

최 중
연구보고서

호접란 병해충 (달팽이류 및 잿빛곰팡이병) 방제를 위한
저항성 유전자 선발 및 형질전환체 개발에 관한 연구

Cloning of resistant genes against pest and
gray mold disease, and development transgenic
Phalaenopsis orchid plants using the genes

연구기관
동아대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “호접란 병해충 (달팽이류 및 잿빛곰팡이병) 방제를 위한 저항성 유전자 선발 및 형질전환체 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 7 월 14 일

주관 연구 기관명 : 동아대학교
총괄 연구 책임자 : 손 홍 대
제1세부 연구책임자 : 손 홍 대
제2세부 연구책임자 : 김 도 훈
연구원 : 박 남 숙
연구원 : 계 중 정
연구원 : 최 용 수
연구원 : 김 보 연
연구원 : 전 은 지
연구원 : 황 운 하
연구원 : 노 혜 선
연구원 : 오 숙 영

요 약 문

I. 제 목

호접란 병해충 (달팽이류 및 잿빛곰팡이병) 방제를 위한 저항성 유전자 선발 및 형질전환체 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

농가 고소득 수출 화훼작목으로 위치를 굳혀가고 있는 호접란은 매년 재배농가와 생산량 및 시장규모가 증대되고 있으나 호접란 재배의 가장 큰 문제점으로 대두되고 있는 것 중의 하나가 병해충으로, 달팽이류 해충과 곰팡이병에 의한 극심한 피해로 호접란의 상품화율을 낮추는 주된 원인이 되고 있고, 농가의 소득향상에 큰 걸림돌이 되고 있다.

호접란의 대표적 해충으로 달팽이류는 잎을 주로 가해함으로써 불규칙한 구멍을 만들고 가해부분을 시들게 하며, 기어다닌 자리에 점액질의 분비물이 남아 있어 광택을 띠는 얼룩을 남김으로 상품가치를 떨어뜨린다. 개화기에는 꽃을 가해하여 상품가치를 떨어뜨리므로 피해가 크다. 대부분의 난원에 발생하여 피해를 주며, 다습한 재배조건은 달팽이류의 발생에 좋은 조건이 된다. 난원은 재배 시설 특성 상 동일장소에서 연작되며, 재배사의 환경조건이 달팽이류 해충이 연중 발생할 수 있는 호조건을 제공하기 때문에 그 발생속도가 빠르고 피해가 급증하고 있는 실정이다.

특히 중요한 것은 달팽이류가 해충으로서 호접란의 발육특성상 가장 중요한 종묘시기인 여름에 대발생하여 호접란에 직접적인 가해 피해뿐만 아니라 기어 다닌 얼룩과 가해 상처에 의한 주요 병해인 곰팡이병과 세균병을 전염시키는 중요한 매개체로 작용한다는 것이다.

호접란 재배환경의 고온 다습한 조건은 식물병해 중 가장 피해규모가 큰 곰팡이병 발생의 최적조건으로 호접란 역시 곰팡이병에 의한 그 피해가 크다. 호접란의 재배시 주로 발생하는 병해로 모자이크병, 잿빛곰팡이병, 무름병 등으로 쉽게 전염된다.

식물의 경우 생명공학 기술의 발전으로 선진각국에서 비식용작목을 중심으로 병해충의 효율적 방제를 위한 병해충 저항성 유전자의 도입과 형질전환기술의 개발을 통한 저항성 신종 육성에 박차를 가하고 있으며, 그 시장규모도 증대되고 있는 실정이며 호접란의 종묘생산

은 조직배양에 의한 실생번식이 약 70%, 영양계번식으로 약 30%를 생산하고 있다. 호접란의 경우 세계시장 규모 등을 고려할 때, 형질전환에 의한 다양한 신품종육성이 기대되나, 아직 형질전환 기술이 체계적으로 확립되어 있지 않은 실정이다.

따라서 우리 나라의 호접란 재배 농가, 생산량 및 시장의 규모 등에 따른 달팽이류에 의한 피해 정도와 발생양상 및 병해 매개 그리고 화학적 방제의 문제점 등을 고려할 때, 본 과제에서 수행코자 하는 호접란의 형질전환 기술 개발에 따른 신품종 육성, 형질전환에 의한 달팽이류 해충 및 잿빛곰팡이병 방제 등 친환경적인 방제 기술 개발을 하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 호접란 재배시 큰 피해를 주는 달팽이류 및 잿빛곰팡이병 방제를 위한 저항성 유전자 선발 및 형질전환체 개발로 그 연구개발 내용 및 범위는 다음과 같다.

1. 병해충 (달팽이류 및 잿빛곰팡이병) 방제를 위한 저항성 유전자 선발
2. 병해충 (달팽이류 및 잿빛곰팡이병) 저항성 형질전환체의 개발

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 병해충 (달팽이류 및 잿빛곰팡이병) 방제를 위한 저항성 유전자 선발

가. cDNA 유전자은행 제작 및 저항성 유전자 선발

P. rufa, *A. germari*와 *A. ventricosus* 등의 cDNA 유전자은행을 제작하고 무작위로 선별한 cDNA 염기서열 결정하였다. *P. rufa*의 경우에는 모두 54개 그리고 *A. ventricosus*의 경우에는 385개의 클론에서 발현 유전자 코리표 (ESTs)를 생산할 수 있었다. *P. rufa* cDNA 유전자은행에서 독소 유전자를, *A. germari*로부터 키틴아제 유전자를 그리고 *A. ventricosus*의 cDNA 유전자은행으로부터 키틴아제 유전자를 선발하였다.

1) *P. rufa* 독소 유전자 (*PrNT*): cDNA 염기서열은 258 bp이고 85개의 아미노산으로 이루어져 있으며 GenBank database 상동성 검색에서 뱀 (*Naja kauthia*, *Naja sputatrix* 및 *Naja atra*) toxin 유전자와 높은 상동성을 보였다. *PrNT*는 8개의 Cystein 영역이 잘 보존되어 있었다. 그리고 *PrNT*의 genomic structure는 456 bp의 염기서열로 2개의 intron과 3

개의 exon으로 구성되어 있다.

2) *A. germari*로부터 키틴아제 유전자 (*AgChi*): cDNA의 염기서열은 390개의 아미노산으로 구성되며 키틴아제 family 18 active site에 잘 보존되어진 [LIVMFY]-[DN]-G-[LIVMF]-[DN]-[LIVMF]-[DN]-X-E의 active site를 가진다. *AgChi*의 genomic DNA의 구조는 2,894 bp의 염기서열로 6개의 exon과 5개의 intron으로 구성되어 있다.

3) *A. ventricosus*의 키틴아제 유전자 (*AvChit1*): *AvChit1*는 1,293 bp이고 431 개의 아미노산으로 구성되어 있으며 키틴아제 family 18에서 보이는 active site signature, [LIVMFY]-[DN]-G-[LIVMF]-[DN]-[LIVMF]-[DN]-X-E를 확인할 수 있다.

*AvChit1*의 예상되는 아미노산 서열과 지금까지 보고된 유사 키틴아제와의 계통도를 분석하였는데, 3개의 group으로 분류되었다. *AvChit1*는 serine/threonine과 키틴 결합 도메인이 결핍된 *Glossina morsitans morsitans*, *Lutzomyia longipalpis*, *Anopheles gambiae*, *Phaedon cochleariae* 그리고 *Drosophila melanogaster*와 같은 곤충 유래 키틴아제들과 같은 subgroup을 형성하였다. *AvChit1*은 *G. morsitans morsitans*의 키틴아제 및 human chitotriosidase와 43%가 일치하였으며, 같은 subgroup 내 다른 곤충 키틴아제들과 30-40%의 상동성을 보였다

나. 저항성 유전자 (*PrNT*, *AgChi* 및 *AvChit1*)의 발현 및 특성 분석

1) *P. rufa* 독소 유전자 (*PrNT*): Northern blot 분석의 결과에 의하면 *PrNT* 독소 유전자는 표피와 독샘 특이적으로 전사 및 발현되었다. 재조합 벡로로바이러스 AcNPV-*PrNT*를 제작하고 곤충세포 Sf9에 감염시켜 정제하였을 때, 분리 정제한 재조합 단백질을 15% SDS-PAGE를 실시한 결과, AcNPV-*PrNT*를 감염시킨 곤충세포에서만 약 14 kDa으로 나타났다.

2) *A. germari*로부터 키틴아제 유전자 (*AgChi*): Southern blot 분석에서 *AgChi*는 single copy로 나타났고, *AgChi* cDNA는 Sf9에 감염시킨 곤충세포주에서 46 kDa의 재조합 단백질로 발현되었으며, chitinase activity를 보였다. Tunicamycin을 처리하여 당이 부가되지 못하도록 하였을 때, 분자량은 작아 졌지만 chitinase activity에는 영향을 주지 않았다. Northern blot과 Western blot 분석에서 *AgChi*는 전장, 중장 그리고 후장 모두에서 발현되는 장 특이적인 유전자임을 알 수 있다.

3) *A. ventricosus*의 키틴아제 유전자 (*AvChit1*): Southern blot 분석 결과, *AvChit1*는 single copy로 존재하였고 Northern blot과 Western blot 분석에서 *AvChit1*는 지방체 특이

적으로 발현되는 것으로 나타났다. AvChit1를 가진 재조합 벡로바이러스를 Sf9에 감염시켰을 때, 약 61 kDa으로 나타났으며 0.1% glycol chitin을 함유한 SDS-PAGE에서 chitinase 활성을 측정하였다. 그리고 Tunicamycin을 처리하여 당 부가를 저해하였으나, 재조합 AvChit1는 여전히 chitinase activity를 가졌다. 이러한 현상은 당 부가 여부는 chitinase activity에 필요하지 않다는 것을 의미한다.

다. 활용 건의

본 연구, 병해충 저항성 유전자를 선발하는 과정에서 실험한 저항성 유전자의 하나인 거미 키틴아제 유전자 (*AgChit1*)의 염기서열을 분석하고 유전자를 발현하여 특성을 밝혀 국제 SCI 학술잡지 (Comparative Biochemistry and Physiology)에 게재하였으며, 뽕나무 하늘소 유충 유래 키틴아제 역시 국제 SCI 학술잡지 (European Journal of Entomology)에 투고 중에 있다.

2. 병해충 (달팽이류 및 잣빛곰팡이병) 저항성 형질전환체의 개발

가. 식물에서 곤충 유래 유전자의 발현 및 기능분석

거미 유래 키틴아제 유전자(*AvChi*) 및 반딧불이 유래 독소 유전자(*PrNT*)를 pCambia 1300 벡터에 클로닝 Arabidopsis에 infiltration 방법으로 형질전환한 후, hygromycin 50mg/L을 함유한 MS 배지에 2세대에 걸쳐 호모라인을 선발하였다. 곤충 유래 키틴아제와 독소 유전자 특이적 프라이머를 이용한 PCR 수행과 Southern blot 실험을 수행한 결과, 목적으로 하는 유전자가 형질전환체에 존재함을 확인하였다. Northern blot 실험을 수행하여, 곤충 유래 유전자인 독소 유전자가 식물체 내에서도 정상적으로 발현을 하는 것을 확인할 수 있었으며 외부 형질적 특성에는 야생형과 차이를 보이지 않았다. 키틴아제 유전자의 경우도 형질전환체 내에서 안정적인 발현 양상을 보였고 형질전환체의 생육 정도는 야생형 보다 형질전환체의 생육이 다소 좋은 것으로 나타났다. 곤충 유래 키틴아제 유전자가 도입된 애기장대 형질전환체의 키틴아제 효소의 활성을 측정한 결과, 키틴아제 효소활성이 높게 나타났으며, 야생형의 경우 키틴아제 활성을 보이지 않았다. Western blot 분석을 실시한 결과 야생형 애기장대에서는 밴드가 나타나지 않은 반면, 형질전환체 계통들에서는 밴드를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 곤충 유래 키틴아제 유전자가 식물에 도입되어 유전자의 전사과정과 번역과정이 정상적으로 이루어져 목적으로 하는 곤충 유래 키틴아제 단백질이 만들어진 것으로 생각되며, 곤충 유래 유용 유전자를 식물에 도입하여 기

존 식물이 가지고 있지 않은 유용 형질의 도입이 가능할 것으로 생각된다. 곤충 유래 키틴아제 유전자가 도입된 형질전환체의 병저항성 정도를 검정하기 위해 *Botrytis cinerea*를 접종하고 과습 조건에서 병원균의 발병을 유도한 결과 야생형 비해 형질전환체가 저항성을 나타냈다. 이러한 연구결과로 보아 거미 유래 키틴아제 유전자를 이용하여 병저항성 형질전환 식물체의 육성이 가능할 것으로 생각된다.

나. 호접란 형질전환 시스템의 구축 및 형질전환체 개발

호접란의 형질전환을 위해 대량의 질적으로 우수한 PLB의 육성이 매우 필요하여, 이들 재료의 확보를 위해 우수한 PLB를 대량으로 증식시키기 위한 연구를 수행하였다. 하이포넥스 배지를 기본으로 하고, 몇 가지 첨가물에 대한 PLB 증식 정도를 조사하였다. 그 결과, 30g/L의 감자즙이 코코넛워터에 비해 PLB 증식에 효과적인 것으로 나타났고, 0.5g/l의 활성탄소양, 티아민 처리, 하이포넥스 (1g/L) 및 sucrose 20g/L를 사용하여 PLB 증식하고 호접란의 형질전환을 위해 화경에서 유도된 PLB를 증식시키면서 가장 상태가 좋은 것을 선발하여 사용하였다. 먼저, 호접란 PLB를 위쪽으로부터 1/3부위를 자르고, 목적으로 하는 유전자가 함유된 *Agrobacterium* 배양액을 철제 침에 묻혀 PLB를 침으로 찔러 상처 내는 deeping 처리를 하고 *Agrobacterium* 배양액과 PLB 절편을 공동 배양하여 *Agrobacterium*을 감염시켰다. Hygromycin이 함유된 PLB 증식 배지에 치상하여 형질전환된 PLB를 선발하였고, 새롭게 유도된 PLB를 shooting 배지에 옮겨 multishoot을 유도한 후 rooting 배지에 옮겨 재분화 개체를 확보하였다. 식물의 형질전환을 위해 주로 *Agrobacterium*을 매개체로 한 방법을 사용한다. *Agrobacterium*이 감염된 정도는 GUS assay를 통해 배양 과정에서 계속해서 동정하여 정상적으로 형질전환된 것을 선별하였다. 곤충 유래 키틴아제 유전자와 독소 유전자가 도입된 호접란의 선발을 위해 목적 유전자의 특이적인 프라이머를 작성하여 PCR을 수행한 결과, 키틴아제 유전자가 도입된 형질전환체로부터 1.3kb 크기의 밴드를 얻을 수 있었고, 독소 유전자가 도입된 형질전환 식물체로부터 약 300bp 크기의 밴드를 확인하였다.

다. 활용 건의

병충해 저항성 유전자로 형질전환 시키기 호접란의 최적 조건은 앞으로 호접란의 형질전환에 중요한 자료가 되며, 이는 곧 국제 SCI 학술잡지에 투고 예정이다. 그리고 최종 산물인 병충해 저항성 호접란의 형질전환 품종은 전문가와 함께 현장 실증시험을 거쳐 개발하고 특허 및 등록 후 현장 보급을 추진코자한다.

SUMMARY

I. Title

Cloning of resistant genes against pest and gray mold disease, and development of transgenic plants using the genes

II. Objectives and Significance of the Research

The objective of the present work is to develop the transgenic plants by the cloning of resistant genes against pest (snail) and gray mold disease (*Botrytis cinerea*).

The cultivation of Phalaenopsis orchid, which was one of the most important commercial varieties of flowering grass, has been increased rapidly, but pest (snails) and plant disease (*Botrytis cinerea*) are the two major problems in cultivation. One of the major pests of Phalaenopsis orchid is snail, which makes holes on the leaves, as a result, the plants withered up. The orchid is usually damaged during cultivation. In addition, gray mold, caused by *Botrytis cinerea*, is one of the most destructive Phalaenopsis orchid disease and is responsible for significant pre- and post-harvest yield loss.

For these serious problems, the best strategy to control the infection of snail and gray mold disease is the development of pest- and disease-resistant transgenic Phalaenopsis orchid plant. Thus, transgenic expression of resistant genes in plants is an appealing methodology for introducing resistance to pest and disease.

In this work, therefore, we have cloned the venom and chitinase genes and evaluated the effect of the transgenic expression of the genes on the protection of cultivar against snail and gray mold disease. Increased plant tolerance toward pest and fungal pathogen through the expression of heterologous genes whose products have resistant activity is a valuable alternative to produce the cultivars resistance to pest and disease. In conclusion, our results showed that the constitute expression of the venom and chitinase in transgenic plant is an effective strategy to provide protection against pest

and disease, facilitating the large-scale cultivation of Phalenopsis orchid plant.

III. Contents and Scope of the Research

The present work was performed to develop the transgenic orchid plants by the cloning of resistant genes against pest (snail) and gray mold disease (*Botrytis cinerea*). For this purpose, the novel pest- and gray mold disease-resistant genes that contain the venom gene from *Pyrocoelia rufa* and the chitinase genes from *Araneus ventricosus* and *Apriona germari* were introduced into plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. The introduced genes were expressed in transgenic plants. Finally, we have evaluated the effect of the transgenic expression of the genes on the resistance of transgenic plant against pest and disease.

This work are based on the following content and scope:

- 1) Cloning of resistant genes against pest and disease,
- 2) Development transgenic plants using the resistant genes and evaluation of the transgenic expression against pest and disease.

IV. Results of the Research and Suggestion for the Application

Part 1. Cloning of resistant genes against pest (snail) and gray mold disease (*Botrytis cinerea*)

1. Construction of cDNA libraries and cloning of resistant genes

Construction of cDNA libraries were prepared from the whole body of *Pyrocoelia rufa*, *Apriona germari* and *Araneus ventricosus*. Sequence analysis of randomly selected clones harboring cDNA inserts was performed to generate the ESTs of 58 clones from *P. rufa* and 385 clones from *A. ventricosus*. Of these ESTs, one exhibited similarity to the reported toxins and two did similarity to the known chitinases.

- 1) *P. rufa* PrNT cDNA: We have cloned cDNA encoding toxin from the firefly, *P.*

rufa. The 258 bp cDNA encodes for 54 amino acid residues. The deduced protein of *P. rufa* toxin gene contains the eight conserved cysteine residues. Alignment of the deduced protein of *P. rufa* toxin gene showed homology to venom toxins from *Naja kauthia*, *Naja sputatrix* and *Naja atra*. In genomic structure, The *PrNT* gene spans 456 bp and consists of two introns and three exons.

2) *A. germari AgChi* cDNA: A gut-specific chitinase gene was cloned from the mulberry longicorn beetle, *A. germari*. The *A. germari* chitinase (*AgChi*) gene spans 2,894 bp and consists of five introns and six exons coding for 390 amino acid residues. *AgChi* possesses the chitinase family 18 active site signature and two N-glycosylation sites.

3) *A. ventricosus AvChit1* cDNA: A fat body-specific chitinase cDNA was cloned from the spider, *A. ventricosus*. The cDNA encoding *A. ventricosus* chitinase (*AvChit1*) is 1,515 base pairs long with an open reading frame of 431 amino acid residues. *AvChit1* possesses the chitinase family 18 active site signature and one N-glycosylation site. The deduced amino acid sequence of *AvChit1* cDNA showed 43% identity to both *Glossina morsitans morsitans* chitinase and a human chitotriosidase, and 30-40% to some insect chitinases which lack both the serine/threonine and chitin binding domains.

2. Expression and characterization of resistant genes

1) *P. rufa PrNT*: Northern blot analysis revealed that *PrNT* gene is specially expressed in the epidermis and venom gland of *P. rufa* larvae. The recombinant *PrNT* with a molecular mass of 14 kDa was purified from the recombinant baculovirus (AcNPV-*PrNT*)-infected Sf9 cells. The purified recombinant baculovirus *PrNT* was identified as a single band of 46 kDa by SDS-PAGE and confirmed by Western blot analysis using the antibody of His-tag.

2) *A. germari AgChi*: Southern blot analysis of genomic DNA suggested that *AgChi* gene is a single copy gene. The *AgChi* cDNA was expressed as a 46-kDa polypeptide in baculovirus-infected insect Sf9 cells and the recombinant *AgChi* showed activity in the chitinase enzyme assay. Treatment of recombinant virus-infected Sf9 cells with tunicamycin, a specific inhibitor of N-linked glycosylation, revealed that

AgChi is N-glycosylated, but the carbohydrate moieties are not essential for chitinolytic activity. Northern and Western blot analyses showed that AgChi was specifically expressed in the gut; AgChi was expressed in three gut regions, indicating that the gut is the prime site for AgChi synthesis in *A. germari* larvae.

3) *A. ventricosus* AvChit1: Southern blot analysis of genomic DNA suggested the presence of *AvChit1* gene as a single copy. Northern and Western blot analysis and enzyme activity assay showed the tissue-specific expression of AvChit1 in the *A. ventricosus* fat body. The *AvChit1* cDNA was expressed as a 61-kDa polypeptide in baculovirus-infected insect Sf9 cells and the recombinant AvChit1 showed activity in the chitinase enzyme assay using 0.1% glycol chitin as a substrate. Treatment of recombinant virus-infected Sf9 cells with tunicamycin, a specific inhibitor of N-glycosylation, revealed that AvChit1 is N-glycosylated, but the carbohydrate moieties are not essential for chitinolytic activity.

3. Suggestion for the application

The Results of *A. ventricosus* chitinase (AvChit1) is published in SCI journal (Comparative Biochemistry and Physiology 2005). In addition, the Results of *A. geramri* chitinase (AgChi) is submitted in SCI journal (European Journal of Entomology). Genetic informations of *P. rufa*, *A. geramri* and *A. ventricosus* were identified from this study and they would be useful.

Part 2. Development transgenic plants using the genes against pest (snail) and gray mold disease (*Botrytis cinerea*)

1. Expression and characterization of resistant genes from insects and spider in plant

P. rufa toxin gene (*PrNT*) and *A. ventricosus* chitinase gene (*AvChi*) were transformed to *Arabidopsis* using infiltration method. After transformation, homoline was cultivated in MS plate containing hygromycin 50 mg/L for two generations. The transformations were screened by PCR using gene specific primers and Southern blot analysis. Northern blot analysis showed only the signal bands in transgenic plants transformed with *PrNT* and *AvChi* but not in control. The *Arabidopsis* transformed

with *PrNT* showed no difference compared to the control in rearing, but the *Arabidopsis* transformed with *AvChi* grew faster than control.

Western blot analysis showed the *AvChi* was expressed as a 61 kDa polypeptide in the transgenic plants using the antibody of the recombinant *AvChi* and transgenic plants transformed with *AvChi* showed activity in the chitinase enzyme assay using 0.1% glycol chitin as a substrate, suggesting that *AvChi* is well expressed in the transgenic plants.

Transgenic plants with *AvChi* gene was tested against *Botrytis cinerea* after infection, as a result, the transgenic *Arabidopsis* showed the resistance against *Botrytis cinerea*. For these results, it shows the possibility to use the *AvChi* gene from spider as a resistant gene against plant disease for a transgenic plant.

2. System construction and development of transgenic Phalaenopsis orchid plant

For development of transgenic Phalaenopsis orchid plant, PLBs of Phalaenopsis were maintained on hyponex medium supplemented with 30g/L of potato juice, 0.5g/L of activated charcoal, 200.5g/L of sucrose and thiamine. For the plant transformation, the selected PLBs were co-cultivated for 20 minutes with *Agrobacterium* which contains binary vector, pCAMBIA, harboring *PrNT* gene and *AvChi* gene. After transformation, they were transferred to the same medium described above with 200mg/L of carbenicillin. Newly-formed PLBs were put on medium supplemented with hygromycin. The transformations were screened by GUS assay, then they were confirmed by PCR with gene specific primers.

3. Suggestion for the application

The result of transgenic plant is ready to submit to SCI journal and we confirmed the system construction and development of transgenic plant. we expect that the transgenic plant may be useful for control of pests and gray mold disease.

CONTENTS

SUMMARY	8
CONTENTS	13
Chapter 1. Introduction	17
Chapter 2. Current situation and problems in domestic and foreign technology	21
Chapter 3. Research contents and results	24
Section 1. Introduction	24
Section 2. Cloning of resistant genes against pest and gray mold disease	25
1. Materials and methods	25
1) Collection of insects and spiders	25
2) Construction of cDNA libraries, nucleotide sequencing and EST analysis	25
3) Sequencing and data analysis of <i>PrNT</i> , <i>AgChi</i> and <i>AvChit1</i> cDNA	26
4) Expression and characterization of <i>PrNT</i> , <i>AgChi</i> and <i>AvChit1</i> cDNA	27
i. Northern blot analysis	27
ii. Genomic structure analysis	27
iii. Southern blot analysis	28
iv. Cell culture and expression in baculovirus-infected insect cells	28
v. Prepare polyclonal antibody and Western blot analysis	29
vi. Determination of chitinase activity	30
vii. Tunicamycin treatment	30
2. Results and discussion	30
1) Construction of cDNA libraries, nucleotide sequencing and EST analysis	30
2) Characterization of <i>P. rufa</i> toxin	43
i. Cloning and sequencing of <i>PrNT</i> cDNA	43
ii. Genomic structure analysis of <i>PrNT</i>	44
iii. Tissue-specific expression of <i>PrNT</i>	45

iv. Expression of PrNT in baculovirus-infected insect cells	45
3) Chacterization of <i>A. germari</i> chitinase	47
i . Cloning and sequencing of <i>AgChi</i> cDNA	47
ii. Expression of the <i>AgChi</i> in baculovirus-infected insect cells	47
iii. N-glycosylation of recombinant <i>AgChi</i>	51
vi. Tissue distribution of <i>AgChi</i>	53
4) <i>A. ventricosus</i> chitinase	55
i . Cloning and sequencing of <i>AvChit1</i> cDNA	55
ii. Tissue-specific expression of <i>AvChit1</i>	59
iii. Copy number of <i>AvChit1</i> gene	59
vi. Expression of the <i>AvChit1</i> in baculovirus-infected insect cells	62
v . N-glycosylation of recombinant <i>AvChit1</i>	62
Section 3. Development transgenic plants using the genes against pest and gray mold disease	65
1. Methods, Results and Discussion	65
1) Expression and charaterization of resistant genes from insects and spider in plant	65
2) System construction and development of transgenic Phalaenopsis orchid plant	74
Chapter 4. Accomplishment and contribution	89
Chapter 5. Application scheme of the research	91
Chapter 6. Information of foreign technology	92
Chapter 7. References	94

목 차

제 1 장 연구개발 과제의 개요	17
제 2 장 국내·외 기술 개발 현황	21
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	24
제 1 절 서론	24
제 2 절 병해충 (달팽이류 및 잣빛곰팡이병) 방제를 위한 저항성 유전자 선발	25
1. 재료 및 방법	25
가. 곤충 (반딧불이 유충과 뽕나무하늘소 유충) 및 거미류 시료 채집	25
나. cDNA 유전자은행 제작 및 유전자 발현 꼬리표 (ESTs) 작성	25
다. 독소 유전자 및 키틴아제 유전자의 클로닝 및 구조 분석	26
라. 독소 유전자 및 키틴아제 유전자의 발현 및 특성 분석	27
1) Total RNA 분리와 Northern blot 분석	27
2) Genomic DNA의 분석	27
3) Genomic DNA 분리 및 Southern blot 분석	28
4) 곤충세포배양 및 재조합 바이러스 제작	28
5) Polyclonal antibody 제작 및 Western blot 분석	29
6) 키틴아제 활성 측정	30
7) Tunicamycin 처리	30
2. 결과 및 고찰	30
가. cDNA 유전자은행 제작 및 유전자 발현 꼬리표 (ESTs) 작성	30
나. <i>P. rufa</i> 독소 유전자의 특성 분석	43
1) 독소 유전자의 클로닝 및 구조 분석	43
2) <i>P. rufa</i> 독소 유전자의 genomic DNA 구조 분석	44
3) <i>P. rufa</i> 독소 유전자의 발현 및 특성 분석	45
4) <i>P. rufa</i> 독소 유전자의 재조합 벡로바이러스 제작 및 발현	45
다. <i>A. germari</i> 키틴아제 AgChi의 특성 분석	47
1) AgChi의 클로닝 및 염기서열 분석	47
2) 재조합 벡로바이러스를 이용한 AgChi 유전자의 발현	47

3) 재조합 단백질 AgChi의 당쇄부가	51
4) AgChi의 조직 특이적 발현	53
라. <i>A. ventricosus</i> chitinase의 특성 분석	55
1) <i>AvChit1</i> cDNA의 클로닝 및 염기서열 분석	55
2) <i>AvChit1</i> 의 조직 특이적 발현	59
3) <i>AvChit1</i> 유전자의 copy number 분석	59
4) 벡로바이러스를 이용한 <i>AvChit1</i> 유전자의 발현	62
5) 재조합 단백질 AcChit1의 당쇄부가	62
제 3 절 병해충 (달팽이류 및 잣빛곰팡이병) 저항성 형질전환체의 개발	65
1. 방법, 결과 및 고찰	65
가. 식물에서 곤충 유래 유전자의 발현 및 기능분석	65
나. 호접란 형질전환 시스템의 구축 및 형질전환체 개발	74
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	89
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	91
제 6 장 연구개발과정 중에 수집한 해외과학 기술 정보	92
제 7 장 참고문헌	94

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적과 필요성

1. 기술적 측면

농가 고소득 수출 화훼작목으로 위치를 굳혀가고 있는 호접란은 매년 재배농가와 생산량 및 시장규모가 증대되고 있다. 연간 입식되는 종묘는 약 천만본으로 추정되며, 묘를 입식하여 상품화되기까지는 대개 1년 2개월에서 6개월 정도이면 출하하는데 상품화율은 그리 높지 않다. 개화주 유통은 연간 300만주로 추정된다. 2000년도 호접란의 수출현황은 333,000본으로 집계되었다. 그러나 호접란 재배의 가장 큰 문제점으로 대두되고 있는 것 중의 하나가 병해충으로, 달팽이류 해충과 곰팡이병에 의한 극심한 피해로 호접란의 상품화율을 낮추는 주된 원인이 되고 있고, 농가의 소득향상에 큰 걸림돌이 되고 있다.

호접란의 대표적 해충으로 달팽이류는 잎을 주로 가해함으로써 불규칙한 구멍을 만들고 가해부분을 시들게 하며, 기어다닌 자리에 점액질의 분비물이 남아 있어 광택을 띠는 얼룩을 남김으로 상품가치를 떨어뜨린다. 개화기에는 꽃을 가해하여 상품가치를 떨어뜨리므로 피해가 크다. 대부분의 난원에 발생하여 피해를 주며, 다습한 재배조건은 달팽이류의 발생에 좋은 조건이 된다. 난원은 재배 시설 특성 상 동일장소에서 연작되며, 재배사의 환경조건이 달팽이류 해충이 연중 발생할 수 있는 호조건을 제공하기 때문에 그 발생속도가 빠르고 피해가 급증하고 있는 실정이다.

특히 중요한 것은 달팽이류가 해충으로서 호접란의 발육특성상 가장 중요한 중묘시기인 여름에 대발생하여 호접란에 직접적인 가해 피해뿐만 아니라 기어다닌 얼룩과 가해 상처에 의한 주요 병해인 곰팡이병과 세균병을 전염시키는 중요한 매개체로 작용한다는 것이다. 그러나 호접란 재배시 항상 발생하는 달팽이류 해충에 대한 현재 방제대책으로, 카바메이트계 살충제가 시판되고 있다. 그러나 실제 난재배 농가에서는 주로 일본제품인 달팽이 방제제(나메톨)를 수입하여 사용하고 있는 실정이다. 또 재배 농가 현장에서는 거의 수작업에 의한 달팽이류 퇴치로 많은 노동력 손실을 감수하고 있는 실정이다.

호접란 재배환경의 고온 다습한 조건은 식물병해 중 가장 피해규모가 큰 곰팡이병 발생의 최적조건으로 호접란 역시 곰팡이병에 의한 그 피해가 크다. 호접란의 재배시 주로 발생하는

병해로 모자이크병, 잿빛곰팡이병, 무름병 등으로 쉽게 전염된다. 그 중 가장 문제가 되고 재배환경상 다발생하는 잿빛곰팡이병의 방제로 발생초기에 지오관수화제, 만코지 등이 살포되고 있으나 꽃에 살포되는 경우 약해 우려가 있으므로 주의가 요구되어지고 있는 실정이다.

식물의 경우 생명공학 기술의 발전으로 선진각국에서 비식용작목을 중심으로 병해충의 효율적 방제를 위한 병해충 저항성 유전자의 도입과 형질전환기술의 개발을 통한 저항성 신품종 육성에 박차를 가하고 있으며, 그 시장규모도 증대되고 있는 실정이며 호접란의 종묘생산은 조직배양에 의한 실생번식이 약 70%, 영양계번식으로 약 30%를 생산하고 있다. 호접란의 경우 세계시장 규모 등을 고려할 때, 형질전환에 의한 다양한 신품종육성이 기대되나, 아직 형질전환 기술이 체계적으로 확립되어 있지 않은 실정이다.

따라서 우리 나라의 호접란 재배 농가, 생산량 및 시장의 규모 등에 따른 달팽이류에 의한 피해 정도와 발생양상 및 병해 매개 그리고 화학적 방제의 문제점 등을 고려할 때, 본 과제에서 수행코자 하는 호접란의 형질전환 기술 개발에 따른 신품종 육성, 형질전환에 의한 달팽이류 해충 및 잿빛곰팡이병 방제 등 친환경친화적인 방제 기술 개발이 급선무이다.

2. 경제·산업적 측면

수출용 화훼작목으로 잘 알려진 호접란은 농가 고소득 작목이며 수출 유망작목으로도 충분한 경쟁력을 갖고 있어 주목받고 있다. 호접란의 세계시장 규모는 심비디움과 함께 중요한 화종으로 주생산국은 우리나라를 비롯하여 대만, 태국, 중국이며, 주로 일본, 화란, 미국 등으로 수출되고 있다. 주수입국의 연간 소요량은 미국 1억본 (12억 달러), 일본 3천본 (4억 달러) 등이다. 미국의 호접란 시장의 경우 통계수치로 실체는 3배를 예측하고 있다.

이러한 규모로 볼 때, 한국의 호접란 재배는 약 5백만본으로 충분한 시장규모와 발전 가능성 및 경쟁성을 가지고 있다. 호접란 재배지에서 병해충의 효율적인 방제로 생산량의 증대가 요구되어진다. 수출 중요시기에 병해충의 발생 및 피해는 경제·산업적 손실로 친환경친화적인 방제 기술 및 신품종육성 기술 개발은 당연한 시급과제라 여겨진다.

호접란의 경우 미국은 대부분 종묘 (즉 잎이 4매 정도인 중요시기) 형태로 수입하여 현지에서 개화분으로 육성 판매되고 있다. 이는 미농무성법에 의하면 미국에서 일정기간 (1년) 재배 식물만이 판매가 가능하도록 하였기 때문이다. 또 미국에 수출하는 대만, 태국에서 생산된 묘보다 한국 생산 묘가 높이 평가되고 있다. 이러한 점은 수출 증대의 가능성을 밝게 하고 있으며, 종묘의 안정적인 대량생산은 수출농업산업의 발전과 농가의 경제적 이득으로 직결된다고 할 수 있다.

제주도의 경우 화훼류 중 수출 유망품목으로 급부상 중인 호접란을 지역특화 사업으로 호접란 수출단지 조성 계획을 추진 중에 있다. 즉 제주도에 호접란 수출단지를 조성하고 중묘(개화직전 상태)로 미국에 수송하여 현지 농장에서 개화한 후 판매하는 체제를 구축하기 위하여 미국에 현지농장 3,000평 설립을 추진 중에 있다고 보고되고 있다.

3. 사회·문화적 측면

관상용인 호접란은 양란 중 심비디움과 함께 중요한 화종으로 선호도가 높다. 특히 최대의 수출국인 미국의 경우 꽃 수요가 장미, 백합 등 절화류에서 호접란으로 그 기호도가 변하고 있다.

호접란은 시장 규모와 고소득 추천 작목으로 매년 증가 일로로 단지화되고 있으며, 시설재배 특성 상 연작으로 인해 재배농가 현장에서 달팽이류, 잿빛곰팡이병 등의 피해 호소에 대한 대책과 영농지도책이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

또한 난 가치와 상품성의 제고를 위해 재배농가 현장에서 생명공학 기술을 이용한 신품종의 육성 요구가 계속적으로 증대되고 있다.

최근 환경문제에 대한 관심 고조로 환경친화적 또는 환경농업이 범세계적 추세이기 때문에 환경친화적 지속 농업 기술 개발은 안정된 농업 기반 조성에 따른 농촌경제와 고용증대뿐만 아니라 수출농업 육성에 따른 국가경쟁력 확보에도 중요한 역할을 할 것이다.

또 식물생명공학 기술의 발달에 따른 신품종 육성은 범세계적인 추세이며, 형질전환 기술 개발에 따른 신품종 특허 및 등록은 국가 농업유전자원의 확보 및 선점이라는 관점에서 시급한 국가적 과제라고 볼 수 있다.

제 2 절 연구개발 내용 및 범위

1. 최종 연구 목표

호접란 병해충 (달팽이류 및 잿빛곰팡이병) 방제를 위한 저항성 유전자 선발 및 형질전환체 개발

- 병해충 (달팽이류 및 잿빛곰팡이병) 방제를 위한 저항성 유전자 선발
- 병해충 (달팽이류 및 잿빛곰팡이병) 저항성 형질전환체의 개발

2. 연차별 연구개발 내용 및 범위

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> · 달팽이류 및 잭빛곰팡이병 방제를 위한 독소 및 키틴아제 유전자 선발 · 형질전환 기술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 달팽이류 및 잭빛곰팡이병 방제를 위한 늦반딧불이 유래 독소 유전자 및 거미 유래 키틴아제 유전자의 탐색 및 구조 분석 · 늦반딧불이 유충 cDNA 유전자은행 제작 및 유전자 발현 꼬리표 (ESTs) 작성 · 독소 관련 유전자 클로닝 및 구조 분석 · 독소 관련 유전자의 발현 및 특성 분석 · 거미 cDNA 유전자은행 제작 및 유전자 발현 꼬리표 (ESTs) 작성 · 키틴아제 유전자 클로닝 및 구조 분석 - 초록색 형광단백질 유전자를 이용한 형질전환 기술 개발 · 초록색 형광 단백질 발현 벡터 제작 · Agrobacterium을 이용한 형질전환 시스템의 확립 · 형질전환용 벡터의 제조 · 형질전환용 배지의 선발
2차 년도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> · 달팽이류 및 잭빛곰팡이병 방제를 위한 독소 및 키틴아제 유전자의 발현 및 생물검정 · 달팽이류 방제를 위한 저항성 형질전환체 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 달팽이류 및 잭빛곰팡이병 방제를 위한 독소 유전자 및 키틴아제 유전자의 발현 및 생물검정 · 재조합 독소의 생물검정 · 키틴아제 유전자의 발현 및 특성 분석 · 재조합 키틴아제의 생물 검정 - 늦반딧불이 유래 독소 유전자를 이용한 식물의 형질전환 · 달팽이류 방제를 위한 저항성 유전자가 도입된 식물 형질전환체의 개발 · 형질전환체의 독소 단백질 생산 여부 확인 · 형질전환체 선발을 위한 GUS 분석
3차 년도 (2005)	<ul style="list-style-type: none"> · 병해충 (달팽이류 및 잭빛곰팡이병) 방제효과 검정 · 곰팡이병 방제를 위한 저항성 형질전환체의 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 독소 유전자 도입된 형질전환체의 달팽이류 방제효과 검정 · 독소 발현 수준 분석 · 달팽이 방제 효과 검정 - 거미 유래 키틴아제 유전자가 도입된 형질전환체의 잭빛곰팡이병 방제효과 검정 · 키틴아제 발현 수준 분석 · 잭빛곰팡이병 방제 효과 검정 - 거미 유래 키틴아제 유전자를 이용한 형질전환체의 육성 - 잭빛곰팡이병 방제를 위한 저항성 형질전환체의 개발 - 저항성 유전자를 대량 발현하고 있는 형질전환체의 선발 - 저항성 유전자의 발현 수준 분석 - 저항성 유전자 산물의 활성 분석

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

국내 농업 관련 연구기관인 농업과학기술원, 원예시험장, 각도 진흥원, 화훼시험장 등을 중심으로 호접란 관련 조직배양, 배양 생리, 개화기 조절, 재배 생력화 및 연중생산 기술 등에 관한 많은 연구가 진행되고 있으며, 수출 증진에 박차를 가하고 있다.

농림기술 개발 사업으로는 화훼 (온시디움, 호접)의 생산기술 향상 및 저비용 상토 개발 등이 수행되었으나 수출 증대 작목인 호접란의 규모와 중요성에 비해, 호접란의 생산량과 병해의 매개체로서 주요한 문제요인이 되고 있는 달팽이류 해충 및 잿빛곰팡이병의 방제에 대한 연구는 미흡하며, 품질이 우수한 호접란의 안정적인 대량생산을 위해서는 이들 병해충에 저항성을 가지는 신품종의 개발이 시급한 과제이다. 이러한 문제는 생명공학 기술을 이용한 저항성 유전자의 발굴 및 형질전환 기술의 확립으로 해결의 가능성을 찾을 수 있을 것으로 생각된다. 또한 저항성 품종을 이용한 병해충의 친환경친화적 방제 기술 개발로 농업환경의 오염을 현저히 경감시킬 수 있을 것으로 여겨진다.

현재 국내 농약회사에서 호접란의 병방제 약제와 달팽이류 방제 약제가 시판되고 있으며, 달팽이류 방제 약제는 일본에서 개별적으로 수입하여 주로 사용하고 있는 것으로 조사되었는데 실제 경남 김해지역을 중심으로 조사한 결과, 재배현장에서 큰 문제점으로 병 및 달팽이류 피해 묘는 선발하여 시설재배사 밖에 어떤 조치도 없이 단순히 폐기하는 것으로 조사되었다. 이는 특히 병 발생 묘의 경우 2차 감염의 문제가 야기된다. 또 피해 묘의 폐기분을 보충하기 위하여 또 다시 조직배양 작업을 반복적으로 수행하고 있어 노동력의 큰 손실과 아울러 경제적 손실로 이어지고 있었다. 또한 화훼 중 난의 특성 상 상품성의 제고를 위해 재배농가 현장에서 생명공학 기술의 발전에 따른 신품종의 요구가 계속적으로 증대되고 있으나, 아직 그 해결책은 없는 실정이다.

본 연구진은 이미 경남 김해지역의 난 재배농가의 현장 지도를 주기적으로 수행하면서 현장의 문제점을 파악하고자 하였다.

그 중의 대표적 사례로 생명공학 기술 (형질전환 기술)을 이용한 신품종 호접란의 육성을 들 수 있다. 호접란의 경우 대표적 수출용 관상용 화훼작목으로 잎과 꽃의 질이 곧 상

품성의 제고로 이어진다. 따라서 잎과 꽃의 변형 및 색상의 조절 기술 개발이 현장에서 가장 요구되어졌다. 또한 시설재배 및 호접란의 재배 특성상 달팽이류 해충의 방제와 잿빛곰팡이병 방제 기술의 요구 역시 계속되었다.

그러나 호접란의 경우 조직배양 기술은 보편화되어 있으나 형질전환 기술은 아직 체계적으로 확립되어 있지 않다. 따라서 본 연구진은 신품종 호접란 개발을 위한 형질전환 기술의 체계적인 구축이 급선무라 여겨져 현재 기초적인 연구를 수행하고 있는 상태이다.

중묘 재배과정의 문제점으로 지적되고 있는 병해충으로 달팽이류와 잿빛곰팡이 등의 방제를 위해 달팽이류에 독성을 보이는 살충성 유전자와 곰팡이병 방제를 위해 이미 시도되고 있는 키틴아제 효소 유전자를 도입한 형질전환 호접란 제작이 노동력 등의 경제성을 고려할 때, 가장 효율적으로 판단되었다.

따라서 육서 달팽이류를 먹이로 하는 늦반딧불이 유충으로부터 관련 독소 유전자를 찾기 위하여 유전자는행을 제작하여 탐색을 수행하고 있다. 늦반딧불이로부터 달팽이 방제용 독소 유전자 탐색용 기주로 선택한 이유는, 늦반딧불이 유충은 반딧불이 중 충체가 큰 종류로 달팽이류를 포식할 때 날카로운 턱을 이용하여 달팽이류를 물게 되는데 이때 그 턱의 관을 통하여 아직 정확하게 구멍되지는 않았지만 독소가 분비됨으로 달팽이는 바로 마비되어 죽게되는 것으로 본 연구진의 기초연구에서 밝혀졌기 때문이다.

또한 곰팡이병 방제로 곰팡이의 키틴질을 분해함으로써 감염을 방지하고자 하는 방법의 하나로 거미에서 키틴아제 효소 유전자를 탐색하기 위하여 현재 유전자는행을 제작하여 수행 중에 있다. 거미는 곤충 포식성 절지동물로 포식과정에서 강력한 키틴아제 효소를 분비하는 것으로 알려져 있다. 이러한 유전자 탐색과 호접란으로의 도입은 효과적인 달팽이 및 곰팡이병 방제가 가능할 것으로 여겨진다.

현재까지 본 연구진에 의해 연구 및 현장 조사된 결과를 종합할 때, 달팽이류 해충 및 곰팡이병은 호접란의 발육 및 재배 특성 상 중요한 시기인 중묘 재배시기에 대발생하며, 개화시기 등 연중발생하여 호접란에 직접적인 큰 피해를 가하고 있다. 따라서 달팽이류와 곰팡이병에 방제효과가 있는 유전자 탐색과 호접란으로의 도입은 상품가치의 제고, 노동력 절감, 안정적인 대량생산 등 경제적 이득으로 직결되는 새로운 친환경적인 방제법이라고 할 수 있다.

그 개발코자하는 호접란 병해충 (달팽이류 및 곰팡이병) 방제를 위한 저항성 유전자 선발, 형질전환 기술에 의한 저항성 품종 육성 및 방제효과 실증시험 등의 친환경친화적 방제법 개발은 호접란의 신품종 육성에도 필수적인 기술로 체계적인 기술 구축이 바람직하게 여겨진다.

제 2 절 앞으로의 전망

관상용 호접란의 경우 수출과 소비량의 증대와 함께 대규모화 및 기업농화 추세로 발전되고 있는 실정이다. 이러한 결과로 대두되는 문제점으로는 시설재배지내의 연작화와 단지화에 따른 병해충 발생의 심각한 피해가 계속될 것이다.

특히 우리나라 수출 유망 화훼류인 호접란은 재배시설 및 발육 시기 등의 특성상 그리고 병해충의 특성과 대발생 시기 등이 겹침으로 그 피해정도가 심하다. 따라서 본 과제의 호접란 병해충 방제의 친환경친화적 기술 개발은 안정적인 그리고 고품질의 호접란 생산과 신품종 육성에 따른 국제경쟁력 확보로 지속적인 수출증대가 충분히 가능할 것으로 전망된다.

제 3 절 기술도입의 타당성

환경친화적 기술 개발 및 식물생명공학 기술을 이용한 신품종 육성은 범세계적인 추세이나 아직까지 국내·외적으로 호접란의 병해충의 방제를 위한 관련 유전자 도입 기술 및 신품종 육성 기술은 아직 수립되어 있지 않다.

따라서 이러한 생명공학 기술을 이용한 호접란의 친환경친화적 방제 기술 및 신품종 육성 기술 개발은 오히려 호접란 주요 생산국인 대만, 태국, 중국 등에 기술 수출이 충분히 가능할 것으로 기대된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 서론

우리나라에서 호접란을 포함한 양란을 본격적으로 도입하게 된 1990년대 초반부터 국내 재배면적은 지속적으로 증가해 왔고, 수출규모도 많은 성장을 했다. 그 동안 양란 국내 유통량의 대부분은 일본, 태국, 필리핀 등 몇몇 나라에서 거의 전량 수입해야하는 실정이었으나 최근에 와서는 유묘의 생산 및 개화주의 재배뿐만 아니라 유통, 소비분야에 활기를 띠고 있으며, 중국과 미국 등 주요 양란 소비국에 한국양란업체가 진출하여 활발한 활동을 전개하고 있다.

제 1 기 (초기단계: 1990년대 초): 호접란이 한국에 처음 소개되었으며, 한국의 한 수입업체가 수출하고 현지에서 직접 판매까지 하였으며, 품질의 기준이나 품종 구분이 필요하지 않았을 정도로 수출에 큰 어려움이 없었던 시기이다. 제 2 기 (접근기: '98-'00): 본격적으로 농협조직이나 경매장이 수출을 도모하는 시기로 수출을 목적으로 하는 농가가 나타나기 시작하였다. 수출용인 경우, 동일 품종 및 품질임에도 불구하고 내수용에 비해 상당히 높은 수출가격이 책정되었으며, 소수 수집상들이 수출, 수입을 대리하여 수거하면서 농가와 수입상의 창구역할을 하였다. 이로 인해 품질에 대한 기준이 주관적인 경우도 있었는데, 이는 현재도 심각한 문제점으로 지적되고 있다. 제 3 기 (호황기: '01-현재): 엄격하게 품종과 품질이 중국시장에서 평가되고 가격의 편차가 발생하였으며, 한국산 양란이 중국시장에서 최대 활황을 누리기 시작했다. 품종별 유행과 인기도에 따라 가격이 책정되고 지역별로 시장의 특성이 서서히 부각되었으며, 이와 더불어 이러한 호황기 속에서 한국산 양란의 문제점이 드러나기 시작하였다.

호접란의 세계 시장 규모는 북미 5억불, 아시아 3억불, 유럽 4억불 정도이며 매년 크게 증가하고 있다. 이러한 호황기 속에서도 호접란의 피해 상황이 계속해서 보고되고 있는데, 호접란 재배 농가 37개 농가 중 7개 농가에서 유묘의 잎이 위축되고 뒤틀리며 기형으로 변하는 피해가 발생하였는데, 이는 호접란 유묘에서 새잎이 전개되지 못하고 기형으로 변하는 현상으로 나타났으며 원인은 호접란 뿌리에 암갈색 곰팡이가 발생하여 뿌리썩음병을 일으키고 있다. 주로 20~33℃에서 병원균 생육이 가장 왕성하고 다습한 환경에서 병이 급진적으로 발생하는 대표적인 병해이다. 그리고 호접란의 수확기인 여름철에 달팽이에 의

한 잎에 구멍을 내어 결국 잎이 말라죽는 현상이 나타나고 있으며, 달팽이가 기어 다닌 곳에는 달팽이로부터 나온 점액성 물질에 의한 상품가치 저하를 초래하였다. 호접란의 재배 환경이 달팽이가 나오는 여름철에 집중되고 있고 다습한 환경으로 인한 곰팡이 병이 계속해서 초래되고 있다.

따라서 본 연구진은 국내 호접란 재배지에서 흔히 발생하는 달팽이와 곰팡이에 의한 피해에 대한 저항성을 가지는 형질전환 호접란을 개발하고자 하였다. 본 개발 기술은 달팽이의 천적인 늦반딧불이의 독소 유전자와 곰팡이를 분해하는 키틴아제 유전자를 확보하여 이 유전자들을 호접란에 형질전환시켜 병해충 저항성 호접란을 개발하고자 하였다.

제 2 절 병해충 (달팽이류 및 잿빛곰팡이병) 방제를 위한 저항성 유전자 선발

1. 재료 및 방법

가. 곤충 (반딧불이 유충과 뽕나무하늘소 유충) 및 거미류 시료 채집

곤충 및 거미로부터 병해충 방제를 위한 저항성 유전자를 선별하기 위하여 육서 달팽이를 먹이로하는 늦반딧불이(*Pyrocoelia rufa*) 유충을 경남, 밀양등지에서 채집하였으며, 곰팡이병 방제로 키틴아제 효소 유전자를 탐색하기 위하여 뽕나무하늘소(*Apriona germari*) 유충과 산왕거미(*Araneus ventricosus*)가 많이 서식하는 진주 그리고 고성에서 각각을 채집하였다. 채집된 시료들은 유전자 확보를 위한 cDNA 유전자은행 제작에 사용하였다.

나. cDNA 유전자은행 제작 및 유전자 발현 꼬리표 (ESTs) 작성

본 연구에 사용된 곤충 및 거미는 cDNA 유전자은행을 제작하기 위하여 유발에 마취하여 SV total RNA Isolation System (Promega Co.)을 이용하여 total RNA를 분리하였다. total RNA의 농도를 측정하여 500 μ g 정도를 모으고 poly(A) Quick mRNA Isolation Kit (Stratagene Co.)를 이용하여 oligo(dT)-셀룰로오스 크로마토그래피에 의해 mRNA를 분리

한 후 역시 농도를 측정하여 5 μ g의 mRNA를 cDNA 유전자은행 제작에 사용하였다. cDNA 유전자은행 제작을 위해 Stratagene사 (CA, U.S.A)의 Uni-ZAP XR Vector Kit와 Packaging Extract를 사용하였는데, 먼저 poly A+ RNA로부터 *Xho*I linker primer와 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 평탄말단으로 만들었다. 그리고 제한효소 *Eco*RI adaptor를 부착시킨 후 제한효소 *Xho*I으로 절단하고 size fractionation을 거쳐 적당한 크기의 단편만을 취하였다. 이러한 cDNA를 Uni-ZAP XR vector에 삽입시켜 bacteriophage 상태가 되도록 coat protein으로 packaging하여 cDNA 유전자은행을 제작하고 기주세포(XL1-blue MFR' strain)내에 감염시킨 후 cDNA 농도를 적정하고 이를 적당한 농도로 증폭하여 본 실험에 사용하였다. 이렇게 제작한 cDNA phage 유전자은행을 *in vivo* excision 방법을 이용하여 플라스미드화 한 후, 임의의 클론을 선발하여 5말단 또는 3말단 중 한쪽 방향으로 부분 염기서열을 분석하고 기존 데이터베이스를 통한 상동성 분석에 의한 유전자들의 잠정적인 기능을 추정하는 방법인 발현 유전자 꼬리표 (expressed sequence tags: ESTs) 분석 방법을 수행하였다. 먼저 임의로 선발한 클론으로부터 Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System을 이용하여 분리한 DNA(0.2 μ g)를 T3 혹은 T7 primer와 혼합한 후 BigDye Cycle Sequencing kit와 혼합한 후 PCR (polymerase chain reaction) 반응을 수행하였다. PCR 산물은 1 capillary 방식인 310 Genetic Analyzer (ABI PRISM)에 의해 분석하여 염기서열을 결정하고 얻어진 염기서열은 GenBank database(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)를 통하여 상동성을 분석하여 유전자 발현 꼬리표를 작성하였다.

다. 독소 유전자 및 키틴아제 유전자의 클로닝 및 구조 분석

늦반딧불이와 산왕거미의 cDNA 유전자은행으로부터 유전자 발현 꼬리표(ESTs)를 생산하여 GenBank database에 상동성 검색을 통하여 독소 유전자와 키틴아제 유전자와 각각의 상동성을 보이는 샘플을 선별하고, 뽕나무하늘소 유충으로부터 키틴아제 특이적 primer를 제작하고 RT-PCR을 이용하여 키틴아제와 상동성을 나타내는 유전자를 클로닝하고 전체 염기서열 결정을 위하여 Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System에 의해 분리된 플라스미드 DNA(0.2 μ g)를 각각 T3 혹은 T7 primer로 BigDye Terminator cycle sequencing kit을 이용하여 96°C에서 10초, 50°C에서 10초 그리고 60°C에서 4분씩 25회 반복조건을 설정하여 수행하였다. PCR 산물은 알코올 침전시켜 10,000 \times g로 15분간 원심분리를 실시하고 70% 에탄올로 세척하였다. 이렇게 준비된 PCR 산물을 1

capillary 방식인 310 Genetic Analyzer (ABI PRISM)에 의해 분석하여 염기서열을 결정하고 분석하였다. 결정된 염기서열은 NCBI, GenBank, EMBL과 SwissProt에서 제공되는 BLAST algorithm program (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)을 이용하여 유사 유전자들을 찾고 비교하였다. 본 연구에서 찾은 독소 유전자 및 키틴아제 유전자와 상동성을 보이는 유전자의 아미노산서열 비교를 위해 MacVector (ver. 6.5, Oxford Molecular)를 사용하였고 계통도 분석을 위하여 PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) version 4.0 (Swofford, 2000)을 사용하였다.

라. 독소 유전자 및 키틴아제 유전자의 발현 및 특성 분석

1) Total RNA 분리와 Northern blot 분석

늦반딧불이 독소 유전자인 PrNT, 뽕나무하늘소 유충 키틴아제 AgChi 및 산왕거미 키틴아제 AvChi가 발현되는 조직을 조사하기 위하여 *P. rufa*, *A. germari* 및 *A. ventricosus*의 현미경 (Zeiss, Jena, Germany)을 이용하여 해부를 실시, 조직을 채취하였다. *P. rufa*로부터 표피, 지방체, 중장 그리고 독샘을, *A. germari*로부터 표피, 지방체 그리고 중장을, *A. ventricosus*로부터 지방체, 중장, 실샘 그리고 표피를 분리하였다. 각각의 분리된 조직은 PBS (140 mM NaCl, 27 mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄, pH 7.4) 용액에 2회 씻어낸 후, Total RNA Extraction Kit (Promega)을 이용하여 각 조직으로부터 Total RNA를 분리하였다. Total RNA는 glyoxylation 방법 (McMaster and Carmichael, 1977)에 의해 변성시키고 nylon blotting membrane (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany)에 흡착시켜, membrane과 각각의 probe와 함께 hybridization 용액 (5× SSC, 5× Denhardt's solution, 0.5% SDS 그리고 100 µg/ml의 변성 salmon sperm DNA)에 넣어 42 °C에서 hybridization을 실시하였다. PrNT는 258 bp의 cDNA를, AgChi의 경우 1,173 bp의 cDNA, 그리고 AvChi의 경우 1,296 bp의 cDNA를 [³²P] dCTP (Amersham, Arlington Heights, IL)와 Prime-It II Random Primer Labelling Kit (Stratagene)을 이용하여 labelling 하여 probe로 사용하였다. Hybridization 후, membrane은 65°C에서 washing 용액 (0.1% SDS 그리고 0.2×SSC)에 30분씩 3회 washing 하고 X-ray film에 노출시켰다.

2) Genomic DNA의 구조분석

P. rufa 독소 유전자인 PrNT와 *A. germari* 유충 키틴아제 AgChi의 Genomic DNA의 구조분석을 위하여 *P. rufa*와 *A. germari*로부터 Wizard™ Genomic DNA Purification

Kit를 사용하여 genomic DNA를 분리하고 유전자 특이 primer (PrNT-F: 5' -ATGAAACTCTGCTGATT AAAG-3' and PrNT-R: 5' -TCACGAGTTACTTATCACT-3' for PrNT or AgChi-F: 5' -ATGAAGGTTACTACTGTTTC-3' and AgChi-R: 5' -TTAGTTATCTAGTGTTC-3' for AgChi)를 제작하고 Pre-Mix (Bioneer사)에 *P. rufa* Genomic DNA와 *A. germari* Genomic DNA를 각각의 primer 0.1-0.5 μ M을 넣은 다음 DNA Thermal Cycler (Bioneer사)로 94°C에서 30초, 48°C에서 40초 그리고 72°C에서 2분씩 35회 반복조건을 설정하여 수행하였다. PrNT의 456 bp와 AgChi의 2,894 bp PCR 산물은 알코올 침전시켜 10,000 \times g로 15분간 원심분리를 실시하고 70% 에탄올로 세척하였다. 이렇게 준비된 PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동하여 분석하고 염기서열 분석을 위하여 pGemT vector (Promega)에 클로닝하고 BigDye Terminator cycle sequencing kit을 이용하여 염기서열을 분석하였다.

3) Genomic DNA 분리 및 Southern blot 분석

거미 키틴아제 유전자 AgChi와 AvChi의 Southern blot 분석을 위하여 *A. germari*의 중장과 *A. ventricosus*의 지방체로부터 WizardTM Genomic DNA Purification Kit를 사용하여 Genomic DNA를 분리하고 AgChi의 경우 제한효소 *Apa*I, *Bam*HI 그리고 *Hind*III를, AvChi의 경우 제한효소 *Eco*RI과 *Hind*III를 처리하여 단편화 시키고 1% agarose gel에 전기영동하고 단편화된 DNA를 nylon blotting membrane (Schleicher & Schuell)에 흡착시켜 AgChi 1,173 bp와 AvChi 1,296 bp cDNA를 probe로하여 42°C에서 hybridization을 실시하였다. Hybridization 후, membrane은 65°C에서 washing 용액 (0.1% SDS 그리고 0.2 \times SSC)에 30분씩 3회 washing 하고 X-ray film에 노출시켰다.

4) 곤충세포배양 및 재조합 바이러스 제작

독소 유전자 *PrNT*, 키틴아제 *AgChi* 그리고 *AvChit1*의 재조합 단백질을 만들기 위하여 베클로바이러스인 *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV)를 이용하였다. 먼저, *Spodoptera frugiperda* IPLB Sf21-AE (Vaughn et al., 1977) clone 9 (Sf9) 곤충세포를 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO BRL LIFE Technologies)를 첨가한 TC100 배양액 (GIBCO BRL LIFE Technologies)을 넣어 27°C에서 O'Reilly의 방법에 따라 배양하였다. Wild-type AcNPV와 재조합 AcNPVs는 Sf9 곤충세포에 감염시켜 사용하였고, 바이러스 농도는 ml 당, plaque forming units (PFU)으로 나타냈다.

각각의 유전자들을 전이벡터인 pBAC1 (Invitrogen)과 pBacPAK9 (Clontech)에 클로닝

하였다. PrNT의 경우, 모두 85개의 아미노산을 가지는데 발현하였을 시, 예상되는 분자량이 8-9 kDa으로 발현의 어려움을 극복하고 정제를 쉽게하기 His-Tag을 가진 pBAC1에 클로닝하였다. 클로닝 할 때 사용된 제한 효소는 *Bam*HI과 *Xho*I을 처리하여 pBAC1에 삽입하여 pBAC1-PrNT를 만들었다. 그리고 키틴아제 AgChi와 AvChi는 제한효소 *Eco*RI과 *Xho*I 그리고 *Sac*I과 *Kpn*I을 각각 처리하여 pBacPAK9에 삽입하여 pBacPAK9-AgChi와 pBacPAK9-AvChi를 만들었다. 이렇게 삽입된 세 개의 유전자들은 AcNPV polyhedrin promoter 하에 두었다.

재조합 베쿨로바이러스를 만들기 위하여, 35-mm 세포배양 plate에 $1.0-1.5 \times 10^6$ 개의 세포를 준비하여 세포가 plate에 잘 붙도록 1시간 동안 27°C에서 배양하였다. pBacPAK6 viral DNA 1 μ g과 독소 및 키틴아제를 삽입한 전이벡터, pBAC1-PrNT, pBacPAK9-AgChi 및 pBacPAK9-AvChi의 plasmid DNA 5 μ g을 각각 20 mM HEPES 용액에 50 μ l가 되게 혼합하고 50 μ l의 Lipofectin™ (100 μ g/ml, GIBCO BRL LIFE Technologies, Gaithersburg, MD)을 DNA 혼합액에 넣어 잘 섞어 실온에 30분간 방치하였다. 이 Lipofectin-DNA 혼합액을 6-well plate의 세포 배양액에 넣기 전에 Sf9 세포를 serum-free TC100 배양액으로 2회 씻어낸 후, 다시 1.5 ml의 serum-free 배양액을 넣고 여기에 Lipofectin-DNA 혼합액 잘 섞어 넣어 27°C에서 5시간 동안 배양한 후, 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO)를 함유한 TC100 배지를 새로이 갈아 넣어 5일간 27°C에서 배양하였다. 5일간 배양 후, 배양액을 수거하여 2000 rpm에서 5분간 원심분리를 실시하여 상등액을 수거하여 plaque assay를 실시할 때까지 4°C에 보관하였다. 6-well plate에 1.5×10^6 개의 Sf9 세포를 준비하고 plaque assay를 실시하여 재조합 베쿨로바이러스를 선별하여 재조합 베쿨로바이러스의 증식 및 발현에 사용하였다.

5) Polyclonal antibody 제작 및 Western blot 분석

항체 제작을 위하여 SDS-PAGE gel로부터 발현된 단백질 밴드를 같은 양의 Freund's complete adjuvant (200 μ l, Sigma)와 혼합하여 쥐에 주사하였다. 그리고 1주일 후, antigens과 Freund's incomplete adjuvant (200 μ l, Sigma)를 혼합하여 3회 1주일 간격으로 주사하고 마지막 주사 후, 3일 뒤에 쥐로부터 피를 뽑고 10,000×g에서 5분간 원심분리하여 혈장을 추출하여 Western blot에 사용하였다.

Western blot을 위하여 단백질을 10% SDS-PAGE에 전기영동하고 단백질을 nitrocellulose membrane (0.45 μ m pore size)에 blotting하였다. Blotting한 후, membrane은 1% (v/v) BSA에 실온에서 2시간 동안 침지시키고 다시 제작한 PrSP 항체 (1:1000 v/v)에

실온에서 1시간 동안 침지시켰다. 그리고 membrane을 TBST (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.05% Tween 20)에 washing하고 anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP) conjugate와 HRP-streptavidin 혼합물에 침지시켰다. Membrane을 반복하여 TBST buffer에 washing한 후, ECL detection reagents (Amersham Pharmacia Biotech)와 반응시키고 X-ray film에 노출시켰다.

6) 키틴아제 활성 측정

키틴아제 활성은 Trudel과 Asselin (1989)의 방법에 따라 SDS-PAGE를 이용하였다. SDS-PAGE를 실시한 후, gel을 150 mM sodium acetate 용액 (pH 5.0)에 5분간 반응시킨 다음 gel을 유리 위에 올리고 0.01% (w/v) glycol chitin (in 100 mM sodium acetate 용액 (pH 5.0))을 함유한 7.5% polyacrylamide gel을 만들어 덮는다. 이 gel을 37°C에서 1시간가량 마르지 않도록 반응시킨다. 반응 후, lytic zone은 UV-illuminator에서 확인하고 사진 촬영하였다.

7) Tunicamycin 처리

AgChi 및 AvChi 키틴아제의 아미노산 구조에 당쇄부가 (Hasemann and Capra, 1990) 영역이 나타나는데, 곤충세포 배양시, 당쇄부가를 막기 위하여 재조합 벡로바이러스 AcNPV-AgChi 및 AcNPV-AvChi를 감염시킨 곤충세포에 tunicamycin (5 μ g/ml, Sigma)을 처리하였다. 35mm 세포배양 plate에 Sf9 1×10^6 개 곤충세포를 준비하고 mock-, wtAcNPV, 재조합 바이러스 AcNPV-AvChi 또는 AcNPV-AgChi를 각각 감염시키고 2시간 27°C에서 배양한 후, 5 μ g/ml의 tunicamycin을 함유하는 TC100 배양액을 새로이 5 ml 씩 넣어 주었다. 27°C에서 배양 후, 곤충세포 lysate를 24, 48 그리고 72시간에 모아서 0.01% glycol chitin 을 함유한 10% SDS-PAGE를 실시하여 lytic zone을 UV-illuminator 하에서 확인하였다 (Trudel and Asselin 1989).

2. 결과 및 고찰

가. cDNA 유전자은행 제작 및 유전자 발현 꼬리표 (ESTs) 작성

제작한 cDNA library의 titer를 측정한 결과, 약 1.3×10^6 개 이상의 plaque이 존재하였으며, cDNA의 재조합 비율을 알아보기 위하여 이 phage를 *E. coli*에 감염시킨 후 X-Gal과 IPTG가 첨가된 NZY 배지에서 배양한 결과 98% 이상의 plaque이 cDNA가 도입

된 재조합 phage plaque으로 확인되었다. 고등생물의 경우 약 10만여 개의 유전자가 있고 이중 약 15%만이 세포 개체들에서 공통적으로 발현되고, 한 세포내에서도 abundant 그룹과 rare 그룹이 존재한다. 초파리의 유전자는 사람의 1/5에 해당하며, 이 비율을 본 실험 각각의 개체에 적용할 때 제작된 cDNA library는 세포내에 적은 양으로 존재하는 poly A+ RNA종을 모두 포함하는 것으로 생각되었다. 제작된 cDNA library에서 벡터내에 삽입된 cDNA 크기를 확인하기 위하여 무작위로 선발한 phage를 *in vivo* excision하여 pBluescript SK 전환하였다.

*P. rufa*와 *A. ventricosus* 등의 cDNA 유전자은행에서 무작위로 *in vivo* excision을 이용하여 얻은 박테리아 콜로니로부터 DNA 염기서열 결정을 위해 플라스미드 DNA를 분리하였다. 염기서열 분석을 위한 primer는 삽입 cDNA에 근접해 있는 T3 primer를 사용하였고 one capillary 방식의 310 Genetic Analyzer를 사용하여 cDNA 염기서열을 결정하였다. *P. rufa*의 경우에는 모두 54개 그리고 *A. ventricosus*의 경우에는 385개의 클론에서 발현 유전자 꼬리표 (ESTs)를 생산할 수 있었다. 클론마다 평균 250 bp 이상의 염기서열을 판독할 수 있었는데 판독한 염기서열은 GenBank database에서 기존에 알려진 유전자와의 상동성 검색을 통하여 *P. rufa* cDNA 유전자은행에서 독소 유전자를 그리고 *A. ventricosus*의 cDNA 유전자은행으로부터 키틴아제 유전자를 선발하였다. 한편, *A. germari*의 total RNA로부터 gene specific primer를 이용한 RT-PCR을 수행하여 키틴아제 유전자를 선발하였다.

Table 1는 *P. rufa* cDNA 유전자은행으로부터 얻은 cDNA 클론의 발현 유전자 꼬리표를 나타낸다. 54개의 cDNA 클론 중, 24개가 다른 곤충 관련 유전자와 상동성을 보였으나 기존에 알려진 다른 종의 반딧불이와는 상동성을 보이지 않았다. 그리고 이 24개의 곤충관련 유전자 중, 약 46%가 초파리와 상동성을 보였다. *P. rufa* 유충은 달팽이를 주식으로 하므로 달팽이 방제를 위한 유전자를 선별하였는데, ESTs 중, GenBank database에서 독소 유전자와 상동성을 보이는 독소 유전자를 선별하여 본 실험을 수행하였다.

Table 1. Summary of the expressed sequence tags isolated from the cDNA library of the firefly, *Pyrocoelia rufa*

Clone	Putative identification	Species	Overlength (bp)	Homology (%)	Acc. No.
PR1-10	CoA-Ddehydrogenase	<i>Homo Sapiens</i>	572	63	AT003771
PR1-15	Troponin T	<i>Drosophila melanogaster</i>	476	81	AT003772
PR1-27	ATPase synthase 6	<i>Limulus polyphemus</i>	103	88	AT003773
PR1-36	CG3981	<i>Drosophila melanogaster</i>	443	51	AT003774
PR1-38	Integral membrane transport protein	<i>Homo sapiens</i>	101	84	AT003775
PR1-43	ATPase subunit E	<i>Manduca sexta</i>	542	63	AT003776
PR1-82	RNase L inhibitor	<i>Homo sapiens</i>	278	88	AT003777
PR2-19	Unconventional myosin-15	<i>Mus musculus</i>	323	37	AT003778
PR2-21	CG3981	<i>Drosophila melanogaster</i>	257	53	AT003779
PR2-60	Sodium channel alpha subunit	<i>Homo sapiens</i>	308	41	AT003780
PR2-79	Chitinase	<i>Aeromonas hydrophila</i>	113	60	AT003781
PRX-1	Core 1 UDP-galactose	<i>Mus musculus</i>	326	51	AT003782
PRX-17	Helicase-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	131	54	AT003783
PRX-19	Non-functional subunit binding protein	<i>Homo sapiens</i>	389	42	AT003784
PRX-20	Integral membrane subunit	<i>Aedes aegypti</i>	125	80	AT003785
PRX-21	Annexin	<i>Bombyx mori</i>	374	64	AT003786
PRX-29	Carboxypeptide	<i>Astacus astacus</i>	221	60	AT003787
PRB-1	CG3884	<i>Drosophila melanogaster</i>	413	67	AT003788
PRB-6	Myophilin	<i>Echinococcus multilocularis</i>	293	74	AT003789
PRB-17	Male specific serum polypeptide beta	<i>Ceratitidis capitata</i>	254	49	AT003790
PRB-26	Serine protease inhibitor	<i>Schistocerca gregaria</i>	89	56	AT003791
PRB-32	Alpha L1 nicotinic acetyl choline receptor	<i>Acheta domesticus</i>	74	72	AT003792
PRB-37	Histone H3	<i>Drosophila melanogaster</i>	320	99	AT003793
PRB-61	Phospholipase A2 inhibitor	<i>Oxyuranus microlepidotus</i>	227	44	AT003794
PRB-73	Sodium/Potassium exchanging ATPase alpha subunit	<i>Ctenocephalides felis</i>	524	92	AT003795
PRB-74	Ribosomal protein L27	<i>Mus musculus</i>	404	72	AT003796
PRB-76	Endothelin-converting enzyme	<i>Bos taurus</i>	380	68	AT003797
PRB-81	Myophilin	<i>Echinococcus multilocularis</i>	293	74	AT003798
PRB-85	Phermone binding protein	<i>Choristoneura murinara</i>	173	55	AT003799
PRB-90	Isopenicillin Nsynthase	<i>Streptomyces cattleya</i>	170	48	AT003800
PRB-92	Serpin	<i>Oryza sativa</i>	203	57	AT003801
PRB-94	Nucleolar protein p40	<i>Homo sapiens</i>	95	84	AT003802
PRB-99	Elongation factor I-alpha	<i>Nanexila gracilis</i>	227	94	AT003803
PR13	CG3950	<i>Drosophila melanogaster</i>	137	65	AT003804
PR65	Tropomyosin I	<i>Drosophila melanogaster</i>	164	54	AT003805
PR113	Reverse transcriptase	<i>Caenorhabditis elegans</i>	93	49	AT003806
PR126	Easily shocked protein	<i>Caenorhabditis elegans</i>	227	74	AT003807
PR241	Ubiquitin	<i>Sus scrofa</i>	203	85	AT003808

Table 1. Continued

Clone	Putative identification	Species	Overlength (bp)	Homology (%)	Acc. No.
PR242	Myosin II essential light chain	<i>Caenorhabditis elegans</i>	440	80	AT003809
PR326	Nerotoxin	<i>Naja atra</i>	69	42	
PR768	40S ribosomal protein	<i>Xenopus laevis</i>	581	89	AT003810
PR770	Glycophorin-binding protein	<i>Caenorhabditis elegans</i>	239	48	AT003811
PR824	40S ribosomal protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	425	85	AT003812
PR826	Mitochondrial outer membrane protein	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	62	AT003813
PR884	Peritrophin-95 precursor	<i>Lucilia cupriona</i>	113	60	AT003814
PR951	Cytochrome p450-like protein	<i>Bacillus subtilis</i>	143	39	AT003815
PR972	Z83216	<i>Caenorhabditis elegans</i>	239	47	AT003816
PR1183	RNA helicase	<i>Drosophila melanogaster</i>	287	95	AT003817
PR1310	Endothelin converting enzyme	<i>Rattus norvegicus</i>	188	49	AT003818
PR1421	60S ribosomal protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	323	46	AT003819
PR1429	60S ribosomal protein L15	<i>Chironomus tentans</i>	257	48	AT003820
PR1439	Pheromone binding 143protein	<i>Popillia japonica</i>	188	53	AT003821
PR1441	Myosin light chain II	<i>Drosophila melanogaster</i>	407	74	AT003822
PR1505	40S ribosomal protein S19	<i>Gillichthys mirabilis</i>	143	64	AT003823
PR1512	Cytochrome b	<i>Rhytidoponera</i> sp.	140	89	AT003824

Table 2는 *A. ventricosus* cDNA 유전자은행로부터 얻은 cDNA 클론의 발현유전자 꼬리표를 나타내는데, 총 385개의 클론으로부터 염기서열을 결정하고 GenBank database의 등록된 다른 유전자와 아미노산으로 번역하여 상동성을 검색하였다. 385개의 클론 중, 383개가 등록된 유전자와 상동성을 보였으며 특히 241개의 클론(62.6%)은 높은 상동성을 보였다. 385개의 클론 중 68개의 클론은 곤충과 상동성을 보였고 약 82.4%가 초파리에서 밝혀진 유전자와 유사한 것으로 생각되어졌다. 그리고 발현유전자 꼬리표에서 반복해서 나타나는 유전자 중, 특히 번역 관련 유전자와 ribosomal protein이 많이 확인되었으며, 분석한 클론 중 반복해서 나타나는 정도를 조사해본 결과 약 53개의 클론, 즉 13.8%가 다른 클론과 유사성을 보였다 (Fig. 1). 이 *A. ventricosus* cDNA 유전자은행의 발현 유전자 꼬리표 중에서 잣빛곰팡이병을 방제하기 위한 목적으로 키틴아제 유전자를 선별하여 본 연구를 진행하였다.

Table 2. Summary of the expressed sequence tags isolated from the cDNA library of the spider, *Araneus ventricosus*

actor pathway inhibitor 2	<i>Homo sapiens</i>	129	60
actor pathway inhibitor 2	<i>Mus musculus</i>	63	67
roteinase inhibitor	<i>Sarcophaga bullata</i>	162	66
CG13748	<i>Drosophila melanogaster</i>	105	51
uvoyl tetrahydropterin synthase	<i>Rattus norvegicus</i>	288	75
Cytochrome b	<i>Cryptotermes brevis</i>	284	80
Apoprotein A2	<i>Porphyra purpurea</i>	144	49
roteinase inhibitor	<i>Sarcophaga bullata</i>	81	59
ibosomal protein S23	<i>Brugia malayi</i>	245	88
bosomal protein S4	<i>Plasmodium falciparum</i>	297	44
DP/AIP translocase	<i>Drosophila melanogaster</i>	208	78
chol 1,2-dioxygenase	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	138	38
ike growth factor-binding	<i>Rattus norvegicus</i>	96	57
rotein 1 precursor			
BGDS00180.8	<i>Drosophila melanogaster</i>	153	45
luciferase	<i>Epiblema scudderiana</i>	247	87
glycerate dehydrogenase	<i>Oryza sativa</i>	108	60
LEK1	<i>Mus musculus</i>	351	52
Vng1894c	<i>Halobacterium</i> sp.	117	53
der against cell death 1	<i>Xenopus laevis</i>	180	59
F46H5.7	<i>Caenorhabditis elegans</i>	99	54
Vir B11	<i>Aeropyrum pernix</i>	168	49
N-acetylglucosaminidase	<i>Mus musculus</i>	171	66
α-interferon inducible	<i>Homo sapiens</i>	180	51
somal thiol reductase			
trypsinogen gene	<i>Mus musculus</i>	204	46

Table 2. Continued

70cp	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	255	68
hemolysin	<i>Virionimicus</i>	108	54
763	<i>Drosophila melanogaster</i>	201	68
zyme 2 precursor	<i>Oryzias latipes</i>	186	56
3810	<i>Drosophila melanogaster</i>	153	52
ysinH	<i>Oryzias latipes</i>	197	68
BOX1	<i>Homo sapiens</i>	346	57
hway inhibitor 2	<i>Mus musculus</i>	65	63
teinase 1	<i>Hydra vulgaris</i>	122	58
al protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	107	64
tein product	<i>Homo sapiens</i>	278	48
tein p53 CDC	<i>Rattus norvegicus</i>	389	76
protein	<i>Bombyx mori</i>	246	48
ling protein	<i>Homo sapiens</i>	131	57
Platelet	<i>Rattus norvegicus</i>	147	51
odium channel	<i>Takifugu pardalis</i>	128	57
k factor 3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	234	50
Aldehyde hydrogenase	<i>Sus scrofa</i>	363	63
isor			
ne product	<i>Drosophila melanogaster</i>	177	63
ne product	<i>Drosophila melanogaster</i>	336	73
none receptor II	<i>Drosophila melanogaster</i>	137	58

Table 2. Continued

230	Pfennain	<i>Cerohobolis degens</i>	305	66
193	Ferrin	<i>Echinococcus granulosus</i>	98	84
2315	Etahexaninidæ	<i>Anphalagonhice</i>	188	61
2340	6Phosphofudckinæ	<i>Mechizumai</i>	98	60
2349	CC923	<i>Diosphilanelarogster</i>	203	93
2391	3oxoacyl carrier protein synthæ III	<i>Leinococcus rodolatus</i>	110	53
2393	Protein kinæ	<i>Acidopsis thaliana</i>	144	45
2404	HJ1201	<i>Hinospiers</i>	137	51
2421	Nuclear RNA binding protein SUM 1	<i>Rattus norvegicus</i>	179	61
2248	Hatinlike protein	<i>Diosphilanelarogster</i>	41	100
2473	Synphilin precursor	<i>Rivacetes bicra</i>	132	72
2419	Hypothetical protein C54D1.1	<i>Cerohobolis degens</i>	63	80
2607	Cytochrome b	<i>Latrodectus</i>	252	78
2581	CC400	<i>Diosphilanelarogster</i>	137	69
2475	Elongation factor-1 alpha	<i>Idogryps pallida</i>	354	89
2572	CC673	<i>Diosphilanelarogster</i>	168	63
2580	Reductase hexon	<i>Flasmodium falciparum</i>	195	52
2628	Rtative gypsy type retrotransposon	<i>OryzSATIVA</i>	48	75
2609	Cyano tyrosin inhibitor (AMCI)	<i>Oryzopsis arialis</i>	117	53
2527	Oxidoreductase	<i>Rattus norvegicus</i>	186	71
2627	Avidin	<i>Oryzopsis</i>	179	55
2641	Tyrosine kinase	<i>Callisgillus</i>	69	82
2648	Adhesin protein	<i>Mycoplasma pranice</i>	150	38

Table 2. Continued

	<i>oxytelastrol</i>			
310	C671	<i>Oscaria</i>	10	9
341	Heroin	<i>Daphnia magna</i>	15	50
354	Nifedipine 20	<i>Daphnia magna</i>	24	7
367	Cyprinid olfactory	<i>Tilapia zilli</i>	35	48
373	Nifedipine 1	<i>Mus mus</i>	38	8
375	C78	<i>Daphnia magna</i>	28	7
378	Nifedipine 100	<i>Bryopsis</i>	13	7
361	Rosiglitazone	<i>Rattus norvegicus</i>	21	9
357	Rosiglitazone	<i>Rattus norvegicus</i>	26	4
379	Nifedipine receptor	<i>Rattus</i>	8	9
324	AR human thyroglobulin	<i>Mus mus</i>	17	46
329	Nifedipine 1	<i>Flycatcher</i>	27	5
326	Rat cell division	<i>Setacea sp.</i>	13	48
318	C75	<i>Daphnia magna</i>	27	48
324	Chick	<i>Appl. entom.</i>	23	7
325	Beatin	<i>Oscaria</i>	35	8
328	Nifedipine 1	<i>Flycatcher</i>	15	6

Table 2. Continued

388	IF904pa	<i>Laiceio</i>	14	4
386	Hyphal ptn R38c	<i>Melobesium laccis</i>	19	3
384	Cypharia poicidinae	<i>Herodiscotus</i>	18	2
382	Hyphal ptn ZH6	<i>Ceobotis degis</i>	14	5
353	Cypharia	<i>Escholtzia escholtzii</i>	34	7
398	Hemoxysae2	<i>Msmachs</i>	30	4
393	Radial hyphae radial ptn	<i>Tempsnacophilum</i>	18	8
327	Xth ptn	<i>Xopskais</i>	19	6
329	Fetok factorial ptn	<i>Msmachs</i>	16	8
324	Aid G Algae	<i>Calboterocetus</i>	14	4
420	Hedelin	<i>Dophiloneogaster</i>	15	50
387	DApkyrae	<i>Pophyppiquei</i>	14	4
398	Imoglobulin A ptn	<i>Herophilus flexa</i>	8	9
	peuso			
397	Hyphal ptn ZOL2	<i>Ceobotis degis</i>	15	3
489	Citirae	<i>Cestrion lermellum</i>	19	4
407	CS75	<i>Dophiloneogaster</i>	24	4
497	Floerda soitecharbae ptn	<i>Ritus rovegas</i>	17	80

Table 2. Continued

465	Homodimeric Sl	<i>Plectonikium</i>	26	47
494	CC34	<i>Dicophila longicauda</i>	38	86
479	Meliponin 1	<i>Hydrobia</i>	19	66
478	Putative sodium flux carrier protein	<i>Actinopterygion</i>	19	57
472	DNA-dependent RNA polymerase	<i>Plectonikium</i>	23	49
482	thyroglobulin	<i>Mus musculus</i>	28	45
491	CC24	<i>Cerioderma degeri</i>	174	49
485	PsB protein	<i>Vaccinium</i>	171	55
426	Tyrosine kinase receptor	<i>Callisyllus</i>	26	49
427	Hydrolytic protein F884	<i>Cerioderma degeri</i>	9	70
487	Giblin 1	<i>Zenopsis</i>	198	42
482	DNA polymerase alpha 1	<i>Mus musculus</i>	57	84
481	Tidæ	<i>Rattus norvegicus</i>	357	76
487	CSF	<i>Neotoma lepida</i>	25	48
474	Red cell haemoglobin	<i>Clostridium acetabutylicum</i>	144	53
474	Rhynchodermone	<i>Tenacognathina</i>	19	57
487	NADH dehydrogenase subunit	<i>Alvinicoccus</i>	22	59
486	Hydrolytic protein F900C	<i>Plectonikium</i>	24	48
485	Putative tyrosine phosphatase	<i>Fragaria</i>	231	60
482	Aerobic hydrogenase	<i>Synchaeta</i>	111	66

Table 2. Continued

5165	Collagen protein	<i>Stenotermus</i>	141	21
5172	Hypothetical protein CBF81	<i>Cerohobolus degers</i>	111	80
5200	Hypothetical protein FCO24c	<i>Plasmodium falciparum</i>	204	50
5195	Conserved hypothetical protein	<i>Chlamydomonas</i>	111	66
5216	Hagelliform silk protein	<i>Nephelochloa scariensis</i>	174	36
5161	nuclein	<i>Xeropsalax</i>	276	56
5158	Reticulocyte binding protein 2	<i>Plasmodium vivax</i>	99	60
5198	Hypothetical protein T2256	<i>Cerohobolus degers</i>	141	71
5218	Translation elongation factor	<i>Hirundo</i>	456	62
5219	Sulfatase hydrolase	<i>Rachnoecia angiosa</i>	93	73
5228	Relative histone	<i>Agrius bisporus</i>	159	59
5229	Amlyo-1,6 glucosidase	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	147	81
5233	4S ribosomal protein S20	<i>Ichneumonidae</i>	233	88
5236	Esturolactase-10	<i>Picea canadensis</i>	96	77
5242	Relative RNA binding protein	<i>Rattus norvegicus</i>	158	59
5255	Ynf77	<i>Trichynera athenaphila</i>	192	53
5271	ATP synthase subunit	<i>Pemphigus sprucei</i>	317	73
5283	Malaria parasite surface antigen	<i>Plasmodium falciparum</i>	111	63
5286	Ribosomal protein S2	<i>Plasmodium falciparum</i>	210	52
5289	N-type calcium channel alpha 1	<i>Mus musculus</i>	144	52
5297	Cytochrome P450 monooxygenase	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	117	71
5320	DNA directed RNA polymerase II large chain	<i>Nosema locustae</i>	159	52
5312	Avian influenza antigen	<i>Actinoptera thalassidroma</i>	153	58

Table 2. Continued

287	Immunoglobulin A1 protease precursor	<i>Hemophilus influenzae</i>	81	59
290	Hypothetical protein FC095C	<i>Flasmodium falciparum</i>	204	48
280	Cell division protein	<i>Ureplasma urechiticum</i>	204	46
305	Vitagenase domain homolog B1a1	<i>Bifidobacterium</i>	165	41
309	Axyltransferase	<i>Morchella moki</i>	231	39
306	HIVike protein	<i>Acronotus punctata</i>	144	58
302	Rtaivenaturae	<i>Astaellatella</i>	117	58
314	Hypothetical protein FC8A4	<i>Ceratomyces elegans</i>	93	70
320	Hypothetical protein FC095C	<i>Flasmodium falciparum</i>	204	48
513	Unknown protein	<i>Acidobacterium tholera</i>	159	54
95	Kalidure1	<i>Aeromonas lacta</i>	167	68
129	Rtassum domain blocking toxin	<i>Ceratomyces limpidus</i>	85	56
182	Sigare product	<i>Drosophila melanogaster</i>	285	51
188	Exonin	<i>Homo sapiens</i>	189	78
195	IgG protein	<i>Homo sapiens</i>	141	57
182	Sigare product	<i>Drosophila melanogaster</i>	285	51
276	Cystein protease	<i>Tetrahymena thermophila</i>	257	50
297	Metalloproteinase I	<i>Hydrophilus</i>	312	61
290	Exonin ABC subunit B	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	132	49
292	Cell division protein	<i>Streptococcus pyogenes</i>	183	48
295	Mosin heavy chain	<i>Rattus</i> sp	110	70
297	Cytochrome B	<i>Bacillus thuringiensis</i>	315	68
310	Hypothetical protein 15173-12677	<i>Acidobacterium tholera</i>	119	61

Table 2. Continued

330	AM29	<i>Ascatamoia etonquovins</i>	13	34
332	Cystinaphalindprotein	<i>Mismachis</i>	108	5
331	HyalinaproteinF9E16	<i>Cerohobolisdegis</i>	204	40
336	RibosomalproteinS11	<i>Pasnodunflajann</i>	26	47
288	DafsinB	<i>Onitabosnabata</i>	13	48
264	MallproteinæI	<i>Fybloulgis</i>	207	0
320	Hatinlikeprotein	<i>Doxphilanalarogster</i>	42	10
409	Sitprotein	<i>Doxphilanalarogster</i>	25	47
430	AM29	<i>Ascatamoia etonquovins</i>	13	34
368	Coch	<i>Darioerio</i>	26	42
384	CC696	<i>Doxphilanalarogster</i>	144	34
459	Typhank-Frasylhae	<i>Casodlanabli</i>	16	47

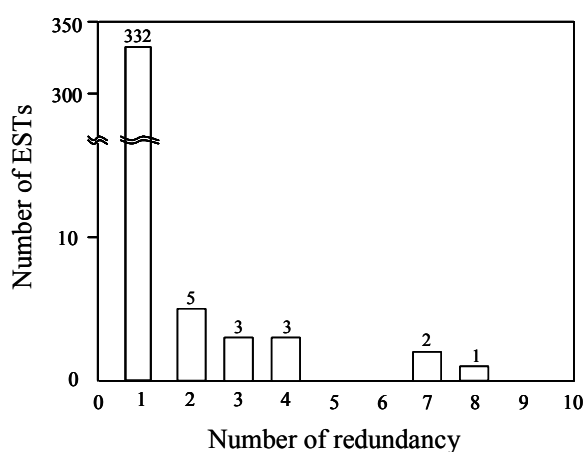


Fig. 1. Frequency distribution of ESTs showing redundancy in 385 clones. The number of the EST clones is given above each bar.

나. *P. rufa* 독소 유전자의 특성 분석

1) 독소 유전자의 클로닝 및 구조 분석

*P. rufa*의 발현 유전자 꼬리표 생산을 통하여 선별한 독소 관련 유전자의 전체 염기서열을 분석한 결과, cDNA 염기서열은 258 bp이고 85개의 아미노산으로 이루어져 있으며 (Fig. 2A), GenBank database 상동성 검색에서 뱀 (*Naja kauthia*, *Naja sputatrix* 및 *Naja atra*) toxin 유전자와 높은 상동성을 보였다. 이를 PrNT라 명명하였고 Fig. 2B에서 보는 것과 같이 아미노산 비교에서 다른 종류의 뱀에서 알려진 독과 높은 상동성을 나타냈는데, 특히 8개의 Cystein 영역이 잘 보존되어 있었고 이는 독소 유전자에서 잘 나타나는 disulfide 결합을 하는 중요한 역할을 하는 잔기임을 알 수 있었다. 이는 8개의 Cystein 영역이 서로 결합하여 4개의 disulfide 결합을 하리라 사료되어진다.

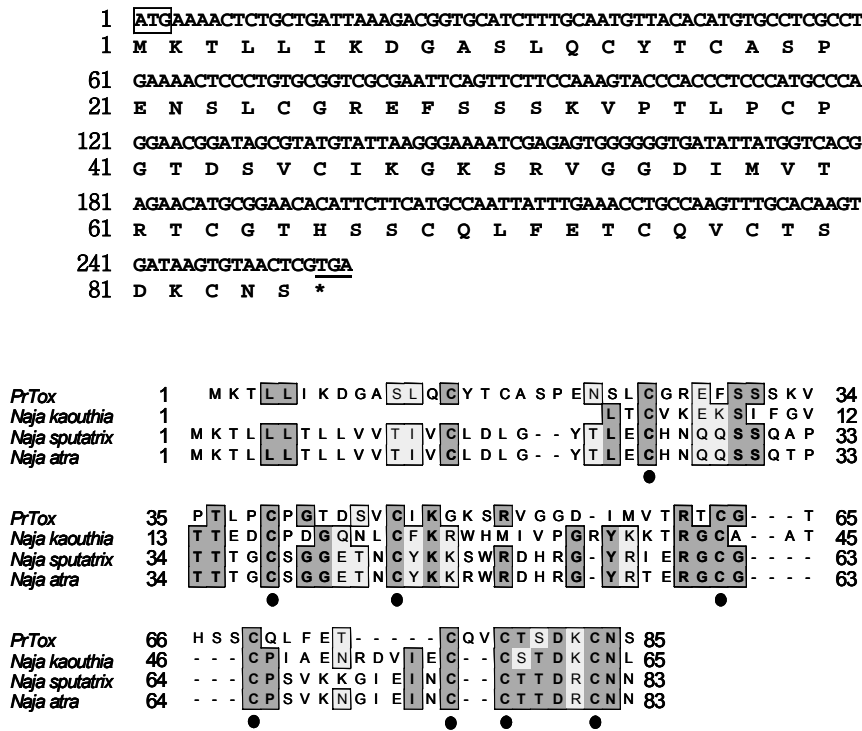


Fig. 2. The nucleotide and deduced amino acid sequences of *P. rufa* toxin homologue gene (PrNT). The start codon is boxed and the termination codon is underlined (A). The deduced amino acid sequence of *P. rufa* toxin homologue gene (PrNT) is aligned with *Naja kaouthia*, *Naja sputatrix* and *Naja atra* toxin genes (B). The eight conserved cysteine residues are marked by solid circles.

PrNT 유전자는 뱀 독소 유전자들과 전반적으로 40% 이상의 상동성을 보이며, *N. kauthia*의 독소 유전자와 44%로 가장 높은 상동성을 보였다.

2) *P. rufa* 독소 유전자의 genomic DNA 구조 분석

PrNT 독소 유전자의 genomic structure를 알아보기 위하여 PrNT 특이적인 primer를 제작하고 PCR을 수행하여 하나의 band를 확보하고 염기서열을 밝혔다. 그 결과, cDNA 상의 coding 영역을 100% 확인할 수 있었으며 그 genomic 구조는 Fig. 3에 나타내었다. Genomic DNA는 개시코돈에서 종결코돈까지 456 bp의 염기서열로 2개의 intron과 3개의 exon으로 구성되어 있으며 (Fig. 3A), exon-intron의 경계영역에는 모든 진핵생물에서 변화없이 나타나는 intron 5'의 GT 그리고 intron 3'의 AT가 있음을 확인하였다 (Fig. 3B). 뱀 독소 유전자에서 보여지는 여덟 개의 cysteine 잔기도 exon 2와 3에 잘 보존되어 있었다.

(A)



(B)

Exon	Length of exon (bp)	Position in gene	Sequence exon-intron junction
1	25	1-25	ATCAGAAACCTCG.....AAACACGgtgagtggt M K Y L R D
2	139	173-311	acggtttcagGTGACCT.....GTGGGGGgtgaagtttcg G A S V G G
3	91	365-456	aatctttcagATATATGG.....AACCTCGA D I M N S stop

Fig. 3. Genomic organization of PrNT. (A) Schematic drawing of genomic structure of PrNT. Solid and open boxes represent exons and introns, respectively. Numbers indicate the nucleotide position in the genomic sequences. (B) Length of exons and exon.intron boundaries.

3) *P. rufa* 독소 유전자의 발현 및 특성 분석

전사단계에서 PrNT 독소 유전자의 발현되는 조직을 알아보기 위하여 *P. rufa*의 표피, 지방체, 중장 그리고 독샘 조직을 해부하여 total RNA를 분리하고 Northern blot 분석을 실시하였다 (Fig. 4). 그 결과, 표피 조직과 독샘 조직에서 band를 확인할 수 있었는데, 이것은 PrNT 독소 유전자가 표피와 독샘 특이적으로 전사 및 발현되는 유전자임을 알 수 있다. 이러한 결과로 추측건데, PrNT 독소 유전자는 *P. rufa* 유충이 주식으로 하는 달팽이를 잡아먹을 때, 발현되는 것으로 사료되어진다.

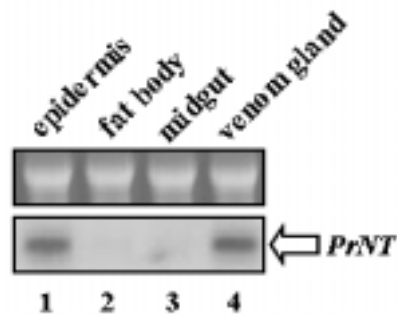


Fig. 4. Northern blot analysis of the *P. rufa* toxin homologue gene. Total RNAs were isolated from epidermis (lane 1), fat body (lane 2), midgut (lane 3) and venom gland (lane 4), respectively. The RNAs were separated by 1.0% formaldehyde agarose gel electrophoresis (upper panel), transferred on to a nylon membrane, and hybridized with the radiolabelled *P. rufa* toxin homologue gene (lower panel). Transcripts of the *P. rufa* toxin homologue gene (PrNT) are indicated on the right of panel by arrow.

4) *P. rufa* 독소 유전자의 재조합 베쿨로바이러스 제작 및 발현

PrNT의 경우, 모두 85개의 아미노산을 가지는데 발현하였을 시, 예상되는 분자량이 8-9 kDa으로 발현의 어려움을 극복하고 정제를 쉽게하기 His-Tag을 가진 pBAC1에 클로닝하였다. 클로닝 할 때 사용된 제한 효소는 *Bam*HI과 *Xho*I을 처리하여 pBAC1에 삽입하여 pBAC1-PrNT를 만들고 (Fig. 5) 재조합 베쿨로바이러스 AcNPV-PrNT를 제작하였다. 이 재조합 베쿨로바이러스 AcNPV-PrNT를 곤충세포 Sf9에 감염시키고 SDS-PAGE (data not shown)를 실시하였으나 mock- 또는 wtAcNPV-를 감염시킨 Sf9과 별 차이가 없었다. 이는 독소 유전자의 크기가 너무 작아서 발현에 어려움이 있었다. 그래서 재조합 베쿨로바이러스를 감염시킨 세포 lysate를 MagneHisTM Protein Purification System (Promega)을

이용하여 재조합 단백질 PrNT를 분리 정제하였다. 분리 정제한 재조합 단백질을 15% SDS-PAGE를 실시하고 His-tag antibody (Clontech)를 이용하여 Western blot 분석 (Fig. 6)을 실시하였다. 그 결과, 재조합 단백질 PrNT는 mock- 그리고 wtAcNPV를 감염시킨 곤충세포에서는 나타나지 않고 AcNPV-PrNT를 감염시킨 곤충세포에서만 약 14 kDa으로 나타났다. 예상되는 분자량은 약 8kDa 이었으나, 아마도 O-glycosylation에 의한 것으로 추측된다.

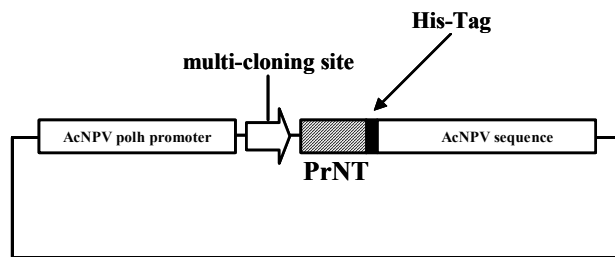


Fig. 5. Structure of the transfer vector used to generate the recombinant baculovirus. The transfer vector pBAC1-PrNT was constructed by insertion of the *P. rufa* toxin homologue gene into pBAC1, under the control of AcNPV polyhedrin promoter (polh). The arrow shows the direction of transcription.

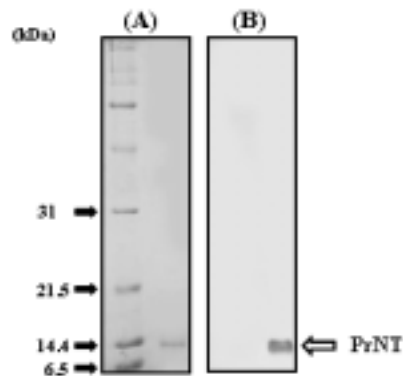


Fig. 6. Purification and Western blot analysis of the recombinant PrNT expressed in baculovirus-infected insect cells. The recombinant PrNT purified from baculovirus-infected insect cells was subjected to 15% SDS-PAGE (A), electroblotted and incubated with His-tag antibody (B).

다. *A. germari* 키틴아제 AgChi의 특성 분석

1) AgChi의 클로닝 및 염기서열 분석

유전자 특이 primer를 이용한 RT-PCR을 수행하여 확보한 키틴아제 유전자, AgChi를 선별하였다. *A. germari*로부터 클로닝한 키틴아제의 전체 cDNA의 염기서열을 분석한 결과, 390개의 아미노산으로 구성되며, 기존에 GenBank에 알려진 다른 키틴아제들과의 아미노산을 비교하였다 (Fig. 7). AgChi는 키틴아제 family 18 active site에 잘 보존되어진 [LIVMFY]-[DN]-G-[LIVMF]-[DN]-[LIVMF]-[DN]-X-E (Van Scheltinga et al., 1994)의 active site를 가지며 예상되는 N-terminal 서열에서 극소수성 아미노산 구조를 가지는 것으로 보아 signal peptide로의 역할을 하는 것으로 생각되어진다. Von Heijne's 법칙에 따르면 예상되는 signal peptide는 19번째 아미노산인 Ala 뒤에서 잘릴 것으로 사료된다. AgChi는 2개의 예상되는 N-glycosylation site를 가지는데 그 아미노산 서열은 154-157번째인 NGSA 그리고 241-244번째인 NATL 이다. 본 연구에서 찾은 AgChi는 현재 알려진 곤충 키틴아제와 같은 family에 속하는 것으로 예상되며 딱정벌레 *Phaedon cochleariae*의 키틴아제와 57%로 가장 높은 상동성을 나타낸다.

AgChi의 genomic DNA의 구조를 분석하기 위하여 AgChi 특이적인 primer를 제작하고 PCR을 수행하여 하나의 band를 확보하고 염기서열을 밝혔다. 그 결과, cDNA 상의 coding 영역을 100% 확인할 수 있었으며 그 결과는 Fig. 8A에 나타내었다. Genomic DNA는 개시코돈에서 종결코돈까지 2,894 bp의 염기서열로 6개의 exon과 5개의 intron으로 구성되어 있으며, exon-intron의 경계영역에는 모든 진핵생물에서 변화없이 나타나는 intron 5'의 GT 그리고 intron 3'의 AT가 있음을 확인하였다.

A. germari genomic DNA 상에 AgChi 유전자의 copy number를 알아보기 위하여 AgChi 유전자를 자르지 않는 제한효소를 처리하여 Southern blot을 실시하였다. 그 결과, Fig. 8B에서 보는 바와 같이 3개의 제한효소 *ApaI*, *BamHI* 그리고 *HindIII* 에 대하여 각각 single band로 나타났으며 이는 AgChi 유전자가 single copy로 존재함을 나타낸다.

2) 재조합 벡로바이러스를 이용한 AgChi 유전자의 발현

AgChi를 발현시키기 위하여 1,170 bp의 AgChi cDNA를 벡로바이러스 전이 벡터에 삽입하여 polyhedrin promoter 하에 두어 pBacPAK9-AgChi를 제작하였다. 재조합 바이러스, AcNPV-AgChi는 Sf9 곤충세포에 wild-type AcNPV와 pBacPAK9-AgChi를 같이 cotransfection시켜 유래되었다. 재조합 AcNPV-AgChi를 감염시킨 Sf9 곤충세포의 lysate

를 SDS-PAGE에 전기영동하여 46 kDa의 재조합 단백질 AgChi를 확인하였다 (Fig. 9A). 재조합 AgChi를 정제하여 단백질 전기영동을 하여 분리, 정제된 46 kDa의 band를 확인할 수 있었다(Fig. 9B). AgChi 항체를 이용한 Western blot 분석을 실시하여 SDS-PAGE와 마찬가지로 약 46 kDa의 band를 확인할 수 있다 (Fig. 9C). 그리고 정제한 재조합 단백질 AgChi를 0.01% glycol chitin을 함유한 SDS-PAGE를 실시하여 chitinolytic activity를 UV-illuminator 하에서 측정하여 lytic zone을 확인하였다 (Fig. 9D).

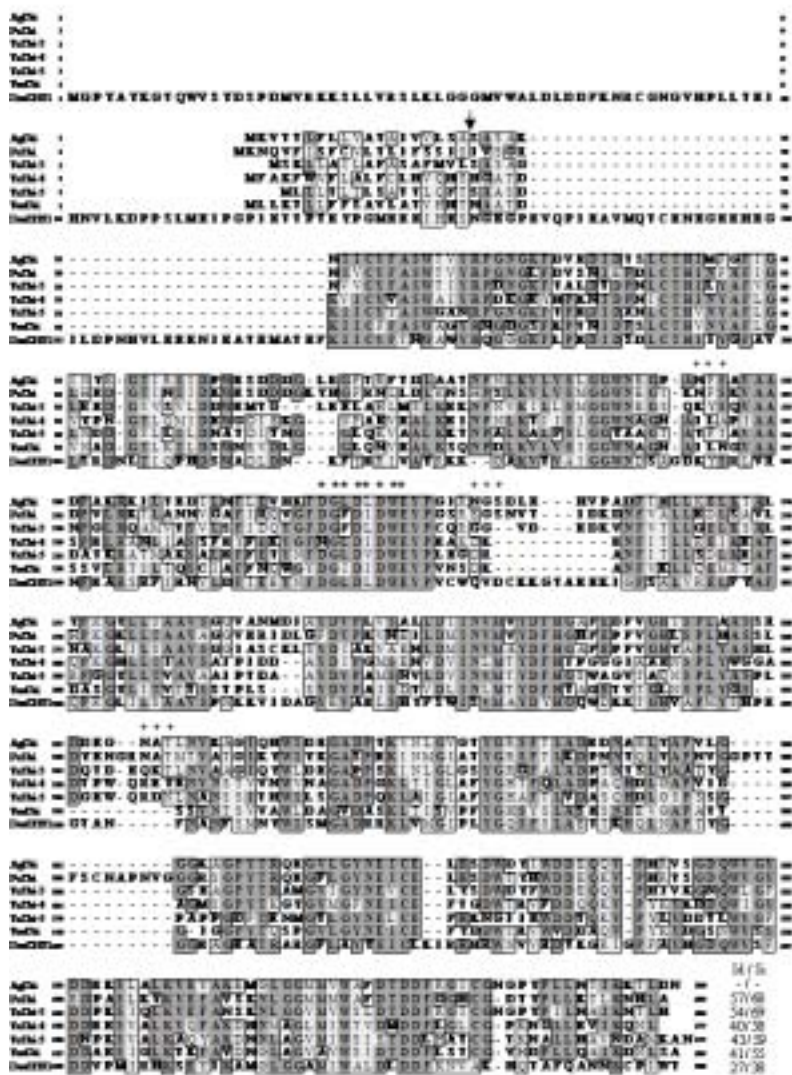


Fig. 7. Fig. 1. Alignment of the amino acid sequence of *AgChi* cDNA with known chitinases. Residues are numbered according to the aligned chitinase sequences, and invariant residues are shaded black. Dots represent gaps introduced to improve alignment. Chitinase family 18 active site signature is marked by asterisk. The arrow shows the end of the signal peptides. The N-linked glycosylation sites are indicated with the cross. The abbreviation and GenBank accession number for the chitinase sequences aligned are: *AgChi*, *A. germari* chitinase (this study); *PcChi*, *Phaedon cochleariae* chitinase (Y18011); *TcChi-3*, *Tribolium castaneum* chitinase-3 (AY873914);

TcChi-4, *T. castaneum* chitinase-4 (AY873915); TcChi-5, *T. castaneum* chitinase-5 (AY873916); TmChi, *Tenebrio molitor* chitinase (AY325895); DmCHI1, *Drosophila melanogaster* chitinase 1 (Q9W5U3).

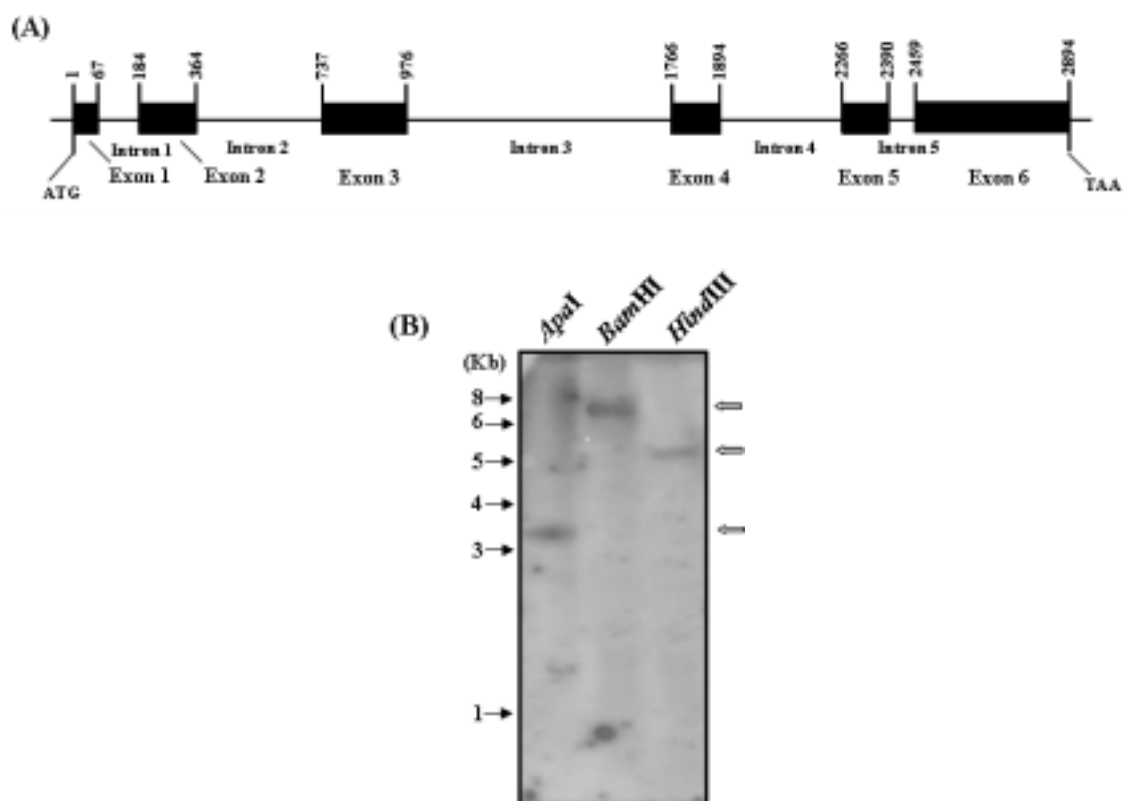


Fig. 8. Genomic organization and copy number of the *AgChi* gene. (A) Organization of the *AgChi* gene. Numbers indicate the position in the genomic sequences. (B) Southern blot analysis of *A. germari* genomic DNA for the *AgChi* gene. Genomic DNAs were digested with three restriction enzymes, *Apa*I, *Bam*HI and *Hind*III, respectively, and hybridized with radiolabeled *AgChi* cDNA. Size markers are shown on the left. Open arrows indicate hybridized bands.

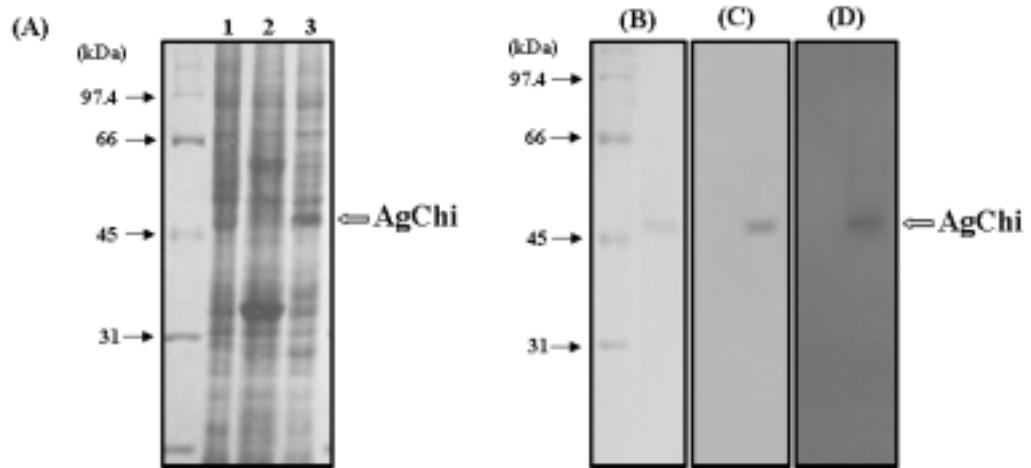


Fig. 9. Expression, purification and chitinolytic activity assay of the recombinant AgChi expressed in baculovirus-infected insect cells. (A) SDS-PAGE of the recombinant AgChi expressed in baculovirus-infected insect cells. Sf9 cells were mock-infected (lane 1) or infected with wild-type AcNPV (lane 2) and recombinant AcNPV (lane 3) at a MOI of 5 PFU per cell. Cells were collected at 2 days p.i. Total cellular lysates were subjected to 10% SDS-PAGE. The recombinant AgChi is indicated by open arrow on the right side of the panel. Molecular weight standards were used as size marker. (B-D) The identification of purified recombinant AgChi. The recombinant AgChi purified from baculovirus-infected insect cells was subjected to 10% SDS-PAGE (B), electroblotted and incubated with recombinant AgChi antibody (C). The same recombinant AgChi as in (B) was separated by 10% SDS-PAGE containing 0.01% glycol chitin. The chitinolytic activity of recombinant AgChi was assayed as dark lytic zones under UV illumination (D).

3) 재조합 단백질 AgChi의 당쇄부가

AgChi의 아미노산서열에서 2개의 예상되는 N-glycosylation site를 가지는데, 이 키틴 아제 단백질에 당의 부가와 역할을 알아보기 위하여 재조합 벡로로바이러스 AcNPV-AgChi를 Sf9 세포주에 감염시키고, tunicamycin을 처리하고, 대조구로는 tunicamycin을 처리하지 않았다. 감염시킨 곤충세포의 lysate를 SDS-PAGE 전기영동

(Fig. 10A), Western blot 분석 (Fig. 10B) 및 chitinolytic activity assay를 실시하였다 (Fig. 10C). Fig. 10에서 보는 바와 같이 tunicamycin을 처리한 곤충세포의 재조합 AgChi의 분자량이 줄어들었다. Western blot 분석 결과에서도 당 부가가 된 것은 46 kDa 그리고 tunicamycin에 의해 당 부가가 되지 못한 것은 42 kDa으로 나타났다. 똑같은 양의 단백질을 이용하여 chitinolytic activity assay를 실시하였다. 이때 당 부가여부에 상관 없이 모두 activity를 가지는데, 이는 AgChi가 당에 상관 없이 그 활성을 가진다는 것을 알수 있다.

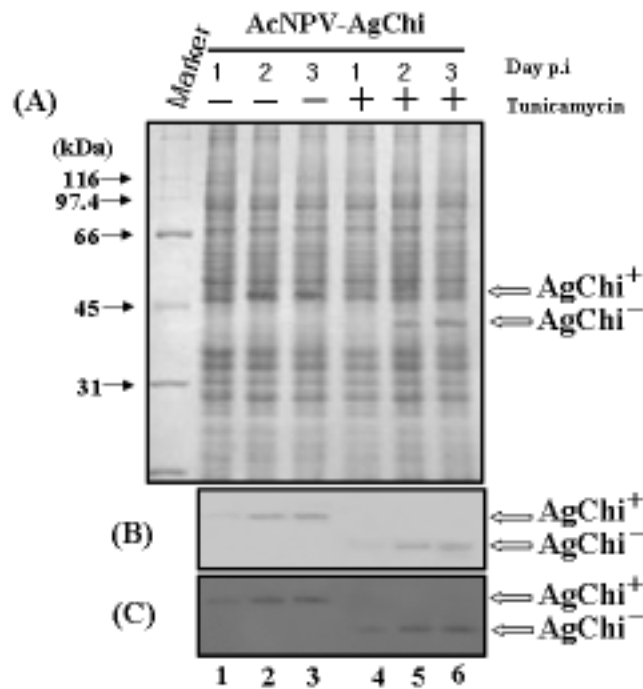


Fig. 10. N-linked glycosylation of recombinant AgChi by tunicamycin treatment. Sf9 cells were infected with recombinant AcNPV at a MOI of 5 PFU per cell. Cells were treated without (lanes 1, 2 and 3) or with (lanes 4, 5 and 6) tunicamycin (5 μ g/ml). Total cellular lysates were collected at 1 (lanes 1 and 4), 2 (lanes 2 and 5) and 3 (lanes 3 and 6) days p.i., respectively. Total cellular lysates were subjected to 10% SDS-PAGE (A), electroblotted and incubated with recombinant AgChi antibody (B). The same cellular lysates as in (A) were separated by 10% SDS-PAGE containing 0.01% glycol chitin. The proteins with chitinolytic activity are identified as dark lytic zones under UV illumination. The N-linked glycosylated AgChi (AgChi⁺) and

carbohydrate-deficient AgChi (AgChi-) are indicated by arrow on the right side of the panel.

4) AgChi의 조직 특이적 발현

AgChi의 조직 특이적 전사 및 발현 수준을 조사하였다. 먼저, *A. germari*의 표피, 지방체 그리고 장에서 분리한 total RNA를 이용한 Northern blot 분석에서 hybridization signal band는 장에서만 확인되었는데 (Fig. 11A) 이것은 장에서만 특이적으로 AgChi가 합성된다는 것을 알 수 있다. 그리고 장을 세부분, 전장, 중장 및 후장으로 구분하여 분리한 total RNA를 이용한 Northern blot 분석에서 signal band가 후장에서 다소 약하게 나왔지만 세 가지 모든 장 조직에서 발현된다는 것을 나타냈다 (Fig. 11B). 또한 전장, 중장 그리고 후장 세 조직을 SDS-PAGE 전기영동하고 Western blot 분석을 실시하였다 (Fig. 11C). 그 결과 Northern blot 결과와 같은 결과를 얻었다. 이것은 AgChi가 전장, 중장 그리고 후장의 모든 조직에서 전사 및 발현된다는 것을 알 수 있었다.

*A. germari*의 표피, 지방체 그리고 장 조직을 해부하여 SDS-PAGE 및 Western blot 분석하여 AgChi가 발현되는 조직을 연구하였다. 각각의 조직을 10% SDS-PAGE (Fig. 12A)를 전기영동하고 Western blot 분석 (Fig. 12B)을 실시한 결과, Western blot 분석에서 장 조직에서만 약 46 kDa의 band를 확인 할 수 있었다. 이것은 Northern blot 분석과 마찬가지로 AgChi는 장 특이적으로 합성, 분비 된다는 것을 나타낸다. 그리고 각 조직의 chitinolytic activity assay에서도 약 46 kDa에서 lytic zone을 확인 할 수 있다 (Fig. 12C). 그러나 장 조직에서 약 44 kDa의 lytic zone도 확인할 수 있으며 표피와 지방체 조직에서도 chitinolytic activity를 보이는 band가 나타났는데, 이것은 *A. germari*의 다른 종류의 키틴아제를 가지는 것으로 사료된다.

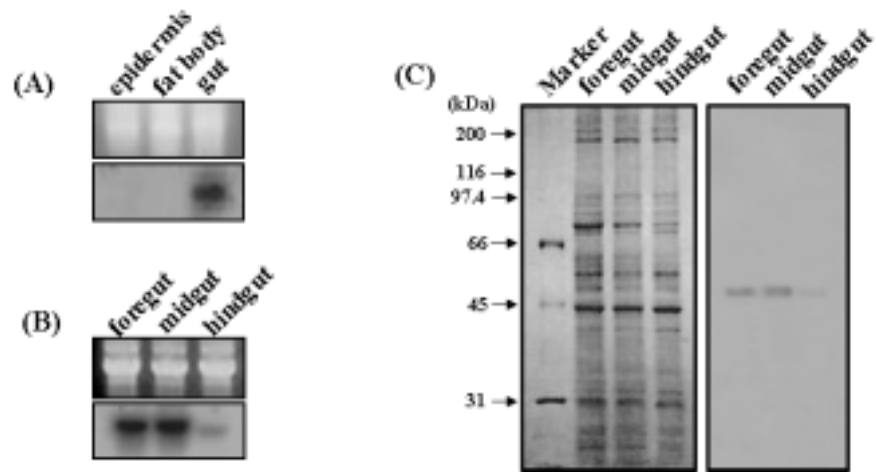


Fig. 11. Distribution of AgChi in *A. germari* larva. (A, B) Northern blot analysis of *AgChi* gene. Total RNA was isolated from the epidermis, fat body, and gut (foregut, midgut and hindgut), respectively. The RNA was separated by 1.0% formaldehyde agarose gel electrophoresis (upper panels), transferred onto a nylon membrane, and hybridized with radiolabelled *AgChi* cDNA (lower panels). (C) Western blot analysis of AgChi. The protein sample was collected from foregut, midgut and hindgut of *A. germari* larvae. The protein samples were subjected to 10% SDS-PAGE (left panel), electroblotted and incubated with recombinant AgChi antibody (right panel).

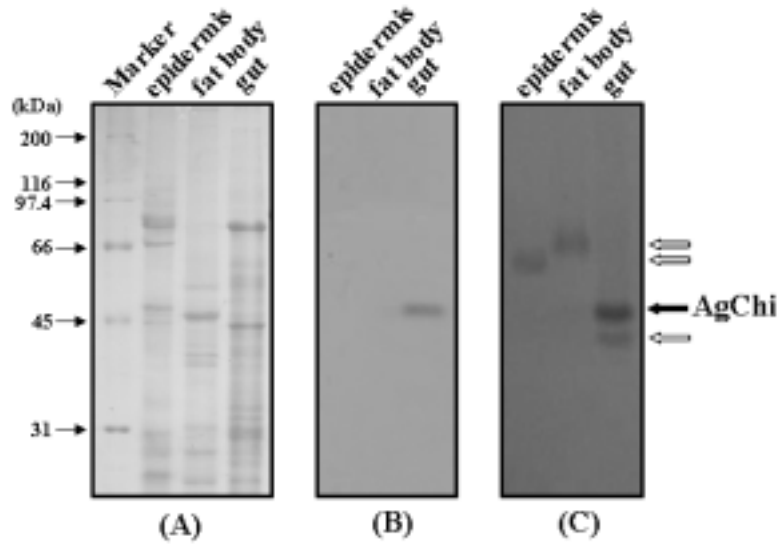


Fig. 12. Tissue-specific expression of AgChi. The protein samples were collected from epidermis, fat body, and gut of *A. germari* larva. The protein samples were subjected to 10% SDS-PAGE (A), electroblotted and incubated with recombinant AgChi antibody (B). In addition, the protein samples of panel (A) were separated by 10% SDS-PAGE containing 0.1% gelatin and the proteins with proteolytic activity were identified as lytic zones (C). The AgChi (solid arrow) and signal bands showing proteolytic activity (open arrows) are indicated on the right side of the panel.

라. *A. ventricosus* chitinase의 특성 분석

1) *AvChit1* cDNA의 클로닝 및 염기서열 분석

A. ventricosus 유전자 은행에서 클로닝한 *AvChit1*는 염기서열을 분석한 결과, 1,293 bp이고 431 개의 아미노산으로 구성되어 있다. 기존에 보고된 키틴아제와의 아미노산 서열을 비교하였다 (Fig. 13). *AvChit1*은 키틴아제 family 18에서 보이는 active site signature, [LIVMFY]-[DN]-G- [LIVMF]-[DN]-[LIVMF]-[DN]-X-E (Van Scheltinga et al., 1994)를 확인할 수 있다. 예상되는 *AvChit1*의 N-terminal sequence에 극소수성 아미노산 구조를 가지는 것으로 보아 signal peptide로의 역할을 하는 것으로 생각되어진다. Von

Heijne's 법칙에 따르면 예상되는 signal peptide는 19번째 아미노산인 Ala 뒤에서 잘릴 것으로 사료된다. 그리고 아미노산 260-263 번째에서 예상되는 N-glycosylation site 하나를 가지고 있다.

AvChit1의 예상되는 아미노산 서열과 지금까지 보고된 유사 키틴아제와의 계통도를 분석하였는데, 3개의 group (Fig. 14A)으로 분류되었다. AvChit1는 serine/threonine과 키틴 결합 도메인이 결핍된 *Glossina morsitans morsitans*, *Lutzomyia longipalpis*, *Anopheles gambiae*, *Phaedon cochleariae* 그리고 *Drosophila melanogaster*와 같은 곤충 유래 키틴아제들과 같은 subgroup을 형성하였다. AvChit1은 *G. morsitans morsitans*의 키틴아제 및 human chitotriosidase와 43%가 일치하였으며, 같은 subgroup 내 다른 곤충 키틴아제들과 30-40%의 상동성을 보였다 (Fig. 14B).

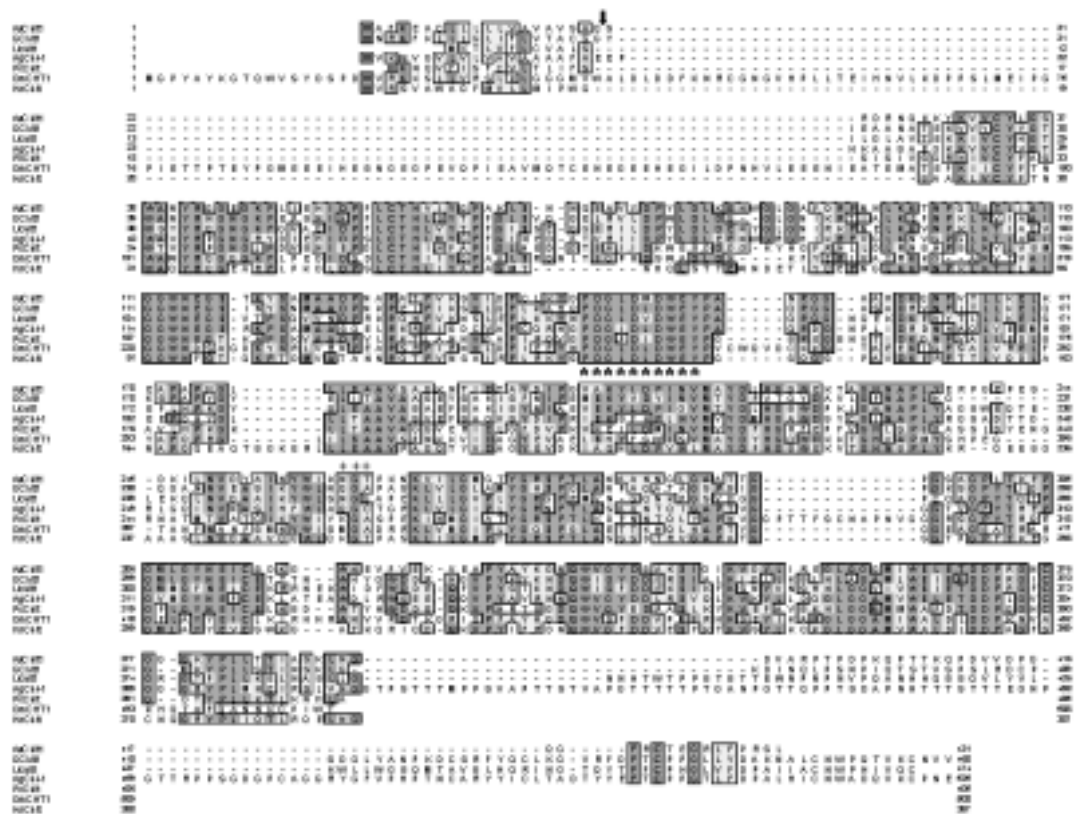


Fig. 13. Alignment of the amino acid sequence of *AvChit1* cDNA with known chitinases. Residues are numbered according to the aligned chitinase sequences, and invariant residues are shaded black. Dots represent gaps introduced to improve alignment. Chitinase family 18 active site signature is marked by asterisk. The arrow shows the end of the signal peptides. The N-glycosylation site is indicated with the cross. The GenBank accession numbers of *AvChit1* cDNA is AY120879. The abbreviation and GenBank accession number for the chitinase sequences aligned are: *AvChit1*, *A. ventricosus* chitinase (AY120879; this study); *Gchit1*, *Glossina morsitans morsitans* chitinase (AF337908); *Llchit1*, *Lutzomyia longipalpis* chitinase (AY148807); *AgChi-1*, *Anopheles gambiae* chitinase (AF008575); *PcChit1*, *Phaedon cochleariae* chitinase (Y18011), *DmCHT1*, *Drosophila melanogaster* chitinase (Q9W5U3); *HsChit*, *Homo sapiens* chitotriosidase (U62662).

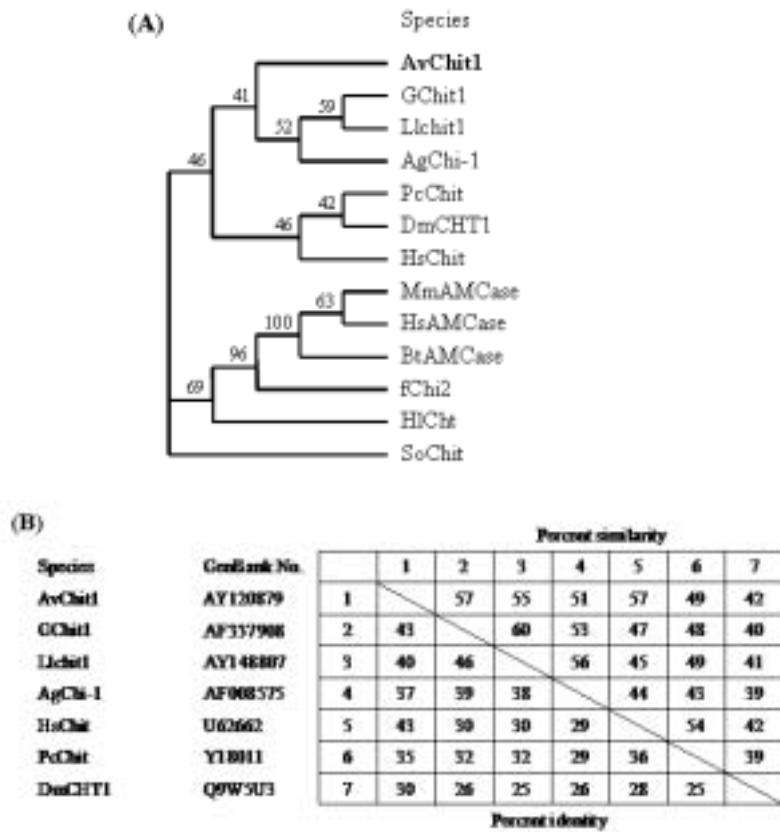


Fig. 14. Relationships among amino acid sequences of *AvChit1* and known chitinases. (A) A maximum parsimony analysis for the amino acid sequences of *AvChit1* and known chitinases. The tree was obtained by bootstrap analysis with the option of heuristic search and the numbers on the branches represent bootstrap values for 1,000 replicates. Outgroup was chosen as bacterium *Streptomyces olivaceoviridis* exochitinase (SoChit; Q05638). The abbreviation and GenBank accession number for the chitinase sequences analyzed are: AvChit1, *A. ventricosus* chitinase (AY120879; this study); GChit1, *G. morsitans morsitans* chitinase (AF337908); Llchit1, *L. longipalpis* chitinase (AY148807); AgChi-1, *A. gambiae* chitinase (AF008575); PcChit1, *P. cochleariae* chitinase (Y18011); DmCHT1, *D. melanogaster* chitinase (Q9W5U3); HsChit1, *H. sapiens* chitotriosidase (U62662); MmAMCase, *Mus musculus* acidic mammalian chitinase (AF290003); HsAMCase, *H. sapiens* acidic mammalian chitinase (AF290004);

BtAMCase, *Bos taurus* acidic mammalian chitinase (Q95M17); fChi2, *Paralichthys olivaceus* chitinase (AB121733); HlChit, *Haemaphysalis longicornis* chitinase (ABO74977). (B) Pairwise identities and similarities of the deduced amino acid sequence of *AvChit1* cDNA among chitinase sequences.

2) *AvChit1*의 조직 특이적 발현

먼저, *AvChit1*가 발현되는 조직을 조사하기 위하여 *A. ventricosus*로부터 지방체, 중장, 실샘 그리고 표피 조직에서 RNA를 분리하고 Northern blot 분석을 실시하였다 (Fig. 15). *AvChit1*는 지방체에서만 발현되는 것으로 보아 지방체에서만 특이적으로 발현된다는 것을 알 수 있다.

그리고 지방체, 중장, 실샘 및 표피 조직의 단백질을 분리하여 10% SDS-PAGE를 실시하고 (Fig. 16A) Western blot 분석 (Fig. 16B)을 실시하였다. Western blot 분석 결과, 지방체 조직 단백질에서만 한 개의 약 61 kDa band가 확인되었다. 또한 chitinolytic activity 실험 (lane 2 of Fig. 16C)에서 역시 약 61 kDa의 단백질 band를 확인하였는데, 이는 Northern blot, Western blot 및 chitinolytic activity 실험에서 *AvChit1*가 지방체에서 발현된다는 동일한 결과를 얻었다. 그러나 chitinolytic activity 실험에서, 표피 조직에서 약 60 kDa, 중장 조직에서 약 40 kDa 그리고 지방체 조직에서 또 다른 47 kDa의 chitinolytic activity band를 확인하였는데 이는 *A. ventricosus*에서 발현되는 다른 종류의 키틴아제들인 것으로 사료된다.

3) *AvChit1* 유전자의 copy number 분석

A. ventricosus genomic DNA 상에 *AvChit1* 유전자의 copy number를 알아보기 위하여 *AvChit1* 유전자를 자르지 않는 제한효소를 처리하여 Southern blot을 실시하였다. 그 결과, Fig. 17에서 보는 바와 같이 2개의 제한효소 *EcoRI* 그리고 *HindIII* 에 대하여 각각 single band로 나타났으며 이는 *AvChit1* 유전자가 single copy로 존재함을 나타낸다.

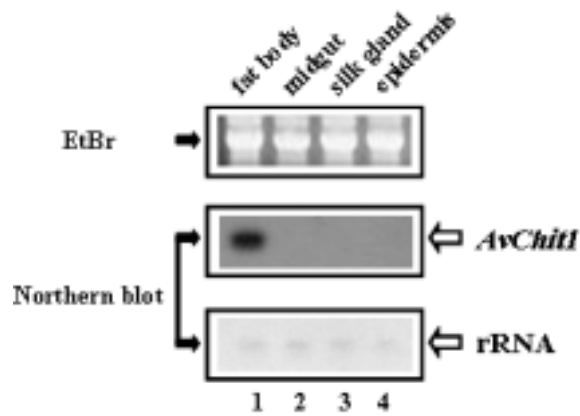


Fig. 15. Northern blot analysis of *AvChit1* gene. Total RNA was isolated from the fat body (lane 1), midgut (lane 2), silk gland (lane 3), and epidermis (lane 4), respectively. The RNA was separated by 1.0% formaldehyde agarose gel electrophoresis (upper panel), transferred on to a nylon membrane, and hybridized with the appropriate radiolabelled probe (middle panel). The 28S rRNA gene was used as an internal loading control (lower panel). Transcripts are indicated by arrow on the right side of the panel.

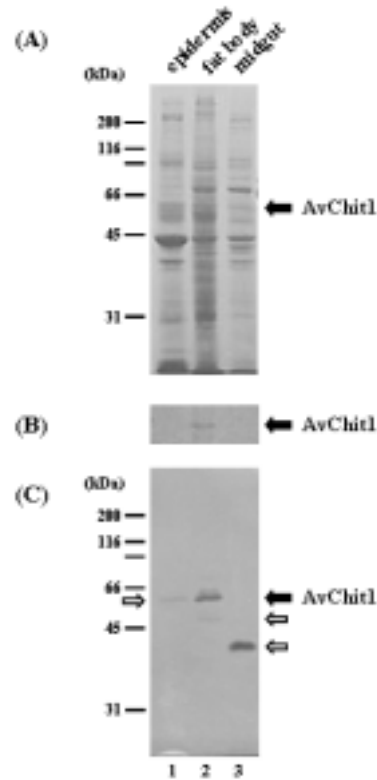


Fig. 16. Tissue-specific expression of AvChit1. The protein samples were collected from epidermis (lane 1), fat body (lane 2), and midgut (lane 3) of *A. ventricosus*. The protein samples were subjected to 10% SDS-PAGE (A), electroblotted and incubated with recombinant AvChit1 antibody (B). The same protein samples as in (A) were separated by 10% SDS-PAGE containing 0.01% glycol chitin. The proteins with chitinolytic activity are identified as dark lytic zones under UV illumination (C). The AvChit1 (solid arrow) and signal bands showing chitinolytic activity (open arrow) are indicated on the right side of the panel. Molecular weight standards were used as size marker.

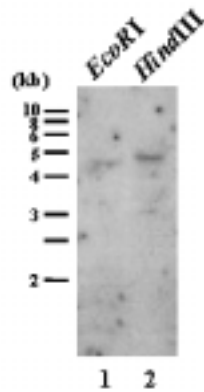


Fig. 17. Southern blot analysis of *A. ventricosus* genomic DNA for *AvChit1* gene. Genomic DNAs were digested with two restriction enzymes, *EcoRI* (lane 1) and *HindIII* (lane 2), and hybridized with radiolabelled *AvChit1* cDNA. Size markers are shown on the left.

4) 베쿨로바이러스를 이용한 *AvChit1* cDNA의 발현

*AvChit1*를 발현시키기 위하여 1,515 bp의 *AvChit1* cDNA를 베쿨로바이러스 전이 벡터에 삽입하여 polyhedrin promoter 하에 두어 pBacPAK9-*AvChit1*를 제작하였다. 재조합 바이러스, AcNPV-*AvChit1*는 Sf9 곤충세포에 wild-type AcNPV와 pBacPAK9-*AvChit1*를 같이 cotransfection시켜 유래되었다. 재조합 바이러스 AcNPV-*AvChit1*를 감염시킨 Sf9 곤충세포의 lysate를 SDS-PAGE에 전기영동 (Fig. 18A)을 하고 Western blot 분석 (Fig. 18B)을 실시하였다. 재조합 바이러스 AcNPV-*AvChit1*를 감염시킨 곤충세포에서 약 61 kDa의 재조합 *AvChit1*를 확인하였고 0.01% glycol chitin을 함유한 SDS-PAGE에서 역시 약 61 kDa 재조합 *AvChit1*의 lytic zone을 UV-illuminator 하에서 이용하여 확인하였다 (Fig. 18C).

5) 재조합 단백질 *AvChit1*의 당쇄부가

*AvChit1*의 아미노산서열에서 1개의 예상되는 N-glycosylation site (Asn260)를 가지는데, 이 키틴아제 단백질에 당의 부가와 역할을 알아보기 위하여 재조합 베쿨로바이러스 AcNPV-*AvChit1*를 Sf9 세포주에 감염시키고, tunicamycin을 처리하고, 대조구로는 tunicamycin을 처리하지 않았다. 감염시킨 곤충세포의 lysate를 0.01% glycol chitin을 함유

한 SDS-PAGE 전기영동하여 chitinolytic activity assay를 실시하였다 (Fig. 19). Fig. 19에서 보는 바와 같이 tunicamycin을 처리한 곤충세포의 재조합 AvChit1의 분자량이 약 58 kDa으로 약 61 kDa의 tunicamycin을 처리하지 않은 곤충세포의 결과보다 분자량이 줄어들었다. 이것은 재조합 단백질 AvChit1가 당 부가여부에 상관 없이 모두 activity를 가지는데, 이는 AvChit1이 당에 상관 없이 그 활성을 가진다는 것을 나타낸다.

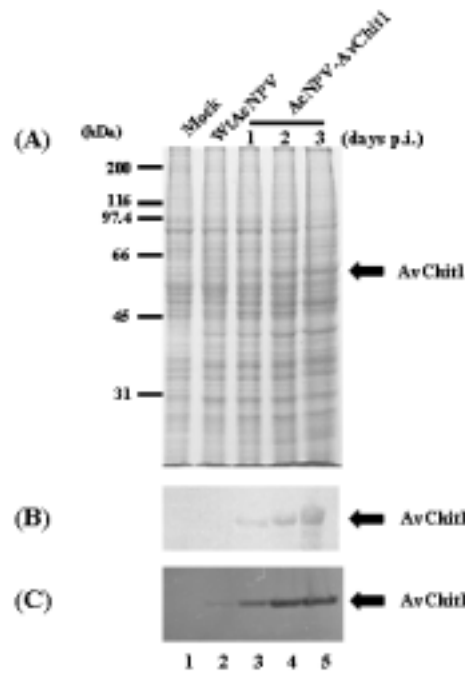


Fig. 18. SDS-PAGE, Western blot analysis and chitinolytic activity assay of the recombinant AvChit1 expressed in baculovirus-infected insect cells. Sf9 cells were mock-infected (lane 1) or infected with wild-type AcNPV (lane 2) and recombinant AcNPV (lanes 3, 4 and 5) at a MOI of 5 PFU per cell. Cells were collected at 1 (lane 3), 2 (lanes 2 and 4) and 3 (lane 5) days p.i. Total cellular lysates were subjected to 10% SDS-PAGE (A), electroblotted and incubated with recombinant AvChit1 antibody (B). The same cellular lysates as in (A) were separated by 10% SDS-PAGE containing 0.01% glycol chitin. The proteins with chitinolytic activity are identified as dark lytic zones under UV illumination (C). The recombinant AvChit1 is indicated by arrow on

the right side of the panel. Molecular weight standards were used as size marker.

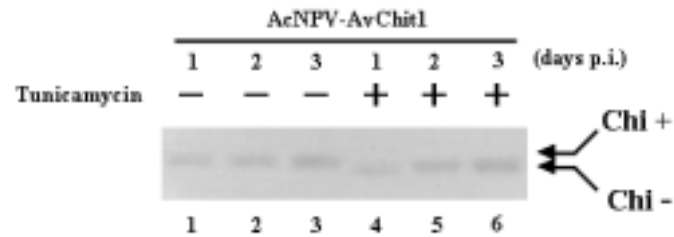


Fig. 19. *N*-linked glycosylation of recombinant AvChit1 by tunicamycin treatment. Sf9 cells were infected with recombinant AcNPV at a MOI of 5 PFU per cell. Cells were treated without (lanes 1, 2 and 3) or with (lanes 4, 5 and 6) tunicamycin (5 μ g/ml). Total cellular lysates were collected at 1 (lanes 1 and 4), 2 (lanes 2 and 5) and 3 (lanes 3 and 6) days p.i. Total cellular lysates were subjected to 10% SDS-PAGE containing 0.01% glycol chitin. The proteins with chitinolytic activity are identified as dark lytic zones under UV illumination. The *N*-glycosylated AvChit1 (Chi+) and carbohydrate-deficient AvChit1 (Chi-) are indicated by arrow on the right side of the panel.

제 3 절 병해충 (달팽이류 및 잭빛곰팡이병) 저항성 형질전환체의 개발

1. 방법 및 결과

가. 식물에서 곤충 유래 유전자의 발현 및 기능분석

거미 유래 키틴나아제 유전자(*AvChi*) 및 반딧불이 유래 독소 유전자(*PrNT*)를 식물에 도입하기 위해 pCambia 1300을 약간 변형한 벡터에 클로닝하였다. 클로닝 후 제한효소 (*SaI*)로 절단하고 전기영동하여 삽입 유전자를 확인하였다. 그리고 GUS 유전자를 호접란 형질전환 시스템 개발용 벡터로 이용하기 위해 pCambia 1300에 클로닝하였다 (Fig. 1).



Fig.1. Constructs for Arabidopsis and Phalaenopsis transformation. LB, left border; RB, right border; GUS, β-glucuronidase; HPT, hygromycin phosphotransferase; HT, histidine tag.

먼저 식물에서 곤충유래 유전자가 정상적으로 작동하여 발현하고 목적 단백질을 생산하는지를 알아보기 위해 식물 형질전환용 벡터에 클로닝된 유전자를 Arabidopsis에 infiltration 방법으로 형질전환한 후 T0 종자를 수확하여 hygromycin 50mg/L을 함유한 MS 배지에 과종하고 형질전환체를 선별하였다 (Fig. 2).

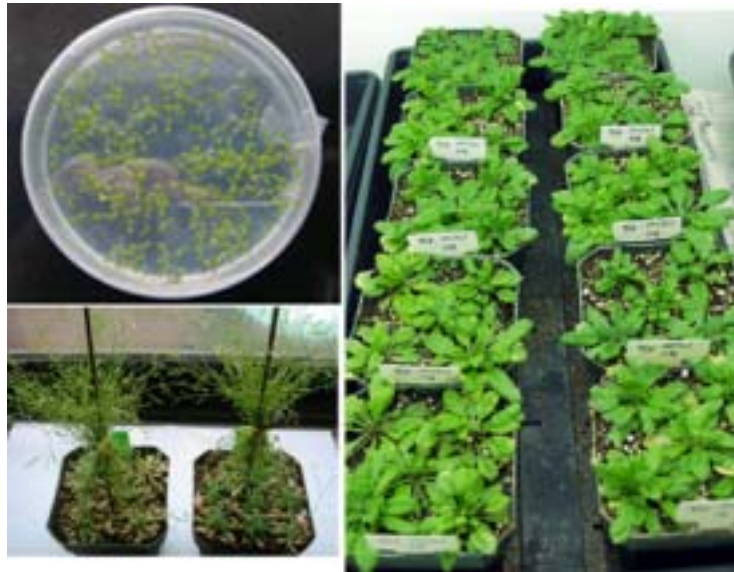


Fig. 2. Generation of transgenic *Arabidopsis* overexpressing *AvChi* and *PrNT* genes in the direct of sense.

MS 배지에서 항생제에 내성을 나타내는 형질전환체를 선발하여 포트에 심어 키운 후 T1 형질전환체로부터 종자를 수확하였다. 그리고 이들 종자를 2세대에 걸쳐 항생제가 함유된 배지에 파종하여 호모라인을 선발하였다 (Fig. 2). 곤충 유래 키티나아제와 독소 유전자 특이적 프라이머를 제작하여 선발된 호모라인을 대상으로 PCR을 수행한 결과, 대부분의 독소 유전자의 형질전환체로부터 약 300bp 크기의 PCR 밴드 얻었고, 키티나아제 유전자의 형질전환체로부터는 약 1.3kb 크기의 PCR 밴드를 얻어 목적으로 하는 유전자가 형질전환체에 존재함을 확인하였다 (Fig. 3).

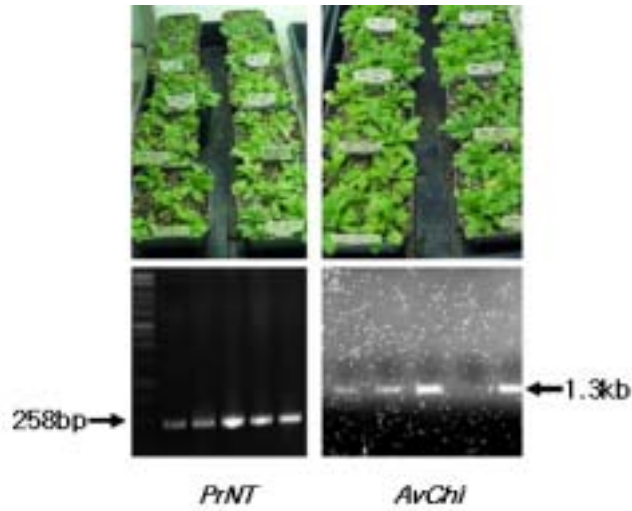


Fig. 3. Detection of transgenes from putative transgenic Arabidopsis plants containing *AvChi* or *PrNT* with PCR.

PCR로 선발된 형질전환체를 대상으로 각 유전자 특이적 probe를 제작하여 Southern blot 실험을 수행하였다 (Fig. 4). 각 형질전환체는 제한효소 *EcoRI*과 *BamHI*으로 genomic DNA를 절단한 후 전기영동하고, membrane에 흡착시킨 후 ^{32}P 로 표시된 probe로 Southern blot 실험을 수행한 결과, single copy 유전자가 형질전환체 내에 존재하는 것을 확인할 수 있었다.

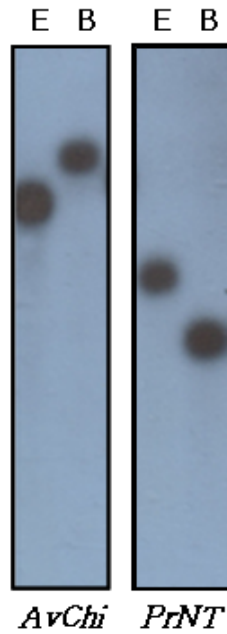


Fig. 4. Southern blot analysis of Arabidopsis genomic DNA digested with *EcoRI* (E), *BamHI* (B). The blots were hybridized with labeled cDNA *PrNT* or *AvChi*.

에기장대에 도입된 유전자들의 발현 정도를 알아보기 위해 Northern blot 실험을 수행하였다 (Fig. 4). 독소 유전자의 경우 형질전환체에 따라 유전자의 발현 정도에는 차이가 있었지만 곤충 유래 유전자인 독소 유전자가 식물체 내에서도 정상적으로 발현을 하는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 식물체의 외부 형질적 특성에는 야생형과 차이를 보이지 않았다 (Fig. 5).

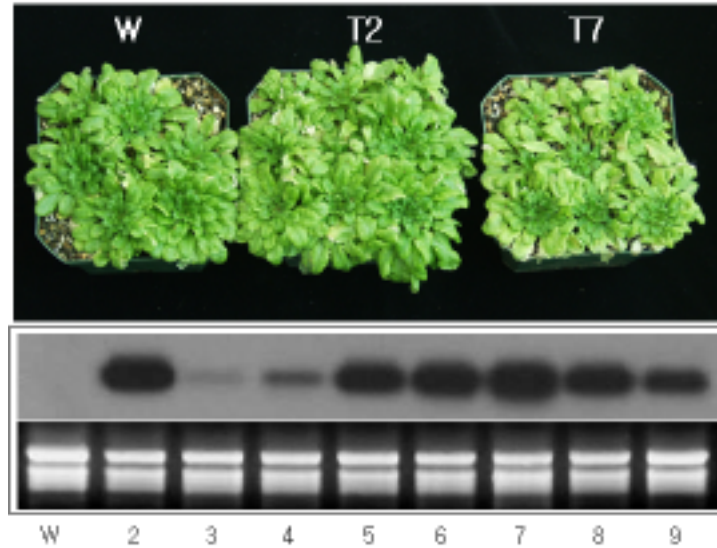


Fig. 5. Northern blot analysis of the expression of *PrNT* gene in wild-type and transgenic *Arabidopsis*. A, Phenotype of the *PrNT* overexpression lines and wild-type plants grown in the soil for 4 weeks. B, Levels of expression of the *PrNT* gene in the transgenic plants. 10 μ g of total RNA was loaded per line. The blot was probed with the *PrNT* insert.

키티나아제 유전자의 경우도 형질전환체 내에서 안정적인 발현 양상을 보였고, 특히 T2와 T4 라인에서 유전자의 발현 정도가 높았으며, 형질전환체의 생육 정도는 야생형 애기장대보다 형질전환체의 생육이 다소 좋은 것으로 나타났다 (Fig. 6).

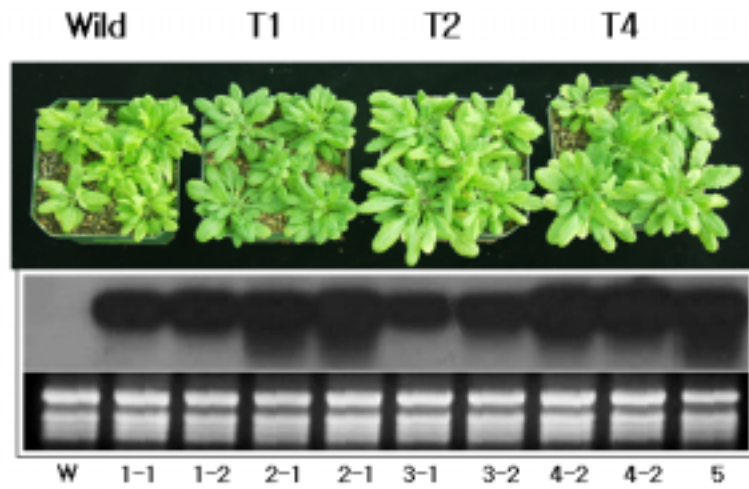


Fig. 6. Northern blot analysis of the expression of *AvChi* gene in wild-type and transgenic Arabidopsis. A, Phenotype of the *AvChi* overexpression lines and wild-type plants grown in the soil for 4 week; B, Levels of expression of the *AvChi* genes in the transgenic plants. 10 μ g of total RNA was loaded per line. The blot was probed with the *AvChi* insert.

곤충 유래 키틴나아제 유전자가 도입된 애기장대 형질전환체의 키틴나아제 효소의 활성을 측정한 결과, 유전자의 발현 정도가 높은 계통이 키틴나아제 효소활성이 높게 나타났으며, 야생형의 경우 거의 키틴나아제 활성을 보이지 않았다 (Fig. 7).

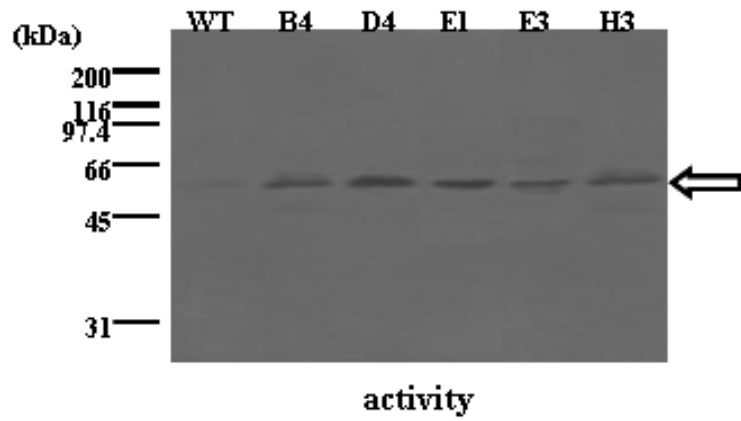


Fig. 7. Differential chitinase activity of transgenic Arabidopsis plants containing *AvChi* gene.

식물에 도입된 곤충 유래 키티나아제 유전자로부터 단백질의 생합성 유무를 알아보기 위해 Western blot 분석을 실시하였다. 거미 유래 키티나아제 유전자 (*AvChi*)를 벡탈로바이러스 벡터에 클로닝한 (Fig. 8) 후 곤충 세포에 형질전환하여 단백질을 발현시켰다.

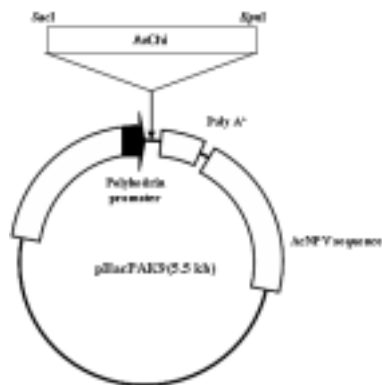


Fig. 8. Construction of recombinant virus with chitinase gene.

곤충 세포로부터 단백질을 분리하여 SDS-PAGE 전기영동한 결과, 형질전환 세포에서 키틴단백질이 발현됨을 확인하였다. 곤충 세포에서 발현된 키틴단백질을 분리한 후 쥐를 이용하여 항체를 제작하고 곤충 세포 유래 단백질과 Western blot 분석을 한 결과, 형질전환 세포에서 분리한 단백질에서만 밴드를 확인할 수 있다 (Fig. 9).

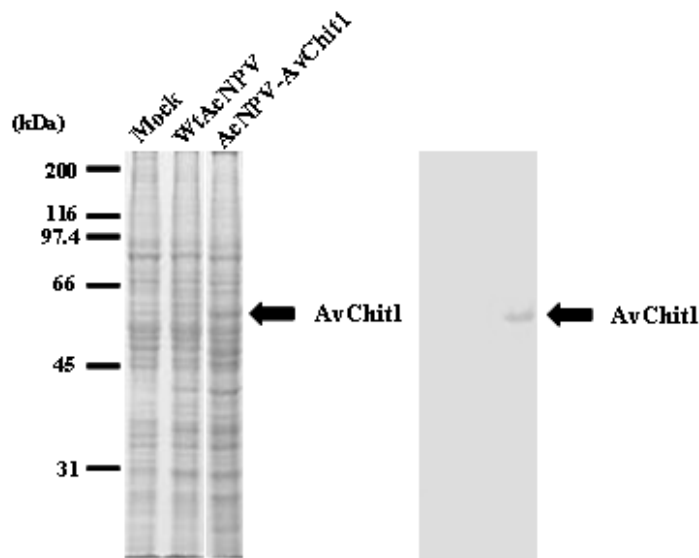


Fig. 9. SDS-PAGE and Western blot analysis of the recombinant *AvChit* gene expressed in baculovirus-infected insect cells.

곤충 세포 유래 키틴단백질로부터 제작된 항체를 이용하여 키티나아제 유전자가 도입된 형질전환 식물체로부터 분리된 단백질을 SDS-PAGE 전기영동 후 Western blot 분석을 실시하였다 (Fig. 10). 곤충 유래 키티나아제 유전자의 발현량이 많고 효소활성이 높았던 계통으로부터 단백질을 분리하여 전기영동 후 Western blot 분석을 실시한 결과 야생형 애기장대에서는 밴드가 나타나지 않은 반면, 형질전환체 계통들에서는 밴드를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 곤충 유래 키티나아제 유전자가 식물에 도입되어 유전자의 전사 과정과 번역과정이 정상적으로 이루어져 목적으로 하는 곤충 유래 키틴단백질이 만들어진 것으로 생각되며, 곤충 유래 유용 유전자를 식물에 도입하여 기존 식물이 가지고 있지 않은 유용 형질의 도입이 가능할 것으로 생각된다.

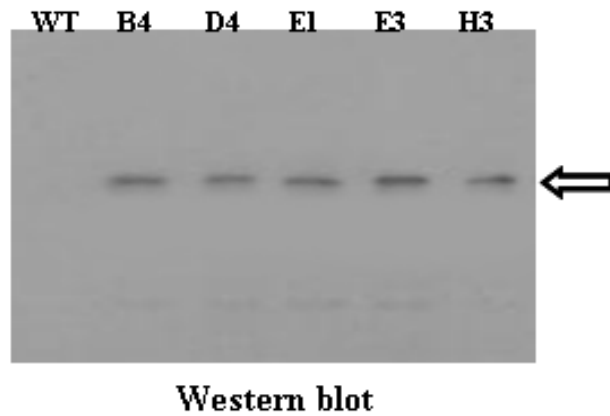


Fig. 10. Western blot analysis of the recombinant *AuChit* gene expressed in transgenic *Arabidopsis* plants.

곤충 유래 키틴아제 유전자가 도입된 형질전환체의 병저항성 정도를 검정하기 위해 키틴단백질의 생성량이 많았던 계통을 대상으로 *Botrytis cinerea*를 접종하였다 (Fig. 11). 2회에 걸쳐 *Botrytis cinerea*를 접종하고 과습 조건에서 병원균의 발병을 유도한 결과 야생형 애기장대에 비해 형질전환체가 약 40% 정도의 저항성을 나타냈고, 전체적인 생육도 야생형에 비해 형질전환체가 좋았다. 이러한 연구결과로 보아 거미 유래 키틴아제 유전자를 이용하여 병저항성 형질전환 식물체의 육성이 가능할 것으로 생각되며, 현재 여러 가지 병원균에 대한 저항성 정도를 구명하기 위한 연구를 수행 중에 있다.



Fig. 11. In vivo fungal bioassays of transgenic plants containing chitinase gene. T, Transgenic *Arabidopsis*; W, Wild-type *Arabidopsis*.

곤충유래 독소 유전자가 도입된 형질전환체의 해충저항성 정도를 검정하기 위해 독소 유전자의 발현량이 많았던 계통을 선발하여 검정날개버섯파리의 유충에 의한 가식 정도를 실험하였다 (Fig. 12). 2회에 걸쳐 검정날개버섯파리 유충에 의한 가식 정도를 조사한 결과 형질전환체는 거의 가식을 하지 않았고, 야생형 애기장대의 경우 가식의 정도가 심하여 생육에 크게 지장을 초래하는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 볼 때 곤충유래 독소 유전가 식물체 내에 도입되어 생산하는 독소 관련 단백질이 해충의 가식을 회피할 수 있는 중요한 수단이 될 것으로 생각되며, 독소 유전자를 이용한 다양 해충 저항성 작물의 개발도 가능할 것으로 생각된다. 그리고 현재 여러 가지 해충에 대한 가식 회피 정도를 계속 실험 중에 있다.



Fig. 12. Representative arabidopsis plants inoculated with *Bradysia* sp.

나. 호접란 형질전환 시스템의 구축 및 형질전환체 개발

호접란의 증식은 PLB를 이용하여 이루어지고 있고, 호접란의 형질전환은 대부분 PLB를 이용하여 이루어지고 있다. 호접란의 PLB는 주로 종자에서 유도하여 호접란의 대량번식에 이용하고 있고, 화경이나 잎의 절편으로부터 유도하기도 한다. 유도된 PLB는 일정기간의 계대배양을 통해 빠른 속도로 증식된다. 본 실험에서는 호접란 화경의 측아를 이용하여 절편을 얻고 이들 절편을 PLB 유도배지에 치상하여 상태가 양호한 PLB를 얻었다 (Fig. 13 and Table 1).

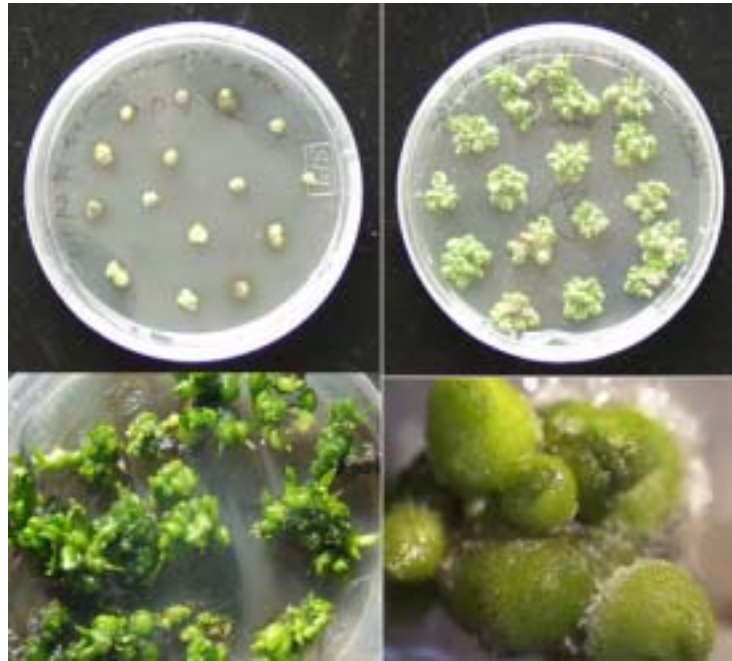


Fig. 13. Representation of PLB multiplication in Phalaenopsis.

Table 1. PLB induction medium of Phalaenopsis.

Items	Contents
Hyponex (N:P:K = 6.5:4.5:19)	1g/L
Hyponex (N:P:K = 20:20:20)	1g/L
Pepton	2g/L
Potato	30g/L
Activated Charcoal	0.5 g/L
Sucrose	30g/L
Agar	8g/L
pH	5.6

호접란의 형질전환을 위해 대량의 질적으로 우수한 PLB의 육성이 매우 필요하며, 이들 재료의 확보를 위해 우수한 PLB를 대량으로 증식시키기 위한 연구를 수행하였다. 하이포

넥스 배지를 기본으로 하고, 몇 가지 첨가물에 대한 PLB 증식 정도를 조사하였다. 일반적으로 호접란의 PLB 증식용 배지에는 코코넛워터를 주로 사용하여 왔다. 그러나 코코넛워터는 가격이 비싸고 구입이 어려워 다른 대체 물질로서 감자즙을 사용하여 PLB 증식에 미치는 효과를 실험하였다. 감자즙 30g/L를 코코넛워터 대신에 배지에 넣어 실험한 결과, 감자즙이 코코넛워터에 비해 PLB 증식에 효과적인 것으로 나타났고, 특히 초기 PLB 증식에 효과적이었으며, 코코넛워터의 경우 PLB 유도는 잘되나 생장이 늦은 특성을 나타내었다 (Fig. 14).

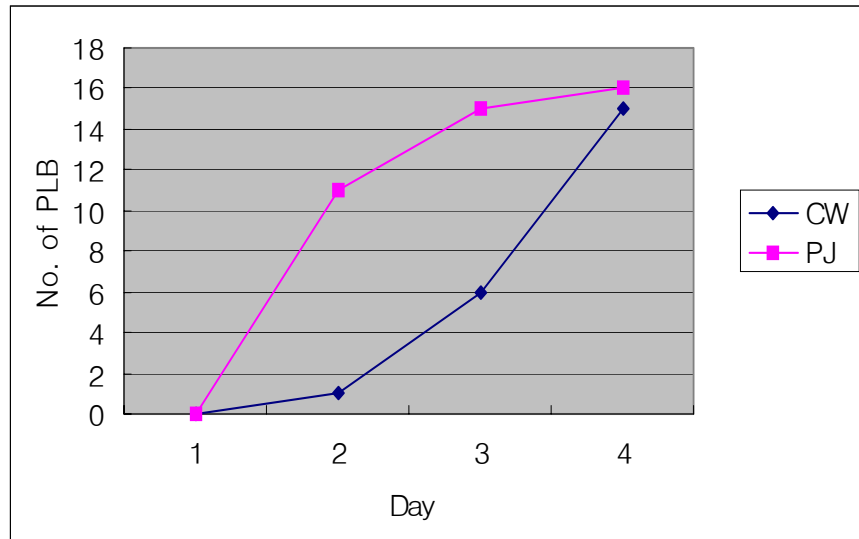


Fig. 14. Effect of coconut water (cw) and potato juice (pj) on PLB multiplication in Phalaenopsis.

호접란 PLB 배양시 많은 양의 페놀성 화합물이 절단면을 통해 유출되고 이들 물질이 PLB 증식에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이들 물질의 제거를 위해 활성탄소 분말을 잘 현탁하여 배지에 첨가한 후 활성탄소의 양이 PLB 증식 정도에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 15). 그러나 활성탄소의 경우 0.5g/L과 1g/L의 함량 차이에 의한 PLB 증식 정도에 차이를 보이지 않아 0.5g/L의 활성탄소량으로도 PLB 증식에는 큰 문제가 없을 것으로 생각된다.

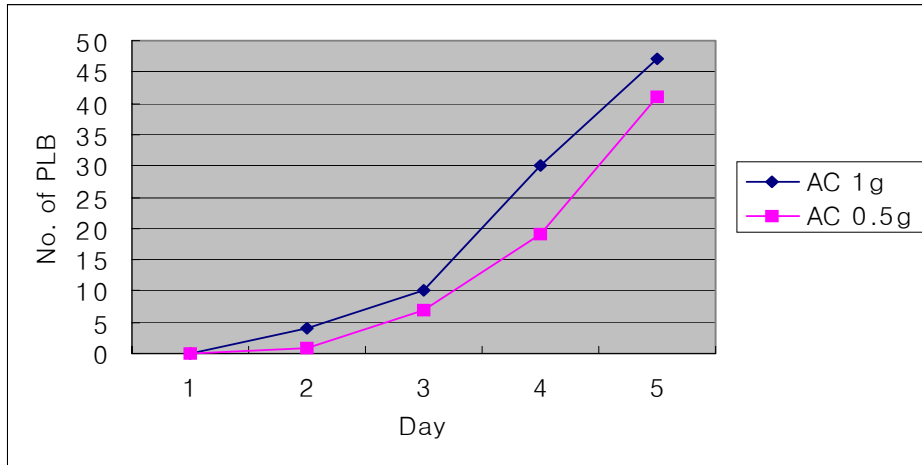


Fig. 15. Effect of activated charcoal (AC) concentration in hyponex medium on PLB multiplication in Phalaenopsis.

호접란 배양시 티아민의 처리가 PLB 증식에 미치는 영향에 대해 조사한 결과, 티아민 처리구가 무처리구에 비해 PLB 유도 및 증식에 효과적이었다. 그리고 초기 PLB 유도에 티아민이 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다 (Fig. 16).

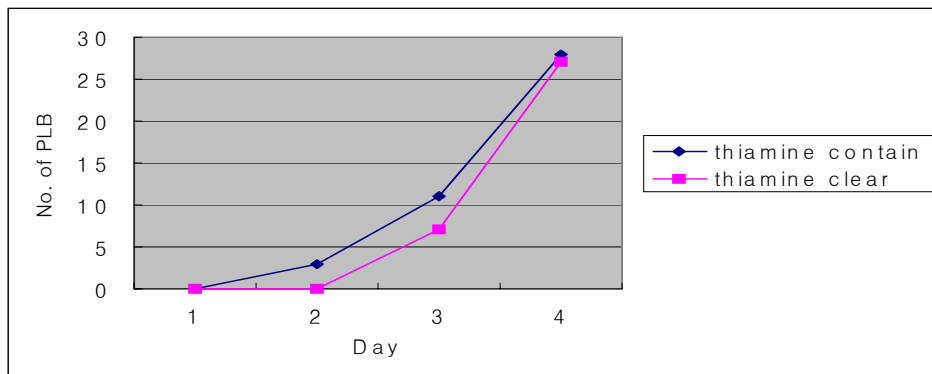


Fig. 16. Effect of thiamine contain and clear different on PLB formation in Phalaenopsis.

호접란 배양시 다량원소인 질소, 인산, 칼륨의 공급원으로 하이포넥스를 사용하고 있고, 가격이 저렴하고 사용이 편리하다. 호접란 PLB 증식에 미치는 하이포넥스의 영향을 조사한 결과, 하이포넥스를 공급하지 않은 처리구에서는 PLB의 증식이 현저하게 저하되었고, 1g/L과 2g/L 처리구에서는 PLB의 증식이 활발하게 이루어졌으며, 두 처리구간 증식율에는 차이가 없었다(Fig. 17).

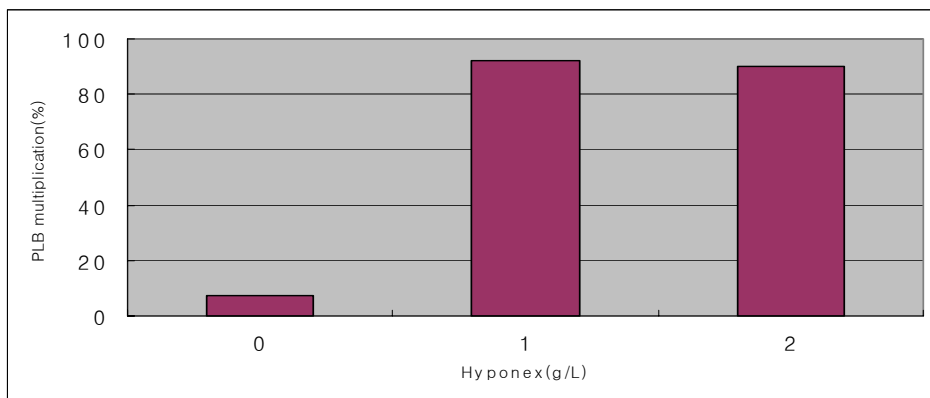


Fig. 17. Effect of hyponex concentration on PLB multiplication in Phalaenopsis.

식물 조직배양시 탄소원으로 주로 sucrose를 사용하고 있고, 호접란의 경우에도 다른 당들 보다 sucrose가 PLB의 증식에 효과적인 것으로 알려져 있다. 호접란의 PLB 증식에 미치는 sucrose의 적정 농도를 규명하기 위해 실험을 실시한 결과, 무처리에 비해 처리구가 PLB 증식에 효과적이었으며, sucrose 20g/L과 30g/L 처리구 간에는 유의적인 차이가 인정되지 않았다.(Fig. 18).

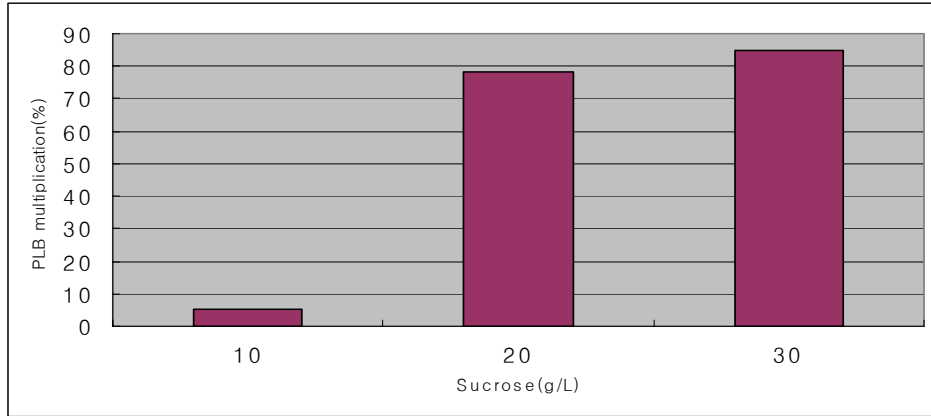


Fig. 18. Effect of sucrose concentration on PLB multiplication in Phalaenopsis.

호접란 PLB 증식 과정에서 배지의 조성이 가장 중요한 요인으로 작용하고 있으며, PLB 계대배양시 PLB의 절단 방법도 증식 과정에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 호접란 계대 배양시 PLB를 횡단하여 사용하는 것이 증식율이 좋으며, 종단하거나 여러조각으로 잘라서 사용할 경우 PLB 증식율이 매우 낮아진다. 호접란 계대배양시 PLB의 횡단 정도가 PLB의 증식율에 미치는 영향을 조사한 결과, PLB를 위로부터 1/3부위를 절단하여 계대배양한 경우 PLB의 증식율이 가장 높았고, 절단 부위가 아래쪽으로 내려갈수록 증식율이 떨어지는 경향을 나타냈다(Fig. 19).



Fig. 19. Effect of cutting position on PLB multiplication in Phalaenopsis.

A, 1/3 part from top position; B, 1/2 part from top position; C, 2/3 part from top position.

호접란의 형질전환을 위해 화경에서 유도된 PLB를 증식시키면서 가장 상태가 좋은 것을 선발하여 사용하였다. 먼저 호접란 PLB를 위쪽으로부터 1/3부위를 자르고, 목적으로 하는 유전자가 함유된 *Agrobacterium* 배양액을 철제 침에 묻혀 PLB를 침으로 찔러 상처 내는 deeping 처리를 하였다. 그리고 *Agrobacterium* 배양액과 PLB 절편을 공동 배양하여 *Agrobacterium*을 감염시켰다. Hygromycin이 함유된 PLB 증식 배지에 치상하여 형질전환된 PLB를 선발하였고, 새롭게 유도된 PLB를 shooting 배지에 옮겨 multishoot을 유도한 후 rooting 배지에 옮겨 재분화 개체를 확보하였다(Fig. 20, Table 2).

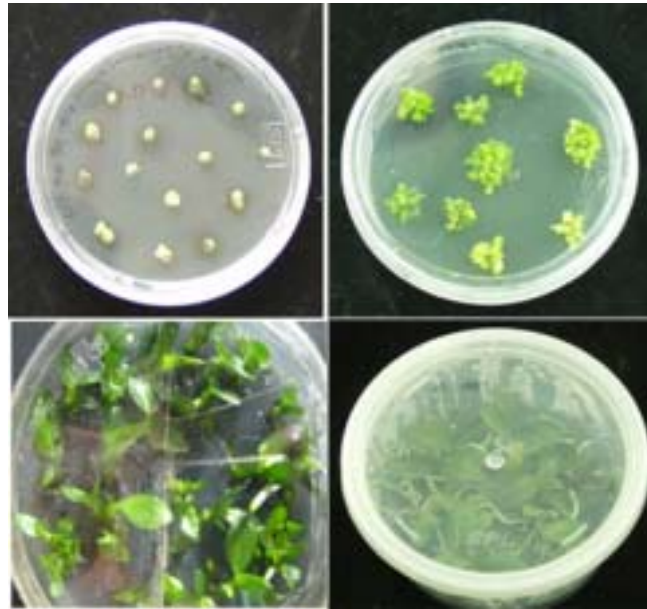


Fig. 20. Representation of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phalaenopsis*.

Table. 2. Multishoot and root induction medium of Phalaenopsis

Multishooting medium		Rooting medium	
Items	Contents	Items	Contents
MS	4.4g	Hyponex	1g
CW	50ml	CW	50ml
Sucrose	30g	Sucrose	30g
AC	0.5g	AC	0.5g
TDZ	30mg	Peptone	2g
Gelite	2.3g	Agar	8g
pH	5.6	pH	5.6

식물의 형질전환을 위해 주로 *Agrobacterium*을 매개체로 한 방법을 사용한다. 쌍떡잎 식물의 경우 *Agrobacterium*을 이용하여 외부 유전자의 도입이 쉽게 이루어지고 있으나 외떡잎식물의 경우 *Agrobacterium*이 옆절편 등을 통해 잘 감염되지 않기 때문에 *Agrobacterium*을 이용한 외부 유전자의 도입에 어려움이 있다. 벼의 경우 종자에서 캘러스를 유도하고, 유도된 캘러스로부터 배발생 캘러스를 선발하여 *Agrobacterium*을 감염시켜 외부 유전자를 도입하고 있다. 호접란도 외떡잎 식물로서 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에 어려움이 있고, 지금까지 몇몇 연구자들이 호접란 형질전환 실험을 수행하였고, Belarmino and Mii가 2000년에 최초로 화경에서 유도된 세포로부터 *Agrobacterium*을 이용한 호접란의 형질전환에 성공하였다. 그러나 좋은 세포를 얻기가 매우 어려운 단점이 있다. Chai 등은 PLB를 이용한 형질전환에 성공하였으나 이 또한 호접란의 종류에 따라 형질전환 효율에 큰 차이를 보여 안정적인 형질전환 방법으로 사용하기에는 어려움이 있다. 최근 Mishiba 등이 종자를 이용하여 PLB를 유도하고 여기에 형질전환을 하는 방법을 확립하였다. 그러나 형질전환 효율이 아직 낮고, 특히 종자로부터 유도되는 PLB는 변이체가 많이 생겨 상품화하기에는 많은 문제를 안고 있다. 본 연구에서는 생육이 좋고 변이가 적

은 우량 호접란의 PLB를 이용하여 Agrobacterium에 의한 호접란의 형질전환 체계를 확립하였고, 그 결과는 다음과 같다. Agrobacterium은 GV3101과 LBA4404보다 EHA105계통이 형질전환 효율이 높게 나타났다. Agrobacterium 접종 방법은 기존의 PLB 절편체를 Agrobacterium 배양액에 넣어 감염시키는 방법을 개선하여 Agrobacterium 배양액을 농축한 후 철제 침에 묻혀 PLB의 윗부분에 deeping 처리하였다. 이렇게 처리된 PLB를 다시 Agrobacterium 배양액에 넣어 감염시켰다. PLB 절단면에는 Agrobacterium이 잘 감염되지 않았으며, deeping 처리된 부위에는 Agrobacterium이 감염된 정도를 GUS assay를 통해 배양 과정 중에 계속해서 동정하였다(Fig. 21).

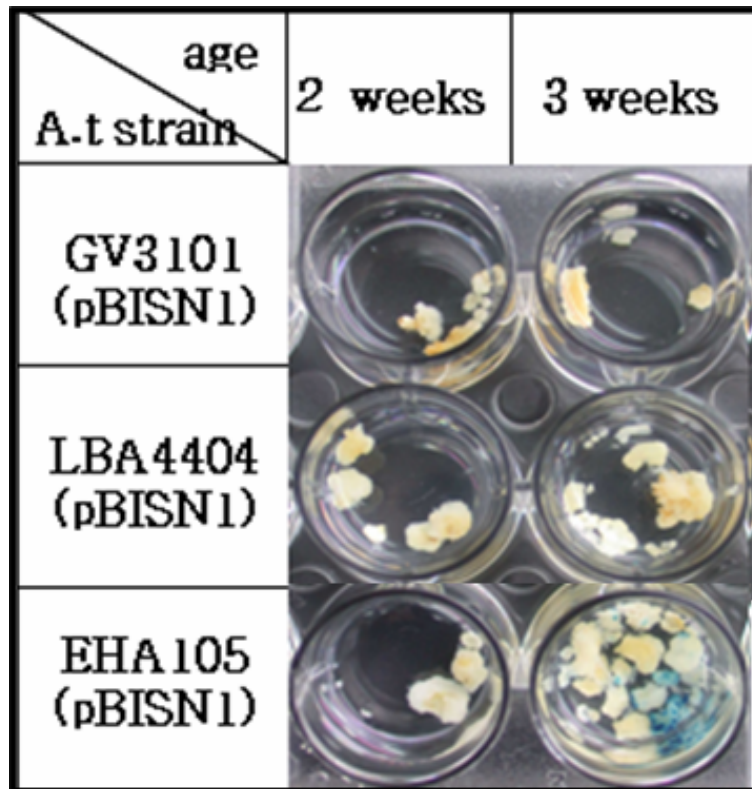


Fig. 21. Effects of Agrobacterium strains on the efficiency of Agrobacterium-mediated Phalaenopsis transformation

Agrobacterium 배양액의 농도가 호접란의 형질전환율에 미치는 영향을 조사한 결과, 배양액의 흡광도 값이 0.8일 때 가장 적당하였고, 1.2의 경우 Agrobacterium의 제거에 어려움이 있었으며, 이로 인해 PLB의 증식이 억제되고 형질전환된 PLB를 선발하기가 매우 어려웠다. Agrobacterium의 제거를 위해 카베니실린을 사용하였으며, 일반적인 농도보다 다소 높은 200mg/L의 농도가 효과적인 것으로 나타났다(Fig. 22).

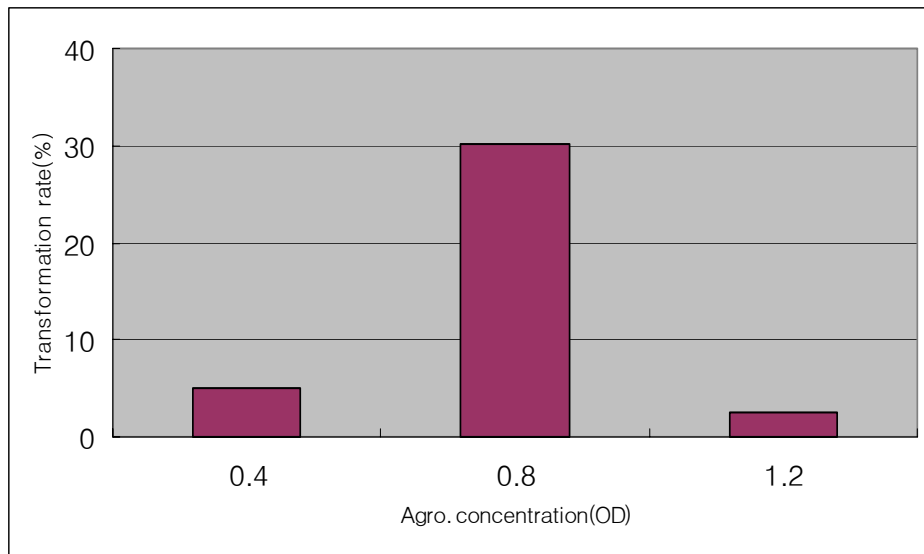


Fig. 22. Effect of Agrobacterium concentration on transformation efficiency in Phalaenopsis.

형질전환된 호접란 PLB의 선발은 hygromycin이 함유된 PLB 증식 배지에서 이루어졌고, hygromycin 농도가 증가할수록 형질전환 되지 않은 PLB의 증식이 억제된 후 죽는 개체가 증가하였다. 그리고 형질전환된 개체도 농도의 증가에 따라 증식이 억제되는 경향을 나타내어 저농도의 hygromycin을 함유한 배지에서 형질전환된 PLB를 선발하는 것이 바람직할 것으로 생각된다 (Fig. 23).

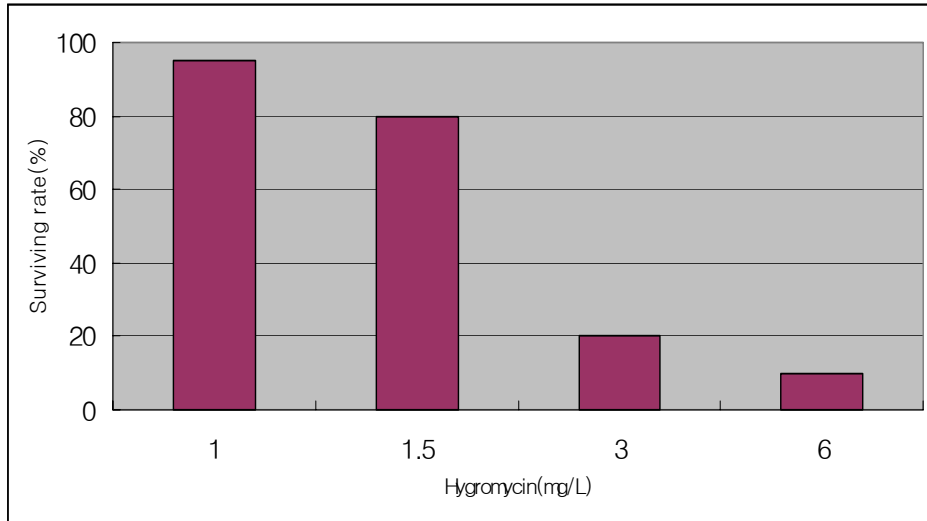


Fig. 23. Effect of hygromycin concentration on surviving rate of PLB in Phalaenopsis.

Agrobacterium의 감염 시간이 형질전환 효율에 미치는 영향을 조사한 결과, deeping 처리된 호접란 PLB를 20분간 아그로박테리아 배양액에 넣어 감염 시키는 것이 가장 효과적인 것으로 나타났다. 감염 시간을 30분으로 한 경우 PLB의 증식이 다소 지연되는 것으로 나타났다(Fig. 24).

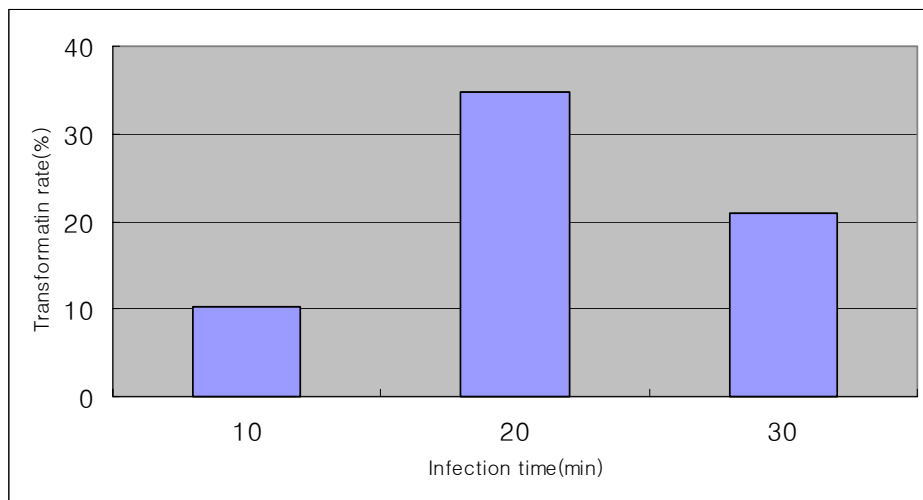


Fig. 24. Effect of infection time on transformation efficiency in Phalaenopsis.

Agrobacterium을 매개로 한 형질전환에서 Agrobacterium의 감염을 촉진하기 위해 공동 배양 시간은 매우 중요하다. 일반적으로 공동배양 시간을 길게 하면 감염율은 증가시킬 수 있지만 공동배양 후 잉여의 Agrobacterium을 제거하기가 곤란하며, 이로 인해 형질전환체의 생육이 저해를 받는다. 호접란 형질전환 효율 증대를 위한 공동배양 시간은 5일 정도가 적당한 것으로 생각되며, 공동배양 시간이 7일의 경우 Agrobacterium의 제거가 잘되지 않아 PLB의 증식이 억제되어 형질전환 PLB를 얻기가 어려웠다(Fig. 25).

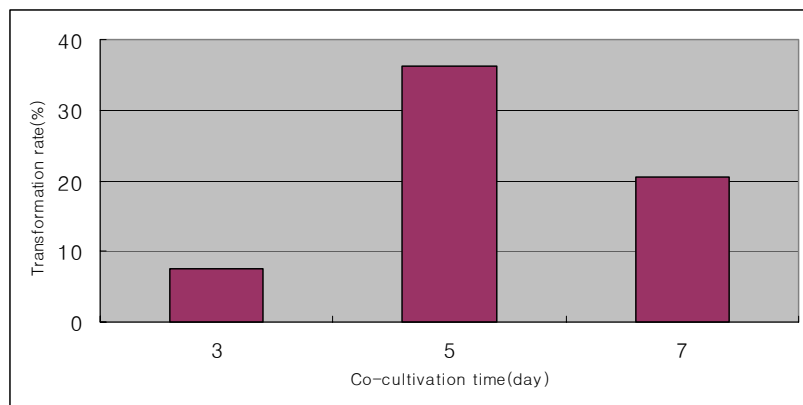


Fig. 25. Effect of co-cultivation time on transformation efficiency in Phalaenopsis.

효율적인 호접란 형질전환 체계의 확립을 위해 GUS 유전자를 함유하고 있는 pCambia 1302 벡터를 Agrobacterium EHA105에 도입한 후 deeping 방법으로 호접란 PLB에 형질전환하였다. Hygromycin을 함유한 PLB 증식배지에서 형질전환체를 선발하였고, 선발된 PLB 형질전환체와 식물체를 GUS assay로 형질전환 유무를 확인하였다(그림 26). 형질전환된 호접란 PLB로부터 증식된 대부분의 새로운 PLB는 GUS 염색이 강하게 나타났고, 특히 기존의 PLB는 GUS 염색이 되지 않은 반면 기존 PLB에서 deeping 처리된 부위에서 새롭게 생성되는 PLB에서 GUS 염색이 강하게 나타났다. 형질전환 되지 않은 개체는 GUS 염색이 되지 않았다. 이러한 결과로 보아 호접란 PLB를 deeping 처리하는 것이 형질전환 효율을 증진시킬 수 있을 것 생각된다.



Fig. 26. Regeneration of transgenic phalaenopsis plants from protocorms using *Agrobacterium tumefaciens*.

호접란 형질전환체의 선발을 위해 GUS 염색을 나타내는 개체를 대상으로 GUS 유전자 특이적인 프라이머를 제작하여 PCP을 수행하였다(Fig. 27). GUS 유전자가 도입된 PLB와 식물체로부터 1.2kb 크기의 밴드를 얻을 수 있었고, 반면 야생형에서는 밴드가 나타나지 않아 GUS 발현을 보이는 개체들이 정상적으로 형질전환된 것을 알 수 있었다.

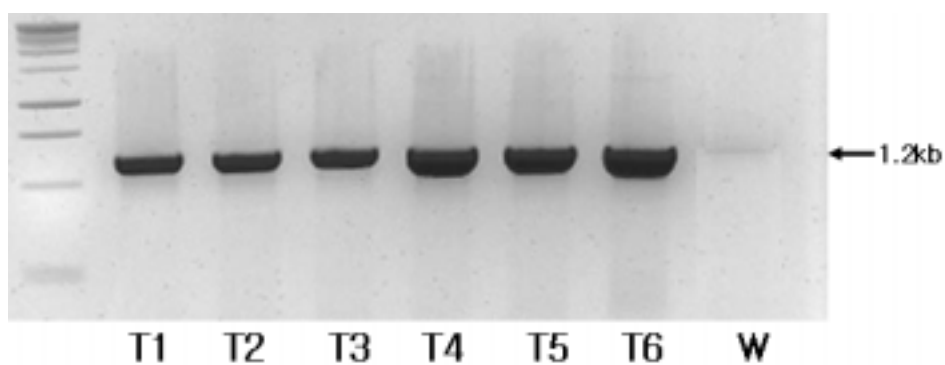


Fig. 27. PCR analysis on transgenic Phalaenopsis containing GUS gene.
T, Transgenic PLB and plant; W, wild-type

곤충 유래 키틴아제 유전자와 독소 유전자가 도입된 호접란의 선발을 위해 목적 유전자에 특이적인 프라이머를 작성하여 PCR을 수행한 결과, 키틴아제 유전자가 도입된 형질전환체로부터 1.3kb 크기의 밴드를 얻을 수 있었고, 독소 유전자가 도입된 형질전환 식물체로부터 약 300bp 크기의 밴드를 확인하였다(Fig. 28).

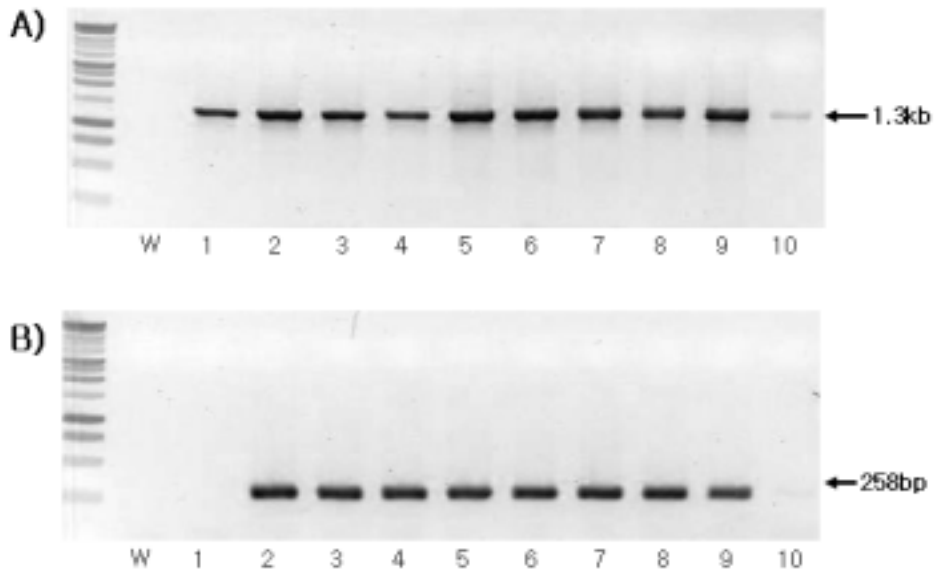


Fig. 28. PCR analysis on transgenic *Phalaenopsis* containing chitinase and toxin gene. A, chitinase gene; B, toxin gene

이러한 결과들은 PLB를 이용한 기존의 형질전환 방법과 *Agrobacterium*을 감염시키는 방법이 전혀 다른 것으로서 Belarmino와 Mishiba의 형질전환 효율보다 훨씬 높은 호접란 형질전환효율을 나타내었다. 그리고 변이체의 발생빈도도 훨씬 적을 것으로 생각되어 본 연구방법이 호접란 형질전환을 위해 가장 적합할 것으로 생각된다. 본 연구결과를 이용할 경우 이미 알려져 있는 방법에 비해 곤충 독소 유전자 및 거미 유래 키틴아제 유전자가 안정적으로 형질전환된 식물체에서 삽입, 발현되며, 그 activity 또한 가진다는 것을 알 수 있다. 본 연구에서 확립된 호접란 형질전환법을 사용하여 병충해에 저항성을 가지는 호접란의 육성과 식물의 분화발달 기능을 가진 유전자를 이용하여 형태적으로 고부가가치를

가지는 호접란을 육성함으로서 병해충 방제를 위한 농민의 일손을 덜어 주어 생산비를 절감하고, 안정적이고 고부가가치를 가지는 호접란 신품종의 육성으로 소득증대에 크게 기여할 것으로 생각된다.

4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 달팽이 방제에 효과적인 독소 유전자 선발 ○ 달팽이 방제에 효과적인 독소 유전자의 발현 및 특성 분석 ○ 잣빛곰팡이병 방제에 효과적인 키틴아제 유전자 선발 ○ Agrobacterium을 이용한 형질전환 시스템의 확립 ○ 형질전환용 벡터의 제조 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 달팽이 방제에 효과적인 독소 유전자 선발 (20) ○ 달팽이 방제에 효과적인 독소 유전자의 발현 및 특성 분석 (20) ○ 잣빛곰팡이병 방제에 효과적인 키틴아제 유전자 선발 (10) ○ Agrobacterium을 이용한 형질전환 시스템의 확립 (30) ○ 형질전환용 벡터의 제조 (20)
2차년도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 달팽이 방제에 효과적인 재조합독소의 생물검정 ○ 잣빛곰팡이병 방제에 효과적인 키틴아제 유전자의 발현 및 생물 검정 ○ 달팽이류 방제를 위한 저항성 유전자가 도입된 형질전환체의 개발 ○ 형질전환체 선발을 위한 GUS 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 달팽이 방제에 효과적인 재조합독소의 생물검정 (25) ○ 잣빛곰팡이병 방제에 효과적인 키틴아제 유전자의 특성 및 생물 검정 (25) ○ 달팽이류 방제를 위한 저항성 유전자가 도입된 형질전환체의 개발 (50)
3차년도 (2005)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 달팽이류 방제를 위한 저항성 품종의 방제효과 ○ 잣빛곰팡이병 방제를 위한 저항성 형질전환체의 방제효과 ○ 잣빛곰팡이병 방제를 위한 저항성 형질전환체의 개발 ○ 저항성 유전자를 대량 발현하고 있는 형질전환체의 선발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 달팽이류 방제를 위한 저항성 형질전환체의 방제효과 (25) ○ 잣빛곰팡이병 방제를 위한 저항성 형질전환체의 방제효과 (25) ○ 잣빛곰팡이병 방제를 위한 저항성 형질전환체의 개발 (50)
최종 평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 달팽이류 및 잣빛곰팡이병 방제를 위한 저항성 형질전환체의 육성 ○ 달팽이류 및 잣빛곰팡이병 방제를 위한 저항성 형질전환체의 방제효과 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 달팽이류 및 잣빛곰팡이병 저항성 형질전환체의 방제효과 (50) ○ 달팽이류 및 잣빛곰팡이병 방제를 위한 저항성 형질전환체 개발 및 특허 출원 (50)

제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도 및 기대효과

1. 기술적 측면

- 가. 곤충 등 저항성 유전자 탐색으로 다양한 유전자원 확보
- 나. 병해충 (달팽이류 및 잭빛곰팡이병)에 대한 저항성을 가진 호접란 형질전환체 개발
 - 달팽이 방제를 위한 독소 유전자를 가진 호접란 개발
 - 잭빛곰팡이병 방제를 위한 키틴아제를 이용한 호접란 개발
- 다. 병해충 저항성 형질전환체 개발로 타 작물의 형질전환체 개발 기술 제고
- 라. 호접란의 형질전환체 개발 기술 확립

2. 경제·산업적 측면

- 가. 농가 고소득 수출 화훼작목으로 위치를 굳혀가고 있는 호접란은 연간 입식되는 종묘는 약 천만본으로 추정되는데, 병해충의 피해를 친환경화적 방제 기술 개발에 의해 줄임으로서 생산성 향상과 안정적 재배로 상품화율의 제고 및 농가 소득 증대에 기여
- 나. 호접란 병해충의 친환경화적 방제 기술 개발은 호접란 재배에 있어서 병해 감소에 따른 비용절감과 아울러 안정적인 재배와 단지화가 가능하여 지속적인 농가 고소득 작목으로 농가 소득 증대
- 다. 호접란 병해충의 친환경화적 방제 기술 개발은 호접란 신품종 육성 기술로 이어지기 때문에 국내 호접란 화훼산업의 경쟁력 확보가 가능하고 아울러 국내·외에 등록과 함께 수출이 가능함

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구, 병해충 저항성 유전자를 선발하는 과정에서 실험한 저항성 유전자의 하나인 거미 키틴아제 유전자 (*AgChitI*)의 염기서열을 분석하고 유전자를 발현하여 특성을 밝혀 국제 SCI 학술잡지 (Comparative Biochemistry and Physiology)에 게재하였으며, 뽕나무 하늘소 유충 유래 키틴아제 역시 국제 SCI 학술잡지 (European Journal of Entomology)에 투고 중에 있다.

호접란 병해충 (달팽이, 잿빛곰팡이병) 방제에 효과적인 저항성 품종 및 신품종 육성 기술 개발에 의한 호접란의 형질전환 품종은 전문가와 함께 현장 실증시험을 거쳐 개발하고 특허 및 등록 후 현장 보급을 추진코자한다.

아울러 본 연구 기술을 바탕으로 다양한 신품종 육성을 화훼시험장과 공동연구를 수행함으로써 계속 발전시키고 현장 보급과 함께 국외에 수출을 추진한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

2차대전 이후 급속히 발달한 석유화학공업 및 유기합성화학기술의 개발에 힘입어 많은 선진문명국에서는 고도의 생활수준을 유지할 수 있게 되었다. 그러나 그동안 인구의 증가와 향상된 생활 수준유지를 위해 지구상에 존재하는 많은 자원을 남용함으로써 자원이 고갈돼 가고 있으며 환경공해 또한 극심한 지경에 도달하게 됐다. 우리주변의 물, 공기, 토양 등을 보존하면서 청결한 농산물을 생산해야겠다는 필요성일 증대와 선진국의 강렬한 공해구제에 따라 환경문제가 전 세계적으로 커다란 관심사로 떠오르고 있다.

이러한 문제해결을 위해서는 생명주전공학기술을 통한 신제품 개발로 각종 난분해성 화학물질과 유독성 화학물 유독성 농약등을 저공해 무공해성 물질 및 재료로 대체할 필요가 있다. 2000년대 까지 약 30조원에 이를 것으로 추정되는 농약산업도 급속한 생명공학 기술개발과 더불어 농약산업도 급속한 생명공학 기술개발과 더불어 8조~9조원 정도는 환경공해가 적은 저독성 천연물 생물농약으로 대체될 것으로 전망되며 농업기술 자체도 환경에 평형을 유지시켜주면서 소량의 농약과 소량의 비료를 투입하는 신 농법으로 대체될 전망이다.

이러한 추세에 따라 선진국에서는 각종 생물농약분야 연구가 최근 활발해 지고 있으며 특히 유용미생물 탐색기술과 유용유전자 재조합에 의한 활성미생물 생산기술과 생물농약의 효율적인 전달체계개발, 저렴한 대량생산기술개발 동식물의 형질전환에 의한 저항성 품종개발 등의 연구에 많은 노력을 하고 있다.

또한 식물이나 해양생물자원에서 저독성 농약 원료들을 탐색하거나 식물이 생산하는 호르몬, 곤충이 생산하는 호르몬 등을 이용한 병충해 잡초 방제연구도 활발해지고 있으며 이러한 노력을 모두 환경에 큰 손상을 주지 않으려는 노력의 일환이라고 할 수 있다.

특히 미생물 제제개발을 통한 병충해 잡초방제연구가 활발히 진행되고 있으며 실용화된 제품수도 크게 증가하고 있다. 국내에서도 유전공학연구소, 농진청 농약연구소등 국가 연구기관을 비롯해 대학교에서 병충해의 생물학적 방제에 관한 연구가 활발하다. 그러나 아직도 종부의 이 분야 연구비 투자 규모나 산, 학, 연의 공동연구 및 일반 국민의 관심도가 크게 부족한 상황이다.

식물에 외래유전자를 인위적으로 도입시켜 새로운 형질전환 식물체를 만드는 기술이 개발된 것은 1983 년이었다. 자료에 따르면 1986년부터 1997년까지 20년간 세계 45개 국가에서 60가지 식물의 10가지 특성에 대해 대하여 약 25,000건의 현장 실험(field trials)이 이루어졌다. 총 25,000건 중 15,000건(60%)의 현장실험은 1986년부터 1995년까지 10년간 34개

국가에 서 이루어진 것이며, 10,000건(40%)은 1996년과 1997년 2년간에 이루어진 것으로
최근들어 형질전환 작물의 실험건수가 급속히 증가하고 있다.

제 7 장 참고문헌

- Anzai H, Ishii Y, Shichinohe M, Katsumata K, Nojiri C, Morikawa H, Tanaka M (1996) Transformation of *Phalaenopsis* by particle bombardment. *Plant Tissue Cult. Lett.* 13, 265-271.
- Barry M. K., Triplett A. A., Christensen A. C. (1999) A peritrophin-like protein expressed in the embryonic tracheae of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 319-327.
- Belarmino MM, Mii M (2000) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a phalaenopsis orchid. *Plant Cell Rep.* 19, 435-442.
- Boot R. G., Renkema G. H., Strijland A., Van Zonneveld, A. J. Aerts, J.M.F.G., (1995) Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *J. Biol. Chem.* 270, 26252-26256.
- Bonning B. C., Hammock B. D. (1996) Development of recombinant baculovirus for insect control. *Annu. Rev. Entomol.* 41, 191-210.
- Chai ML, Xu CJ, Senthil KK, Kim JY, Kim DH (2002) Stable transformation of protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Sci. Hortic.* 96, 213-224.
- Chung E. H., Lee K. S., Han J. H., Sohn H. D., Jin B. R. (2001) Analysis of expressed sequence tags of the spider, *Araneus ventricosus*. *Int. J. Indust. Entomol.* 3, 191-199.
- De la Vega H., Specht C. A., Liu Y., Robbins, P. W. (1998) Chitinases are a multi-gene family in *Aedes*, *Anopheles* and *Drosophila*. *Insect Mol. Biol.* 7, 309-319.
- Estruch J. J., Carozzi N. B., Desai N., Duck N. B., Warren G. W., Koziel M. G. (1997) Transgenic plants: an emerging approach to pest control. *Nature Biotech.* 15, 137-141.
- Flach J., Pilet P. E., Jolles P. (1992) What's new in chitinase research? *Experientia* 48, 701-716.
- Fitches E., Wilkinson H., Bell H., Bown D. P., Gatehouse J. A., Edwards J. P. (2004) Cloning, expression and functional characterization of chitinase from larvae of tomato moth (*Lacanobia oleracea*): a demonstration of the insecticidal activity of insect chitinase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 1037-1050.

- Fukamizo T., Kramer K. J., (1985a) Mechanism of chitin oligosaccharide hydrolysis by the binary enzyme chitinase system in insect moulting fluid. *Insect Biochem.* 15, 1-7.
- Fukamizo T., Kramer K. J., (1985b) Mechanism of chitin hydrolysis by the binary enzyme chitinase system in insect moulting fluid. *Insect Biochem.* 15, 141-145.
- Girard C., Jouanin L. (1999) Molecular cloning of a gut-specific chitinase cDNA from the beetle *Phaedon cochleariae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 549-556.
- Gopalakrishnan B., Muthukrishnan S., Kramer K. J. (1995) Baculovirus-mediated expression of a *Manduca sexta* chitinase gene: properties of the recombinant protein. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 255-265.
- Hamill JD, Rounsley S, Spencer A, Todd G, RhodesMJC (1991) The use of the polymerase chain reaction in plant transformation studies. *Plant Cell Rep.* 10, 221-224.
- Hasemann C. A., Capra J. D. (1990) High-level production of a functional immunoglobulin heterodimer in a baculovirus expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3942-3946.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6, 3901-3907.
- Kim J. P., Lee Y. B., Jang S. J. Kim M. A. (1997) The studies of properties of matter and chemical qualitative analysis on web of *Araneus ventricosus* L. KOCH, 1878. *Korean J. Arachnol.* 13, 87-91.
- Kim M. G., Shin S. W., Bae K. S., Kim S. C., Park H. Y. (1998) Molecular cloning of chitinase cDNAs from the silkworm, *Bombyx mori* and the fall webworm, *Hyphantria cunea*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 163-171.
- Kramer K. J., Corpuz L., Choi H. K., Muthukrishnan S. (1993) Sequence of a cDNA and expression of the gene encoding epidermal and gut chitinases of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23, 691-701.
- Kramer K. J., Muthukrishnan S. (1997) Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, 887-900.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee K. S., Chung E. H., Han J. H., Sohn H. D., Jin B. R. (2003) cDNA cloning of a defender against apoptotic cell death 1 (DAD1) homologue, responsive to external

- temperature stimulus from the spider, *Araneus ventricosus*. Comp. Biochem. Physiol. B 135, 117-123.
- McMaster G. K., Carmichael G. G. (1977) Analysis of single- and double-stranded nuclei acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4835-4838.
- Mishiba K, Chin D. P, Mii M. (2005) Agrobacterium-mediated transformation of *Phalaenopsis* by targeting protocorms at an early stage after germination Plant Cell Rep. 24, 297-303.
- Ogawa Y, Mii M. (2004) Screening for highly active β -lactam antibiotics against *Agrobacterium tumefaciens*. Arch. Microbiol. 181, 331-336.
- O'Reilly D. R., Miller L. K., Luckow V. A. (1992) Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual. W. H. Freeman & Co., New York.
- Ramalho-Ortigao J. M., Traub-Cseko Y. M. (2003) Molecular characterization of Lchit1, a midgut chitinase cDNA from the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis*. Insect Biochem. Mol. Biol. 33, 279-287.
- Rayms-Keller A., McGaw M., Oray C., Carlson J. O. Beaty B. J. (2000) Molecular cloning and characterization of a metal responsive *Aedes aegypti* intestinal mucin cDNA. Insect Mol. Biol. 9, 419-426.
- Shen Z., Jacobs-Lorena M. (1997) Characterization of a novel gut-specific chitinase gene from the human malaria vector *Anopheles gambiae*. J. Biol. Chem. 272, 28895-28900.
- Shinoda T., Kobayashi J., Matsui M., Chinzei Y. (2001) Cloning and functional expression of a chitinase cDNA from the common cutworm, *Spodoptera litura*, using a recombinant baculovirus lacking the virus-encoded chitinase gene. Insect Biochem. Mol. Biol. 31, 521-532.
- Swofford D. L. (2000) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4, Sinauer Sunderland, MA.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354.
- Tokuhara K, Mii M (1993) Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by

- culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Rep.* 13, 7-11.
- Trudel J., Asselin A. (1998) Detection of chitinase activity after polyacrylamide gels electrophoresis. *Anal. Biochem.* 178, 362-366.
- Van Scheltinga A.C.T., Kalk K. H., Beintema J. J., Dijkstra B. W. (1994) Crystal structures of hevamine, a plant defense protein with chitinase and lysozyme activity, and its complex with an inhibitor. *Structure* 2, 1181-1189.
- Vaughn J. L., Goodwin R. H., Thompkins G. J., McCawley P. (1977) The establishment of two insect cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro* 13, 213-217.
- Von Heijne G. (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* 14, 4683-4690.
- Wu Y., Gillian G., Underwood A. P., Sakuda S., Bianco A. E. (2001). Expression and secretion of a larval-specific chitinase (family 18 glycosyl hydrolase) by the infective stages of the parasitic nematode, *Onchocerca volvulus*. *J. Biol. Chem.* 276, 42557-42564.
- Yan J., Cheng Q., Narashimhan S., Li C. B., Aksoy S. (2002) Cloning and functional expression of a fat body-specific chitinase cDNA from the tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 979-989.
- You M., Xuan X., Tsuji N., Kamio T., Taylor D., Suzuki N., Fujisaki K. (2003) Identification and molecular characterization of a chitinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *J. Biol. Chem.* 278, 8556-8563.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.