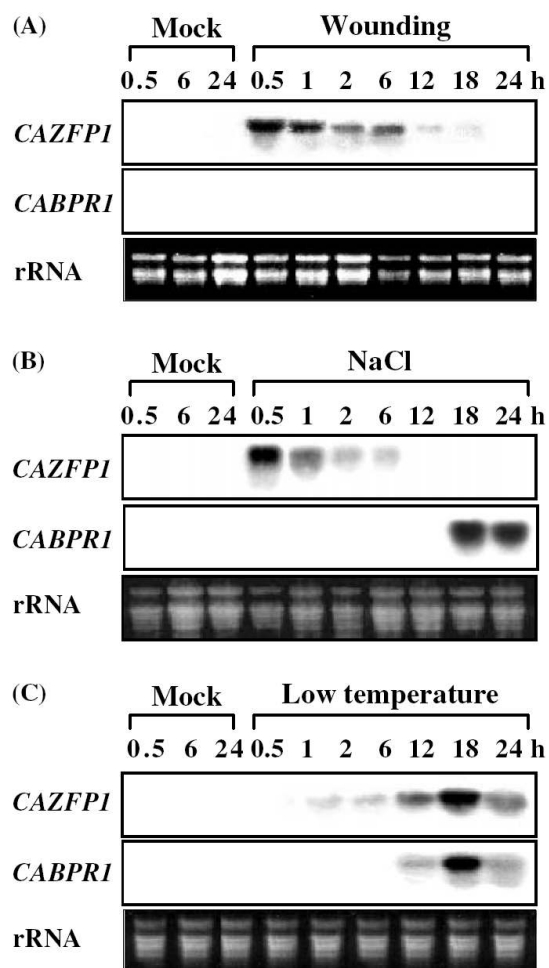


Fig. 1–22. RNA gel blot analyses of *CAZFPI* and *CABPRI* gene expressions in pepper leaves at various time intervals after treatment with: (A) wounding, (B) NaCl and (C) low temperature. Twenty micrograms of total RNA was loaded in each lane. The blots were hybridized with probes of pepper full length cDNA clones of the zinc–finger protein (*CAZFPI*) and basic PR–1 protein (*CABPRI*) genes. Ethidium bromide–stained rRNA is shown as a control for loading.

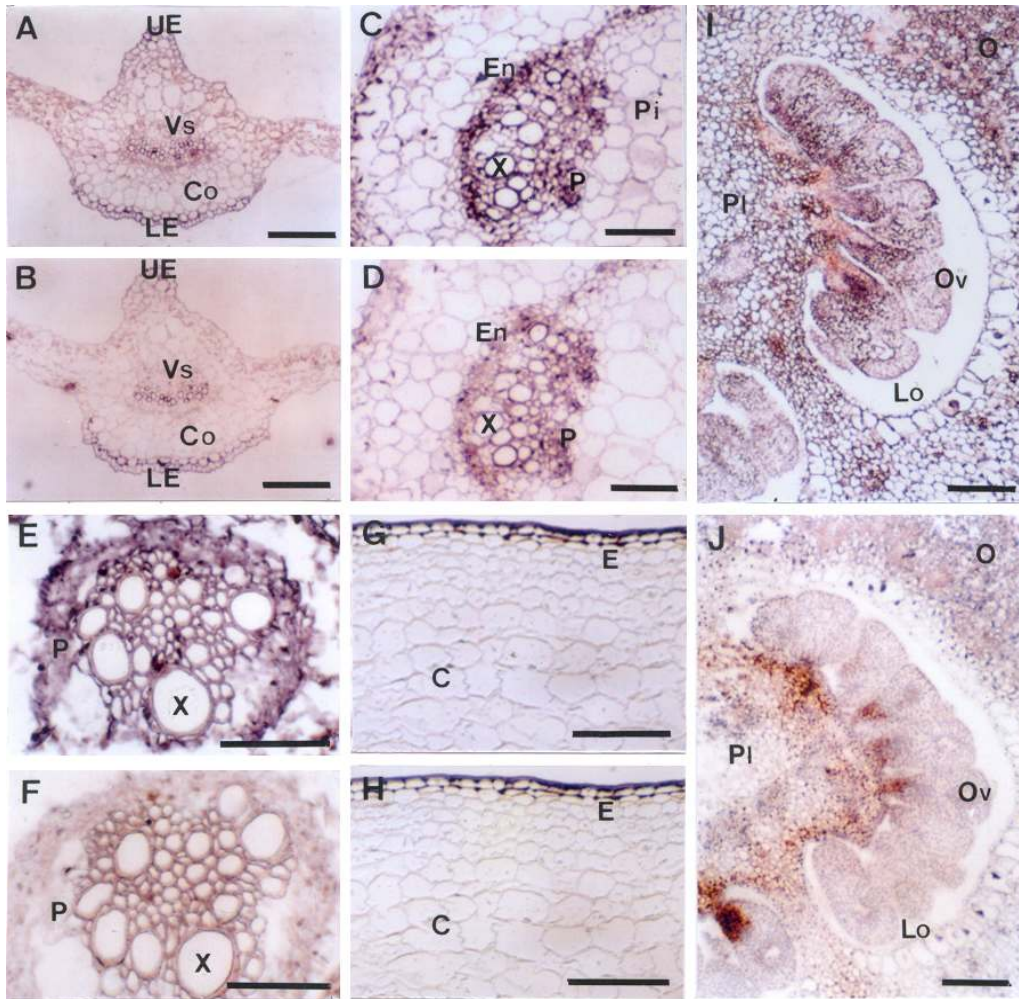


Fig. 1–23. In situ localization of the *CAZFPI* mRNAs in different pepper organs. Cross sections of pepper organs were hybridized with *CAZFPI* antisense, (A), (C), (E), (G) and (I), or sense, (B), (D), (F), (H) and (J), digoxigenin-labeled RNA probes, and photographed under bright-field conditions. The transcript signal is purple. (A) and (B), leaf midrib. (C) and (D), stem. (E) and (F), root. (G) and (H) green fruit. (I) and (J) flower. C: cortical cell, Co: collenchyma cell, E: endodermis, LE: lower epidermis, Lo: locule, O: ovary, Ov: ovule, P: phloem, Pl: placenta, UE: upper epidermis, X: xylem and Vs: vascular bundle. Scale bar = 100 μm .

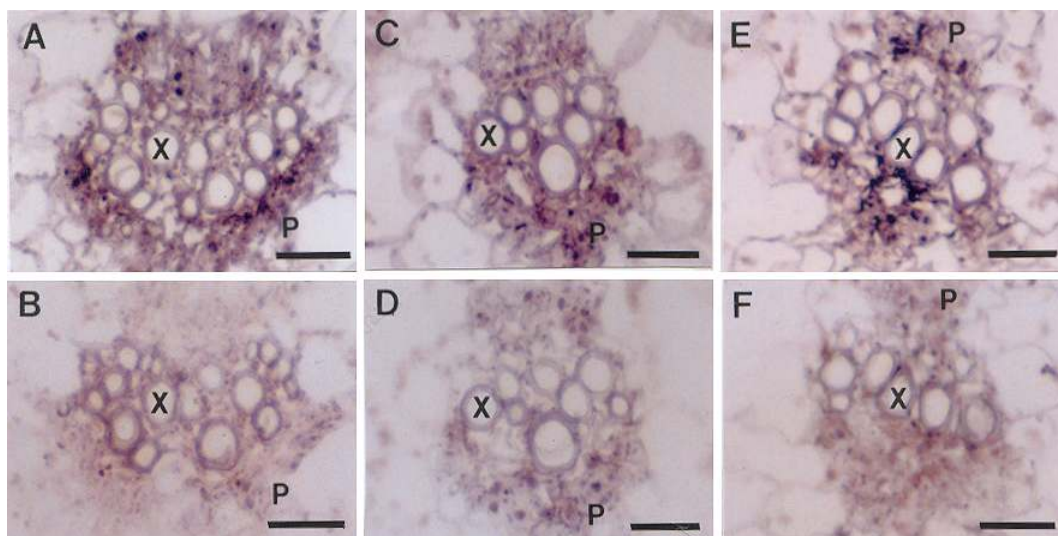


Fig. 1–24. *In situ* localization of *CAZFPI* mRNAs in pepper leaf midrib infected by *Colletotrichum coccodes* at the 4–leaf stage or treated with ethylene and abscisic acid (ABA). Cross sections of leaf midribs were hybridized with *CAZFPI* antisense, (A), (C) and (E) or sense, (B), (D) and (F) digoxigenin–labeled RNA probes, and photographed under bright–field conditions. The transcript signal is purple. (A) and (B). Leaf midrib tissue 24 h after inoculation with *C. coccodes*. (C) and (D). Leaf midrib tissue 18 h after treatment with ethylene. (E) and (F). Leaf midrib tissue 18 h after treatment with ABA. P: phloem, X: xylem. Scale bar = 30 μ m.

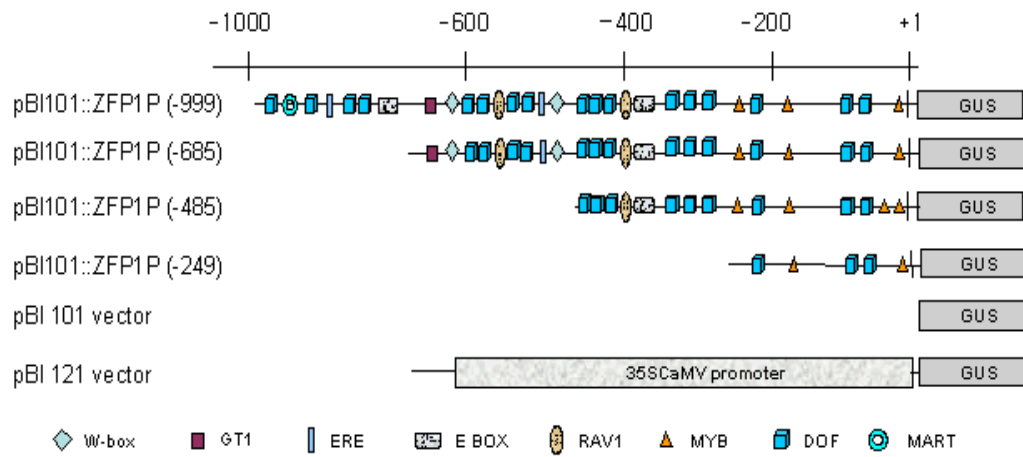


Fig. 1–25. Schematic maps of the chimeric 5'–*CAZFPI* promoter deletion–*GUS* constructs for assaying the reporter gene expression in tobacco leaves. *CAZFPI* promoter were fused to the *GUS* (β -glucuronidase) reporter gene in the pBI101 vector. pBI101, a negative vector control; pBI121, a positive vector control containing CaMV 35S promoter fused to *GUS* (β -glucuronidase) reporter gene.

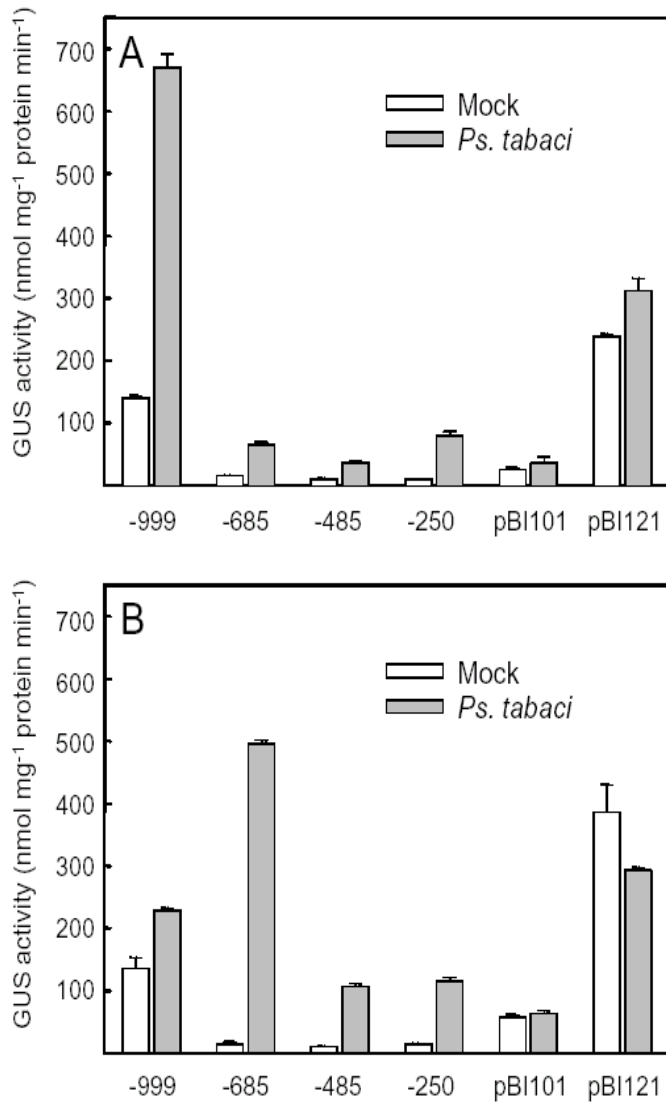


Fig. 1–26. Induction of the GUS activity of the *CAZFP1* promoter–GUS chimeric constructs by *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (A) 3h and (B) 18h after inoculation.

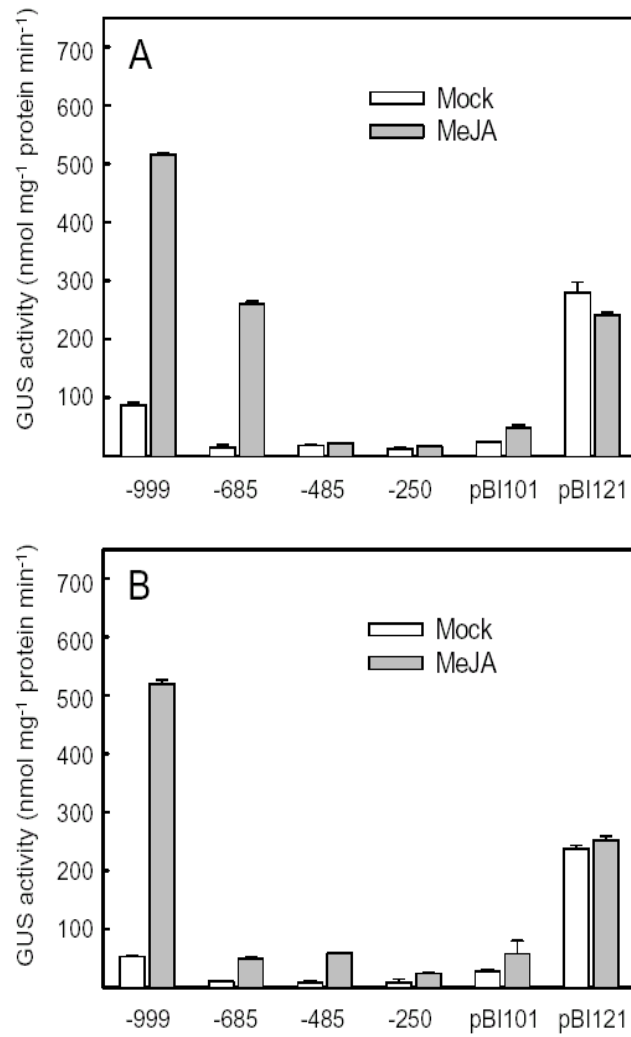


Fig. 1–27. Induction of the GUS activity of the *CAZFP1* promoter–GUS chimeric constructs by methyl jasmonate. (A) 3h and (B) 18h after treatment.

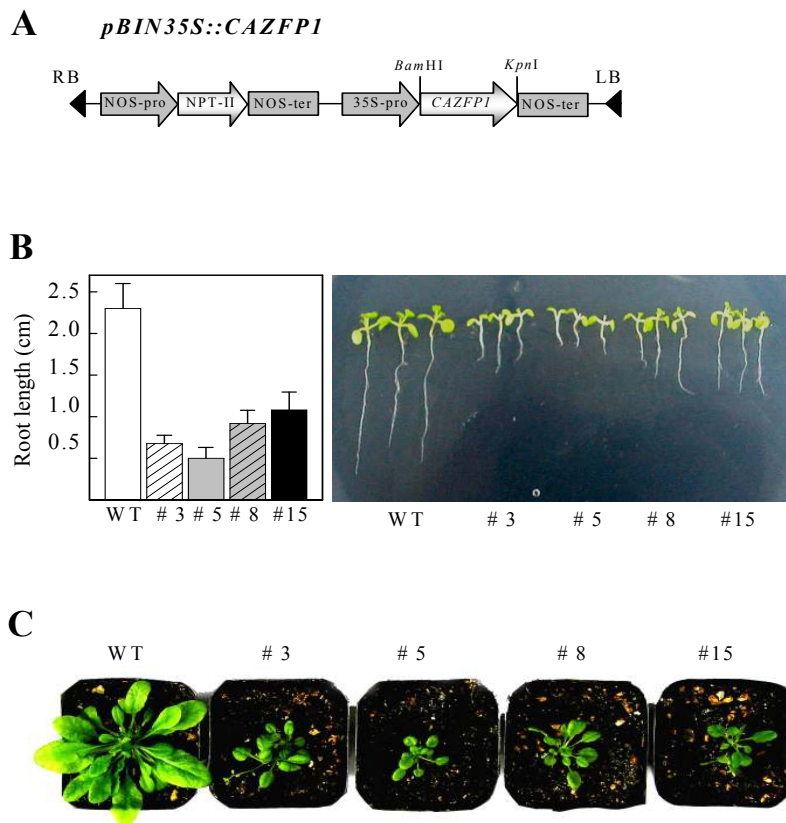


Fig. 1–28. (A) Diagram of the 35S promoter–*CAZFP1* gene construct used for transformation of *Arabidopsis*. RB, right border; LB, left border; NOS–pro, nopaline synthase promoter; NOS–ter, nonpaline synthase terminator; NPT–II, neomycin phosphotrasnferase; 35S–pro, CaMV 35S promoter. (B) Northern blot analysis of expression of the *CAZFP1* transgene in wild type and the *CAZFP1* transgenic T1 lines. Ten micrograms of total RNA from one of the transgenic lines was loaded in each lane and the gel blot was hybridized with the *CAZFP1* probe. Ethidium bromide–stained rRNA is shown as a control for loading. (C) Root growth of 2–weekold seedlings of wild type and the *CAZFP1* transgenic T2 lines. (D). Morphology of 6–week–old seedlings of wild type and the *CAZFP1* transgenic *Arabidopsis* T2 lines.

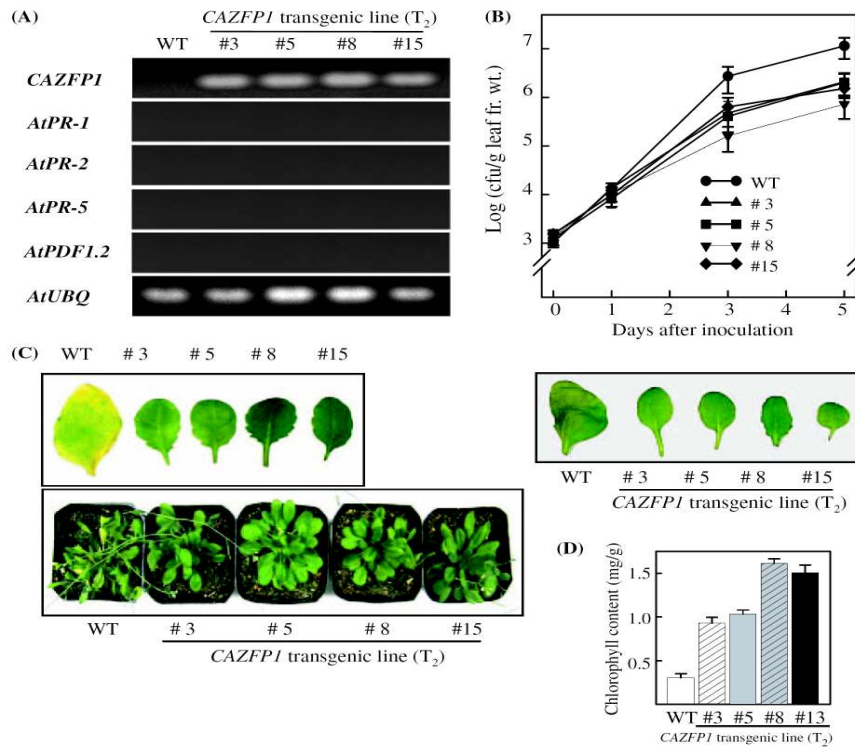


Fig. 1–29. Reactions of the *CAZFP1* transgenic *Arabidopsis* plants to bacterial infection and dehydration conditions. (A). RT–PCR amplification of *Arabidopsis* PR genes in wild type (WT) and the *CAZFP1* transgenic T₂ lines. Amplification of the ubiquitin is shown for the equal loading of RNA. (B). Growth of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 in the wild type (WT) and transgenic plants. Numbers of bacterial cells in the leaf tissues were measured at different time points after infiltration with bacterial suspension ($1 \cdot 10^4$ cfu/ml). Data are the means \pm standard deviations from three independent experiments. Disease symptoms developed on the leaves of wild type (WT) and transgenic lines 5 day after inoculation. (C). Enhanced resistance of adult plants of the *CAZFP1* transgenic *Arabidopsis* lines to drought stress. Comparison of the morphology of wild type and *CAZFP1* transgenic lines without watering for 12 days. (D). Chlorophyll content in the leaf tissues of wild type plants and *CAZFP1* transgenic lines after drought treatment for 12 days. Data are the means \pm standard deviations from three independent experiments.

바. *CADC1.2* 유전자의 특성 분석

1) 염기서열 분석

CADC1.2 유전자는 834 개의 염기 길이를 가지고 있는 cDNA였으며, 5'-UTR는 54 개, 3'-UTR은 174개의 염기 서열을 가지고 있었다. 이의 염기 서열을 근거로 추정된 코딩 영역은 200 개의 아미노산을 구성하였다(Fig. 1-30). 이 단백질의 예상되는 분자량은 21.39 kDa, pI는 6.51로 추정되었다. 이 단백질에는 156개의 아미노산이 잘 보존된 pectin methyl esterase inhibitor (PMEI) 도메인을 형성하고 있었다 (Fig. 1-31). 4개의 cystein 잔기는 이황화 결합의 형성에 관계되리라 생각되었다. *CADC1.2*는 *Nicotiana tabacum*의 DC1.2 단백질 (accession number BAA95794)와 80% 상동성을 가졌으며, *Arabidopsis thaliana*의 ripening-related 단백질 (accession number BAA97200)와는 50%, *Pinus radiata*의 pectinesterase homologue (accession number T08112)와는 36%, *Arabidopsis thaliana* invertase homologue (accession number NP_201267)와는 24%의 상동성을 가졌다. 담배의 DC1.2 homologue은 상처에 대하여 초기에 반응하는 유전자로 알려졌다 (Hara et al., 2000). 그러나 병감염을 비롯한 스트레스 반응에서 더 이상의 이들 유전자의 특성 분석이 이루어지지 않고 있는 상황이다.

2) 병감염에서 *CADC1.2* 유전자의 발현

세균 감염에 의해 유도되는 *CADC1.2* 유전자의 mRNA 축적은 각각 친화적, 불친화적 반응에서 차별적으로 나타났다 (Fig. 1-32). *CADC1.2*의 유전자는 virulent 균주와 avirulent 균주의 접종으로 30분 내에 빠르게 발현되었다. 친화적 반응에서 접종 2 시간 후 유전자 발현이 증가하며, 높은 수준의 유전자 발현이 접종 후 18 시간까지 지속되고, 24 시간에 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 불친화적 반응에서 접종 후 1 시간부터 발현되기 시작하여 2-6시간 되어 그 발현 양이 최고로 증가한다. 이 발현은 접종 후 12 시간에 차츰 줄어들어 18-24 시간이 되면 그 발현양은 급격하게 감소하였다. 일반적으로 식물-병원균 상호 작용에서 병방어 관련 유전자의 발현이 친화적 반응에서보다 불친화적 상호 반응에서 더 빠르고 높게 나타나는데, *CADC1.2* 유전자의 발현은 친화적 반응에서 더 강하게 지속적으로 나타난다. 또한 일반적인 병방어관련유전자의 발현이 친화적 불친화적 반응에서 각기 12 시간과 18 시간이후에 나타나는 반면 *CADC1.2* 유전자의 발현은 이보다 빠르게 나타나는 초기 발현 유전자 (early responsive gene)임이 밝혀졌다. 이는 식물병방어반응의 신호 전달체계에서 *CADC1.2* 유전자가 *CABPRI*과 같은 일반적인 pathogenesis-related 유전자보다 상위에서 관여할 가능성이 있음을 시사하는 것이다.

세균 감염에 의해 유도되는 *CADCI.2*의 발현이 접종 부위뿐만 아니라 주위의 비 접종 부위에서도 관찰되었다 (Fig. 1-33). 접종 후 3, 18, 30 시간에 조사된 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*와의 친화적 반응과 불친화적 반응에서 접종 부위 뿐만 아니라 접종되지 않은 상위 잎에서도 거의 동일한 시간대에 *CADCI.2* 유전자가 발현되었다. 병원성이 없는 *Pseudomonas fluoresces* 및 *E. coli*를 고추 잎에 infiltration 접종했을 경우 *X. campestris* pv. *vesicatoria*에 의한 친화적, 불친화적 반응에서와 같은 *CADCI.2* 유전자의 전신적 발현을 관찰 할 수 있었다. *CADCI.2* 유전자는 고추 식물에서 전신적 획득저항성(systemic acquired resistance)에 연관되어 있음을 알 수 있었다.

3) 화학적 elicitor 처리 의한 *CADCI.2* 유전자의 발현

salicylic acid, ethylene, methyl jasmonate를 처리했을 때 *CADCI.2*의 발현이 유도되었다 (Fig. 1-34). 세 가지 종류의 비생물적인 elicitor의 처리에 의해서 1시간 만에 *CADCI.2* 발현이 유도되었으며, 이의 발현은 6-18 시간에 가장 강하였고, 24 시간이 되면 약간 줄어드는 경향을 나타내었다.

4) *CADCI.2* 유전자의 조직학적 *in situ* 발현

병원균의 감염과 에틸렌 처리에 의한 *CADCI.2* 유전자의 발현을 세포학적으로 관찰하기 위해 *in situ* hybridization을 수행하였다 (Fig. 1-35). 건전한 잎 조직에서는 어떠한 transcripts의 축적도 발견 되지 않았다. 그러나 *Colletotrichum coccodes* 감염 및 에틸렌의 처리에 의하여 *CADCI.2* 유전자는 잎 조직의 phloem 세포에 주로 발현됨을 관찰하였다. 줄기 조직에서는 어떠한 접종 및 처리를 하지 않은 건전한 상태에서 *CADCI.2* 유전자의 발현이 phloem 세포에서 관찰되었다.

위의 결과를 볼 때 병방어유전자의 발현과 mRNA 축적에 있어 식물조직의 vascular bundle이 매우 중요한 부위임을 알 수 있었으며 병 방어 과정의 더 진전된 연구를 위해 이 부위에서 나타나는 방어 반응에 집중할 필요가 있다는 것을 발견하였다.

5) *CADCI.2* 유전자의 프로모터 분리 및 분석

CADCI.2 유전자의 프로모터 부위에 transcription factor가 결합할 수 있는 다양한 element들이 958 개의 염기 서열 내에 발견되었다 (Fig. 1-36). W-box (TTGAC)는 salicylic acid에 의해 유도되는 transcription factor인 WRKY transcription factor가 결합하는 부위이며, MYB core (CNGTTR)은 *Arabidopsis*의 ATMYB1과 ATMYB2이 결합하는 위치이다. ATMYB2는 water stress에 반응하여 조절되는 유전자로 알려져 있다.

MYBST1 (GGATA)는 감자의 MYB homologue의 결합 위치이며, MYB plant(MACCWAMC)는 phenylpropanoid 생합성 유전자의 결합위치이다. RAV1 element(CAACA)는 *Arabidopsis*의 DNA 결합 단백질인 RAV1의 결합위치로 생각된다.

GCACGAGGAAAGAATTCATTTTTTTTTAAAGAAAGGCTCAGCGAAATTAAGAAG ATGGAA	60
	M E
GGTGGCAATTTTCTCACAGTTTGTCTTATTTTAGTTGCCTTGACTACTTCTAATTATTTG	120
G G N F L T V C L I L V A L T T S N Y L	22
AAATCAGTTTCAGCGGCAAGGCCAGCTGTGGGGGAAACAAATACGGAGTTTATAAGAACA	180
K S V S A A R P A V G E T N T E F I R T	42
TCTTGTAAAGTCAACAACCTTATCCTAECTTATGTTTCAGCTCATTATCAAGCCGTGCAAGT	240
S C K S T T Y P N L C F S S L S S R A S	62
GCTATTGGAGCTTCCCCACAACCTTAGCAGCATGAATCCCTCACCGTTAGCCTCGAAACA	300
A I G A S P Q L L A H E S L T V S L E T	82
GCTCAATCAACATCCTCTATGATGTTGAAGTTGGCACACGGTCAAGGCATGACGCCGAGA	360
A Q S T S S M M L K L A H G Q G M T P R	102
GAGATCGGCGCCATGCATGACTGTGTGGAGGAACCTAAGTGACACAGTCGTTGGACTGAGG	420
E I G A M H D C V E E L S D T V V G L R	122
AAGTCTTTGGGGGAAATGAAGCAACTAAGGGGCAAAGATTTTGATTTGAAAATGAATGAT	480
K S L G E M K Q L R G K D F D L K M N D	142
ATTCAAACATGGGTAAGTGCTGCCTTGACGGACGAGGATACATGCACTGAGGGGTTTGAT	540
I Q T W V S A A L T D E D T C T E G F D	162
GGAAAAGTGATGAACGGGAAAGTCAAGACAGTTGTTAGGGGAAAGATTCTTGAAGTTGCA	600
G K V M N G K V K T V V R G K I L E V A	182
CATTTGACGAGCAATGCTTTGGCTTTGATCAACCGTCTGGCTGCCCTTCACGGC TAAAGT	660
H L T S N A L A L I N R L A A L H G *	200
ACTCAAAGGACAATTAGTTGTATACTGTTTGGTGTGTTAATCTTCTTTTAGAAAAAGTG	720
TACTTAATTCATGCTTAGTTGATTGCTGTAATAGATATAATACCTTTTGTGATGAATTC	780
TTGAATGAAAATGTTCCATATGCATTTGTTAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	834

Fig. 1–30. Nucleotide and deduced amino acid sequences of pepper *CAD1.2* cDNA. The deduced amino acid sequence is given below the nucleotide sequence. The translation start site is shown in bold type and termination codon is marked by an asterisk (*).

CADC1.2	MEG-----GNFLTVCLILVALTTSNYLKSVSAAARPAVGH	TNTE	38
BAA95794	MEGTCN--NRSHFQTIIFLILVVFTSSSFTEVSAAARPVAGI	TNTE	43
BAA97200	MGESFRLFNHHHFLTTFLIIIAMLK---LVHTTTTTTTTTT	TNTE	42
T08112	MDSR-----PATVLVIIVSAIMASATAKDVNPQHSGI	SIAE	36
NP201267	MASSL-----IFLLLVTLTFS-----STLISAKS	NTT	29
	* * Pectin methylesterase inhibitor domain		
CADC1.2	FIRTSCKSTTYPNLCFSSLSSRASAIGASPQLLAHESLTVS	LETA	83
BAA95794	FIRTSCKSTTYPNLCFSSLSSRATAIGVSPQLLAHESLTVS	LETA	88
BAA97200	FVKSSCTFTTYPRLCFSSLSTHASLIQTSPKLMHAALNIT	LASA	87
T08112	FIKSSCTFTTYPRLCVSSLSPYAGSLKPTLCDLVKAAMNVS	LVNA	81
NP201267	IIESTCKTTNYKFCVSALKSDPRSPTADTKGLASIMVGV	GMTNA	74
	*		
CADC1.2	QSTSSMML-KI-AHGQGMTPREIGAMHDCVEELS	SDTVVGLRKS LG	126
BAA95794	QSTSVTMV-EL-AHGQGMTPREIGAMHDCVEELS	SDTVVGLRKS LG	131
BAA97200	KVTSAMMV-RL-SNSR-LKPKEVSAMRDCVEELSDAV	VELRKS LG	129
T08112	RTVSVWAA-GLKGRSAEMSERERAALNDCIQNFDDT	VDEIQKSLK	125
NP201267	TSTANYIAGNLSATVKDTVLKKV--LODCSEKYALA	ADSLRLTIO	117
	*		
CADC1.2	EMKQLRGKDFDLKMNDIQTWVSAALTDEDTC	TEGFDG-KVMNGKV	170
BAA95794	EMKQLRGKDFDLKMSDIQTWVSAALTDEDTC	TEGFAG-KVMNGKV	175
BAA97200	EMCQLSGSNYEVYISDIQTWVSAALTDVNTCT	DGFEG-EDMDGKV	173
T08112	ELEQLQRSNENPQMNDMQTFMSAALTDQGSCL	NGFEDVKAAGKI	170
NP201267	DLDD---EAYD--YASMH--VLAAODYPNVC	RNIERRVKGLA--Y	153
CADC1.2	KTVVRGKILEVAHLTSNALALINRLA-----	ALHG	200
BAA95794	KTVVRGRI LDVAHMTSNALALINSLA-----	AFHG	205
BAA97200	KVLVRGRILVIAHLTSNALALINHFA-----	SIHG	203
T08112	SAMVKVRVQNESELI SNALALLNALALNAFANT	GVDDGIHA	211
NP201267	PVEIRRREASLRRICGVVSGILDRLV-----	E	180

Fig. 1–31. Sequence alignment of pepper *CADC1.2* with *Nicotiana tabacum* DC1.2 protein (accession no. BAA95794), *Arabidopsis thaliana* ripening-related protein (accession no. BAA97200), *Pinus radiata*pectinesterase homologue (accession no. T08112) and *Arabidopsis thaliana* invertase homologue (accession no. NP_201267). Amino acid sequence in boxes represents the pectin methylesterase inhibitor (PMEI) domain. Conserved cysteine residues are marked by asterisk (*). Shaded regions are the conserved amino acid residues among DC1.2 proteins.

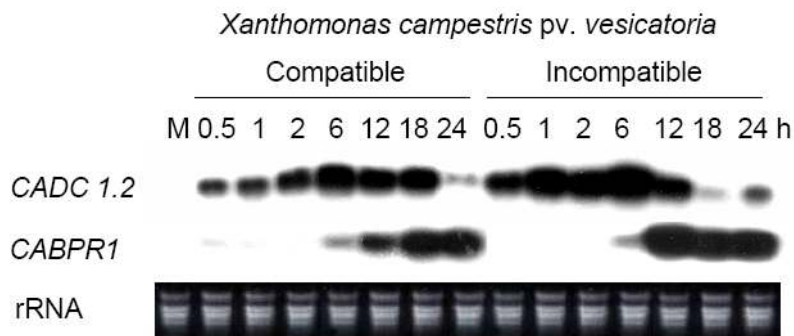


Fig. 1–32. Induction of the *CADC1.2* gene in leaf tissues infected with *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* at the 6-leaf stage of pepper plants during the compatible and incompatible interactions. The rRNA in agarose gels was stained with ethidium bromide to show equal loading of RNA.

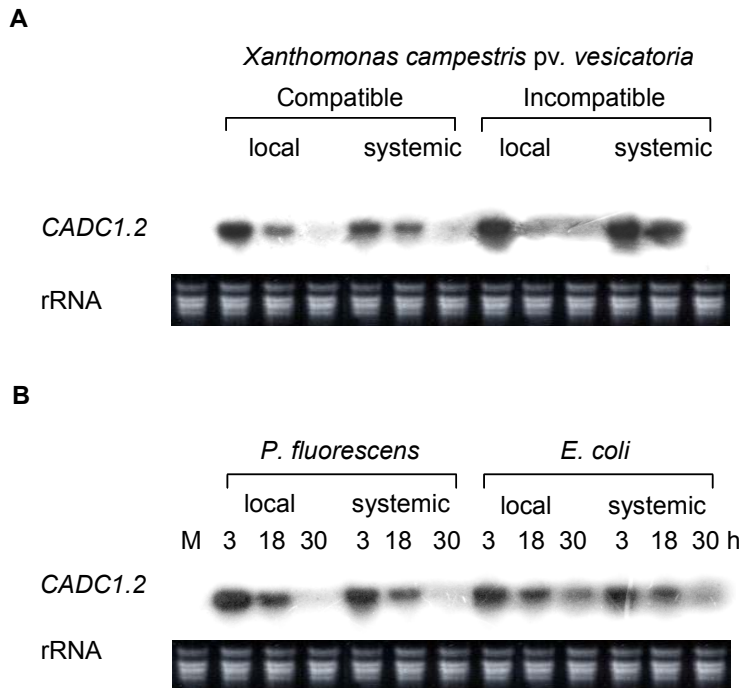


Fig. 1–33. Northern blot analyses of systemic expression of *CADC1.2* gene in infected lower leaves (local) and uninfected upper leaves (systemic) at various time intervals after inoculation with virulent strain Ds1 and avirulent strain Bv5–4a of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (A), *Pseudomonas fluorescens* ATCC13525 and *Escherichia coli* JM109 (B) on the lower leaves of pepper plants at 6–leaf stage. For the mock–inoculation, lower leaves were infiltrated with 10 mM MgSO₄. The membranes were hybridized with probes of 3'UTR region of pepper cDNA clones of *CADC1.2* and of full–length cDNA clones of *CABPRI*. Equal loading (20 μ g) was verified by visualizing RNA on a gel stained with ethidium bromide.

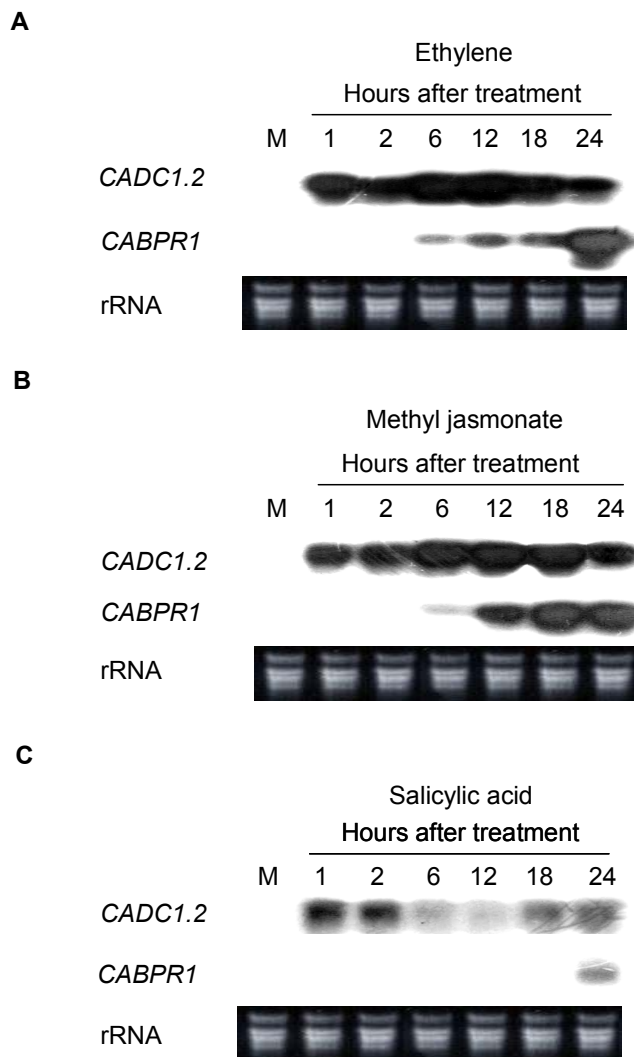


Fig. 1–34. Northern blot analyses of expression of *CADC1.2* and *CABPR1* genes in pepper leaves at various time intervals after treatment with (A) ethylene (5 $\mu\text{L/L}$), (B) methyl jasmonate (100 μM) and (C) salicylic acid (5 mM). The membranes were hybridized with probes of 3' UTR region of pepper cDNA clones of *CADC1.2* and of full-length cDNA clones of *CABPR1*. Equal loading (20 μg) was verified by visualizing RNA on a gel stained with ethidium bromide. M : 24 h after mock-inoculation.

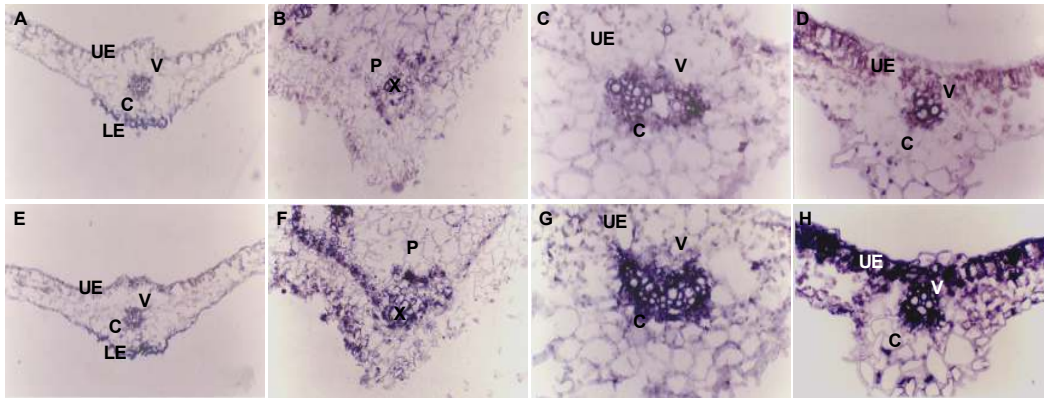


Fig. 1–35. *In situ* localization of *CADCI.2* mRNAs in pepper leaf and stem tissues. Cross sections of pepper organs were hybridized with *CADCI.2* antisense (A, B, C and D) or sense (E, F, G and H) digoxigenin–labeled RNA probes, and photographed under bright–field conditions. The transcript signal is purple. (A and E) Leaf midrib tissues. (B and F) Stem tissues. (C and G) Leaf midrib tissues at 18 h after treatment with ethylene. (D and H) Leaf midrib tissues at 24 h after inoculation with *C. coccodes*. C: collenchyma cell, LE: lower epidermis, P: phloem, UE: upper epidermis, V: vascular bundle and X: xylem. Bars = 100m.

```

-958                                     AAAAA
-954  TCTATCAAAATCACCCAACTTAACCAATTTACCTACAAAGATTATCAAAGACTTTTGGAG
-894  ATACTTTTTCTTAGACTTTTGTTGGTTGCATAAAAAAGTCGCAAGAATGGATGAATTAAGA
      Myb core          RAV1
-834  TTCCGTTGTCTCATGAGGAGATTTTGGGAAGAAGAAAAAATTGAAGTGCCTTCAATT
      W-box
-774  TTGACGTTCTTTATCGATGAAAGTAGAAAGAAATGAGTAATGTGGTAGTTAGATATTTAA
      RAV1          Myb st1
-714  CTCAGTTGTTGTTGAAATTAATAGGATATTTTTGTAAAAATAAAAAAGAGATCATTTA
      Myb core          Myb st1
-654  TAATAATAAATAAAGTTGAAATAATTTGGAATAGGATATTTACAAAAATAATTTGAAATT
      Myb st1
-594  GCATTTGAGATTCGCATGACCAAACACCCTAATTTTATTAAAAATAAATAATTTTTTTA
      Myb plant
-534  TAAAAATAAAATAGTTTTTTATAACCAAACGATCTTTAAGTACTAGGCCTGGTTGAGTCCC
      Myb plant
-474  AACTTTATGAAAATTTATAGCGCTTACATCTCGCTCGTGCTACATAAAACAACGCCTCAT
-414  CTCACGTTTTTGTCTTTTAAAAACTAACTTTAAGCTGAATCTAAAAGTTTAAATAGTTTT
-354  TTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATGAATTTCCGTTTGGATTTGGATTTGCTCAAATTATGCCC
-294  ACCCTACATGCGACCCCACTGGTTCAAAGTGCAAACAAGTGGATAGGCCTTCTCAGCAC
      Myb st1
-234  GCCAGAGGCACATACGAACTAAGGCGAAAACACGACACGGAATAAGATATTACCTAAT
-174  TATTTAATTTGAACTGTATTACAAATCCACCCCGTAGCCCTCATATATATCACCTTGAGA
-114  CGTTTTCCTATAAATTCAGAAATCCTACACCCCAAAATTCAACATCACCCAACATAATTAAC
      TATA box          RAV1
-54  ATATTCAGAAAGAATTCATTTTTTTTTAAAAGAAAGGCTCAGCGAAATTAAGAAGATGGAA
      2                                     M E

```

Fig. 1–36. Nucleotide sequence and putative *cis*-acting elements of the pepper *CADC1.2* gene promoter. The putative *cis*-acting elements are underlined and the names are given above or under the elements.

사. 세포막 위치 단백질을 코딩하는 *CaPIMP1* 유전자의 특성 분석

1) 염기서열 분석

CaPIMP1 유전자는 병 감염에 의해 강하게 발현되어 differential hybridization을 통하여 선발된 유전자이다 (Fig. 1-37). 그러나 GenBank 검색결과 이 유전자와 유사한 염기서열 또는 아미노산 서열을 가지는 다른 식물 유전자는 단지 *Arabidopsis*에서만 밝혀져 있었다. 이들 유전자 또한 코딩하는 단백질의 기능을 알 수 없는 것들이었다. 이 *CaPIMP1* 유전자는 166 개의 아미노산으로, 예상되는 분자량이 약 18 kDa 정도의 염기성 polypeptide를 구성하리라 생각되었다. 특히 아미노산 서열에 존재하는 transmembrane domain은 이 단백질이 세포막에 존재하는 막 단백질을 코딩할 것임을 보여주었다.

다양한 종류의 식물 세포막 단백질이 알려져 있다. 특히 외부의 염류 스트레스에 대한 식물 세포의 이온 항상성 (cellular ion homeostasis)를 유지하기 위한 transport 단백질의 역할을 하여 스트레스에 적응 또는 저항하는 것으로 알려져 있다. 각 종 이온의 선택적인 이동을 조절하고, 특히 독성 이온이 세포질에 유입되어 세포 소기관들에 작용하는 것을 억제한다. 액포의 Na^+/H^+ antiporter와 H^+ -pyrophosphatase pump를 식물에 overexpression 시키면 염류 및 건조 스트레스에 내성을 증가시킬 수 있다 (Gaxiola et al., 2001; Zhang and Blumwald, 2001). 벼의 heterotrimeric G protein 신호전달체계에 서도 세포막은 주요한 반응이 일어나는 위치이다. $G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$ 의 세 가지 형태의 G protein들이 heterotrimer를 형성하여 복합체의 형태로 세포막에 존재한다 (Kato et al., 2004). Heterotrimeric G protein로부터 세포막에 존재하는 NADPH oxidase로의 신호전달은 벼에서의 병저항성의 발현과 과민성 세포 사멸 반응에 연관이 있다 (Suharsono et al., 2002). 토마토 *Cf-9*과 같은 *Cladosporium fulvum* 곰팡이 병저항성 유전자는 유전자의 구조에 transmembrane domain을 가지고 있으며, 실제로 heteromultimeric membrane-associated 복합체에 존재한다 (Rivas et al., 2000). 세포막에 존재하리라 생각되는 고추 *CaPIMP1* 단백질이 병방어 반응에 어떠한 역할을 하는지 규명하는 것은 매우 중요하다고 생각되었다.

2) *CaPIMP1* 단백질의 세포내 위치

CaPIMP1 유전자에 의해 코딩되는 단백질이 세포막으로 이동하는지 알아보기 위하여, *CaPIMP1* 유전자의 코딩 영역의 말단에 녹색형광단백질(Green fluorescent protein, GFP)을 코딩하는 유전자를 융합시켜 vector를 제조하였다. 그리고 이 construct를 이용

히여 양파의 표피 세포에 bombardment를 이용하여 일시적인 유전자 발현을 유도 하였다. GFP 만을 양파 세포에 발현시키면 세포질을 비롯한 모든 세포에 녹색 형광단백질이 관찰 되었으나, CaPIMP1-GFP 융합 단백질은 세포막에서만 관찰 할 수 있었다 (Fig. 1-38).

3) 병감염에서 *CaPIMP1* 유전자의 발현

그 기능을 알지 못하는 *CaPIMP1* 유전자가 세균성 점무늬병 감염에 의해 빠르고 강하게 발현되었다 (Fig. 1-39). *CaPIMP1* 유전자 또한 지금까지 알려진 고추 병방어관련 유전자들의 발현에서처럼 친화적 반응에서 보다 불친화적 반응에서 빠르고 강하게 발현 되었다. 10 mM MgCl₂만을 고추 잎에 infiltratoin 한 경우는 발현이 유도되지 않았다. 친화적 반응에서 접종 후 2 시간에 발현되고 18 시간까지 그 발현 양이 유지되다가 24 시간이 되면 그 발현양이 약간 감소하였다. 불친화적 반응에서 *CaPIMP1* 유전자의 mRNA는 접종 후 1 시간에 처음으로 관찰되고, 2-6 시간에 발현이 증가 하였으며, 12-18 시간에 이르러 최대로 강한 발현을 나타내었다. 불친화적인 균주 접종 24 시간 후에는 18 시간보다 그 발현양이 약간 감소하였으나, 친화적 반응에서의 발현보다는 강하게 나타났다. 이 *CaPIMP1* 유전자의 발현을 염기성 PR-1 단백질을 코딩하는 기존 병방어관련 유전자인 *CABPR1*의 mRNA 발현 양상과 비교하였다. 친화적, 불친화적 반응에서 모두 *CABPR1* 유전자의 발현보다 *CaPIMP1* 유전자의 발현이 4-5 시간 정도 앞서는 것을 발견하였다. 이는 병감염에 대한 방어 반응의 신호 전달체계에서 *CaPIMP1* 유전자가 *CABPR1* 유전자보다 상위에서 관여할 가능성이 있음을 시사하는 것이다.

4) 화학적 elicitor 처리 의한 *CaPIMP1* 유전자의 발현

CaPIMP1 유전자는 식물병방어에 관여한다고 알려진 화학적인 elicitor의 처리에 의해 유도 발현되었다 (Fig. 1-40). Ethylene의 처리에 반응하여 2 시간에 약하게 발현, 6 시간에 발현이 증가하다가 그 이후에는 감소경향을 보였다. Methyl jasmonate와 abscisic acid에 의해서도 단지 6 시간을 전후하여 약하게 발현되었다. β -aminobutyric acid의 처리로 처리 1 시간에 발현이 관찰되었으며, 2-6 시간에 걸쳐 그 발현이 증가되다 12 시간 이후로 발현이 줄어들어 18 시간 이후는 발현이 관찰 되지 않았다.

5) 환경 스트레스에 의한 *CaPIMP1* 유전자의 발현

CaPIMP1 유전자의 발현을 상처와 저온에 대해 조사하였다. 고추 잎에 바늘로 상처를 준 후 30 분 안에 유전자의 발현이 나타났고 1시간 후 그 발현이 약간 줄어든 후 24

시간까지 약한 수준의 mRNA 축적을 나타내었다 (Fig. 1-40). 이에 반해 4 °C의 저온 처리에 의해서는 *CaPIMP1*의 발현이 상처에 의한 유전자 발현보다 매우 늦게 나타나 24 시간후에 관찰되었다. 상처 후의 빠른 반응과 대조를 이루었다.

6) 유전자의 프로모터 분리 및 분석

고추 genomic DNA로부터 *CaPIMP1* 유전자의 시작 코돈 ATG로부터 upstream 부위로 1193 염기를 증폭하여 획득하였다 (Fig. 1-41A). PLACE website 를 통하여 이 부위에 스트레스 반응, 호르몬 반응 및 일반적인 metabolism에 관여한다고 알려진 수많은 *cis*-acting elements가 존재하고 있음을 확인하였다 (Higo et al., 1999). *CaPIMP1* 프로모터 부위의 5' 부분을 차례로 deletion 하여 이 DNA 조각들을 pCAMBIA 1381 vector 에 삽입하여 GUS reporter 유전자의 앞쪽에 위치하도록 하였다. 이렇게 제작한 (-1193), (-1017), (-793), (-593), (-417)의 5 개의 프로모터 constructs를 가지고 담배 잎에서의 프로모터 활성을 측정하였다.

7) 병원세균 감염 및 화학적 elicitor에 의한 *CaPIMP1* 프로모터의 활성화

CaPIMP1 프로모터는 담배들불병균인 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*의 접종에 의해 활성화되었다 (Fig. 1-41B). (-1193)프로모터는 약 3.14 배의 활성이 증가하였으며, 더 절단한 프로모터 조각인 (-1017)에서 (-417) 프로모터의 경우는 *P. syringae* pv. *tabaci*의 접종에 대해 활성화되지 않았다. (-1193)과 (-1017)부위에 담배들불병균에 반응하는 최소한의 활성화 영역이 존재하는 것 같다.

CaPIMP1 프로모터는 병원균의 감염 뿐 만 아니라 abscisic acid, nitric oxide, ethylene, methyl jasmonate 등의 식물방어신호물질(plant defense signal molecules)의 외부적인 처리에 의해서도 반응하여 활성화 되었다 (Fig. 1-41C).

8) *CaPIMP1* 유전자를 이용한 형질전환 *Arabidopsis*의 제조

Pepper CaPIMP1	MT PP FTTT VPP Y SI IVRI LT L IC LL IS E IV IATNNQTVS	40
Arabidopsis (BAD93967)	M AP PP PS -- PP AVSLK V LLLL LR V LT GV EL V IA L I ILSTN	38
Arabidopsis (NP_181485)	M AP PP PA -- PP SV TL RT V LLLL LR V LT AA EL L IT V V L IS TN	38
Arabidopsis (T00563)	M AP PP PA -- PP SV TL RT V LLLL LR V LT AA EL L IT V V L IS TN	38
Pepper CaPIMP1	TVAGD----- V K IK E K D F Y A Y R Y L IAT V I G M A Y T L L Q IA	75
Arabidopsis (BAD93967)	SV T IV S Q G S AL K F H E K V Y A Y R Y M L S A AV I G L V Y AV I Q L F	78
Arabidopsis (NP_181485)	TV T L E I S S T S I K L P E N D V Y A Y R Y M L S A A V I G L V Y AV V Q L F	78
Arabidopsis (T00563)	TV T L E I S S T S I K L P E N D V Y A Y R Y M L S A A V I G L V Y AV V Q L F	78
Pepper CaPIMP1	F S I S LL T G N R I G G E G F L L E D F Y G D K - F I S Y F L V T G A A A S	114
Arabidopsis (BAD93967)	F T I S E F A T G V K N P F N Y Q L -- D F Y G D K L - I S Y L V A T G S A A G	115
Arabidopsis (NP_181485)	L T I S Q F A T G K T H P L T Y Q -- F D F Y G D K V - I S Y L L A T G S A A G	115
Arabidopsis (T00563)	L T I S Q F A T G K T H P L T Y Q -- F D F Y G D K V E I S - F L R K Y Y L --	113
Pepper CaPIMP1	FG M T Q D L K Q L E G S D N Y -- S ----- K F L N T S N A A S L C L I G	147
Arabidopsis (BAD93967)	FG V T K D L K D T F L A L V A L D S T D P V D K F F S K G Y A S A S L L L F A	155
Arabidopsis (NP_181485)	FG V S K D L K D T Y I A L E F D S T D P V D K F F S K G Y A S A S L L L F A	155
Arabidopsis (T00563)	-----	113
Pepper CaPIMP1	FFF-A V A S S I F S S Y N L P K R I ----	166
Arabidopsis (BAD93967)	F I C L A V L-S V F S S F A M A K R N ----	174 (38.04%)
Arabidopsis (NP_181485)	F V S L A V L-S V F S S L A L S K R P V P V S	178 (36.96%)
Arabidopsis (T00563)	-----	113 (22.83%)

Fig. 1–37. Sequence alignment of pepper CaPIMP1 with hypothetical proteins from *Arabidopsis thaliana*. Shaded regions are the conserved amino acid residues among hypothetical proteins.

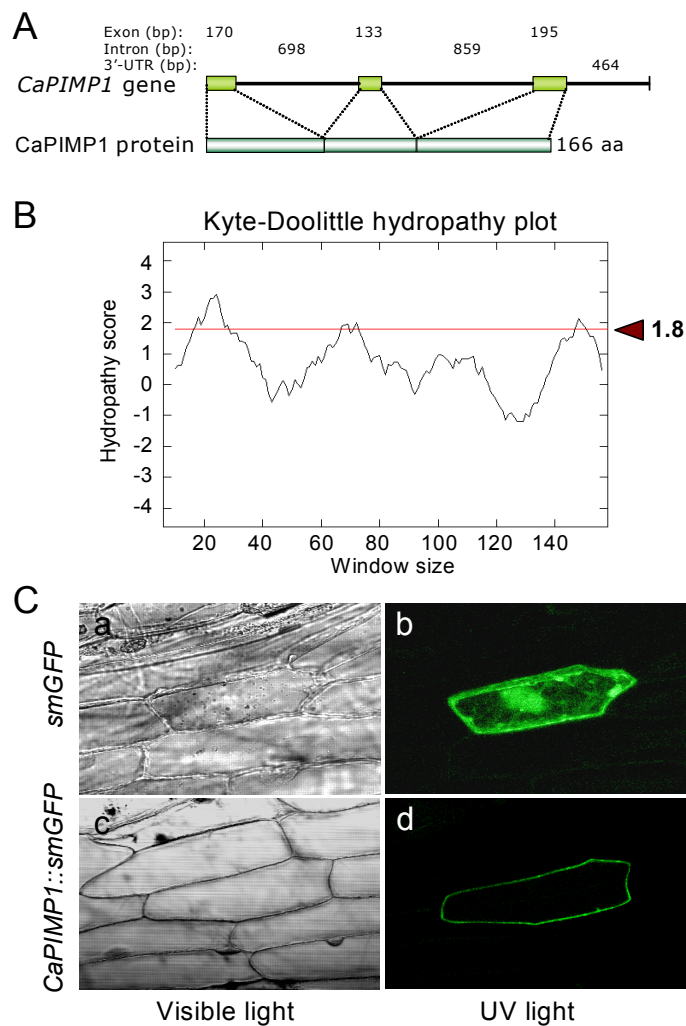


Fig. 1–38. (A) schematic representation of the genomic and deduced amino acid structures of *CaPIMP1* gene from pepper (*Capsicum annuum*). (B) Hydropathy plot of the CaPIMP1 protein. Hydropathy analysis was performed using a window of nineteen amino acids. (C) Subcellular localization of CaPIMP1–GFP in onion epidermal cell. *CaMV35S::smGFP* and *CaMV35S::CaPIMP1–smGFP* fusion constructs were independently introduced in onion epidermal cells with a Biolistic PDS–1000/He particle delivery system (Bio–Rad, Hercules, CA, USA). Expression of GFP proteins was monitored by laser scanning confocal microscopy under bright (a and c) and dark field (b and d).

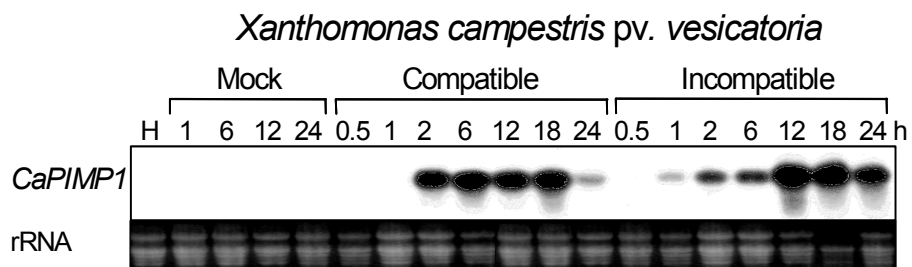


Fig. 1-39. Time course of *CaPIMP1* transcript accumulation in pepper plants by bacterial and fungal pathogen infections. Induction of the *CaPIMP1* gene in leaf tissues infected with *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* at the 6-leaf stage of pepper plants during the compatible and incompatible interactions. The rRNA in agarose gels was stained with ethidium bromide to show equal loading of RNA.

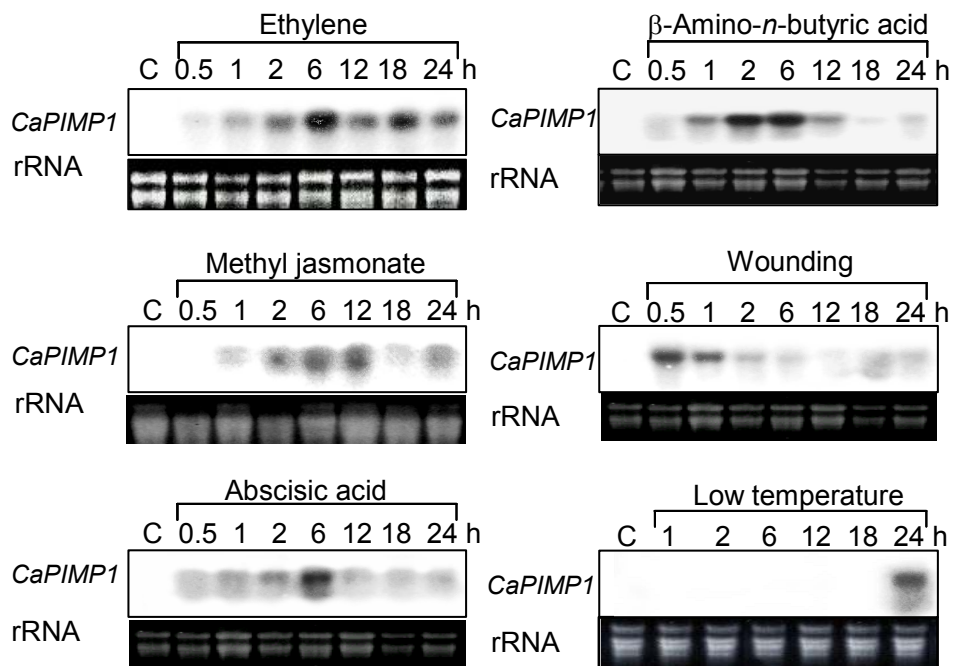
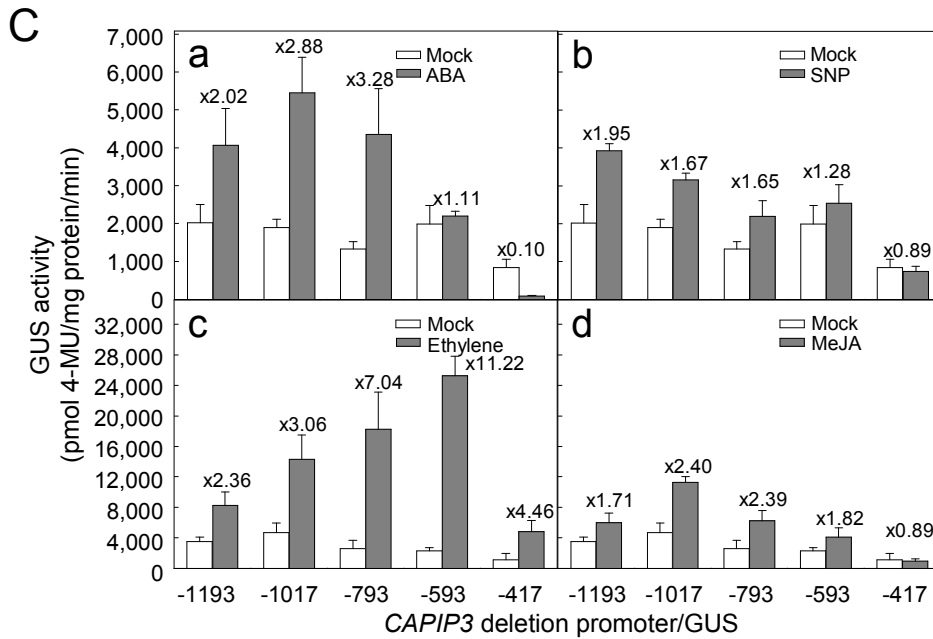
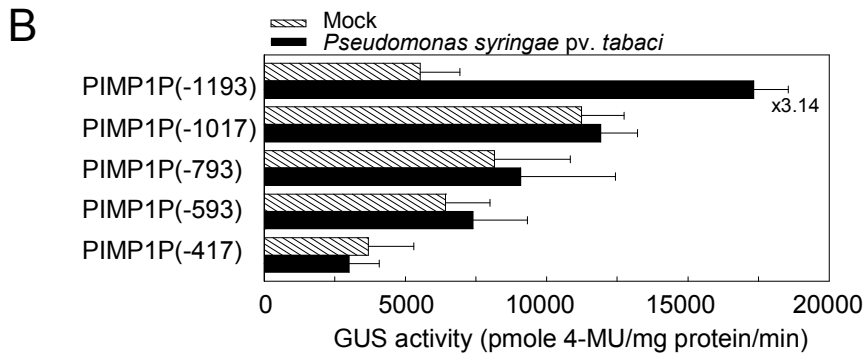
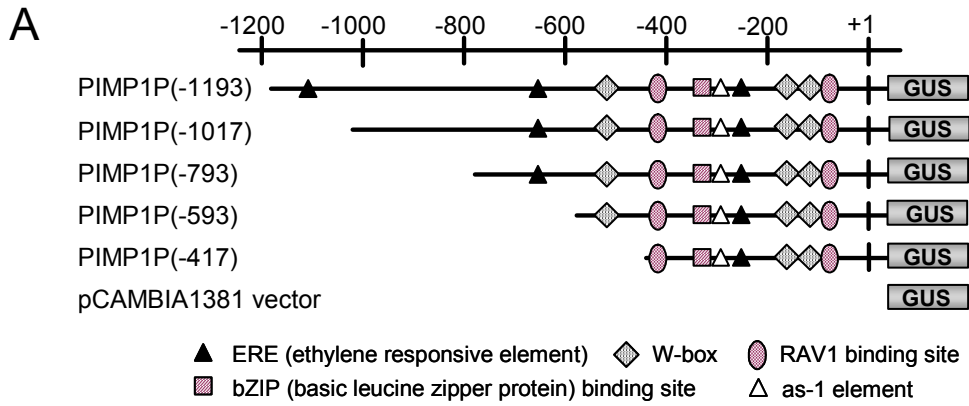


Fig. 1–40. Northern blot analyses of expression of *CaPIMP1* gene in pepper leaves at various time intervals after treatment with ethylene (5 μ L), methyl jasmonate (100 μ M), abscisic acid (100 μ M), β -amino-*n*-butyric acid, wounding and low temperature. The membranes were hybridized with probes of 3' UTR region of pepper cDNA clones of *CaPIMP1*. Equal loading (20 μ g) was verified by visualizing RNA on a gel stained with ethidium bromide. M : 24 h after mock-inoculation.

Fig. 1–41. GUS activity driven by *CaPIMP1* promoter constructs for assaying GUS (β -glucuronidase) reporter gene expression in tobacco leaves. The serially 5'-deleted promoter constructs of the *CaPIMP1* gene were fused to the GUS reporter gene in pCAMBIA1381 vector. (b) *CaPIMP1* promoter activation in response to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* infection in tobacco leaf tissues transiently transformed with the 5'-*CaPIMP1* promoter deletion-GUS chimeric constructs. Tobacco leaves were infiltrated with either bacterial suspension of *P. syringae* pv. *tabaci* (2×10^8 cfu/ml 10 mM $MgCl_2$) or with 10 mM $MgCl_2$ as a mock inoculation. The number at the right side of the bar indicates the fold increases in induction of GUS activity after chemical treatment versus mock treatment. (c) *CaPIMP1* promoter activation in response to abscisic acid (ABA), sodium nitroprusside (SNP), ethylene, and methyl jasmonate (MeJA) treated to the tobacco leaf tissues transiently transformed with 5'-*CaPIMP1* promoter deletions-GUS chimeric constructs. The numbers over the bars indicate the fold increases in induction of GUS activity after chemical treatment versus mock treatment. The GUS activity, which was analyzed fluorometrically, is expressed as pmoles 4-methylumbelliferone (MU)/mg protein/min. Data are means \pm standard deviations from independent assays of extracts from tobacco leaf tissues.



아. *CABPR1* 유전자의 특성 분석

PR-1 유전자 또는 단백질의 유도 발현은 세균, 난균, 진균의 감염에 대하여 다양한 종의 단자엽과 쌍자엽 식물에서 발견되어 왔다 (Hoegen et al., 2002). PR-1의 발현은 자외선 조사와 같은 환경 스트레스에 의해서도 높은 수준으로 유도됨이 관찰 되었다 (Yalpani et al., 1994). 이러한 생물적, 비생물적 스트레스에 대한 강한 발현에도 PR-1 유전자의 생물학적 기능은 아직까지 완전히 밝혀지지 않았다.

1) *CABPR1* 유전자의 프로모터 분리

고추 genomic DNA로부터 *CABPR1* 유전자의 시작 코돈 ATG로부터 upstream 부위로 2562 염기를 증폭하여 획득하였다 (Fig. 1-42). PLACE website 를 통하여 이 부위에 스트레스 반응, 호르몬 반응 및 일반적인 metabolism에 관여한다고 알려진 수많은 cis-acting elements가 존재하고 있음을 확인하였다 (Higo et al., 1999). *CABPR1* 프로모터 부위의 5' 부분을 차례로 deletion 하여 이 DNA 조각들을 pBI101 vector에 삽입하여 GUS reporter 유전자의 앞쪽에 위치하도록 하였다. 이렇게 제작한 (-2162), (-1670), (-1157), (-603), (-369)의 5 개의 프로모터 constructs를 가지고 담배 잎에서의 프로모터 활성을 측정하였다 (Fig. 1-43).

2) 병원세균 감염에 의한 *CABPR1* 프로모터의 활성화

CABPR1 프로모터는 담배들불병균인 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*의 접종에 의해 활성화되었다(Fig. 1-44). (-2162)프로모터는 약 1.7 배의 활성이 증가하였으며, 더 절단한 프로모터 조각인 (-1670)의 경우는 오히려 그 활성이 5.8 배가량 증가하였다. 이는 (-2162)와 (-1670)프로모터 사이의 부위에 이 유전자의 활성을 억제하는 negative regulator와 상호 작용하는 영역이 있는 것으로 생각되어 지며, 이 부위를 제외한 (-1670)부위의 사용으로 더욱 효과적인 프로모터의 개발을 이룰 수 있을 것으로 생각되었다. (-1157)까지 더 잘라낸 경우 프로모터 활성은 1.5 배 정도로 감소하였으며, 그 이후의 더 짧은 프로모터 조각은 *P. syringae* pv. *tabaci*의 접종에 대해 활성화되지 않았다. (-1157)과 (-603)부위에 담배들불병균에 반응하는 최소한의 활성화 영역이 존재하는 것 같다. 가장 높은 프로모터 활성을 보였던 (-1670) 프로모터에 대하여 이 *CABPR1* 유전자 프로모터가 국부적 또는 전신적으로 활성화됨을 확인하였다. *CABPR1* 유전자의 발현은 고추 식물에서 세균성점무늬병균 (*X. campestris* pv. *vesicatoria*)와의 불친화적 반응에 특이적으로 전신획득저항성(systemic acquired resistance, SAR)과 연관하여 발

현되었다. 이 (-1670) 프로모터 부위가 담배와 들불병균 간의 친화적 반응에서 전신적으로 반응한 것으로 보아 SAR에 관여되는 부분 또한 (-2162)와 (-1670)사이에 있음을 생각할 수 있다.

3) 식물방어신호물질에 의한 *CABPRI* 프로모터의 활성화

CABPRI 프로모터는 병원균의 감염 뿐 만 아니라 식물방어신호물질(plant defense signal molecules)의 외부적인 처리에 의해서도 반응하여 활성화 되었다 (Fig. 1-45). *CABPRI* 프로모터가 에틸렌 처리에 의해 반응하는 것을 24 시간에 관찰하였다. 에틸렌의 처리에 의해 *CABPRI* (-2162) 프로모터는 강하게 활성화되어 약 3.7 배의 증가를 보였다. 5'-deletion에 의해 (-1670)프로모터 부위는 에틸렌에 대한 반응성이 줄어들었다. (-1157) 프로모터는 에틸렌 처리에 의해 오히려 발현이 억제되는 현상을 나타내었고, (-603)과 (-369) 프로모터에서는 다시 에틸렌 반응성이 회복되었다. 일반적으로 병방어 관련유전자의 에틸렌 반응하여 발현하는 것은 이들 유전자의 프로모터 부위에 존재하는 GCC-box의 존재에 기인하는 것으로 알려졌다 (Hao et al., 2002). *CABPRI* 프로모터에는 두개의 GCC-box가 발견된다. 처음 (-369) 프로모터에 존재하는 한 개의 GCC-box로 인해 에틸렌 반응이 나타난 것으로 보인다. (-603) 프로모터에는 여전히 한 개의 GCC-box가 존재하지만 에틸렌에 의한 활성이 증가된 것으로 보아, 또 다른 에틸렌 반응을 할 수 있는 *cis*-acting elements나 기존의 (-369) 프로모터에 있었던 GCC-box의 활성을 강화시킬 수 있는 다른 영역을 생각해 볼 수 있다. 두 번째 GCC-box의 출현으로 *CABPRI* 프로모터의 에틸렌 반응성을 역전되는데 이는 GCC-box의 성격 때문으로 생각된다. 일반적으로 GCC-box에는 에틸렌에 의해 반응하는 transcription factor인 ERF들이 결합하게 되는데, 어떠한 종류의 ERF는 프로모터 부위에 결합하여 에틸렌에 의한 유전자의 발현을 활성화시키기도 하지만 또 다른 종류의 ERF는 에틸렌에 반응하여 유전자의 발현을 억제하는 것으로 보고되어 있다 (Fujimoto et al., 2000; Ohta et al., 2000; Onate-Sanchez and Singh, 2002). 아마도 *CABPRI* 프로모터의 GCC-box 중 (-369) 부위에 있는 것에는 positive regulator ERF가, (-603)와 (-1157)사이의 GCC-box에는 negative regulator ERF가 결합하리라고 생각된다. (-1670) 프로모터의 에틸렌에 의한 활성은 아마도 또 다른 에틸렌 반응 elements의 존재를 시사해주었다. *CABPRI* 프로모터는 SA처리에 의해서도 반응하여 활성화되었다. 고추 식물에서 *CABPRI* 유전자의 발현이 매우 약하여 처리 후 20 시간 이후에나 발현이 관찰된다. 이는 일반적인 다른 식물에서의 acidic PR-1 유전자의 경우 SA에 의해 빠르고 강하게 발현되는 것과 대

조적인 현상이었다. 담배 잎에서 수행한 *CABPRI*의 프로모터 분석을 통하여서도 SA 처리 후 24 시간에는 거의 프로모터 활성을 특정할 수 없었다. SA 처리 후 48 시간에 (-369) 프로모터를 제외한 *CABPRI* 유전자의 각 프로모터 construct들이 SA에 의해 활성화됨을 확인할 수 있었다. *CABPRI* 프로모터가 nitric oxide에 의해서 활성화 됨을 관찰 하였다. Nitric oxide는 고도의 활성 free radical의 일종으로 생물적, 비생물적 스트레스에 대한 식물의 방어 반응에 주요 신호 전달 물질로 알려졌다 (Delledone et al., 1998; Mata et al., 2001). (-2162) 프로모터는 nitric oxide의 releasing 화합물인 sodium nitroprusside (SNP) 처리에 의하여 2.7 배 활성이 증가되었으며, (-1670) 프로모터는 (-2162) 두 배 이상 더욱 증가하여 5.8 배의 증가를 보였다. 이후의 작은 프로모터 construct에서는 SNP에 의해 반응하지 않았다. SNP에 의해 반응하는 *CABPRI* 유전자의 프로모터 부위는 에틸렌이나 SA에 의해 반응하는 부위보다 넓지 않으나 매우 특이적으로 높은 수준의 *CABPRI* 유전자의 활성을 유도하였다.

4) 환경 스트레스에 의한 *CABPRI* 프로모터의 활성화

CABPRI 유전자의 발현이 고추 식물에서 고염류 및 저온에 의해서 유도되었으며, 실제로 *CABPRI*의 프로모터 부위에 LTRE (low-temperature responsive element)와 CRT/DRE (drought responsive element) 등 건조, 염류, 저온에 반응하는 유전자의 프로모터에서 주요 역할을 한다고 알려져 있는 *cis*-acting element들이 발견되었다 (Shinozaki et al., 2003). 병원균 및 방어신호전달물질의 처리에 의하여 가장 민감하게 반응하는 (-1670) 프로모터에 대하여 환경적인 스트레스에 의한 활성을 측정하였다(Fig. 1-46). Mannitol 처리에 의한 건조, 고농도의 염화나트륨 처리에 의한 염류 반응, 4 °C에서 처리한 저온 반응 그리고 물질적인 상처에 의한 반응을 조사한 결과, 상처를 제외한 나머지 환경적인 스트레스에 의해서 *CABPRI* (-1670) 프로모터가 1.6-2.5 배의 활성을 보임을 관찰 할 수 있었다.

5) *CABPRI*-형질전환 *Arabidopsis*의 제조

선행 연구 결과에서 고추에서 분리된 유전자 *CABPRI*이 병감염 및 환경 스트레스에 반응하여 고추 식물에서 발현됨을 관찰하였으며, 이 유전자의 프로모터 부위를 분리하여 분석한 결과, 병감염 및 환경 스트레스에 의한 *CABPRI* 유전자의 발현이 프로모터의 활성화로 기인함을 관찰하였다. 이 유전자가 다른 종류의 식물에 도입되어 사용될 분자적인 재료로서의 효과를 검증하기 위해 모델 식물인 *Arabidopsis*에 도입하여 병저항성

및 환경 스트레스 내성을 검정하였다(Fig. 1-47). 선발된 형질전환 식물체로부터 추출한 genomic DNA를 대상으로 PCR을 수행하여 *CABPR1* 유전자가 Arabidopsis의 genome에 정상적으로 삽입되었는지 여부를 조사하였다. 또한 Arabidopsis 식물체에서의 고추 *CABPR1* 유전자의 발현이 Arabidopsis 내에 있는 병방어관련 유전자들의 발현에 영향을 미치는지 알아보기 위해 northern blot 분석을 수행하였다. 네 가지의 독립된 형질전환체 line에서 *AtPR4*, *AtPR5*, *AtPDF1.2* 등의 발현이 스트레스를 주지 않은 건전한 형질전환식물체에서 발현됨을 관찰하였다. *CABPR1* 유전자는 아마도 다른 유전자의 발현에 직·간접적으로 영향을 미치고 있음을 발견하였다.

6) *CABPR1*-형질전환 Arabidopsis의 병저항성

형질전환 식물체의 세균병에 대한 저항성을 검정하기 위해 Arabidopsis Col-0 ecotype에 병원성인 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000을 wild type과 형질전환식물체에 접종하였다(Fig. 1-48). 접종 후 1, 3, 5일의 시간별로 식물 잎 조직 내에서의 세균의 개체수를 측정하였다. 접종 후 병진전이 됨에 따라 wild type에 비해 형질전환식물체에서의 병원성 세균의 개체수는 10-100 배의 감소를 보였다. 접종 7일 후 wild type 식물체가 황화현상이 일어나며 잎이 시들어감에 비해 형질전환식물체는 건전한 상태의 잎을 유지하고 있었다.

7) *CABPR1*-형질전환 Arabidopsis의 고 염류 스트레스 내성

최근의 연구들로 병방어관련 유전자들이 병저항성 뿐 아니라 비생물적인 환경 스트레스에 의해서도 반응하여 발현됨이 다양한 식물체에서 보고되었다. 고추 잎에서의 *CABPR1* 유전자의 발현이 고농도의 NaCl의 처리에 의해서도 유도되었다. 1 분지기의 고추 식물을 포트에서 조심스럽게 뽑아 400 mM NaCl 용액으로 옮겨준 후 잎 조직에서의 유전자 발현을 점검하기 위해 시간별로 잎 조직을 sampling하였다. 염류처리한지 1 시간 내에 이미 *CABPR1* 유전자의 뚜렷한 발현이 나타났으며, 유전자 발현은 꾸준히 증가하다가 12시간 이후 24 시간이 급격히 증가하였다. 이는 *CABPR1* 유전자의 발현이 고추식물의 염류 스트레스의 내성에 관여 할 가능성을 제시하여준 결과였다. 따라서 *CABPR1* 유전자가 기능적으로 염류 스트레스 내성에 관여하고 있는지 알아보기 위하여 *CABPR1* 유전자가 도입된 형질전환 Arabidopsis 식물체를 대상으로 염류 스트레스 내성 실험을 수행하였다(Fig. 1-49). wild type과 형질전환식물체의 종자를 250 mM NaCl 이 포함된 MS 배지에 과중하고 발아율을 측정하였다. 과중 후 10일이 되어도 wild type

의 종자는 전혀 발아하지 않았다. 이에 반해, 형질전환식물체의 종자들은 과중 3일째부터 발아하기 시작하여 시간이 갈수록 차츰 증가하여 10일째에는 20-35% 정도의 발아율을 나타내었다. 어린 유묘의 염류 스트레스 내성을 검정하였다. 1xMS 배지에서 발아시킨 wild type과 형질전환식물체의 유묘를 7일간 키운 후 150 mM NaCl 용액에 옮겨준 후 관찰하였고, 스트레스 내성은 엽록체의 함량으로 표시하였다. 형질전환식물체 line 2와 line 4에서는 전혀 내성을 볼 수가 없었으며, line 10과 line 19는 염에 대하여 약간의 내성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

8) *CABPRI*-형질전환 *Arabidopsis*의 건조 스트레스 내성

*CABPRI*의 발현이 NaCl에 의해서 발현됨을 관찰하고 다른 종류의 osmotic stress인 건조에 대한 유전자 발현을 조사하였다. 고추 잎에서의 *CABPRI* 유전자의 발현이 고농도의 mannitol의 처리에 의해서도 유도되었다. 1 분지기의 고추 식물을 꽃트에서 조심스럽게 뽑아 400 mM mannitol 용액으로 옮겨준 후 잎 조직에서의 유전자 발현을 점검하기 위해 시간별로 잎 조직을 sampling하였다. 염류처리한지 1 시간 내에 이미 *CABPRI* 유전자의 발현이 나타났으며, 유전자 발현은 어느 정도 유지되다가 12시간 이후 24 시간이 급격히 증가하였다. 이는 *CABPRI* 유전자의 발현이 고추식물의 염류 스트레스의 내성 뿐 만 아니라 건조 스트레스 내성에 관여 할 가능성을 제시하여준 결과였다. 따라서 *CABPRI* 유전자가 기능적으로 건조 스트레스 내성에 관여하고 있는지 알아보기 위하여 *CABPRI* 유전자가 도입된 형질전환 *Arabidopsis* 식물체를 대상으로 건조 스트레스 내성 실험을 수행하였다(Fig. 1-50). wild type과 형질전환식물체의 종자를 600 mM mannitol이 포함된 MS 배지에 과중하고 발아율을 측정하였다. 과중 후 10일이 되어도 wild type의 종자는 전혀 발아하지 않았다. 이에 반해, 형질전환식물체의 종자들은 과중 4일째부터 발아하기 시작하여 시간이 갈수록 차츰 증가하여 10일째에는 line 별로 차이가 있으나 30-70% 정도의 발아율을 나타내었다. 어린 유묘의 건조 스트레스 내성을 검정하였으나 wild type과 뚜렷한 차이는 관찰할 수 없었다.

9) *CABPRI*-형질전환 *Arabidopsis*의 abscisic acid에 대한 반응

일반적으로 나타나는 osmotic stress에 대한 내성 반응은 식물체의 호르몬의 일종인 abscisic acid (ABA)의 역할과 밀접한 관계가 있음이 연구되어 왔다 (Finkelstein et al., 2002). 고염류 및 건조에 대하여 나타났던 *CABPRI*-형질전환 식물체의 발아과정동안의 내성이 ABA와 어떤 관계가 있는지 알아보기 위해 ABA 존재 하에서 wild type과 형질

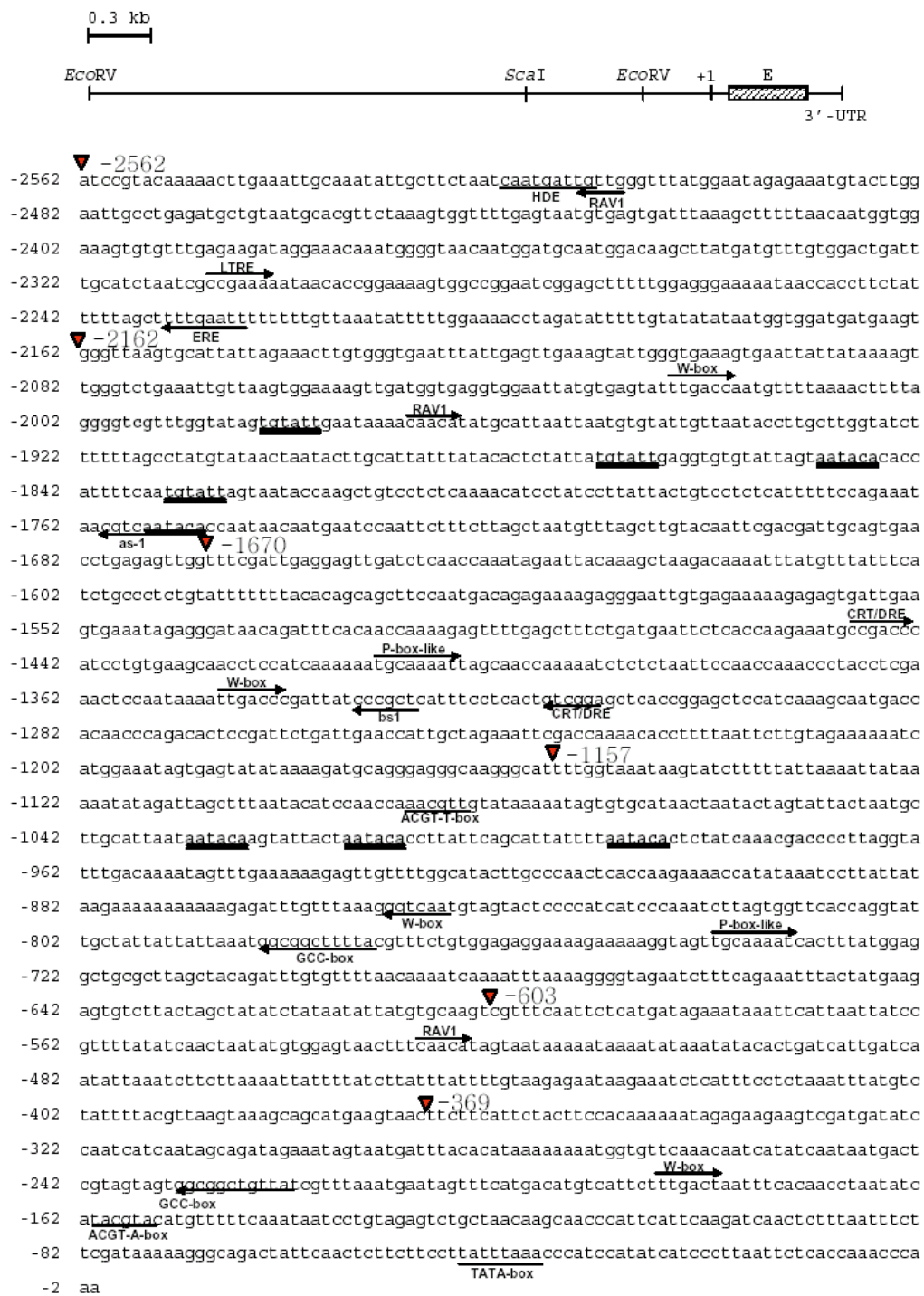
전환식물체의 발아율을 측정하였다(Fig. 1-51). ABA의 외부적인 처리로 인해 종자의 발아는 억제되는데 *CABPRI*-형질전환식물체의 종자는 외부적인 ABA의 처리에 매우 민감하게 반응함이 나타났다. 이를 볼 때 NaCl과 mannitol 처리 동안 나타났던 형질전환식물체의 스트레스 내성은 NaCl과 mannitol 처리동안 축적되는 스트레스 호르몬인 ABA에 대하여 반응성이 낮은 것이 아니라 ABA 축적의 정도가 낮거나 또 다른 기작에 의해서 가능하다는 것이 밝혀졌다.

10) *CABPRI*-형질전환 *Arabidopsis*의 oxidative stress에 대한 반응

고추 잎에서의 *CABPRI* 유전자의 발현이 산화적인 스트레스 (oxidative stress) 중에 유도됨을 확인하였다. 1 분지기의 고추 식물에 산화적인 스트레스를 일으킬 수 있는 methyl viologen (MV)을 엽면 살포하고 잎 조직에서의 유전자 발현을 점검하기 위해 시간별로 잎 조직을 sampling하였다. 처리한지 1 시간 내에 이미 *CABPRI* 유전자의 발현이 나타났으며, 6 시간 이후 유전자 발현은 꾸준히 증가하다가 12시간 이후 24 시간에 급격히 증가하였다. 일반적으로 peroxidase 유전자와 활성산소류들((reactive oxygen species, ROS)이 식물-병원균 상호작용에서 일어나는 산화적인 스트레스에 관련되어 있다는 보고가 있다 (Do et al., 2003; Krause and Durner, 2004). MV 처리에 대하여 고추 ascorbate peroxidase 유전자와 *CAPOA1*과 peroxidase 유전자 *CAPO1*의 발현을 함께 조사하였다. 이들의 발현이 *CABPRI*의 발현과 거의 비슷한 시간에 유도되었으나 *CABPRI*의 발현은 *CAPOA1*, *CAPO1* 유전자의 발현보다 매우 우세하였다. 이는 *CABPRI* 유전자의 발현이 고추식물의 산화적인 스트레스의 내성에 관여 할 가능성을 제시하여준 결과였다. 따라서 *CABPRI* 유전자가 기능적으로 산화적 스트레스 내성에 관여하고 있는지 알아보기 위하여 *CABPRI* 유전자가 도입된 형질전환 *Arabidopsis* 식물체를 대상으로 MV 스트레스 내성 실험을 수행하였다 (Fig. 1-52). Wild type과 형질전환식물체의 종자를 100 μ M MV이 포함된 MS 배지에 과중하고 발아율을 측정하였다. Wild type의 종자는 과중 후 4일에 발아하기 시작하여 발아율이 증가하였으나 과중 후 7일에 25% 정도의 종자만이 발아하였다. 형질전환 식물체의 경우, 과중 후 2 일째 처음 발아하기 시작하였으며, 5일까지 30-95%정도에 이를 정도로 급격한 발아율의 증가를 나타내었으나 5-7일 동안에는 뚜렷한 발아율의 증가를 나타내지 않았다. *Arabidopsis* 식물 유묘의 MV 스트레스 내성을 검정하였다. 1xMS 배지에서 발아시킨 wild type과 형질전환식물체의 유묘를 7일간 키운 후 0.5 μ M MV 용액에 옮겨준 후 유묘의 스트레스 반응을 관찰하였다. 스트레스 내성은 상대적인 생체중과 엽록체의 함량으로 표시하였다. 각

각의 형질전환식물체는 생체중과 엽록체 함량 측면에서 모두 wild type 보다 저항성을 보였다. Wild type과 형질전환식물로부터 성체 식물의 잎을 취하여 MV 용액에 띄운 결과 또한 형질전환식물체가 MV에 저항성을 가지고 있음을 나타내었다. 이러한 결과들은 CABPR1 자체가 superoxide dismutase나 catalase처럼 직접적인 ROS의 scavenging 활성을 지닐 수 있음을 시사하였다 (Willekens et al. 1997).

Fig. 1-42. Nucleotide sequence of the 5'-flanking region containing the promoter and putative *cis*-acting elements of the *CABPR1* gene. HDE, homeodomain binding element; RAV1, RAV transcription factor binding site; LTRE, low temperature responsive element; ERE, ethylene-responsive element; W-box, WRKY transcription factor binding site; as-1, TGA transcription factor binding site; CRT/DRE, C-repeat drought responsive element; P-box-like, prolamin-box-like element; bs1, element for vascular bundle-specific expression; ACGT-T-box, bZip transcription factor binding site; GCC-box, ERF transcription factor binding site; ACGT-A-box, bZip transcription factor binding site ▼ : Start point of 5'-deleted derivatives.



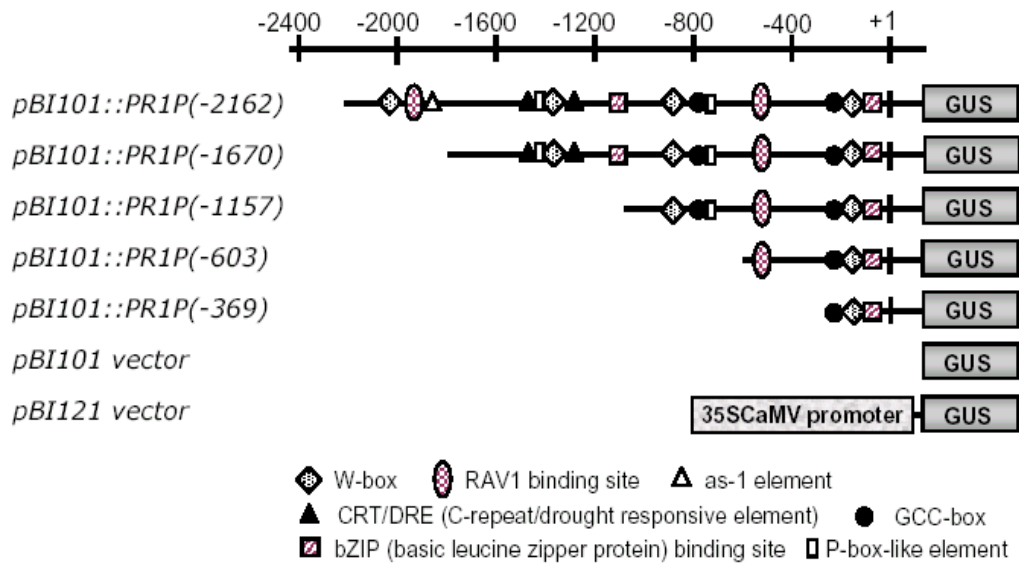


Fig. 1–43. Schematic maps of the chimeric 5'–*CABPR1* promoter deletion–*GUS* constructs for assaying the reporter gene expression in tobacco leaves. The serially deleted promoter constructs, designated *PRIP* of the pepper basic PR–1 gene, *CABPR1*, were fused to the *GUS* (β –glucuronidase) reporter gene in the *pBI101* vector. *pBI101*, a negative vector control; *pBI121*, a positive vector control containing *CaMV* 35S promoter fused to *GUS* (β –glucuronidase) reporter gene.

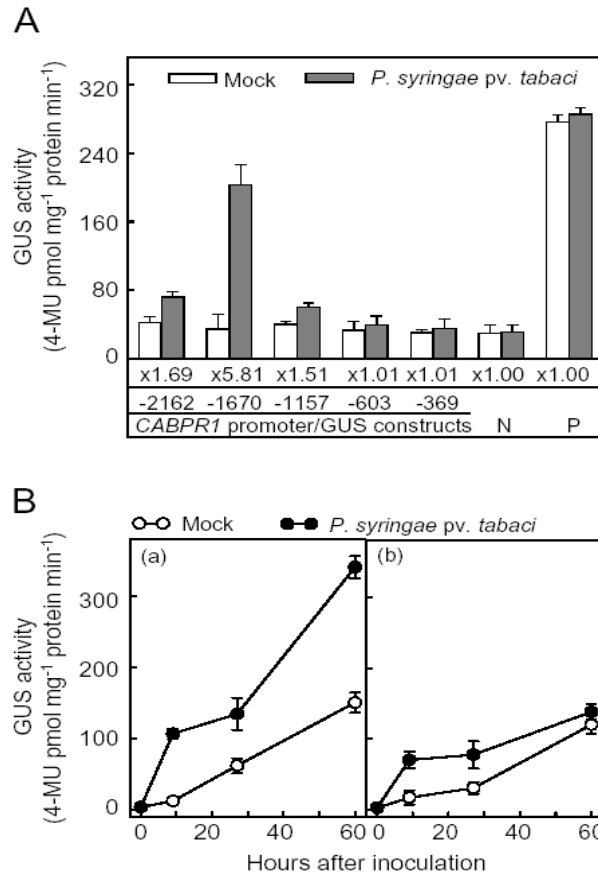


Fig. 1–44. GUS activity driven by the *CABPR1* promoters in the tobacco leaf tissues in response to a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* infection. The GUS activity, which was analyzed fluorometrically, is expressed as 4-methylumbelliferone (MU) pmole mg⁻¹ protein min⁻¹. The averages of the GUS activity and the standard deviations of the experimental data are from independent assays of the extracts from tobacco leaf tissues. (A) Induction of GUS activity by the five 5'-*CABPR1* promoter deletion-GUS chimeric constructs. The tobacco leaves were infiltrated with either a bacterial suspension of *P. syringae* pv. *tabaci* (2×10^8 cfu/mL in 10 mM MgCl₂) or 10 mM MgCl₂ as mocks. The numbers under the bars indicate the fold induction of GUS activity after a pathogen infection versus a mock inoculation. N: negative control, P: positive control. (B) Time courses of (a) local and (b) systemic activation of the *CABPR1* (-1670) promoter by *P. syringae* pv. *tabaci* infection.

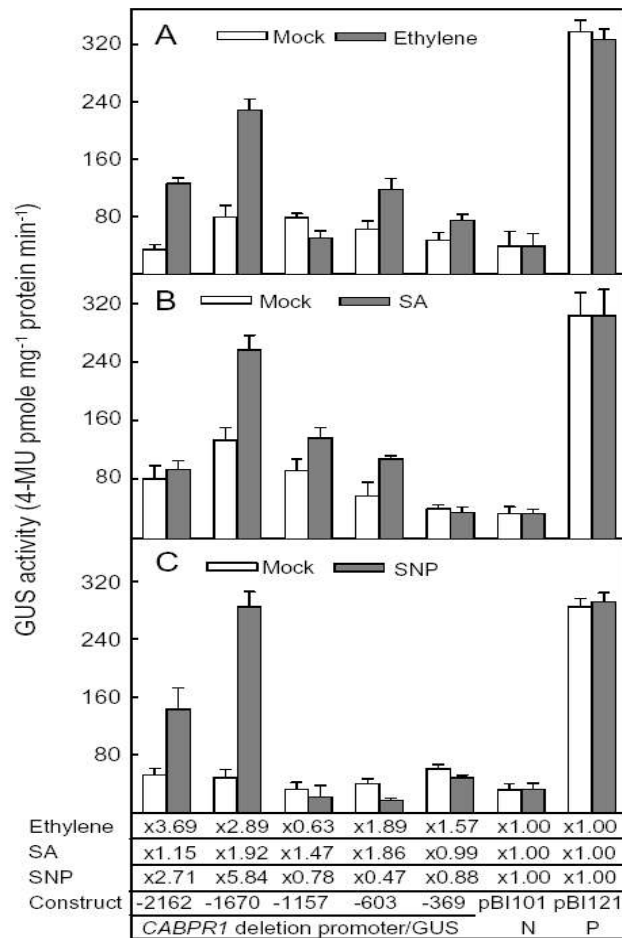


Fig. 1-45. Induction of GUS activity of the five 5'-*CABPR1* promoter deletions-GUS chimeric constructs by a treatment with ethylene, salicylic acid (SA) and nitric oxide (SNP). The GUS activity that was analyzed fluourometrically is expressed in 4-methylumelliferone (MU) pmole mg⁻¹ protein min⁻¹. N, negative control; P, positive control. The averages of the GUS activity and the standard deviations of the experimental data are from independent assays of the extracts from tobacco leaf tissues. (A) GUS activity in the leaves treated with 20 μ l/l ethylene gas for 24 h. (B) GUS activity in the leaves sprayed with distilled water as a mock and with 1 mM salicylic acid (SA) for 48 h. (C) GUS activity in the leaves sprayed with distilled water as a mock and with 100 M sodium nitroprusside (SNP) for 24 h.

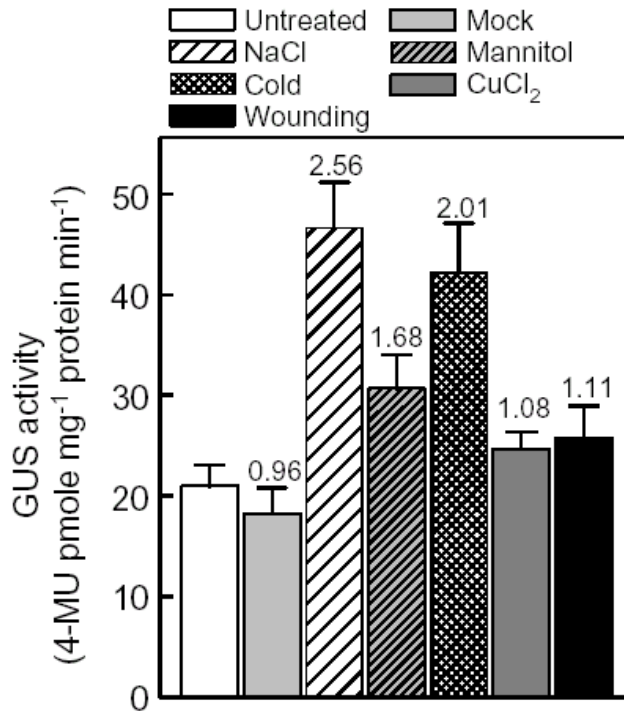


Fig. 1-46. Induction of the GUS activity of the *CABPR1* (-1670) promoter-GUS chimeric constructs by various environmental stresses in tobacco plants. The GUS activity in the leaf tissues of tobacco plants treated with 400 mM NaCl, 300 mM mannitol, cold at 4 °C, 1 mM CuCl₂ and the mechanical wounding for 24 h is expressed as 4-methylumelliferone (MU) pmole mg⁻¹ protein min⁻¹. The numbers above the bars indicate the fold induction of GUS activity after pathogen infection versus mock inoculation.

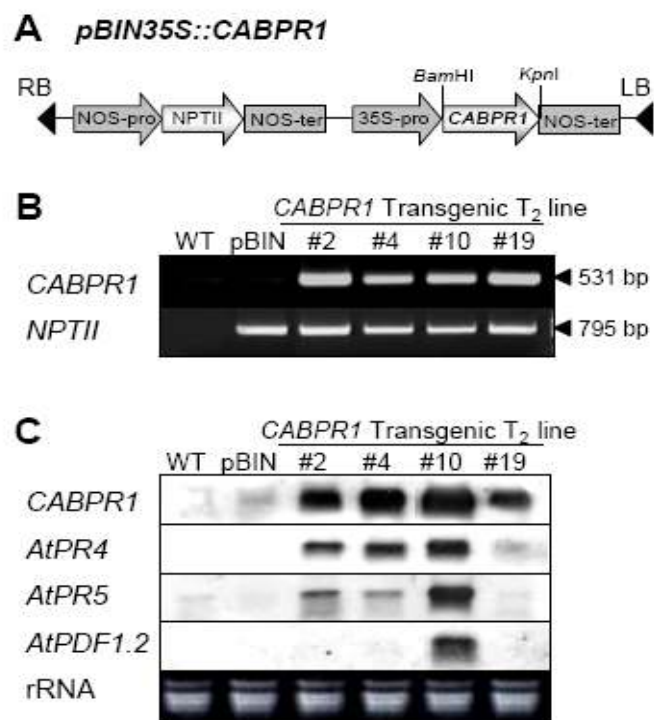


Fig. 1–47. Generation of the transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing the *CABPR1* gene. (A) Diagram of the expression cassette of the *CABPR1* gene in the plant transformation vector, pBIN35S. RB, right border; LB, left border; NOS–pro, nopaline synthase promoter; NOS–ter, nopaline synthase terminator; NPTII, neomycin phosphotransferase; 35S–pro, CaMV 35S promoter. (B) Integration of the *CABPR1* transgene in the transgenic T₂ lines. PCR amplification of the *CABPR1* transgene and the *NPTII*, kanamycin resistance gene, from healthy *Arabidopsis* plants. The arrows indicate the size of the PCR products. (C) RNA gel blot analysis of the expression of the *CABPR1* transgene and *Arabidopsis* PR genes in *Arabidopsis* transgenic plants. Ten μ g of the total RNA was loaded in each lane and the gel blots were hybridized with *CABPR1* or the different *Arabidopsis* PR gene (*AtPR4*, *AtPR5* and *AtPDF1.2*) probes. Equal RNA loading was verified with ethidium bromide staining of ribosomal RNA.

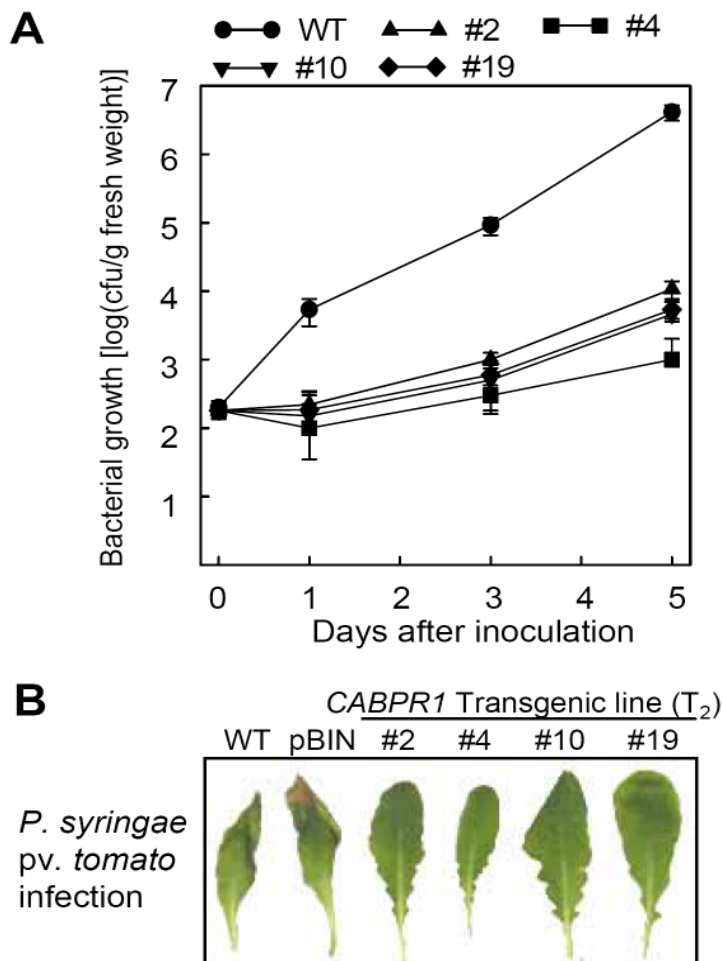


Fig. 1–48. Enhanced resistance to bacterial infection of transgenic Arabidopsis T₂ lines (#2, #4, #10 and #19) overexpressing *CABPR1*. (A) Growth of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* strain DC3000 in wild-type and transgenic Arabidopsis plants. The data points are the mean bacterial cell numbers [$\log_{10}(\text{cfu/g fresh weight})$] \pm standard deviations. (B) Differential disease responses to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* strain DC3000 infection of the wild-type and transgenic Arabidopsis plants. The photograph was taken 5 days after inoculation. WT, Col-0 wild-type plants pBIN, Col-0 plants transformed with pBIN35S vector only.

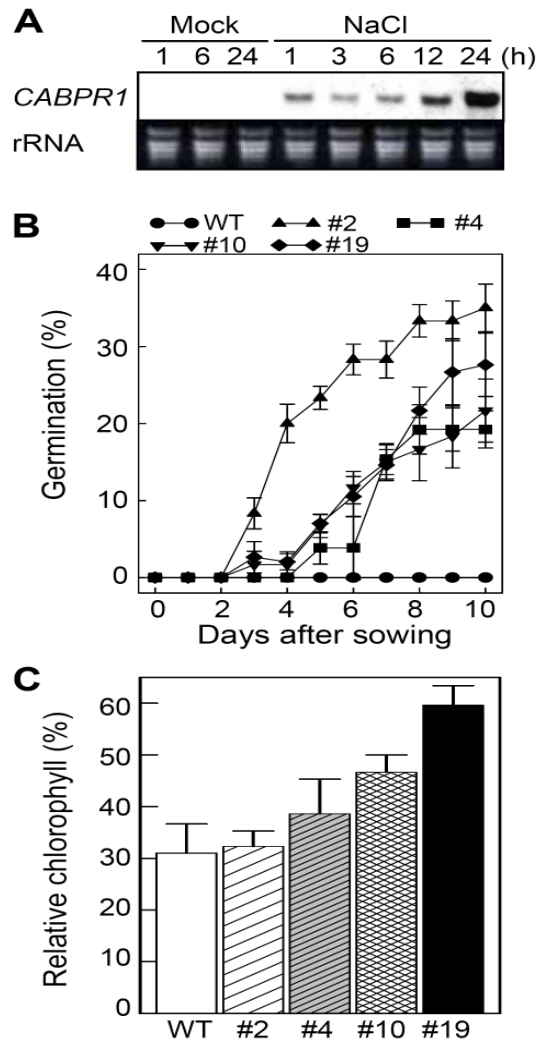


Fig. 1-49. Enhanced salt tolerance of the transgenic *Arabidopsis* T2 lines (#2, #4, #10 and #19) overexpressing *CABPR1*. (A) Induction of the *CABPR1* gene in the pepper leaf tissues treated with 400 mM NaCl. The rRNA in the agarose gels was stained with ethidium bromide to show an equal loading of RNA. (B) Percentage of seed germination in the wild-type (WT) and *Arabidopsis* lines on MS agar medium containing 250 mM NaCl. Germination was scored when the radicle tip had fully emerged from the seed coats. Data are the means \pm standard deviations of three independent experiments. (C) Relative chlorophyll content of the wild-type (WT) or transgenic lines grown in the presence or absence of 150 mM NaCl. Data are the means \pm standard deviations of three independent experiments. The seedlings grown without NaCl are given a value of 100%.

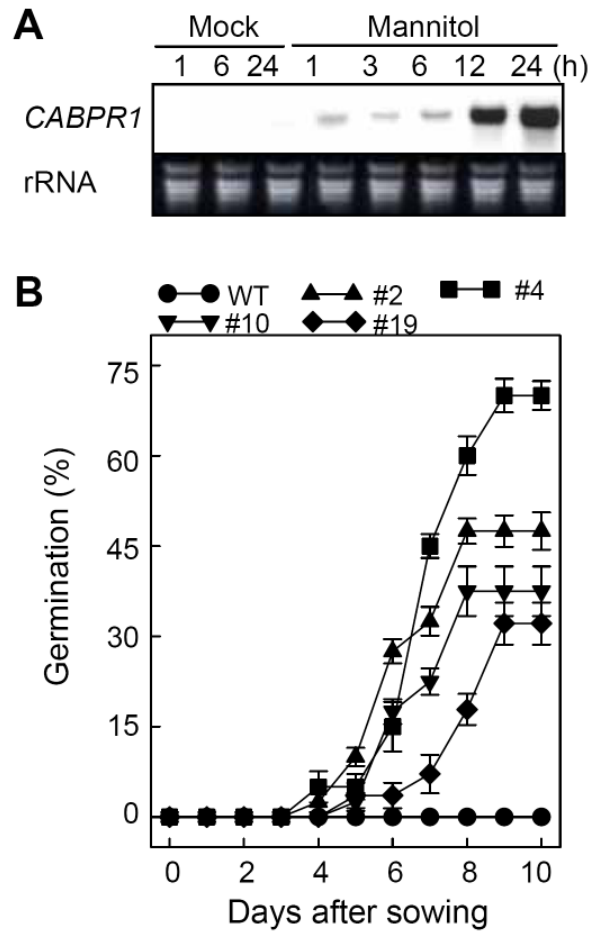


Fig. 1–50. Enhanced tolerance to drought of the transgenic *Arabidopsis* T2 lines (#2, #4, #10 and #19) overexpressing *CABPR1*. (A) Induction of the *CABPR1* gene in pepper leaf tissues treated with 400 mM mannitol. Mock: pepper plants in the 1MS solution without mannitol. The rRNA in agarose gels was stained with ethidium bromide to show an equal RNA loading. (B) Percentage of seed germination of the wild-type (WT) and *Arabidopsis* lines on the MS agar medium containing 600 mM mannitol. Germination was scored when the radicle tip had fully emerged from the seed coat. Data are the means \pm standard deviations of three independent experiments.

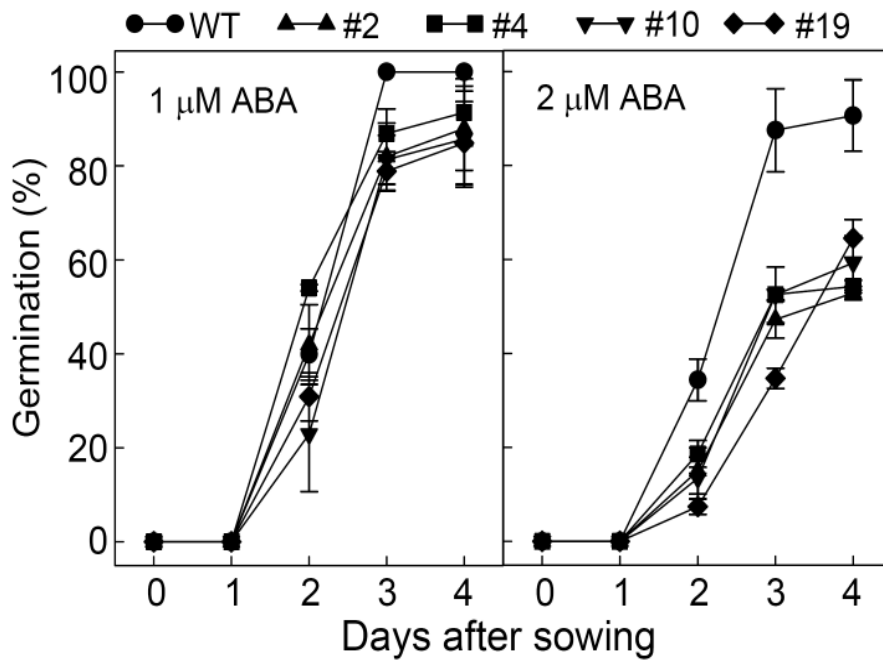


Fig. 1–51. Enhanced sensitivity to abscisic acid (ABA) of the transgenic *Arabidopsis* T2lines (#2, #4, #10 and #19) overexpressing *CABPR1*. The inhibition of germination of the wild-type and the *CABPR1*-transgenic lines on the MS agar medium containing 1 and 2 M ABA. Germination was scored when the radicle tip had fully emerged from the seed coat. Data are the means \pm standard deviations of three independent experiments.

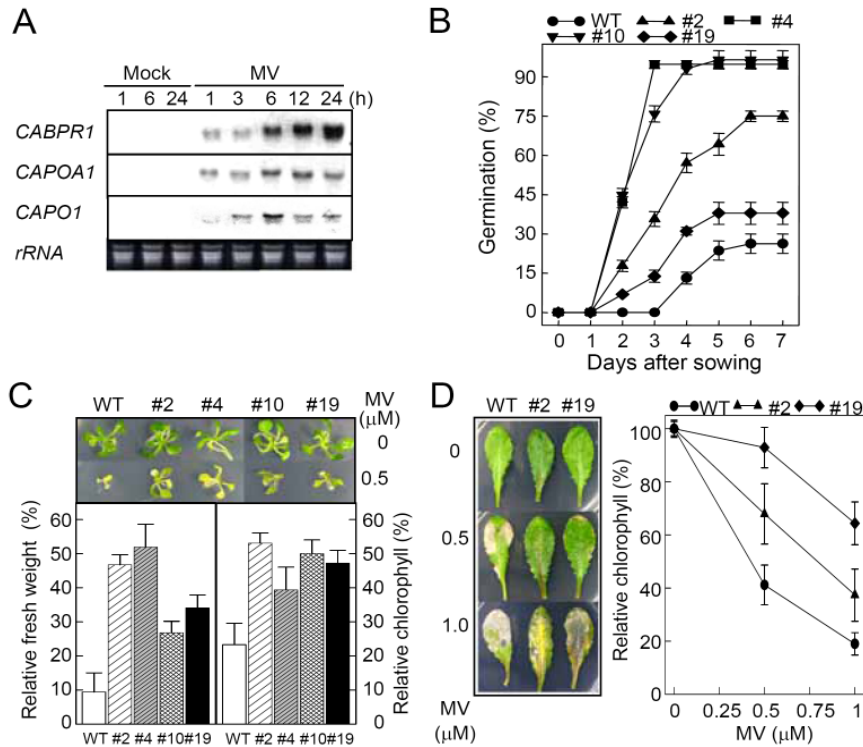


Fig. 1–52. Enhanced tolerance to methyl viologen (MV) of the transgenic Arabidopsis T2 lines (#2, #4, #10 and #19) overexpressing *CABPR1*. (A) Induction of the *CABPR1*, *CAPOA1*, and *CAPO1* genes in the pepper leaf tissues treated with methyl viologen (MV). The rRNA in agarose gels was stained with ethidium bromide to show an equal RNA loading. (B) Percentage of seed germination of the wild-type (WT) and transgenic Arabidopsis lines on 1x MS agar medium containing 100 μM MV. Germination was scored when the radicle tip had fully emerged from the seed coat. Data are the means ± standard deviations of three independent experiments. (C) Enhanced tolerance to methyl viologen of the transgenic plants at the early seedling stage. Representative seedlings 14 days after MV treatment are shown. Relative fresh weight and relative chlorophyll content of the wild-type or transgenic lines grown in the absence or presence of MV. Data are the means ± standard deviations of three independent experiments. The seedlings grown without MV are given a value of 100%. (D) Enhanced tolerance to methyl viologen of the adult transgenic plants. Representative rosette leaves from the wild-type (WT) and transgenic plants 5 days after the MV treatment are shown. The chlorophyll concentration of the leaf tissues of the wild type or transgenic lines were measured in the presence or absence of different MV concentrations. Data are the means ± standard deviations of three independent experiments.

제 2 절 식량 작물 병방어유전자의 개발 및 functional genomics (제1협동과제)

1. 연구 개발 수행 방법 및 내용

가. 벼에서 병저항성 반응 cDNA library 제작

벼의 흰잎마름병에 저항성을 나타내는 유전자를 탐색하기 위하여 파종 후 2주일이 지난 동진벼 (*Oryza sativa* L. cv. Dongjin)에 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 10331 (K1)을 처리하여 3~6시간 후의 벼 잎에서 total RNA를 분리하여 PolyATract mRNA isolation system (Promega)을 이용하여 mRNA를 분리하였다. 분리된 mRNA는 ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. Library는 Uni-ZAP XR vector (stratagene)를 이용하여 construction하고, Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene)로 packaging하였다 (Guthrie and Fink, 1991).

나. Northern 및 RT-PCR로 방어유전자 선별

개략적인 방법을 Fig. 2-1에 나타내었다.

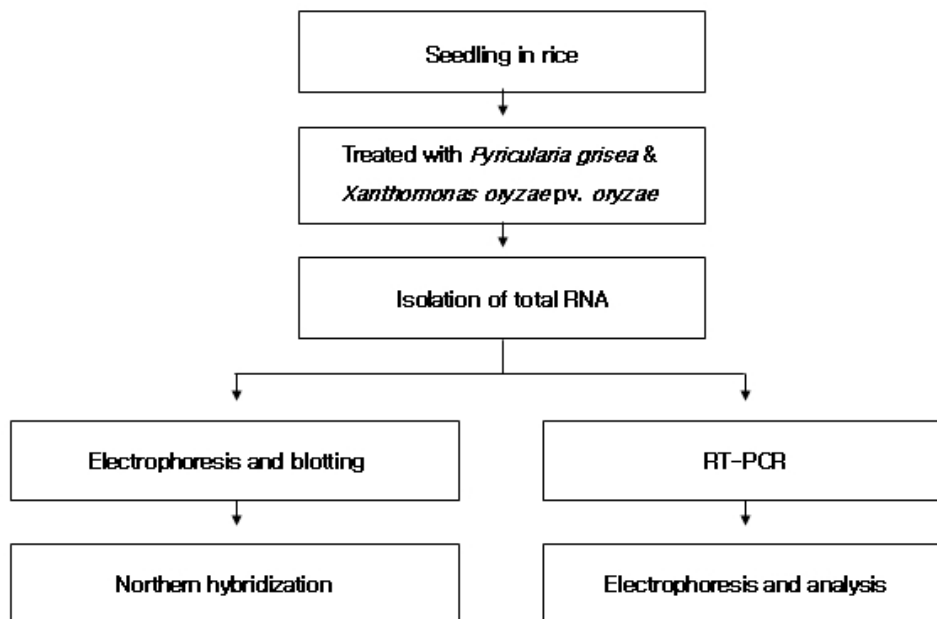


Fig. 2-1. Overview of RNA gel blot analysis and RT-PCR.

1) 식물, 세균 및 시약

상태로 28°C growth chamber에서 동진벼 종자를 2~3일 동안 발아시킨 후 수도용 상토에 파종하여 온실에서 2주간 자란 어린잎을 사용하였다. 본 연구에 사용한 균주는 벼흰잎마름병균 (*Xoo* K1과 K3, PSA media; peptone 10 g, Na-glutamate 1 g, sucrose 20 g/L, 30°C에서 2 ~ 3일 배양 후 10^8 /ml로 희석)과 벼도열병균 *Magnaporthe grisea* KJ-301과 KJ-101 (쌀겨 20 g, sucrose 20 g, agar 24 g /L, 30°C에서 3 ~ 4일 간 배양 후 5×10^5 spore/ml으로 0.01% Triton X-100에 희석)을 spray method에 의해 처리한다. 처리 후 Dew chamber (25°C, dark)에서 24시간 incubation 후 온실로 옮겨 배양하면서 시간대별로 sampling하였다 (Agawal et al., 2001).

Salicylic acid (SA), ethephone과 cantharadin (CN)은 Sigma (St. Louis, USA)사 제품을 구매하여 사용하였으며 benzothiazole (BTH)는 Hayashi Pure Chemical Ind. 제품을 사용하였다. 모든 시약은 analytical grade를 사용하였고 저장 용액은 이전에 보고된 대로 준비하였다 (Agawal et al., 2002a, 2002b).

2) Total RNA 분리

액체질소를 이용하여 sample을 곱게 간 후, 2 ml E-tube에 100 mg 넣고, 800 μ l TRI-reagent (MRC, USA)를 넣어 sample과 잘 혼합하였다. 200 μ l chloroform을 첨가하고 잘 섞은 후 12,000 g로 4°C에서 10분간 원심분리 후 상등액을 새 tube에 옮겼다. 여기에 500 μ l isopropanol을 넣고 잘 섞은 후 원심분리하고 pellet에 75% ethanol 1 ml을 넣고 washing한 후 공기 중에서 말렸다. 말린 pellet은 RNase-free water에 녹인 후 농도를 측정하고 분주하여 -70°C에 보관하면서 필요시 사용하였다.

3) Formaldehyde RNA gel 전기영동과 capillary blotting

20 μ g의 total RNA sample에 EtBr을 함유한 loading dye를 넣고 65°C에서 15분 동안 denaturation시켜 1% denaturing formaldehyde gel에서 70 Volt로 3 시간 동안 전기영동 하였다. 이 겔을 증류수에 20 분 동안 shaking하면서 washing하고 10 X SSC buffer로 옮겨 saturation시킨 후 hybond-N⁺ membrane (Amersham, USA)으로 전이하였다. 전이된 membrane은 2 X SSC로 washing한 후 65°C에서 10분간 말린 후 UV crosslinker로 autocrosslinking하였다 (Sambrook et al., 1989).

4) Random hexamer labelling에 의한 probe 제조

Probe 표지는 random primer (Amersham, USA) 5 μ l와 probe DNA (25 ng 이상)를

혼합하여 95°C에서 5분간 끓인 후 실온에 방치하였다. Labelling mixture (10 X labelling buffer, dNTP mixture 2.5 µl, labelled dCTP 5 µl, Klenow fragment 1 µl)를 넣고 37°C에서 30 분간 반응시킨 후 5 M EDTA 1 µl를 넣어 반응을 종결시켰다. 반응혼합물을 가이거 카운터로 모니터하여 radioactivity를 확인하여 probe로 사용하였다.

5) Northern hybridization

Hybridization buffer (0.5 M NaHPO₄, 1% crystalline BSA, 1 mM EDTA, 7% SDS/1 L)에 total RNA가 transfer된 membrane을 넣어 65°C에서 15분 이상 pre-hybridization 한 후 probe를 3분간 끓인 후 식혀서 넣고 65°C에서 12시간 이상 shaking하였다. 2 X SSC/0.1% SDS 용액으로 65°C에서 10분간 washing한 후 가이거 카운터로 모니터하여 signal이 강하면 좀 더 높은 stringency의 용액 (1 X SSC/0.1% SDS 또는 0.1 X SSC/0.1% SDS)으로 65°C에서 washing한 후 BAS cassette (Fujifilm)에서 12시간 이상 노출시켰다 (Sambrook et al., 1989).

6) RT-PCR

RT-PCR 조건은 Total RNA; 1µg, oligodT; 100 pmol, ddH₂O; 10 µl를 혼합하여 70°C에서 10분간 가열 후 얼음위에서 식히고 -5X first strand buffer; 4 µl -0.1 M DTT; 1 µl -dNTP (2.5mM); 2 µl를 섞고 42°C에서 2분간 반응시키고 Superscript II를 1 µl (5 unit) 첨가 후 37°C에서 1시간 반응시킨 후 70°C에서 10분간 효소를 불활성화 시키고 여기에 RNaseH를 1 µl 첨가하고 37°C에서 20분간 반응 후 다시 70°C에서 10분간 불활성화 시킴으로써 First strand 합성을 하였고, Target gene의 발현은 First strand 반응액; 10 µl, gene specific primer (F); 20 pmol, gene specific primer (R); 20 pmol, Taq polymerase; 0.5 µl, 10x PCR buffer; 2 µl, ddH₂O; up to 20 µl를 혼합하여 95°C 2분 predenaturing, 94°C 30초, 50°C 30초, 72°C 1분을 25cycle의 PCR 수행 후 agarose gel에 전기영동 하여 확인하였다.

다. Nucleotide sequence 분석

분리된 plasmid DNA와 분리한 cDNA는 Big Dye Terminator V.3.0을 이용하여 PCR한 후 ABI 3100 automatic DNA sequencer를 이용한 염기서열 분석하고 이 염기서열을 NCBI Database와 다른 network를 상에서 상동성 조사하여 유용 벼 방어유전자 탐색 및 database 구축하였다.

라. Microarray를 위한 cDNA chip 제작

cDNA library에서 선별된 plasmid DNA (20 ug 이상)를 template로 T7 primer와 T3 primer를 사용하여 유전자 단편 증폭하여 spectrophotometer와 전기영동 비교 분석에 의한 정확한 농도 보정을 한 후 Pin & Ring 방식에 의해 slide glass에 DAN fragment spotting 한 후 Membrane filter spotting을 하였다. QC (Quality Check; NHQC, SHQC, PHQC, SFQC)를 실시하면 DNA chip products 완성이 되고 DNA chip 해석은 Scan-428 Array Scanner (Affymetrix)를 이용해 Flying Objective Microscope, Confocal laser microarray scanning system으로 하였다 (Fig. 2-2) (Hdge et al., 2000).

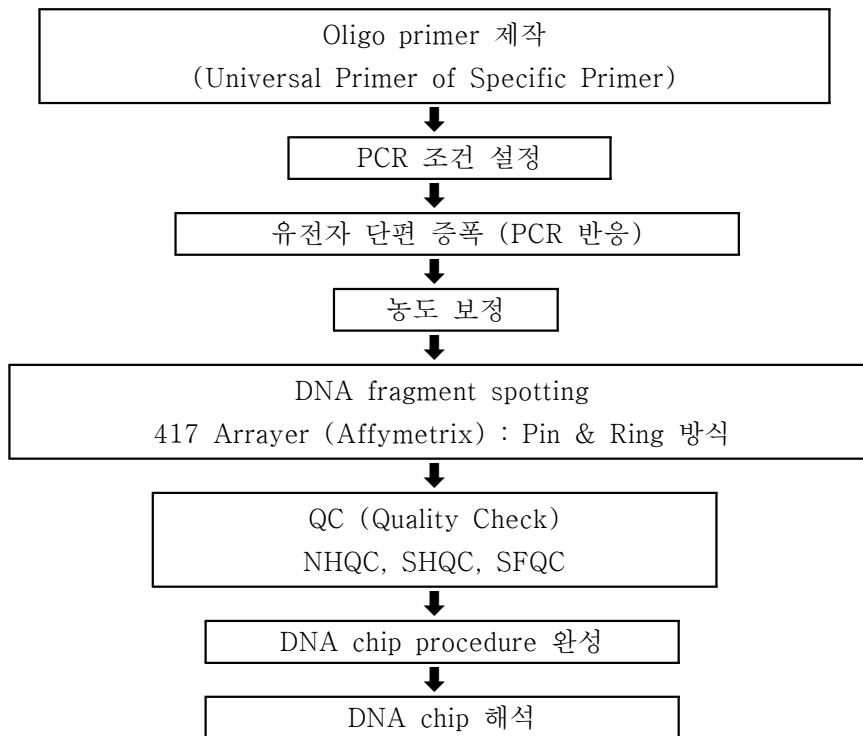


Fig. 2-2. Overview for construction of DNA chip.

마. Microarray에 의한 방어유전자 분리, 염기서열 분석

병처리한 동진벼와 처리하지 않은 동진벼, 병저항성 관련 유전자를 overexpression 시킨 형질전환체와 knock out시킨 벼의 RNA를 이용해 microarray 분석을 실시하여 2배

이상 up-regulated되거나 down-regulation되는 유전자들을 선별한 후 RT-PCR을 통해 확인 한 후 이들의 기능을 분석하는데 이용하고자 염기서열을 분석하여 그들의 상동성을 NCBI database 상에서 조사하였다.

바. 방어유전자의 기능분석

1) 벼병방어유전자를 이용한 벼와 담배 형질전환

○ 식물 발현 vector 구축 및 Agrobacterium 형질전환

식물발현 vector의 구축은 GATEWAY system (Invitrogen)을 이용하여 구축하고 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 or EHA 105 균주를 이용하였다 (Karimi et al., 2002; Joubes et al., 2004; Karimi et al., 20005).

○ 벼 형질 전환

외피를 제거한 벼를 70% EtOH 25ml 넣고 5분간 소독한 후 1/2락스 25ml 넣고 15분간 소독하여 멸균수 25ml로 3분씩 4회 행귀낸 후 1/2락스 25ml 넣고 15분간 소독하고 멸균수 25ml로 3분씩 6회 행균 다음 약 2시간 가량 건조 시켰다. 건조시킨 벼를 2N6배지에 올린 다음 27°C에서 3~4주간 암배양 하였다. embryogenic한 callus를 선별하여 2N6배지에 올린 다음 27°C에서 4일~1주간 암배양 하고 Agrobacterium도 배양하여 cell down 한 후 AAM배지에서 혼합하여 OD값을 맞춘 후(OD 1.5~2.0 at 600nm) Acetosylingone (100nM)을 첨가하였다. Callus를 Agrobacterium이 혼합된 AAM-AS배지에 혼합하여 20분간 감염시킨 후에 배지를 제거하고 완전히 마르기전에 2N6-AS배지에 올려놓고 25°C에서 3일간 암배양한 callus를 cefotaxime를 첨가한 멸균수에 넣어 상하로 흔들어주면서 washing하는데 육안으로 Agrbacterium이 보이지 않을 때 까지 한 다음 2N6-cp배지에서 27°C, 3주간 암배양하였다. 갈변되지 않고 살아남은 callus을 2N6-cp배지에서 27°C 2주간 암배양하였다. 저항성을 띤 callus를 MSR media에 치상한다. 27°C에서 1달간 명배양하였다. Shooting 된 개체를 MSO media에 옮겨 27~29°C /light 조건에서 배양하여 뿌리가 내리고 1주일이 지나면 pot에 심어 온실에서 배양하였다 (Hiei et al., 1994).

○ 담배 형질 전환

배양실에서 무균상태로 자란 담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) 잎을 대략 5 x 5 mm 크기로 잘라서 200µl의 아그로박테리움(*Agrobacterium*)이 포함된 MSO 액체배지

(MS염 4.3g, sucrose 30 g/l, pH 5.6~5.8)에 넣었다가 암조건에서 2~3일 동안 배양하고, 배양된 잎 절편을 500 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 세포탁심 (cefotaxime)이 포함된 증류수로 2~3회 세척한 후 캘러스-슈트 (callus-shoot) 유도배지 (MSO배지에 100 μg NAA, 1mg BA, 500 μg 세포탁심, 1 mg 포스피노트리신 (phosphinothricin), 0.7% 피토 한천 (phyto agar), pH 5.6)으로 옮겨주고, 2주마다 새로운 배지로 옮겨 주었다. 유도된 발아는 1.5~2cm 정도 자라면 루트-인덕션 배지 (MSO배지에 250 μg 세포탁심, 10mg 포스피노트리신, 0.7% 피토 한천, pH 5.6)로 옮겨 주었다. 담배의 형질전환 여부는 형질전환 담배의 게놈 DNA를 추출한 후 (Edwards et al., 1991; Gelvin et al., 1991) bar 유전자 (제초제 저항성 유전자) 특이 프라이머를 이용하여 PCR 방법으로 확인하였다.

○ 형질전환체 분석

형질전환 담배 식물체에 원하는 유전자가 삽입 여부를 확인하기 위해 PCR 방법을 이용하였다. 먼저 형질전환 담배의 genomic DNA를 분리하여 bar gene specific primer (bar-F; CCGTACCGAGCGCAGGAACC, bar-R; GGCAGCCCGATGACAGCGACCAC)를 이용하여 대조구가 갖지 않는 원하는 크기 (279 bp)의 DNA 단편이 검출된 형질전환 담배를 선별하고, 2차로 pBIN35S-S (CAAGGCTTGCTTCTAAACC)와 gene specific primer를 이용하여 원하는 유전자의 삽입여부를 확인 및 northern blot으로 발현 여부를 확인하였다.

사. 병저항성 유전자의 promoter 분리, 분석

1) Promoter 분리

병저항성 유전자의 promoter 부분을 찾기 위해 rice genome sequencing database와 Clontech사의 universal genomewalker kit를 사용한다. 이 kit에서 사용된 방법은 우선 벼에서 genomic DNA를 분리하고 분리된 genomic DNA를 여러 제한효소로 자른 다음 adaptor를 붙여서 adaptor site에 존재하는 sense primer와 RD22 유전자 앞머리에 anti-sense primer를 제작하여 primary PCR을 하고 그 산물을 다시 그 내부 부분에 nested primer를 각각 제작하여 secondary PCR을 하여 promoter가 예상되는 부분을 찾는 것이다.

2) Promoter 분석

OsDRP promoter와 GUS gene으로 구축하여 Agro-infiltration 방법으로 tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi*) 잎에 접종하고 접종 24시간 후 *Pseudomonas syringae*

pv. tabaci KACC10388를 다시 infiltration하고, SA (5 μ M) spray 하였다. Mock test를 위해 물을 spray하여 동일 조건에서 배양하였다. stress 처리 24시간 후 담배잎을 sampling 하고, 단백질을 추출 시까지 -70°C 에 보관한다. Fluorometric GUS assay를 위해서 GUS extraction buffer (10 mM EDTA, 0.1% Sodium lauryl sarcosine, 0.1% TritonX-100, 10 mM 2-mercaptoethanol and 50 mM NaH_2PO_4 , pH7.0)에서 같은 상등액을 이용해 GUS assay를 실시하였다. 기질로는 4-methyl umbelliferyl glucuronide (MUG)를 이용하고, 37°C 에서 배양한 후 stop buffer (200 mM Na_2CO_3)를 첨가하여 반응을 중지시켰다. Fluorescent 생성물인 4-methyl umbelliferone (4-MU)를 365 nm의 excitation과 455 nm의 emission 상에서 fluorometer를 이용해 정량하였다. 10 mM MgCl_2 를 mock test를 위해 사용하고 pBI121을 positive control로 pBI101을 negative control로 사용하였다 (Jefferson, 1987; Henning et al., 1993; Yang et al., 2000).

아. Yeast-two-hybrid system을 이용한 병방어 조절유전자 분석

1) Yeast-two-hybrid cDNA library 제작

본 실험은 도열병, 흰잎마름병 등 벼의 주요 병원균에 대해 저항성을 보이는 동진벼와 *Arabidopsis*를 이용하여 병저항성 유전자와 상호작용하는 유전자를 찾기 위해 yeast two hybrid (Fields & Song, 1989; Bartel et al., 1993; Luban et al., 1995) 유전자 은행을 제작하였다.

동진벼를 온실에서 벼 재배용 상토에 3주간 재배하고 흰잎마름병균을 처리하여 3~6시간 후 지상부 시료를 채취하여 total RNA를 분리하고 mRNA 만 선별하여 제조회사 (Stratagene)의 방법에 따라 cDNA를 합성한 후 library를 제작한다. 제작한 library에서 삽입유전자들의 다양성을 비교하기 위하여 random으로 클론을 선발하여 primer로 PCR 후 크기를 확인하였다 (Fig. 2-3).

2) Bait 벡터제작

Bait vector construction은 병저항성 유전자로 추정되는 *OsDRP* 유전자를 bait로 사용하기 위해 pBD-GAL4 vector에 construction하고 Construction된 Bait vector는 AH109 strain의 yeast에 transformation 하여 SD trp w/o배지에서 selection하여 colony를 얻고, 이들은 *OsDRP* 유전자의 sense primer와 antisense primer를 사용하여 colony PCR 및 염기서열을 분석 Bait vector가 완성여부를 확인하였다.

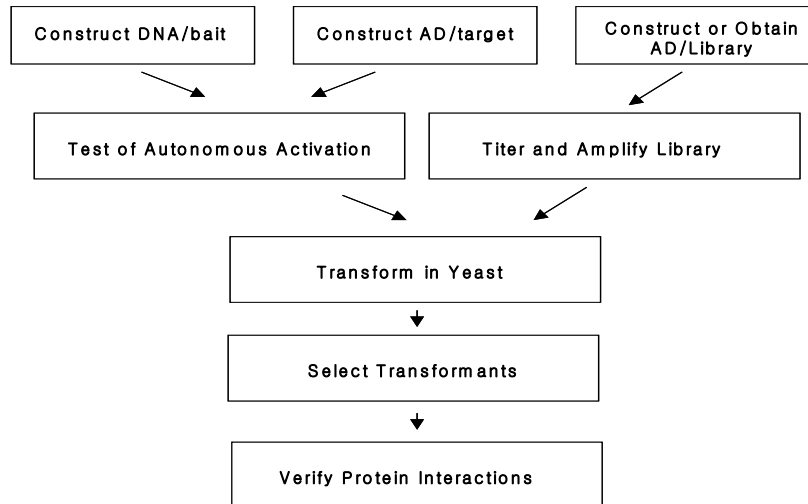


Fig. 2-3. Overview of performing a yeast two-hybrid screen.

3) Yeast cotransformation

OsDRP 유전자를 bait로 하여 흰잎마름병원균을 처리한 벼 cDNA를 prey로 사용하여 interaction하는 클론을 선발하고. Yeast two-hybrid system은^{28,29,30,31)} *in vivo* 상태에서 단백질과 단백질 상호작용을 확인할 수 있는 방법으로 많이 이용되고 있으며 단백질 상호결합 유무를 밝히는 대표적인 방법 중의 하나로 알려져 있다. *OsDRP* 유전자와 상호작용하는 유전자들을 분리하기 위하여 bait vector인 *OsDRP* 유전자와 pAD-GAL4 library를 Yeast cotransformation 하여 SD Trp, Leu, His w/o의 selection배지에서 배양하고 얻어진 colony들 중 bait 유전자인 *OsDRP* 유전자와의 interaction을 확인하기 위하여 X-gal처리에 의한 screening을 수행하여 galactosidase 활성을 보인 clone을 선발하였다. plasmid DNA를 분리하여 염기서열을 분석한 후 blast search에 의해 상동성을 조사하고. 또한 이들 중 병 관련 유전자로 추정되는 clone들의 유전자 발현을 보기 위해 northern hybridization을 실시하였다.

4) *OsDRP* 유전자와 상호작용하는 클론 선발

Yeast cotransformation으로 얻어진 클론은 효모에서 DNA를 분리하여 이를 다시 대장균에 형질전환한 후 항생제를 marker로 하여 선별하였다. 형질전환체들이 지닌 recombinant 유전자들의 염기서열을 분석하여 Blast search로 상동성을 조사하여 유전자들의 기능을 추정하였다.³²⁾

5) Yeast two-hybrid screening

Clontech의 Yeast Two-hybrid system을 이용하여 먼저 동진벼의 *OsDRP* 유전자를 bait로 *Magnaporthe grisea*로부터 *cyclophilin1* 유전자 pray로 하여 Yeast Two-hybrid 를 수행하고 bait와 pray를 바꾸어서 interaction 여부를 조사하였다. 또한 동진벼의 *OsDRP* 유전자의 LRR domain 부분만 cloning하여 *Magnaporthe grisea*의 *cyclophilin1* 유전자와 bait와 pray로 바꾸어 가면서 interaction 여부를 조사하였고, *OsDRP* 유전자의 LRR domain이 결여된 부분을 이용해 *Magnaporthe grisea*의 *cyclophilin1* 유전자와 bait와 pray로 바꾸어 가면서 interaction 여부를 조사하였다. 도열병 내성이 비교적 약한 품종인 일품벼에서 *DRP* 유전자를 cloning하여 *Magnaporthe grisea*의 *cyclophilin1* 유전자와 bait와 pray로 바꾸어 가면서 interaction 여부를 조사하였다.

자. 형질전환 식물체의 병저항성 검정

1) 세균병 저항성 검정

형질전환 담배에 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* KACC 10388을 50 mg/l의 rifampicin이 함유된 nutrient broth에 overnight 배양한 후 $OD_{600}=0.5$ 되게 균의 농도를 조절하여 infiltration하였다. Infiltration 후 시간대별로 동일 량의 형질 전환 담배 잎을 sampling 하여 10 mM $MgCl_2$ buffer에서 마쇄한 후 순차적 희석 하여 50 mg/l의 rifampicin이 함유된 nutrient agar 배지에 spreading 하여 배양한 후 생성된 bacteria를 counting하였다 (Rathjen et al., 1999).

2) 역병저항성 검정

역병균인 *Phytophthora nicotianae* KA 40906을 V8 주스 배지 (200 ml V8 juice, 15 g Bacto agar, 3 g $CaCO_3$ in 1 l dH_2O)를 이용해 26°C 암상태에서 배양하였다. 5 - 6 주된 잎들을 infection에 이용하였다. 배양 후 4일된 역병균 균사체 plug를 각 잎의 표면에 접종하고 2장의 젖은 filter paper를 깔 Petri dish에서 16시간의 광을 주고 25°C에 유지하였다. 3 - 5일 후 감염된 잎의 병반 길이를 측정하였다.

2. 연구 개발 수행 결과 및 고찰

가. 벼 방어유전자 탐색을 위한 PCR 수행 및 cDNA chip 분석

FAO 조사에 의하면 식용으로 이용하는 작물의 수는 7,000여종을 상회하나 이중 식량작물은 벼, 밀, 옥수수등 소수 작물이 인류 식량의 대부분을 공급하고 있다. 다수확을 위한 작물 생산체계가 집약화되고 단일작물(monoculture)로 전환됨에 따라, 예전보다 식물병원균의 양분섭취와 증식에 유리한 조건이 조성되어 식물병 발생이 대폭 증대되고 있다. 이에 대처하기 위해 병원균의 방제기술과 함께 식물의 병저항성 메카니즘에 관한 심도있는 연구가 요구되고 있다.

동진벼는 국내에서 개발된 품질이 우수하고 병저항성을 지닌 벼품종으로 우수품종으로 병저항성 유전자를 함유하고 있다. 또한 동진벼는 high throughput으로 유전자 기능을 분석하기 위한 T-DNA tagging line 구축(An *et al.*, 2005), Ac/DS line 구축(Kim *et al.*, 2004) 등이 이루어져 분자생물학분야의 연구 재료로 널리 사용되고 있어 연계 연구를 통한 synergy 효과를 올릴 수 있다. 벼 흰잎마름병균은 세균성 병으로 호남지역에 주로 발생하는 병으로 우리나라에서 심각한 병은 아니었으나 최근 기후변화와 관련하여 발병면적이 대폭 증가되고 있으며 중부지역까지 확대되고 있다. 벼흰잎마름병균은 열대, 아열대 기후대의 동남아시아에서 심각한 병으로 야생벼에서 저항성 유전자 Xa21을 분리하였다(Song *et al.*, 1995). 그러나 우리나라에서 발견되는 벼흰잎마름병균 KX085는 Xa21 저항성 유전자를 지닌 벼를 공격할 수 있어 특이하다. 아직 벼의 저항성 유전자가 분리된지 10년이 지났으나 아직 비병원성 유전자 avrXa21은 분리되기 위해 남아있다(Shen *et al.*, 2001). 따라서 농업생명공학연구소에서는 우리나라의 독특한 특성을 지닌 균 KX085의 병원성에 관한 특성을 분석하기 위하여 염기서열을 완전히 분석 하였다(Lee *et al.*, 2005). 우리나라의 벼흰잎마름병균에 의해 유도되는 벼의 병저항성 유전자 및 병방어 유전자를 분리하기 위하여 벼흰잎마름병균을 처리한 벼에서 library를 구축하였다. 벼의 mRNA를 분리하여 cDNA library를 제작하였으며 또한 동진벼의 병저항성 유전자로 추정되는 유전자와 상호작용하는 유전자를 찾기 위해 yeast two-hybrid 유전자 은행을 제작하였다. 흰잎마름병 처리된 벼를 이용해 total RNA를 분리하고 mRNA만 선별하여 제조회사(Stratagene)의 방법에 따라 cDNA를 합성한 후 library를 제작하였다. 제작된 cDNA library의 titer를 조사한 결과 6.1×10^6 pfu/ml임을 확인하였다. 제작한 library에서 삽입유전자들의 다양성을 비교하기 위하여 random으로 클론을 선발하여 primer로 PCR후 크기를 비교한 결과 0.5 ~ 2kb의 범위에 속하는 다양한 크기의 유

전자들이 포함되어 있음을 확인하였다 (Fig. 2-4). 유전자 은행은 full length cDNA library는 아니지만 2KB 정도의 fragment가 삽입되었을 때 유전자의 크기가 작은 경우는 full gene을 함유하는 경우도 많았다.

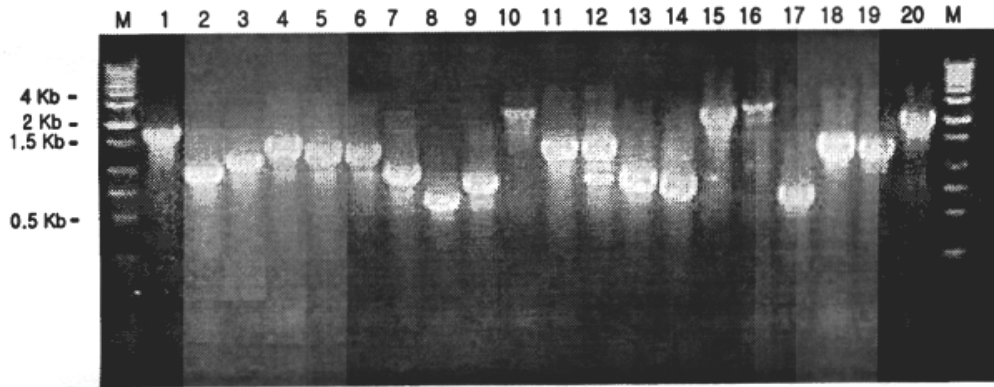


Fig. 2-4. Determination of insert size from rice cDNA library. Twenty plaques are randomly picked and insert DNA are PCR amplified with T7 and T3 primer. PCR products were electrophoresed on a 1% TAE agarose gel. Lane M: 1kb plus DNA ladder (Gibco BRL), lane 1 - 20 : PCR products.

나. 벼 병방어관련 유전자의 screening과 염기서열분석

벼 cDNA library에서 EST의 염기서열을 분석하여 NCBI database상에서 상동성을 조사하여 병저항성과 연관이 있는 유전자들을 Table 2-1에 나타내었다.

식물 및 병원균의 레이스에 상관없이 저항성 반응을 일으킬수 있는 병해충저항성의 신호전달인자로서 살리실산 (SA)과 자스몬산 (JA)등이 알려져 있다. 살리실산은 식물의 비감염부위에 PR 단백질(pathogenesis related protein)의 발현을 유도하여 궁극적으로 식물체전체에 2차감염에 대한 저항성을 전파시키는 신호전달인자(signal transducer)이다. 그리고 자스몬산은 일부 병원균과 상해 (wounding)를 수반하는 해충에 대하여 식물이 저항성을 갖도록 작용하는 신호전달인자(signal transducer)이다. SAR의 궁극적인 발현 단백질은 PR 단백질들인데 비해 자스몬산의 경우는 defensin, thionin등 유황함유 단백질들이 저항성에 관여하는 것으로 알려져 있다.

벼흰잎마름병균을 처리한 벼에서 발현이 증폭된 유전자중 NDR1/HIN1-like protein,

putative elicitor response protein, disease resistance protein, Pib, NBS-LRR type resistance gene, response regulator, Receptor like kinase, MAP kinase, putative Regulatory protein NPR1, 등 upstream에서 receptor 및 신호전달에 관련된 유전자들이 발현되었다. 또한 modification protein 으로 알려진 14-3-3 protein이나 R-gene과 interaction 하는 것으로 애기장대에서 알려진 Sgt유전자가 발현이 증폭되었다. 또한 sesquiterpene cyclase, phenylalanine ammonia-lyase과 같은 phytoalexin 생합성에 관련된 유전자들이 발현 증폭되고 lipid transfer protein LPT II, peroxidase과 같은 PR 단백질들이 발현이 증가되었으며 병원균 침입시 생성되는 ROS를 제거하는 superoxide dismutase, putative glutathione S-transferase OsGSTZ1등의 발현이 증폭되었다.

Table 2–1. Putative identification of rice ESTs related to defense

Clone No.	Putative identification	Source of comparison	Acession No.	Homology (%)	Score
7F4	oryzacystatin (cysteine proteinase inhibitor)	<i>Oryza sativa</i>	AAB24011	84	167
22E 4	lipid transfer protein LPT II	<i>Oryza sativa</i>	AAB70539.1	64	147
22H10	abscisic acid- and stress-inducible protein	<i>Oryza sativa</i>	AAB96681.1	40	100
10E 2	calcium dependent protein kinase	<i>Oryza sativa</i>	AAC05270.1	94	301
BMO004E03	glutathione S-transferase II	<i>Oryza sativa</i>	AAC64007.1	91	381
13F6	ethylene-inducible CTR1-like protein kinase	<i>Lycopersicon esculentum</i>	AAD10056.1	58	49
16H1	Sgt1	<i>Oryza sativa</i>	AAF18438.1	88	267
16H6	putative glutathione S-transferase OsGSTZ1	<i>Oryza sativa</i>	AAG32474.1	81	288
BMO004F06	protein kinase REK	<i>Oryza sativa</i>	AAG60195.1	97	356
7F9	putative disease resistance protein	<i>Oryza sativa</i>	AAK27809	67	198
18D1	putative 14-3-3 protein, brain specific protein	<i>Oryza sativa</i>	AAK38492.1	97	137
10G1	protein kinase-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAK43886.1	41	33
17H2	RSH-like protein	<i>Capsicum annuum</i>	AAK82651.1	86	269
7D6	protein kinase - like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAK96815.1	96	305
9H1	Putative wall-associated kinase 2	<i>Oryza sativa</i>	AAK98689.1	55	132
21H11	containing a von Willebrand factor type	<i>Oryza sativa</i>	AAK98695.1	66	192
BMO02001C01	Putative wall-associated protein kinase	<i>Oryza sativa</i>	AAL25177.1	51	95
BMO02004G06	abscisic acid response protein	<i>Cucumis melo</i>	AAL27560.1	45	59
BMO02004F03	sesquiterpene cyclase	<i>Zea mays</i>	AAL59230.1	67	62
BMO02A10	pathogen-related protein	<i>Oryza sativa</i>	AAL74406.1	95	156
12D12	Putative wall-associated kinase 1	<i>Oryza sativa</i>	AAL76192.1	57	125
23A11	anti-disease protein 1	<i>Oryza sativa</i>	AAL77198.1	78	201
BMO02002D02	disease-resistant-related protein, histone H3	<i>Oryza sativa</i>	AAL78367.1	96	254
9H5	putative MAP3K epsilon protein kinase	<i>Oryza sativa</i>	AAL87195.1	86	159
BMO004D07	receptor protein kinase-like	<i>Oryza sativa</i>	AAM00988.1	70	238
22E 7	putative disease resistance	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAM45000.1	76	93
BMO004A01	antigen receptor, putative	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAM65756.1	76	127
18B9	GSK-like kinase, putative shaggy kinase alpha	<i>Triticum aestivum</i>	AAM77397.1	85	141
22C6	putative serine/threonine protein kinase	<i>Oryza sativa</i>	AAM88622.1	80	261

Table 2-1. continued

17A4	putative PKC η -interacting protein	<i>Oryza sativa</i>	AAM93692.1	99	336
16B7	Putative abscisic acid-induced protein	<i>Oryza sativa</i>	AAN05334.1	62	26
18D4	Putative response regulator 10	<i>Oryza sativa</i>	AAN52739.1	100	358
7F3	phenylalanine ammonia-lyase	<i>Oryza sativa</i>	AAO72666.1	85	296
15H1	cell death suppressor protein Lls1 homolog	<i>Oryza sativa</i>	AAP21411.1	83	139
7G12	protein serine/threonine kinase	<i>Lophopyrum elongatum</i>	AF131222_1	60	113
BMO004B05	Sgt	<i>Oryza sativa</i>	AF192467_1	96	192
22B5	receptor-like kinase Xa21-binding protein 3	<i>Oryza sativa</i>	AF272860_1	96	164
BMO004E12	MAP kinase phosphatase	<i>Oryza sativa</i>	AF312746_1	76	195
BMO02G07	putative leucine-rich repeat protein	<i>Oryza sativa</i>	AF364178_1	100	359
15C8	disease-resistant-related protein	<i>Oryza sativa</i>	AF467728_1	89	193
23G1	ferredoxin	<i>Oryza sativa</i>	BAA06436.1	73	158
16A10	OsPK4	<i>Oryza sativa</i>	BAA83688.1	87	97
14H4	kinase-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BAB02494.1	64	46
7H9	putative wall-associated kinase 2	<i>Oryza sativa</i>	BAB40021.1	67	121
22D8	kinase-like protein	<i>Oryza sativa</i>	BAB41205.1	90	263
18F3	putative protein kinase	<i>Oryza sativa</i>	BAB56022.1	75	117
BMO01C03	putative receptor-protein kinase	<i>Oryza sativa</i>	BAB56062.1	91	270
25E 11	putative protein kinase APK1A <i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Oryza sativa</i>	BAB61937.1	39	32
16C1	putative peroxidase	<i>Oryza sativa</i>	BAB63623.1	92	290
BMO02001H09	putative serine/threonine-specific protein kinase	<i>Oryza sativa</i>	BAB63697.1	92	281
18C11	putative MRP protein (ATP/GTP-binding protein)	<i>Oryza sativa</i>	BAB68067.1	56	58
BMO02001H01	putative RIC1_ORYSA RAS-RELATED PROTEIN RIC1, small GTP-binding protein	<i>Oryza sativa</i>	BAB85387.1	98	182
23H6	MAP kinase-like protein	<i>Oryza sativa</i>	BAB89473.1	92	314
13F7	putative protein kinase	<i>Oryza sativa</i>	BAB89924.1	97	82
22D4	putative receptor-like protein kinase	<i>Oryza sativa</i>	BAB91716.1	90	144
16D11	putative chitinase III	<i>Oryza sativa</i>	BAC06930.1	71	42
17B4	putative elicitor response protein	<i>Oryza sativa</i>	BAC07321.1	97	296
23B12	calmodulin	<i>Oryza sativa</i>	BAC10352.1	100	258
13E 5	putative Regulatory protein NPR1	<i>Oryza sativa</i>	BAC10768.1	94	137
15B8	putative protein kinase Xa21 receptor type precursor	<i>Oryza sativa</i>	BAC10827.1	63	69

Table 2–1. continued

18D9	Calcium–dependent protein kinase	<i>Oryza sativa</i>	BAC20693.1	96	360
23D9	14–3–3–like protein	<i>Oryza sativa</i>	CAB77673.1	76	97
21A5	NDR1/HIN1–like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAC34513.1	65	118
11H1	putative cold–induced protein	<i>Oryza sativa</i>	CAC81268.1	42	38
17F5	Similar to gene for Pib, NBS–LRR type resistance gene	<i>Hordeum vulgare</i>	CAD45030.1	61	130
15B9	putative mitogen–activated protein kinase kinase	<i>Oryza sativa</i>	CAD45180.1	83	
10A3	putative MAP kinase	<i>Oryza sativa</i>	CAD54742.1	83	246
BMO02003A03	heat shock protein	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	NP_078243.1	67	59
14H5	PRLI–interacting factor L	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_173025.1	76	71
BMO02004H03	putative MAP kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_173271.1	60	67
16E 9	Putative protein kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_173302.1	62	129
BMO02003H04	receptor–like protein kinase, putative disease resistance protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_179108.1	63	98
BMO004B08	putative WD–40 repeat protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_179533.2	70	163
17E 12	protein kinase – like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_190276.1	77	92
22A2	receptor–like serine/threonine kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_564003.1	64	90
BMO02003C04	putative protein kinase, putative serine/threonine–specific protein kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_565408.1	78	220
22C10	protein kinase like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_568041.1	90	259
12D3	oryzacystatin	<i>Oryza sativa</i>	P09229	100	191
15G3	anti–disease protein 1	<i>Oryza sativa</i>	P11051	100	63
BMO02004G03	anti–disease protein 1, ferredoxin	<i>Oryza sativa</i>	P11051	79	174
BMO02003C12	superoxide dismutase	<i>Oryza sativa</i>	P28756	94	142
11H12	isoflavone reductase–like protein	<i>white lupine</i>	P52581	82	180
BMO02004G05	ferredoxin–thioredoxin–reductase	<i>Zea mays</i>	P80680	93	132
24D11	nonspecific lipid–transfer protein 2 precursor (LTP 2)	<i>Oryza sativa</i>	Q42978	84	167
23A4	phenylalanine ammonia–lyase	<i>Oryza sativa</i>	S06475	92	282
8H4	phenylalanine ammonia–lyase	<i>Petroselinum crispum</i>	S48726	52	32
BMO02004F06	reductase (ferredoxin) (EC 1.8.7.1) sir precursor	<i>Zea mays</i>	T01695	95	281
7C10	lipid transfer protein LPT II	<i>Oryza sativa</i>	T02042	100	108
24D3	abscisic acid– and stress–induced protein	<i>Oryza sativa</i>	T02663	39	95
24B8	protein kinase homolog	<i>Oryza sativa</i>	T03444	94	97
BMO004A03	pathogen–inducible alpha–dioxygenase	<i>Nicotiana tabacum</i>	T03631	93	55

Table 2–1. continued.

25E 11	putative protein kinase APK1A	<i>Oryza sativa</i>	BAB61937.1	39	32
16C1	putative peroxidase	<i>Oryza sativa</i>	BAB63623.1	92	290
BMO02001H09	putative serine/threonine–specific protein kinase	<i>Oryza sativa</i>	BAB63697.1	92	281
18C11	putative MRP protein (ATP/GTP–binding protein)	<i>Oryza sativa</i>	BAB68067.1	56	58
BMO02001H01	putative RIC1_ORYSA RAS–RELATED PROTEIN RIC1, small GTP–binding protein	<i>Oryza sativa</i>	BAB85387.1	98	182
23H6	MAP kinase–like protein	<i>Oryza sativa</i>	BAB89473.1	92	314
13F7	putative protein kinase	<i>Oryza sativa</i>	BAB89924.1	97	82
22D4	putative receptor–like protein kinase	<i>Oryza sativa</i>	BAB91716.1	90	144
16D11	putative chitinase III	<i>Oryza sativa</i>	BAC06930.1	71	42
17B4	putative elicitor response protein	<i>Oryza sativa</i>	BAC07321.1	97	296
23B12	calmodulin	<i>Oryza sativa</i>	BAC10352.1	100	258
13E 5	putative Regulatory protein NPR1	<i>Oryza sativa</i>	BAC10768.1	94	137
15B8	putative protein kinase Xa21 receptor type precursor	<i>Oryza sativa</i>	BAC10827.1	63	69
18D9	Calcium–dependent protein kinase	<i>Oryza sativa</i>	BAC20693.1	96	360
23D9	14–3–3–like protein	<i>Oryza sativa</i>	CAB77673.1	76	97
21A5	NDR1/HIN1–like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAC34513.1	65	118
11H1	putative cold–induced protein	<i>Oryza sativa</i>	CAC81268.1	42	38
17F5	Similar to gene for Pib, NBS–LRR type resistance gene	<i>Hordeum vulgare</i>	CAD45030.1	61	130
15B9	putative mitogen–activated protein kinase kinase	<i>Oryza sativa</i>	CAD45180.1	83	
10A3	putative MAP kinase	<i>Oryza sativa</i>	CAD54742.1	83	246
BMO02003A03	heat shock protein	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	NP_078243.1	67	59
14H5	PRLI–interacting factor L	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_173025.1	76	71
BMO02004H03	putative MAP kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_173271.1	60	67
16E 9	Putative protein kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_173302.1	62	129
BMO02003H04	receptor–like protein kinase, putative disease resistance protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_179108.1	63	98
BMO004B08	putative WD–40 repeat protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_179533.2	70	163
17E 12	protein kinase – like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_190276.1	77	92
22A2	receptor–like serine/threonine kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_564003.1	64	90
BMO02003C04	putative protein kinase, putative serine/threonine–specific protein kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_565408.1	78	220
22C10	protein kinase like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_568041.1	90	259

Table 2-1. continued.

12D3	oryzacystatin	<i>Oryza sativa</i>	P09229	100	191
15G3	anti-disease protein 1	<i>Oryza sativa</i>	P11051	100	63
BMO02004G03	anti-disease protein 1, ferredoxin	<i>Oryza sativa</i>	P11051	79	174
BMO02003C12	superoxide dismutase	<i>Oryza sativa</i>	P28756	94	142
11H12	isoflavone reductase-like protein	<i>white lupine</i>	P52581	82	180
BMO02004G05	ferredoxin-thioredoxin-reductase	<i>Zea mays</i>	P80680	93	132
24D11	nonspecific lipid-transfer protein 2 precursor (LTP 2)	<i>Oryza sativa</i>	Q42978	84	167
23A4	phenylalanine ammonia-lyase	<i>Oryza sativa</i>	S06475	92	282
8H4	phenylalanine ammonia-lyase	<i>Petroselinum crispum</i>	S48726	52	32
BMO02004F06	reductase (ferredoxin) (EC 1.8.7.1) sir precursor	<i>Zea mays</i>	T01695	95	281
7C10	lipid transfer protein LPT II	<i>Oryza sativa</i>	T02042	100	108
24D3	abscisic acid- and stress-induced protein	<i>Oryza sativa</i>	T02663	39	95
24B8	protein kinase homolog	<i>Oryza sativa</i>	T03444	94	97
BMO004A03	pathogen-inducible alpha-dioxygenase	<i>Nicotiana tabacum</i>	T03631	93	55
8D10	cathepsin B-like cysteine proteinase	<i>Triticum aestivum</i>	T06466	75	175
BMO02004G04	pitriylsin, probable proteinase	<i>Pisum sativum</i>	T06521	78	289
10E 9	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	T08575	67	147
7D1	similar to autoimmune regulator	<i>Mus musculus</i>	XP_228067.1	51	35

DNA chip 제작을 위해 분석된 2000 여 개의 clone 중에서 transcription factor와 protein kinase와 homology를 보인 100 여 개의 clone을 선발하였다 (Table 2-2). 병방어 신호전달경로에 관련된 유전자를 분리하고자 protein kinase와 전사인자들에 관련된 유전자들을 분리하였다. 약 56종의 전사인자와 34종의 kinase들이 발현됨을 확인 하였다. 전사인자 중에는 npr1과 상호작용하는 TGA type 전사인자들이 있었으며 AP2 domain을 지니고 있는 EREBP type 전사인자들도 있었다(Kim et al., 2000). Cheong *et al.*, (2003)은 벼 EREBP1 유전자는 BWMK1 인 map kinase protein에 의해 phosphorylation되고 EREBP 유전자는 PR protein 들의 promoter에 있는 GCC box element (AGCCGCC)에 결합하여 PR 단백질의 발현을 조절함을 밝히기도 하였다. 쌍자엽식물에서 광역 기주저항성 (broad spectrum resistance)은 systemic acquired resistance에 의해 나타난다. Systemic acquired resistance는 npr1 유전자의 발현에 의해 나타나며 애기장대에서 npr1 유전자는PR 단백질들의 발현을 조절하는 basic leucine zipper type인 TGA 전사인자상호작용을 하는 것으로 알려져 있다. Fitzgerald et al., (2005)은 npr1와 상호작용하는 벼의 TGA 유전자중 rTGA2.1을 RNAi로 blocking시켰을 때 PR 유전자의 발

현이 증폭되고 벼 흰잎마름병균에 대해서도 저항성을 나타냈으며 연구자들은 rTGA2.1가 negative regulator임을 제시하였다. 야생벼에서 subtractive hybridization에 homolog 분리한 유전자중에서 fungal elicitor와 wounding에 의해서 발현이 3배이상 증폭된 156개 클론을 분리하여 상동성을 비교 하고 categorization한 결과 cell rescue, defense, virulence, transcription, cellular transport에 관련된 것으로 나타났다 (Kim et al., 2005).

Table 2-2. EST clones related to transcription factors and protein kinases

Serial No.	Clone No.	Characreristic	Acession No.
OsTF 1	BMO02003H03	putative homeodomain transcription factor	AAK00972.1
OsTF 2	24E 6	transcription factor VIP2 protein	AAK70903.1
OsTF 3	15H8	putative WD-repeat protein	AAK71552.1
OsTF 4	BMO02001F09	leucine zipper-containing protein	AAL13304.1
OsTF 5	14H7	Putative RING-H2 finger protein RHB1a	AAL25175.1
OsTF 6	24C12	putative zinc finger DNA-binding protein	AAL84292.1
OsTF 7	16H8	putative EREBP-type transcription factor	AAM00285.1
OsTF 8	BMO02001F12	F-box protein family	AAM65437.1
OsTF 9	15F10	zinc finger protein	AAM65531.1
OsTF 10	27C2	putative WD containing protein	AAN05533.1
OsTF 11	14F9	PNIL34, bZip containing protein	AAO89566.1
OsTF 12	OsNAC6	NAC protein family (NAC6)	AB028125
OsTF 13	OsNAC5	NAC protein family (NAC5)	AB028184
OsTF 14	BMO02004B01	bZIP transcription factor	BAA36492.1
OsTF 15	12A10	homeobox gene	BAA77821.2
OsTF 16	7C7	MADS box-like protein	BAA81886.1
OsTF 17	BMO02002A09	putative CREB-binding protein	BAB40067.1
OsTF 18	17G7	putative zinc finger protein	BAB64114.1
OsTF 19	24B7	transcription factor regulator	BAB67981.1
OsTF 20	OsTGA2	bZIP transcription factor (TGA2 type)	BAB72061
OsTF 21	21G12	putative Myb-related transcroption factor	BAB78640.1
OsTF 22	22F7	Rab7 family	BAB78669.1
OsTF 23	15E 12	putative zinc finger protein	BAB86142.1
OsTF 24	27B8	GRAS family transcription factor	BAB86447.1
OsTF 25	BMO004G06	bZIP transcription factor	BAB90561.1
OsTF 26	10D11	putative transcription factor TEIL	BAC10338.1
OsTF 27	8D12	similar to ring-H2 zinc finger protein	BAC16026.1
OsTF 28	24F2	P-type R2R3 Myb protein	BAC16186.1
OsTF 29	BMO02004C01	yeast dcpl transcription factor	BAC20813.1

Table 2–2. continued

OsTF 31	17H7	RNA binding protein	BAC56813.1
OsTF 32	10D2	zinc finger protein	NP_173915.1
OsTF 33	16H10	RNA-binding protein	NP_174556.1
OsTF 34	BMO02001G02	transcription factor hap5b	NP_176013.1
OsTF 35	12C3	putative RING zinc finger protein	NP_178156.1
OsTF 36	BMO02002G06	putative WD-repeat protein	NP_178164.1
OsTF 37	BMO02003H05	putative RING zinc finger protein	NP_179155.1
OsTF 38	BMO02002D06	putative MYB family transcription factor	NP_180597.1
OsTF 39	7E 4	DNA binding protein	NP_181718.1
OsTF 40	9D4	putative ankyrin repeat protein	NP_187566.1
OsTF 41	18B4	bHLH protein	NP_188620.1
OsTF 42	BMO02004H05	zinc finger-like protein	NP_190193.1
OsTF 43	BMO2001D12	leucine zipper-containing protein	NP_191253.1
OsTF 44	17F2	CONSTANS B-box zinc finger family protein	NP_195607.2
OsTF 45	22E 2	transcription initiation factor IID-associated factor-like protein	NP_197897.1
OsTF 46	18H9	KH domain protein	NP_199431.1
OsTF 47	10E 1	putative bHLH transcription factor	NP_200279.1
OsTF 48	15G9	similar to RRM-containing RNA-binding protein	NP_683478.1
OsTF 49	BMO02003B09	DNA BINDING PROTEIN S1FA	P42553
OsTF 50	8A5	RING-finger protein	S49446
OsTF 51	22F9	RNA binding protein	T05727
OsTF 52	24C4	probable zinc finger protein SCOF-1	T09602
OsTF 53	25A6	COG1813, Predicted transcription factor	T10078
OsTF 54	BMO02003E05	zinc finger protein	T48868
OsTF 55	OsTGA3	bZIP transcription factor (TGA3 type)	
OsTF 56	OsTGA5	bZIP transcription factor (TGA5 type)	
OsTF 57	7D6	protein kinase – like protein	AAK96815.1
OsTF 58	BMO02G07	putative leucine-rich repeat protein	AF364178_1
OsTF 59	10A3	putative MAP kinase	CAD54742.1
OsTF 60	10E 9	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	T08575
OsTF 61	BMO01C03	putative receptor-protein kinase	BAB56062.1
OsTF 62	BMO004D07	receptor protein kinase-like	AAM00988.1
OsTF 63	BMO01C03	putative receptor-protein kinase	BAB56062.1
OsTF 64	7D6	protein kinase – like protein	AAK96815.1
OsTF 65	7H9	putative wall-associated kinase 2	BAB40021.1
OsTF 66	9H5	putative MAP3K epsilon protein kinase	AAL87195.1
OsTF 67	10A3	putative MAP kinase	CAD54742.1

Table 2-2. continued

OsTF 68	10E 9	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	T08575
OsTF 69	10G1	protein kinase-like protein	AAK43886.1
OsTF 70	12D12	Putative wall-associated kinase 1	AAL76192.1
OsTF 71	13F7	putative protein kinase	BAB89924.1
OsTF 72	14H4	kinase-like protein	BAB02494.1
OsTF 73	15B9	putative mitogen-activated protein kinase kinase	CAD45180.1
OsTF 74	16E 9	Putative protein kinase	NP_173302.1
OsTF 75	17A4	putative PKCq-interacting protein	AAM93692.1
OsTF 76	17E 12	protein kinase - like protein	NP_190276.1
OsTF 77	18B9	GSK-like kinase, putative shaggy kinase alpha	AAM77397.1
OsTF 78	18D9	Calcium-dependent protein kinase	BAC20693.1
OsTF 79	18F3	putative protein kinase	BAB56022.1
OsTF 80	18H11	putative receptor-protein kinase	BAB56062.1
OsTF 81	22A2	receptor-like serine/threonine kinase	NP_564003.1
OsTF 82	22C6	putative serine/threonine protein kinase	AAM88622.1
OsTF 83	22C10	protein kinase like protein	NP_568041.1
OsTF 84	22D4	putative receptor-like protein kinase	BAB91716.1
OsTF 85	22D8	kinase-like protein	BAB41205.1
OsTF 86	22D9	MAP kinase-like protein	BAB89473.1
OsTF 87	23H6	MAP kinase-like protein	BAB89473.1
OsTF 88	24B8	protein kinase homolog	T03444
OsTF 89	25E 11	putative protein kinase APK1A Arabidopsis thaliana	BAB61937.1
OsTF 90	BMO02003C04	putative protein kinase, putative serine/threonine-specific protein kinase	NP_565408.1
OsTF 91	BMO02003H04	receptor-like protein kinase, putative disease resistance protein	NP_179108.1
OsTF 92	BMO02001H09	putative serine/threonine-specific protein kinase	BAB63697.1
OsTF 93	BMO02001C01	Putative wall-associated protein kinase	AAL25177.1
OsTF 94	BMO02004H03	putative MAP kinase	NP_173271.1
OsTF 95	BMO004F06	protein kinase REK	AAG60195.1
OsTF 96	7G12	protein serine/threonine kinase	AF131222_1
OsTF 97	9H1	Putative wall-associated kinase 2	AAK98689.1
OsTF 98	10E 2	calcium dependent protein kinase	AAC05270.1
OsTF 99	15B8	putative protein kinase Xa21 receptor type precursor	BAC10827.1
OsTF 100	16A10	OsPK4	BAA83688.1

다. Microarray 분석 결과

Aglient Rice Oligo Microarray Kit를 이용하여 동진벼에 *Magnaporthe grisea* KJ-301(02-013 strain)을 처리한 1시간과 24시간 후의 동진벼에서 RNA를 분리하여 Microarray 분석을 실시한 결과 up-regulated된 host-pathogen interaction, response to external stimulus, response to stress, cell death, receptor 관련 유전자들을 screening할

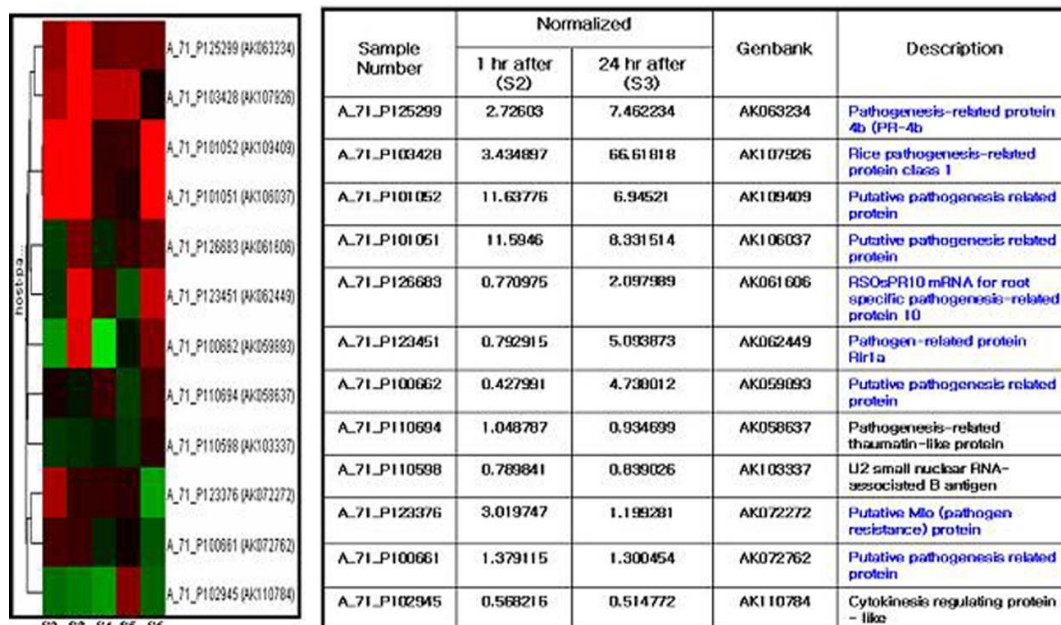
수 있었다 (Fig. 2-5).

S2, S3, S4, S5, S6은 동진벼에 도열병 처리 후 1시간(S2), 동진벼에 도열병 처리 후 24시간(S3), 병방어 유전자를 RNAi로 knock down 시킨 동진벼 strain 1(S4), 병방어 유전자를 RNAi로 knock down 시킨 동진벼 strain 2(S5), 병방어 유전자를 RNAi로 knock down 시킨 동진벼 strain 3(S6)의 분석 결과를 나타내고 있다. 초기 발현하는 유전자가 농업적 이용시 매우 유익할 것으로 사료되어 1시간 후 발현을 확인하고 대부분의 PR gene 들이 24시간에 발현이 잘되어 병처리후 24시간에 발현되는 유전자들을 분석하였다. Host pathogen interaction 에 관련된 유전자들을 통계적으로 유의성을 나타낸 결과를 보면 12종의 유전자들의 발현이 변화되었다. 그중 특히 병원균 처리 후 1시간 보다 24시간에 발현이 증가한 유전자 (Host pathogen interaction)는 PR protein PR-4b (AK063234), PR protein class 1 (AK107926), PR10 (AK61606), PR protein Rir1A (AK062449), putative PR protein (AK059893)들이었으며 24시간 후보다 1시간 처리 후, 즉 초기 발현이 증가된 유전자는 putative pathogenesis related protein인 AK109409 와 AK106037이 있었으며 putative Mlo(pathogen resistance) protein인 AK072272가 있었다. 외부자극 (Response to external stimulus)에 의해 발현이 증폭되는 upstream의 receptor 역할을 할 것으로 예측되는 유전자 중에서는 putative disease resistance protein (AK065165), putative osmotic stress activated protein kinasse (AK067395), Isolate 29050 disease resistance-like protein (AK065760), putative Mlo (pathogen resistance) protein (AK072272) 유전자들이 초기에 발현이 증폭되었다.

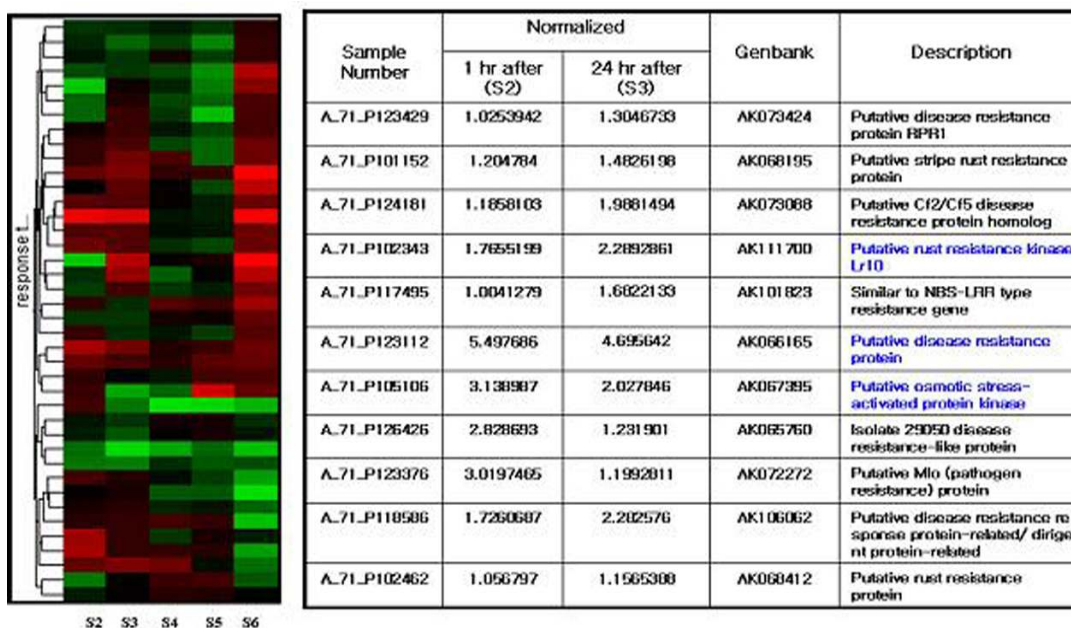
Stress 반응에 관련된 유전자(Response to stress) 에서는 putative osmotic stress activated protein kinasse (AK067395) 가 초기에 발현되고 water stress inducible protein (KC917) 인 AK069863은 24시간 후 발현이 증가되었다.

Cell death에 관련된 유전자 (cell death) 중에서는 cell death related protein (AK105835) 가 병원균 처리 후 1시간에 발현 증가하였고 receptor는 receptor like protein kinase중 AK100394 AK111680, AK106635, AK111546이 병원균 처리 후 1시간에 발현이 증폭되고 AK111612, AK100376, AK111748은 24시간 처리했을 때 발현량이 더 많았다. 그러나 AK065488은 1시간 처리와 24시간 처리에서 거의 비슷한 발현 증가 결과를 보였다.

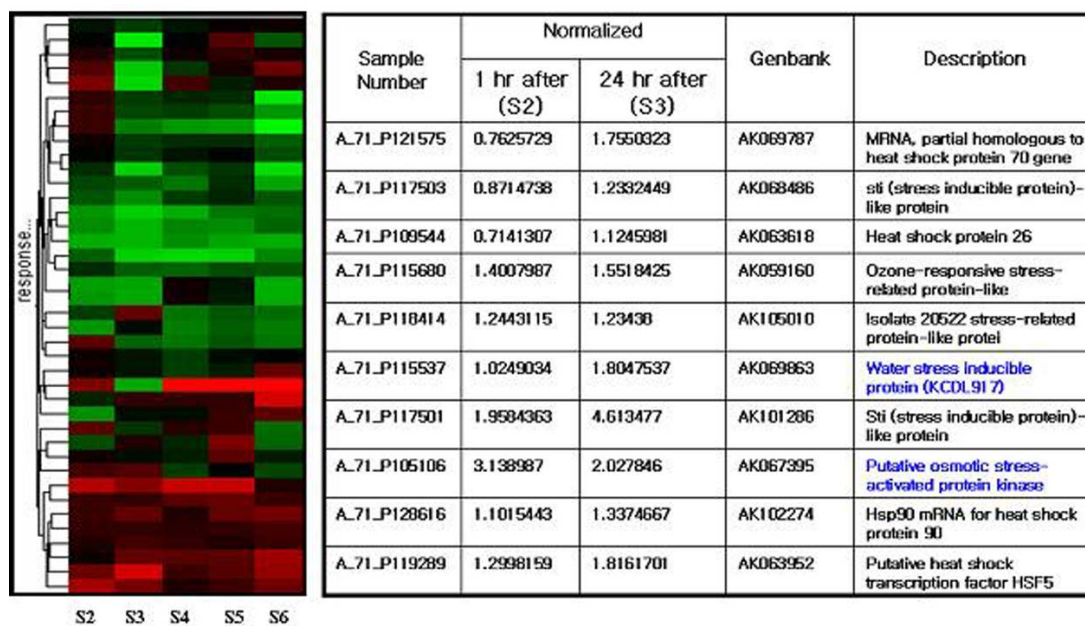
1. Host-pathogen interaction



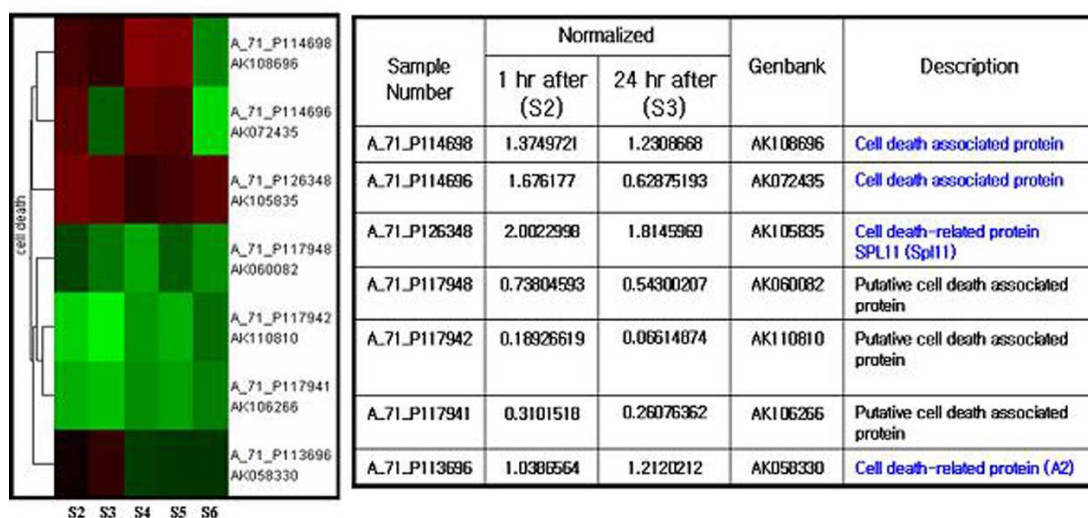
2. Response to external stimulus



3. Response to stress



4. Cell death



5. Receptor

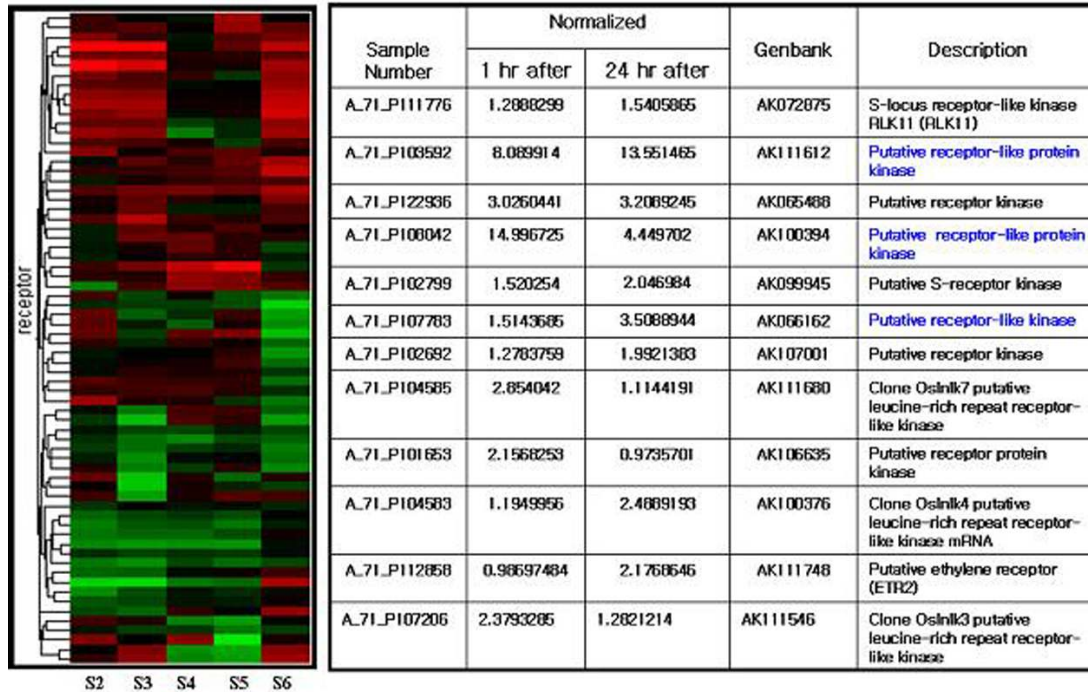


Fig. 2-5. Microarray analysis of genes up regulated genes by *Magnaporthe grisea* infection.

라. 병저항성 단백질을 코딩하는 벼 *OsDRP* 유전자의 특성 분석

많은 종류의 병방어 유전자들이 microarray 분석 결과 얻어졌으나 더욱더 정밀검정을 하고자 여러 종류의 무생물적 스트레스, 생물적 스트레스, 호르몬 등을 처리하고 Northern 분석을 실시하여 유전자의 발현을 확인하였다. 생물적 스트레스 중 compatible strain을 처리 하였을 때에 비해 Incompatible strain 병원균을 처리 하였을 때 발현량이 증폭되는 유전자에 관심을 가졌다. *OsDRP* 유전자는 896개의 아미노산을 암호화하는 2,691 bp 크기의 full length cDNA로 이루어져 있으며 (Fig. 2-6), NB-ARC domain과 LRR domain을 가지는 병저항성 유전자의 하나로 추정되었다 (Fig. 2-7).

```

1      GCTAGCCAA GCCACCDCCAAGAACADGAGGGGAGGGATACAAACAATTTCAGAGATTCAGTIGATCATAICCAAGATTCAAGA
91     AGACGAGCAGSAGCAAGAGAGAGSAGSAAITCTGTTCAATTCATIGATTCATCCATAICCAAGAICCAAGAGAGCAGGCAGAGAAITAGAA
181     AGAATCTGTTGATGCAATGGATTTTCATCATCCACAGATCCACAGAGAGAGAGAGGGCAGGGAAGAAATGTTGGATTGATTTTIGAA
271     GAGTGGAGGC
272     ATGAGAGGCTGTTCCAGAGAGCTGGCGGGGAGCGGGCTGAGAGGAGCTGCTCGCGGGTGAGGGGGACGTTCTTCAGAGTGCAGCGCG
1     NEERLRFELAELEAVKELLRRAURGITFEFCRSTIA
382     GAGCGGCTGCCCGGACGTGGAGCCGCTGCTGCCGCTGGAGCGCCAGCGGGCCAGGGGGGAGAGGGTGGGGCAGCGGGCGGAGC
31     ERLRLGCCRRNUEPFLLEFLUQFQAAGGGGGGGUMGHGRS
452     GCCGCGAGCTGGCGGAGCTGGCGCGAGCTGAGGGAGCGCTGAGAGCTGGCGCGCCGCGCTCGCGGCGGGGAGGACGTTAC
81     AGELELAELAQLLREAGGELLAERRAASAAPRUMNUY
542     CCACCGCCAGCTGGCGGCGAGGGAGCCCGACCCCATCGCGCGCTGCTCCCGCAGCAGCAGCAAFPAHULD
91     RPAQGLRERNENAADTAIAARUULSCRHAAPFAHULD
832     GGGCTGGCCGCTCGCGGAGCGGGCCGCAICGCGCCGCTCGAGCGCCGGCTCGAGGAGGTCGCGCCGCGGAGCAGCAGCAG
121     EURLREDEADARRIGRLEERREFUEEUAQAQQQ
722     CAGCGCGGGCCAGCGCCTTCACCCCGCCACTCCTCCCTCGCTCICCCCCACACCTCCGCGCCCAAGGCCAIGGCGGATG
151     QRANAATALEFPFAISLFFALFPFPFPFPAAN
812     ATGGCCATGATAGCAGCCAGGCAATGGGGTGGGATGGAGTGGAGCTCCCGTCCGGAGCAGCAGGAGGACGAGAGCAGT
181     NANGUUGNEAUELELFDDEEDEN
902     GTGGCGGGCGGTGAGGCTGGCAAGAGAGAGTGAAGAGATGGTGAAGAGCGGCGGCGGGGGTGGGAGGCCGTCGGAACTTCG
211     UGGLFURUGKELNUNSGGFGGUEAVGIC
392     GGCAAGGCGGCGGCAAGGACCCAGCTCGCCATGGAACTTCAGGATACAAAATCCGAGATCTGTTACAAAAGACAGTGTAT
241     GNGLSNGKIHRRHGNLGGSQNFRSHRKY
1082    ITGATCCITGCTGGTTCCTGGAAGAGCTACTACGATAGAGTCTCTTIGAGGAGATCTCCGAGTCCGCAATCTGGACACTIC
271    LILCLMFLMKGLYFSDRFETISQSAANLDTI
1172    AAGATGAGCTAGGGAGCAGTCAAGTGAAGCCITGCTGGGCTCAACCAAGATCCAGAAITGGCACTCAGTGGGGCCAGG
301    KNKLMELQISGNLUGLGAYNQIFEMQLKGLGF
1282    GGCAGAGACCTGCTGTTAICCTTGATGATGCTGGCTCTCTCCAGCTAGAGGAGCTCACTTCAGTCCCTGGGTCAGAGACA
331    DKGFLULVILDDVULSLSQLLEELIFKFFPFGCKI
1352    CTGTGATATCAAGCTCAAGTCCCTCGTGGTCCCGGACTTACGAAGTGGAGTGCATGATGAGGAGCGGGCTCTTTCCTCTTC
381    LVUSLRFKFLFSLVIRIYEHELELDEEALALN
1442    ITGCTGCTCCITGATCAGGAGTCCGTTCCCTCGGACTGGACGAACTGGTICGGCAGGTTGCTGAGAGTGCAGAGGACTCCCT
391    CRAAFDQESUVPTADKKLVLURVAAE CRGLF
1532    CTAGCATGAAGTATCGGTCGCTGCGGGATCAGCTTCTAGATATGGTIGAGTGGAGAACCGGTTGCTGGGAGGAGGACT
421    LALKLIGASLKRDPFPFKIMULSARKNRRLSREGIT
1822    ATATGACTCTCAGAGCACAACTTGGAGAGGATGGCCAGGCACTGAGTGTCTGTCAGGAGGATAGAGAAITGTTCTTGTAT
451    ISDSHFETIKLLEHRNRASIECLSGKVRREDCLF
1712    CTGGTTCGTTCCGGAGGATAGAAATCCCATGGAGTGTGTGATCAATATGGATGGAGATCATGATCTTGTAGAGCCGGATGCC
481    LGCCTFPFBGAKKILELDVULININIUHNEIHDLDDEFDA
1802    TCCGCTCTGGTGGATCAACAGAGATCTCTCCCTAGTATAGATGACAGAGAACAGCCCGCATTTGTACGAGCTAC
511    FRAILULFSLNRKHLLELTLUNDAAGNKAAGDLLYSY
1892    CATGACTTCTCGGATACCAACATGATGTATGAGGGATCAGCGCTTCCATGATGATGTTGCTGCAACACGGAGACCGCTG
541    LDFSLVTLQHDULRDLRDLALHNSGRDLALNMHRRL
1882    GTGATGCCAAGAGAGAGACTACTACGAGGATGAGGAGGATGAGGACACTCCGTTCCAGGCTCAGATAGTITCCATTCATADA
571    NFRRREBESLFRKDULFNKDFPEAQIU SHI
2072    GGTAGAGAGAGAAITGACTGGTCCAGTGGAGCTTCCCGAGCGGAGTGCITATCCCACTTCCGCTCAGGTATATATCTC
801    GENKESDUMFNSEFRAEULELILHFASVUYLYL
2152    CCACCATTCATGCAACATGCAAGCTTGAAGCCCTGAGGCTGAGTCACTTGGACCACTCAGTGCACCCCTGATACCTTATCCGCC
831    LFFAISAIINQLNLRALULIINYLGGACCACTTSAITLDEHLSA
2252    TTCACCGCTCAGTACCTGAGGAGCCTTGGCTGAGAGATCAGCTTCCACCGCTACCAAAACCAAACTCCACTGAGAGACCTG
881    FTTTTLSDELRSLELLEKRITLFPFLFRITITIFLRKHL
2342    CGCAAGATATCCCTGCTCTGTGAGCTGACCAACAGTTCAGAGGATCAAAGTGGATCTCTGATGACATCCCGCGCTATCCAAC
891    RKISLVLLELTNLSLRGSKVDLSTNFPRLSN
2432    CTCACCAITGACCACTGATAGACCIGAGGAGCTACCACTGATATGTAATCAGTTCCTGGGAGGATCTCCATCTCAAACTG
721    LITIDHCTIDLKLKLELPSLSICEISSSLESISISSNLC
2522    CATGACTACAGAGCTTCCATGAGCTGGGCAAGCTGCAITGGCTGAGCACTCAAGGATACGCTGCGCGCTCTGGGGCTC
751    HDLITELFYELEGLKLHCLLSLRLRUYACFALWRL
1812    CCGCTTCGATAAGCAGCTGAGAGGGTGAATACCTGACATTCGAGTGTGTCACCTGAGGACCTCCCTGAGGAGCTCGGCTAC
781    PFSSTVCSLKRRLKYLDIISQCVNLITDLFEEELGH
2702    CTGACAGCCITGGAGAGATCGACATCGGAGATGCTCGGACITGAGGAGCCITCCGAGGTCGCTCAGCTCAGTCCCTCGGGCAC
811    HTSLEKI DNRECSSRLRSLFRSSSLKSLGH
2792    GTCGTGTCGAGCAGGAGACCGGGTGGTGGAGGAGAGCTGAGCAGGATCCAGAGCTCCGAGGTCAGGATGAGGAGCAATCCAC
841    UVCDAEETA LLWRAEA EQVIPDLRVQDGGT IH
2882    ITGCAATITGACATGTCAGTICAGTICAGTICAGTICAGTICAGTICAGTICAGTICAGTICAGTICAGTICAGTICAGTICAGT
871    TSAI LITCSVFNFNLILKQKQPKLCIAEKIEP
3242    AAGCAGAGATATTTACATACATAGCAATACAAATACATACATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
332    CCAATACATGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT

```

Fig. 2-6. Translation of the rice *OsDRP* gene. Purple color indicated NB-ARC domain and blue color indicated LRR domain.

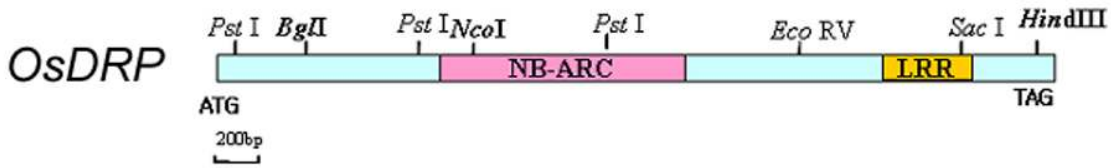


Fig. 2-7. Gene structure of the rice *OsDRP* gene.

OsDRP 유전자의 유전적인 유연관계를 조사해본 결과 *Arabidopsis thaliana*의 CC-NBS-LRR 계열의 병저항성 유전자들과 연관이 많다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 2-8).

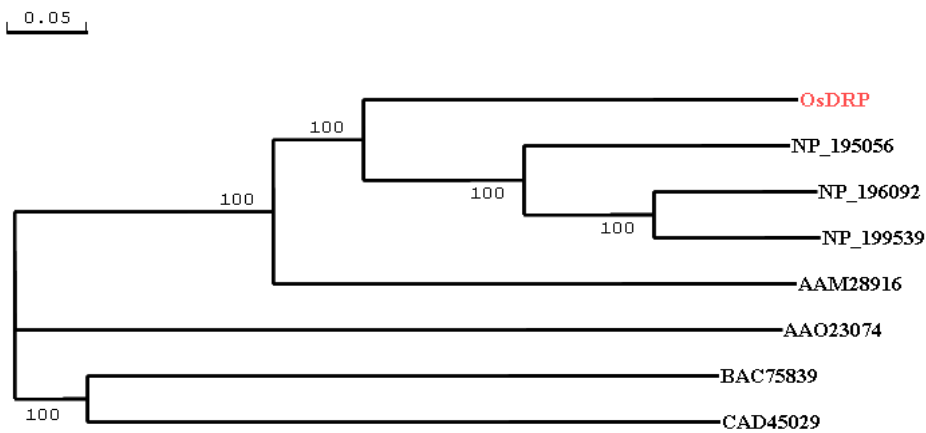


Fig. 2-8. Phylogenetic tree of rice disease resistant protein gene *OsDRP*. NP_195056; disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) of *Arabidopsis thaliana*, NP_196092; disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) of *Arabidopsis thaliana*, NP_199539; disease resistance protein (NBS-LRR class) of *Arabidopsis thaliana*, AAM28916; disease resistance TIR-NBS-LRR proteins of *Pinus taeda*, AAO23074; R 10 protein of *Glycine max*, CAD45029; NBS-LRR disease resistance protein homologue of *Hordeum vulgare*, BAC75839; utative NBS-LRR resistance protein RGH1 of *Oryza sativa*.

Northern hybridization을 이용한 발현 분석 결과 *Magnaporthe grisea*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, BTH, ethephon, JA, SA, ABA, cold, wounding 등 다양한 stress에 의해 발현을 조사하였다 (Fig. 2-9). 특히 *Magnaporthe grisea*의 처리시에는 compatible

strain 보다 incompatible strain 처리시 발현량이 증가하고 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, BTH, ethylene, SA에 의해 발현이 증폭되는 것을 확인하였다. 전체적인 발현량은 LTP 유전자의 발현과 비교하였을때 상대적으로 발현량이 적었다. 또한 *OsDRP* 유전자는 생물적으로 특이하게 발현을 증폭하며 병의 발병기작보다는 저항성 기작에 관련된 유전자로 추정하여 추가의 분석을 실시하였다.

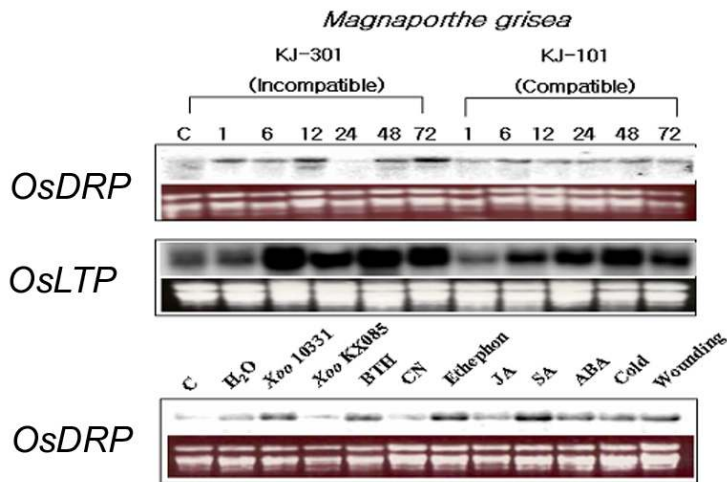


Fig. 2-9. Northern blot analysis of expression of rice *OsDRP* gene in rice leaves treated with pathogens or abiotic stresses. C; untreated, 1; 1 hr, 3; 3 hrs, 6; 6 hrs, 12; 12 hrs, 24; 24 hrs, 48; 48 hrs, 72; 72 hrs after *Magnaporthe grisea* KJ-301, respectively. Used probes were *OsDRP* gene and PR5 gene. RNA from leaf treated with 100 μ M Benzothiadiazole (BTH), 100 μ M Cantharadin (CN), 1 mM Ethephon, 100 μ M Jasmonic acid (JA), 100 μ M Salicylic acid (SA) and 100 μ M Abscibic acid (ABA). C; untreated, H₂O; treated with water, Xoo 10331; inoculation with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 10331, Xoo KX085; inoculation with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* KX085, Cold; treated with cold at 4°C, Wounding; mechanical wounding. Rice leaves were sampled 6 h after treatment under dew chamber at 25°C.

지금까지 밝혀진 R proteins은 크게 5종류로 나눌 수 있다. Class I은 토마토의 Pto로 N-말단에 serin/threonine kinase catalytic region과 myristylation motif를 가진다. Class

2는 leucine rich repeats (LRRs)영역과 nucleotide binding site (NBS) 그리고 N-말단 leucine-zipper (LZ) 또는 coiled-coil (CC) 서열을 가진다. Class 3은 class2의 CC 대신에 N-말단에 Toll and Interleukin 1 receptor (IL-1R)인 TIR region을 가진다. 이들 3 class는 모두 transmembrane (TM)이 결합되어 있어 intracellular에 위치하는 특징을 가진다. Class 4에는 토마토의 Cf 단백질이 포함되며 NBS가 결합되어있고 TM과 extracellular LRR을 가진다. Class 5에는 Xa21 protein이 포함되며 extracellular LRR과 TM 그리고 cytoplasmic serine/threonine kinase region을 가지는 것이 특징이다. 또한 이들 5개의 class에 포함되지 않는 barley stem rust에 저항성을 보이는 Rpg1 단백질 (Brueggeman *et al.*, 2002)은 2개의 tandem protein kinase domain과 약한 TM domain을 가지고 있다. 이러한 R-gene 들은 그 pathway 상에서 downstream에 여러 가지 signaling components를 요구하고 있다 (Martin *et al.*, 2003).

본실험에서 분리된 *OsDRP* 유전자는 그 중 가장 큰 종류인 NBS-LRR 계통의 R-gene으로 (Meyers *et al.* 2003) class 2에 포함되는 것으로 추정되었다. 애기장대, 담배와 토마토 같은 쌍떡잎식물은 NH₂-termini에서 TIR motif를 가지고 있는 TIR-NB-LRR subclass가 가장 많다고 알려져 있다. 대신 벼에서는 ARC (apoptosis-resistance-conserved) domain을 가지고 있다. 약 600개의 유전자가 NB-ARC와 유사한 것으로 밝혀졌으며 다음으로 extracellular LRR genes이 있다고 보고하고 있다 (Goff *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002). Ramalingam *et al.* (2003)은 벼, 보리와 옥수수로부터 질적·양적 저항성에 관여하는 병저항성 관련 유전자들에서도 NBS-LRR 계통의 R gene들을 marker로 이용하여 QTL map을 분석하기도 하였다. 저항성 유전자에 T-DNA가 삽입된 mutant를 이용해 벼도열병에 감수성이 증가되었다는 보고도 있다 (Kim *et al.*, 2005). 따라서 우리가 분리한 *OsDRP* 유전자가 병저항성에 효과가 있을 것으로 판단되어 이후의 실험을 수행하였다.

Northern blot을 이용한 발현 분석 실험에서 *Magnaporthe grisea* incompatible isolate (KJ-301: 02-013) 과 compatible isolate (KJ-201: 02-002), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, BTH, ethephon, JA, SA, ABA, cold, wounding 등 다양한 stress에 의해 발현됨을 확인하였다 (Fig. 2-12).

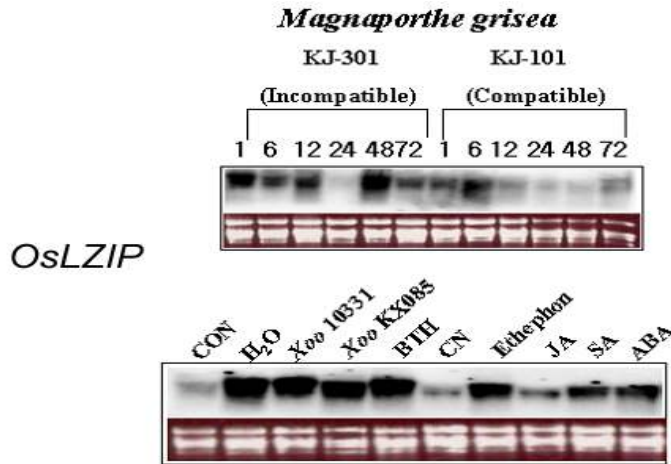


Fig. 2-12. Northern blot analysis of expression of rice *OsLZIP* gene. Total RNA was extracted from pathogen-treated Dongjin rice. CON; untreated, 1; 1 hr, 3; 3 hrs, 6; 6 hrs, 12; 12 hrs, 24; 24 hrs, 48; 48 hrs, 72; 72 hrs after *Magnaporthe grisea* KJ-301 and KJ-101, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 10331 and K3 treatment, respectively. 100 μ M benzothiadiazole (BTH), 100 μ M cantharadin (CN), 1 mM ethephon, 100 μ M jasmonic acid (JA), 100 μ M salicylic acid (SA) and 100 μ M abscisic acid (ABA). H₂O; treated with water, Xoo 10331; inoculation with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 10331, Xoo KX085; inoculation with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* KX085. Rice leaves were sampled 6 h after treatment under dew chamber at 25°C.

Singh et al. (2002) 보고의 많은 transcription factor들처럼 *OsLZIP* 유전자는 leucine zipper domain을 가지고 있고 외부 stress에 의해 빠른 시간에 발현이 증가되는 것으로 보아 transcription factor로 생각되며 biotic 뿐만 아니라 abiotic에도 관여할 것으로 생각된다. 따라서 이 유전자를 이용한 형질전환 식물체에서 분석을 위해 형질전환체를 육성하여 분석해보고자 하였다.

바. NDR/HIN을 코딩하는 벼 *OsNDR/HIN* 유전자의 특성분석

OsNDR/HIN 유전자는 220개의 아미노산을 암호화하는 663 bp로 이루어져 있었으며 Hin1 domain을 가지고 있었다 (Fig. 2-13).

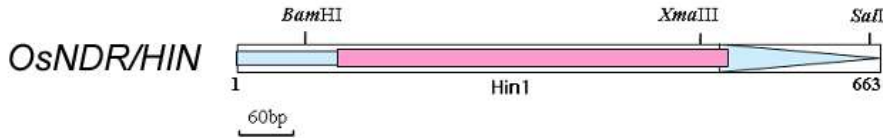


Fig. 2-13. Gene structure of the rice *OsNDR/HIN* gene.

이 유전자의 유전적 유연관계 조사는 Fig. 2-14에 보이고 있다.

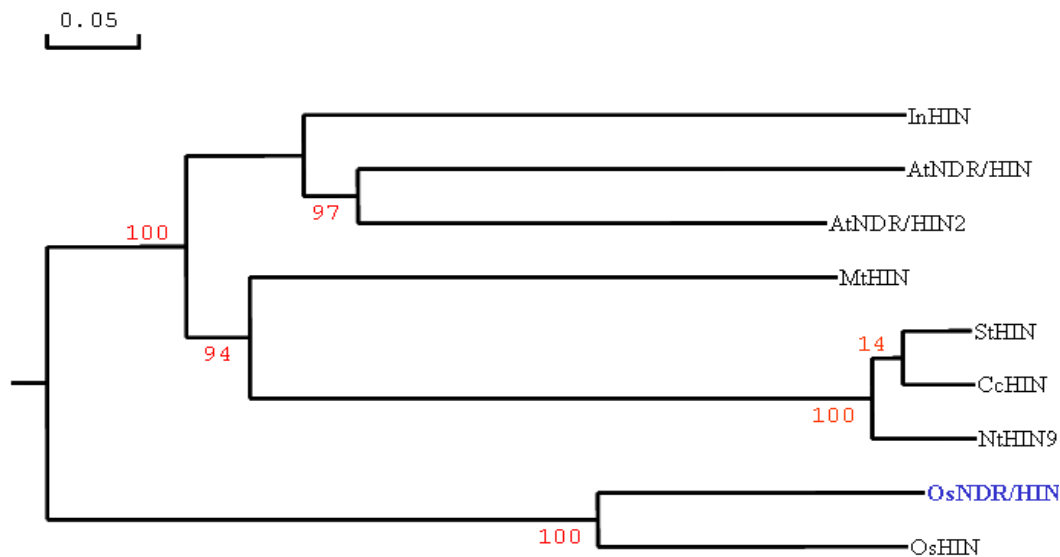


Fig. 2-14. Phylogenetic tree of *OsNDR/HIN* gene. InHIN (BAE94408), harpin-induced family protein from *Ipomoea nil*; AtNDR/HIN (CAC34513), NDR/HIN-like protein from *Arabidopsis thaliana*; AtNDR/HIN2 (BAB08955), NDR/HIN-like protein from *Arabidopsis thaliana*; MtHIN (ABD32713), harpin-induced 1 from *Medicago truncatula*; StHIN (AAU21296), HIN-like protein from *Solanum tuberosum*; CcHIN (BAD11071), hin1 like protein from *Capsicum chinense*; NtHIN (BAD22533), harpin inducing protein 1-like 9 from *Nicotiana tabacum*; OsHIN (BAD27922), harpin-induced protein-like from *Oryza sativa*.

Northern hybridization 결과를 Fig. 2-15에 나타내었다. 이 유전자는 흰잎마름병균과 도열병균 처리에 의해 발현이 증가된다는 것을 확인하였다. 이전의 보고에 따르면 애기장대의 *AtNDR1* 유전자의 돌연변이에서 세 개의 병저항성 유전자인 *RPS2* (Bent et al., 1994; Mindrinos et al., 1994), *RPM1* (Grant et al., 1995) 와 *RPS5* (Warren et al., 1998)의 병저항성 반응을 감소시켰으며 *OsNDR1*을 과발현 시킨 형질전환체에서 병방어 활성화에 필수적인 PBZ1의 발현을 촉진시켰다는 보고도 있다 (Lee et al., 2005). 따라서 우리가 분리한 이 유전자와 유사한 *OsNDR/HIN* 유전자의 기능을 분석하기 위해 형질전환체를 제작하였다.

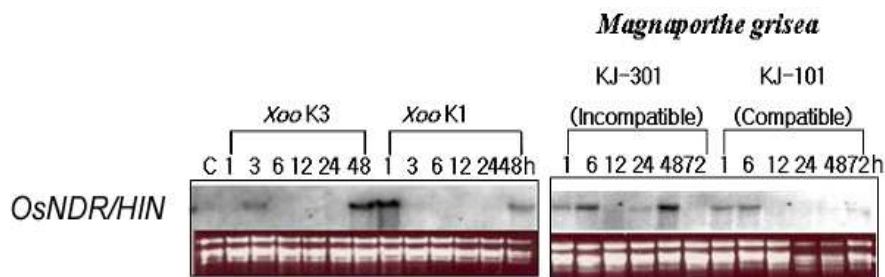


Fig. 2-15. Northern blot analysis of expression of rice *OsNDR/HIN* gene.. Total RNA was extracted from pathogen-treated Dongjin rice. C; untreated, 1: 1 hr, 3: 3 hrs, 6: 6 hrs, 12: 12 hrs, 24: 24 hrs, 48: 48 hrs, 72: 72 hrs after inoculation with *Magnaporthe grisea* KJ-301 and KJ-101, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 10331 and K3.

사. Myb like 단백질을 코딩하는 벼 *OsMyb* 유전자의 특성 분석

OsMyb 유전자는 348개의 아미노산을 암호화하는 1047 bp로 이루어져 있으며 Myb-DNA-binding domain을 가지고 있는 것으로 분석되었다 (Fig. 2-16).

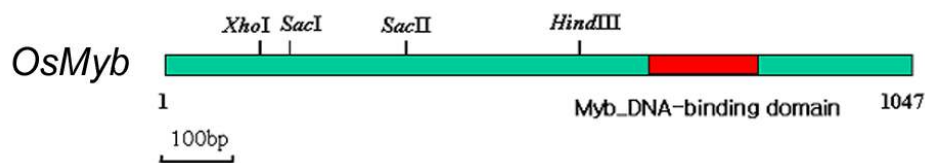


Fig. 2-16. Structure of the *OsMyb* gene.

분리된 total RNA 각 1 μ g을 template로 하여 RNA PCR kit (Takara, Ver.2.1)를 이용하였다. 먼저 first strand cDNA를 합성하고 목표 Actin유전자와 OsMyb-like DNA binding protein 특이 primer를 이용하여 증폭한 후 1% agarose gel에 전기영동 후 확인하였다 (Fig. 2-17).

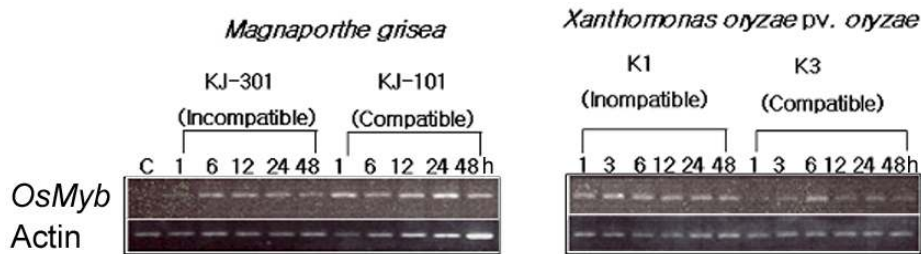


Fig. 2-17. Expression analysis of rice *OsMyb* gene by RT-PCR. Total RNA was extracted from Dongjin rice treated with pathogens. Inoculation with *Magnaporthe grisea* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Rice leaves were sampled at 1, 6, 12, 24, 48 hrs after pathogen inoculation.

MYB protein은 R2R3-MYB, R1R2R3-MYB and heterogeneous group의 3개의 subfamily로 나누어지며 그 중 하나인 R2R3 type Myb transcription factor는 고등식물에 광범위하게 존재하며 가장 큰 regulatory protein family로 알려져 있다 (Ogata et al., 1994). 애기장대에서 AtMyb102가 osmotic stress와 ABA 처리에 의해 유도된다는 보고도 있으며 (Denekamp and Smeekens, 2003), R2R3MYB transcription factor를 암호화하는 BOS1 유전자가 애기장대에서 biotic and abiotic stress 반응에 요구된다는 보고도 있다 (Mengiste et al., 2003). 벼에서 이들 MYB transcription factor에 대해서는 종자발달과 glutelin 저장과 연관이 있다는 보고 (Suzuki et al., 1997; 1998)가 있다. 또한 JA inducible한 rice myb이 fungal infection과 host cell death에 연관이 있다는 보고도 있다 (Lee et al., 2001). 또한 애기장대에서 198개의 MYB superfamily를 분석하여 벼의 MYB family와 비교하였으며, 126개의 R2R3 type, 5개의 R1R2R3 type, 64개의 MYB related와 3개의 비전형적인 유전자로 분류하여 보고하였다 (Yanhui et al., 2006). 따라서 *OsDRP*를 bait로 yeast two-hybrid를 통해 분리된 *OsMYB*의 병저항성관련 연구는 상당히 흥미로운 것으로 생각되며 기능분석을 하고자 형질전환체를 제작하였다.

아. WRKY-DNA binding protein을 코딩하는 벼 *OsWRKY* 유전자의 특성분석

OsWRKY 유전자는 674개의 아미노산을 암호화하는 2025 bp의 염기로 구성되어있으며 2개의 WRKY domain을 가지고 있는 것으로 분석되었다 (Fig. 2-18)

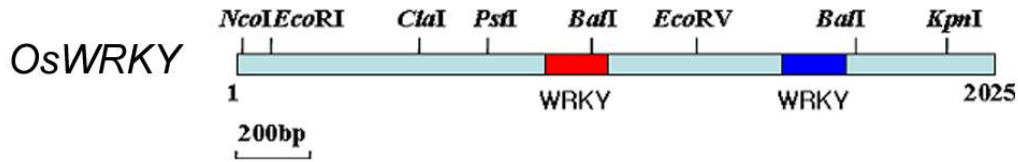


Fig. 2-18. Structure of the rice *OsWRKY* gene.

유전적 유연관계 조사결과는 *Triticum aestivum*과 *Brachypodium sylvaticum*의 WRKY-DNA binding protein과 가장 밀접한 것으로 조사되었다 (Fig. 2-19).

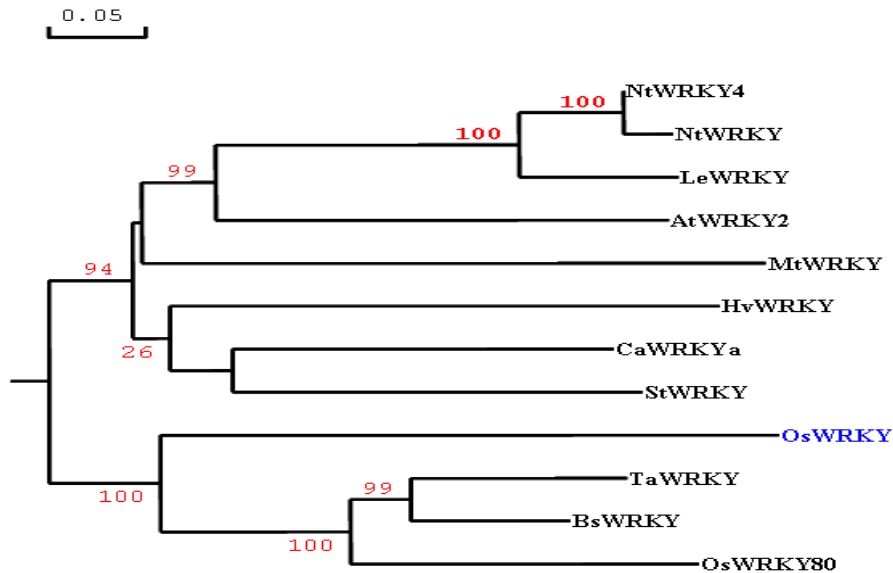


Fig. 2-19. Phylogenetic tree of rice *OsWRKY* (GIIb) gene. NtWRKY (BAA86031), transcription factor NtWRKY4 from *Nicotiana tabacum*; NtWRKY (BAB61056), WRKY DNA-binding protein from *Nicotiana tabacum*; LeWRKY (CAC36402), hypothetical protein from *Lycopersicon esculentum*; AtWRKY2 (NP_200438), WRKY2 transcription factor from *Arabidopsis thaliana*; MtWRKY (ABE89809), DNA-binding WRKY from *Medicago truncatula*; HvWRKY (AAQ63880), SUSIBA2 from *Hordeum vulgare*; CaWRKYa (AAR26657), WRKY transcription factor-a from *Capsicum*

annuum: StWRKY (BAE46417), double WRKY type transfactor from *Solanum tuberosum*; TaWRKY (CAJ19358), WRKY DNA binding protein from *Triticum aestivum*; BsWRKY (CAJ26376), putative WRKY DNA-binding protein from *Brachypodium sylvaticum*; OsWRKY80 (GIIIa, DAA05638), WRKY transcription factor from *Oryzae sativa* (japonica cultivar-group).

*OsWRKY*의 northern 분석 결과 도열병과 흰잎마름병 처리시에 발현이 1시간 이후 부터 증가하는 것으로 조사되었다 (Fig. 2-20).

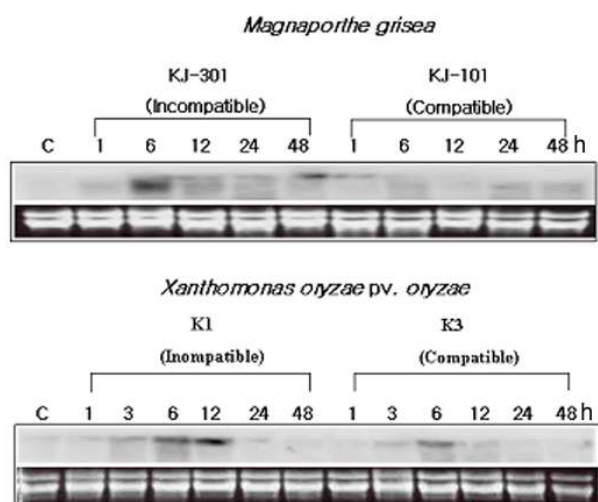


Fig. 2-20. Northern blot analysis of expression of rice *OsWRKY* gene. Total RNA was extracted from pathogen-treated Dongjin rice. C; untreated, 1: 1 hr, 3: 3 hrs, 6: 6 hrs, 12: 12 hrs, 24: 24 hrs, 48: 48 hrs after inoculation with *Magnaporthe grisea* KJ-301 and KJ-101, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 10331 and K3.

Transcription factor 중 식물체에만 존재하는 것으로 알려진 WRKY transcription factor는 현재 벼에서 102개가 있는 것으로 알려져 있으며 (Wu et al., 2005) 4개의 group으로 분류된다. 최근 병저항성 반응과 관련해 벼의 WRKY gene superfamily의 발현을 분석한 것이 보고되었으며 병처리에 의해 발현이 다양함을 보여주었다. 45개의 발현을 분석해 본 결과 15개가 도열병과의 incompatible 반응에서 현저하게 발현이 증가하였으며 12개는 흰잎마름병 감염에 의해 도열병감염과는 다른 발현 양상을 보였다 (Ryu et al., 2006). 본 실험에서 우리가 분리한 *OsWRKY*는 2개의 WRKY domain을 갖고 있

었으며 group IIb에 속하는 것으로 추정된다. 또한 병원균에 의해 발현이 증가되는 것으로 보아 병방어에 효과가 있을 것으로 추정되며 그 기능을 분석하고자 형질전환체를 만들었다.

자. Yeast-two-hybrid를 이용한 유전자 기능 분석

1) Yeast-two-hybrid rice cDNA library 제작

본 실험은 도열병, 흰잎마름병 등 벼의 주요 병원균에 대해 저항성을 보이는 동진벼를 이용하여 병저항성 유전자와 상호작용하는 유전자를 찾기 위해 yeast two hybrid 유전자 은행을 제작하였다. 동진벼를 온실에서 벼 재배용 상토에 3주간 재배하고 흰잎마름병균을 처리하여 3~6시간 후 지상부 시료를 채취하여 total RNA를 분리하고 mRNA만 선별하여 제조회사 (Stratagene)의 방법에 따라 cDNA를 합성한 후 library를 제작하였다. 제작한 library에서 삽입유전자들의 다양성을 비교하기 위하여 random으로 클론을 선발하여 primer로 PCR후 크기를 비교한 결과 0.5 ~ 2kb의 범위에 속하는 다양한 크기의 유전자들이 포함되어 있음을 확인하였다 (Fig. 2-4).

2) Bait 벡터제작

병 저항성 유전자들 간의 상호작용을 분석하기 위하여 yeast two-hybrid system을 이용하였다. Bait vector construction은 병저항성 유전자로 추정되는 *OsDRP* 유전자를 bait로 사용하기 위해 pGBKT7 vector에 construction하였다 (Fig. 2-5). Construction된 Bait vector는 AH109 strain의 yeast에 transformation 하여 SD trp w/o배지에서 selection하여 colony를 얻었으며, 이들은 *OsDRP* 유전자의 sense primer와 antisense primer를 사용하여 colony PCR 및 염기서열을 분석하여 *OsDRP* 유전자의 bait vector가 완성되었음을 확인하였다 (Fig. 2-21).

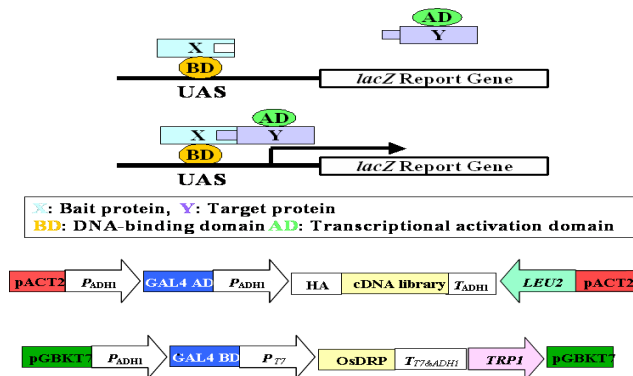


Fig. 2-21. Construction of rice *OsDRP*-BD/bait and cDNA library - AD/prey fusion for yeast two - hybrid interaction.

3) Yeast cotransformation

OsDRP 유전자를 bait로 하여 흰잎마름병원균을 처리한 벼 cDNA를 prey로 사용하여 interaction하는 클론을 선발하였다. Yeast two hybrid system은 *in vivo* 상태에서 단백질과 단백질 상호작용을 확인할 수 있는 방법으로 많이 이용되고 있으며 단백질 상호 결합 유무를 밝히는 대표적인 방법 중의 하나로 알려져 있다. *OsDRP* 유전자와 상호작용하는 유전자들을 분리하기 위하여 bait vector인 *OsDRP* 유전자와 pAD-GAL4 library를 yeast cotransformation 하여 SD Trp, Leu, His w/o의 selection배지에서 배양한 결과 다수의 colony를 확인하였다. 얻어진 colony들 중 bait 유전자인 *OsDRP* 유전자와의 interaction을 확인하기 위하여 X-gal처리에 의한 screening을 수행하여 galactosidase 활성을 보인 clone을 선발하였다 (Fig. 2-22). Plasmid DNA를 분리 하여 제한효소로 절단하여 insert를 확인하였다 (Fig. 2-23).

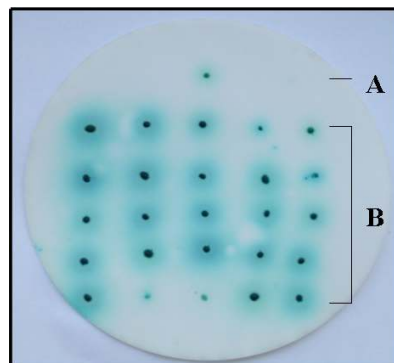


Fig. 2-22. Screening of positive clones by β -galactosidase activity.

A : pGAD7-RecT+pGBKT7-53 (positive control), B : putative positive colonies.

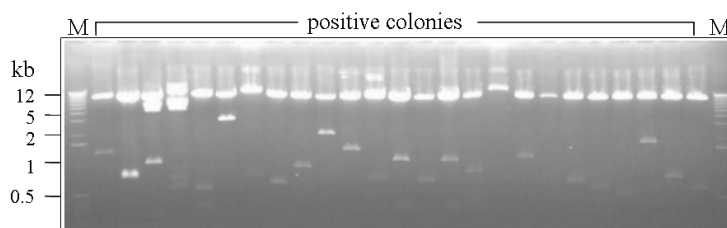


Fig. 2-23. Restriction analysis of positive colonies carrying plasmids with rice cDNA inserts of AD/fusion library. M: 1 Kb DNA ladder (BRL)

4) *OsDRP* 유전자와 상호작용하는 클론 선발

Yeast cotransformation으로 얻어진 클론은 효모에서 DNA를 분리하여 이를 다시 대장균에 형질전환한 후 항생제를 marker로 하여 선별하였다. 형질전환체들이 지닌 recombinant 유전자들의 염기서열을 분석하여 Blast search로 상동성을 조사하여 유전자들의 기능을 추정하였다 (Table 2-3). *OsDRP* 와 상호작용하는 유전자는 GTP binding protein, cysteine protease, metallothionin protein, Myo inositol phosphate synthase, immunophilin 등이 있었다. Coaker *et al.*,(2005)는 Immunophilin 중의 하나인 cyclophilin 이 단백질 단백질 interaction에서 병저항성 유전자와 관련이 됨을 보고하였다.

Table 2-3. Putative identification of positive clones interacted with rice *OsDRP* BD/bait using yeast-two-hybrid screening.

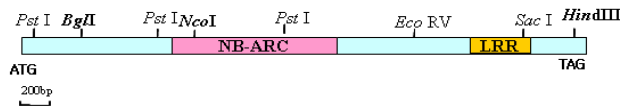
Sequence homology	Accession number
Fructose- biphosphate aldolase	S65073
Metallothionein-like protein type 2	P93433
F1-ATPase	AAP80663
cysteine synthase	CAC09469
Ribosomal protein L7Ae family	NP_850856
hypothetical protein	BAC20675
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	CAD79700
Prolamin precursor	BAA36699
Kinesin-like protein	AAK70904
Myo-inositol phosphate synthase	AAP85531
UDP- galactose-4- epimerase-like protein	BAC53786
Metallothionein- like protein	AAP80616
enolase	AAP94211
Adenosylhomocysteinase-like protein	AAO72664
immunophilin	AAM65589
expressed protein	BAA90797
GTP-binding protein	NP_196119

5) *OsDRP*와 *Magnaporthe grisea*의 CYP1과의 Yeast Two-hybrid

Clontech의 yeast two-hybrid system을 이용하여 bait와 prey를 구축하여 실험을 수행하였다. 먼저 동진벼의 *OsDRP* 유전자를 bait로 *Magnaporthe grisea*로부터 *cyclophilin1* (Viaud *et al.* 2002) 유전자를 pray로 하여 yeast two-hybrid를 수행하였으며 bait와 prey를 바꾸어서 interaction 여부를 조사하였다. 또한 동진벼의 *OsDRP* 유전자의 LRR domain 부분만 cloning하여 *Magnaporthe grisea*의 *cyclophilin1* 유전자와 bait와 pray로 바꾸어 가면서 interaction 여부를 조사하였으며, *OsDRP* 유전자의 LRR domain이 결여된 부분을 이용해 *Magnaporthe grisea*의 *cyclophilin1* 유전자와 bait와

pray로 바꾸어 가면서 interaction 여부를 조사하였다. 도열병 내성이 비교적 약한 품종인 일품벼에서 *OsDRP* 유전자를 cloning하여 *Magnaporthe grisea*의 *cyclophilin1* 유전자와 bait와 prey로 바꾸어 가면서 interaction 여부를 조사한 결과 interaction함을 확인할 수 있었다 (Fig. 2-24).

○ *OsDRP* gene의 특성



```

MERLFEELAGEAVKELLRAVRGTFRCRST AERLRRNVEPLLPLVQPQAAQGGGGWGHGRSAGELAE LAAQLREALIARRAA
SAPRWNVYRTAQLARRMEAADTAIARWLSRHAPAHVLDGVRRLRDEADARIGRLERRVEEVAQAQQQQAATAALPPPAILP
FALPPPPPPKAMAMMAMMDTPPTKGMAVGMEVELPFPDDEEDESIVGGVVRVKGKVKEMVMSSGGGGGWEAVGICGMG
GSGKTHARHGNIQQSQNPRSVHKRQLYLJLCWFLWKGYFSDRVFFETISQSANLDTIKMKLWEQISGNLVLGAYNQIPEWQLK
LGPRDKGPVLVLDVWVSLSQLLEELFKFP GCKTLVVSFRKFP SLVTRTYEMELLDEEAALSVFCRAAFDQESVPR TADKLVQ
VAAECRGLPLALKVIGASLRDQPPKIWLSAKNRLSRGETISDSHETKLLERMAASIECLSGKVVRECFDLGCFPEDKKIPLDVLINI
WMEIHDLDEPDFAFAILVELSNKNLLTLVND AQNKAGDLYSSYHDFSVTQHDVLRDLALHMSGRDALNRRRLVMPREESLPK
DWQRNKDTPFEAQVSIHTGEMKESDWFQMSFPKAEVLILNFASSVYLPPIATMQNLKALVLINYG TISATLDNLSAFTT LSDL
RSLWLEKITLPPLKTTIPLKNLRKISLVLCEL TNSLRGSKVDLSMTFPRLSNLTIDHCIDLKELPSSICEISSLESISNCHDLTELP
YELGKHLCLSLRVYACPALWRLPPSVCSLKRKYLDISQC VNLTDLPEELGHLTSLEKIDMRECSRLRSLPRSSSSLSLGHV
CDEETALLWRAEQVMPDLRVQDGGTIHSAILTCSVFMQLTLQQQPKLAEKIEP
    
```

○ *Cyp1* gene encoding Cyclophilin of *Magnaporthe grisea*

```

MRTLLRPLVPRQNI FSSSIPRTS FVKPNFVATPKSPINNTTRVRFYSS TMSKPNVFFDIS
FNGVTKRVEFKLYDDVVPKTADNFRR LCVGEPGVGGYKDSG FHRIPDFMLQGGDF T
RGNGTGGKSVYGEKFADENFQIKHTRPGLLSMANAGPNTNGSQFFITTVKTSWLDGK
HVVVGEVVS GFEDVIKPIEALGSSSGTPKTKVTIVNAGTV
    
```

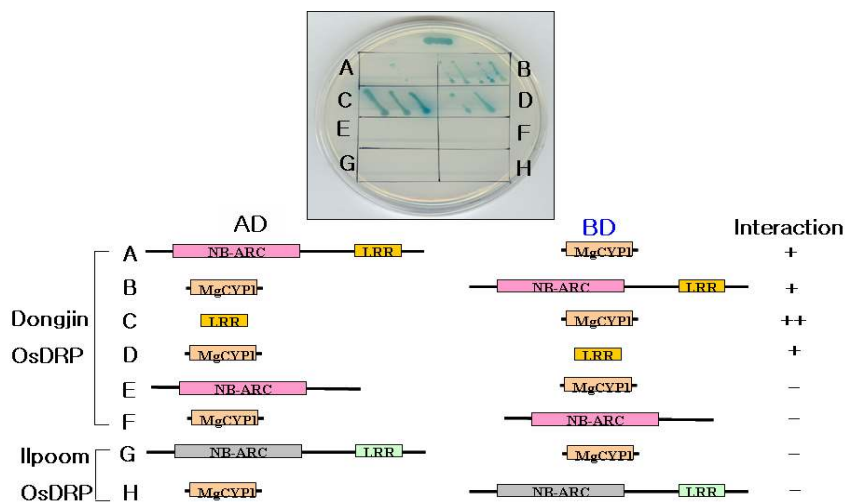


Fig. 2-24. Interaction of OsDRP and LRR domain with MgCYP1 by yeast two-hybrid system.

6) Yeast-two-hybrid Arabidopsis cDNA library 제작

Arabidopsis cDNA library에서 OsDRP와 상호작용하는 유전자를 탐색하였다. 벼의 병저항성 유전자로 추정되는 OsDRP 유전자와 상호작용하는 유전자를 Arabidopsis에서 찾기 위해 yeast two-hybrid 유전자 은행을 제작하였다.

Arabidopsis whole plants를 이용해 total RNA를 분리하고 mRNA 만 선별하여 제조 회사(Stratagene)의 방법에 따라 cDNA를 합성한 후 library를 제작하였다. 제작된 cDNA library의 titer를 조사한 결과 8.0×10^6 pfu/ml임을 확인하였다. 제작한 library에서 삽입유전자들의 다양성을 비교하기 위하여 random으로 클론을 선발하여 primer로 PCR후 크기를 비교한 결과 0.5 ~ 2 kb의 범위에 속하는 다양한 크기의 유전자들이 포함되어 있음을 확인하였다 (Fig. 2-25).

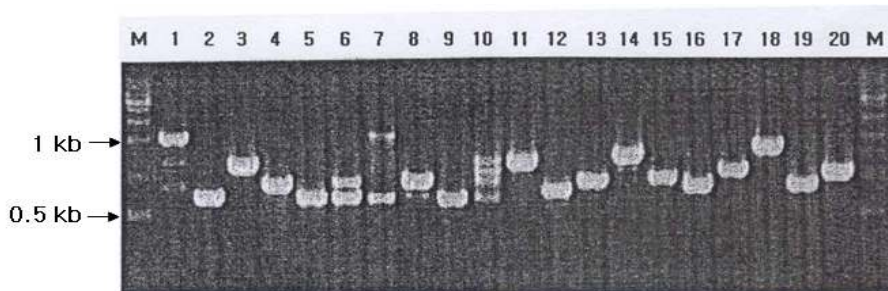


Fig. 2-25. Determination of insert sizes. Twenty plaques were randomly picked and insert DNA were PCR-amplified with T7 and T3 primers. PCR products were electrophoresed on a 1% TAE agarose gel. Lane M: 1kb plus DNA ladder (Elpis Biotech), lane 1 - 20 : PCR products.

OsDRP와 동일한 방법으로 상호작용하는 유전자를 선별한 결과 다수의 positive clone을 얻었다 (Fig. 2-26).

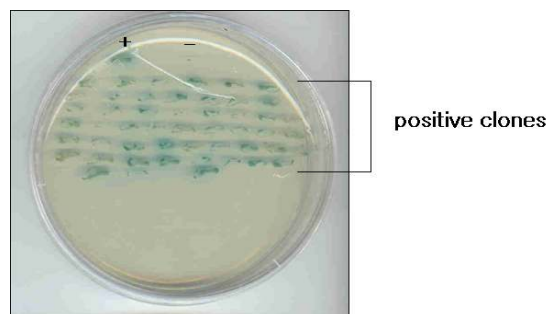


Fig. 2-26. Screening of positive clones by β -galactosidase activity.

+ : pGAD7-RecT+pGBKT7-53 (positive control), B : putative positive colonies.

이들 positive clone들의 DNA를 분리하고 염기서열을 분석하여 상동성을 조사하였다 (Table 2-4). 그 결과 CIPK6, WRKY54 transcription factor, AP1, DNA binding transcription factor 등 병저항성과 관련 있는 유전자들을 확인 할 수 있었다.

Table 2-4. Putative identification of positive clones interacted with OsDRP-BD/bait using yeast-two-hybrid screening

Clone No.	Putative identification	Source of comparison	Accession No.	Homology	Score	E-value
DRP1-AS	ferredoxin-dependent glutamate synthase	Arabidopsis thaliana	Y09667.1	55	57	7E-07
DRP2-AS	cyclic nucleotide and calmodulin-regulated ion	Arabidopsis thaliana	AC005170.3	71	78,6	2E-13
DRP3-AS	CIPK6	Arabidopsis thaliana	NM_119244.2	100	276	8E-73
DRP4-AS	WRKY54; transcription factor	Arabidopsis thaliana	NM_129637.2	100	163	7E-39
DRP5-AS	AP1	Arabidopsis thaliana	NM_105581.1	95	239	9E-62
DRP6-AS	DNA binding / transcription factor	Arabidopsis thaliana	NM_114886.2	98	119	1E-25
DRP7-AS	unknown protein	Arabidopsis thaliana	NM_113704.3	98	114	6E-24
DRP8-S	protein binding	Arabidopsis thaliana	NM_120804.1	94	177	5E-43
DRP9-AS	ATP binding / kinase/ phosphoribulokinase/ u	Arabidopsis thaliana	NM_102940.3	100	110	8E-23
DRP10-AS	hypothetical protein	Arabidopsis thaliana	AK220987.1	75	82	2E-14
DRP11-AS	OPR3; 12-oxophytodienoate reductase	Arabidopsis thaliana	NM_201702.1	89	192	1E-47
DRP12-S	ORF2 bases 1807-2850; first start codon at 2	Trypanosoma brucei	M14820.1	27	34,3	4,9
DRP13-AS	putative FtsH protease	Arabidopsis thaliana	AY045951.1	98	102	2E-20
DRP14-AS	ATP binding / protein binding	Arabidopsis thaliana	NM_122537.2	100	45,4	0,003
DPR15-AS	At2g39730/T617.3	Arabidopsis thaliana	BT000613.1	98	204	3E-51
DPR16-AS	6-phosphofructokinase	Arabidopsis thaliana	NM_119066.2	58	56,6	9E-07
DPR17-S	Rho GDP-dissociation inhibitor	Arabidopsis thaliana	NM_104925.1	94	201	2E-50
DPR18-AS	GDH2	Arabidopsis thaliana	NM_120826.2	100	87	6E-16
DPR19-AS	At3g14210/MAG2_18	Arabidopsis thaliana	AY113066.1	100	141	3E-31
DPR20-AS	VHA-A	Arabidopsis thaliana	NM_00103620	98	149	2E-34
DPR21-S	ribulose-bisphosphate carboxylase	Arabidopsis thaliana	NM_123202.2	100	267	3E-70
DPR22-AS	unknown protein	Arabidopsis thaliana	NM_112413.2	99	251	2E-65

차. 벼 병방어 유전자를 이용한 벼와 담배의 형질전환

1) Overexpression vector 제작

Gateway system (Invitrogen)을 이용한 overexpression용 vector 제작을 위해 OsDRP-attB1 primer (5' -AAAAAGCAGGCTTCATGGTGCTAA-3')와 OsDRP-attB2 primer (5' -AGAAAGCTGGGTATCACCTGTATG-3')를 이용하여 1차 PCR을 수행하고, attB1 adapter primer (5' -GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3')와 attB2 adapter primer (5' -GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3')를 이용하여 2차 PCR을 수행하였다. PCR 산물을 cloning하여 염기서열을 분석하여 확인하고 BP reaction과 LR reaction을 수행하여 식물체에서의 overexpression을 위한 vector를 제작하였다. 다른 유전자도 동일한 방법을 이용하였다 (Fig. 2-27).

2) RNAi를 이용한 Knockout mutant 제작

Knockout mutant를 만들기 위해 OsDRP-attB1 primer (5' -AAAAGCAGGCTCTCATCGCTCAAGT-3')와 OsDRP-attB2 primer (5' -AGAAAGCTGGGTCTCAGTCTACAAG-3')를 이용하여 첫 번째 PCR을 수행하고, attB1 adapter primer (5' -GGGGACAAGT TTGTACAAAAAAGCAGGCT-3')와 attB2 adapter primer (5' -GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3')를 이용하여 2차 PCR을 수행하였다. PCR 산물을 cloning하여 염기서열을 분석하여 확인하고 BP reaction과 LR reaction을 수행하여 knockout mutant를 위한 RNAi vector를 제작하였다. 다른 유전자도 동일한 방법을 이용하였다 (Fig. 2-27).

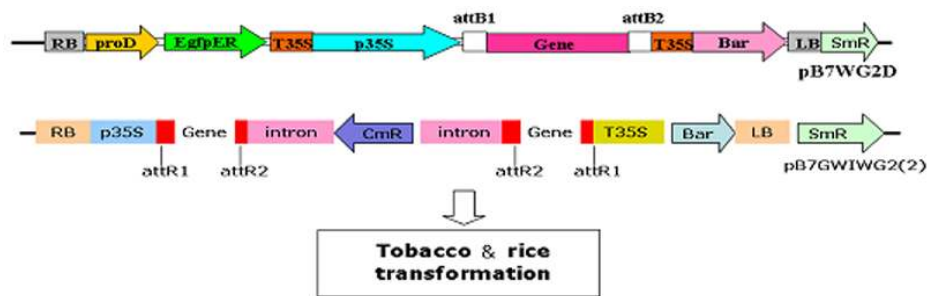


Fig. 2-27. Construction of plant overexpression and RNAi vector.

3) 형질전환 식물체 제작

제작된 vector들을 *Agrobacterium* LBA4404에 형질전환하였으며, 동진벼와 낙동벼의 callus를 유기하여 형질전환 벼를 만들었다. 동진벼는 저항성 인자를 많이 지니고 있으므로 병저항성 증진효과를 검정하기 위하여 여러 종류의 병원균에 대해 감수성을 나타내는

낙동벼에도 형질전환을 실시하였다. 식물체 형질전환을 위해 제작된 vector들을 *Agrobacterium* LBA4404에 형질전환 하였으며, 동진벼의 callus를 유기하여 형질전환 벼 (transgenic rice)와 *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi를 이용해 형질전환 담배 (transgenic tobacco)를 만들었다 (Fig. 2-28).

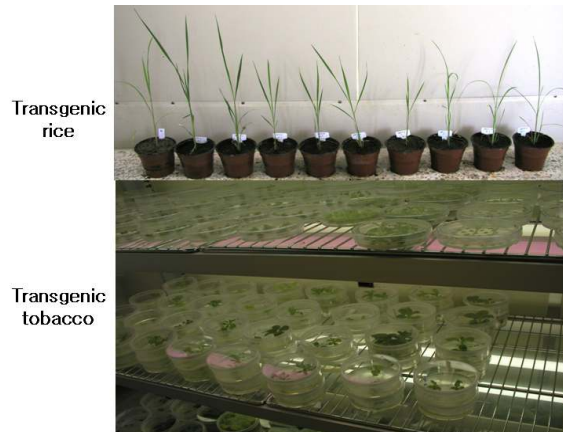


Fig. 2-28. Generation of transgenic rice and tobacco overexpressing *OsDRP* plants

4) 형질전환 식물체 확인

제작된 vector를 이용하여 만들어진 *OsDRP* 과발현 형질전환 벼와 담배의 형질전환 여부를 bar specific primer와 gene specific primer를 이용한 genomic PCR 방법을 이용하여 확인한 결과 9개체의 벼와 24 개체의 담배가 형질전환체임을 확인하였으며 (Fig. 2-29) 현재 온실에서 재배 중에 있다. 또한 *OsWRKY* 과발현 담배형질전환체 24종, *OsNDR/HIN* 과발현 담배 형질전환체 9종, *OsMyb* 과발현 형질전환체 12종, *OsLZIP* 과발현 담배 형질전환체 10종을 얻어 온실 재배 중이다. WRKY 과발현 벡터는 벼에 형질전환중에 있으며 knock out mutant 는 동진벼의 T-DNA line(An et al., 2005)이 이 확보되어 종자를 얻기 위해 식물체를 육성하는 중이다.

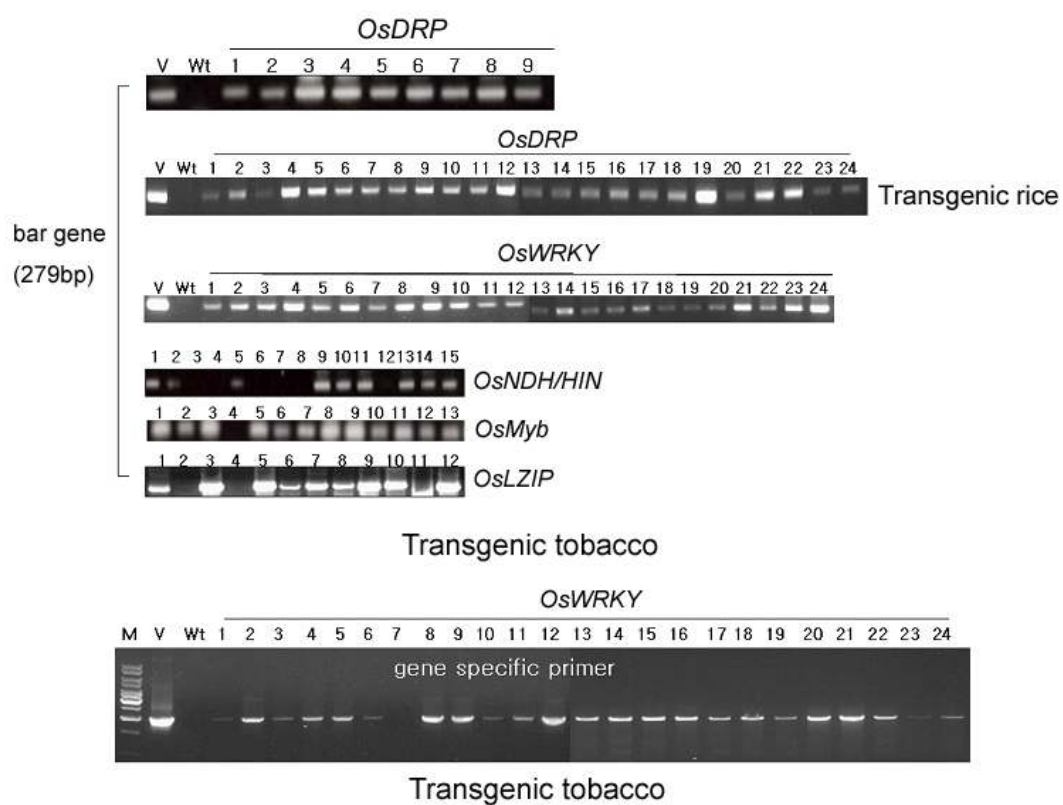
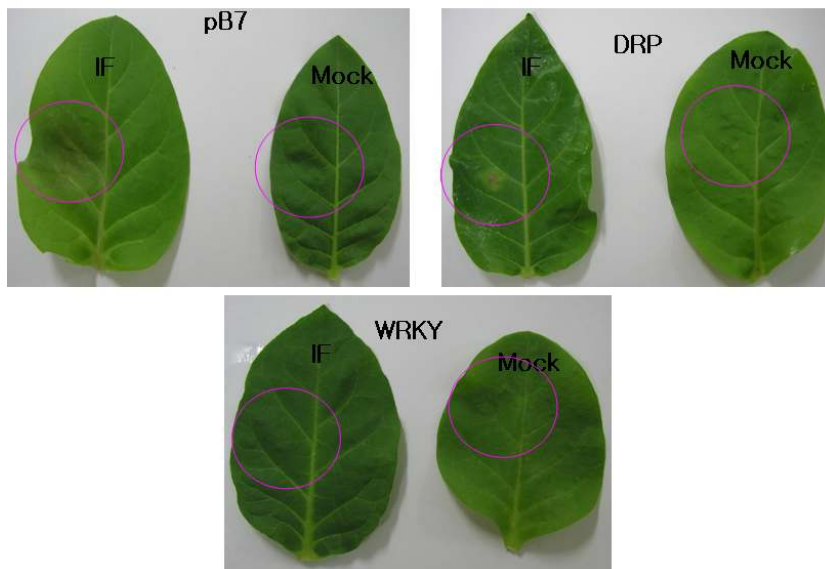


Fig. 2–29. Genomic PCR analysis of transgenic rice and tobacco plants using bar specific primer and gene specific primer.

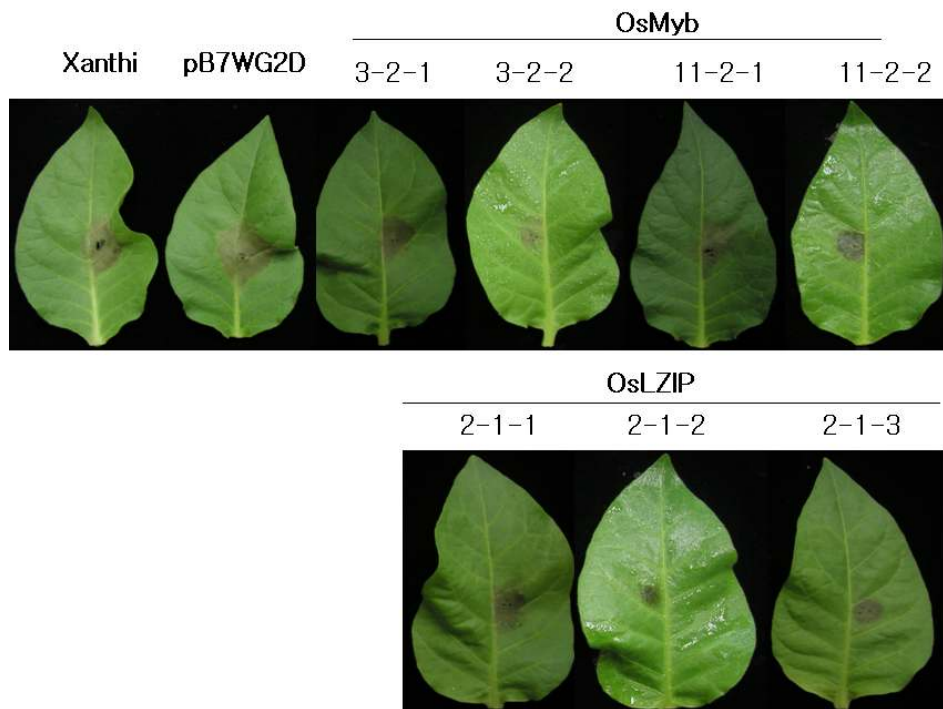
카. 형질전환 식물체의 병저항성 검정

– 형질전환 담배의 역병 저항성 기능을 검정하기 위해 wild type 담배, vector만 가진 형질전환체와 형질전환담배에 *Phytophthora nicotianae*를 접종 후 44시간, 68시간, 72시간이 지난 후 병징을 관찰한 결과 병징의 발병 정도가 현저하게 감소하는 형질전환체 들을 확인 할 수 있었으며 (Fig. 2-30, 2-31), 추가 병저항성 검정을 위해 세대 증식 중에 있다. 또한 *Pseudomonas syringe* pv. *tabaci* 세균병의 저항성 검정을 위해 현재 개체를 증식 중에 있다. 이들 형질전환체에서 RT-PCR 등을 통해 병저항성 관련 유전자들의 발현 분석 실험이 필요하리라 생각된다.



Gene name	Lesion diameter (mm)	
	Mock	<i>P. nicotianae</i>
pB7 (vector)	–	30.6
OsDRP	–	7
OsWRKY	–	–

Fig. 2-30. Results of pathogenicity test of transgenic tobacco plants overexpressing rice *OsDRP* or *OsWRKY* genes. Photos were taken 3 days after infection by *Phytophthora nicotianae*.



Gene name	Lesion diameter (mm)	
	Mock	<i>P. nicotianae</i>
Xanthi	–	15
pB7WG2D (vector)	–	23
OsMyb 3-2	–	5
OsMyb 11-2	–	4
OsLZIP	–	3

Fig. 2-31. Results of pathogenicity test of transgenic tobacco plants overexpressing rice *OsMyb* or *OsLZIP* genes. Photos were taken 3 days after infection by *Phytophthora nicotianae*.

Luo et al. (2005)는 rice homeodomain gene *OsBIHDI*을 과발현 시킨 담배 형질전환체에서 병방어 관련 PR-1 유전자의 발현이 증가되고 tomato mosaic virus, tobacco

mosaic virus와 *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*에 대해 병저항성이 증대되었으며 salt와 oxidative stress에 대해서는 민감성이 증대되었다고 보고하였다. 따라서 본 실험에서 만들어진 형질전환체들의 세균병에 대한 저항성과 다양한 병원균에 대한 저항성의 검정도 필요할 것으로 판단된다.

타. *OsDRP* 유전자의 promoter 분석

1) Promoter 분리

OsDRP 유전자 promoter를 찾기 위하여 genome walker와 벼 genome sequence상의 database를 이용하여 primer를 작성하고 genomic DNA를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 *OsDRP*는 2.8 kb, 1.4 kb, 0.9 kb와 0.5 kb 크기를 선별하여 T-vector에 cloning하여 염기서열을 분석하여 확인하고 pBI101 vector에 cloning하였다 (Fig. 2-32).

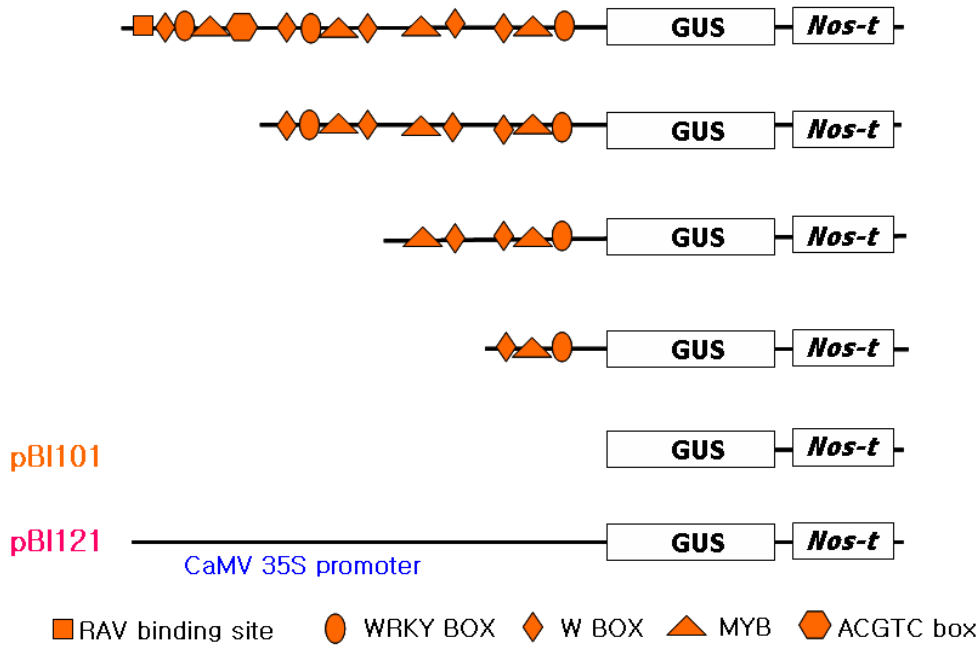


Fig. 2-32. Constructs for the analysis of rice *OsDRP* promoter regions.

2) Promoter assay

OsDRP promoter와 GUS gene으로 구축하여 Agro-infiltration 방법으로 tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) 잎에 접종하였다. *Agrobacterium* LBA4404 접종 24시간 후 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* KACC10388를 infiltration하였고, SA (5 μ M)를 spray 하였다. Mock test를 위해 물을 spray하여 동일 조건에서 배양하였다. stress 처리 24시간 후 담배 잎을 sampling 하였으며, 단백질을 추출 시까지 -70°C 에 보관하였다. Fluorometric GUS assay를 위해서 GUS extraction buffer (10 mM EDTA, 0.1% Sodium lauryl sarcosine, 0.1% TritonX-100, 10 mM 2-mercaptoethanol and 50 mM NaH_2PO_4 , pH7.0)에서 같은 상등액을 이용해 GUS assay를 실시하였다. 기질로는 4-methyl umbelliferyl glucuronide (MUG)를 이용하였고, 37°C 에서 배양한 후 stop buffer (200 mM Na_2CO_3)를 첨가하여 반응을 중지시켰다. Fluorescent 생산물인 4-methyl umbelliferone (4-MU)를 365 nm의 excitation과 455 nm의 emission 상에서 fluorometer를 이용해 정량하였다. 10 mM MgCl_2 를 mock test를 위해 사용하였고 pBI121을 positive control로 pBI101을 negative control로 사용하였다. 약 2.5 kb의 promoter (-2471)는 병원균에 의해 발현 증폭되지 못하나 1,381 bp promoter는 병원균에 의해 발현이 증폭됨을 확인하였다. 1,000부터 1,500bp 부위에 존재하는 WRKY box, W box, MYB box 부위가 제외된 더 작아진 promoter (981과 525)는 병원균에 의해 발현이 증폭되지 않았으므로 *OsDRP*의 promoter는 1,381 bp가 병원균에 의해 발현이 증폭되는 조절부위로 확인되었다 (Fig. 2-33).

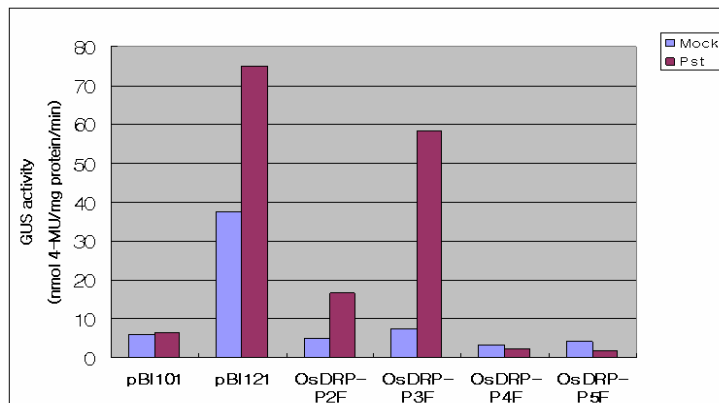


Fig. 2-33. The promoter region-GUS constructs and GUS activity of the rice *OsDRP* gene promoter.

제 3 절 방어유전자를 이용한 형질전환 병저항성 작물개발 (주관 제 2 세부과제)

1. 연구 개발 수행 방법 및 내용

가. 타 세부과제로부터 제공받은 유전자

형질전환에 필요한 식물 발현벡터 제작을 위한 고추 병저항성 유전자는 *CASLPI*, *CABPR1*, *CALTP3*, *CALTP1*, *CALTP2*, *CAPOA1*, *CALRR* 7가지로서 식물병원세균인 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 감염에 대해서 고추 잎 조직에서 강하게 발현되는 유전자들이다. 이 중에서 *CABPR1* (basic pathogenesis-related protein 1), *CALTP1* (lipid transfer protein 1), *CALTP2* (lipid transfer protein 2), *CAPOA1* (ascorbate peroxidase-like 1) 유전자가 도입된 담배와 애기장대 혹은 토마토 형질전환체를 중심으로 특성을 분석하였다.

나. 병저항성 유전자 발현 벡터 제작

6 개의 유전자들 중에서 *CASLPI*, *CABPR1*, *CALTP1*, *CAPOA1*, *CALRR* 5개 유전자 내에는 *BamH1*과 *Kpn1* 절단부위가 없기 때문에, 이미 clone되어진 pBluescript SK⁻의 3' 말단의 *Kpn1*과 5' 말단의 *BamH1*을 이용하여 vector로부터 600~800 bp 크기의 유전자 부위를 절단하고, 식물 발현벡터인 pMBP1도 같은 제한효소로 절단하여 유전자를 ligation하였다 (Fig. 3-1). 하지만 *CALTP3*의 경우에는 유전자 부위 내에 *BamH1* site가 있기 때문에 제한효소를 이용하여 절단하여 cloning하는 것이 불가능하였고, 따라서 PCR을 이용하여 증폭하여 ligation하였다 (Fig. 3-2).

다. *CASLPI*, *CABPR1*, *CALTP1*, *CAPOA1*, *CALRR*의 vector construction

1) insert와 vector의 준비

도입할 유전자가 들어있는 vector를 plasmid 상태로 받았다. Insert가 들어있는 plasmid들과 expression vector로 사용될 pMBP1은 *E. coli* DH5a cell에 형질전환하여 다시 plasmid를 추출하여 사용하였다. Competent cell은 CsCl₂를 이용하여 만들었으며, plasmid는 heat shock을 통하여 도입하였다. *E. coli* cell로부터 plasmid 추출은 plasmid DNA miniprep kit를 이용하였다.

2) insert 및 pMBP1 digestion과 purification

도입할 유전자가 포함된 pBluescript SK⁻와 pMBP1은 모두 *Kpn*I과 *Bam*HI으로 절단하여 sticky ends를 갖게 만들었다. 절단된 DNA fragment들은 전기영동으로 확인하였다. (Fig. 3-3). Insert는 plasmid에 따라 500~800 bp 크기의 조각으로서 겔에서 elution하였고, pMBP1 vector는 13 kb정도로서 10 bp 정도만 잘려나가기 때문에 ethanol 침전으로 purification하였다. Insert의 elution에는 kit와 electroelution방법을 병행하여 사용하였다. 정제한 후에는 전기영동으로 확인한 후 ligation에 사용하였다.

3) ligation과 *E. coli* transformation

순수분리된 insert와 vector는 25°C에서 2 시간, 4°C에서 overnight으로 ligation하여 heat shock으로 *E. coli* cell에 transformation하였다. pMBP1의 selective maker는 kanamycin이므로 LB/kan 배지에서 cell을 키운 후에 colony들을 colony PCR로 도입된 유전자가 있는지를 선별하였다. 선별된 clone들은 다시 plasmid를 추출하여 제한효소를 처리하여 확인한 후에 *Agrobacterium*에 형질전환하였다. 그 결과 *CASLPI*, *CALTP1*, *CALRR* 유전자를 cloning에 성공하였다.

라. 병저항성 유전자 발현 벡터를 *Agrobacterium*에 도입

1) *Agrobacterium* competent cell 제조

Agrobacterium tumefaciens strain EHA105를 YEP/rif 고체배지에 streaking하여 키운 후 single colony를 액체배지에 접종하여 seed culture를 하였다. 다시 액체배지에 OD₆₀₀에서 0.5~1.0이 될 때까지 키운 후 NaCl 용액으로 세포막을 팽창시켜 CaCl₂에 녹여서 -70°C에 보관했다. 모든 과정은 얼음에서 수행하여 cell이 재 수축되는 것을 막았다.

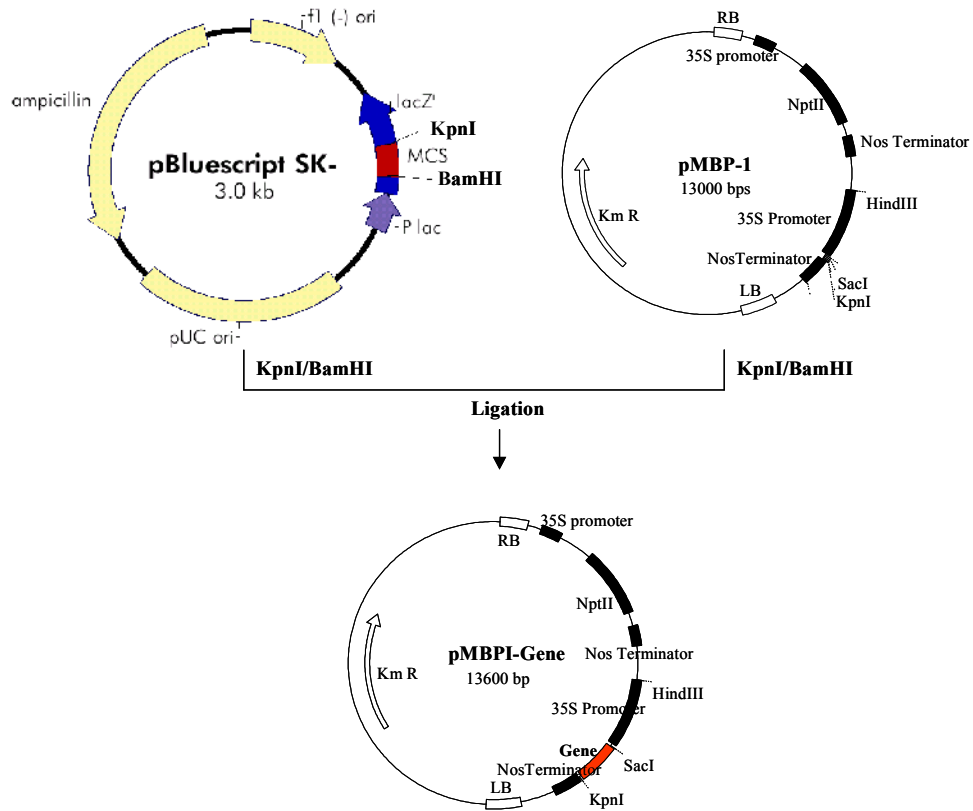


Fig. 3-1. Scheme for construction of pMBP1 expression vector using CASLP1, CABPR1, CALTP1, CAPOA1, CALRR clones.

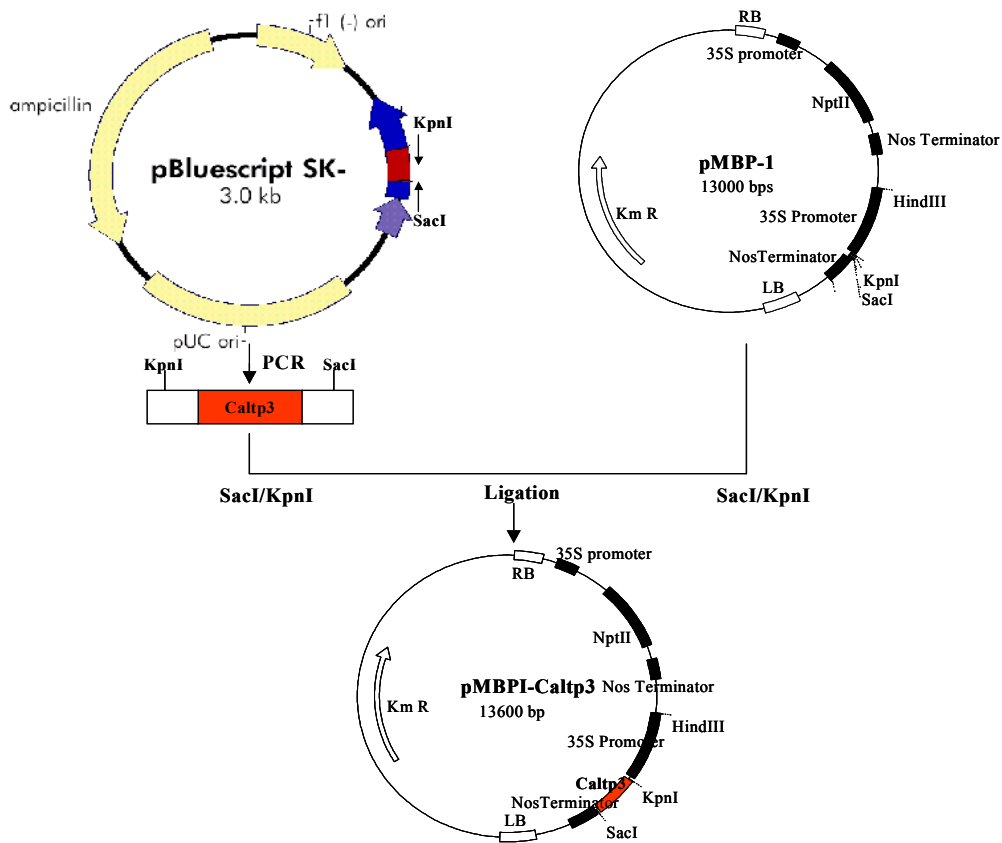


Fig. 3-2. Scheme for construction of pMBP1 expression vector using CALTP3.

2) Cloning한 vector를 *Agrobacterium*에 transformation

Competent cell과 plasmid를 섞어서 얼음에 방치하였다가 1분간 액체질소에서 얼린 후 37°C에서 5 분간 heat sock을 주어 도입하고, YEP 액체배지에서 4 시간 정도 shaking incubation을 하였다. 유전자가 도입되었으리라 생각되는 *Agrobacterium*을 YEP/rif/kan가 함유된 고체배지에서 2~3일간 배양한 후 형성된 colony를 selection하였다. 선택되어진 colony를 가지고 PCR과 digestion으로 확인하였다.

마. 담배, 토마토, 애기장대 형질전환

담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun or Xanthi) 형질전환에는 *Agrobacterium*

tumefaciens EHA105를 이용하였다. 온실에서 9 주 동안 성장된 유묘의 잎을 20% sodium hypochloride로 10 ~ 20 분간 멸균하였다.

멸균수로 세척한 후 0.5 cm² 크기의 조각으로 절단하여 leaf disk를 MS 액체배지 5 mg/l와 *Agrobacterium* 200 µl를 같이 섞은 용액에서 28°C 3 일간 암 상태에서 cocultivation하였다. 처리된 leaf disk들은 carbenicillin 250 mg/l이 포함된 MS 액체배지로 세척하고 다시 멸균수로 세척하여 *Agrobacterium*을 완전히 제거하였다. 멸균된 leaf disk들은 carbenicillin 250 mg/l, kanamycin 100 mg/l, BA 2 mg/l, NAA 0.1 mg/l이 포함된 MS 고체배지에서 shooting을 유도하였다. kanamycin이 포함된 배지에서 형성된 shoot들은 leaf disk로부터 분리하여 신선한 배지로 다시 옮겼고, 약 1~2 주 후 다시 호르몬이 없는 rooting media (250 mg/l carbenicillin과 100 mg/l kanamycin을 포함한 MS 고체배지)로 옮겼다. 선발된 형질전환체들은 토양으로 옮겼다 (Fig. 3-4).

형질전환된 식물체로부터 genomic DNA를 추출하여 PCR로 유전자 도입 여부를 확인하였다. Primer는 nptII specific한 5'-GAGGCTATTCGGCCTATGACTG-3'과 5'-ATCGGGAGCGGCG ATACCGTA-3'를 사용하였다. PCR 조건은 denature 95°C 5분 후, 30 cycle의 annealing 94°C 20초, 68°C 20초, extension 72°C 40초로 하였다 (Fig 3-5). 개별 유전자의 도입은 특정 primer와 특정 조건하에서 확인하였으며 결과 및 고찰 부분에 자세하게 설명하였다.

Agrobacterium tumefaciens 균주 LBA4404를 이용하여 토마토 형질전환을 하였다. 먼저 *A. tumefaciens*를 50 mg/l rifampicin과 50 mg/l kanamycin이 함유된 YEP 배지에 접종하여 mid-log phase (OD₆₀₀ = 0.8)이 될 때까지 28°C에서 진탕 배양하였다. 박테리아를 1500 xg에서 5분간 원심분리하여 수거하였고 이를 다시 shoot regeneration 배지에 녹여 OD₆₀₀ 값이 0.8이 되게 조정하였다. 형질전환 후, 절편체를 200 mg/l kanamycin과 200 mg/l cefotaxime을 함유하는 선발배지 (MS salts and vitamins, 2 mg/l BA, 0.01 mg/l IBA, 30 g/l sucrose)에서 배양하였다. 재분화 개체를 절단하여 같은 배지에서 성장 시켰으며, 선발 후에는 200 mg/l kanamycin을 함유한 rooting medium (MS salts and vitamins, 0.1 mg/l IBA, 30 g/l sucrose) 배지에서 키웠다. 애기장대 형질전환은 일반적으로 사용되는 floral dipping 방법을 이용하였다.

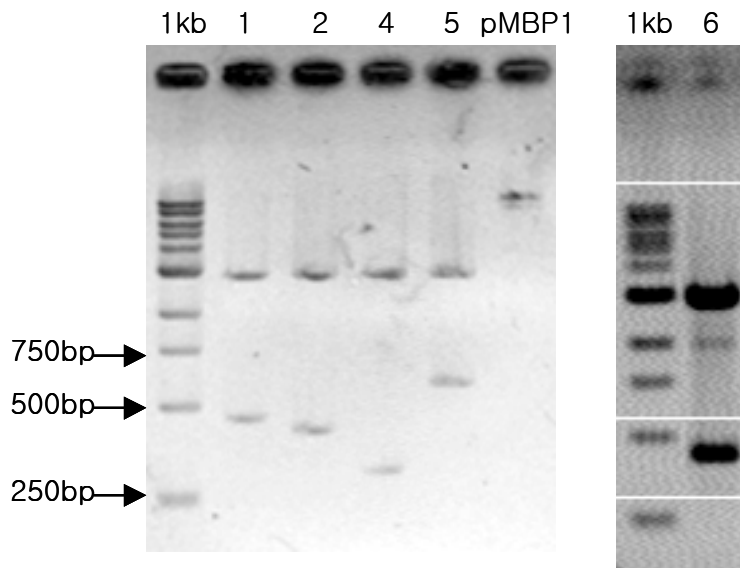


Fig. 3-3. Restriction digestion of inserts and expression vectors. Numbers 1~2 and 4~6 indicate *CASLP1*, *CABPR1*, *CALTP1*, *CAPOA1*, and *CALRR*, respectively.

바. Genomic DNA, RNA 추출, PCR 및 Northern 분석

Genomic DNA는 Edwards 등 (1991)의 방법을 변형하여 추출하였다. 1.5 ml microcentrifuge 튜브의 뚜껑을 이용하여 잎을 punch하여서 조각들을 수집한 후에 400 ml의 genomic DNA extraction buffer (200 mM Tris-HCl, pH7.5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0.5% SDS) 내에서 pellet pestle을 이용하여 추출하였다. PCR 증폭의 조건은 95°C 3분 후, 30회의 95°C 20초, 58°C 30초, 72°C 1분의 cycle을 수행하였다. PCR 증폭산물은 1% agarose gel에서 확인하였다.

Total RNA는 TRIzol Reagent (Gibco-BRL, USA)를 이용하여 추출하였다. Northern 분석은 Southern-StarTM detection kit (Tropix, USA)를 이용하였다. 10 µg RNA를 1% denaturing agarose gel (1X MOPS buffer, 15% formaldehyde, 1% agarose)에서 전기영동한 후에 Tropilon-plusTM membrane (Tropix, USA)에 alkaline transfer method로 transfer하고 UV를 쬐어서 crosslink시켰다. 68°C 16시간동안 probe로 hybridization하여

서 X-film으로 detection하였다.

사. 확립된 형질전환 시스템을 이용한 저항성 유전자의 도입

*Agrobacterium*을 이용하여 상기한 모든 유전자들을 담배에 도입하였다. Root 분화 유도 시에 1 mg/l 농도의 BA를 사용한 것을 제외하면 위에 언급한 방법과 동일한 방법을 사용하여 유전자를 도입하였다. 항생제에 저항성을 보이는 callus들을 선택하여 regeneration을 유도 한 후 토양으로 옮겨 키웠다 (Fig. 3-6). 애기장대 형질전환은 일반적으로 사용되는 floral dipping 방법을 이용하였다.

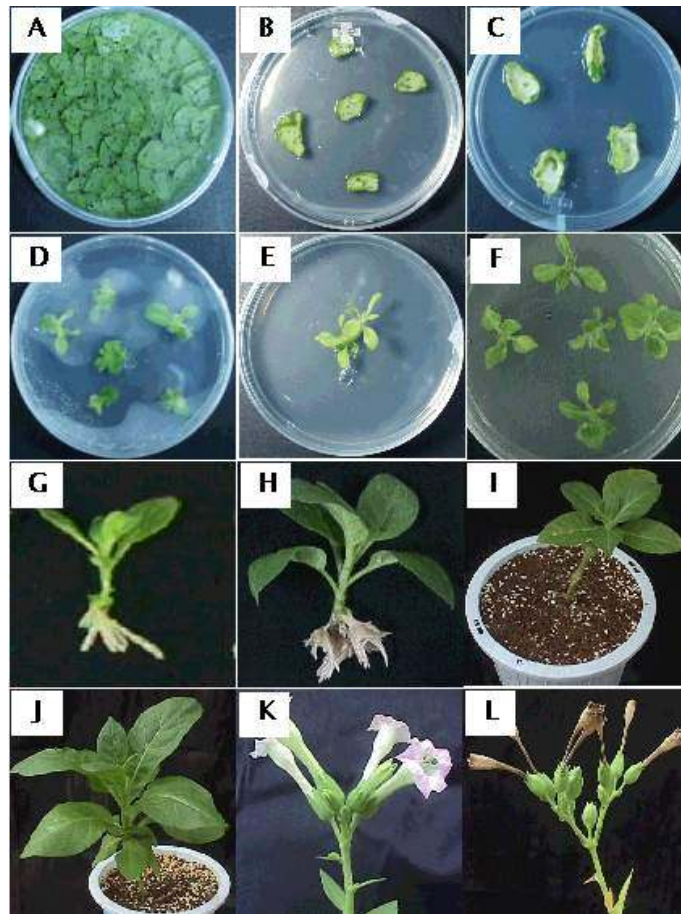


Fig. 3–4. Regeneration of transgenic tobacco plants. (A) Leaf disk inoculation; tobacco leaves were cut and inoculated with *Agrobacterium* containing pGAbGH1 or pGAbGH15. (B) Initial cultivation on the shooting media. (C) Callus formation (two weeks after transformation). (D) Shoot formation (three weeks after transformation). (E) Initial cultivation on the rooting media (seven weeks after transformation). (F) Root formation (nine weeks after transformation). (I) and (J) Young seedling transferred to soil. (K) Flower formation. (L) Seed formation.

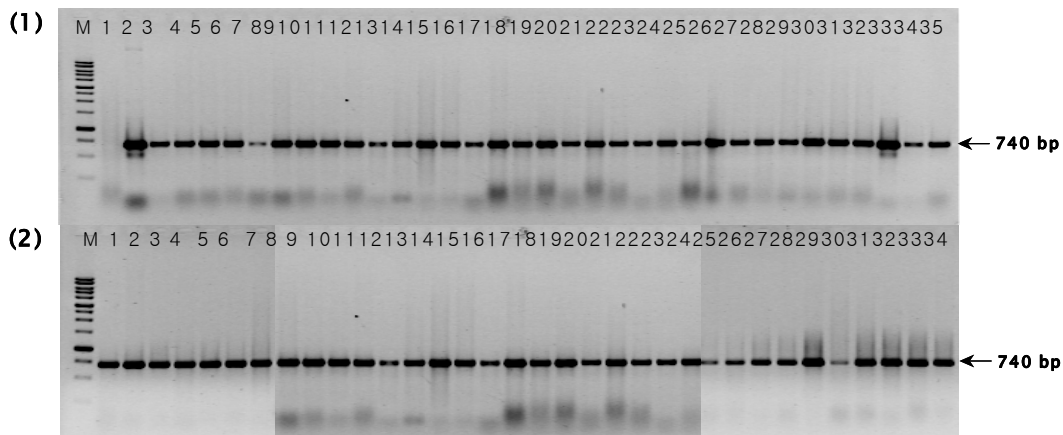


Fig. 3–5. Genomic PCR analysis of regenerated plants using *nptII* gene specific primers. The kanamycin-resistant putative transgenic plants were screened by PCR analysis. Genomic DNA samples isolated from individual transgenic plants were used as template for amplifying the *nptII* gene. The arrow indicates 740 bp of DNA fragments in size. Lane (1) 1, the wild type plant as a negative control; Lane (1) 2, pGAbGH1 as a positive control; Lane (1) 3~32, pGAbGH1-transformed tobacco plants; Lane (1) 33, pGAbGH15 as a positive control; Lane (1) 34~(2) 34, pGAbGH15-transformed tobacco plants.

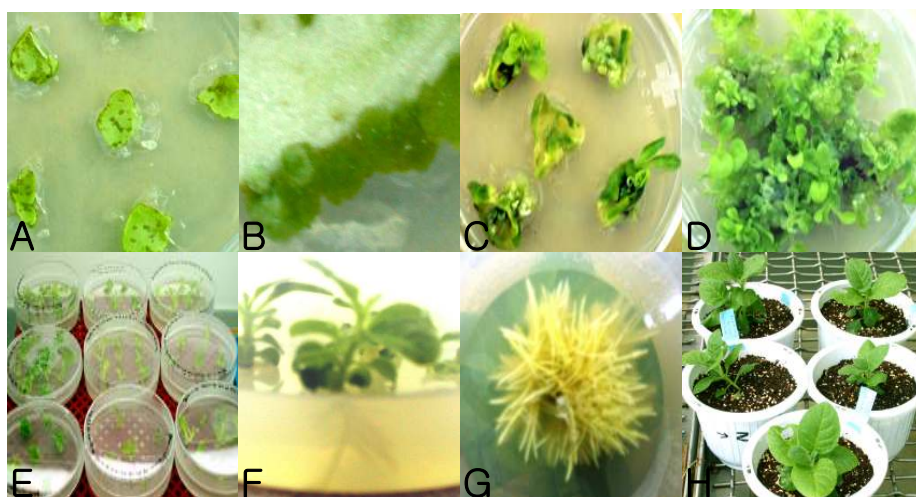


Fig. 3–6. Regeneration of transgenic tobacco plant. (A) Leaf disc inoculation 3 days after culture. (B) Callus formation in the cut and of leaf disc 15 days after culture. (C) Shoot regeneration from leaf disc culture after 25 days of culture. (D) Shoot multiplication after 25 days of culture. (E) Elongation of multiple shoots. (F) Adventitious root formation in MS free hormone medium after 15 days after culture. (G) Adventitious root formation in MS with 1 mg/l 1BA 20days after culture. (H) Establishment of micro–shoot in soil after 10 days.

아. 형질전환체의 특성 검정

1) Peroxidase 활성 분석

Peroxidase의 활성은 Do 등 (2003)의 방법으로 분석하였다. 1 g의 잎 조직을 액체질소에서 마쇄하고 추출액 (10 mM sodium phosphate; 1% sodium metabisulphite, pH 6.0)을 생체중의 10배에 해당하는 양을 추가하여 재차 마쇄하였다. 4°C에서 13,000 xg로 30분간 원심분리하여 상층액을 수집한 후 -70°C에 저장하였다. 총 peroxidase 활성은 470 nm에서 흡광기로 측정하였으며, guaiacol을 수소공여자로 사용하였다. 반응혼합액은 2.9 ml phosphate buffer (10 mM, pH 6.0, 25°C), 1.25% (v/v) guaiacol과 0.1 M H₂O₂로 구성되었다. 효소반응은 100 µl의 효소를 추가하여 시작하였고 흡광정도를 25°C에서 5분간 동안 분당 0.1에서 0.2 흡광단위로 측정하였다. 추출액의 peroxidase 활성은 tetraguaiacol의 molar extinction coefficient (26.6 x 10³ mol/cm)로 계산하였고, 전체 단백질 mg 당 nano katal로서 표시하였다.

2) 산화적 스트레스 내성 정도 분석

산화적 스트레스 내성정도를 분석하기 위하여 methyl viologen (superoxide-generating 화합물)을 식물체에 처리하였다. Tween 20에 methyl viologen (MV)를 0.1% 농도가 되게 녹여서, 각 처리마다 50 혹은 100 µM 농도를 처리하였고, 세 번의 독립적인 실험을 수행하여 분석하였다. 식물 잎에 처리한 후 growth chamber (광조건, 28°C)에서 계속 키웠다. 각 계통 당 9 개체에서 각 9개의 잎 조직을 본 실험에 사용하였다. 처리 9 시간 후에 엽록체 양을 측정하였다. 또한 종자를 50 ml/l kanamycin 항생제가 포함되어 있는 MS 배지에서 발아를 시키고 (정상 종자는 항생제 제외), 10일 후에 50 µM MV이 포함된 배지에 다시 옮겼다. 4일간 처리한 유묘는 다시 MS basal 배지에 옮겨서 회복을 시키면서 내성을 관찰하였다. 5주된 유묘와 8-10주의 식물체도 실험을 하였다. 이들 식물체에는 20 ml의 MV (50 µM)를 뿌려주었고, 4일 후에 관찰하였다.

3) 염과 삼투 스트레스 저항성 분석

염 스트레스 저항성의 경우에는 250 mM NaCl을 첨가한 MS 배지에서 종자발아 실험을 하였고, 삼투 스트레스 저항성은 종자를 500 mM mannitol을 함유한 MS 배지에서 발아 실험을 하였다.

4) 병원균의 접종

*Phytophthora nicotianae*는 Black Shank 병을 유발하는 oomycete 병원균으로서 V8

juice agar 배지 (200 ml V8 juice, 15 g Bactoagar, 3 g CaCO₃ in 1 L dH₂O)에 접종하고 26°C 암 상태에서 배양하였다. 절단 잎 실험을 위해서는 5-6주의 잘 전개된 잎을 이용하였다. 5일 자란 (직경 0.5 mm) oomycete plug를 잎의 표면 중간에 위치시켰다. 접종한 잎은 축축한 필터종이 두 장을 간 페트리 접시에 놓고 25°C에서 16시간 광 처리 조건하에 두었다. 접종 5일 후에 감염된 잎 부위를 측정하였다. 줄기 감염을 위해서는 줄기 껍질을 멸균된 칼날로 0.5~1 cm²를 벗겨내고, 균사체 plug를 상처부위에 접종하였다. 접종된 식물체는 습도 100%의 16시간 광조건, 25°C에서 배양하였고 접종 후 30일 후에 촬영하였다.

박테리아 병원균 *P. syringae* pv. *tomato* DC3000은 King's B 배지에서 28°C에서 키웠다. 박테리아 현탁액 (10⁴ cfu ml⁻¹)은 주사바늘이 없는 hypodermic syringe를 이용하여 잎의 mesophyll 조직으로 침투시켜 접종하였다. 접종 5일 후에 잎 조직에서의 박테리아 성장 정도를 확인하기 위하여 조직을 멸균수에서 마쇄한 후에 King's B agar 배지에 뿌렸다. 박테리아 집단은 rifampicin 선택 배지 위에 형성되는 균락의 수로서 결정하였다.

*Phytophthora capsici*는 토마토의 bucket rot 병을 유발하는 병원균으로서 26°C 암조건 하에서 V8 juice agar 배지 (200 ml V8 juice, 3 g CaCO₃, 800 ml DW, 15 g agar, pH 6.4)에서 키웠다. 잎 접종 실험을 위해서 5-6주 지난 식물체의 전개된 잎을 이용하였다. 5일된 oomycete plug (직경 0.4 mm)를 잎 표면의 중앙에 위치시켰고 25°C 100% 습도 하의 생장기에서 배양하였다. 감염된 잎 면적은 접종 2일 후에 측정하였다.

5) 토마토 형질전환 및 재분화

*CABPR1*과 *CAPOA1* 두 가지 유전자를 형질전환에 이용하였다. *Agrobacterium tumefaciens* 균주 LBA4404를 이용한 토마토 형질전환은 Park 등 (2003)의 방법을 변형하여 사용하였다. *A. tumefaciens*를 50 mg/l rifampicin과 50 mg/l kanamycin이 보충된 YEP 배지에서 28°C에서 mid-log 단계 (OD₆₀₀ = 0.8)까지 키우고, 1,500 xg에서 5분간 원심분리하여 박테리아를 수집한 후에 shoot regeneration 배지용액으로 최종농도가 OD₆₀₀으로 0.8이 되게끔 다시 현탁시켰다.

형질전환 후, 배양체를 shoot regeneration을 위한 선택배지 [(MS salts, vitamins, 2.0 mg/l BA, 0.01 mg/l IBA, 30 g/l sucrose) + (200 mg/l kanamycin, 200 mg/l cefotaxime)]에서 키웠다. 재분화된 shoot (T₀)은 잘라서 키우면서 선발하였다. Kanamycin 저항성 shoot들은 rooting 배지 [(MS salts, vitamins, 0.1 mg/l IBA, 30 g/l

sucrose) + (200 mg/l kanamycin)]에 다시 키웠다. 뿌리 발육이 왕성한 식물체들만 골라서 화분에 옮겨 심고 온실에서 계속 키웠다.

2. 연구 개발 수행 결과 및 고찰

가. *CAPOAI* 유전자 도입 담배 형질전환체 확립 및 발현 검증

1) PCR을 통한 유전자 도입의 확인

유전자도입여부를 확인하기 위해 genomic DNA PCR을 실시하였다. PCR에는 *CAPOAI* 유전자의 gene specific primer인 5'-GGGGATCCGCACGAGGTCGGTTCTCTCTC-3'과 5'-GGGGATCCGCACGAGGTCGGTTCTCTCTC-3'를 사용하였다. PCR 조건은 DNA denaturation을 위해 95°C 5 분 이후, 95°C에서 15 초, 55°C에서 20 초, 72°C에서 1분간으로 총 35 cycle을 실시하였다. PCR 결과, 560 bp의 증폭 DNA 밴드들을 관찰할 수 있었고, *CAPOAI* 유전자가 담배 내로 성공적으로 도입되었음을 확인하였다.

2) 형질전환식물체의 생산 및 유전자 과발현 확인

초기 genomic PCR로 확인된 8개의 형질전환체 중에서 4개의 계통에서 명확한 562 bp 밴드가 확인되었고 (Fig. 3-7B), 도입된 유전자는 형질전환체에서 높은 수준으로 지속적으로 발현됨을 Northern 분석으로 확인하였다 (Fig. 3-7C). 자가수분으로 T₁ 종자를 걸실시켜서 확보하여 다음 실험에 이용하였다.

나. *CAPOAI* 유전자 도입 형질전환체의 특성 분석 결과

1) 형태적 특성과 성장속도

고추의 ascorbate peroxidase-like 1 (*CAPOAI*) 유전자가 형질전환 되었을 때 성장과 발육에 영향을 미칠 수 있는지를 확인하기 위하여 유묘의 뿌리길이와 개화시기까지의 식물의 크기와 마디 수를 측정하였다. 정상 식물에 비해서 4개의 형질전환 계통 모두 40% 이상 뿌리의 길이가 길었으며 35.53% 키가 컸고, 15.42% 더 많은 마디수가 관찰되었다 (Fig. 3-8).

특히 형질전환 계통 #2는 peroxidase 활성이 가장 높은 계통이었는데, 이 계통은 식물체의 길이와 마디 수뿐만 아니라 뿌리의 길이가 훨씬 더 길었다. 이러한 결과는 고추 ascorbate peroxidase-like 1 유전자를 과다발현 시키면 성숙단계에 있는 식물체뿐만 아니라 유묘기의 식물성장 조절에 매우 중요한 역할을 한다는 것을 제시해 준다.

2) *CAPOA1*의 과다발현은 peroxidase 활성을 증가

완전히 전개된 담배 잎을 이용하여 peroxidase의 총 활성을 측정하였다. 기대하였던 것처럼, 형질전환 계통의 peroxidase 활성은 정상 식물에 비하여 약 2배가량 높았다 (Fig. 3-9). 이는 형질전환체의 증가된 peroxidase 활성은 *CAPOA1*이 과다 발현되어서 생성된 것으로 확인되었다.

3) 형질전환체의 산화적 스트레스에 높은 내성

MV를 처리하였을 때, *CAPOA1* 형질전환 식물체는 잎 조각을 이용한 실험이나 전체 식물체를 이용한 식물에서 상관없이, 정상 식물 보다 산화적 스트레스에 한층 증가된 내성을 나타내었다. 정상 잎 조각은 MV (50 혹은 100 μM) 처리 후에 심각한 백화현상이 관찰되었다. 이에 따라 MV 처리된 식물 잎 조직과 정상 잎 조직에서 엽록소 총 함량을 측정하였다. 엽록소 농도는 정상 식물체 보다 형질전환체에서 MV 50 μM 에서 44.93%, MV 100 μM 에서 81.84% 더 높았다 (Fig. 3-10A). 50 μM 의 MV를 처리한 후 4 일째에 정상 유묘는 심각한 백화현상이 나타났으며, 배지로 옮겨서 회복되기 전에 죽었다. 세 개의 형질전환 계통인 *CAPOA1-1*, *-2*, *-4*는 모두 약간의 황화 증상을 나타내었으나 여전히 죽지 않았으며, 높은 농도에서도 마찬가지로이었다 (Fig. 3-10B, 위). 회복 배지에 옮겨준 후에는 세 계통의 식물체의 약 45-48%가 살아남았다.

5주된 식물체의 처리에서도 마찬가지로 현상이 관찰되었다. 정상 식물체는 형질전환체에 비해서 MV 산화적 스트레스에 매우 민감하였다. 정상 식물체는 처리 후 24시간 이내에 괴사점이 나타났으며, 3일 후에는 많은 개체들이 마르고 더 많은 괴사점이 형성되었다. 반면에 형질전환 식물체는 극히 적은 괴사점이 발견되었고 마르는 증상이 관찰되지 않았다 (Fig. 3-10B, 중간). 또한 성숙된 식물체의 경우에서도 정상 개체는 황화 점들이 많이 관찰되었으나, 형질전환체는 극히 적게 관찰되었다 (Fig. 3-10B, 아래).

4) 병원균에 대한 저항성

*CAPOA1*을 과다발현시킴으로써 oomycete 병원체인 *P. nicotianae*에 저항성을 갖게 되는지를 확인하기 위하여 oomycete plug를 절단된 잎 표면의 중간에 접종하였다. 접종 5일 후에는 실험한 모든 잎에서 병증이 관찰되어 성공적으로 접종된 것을 확인하였다. 형질전환체에서는 병 발육이 지연되면서 약 52% 감소율이 보였다 (Fig. 3-11). Black Shank 병에 대한 신뢰도가 높은 저항성이 보인 것은 줄기 접종 실험에서 확인되었다. 형질전환체에서도 접종 7일 이내에 매우 작은 괴사 증상이 보였으나, 정상 식물체는 이

괴사점이 신속하게 커지는 반면에 형질전환체는 그렇지 않았다.

접종 30일 후에 정상식물체의 괴사점은 직경 6.3 cm에 달하였으나 형질전환체는 매우 작은 괴사지역이 관찰되었다 (Fig. 3-11B). 또한 정상 식물체는 hollow-shank 증상이 관찰되었다. 하지만, 계통 #5는 약간의 병증이 관찰되었지만, 계통 #1, #2, #4는 전형적인 Black Shank 증상을 보이지 않았다 (Fig. 3-11A). 감염된 지점의 줄기 두께 또한 정상 식물체는 통계적으로 유의한 수준의 감소를 확인 할 수 있었다 (Fig. 3-11C). peroxidase 활성과 mRNA 발현이 매우 높았던 계통 #1과 #2는 Black Shank 병에 극히 저항성이었다.

비슷한 결과를 5-6주된 유묘식물체의 줄기에서도 관찰하였다. 이러한 결과는 담배에서 *CAPOA1*을 과다발현 시키면 Black Shank 병원균인 *P. nicotianae*에 저항성을 갖는다는 것을 제시해 준다. 하지만, 이들 형질전환체들은 박테리아 병원균에 대해서는 저항성을 보이지 않았다. 형질전환체에서 *R. solanacearum*의 성장이 약간 억제되었으나, *P. syringae* 성장의 감소는 보이지 않았다.

5) *CAPOA1*의 subcellular localization

*CAPOA1*의 subcellular localization을 확인하기 위하여 C-말단 암호부위에 GFP를 붙였고 양과 표피세포를 이용하여 transient assay를 실시하였다 (Fig. 3-12). 유전자총으로 처리하였을 때, GFP 형광은 세포의 바깥에서 관찰되었기에, *CAPOA1*은 apoplasmic ascorbate peroxidase-like 단백질이라는 것을 확인하였다.

다. *CAPOA1* 실험 결과에 대한 고찰

Compatible 및 incompatible 식물-병원균 상호작용에서 peroxidase 활성이 증가되는데, 이는 peroxidase가 비특이적 방어 반응에 관련되어 있다는 것을 지적하고 있으며, 따라서 생물학적 및 비생물학적 스트레스에 대해서 저항성을 증가시킨다 (Way 등, 2000). 본 연구에서는 *X. campestris* pv. *vesicatoria*의 비병원성 균주 BV 5-4a를 처리한 고추에서 분리한 *CAPOA1* 유전자를 과다발현 시킨 담배가 산화적 스트레스와 병원균에 대해서 어떠한 기능을 할지를 검증하였다. 검증한 형질전환 식물체는 서로 *CAPOA1* 전사와 peroxidase 전체 활성은 달랐지만, 정상 식물체에 비해서 형질전환체의 peroxidase 총 활성은 약 2배가량 높았다. Kazan 등 (1998)은 담배와 canola에서 pathogenesis-related peroxidase 유전자 (*Shpx 6a*)를 이용하여 비슷한 결과를 보고하였다. peroxidase는 성장 조절과 세포 팽창 등의 많은 생리학적 과정에서 중요한 역할을 한다고 이미 보고된 바 있다.

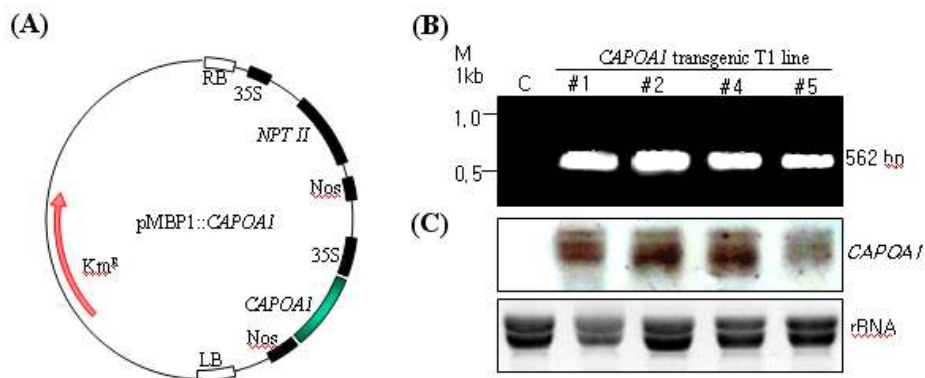


Fig. 3-7. Generation of the *CAPOAI* transgenic tobacco plants. (A) Diagram of the constructed plant expression pMBP1-*CAPOAI* vector. RB, right border; LB, left border; *NPTII*, neomycin phosphotransferase; 35S, cauliflower mosaic virus 35S promoter; *NOS*, nopaline synthase terminator. (B) Amplification of *CAPOAI* from the genomic DNAs of four different transgenic plants. M, marker; C, control plants (pMBP1-transformed plants); transgenic lines, #1, #2, #4, and #5. (C) Northern blot analysis. C, control plants (pMBP1-transformed plants); transgenic lines, #1, #2, #4, and #5.

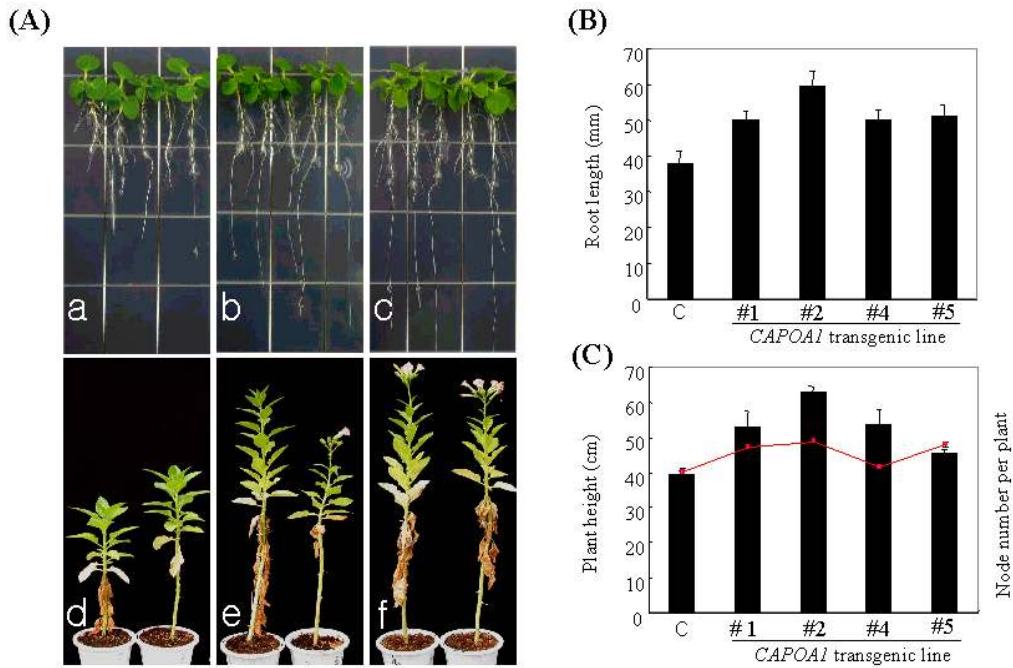


Fig. 3–8. Phenotype of the *CAPOA1* transgenic tobacco plants. (A) (Upper panel) Root growth on MS medium supplemented with 50 mg/l kanamycin. a, control; b and c, *CAPOA1* line #1 and #2, respectively. (Lower panel) Plant growth at the flowering stage. d, control; e and f, *CAPOA1* line #1 and #2, respectively. (B) Root growth in MS + Kanamycin 50 mg/l medium. Data are expressed as the means \pm standard errors from three independent experiments. (C) Plant height and node number at the flowering stage. Data are expressed as the means \pm standard errors of 10~12 independent plants.

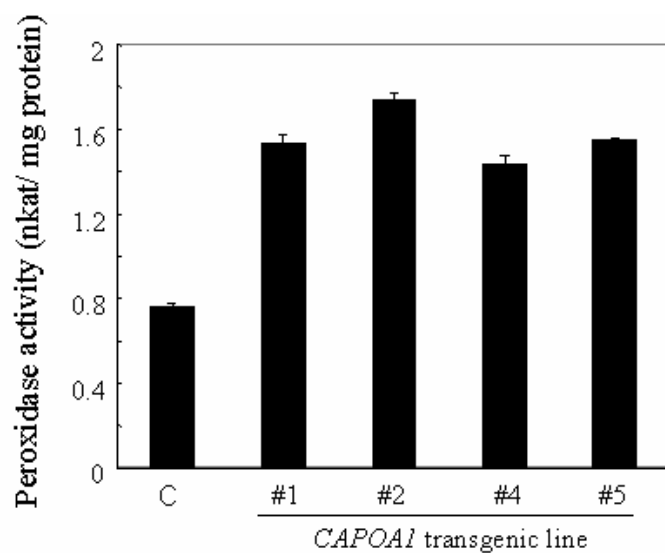
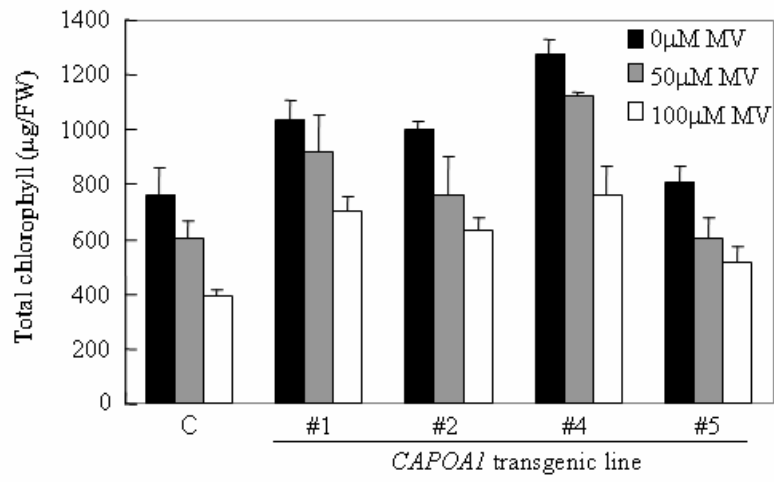


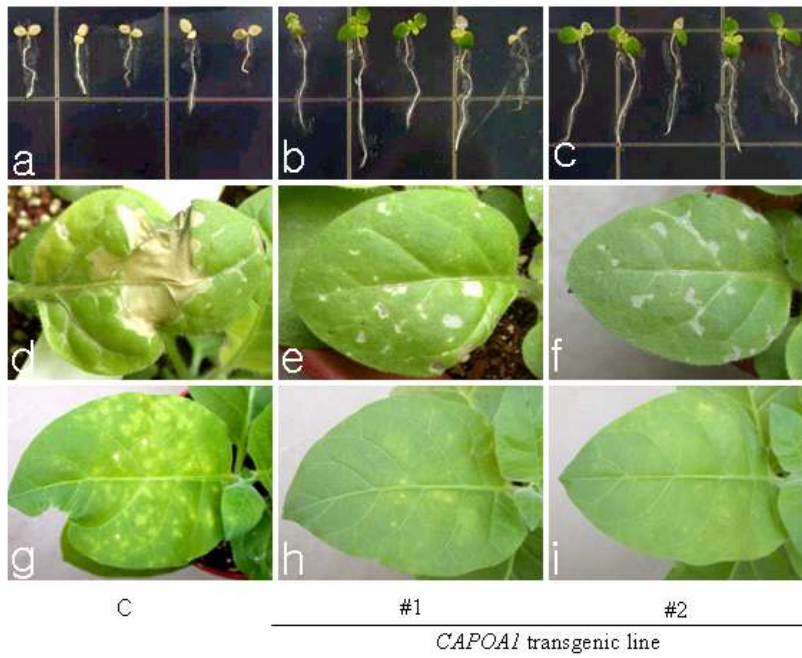
Fig. 3–9. Total peroxidase activity in the control and *CAPOA1*–transgenic tobacco plants. Data are expressed as the means standard errors from three independent experiments.

Fig. 3–10. Enhanced tolerance of the *CAPOA1* transgenic tobacco plants to methyl viologen (MV). (A) Total chlorophyll content in leaf tissues. Black bar, without treatment; gray bar, treatment with 50 μ M MV; white bar, treatment with 100 μ M MV. Data are expressed as the means \pm standard errors from three independent experiments. (B) Oxidative stress tolerance of transgenic plants. (Upper panel) *In vitro* oxidative stress tolerance of transgenic plants. Ten day–old seedlings were transferred to the MS medium supplemented with 50 μ M MV. a, control; b and c, transgenic lines #1 and #2, respectively. (Middle panel) Effect of 50 μ M MV on young (5–week–old) plants. d, control; e and f, transgenic lines #1 and #2, respectively. (Lower panel) Effect of 50 μ M MV on mature (8 to 10–weeks–old) plants. g, control; h and i, transgenic lines #1 and #2, respectively.

(A)



(B)



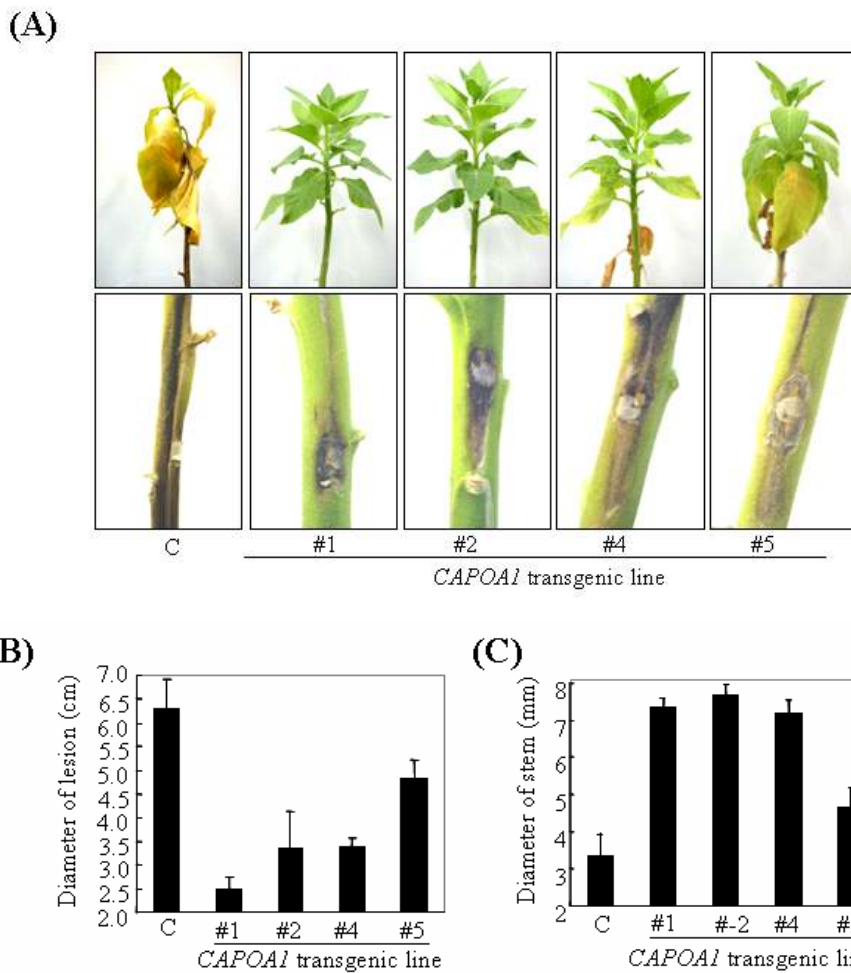


Fig. 3–11. Disease development in the *CAPOA1* transgenic tobacco plants inoculated with *Phytophthora nicotianae* KACC40906 at the wounded stems of both control and transgenic lines. (A) Disease symptoms on the whole plant and inoculated stems. (B) Disease areas (cm in diameter) in the inoculated stems, 30 days after inoculation. (C) Measurement of stem diameters at the infected point after 30 days of infection. Data are expressed as the means \pm standard errors from three independent experiments.

본 결과에서도 형질전환체는 뚜렷한 형태적인 이상이 발견되지 않았으나, 형질전환 계통의 키가 유의적으로 크다는 것이 확인되었다. 본 결과는 Pignocchi 등 (2003)이 apoplastic ascorbate oxidase를 과다발현 시킨 형질전환 담배의 성장 증진을 보고한 결과와 동일하였다. Kato 등 (2000)도 ascorbate oxidase를 과다발현 시킨 담배 원형질체의 팽창을 보고한 바 있다. 이러한 결과들과 함께 본 연구결과를 종합해 보았을 때, ascorbate oxidase 혹은 peroxidase는 담배 식물체의 성장과 발육에 중요한 역할을 한다는 증거가 명확하였다.

또한 *CAPOAI*을 과다발현 시킨 식물체는 superoxide (O_2^-)를 생성하는 화합물인 MV를 처리하여 유도시킨 산화적 스트레스에 대해서 저항성이 증가됨을 보여주었다. 일조각에 MV (50 혹은 100 μ M)를 처리하였을 때, 정상 식물체의 엽록소 함량은 유의적으로 감소되었으나 형질전환 식물체는 거의 감소하지 않거나 아예 감소하지 않았다. 전자 전달계에서 광합성 도구에서부터 나온 전자들은 엽록체 내의 상대적으로 높은 농도의 산소와 쉽게 반응한다 (Foyer 등, 1994). 그래서 식물은 계속적인 산화적 스트레스로부터 스스로를 보호하기 위하여 항산화 방어 메커니즘을 활성화시키고 있다. ascorbate peroxidase를 과발현 시키는 것은 아마도 과산화수소를 물로 변환시키는 방어 기작을 가동시키게 한다. 여러 가지 스트레스 조건에서 다른 항산화제 (예, catalase)와 비하여 APX가 더 많이 증가한다는 것은 산소 활성종을 무력화하는 역할을 한다는 것을 의미한다 (Asada, 1992).

본 연구에서 형질전환 담배에서 *CAPOAI*이 과다발현됨으로써 일조각, 유묘, 성체에서 모두 MV에 의해서 유도되는 산화적 손상에 대한 저항성 증가된다는 것을 보여주었다. 최근에 Badawi 등 (2004)은 cytosolic ascorbate peroxidase를 과다발현 시켰을 때, 담배 엽록체의 APX 활성이 3.8배 증가하고, 과산화수소의 독성을 감소시키며, paraquat 과 sodium sulphite에 의한 활성산소종에 대해 저항성이 증가된다는 것을 보고한 바 있다. Fe- 혹은 Cu/Zn-superoxide dismutase와 같은 여러 가지 다른 항산화 유전자의 과다발현도 산화적 스트레스 저항성을 증가시킨다는 보고가 있다 (Gupta 등, 1993; van Camp 등, 1996; Kwon 등, 2002).

몇몇 논문에서 peroxidase가 특정 곰팡이 병에 저항성을 나타낸다는 보고와 마찬가지로, 본 연구에서 *CAPOAI* 형질전환 담배는 *P. nicotianae*에 높은 저항성을 보였다. 특히, mRNA 전사가 많고 peroxidase 활성이 높은 계통이 oomycete 병원균에 더 높은 저

항성을 보였다는 것이 흥미롭다. 하지만, 박테리아 병원균인 *R. solanacearum*에 대해서는 유의적이지는 않지만 약한 저항성을 보였으나, *P. syringae* pv.tabaci에는 저항성이 없었다. ascorbate peroxidase의 명확한 저항성 기작은 알 수는 없지만, 감염부위의 병원균 성장을 저하시키는 효과가 있을 것으로 추정된다. 이 유전자의 기능을 좀 더 명확하게 추정하기 위하여 subcellular localization을 수행하였고, CAPOA1은 세포의 extracellular 부위에 위치함이 확인되었고, 병원균 성장저해에 작용할 것으로 추정되었다.

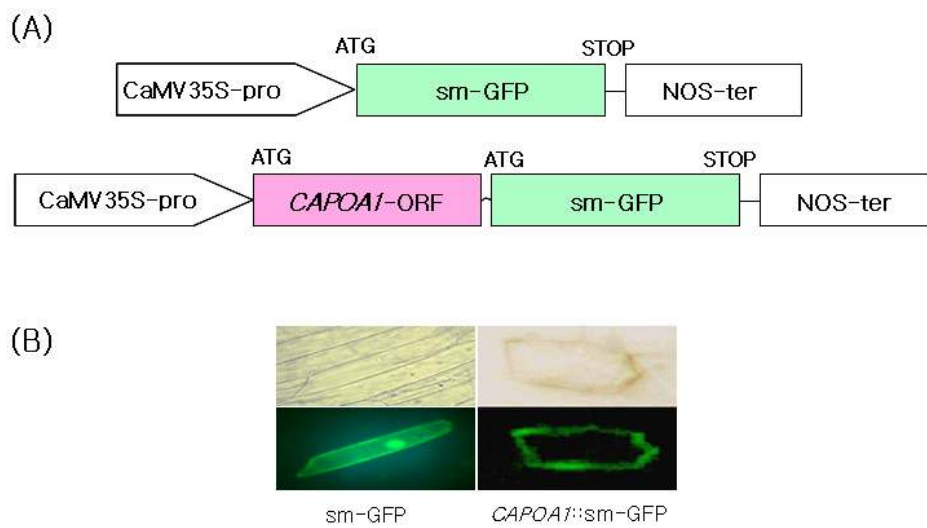


Fig. 3-12. Subcellular localization of CAPOA1 in onion epidermal cells. (A) Diagram of the vector constructs used. (Upper) only GFP as a control; (Lower) GFP fused to the C-terminus of the coding region of *CAPOA1*. (B) Subcellular localization of smGFP and *CAPOA1*::smGFP. (Upper) bright field image of onion epidermal cells; (Lower) UV-blue light excitation image of GFP and GFP-fused with *CAPOA1* under fluorescence microscopy.

라. *CABPR1* 유전자 도입 담배 형질전환체 확립 및 발현 검증

1) PCR을 통한 유전자 도입의 확인

PCR에는 *CABPR1* 유전자의 gene specific primer인 5' - C C G G G A T C C G T C A T G G G A C A C T C T A A T A T T G C C - 3' 과 5'-CAAGAGCTCGTAACGTACTCCACAGAAC-3'를 사용하였다. PCR 조건은 DNA denaturation을 위해 95°C 5분 이후, 95°C에서 15초, 55°C에서 20초, 72°C에서 1분간으로 총 35 cycle을 실시하였다 (Fig. 3-13). PCR 결과, 증폭 DNA 밴드들을 관찰할 수 있었고, *CABPR1* 유전자가 담배 내로 성공적으로 도입되었음을 확인하였다.

2) 형질전환식물체의 생산 및 유전자 과발현 확인

병원균과 증금속에 저항성을 보이는 고추의 *CABPR1*의 영향을 알아 보기위해 *CABPR1* cDNA를 35S promoter 조건 하에서 과다발현 할 수 있게끔 벡터를 구축하여, 담배에 형질 전환을 시켰다 (Fig. 3-14A). 네 개의 담배 과다 발현 형질전환체는 gene specific primer를 사용한 PCR에서 명확한 645 bp 밴드가 확인되었고 (Fig. 3-14B), 그리고 Northern 분석을 통해 네 개 개체 모두에서 도입된 *CABPR1* 유전자가 높게 발현됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 3-14C). 하지만 *CABPR1-6*계통은 종자를 획득하는데 실패하여 다른 세 개의 개체들은 자가수분하여 T₁과 T₂의 종자를 확보한 후에 다음 실험들을 진행하였다.

마. *CABPR1* 유전자 도입 형질전환체의 특성 분석 결과 및 고찰

1) *CABPR1* transgenic 식물을 이용한 병 진단 실험

담배 black shank 병에 대한 *CABPR1* 형질전환체의 반응을 확인하기 위해, *P. nicotianae*를 접종 3일 후와 5일 후에 그 병증을 관찰하였다. 각각 개체에서 아홉 개의 식물체를 선별하여 실험을 진행하였다. 감염시킨 지 3일 후에 식물체를 관찰한 결과 형질전환체가 정상식물체에 비해 병증이 현저하게 지연됨을 확인할 수 있었다. 그리고 감염시킨 지 5일 후에는 실험이 진행된 모든 잎에서 괴사된 곳이 나타나 성공적으로 접종된 것을 확인하였다 (Fig. 3-15A, 위). 병증이 형질전환체에서 현저하게 지연되는 이러한 결과는 담배에 *CABPR1*을 발현시켰을 때 *P. nicotianae*에 대해 저항성을 가진다는 것을 의미한다 (Fig. 3-15A ,아래).

전형적인 세균병 증후는 담배의 잎에 *R. solanacearum*과 *P. syringae* pv. *tabaci*을 접종시켜서 관찰하였다. 정상 식물체와 형질전환체에 감염을 시켜서 자라는 세균의 수를

0일과 5일 후에 그 수를 관찰하였다 (Fig. 3-15B, C). 형질전환체의 감염 부위로부터 채취한 세균의 수는 정상 식물체의 감염부위에서 채취한 세균의 수 보다 현저히 적었다. 비록 세 개의 병원체를 서로 비교 분석한 것은 아니더라도 모든 형질전환체가 *P. nicotianae*, *R. solanacearum*과 *P. syringae* pv. *taba*차에 대해서 상당히 높은 저항성을 보여주고 있었다.

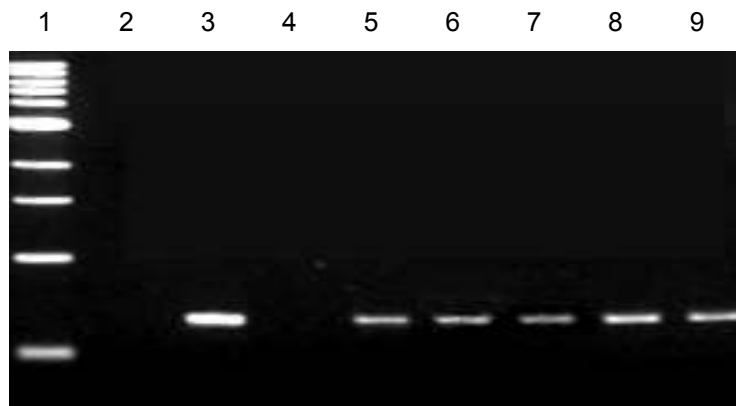


Fig. 3-13. PCR amplification of a target 750 bp with *CABPRI* gene specific primers. Genomic PCR analysis of regenerated plants using *CaBPR1* gene specific primers. The kanamycin-resistant putative transgenic plants were screened by PCR analysis. Genomic DNA samples isolated from individual transgenic plants were used as template for amplifying the *CABPRI* gene. Lane 1, Marker; lane 2, distilled water as a negative control; Lane 3, pMBP1 as a positive control; Lane 4, the wild type plant as a negative control; Lane 5~9, *CABPRI*-transformed tobacco plants.

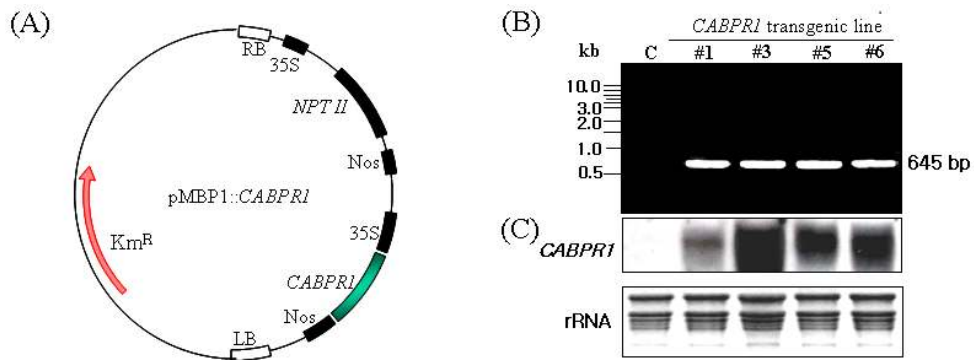


Fig. 3–14. Vector construction and generation of the *CABPR1* transgenic tobacco plants. (A) Diagram of the constructed plant expression vector pMBP1–*CABPR1*. RB, right border; LB, left border; *NPTII*, neomycin phosphotransferase; 35S, *Cauliflower mosaic virus* 35S promoter; *NOS*, nopaline synthase terminator. (B) Expected 645 bp bands were amplified from the genomes of four different transgenic plants, while control plant did not show the band. M, marker; C, control plant; lines #1, #3, #5, and #6, four individual transgenic lines. (C) Northern blot analysis for detection of *CABPR1* transcripts. C, control lines #1, #3, #5, and #6, four individual transgenic lines.

2) *CABPR1* 담배 형질전환체의 중금속에 대한 내성 증대

두 계통의 *CABPR1* 형질전환체와 정상식물체의 중금속 내성을 비교하기 위해 각각 250 μM CdCl_2 과 50, 100 μM HgCl_2 이 포함되어있는 배지 위에서 종자의 발아를 실험해 보았다. *CABPR1* 형질전환체들은 카드뮴과 수은에 대해서 내성을 가지는 반면에 정상식물체는 모든 중금속 처리에 의해 발아가 저해됨을 알 수 있었다 (Fig. 3-16A). 250 μM CdCl_2 에서 정상식물체는 가늘고 허약하게 발아가 되고 결뿌리가 적게 자라는 반면 형질전환체는 잎도 크고 정상적으로 뿌리가 잘 발달되고 있음을 관찰할 수 있었다. Fig. 3-16B는 카드뮴의 농도가 서로 다른 배지위에서 실험을 진행했을 때도 각각 형질전환체의 뿌리기가 정상 식물체의 뿌리보다 10~40% 이상 더 잘 자라고 있음을 보여준다.

특히, 100 μM HgCl_2 에서는 형질전환체가 정상식물체와 비교했을 때 뿌리털이 더 발달되어 있었다. 배지에서 발아된 지 30일이 지난 식물체를 100 μM HgCl_2 가 포함된 배지에 옮겨 주어 스트레스 조건으로 만들어준 후 괴사 부위, 뿌리의 형태와 줄기 등을 정상 식물체와 비교 해 보았을 때도 형질전환 식물체가 성숙된 단계에서 중금속에 대해 내성을 가짐을 알 수 있었다. 이 결과는 *CABPR1* 유전자를 과다 발현 유도시킴으로써 병원체와 중금속에 강한 저항성을 가진다는 것을 말해준다.

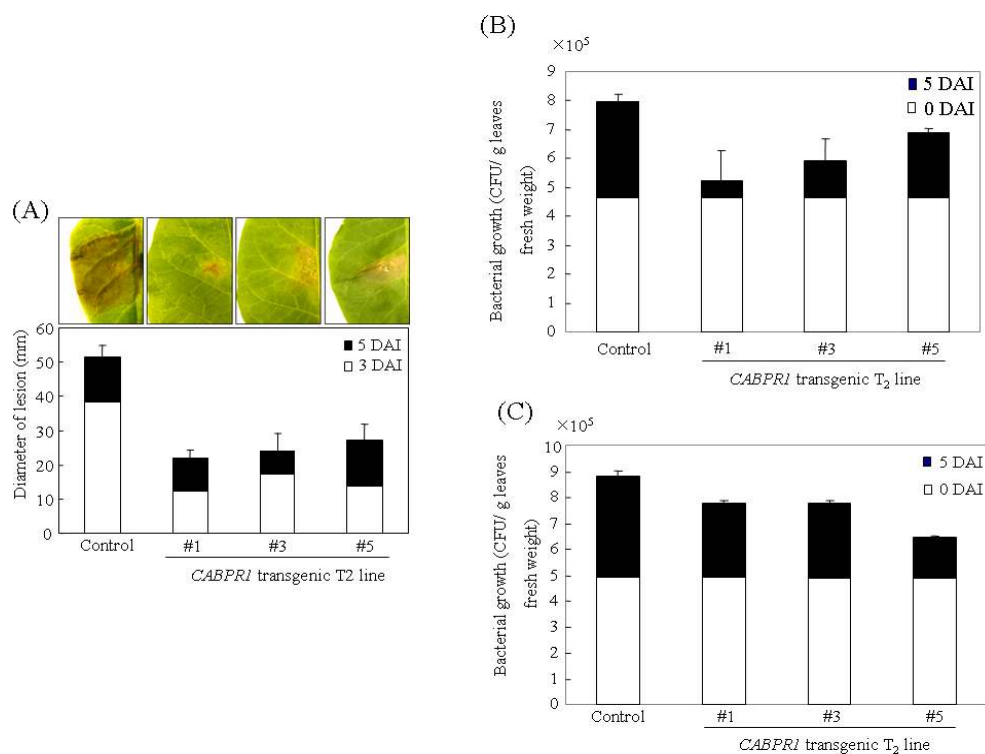
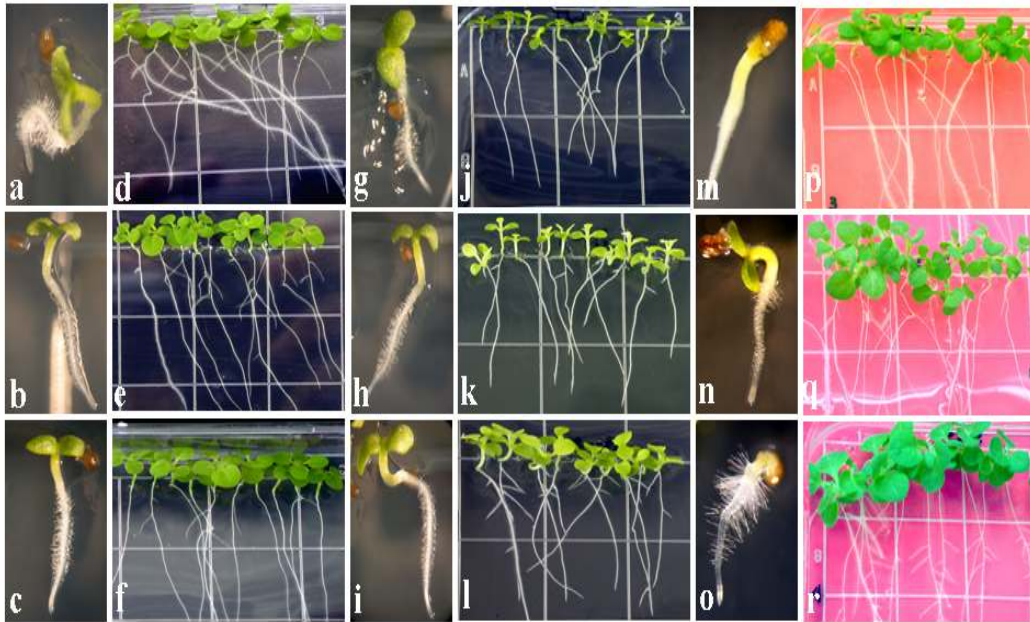


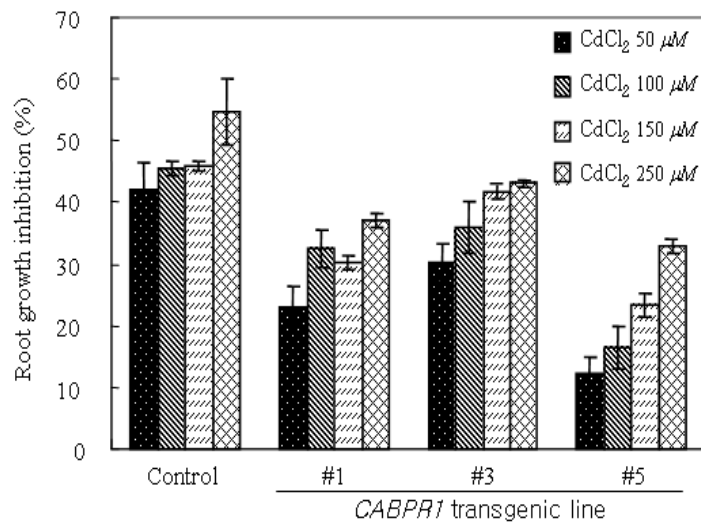
Fig. 3–15. Disease evaluation of the *CABPR1*–transgenic tobacco plants. (A) Inhibition of disease development (mm) on the transgenic plants infected by *Phytophthora nicotianae* KACC40906. Photos were taken 5 days after infection (upper panel) and data were recorded 3 (white bar) and 5 (black bar) days after infection of tobacco leaves (lower panel), and represented as the mean \pm standard errors of three replications, each replication comprising three sub–replications. (B) Inhibition of *Ralstonia solanacearum* growth in transgenic tobacco leaves. Data were taken 0 (white bar) and 5 (black bar) days after infiltration of the bacterial pathogen, and represented as the mean \pm standard errors of three replications, each replication comprising three sub–replications. (C) Inhibition of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* growth in transgenic tobacco leaves. Data were taken 0 (white bar) and 5 (black bar) days after infiltration of the bacterial pathogen, and represented as the mean \pm standard errors of three replications, each replication comprising three sub–replications.

Fig. 3-16. Heavy metal tolerance in *CABPRI* transgenic tobacco plants. (A) Effect of heavy metals on seed germination. (1) Seed germination after 7 days on MS basal media without stress; (a) control, (b & c) transgenic lines *CABPRI-1* and *CABPRI-3*, respectively. (2) Seedling growth after 15 days on MS basal media without stress; (d) control, (e) *CABPRI-1*, (f) *CABPRI-3*. (3) Seed germination after 7 days on 250 μ M cadmium chloride containing MS media; (g) control, (h & i) transgenic lines *CABPRI-1* and *CABPRI-3*, respectively. (4) Seedling growth after 15 days on 250 μ M cadmium chloride; (j) control, (k) *CABPRI-1*, (l) *CABPRI-3*. (5) Seed germination after 7 days on 100 μ M mercuric chloride containing MS basal medium; (m) control, (n) *CABPRI-1* (o) *CABPRI-3*. (6) Seedling growth after 23 days on 50 μ M mercuric chloride; (p) control, (q) *CABPRI-1*, (r) *CABPRI-3*. (B) Percentage of root growth inhibition in various concentrations of cadmium chloride. Data represented as the mean \pm standard errors of three independent replications.

(A)



(B)



3) 형질전환 식물체 내에서의 PR 유전자들, 중금속 스트레스 관련 유전자 및 ascorbate peroxidase 유전자의 발현 양상 확인

*CABPR1*의 과다발현이 PR 유전자들의 발현에 영향을 주는지를 알아보기 위해, RT-PCR 기법을 이용하여 그 발현 양상을 확인하였다: *PR-1a* (Payne 등, 1988), *PR-2* (Ward 등, 1991), *PR-Q* (Payne 등, 1990), *PR-4* (Wang 등, 2000) *osmotin* (Singh 등, 1989) 그리고 *thaumatin* (Cornelissen 등, 1986) (Table 3-1).

그 결과, *CABPR1* 과다발현 식물체에서 *PR-Q* 유전자의 증가와 *PR-1a* 및 *thaumatin* 유전자의 감소된 발현을 확인하였다 (Fig. 3-17A). 또한 모든 형질전환체 내에서 *osmotin* 유전자는 동일하게 발현했으며, 정상 식물체를 포함한 형질전환 식물체 내에서의 *PR-2*와 *PR-4* 유전자는 발현하지 않고 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 *CABPR1*의 과다발현이 PR 유전자 발현에 영향을 주고 있음을 보여주고 있지만, 그 PR 유전자 조절 자체가 너무 근소하여 병 저항성에는 영향을 주지 못함을 알 수 있었다. 또한 *CABPR1* 유전자의 과다발현이 스트레스 관련 유전자인 glutathione S-transferase (*GST*) (Takahashi와 Nagata, 1992), ascorbate peroxidase (*APX*), metallothionein-like (*MLP2*), catalase (*CAT*) (Takahashi 등, 1997), 또는 *defensin* (Li와 Gray 1999) 유전자들의 발현에 영향을 주는지를 확인해 보았다.

Fig. 3-17B에서의 결과와 같이, 형질전환 식물체내에서는 *GST* 유전자가 강하게 발현하고, *APX* 유전자의 발현은 약간 감소하였고, 그리고 *CAT*, *defensin*과 *MLP2*의 발현은 차이가 없음을 확인하였다. 이러한 결과는 식물 세포내 *CABPR1* 유전자의 과다 발현은 스트레스 관련 유전자들의 발현에 영향을 주고 있음을 의미하였다.

4) *CABPR1* 형질전환체내 peroxidase 활성 감소

Ascorbate는 중금속에 대한 해독작용과 산화 스트레스들 (Shigeka 등, 2002)에 대한 방어 작용 과정에서 기능을 한다. 정상 식물체와 형질전환 식물체내에서 peroxidase 활성을 측정된 결과 Table 2에서 보듯, 3개의 형질전환 식물체 내에서의 peroxidase 활성은 모두 정상 식물체에 비해 85% 이상 감소함을 확인하였다.

바. *CALTP1*와 *CALTP2* 유전자 도입 담배 및 애기장대 형질전환체 확립 및 발현 검증

1) PCR을 통한 유전자 도입의 확인

CALTP1 유전자의 gene specific primer인 5'-CGGATCCGGCACGACTTCTTCTCTCAA-3'과 5'-TTAGAGCTCGACTCGACTACGACTCG-3'를 PCR에 사용하였다. PCR 조건은

DNA denaturation을 위해 95°C 5분 이후, 95°C에서 15초, 55°C에서 20초, 72°C에서 1분 간으로 총 35 cycle을 실시하였다. PCR 결과, 554 bp와 363 bp의 증폭 DNA 밴드들을 관찰할 수 있었고, CALTP1 유전자가 담배 내로 성공적으로 도입되었음을 확인하였다 (Fig. 3-18).

Table 3-1. Sequences of gene-specific primers used for RT-PCR in the study.

Name	Accession no.	Primer sequence
PR-1	X12737	5'-CTTGTCTCTACACTTCTC-3'
		5'-GTATGGACTTTTCGCCTCT-3'
PR-2	M60460	5'-GCAACATATTCAGGGATC-3'
		5'-ATTGAAATTGAGTTGATA-3'
PR-Q	M29868	5'-CCAGAGTGACAGATATTA-3'
		5'-GCCCTGGCCGAAGTTCCT-3'
PR-4	AF154635	5'-CACGAGAAACCCTGGAAG-3'
		5'-GTCGAATAGCTTCAATGC-3'
Osmotin	M29279	5'-CGAGGTCCGAAACAACACTG-3'
		5'-GGTCTTTGTGTGCAACAA-3'
Thaumatococin	X03913	5'-GTCAACCAATGCACCTAC-3'
		5'-GGTGGATCATCCTGTGGA-3'
Defensin	X99403	5'-GATCTGTCTGGGGAAATGGC-3'
		5'-GCTTCTCCAATCCCTTAACCC-3'
GST	D10524	5'-GGCGATCAAAGTCCATGGTAG-3'
		5'-GCTTCTCCAATCCCTTAACCC-3'
Catalase1	U93244	5'-GGATCCATACAAGTACCGTCC-3'
		5'-CAAGGACCCTCCAATTCTCCTG-3'
MLP2	AJ299253	5'-GAAGTCGTGGCTGTGGATCTG-3'
		5'-CAGCCCAAATCAGCTTCCTTTC-3'
APX	AF443182	5'-GCATGGCACTCTGCTGGTACC-3'
		5'-GGGGATTGGTAGTCCAAGGTC-3'

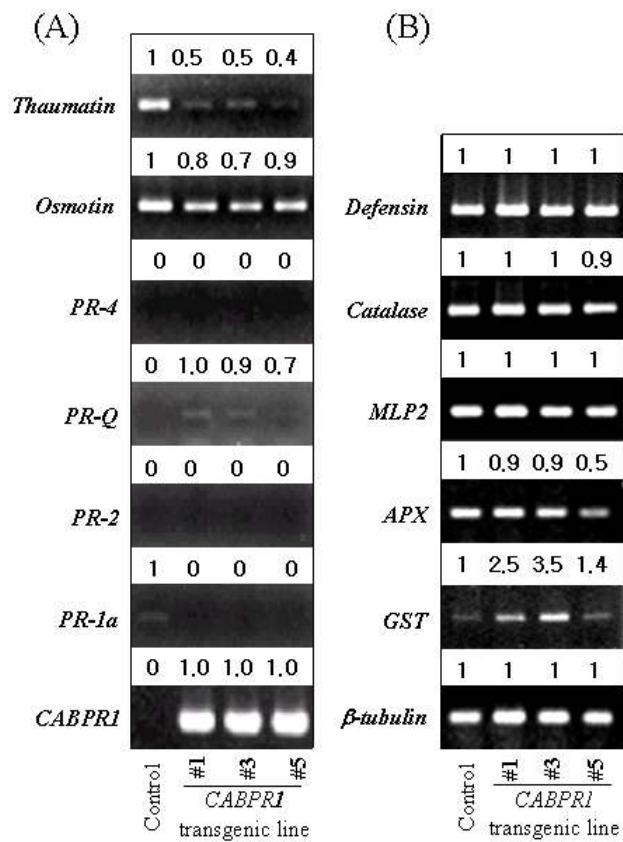


Fig. 3-17. Expression analyses of thirteen genes in the *CABPRI* transgenic tobacco plants by RT-PCR. (A) Expression profiles of pathogenesis-related genes (*PR-1*, *PR-2*, *PR-Q*, *PR-4*, *osmotin* and *thaumatocin*) in transgenic plants; (B) Expression profiles of metal stress genes (*GST*, *CAT*, *MLP2*, *defensin*) and ascorbate peroxidase gene in transgenic plants.

Table 3-2. Inhibition of peroxidase activities in the *CABPRI* transgenic tobacco plants

Source	Total peroxidase		Inhibition (%)
	Activity (nkat/mg protein)		
Control	0.683	0.033	-
<i>CABPRI-1</i>	0.093	0.010	86
<i>CABPRI-3</i>	0.086	0.007	87
<i>CABPRI-5</i>	0.077	0.003	88

2) 형질전환식물 내에서의 유전자 발현의 확인

*CALTP1*과 *CALTP2* 유전자의 형질전환식물체들 내에서 도입 유전자가 발현되고 있는지를 확인하기 위하여 Northern blot 분석을 실시하였다 (Fig. 3-18). 형질전환 식물체들로부터 추출된 10 µg의 total RNA들을 nitrocellulose membrane에 옮긴 후, biotin이 표지 되어 있는 DNA probe를 이용하여 hybridization을 실시하였다. 정상적인 담배 식물체에서는 signal이 확인되지 않았던 반면에 각각의 형질전환 식물체들에서는 모두 signal들을 확인할 수 있었다. 따라서 *CALTP1*와 *CALTP2* 유전자가 형질전환 된 식물체들 내에서 안정적으로 발현되고 있음을 확인할 수 있었다.

사. *CALTP1*와 *CALTP2* 형질전환체의 특성 분석 결과 및 고찰

1) 형질전환체 T₃ 계통의 표현형

*CALTP1*과 *CALTP2* 유전자를 지속적으로 발현시켰을 때 식물 형태와 발육에 명확한 차이를 보이는지를 확인하기 위하여 종자를 kanamycin이 함유된 MS 배지에서 발아시켰다. 발아 10일 후에 유묘를 화분에 옮겨서 온실에서 계속 재배하였고 30일 후에 표현형을 관찰하였다. 형질전환 계통 *CALTP1-5*와 *CALTP2-2*에서 성장율과 생체중이 증가하는 것을 관찰하였다 (Fig. 3-19A). 하지만, *CALTP2-4*와 *CALTP2-5*는 약간의 생체중 증가가 있었지만 성장율에서는 정상과 매우 비슷하였다 (Fig. 3-19B). 형질전환체들의 건물중은 정상체에 비해서 약간 증가하였다. 따라서 식물체 크기를 개화시기까지 측정하였다. 정상체에 비하여 *CALTP1-5*는 평균 1.24배, *CALTP2* 계통은 평균 1.06배 키

가 큰 것을 확인하였다 (Fig. 3-19C).

2) TEM 전자현미경을 이용한 세포벽의 분석

LTP는 큐틴과 왁스 분자체들을 큐틴 합성의 장소로 운반하여 큐티클 부위를 강화시키는 것으로 생각된다. *CALTP1*과 *CALTP2*의 과다발현이 과연 큐티클 층을 강화시키는지를 확인하기 위하여 TEM으로 형질전환 담배 잎 (특히 최상층 표피세포 부위)을 분석하였다. 형질전환체 *CALTP2-2* 계통은 정상체나 *CALTP1-5* 계통에 비하여 유의적으로 두꺼운 세포벽과 큐티클 부위를 보였다. 또한 정상체에 비하여 *CALTP1-5*는 약간 두꺼운 세포벽을 갖고 있었다 (Fig. 3-20). 본 연구결과는 세포벽과 큐티클이 강화되는 것이 *CALTP1*과 *CALTP2*의 작용에 의한 것이라는 사실을 보여주었다.

3) 과다발현 담배에서 염과 삼투 스트레스 저항성 증가

형질전환체들이 염과 삼투 스트레스에 반응하는 정도 확인을 위하여 기내 종자발아 및 생장을 250 mM NaCl과 500 mM mannitol 배지에서 확인하였다. 500 mM mannitol 농도에서 *CALTP1* 두 계통의 종자는 각각 45%, 63%의 발아율을 보였고 *CALTP2* 두 계통의 발아율은 각각 83%, 71%이었는데 정상 종자는 이러한 스트레스 조건하에서 발아율이 약 20% 정도이었다 (Fig. 3-21A, 중간; Fig. 3-21B). 250 mM NaCl이 처리된 염 스트레스의 경우 정상체는 22%가 발아된 반면에 형질전환 계통들은 70%의 종자가 발아하였다. 정상 종자의 발아율이 22%이었지만 발아된 식물체들은 모두 정상적으로 뿌리가 내리지 못하고 생존하지 못하고 죽었다 (Fig. 3-21A, 아래; Fig. 3-21C).

4) Na^+ , K^+ , Ca^{2+} 이온 농도의 변화

토양 용액 속의 고농도의 Na^+ 이온은 식물세포의 영양이온의 활성을 낮추고 따라서 이온 항상성의 불균형을 초래한다. 염도는 식물대사에 영향을 미치는 복잡한 상호작용을 초래하면서 상처에 대한 민감도를 증대한다. 정상체와 *CALTP1-5* 식물체의 이온 항상성 정도에 대한 NaCl의 효과를 검증하기 위하여, 식물 전체 수준의 Na^+ 농도를 측정하였고 (Table 3-3A), 잎 intercellular washing fluid (IWF)의 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} 이온 농도를 측정하였다 (Table 3-3B). Table 3-3A에서 보는 것처럼, 정상적인 성장상태에서는 *CALTP1-5*와 정상식물체의 Na^+ 농도는 거의 비슷한 수준이었으나, 150 mM NaCl을 6일간 처리한 후에는 형질전환체에 비하여 정상체에서 농도의 증가가 급격하였다. Table 3-3B에서 보는 바와 같이, IWF의 K^+ 이온의 농도는 처리 후에는 정상체에서 오히려 감소하였다. K^+ 이온의 감소는 과도한 Na^+ 이온에 의해서 K^+ 이온의 투과성 정도가 크게

영향을 받는다는 것을 의미한다. 이에 비하여 처리 후의 형질전환체에서는 K^+ 농도가 약 1.5배 증가하였다. 이러한 결과는 형질전환체에서는 Na^+ 독성을 감소시키며 K^+ 이온에 대한 Na^+ 의 효과가 낮아졌다는 것을 암시해 준다. 150 mM NaCl 처리 후에, Ca^{2+} 또한 형질전환체가 정상체에 비하여 4.5배 높았다.

5) 형질전환 *Arabidopsis*에서의 염과 삼투스트레스 관련 유전자들의 발현 양상

Arabidopsis 형질전환체를 이용하여 *CALTP1* 과다발현이 염과 삼투 스트레스 관련 유전자들 (*RD29A*, *RD22*, *SOS1*, *SOS2*, *SOS3*, *ABI1*, *ABI2*, *ABA1*, *NCED*)의 발현에 영향을 미치는지를 확인하였다 (Fig. 3-22). *Arabidopsis*에서 *CALTP1* 유전자의 과다발현은 스트레스 관련 유전자들을 유도하지 않았다. 하지만 RT-PCR의 결과는 *RD29A*와 *RD22*가 정상 식물체와 형질전환체에 염 처리 시에 크게 증가하는 것을 보여준다. 이러한 실험 조건에서도 *SOS1* 발현은 변화가 없는 것으로 보였으며, *SOS2*와 *SOS3*는 발현이 감지되지 않았다. *ABA1*, *ABI1*, *ABI2*와 *NCED*는 삼투 스트레스에 노출된 형질전환체에서 약간 증가되는 것이 확인되었다. 본 연구결과는 *CALTP1*의 과다발현은 처리 후의 형질전환 계통에서 스트레스 관련 유전자들을 선별적으로 유도하는 것을 확인하였다.

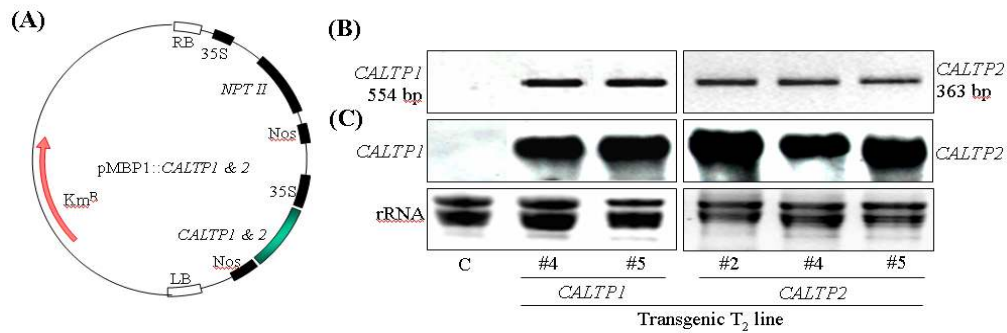


Fig. 3-18. Vector construction and generation of the *CALTP1* and *CALTP2* transgenic tobacco plants. (A) Diagram of the constructed plant expression vector pMBP1-*CALTP1* and pMBP1-*CALTP2*. RB, right border; LB, left border; *NPTII*, neomycin phosphotransferase; 35S, *Cauliflower mosaic virus* 35S promoter; *NOS*, nopaline synthase terminator. (B) Expected 554 and 363 bp bands were amplified from the genomes of five different transgenic plants (C) Northern blot analysis of different transgenic plants for detection of *CALTP1* and *CALTP2* transcripts. C, control lines #4, #5 represents two lines of *CALTP1* and #2, #4, #5 represents three individual transgenic lines of *CALTP2*.

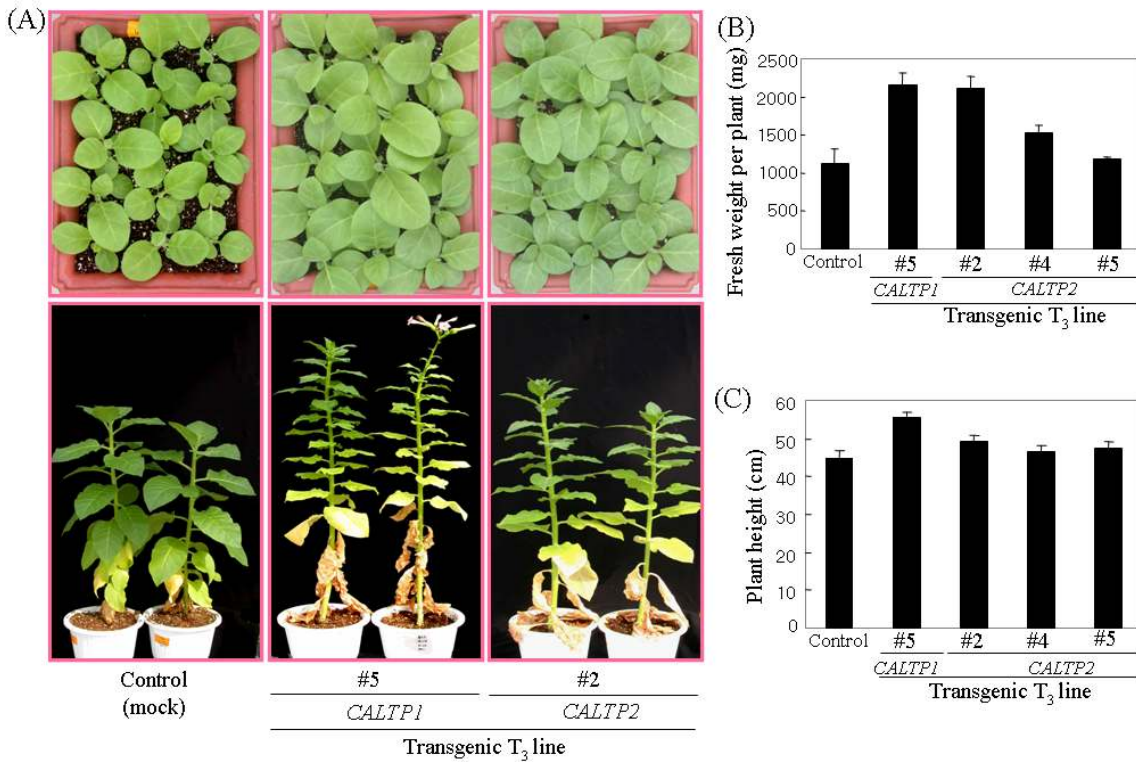


Fig. 3–19. Phenotype of the *CALTP1* and *CALTP2* transgenic tobacco plants. (A) (Upper panel) Increased growth rate in the early stage of development. (Lower panel) Plant height at the flowering stage. (B) Fresh weight of plant in the early stage. Data are expressed as the means \pm standard errors from three independent experiments. (C) Plant height at the flowering stage. Data are expressed as the means \pm standard errors of 10 independent plants.

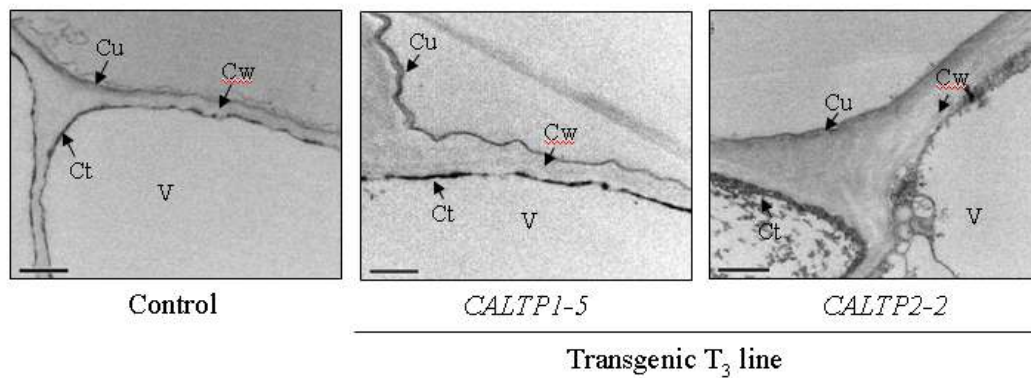


Fig. 3-20. Transmission electron microscopy of the leaf epidermis of transgenic tobacco. Thirty-day-old leaves of control and transgenic plants were cross-sectioned for imaging of epidermis cell walls. Control plants showing thin walls (left). Transgenic *CALTP1-5* showing thicker wall (middle) and *CALTP1-2* showed markedly thicker cell wall (right). cu, cuticle; cw, cell wall; ct, cytoplasm; v, vacuole. Bar, 1 μ m.

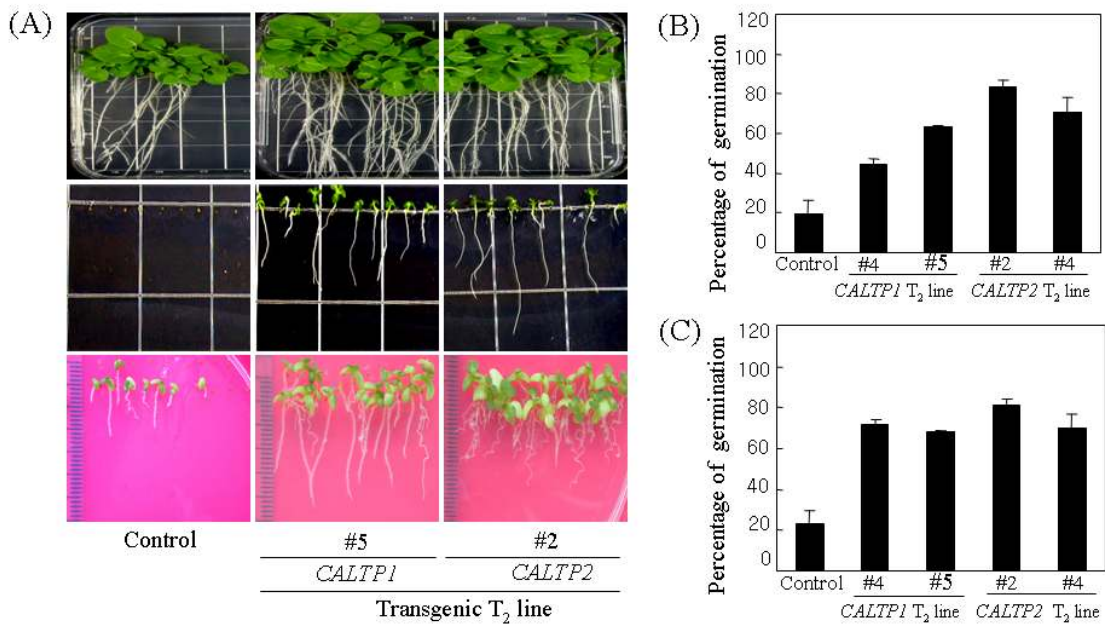


Fig. 3–21. Enhanced tolerance of the *CALTP1* and *CALTP2* transgenic tobacco plants to salt and osmotic stress. (A) Seed germination of control (wild type) and transgenic tobacco plants on MS0 (upper panel), on 500 mM mannitol (middle panel) and on 250 mM NaCl (lower panel). (B) Percentage of seed germination on 500 mM mannitol. (C) Percentage of seed germination on 250 mM NaCl. Data are expressed as the means \pm standard errors from three independent experiments.

Table 3–3. Determination of Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ in wild type and *CALTP1*–transformed *Arabidopsis* plants. (A) Determination of Na⁺ ion in whole leaves. (B) Determination of Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ in intracellular washing fluids

(A)

Ion name	Col-0 0 mM NaCl	Col-0 150 mM NaCl	Fold change (+/-)	<i>CALTP1-5</i> 0 mM NaCl	<i>CALTP1-5</i> 150 mM NaCl	Fold change (+/-)
Na ⁺ (μM/g FW)	1.83 ± 0.016	5.99 ± 0.057	+3.275	1.85 ± 0.00	7.13 ± 0.054	+3.85

(B)

Na ⁺ (μM/g FW)	0.798 ± 0.17	1.13 ± 0.016	+1.422	1.49 ± 0.041	1.72 ± 0.031	+1.159
K ⁺ (μM/g FW)	0.57 ± 0.002	0.35 ± 0.001	-0.599	0.58 ± 0.00	0.83 ± 0.00	+1.429
Ca ²⁺ (μM/g FW)	0.392 ± 0.21	0.49 ± 0.018	+1.254	0.15 ± 0.014	0.653 ± 0.02	+4.401

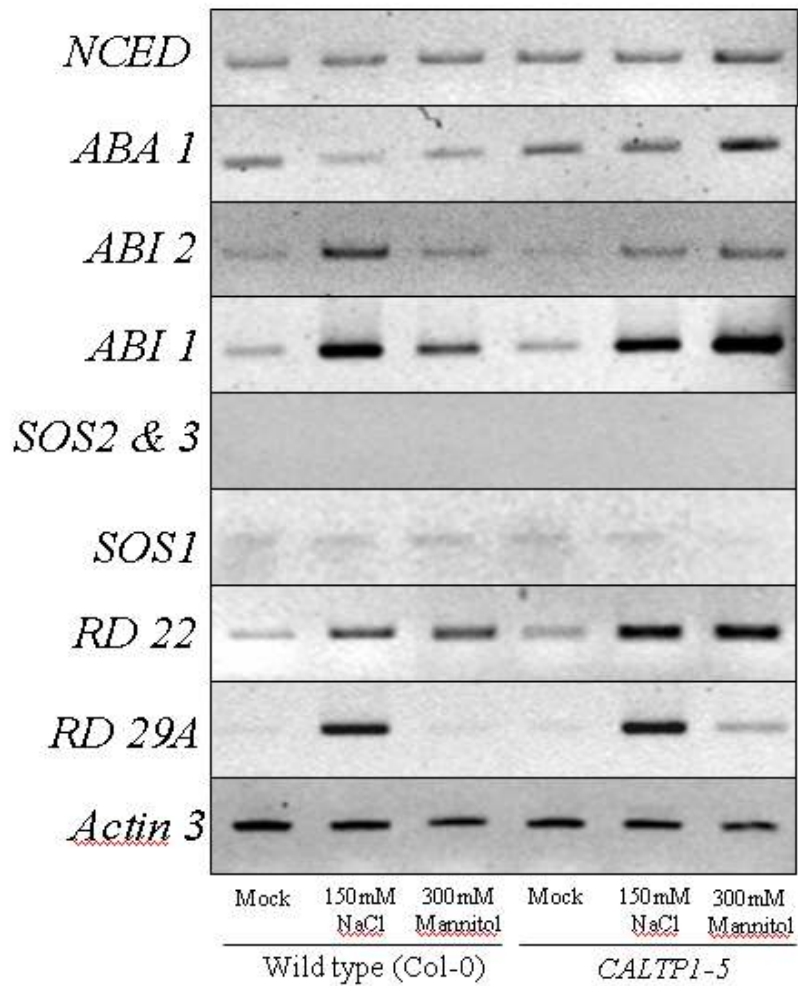


Fig. 3-22. Expression analyses of nine stress-related genes in wild type and *CALTP1* transgenic *Arabidopsis* plants by RT-PCR.

6) 염과 삼투스트레스 처리 *Arabidopsis*의 2-DE 분석

150 mM NaCl과 300 mM mannitol 상태에서 정상 식물 유묘는 형질전환 식물체에 비해서 새로운 잎 형성의 저해와 생장율의 감소 등과 같은 명확한 스트레스 증상을 나타낸다. 전체 단백질을 추출하여 pH 3-10의 IPG strip을 사용하여 2-dimensional electrophoresis (2-DE)를 수행하였다. SDS-PAGE gel에서 700개 이상의 단백질 spot들이 관찰되었다 (Fig. 3-23). 정상체와 형질전환체 간의 차이는 그리 많지 않았다. 13개의 단백질 spot들이 유의적이면서 재현성 높게 대량 발현되는 변화를 보였다 (Fig. 3-23 A-F). 이들 13개 spot 중에서 spot 1과 2는 정상체와 형질전환체 모두에서 염과 삼투스트레스 조건하에서 대량 발현되었으나, 정상 조건 하에서는 전혀 축적되지 않았다. Spot 3과 9는 염 스트레스에서 정상체에서 약간 축적이 되지만 삼투 스트레스에서는 축적되지 않았다.

하지만 형질전환체에서 이들 단백질들의 축적은 정상체와는 오히려 반대로 나타났다. Spot 4는 염에서는 down-regulation되었으나 삼투스트레스에서는 영향이 없었다. 형질전환체에서 spot 4는 모든 조건에서 동일하게 높게 발현되었다. 정상체에서 spot 5와 6은 염 스트레스에서 down-regulation되었으나 삼투 스트레스에서는 그렇지 않았다. 반면에 이들 spot들은 형질전환체에서는 모든 처리 조건에서 높게 축적됨을 확인할 수 있었다. Spot 7과 8은 두 가지 스트레스에 민감하였으며 축적되는 정도는 정상체와 형질전환체에서 모두 동일하였다. Spot 10은 염 조건에서 정상체에서 과다발현 되었으나 삼투 스트레스에서는 오히려 감소하였다. 하지만 형질전환체에서는 이 현상이 오히려 반대로 나타났다. Spot 11은 정상체에서 염에서는 많이 발현되었지만 삼투스트레스에는 영향을 받지 않았다. Spot 12와 13은 형질전환체에서 정상 조건에서는 감지되지 않았다 (Fig. 3-23 A-F).

이들 13개의 염과 삼투 스트레스 반응 단백질 spot들은 LC-MS./MS로 분석하였다. Mass 데이터는 Mascot를 사용하여 분석하였다. Spot 1과 2는 malate dehydrogenase이었고, spot 7과 8은 rubisco small subunit 3B이었다. Spot 4와 9는 일치하는 단백질이 없었으며, spot 12와 13은 미지의 단백질이었다. Spot 3은 RNA binding protein-like, spot 5는 protein kinase-like protein, spot 6은 putative kinesin heavy chain, spot 10은 nucleoside diphosphate kinase 3, 그리고 spot 11은 putative protein phosphatase-2C로 확인되었다 (Table 3-4).

7) 형질전환체의 박테리아와 oomycete에 대한 저항성의 증가

*CALTP1*과 *CALTP2* 유전자의 지속적인 발현이 병 저항성을 유도하는지를 테스트하기 위하여 *CALTP1*과 *CALTP2* 형질전환 계통들을 담배 black shank 병을 유발하는 *P. nicotianae*를 감염시키고 3일과 5일 후에 각각 병 발생 유무를 확인하였다. 병증은 형질전환체와 정상 담배 모두에서 감염 3일 이내에 관찰할 수 있었다. 감염 3일 후에, 병증의 발육은 정상체에 비하여 형질전환체에서 유의적으로 지연되었다. 감염 5일 후에는 형질전환체와 정상체 모두에서 현저한 괴저부위가 확인되었는데 이는 병 감염 실험이 제대로 수행되었음을 보여준다 (Fig. 3-24A, 위). 병증의 발육은 형질전환체에서 현저하게 지연되었다 (Fig. 3-24A, 아래). 초기에는 정상체에 비하여 *CALTP1-5*는 77%의 감소된 괴저부위를 나타내었고, *CALTP2*는 평균 58% 감소율을 나타내었다. 감염 5일 후의 정상체는 괴저부위가 급격하게 증가하여 잎 lamina의 끝 부분까지 도달하였다. 하지만 *CALTP1-5*는 56%, *CALTP2* 계통은 49% 감소된 병 발육을 보였다. 이들 두 가지 유전자에 대해 비교해 보았을 때 *CALTP1*은 *CALTP2*에 비하여 더 저항성을 보였다. 이러한 결과는 T₂ 세대에서도 관찰되었다.

*R. solanacearum*과 *P. syringae* pv. *tabaci*를 담배 잎에 접종하였을 때, 전형적인 마름 현상이 관찰되었다. 감염 5일 후에 박테리아를 회복시켜 보았더니 형질전환체는 정상체에 비하여 회복된 박테리아의 수가 유의적으로 적었다. Fig. 3-24 (B와 C)에서 보여주는 바와 같이, 형질전환 계통의 박테리아 생장은 정상체에 비하여 유의적으로 낮았다. 정상체와 *CALTP2* 계통에 비하여 *CALTP1-5*는 *P. syringae* pv. *tabaci*에 대하여 월등한 저항성을 보였다. 하지만 *CALTP2-2*와 *CALTP2-5*는 *CALTP1-5*와 *CALTP2-4*에 비하여 *R. solanacearum*에 대하여 더 저항성인 것으로 확인되었다. 본 연구결과는 *CALTP1*과 *CALTP2* 과다발현은 식물 방어 반응을 시작하게 하는 것을 말해준다.

Fig. 3-23. Representative 2-DE maps of total proteins in MS0 medium (A & B), in 150 mM NaCl medium (C & D) and 300 mM mannitol (E & F). A, C, E represents control and B, D, F represents *CALTPI*-transformed *Arabidopsis* plants. Ten-day-old seedlings were cultured to 150 mM NaCl and 300 mM mannitol containing medium for 5 days. Five days after treatment seedlings were moved to MS0 medium for recovery. Total protein was isolated from the stress recovered plants and 150 μ g proteins were loaded onto pH 3-10 IPG strips (24 cm, linear). SDS-PAGE was performed with 12% gels. The spots were visualized by silver staining. Differentially accumulated 13 protein spots are indicated by circle.

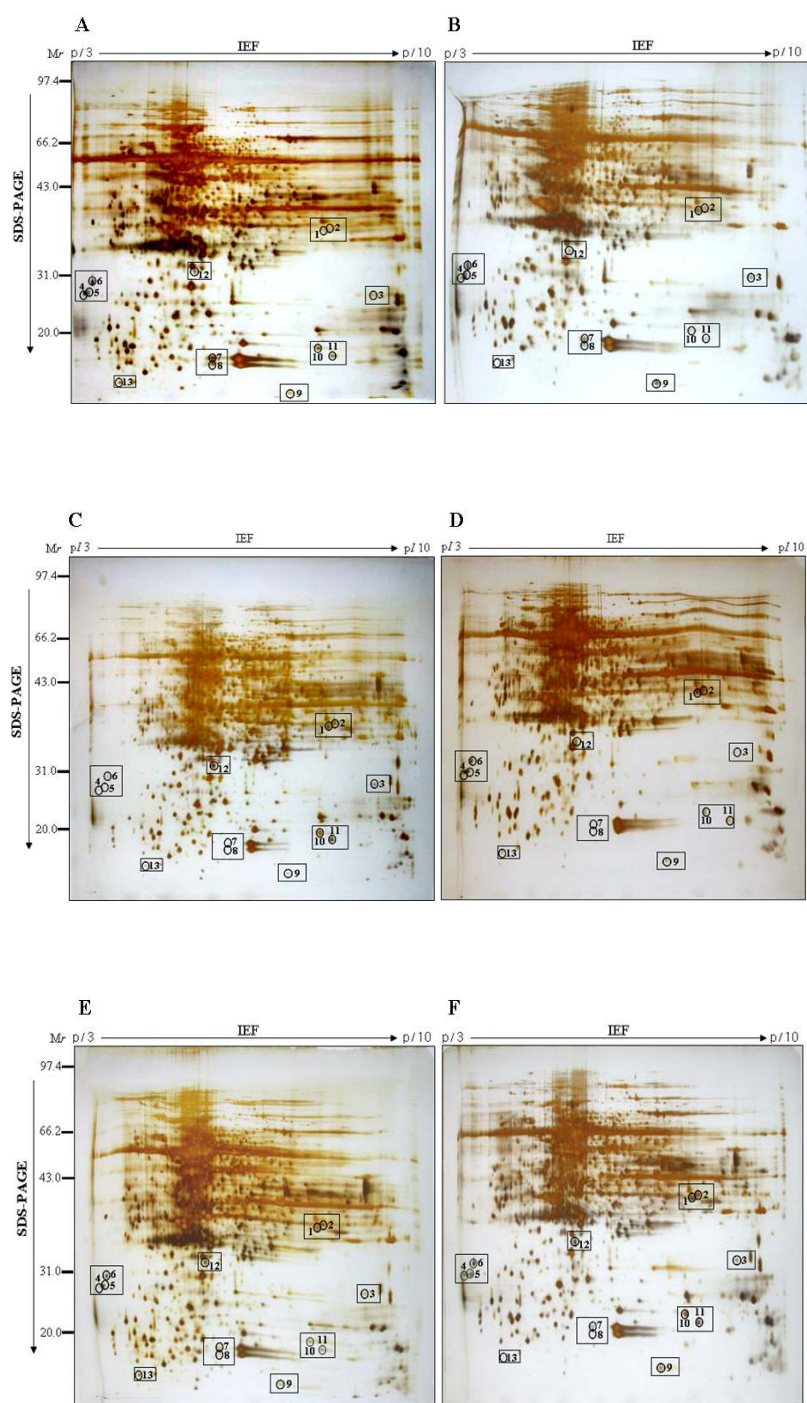


Table 3–4. Salt and osmotic stress regulated protein identification by LC–MS/MS

Spot no	Protein identification	Plant line	Responses in stresses			Accession No	MW (kDa)
			normal	salt	osmotic		
1	Malate dehydrogenase	ColO	-	↑	↑	9758994	37.37
		<i>CALTP1-5</i>	↑	↑	↑		
2	Malate dehydrogenase	ColO	-	↑	↑	14334992	37.46
		<i>CALTP1-5</i>	↑	↑	↑		
3	RNA binding protein-like	ColO	-	↑	-	9293981	32.13
		<i>CALTP1-5</i>	↑	-	↑		
4	At2g2771	ColO	↑	↓	-	30102816	11.43
		<i>CALTP1-5</i>	↑	↑	↑		
5	Protein kinase like	ColO	↑	↓	↓	9758801	87.87
		<i>CALTP1-5</i>	↑	↑	↑		
6	Putative kinesin heavy chain	ColO	↑	↓	↓	4567265	66.45
		<i>CALTP1-5</i>	↑	↑	↑		
7	Rubisco small subunit 3B	ColO	↑	↓	↓	68060	20.59
		<i>CALTP1-5</i>	↑	↓	↓		
8	Rubisco small subunit 3B	ColO	↑	↓	↓	68060	20.59
		<i>CALTP1-5</i>	↑	↓	↓		
9	F7F22.15	ColO	↑	↑	-	6691191	21.44
		<i>CALTP1-5</i>	↑	-	↑		
10	Nucleotide diphosphate kinase	ColO	↑	↑	↓	17065632	25.83
		<i>CALTP1-5</i>	↑	↓	↑		
11	Putative protein phosphatase 2C	ColO	↑	↑	↑	6728987	54.38
		<i>CALTP1-5</i>	-	↑	↑		
12	Unknown protein	ColO	↑	↑	↑	13194796	20.05
		<i>CALTP1-5</i>	↑	↑	↑		
13	Unknown protein	ColO	↑	↑	↑	1232094	45.98
		<i>CALTP1-5</i>	-	↑	↑		

- = no expression; ↑ = up expression, and ↓ = down expression

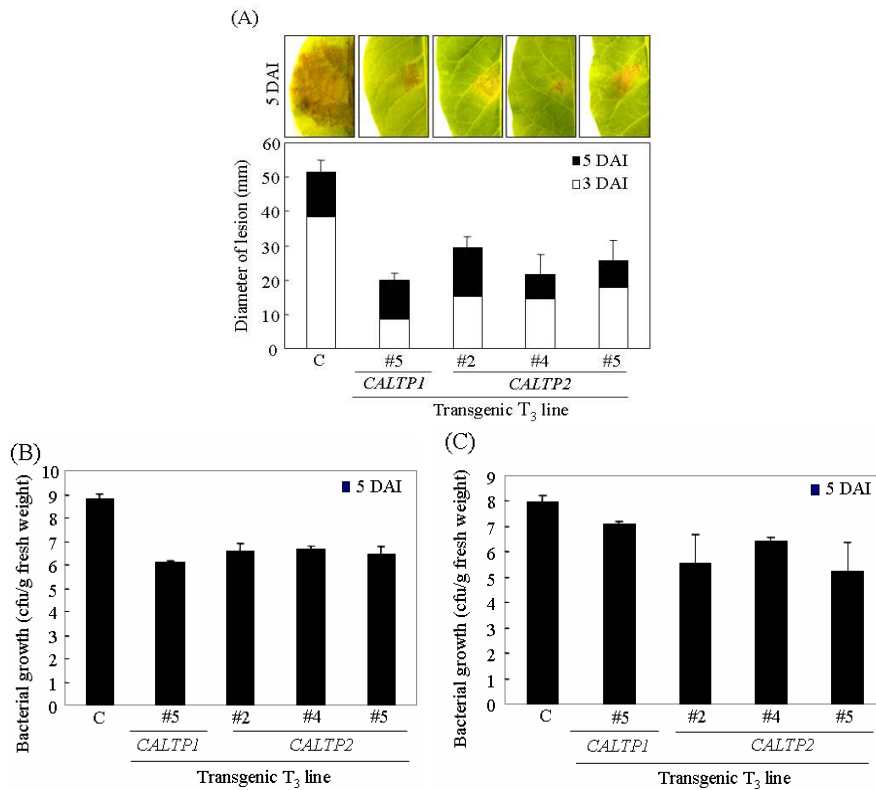


Fig. 3–24. Disease evaluation of the *CALTP1* and *CALTP2*–transgenic tobacco plants. (A) Inhibition of disease development (mm) on the transgenic plants infected by *Phytophthora nicotianae* KACC40906. Photos were taken 5 days after infection (upper panel) and data were recorded 3 (white bar) and 5 (black bar) days after infection of tobacco leaves (lower panel), and represented as the mean \pm standard errors of three replications, each replication comprising three sub–replications. (B) Inhibition of *Ralstonia solanacearum* growth in transgenic tobacco leaves. Data were taken 5 days after infiltration of the bacterial pathogen, and represented as the mean \pm standard errors of three replications, each replication comprising three sub–replications. (C) Inhibition of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* growth in transgenic tobacco leaves. Data were taken 5 days after infiltration of the bacterial pathogen, and represented as the mean \pm standard errors of three replications, each replication comprising three sub–replications.

8) 형질전환체에서의 PR 유전자들의 발현 양상

*CALTP1*과 *CALTP2* 과다발현 계통들의 저항성 증가의 분자적 근거를 제시하기 위하여 *PR-1a* (Payne 등, 1988), *PR-3* (Payne 등, 1990), *PR-4* (Wang 등, 2000) 그리고 *PR-5*, *thaumatin* (Cornelissen 등, 1986) 등의 PR 유전자들의 발현 수준을 조사하였다 (Fig. 3-25). Northern 분석의 결과에서 *PR-1a*, *PR-3*, *PR-4*, *Thaumatin*은 *CALTP1* 과다발현 형질전환체에서 up-regulation되었다. 하지만 *CALTP2* 계통에서는 *PR-4*는 up-regulation되었지만, *PR-1a*, *PR-3*, *thaumatin*은 그렇지 않았다. 기대하였던 것처럼, 정상식물체에서는 이들 유전자들이 전혀 발현되지 않았다. 일반적으로 *PR-1*과 *PR-5* 단백질의 활성화는 SA 축적에 의존된다고 알려져 있다. 본 연구결과는 *CALTP1*의 도입은 SA에 의해서 조절받는 담배 저항성 관련 유전자들의 전사를 조절하는 것을 설명해 주었다.

9) 형질전환체에서의 SA와 H₂O₂의 증가

병원체의 침입에 대한 과민반응으로 내성적인 Salicylic acid (SA)의 축적이 증가된다. SA의 축적이 증가되면 식물 방어 관련 유전자들의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다 (Verberne 등, 2000). 본 연구에서는 형질전환체 내부의 SA 함량을 측정하였다. *CALTP1* 형질전환체는 정상체나 *CALTP2* 형질전환체에 비하여 4배 높은 함량을 보였다 (Fig. 3-26A). 그래서 *CALTP1* 유전자가 PR 유전자들의 전사를 활성화시키는 능력은 *CALTP1* 형질전환체 내의 SA 축적에 따라서 발생하는 것이라는 결론을 내릴 수 있었다. H₂O₂는 초민감성 세포사멸의 국부적인 신호로서 그리고 방어 유전자 유도를 위한 신호로서 역할을 하는 분자체로서 식물 방어 신호전달계의 중심역할을 한다. 과산화수소가 증가되면 병원균에 대해 직접적인 독성으로 작용한다. 형질전환체는 정상식물체에 비하여 과산화수소의 농도가 두 배가량 높았다 (Fig. 3-26B). 기대하였던 것처럼, *CALTP1* 형질전환 식물체는 SA의 높은 농도를 보여 주었기 때문에 과산화수소의 농도도 높았다. 예상하지 않게도 *CALTP2* 계통들은 SA의 영향을 받지 않는에도 불구하고 과산화수소 농도가 높았다.

10) VIGS 식물체 이용한 발현 검증 실험

Agroinoculation의 잎 infiltration 방법은 *N. benthamiana*를 VIGS로 silencing시키는 데 효과적으로 사용된다. 본 실험에서 고추의 내생적 *CALTP1*과 *CALTP2* 유전자를 silence시키기 위하여 이 방법을 이용하였다. 6~8일 후에 gene-silencing 형질이 관찰되

였으며 효율은 90~95%에 달했다. Silence된 식물체는 어떠한 비정상적인 표현형을 보이지는 않았으나 mosaic 증상이 나타남을 확인하여 viral 벡터가 정상적으로 도입되었음을 확인할 수 있었다. 따라서 *CALTP1*과 *CALTP2* 유전자의 silencing이 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 81-23 접종 후에 *CALTP3*나 *CABPR1*의 발현에 영향을 미치는지를 확인하였다. RT-PCR 결과 *CALTP1*과 *CALTP2*가 부분적으로 suppression 되었음을 보여주었다. *CALTP1* silence된 식물체에서는 *CALTP2*와 *CALTP3* 발현에는 영향이 없었고 *CALTP2* silence된 식물체는 그 반대였다. 흥미로운 사실은 이 두 가지 silence된 식물체에서 *CABPR1*이 up-regulation되지 않았다 (Fig. 3-27B). 따라서 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 81-23을 mock control 식물체와 silence된 식물체에 접종하였다. 두 가지 silence된 식물체는 mock control 식물체에 비하여 저항성을 보이지 않았으며, 박테리아 생장율이 오히려 높았다. 본 실험의 결과로 LTP가 방어기작에 중요하게 작용함을 확인할 수 있었다.

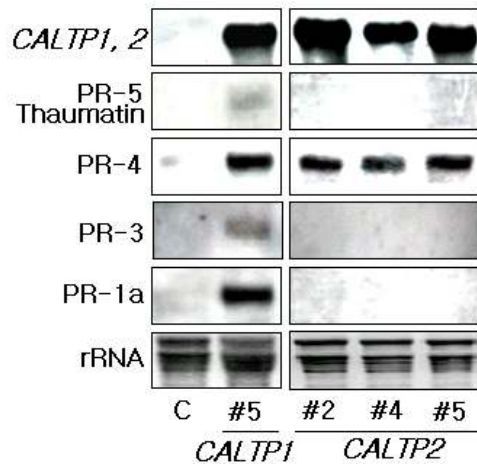


Fig. 3-25. Expression analyses of pathogenesis-related (*PR-1*, *PR-3*, *PR-4*, *PR-5*) genes in the *CALTP1* and *CALTP2* transgenic tobacco plants by northern blot analysis.

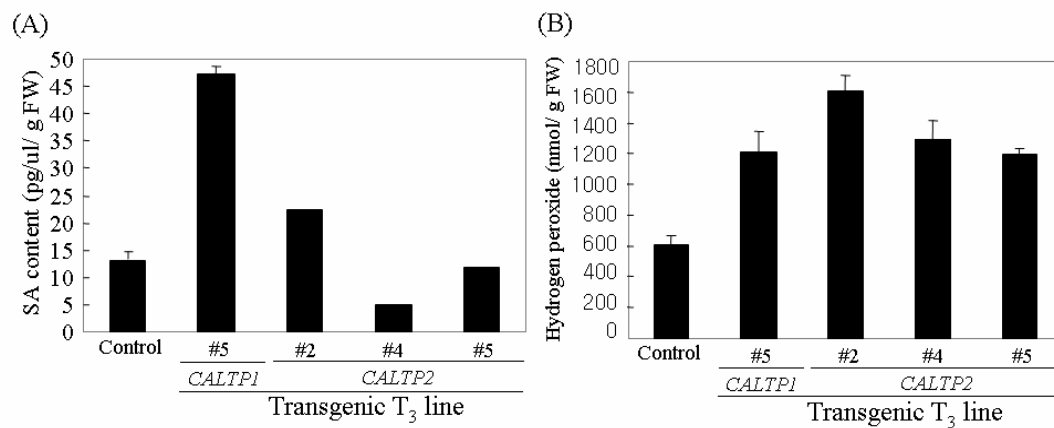


Fig. 3–26. Determination of endogenous salicylic acid (SA) and hydrogen peroxide (H₂O₂). (A) level of salicylic acid in the leaves of control, *CALTP1–5* and *CALTP2* lines #2, #4, and #5, (B) endogenous level of H₂O₂ in the leaves of control *CALTP1–5* and *CALTP2* lines #2, #4, and #5. Each experiment was performed at least three times and data represented as the mean ± standard errors of three independent experiments.

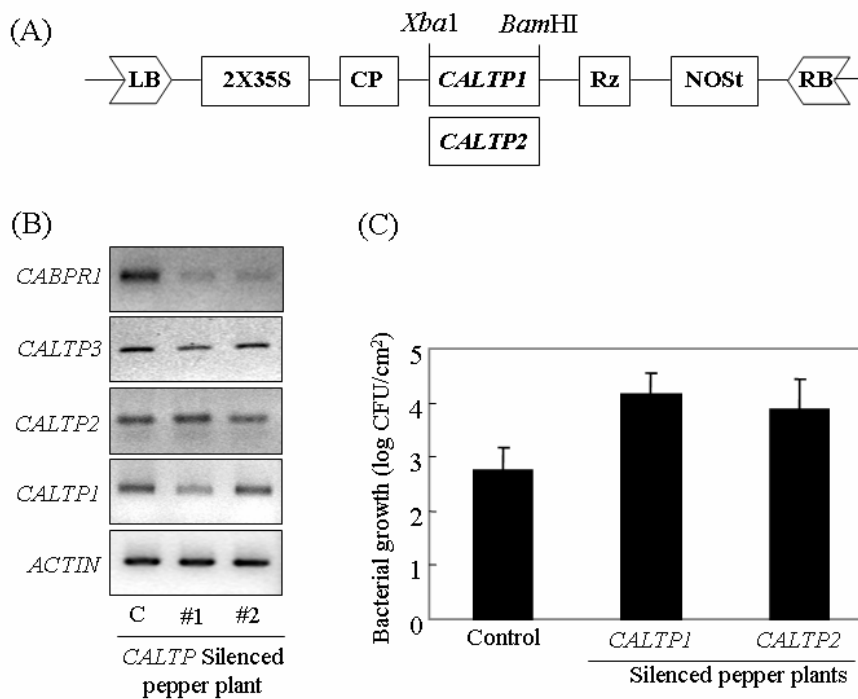


Fig. 3–27. Generation of *CALTP1*– and *CALTP2*–silenced pepper plants. (A) Diagram of the virus induced gene silence vector (pTRV2::*CALTP1*, pTRV2::*CALTP2*). RB, right border; LB, left border; 35S, *Cauliflower mosaic virus* 35S promoter CP, Coat protein Rz, self–cleaving ribozyme; *NOST*, nopaline synthase terminator. (B) Expression analysis of *CALTP1*, *CALTP2*, *CALTP3*, *CABPR1* genes in silenced pepper plants in the local leaf after *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 81–23 inoculation and (C) Determination of growth of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 81–23 in silenced pepper plants. Data were taken 3 days after infiltration, and represented as the mean \pm standard errors of three replications, each replication comprising three sub–replications.

11) long distance systemic signaling에 관여

CALTP1 형질전환체는 내생적인 SA의 축적을 증가시키고 이들 식물체들은 *PR-1a*, *PR-3*, *PR-4*, *PR-5* (*thaumatin*)의 발현을 up-regulation하는 것을 관찰하였다. *CALTP1*이 원거리 systemic signaling에 관여하는지를 확인하기 위하여 접붙이기 실험을 수행하였다. Fig. 3-28A에서 보여주는 것처럼 실험을 설계하였다. 대목으로는 *CALTP1-4*, *CALTP1-5* 그리고 정상식물체를 각각 사용하였다. Negative control로서는 정상개체에 정상개체를 접붙였으며, positive control로서 *CALTP1-5*에 *CALTP1-5*를 접붙인 것을 이용하였다. 접붙이고 난 15일 후에 접목된 담배 잎으로부터 total RNA를 추출하여서 *PR-1a*와 *PR-4*를 이용하여 Northern 분석을 실시하였다. *PR-1a*는 정상 개체가 접목된 잎에서는 감지되지 않았으나, *PR-4*는 약한 발현을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3-28B). 이 결과는 대목 식물체에서 생성된 신호가 접붙인 자리를 통과하여 접목 식물체까지 이전된다는 것을 보여준다. 따라서 모든 가능한 조합 (WT/WT, *CALTP1-5*/*CALTP1-5*, *CALTP2-2*/*CALTP2-2*, WT/*CALTP1-4*, WT/*CALTP1-5*, WT/*CALTP2-2*, WT/*CALTP2-4*)으로 모두 접을 붙였다. 그런 다음 *Phytophthora nicotianae*와 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*의 oomycet plug를 접목의 앞에 접종하였고 괴저부위와 박테리아 생장을 관찰하였다. 기대하였던 것처럼, negative control에 비하여 positive control (*CALTP1*/*CALTP1*, *CALTP2*/*CALTP2*)에서 괴저부위와 박테리아 생장이 유의적으로 감소함을 관찰하였다. 형질전환체 대목 위에 접을 붙인 정상 개체들에서는 괴저부위와 박테리아 생장이 약간 감소하였음을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3-28C, D). 이러한 발견은 LTP가 식물-병원균 상호작용 동안에 원거리 systemic signaling에 관여한다는 것을 설명해 준다.

12) 형질전환 *Arabidopsis*에 *P. syringae* pv. *tomato*를 감염 후 2-DE 분석

CALTP1-5 형질전환 *Arabidopsis*를 3주 키운 후에 박테리아 현탁액을 infiltrating시키는 방법으로 접종시켰다. Mock 처리로는 10 mM MgCl₂을 사용하였다. 처리 1일 후에 전체 단백질을 systemic 잎에서 추출하였으며, 100 µg의 단백질을 pH3-10의 IPG strip을 이용하여 2-DE 실시하였다. Fig. 3-29에는 7개의 차별 발현되는 spot들을 확대하여 보여준다. 이들 7개의 단백질 spot들은 정상개체와 형질전환체 모두에서 병 접종 후에 많이 축적되는 것들이다. 이 중에서 spot 1, 2, 3, 4는 병 처리를 하지 않았을 때 형질전환체에서는 축적이 되지만 정상 식물체에서는 나타나지 않은 것이다. 이들 7개의 단백질 spot은 LC-MS/MS로 검증하였고, 그 결과는 Table 3-5에 보여준다.

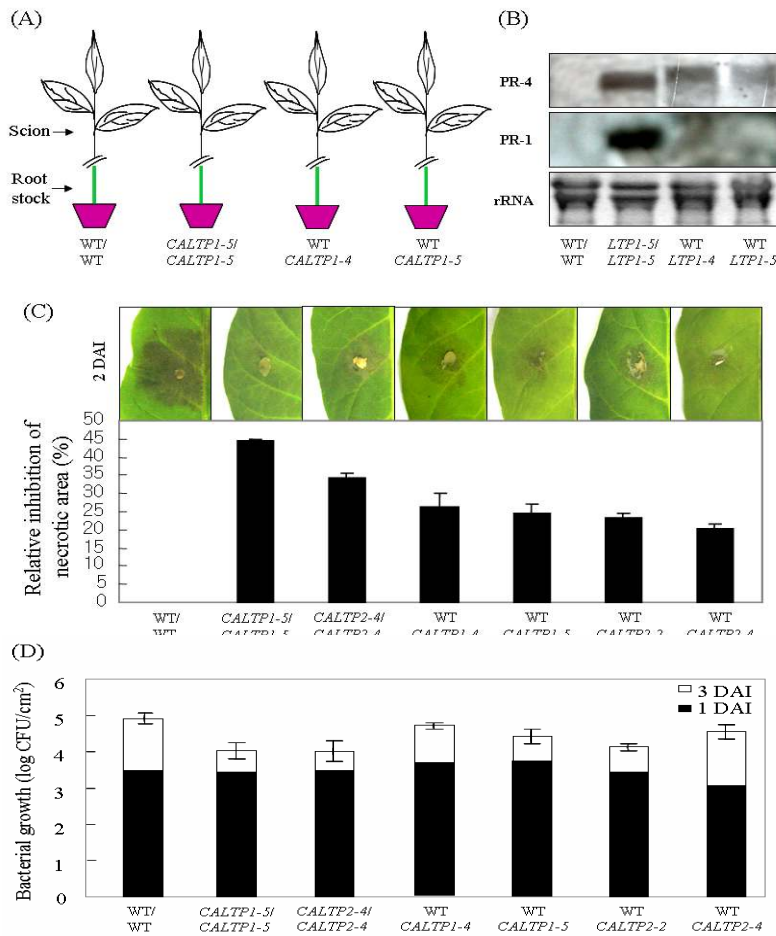


Fig. 3–28. PR gene expression in grafted tobacco plants. (A) Diagrammatic Fig. of graft. (B) Expression of PR genes by northern blot analysis. (C) Relative inhibition of disease development on the scion leaves infected by *Phytophthora nicotianae* KACC40906. Photos and data were taken 2 days after infection and represented as the mean \pm standard errors of three replications. (D) Inhibition of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* growth in scion leaves. Data were taken 1 (black bar) and 3 (white bar) days after infiltration of the bacterial pathogen, and represented as the mean \pm standard errors of three replications, each replication comprising three sub-replications.

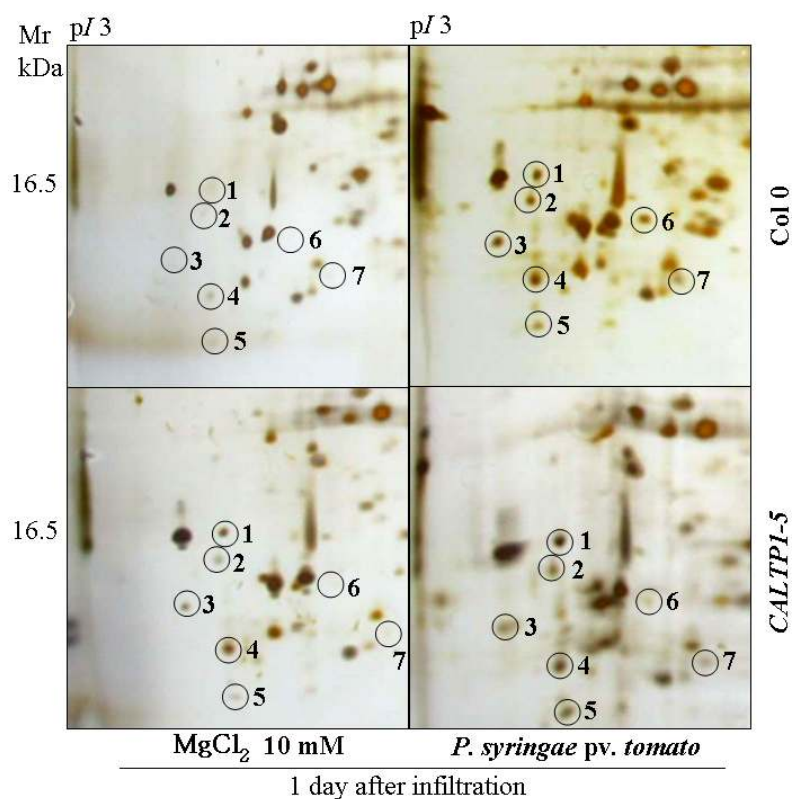


Fig. 3–29. Magnified view of representative 2–DE maps of total proteins. Total protein from systemic leaves were extracted and separated by 2–DE. In IEF, 100 µg proteins were loaded onto pH 3–10 IPG strips (24 cm, linear). SDS–PAGE was performed with 12% gels. The spots were visualized by silver staining. Differentially upregulated 7 protein spots are indicated by circle.

Table 3-5. Pathogen induced protein identification by LC-MS/MS

Spot no.	Identified protein	Accession number	%AA coverage	Score (spectrum mill)	Species	MW (Da)	PI
1	60S acidic ribosomal protein P3	15236029	15	13.9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	11848.8	4.42
2	Lipid- associated family protein	15236014	11	25.19	"	20135.9	4.97
3	DNA-damage repair protein DRT112precursor	15217918	14	15.26	"	16984.4	5.06
4	Not identified	-	-	-	-	-	-
5	F-box family protein	10178235	1	15.18	"	57503.8	5.95
6	Ribulose1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large chain	7525041	11	57.7	"	52955.3	5.88
7	Thioredoxin H-type 3	15239136	11	16.03	"	13109.4	5.06

아. *CABPRI*과 *CAPOAI* 유전자 도입 토마토 형질전환체 확립 및 발현 검증

*CABPRI*과 *CAPOAI*을 발현하는 토마토 형질전환체를 만들기 위하여 이들 유전자들의 cDNA 전체 염기서열을 *CaMV35S* promoter와 *nos* terminator 사이에 넣어 벡터를 제작하였다 (Fig. 3-30A). *CABPRI*과 *CAPOAI*을 독립적으로 도입한 총 240개의 배양체를 200 mg/l kanamycin을 함유하는 선발배지에 8주간 키웠고 76 개의 shoot이 재분화되었다. 배양체로부터 대부분 단일 shoot이 나왔으나 어떤 경우에는 두 개 혹은 세 개의 shoot이 나오는 경우도 있었다.

PCR과 RT-PCR을 이용하여 이들 유전자들이 토마토 genomic DNA에 성공적으로 도입되었고 지속적으로 발현되는 것을 확인하였다 (Fig. 3-30B, C). *CABPRI* 4 계통과 *CAPOAI* 3 계통을 최종적으로 선발하였고 기내에서 증식시켰다 (Fig. 3-31). 기내 배양된 microshoot들은 rooting 배지에서 키워 뿌리를 발육시켰으며, 뿌리 발육이 왕성한 식물체들을 화분에 옮겨서 병저항성 검증을 실시하였다.

자. *CABPRI*과 *CAPOAI* 유전자 도입 토마토 형질전환체의 특성 분석 결과 및 고찰

*CABPRI*과 *CAPOAI*을 도입하였을 때, *P. capsici*에 의해서 야기되는 토마토 buckeye 병에 저항성을 갖게 되는지를 확인하기 위하여, 6주된 토마토 (정상체와 형질전환체)에 agar plug 방법을 이용하여 접종하였다. 정상 식물체와 형질전환 토마토 간의 병증 발육의 유의한 차이는 접종 2일 후부터 관찰되었다 (Fig. 3-32A). 접종 2일 후에

정상식물체의 잎에는 심각한 백화 증상을 갖는 괴저부위가 현저한 반면에 모든 형질 전환체는 병증 발육이 크게 감소되었다. 정상 식물체와 비교하였을 때 *CABPRI*은 평균 50%, *CAPOA1*은 43%의 괴저부위 감소를 나타내었고 감염부위 주변에 미약한 황화증상이 관찰되었다 (Fig. 3-32B).

*CABPRI*과 *CAPOA1* 형질전환체의 저항성 증가는 bacterial speck 병을 감염시킨 6주된 식물체에서도 관찰되었다. *P. syringae* pv. *tomato* DC3000으로 감염시킨 정상 토마토 잎에서는 전형적인 bacterial speck 증상이 관찰되었다. 접종 5일 후에 박테리아 생장률을 측정하였는데, *CABPRI* 2 계통 (#1, #5)은 약간 감소하였으나, *CAPOA1-1*과 *CAPOA1-6*은 정상 식물체와 비교하여 크게 감소하였다 (Fig. 3-32C). 하지만 이러한 저항성 증가는 *CABPRI*과 *CAPOA1* 발현양과 상관관계는 없었다. 본 연구결과는 담배에 *PR1a*, *PR1b*, *APX1* 형질전환체에서 얻은 다른 논문의 결과와 일치한다 (Alexander 등, 1993; Sarowar 등, 2005a; Sarowar 등, 2005b; Kazan 등, 1998; Way 등, 2000). 이러한 결과들은 *CABPRI*과 *CAPOA1*을 담배나 토마토에 과다발현 시켰을 때 oomycete 병원균인 *P. nicotianae*와 *P. capsici*에 대한 저항성이 증대된다는 것을 의미한다. 토마토에서 이들 유전자를 과다발현 시키는 것은 식물세포의 homeostasis를 혼란시킴으로써 방어관련 유전자들을 발현시키는 것으로 보인다.

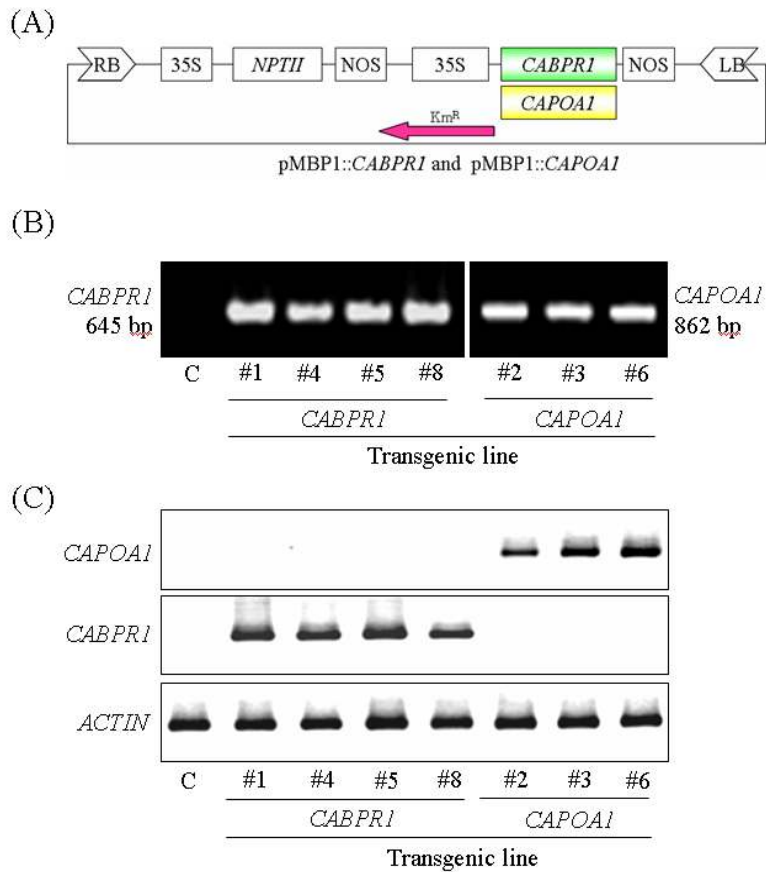


Fig. 3–30. Vector construction and generation of the *CABPR1* and *CAPOA1* transgenic tomato plants. (A) Diagram of the constructed plant expression vector pMBP1–*CABPR1* and pMBP1–*CAPOA1*. RB, right border; LB, left border; *NPTII*, neomycin phosphotransferase; 35S, *Cauliflower mosaic virus* 35S promoter; *NOS*, nopaline synthase terminator. (B) Genomic DNA PCR analysis of regenerated plants. The kanamycin–resistant putative transgenic plants were screened by PCR analysis by using *CABPR1* and *CAPOA1* gene–specific primers. (C) RT–PCR analysis of different transgenic plants for detection of *CABPR1* and *CAPOA1* transcripts. c, control lines #1, #4, #5, #8 represents four lines of *CABPR1* and #2, #3, #6 represents three individual transgenic lines of *CAPOA1*.

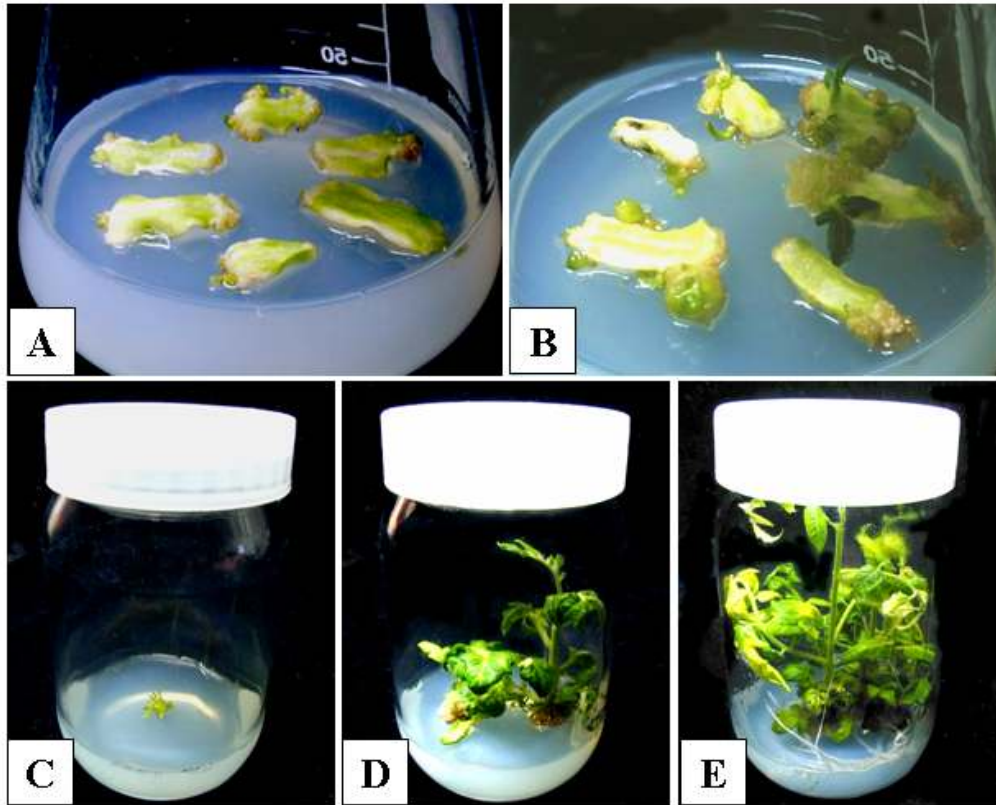
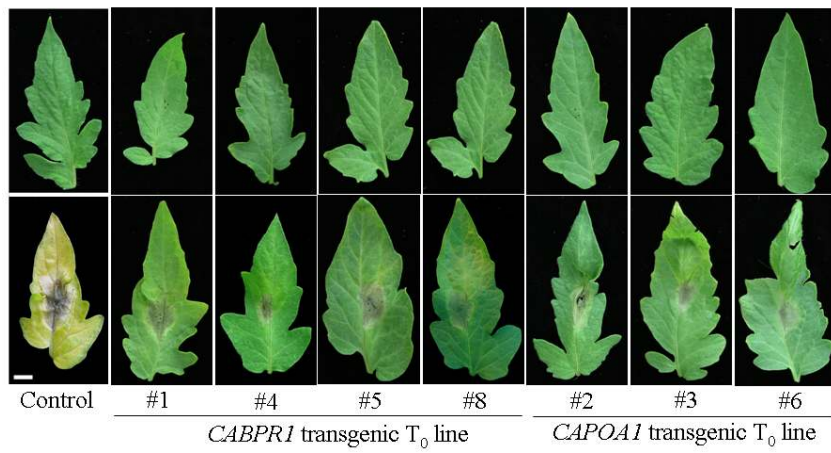


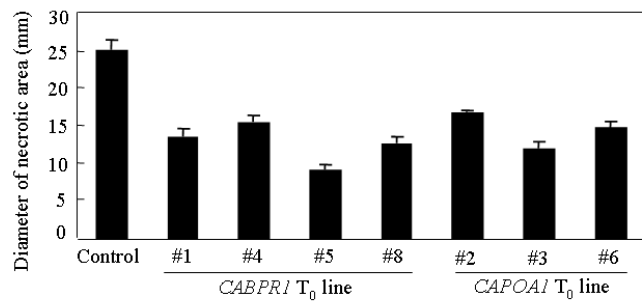
Fig. 3–31. Procedure of *Agrobacterium*–mediated gene transformation of tomato. (A) Initiation of callus formation at the cut end of cotyledon explants 7 days after cocultivation with *Agrobacterium*. (B) Callus formation and shoot regeneration. (C & D) Shoot multiplication and elongation. (E) Root formation in the rooting medium.

Fig. 3–32. Disease evaluation in *CABPR1* and *CAPOA1*–transgenic tomato plants. (A & B) Inhibition of disease development (mm) on transgenic plants infected by *Phytophthora capsici*. (upper panel) healthy leaves with agar plug inoculation and (lower panel) disease development in the tested leaves. Photos and data recorded 2 days after infection and represented as the mean \pm standard errors of three replications, each replication comprising three sub–replications. Bar indicates 0.8 cm. (C) Inhibition of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 growth in transgenic tomato leaves. Data were taken 5 days after infiltration of the bacterial pathogen, and represented as the mean \pm standard errors of three replications, each replication comprising three sub–replications.

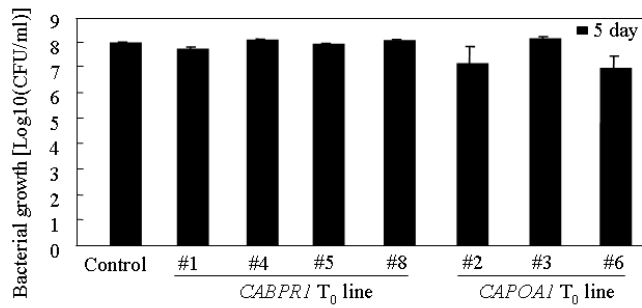
(A)



(B)



(C)



제 4절 주요 작물병의 진단 시스템 개발

1. 연구 개발 수행 방법 및 내용

A. 고추역병균 진단 kit 개발

가. 공시균주

1) *Phytophthora* spp.의 수집 및 분리

공시균주로 사용된 *P. capsici*, *P. infestans*, *P. parasitica*는 충청남도 공주와 청양 일대 고추, 토마토, 참깨 재배농가에서 수집한 수침상 및 마름증상을 나타내는 기주식물의 이병부위로부터 분리하였다. 그리고 기타 공시균주들은 충남대학교 농생물학과 식물병리학 연구실에 보존중인 균주들과 농업과학기술원에서 분양받아 사용하였다(Table 4-1, 4-2).

병원균을 분리하기 위해 채집된 병든 고추의 지체부를 멸균된 메스로 적당히 잘라 멸균수로 깨끗이 세척한 후 1% NaOCl에 2분간 침지하여 표면 소독하고 멸균수로 세척한 다음 여과지로 물기를 제거하였다. 표면 소독한 조직을 ampicillin 100ppm이 첨가된 10% V8 juice agar 배지에 올려놓고 25°C 항온배양기에서 배양하였다. 배양된 조직에서 나온 분리균들의 균총 가장자리에서 균사의 끝을 잘라 V8 juice agar 배지에 재분리하였다. 재분리 한 것을 25°C에서 2일간 배양하여 유주자낭을 형성하는지 확인하여 단포자 분리를 하였다.

Table 4–1. *Phytophthora capsici* isolates obtained from diseased pepper plants used in this study

Isolate	Mating type	Collection site
20CG0001	A1	Gongju, Chungnam
20CG0002	A1	Gongju, Chungnam
20CC0005	A1	Cheongyang, Chungnam
20CC0007	A2	Cheongyang, Chungnam
95CG3413	A1	Gongju, Chungnam
95CG3418	A1	Gongju, Chungnam
95CG3407	A1	Gongju, Chungnam
95CD3208	A1	Danyang, Chungbuk
95CP2102	A2	Pyoungtaek, Gyonggi
95CY1102	A2	Youngwol, Gangwon
95CD7102	A1	Damyang, Jeonnam
95CH5101	A2	Hwasun, Jeonnam
95CS6105	A2	Sunchang, Jeonbuk
95CC7203	A1	Changryong, Gyongnam
95CY8101	A2	Yuisung, Gyongbuk
95CA8310	A2	Andong, Gyongbuk

Table 4–2. *Phytophthora* species and other fungi used in this study

Isolate	Species	Host
2000–67–3	<i>Phytophthora parasitica</i>	<i>Lycium chinense</i>
20B12	<i>P. infestans</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
PCAC	<i>P. cactorum</i>	<i>Malus pumila</i>
9813CITRI	<i>P. citricola</i>	<i>Zizyphus jujuba</i>
SP70	<i>P. cinnamomi</i>	<i>Larix leptolepis</i>
PCRY	<i>P. crytozea</i>	<i>Gerbera jamesonii</i>
PMAG	<i>P. megasperma</i>	<i>L. esculentum</i>
PBOEH	<i>P. boehmeriae</i>	<i>Ailanthus alitissima</i>
PERY	<i>P. erythrpseptica</i>	<i>L. esculentum</i>
SP12	<i>P. citrophthora</i>	<i>M. pumila</i>
KACC40159	<i>P. cambivora</i>	<i>M. pumila</i>
KACC40167	<i>P. palmivora</i>	<i>Ficus carica</i>
PY–1	<i>Pythium</i> sp.	<i>Capsicum annuum</i>
IS–11	<i>Fusarium</i> sp.	<i>C. annuum</i>
COL–1	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>C. annuum</i>
ASO–1	<i>Alternaria solani</i>	<i>C. annuum</i>
AAL–1	<i>A. alternata</i>	<i>C. annuum</i>
PEN–1	<i>Penicillium</i> sp.	<i>M. pumila</i>
STE–1	<i>Stemphylium lycopersici</i>	<i>C. annuum</i>

2) 분리균의 동정

분리균들의 동정은 Newhook 등(1978)의 방법에 따라 유주자낭의 형태, 탈락성 여부, 유두돌기 형성 유무, 후막포자 생성여부, 난포자 형성시 장정기의 부착위치 등을 기준으로 10% V8 juice agar 배지 상에서 실시하였다.

병원성 검정을 위해 10% V8 juice agar 배지에 이식하여 암상태로 20-28°C에서 7일간 배양한 후 2일간 광조사하여 형성된 유주자낭을 두 겹의 멸균거즈로 걸렀다. 이어 4°C에서 2시간 동안 유주자를 유출시켰고, haemocytometer를 이용하여 10^4 zoospore/ml의 현탁액으로 조정하고, 접종원으로 사용했다.

병원균 접종은 고추(다복), 토마토(서광), 참깨(단백)등의 기주식물의 지체부에 유주자 현탁액 1ml씩을 관주하여 실시하였으며 유묘의 시들음 증상과 지체부에서의 갈변 유무를 매일 관찰하였다.

나. Genomic DNA 분리

1) 곰팡이 genomic DNA 분리

모든 공시균주들을 10% V8 juice agar 배지상에서 25°C에서 5일간을 배양하였다. 각 균주의 균총 가장자리로부터 cork borer를 사용하여 직경 6mm 균총원판을 3~4조각 떼어 내어 20% V8 broth에 접종한 후, 암상태의 25°C 항온기내에서 5일간 정치배양 하였다. 배양 후 균사체를 멸균된 2겹의 가아제로 걸러 effendorf 튜브에 넣고 -70°C에서 얼린 후 동결건조를 실시하였다. 동결건조된 균사체는 Murray(1980)의 방법을 조금 변형하여 DNA분리를 수행하였다. 동결건조된 균사체를 마쇄한 다음 400µl의 extraction buffer [200mM Tris-HCl (pH 8.0), 200mM NaCl, 30mM EDTA, 0.5% SDS]와 proteinase K (50µg)를 첨가, 37°C에서 1시간 처리하였다. 이어서 400µl의 2×CTAB solution [2% CTAB (w/v), 100mM Tris-HCl (pH8.0), 20mM EDTA (pH 8.0), 1.4M NaCl, 1% PVP (Polyvinylpyrrolidone)]을 첨가하여 잘 섞어 주었다. 이를 600µl의 chloroform:isoamylalcohol (24:1)로 추출하고 12,000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 1.5ml tube에 넣었다.

취해진 상등액 0.7 배량의 isopropanol을 첨가하고 실온에서 10분간 방치한 후 12,000rpm에서 10분 동안 원심분리 하였다. 침강된 DNA는 70% ethanol을 이용해 같은 방법으로 세척하였다. 튜브내의 ethanol을 제거, 건조시킨 후 DNA를 100µl의 TE buffer에 녹인 다음 2µl(10mg/ml)의 RNase를 첨가하여 RNA를 제거 한 후 agarose gel에 전기영동하여 DNA를 확인 및 정량하였다.

2) 양액에서의 DNA 분리

수거된 유주자, 난포자를 각각 10^5 부터 10^0 , 10^4 부터 10^0 까지 측정하여 양액에 혼합한 후 DNA 분리를 실시하였다. 각각의 포자와 혼합한 양액으로부터의 DNA 분리는 동결건조를 시키지 않았으며 bead를 넣어 포자의 세포벽을 분해시키는데 보다 용이하게 한 후 DNA 분리를 실시하므로 하루 정도 시간을 단축시킬 수 있었다. DNA 분리는 Intron사의 DNA extraction kit을 이용하였다.

3) 토양에서의 DNA 분리

수거된 유주자, 난포자를 각각 10^5 부터 10^0 , 10^4 부터 10^0 까지 측정하여 각기 성질이 다른 토양 1g과 혼합한 후 DNA 분리를 실시하였다.

토양은 모래, 산토양, 밭토양으로 구분하여 수집하였으며 모래는 유기물이 가장 적은 운동장의 토양, 산토양은 추후 작물 재배가 예상되는 곳의 토양, 밭토양은 고추가 재배되고 있는 곳의 토양을 수집하여 실험에 이용하였다.

각각의 포자와 혼합한 토양을 동결건조시킨 후 bead를 넣고 500 μ l의 2 \times CTAB solution [2% CTAB (w/v), 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 1% PVP (Polyvinylpyrrolidone), 20 mM mercaptoethanol]을 첨가하여 강하게 15분 vortexing 하였다. 65 $^{\circ}$ C에 30분간 처리하였다. 이어 SDS 10%을 500 μ l을 처리하여 다시 65 $^{\circ}$ C에 30분간 처리하여 잘 섞어주었다. 그 후 상등액을 600 μ l 취하고, 상등액에 600 μ l의 chloroform : isoamylalcohol (24:1)로 추출하고 12,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 상등액을 2 ml tube에 넣었다. 취해진 상등액 0.7배량의 isopropanol을 첨가하고 실온에서 10분간 방치한 후 12,000rpm에서 10분동안 원심분리하였다. 침강된 DNA는 70% ethanol을 이용해 같은 방법으로 세척하였다. 튜브내의 ethanol을 제거, 건조시킨 후 DNA를 100 μ l의 DDW에 녹인 다음 DNA 정제를 위해 Intron사의 DNA extraction kit을 이용하여 DNA를 정제하였다.

4) *P. capsici*의 번식기관의 DNA 함량조사

가) 유주자 DNA 함량

고추역병균 균주를 10% V8 juice agar 배지상에서 25 $^{\circ}$ C에서 7일간 배양한 후 2일간 광조사를 하여 유주자낭을 얻었다. 그 후에 4 $^{\circ}$ C에 1시간정도 배양하여 유주자낭에서 유주자가 나출되는 것을 관찰할 수 있었고, 25 μ l의 sieve을 이용하여 유주자만을 수거하였다. 수거된 유주자를 10^2 /ml로 측정 후에 bead를 넣고 마쇄봉으로 분쇄하였고,

DNA 분리는 Intron사의 DNA extraction kit을 이용하여 수행하였으며 1.5% agarose gel에 100 pg, 200 pg, 400 pg, 500 pg, 1 ng, 2 ng의 농도로 marker와 같이 전기영동하여 유주자의 DNA 농도를 조사하였다.

나) 난포자 DNA 함량

서로 다른 교배형을 대치배양하여 10% V8 juice agar 배지상에서 25°C로 10일간 배양한 후 난포자 형성 여부를 관찰하였다. 형성된 난포자를 메스를 이용하여 난포자가 형성된 부분의 배지를 얇게 자른 후 homogenizer를 이용하여 마쇄하였다. 이어 Novozym234를 처리하여 균사를 제거하였고 이어 100 μ l, 50 μ l, 25 μ l 크기의 sieve를 이용해 난포자만을 수거하였다. 수거된 난포자 역시 유주자와 같은 방법으로 DNA 농도를 조사하였다.

다. 종특이적 primer 선별 및 활용

1) 고추역병균 종특이적 primer 선별

가) 종특이적 probe DNA 선별

Probe DNA를 조제하기 위하여 공시균주중 *P. capsici* CY3119의 genomic DNA를 Vieira와 Messing(1982)과 Sambrook 등(1989)의 방법에 따라 cloning을 실시하였다. 먼저 genomic DNA를 *Hind*III로 자른 후 *Hind*III로 자른 pUC322과 ligation 시켰다. 이어 *E. coli* strain DH 5 α 에 형질전환을 시킨 후 alkali lysis법에 의해 plasmid DNA를 분리하였다. 선별된 plasmid를 *Hind*III로 처리한 후 전기영동을 실시하여 insert DNA의 크기를 확인하였으며, 이를 전이한 후 표지된 CY3119 균주의 genomic DNA를 probe로 이들과 hybridization을 실시하였다. Hybridization 실시 후 진한 밴드를 나타내는 단편을 포함하는 clone들을 선별하여 labelling하고 종 특이적 및 유연관계 분석에 유용한 probe로써의 이용가능성 여부를 조사하였다.

Probe DNA의 합성과 labelling 그리고 hybridization 및 dig-dUTP의 혈청학적 검출은 독일 Boehringer Mannheim사의 non radioactive dig-kit을 이용하여 제조회사의 권장방법에 따라 실시하였다.

나) 종특이적 DNA 단편(PC22)의 염기서열

*P. capsici*에 특이적 단편인 PC22(송과 김, 2002)의 DNA 염기서열분석을 위해 이 단편을 제한효소 *Hind*III로 자른 pBR322에 ligation시켜 *Escherichia coli*에 형질전환 시키고 50ml LB broth에 24시간 진탕 배양하여 대량 배양시켰다. 그 후 *E. coli*에서

plasmid를 분리하고 pBR322에 존재하는 primer site을 이용하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열분석은 (주)제노텍에 의뢰하여 수행하였다.

다) Primer 설계

*P. capsici*의 종 특이적 단편(PC22)의 염기서열정보를 바탕으로 primer design program (Gene Runner, Hastings software Inc.)을 이용하여 7쌍의 primer들을 설계하였다. 7쌍의 primer들 모두 primer 내부에 hairpin loops를 형성하지 않으면서 primer들 사이에서 dimer나 internal loop가 형성되지 않게 하였으며 각각 primer의 annealing 온도를 비슷하게 하기 위해 GC content 값과 염기 수가 서로 비슷하도록 설계하였다. 또한 *P. infestans* (Judelson and Tooley 2000), *P. nicotianae* (Kong et al., 2003) 종 특이적 primer도 (주)제노텍에 의뢰하여 합성하였다.;

2) Southern 분석

가) Alkali lysis에 의한 plasmid 분리

Plasmid 분리는 bioneer의 plasmid extraction kit를 이용하였다. Clone pPC22를 포함하는 *Escherichia coli*를 1~5ml의 LB broth에 진탕배양 후 12,000rpm에서 3분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 250 μ l의 resuspension buffer(R)를 첨가한 후 vortexing하여 충분히 섞었다. 그 후 250 μ l의 lysis buffer를 첨가하고 부드럽게 혼합하였으며 상온에서 대략 5분 정도 두었다. 350 μ l neutralization buffer를 첨가하고 부드럽게 섞어준 후, 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 처리하였다. 그리고 12,000rpm으로 8분 정도 원심한 후 상등액을 binding column tube에 옮기고 12,000rpm에 1분 원심분리를 하였다. 이때 생긴 여과액은 버리고 80% ethanol 700 μ l를 첨가하여 12,000rpm으로 1분간 원심하여 binding column tube를 세척했다. 그후 13,000rpm으로 1분 원심하여 에탄올을 완전히 제거시키고 마지막으로 50 μ l의 elution buffer를 첨가하고 13,000rpm으로 1분간 원심분리하여 binding column tube에 결합되어 있는 plasmid를 추출하였다.

나) Agarose gel로부터 DNA 추출

Clone pPC22 내에 삽입된 단편을 추출하기 위해 QIAEX II agarose gel kit을 이용하였다. 먼저 전기영동하고 gel에서 band가 있는 부분을 칼날로 자른 다음 1.5ml tube에 넣었다. 자른 gel 무게의 3배양의 Buffer QX I 과 10 μ l의 QIAEX II를 넣고 vortex 하였다. 50 $^{\circ}$ C의 water bath에 10분 동안 처리한 후 4 $^{\circ}$ C 12,000rpm으로 5분간 원심분리 하

였다. Pellet에 buffer QX I 을 500 μ l 넣고 vortex 하여 4 $^{\circ}$ C에서 12,000rpm으로 5분 동안 원심분리 하였다. Pellet은 500 μ l PE buffer를 넣어 세척하고 4 $^{\circ}$ C, 12,000rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 버리고 pellet을 상온에 말린 후, 멸균된 2차 증류수 20 μ l를 넣고 vortex 하였다. 상온에서 5~10분 동안 녹인 다음, 4 $^{\circ}$ C 12,000rpm으로 5분간 원심 분리하여, 상등액을 새 tube에 옮기고, 분리된 DNA 단편을 이용하여 probe를 제작하였다.

다) Probe DNA의 labelling

전기영동된 gel로부터 추출한 DNA 10 μ l와 TE 90 μ l를 혼합하였다. 이어 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) 100 μ l를 넣고 4 $^{\circ}$ C, 12,000rpm으로 15분 동안 원심분리 한 후 상등액을 취해 2 μ l의 5M NaCl과 ethanol 200 μ l를 첨가하였다. 그 후 -70 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 두었다가 4 $^{\circ}$ C, 12,000rpm으로 15분간 원심분리 하였다. Pellet은 10 μ l의 TE buffer로 녹이고, 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 denaturation시켜, 신속히 -70 $^{\circ}$ C에 30분간 두었다. 그 후 Boehringer Mannheim사의 dig-kit을 이용하여 hexanucleotide, dNTPs, klenow enzyme을 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 두었다. 반응정지를 위하여 0.2 μ l의 0.2M EDTA (pH8.0), 2 μ l의 4M LiCl, 냉각된 60 μ l의 ethanol을 첨가하여 -70 $^{\circ}$ C에 30분간 처리 후, 4 $^{\circ}$ C 12,000rpm으로 15분 원심 분리하였다. Pellet에 TE buffer 50 μ l를 넣어 녹인 다음 95 $^{\circ}$ C, 10분간 denaturation후에 신속히 -70 $^{\circ}$ C에 보관하고 labelling을 마쳤다.

라) Southern hybridization

*P. capsici*의 종특이적 영역을 PCR 증폭하고 2.0% agarose gel에 100V로 30분 동안 0.5 \times TBE buffer (45mM Tris, 1mM EDTA)를 사용하여 전기영동하고, Sambrook 등 (1989)의 방법으로 Schleicher & Schunell사의 nylon membrane에 DNA를 transfer 하였다. Hybridization은 hybridization solution (5 \times SSC, 0.02% SDS, 0.1% sarcosine, 0.5% blocking reagent)으로 denature된 probe DNA를 녹여서 65 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 실시하였고, Dig-dUTP의 immunological detection은 Boehringer Mannheim사의 dig-kit을 이용하여 제조회사의 권장방법에 따라 수행하였다.

3) CSP23A/CSP23B primer 활용

가) Hot start PCR을 이용한 genomic DNA의 증폭

*P. capsici*의 종특이적 DNA 증폭은 선발한 CSP23A/CSP23B, 22R1P/22H1P, 22R5/22H5 3쌍의 primer를 이용하여 실시하였다. PCR 반응은 최신 PCR 기법인 Hot start

PCR method를 사용하였으며 반응 mixture는 total volume을 50 μ l로 하고 template DNA 10ng, 각각 primer set 20pmole, 250 μ M dNTPs, 10 \times PCR buffer 5 μ l, 2mM MgCl₂, FastStart Taq DNA Polymerase 2unit (Promega Co.)을 첨가하였으며, 그 외 PCR 조건은 Table 4-4과 같다.

ITS 영역의 증폭은 Hamelin 등(1996)의 문헌에 근거하여 (주)제노텍에 의뢰하여 제작한 ITS 1과 ITS 4를 이용하였다(Table 4-3). PCR 반응 mixture는 genomic DNA의 종특이적 DNA 증폭시와 동일하게 제조하였다. 이어서 MJ Research사의 PTC-100을 이용하여 PCR 증폭을 하였으며 증폭된 PCR 산물은 2% agarose gel에서 50V에 1시간 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 관찰하였다.

본 연구에 사용한 Hot start PCR은 기존에 많이 사용하고 있는 Cold start PCR과는 사용하는 polymerase에 차이가 있다. Hot start PCR의 polymerase는 wax 층에 쌓여 있어 온도가 60 $^{\circ}$ C까지 올라가야 wax가 녹아 비로소 polymerase가 작용을 시작한다. 따라서 낮은 온도에서의 mismatching을 방지할 수 있어 기존의 방법보다 sensitivity가 더욱 높아지며 specificity도 또한 높아 각종 병원진균의 동정과 검출에 매우 우수한 기술이다.

Table 4–3. PCR primers used against *Phytophthora capsici*, *P. infestans* and *P. parasitica*

Target pathogen	Primer	Sequence (5'– 3')	
<i>P. capsici</i>	CSP21A	GCT CCA TCG AAA CTC AGA AC	
	CSP22A	GTC CCA TCT TCA TCC CGT TG	
	CSP23A	TCA TTC AAC ACA CGT CCT G	
	CSP23B	CCT ATC CCG TCC TTT ATC G	
	CSP1	GAC TGT ACC AAA GCC CTG A	
	CSP2	TTC ATT CAG GAC TTA CCC G	
	22R1P	AAC AAC CAC GGG TTC TTG G	
	22H1P	CGG TAC ATA TCA GCC GCG	
	22R5	TTG ACG AAT CTG CCA TCC	
	22H5	ACG AGA TTA GTG CTG AAG GA	
	<i>P. parasitica</i>	PN1	CCA CCA CGC AGC AAA CTG CGG C
		PN2	TTG AGT ACC AGG CCG CTC GTA G
<i>P. infestans</i>	PNIF	CTC GCT ACA ATA GGA GGG TC	
	ITS5	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	

Table 4–4. PCR conditions of primer sets used for PCR

Primer set	Initial denaturation	Step cycle				Final extension
		Denaturation	Annealing	Extension	Cycle	
CSP1/CSP2	95°C/5min	95°C/1min	60°C/1min	72°C/2min	38	72°C/7min
CSP1/CSP21A	95°C/5min	95°C/1min	56°C/1min	72°C/2min	38	72°C/7min
CSP1/CSP23B	95°C/5min	95°C/1min	56°C/1min	72°C/2min	38	72°C/7min
CSP2/CSP23A	95°C/5min	95°C/1min	56°C/1min	72°C/2min	38	72°C/7min
CSP21A/CSP2	95°C/5min	95°C/1min	56°C/1min	72°C/2min	38	72°C/7min
CSP21A/CSP23 B	95°C/5min	95°C/1min	56°C/1min	72°C/2min	38	72°C/7min
CSP22A/CSP2	95°C/5min	95°C/1min	56°C/1min	72°C/2min	38	72°C/7min
CSP22A/CSP23 B	95°C/5min	95°C/1min	60°C/1min	72°C/2min	38	72°C/7min
22RIP/22H1P	95°C/4min	95°C/1min	61°C/1min	72°C/2min	38	72°C/7min
22R5/22H5	95°C/4min	95°C/1min	60°C/1min	72°C/2min	38	72°C/7min
ITS1/ITS4	95°C/4min	95°C/35sec	55°C/1min	72°C/2min	35	72°C/8min
PN1/PN2	96°C/2min	94°C/30s	65°C/45s	72/1min	35	72°C/10min
PNIF/ITS5	96°C/2min	96°C/1min	55°C/1min	72°C/2min	35	72°C/10min

나) Genomic DNA 농도별 증폭

P. capsici 20CG0001균주 의 genomic DNA를 10ng, 5ng, 1ng, 500pg, 100pg, 50pg, 10pg, 5pg, 1pg, 500fg, 100fg, 50fg, 10fg, 5fg, 1fg의 15단계로 조정 한 후 PCR 증폭을 실시하였다. PCR 증폭은 종특이적 primer set으로 선발된 primer CSP1과 CSP2를 이용하였다. PCR 반응 mixture는 genomic DNA의 종특이적 단편 증폭 시와 동일하게 제조하였고, 역시 Hot start PCR 기법을 사용하여 증폭하였다.

다) 유사종 DNA 혼합액으로부터 *P. capsici*의 검출

*P. capsici*와 형태적으로 유사하여 *Phytophthora* 분류체계상 같은 II group에 속해 있는 *P. parasitica*, *P. palmivora*, *P. boehmeriae*와 우리나라뿐만 아니라 세계적으로 막대한 피해를 주고 있는 감자역병균 *P. infestans*를 *P. capsici*의 DNA와 같은 비율로 혼합한 후 CSP23A/CSP23B primer set을 가지고 PCR 증폭을 실시하였다.

PCR 반응 mixture와 조건은 genomic DNA의 종특이적 단편 증폭과 동일하게 하였다.

라) *P. capsici*와 고추 DNA 혼합액에서의 농도별 증폭

*P. capsici*의 DNA와 고추 DNA의 농도를 상대적으로 서로 달리하며 PCR을 수행하여 기주체의 DNA가 상대적으로 많이 존재할 때에도 *P. capsici*가 검출가능한지 여부를 조사하였다.

Primer는 종특이적 primer로 선발된 CSP23A/CSP23B primer set을 사용하였으며 PCR 반응시 template DNA로 *P. capsici*의 DNA를 0.1ng으로 고정하고 고추(*Capsicum annuum*)의 genomic DNA 농도는 0.1ng, 1ng, 10ng, 100ng, 1 μ g으로 높여가며 PCR을 하였다. PCR 조건은 역시 종특이적 단편 증폭과 동일하게 하였다.

마) NaOH 추출법을 이용한 이병식물체로부터 병원균 검출

고추 포장에서 역병에 감염된 고추를 채집하여 Wang 등(1993)의 방법에 따라 병원균을 검출하였다. 이병된 고추의 지체부 약 10mg을 멸균된 메스로 잘라 액체질소로 급속 냉각시킨 후 마쇄하였다. 이어서 1.5ml tube에 0.5N NaOH 20 μ l와 함께 넣어 잘 현탁했으며 원심분리기를 이용하여 17,000 \times g에 5min간 원심분리한 후 5 μ l의 상등액을 취해 즉시 45 μ l의 100mM Tris(pH 8.0)를 넣었다. 그리고 여기서 다시 추출한 2 μ l의 추출액을 PCR을 위한 template DNA로 사용하여 CSP23A/CSP23B primer set을 PCR에 이용하였다.

이 방법으로 식물체에서 DNA를 분리하여 PCR을 수행했던 기존의 방법보다 시간과 효율을 대폭 향상시킬 수 있었다.

4) 양액 및 토양으로부터 병원균 검출을 위한 종특이적 primer의 활용

가) Genomic DNA에 대한 PCR 증폭

*P. capsici*를 특이적으로 증폭하는 primer SET을 선발하고자 PCR을 수행하였다. 반응 mixture는 total volume을 50 μ l로 하고 template DNA 10 ng, 각 primer set 10 pmole, 250 μ M dNTPs, 10 \times PCR buffer 5 μ l, 2 mM MgCl₂, Taq DNA Polymerase 2 unit(Solgent Co.)을 첨가하여 PCR을 수행하였으며 그 외 PCR 조건은 Table 4-4와 같다.

PCR 반응 mixture는 genomic DNA의 종특이적 DNA 단편 증폭때와 동일하게 제조하였다. 이어서 MJ Research사의 PTC-100을 이용하여 PCR 증폭을 하였으며 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 100V에 30분간 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 관찰하였다.

나) Genomic DNA 농도별 증폭

개발된 primer의 민감도를 알아보기로 *P. capsici* 균주의 genomic DNA를 10 ng, 2 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 0.1 fg의 10단계로 조정된 후 PCR 증폭을 실시하였다. PCR 증폭은 종특이적 primer set으로 선발된 primer CSP23A와 CSP23B를 이용하여 수행하였다. PCR 반응 mixture는 genomic DNA의 종특이적 단편 증폭시와 동일하게 제조하였다.

다) 양액으로부터 병원균의 검출

양액으로부터 분리된 병원균 DNA를 가지고 종특이적 PCR 증폭을 실시하였으며 그 방법은 genomic DNA의 PCR 증폭방법과 같다. 그리고 양액으로부터의 병원균 검출을 위해 *P. capsici* 뿐만 아니라 국내 양액재배지에서 심한 피해를 주는 *P. infestans*, *P. nicotianae*에 대해서도 위와 동일한 방법으로 PCR 증폭을 실시하였다.

라) 토양으로부터 *P. capsici*의 검출

토양으로부터 병원균의 DNA를 분리한 후 실시한 PCR 증폭은 genomic DNA의 PCR 증폭 방법과 동일하게 수행하였다.

5) 시제품 진단 kit의 포장 검정

가) kit의 구성

상위 실험에 의해 찾아낸 최적 primer CSP 23A/23B와 함께 사용할 시제품 진단 kit

는 (주) sun genetics에 의뢰해 제작하였으며 Glass bead 5g, 마쇄봉 25개, solution A 15ml, solution B와 C 각각 7ml, buffer W 5ml, Spin-column 25columns, Collection tube 25tubes, 2×Taq premix 400 μ l, 100bp DNA ladder 50 μ l, 설명서로 구성되어있다.

나) 시제품 진단 kit의 포장 검정

실제 역병에 걸린 포장에서 토양과 뿌리조직 샘플을 채취해 시제품 진단 kit를 이용해 DNA를 분리한 후 PCR을 수행하였다.

B. *Alternaria* 속 병원균 진단 kit 개발

가. 공시균주

본 연구에 사용한 균주들은 Table 4-5과 4-6에서와 같다. 공시균주들은 potato dextrose agar (PDA, Difco) 사면배지에서 4℃ 또는 20%의 glycerol 포자 현탁액에서 -70℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

Table 4–5. Isolates used for PCR amplification and specificity test of *A. panax*

Species	Isolate	Host	Geographic origin
<i>Alternaria</i>	CNU–APG4	<i>Panax ginseng</i>	Kumsan, Chungnam
<i>panax</i>	CNU–APG5	<i>Panax ginseng</i>	Kumsan, Chungnam
	CNU–APG9	<i>Panax ginseng</i>	Kumsan, Chungnam
	CNU–3405	<i>Panax ginseng</i>	Kumsan, Chungnam
	CNU–3578	<i>Panax ginseng</i>	Kumsan, Chungnam
	CNU–3546	<i>Panax ginseng</i>	Kumsan, Chungnam
	CNU–3161	<i>Aralia elata</i>	KT&G, Daejeon
	CNU–3012	<i>Aralia continentalis</i>	Buyeo, Chungnam
	CNU–3213	<i>Aralia continentalis</i>	Buyeo, Chungnam
	CNU–3231	<i>Aralia continentalis</i>	KT&G, Daejeon
	CNU–3253	<i>Echinopanax horrium</i>	Pyeongtaek, Kangwon
	CNU–3382	<i>Echinopanax horrium</i>	Ullungdo, Kyeongbuk
	CNU–3010	<i>Kalopanax pictus</i>	Buyeo, Chungnam
	CNU–AP0401	<i>Panax ginseng</i>	Kumsan, Chungnam
	CNU–AP0402	<i>Panax ginseng</i>	Kumsan, Chungnam
	CNU–AP0403	<i>Panax ginseng</i>	Kumsan, Chungnam
	CNU–AP0404	<i>Panax ginseng</i>	Kumsan, Chungnam
	CNU–AP0405	<i>Panax ginseng</i>	Kumsan, Chungnam
	CNU–AP0406	<i>Panax ginseng</i>	Kumsan, Chungnam
	CNU–AP0407	<i>Panax ginseng</i>	Kumsan, Chungnam
	CNU–AP0408	<i>Panax ginseng</i>	Kumsan, Chungnam
	CNU–AP0409	<i>Panax ginseng</i>	Kumsan, Chungnam
	CNU–AP0410	<i>Panax ginseng</i>	Kumsan, Chungnam
	CNU–AP0411	<i>Panax ginseng</i>	Kumsan, Chungnam
	CNU–AP0412	<i>Panax ginseng</i>	Kumsan, Chungnam
<i>A. tenuissima</i>	IMI–79630	–	Unknown

Table 4–5. Continued

Species	Isolate	Host	Geographic origin
<i>A. tenuissima</i>	IBT-8398	–	Unknown
	CNU-A005	<i>Panax ginseng</i>	Kumsan, Chungnam
<i>A. alternata</i>	CNU-SS703	<i>Panax ginseng</i>	Kumsan, Chungnam
	IMI-89343	–	Unknown
	CNU-NI701	–	Chonnam
<i>Rhizotonia solani</i>	–	<i>Panax ginseng</i>	Daejeon
<i>Botrytis cinerea</i>	–	<i>Panax ginseng</i>	Daejeon
<i>Phytophthora cactorum</i>	–	–	Daejeon
<i>Pythium</i> sp.	–	<i>Panax ginseng</i>	Daejeon
<i>Colletotrichum gloeosporioide</i>	–	<i>Panax ginseng</i>	Kumsan, Chungnam
<i>Ginseng</i> DNA	–	–	–

Table 4–6. Isolates used for PCR amplification and specificity test of *A. gaisen*

Species	Isolate	Host	Geographic origin
<i>A. gaisen</i>	AK-42	Pear	Daejeon, Korea
	AK-21	Pear	Daejeon, Korea
	K-3	Pear	Daejeon, Korea
	No.15A	Pear	Tottori, Japan
	AK-11	Pear	Tottori, Japan
	K-1	Pear	Tottori, Japan
	K-2	Pear	Tottori, Japan
	K-4	Pear	Tottori, Japan
	K-5	Pear	Tottori, Japan
	O-274	Pear	Tottori, Japan
	O-275	Pear	Tottori, Japan
	CNU-SS704	Pear	Chonnam, Korea
	CNU-SS706	Pear	Chonnam, Korea
	<i>A. mali</i>	IFO-8984	Apple
M-72		Apple	Chungnam, Korea

Table 4-6. Continued

Species	Isolate	Host	Geographic origin
<i>A. mali</i>	M-89	Apple	Chungnam, Korea
	AM-22	Apple	Chunganm, Korea
	AM-17	Apple	Tottori, Japan
	AM-28	Apple	Tottori, Japan
	M-69	Apple	Tottori, Japan
	M-70	Apple	Tottori, Japan
	M-71	Apple	Tottori, Japan
	M-88	Apple	Tottori, Japan
	O-153	Apple	Tottori, Japan
	O-T-M1	Apple	Daejeon, Korea
<i>A. tenuissima</i>	IBT-8398	—	Unknown
	IBT-8400	—	Unknown
	IMI-79630	—	Unknown
	CNU-013	—	Unknown
	CNU-A005	—	Chonnam, Korea
	CNU-A006	—	Chonnam, Korea
	CNU-A007	—	Chonnam, Korea
	CNU-A014	—	Gyeongbuk, Korea
	CNU-A015	—	Gyeongbuk, Korea
	CNU-A017	—	Gyeongbuk, Korea
	CNU-A020	—	Gyeongbuk, Korea
	CNU-A067	—	Chonnam, Korea
	STR N-1	—	Unknown
	O-T-L	—	Unknown
<i>A. alternata</i>	EGS 35-193	—	Unknown
	IMI-147909	—	Unknown
	IMI-89343	—	Unknown
	CNU-HR701	—	Kangwon, Korea
	CNU-A079	—	Chonnam, Korea
	CNU-NI701	—	Chonnam, Korea
	CNU-NI716	—	Chonnam, Korea
	CNU-HW703	—	Chonnam, Korea
	CNU-HW704	—	Chonnam, Korea
	CNU-HW712	—	Chonnam, Korea
	CNU-SS701	—	Chonnam, Korea

Table 4-6. Continued

Species	Isolate	Host	Geographic origin
<i>A. alternata</i>	CNU-SS702	-	Chonnam, Korea
	CNU-SS03	-	Chonnam, Korea
	CNU-SS705	-	Kyounggi, Korea
	CNU-HR702	-	Kyounggi, Korea
	CNU-HR703	-	Kyounggi, Korea
<i>A. longipes</i>	CNU-HR704	-	Kyounggi, Korea
	AT-204	Tobacco	Daejeon, Korea
	AT-246	Tobacco	Daejeon, Korea
	AT-2a-1	Tobacco	Daejeon, Korea
	AT-2b-1	Tobacco	Daejeon, Korea
	AT-34b	Tobacco	Daejeon, Korea
	AT-3b-1	Tobacco	Daejeon, Korea
	O-205	Tobacco	Tottori, Japan

나. 형태적, 배양적 특성 조사

Alternaria 균들의 병반상에 형성된 분생포자와 분생자경의 형태적 특성을 조사하였고 V-8 juice agar 배지에 인공배양하여 형성된 분생포자와 분생자경의 형태적 특징을 조사하였으며 인공배양기(PDA)에서의 균총의 특징을 관찰하였다.

다. DNA extraction

공시균주는 PDA 사면배지에 접종하여 25°C에서 3일간 배양한 후 균사 소량을 potato dextrose broth(PDB)에 접종, 125rpm으로 25°C에서 2일간 진탕배양 하여 균사체를 얻었다. 균사체는 동결건조 후 1.5ml eppendorf tube에 넣고 마쇄하였다. 튜브에 400µl의 extraction buffer [200mM Tris-HCl(pH 8.0), 200mM NaCl, 30mM EDTA, 0.5% SDS]에 현탁하고 proteinase K 50µg을 첨가, 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 여기에 400µl의 2× CTAB solution [2% CTAB(w/v), 100mM Tris-HCl(pH 8.0), 20mM EDTA(pH 8.0), 1.4M NaCl, 1% PVP(polyvinylpyrrolidone)]을 첨가하여 섞어준 뒤 chloroform : isoamylalcohol(24:1)로 추출하고, 원심분리 하였다. 원

심분리하여 얻은 상등액에 0.7volume의 isopropanol을 첨가함으로써 DNA의 추출을 촉진시켰다. 이렇게 얻은 pellet을 70% ethanol을 이용하여 세척한 후 건조하고 TE (10mM Tris-HCl (pH8.0)), 1mM EDTA (pH8.0)) buffer로 다시 녹인다. 각각의 샘플에 RNase를 첨가하여 RNA를 제거한 후 37°C에서 한 시간 동안 incubation한다. DNA의 크기와 양은 TBE buffer에 0.7% agarose gel을 통해 전기영동을 하고 ethidium bromide로 염색한 후 UV light로 찍어 측정하였다. 그리고 DNA는 사용하기 전까지 4°C에서 보관되었다.

라. 종 특이적 primer의 제작

1) *A. panax*의 동정 및 검출기술 개발

분생포자의 형태적 특징으로는 신속하고 정확한 병원균의 동정과 조기 진단이 불가능하므로 *Alternaria*속 균들을 PCR을 이용하여 빠르고 정확하게 검출하기 위해 다양한 molecular marker를 이용, 종 특이적인 clone을 탐색하였다.

가) URP-PCR amplification

두 번째 테마 실험의 PCR 핵산지문 분석에는 서린생명과학연구소(SRILS)의 SRILS UniPrimer™ kit를 사용하였다. 12종의 primer를 사용하였다(Table 4-7). PCR 증폭은 15ng의 genomic DNA, primer 100ng, dNTP's 200μM, *Taq* DNA polymerase 2.5unit, 10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂에 H₂O를 첨가하여 최종 volume을 20μl로 조정하였다. DNA 증폭반응은 initial denaturation을 94°C에서 4분간 실시하고, denaturation 1분(94°C), annealing 1분(55°C), extension 2분(72°C)으로 35 cycle을 실시한 뒤 72°C에서 7분간 extension 하였다. PCR 반응 이후, 15μl의 생성물을 1.2% agarose gel에서 60V, 5시간 동안 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 관찰하였다.

Table 4-7. Oligonucleotide sequences of 12 URP primers

Primer	Sequence (5'-3')	GC content(%)	T _m
URP-01	ATC CAA GGT CCG AGA CAA CC	50	65
URP-02	GTG TGC GAT CAG TTG CTG GG	50	67
URP-03	CCC AGC AAC TGA TCG CAC AC	50	65
URP-04	AGG ACT CGA TAA CAG GCT CC	50	66
URP-05	GGC AAG CTG GTG GGA GGT AC	50	65
URP-06	ATG TGT GCG ATC AGT TGC TG	50	67
URP-07	TAC ATC GCA AGT GAC ACA GG	50	68
URP-08	AAT GTG GGC AAG CTG GTG GT	50	74
URP-09	GAT GTG TTC TTG GAG CCT GT	50	65
URP-10	GGA CAA GAA GAG GAT GTG GA	50	65
URP-11	TAC ACG TVT CGA TCT ACA GG	50	65
URP-12	AAG AGG CAT TCT ACC ACC AC	50	65

나) URP-PCR 단편의 분리와 cloning 그리고 sequencing

URP-PCR 산물은 2% low melting agarose gel에 전기영동하여 중 특이적인 band를 절단, 1.5ml tube에 넣고 70°C에서 완전히 용해한 뒤 Wizard® PCR preps DNA Purification System을 사용하여 정제하였다.

정제된 중 특이적인 밴드는 pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, WI, U.S.A)를 사용하여 클론하였고 *Escherichia coli* JM 109 competent cell을 이용하여 형질전환 하였다.

형질전환된 cell들은 ml당 100µg의 ampicillin과 ml당 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosede (X-gal)을 80µg 포함하는 Luria-Bertani (LB) plates에 spread 하였다. 형질전환의 확인은 선발된 colony를 멸균된 100ul의 증류수가 들어있는 eppendorf tube로 옮기고 vortex 한후 그 중 5µl를 dNTP's 200µM, 10mM Tris-HCl (pH 9.0), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 각 8 pmol/µl primer (T₇-promotor, primer and Sp₆ promotor primer (Promega)), *Taq* DNA polymerase 2.5 unit과 H₂O를 첨가하여 최종 반응

volume을 50 μ l 로 하여 PCR 반응을 수행하였다.

PCR 반응은 initial denaturation을 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 실시하고, denaturation 40초(95 $^{\circ}$ C), annealing 40초(55 $^{\circ}$ C), extension 1분(72 $^{\circ}$ C)으로 30cycle을 실시하고 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 15분간 incubation하였다. PCR 산물은 0.5 \times TBE buffer에서 1.2% agarose gel 에서 분리되었고 ethidium bromide로 염색한 후 UV light 하에서 관찰하였다. PCR 산물은 Wizard[®] PCR Prep DNA Purification System을 이용하여 정제하였다.

다) Primer의 제작과 PCR 반응

종 특이적인 primer는 primer 3_www.cgi v 0.2을 사용하여 URP 절편의 sequence 정보를 이용하여 설계되고 Bioneer Inc. (Korea)에 의뢰하여 합성하였다. PCR 증폭은 a *i*-cycler (BIO-RAD, USA) 을 이용 10 pmol 의 각각의 primers, 250 M dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 2 U 의 *Taq*-DNA polymerase (Bioneer, Korea), and 100 ng 의 template DNA 를 첨가하여 최종 volume을 50 μ l로 조정하였다. DNA 증폭은 initial denaturation 을 95 $^{\circ}$ C 에서 10분간 실시하고 denaturation 40초 (95 $^{\circ}$ C), annealing 40초 (55 $^{\circ}$ C), extension 1분(72 $^{\circ}$ C)으로 30 cycle을 실시한 뒤 final extension 72 $^{\circ}$ C 에서 15 분간 실시한다.

2) *A. gaisen*의 동정 및 검출기술 개발

가) AFLP 분석

AFLP 분석은 Vos등에 의해 약간 수정된 방법을 사용하였다. 본 실험에서는 genomic DNA 1 μ g을 각각 제한효소(*EcoRI*, *MseI*) 5unit 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 절단을 한 후 2.5배의 에탄올을 첨가하여 20 $^{\circ}$ C에서 12시간동안 처리한 후, 13,000rpm에서 20분 동안 원심분리하여 절단하였다. 침전된 DNA는 3차 증류수에 녹인 후 5unit의 T4 DNA ligase와 각각의 adapter(50pMol의 *EcoR* I adapter, 5pMol 의 *Mse* I adapter)를 첨가한 후 16 $^{\circ}$ C에서 12시간 ligation시켰다. Ligation DNA는 pre-amplification을 하기 위한 재료로 사용하였다. Pre-amplification은 adapter에 상보적인 염기서열을 가진 1 μ l 의 각각의 primer (*EcoR* I-0/*Mse* I-0), ligaton된 DNA(1.5 μ l), 5 μ l of *Taq* 10 \times buffer(with Mg²⁺), 5 μ l of 2.5mM each of dNTP, 0.4 μ l of *Taq*DNA polymerase(5U μ l-1)를 첨가하여 a *i*-cycler (BIO-RAD, USA)에서 pre-heating을 94 $^{\circ}$ C 5분하고, 94 $^{\circ}$ C 30초, 56 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분을 한 주기로 20회 반복하고 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 final extension을 실시하였다. 증폭된 산물은 1:10으로 희석하여 2차 PCR반응을 수행하

기 위한 재료로 사용하였다. 2차 PCR 반응의 조건은 희석된 DNA 1µl에 5µl of 250 M dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 2 U 의 *Taq*-DNA polymerase (Bioneer, Korea), 각각의 primer의 조합을 첨가하여 pre-heating을 94°C 5분 하고 94°C에서 30초, 67°C에서 30초, 72°C에서 1분간 반응시킨 후 annealing 온도를 0.7°C 씩 감소시키면서 11주기를 반복한 뒤, 마지막으로 94°C에서 30초, 57°C에서 20초, 72°C에서 1분간을 23회 반복하고 72°C에서 7분간 final extension을 실시하였다. 본 실험에 사용된 adapter와 primer는 표 4-8과 같다. 반응 후, long ranger gel에 1800V 80W에서 3시간 loading한 다음 silver staining으로 결과를 분석하였다.

Table 4-8. AFLP adapters and primers used in this study

Adapter	<i>Mse</i> I	5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3'
		3'-TAC TCA GGA CTC AT-5'
	<i>Eco</i> R I	5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3'
		3'-CAT CTG ACG CAT GGT TAA-5'
Primer	M00	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A-3'
	M01	5'-GAT GAG TCT GAG TAA A-3'
	M13	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAG-3'
	M132	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAG C-3'
	M134	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAG T-3'
	E00	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C-3'
	E01	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3'
	E03	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CG-3'
	E13	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAG-3'

나) AFLP fragments 분리와 sequencing

Polyacrylamide gel을 통해 확인한 특이적인 밴드는 멸균된 칼을 이용하여 마른 gel로부터 잘라 TE buffer (pH 8.0) 20 µl를 넣어 37°C에서 12시간 incubation 한다. 원심을 한 후 상등액에 0.1 volume의 3 M sodium acetate 와 2 volume 의 차가운 95% ethanol 을 첨가하여 DNA를 얻었다. TE buffer에 DNA를 녹여 4 µl를 AFLP에서 사용한 동일 primer로 PCR을 실시하여 PCR 산물을 얻었다. PCR산물은 Wizard PCR prep

kit (Promega, Madison, WI, USA)으로 정제하고, sequencing 반응은 앞에서와 동일하였지만 primer로 AFLP 반응에 사용한 동일한 primer를 사용하였다.

다) Design of primer and PCR amplification

종 특이적인 primer쌍은 3_www.cgi v 0.2 (Rozen and Skaletaky, 2000)와 Bioneer Inc. (Korea)의 합성을 사용한 URP fragment의 염기서열 정보를 이용하여 제작되었다. 이 종 특이적인 primer를 각각 25pmol primer, 250 μ M dNTP, 10mM Tris-HCl (pH 9.0), 40mM KCl, 1.5mM MgCl₂ 그리고 2.5U의 *Taq* DNA polymerase를 첨가하여 최종 반응 산물이 50 μ l인 *A. gaisen*의 genomic DNA를 증폭하기 위해 사용되었다. PCR 반응은 initial denaturation을 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 실시하고, denaturation 1분(95 $^{\circ}$ C), annealing 1분(58 $^{\circ}$ C), extension 1분(72 $^{\circ}$ C)으로 30cycle을 실시하고 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 15분간 extension하였다.

마. 종 특이적 primer의 DNA 증폭

1) Primer의 특이성 및 민감도

가) *A. panax*

A. panax 특이적 primer를 이용하여 *A. panax*에 대한 PCR의 특이성 및 민감도를 검정했다. *A. panax*와 형태적으로 유사한 *A. alternata*, *A. tenuissima*, 및 기타 식물병원균 *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora cactorum*, *Pythium* sp. 및 *Colletotrichum gloeosporioide* 및 인삼 잎으로부터 DNA를 얻고 *A. panax* 특이적 primer쌍을 이용해 위와 동일한 방법으로 PCR 증폭을 실시하였다. 이들 primer의 민감도를 측정하기 위하여 *Alternaria panax*의 게놈 DNA 양을 최고 40ng에서 500fg까지 조절한 다음 위와 동일한 방법으로 PCR 증폭을 실시하였다.

나) *A. gaisen*

A. gaisen 특이적 primer를 이용하여 *A. gaisen*에 대한 PCR의 특이성 및 민감도를 검정했다. *A. gaisen*과 형태적으로 유사한 *A. mail*, *A. tenuissima*, *A. alternaria*, *A. longipes*로부터 DNA를 얻고 *A. gaisen* 특이적 primer쌍을 이용해 위와 동일한 방법으로 PCR 증폭을 실시하였다. 이들 primer의 민감도를 측정하기 위하여 *Alternaria panax*의 게놈 DNA 양을 최고 10ng에서 500fg까지 조절한 다음 위와 동일한 방법으로 PCR 증폭을 실시하였다.

2) 신속한 추출방법을 이용한 DNA의 PCR

PCR 증폭반응을 통해 DNA를 얻기 위해 보다 간단한 방법이 연구되었다(Migheli and Cavallarin 1994). 약 5mg의 균사를 PDA 배지 상의 멸균한 셀로판 디스크 위에서 자란 콜로니의 가장자리로부터 얻은 후 150 μ l의 Tris-EDTA(TE buffer)를 첨가한 1.5ml Eppendorf tube에 옮겼다. 멸균된 이쭉시개를 이용해 buffer 내에서 균사를 마쇄했다. 그 후 tube를 액체질소에 4분간 처리했다. 동결 후 22 $^{\circ}$ C에서 녹이는 과정을 네 번 반복하고 65 $^{\circ}$ C water bath에 15분간 놓아뒀다. 이를 13,000rpm에서 10분간 원심분리 한 뒤 상층액을 새로운 Eppendorf tube에 옮기고 동량의 Chloroform/Isoamyl alcohol(24:1)을 첨가한 후 두 차례 강하게 흔들어 혼합했다. 13,000rpm에서 10분간 다시 원심분리 한 후 새로운 Eppendorf tube에 상층액 24 μ l를 옮겼다. 여기에 isopropanol 16 μ l을 넣어 DNA를 응집시키고 5분간 원심분리했다. tube에서 isopropanol을 제거하고 70% ethanol 60 μ l을 넣어 pellet을 세척한 뒤 5분간 원심분리했다. Laminar flow hood 아래에서 pellet을 건조시키고 20 μ l의 TE buffer로 용해시켰다. PCR에서는 이를 10배 희석해서 사용했다.

3) 인삼잎에서 병원균 검출 기술

A. panax 특이적 primer를 이용하여 이병조직으로부터 *A. panax*의 동정 및 검출을 실시하였다. 우선 이병 잎의 disk(지름 8.5mm) 3~4개를 0.1% Tween solution에 1분간 씻어낸 후, 1% sodium hypochlorite를 5분간 처리하고 멸균수를 이용해 3분간 씻어냈다. 70% ethanol에 1분 동안 한차례 더 표면소독하고 laminar flow chamber에서 건조시켰다. Eppendorf tube에 이를 넣은 후 3~4시간 동안 -70 $^{\circ}$ C에서 동결시켰다. 잎의 작은 disk를 멸균된 grinder와 유리 bead를 이용해 마쇄한 후 2 \times CTAB(2% CTAB(w/v), 100mM Tris-HCl(pH8.0), 20mM EDTA(pH8.0), 1.4M NaCl, 1% PVP) 400 μ l와 phenol chloroform isoprophyl alcohol(25:24:1) 400 μ l을 넣었다. 15분간 원심분리한 후에 새로운 Eppendorf tube에 상층액을 옮겼다. Isoamyl alcohol을 넣어 genomic DNA를 응집시키고 10분간 원심분리했다. 70% ethanol에 pellet을 세척한 뒤 건조시키고 TE buffer를 이용해 용해했다. PCR을 위해 10~100배로 희석했다. 대조구로는 건전한 인삼의 잎으로부터 추출된 DNA를 이용했다.

4) 진단 Kit의 포장검정

시제품 진단 Kit (Sun Genetics Co.)을 이용하여 이병조직으로부터 *A. panax*의 동정 및 검출을 실시하였다. 우선 이병 잎의 disk(지름 8.5mm) 3~4개를 시제품 진단 Kit을 이

용하여 게놈 DNA를 분리하여 *A. gaisen* 특이적 primer쌍을 이용해 위와 동일한 방법으로 PCR 증폭을 실시하였다.

C. 작물 주요병원균의 종 다양성 DNA profile의 database 구축 및 조기 진단 kit 개발

가. Bacterial strain과 배양 조건

세 번째 테마에서 사용된 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*을 포함한 기타 미생물은 농업생명공학연구원 유전자원과의 Korean Agricultural Culture Collection(KACC) 및 벨기에의 the Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (BCCMTM) 에서 분양받았으며, 이들의 출처에 대하여 각 표에 명시하였다. *Erwinia*, *Pectobacterium* 및 *Pseudomonas* 균주는 영양한천배지(nutrient agar: NA, DifcoTM), *Xanthomonas* 균주는 YGC배지(D-(+)-glucose 2.0%, CaCO₃ 2.0%, Yeast extract 1.0% :1L), *Fusarium* spp.은 potato dextrose agar(PDA, DifcoTM), *Escherichia coli*는 LB한천배지(Sambrook와 Maniatis 1989)에서 배양하였다.

나. Total DNA의 추출

배양된 균주의 총 DNA는 CTAB 방법으로 추출하였으며, 다른 미생물의 총 DNA는 Qiagen(Hilden, Germany)사의 게놈 DNA 추출 키트(Genomic-tips)을 이용하여 추출하였다.

다. 특이 염기서열 정보 탐색을 위한 blastn 프로그램 이용 분석

Xanthomonas 속 *Pectobacterium* 속의 각 종 또는 병원형을 검출하기 위한 특이 primer set의 제작을 위해 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 GenBank(www.ncbi.nlm.nih.gov/)에 등록된 유전체 정보 중 blastn 프로그램을 통해 다양성을 확인하고 primer를 제작하였다.

라. PCR 증폭 반응

PCR 증폭 반응은 PTC-200TM thermocycler(MJ Research, Watertown, Mass)를 사용하여 실시하였으며, 각 반응은 Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, MgCl₂ 1.5mM, 젤라틴 0.01%, dNTP는 각각 0.2mM, primer는 각각 10pM, 2unit의 Taq 중합효소(Taq polymerase,(Promega, Madison, Wis.)을 함유하는 PCR 혼합액으로 총50 μ l의 양으로 수

행하였다. PCR 혼합액에 첨가한 몇몇 미생물의 게놈 DNA 양은 약 50ng이었다.

반응은 94°C에서 5분간 변성하고 94°C 60초, 62°C(대상 균에 따라 다름) 30초, 72°C 60초로 25회 반복시킨 후 72°C에서 7분간 반응하였다. 증폭반응 후 8µl의 PCR 증폭산물을 1%농도의 agarose gel에 전기영동한 후 ethidium bromide에 착색시켜 자외선 조사기(UV transilluminator)에서 확인하였다.

마. 병 조직으로부터 병원균 검출

세 번째 테마에 의한 primer set를 이용하여 PCR 반응을 수행하였을 때 실제 병원균에 감염된 것으로 의심되는 발병 조직으로부터 1그램의 샘플을 채취한 후 게놈 DNA를 CTAB 분리법 (Murray and Thompson, 1980)을 통해 분리 한 후 개발된 primer set를 이용하여 상기 in vitro 상에서 실시한 PCR 조건으로 수행하였다.

2. 연구 개발 수행 결과 및 고찰

A. 고추역병균 진단 kit 개발

가. 국내 발생 주요 *Phytophthora* spp.의 분류학적 특성

첫 번째 테마에서 병 진단용 중 특이적 primer 개발에 공시된 고추역병균 *P. capsici*와 토마토 역병균 *P. infestans* 그리고 담배 역병균 *P. nicotianae*균주들은 각각의 발병한 기주들로부터 분리된 후 유주자낭 형태, 크기, 유두돌기 형태, 난포자 형성유무, 장정기 부착형태, 후막포자 형성유무 등의 형태적 특징과 병원성 등을 근거로 정확한 동정이 실시된 후 공시균주로 사용되었다(Fig. 4-1). *P. capsici*, *P. infestans*, *P. nicotianae* 공시균주들의 병원성을 조사하기 위해 각각의 분리기주의 유묘에 접종한 결과 접종된 기주작물들은 모두 수침상 병징을 나타냈으며 결국 완전히 고사된 것을 관찰할 수 있었다.

또한 이들의 형태적, 배양적 특성을 조사한 결과 고추로부터 분리한 *P. capsici*는 유주자낭의 크기가 평균 $44.2 \times 27.6 \mu\text{m}$ 이었고, 유두돌기가 뚜렷했으며, 레몬형 또는 둥근 타원형이 많이 관찰되었다. 교배형 관별균주들을 사용해 대치배양 후 난포자 형성을 유도시키면 장정기가 저장된 둥근 난포자를 관찰할 수 있었으며, 교배형은 A1과 A2형이 모두 존재했다. 감자로부터 분리한 *P. infestans*는 서양배와 장타원형의 탈락이 매우 쉬운 유주자낭이 관찰되었으며, 평균 $27.3 \times 20.6 \mu\text{m}$ 이었다. 또한, 저장의 장정기가 형성되어 난포자를 형성하는 자웅이주로 A1과 A2 교배형이 모두 조사됐다. 후막포자는 발견되지 않았다. 담배로부터 분리한 *P. nicotianae*는 크기가 평균 $43.1 \times 36.7 \mu\text{m}$ 의 유주자낭은 주로

구형으로 돌출형의 유도돌기를 가지며, 잘 탈락되지 않았다. 특징적으로 다량의 후막포자를 생성하며, 자웅이주로 장정기가 저장된 난포자를 형성했다. 따라서 이들을 Newhook (1983) 등의 방법에 따라서 종동정을 실시한 후 종 특이적 primer를 이용한 병원균 진단법 개발에 공시균주로 활용하였다.

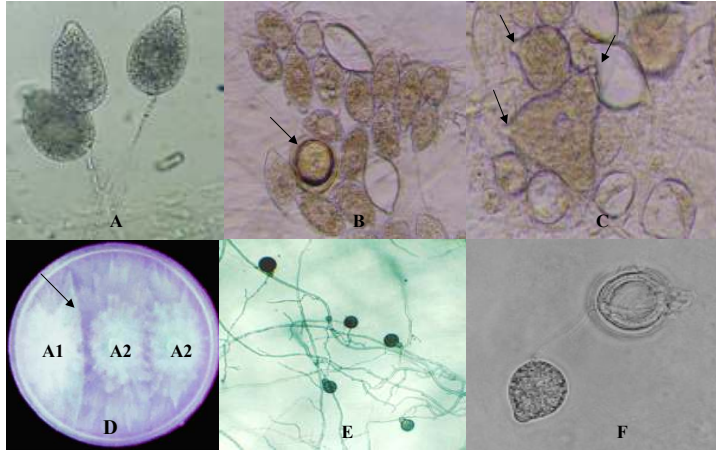


Fig. 4-1. Photographs showing various morphological characteristics of *Phytophthora capsici*. A; Sporangia of isolate, B; Oospore (→) and sporangia, C; One or two papilla on sporangia (→). D; Mating zone formed oospores, E; Sporangium originated from oospore.

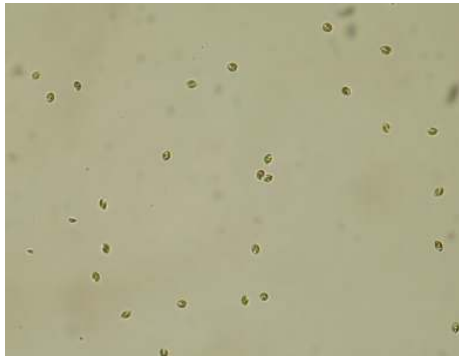
나. 병원균의 정량적 검출을 위한 단일세포 내 DNA 함량 조사

1) 단일 유주자 DNA 농도 정량

병원균의 정량화 및 병전반시 정확한 검출 가능성을 조사하기 위해 고추 역병균(*P. capsici*)의 순수한 유주자만을 분리하여 단일 유주자의 DNA 농도를 측정하였다. 수매전반을 통해 폭발적인 병전염을 일으키는 무성생식 기관인 유주자는 가장 중요한 병전반요인 중의 하나이며 단일 세포로 구성되어있기 때문에 병원균의 정량화에 있어서 중요한 기준이 된다. 또한 짧은 시간이지만 수매전반시 관개수와 양액배배시 양액내에서 주요 전반 형태인 유주자의 검출은 병 진단에 있어서 중요한 지표가 될 것이다.

대부분의 유주자탕에서 유주자는 10-20개 정도가 나출되었으며, 4℃에서 1시간 정도 정치시킨 후 유주자가 나출되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4-2). 본 연구의

genomic DNA 분리방법에 따라 유전자로부터 DNA를 분리한 후 단일 유주자의 DNA 농도를 추산한 결과 2.2-2.5 pg으로 나타났다(Table 4-9). 본 연구에서 개발된 고추 역병 특이적 primer의 PCR 증폭 민감도는 100 fg이므로 조사하고자 하는 샘플에 병원균의 포자 또는 세포가 하나라도 존재한다면 병원균의 존재를 확인할 수 있을 것으로 판단된다.



Zoospores released from sporangia

- Mycelial growth of *P. capsici* on V8 agar media.
- Incubation in the dark for 7 days.
- Induction of sporangia under light condition for one day.
- Release of zoospores from sporangia at 8°C for 1 hour.
- Mixing with water or soil.
- DNA extraction by NaOH, CTAB method.

Fig. 4-2. Single zoospores of *Phytophthora capsici*.

2) 단일 난포자 DNA 농도 정량

Novozym234와 다양한 크기의 sieve를 이용하여 순수한 난포자를 수집하였다(Fig. 4-3). 유주자의 DNA 분리 방법과 마찬가지로 DNA를 분리한 후 단일 난포자의 DNA 농도를 추산한 결과 평균적으로 4.5-5.5 pg의 농도를 나타냈다(Fig. 4-4, Table 4-9). 유주자의 경우와 마찬가지로 난포자 또한 조사하고자하는 샘플에 단일 포자가 존재한다면 개발된 종특이적인 primer를 활용한다면 고추역병의 발병가능성을 예측할 수 있을 것이다.

난포자는 세포벽이 두터워 토양에서 수년간 월동이 가능하고 그 이듬해에 1차 전염원으로서의 역할을 하기 때문에 재배예정지로부터 난포자의 검출여부는 매우 중요하다. 또한 재배기간 중 토양내 난포자의 형태로 존재시 일반적인 역병균의 균사나 무성생식 포자와는달리 선택배지를 이용할 경우라도 검출이 되지 않아 그 존재여부를 파악하기 매우 어렵다. 따라서 재배 토양내 병원균의 존재여부를 진단하는데 있어서 난포자의 존재여부에 대한 규명은 매우 의미있는 일이다.



Oospores of *P. capsici*

- Induction of oospores by mating between A1 and A2 isolates.
- Incubation of oospores in the dark for 2 months.
- Treatment of Novozym 234 after homogenizing agar blocks containing oospores.
- Collection of oospores through sieve 100, 50, 25 μm successively.
- Mixing with water or soil.
- DNA extraction by NaOH, CTAB method.

Fig. 4-3. Isolation of single oospores of *Phytophthora capsici*.

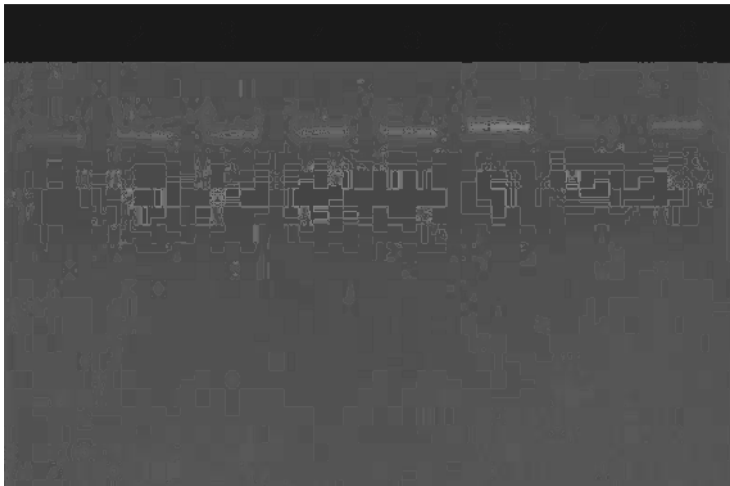


Fig. 4-4. The DNA content of zoospore and oospore cell of *Phytophthora capsici*. Lambda DNA marker (1): 100 pg, (2): 200 pg, (3): 400 pg, (4): 500 pg, (5): 1 ng, (6): 2 ng. Genomic DNA of *P. capsici*; (7): 10^2 zoospore /ml, (8): 10^2 oospore/ml.

Table 4-9. DNA content (Picogram, unit) per one cell of reproductive organs

Reproductive organism	DNA concentration
Zoospore	1.7 - 2.3
Oospore	4.0 - 5.0

다. 식물병원균 동정용 종특이적 DNA marker 개발

1) *P. capsici* 유전분석용 종특이적 probe DNA 선발

가) 형질전환된 clone내 임의로 삽입된 각 단편들의 특성

Probe DNA를 조제하기 위하여 공시균주 중 *Phytophthora capsici* CY3119의 genomic DNA를 Vieira와 Messing (1982)과 Sambrook 등 (1989)의 방법에 따라 cloning을 실시하였다. 선발된 plasmid를 *Hind*III로 처리한 후 전기영동을 실시하여 insert DNA의 크기를 확인하였으며, 이를 전이한 후 표지된 CY3119 균주의 genomic DNA를 probe로 이들과 hybridization을 실시하였다. Hybridization을 실시 후 진한 밴드를 나타내는 단편을 포함하는 clone들을 선발하여 labelling하고 종 특이적 분석에 유용한 probe로서의 이용가능성 여부를 조사하였다.

*Hind*III로 처리된 *P. capsici* 95CY3119 균주의 genomic DNA 단편들을 각기 임의로 형질전환 시킨후 checking buffer를 처리하여 agarose gel 상에서 전기영동을 실시한 결과, 다양한 크기의 삽입단편을 포함하는 clone들을 얻었다. Checking buffer의 처리로 대략 1,200개 세균 콜로니들에 대해 20시간 내에 형질전환 여부를 모두 확인할 수 있었다(data not shown). 또한 삽입된 genomic DNA 단편을 포함하고 있는지를 확인하고자 선발된 250개의 plasmid DNA들에 대해 *Hind*III를 처리한 후 전기영동을 실시한 결과 임의로 삽입된 다양한 크기의 genomic DNA의 단편이 나타났다(Fig. 4-5).

선발된 clone내 삽입된 각 단편의 특성을 조사하기 위해 *Hind*III로 처리된 plasmid DNA를 nytran membrane에 전이하였다. 그 후 labelling된 95CY3119 균주의 *Hind*III로 처리된 genomic DNA를 probe로 하여 hybridization을 실시한 결과 다양한 위치에서 밴

드들이 나타났다(Fig. 4-6). 이들 중 진한 밴드가 나타났던 clone pPC9, pPC15, pPC22 등에 포함된 DNA 단편들을 *P. capsici* genomic DNA 상에서 균의 유전적 특성분석에 활용되는 repetitive copy 염기서열을 갖는 단편으로 판단하여 RFLP 분석용 probe로써의 이용 가능 여부를 조사하기 위해 선발하였다.

또한 선발되는 Probe DNA의 특이성을 높이기 위해 진핵세포내 genomic DNA 상에 반수체당 200 copy 수를 갖는 것으로 알려진 ribosomal DNA를 probe로 하여 hybridization을 실시하였으며, 이들과 반응을 하지 않는 clone들을 선발하였다. 본 연구에서 유전분석용 probe로 적합할 것으로 여겨진 pPC9와 pPC22와는 반응하지 않았다(data not shown). 따라서 이들 probe DNA는 rDNA 염기서열을 포함하지 않음을 알 수 있었다.

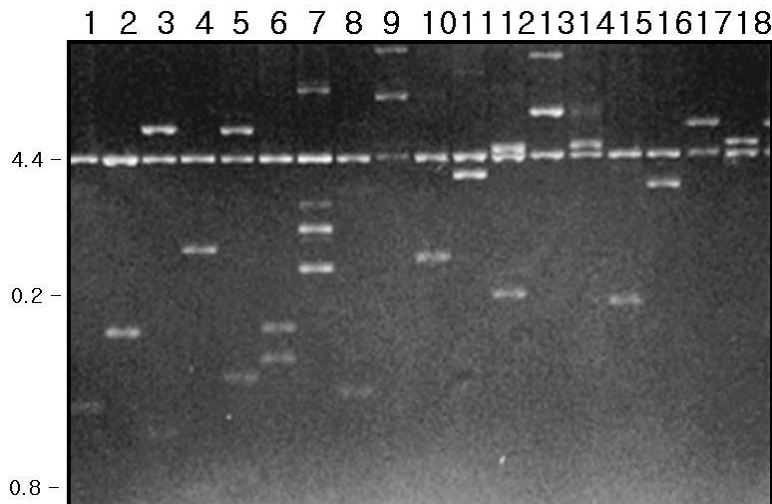


Fig. 4-5. Agarose gel electrophoresis of *Hind*III-digested clones from genomic DNA of *Phytophthora capsici* isolate CY3119. Lanes presented 1; pPC21, 2; pPC3, 3; pPC6, 4; pPC9, 5; pPC10, 6; pPC15, 7; pPC17, 8; pPC19, 9; pPC20, 10; pPC22, 11; pPC24, 12; pPC25, 13; pPC27, 14; pPC29, 15; pPC30, 16; pPC33, 17; pPC45, 18; pPC48.

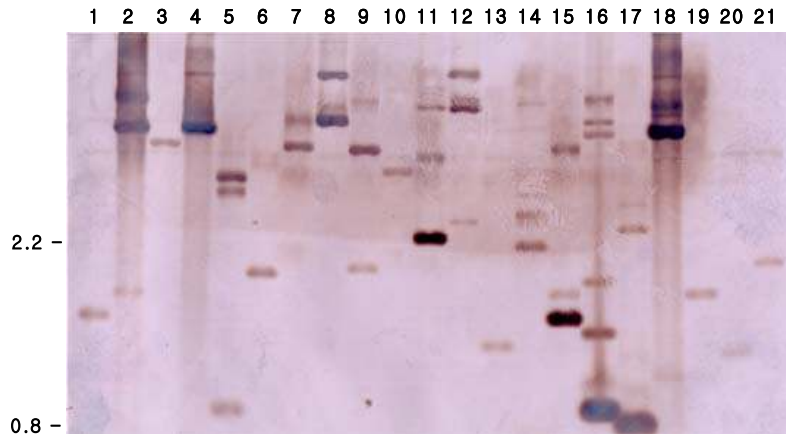


Fig. 4-6. Hybridization of genomic clones (pPC) obtained from *Hind*III-digested genomic DNAs of *Phytophthora capsici* isolate 95CY3119 with *Hind*III-digested genomic DNAs of *P. capsici* isolate 95CY3119. DNA fragments inserted into individual clones, which are strongly hybridized with *Hind*III digests of *P. capsici*, were selected for using probe. Lanes presented 1; pPC52, 2; pPC49, 3; pPC48, 4; pPC45, 5; pPC33, 6; pPC30, 7; pPC29, 8; pPC27, 9; pPC25, 10; pPC24, 11; pPC22, 12; pPC21, 13; pPC20, 14; pPC19, 15; pPC15, 16; pPC10, 17; pPC9, 18; pPC17, 19 pPC3, 20; pPC21, 21; pPC16.

나) *P. capsici* 종특이적 probe DNA의 선발

Hybridization에서 95CY3119 균주의 genomic DNA probe에 의해 진한 밴드가 나타났던 각 clone내의 삽입단편을 agarose gel로부터 추출하여 labelling 한 후 종특이적 probe로서의 이용가능성 여부를 조사하였다. 선발된 clone들 중 pPC9은 대략 0.7kb 크기의 DNA 단편으로 PC9을 probe로 *Hind*III 처리된 *P. parasitica*, *P. infestans* 그리고 *P. capsici*의 genomic DNA와 hybridization을 실시한 후 나타난 밴드양상을 비교하였다 (Fig. 4-7). *P. capsici*와 기주범위 및 형태적인 특성이 유사한 *P. parasitica*와 *P. infestans*에서는 1-2개의 진한 밴드만 형성되어 다수의 밴드가 나타난 *P. capsici*의 균주들과는 종간에 밴드양상의 차이를 나타냈다. 또한 다양한 지역으로부터 수집된 국내 고추역병균 *P. capsici* 균주들간에 다양한 밴드패턴을 형성시켜 이 병원균 집단내 유전적

으로 다양한 변이가 존재한다는 것을 나타냈다(Fig. 4-8). 한편, 최종 선발된 probe pPC22를 이용하여 33개 포장으로 분리된 94개의 균주들의 genomic DNA와 hybridization을 실시한 결과, *P. capsici* 균주들과는 30-40개의 밴드를 형성한 반면, *P. capsici*와 형태적으로 유사하며 기주범위도 유사한 *P. infestans*, *P. nicotianae*등과 국내에서 발생하는 *P. cryptogea*, *P. palmivora*, *P. citricola*, *P. megasperma*, *P. boehmeriae*, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora*, *P. erthroseptica*, *P. cambivora* 등 11종의 *Phytophthora* spp.들에게는 전혀 반응을 나타내지 않았다(Fig. 4-9).

Phytophthora 속의 종동정과 식물체에서 병원균의 직접 검출을 위해 cloning된 DNA probe는 지속적으로 개발되어져 왔다. Goodwin 등(1990a, 1990b)은 *P. parasitica*의 동정과 기주조직에서의 병원균 검출에 있어서 genomic DNA로부터 얻어진 clone된 DNA probe를 이용했다. 또한 Goodwin 등(1990b)은 probe를 이용하여 감염된 식물체 조직으로부터 *P. citrophthora*를 검출했으며, Judelson & Messenger-Routh(1996)는 *P. cinnamomi*를 Avocado 열매로부터 검출해냈다. 그 밖에도 Lee 등(1993)은 *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. megakarya*, *P. palmivora* 등에 대해 ribosomal ITS 영역의 단편을 probe로 이용하여 이들을 각기 종특이적으로 식별하였다. 따라서 선발한 pPC22에 포함된 단편의 특성을 좀 더 밝히면 추후 종내 형태적 특성과 변이가 심한 *P. capsici*의 정확하고 신속한 동정과 토양이나 식물체의 이병부로부터의 병원균의 신속한 검출에 매우 유용하게 활용이 가능할 것으로 판단된다.

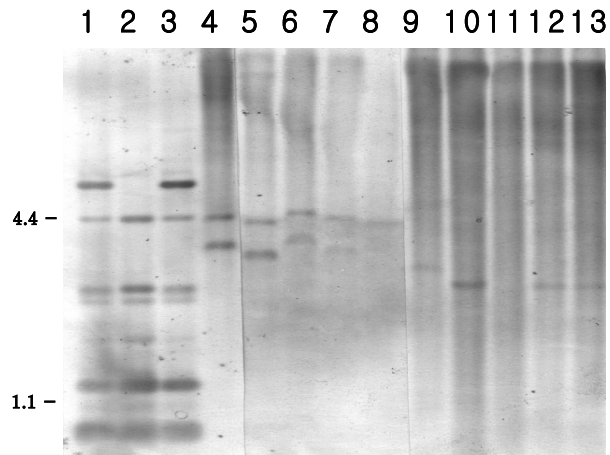


Fig. 4-7. Hybridization of pPC9 to *Hind*III-digested genomic DNAs of *Phytophthora* spp. Isolates from left 1-3: *P. capsici*, 4-8: *P. parasitica*, 9-13: *P. infetans*.

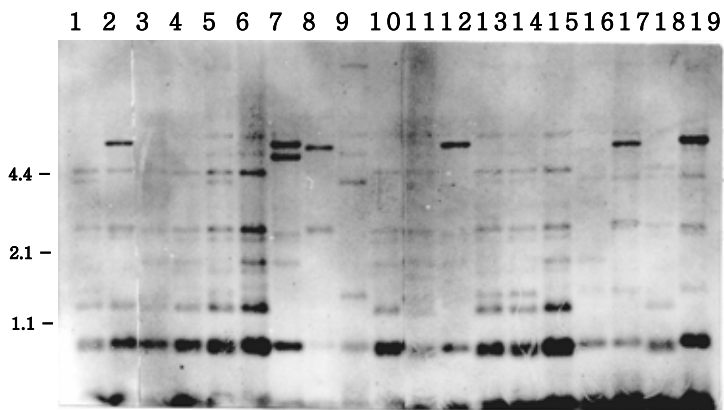


Fig. 4-8. Hybridization of pPC9 to *Hind*III-digested genomic DNAs of *Phytophthora capsici* from various origins. The lanes contained DNA from isolates as follow: 1; 95CA8203, 2; 95CY8101, 3; 95CC7301, 4; 95CC7111, 5; 95CY6229, 6; 95CD5107, 7; 95CH5108, 8; 95CY4203, 9; 95CC4201, 10; 95CC4107, 11; 95CD3207, 12; 95CG3113, 13; 95CC3501, 14; 95CC3402, 15; 95CC3318, 16; EGG, 17; 95CP2101, 18; 95CY2131, 19; 95CY1102.

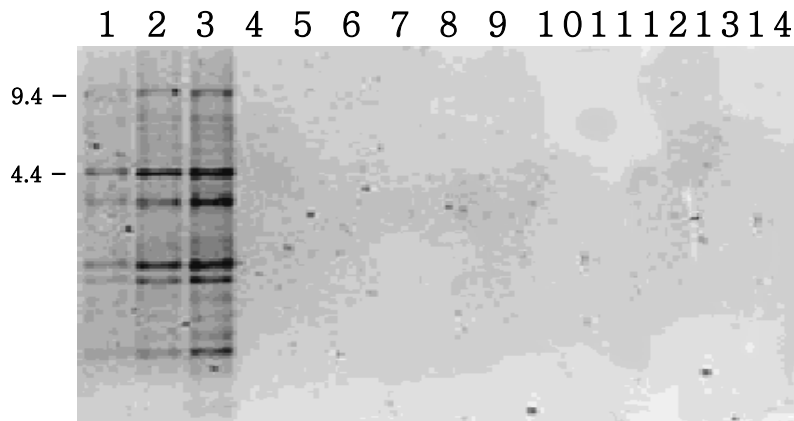


Fig. 4-9. Hybridization patterns of *Hind*III-digested genomic DNAs of *Phytophthora capsici* from pepper and the other *Phytophthora* species or isolated from the different hosts, hybridized with species-specific probe pPC22. The lanes contained DNA from as follow: 1-3; *P. capsici*, 4; *P. infestans*, 5; *P. parasitica*, 6; *P. cryptogea*, 7; *P. palmivora*, 8; *P. citricola*, 9; *P. megasperma*, 10; *P. boehmeriae*, 11; *P. cinnamomi*, 12; *P. citrophthora*, 13; *P. erthroseptica*, 14; *P. cambivora*.

2) *P. capsici* 동정용 특이 primer 제작

가) 종특이적 단편(PC22)의 염기서열 분석

*P. capsici*의 종특이적 DNA 단편인 PC22를 포함하고 있는 pBR322을 대량 증식한 다음 plasmid를 추출하고 그로부터 insert DNA를 sequencing 하였다. vector로 사용된 pBR322 plasmid는 각각 제한효소 위치에 sequencing primer가 고안되어 있기 때문에 용이하게 염기서열분석을 할 수 있었다. 염기서열분석은 (주)제노텍에 의뢰하여 수행하였으며 한번 반응시 약1,000~1,400bp 씩 염기서열을 분석하므로 총 2번에 걸쳐 반응을 실시하였고 첫 번째는 pPC22의 바깥쪽에서부터 한 번 반응을 한 후 해석된 염기서열을 바탕으로 내부에 primer set를 다시 제작하고 안쪽까지 sequencing을 하여 최종적으로 2,401bp의 유전정보를 얻을 수 있었다(Fig. 4-10).

1	AAGCTTTCTG	GCTCGGGGAC	GTGGTAGATC	TCCCACATCA
41	CCCTTTAGGA	ATTTGATGAG	ATCCGCTAAC	ACTGGGTCTT
81	GGTTCTGGTG	CGCTTTGATC	CACCTCCATC	GTTCCGCTGG
121	AACACAAGTG	GTCCCATAGG	ATCTCCGGGG	AGTTCCTCAT
161	TTCGAACTTG	CGCACGAGTC	ACAGCTATTA	GCACCTTGGC
201	CGCTAACGGC	AATGGGGCAC	ACGCTGCTGC	AGGGCTCGGT
241	TCTTCAGTCG	TGTGAATCCT	GGGAACCATG	ATTCTTTGAG
281	ACTTGAGCGT	CGGGCTCTTC	AGAGACATGG	GGCTTCATCA
321	ACTTCTCGTG	GATCTTGGAC	ACCAGACGTA	AGTGAGTATA
361	CTCGTCAGCG	TCCTCGACTT	GCCTCGATTT	ACCCATAACC
401	AACGTCTTTG	ACGTGAGGTA	ATCTGCTGCC	TGGTTGTATT
441	CCCGTTTCAC	ATGCACCAGC	CGCAGAATCC	GGAATTTGTC
481	TTTCAGAGAT	TCAAACCTCCG	CCAAACGTCG	TTGCAAGTAC
521	GGTTGATTGC	AGTTAATTAT	GCCCTGGGCC	TGTTGAATGG
561	CAATGCGTGA	GTCTCCAACA	ACCACGGGTT	CTTGGGATCC
601	CACGCCTCAG	GGCTATCTTC	AGCCCGTTCA	CCAGTCCGCA
641	ATACTAGAAT	CGTTGACCGT	GACATCAGTC	AAGGCGAAAC
681	CTTGAGCTTC	AAGGACGTTT	CTTCCGGGAA	GTTCCCAGAG
721	TATACATCCA	CAACTTCCGA	GGCGTGTTGA	TATCTTTGGG
761	GCTCCATCGA	AACTCAGAAC	ACATCCACTG	TAGTCAGCCT
801	CCAACATCTC	CACGCTAATC	GGTGCCGGAG	GTTTAACACG
841	CCCCTTGGCC	GGAATCAAAT	TCTCAGAGAC	TTCATCGAGA
881	TGTTCTCTGG	GGGTGATGCC	GGCTCCCAGT	ATAGCGGGGA
921	GTCCATCTTC	ATCCC GTTG	ACCCTGAGGA	TTTCCAAATT
961	CCAGTGAGAT	AACATCAGCC	CCCATTTGAC	GAATCTGCCA
1001	TCCGCAGAAC	TCGAGGTCAA	TAGCCACTTC	AAGGCTGAAT
1041	AGCGGGTATA	CACAATGATC	ACTGGGCTCG	ACTGTACCAA
1081	AGCCCTGAAA	TTTTCCAGGA	CTCTAAGAAT	CGCGACAACC
1121	TCCTTCTCGG	CGATGTGATA	TCGTAGCTCG	GAATCATTCA
1161	ACACACGTCC	TGTGAAACGG	ACCGGATGGA	TTACTCCATC

(continue)

1201	GTATTCCTGG	CCTAGGACCG	CTGCAGCCCA	CGGGTTTGCG
1241	TGTGGAATAA	TGACAAACGG	CCTCGCACGA	TCTGGATGTC
1281	TGAGAAGTGG	AGTCGACACG	ATCTTGAGTT	TCAGAATCTC
1321	GAAGGCTTCC	TTGGCACGGG	TCAAGTCCCT	CCCGGCTCGG
1361	ATCTGTTTAT	CTGTCAACTC	GTACAGCGTA	GCGGCGATCA
1401	CGGGTAAGTC	CTGAATGAAC	TTATTGTAGT	AATTCAGACT
1441	CCCCATGAAG	CTGTGTACGC	CCTTGAGTGT	CGACGGGAAT
1481	GGCAATTCTT	GGACTCCTTT	GGCAACCTTC	GGAGTGGCCC
1521	TCAATCCTTC	AGCACTAATC	TCGTGCGACA	AGTACGGGAT
1561	CGAAAGTTTT	CCAAATTCAC	TCTTAGGCAA	ACTCACAGAA
1601	ATATTCCAAT	ATCGCAACCT	GAAAAGTAGC	GCGTTCAGAT
1641	CTTCACAGAG	CTGGTCCCAA	GTTGGAGCAC	CATGCGCGAT
1681	GTCGTCAATG	TAGGAACTTC	GACCTAACAC	CGGCCCCGATA
1721	AAGGACGGGA	TAGGGATGTT	TCTCTGAAAG	ACAGTCATCT
1761	GTTTGGTGAG	TGCAGTTGAT	CCTGACCTTG	AGACGTCATT
1801	CTCAGAAAGC	GCGAGGGGAT	TCTCAGACCC	TTGAGGCGTC
1841	ATCTTCAGGA	AATCCAATAC	GTCAGAATCG	ACATCTGCTT
1881	CCTCTTCAGG	TGACAGCCGT	GTGAGATTGC	TATTTCCGGT
1921	TTTCGAGCGA	ACGGTCGCGG	CTCTCTATAT	GTGTGTGTGG
1961	GATATACGGC	TTCGGGAGAA	AGGGGGCTGG	GACGCGGCTG
2001	ATATGTACCG	GTTCTGTGGT	GTAATATTTT	GCTTTATGGA
2041	TTCATCCTTC	GCCTGTTTGT	AAAGGGGTCC	AACGGGTG
2081	AAGTGCTACC	CAAGACTGTG	CACAAGTCTG	GGCATACTAG
2121	CACTCAGTCC	AACCACCGGA	CTTTCCCCGA	CGACGAGTGC
2161	CTAAGTTCTG	GCGGAAAGTC	TCTCAGATTG	AATGTATCTC
2201	TGAGAGACCT	CGTCCCGTTA	CACCCATGTG	CGACGATTGA
2241	CGGTTCAAGG	ATCCTAACCA	AGACCCACAA	GACCCAAGAG
2281	GCCCGAAGTG	CCCAAGTGTC	ATATGCCGTA	CGTCGCCTAC
2321	CCAAGACACC	CCTGAGGACG	TTGTGTGCAT	TGAGCATTGA
2361	AGCTCTGCAC	CCGGAATCAT	CGTCTCAAGT	CAGGATCAAG
2401	C			

Fig. 4–10. Sequencing data of species-specific DNA fragment(PC22). Bold letter indicates each primer site designed in this study.

나) PCR 증폭을 위한 종특이적 primer set의 설계

Primer 설계 프로그램(Gene Runner, Hastings software Inc.)을 이용하여 primer 자체 hairpin loop를 형성하지 않으면서 primer들 사이에서 dimer나 internal loop가 형성되지 않게 하였다. 또한 각각의 primer들의 annealing 온도를 비슷하게 하기 위해 GC 함량을 약 50% 정도로 비슷하게 하여 설계하였다.

먼저 1차적으로 세 쌍의 PCR primer (A: 22R1P, B: 22R5, C: CSP1, D: CSP2, E: 22H5, F: 22H1P)가 종특이적 단편의 염기서열정보를 바탕으로 설계되었다. 이들 primer set들을 이용하여 종특이적 단편을 포함하고 있는 clone pPC22를 PCR 증폭한 결과 product size는 각각 A-F : 1434bp, B-E : 559bp, C-D : 350bp로 나타나 염기서열 분석 결과와 비교하여 같은 크기의 증폭산물들을 확인할 수 있었다. 또한 *P. capsici*의 genomic DNA도 PCR 증폭한 결과 pPC22에서와 똑같은 크기의 산물을 증폭하는 것으로 보아 본 primer들이 안정적으로 설계되어 genomic DNA에서도 효과적인 증폭이 가능하다는 것을 알 수 있었다(Fig. 4-11).

2차적으로 8쌍의 설계된 prime set를 이용하여 *P. capsici*를 포함한 *P. cactorum*, *P. sojae*, *Colletotrichum sp.*와 *Alternaria alterna*. 등의 5균주를 선발하여 PCR을 수행하였다(Fig. 4-12). 그 결과 CSP23A, CSP23B의 조합을 비롯한 5개 primer 조합의 PCR 증폭에서 고추역병균에 대한 다양한 크기의 특이적인 증폭산물이 나타났다. 따라서 이들을 새로운 종특이적 primer로서 유력한 후보로 선발하였다.

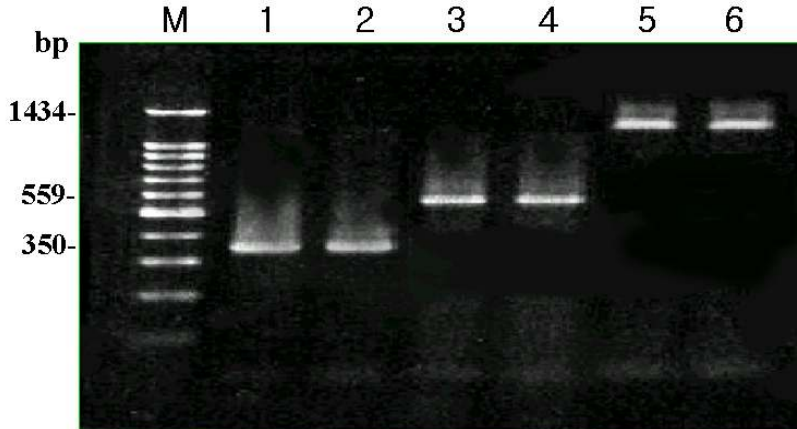


Fig. 4-11. PCR amplification of genomic DNA obtained from *P. capsici* and clone pPC22 with each primer set. Lane 1, 3, 5: genomic DNA of *Phytophthora capsici*, lane 2, 4, 6: clone pPC22 DNA. Lane 1, 2 (A): CSP23A/CSP23B, lane 3, 4 (B): 22R5/22H5 lane 5,6 (C): 22R1P/22H1P.

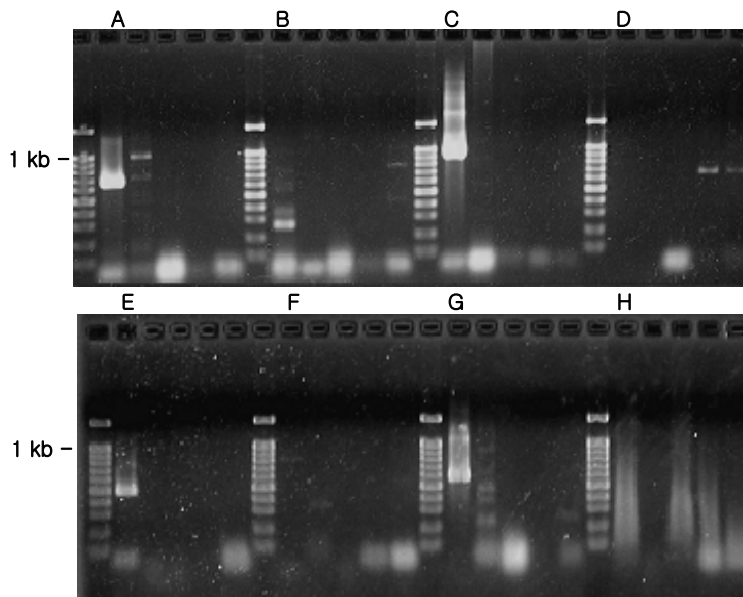


Fig. 4-12. Selection of species-specific primer set. Group A: CSP1/CSP23B, B; CSP2/CSP23A, C; CSP21A/CSP23B, D: CSP21A/CSP2, E: CSP22A/CSP2, F: CSP22A/CSP23B, G: CSP23A/CSP23B, H: CSP1/CSP2A. Each first lane is *Phytophthora capsici* genomic DNA, and follow *P. sojae*, *P. cactorum*, *Colletotrichum* sp. and *Alternaria alternata*.

라. 선발된 종특이적 primer의 제반 특성 및 활용

1) 종특이적 primer set CSP23A/CSP23B의 PCR 증폭 특성

가) CSP23A/CSP23B의 *P. capsici* DNA에 대한 특이적 증폭

Primer들의 종특이적 DNA 증폭 특성을 확인하기 위해 *P. capsici* 외에 이와 유사 종들인 *Phytophthora* spp. 그리고 고추를 기주로 하는 여러 종의 병원진균과 부생균을 이용하였다. 사용한 모든 DNA는 ITS 1과 ITS 4 primer로 증폭을 미리 실시하여 안정적으로 증폭이 되는 균주들만 사용하여 실험상의 오차를 최소화하였다(Fig. 4-13).

Primer set 22R1P와 22H1P를 이용하여 각기 공시균주들의 genomic DNA로 Hot start PCR을 수행했을때 *P. capsici*외에도 여러 균주에서 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 4-14). 이는 종특이적 염기서열을 포함하는 것으로 판단되는 PC22의 염기서열들이 모두 종특이적이지는 않으므로 *P. capsici*만 특이적으로 증폭하기 위해서는 이 영역 내에서 적당한 primer site를 찾을 필요가 있다. 또한 PCR 조건이 맞지 않아도 non-specific한

밴드들이 나올 수도 있기 때문에 annealing 온도를 1°C씩 높여가며 실험을 하였지만 다른 lane의 밴드와 함께 *P. capsici* lane의 밴드도 함께 사라져갔다. 이것은 이 primer site가 *P. capsici*에만 특이적으로 작용하지 않기 때문이다. 따라서 본 primer는 *P. capsici*에 특이적인 검출과 동정을 위한 primer set으로 적합하지 않았다.

이어서 primer set 22R5와 22H5를 이용하여 PCR을 수행한 결과도 마찬가지로 1번 lane인 *P. capsici* 외에도 여러 균주에서 밴드를 확인할 수 있었다. 따라서 본 primer도 역병균에 특이적인 primer로 사용될 수 없었다(Fig. 4-15).

Primer set CSP23A와 CSP23B로 PCR을 수행한 결과 국내의 다양한 고추 재배 포장으로부터 선발한 고추역병균 *P. capsici*의 genomic DNA에서는 350bp의 증폭산물을 형성했으나, 다른 종의 공시균주들에는 증폭산물을 형성하지 않았다(Fig. 4-16). 이것은 이 primer set이 *P. capsici*에 특이적으로 작용한 결과이며, *P. capsici*의 genomic DNA에 특이적으로 포함되어 있는 영역들이라는 것을 말해준다. CSP23A와 CSP23B로 증폭된 산물이 *P. capsici*의 genomic DNA에 동일하게 존재하는지를 알아보기 위해 nylon membrane에 transfer 하고 *P. capsici*의 genomic DNA 단편인 PC22를 Dig-kit로 labelling하여 probe를 제조한 후 southern hybridization을 실시한 결과 *P. capsici*에서만 증폭산물과 동일한 위치에서 밴드가 형성되었다. 이는 PCR을 통해 증폭된 350bp 크기의 단편이 primer set에 의해 비롯된 DNA 단편이라는 것을 증명시켜 주는 결과로서 *P. capsici*의 특이적 동정과 검출에의 이용 가능성을 확인할 수 있었다.

또한 전국 각지에서 수집하였고 유전적으로 다양한 *P. capsici*의 genomic DNA를 분리하여 종특이적 primer로 선발한 primer set CSP23A/CSP23B를 가지고 PCR을 수행한 결과 350bp의 동일한 product를 확인할 수 있었다. 따라서 조사된 모든 *P. capsici*가 본 primer site의 특이적 염기서열을 포함하고 있어 PCR을 통해 안정적으로 증폭이 된다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4-17).

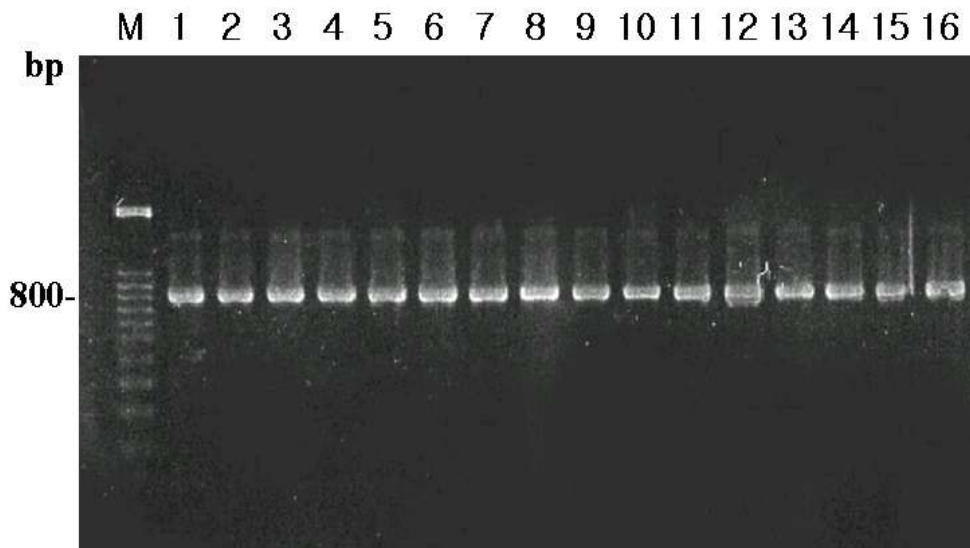


Fig. 4–13. The PCR products of ITS (Internal transcribed spacer) region of isolates with primer ITS 1 and ITS 4. (M): marker (100bp ladder), (1) *Phytophthora capsici*, (2) *P. parasitica*, (3) *P. infestans*, (4) *P. cactorum*, (5) *P. citricola*, (6) *P. cinnamomi*, (7) *P. citrophthora*, (8) *P. cambivora*, (9) *P. palmivora*, (10) *Pythium* sp., (11) *Fusarium* sp., (12) *Colletotrichum* sp., (13) *Alternaria solani*, (14) *A. alternata*, (15) *Penicillium* sp., (16) *Stemphylium lycopersici*.

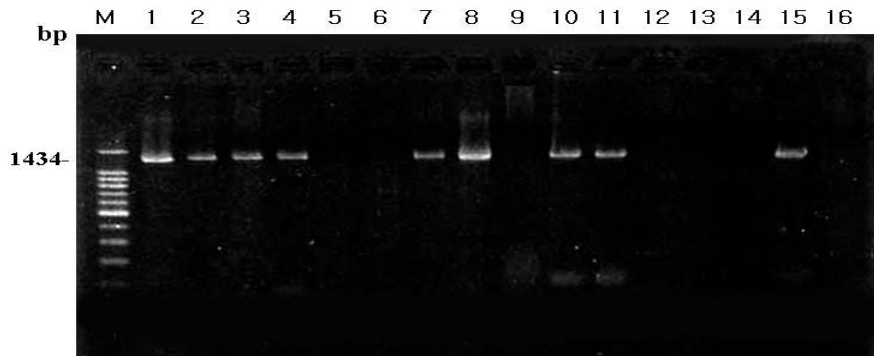


Fig. 4–14. PCR amplification of various isolates including *P. capsici* using 22R1P and 22H1P as a primer set. (M): marker (100bp ladder), (1) *P. capsici*, (2) *P. parasitica*, (3) *P. infestans*, (4) *P. cactorum*, (5) *P. citricola*, (6) *P. cinnamomi*, (7) *P. citrophthora*, (8) *P. cambivora*, (9) *P. palmivora*, (10) *Pythium* sp., (11) *Fusarium* sp., (12) *Colletotrichum* sp., (13) *Alternaria solani*, (14) *A. alternata*, (15) *Penicillium* sp., (16) *Stemphylium lycopersici*.



Fig. 4–15. PCR amplification of various isolates including *P. capsici* using 22R5 and 22H5 as a primer set. (M): marker (100bp ladder), (1) *P. capsici*, (2) *P. parasitica*, (3) *P. infestans*, (4) *P. cactorum*, (5) *P. citricola*, (6) *P. cinnamomi*, (7) *P. citrophthora*, (8) *P. cambivora*, (9) *P. palmivora*, (10) *Pythium* sp., (11) *Fusarium* sp., (12) *Colletotrichum* sp., (13) *Alternaria solani*, (14) *A. alternata*, (15) *Penicillium* sp., (16) *Stemphylium lycopersici*.

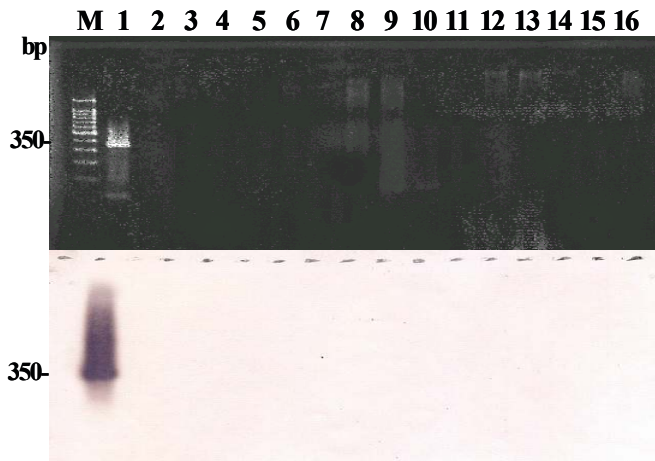


Fig. 4–16. Upper: PCR amplification of *Phytophthora* spp. and other fungi using CSP23A/CSP23B as a primer set. Below: Southern hybridization by probe PC22 to PCR product of various pathogen isolates used. (M): marker (100bp ladder), (1) *P. capsici*, (2) *P. parasitica*, (3) *P. infestans* (4) *P. cactorum*, (5) *P. citricola*, (6) *P. cinnamomi*, (7) *P. citrophthora*, (8) *P. cambivora*, (9) *P. palmivora*, (10) *Pythium* sp., (11) *Fusarium* sp., (12) *Colletotrichum* sp., (13) *Alternaria solani*, (14) *A. alternata*, (15) *Penicillium* sp., (16) *Stemphylium lycopersici*.

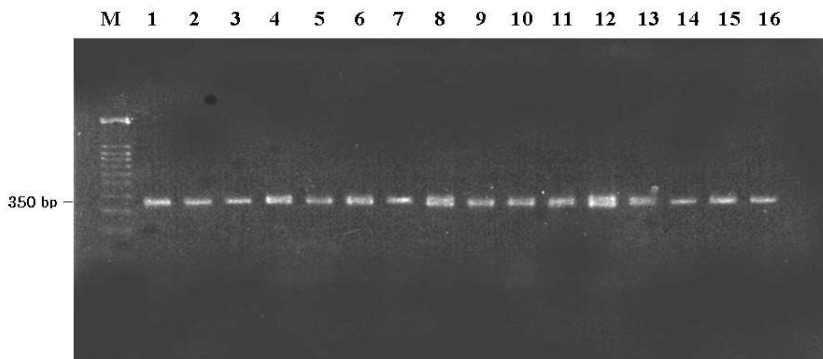


Fig. 4–17. Band pattern of electrophoresis of PCR amplification product obtained from various isolates of *P. capsici* using the species–specific primer set, CSP23A /CSP23B. (M): marker (100bp ladder), (1) 20CG0001, (2) 20CG0002, (3) 20CC0005, (4) 20CC0007, (5) 95CG3413, (6) 95CG3418, (7) 95CG3407, (8) 95CD3208, (9) 95CP2102, (10) 95CY1102, (11) 95CD7102, (12) 95CH5100, (13) 95CS6105, (14) 95CC7203, (15) 95CY8100, (16) 95CA8310.

나) Genomic DNA 농도별 증폭 감수성

20CG0001 균주의 genomic DNA를 spectrophotometer(U-2001, Hitachi Co.)로 농도를 측정하고 10ng, 5ng, 1ng, 500pg, 100pg, 50pg, 10pg, 5pg, 1pg, 500fg, 100fg, 50fg, 10fg, 5fg, 1fg의 15단계로 조정된 후 CSP23A와 CSP23B primer set을 이용하여 Hot start PCR 증폭을 실시하였다. PCR에서 생긴 산물은 genomic DNA 증폭 때와 마찬가지로 크기가 350bp였으며 농도에 따라 band의 intensity가 달리 나타났으며, 500fg까지 밴드가 나타났다(Fig. 4-18).

Genomic DNA를 농도별로 희석하여 증폭한 PCR 생성물에 대해 PC22를 probe하여 hybridization을 실시한 결과도 마찬가지로 농도별로 band의 intensity에 차이가 있었다. 또한 농도가 높은 쪽은 band가 굵고 진하게 나타났으며, 농도가 낮아질수록 band도 얇아졌다. 특히 이 방법에서는 50fg까지 검출이 가능하였다. 이와 같은 사실은 Hot start PCR을 통하여 매우 낮은 농도의 DNA로도 검출이 가능함을 확인시켜 주었으며, southern hybridization을 통해서 보다 낮은 농도에서도 DNA를 검출할 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

일반적으로 알려진 1개의 cytoplasm에 들어있는 DNA의 양은 균마다 모두 다르며 *Phytophthora* 속균의 경우 *P. infestans*는 0.95pg, *P. palmivora*는 0.15 ~ 0.17pg, *P. drechsleri*는 0.45pg이다(Erwin and Ribeiro, 1996). 한편, 본 연구에서 *P. capsici*의 조사 결과에 있어서는 유주자와 난포자 단일 포자 모두에게서 최소 2pg 이상의 DNA 농도를 함유하는 것으로 조사된 것으로 미루어 *Phytophthora* spp. 균주들은 최소한 1개의 cytoplasm에 0.2 ~ 0.5pg 이상의 DNA가 들어있다고 가정할 수 있을 것이다. 따라서 개발된 종특이적 primer가 반응할 수 있는 500fg의 DNA 양 검출능력은 Hot start PCR을 수행할 경우 시료속에 1개의 포자가 있을 경우에 검출 가능한 양이며 Southern hybridization의 경우 0.1개의 포자를 검출할 수 있는 양이다. 따라서 이처럼 미세한 양의 DNA도 검출할 수 있으므로 이병조직 혹은 이병토에서 아주 낮은 밀도로 존재하는 *P. capsici*라도 검출이 가능할 것으로 판단된다.

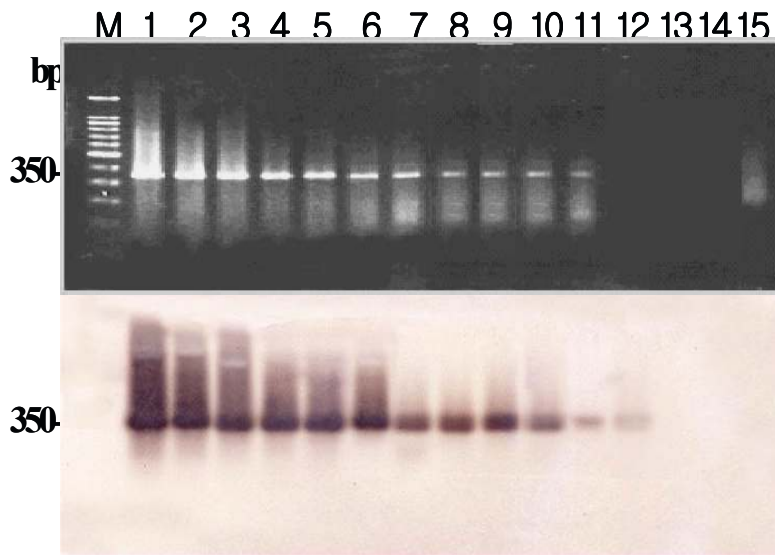


Fig. 4-18. Sensitivity of the primer set, CSP23A/CSP23B, on *Phytophthora capsici*. Upper: PCR amplification, Below: Southern hybridization. (M) marker (100bp ladder), (1) 10ng, (2) 5ng, (3) 1ng, (4) 500pg, (5) 100pg, (6) 50pg, (7) 10pg, (8) 5pg, (9) 1pg, (10) 500fg, (11) 100fg, (12) 50fg, (13) 10fg, (14) 5fg, (15) 1fg.

다) 유사종 DNA 혼합액으로부터 *P. capsici*의 특이적 검출

첫 번째 테마에서 선발된 primer set CSP 23A와 CSP 23B를 이용하여 *P. capsici*의 종 동정 및 검출에 사용할 수 있는지 여부를 확인하였다. *Phytophthora* spp.들은 형태적으로 매우 유사할 뿐 아니라 *P. capsici* 내에서도 유전적 특성이 매우 다양하고 형태적으로도 변이가 많기 때문에 형태적인 특징만으로 분류를 하기엔 매우 전문적인 지식을 요구하며 또한 그 시간이 너무 많이 걸린다. 따라서 선발된 primer set을 이용하여 빠른 시간 안에 정확히 고추 역병균을 동정 및 검출할 수 있는 기술은 식물병리학이나 병방제 측면에서 매우 중요하다고 하겠다. 이를 위해 고추 역병균과 형태적으로 유사하여 *Phytophthora* 분류체계상 같은 II group에 속해 있는 *P. parasitica*, *P. palmivora*, *P. boehmeriae*, *P. citrophthora*와 우리나라 뿐만 아니라 세계적으로 막대한 피해를 주고 있는 감자역병균 *P. infestans*를 *P. capsici*의 DNA와 같은 비율로 혼합한 후 CSP 23A와 CSP 23B primer set을 가지고 PCR 증폭을 실시하였다. 그 결과 *P. capsici*가 들

어있는 lane에서만 모두 350bp의 PCR 산물이 생성되는 것을 확인할 수 있었으며 들어 있지 않은 lane에서는 전혀 밴드를 형성하지 않았다(Fig. 4-19).

따라서 *P. capsici*의 DNA만 순수하게 존재하거나 다른 균들의 DNA와 혼합되어 있어도 *P. capsici*의 DNA가 미량만 있다면 본 primer를 가지고 PCR을 수행함으로써 정확하고 빠르게 검출 및 동정이 가능하였다. 실제 *P. capsici*를 형태학적인 특징만으로 동정하기 위해서는 많은 시간이 필요하지만 이처럼 본 논문에서 개발한 primer set을 이용한다면 균동정을 쉽고 빠르게 할 수 있을 것이다.

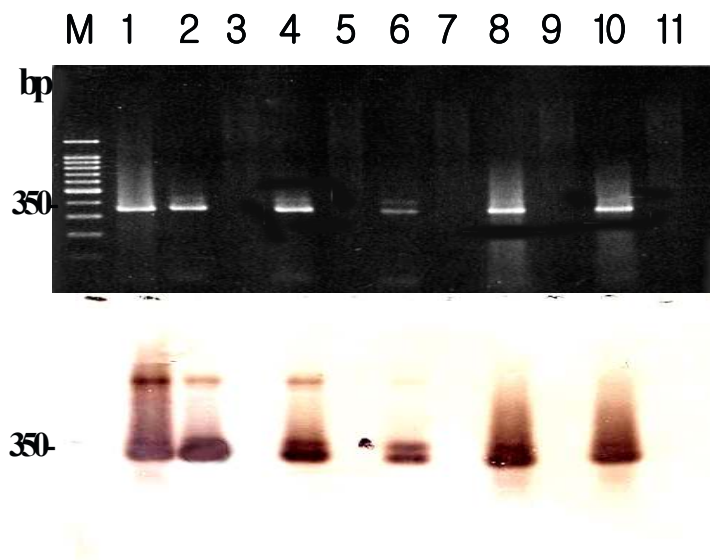


Fig. 4-19. PCR amplification of *P. capsici* and other *Phtophthora* spp. DNA mixtures using CSP23A/CSP23B as the species specific primer set. Upper: hot start PCR amplification, Below: Southern analysis of these products with probe PC22. (M) marker (100bp ladder), (1) *P. capsici*, (2) *P. capsici* + *P. parasitica*, (3) *P. parasitica*, (4) *P. capsici* + *P. infestans*, (5) *P. infestans*, (6) *P. capsici* + *P. boehmeriae*, (7) *P. boehmeriae*, (8) *P. capsici* + *P. palmivora*, (9) *P. palmivora*, (10) *P. capsici* + *P. citrophthora*, (11) *P. citrophthora*.

라) *P. capsici*와 고추 DNA 혼합액에서의 농도별 검출

고추역병이 발생한 포장의 병든 고추로부터 *P. capsici*의 검출 가능성을 알아보기 위해 고추의 DNA를 *P. capsici*의 DNA에 대해 상대적인 농도구배를 한 후 PCR 증폭을 수행하여 *P. capsici*가 검출될 수 있는 농도를 조사하였다.

*P. capsici*의 DNA를 0.1ng으로 고정하고 고추(*Capsicum annuum*)의 genomic DNA의 농도와와의 혼합비를 1:0, 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 0:1로 높여가며 PCR을 실시한 결과 *P. capsici*와 고추 DNA의 비율이 1 : 10,000에서도 병원균을 검출할 수 있었다(Fig. 4-20).

실제 이병주에서 DNA를 분리하면 기주식물 DNA 속에 *P. capsici*의 genomic DNA가 섞여 있지만 기주식물의 DNA에 비해 병원균의 DNA는 극히 적기 때문에 검출이 쉽지 않다.

하지만 조사된 바와 같이 *P. capsici*와 기주작물 DNA의 비율이 1 : 10000에서도 병원균을 정확히 검출할 수 있었기 때문에 실제 포장에서 역병균이 미량만 존재하여도 역병균을 선택적으로 검출할 수 있을 것으로 여겨진다.

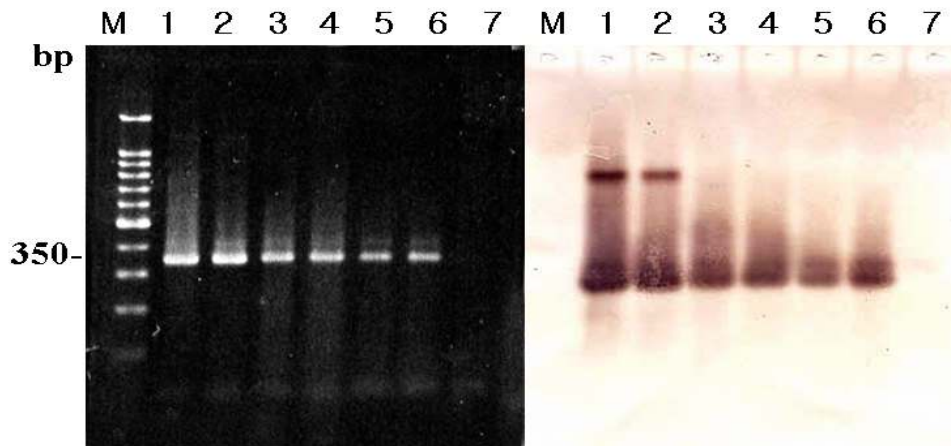


Fig. 4-20. PCR amplification of *P. capsici* and pepper plant DNA mixtures using the species specific primer set, PC22E3 and PC22H3. A. Hot start PCR amplification, B. Southern analysis of these PCR products with probe PC22. (M) marker (100bp ladder), (1) Pathogen-host DNA ratio 1:0, (2) ratio 1:1, (3) ratio 1:10, (4) ratio 1:100, (5) ratio 1:1000, (6) ratio 1:10000, (7) ratio 0:1.

마) 고추 감염부위에서 *P. capsici*의 신속, 정확한 검출

고추역병균(*P. capsici*)은 전 세계적으로 고추가 재배되는 지역이면 어디든지 발생되며 많은 피해를 주는 병원균이다. 하우스 재배에서는 연중 발생되며, 노지 재배에서는 7~8월 장마철에 특히 발생이 심하다. 실제 토양 중에 병원균이 있어도 장마가 오기 전에는 병이 잘 나타나지 않다가 강우시 재배포장에 물이 차기 시작하면 1주일 안으로 전포장이 역병에 감염되어 커다란 피해를 보는 사례가 많이 있다. 따라서 조기에 역병을 진단하여 적시에 방제하는 것이 아주 중요하다.

본 실험은 실제 포장에서 고추역병의 신속한 진단 가능성을 실험하기 위해 포장에서 고추 역병균에 약하게 감염된 고추와 건전주를 채집하여 지체부의 일부를 잘라 DNA를 분리하지 않고 최신의 NaOH 추출법으로 *P. capsici* 특이적 primer를 사용하여 PCR 증폭을 실시하였다. PCR을 실시한 결과 이병주에서만 정확하게 350bp의 증폭 산물을 확인할 수 있었다(Fig. 4-21).

또한 이병주와 건전주의 DNA를 PCR 증폭하여 southern hybridization을 실시한 결과도 이병주에서만 정확하게 밴드를 형성하여 본 테마에서 개발한 primer set이 실제 포장에서도 이병주를 정확하게 검출함으로써 추후 고추역병의 조기진단에 유용하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

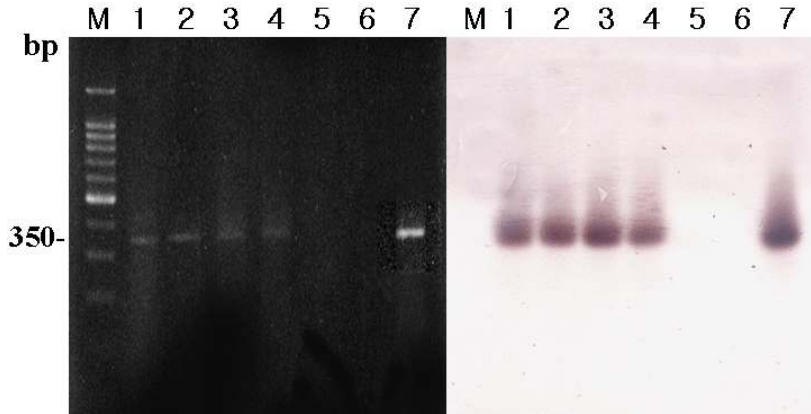


Fig. 4-21. PCR detection of *P. capsici* in naturally infected pepper collected from the field. Left: Hot start PCR amplification, right: Southern hybridization. (M) marker (100bp ladder), (1)-(4) infected pepper, (5) and (6) healthy pepper, (7) pure *P. capsici* DNA.

2) 종특이적 primer CSP23A/CSP23B의 *P. capsici*에 대한 PCR 증폭 특성

가) CSP23A/CSP23B의 *P. capsici*에 대한 특이적 PCR 증폭

앞서 종특이적 primer로 예상되어 선발된 primer set 5개 조합중 4조합에 대한 PCR 증폭 특성을 자세히 살펴보고자 *Phytophthora* spp. 9균주 이외의 주요 식물병원진균인 *Pythium* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Alternaria solani*, *A. alternata*, *Penicillium* sp. 등을 추가하여 PCR을 수행하였다. 이들중 CSP23A/CSP23B 조합을 제외한 나머지 조합들은 *P. capsici*의 genomic DNA 이외에 다른 증폭산물을 형성시켰다 (Fig. 4-22, Fig. 4-23, Fig. 4-24, Fig. 4-25). 시켜는 증폭산물을 형성하지 않음을 알 수 있었다. 따라서 CSP23A/CSP23B primer set을 종특이적인 primer로 선발하여 추후 병진단에 활용하고자 제반 특성을 조사하였다. 전국 각지에서 수집하였으며 유전적으로 다양한 *P. capsici* 균주들의 genomic DNA를 분리한 후 종특이적 primer로 선발한 CSP23A와 CSP23B를 이용해 PCR을 수행한 결과 모든 균주들로부터 1,000 bp의 증폭산물을 얻을 수 있었다. 따라서 조사된 모든 *P. capsici*가 개발된 primer의 특이적 염기서열을 포함하고 있어 안정적인 PCR 증폭이 이루어진다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4-26).

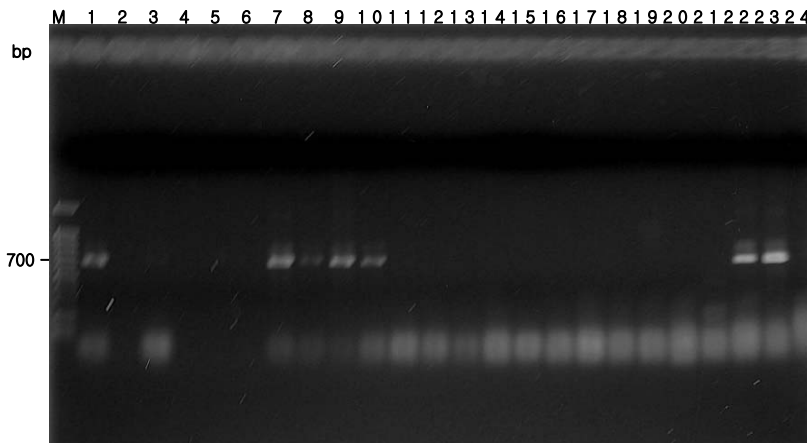


Fig. 4-22. Specificity of A: CSP23A/CSP23B against *Phytophthora capsici* (1 to 10), *P. parasitica* (11), *P. infestans* (12), *P. cactorum* (13), *P. citricola* (14), *P. cinnamomi* (15), *P. citrophthora* (16), *P. cambivora* (17), *P. palmivora* (18), *Pythium* sp. (19), *Fusarium* sp. (20), *Colletotrichum* sp. (21), *Alternaria solani* (22), *A. alternata* (23), *Penicillium* sp. (24). M: 100 bp ladder.

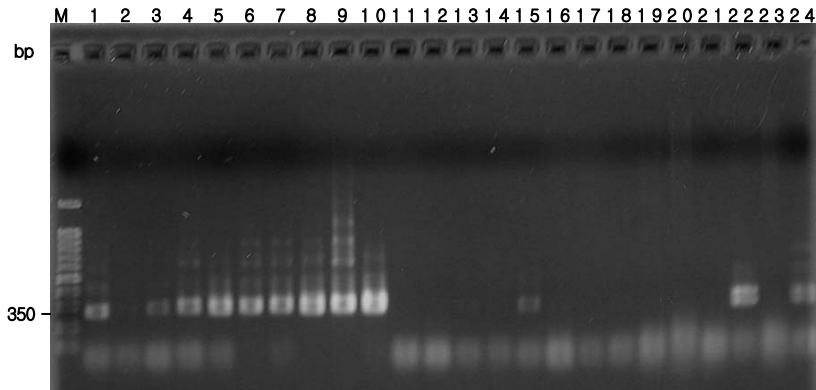


Fig. 4-23. Specificity of CSP23A/CSP23B against *P. capsici* (1 to 10), *P. parasitica* (11), *P. infestans* (12), *P. cactorum* (13), *P. citricola* (14), *P. cinnamomi* (15), *P. citrophthora* (16), *P. cambivora* (17), *P. palmivora* (18), *Pythium* sp. (19), *Fusarium* sp. (20), *Colletotrichum* sp. (21), *Alternaria solani* (22), *A. alternata* (23), *Penicillium* sp. (24). M: 100 bp ladder.

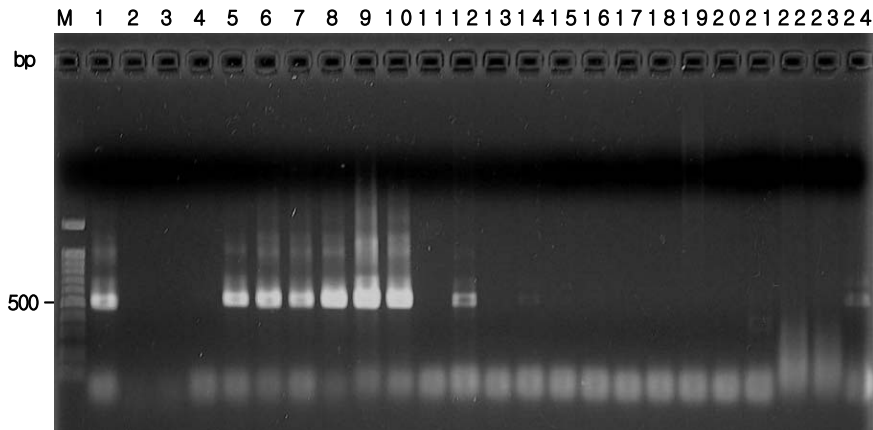


Fig. 4-24. Specificity of CSP23A/CSP23B against *P. capsici* (1 to 10), *P. parasitica* (11), *P. infestans* (12), *P. cactorum* (13), *P. citricola* (14), *P. cinnamomi* (15), *P. citrophthora* (16), *P. cambivora* (17), *P. palmivora* (18), *Pythium* sp. (19), *Fusarium* sp. (20), *Colletotrichum* sp. (21), *Alternaria solani* (22), *A. alternata* (23), *Penicillium* sp. (24). M: 100 bp ladder.

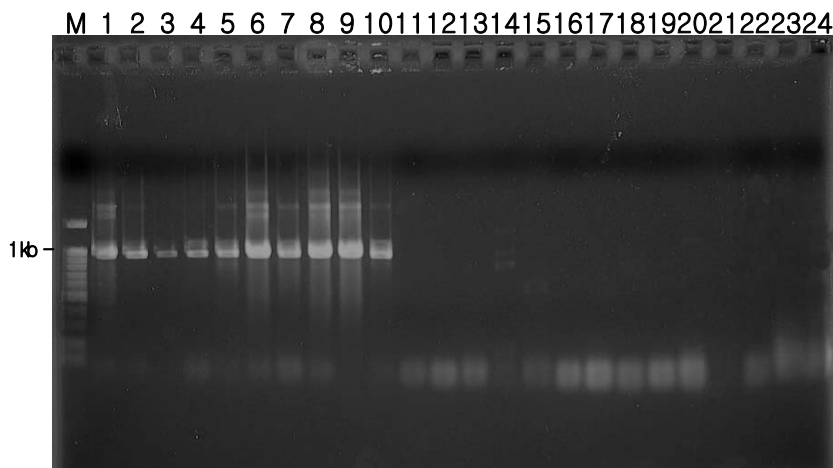


Fig. 4-25. Specificity of CSP23A/CSP23B against *Phytophthora capsici* (1 to 10), *P. parasitica* (11), *P. infestans* (12), *P. cactorum* (13), *P. citricola* (14), *P. cinnamomi* (15), *P. citrophthora* (16), *P. cambivora* (17), *P. palmivora* (18), *Pythium* sp. (19), *Fusarium* sp. (20), *Colletotrichum* sp. (21), *Alternaria solani* (22), *A. alternata* (23), *Penicillium* sp. (24). M: 100 bp ladder.

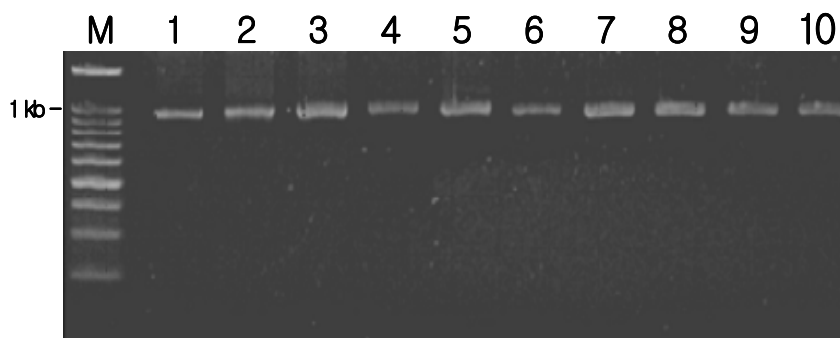


Fig. 4-26. Band pattern of electrophoresis of PCR amplification product obtained from various isolates of *P. capsici* using the species-specific primer set, CSP23A/CSP23B. (M): marker (100 bp ladder), (1) 20CG0001, (2) 20CG0002, (3) 20CC0005, (4) 20CC0007, (5) 95CG3413, (6) 95CG3418, (7) 95CG3407, (8) 95CD3208, (9) 95CP2102, (10) 95CY1102.

나) 종특이적 primer의 PCR 반응 민감도

20CG0002 균주의 genomic DNA 10 ng, 2 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg의 10단계로 조정 한 후 CSP23A와 CSP23B primer set을 이용하여 PCR 증폭을 실시하였다. PCR 반응으로 얻어진 증폭산물은 genomic DNA 증폭시와 마찬가지로 크기가 1,000 bp였으며, template DNA의 농도에 따라 증폭산물이 나타나는 밴드의 선명도가 달리 나타났으며, 100 fg까지 밴드가 나타났다(Fig. 4-27). 이는 일반적으로 개발되어 사용되는 ITS 영역의 종 특이적 primer들이 1 pg 내외의 반응 민감성을 보여주는 것에 비해 매우 민감한 반응을 나타내는 것으로 추후 고추 역병균의 진단에 매우 유용하게 사용되어 질 것으로 판단됐다.

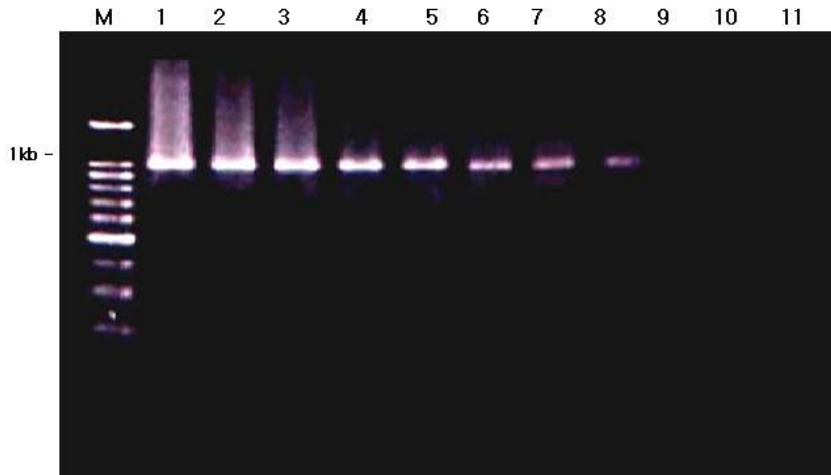


Fig. 4-27. PCR sensitivity of CSP23A/CSP23B, for *P. capsici* genomic DNA diluted serially. (M): Marker (100 bp ladder), (1): 2ng, (2): 1 ng, (3): 500 pg, (4): 100 pg, (5): 50 pg, (6): 1 pg, (7):500 fg, (8): 100 fg, (9); 50 fg, (10): 10 fg., (11): 1 fg.

다) 양액에서의 *P. capsici* 검출

최근 상당수의 비닐하우스 농가에서는 양액을 이용해 다양한 작물을 재배하고 있다. 양액을 이용한 작물재배시 역병균들과 같은 수생식물병원균에 의해 발병되면 포장내 급속한 병진반으로 방제가 어려워지며 그 피해 또한 매우 크게 나타난다. 따라서 종 특이적 primer를 이용한 양액에서의 신속하고 정확한 병원균 검출은 매우 중요하다.

양액에 고추 역병균 유주자를 각각 10^5 /ml부터 10^1 /ml까지 접종한 후에 DNA를 분리하였으며, 이어서 종 특이적 primer를 이용해 PCR을 수행한 결과 유주자 혼합액 처리농도가 최저 10^0 /ml인 처리구까지 병원균의 검출이 가능했다(Fig. 4-28). 대부분의 역병균들은 유주자의 농도가 최저 10^4 /ml 수준에서부터 급진적으로 발병한다. 따라서 양액내 최저 유주자 검출농도가 10^0 /ml인 본 연구에서 개발된 종특이적 primer를 병 발생전 주기적인 진단에 활용한다면 효과적이고 신속한 병 방제 대책을 수립하는데 많은 도움을 줄 수 있을 것이다.

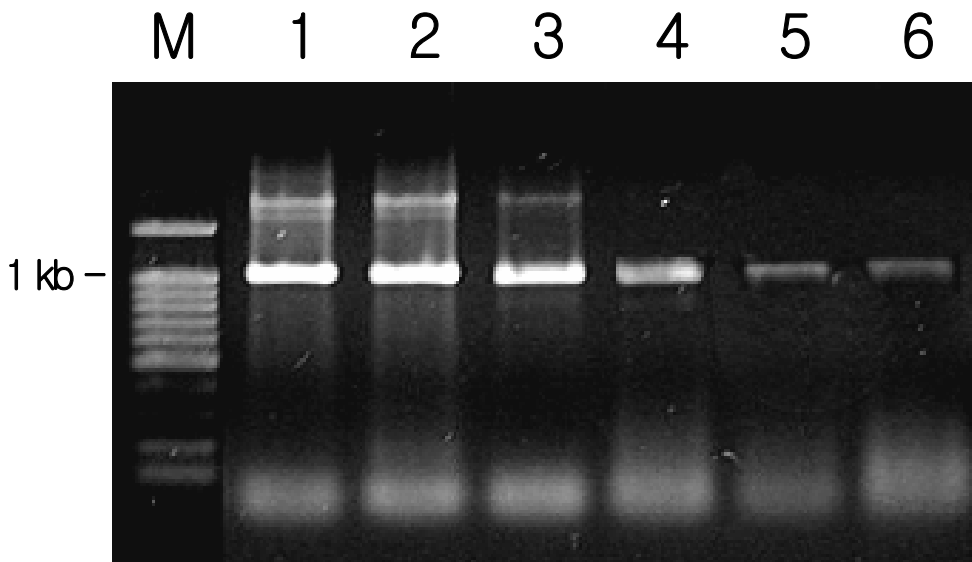


Fig. 4-28. Detection sensitivity of CSP23A/CSP23B against diluted zoospore of *Phytophthora capsici* mixed with nutrient solution. (M): marker (100 bp ladder), (1): Positive control, (2): 10^4 zoospore/ml, (3): 10^3 zoospore/ml, (4): 10^2 zoospore/ml, (5): 10^1 zoospore/ml, (6): 10^0 zoospore/ml.

라) 다양한 토양조건으로부터 *P. capsici* 검출

우리나라의 고추재배는 거의 전역에 걸쳐 이루어지며 고추역병균은 전국의 다양한 토양에 분포하는 것으로 판단되는데 다양한 토양조건에서의 유주자, 난포자의 검출은 병 발생 예찰에 중요한 방법 중에 하나일 것이다. 모래, 산토양, 밭토양 등 다양한 토양과 고추역병균의 유주자와 난포자를 혼합하여 DNA를 분리한 후 종특이적 primer와 PCR을 이용한 고추 역병균의 검출 가능성을 조사하였다. 다양한 토양과 혼합하여 유주자 10^5 에서 10^0 까지 PCR을 수행한 결과 모래와 혼합한 유주자는 10^0 처리구에서도 증폭산물을 확인할 수 있었다(Fig. 4-29). 하지만 산토양은 10^2 , 밭토양은 10^3 의 유주자가 존재하는 처리구에서 병원균을 검출 할 수 있었다.(Fig. 4-30, 4-31). 특히, 모래와 혼합한 낮은 농도의 병원균 포자농도 처리구로부터 병원균의 검출은 PCR 증폭시 방해요인으로 작용하는 토양내 각종 불순물의 양이 가장 적은 이유로 설명될 수 있을 것이다.

난포자를 농도별로 모래에 혼합한 후 각각 DNA를 분리하여 종특이적 primer를 이용한 PCR 검출을 시도한 결과 최저 10^2 oospore/ml 난포자 처리구까지 PCR 증폭산물을 얻을 수 있었다(Fig. 4-32). 10^0 zoospore/ml의 유주자 처리구 결과에서와는 달리 상대적으로 낮은 검출 민감도는 토양과 혼합된 난포자로부터 DNA를 분리시 세포벽 두께의 차이로 DNA 분리량의 차이가 나타나기 때문으로 추측된다. 난포자는 두터운 세포벽을 가지고 있어 그 생존기간이 유주자에 비해 매우 긴 것으로 알려져 있다. 또한 작물의 재배 기간 중에는 병전반 전반수단으로서 유주자의 역할이 매우 크지만 불리한 환경조건에서는 난포자의 역할이 매우 큰 것으로 알려져 있다. 따라서 아직은 미흡하지만 토양으로부터 DNA 분리정제법만 안정적으로 이루어진다면 현재 개발된 고추역병 특이적 primer의 민감도로 미루어 아주 적은 소량의 난포자가 월동할 경우에도 검출이 가능해질 것으로 판단되며 추후 병발생 예찰에 매우 유용하게 활용될 것으로 판단된다.

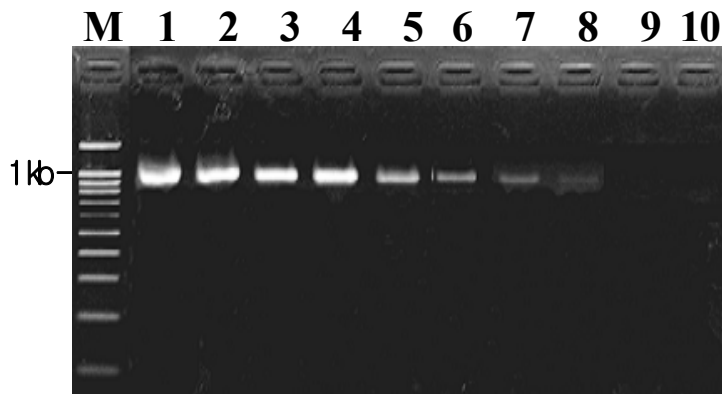


Fig. 4-29. Sensitivity of CSP23A/CSP23B against zoospores of *Phytophthora capsici* mixed with sand. (M): marker (100 bp ladder), (1): 2 ng of *P. capsici* genomic DNA, (2): 10^5 zoospore/ml, (3): 10^4 zoospore/ml, (4): 10^3 zoospore/ml, (5): 10^2 zoospore/ml, (6): 10^1 zoospore/ml, (7): 10^0 zoospore/ml, (8): 10^0 zoospore/ml, (9), (10) 0 zoospore/ml.

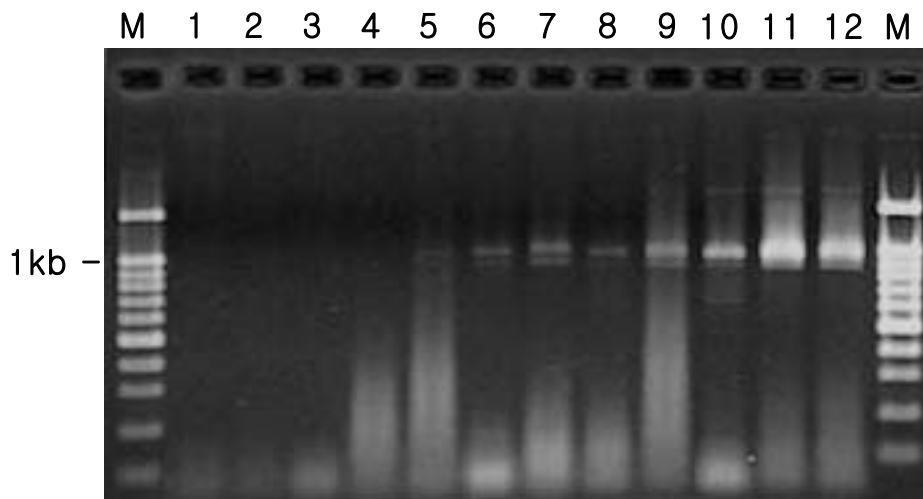


Fig. 4-30. Sensitivity of CSP23A/CSP23B against zoospore of *Phytophthora capsici* mixed with mountain soil. (M): marker (100 bp ladder), (1), (2): 10^0 zoospore/ml, (3), (4): 10^1 zoospore/ml, (5), (6): 10^2 zoospore/ml, (7), (8): 10^3 zoospore/ml, (9), (10): 10^4 zoospore/ml, (11), (12): 10^5 zoospore/ml.

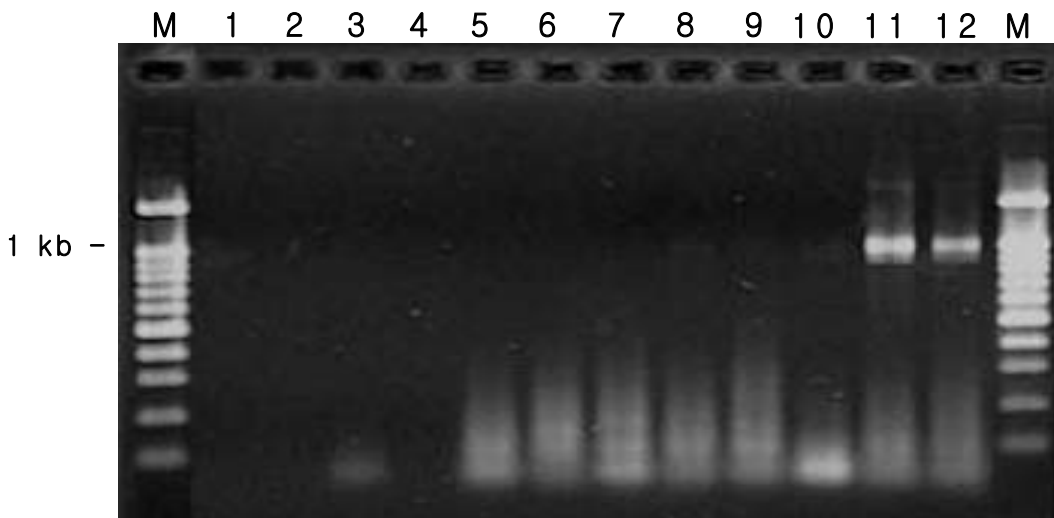


Fig. 4-31. Sensitivity of CSP23A/CSP23B against zoospore of *Phytophthora capsici* mixed with soil. (M): marker (100 bp ladder), (1), (2): 10^0 zoospore/ml, (3), (4): 10^1 zoospore/ml, (5), (6): 10^2 zoospore/ml, (7), (8): 10^3 zoospore/ml, (9), (10): 10^4 zoospore/ml, (11), (12): 10^5 zoospore/ml.

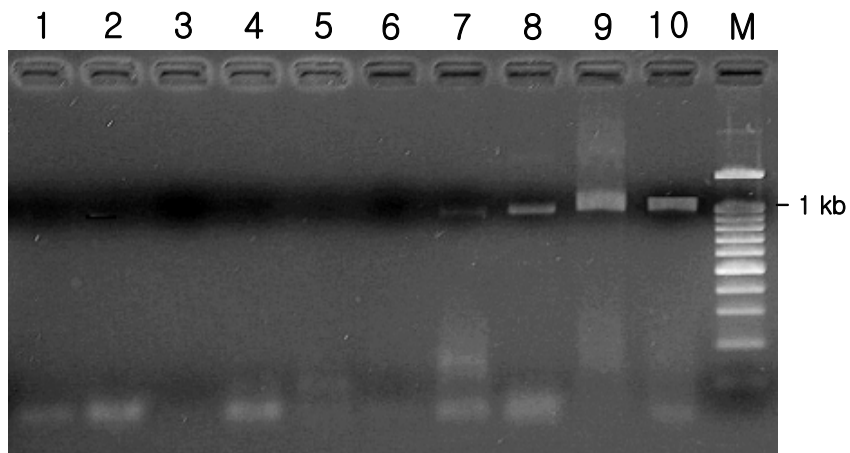


Fig. 4-32. Sensitivity of CSP23A and CSP23B against oospores of *Phytophthora capsici* mixed with sand. (M): marker (100 bp ladder), (1), (2), (3): 10^0 oospore/ml, (4), (5), (6): 10^1 oospore/ml, (7): 10^2 oospore/ml, (8): 10^3 oospore/ml, (9) : 10^4 oospore/ml, (10): positive control.

3) *P. infestans*와 *P. nicotianae* 종특이적 primer의 선발 및 활용

양액재배지에서 병발생시 피해가 매우 클 것으로 판단되는 *P. infestans*(Judelson and Tooley 2000) *P. nicotianae*(Kong et al, 2003)등에 대해서 이미 알려진 종특이적 primer PINF/ITS5와 PN1/PN2를 이용하여 양액내 병원들에 대한 PCR 검출을 시도하였다. 양액에서 검출을 시도 하기전에 조사결과 이들의 PCR 민감도를 조사한 결과 *P. infestans*의 경우는 200fg의 PCR 민감도를 보였으며, *P. nicotianae*의 경우는 2pg으로 나타났다 (Fig. 4-33). 이어서 양액내에 *P. infestans*, *P. nicotianae* 그리고 *P. capsici*의 포자를 혼합한 후 각각의 primer를 이용해 PCR 검출을 실시한결과 각각의 종특이적 primer들은 *P. infestans*와 *P. nicotianae*를 특이적으로 검출해냈다(Fig. 4-34, 4-35).

따라서 다양한 작물의 양액재배시 기주범위가 매우 넓은 *Phytophthora* 속 병원균들을 대상으로 본 연구에서 사용된 종 특이적인 primer들을 병발생전 진단에 활용한다면 매우 유용할 것으로 기대된다.

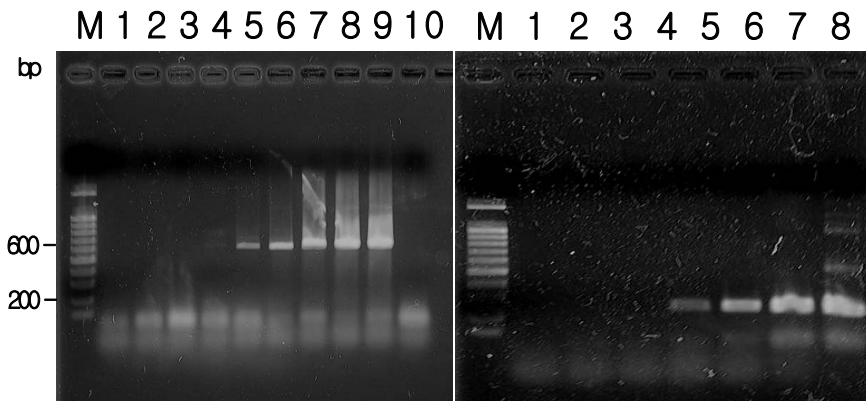


Fig. 4-33. PCR sensitivity of each specific primer for genomic DNA of *Phytophthora parasitica* (left) and *P. infestans* (right).

M 1 2 3 4 5 6 M 1 2 3 4 5 6 M 1 2 3 4 5 6

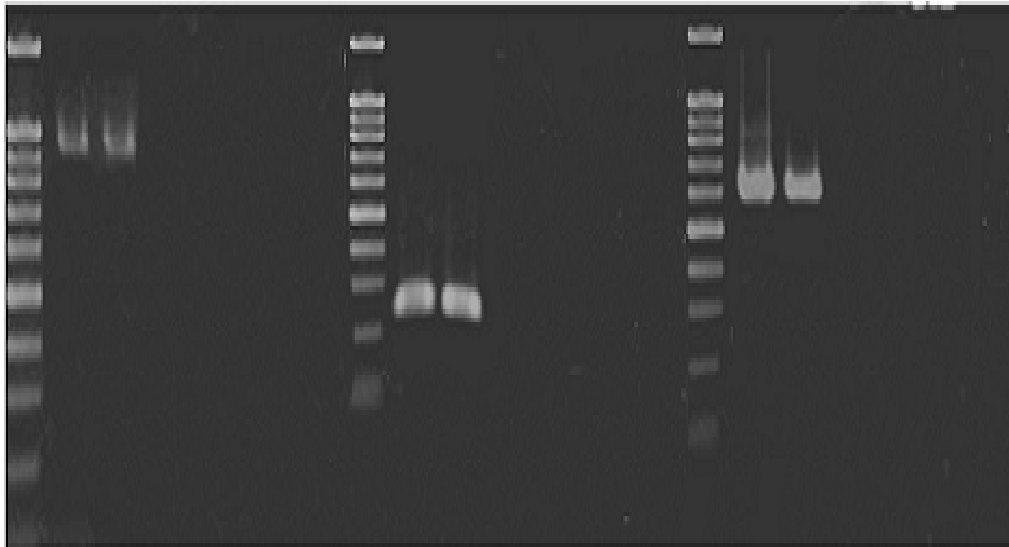


Fig. 4-34. Specificity of primers (Left; CSP23A and CSP23B (*P. capsici*), Middle; ITS5 and PINF (*P. parasitica*), Right; PN1 and PN2 (*P. infestans*)) against *Phytophthora* spp. mixed with nutrient solution. Left; (M): marker (100 bp ladder), (1), (2): *P. capsici*, (3), (4): *P. infestans*, (5), (6): *P. parasitica*, Middle; (M): marker, (1), (2): *P. infestans*, (3), (4): *P. capsici*, (5), (6): *P. parasitica*, Right; (M): marker, (1), (2): *P. parasitica*, (3), (4): *P. capsici*, (5), (6): *P. infestans*.

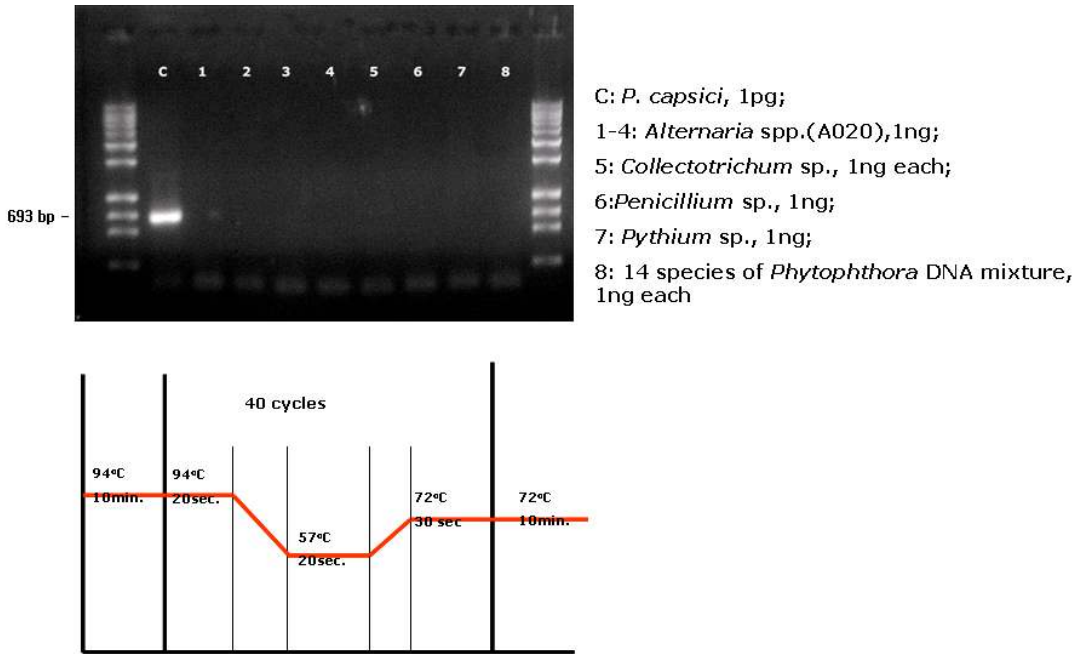


Fig. 4-35. Specificity of primers(CSP23A/CSP23B) and PCR condition.

4) 병진단 kit을 이용한 실제 적용 시험

본 테마에서 사용한 DNA 분리 조건은 DNA 손실이 있는 것으로 생각되어져 새로운 최적 DNA분리 방법을 찾으면 더욱 정확히 감염된 포장을 쉽게 구별할 수 있으리라 생각해 최적 DNA분리 방법을 연구했다. 먼저, 100 μ l의 solution A를 처리하고 72°C에서 20분간 섞어준 후, 400 μ l의 solution A와 100 μ l의 solution B를 혼합한 후 72°C에서 30분간 혼합해준다. 여기에서 사용한 solution A, B의 차이와 column을 거치는가에 따라 6가지로 나누어서 PCR을 해본결과 그림 4-35와 같이 solution A, B에 각각 CTAB과 10% SDS를 사용한 후에 column을 거치는 것이 가장 효과적인 것으로 나타났다(Fig. 4-36).

본 실험결과 제작된 시제품 진단 kit를 활용해 실제 역병에 걸린 포장의 토양과 뿌리 조직의 DNA를 분리한 후 PCR을 수행한 결과 뚜렷한 밴드를 확인함으로써 실제 포장에의 적용이 가능함을 확인하였다(Fig. 4-37, 4-38, 4-39).

따라서, 새로이 제작된 kit를 제품화한다면 *P. capsici*에 감염된 포장을 쉽게 구분해 낼 수 있어 고추역병에 의한 피해를 사전에 대비해 피해를 최소한으로 줄일 수 있을 것으로 보인다.

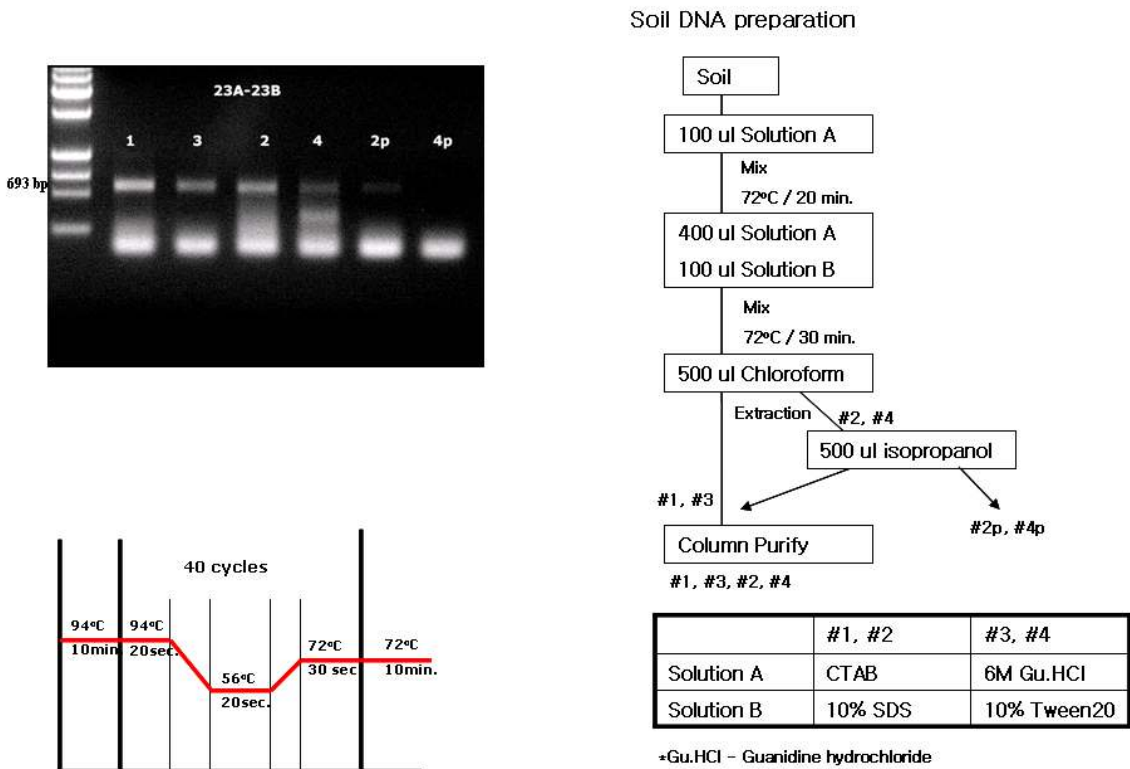


Fig. 4-36. Isolation step of DNA extraction and PCR condition.

Kit의 구성



분류	용량	수량
Glass bead	5 g	1 tube
마쇄봉	25	1 pack
Solution A	15 ml	1 bottle
Solution B	7 ml	1 bottle
Solution C	7 ml	1 bottle
Buffer W	5 ml	1 bottle
Spin-column	25 columns	1 pack
Collection tube	25 tubes	1 pack
2X Taq premix	400 ul	1 tube
100 bp DNA ladder	50 ul	1 tube
Manual		1

용량: 25 samples

Fig. 4-37. A structure of prototype diagnosis kit.

Fungal DNA Isolation kit(from soil, root, stem and leaf)

Kit의 구성

분류	용량	수량
Glass bead	5 g	1 tube
마쇄봉	25	1 pack
Solution A	15 ml	1 bottle
Solution B	7 ml	1 bottle
Solution C	7 ml	1 bottle
Buffer W	5 ml	1 bottle
Spin-column	25 columns	1 pack
Collection tube	25 tubes	1 pack
2X Taq premix	400 ul	1 tube
100 bp DNA ladder	50 ul	1 tube
Manual		1

* Buffer W는 사용전에 20ml의 Ethanol(95%이상)을 첨가하십시오.

실험자 준비사항

기계류

Microcentrifuge, Vortex mixer, Waterbath, Thermal cycler

시약류

멸균증류수, Ethanol(95%이상), Chloroform 또는 Phenol/Chloroform 혼합액, Isopropanol, TE(pH 9.0)

기타

멸균된 이부시개, 멸균된 1.5 ml microtube

시료의 준비

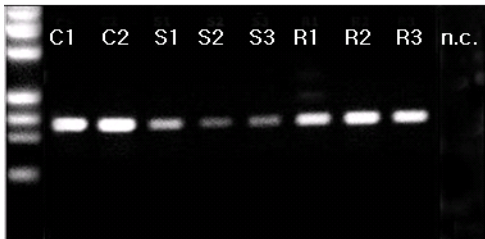
- ✓토양-1~0.25g을 1.5ml tube에 넣은 후 멸균증류수 1ml를 가하여 잘 섞어준 후 원심분리하여 상층액을 제거한다.
- ✓뿌리, 줄기-뿌리나 줄기에 묻어있는 흙 및 기타 불순물은 세척하여 제거하고, 목질부를 제외한 발반이 있는 피층을 수거하여 0.05~0.2g경도를 준비한다.
- ✓열, 열매-불순물이 없도록 세척한 후 0.05~0.2g경도를 준비한다.

실험방법(DNA Isolation)

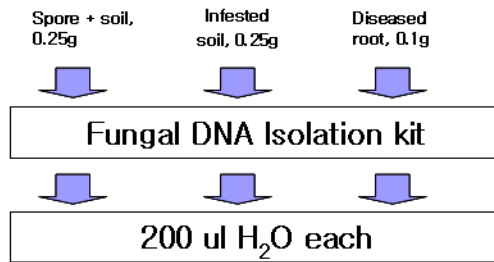
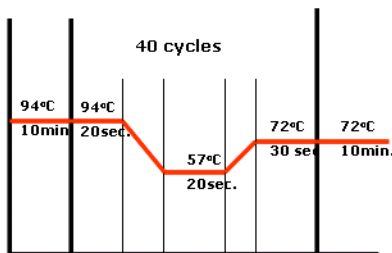
1. 시료가 들어있는 1.5ml microtube에 ~0.1g의 Glass bead를 넣는다.
2. Solution A를 200ul 첨가 후, 멸균된 이부시개나 Vortex mixer로 잘 섞어준다.
3. 65°C~75°C의 Waterbath에서 30분간 반응시킨다.
4. 마쇄봉을 이용하여 2~3분간 잘 마쇄하여준다. 마쇄봉이 닿지않는 부분은 멸균된 이부시개로 섞어주면서 마쇄한다.
5. Solution A를 200ul, Solution B를 200ul 첨가 후 Vortex mixer를 이용하여 2~3분간 잘 섞어준다.
6. 65°C~75°C의 Waterbath에서 30분간 반응시킨다.
7. Chloroform 또는 Phenol/Chloroform혼합액을 500ul 첨가한 후 Vortex mixer를 이용하여 2~3분간 잘 섞어주고, Microcentrifuge를 이용하여 상층에서 5분간 원심분리한다.
8. Pipet을 이용하여 상층액을 500ul 취하여 새로운 1.5ml microtube에 옮겨준다.
9. Isopropanol 500ul를 첨가하여 Vortex mixer로 1분간 섞어준 후, 상층에서 5분간 방치한다. Microcentrifuge로 상층에서 5분간 원심분리한 후, 상층액을 제거한다. 다시 10초간 원심분리한 후 pipet을 이용하여 남아있는 용액을 제거한다.
10. Pellet를 멸균증류수 200ul를 첨가하여 녹인다. 여기에 Solution C를 200 ul 첨가한 후 잘 섞어준다.
11. Collection tube에 Spin-column을 끼우고 Spin-column에 위의 pellet/Solution C 혼합액을 넣는다.
12. Microcentrifuge로 1분간 원심분리 후 Collection tube내의 용액을 제거한다. 다시 Spin-column을 끼우고, Spin-column에 500ul의 Buffer W를 넣고 1분간 원심분리한다.
13. Spin-column을 새로운 1.5ml microtube에 끼운 후 200ul의 멸균증류수나 TE(pH 9.0)용액을 넣고 상온 또는 65°C에서 1분간 방치한다.
14. 1분간 원심분리 후, 1.5 ml microtube에 얻어진 DNA 용액은 냉동보관한다.

SUN GENETICS

Fig. 4-38. An operating manual of prototype diagnosis kit.



n.c.: negative control
 C1, C2: control soil mix with spore.
 S1,S2,S3: soil samples from 3 diseased areas.
 R1,R2,R3: root samples from 3 diseased plants.



In 20 ul PCR reactions,
 1ul DNA solution is used.

Fig. 4-39. Test of prototype diagnosis kit in infested field.

B. *Alternaria* 속 병원균 진단 kit 개발

가. *Alternaria*의 균주수집 및 특성 조사

1) 형태적 특징

가). *Alternaria gaisen* Nagano

분생자경: 단생 또는 소량의 다발을 이루며, 대부분 분지하지 않지만 드물게 분지하는 것도 있다. 곧게 신장하나 약간 굽은 것도 있고, 옅은 황갈색에서 황록갈색을 띠며, 표면은 매끄럽고 격막이 있다. 보통 하나의 분생포자 형성흔이 있고, 가끔 1~2개의 포자흔이 보이는 슬상관절을 이루기도 한다. 길이는 150 μm 이상으로 길고, 폭은 3~5 μm 이다. 인공 배양시에는 분생자경이 균사의 표면이나 측면 신장부로부터 직접 형성되고, 분지하는 경우가 많아진다. 분생포자: 대부분 기주 조직에서 혹은 배양시에 3~8개의 분생포자로 이루어진 짧거나 중간정도 길이의 포자사슬을 형성하고, 보통은 분지를 하지 않지만 배양시에는 분지하는 경우도 있다. 배양시에 형성된 분생포자는 신장된 난형 또는 긴 타원형을 하며 황갈색을 띠고, 표면은 매끄러운 것에서부터 두드러진 사마귀점이 있는 것이 있다. 대부분 beak가 없거나 선단부위에 2차 분생자경을 갖고 있다. 자연 조건에서는 비교적 짧은 beak를 갖는 경우도 있으며, 일부 어린 분생포자는 송곳모양으로 형성되는 경우도 있다. 크기는 기주상에서 20~55(~60) \times 10~15 μm 이지만 배양하면 작아지고 두꺼워져서 20~50 \times 10~18 μm 정도가 되며, 3~7 개의 횡격막과 1~2 개의 종격막 또는 횡격막 부위에 사선의 격막이 일부 형성된다. 1~3개의 횡격막 부위는 잘록하게 들어가 있고 중앙의 횡격막은 진한 색을 띠며 다른 격막보다 더 잘록하게 함몰되어 있다. Beak가 존재할 경우, 분생포자 선단의 형성부위로부터 점차 가늘게 되어 분생포자와 비슷하거나 짧다. 배양시, 일반적으로 2차 분생자경이 형성된 분생포자의 선단부위는 무더지고 보통 길이 3~6 μm , 폭 3~5 μm 의 1개의 세포로 짧게 형성되며, 간혹 길이가 35 μm 까지 신장하기도 한다. 균총: 배지상에서 회색~회녹색 또는 흑색을 띠고, 포자를 형성하지 않는 다량의 기주균사와 표면균사가 솜털 같이 형성되며, 7일간 배양시 직경 60~70mm 정도 성장한다. (Fig. 4-40)

나). *Alternaria longipes* (Ell. & Ev.) Mason

분생자경: 단생 또는 2~5개의 분생자경이 다발을 이루며, 보통은 분지하지 않지만 간혹 분지하는 것도 있고, 직선 또는 굴곡이 있는 형태를 이룬다. 옅은 갈색으로 표면은 매끄럽고 격막이 있다. 보통 선단부에 1개의 포자흔이 있지만 슬상관절을 형성한 경우

여러 개의 포자흔이 관찰된다. 길이는 $100\mu\text{m}$ 이상, 폭은 $2\sim 5\mu\text{m}$ 이고, 배양하였을 경우 분생자경은 균사의 끝이나 측면, 또는 균사 표면으로부터 직접 발생한다. 분생포자: 대부분 2차 분생자경에 의해 3~8개의 포자로 이루어진 짧은거나 혹은 중간 길이의 포자사슬을 형성하며, 가끔은 단생을 하기도 한다. 배지상에서는 종종 7~10개의 긴 포자사슬이 형성되기도 하며, 대부분 분지하지 않지만 배양시에는 분지하기도 한다. 옅고 밝은 황갈색을 띠며 좁은 난형, 타원형, 또는 곤봉형으로 표면은 보통 매끄러운 편이고 대부분 beak가 없으나, 간혹 2차 분생자경을 형성하여 짧고 뾰족한 beak를 갖기도 한다. 배양시에는 beak가 없는 것과 2차 분생자경을 형성하는 것 중 하나만이 형성된다. 분생포자의 크기는 기주상에서 $15\sim 55 \times 8\sim 17 \mu\text{m}$ 이고, 배양시에는 $20\sim 80 \times 8\sim 20 \mu\text{m}$ 이며, 2~7개의 횡격막이 있다. 보통 종격막은 없지만 가끔 횡격막 부위에 단 하나(드물게는 2개)의 종격막이 존재하기도 한다. 2차 분생자경은 분생포자의 정단세포에서 시작하는데, 보통 원통형으로 짧고 1개의 세포로 되어있지만 종종 길이 $10\sim 30(\sim 60) \mu\text{m}$ 와 폭 $2\sim 4 \mu\text{m}$ 까지 신장하기도 한다. 균총: 배지상에서 회색 또는 황록색을 띠는 회색의 성긴 솜털모양의 균총을 형성한다. 7일간 배양시 직경 $30\sim 40\text{mm}$ 정도 성장한다. 보통 진홍색 색소가 배지로 분비된다. (Fig. 4-41)

다). *Alternaria mali* Roberts

분생자경: 단생 또는 작은 다발을 이루고, 대부분 분지를 하지 않으며 곧거나 약간 굽은 형태이다. 약간 어두운 갈색으로 표면은 매끄럽고, 격막이 있으며, 정단에 하나의 포자흔이 있지만 슬상관절을 이루어 1~2개의 포자흔이 관찰되는 경우도 있다. 길이는 $20\sim 90 \mu\text{m}$ 이고 폭은 $2\sim 4 \mu\text{m}$ 이다. 배양하였을 경우 균사의 표면 혹은 선단부, 그리고 측면에서 형성된다. 분생포자: 대부분 3~8개의 분생포자가 짧은거나 중간 정도의 포자사슬을 형성하며, water agar 에서는 10개 혹은 그 이상의 긴 포자사슬이 형성된다. 분지를 하지 않거나 분지하는 경우가 있으며, 분지를 하는 경우에는 단지 몇 개의 분생포자만이 형성된다. 기주상에서는 곤봉형에서 좁은 난형 또는 긴 타원형의 형태를 하고 있으며 배양시에는 짧은거나 긴 난형 또는 넓은 타원형이다. 옅은 황갈색을 띠며 표면에는 사마귀점이 있거나 또는 매끄러우며, 대부분 beak가 없거나 2차 분생자경을 갖는다. 종종 자연상태 하에서는 비교적 짧은 beak가 형성되기도 한다. 크기는 기주상에서 $18\sim 55 \times 5\sim 12 \mu\text{m}$ 이고, 배양시에는 $15\sim 65 \times 8\sim 20 \mu\text{m}$ 이다. 3~8개의 횡격막이 있고 보통은 종격막이 없거나 1~3개의 횡격막에 단 한 개의 종격막이 있다. 간혹 1~3개의 횡격막 부위가 잘록하게 들어가

있고, beak가 있을 경우 점점 끝이 좁아지며 크기는 포자와 비슷하거나 짧다. 2차 분생자경은 보통 짧고 1개의 세포로 되어 있으며 크기는 $3\sim 5 \times 3\sim 5 \mu\text{m}$ 이지만 간혹 $30 \times 2\sim 4 \mu\text{m}$ 까지 신장한다. 균총: 배지상에서는 황록색 또는 진한 황록색이며, 포자를 형성하지 않는 균사들로 솜털모양을 하고 있다. 7일간 배양하였을 경우 직경 60~65 mm 정도 성장한다.(Fig. 4-42)

라). *Alternaria panax* Whetzel

분생자경: 단생 또는 2-10개의 분생자경이 다발을 이루며 곧거나 약간 굽은 모양이다. 1-2개의 슬상관절을 가지며 정점부위가 약간 부풀어 있다. 병반에서의 크기는 길이가 최고 $150\mu\text{m}$ (배양시에는 $200\mu\text{m}$), 폭은 $3\sim 7\mu\text{m}$ 이다. 분생포자: 기주상에서 대부분은 단생하나 2-3개의 짧은 사슬을 형성하기도 하며 배양시에는 3-5개의 사슬도 관찰할 수 있다. 때때로 분지하며 곧거나 약간 굽은 형태로 장타원형이며 연한 갈색 또는 어두운 갈색을 띤다. 크기는 $35\sim 90 \times 10\sim 25$ (-40) μm 로 3-11개의 횡격벽과 1개에서 여러개의 종격벽을 가지고 있으며 1-6개의 뚜렷한 횡격벽이 관찰된다. beak의 길이는 최고 $100\mu\text{m}$, 폭은 $2.5\sim 7.5 \mu\text{m}$ 이며 2차 분생자경은 $4\sim 9\mu\text{m}$ 로 슬상관절을 형성하기도 한다.(Fig. 4-43)

마). *Alternaria alternata* (Fries: Fries) Keissler

분생자경: 단생 또는 작은 다발을 이루고, 보통 분지한다. 곧거나 굴곡이 있게 형성하며 옅은 갈색을 띤다. 표면은 매끄럽고 격막이 있으며, 끝은 약간 부풀어 있으며 투명하고, 분생포자 형성 부위에는 포자흔이 있다. 슬상관절을 형성하였을 경우 하나 또는 여러 개의 포자흔이 보인다. 길이는 $80 \mu\text{m}$ 이상으로 다양하고, 폭은 $3\sim 5 \mu\text{m}$ 정도이다. 배양하면 분생자경은 균사에서 직접 형성되거나 균사 끝부분에 형성된다. 분생포자: 5~10개 또는 그 이상의 분생포자로 긴 사슬을 형성하고, 간혹 분지한다. 초기에는 긴 타원형이나 점차 난형, 곤봉형으로 되고, 옅은 갈색~황갈색 또는 탁한 갈색을 띤다. 보통은 표면에 돌기 혹은 조밀한 사마귀점이 있으나, 매끄러운 것도 있다. 대부분은 beak가 없거나 2차 분생자경(secondary conidiophore)을 갖지만 아주 드물게 짧고 가늘고 뾰족한 beak를 갖는 것도 있다. 포자사슬은 2차 분생자경에 의해 형성된다. 크기는 병반상에서 $15\sim 35 \times 8\sim 16 \mu\text{m}$ 이고, 배양시에는 $13\sim 35$ (~43) $\times 8\sim 14 \mu\text{m}$ 이며 3~5 개의 횡격막과 1개(드물게 2개)의 종격막 또는 1~2개의 횡격막 부위에 사선의 격막이 있고, 보통 횡격막 부위는 약간 잘록하며 진한 중앙격막은 없다. 2차 분생자경은 분생포자의 선단부위 또는 맨 끝 세포에 형성되고 보통 짧고, $2\sim 4 \mu\text{m}$ 의 단세포이다. 간혹 슬상관절 구조를 하며 $15\sim 40 \mu\text{m}$ 까지 신장하는 것이 있다. 균총: 배지 표면에 촘촘히 자라고, 황흑색 또는

검은색을 띠며, 다량의 포자를 형성하지만 배지에 색소를 분비하지 않는다. 7일간 배양하면 직경 60~80 mm정도 성장한다..(Fig. 4-44)

바). *Alternaria tenuissima* (Nees and T. Nees: Fr.) Wiltshire

분생자경: 단생 또는 다발을 이루고, 분지는 하지 않거나 드문드문 분지하며 격막이 있다. 정단부위에는 한개의 포자흔이 있고, 슬상관절이 형성된 경우에는 1~5개의 포자흔이 관찰된다. 종종 정단부위는 약간 부풀어 있으며 대부분 투명하다. 길이는 20~110 μm 이고, 폭은 3~5 μm 이다. 배양을 하였을 경우에는 기질로부터 직접 형성되거나 균사의 측면에 분지한다. 분생포자: 3~8개의 분생포자로 이루어진 짧거나 중간정도의 포자사슬을 형성하며, 간혹 분지를 한다. 배양을 하였을 경우에는 자연상태하에서 보다 길게 분지한 포자사슬을 형성한다. 자연상태하에서는 긴 타원형에서 신장된 난형, 또는 곧봉형이며, 배양하였을 경우에는 타원형 또는 넓은 난형이다. 옅은 갈색에서 황금갈색을 띠고, 표면 구조물은 없거나 자세히 관찰하면 특징적으로 반점들이 있다. 포자의 시작부위는 종종 송곳모양으로 좁아져서 뾰족해지고, 가끔 끝부분이 무더져서 2차 분생자경을 형성하며, 종종 beak 쪽으로 가늘어지는 경우도 있다. 포자의 크기는 기주상에서는 25~58 \times 10~18 μm 이고 배양하였을 경우에는 22~55 \times 8~16 μm 이며, 4~10개의 횡격막과 1~2개의 종격막 또는 횡격막으로 나누어진 부위에 비스듬한 종격막이 있고 1~3개의 횡격막은 잘록하게 들어가 있다. 가끔 중앙의 횡격막은 다른 격막보다 짙은 색을 띤다. Beak가 있는 경우, 매우 다양하여 좁아지면서 포자와 비슷하거나 더 긴 경우(40 μm 이상)도 있지만 보통은 짧다. 2차 분생자경은 보통 짧고 1~2개의 세포로 이루어져 있으며 길이는 3~10 μm 이지만 종종 50~60 μm 정도로 신장한다.(Fig. 4-45)

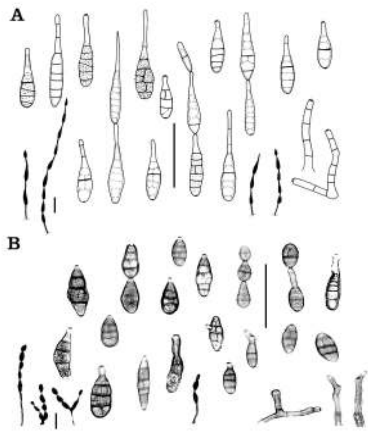


Fig. 4-40. *Alternaria gaisen*: conidia and conidiophores from host (A) and culture (B). Sporulation habit: conidia (opaque) and conidiophores (clear). Bar=50 μ m.

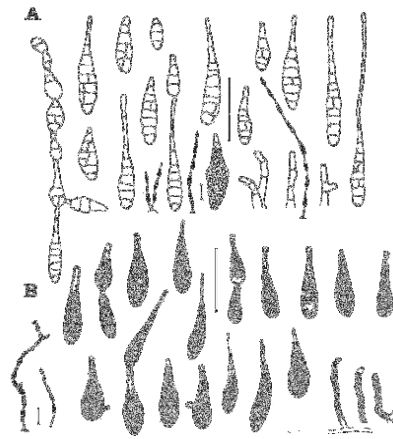


Fig. 4-41. *Alternaria longipes*: conidia and conidiophores from host (A) and culture (B). Sporulation habit: conidia (opaque) and conidiophores (clear). Bar=50 μ m.

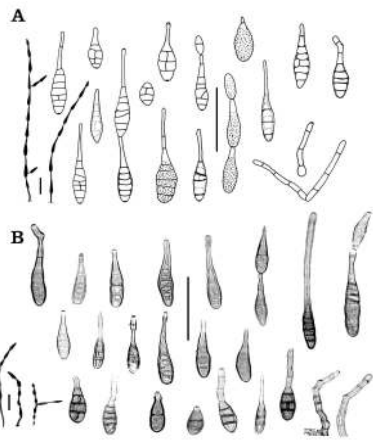


Fig. 4-42. *Alternaria mali*: conidia and conidiophores from host (A) and culture (B). Sporulation habit: conidia (opaque) and conidiophores (clear). Bar=50 μ m.

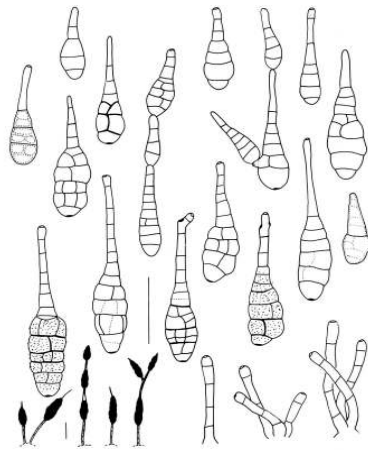


Fig. 4-43. *Alternaria panax*: conidia and conidiophores from host (*Panax ginseng*). Sporulation habit: conidia (opaque) and conidiophores (clear). Bar=50 μ m.

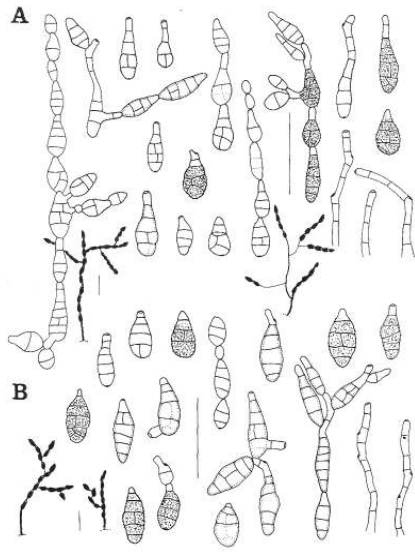


Fig. 4-44. *Alternaria alternata*: conidia and conidiophores from *Allium monanthum*(A) and seed of *Capsicum annuum* (B). Sporulation habit: conidia(opaque) and conidiophores(clear). Bar=50 μ m.

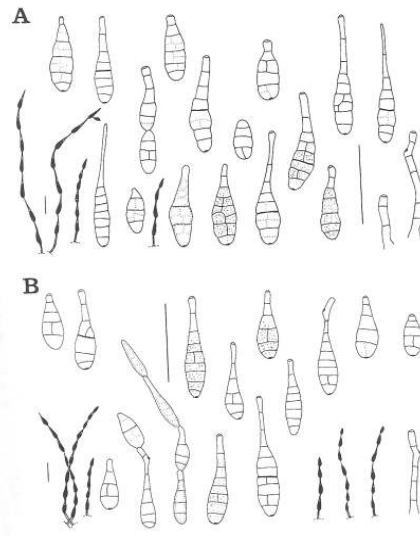


Fig. 4-45. *Alternaria tenuissima*: conidia and conidiophores from fruit of *Capsicum annuum* (A) and seed of *Hordeum vulgare* var. *hexastichon*(B). Sporulation habit: conidia(opaque) and conidiophores(clear). Bar=50 μ m.

2) 배양적 특징

Table 4-10. Cultural characteristics of *Alternaria* spp. on PDA media for 7 days at 25°C

species	Substrate	conidiophore length (μm)	No. of septa ^a	Body width (μm)	Body length (μm)	Pseudorostrate length (μm)
<i>Alternaria alternata</i>	nature	>80	3~5	8~16	15~35	
	culture			8~14	13~35(~43)	2~4
<i>gaisen</i>	host	>150	3~7	10~15	20~55	
	culture			10~18	20~50	3~6
<i>longipes</i>	host	>100	2~7	8~17	15~55	
	culture			8~20	20~80	
<i>mali</i>	host	20~90	3~8	5~12	18~55	3~5
	culture			8~20	15~65	
<i>tenuissima</i>	host	20~110	4~10	10~18	25~58	3~10
	culture			8~16	22~55	

^aNumber of transverse septa. ¹Simmons, E. G. 1999. ²Simmons, E. G. 1994.

3) 병원성 검정

사용균주들의 각각의 기주에 대한 병원성을 확인하였음.

4) *Alternaria*의 종 특이적 밴드 탐색을 위한 URP-PCR

본 테마에 사용된 12종의 URP primer는 소형포자를 형성하는 *Alternaria* 균주들에 대해 많은 증폭 band를 형성하였으나, URP-07과 URP-12 primer는 전 균주에 걸쳐 매우 미약한 증폭반응을 나타내었다. *Alternaria* 균주는 10종의 URP primer 별로 증폭된 band의 수에 차이를 보였는데, URP-06 primer에서 56개로 가장 많았고 URP-09에서 23개로 가장 적었다. 대부분의 primer에서는 30~40개 정도의 band가 증폭되었다. 증폭생성물 중에는 중간 특이적으로 존재하는 몇 개의 band들이 관찰되어 이들을 agarose gel로부터 회수하여 pGEM T-Vector (Promega)에 cloning을 수행 중에 있다(Fig. 4-46).

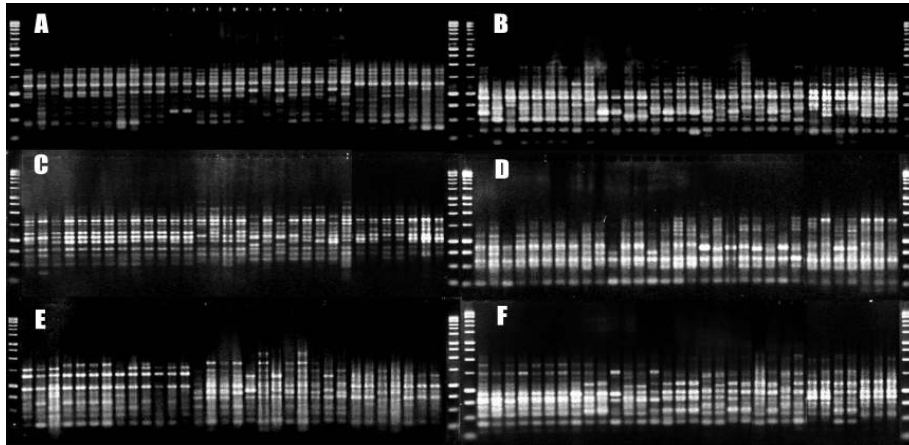


Fig. 4-46. PCR fingerprinting patterns of small-spored *Alternaria* species amplified by primers URP-01 (A), URP-02 (B), URP-04 (C), URP-05 (D), URP-06 (E), and URP-11 (F): lanes 1~13, *A. gaisen*; 14~25, *A. mali*; 26~32, *A. longipes*. Molecular weight marker are 1 kb DNA ladder.

나. *Alternaria panax*의 종특이성

SRILS UniPrimer™ Kit 12종의 primer 중 URP-05 primer로 URP-PCR을 실시한 결과 다른 종에는 증폭되지 않고 *A. panax* 균주들에서 만 증폭되는 대략 1260 bp의 밴드를 얻었다 (Fig. 4-47). 이들 밴드의 염기서열 분석을 실시하였다(Fig. 4-48).

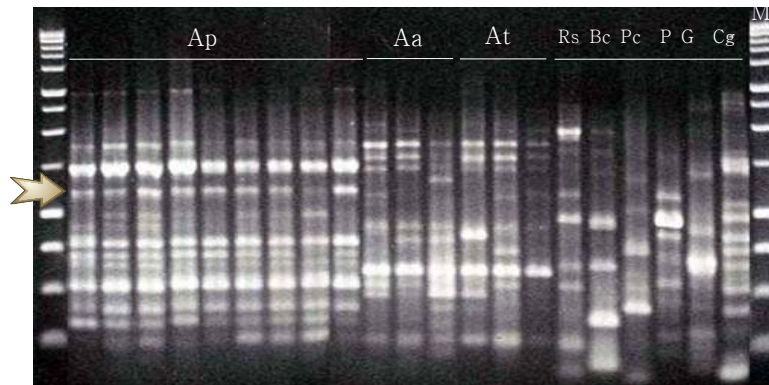


Fig. 4-47. PCR fingerprinting pattern generated from total genomic DNA of *Alternaria* spp. with URP-5. Ap : *A. panax* isolates CNU-APG5, CNU-APG9, CNU-3405, CNU-3161, CNU-3231, CNU-3356, CNU-3253, CNU-3382, CNU-3010; Aa : *A. alternata* isolates CNU-SS703, IMI-89343, CNU-NI701; At : *A. tenuissima* isolates IMI-79630, IBT-8398, CNU-A005; Rs : *Rhizoctonia solani*, Bc : *Botrytis cinerea*, Pc : *Phytophthora capsici*, P : *Pythium* sp., G : Ginseng DNA, Cg : *Colletotrichum gloeosporioide*; M: 1-kb DNA ladder; The arrows point to unique fragments present only in *A. panax*.

5' → 3'

```
1 CTGCGATGCTCCCGGCCCATGGCGGCCCGCGGAATTCGATTGGCAAGCTGGTGGGAGG
61 TACGAGCACCACTACTCCAACAACCAGTACGGTATCAAGGCGCTGATGTTTACGCGACGAC
121 GCAGATACGACGGCATACTAGGCGTCCAATCCGCCCTAGAAGTCCCTCCGCACCCCTTCACG
181 AAAACAACATCCAAACCTACTGTCCGCTTTCGCGCTGATAAACTGGACAAACGAAGAGGGCG
241 CGCGTTTTCCCGGGCGCGATGATGGCGTCTGGTGTGTGGAGCACACATAGCAGCACAGGTC
301 AATCTTACATGCCATTCTCTCCGTGACACCGACGGTATGTCCATGGAATCAGCTTTACAGG
361 AAACGGGATACCTAGGTCCATCGCCCTGCGATTACCGGGAGAACAGTCTATCAGCGCATT
421 TTGAACTCCACATCGAGCAAGGCCCTATTCTAGAAAAGGAAGGAAAGAGTGTGGGTATCG
481 TGACGAGCGTACAGGGCATGAAATGGTATGCCATCCGCGTTACAGGACGAGAAGGACATT
541 CTGGTACGACGCCCATGGTTCGGTTCGAGCAGATGCGCTAGTCACAGCTTPanax F / Panax R
601 CTGCTGTGCGCGATACGGCGCTTCATAGTGGCCTGGGCGTTGCTACCGTGGGTGTTATCA
661 GCAGTGATACGAGTTCCCAAGCTACTATACCCGCTGGTGTAGCATTTGTGCGTGGATGTCA
721 GATGCGAGACCGACGACCTCGTTACTCAGCTTTCGGAAAAGACACTACACGCGTTTGACC
781 AGATTATCAGCGAGGAAGACAATGGGACGACGTATCGCGTGGAGCGCACGTGGGGCTTAC
841 CAGAGTCAAAGTTTCATCCTGATTGTATTGGCGCTGTGAGGAAGGCAGCAGTGGGACTGG
901 TGGGTGAAGTGC AAGTCATGGACATGAAGAGTAGAGCGGGACACGACAGTGCCTGGACGA
3405F/3405RGTCCGACGAGTATGATCTTCGTACCTAGTAGAGGGGGAATAAGCCATAATC
1021 CGGAGGAATATACGAGTCCAGAGCATTGTGCACTCGGGGCGCAGGTTTTACTCGATACGG
1081 TACTAGAGTATGATGAGAGAACCAGGAGCGGAGAGATTGGAGCCTAGGGTCTGCATATG
1141 ACAAGGATATCGAGCGAGTTTTATTTCTACCAACATGAAGACTCGATGAACAACTATTTAC
1201 AAAGAAGTACCTCCCACCAGCTTGCCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCCGCTGCAGGTCG
1261 ACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCAT
```

Fig. 4-48. The nucleotide sequence of *A. panax*-specific URP marker identified in this study. Bold letter indicates each primer site designed in this study.

1) 3405F/3405R primer의 특이성과 민감도

이들 염기서열을 기초로 3405F/3405R primer를 제작하였다(Table. 4-11). 이들 특이적 primer를 이용하여 특이성 및 민감성을 조사하였다. 이병 조직으로부터 분리한 11개의 *A. panax* 균주에서 약 1.2kb 밴드가 증폭되었다. *A. panax*와 형태적으로 유사한 *A. alternata*, *A. tenuissima*, 및 기타 식물병원균 *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora cactorum*, *Pythium* sp. 및 *Colletotrichum gloeosporioide* 및 인삼 잎에서는 증폭되지 않았다(Fig. 4-49). 민감성 실험에서는 genomic DNA 농도가 200 pg에서까지 1.2kb의 명확한 증폭 산물을 얻을 수 있었다.(Fig. 4-50)

Table 4–11. Sequence of specific primer for detecting *A. panax*

Target species	Specific primer	Sequence (5'–3')	Length	Tm	%GC	Applicon size (bp)
<i>A. panax</i>	3405F	CCACTACTCCAACAACCAGT	20	55.05	50.00	1200
	3405R	TTCATCGAGTCTTCATGTTG	20	54.61	40.00	

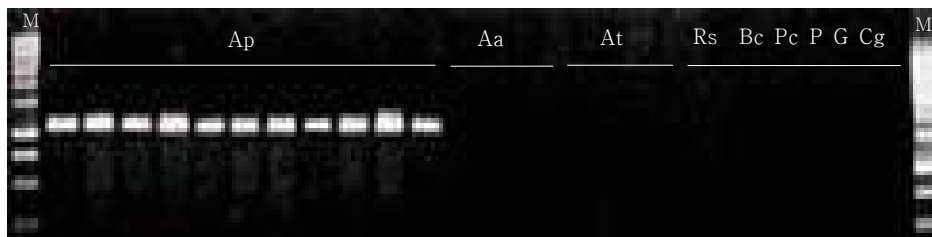


Fig. 4–49. PCR amplification of *A. panax* and other fungi using *A. panax*–specific primer (3405F/3405R). Ap : *A. panax* isolates CNU–APG4, CNU–APG5, CNU–APG9, CNU–3405, CNU–3253, CNU–3578, CNU–3356, CNU–3012, CNU–3161, CNU–3213, CNU–3231; Aa : *A. alternata* isolates CNU–SS703, IMI089343, CNU–NI701; At : *A. tenuissima* isolates IMI–79630, IBT–8398, CNU–A005; Rs : *R. solani*, Bc : *B. cinerea*, Pc : *P. cactorum*, P : *Pythium* sp. G : Ginseng DNA, Cg : *C. gloeosporioide*; M: 1–kb DNA ladder.

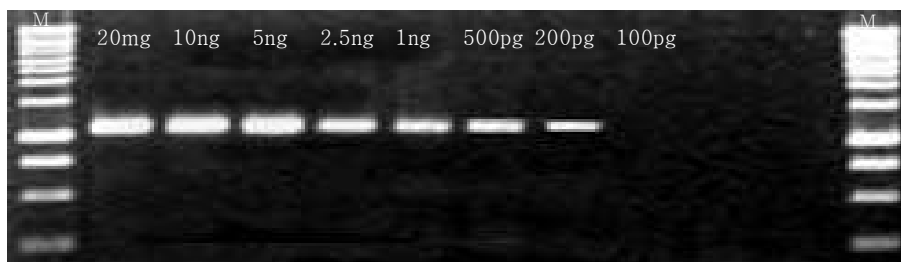


Fig. 4–50. Sensitivity of PCR amplification using *A. panax*–specific primer (3405F/3405R). PCR amplification of serial amounts of genomic DNA (100pg to 20ng) from *A. panax* isolate 3405; M: 1–kb DNA ladder.

가) 신속한 추출방법을 이용한 DNA의 PCR

신속히 균류의 DNA를 얻기 위한 절차는 PCR detection을 통해 가능하다. PCR 증폭 반응을 통해 얻는 적절한 DNA는 이러한 방법을 이용하면 하루 안에 얻을 수 있다. 이 방법으로 추출된 genomic DNA을 사용하여 *A. panax* primer인 3405F/3405R primer로 대략 1200-bp의 DNA fragment의 증폭을 완벽하게 유도하였다.(Fig. 4-51) 이러한 절차는 5mg~2.5mg 의 *A. panax* 균사체로부터 추출된 DNA template를 사용하였을때 *A. panax*의 빠른 검출을 가져왔다 (Fig. 4-52).

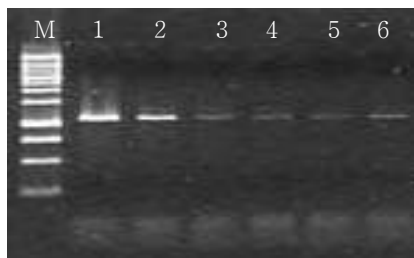


Fig. 4-51. PCR amplification of *A. panax* DNA extracted the rapid DNA extraction procedure using *A. panax*-specific primer (3405F/3405R). Lane 1: DNA extracted by CTAB procedure (pure *A. panax* DNA). Lanes 2 to 6: DNA extracted by the rapid extraction procedure; M: 1-kb DNA ladder.

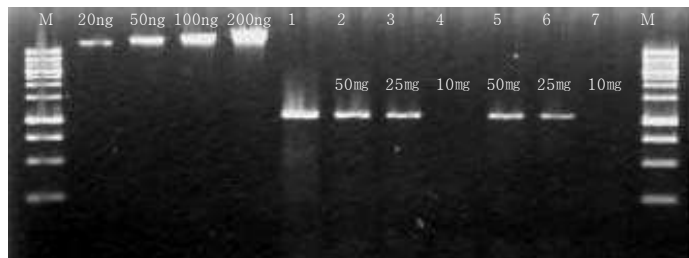


Fig. 4-52. PCR amplification of DNA from *A. panax* using the rapid DNA extraction procedure. Lane 1: DNA extracted by CTAB procedure (CNU-3405); Lanes 2 to 7: DNA extracted by the rapid extraction procedure(CNU-AP0405, CNU-AP0407); M: 1-kb DNA ladder.

나) *A. panax*와 다른 곰팡이의 DNA 혼합액에서 특이적 band의 검출

검출실험은 *A. panax* 나 다른 fungus 또는 인삼잎에서 만든 동일 볼륨의 DNA를 혼합하여 PCR template로 사용한 PCR 반응으로 수행하였다. 오직 *A. panax*의 특이적인 밴드만이 제작된 3405F/3405R primer쌍을 사용한 DNA mixture에서 검출되었다. (Fig. 4-53.)

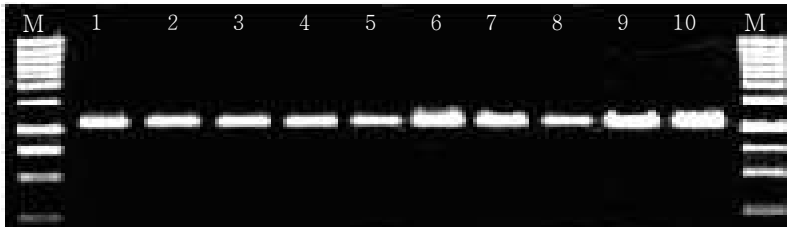


Fig. 4-53. PCR amplified products using *A. panax*-specific primers (3405F/3405R). Lane 1: *A. panax* (CNU-3356), 2: *A. panax* (CNU-3356)+*A. alternata* (CNU-SS703), 3: *A. panax* (CNU-3356)+*A. tenuissima* (CNU-A005), 4: *A. panax* (CNU-3356)+*R. solani*, 5: *A. panax* (CNU-3356)+*B. cinerea*, 6: *A. panax* (CNU-3356)+*P. cactorum*, 7: *A. panax* (CNU-3356)+*Pythium* sp., 8: *A. panax* (CNU-3356)+Ginseng leaf DNA, 9: *A. panax* (CNU-3356)+*C. gloeosporioides*, 10: *A. panax* + *B. cinerea* + *C. gloeosporioides*; M: 1-kb DNA ladder.

2) PanaxF/PanaxR primer의 특이성과 민감도

이들 염기서열을 기초로 PanaxF/PanaxR primer를 제작하였다(Table. 4-12). 이들 특이적 primer를 이용하여 특이성 및 민감성을 조사하였다. 여러 숙주에서 분리한 *A. panax* 14균주 모두에서 470bp의 밴드가 증폭되었다.(Fig. 4-54) *Alternaria panax*가 들어있는 샘플에서만 470bp의 PCR 산물이 증폭 되는 것을 확인할 수 있었다. 그 외의 *A. alternata*, *A. tenuissima*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora cactorum*, *Pythium* sp. 등의 다른 진균성 식물병원균 및 인삼에서는 증폭된 DNA 밴드를 검출할수 없었다.(Fig. 4-55) DNA 샘플양에 따른 PCR에 의한 PanaxF와 PanaxR primer쌍의 증폭 민감성 정도를 측정하기 위해 *A. panax*의 게놈 DNA 양을 최고 40ng에서 500fg까지 조절한 다음, 여기에 PanaxF와 PanaxR primer쌍을 연속적으로 반응시켜 확인하였으며 그 결과는 다음(Fig. 4-56)에 나타내었다.

그 결과, 상기 primer쌍을 이용하였을 때 11레인까지 명확하게 증폭산물이 나타난 것을 볼 수 있었고, 이를 미루어 최저 검출 수준은 5pg이었음을 알 수 있었다.

Table 4-12. Sequence of PanaxF/PanaxR for detecting *A. panax*.

Target species	Specific primer	Sequence (5'-3')	Length	Tm	%GC	Applicon size (bp)
<i>A. panax</i>	Panax F	ATAGCAGCACAGGTCAATCT	20	55	45	476
	Panax R	CTTTTCCGAAAGCTGAGTAA	20	55	40	

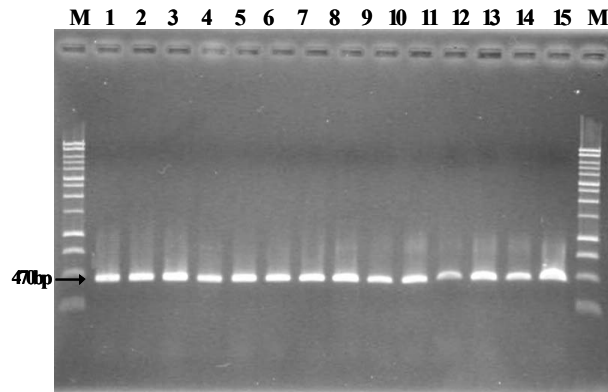


Fig. 4-54. PCR amplification of *A. panax* using *A. panax*-specific primer (PanaxF/PanaxR). *A. panax* isolates 1; CNU-APG4, 2; CNU-APG5, 3; CNU-APG9, 4; CNU-3405, 5; CNU-3253, 6; CNU-3578, 7; CNU-3356, 8; CNU-3012, 9; CNU-3161, 10; CNU-3213, 11; CNU-3231, 12; CNU AP0401, 13; CNU AP0405, 14; CNU AP0409, M; 1-kb DNA ladder.

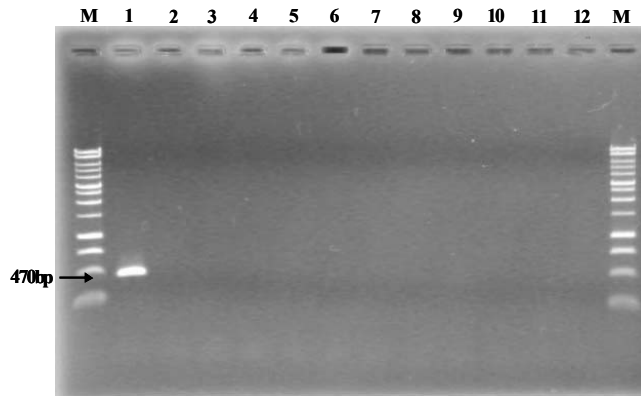


Fig. 4-55. PCR amplification of *A. panax* and other fungi using *A. panax*-specific primer (PanaxF/PanaxR). 1; *A. panax* isolates CNU 3405, 2-4; *A. alternata* isolates CNU-SS703, IMI089343, CNU-NI701; 5-7; *A. tenuissima* isolates IMI-79630, IBT-8398, CNU-A005; 8; *R. solani*, 9; *B. cinerea*, 10; *P. cactorum*, 11; *Pythium* sp. 12; Ginseng DNA, M; 1-kb DNA ladder.

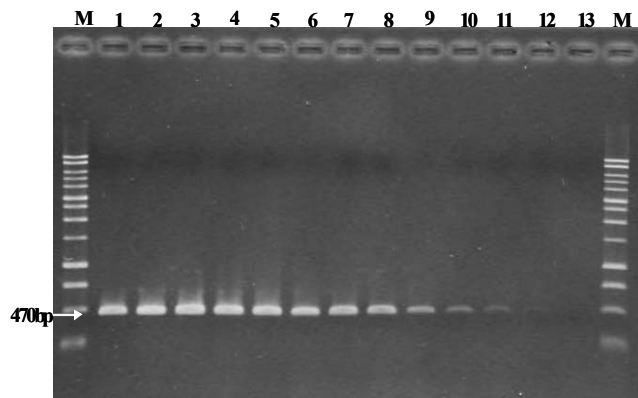


Fig. 4-56. Sensitivity of PCR amplification using *A. panax*-specific primer (PanaxF/PanaxR). PCR amplification of serial amounts of genomic DNA (40pg to 500fg) from *A. panax* isolate 3405; M: 1-kb DNA ladder.

가) *A. panax*와 다른 곰팡이의 DNA 혼합액에서 특이적 band의 검출
*Alternaria panax*와 형태적으로 유사한 *A. alternata*, *A. tenuissima*, 및 기타 식물병원균 *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora cactorum*, *Pythium* sp. 및

Colletotrichum gloeosporioide 및 인삼 잎으로부터 DNA를 얻고, 이들을 *Alternaria panax*의 DNA와 같은 비율로 혼합한 후 PanaxF 와 PanaxR primer를 이용해 위와 동일한 방법으로 PCR 증폭을 실시하였다. 그 결과 *Alternaria panax* 가 들어있는 샘플에서만 470bp의 PCR 산물이 증폭 되는 것을 확인할 수 있었다. (Fig. 4-57)

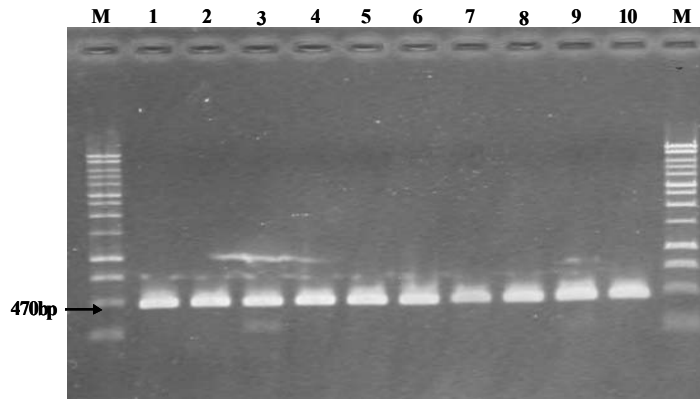


Fig. 4-57. PCR amplified products using *A. panax*-specific primers (PanaxF/PanaxR). Lane 1: *A. panax* (CNU-3356), 2: *A. panax* (CNU-3356)+*A. alternata* (CNU-SS703), 3: *A. panax* (CNU-3356)+*A. tenuissima* (CNU-A005), 4: *A. panax* (CNU-3356)+*R. solani*, 5: *A. panax* (CNU-3356)+*B. cinerea*, 6: *A. panax* (CNU-3356)+*P. cactorum*, 7: *A. panax* (CNU-3356)+*Pythium* sp., 8: *A. panax* (CNU-3356)+Ginseng leaf DNA, 9: *A. panax* (CNU-3356)+*C. gloeosporioides*, 10: *A. panax* + *B. cinerea* + *C. gloeosporioides*; M: 1-kb DNA ladder.

나) 감염된 인삼잎에서 검출

인삼점무늬병 이병 조직, 탄저병 이병 조직과 건전조직의 일부를 잘라 위에 기술한 방법으로 DNA를 분리하여 PanaxF 와 PanaxR primer를 사용하여 위에 기술한 조건으로 PCR 증폭을 실시하였다. PCR을 실시한 결과 탄저병 이병 조직과 건전부위의 조직은 증폭 결과가 나타나지 않았지만 인삼점무늬병 이병 조직에서는 정확하게 470bp의 증폭 산물을 확인할 수 있었다(Fig. 4-58).

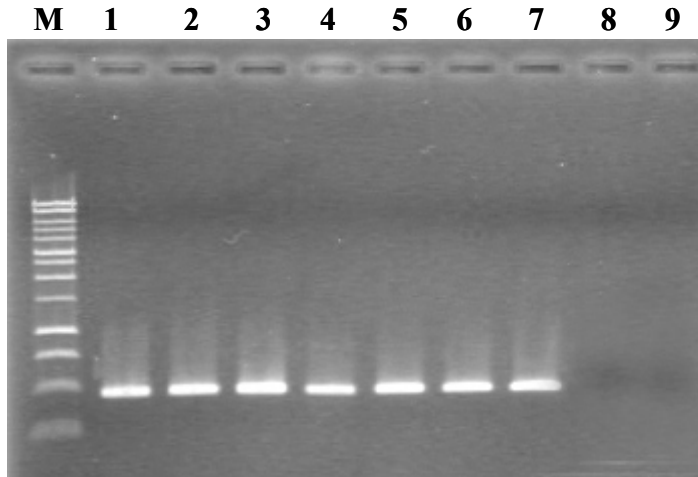


Fig. 4-58. PCR amplification of DNA from infected ginseng leaves using detection Kit. *A. panax* in ginseng leaves inoculated with *A. panax*. Lane 1-7; ginseng leaf infected with *A. panax*, Lanes 8; ginseng leaf infected with *Botrytis cinerea*, Lanes 9; healthy ginseng leaf, M: 1-kb ladder.

3) 진단 Kit의 포장검정

*A. panax*의 빠른 동정 및 검출을 실시하기 위하여 Sun Genetics Co.에 의뢰하여 진단 Kit (Sun Genetics Co.)을 제작하였고 이들의 구성은 표 13과 같다 (Fig. 4-59). 인삼 점무늬병 이병 조직, 탄저병 이병 조직과 건전조직의 일부를 잘라 진단 Kit을 이용하여 DNA를 분리한 결과 쉽고 빠르게 게놈 DNA를 분리하였고 다양한 게놈 DNA 양을 얻을 수 있었다 (Fig. 4-60). PanaxF 와 PanaxR primer를 사용하여 위에 기술한 조건으로 PCR 증폭을 실시하였다. PCR을 실시한 결과 탄저병 이병 조직과 건전부위의 조직은 증폭 결과가 나타나지 않았지만 인삼점무늬병 이병 조직에서는 정확하게 470bp의 증폭 산물을 확인할 수 있었다(Fig. 4-61).



Fig. 4-59. Detection kit of *Alternaria panax*.

Table 4-13. Composition of detection kit

분류	용량	수량
Glass bead	5 g	1 tube
마쇄봉	25	1 pack
Solution A	15 ml	1 bottle
Solution B	7 ml	1 bottle
Solution C	7 ml	1 bottle
Buffer W	5 ml	1 bottle
Spin-column	25 columns	1 pack
Collection tube	25 tubes	1 pack
2X Taq premix	400 ul	1 tube
100 bp DNA ladder	50 ul	1 tube
Manual		1

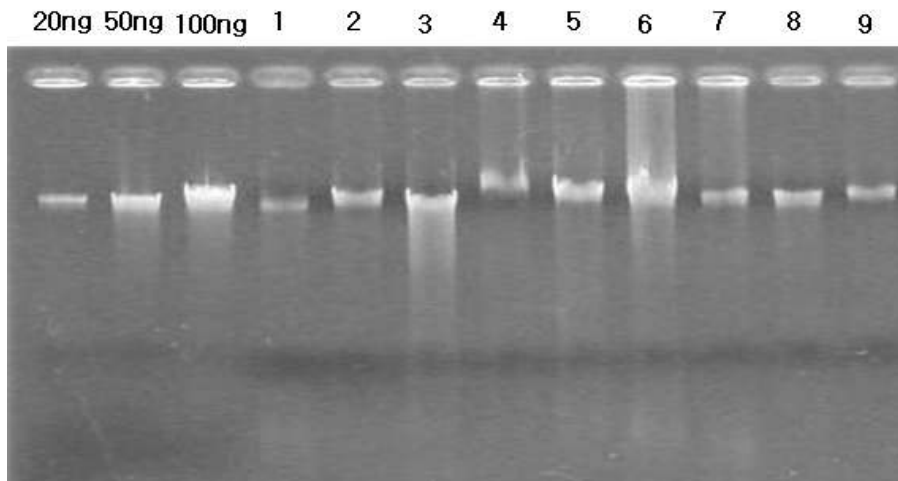


Fig. 4-60. DNA quantity extracted from infected ginseng leaves using detection Kit.

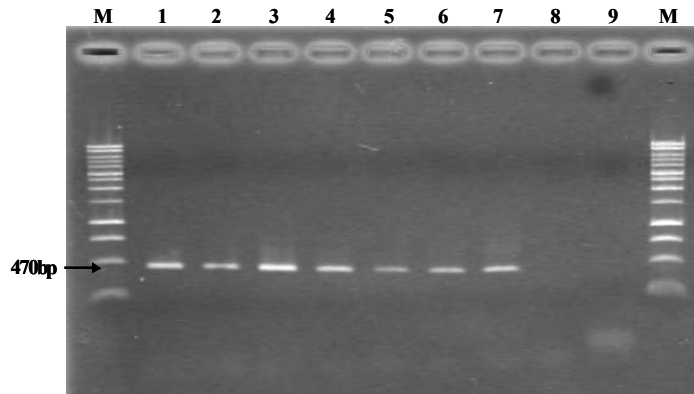


Fig. 4-61. PCR amplification of DNA from infected ginseng leaves using detection Kit. *A. panax* in ginseng leaves inoculated with *A. panax*. Lane 1-7; ginseng leaf infected with *A. panax*, Lanes 8; ginseng leaf infected with *Botrytis cinerea*, Lanes 9; healthy ginseng leaf, M: 1-kb ladder.

다. *A. gaisen* 동정을 위한 DNA markers

1) AFLP markers의 SCAR로 전환

7개의 서로 다른 primer pair의 조합을 이용한 AFLP를 통해 *A. gaisen*, *A. mali*, *A. tenuissima*, *A. alternata*, *A. longipes*의 균주를 분석했다. 다른 종간의 유전적 다형현상을 유발하는 이러한 primer는 이들 증폭반응의 재현성을 확인하기 위해 몇 차례 검정되었다.

M132/E01 Primer pair은 AFLP에서 *A. gaisen*의 모든 균주에서 약 370bp의 single band를 증폭했지만 다른 종에서는 증폭반응이 나타나지 않았다(Fig. 4-62). 이러한 PCR product는 *A. gaisen*의 균주로부터 분리되었고 이들 밴드의 염기서열 분석을 실시하였다.(Fig. 4-63). 염기서열 정보는 SCAR AG-F/AG-R primer pair를 제작하는데 이용되었다(Table 4-14).

2) *A. gaisen*의 특이성과 민감도

primer pair를 이용한 종 특이적 증폭을 위한 최적의 PCR 조건은 annealing temperature 가 58°C 일때이다. 모든 반응은 최소 두 번씩 반복 수행했으며 결과는 일치했다.

5 종의 *Alternaria*로부터 얻은 total genomic DNA에 대한 특이성 검정에서, *A. gaisen* 종 특이적 primer pair는 약 266bp의 band가 증폭되었다. 다른 *Alternaria* 종에 특

이적 primer를 검정했을 때 증폭반응은 일어나지 않았으며, 다른 종의 균류에서도 교차 반응이나 추가적 fragment가 관찰되지 않았다(Fig. 4-64)

PCR 검정을 통해 확인할 수 있는 최소량의 genomic DNA의 양을 결정하기 위해 PCR 반응은 50pg~20ng의 범위에서 genomic DNA양을 변화시키면서 수행하였다. AG-F/AG-R primer pair 을 이용하여 No.15A 균주의 genomic DNA로부터 증폭된 PCR product는 Fig. 4-19에 나타나 있다. *A. gaisen*의 genomic DNA 총량이 50pg 이상이면 육안으로 확인 가능한 PCR product를 산출하는데 충분한 양이다(Fig. 4-65).

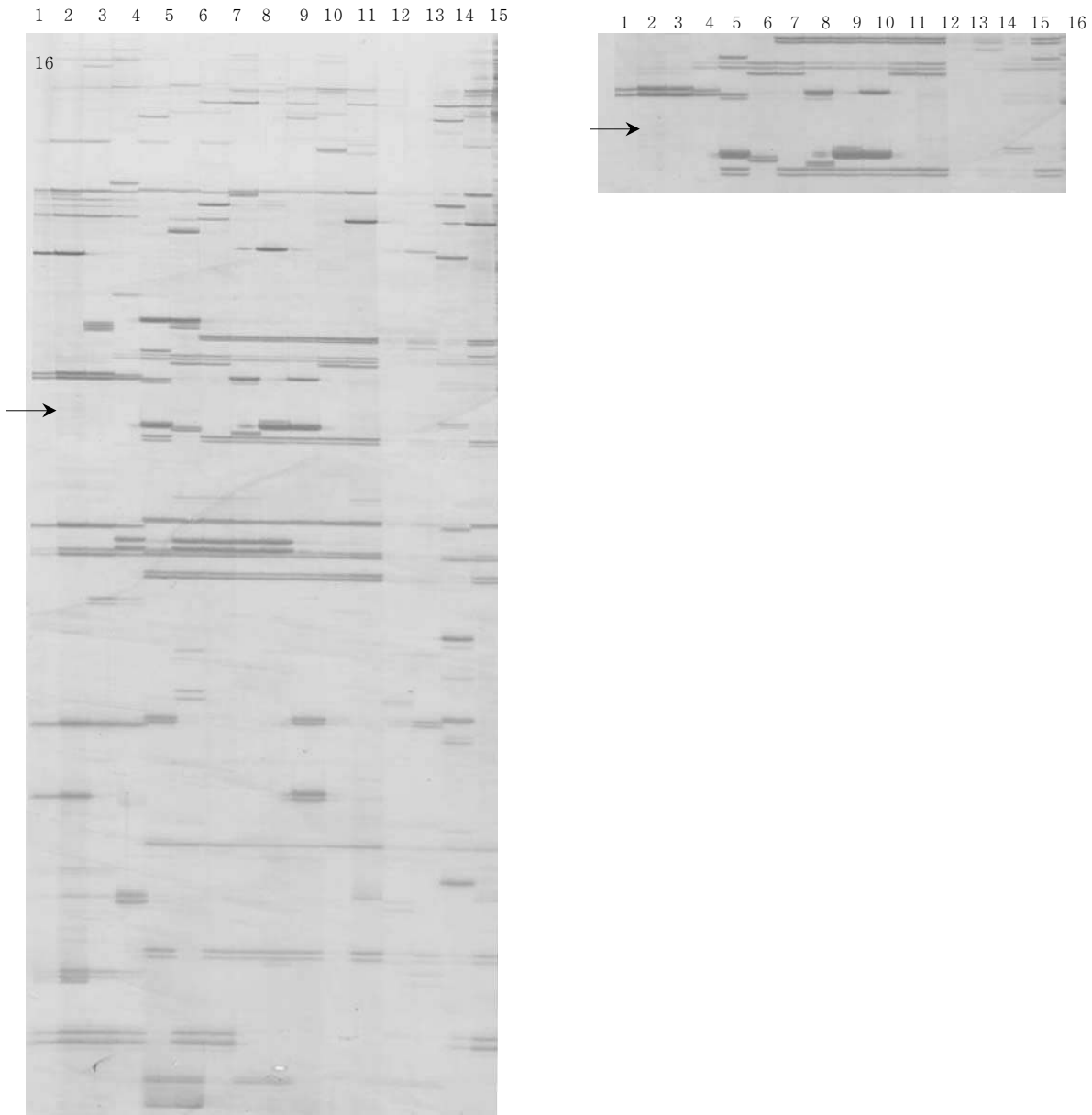


Fig. 4-62. AFLP patterns of *A. gaisen* and other *Alternaria* species. Lanes 1 to 4: *A. gaisen* (AK-42, AK-21, K-3, No. 15A); Lanes 5 to 8: *A. mali* (IFO-8984, M-72, M-89, Am-22); Lanes 9 to 12: *A. tenuissima* (IBT-8398, IBT-8400, IMI-79630, CNU-A013); Lanes 13 to 16: *A. alternata* (EGS 35-193, IMI-147909, IMI-89343, CNU-HR701); produced by primer set (M132/E01). The arrows point to unique fragments present only in *A. gaisen*.

1 GATCCAGTAGCCCGCGGTCGATGCATACCAGAGCTGCCAAGGCGCAGACAGTCTTGGTA
 61 GAGGACCAGATACACGTTACAGTGTCTTTCTCCCACGAGCGAGTTCGAGCTTCATCTGCG
 121 TAACCGCCCCAGATGTCGACGACGTCTTTGCCATCGACGTTGACGCAGACAGAGGCGCCG
 181 AGCTCTTCTCCAGAGTCGAGATAGGACTGGAAGAGGTCTTTGACCTTGGCAAAGCGGGGT
 241 TCGCAGGTTCCCTGGACGTTGGCCATGGTGATGGAAGTTCCTGCTAAAGTTTCGGATACC
 301 TTCGGATGATTTTGTGTTGTACCTGTGTTGTATTTCGTGATGGTCGAAAATCTGGAGCACC
 361 AGGTTTTATATG

Fig. 4–63. The nucleotide sequences of *A. gaisen*–specific AFLP marker identified in this study. Bold letter indicates forward and reverse species–specific primer sites designed to sequence.

Table 4–14. Sequences of specific primers for detecting *A. gaisen*

Target species	Specific primer	Sequence	Length	Tm	%GC	Applicon size (bp)
<i>A. gaisen</i>	AG–F	5'AGATACACGTTACAGTGTCTTTC	25	55.96	40	266
		TC–3'				
	AG–R	5'–ATACAACACAGGTACAACACAAA	25	56.75	32	
		AT–3				

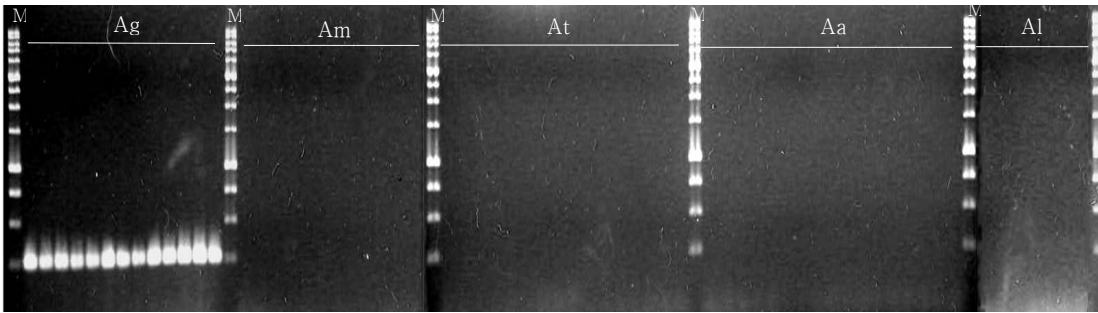


Fig. 4-64. PCR amplification of *A. gaisen* and other *Alternaria* species using *A. gaisen*-specific primer (AG-F/AG-R). Ag: *A. gaisen* isolates (AK-42, AK-21, K-3, No.15A, AK-11, K-1, K-2, K-4, K-5, O-274, O-275, CNU-SS704, CNU-SS706); Am: *A. mali* isolates (IFO-8984, M-72, M-89, Am-22, AM-17, Am-28, M-69, M-70, M-71, M-88, O-153, O-T-M1); At: *A. tenuissima* isolates (IBT-8398, IBT-8400, IMI-79630, CNU-013, CNU-A005, CNU-A006, CNU-A007, CNU-A014, CNU-A017, CNU-A020, CNU-A067, STR N-1, O-T-L); Aa: *A. alternata* isolates (EGS 35-193, IMI-147909, IMI-89343, CNU-HR701, CNU-A079, CNU-NI701, CNU-NI716, CNU-HW703, CNU-HW704, CNU-HW712, CNU-SS701, CNU-SS702 CNU-SS703, CNU-SS705, CNU-HR702); Al: *A. longipes* isolates (AT-204, AT-246, AT-2a-1, AT-2b-1, AT-34b, AT-3b-1, O-205); M: 1kb DNA ladder.

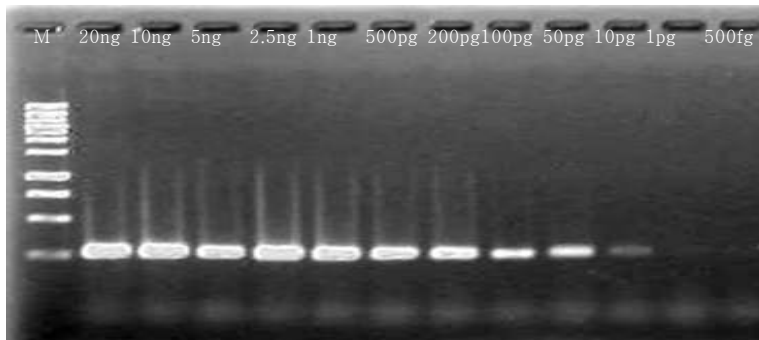


Fig. 4-65. Sensitivity of PCR amplification using *A. gaisen*-specific primer (AG-F/AG-R). Polymerase chain reaction amplification of serial amounts of genomic DNA (10pg to 20ng) from *A. gaisen* isolate No.15A; M: 1-kb DNA ladder.

3) *A. gaisen*과 다른 *Alternaria* spp.의 DNA에서 특이 band의 검출

검출실험은 *A. gaisen*나 다른 *Alternaria* sp.의 동일 볼륨의 DNA를 혼합하여 PCR template로 사용한 PCR 반응으로 수행되었다. *A. gaisen*과 다른 *Alternaria* sp.의 DNA mixture에서 AG-F/AG-R primer pair를 이용한 PCR test에서는 오직 *A. gaisen* 만이 검출되었다(Fig. 4-66).

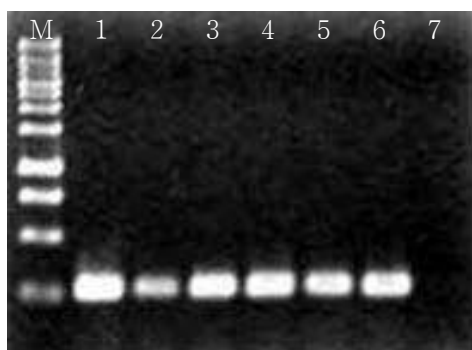


Fig. 4-66. PCR amplified products using *A. gaisen*-specific primer (AG-F/AG-R). DNA mixtures using species-specific primer set (AG-F/AG-R). Lane 1: *A. gaisen* (AK-42); Lane 2: *A. gaisen* + *A. mali* (IFO-8984); Lane 3: *A. gaisen* + *A. tenuissima* (IBT-8398); Lane 4: *A. gaisen* + *A. alternata* (EGS 35-193); Lane 5: *A. gaisen* + *A. longipes* (AT-204); Lane 6: *A. gaisen* + *A. mali* + *A. tenuissima* + *A. alternata* + *A. longipes*; Lane 7: *A. mali* + *A. tenuissima* + *A. alternata* + *A. longipes*; M: 1-kb DNA ladder.

4) 신속한 추출방법을 이용한 DNA의 PCR

신속히 균류의 DNA를 얻기 위한 절차는 PCR detection을 통해 가능하다. PCR 증폭 반응을 통해 얻는 적절한 DNA는 이러한 방법을 이용하면 하루 안에 얻을 수 있다. 이러한 방법으로 추출한 genomic DNA를 이용하여, *A. gaisen*의 AG-F/AG-R primer pair를 이용하여 약 266bp DNA fragment의 증폭반응을 유도할 수 있다(Fig. 4-67.). 이러한 방법은 5mg~2.5mg 의 *A. panax* 균사체로부터 추출된 DNA templates를 사용하였을 때 *A. panax*의 빠른 검출을 가져왔다(Fig. 4-68).

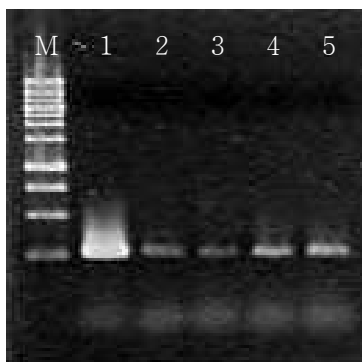


Fig. 4-67. PCR amplification of *A. gaisen* DNA extracted the rapid DNA extraction procedure using *A. gaisen*-specific primer (AG-F/AG-R). Lanes 1: DNA extracted by CTAB procedure; Lanes 2 to 5: DNA extracted by rapid extraction procedure; M: 1-kb DNA ladder.



Fig. 4-68. PCR amplification of DNA from *A. gaisen* using the rapid DNA extraction procedure. Lane 1: DNA extracted by CTAB procedure (No.15A); Lanes 2 to 7: DNA extracted by the rapid extraction procedure(AG0402, AG0405); M: 1-kb DNA ladder.

C. 주요 작물병원균의 종 다양성 DNA profile의 database 구축 및 조기진단 kit 개발
가. 주요 작물 병원균의 DNA profile database 구축 및 웹 기반의 관련 정보 검색 시스템 개발

1) *Phytophthora* spp.의 URP-PCR 핵산지문 표준지표

세 번째 테마에서는 다양한 기주에 국내 고질적인 병을 일으키는 15종 80균주 *Phytophthora* spp.을 대상으로 URP primer의 PCR핵산지문을 실시 종간, 종내의 PCR다형성을 조사하였다. 우선 12종류의 URP primer를 screening한 결과 URP2F가 *Phytophthora* spp.에 대하여 유용성이 판명되어 표준 PCR primer로서 선발 연구에 이용하였다.

Fig. 4-69는 *Phytophthora* spp.를 URP2F로 PCR분석한 전기영동 결과를 나타낸 것으로서 균주간, 종간의 특징적인 PCR pattern을 관찰 할 수 있다. 예로서 21 균주로 구성된 *Phytophthora drechslei* 내에는 6개 type의 PCR다형성이 검출되었으며 11균주로 구성된 *P. cryptogea* 는 6개 type의 PCR다형성을 보여 주었다. 그러나 두 종간의 차이는 뚜렷이 나타났다. *P. capsici*의 경우는 6개 type의 PCR다형성을 보여주었으나 KACC40471균주는 *P. cryptogea*의 KACC40407과 KACC40408 균주와 같은 패턴을 보여 *P. cryptogea* 균주일 가능성을 시사하여 주었다. 그 밖의 다른 *Phytophthora* spp. 경우에도 종간에 뚜렷한 DNA 다형성을 보여 URP-PCR 패턴을 이용한 *Phytophthora* spp.의 종 동정 및 종내의 유전적 다양성 (Genetic diversity)조사를 위하여 유용 할 것으로 사료되었다.

위에서는 URP2F primer를 이용한 PCR다형성을 기술하였다. 종 별 특징적인 PCR profile을 형성하였으나 본 연구는 다양한 profile 내에서의 새로운 균의 동정을 위해서는 컴퓨터 프로그램을 이용한 신속한 동정시스템을 개발, 적용하는 것에 목적을 두고 있어 GelComar II program을 이용하여 균 동정 시스템 구축을 시도하였다.

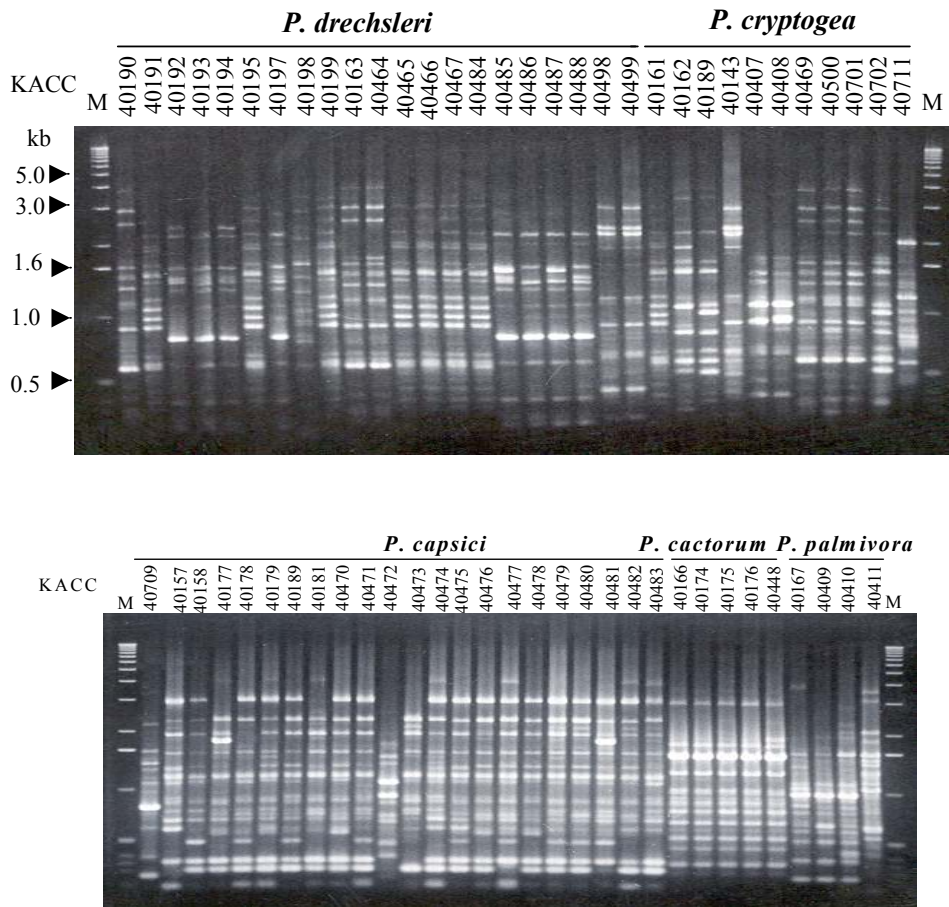


Fig. 4-69. PCR fingerprint of *Phytophthora* spp. amplified by primer URP2F.

이를 위하여 미리 제작하여놓은 PCR profile을 이 program에 입력하여 특정 균의 D/B 구축을 하여놓는다. 이때 입력되는 밴드들은 유사밴드별로 재배치되고 각각의 균주간의 유연관계가 dendrogram으로 표시된다. 이렇게 구축된 D/B를 이용하여 미 동정된 균을 동정하고 싶을 때 PCR 밴드를 D/B에 입력 동정시스템을 작동시키게 되면 자동으로 DNA 패턴에 의하여 종 동정이 완료되는 것이다. 밴드의 유사도는 기준마커를 기준으로 밴드와 밴드간의 거리에 의하여 computer에서 자동으로 결정된다. Fig. 4-70은 균주간 group type을 GelCompar II program에 입력 D/B 구축한 예를 보여 주고 있다.

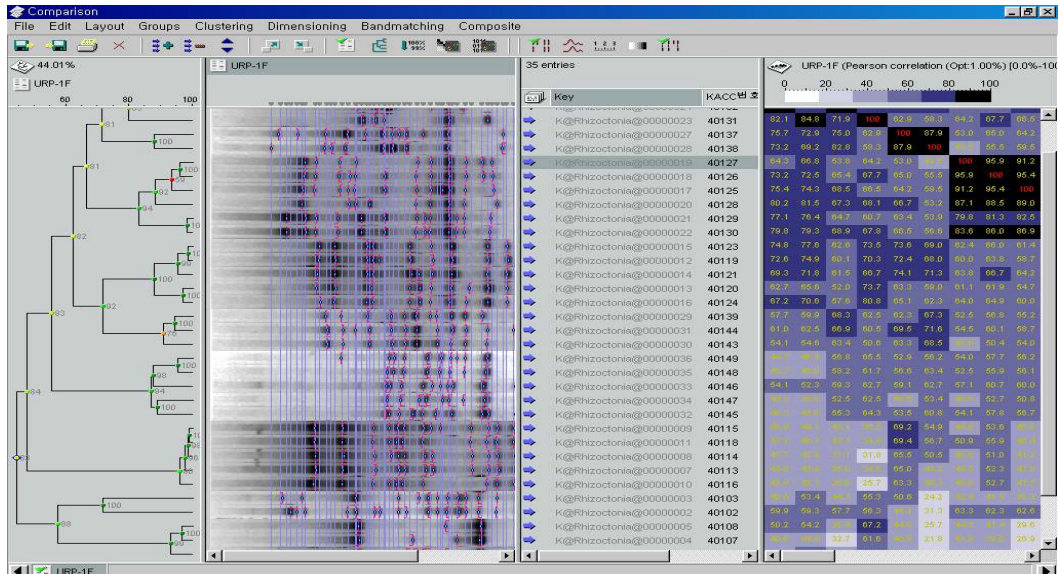


Fig. 4-70. Database of URP-PCR product constructed by GelcomparII.

2) *Trichoderma* spp.의 URP-PCR profile 작성 및 database 구축

본 연구에서는 다양한 기주에 국내 고질적인 병을 일으키는 13종 41균주 *Trichoderma* spp.을 대상으로 URP primer의 PCR핵산지문을 실시 종간, 종내의 PCR다형성을 조사하였다. 우선 12종류의 URP primer를 screening한 결과 URP2R가 *Trichoderma* spp.에 대하여 유용성이 판명 되어 표준 PCR primer로서 선발 연구에 이용 하였다.

Fig. 4-71은 *Trichoderma* spp.를 URP2R로 PCR분석한 전기영동 결과를 나타낸 것으로서 균주간, 종간의 특징적인 PCR pattern을 관찰 할 수 있다. 41 균주로 구성된 *Trichoderma* 내에는 8개 type의 PCR 다형성이 검출되었으며 10균주로 구성된 Group B2와 4균주로 구성된 Group B1은 형태학적 분류에서와 마찬가지로 종 명칭에 큰 차이를 보였다. 특히 *T. harzianum*의 경우에는 이번 결과를 통해 있어서 형태적 분류에 많은 한계점이 있음을 알 수 있었다. 그러나 그 외의 종간의 차이는 뚜렷이 나타났다. *Trichoderma* spp. 경우에도 종간에 뚜렷한 DNA 다형성을 보여 URP-PCR 패턴을 이용한 *Trichoderma* spp.의 종동정 및 종내의 유전적 다양성 (Genetic diversity) 조사를 위하여 유용 할 것으로 사료되었다.

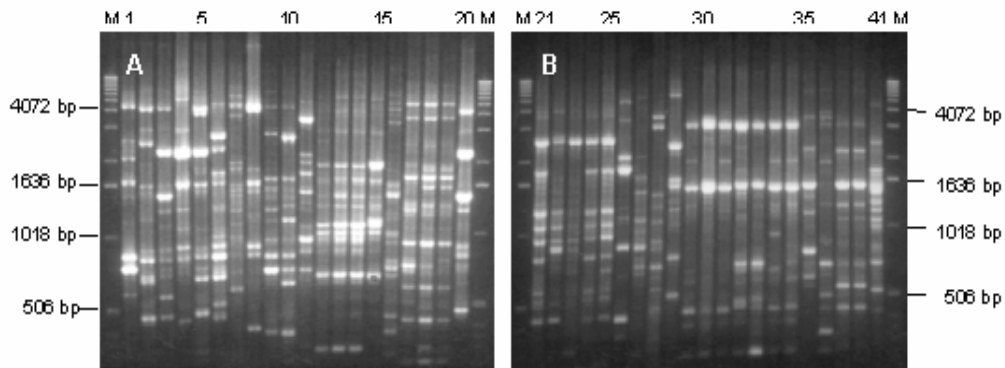


Fig. 4-71. PCR fingerprint of *Trichoderma* spp. amplified by primer URP2R. M: 1kb ladder (Promega). Plate A: Lanes 1-3, 5, 7, and 9-11, isolates of *T. aureoviride* (T116, T115, T113, T119, T2, T14, T60, and T99). Lanes 4, 12, 14, and 15, isolates of *T. harzianum* (CBS436.95, T4, CBS101525, and CBS450.95). Lanes 6 and 8, isolates of *T. inhamatum* (CBS164.90 and CBS273.78). Lane 13, isolate of *T. aggressivum f.europaeum* (CBS689.94). Lanes 16-19, isolates of *T. virens*(T162, T50, CBS609.95, and T1). Lane 20, isolate of *T. koningii* (T141). Plate B: Lanes 21-25, isolates of *T. longibrachiatum* (T153, T5, T152, T9, and CBS821.91). Lane 26, isolate of *T. ressei* (KACC40517). Lane 27, isolate of *T. citrinoviride* (T7). Lane 28, isolate of *T. sp.* (T10). Lane 29, isolate of *T. polysporum*(CBS898.72). Lanes 30, 32-36, and 39-41, isolates of *T. atroviride*(T73, T150, KACC40556, KACC40551, CBS693.94, T125, KACC40552, T123, and T184). Lane 31, isolate of *T. harzianum*(CBS432.95). Lane 37, isolate of *T. viride* (CBS289.79). Lane 38, isolate of *T. koningii* (CBS979.70).

3) *Pseudomonas* spp.의 URP-PCR profile 작성 및 database 구축

본 연구에서는 다양한 기주에 국내 고질적인 병을 일으키는 21종 55균주 *Pseudomonas* spp.을 대상으로 URP primer의 PCR핵산지문을 실시 종간, 종내의 PCR다형성을 조사하였다. 우선 12종류의 URP primer를 screening한 결과 URP3가 *Pseudomonas* spp.에 대하여 유용성이 판명 되어 표준 PCR primer로서 선발 연구에 이용 하였다.

Fig. 4-72는 *Pseudomonas* spp.를 URP3로 PCR분석한 전기영동 결과를 나타낸 것으로서 균주간, 4-종간의 특징적인 PCR pattern을 관찰 할 수 있다. 55 균주로 구성된

Pseudomonas 속 내에는 8개 type의 PCR다형성이 검출되었으며 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 의 경우는 종 명명에 있어서 다소 불일치되는 패턴을 보였으며 *Pseudomonas syringae* pv. *helianthi* 와 *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* 는 동일 pathovar인 것으로 확인 되었다. 따라서 두 pathovar 는 분류학 상 재검토가 필요한 상태이다. 본 연구결과로 URP-PCR 패턴을 이용한 *Pseudomonas* spp.의 종 동정 및 종내의 유전적 다양성 (Genetic diversity)조사 결과는 차후 종의 동정에 있어서 유용한 마커로 사용될 수 있음 확인 하였다.

Table 4-15. Isolates of *Pseudomonas* spp. used in this study

Strains		Collection No.
1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>oryzae</i>	KACC 10133, LMG 10912
2	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	KACC 10134, LMG 1247
3	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	LMG 5082
4	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	LMG 5083
5	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	LMG 5084
6	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	LMG 5085
7	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	LMG 5086
8	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	LMG 5087
9	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	LMG 5088
10	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	LMG 5141
11	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	LMG 5190
12	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	LMG 5191
13	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	LMG 5494
14	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	LMG 6104
15	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i>	LMG 5059
16	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofeciens</i>	LMG 5095
17	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofeciens</i>	LMG 5000
18	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>japonica</i>	LMG 5068
19	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	KACC 10135, LMG 5093
20	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	KACC 10388, LMG 5393
21	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tagetis</i>	KACC 10389, LMG 5090
22	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tagetis</i>	LMG 5091
23	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tagetis</i>	LMG 5684
24	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tagetis</i>	LMG 5685
25	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tagetis</i>	LMG 5686
26	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>helianthi</i>	LMG 2198
27	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>helianthi</i>	LMG 5067
28	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>helianthi</i>	LMG 5556
29	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>helianthi</i>	LMG 5557

30	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>helianthi</i>	LMG 5558
31	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i>	KACC 10390, LMG 5074
32	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>antirrhini</i>	KACC 10392, LMG 5057
33	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	KACC 10393, LMG 5066
34	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>delphinii</i>	KACC 10394, LMG 5381
35	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>eriobotryae</i>	LMG 2184
36	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	KACC 10396, LMG 5070
37	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i>	KACC 10397, LMG 5075
38	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i>	LMG 2222
39	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	KACC 10398, LMG 5064
40	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>delphinii</i>	KACC 10479, LMG 2177
41	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i>	KACC 10497
42	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i>	LMG 5383
43	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i>	LMG 5384
44	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>sesami</i>	KACC 10649, LMG 2289
45	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	KACC 10302
46	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	KACC 10676, LMG 2158
47	<i>Pseudomonas coronafaciens</i>	KACC 10678, LMG 5060
48	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	KACC 10776, LMG 18378
49	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	KACC 10797,
50	<i>Pseudomonas mucidolens</i>	KACC 10800, ATCC 4685
51	<i>Pseudomonas graminis</i>	KACC 10803, DSM 11363
52	<i>Pseudomonas jessenii</i>	KACC 10808, CIP 105274
53	<i>Pseudomonas libanensis</i>	KACC 10809, CIP 105460
54	<i>Pseudomonas lundensis</i>	KACC 10832, LMG 13517
55	<i>Pseudomonas taetrolens</i>	KACC 10836, LMG 2336

위에서는 URP3 primer를 이용한 PCR 다형성을 기술하였다. 종 별 특징적인 PCR profile을 형성하였으나 본 연구는 다양한 profile 내에서의 새로운 균의 동정을 위해서는 컴퓨터 프로그램을 이용한 신속한 동정시스템을 개발, 적용하는 것에 목적을 두고 있어 GelCompar II program을 이용하여 균 동정 시스템을 구축을 시도하였다. 이를 위하여 미리 제작하여놓은 PCR profile을 이 program에 입력하여 특정 균의 D/B 구축을 하여놓는다. 이때 입력되는 밴드들은 유사밴드별로 재 배치되고 각각의 균주간의 유연관계가 dendrogram으로 표시 된다. 이렇게 구축된 D/B를 이용하여 미 동정된 균을 동정하고 싶을 때 PCR밴드 를 D/B에 입력 동정시스템을 작동시키게 되면 자동으로 DNA 패턴에 의하여 종 동정이 완료되는 것이다. 밴드의 유사도는 기준마커를 기준으로 밴드와 밴드간의 거리에 의하여 computer에서 자동으로 결정된다(Fig. 4-73).

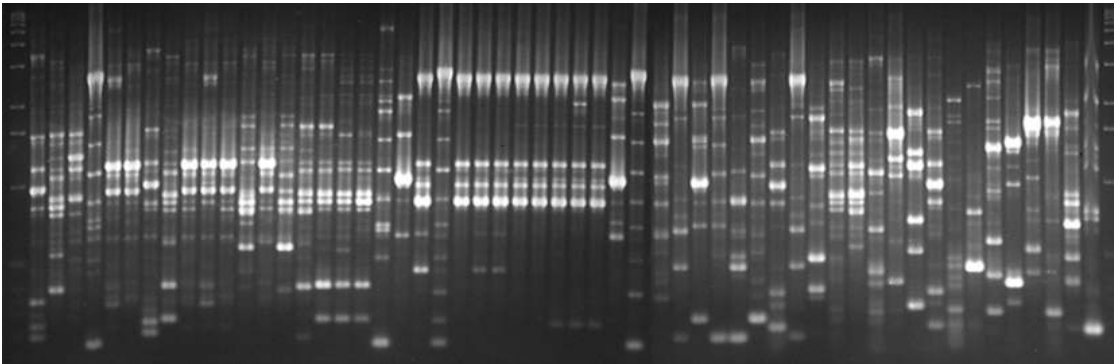


Fig. 4–72 PCR fingerprint of *Pseudomonas* spp. amplified by primer URP3.

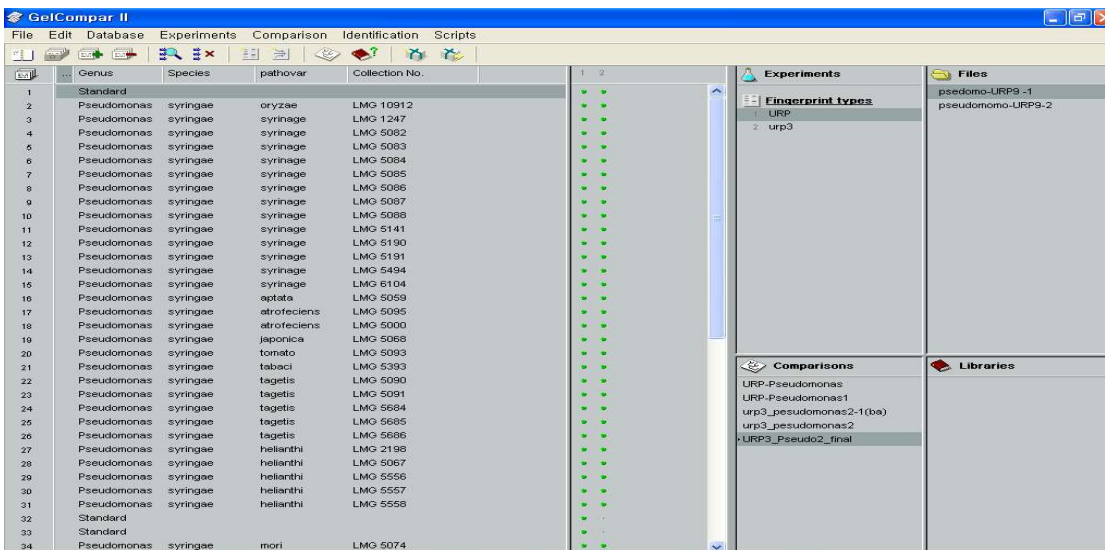


Fig. 4–73. Database of *Pseudomonas* spp. DNA profiles of URP–PCR product generated by GelcomparII S/W.

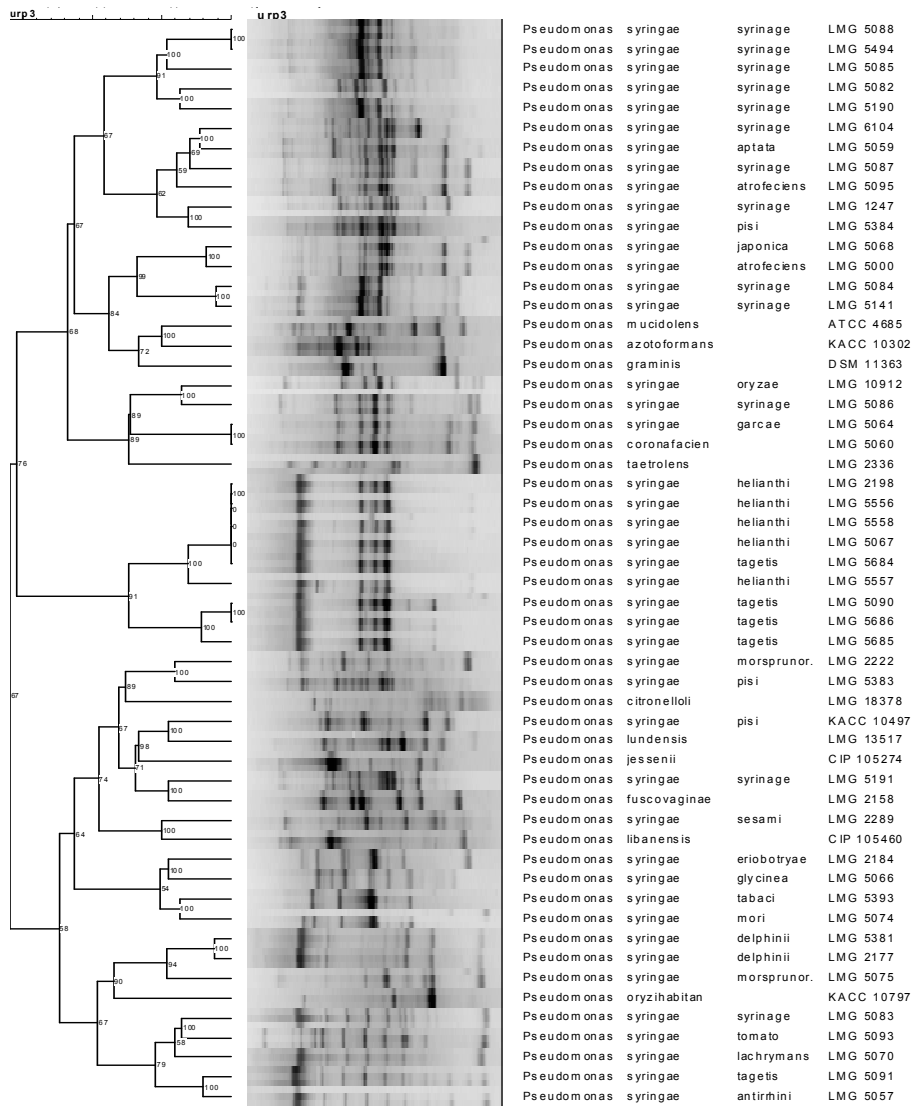


Fig. 4-74. WARD dendrogram derived from PCR (polymerase chain reaction) profiles of genetic DNA in 55 isolates of *Pseudomonas* species. Detailed information about the isolates is listed in Table 4-15.

4) DNA profile DB 구축 및 web을 통한 검색 시스템 개발

본 테마는 다양한 profile 내에서의 새로운 균의 동정을 위해서는 컴퓨터 프로그램을 이용한 신속한 동정시스템을 개발, 적용하는 것에 목적을 두고 있어 GelCompar II program을 이용하여 균 동정 시스템을 구축을 시도하였다. 이를 위하여 미리 제작하여 놓은 PCR profile을 이 program에 입력하여 특정 균의 D/B 구축하여 놓았다. 이때 입력되는 밴드들은 유사밴드별로 재배치되고 각각의 균주간의 유연관계가 dendrogram으로 표시되며 이렇게 구축된 D/B를 이용하여 미 동정된 균을 동정하고 싶을 때 PCR밴드를 D/B에 입력 동정시스템을 작동시키게 되면 자동으로 DNA 패턴에 의하여 종 동정이 완료되는 것이다. 밴드의 유사도는 기준마커를 기준으로 밴드와 밴드간의 거리에 의하여 computer에서 자동으로 결정된다. Fig. 4-73, 4-74는 균주간 group type을 GelCompar II program에 입력 D/B 구축한 예를 보여 주고 있다. 그러나 GelCompar II program은 자료가 많이 축적될 때 DB 축적량 및 이미지 처리에 한계점이 있어 GelCompar II를 보완한 web 기반의 java를 이용한 DNA profile 밴드 수치 정보의 이미지화 및 D/B 구축을 추진하였다(Fig. 4-75).

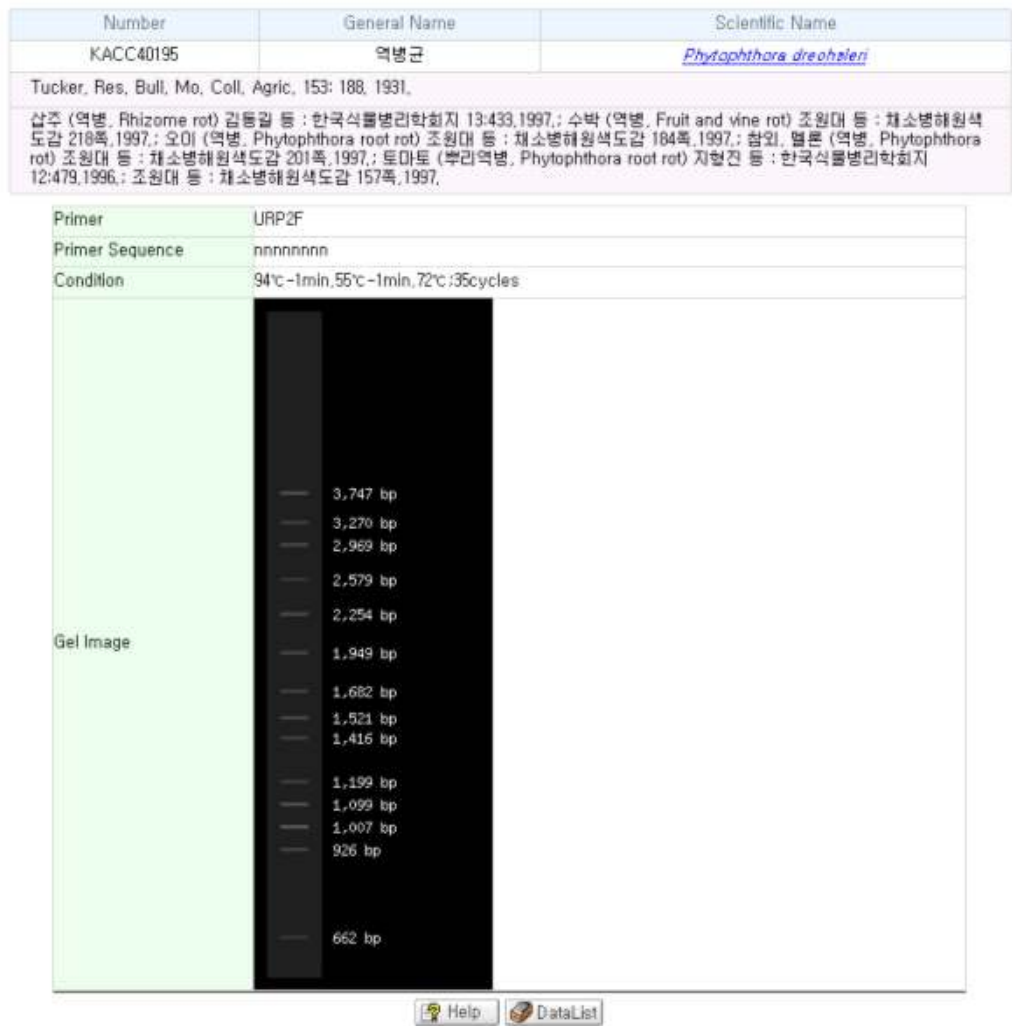


Fig. 4-75. Web-based Database construction of DNA profiles with URP primers generated.

나. 주요 작물 병원세균의 진단 마커 개발

1) PCR primer를 이용한 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 특이검출 pECC2F의 DNA 절편의 염기서열부터 제작한 EXPCCF/EXPCCR primer set로 Table 4-16의 4-56 세균 균주의 검출을 조사한 결과이다. EXPCCF/EXPCCR primer set는 Pcc와 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *wasabiae* (Pcw)균주에서 0.55의 특이적인

밴드 (Fig. 4-76a)를 증폭하였으나 *P. carotovorum* subsp. *atroseptica*, *P. carotovorum* subsp. *betavasculatorum*, *P. carotovorum* subsp. *odorifelum*의 *Pectobacterium carotovorum* subspecies를 비롯한 *Pectobacterium* species와 *Erwinia* spp. 및 다른 세균에서는 특이밴드가 검출되지 않았다. Pcc 균주와 Pcw 균주간의 DNA다형성을 조사하기 위하여 0.55kb의 PCR산물을 Rsa I으로 절단하여 균주간 DNA pattern을 조사한 결과 Pcc에서는 5가지의 DNA다형성 type이 관찰되었고 Pcw에서는 Pcc 균주에서 발견되지 않은 독특한 DNA다형성 pattern을 보여 주었다(Fig. 4-76b). 따라서, EXPCCF/EXPCCR primer에 의한 PCR 증폭과 Rsa I을 이용한 PCR-RFLP분석으로 Pcc의 특이적 검출이 가능 할 것으로 사료되었다.

Pcc 세포수에 따른 EXPCCF/EXPCCR primer의 검출 민감도를 실험하기 위하여 다양하게 희석한 세포를 직접 PCR에 이용하였다. Fig. 4-77에 보여 주는 것같이 1차 PCR을 실시할 경우 10^2 개의 세포까지 검출하였으나, 2차 PCR인 Nested PCR은 0.4kb의 PCR밴드를 검출하면서 2.5개의 세포수에서 까지 높은 민감도로 검출 할 수 있었다. 따라서, 매우 적은 밀도하에서의 검출가능성을 시사 하여주어 자연상태에서의 조기진단을 위하여 이용 될 수 있을 것으로 사료되었다. 전에 *Pectobacterium carotovorum*를 검출하기 위한 방법으로 특이항체, pel (pectate lyase) 유전자를 이용하여 왔다. 그러나, Pcc의 특이검출은 균주의 다양성으로 인하여 해결되지 않고 있었다. subspecies 수준에서 *Pectobacterium carotovorum*을 DNA검출방법으로는 세계적으로 *P. carotovorum* subsp. *atroseptica*를 대상으로 보고가 되어 있으며 Pcc에 관하여는 보고 되어 있지 않다. 우리나라에서는 Pcc가 대표적 세균 무름병원균으로서 가장 많이 분리되고 있으며 EXPCCF/EXPCCR primer에 의한 PCR검정은 Pcc의 신속동정과 조기진단에 유용하게 이용 될 수 있을 것이다.

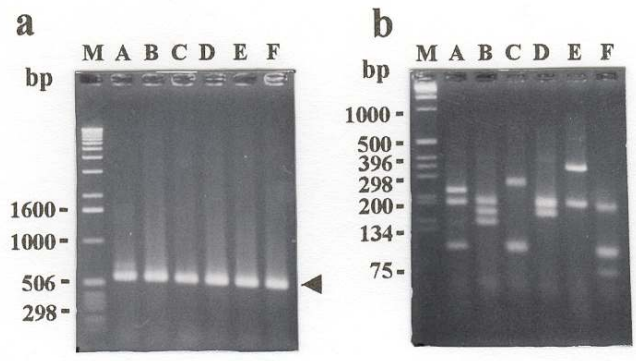


Fig. 4-76. Restriction enzyme digested profiles of PCR products of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (P.c.c.) and *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* (P.c.w.) strains amplified by primer pair EXPCCF/EXPCCR. The amplified products (Panel a) of P.c.c. and P.c.w. strains were digested with Rsa I and separated on 4% agarose gel (Panel b). The fragments were visualized by staining with ethidium bromide. Lanes M: 1 kb ladder (GIBCO, BRL); lanes A,B,C,D, and E: P.c.c. strains KACC 10458, ATCC 15173, LMG 2405, LMG 6686 and LMG2405; lane F: P.c.w. strain ATCC 43316.

Table 4–16. Bacterial strains used in this study

Bacterial strains	Country/Hosts	<i>RsaI</i> -digested profiles
<i>Pectobacterium carotovorum</i>		
subsp. <i>carotovorum</i>		
*ATCC 15173	Denmark/Potato	B
ATCC 12312	Unknown/Tobacco	E
KACC 10458	Korea/chinese cabbage	A
KACC 10401	Korea/Potato	B
KACC 10422	Korea/Potato	E
KACC 10406	Korea/Potato	C
KACC 10421	Korea/Radish	D
KACC 10346	Korea/chicory	B
KACC 10347	Korea/Japanese horseradish	B
KACC 10343	Korea/Japanese horseradish	B
KACC 10348	Japan/Tomato	B
Ecc17	Korea/ chinese cabbage	E
PCI	Korea/ Unknown	B
**LMG 2458	Uganda/Tobacco	
LMG 2412	U.K./ <i>Hyacinthus orientalis</i>	
LMG 2453	Belgium/ <i>Cyclamen</i> spp.	B
LMG 2433	Netherland/Potato	B
LMG 2405	Israel/ <i>Persea americana</i>	B
LMG 6686	Switzerland/Potato	E
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>wasabiae</i>		
ATCC 43316	Japan/Horseradish	C
ATCC 43316	"	
ATCC 43316	"	
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>atroseptica</i>		
ATCC 33260	U.K./Potato	F
LMG 6678	Germany/Potato	F
LMG 2375	U.K./Potato	F
LMG 6685	Switzerland/potato	No PCR product
LMG 6672	Unknown/Potato	"
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>betavascularum</i> ATCC 43762		
	USA/sugar beet	"
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>odorifelum</i> LMG 13009		
<i>P. chrysanthemi</i> ATCC 11663	France/ <i>Apiumgraveolens</i>	"
	U.S.A./Chrysanthemum	"
<i>P. cypripedii</i> ATCC 29267	U.S.A./Lady-slipper	"
<i>E. herbicola</i> ATCC 33243	Canada/Unknown	"
<i>E. mallotivora</i> ATCC 29573	Japan/ <i>Japonicus mallotus</i>	"
<i>E. milletiae</i> ATCC 33261	U.S.A./ <i>Witeria floribunda</i>	"
<i>E. nigrifluence</i> ATCC 13028	U.S.A./Walnut	"
<i>E. persicinus</i> ATCC 35998	Japan/Tomato	"
<i>E. psidii</i> ATCC 49406	Brazil/ <i>Psidium guajaya</i>	"
<i>E. quercina</i> ATCC 29281	U.S.A./Oak acofn	"
<i>E. rhapontici</i> ATCC 29281	England/ <i>Rheum rhaponticum</i>	"
<i>E. rubrifaciens</i> ATCC 29291	U.S.A./Walnut	"
<i>E. stewartii</i> ATCC 8199 "	U.S.A./Sweetcorn	"
<i>E. tracheiphila</i> ATCC 33245	U.S.A./Melon	"
<i>E. uredovora</i> ATCC 19321	U.S.A./Cereal rusts	"
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> KACC 10314	Korea/Rice	"
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> KACC 10377	Korea/Chinese cabbage	"
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> KACC10134	U.K./ <i>Syringa vularis</i>	"
<i>P. marginalis</i> pv. <i>pastinacae</i> KACC 10469	U.S.A./ <i>Pastinaca sativa</i>	"
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> KACC 10388	Hungary/Tobacco	"
<i>Ralstonia solanacearum</i> KACC 10149	U.S.A./Tomato	"
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> KACC 10305	Japan /unknown	"
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	comercial source	"
<i>Serratia marcescens</i> KACC 10002	Korea/soil	
<i>Bacillus subtilis</i> KACC 10372	Korea/soil	
<i>Enterobacter</i> sp. KACC 105263	Korea/soil	

*ATCC, American Type Culture Collection; **KACC, Korea Agricultural Culture Collection (National Institute of Agricultural Science & Technology,, Suwon Korea);***LMG, Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms, Laboratory of Microbiology, University of Ghent.

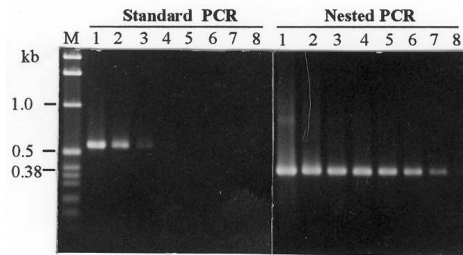


Fig. 4-77. PCR detection limit of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* with specific primer pairs. Respective primer sets EXPCCF/EXPCCR and INPCCF/INPCCR were used for standard PCR (a) and nested PCR (b). Aliquots of 15 μ l from each amplified PCR mixture were separated by electrophoresis on 1.5 % agarose gel. Lane M: 1 kb DNA ladder (Gibco BRL). Number of cfus /ml: lane 1, 1×10^4 ; lane 2, 1×10^3 ; lane 3, 1×10^2 ; lane 4, 5×10^1 ; lane 5, 2.5×10^1 ; lane 6, 4 cells; lane 7, 2.5 cells; Lane 8, water.

2) PCR primer를 이용한 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 특이검출

본 테마는 십자화과의 흑부병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)의 특이 DNA 단편을 신속, 정확하게 검출할 수 있는 PCR primer에 관한 것으로 본 primer는 polymerase chain reaction (PCR)법을 이용하여 이 균만을 검출해내는 것이다. 이 세균(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)은 무, 양배추, 칼리플라워, 순무, 청경채 등 많은 십자화과 작물에서 발생하며 이 중에서도 양배추, 브로콜리 및 칼리플라워의 피해가 가장 크다. 전염경로로는 병든 식물체에 부착되어 토양속에서 생존해 있다가 또는 이 병 종자를 통해서 전염이 된다. 현재까지 이 균에 특이적인 살균제는 없고 현재 베노밀이라는 대체 약제를 쓰고 있으나 종자 QC(Quality Control)에는 큰 도움을 주지 못하고 있으며 및 배양 시 균 성장속도도 느려 검역에 매우 많은 시간이 소요되고 있다. 기존의 연구는 종 수준까지 DNA 탐침자를 이용하여 검출하였으나 본 연구에서는 유전자 특성을 이용하여 제작된 것이므로 병원성 타입까지 검출해낼 수 있다. 개발된 primer 셋은 십자화과 흑부병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)에서만 540bp의 단일 밴드를 형성하며 다른 *Xanthomonas*속 내 유사 종 및 다른 병원성 계통에는 밴드를 검출하지 않고 6시간 정도면 밴드를 검출할 수 있어 DNA 수준에서 신속, 정확히 흑부병원

균(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)의 감염 진위 여부를 판별 할 수 있다.

Fig. 4-78 은 *Xanthomonas* strain의 *HrpF* 유전자와 *M. loti*의 *noIX* 유전자와의 아미노산 염기서열의 비교분석을 나타낸 것이다. 이 결과, *X. a.* pv. *citri*, *X. o.* pv. *oryzae*, *X. c.* pv. *vesicatoria*의 염기배열은 *X. c.* pv. *campestris*의 염기배열과 유사함을 알 수 있다.

noIX 유전은 또한 *hrpF* 유전자와 높은 상동성이 있음을 확인하였다. *X. o.* pv. *oryzae*, *X. a.* pv. *citri*, *X. c.* pv. *vesicatoria*는 아미노산 염기서열의 N-말단부분의 일부를 제외하고는 전체적으로 매우 높은 수준의 상동성이 발견되었다. *X. c.* pv. *campestris*는 *X. o.* pv. *oryzae*에 63%, *X. a.* pv. *citri*에 63.1%, *X. c.* pv. *vesicatoria*에 64.5%의 유사성을 갖는다. 특히 *X. o.* pv. *oryzae*와 *X. c.* pv. *vesicatoria*는 그 유사성이 92.5%로 매우 높게 나타났다(Fig. 4-79a). 아미노산 염기서열비교분석 자료에 기초한 유전적 유연관계를 이용하여 *hrpF* 유전자와 *noIX* 유전자의 유전적 계통도를 구성하였다(Fig. 4-79b). 유전적 계통도를 살펴본 결과 *X. o.* pv. *oryzae*와 *X. c.* pv. *vesicatoria*가 매우 높은 유전적 유사성이 있음을 확인하였다. 이상과 같이 유전자의 계통도를 살펴본 결과 *hrpF* 유전자와 *noIX* 유전자는 3.5~48.7범위의 높은 유전적 유사성이 있음을 확인할 수 있었다

X. c. pv. *campestris*를 검출하기 위한 특이 primer는 *hrpF* 유전자의 아미노산 N-말단 부분에서 제작하였다(Fig. 4-80). HFF와 HFRprimer의 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*에 대한 특이성을 확인하기 위해 *Xanthomonas* 균주와 기타 다른 미생물을 대상으로 PCR반응을 실시한 결과 *X. c.* pv. *campestris*만 증폭되고 기타 다른 *Xanthomonas* 균주와 미생물은 PCR산물이 증폭되지 않았다(Fig. 4-81). HFF와 HFR primer를 각 미생물에서 추출한 50ng의 DNA 농도와 적정 조건(MgCl₂ 1.5mM, dNTP 각각 0.2mM, 각 primer 10pM, *Taq* polymerase 2unit, 10X PCR buffer 5 μ l를 함유한 PCR reaction 50 μ l)하에서 혼합하여 PCR반응을 시켰을때 *X. c.* pv. *campestris*로부터 535bp길이의 유전자 단편이 증폭 됨을 확인할 수 있었다. 또한 Perkin Elmer 9600 thermal cyclers(Perkin Elmer International, Rotkreuz)을 사용하여 PCR반응을 실시한 결과 위와 동일한 결과를 얻을수 있었다. 이 밖에 기타 다른 제조업체(Promega, Takara, Toyobo)에서 판매하는 *Taq* polimerase 효소를 사용하여 PCR증폭을 실시 하여도 같은 결과를 얻을수 있었다.

Xanthomonas campestris pv. *campestris*를 제외한 기타 다른 *Xanthomonas* 균주의

HrpF 유전자 존재여부를 DNA dot blot분석에 의해 확인할 수 있었다. DNA dot blot분석에 의해 나타난 결과로 *hrpF* 유전자는 *Xanthomonas* 균주들 간에는 그 유사성이 매우 높고, 기타 본 실험에 사용된 다른 미생물에는 존재하지 않거나 존재 하여도 유사성이 없음을 확인할 수 있었다(Fig. 4-82). 이 결과로 *Xanthomonas* 균주들 간의 *HrpF* 유전자는 매우 높은 유사성이 있음을 확인할 수 있었고, 또한 HFF와 HFRprimer는 *Xanthomonas campestris pv. campestris*만을 특이적으로 검출하는데 매우 유용한 재료임을 입증한 것이다

본 테마에 의해 제작된 HFF와 HFRprimer의 검은 썩은병원균(*Xanthomonas campestris pv. campestris*)에 대한 특이성을 확인하기 위해 이전에 소재한 (주)신젠타코리아로부터 검은 썩은병에 감염된 것으로 추정되는 양배추 잎과 감염되지 않은 양배추 잎을 채집하여 PCR증폭을 실시하였다. 멸균된 가위를 이용하여 감염 및 비감염된 양배추 조직을 적당한 크기로 절단하고 CTAB 방법을 이용하여 total genomic DNA를 각각 추출하였다. 양배추 조직에서 추출된 genomic DNA 50ng을 취하여 HFF와 HFR을 사용하여 실시예1에서 언급한 방법과 동일하게 PCR증폭반응을 실시하였다.

Fig. 4-83에서 나타난 것과 같이 검은 썩은병원균에 감염된 양배추 조직에서만 대조구(*Xanthomonas campestris pv. campestris*)와 동일하게 PCR증폭된 유전자 단편을 확인할 수 있었다. 위와 같은 결과로 양배추를 감염시킨 병원균은 *Xanthomonas campestris pv. campestris*임을 확인할 수 있었다.

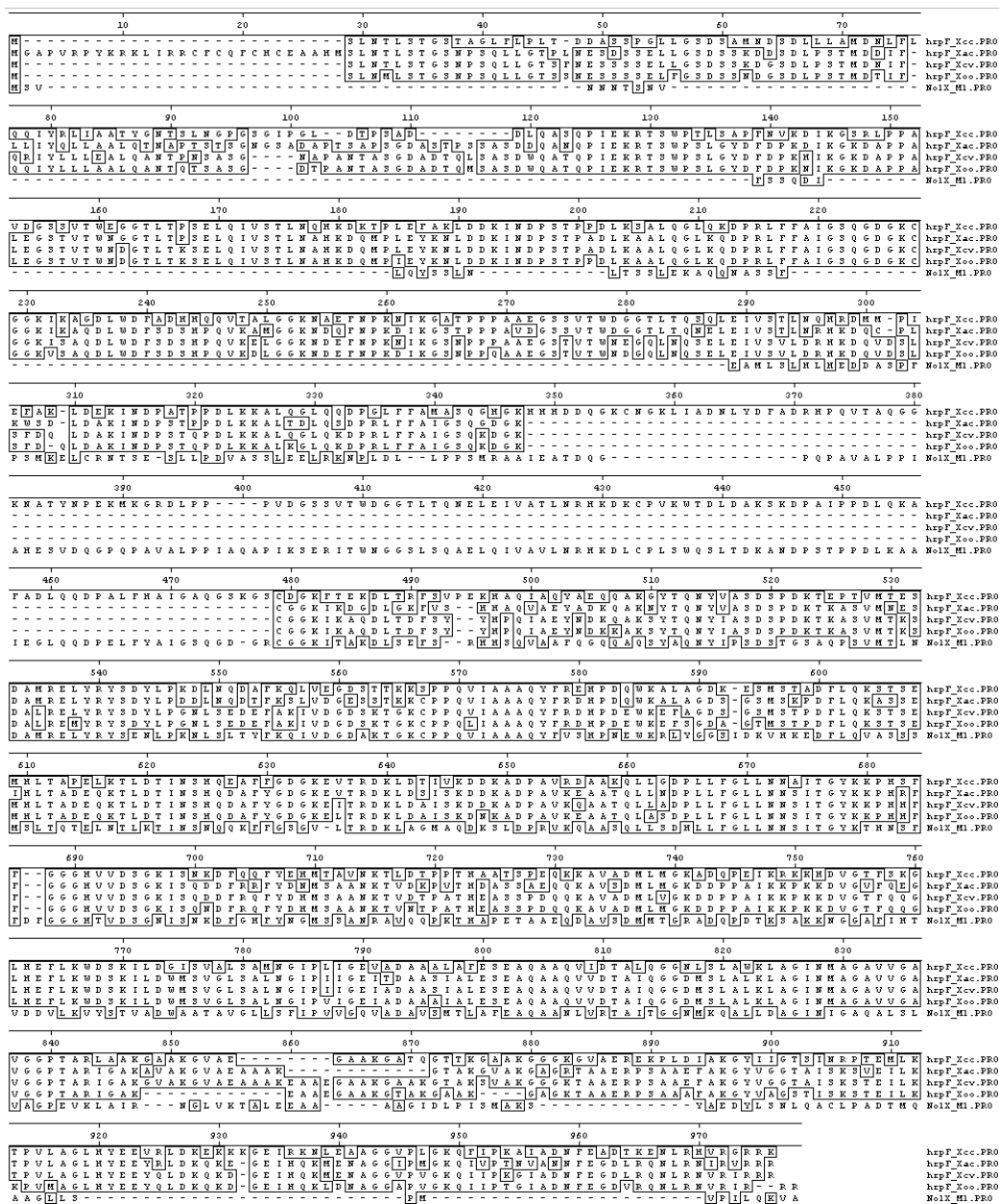


Fig. 4–78. Amino acid sequence analysis in *hrpF* of *Xanthomonas* and *nolX* gene of *Mesorhizobium loti* (Xac: *X. axonopodis* pv. *citri*, Xoo: *X. oryzae* pv. *oryzae*, Xcc: *X. campestris* pv. *campestris*, Xcv: *X. campestris* pv. *vesicatoria*, MI: *M. loti*).

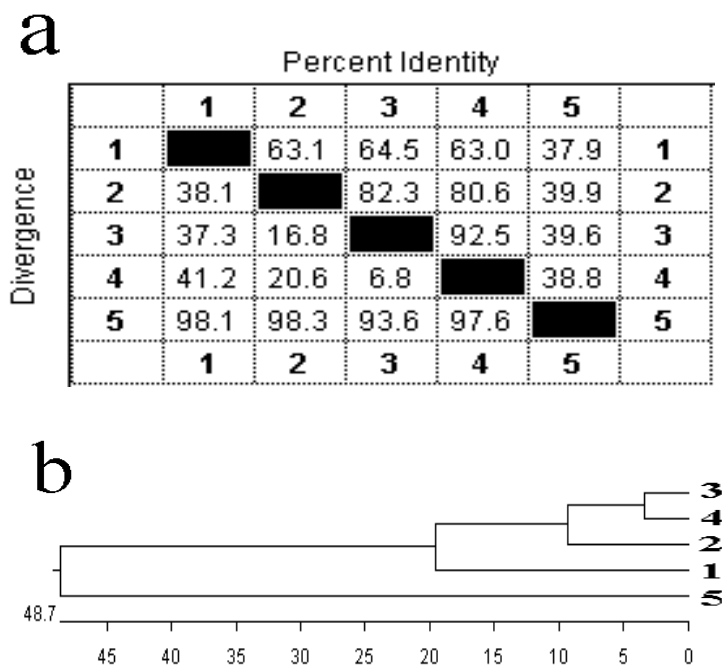


Fig. 4-79. Genetic relative analysis in *hrpF* of *Xanthomonas* and *nolX* gene of *Mesorhizobium loti*. a, Genetic relative analysis modify by percentage. ; b, Genetic relative analysis chart. 1: *X. campestris* pv. *campestris*(*hrpF*), 2 : *X. axonopodis* pv. *citri*(*hrpF*), 3 : *X. campestris* pv. *vesicatoria*(*hrpF*), 4 : *X. oryzae* pv. *oryzae*(*hrpF*), 5 : *M. loti*(*nolX*).

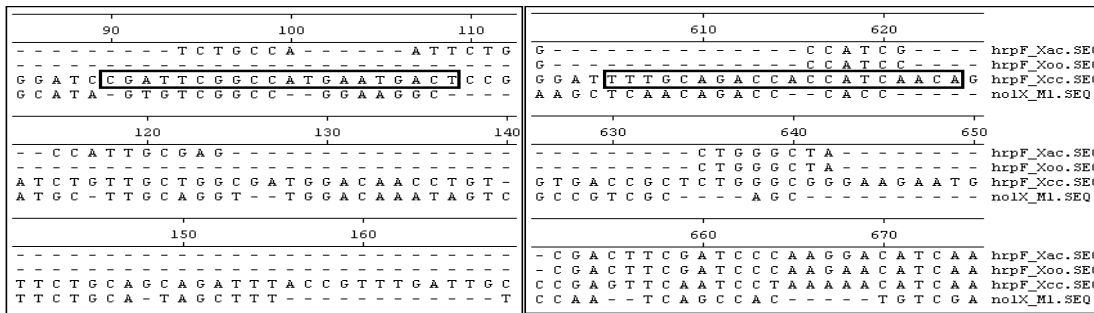


Fig. 4-80. HFF and HFR primer design from *hrpF* gene of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. left : HFF (nucleotides 90 to 109), right: HFR (nucleotides 605 to 624).

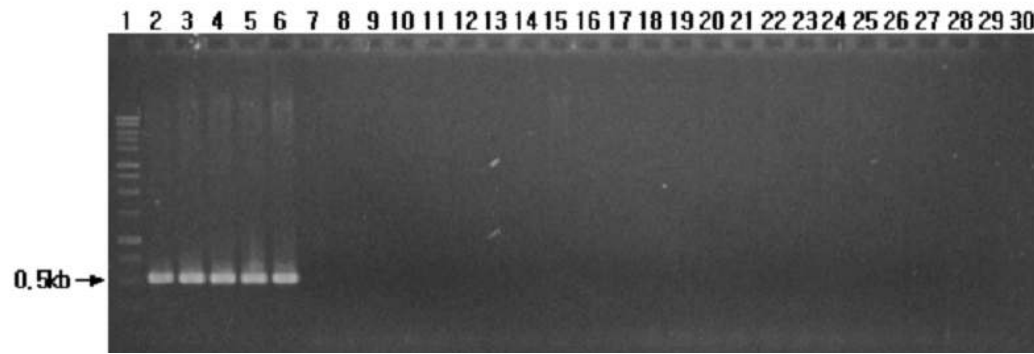


Fig. 4-81. Species-specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* which used HFF and HFR primer. 1, ladder marker (1Kb DNA ladder); 2, *X. c. pv. campestris* KACC10913; 3, *X. c. pv. campestris* LMG 568; 4, *X. c. pv. campestris* LMG 582; 5, *X. c. pv. campestris* LMG 584; 6, *X. c. pv. campestris* LMG 8110; 7, *X. c. pv. carotae*; 8, *X. c. pv. glycines*; 9 *Xanthomonas campestris* (Pammel 1895) Dowson; 10 to 12, *X. o. pv. oryzae*; 13, *X. c. pv. vesicatoria*; 14, *X. c. pv. aurantifolii*, 15 to 16, *X. a. pv. citri*; 17, *Pseudomonas aeruginosa*; 18, *Pseudomonas putida*; 19, *Pseudomonas stutzeri*; 20, *Pseudomonas fluorescens*; 21 to 25, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; 26 to 28, *Fusarium oxysporum*; 29, *Escherichia coli* (O157:H7); 30, *Mesorhizobium loti*.



Fig. 4–82. Detection of *hrpF* gene of another microorganism by DNA dot–blot and similarity with *X. campestris* pv. *campestris*. 1, *X. c.* pv. *campestris* KACCI0913; 2, *X. c.* pv. *campestris* LMG 568; 3, *X. c.* pv. *campestris* LMG 582; 4, *X. c.* pv. *campestris* LMG 584; 5, *X. c.* pv. *campestris* LMG 8110; 6, *X. c.* pv. *carotae*; 7, *X. c.* pv. *glycines*; 8 *Xanthomonas campestris* (Pammel 1895) Dowson; 9 to 11, *X. o.* pv. *oryzae*; 12, *X. c.* pv. *vesicatoria*; 13, *X. c.* pv. *aurantifolii*, 14 to 15, *X. a.* pv. *citri*; 16, *Pseudomonas aeruginosa*; 17, *Pseudomonas putida*; 18, *Pseudomonas stutzeri*; 19, *Pseudomonas fluorescens*; 20 to 24, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; 25 to 27, *Fusarium oxysporum*; 28, *Escherichia coli* (O157:H7); 29, *Mesorhizobium loti*.

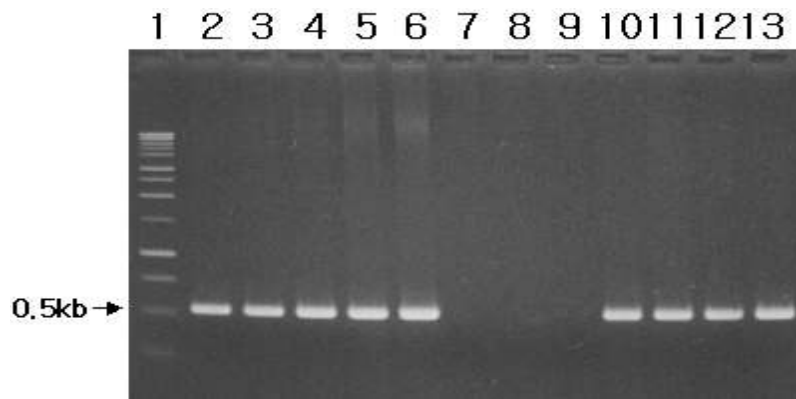


Fig. 4-83. Detection of *X. campestris* pv. *campestris* from infected cabbage. 1, ladder marker (1Kb DNA ladder); 2, *X. c.* pv. *campestris* KACC10913; 3, *X. c.* pv. *campestris* LMG 568; 4, *X. c.* pv. *campestris* LMG 582; 5, *X. c.* pv. *campestris* LMG 584; 6, *X. c.* pv. *campestris* LMG 8110; 7 to 9, control from cabbage leaf; 10 to 13, cabbage leaf infected by *X. campestris* pv. *campestris*.

Table 4–17. List of bacterial and fungal strains used in this study

Bacterial and fungal isolate	Source ^a	Geographical origin
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	KACC10913 (ATCC 33913) ^b	United Kingdom
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	LMG 568	United Kingdom
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	LMG 582	Belgium
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	LMG 584	Belgium
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	LMG 8110	Tonga
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>carotae</i>	KACC10164 (ATCC10547) ^b	USA
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>glycines</i>	KACC10445 (LMG7403) ^b	Zambia
<i>Xanthomonas campestris</i>	KACC10490	
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (Xoo90)	KACC10312	Korea
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (Xoo85)	KACC10331	Korea
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (PXO99)	KACC10884	Philippines
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	LMG 10429	
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>aurantifolii</i>	KACC10161	
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	KACC10443	Korea
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	KACC10444	Korea
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KACC10259 (ATCC 10145) ^b	
<i>Pseudomonas putida</i>	KACC10266 (ATCC 12633) ^b	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	KACC10290 (ATCC 17588) ^b	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	KACC10327 (LMG 1794) ^b	United Kingdom
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	KACC10436 (LMG 2435) ^b	Italy
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	KACC10440 (LMG 2433) ^b	The Netherlands
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	KACC10441 (LMG 2412) ^b	United Kingdom
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	KACC10455 (LMG 2453) ^b	Belgium
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	KACC10442 (LMG 2458) ^b	Uganda
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	KACC40529 (ATCC11939) ^b	
<i>Fusarium oxysporum</i>	KACC40053	Korea
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	KACC40525 (ATCC16016) b	Germany
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	KACC10765 (ATCC 35150) ^b	
<i>Mesorhizobium loti</i>	KACC 10644 (LMG 10644) ^b	New Zealand

a: KACC, Korean Agricultural Culture Collection, Korea (<http://mgd.niast.go.kr>); ATCC, American Type Culture Collection, USA ; LMG, The Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (BCCMTM), Belgium. b: Other Collection No.

3) PCR primer를 이용한 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 특이검출

본 테마는 감귤류의 궤양병 병원균(*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)의 특이 DNA 단편을 신속, 정확하게 검출할 수 있는 PCR primer(primer) set에 관한 것이다. 본 primer는 polymerase chain reaction (PCR)법을 이용하여 감귤류 궤양병 병원균만을 검출해내는 것이다.

궤양병 병원균(*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)은 세균에 의한 병으로서 동남아시아에서 기원이 되어, 세계 여러 지역의 감귤 재배지로 전파되어졌다. 오렌지나 레몬과 같이 궤양병에 약한 품종에 있어서는 그 피해가 상당히 크기 때문에 미국을 비롯한 몇몇 국가에서는 가장 중요한 검역 대상 병해 중의 하나이다.

궤양병균은 품종에 따라서 병발생 여부나 병징이 다르게 나타나는, 즉 여러 가지의 병원형으로 분화되어 있다. 이들 중 가장 널리 분포하며 그 피해도 심한 것은 아시안형(canker A)으로서 병원균은 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse)Vaut. 이다. 이 균은 막대모양으로 단극모이며 생육 적온은 28~30℃이다.

잎, 가지, 열매에 발생하며 반점형태로 외관을 해치고 심할 경우에는 잎이 뒤틀리며 낙엽이 되고 새순의 경우 순 전체가 죽고 과실은 낙과 될 수도 있다. 감염 7~10일 후에 첫 병징이 보이기 시작하며 초기 증상은 주위가 황화된 매우 작은 반점(직경 약 0.3mm~0.5mm)으로부터 시작하여 병이 진전되면서 점차 그 크기가 커지고 모양도 원형에서 불규칙한 모양으로 발전되며 잎의 양면, 특히 잎의 뒷면이 부풀어 오르고 나중에 이 부분이 코르크화 되며 분화구 모양이 된다.

병원균은 기공과 바람이나 해충 등에 의해 생긴 상처를 통해서 침입하여 그 잎이나 열매가 떨어질 때까지 거기에서 존재하지만 잎이나 열매가 땅에 떨어지면 거기에서는 오래 생존하지 못한다. 또한 식물체내로 침입하지 않고 표면에 남아있는 궤양병균도 물기가 말라서 표면이 건조해지면 오래가지 못하여 죽어버린다.

현재까지 이 균에 대한 방제는 근본적으로 과원의 습기를 적게하여 수체표면의 습윤기간(물기가 묻어있는 기간)을 최소화하고 침입의 주 경로인 상처를 최소한 줄이는 방법을 사용하고 있다. 이를 위해서는 근본적으로 밀식된 과원은 간벌을 실시하여 통풍을 원활히 함으로써 수관내 습윤기간을 짧게 해주고 수확이나 전정시 이병잎을 제거함으로써 사전에 전염원을 차단시키고 있다.

현재, 이러한 감귤궤양병원균의 검출을 위해서 선택배지를 이용하거나 병원균의 생리, 생화학적 특성의 검정을 수행하는 방법이 이루어지고 있다. Fig. 4-84에서 볼 수 있듯이,

hrpW 유전자는 전체적으로 3.5~48.7% 범위의 유전적 유사성을 나타낸 반면, 같은 속 (*Xanthomonas*)에 해당하는 균주들인 *X. a. pv. citri*, *X. o. pv. oryzae*, *X. c. pv. vesicatoria*의 *hrpW* 아미노산서열은 *X. c. pv. campestris*의 *hrpW* 아미노산서열과 60% 이상의 매우 높은 유사성(상동성)을 보였다함을 알 수 있다. 구체적으로는, 궤양병 병원균(*X. c. pv. axonopodis*)은 *X. o. pv. oryzae*에 63%, *X. a. pv. citri*에 63.1%, *X. c. pv. vesicatoria*에 64.5%의 유사성을 보였다. 특히 *X. o. pv. oryzae*와 *X. c. pv. vesicatoria*는 그 유사성이 92.5%로 매우 높게 나타났다. 그러나, 전체적으로는 N-말단부분에 해당하는 염기서열(1~약 650bp, 따라서 단백질의 경우 1~약 217bp에 해당하는 범위)에서 상당한 정도의 비유사성이 확인되었다.

X. caxonopodis pv. *citri* 검출하기 위한 특이 primer는 *X. caxonopodis* pv. *citri*의 *hrpW* 유전자의 N-말단부위의 90번~109번 염기서열과 동일한 서열을 가지는 XACF primer와, 605번~624번 염기서열의 안티서열을 가지는 XACR primer set를 제작하였다 (Fig. 4-85).

반응을 실시한 결과 *X. axonopodis* pv. *citri* 만 증폭되고 기타 다른 *Xanthomonas* 균주와 미생물은 PCR 산물이 증폭되지 않았다(Fig. 4-86). XACF와 XACR primer를 각 미생물에서 추출한 50ng의 DNA 농도와 적정 조건 (MgCl₂ 1.5mM, dNTP 각각 0.2mM, 각 primer 10pM, *Taq* polymerase 2unit, 10X PCR buffer 5μl를 함유한 PCR reaction 50μl) 하에서 혼합하여 PCR 반응을 시켰을 때 *X. axonopodis* pv. *citri*로부터 535bp 길이의 유전자 단편이 증폭됨을 확인할 수 있었다. 또한 Perkin Elmer 9600 thermal cyclers(Perkin Elmer International, Rotkreuz)를 사용하여 PCR 반응을 실시한 결과 위와 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 이 밖에 기타 다른 제조업체(Promega, Takara, Toyobo)에서 판매하는 *Taq* polymerase 효소를 사용하여 PCR 증폭을 실시하여도 같은 결과를 얻을 수 있었다.

따라서, 전술한 특이서열의 전부 또는 일부를 증폭할 수 있는 primer set를 이용하여 PCR 증폭실험을 수행하면 궤양병 병원균을 특이적으로 검출할 수 있음이 확인되었다. 한편, 본 primer set를 이용하여 PCR 증폭하였을 때 실제 감귤 궤양병원균에 감염된 감귤류 잎으로부터 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*를 검출할 수 있는지를 확인하기 위해 제주농업시험장로부터 궤양병에 감염된 것으로 추정되는 감귤류 잎과 감염되지 않은 건강한 감귤류 잎을 채집하여 PCR 증폭을 실시하였다. 멸균된 가위를 이용하여 감염 및 비감염된 감귤류 조직을 적당한 크기로 절단하고 CTAB 방법을 이용하여 총 genomic

DNA를 각각 추출하였다. 감귤류 조직에서 추출된 genomic DNA 20ng을 취하여 XACF와 XACR을 사용하여 상기 언급한 방법과 동일하게 PCR 증폭반응을 실시하였다.

그 결과, 궤양병으로 추정되는 감귤류 조직에서만 양성-대조구(*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)와 동일하게 PCR 증폭된 유전자 단편을 확인할 수 있었다 (Fig. 4-87). 위와 같은 결과로 감귤류를 감염시킨 병원균은 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*임을 확인할 수 있었다. 따라서, 전술한 특이서열의 전부 또는 일부를 증폭할 수 있는 primer set를 이용하여 PCR 증폭실험을 수행하면 감귤류 식물체가 궤양병 병원균에 감염되었는지 여부를 특이적으로 그리고 신속하게 검출할 수 있음이 확인되었다.

		Percent Identity						
		1	2	3	4	5		
Divergence	1	■	43.9	15.6	17.2	16.1	1	hrpW_Xac
	2	52.2	■	16.0	24.7	26.4	2	hrpW_Xcc
	3	93.1	92.7	■	26.4	25.6	3	hrpW_Er_amy
	4	96.6	92.3	78.8	■	76.1	4	HrpW_Psto
	5	101.1	93.2	87.0	30.2	■	5	hrpW_Ps_sy
		1	2	3	4	5		

Fig. 4-84. Genetic relative analysis in *hrpW* of *Xanthomonas* and *hrpW* gene of *Pseudomonas syringae*. 1: *X. axonopodis* pv. *citri*, 2 : *X. campestris* pv. *campestris*, 3 : *Erwinia amylovora*(hrpW), 4 : *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, 5 : *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

	C	A	G	C	A	C	C	G	G	T	G	G	C	G	C	T	A	T	C	-	G	C	G	C	T	C	C	G	A	C	Majority	
54	A	A	A	C	A	C	-	-	-	G	T	C	G	C	A	A	T	-	-	A	C	G	A	T	T	G	G	A	A	hrpW_Xac		
83	C	A	C	C	A	C	C	G	A	T	G	C	C	G	C	C	T	C	-	G	C	G	C	C	C	G	C	C	C	hrpW_Xcc		
468	C	A	A	C	A	A	C	A	G	T	G	C	C	T	C	T	C	C	G	G	T	A	C	T	T	C	T	T	C	hrpW_Er_amy		
447	C	G	G	T	G	G	C	G	G	C	G	G	T	G	A	T	A	-	-	-	-	C	T	C	C	G	A	C	HrpW_Psto			
456	T	G	G	T	G	A	C	G	G	T	G	G	T	G	G	C	G	T	A	C	A	T	C	C	C	G	A	C	hrpW_Ps_sy			
	C	G	C	T	G	C	A	G	G	T	T	C	C	C	G	T	G	G	G	A	C	G	A	C	-	C	-	-	C	Majority		
78	C	C	C	T	T	C	G	C	C	T	T	C	C	C	A	T	G	-	G	G	A	C	G	T	C	-	-	-	-	hrpW_Xac		
112	T	G	T	T	C	C	A	C	C	A	A	C	C	C	C	G	G	C	G	G	A	C	A	A	C	A	C	G	G	T	hrpW_Xcc	
498	A	T	C	T	G	G	C	G	G	T	T	C	C	C	C	T	T	T	T	A	A	C	G	A	T	C	T	A	T	C	hrpW_Er_amy	
471	C	G	C	A	A	C	A	G	G	C	G	T	G	C	G	C	G	C	A	G	C	-	-	-	-	-	-	-	-	HrpW_Psto		
486	C	A	C	T	G	A	A	G	T	G	A	C	G	G	C	G	G	C	G	G	T	A	C	A	T	C	T	C	C	hrpW_Ps_sy		

	G	C	T	G	A	A	C	A	T	C	A	T	T	A	A	C	A	G	C	A	C	C	T	T	C	A	A	G	G	A	Majority	
582	G	A	T	C	G	A	A	A	T	C	C	T	C	G	A	C	A	G	T	T	C	C	T	T	C	G	A	C	A	A	hrpW_Xac	
645	G	G	T	C	G	A	C	A	T	C	A	T	C	A	A	T	T	G	C	A	C	G	T	T	C	A	A	G	A	A	hrpW_Xcc	
1042	G	T	T	G	A	A	-	A	T	C	A	C	T	A	A	C	A	G	T	T	C	C	T	T	C	G	A	G	C	A	hrpW_Er_amy	
969	T	C	T	G	A	A	C	A	T	C	A	A	G	A	A	C	A	G	C	A	G	T	G	C	C	A	A	A	G	G	HrpW_Psto	
1020	C	C	T	G	A	A	C	A	T	C	A	C	T	A	A	C	A	G	C	A	G	C	G	C	C	A	A	C	G	G	hrpW_Ps_sy	
	T	G	C	C	G	C	T	G	A	C	A	A	G	G	T	C	G	T	G	C	A	G	C	T	C	A	A	T	G	C	Majority	
612	T	G	C	C	T	C	C	G	A	C	A	A	G	G	T	G	A	T	C	C	A	G	G	A	C	A	A	C	C	A	hrpW_Xac	
675	T	G	C	C	G	C	A	G	A	C	A	A	G	G	T	C	G	T	G	C	A	G	G	A	C	A	A	T	G	G	hrpW_Xcc	
1071	C	G	C	C	T	C	T	G	A	C	A	A	G	A	T	C	C	G	T	G	C	A	G	C	T	G	A	A	T	G	C	hrpW_Er_amy
999	T	G	C	A	G	A	C	G	A	C	A	A	G	G	T	T	G	T	C	C	A	G	C	T	C	A	A	C	G	C	HrpW_Psto	
1050	T	G	C	C	G	A	T	G	A	C	A	A	G	G	T	C	A	T	T	C	A	G	C	T	C	A	A	T	G	C	hrpW_Ps_sy	

Fig. 4-85. XACF and XACR primer design from *hrp* gene of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. left : XACF (nucleotides 90 to 109), right: XACR (nucleotides 605 to 624).



Fig. 4-86. Specific PCR amplification of partial *hrpW* gene from *X. axonopodis* pv. *citri* with *hrp*-specific primers XACF and XACR. Lane M, Size marker (1Kb DNA ladder; Gibco BRLTM); lanes 1-26 listed in Table 4-18.

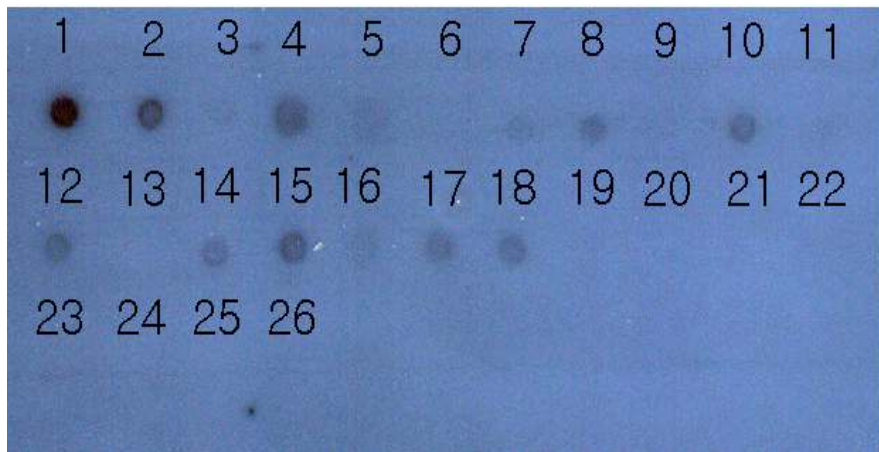


Fig. 4-87. DNA dot-blot analysis of *hrpW* with PCR amplified fragment (561 bp) from *X. axonopodis* pv. *citri*. Lanes 1, *X. a.* pv. *citri* KACC10443 lane 2, *X. a.* pv. *citri* KACC 10444 lane from 3 to 26 (corresponding to the number in Table 4-18), other reference microbes.

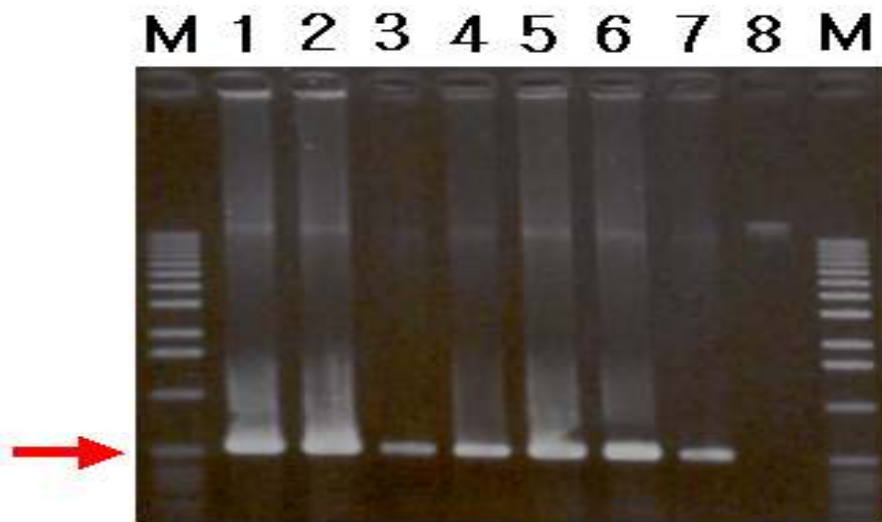


Fig. 4-88. 1: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (KACC10443), 2: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (KACC10444), 3: orange (infection), 4: summer mandarin (infection), 5: lemon (infection), 6: mandarin orange (infection), 7: mandarin orange (infection), 8: mandarin orange (control), M : 1kb ladder marker

Table 4–18. List of bacterial and fungal strains used in this study

Bacterial and fungal isolate	Source	Geographical origin
1 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	KACC10443 ^a	Korea
2 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	KACC10444	Korea
3 <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (Xoo85)	KACC10331 (K1 race)	Korea
4 <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (PXO99A)	KACC10883	Philippines
5 <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	MAFF311018 ^a	Japan
6 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	KACC10913 (ATCC 33913) ^b	United Kingdom
7 <i>Xanthomonas sesami</i>	KACC10648	Belgium
8 <i>Xanthomonas translucens</i> vauverin	KACC10674	Belgium
9 <i>Xanthomonas codiae</i> vauverin	KACC10909	Tonga
10 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>carotae</i>	KACC10164 (ATCC10547) ^b	USA
11 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>glycines</i>	KACC10445 (LMG7403) ^c	Zambia
12 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>glycines</i>	KACC10446	Zimbabwe
13 <i>Xanthomonas campestris</i> (Pammel 1895) Dowson	KACC10490	
14 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>aurantifolii</i>	KACC10161	
15 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i>	KACC10935	Columbia
16 <i>Xanthomonas fragariae</i>	KACC11115 (DSMZ3587) ^d	USA
17 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>	KACC11127(DSMZ1220)	Germany
18 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pelargonii</i>	KACC11128(DSMZ50857)	Germany
19 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>juglandis</i>	DSMZ1049	United Kingdom
20 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	KACC10327 (LMG 1794)	United Kingdom
21 <i>Pseudomonas stutzeri</i>	KACC10290 (ATCC 17588)	
22 <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	KACC10436 (LMG 2435)	Italy
23 <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	KACC10440 (LMG 2433)	The Netherlands
24 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	KACC40529 (ATCC11939)	
25 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	KACC40525 (ATCC16016)	Germany
26 <i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	KACC10765 (ATCC 35150)	

a: KACC, Korean Agricultural Culture Collection, Korea (<http://mgd.rda.go.kr>); ATCC, American Type Culture Collection, USA ; LMG, The Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (BCCMTM), Belgium. b: Other Collection No.

4) PCR primer를 이용한 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 특이검출

세 번째 테마 중 본 연구는 감자 흑각병원균(*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*)의 특이 DNA 단편 검출을 위한 PCR primer set에 관한 것으로, 보다 상세하게는 감자 흑각병원균의 특이 DNA 단편을 검출할 수 있는 20mer로 제작된 한쌍의 primer를 이용하여 감자 흑각병원균의 감염여부를 신속, 정확하게 진단할 수 있는 아종(subspecies) 특이적인 PCR primer set에 관한 것이다. 본 연구에서 사용된 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*을 포함한 기타 미생물은 농업생명공학연구원 유전자원과의 Korean Agricultural Culture Collection(KACC) 및 벨기에의 the Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (BCCMTM) 에서 분양받았으며, 이들의 출처에 대하여 표 4-1에 정리하였다. *Erwinia*, *Pectobacterium* 및 *Pseudomonas* 균주는 영양한천배지 (nutrient agar: NA, DifcoTM), *Xanthomonas* 균주는 YGC배지(D-(+)-glucose 2.0%, CaCO₃ 2.0%, Yeast extract 1.0% :1L), *Fusarium* spp.은 potato dextrose agar(PDA, DifcoTM), *Escherichia coli*는 LB한천배지(Sambrook와 Maniatis 1989)에서 배양하였다.

배양된 *Erwinia* 균주 또는 *Pectobacterium* 균주의 총 DNA는 CTAB 방법으로 추출하였으며, 다른 미생물의 총 DNA는 Qiagen(Hilden, Germany)사의 게놈 DNA 추출 키트(Genomic-tips)을 이용하여 추출하였다.

Erwinia carotovora subsp. *atroseptica*를 검출하기 위한 특이 primer set의 제작을 위해 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 GenBank(www.ncbi.nlm.nih.gov/)에 등록된 (등록번호 : BX950851) *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 유전체 정보 중 *rhs* 유전자 서열정보(GI: 5012234)를 blastn 프로그램을 통해 다양성을 확인하고 primer를 제작하였다.

Erwinia carotovora subsp. *atroseptica*의 *rhs* 유전자에서 904bp 크기의 단편을 증폭하는 PEA primer(서열 2)와 PEAR primer(서열 3) set를 제작하였다. primer의 서열은 다음과 같다.

- PEA primer : 5'-CCGGTACTTCAAGCTAATCC -3' 20mer (서열 2)
- PEAR primer : 5'-CCTTACCTATCGCTTCTCCT -3' 20mer (서열 3)

PCR 증폭 반응은 PTC-200TM thermocycler(MJ research, Watertown, mass)를 사용하여 실시하였으며, 각 반응은 Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, MgCl₂ 1.5mM, 젤라틴 0.01%, dNTP는 각각 0.2mM, primer는 각각 10pM, 2unit의 텍 중합효소(*Taq* polymerase,(Promega, Madison, Wis.)을 함유하는 PCR 혼합액으로 총50μl의 양으로 수

행하였다. PCR 혼합액에 첨가한 몇몇 미생물의 게놈 DNA 양은 약 50ng이었다.

반응은 94°C에서 5분간 변성하고 94°C 60초, 62°C 30초, 72°C 60초로 25회 반복시킨 후 72°C에서 7분간 반응하였다. 증폭반응 후 8µl의 PCR 증폭산물을 1%농도의 아가로스 젤에 전기영동한 후 에티디움 브로마이드에 착색시켜 자외선 조사기(UV transilluminator)에서 확인하였다.

분석 결과 Fig. 4-89에서 보는 바와 같이, 감자 흑각병원균주에서만 904bp 크기의 핵산 단편이 특이적으로 증폭된 것을 확인할 수 있었다. 따라서, PEAf primer 또는 PEAR primer는 감자 흑각병원균의 특이 DNA 단편만을 증폭시킬 수 있으므로, 흑각병원균의 감염여부 진단을 위한 PCR primer로 이용이 가능하다는 것을 알 수 있다. 즉, 서열번호 1의 특이 DNA 단편으로부터 제작된 primer set는 감자에서 흑각병원균을 특이적으로 검출할 수 있음이 확인되었다.

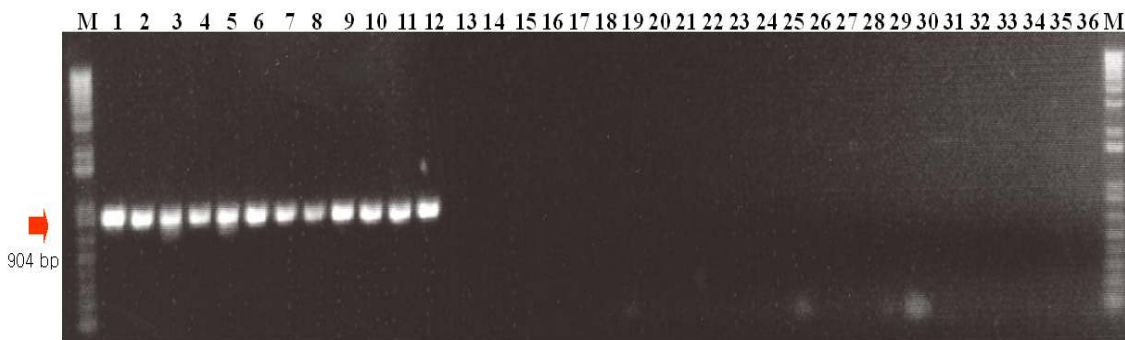


Fig. 4-89. PCR amplification of partial *Rhs* family gene from *Pectobacterium atrosepticum* with species-specific primer-set PEAf and PEAR. Lane M, Size marker (1Kb plus DNA ladder; Gibco BRL™); lanes 1-36 listed in 4-Table 19.

이병 조직으로부터 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 검출은 실제 감자 흑각병원균에 감염된 것으로 의심되는 감자 괴경으로부터 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*을 검출할 수 있는지를 확인하고자 실시하였다. 제작된 PEAf primer와 PEAR primer의 흑각병원균(*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*)에 대한 특이성을 확인하기 위해 직경 20cm pot에 종서를 파종 후 지상부 및 괴경이 형성되는 한달 후에 줄기 및 괴경에 10^6 /ml 농도로 현탁한 현탁액을 상처에 접종하였다. 접종구는 습실처리를 하여 2-3일 경과 후 발병 조

직으로부터 1 그램의 샘플을 채취한 후 게놈 DNA를 CTAB 분리법 (Murray and Thompson, 1980)을 통해 분리 한 후 PEAR와 PEAR primer set를 이용하여 PCR을 실시하고, 그 결과를 Fig. 4-90에 나타내었다. Fig. 4-2에서 M은 DNA 크기측정 마커(1kb DNA plus ladder, Gibco BRL™)이고, 1번은 *Pectobacterium atrosepticum* LMG2386이고, 2~6번은 흑각병원균에 감염된 흰 감자 괴경(artificially infected white potato tubers)이며, 7번은 흑각병원균에 감염되지 않은 흰 감자 괴경(control white potato tuber)이다. 그 결과 Fig.4-91에서 볼 수 있는 바와 같이, PEAR와 PEAR primer set를 이용하여 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*를 특이적으로 검출하였다.

특이 유전자에 대한 DNA dot blot분석은 감자 흑각병원균 및 이 미생물과 계통학적, 생화학적으로 유사성이 있는 것으로 인정되는 같은 속(*Erwinia* 또는 *Pectobacterium*) 및 다른 속의 여러 미생물에서 *rhs*유전자 존재여부를 확인하고자 실시하였다. 즉, DNA 드트 블롯은 특이 서열 추정 부분이 본 발명에서 사용된 다른 미생물에도 존재하는지를 확인하기 위해 수행되었다. *Erwinia* 또는 *Pectobacterium* strain과 본 발명에 사용된 기타 미생물로부터 추출된 20ng의 게놈 DNA를 하이본드-N⁺ 나일론막(Amersham pharmacia biotech, UK)에 각각 분주한 후, UV 크로스-링크를 사용하여 고정시켰다. 흑각병원균(*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*)으로부터 증폭된 유전자 단편을 유전자 탐침인자로 사용하기 위해 랜덤 프라임(random prime) 방법에 따라 라더만(Ladderman™) 라벨링 키트(Takara, Japan)을 이용하여 방사선 동위원소 [³²P]dCTP로 표지하였다. 방사선 동위원소로 표지된 탐침인자와 하이본드-N⁺ 나일론막에 고정된 각 미생물 게놈 DNA와의 혼성화는 65°C에서 18시간동안 혼성화 완충용액(NaCl 0.75M, 구연산 나트륨 75mM, 0.5% SDS, 0.1% BSA, 0.1% 피콜, 0.1% 폴리비닐피롤리돈과 변성된 연어혈청DNA 50µg/ml)을 사용하여 실시하였다. 혼성화 되어진 나일론막을 0.1%의 SDS(sodium dodecyl sulfate)가 포함된 2× SSC 완충액으로 실온에서 두 번 세척(각 10분씩)하고, 0.1%의 SDS를 포함한 0.1× SSC로 65°C에서 다시 두 번(각 15분씩) 세척하였다. 혼성화작업 및 세척작업 후 나일론막을 X-ray 필름(AGFA, Belgium)에 -70°C에서 하루동안 노출시킨 후 현상하고, 그 결과를 Fig. 4-91에 나타내었다. 그 결과 Fig. 4-91에서 보는 바와 같이, 감자흑각병원균의 총 DNA에서만 특이적으로 PCR 프로브가 결합하는 양상이 확인되었다.

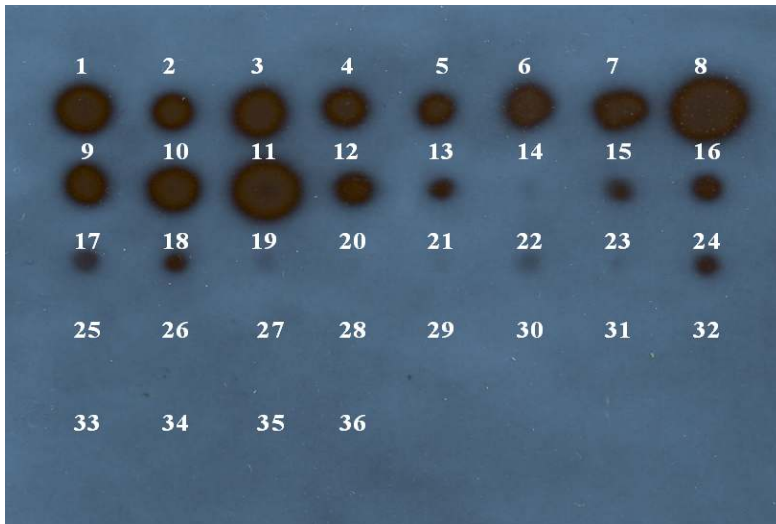


Fig. 4-90. DNA dot-blot analysis of *Rhs* family gene with PCR amplified fragment (904 bp) from *Pectobacterium atrosepticum*. Lane 1-12, *Pectobacterium atrosepticum* lane from 13 to 36(corresponding to the isolates numbered in Table 4-19).

5) PCR primer를 이용한 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 특이검출

세 번째 테마 중 본 연구는 세균성점무늬병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 특이 DNA 단편을 신속, 정확하게 검출할 수 있는 병원형(Pathovar) 특이 PCR primer set에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명의 primer set는 PCR(polymerase chain reaction)법을 이용하여 세균성점무늬병원균만을 검출해내는 20mer로 제작된 1쌍의 primer set로서, 상기 primer set는 세균성점무늬병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에서만 517 bp의 단일 밴드를 형성하고 다른 *Xanthomonas*속 내 유사 종 및 다른 병원성 계통에는 밴드를 검출하지 않으며, 6시간 내에 DNA 수준에서 신속, 정확히 세균성점무늬병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 감염 진위 여부를 판별할 수 있어 종자 감염 여부 및 재배 포장에서의 발생 예찰에 효과가 있다.

본 연구에 사용된 세균성점무늬병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 포함한 기타 미생물은 농업생명공학연구원 유전자원과의 한국농업미생물자원센터(KACC, Korean Agricultural Culture Collection) 및 벨기에의 the Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (BCCM™)에서 분양받았다 (Table 4-19). *Xanthomonas*

균주는 YGC 배지(D-(+)-glucose 2.0%, CaCO₃ 2.0%, Yeast extract 1.0% :1L), *Fusarium* spp.은 potato dextrose agar(PDA, Difco), *Escherichia coli*은 LB agar(Sambrook와 Maniatis 1989)에서, 다른 세균들은 nutrient agar(NA, Difco)에서 배양하였다.

YGC 배지에서 배양된 *Xanthomonas* 균주는 CTAB 방법으로 total DNA를 추출하였으며(Lazo, G.R., Gabriel, D.W., 1987. *Phytopathology*. 77, 448-453), 다른 미생물로부터의 total DNA는 Qiagen(Hilden, Germany)사의 genomic DNA extraction kit(Genomic-tips)를 이용하여 추출하였다.

Table 4-19. List of bacterial and fungal strains used in this study

No.	Bacterial and Fungal Isolates	Source	Geographical origin
1	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	KACC 11153	Republic of Korea
2	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	KACC 11154	Republic of Korea
3	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	KACC 11157	Republic of Korea
4	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	KACC 11158	Republic of Korea
5	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	LMG 905	-
6	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	LMG 668	Cook island
7	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	LMG 904	-
8	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	LMG 667	-
9	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	KACC 10563	Hungary
10	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	KACC10331	Korea
11	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	ATCC 33913	United Kingdom
12	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>carotae</i>	ATCC 10547	USA
13	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>glycines</i>	LMG 7403	Zambia
14	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pelargoni</i>	DSMZ 50857	Germany
15	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>juglandis</i>	DSMZ 1049	United Kingdom
16	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>	DSMZ 1220	Germany
17	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	KACC10443	Korea
18	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i>	LMG 695	Brazil
19	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>	LMG 901	Muritus
20	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	LMG 551	United Kingdom
21	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	LMG 7455	Belgium
22	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phyllanthi</i>	LMG 844	Sudan
23	<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>cerealis</i>	LMG 679	USA
24	<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>hordei</i>	LMG 882	Canada
25	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>poinsetticola</i>	LMG 5403	New Zealand
26	<i>Xanthomonas cassavae</i>	LMG 673	Malawi
27	<i>Xanthomonas cucurbitae</i>	LMG 8662	New Zealand
28	<i>Mesorhizobium loti</i>	LMG 6125	New Zealand
29	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	LMG 2386	United Kingdom
30	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	LMG 5093	United Kingdom
31	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35150	-
32	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	ATCC 11939	-

KACC, Korean Agricultural Culture Collection, Republic of Korea
(<http://kacc.rda.go.kr>);

ATCC, American Type Culture Collection, USA;

LMG, The Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms (BCCM™), Belgium

세균성점무늬병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 검출하기 위한 특이 primer set의 제작을 위해 National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 GenBank(www.ncbi.nlm.nih.gov/)에 등록된 (등록번호 : AM039952, GI : 78048271) 세균성점무늬병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* str.) 85-10 유전체 정보 중 *rhs* 유전자 서열정보를 blastn 프로그램을 통해 그 특이성을 확인하였다.

PCR 증폭 반응은 PTC-200TM thermocycler(MJ research, Watertown, mass)를 사용하여 실시하였으며, 각 반응은 Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, MgCl₂ 1.5mM, 젤라틴 0.01%, dNTP는 각각 0.2mM, primer는 각각 10pM 및 *Taq* polymerase 2 unit(Promega™, Madison, Wis.)를 함유하는 PCR 혼합액으로 총 50μl의 양으로 수행하였다. PCR 혼합액에 첨가한 미생물들의 각각의 계능 DNA 양은 약 50ng이었다. 반응은 94℃에서 5분간 변성하고 94℃ 60초, 58℃ 30초, 72℃ 60초로 25회 반복시킨 후 72℃에서 7분간 반응한다. 증폭반응 후 8μl의 PCR 산물을 1% 농도의 agarose gel에 전기영동한 후 EtBr(ethidium bromide)에 착색시켜 UV transilluminator에서 확인하였다(Fig. 4-1).

Fig. 4-91 은 특이 primer set(XCVF/XCVR)를 이용하여 세균성점무늬병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) 특이 DNA 단편의 검출여부를 조사한 결과 디자인된 영역 (517bp: 756 ~ 1272bp)에서 증폭됨을 확인하였다.



Fig. 4-91. Specific PCR amplification of the *Rhs* family gene from *X. campestris* pv. *vesicatoria* with specific primers XCVF and XCVR. Lane M, Size marker (1Kb DNA plus ladder; Gibco BRL™); lanes 1-32 listed in Table 4-19.

이병 조직으로부터 세균성점무늬병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 검출하는 실험을 위해 인위적으로 고추 품종에 세균성점무늬병원균을 접종하였다 (Sahin, F., Miller, S.A., 1998. Plant Disease. 82, 794-799). 또한, 접종된 이병 조직으로

부터의 total 게놈 DNA 분리는 Murray의 방법에 따라 실시하여 분석하였다(Murray, M.G., Thompson, W.F., 1980. Rapid isolation of high molecular-weight plant DNA. Nucl. Acid Res. 8, 4321.). 그 결과 접종된 고추 잎 조직(lane 2-6)에서만 특이 DNA 단편이 증폭되었고 무처리 대조군(control)으로 사용된 lane 7에서는 전혀 검출되지 않았다 (Fig. 4-92).

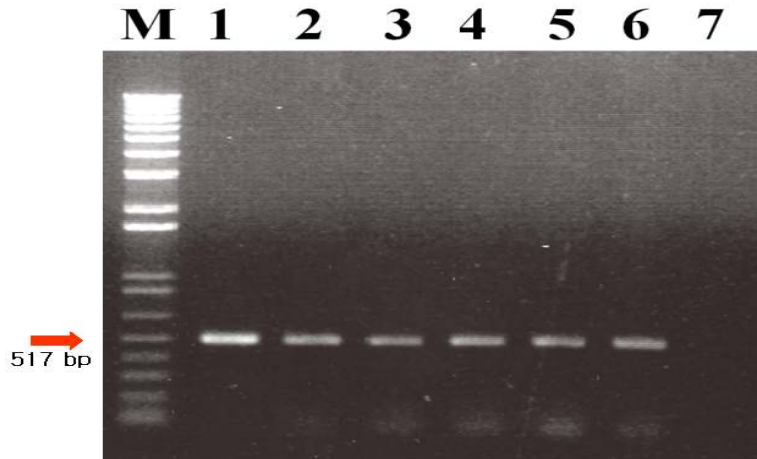


Fig. 4-92. PCR detection of artificially infected red pepper leaves. M, size marker (1kb DNA plus ladder; Gibco BRLTM); 1, *X. campestris* pv. *vesicatoria* KACC11153; lane 2-6, inoculated *Capsicum annuum* cultivars; lane 7, healthy *Capsicum annuum* cultivar.

DNA 도트 블랏 분석은 특이 서열 추정 부분이 이 연구에서 사용된 다른 미생물에도 존재하는지를 확인하기 위해 수행되었다. *Xanthomonas* strain와 본 실험에 사용된 기타 미생물로부터 추출된 20ng의 게놈 DNA를 Hybond-N+ nylon membrane(Amersham pharmacia biotech, UK)에 각각 분주한 후 UV 교차결합(cross-link)을 사용하여 고정시켰다. 세균성점무늬병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)으로부터 증폭된 유전자 단편을 유전자 탐침인자로 사용하기 위해 random prime 방법에 따라 Ladderman Labeling kit(TakaraTM, Japan)을 이용하여 방사선 동위원소 [³²P]dCTP로 표식하였다. 방사선 동위원소로 표식된 탐침인자와 Hybond-N+ nylon membrane에 고정된 각 미생물

계놈 DNA와의 혼성화는 65°C에서 18시간동안 hybridization buffer(NaCl 0.75M, sodium citrate 75mM, 0.5% SDS, 0.1% BSA, 0.1% Ficoll, 0.1% polyvinylpyrrolidone 및 변성된 salmon sperm DNA 50µg/ml)로 실시하였다. 혼성화된 나일론 막(nylon membrane)은 0.1%의 SDS(sodium dodecyl sulfate)가 포함된 2xSSC buffer로 실온에서 두 번 세척(각 10분씩)하고, 0.1%의 SDS(sodium dodecyl sulfate)를 포함한 0.1xSSC로 65°C에서 다시 두 번(각 15분씩) 세척하였다. 혼성화 작업 및 세척 작업 후 나일론 막을 X-ray 필름 (AGFA, Belgium)에 -70°C에서 하루동안 노출시킨 후 현상하였다.(Fig. 4-92) 그 결과 세균성점무늬병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 total 계놈 DNA와 자체 증폭된 PCR 프로브(probe)의 혼성화 결과에서는 양성 반응(positive reaction)이 나왔으나, 그 밖의 다른 균주에서의 total 계놈 DNA와 세균성점무늬병원균에서 증폭된 PCR 프로브(probe)의 혼성화에서는 결합 현상(hybridization)이 전혀 나타나지 않아 특히 primer로 제작된 PCR 산물이 세균성점무늬병원균만이 갖는 특이 DNA 단편이라는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4-93)

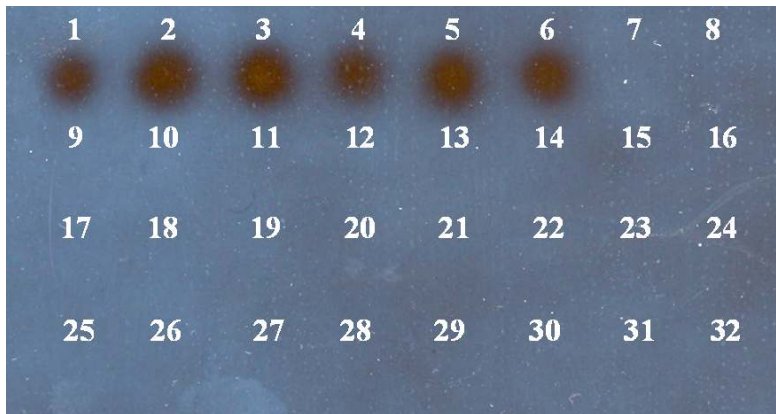


Fig. 4-93. DNA dot-blot analysis of the *Rhs* family gene with PCR amplified fragment (517 bp) from *X. campestris* pv. *vesicatoria* KACC11153. Lane 1, *X. campestris* pv. *vesicatoria* KACC11153 lane 2, *X. campestris* pv. *vesicatoria* KACC 11154 lane 3, *X. campestris* pv. *vesicatoria* KACC 11157 lane 4, *X. campestris* pv. *vesicatoria* KACC 11158 lane 5, *X. campestris* pv. *vesicatoria* KACC 11161 lane 6, *X. campestris* pv. *vesicatoria* LMG 668 lanes from 7 to 32(corresponding to the number in Table 4-19), other reference microbes.

6) PCR primer를 이용한 *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* 특이검출

세 번째 테마 중 본 연구는 콩불마름병원균(*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*)의 특이 DNA 단편을 감염된 생물체로부터 신속, 정확하게 감염여부를 진단할 수 있는 PCR primer 및 이를 이용한 콩불마름병원균의 검출방법에 관한 것으로서 개발된 primer는 PCR법을 이용하여 이 균만을 검출할 수 있는 22mer 와 19mer로 이루어진 콩불마름병원균 특이 primer이다. 본 primer set는 콩불마름병원균(*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*)에서만 461bp의 단일 밴드를 형성하며 다른 *Xanthomonas*속 내 유사 종 및 다른 병원형(pathovar)에는 밴드를 검출하지 않고 6시간 내에 DNA 수준에서 신속, 정확히 콩불마름병원균(*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*)의 감염 진위 여부를 판별할 수 있으므로 종자 감염 여부 및 재배 포장에서의 발생 예찰에 효과가 있다.

본 연구에 사용된 콩불마름병원균(*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*)을 포함한 기타 미생물은 농업생명공학연구원 유전자원과의 한국농업미생물자원센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC) 및 벨기에의 The Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (BCCMTM) 에서 분양받았으며, 표 4-20에 정리되어 있다. *Xanthomonas* 균주는 YGC배지(D-(+)-glucose 2.0%, CaCO₃ 2.0%, Yeast extract 1.0% :1L), *Fusarium* spp. 은 potato dextrose agar(PDA, DifcoTM), *Escherichia coli*는 LB한천배지(Sambrook와 Maniatis 1989)에서, 다른 세균들은 영양한천배지(nutrient agar: NA, DifcoTM)에서 배양하였다.

Total DNA의 추출은 YGC배지에서 배양된 *Xanthomonas* 균주로부터 CTAB 방법으로 전체 DNA를 추출하였으며 다른 미생물로부터의 전체 DNA는 Qiagen(Hilden, Germany)사의 게놈 DNA 추출 키트(Genomic-tips)를 이용하여 추출하였다.

Table 4–20. List of bacterial and fungal strains used in this study

No. ⁺	Bacterial and Fungal Isolates ⁺	Source ⁺	Geographical origin ⁺
1 ⁺	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> ⁺	DSMZ 7403 ⁺	Zambia ⁺
2 ⁺	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> ⁺	DSMZ 7404 ⁺	Zimbabwe ⁺
3 ⁺	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> ⁺	KACC 11145 ⁺	Korea ⁺
4 ⁺	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ⁺	KACC 10331 ⁺	Korea ⁺
5 ⁺	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> ⁺	BLS 349 ⁺	Philippines ⁺
6 ⁺	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> ⁺	ATCC 33913 ⁺	United Kingdom ⁺
7 ⁺	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>carotae</i> ⁺	ATCC 10547 ⁺	USA ⁺
8 ⁺	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pelargoni</i> ⁺	DSMZ 50857 ⁺	- ⁺
9 ⁺	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>juglandi</i> ⁺	DSMZ 1049 ⁺	United Kingdom ⁺
10 ⁺	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i> ⁺	DSMZ 1220 ⁺	- ⁺
11 ⁺	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> ⁺	KACC 10443 ⁺	Korea ⁺
12 ⁺	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i> ⁺	LMG 695 ⁺	Brazil ⁺
13 ⁺	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i> ⁺	LMG 901 ⁺	Muritius ⁺
14 ⁺	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i> ⁺	LMG 551 ⁺	United Kingdom ⁺
15 ⁺	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> ⁺	LMG 7455 ⁺	Vulgaris ⁺
16 ⁺	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phyllanthi</i> ⁺	LMG 844 ⁺	Sudan ⁺
17 ⁺	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i> ⁺	KACC 10161 ⁺	Brazil ⁺
18 ⁺	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> ⁺	LMG 905 ⁺	Sudan ⁺
19 ⁺	<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>phleipratensis</i> ⁺	LMG 843 ⁺	USA ⁺
20 ⁺	<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>cerealis</i> ⁺	LMG 679 ⁺	USA ⁺
21 ⁺	<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>hordei</i> ⁺	LMG 882 ⁺	Canada ⁺
22 ⁺	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>poinsettiicola</i> ⁺	LMG 5403 ⁺	New Zealand ⁺
23 ⁺	<i>Xanthomonas cassavae</i> ⁺	LMG 673 ⁺	Malawi ⁺
24 ⁺	<i>Xanthomonas cucurbitae</i> ⁺	LMG 8662 ⁺	New Zealand ⁺
25 ⁺	<i>Xanthomonas theicola</i> ⁺	LMG 8684 ⁺	Japan ⁺
26 ⁺	<i>Xanthomonas pisi</i> ⁺	LMG 847 ⁺	Japan ⁺
27 ⁺	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> ⁺	LMG 5093 ⁺	United Kingdom ⁺
28 ⁺	<i>Escherichia coli</i> (O157:H7) ⁺	ATCC 35150 ⁺	- ⁺
29 ⁺	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Dianthi</i> ⁺	ATCC 11939 ⁺	- ⁺
30 ⁺	<i>Penicillium italicum</i> ⁺	KACC 40826 ⁺	Korea ⁺
31 ⁺	<i>Trichoderma harzianum</i> ⁺	KACC 40543 ⁺	Korea ⁺

KACC, Korean Agricultural Culture Collection, Republic of Korea (<http://kacc.rda.go.kr>);

ATCC, American Type Culture Collection, USA;

LMG, The Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms (BCCMTM), Belgium;

NCPPB; National Collections of Plant Pathogenic Bacteria, UK;

DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Germany;

BLS, International Rice Research Institute, Philippines

콩불마름병원균(*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*)을 검출하기 위한 특이 primer의 제작을 위해 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 GenBank에 등록된 (등록번호: AY52084) hypothetical protein(protein_id="AAS91338.1) 유전자(서열목록 1: 1,075bp)의 upstream region의 서열정보를 blastn 프로그램을 통해 확인하였다.

콩불마름병원균의 hypothetical protein 유전자로부터 461 bp 크기의 유전자 단편을 증폭할 것으로 예상되는 XGF (5'-TGTGCGGCCAGTAGATAGTGAGC-3')(서열목록 2: 23mer)와 XGR (5'-CCGAGGGCCAGCAAAGAAG-3')(서열목록 3: 19mer) primer는 GenBank에 등록된 (등록번호: AY520840) 하이포테티컬 단백질(hypothetical protein, protein_id="AAS91338.1)의 upstream region의 서열정보를 blastn 프로그램을 통해 특이성을 확인 후 제작하였다.

PCR 증폭 반응은 PTC-200TM thermocycler(MJ research, Watertown, mass)를 사용하여 실시하였으며, 각 반응은 Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, MgCl₂ 1.5mM, gelatin 0.01%, dNTP는 각각 0.2mM, primer는 각각 10pM, *Taq* polymerase 2unit(Promega™, Madison, Wis.)을 함유하는 PCR 혼합액으로 총 50µl의 양으로 수행하였다. PCR 혼합액에 첨가한 몇몇 미생물의 genomic DNA 양은 약 50ng이었다. 반응은 94°C에서 10분간 변성하고 94°C 60초, 62°C 30초, 72°C 60초로 25회 반복시킨 후 72°C에서 10분간 반응한다. 증폭반응 후 8µl의 PCR 산물을 1%농도의 agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide에 착색시켜 UV transilluminator에서 확인하였다.

Fig. 4-94에서 나타난 바와 같이 XGF와 XGR primer 쌍을 이용하여 표 4-20에 기재된 31균주 중에서 콩불마름병원균인 *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*에 대하여 특이 DNA 단편을 검출할 수 있었다. 1, 2, 3 lane의 *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*의 콩불마름병원균에서만 특이적으로 존재하는 PCR 단편이 검출되었다.

이병 조직으로부터 콩불마름병원균(*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*) 검출 가능 여부를 확인하기 위해 콩불마름병에 감염된 것으로 의심되는 콩 잎 조직의 genomic DNA를 추출하여 XGR와 XGF primer로 *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*를 PCR에 의해 검출하였다. 그 결과 Fig. 4-95에서와 같이 콩불마름병에 감염된 것으로 의심되는 무 병징의 콩 잎 조직(lane 6, 7, 8)과 콩불마름병원균이 묻은 핀으로 접종된 콩잎 조직(lane 5, 6)으로부터 분리된 1그램의 샘플에서 게놈 DNA를 CTAB 분리법 (Murray M.G., Thompson W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular-weight plant DNA.

Nucleic Acids Res 8:432)을 통해 분리 한 후 XGR와 XGF primer를 이용하여 콩불마름병균, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*을 특이적으로 검출하였다.

DNA dot blot 분석은 특이 서열 추정 부분이 이 연구에서 사용된 다른 미생물에도 존재하는지를 확인하기 위해 수행되었다. *Xanthomonas* strain와 본 실험에 사용된 기타 미생물로부터 추출된 20ng의 게놈 DNA를 Hybond-N+ nylon membrane(Amersham pharmacia biotech, UK)에 각각 분주한 후 UV cross-link를 사용하여 고정시켰다. *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*로부터 증폭된 유전자 단편을 유전자 탐침인자로 사용하기 위해 random prime 방법에 따라 Ladderman Labeling kit(TakaraTM, Japan)을 이용하여 방사선 동위원소 [³²P]dCTP로 표지하였다. 방사선 동위원소로 표지된 탐침인자와 Hybond-N+ nylon membrane에 고정된 각 미생물 게놈 DNA와의 혼성화는 65°C에서 18시간 동안 hybridization buffer(NaCl 0.75M, sodium citrate 75mM, 0.5% SDS, 0.1% BSA, 0.1% Ficoll, 0.1% polyvinylpyrrolidone과 변성된 salmon sperm DNA 50µg/ml)로 실시하였다. 혼성화 되어진 nylon membrane는 0.1%의 SDS(sodium dodecyl sulfate)가 포함된 2xSSC buffer로 실온에서 두 번 세척(각 10분씩)하고, 0.1%의 SDS(sodium dodecyl sulfate)를 포함한 0.1xSSC로 65°C에서 다시 두 번(각 15분씩) 세척하였다. 혼성화작업 및 세척작업 후 nylon membrane을 X-ray 필름(AGFA, Belgium)에 -70°C에서 하루 동안 노출시킨 후 현상하였다.

Fig. 4-96 에서 증폭된 DNA 단편을 프로브로 하여 콩 불마름병균 및 다른 미생물에 대하여 돛(Dot) 블랏(blot) 분석을 수행하였다. 그 결과 *Xanthomonas*속 세균 중 hypothetical protein 부분에서 상동성이 있는 병원균에서 양성(positive) 반응이 있음을 확인할 수 있었고 그 외 나머지 세균 및 곰팡이에서는 음성(negative) 반응이 일어남을 확인할 수 있었다. 따라서 본 primer가 상당한 특이성을 갖고 있음을 확인할 수 있었다.

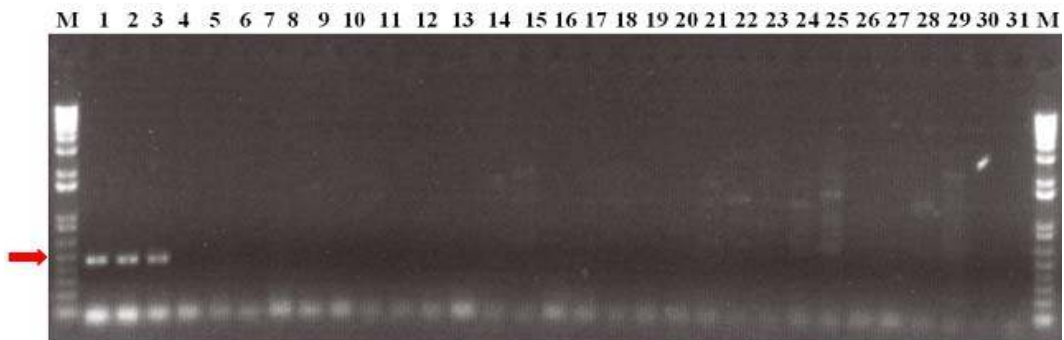


Fig. 4-94. Specific PCR amplification of a partial hypothetical protein from *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* with pathovar specific primers XAGF and XAGR. Lane M, Size marker (1Kb DNA plus ladder; Gibco BRL TM); lanes 1-31 listed in Table 4-20.

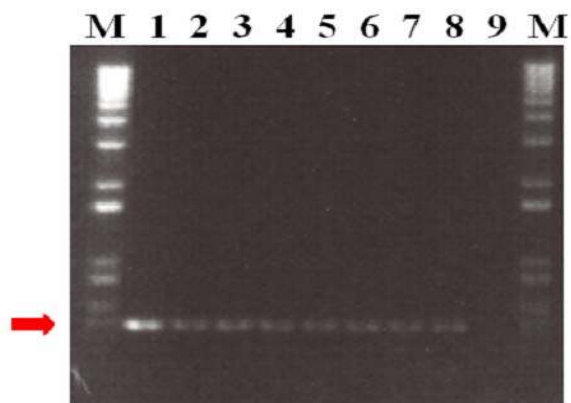


Fig. 4-95. PCR detection of naturally and artificially infected soybean leaves. M, size marker (1 kb DNA plus ladder; Gibco BRL TM); lane 1, *X. axonopodis* pv. *glycines* DSMZ 7403; lane 2, *X. axonopodis* pv. *glycines* DSMZ 7404 lane 3, *X. axonopodis* pv. *glycines* KACC 11145 lane 4, artificially inoculated leaf from *Glycine max* lane 5, artificially inoculated leaf from *Glycine max* lane 6, symptomless leaf from *Glycine sojae* lane 7, symptomless leaf from *Glycine sojae* lane 8, symptomless leaf from *Glycine sojae* lane 9, control leaf from *Glycine max*.

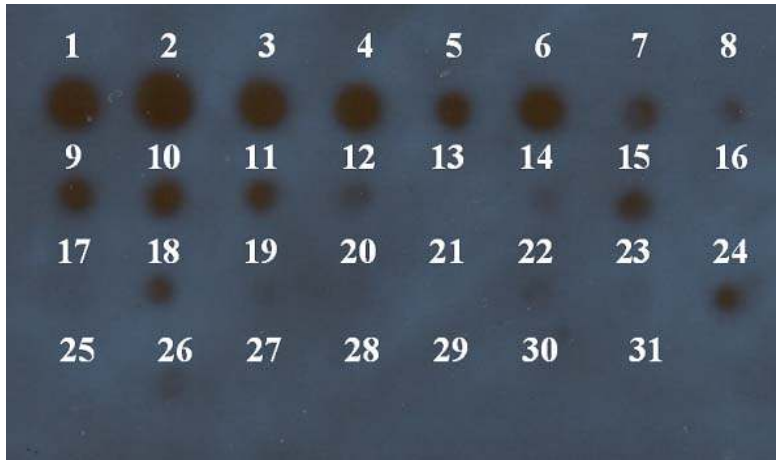


Fig. 4-96. DNA dot-blot analysis of a hypothetical gene with PCR amplified fragment (461 bp) from *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* DSMZ 7403. Lanes 1, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* DSMZ 7403 lane 2, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* DSMZ 7404 lane 3, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* KACC 11145; lane from 4 to 31 (corresponding to the number in Table 4-20), other reference microbes.

7) PCR primer를 이용한 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 특이검출

세 번째 테마 중 본 연구는 벼 흰잎마름병원균(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)의 특이 DNA 단편을 감염된 생물체로부터 신속, 정확하게 감염여부를 진단할 수 있는 PCR primer 및 이를 이용한 벼 흰잎마름병원균의 검출방법에 관한 것이다.

벼 흰잎마름병원균(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)의 발병시기는 7월초~수확기이나 주로 7월 상순~8월 중순에 발병한다. 현재까지 이 균에 특이적인 살균제는 없고 종자 QC(Quality Control)에는 큰 도움을 주지 못하고 있으며 배양시 균 성장속도도 예찰 및 방역에 매우 많은 시간이 소요되고 있다. 이러한 특성을 지닌 벼 흰잎마름병원균의 검출을 위해서 선택배지를 이용하거나 병원균의 생리, 생화학적 특성의 검정을 수행하는 방법이 이루어지고 있다. 그러나 이러한 방법들은 병원세균의 분리 및 배양에 장시간이 소요되고 분리세균의 농도가 상당히 높은 상태(103CFU 이상)에서만 진단이 가능하며, 유사한 생리적 특성으로 인하여 동일한 *Xanthomonas*속 또는 동종(*Xanthomonas oryzae*) 내의 여러 병원형(pathovar)성 아종들과의 관계에서 정확한 동정이 매우 어렵기 때문에 전문적인 분류학자를 통해서만 가능한 문제점이 있다. 한편, 항체반응

을 이용한 ELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 진단법은 검출 감도가 높은 것임에도 불구하고 절차가 복잡하고 고가의 분석비용이 요구되며, 시간이 많이 소요되는 동정방법이라는 문제점이 있다. 현재는 미생물 탐침법으로 PCR법이 점차 확대되어 사용되고 있다. 그러나 기존의 검출 방법은 DNA 탐침자를 이용하여 중 수준까지만 검출이 가능하고 병원형(pathovar)은 확인할 수 없었다.

그러나, 본 연구에서 개발된 primer는 PCR법을 이용하여 이 균만을 검출할 수 있는 각각 20mer로 이루어진 베희일마름병원균 특이 primer set이다. 이 primer set는 베희일마름병원균(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)에서만 605 bp의 단일 밴드를 형성하며 다른 *Xanthomonas*속 내 유사 종 및 다른 병원성 계통에는 밴드를 검출하지 않고 6시간 내에 DNA 수준에서 신속, 정확히 베희일마름병원균(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)의 감염 진위 여부를 판별할 수 있어 종자 감염 여부 및 재배 포장에서의 발생 예찰에 효과가 있다.

본 연구에 사용된 베희일마름병원균(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)을 포함한 기타 미생물은 농업생명공학연구원 유전자원과의 한국농업미생물자원센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC) 및 벨기에의 The Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (BCCMTM) 에서 분양받았으며, 표 4-21에 정리되어 있다. *Xanthomonas* 균주는 YGC배지(D-(+)-glucose 2.0%, CaCO₃ 2.0%, Yeast extract 1.0% :1L), *Fusarium* spp.은 potato dextrose agar(PDA, DifcoTM), *Escherichia coli*는 LB한천배지(Sambrook와 Maniatis 1989)에서, 다른 세균들은 영양한천배지(nutrient agar: NA, DifcoTM)에서 배양하였다.

Total DNA의 추출은 YGC배지에서 배양된 *Xanthomonas* 균주로부터 CTAB 방법으로 전체 DNA를 추출하였으며 다른 미생물로부터의 전체 DNA는 Qiagen(Hilden, Germany)사의 게놈 DNA 추출 키트(Genomic-tips)를 이용하여 추출하였다.

Table 4–21. List of bacterial and fungal strains used in this study

No.	Bacterial and Fungal Isolates	Source	Geographical origin
1	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (KXO85)	KACC 10331	Korea
2	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	KACC 10383	Korea
3	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (PXO99)	KACC 10883	Philippines
4	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	BLS 349	Philippines
5	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	ATCC 33913	United Kingdom
6	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>carotae</i>	ATCC 10547	USA
7	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>glycines</i>	LMG 7403	Zambia
8	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pelargoni</i>	DSMZ 50857	Germany
9	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>juglandis</i>	DSMZ 1049	United Kingdom
10	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>	DSMZ 1220	Germany
11	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	KACC10443	Korea
12	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i>	LMG 695	Brazil
13	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>	LMG 901	Muritus
14	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	LMG 551	United Kingdom
15	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	LMG 7455	Belgium
16	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phyllanthi</i>	LMG 844	Sudan
17	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i>	KACC 10161	
18	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	LMG 905	Tonga
19	<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>phleipratensis</i>	LMG 843	USA
20	<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>cerealis</i>	LMG 679	USA
21	<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>hordei</i>	LMG 882	Canada
22	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>poinsetticola</i>	LMG 5403	New Zealand
23	<i>Xanthomonas cassavae</i>	LMG 673	Malawi
24	<i>Xanthomonas cucurbitae</i>	LMG 8662	New Zealand
25	<i>Xanthomonas theicola</i>	LMG 8684	Japan
26	<i>Xanthomonas pisi</i>	LMG 847	Japan
27	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	LMG 5093	United Kingdom
28	<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	ATCC 35150	
29	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	ATCC 11939	

KACC, Korean Agricultural Culture Collection, Republic of Korea

(<http://kacc.rda.go.kr>); ATCC, American Type Culture Collection, USA;

LMG, The Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms (BCCMTM), Belgium;

DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures;

BLS, International Rice Research Institute, Philippines

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae*를 검출하기 위한 특이 primer set의 제작을 위해 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 GenBank(www.ncbi.nlm.nih.gov/)에 등록된 (등록번호 : AE013598; gi 58581203) *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 유전체 정보 중 *RhsD* 유전자 서열정보(서열목록 1: 1,509 bp)를 blastn 프로그램을 통해 다양성을 확인하고 primer를 제작하였다.

primer 제작과 PCR 증폭 반응은 605bp 크기의 단편을 증폭하는 XOOF (5'-ATACTCGGCTGGTAATGGCT-3') 와 XOOR (5'-TGGTGTGGATATGCGCTTC-3') primer는 GenBank 등록된 (등록번호 : AE013598; gi 58581203) *RhsD*의 서열정보를 blastn 프로그램을 통해 특이성을 확인 후 제작되었다. PCR 증폭 반응은 PTC-200™ thermocycler(MJ research, Watertown, mass)를 사용하여 실시하였으며, 각 반응은 Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, MgCl₂ 1.5mM, gelatin 0.01%, dNTP는 각각 0.2mM, primer는 각각 10pM, *Taq* polymerase 2unit(Promega™, Madison, Wis.)을 함유하는 PCR 혼합액으로 총 50µl의 양으로 수행하였다. PCR 혼합액에 첨가한 몇몇 미생물의 genomic DNA 양은 약 50ng이었다. 반응은 94℃에서 5분간 변성하고 94℃ 60초, 58℃ 30초, 72℃ 60초로 25회 반복시킨 후 72℃에서 7분간 반응한다. 증폭반응 후 8µl의 PCR 산물을 1%농도의 아가로스 젤(agarose gel)에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 착색시켜 UV transilluminator에서 확인하였다.

Fig. 4-97에서 나타난 바와 같이 XOOF와 XOOR primer 쌍을 이용하여 표 1에 기재된 29균주 중에서 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 대하여 특이 DNA 단편을 검출할 수 있었다. 1, 2, 3 lane의 벼 흰잎마름병원균에서만 특이적으로 존재하는 PCR 단편이 검출되었다.

이병 조직으로부터 벼 흰잎마름병원균 검출 가능 여부를 확인하기 위해 10개의 이병성이 높은 벼 품종에 흰잎마름병원균(KACC10383)이 묻어있는 가위로 잎을 잘라 접종한 후 15일간 재배된 이병 벼 조직으로부터 1그램의 샘플을 취한 후 총 DNA를 CTAB 분리법(Murray M.G., Thompson W.F. 1980 Rapid isolation of high molecular-weight plant DNA, Nucleic Acids Res 8:432)을 통해 분리한 다음 상기방법에 따라 PCR을 실시하였다. 그 결과 Fig. 4-99에 나타난 바와 같이 벼 흰잎마름병원균을 접종한 B군 모두에서 특이 DNA 단편인 605bp 크기의 전기영동 산물을 확인하였다.



Fig. 4-97. Specific PCR amplification of a partial *rhsD* protein from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* with pathovar specific primers XOOOF and XOOR. Lane M, Size marker (1Kb DNA plus ladder; Gibco BRL™); lanes 1-29 listed in Table 4-21.

DNA dot blot는 특이 서열 추정 부분이 이 연구에서 사용된 다른 미생물에도 존재하는지를 확인하기 위해 수행되었다. *Xanthomonas* train과 본 실험에 사용된 기타 미생물로부터 추출된 20ng의 genomic DNA를 Hybond-N+ nylon membrane(Amersham pharmacia biotech, UK)에 각각 분주한 후 UV cross-link를 사용하여 고정시켰다. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*로부터 증폭된 유전자 단편을 유전자 탐침인자로 사용하기 위해 random prime 방법에 따라 Ladderman Labeling kit(Takara™, Japan)을 이용하여 방사선 동위원소 [³²P]dCTP로 표식 하였다. 방사선 동위원소로 표식된 탐침인자와 Hybond-N+ nylon membrane에 고정된 각 미생물 genomic DNA와의 혼성화는 65℃에서 18시간동안 hybridization buffer(NaCl 0.75M, sodium citrate 75mM, 0.5% SDS, 0.1% BSA, 0.1% Ficoll, 0.1% polyvinylpyrrolidone과 변성된 salmon sperm DNA 50µg/ml)로 실시하였다. 혼성화 되어진 nylon membrane는 0.1%의 SDS(sodium dodecyl sulfate)가 포함된 2xSSC buffer로 실온에서 두 번 세척(각 10분씩)하고, 0.1%의 SDS(sodium dodecyl sulfate)를 포함한 0.1xSSC로 65℃에서 다시 두 번(각 15분씩) 세척하였다. 혼성화작업 및 세척작업 후 nylon membrane을 X-ray 필름(AGFA, Belgium)에 -70℃에서 하루 동안 노출시킨 후 현상하였다.

그 결과 Fig. 4-98에서와 같이 벼흰잎마름병원균에서만 특이적으로 hybrid를 형성하였고 다른 *Xatnomonas*속 내 타종에서도 거의 모두 음성 반응을 나타내었다. 18번의 경우에는 약간의 양성 반응이 나왔으나 이는 dot blot에서 프로브로 사용된 PCR 산물의 5'

영역에서 약 100bp 크기의 상동성이 존재하는 관계로 이러한 결과가 나온 것으로 분석되었다. 그러나 나머지 약 500bp영역은 매우 특이한 정보를 지니고 있으므로 이 특이 DNA 단편은 다른 병원형 균에서는 존재하지 않음을 확인할 수 있었다.

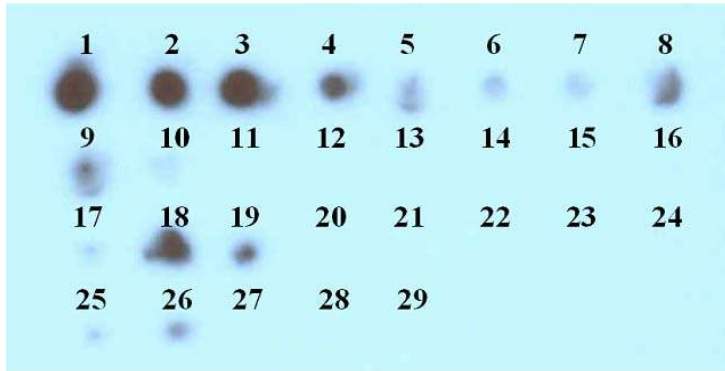


Fig. 4-98. DNA dot-blot analysis of a partial *rhsD* protein with PCR amplified fragment (605 bp) from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Lanes 1-29 listed in Table 4-21.

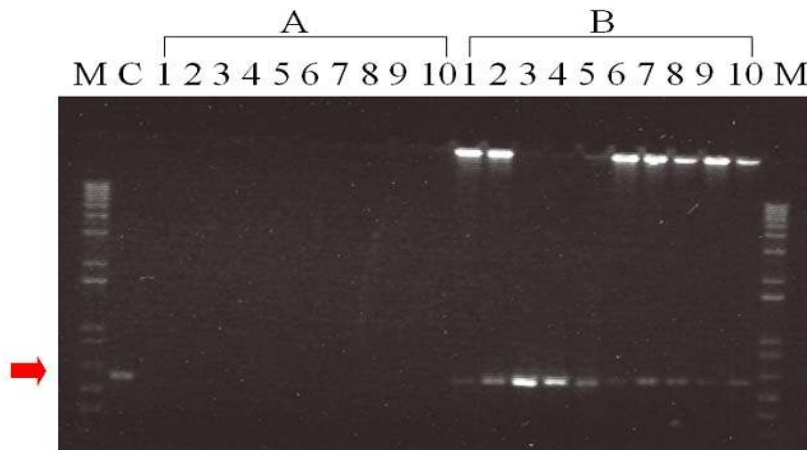


Fig. 4-99. PCR detection of artificially infected rice leaves. A) non-infected rice cultivars; B) infected rice cultivars. M, size marker (1kb DNA plus ladder; Gibco BRL™); C, *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC10331; lane 1, Milyang-42; lane 2, Cungchung; lane 3, Milyang -23; lane 4, Samkang; lane 5, Daechung; lane 6, Dongjin; lane 7, Seokwangother; lane 8, Hwayoung; lane 9, Hangangchal; lane 10, China-45.

다. 주요 작물 병원균의 진단 Kit 개발

1) 작물 병원균 진단을 위한 범용 DNA 추출 Kit 개발

본 연구는 또한 다양 작물의 감염 조직 및 토양 등으로부터 DNA를 쉽고 간편하게 분리 이용하고자 범용 DNA kit를 개발하였다. 개발된 DNA 추출 kit는 토양에 존재하는 곰팡이 포자로부터도 DNA를 추출이 가능하며, 그 절차와 방법에 있어서도 매우 간편하다는 특징을 가지고 있다. 그 시작품의 명칭은 “AGROmicrobial-gDNA kit“로 하였다(Fig. 4-100). 본 시작품은 시료 내에 존재하는 어떠한 형태의 DNA라도 분리 할 수 있도록 개발되었다. 식물의 열매, 잎, 줄기, 뿌리 및 토양에서 제공된 구성시약 및 방법을 통하여 초보자라도 손쉽게 DNA를 분리 할 수 있으며, 분리된 DNA는 이후의 효소반응, 특히 PCR에 적합한 template로 사용할 수 있다. 실험과정은 plastic pestle을 이용한 간단한 분쇄와, 단백질을 제거과정 후 column 및 증류수나 elution buffer를 이용한 정제의단계로 이루어져 있다. PCR에 필요한 시험재료의 양으로는 토양의 경우 0.1~0.25 g, 뿌리, 줄기는0.05~0.2g, 잎, 열매는 0.05~0.2 g가 요구된다. 개발된 DNA 분리 Kit 주요 구성요소는 다음과 같다 (Fig. 4-100).

Table 4-22. Key components of DNA extraction kits

Component	Volume	Quantity
Glass bead	10 g	1 tube
Plastic Pestles	50	1 pack
Solution A	25 ml	1 bottle
Solution B	12 ml	1 bottle
Solution C	20 ml	1 bottle
Buffer W	50 ml	1 bottle
Spin-column	50 columns	1 pack
Collection tube	50 tubes	1 pack
Manual		



Fig. 4-100. Wide-used genomic DNA extraction kits developed (Kit name: AGROmicrobial-gDNA kit)

2) 주요 작물 병원 세균의 진단을 위한 DNA진단 Kit 개발

본 연구는 상기 제 2절에서 연구 개발 결과를 토대로 실제 병해 진단 및 검역 현장에 활용하고자 이들 중 5종의 세균 병원균에 대하여 시작품을 제작하였다. 그 진단 대상 균 및 키트 구성은 다음과 같다 (Fig. 4-101). 본 키트의 특징은 세균병에 대한 특이적 염기 서열을 1~2시간내에 검출할 수 있도록 구성되었다. 간단한 실험을 위하여 반응시약이 모두 함유된 premix 형태로 PCR 시약이 제공되므로 처음 사용자라도 pipetting error 없이 간단하게 primer와 template의 조합을 넣는 것만으로도 해당 병원균의 존재여부를 판별할 수 있으며 그 구성은 다음과 같다(Table 4-23).

Table 4–23. Key components of diagnosis kits

Component	Concentration	Volume
XAc forward/reverse primer mixture	10pmol/ul	60 ul
2X PCR premixture		600 ul
Control DNA size standards		300 ul
Manual		1 copy



Fig. 4–101. Five DNA diagnosis kits developed.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

주관 제 1 세부과제에서는 “**채소병방어유전자개발 및 functional genomics**”에 대한 연구개발을 성공적으로 수행하여 고추식물에서 유용한 식물병방어(저항성)유전자를 분리하여 그 특성을 면밀하게 분석하였다. 고추식물에서 병저항성반응 과정에서 관여하는 유전자들을 획득하기 위해 고추 세균성 점무늬병균에 감염된 고추 잎으로부터 추출한 mRNA를 사용하여 cDNA library를 제작하였으며, 이 cDNA library를 재료로 사용하고 differential hybridization 방법을 사용하여 다양한 병방어관련 유전자들을 분리하였다. 고추 식물로부터 유래한 다양한 병방어관련유전자들의 5'-말단의 염기서열을 분석하였으며, 이 중에 주요한 유전자에 대한 발현 검정을 수행하였다. 고추식물에서 식물병방어(저항성)반응에 유용하다고 평가되는 유전자 *CACYPI* (cyclophilin 유전자), *CACBPI* (chitin-binding protein 유전자), *CAOSMI* (osmotin-like protein 유전자), *CADC1.2* (DC1.2 유사유전자), *CAZFP1* (Cys2/His2 zinc-finger transcription factor 유전자), *CaPIMPI* (세포막위치단백질 유전자)의 full-length clone을 성공적으로 분리하여 이들 유전자의 기능을 면밀하게 규명할 수 있었다. 이들 고추병 방어관련유전자들의 병 감염, 화학적인 elicitor 처리 및 환경 스트레스 중의 시간적인 mRNA 발현 분석이 northern blot 분석을 통하여 이루어졌고 병방어관련유전자의 공간적인 mRNA 발현 분석이 *in situ* hybridization을 통하여 수행되어 이들 유전자 mRNA가 유관속(vascular bundle)의 사부세포(phloem cell)에 위치하고 있음을 확인할 수 있었다. 식물병 방어유전자의 조절 기작을 규명하기 위해 *CABPR1*, *CAZFP1*, *CaPIMPI*, *CADC1.2* 유전자의 프로모터가 분리되어 면밀하게 특성을 분석함으로써 작물형질전환에 유용한 프로모터의 기능 분석의 기초를 마련하게 되었다. 그 기능이 알려져 있지 않은 PR-1 family에 속하는 유전자인 *CABPR1*와 Cys2-His2 type의 zinc-finger transcription factor 단백질을 코딩하는 *CAZFP1*를 이용하여 *Arabidopsis*를 형질 전환시켜 고추 식물에서 유래한 이들 병방어 관련유전자들이 병저항성에 기능적으로 중요한 역할을 하고 있음을 확인할 수 있었다. 본 연구과제는 연구개발목표 및 평가착안점에 입각하여 연구개발목표를 초과달성할 수 있었으며 특성이 뚜렷한 다수의 병방어유전자를 제 2 세부과제팀(신정섭)에게 제공하여 형질전환병저항성작물개발에 사용되도록 하였다. 본 연구결과에서 8 편의 SCI 논문, 1 편의 국내잡지 논문을 게재하였으며 2 개의 특허 등록, 1 개의 특허출원을 하였고 3

편의 논문을 국내외학술대회에서 학술발표하였다.

제 1 협동과제에서는 “식량작물 병방어유전자의 개발 및 functional genomics”에 대한 연구를 우리나라의 주요 식량작물로서 벼를 이용하여 수행하여 연구개발목표를 성공적으로 달성할 수 있었다. 본 연구결과로는 벼의 whole genome sequencing이 최근에 완료된 후 기능유전체 연구를 효율적으로 정착시키기 위한 기술정립과 유용 병방어(저항성)유전자의 농업적 이용 가능성을 평가하고자 수행하였다. 벼에서 병저항성관련유전자 *OsDRP*(disease resistance protein 유전자), *OSLZIP*(leucine zipper protein 유전자), *OsMyb*(Myb-like protein 유전자), *OsNDR/HIN*(NDR/HIN 유전자) 를 벼흰잎마름병이 감염된 벼의 cDNA library에서 microarray, yeast-two-hybrid screening 방법을 이용하여 선별하였다. 이들 병저항성관련유전자는 Northern blotting과 RT-PCR을 이용한 발현 분석에서 감염된 벼에서, 특히 병저항성반응에서 더 강하게 발현됨을 확인할 수 있었다. 이들 저항성관련유전자중에서 *OsDRP* 유전자는 *NBS-LRR* class의 R gene으로 추정되며 이 단백질은 도열병균의 병원성인자로 알려진 CYP1(cyclopilin 1) 단백질과 상호작용하는 것으로 yeast-two-hybrid 실험을 통하여 확인하였고 *OsDRP*의 upstream 1381 bp 부위가 병원균감염시 유전자발현을 증진시키는 조절부위로 확인되었다. 이들 병저항성관련유전자를 이용하여 과발현하는 형질전환 벼와 담배식물을 제조하거나 RNAi를 이용하여 knock-down 형질전환벼를 제작하여 병저항성발현여부를 시험하였다. 본 연구개발과제는 대량 유용 유전자 분리를 위한 특이 발현 유전자 은행 제작, microarray를 이용한 대량 유전자 발현 분석, 각 유전자의 병원균에 대한 반응 검정, 유전자 기능 분석을 위한 suppression과 overexpression, 병원균 특이 발현 promoter의 기능 분석, 신호전달 기작 연구를 위한 yeast-two-hybrid system 구축 등을 완수하여 목표 달성도가 높고 벼유전자의 functional genomics 연구 시스템을 구축함으로써 다른 작물이나 기능유전체연구 분야 발전에 기여하리라 사료된다. **본 연구결과에서 특허출원 1 건, 학술대회 5건을 도출하였고 다수의 논문이 현재 작성 준비중에 있다.**

주관 제 2 세부과제에서는 “방어유전자를 이용한 형질전환 병저항성 작물개발”에 대한 연구를 성공적으로 수행할 수 있었다. Alexander 등(1993)은 PR-1a를 도입한 담배 형질전환체가 *Peronospora tabacina*와 *Phytophthora parasistica* var. *nicotianae* 2종의 난균류 (oomycete) 병원균 감염시 병징이 크게 감소됨을 확인한 바 있고 Neuhaus (1999)도 식물 내 곰팡이, 박테리아 및 바이러스의 공격에 대응하여 강하게 발현이 증가되는 chitinase (PR-Q)를 분리, 동정하였다. 본 연구에서는 주관 제 1 세부과제(황병국)

에서 개발된 고추병 저항성 혹은 신호전달에 관련된 유전자들을 담배, 토마토, 애기장대 등의 식물에 도입하여 형질전환병저항성식물제조기술을 개발하였다. 따라서 본 연구에서는 제 1 세부과제 연구팀에서 개발되어 제공된 고추의 *CAPOAI*(ascorbate peroxidase, *CABPRI*(basic PR-1 protein), *CALTP1*(lipid transfer protein 1)과 *CALTP2*(lipid transfer protein 2) 유전자를 이용하여 담배, 애기장대(*Arabidopsis*), 토마토를 형질전환하여 도입유전자의 발현을 검정하였고, 난균류(oomycete)병원균과 병원세균 등 생물학적 스트레스에 대한 저항성과 건조, 염 등 비생물학적 스트레스에 대한 내성(tolerance)를 평가함으로써 처음 계획된 목표를 달성하였다. 이의 연구결과로써 병원균 및 중금속에 대한 저항성을 보이는 *CABPRI* 과발현형질전환 담배, 병원균 및 산화적 스트레스 저항성 *CAPOAI* 형질전환 담배, 병원균 및 비생물학적 스트레스 저항성 *CALTP1* 및 *CALTP2* 형질전환 담배 및 애기장대를 개발할 수 있었고 병 저항성을 보이는 *CABPRI* 및 *CAPOAI* 형질전환 토마토를 개발하였다. 본 연구결과로는 **3편의 SCI 논문을 게재하였고 1편의 논문을 학술발표하였으며 SCI 논문 1편을 준비 중에 있다.** 담배, 애기장대, 토마토 형질전환식물에서 병 저항성이 확인되었으므로 유용작물에 병 저항성을 형질전환하는 기술개발이 앞으로 활용될 가능성이 높다고 판단된다.

제 2 협동과제와 위탁과제에서는 “**주요 작물병의 진단시스템 개발**”에 대한 연구에서는 우리나라의 대표적 고질적 난방제성인 작물병인 역병 *Phytophthora* 속 중에서 *P. capsici* 종 특이적 primer는 염기서열분석과 RFLP 및 RAPD 분석을 통해 제작하였고 검출 가능성을 PCR 및 southern hybridization을 통해 확인하였다. 종 특이성을 분석하기 위하여 *P. capsici*와 그 외 12종의 주요 *Phytophthora* 속 균과 7종의 다른 병원균들을 공시하여 특이적 검출과 동정을 실시하여 본 연구에서 *P. capsici* 종 특이적 primer인 CSP23A/CSP23B(693 bp)가 조기진단 Kit로 개발되어 토양, 작물체와 포장에서 신속, 정확한 진단이 확인되었다. 또한 인삼, 사과, 배 등 주요 농작물에 피해를 주는 *Alternaria* 속 중 *A. panax*와 *A. gaisen* 균의 검출,동태 추적, 진단, 분류동정, 그리고 특성을 분석하기 위하여 최적 종특이적 primer로 PanaxF/PanaxR와 AG-F/AG-R이 분자생물학적 진단 Kit로 개발되었다. 더 나아가서 주요 작물병원균(*Phytophthora* spp., *Trichoderma* spp., *Pseudomonas* spp.,)의 DNA profile database 구축 및 web 기반의 관련정보검색시스템을 개발하고 주요 작물병원세균의 특유의 염기서열, 주로 “Orphan gene”을 찾을 수 있는 프로그램의 개발에 중점을 두어 그로부터 구축된 database로부터 각 병원균을 완벽하게 검출해낼 수 있는 다양한 primer들이 만들어졌다. 종과 pathovar

및 serovar 특이적 유전자 marker 개발에 관련된 이 원천기법으로부터 병원 세균 검출을 위한 민감도와 특이성, 신속성 증진 및 병의 효과적인 관리에 도움을 줄 수 있는 다양한 재료와 고효율의 기법들이 제공되었다. 개발된 프로그램을 통해 선발된 종 특이적 primer는 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and *Pectobacterium atrosepticum*를 포함하는 병원성 세균의 검출과 동정을 명확히 할 수 있었다. 그 결과 생물정보학(bioinformatics)과 유전학이 조합된 PCR에 기초한 이 기법의 진일보한 정보를 식물병 진단에 제공할 수 있음이 입증되었다. 이에 부가해서 개체군의 다양성을 URP-PCR에 기초한 유전적 지문분석 방법을 이용하여 효율적으로 평가, 보조적으로 컴퓨터 분석을 결합시켰을 때 더욱 효율적이었다. 주요 작물병의 DNA profile은 다양한 분야에서 병원균에 관한 유용한 기초 정보를 제공할 수 있었으며 이중에서 비 중복성 정보인 nrDB(non-redundant database)를 이용하여 생물특이서열 정보를 발굴하는 알고리즘 및 프로그램을 개발하여 관련 정보를 DB로 구축하였다. **본 연구결과로는 7 편의 논문(3편의 SCI 논문)을 게재하였고 12 편의 논문을 국내외학술대회에서 학술발표하였으며 10 건의 특허출원이 있었으며 7 개의 진단 Kit가 제작되었다.** 또한 이번 발굴된 마커 정보는 모든 미생물 진단, 동정 및 탐색 분야에까지 산업화 및 실용화 하는데 진일보하는 계기를 만들었으며 이는 실제 농촌 현장의 고질적 식물병을 사전에 진단함으로써 효과적인 병 방제에도 기여할 수 있을 것이다. 이러한 종 특이적 primer를 이용한 진단용 Kit을 사용한 값이 싸면서도 빠르고 정확하며 손쉬운 고질적 난방제성 주요 식물병원균의 검출과 동정 및 병해진단 방법은 앞으로 농가에 보급되어 농민의 소득 창출에 크게 이바지할 것으로 확신한다.

본 연구개발결과로서 국제(SCI)학술지 14 편, 국내학술지 1 편 논문을 게재하고 특허등록 6 개, 특허출원 8 개, 진단 Kit 7 개 제작 등의 성과를 달성하였다.

제 2 절 관련분야에의 기여도

Post-Genome 시대를 맞이하여 채소작물로서 고추와 식량작물로서 벼에 보존되어 있는 유전자 pool의 array-based differential hybridization, microarray에서 얻어진 다수 식물저항성(방어)유전자의 기능분석, 염기서열이 분석되어 EST나 full-length sequence로 국제 NCBI GenBank에 등록, 전 세계의 식물분자유전육종가들에게 활용되어 식물분자생물학분야에 크게 기여할 것이다.

이들 고추, 벼의 식물방어유전자들의 database는 다른 식물genome의 구조규명과

genome상의 유전자 기능(function) 규명에 기여할 것이며 국내, 국제 특허출원, 등록된 식물병방어유전자를 이용하여 본 연구팀에서 개발한 효율적인 식물병저항성 형질전환시스템이 분자유종(Molecular Breeding) 분야에 기여할 것이다. 생명공학기법을 이용하여 종래에 가질 수 없었던 병저항성 형질을 갖게 되는 형질전환 식물체의 개발로 고진적 교잡 육종에 의한 신품종 개발에 소요되는 시간과 비용을 크게 줄일 수 있으며, 일단 상품화하는 경우 시장의 규모가 매우 커서 종자수출이 가능하여 종자생산분야에 기여할 것이다.

고질적 작물병에 관여하는 국내 토착 병원균의 집중적인 분리 및 형태학적, 생리 병리학적 규명을 통하여 병원균의 생태형을 파악할 수 있으며 외부 도입균 특성을 신속 판별 할 수 있는 기초자료로 활용가능하게 되어 체계적인 균주 monitoring하는 병원균의 집단유전학분야에 기여할 것이다. 일부 병원균에 한정하여 연구되어온 DNA분자검정 시스템을 종합 database 함으로서 Microbial Bioinformatics의 새로운 정보화 기술이 확보되어 생물정보학(Bioinformatics)분야의 연구발전에 기여할 것이다.

병저항성 작물 개발로 농약사용을 줄일 수 있으며 이에 따른 농가소득 증대 및 농약 수입 대체효과가 발생하고 고질적 작물 병의 진단 Kit 개발로 정확한 작물 병 진단으로 저 농약 작물병방제가 가능하게 되어 친환경농산물의 소비증진 및 건강 증진에도 기여하게 되고 병원균의 동태를 미리 파악, 적절한 조건에서 정확히 방제를 함으로써 저비용, 고효율의 병 방제체제 확립에 기여하고 결국에는 농업 생산성 향상과 친환경농업을 이루게 되어 사회와 농업 전 분야에 기여할 수 있을 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 연구결과의 활용계획

다양한 종류의 병방어관련 유용유전자 *CACYPI* (cyclophilin 유전자), *CACBPI* (chitin-binding protein 유전자), *CAOSMI* (osmotin-like protein 유전자), *CADCL2* (DC1.2 유사유전자), *CAZFP1* (Cys2/His2 zinc-finger transcription factor 유전자), *CaPIMPI* (세포막위치단백질 유전자)들이 채소작물인 고추로부터, 또한 벼에서 병저항성관련유전자 *OsDRP*(disease resistance protein 유전자), *OSLZIP*(leucine zipper protein 유전자), *OsMyb*(Myb-like protein 유전자), *OsNDR/HIN*(NDR/HIN 유전자)들이 성공적으로 분리되었고 이들 유전자의 기능을 면밀하게 규명하여 특허를 출원, 등록하여 새로운 저항성유전자원으로 타 연구자나 국내외 생명공학 종묘회사에 제공되어 병저항성형질전환작물을 생명공학적으로 개발하는데 활용될 수 있을 것이다.

고추와 벼에서 병방어유전자의 크로닝을 위해 이번 연구에서 사용된 생명공학기술이 효과적이었음이 입증되었다. 병방어유전자크로닝을 위하여 효율적으로 사용되어졌던 cDNA library 합성방법, microarray, differential hybridization 방법, RT-PCR, yeast-two-hybrid screening방법 등을 본 연구팀에서 확립하여 병저항성유전에 대하여 연구하려는 타 연구자에게 제공할 수 있고 병저항성의 신호전달경로에 대한 분자적 기작연구 등의 타 연구에 효율적으로 활용될 수 있을 것이다.

고추병 방어유전자의 조절기작을 규명하기 위해 *CABPRI*, *CAZFP1*, *CaPIMPI*, *CADCL2* 유전자와 벼 저항성관련유전자 *OsDRP*의 promoter가 분리되어 면밀하게 특성을 분석함으로써 작물형질전환체를 개발하려는 타 연구자나 종묘회사, 그리고 형질전환체 개발을 위한 추가 연구에 유용한 promoter로서 활용할 수 있을 것이다. 또한 벼 promoter를 담배에서 기능을 분석한 결과 단자엽식물의 promoter가 쌍자엽 식물인 담배에서도 발현되어 단자엽식물의 형질전환에서 이들 promoter를 활용할 수 있을 것이다.

제 1 세부과제 연구팀에서 분리, 기능이 분석된 고추의 *CAPOAI*(ascorbate peroxidase, *CABPRI*(basic PR-1 protein), *CALTPI*(lipid transfer protein 1)과 *CALTP2*(lipid transfer protein 2) 유전자가 제 2 세부과제로 양도되어 병저항성 형질전환 작물체 개발을 위한 분자유종의 재료로 활용되어 담배와 토마토의 형질전환 및 재분화기술개발기술을 확립함으로써 종묘회사에 상업적인 병저항성형질전환작물체의 개발기술을 제공할 수 있게 되었다.

방제하기 어려운 *Phytophthora*, *Alternaria*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*,

Pectobacterium 등에 의해 발생하는 고질적인 작물병을 조기 진단하여 그 피해를 줄일 수 있는 DNA검정 marker가 손쉽고 간단하게 이용할 수 있게 진단 Kit가 개발되어 국내의 각종 농업관련 기관과 농업현장에 실질적으로 그 기술의 보급이 가능해 질 것이다. 농산물개발 방화에 따른 농산물 수출입이 증가하고 있는 상황에서 방제가 까다롭고 병발생 피해가 큰 외래 병원균에 대해 신속 정확한 병진단 및 동정이 요구되는 현시점에서 본 연구에서 개발된 이러한 식물병진단 Kit는 식물 검역에 매우 유용하게 활용될 수 있을 것이다. 이러한 병원균 DNA검정marker를 이용하여 각종 토양 전염성 병원균들의 분포, 밀도, 변이를 조사하여 이를 토대로 효과적 방제체계 도출이 가능할 것이다. 특히 DNA검정 marker, 균 동정을 위한 DNA profile의 D/B 와 유전자들은 지적 소유권 획득을 위하여 특허출원, 등록되어 관련회사 등에 기술이 전수되어 제품화시킬 수 있을 것이다. 또한 이번 발굴된 marker 정보는 모든 미생물 진단, 동정 및 탐색 분야에 까지 산업화 및 실용화 하는데 진일보하는 계기를 만들었으며 이는 실제 농촌현장에서 고질적 식물병을 사전에 진단함으로써 효과적인 병방제에도 기여할 수 있을 것이다. 이러한 중 특이적 primer를 이용한 진단용 Kit을 사용한 값이 싸면서도 빠르고 정확하며 손쉬운 고질적 난방제성 주요 식물병원균의 검출과 동정 및 병해진단 방법은 앞으로 농가에 보급되어 농민의 소득 창출에 크게 기여할 것이다.

제 2 절 농업 실용화 및 향후 활용계획

병저항성작물을 개발하여 농업에 실용화시키기 위하여 본 연구팀에서 병저항성작물을 분자적으로 육종하기위하여 위에서 기술한 고추와 벼에서 얻어진 여러 종류의 저항성관련유전자를 국내의 생명공학회사나 작물분자유종가에게 제공할 계획이다. 그러나 가까운 시일내의 고질적인 작물병에 대한 저항성을 보이는 형질전환작물의 농업실용화는 어려우나 산, 학, 연의 공동의 노력으로 육성, 재배가 가능할 것이다.

고추역병은 최근 전국적으로 그 피해가 심각할 뿐만 아니라 피해정도가 매년 더욱 심해지고 있는 난방제성 고질적 병해이다. 이 병원균의 조기진단 및 신속 정확한 탐색을 통하여 병 발생의 사전 예방 및 효과적인 종합적 방제 차원에서 농업실용화를 위해 개발된 고추 역병균에 대한 중 특이적 진단 Kit는 본 과제 수행 중에 이미 일부 농가포장에서 실용적으로 활용된바 있다. 이러한 경험을 바탕으로 관련 내용을 홍보도 병행하면서 직접 농민들을 대상으로 이제부터 좀 더 많은 수의 농가에 개발된 이 진단기법을 현장에 활용하고자 한다.

도 농업기술원 및 시군 농업기술센터 등 농업관련 기관을 통해 개발된 진단Kit의 유용성을 널리 홍보하여 대농민 지원사업에 보다 더 다양하게 적극 활용할 계획이다. 그리고 대

농민 교육이나 연구기관의 세미나 발표시 본 연구진들의 참여를 통해 관련 내용을 적극 홍보할 예정이다.

보급 및 판매에 관심을 보이는 회사를 물색하여 보다 효율적으로, 그리고 경제적으로 활용이 가능한 진단Kit를 개발하는 방법을 모색 중에 있다. 또한 인삼 점무늬병균 진단 Kit와 다른 고질적 작물병 역시 고추 역병의 경우와 동일한 방식으로 특허등록이 완료되는 즉시 농업현장적용에 투입할 예정이다.

현재까지 농업실용화를 위한 진단 Kit를 개발하기 위한 조치와 농민들이 활용할 수 있도록 언론매체 홍보결과는 아래에 열거하였으며 앞으로 고질적 작물병의 진단Kit을 활용할 수 있도록 농민들에 대한 홍보를 계속할 예정이다..

1) 특허 출원 및 등록 목록(6건)

- 출원명: 감자흑각병원균 특이 DNA 단편 검출을 위한 PCR 프라이머 세트, 출원번호(2006-0012015)
- 출원명: 콩불마름병원균 특이 DNA 단편에 대한 PCR 프라이머 및 이를 이용한 검출방법, 출원번호(2006-0006931)
- 출원명: 벼흰잎마름병원균 특이 DNA 단편 검출을 위한 PCR 프라이머 및 이를 이용한 검출방법, 출원번호 (2006-0007472)
- 출원명: 세균성점무늬병원균(Xanthomonas Campestris pv.vesicatoria)특이 DNA 프라이머 세트 및 그 검출방법, 출원번호 2006-31694
- 출원명: 감귤류 궤양병 병원균의 특이적 검출을 위한 프라이머 세트 및 이를 이용한 궤양병 병원균의 검출방법, 등록번호: 10-0599525
- 출원명: 십자화과 흑부병원균의 특이적 검출을 위한 프라이머 세트 및 이를 이용한 흑부병원균의 검출방법, 등록번호: 10-2003-0013954

2) 진단Kit 실시권 계약 예정 업체 및 신청 방법

- G&P life Science
- 농진청 평가 조정담당관실에 공문 발송 요청

3) 홍보 책자 (리플렛) 발간 예정

- 전 6면
- 배포일 : 2006년 9월 15일

4) 언론 매체 홍보(보도) 결과 (총 9건)

- 병원 미생물 진단용 DNA 정보 대량 발굴 기술 개발(국정브리핑.2006. 9. 4.)
- 병원균 DNA 진단 한 차원 높인다 (인천일보. 2006.9.4.)
- 병원미생물 정확한 조기진단 '쉬워진다'. (뉴시스. 2006. 9.4.)
- 농진청, 유전체 정보 분석 기술 개발 (경기신문 2006. 9. 5.)
- 동 ■.식물 병원균 진단 빨라진다 (평화일보 2006.9. 5.)
- 농진청 세균 병원균 조기 진단용 DNA 키트 5종 개발 (기호일보. 2006. 9. 4.)
- 병원균 진단용 DNA 정보 초고속 발굴 기술 개발(E-헬스통신. 2006. 9. 4.)
- 병원균 진단용 DNA 정보 초고속 탐색 세계최초 개발(경기도민일보. 2006. 9. 4.)
- 병원 미생물 진단용 DNA 정보 대량 발굴기술 개발(네이버뉴스. 2006. 9. 4.)
- 병원 미생물 진단용 DNA 정보 대량 발굴기술 개발(Daum뉴스. 2006. 9. 4.)

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

콩, 옥수수, 면화, 유채, 벼 등의 형질전환작물이 1996 년 이후로 상업화되어 10 년이 되는 2005년에는 전 세계적으로 4 억 ha, 21 개 국가, 850만의 농민이 재배하고 있다(James 2005). 2005년 Croprosis가 예측한 형질전환작물의 세계시장가치는 52억 5천만 \$이며 340억 2천만 \$에 달하는 세계 작물보호제 시장의 15%, 그리고 300억 \$에 달하는 세계 종자시장의 18%를 차지한다.

작물생산에서 식물병의 환경친화적 방제방법으로 병저항성 작물의 육성, 보급, 재배가 전 세계적으로 가장 권장되고 있다. 그러나 새로운 병원균이나 레이스(race)의 발생으로 전통적인 교잡육종기술로 육성, 재배된 저항성품종이 감수성화되어 교잡육종품종의 재배수명이 오래 가지못함을 역사적으로 실제 경험하고 있어서 최근 각광을 받고 있는 유전공학적인 형질전환병저항성작물개발에 대한 연구가 세계적으로 기업, 정부차원의 연구소에서 활발히 진행되고 있다. 식물병 형질전환 작물을 육성하기 위해 집중적으로 투자하고 있는 세계적인 기업으로는 Dupont, Mogen International, Calgene, Dow Chemical, Rohm & Hass, Novatis, Monsanto, Drop Genetics, DNA Plant Technology, Ecofer, Mycoger, Tinger, Ecoscience, Neogen 등이 있고 독일 Max-Planck 식물육종 연구소, 영국 John Innes 연구소, 미국 Donald Danforth Plant Science Center 등이 활발하게 연구하고 있다. 제초제저항성, 해충저항성(Bt), 병저항성 등의 외래유전자를 도입하여 새로운 형질을 가지는 형질전환 식물체개발 기술은 차세대 농업의 방향을 결정할 중요 기술로 부각되고 있다. 1986년에 Dr. Beachy가 피복유전자(coat protein)을 이용한 바이러스 저항성 담배의 성공적 개발이후 이미 많은 형질전환바이러스작물에서 성공사례가 입증되고 있고 면화, 담배, 사탕무 등의 바이러스 저항성 형질전환작물이 재배되고 있다. 또한 진균병, 세균병저항성 유전자를 주요작물에 도입하여 식물병을 방제하려는 시도가 대학, 연구소, 기업체에서 활발히 수행되고 있으나 아직 실용화되지 못하고 있다. 네덜란드 Mogen International사에서의 식물 chitinase를 이용하여 *Fusarium*병에 저항성이 증진된 토마토의 개발이 보고 되었고 식물의 자체 방어기작에 관련된 단백질의 유전자(ribosomal inactivating protein, small GTP-binding protein, thionin 등)를 작물에 도입하여 바이러스, 세균, 곰팡이 및 곤충에 저항성을 유도시켰다.

고추는 형질전환식물체제조기술의 개발이 어렵고 재배국이 주로 아시아, 남미권이어서 선진국에서의 형질전환 체계 및 이를 이용한 병 저항성 작물 개발에 대한 연구 결과가 거의 보고되어 있지 않다. 벼는 세계의 가장 중요한 식량작물로서 2.5억 명이 재배하고 있으며

13억 저개발국가의 빈곤층 주요 식량작물이다. 따라서 생명공학적으로 개발한 형질전환벼의 상업화는 아시아의 쌀 생산 및 저개발국가의 빈곤, 기아, 영양부족을 경감시킬 수 있다는 엄청난 의미를 가지고 있다. 이란과 중국은 형질전환벼의 상업화에 있어서 가장 앞선 국가이다. 해충저항성(Bt) 벼가 2004년 공식적으로 이란에서 재배되었고 2005년에는 수백명의 경작자가 4천 ha를 경작함으로써 형질전환벼의 상업화가 시작되었으며 2006년에는 완전한 상업화를 위한 종자공급을 시작할 것으로 보인다(James 2005). 중국은 이미 포장시험을 수행하였고 빠른 시일내에 형질전환벼의 재배를 승인할 것으로 보인다.

형질전환병저항성식물을 개발하기 위해 사용되는 병방어(저항성)관련유전자로써 알려져 있는 pathogenesis-related (PR) 단백질은 식물에서 병충에 대한 감염 또는 비생물학적 스트레스 조건하에서 발현이 증가한다 (Kim과 Hwang, 2000). 현재까지 식물에서 약 14가지의 PR 단백질이 알려져 있고, 이들 중 몇몇 단백질은 그 생화학적 기능이 알려져 있다. 예를 들어 β -1,3-glucanase 기능을 가지고 있는 PR-2 단백질, chitinase 기능을 가지고 있는 PR-3, 그리고 PR-4, PR-8, PR-11 단백질, proteinase inhibitor 기능의 PR-6 단백질 및 peroxidase 기능을 가지고 있는 PR-9 단백질 모두 병 저항성 단백질로 알려져 있다 (van Loon과 van Strien, 1999). 기존에 몇몇 연구는 이러한 PR 단백질을 이용한 과다발현 형질전환체들 (예, 감자에서 osmotin의 과다발현, 벼에서의 taumatin-like 단백질 과다발현 및 오렌지에서의 감자 PR-5 단백질의 과다발현 식물체 등)이 식물병에 대한 저항성을 가짐을 확인하였다 (Liu 등, 1994; Datta 등, 1999; Fagoaga 등, 2001). 그러나 다양한 PR 단백질 중에서 식물병, 살리실산 또는 에틸렌 등에 반응하면서 식물의 전신획득저항성(systemic acquired resistance, SAR)을 일으킨다고 알려져 있는 PR-1 단백질의 기능에 대해서는 잘 알려진 바가 없다. 단지 PR-1a 과다발현 식물체가 *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*와 *Peronospora tabacina*의 난균류 식물병에 대해 저항성을 획득하는 현상 (Alexander 등, 1993)과 토마토 PR-1 단백질이 *Phytophthora infestans* 병원균의 유주자의 발아와 이러한 난균류 병원균에 감염된 잎 표면의 병진전을 억제시킨다고 보고하고 있다 (Niderman 등, 1995).

최근 식물체내에서의 산화 스트레스에 대한 항산화 작용을 하는 유전자가 개발되어 식물병 및 환경스트레스에 대한 저항성 형질전환 식물체를 개발하는데 이용되고 있다. Foyer 등 (1994)과 Gillham 등 (1987)은 식물체가 고온 또는 저온상태에서 강한 빛을 받거나 가뭄, 공기 오염 및 자외선과 비선택적 제초제인 파라콰트(paraquat)에 노출되면 세포내 활성산소(예, 초산화물 $[O_2^-]$, 과산화수소 $[H_2O_2]$, 수산화기 $[OH^-]$ 등) 함량이 높아져 이 자체가 식물체

에 스트레스로 작용함을 확인하였다. 이러한 스트레스에 대해서 식물은 항산화제 기능을 하는 단백질들의 발현을 조절하여 방어 기작을 하고 있고 (Murgia 등, 2004), 이러한 단백질 중에서 1997년 Jespersen 등은 APX (ascorbate peroxidase)라는 단백질이 광합성 과정에서 과산화수소의 해독작용을 위하여 중요한 환원제인 ascorbate를 이용, 식물세포 내 엽록체와 세포질로부터 독소인 과산화수소를 제거하는 아주 중요한 효소 중 하나라고 발표하였다. 그렇기 때문에 식물에 있어서의 세포 손상을 막는 이러한 효소들은 식물 저항성을 발현하는데 중요하다고 알려져 있다 (Kvaratskhelia 등, 1977). Camp 등 (1996)은 superoxide dismutase 유전자를 이용한 과다발현 형질전환체가 산화적 스트레스에 저항성이 있다는 보고를 하였고, Aono 등 (1995)은 glutathione reductase 유전자를 과다 발현시킨 형질전환체가 야생형 식물에 비해 활성산소 생성에 의한 스트레스에 강한 내성을 보인다고 보고하였다. 그리고 Kazan 등 (1998)과 Way 등 (2000)은 pathogenesis 관련 유전자인 peroxidase (*Shpx2*와 *Shpx6a*)를 과다발현 시킨 식물체가 난균류 병원균에 대해 저항성을 가진다고 보고하였다.

식물 지질수송 단백질 (lipid transfer protein)은 식물체내에서의 그 기능이 밝혀져 있지 않지만, 2002년에 들어 Edqvist와 Farbos에 의해 종자 발아동안이나 곰팡이 공격에 의해 그 발현이 빠르게 증가한다고 밝혔고, 또한 Park 등에 의해 고추 식물이 담배 모자이크 바이러스 (TMV)에 노출될 때도 그 발현이 강하게 증가한다고 알려졌다. 이러한 결과들은 지질 수송 단백질이 큐틴 생합성, 식물 표면에서의 왁스 형성뿐만 아니라 외부 환경적인 스트레스에 대해서도 중요한 기능을 한다는 단서를 제공하고 있다. 1997년 Molina와 Garcia-Olmedo는 담배와 애기장대에 지질 수송 단백질 2 (LTP2)를 과다 발현 시켰을 때, 세균성 병원균인 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*와 *P. syringae* pv. *tomato*에 대해 강한 저항성을 보임을 확인하였고, 2002년 Maldonado 등은 애기장대 식물의 지질 수송 단백질과 유사한 염기 서열을 가지고 있는 *DIR1* (defective in induced resistance1) 유전자 기능이 상실된 식물체를 이용하여 실험을 수행한 결과, 이 식물체가 외부 병원균의 공격에 대한 국부적 저항은 유지하지만 전신적으로 획득되어지는 저항성 (SAR)과 다양한 PR 유전자들의 발현이 상실되는 것을 확인하였다. 이는 식물의 외부 병원균에 대한 방어 기작 과정에서 지질로 인해 전해지는 신호 전달 물질들이 국부적인 방어뿐 아니라 원거리로 그 신호를 전달하기 위해서 꼭 필요함을 의미하고, 이로써 지질 수송 단백질이 원거리 신호 전달 (long distance signaling)을 위해 필요함을 보여주고 있다.

외부의 환경적 및 비생물학적 공격에 대한 식물 방어기작 과정상에서의 저항성 관련 유

전자의 발현 및 병원균 침입 부위의 국부적 세포 사멸과정 등에 식물 호르몬이 중요하게 관여하여 조절한다고 알려져 있다 (Kunkel과 Brooks, 2002). 예를 들어, 에틸렌은 다양한 곰팡이 균에 대한 저항성 과정에 (Knoester 등, 1998, 1999), 살리실산 (salicylic acid)은 병원균에 대한 전신획득 저항성 (SAR; systemic acquired resistance) 과정에 작용한다고 알려져 있다. 이러한 결과들은 식물 호르몬 (에틸렌, 살리실산, 자스몬산) 생합성 및 호르몬 신호전달체계가 형질전환 식물을 이용한 실험을 통해서 확인 되었다. 예를 들어, 1992년 Bent 등은 애기장대의 에틸렌 신호전달 체계에 관여하는 *Ein2* (Ethylene insensitive 2) 유전자 기능이 상실된 돌연변이체를 이용하여, 에틸렌 신호 전달체계가 원활치 못하면 병원균의 공격에 대해 저항성이 감소함을 확인하였고, Lund 등 (1998)과 O'Donnell 등 (2001)은 각각 에틸렌과 살리실산 생합성이 적은 토마토 식물의 특정 계통을 이용하여, 이 식물호르몬 생합성량이 적으면 *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (*Xcv*) 병원세균의 병징이 감소됨을 확인하였고, 이는 식물 호르몬에 의한 방어기작은 병원균의 침입 후 병징진전과는 무관함을 말하여 준다. 최근에, McDowell과 Dangl (2000)은 애기장대 식물을 이용해서, 에틸렌, 자스몬산 및 살리실산은 식물 방어 기작 과정에서 서로 간에 상호작용 및 반작용 과정을 한다고 밝히고 있고, 2005년에 Block 등에 의해 토마토에서는 세균성점무늬병을 일으키는 병원균인 *Xcv*의 공격에 대해 식물호르몬들 (에틸렌, 자스몬산과 살리실산)간의 반대작용 보다는 상호작용을 통해 방어 기작을 보인다고 밝히고 있으며, 이는 식물 호르몬들의 기능이 식물 종에 따라 다를 수도 있음을 확인하였다 (O'Donnell 등, 2003).

최근에 PCR에 의한 병원균의 분자적 진단기술은 세균, 균류 등 다양한 식물병원균의 종간, 종내의 분류, 검출, 및 감염경로 분석 등에 널리 활용되는 기법으로 대상 병원균의 유전 정보를 모르더라도 신속한 적용이 가능하여 최근 들어 더욱 각광을 받고 있다(Welsh 등 1990, White 등 1990, Williams 등 1990). 특정 유전자의 염기서열을 바탕으로 한 종 (species) 특이적 primer의 개발과 더불어 genomic DNA의 hybridization에 의하여 종 특이적인 DNA 염기서열 및 RAPD, microsatellite와 AFLP를 포함한 DNA fingerprinting로 부터 얻은 종 특이적인 밴드의 염기서열을 바탕으로 SCARs primer의 개발은 다양한 식물 병원균의 동정 및 검출을 가능하게 하였다 (Groppe *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999; Plyler *et al.*, 1999; Förster *et al.*, 2000; Vandermark *et al.*, 2001; Winton *et al.*, 2001; Chitarra *et al.*, 2002; Maria *et al.*, 2003). 이들 종 특이적인 primer를 이용한 작물의 주요 병 방제를 위한 진단용 primer의 개발에 많은 노력이 활발히 이루어지고 있고 상용화 되어 널리 이용되고 있다. 최근 미국을 비롯한 선진각국에서도 본 과제와 유사한 연구에 박차를 가

하고 있음을 알 수 있으며 특히 primer 개발에 중점을 두고 연구를 하고 있다. 그리고 그들은 primer 개발에 Real-time PCR과 SCAR marker 기법을 활용하여 보다 효과적으로 목적을 달성하고 있다 (De Merlier *et al.*, 2005; Schena *et al.*, 2004; Silvar *et al.*, 2005). 또한 본 과제와 유사한 내용이 미 농무성(USDA)의 연구지원 과제로 선정되고 있었으며 그들의 최종목표도 진단용 Kit의 개발이었다(Hartman, G. in University of Illinois, 2006. personal communication). 한편 현재 세계적으로 중요한 유전체 정보는 미국 국립 보건원(NIH) 산하 NCBI(National Center for Biotechnology Information) GenBank(www.ncbi.nlm.nih.gov)에 여러 가지 형태의 정보로 등록되어 있다. 이들은 비 중복성 정보인 nrDB(non-redundant database)를 이용하여 생물 특이서열 정보를 발굴하는 알고리즘 및 프로그램을 개발하여 관련 정보를 DB로 구축하고 있으며, 이들 유전체 정보를 통해서 진화적인 특성과 적응 변이에 관련하는 유전자 pool을 다수 확보할 수 있었고 이를 통해 유전체가 해독되지 않은 미생물도 특이염기서열을 찾아낼 수 있는 기반을 확보하고 있다. 이들 정보는 해당 병원균 진단 및 검출 방법 수준을 중 이하 개념인 병원형(pathovar) 또는 혈청형(serovar) 특이 마커(specific marker) 까지 개발 적용할 수 있으므로 관행 연구 수행 전략보다 더욱 빠르게 마커를 찾을 수 있으며 다양한 마커 정보를 발굴하는 기회를 만들어 추후 농업 및 미생물학과 식물병리학 분야에서 유용하게 사용될 것이다.

제 7 장 참고문헌

- Agrawal, G.K., Rakwal, R., Jwa, N.S. and Agrawal, V.P. 2001. Signaling molecules and blast pathogen attack activates rice *OsPR1a* and *OsPR1b* genes: a model illustrating components participating during defense/stress response. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 1095–1103.
- Agrawal, G.K., Rakwal, R., Jwa, N.S. and Agrawal, V.P., 2002a. Effects of signaling molecules, protein phosphatase inhibitors, and blast pathogen (*Magnaporthe grisea*) on the mRNA level of a rice (*Oryza sativa* L.) phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (*OsPHGPX*) gene in seedling leaves. *Gene* 283: 227–236.
- Agrawal, G.K., Rakwal, R., Yonekura, M. and Kubo, S.H. 2002b. Rapid induction of defense/stress-related proteins in leaves of rice (*Oryza sativa*) seedlings exposed to ozone is preceded by newly phosphorylated proteins and changes in a 66-kDa ERK-type MAPK. *J. Plant Physiol.* 159: 361–369.
- Alexander, D., Goodman, R.M., Gut-Rella, M., Glascock, C., Weyman, K., Friedrich, L., Maddox, D., Ahl-Goy, P., Luntz, T., Ward, E. and Ryals, J. 1993. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7327–7331.
- Aono, M., Saji, H., Sakamoto, A., Tanaka, K., Kondo, N. and Tanaka, K. 1995. Paraquat tolerance of transgenic *Nicotiana tabacum* with enhanced activities of glutathione reductase and superoxide dismutase. *Plant Cell Physiol.* 36: 1687–1691
- Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase—a hydrogenperoxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85 :235–241.
- Badawi, G.H., Kawano, N., Yamauchi, Y., Shimada, E., Sasaki, R., Kubo, A. and Tanaka, K. 2004. Over-expression of ascorbate peroxidase in tobacco chloroplasts enhances the tolerance to salt stress and water deficit. *Physiol. Plant.* 121: 231–238
- Bartel, P. L., Chien, C.T., Sternglanz, R. and Fields, S. 1993. Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. In: *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach*, D. A. Hartley (Ed.), p 153–179. Oxford Univ. Press, Oxford, United Kingdom.

- Beck, J. J. and Ligon, J. M. 1995. Polymerase chain reaction assays for the detection of *Stagonospora nodorum* and *Septoria tritici* in wheat. *Phytopathology* 85: 319–324
- Behura, S. K., Sahu, S. C., Rajamani, S., Devi, A., Mago, R., Nair, S. and Mohan, M. 1999. Differentiation of the Asian rice gall midge, *Orseolia oryzae* (Wood–Mason) biotype, by sequence characterized amplified regions (SCARs). *Insect Mol. Biol.* 8: 391–398.
- Bent, A.F., Kunkel, B.N., Dahlbeck, D., Brown, K.L., Schmid, T.R., Giraudat, J., Leung, J., and Staskawicz, B.J. 1994. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 265: 1856–1860.
- Block, A., Schmelz, E., O'Donnell, P.J., Jones, J.B. and Klee, H.J. 2005. Systemic acquired tolerance to virulent bacterial pathogens in tomato. *Plant Physiol.* 138(3): 1481–90.
- Bolwell, G.P. 1998. Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 287–294.
- Breda, C., Sallaud, C., EI-Turk, J., Buffard, D., de Kozak, I., Esnault, R. and Kondorosi, A. 1996. Defense reaction in *Medicago sativa*: a gene encoding a class 10 PR protein is expressed in vascular bundles. *Mol. Plant–Microbe Interac.* 9: 713–719
- Broekaert, W.F., Cammue, B.P.A., Bolle, M.F.C., Thevissen, K., de Sambianx, G.W. and Osborn, R.W. 1997. Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 16: 297–323.
- Brown, A.E., Muthumeenakshi, S., Sreenivasaprasad, S., Mills, P.R. and Swinburne, T.R. 1993. A PCR primer-specific to *Cylindrocarpon heteronema* for detection of the pathogen in apple wood. *FEMS Microbiol. Lett.* 15: 117–120
- Bruns, T.D., White, T.J. and Taylor, J.W. 1991. Fungal molecular systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22: 525–564.
- Camp, W.V., Capiou, K., Montagu, M.V., Inze, D. and Slooten, L. 1996. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiol.* 112: 1703–1714.
- Carstens, M., Vivier, M.A. and Pretorius, I.S. 2003. The *Saccharomyces cerevisiae* chitinase, encoded by the CTS1–2 gene, confers antifungal activity against *Botrytis*

- cinerea* to transgenic tobacco. *Transgenic Res.* 12(4): 497–508.
- Chen, X., Romaine, C. P., Ospina–Giraldo, M. D. and Royse, D. J., 1999. A polymerase chain reaction–based test for the identification of *Trichoderma harzianum* biotypes 2 and 4, responsible for the worldwide green mold epidemic in cultivated *Agaricus bisporus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 246–250.
- Cheong, Y.H., Moon, B.C., Kim, J.K., Kim, C.Y., Kim, M.C., Kim, I.H., Park, C.Y., Kim, J.C., Park, B.O., Koo, S.C., Yoon, H.W., Chung, W.S., Lim, C.O., Lee, S.Y. and Cho, M.J., 2003. BWMK1, a rice mitogen–activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis–related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiol.* 132(4): 1961–1972.
- Chiterra, L.G., Langerak, C.J., Bergervoet, J.H.W. and van den Bulk, R.W. 2002. Detection of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in seed extracts of *Brassica* sp. applying fluorescent antibodies and flow cytometry. *Cytometry* 47: 118–126.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. Single–step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156–159.
- Chung, H.J., Kim, G.Y., Koh, Y.J., Nou, I.S. and Hwang, B.K. 1997. Genetic differentiation of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vescatoria* by random amplified polymorphic DNA(RAPD). *Korean J. Plant Pathol.* 13(1): 5–12.
- Clough, S.J. and Bent, A.F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*–mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735–743.
- Coaker, G., Falick, A. and Staskawicz, B. 2005. Activation of a phytopathogenic bacterial effector protein by a eukaryotic cyclophilin. *Science* 308(5721): 548–50.
- Cornelissen, B.J., van Huijsduijnen, R.A.H. and Bol, J.F. 1986. A tobacco mosaic virus–induced tobacco protein is homologous to the sweet–tasting protein thaumatin. *Nature* 321: 531–532.
- Daniel, X., Lacomme, C., Morel, J.B. and Roby, D. 1999. A novel myb oncogene homologue in *Arabidopsis thaliana* related to hypersensitive cell death. *Plant J.* 20: 57–66.
- Datta, K., Velazhahan, R., Oliva, N., Ona, I., Mew, T., Khush, G.S., Muthukrishnan, S.

- and Datta, S.K. 1999. Over-expression of the cloned rice thaumatin-like protein (PR-5) gene in transgenic rice plants enhances environmental friendly resistance to *Rhizoctonia sonali* causing sheath blight disease. *Theor. Appl. Genet.* 98: 1138–1145.
- Dean, A.R., Talbot, N.J., Ebbole, D.J., Farman, M.L., Mitchell, T.K., Orbach, M.J., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J.R., Pan, H., Read, N.D., Lee, Y.H., Carbone, I., Brown, D., Oh, Y.Y., Donofrio, N., Jeong, J.S., Soanes, D.M., Djonovic, S., Kolomiets, E., Rehmeier, C., Li, W., Harding, M., Kim, S., Lebrun, M.H., Bohnert, H., Coughlan, S., Butler, J., Calvo, S., Ma, L.J., Nicol, R., Purcell, S., Nusbaum, C., Galagan, J.E., Birren, B.W., 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* 434: 980–986.
- De Merlier, D., Chandelier, A., Debruxelles, N., Noldus, M., Laurent, F., Dufays, E., Claessens, H. and Cavelier, M. 2005. Characterization of alder *Phytophthora* isolates from Wallonia and development of SCAR primers for their specific detection. *J. Phytopathol.* 153: 99–107.
- Desjarlais, J.R. and Berg, J.M. 1992. Toward rules relating zinc finger protein sequences and DNA binding site preferences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7345–7349.
- Do, H.M., Hong, J.K., Jung, H.W., Kim, S.H., Ham, J.H. and Hwang, B.K. 2003. Expression of peroxidase like genes, H₂O₂ production, and peroxidase activity during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in *Capsicum annum*. *Mol. Plant–Microbe Int.* 16: 196–205.
- Dong, X. 1998. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 316–323.
- Doss, R.P. and Welty, R.E. 1995. A polymerase chain reaction-based procedure for detection of *Acremonium coenophialum* in tall fescue. *Phytopathology* 85: 913–917.
- Edqvist, J. and Farbos, I. 2002. Characterization of germination-specific lipid transfer proteins from *Euphorbia lagascae*. *Planta* 215: 41–50.
- Edwards, K., Johnstone, C. and Thompson, C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids Res.* 19: 1349.
- Ellis, M.B. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

- Erwin, D.C. and Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. p. 562.
- Fagoago, C., Rodrigo, I., Conejero, V., Hinarejos, C., Tuset, J.J., Arnau, J., Pina, J.A., Navarro, L. and Peña, L. 2001. Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis-related protein PR-5. *Mol. Breeding* 7: 175–185.
- Fields, S. and Song, O. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interaction. *Nature* 340: 245–247.
- Finkelstein, R.R., Gampala, S.S.L. and Rock, C.D. 2002. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* S15–S45.
- Fitzgerald, H.A., Canlas, P.E., Chern, M.S. and Ronald, P.C. 2005. Alteration of TGA factor activity in rice results in enhanced tolerance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant J.* 43(3): 335–347.
- Förster, H. and Adaskaveg, J.E. 2000. Early brown rot infections in sweet cherry fruit are detected by *Monilinia*-specific DNA primer. *Phytopathology* 90: 171–178.
- Foyer, C.H., Descourvieres, P. and Kunert, K.J. 1994. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 17: 507–523.
- Fujimoto, S.Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H. and Ohme-Takagi, M. 2000. Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* 12: 393–404.
- Fulton, C.E. and Brown, A.E. 1997. Use of SSU rDNA group-I intron to distinguish *Monilinia fructicola* from *M. laxa* and *M. fructigena*. *FEMS Microbiol. Lett.* 157: 307–312.
- Gaxiola, R.A., Li, J., Undurraga, S., Dang, L.M., Allen, G.J., Alper, S.L. and Fink, G.R. 2001. Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺ pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11444–11449.
- Gelvin, S.B., Schilperoort, R.A. and Verma, D.P.S. 1991. *Plant Molecular Biology Manual*, Second Ed., Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Gillham, D.J. and Dodge, A.D. 1987. Chloroplast superoxide and hydrogen peroxide

- scavenging systems from pea leaves: seasonal variations. *Plant Sci.* 50: 105–109.
- Goff, S.A., Ricke, D., Lan, T.-H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H., Hadley, D., Hutchison, D., Martin, C., Katagiri, F., Lange, B.M., Moughamer, T., Xia, Y., Budworth, P., et. al., 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. *japonica*). *Science* 296: 92–100.
- Goodwin, P.H., English, J.T., Neher, D.A., Duniway, J. and Kirkpatrick, B.C. 1990a. Detection of *Phytophthora parasitica* from soil and host tissue with a species-specific DNA probe. *Phytopathology* 80: 277–281.
- Goodwin, P.H., Kirkpatrick, B.C. and Duniway, J.M. 1990b. Identification of *Phytophthora citrophthora* with cloned DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 669–674.
- Grant, M.R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R.W. and Dangl, J.L. 1995. Structure of the Arabidopsis RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* 269: 843 – 846.
- Grillo, S., Leone, A., Xu, Y., Tucci, M., Framcione, R., Hasegawa, P.M., Monti, L. and Bressan, R.A. 1995. Control of osmotin gene expression by ABA and osmotic stress in vegetative tissues of wild-type and ABA-deficient mutants of tomato. *Physiol. Plant.* 93: 498–504.
- Groppe, K. and Boller, T. 1997. PCR assay based on a microsatellite-containing locus for detection and quantification of *Epichloe endophytes* in grass tissue. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1543–1550.
- Gupta A.S., Web, R.P., Holaday, A.S. and Allen, R.D. 1993. Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. *Plant Physiol.* 103: 1067–1073.
- Guthrie, C. and Fink, G. R. (Eds.) 1991. *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, Vol. 194. Academic Press, Inc., Boston.
- Hamelin, D.R., Berube, P., Gignac, M. and Bourassa, M. 1996. Identification of root rot fungi in nursery seedlings by nested multiplex PCR. *American Society for Microbiology* 62: 4026–4031.
- Han, S.S. 1996. Genetic variability and population structure of Korean isolates of *Pyricularia grisea*. 박사학위논문(일본동경농공대)
- Hao, D., Yamasaki, K., Sarai, A. and Ohme-Takagi, M. 2002. Determinants in the

- sequence specific binding of two plant transcription factors, *CBF1* and *NtERF2*, to the DRE and GCC motifs. *Biochemistry* 41: 4202–4208.
- Hedge, P., Qi, R., Abernathy, K., Gay, C., Dharap, S., Gaspard, R., Huges, J.E., Snrud, E., Lee, N. and Quackenbush, J. 2000. A concise guide to cDNA microarray analysis. *Biotechniques* 29: 548–550.
- He'lias, V., Le Roux, A.C., Bertheau, Y., Andriron D., Gauthier, J.P. and Jouan, B. 1998. Characterisation of *Erwinia* subspecies and detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potato plants, soil and water extracts with PCR-based methods. *European J. Plant Pathol.* 104: 685–699.
- Henning, J., Dewey, R.E., Cutt, J.R. and Klessing, D.F.. 1993. Pathogen, salicylic acid and development expression of a β -1,3-glucanase/GUS gene fusion in transgenic tobacco plants. *Plant J.* 4: 481–493.
- Henson, J.M., Goins, T., Grey, W., Mathre, D.E. and Elliott, M.L. 1993. Use of polymerase chain reaction to detect *Gaeumannomyces graminis* DNA in plants grown in artificially and naturally in fested soil. *Phytopathology* 83: 283–287.
- Hermosa, M.R., Grondona, I., Diaz-Minguez, J.M. Iturriaga, E.A. and Monte, E. 2001. Development of a strain-specific SCAR marker for the detection of *Trichoderma atroviride*11, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Curr. Genet.* 38: 343–350.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6(2): 271–82.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. and Korenaga, T. 1999. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Res.* 27: 297–300.
- Hoegen, E., Strömberg, A., Pihlgren, U. and Kombrink, E. 2002. Primary structure and tissue-specific expression of the pathogenesis-related protein PR-1b in potato. *Mol. Plant Pathol.* 3: 329–345.
- Hong, J.K. and Hwang, B.K. 1998. Influence of inoculum density, wetness duration, plant age, inoculation method, and cultivar resistance on infection of pepper plants by *Colletotrichum coccodes*. *Plant Dis.* 82: 1079–1083.

- Hong, J.K. and Hwang, B.K. 2002. Induction by pathogen, salt and drought of a basic class II chitinase mRNA and its in situ localization in pepper (*Capsicum annuum*). *Physiol. Plant.* 114: 549–558.
- Hong, J.K. and Hwang, B.K. 2005. Induction of disease resistance and oxidative stress tolerance by overexpression of pepper basic *PR-1* gene in Arabidopsis. *Physiol. Plant.* 124: 267–277.
- Hong, J.K., Jung, H.W., Lee, B.K., Lee, S.C., Lee, Y.K. and Hwang, B.K. 2004. An osmotin-like protein gene, *CAOSMI*, from pepper: Differential expression and in situ localization in pepper tissues during pathogen infection and abiotic stresses. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 64: 301–310.
- Hong, J.K., Lee, S.C. and Hwang, B.K. 2005. Activation of pepper basic *PR-1* gene promoter during defense signaling to pathogen, abiotic and environmental stresses. *Gene* 356: 169–180.
- Horvath, D.M., Huang, D.J. and Chua, N.H. 1998. Four classes of salicylate-induced genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 895–905.
- Howard, S.J. and Paul, W.T. 2000. Enhanced polymerase chain reaction methods for detecting and quantifying *Phytophthora infestans* in plants. *Phytopathology* 90: 1112–1119.
- Hwang, B.K. and Kim, C.H. 1995. *Phytophthora* blight of pepper and its control in Korea. *Plant Dis.* 79: 221–227.
- Hwang, B.K., de Cock, A.W.A.M., Bahnweg, G., Prell, H.H., and Heitefuss, R. 1991. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among *Phytophthora capsici* isolates from pepper. *Systematic Applied Microbiol.* 14: 111–116.
- Hwang, B.K., Lee, J.T., Hwang, B.G., and Koh, Y.H. 1995. Restriction fragment length polymorphism analyses of the plasmid DNAs in strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from different geographic areas. *J. Phytopathology* 143: 185–191.
- James, C. 2005. Executive Summary of Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops:2005. ISAAA Briefs No. 34. ISAAA: Ithaca, N.Y., U.S.A.
- Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants : The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 387–405.

- Jespersen, H.M., Kjaersgard, I.V.H., Ostergaard, L. and Welinder, K.G. 1997. From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. *Biochem. J.* 326: 305–310.
- Jia, Y. and Martin, G.B. 1999. Rapid transcript accumulation of pathogenesis related genes during an incompatible interaction in bacterial speck disease-resistant tomato plants. *Plant Mol. Biol.* 40: 455–465.
- Joly, P. 1964. Le Genre *Alternaria*. *Ency. Mycological*. P. Lechevalier, Paris.
- Jones, D.G. 2001. Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 281–287.
- Lee, J.H., Kim, S.H., Jung, Y.H., Kim, J.A., Lee, M.O., Choi, P.K. Choi, W. Kim K.N. and Jwa N.S. 2005. Molecular cloning and functional analysis of rice (*Oryza sativa* L.) *OsNDR1* on defense signaling pathway. *Plant Pathol. J.* 21(2): 149–157.
- Joubes, J., De Schutter, K., Verkest, A., Inze, D. and De Veylder, L. 2004. Conditional, recombinase-mediated expression of genes in plant cell cultures, *Plant J.* 37(6): 889–96.
- Judelson, H.S. and Messenger-Routh, B. 1996. Quantitation of *Phytophthora cinnamomi* in avocado roots using a species-specific DNA probe. *Phytopathology* 86: 763–768.
- Judelson, H.S. and Tooley, P.W. 2000. Enhanced polymerase chain reaction methods for detecting quantifying *Phytophthora infestans* in plants. *Phytopathology* 90: 1112–1119.
- Jung, H.W. and Hwang, B.K. 2000. Isolation, partial sequencing, and expression of pathogenesis-related cDNA genes from pepper leaves infected by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Plant-Microbe Inter.* 13: 136–142.
- Jung, H.W., Kim, K.D. and Hwang, B.K. 2005. 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.
- Kageyama, K., Ohyama, A. and Hyakumachi, M. 1997. Detection of *Pythium ultimum* using polymerase chain reaction with species-specific primers. *Plant Dis.* 81: 1155–1160.

- Kang, H.W., Cho, Y.G., Yoon, U.H. and Eun, M.Y. 1998. Rapid DNA extraction method for RFLP and PCR analysis from a single dry seed. *Plant Mol. Biol. Reporter* 16: 90–90.
- Kang, H.W., Go, S.J. and Kwon, S.W. 1998. Specific detection of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by DNA probe selected from PCR polymorphic bands. *Korean J. Plant Pathol.* 14(2): 161–170.
- Kang, H.W., Go, S.J., Ryu, J.C., Kim, K.T. and Eun, M.Y. 2000. Fingerprinting genomes of various organisms using PCR with URP primers developed from repetitive sequence of rice. *Plant and Animal Genome VIII* (U.S.A., Town & Country Hotel, SanDiego, 2000. 1. 9–12).
- Kang, H.W., Go, S.J., Yu, S.H., Kim, B.R., Ryu, J.C., Kim, K.T. and Eun, M.Y. 2000. Genomic differentiation of host specific toxins–producing *Alternaria* species by URP–PCR fingerprints and probes derived from the polymorphic PCR bands. *Agricultural Microbes Genome*. (U.S.A., Town & Country Hotel, SanDiego, 2000. 1. 13–15).
- Kang, H.W., Kwon, S.W. and Go, S.J. 2003. PCR–based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* by primers generated from a URP–PCR fingerprinting–derived polymorphic band. *Plant Pathol.* 52: 127–133.
- Karimi, M., De Meyer, B. and Hilson, P. 2005. Modular cloning in plant cells, *Trends in Plant Sci.* 10(3): 103–105.
- Karimi, M., Inze, D. and Depicker, A. 2002. GATEWAY vectors for agrobacterium–mediated plant transformation, *Trends in Plant Science* 7(5): 193–195.
- Kato, N. and Esaka, M. 2000. Expansion of transgenic tobacco protoplasts expressing pumpkin ascorbate oxidase is more rapid than that of wild–type protoplasts. *Planta* 210:1018–1022.
- Kazan K., Goulter K.C., Way H.M. and Manners, J.M. 1998. Expression of a pathogenesis–related peroxidase of *Stylosanthes humilisin* transgenic tobacco and canola and its effect on disease development. *Plant Sci.* 136:207–217.
- Kim C.M., Piao, H.L., Park,S.J., Chon, N.S., Je, B.I., Sun, B., Park, S.H., Park, J.Y., Lee, E.J., Kim, M.J., Chung, W.S., Lee, K.H., Lee, Y.S., Lee, J.J., Won, Y.J., Yi, G., Nam,

- M.H., Cha, Y.S., Yun, D.W., Eun, M.Y. and Han, C.D. 2004. Rapid, large-scale generation of Ds transposant lines and analysis of the Ds insertion sites in rice. *Plant J.* 39(2): 252–263.
- Kim, C.Y., Lee, S.H., Park, H.C., Bae, C.G., Cheong, Y.H., Choi, Y.J., Han, C., Lee, S.Y., Lim, C.O. and Cho, M.J. 2000. Identification of rice blast fungal elicitor-responsive genes by differential display analysis. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13(4): 470–474.
- Kim, H.K., Lee, S.K., Cho, J.I., Lee, S., An, G., Jwa, N.S., Kim, B.R., Cho, Y.C., Han, S.S., Bhoo, S.H., Lee, Y.H., Hong, Y.K., Yi, G., Park, D.S., Hahn, T.R., and Jeon, J.S. 2005. Characterization of rice mutants with enhanced susceptibility to rice blast. *Mol Cells.* 20(3): 385–391.
- Kim, K.M., Cho, S.K., Shin, S.H., Kim, G.T., Lee, J.H., Oh, B.J., Kang, K.H., Hong, J.C., Choi, J.Y., Shin, J.S. and Chung, Y.S. 2005. Analysis of differentially expressed transcripts of fungal elicitor- and wound-treated wild rice (*Oryza grandiglumis*), *J. Plant Res.* 118: 347–354.
- Kim, Y.J. and Hwang, B.K. 2000. Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible. *Physiol. Plant.* 108:51–60.
- Kim, B.S. and Hwang, B.K. 1992. Isolation of antibiotic-producing bacteria antagonistic to *Phytophthora capsici* from pepper-growing soils and evaluation of their antibiotic activity. *Korean J. Plant Pathol.* 8: 241–248.
- Kim, C.S., Yi, S.Y., Lee, Y.K., and Hwang, B.K. 2000. Isolation and differential expression of an acidic PR-1 cDNA gene from soybean hypocotyls infected with *Phytophthora sojae* f.sp. *glycines*. *Plant Pathol. J.* 16:9–18.
- Kim, E., Hammond-Kosack, K.E. and Jonathan D.G.J. 1997. Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 575–607.
- Kim, H.G. and Song, J.Y. 1996a. Genetic variation and diversity in *Phytophthora capsici* populations from Korea. *Proceedings of The 7th International Joint Seminar.* pl-16.
- Kim, H.G., Kim, Y.T. and Yu, S.H. 1994. *Fusarium oxysporum*의 유연관계 분석을 위한 Recombinant DNA의 Probe로서의 이용 가능성. *한국식물병리학회지* 10(1):1–6.
- Kim, J.C., Lee, S.H., Cheong, Y.H., Yoo, C.M., Lee, S.I., Chun, H.J., Yun, D.J., Hong, J.C., Lee, S.Y., Lim, C.O. and Cho, M.J. 2001. A novel cold-inducible zinc finger

- protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants. *Plant J.* 25: 247–259.
- Kim, Y.J. and Hwang, B.K. 1994. Differential accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of *Phytophthora capsici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 45: 195–209.
- Knoester, M., Pieterse, C.M., Bol, J.F. and van Loon, L.C. 1999. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 12: 720–727.
- Knoester, M, van Loon L.C., van den Heuvel, J., Hennig, J., Bol, J.F. and Linthorst, H.J.M. 1998. Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 1933–1937.
- Ko, J.H., Hwang, B.K., and Hwang, B.G. 1993. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial and nuclear DNAs among Korean races of *Magnaporthe grisea*. *J. Phytopathology* 138: 41–54.
- Kong, H.Y., Lee, S.C. and Hwang, B.K. 2001. Expression of pepper cyclophilin gene is differentially regulated during the pathogen infection and abiotic stress conditions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 59: 189–199.
- Kong, P. Hong, C.X., Jeffers, S.N. and Richardson, P.A. 2003. A species specific polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Phytophthora nicotianae* in irrigation water. *Phytopathology* 93: 822–831.
- Kranz, H.D., Denekamp, M., Greco, R., Jin, H., Leyva, A., Meissner, R.C., Petroni, K., Urzainqui, A., Bevan, M., Martin, C., Smeekens, S., Tonelli, C., Paz-Ares, J. and Weisshaar, B. 1998. Towards functional characterization of the members of the *R2R3-MYB* gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 263–276.
- Krause, M. and Durner, J. 2004. Harpin inactivates mitochondria in *Arabidopsis* suspension cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17: 131–139.
- Kubo, K., Sakamoto, A., Kobayashi, A., Rybka, Z., Kanno, Y., Nakagawa, H., Nishino, T. and Takatsuji, H. 1998. Cys2/His2 zinc-finger protein family of petunia: evolution and general mechanism of target sequence recognition. *Nucleic Acids Res.* 26: 608–615.
- Kunkel, B.N. and Brooks, D.M. 2002. Cross talk between signaling pathways in pathogen

- defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 325–331.
- Kusaba, M. and Tsuge, T. 1994. Nuclear ribosomal DNA variation and pathogenic specialization in *Alternaria* fungi known to produce host specific toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 903–909.
- Kusaba, M. and Tsuge, T. 1995. Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Curr. Genet.* 28: 491–498.
- Kvaratskhelia, M., George, S.J. and Thorneley, R.N.F. 1997. Salicylic acid is a reducing substrate and not an effective inhibitor of ascorbate peroxidase. *J. Biol. Chem.* 272: 20998–21001.
- Kwon, S.Y., Jeong, Y.J., Lee, H.S., Kim, J.S., Cho, K.Y., Allen, R.D. and Kwak, S.S. 2002. Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. *Plant Cell Environ.* 25: 873–882.
- Kwon, S.W., Go, S.J., Kang, H.W., Ryu, J.C. and Jo, J.K. 1997. Phylogenetic analysis of *Erwinia* species based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 1061–1064.3.
- Laskey, R.A. and Dingwall, C. 1993. Nucleus shuttling: the default pathway for nucleus proteins. *Cell* 74: 585–586.
- Lee, B.M., Park, Y.J., Park, D.S., Kang, H.W., Kim, J.G., Song, E.S., Park, I.C., Yoon, U.H., Hahn, J.H., Koo, B.S., Lee, G.B., Kim, H., Park, H.S., Yoon, K.O., Kim, J.H., Jung, C.H., Koh, N.H., Seo, J.S. and Go, S.J. 2005. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Res.* 33: 577–86.
- Lee, H.M. 2005. Development of the Species-Specific Primer for Rapid Identification and Detection of *Alternaria panax* and *A. gaisen*. Ms. D. Thesis. Chungnam National University.
- Lee, H., Xiong, L., Gong, Z., Ishitani, M., Stevenson, B. and Zhu, J.K. 2001. The *Arabidopsis HOS1* gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning.

- Genes Dev. 15: 912–924.
- Lee, M.W., Qi, M. and Yang, Y. 2001. A novel jasmonic acid-inducible rice *myb* gene associates with fungal infection and host cell death. *Mol Plant Microbe Interact*, 14(4): 527–35.
- Lee, Y.K. and Hwang, B.K. 1996. Differential induction and accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms in the intercellular space and leaf tissues of pepper by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Phytopathol.* 144: 79–87.
- Lee, Y.K., Hippe-Sanwald, S., Jung, H.W., Hong, J.K., Hause, B. and Hwang, B.K. 2000. In situ localization of chitinase mRNA and protein in compatible and incompatible interactions of pepper stems with *Phytophthora capsici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57: 111–121.
- 이윤수. 2005. 고추역병 진단용 종특이적 Primer의 개발 및 활용. 충남대학교 석사학위논문
- Li, H.Y. and Gray, J.E. 1999. Molecular characterization of a cDNA, NTS13, encoding a defensin-like protein in tobacco styles. *Plant Physiol.* 120: 633–633.
- Li, K.N., Rouse, D.I. and German, T.L. 1994. PCR primers that allow intergenetic differentiation of ascomycetes and their application to *Verticillium* spp. *Appl. Environ, Microbiol.* 60: 4324–4331.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148: 350–382.
- Liu, D., Raghothama, K.G., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. 1994. Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 1888–1892.
- Louws, F.J., Rademaker, J.L.W. and de Bruijn, F.J. 1999. The three ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 81–125.
- Luban, J. and Goff, S.P. 1995. The yeast two-hybrid system for studying protein-protein interactions. *Curr. Opinion in Biotechnol.* 6: 59–64.
- Lund, S.T., Stall, R.E. and Klee, H.J. 1998. Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *Plant Cell* 10: 371–382.
- Magome, H., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kamiya, Y. and Oda, K. 2004. Dwarf and

- delayed-flowering 1, a novel Arabidopsis mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *Plant J.* 37: 720–729.
- Makino, S., Sugio, A., White, F. and Bogdanove, A.J. 2006. Inhibition of resistance gene-mediated defense in rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19: 240–249.
- Maldonado, A.M., Doerner, P., Dixon, R.A., Lamb, C.J. and Cameron, R.K. 2002. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signaling in Arabidopsis. *Nature* 419: 399–403.
- Maria del, M.J. and Rafael, M.J. 2003. Development of a specific polymerase chain reaction-based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5, and 6. *Phytopathology* 93: 200–209.
- Martin, G.B., Bogdanove, A.J. and Sessa, G. 2003. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 23–61.
- McDowell, J. and Dangl, J. 2000. Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem. Sci.* 25: 79–82
- Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H. and Michelmore, R.W. 2003. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. *Plant Cell* 15: 809–834
- Migheli, Q. and Cavallarin, L. 1994. Characterization of antagonistic and pathogenic *Fusarium oxysporum* isolates by random amplification of polymorphic DNA. *Mol. Biotechnol.* 2: 197–200.
- Mindrinos, M., Katagiri, F., Yu, G.L. and Ausubel, F.M. 1994. The *A. thaliana* disease resistance gene *RPS2* encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell* 78: 1089–99.
- Molina, A. and Garcia-Olmedo, F. 1997. Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP2. *Plant J.* 12: 669–675
- Montague, J.W., Hughes, F.M. Jr. and Cidlowski, A. 1997. Native recombinant cyclophilin A, B, and C degrade DNA independently of peptidyl cis-trans-isomerase activity. *J. Biol. Chem.* 272: 6677–6684.

- Moritz, C. and Hillis, D.M. 1996. Molecular systematics: Context and controversies. *Molecular Systematics* 2: 1–13.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497.
- Murgia, I., Tarantino, D., Vannini, C., Bracale, M., Carravieri, S. and Soave, C. 2004. *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. *Plant J.* 38: 940–953.
- Murray, M.G. and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321–4325.
- Nam, M. 2002. 고추역병균(*Phytophthora capsici*)의 동정 및 검출을 위한 종 특이적 primer 개발. 충남대학교 석사학위 논문.
- Neergaard, P. 1945. Danish Species of *Alternaria* and *Stemphylium*. Einar Munksgard, Copenhagen, p. 560.
- Neuhaus, J.M. 1999. Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). In: Datta SK, Muthukrishnan S (eds) Pathogenesis-Related Proteins in Plants. CRC, Boca Raton, Fla., pp 77–105.
- Newhook, F.J., Waterhouse, G.M. and Stamps, D.J. 1978. Tabular key to the species of *Phytophthora*. de Bary. *Mycol. Pap.* 143. Commonw. Mycol. Inst. Kew, Surrey, UK.
- Newton, S.S. and Duman, J.G. 2000. An osmotin-like cryoprotective protein from the bittersweet nightshade *Solanum dulcamara*. *Plant Mol. Biol.* 44: 581–589.
- Niderman, T., Genetet, I., Bruyere, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B. and Mosinger, E. 1995. Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal: Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.* 108: 17–27.
- Nielson, K.K., Nielson, J.E., Madrid, S.M. and Mikkelsen, J.D. 1997. Characterization of new antifungal peptide from sugar beet leaves. *Plant Physiol.* 113: 83–91.
- Niessen, M.L. and Vogel, R.F. 1998. Group specific PCR-detection of potential trichothecene-producing *Fusarium*-species in pure cultures and cereal samples. *Syst.*

- Appl. Microbiol. 21: 618–631.
- Nishimura, S., Sugihara, M., Kohmoto, K. and Otani, H. 1978. Two different phases in pathogenicity of the *Alternaria* pathogen causing black spot disease of Japanese pear. Journal of the Faculty of Agriculture, Tottori University 13: 1–10.
- O'Donnell, P.J., Jones, J.B., Antoine, F.R., Ciardi, J. and Klee, H.J. 2001. Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. Plant J. 25:315–323.
- O'Donnell, P.J., Schmelz, E., Block, A., Miersch, O., Wasternack, C., Jones, J.B. and Klee, H.J. 2003. Multiple hormones act sequentially to mediate a susceptible tomato pathogen defense response. Plant Physiol. 133: 1181–1189.
- Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H., Sekikawa, A., Inoue, T., Kanai, H., Sarai, A., Ishii, S. and Nishimura, Y. 1994. Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices. Cell 79: 639–648.
- Ohta, M., Ohme-Takagi, M. and Shinshi, H. 2000. Three ethylene-responsive transcription factors in tobacco with distinct transactivation functions. Plant J. 22: 29–38.
- Oñate-Sánchez, L. and Singh, K.B. 2002. Identification of Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors with distinct induction kinetics after pathogen infection. Plant Physiol. 128: 1313–1322.
- Park, S.H., Morris, J.L., Park, J.E., Hirschi, K.D. and Smith, R.H. 2003. Efficient and genotype-independent *Agrobacterium*-mediated tomato transformation. J. Plant Physiol. 160: 1253–1257.
- Payne, G., Ahl, P., Moyer, M., Harper, A., Beck, J., Meins, F. Jr. and Ryals, J. 1990. Isolation of complementary DNA clones encoding pathogenesis-related proteins P and Q, two acidic chitinases from tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:98–102.
- Payne, G., Parks, T.D., Burkhart, W., Dincher, S., Ahl, P., Metraux, J.P. and Ryals, J. 1988. Isolation of the genomic clone for pathogenesis-related protein 1a from *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi-nc*. Plant Mol. Biol. 11: 89–94.
- Penninckx, I.A., Thomma B.P., Buchala, A., Metraux, J.P. and Broekaert, W.F. 1998. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for

- induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *Plant Cell* 10: 2103–2113.
- Pignocchi, C., Fletcher, J.M., Wilkinson, J.E., Barnes, J.D. and Foyer, C.H. 2003. The function of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Physiol.* 132: 1631–1641.
- Plyler, T.R., Simone, G.W., Fernandez, D. and Kistler, H.C. 1999. Rapid detection of the *Fusarium oxysporum* lineage containing the Canary island date palm wilt pathogen. *Phytopathology* 89: 407–413.
- Qin, F., Sakuma, Y., Li, J., Liu, Q., Li, Y.Q., Shinozaki, K. and Yamaguchi–Shinozaki, K. 2004. Cloning and functional analysis of a novel *DREB1/CBF* transcription factor involved in cold–responsive gene expression in *Zea mays* L. *Plant Cell Physiol.* 45: 1042–1052.
- Raikhel, N. 1992. Nucleus targeting in plants. *Plant Physiol.* 100: 1627–1632.
- Ramalingam, J., Vera Cruz, C.M. , Kukreja, K., Chittoor, J.M., J.L. Wu, S.W. Lee, Baraoidan, M., George, M.L. , Cohen, M.B. , Hulbert, S.H. Leach, J.E. and Leung, H. 2003. Candidate defense genes from rice, barley, maize and their association with qualitative and quantitative resistance in rice. *Mol. Plant–Micro interac.* 1: 14–24.
- Rathjen, J., Chang, J.H., Staskawicz, B.J. and Michelmore R.W. 1999. Constitutively active *Pto* induces a *Prf*–dependent hypersensitive response in the absence of *avrPto*. *EMBO J.* 18: 3232–3240.
- Rivas, S., Romeis, T. and Jones, J.D.G. 2002. The Cf–9 disease resistance protein is present in an ~420–kilodalton heteromultimeric membrane–associated complex at one molecule per complex. *Plant Cell* 14: 689–702.
- Roberts, R.G., Reymond, S.T. and Andersen, B. 2000. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small–spored *Alternaria* species and species groups. *Mycological Research* 104: 151–160.
- Rollo, F., Salvi, R. and Torchia, P. 1990. Highly sensitive and fast detection of *Phoma tracheiphila* by polymerase chain reaction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 572–576.
- Rotem, J. 1994. The genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology, and Pathogenicity. APS Press, St Paul, MN.
- Rushton, P.J. and Somssich, I.E. 1998. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 311–315.

- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y. and Hunt, M.D. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8: 1809–1819.
- Ryu, H.S., Han, M., Lee, S.K., Cho, J.I., Ryoo, N., Heu, S., Lee, Y.H., Bhoo, S.H., Wang, G.L., Hahn, T.R. and Jeon, J.S.. 2006 A comprehensive expression analysis of the *WRKY* gene superfamily in rice plants during defense response. *Plant Cell Rep.* in press.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, R. 1989. *Molecular cloning : A Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Sarowar, S., Kim, E.N., Kim, Y.J., Ok, S.H., Kim, K.D., Hwang, B.K. and Shin, J.S. 2005a. Overexpression of a pepper ascorbate peroxidase–like 1 gene in tobacco plants enhances tolerance to oxidative stress and pathogens. *Plant Sci.* 169: 55–63.
- Sarowar, S., Kim, Y.J., Kim, E.N., Kim, K.D., Hwang, B.K., Islam, R. and Shin, J.S. 2005b. Overexpression of a pepper basic pathogenesis–related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. *Plant Cell Rep.* 24:216–224.
- Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A. and Gallitelli, D. 2004. Real–time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* 110: 893–908.
- Sela–Burlage, M.B., Ponstein, A.S., Bres–Vloemans, S.A., Melchers, L.S., van Den Elzen, P.J.M. and Cornelissen, B.J.C. 1993. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and –1,3–glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol.* 101: 857–863.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y. and Yoshimura, K. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. Exp. Bot.* 53: 1305–1319.
- Silvar, C., Duncan, J.M., Cooke, D.E.L., Williams, N.A., Diaz, J. and Merino, F. 2005. Development of specific PCR primers for identification and detection of *Phytophthora capsici* Leon. *European J. Plant Pathol.* 112: 43–52.
- Simmons, E.G. 1990. *Alternaria* themes and variation. *Mycotaxon* 37: 79–119.
- Simmons, E.G. 1992. *Alternaria* taxonomy: Current status, viewpoint, challenge. In: *Alternaria–Biology, Plant Diseases and Metabolites. Topics in Secondary Metabolism*

3: 1–35.

- Simmons, E.G. 1995. *Alternaria* themes and variation. Mycotaxon 55: 55–163.
- Singh, N.K., Nelson, D.E., Kuhn, D., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. 1989. Molecular cloning of osmotin and regulation of its expression by ABA and adaptation to low water potential. Plant Physiol. 90: 1096–1101.
- Singh, K.B., Foley, R.C. and Sanchez, L.O. 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. Curr. Opin. in Plant Biol. 5: 430–436.
- 송정영. 2000. 고추역병균 *Phytophthora capsici* 집단들의 유전적 다양성과 변이요인 분석. 충남대학교 박사학위논문.
- Stamps, D.J., Waterhouse, G.M., Newhook, F.J. and Hall, G.S. 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. Mycological Papers No. 162.
- Suetake, T., Tsuda, S., Kawabata, S., Miura, K., Iwanaga, S., Hikichi, K., Nitta, K. and Kawano, K. 2000. Chitin-binding proteins in invertebrates and plants comprise a common chitin-binding structural motif. J. Biol. Chem. 275: 17929–17932.
- Sugano, S., Kaminaka, H., Rybka, Z., Catala, R., Salinas, J., Matsui, K., Ohme-Takagi, M. and Takatsuji, H. 2003. Stress-responsive zinc finger gene *ZPT2-3* plays a role in drought tolerance in petunia. Plant J. 36: 830–841.
- Suharsono, U., Fujisawa, Y., Kawasaki, T., Iwasaki, Y., Satoh, H. and Shimamoto, K. 2002. The heterotrimeric G protein alpha subunit acts upstream of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 13307–13312.
- Sun, X., Cao, Y., Yang, Z., Xu, C., Li, X., Wang, S. and Zhang, Q. 2004. Xa26, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein. Plant J. 37: 517–527.
- Suzuki, A., Wu, C.Y., Washida, H. and Takaiwa, F. 1998. Rice MYB Protein OSMYB5 specifically binds to the AACA motif conserved among promoters of genes for storage protein glutelin. Plant Cell Physiol. 39: 555 – 559.
- Suzuki, A., Suzuki, T., Tanabe, F., Toki, S., Washida, H., Wu, C.Y. and Takaiwa, F. 1997. Cloning and expression of five myb-related genes from rice seed. Gene 198: 393–398.
- Takahashi, H., Chen, Z., Du, H., Liu, Y. and Klessig, D.F. 1997. Development of necrosis

- and activation of disease resistance in transgenic tobacco plants with severely reduced catalase levels. *Plant J.* 11:993–1005.
- Takahashi, Y. and Nagata, T. 1992. ParB: an auxin-regulated gene encoding glutathione S-transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 56–59.
- Tang, W., Charles, T.M. and Newton, R.J. 2005. Overexpression of the pepper transcription factor *CaPFI* in transgenic *Virginia pine* (*Pinus Virginiana* Mill.) confers multiple stress tolerance and enhances organ growth. *Plant Mol. Biol.* 59(4): 603–17.
- Van Camp, W., Capiou, K., van Montagu, M., Inze, D. and Slight, L. 1996. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe superoxide dismutase in chloroplast. *Plant Physiol.* 112:1703–1714.
- Van Der Krol, A.R., van Poecke, R.M., Vorst, O.F., Voogt, C., van Leeuwen, W., Borst-Vrensen, T.W., Takatsuji, H. and van Der Plas, L.H. 1999. Developmental and wound-, cold-, desiccation-, ultraviolet-B-stress-induced modulations in the expression of the petunia zinc finger transcription factor gene *ZPT2-2*. *Plant Physiol.* 121: 1153–1162.
- Van Loon, L.C. and van Strien, E.A. 1999. The families of pathogenesis related proteins, their activities, and comparative analysis of PR1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55: 85–97.
- Vandemark, G.J., Kraft, J.M., Larsen, R.C., Gritsenko, M.A. and Boge, W.L. 2000. A PCR-based assay by sequence-characterized DNA markers for the identification and detection of *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology* 90: 1137–1144.
- Varet, A., Hause, B., Hause, G., Scheel, D. and Lee, J. 2003. The Arabidopsis *NHL3* gene encodes a plasma membrane protein and its overexpression correlates with increased resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Plant Physiol.* 132: 2023–2033.
- Verberne, M.C., Verpoorte, R., Bol, J.F., Blanco, J.M. and Linthorst, H.J.M. 2000. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nat. Biotech.* 18: 779–783.
- Viaud, M.C., Balhadere, P.V. and Talbot, N.J.A. 2002. *Magnaporthe grisea* cyclophilin act

- as a virulence determinant during plant infection. *Plant Cell* 14: 917–930.
- Vieira, J. and Mesing, J. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for international mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*. 19: 259–268.
- Wang, J., Sheehan, M., Brookman, H. and Timko, M.P. 2000. Characterization of cDNAs differentially expressed in roots of tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. *Burley 21*) during the early stages of alkaloid biosynthesis. *Plant Sci.* 158: 19–32.
- Wang, G.L., Song, W.Y., Ruan, D.L., Sideris, S. and Ronald, P.C. 1996 The closed gene, *Xa21*, confers resistance to multiple *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates in transgenic plants. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 9: 850–855.
- Wang, H., Qi, M. and Cutler, A.J. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* 21: 4153–4154.
- Wang, H., Huang, Z., Chen, Q., Zhang, Z., Zhang, H., Wu, Y., Huang, D. and Huang, R. 2004. Ectopic overexpression of tomato *JERF3* in tobacco activates downstream gene expression and enhances salt tolerance. *Plant Mol. Biol.* 55: 183–192.
- Ward, E.R., Payne, G.B., Moyer, M.B., Williams, S.C., Dincher, S.S., Sharkey, K.C., Beck, J.J., Taylor, H.T., Ahl-Goy, P., Meins, F. Jr. and Ryals, J.A. 1991. Differential regulation of β -1,3-glucanase messenger RNAs in response to pathogen infection. *Plant Physiol.* 96: 390–397.
- Waterhouse, G.M. 1963. Key to the species of *Phytophthora*. de Bary. Mycol. Pap. 92.p. 22 Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Way, H.M., Kazan, K., Goulter, K.C., Birch, R.G. and Manners, J.M. 2000. Expression of the *Shpx2* peroxidase gene of *Stylosanthes humilis* in transgenic tobacco leads to enhanced resistance to *Phytophthora parasitica* pv. *nicotianae* and *Cercospora nicotianae*. *Mol. Plant Pathol.* 1: 223–232.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213–7218.
- White, J.J., Bruns, J., Lee, S.B. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungus ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols, A guide to methods and applications ed. By Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White,

- T.J. pp. 315–322. Academic press, San Diego, CA, USA.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inze, D. and Van Camp, W. 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *EMBO J.* 16: 4806–4816.
- Williams, J.G.K., Kubelic, A.R., Livak, K.J., Rafalski J.A. and Tingey S.R. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531–6535.
- Winton, L.M. and Hansen, E.M. 2001. Molecular diagnosis of *Phytophthora lateralis* in trees, water, and foliage baits using multiplex polymerase chain reaction. *Forest Pathology* 31: 275–283.
- Wu, K.L., Guo, Z.J., Wang, H.H. and Li, J. 2005. The *WRKY* family of transcription factors in rice and Arabidopsis and their origins. *DNA Res.* 12: 9–26.
- Yalpani, N., Enyedi, A.J. and Raskin, I. 1994. Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta* 193: 372–376.
- Yang, Y., Li, R. and Qi, M. 2000. In vivo analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *Plant J.* 22: 543–551.
- Yang, Y., Shah, J. and Klessig, D.F. 1997. Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* 11: 1621–1639.
- Yanhui, C., Xiaoyuan, Y., Kun, H., Meihua, L., Jigang, L., Zhaofeng, G., Zhiqiang, L., Yunfei, Z., Xiaoxiao, W., Xiaoming, Q., Yunping, S., Li, Z., Xiaohui, D., Jingchu, L., Xing-Wang, D., Zhangliang, C., Hongya, G. and Li-Jia, Q. 2006. The *MYB* transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice *MYB* family. *Plant Mol Biol.* 60(1): 107–24.
- Yi, S.Y., Kim, J.H., Joung, Y.H., Lee, S., Kim, W.T., Yu, S.H. and Choi, D. 2004. The pepper transcription factor *capfl* confers pathogen and freezing tolerance in Arabidopsis. *PlantPhysiol.* 136: 2862–2874.
- Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G.K., Li, S., Liu, B., Deng, Y., Dai, L., Zhou, Y., Zhang, X., Cao, M., Liu, J., Sun, J., Tang, J., Chen, Y., Huang, X., Lin, W., Ye, C., Tong, W., Cong, L., et al., 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp.

indica). Science 296: 79–92

- Zeze, A., Hosny, M., Gianinazzi–Pearson, V. and Dullieu, H. 1996. Characterization of a highly repeated DNA sequence (SCI) from the arbuscular mycorrhizal fungus *Scutellospora castanea* and its detection in planta. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2443–2448.
- Zhang, H.X. and Blumwald, E. 2001. Transgenic salt–tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. Nat. Biotechnol. 19: 765–768.
- Zhou, J., Tang, X. and Martin, G.B. 1997. The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis–element of pathogenesis–related genes. EMBO J. 16: 3207–3218.
- Zhu, B., Chen, T.H.H. and Li, P.H. 1993. Expression of an ABA–responsive osmotin like gene during the induction of freezing tolerance in *Solanum commersonii*. Plant Mol. Biol. 21: 729–375.
- Zhu, B., Chen, T.H.H. and Li, P.H. 1995. Expression of three osmotin–like protein genes in response to osmotic stress and fungal infection in potato. Plant Mol. Biol. 28: 17–26.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.