

최 종
연구보고서

오이 기능성 유전체 연구를 통한
DNA-Chip 및 저항성 육종소재 개발

Development of DNA-Chip and resistant breeding line
by functional genomics in cucumber

서울여자대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “오이 기능성 유전체 연구를 통한 DNA-Chip 및 저항성 육종소재 개발” 과제 (세부과제 “오이의 기능성 유전체 연구”, “오이 감염 바이러스 cDNA-chip의 개발 및 유전자의 식물발현 조절”, “오이 특이발현 유전자의 규명 및 식물 분자유종”, “식물체 DNA-chip 개발 및 상용화”)의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 8월 22일

주관연구기관명 : 서울여자대학교

총괄연구책임자 : 이공표

세부연구책임자 : 이공표, 류기현

연 구 원 : 최선희

연 구 원 : 민병은

연 구 원 : 노영미

연 구 원 : 정소영

연 구 원 : 이경희

연 구 원 : 최지용

연 구 원 : 이창후

연 구 원 : 김정선

위탁연구기관명 : (주)비엠에스 부설 생명과학연구소

위탁연구책임자 : 이충식

요 약 문

I. 제 목

오이 기능성 유전체 연구를 통한 DNA-Chip 및 저항성 육종소재 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

오이의 기능성 유전체 연구(functional genomics)를 통하여 바이러스 감염 등의 스트레스상태에서의 오이 유전자의 발현을 계층 수준에서 파악하고자 하며, 바이러스 저항성 육종소재 개발을 목표로 함. 또한, 오이 유전체 연구에 반드시 요구되는 오이 유전자 발현을 검정 및 바이러스의 검정을 수행할 수 있는 DNA-Chip을 개발함을 목표로 함.

가. 오이의 기능성 유전체 연구 (1세부과제)

- (1) 오이 cDNA library의 제조
- (2) 오이 ESTs (Expressed Sequence Tags)의 구축
- (3) 오이 cDNA-chip의 제조
- (4) Microarray를 이용한 특이발현 유전자의 탐색 및 선별
- (5) 바이러스 감염에 따른 오이 유전자 변화 profiling을 통한 상호작용 연구
- (6) 오이 ESTs 및 cDNA-chip 시험에 따른 microarray에 대한 DB 구축

(1세부 위탁과제) 식물체 DNA-chip 개발 및 상용화

- (1) DNA-chip 제조 제반 기술의 확립
- (2) 바이러스 진단용 DNA-chip 상용화
- (3) 고밀도의 식물용 cDNA-chip 개발

나. 오이감염 바이러스 cDNA-chip의 개발 및 유전자의 식물발현 조절 (2세부과제)

- (1) 오이 감염 바이러스 cDNA-chip 개발
- (2) 오이 감염 바이러스의 in vitro transcript의 개발, mutant 제작 및 적용
- (3) 오이 감염 바이러스를 이용한 viral vector의 제작
- (4) 바이러스 저항성 오이의 검정

다. 오이 특이발현 유전자의 규명 및 식물 분자유종 (3세부과제)

- (1) 오이에서 바이러스 감염시 발현되는 특이 유전자 확보
- (2) 바이러스 저항성 오이 육종소재의 개발
- (3) 특이 유전자의 식물체 내에서의 기능 규명

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

- 1) 21세기는 포스트 게놈연구(post-genome research)의 시대라 할 수 있으며, 동식물을 망라하여 가장 중요한 현안으로 대두되고 있음. 이는 유전자의 염기서열 결정에서 유전자 기능연구로의 전환을 의미함.
- 2) 식물게놈 연구의 모델인 *Arabidopsis* (애기장대)의 전체 게놈분석이 2000년 12월 14일로 완료되어, 모델식물의 유전자 기능연구를 통한 경제작물로의 응용가능성이 증대되고 있음.
- 3) 전 세계적으로 경제작물의 유전자에 대한 특허획득 및 유용 품종개발은 현재도 끊임없이 이루어지고 있으며, 국내에서도 이에 대비한 연구가 진행되고 있음.
- 4) 대표적 경제작물중 하나인 오이의 경우, 재배생리 연구를 통한 생산성 향상으로 대일 수출오이 재배면적이 급격히 증가하고 있고, 육종 상황도 외국에 대하여 고유의 품종을 보유하고 있어 매우 경쟁력 있는 작물이라 할 수 있음.
- 5) 그 경제적 중요성(농가 및 육종산업)을 비추어볼 때 타작물에 비하여 재배생리를 제외한 생명공학적인 연구가 제대로 진행되고 있지 않은 현실에서, 고품질 오이를 짧은 기간에 경제적으로 선발 육종할 수 있는 방법이 요구됨.
- 6) 현재 유전자 기능연구에서 가장 활발히 진행되고 있는 핵심분야 중 하나는

DNA-chip을 이용한 대규모 유전자발현 연구라 할 수 있으며, DNA-Chip은 한 장의 슬라이드에 1,000-100,000개 이상의 유전자를 심어 놓은 것으로 해당 식물체의 다양한 환경 및 생리변화에 대한 유전자 발현의 변화를 탐색할 수 있는 매우 유용한 기술임. 이 기술의 개발은 오이를 비롯한 농작물에 있어서도 응용가능성이 지대함.

- 7) DNA-Chip 기술은 농작물에서 유용한 유전자의 탐색 및 클로닝 뿐만 아니라, 생육단계별 혹은 생표현에 관련한 유전자 발현, 다양한 환경스트레스 또는 병원체의 침입에 대한 식물체의 반응 등을 각 식물체의 전체 게놈 수준에서 유전자의 발현 여부 및 그 정도를 다이나믹하게 비교할 수 있는 기술임.
- 8) 외국의 경우, 농작물 분야에서의 DNA-Chip 기술의 응용은 이제 시작 단계이며, 최근 신기술의 국내도입이 빨라져 현재 국내에서 개발이 시작된다면 충분한 국제 경쟁력을 가질 수 있음.
- 9) 본 과제의 대상작물인 오이의 경우, DNA-Chip 효용성의 극대화를 위해서는 기초적인 연구가 선행 또는 병행되어야 하는데, 작물의 교배 후, 분자적 표지인자(molecular marker)를 이용한 유전자지도(genetic map), 물리적지도(physical map)의 작성이 선결조건임. 또한 최근 만연하고 있는 바이러스 및 병원균의 검정 및 식물체의 저항성 연구를 효율적으로 연구하기 위해서는 DNA-Chip 제조기술 자체 뿐만 아니라, 식물체에 대한 기초연구와 바이러스에 대한 기본적인 연구결과가 필요함.

나. 경제·산업적 측면

- 1) 현재 우리나라에서 재배되는 박과 작물의 일년 총 생산액 규모를 비교하면, 총 3조 5천억원 규모로 파악되며, 이중 오이가 1.2조원으로 가장 많고, 수박은 7000억원, 그리고 호박, 주키니, 참외, 멜론의 순이다. 반면, 외국의 총 시장규모는 약 300조원으로 파악되어 오이의 경제적 비중은 매우 크다할 수 있음.
- 2) 시설재배 오이의 축성재배시 난방비가 차지하는 비율은 현재 축성재배 오이생산비의 약 20%를 점유하고 있으며, 각종 병해를 방제하기 위한 농약비도 약 10-30%를 점유하고 있음. 따라서, 내한성 및 병저항성 오이의 육종이 절실히 요구되는 현실임.

다. 사회·문화적 측면

1) 가속화되는 농업기반 약화

- 고부가가치의 오이의 안정 재배로 농업 경쟁력을 제고하여 농업기반 약화 방지 및 농민들에게 농업에 대한 자긍심을 제고하기 위하여 우수 품종도입의 개발 및 재배가 필요.

2) 국내 종자에 대한 신뢰성 및 자긍심 확보

- 현재 대일 수출오이는 모두 일본종자를 사용하고 있는 실정에서, 향상된 내한성 및 내병성 고품질 오이의 국내 종자생산은 다국적 종묘산업 하에서 약화된 국내 종묘생산의 신뢰성 및 자긍심을 회복할 수 있는 첩경임.

3) 국가 농업 기술력에 대한 농민의 신뢰감 제고

- 다양한 첨단 생명공학 기법을 통한 신품종의 육성을 통하여 외국의 종자산업체에 대항할 수 있는 국내 농업수준을 농민에게 인식시킴으로써, 국가 농업 기술력에 대한 농민의 신뢰감을 회복시킬 수 있음

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 오이의 기능성 유전체 연구

(1) 오이 cDNA library의 제조

‘청장’ 및 ‘백다다기’ 오이 (Syngenta)의 각각 잎과 자엽에 ZGMMV를 접종한 후, 24시간 및 3, 6, 12, 24, 48, 72시간이 경과된 시점에서 수확한 후 total RNA 및 mRNA를 분리하였다. ‘청장’ 오이의 경우 PCR-based cDNA library 구축 방법을 이용하였고, ‘백다다기’오이의 경우는 lambda-ZAPII를 이용한 library 제조 방법을 이용하였다.

(2) 오이 ESTs (Expressed Sequence Tags)의 구축

구축한 cDNA library 들에서 얻어진 유전자들을 *E.coli*에 mass conversion 시킨 후에, 각 colony 들을 선별 배양하여 plasmid 들을 준비하였다. 깨끗하게 정제한 plasmid들을 5' primer로 automatic sequencing하였다. 얻어진 염기서열은 filtering 과정을 거쳐서 순수한 cDNA들만의 염기서열을 얻었다. 이들 염기서열을 BlastX 및 WU-BlastX 등의 GenBank에 등록된 단백질 서열과 비교하여 expressed sequence tags (ESTs)를 구축하였다. 얻어진 각각의 plasmid, cell 그리고 전체 데이터는 DB에 등록하기 위하여 저장하였다.

(3) 오이 cDNA-chip의 제조

구축한 ESTs들 및 특이발현 유전자 등을 PCR로 증폭하여 cDNA-chip을 제조하였다. PCR 증폭은 cDNA가 포함된 각각의 plasmid 별로 5'과 3'에 해당하는 universal primer를 이용하여 증폭하였으며, gel에 loading하여 그 양과 크기를 확인하였다. 총 부피는 40ul로 하였고, 농도는 200ng/ul 이상으로 유지하였다. 최종 solution 은 sodium bicarbonate (pH 9.0) 혹은 2X hybridization buffer (Telechem사)를 사용하여 Superamine (Telechem사) substrate에 spotting하였다. Spotting용 arrayer는 Microwell (Biorobotics사)를 사용하였다.

(4) Microarray를 이용한 특이발현 유전자의 탐색 및 선별

바이러스에 의해 특이적으로 발현하는 유전자를 확인하기 위하여 일단 선별한 유

전자들은 membrane-coated slide에 manual arrayer (최대 780개 클론의 spotting이 가능)를 이용하여 spotting하고, fluorescent dye로 labeling한 probe를 이용하여 hybridization 시켰다. 여기에서 발현되는 유전자를 선별하였다.

Microarray 및 바이러스 처리에 따른 특이 유전자 선별 방법을 확립하기 위하여 모델 식물인 Arabidopsis를 이용하였다. Arabidopsis 유전자 약 8,000개가 spotting 되어 있는 cDNA-chip을 사용하였고, Arabidopsis ecotype들인 Col-0와 C24에 CMV를 감염시킨 후, 1시간 및 3시간째에 수확하여 발현된 mRNA의 profiling을 실시하였다.

(5) 바이러스 감염에 따른 오이 유전자 변화 profiling을 통한 상호작용 연구

바이러스 감염에 따른 오이 유전자의 변화를 확인하기 위하여 앞서 제작한 오이 cDNA-chip을 이용하였다. 오이 자엽에 ZGMMV를 접종한 후, 6, 12, 24, 48, 72시간 경과 후에 식물체를 수확하였다. 이때 수확한 식물체와 mock 처리구의 mRNA를 역전사시키면서, Cy5와 Cy3를 각각 labeling한 후, 오이 cDNA chip에 hybridization 하였다. 결과 이미지 및 형광강도 관련 data를 통계프로그램 (Acuity ver. 4.0)을 이용하여 normalization, 통계 분석 및 clustering을 실시하였다.

(6) 오이 ESTs 및 cDNA-chip 시험에 따른 microarray에 대한 DB 구축

오이 ESTs 데이터 및 cDNA-chip을 이용한 profiling 결과를 구축한 Web-DB에 DB화 하였다. Web-DB의 구축은 Oracle 10g DB를 이용하였고, 여기에 JAVA2 언어를 지원하는 응용프로그램 (JSP, Tompcat)들을 적용하였다.

(1세부 위탁과제) 식물체 DNA-chip 개발 및 상용화

(1) DNA-chip 제조 제반 기술의 확립

본 과제에서 요구되었던 DNA-chip 제조에 관련한 제반 기술을 확립하였다. 클론을 균일하게 spotting 할 수 있는 arrayer를 확보하였고, 최적의 hybridization이 가능할 수 있는 다양한 조건을 확립하였다.

(2) 바이러스 진단용 DNA-chip 상용화

cDNA-chip에서 진일보하여 박과 감염성 바이러스들 간의 특이적 혹은 보존적 sequence들을 바탕으로 바이러스 별로 다양한 oligomer를 합성하였고, 이들을 이용하

여 oligo-chip을 제작하였다. 제작한 chip의 시험적 사용으로 박과감염성 바이러스 간의 검정이 가능하였다.

(3) 고밀도의 식물용 cDNA-chip 개발

1.2K 수준의 오이용 cDNA-chip을 개발하였다. 이 chip의 제작을 통하여 오이-바이러스 간의 상호작용을 profiling할 수 있는 결과를 확보할 수 있었다.

2. 오이 감염 바이러스 cDNA-chip의 개발 및 유전자의 식물발현 조절

(1) 오이 감염 바이러스 cDNA-chip 개발

오이를 포함한 박과식물 감염성 바이러스의 외피단백질을 증폭하였고, 이 클론들을 이용하여 membrane-coated slide에 spotting한 cDNA-chip을 개발하였다. 적용한 바이러스는 ZGMMV, KGMMV, CGMMV, CFMMV, TMV, PVX, ZYMV 등이며 control 유전자로 alpha-tubulin을 사용하였다.

(2) 오이 감염 바이러스의 in vitro transcript의 개발, mutant 제작 및 적용

오이 감염바이러스의 전체 genome을 확보하였고, 이들을 T7 promoter로 transcription 할 수 있도록 클로닝하였다. 이들의 in vitro transcription으로 감염성 바이러스 클론을 얻었으며, 각 바이러스의 기능을 조절하기 위하여 돌연변이체 들을 제작하였다. 이들 돌연변이체들을 식물에 감염시켜 병징의 변화를 조사하였다.

(3) 오이 감염 바이러스를 이용한 viral vector의 제작

오이에서 viral vector의 적용이 가능할 수 있도록 ZGMMV-GFP를 적용하였다. 즉, ZGMMV의 movement protein과 coat protein 사이에 클로닝이 가능한 site를 만들었고 여기에 GFP (green fluorescent protein) 유전자를 삽입하여 ZGMMV가 식물체에 감염되었을 때 GFP를 발현할 수 있도록 하였다.

(4) 바이러스 저항성 오이의 검정

ZGMMV의 coat protein 유전자로 형질전환된 바이러스 저항성 오이의 분자적 및 혈청학적 검정을 수행하여 저항성 오이의 확인연구를 수행하였다.

3. 오이 특이발현 유전자의 규명 및 식물 분자유종

(1) 오이에서 바이러스 감염시 발현되는 특이 유전자 확보

오이에서 바이러스 감염시 발현되는 특이 유전자를 확보하기 위하여 SSH (subtractive suppression hybridization) 기법 및 cDNA-AFLP 방법을 응용한 DDRT 방법으로 다양한 특이 발현 유전자를 확보하였다.

(2) 바이러스 저항성 오이 육종소재의 개발

오이 감염성 바이러스 저항성 오이의 개발을 위하여 분자유종적 방법을 이용하여 ZGMMV의 coat protein이 삽입되어 ZGMMV 감염시 저항성을 나타내는 오이 육종소재를 개발하였다.

(3) 특이 유전자의 식물체 내에서의 기능 규명

바이러스 감염시 오이에서 특이발현 하였던 유전자와 ESTs 중 바이러스 감염과 관련성을 보였던 오이 유전자의 기능을 규명하기 위하여, VIGS (virus induced gene silencing)을 야기할 수 있는 pTRV vector를 이용하여 오이 유전자의 gene silencing을 야기시켰고, 여기에 TMV-GFP virus를 접종하여 식물-바이러스의 상호작용 및 오이 유전자의 기능을 스크린하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 오이의 기능성 유전체 연구 분야

오이 ESTs 구축을 통한 저항성 유전체 연구를 위하여 국내외에서 거의 연구된 바 없는 오이 유전체에 대한 이해와 분석 연구를 위하여 cDNA library를 제작하였고, 특히 국내에서 박과식물을 기주로 하며 생산량과 품질을 저하시키는 박과식물 감염성 바이러스들과 오이 유전체의 상호작용을 연구하기 위하여 이에 대한 연구에 집중하였다. 특히, 박과식물 감염성 바이러스 중의 하나이며, 국내에서 첫 발견되고, 국제적으로 새로이 명명된 ZGMMV (Zucchini Green Mottel Mosaic Virus)에 의하여 유도되는 다양한 cDNA library를 제조하고 이를 이용한 ESTs를 구축하였다. 염기서열 분석이 끝난 후, 분석한 결과를 보면 기존에 알려져 있지 않았던 다양한 종류의 유전자들이 확인되어 오이를 비롯한 관련 박과식물 유전자 자원 확보에 큰 역할을 할 수 있었다. 이 자료는 향후 오이 유전체 연구에 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 생각되며, 본 연구과제에서는 이를 이용한 cDNA-chip을 제작할 수 있는 토대가 되었다. 본 과제에서 구축한 ESTs는 본 연구과제의 일회성 보고로 끝나지 않고, 자체 Web-DB를 구축하여 연구자들에게 다양한 자료를 제공할 수 있는 시스템을 마련하였다 (<http://www.cgrc.wo.to>). 이 결과는 향후 박과식물 및 바이러스 연구자들의 연구자들에게 많은 기여를 할 수 있을 것으로 기대된다.

Microarray를 이용한 식물-바이러스 상호작용 연구 부문에서는 우선 모델 식물인 Arabidopsis의 cDNA-chip 이용하여 박과감염성 바이러스 중의 하나인 CMV와 식물과의 상호작용을 profiling하였다. 저항성 ecotype인 C24와 감수성인 ecotype인 Columbia를 이용하여 microarray를 수행하였다. 접종 후 초기 3시간이내의 반응 결과를 통하여 CMV의 감염은 비생물학적 스트레스와 상당히 유사하지만, 저항성 C24에서 바이러스 특이적인 유전자의 발현이 있음을 확인하였다.

Arabidopsis의 결과를 토대로 오이 cDNA-chip을 이용한 유전자 탐색을 시도하였다. 오이 cDNA-chip의 제조를 위하여 다양한 실험을 통하여 cDNA-chip 제조 및 hybridization 기법의 최적화를 수행하였고, 확보한 오이 특이적 ESTs를 이용하여 목표한 1.2K 수준의 cDNA-chip을 제조하였다. 제조한 cDNA-chip을 이용하여 ZGMMV (tobamovirus 그룹) 및 CMV (cucumovirus 그룹) 에 접종된 오이에서 6, 12, 24, 48, 72 시간후 발현되는 mRNA를 profiling하였다. 그 결과 기존 연구에서는 볼 수 없었던 식물-바이러스 간의 상호작용 profile을 확보할 수 있었으며 시간별 및 바이러스 종류별

유전자 발현의 clustering을 통하여 심도있는 이해를 얻게 되었다. 이 microarray 결과도 Web-DB에 등록하였고, 자체 확보한 오이 유전자 DB와ダイナ믹하게 연결하여 이 분야 연구자들의 연구자료로서 쉽게 이용될 수 있도록 기여하였다.

확보된 오이 ESTs 및 microarray 데이터는 인터넷으로 쉽게 이용할 수 있도록 하기 위하여 앞서 언급한 대로 목표한 DB 구축을 달성하였는데, 중점을 두었던 부분은 확보한 유전자의 원활한 검색과 microarray 결과와의 유기적인 결합이었다. 사용한 DB는 oracle 10g 였으며, JAVA2 언어를 사용할 수 있도록 하여 대부분 JSP를 사용하여 Web application을 구현하였다. 구축된 DB는 국제적으로 오이에서는 처음으로 개발된 시스템이라 할 수 있으며, 이 분야의 유전자 탐색에 중요한 역할을 수행할 수 있으리라 기대된다 (<http://www.cgrc.wo.to>).

(위탁과제) 식물체 DNA-chip 개발 및 상용화

식물체 cDNA를 microarray가 가능하도록 chip을 제작하는 기술을 개발 확보하였으며, 1, 2세부과제와 같이 바이러스 진단용 cDNA-chip을 제작하였다. 이 결과를 바탕으로, 박과식물 바이러스 검정용 chip의 상용화를 위하여 각 바이러스가 보유하고 있는 특이적 염기서열을 분석하고 이를 토대로 oligomer를 제조하고 슬라이드 글라스에 printing하여 oligo-chip을 제작후 시험하였다. 제작된 oligo-chip은 각 바이러스를 확연하게 구분할 수 있었으며, 향후 박과식물 바이러스 외에도 타 식물바이러스 검정용으로 확대 연구를 수행할 수 있을 것으로 기대하고 있다. 이 결과는 농산물 방역 검사 등에 기여할 수 있는 제품으로 기대하고 있다.

또한, 1세부과제에서 수행하였던 오이 cDNA-chip을 슬라이드 글라스에 1.2K의 수준으로 spotting하였으며, chip의 완성도를 높이기 위하여 노력하였다. 또한, 최적화된 hybridization을 수행하여 오이용 cDNA-chip 제작을 지원하였다.

2. 오이 감염 바이러스 cDNA-chip의 개발 및 유전자의 식물발현 조절

오이 감염성 바이러스의 진단방법 개선을 위한 연구 분야를 수행하였다. 기존의 바이러스 진단법은 표준식물 검정법, 항체이용 진단법, RT-PCR법 등으로 요약될 수 있으며, 최근에는 real-time PCR을 이용한 정량적 진단법이 추가로 사용되고 있다. 이들 바이러스 진단법은 한번 반응에 몇 가지 바이러스를 진단하며, multiplex PCR을 이용한 검정에서도 해석이 어려운 경우가 많았다. 이런 문제를 극복하고자 본 연구과제에 서는 바이러스 cDNA를 심어놓은 chip을 개발하여 한번의 실험수행으로 박과식물 감

염성 바이러스 대부분을 구별하고자 박과식물 감염성 바이러스 특이적 검정을 위한 cDNA-chip을 개발하였다. 개발된 cDNA-chip은 기존에 박과식물에서 보고된 ZGMMV, CGMMV, KGMMV, CFMMV 등을 확연히 구별할 수 있었으며, 바이러스간의 유전적 유사성까지 나타내고 있었다. 완성한 cDNA-chip 시험결과는 바이러스 검정 연구분야에서 국제적으로 처음 확보된 연구결과로 SCI 논문에 출판되었다 (Lee et al., 2003).

식물-바이러스의 상호작용 연구는 바이러스 자체에 대한 이해가 필수적인 요소이므로, 본 과제에서는 박과식물 감염성 바이러스 각각에 대한 전체 genome을 확보하고 클로닝하였으며, 시험관 내에서 바이러스를 재생산할 수 있는 시스템인 *in vitro* transcription system을 확립하였다. 더 나아가 이들 바이러스의 돌연변이체 (mutant)를 만들어서 식물-바이러스 간의 상호작용을 연구하였는데, 접종 결과로 오이에서 다양한 병징을 확인할 수 있었다. 또한, 바이러스는 최근 들어 원하는 유전자의 식물체내 발현에 이용될 수 있는 viral vector 시스템으로 많이 이용되는데, 본 연구과제에서도 ZGMMV를 이용하여 모델 단백질인 GFP의 발현 시스템을 확립하였다. 이 결과는 기존 viral vector 시스템이 대부분 담배 등의 가지과 식물에 한정되었던 것을 극복한 새로운 시스템의 확립이라 할 수 있으며, 앞으로 박과식물을 대상으로 유전자 발현 및 기능 검정, 그리고 박과식물에서의 단백질 발현에 획기적인 발전을 가져올 수 있는 기틀을 마련하였다고 할 수 있다.

3. 오이 특이발현 유전자의 규명 및 식물 분자육종

오이의 저항성 육종소재 개발 분야에서는 오이 감염성 바이러스인 ZGMMV에 대한 저항성 분자육종에 중점을 두어 수행하였다. ZGMMV의 외피 단백질을 식물 발현용 벡터에 삽입한 후 담배에서 일차 검정하였고, 이 벡터를 다시 오이에 형질전환시켜 ZGMMV 저항성 오이를 육성하고자 하였다. 이 과정에서 현실적으로 매우 어려운 오이 형질전환 방법을 최적화하고자 다양한 연구를 수행하여 *Agrobacterium*을 매개로 한 기관형성 방법 및 체세포배형성 방법을 통한 오이 형질전환 방법에 대한 연구를 다각도로 탐색하였다. 최종적으로 현재 오이 형질전환체 T1 세대를 육성하고 있으며, 이 육종소재는 오이 내병성 육종에 기여할 수 있으리라 기대된다.

오이를 포함한 박과식물들은 최근 바이러스에 의한 감염이 큰 문제로 제기되고 있는데, 이 문제를 해결하기 위해서는 바이러스 감염시 식물-바이러스 간의 상호작용 이해가 필수적이다. 본 연구과제에서는 또 다른 시도로 오이에서 ZGMMV의 감염시 특이 발현하는 유전자를 선별 확보하고자 하였고, 다양한 유전자를 클로닝할 수 있었

다. 이들 유전자를 cDNA-chip에 포함시켜 microarray를 통한 분석에 이용하였고, in planta assay의 재료 유전자로도 사용하였다.

오이 형질전환은 다른 원예작물과 비슷하게 현재로도 형질전환율이 매우 낮고, 형질전환체를 완성하는데 장기간이 소요되어 과제에서 목표로 제안하였던 형질전환체를 이용한 오이 특이 유전자의 발현 및 확인은 어려웠다. 이에 따라 확보한 오이 유전자의 식물체내 기능 확인을 위하여 기존에 보고된 바 있는 VIGS (virus inducing gene silencing)의 시스템을 이용하여 상응하는 유전자 발현을 억제시키고, 감염성 TMV-GFP를 접종하여 TMV의 감염, 이동 및 병징을 가시적으로 확인하였다. 시도한 유전자의 silencing 결과중 오이에서 확보한 phloem protein의 경우, TMV의 감염이 이루어지지 않아 TMV의 감염성에 지대한 영향을 미치는 것으로 판단되었고, phloem filament protein의 경우는 TMV 이동이 억제되었으며, glycine cleavage system H protein의 경우는 TMV 감염시 상위 엽의 chlorosis를 유발하는 특징적인 변화가 관찰 되었다. 이 시스템의 장점은 단기간에 효율적으로 확보한 유전자의 기능을 효과적으로 관찰하는 것이 가능한 점이었고, 형질전환체는 아니었지만 본 과제의 목적에 부합하는 연구성과를 달성하는 결과를 얻었다.

세부분으로 구성된 본 연구과제를 통하여 오이 유전체의 기능에 대한 이해를 넓혔고, 바이러스 진단용 cDNA-chip 및 oligo-chip을 개발하였으며, 바이러스 저항성 육종 소재를 개발하였다. 따라서, 재배면적이 매우 넓고 주요 채소로 이용되고 있는 오이의 유전적 연구의 폭을 넓힐 수 있는 계기가 되었으며, 본 과제의 결과는 앞으로 저항성 기작 및 식물에서의 바이러스병 신호전달체계에 대한 심도있는 연구의 뒷받침이 될 것으로 기대된다.

SUMMARY

1. Functional genomics in cucumber

In cucumber (*Cucumis sativus* L.), virus disease is one of the major causes to decrease in production and fruit quality. Thus, we concentrated on the interaction between cucumber plant and cucurbit-infectious viruses. To understand and analyze genome of cucumber related to virus infection, we constructed cDNA library induced by virus infection and ESTs by 5' forward sequencing inserts of the cDNA library. Especially, recently newly named virus, ZGMMV (Zucchini green mottle mosaic virus), one of the major cucurbit-infectious virus, was first reported in Korea. This virus was used for construction of our cucumber cDNA library and ESTs. In analysis of ESTs, various kinds of cucumber gene were newly found and these data may give great help to study cucumber genome research. Constructed cDNA libraries and analyzed cucumber ESTs were used for spotting clones of cDNA chip. Our cucumber ESTs data were transformed and uploaded to Web-DB (<http://www.cgrc.wo.to>), and these will be accessed freely and used to study cucumber genome by researcher.

Arabidopsis cDNA-chips (Incyte), microarrayed by eight-thousand genes, were used as model plant to study cucumber plant - virus interactions by microarray profiling with CMV-infected ecotypes of Col-0 and C24. Col-0 ecotype is susceptible, but C24 is resistant to CMV-fny infection. C24 especially shows local reaction of HR (hyper response) against CMV-fny inoculation. When Arabidopsis cDNA microarrays were hybridization with Cy5-labeled cDNA of CMV-fny infected Arabidopsis, specific genes related HR or programmed cell death (PCD) were induced comparing to those of Col-0. Virus such as tobamovirus, in plants parental virion can uncoat and reassemble within 35 min. and produce progeny virus particle within 45 min. We focused on two time points of 1 and 3 hours after inoculation (HAI) and subtracted wounding response by mock inoculation treatment at each time point.

PAL1 and PAL2, upregulated stress response gene and R2R3 MYB transcription factors were induced high level at 1 HAI in both of Col-0 and C24. In case of

highly induced genes (more than 2 fold), in groups of defense and transcription related genes, some genes were matched in both ecotypes, but other groups of metabolism, cellular organization and energy related genes were not matched each other regardless time points. This different gene induction can be conferred that Col-0 and C24 have different response pathway in CMV infection.

HR by pathogens in plants occurs at the site of pathogen entry and involves PCD in and around the infection site. It is also accompanied by the induction of plant defence responses that serve to confine the pathogen and protect plant. CMV-infected C24 expressed specific genes, but not in common, at 3 HAI (Table 1). Most of these significantly induced genes were corresponded with known HR-related genes. It is considered that TMV N-gene like (R-gene like), cystein protease (caspase-like), HSR201-like(found in common HR), germin-like(HR in pepper), AOX (regulate ROX production), bZIP domain transcription factor (NPR1 interaction), RPP5-like, HR-like lesion inducing, and dirigent-like protein are directly related pathogen resistance and HR. Listed genes in Table 1 may be comprised in receptor signals, ROS production and regulation, conserved HR mediators, ion (Ca^{++})and pH condition, sugar partitioning, energy balance (ATP, NADPH), nuclear DNA cleavage, and activation of caspase, which were commonly found in PCD signal pathway.

Based on the result of Arabidopsis microarray, trials for functional gene exploring of cucumber were accomplished by cucumber microarray. For the successful microarray hybridization, all the procedure was optimized step by step including clone preparation, construction of cDNA-chip, hybridization condition, and washing condition. Finally, we produced 1.2k cucumber cDNA-chip for microarray. Using this, we profiled transcripts from virus infected cucumber plants, in which ZGMMV-infected and CMV-infected cotyledons were harvested at the time points of 6, 12, 24, 48, and 72 hours after those viruses. As a result, there were newly discovered interactions profiling between cucumber and ZGMMV or CMV. In addition, clustering analysis according to time-points and kinds of virus experiments gave us profound profiling results. This micorarray results were also registered to our Web-DB and dynamically linked to ESTs DB with close

relationships. Researcher and users can easily find interesting cDNAs and their linked microarray data.

Our Web-DB was based by Oracle 10g and applied by JAVA2 language for JSP application. This is the first Web applied DB for cucumber genome research including ESTs and microarray and expected to an important place for exploring genes in cucumber.

2. Development of cDNA-chip for cucurbit-infectious viruses detection and regulation of gene expression in cucumber

Conventional detection methods for virus infection in plants are summarized as 1) detection using test plants, 2) using virus specific antisera, 3) using RT-PCR application, and 4) using real-time PCR for quantitative analysis. These methods were somewhat accurate, but they could not be used for unknown or detecting many viruses at the same tube. To overcome the present obstacles we developed cDNA-chip for virus detection, in which cDNAs of many viruses were densely arrayed. It was possible that many viruses were detected by one experiment at the same time. Previously reported cucurbit-infectious viruses such as ZGMMV, CGMMV, KGMMV, and CFMMV were clearly detected by the developed cDNA-chip. This result was published in Journal of Virological Methods (Lee et al., 2003).

Full genome of a few cucurbit-infectious viruses were cloned to pUC18 plasmids for developing infectious clones in vitro. These clones were transcribed in cell free system and inoculated to plant leaves, where they developed typical symptoms as the same as those of their intact virions. Moreover, those mutated IVTs (in vitro transcripts) were obtained by exchanges of their functional domain between tobamoviruses or using Tu-mutation system and they showed variable different symptoms in cucumber, respectively. These systems were used for studying plant-virus interactions.

Recently, many researchers have used viral vector system to express interesting cDNA clones or full length clones in plants. However, most of them have limitation for applying major crops. Few viral vector system can be useful to

cucurbit plants. Thus, we developed viral vector system using ZGMMV carrying GFP (green fluorescent protein). This new ZGMMV vector system will give great help for testing function of interesting genes and expressing target proteins in cucurbit plants.

3. Selection of cucumber specific genes and plant molecular breeding

For the development of virus-resistant plants, we focused on developing ZGMMV-resistant cucumber. Coat protein gene was isolated and cloned to pGreenII vector system. This construct was transformed to *Agrobacterium* LBA4404 for transformation to cucumber plant. During the transformation of cucumber, we optimized the protocol for cucumber transformation procedure in organogenesis or embryogenesis by various applications such as exchanging gelling agent, sucrose concentration, preparation of explants, and so on. Finally, ZGMMV-resistant T1 cucumber plants were obtained. We cloned virus induced specific clones in cucumber. These clones were included in arrayed genes on cDNA-chip for micorarray and also used for VIGS (virus induced gene silencing) in planta assay.

Transgenic cucumber production was difficult because its transforamtion efficiency was low and long time was required. Subsequently, it was hardly to test specific cDNA expression in trangenic cucumber. We have to choose alternative method such as VIGS system for test the function of cloned cucumber cDNAs. Using TRV vector system, cucumber cDNAs were silenced in plants and infected by TMV-GFP. Among tested cDNAs, silencing of phloem protein has great effect on TMV infectivity in plants. In case of phloem filament protein silencing, the movement of TMV were delayed. Although we could not test the function of cucumber cDNAs, application of this VIGS system enables us to test and screen the function of cucumber cDNAs efficiently in short period.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	24
Section 1. Research Purpose and Area	24
Section 2. Needs for Research	25
1. Technological View	25
2. Ecological and Industrial View	26
3. Social and Cultural View	26
Section 3. Research Area	27
1. Functional genomics in cucumber	27
2. Development of cDNA-chip for cucurbit-infectious viruses detection & regulation of gene expression in cucumber	29
3. Selection of cucumber specific genes and plant molecular breeding	30
Chapter 2. Status of technique development in domestic and foreign countries	31
Chapter 3. Research Results	34
Section 1. Functional genomics in cucumber	34
1.1 Material and Method	34
1.1.1 Construction of cucumber ESTs	34
1.1.2 Development of cDNA-chip for detection of cucurbit virus	42
1.1.3 Exploring specifically expressed genes	45
1.1.4 Production of cucumber cDNA-chip	47
1.1.5 Exploring gene expression with cDNA-chip	48
1.1.6 Construction of DB for cucumber ESTs and microarray data	50
1.1.7 Development and commercialization of plant cDNA-chip	52

1.2 Research results	55
1.2.1 Construction of cucumber ESTs	55
1.2.2 Development of cDNA-chip for detection of cucurbit virus	91
1.2.3 Exploring specifically expressed genes	96
1.2.4 Production of cucumber cDNA-chip	132
1.2.5 Exploring gene expression with cDNA-chip	135
1.2.6 Construction of DB for cucumber ESTs and microarray data	163
1.2.7 Development and commercialization of plant cDNA-chip	179
Section 2. Development of cDNA-chip for cucurbit-infectious viruses detection & regulation of gene expression in cucumber	188
2.1 Material and method	188
2.1.1 Production of cDNA-chip for cucurbit-infectious viruses detection ..	188
2.1.2 Development of binary vectors for virus resistant plants	192
2.1.3 Development fo viral vector system	193
2.1.4 Plant-virus interactions	200
2.2 Research results	201
2.2.1 Production of cDNA-chip for cucurbit-infectious viruses detection ..	201
2.2.2 Development of binary vectors for virus resistant plants	211
2.2.3 Development fo viral vector system	215
2.2.4 Plant-virus interactions	226
2.2.5 Test for virus-resistant transgenic plants	234
Section 3. Identification of specifically expressed genes in cucumber and plant molecular breeding	236
3.1 Material and method	236
3.1.1 Selection of cucumber specific genes	236
3.1.2 Production of transgenic cucumber	242
3.1.3 Analysis of cucumber specific genes	246
3.2 Research results	248

3.2.1 Selection of cucumber specific genes	248
3.2.2 Production of transgenic cucumber	255
3.2.3 Analysis of cucumber specific genes	274
Chapter 4. Achivement and contribution	283
Chapter 5. Plan for practical use	287
Chapter 6. Compilation of scientific information from foreign countries ...	288
Chapter 7. References	289

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	24
제 1 절 연구개발과제의 목적 및 범위	24
제 2 절 연구개발과제의 필요성	25
1. 기술적 측면	25
2. 경제산업적 측면	26
3. 사회문화적 측면	26
제 3 절 연구개발과제의 범위	27
1. 오이 기능성 유전체 연구	27
2. 오이 감염 바이러스 cDNA-chip의 개발 및 유전자 식물발현 조절	29
3. 오이 특이발현 유전자의 규명 및 식물 분자유종	30
제 2 장 국내외 기술개발 현황	31
제 1 절 국내외 기술개발 현황	31
제 2 절 국내외 기술개발 현황에서 차지하는 위치	33
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	34
제 1 절 오이 기능성 유전체 연구	34
1.1 연구재료 및 방법	34
1.1.1 오이 ESTs의 구축	34
1.1.2 바이러스 진단용 cDNA-chip의 개발	42
1.1.3 특이적 발현 유전자 탐색	45
1.1.4 오이의 cDNA-chip 제작	47
1.1.5 오이 cDNA-chip을 이용한 유전자 발현 탐색	48
1.1.6 오이 ESTs와 micorarray의 DB 구축	50
1.1.7 식물체 DNA-chip 개발 및 상용화	52

1.2 연구내용 및 결과	55
1.2.1 오이 ESTs의 구축	55
1.2.2 바이러스 진단용 cDNA-chip의 개발	91
1.2.3 특이적 발현 유전자 탐색	96
1.2.4 오이의 cDNA-chip 제작	132
1.2.5 오이 cDNA-chip을 이용한 유전자 발현 탐색	135
1.2.6 오이 ESTs와 micorarray의 DB 구축	163
1.2.7 식물체 DNA-chip 개발 및 상용화	179
제 2 절 오이 감염 바이러스 cDNA-chip의 개발 및 유전자 식물발현 조절	188
2.1 연구재료 및 방법	188
2.1.1 바이러스 진단용 cDNA-chip 제작	188
2.1.2 바이러스 저항성 형질전환용 vector 개발	192
2.1.3 Viral vector 시스템 개발	193
2.1.4 식물체와의 상호작용 연구	200
2.2 연구내용 및 결과	201
2.2.1 바이러스 진단용 cDNA-chip 제작	201
2.2.2 바이러스 저항성 형질전환용 vector 개발	211
2.2.3 Viral vector 시스템 개발	215
2.2.4 식물체와의 상호작용 연구	226
2.2.5 바이러스 저항성 형질전환 오이의 검정	234
제 3 절 오이 특이발현 유전자 규명 및 식물 분자유종	236
3.1 연구재료 및 방법	236
3.1.1 오이의 특이발현 유전자의 선발	236
3.1.2 형질전환 식물체의 육성	242
3.1.3 오이 특이유전자의 분석	246
3.2 연구내용 및 결과	248
3.2.1 오이의 특이발현 유전자의 선발	248

3.2.2	형질전환 식물체의 육성	255
3.2.3	오이 특이유전자의 분석	274
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	283
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	287
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	288
제 7 장	참고문헌	289

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발과제의 목적 및 범위

- 최근 인간을 비롯한 동식물의 유전자원 확보 및 이를 통한 유전체의 기능 연구 (functional genomics)는 게놈의 염기서열 결정 후의 연구 (post-genome research)과정에서 매우 중요한 분야로 인식되고 있으며, 본 과제에서는 국내외에서 진행되고 있지 않은 경제작물 중 하나인 오이의 유전체 기능 연구를 통하여 재배 생산성 및 품질에 영향을 주는 바이러스 감염 등의 스트레스 상태에서 오이 유전자의 발현을 게놈 수준에서 파악하고자 함.
- 바이러스 등의 스트레스 상태에서 유도되는 cDNA library를 제작하고, 1,000개 이상의 기본적인 ESTs (expressed sequence tag)를 확보하며, 특이적 발현 유전자를 판별하고자 함.
- 식물의 생산량과 품질에 지대한 영향을 주는 병원체 중 바이러스와 오이 간의 분자적 상호작용 (plant-virus molecular interaction)을 파악하고자 함.
- 식물 중 모델로서 많이 연구하고 있는 Arabidopsis (애기장대)의 microarray를 이용하여 식물과 바이러스 간의 상호작용을 파악하고, 이를 오이와 박과감염성 바이러스간의 상호작용 연구에 토대로 이용하고자 함.
- 오이 유전체 연구에 반드시 요구되는 오이 유전자 발현을 검정 및 바이러스의 검정을 수행할 수 있는 DNA-Chip을 개발, 상용화함을 목표로 함.
- 바이러스 저항성 오이 형질전환체를 육성하여 병저항성 육종의 중간모본으로 육성하고자 함.
- 본 과제를 통하여 확보되는 오이 유전자, microarray 결과, 형질전환체 육성 결과 등에 대한 database를 구축하여 국내 연구자에게 그 자료를 공유하도록 함.

제 2 절 연구개발과제의 필요성

1. 기술적 측면

- 21세기는 포스트 게놈연구(post-genome research)의 시대라 할 수 있으며, 동식물을 망라하여 가장 중요한 현안으로 대두되고 있음. 이는 유전자의 염기서열 결정에서 유전자 기능연구로의 전환을 의미함.
- 식물게놈 연구의 모델인 Arabidopsis(애기장대)와 벼의 전체 게놈분석이 완료되었고, 모델식물의 유전자 기능연구를 통한 경제작물로의 응용가능성이 증대되고 있음.
- 전 세계적으로 경제작물의 유전자에 대한 특허획득 및 유용 품종개발은 현재도 끊임없이 이루어지고 있으며, 국내에서도 이에 대비한 연구가 진행되고 있음.
- 대표적 경제작물중 하나인 오이의 경우, 재배생리 연구를 통한 생산성 향상으로 대일 수출오이 재배면적이 급격히 증가하고 있고, 육종 상황도 외국에 대하여 고유의 품종을 보유하고 있어 매우 경쟁력 있는 작물이라 할 수 있음.
- 그 경제적 중요성(농가 및 육종산업)을 비추어볼 때 타작물에 비하여 재배생리를 제외한 생명공학적인 연구가 제대로 진행되고 있지 않은 현실에서, 고품질 오이를 짧은 기간에 경제적으로 선발 육종할 수 있는 방법이 요구됨.
- 현재 유전자 기능연구에서 가장 활발히 진행되고 있는 핵심분야는 DNA-chip(microarray)을 이용한 대규모 유전자발현 연구라 할 수 있으며, DNA-Chip은 한 장의 슬라이드에 대략 1,000-100,000개 이상의 유전자를 심어 놓은 것으로 해당 식물체의 다양한 환경 및 생리변화에 대한 유전자 발현의 변화를 탐색할 수 있는 매우 유용한 기술임. 오이에서의 이 기술 개발은 오이를 비롯한 타 박과식물 농작물에 있어서도 응용가능성이 지대함.
- DNA-Chip 기술은 농작물에서 유용한 유전자의 탐색 및 클로닝 뿐만 아니라, 생육단계별 혹은 성표현에 관련한 유전자 발현, 다양한 환경스트레스 또는 병원체의 침입에 대한 식물체의 반응 등을 각 식물체의 전체 게놈 수준에서 유전자의 발현 여부 및 그 정도를ダイナ믹하게 비교할 수 있는 기술임.
- 외국의 경우, 농작물 분야에서의 DNA-Chip 기술의 응용은 매우 활발하며, 최근 국내에서의 개발로 충분한 국제 경쟁력을 가질 수 있다고 사료됨.
- 본 과제의 대상작물인 오이의 경우, DNA-Chip 효용성의 극대화를 위해서는 기

초적인 연구가 선행 또는 병행되어야 하는데, 작물의 교배 후, 분자적 표지인자(molecular marker)를 이용한 유전자지도(genetic map), 물리적지도(physical map)의 작성이 선결조건임. 또한 최근 만연하고 있는 바이러스 및 병원균의 검정 및 식물체의 저항성 연구를 효율적으로 연구하기 위해서는 DNA-Chip 제조 기술 자체뿐만 아니라, 식물체에 대한 기초연구와 바이러스에 대한 기본적인 연구결과가 필요함.

- 오이 유전체 정보 및 이를 활용한 기능분석 자료와 결과들을 국내 연구자들과 공유하여 이 분야에 대한 연구 기초 자료를 제공할 수 있는 데이터베이스가 필요함.

2. 경제·산업적 측면

- 2001년 현재 우리나라에서 재배되는 박과 작물의 일년 총 생산액 규모를 비교하면, 총 3조 5천억원 규모로 파악되며, 이중 오이가 1.2조원으로 가장 많고, 수박은 7000억원, 그리고 호박, 주키니, 참외, 멜론의 순임. 반면, 외국의 총 시장규모는 약 300조원으로 파악되어 오이의 경제적 비중은 매우 크다할 수 있음.
- 시설재배 오이의 축성재배시 난방비가 차지하는 비율은 현재 축성재배 오이생산비의 약 20%를 점유하고 있으며, 각종 병해를 방제하기 위한 농약비도 약 10-30%를 점유하고 있음. 이러한 현실을 근거로 병저항성 오이의 육종이 절실히 요구되는 현실임.

3. 사회·문화적 측면

- 가속화되는 농업기반 약화
 - 고부가가치의 오이의 안정 재배로 농업 경쟁력을 제고하여 농업기반 약화 방지 및 농민들에게 농업에 대한 자긍심을 제고하기 위하여 우수 품종도입의 개발 및 재배가 필요.
- 국내 종자에 대한 신뢰성 및 자긍심 확보
 - 현재 대일 수출오이는 모두 일본종자를 사용하고 있는 실정에서, 향상된 내한성 및 내병성 고품질 오이의 국내 종자생산은 다국적 종묘산업 하에서 약화된 국내 종묘생산의 신뢰성 및 자긍심을 회복할 수 있는 첩경임.
- 국가 농업 기술력에 대한 농민의 신뢰감 제고
 - 다양한 첨단 생명공학 기법을 통한 신품종의 육성을 통하여 외국의 종자산업

체에 대항할 수 있는 국내 농업수준을 농민에게 인식시킴으로써, 국가 농업 기술력에 대한 농민의 신뢰감을 회복시킬 수 있음

제 3 절 연구개발과제의 범위

1. 오이의 기능성 유전체 연구

(1) 오이 cDNA library의 제조

‘칭장’ 및 ‘백다다기’ 오이 (Syngenta)의 각각 잎과 자엽에 ZGMMV를 접종한 후, 24시간 및 3, 6, 12, 24, 48, 72시간이 경과된 시점에서 수확한 후 total RNA 및 mRNA를 분리함. ‘칭장’ 오이의 경우 PCR-based cDNA library 구축 방법을 이용하였고, ‘백다다기’오이의 경우는 lambda-ZAPII를 이용한 library 제조 방법을 이용하였다.

(2) 오이 ESTs (Expressed Sequence Tags)의 구축

구축한 cDNA library 들에서 얻어진 유전자들을 *E.coli*에 mass conversion 시킨 후에, 각 colony 들을 선별 배양하여 plasmid 들을 준비하였다. 깨끗하게 정제한 plasmid들을 5' primer로 automatic sequencing하였다. 얻어진 염기서열은 filtering 과정을 거쳐서 순수한 cDNA들만의 염기서열을 얻었다. 이들 염기서열을 BlastX 및 WU-BlastX 등의 GenBank에 등록된 단백질 서열과 비교하여 expressed sequence tags (ESTs)를 구축하였다. 얻어진 각각의 plasmid, cell 그리고 전체 데이터는 DB에 등록하기 위하여 저장하였다.

(3) 오이 cDNA-chip의 제조

구축한 ESTs들 및 특이발현 유전자 등을 PCR로 증폭하여 cDNA-chip을 제조하였다. PCR 증폭은 cDNA가 포함된 각각의 plasmid 별로 5'과 3'에 해당하는 universal primer를 이용하여 증폭하였으며, gel에 loading하여 그 양과 크기를 확인하였다. 총 부피는 40ul로 하였고, 농도는 200ng/ul 이상으로 유지하였다. 최종 solution 은 sodium bicarbonate (pH 9.0) 혹은 2X hybridization buffer (Telechem사)를 사용

하여 Superamine (Telechem사) substrate에 spotting하였다. Spotting용 arrayer는 MicrorgridIII (Biorobotics사)를 사용하였다.

(4) Microarray를 이용한 특이발현 유전자의 탐색 및 선별

바이러스에 의해 특이적으로 발현하는 유전자를 확인하기 위하여 일단 선발한 유전자들은 membrane-coated slide에 manual arrayer (최대 780개 클론의 spotting이 가능)를 이용하여 spotting하고, fluorescent dye로 labeling한 probe를 이용하여 hybridization 시켰다. 여기에서 발현되는 유전자를 선별하였다.

Microarray 및 바이러스 처리에 따른 특이 유전자 선별 방법을 확립하기 위하여 모델 식물인 Arabidopsis를 이용하였다. Arabidopsis 유전자 약 8,000개가 spotting 되어 있는 cDNA-chip을 사용하였고, Arabidopsis ecotype들인 Col-0와 C24에 CMV를 감염시킨 후, 1시간 및 3시간째에 수확하여 발현된 mRNA의 profiling을 실시하였다.

(5) 바이러스 감염에 따른 오이 유전자 변화 profiling을 통한 상호작용 연구

바이러스 감염에 따른 오이 유전자의 변화를 확인하기 위하여 앞서 제작한 오이 cDNA-chip을 이용하였다. 오이 자엽에 ZGMMV를 접종한 후, 6, 12, 24, 48, 72시간 경과 후에 식물체를 수확하였다. 이때 수확한 식물체와 mock 처리구의 mRNA를 역전사시키면서, Cy5와 Cy3를 각각 labeling한 후, 오이 cDNA chip에 hybridization 하였다. 결과 이미지 및 형광강도 관련 data를 통계프로그램 (Acuity ver. 4.0)을 이용하여 normalization, 통계 분석 및 clustering을 실시하였다.

(6) 오이 ESTs 및 cDNA-chip 시험에 따른 microarray에 대한 DB 구축

오이 ESTs 데이터 및 cDNA-chip을 이용한 profiling 결과를 구축한 Web-DB에 DB화 하였다. Web-DB의 구축은 Oracle 10g DB를 이용하였고, 여기에 JAVA2 언어를 지원하는 응용프로그램 (JSP, Tompcat)들을 적용하였다.

(1세부 위탁과제) 식물체 DNA-chip 개발 및 상용화

(1) DNA-chip 제조 제반 기술의 확립

본 과제에서 요구되었던 DNA-chip 제조에 관련한 제반 기술을 확립하였다. 클론을 균일하게 spotting 할 수 있는 arrayer를 확보하였고, 최적의 hybridization이 가능할 수 있는 다양한 조건을 확립하였다.

(2) 바이러스 진단용 DNA-chip 상용화

cDNA-chip에서 진일보하여 박과 감염성 바이러스들 간의 특이적 혹은 보존적 sequence들을 바탕으로 바이러스 별로 다양한 oligomer를 합성하였고, 이들을 이용하여 oligo-chip을 제작하였다. 제작한 chip의 시험적 사용으로 박과감염성 바이러스 간의 검정이 가능하였다.

(3) 고밀도의 식물용 cDNA-chip 개발

1.2K 수준의 오이용 cDNA-chip을 개발하였다. 이 chip의 제작을 통하여 오이-바이러스 간의 상호작용을 profiling할 수 있는 결과를 확보할 수 있었다.

2. 오이 감염 바이러스 cDNA-chip의 개발 및 유전자의 식물발현 조절

(1) 오이 감염 바이러스 cDNA-chip 개발

오이를 포함한 박과식물 감염성 바이러스의 외피단백질을 증폭하였고, 이 클론들을 이용하여 membrane-coated slide에 spotting한 cDNA-chip을 개발하였다. 적용한 바이러스는 ZGMMV, KGMMV, CGMMV, CFMMV, TMV, PVX, ZYMV 등이며 control 유전자로 alpha-tubulin을 사용하였다.

(2) 오이 감염 바이러스의 in vitro transcript의 개발, mutant 제작 및 적용

오이 감염바이러스의 전체 genome을 확보하였고, 이들을 T7 promoter로 transcription 할 수 있도록 클로닝하였다. 이들의 in vitro transcription으로 감염성 바이러스 클론을 얻었으며, 각 바이러스의 기능을 조절하기 위하여 돌연변이체 들을 제작하였다. 이들 돌연변이체들을 식물에 감염시켜 병징의 변화를 조사하였다.

(3) 오이 감염 바이러스를 이용한 viral vector의 제작

오이에서 viral vector의 적용이 가능할 수 있도록 ZGMMV-GFP를 적용하였다. 즉, ZGMMV의 movement protein과 coat protein 사이에 클로닝이 가능한 site를 만들었고 여기에 GFP (green fluorescent protein) 유전자를 삽입하여 ZGMMV가 식물체에 감염되었을 때 GFP를 발현할 수 있도록 하였다.

(4) 바이러스 저항성 오이의 검정

ZGMMV의 coat protein 유전자로 형질전환된 바이러스 저항성 오이의 분자적 및 혈청학적 검정을 수행하여 저항성 오이의 확인연구를 수행하였다.

3. 오이 특이발현 유전자의 규명 및 식물 분자유종

(1) 오이에서 바이러스 감염시 발현되는 특이 유전자 확보

오이에서 바이러스 감염시 발현되는 특이 유전자를 확보하기 위하여 SSH (subtractive suppression hybridization) 기법 및 cDNA-AFLP 방법을 응용한 DDRT 방법으로 다양한 특이 발현 유전자를 확보하였다.

(2) 바이러스 저항성 오이 육종소재의 개발

오이 감염성 바이러스 저항성 오이의 개발을 위하여 분자유종적 방법을 이용하여 ZGMMV의 coat protein이 삽입되어 ZGMMV 감염시 저항성을 나타내는 오이 육종소재를 개발하였다.

(3) 특이 유전자의 식물체 내에서의 기능 규명

바이러스 감염시 오이에서 특이발현 하였던 유전자와 ESTs 중 바이러스 감염과 관련성을 보였던 오이 유전자의 기능을 규명하기 위하여, VIGS (virus induced gene silencing)을 야기할 수 있는 pTRV vector를 이용하여 오이 유전자의 gene silencing을 야기시켰고, 여기에 TMV-GFP virus를 접종하여 식물-바이러스의 상호작용 및 오이 유전자의 기능을 스크린하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술개발 현황

1. 오이 품종 및 계통에 대한 분자표지(molecular marker) 연구

세계적으로 오이의 육종계통에 대한 분자표지에 관한 연구는 예상외로 상당히 미개발 상태이며 미국 Wisconsin 대학 및 USDA 소속의 Staub 박사 연구팀과 이스라엘의 Katzir 박사 그룹에서 32개의 품종 및 계통에서 RFLP 및 RAPD 방법으로 각각 58개의 probe 및 135개의 다형화 밴드를 확인한 바 있음 (2000년). 그러나, 오이는 유전적 배경이 매우 협소한 이유로 실제 교배육종시 유용하게 사용할 수 있는 육종지표로서의 표지인자는 매우 한정되어 지속적인 분자표지 인자의 개발이 요구되고 있음.

국내에서 이용되는 오이 품종들은 미국 및 유럽종과는 상당히 차이가 있어 국내에서 육종용 표지인자로 이용하기 위해서는 좀더 다양한 표지인자의 개발이 이루어져야 할 것이며, 분자표지를 이용한 육종연한 단축 및 효율적 육종을 위해서는 국내 육종계통에 대한 분자적 표지인자 및 표현형의 연관지도 작성이 필수적임.

또한, 앞으로의 포스트 게놈시대에 발맞추어 오이 등의 과채류의 육종을 선진화, 과학화하기 위해서는 국내에서도 분자표지 연관유전자 지도의 작성이 필수적인 것으로 사료됨.

2. 오이 내한성에 관한 연구

국외의 경우, 오이에 국한한 내한성 연구는 특별히 이루어진 바가 없으며, 단지 국내에 도입된 오이의 품종 중 반백계는 저온에 민감하며, 청장계(취청)는 반백계에 비하여 상대적으로 저온에 둔감한 것으로 보고됨. 그러나, 수출오이를 비롯한 국내 대도시에서 소비되는 대부분의 오이계통은 반백계오이가 선호되고 있어 이에 대한 육종연구가 요구됨.

다른 작물에 대한 내한성 연구는 모델 식물인 Arabidopsis 및 벼, 밀, 보리, 옥수수 등에서 매우 다양한 연구가 진행되어 왔으며, 최근 저온, 건조, 염류에 대한 스트레스가 밀접한 관계가 있음이 밝혀짐. 또한, 오이는 저온 스트레스를 비롯한 저광도, 양분 부족 등의 환경스트레스에 의하여 급격한 순밋음 현상 및 곡과, 기형과 등의 발생으로 과실생산성이 저하되는데, 이에 대한 분자생리 및 유전적 연구는 거의 이루어진

바가 없음.

3. 오이 내병성(내바이러스성)에 관한 연구

실제로 전세계적으로 오이를 기주로 하는 병은 그 종류를 헤아릴 수 없을 만큼 다양하며, 세균병, 곰팡이병, 바이러스병 모두가 농가재배에서 문제가 되어 농약, 생리활성제 및 생물학적방제에 이르는 다양한 처리를 통한 방제 시도가 이루어졌음. 내병성 육종은 현재에도 전세계 육종가에게 최대의 목표가 되어왔음. 최근에는 국내에서 오이녹반모자이크바이러스 (CGMMV; Cucumber Green Mottle Mosaic Virus) 및 추키니 녹반모자이크바이러스 (ZGMMV; Zucchini Green Mottle Mosaic Virus)의 발병으로 국내에서도 이에 대한 분리 및 동정이 이루어짐. CGMMV는 NS, Y, W 등의 최소한 3가지 형태의 변이종이 동정되어 있고, ZGMMV의 경우 ZU type의 새로운 strain이 보고되었고, 이들의 외피단백질 염기서열이 보고됨.

현재, 많은 박과작물 재종이 중국 등의 외국에서 이루어지는 현실에서, 앞으로도 다양한 바이러스병이 국내에서 발병할 우려가 있는 상황이므로, 이에 대한 보다 근본적인 식물체의 내바이러스성 연구가 요구됨.

4. 형질전환체 육성에 관한 연구

오이의 형질전환 방법 연구는 많은 시도가 이루어졌으며, 최근에는 일본 국립농생물자연연구소(NIAR)의 Tabei 박사팀이 벼의 내생 chitinase 유전자를 도입한 잿빛곰팡이병 저항성 오이를 발표한 바 있음 (1998년). 국내에서는 유용한 유전자의 도입이 보고되어 있지 않음. 본 연구팀은 오이의 regeneration system을 확립하였고, uidA gene이 도입된 형질전환 식물체를 확보하고 있음.

내병성 유전자의 도입을 통한 저항성 품종의 육종은 1999년도에 협의된 국내의 종합방제 대책에서 거론된 바가 없으나, 종합대책이 추구하는 방제기술 개발이 방대하고 포괄적이어서 기술적인 면이나 시간적인 측면에서 장기적인 반면에, 식물형질전환체를 통한 저항성 품종 개발과 같이 병행되어야 할 것으로 사료됨.

5. DNA-Chip에 관한 연구

포스트 게놈연구(post-genomics)는 현재, 염기서열을 바탕으로 한 기능적 유전체 연구(functional genomics)로 집약되고 있으며, 대표적으로 DNA-Chip의 활용을 들 수 있음. 인간 게놈 프로젝트가 진행되고 있는 (2003년 완료 예정) 인간 유전체 연구에서

DNA-Chip은 각종 암연구, 노화, 치매 등의 학술적 연구 외에도 유전병진단, 다양한 병의 동시진단, 신약개발, 항생제 개발 등의 산업적 용도로도 각광 받고 있음. 또한, 인간과 비슷한 염기배열을 갖고 있는 것으로 알려진 쥐(mouse), 그리고 대장균, 효모, 초파리 등에서도 DNA-Chip을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있음.

식물체에서는 처음으로 Arabidopsis의 전체 게놈의 유전자서열 결정이 완료(2000.12.14.)된 현 시점에서, 전 세계적으로 동물시스템과 유사한 개념에서의 DNA-Chip 연구가 진행되고 있음. Arabidopsis는 Stanford 대학을 중심으로 Arabidopsis Functional Genomics Consortium (AFGC)가 이루어져 연구자들의 정보교류가 활발히 이루어지고 있으며, The Institute for Genomic Research (TIGR)에서는 인간, 쥐, 초파리, 미생물 등을 비롯하여 식물 (Arabidopsis, 콩, 토마토, 옥수수, 감자 등)의 염기/단백질의 서열, 유전자 정보, cDNA library 및 이들 간의 기능적 정보탐색의 Web page를 운영하고 있음.

국내에서도 DNA-Chip 연구분야는 활기를 띠고 있으나, 고가의 장비 구입 등의 연구자본 창출의 어려움이 존재한다. 몇몇 센터 외에는 도입하기 어려운 실정임. 또한, 식물 연구분야에 있어서는 현재, 벼와 배추 등의 작물에 국한되어 연구가 진행되는 상황으로 여겨짐. 이러한 국내의 현실을 감안할 때, 개개 실험실 수준에서는 기존 산업체와의 공동연구를 지향하며, 국제적 경쟁력을 가질 수 있는 작물에 대한 연구로 방향을 설정하는 것이 바람직할 것으로 사료됨.

제 2 절 국내외 기술개발 현황에서 차지하는 위치

- 오이는 상대적으로 작은 게놈크기 (약 367Mbp)를 갖고 있어, 오이 기능성 유전체 연구는 다른 박과작물의 유전체 연구는 물론 식물체의 유전체 연구에 있어서도 중요한 역할을 담당할 수 있을 것임.
- 오이는 바이러스는 물론, 다양한 진균류 및 세균류에 의한 병해에 매우 취약한 작물로 현재의 농약사용율을 줄이기 위해서는 내병성 형질전환 오이를 위한 연구가 앞으로 지속적으로 이루어질 전망이다.
- 앞으로도 농업작물의 형질전환체의 육성은 선진국을 중심으로 지속적으로 이루어질 것이며, 현재의 노출된 문제점들은 상당수 해결될 수 있을 전망이다. 국내에서도 형질전환 식물체에 대한 기반연구는 지속적으로 이루어져야할 것으로 사료됨.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 오이 기능성 유전체 연구

1.1. 연구재료 및 방법

1.1.1. 오이 ESTs의 구축

1.1.1.1. 오이 cDNA library 제작 개요

바이러스 감염시 발현하는 오이 유전자의 정보를 얻고자, 오이의 생산성 감소와 품질저하를 야기하며, 국내 남부지역에서 만연하고 있는 박과바이러스 중 Zucchini Green Mottle Mosaic Virus (ZGMMV)를 접종한 오이에서 유도되는 RNA에 대한 cDNA의 library를 제작하고자 하였다.

바이러스 감염에 대한 2종의 cDNA library를 완성하였으며, 식물재료는 ‘청장’ 오이를 대상으로 본엽 2매기에 ZGMMV를 접종한 후, 24시간 후에 식물체를 수확한 것과 ‘백다다기’ 오이를 대상으로 과종 후 6일째의 자엽에 접종한 후 접종 부위를 제외한 나머지 자엽을 수확한 것으로 하였다. 구체적인 제작방법은 다음과 같다.

1.1.1.2. PCR을 기초로 한 cDNA library 제작

가. 식물재료 및 접종원

식물재료는 청장계통의 오이 (Syngenta Korea Co.)를 peat/vermiculite (1:1, v/v)의 plug pot에 과종한 후, 밤/낮 (28C/24C)을 16hr/8hr이 유지되는 생육실에서 재배하였다. 접종원 준비는 담배 (*Nicotiana bethamiana*)에서 유지한 ZGMMV (Zucchini Green Mottle Mosaic Virus)를 0.01M PBS buffer (pH 7.0)로 1/1000(w/v)의 농도가 되도록 한 후, 얼음 상에서 유발과 유봉을 이용하여 잘 마쇄하였다. 얼음 상에서 2시간동안 방치한 후, 본엽 2매기의 ‘청장’ 오이 (Syngenta Korea Co.)의 잎에 carborandum 가루를 알맞게 뿌린 후 latex 장갑을 착용하고 100ul를 접종하였다.

접종 후 1, 3, 8, 24, 48, 72시간으로 나누어 접종엽을 수확하였고, 수확 즉시 액체질

소로 얼리고 사용 전까지 -85°C의 deep freezer에서 보관하였다. 이중 24시간째에 수확된 잎을 대상으로 cDNA library를 제작하였다.

나. Total RNA의 추출

cDNA library 제작을 위한 Total RNA의 추출방법은 기본적으로 Trizol reagent (Invitrogen)의 방법을 적용하였다. 식물체 0.1g 당 1mL의 Trizol 용액을 이용하였다. 이때 식물체의 탄수화물과 2차대사산물의 제거를 위하여 2% PVP를 함유시킨 용액을 사용하였다. 액체질소로 차갑게 유지시킨 유발과 유봉을 사용하였으며, 식물 분말이 녹음과 동시에 Trizol 용액과 섞이도록 하였다. Homogenizing된 용액을 원심분리용 튜브에 넣은 후, 이 상등액의 약 1/2.5부피의 chloroform을 첨가한 후 20초간 vortexing한 후 10분간 반응시키고 15,000g에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 새 튜브로 옮긴 후 상등액의 1/2 부피의 high salt (sodium citrate, sodium acetate)와 역시 1/2 부피의 isopropanol을 첨가하고 10분간 상온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후 15,000g에서 15분간 원심분리하고, DEPC가 처리된 75% EtOH 용액으로 washing 하였다. 눈으로 볼 수 있는 RNA 침전물을 상온에서 약 10분간 건조시킨 후 다량의 DEPC 처리된 증류수로 용해시키고 다시 얼음에서 2시간동안 반응시켰다. 반응이 끝난 용액은 다시 1/10 부피의 sodium acetate (pH 5.2)와 2.5배 부피의 EtOH로 -20°C에서 밤새 침전시켰다. 다음날 다시 원심분리로 RNA를 회수한 후, 소량의 멸균수로 RNA를 용해시켰으며, 여기에 RNase Inhibitor를 첨가하고 이를 사용 전까지 -85°C에서 보관하였다.

추출이 끝난 RNA는 우선 denature gel에서 전기영동하여 대략적인 양과 28S ribosomal RNA와 18S ribosomal RNA의 비율로 integrity를 확인하였다. 정량은 Spectrophotometer를 이용하여 A260의 흡광도에서 1.0OD를 기준으로 하여 40ng/ul의 환산비를 이용하였다. 또한 A230/A260과 A260/A280의 비율로 순도를 확인하였다.

다. mRNA의 분리

mRNA는 앞서 추출한 total RNA로부터 분리하였는데, Qiagen사의 oligotex column을 이용하는 방법에 준하여 이용하였다. 우선 1mg의 total RNA를 준비하고 이를 65°C에서 3분간 반응시킨 후 5초간 vortex하는 과정을 3회 반복하여 충분히 denature 시켰다. Denature시킨 RNA 500ul를 poly(A)와 결합할 수 있는 resin이 포함된 용액 500ul와 섞

은 후 상온에서 10분간 반응시켰다. 이 반응물을 15,000g에서 2분간 원심분리하고 상등액을 제거하였다. 여기에 column binding solution을 첨가하고 원심분리용 column을 이용하여 원심분리시켰다. resin과 결합한 RNA는 washing solution으로 2회 씻어낸 후 최종적으로 RNase-free water로 mRNA를 분리하였다. Ribosomal RNA의 혼입을 최대한 억제하기 위하여 상기의 방법을 2회 반복하여 mRNA를 좀더 순수분리하였다.

분리한 mRNA는 사용전까지 RNase-inhibitor가 첨가된 용액으로 -80C에서 보관하였다.

라. cDNA library의 제작

Genomic DNA의 혼입을 막고, 최대한 full-length의 cDNA를 얻기 위하여 본 실험에서는 PCR을 이용한 cDNA library 제작방법을 적용하였다.

1) First-strand cDNA 합성

0.5ug (1-3ul)의 mRNA, 1ul SMART oligonucleotide, 1ul CDSIII/3' primer를 물과 함께 5ul가 되도록 한 후, 72°C에서 2분간 반응시키고 얼음상에서 유지한다. Denature시킨 mRNA와 primer에 2.0ul 5X RT buffer, 1.0ul DTT(20mM), 1.0ul dNTP mix (10mM), 그리고 1.0ul reverse transcriptase (200U/ul)를 첨가하여 10ul가 되도록 한 후, 42°C에서 1시간동안 역전사시킨다. 반응이 끝나면 얼음상에서 반응을 종결시키고, 1ul NaOH를 첨가후 68°C에서 30분간 반응시켜 남아있는 RNA를 alkali-lysis 시킨다.

2) primer extension을 이용한 ds cDNA의 합성

11ul의 합성된 1st-strand cDNA에 10ul 10X PCR buffer, 2ul 50X dNTP mix, 2ul 5' primer, 2ul 3' primer, 2ul hot start PCR polymerase, 71ul water를 첨가하여 총 100ul가 되도록한다. 이 용액을 PCR machine에서 72°C 10분, 95°C 1분, 그리고 3 cycle의 95°C 15초, 68°C 8분으로 primer extension을 시킨다. 이후, 반응물중 5ul 정도를 전기영동하여 DNA의 합성을 확인한다.

3) Protease K digestion

50ul (2-3ug)의 합성된 DNA에 2ul protease K (20ug/ul)를 첨가한 후 45°C에서 20분간 반응시키고, 여기에 50ul의 water를 첨가한다. 이후 100ul의 phenol로 분리한후 다시

100ul의 chloroform으로 남아있는 phenol을 씻어주고, 상등액에 10ul의 3M NaOAc, 1.3ul glycogen (20ug/ul)와 260ul의 95% EtOH를 첨가한 후, 즉시 14,000g에서 20분간 원심분리하여 cDNA를 회수한다. 70% EtOH로 washing한 후, 79ul의 water에서 잘 녹인다.

4) *Sfi* digestion

3)번에서 얻어진 cDNA 79ul에 10ul 10X *Sfi* buffer, 10ul *Sfi* enzyme, 1ul 100X BSA를 첨가하고 50°C에서 2시간 반응시킨다. 여기에 2ul의 1% xylene cyanol dye를 첨가하고 잘 섞은 후 다음의 chromatography를 진행한다.

5) cDNA size fractionation (CHROMA SPIN-400)

CHROMA SPIN-400 (BD Science) column을 준비하고, washing하여 유속이 40-60초당 1방울씩 떨어지도록 유지한다. 이때 한 방울은 약 25ul가 되어야한다. 여기에 700ul의 column buffer를 loading하고 완전히 빠지도록 한다. 약 15-20분 경과후, 4)의 100ul 반응물을 loading하고, 다 빠지기를 기다린 후, 여기에 600ul의 column buffer를 첨가하고 1-16번의 single-drop fraction을 1.5mL tube에 모은다. 각 tube를 3-4개 정도씩 합친 후에 7ul 정도로 농축시켜서 보관한다.

6) Ligation of cDNA

5)의 ds cDNA를 0.5ul, 1.0ul, 1.5ul 씩 사용하여 λ TriplEX2 vector에 ligation 시킨다. 16°C에서 밤새 반응시키고, 반응이 끝나면 각각의 반응물을 λ -phage packaging에 반응시킨다. 이때 primary titer는 최소 $>1-2 \times 10^6$ 이 되어야 하는데, 이때 host Bacterial cell은 XL1-blue를 이용한다.

7) Titering the unamplified library

Titer (pfu/ul)를 결정하기 위하여 unamplified lambda lysate를 1:5에서 1:20의 희석조합을 만들고 1ul의 희석된 phage와 200ul의 XL1-blue를 섞은 후 37°C에서 10-15분간 phage가 부착되도록 한 후에 2mL의 LB/MgSO₄ top agar를 첨가한다. 그리고 이것을 LB/MgSO₄ plate에 균일하게 덮어지도록 재빨리 붓는다. 10분간 굳힌후, 6-18시간 배양후 titer를 계산한다. 다음날 lacZ α -complementation을 이용하여 recombinant clone의 비율을 결정한다.

8) Library amplification

일반적으로 λ TriplEx2를 이용할 경우, 15cm plate에서 primary titer가 약 $6-7 \times 10^4$ 정도가 되므로 약 20개의 plate를 이용하면 amplification이 가능하다. Amplification은 다른 cDNA library 제조시와 마찬가지로 λ -phage extracts를 이용한다. 성공적으로 amplification이 이루어지면 약 10^{10} pfu/ml을 얻을 수 있다.

9) Mass conversion (lambda-TriplEx에서 pTriplEx로)

BM25.8 cell을 이용하여 plasmid DNA로 변환시킬 수 있다. 변환 방법은 일반적인 library conversion 방법을 이용한다. 변환된 plasmid들은 mini-prep 후에 ESTs의 확보를 위한 insert의 증폭과 sequencing을 위하여 5' primer(5'-TCCGAGATCTGGACGAGC-3')와 3' primer (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')를 이용한다.

1.1.1.3. λ -ZAPII를 이용한 cDNA library 제작

가. 식물재료

ZGMMV 및 CMV에 대한 감염성이 높은 '백록다다기' 오이(Syngenta Co.)를 대상으로 자엽전개기인 파종후 6일째에 자엽의 일부를 바이러스로 접종하고 접종되지 않은 부위를 30분, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72시간으로 나누어 수확하였다. 각 바이러스에 대한 식물체의 transcripts를 대변하는 cDNA library를 제작하기 위하여 각 수확 시간별로 total RNA를 추출하고, mRNA를 순수분리하였다 (방법은 상기와 동일). 총 5ug의 mRNA로 각 시간별 그리고 접종한 virus 종류별로 동량의 mRNA를 pooling하였다. 각각의 virus에 대한 오이 자엽의 cDNA library를 제작하기 위하여 λ -ZapII를 사용하는 package하는 cDNA library Kit (Stratagene)를 이용하였다.

나. cDNA library의 제조

앞서의 PCR-based library 제조와는 달리 *Xho* I site를 포함하는 oligo(dT) linker-primer를 사용하고 5-methyl dNTP를 포함시켜 역전사시킨다. 이때 만들어지는 1st-strand cDNA의 5-methylation은 이후의 restriction enzyme이 cDNA를 자르지 못하도록 하게 된다. ds cDNA는 *EcoR* I adaptor와 T4 DNA ligase를 이용한다. ds cDNA가 합성되면

Xho I digestion 후, Sepharose CL-2B gel filtration을 이용하여 크기별 분획을 수행하였다. 적절히 분획된 cDNA를 모아서 plasmid vector인 pBluscript에 ligation 시켰다. Ligation이 끝나면 결과물을 GigapackIII gold packaging extract를 이용하여 phage에 packaging하였다. Primary titer는 약 0.5×10^6 pfu/ug 이었고, 15cm에서 blue colony는 10개 미만으로 나타났다. Primary library인 UNI-ZAP XR library를 amplification 시켜서 최종적으로 2×10^{11} pfu/ml 의 titer를 갖는 cDNA library를 제작할 수 있었다.

1.1.1.4. Cloning of cDNA inserts by PCR

Insert의 확인을 위하여 30개의 colony를 무작위로 선발하여 PCR을 수행하였으며, 제작한 library는 -80°C 에서 보관하였다. Library의 mass conversion은 앞서의 내용과 동일하게 수행하였는데, pBluscript II SK- plasmids가 ExAssist (Stratagene) phage.를 이용하여 lambda ZAP clones에서부터 in vivo excision되는 현상을 이용하였다. pBluscriptII에 cloning된 cDNA insert는 다음의 protocol을 이용하여 증폭하였다.

가. cDNA insert의 PCR

0.5 % chloroform이 함유된 200 μl of SM buffer (100mM NaCl, 8mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mM Tris-HCl pH 7, 0.04% gelatin)에 존재하는 cDNA library로부터 각각의 recombinant cDNA을 무작위로 선발하였다. 4°C 에서 최소한 12시간동안 배양하여 agar plug에서 phage particle이 elution되도록 하였고, 이중 5ul의 phage suspension을 PCR에 이용하였다. PCR 분석 갯수에 충분하도록 10%이상의 PCR master mix를 준비하였으며, 분석은 50ul (45 μl master mix + 5 μl template DNA)반응을 기준으로 하였다. 45 μl master mix에는 38.05 μl sterile water, 5 μl 10X PCR buffer, 0.75 μl 150 μM dNTPs, 그리고 0.5 μl 0.1 μM primers로 구성하였다. Universal sequencing primer 로 T3와 T7 primer를 이용하였다. 5 μl phage suspension을 각 master mix tube에 넣고 필요할 경우 한방울의 light mineral oil (Sigma)을 첨가하였다.

PCR은 *Taq* polymerase 첨가 전에 initial denaturation step으로 phage나 bacteria에서 DNA가 빠져나올 수 있도록 95°C 에서 10 min분간 반응시켰다. 이후 0.2 μl *Taq* DNA polymerase (5 U/ μl)를 첨가하고 바로 PCR을 진행시켰다. Thermal cycling parameters는 30 cycles로 구성하였는데, denaturation step으로 95°C 에서 90초간, annealing step으로

60°C에서 90초, 그리고 extension step으로 72°C에서 210초간 수행하였으며, final extension을 위하여 72°C에서 15분간 반응시켰다. 이때 Control은 DNA가 포함되지 않은 tube로 하여 반응액들의 혼입을 검사하였다. 반응이 끝난 산물들은 -20°C에서 sequencing 전까지 보관하였다. 각 PCR 산물들은 1.0-1.5% agarose gels로 확인하였으며, 대략 600bp 이상의 산물들만을 sequencing용으로 준비하였다. 정량은 A260에서 수행하였다.

1.1.1.5. cDNA library의 sequencing

가. Sequencing을 위한 DNA template 준비

전체 sequencing 작업에서 몇가지 다른 DNA template 준비작업을 수행하였다. 대부분의 sequencing은 E.coli로 transformation시킨 pBluscripts를 commercial kit (DNA mini-prep kit, Qiagen)를 이용하여 분리정제하여 sequencing하였고, 일부는 phage suspension에 존재하는 DNA template을 직접 PCR하고 primer, primer-dimer, dNTP들이 포함되지 않도록 column으로 정제한 후, sequencing하였다.

나. Sequencing 반응

Sequencing은 Applied Biosystems PRISM Ready Reaction Dye Primer Cycle Sequencing kits을 이용하여 Perkin-Elmer 9600 thermocycler를 이용하였고, primer는 T7과 T3 primer를 이용하였다. 반응산물은 3M sodium acetate 혹은 glycogen을 carrier로 이용하여 95% EtOH에 침전시키고 70% ethanol로 한번 washing한 후 vacuum으로 건조시켰다. 건조된 반응물은 -20°C 암소에 보관하였다.

다. Automated DNA sequencing

Sequencing 반응물은 AB373S DNA 혹은 Genotyper 310 sequencers (Perkin Elmer Applied Biosystems) 를 이용하였고, version 1.2 data collection과 analysis software를 이용하였다. 본 과제의 주요한 목표는 유전자의 발굴이므로 대부분의 염기서열 결정은 각 유전자의 5' end 쪽인 T3 primer를 이용하였는데, 대부분 5' 말단쪽이 3' 말단 쪽보다는 좀더 많은 단백질을 암호화하는 염기서열이 많다고 알려져 있어 putative identification에 좀더 유용하였다.

라. Sequence analysis

1) Sequence editing과 quality analysis

형광 염기서열 분석기로 ABI 377 또는 Genotyper 310을 이용하였으며, ABI Sequence Analysis와 같은 프로그램으로 data를 capture하였다. 염기서열의 handling, 저장, 분석은 Apple Macintosh BW G3 workstation을 이용하였다.

2) Sequence trimming

ABI377과 Genotyper 310 데이터 분석 프로그램은 대체로 약 600개의 염기를 읽어낼 수 있으나 마지막 부분들은 peak가 겹치는 등 부정확할 수 있으므로, automatic sequencer로 분석되는 모든 염기서열 데이터는 Sequencher 3.0 등의 프로그램으로 peak shape에 대한 확인작업이 이루어졌다. 부정확한 3' end sequence는 프로그램 filter를 이용하여 trimming 작업이 수행되었고, 수작업을 통하여 다시 확인을 하였다. Cloning vector의 polylinker sequence 등에 대한 제거는 Sequencher 프로그램을 이용하였는데, vector, polylinker, adaptor, poly(A/T)의 염기들을 상동성 검색방법으로 제거할 수 있었다.

3) Sequence accuracy

Sequence의 정확도는 batch sample에서 알려진 cDNA 염기서열을 얼마나 정확히 읽어내는가에 대한 평가로 측정하였다. 평균 염기서열 판독 정확도는 본 과제의 경우 약 98% 이상으로 파악되었다.

4) Sequence contamination

세균이나 효모와 같은 생물체에는 식물과 곰팡이 조직에 존재할 수 있다. 이런 미생물체의 오염으로 보통 non-relevant sequence가 나타날 수 있다. 본 과제에서는 따라서 E.coli, yeast, 혹은 bacteriophage lambda와 염기서열이 100% 일치하는 결과를 보여주었던 데이터는 모두 오염원으로 판단하고 제거하였는데, 염기서열 결정 과정에서 매우 일부만이 해당되었다.

1.1.2. 바이러스 진단용 cDNA-chip의 개발

1.1.2.2. 식물재료, 바이러스, 항체

본 연구에 사용된 바이러스인 CGMMV(Cucumber Green Mottle Mosaic Virus), KGMMV (Kyuri Green Mottle Mosaic Virus), 그리고 ZGMMV (Zucchini Green Mottle Mosaic Virus)는 Plant Virus GenBank (www.virusbank.org)에서 분양 받았다. CFMMV는 이스라엘의 Armit 박사 (Department of Virology, Volcani Center, Dagan, Israel)로부터 분양받았다.

ZGMMV, CGMMV, 및 KGMMV의 항체는 뉴질랜드 흰토끼의 면역반응을 이용하여 생산하였다. CFMMV의 항체는 역시 Amit 박사에게서 분양받았다 (Antignus et al., 2001)

1.1.2.2. 식물바이러스 cDNA clone과 target probe의 증폭

cDNA microarray 분석에서 9가지의 cDNA clone들은 9가지의 서로 다른 바이러스의 외피단백질 (coat protein, CPs)을 coding하고 있는 RNA sequence를 바탕으로 제조되었다. 본 연구에서 사용된 9가지의 바이러스는 6가지의 tobamoviruses (*Tobacco mosaic virus*, TMV; *Zucchini green mottle mosaic virus*, ZGMMV; *Kyuri green mottle mosaic virus*, KGMMV; *Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV; *Cucumber fruit mottle mosaic virus*, CFMMV; *Pepper mild mottle virus*, PMMoV) potexvirus (*Potato virus X*, PVX), cucumovirus (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 그리고 potyvirus인 *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV)로 구성되었으며 모두 cDNA chip의 생산에 사용되었다 (Ryu et al., 2002).

또한, control clone으로서 Arabidopsis의 alpha-tubulin이 internal control로 사용되었고, 사람의 tumor protein인 p35-binding protein 2 유전자가 negative control로 사용되었다.

선발된 클론에서 각 바이러스의 삽입된 CP 유전자는 pGEM-T Easy vector (Promega)에 존재하고 있어 universal primer인 T7과 SP6 primer를 각기 forward와 reverse로 사용하여 PCR로 증폭하였다.

Tube당 100ul의 반응량으로 하였고, plasmid template은 reaction당 10ng을 사용하였다. 여기에 0.25mM의 dNTPs, 0.2 uM each primer, 1 X rTaq buffer (Takara Shuzo, Kyoto, Japan) 그리고, 1.25 units의 rTaq DNA polymerase (Takara Shuzo)를 첨가하였다. PCR은 다음의 반응으로 수

행되었다. 즉, 94C에서 3분동안 초기 denature 시켰고, 총 35 cycle로 95C에서 1분, 52C에서 30초, 그리고 72C에서 3분을 수행하였고, 마지막으로 final extension을 72C에서 12분간 수행하였다. PCR product를 Qiagen 사의 Qiaprep Miniprep Kit을 이용하여 순수분리하고 membrane chip에 printing할 수 있도록 하였다. PCR 반응물은 EtOH를 이용하여 침전시킨 후, 30 ul의 10 X SSC (1 X SSC: 0.15M NaCl과 15mM sodium citrate)에 다시 용해시켰다. PCR 산물은 0.8% agarose gel에서 크기와 integrity를 확인하였다 (Sambrook et al., 1989).

1.1.2.3. 식물조직에서 RNA의 추출

쭈키니 호박 (zucchini squash cv. Black Beauty)의 잎에 각 바이러스원 (ZGMMV, KGMMV, CGMMV와 CFMMV)을 접종하고 14일 후에 식물조직의 RNA와 바이러스 RNA를 동시에 추출하는 방법을 적용하였다. 이외의 다른 바이러스들은 담배 (*Nicotiana tabacum* 혹은 *N. benthamiana*)에 접종한 후 동일한 방법으로 RNA를 추출하였다. 잎 조직에서 total RNA의 추출은 TRIzol (Invitrogen, CA, USA) reagent를 이용하여 분리하였는데, 간단히 요약하면, 바이러스의 감염이 확인된 각 식물 잎조직 1g을 수확하여 액체질소로 마쇄한 다음 10배의 부피인 10mL의 TRIzol reagent를 첨가하여 추출하였다. Chloroform을 이용하여 RNA가 포함된 층을 분획하고 동량의 ethanol로 침전시킨 다음, 20ul의 DEPC-treated water에 녹이고, denature gel에서 RNA의 integrity를 확인하였으며, A260에서 spectrometer를 이용하여 정량하였다.

1.1.2.4. 형광 probe의 준비

분리한 total RNA는 Cy3-dUTP 또는 Cy5-dUTP (NEN)을 첨가하여 역전사 시켰다. 반응은 총 30ul로 하였으며, 10ug의 total RNA, 4 ug의 pd(N)₆ primer, 10 mM DTT, 500 uM 의 dNTP, 200 uM dTT, 100 uM Cy3-dUTP (virus를 감염시킨 샘플의 labeling) 또는 Cy5-dUTP (건전한 식물체의 RNA labeling), 그리고 400 unit의 SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, CA)를 1 X first-strand buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, and 20 mM DTT)를 반응시켰다. 42C에서 2시간동안 반응시킨 후, Cy3- 혹은 Cy5-dUTP로 labeling 시킨 반응물을 한 tube로 합쳤다. 반응물은 15 ul의 0.1 M NaOH와 1.5 ul의 20 mM EDTA를 첨가하고 70C에서 10분동안 남아있는 RNA를 lysis 시켰다. 이후, 15 ul의 1 M Tris-HCl (pH 7.5)로 중화하였다. Unincorporated dyes의 제거를 위하여 각 반응물들은 QIAquick PCR Purification Kit

(Qiagen, Germany)으로 순수분리하였다.

1.1.2.5. cDNA chip의 준비와 microarray hybridization

준비한 PCR 반응물을 manual microarrayer (VP478A, V&P Scientific, San Diego, CA)를 이용하여 microporous polymer-coated glass slide (FAST Slide, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany)에 printing하였다. Hybridization과 데이터의 분석은 FAST Slides (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) protocol (<http://www.s-and-s.com/arrays>)을 기본적으로 참조하였고, 실험과정은 약간 변형하였다. 간단히 요약하면, Manual arrayer의 tip은 384-well microtiter plate로부터 한번에 약 6 nl의 PCR 산물(500 ng/ul)을 load 할 수 있고, 이 tip이 microporous polymer-coated glass slide에 찍힐 경우, slide의 spot은 약 3nl가 된다. 이때 spot의 지름은 약 500um 정도이다. 각 spot의 간격은 약 500um 정도이며 1cm의 간격으로 4반복으로 array 되도록 하였다. Array가 완전히 끝나면, array 되어있는 DNA들을 oven에서 80℃로 30분간 구웠다. 이렇게 만들어진 슬라이드는 사용 전까지 건조한 암소에서 보관하였다. Hybridization 실험시 prehybridization 바로 직전에 array 되어있는 DNA를 denature시키기 위하여 끓는 물에서 2분간 처리하였다. 이렇게 처리한 slide를 hybridization chamber에 넣고, chamber gasket을 끼워 넣었다. Prehybridization solution (0.5 X Denhardt's solution, 0.5 X SSC, 0.1% SDS and 5% formamide)을 slide와 chamber 사이에 위치하도록 pippet으로 넣고 1시간 동안 42℃에서 prehybridization 시켰다. Hybridization은 동일한 용액으로 42℃에서 12시간동안 수행하였다. 반응이 끝난 slide는 2 X SSC, 0.1% SDS에서 15분씩 3번 washing 하였고, 1 X SSC로 5분동안 한번 더 washing 하였다 (Sambrook et al., 1989).

각 spot의 형광광도의 측정은 focus의 높낮이 조절이 가능한 GenePix4000B (Axon Instruments, CA)을 이용하였고, channel은 dual-channel (635nm, 532 nm)을 이용하였다. Image의 분석은 GenePix Pro Ver.3.0.6 software (Axon Instruments)를 이용하였다. 각 spot의 형광광도의 결정은 각각의 흡광과장에서 background의 강도를 빼주었고, 각각의 강도는 median 값으로 결정하였다. 발현수준의 결정과 normalization은 식물자체의 house-keeping gene인 alpha-tubulin 유전자를 기준으로 하였다.

1.2.2.6. Western blot 분석

4가지의 서로 다른 tobamoviruse들의 외피단백질을 12 % SDS-polyacrylamide gel에서 분리

하였고, 이것을 nitrocellulose (NC) membrane으로 transfer electroblot unit (Bio-Rad Laboratories, CA)을 이용한 electro-blotting 방법으로 옮겼다. Membrane은 TBS-T buffer (20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 0.1 % Tween20)를 이용하여 3회 washing하였고 5 % nonfat milk가 포함된 동일한 용액에서 25°C로 4시간동안 washing하였다. 만들어진 membrane에 CGMMV, CFMMV, KGMMV와 ZGMMV 각각에 대한 항체들 (1:1,500 dilutions; immunoglobulin G (IgG) fraction; 1 mg/ml)을 probing 하였다. TBS-T buffer로 membrane을 세 번 수세한 후 alkaline phosphatase (AP)-conjugated secondary antibody (1:7,500 dilution; Promega Corp., Madison, WI)와 반응시켰다. 반응이 끝난 membrane은 TBS-T buffer로 세 번 수세하고 AP-substrate buffer (0.1 M Tris (pH 9.5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂)로 다시 한 번 반응시켰다. 항체 특이적 단백질을 보이 위하여 membrane을 AP-substrate solution (Western Blue Stabilized Substrate Solution; Promega Corp.)와 반응시켰다.

1.1.3. 특이적 발현 유전자 탐색 (Arabidopsis Microarray를 이용)

1.1.3.1 식물재료 및 바이러스의 접종

Arabidopsis ecotype인 Col-0와 C24의 종자를 1% Rox에서 10분간 살균 후, 멸균수로 5회 수세하였다. 1.5ml tube에서 0.1% agar solution에 현탁시킨 후, 4°C에서 5일간 저온 처리하였다. 처리간 끝난 종자를 멸균벤치 하에서 MS medium (1% sucrose)에 1cm 간격으로 파종하였다. 파종 후 5일째에 발아한 식물체들을 미리 준비한 Sunshine Mix No 1. 상토가 채워진 32공 plug tray에 옮겨주었고, 순화를 위하여 투명한 plastic dome을 씌워주었다. 식물의 재배조건은 22-24°C에서 14hr/10hr (낮/밤)의 조건으로 생육실에서 재배하였으며, 최대한 엽면적을 넓히고자 하였다.

바이러스원의 준비는 동결건조시킨 CMV-fny를 *Nicotiana benthamiana*에 접종한 후 약 2주후에 충분한 병징을 나타났을 때 접종원으로 사용하였다.

Arabidopsis의 엽수가 8매 정도되었을 때, CMV-fny를 접종하였는데 접종원 준비는 병징을 보이고 있는 담배의 잎을 수확하여 얼음상에서 유발과 유봉을 이용하여 1/1000 (w/v)이 되도록 0.01M PBS buffer (pH 7.0)로 곱게 마쇄하였다. 접종방법은 멸균한 면봉을 바이러스 접종원에 충분히 적신 후, carborandum을 약간 묻혀 식물체의 잎에 수회 조심스럽게 접종하였다. 접종이 끝난 식물체는 다시 plastic dome을 씌워서

충분한 습도가 유지되도록 하였으며, 식물체의 스트레스를 최소화 하였다. 바이러스 접종시 대조구를 유지하기 위하여 0.01M PBS buffer로만 접종한 mock 처리구를 준비 하였다.

바이러스를 접종한 식물체는 3시간과 24시간째에 수확하였다. 수확시 잘라낸 식물체의 잎을 액체질소로 곧바로 얼렸으며 RNA의 추출 전까지 -80℃로 유지하였다.

1.1.3.2. RNA 준비 및 Cy-dye labeling

Total RNA의 분리는 오이의 경우와 같이 Trizol reagent (Invitrogen)를 이용하였고, mRNA의 순수분리 역시 동일하게 Qiagen사의 oligotex column을 이용하여 poly(A+) RNA를 분리하였다. 분리한 mRNA는 spectrophotometer를 이용하여 정량하였고, MOPS gel을 이용하여 integrity를 확인하였다.

Microarray를 위한 Cy-dye의 labeling은 mRNA에 Cy5-dUTP 및 Cy3-dUTP (NEN)를 이용하여 direct labeling 방법을 적용하였다. 간략히 요약하면 각 2 ug mRNA인 12.9ul (RNA #1)와 12.9ul (RNA #2)를 각각 Oligo dT (2 ug/uL) 2.5ul와 섞어 총부피가 15.4 ul가 되도록 하였다. 이후 각 튜브를 70C에서 10분간 반응시킨 후, 얼음상에서 유지하였다. First single strand cDNA의 합성법과 동일하게 Superscript II buffer, DTT (0.1 M), dNTPs dTTP, Superscript II (200 U/uL)를 이용하고, 여기에 Cy3- 혹은 Cy5 dUTP를 첨가하였다. 이후, 42C에서 2시간 반응후, 얼음상에서 식혔다. 500 uL TE (pH 7.4)를 넣고 unincorporated dye가 제거될 때까지 microcon filter를 이용하여 계속 씻어주었다. 다시 Cy3- 와 Cy5-labeled cDNA들을 섞은 후, 농축하였다. 여기에 1 ul polyA DNA 또는 RNA를 첨가하여 비특이적 혼성화를 방지하고자 하였고, 3 uL 20X SSC를 첨가하여 총 부피가 12-15 ul 가 되도록 하였다.

1.1.3.3. Hybridization, Washing, Scanning

본 연구에서 쓰인 Arabidopsis cDNA chip은 Incyte사의 Arabidopsis cDNA chip으로 총 8160개 (control gene 포함)의 cDNA를 array한 것이었다. Prehybridization buffer (5X SSC, 0.1% SDS, 1% BSA)를 이용하여 42C에서 3시간 hybridization한 후에, slide rack에 끼운 채로 water에 5회 washing, ethanol에서 1회 washing 후, 1,000rpm에서 1분간 원심 분리하여 slide를 말렸다. Hybridization은 Cy-dye의 labeling이 끝난 cDNA를 10X SSC,

0.2% SDS, 50% formamide에 섞은 후, slide에 hydrophobic cover-slip (Sigma)을 이용하여 hybridization 되도록 하였으며, 반응 chamber는 Corning사의 밀폐형 용기를 이용하였다. 반응온도는 42C로 하였으며, water bath에서 14-18시간 수행하였다. Hybridization 된 microarray는 2X SSC, 0.2% SDS에서 15분간, 2X SSC에서 15분, 0.2X SSC에서 10분간 stirrer를 이용하여 washing을 수행하였다. Washing이 끝난 slide glass들은 1,000rpm에서 1분30초간 원심분리하여 물기를 제거하였다. Washing이 끝난 slide glass들은 상온 암소에서 보관하였으며, 분석은 GenePix 4000B (Axon) Scanner를 이용하여, Cy3와 Cy5의 emission signal에 대한 각각의 laser channel을 이용하여 분석하였다 (Shalon et al., 1996).

1.1.4. 오이의 cDNA-chip 제작

1.1.4.1. PCR을 이용한 cDNA의 증폭 및 정제

가. 소규모 실험 (320개 유전자)

최종 오이 cDNA chip의 제작 전에 cDNA chip의 시험을 위하여 사용된 목적 probe의 개수는 시험 목적상 320개로 하였다. 각 cDNA 유전자의 증폭은 ‘청장’ 오이의 잎에 바이러스를 접종한 후, 24시간째에 수확한 오이에서 얻어진 cDNA library인 pTriplEx2 및 SSH 등의 방법으로 특이클론을 확보한 경우 T-A cloning vector인 pGEM-T에 대한 vector들의 universal primer site를 이용하였다.

pTriplEx2의 경우 up-triplEx (5'-CTCGGGAAGCGCGCCATTGTGTTGGT-3')과 down-T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGGC-3')을 이용하였고, pGEM-T는 T7과 SP6 primer를 이용하였다.

96-well plate에 각 bacterial cell을 200ul씩 밤새 키운 다음, cell을 2ul씩 취하여 총 50ul의 PCR을 수행한 후, 2ul를 전기영동하여 증폭산물의 크기와 양을 확인하였다. 확인된 PCR product들은 3M sodium acetate (1/10 volume)와 2.5배 부피의 EtOH로 -20C에서 overnight 침전시키고, 70% EtOH로 2번 washing 하였다. 진공감압 하에서 완전히 건조시킨 DNA를 최종 농도가 50-250ng/ul가 되도록 50% DMSO로 30ul가 되도록 녹여 준비하였다. 준비된 clone들은 다시 384-well plate로 옮겨 aminosilane glass slide에 array

할 수 있도록 준비하였다. Well converter program을 이용하여 384-well plate 및 array 순서를 기록하였다.

나. 1.2K 오이 cDNA chip

소규모의 320개 cDNA 유전자 외에 ZGMMV를 ‘백록다다기’ 오이에 접종한 후 얻어진 cDNA library에서 약 1,200개의 ESTs를 얻었으며, 여기에서 cDNA microarray를 위한 디자인을 끝내고, 1,224개의 유전자를 준비하였다. 소규모 실험에서와 마찬가지로 universal primer를 이용하여 증폭하였는데, 추가적인 ESTs 들은 pBluscript SK-에 inster 들이 존재하기 때문에, 증폭을 위하여 T3 (forward)와 T7 (reverse) promoter sequence를 이용하였다. Spotting을 위한 증폭시 최종 목표농도는 200ng/ul 로 하였고, 총 30ul 이상을 확보하였다. 앞서와 동일한 방법으로 정제한 cDNA들은 Telechem 사의 2X spotting buffer에 용해시켰으며, spotting 전까지 -20℃에서 보관하였다.

다. Slide substrate 및 spotting

Slide substrate는 각 실험 공히 Telechem사의 Superamine substrate를 이용하였다. 준비한 PCR 반응물들은 384 well plate platform으로 준비한 후, 영국 BioRobotics사의 MicroGrid II를 이용하여 array 하였다. Array는 4-pin type 방식을 이용하였고, Clonetracker를 이용하여 각 유전자의 순서를 명확히 하였다. Array가 끝난 slide들은 최소 24시간이상 건조시킨 후 사용하였다.

Clone spot의 integrity는 현미경을 사용하여 array가 끝난 spot을 관찰하거나, Scanner로 직접 slide를 읽고 532nm에서의 이미지를 확인하여 정상적인 슬라이드만을 선택하여 사용하였다.

1.1.5. 오이 cDNA-chip을 이용한 유전자발현 탐색

1.1.5.1. 식물재료 및 바이러스원

가. 소규모 실험 (320개 유전자)

Blast search를 끝낸 clone들에 대한 오이 cDNA chip을 시험제작 후, 바이러스 접종 식물체와 mock 접종 (buffer로만 접종) 식물체의 유전자 발현양상을 비교하여 보았다. 식물재료는 ‘백록다다기’ 오이 (Syngenta)를 사용하였으며, 바이러스원은 ZGMMV, CGMMV와 CFMMV로 하였다. 과종 후 7일째의 오이 자엽에 상기의 3가지 바이러스를 각각 30개체씩 접종하였으며, 접종 후 3시간과 24시간째에 접종한 자엽을 수확하였다. 수확한 접종엽은 앞서와 같은 방법으로 저장하였고, total RNA를 추출하였다.

나. 1.2K 오이 cDNA chip

박과바이러스의 오이 유전자와의 상호작용을 탐색하기 위하여 ‘백록다다기’ 오이를 대상으로 ZGMMV와 CMV-fny를 mock control을 포함하여 총 256개체 접종하였으며 각기 6, 12, 24, 48, 72시간째에 접종엽을 수확하고 total RNA를 준비하였다.

접종의 성공여부를 확인하기 위하여 각 바이러스 접종식물체 3개체씩은 수확하지 않고 본엽 2매기 이후의 병징 유무를 파악하였다.

1.1.5.2. RNA 준비 및 Hybridization

가. Total RNA 준비 및 indirect hybridization

Total RNA의 준비는 앞서의 방법과 동일한데, 오이의 cDNA-chip 실험은 direct labeling 방식을 지양하고 (Cy5와 Cy3의 형광강도가 direct labeling시 직선적 상관관계를 보이지 않음), Genisphere사의 indirect labeling 방식인 Array900 system을 이용하였다. 이 방식은 고순도 소량의 total RNA 10ug을 직접 reverse transcription(RT)하게 되는데, 이때 약 600여개의 Cy5 혹은 Cy3 dye가 붙어있는 dendrimer가 붙을 수 있는 2가지의 oligo(dT)-adaptor sequence를 사용하게 된다. 따라서, RT 반응이 이루어진 산물을 먼저 hybridization (14시간) 시키고, 2차 hybridization (3-4시간) 시에는 dye dendrimer로 특이적인 hybridization이 이루어지도록 하는 방법이다. 이러한 indirect labeling 방식은 소량의 RNA만으로도 scanner가 인식할 수 있는 충분한 형광강도를 얻게 할 수 있으며, 동시에 Cy5와 Cy3의 비직선적 형광강도 측정방식의 단점을 극복할 수 있는 새로운 microarray 측정기법이라고 할 수 있다. Hybridization은 기존의 방식이 cover slip을 덮고, chamber에 넣어서 hybridization 시키는 방식이었으나, 이 방법은 전체 슬라이드가

균일하게 hybridization이 이루어지지 않는 단점을 보여 마치 Northern blot 후 roller bottle에서 유동적으로 hybridization 시키는 것처럼 air-blow를 이용하여 solution을 계속 움직이게 하는 Maui system (BioMicro Systems)을 이용하였다.

나. Washing, Scanning, 및 Data 분석

Hybridization이 끝난 slide들은 55°C의 2X SSC, 0.2% SDS용액에서 15분, 1X SSC, 0.1% SDS용액에서 15분, 0.1X SSC 용액에서 15분의 순으로 washing 하였고, 슬라이드 원심분리기에서 건조시켰다. 건조가 끝난 슬라이드들은 scanning 전까지 건랭 암소에서 보관하였다.

Scanning은 GenePix Pro ver4.1 (Axon Instrument) 프로그램을 이용하여 Cy5 (635nm)와 Cy3(532nm)의 흡광과장으로 수행하였다. 프로그램의 분석은 먼저 유전자에 대한 ID와 Name을 포함하는 유전자의 위치를 기록한 *.gal 파일을 작성하고 spot의 위치와 일치시킨 후, 최적의 형광강도로 결과를 얻었다. 얻어진 결과를 토대로 global normalization을 수행하였으며, 이에 대한 scatter plot, image map 및 interesting feature를 출력하였다. 결과파일은 *.gpr로 나타나게 되며 각 결과를 Acuity (ver. 4.0) 프로그램에서 읽어들이어 clustering 및 통계분석을 수행하였다. Acuity 프로그램에서는 최근의 신뢰할만한 normalization 기법인 Lowiess normalization 방법을 지원하고 있으며, 여러 가지 clustering 방법을 지원한다. Clustering은 hierachical, K-means, K-medians, 2-D self organizing map (SOM), geneshaving clustering 방법을 사용할 수 있으며, Pearson centered 및 Euclidean Squared 방식의 통계기법을 적용할 수 있다. 본 과제에서는 각각의 통계적 분류기법을 이용하여 바이러스 접종후 경과시간별 유전자의 발현변화와 분류를 수행하였다.

1.1.6. 오이 ESTs와 microarray의 DB구축

1.1.6.1. 오이 ESTs의 분석 및 microarray 결과

오이의 cDNA library에 기초한 ESTs의 Blast search는 GenBank의 BlastX 2.0 및 EMBL의 WU-BlastX를 이용하여 기존의 database와 비교한 결과를 수록하였다. 각각의

sequence search는 sequencing 결과를 trimming한 내용으로 search하였고, 결과는 search 시 E-score에 따른 결과와 가장 높은 score를 보인 BlastX 결과를 나누어 수록하였으며 gene annotation은 BlastX 결과에 따라 정리하였다. 모든 결과는 Web-DB에서 공유하기 위하여 각기 저장하였다.

DNA-chip을 위하여 BioDiscovery사의 CloneTracker를 갖추었다. 이것은 array를 design 하는 능력뿐 만아니라 DNA sample 추적을 위한 database를 갖고 있다. 이를 이용하여 DNA-chip을 design하고 제작한 chip위에 spotting된 DNA sample들의 database를 구축할 것이다.

이 외에도 DNA-chip 실험 결과 분석 및 통계 처리를 위하여 GenePix Pro (ver. 4.1) 및 Acuity (ver. 4.0)를 확보하였는데 이 프로그램들을 이용하여 오이 cDNA chip을 이용한 expression analysis, data mining, 통계분석, 및 cluster 분석을 할 수 있다.

Cluster 분석은 K-means, hierarchical, 2-D self-organizing map 등의 적용이 가능하다.

Microarray의 결과는 분석결과의 excel file (raw data), image map (각 유전자와 link), interesting features (Cy5 및 Cy3 별로 발현비율이 높은 순으로 각각의 spot 이미지와 함께 정리), virtual image (가상이미지로 전체의 모습을 단순화함)로 정리하였고, 또한 일련의 time-course 실험들은 Acuity를 이용한 clustering 결과를 image file (jpeg)로 DB에서 이용할 수 있도록 하였다.

1.1.6.2. Web-DB의 구축

오이 유전자의 기능을 손쉽게 파악할 수 있으며, 타 연구자 및 연구기관과의 공유를 위하여 www.cgrc.wo.to 의 주소로 Web-DB를 구축하고자 하였다.

DB구축을 위한 각각의 data 형태는 ESTs data와 microarray data를 excel의 형태 그대로 DB에 upload 할 수 있도록 하여 지속적인 data의 upgrade를 손쉽게 하였고, microarray의 결과와 ESTs DB를 유기적으로 연결하여 연구자의 실험내용 파악이 손쉽게 설게하고자 하였다. Microarray 결과는 실제 image외에도 가상이미지를 실험별로 한 화면에서 비교할 수 있도록 하여, 실험자 외의 연구자들이 한 유전자에 대한 발현 정보를 손쉽게 파악할 수 있도록 설게하였다. 이를 위한 server는 windows 2003 (standard edition)을 운영체제로 사용하며, server의 환경은 JSP/Servlet Container(HTTP Server)을 지원하는 Apache Tomcat/5.0.27으로 설정하였다. Database Server는 Oracle 10g이며, 언어는 Java2 (SDK 1.4.2 Version)로 개발하였다.

(위탁과제) 식물체 DNA-Chip 개발 및 상용화

1.1.7. 재료 및 연구방법

1.1.7.1. 고밀도, 자동화 DNA-chip의 제반 기술 확립

오이 cDNA-chip과 바이러스 진단용 DNA-chip을 제작하기 위하여 영국 BioRobotics사의 MicroGrid II를 도입하였다. 이 기기는 pin-type 방식으로 glass slide나 membrane slide를 사용할 수 있다. 본 연구에서는 glass slide를 주로 사용하였고 위 기기로 한 번에 100장의 DNA-chip을 제작할 수 있고 한 slide위에 30,000개 이상의 DNA sample을 spotting할 수 있다. DNA spotting 속도는 1초에 64개의 spot을 찍을 수 있다. DNA sample source는 96, 384, 또는 1536 well plate에 넣어 사용하고 한 번에 24개의 source plate를 이 기기에 넣을 수 있고 bar code를 붙여 plate를 확인할 수 있다.

Source plate내 DNA sample의 건조를 막기 위하여 plate를 cooling하고 뚜껑을 필요시만 자동적으로 개폐하게 되어 있고 기기 전체가 box안에 들어 있어 먼지 등 이물질을 막아주고 spotting area의 주위 환경을 조절할 수 있다. MicroGrid II는 solid pin과 split pin을 사용할 수 있는데 100 micron 크기의 작은 spot을 찍을 수 있다. 본 연구에서는 이 기기를 사용하여 DNA spotting을 할 때의 여러 parameter들, 즉 pin 높이, slide 위치, pre-spotting 횟수 등을 결정하였다.

DNA-chip 실험 후 결과 분석을 하기 위하여 slide 위의 형광을 탐지하여야 하는 데 이를 위하여 Packard사의 ScanArray 5000을 사용하였다. 이 기기는 confocal laser 방식의 scanner로서 spot 주위로부터 오는 빛을 차단하므로 background를 줄일 수 있는 장점이 있다. 이 기기는 0.1 fluors/mm²의 sensitivity와 5mm의 resolution을 갖고 있고, 4개 laser를 사용하므로 4개의 서로 다른 형광 물질을 이용한 실험을 할 수 있다. 실험 후의 image는 ScanArray의 QuantArray나 BioDiscovery사의 Imagene이라는 software를 사용하여 spot의 형광 세기 측정, cy3와 cy5의 ratio, normalization 등을 수행하고 그 결과는 scatter plot, histogram, pie diagram 등으로 표시한다.

MicroGrid II를 사용한 DNA spotting 방법을 확립한 다음에 어떤 종류의 glass slide를 사용할 지를 정하기 위하여 amine 또는 aldehyde로 코팅된 slide에 다양한 buffer에 녹인 DNA를 spotting한 후 slide에 binding된 DNA 비율을 측정하여 binding efficiency를 계산하였다.

1.1.7.2 바이러스 진단용 DNA-chip 제작

가. 오이 바이러스 진단 oligo-chip 제작

위에서 제작한 probe를 이용해 oligonucleotide DNA chip을 제작하였고 array 내에서 spot 사이의 재현성을 보기 위해 probe를 각각 duplicate로 찍었다. Probe는 50 μ M의 농도로 50% DMSO에 녹인 후 MicroGrid II(MicroGrid TAS, BioRobotics, UK)를 이용하여 2nl 정도로 Aldehyde slide(CEL Associates, USA.)에 spotting 후 고정시켰다. 고정된 slide를 0.2% SDS로 5분간 2회 세척, 증류수로 2회 세척하고 95 $^{\circ}$ C 증류수에 2분간 담근 후, blocking solution(1.0g NaBH₄, 300ml PBS, 100ml ethanol)으로 20분간 blocking시킨다. Blocking한 후 0.2% SDS로 5분간 2회 세척, 증류수로 2회 세척하고 95 $^{\circ}$ C 증류수에 5초간 담근 후, 상온에서 건조시켜 사용 전까지 먼지가 없는 chamber에서 보관하였다.

나. RT-PCR반응

바이러스에 감염된 오이 잎에서 추출한 viral RNA(제2 세부과제 수행기관에서 제공 받음)를 사용하여 RT 반응 후 만들어진 cDNA로 PCR을 수행하였다. RT 반응시 각 Tobamovirus 종에 specific한 PCR reverse primer와 adaptor tail을 RT primer로 사용하여 multiplex로 수행하였다. 20ul reaction mixture에 RT multiplex primer set 농도는 CGMMV-R, CFMMV-R, adaptor tail은 1uM/each, ZG/KGMMV-R은 2uM로 하였다. 실험에 사용한 각 component는 viral RNA sample 2ug, control RNA 400ng을 사용하였고, dNTP mix는 1.25mM/each, RNase Inhibitor 1U, MMLV-RTase 5U, 1X RT buffer를 사용하여 38 $^{\circ}$ C에서 2시간, 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응 후 ice에서 cooling 시킨다. 그 다음 1N NaOH 7ul를 첨가하여 70 $^{\circ}$ C에서 10분 반응하여 hydrolysis시킨 후, 1M Tris-HCl(pH 8.0) 10ul으로 neutralization 시킨다. RT 반응이 끝난 후 만들어진 오이 바이러스 cDNA는 probe의 signal을 detection 할 수 있게 형광으로 labeling된 dCTP (Cy5-dCTP)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응 조성은 50ul reaction mixture에 cDNA template 5ul, 1X PCR buffer, dATP와 dCPT가 각각 100uM, dCTP 10uM, dTTP 16uM, dUTP 4uM, Cy5-dCTP 2uM, Taq polymerase 0.05U, primer mix(multiplex primer ; CGMMV-F, CGMMV-R, CFMMV-F, CGMMV-R, ZG/KGMMV-F, ZG/KGMMV-R, Poty-F, Poty-R,

spike 400-F, s400-R, 각각 0.4uM)이고, 반응은 95℃에서 5분한 다음, 95℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 1분을 30 cycle한 다음, 72℃에서 10분간 incubation하였다.

다. Target DNA 준비 및 hybridization과 washing

Labeled된 PCR product는 double strand로 되어있고 길이도 약 1kb 정도가 되기 때문에 oligonucleotide chip의 probe와 hybridization 하는데 영향을 미친다. 그래서 probe와의 반응성을 좋게 하기 위해 labeled된 PCR product에 λ exonuclease를 처리하여 phosphate가 붙어있는 strand를 제거하고, Uracil DNA Glycosylase (UNG)를 처리하여 dUTP가 incorporate된 부분을 잘라 target 길이를 짧게 만들었다. 반응 조건은 labeled된 PCR product 43ul에 λ exonuclease (10U/ul) 1ul, 10X λ exonuclease buffer 5ul를 첨가한 후 37℃에서 30분, 75℃에서 15분 incubation하여 single strand DNA로 만든 다음, Uracil DNA Glycosylase (UNG, 1U/ul) 1ul를 넣고 37℃에서 60분, 95℃에서 10분간 incubation하여 single DNA를 절단하였다.

DNA chip위의 oligonucleotide probe와 target DNA를 hybridization시키기 위하여 oligonucleotide가 있는 부위에 Coverwell perfusion chamber(SIGMA)를 덮고 여기에 fragmentation된 labeled된 PCR product(target DNA) 40ul와 2X hybridization buffer(50% formamide, 10X SSC, 0.45% SDS, 180uM dNTP mix) 40ul를 넣어 총 80ul volume으로 41℃에서 30분간 반응 하였다. 반응 후 Coverwell perfusion chamber(SIGMA)를 제거하고 2X SSC, 0.2% SDS에서 5분간 4회, 0.2X SSC에서 5분간 2회, 0.1X SSC에서 5분간 1회 washing 후 slide를 centrifugation하여 말렸다. Washing 및 dry는 실온에서 수행하였다.

라. Microarray scanning 및 analysis

DNA microarray 실험 후 결과를 분석하기 위해 confocal laser 방식의 scanner인 ScanArray 5000 (Packard BioScience, USA)을 이용하여 image를 얻었다. Spot signal은 Cy5 형광을 나타내므로 670nm의 파장에서 scan하였다.

1.2. 연구내용 및 결과

1.2.1. 오이 ESTs의 구축

오이 ESTs의 구축은 long-distance PCR 방법을 기초로 한 cDNA library과 기존의 lambda ZAPII를 이용한 cDNA library를 이용하였다. 염기서열의 결정은 좀더 많은 cDNA의 정보를 담는 것으로 보고되는 5' 쪽의 forward primer를 이용하여 단방향으로 신뢰성 있는 최대 800bp까지의 염기서열을 얻고자 하였다.

본 과제에서 cDNA library는 다음의 주의사항을 적극적으로 고려하여 제작하였다.

가. 클로닝되는 유전자들은 동일한 빈도를 갖는 초기 poly(A)+ RNA 집단을 대표하도록 한다.

나. 각 cDNA의 방향성이 유지되도록 unidirectional cloning이 되도록 한다.

다. cDNA insert들은 최대한 길게 cloning되도록 하여서 full length를 얻을 수 있도록 한다.

라. genimic, mitochondrial, 혹은 ribosomal RNA insert가 최대한 적게 포함되도록 한다.

마. 삽입되는 cDNA insert 들이 최대한 짧은 poly(A)+ tail을 갖도록 한다.

1.2.1.1. PCR을 기초로한 cDNA library 및 ESTs 제작

본 연구는 우선 박과식물 감염성 바이러스의 오이 감염시, 식물체에서 발현하는 전사물(transcript)의 동정(identification)과 변화를 살펴보고자 '청장' 오이 잎의 cDNA library를 제작하였다.

접종 후, 수확시기는 30분, 3, 6, 12, 18, 24, 48, 72시간으로 하였고, 12시간까지는 초기반응(early response), 그리고, 48시간이후는 late response로 분류하여 바이러스 감염에 따른 식물체의 반응을 구분하여 분석하고자 하였다. 또한, 각 수확시기에 대한 대조구로서 mock inoculation (buffer로만 접종) 처리구를 두어 wounding에 의한 식물반응을 구분하고자 하였다.

분리한 total RNA는 25S (3.7kb), 23S (2.9kb), 18S (1.9kb), 16S (1.5kb) ribosomal RNA가 선명하게 구분되어 RNA의 integrity가 유지되고 있음을 알 수 있었다 (Fig 1.1).

24시간째 발현한 mRNA를 이용하여 1st strand cDNA를 합성하고, Chroma Spin 30

column (BD science)을 이용하여 size fractionation 한 후 (Fig 1.2), 500kb 이상의 fraction을 모아 double strand의 cDNA를 합성한 결과는 Fig 1.3과 같다.

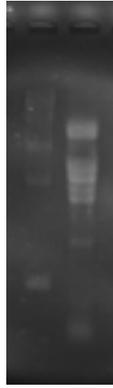


Fig. 1.1. Total RNA Isolation Result



Fig. 1.2. Size distribution of 1st strand cDNA



Fig. 1.3. dsDNA synthesis result

각각의 ds cDNA는 adapter sequence를 포함한 primer로 증폭시켜 합성하였으며, 이를 phagemid인 TriplEx2로 ligation 시킨 후, phage extract를 이용하여 packaging하였다. Semi-solid agar에서 plaque를 형성시켜 titer를 추정한 결과 약 2.5×10^6 pfu/ml이었으며, amplification용 primer site를 이용하여 PCR한 결과, insert가 없는 null clone은 약 1% 정도로 매우 높은 ligation 효율을 보였다.

이것을 다시 amplification 시켜서 최종적으로 약 4.1×10^9 pfu/ml의 cDNA library를 확보하였으며, mass excision protocol을 따라 E. coli BD cell로 auto conversion 시켰다.

Coverion 시킨 cell을 carbenicilin 50ug/ml이 첨가된 LB 배지에서 single colony를 형성시키고, 각각의 plate에서 picking하여 150ul의 액체 LB plate (96 well plate)에서 18시간 키운 후, 이중 2ul를 20ul volume의 PCR로 insert의 유무와 크기를 확인하였다.

임의로 증폭한 30개의 clone에 대한 insert 확인 결과, 1 colony는 insert가 없었으며, 28개가 500bp이상으로 나타났으며, 이 중 4개는 1.5kb이상의 증폭결과를 나타내었다.

확보된 cDNA library를 이용하여 ESTs를 준비하였다. pTriplEx2 vector가 transformation된 E. coli를 5mL LB broth에서 14시간 키운 후, Qiaspin prep kit를 이용하여 최종적으로 40ul에 elution 하였으며, ul당 500ng 이상이 되도록 준비한 후, 이를 sequencing 하였다. Plasmid의 sequencing은 BigDye Terminator (AB)를 이용하여 반응시키고, ABI 377 automatic sequencer를 이용하여, ESTs 확보를 위하여 5' 방향으로 단방

향 sequencing을 수행하였다.

염기서열 결정이 끝난 clone들은 linker sequence를 제외하고, FASTA text file로 저장하여 NCBI (www.ncbi.nih.gov/Blast/) 및 EBI (www.ebi.org/blast)에서 BLASTN과 WU-BlastX로 search를 수행하였다. BlastX html의 결과는 DB의 기본 자료로 저장하였고, E-value < 10^{-5} 의 결과를 유의성이 있다고 판단하였다. 평균적인 read length는 약 521bp이었다.

ESTs의 functional assignment는 BlastX algorithm을 이용한 GenBank의 non-redundant protein database와 비교한 결과를 바탕으로 하였고, MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences, <http://mips.gsf.de>) role categorization을 참조하여 직접 annotation하고 분류 정리하였다.

현재까지 염기서열을 읽은 clone은 약 600여개이며, 이 중 약 400여개의 ESTs를 정리하였고, 완전히 일치하는 유전자를 제외한 약 300여개의 cDNA들을 보관하였다. 확보된 cDNA들은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 GenBank dbEST에 등록 중이다. 이 과정에서 확보한 ESTs 중 오이가 바이러스에 감염되었을 때 특이적 발현양상을 보이는 유전자를 스크린하기 위하여 cDNA microarray용 클론으로 이용하였다. 또한, 궁극적으로 오이 cDNA-chip의 제작을 위하여 새로운 cDNA library를 만들고 좀 더 다양한 population과 많은 종류의 ESTs를 얻기 위하여 바이러스 접종 후 경과시간별 RNA를 pooling하여 약 1,200개 이상의 ESTs를 얻고자 하였다.

1.2.1.2. λ -ZAPII를 이용한 cDNA library 및 ESTs 제작

앞 항목의 cDNA library는 사용하는 vector와 cell이 불완전하여, 실제로 삽입 유전자의 증폭 및 cell line의 유지가 매우 어려운 단점을 갖고 있었고, 또한 ZGMMV의 감염 후 진행 시간별로 수확하여 만든 것이 아니기 때문에 본 연구목적상 좀더 population을 확대할 필요성이 있었다. 또한, 바이러스가 접종된 식물조직이 아니라, 인접한 식물조직에서 유도되는 식물 RNA를 얻고자 다른 종류의 cDNA library를 제작하였다.

λ -ZAPII (vector name: Uni-ZAP XR, Stratagene)를 이용한 cDNA library의 제작은 ‘백다다기’ 오이(Syngenta)의 자엽에 바이러스 접종직전에 네임펜을 이용하여 1/3을 표시하고 여기에 바이러스를 접종한 후, 경과 시간별로 접종하지 않은 나머지 부위를 수확하였다.

이에 따라, 접종후 식물 자엽을 수확할 때 혼입될 수 있는 바이러스 RNA 및 접종액의 오염을 최대한 줄일 수 있었으며, 바이러스의 감염에 따른 식물 신호전달 관련 유전자 및 바이러스와의 상호작용에 관련한 유전자를 좀더 효율적으로 찾아낼 수 있을 것으로 기대하였다.

만들어진 cDNA library는 primary λ phage library가 λ -ZAP 수율이 3.2×10^7 pfu (500ul SM buffer)이었고, amplified phage library의 경우 complexity를 6.4×10^6 ZAP pfu (100ul의 primary library)로 사용하여 lambda ZAP 수율을 6.5×10^9 pfu로 얻을 수 있었다. 또한, non-recombinant (dark blue)는 0.1% 정도로 나타났다.

Mass excision을 거친 phagemid 수율은 4.2×10^6 cfu/ml 이었고, 총 40ml에 존재하는 phagemid의 수율은 3.12×10^8 pfu 이었다. 결과적으로 amplification은 plaque 당 1.08×10^2 pfu 로 나타났다. Non-recombinant (dark blue)는 1% 미만이었으며, T3와 T7 primer를 이용한 PCR 결과 20개의 클론에서 대부분 500bp 이상의 insert를 확인할 수 있었다.

1.2.1.3. cDNA library Sequencing을 통한 ESTs의 결정 및 분류

다음은 redundant한 clone을 제외하고, WU-BlastX 및 GenBank의 BlastX를 통하여 function의 annotation과 이에 대한 분류 및 설명내용을 요약한 것이다.

현재 진행중인 오이 cDNA sequencing을 통하여 바이러스 접종 후 오이 자엽 및 잎에서 유도되는 다양한 ESTs를 얻을 수 있었는데, 본 연구에서는 얻어진 유전자의 기능별 분류를 수행하였고, 또한 이들 유전자에 대한 식물체내 역할에 대한 고찰을 수행하였다. 기능분류는 바이러스와 병원체 감염에 관련된 부분에 중점을 두어 1)virus infection related, 2)stress related, 3)cellular communication related, 4)structural and basic cellular function related, 5) unclassified 등으로 요약 분류하였다.

식물체 내에서의 기능분류에 포함되는 특정 관심있는 유전자에 대한 현재까지의 연구결과를 대략적으로 요약하여, 후속 연구자들의 손쉬운 이용이 가능하도록 하였으며, 바이러스에 의하여 유도되는 유전자의 전체적인 윤곽을 잡고자 하였다.

이들 유전자에 대한 자세한 ESTs sequence 및 BlastX 결과는 본 과제에서 자체 제작한 오이 유전자 DB에 수록하였고, 그 내용을 www.cgrc.wo.to 에서 확인할 수 있다.

본 연구의 결과로 바이러스 감염과 직접적으로 관련이 있는 것으로 보고된 38개의 유전자가 발견되었다 (Table 1.1).

본 연구의 결과로 바이러스 감염과 직접적으로 관련이 있는 것으로 보고된 38개의 유전자가 발견되었다.

Uracil phosphoribosyltransferase (UMP pyrophosphorylase, UPRase)는 E-value가 매우 낮은 결과이나, 인체에 있어서는 바이러스 감염시 보호기작으로 많이 발현되는 유전자로 gene therapy에 많이 응용이 되고 있으나(Katahira와 Ashihara, 2002; Porosnicu 등, 2003; Sunamura 등, 2002), 식물체에 있어서는 많은 연구가 이루어져 있지 않다.

RNA helicase는 RNA virus에 있어서 매우 중요한 역할을 한다. Turnip yellow mosaic virus(TyMV)에 있어서는 식물체에 바이러스가 감염되었을 때 복제 단백질의 도메인에 있는 proteinase와 polymerase의 상호작용을 RNA helicase complex가 조절하기도 하며 (Jakubiec 등, 2004), 옥수수에서 분리된 DEAD box RNA helicase protein은 식물체에 있는 glycine-rich RNA-binding protein MA16과 상호작용을 하기도 한다(Gendra 등, 2004). 또한, 단백질의 번역과 세포 증식에 관여하는 것으로 알려져 있다(Hutchins 등, 2004).

식물의 virus 혹은 viroid는 double-stranded RNA-stimulated protein kinase(PKR)의 활성화와 밀접한 관계가 있는 식물에 있는 단백질들(pPKR)의 인산화(phosphorylation)를 자극한다. Langland 등(1995)은 다양한 생화학적 그리고 면역학적 방법을 사용하여 이 식물 단백질이 포유동물의 PKR과 비슷하다는 것을 설명하였다. pPKR은 세포질과 리보솜 모두에 연관이 있으며, 포유동물의 PKR과 유사하고, exogenous histones의 phosphorylation 능력을 가지고 있었다(Langland 등, 1995).

Glycine cleavage system protein은 동물에서와 마찬가지로 virus-plant interaction에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Stenbak 등, 2004). 또한 ABC-ATPase 구조모델의 가장 중요한 요소는 두 개의 ABC-domain의 상호작용인데, 이 두 도메인은 glycine cleavage system protein의 균형에 따라 조절되기도 한다(Szentpetery 등, 2004).

Macrophage migration inhibitory factor family protein(MIF family)은 인체에 있어서 바이러스 침입시 트롬빈이나 PAR-1과 PAR-2를 통한 FXa protein과 함께 상처 치료과정에서 염증을 발생시켜 macrophage의 이동을 막아주는 유전자로서(Shimizu 등, 2004), 결핵 환자에게서도 부신피질호르몬에서 발견된 바 있다(Foote 등, 2004). 또한, MIF 유전자 그룹은 인간의 피부 섬유내에서 ultraviolet A에 의해 유기되는 생성물인 metalloproteinase-1에 의해서도 생성되기도 한다(Watanabe 등, 2004).

Thioredoxin F-type(TRX-F)은 CMV와 상호작용하는 단백질로서, dithiol에서 disulfide

Table 1.1. Putative function related virus infection of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber.

Query_ Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
M01A01	Uracil phosphoribosyltransferase (UMP pyrophosphorylase)	93	0.011	<i>Nicotiana tabacum</i>
M01A04	putative RNA helicase	194	3.00E-14	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M01A11	glycine cleavage system protein H precursor (clone HFC1)	660	5.00E-68	<i>Flaveria cronquistii</i>
M01B03	macrophage migration inhibitory factor family protein / MIF family	525	2.00E-52	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M0C01	Thioredoxin F-type, chloroplast precursor (TRX-F)	516	3.00E-51	<i>Pisum sativum</i>
M01F08	26 kDa phloem protein	732	2.00E-76	<i>Cucumis sativus</i>
M01H01	apaG protein, putative	279	1.00E-23	<i>Brucella suis</i>
M02A09	putative potyviral helper component protease-interacting protein 2	178	4.00E-19	<i>Oryza sativa</i>
M02A11	OTU-like cysteine protease family protein	645	3.00E-66	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M02C06	aminotransferase 2	1144	1.00E-124	<i>Cucumis melo</i>
M02E12	U-box domain-containing protein	229	2.00E-18	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M02G08	ATP-dependent RNA helicase, putative	885	4.00E-94	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M02G10	annexin-like protein	722	5.00E-75	<i>Medicago sativa</i>
M02H08	DEAD box RNA helicase (DRH1)	80	0.007	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03E03	RNA recognition motif (RRM)-containing protein	361	3.00E-33	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03H09	pectinacetyltransferase, putative	864	1.00E-91	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M06C11	poly(A)-binding protein	1113	1.00E-120	<i>Cucumis sativus</i>
M06D08	putative major latex protein	444	6.00E-43	<i>Momordica charantia</i>
M06F03	homeodomain protein Hfi22	213	4.00E-24	<i>Nicotiana tabacum</i>
M07C03	polygalacturonase	478	1.00E-46	<i>Pisum sativum</i>
M07C10	pectinesterase family protein	435	3.00E-42	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M07H12	restriction alleviation	339	1.00E-30	<i>Bacteriophage lambda</i>
M09A05	latex-abundant family protein (AMC1) / caspase family protein	514	6.00E-51	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M09C08	subtilase family protein	932	2.00E-99	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M09H07	oxygen-evolving enhancer protein, chloroplast, putative / 33 kDa	211	2.00E-16	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M10D04	26S protease regulatory subunit 6B homolog	365	7.00E-34	<i>Solanum tuberosum</i>
M11A12	Bet v I allergen family protein	249	2.00E-20	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M11C06	ATP-dependent protease La (LON) domain-containing protein	873	2.00E-92	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M11C08	ss-galactosidase	438	1.00E-42	<i>Lycopersicon esculentum</i>
M12G05	cathepsin B-like cysteine protease, putative	913	3.00E-97	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M13B07	arabinogalactan-protein (AGP14)	132	6.00E-07	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M13F02	pathogen-responsive alpha-dioxygenase, putative	576	5.00E-58	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M13F08	DNAJ heat shock protein, putative	974	1.00E-104	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M13F12	squalene synthase	744	2.00E-77	<i>Solanum tuberosum</i>
M13G05	peptidoglycan-binding domain-containing protein	317	1.00E-28	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M13G07	seven transmembrane MLO family protein / MLO-like protein 1	812	2.00E-85	<i>Arabidopsis thaliana</i>
2H11	ATP-dependent protease proteolytic subunit ClpP-like protein	550	1.2e-52	<i>Arabidopsis</i>
5B3	10 kDa chaperonin (Protein CPN10) (Protein groES)	224	1.3e-16	<i>Brassica napus</i>
8B3	Hypothetical protein (Geminivirus replication protein-interacting)	123	1.1e-05	<i>Arabidopsis</i>
15G4	26 kDa phloem protein.	292	1.6e-24	<i>Cucumis sativus</i>

로 만들어지는 active center에서 가역적인 산화를 통하여 다양한 redox 작용에 관여하고 있으며, F form은 광합성적 탄소 사이클에서 많은 효소들을 활성화시키는 것으로 알려져 있다(Lepiniec 등, 1992).

또한, 오이에서 분리된 26 kDa phloem protein(phloem protein PP2)은 RNA binding protein으로서 바이러스의 이동에 관여하리라 추정된다(Gomez와 Pallas, Genbank assession No. AF527536). 또한, Bet v I allergen family protein은 오이에서 발견된 pathogenesis-related protein이다(Suyama 등, 1999).

Poly(A)-binding protein 은 Wang 등(2000)에 의해 zucchini yellow mosaic potyvirus에서 발견된 유전자로 RNA-dependent RNA polymerase와 host poly-(A) binding protein과의 관계규명에서 밝혀졌다. Homeodomain protein Hfi22 은 바이러스의 movement protein과 상호작용을 하는 단백질이다(Desvoyes 등, 2002)

SET domain에 의한 histone의 site-specific lysine methylation은 진핵생물의 유전자 전사 조절에 중요한 역할을 한다. Manzur 등(2003)은 *Paramecium bursaria* chlorella virus의 gene silencing을 통하여 SET domain이 histone H3안에 있는 Lys2 유전자를 di-methylate 할 수 있다고 보고하였다.

병에 관련되는 유전자로 추정되는 apaG protein은 동식물의 병원균과 공생체사이에 발견된다(Paulsen 등, 2002). 병 저항성 관련 유전자에 포함되는 aminotransferase 2는 식물체에서 병에 저항하여 광호흡적 효소들을 encoding하는 eR gene이며(Taler 등, 2004)., *Petroselinum crispum*에서 발견된 U-box domain-containing protein은 곰팡이 발생 초기에 유도되는 CMPG1 유전자와 유사하다(Genbank assession No. NM_129152).

ATP-dependent RNA helicase는 DEAD box family에 속하는 대표적인 효소로서, Linder 등(1989)에 의해 처음 보고된 이후로 *Escherichia coli*에서 인간에 이르기까지 다양하게 분포되어 있다고 보고된 유전자이다. 대부분의 DEAD box family 는 putative ATP-dependent RNA helicase의 활성이나 RNA의 이차적 혹은 3차적 구조의 변경으로 조절이 된다. DEAD box family는 translation initiation, RNA splicing, ribosome biogenesis, 그리고 RNA decay와 같은 생물학적 기능을 가지고 있다(de la Cruz 등, 1999). 식물에서는 담배, *Arabidopsis*, 밀, 그리고 쌀 등에서 보고된 바 있으며, 또 다른 DEAD box 유전자인 RNA helicase의 활성이 담배에서 보고된 바 있다(Nakamura 등, 2004). 염에 반응하여 나타나는 유전자인 HVD1 (*Hordeum vulgare* DEAD box protein) 역시 DEAD box protein으로서 염, 수분, 저온, 그리고 abscisic acid (ABA) 처리 등의 스트레스에 발현된다. 4백만명의 미국인이 감염되어 있다고 알려져 있는 hepatitis C virus (HCV)는 간에 치명적인 병을 유발하는 바이러스이다. Mamiya와 Worman

(1999)는 인간 간세포의 cDNA library에 HCV core protein을 반응시켜 DEAD box protein DBX를 분리하였는데, DBX의 단백질 서열이 쥐의 PL10 즉, ATP-dependent RNA helicase와 매우 유사한 것으로 동정하였다. 포유동물의 세포에서 HCV core protein과 DBX는 서로 결합하여 endoplasmic reticulum에 위치하게 되며, 그 결과로 HCV core protein이 기주세포의 mRNA translation을 막는 것으로 추정되었다.

Pathogen-responsive alpha-dioxygenase는 담배에 세균을 감염시켰을 때 나타난 단백질이며 (Hamberg 등, 2003), squalene synthase는 감자괴경에 *Phytophthora infestans*.를 감염시켰을 때 발견되었다(Yoshioka 등, 1999). Aarabinogalactan-protein (AGP14) 역시 곰팡이에 감염되었을 때 나타난 병 관련 유전자이다(Gilson 등, 2001).

Tobacco mosaic virus (TMV), brome mosaic virus (BMV), 그리고 luciferase의 mRNA 전사를 선택적으로 저해하는 lysine-rich 그리고 arginine-rich histones의 효과가 연구되었다(Cheema 등, 1997). 그 결과를 보면, lysine-rich histone은 TMV mRNA의 전사를 35-57%, arginine-rich histone은 13-31% 저해하였다. 두 개의 histone 모두 luciferase의 mRNA보다 TMV와 BMV 바이러스의 전사를 저해하였다.

단백질의 acetylation은 진핵생물에 있어서 DNA-templated 과정에 있어서 특별하며, 단백질-단백질의 상호작용을 조절하는 데에 매우 중요하다. Geminivirus의 movement protein인 NSP은 viral DNA가 핵과 세포질에 자리를 잡기 위해 이동하는 데에 필수적인 요소이다. McGarry 등(2003)은 NSP와 상호작용을 하는 Arabidopsis 단백질인 AtNSI를 동정하였다. Arabidopsis의 AtNSI는 다양한 식물들에서도 나타는 단백질이었다. NSP의 상호작용을 생화학적으로 연구한 결과, AtNSI는 histones을 acethylation 시키나 NSP에서는 acetylation이 일어나지 않았으며, 특히, AtNSI는 viral coat protein을 acetylation 시켰다. AtNSI는 핵 단백질이기는 하지만, 기내실험에서 eukaryotic histone acetyltransferases로 알려진 transcriptional coactivator로서는 작용하지 못하였다. AtNSI의 overexpression은 Cabbage leaf curl virus에 의한 감염 효과를 증대시켰다. 이 결과는 단백질의 acetylation이 viral DNA genome이 핵내로 들어갔을 때 viral DNA의 복제에 매우 중요한 역할을 한다는 것을 제시하였다.

또한 Geminivirus의 AL1 단백질은 viral DNA의 복제를 시작해주며, 자체 발현을 조절하고, 식물 유전자의 전사를 감소시켜준다. AL1이 기주 단백질과 상호작용하는 것을 잘 이해하기 위하여 Kong과 Hanley-Bowdoin(2002)은 yeast two-hybrid library screening 방법을 이용하였다. 그들은 AL1과 상호작용하는 식물 단백질을 동정하기 위하여 baculovirus protein interaction system을 연구하였다. 그 과정에서 Ser/Thr kinase,

kinesin, 그리고 histone H3가 AL1의 파트너로 동정되었다. Kinase는 스스로도 인산화되며 다른 일반적인 kinase를 인산화시킬 수도 있었다. *Nicotiana benthamiana*와 *Arabidopsis*를 가지고 실험한 결과, 식물의 발달과정과 geminivirus 감염시에 kinase 단백질의 수준과 subcellular location이 조절되었다. 결과적으로 AL1은 기주식물 단백질과 식물의 세포 분열과 발달에 연관되어 상호작용하며, geminivirus가 감염된 식물들의 건강한 생육에 관여하는 것으로 보여진다고 제시하였다.

식물체의 histone binding protein에 관한 연구도 이루어져 왔다. 밀의 HBP-1은 6개의 ACGTCA 염기와 상호작용하는 sequence-specific DNA-binding protein이며, histone H3 유전자와 cis-acting을 하는 요소로 추정된다(Mikami 등, 1989). Cauliflower mosaic virus (CaMV)의 35S RNA와 nopaline synthase (NOS) 유전자를 같이 붙인 후 발현시킨 결과를 보면, HBP-1가 다양한 지역에서 이 6개의 염기와 결합하여 발현을 조절하고 있었다. 밀에서 추출한 HBP-1a(histone binding protein)은 histone 유전자의 발현을 조절하는 transcription factor로 보여진다. Nakayama 등(1997)은 HBP-1a의 기능적인 domain을 설명하기 위하여 이스트의 transcriptional activator인 GAL의 DNA-binding 도메인에 HBP-1a의 다양한 부분을 융합하여 식물에서의 발현 융합 단백질을 새로이 만들었다. GAL4-binding sequence와 H3 core promoter을 beta-glucuronidase (GUS) reporter gene에 붙인 후 담배의 원형질내로 이 유전자를 형질전환시켜 GUS 발현을 분석하였다. 그 결과 HBP-1a의 P region이 활성화 기능을 갖는 여러개의 모듈로 구성되어 있으며, P region을 수정하거나 변형시키면 HBP-1a의 기능에 많은 영향을 미치는 것으로 나타났다.

핵인(nucleolus)은 뛰어난 소핵의 도메인이며 분류적으로 rRNA의 전사가 일어나는 곳이기도 하다. 핵인은 전통적으로 활성을 인지하는 곳이며, 세포 기능의 많은 부분에 참여하기도 한다. Umbravirus-encoded ORF3 단백질은 RNA의 장거리 이동과 관련한 다기능 RNA-binding 단백질이고, RNase로부터 viral RNA를 보호하기도 한다. 게다가 viral RNA가 함유되어 있는 세포질내의 ribonucleoprotein에서, umbraviral ORF3 protein은 핵내에 축적되어 선택적으로 목표하는 핵산을 만들어낸다. ORF3 protein domains은 단백질의 위치자리와 관련이 있으며, 이 단백질의 기능을 분석하기 위하여 돌연변이체를 연구한 결과, 바이러스 감염시 사부를 통한 viral RNA의 장거리 이동과 관련이 있다는 것을 알 수 있었다(Kim 등, 2004).

Table 1.2. Putative function related stress in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber.

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
M01A02	putative DnaJ protein	117	3.00E-12	<i>Malus x domestica</i>
M01A12	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	720	6.00E-75	<i>Antirrhinum majus</i>
M01B11	putative 60S ribosomal protein	496	6.00E-49	<i>Oryza sativa</i>
M01C09	P0446G04.25	389	2.00E-36	<i>Oryza sativa</i>
M01E08	small ras-related protein	456	9.00E-45	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M01E12	P0456F08.26	458	2.00E-44	<i>Oryza sativa</i>
M01F06	Glycerate dehydrogenase (NADH-dependent hydroxypyruvate reductase)	1070	1.00E-115	<i>Cucumis sativus</i>
M01F12	anthocyanin 5-O-glucosyltransferase	120	2.00E-05	<i>Petunia x hybrida</i>
M01G01	chaperone protein dnaJ-related	422	2.00E-40	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M01G06	photosystem II reaction center	217	9.00E-17	<i>Retama raetam</i>
M01H07	putative 60S RIBOSOMAL PROTEIN L36	449	1.00E-43	<i>Oryza sativa</i>
M01H11	SANT/MYB domain protein 1	270	5.00E-23	<i>Lycopersicon esculentum</i>
M02B06	WOUND-INDUCED BASIC PROTEIN	199	6.00E-15	<i>Phaseolus vulgaris</i>
M02C02	type I proteinase inhibitor-like protein	124	3.00E-06	<i>Citrus x paradisi</i>
M02C03	Photosystem II 22 kDa protein, chloroplast precursor (CP22)	804	1.00E-84	<i>Solanum soganandinum</i>
M02C06	aminotransferase 2	1144	1.00E-124	<i>Cucumis melo</i>
M02C08	OSJNBa0013K16.4	136	4.00E-07	<i>Oryza sativa</i>
M02C10	putative inorganic pyrophosphatase	401	2.00E-38	<i>Oryza sativa</i>
M02D05	serine palmitoyltransferase	915	1.00E-97	<i>Solanum tuberosum</i>
M02E06	lipocalin, putative	684	9.00E-71	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M02E07	putative ADP-ribosylation factor	808	4.00E-85	<i>Oryza sativa</i>
M02F03	coenzyme Q biosynthesis Coq4 family protein / ubiquinone	367	3.00E-34	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M02G04	metallothionein 1b	202	6.00E-15	<i>Populus balsamifera</i>
M02G10	annexin-like protein	722	5.00E-75	<i>Medicago sativa</i>
M02G12	RING-H2 finger protein	94	0.021	<i>Glycine max</i>
M02H02	ubiquitin-conjugating enzyme 8	777	2.00E-81	<i>Capsicum annuum</i>
M03C11	putative protein kinase AFC1	513	7.00E-64	<i>Oryza sativa</i>
M03D01	human Rev interacting-like family protein / hRIP family protein	511	8.00E-51	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03D05	oxygen evolving enhancer protein 3	475	8.00E-47	<i>Bruguiera gymnorhiza</i>
M03F04	60S ribosomal protein L22-2 (RPL22B)	431	1.00E-41	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03F08	halotolerance protein (HAL3A)	247	2.00E-20	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03F10	CONSTANS-like protein CO1	277	5.00E-24	<i>Populus deltoides</i>
M03G12	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa (Ubiquitin-protein ligase)	565	4.00E-57	<i>Lycopersicon esculentum</i>
M03H03	auxin-responsive protein, putative	279	7.00E-24	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04A03	60S ribosomal protein L34 (RPL34A)	401	2.00E-38	<i>Arabidopsis thaliana</i>

Table 1.2.a. Putative function related stress in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber (continued).

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
M04A07	ubiquitin conjugating protein	612	7.00E-63	<i>Avicennia marina</i>
M04B06	60S ribosomal protein L38 (RPL38A)	342	2.00E-31	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04C01	protein serine/threonine kinase-like protein	343	2.00E-31	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04C06	beta-glucosidase	429	1.00E-41	<i>Oryza sativa</i>
M04C07	oxidoreductase family protein	722	4.00E-75	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04D01	cystein proteinase inhibitor	308	2.00E-27	<i>Cucumis sativus</i>
M04D09	ubiquitin extension protein	408	4.00E-39	<i>Cucumis sativus</i>
M04D12	glutamate 1-semialdehyde aminotransferase enzyme	874	8.00E-93	<i>Brassica napus</i>
M04E03	60S ribosomal protein L18 (RPL18C)	852	3.00E-90	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04F01	Csf-3	620	1.00E-63	<i>Cucumis sativus</i>
M04G12	putative G10 protein	104	6.00E-04	<i>Oryza sativa</i>
M05A06	F-box family protein (FBL6)	138	7.00E-08	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05B12	lipoxygenase (EC 1.13.11.12)	832	1.00E-87	<i>Cucumis sativus</i>
M05C02	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	374	1.00E-34	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05C04	ubiquitin-conjugating enzyme, putative	789	7.00E-83	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05D04	putative arm repeat containing protein	698	2.00E-72	<i>Oryza sativa</i>
M05E05	P0407B12.26	394	5.00E-37	<i>Oryza sativa</i>
M05E07	ubiquitin family protein	743	5.00E-82	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05F10	serine-rich protein-related	441	2.00E-42	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05F11	quinone reductase family protein	452	1.00E-65	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05G08	Superoxide dismutase [Cu-Zn], chloroplast precursor	730	5.00E-76	<i>Vitis vinifera</i>
M05G09	acyl-CoA binding protein 2	229	3.00E-18	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05G12	ubiquitin-conjugating enzyme 10 (UBC10)	777	2.00E-81	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05H11	OSJNBb0011N17.8	288	3.00E-25	<i>Oryza sativa</i>
M06F11	60S ribosomal protein L13 (RPL13B) / breast basic conserved protein	836	2.00E-88	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M06G01	P0435B05.31	190	2.00E-15	<i>Oryza sativa</i>
M06G04	putative dihydroxy-acid dehydratase	318	1.00E-28	<i>Oryza sativa</i>
M06G05	bZIP DNA-binding protein HBF-1	429	3.00E-41	<i>Glycine max</i>
M07B12	F1N21.17	377	3.00E-35	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M07D08	L-ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11), cytosolic	1111	1.00E-120	<i>Cucumis sativus</i>
M07D10	RSH2	661	4.00E-68	<i>Nicotiana tabacum</i>
M07F06	P0671B11.14	320	2.00E-28	<i>Oryza sativa</i>
M07G02	oxygen evolving enhancer 3 (PsbQ) family protein	615	1.00E-62	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M07G10	enoyl-CoA-hydratase	885	4.00E-94	<i>Avicennia marina</i>
M07H04	Chain A, The X-Ray Crystallographic Structure Of Beta Carbonic	938	1.00E-100	<i>Pisum sativum</i>
M08A05	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit PSST	812	2.00E-85	<i>Lupinus luteus</i>

Table 1.2.b. Putative function related stress in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber (continued).

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
M08A06	dehydration-responsive protein-related	415	5.00E-40	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08A10	DIP-1	1065	1.00E-114	<i>Citrullus lanatus</i>
M08C08	ferredoxin-dependent glutamate synthase	571	2.00E-57	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08D10	geranylgeranyl hydrogenase	1398	1.00E-153	<i>Glycine max</i>
M08D12	phloem lectin	386	2.00E-36	<i>Cucurbita argyrosperma</i> <i>subsp. sororia</i>
M08E02	heavy-metal-associated domain-containing protein	113	2.00E-08	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08E05	BRI1-KD interacting protein 130	166	9.00E-11	<i>Oryza sativa</i>
M08G01	probable DnaJ protein [imported]	789	8.00E-83	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08H04	putative beta-glycosidase	166	4.00E-11	<i>Oryza sativa</i>
M08H07	ubiquitin	965	1.00E-103	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08H11	beta-cyanoalanine synthase	495	3.00E-49	<i>Solanum tuberosum</i>
M09A03	putative adrenal gland protein AD-004	672	2.00E-69	<i>Oryza sativa</i>
M09B07	thioredoxin peroxidase	702	6.00E-73	<i>Nicotiana tabacum</i>
M09C01	Nuclear inhibitor of PP1-like	383	9.00E-36	<i>Oryza sativa</i>
M09D04	beta-carbonic anhydrase	339	3.00E-31	<i>Nicotiana tabacum</i>
M09D07	glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase	950	1.00E-101	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M09E05	ferredoxin-NADP+ reductase homolog F10M6.10	156	6.00E-10	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M09F06	tocopherol cyclase	197	1.00E-14	<i>Eucalyptus gunnii</i>
M09F08	putative initiation factor 3g	603	2.00E-61	<i>Oryza sativa</i>
M09H02	putative p23 co-chaperone	111	2.00E-04	<i>Oryza sativa</i>
M09H05	putative ribose-5-phosphate isomerase	449	8.00E-44	<i>Oryza sativa</i>
M10A04	metallothionein-like protein type 2	212	3.00E-16	<i>Persea americana</i>
M10B11	aldose 1-epimerase family protein	265	2.00E-22	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M10C02	60S ribosomal protein L21	810	2.00E-85	<i>Oryza sativa</i>
M10C11	glycine decarboxylase complex H-protein	583	4.00E-59	<i>Populus tremuloides</i>
M10F01	putative ribosomal protein S29	321	5.00E-29	<i>Oryza sativa</i>
M10G01	lectin 2, phloem-specific	536	2.00E-53	<i>Cucurbita argyrosperma</i>
M10G05	cytokinin-repressed protein CR9	716	2.00E-74	<i>Cucumis sativus</i>
M11A03	WD-repeat cell cycle regulatory protein	1274	1.00E-139	<i>Glycine max</i>
M11B01	xyloglucan endotransglucosylase-hydrolase XTH7	469	5.00E-88	<i>Lycopersicon esculentum</i>
M11D09	ubiquitin activating enzyme E1	553	1.00E-55	<i>Cicer arietinum</i>
M11F02	EC protein homolog (Zinc-metallothionein class II)	88	0.044	<i>Zea mays</i>
M11F10	ABC transporter family protein	888	2.00E-94	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M11G07	ribosomal protein L28-like	557	7.00E-56	<i>Oryza sativa</i>
M11G12	P0698H10.19	112	2.00E-04	<i>Oryza sativa</i>
M11H04	NADH-ubiquinone oxidoreductase-related	380	1.00E-35	<i>Arabidopsis thaliana</i>

Table 1.2.c Putative function related stress in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber (continued).

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
M11H08	OSJNBa0074L08.19	162	2.00E-10	<i>Oryza sativa</i>
M11H11	alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) class III	256	1.00E-21	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M12A05	peroxidase (EC 1.11.1.7)	1102	1.00E-119	<i>Cucumis sativus</i>
M12B04	ACC oxidase	191	5.00E-14	<i>Cucumis sativus</i>
M12B09	monodehydroascorbate reductase, putative	915	2.00E-97	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M12D02	OSJNBa0088A01.20	100	0.005	<i>Oryza sativa</i>
M12F08	zinc finger (B-box type) family protein / salt-tolerance protein	662	4.00E-68	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M12G01	small heat shock protein	268	1.00E-22	<i>Lycopersicon esculentum</i>
M12G02	similar to dJ522J7.2 (Z98885)	246	6.00E-20	<i>Oryza sativa</i>
M12G03	Ras-related GTP-binding protein, putative	253	5.00E-21	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M12H04	polyubiquitin (UBQ10) (SEN3)	1089	1.00E-118	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M13A04	P0518C01.25	104	6.00E-04	<i>Oryza sativa</i>
M13A05	Glycine cleavage system H protein, mitochondrial precursor	730	6.00E-76	<i>Pisum sativum</i>
M13A06	digalactosyldiacylglycerol synthase 2	1031	1.00E-111	<i>Glycine max</i>
M13A10	probable thioredoxin reductase At2g41680 [imported]	1180	1.00E-128	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M13C05	dehydroascorbate reductase	821	2.00E-86	<i>Nicotiana tabacum</i>
M13C09	putative HSP70	1442	1.00E-158	<i>Oryza sativa</i>
M13D01	HEAT SHOCK 70 KD PROTEIN, MITOCHONDRIAL PRECURSOR	470	6.00E-46	<i>Phaseolus vulgaris</i>
M13D04	putative clathrin-associated protein	1192	1.00E-129	<i>Oryza sativa</i>
M13E01	P0514G12.26	101	0.003	<i>Oryza sativa</i>
M13E05	ribosomal protein L15	987	1.00E-105	<i>Oryza sativa</i>
M13E12	putative plastidic glutamine synthetase	1409	1.00E-154	<i>Crataegus crus-galli</i>
M13F06	protein induced upon tuberization	293	3.00E-25	<i>Solanum demissum</i>
M13F10	putative callose synthase 1 catalytic subunit	514	5.00E-51	<i>Oryza sativa</i>
M13G09	pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit, chloroplast	659	8.00E-68	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M13H08	ferredoxin-NADP reductase (EC 1.18.1.2)	609	7.00E-62	<i>Pisum sativum</i>
1A6	beta 1,3-galactanase like protein (olive alegen, Ole 9)	118	1e-25	<i>Olive</i>
1B11	Similar to germinal histone H4 gene (Fragment).	427	8.0e-39	<i>Egg plant</i>
1G4	probable heat shock protein 110 or HSP fragment	68	3e-10	<i>Arabidopsis</i>
1H11	Cucurbita maxima phloem filament protein protein Cucumis sativus cystein proteinase inhibitor protein	78	4e-13	<i>Cucurbita maxima</i> <i>Cucumber</i>
2A4	Retinitis pigmentosa GTPase regulator (fragment) KED (wounding tobacco)	350	1.3e-30	<i>Mus musculus</i> <i>N. tabacum</i>
2E1	Ras-related protein Rab11C (GTPase like)	190	4.3e-13	<i>Arabidopsis</i>
3A9	Hypothetical protein (Serine/threonine protein kinase) (CBL-interacting protein kinase 14).	164	3.4e-10	<i>Arabidopsis</i>

Table 1.2.d Putative function related stress in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber (continued).

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
3C3	Aldose reductase-like protein	906	1.4e-89	<i>Arabidopsis</i>
3E1	Nthsp18p	913	2.5e-90	<i>N. tabacum</i>
3G11	glutathione S-transferase	1219	9.4e-123	<i>Cucurbita maxima</i>
4B5	Silverleaf whitefly-induced protein 3 , or Beta-glucosidase	158	2.5e-10	<i>Cucurbita pepo</i>
4G3	Ultraviolet-B-repressible protein (Fragment).or Unknown protein	288	4.3e-24	<i>Pisum sativum</i>
4G5	Cyclophilin (EC 5.2.1.8) (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase) (PPlase) (Rotamase).	75	0.39	<i>Arabidopsis</i>
4H10	Monomeric lectin SNAI m precursor Ribosome inactivating protein precursor (EC 3.2.2.22) (rRNA N-glycosidase).	434	1.4e-39	<i>Sambucus nigra.</i>
8A11	MLP-like protein 34.	89	0.0064	<i>Arabidopsis</i>
8D4	Metallothionein-like protein type 3 (MT-3)	440 221	3.3e-40 5.4e-17	<i>Musa acuminata</i>
8D10	Glycine-rich RNA-binding protein, putative. Similar to cold inducible RNA binding protein	335 324 283 259	4.4e-29 6.5e-24 1.4e-23 5.0e-21	<i>Arabidopsis</i> <i>Brachydanio rerio</i>
8E3	Stem secoisolariciresinol dehydrogenase (Fragment). CPRD12 protein Alcohol dehydrogenase Sex determination protein tasselseed 2	411 379	3.9e-37 9.7e-34	<i>Forsythia intermedia</i> <i>Vigna unguiculata</i> <i>Phaseolus lunatus</i> <i>Zea mays</i>
8E9	Heat-shock protein. DnaJ-like protein.	245	1.5e-19	<i>Arabidopsis</i> <i>Nicotiana tabacum</i>
8F11	Acyl CoA synthetase (EC 6.2.1.3).	182	7.2e-13	<i>Brassica napus</i>
9D9	Trypsin inhibitor I precursor (TTII).-BELONGS TO THE SQUASH FAMILY OF SERINE PROTEASE INHIBITORS	183	3.9e-12	<i>Trichosanthes kirilowii</i>
9D11	Acid phosphatase (EC 3.1.3.2)	716	1.9e-69	<i>Lupinus luteus</i>
9D12	Metallothionein-like protein type 3 (MT-3).	215	2.3e-16	<i>Musa acuminata</i>
9E8	Putative hydroxymethylglutaryl-CoA lyase (Putative hydroxymethylglutaryl-CoA lyase protein).	146	4.8e-09	<i>Arabidopsis</i>
9F2	17 kDa phloem lectin. Similarity to disease resistance protein.	182	2.6e-22	<i>Cucumis sativus</i>
9F11	Glycolate oxidase (EC 1.1.3.1).	742	3.3e-72	<i>Cucurbita</i>
9G2	Kinesin heavy chain, putative.	302	9.9e-25	<i>Arabidopsis</i>
9G4	Selenium-binding protein-like (Putative selenium binding protein).	694	1.3e-70	<i>Arabidopsis</i>
9H11	CONSTANS-like protein. (Zinc finger protein)	338	4.2e-41	<i>Malus domestica</i>
10A11	Plant metallothionein-like protein.	608	1.8e-57	<i>Hordeum vulgare</i>
10C10	Csf-2 protein.	406	1.2e-52	<i>Cucumis sativus</i>

Table 1.2.e Putative function related stress in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber (continued).

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
10F8	Heat shock protein 70	517	2.3e-48	<i>Cucumis sativus</i>
10F12	Putative cinnamoyl-CoA reductase	253	2.2e-20	<i>Arabidopsis</i>
10G9	Ras-related protein Rab-27A (Rab-27) (GTP-binding protein Ram).	606	6.3e-57	Human
10H4	Cellulose synthase catalytic subunit	569	7.1e-54	<i>Gossypium hirsutum</i>
10H5	Putative cinnamoyl-CoA reductase			<i>Arabidopsis</i>
11D6	Ultraviolet-B-repressible protein (Fragment).	185	6.4e-22	<i>Pisum sativum</i>
11E8	Beta-mannosidase (Beta-mannosidase enzyme). Beta-glucosidase	652	5.5e-73	<i>Lycopersicon esculentum</i>
11H1	Prunasin hydrolase isoform PH A (EC 3.2.1.118) Auxin-repressed protein. Dormancy-associated protein (At1g28330/F3H9_1).	263	1.9e-21	<i>Robinia pseudoacacia</i> <i>Arabidopsis</i>
13C12	Putative metallothionein-like protein	336	3.5e-29	<i>Vitis vinifera</i>
13H1	Isoflavone reductase homolog (EC 1.3.1.-). Pinoresinol-lariciresinol reductase, putative (Putative pinoresinol-lariciresinol reductase).	258	6.4e-21	<i>Lupinus albus</i>
14B3	Putative caffeoyl-CoA O-methyltransferase At1g67980 (Trans-caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase)	836	3.6e-82	<i>Arabidopsis</i>
15A5	Trypsin inhibitor I precursor (TTII).; BELONGS TO THE SQUASH FAMILY OF SERINE PROTEASE INHIBITORS	213	3.8e-16	<i>Trichosanthes kirilowii</i>
15A9	Putative acyl-CoA synthetase	724	5.4e-75	<i>Capsicum annuum</i>
15B10	Heat shock protein 81-2 (HSP81-2). Hsp90 family	286	7.1e-51	<i>Arabidopsis</i>
5B7	Putative anthocyanidine rhamnosyl-transferase.	69	0.62	<i>Capsicum annuum</i>
5D3	Plastidic aldolase.	284	1.1e-23	<i>Nicotiana paniculata.</i>
5D10	Heat-shock protein 80 (Fragment).		1.5e-35	<i>Euphorbia esula</i>
5G12	Gb AAF26101.1 (AT3g17020/K14A17_14).Usp (universal stress protein) domain. Early nodulin ENOD18	647	3.9e-67	<i>Arabidopsis</i>
6A4	Metallothionein-like protein type 3 (MT-3).	215	2.3e-16	<i>Musa acuminata</i>
6G2	Aquaporin.	666	1.1e-63	<i>Vernicia fordii</i>
7D11	Peptidylprolyl isomerase (Cyclophilin) (PPIase) (Rotamase).	360	1.1e-31	<i>Betula verrucosa</i>
7F1	Seed maturation protein, LEA protein in group 5-like (Putative LEA protein).	88	0.088	<i>Arabidopsis</i>
12D11	Short chain alcohol dehydrogenase.	435	1.1e-39	<i>Nicotiana tabacum</i>
13D9	60S ribosomal protein L18a. (RPL18A) (induced by wound)	225	1.2e-16	<i>Castanea sativa</i>
2F8	Putative protein-tyrosine sulfotransferase (EC 2.8.2.20) (Tyrosylprotein sulfotransferase) (TPST). Glycoprotein gp2 (Fragment).	554	2.8e-52	<i>Caenorhabditis elegans.</i>
2G1	60S ribosomal protein L30 (RPL30)	262	4.4e-21	<i>Lupinus luteus</i>
2G3	CONSTANS-like protein. (Zinc binding box)	271	2.7e-22	<i>Pharbitis nil</i>
3G12	Putative NAM-like protein.(37% homology)	388	1.8e-35	<i>Oryza sativa</i>
3H2	At2g06520 protein (Unknown protein).			<i>Arabidopsis</i>

Table 1.3. Putative function related cellular communication in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber.

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
M01B10	Phosphoglycerate kinase, chloroplast precursor	486	1.00E-66	<i>Nicotiana tabacum</i>
M01D07	Oxygen-evolving enhancer protein 3, chloroplast precursor (OEE3)	178	8.00E-23	<i>Spinacia oleracea</i>
M01D08	putative receptor-kinase isolog	828	2.00E-87	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M01E01	chlorophyll a/b-binding protein precursor	311	6.00E-28	<i>Oryza sativa</i>
M01F01	Phosphoribulokinase, chloroplast precursor (Phosphopentokinase)	941	1.00E-100	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>
M01F02	protein kinase family protein	109	2.00E-04	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M01F05	chlorophyll a/b-binding protein 22L precursor - petunia	217	8.00E-25	<i>Petunia sp.</i>
M01G02	WRKY family transcription factor	470	6.00E-46	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M01G10	glycine-tRNA ligase (EC 6.1.1.14), chloroplast [imported] -	632	7.00E-65	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M01G11	chlorophyll a/b-binding protein type I	789	1.00E-93	<i>Nicotiana tabacum</i>
M01H04	transmembrane transport protein-like protein	522	5.00E-52	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M01H08	nuclear movement family protein	495	4.00E-75	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M02A04	60S ribosomal protein L35	404	2.00E-38	<i>Euphorbia esula</i>
M02A05	chlorophyll a/b binding protein of LHCII type I precursor	690	1.00E-71	<i>Panax ginseng</i>
M02A06	ATP-binding-cassette transporter (ABC1)	1038	1.00E-112	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M02A08	Thiazole biosynthetic enzyme, chloroplast precursor	677	6.00E-70	<i>Citrus sinensis</i>
M02C05	chlorophyll a/b-binding protein type I precursor	939	1.00E-100	<i>Lycopersicon esculentum</i>
M02D12	NAD-dependent malate dehydrogenase	610	4.00E-62	<i>Prunus persica</i>
M02F10	putative serine carboxypeptidase precursor	906	2.00E-96	<i>Gossypium hirsutum</i>
M02H03	gibberellin-responsive protein, putative	328	1.00E-29	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M02H09	Magnesium-chelatase subunit chlI, chloroplast precursor	773	4.00E-81	<i>Glycine max</i>
M02H12	calmodulin mutant (2F770)	117	4.00E-05	<i>Caenorhabditis elegans</i>
M03A08	cyclic nucleotide-regulated ion channel / cyclic nucleotide-gated	700	1.00E-72	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03B03	far-red impaired responsive protein, putative	932	1.00E-99	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03B04	putative calmodulin	117	3.00E-05	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03B05	signal recognition particle 54 kDa subunit precursor	761	1.00E-79	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03B08	Pharbitis nil PnC401 mRNA for leaf protein	189	3.00E-13	<i>Ipomoea nil</i>
M03B09	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2 (eIF-5A) (eIF-4D)	143	2.00E-08	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>
M03C02	alanine aminotransferase	517	4.00E-60	<i>Oryza sativa</i>
M03C05	PLASTIDIC ATP/ADP-TRANSPORTER	216	1.00E-16	<i>Solanum tuberosum</i>
M03C10	translation initiation factor eIF-4A.14	692	1.00E-71	<i>Nicotiana tabacum</i>
M03D10	calmodulin 4	757	4.00E-79	<i>Daucus carota</i>
M03D11	phosphate transport protein G7, mitochondrial - soybean	481	2.00E-47	<i>Glycine max</i>
M03E06	Photosystem I reaction center subunit IV B, chloroplast precursor	336	1.00E-30	<i>Nicotiana sylvestris</i>
M03E07	Csf-2	616	6.00E-63	<i>Cucumis sativus</i>

Table 1.3.a Putative function related cellular communication in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber (continued).

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
M03E08	SERINE HYDROXYMETHYLTRANSFERASE, MITOCHONDRIAL PRECURSOR	943	1.00E-111	<i>Pisum sativum</i>
M03F03	extensin-like protein	380	1.00E-35	<i>Cucumis sativus</i>
M03F05	putative H ⁺ -transporting ATP synthase	542	4.00E-55	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03F09	adenylate kinase family protein	546	8.00E-55	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03F12	LcoB	88	0.07	<i>Lactococcus lactis</i>
M03G07	ATP synthase B ¹ chain, chloroplast precursor (Subunit II)	518	1.00E-51	<i>Spinacia oleracea</i>
M03H11	chlorophyll a/b binding protein precursor - upland cotton	229	2.00E-18	<i>Gossypium hirsutum</i>
M04A01	ribosomal protein L7	106	3.00E-04	<i>Solanum tuberosum</i>
M04A04	zinc-binding family protein	620	4.00E-69	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04A12	Rieske [2Fe-2S] domain-containing protein	359	5.00E-33	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04B02	histidine kinase (AHK4) (WOL)	778	8.00E-82	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04B04	FtsH protease, putative	386	1.00E-36	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04B07	plastid ribosomal protein L19 precursor	337	2.00E-30	<i>Spinacia oleracea</i>
M04C04	putative translation factor	546	9.00E-55	<i>Pinus pinaster</i>
M04C08	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplast precursor (OEE1)	912	2.00E-97	<i>Nicotiana tabacum</i>
M04D05	S-adenosylmethionine decarboxylase	264	2.00E-34	<i>Oryza sativa</i>
M04D08	porphobilinogen synthase, putative / delta-aminolevulinic acid	928	5.00E-99	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04D11	Photosystem I reaction center subunit II, chloroplast precursor	149	4.00E-09	<i>Cucumis sativus</i>
M04E02	DEAD/DEAH box helicase, putative	786	2.00E-82	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04E05	Photosystem I reaction centre subunit III, chloroplast precursor	487	2.00E-70	<i>Flaveria trinervia</i>
M04E12	oxygen-evolving enhancer protein 3 precursor	329	5.00E-30	<i>Pisum sativum</i>
M04F09	cell-cell signaling protein csgA homolog F21C20.110	293	3.00E-25	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04G10	excretory/secretory protein Juv-p120 precursor	189	3.00E-13	<i>Litomosoides sigmodontis</i>
M04H01	ABC transporter (TAP1)	905	2.00E-96	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04H05	dolichyl-di-phosphooligosaccharide-protein glycotransferase	571	7.00E-58	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05A03	50S ribosomal protein L3, chloroplast precursor	850	8.00E-90	<i>Nicotiana tabacum</i>
M05A05	senescence-associated family protein	667	1.00E-68	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05A10	chlorophyll a/b-binding protein CP24 precursor	154	1.00E-09	<i>Vigna radiata</i>
M05A12	amino acid transporter AAP4	803	2.00E-84	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05B09	protein disulfide isomerase	1063	1.00E-114	<i>Quercus suber</i>
M05D03	At5g58240	651	6.00E-67	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05F07	cycloartenol synthase	1068	1.00E-115	<i>Luffa cylindrica</i>
M05F09	Myristoyl-acyl carrier protein thioesterase, chloroplast precursor	212	4.00E-16	<i>Gossypium hirsutum</i>
M05G03	calmodulin-binding family protein	456	3.00E-44	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05G04	mechanosensitive ion channel domain-containing protein / MS ion	1087	1.00E-117	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05G05	aminoalcoholphosphotransferase	309	2.00E-27	<i>Pimpinella brachycarpa</i>
M05G11	glutamine synthetase precursor	1395	1.00E-153	<i>Juglans nigra</i>

Table 1.3.b Putative function related cellular communication in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber (continued).

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
M05H02	probable transportin [imported]	147	3.00E-08	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05H12	TUBULIN ALPHA-1 CHAIN	449	2.00E-43	<i>Pisum sativum</i>
M06A04	Ribulose-phosphate 3-epimerase, chloroplast precursor	278	7.00E-24	<i>Solanum tuberosum</i>
M06A05	S-adenosyl-L-methionine synthetase	1044	1.00E-122	<i>Elaeagnus umbellata</i>
M06A08	cysteine proteinase (EC 3.4.22.-) 3 precursor - kidney bean	368	3.00E-34	<i>Phaseolus vulgaris</i>
M06B01	leucine-rich repeat protein kinase, putative	514	5.00E-51	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M06C06	mitochondrial transcription termination factor family protein /	485	2.00E-47	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M06C10	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family	202	4.00E-15	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M06D04	probable receptor-like protein kinase [imported]	470	4.00E-46	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M06E11	26S proteasome regulatory subunit, putative	1118	1.00E-121	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M06E12	ARF GAP-like zinc finger-containing protein ZIGA3	213	5.00E-16	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M06F04	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	415	2.00E-39	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M06F05	KAP-2	702	5.00E-73	<i>Medicago truncatula</i>
M06F09	carboxyl transferase alpha subunit	568	1.00E-57	<i>Glycine max</i>
M06F12	rapid alkalization factor 1 precursor	383	8.00E-36	<i>Populus balsamifera</i>
M06G08	CG14154-PA	96	0.007	<i>Drosophila melanogaster</i>
M07A02	S6 ribosomal protein kinase	1031	1.00E-111	<i>Asparagus officinalis</i>
M07A06	uroporphyrin III methylase (UPM1)	310	8.00E-28	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M07C08	Phosphoglycerate kinase, cytosolic	318	1.00E-28	<i>Nicotiana tabacum</i>
M07C11	GTP-binding family protein	851	3.00E-90	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M07C12	Photosystem I reaction center subunit VI, chloroplast precursor	364	1.00E-33	<i>Spinacia oleracea</i>
M07D01	MutT/nudix family protein	866	9.00E-92	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M07D02	alkaline alpha galactosidase II	1375	1.00E-151	<i>Cucumis melo</i>
M07E01	auxin-regulated protein GH3 homolog At2g46370	514	4.00E-51	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M07E06	CBL-interacting protein kinase 23 (CIPK23)	101	0.001	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M07F03	DNA-directed RNA polymerase (EC 2.7.7.6) chain III	332	4.00E-30	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M07F04	CAO	365	9.00E-34	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M07F05	phospholipid/glycerol acyltransferase family protein	90	0.025	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M07G01	zinc-finger protein	572	1.00E-57	<i>Oryza sativa</i>
M07G05	proteasome maturation factor UMP1 family protein	539	4.00E-54	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08A03	no apical meristem (NAM) family protein	145	2.00E-08	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08B07	ethylene-responsive element binding factor	251	5.00E-21	<i>Capsicum annuum</i>
M08B09	30S RIBOSOMAL PROTEIN S17, CHLOROPLAST PRECURSOR (CS17)	153	1.00E-09	<i>Pisum sativum</i>
M08C01	shaggy-related protein kinase alpha / ASK-alpha (ASK1)	889	3.00E-99	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08D02	Ferritin 3, chloroplast precursor (SFerH-3)	294	6.00E-26	<i>Glycine max</i>
M08D05	membrane protein, 37K, chloroplast inner envelope [imported] -	378	8.00E-37	<i>Lactuca sativa</i>
M08E08	pectate lyase family protein	1277	1.00E-139	<i>Arabidopsis thaliana</i>

Table 1.3.c Putative function related cellular communication in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber (continued).

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
M08E09	putative senescence-associated protein	302	8.00E-27	<i>Pisum sativum</i>
M08E11	At2g19940/F6F22.3	861	4.00E-91	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08E12	zinc finger (AN1-like) family protein	452	7.00E-44	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08F01	AT3g14930/K15M2_7	518	9.00E-52	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08F02	Rab2-like GTP-binding protein (RAB2)	623	1.00E-63	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08F06	Chain A, Wild-Type Pea Fnr	810	3.00E-85	<i>Pisum sativum</i>
M08F08	Translationally controlled tumor protein homolog (TCTP)	756	6.00E-79	<i>Cucumis melo</i>
M08G02	putative transport protein subunit	212	2.00E-16	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08G04	phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family protein / ubiquitin	571	1.00E-57	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08G09	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplast precursor (OEE2)	1077	1.00E-116	<i>Cucumis sativus</i>
M08G10	pantothenate kinase family protein	801	2.00E-84	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M09A06	Protein transport protein SEC61 gamma subunit	208	5.00E-16	<i>Oryza sativa</i>
M09B01	adenosine 5'-phosphosulfate reductase	1236	1.00E-134	<i>Glycine max</i>
M09C07	chloroplast ferredoxin-NADP+ oxidoreductase precursor	1018	1.00E-109	<i>Capsicum annuum</i>
M09C10	Tic62 protein	132	5.00E-07	<i>Pisum sativum</i>
M09E09	probable phytochelatin synthetase [imported]	1146	1.00E-124	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M09F03	asparaginyl endopeptidase (VmPE-1)	311	6.00E-28	<i>Vigna mungo</i>
M09H01	Rieske Fe-S precursor protein	643	4.00E-66	<i>Oryza sativa</i>
M10C01	sedoheptulose-1,7-bisphosphatase precursor	777	1.00E-81	<i>Oryza sativa</i>
M10C04	dehydroquinase synthase	230	2.00E-18	<i>Lycopersicon esculentum</i>
M10D02	PIN1-like auxin transport protein	872	2.00E-92	<i>Populus tremula x Populus</i>
M10D03	Calreticulin precursor	1173	1.00E-127	<i>Prunus armeniaca</i>
M10E07	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A, chloroplast precursor	293	7.00E-26	<i>Pisum sativum</i>
M10E09	ASCAB9-A	119	1.00E-05	<i>Argyroxiphium sandwicense</i>
M10F06	Malate dehydrogenase, glyoxysomal precursor	1308	1.00E-143	<i>Cucumis sativus</i>
M10G03	dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase 48kDa	290	2.00E-25	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M10G04	dihydrolipoamide S-acetyltransferase (EC 2.3.1.12) precursor	578	2.00E-58	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M10G06	transcription factor WRKY4	442	2.00E-42	<i>Petroselinum crispum</i>
M10H05	calcium-dependent protein kinase (EC 2.7.1.-) 1	346	1.00E-31	<i>Lycopersicon esculentum</i>
M11B04	Chlorophyll a-b binding protein 3C, chloroplast precursor (LHCII)	284	8.00E-25	<i>Lycopersicon esculentum</i>
M11D11	Proteasome subunit alpha type 4 (20S proteasome alpha subunit C)	819	2.00E-86	<i>Spinacia oleracea</i>
M11E01	ketol-acid reductoisomerase (EC 1.1.1.86) precursor	1086	1.00E-117	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M11E10	stamina pistilloidia protein Stp [imported] - garden pea	162	4.00E-10	<i>Pisum sativum</i>
M11F03	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	364	1.00E-33	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M11F11	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase, chloroplast precursor	1015	1.00E-109	<i>Glycine max</i>

Table 1.3.d Putative function related cellular communication in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber (continued).

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
M11G02	protein kinase, putative	1111	1.00E-120	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M11H02	shikimate kinase	736	9.00E-77	<i>Cucumis sativus</i>
M12B02	bZIP transcription factor	363	2.00E-33	<i>Nicotiana tabacum</i>
M12C12	putative GTP-binding protein	843	3.00E-89	<i>Cucumis sativus</i>
M12D12	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	235	7.00E-19	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M12E06	immunophilin / FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family	713	4.00E-74	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M12E09	Ferredoxin-thioredoxin reductase catalytic chain, chloroplast	626	6.00E-64	<i>Glycine max</i>
M12E11	ribosomal protein S19	596	2.00E-60	<i>Solanum tuberosum</i>
M12G06	neutral invertase	177	7.00E-12	<i>Daucus carota</i>
M12H11	Glutamine synthetase, chloroplast precursor (Glutamate--ammonia	329	5.00E-30	<i>Brassica napus</i>
M13B04	rubisco activase precursor [<i>Datisca glomerata</i>]	270	4.00E-23	<i>Datisca glomerata</i>
M13B05	SRP1 protein homolog - rice	921	5.00E-98	<i>Oryza sativa</i>
M13B06	ribophorin I family protein	1028	1.00E-110	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M13B11	GPRP	417	1.00E-39	<i>Oryza sativa</i>
M13B12	putative carnitine/acylcarnitine translocase	978	1.00E-104	<i>Oryza sativa</i>
M13C06	probable transcription factor - fava bean	206	4.00E-15	<i>Vicia faba</i>
M13C07	GTP-binding protein, ras-like - fava bean	988	1.00E-106	<i>Vicia faba</i>
M13D06	putative branched-chain amino acid aminotransferase protein	763	9.00E-80	<i>Oryza sativa</i>
M13E10	YABBY2-like transcription factor YAB2	620	4.00E-63	<i>Antirrhinum majus</i>
M13F03	protein kinase-like protein	533	4.00E-53	<i>Vitis aestivalis</i>
M13F11	GTP-binding protein Rab6	970	1.00E-103	<i>Nicotiana tabacum</i>
M13G12	PII protein	610	6.00E-62	<i>Ricinus communis</i>
1C11	BlastX:Sambucus nigra ribosome inactivating protein precursor protein.	106	9e-22	<i>Gynostemma pentaphyllum</i>
2A2	Retinitis pigmentosa GTPase regulator (fragment)	178	1.9e-12	<i>Mus musculus</i>
2C3	Thylakoid soluble phosphoprotein precursor			<i>Spinacia oleracea</i>
2E8	Protein phosphatase 2C (PP2C) (EC 3.1.3.16).	574	2.1e-54	<i>Fagus sylvatica</i>
2G11	Photosystem II 10 kDa polypeptide, chloroplast precursor (Light inducible tissue-specific ST-LS1 protein).	939	4.4e-93	<i>Solanum tuberosum</i>
3A12	Fructose-1,6-bisphosphatase, chloroplast precursor (EC 3.1.3.11) (D-fructose-1,6-bisphosphate 1-phosphohydrolase) (FBPase)	953	5.4e-102	<i>Brassica napus</i>
3B11	Acetohydroxyacid synthase (EC 4.1.3.18)	151	1.7e-15	<i>Gossypium hirsutum</i>
4A2	Chlorophyll A-B binding protein of LHCII type I, chloroplast precursor (CAB) (LHCP) (Fragment)	1002	9.3e-100	<i>Cucumis sativus</i>
4B4	Transcription factor LIM (Zinc-binding protein)	360	1.0e-31	<i>Populus kitakamiensis</i>
4F1	Tsl2097 protein, protein kinase	478	3.1e-44	<i>Synechococcus elongatus</i>
4F4	Ferredoxin 2, chloroplast precursor	546	1.9e-51	<i>Arabidopsis thaliana</i>

Table 1.3.e Putative function related cellular communication in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber (continued).

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
8B7	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase B, chloroplast precursor (EC 1.2.1.13) (NADP-dependent glyceraldehydephosphatedehydrogenase subunit B).	216	1.8e-16	<i>Pisum sativum</i>
8F6	Adenylosuccinate synthetase, chloroplast precursor (EC 6.3.4.4) (IMP-- aspartate ligase) (AdSS) (AMPSase).	268	5.6e-22	<i>Arabidopsis thaliana</i>
8F10	Lipid transfer protein isoform 1	670	1.4e-64	<i>Vitis vinifera</i>
8G6	Calmodulin	67	0.92	<i>Oryza sativa</i>
9D1	Profilin.	984	7.5e-98	<i>Litchi chinensis.</i>
9D6	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, chloroplast precursor (EC 1.1.1.49) (G6PD).	213	3.8e-16	<i>Solanum tuberosum</i>
9E4	Alanine aminotransferase (EC 2.6.1.2) (Putative alanine aminotransferase).	716	1.9e-69	<i>Arabidopsis</i>
9E9	Differentially expressed osmotic protein ODE2 (Fragment). Auxin response factor 4 (Auxin response factor ARF4).	460	1.3-41	<i>Capsicum annuum</i>
9E11	Putative ABC transporter protein.	644	8.0e-62	<i>Arabidopsis thaliana</i>
9F4	Genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MRB17 (AT5g54540/MRB17_4). Possible K channel inhibitor	411	3.9e-37	<i>Arabidopsis thaliana</i>
9F9	Adenosine kinase 2 (EC 2.7.1.20) (AK 2) (Adenosine 5'-phosphotransferase 2).	585	1.4e-55	<i>Arabidopsis thaliana</i>
9G5	non; incase of blastP:Cell wall surface anchor family protein	269	4.4e-22	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
9H12	Chloroplast 50S ribosomal protein L19 precursor	661	1.3e-63	<i>Spinacia oleracea</i>
10B7	Elongation factor Tu, chloroplast precursor (EF-Tu).	610	3.2e-58	<i>Glycine max</i>
10B12	Putative tetratricopeptide repeat protein	692	6.6e-67	<i>Oryza sativa</i>
10C6	PSI-H precursor	797	4.9e-78	<i>Nicotiana sylvestris</i>
10F3	ATP-binding cassette transporter A.	517	2.3e-48	<i>Bacteria</i>
10F9	Genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MDF20 (Unknown protein) (At5g55640). Cato protein (BELONGS TO THE BASIC HELIX-LOOP-HELIX (BHLH) FAMILY OF TRANSCRIPTION FACTORS.)	833	7.5e-82	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Drosophila</i>
10G2	Calmodulin-binding protein	427	7.9e-39	<i>Nicotiana tabacum</i>
11B1	Lipid transfer protein (Nonspecific lipid-transfer protein) (LTP).	321	1.3e-27	<i>Davidia involucreta</i>
11B3	Similarity to protein-tyrosine phosphatase (Phosphatase and tensin homolog) (PTEN like protein). Putative Cyclin G-associated kinase	312	1.2e-26	<i>Arabidopsis thaliana</i>
11C6	F14P13.19 protein (AT3g10210/F14P13_19). Rho like	919	5.8e-91	<i>Arabidopsis thaliana</i>
11C9	WD-40 repeat protein MSI1	130	1.2e-06	<i>Lycopersicon esculentum</i>
11D10	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, chloroplast precursor (EC 1.1.1.267) (DXP reductoisomerase) (1-deoxyxylulose-5-phosphate reductoisomerase).	687	2.2e-66	<i>Arabidopsis thaliana</i>

Table 1.3.f Putative function related cellular communication in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber (continued).

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
11F9	Hypothetical 52.9 kDa protein. (InterPro: Putative transcription factor X1)	435	1.1e-39	<i>Arabidopsis thaliana</i>
11G9	Putative MAP kinase ATMPK9 (Fragment).	765	1.2e-74	<i>Arabidopsis thaliana</i>
11G12	AT4g18030/T6K21_210. (InterPro:Putative methyltransferase DUF248)	320	2.6e-39	<i>Arabidopsis thaliana</i>
12A10	Transcription factor.	667	2.9e-64	
12E11	Membrane related protein CP5, putative.	152	1.1e-09	<i>Arabidopsis thaliana</i>
13G7	Putative glycosyl transferase	116	3.4e-05	<i>Arabidopsis thaliana</i>
14F12	Adenine nucleotide translocator.	458	4.1e-42	<i>Lupinus albus</i>
5B11	Homeobox 2 protein.(THOX2)	498	2.4e-46	<i>Lycopersicon esculentum</i>
5E6	GMFP5 (Fragment).(metal ion transporter)	299	2.9e-25	<i>Glycine max</i>
5F10	Protein kinase (Fragment). CSPK3 (Cucumber protein kinase CSPK3). NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 2	531	7.6e-50	<i>Spinacia oleracea</i>
5H5	F3F19.19 protein (At1g13170/F3F19_19). Putative Oxysterol-binding protein, PH(Pleckstrin Homology)_domain	455	8.2e-42	<i>Arabidopsis thaliana</i>
6E8	Phosphate translocator precursor.	713	3.9e-69	<i>Nicotiana tabacum</i>
6H3	Copper-transporting P-type ATPase	247	1.8e-19	<i>Brassica napus</i>
6H9	Pectinacetyltransferase precursor.	299	2.9e-25	<i>Phaseolus aureus</i>
7B1	F12A10.5 protein, putative calmodulin	76	0.12	<i>Caenorhabditis elegans</i>
7D10	Apocytochrome f precursor.	123	1.3e-06	<i>Glycine max</i>
7E4	Small nuclear ribonucleoprotein, putative.	499	1.9e-46	<i>Arabidopsis thaliana</i>
12C2	50S ribosomal protein L15, chloroplast precursor (CL15)	551	5.7e-52	<i>Pisum sativum</i>
12G11	Chlorophyll A-B binding protein 7, chloroplast precursor (LHCI type II CAB-7).	125	8.0e-07	<i>Lycopersicon esculentum</i>
2B3	Putative shikimate kinase precursor (AT2G21940.)	498	2.4e-46	<i>Arabidopsis thaliana</i>
2E9	Probable small nuclear ribonucleoprotein G (snRNP-G) (Sm protein G) (Sm-G) (SmG).	93	0.0020	<i>Arabidopsis thaliana</i>
2H7	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial precursor (Clone PC13III).(CYCL)	787	5.6e-77	<i>Solanum tuberosum</i>

Table 1.4. Putative function related structural and basic cellular function in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber.

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
M01A03	chlorophyll a/b-binding protein	300	1.00E-26	<i>Glycine max</i>
M01A10	40S ribosomal protein S17 (RPS17D)	581	8.00E-59	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M01B04	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain, chloroplast	836	8.00E-89	<i>Cucumis sativus</i>
M01B06	40S ribosomal protein S9 (RPS9C)	869	3.00E-92	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M01B12	oxygen-evolving enhancer protein 3, chloroplast, putative (PSBQ2)	403	3.00E-61	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M01C08	cell division protein-related	140	7.00E-08	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M01C10	phloem filament protein PP1	209	1.00E-15	<i>Cucurbita maxima</i>
M01D04	ferredoxin, chloroplast, putative	461	5.00E-45	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M01D06	SUCROSE-PHOSPHATE SYNTHASE 1 (UDP-GLUCOSE-FRUCTOSE-PHOSPHATE	888	2.00E-94	<i>Citrus unshiu</i>
M01D09	SET domain-containing protein	916	1.00E-97	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M02A12	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	670	2.00E-69	<i>Capsicum annuum</i>
M02B07	GDP-mannose pyrophosphorylase	624	1.00E-63	<i>Solanum tuberosum</i>
M02C04	RBL1	103	7.00E-04	<i>Cucumis sativus</i>
M02C12	PNIL34	1038	1.00E-113	<i>Ipomoea nil</i>
M02D03	coatamer delta subunit (delta-coat protein) (delta-COP)	364	4.00E-34	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M02D11	tubulin beta-2/beta-3 chain (TUB2)	770	1.00E-80	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M02F08	40S RIBOSOMAL PROTEIN SA (P40)	982	1.00E-105	<i>Glycine max</i>
M02F09	photosystem II type I chlorophyll a/b-binding protein	1187	1.00E-129	<i>Glycine max</i>
M02G07	Vacuolar ATP synthase subunit B isoform 2 (V-ATPase B subunit 2)	1116	1.00E-121	<i>Gossypium hirsutum</i>
M02H01	alanine transaminase (EC 2.6.1.2)	376	1.00E-67	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
M02H11	membrane protein, putative	534	2.00E-53	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03A03	light harvesting chlorophyll A/B binding protein	245	3.00E-20	<i>Prunus persica</i>
M03A04	60s acidic ribosomal protein	263	4.00E-22	<i>Prunus dulcis</i>
M03A06	At3g14940	1222	1.00E-133	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03A07	probable aminopeptidase F24D7.4 [imported]	450	5.00E-44	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03B02	subunit of photosystem I	256	1.00E-21	<i>Cucumis sativus</i>
M03B11	chlorophyll a/b binding protein CP29	953	1.00E-107	<i>Vigna radiata</i>
M03D07	chlorophyll A-B binding protein CP26, chloroplast /	340	3.00E-31	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03E09	protein T31J12.5 [imported]	596	9.00E-61	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03E12	H-protein promoter binding factor-2a	213	2.00E-16	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03G01	histone H2A, putative	555	9.00E-56	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03G04	chlorophyll a/b binding protein	400	3.00E-38	<i>[Cicer arietinum</i>
M03G09	OP1	773	5.00E-81	<i>Cucumis sativus</i>
M04B05	photosystem I-N subunit	435	2.00E-42	<i>Phaseolus vulgaris</i>
M04C03	ribosomal protein L32	644	3.00E-66	<i>Mercurialis annua</i>

Table 1.4.a Putative function related structural and basic cellular function in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber (continued).

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
M04D02	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase-related	920	1.00E-104	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04D07	L-asparaginase / L-asparagine amidohydrolase	727	2.00E-83	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04E04	expressed in cucumber hypocotyls	599	3.00E-61	<i>Cucumis sativus</i>
M04E07	histone deacetylase	152	4.00E-09	<i>Solanum chacoense</i>
M04F03	dentin sialophosphoprotein-related	176	8.00E-12	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04F05	F14L17.11 protein	395	3.00E-37	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04F07	beta-amylase	688	1.00E-87	<i>Prunus armeniaca</i>
M04G03	proteasome family protein	723	3.00E-75	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04G07	histone H2B	260	5.00E-22	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04G11	probable ribosomal protein S9 F9E10.18 [imported]	199	6.00E-15	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04H02	ADP-ribosylation factor-like protein 2 (ARL2)	780	3.00E-82	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04H08	yippee family protein	442	4.00E-43	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04H10	alpha tubulin	578	2.00E-58	<i>Zea mays</i>
M05A02	thylakoid lumen 18.3 kDa protein	427	9.00E-41	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05B03	40S ribosomal protein S8	822	2.00E-86	<i>Zea mays</i>
M05C06	ribosomal protein S8e family protein	1230	1.00E-134	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05C09	sucrose cleavage protein - potato	695	8.00E-72	<i>Solanum tuberosum</i>
M05D10	At1g32790	93	0.011	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05E02	polyadenylate-binding protein, putative / PABP, putative	557	7.00E-56	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05E04	Chlorophyll a-b binding protein 151, chloroplast precursor (LHCII)	1318	1.00E-144	<i>Gossypium hirsutum</i>
M05E10	c-myc binding protein, putative / prefoldin, putative	575	6.00E-58	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05E11	fasciclin-like AGP 12	612	3.00E-62	<i>Populus alba x Populus tremula</i>
M05E12	CBS domain-containing protein	834	6.00E-88	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05F06	beta-tubulin 5	1479	1.00E-162	<i>Gossypium hirsutum</i>
M05H04	chlorophyll a/b-binding protein type II precursor	691	7.00E-72	<i>Pisum sativum</i>
M05H09	40S ribosomal protein S25 (RPS25B)	320	1.00E-28	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M06A06	very-long-chain fatty acid condensing enzyme CUT1	360	1.00E-33	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M06B06	(S)-2-hydroxy-acid oxidase (EC 1.1.3.15)	1201	1.00E-130	<i>Cucurbita sp.</i>
M06B07	tetrapyrrole methylase family protein	89	0.034	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M06B08	radical SAM domain-containing protein / TRAM domain-containing	907	2.00E-96	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M06C01	putative U4/U6-associated RNA splicing factor	382	1.00E-35	<i>Oryza sativa</i>
M06C04	protein T24P13.14 [imported]	197	2.00E-14	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M06C12	photosystem II stability/assembly factor, chloroplast (HCF136)	435	6.00E-42	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M06D07	H+-exporting ATPase (EC 3.6.3.6) - kidney bean	879	1.00E-104	<i>Phaseolus vulgaris</i>
M06D11	RUB1 conjugating enzyme	343	4.00E-31	<i>Lycopersicon esculentum</i>

Table 1.4.b Putative function related structural and basic cellular function in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber (continued).

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
M06E09	chlorophyll a/b-binding protein 4 - soybean	938	1.00E-100	Glycine max
M06E10	glucose-1-phosphate adenylyltransferase (EC 2.7.7.27) 2 large chain	332	4.00E-30	Cucumis melo
M06G09	triose-phosphate isomerase (EC 5.3.1.1), cytosolic	640	7.00E-66	Arabidopsis thaliana
M06H06	peroxisomal membrane protein-related	355	5.00E-33	Arabidopsis thaliana
M06H12	ferredoxin	260	5.00E-22	Zea mays
M07A10	protodermal factor 1 (PDF1)	227	4.00E-18	Arabidopsis thaliana
M07A12	putative callose synthase catalytic subunit	608	5.00E-62	Gossypium hirsutum
M07B01	Phosphoglucomutase, cytoplasmic (Glucose phosphomutase) (PGM)	1036	1.00E-111	Pisum sativum
M07B02	eukaryotic translation initiation factor 5A isoform I [Hevea	809	3.00E-85	Hevea brasiliensis
M07D05	ELONGATION FACTOR 1-ALPHA (EF-1-ALPHA)	1261	1.00E-137	Manihot esculenta
M07E03	putative photosystem II core complex proteins psbY, chloroplast	155	7.00E-10	Oryza sativa
M07E04	ribosomal protein	762	1.00E-79	Petunia x hybrida
M07E09	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase (EC 5.4.3.8)	1072	1.00E-115	Nicotiana tabacum
M07E11	At1g25390/F2J7_14	964	1.00E-103	Arabidopsis thaliana
M07F01	nodulin-related	190	1.00E-13	Arabidopsis thaliana
M07F02	cytochrome c1, putative	1117	1.00E-121	Arabidopsis thaliana
M07F11	fibrillin-like protein CHRC, chromoplast	1284	1.00E-140	Cucumis sativus
M07G03	10 kDa photosystem II polypeptide	248	1.00E-20	Trifolium pratense
M07G11	mitochondrial elongation factor, putative	1244	1.00E-135	Arabidopsis thaliana
M07G12	Ribosomal protein L34e	481	3.00E-47	Solanum demissum
M07H09	OSJNBb0103I08.16	344	1.00E-31	Oryza sativa
M08B01	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase PPIC-type family protein	550	2.00E-55	Arabidopsis thaliana
M08B06	plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family protein	255	2.00E-21	Arabidopsis thaliana
M08C05	LOB domain family protein / lateral organ boundaries domain family	90	0.025	Arabidopsis thaliana
M08E06	mago nashi-like protein	706	3.00E-73	Oryza sativa
M08F05	chlorophyll a/b-binding protein (cab-11)	143	2.00E-08	Lycopersicon esculentum
M08F10	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	1239	1.00E-138	Solanum tuberosum
M08G06	F-actin capping protein alpha chain [imported]	304	7.00E-27	Arabidopsis thaliana
M09A08	prefoldin-related KE2 family protein	324	2.00E-29	Arabidopsis thaliana
M09A11	ribosomal protein L27-5 - garden pea	545	2.00E-54	Pisum sativum
M09B04	mitochondrial substrate carrier family protein	164	7.00E-11	Arabidopsis thaliana
M09B06	cytochrome P450	250	1.00E-20	Ammi majus
M09B08	photosystem II 11 kDa protein-related	292	3.00E-25	Arabidopsis thaliana
M09C02	tonoplast intrinsic protein	164	8.00E-11	Cicer arietinum
M09D11	14-3-3-LIKE PROTEIN D (SGF14D)	261	1.00E-21	Glycine max

Table 1.4.c Putative function related structural and basic cellular function in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber (continued).

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
M09E03	esterase/lipase/thioesterase family protein	945	1.00E-101	Arabidopsis thaliana
M09E04	formyltetrahydrofolate deformylase, putative	982	1.00E-105	Arabidopsis thaliana
M09F04	NADH-cytochrome b5 reductase, putative	648	4.00E-78	Arabidopsis thaliana
M09F09	high mobility group protein 2 HMG2	296	9.00E-26	Ipomoea nil
M09F12	ankyrin repeat family protein	111	3.00E-04	Arabidopsis thaliana
M09G11	actin [imported] – mung bean	761	2.00E-79	Vigna radiata
M09H09	ADP-glucose pyrophosphorylase	862	1.00E-91	Cicer arietinum
M10A02	F9L1.23 protein	91	0.024	Arabidopsis thaliana
M10A08	octicosapeptide/Phox/Bem1p (PB1) domain-containing protein /	554	1.00E-55	Arabidopsis thaliana
M10A09	glycine dehydrogenase (decarboxylating) (EC 1.4.4.2) [imported] –	653	3.00E-67	x Tritordeum sp.
M10A10	P0428D12.22	193	6.00E-14	Oryza sativa
M10A11	Photosystem II reaction center W protein, chloroplast precursor	163	9.00E-11	Spinacia oleracea
M10A12	OSJNBa0042L16.6	472	3.00E-46	Oryza sativa
M10B03	fructose-bisphosphate aldolase	1242	1.00E-135	Glycine max
M10B04	pleckstrin homology (PH) domain-containing protein (PH1)	238	2.00E-19	Arabidopsis thaliana
M10C08	sugar isomerase (SIS) domain-containing protein	519	2.00E-51	Arabidopsis thaliana
M10D01	photosystem II reaction center PsbP family protein	648	1.00E-66	Arabidopsis thaliana
M10D05	pyruvate decarboxylase 1	763	8.00E-80	Vitis vinifera
M10D09	leucine zipper-containing protein	894	4.00E-95	Euphorbia esula
M10D12	vacuolar ATP synthase subunit D (VATD) / V-ATPase D subunit /	933	1.00E-99	Arabidopsis thaliana
M10E12	CONSTANS-like protein CO2	152	5.00E-09	Populus deltoides
M10F09	ATP synthase gamma chain 1, chloroplast (ATPC1)	996	1.00E-107	Arabidopsis thaliana
M10G07	60S acidic ribosomal protein P0	305	5.00E-27	Glycine max
M10H04	ribosomal protein L35 family protein	380	1.00E-35	Arabidopsis thaliana
M10H06	amidase family protein	923	2.00E-98	Arabidopsis thaliana
M10H07	ARP protein (REF)	747	5.00E-78	Arabidopsis thaliana
M10H10	putative 40S ribosomal protein S23	252	4.00E-21	Arabidopsis thaliana
M11A05	rhodanese-like domain-containing protein / PPIC-type PPIASE	464	4.00E-45	Arabidopsis thaliana
M11A11	calcineurin-like protein	791	5.00E-83	Eucalyptus grandis
M11B02	predicted protein	478	8.00E-47	Populus alba x Populus tremula
M11B06	40S ribosomal protein S5 (RPS5A)	926	1.00E-98	Arabidopsis thaliana
M11B11	urease accessory protein UreD	779	9.00E-82	Glycine max
M11C12	histone H3.2	679	4.00E-70	Arabidopsis thaliana
M11D04	rhomboid family protein	637	3.00E-65	Arabidopsis thaliana

Table 1.4.d Putative function related structural and basic cellular function in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber (continued).

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
M11D08	ERD15 protein	217	1.00E-16	Arabidopsis thaliana
M11E09	60S acidic ribosomal protein P3	279	7.00E-24	Lactuca saligna
M11F01	core protein - garden pea	521	9.00E-52	Pisum sativum
M11F06	FK506-binding protein 1 (FKBP13)	89	0.033	Arabidopsis thaliana
M11G01	Drm3	166	1.00E-10	Pisum sativum
M11G10	cDNA sequence BC002118	857	8.00E-91	Mus musculus
M11H12	cytochrome b5 reductase	595	2.00E-60	Zea mays
M12A02	lipoic acid synthase (LIP1)	951	1.00E-101	Arabidopsis thaliana
M12B11	chlorophyll a/b-binding protein (cab-12)	993	1.00E-106	Lycopersicon esculentum
M12C01	formin homology 2 domain-containing protein / FH2 domain-containing	680	3.00E-70	Arabidopsis thaliana
M12C11	Cell division cycle protein 48 homolog	96	0.006	Capsicum annuum
M12D04	probable RNA polymerase II fifth largest subunit	277	6.00E-24	Arabidopsis thaliana
M12D08	putative VIP2 protein	102	0.003	Oryza sativa
M12E03	phytoalbumin	1085	1.00E-117	Nicotiana benthamiana
M12E05	gag-pol polyprotein	450	5.00E-44	Vitis vinifera
M12E08	thylakoid lumen 15.0 kDa protein	510	5.00E-51	Arabidopsis thaliana
M12G04	histone H1, stress-inducible	358	6.00E-33	Lycopersicon esculentum
M12G12	photosystem II oxygen-evolving complex protein 1	486	3.00E-48	Oryza sativa
M12H03	60S ribosomal protein L12	805	1.00E-84	Capsicum annuum
M13A01	phosphoglycerate/bisphosphoglycerate mutase family protein	876	8.00E-93	Arabidopsis thaliana
M13A07	putative thioredoxin m2	474	3.00E-46	Pisum sativum
M13B03	60S RIBOSOMAL PROTEIN L15-2	965	1.00E-103	Picea mariana
M13C10	peroxisomal membrane 22 kDa family protein	754	1.00E-78	Arabidopsis thaliana
M13C12	AT4g15940/dl4011w	882	2.00E-93	Arabidopsis thaliana
M13D09	26S proteasome regulatory particle triple-A ATPase subunit6	748	5.00E-78	Oryza sativa
M13E03	pectate lyase	1385	1.00E-152	Malus domestica
M13E04	glycosyl hydrolase family 9 protein	499	3.00E-49	Arabidopsis thaliana
M13E09	At1g34220	253	1.00E-20	Arabidopsis thaliana
M13H04	inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase family protein	187	2.00E-13	Arabidopsis thaliana
M13H06	nuclear cap-binding protein, putative	804	2.00E-84	Arabidopsis thaliana
1A3	Cucumber LHCP mRNA encoding chlorophyll a/b-binding protein, partial cds.	375	e-102	Cucumber
1A11	Lysyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.6).	471	1.2e-50	Arabidopsis
1B5	Putative HesB-like protein(unknown function), (Iron-sulfur cluster assembly protein IscA.)	393	3.2e-35	Arabidopsis
1B6	Chloroplast 50S ribosomal protein L2	585	1.4e-55	White mustard
1B10	Putative 33kDa oxygen evolvingprotein of photosystem II	456	6.8e-42	Rice

Table 1.4.e Putative function related structural and basic cellular function in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber (continued).

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
1C3	Putative phosphoribosylanthranilate transferase, 3' partial, 131493- 134402 (Fragment).	652	3.8e-62	<i>Arabidopsis</i>
1C5	RuBisCO activase.	225	9.5e-19	Apple
1C12	Photosystem I P700 chlorophyll A apoprotein A2 (PsaB)	537	1.8e-50	Spinach
1D2	triosphosphate isomerase protein	820	1.8e-80	Lettuce
2A12	E24 ASN.(The outer membrane protein E24 of spinach chloroplast envelope)	118	0.00021	<i>Spinacia oleracea</i>
2B2	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9 (small Zinc finger like protein)	403	2.8e-36	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>
2B9	At2g25800 protein.	67	0.67	<i>Arabidopsis</i>
2C1	Photosystem I assembly protein ycf4	233	2.9e-18	<i>Carpobrotus chilensis</i>
2D2	Lhca2 protein.(Chlorophyll A-B binding protein)	461	2.0e-42	<i>Arabidopsis</i>
2D9	60S ribosomal protein L37	375	2.6e-33	<i>Arabidopsis</i>
2H3	translation elongation factor EF-Tu precursor, chloroplast	315	5.9e-27	<i>Glycine max</i>
3B8	EATRO 164 kinetoplast (CR4). Glycoprotein gp2 (Fragment).	132	8.1e-07	<i>Trypanosoma brucei</i> , <i>Equine herpesvirus 1</i> .
3H1	Serine 1 ultra high sulfur protein	199	1.1e-14	<i>Mus musculus</i>
3A1	60S ribosomal protein L9 (Gibberellin-regulated protein GA)	304	8.6e-26	<i>Pisum sativum</i>
3C5	Rab1C	149	2.3e-09	<i>Lotus japonicus</i> .
3D2	Photosystem II 10 kDa protein	85	0.88	<i>Xerophyta humilis</i>
3F2	60S ribosomal protein L13a-2	350	7.8e-42	<i>Arabidopsis</i>
3G10	Chlorophyll a/b-binding protein CP24	829	2.0e-81	Pea
4B1	60S ribosomal protein L10 (EQM)	310	2.0e-26	<i>Solanum melongena</i>
4C2	60S ribosomal protein L39	580	4.8e-55	<i>Arabidopsis</i>
4D9	60S ribosomal protein L4-1 (L1)	398	9.4e-36	<i>Arabidopsis</i>
4F5	Histone H2A.F/Z (At3g54560)	542	5.2e-51	<i>Arabidopsis</i>
4H1	Multicatalytic endopeptidase complex, proteasome, beta subunit.	274	1.3e-22	<i>Arabidopsis</i>
4H7	Ribosomal protein L33	352	7.0e-31	<i>Castanea sativa</i>
5B2	RpoD protein.			<i>Plasmodium falciparum</i> .
5E4	PSII K protein.	129	3.8e-07	<i>Atropa belladonna</i>
5E9	ATP citrate lyase b-subunit (EC 4.1.3.8).	280	5.2e-23	<i>Lupinus albus</i>
5F2	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase1.(AAA ATPase, central region)	395	1.9e-35	<i>Gossypium hirsutum</i>
5G6	Photosystem I reaction center subunit X psaK.	561	5.0e-53	<i>Nicotiana tabacum</i>
5H12	At2g31140 protein.	495	4.9e-46	<i>Arabidopsis</i>
6D6	Plastocyanin	346	3.0e-30	<i>Cucumis sativus</i>
6D9	Tubulin beta-2 chain (Beta-2 tubulin).	549	4.4e-63	<i>Lupinus albus</i>
6E5	F8A24.9 protein.	976	5.3e-97	<i>Arabidopsis</i>
7A10	Ribosomal protein L29	117	5.6e-06	<i>Panax ginseng</i> .

Table 1.4.f Putative function related structural and basic cellular function in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber (continued).

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
7D9	Translation initiation factor-like protein	519	1.4e-48	<i>Arabidopsis</i>
7D12	Genomic DNA, chromosome 5, P1	559	8.1e-53	<i>Arabidopsis</i>
7H7	Gossypium barbadense (Sea-island cotton)	509	1.6e-47	<i>Gossypium barbadense</i>
7H10	AT4g33900.(22 kDa peroxisomal membrane protein (PMP22))	331	1.2e-28	<i>Arabidopsis</i>
8A4	PSII 10kD phsphoprotein.	212	4.8e-16	<i>Atropa belladonna</i>
8B11	Super cysteine rich protein (Fragment)	284	6.2e-31	<i>Homo sapiens</i>
8C1	Cysteine synthase) (OAS-TL).	572	3.4e-54	<i>Citrullus lanatus</i>
8C4	HMG protein (AT3G51880/ORF13).	735	1.8e-71	<i>Arabidopsis</i>
8D1	Cytoplasmic ribosomal protein S13.	79	0.17	<i>Panax ginseng</i>
8D3	Cytochrome oxidase subunit II (EC 1.9.3.1)	214	3.0e-16	<i>Prodoxus marginatus.</i>
8F3	Cytoplasmic ribosomal protein S15a-like	251	1.6e-19	<i>Citrullus lanatus</i>
8H9	40S ribosomal protein S10	491	1e-45	<i>Oryza sativa</i>
3E9	Photosystem I reaction center subunit III.	824	6.8e-81	<i>Arabidopsis</i>
9A3	40S ribosomal protein S7.	748	7.6e-73	<i>Avicennia marina</i>
9F12	LHCII type I chlorophyll a/b-binding protein	587	4.2e-55	<i>Phaseolus aureus</i>
10A1	60S ribosomal protein L10a-1.	473	1.1e-43	<i>Arabidopsis</i>
10A6	60S ribosomal protein L37a.	90	8.3e-09	<i>Gossypium hirsutum</i>
10B5	Ribosomal protein L32	309	4.5e-26	<i>Arabidopsis</i>
11A6	60S Ribosomal protein L44 (Ribosomal protein L44).	345	3.9e-30	<i>Gossypium hirsutum</i>
11B2	40S ribosomal protein S3a	750	4.7e-73	<i>Helianthus annuus</i>
11B8	Ribosomal protein small subunit 28 kDa.	312	1.2e-26	<i>Helianthus annuus</i>
11D12	Putative proline-rich protein Putative vesicle-associated membrane protein.(VAMP)	851	9.3e-84	<i>Arabidopsis</i>
11F12	Hypothetical 30.9 kDa protein.	602	2.3e-57	<i>Arabidopsis</i>
11H5	EbiP1409 (Fragment). (BlastN: tRNA for Leu and Phe)	630	2.4e-60	<i>Anopheles gambiae</i>
11H10	40S ribosomal protein S11.	111	2.4e-05	<i>Zea mays</i>
12A2	Chloroplast 30S ribosomal protein S4	261		<i>Atropa belladonna</i>
12C4	Plastid ribosomal protein S6, putative.	84	0.99	<i>Arabidopsis</i>
12E6	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 2 (Fragment).	223	6.3e-2	<i>Gossypium hirsutum</i>
12F12	Fiber protein Fb15.	719	9.0e-70	<i>Gossypium barbadense</i>
12G12	Photosystem II 10 kDa phosphoprotein.	511	9.9e-48	<i>Lotus japonicus</i>
13B4	F8K7.25 protein	216	1.8e-16	<i>Arabidopsis</i>
13C8	F8A24.9 protein	203	4.3e-15	<i>Arabidopsis</i>
13D6	40S ribosomal protein S10-3	680	1.2e-65	<i>Arabidopsis</i>
13H7	Non-symbiotic hemoglobin 2 (Hb2) (ARATH GLB2).	541	1.7e-57	<i>Arabidopsis</i>
15G3	40S ribosomal protein S20-like protein (At3g47370).	803	1.1e-78	<i>Arabidopsis</i>

Table 1.5. Unclassified function in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber.

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
M01A08	expressed protein	91	0.039	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M01C04	unknown protein	204	2.00E-15	<i>Oryza sativa</i>
M01C06	expressed protein	286	1.00E-24	<i>Oryza sativa</i>
M01D01	hypothetical protein YUP8H12R.27	166	4.00E-11	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M01D10	expressed protein	155	2.00E-09	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M01D11	expressed protein	133	3.00E-12	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M01D12	unnamed protein product	269	1.00E-22	<i>Homo sapiens</i>
M01F07	expressed protein	142	9.00E-08	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M01F10	unknown protein	188	3.00E-13	<i>Oryza sativa</i>
M01G08	unknown protein	130	1.00E-10	<i>Oryza sativa</i>
M02B04	hypothetical protein	92	0.015	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M02B11	expressed protein	730	1.00E-76	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M02C01	hypothetical protein [imported]	95	0.007	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M02D02	unknown protein	168	7.00E-11	<i>Oryza sativa</i>
M02E05	expressed protein	103	0.001	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M02E08	expressed protein	165	5.00E-11	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M02E10	unnamed protein product	139	7.00E-14	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M02G05	expressed protein	523	5.00E-52	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03B01	expressed protein	192	5.00E-14	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03C01	hypothetical protein 3 chloroplast	270	1.00E-22	<i>Nicotiana tabacum</i>
M03C04	unknown protein	327	1.00E-52	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03C06	expressed protein	239	4.00E-19	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03C12	expressed protein	502	1.00E-49	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03D03	expressed protein	579	1.00E-59	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03D09	unknown protein; 13384-11892	822	1.00E-86	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03G03	expressed protein	647	1.00E-66	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03G11	unknown	627	4.00E-64	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M03H04	expressed protein	493	2.00E-53	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04A06	hypothetical protein	88	0.051	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04D06	expressed protein	501	1.00E-49	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04D10	expressed protein	621	2.00E-63	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04E10	hypothetical protein	173	2.00E-11	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04E11	expressed protein	158	9.00E-10	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04F04	expressed protein	382	8.00E-36	<i>Oryza sativa</i>
M04F06	expressed protein	187	2.00E-13	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04F12	expressed protein	306	2.00E-27	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M04G06	expressed protein	179	1.00E-12	<i>Arabidopsis thaliana</i>

Table 1.5.a Unclassified function in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber (continued).

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
M05B04	expressed protein	113	5.00E-05	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05B08	expressed protein	683	2.00E-70	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05C05	expressed protein	347	4.00E-32	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05D02	expressed protein	624	9.00E-64	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05D05	expressed protein	335	1.00E-30	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05D06	expressed protein	463	6.00E-45	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05E03	hypothetical protein F2G14_10	262	9.00E-22	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M05G01	expressed protein	162	4.00E-10	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M06A01	unknown protein	188	1.00E-13	<i>Oryza sativa</i>
M06A02	expressed protein	130	6.00E-07	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M06A03	expressed protein	455	3.00E-44	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M06A11	hypothetical protein	132	1.00E-07	<i>Deinococcus radiodurans</i>
M06B05	expressed protein	88	0.044	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M06B11	expressed protein	639	2.00E-65	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M06C05	expressed protein	104	6.00E-04	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M06D03	expressed protein	304	9.00E-27	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M06E04	unknown protein	404	2.00E-38	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M06E07	expressed protein	261	8.00E-22	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M06F08	expressed protein	507	3.00E-50	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M06H03	expressed protein	155	7.00E-10	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M07A09	unknown protein	217	5.00E-17	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M07A11	hypothetical protein	134	2.00E-08	<i>Deinococcus radiodurans</i>
M07B08	expressed protein	672	3.00E-69	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M07B09	expressed protein	149	8.00E-09	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M07B10	unknown	256	1.00E-21	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M07C07	expressed protein	281	6.00E-24	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M07D07	unknown protein; 14-1201	527	2.00E-52	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M07G08	expressed protein	528	1.00E-52	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M07H10	unnamed protein product	155	7.00E-10	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08A09	expressed protein	157	4.00E-10	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08B05	expressed protein	400	7.00E-38	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08B10	expressed protein	331	6.00E-30	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08C04	hypothetical protein	457	4.00E-75	<i>Oryza sativa</i>
M08C06	expressed protein	782	6.00E-82	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08D01	hypothetical protein At2g42580 [imported]	346	1.00E-31	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08D06	expressed protein	452	5.00E-44	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08D09	hypothetical protein F16P17.16 [imported]	365	3.00E-34	<i>Arabidopsis thaliana</i>

Table 1.5.b Unclassified function in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber (continued).

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
M08E01	expressed protein	1065	1.00E-114	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08E07	unnamed protein product	446	5.00E-43	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08E10	hypothetical protein T29H11.60	886	5.00E-94	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08F04	unknown	346	9.00E-32	<i>Cucumis sativus</i>
M08F07	unnamed protein product	326	3.00E-29	<i>Oryza sativa</i>
M08F11	expressed protein	222	5.00E-17	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08G05	expressed protein	139	1.00E-07	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M08H09	expressed protein	244	5.00E-20	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M09A02	expressed protein	283	1.00E-24	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M09A04	expressed protein	843	5.00E-89	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M09B09	expressed protein	385	2.00E-36	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M09C04	expressed protein	264	5.00E-22	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M09C05	expressed protein	441	2.00E-42	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M09C12	expressed protein	317	3.00E-28	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M09D02	unknown protein	727	1.00E-75	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M09D05	expressed protein	616	1.00E-62	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M09E06	unknown protein	400	8.00E-38	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M09E08	hypothetical protein At2g26340 [imported]	469	9.00E-46	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M09E10	hypothetical protein	304	1.00E-26	<i>Oryza sativa</i>
M09G02	unknown protein	137	2.00E-07	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M09G07	hypothetical protein	386	2.00E-36	<i>Brassica oleracea</i>
M09G12	hypothetical protein	534	3.00E-53	<i>Nicotiana tabacum</i>
M09H06	expressed protein	472	4.00E-46	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M10B01	Unknown protein	113	2.00E-04	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M10B05	hypothetical protein F16J13.30	531	5.00E-53	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M10B07	unknown	545	4.00E-55	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M10C03	expressed protein	770	1.00E-80	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M10C05	unknown	187	5.00E-13	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M10C07	unknown	716	3.00E-74	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M10E05	unnamed protein product	123	4.00E-06	<i>Pisum sativum</i>
M10F10	unknown	723	3.00E-75	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M10F11	expressed protein	374	7.00E-35	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M10G09	unknown	104	6.00E-04	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M10G11	hypothetical protein	135	4.00E-07	<i>Plasmodium falciparum</i>
M10H01	expressed protein	199	4.00E-30	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M10H03	hypothetical protein M4I22.200	400	9.00E-38	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M11A08	expressed protein	891	8.00E-95	<i>Arabidopsis thaliana</i>

Table 1.5.c Unclassified function in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber (continued).

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
M11B09	expressed protein	350	5.00E-32	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M11C05	expressed protein	108	3.00E-04	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M11C11	expressed protein	491	2.00E-48	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M11D05	expressed protein	489	3.00E-48	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M11E08	expressed protein	188	2.00E-13	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M11G04	unknown protein	403	3.00E-38	<i>Oryza sativa</i>
M11G05	expressed protein	154	1.00E-09	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M11H03	expressed protein	464	3.00E-45	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M11H07	unknown protein	140	9.00E-08	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M12A01	expressed protein	349	8.00E-32	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M12A06	unknown protein	146	8.00E-09	<i>Oryza sativa</i>
M12A10	expressed protein	764	6.00E-80	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M12A11	unnamed protein product	522	8.00E-52	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M12A12	unknown protein	369	2.00E-34	<i>Oryza sativa</i>
M12B03	unknown	97	0.004	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M12B05	expressed protein	131	1.00E-06	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M12C07	unknown	462	6.00E-45	<i>Cucumis sativus</i>
M12C08	unknown	452	1.00E-43	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M12E01	unknown protein	140	6.00E-08	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M12E02	expressed protein	834	4.00E-88	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M12F04	unknown protein	548	7.00E-55	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M12F06	unknown	657	1.00E-67	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M12F11	expressed protein	848	4.00E-92	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M13B02	unknown protein	175	1.00E-11	<i>Oryza sativa</i>
M13C01	expressed protein	725	2.00E-75	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M13C02	expressed protein	706	4.00E-73	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M13D03	hypothetical protein protein	92	0.016	<i>Bacillus cereus</i>
M13E02	hypothetical protein F6E21.40	1151	1.00E-124	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M13E06	hypothetical protein	88	0.046	<i>Plasmodium falciparum</i>
M13F07	expressed protein	133	5.00E-07	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M13G02	expressed protein	335	4.00E-30	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M13G03	expressed protein	386	1.00E-36	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M13H02	expressed protein	111	1.00E-04	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M13H07	expressed protein	309	3.00E-27	<i>Arabidopsis thaliana</i>
M13H09	hypothetical protein F19H22.150	772	9.00E-81	<i>Arabidopsis thaliana</i>
1C9	Hypothetical Protein (Hypothetical arginine-rich region/HMG-I and HMG-Y DNA-binding domain)	180	1.2e-12	
1D12	Predicted protein			<i>Bateria</i>

Table 1.5.d Unclassified function in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber (continued).

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
1E8	hypothetical protein (calcium binding protein) (InterPro: RNA binding motif, Em/Spm transposon)	219	8.6e-17	<i>Human</i>
1F9	<i>Arabidopsis thaliana</i> hypothetical 43.1kDa protein	91	3e-17	<i>Arabidopsis</i>
2A7	Hypothetical protein.	74	0.55	<i>Arabidopsis</i>
2A8	Hypothetical protein (Similar to plasmodium lophurae histidine-rich glycoprotein).	123	1.3e-06	<i>Dictyostelium discoideum</i>
2B4	Hypothetical protein.	763	2.0e-74	<i>Arabidopsis</i>
2C7	Hypothetical protein CT1172. Chimeric AFGP/trypsinogen-like serine protease (Fragment).	493	8.0e-46	<i>Bacteriophage T7.</i>
2D6	hypothetical protein	894	2.6e-88	<i>Arabidopsis</i>
2F2	Weakly similar to hypothetical 10.3 kDa protein. Glycoprotein gp2 (Fragment).	86	0.076	<i>Mus musculus</i>
3A2	Hypothetical 26.3 kDa protein.(InterPro: Rhodanese-like protein)	142	9.4e-08	<i>Arabidopsis</i>
3A9	Hypothetical protein (Serine/threonine protein kinase) (CBL-interacting protein kinase 14).	164	3.4e-10	<i>Arabidopsis</i>
3D9	Hypothetical tyrosine-rich region containing protein	585	1.4e-55	<i>Mus musculus</i>
3F9	Hypothetical protein (Transcription factor II homolog) (Putative TBP associated factor 15kDa subunit) (Putative TBP-associated 15 kDa subunit protein).	79	0.23	<i>Arabidopsis</i>
3G1	Hypothetical protein	722	1.8e-84	
4C9	At2g41250 protein (Hypothetical protein) (InterPro:HAD-superfamily hydrolase, subfamily IA, variant 1)	398	9.4e-36	<i>Arabidopsis</i>
4E12	Hypothetical protein (InterPro: Plant integral membrane protein)	72	0.32	<i>Arabidopsis</i>
4F2	Hypothetical protein At5g64816 precursor (SwissProt: signal)	389	8.4e-35	<i>Arabidopsis</i>
4G9	Hypothetical protein (Fragment).	348	1.9e-30	<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>
5B10	Hypothetical protein.	299	2.9e-25	<i>Bacillus anthracis</i>
5D4	Genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MSF19 (Hypothetical protein). Putative nucleic acid binding protein (Human virus)	265	1.2e-21	<i>Arabidopsis</i>
5F4	Hypothetical protein (At3g53470).	832	9.6e-82	<i>Arabidopsis</i>
6E1	Similarity to unknown protein (Hypothetical protein). Similar to Rnase III	230	6.0e-18	<i>Arabidopsis</i>
7B6	Hypothetical protein, unlikely.	247	9.4e-20	<i>Trypanosoma brucei.</i>
7C5	Hypothetical 10.0 kDa protein	236	1.4e-18	<i>Arabidopsis</i>
7E7	Hypothetical protein.	189	1.3e-13	<i>Arabidopsis</i>
8A3	Hypothetical protein P0519E12.3.	334	5.7e-29	<i>Oryza sativa</i>
8B8	Hypothetical 34.6 kDa protein.	303	1.1e-25	<i>Arabidopsis</i>
8G11	Predicted protein	62	0.991	<i>Methanosarcina acetivorans</i>

Table 1.5.e Unclassified function in plants of ESTs obtained from ZGMMV-infected cucumber (continued).

Query Name	Subject_Gene	Score Row	Score EValue	Source
8H1	Hypothetical 6.3 kDa protein (Grapevine leafroll-associated virus 2)	765	1.2e-74	<i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i>
8H11	Gb AAF67764.1 (AT5g13610/MSH12_7) (hypothetical protein 42.3kDa)	685	3.6e-66	<i>Arabidopsis</i>
9A5	Putative chloroplast membrane-associated 30 kDa protein.(hypothetical protein, lipid transfer protein, IM)	510	1.3e-47	<i>Oryza sativa</i>
9A11	Hypothetical protein.(24.4kDa protein)	428	6.2e-39	<i>Arabidopsis</i>
9C3	Hypothetical protein (38.3kDa protein)	366	2.3e-32	<i>Arabidopsis</i>
9C6	Hypothetical protein (Photosystem I subunit O precursor)(Putative 16kDa membrane protein).	396	1.5e-35	<i>Arabidopsis</i>
9F6	Hypothetical protein At5g07960.	465	7.5e-43	<i>Arabidopsis</i>
10C5	T17H3.3 protein (Similar to CGI-126 protein) (Hypothetical protein).	213	3.8e-16	<i>Arabidopsis</i>
10G1	Hypothetical protein	530	9.6e-50	<i>Arabidopsis</i>
10G5	Hypothetical protein (Glyoxalase, lactoylglutathione lyase activity, carbohydrate metabolism)	1075	8.2e-112	<i>Arabidopsis</i>
11C11	Hypothetical protein.	185	6.4e-22	<i>Arabidopsis</i>
11F1	Hypothetical 25.8 kDa protein.	295	9.7e-24	<i>Arabidopsis</i>
11F4	Hypothetical 90.8 kDa protein	480	1.9e-44	<i>Arabidopsis</i>
11F8	Maybe sequence contam, but Hypothetical protein. Or alfalfa mosaic virus truncated MP	378	1.2e-33	<i>Arabidopsis</i>
11G2	AT3g11530/F24K9_21 (Hypothetical protein).(InterPro: Vacuolar protein sorting 55)	568	9.1e-54	<i>Arabidopsis</i>
11G6	Hypothetical protein (Putative ribosomal protein L28)	268	5.6e-22	<i>Arabidopsis</i>
11G8	Putative 40S ribosomal protein S3.	204	4.2e-19	<i>Triticum aestivum</i>
11H12	Gb AAD43151.1 (AT3g19030/K13E13_15) (Hypothetical protein).	665	4.8e-64	<i>Arabidopsis</i>
12C5	Hypothetical protein At1g67360.	474	8.3e-44	<i>Arabidopsis</i>
13E4	Hypothetical 54.4 kDa protein	76	0.63	<i>Arabidopsis</i>
13F5	Putative PQQ enzyme repeat	702	5.7e-68	<i>Salmonella typhimurium</i> .
13G10	Hypothetical 34.3 kDa protein (Fragment).	408	8.2e-37	<i>Cicer arietinum (Chickpea)</i>
13G11	Hypothetical protein	213	3.8e-16	<i>Arabidopsis</i>
14B7	Hypothetical protein.	86	0.82	<i>Arabidopsis</i>
14F10	Hypothetical 20.4 kDa protein	789	3.5e-77	<i>Arabidopsis</i>
15A11	At2g25280 protein (Hypothetical protein).	955	8.8e-95	<i>Arabidopsis</i>
15G11	Hypothetical 28.7 kDa protein.(Calcium binding EF-hand)	100	0.068	<i>Arabidopsis</i>

상기의 Table들과 같이 기본적인 세포내 기능을 수행하는 transcripts를 비롯하여, 스트레스, 전사인자, 세포내 신호전달, 기능이 알려져 있지 않은 transcripts 등 다양하게 확보할 수 있었으며, 그 분포는 Structural and basic cellular function (28%), Virus Infection related (4%), Stress related (21%), Cellular communication and signal transduction (25%), Undefined function and hypothetical protein (22%)로 나타났다 (Fig. 1.4).

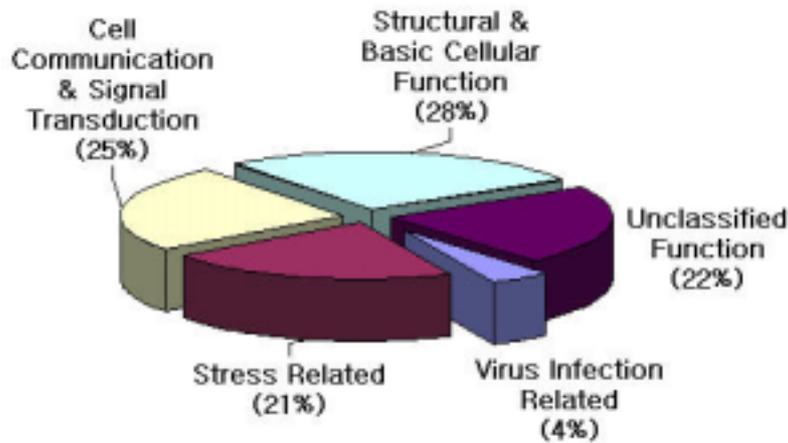


Fig. 1.4. Distribution of cucumber cotyledons transcripts infected with ZGMMV by functional categories.

바이러스의 감염에 따른 식물체의 반응을 파악하기 위한 노력의 일환으로, 현재까지 진행한 sequencing과 blast의 결과로 볼 때, 현재까지 박과식물에서 보고된 유전자가 매우 적은 것을 알 수 있으며, 30% 정도는 기능이 알려져 있지 않은 유전자로 파악되고 있는데, 이는 GenBank의 dbEST (총 17,618,241개, 2003년 6월 현재)중 오이(*Cucumis sativus*) 321개, 멜론 (*Cucumis melo*) 6개 정도가 등록되어 있기 때문이다. 따라서, Table 1.1의 내용의 대부분은 박과식물에서 새로이 보고될 유전자라고 할 수 있다. 그럼에도 BlastN의 결과를 보면, Arabidopsis, potato, tobacco, cotton 등 십자화과, 가지과 식물 등과 매우 높은 sequence homology를 갖고 있음을 알 수 있었다. 이러한 sequence homology는 물론 기본적인 세포생명 유지에 필요한 구조적 단백질들에서 확연히 나타났다.

한편, 오이의 mRNA에 대한 Arabidopsis cDNA microarray를 시험한 결과 Arabidopsis

mRNA에 비하여 매우 낮은 signal intensity를 보여 실제로 species 특이적인 sequence variation은 존재하는 것으로 보인다.

바이러스 감염의 경우, 구조단백질 및 세포활성에 기본적으로 필요한 전사체들이 많이 나타난 것은 바이러스가 식물세포 내로 침입 후, 식물세포의 전사체와 단백질을 이용하여 복제, 증식하는 의존적인 기생체이기 때문으로 생각된다. 식물의 생육과 수량감소에 결정적인 영향을 줄 수 있는 바이러스의 감염에 대한 연구는 저항성유전자를 갖는 식물체를 이용하여 저항성 기작을 탐색하는 것도 매우 중요하지만, 감수성 식물체의 감염기작을 이해함으로써 바이러스의 증식과정을 이해하는 것도 중요한 방향으로 판단하고 있다.

Table 1.1에서 볼 수 있듯이 ZGMMV 감염시 알려진 대부분의 식물세포 반응 관련 유전자들이 다량 ESTs로 확보되었음을 알 수 있다. 물론, cDNA library의 제작을 위한 바이러스의 접종은 상처(wounding)와 같이 이루어지기 때문에 wound-induced transcripts가 동시에 발현되지만, 기존에 보고된 논문을 기초로 볼 때, 확보된 ESTs중 많은 부분이 확실히 바이러스의 침입, 복제, virion의 재형성 및 cell to cell movement (short distance movement)의 과정에서 식물이 반응하는 전사체로 판단되었다.

Clone identification이 이루어진 유전자들은 GenBank에 ESTs로 등록 준비 중이며, 현재 실험실 내에 freezer medium으로 보관하고 있다.

1.2.2. 바이러스 진단용 cDNA chip의 개발

본 연구내용은 제 2 세부과제와 공동으로 개발한 내용이다.

농업 현장 및 농산물 검역소 등에서는 분석하고자 하는 바이러스의 충분한 정보를 갖고 있지 않은 경우, 바이러스를 검출하기는 매우 어렵다. 즉, 박과식물의 경우로 예를 들어보면, ZGMMV, KGMMV, CGMMV, ZYMV, WMV, CMV 등 매우 많은 종류의 바이러스가 식물체 혹은 종피 등에 존재할 수 있는데, 이를 검정하기 위해서는 많은 횟수의 실험이 요구되며, 최근 많이 이용되는 multiplex PCR을 이용하는 경우에도 한번에 10가지 바이러스를 동시에 검정하는 것은 불가능에 가깝다. 이러한 현실적 고충을 해결하고자, 본 연구는 박과식물 및 원예작물에 존재할 수 있는 바이러스에 대한 정보를 수집하고, 이 내용을 하나의 슬라이드에 array 한 후, 검사자가 바이러스 종류

에 구애받지 않고 식물체를 검정할 수 있는 도구를 제안하였다.

따라서, 본 연구에서는 우선 각기 서로 다른 바이러스의 외피단백질의 특정 부위를 PCR로 증폭, 정제하고 slide에 spotting한 후, Cy5/Cy3 형광염색시약을 labeling 시킨 감염식물의 total RNA와 hybridization시켜 그 결과를 얻는 방안을 설계하였다.

바이러스의 nucleotide 및 혈청학적 연관관계에 근거하여 박과식물 바이러스 검정용 cDNA chip을 설계하였다. 4가지의 서로 다른 박과식물 감염성 tobacoviruse (target virus)들을 선택하였으며, 대상 바이러스들은 ZGMMV, CGMMV, KGMMV 및 CFMMV였다. 그 결과는 Fig 1.5와 같았다.

처음 시도할 때는 glass slide를 이용하여 검정하고자 하였으나, 형광강도가 매우 약하였고, cross reaction이 많이 일어나는 단점이 있어 membrane-coated slide를 사용하여 이러한 단점을 극복할 수 있었다. 물론, membrane-coated slide의 경우 background signal이 나타나는 단점이 보였지만, 몇가지 실험방법의 변형으로 target virus spot에 상대적으로 매우 강한 결합을 하여 형광강도가 서로 구별할 수 있을 만큼 높게 나타나 본 연구목적에 부합하였다.

ZGMMV에 감염된 오이 식물의 RNA로 만들어진 probe를 적용하였을 경우, Fig 1.2.2.2A에 나타나는 것처럼 ZGMMV spot에는 가장 강하게 결합하였고, 상대적으로 KGMMV와 CFMMV에는 약하게 결합한 결과를 보여주었다.

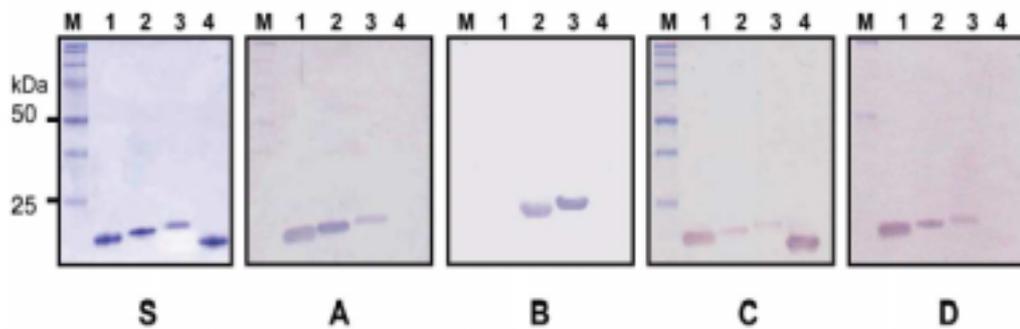


Fig. 1.5. Western blot hybridization을 이용하여 결정된 4가지 서로 다른 박과식물 감염성 tobamoviruse들의 혈청학적 유연관계.

Lane (M) SDS-prestained protein markers; (1) CGMMV; (2) ZGMMV; (3) KGMMV; (4) CFMMV. Panel (S), Coomassie-stained SDS-PAGE Panels (A), (B), (C), (D), Western blots mmunoprobed with (A) ZGMMV; (B) KGMMV; (C) CFMMV; (D) CGMMV antisera.

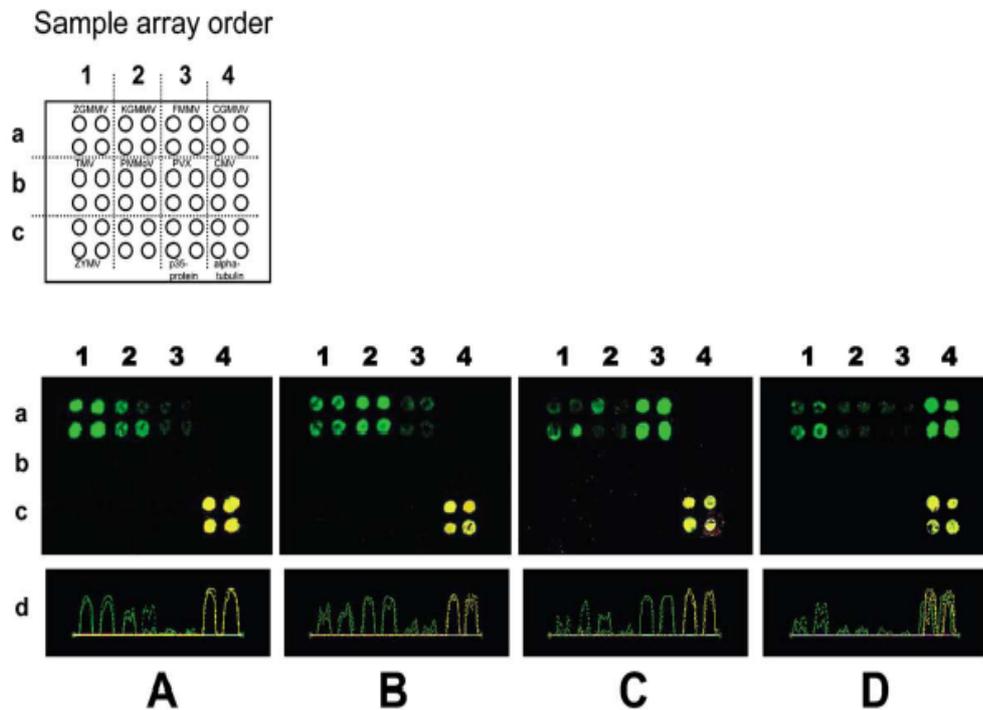


Fig. 1.6. 4가지 박과식물 감염성 tobamovirus의 검정에 사용된 식물 바이러스 cDNA chip 분석

샘플의 array 순서 (a, b, c and 1, 2, 3, 4) 는 그림의 내용과 같음.

Panels (A), (B), (C), (D), hybridization of cDNA chip probed to (A) ZGMMV; (B) KGMMV; (C) CFMMV; (D) CGMMV.

Row (d)는 cDNA chip hybridization시 나타난 형광강도 density graph임.

바이러스 검정용 chip을 이용하여 바이러스의 종류 및 존재농도를 결정 (정성 및 정량분석)하기 위해서는 실제 검정시 건전한 식물체에 존재하는 internal control (standard)과 다른 오염원 및 non-specific probe를 구별할 수 있는 유전자가 필요한데, 본 연구에서는 2개의 housekeeping 유전자를 사용하였다. 건전 식물체에 대한 control로 Arabidopsis에서 얻어진 alpha-tubulin과 다른 하나는 사람의 발암관련 유전자인 p35-protein gene을 이용하였다. 그 결과 연구에서 이루어진 모든 slide의 결과에서 일정한 수준으로 발현 혹은 미발현되는 결과를 얻을 수 있었다.

다른 바이러스 probe 조합과 목표 바이러스 spot과의 hybridization 결과도 ZGMMV의 경우와 유사하였다(Fig. 1.6 B, C, D). 바이러스 probe와 목표 바이러스 사이의

nucleotide sequence 동질성은 실제 슬라이드에서 나타나는 형광강도의 정도와 고도의 유의성을 보여주었다 (Table 1.6). 이 signal은 특정 바이러스의 검정에 이미지 파일로 이용될 수 있을 것으로 여겨져 바이러스의 동정과 분류에 매우 유용한 자료로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

Table 1.6. ZGMMV와 다른 tobamovirus들과의 nucleotide (nt) 및 coat protein amino acid (aa)의 상동성 (sequence similarity percentage) 비교.

nt	ZGMMV	KGMMV	CFMMV	CGMMV
ZGMMV		81.0	76.9	56.1
KGMMV	81.0		80.0	54.1
CFMMV	76.9	80.0		53.5
CGMMV	56.1	54.1	53.5	

aa	ZGMMV	KGMMV	CFMMV	CGMMV
ZGMMV		77.6	77.6	45.3
KGMMV	77.6		81.4	46.6
CFMMV	77.6	81.4		45.3
CGMMV	45.3	46.6	45.3	

목표 바이러스 spot 중 TMV와 PMMoV는 시험한 4가지 박과바이러스와 반응하지 않았는데, 이것은 기존에 보고된 (Yoon et al., 2002)에서의 결과처럼 nucleotide sequence의 상동성이 40% 이하이기 때문인 것으로 보여진다.

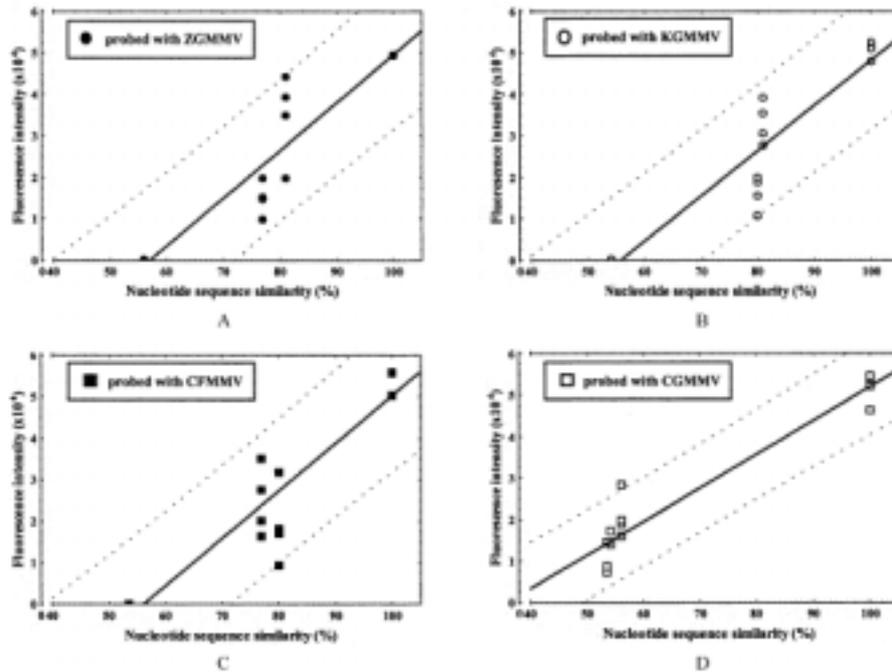


Fig. 1.7. 각각의 바이러스 특이 probe와 목표 바이러스 사이의 결합 형광강도 및 nucleotide 염기서열 사이의 scatter diagrams.

635nm 및 532nm에서의 형광강도에서 각 파장의 background 형광강도를 빼 준 값에 대하여 각 슬라이드의 alpha-tubuline의 형광강도값으로 normalization 한 결과이다. 이미지의 scan과 통계처리는 GenePix Pro (ver 4.1. Axon Instrument) 프로그램을 이용하였다. (A)와 (D)는 ZGMMV, KGMMV, CFMMV와 CGMMV 각각의 외피단백질에 대한 cDNA를 Cy3로 labeling한 결과임.

Each regression value (A) $6.5709 + 0.1153x$, $R^2 0.8607$; (B) $6.0771 + 0.109x$, $R^2 0.8749$; (C) $6.4391 + 0.1147x$, $R^2 0.8678$; (D) $2.9197 + 0.0812x$, $R^2 0.9264$.

Dotted line은 predicted 95% confidence intervals임.

(G.P. Lee et al. / Journal of Virological Methods 110 (2003) 19:24-23)

본 연구에서는 바이러스 검정용 cDNA chip microarray를 위하여 간이 수동 arrayer를 이용하였는데(Fig. 1.7), 그 적용성은 약 765개의 spot만을 array 할 수 있는 소규모의 실험용 arrayer라고 할 수 있다. 따라서, 최근 사용되고 있는 automatic arrayer를 이용한

다면, 단위 슬라이드당 더 적은 양의 바이러스 PCR product 혹은 oligomer를 이용하여 더 많은 개수의 spot을 array할 수 있어 현실적인 cDNA-chip 제작에 도움이 될 수 있으리라 사료된다.

이 연구는 세계적으로 처음으로 시도되고 publish (Lee et al., 2003)된 cDNA chip 기술을 이용한 식물바이러스 검정 기법의 결과라 할 수 있다. 이 기술을 다른 식물바이러스의 검정에 적용한다면, 바이러스의 genus 또는 strain 수준에서 구별이 가능한 매우 유용한 검정기법이 될 수 있을 것으로 여겨지며, 또한 바이러스 유전자를 변형시켜 식물에 도입한 형질전환체 (GMO)의 모니터링과 검출에 매우 효과적일 것으로 사료된다.

1.2.3. 특이발현 유전자의 탐색

가. 특이 발현 유전자의 스크린 및 profiling

cDNA microarray를 이용하여 바이러스 감염의 스트레스 조건에서 특이적으로 발현하는 유전자를 스크린 하고자 하였다. 특히, 3세부과제에서 클로닝되는 유전자에 대한 cDNA microarray를 적용하였다. SSH(subtractive suppression hybridization)는 상당히 높은 비율로 특이발현 유전자를 선발할 수 있는 방법이지만, 또한 많은 클론들이 높은 redundancy를 보여준다. 따라서, 각각의 클론에 대한 발현량을 total RNA를 대상으로 스크린하는 과정이 필요한데, 300여 개의 클론들에 대한 Northern 과정을 한번의 hybridization을 통하여 스크린 할 수 있었다.

SSH를 이용하여 mock inoculation한 처리구에 비하여 상대적으로 differential 하게 induction 되었던 sequence들을 선발하였고, 이들 중 rRNA와 비슷한 크기이거나, 혹은 Rubisco large/small subunit sequence들과 homology를 갖는 sequence들은 colony hybridization을 통하여 제외시켰다.

선발된 clone들은 T-vector의 universal primer (T7/SP6 promoter sequence)를 이용하여 PCR 증폭 (reaction volume: 100ul) 였고, 그 결과는 다음 Fig 1.8과 같다. 각 lane별로 DNA 양을 정량하였다.



Fig. 1.8. Selection and PCR amplification of each cloned differential sequences between virus inoculated and mock inoculated plants. These amplified sequences were arrayed on commercial Amine coated slide (Superamine Slide; Arrayit) with manual DNA arrayer (V&P Scientific). Each loading amount was of 3ul of 50ul reaction.

특이 클론의 선별을 위하여 total RNA를 준비하였고(Fig. 1.9), Northern Analysis를 통하여 RNA의 농도와 integrity를 확인하였다(Fig. 1.10). 또한 cDNA-chip에 hybridization을 위해서는 reverse transcription이 균일하게 되어야하므로, 1st-strand cDNA의 합성효율을 비교 분석하였다 (Fig. 1.11).

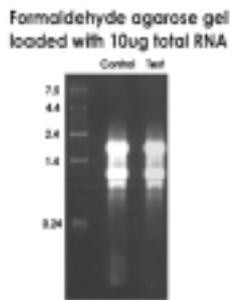


Fig. 1.9. Total RNA Isolation Result

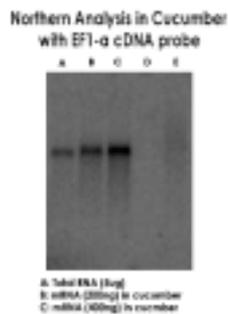


Fig. 1.10. Northern Analysis Result

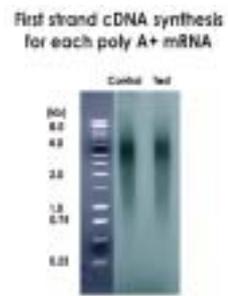


Fig. 1.11. cDNA(1st) synthesis Result

연구수행방법에 요약된 microarray 방법을 통하여, Fig. 1.12와 같은 cDNA microarray image를 얻을 수 있었다. Mock treatment의 경우 red dye (Cy5)를 이용하였고, array된

clone들은 SSH를 통하여 virus에 의해서만 유도된 clone들을 선별한 것이기 때문에 red의 image는 나타나지 않았다. 또한, 본 결과그림으로 살펴볼 때, SSH를 통하여 다량 발현한 clone으로 선별하였다 하더라도, mock treatment에서도 역시 다량으로 발현하는 clone은 yellow의 색을 나타낸 것을 보여주고 있다.

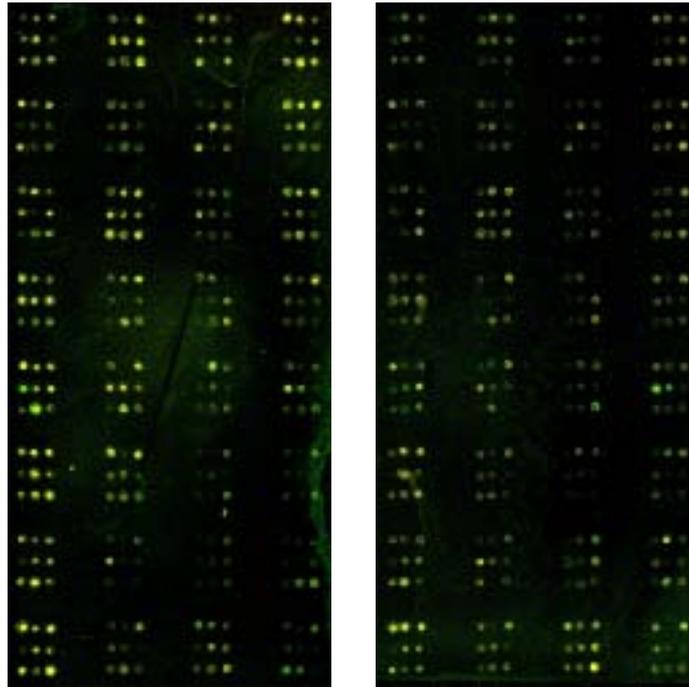


Fig. 1.12. ZGMMV (left) and CGMMV (right) induced cucumber mRNA profiling with cDNA microarray.

이들 각각의 clone들은 sequencing하여 최종적으로 cDNA-chip을 위한 유전자 DB에 추가하였다. 또한 결과 이미지를 보면 바이러스의 strain에 따라서 서로 다른 profile을 보여주고 있다. 실제로 ZGMMV와 CGMMV는 오이에서 각각 다른 병징과 감염양상을 보인다.

cDNA microarray의 결과를 확증하기 위하여 몇가지 clone들에 대한 RNA gel blotting을 실시하였다 (Fig. 1.13).

이들 결과와 microarray를 통하여 얻은 normalized data 간에는 상당히 일치하는 결과

를 나타내어 성공적인 screening을 수행할 수 있었다.

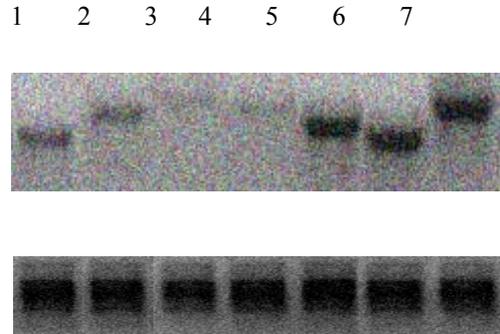


Fig. 1.13. RNA gel blot analysis for with different RNA probes. 1: clone No. 3, 2: clone No. 22, 3: clone No. 23, 4: clone No. 48, 5: clone No. 50, 6: EF1-alpha, 7: rRNA small subunit cDNA

본 연구를 통하여, 식물체와 바이러스 간의 상호작용을 좀더 면밀하고, 자세히 탐색할 수 있었고, 기 보고된 식물체에 대한 생물학적 혹은 비생물학적 스트레스와의 비교를 통하여, 식물체는 바이러스 감염시 fungi 등의 감염에 대한 생물학적 반응과정 보다는, 비생물학적 스트레스에 대한 반응과정과 좀더 많은 부분을 공유하고 있음을 알 수 있었다. 그리고, microarray의 방법적 적용은 전사발현의 profiling에도 매우 유용하지만, competitive hybridization과정을 포함하므로, 특이적 발현 유전자의 screening에 적용 시에도 매우 효율적이었다.

나. Arabidopsis cDNA-chip을 이용한 기능성 유전체 발현 검정

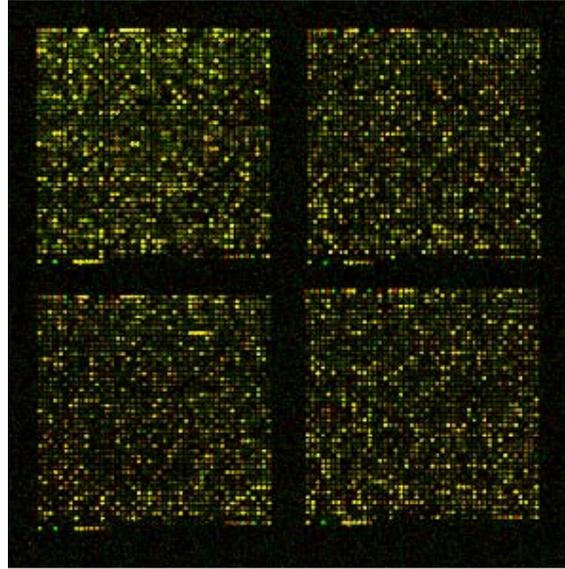
제2세부과제 및 위탁과제와 공동으로 Arabidopsis에 오이 기주 바이러스 중의 하나인 CMV를 감염시켜 재료를 확보하고 있으며, Arabidopsis의 virus 감염시 발현하는 유전자의 profiling을 위하여 약 8000여개의 클론이 array되어 있는 Incyte사의 cDNA chip을 확보하였다. 바이러스 감염시 uncoating에 관여하는 (감염 후, 3시간 이내) virus inducible 식물 유전자 스크린을 실시하였다.

이 연구의 목적은 바이러스의 감염시 식물체의 어떤 유전자가 발현 혹은 감소되는 지에 대한 기본적인 정보를 얻고자 실시되었다. 현재, 가장 많이 이용되는 식물체의 cDNA-chip은 모델 식물인 Arabidopsis용으로 Arabidopsis는 게놈 크기가 125Mbp로 매우 작고, 전체 genome 염기서열이 밝혀져 있어, 매우 유용한 정보를 다량 얻을 수 있는 장점을 갖고 있다. 연구과제의 오이 cDNA-chip의 완전한 제작이 3차년도에 이르러 서야 가능하여서 먼저 Arabidopsis chip을 이용하여 바이러스에 의하여 유도되는 유전자의 기본적인 정보를 획득하고 또한, 오이의 mRNA profiling 가능 여부를 확인하고자 하였다.

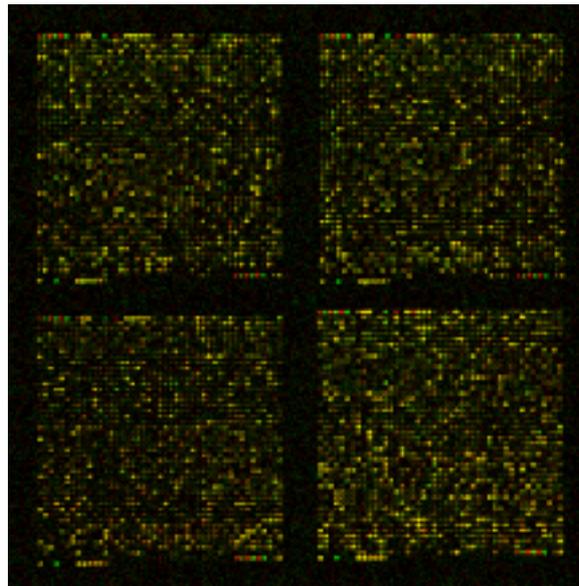
일반적으로 식물 바이러스는 식물체에 감염될 경우, 1시간 정도면, 감염전의 virion 상태로 다시 복제 및 재생산이 가능한 것으로 보고되어 있다. 이 경우, 바이러스의 uncoating, replication, short distance movement, coat protein production, re-coating의 과정을 겪는 것으로 판단된다. 따라서, 약 1-3시간동안, 실제로는 감염부위에서 위의 전 과정을 다 이루어내는 것으로 추론하고, 본 실험을 수행하였다.

또한, Arabidopsis의 경우, 매우 다양한 ecotype 들이 존재하는데, CMV (cucumber mosaic virus)의 경우에는 ecotype Col-0에는 감염성을 보이고, ecotype C24에서는 local region을 형성시킨다 (저항성 표현형). 따라서, 본 연구는 두가지 ecotype에 CMV를 감염시키고, 1시간 및 3시간 후에 접종엽을 수확하여 식물체에서 전사되는 유전자의 profiling을 얻고자 하였다. 또한, CMV는 오이를 기주로 하는 바이러스이므로, 오이에 동일 CMV를 감염시킨 후, 3시간 후의 오이 유전자의 profiling을 같이 수행하였다 (Fig 1.14).

Incyte chip의 특징은 다양한 control gene과 spiking gene을 사용하여, chip의 quality control을 수행하고 있다는 점이다. 이를 위하여, 본 연구에서는 식물 mRNA에 대한 최대한 정확한 quality control을 수행하여, spiking control (Cy3/Cy5 = 1:2, 1:5, 1:10 및 Cy3/Cy5 = 2:1, 5:1, 10:1)의 결과값이 동일하게 나타나도록 하였고, 9가지 27개의 housekeeping gene들에서 슬라이드간의 변이를 최소화 하였으며, negative control인 non-plant gene들에 대한 QC data를 얻을 수 있었다.

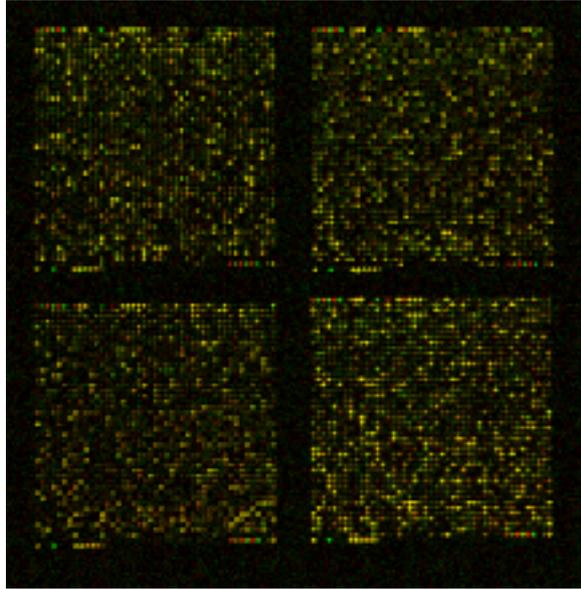


(A)

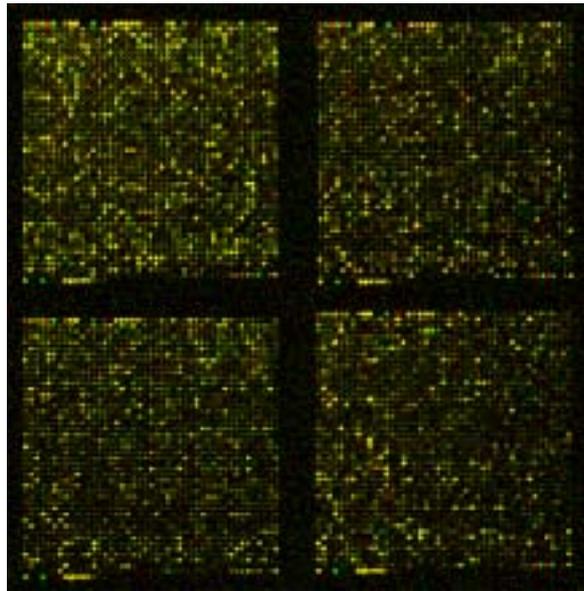


(B)

Fig 1.14. Transcripts profiling with Cy5-labeled-cDNAs of CMV-fny-inoculated Arabidopsis ecotype Col-0. Mock cDNAs were also labeled with Cy-3 dye. 1hr (A) and 3hrs (B) after inoculation, respectively.



(C)



(D)

Fig 1.15. Transcripts profiling with Cy5-labeled cDNA of CMV-fny-inoculated Arabidopsis ecotype C24. Mock cDNAs were also labeled with Cy-3 dye.1hr (A) and 3hrs (B) after inoculation, respectively.

Fig. 1.14는 Col-0에 CMV를 감염시킨 후, 1시간째 수확한 잎을 이용한 결과 (A), Col-0 3hr (B)를 나타내며, Fig. 1.15는 CMV 저항성 ecotype인 C24 1hr (C), C24 3hr (D)의 profiling 결과를 보여주고 있다. 약 8000여개의 유전자가 4개의 block을 구성하며, array되어 있는데, 이중에서 약 600여개는 앞서 기술한 control gene들로 구성되어 있다. Red image는 바이러스 감염에 의하여 발현이 증가되는 유전자를 의미하며, Green image는 발현이 감소되는, 그리고, Yellow image는 감염잎 및 mock 접종잎 (buffer로만 접종)에서 동시에 발현되는 유전자를 의미한다.

Cy5와 Cy3의 형광강도 및 reverse transcription시에 labeling 효율이 달라질 수 있는 점을 고려하여 각각의 실험에 대하여 Cy5와 Cy3의 dye swap 실험을 수행하였다. Fig. 1.16에서 볼 수 있는 것처럼 상당히 높은 재현성을 보여주어 실험의 신뢰도를 높일 수 있었다.

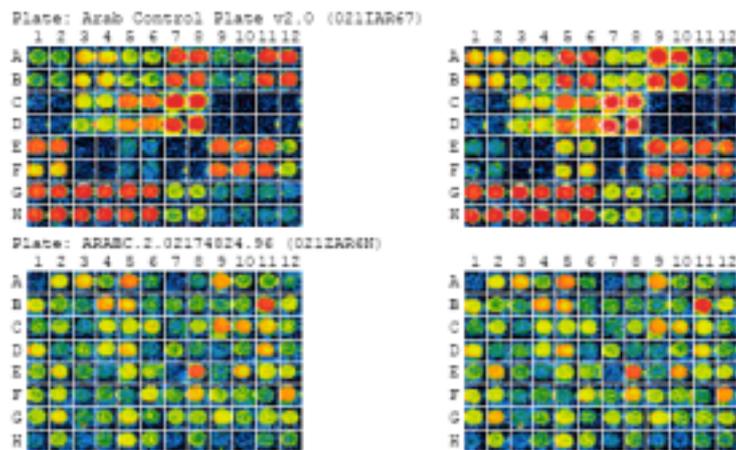


Fig. 1.16. Examples of dye-swap experiment results

Mock과 바이러스 접종후 발현하는 유전자군들은 각기 Cy3 (green)과 Cy5 (red)로 나타나게 되는데 이들 간의 비율은 특징적인 산포도 (scatter plot)를 나타내게 된다. Fig. 1.17의 경우 Col-0와 C24에서 바이러스 접종후 1시간 (A) 및 (C)째에 그리고, 3시간 째 (B) 및 (D)의 scatter plot을 보여주고 있다. 2배에서 3배까지 발현하는 유전자들의 집단을 볼 수 있다.

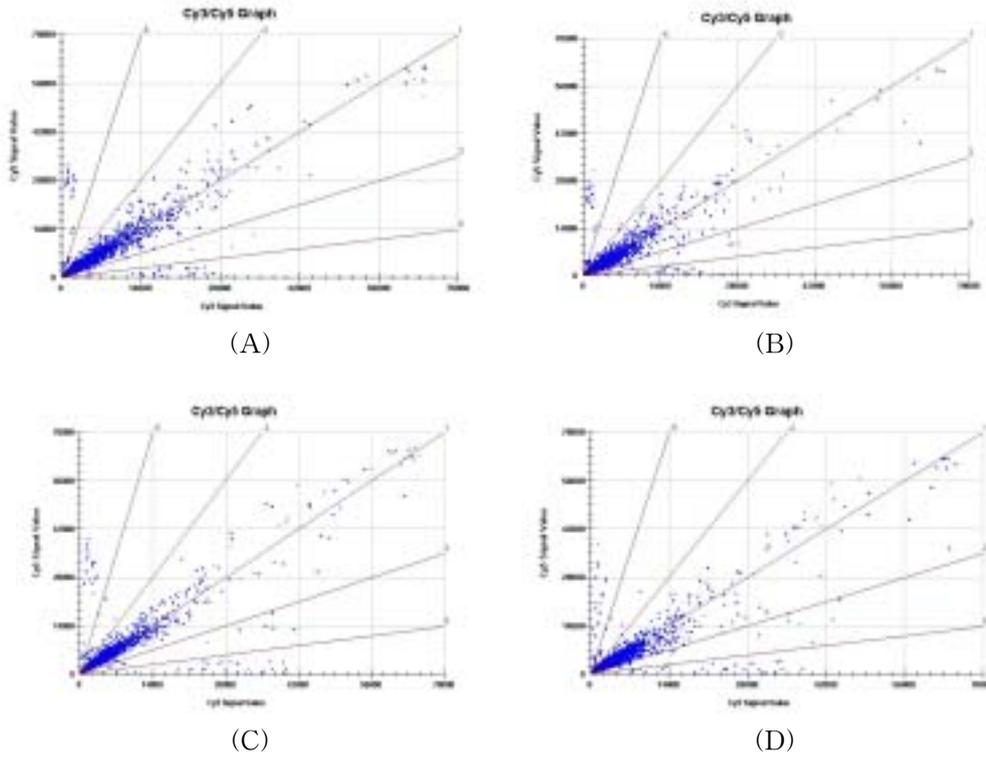


Fig. 1.17. Scatter plot of Cy3/Cy5 signal intensities in Col-0 and C24. 1hr (A), 3hrs (B) after CMV inoculation in Col-0; 1hr (C) and 3hrs (D) after CMV inoculation in C24.

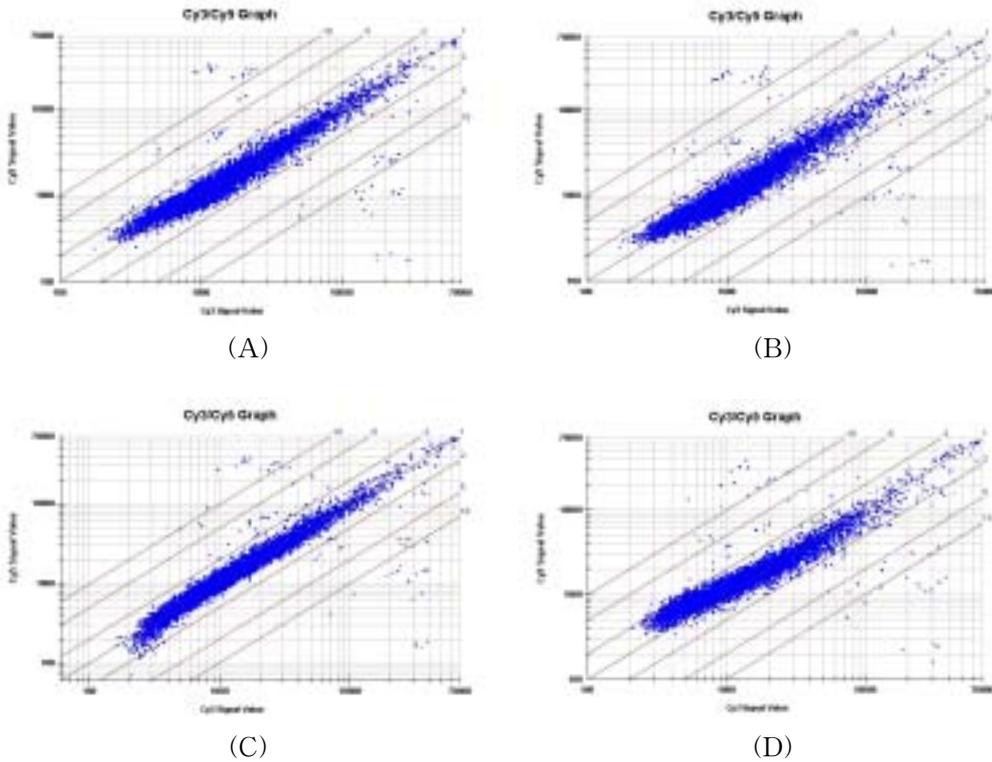


Fig. 1.18. Scatter plot of Cy3/Cy5 log signal intensities in Col-0 and C24. 1hr (A), 3hrs (B) after CMV inoculation in Col-0; 1hr (C) and 3hrs (D) after CMV inoculation in C24.

Fig. 1.18의 경우 Cy3/Cy5의 log-transformed graph로서 각 spot의 형광강도가 어떤 분포를 하고 있는 가를 보여준다. Data의 분포에 대한 수정은 normalization으로 가능하며, 이것은 매우 높거나 낮은 형광강도의 변이를 충분히 정규화 할 수 있는 방법으로 알려져 있다.

그 계산식은 다음과 같다.

Green intensity (532nm) / Normalized Red intensity (635nm)

여기서, normalized red intensity = (Green intensity median / Red normalized median)

Normalization (본 연구에서는 전체 유전자에 대하여 normalization을 수행) 후, 발현량을 비교한 결과, 증가량은 최대 2.7배까지 나타났고, 감소량은 최대 2배까지 나타났

다. 바이러스 감염 후, 증가된 총 유전자의 비율은 C24 3hr의 경우를 예로 들면, 70% (5240/7400)이며, 감소된 유전자의 비율은 22% (1682/7400)이었다. 이때, 유의성 있게 housekeeping gene들보다 더 많이 발현된 유전자의 비율을 보면, 40% (2953/7400)의 비율을 보였다. 이 결과는 기존의 다른 Arabidopsis chip 보다 현저히 높은 발현비율을 나타내는 것으로 Incyte chip의 array된 클론들이 본 연구에 매우 적합함을 보여주고 있다.

전체적인 발현양상의 비교 및 시간별 혹은 ecotype별 발현 유전자군의 분류를 위하여 Hierarchical clustering 분석 (Pierson squared)을 수행하였다 (Fig. 1.19).

한편, 위의 결과를 토대로 전체 발현증가 및 감소된 유전자에 대한 clustering 결과를 보면, Fig. 1.19는 전체 clustering 중 일부만을 표시한 결과인데, C24 3hr에서만 특이적으로 발현량이 증가하는 유전자들이 clustering 된 것을 볼 수 있다.

그림 오른쪽의 number는 Genebank의 accession number로 각각의 유전자에 대한 information을 바로 확인할 수 있다. 이 결과들을 좀더 자세히 확인해 보면, Fig. 1.19(B)와 같이 볼 수 있는데, 붉은 색은 control에 비하여 발현량이 증가된 것, 초록색은 감소한 것, 검은색은 동일하게 발현하고 있는 것, 그리고 회색은 hybridization이 아예 이루어지지 않은 것을 의미한다.

본 연구결과를 통하여 얻어진 Arabidopsis 유전자에 대한 information 및 자세한 검토는 현재 분석 중이며, 다른 strain의 바이러스 및 생물학적 혹은 비생물학적 스트레스에 의한 Arabidopsis profiling data와 비교 검토 중이다.

Fig. 1.20은 K-mean을 이용한 clustering을 Col-0의 1hr와 3hr 사이에서 비교한 결과로 3hr에서 발현량이 증가하는 유전자들을 확연히 구별할 수 있었다. 또한, hierarchical clustering을 통하여 더욱 확실히 1) 3hr에서 증가하는 유전자군, 2) 1hr, 3hr에서 동일하게 발현이 감소된 유전자군, 3) 1hr, 3hr에서 동일하게 혹은 더욱 발현이 증가하는 유전자군 등으로 구분이 가능하였다 (Fig 1.21).

이러한 grouping을 더욱 확실히 확인하고자, 2-D self-organizing map clustering 수행한 결과 Fig 1.22와 같은 결과를 얻을 수 있었다.

본 결과를 볼 때, 매우 높은 비율로 유전자들이 발현되었고, 다양한 발현패턴의 clustering이 가능하였는데, 본 연구목적의 하나인, 저항성 식물체에서의 유전자 발현양

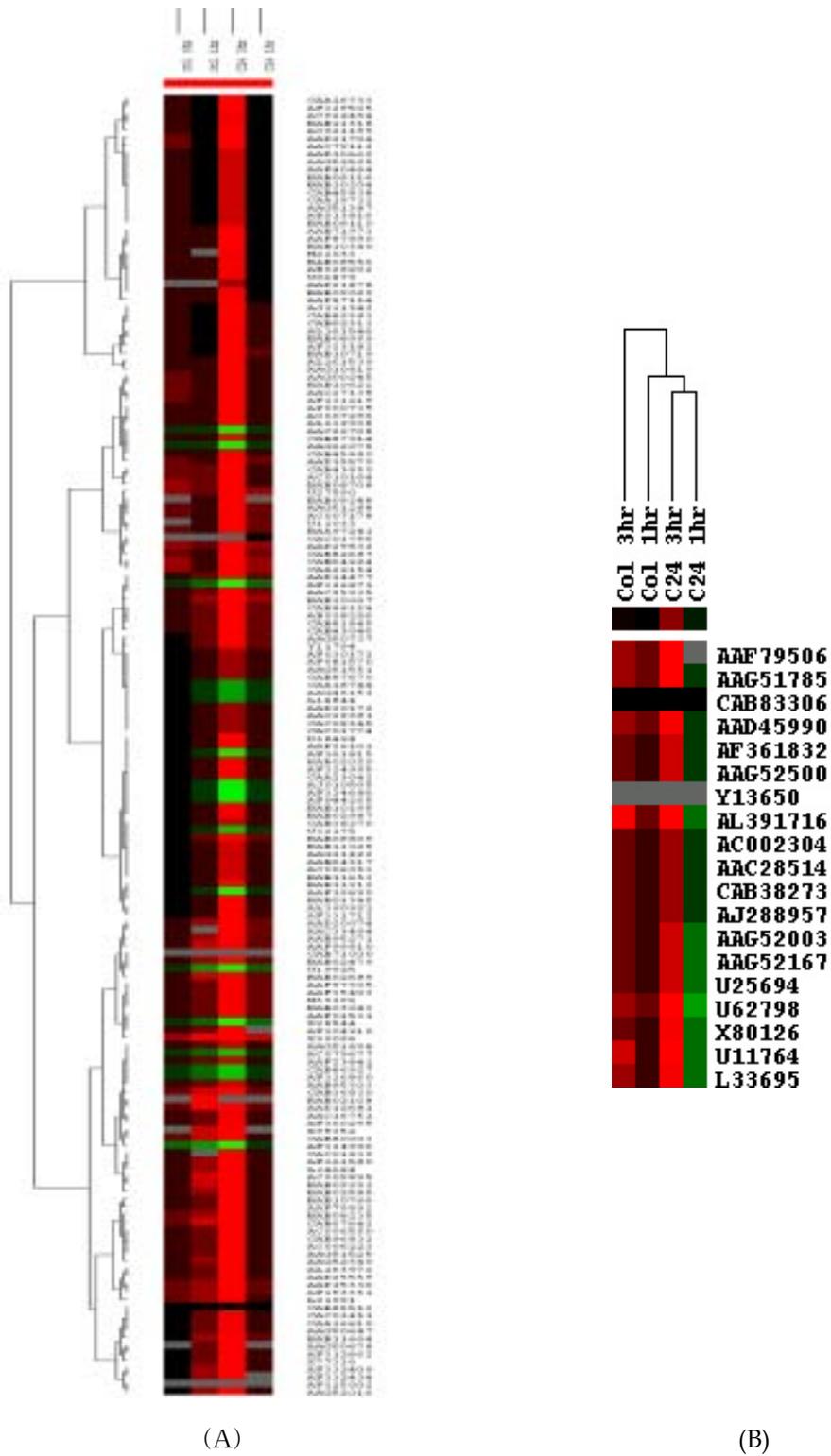


Fig. 1.19. Hierarchical clustering of the Arabidopsis chip data.

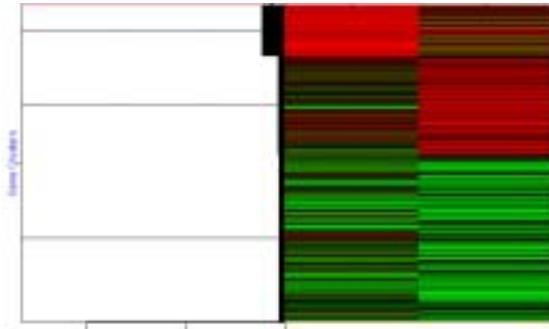


Fig. 1.20. K-means clustering of the Arabidopsis chip data in Col-0.

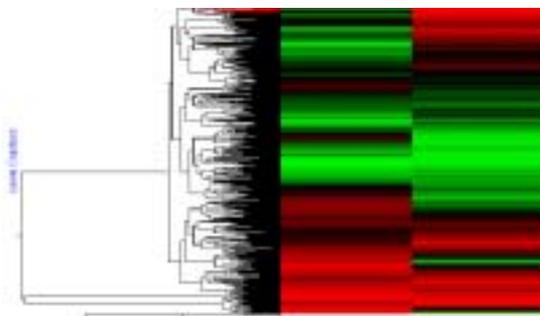


Fig. 1.21. K-means clustering of the Arabidopsis chip data in C24.

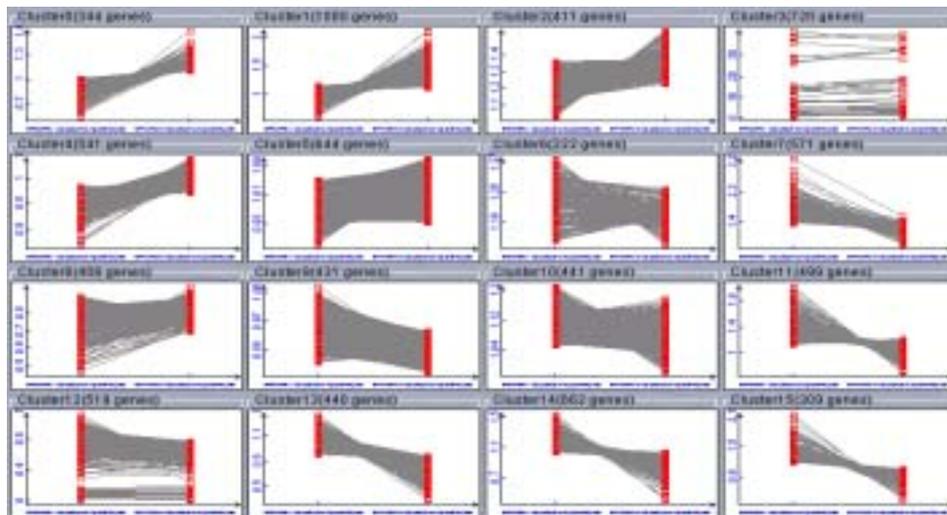


Fig. 1.22. 2-D self-organizing map (SOM) 4X4 clustering of the Arabidopsis chip data.

상을 비교하고자, 전체 실험구를 모두 Hierarchical clustering 한 결과, 매우 특이한 결과를 얻을 수 있었다 (이 경우, 분석프로그램은 Stanford 대학에서 free-distribution하는 Cluster 및 Tree View program을 이용하였다).

즉, 저항성 식물체인 C24 1hr 및 3hr에서 발현하는 유전자군이 같은 group으로 clustering되었고, 여기에 감수성인 Col-0 1hr에서 발현하는 유전자군, 그리고, Col-0 3hr에서 발현하는 유전자군으로 나뉘어졌다.

Arabidopsis ecotype Col-0와 C24에 CMV-fny를 감염시켰을 때, 각기 1시간 및 3시간 경과후 발현하는 유전자의 양상을 구체적으로 보기 위하여 mock 처리구 (주료 wounding)에 비하여 2배이상 발현한 유전자의 정보를 요약하여 Table 1.7, 1.8, 1.9, 1.10에 나타내었다.

Table 1.7. Detail information of CMV-fny-induced genes on 1hr after inoculation in Col-0.

GEMID	Cy5/ Cy3	GeneName	AccNum
022RCNNI ont	-3.4	Arabidopsis Landsberg erecta phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene	L33677
022RCNNI ati	-3.2	F7G19.1	AAB70396
022RCNNI ati	-3.2	Arabidopsis thaliana calreticulin (Crt3) mRNA, complete cds.	U66345
022RCNNI and	-3.1	F14G24.3; putative lipase; 20450-21648	AAG52273
022RCNNI put	-3.1	F24K9.22; unknown protein; 80797-81587	AAG51441
022RCNNI ati	-3.1	A.thaliana mRNA for beta-fructosidase.	X74514
022RCNNI unk	-3.1	Arabidopsis thaliana protodermal factor 1 (PDF1) mRNA, complete cds.	AF141375
022RCNNI que	-3.0	Arabidopsis thaliana (strain Columbia) phenylalanine ammonia-lyase (PAL2)	L33678
022RCNNI 1A	-3.0	Arabidopsis thaliana ribonuclease (RNS1) mRNA, complete cds.	U05206
022RCNNI s t	-3.0	Internal_Control_N	
022RCNNI que	-3.0	F24A6.100; putative protein	CAA23067
022RCNNI pu	-2.9	Genomic Sequence For Arabidopsis thaliana Clone C6L9,	AC012477
022RCNNI s t	-2.8	At2g17120	AAB81674
022RCNNI s t	-2.8	Arabidopsis thaliana AT3g04520 (AT3g04520/T27C4_17) mRNA, complete cds.	AF325033
022RCNNI s t	-2.8	Arabidopsis thaliana germin-like protein (GLP6) mRNA, complete cds.	U75194
022RCNNI ont	-2.7	AT4g30530; putative protein	CAB79771
022RCNNI s t	-2.7	A.thaliana mRNA for AtMYB15 R2R3-MYB transcription factor.	Y14207
022RCNNI s t	-2.6	Arabidopsis thaliana unknown protein (At2g39650) mRNA, complete cds.	AF325085
022RCNNI mR	-2.6	Sequence of BAC F14D7 from Arabidopsis thaliana chromosome 1	AC021198
022RCNNI cat	-2.6	F12M12_80; putative protein	CAB90938
022RCNNI pu	-2.6	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 3, BAC clone: T20D4.	AP002059
022RCNNI ke	-2.4	Arabidopsis thaliana protein phosphatase 2A 62 kDa B" regulatory subunit mRNA	AF165429
022RCNNI pu	-2.4	F4P12_260; putative protein	CAB67663
022RCNNI pu	-2.4	At2g41170	AAD11995
022RCNNI 1A	-2.4	Arabidopsis thaliana chromosome I BAC F25P12 genomic sequence	AC009323

Table 1.7A. Detail information of CMV-fny-induced genes on 1hr after inoculation in Col-0 (continued).

GEMID	Cy5/ Cy3	GeneName	AccNum
022RCNNI s t	-2.3	F14J22.5	AAG13060
022RCNNI 1A	-2.3	T7I23.15	AAC24379
022RCNNI 1A	-2.3	F24P17.24	AAF08583
022RCNNI 1A	-2.3	At2g40360; putative WD-40 repeat protein	AAD25679
022RCNNI s t	-2.2	AT4g34230; cinnamyl alcohol dehydrogenase-like protein	CAA17549
022RCNNI no	-2.1	A.thaliana CAD gene for cinnamyl alcohol dehydrogenase.	Z31715
022RCNNI and	-2.1	A.thaliana gene for methyltransferase.	X77335
022RCNNI 3-h	-2.1	AT4g04500; putative receptor-like protein kinase	CAB77918
022RCNNI s t	-2.1	F11P17.17	AAB71484
022RCNNI s t	-2.0	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 3, P1 clone: MLM24.	AB015474
022RCNNI ge	-2.0	AT4g26630; putative protein	CAB43859
022RCNNI s t	-2.0	Arabidopsis thaliana chromosome I BAC F25P12 genomic sequence	AC009323
022RCNNI 1A	-2.0	AT4g34050; caffeoyl-CoA O-methyltransferase-like protein	CAA17567
022RCNNI s t	-2.0	F11P17.17	AAB71484
022RCNNI 1A	-2.0	Arabidopsis thaliana CHIV gene.	Y14590
022RCNNI and	-2.0	At2g17120	AAB81674
022RCNNI 1A	-2.0	Arabidopsis thaliana chromosome 1 BAC T11I11 genomic sequence	AC012680
022RCNNI s t	-2.0	At2g27580	AAC73042
022RCNNI s t	-2.0	Arabidopsis (Landsberg erecta) phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene	L33677
022RCNNI s t	-2.0	A.thaliana mRNA for lectin-like protein.	X91259
022RCNNI mR	-2.0	flavanone 3-hydroxylase-like protein	BAB11205
022RCNNI pu	-2.0	Arabidopsis thaliana ESCAROLA (ESC) mRNA, complete cds.	AF194974
022RCNNI 1A	-2.0	F22O13.6	AAF99782
022RCNNI 1A	-2.0	histone acetyltransferase HAT B	BAB09892
022RCNNI ety	-2.0	Arabidopsis thaliana unknown mRNA.	U77721
022RCNNI om	-2.0	Arabidopsis thaliana myosin heavy chain-like protein mRNA, complete cds.	U62744
022RCNNI s t	-2.0	F16G20.240; putative protein	CAA20475
022RCNNI ; p	-2.0	Public domain EST	
022RCNNI ain	-2.0	Arabidopsis thaliana dfr gene for dihydroflavonol 4-reductase	AJ251983
022RCNNI s t	-2.0	F21D18.10	AAF79539

Table 1.8. Detail information of CMV-fny-induced genes on 3hr after inoculation in Col-0.

GEM ID	Cy5/ Cy3	GeneName	AccNum
022YCNNJ ont	-3.9	Arabidopsis mRNA for branched-chain amino acid transaminase (bcat4 gene).	AJ271732
022YCNNJ s t	-3.5	T9A4.14	AAC62812
022YCNNJ 2A	-3.4	Arabidopsis putative ethylene responsive element binding protein (K11J9.13)	AF360149
022YCNNJ mR	-3.3	A.thaliana zat10 gene.	X98671
022YCNNJ pu	-3.3	Arabidopsis putative ethylene responsive element binding protein (K11J9.13)	AF360149
022YCNNJ ans	-3.3	CCR4-associated factor-like protein	BAB08323
022YCNNJ iat	-3.3	F15H21.8; unknown protein; 55746-55489	AAG51721
022YCNNJ s t	-3.2	At2g27830	AAC73017
022YCNNJ s t	-3.1	At2g20670	AAD21702
022YCNNJ 2A	-3.1	Arabidopsis thaliana histone H1-3 (His1-3) mRNA, complete cds.	U73781
022YCNNJ 2A	-3.1	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MWD22.	AB023044
022YCNNJ s t	-3.1	Sequence of BAC F21F23 from Arabidopsis thaliana chromosome 1	AC027656
022YCNNJ s t	-3.0	T27I15_150; putative protein	CAB94142
022YCNNJ ; p	-3.0	Arabidopsis thaliana unknown protein (F3F19.11) mRNA, complete cds.	AF325097
022YCNNJ unk	-3.0	FRO2-like protein; NADPH oxidase-like	BAA98161
022YCNNJ pro	-3.0	F17I5.170; putative protein	CAA19880
022YCNNJ pu	-3.0	T18K17.7; putative trypsin inhibitor; 19671-20297	AAG52121
022YCNNJ hyp	-2.9	T10D17_50; CCR4-associated factor 1-like protein	CAB88994
022YCNNJ CC	-2.9	Arabidopsis thaliana J8 mRNA, nuclear gene encoding plastid protein	AF099906
022YCNNJ pu	-2.9	Arabidopsis thaliana unknown protein (F10D13_14) mRNA, complete cds.	AF360201
022YCNNJ s t	-2.9	Arabidopsis thaliana mRNA for putative RNA binding protein.	Y15382
022YCNNJ pu	-2.9	F14G6.19; unknown protein; 77280-78196	AAG51950
022YCNNJ unk	-2.9	Arabidopsis thaliana putative Cys3His zinc finger protein (ATCTH) mRNA	U81238
022YCNNJ s t	-2.9	Arabidopsis AZF3 gene for Cys2/His2-type zinc finger protein 3, partial cds.	AB030732
022YCNNJ OM_	-2.9	F12K8.2	AAF18516
022YCNNJ 2A	-2.9	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MQN23.	AB013395
022YCNNJ s t	-2.9	PnC401; leaf protein	BAA25906
022YCNNJ af	-2.9	YUP8H12R.35	AAC17053
022YCNNJ ike	-2.8	Arabidopsis thaliana Ccr2 mRNA, partial ORF.	L04172
022YCNNJ 2A	-2.8	Arabidopsis thaliana unknown protein (F7H2.1) mRNA, complete cds.	AF332423
022YCNNJ ; p	-2.8	light-regulated glutamine synthetase isoenzyme	S69727
022YCNNJ luc	-2.8	T4C9.120; copper amine oxidase like protein (fragment2)	CAB45975
022YCNNJ s t	-2.8	F25P22.10; feebly-like protein; 35361-32165	AAG52078
022YCNNJ cat	-2.8	gb AAD26355.1 gene_id:MZF16.5 similar to unknown protein	BAB02617
022YCNNJ 5.1	-2.7	gb AAD04946.2 gene_id:F15M7.10 similar to unknown protein	BAB11406
022YCNNJ 6.2	-2.7	F28K19.24	AAF17687
022YCNNJ 1.1	-2.6	Arabidopsis thaliana putative uridylyl transferase (F22K20.9) mRNA	AF360322
022YCNNJ s t	-2.6	Arabidopsis thaliana 2-isopropylmalate synthase (IMS2) mRNA, complete cds.	AF327648
022YCNNJ s t	-2.6	F17J16_30; putative protein	CAB86926
022YCNNJ r-l	-2.6	Arabidopsis putative ERF4 protein (F3M18.20) mRNA, complete cds.	AF360232
022YCNNJ s t	-2.6	putative protein	CAB71049
022YCNNJ rot	-2.6	Arabidopsis thaliana unknown protein (F3F19.11) mRNA, complete cds.	AF325097
022YCNNJ s t	-2.6	F2D10.34	AAF80624
022YCNNJ 2A	-2.6	gb AAF34833.1 gene_id:K19P17.6 similar to unknown protein	BAB10720
022YCNNJ 3.1	-2.6	Arabidopsis thaliana T23O15.13 mRNA, complete cds.	AF324691
022YCNNJ s t	-2.6	Arabidopsis thaliana RING finger protein mRNA, complete cds.	AF134155

Table 1.8A. Detail information of CMV-fny-induced genes on 3hr after inoculation in Col-0 (continued).

GEM ID	Cy5/ Cy3	GeneName	AccNum
022YCENN s t	-2.5	Arabidopsis thaliana putative transcription factor (MYB59) mRNA	AF062894
022YCENN s t	-2.5	F19K16.14; putative carnitine/acylcarnitine translocase; 50581-51656	AAG52250
022YCENN s t	-2.5	Arabidopsis thaliana clone HAT1 homeobox protein mRNA, complete cds.	U09332
022YCENN s t	-2.5	Arabidopsis thaliana RuBisCO small 3b subunit (MXI10.13) mRNA	AF360124
022YCENN s t	-2.5	Arabidopsis thaliana RuBisCO small 3b subunit (MXI10.13) mRNA	AF360124
022YCENN s t	-2.4	Arabidopsis thaliana mRNA for putative beta-galactosidase (BGAL1 gene).	AJ270297
022YCENN s t	-2.4	Arabidopsis thaliana FL5-2I22 mRNA for DC 1.2 homolog, partial cds.	AB046991
022YCENN s t	-2.4	Arabidopsis thaliana RuBisCO small 3b subunit (MXI10.13) mRNA	AF360124
022YCENN OM	-2.4	F19C24.20; unknown protein	AAG50882
022YCENN 2A	-2.4	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 4, BAC clone F26P21 (ESSA project).	AL031804
022YCENN s t	-2.4	At2g26080; putative glycine dehydrogenase	AAC31228
022YCENN pu	-2.4	Arabidopsis thaliana mRNA for RD22BP1, complete cds.	AB000875
022YCENN in-	-2.2	Sequence of BAC F10K1 from Arabidopsis thaliana chromosome 1	AC067971
022YCENN que	-2.2	Arabidopsis thaliana putative c2h2 zinc finger transcription factor mRNA	AF022658
022YCENN s t	-2.2	A.thaliana mRNA for unknown protein, ORF03.	X97485
022YCENN ypo	-2.2	T12H17.80; cytochrome P450 like protein	CAA16554
022YCENN cy	-2.2	Arabidopsis thaliana BAC F7P1.	AF272706
022YCENN and	-2.2	A.thaliana zat12 gene.	X98674
022YCENN and	-2.2	Arabidopsis mRNA for branched-chain amino acid transaminase (bcat4 gene).	AJ271732
022YCENN 2A	-2.2	Arabidopsis thaliana ATP sulfurylase precursor (ASA1) mRNA,	U40715
022YCENN 2A	-2.1	putative protein	CAB86422
022YCENN s t	-2.1	F17I5.170; putative protein	CAA19880
022YCENN pu	-2.1	F2J7.10; zinc finger protein, putative	AAG50803
022YCENN inc	-2.1	Arabidopsis thaliana thioredoxin fl mRNA, complete cds.	AF144385
022YCENN s t	-2.1	putative protein	CAB75767
022YCENN rot	-2.1	Arabidopsis abscisic acid responsive elements-binding factor (ABRE) mRNA	AF093544
022YCENN s t	-2.0	T18A20.12	AAF02862
022YCENN and	-2.0	emb CAB75797.1 gene_id:MYJ24.5 similar to unknown protein	BAB09823
022YCENN 97.	-2.0	Arabidopsis thaliana AtERF6 mRNA for ERF.	AB013301
022YCENN s t	-2.0	At2g36790; putative glucosyl transferase	AAD20155
022YCENN pu	-2.0	F10M6.70; putative protein	CAA16961
022YCENN put	-2.0	Arabidopsis thaliana unknown protein (F25A4.15) mRNA, complete cds.	AF344320
022YCENN pr	-2.0	Arabidopsis thaliana putative transcription factor MYB112 mRNA	AY008377
022YCENN f B	-2.0	F1N19.25	AAF19681
022YCENN 2A	-2.0	Arabidopsis thaliana RING-H2 finger protein RHA1a mRNA, complete cds.	AF078683
022YCENN s t	-2.0	T13J8.190; putative protein	CAB36777
022YCENN pu	-2.0	A.thaliana ATapt2 mRNA for adenine phosphoribosyltransferase.	X96866
022YCENN AT	-2.0	dl4233c; hypothetical protein	CAB46037
022YCENN ypo	-2.0	Arabidopsis thaliana HAL3B protein (HAL3B) gene, complete cds.	U80192
022YCENN s t	-2.0	Arabidopsis putative EREBP (At2g44840) mRNA, complete cds.	AF325089

Table 1.9. Detail information of CMV-fny-induced genes on 1hr after inoculation in C24.

GEM ID	Cy5/ Cy3	GeneName	AccNum
ont	-3.8	AT4g34230; cinnamyl alcohol dehydrogenase-like protein	CAA17549
022CCNNL ati	-3.7	Arabidopsis Landsberg erecta phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene	L33677
022CCNNL s t	-3.7	Genomic Sequence For Arabidopsis thaliana Clone C6L9,	AC012477
022CCNNL ati	-3.5	A.thaliana CAD gene for cinnamyl alcohol dehydrogenase.	Z31715
022CCNNL ont	-3.3	Arabidopsis thaliana mRNA for glutathione S-transferase, complete cds.	D44465
022CCNNL ont	-3.1	A.thaliana hsp81.2 gene.	Y11827
022CCNNL hs	-3.1	AT4g30530; putative protein	CAB79771
022CCNNL pu	-3.1	F1N13_150; steroid 5alpha-reductase-like protein	CAC01800
022CCNNL st	-3.1	A.thaliana heat shock protein 83 mRNA, complete cds.	M62984
022CCNNL ont	-2.8	Arabidopsis thaliana kin1 gene for cold and ABA inducible protein.	X51474
022CCNNL s t	-2.8	A.thaliana heat shock protein 83 mRNA, complete cds.	M62984
022CCNNL he	-2.6	T7B11.13; predicted protein of unknown function	AAD22649
022CCNNL pre	-2.4	Arabidopsis thaliana CHIV gene.	Y14590
022CCNNL ont	-2.3	A.thaliana hsp81.4 gene.	Y11828
022CCNNL OM_	-2.3	F7G19.1	AAB70396
022CCNNL 3A	-2.3	Arabidopsis Columbia phenylalanine ammonia-lyase (PAL2) gene	L33678
022CCNNL s t	-2.3	Arabidopsis thaliana plant IF-like protein mRNA, complete cds.	U72393
022CCNNL s t	-2.2	Arabidopsis Landsberg erecta phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene	L33677
022CCNNL s t	-2.2	C7A10.720; putative protein	CAB16829
022CCNNL pu	-2.2	At2g38240; putative anthocyanidin synthase	AAC27173
022CCNNL pu	-2.1	Arabidopsis thaliana cor78 protein mRNA, complete cds.	L22567
022CCNNL s t	-2.1	AT4g30530; putative protein	CAB79771
022CCNNL pu	-2.1	Arabidopsis thaliana mRNA for Aps2, partial cds.	AB017977
022CCNNL s t	-2.0	T17F15.170; putative peptide transporter	CAB41143
022CCNNL ; p	-2.0	M4E13.160; putative protein	CAA17775
022CCNNL pu	-2.0	A.thaliana mRNA for Eli3-2.	X67815
022CCNNL mR	-2.0	T28A8_10; lipid-transfer-like protein	CAB83144
022CCNNL lip	-2.0	F9I5.19; unknown protein	AAF29406
022CCNNL nkn	-2.0	Arabidopsis thaliana BAC TIM15.	AF296832
022CCNNL s t	-2.0	Arabidopsis thaliana ribonuclease (RNS1) mRNA, complete cds.	U05206

Table 1.10. Detail information of CMV-fny-induced genes on 3hr after inoculation in C24.

GEM ID	Cy5/ Cy3	GeneName	AccNum
022JCNNM ont	-3.7	Arabidopsis thaliana chromosome II section 92 of 255 of CDS.	AC006438
022JCNNM s t	-3.7	Pea chloroplast psbM gene for photosystem II polypeptide M.	D12535
022JCNNM pla	-3.7	F4P12_50; putative protein	CAB67642
022JCNNM ati	-3.6	A.thaliana mRNA (orf06) from chromosome III.	X97828
022JCNNM mR	-3.5	MJK13.19	AAF35419
022JCNNM ati	-3.4	A.thaliana mRNA for peroxidase ATP17a, clone EST 119F5T7.	X99096
022JCNNM mR	-3.4	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MUB3.	AB010076
022JCNNM s t	-3.4	Arabidopsis thaliana spindle pole body protein (T10B6_70/AT5g17410) mRNA	AF360238
022JCNNM s t	-3.4	Arabidopsis thaliana AT3g04520 (AT3g04520/T27C4_17) mRNA, complete cds.	AF325033
022JCNNM ati	-3.3	A.thaliana P2 mRNA for zeta-crystallin-like protein.	Z49268
022JCNNM P2	-3.3	Arabidopsis thaliana Fe(II) transport protein (IRT1) mRNA, complete cds.	U27590
022JCNNM s t	-3.3	F5F19.13	AAD12681
022JCNNM s t	-3.2	F14J22.5	AAG13060
022JCNNM 4A	-3.2	contains similarity to root cap protein gene_id:MUF9.15	BAB08235
022JCNNM imi	-3.2	F16L2_80; putative protein	CAB82811
022JCNNM pu	-3.1	Arabidopsis thaliana CDPK-related kinase 1 (CRK1) mRNA, complete cds.	AF153351
022JCNNM s t	-3.1	Arabidopsis thaliana basic helix-loop-helix FBI1 protein (FBI1) mRNA	AF323182
022JCNNM s t	-3.1	T5J8.12; hypothetical protein	AAD15336
022JCNNM ypo	-3.1	T31J12.1	AAD18100
022JCNNM 4A	-3.1	AT4g19530; TMV resistance protein N-like	CAB78955
022JCNNM TM	-3.1	A.thaliana mRNA for zeta-crystallin homologue.	Z49768
022JCNNM ont	-3.1	At2g22620	AAD15570
022JCNNM 4A	-3.1	Arabidopsis thaliana chromosome 1 BAC T5M16 genomic sequence	AC010704
022JCNNM s t	-3.1	acyltransferase	BAB10067
022JCNNM era	-3.1	T20H2.1	AAF79892
022JCNNM 4A	-3.1	At2g41550	AAB84337
022JCNNM 4A	-3.1	Arabidopsis thaliana germin-like protein (GLP9) mRNA, partial cds.	U81294
022JCNNM s t	-3.1	Arabidopsis RNA polymerase II third largest subunit (RPB35.5A) gene cds	L34770
022JCNNM s t	-3.1	gene_id:MNF13.27 unknown protein	BAB08543
022JCNNM F13	-3.1	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 4, contig fragment No. 39.	AL161539
022JCNNM s t	-3.1	gene_id:K3K3.12 unknown protein	BAB09377
022JCNNM K3	-3.1	A.thaliana gene for nucleoside diphosphate kinase, exons 1-3.	X69376
022JCNNM ge	-3.1	Arabidopsis thaliana chromosome II section 244 of 255 of the complete sequence. Sequence from clones F17K2, F4I18.	AC004665
022JCNNM s t	-3	AT4g34230; cinnamyl alcohol dehydrogenase-like protein	CAA17549
022JCNNM 4A	-3	T4I9.18; hypothetical protein	AAC79112
022JCNNM ypo	-3	Arabidopsis thaliana RING finger protein mRNA, complete cds.	AF134155
022JCNNM s t	-3	Arabidopsis thaliana chromosome 1 BAC F7F23 genomic sequence, complete sequence.	AC021199
022JCNNM s t	-3	Arabidopsis thaliana unknown protein (F23A5.30) mRNA, complete cds.	AF332462
022JCNNM s t	-3	F18A5.50; isoflavone reductase-like protein	CAB36830
022JCNNM iso	-3	F16J13.40; putative protein	CAB40938
022JCNNM pu	-3	Arabidopsis thaliana hexokinase 2 (AtHXK2) mRNA, complete cds.	U28215
022JCNNM s t	-3	At2g28210; putative carbonic anhydrase	AAD29832
022JCNNM pu	-3	A.thaliana mRNA for peroxidase ATP8a.	X98855

Table 1.10A. Detail information of CMV-fny-induced genes on 3hr after inoculation in C24
(continued).

GEM ID	Cy5/ Cy3	GeneName	AccNum
022JCNNM mR	-3	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 5, BAC clone F21E1 (ESSA project).	AL391716
022JCNNM s t	-3	Arabidopsis thaliana alternate oxidase mRNA, complete cds.	M96417
022JCNNM s t	-3	gb AAC09025.1 gene_id:F20C19.21 strong similarity to unknown protein	BAB02209
022JCNNM 5.1	-3	At2g30910; putative ARP2/3 protein complex subunit p41	AAC20725
022JCNNM pu	-3	receptor protein kinase-like protein	BAB10719
022JCNNM rot	-3	dl3050c; hypothetical protein	CAB10181
022JCNNM ypo	-3	F5A18.15; unknown protein; 59759-58619	AAG52340
022JCNNM unk	-3	contains similarity to unknown protein dbj BAA91655.1 gene_id:K6M13.8	BAB10766
022JCNNM imi	-3	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 4, contig fragment No. 39.	AL161539
022JCNNM s t	-3	Arabidopsis thaliana chromosome 1 BAC T7P1 genomic sequence, complete sequence.	AC018908
022JCNNM s t	-3	dl3740c; HSR201 like protein	CAB10318
022JCNNM SR2	-3	T22K18.9; germin-like protein	AAF04416
022JCNNM ger	-3	At2g38180	AAC27167
022JCNNM 4A	-3	F11A6.2	AAF99810
022JCNNM 4A	-3	Arabidopsis thaliana AT5g49870/K9P8_1 gene, complete cds.	AF367353
022JCNNM s t	-3	Sequence of BAC F21F23 from Arabidopsis thaliana chromosome 1, complete sequence.	AC027656
022JCNNM f B	-3	Arabidopsis thaliana phosphate transporter (AtPT2) mRNA, complete cds.	U62331
022JCNNM ont	-3	T26J12.11	AAC00608
022JCNNM 4A	-3	Arabidopsis thaliana senescence-specific protein (SAG12) gene, promoter region and complete cds.	U37336
022JCNNM s t	-3	T12C14_240; putative protein	CAB82968
022JCNNM ; p	-3	AT4g26660; putative protein	CAB43862
022JCNNM pu	-3	gene_id:K23L20.5 ref NP_011731.1 similar to unknown protein	BAB08824
022JCNNM 3L2	-3	Arabidopsis thaliana ubiquitin conjugating enzyme (UBC4) gene, complete cds and flanking regions.	L19354
022JCNNM cat	-3	Arabidopsis thaliana mRNA for heat shock protein 17.6A.	Y14070
022JCNNM s t	-3	Arabidopsis thaliana germin-like protein (GLP2a) mRNA, complete cds.	U75192
022JCNNM s t	-3	gb AAB61527.1 gene_id:MOK9.8 similar to unknown protein	BAB08708
022JCNNM 7.1	-3	T22K18.5	AAF04412
022JCNNM rp	-2.9	Arabidopsis thaliana homeodomain protein (PRHA) mRNA, complete cds.	L21991
0 2 2 J C N N M OM_	-2.9	F4F15.320; putative protein	CAB41341
022JCNNM pu	-2.9	F1N21.11	AAG00252
022JCNNM 4A	-2.9	T4D2.140; putative protein	CAB64224
022JCNNM put	-2.9	F22I13.110; putative protein	CAB37490
022JCNNM ; p	-2.9	At2g01640	AAD12707
0 2 2 J C N N M OM_	-2.9	Arabidopsis thaliana ApL3 gene.	Y18432
022JCNNM s t	-2.9	Arabidopsis thaliana hsp17.6 mRNA for 17.6 kDa heat shock protein.	X16076
022JCNNM s t	-2.9	Arabidopsis thaliana chromosome I BAC F22K20 genomic sequence, complete sequence.	AC002291
022JCNNM s t	-2.9	gene_id:MLE2.7 unknown protein	BAB08809
022JCNNM E2.	-2.9	AT4g22490; RCc3-like protein	CAA22154

Table 1.10B. Detail information of CMV-fny-induced genes on 3hr after inoculation in C24

(continued).

GEM ID	Cy5/ Cy3	GeneName	AccNum
022JCNNM RC	-2.9	F10M6.110; putative protein	CAA16965
022JCNNM pu	-2.9	T12H1.29	AAF27038
022JCNNM 4A	-2.9	T9L3_30; putative protein	CAC01872
022JCNNM uta	-2.9	T22E16.80; putative protein	CAB75900
022JCNNM pu	-2.9	F22F7.12	AAF64539
022JCNNM 4A	-2.9	At2g03800	AAD20081
022JCNNM 4A	-2.9	At2g41760	AAC02771
022JCNNM 4A	-2.9	F7J8_60; putative protein	CAB69836
022JCNNM uta	-2.9	dl3045c; hypothetical protein	CAB10180
022JCNNM ypo	-2.9	pectinacylesterase	BAB10060
022JCNNM yle	-2.9	AT4g11110; COP1 like protein	CAB43046
022JCNNM CO	-2.9	A.thaliana mRNA for gibberellin 20-oxidase (1425 bp).	X83381
022JCNNM mR	-2.9	unknown	CAA77884
022JCNNM 4A	-2.9	gb AAD21483.1 gene_id:MWL2.4 similar to unknown protein	BAB01314
022JCNNM 3.1	-2.9	serine/threonine-specific protein kinase-like protein	BAB09338
022JCNNM eon	-2.9	F1P2.60; putative protein	CAB61977
022JCNNM uta	-2.9	At2g22610; putative kinesin heavy chain	AAD15569
022JCNNM pu	-2.9	F6N18.13	AAF25977
022JCNNM 4A	-2.9	At2g32960	AAB91974
022JCNNM 4A	-2.9	T23E23.14	AAF87154
022JCNNM 4A	-2.9	Arabidopsis thaliana mRNA for AHP1, complete cds.	AB015141
022JCNNM s t	-2.9	A.thaliana mRNA for cytochrome P450.	X90458
022JCNNM mR	-2.9	G protein-coupled receptor-like protein	BAB11664
022JCNNM cou	-2.9	Arabidopsis thaliana germin-like protein (GLP6) mRNA, complete cds.	U75194
022JCNNM s t	-2.9	At2g03800	AAD20081
022JCNNM 4A	-2.9	T22C5.2	AAF24938
022JCNNM 4A	-2.9	A.thaliana mRNA for peroxidase ATP8a.	X98855
022JCNNM mR	-2.8	A.thaliana mRNA for NLM1 protein.	Y07625
022JCNNM mR	-2.8	dl3910c; hypothetical protein	CAB10352
022JCNNM ypo	-2.8	F28M20.80; hypothetical protein	CAA19750
022JCNNM hy	-2.8	F1K23.2	AAF24539
022JCNNM 4A	-2.8	Arabidopsis thaliana germin-like protein (GLP6) mRNA, complete cds.	U75194
022JCNNM s t	-2.8	At2g46750	AAC33494
022JCNNM 4A	-2.8	F28P22.9; unknown protein; 33231-33614	AAG51864
022JCNNM unk	-2.8	AT4g19900; putative protein	CAB52870
022JCNNM and	-2.8	Arabidopsis thaliana germin-like protein (GLP7) mRNA, complete cds.	U75202
022JCNNM s t	-2.8	T5J17.90; putative protein	CAB38905
022JCNNM put	-2.8	contains similarity to phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer protein gene_id:MNJ7.10	BAB09077
022JCNNM imi	-2.8	dbj BAA87936.1 gene_id:MQC12.15 similar to unknown protein	BAB02819
022JCNNM cy	-2.7	A.thaliana CAD gene for cinnamyl alcohol dehydrogenase.	Z31715
022JCNNM s t	-2.7	A.thaliana mRNA for zeta-crystallin homologue.	Z49768
022JCNNM mR	-2.7	F19K6.14; myosin-like protein; 12311-7712	AAG51543
022JCNNM myo	-2.7	Arabidopsis thaliana RING-H2 finger protein RHG1a mRNA, partial cds.	AF079183
022JCNNM s t	-2.7	At2g30470; putative VP1/ABI3 family regulatory protein	AAB63089
022JCNNM ng_	-2.7	T30N20_40; nucleoid DNA-binding protein cnd41-like protein	CAB96832

Table 1.10C. Detail information of CMV-fny-induced genes on 3hr after inoculation in C24

(continued).

GEM ID	Cy5/ Cy3	GeneName	AccNum
022JCNNM nu	-2.6	gene_id:MUL8.22 pir S77152 similar to unknown protein	BAB11027
022JCNNM L8.	-2.6	Arabidopsis thaliana chromosome I BAC T5A14, complete sequence.	AC005223
022JCNNM s t	-2.6	At2g20650	AAD21704
022JCNNM 4A	-2.6	T12H20.3	AAC35521
022JCNNM 4A	-2.6	A.thaliana (clone GBGa483) mRNA for exopolygalacturonase.	X72292
022JCNNM (c	-2.6	F21B7.1	AAF86508
022JCNNM 4A	-2.6	T2J15.15; unknown protein; 32731-33266	AAG51525
022JCNNM unk	-2.6	Arabidopsis thaliana chromosome I BAC F1003 sequence, complete sequence.	AC006550
022JCNNM s t	-2.6	Arabidopsis thaliana partial mRNA for putative sugar transporter (SUGTL5 gene).	AJ249971
022JCNNM s t	-2.6	Arabidopsis thaliana mRNA for AGP6 protein.	AJ012459
022JCNNM cat	-2.5	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 4, BAC clone F1C12 (ESSA project).	AL022224
022JCNNM s t	-2.5	F20D10.170; putative protein	CAB37545
022JCNNM ; p	-2.5	F1N21.22	AAG00245
022JCNNM 4A	-2.5	A_TM021B04.3	AAB61068
022JCNNM .3A	-2.5	F26K9_20; putative protein	CAB83109
022JCNNM put	-2.5	Arabidopsis thaliana mRNA for LEA-like protein.	AJ131342
022JCNNM s t	-2.5	At2g39100; putative C3HC4-type RING zinc finger protein	AAC79620
022JCNNM pu	-2.5	F23A5.16	AAF14668
022JCNNM 4A	-2.5	Arabidopsis thaliana chromosome III BAC T21P5 genomic sequence, complete sequence.	AC009895
022JCNNM s t	-2.5	T27H1.6	AAC34332
022JCNNM 4A	-2.5	gb AAB60912.1 gene_id:MGF10.6 similar to unknown protein	BAB02689
022JCNNM 2.1	-2.5	Arabidopsis thaliana MADS-box protein AGL11 (AGL11) mRNA, complete cds.	U20182
022JCNNM s t	-2.5	T15B3_100; cysteine proteinase-like protein	CAB88124
022JCNNM cy	-2.5	Arabidopsis thaliana chromosome II section 180 of 255 of the complete sequence. Sequence from clones F20M17, F22D22.	AC006223
022JCNNM ain	-2.5	F5I6.3; unknown protein; 13661-11359	AAG52432
022JCNNM kno	-2.5	F7F23.10; hypothetical protein; 51999-52350	AAG52199
022JCNNM hyp	-2.5	Arabidopsis thaliana gene for nicotianamine synthase, complete cds.	AB021936
022JCNNM s t	-2.5	A.thaliana CDC2b gene for p34(cdc2) cell cycle protein.	X57840
022JCNNM CD	-2.5	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 4, BAC clone T5K18 (ESSA project).	AL022580
022JCNNM s t	-2.5	contains similarity to cytochrome oxidase assembly factor gene_id:MDA7.15	BAB09291
022JCNNM imi	-2.5	Arabidopsis thaliana CW7 mRNA, complete cds.	AB028226
022JCNNM s t	-2.4	F12B17_50; cytochrome P450-like protein	CAB89383
022JCNNM cy	-2.4	T19K24.11; similar to pMS10 protein	AAC79143
022JCNNM si	-2.4	F19K19.7	AAG10819
022JCNNM 4A	-2.4	T13O15.6; feebly-like protein	AAF24612
022JCNNM fee	-2.4	F12M16.11	AAF69551
022JCNNM 4A	-2.4	F15M4.22; hypothetical protein; 84465-87513	AAF16672
022JCNNM hyp	-2.4	F17J6.23; unknown protein	AAG51195
022JCNNM unk	-2.4	At2g19340	AAC16464
022JCNNM 4A	-2.4	gene_id:K21P3.8 unknown protein	BAB10339
022JCNNM 1P3	-2.4	F6G3.180; hypothetical protein	CAB43850

Table 1.10D. Detail information of CMV-fny-induced genes on 3hr after inoculation in C24
(continued).

GEM ID	Cy5/ Cy3	GeneName	AccNum
022JCNNM hyp	-2.4	T10O8_180; putative protein	CAB81930
022JCNNM pu	-2.3	At2g03720	AAD20074
022JCNNM 4A	-2.3	T28J14_20; putative protein	CAB87264
022JCNNM pu	-2.3	At2g26100	AAC31227
022JCNNM 4A	-2.3	T8B10_250; putative protein	CAB81845
022JCNNM pu	-2.3	Arabidopsis thaliana chromosome II section 18 of 255 of the complete sequence. Sequence from clones F3L12, T16B23.	AC007178
022JCNNM s t	-2.3	F8B4.190; nodulin-like protein	CAA22576
022JCNNM and	-2.3	serine/threonine-protein kinase Mak (male germ cell-associated kinase)-like protein	BAB09171
022JCNNM eon	-2.3	AT4g16900; disease resistance RPP5 like protein	CAB80962
022JCNNM di	-2.2	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, TAC clone:K21C13.	AB010693
022JCNNM s t	-2.2	T18A20.12	AAF02862
022JCNNM 4A	-2.2	Arabidopsis thaliana chromosome I BAC F14M2 genomic sequence, complete sequence.	AC010164
022JCNNM s t	-2.2	HR-like lesion-inducing protein	BAA95732
022JCNNM sio	-2.2	Arabidopsis thaliana BAC F21J6 from chromosome V, containing KNAT3 and mapping near 60.5 cM, complete sequence.	AC006259
022JCNNM s t	-2.2	F2G14_150; putative protein	CAC01822
022JCNNM pu	-2.2	F5A18.26; putative alliinase; 99695-97270	AAG52348
022JCNNM put	-2.2	F6A14.21	AAF27111
022JCNNM 4A	-2.2	T26D22.10	AAC13601
022JCNNM 4A	-2.2	Arabidopsis thaliana calcium sensor homolog (SOS3) gene, complete cds.	AF060553
022JCNNM s t	-2.2	T16O9.6; protein kinase, putative	AAG51288
022JCNNM rot	-2.1	Arabidopsis thaliana AT4 mRNA sequence.	AF055372
022JCNNM s t	-2.1	gene_id:MDF20.25 ref NP_011524.1 similar to unknown protein	BAB09248
022JCNNM F20	-2.1	Arabidopsis thaliana biotin carboxyl carrier protein isoform 2 (BCCP2) mRNA, nuclear gene encoding plastid protein, complete cds.	AF223948
022JCNNM s t	-2.1	At2g39120	AAC79622
022JCNNM 4A	-2.1	At2g48080	AAD13711
022JCNNM 4A	-2.1	putative protein	CAB62313
022JCNNM rot	-2.1	T26I12.110; disease resistance response/ dirigent-like protein	CAB75757
022JCNNM ; d	-2.1	T27E11.80; putative protein	CAB43972
022JCNNM pu	-2.1	gb AAC32911.1 gene_id:MJB21.3 similar to unknown protein	BAB10622
022JCNNM 1.1	-2.0	F2P3.11	AAC35535
022JCNNM 4A	-2.0	Public domain EST	
022JCNNM ain	-2.0	F13K23.2	AAF78482
022JCNNM 4A	-2.0	T9A21.110; unknown protein	CAA16798
022JCNNM un	-2.0	F27K7.5; endo-beta-1,4-glucanase, putative	AAG29742
022JCNNM OM_	-2.0	contains similarity to ankyrin gene_id:MRI1.10	BAB09592
022JCNNM imi	-2.0	Arabidopsis thaliana defective in exine formation (DEX1) mRNA, complete cds.	AF257187
022JCNNM s t	-2.0	T12M4.4	AAC24081
022JCNNM 4A	-2.0	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase-like	BAA96983
022JCNNM dro	-2.0	F28N24.5	AAF88111
022JCNNM 4A	-2.0	A.thaliana AtMlo-h1 gene.	Z95352

Table 1.10E. Detail information of CMV-fny-induced genes on 3hr after inoculation in C24
(continued).

GEM ID	Cy5/ Cy3	GeneName	AccNum
022JCNNM At	-2.0	At2g37090	AAD18150
022JCNNM 4A	-2.0	Genomic Sequence For Arabidopsis thaliana Clone F17K4 From Chromosome V, complete sequence.	AC068655
022JCNNM que	-2.0	gb AAD43153.1 gene_id:K13E13.10 similar to unknown protein	BAB01695
022JCNNM 3.1	-2.0	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 4, BAC clone F20D10 (ESSA project).	AL035538
022JCNNM s t	-2.0	Arabidopsis thaliana chromosome II section 194 of 255 of the complete sequence. Sequence from clones T32F12.	AC005314
022JCNNM s t	-2.0	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 3, P1 clone:MLD15.	AP000386
022JCNNM s t	-2.0	AT4g19240; hypothetical protein	CAA18611
022JCNNM hy	-2.0	Arabidopsis thaliana peroxidase (basic, prxEa) gene, complete cds.	M58381
022JCNNM OM_	-2.0	AT4g32860; putative protein	CAB80003
022JCNNM pu	-2.0	gb AAC72114.1 gene_id:MRO11.18 similar to unknown protein	BAB10051
022JCNNM 4.1	-2.0	gb AAF40458.1 gene_id:MUJ8.11 similar to unknown protein	BAB01362
022JCNNM 8.1	-2.0	F23A5.32	AAF14684
022JCNNM 4A	-2.0	AT4g09580; putative protein	CAB78081
022JCNNM pu	-2.0	gene_id:MUB3.4 ref NP_005422.1 similar to unknown protein	BAB11419
022JCNNM B3.	-2.0	At2g46750	AAC33494
022JCNNM 4A	-2.0	contains similarity to unknown protein gb AAF19687.1 gene_id:MOP9.16	BAB10398
022JCNNM imi	-2.0	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 5, BAC clone T4C12 (ESSA project).	AL392145
022JCNNM s t	-2.0	Arabidopsis thaliana At1g67090 (At1g67090/F1O19.10) mRNA, complete cds.	AF325004
022JCNNM OM_	-2.0	A.thaliana mRNA for Eli3-2.	X67815
022JCNNM s t	-2.0	Arabidopsis thaliana putative cinnamyl-alcohol dehydrogenase (AT4g37980) mRNA, complete cds.	AF360225

Wu and Shaw (1996)에 의하면 tobamovirus의 경우는 식물체에 들어간 후 parental virion에서 외피단백질을 uncoat하고 다시 reassemble하는 과정을 단 35분이면 끝낼 수 있다고 보고하였고, 후대 바이러스를 재생산하는데는 총 45분이면 가능하다고 하였다. 이 보고를 참조할 때, 보통 가시적인 병징은 약 1주일이 경과되어야 하지만 식물에서의 바이러스 복제는 예상보다 매우 빨리 이루어짐을 알 수 있다. 따라서, 본 연구는 바이러스의 감염에 따른 식물의 초기 반응 (early response; early event)에 중점을 두어 바이러스와 식물체 간의 상호작용을 연구하고자 하였다.

초기반응의 시간은 접종 후 1시간 (1 hpi)과 3시간 (3 hpi)으로 나누어 살펴 보기로 했고, 각각의 time point에서 mock response를 control로 사용하였다.

접종후 경과시간별로 유도된 유전자의 양상을 거시적으로 비교해 보면, 스트레스 및 병원체 침입 upregulation 되며 발현하는 *PAL1* 과 *PAL2* 및 R2R3 MYB transcription factor들은 Col-0 및 C24 공히 접종 후 1시간 이내 (1 hpi)에서 높은 수준으로 발현되어, 바이러스의 감염 초기 1시간 이내에 식물체에서의 바이러스 침입에 대한 signal transduction이 시작됨을 알 수 있다.

CMV-fny 저항성 ecotype인 C24에서 3시간 경과후에 가장 특이적인 유전자들이 발현되었다. C24에서 1시간이 경과된 경우(C24 1hpi)는 특이유전자의 발현이 타 처리구에 비하여 매우 적은 종류의 특이유전자가 발현되었음을 알 수 있다. 따라서, 전체 유전자의 형광강도에 대한 Lowiess Normalization을 수행한 후 C24 3시간 처리구 (C24 3hpi)에서 발현된 유전자중 mock에 비하여 2.1배 이상 발현된 spot 224개를 Col-0 1, 3hpi 및 C24 1hpi와 비교하여 보았다.

그 결과는 Table 1.11에 정리하였다. 정리된 결과를 보면, 우선 C24에서는 바이러스 접종 후 3시간이 경과되면서 C24 1hpi 및 Col-0 1, 3hpi에서 전혀 발현되지 않았던 유전자의 발현 및 발현강도가 매우 높은 경우가 거의 대부분임을 알 수 있다 (Table 1.11). C24 3hpi의 경우 2.1배 이상 높게 발현된 유전자들의 경우 방어(defense)와 전사(transcription)에 관련된 유전자들이 다른 처리구에서는 특이적으로 발현하지 않았던 결과를 보여주고 있으며, 다른 처리구와 비슷한 발현양상을 보여주었던 유전자들은 대부분 대사, 세포의 기본적 구성 및 에너지 대사에 관련된 유전자들이었다. 이 결과는 Arabidopsis에 CMV가 감염될 때, 초기 반응이 C24와 Col-0가 서로 다른 pathway로 진행되었다고 볼 수 있다.

Whitham et al. (2003)은 바이러스 감염시 heat shock protein (HSP)의 발현과 관련하여 동정

되지 않은 반응 인자들이 HSP 및 방어관련 유전자들의 발현에 관계하고 있다고 보고한 바 있다. 이들은 TVCV 혹은 ORMV가 감염후 하루가 경과된 Arabidopsis (Col-0)의 조직에서 heat shock 유전자들 (*HSP83*, *HSP70*, *HSP23.6*, *HSP17.6A*, and *HSP17.4*) 이 처음 나타났으나, CMV, PVX, TuMV가 감염된 경우는 2, 4, 혹은 5일이 되어서야 처음 발현하였다고 보고한 바 있다. 반면에 본 실험에서는 HSPs 의 발현수준이 Col-0의 경우 1hpi에서 *HSP83*, *HSP81.4*, *HSP81.2* 가 각각 3.4, 3.3, 3.3배로 유의성있게 증가하였다. 또한 C24 3hpi 에서는 단지 *HSP17.6* 만이 발현수준이 증가하였다. 이 결과 역시 Col-0와 C24는 서로 다른 바이러스 방어기작을 갖고 있음을 나타낸다 할 수 있다.

식물체에서 병원체에 의한 과민반응 (hyper-response; HR)은 병원체의 침입과 관련하여 감염부위의 programmed cell death (PCD)가 관여한다고 알려져 있다. 이것은 식물체의 방어 반응의 유도에 의하여 병원체의 증식을 감염부위로 제한하고 전체 식물체를 보호하는 자기 방어 시스템의 일환이라 볼 수 있다. CMV가 감염된 C24의 경우 감염부위에서 local lesion을 형성하는 전형적인 HR을 보여주는데, 감염 초기 (본 실험에서는 3 hpi)에 매우 특이적인 유전자들의 발현을 나타내었다 (Table 1.11). 이 경우 대부분의 유의성있게 발현된 유전자는 기존의 연구 보고들에서 HR에 직,간접적으로 역할을 하는 유전자들이었다.

예를 들어, TMV N-gene like (R-gene like), cystein protease (caspase-like), HSR201-like(found in common HR), germin-like(HR in pepper), AOX (regulate ROX production), bZIP domain transcription factor (NPR1 interaction), RPP5-like, HR-like lesion inducing, and dirigent-like protein들은 식물의 병원체에 대한 저항성 및 HR과 직접적인 관련성이 있다고 보고된 유전자들이었다.

이외에 Table 1.11에서는 동식물에서 PCD signal pathway에서 일반적으로 관여하는 유전자들인 receptor signals, ROS production and regulation, conserved HR mediators, ion (Ca^{++})and pH condition, sugar partitioning, energy balance (ATP, NADPH), nuclear DNA cleavage, and activation of caspase 등의 발현이 발견되었다. 여기에서 나타난 유전자들은 결국 C24의 CMV 저항성 기작에 참여하는 유전자들일 것으로 추측되며, 바이러스의 침입과 관련하여 바이러스에 저항하는 식물체의 반응은 매우 빠르고 (3 hpi), 특이적일 것으로 (C24-specific) 판단되었다.

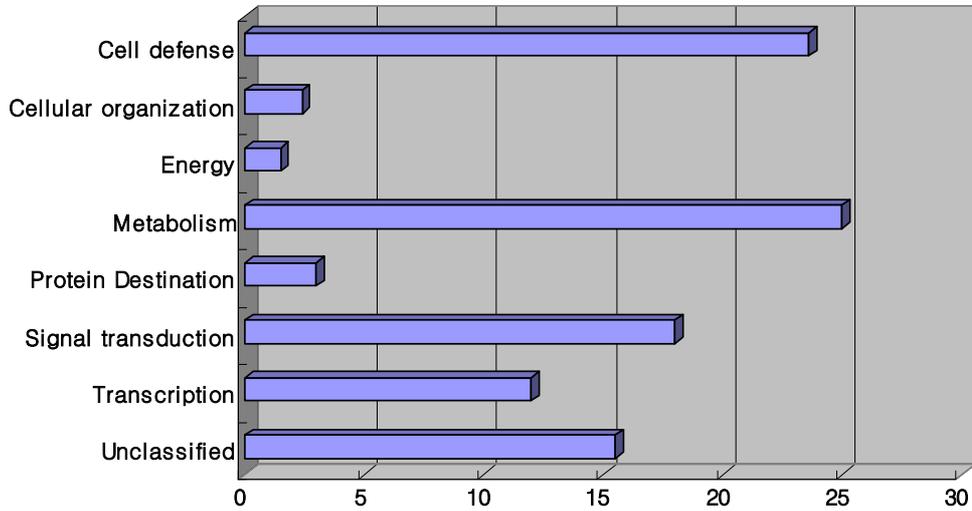


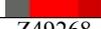
Fig. 1.23. Distribution of genes induced by CMV infection in inoculated Arabidopsis leaves.

Arabidopsis ecotype과 접종후 경과시간별로 발현된 transcripts를 기능적으로 분류한 결과는 Fig 1.23과 같다. 흥미롭게도 각 기능별 group에서 ecotype별로 그리고 경과시간별로 서로 중복되는 유전자의 redundancy는 매우 낮았다.

전체적인 발현비율은 일반적인 대사에 참여하는 유전자의 발현비율이 가장 높았는데 (24.8%), 외부 침입한 바이러스는 기주식물의 machinery를 이용하기 때문인 것으로 생각된다. CMV를 접종하였기 때문에 역시 세포 방어에 관련된 유전자의 발현 비율이 높았다 (23.2%). 그 외에 signal transduction 및 transcription factor 등의 발현비율이 증가하였다.

접종용 buffer (0.01M PBS, pH 7.0)로만 접종한 mock에 비하여 CMV 접종구에서 2배 이상 높게 발현된 대부분의 transcript들은 대부분 cell defense, signal transduction, 그리고 metabolism에 관련된 유전자들 이었다. 다른 transcript들 대부분은 cellular organization, energy, protein destination, transcription, 그리고 unidentified group으로 분류할 수 있었다.

Table 1.11. Comparison of CMV-fny-induced genes on 3hr after inoculation in C24 to Col-0 and other harvesting time points. Sorting is ordered by expression value (ratio of median; 635/532) of No4 C24-3hr. Each expression values were normalized by Lowess normalization method.

NO	GeneName	Accession Num	No3 C24-1	No4 C24-3	No1 Col-1	No2 Col-3
001	Arabidopsis thaliana chromosome II section 92 of 255 of the complete sequence. Sequence from clones F19G14, F7H1.	AC006438 	1.1	-3.7	1.1	1.2
002	Pea chloroplast psbM gene for photosystem II polypeptide M.	D12535 	-1.3	-3.7	-1.3	-1.3
003	F4P12_50; putative protein	CAB67642 	-1.1	-3.7	-1.4	-1.2
004	A.thaliana mRNA (orf06) from chromosome III.	X97828 		-3.6	-1.4	-1.4
005	MJK13.19	AAF35419 	1.1	-3.5	-1	1.1
006	A.thaliana mRNA for peroxidase ATP17a, clone EST 119F5T7.	X99096 	-1.4	-3.4	-1.5	-1.3
007	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MUB3.	AB010076 	-1.3	-3.4	1.1	1.1
008	Arabidopsis thaliana putative spindle pole body protein (T10B6_70/AT5g17410) mRNA, complete cds.	AF360238 	-1.3	-3.4	-1.2	-
009	Arabidopsis thaliana AT3g04520 (AT3g04520/T27C4 17) mRNA, complete cds.	AF325033 	-	-3.4	-2	-1.4
010	A.thaliana P2 mRNA for zeta-crystallin-like protein.	Z49268 	-1.4	-3.3	-1.2	1.1
011	Arabidopsis thaliana Fe(II) transport protein (IRT1) mRNA, complete cds.	U27590 	-1.3	-3.3	-1.2	-1.3
012	F5F19.13	AAD12681 	-1.2	-3.3	-1.5	-1.2
013	F14J22.5	AAG13060 	-	-3.2	-1.8	1.4
014	contains similarity to root cap protein gene id:MUF9.15	BAB08235 	-1.1	-3.2	-1.3	-1.2
015	F16L2_80; putative protein	CAB82811 	1.0	-3.2	-	-
016	Arabidopsis thaliana CDPK-related kinase 1 (CRK1) mRNA, complete cds.	AF153351 	-1.2	-3.1	-1.3	-1.2
017	Arabidopsis thaliana basic helix-loop-helix FBI1 protein (FBI1) mRNA, complete cds.	AF323182 	-1.1	-3.1	-1	-1.1
018	T5J8.12; hypothetical protein	AAD15336 	-1.2	-3.1	-1.3	-1.2
019	T31J12.1	AAD18100 	-1.4	-3.1	-1.2	-1
020	AT4g19530; TMV resistance protein N-like	CAB78955 	-1.1	-3.1	-1.2	1.1
021	A.thaliana mRNA for zeta-crystallin homologue.	Z49768 	-1.1	-3.1	-1.4	1.2

022	At2g22620	AAD15570	-1.2	-3.1	-1.1	-1.2
025	Arabidopsis thaliana chromosome 1 BAC T5M16 genomic sequence, complete sequence.	AC010704	-1.2	-3.1	-1	-1.4
023	acyltransferase	BAB10067	-1.3	-3.1	-1.3	-1.1
024	T20H2.1	AAF79892	-1.1	-3.1	-1.2	-1.1
025	At2g41550	AAB84337	-1.3	-3.1	-1.4	-1.4
026	Arabidopsis thaliana germin-like protein (GLP9) mRNA, partial cds.	U81294	-1.1	-3.1	-	-
027	Arabidopsis thaliana RNA polymerase II third largest subunit (RPB35.5A) gene, complete cds.	L34770	-	-3.1	-1.2	-1.4
028	gene_id:MN13.27 unknown protein	BAB08543	-1.1	-3.1	-	-
029	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 4, contig fragment No. 39.	AL161539	-1.1	-3.1	-1.1	-1.1
030	gene_id:K3K3.12 unknown protein	BAB09377	-	-3.1	-	-
031	A.thaliana gene for nucleoside diphosphate kinase, exons 1-3.	X69376	-	-3.1	-1.2	-1.6
032	Arabidopsis thaliana chromosome II section 244 of 255 of the complete sequence. Sequence from clones F17K2, F4I18.	AC004665	-	-3.1	-1.5	-1.6
033	AT4g34230; cinnamyl alcohol dehydrogenase-like protein	CAA17549	-3.8	-3	-2.0	1.1
034	T4I9.18; hypothetical protein	AAC79112	-1	-3	-1	-1.2
035	Arabidopsis thaliana RING finger protein mRNA, complete cds.	AF134155	-1.5	-3	-1.3	-1
036	Arabidopsis thaliana chromosome 1 BAC F7F23 genomic sequence, complete sequence.	AC021199	-1	-3	1	-1.1
037	Arabidopsis thaliana unknown protein (F23A5.30) mRNA, complete cds.	AF332462	-1.3	-3	-1	-1.1
038	F18A5.50; isoflavone reductase-like protein	CAB36830	-1.2	-3	-1.4	-1.2
039	F16J13.40; putative protein	CAB40938	-	-3	1	-
040	Arabidopsis thaliana hexokinase 2 (AtHXK2) mRNA, complete cds.	U28215	-1.3	-3	-1	-1.2
041	At2g28210; putative carbonic anhydrase	AAD29832	-1.3	-3	-1.2	-1.3
042	A.thaliana mRNA for peroxidase ATP8a.	X98855	-	-3	-1.1	-1
043	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 5, BAC clone F21E1 (ESSA project).	AL391716	1.2	-3	-1.2	-1.5
044	Arabidopsis thaliana alternate oxidase mRNA, complete cds.	M96417	-1.4	-3	-1.4	-1
045	gb AAC09025.1 gene_id:F20C19.21 strong similarity to unknown protein	BAB02209	-1	-3	-1.1	-

046	At2g30910; putative ARP2/3 protein complex subunit p41	AAC20725	-1.3	-3	-1.3	-1.3
047	receptor protein kinase-like protein	BAB10719	-1.1	-3	-1.2	-1.1
048	dl3050c; hypothetical protein	CAB10181	-1.4	-3	-1.2	-1.4
049	F5A18.15; unknown protein; 59759-58619	AAG52340	-1.1	-3	-1.3	-1.1
050	contains similarity to unknown protein dbj BAA91655.1 gene id:K6M13.8	BAB10766	-1.1	-3	-1.2	-1.1
052	Arabidopsis thaliana chromosome 1 BAC T7P1 genomic sequence, complete sequence.	AC018908	1.1	-3	1.2	1.4
053	dl3740c; HSR201 like protein	CAB10318	-	-3	1	-
054	T22K18.9; germin-like protein	AAF04416	-	-3	-1.2	-
055	At2g38180	AAC27167	-1	-3	-1.1	1
056	F11A6.2	AAF99810	-1.2	-3	-1.4	-1.1
057	Arabidopsis thaliana AT5g49870/K9P8_1 gene, complete cds.	AF367353	1.1	-3	-1.5	-1.3
058	Sequence of BAC F21F23 from Arabidopsis thaliana chromosome 1, complete sequence.	AC027656	-	-3	-1.2	-2.1
059	Arabidopsis thaliana phosphate transporter (AtPT2) mRNA, complete cds.	U62331	-1.1	-3	-1.4	-1.4
060	T26J12.11	AAC00608	-	-3	-	-
061	Arabidopsis thaliana senescence-specific protein (SAG12) gene, promoter region and complete cds.	U37336	-1.3	-3	-1.5	-1.4
062	T12C14_240; putative protein	CAB82968	1.1	-3	-	-1.4
063	AT4g26660; putative protein	CAB43862	-1.2	-3	-1	-
064	gene_id:K23L20.5 ref NP_011731.1 similar to unknown protein	BAB08824	-	-3	-	-
065	Arabidopsis thaliana ubiquitin conjugating enzyme (UBC4) gene, complete cds and flanking regions.	L19354	1	-3	-	-
066	Arabidopsis thaliana mRNA for heat shock protein 17.6A.	Y14070	-	-3	1	-
067	Arabidopsis thaliana germin-like protein (GLP2a) mRNA, complete cds.	U75192	-	-3	-1.3	-1.3
068	gb AAB61527.1 gene_id:MOK9.8 similar to unknown protein	BAB08708	-1.1	-3	-1.2	-1.3
069	T22K18.5	AAF04412	-1.4	-3	1.1	-1.2
070	Arabidopsis thaliana homeodomain protein (PRHA) mRNA, complete cds.	L21991	-1.1	-2.9	-1.3	-1.2
071	F4F15.320; putative protein	CAB41341	-1.4	-2.9	-1.5	-1.2
072	F1N21.11	AAG00252	1	-2.9	-1.4	-1.2

073	T4D2.140; putative protein	CAB64224	-1.3	-2.9	-1.1	-1.3
074	F22I13.110; putative protein	CAB37490	-	-2.9	-	-1.2
075	At2g01640	AAD12707	-	-2.9	-	-
076	Arabidopsis thaliana ApL3 gene.	Y18432	1.1	-2.9	-1.5	-1.2
077	Arabidopsis thaliana hsp17.6 mRNA for 17.6 kDa heat shock protein.	X16076	-1.4	-2.9	-1.3	-1.3
078	Arabidopsis thaliana chromosome I BAC F22K20 genomic sequence, complete sequence.	AC002291	-1.3	-2.9	-1.4	1
079	gene_id:MLE2.7 unknown protein	BAB08809	-1.2	-2.9	-1.2	1
080	AT4g22490; RCc3-like protein	CAA22154	-1.3	-2.9	-1	-1.3
081	F10M6.110; putative protein	CAA16965	-1.1	-2.9	1	1
082	T12H1.29	AAF27038	1	-2.9	-1.2	1.3
083	T9L3_30; putative protein	CAC01872	-1.1	-2.9	-1.2	-1.6
084	T22E16.80; putative protein	CAB75900	-	-2.9	-1.3	-1.2
085	F22F7.12	AAF64539	1.1	-2.9	-1.3	-1.2
086	At2g03800	AAD20081	-1.2	-2.9	1	-1.3
087	At2g41760	AAC02771	1	-2.9	-1.3	-1.1
088	F7J8_60; putative protein	CAB69836	-	-2.9	1.1	1
089	dl3045c; hypothetical protein	CAB10180	1.1	-2.9	-1.5	-1.1
090	pectinacylesterase	BAB10060	-	-2.9	-1.1	1.3
091	AT4g11110; COP1 like protein (photomorphogenesis repressor COP1 - Arabidopsis thaliana)	CAB43046	-1.2	-2.9	-1.2	-1.1
092	A.thaliana mRNA for gibberellin 20-oxidase (1425 bp).	X83381	1	-2.9	-1.3	-1.3
094	gb AAD21483.1 gene_id:MWL2.4 similar to unknown protein	BAB01314	-1.3	-2.9	-1.4	-
095	serine/threonine-specific protein kinase-like protein	BAB09338	-	-2.9	-1.4	-1.2
096	F1P2.60; putative protein	CAB61977	-1.2	-2.9	-1.1	-1.1
097	At2g22610; putative kinesin heavy chain	AAD15569	-	-2.9	-	-
098	F6N18.13	AAF25977	-1.2	-2.9	-1.2	-1.2
099	At2g32960	AAB91974	-1.3	-2.9	-1.1	-1

100	T23E23.14	AAF87154	1	-2.9	-1.1	-1.1
101	Arabidopsis thaliana mRNA for AHP1, complete cds.	AB015141	-	-2.9	-1.3	-1.2
102	A.thaliana mRNA for cytochrome P450.	X90458	-1.4	-2.9	-1.5	-1.1
103	G protein-coupled receptor-like protein	BAB11664	-1.2	-2.9	-1.3	-1.1
104	Arabidopsis thaliana germin-like protein (GLP6) mRNA, complete cds.	U75194	-	-2.9	-2	-
106	T22C5.2	AAF24938	1.1	-2.9	-1.1	-
108	A.thaliana mRNA for NLM1 protein.	Y07625	-1.1	-2.9	-1.4	1
109	dl3910c; hypothetical protein	CAB10352	-	-2.9	-	-
110	F28M20.80; hypothetical protein	CAA19750	-1.4	-2.9	-1.3	-1.1
111	F1K23.2	AAF24539	1	-2.9	-1.3	-1.2
113	At2g46750	AAC33494	-	-2.8	-1.4	-
114	F28P22.9; unknown protein; 33231-33614	AAG51864	-1.1	-2.8	-	-
115	AT4g19900; putative protein	CAB52870	-	-2.8	-	-
116	Arabidopsis thaliana germin-like protein (GLP7) mRNA, complete cds.	U75202	-1.2	-2.8	-	-
117	T5J17.90; putative protein	CAB38905	-	-2.8	-	-
118	contains similarity to phosphatidylinositol/phosphatidylcholine protein gene id:MNJ7.10	BAB09077	-	-2.8	-1.3	-
119	dbj BAA87936.1 gene_id:MQC12.15 similar to unknown protein	BAB02819	-	-2.8	-	-
120	A.thaliana CAD gene for cinnamyl alcohol dehydrogenase.	Z31715	-3.5	-2.7	-1.7	1
122	F19K6.14; myosin-like protein; 12311-7712	AAG51543	-1.2	-2.7	-1.4	-1.4
123	Arabidopsis thaliana RING-H2 finger protein RHG1a mRNA, partial cds.	AF079183	-1.5	-2.7	-1.3	-1.1
124	At2g30470; putative VPI/ABI3 family regulatory protein	AAB63089	-1.1	-2.7	-1.4	-1.3
125	T30N20_40; nucleoid DNA-binding protein cnd41-like protein	CAB96832	-1.1	-2.7	-1.2	-1.1
126	gene_id:MUL8.22 pir S77152 similar to unknown protein	BAB11027	-1.2	-2.7	1.3	-1.2
127	Arabidopsis thaliana chromosome I BAC T5A14, complete sequence.	AC005223	-1.3	-2.7	-1	-1.1

128	At2g20650		AAD21704	-1	-2.7	1	-1.2
129	T12H20.3		AAC35521	-1.3	-2.7	-1.4	-1.3
130	A.thaliana (clone GBGa483) mRNA for exopolygalacturonase.		X72292	-1.1	-2.7	-1	1
131	F21B7.1		AAF86508	1	-2.6	1.1	-1.2
132	T2J15.15; unknown protein; 32731-33266		AAG51525	-1.1	-2.6	-1.2	-1.1
133	Arabidopsis thaliana chromosome I BAC F1003 sequence, complete sequence.		AC006550	-1.1	-2.6	-1.2	-1.1
134	Arabidopsis thaliana partial mRNA for putative sugar transporter (SUGTL5 gene).		AJ249971	1.1	-2.6	1.1	-1.1
135	Arabidopsis thaliana mRNA for AGP6 protein.		AJ012459	-1	-2.6	-1.6	-1.3
136	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 4, BAC clone F1C12 (ESSA project).		AL022224	-1.1	-2.6	1	1.2
137	F20D10.170; putative protein		CAB37545	-1.3	-2.6	-1	-1.3
138	F1N21.22		AAG00245	-1.1	-2.6	-1.1	-1.2
139	A_TM021B04.3		AAB61068	1	-2.6	1.1	-1.1
140	F26K9_20; putative protein		CAB83109	-	-2.6	1.1	-1.1
141	Arabidopsis thaliana mRNA for LEA-like protein.		AJ131342	-1.1	-2.6	-1	-1.1
142	At2g39100; putative C3HC4-type RING zinc finger protein		AAC79620	-1.1	-2.6	-1	-1.3
143	F23A5.16		AAF14668	-1.2	-2.6	-1.5	-1.4
144	Arabidopsis thaliana chromosome III BAC T21P5 genomic sequence, complete sequence.		AC009895	-1.1	-2.6	-1.4	-1.1
145	T27I1.6		AAC34332	-1.6	-2.6	-1.6	-1.3
146	gb AAB60912.1 gene_id:MGF10.6 similar to unknown protein		BAB02689	-1.2	-2.6	-1.4	-1.1
147	Arabidopsis thaliana MADS-box protein AGL11 (AGL11) mRNA, complete cds.		U20182	-1.3	-2.6	-1.1	1
148	T15B3_100; cysteine proteinase-like protein		CAB88124	-1.2	-2.5	-1.2	-1.1
149	Arabidopsis thaliana chromosome II section 180 of 255 of the complete sequence. Sequence from clones F20M17, F22D22.		AC006223	-1.1	-2.5	-1.2	-1.1
151	F5I6.3; unknown protein; 13661-11359		AAG52432	1	-2.5	-1.3	1.1
152	F7F23.10; hypothetical protein; 51999-52350		AAG52199	-1.1	-2.5	1.1	1
153	Arabidopsis thaliana gene for nicotianamine synthase, complete cds.		AB021936	-1.2	-2.5	1.2	-1.3
154	A.thaliana CDC2b gene for p34(cdc2) cell cycle protein.		X57840	1.1	-2.5	-1.1	-1.1
155	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 4, BAC clone T5K18 (ESSA project).		AL022580	-1.2	-2.5	-1.1	-1.3

156	contains similarity to cytochrome oxidase assembly factor gene id:MDA7.15	BAB09291	-1.1	-2.5	-1.4	-1.1
157	Arabidopsis thaliana CW7 mRNA, complete cds.	AB028226	-1.2	-2.5	-1.2	-1.1
158	F12B17_50; cytochrome P450-like protein	CAB89383	-1.1	-2.5	1	-1.1
159	T19K24.11; similar to pMS10 protein	AAC79143	-1.1	-2.5	-1.4	-1.3
160	F19K19.7	AAG10819	-1.1	-2.5	-1.1	-1.1
161	T13O15.6; feebly-like protein	AAF24612	-1.1	-2.5	-	-1.4
162	F12M16.11	AAF69551	-1.3	-2.5	-1.2	-1
163	F15M4.22; hypothetical protein; 84465-87513	AAF16672	-1.1	-2.5	-	-1
164	F17J6.23; unknown protein	AAG51195	-1.3	-2.5	-1.1	-1.1
165	At2g19340	AAC16464	-1.2	-2.4	-1.2	-1.3
166	gene_id:K21P3.8 unknown protein	BAB10339	-1.1	-2.4	-1.3	-1.4
167	F6G3.180; hypothetical protein	CAB43850	-1.1	-2.4	-1.2	-1.2
168	T10O8_180; putative protein	CAB81930	1.3	-2.4	-1.2	-1.1
169	At2g03720	AAD20074	-1.2	-2.4	-1.3	-1.1
170	T28J14_20; putative protein	CAB87264	-1.1	-2.4	-1.5	-1.1
171	At2g26100	AAC31227	-1.2	-2.4	-1.2	-1.2
172	T8B10_250; putative protein	CAB81845	-1.2	-2.4	-1.2	-1.1
173	Arabidopsis thaliana chromosome II section 18 of 255 of the complete sequence. Sequence from clones F3L12, T16B23.	AC007178	-1.2	-2.4	-1.1	-1.2
174	F8B4.190; nodulin-like protein	CAA22576	-	-2.4	-	-
175	serine/threonine-protein kinase Mak (male germ cell-associated kinase)-like protein	BAB09171	-1.2	-2.4	-1	1.1
176	AT4g16900; disease resistance RPP5 like protein	CAB80962	-1.3	-2.4	-1.2	-1
177	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, TAC clone:K21C13.	AB010693	-	-2.4	-1.2	1.1
178	T18A20.12	AAF02862	1.1	-2.4	1.2	-1.7
179	Arabidopsis thaliana chromosome I BAC F14M2 genomic sequence, complete sequence.	AC010164	-1.1	-2.3	-1.2	-1.2
180	HR-like lesion-inducing protein	BAA95732	-1	-2.3	-1.2	-1.2
181	Arabidopsis thaliana BAC F21J6 from chromosome V, containing KNAT3 and mapping near 60.5 cM, complete sequence.	AC006259	-1	-2.3	-1.2	-1.2

182	F2G14_150; putative protein	CAC01822	-1.3	-2.3	-	-
183	F5A18.26; putative alliinase; 99695-97270	AAG52348	-1.2	-2.3	-1.4	1
184	F6A14.21	AAF27111	-1.2	-2.3	-1.4	-1.4
185	T26D22.10	AAC13601	-1.1	-2.3	-1.3	-1.4
186	Arabidopsis thaliana calcium sensor homolog (SOS3) gene, complete cds.	AF060553	-1.3	-2.3	-	-
187	T16O9.6; protein kinase, putative	AAG51288	-1.2	-2.2	-1.1	-1.2
188	Arabidopsis thaliana AT4 mRNA sequence.	AF055372	-1.2	-2.2	-1.2	-1.3
189	gene_id:MDF20.25 ref NP_011524.1 similar to unknown protein	BAB09248	-	-2.2	-1.1	-
190	Arabidopsis thaliana biotin carboxyl carrier protein isoform 2 (BCCP2) mRNA, nuclear gene encoding plastid protein, complete cds.	AF223948	-	-2.2	-	-1.4
191	At2g39120	AAC79622	-1.3	-2.2	-1.2	-1.3
192	At2g48080	AAD13711	-1.4	-2.2	-1.5	-1.3
193	putative protein	CAB62313	-1.1	-2.2	-1	-1.1
194	T26I12.110; disease resistance response/ dirigent-like protein	CAB75757	-1.2	-2.2	-1.2	-1.2
195	T27E11.80; putative protein	CAB43972	-1.1	-2.2	-1.3	-1.3
196	gb AAC32911.1 gene_id:MJB21.3 similar to unknown protein	BAB10622	-1.1	-2.2	-1.1	-1.2
197	F2P3.11	AAC35535	1	-2.2	-1.3	-
198	F13K23.2	AAF78482	-1.3	-2.2	-1.2	-1.1
199	T9A21.110; unknown protein	CAA16798	-1.4	-2.2	-1.4	-1.2
200	F27K7.5; endo-beta-1,4-glucanase, putative	AAG29742	-	-2.1	-	-
201	contains similarity to ankyrin gene_id:MR11.10	BAB09592	1	-2.1	1.1	1.5
202	Arabidopsis thaliana defective in exine formation (DEX1) mRNA, complete cds.	AF257187	1.1	-2.1	1.2	-1.2
203	T12M4.4	AAC24081	-1.4	-2.1	-1.3	-1.1
204	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase-like	BAA96983	-	-2.1	-	-
205	F28N24.5	AAF88111	-	-2.1	-	-
206	A.thaliana AtMlo-h1 gene.	Z95352	-	-2.1	-1.4	-
207	At2g37090	AAD18150	-	-2.1	-	-
208	Genomic Sequence For Arabidopsis thaliana Clone F17K4 From Chromosome V, complete sequence.	AC068655	-	-2.1	-1.6	1.1

209	gb AAD43153.1 unknown protein	gene_id:K13E13.10	similar	to	BAB01695	-	-2.1	-	-
210	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 4, BAC clone F20D10 (ESSA project).				AL035538	-1.2	-2.1	-1.4	-
211	Arabidopsis thaliana chromosome II section 194 of 255 of the complete sequence. Sequence from clones T32F12.				AC005314	-	-2.1	-1.4	-
212	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 3, PI clone:MLD15.				AP000386	-	-2.1	-	-
213	AT4g19240; hypothetical protein				CAA18611	-	-2.1	-	-
214	Arabidopsis thaliana peroxidase (basic, prxEa) gene, complete cds.				M58381	-	-2.1	-	-
215	AT4g32860; putative protein				CAB80003	-1.1	-2.1	-1.4	-1.2
216	gb AAC72114.1 unknown protein	gene_id:MRO11.18	similar	to	BAB10051	-	-2.1	-	-
217	gb AAF40458.1 unknown protein	gene_id:MUJ8.11	similar	to	BAB01362	-	-2.1	-	-
218	F23A5.32				AAF14684	-	-2.1	-1.2	-1.3
219	AT4g09580; putative protein				CAB78081	1.2	-2.1	1	1
220	gene_id:MUB3.4 unknown protein	ref NP_005422.1	similar	to	BAB11419	1.1	-2.1	-1.2	1
221	At2g46750				AAC33494	-1.2	-2.1	-	-1.1
222	contains similarity to unknown protein gb AAF19687.1 gene id:MOP9.16				BAB10398	-1.3	-2.1	-1	-1.3
223	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 5, BAC clone T4C12 (ESSA project).				AL392145	-	-2.1	1	-1.2
224	Arabidopsis thaliana At1g67090 (At1g67090/F1O19.10) mRNA, complete cds.				AF325004	-	-2.1	-	-

1.2.4. 오이 cDNA chip의 제작 및 시험 (소규모 320 spot)

가. 오이 cDNA chip을 위한 클론 증폭

Blast search를 끝낸 clone들에 대한 오이 cDNA chip을 시험제작 후, 바이러스 접종 식물체와 mock 접종 (buffer로만 접종) 식물체의 유전자 발현양상을 비교하기 위하여 각 cDNA insert들을 PCR을 이용하여 증폭하였다. cDNA chip에 사용된 목적 probe의 개수는 시험 목적상 320개로 하였다. 클론의 증폭은 pTriplEx2 및 pGEM-T vector의 universal primer site를 이용하였다. pTriplEx2의 경우 up-triplEx (5'-CTCGGGAAGCGC-GCCATTGTGTTGGT-3')과 down-T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGGC-3')을 이용하였고, pGEM-T는 T7과 SP6 primer를 이용하였는데, 증폭효율이 매우 낮고, plasmid를 갖고 있는 E.coli의 증식율이 매우 낮아 클론의 준비에 어려움이 있었다.

준비된 clone들은 다시 384-well plate로 옮겨 aminosilane glass slide에 array할 수 있도록 준비하였다. Well converter program을 이용하여 384-well plate 및 array 순서를 기록하였다.

나. microarray spotting 및 시험

Spotting은 위탁과제에서 수행하였으며, BioRobotics사의 MicroGrid II로 약 5nl가 loading되도록 하였으며, spot의 크기는 약 100um 그리고, spot 간의 space는 약 180um 정도가 되도록 하였다. Spotting이 끝난 slide들은 blocking 과정을 거쳐 건조한 암소에 보관하였다.

ZGMMV를 감염시킨 후, 3, 24hr째에 수확한 자엽, CFMMV를 접종후 24hr 째에 수확한 자엽 및 무처리 자엽의 total RNA를 추출한 후, hybridization을 위하여 Genisphere사의 Array 50 kit을 이용하여 indirect labeling을 수행하였다.

각 처리구에서 50ug의 total RNA를 SuperScript II RT (Invitrogen)로 reverse transcription 시켰으며, 이때 Cy5-, Cy3-dendrimer 특이적인 primer를 사용하였다. 바이러스 접종구는 Cy5, 대조구는 Cy3로 labeling이 될 수 있도록 하였다. 합성된 cDNA는 EtOH down으로 10ul에 농축하였고, 2X SDS buffer와 같이 1st step hybridization을 수행하였다. 16시간의 hybridization 후, 2X SSC, 0.2% SDS에서 10분 (60C), 2X SSC 10분 (RT), 0.2X SSC 10분 (RT)의 순서로 washing하고 다시 Cy5-, Cy3-dendrimer가 포함된 hybridization buffer를 이용하여 암소에서 2nd step hybridization을 3시간동안 수행하였으며, Lan(dT) 및 Cot-1 DNA를 이용하여 background를 줄이고, non-specific reaction이

일어나지 않도록 하였다. 이후, 앞서와 동일한 과정으로 washing하였다. 완전히 건조된 slide를 바로 Axon사의 scanner (GenePix 4000A)로 635nm와 532nm에서의 여기파장을 이용하여 scanning 하였다.

Scan된 이미지는 GenePix Pro (ver. 4.0) program을 이용하여 분석하였다. 전체 spot에 대한 normalization을 수행하였고, 형광강도 비율을 ratio of median, median of ratio 등으로 분석 저장하였다. 최종적으로 다음 Fig. 1.24 및 Fig. 1.25와 같은 결과 이미지를 얻을 수 있었다.

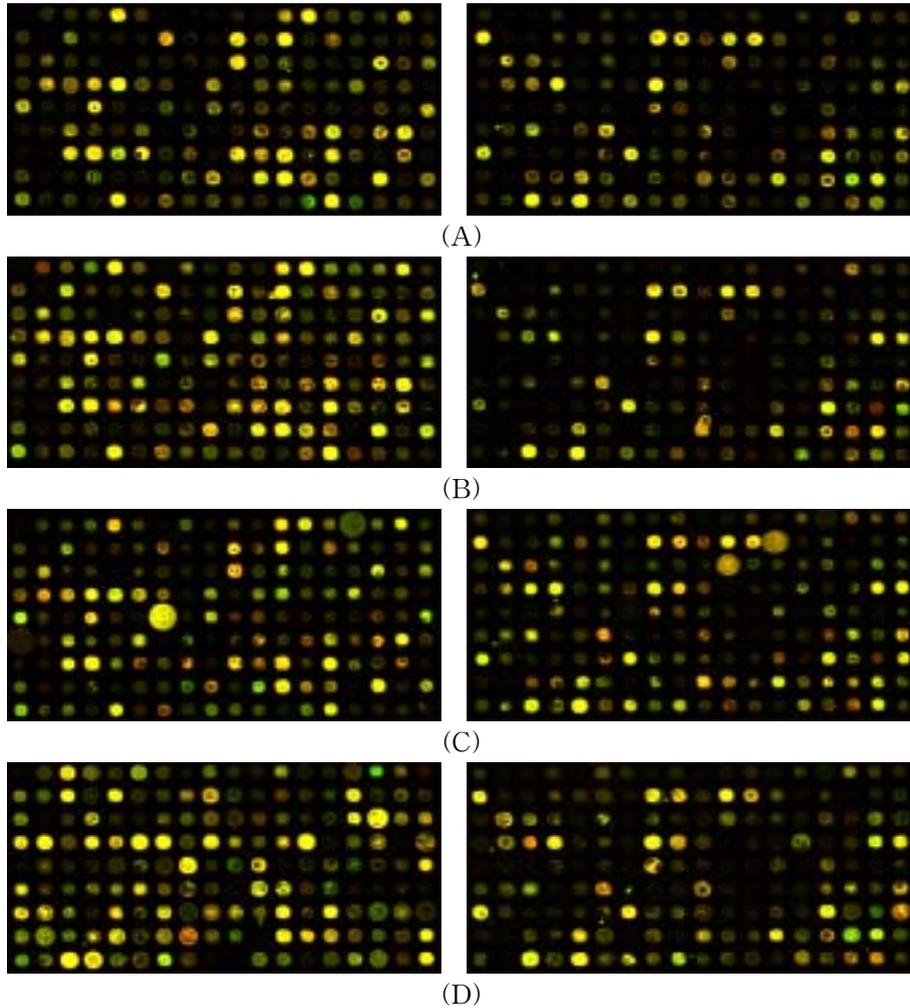


Fig. 1.24. Scan image analysis of ZGMMV induced cucumber plants mRNA profiling.
(A) 3hr, (B) 6hr, (C) 12hr, (D) 24hr after inoculation with ZGMMV.

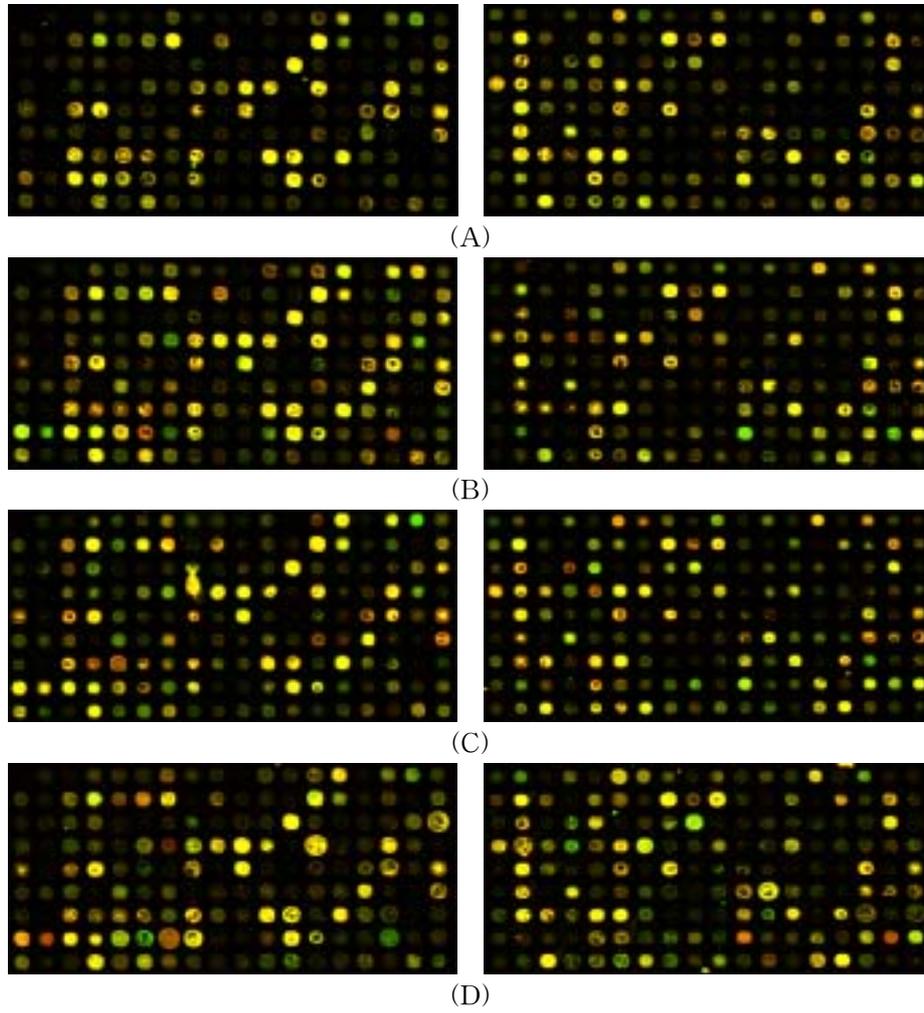


Fig. 1.25. Scan image analysis of CFMMV induced cucumber plants mRNA profiling. (A) 3hr, (B) 6hr, (C) 124hr, (D) 24hr after inoculation with the virus.

예상한 바와 같이 전체적으로 virus infection과 wound에 의해 동시에 발현되는 transcripts들이 50% 정도로 나타났으며, 반면에 wound specific 한 유전자들의 발현이 많이 나타났다.

또한, putative transcription factor, membrane associated protein과 unidentified hypothetical protein들은 접종 후 시간의 경과에 따라 발현이 증가되었다가 억제되는 다양한 발현 pattern을 보여주었다.

한편, 오이 감염성 tobamo virus이면서 ZGMMV와는 다른 subgroup의 CFMMV (Cucumber fruit mottle mosaic virus)을 접종한 결과는 ZGMMV의 profiling과 매우 상이한 결과를 나타내었다. Fig. 1.25에서 볼 수 있듯이 Fig. 1.26과는 매우 다른 유전자 발현양상을 나타내어 이에 대한 좀더 심도있는 연구가 필요하다고 생각된다. 실제 오이에 감염되었을 경우에도 CFMMV의 경우 mottle의 정도가 매우 심하며, 병징의 발현이 더 빠르고, 주변 환경이 부적절할 경우 어린 묘 상태에서 50%이상이 제대로 생육하지 못하고 고사하는 등 매우 강력한 virus라고 보여진다.

본 결과를 통하여 오이 cDNA-chip의 시험적 제작 및 필요한 실험환경을 확립하였고, 좀더 다양한 cDNA, ESTs를 확보하여 박과바이러스 감염시 오이에서의 유전자 발현 변화를 알아보려고 다음 항목의 연구를 진행하였다.

1.2.5. 오이 cDNA-chip을 이용한 유전자발현 탐색 (1.2K spot)

1.2.5.1. 오이 cDNA-chip용 클론의 증폭

약 1200개의 spot을 array한 오이 유전자 발현탐색을 위한 cDNA-chip을 제조하기 위하여 PCR을 이용하여 각 유전자를 증폭하였다. 증폭된 유전자의 최종 농도는 200ng/ul 이상이 되도록 하였으며, 이때 총량은 40ul 이상이 되도록 하였다.

이들 유전자는 실험목적상 서로 각기 다른 plasmid에 subcloning되어 있었기 때문에, PCR-based cDNA library는 Triplex sequencing primer (forward)와 T7 promoter primer (reverse)를 이용하여 증폭하였고 (Fig. 1.27), SSH 및 DDRT의 방법으로 sequencing하였던 유전자들은 pGEM T-Easy vector (Promega)에 subcloning되어 있어 T7 promoter (forward)와 SP6 (reverse)의 universal primer set을 이용하였다 (Fig. 1.28). 또한, lambda-ZAPII를 이용한 cDNA library는 pBluscriptII SK-를 이용하고 있어, 이 경우 T3 (forward)와 T7 (reverse) primer set을 사용하여 증폭하였다 (Fig. 1.29). 이들 증폭산물의 전기영동 결과는 다음과 같다.

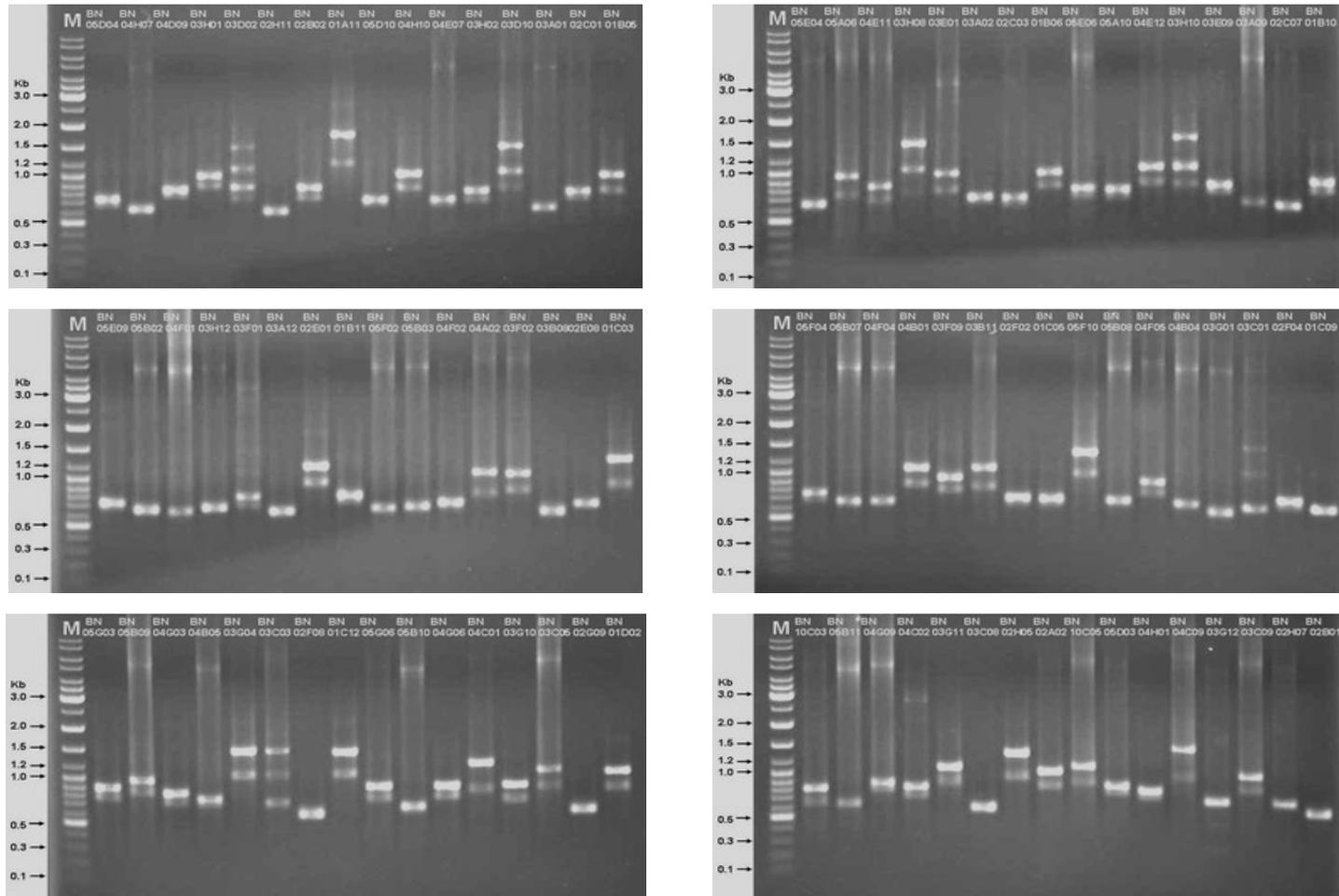


Fig. 1.27. Sequenced PCR clone used in microarray searching for different genes expressed in virus inoculated *Cucumber* (Plate 1) - 5TriplEx & T7 primer

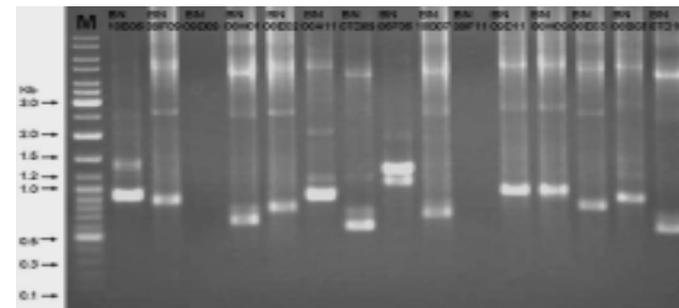
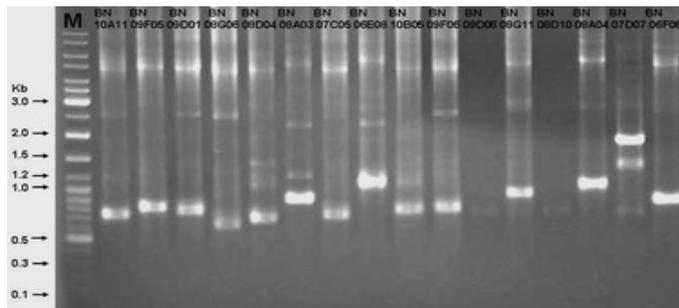
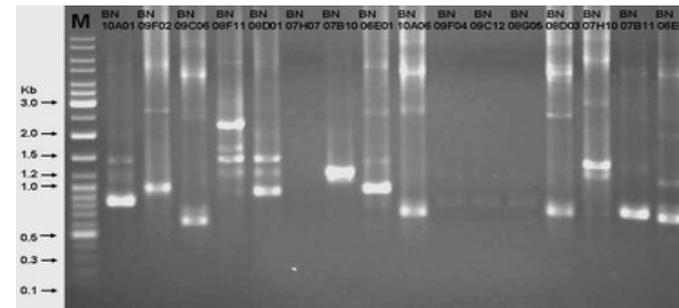
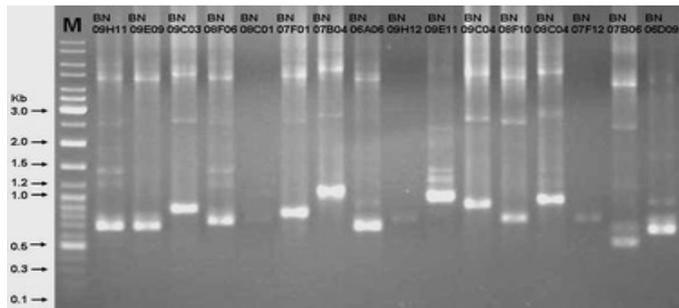
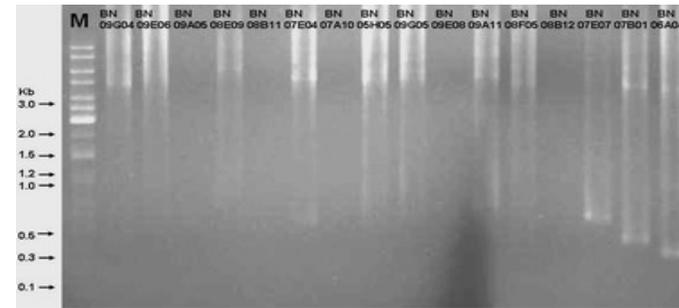
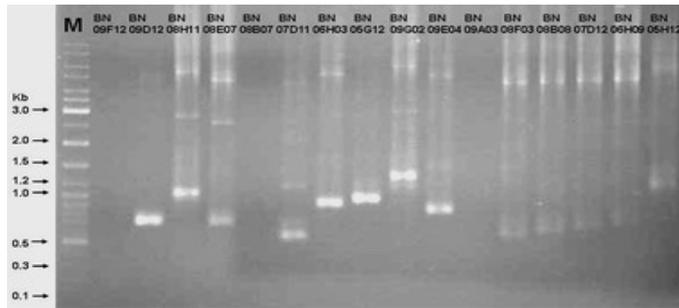


Fig. 1.27A. Continued (plate 2) - 5TriplEx & T7 primer

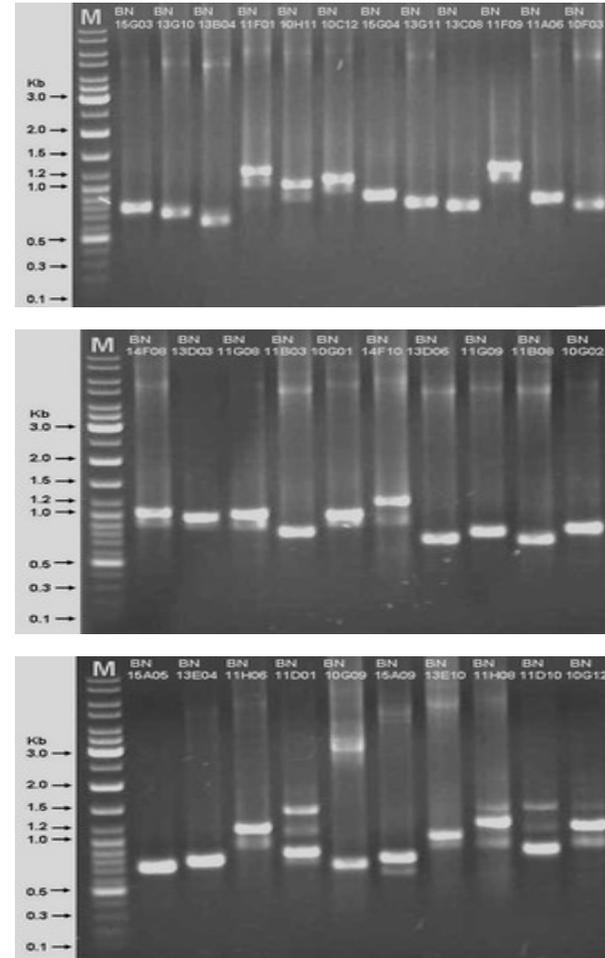
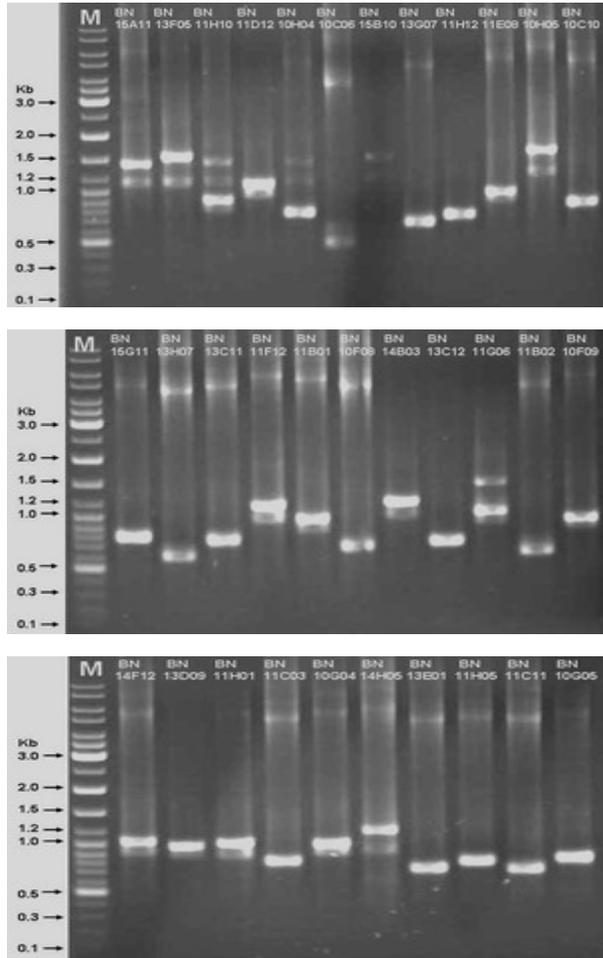


Fig. 1.27B. Continued (plate 3) - 5TriplEx & T7 primer

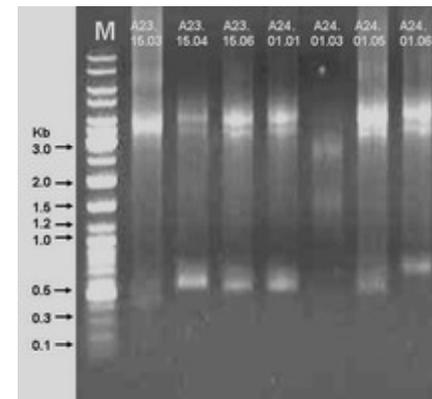
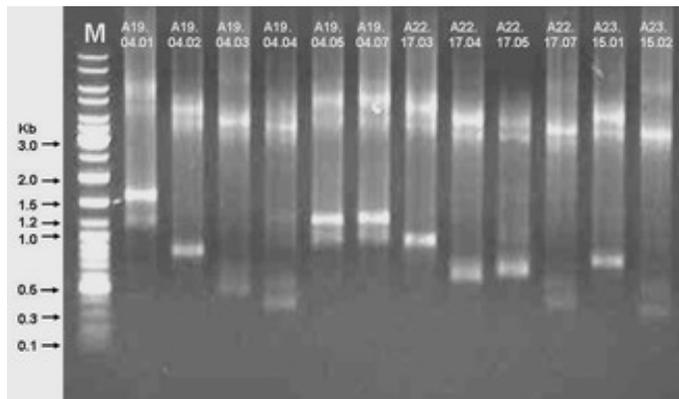
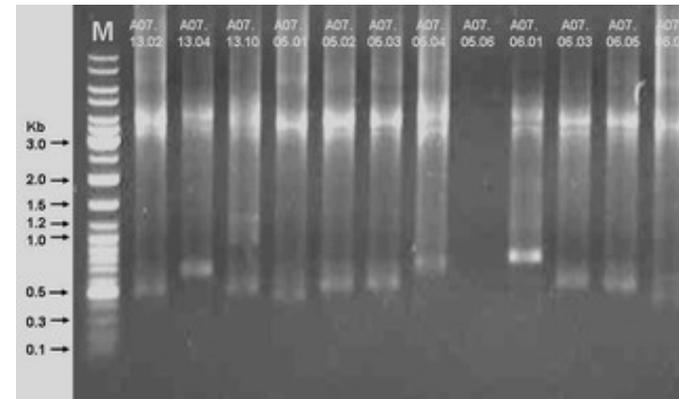
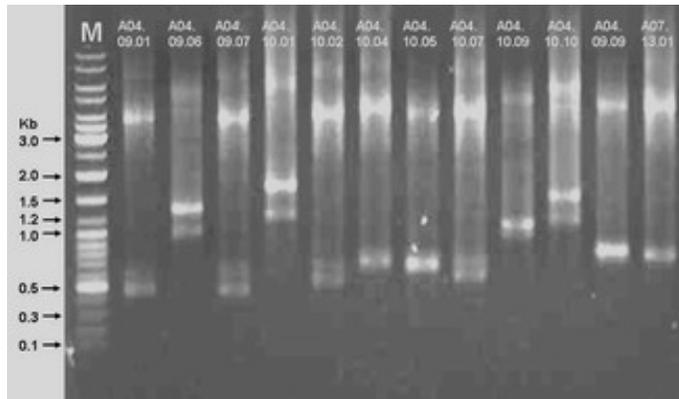


Fig. 1.28. Sequenced PCR clone used in microarray searching for different genes and specifically expressed in virus inoculated *Cucumber* (plate 4) - SSH and DDRT clone (T7 & SP6)

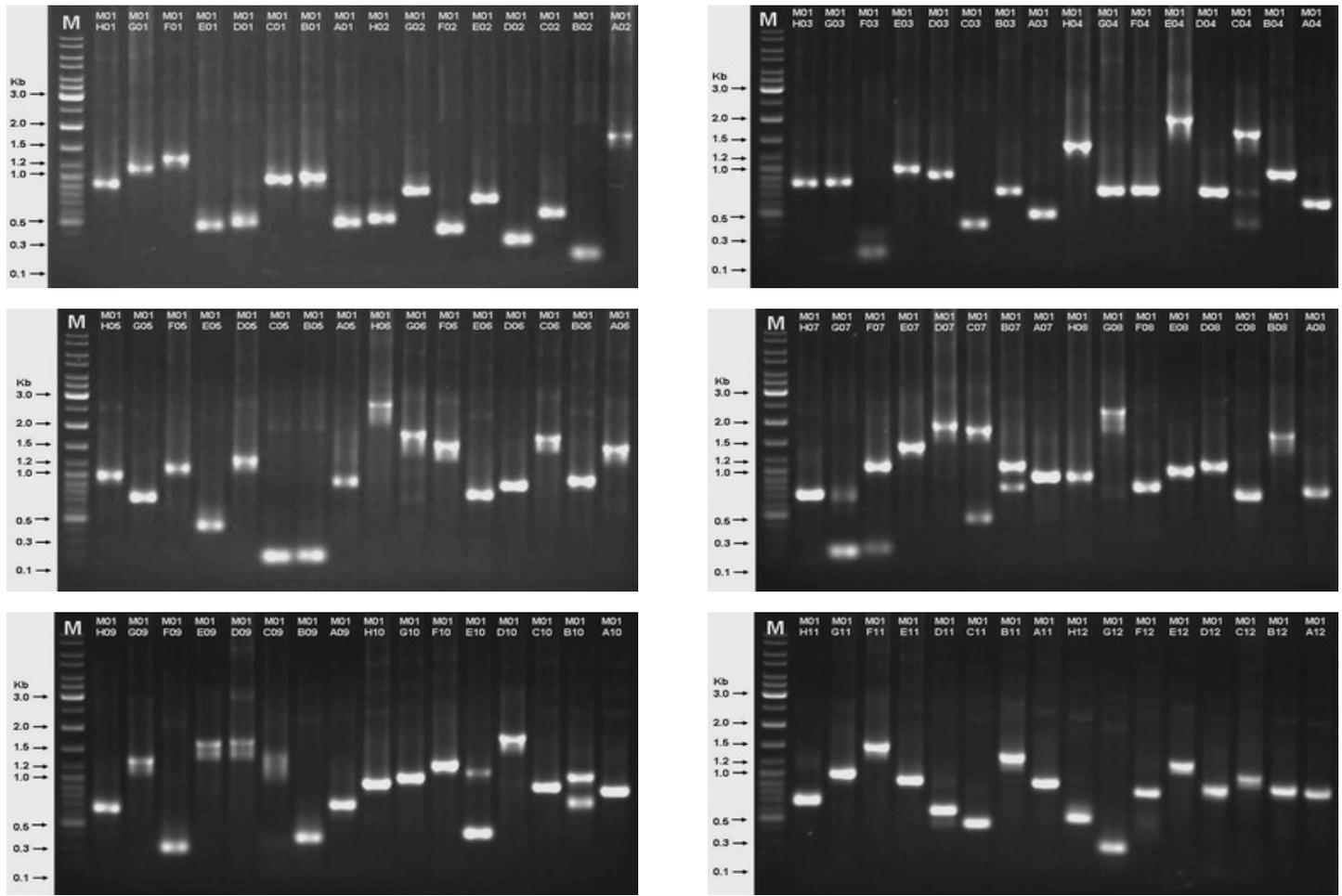


Fig. 1.29. Microgen sequencing PCR clone used in microarray searching for different genes expressed in virus inoculated *Cucumber* (M1) (T7 & T3)

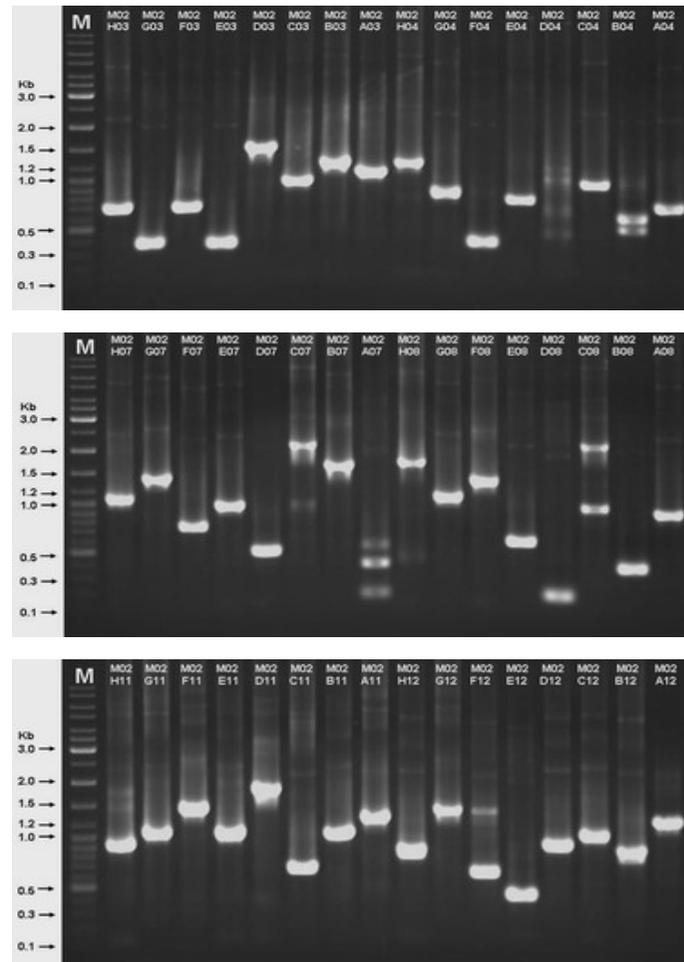
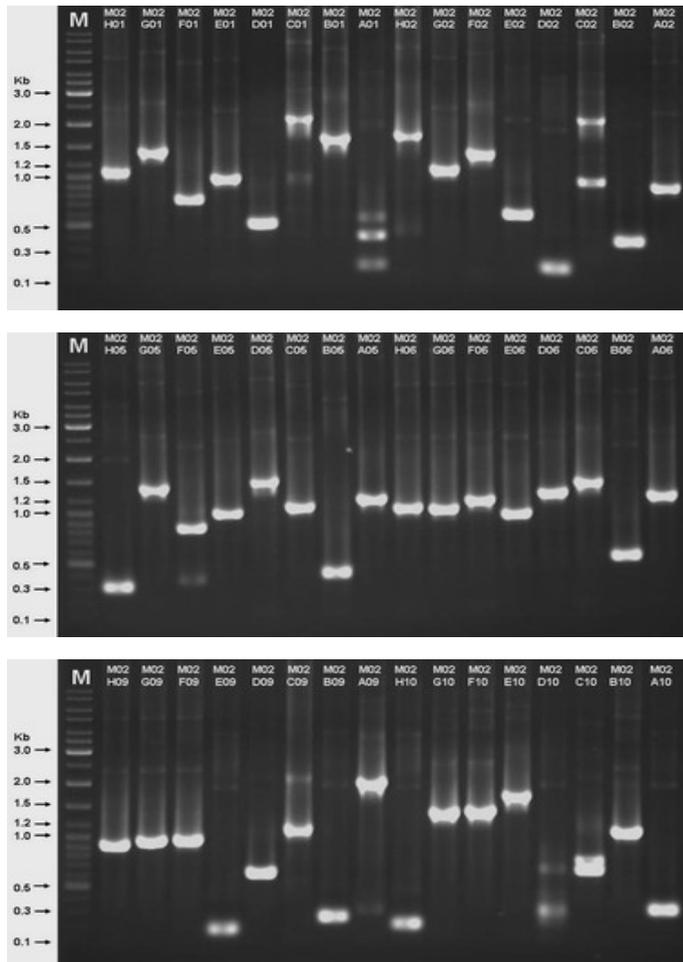


Fig. 1.29A. Continued (M2) - (T7 & T3)

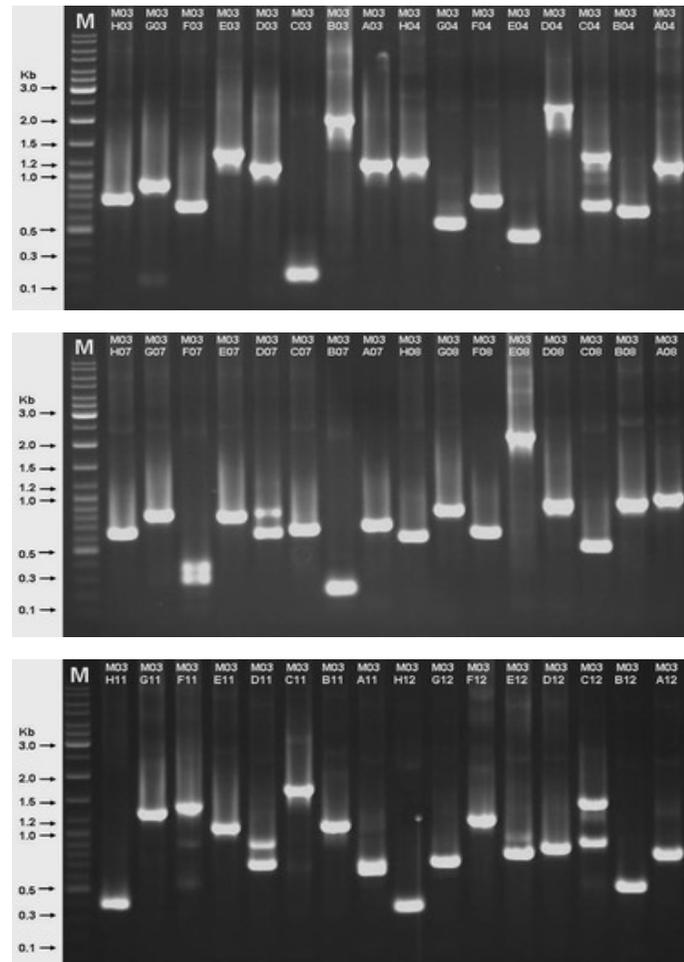
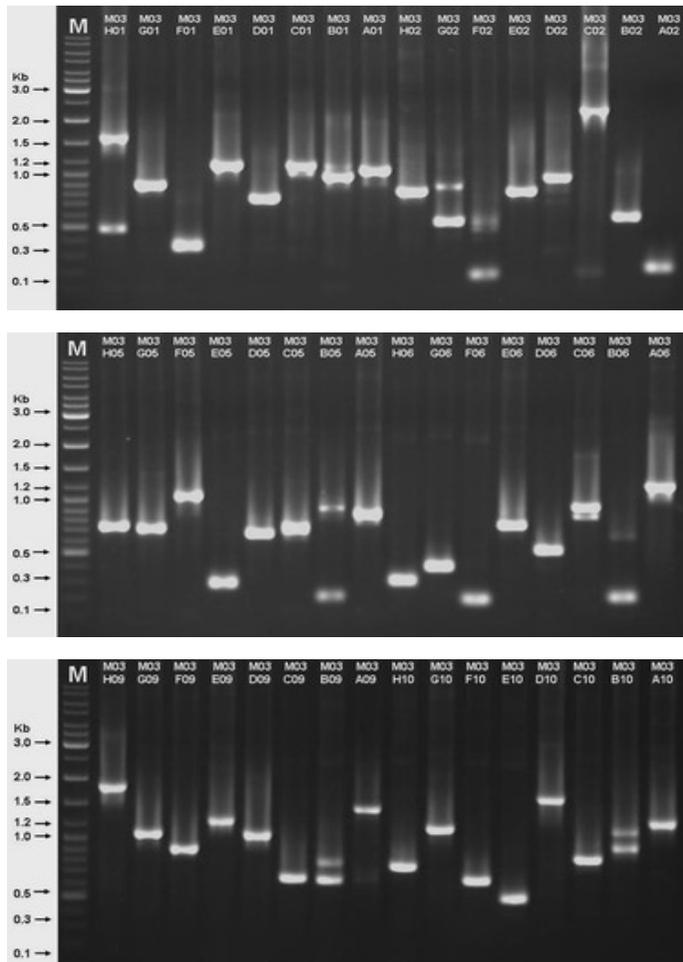


Fig. 1.29B. Continued (M3) (T7 & T3)

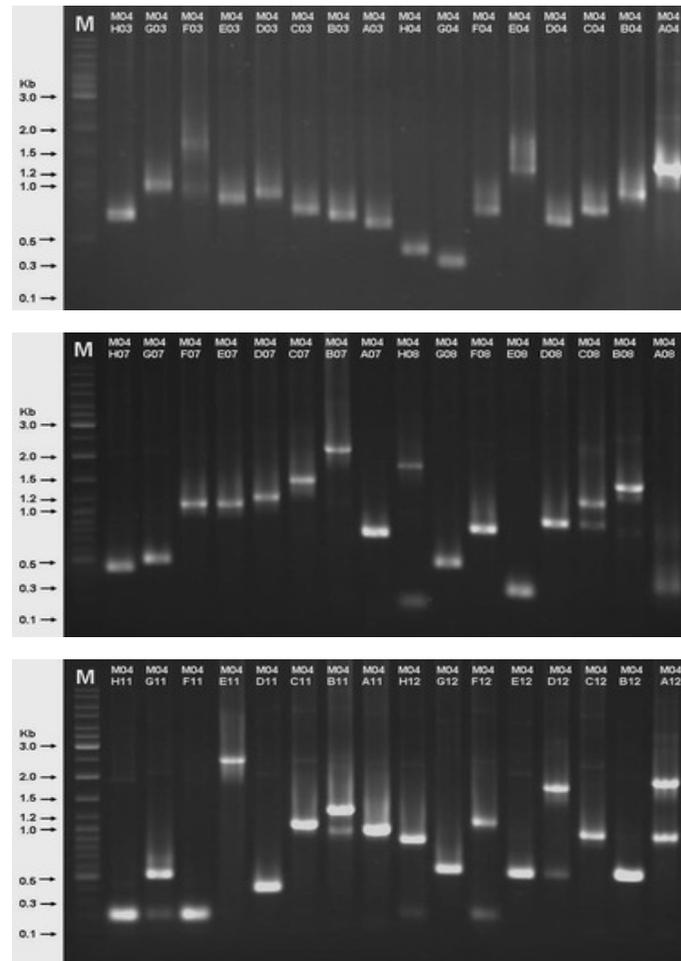
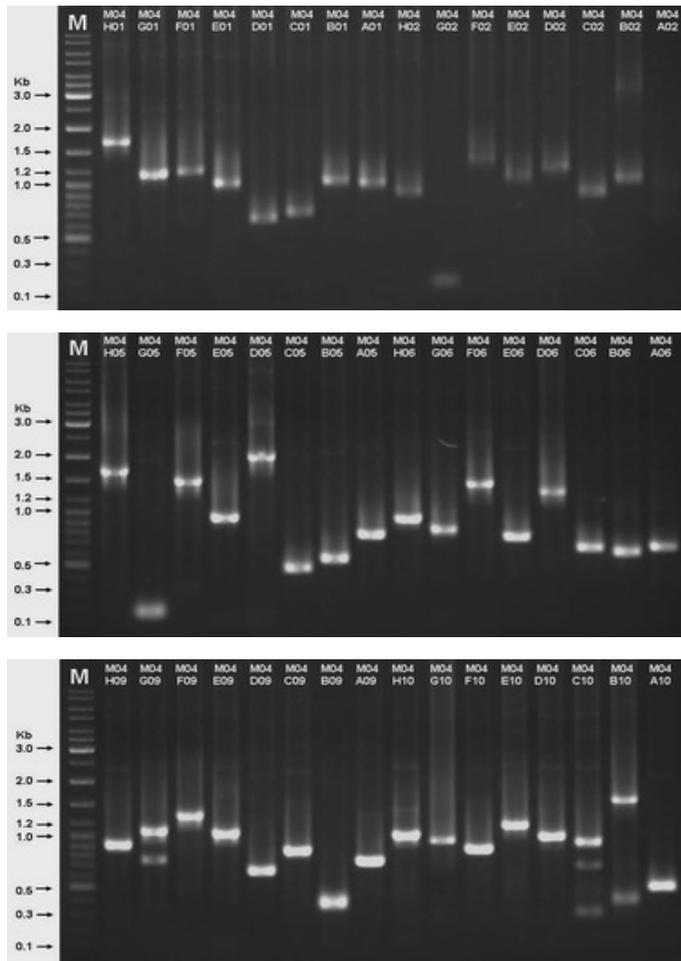


Fig. 1.29C. Continued (M4) - (T7 & T3)

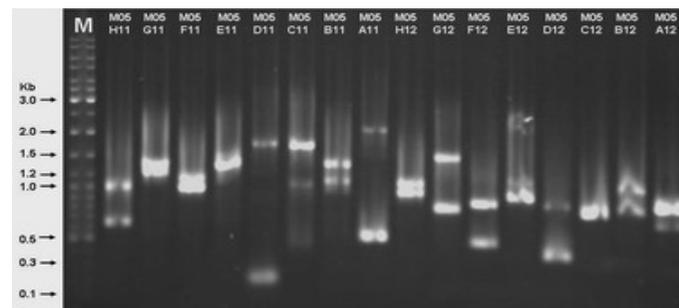
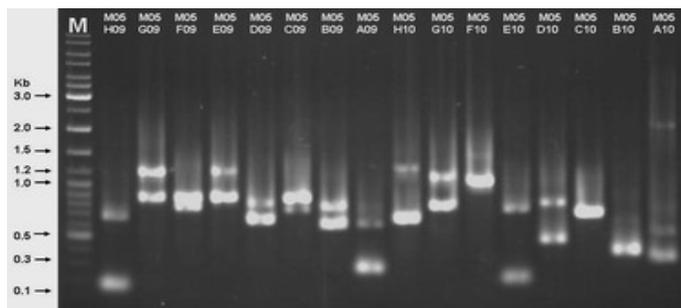
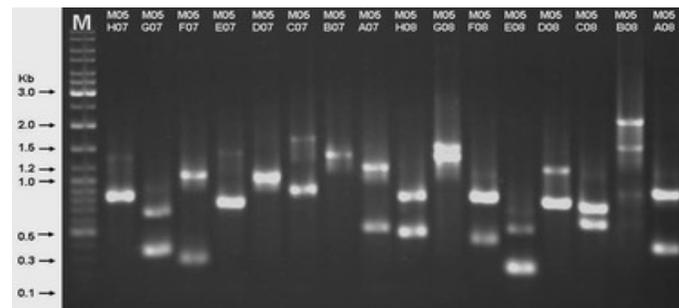
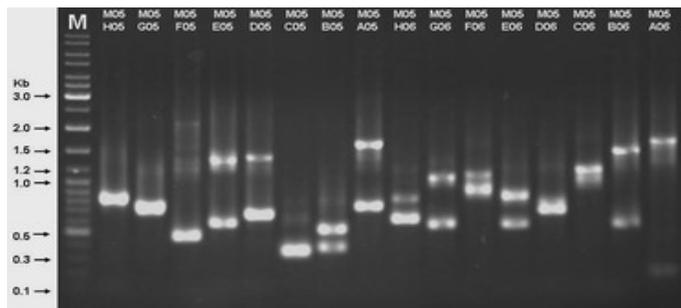
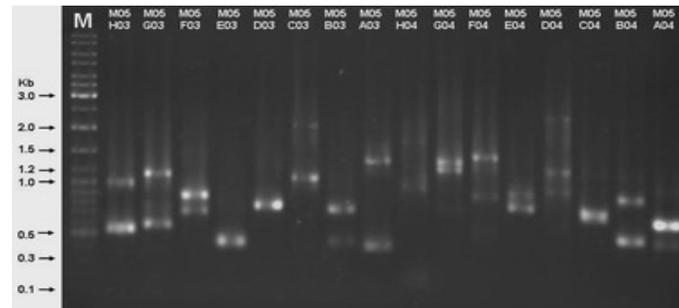
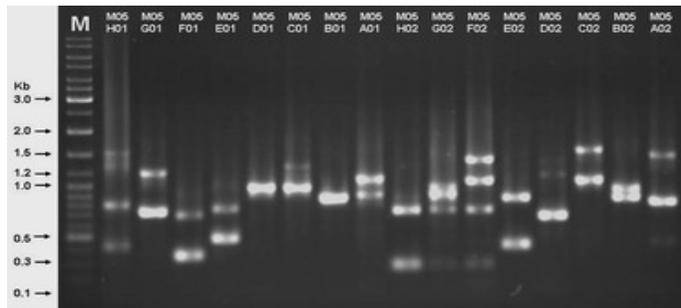


Fig. 1.29D. Continued (M5) - (T7 & T3)

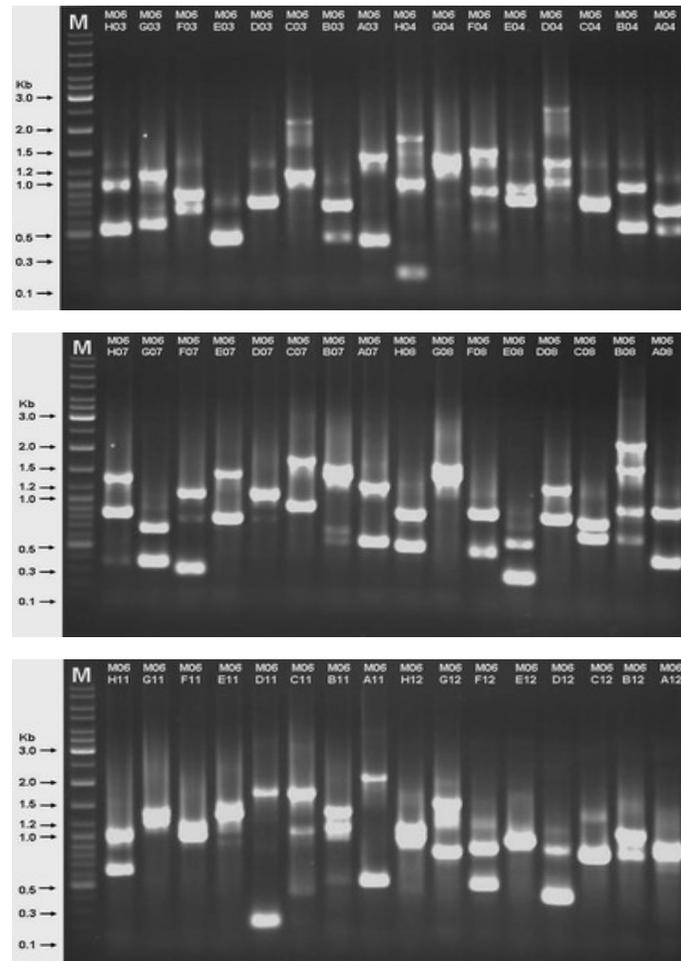
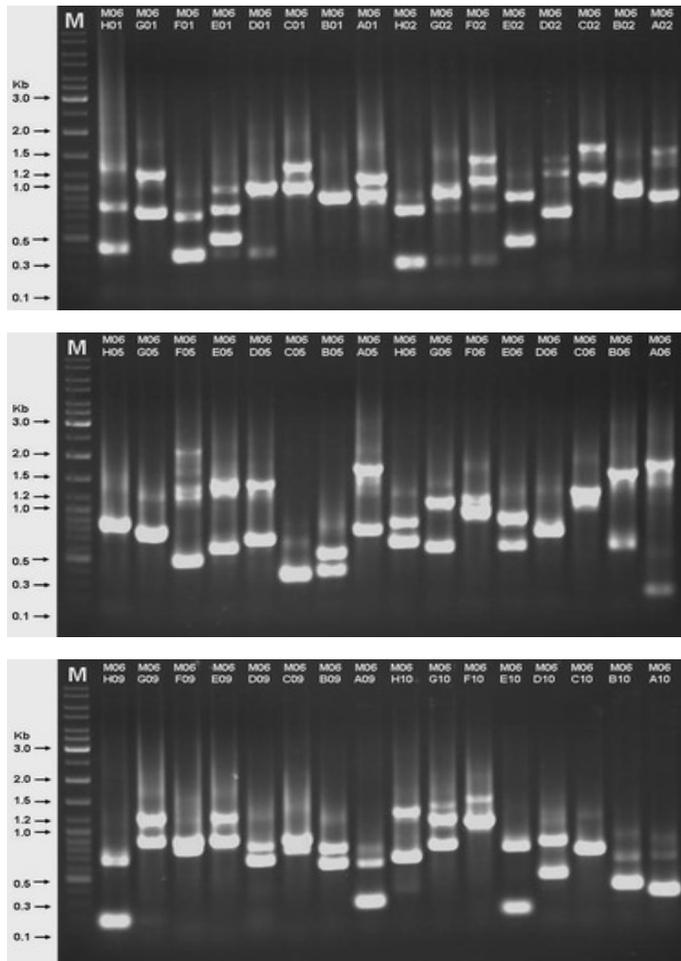


Fig. 1.29E. Continued (M6) - (T7 & T3)

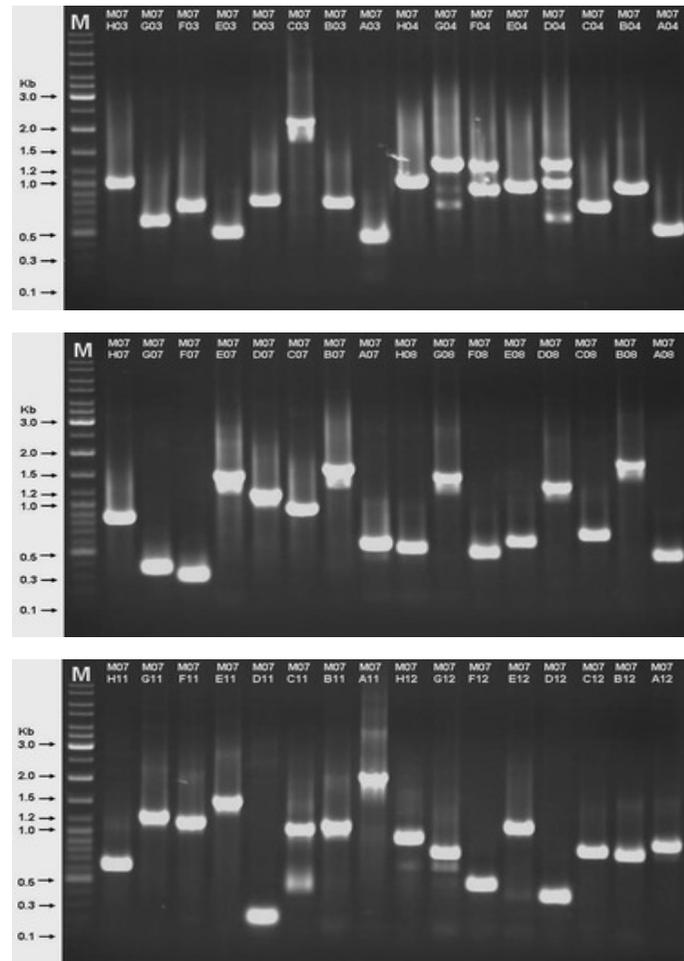
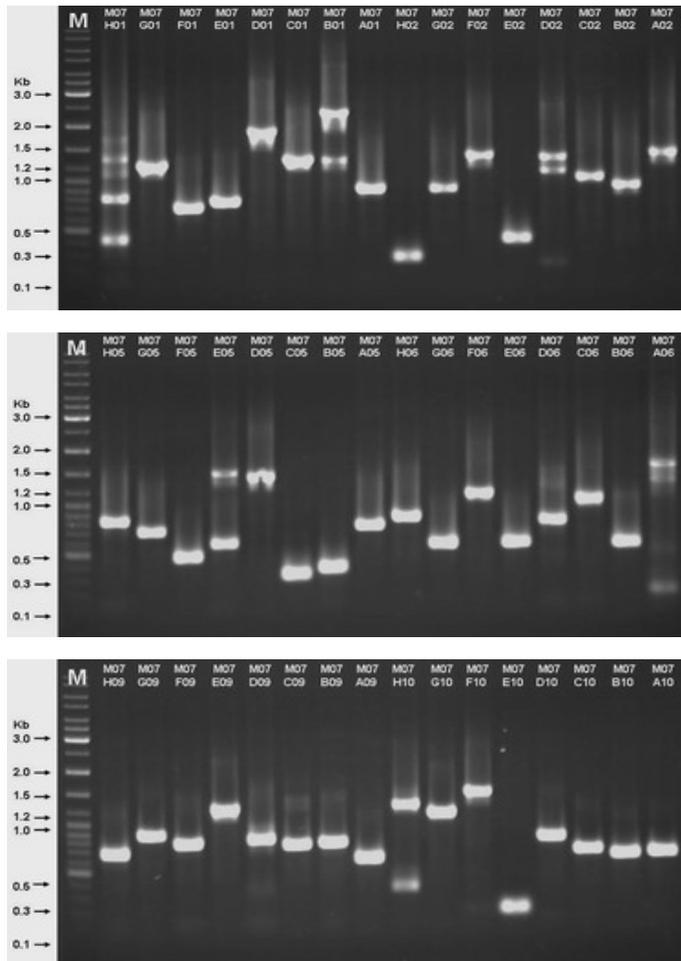


Fig. 1.29F. Continued (M7) - (T7 & T3)

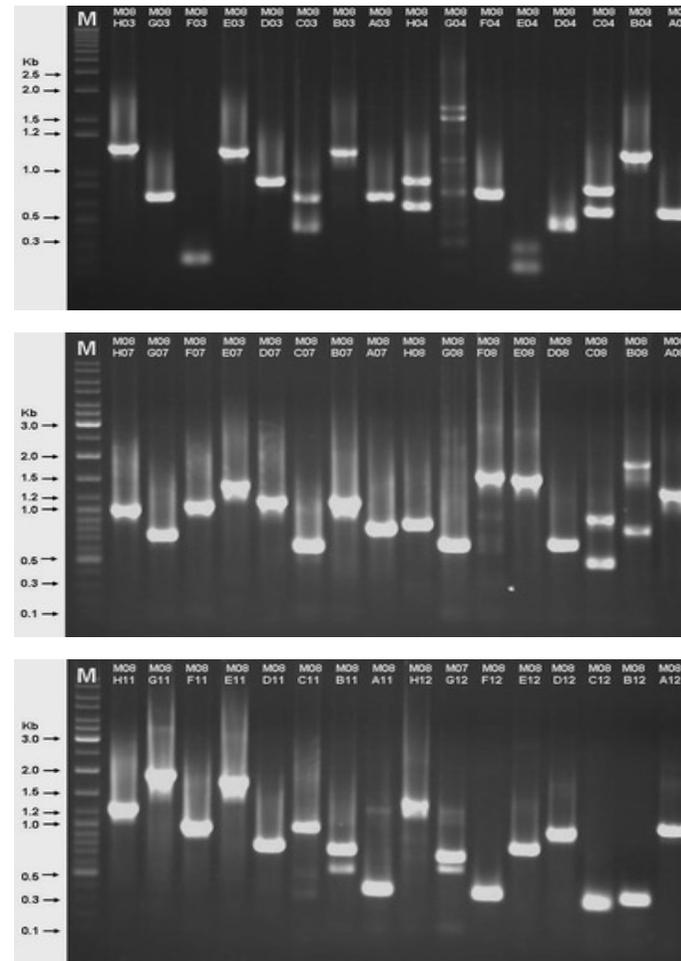
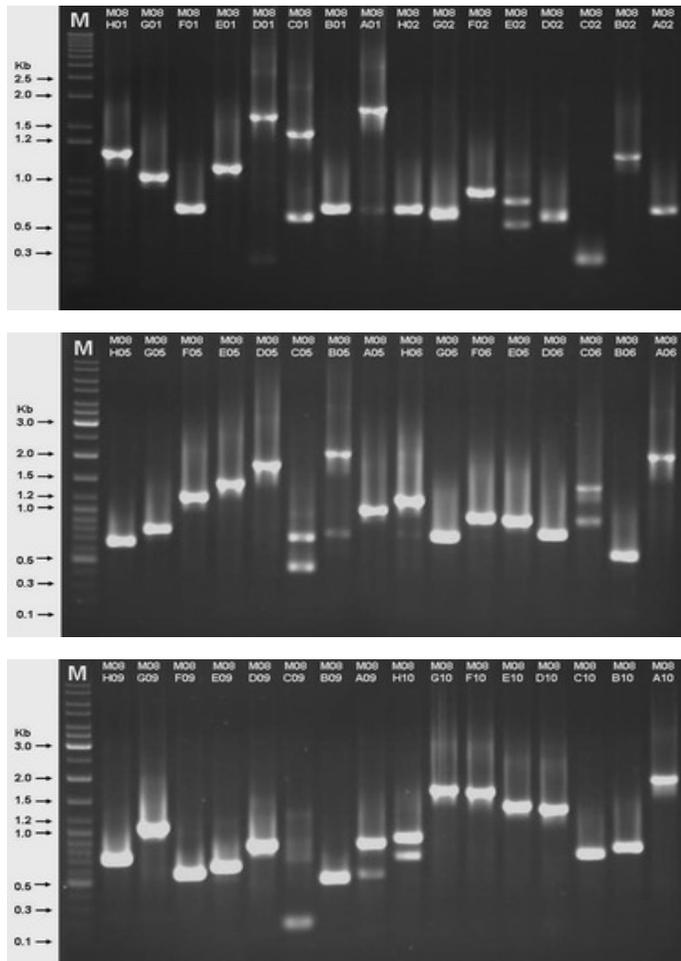


Fig. 1.29G. Continued (M8) - (T7 & T3)

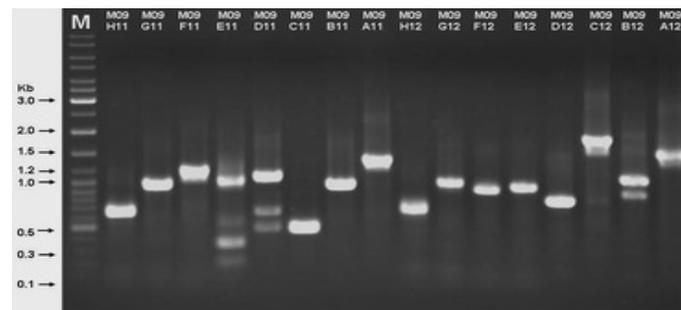
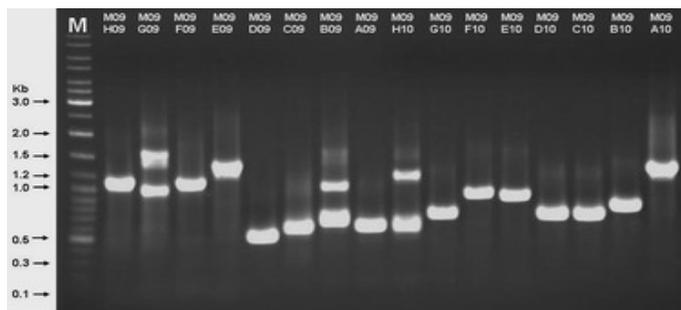
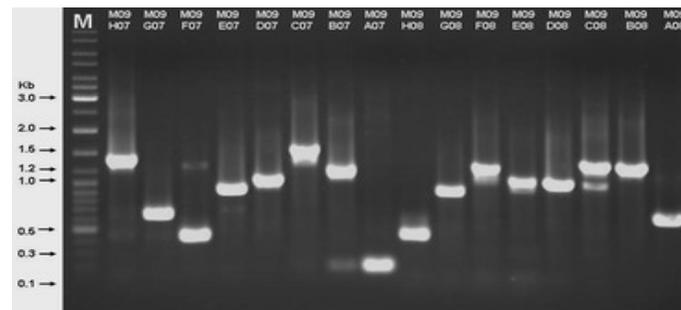
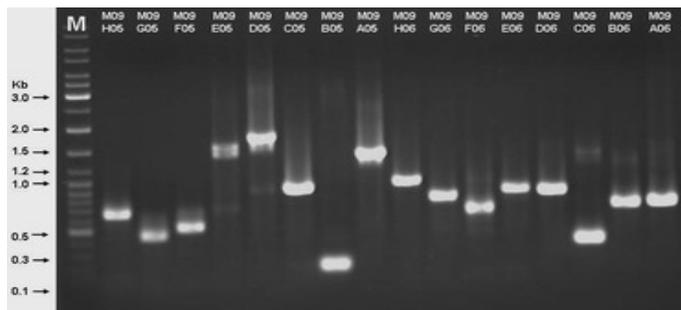
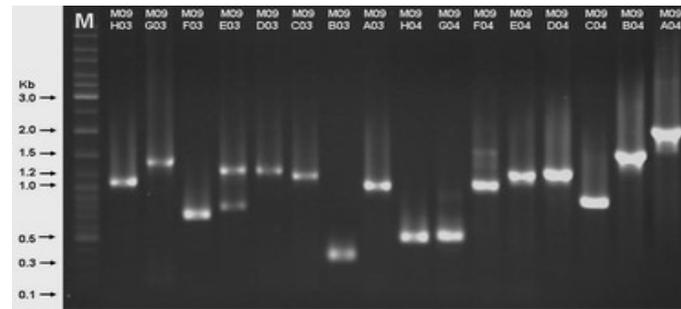
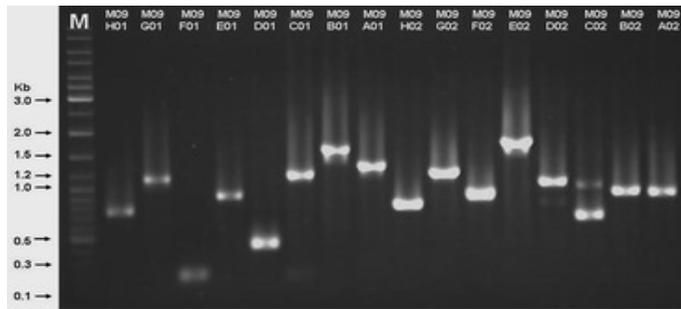


Fig. 1.29H. Continued (M9) - (T7 & T3)

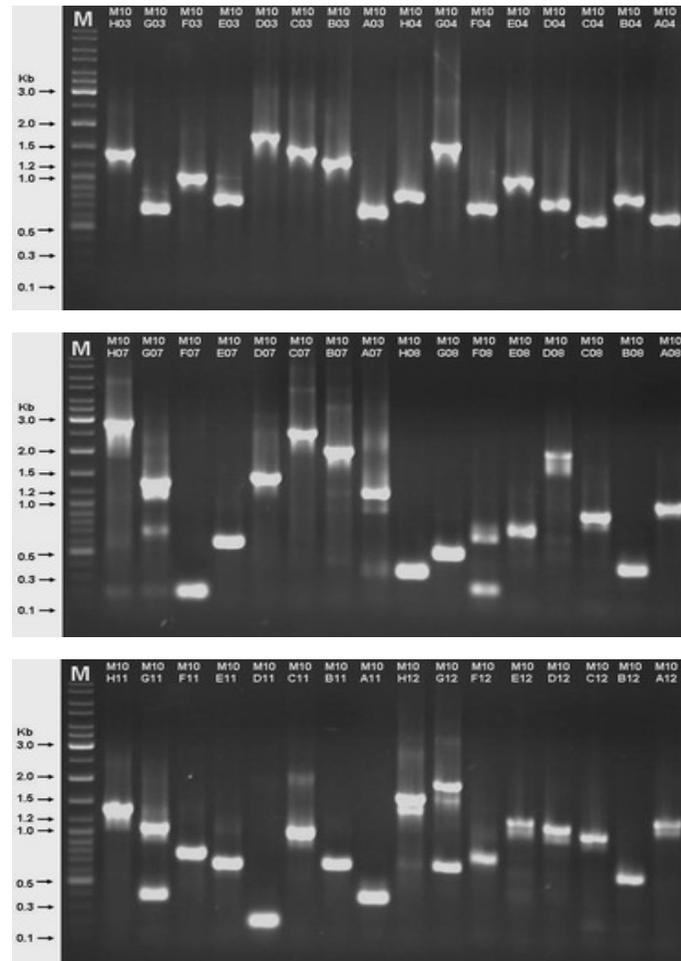
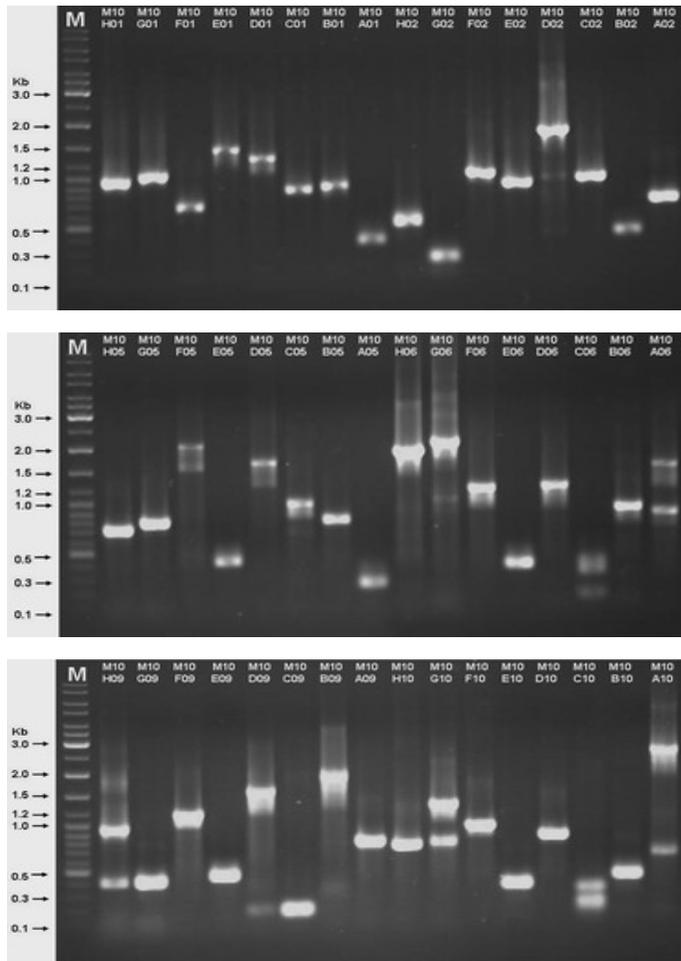


Fig. 1.29I. Continued (M10) - (T7 & T3)

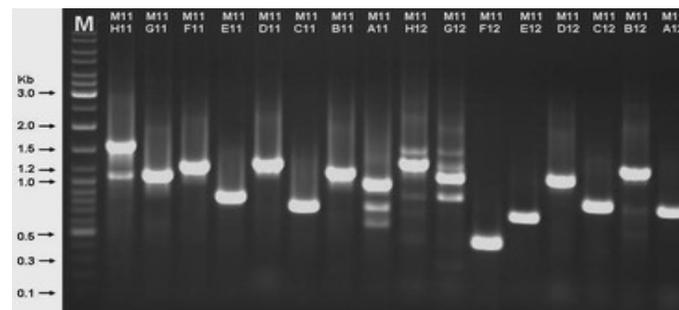
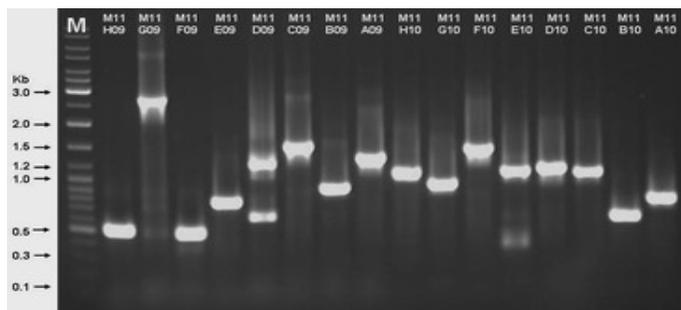
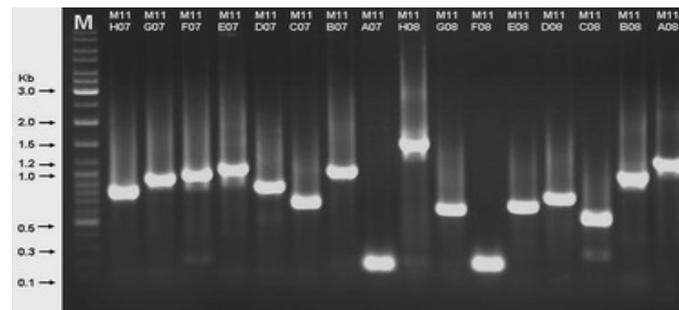
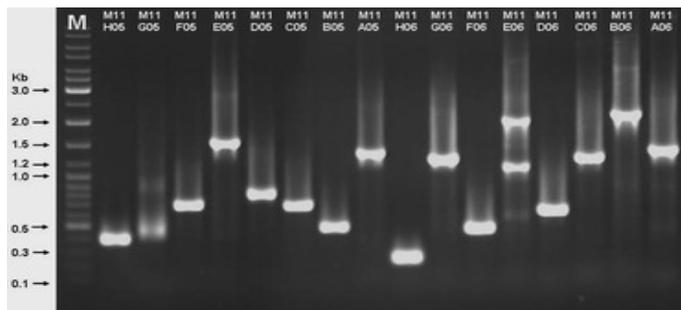
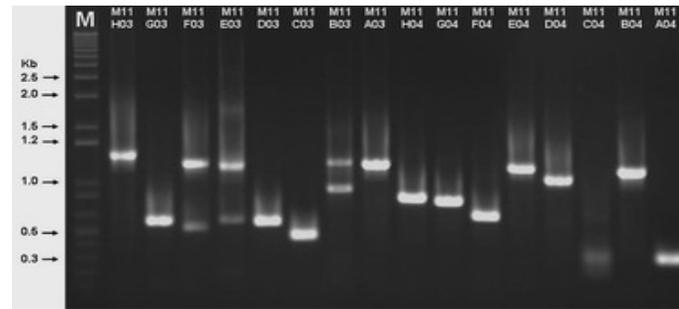
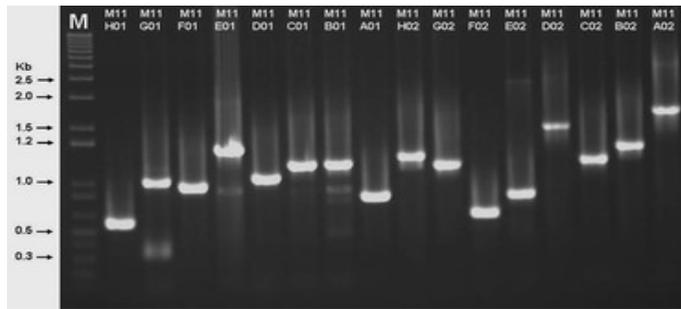


Fig. 1.29J. Continued (M11) - (T7 & T3)

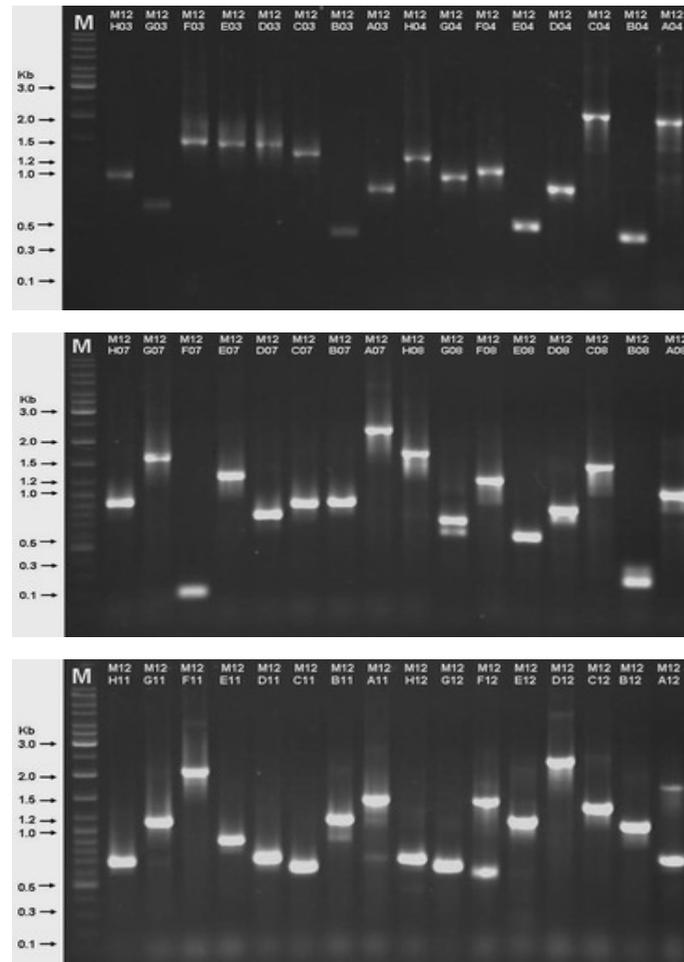
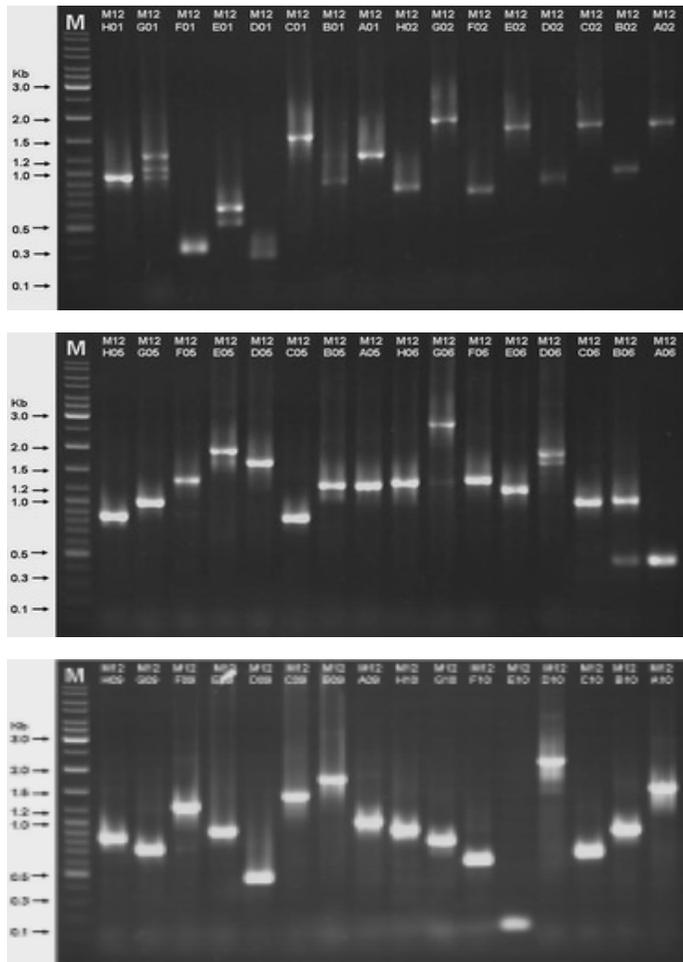


Fig. 1.29K. Continued (M12) - (T7 & T3)

증폭된 유전자는 sequencing으로부터 얻었던 결과물과 크기를 비교하였고, 일치하는 결과물만을 제작에 사용하였다.

1.2.5.2. 오이 cDNA-chip 제작

오이 cDNA-chip의 제작은 위탁과제에서 수행하였으며, 그 과정 및 결과는 위탁과제 결과부분 (식물체 DNA-chip 개발 및 상용화)에 보고하였다.

1.2.5.3. 오이 cDNA-chip을 이용한 유전자 발현 탐색

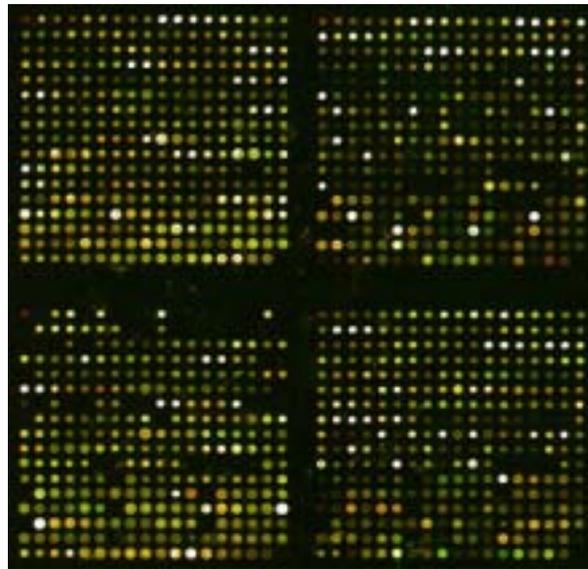
확보한 오이 ESTs를 사용하여 만들어진 cDNA-chip을 이용하여 ZGMMV 및 CMV를 감염시킨 오이에서의 유전자 발현 탐색을 위하여 microarray hybridization을 수행하였다.

ZGMMV 및 CMV 접종 후, 6, 12, 24, 48, 72시간이 경과했을 때, 감염된 바이러스에 의한 식물체의 transcription 변화를 profiling하기 위하여, hybridization과 washing이 끝난 각 slide를 GenePix Pro (ver.4.1) 프로그램을 이용하여 Cy5 (635nm)와 Cy3 (532nm)의 파장으로 동시에 confocal scanning 하였다.

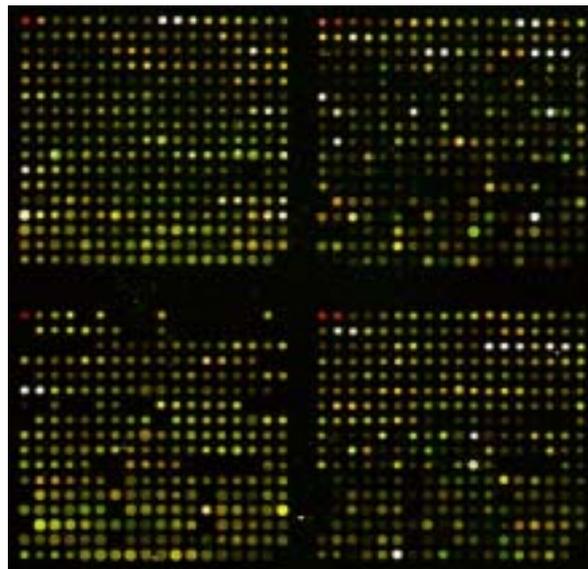
Scanning된 이미지는 ZGMMV와 CMV-fny 접종 후 경과시간별로 6시간 (Fig. 1.30), 12시간 (Fig. 1.31), 24시간 (Fig. 1.32), 48시간 (Fig. 1.33), 그리고 72시간 (Fig. 1.34)로 나누어 비교하여 보았다. 흥미로운 것은 Tobamovirus인 ZGMMV 감염 앞에서 유래한 유전자들 임에도 Cucumovirus인 CMV-fny에 대한 response가 시간경과별로 더 dynamic한 profiling을 보여주었다. 따라서, 본 cDNA-chip은 오이 감염성 tobamovirus group 뿐만 아니라 다른 오이 감염성의 다른 virus group에 대한 식물체의 transcription 변화 양상을 관찰하기에 적합한 것으로 판단되었다.

각 spot의 image는 printing 용 pin의 노후화에 따른 것으로 앞으로 version이 새로워지면, 좀더 균일한 크기의 spot을 얻을 수 있을 것으로 기대하고 있다.

경과 시간별 이미지의 패턴은 대체로 6시간까지 초기 반응이 존재하고 12시간째에는 repression되는 spot들이 많이 나타나게 된다. 또한 24시간부터는 differential 이미지들이 급증하여, 바이러스의 증식이 한번 이루어지고 다시 이동이 시작되는 것으로 예측되었다.

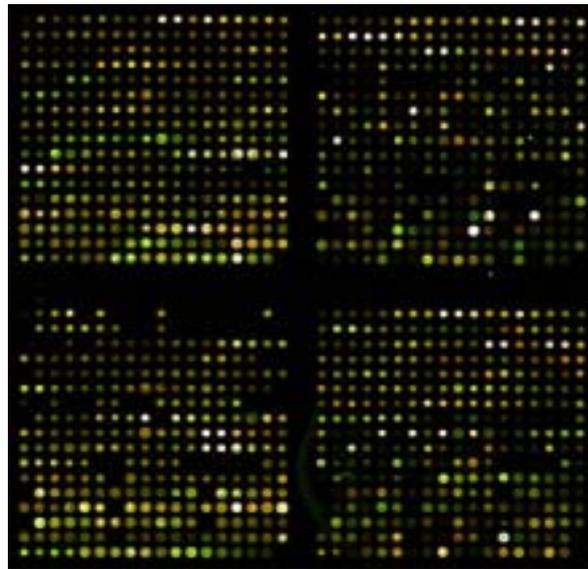


(A)

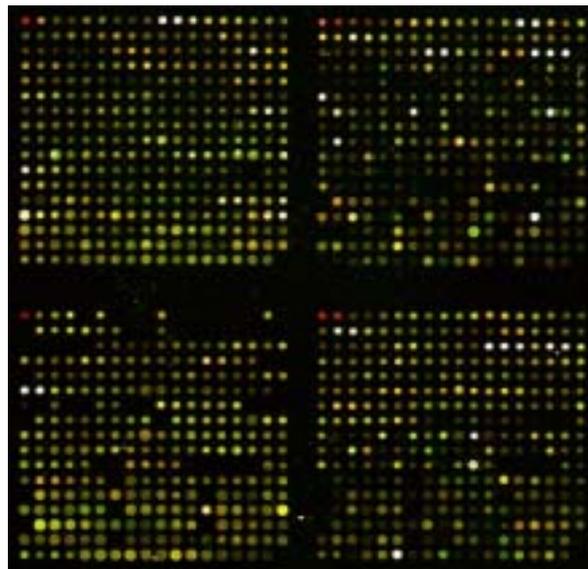


(B)

Fig. 1.30. Scanned images of cucumber cDNA-chip for ZGMMV- and CMV-fny-induced cucumber plant's transcripts profiling. 6hrs after inoculation with ZGMMV (A) and CMV-fny (B).

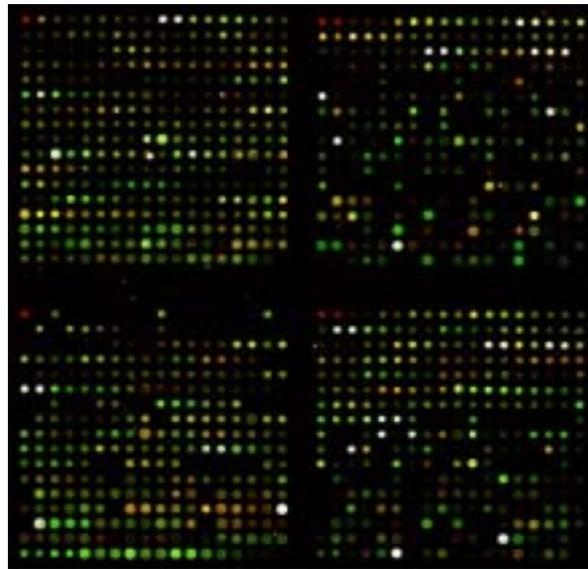


(A)

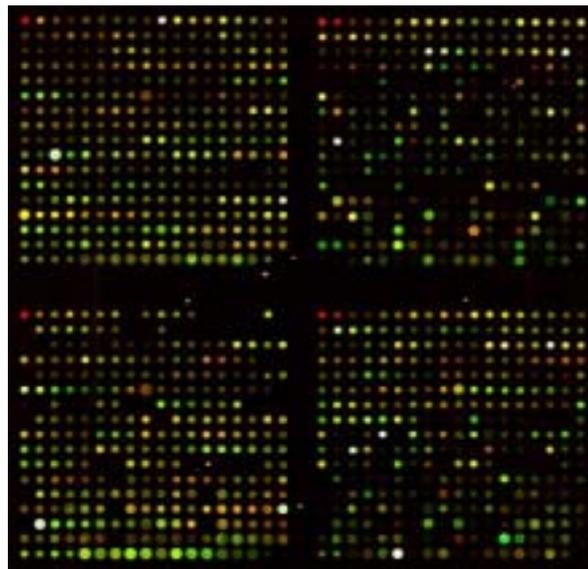


(B)

Fig. 1.31. Scanned images of cucumber cDNA-chip for ZGMMV- and CMV-fny-induced cucumber plant's transcripts profiling. 12hrs after inoculation with ZGMMV (A) and CMV-fny (B).

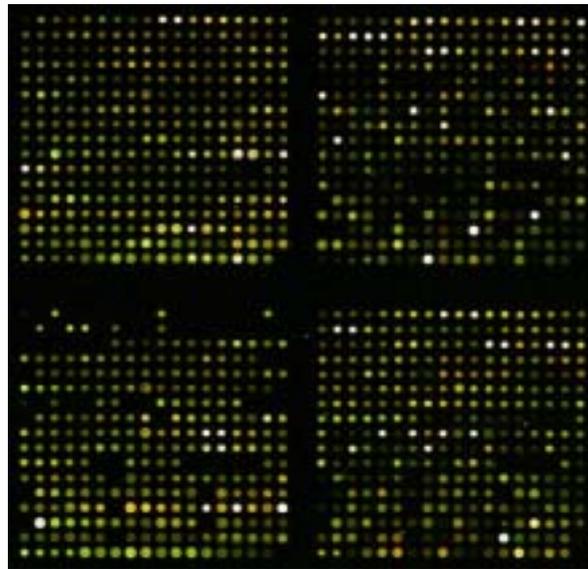


(A)

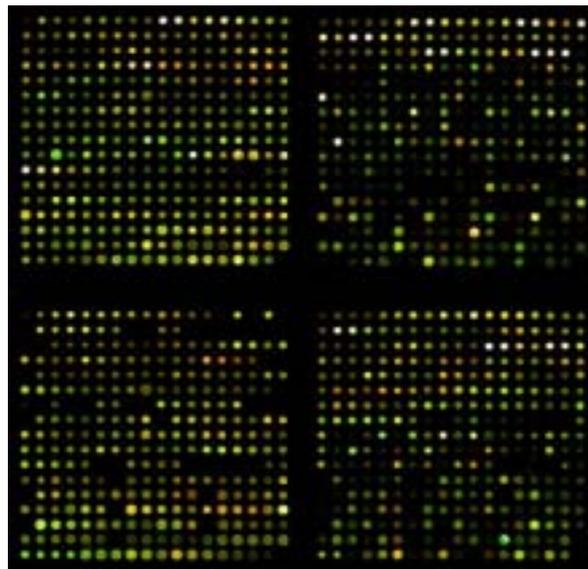


(B)

Fig. 1.32. Scanned images of cucumber cDNA-chip for ZGMMV- and CMV-fny-induced cucumber plant's transcripts profiling. 24hrs after inoculation with ZGMMV (A) and CMV-fny (B).

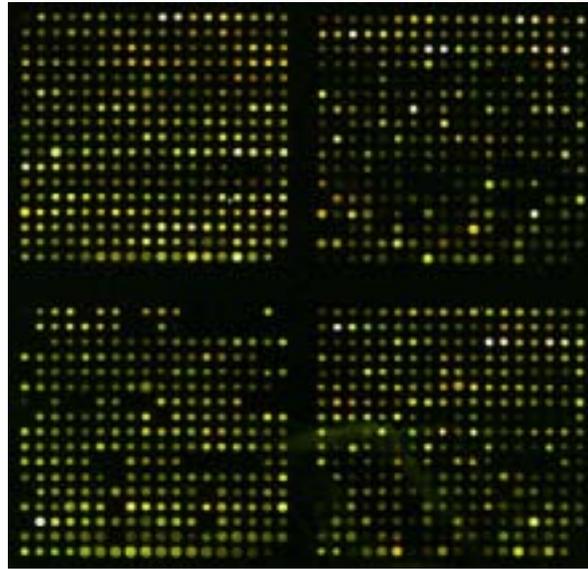


(A)

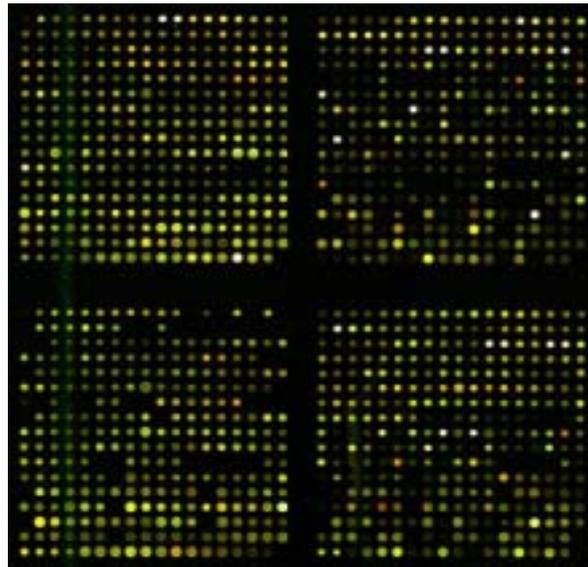


(B)

Fig. 1.33. Scanned images of cucumber cDNA-chip for ZGMMV- and CMV-fny-induced cucumber plant's transcripts profiling. 48hrs after inoculation with ZGMMV (A) and CMV-fny (B).



(A)



(B)

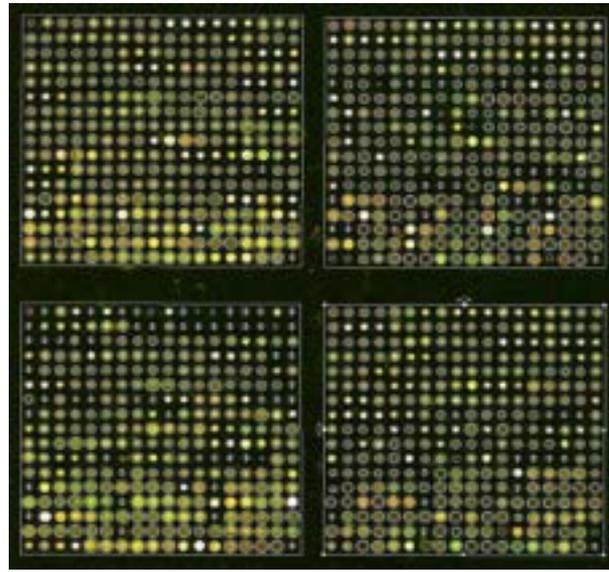
Fig. 1.34. Scanned images of cucumber cDNA-chip for ZGMMV- and CMV-fny-induced cucumber plant's transcripts profiling. 72hrs after inoculation with ZGMMV (A) and CMV-fny (B).

Fig. 1.35는 scanner를 통하여 읽은 이미지를 통하여 각 spot의 integrity 및 위치를 확인하는 과정과 ZGMMV 및 CMV-fny에 의하여 유도된 유전자 발현정도의 전체적인 scatter plot의 결과를 나타내었다.

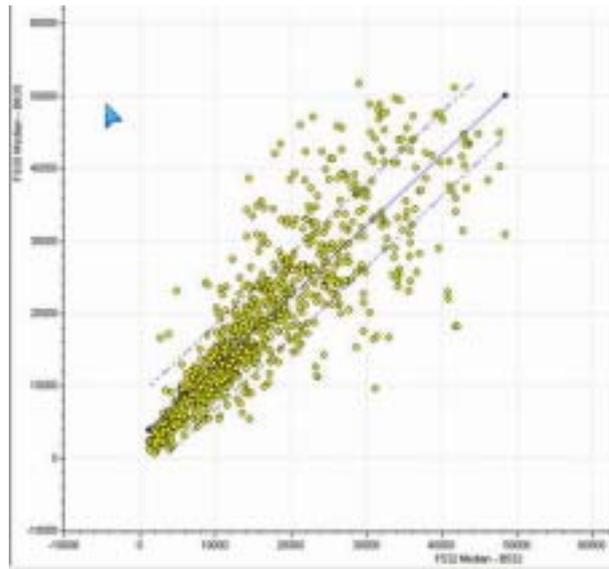
Scatter plot의 결과는 X축을 532nm Median intensity - 532nm Background intensity의 Log 값으로 표현하였고, Y축은 635nm Median intensity - 635nm Background intensity 값으로 나타내었다. cDNA-chip상의 spot의 종류 및 분포가 전체 발현유전자에 비하여 상당히 적은 상황이기 때문에 (예상 오이 유전자의 개수는 약 100,000개 이상으로 추정), 약간 bias되는 결과를 예측했다. 또한, 바이러스 감염시 유도되는 유전자가 매우 높은 비율로 포함되어 있어 매우 높게 발현되는 군과 매우 억제되는 유전자군의 비율이 높아 전체 유전자에 대한 normalization이 필요하였다.

Fig. 1.36에서 Fig. 1.40까지 각 경과시간별로 ZGMMV 와 CMV-fny 각각에 의하여 오이 자엽에서 발현이 증가한 유전자들을 16개씩 정리하여 표현하였다. 가장 왼쪽의 이미지는 실제 scanning하였을 때 해당 spot의 이미지를 추출하여 나타낸 것이며, 그 다음 clone name은 각 유전자의 id를 본 과제에서 정한 규칙에 따라 정리하여 표현하였다. 발현 증가비율 (mock 처리구에 대하여)은 Raio of Median (635nm Median - 653nm Background intensity / 532nm Median - 532 Background intensity)로 올림차순으로 표현하였다. 본 연구에서는 바이러스 처리구를 Cy5로 labeling했기 때문에 이 값이 높을수록 wounding 처리구인 mock에 비하여 바이러스에 의해서 더 발현하는 유전자로 생각할 수 있다. 일반적으로 2-3배 이상 발현한 유전자가 유의성 있는 결과를 나타낸다고 예상한다. 그러나, 사실상 2가지 형광시약을 labeling한 cDNA가 동시에 한 슬라이드에서 경쟁적으로 hybridization되는 시스템에서는 정량적 발현량을 추정하기에는 다소 무리가 있다. 즉, 1.5배 증가된 발현량과 3.5배 증가된 발현량을 비교하기 위한 정량적 개념의 대입은 실제 Northern Blot Hybridization과는 차이가 있을 수 있다. 또한, 본 연구과제의 오이 chip은 ESTs를 얻고, cDNA를 증폭하여 spotting한 것이기 때문에 약 80%정도의 오차를 갖을 수 있는 단점이 존재한다. 이 부분은 앞으로 oligo-chip의 개발로 어느 정도 상쇄시킬 수 있을 것이지만, 오이 전체 유전자에 대한 sequencing이 진행되지 않는 한, 당분간 해결되기 어려울 것으로 보인다.

Ratio of Median의 상대적인 발현비율의 수치만으로는 실제 spot을 예측하는데 무리가 있기 때문에 Sum of Median값을 통하여 실제 spot의 형광강도가 어느 정도로 높게 나타났는지를 파악할 수 있다.



(A)



(B)

Fig. 1.35. Representative spot finding and scanning procedure(A) and subsequent scatter plot(B) images of cucumber cDNA-chip for ZGMMV induced cucumber plant's transcripts profiling.

Number of features found: 59 / 1224

Ratio Image	ID	Ratio of Medians (635/532)	Sum of Medians	Name
	CaEST_LEF_VR_8901A11	44.834	18121	Lysyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.8)
	CaEST_LEF_VR_8901B05	22.078	18818	Putative HsdR-like protein(unknown function), (Iron-sulfur clus
	CaEST_LEF_VR_8902H11	5.308	18387	ATP-dependent protease proteolytic subunit CspF-like protein (A
	CaEST_LEF_VR_8903A81	4.175	26704	60S ribosomal protein L9 (Gibberellin-regulated protein GA)
	CaEST_GOT_VR_8912H06	3.984	18968	expressed in cucumber hypocotyle [Cucumis sativus]
	CaEST_GOT_VR_8928G02	2.681	68717	expressed proteins [Arabidopsis thaliana]
	CaEST_GOT_VR_8996G08	2.496	12506	hypothetical protein AQ26340 [imported] - Arabidopsis thalian
	CaEST_LEF_VR_8903A09	2.398	21835	Hypothetical protein (Serratiaferritin protein kinase) (CBL-nt
	CaEST_GOT_VR_8910H05	2.292	32039	Hypothetical protein F16J13.32 - Arabidopsis thalian
	CaEST_GOT_VR_8910C12	2.281	51836	expressed proteins [Arabidopsis thaliana]
	CaEST_GOT_VR_8910H03	2.205	86828	histone H4 [Citrus jambhiri]
	CaEST_GOT_VR_8910G01	2.090	47821	chaperone protein dnaJ-related [Arabidopsis thaliana]
	CaEST_GOT_VR_8910F11	2.08	88806	expressed proteins [Arabidopsis thaliana]
	CaEST_GOT_VR_8920G01	2.039	68333	Chlorophyll a-b binding protein 151, chloroplast precursor
	CaEST_GOT_VR_8910G09	2.038	88514	unknown protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
	CaEST_GOT_VR_8910F11	2.02	60389	putative arm repeat containing protein [Oryza sativa

(A)

Number of features found: 41 / 1224

Ratio Image	ID	Ratio of Medians (635/532)	Sum of Medians	Name
	CaEST_LEF_VR_8901A11	122.276	28123	Lysyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.8)
	CaEST_LEF_VR_8901B05	73.37	47962	Putative HsdR-like protein(unknown function), (Iron-sulfur clus
	CaEST_LEF_VR_8903A81	27.385	62961	60S ribosomal protein L9 (Gibberellin-regulated protein GA)
	CaEST_LEF_VR_8902H11	19.091	41743	ATP-dependent protease proteolytic subunit CspF-like protein (A
	CaEST_LEF_VR_8903A82	4.762	30219	Hypothetical 26.3 kDa protein (InterPro: Ribosome-like protein
	CaEST_LEF_VR_8903A09	4.434	28843	Hypothetical protein (Serratiaferritin protein kinase) (CBL-nt
	CaEST_LEF_VR_8902G09	2.889	22066	SATRO 184 histoneH4 (CR4). Glycoprotein gp2 (Fragment).
	CaEST_LEF_VR_8901H10	2.18	68019	Putative 33kDa oxygen evolving protein of photosystem II
	CaEST_GOT_VR_8912H06	2.105	19028	expressed in cucumber hypocotyle [Cucumis sativus]
	CaEST_LEF_VR_8903A12	2.068	14158	Fructose-1,6-bisphosphatase, chloroplast precursor (EC 3.1.3.11
	CaEST_LEF_VR_8902G01	1.89	13653	Hypothetical glycine-rich protein nr0585 Clweno AF09M7type8
	CaEST_LEF_VR_8907D12	1.838	14735	Genomic DNA, chromosome 5, P1 clone RGJ10/A75g22580/MQJ16_12
	CaEST_LEF_VR_8906G04	1.801	57786	Metallothionein-like protein type 3 (MT-3)
	CaEST_GOT_VR_8912G09	1.904	68235	unknown protein [Arabidopsis thaliana]
	CaEST_LEF_VR_8901B11	1.888	79808	Metallothionein-like protein type 3 (MT-3)
	CaEST_LEF_VR_8901D07	1.88	43891	Transcription factor

(B)

Fig. 1.36. Induced interesting features in ZGMMV- and CMV-fny-induced cucumber plant's transcripts. 6hrs after inoculation with ZGMMV(A) and CMV-fny(B).

Number of features found: 96 / 1224

Ratio Image	ID	Ratio of Medians (635/532)	Sum of Medians	Name
	CaEST_LEF_VR_BH1261	2.99	8306	expressed-proteins [Arabidopsis thaliana]
	CaSD_COT_VR_A231506	2.787	8972	Rubisco activase beta (Fragment)
	CaEST_COT_VR_M8589	2.681	81297	polyethylene-binding protein, putative / PABP, putative
	CaSD_COT_VR_A240109	2.514	66076	Hypothetical protein ST624
	CaEST_COT_VR_M8706	2.479	57040	Metallothionein-like protein type 3 (MT-3)
	CaEST_LEF_VR_BH07811	2.462	42002	Metallothionein-like protein type 3 (MT-3)
	CaEST_LEF_VR_BH12006	2.457	73351	40S ribosomal protein S10-3
	CaEST_LEF_VR_BH12634	2.416	54924	FRK7.25 protein
	CaEST_LEF_VR_BH12612	2.366	76110	Putative metallothionein-like protein
	CaSD_COT_VR_A240101	2.358	79101	Rubisco activase beta (Fragment)
	CaEST_LEF_VR_BH09017	2.352	29146	Metallothionein-like protein type 3 (MT-3)
	CaEST_COT_VR_M11989	2.317	21006	No Hts
	CaEST_LEF_VR_BH07007	2.311	24366	Transcription factor
	CaEST_LEF_VR_BH10889	2.297	94776	Ras-related protein Rab-27A (Rab-27) (GTP-binding protein RAB)
	CaEST_COT_VR_M8912	2.257	79466	Metallothionein-like protein type 3 (MT-3)
	CaEST_LEF_VR_BH05481	2.207	11170	60S ribosomal protein L9 (Gibberellin-regulated protein GA)

(A)

Number of features found: 42 / 1224

Ratio Image	ID	Ratio of Medians (635/532)	Sum of Medians	Name
	CaSD_COT_VR_A231506	2.99	87941	Rubisco activase beta (Fragment)
	CaEST_LEF_VR_BH12631	1.973	96589	expressed-proteins [Arabidopsis thaliana]
	CaEST_COT_VR_BH1885	1.937	53529	No Hts
	CaEST_LEF_VR_BH07811	1.916	32512	Metallothionein-like protein type 3 (MT-3)
	CaEST_LEF_VR_BH08012	1.837	22135	Metallothionein-like protein type 3 (MT-3)
	CaEST_LEF_VR_BH02724	1.836	97826	Metallothionein-like protein type 3 (MT-3)
	CaEST_COT_VR_BH18119	1.817	14873	No Hts
	CaEST_COT_VR_BH08829	1.797	69932	photosystem LN subunit [Phaseolus vulgaris]
	CaEST_COT_VR_BH04812	1.797	82440	oxygen-evolving enhancer protein 3 precursor [Phaseolus vulgaris]
	CaEST_COT_VR_BH07898	1.797	22544	Metallothionein-like protein type 3 (MT-3)
	CaEST_COT_VR_BH05089	1.792	32019	No Hts
	CaEST_COT_VR_BH02901	1.757	19188	expressed-proteins [Arabidopsis thaliana]
	CaEST_COT_VR_BH02900	1.744	31483	No Hts
	CaEST_COT_VR_BH09003	1.736	75495	expressed-proteins [Arabidopsis thaliana]
	CaEST_LEF_VR_BH14808	1.73	42983	Chlorophyll A-B binding protein of LHCII type 1, chloroplast or
	CaSD_COT_VR_A240101	1.729	64983	Rubisco activase beta (Fragment)

(B)

Fig. 1.37. Induced interesting features in ZGMMV- and CMV-fny-induced cucumber plant's transcripts. 12hrs after inoculation with ZGMMV(A) and CMV-fny(B).

Number of features found: 202 / 1224

Ratio Image	ID	Ratio of Medians (S25/S32)	Sum of Medians	Name
	CaEST_LEF_VR_BN01A11	267.616	41719	Lyxyl-2904 synthetase (EC 6.1.1.4)
	CaEST_LEF_VR_BN01B85	82.054	43047	Putative HsdS-like protein(unknown function), (HsdS-sulfur clea
	CaEST_LEF_VR_BN03A01	24.101	48271	80S ribosomal protein L3 (Dibberlin-regulated protein GA)
	CaEST_LEF_VR_BN02H11	15.682	39121	ATP-dependent protease proteolytic subunit Clp-like protein (A
	CaEST_LEF_VR_BN03A09	8.578	33487	Hypothetical protein (Serine/threonine protein kinase) (CBL-Int
	CaEST_LEF_VR_BN03A02	6.411	24636	Hypothetical 26.3 kDa protein (InterPro: Rhodanese-like protein
	CaEST_LEF_VR_BN03B85	4.902	15282	EATRO 164 kintoplast (CR4) Glycoprotein gp2 (Fragment)
	CaEST_COT_VR_M02A81	4.301	58260	gibbon filament protein RP1 - winter squash
	CaSQ_COT_VR_A24.01.85	4.238	48997	Hypothetical protein ST0624
	CaSQ_COT_VR_A84.10.18	3.891	48140	Hypothetical protein, unlikely
	CaSQ_COT_VR_A24.01.81	3.889	44930	Rubisco activase beta (Fragment)
	CaEST_COT_VR_M05C10	3.761	12951	No hits
	CaSQ_COT_VR_A84.09.88	3.273	14992	Hypothetical protein
	CaSQ_COT_VR_A84.10.87	3.163	54314	ABC transporter permease (hypothetical protein)
	CaSQ_COT_VR_A67.12.81	3.029	28919	Hypothetical protein
	CaSQ_COT_VR_A23.15.84	3.021	41038	80s acidic ribosomal protein

(A)

Number of features found: 177 / 1224

Ratio Image	ID	Ratio of Medians (S25/S32)	Sum of Medians	Name
	CaEST_LEF_VR_BN01B25	121.025	46001	Putative HsdS-like protein(unknown function), (HsdS-sulfur clea
	CaEST_LEF_VR_BN03A21	26.581	43421	80S ribosomal protein L8 (Dibberlin-regulated protein GA)
	CaEST_LEF_VR_BN02H11	20.997	30742	ATP-dependent protease proteolytic subunit Clp-like protein (A
	CaEST_LEF_VR_BN03A09	12.455	25852	Hypothetical protein (Serine/threonine protein kinase) (CBL-Int
	CaEST_LEF_VR_BN03A02	6.304	19873	Hypothetical 26.3 kDa protein (InterPro: Rhodanese-like protein
	CaSQ_COT_VR_A24.01.01	4.504	35820	Rubisco activase beta (Fragment)
	CaEST_LEF_VR_BN03B20	4.401	11474	EATRO 164 kintoplast (CR4) Glycoprotein gp2 (Fragment)
	CaSQ_COT_VR_A24.01.02	3.981	22812	Hypothetical protein ST0624
	CaEST_COT_VR_M98D16	3.743	62962	No hits
	CaSQ_COT_VR_A23.15.06	3.705	26369	Rubisco activase beta (Fragment)
	CaSQ_COT_VR_A84.10.10	3.423	26209	Hypothetical protein, unlikely
	CaEST_COT_VR_M288E1	3.408	15018	adenosine 5'-phosphosulfate reductase [Dicyclohexa]
	CaEST_COT_VR_M11C07	3.364	13274	No hits
	CaEST_LEF_VR_BN04F52	3.354	15537	Hypothetical protein ADG64016 precursor (SwissProt: signal)
	CaEST_COT_VR_M88F31	3.351	27074	expressed-protein1 (Arabidopsis thaliana)
	CaEST_COT_VR_M88E31	3.302	40975	photosystem LN subunit (Phaseolus vulgaris)

(B)

Fig. 1.38. Induced interesting features in ZGMMV- and CMV-fny-induced cucumber plant's transcripts. 24hrs after inoculation with ZGMMV(A) and CMV-fny(B).

Number of features found: 37 / 1224

Ratio Image	ID	Ratio of Medians (635/532)	Sum of Medians	Name
	CaSQ_COT_VR_A2318.00	2.987	73402	Rubisco activase beta (Fragment)
	CaEST_LEP_VR_B932A61	2.481	11654	85S ribosomal protein L9 (Gibberellin-regulated protein GA)
	CaEST_COT_VR_H12FD1	2.148	76737	No hit
	CaSQ_COT_VR_A1924.00	1.988	37926	Hypothetical protein (linksawa protein from mRNA of Arabidopsis)
	CaEST_LEP_VR_B613D11	1.933	12770	Hypothetical protein
	CaSQ_COT_VR_A2481.00	1.897	20327	expressed-protein [Arabidopsis thaliana]
	CaEST_COT_VR_B616D5	1.873	67304	No hit
	CaEST_COT_VR_B93FD1	1.836	72156	expressed-protein [Arabidopsis thaliana]
	CaSQ_COT_VR_A2481.00	1.82	61767	Hypothetical protein BT0626
	CaEST_LEP_VR_B927B11	1.82	67907	Methylketone-like protein type 3 (MT-3)
	CaEST_COT_VR_B93D14	1.82	93064	probable receptor-like protein kinase (inverted) - Arabidopsis
	CaEST_LEP_VR_B968D0	1.813	19801	Copper-transporting P-type ATPase
	CaSQ_COT_VR_A0786.00	1.797	42626	expressed-protein [Arabidopsis thaliana]
	CaEST_COT_VR_B929C18	1.796	88960	Tier2 protein [Pisum sativum]
	CaEST_LEP_VR_B93D12	1.793	34606	Methylketone-like protein type 3 (MT-3)
	CaEST_COT_VR_B93D18	1.788	105040	No hit

(A)

Number of features found: 118 / 1224

Ratio Image	ID	Ratio of Medians (635/532)	Sum of Medians	Name
	CaSQ_COT_VR_A0418.18	3.890	62581	Hypothetical protein, unklasy
	CaSQ_COT_VR_A0713.21	3.789	29405	Hypothetical protein
	CaSQ_COT_VR_A0418.22	3.719	86413	ABC transporter permease (Hypothetical protein)
	CaSQ_COT_VR_A0713.24	2.983	19818	Hypothetical protein
	CaEST_LEP_VR_B982A01	2.972	11796	85S ribosomal protein L8 (Dibberellin-regulated protein GA)
	CaEST_LEP_VR_B913B24	2.888	99063	FAK2 2S protein
	CaEST_COT_VR_B02A61	2.485	39709	phleum filament protein PP1 - winter squash
	CaEST_COT_VR_B93D33	2.456	21651	26S proteasome regulatory subunit, putative (RPN9) [Arabidopsis]
	CaSQ_COT_VR_A0418.29	2.447	32039	Hypothetical protein
	CaSQ_COT_VR_A0713.22	2.433	69481	Probable insulin-like growth factor type 2 precursor (IGF2) tran
	CaEST_LEP_VR_B987B11	2.377	73428	Methylketone-like protein type 3 (MT-3)
	CaEST_COT_VR_B01C12	2.372	12486	expressed-protein [Arabidopsis thaliana]
	CaEST_COT_VR_M10A84	2.361	89403	methylketone-like protein type 2 [Pisum sativum]
	CaEST_COT_VR_B92C32	2.341	67578	type 1 proteinase inhibitor-like protein [Citrus x paradisi]
	CaEST_COT_VR_B07D06	2.336	39232	Methylketone-like protein type 3 (MT-3)
	CaSQ_COT_VR_A0786.04	2.329	64043	N-glycanase-like 2-phosphotransferase-like

(B)

Fig. 1.39. Induced interesting features in ZGMMV- and CMV-fny-induced cucumber plant's transcripts. 48hrs after inoculation with ZGMMV(A) and CMV-fny(B).

Number of features found: 35 / 1224

Ratio Image	ID	Ratio of Medians (635/532)	Sum of Medians	Name
	CaEST_COT_VR_M02802	2.266	27938	expressed-proteins [Arabidopsis thaliana]
	CaEST_LEP_VR_BV09012	2.258	35126	Metallothionein-like protein type 3 (MT-3)
	CaEST_LEP_VR_BV07207	2.057	21246	Transcription factor
	CaEST_LEP_VR_BV05003	2.05	94319	18 kDa chaperonin (Protein Cpn10) (Protein grp95)
	CaEST_LEP_VR_BV07011	2.045	54225	Metallothionein-like protein type 3 (MT-3)
	CaEST_LEP_VR_BV13821	1.985	99070	expressed-proteins [Arabidopsis thaliana]
	CaEST_LEP_VR_BV13012	1.947	99743	Putative metallothionein-like protein
	CaEST_LEP_VR_BV05044	1.933	41206	Metallothionein-like protein type 3 (MT-3)
	CaEST_COT_VR_M02805	1.891	40823	expressed-protein [Arabidopsis thaliana]
	CaEST_LEP_VR_BV05004	1.884	40491	Metallothionein-like protein type 3 (MT-3)
	CaSQ_COT_VR_A0439.01	1.883	75991	RPS2-like disease resistance protein (Fragment) (hypothetical)
	CaEST_LEP_VR_BV13209	1.875	74288	48S ribosomal protein E18-3
	CaEST_COT_VR_M01F08	1.867	47058	26 kDa phloem protein [Cucumis sativus]
	CaEST_COT_VR_M01F11	1.863	22050	expressed-proteins [Arabidopsis thaliana]
	CaEST_COT_VR_M07088	1.847	36310	Metallothionein-like protein type 3 (MT-3)
	CaEST_LEP_VR_BV02028	1.811	103037	expressed-proteins [Arabidopsis thaliana]

(A)

Number of features found: 30 / 1224

Ratio Image	ID	Ratio of Medians (635/532)	Sum of Medians	Name
	CaEST_COT_VR_M02A01	3.455	46585	phloem floem protein PP1 - winter squash
	CaEST_LEP_VR_BV03A23	2.995	10184	80S ribosomal protein L5 (Obliterin-regulated protein 5A)
	CaEST_COT_VR_M02R02	2.867	49473	expressed-proteins [Arabidopsis thaliana]
	CaEST_COT_VR_M05F11	2.816	26823	putative arm repeat containing protein [Oryza sativa]
	CaEST_COT_VR_M07H04	2.732	47563	Chain A, The X-Ray Crystallographic Structure Of Beta Carbon
	CaEST_COT_VR_M07G06	2.717	46597	26 kDa phloem protein [Cucumis sativus]
	CaEST_COT_VR_M01F08	2.617	75840	26 kDa phloem protein [Cucumis sativus]
	CaEST_COT_VR_M01F11	2.593	67249	expressed-proteins [Arabidopsis thaliana]
	CaEST_COT_VR_M05H03	2.523	44767	histone H4 [Citrus jambhiri]
	CaEST_COT_VR_M03E11	2.431	63276	26 kDa phloem protein [Cucumis sativus]
	CaEST_COT_VR_M10B08	2.244	16293	hypothetical protein F16J13.30 - Arabidopsis thaliana
	CaEST_COT_VR_M01G01	2.225	31461	chaperone protein dnaJ-related [Arabidopsis thaliana]
	CaSQ_COT_VR_A0439.01	2.115	64858	RPS2-like disease resistance protein (Fragment) (hypothetical)
	CaEST_COT_VR_M05D08	2.031	40214	No hits
	CaEST_COT_VR_M01C02	2.02	14585	expressed-proteins [Arabidopsis thaliana]
	CaEST_COT_VR_M08D01	2.018	21331	Chromophyll a/b binding protein 151, chloroplast precursor

(B)

Fig. 1.40. Induced interesting features in ZGMMV- and CMV-fny-induced cucumber plant's transcripts. 72hrs after inoculation with ZGMMV(A) and CMV-fny(B).

앞서 언급했듯이, 슬라이드 상에 printing된 각 spot들은 항상 변이가 존재한다. 즉, spot의 DNA 농도, 순도, 양, integrity가 모두 약간씩 차이가 있을 수 있고, 증폭된 DNA의 size가 차이가 있기 때문에 농도를 매우 주의 깊게 동일화 시켜도 molar concentration은 차이가 발생하게 된다. 또한, hybridization 과정에 있어서도 solution이 균질하게 rolling되는 것이 아니기 때문에 슬라이드 내 spot의 위치에 따라 hybridization 효율이 달라질 수 있게 된다. 통계적인 문제에 있어서도, microarray 기법에 따른 최종적인 결과 값은 형광강도로 표현되는데 이 값들의 변이가 실제로 백만배 이상 차이가 날 수 있어 결과 값에 대한 정규화 (normalization)가 반드시 요구된다.

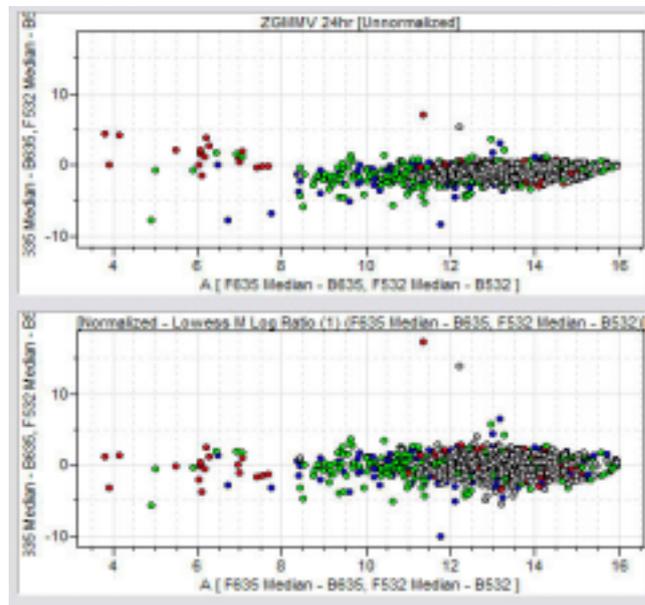
이러한 모든 문제에서 유발되는 variation을 최소화 시키고, 얻게되는 결과 값의 정규화를 위하여 normalization을 수행할 경우, 몇가지 기법을 적용하게 되는데, 대표적으로 세가지 정도로 요약할 수 있다.

첫 번째는 몇 개의 spot들을 지정하여 Ratio of Median (635nm/532nm = Cy5/Cy3) 값을 임의로 지정하고 이 값들에 대한 normalization을 수행하는 것이다. 이것은 spiking gene을 이용할 경우 유용할 수 있다.

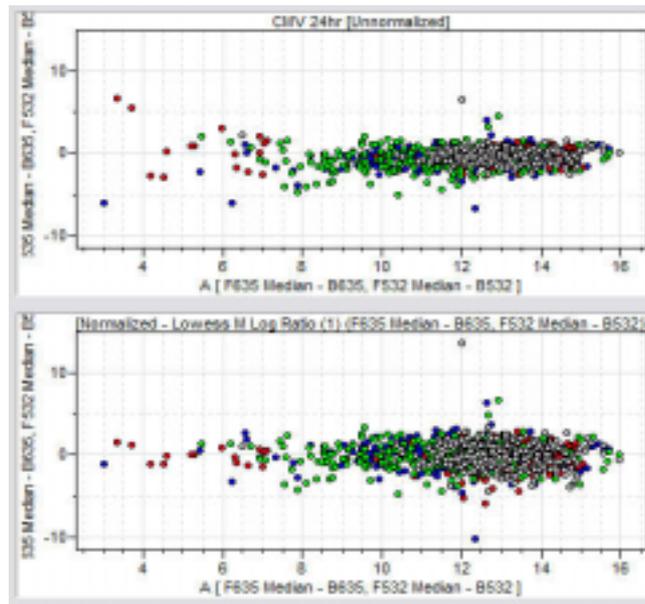
두 번째는 세포 내에서 항상 일정한 비율로 발현이 유지되는 housekeeping gene을 지정하여 이 유전자들을 기준으로 normalization 하는 것이다. 그러나, 최근에는 이 방법에서 사용되는 housekeeping 유전자가 외부의 처리에 따라 항상 일정한 비율로 발현되기 어렵다는 결과가 보고되고 있다.

세 번째는 global normalization 방법인데, 전체 유전자들을 대상으로 정규분포화 시키는 방법이다. 최근 논문들의 경향은 이 방법 단독으로 데이터를 정규화하거나, 혹은 첫 번째 방법을 같이 사용하는 추세이다.

본 연구에서는 non-linear data의 linearization시키는 transformation 방법으로 global normalization을 사용하였고, microarray에 있어 일반적으로 적용되고 있는 non-linear normalization의 방법중 Lowess (locally weighted scatter plot smoothing) Normalization을 택하였다 (Dudoit et al., 2002; Yang et al., 2002). Fig. 1.41에서 위쪽 패널은 unnormalized data를 보여주고 있고, 아래쪽 패널은 normalized data를 보여준다. 두 plot 모두 M 대 A (log ration vs average intensity)를 기준으로 spot이 분포된다. Y축의 가로선이 print-tip lowess curves를 나타내게 되는데, 즉, 이미지의 각 block에서 얻어지는 데이터에 대한 lowess smoothing curve를 의미한다. Normalization을 수행하기 전 raw



(A)



(B)

Fig. 1.41. Examples of Lowess Normalization(Median Log Ratio). Denominator was F532Median-B532. 24hrs after inoculation with ZGMMV(A) and CMV-fny(B).

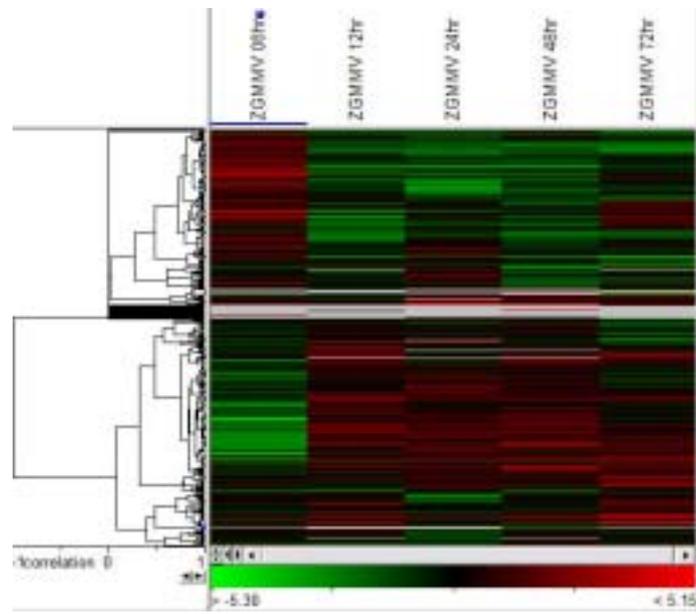
data의 spot 분포와 분산은 결국 어느 정도의 normalization을 위한 data transformation (smoothing, centering, scaling의 정도)이 요구되는 가를 의미하게 되며, 본 연구에서는 가장 최적의 조건을 찾아 normalization을 각 슬라이드 별로 수행하였다.

바이러스 접종 후 경과시간별로 유의성 있게 발현되는 유전자뿐만 아니라, 시간의 경과에 따라 발현되는 유전자의 clustering은 식물체 transcript 변화에 대해 깊이있게 이해할 수 있는 중요한 도구라 할 수 있다. Fig. 1.42는 각 시간별로 전체 유전자가 어떻게 발현되었는 가에 대한 정보를 제공하고 있다. Hierarchical clustering을 통하여 발현 유전자들 패턴에 따른 grouping을 수행하였다. 사용된 통계적 방법은 Pearson Squared Method를 이용하였다. 이 방법은 Pearson의 correlation coefficients 방법을 적용하는 것이다. ZGMMV의 경우 크게 2그룹으로 나눌 수 있었고, CMV 감염 시에는 크게 3그룹으로 분류할 수 있었다. 분류를 위해 사용한 프로그램은 Axon 사의 Acuity (ver. 4.0.0.39)이었다.

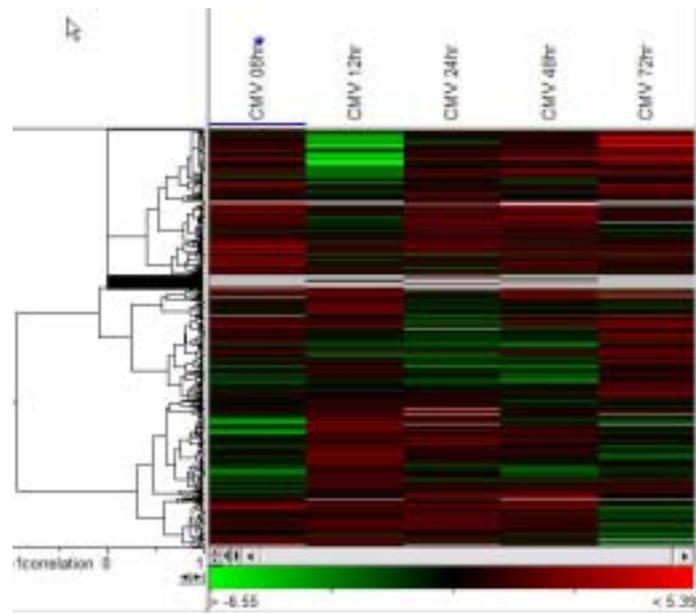
Clustering의 또 다른 방법들로 앞의 방법과는 다른 non-hierarchical clustering 방법인 K-means (Fig. 1.43), 2-D self organizing map (Fig. 1.44), Geneshaving clustering (Fig. 1.45)을 적용하여, 각 바이러스로 인하여 발현되는 혹은 발현이 억제되는 유전자들에 대한 분류를 수행하였다.

K-means clustering은 분류할 최종 group의 개수를 정하고, 상호배타적인 data set을 구하는 방법이다. Hierarchical clustering이 전체적인 data를 분류하기 때문에 cluster 각각에 대한 고찰이 쉽지 않은 것에 비하여 이 방법은 상당히 작은 set으로 나누어 볼 수 있어 분석을 용이하게 할 수 있다. 또한 분석 data의 양이 많을수록 더 유용하다. 대체로 10개 미만의 data와 30,000개 이상의 data 분석에는 불합리하며, 이 사이의 data 값에서는 hierarchical clustering보다 매우 빨리 분석이 가능하다. 오이 연구결과의 clustering은 4 x 4 clusterin을 수행하였으며, ZGMMV 감염의 경우, 206, 439, 300, 168 개의 data들이 4개의 group으로 분류되었고, CMV 감염의 경우, 521, 518, 31, 59개의 data들이 역시 4개의 group으로 분류되었다.

Self-Organizing Map 분석은 array상에서 서로 비슷한 패턴을 보이는 data들을 그룹화 시키는데 사용한다. 즉, 본 과제 분석내용처럼 3 x 3의 clustering을 수행할 때, 유사성이 높은 data들 집단은 비교시 가까운 위치에 놓이게 하고, 반대로 유사성이 적은 data 집단은 멀리 위치하도록 하여 유사도 순으로 grouping을 수행하게 된다. 이 분석 방법은 K-means 분석결과와 비교할 수 있어 보완적인 성격이 강하다.

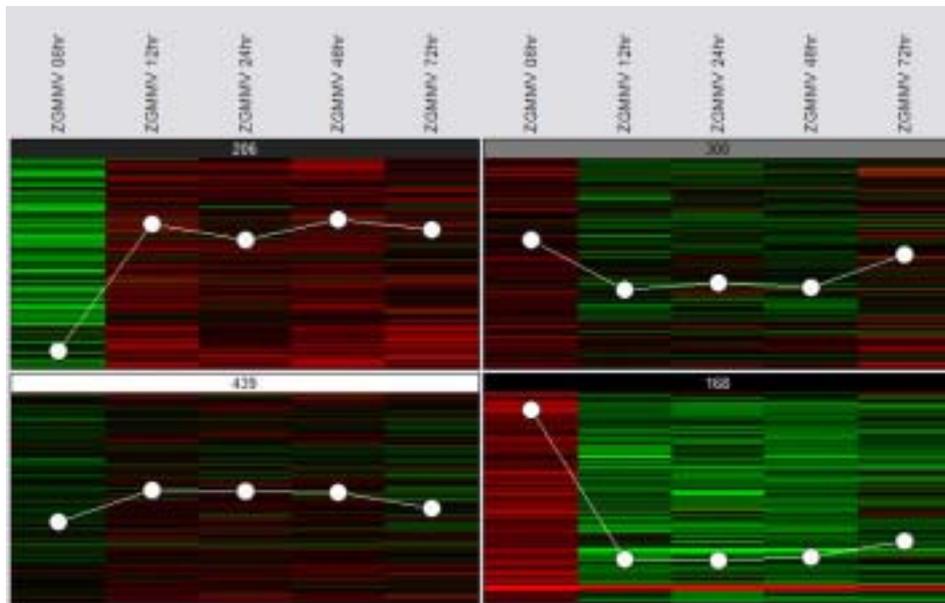


(A)

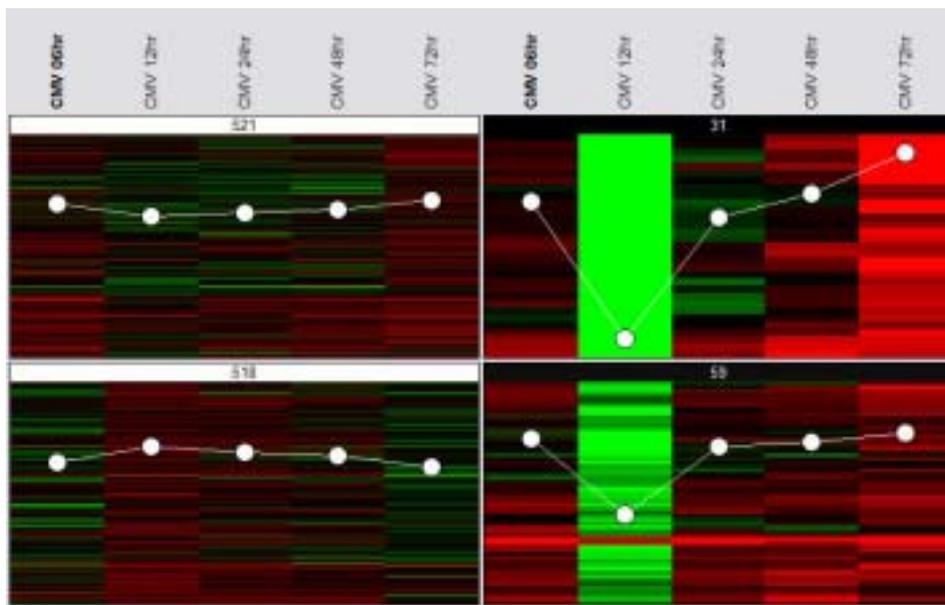


(B)

Fig. 1.42. Hierarchical clustering (Pearson squared) features in ZGMMV-(A) and CMV-fny-(B) induced cucumber plant's transcripts.

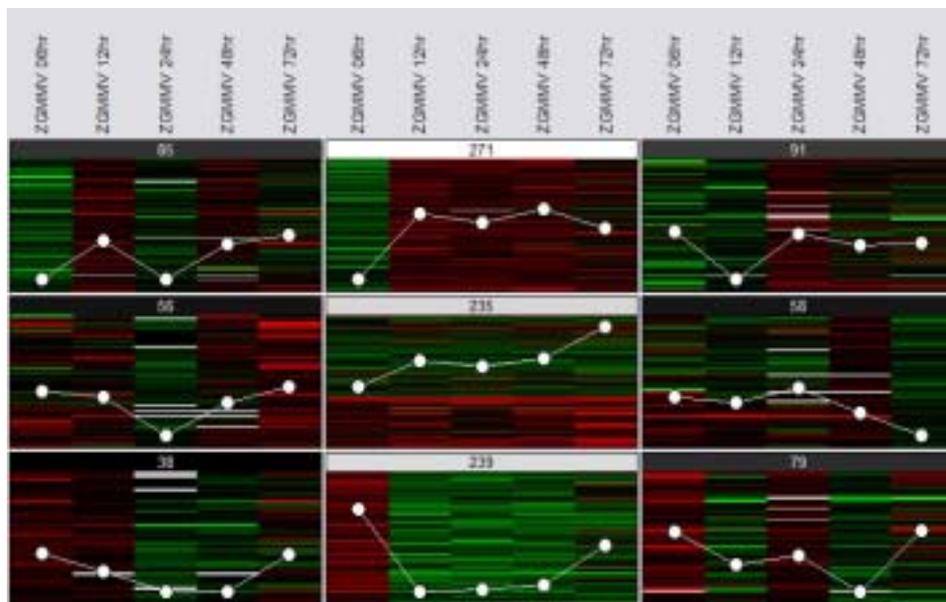


(A)

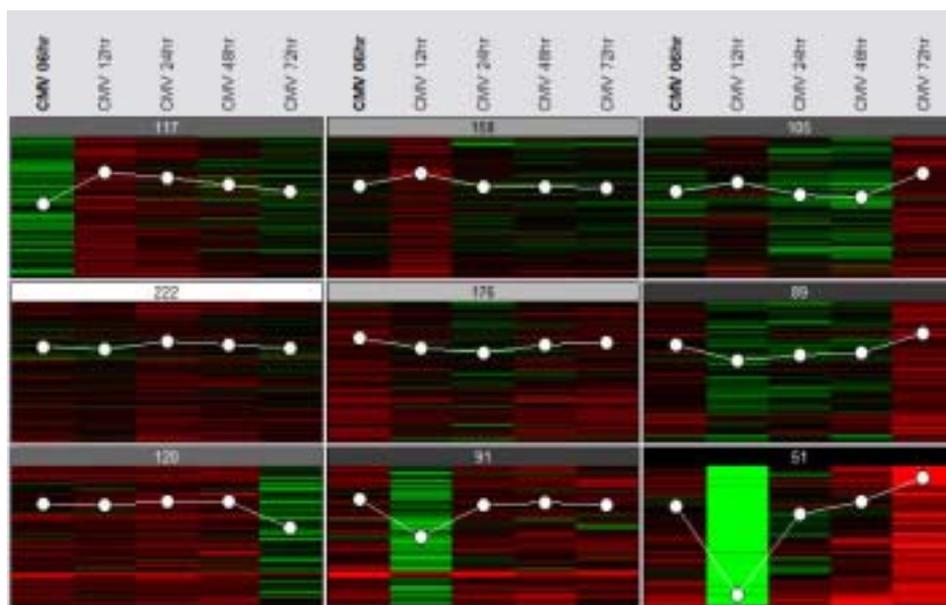


(B)

Fig. 1.43. K-means 4 X 4 clustering (Euclidean squared) features in ZGMMV-(A) and CMV-fny-(B) induced cucumber plant's transcripts.



(A)



(B)

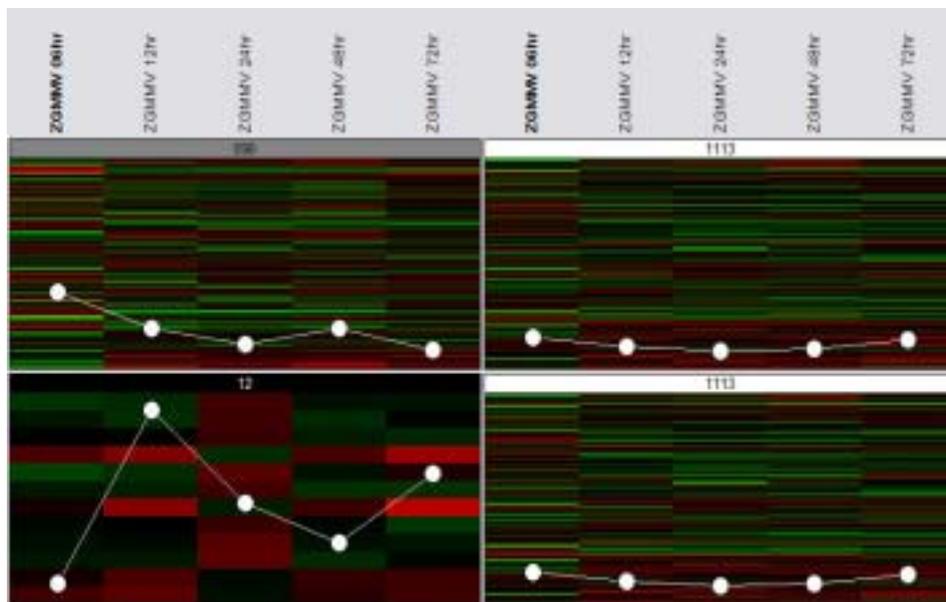
Fig. 1.44. Self organizing map (SOM) 3 X 3 clustering (Euclidean squared) features in ZGMMV-(A) and CMV-fny-(B) induced cucumber plant's transcripts.

Gene Shaving 분석은 역시 non-hierarchical clustering에 속하며, 앞서의 K-means와 SOM이 전통적인 통계분석 방법에 의거하여 clustering하는 것에 비하여, 이 분석방법은 Hastie et al (2000)에 의하여 최근 개발된 유전자 발현 분석방법이다. 이 방법은 발현이 일관성을 보이는 유전자의 그룹을 결정하고, 다양한 발현의 변이를 최적화시키는 방법이다.

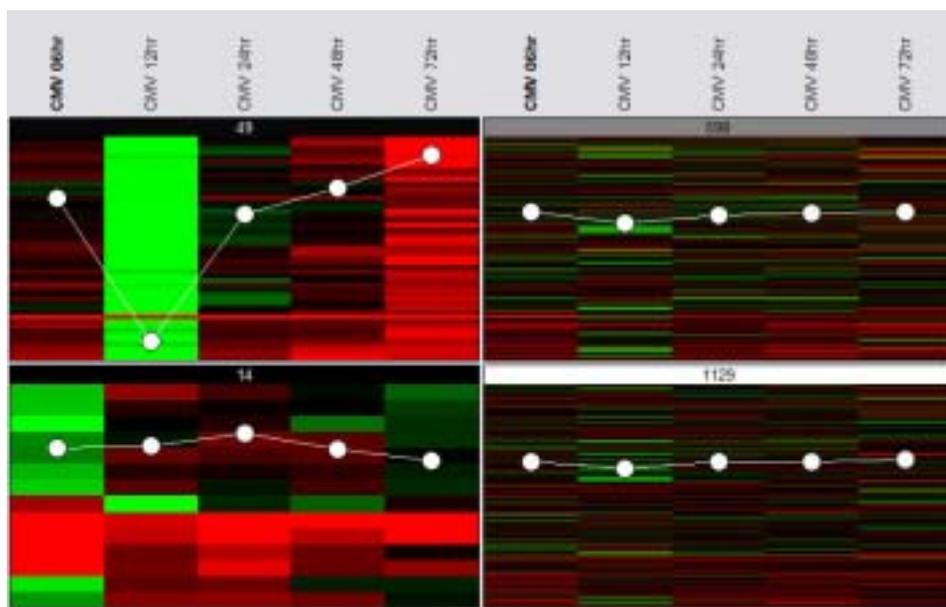
따라서, 각 cluster들의 구성인자 사이에 변이가 큰 cluster 및 일관성을 보이는 유전자를 그룹화시킨다. 이 그룹들의 특징은 Fig. 1.45에서 볼 수 있듯이 매우 강한 발현 차이가 있어야 다른 그룹으로 나뉘어지게 되고, 유전자들이 subgroup으로 배타적으로 존재하지 않는다. 즉 앞서의 K-means와 SOM의 경우는 각 그룹에 해당하는 유전자 개수를 다 더하면 총 유전자의 개수가 나오게 되는 배타적 그룹화를 수행하는 것에 비하여, Gene Shaving의 경우는 가능한 그룹을 제시하고 그 그룹에 해당하는 유전자를 비배타적으로 포함시켜 표현한다. 즉, 하나의 유전자가 여러 그룹에 포함될 수 있다. 따라서, 각 그룹은 상호 독립적 profile을 갖게 된다.

Fig. 1.44의 SOM 결과는 ZGMMV는 K-means에서 4가지의 그룹으로 구분하였을 때 각 그룹에 해당하는 유전자의 개수가 매우 광범위한 문제를 해결할 수 있는 방안으로 발현패턴을 세분화함과 동시에 해당 유전자의 개수를 줄여서 유전자 동정을 쉽게 할 수 있으나, 그룹별 패턴이 비슷해지는 결과를 보였다.

반면, Fig. 1.45의 Gene Shaving 결과는 매우 특이적인 소수의 유전자들이 독립 그룹으로 분류되어 상당히 유의성 있게 변화하는 유전자들만 따로 그룹화 하여 분석이 용이하게 되는 장점을 보였다. 즉, ZGMMV 감염의 경우, 3가지의 그룹이 존재할 수 있으며, 12개 유전자와 590개 유전자 그리고, 1113개의 유전자로 구분하여 특이적인 12개 유전자를 쉽게 찾아 볼 수 있는 분류 결과를 나타내었다. CMV 감염의 경우는 14개, 49개, 598개, 1129개의 유전자 발현 그룹을 설정하였는데, 이중 14개와 49개에 해당하는 그룹이 특이적 유전자 발현 그룹으로 판단되었다.



(A)



(B)

Fig. 1.45. Gene Shaving 4-clustering (Euclidean squared) features in ZGMV-(A) and CMV-fny-(B) induced cucumber plant's transcripts.

1.2.6 오이 ESTs의 DB 구축 및 기보고된 타 식물의 DB와의 연계

본 과제에서 수행한 ESTs 분석 및 확보된 data의 지속적 연구와 연구자 간의 교류를 위하여 Web-DB를 구축하고자 하였다.

Web-DB 구축을 위한 server는 windows 2003 (standard edition)을 운영체제로 사용하며, server의 환경은 JSP/Servlet Container(HTTP Server)을 지원하는 Apache Tomcat/5.0.27으로 설정하였다. Database Server는 Oracle 10g이며, 언어는 Java2 (SDK 1.4.2 Version)로 개발하였다.

1.2.6.1. DB 구축의 기본 개념

- 1) DB구축을 위한 각각의 data 형태는 ESTs 및 microarray 결과를 MS사의 excel data 그대로 upload할 수 있도록 해야 지속적인 data의 upgrade가 손쉬울 것으로 생각하였다.
- 2) ESTs DB와 microarray 결과의 search가 통합적으로 이루어지도록 하였다.
- 3) Microarray의 결과와 ESTs DB를 유기적으로 연결하여 연구자의 실험내용 파악이 손쉽도록 설계하고자 하였다.
- 4) Microarray 결과는 실제 image외에도 가상이미지를 실험별로 한 화면에서 비교할 수 있도록 하여, 실험자 외의 연구자들이 한 유전자에 대한 발현정보를 손쉽게 파악할 수 있도록 설계하였다.
- 5) 모델 식물인 Arabidopsis의 microarray 결과를 추가하여 타 DB와 연결하고자 하였다.
- 6) 관리자 화면 및 입력시 조건을 세분화하여 외부 data의 변동사항에 적절히 대처할 수 있도록 하였다.

이를 위하여 Fig. 1.46과 같은 기본 개념을 포함하는 Web-DB 구축을 시도하였다. 개발환경에 가장 적합한 언어는 JAVA2 를 사용하기로 하였으며, 주로 JSP를 이용하여 DB와 data를 연계하였다.

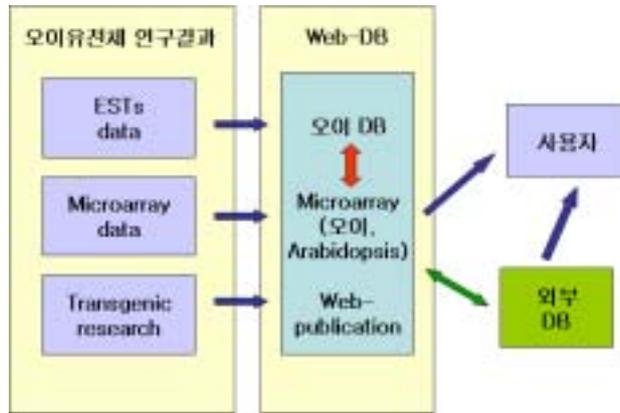


Fig. 1.46. 오이 유전체 연구결과 공유를 위한 Web-DB 개발도

1.2.6.2. Web-DB의 구성 및 소개



Fig. 1.47. Web-DB 메인화면 및 ESTs DB와 microarray DB와의 링크

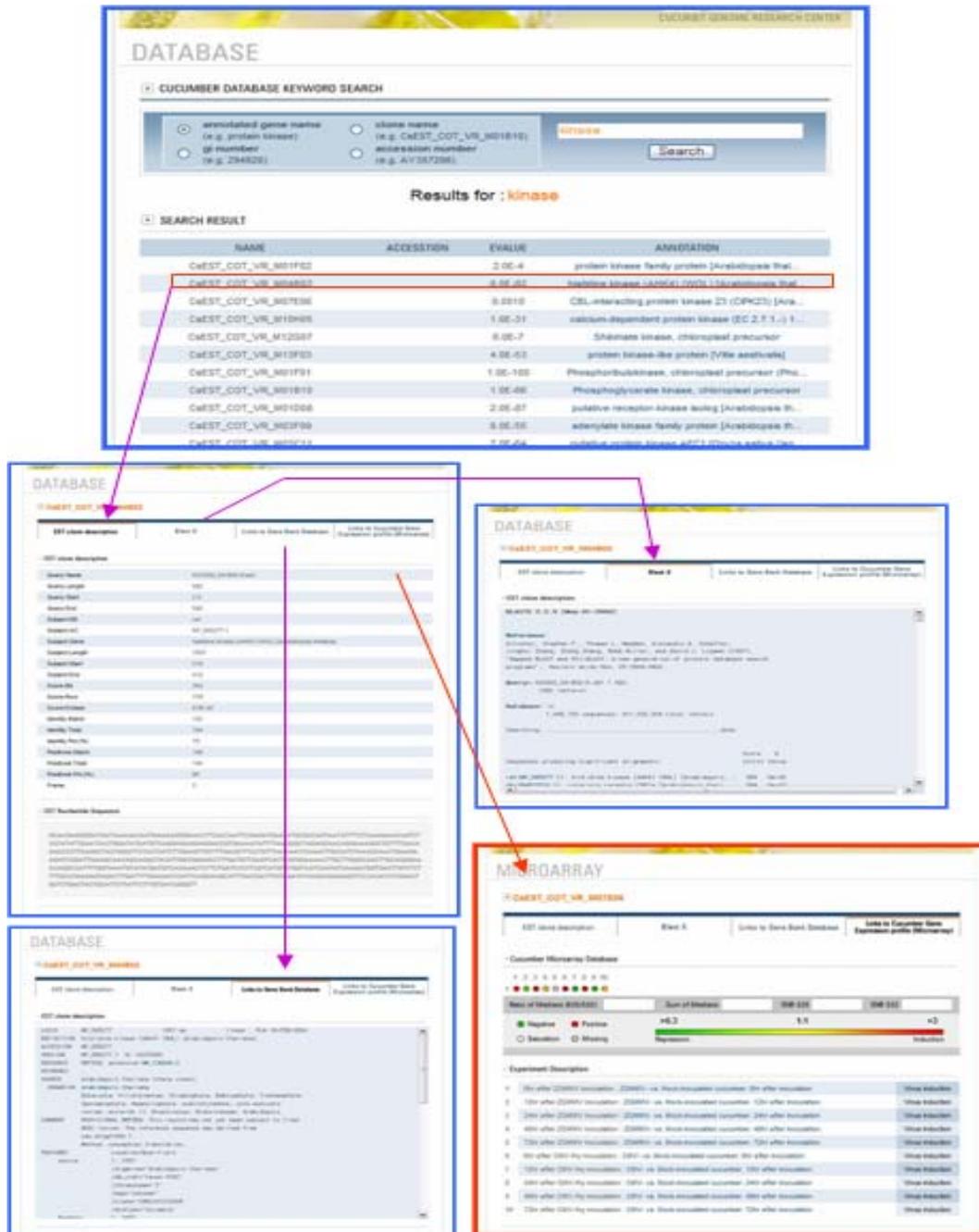


Fig. 1.48. ESTs DB의 search 및 microarray DB와의 연계

Fig. 1.47과 같이 Web-DB를 구성하였는데, 우선 ESTs DB에 접근하는 항목, Microarray DB에 접근하는 항목, 그리고 본 과제의 형질전환 오이에 대한 presentation 결과에 연결될 수 있도록 하였다.

또한, Fig. 1.48과 같이 search keyword를 4가지 형태로 찾을 수 있도록 하였으며, 예를 들어, kinase를 입력하였다면, kinase라는 글자가 들어간 형태는 모두 출력하도록 하였다. 이후 원하는 결과 클론을 클릭하면, EST sequencing 정보 및 sequence 출력, BlastX 결과 파일 출력, GenBank link, 그리고, 자체 DB에 존재하는 유전자로 microarray를 수행한 결과화면으로 이동될 수 있도록 하였다.



Fig. 1.49. Microarray 결과 search 화면 및 그 링크 화면들.

Fig. 1.49는 microarray 결과를 search할 수 있는 화면에 대한 설명이다.

(A)는 실험에 대한 기본적인 분류를 정의한다. 분류 내에 일련의 실험들에 대한 clustering 분석 결과를 출력할 수 있도록 하였다. 여기에서 Exp. Detail이나 View Genes 을 클릭하면 (B) 또는 (C)화면으로 이동할 수 있다.

(B)화면은 각 실험(슬라이드 단위)에 대한 기본적인 정보를 정의하며, 자세한 실험결과를 링크한다. (B)화면에서는 웹상에서 볼 수 있는 View Data와 압축파일을 다운받아 사용할 수 있는 downloadable data를 분류하였고, 특이적으로 발현하였거나 발현이 억제된 유전자의 정보를 Interesting Feature라는 항목으로 제공한다. 다시, 이 화면에서 (C): View Data와 (D): Clickable Image의 화면으로 이동할 수 있다.

(C)화면은 각 실험(슬라이드 단위)의 결과를 출력하는 화면이다. 즉, 각 실험에 대한 microarray data를 총 spot수에 맞추어 화면에 출력할 수 있다. 이 출력화면에서 원하는 유전자의 발현정도를 찾아볼 수 있고, 각각의 필드명을 이용하여 오름차순과 내림차순으로 정리하여 원하는 결과물을 쉽게 찾을 수 있도록 하였다.

(D)화면은 Clickable image로서 슬라이드 하나 하나에 대한 image와 각 spot의 정보를 담은 map을 제공한다. 이 화면에서 spot 하나 하나는 자체 ESTs DB data 또는 외부의 식물체 DB와 연결되어 있다. 따라서, 흥미로운 spot을 마우스로 클릭하면 그 유전자와 링크되어 있는 DB로 이동된다.

Fig. 1.50의 (A)화면에서는 실험의 기본정보를 설명하는데, (B)와 (C)로 이동할 수 있다. (B)는 유전자 발현정보를 Cy5 혹은 Cy3로 나누어 결과를 출력한다. (C)화면은 슬라이드의 각 spot 이미지를 virtual로 표현한 결과를 보여준다.

(D)화면은 일련의 슬라이드 결과를 합쳐서 clustering한 분석결과를 보여준다. 현재 오이가 ZGMMV에 감염된 결과와 CMV에 감염된 결과를 따로 묶어서 유전자의 발현정도를 경과시간에 따라 clustering한 결과가 제공되고 있다.

이러한 결과들은 www.cgrc.wo.to 에서 직접 확인할 수 있으며, 연구의 결과를 지속적으로 update할 예정이다.

1.2.7. (위탁과제: 식물체 DNA-chip 개발 및 상용화) 연구 결과 내용

1.2.7.1. 고밀도, 자동화 DNA-chip의 제반 기술 확립

Fig. 1.51과 1.52는 각각 aldehyde와 amine slide에 여러 buffer에 녹인 형광 dye로 labeling된 DNA를 spotting하고 binding 시킨 후 scanner를 사용하여 형광 image를 분석한 결과이다. 그림에서 보는 바와 같이 350mM sodium bicarbonate에 녹인 DNA가 spotting하였을 때 spot내에 DNA가 골고루 퍼져있고 binding efficiency가 가장 높았다 (Fig. 1.51, 1.52, Table 1.12, 1.13).

다른 buffer를 사용하면 binding efficiency가 낮거나 spot내에서 DNA가 특정 부분에만 뭉쳐있는 현상이 일어났다. 그리고 aldehyde slide가 amine slide 보다 DNA binding efficiency가 높았으나 연구 수행 방법에서 기술한 바와 같이 aldehyde slide의 경우 DNA를 변형시켜야 하므로 DNA-chip 제작 비용이 증가하는 단점이 있다.

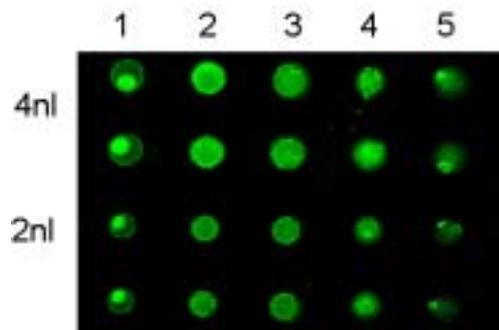


Fig. 1.51. DNA spotting on aldehyde group coated slide using cy5-labeled ras DNA in various buffers. 1: 300mM Bicin (pH 9.5), 2: 350mM NaHCO₃ (pH 9.0), 3: 100mM Tris (pH 8.5), 4: 50mM Bicin + 300mM NaCl (pH 9.5), 5: 3x SSC (pH 7.0).

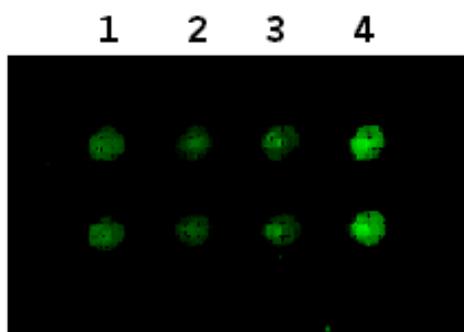


Fig. 1.52. DNA spotting on amine group coated slide using cy5-labeled ras DNA in various buffers. 1: 200mM MES (pH 4.0), 2: 200mM MES (pH 6.0), 3: 3XSSC (pH 7.0), 4: 350mM Sodium bicarbonate (pH 9.0).

Table 1.12. Probe DNA binding efficiency on aldehyde group coated slide.

Spotting buffer	Binding efficiency (%)
300mM Bicin (pH 9.5)	49.1
350mM NaHCO ₃ (pH 9.0)	43.1
100mM Tris (pH 8.5)	35.8
50mM Bicin + 300mM NaCl (pH 9.5)	41.8
3x SSC (pH 7.0)	22.6

Table 1.13. Probe DNA binding efficiency on amine group coated slide.

Spotting buffer	Binding efficiency (%)
200mM MES (pH 4.0)	11.2
200mM MES (pH 6.0)	6.1
3x SSC (pH 7.0)	10.1
350mM NaHCO ₃ (pH 9.0)	24.1

Target DNA 양과 형광 세기 사이의 관계가 linear한 범위를 알아보기 위하여 $10^4 \sim 10^9$ copy number의 target DNA를 사용하여 실험을 하였다. Target DNA의 copy number가 $10^4 \sim 10^5$ 일 경우에는 형광 세기가 너무 약하여 측정할 수 없었고 10^9 이상이면 형광 세기가 saturation이 되어 copy number가 $10^6 \sim 10^8$ 일 때 target DNA 양과 형광 세기가 linear한 관계를 갖게 된다 (Fig. 1.53).

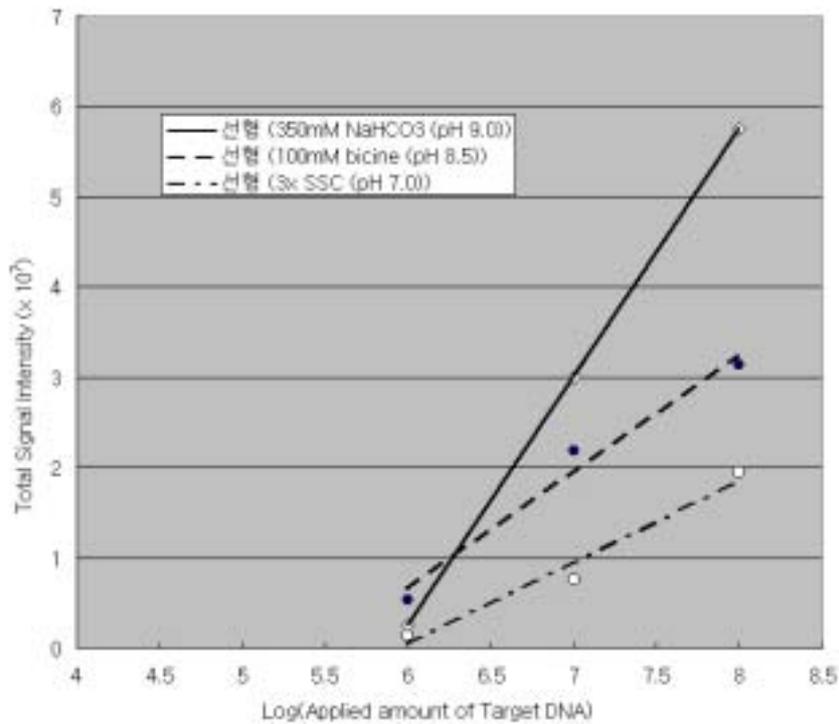


Fig. 1.53. Relationship between the target DNA amount and signal intensity.

4.2.2 바이러스 진단용 DNA-chip 제작 (oligo-chip)

박과 식물 바이러스 진단용 DNA chip을 제작하기 위하여, 진단하고자 하는 virus를 몇 개를 선정하였다. Tobamovirus에 속하는 4종류, Potyvirus에 속하는 2종류 (Table 1.14)를 선별하여 이를 미국 NCBI에서 sequence 검색을 하였다.

검색한 sequence를 align하여 각각의 virus에 특이적으로 identification할 수 있는 부분

을 선정하였고 (coat protein sequence), 그 부위에서 각 virus에 특이적인 sequence 네 부분을 이용 진단 probe를 제작하였다 (Table 1.15).

진단 probe는 virus들 사이에 변이가 심한 부분을 선정하였는데, 각 probe와 다른 probe 간에는 최소 6개 이상의 염기서열이 다른 부분을 선정하여 oligonucleotide probe를 제작하였다. Oligonucleotide DNA chip의 경우 심어주는 probe는 5' 말단에 amine기로 modify를 하고 linker (d(T)₁₅-)를 붙여주어 labeled된 target이 probe와 잘 붙을 수 있도록 제작하였다.

그리고 oligonucleotide DNA chip 실험에서 target sample (test sample)을 fluorescence dye를 이용해 labeling할 때 signal intensity를 높이기 위해 RT-PCR을 이용하였고, 이를 위한 primer를 제작하였다 (Table 1.16).

Variable region인 coat protein sequence 부분을 cover 할 수 있는 PCR primer를 제작하는데 어려움이 있어 같은 종류인 Potyvirus에 specific한 primer 세트와, Tobamovirus에 속하는 virus 4 종류에 각각 specific한 primer 세트(3 세트)를 선정하였다. PCR primer 제작 시 forward primer에는 5' 말단에 phosphate를 붙여주어 나중에 single strand를 만드는데 사용하도록 하였다.

Table 1.14. The type of viruses used in the plant virus detection DNA chip.

Virus type	Virus name
Tobamovirus	CGMMV; Cucumber green mottle mosaic virus
	CFMMV; Cucumber fruit mottle mosaic virus
	KGMMV; Kyuri green mottle mosaic virus
	ZGMMV; Zucchini green mottle mosaic virus
Potyvirus	ZYMMV; Zucchini yellow mosaic virus
	WMV; Watermelon mosaic virus

Table 1.15. The probe sequence for the plant virus detection DNA chip.

Probe Name	Probe Sequence
CGMMV 1-1	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-CTG TTT CTT TCG ACG ATG GCT
CGMMV 1-2	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-TCT AGT TGC TTC ACA AGG TAC
CGMMV 1-3	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-CTT CGT TTC GCT TCT CAG CTC
CGMMV 1-4	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-ACC ACC TCG AAA GCT TAG TTT
CFMMV 2-1	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-GCC ACT AAG TTC ATA ATC AAG
CFMMV 2-2	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-AGG TGG AGC CCT GCA AAC GCA
CFMMV 2-3	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-GCG TTG GAT TCA AGA AAT AGG
CFMMV 2-4	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-GCT GCG TCG TCG TCT ACC TC
KGMMV 3-1	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-GCG ATG CTT ATG AAC CAC CTC
KGMMV 3-2	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-GTT GGT TTC GGC CCA AGG AGG
KGMMV 3-3	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-AAT CGA TTC GTT GTT ATC CGC
KGMMV 3-4	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-GCA AGC GCT ACT TCC TCA AAG
ZGMMV 4-1	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-ATA GCG CTT CTG AGC TAC CCG
ZGMMV 4-2	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-ATT AAT AAC AAA TCA AGG GGC
ZGMMV 4-3	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-GAT CGA TTC TCT CTT CGG TGC
ZGMMV 4-4	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-GCA GGT TCG TCT ACC TCG TCT
ZYMMV 5-1	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-TTG AAC AAG GAG ACA CCG TAA
ZYMMV 5-2	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-AGA CGC TGG GGC CAC AAA GAA
ZYMMV 5-3	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-TGA GAA GAC AGT AGC AGC TGT
ZYMMV 5-4	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-TAG CAA TGT TTC TTC AAG GTT
WMV 6-1	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-ATG GTT GCT GTG AAT CAG TGT
WMV 6-2	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-GGA CGC AGG GAA AGA ATC AAA
WMV 6-3	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-TGA GTA CAA ACC TAG TCA AG
WMV 6-4	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-TAT CGA TAA CGG TAC ATC TCC
random(-)	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-d(N)21
probe s400	5'-NH ₂ -C ₆ -TTTTTTTTTTTTTTTT-GGC ATG ATG TAT GGA GGA AC

Table 1.16. The primer sequence for RT-PCR.

primer name	sequence
CGMMV-F	5'- P -GGAGGTTGGACTCTGCTTCT-3'
CGMMV-R	5'-ACTTCAACGTCACACGTGAG-3'
CFMMV-F	5'- P -AGTGGACCTGTGTCGCGTAA-3'
CFMMV-R	5'-GTGATTCGAACACCTCTACC-3'
ZG/KGMMV-F	5'- P -CYCGCGATAGRTCTTAYGTT-3'
ZG/KGMMV-R	5'-GTGATTCGAACACCTCTACC-3'
Poty-F	5'- P -CTCCATACATAGCTGAGAC-3'
Poty R	5'-ATT WAC RTC MCK TGC AGT-3'
Spike 400-F	5'- P -CATGAGAAGCACGACAAG-3'
s400 R	5'-GTG GTG GTA CAG ATG AGG TC-3'
adaptor tail	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTT-d(T) ₂₄ -3'

Table 1.17. The array pattern in plant virus detection DNA chip.

1-1	1-2	1-3	1-4	2-1	2-2	2-3	2-4	3-1	3-2	3-3	3-4
1-1	1-2	1-3	1-4	2-1	2-2	2-3	2-4	3-1	3-2	3-3	3-4
4-1	4-2	4-3	4-4	5-1	5-2	5-3	5-4	6-1	6-2	6-3	6-4
4-1	4-2	4-3	4-4	5-1	5-2	5-3	5-4	6-1	6-2	6-3	6-4
s400 +	s400 +	-	-					-	-	s400 +	s400 +

Scanning 결과 각 virus RNA로 target DNA를 만들어 사용하면 그 virus 종에 specific하게 signal을 나타내고 있었고 positive control에서도 signal이 나오고 있으나, *E. coli* RNA로 만들어진 target DNA를 사용하면 어떠한 virus signal도 탐지되지 않으므로, RT-PCR 반응과 hybridization 반응 조건이 최적임을 보여주고 있다 (Fig. 1.54 ~ 1.57).

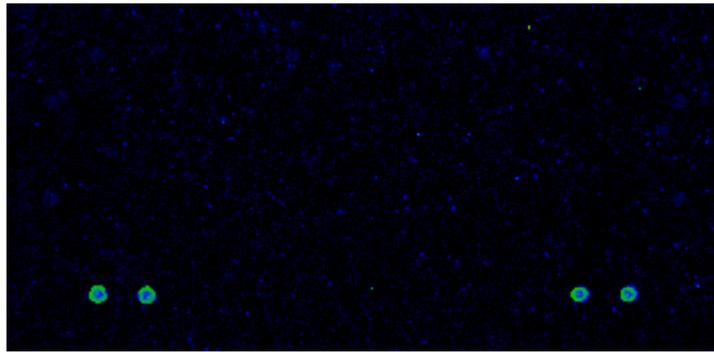


Fig. 1.54. Laser scan image of DNA-chip to which *E. coli* target DNAs were hybridized.

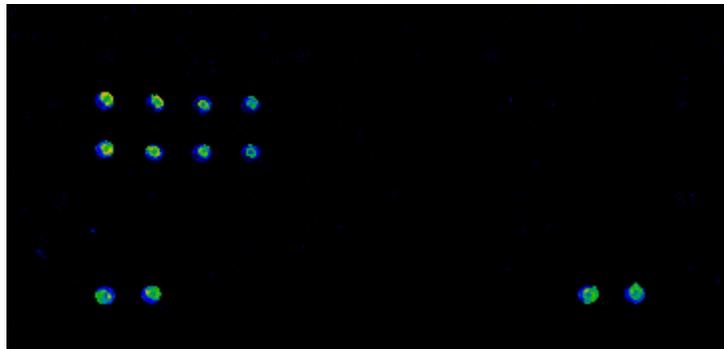


Fig. 1.55. Laser scan image of DNA-chip to which CGMMV(Cucumber green mottle mosaic virus) target DNAs were hybridized.

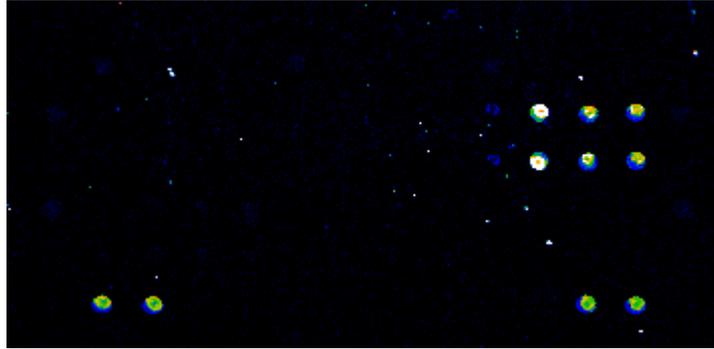


Fig. 1.56. Laser scan image of DNA-chip to which KGMMV(Kyuri green mottle mosaic virus) target DNAs were hybridized.

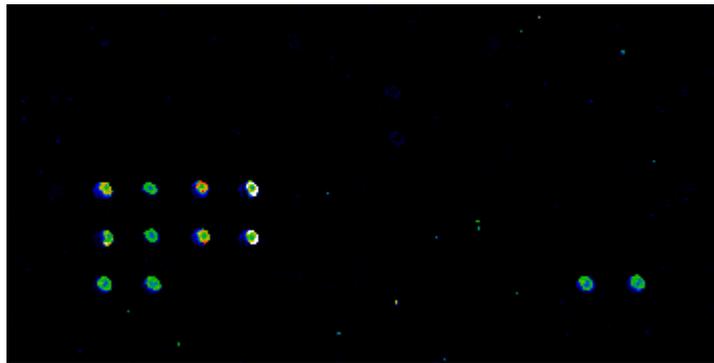


Fig. 1.57. Laser scan image of DNA-chip to which ZGMMV(Zucchini green mottle mosaic virus) target DNAs were hybridized.

4.3 오이 cDNA chip 제작

4.3.1 소규모 오이 cDNA-chip 제작

1세부과제의 오이 cDNA library로부터 얻은 320개의 clone을 PCR 증폭시켜 product를 얻었다. 이것을 probe로 이용하여 50% DMSO에 녹인 후 MicroGrid II(MicroGrid TAS, BioRobotics, UK)를 이용하여 2nl 정도로 SuperAmine slide(Telechem, USA.)에 spotting한 후 UV crosslinking(65mJ)으로 고정시켰다. 고정된 slide를 0.1% SDS로 5분간 2회 세척, 증류수로 2회 세척한 후, blocking solution(3.0g Succinic anhydride, 500ml 1-methyl-2-pyrrolidinon, 500ml 0.2M Boric acid (pH 8.0))으로 20분간 blocking시킨다. Blocking한 후 증류수로 1분간 5회 세척하고 95℃ 증류수에 2분간 담근 후, 상온에서 건조시켜 사용 전까지 먼지가 없는 chamber에서 보관하였다. Hybridization 및 analysis는 제1세부과제에서 수행하였다.

4.3.2. 1.2K 오이 cDNA chip의 제작

소규모의 오이 cDNA-chip (320 clone) 제작과 대체로 동일한 방법을 이용하여 cDNA-chip을 제작하였다. 단지 hybridization solution을 sodium bicarbonae (pH 9.0)을 이용하려 했으나, 장시간 방치의 경우 pH의 변화가 있을 수 있어 Telechem 사의 2X hybridization solution을 이용하였다. 역시 MicroGrid II를 이용하여 Superamine slide에 spotting 하였고, UV crosslinker로 고정하여 cDNA-chip을 완성하였다.

사용된 클론의 순서는 clone tracker (BioRototics) 를 이용하여 excel file로 정리하였고, control gene으로 yeast의 s900 유전자를 사용하였다.

제 2 절 오이감염바이러스 cDNA-Chip 개발 및 유전자의 식물발현 조절

2.1. 연구재료 및 방법

2.1.1. 바이러스 진단용 cDNA-chip 제작

가. 바이러스 진단용 DNA-chip 클론 준비

박과 감염성 바이러스 진단을 위하여 virus 클론을 준비하였다. 준비된 클론들은 박과 감염성 바이러스인 ZGMMV, CGMMV, KGMMV, CFMMV, ZYMV, CMV 등의 coat protein이며, reference 바이러스 클론으로, TMV, PMoMV, PVX, PVY 등의 coat protein을 준비하였다. 이들 각 클론들의 coat protein 증폭은 다음 Table 2.1의 primer set을 이용하였다. 각 product의 크기는 500-700bp 사이로 조절하였고, annealing temp는 모두 약 62℃로 조절하였다.

Tube당 100ul의 반응량으로 하였고, plasmid template은 reaction당 10ng을 사용하였다. 여기에 0.25mM의 dNTPs, 0.2 uM each primer, 1 X rTaq buffer (Takara Shuzo, Kyoto, Japan) 그리고, 1.25 units의 rTaq DNA polymerase (Takara Shuzo)를 첨가하였다. PCR은 다음의 반응으로 수행되었다. 즉, 94C에서 3분동안 초기 denature 시켰고, 총 35 cycle로 95C에서 1분, 62C에서 30초, 그리고 72C에서 3분을 수행하였고, 마지막으로 final extension을 72C에서 12분간 수행하였다. PCR product를 Qiagen 사의 Qiaprep Miniprep Kit을 이용하여 순수분리하고 membrane chip에 printing할 수 있도록 하였다. PCR 반응물은 EtOH를 이용하여 침전시킨 후, 30 ul의 10 X SSC (1 X SSC: 0.15M NaCl과 15mM sodium citrate)에 다시 용해시켰다. PCR 산물은 0.8% agarose gel에서 크기와 integrity를 확인하였다 (Sambrook et al., 1989).

나. Total RNA의 추출

cDNA-chip hybridization을 위한 viral RNA의 준비는 우선 식물체의 total RNA를 분리하였는데 기본적으로 Trizol reagent (Invitrogen)의 방법을 적용하였다. 식물체 0.1g 당 1mL의 Trizol 용액을 이용하였다. 이때 식물체의 탄수화물과 2차대사산물의 제거를 위하여 2% PVP를 함유시킨 용액을 사용하였다. 액체질소로 차갑게 유지시킨 유발과

유봉을 사용하였으며, 식물 분말이 녹음과 동시에 Trizol 용액과 섞이도록 하였다. Homogenizing된 용액을 원심분리용 튜브에 넣은 후, 이 상등액의 약 1/2.5부피의 chloroform을 첨가한 후 20초간 vortexing한 후 10분간 반응시키고 15,000g에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 새 튜브로 옮긴 후 상등액의 1/2 부피의 high salt (sodium citrate, sodium acetate)와 역시 1/2 부피의 isopropanol을 첨가하고 10분간 상온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후 15,000g에서 15분간 원심분리하고, DEPC가 처리된 75% EtOH 용액으로 washing 하였다. 눈으로 볼 수 있는 RNA 침전물을 상온에서 약 10분간 건조시킨 후 다량의 DEPC 처리된 증류수로 용해시키고 다시 얼음에서 2시간동안 반응시켰다. 반응이 끝난 용액은 다시 1/10 부피의 sodium acetate (pH 5.2)와 2.5배 부피의 EtOH로 -20C에서 밤새 침전시켰다. 다음날 다시 원심분리로 RNA를 회수한 후, 소량의 멸균수로 RNA를 용해시켰으며, 여기에 RNase Inhibitor를 첨가하고 이를 사용 전까지 -85C에서 보관하였다.

추출이 끝난 RNA는 우선 denature gel에서 전기영동하여 대략적인 양과 28S ribosomal RNA와 18S ribosomal RNA의 비율로 integrity를 확인하였다. 정량은 Spectrophotometer를 이용하여 A260의 흡광도에서 1.0OD를 기준으로 하여 40ng/ul의 환산비를 이용하였다. 또한 A230/A260과 A260/A280의 비율로 순도를 확인하였다.

Table 2.1. Primer sequences of 8 kinds of virus for viruses detection cDNA-chip.

Virus	Primer sequence	Annealing Temp.
CGMMV	Forward : 5'- AAT CTG AAT CAA CCA GTG CCG -3' Reverse : 5'- CGT CCG CAA ACA TAG CAG AGA -3'	62°C
CFMMV	Forward : 5'- CTT CTG GTT TGC GTT CTT TGC -3' Reverse : 5'- GCT CTA TCA AAC ACA CCG GCA -3'	62°C
KGMMV	Forward : 5'- CGC TTC CTG CTT TCG CTA AG -3' Reverse : 5'- TTG AGG AAG TAG CGC TTG CG -3'	63°C
ZGMMV	Forward : 5'- GCG GTA TTC GTT CGC TTC CT -3' Reverse : 5'- AAA CGC CCG CAC CTT CAT T -3'	62°C
TMV	Forward : 5'- CGT CAT GGC CGA ACA AGA A -3' Reverse : 5'- GCA CCA CGT GTG ATT ACG GA -3'	62°C
PVX	Forward : 5'- TCG AAA GAT GTC AGC ACC AG -3' Reverse : 5'- AAA GGC AGC AGT TTG GGC AG -3'	62°C
ZYMV	Forward : 5'- TCG GGC ACT CAG CAA ACT GT -3' Reverse : 5'- CCC AGC AAG GTG TGC ATG TT -3'	62°C
CMV	Forward : 5'- TCC TCC GCG GAT GCT AAC TT -3' Reverse : 5'- CCA GAT GTG GGA ATG CGT TG -3'	62°C

다. mRNA의 분리

mRNA는 앞서 추출한 total RNA로부터 분리하였는데, Qiagen사의 oligotex column을 이용하는 방법에 준하여 이용하였다. 우선 1mg의 total RNA를 준비하고 이를 65C에서 3분간 반응시킨 후 5초간 vortex하는 과정을 3회 반복하여 충분히 denature 시켰다. Denature시킨 RNA 500ul를 poly(A)와 결합할 수 있는 resin이 포함된 용액 500ul와 섞은 후 상온에서 10분간 반응시켰다. 이 반응물을 15,000g에서 2분간 원심분리하고 상등액을 제거하였다. 여기에 column binding solution을 첨가하고 원심분리용 column을 이용하여 원심분리시켰다. resin과 결합한 RNA는 washing solution으로 2회 씻어낸 후 최종적으로 RNase-free water로 mRNA를 분리하였다. Ribosomal RNA의 혼입을 최대한 억제하기 위하여 상기의 방법을 2회 반복하여 mRNA를 좀더 순수분리하였다.

분리한 mRNA는 사용전까지 RNase-inhibitor가 첨가된 용액으로 -80C에서 보관하였다.

라. First-strand cDNA 합성 및 Cy-dye labeling

분리한 mRNA에 대하여 Cy3-dUTP 또는 Cy5-dUTP (NEN)을 첨가하여 역전사 시켰다. 반응은 총 30ul로 하였으며, 10ug의 total RNA, 4 ug의 pd(N)₆ primer, 10 mM DTT, 500 uM 의 dNTP, 200 uM dTT, 100 uM Cy3-dUTP (virus를 감염시킨 샘플의 labeling) 또는 Cy5-dUTP (건전한 식물체의 RNA labeling), 그리고 400 unit의 SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, CA)를 1 X first-strand buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, and 20 mM DTT)를 반응시켰다. 42C에서 2시간동안 반응시킨 후, Cy3- 혹은 Cy5-dUTP로 labeling 시킨 반응물을 한 tube로 합쳤다. 반응물은 15 ul의 0.1 M NaOH와 1.5 ul의 20 mM EDTA를 첨가하고 70C에서 10분동안 남아있는 RNA를 lysis 시켰다. 이후, 15 ul의 1 M Tris-HCl (pH 7.5)로 중화하였다. Unincorporated dyes의 제거를 위하여 각 반응물들은 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany)으로 순수분리하였다.

마. cDNA chip의 준비와 microarray hybridization

준비한 PCR 반응물을 manual microarrayer (VP478A, V&P Scientific, San Diego, CA)를 이용하여 microporous polymer-coated glass slide (FAST Slide, Schleicher & Schuell, Dassel,

Germany)에 printing하였다.

Manual arrayer의 tip은 384-well microtiter plate로부터 한번에 약 6 nl의 PCR 산물(500 ng/ul)을 load 할 수 있고, 이 tip이 microporous polymer-coated glass slide에 찍힐 경우, slide의 spot은 약 3nl가 된다. 이때 spot의 지름은 약 500um 정도이다. 각 spot의 간격은 약 500um 정도이며 1cm의 간격으로 4반복으로 array 되도록 하였다. Array가 완전히 끝나면, array 되어있는 DNA들을 oven에서 80°C로 30분간 구웠다. 이렇게 만들어진 슬라이드는 사용 전까지 건조한 암소에서 보관하였다. Hybridization 실험시 prehybridization 바로 직전에 array 되어있는 DNA를 denature시키기 위하여 끓는 물에서 2분간 처리하였다. 이렇게 처리한 slide를 hybridization chamber에 넣고, chamber gasket을 끼워 넣었다. Prehybridization solution (0.5 X Denhardt's solution, 0.5 X SSC, 0.1% SDS and 5% formamide)을 slide와 chamber 사이에 위치하도록 pipet으로 넣고 1시간 동안 42°C에서 prehybridization 시켰다. Hybridization은 동일한 용액으로 42°C에서 12시간동안 수행하였다. 반응이 끝난 slide는 2 X SSC, 0.1% SDS에서 15분씩 3번 washing 하였고, 1 X SSC로 5분동안 한번 더 washing 하였다 (Sambrook et al., 1989). 각 spot의 형광광도의 측정은 focus의 높낮이 조절이 가능한 GenePix4000B (Axon Instruments, CA)을 이용하였고, channel은 dual-channel (635nm, 532 nm)을 이용하였다. Image의 분석은 GenePix Pro Ver.3.0.6 software (Axon Instruments)를 이용하였다. 각 spot의 형광강도의 결정은 각각의 흡광과장에서 background의 강도를 빼주었고, 각각의 강도는 median 값으로 결정하였다. 발현수준의 결정과 normalization은 식물자체의 house-keeping gene인 EF1-alpha 유전자를 기준으로 하였다.

사. Western blot 분석

4가지의 서로 다른 tobamoviruse들의 외피단백질을 12 % SDS-polyacrylamide gel에서 분리하였고, 이것을 nitrocellulose (NC) membrane으로 transfer electroblot unit (Bio-Rad Laboratories, CA)을 이용한 electro-blotting방법으로 옮겼다. Membrane은 TBS-T buffer (20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 0.1 % Tween20)를 이용하여 3회 washing하였고 5 % nonfat milk가 포함된 동일한 용액에서 25°C로 4시간동안 washing하였다. 만들어진 membrane에 CGMMV, CFMMV, KGMMV와 ZGMMV 각각에 대한 항체들 (1:1,500 dilutions; immunoglobulin G (IgG) fraction; 1 mg/ml)을 probing 하였다. TBS-T buffer로 membrane을 세 번 수세한 후 alkaline phosphatase (AP)-conjugated secondary antibody (1:7,500 dilution; Promega Corp., Madison, WI)와 반응시켰다. 반응이 끝난 membrane은 TBS-T buffer로 세 번

수세하고 AP-substrate buffer (0.1 M Tris (pH 9.5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂)로 다시 한 번 반응시켰다. 항체 특이적 단백질을 보이 위하여 membrane을 AP-substrate solution (Western Blue Stabilized Substrate Solution; Promega Corp.)와 반응시켰다.

2.1.1.1. 바이러스 진단용 DNA-Chip 보완 및 oligo-chip의 개발

Tobamovirus group으로서 CGMMV (Cucumber green mottle mosaic virus), CFMMV (Cucumber fruit mottle mosaic virus), KGMMV (Kyuri green mottle mosaic virus), ZGMMV (Zucchini green mottle mosaic virus)와 Potyvirus group인 ZYMMV (Zucchini yellow mosaic virus), WMV (Watermelon mosaic virus) 등 총 6가지 바이러스에 대한 세부과제에서 제작한 바이러스 진단용 DNA-chip을 위한 virus 클론을 목표로 하였으며, 이들 바이러스 특이적 염기서열에 single nucleotide polymorphism을 구별할 수 있는 수준으로 진단이 될 수 있도록 하기 위하여, 바이러스 특이적 primer를 디자인 하였다

또한, 목적하는 각 바이러스의 염기서열을 DNASTar program으로 align하여 기본적인 상동성을 비교하였고, 여기에서 conserved 및 variable region을 파악하였다. 그 결과를 토대로 다시 미국 NCBI에서 sequence 검색을 하였고, 검색한 sequence를 align하여 각각의 virus에 특이적으로 identification할 수 있는 부분을 선정하였고 (coat protein sequence), 그 부위에서 각 virus에 특이적인 sequence 네 부분을 이용 진단 probe를 위탁과제와 함께 제작하였다.

Variable region인 coat protein sequence 부분을 완전히 cover할 수 있는 PCR primer를 제작하는데 어려움이 있어 같은 종류인 Potyvirus에 specific한 primer 세트와, Tobamovirus에 속하는 virus 4 종류에 specific한 primer 세트(3 세트)를 선정하였다.

2.1.2 바이러스 저항성 형질전환용 vector 개발

2.1.2.1. 형질전환용 vector 개발

바이러스 저항성 형질전환용 vector는 식물체 발현용 binary vector의 하나인 pGreenII vector를 backbone으로 하여, ZGMMV의 coat protein (500bp)과 movement protein (900bp)을 sense 및 antisense로 각각 식물체에 도입될 수 있도록 하였다.

대략적인 vector 제작방법은 다음과 같다. 먼저 분양받은 35S casset plasmid (pGH0000)에 *EcoRV*로 insert가 삽입될 site를 만들었다. 그리고, ZGMMV가 cloning되어 있는 pZF37 plasmid (pUC18 backbone)를 *Sph* I으로 linearize 시킨 후, full length의 coat protein 및 movement protein을 specific primer를 이용하여 PCR 하였다. 이 산물을 T-vector에 cloning 한 후, *EcoRV*로 잘라내어 삽입할 insert를 준비하였다.

이들을 ligation 시킨 후, restriction enzyme mapping을 통하여 insert의 orientation을 확인하였다. 확인된 클론은 다시 *Xba* I와 *Not* I으로 잘라내어 35S promoter - insert - NOS terminator로 이루어진 삽입 insert를 준비하였다.

최종적으로 pGreenII0029 (Km resistant)와 pGreenII0229 (Barsta resistant)를 준비하고, *Xba* I와 *Not* I으로 이루어진 삽입위치를 만들어주고 ligation 시켰다.

E. coli (JM109) 에서 확인된 clone들은 sequencing을 통하여 insert의 integrity를 확인하였다. 다시 electroporation 방법으로 Agrobacterium인 competent LBA4404 cell에 transformation 시킨 후, restriction enzyme mapping으로 최종 확인작업을 수행하였다.

이 방법을 통하여 최종적으로 각기 kanamycine과 Basta 저항성 유전자를 포함하는 ZGMMV coat protein이 삽입된 pGZGCPS29 및 pGZGCPA29 (sense- 및 antisense-orientation, Km-resistant)와 pGZGCPS229 및 pGZGCPA229 (sense- 및 antisense-orientation, Basta-resistant), ZGMMV movement protein이 삽입된 pGZGMPS29 및 pGZGMPA29 (sense- 및 antisense-orientation, Km-resistant)와 pGZGMPA229 및 pGZGMPS229 (sense- 및 antisense-orientation, Basta-resistant)의 클론을 완성하였다.

2.1.3 Viral vector 시스템 개발

2.1.3.1. Viral vector 시스템 모델 개발

가. CGMMV full-length cDNA clone 제작

오이에서 분리한 Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)의 full-length cDNA clone의 제작은 기본적으로 CGMMV 특이적 primer sets과 long-template RT-PCR로 바이러스 게놈 RNA 유전자에 대한 full-length cDNA를 대량으로 증폭하였다. 증폭된 산물을 이용하여 총 8종의 제한효소로 분석을 실시하였고, 염기서열을 결정하였다.

증폭된 PCR 산물을 pUC18 vector에 클로닝을 실시하여 얻은 recombinants로부터 full-length cDNA clone을 선발하였고, 선발된 클론은 RFLP 분석으로 확인하였다.

총 5개의 full-length cDNA clone을 선발하여 이들에 대하여 담배 및 오이에서 감염성 시험을 실시하였다.

나. CGMMV 클론 Infectivity test 및 virus product 검정

선발된 CGMMV 클론의 오이 감염성 조사를 위하여 선발된 full-length cDNA clone을 template로 하여 SP6 RNA polymerase를 이용하여 *in vitro* transcription을 실시하였다.

다. ZGMMV full-length cDNA clone 제작

오이에서 분리한 Zucchini green mottle mosaic virus (ZGMMV)의 full-length cDNA clone의 제작은 기본적으로 ZGMMV 특이적 primer set과 long-template RT-PCR로 바이러스 게놈 RNA 유전자에 대한 full-length cDNA를 대량으로 증폭하였다. 증폭된 산물을 이용하여 총 8종의 제한효소로 분석을 실시하였고, 염기서열을 결정하였다.

증폭된 PCR 산물을 pUC18 vector에 클로닝을 실시하여 얻은 recombinants로부터 full-length cDNA clone을 선발하였고, 선발된 클론은 RFLP 분석으로 확인하였다.

총 5개의 full-length cDNA clone을 선발하여 이들에 대한 식물체 감염성 시험을 실시하였다.

라. Virus clone의 in vitro transcripts 반응

각 virus의 full genome이 삽입되어 있는 plasmid DNA 3-5ug을 이용하여 다음의 반응을 진행시켰다. 먼저, linearization을 위하여 2ul (3-5ug DNA)에 26.5ul Nulease-free water, 3.5ul 10X digestion buffer, 3ul (10U/ul) restriction enzyme을 첨가하여 총 35ul의 부피로 약 1시간동안 digestion을 실시하였다. 전기영동으로 digestion을 확인한 다음, 일정량을 T7 polymerase를 이용하여 전사시켰다. 이때 NEB사의 RNA Cap structure analogue로 capping하여 virus의 integrity를 유지하였다. 전사물은 전기영동으로 확인하여 정성, 정량하여 식물체에 접종할 수 있도록 하였다.

마. ZGMMV 클론의 Infectivity test 및 virus product 검정

선발된 ZGMMV 클론의 오이 감염성 조사를 위하여 선발된 full-length cDNA clone 을 template로 하여 T7 RNA polymerase를 이용하여 *in vitro* transcription을 실시하였다. *in vitro* transcript의 감염성을 오이에서 실시하였고, 합성된 transcript RNA를 백다다기 오이와 *Nicotiana benthamiana* 에 각 10개체씩 접종을 실시하여 감염성을 조사하였다.

마. Viral vector 제작

Viral vector는 기본적으로 기존에 보고된 TMV의 foreign protein expression system을 바탕으로 하였으며, Fig. 2.1을 기본적 모델로 하여 smGFP 유전자를 삽입하고, 접종하여 UV-lamp 및 형광현미경을 이용하여 삽입된 GFP의 발현 유무, 발현강도 등을 조사하였다.

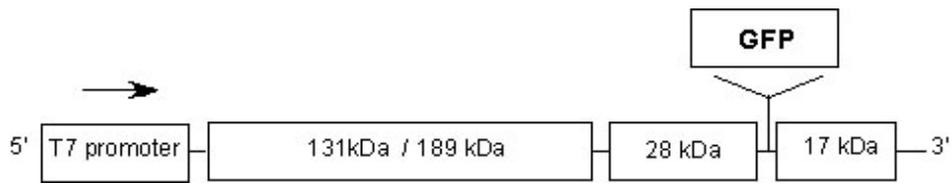


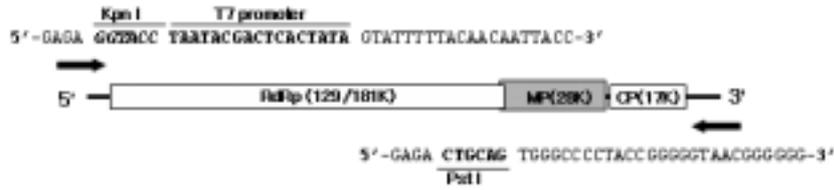
Fig. 2.1. Basic scheme for GFP expressing viral vector system

1) Viral vector 제작을 위한 IVT 설계

Viral vector 제작을 위하여 IVT의 클로닝을 실시하였고, Fig. 2.2와 같은 설계방법을 이용하였다.

각 tobamovirus는 pUC18에 subcloning하였고, T7 promoter sequence를 이용하여 *in vitro* transcription 할 수 있도록 하였다.

1) TMV full-length PCR and cloning



2) KGMMV Primer and vector construct design



3) ZGMMV Primer and vector construct design

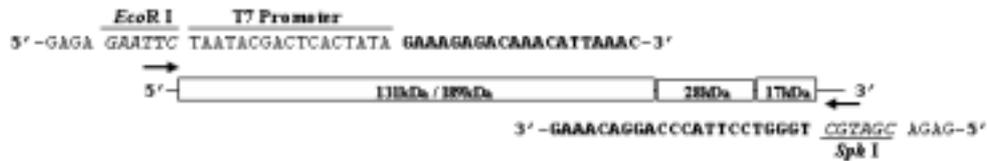


Fig.2.2. Schematic diagram for tobamoviruses IVT (*in vitro* transcription) construction.

2) Viral vector의 모델 제작을 위한 단백질 발현 시스템 구축

① ZGMMV에서 gfp의 발현

Viral vector의 설계를 위하여 다음 Fig. 2.3과 같은 클로닝 단계를 거쳤다. 즉, 기존의 subcloning된 GFP와 MP를 ZGMMV의 MP와 CP 사이에 fusion 하고, 결과물을 최종 IVT 내에 삽입하는 시스템을 이용하였다.

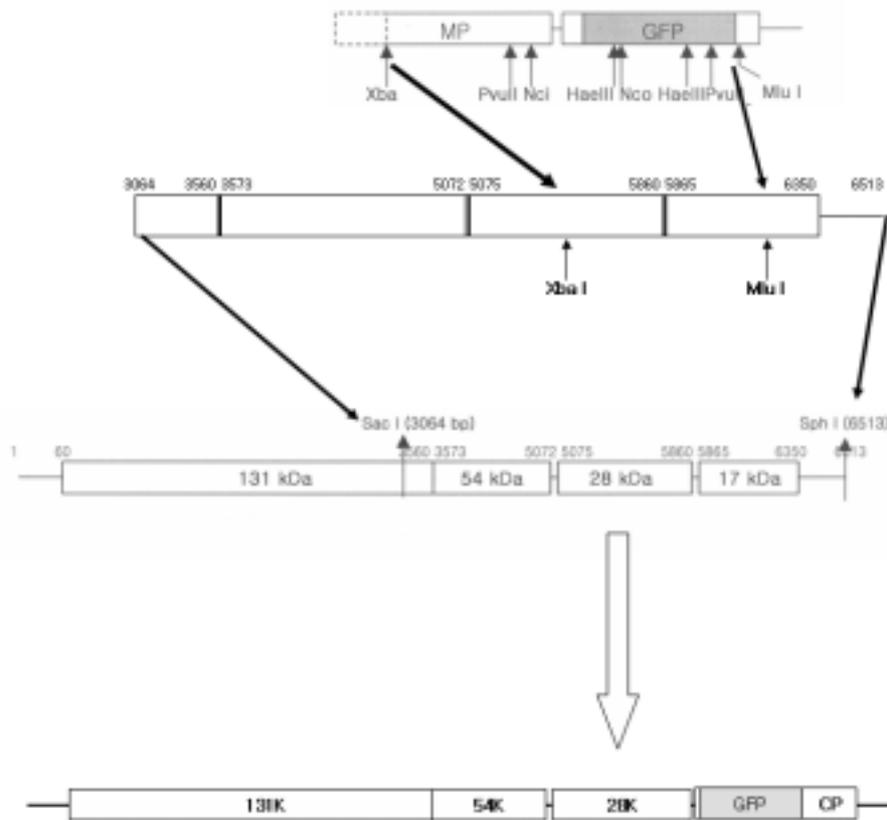


Fig.2.3. Schematic diagram for GFP-fused ZGMMV IVT (*in vitro* transcription) construction.

② KGMMV에서 단백질의 발현 시스템 구축

또한, KGMMV IVT에서 단백질을 발현할 수 있도록 Fig. 2.4과 같은 construction 방법을 이용하였다. 이 과정에서는 기존의 KGMMV IVT의 각 functional domain들을 나누어서 fusion 시키는 방법을 이용했고, 이들 각각의 fragment의 fusion시 그 사이에 GFP를 삽입하여 발현 여부를 조사하였다.

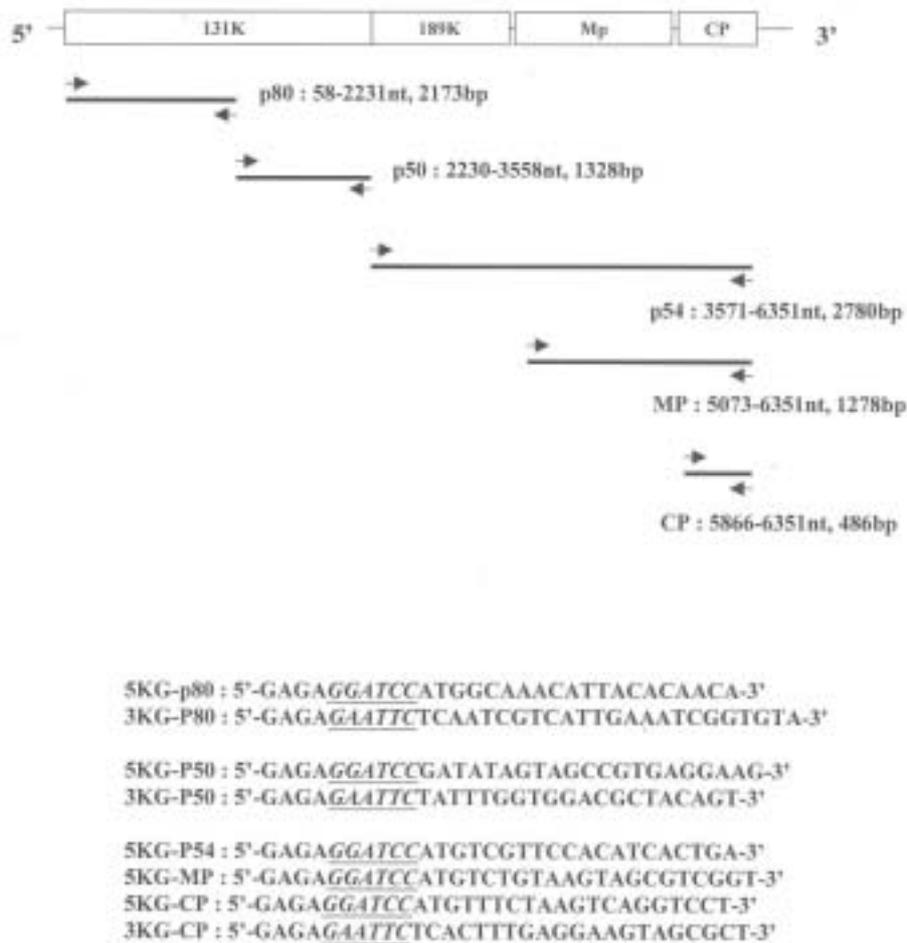


Fig. 2.4. Schematic diagram of KGMMV IVT primer design for foreign protein expression.

③ ZGMMV에서 단백질의 발현 시스템 구축

또한, ZGMMV IVT에서 단백질을 발현할 수 있도록 Fig. 2.5와 같은 construction 방법을 이용하였다. 이 과정에서는 기존의 ZGMMV IVT의 각 functional domain들을 나누어서 fusion 시키는 방법을 이용했고, 이들 각각의 fragment의 fusion시 그 사이에 GFP를 삽입하여 발현 여부를 조사하였다.

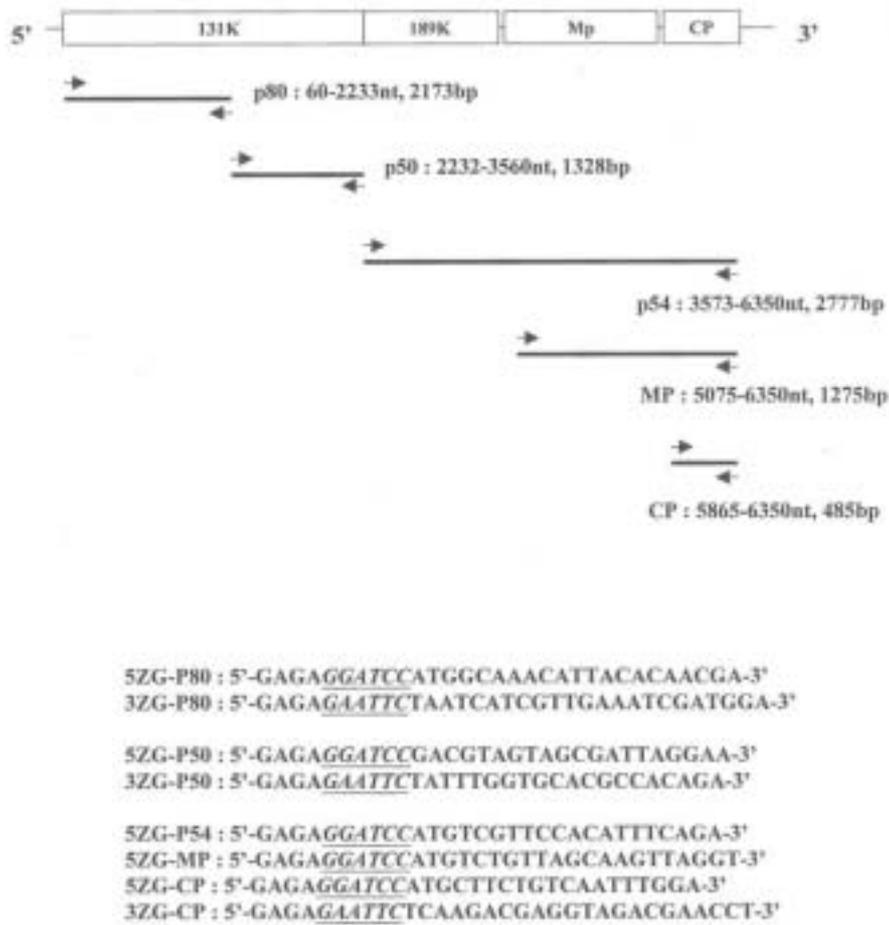


Fig. 2.5. Schematic diagram of ZGMMV IVT primer design for foreign protein expression.

2.1.4 식물체와의 상호작용 연구

2.1.4.1. 바이러스 클론을 이용한 chimeric virus 제작

Tobamovirus인 Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV), Zucchini green mottle mosaic virus (ZGMMV)와 Kyuri green mottle mosaic virus (KGMMV)의 full-length cDNA clone을 이용하여 CGMMV 유전자 부위별로 chimeric mutants를 제작하여, RT-PCR로 분석을 실시하였고, 이들에 대한 감염성을 오이에서 실시하였다. 합성된 transcript RNA를 백다다기 오이와 *Nicotiana benthamiana* 에 각 10개체씩 접종을 실시하여 감염성을 조사하였다.

ZGMMV (pZGF37)와 KGMMV(pKGF12) 각각의 54K Da의 SpeI site를 서로 교환하여 바이러스의 감염성 및 병징의 정도를 비교하였다. 자연 상태에서 ZGMMV와 KGMMV가 복합감염 되었을 경우를 예상할 수 있는 chimeric virus (pZK11과 pKZ1)들을 제작하였고, 이들 chimeric virus 들을 담배, 오이, 호박에서 감염성 검정 및 병징의 변화를 관찰하였다.

2.1.5. 바이러스 형질전환 오이의 검정

형질전환 식물체의 분자적 검정을 위하여 RT-PCR 및 Western blot hybridization을 수행하였다. RT-PCR은 ZGMMV coat protein specific reverse primer를 이용하여 reverse transcription 시킨 것을 forward 및 reverse primer로 증폭시켜 확인하였다.

Western blot hybridization은 먼저 SDS-PAGE로 ZGMMV의 외피단백질을 12 % SDS-polyacrylamide gel에서 분리하였고, 이것을 nitrocellulose (NC) membrane으로 transfer electroblot unit (Bio-Rad Laboratories, CA)을 이용한 electro-blotting방법으로 옮겼다. Membrane은 TBS-T buffer (20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 0.1 % Tween20)를 이용하여 3회 washing하였고 5 % nonfat milk가 포함된 동일한 용액에서 25°C로 4시간동안 washing 하였다. 만들어진 membrane에 CGMMV, CFMMV, KGMMV와 ZGMMV 각각에 대한 항체들 (1:1,500 dilutions; immunoglobulin G (IgG) fraction; 1 mg/ml)을 probing 하였다. TBS-T buffer로 membrane을 세 번 수세한 후 alkaline phosphatase (AP)-conjugated secondary antibody (1:7,500 dilution; Promega Corp., Madison, WI)와 반응시켰다. 반응이 끝난 membrane은 TBS-T buffer로 세 번 수세하고 AP-substrate buffer (0.1 M Tris (pH 9.5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂)로 다시 한 번 반응시켰다. 항체 특이적 단백질을 보이 위하여 membrane을 AP-substrate solution (Promega)과 반응시켰다.

2.2. 연구내용 및 결과

2.2.1. 바이러스 진단용 cDNA-chip 제작

2.2.1.1. 제작 개요

박과 식물의 병은 fungi, bacteria, viruses, phytoplasmas, viroids, and nematodes 등에 의해서 발생되며 약 200가지 이상의 병이 알려져 있다 (Zitter et al., 1996). 이들 병 중에 바이러스 병은 특히 방제가 어렵고, 매우 파괴적이며, 병징의 정도는 기주식물체 및 바이러스 운반체 (vector) 그리고 바이러스 자체의 염기서열 변화에 따라서 그 정도가 다양해질 수 있다. 박과 식물들인 오이, 수박, 호박, 추키니, 그리고 멜론 등의 생산량과 품질에 절대적 영향을 미치는 바이러스의 종류는 약 32가지 이상이 알려져 있다.

따라서, 특정 바이러스 병을 일으키는 바이러스에 대한 동정은 매우 중요하다고 할 수 있다. 문제는 감염된 식물체에서 어떤 바이러스에 감염되었는지를 알아낼 수 있는 검정방법이 최대한 신속하고 효율적이어야 이에 대한 대처도 더 적극적일 수 있다는 점이다.

오이, 수박, 추키니 등과 같은 박과 식물은 대체로 tobamovirus group에 속하는 4가지의 주요 바이러스들에 의하여 큰 피해를 입고 있다. 이 4가지의 바이러스는 *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), *Cucumber fruit mottle mosaic virus* (CFMMV), *Kyuri green mottle mosaic virus* (KGMMV) and *Zucchini green mottle mosaic virus* (ZGMMV) (Antignus et al., 2001; Choi et al., 2001; Ryu et al., 2000; Yoon et al., 2001; Yoon et al., 2002) 이다.

이들의 기주 특성 및 범위는 박과식물로 한정되어 있는 점이 특징이어서 바이러스의 동정에 필요한 표준 기주식물의 범위가 매우 한정된다. 따라서, 표준 검정식물로의 동정 및 분류는 매우 어려운 실정이다 (Antignus et al., 2001; Yoon et al., 2002).

본 연구팀은 최근 이들 바이러스 중 ZGMMV와 KGMMV에 대하여 완전한 genome sequence를 발표한 바 있다. 4가지의 tobamovirus의 염기서열을 확보하고 있기 때문에 사실 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 을 이용한다면 이들에 대한 검정은 가능하며, 또한 primer의 디자인에 따라 복합검정도 가능할 수 있다 (Choi et al., 1999).

그러나, RT-PCR 기술은 때로 priming site에서의 mutation 혹은 매우 변이정도가 큰 염기서

열 부분을 갖는 관련된 mutant virus의 발생이 나타나면 검정에 큰 오류를 야기할 수도 있다.

DNA chip (DNA microarray or biochip)은 생물학계에 새롭고 유용한 도구로서 한 자리를 잡아가고 있다 (Vernet, 2002). 즉, 약 1cm²의 매우 작은 유리 표면에 수백개 혹은 수천개의 서로 다른 oligonucleotides 혹은 cDNA들을 spotting 하고, 상보적인 cDNA와의 결합여부, 정도에 따라 서로 다른 이미지를 얻어낼 수 있어, spotting 되어 있는 probe의 종류만큼 요구되는 실험량을 한 번의 실험으로 끝낼 수 있는 장점을 갖는다. 이런 방법으로 DNA-chip은 특정 세포 혹은 특정 발달단계에서 유전자 발현을 모니터링할 수 있는 좋은 시스템이라 할 수 있다. 본 연구에서는 제1세부과제와 함께 이러한 cDNA-chip의 장점을 이용하여, 서로 다른 종류의 박과바이러스 감염성 바이러스의 동정 및 분류를 하고자 하였다.

이 실험을 위해서는 먼저 선결되어 참고해야할 부분이 바로 박과식물 감염성 바이러스들의 염기서열에 기초한 분자적 유연관계와 혈청학적 근연관계를 파악해야 하는 점이다.

2.2.1.2. 박과감염성 tobamovirus의 혈청학적, 분자적 특성

가. 혈청학적 분류 결과

4가지의 서로 다른 tobamoviruse들인 ZGMMV, CGMMV, CFMMV, KGMMV는 박과식물을 기주로 제한하는 특성을 보이는데, 이로 인하여 생물학적 표현형을 기준으로 하는 표준 검정용 식물로는 분류와 검정이 매우 힘들다.

따라서, 우선 이들 4가지 바이러스의 혈청학적 관계를 검정하기 위하여 각각의 바이러스에 대한 homologous 혹은 heterologous antisera를 만들고 western blot hybridizations 방법을 이용하여 검정하였다. Fig. 2.2.1.2의 Western Blot 결과에 나타난 바와 같이, 각 항혈청은 homologous virus에는 강하게 결합하고 heterologous virus들에는 cross reaction 혹은 약한 결합을 나타내었다. 즉, ZGMMV의 항체는 CGMMV와 cross reaction이 일어났으나 KGMMV에는 상대적으로 약한 결합을 보여주었다. KGMMV 특이적 항체는 역시 단지 ZGMMV에만 cross reaction을 보여주었으며, CFMMV 특이적 항체는 CGMMV와 강하게 그리고, ZGMMV와 KGMMV에는 약하게 결합하는 결과를 나타내었다. 더구나, 4가지 바이러스의 외피단백질은 SDS-PAGE에서 서로 다른 migration rate을 나타내었는데, CFMMV가 다른 3가지 바이러스에 비하여 다소 빠른 이동성을 보여주었고, KGMMV의 외피단백질이 가장 느린 이동성을 나타내었다 (Fig. 2.6). 이러한 이동성의 차이는 반복실험과 western blot

analysis에서 입증되었기 때문에 이 결과도 혈청학적 차이에 근거한 추가적 marker system으로 사용할 수 있으리라 기대하였다.

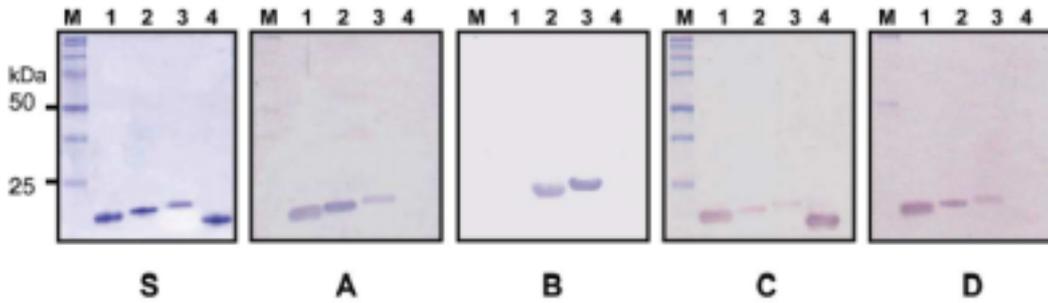


Fig. 2.6. Western blot hybridization을 이용하여 결정된 4가지 서로 다른 박과식물 감염성 tobamoviruse들의 혈청학적 유연관계.

Lane (M) SDS-prestained protein markers; (1) CGMMV; (2) ZGMMV; (3) KGMMV; (4) CFMMV.

Panel (S), Coomassie-stained SDS-PAGE Panels (A), (B), (C), (D),

Western blots immunoprobed with (A) ZGMMV; (B) KGMMV; (C) CFMMV; (D) CGMMV antisera.

이들 4가지 바이러스의 외피단백질에서의 아미노산 서열의 분석결과 45.1%에서 80.9%까지의 다양한 변화 및 차이를 나타내었다. 아미노산 염기서열의 상동성은 전체 외피단백질 서열에서 얻어질 수 있었지만, 이 결과가 Western blot 결과와 항상 일치하는 것은 아니었다. 이 결과를 좀더 확인하기 위하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 수행하였는데, 역시 Western blot hybridization 결과와 비슷한 경향을 보여주었다 (Fig. 2.7). 몇가지 바이러스에서 혈청학적인 교차반응이 보고되었는데, 실제 아미노산 서열과 항상 일치하지는 않았다 (Antignus et al., 2001; Van Regenmortel, 1975).

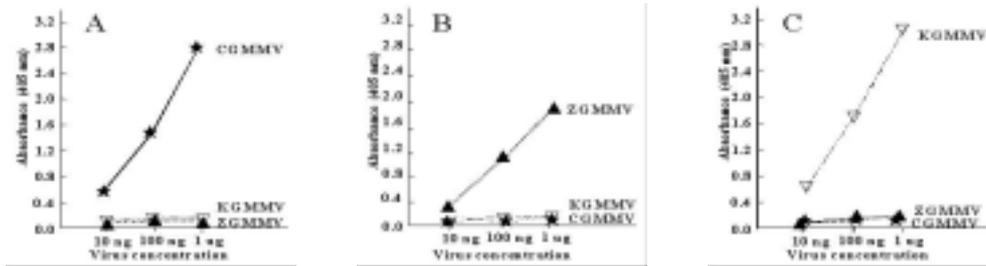


Fig. 2.7. ELISA result for the comparison among CGMMV (A), ZGMMV (B), and KGMMV (C).

이러한 결과를 종합하여 볼 때, 본 연구에 있어서 4가지 박과식물 감염성 바이러스의 보존적인 아미노산 잔기의 일부분이 바이러스의 혈청학적 특성과 밀접히 관련되어 있을 것으로 추정되었으며, 약간의 모호한 결과가 나왔을 것으로 판단되었다. 이 문제가 바로 실제 일반적인 혈청학적 검정법에서 false-positive의 출현을 설명할 수 있을 것으로 생각된다.

나. 바이러스 RNA 염기서열 분류 및 검정

ZGMMV, KGMMV, CFMMV 및 CGMMV는 모두 박과식물을 기주로 하는 Tobamo virus group이다. 이들 바이러스를 구별 및 검정하기 위한 방법은 다양한 접근방법이 가능한데, 우선 이들 바이러스 간의 sequence homology에 대한 alignment를 수행한 결과, 가장 variable한 region은 coat protein 부분이었다. 이 부위는 혈청학적 검정 (serological assay)에도 주요한 target 부위로 신뢰할만한 결과를 얻을 수 있었다.

Fig. 2.8은 박과작물을 기주로 하는 대표적인 바이러스들인 ZGMMV, KGMMV, CGMMV에 대한 coat protein에 해당하는 sequence를 probe로 이용하여 Northern analysis의 결과이다. 각 바이러스에 대한 hybridization 결과로 비추어볼 때, 매우 sequence specific한 hybridization이 가능하며, 높은 stringency에서는 세 바이러스를 구분할 수 있으리라 기대할 수 있었다.

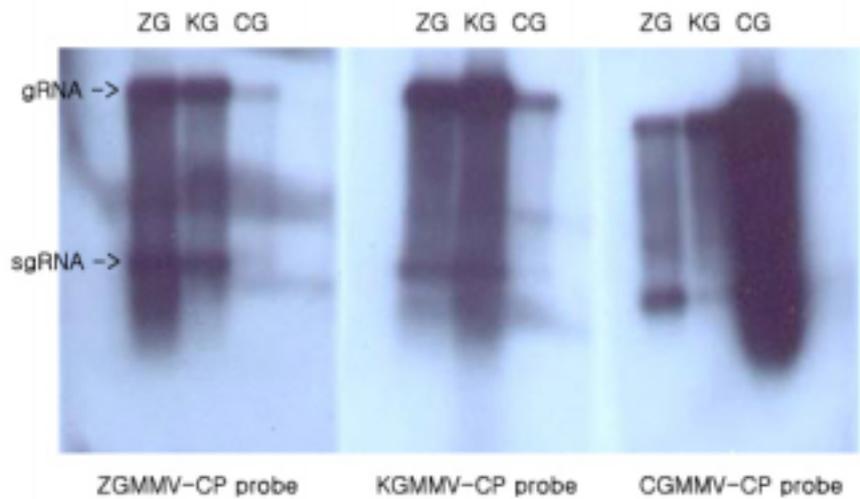


Fig 2.8. RNA gel blot assay for comparing with ZGMMV, KGMMV, CGMMV with their coat-protein probes.

결론적으로, 박과식물 감염성 Tobamovirus group은 Fig. 2.9와 같은 phylogenetic tree로 표현될 수 있었으며, 이 결과는 외피단백질 (coat protein)의 핵산염기서열 상동성을 기초로 clustering 한 것이다.

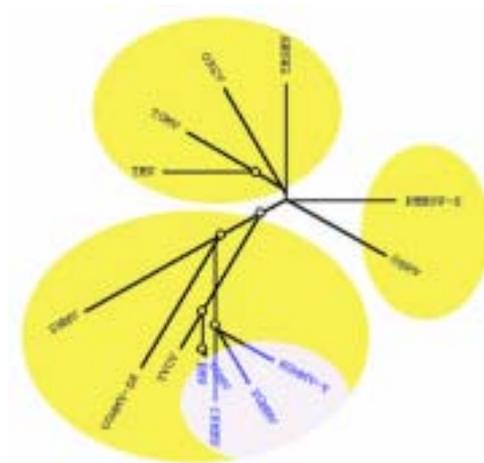


Fig. 2.9. Phylogenetic tree analysis of nucleic acid sequences of coat protein the genus *Tobamovirus*

다. 바이러스 진단용 cDNA-chip 실험

이러한 결과를 바탕으로 본 연구에서는 박과식물 감염성 바이러스들과 reference 바이러스, 그리고 식물체 유전자를 control로 하는 DNA-chip을 이용한 검정결과를 얻었다. 1세대부과제에서 제작하는 바이러스 진단용 DNA-chip을 위한 virus 클론을 준비하였다. 준비된 클론들은 박과 감염성 바이러스인 ZGMMV, CGMMV, KGMMV, CFMMV, CYMV, CMV 등의 coat protein이며, reference 바이러스 클론으로, TMV, PMoMV, PVX, PVY 등의 coat protein을 준비하였다. 또한, 이들 각 클론들의 coat protein 증폭은 일단 pGEM T-easy vector (Promega)에 subcloning하고 universal primer를 이용하여 준비하였다.

Fig. 2.10의 결과와 같이 ZGMMV에 감염된 식물체에서 total RNA를 분리하고 random hexamer를 probe로 하여 Cy3-dUTP를 labeling 한 후, hybridization하면 ZGMMV target spot에 가장 강하게 결합하고, 반면에 KGMMV에는 교차반응이 약간 일어난 것을 볼 수 있다. 이때 Arabidopsis의 EF1- α 를 증폭한 클론은 positive clone 및 normalization의 control spot으로 사용할 수 있었다. 이 결과를 토대로 제1세대부과제와 협력하여 종합적인 연구결과를 얻었으며, 특이적 합성 oligomer에 기초한 상업용 바이러스 cDNA-chip 제작 연구를 수행하였다.

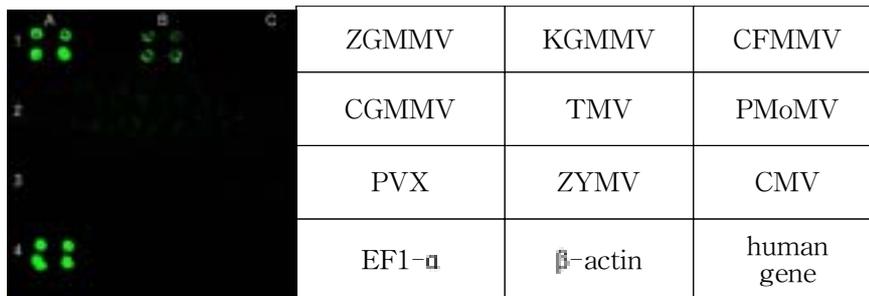


Fig. 2.10. DNA chip analysis of three cucurbit-infecting Tobamoviruses

DNA chip : cDNA chip (PCR products from cloned plasmids)

Sample : Total RNA from ZGMMV-infected cucumber

Labeling : random priming with Cy3-dUTP

라. 바이러스 진단용 DNA-Chip 보완 및 oligo-chip의 개발

식물 바이러스 진단용 cDNA chip은 한번의 실험으로 여러 바이러스에 대한 특이적인 진단이 가능하였다. 각 바이러스 간의 RNA 염기서열 상동성에 따른 근연관계와 실제 바이러스 진단 cDNA-chip에서의 형광강도의 비는 매우 유의적이었으며, 실제 감염 식물체 앞에서 바이러스의 정확한 진단이 가능하였다. 그 결과는 Journal of Virological Methods (110:19-24)에 publish 하였다 (Lee et al, 2003).

그런데, 한편으로 바이러스의 정확한 genotyping을 위해서는 바이러스의 conserved sequence 및 variable sequence에 대한 정확한 진단이 필요할 수 있다.

따라서, 다음 단계의 연구로서 그리고 상용화를 위한 연구를 수행하게 되었다. Tobamovirus group으로서 CGMMV (Cucumber green mottle mosaic virus), CFMMV (Cucumber fruit mottle mosaic virus), KGMMV (Kyuri green mottle mosaic virus), ZGMMV (Zucchini green mottle mosaic virus)와 Potyvirus group인 ZYMMV (Zucchini yellow mosaic virus), WMV (Watermelon mosaic virus) 등 총 6가지 바이러스에 대한 세부과제에서 제작한 바이러스 진단용 DNA-chip을 위한 virus 클론을 목표로 하였다.

이들 바이러스 특이적 염기서열에 single nucleotide polymorphism을 구별할 수 있는 수준으로 진단이 될 수 있도록 하기 위하여, 바이러스 특이적 primer를 디자인 하였다 (Table 2.2).

또한, 목적하는 각 바이러스의 염기서열을 DNASTar program으로 align하여 기본적인 상동성을 비교하였고, 여기에서 conserved 및 variable region을 파악하였다. 그 결과를 토대로 다시 미국 NCBI에서 sequence 검색을 하였고, 검색한 sequence를 align하여 각각의 virus에 특이적으로 identification할 수 있는 부분을 선정하였고 (coat protein sequence), 그 부위에서 각 virus에 특이적인 sequence 네 부분을 이용 진단 probe를 위탁과제와 함께 제작하였다 (Table 2.3).

진단 probe는 virus들 사이에 변이가 심한 부분을 선정하였는데, 각 probe와 다른 probe 간에는 최소 6개 이상의 염기서열이 다른 부분을 선정하여 oligonucleotide probe를 제작하도록 하였다.

Variable region인 coat protein sequence 부분을 완전히 cover 할 수 있는 PCR primer 를 제작하는데 어려움이 있어 같은 종류인 Potyvirus에 specific한 primer 세트와, Tobamovirus에 속하는 virus 4 종류에 각각 specific한 primer 세트(3 세트)를 선정하였다.

Oligomer의 합성 및 chip의 제작은 1세부과제 위탁과제에 의뢰하였고, CGMMV, KGMMV, ZGMMV의 감염잎에서 virus RNA를 추출 후 정제하여 oligo chip의 진단에 이용할 수 있도록 하였다.

Table 2.2. Specific RT-primer set for oligo chip

Virus	Primer sequence
CGMMV	RT PRIMER : 5'AAA CTA AGC TTT CGA GGT GGT 3' FORWARD PRIMER : 5' CTG TTT CTT TCG ACG ATG GCT 3'
CFMMV	RT PRIMER : 5'ACC ACG CCT CAC TTC GAG GTA 3' FORWARD PRIMER : 5' GCC ACT AAG TTC ATA ATC AAG 3'
KGMMV	RT PRIMER : 5'CTT TGA GGA AGT AGC GCT TGC 3' FORWARD PRIMER : 5' GCG ATG CTT ATG AAC CAC CTC 3'
ZGMMV	RT PRIMER : 5'AGA CGA GGT AGA CGA ACC TGC 3' FORWARD PRIMER : 5' ATA GCG CTT CTG AGC TAC CCG 3'
ZYMV	RT PRIMER : 5'OLIOGO d(T) 3' FORWARD PRIMER : 5' TAA TGC TCC AAT CAG GCA CTC 3'
WMV	RT PRIMER : 5'OLIOGO d(T) 3' FORWARD PRIMER : 5' ATG GTT GCT GTG AAT CAG TGT 3'

Table 2.3. Design of specific virus sequences for oligo-chip construction

	Virus	Sequence for oligomer synthesis
Tobamovirus genus	CGMMV	1-1. CTG TTT CTT TCG ACG ATG GCT 1-2. TCT AGT TGC TTC ACA AGG TAC 1-3. CTT CGT TTC GCT TCT CAG CTC 1-4. ACC ACC TCG AAA GCT TAG TTT
	CFMMV	2-1. GCC ACT AAG TTC ATA ATC AAG 2-2. AGG TGG AGC CCT GCA AAC GCA 2-3. GCG TTG GAT TCA AGA AAT AGG 2-4. TAC CTC GAA GTG AGG CGT GGT
	KGMMV	3-1. GCG ATG CTT ATG AAC CAC CTC 3-2. GTT GGT TTC GGC CCA AGG AGG 3-3. AAT CGA TTC GTT GTT ATC CGC 3-4. GCA AGC GCT ACT TCC TCA AAG
	ZGMMV	4-1. ATA GCG CTT CTG AGC TAC CCG 4-2. ATT AAT AAC AAA TCA AGG GGC 4-3. GAT CGA TTC TCT CTT CGG TGC 4-4. GCA GGT TCG TCT ACC TCG TCT
Potyvirus genus	ZYMV	5-1. TAA TGC TCC AAT CAG GCA CTC 5-2. CAC GAA GGA CAA GGA TGT GAA 5-3. TGG AGT GTG GTT CAT GAT GGA 5-4. CAG CGG AGG CAT ACA TAG AAA
	WMV	6-1. ATG GTT GCT GTG AAT CAG TGT 6-2. GGA CGC AGG GAA AGA ATC AAA 6-3. TGA GTA CAA ACC TAG TCA AGT 6-4. GGT GTA TCG ATA ACG GTA CAT

Oligo-chip의 제작 후, 박과바이러스에 감염된 식물체를 제작한 oligo-chip에 hybridization 한 결과를 Fig. 2.11에 나타내었다.

CG 1- 1	CG 1- 2	CG 1-3	CG 1- 4	CF 2- 1	CF 2- 2	CF 2- 3	CF 2- 4	KG 3- 1	KG 3- 2	KG 3- 3	KG 3- 4
CG 1- 1	CG 1- 2	CG 1-3	CG 1- 4	CF 2- 1	CF 2- 2	CF 2- 3	CF 2- 4	KG 3- 1	KG 3- 2	KG 3- 3	KG 3- 4
ZG 4- 1	ZG 4- 2	ZG 4-3	ZG 4- 4	ZY 5- 1	ZY 5- 2	ZY 5- 3	ZY 5- 4	W 6- 1	W 6- 2	W 6- 3	W 6- 4
ZG 4- 1	ZG 4- 2	ZG 4-3	ZG 4- 4	ZY 5- 1	ZY 5- 2	ZY 5- 3	ZY 5- 4	W 6- 1	W 6- 2	W 6- 3	W 6- 4

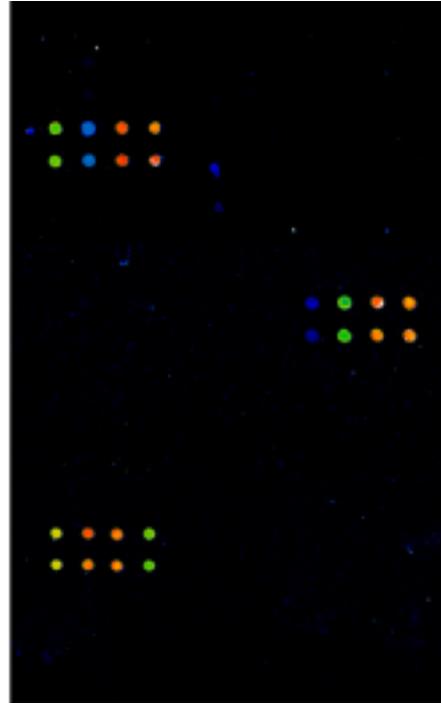


Fig. 2.11. Oligo-chip result for Cucurbit-infeciou virus detection in cucumber plants.

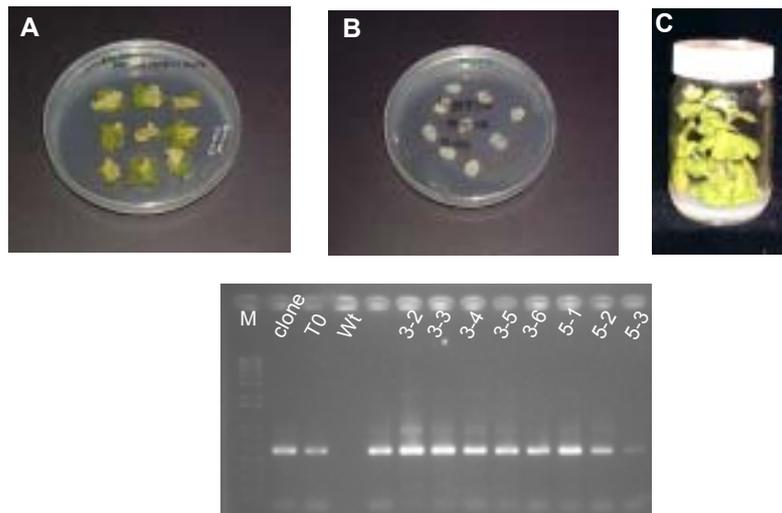
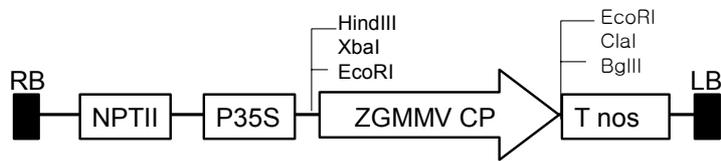
Table. 2.2와 같이 다양한 종류의 oligomer를 제작하고 array한 후, ZGMMV와 CGMMV에 감염된 식물체의 total RNA에서 만들어진 Cy3-labeled cDNA (ZGMMV)와 Cy5-labeled cDNA (CGMMV)를 이용하여 hybridization 시킨 결과 이미지를 보면 (Fig. 2.1.1.6), CG1-3의 경우 매우 높은 binding activity를 보이는 것을 알 수 있고, 반면에 CG1-1 및 CG1-2에는 상대적으로 낮은 binding activity를 보였다. 또한, ZGMMV의 경우 ZG4-2 및 ZG4-3에서는 높은 homology를 나타내었으나, ZG4-4에서는 거의 반응이 이루어지지 않았다. 그리고, ZG4-1에서는 CGMMV와의 cross reaction이 이루어진 것을 볼 수 있다. 이것은 실제로 ZGMMV 혹은 CGMMV의 동시 감염시에 식물체 내에서의 검정이 쉽지 않음을 나타내고 있다.

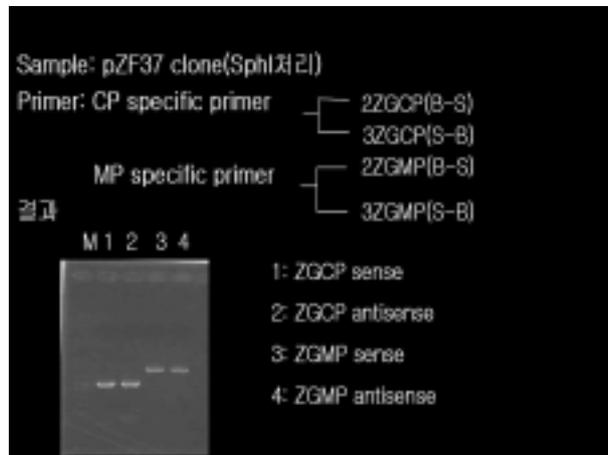
이와 같은 결과를 바탕으로 최종적으로 위탁과제와 함께 바이러스 검정용 oligo-chip을 개발하였다.

2.2.2 바이러스 저항성 형질전환용 vector 개발

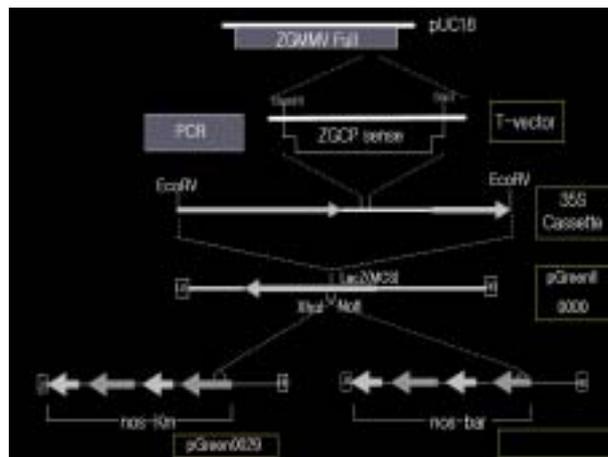
2.2.2.1. 형질전환용 vector 개발

바이러스 저항성 형질전환용 vector는 식물체 발현용 binary vector의 하나인 pGreenII vector를 backbone으로 하였으며, ZGMMV의 coat protein (500bp)과 movement protein (900bp)을 sense 및 antisense로 각각 식물체에 도입될 수 있도록 하였다 (Fig. 2.12, 2.13, 2.14).



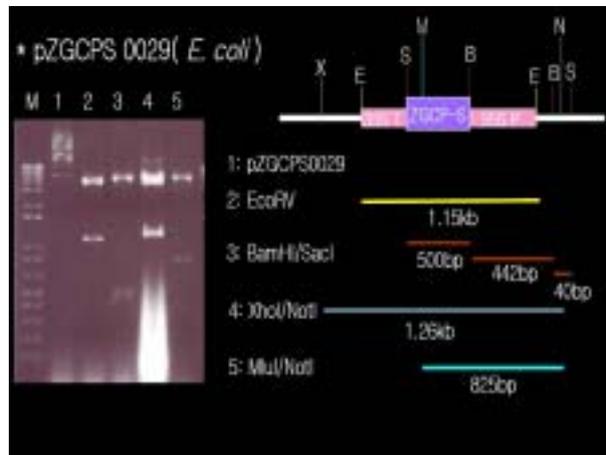


(A)

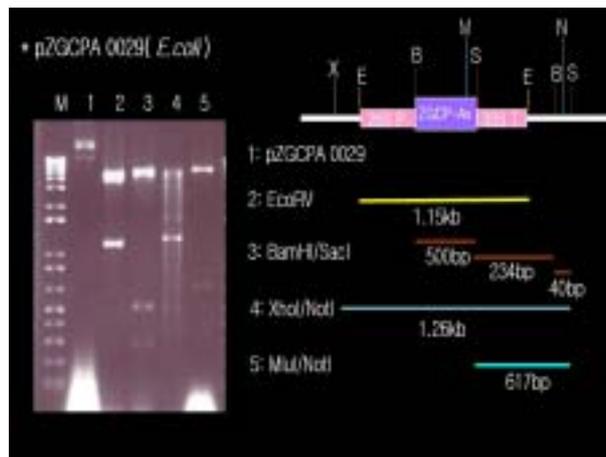


(B)

Fig. 2.12. Amplification result of ZGMMV coat-protein(CP) and movement-protein(MP) by PCR (A), cloning strategy for plant expression with pGreenII vector (B)

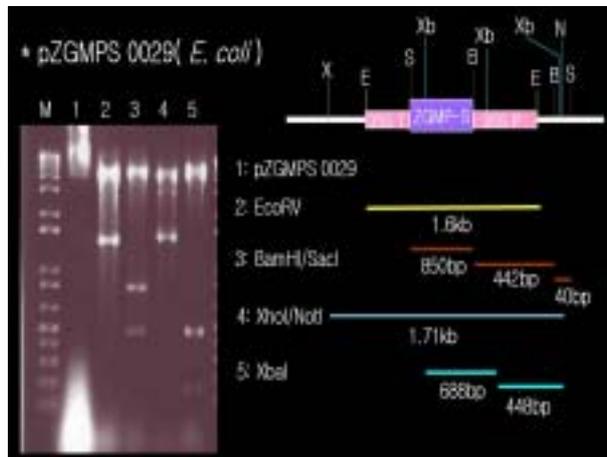


(A)

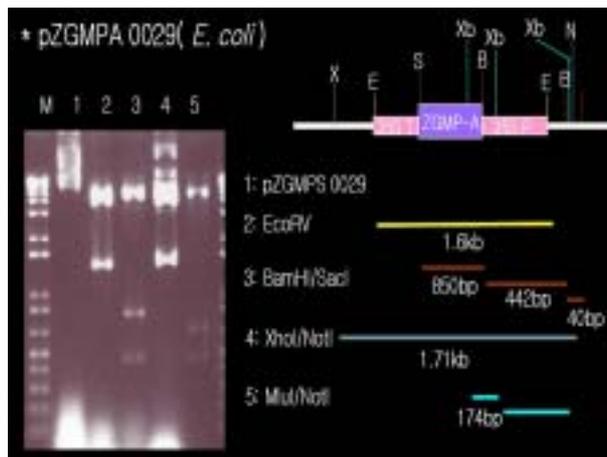


(B)

Fig. 2.13. Construction of pZGCPS and pZGCPA vectors for expression in cucumber plant. (A) sense-wise coat-protein and (B) antisense-wise coat-protein of ZGMMV.



(A)



(B)

Fig. 2.14. Construction of pZGMPS and pZGMPA vectors for expression in cucumber plant. (A) sense-wise movement-protein and (B) antisense-wise movement-protein of ZGMMV.

2.2.3 Viral vector 시스템 개발

2.2.3.1. 박과식물 감염성 바이러스 IVT의 개발

본 과제에서는 박과식물에서 사용가능한 viral vector system을 개발하기 위하여 ZGMMV, CGMMV, KGMMV 등 박과식물 감염성 바이러스에 대한 in vitro transcription (IVT) system을 개발하고자 하였으며, 그 개략적인 개발 모식도는 Fig. 2.15와 같다.

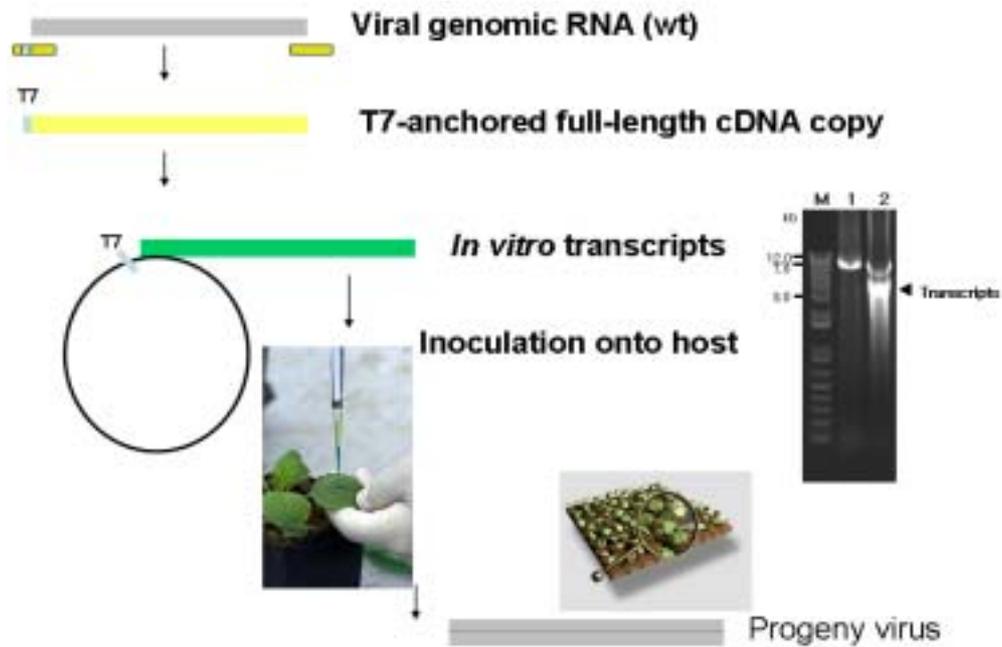


Fig. 2.15 Schematic representation of procedure for in vitro transcription and infectious virus clone construction.

증폭된 PCR 산물을 pUC18 vector에 클로닝을 실시하여 얻은 recombinants로부터 full-length cDNA clone을 선발하였고, 선발된 클론은 RFLP 분석으로 확인할 수 있었다 (Fig. 2.17). 본 연구에서 총 5개의 full-length cDNA clone을 선발하여 이들에 대한 식물체 감염성 시험을 실시하였다.

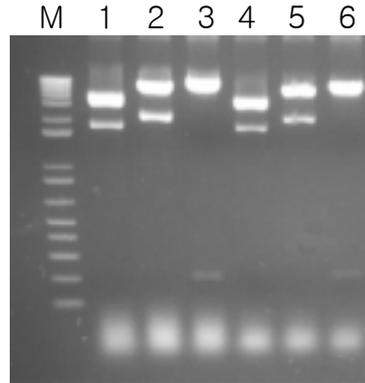


Fig. 2.17. RFLP analysis of CGMMV 1A clones. Lane 1-3, pCGF1A3 ; lane 4-6, pCGF1A5 ; lane 1, *EcoR* I ; lane 2, *Pst* I ; lane 3, *Hind* III ; lane 4, *EcoR* I ; lane 5, *Pst* I ; lane 6, *Hind* III.

나. CGMMV 클론 및 mutant 클론의 Infectivity test 및 virus product 검정

선발된 CGMMV 클론의 오이 감염성 조사를 위하여 선발된 full-length cDNA clone을 template로 하여 SP6 RNA polymerase를 이용하여 *in vitro* transcription을 실시하였다 (Fig. 2.18). 또한, CGMMV와 유사한 박과 Tobamovirus인 Zucchini green mottle mosaic virus (ZGMMV)와 Kyuri green mottle mosaic virus (KGMMV)의 full-length cDNA clone을 이용하여 CGMMV 유전자 부위별로 chimeric mutants를 제작하여, RT-PCR로 분석을 실시하였고 (Fig. 2.19), 이들에 대한 감염성을 오이에서 실시하였다. 합성된 transcript RNA를 백다다기 오이와 *Nicotiana benthamiana* 에 각 10개체씩 접종을 실시하여 감염성을 조사하였다.

분석된 full-length cDNA clone 중에서 3개의 CGMMV 클론이 오이에 감염성이 있는 것으로 확인되었으며 (Fig. 2.20), 이를 이용하여 virus vector의 기본 모델을 제작하였다.

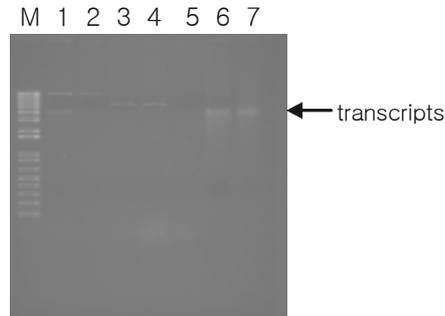


Fig. 2.18. In vitro transcription of CGMMV and its chimeric mutants clones. Lane 1-5, CGMMV clones ; 6-7, pZK clones ; lane 1, pCGF1A3 ; lane 2, pCGF1A5 ; lane 3, pCG2A10, lane 4, pCG2A16 ; lane 5, pCGW7 ; lane 6, pZK11 ; lane 7, pZK12.

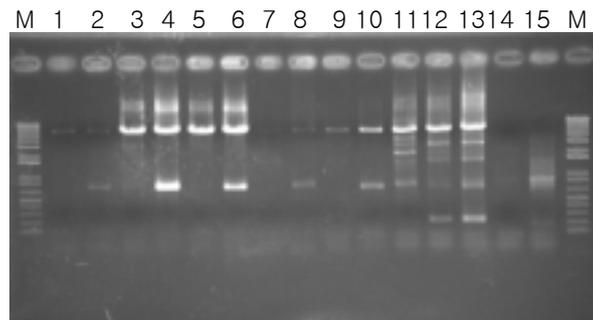


Fig. 2.19. RT-PCR of CGMMV and chimeric viruses. Lane 1-10, cimeric viruses ; lane 1, KZKMCP ; lane 2, KZKCP ; lane 3, ZKZMCP ; lane 4, ZKZCP ; lane 5, ZKZMCP ; lane 6, ZKZCP ; lane 7, KGFZMCP, lane 8, KGFZCP; lane 9, ZGFKMCP ; lane 10, ZGFKCP. Lane 11-15, CGMMV isolates ; lane 11, CGMMV-W ; lane 12-13, CGMMV 2A ; CGMMV 14-15, CGMMV 1-2.

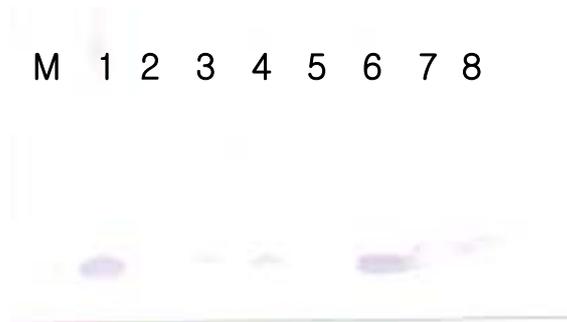


Fig. 2.20. Western blot analysis of CGMMV and its derived chimeric mutants in cucumber plants (cv. Baekdadaki) in systemically infected leaves. Lane M; prestained protein markers, 1; wild-type CGMMV, 2; pCGF1, 3; pCGF2, 4; pCGF3, 5; pCGF4, 6; pCZM1, 7; pCKM4; and 8; pCKM12.

다. ZGMMV full-length cDNA clone 및 mutant 제작

오이에서 분리한 Zucchini green mottle mosaic virus (ZGMMV)의 full-length cDNA clone의 제작은 기본적으로 ZGMMV 특이적 primer set (Table 2.5)와 long-template RT-PCR로 바이러스 게놈 RNA 유전자에 대한 full-length cDNA를 대량으로 증폭하였다. 증폭된 산물을 이용하여 총 8종의 제한효소로 분석을 실시하였고, 염기서열 결정으로 ZGMMV genomic RNA에서 유래되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 2.21).

Table 2.5. Primer sequences for full-length cDNA amplification of ZGMMV genomic RNA

primer name	Sequence (5'-3')	Expected size (kb)
ZG5T7	GAG-AGA-ATT-CTA-ATA-CGA-CTC-ACT-ATA-GAA-AGA-GAC-AAA-CAT-TAA-AC	7.46
ZG3Sph	GAG-ACG-ATG-CAC-CCA-GGA-ATG-GGT-CCT-GTT-TG	

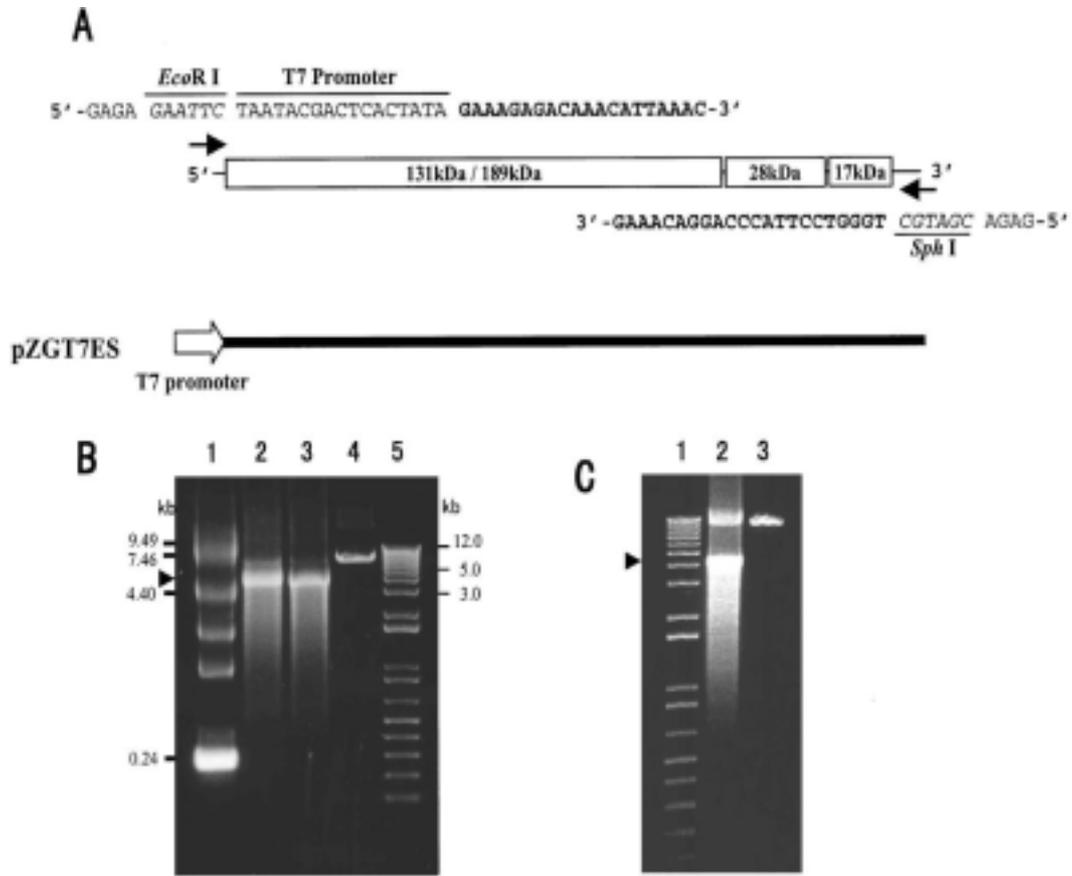


Fig. 2.21. Full length in vitro transcript design for ZGMMV infectious clone (A), gel loading result of in vitro transcripts of ZGMMV (B), comparison of ZGMMV virion (lane 2) to ZGMMV in vitro transcript (lane 3).

증폭된 PCR 산물을 pUC18 vector에 클로닝을 실시하여 얻은 recombinants로부터 full-length cDNA clone을 선발하였고, 선발된 클론은 RFLP 분석으로 확인할 수 있었다 (Fig. 2.22). 본 연구에서 총 5개의 full-length cDNA clone을 선발하여 이들에 대한 식물체 감염성 시험을 실시하였다.

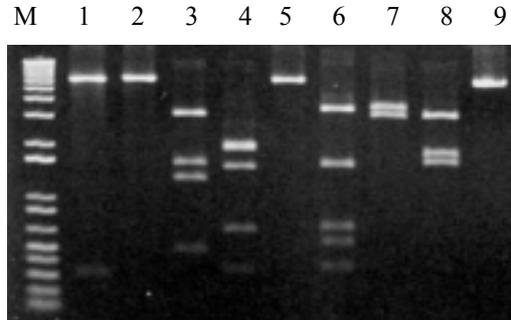


Fig. 2.22. RFLP analysis of ZGMMV 1A clones. Lane 1-4, pZGF1A3 ; lane 5-9, pZGF1A5 ; lane 3, *EcoR* I ; lane 4 , *Pst* I ; lane 6, *Hind* III ; lane 7, *EcoR* I ; lane 8, *Pst* I ; lane 9, *Hind* III.

라. ZGMMV 클론의 Infectivity test 및 virus product 검정

선발된 ZGMMV 클론의 오이 감염성 조사를 위하여 선발된 full-length cDNA clone을 template로 하여 T7 RNA polymerase를 이용하여 *in vitro* transcription을 실시하였다. *in vitro* transcript의 감염성을 오이에서 실시하였고, 합성된 transcript RNA를 백다다기 오이와 *Nicotiana benthamiana* 에 각 10개체씩 접종을 실시하여 감염성을 조사하였다.

분석된 full-length cDNA clone 중에서 3개의 ZGMMV 클론이 오이에 감염성이 있는 것으로 확인되었고, 이 중 하나의 클론은 병징이 매우 심각한 양상을 나타낸 결과를 보여 mutant로서의 이용가능성을 제시하였다 (Fig. 2.23).



Fig. 2.23. Symptom comparisons of ZGMMV *in vitro* transcript (Left: cucumber, Right: zucchini plant)

2.2.3.2. Viral vector 시스템 모델 개발

형질전환 식물체의 개발은 농업현장의 작물재배 측면에서 생산성 향상 및 목적 형질의 발현 및 향상 등의 장점이 있으며, 최근 부각되고 있는 biofarming 및 의료용 유용 단백질의 값싼 생산, 그리고 edible vaccine와 같은 보건의적 효능을 갖는 식물체를 개발할 수 있는 토대가 될 수 있다. 그러나 현실적으로 형질전환 식물체의 개발에는 긴 시간과 노동력이 요구되어 단기간 내에 이루기는 힘든 작업이다.

본 과제에서처럼 많은 ESTs를 발굴하고 그 기능을 탐색하며, 바이러스병 저항성 식물체를 개발하는 과정에서는 좀더 단기간에 발굴한 유전자의 기능을 탐색할 수 있는 시스템이 필요하다.

따라서, 최근에는 많은 연구자들이 형질전환체를 완성하기 전에 발현을 원하는 유전자를 viral vector 내에 삽입하여, over-expression 혹은 silencing을 유도하여 그 기능을 먼저 in planta 혹은 in vivo에서 확인한 후, 형질전환체로의 시도를 하는 경향을 보이고 있다. 물론, 이 viral vector system을 이용하기 위해서는 몇가지 전제 조건을 필요로 한다. 그 고려사항을 언급하면 다음과 같다.

- 가. 먼저 발현을 원하는 viral vector가 대상 식물을 기주(host)로 하는 가
- 나. viral vector가 감염되었을 때 식물체 내에서 복제, 이동 및 목적 단백질 생산이 얼마나 효율적인 가
- 다. viral vector가 삽입한 유전자를 버리고, 원래 자신의 genome구성으로 복귀할 수 있는 확률이 얼마나 낮은 가
- 라. viral vector가 식물체에 감염되었을 때, 식물생육을 완전히 억제하지 않고 심하지 않은 병징을 보이는 가

단순한 biofarming외에도 상기의 대략적인 고려사항을 만족시키기 위해서는 현재까지 사실 몇 종류의 viral vector 만이 광범위하게 사용가능 하다고 할 수 있다. 특히, 본 연구와 같이 박과식물에서 viral vector를 이용한 유전자의 발현 시스템은 접근하기 어려운 실정이다.

따라서, 본 과제에서는 박과식물에서 사용가능한 viral vector system을 개발하기 위하여 1) ZGMMV, CGMMV, KGMMV 등 박과식물 감염성 바이러스에 대한 in vitro transcription (IVT) system을 개발하고자 하였고 (Fig. 2.15), 2) IVT 클론 내에 원하는 유전자를 삽입하여 식물체 내에서 발현할 수 있도록 하고자 하였으며, 3) 바이러스

mutant에 대한 연구를 통하여 식물체에서 발현시 발현량 및 효율을 높일 수 있는 방안을 연구하였고, 4) IVT의 식물내 발현시 삽입한 유전자를 결손시키지 않도록 하는 방안을 연구하였다.

2.2.3.2.1. Viral vector 제작을 위한 IVT 설계

설계된 바이러스의 IVT를 담배 및 오이에 접종한 결과 성공적인 감염성을 보였고, 앞서의 보고한 결과와 같이 실제 바이러스를 접종한 접종엽에서의 Northern analysis 및 Western analysis에서 동일한 양상을 나타내어, subgenomic RNA, replicase, coat protein이 동일하게 발현되고 있음을 관찰할 수 있었다.

2.2.3.2.2. Viral vector의 모델 제작을 위한 외래 단백질 및 GFP 삽입 및 발현

Viral vector의 설계를 위하여 다음 재료 및 방법에 언급한 Fig. 2.17, 2.18, 2.9의 방법과 같은 클로닝 단계를 거쳤다. 즉, 기존의 subcloning된 GFP와 MP를 ZGMMV의 MP와 CP 사이에 fusion 하과, 결과물을 최종 IVT 내에 삽입하는 시스템을 이용하였다 (Fig. 2.17).

또한, KGMMV IVT와 ZGMMV IVT에서 단백질을 발현할 수 있도록 Fig. 2.18과 Fig. 2.19와 같은 construction 방법을 이용하였다. 이 과정에서는 기존의 KGMMV 및 ZGMMV IVT의 각 functional domain들을 나누어서 fusion 시키는 방법을 이용했고, 이들 각각의 fragment의 fusion시 그 사이에 GFP를 삽입하여 발현 여부를 조사하였다.

각각의 PCR 결과물은 다음 Fig. 2.24 (KGMMV의 경우)과 Fig. 2.25 (ZGMMV)과 같다.

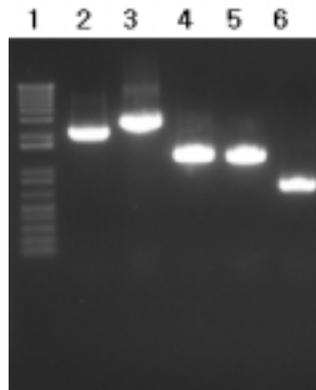


Fig. 2.24. KGMMV RT-PCR result (1: 1Kb+ DNA ladder, 2: p80, 3: p54, 4: p50, 5: MP, 6: CP)

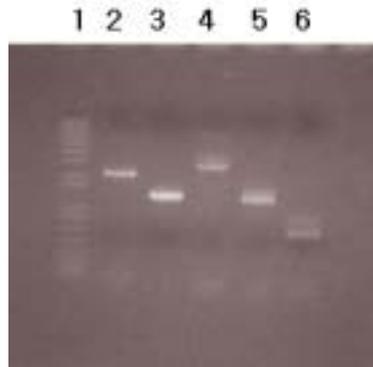


Fig. 2.25. ZGMMV RT-PCR result (1: 1Kb+ DNA ladder, 2: p80, 3: p54, 4: p50, 5: MP, 6: CP)

그러나, 상기의 시스템이 그리 성공적이지 못하여, 다음과 같은 방안으로 GFP 발현을 시도하였다.

Fig. 2.26은 ToMV 를 기초로한 TocJ (Hori and Watanabe, 2003) tobamovirus vector system 을 모델로 하여, ZGMMV IVT를 골격으로 한 시스템의 전체적인 제작 방법이다. 즉, ZGMMV 의 coat protein (CP) 의 start codon 을 치환한 후, 이 부분의 외래 유전자 클로닝을 위한 multi-cloning site (MCS) 를 삽입하였고, 외래유전자의 발현 확인을 위하여, GFP 를 클로닝하여 발현 여부 확인을 확인하였다. GFP 발현에 따라서 ZGMMV 3' UTR 부분의 다른 virus 의 치환여부를 결정하는 방법을 이용하였다.

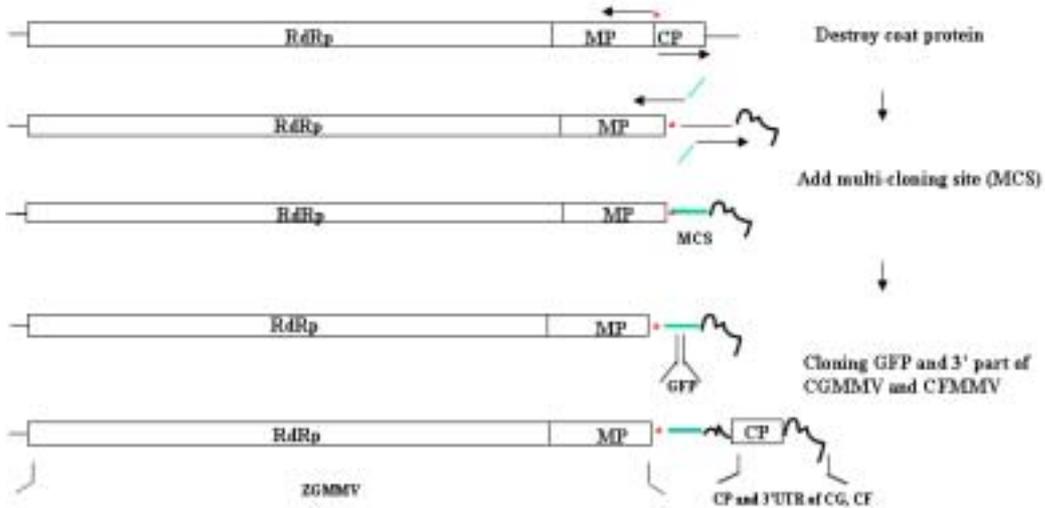


Fig. 2.26. Schematic diagram for the construction of ZGMMV-based viral vector .

그 결과, 다음 Fig. 2.27과 같은 발현 결과를 얻을 수 있었다.

GFP가 fusion 되어있는 pZGMMV::gfp의 IVT를 접종한 후, 10일 후에 형광현미경을 이용하여 촬영한 사진으로, pZGMMV::gfp가 식물체에서 감염성을 잃지 않고 있으며, 동시에 ZGMMV genome에 fusion되어 있는 GFP의 발현이 지속적으로 유지되고 있음을 보여준다 (Fig. 2.27).

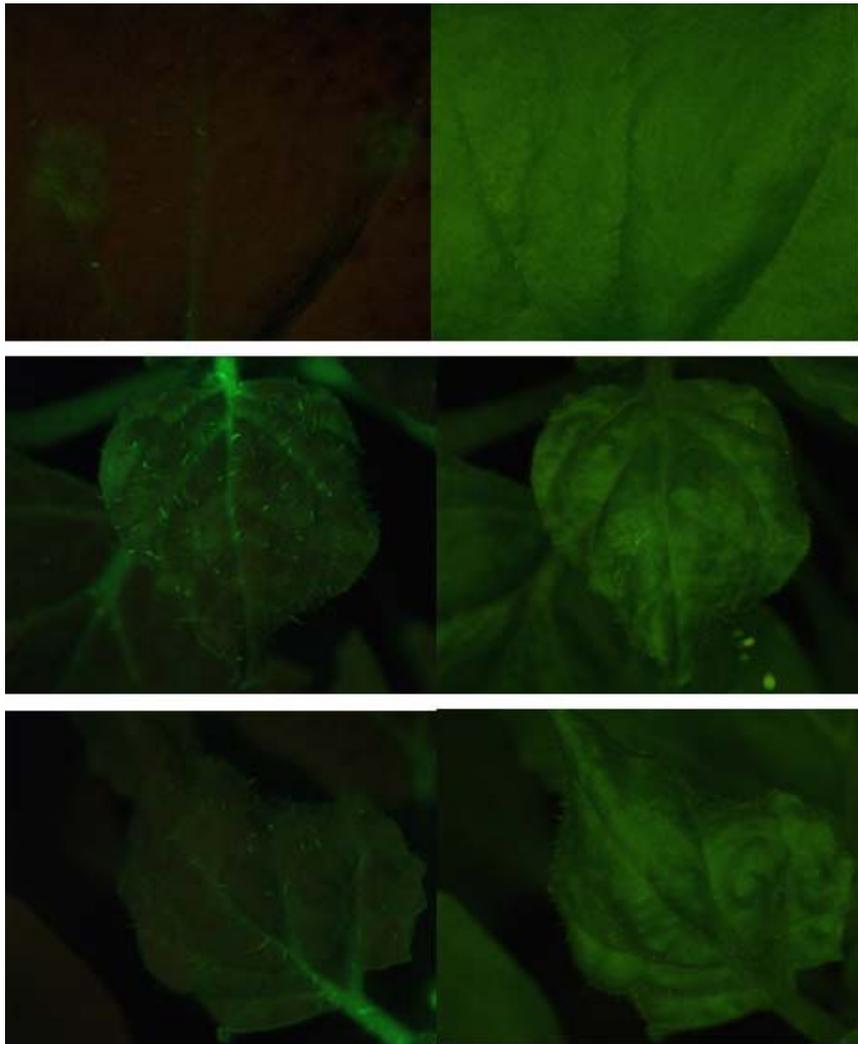


Fig. 2.27. GFP expression by pZGMMV::gfp in *N. benthamiana*.

2.2.4. 바이러스-식물체 상호작용 연구

최근까지 여러 학자들에 의해 보고된 바에 따르면, 바이러스는 침입시 uncoating 후에 자신의 genome상의 3'쪽에 존재하는 tRNA-like 구조를 이용하거나, 혹은 식물의 tRNA를 이용하여 ribosome에서 단백질을 만들게 되는데, tobamovirus의 경우, 126 kD와 183 kD의 replicase를 만들게 된다. 이 Replicase는 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)로서 이후의 자신의 genome을 복제하는데 이용된다. 또한, 순차적으로 54 kD와 movement protein (30 kD), 그리고 coat protein (17.5 kD)을 만들어 infection 되기 전의 virus particle을 유지하게 된다. 복제된 virus는 cell-to-cell movement로 short distance 그리고, phloem을 통하여 long-distance movement를 이루어 식물체 전체에 이동되고, 바이러스 감염 매개체 (vector) 들을 이용하여 다른 식물개체로 transmission 하게 된다.

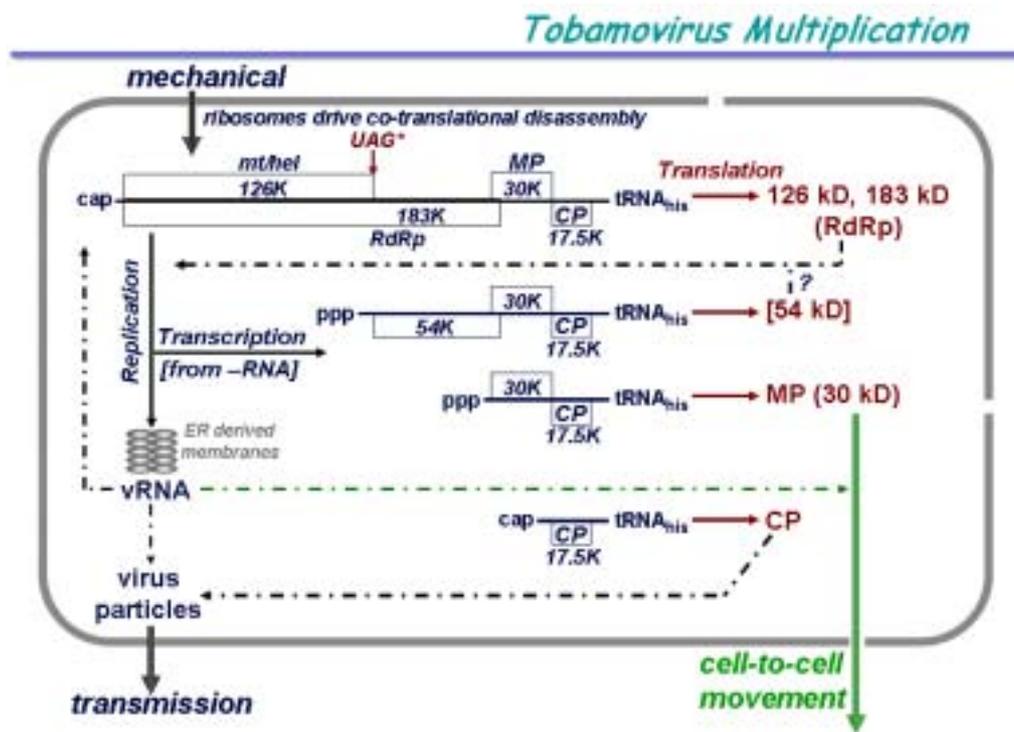


Fig. 2.28. Schematic diagram for tobamo virus infection, replication, and movement in plant cell.

Fig. 2.28에서와 같이 바이러스의 감염, 복제, 이동을 요약할 수 있는데, 바이러스는 설명대로 완전절대 기생체이기 때문에 식물 세포의 다양한 구성물을 자신의 증식에 이용하게 된다. 따라서, 식물체와 바이러스 간의 상호작용이 바로 바이러스의 기주 및 감염성을 결정하게 된다고 할 수 있다.

바이러스-식물체 간의 상호작용은 식물체의 특이적인 유전자의 발현과 역할이 매우 중요하지만, 바이러스 자체의 genome의 구성 및 mutation에 따른 감염성의 변화도 매우 중요하다.

본 과제에서는 박과 감염성 바이러스들의 IVT 확보 할 수 있었으므로, 이들 바이러스의 mutant들을 제작하여 식물과의 상호작용을 연구하고자 하였다.

2.2.4.1. 식물-바이러스 상호작용 연구를 위한 바이러스 IVT 제작 현황

현재까지의 연구결과를 요약해보면, Fig. 2.29와 같이 ZGMMV, KGMMV, CGMMV, CFMMV, TMV-P, TMGMV, PMMoV 등의 다양한 박과감염성 바이러스 등 tobamovirus group의 *in vitro* transcription system을 개발할 수 있었다. Fig. 2.29의 A는 coat protein sequence에 기초한 primer로 RT-PCR을 실시한 결과이고, B는 각 클론의 full-length에 대한 RT-PCR 결과를 나타내고 있다. C는 full-length RT-PCR 반응물의 *in vitro* transcription 결과를 보여주고 있다.

ZGMMV와 KGMMV의 *in vitro* transcription 이 성공적으로 이루어진 것을 확인하기 위하여 오이의 자엽에 접종한 결과, Fig. 2.30과 같이 성공적으로 병징이 나타났다. 또한 Northern blot 과 Western blot hybridization을 통하여 발현 패턴을 비교할 수 있었는데, 자엽에 접종시 상위엽 모두에서 고르게 viral RNA가 검출되었고, 외피단백질도 생장이 활발한 신초에서 가장 강하게 나타나는 결과를 보여주었다.

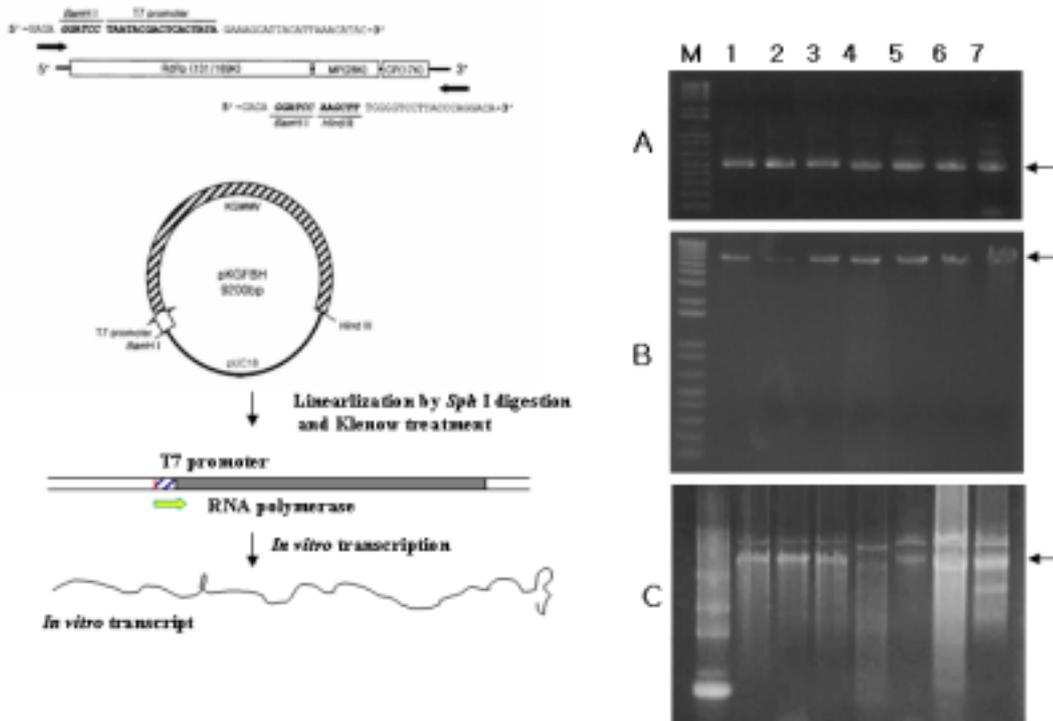


Fig. 2.29. Schematic representation of procedure for *in vitro* transcription of full-length RT-PCR products of ZGMMV, KGMMV, CGMMV, CFMMV, TMV-P, TMGMV and PMMoV. Lane M ; 1Kb+ DNA Marker (A), RNA marker (B), 1 ; ZGMMV 2 ; KGMMV , 3 ; CGMMV, 4 ; CFMMV, 5 ; TMV-P, 6 ; TMGMV, 7 ; PMMoV . Photo A ; RT-PCR product by their CP primer B; full-length RT-PCR products, C; *in vitro* transcription of full-length RT-PCR products

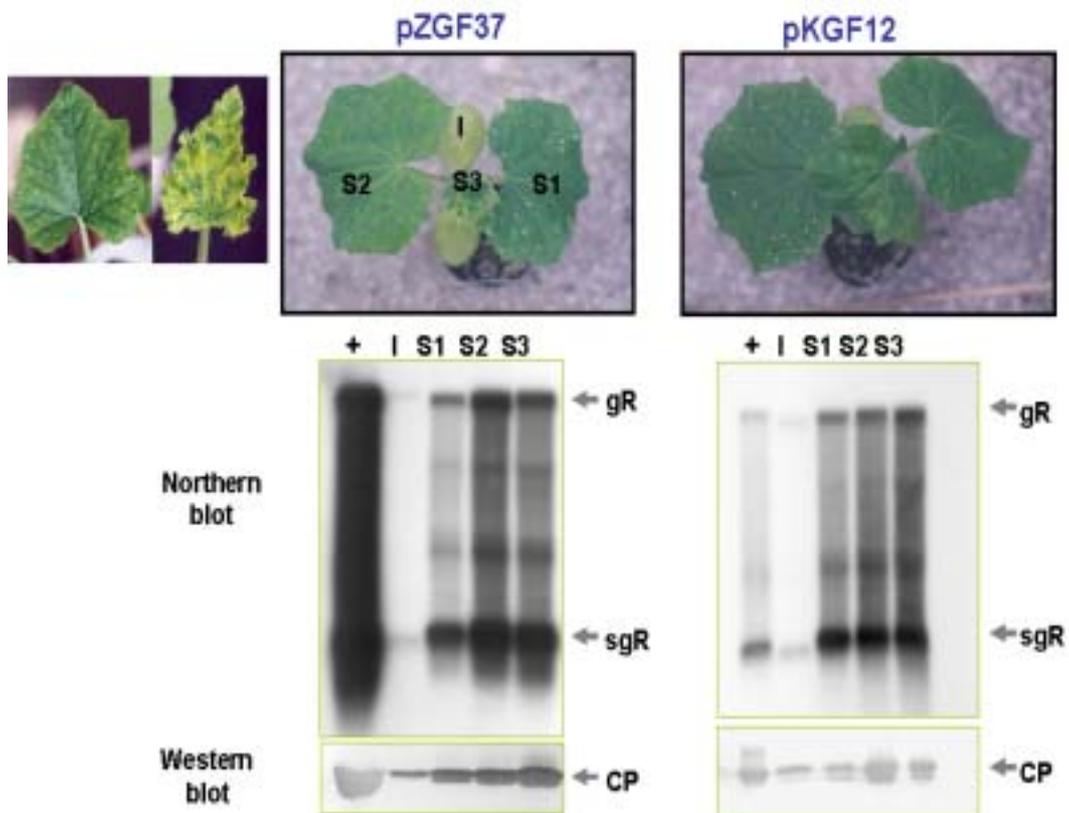


Fig. 2.30. Isolation of ZGMMV and KGMMV mutants from cucumber plants, which were originally inoculated with in vitro transcripts of them.

2.2.4.2. 식물-바이러스 상호작용 연구를 위한 chimeric virus의 이용

Chimeric virus의 제조는 동일 virus genome의 변형도 가능하지만, Fig. 2.31과 같이 ZGMMV (pZGF37)와 KGMMV(pKGF12) 각각의 54K Da의 SpeI site를 서로 교환하여 바이러스의 감염성 및 병징의 정도를 비교하였다. 자연 상태에서 ZGMMV와 KGMMV가 복합감염되었을 경우를 예상할 수 있는 chimeric virus (pZK11과 pKZ1)인데, 이들 chimeric virus 들은 담배와 오이에서는 별다른 병징의 변화가 없었으나, *C. pepo* 에서는 병원성을 잃어버리는 결과를 보였다.

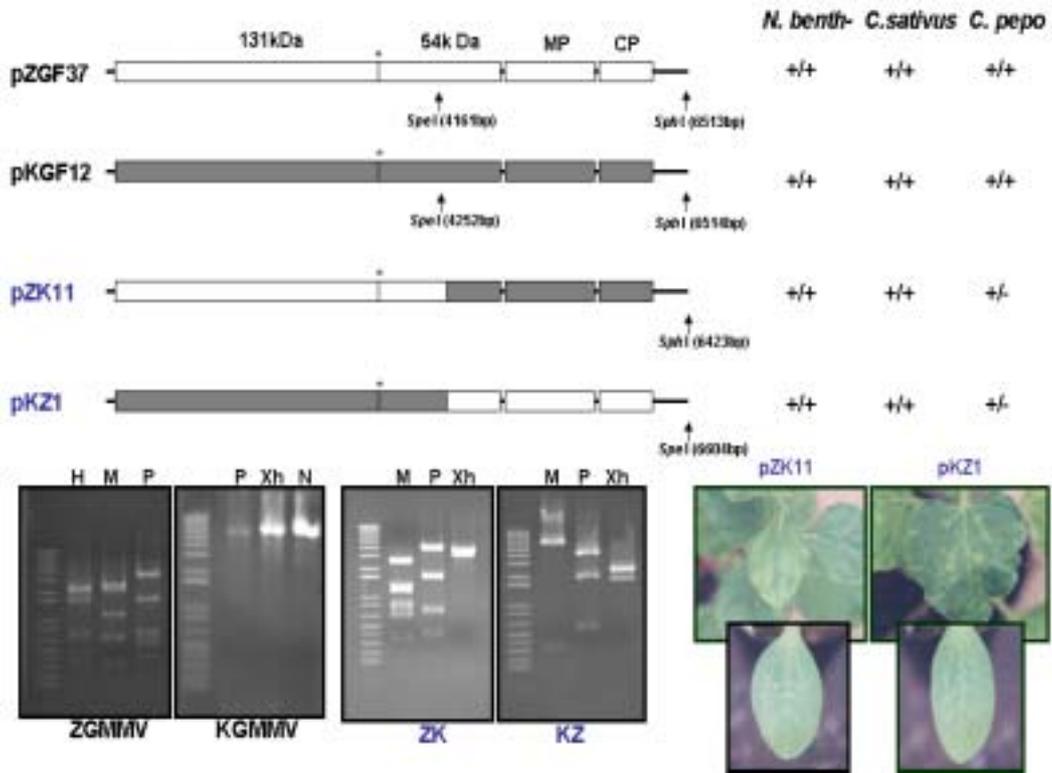


Fig. 2.31. ZGMMV, KGMMV, and their derivative chimeras.

앞서의 결과에서 Fig. 2.31에서와 같은 감염성의 손실이 바이러스 genome 어느 부위에서 결정되는지 알아보기 위하여 ZGMMV와 KGMMV의 각 기능적 domain을 좀더 세분하여 교환시켜 본 결과는 Fig. 2.32와 같다.

역시 54K Da의 virus replicase 일부 부위가 교환될 경우 *C. pepo*에서 감염성이 상실되는 결과를 나타내어 이 부위가 기주(*C. pepo*)에 대한 determinant로 생각되었다.

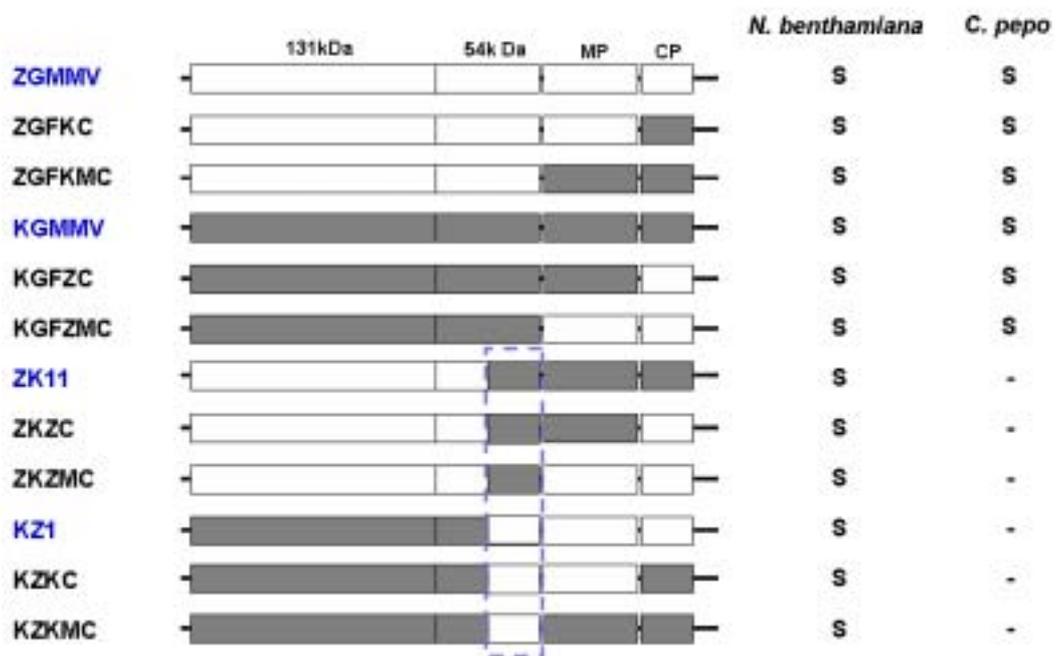


Fig. 2.32. Chimeric virus construction based on ZGMMV, KGMMV and their chimeras.

Blue-dotted box represents the viral active sites or determinants for susceptibility on *C. pepo*.

2.2.4.3. 식물-바이러스 상호작용 연구를 위한 Mu-transposon의 이용

식물-바이러스의 상호작용을 연구하기 위하여 ZGMMV 및 KGMMV의 genome을 Mu-transposon system을 이용하여 돌연변이 시킨 후 (Fig. 2.33), 이들 바이러스의 식물체 감염시 병징의 변화를 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 2.34과 같다.

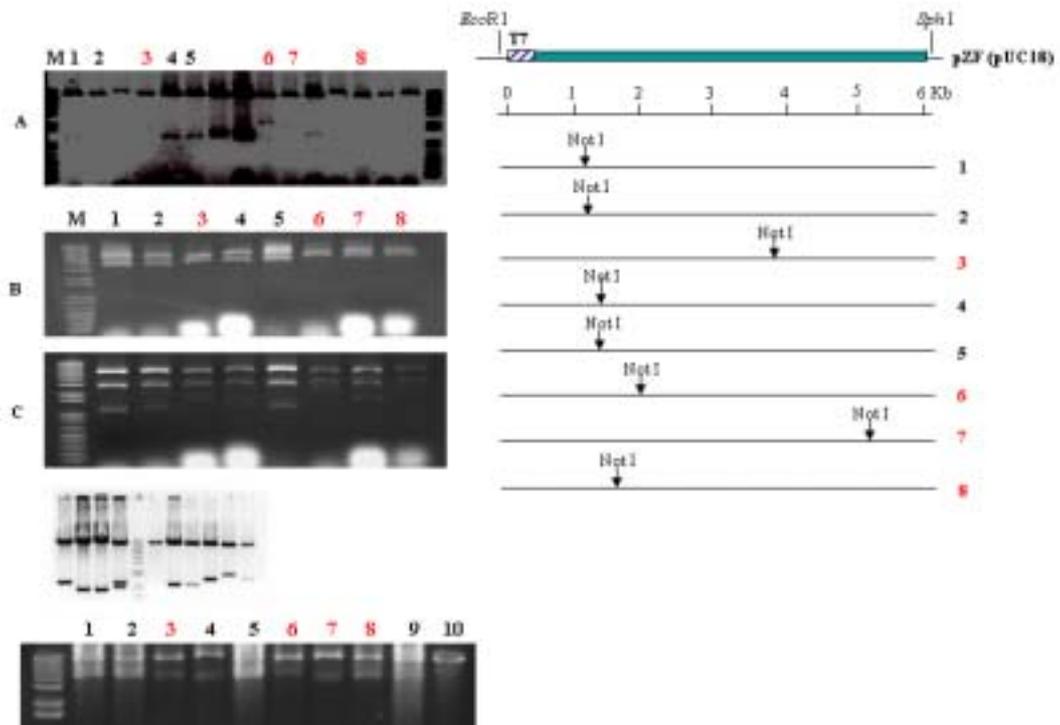


Fig. 2.33. ZGMMV and KGMMV mutagenesis strategy by Mu-transposon system.

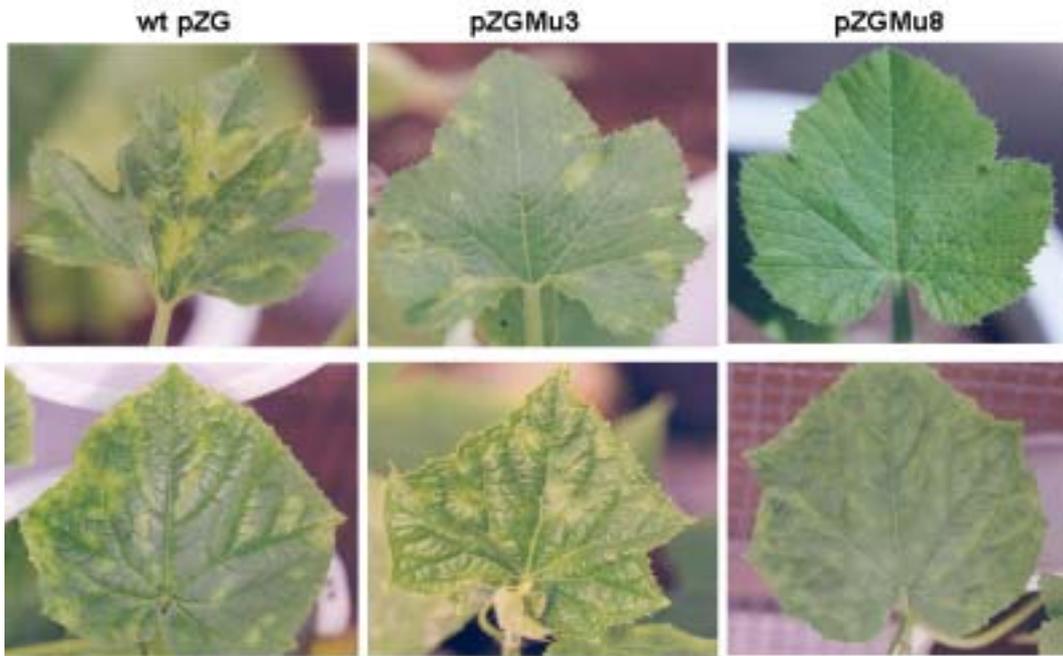


Fig. 2.34. Some Mu-mutants show different symptom expression and movement.

본 연구결과를 통하여 식물-바이러스 간의 상호작용은 바이러스의 경우, 점종한 바이러스의 복제, 이동 및 이에 따른 병징의 변화로 살펴볼 수 있는데, 특히 Fig. 2.34와 같이 Mu-transposon system을 이용한 ZGMMV genome의 염기서열의 변화는 바이러스 이동 및 식물체의 병징의 변화가 명확하여 식물과의 상호작용을 연구하기에 매우 적합한 시스템으로 사료되었다.

2.2.5. 바이러스 저항성 형질전환 오이의 검정

2.2.5.1. 형질전환 벡터의 확인

오이의 형질전환은 오랜 기간이 필요하였기 때문에 우선 빠른 재분화율과 성장을 보이는 담배(*N. benthamiana*)에 형질전환을 실시하였다. 제작한 pZGCP0029를 이용한 transformation을 실시하여 제작한 vector가 문제 없음을 확인하였다 (Fig. 2.35). 형질전환 담배의 T1세대를 대상으로 실제 감염성 바이러스인 ZGMMV를 접종한 결과, 감수성(susceptible)과 저항성(resistant)을 확인할 수 있었으며, 이를 근거로 오이 형질전환이 지속적으로 수행되었다.

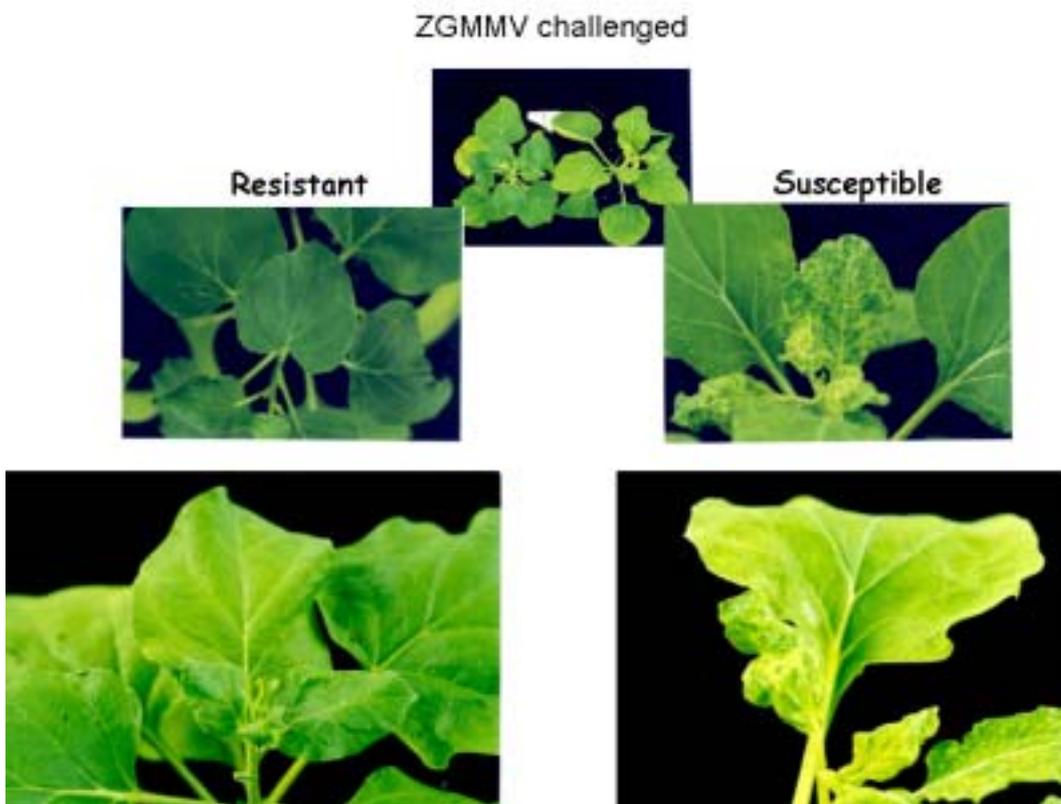


Fig. 2.35. ZGMMV challenging phenotypes in T1 generation of pZGCP0029- transformed tobacco (*N. benthamiana*).

2.2.5.2. 오이 형질전환체의 분자적, 혈청학적 확인

T1세대의 오이 형질전환체 확인을 위하여 Fig. 2.36과 같이 RT-PCR를 수행하여 선별하였다. RT-PCR은 coat protein의 specific reverse primer를 이용하여 1st-strand cDNA를 만들고, 다시 coat protein의 forward와 reverse primer를 이용하여 증폭하였다.

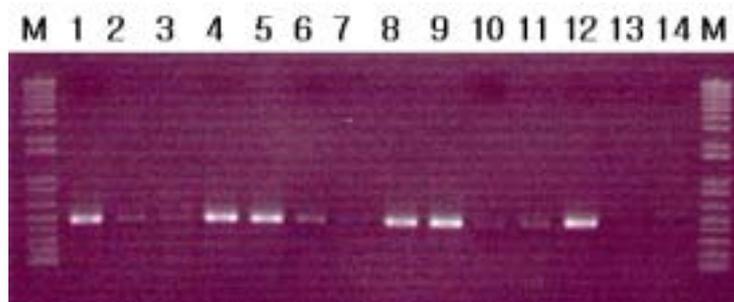


Fig. 2.36. RT-PCR of transgenic cucumbers (T1) harbored by 35S promoter driven ZGMMV coat protein. M:1Kb plus ladder, 1~13:transgenic plants, 14: non-transgenic plant.

또한, coat protein의 발현을 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 실시한 후, Western blot hybridization을 실시한 결과는 Fig. 2.37과 같다.

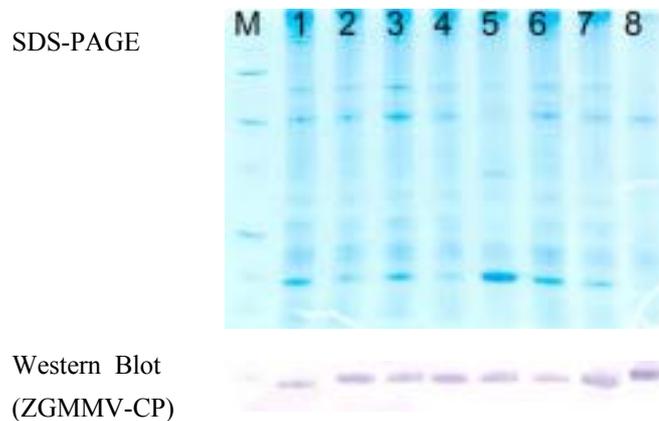


Fig. 2.37. SDS-PAGE and Western blot hybridization with antiserum of ZGMMV coat protein.

제 3 절 오이 특이 발현 유전자 규명 및 식물 분자유종

3.1. 연구재료 및 방법

3.1.1 오이의 특이발현 유전자 선발

1세부과제의 library 제조시 만들었던 동일한 mRNA를 이용하여 ds cDNA를 합성한 후, mock control은 tester로 이용하고, virus 접종엽에서 분리합성된 cDNA는 driver로 이용하여 특이적으로 발현하는 clone을 선발하였다.

앞서의 연구보고와 같이 *Arabidopsis*의 global gene에 대한 large scale microarray로 많은 유전자의 발현을 살펴볼 수 있었지만, 매우 많은 정보를 대상으로 각각에 대한 identification과 full length clone의 선별은 매우 장기간의 연구를 필요로 한다.

따라서, 본 과제의 주 연구 식물이었던 박과채소인 cucumber (오이)를 대상으로 하여 기주 바이러스인 zucchini green mottle mosaic virus (ZGMMV)와 cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)를 각각 감염시킨 후, mock 처리식물에 대하여 감염식물체에서 특이적으로 발현하는 transcript를 선발하고, 이에 대한 microarray를 수행하여 이들의 발현양상 및 screening을 수행하고자 하였다.

전체적인 SSH의 기본 scheme은 Clontech의 기본 protocol을 따라 수행하였고, control로 사용되는 Driver cDNA는 mock inoculation된 식물체의 cDNA로 하였다. 한편, ZGMMV 및 CGMMV를 접종한 식물체의 cDNA는 ZGMMV-tester 및 CGMMV-tester로 따로 분리합성 하고, 명명하였다.

3.1.1.1 Total RNA의 추출 extraction for mRNA handling

본 실험을 위한 total RNA들의 추출과정은 네 가지 과정으로 진행되었다: 1) 효과적인 세포와 조직의 마쇄, 2) nucleoprotein 복합체의 변성, 3) endogenous ribonuclease(RNase)의 불활성화, 그리고 4) DNA와 proteins의 오염제거. 실험에 사용되는 초가기구류는 200°C에서 24시간 건열소독하였으며, 플라스틱 기구류는 0.1 N NaOH와 1 mM EDTA가 혼합된 용액에 침지하였다가 RNase-free water로 헹구어 사용하였다.

Total RNA의 추출에 사용되는 식물체의 세포와 조직은 멸균된 블레이드로 채취하여 액체질소에 동결한 후 멸균된 유발에서 마쇄하였다. 마쇄된 조직에는 액체질소가 남아간 후 바로 175 μ l의 RNA lysis buffer(4 M GTC / 0.01 M Tris, pH 7.5 / 0.97% β -Mercaptoethanol)가 첨가되어졌으며, 잘 혼합한 후 350 μ l RNA dilution buffer Buffer (20X SSC / 0.2% SDS / 0.05% blue dye (v/v))를 다시 첨가하여 70°C에서 3분간 반응시켰다. 이 혼합물들은 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하였으며, 상등액을 분리하여 새 튜브에 옮긴 후 200 μ l의 95% ethanol을 첨가하여 잘 혼합한 후 Spin Column Assembly (Promega, Co)에 옮겼으며, 다시 15,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 컬럼에 total RNA를 흡착시켰다.

Total RNA가 흡착된 Spin Column Assembly는 600 μ l의 RNA wash solution (60 mM potassium acetate / 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 at 25°C / 60% ethanol)이 첨가된 후 15,000 rpm에서 1분간 원심분리 되었으며, 다시 45 μ l의 DNase Incubation Buffer (0.02 M Tris, pH 7.5 / 1 M NaCl / 0.01 M MnCl₂, 0.05% yellow dye (v/v))와 5 μ l의 DNase I enzyme이 첨가된 후 실온에서 15분간 반응되었다. 그 후 200 μ l의 DNase Stop Solution (2 M guanidine isothiocyanate / 4 mM Tris-HCl, pH 7.5 / 57% ethanol)을 첨가하여 15,000 rpm에서 1분간 원심분리하였으며, 600 μ l의 RNA wash solution을 첨가한 후 15,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다.

최종적으로 Spin Column Assembly를 Spin basket(Promega, Co)에 was transferred to 옮긴 후 100 μ l의 Nuclease-Free water를 첨가한 후 15,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 membrane에서 total RNA를 추출하고 -70°C에 보관하였다.

추출된 total RNA는 230, 260 그리고 280nm (i.e., A₂₆₀/A₂₈₀ and A₂₆₀/A₂₃₀)에서의 흡광도를 측정 한 후 그 순도를 확인하였으며, 260 nm에서 값이 1인 것을 40 μ g 의 single-stranded RNA/ml로 환산하여 그 양을 계산하였다.

3.1.1.2 mRNA의 제조

mRNA를 추출하기 위하여, 멸균된 RNase-free tube에 1.0 mg의 total RNA를 분주하고 RNase-free water를 첨가하여 최종 볼륨을 500 μ l로 맞춘 후 65°C heating block에서 10 분간 반응시켰으며, 여기에 3 μ l의 Biotinylated-Oligo(dT) Probe (Promega Co.)와 13 μ l의 20X SSC를 첨가하여 실온에서 완전히 식을 때까지 두어 annealing 반응을 시킨 후 SA-PMPs(Promega Co.)가 함유된 튜브로 옮겨 10분간 실온에 두었다. Magnetic

Stand를 사용하여 SA-PMPs에서 상등액을 분리하여 버린 후 0.3 ml의 0.1X SSC를 넣어 washing을 네 번 반복하여 한 후 0.1 ml의 RNase-Free water를 넣어 mRNA를 분리하였다.

3.1.1.3 특이발현 유전자의 선발을 위한 PCR-select cDNA Subtraction

3.1.1.3.1. cDNA의 합성

Double-stranded cDNA는 Superscript reverse transcriptase (Gibco BRL)를 사용하여 다음과 같이 합성되었다. 2 µg의 poly(A)+ RNA에 500 ng의 oligo (dT30) primer를 섞어 최종볼륨이 11 µl가 되게 하여 thermal cycler(PTC-100, MJ Res)를 이용하여 70°C에서 10간 반응시킨 후 얼음상에서 빠르게 냉각시켰다. 이 반응액에 4 µl의 5×first strand reaction buffer (provided with the reverse transcriptase), 2 µl의 0.1 M DTT, 그리고 1 µl dNTP mix (10 mM each dATP, dGTP, dCTP 그리고 dTTP)를 첨가하여 20 µl가 되게 하였다.

Reverse transcription은 2 µl Superscript reverse transcriptase를 첨가하여 시작하였다. 양쪽 반응 모두 42°C에서 1시간 동안 반응시켰으며, 20 mM의 EDTA로 반응을 정지시켰다.

First strand 합성 후, second strand의 합성은 91.8 µl의 sterile, bidistilled water와 32 µl의 5×second strand buffer(94 mM Tris-HCl, pH 6.9 / 453 mM KCl / 23 mM MgCl₂ / 750 µM β-NAD / 50 mM (NH₄)₂SO₄), 3 µl의 10 mM mixed dNTPs stock, 6 µl의 0.1 M DTT, 2 µl의 *E. coli* DNA ligase (7.5 U/µl), 그리고 4 µl의 *E. coli* DNA polymerase I (10 U/µl)의 첨가로 이루어졌다. 이 반응은 16°C에서 2.5시간동안 이루어졌으며, 이 double-stranded cDNA에 T4 polymerase를 첨가한 후 16°C에서 20분간 더 반응시킨 후 EDTA를 첨가하여 반응을 종결시켰다.

3.1.1.3.2 cDNAs의 representational difference 분석 (cDNA RDA)

Control로 사용되는 Driver cDNA는 mock inoculation된 식물체의 cDNA로 하였으며, ZGMMV 및 CGMMV를 접종한 식물체의 cDNA는 ZGMMV-tester 및 CGMMV-tester로 따로 분리합성하고, 명명하였다. 첫 번째로, cDNA samples들은 모두 blunt ends를 생성

하는 제한효소로 절단되었으며, tester cDNA는 두 가지 portion으로 나뉘어, 각각 suppression PCR을 쉽게 수행하기 위해 특별히 고안된 adaptors가 붙여졌다(Fig. 3.1, 3.2).

Double stranded cDNA들은 four-cutter 제한효소인 *Rsa* I (GT↓AC)로 절단된 후, T4 DNA ligase를 이용하여 Adaptor 1과 Adaptor 2R을 blunt end 양 말단에 붙여주었다.

3.1.1.3.3 Subtractive hybridization

2 μ l의 driver ds cDNA(600 ng)에 2 μ l의 adaptor 1-과 adaptor 2-ligated tester cDNA(20 ng)를 첨가하여 잘 섞은 후 에탄올 침전을 한 후, 1.5 μ l의 hybridization buffer (50 mM Hepes, pH 8.3 / 0.5 M NaCl / 0.02 mM EDTA, pH 8.0 / 10% (wt/vol) PEG 8000)를 넣어 다시 녹였다. 이 용액에 mineral oil을 덮은 후 98°C에서 1.5분간 DNA를 변성하였고, 68°C에서 8시간 동안 첫번째 hybridization을 실시하였으며, 두 개의 샘플로 나누어 heat-denatured driver (≒150 ng)를 넣은 후 1.5 μ l of hybridization buffer를 섞어 68°C에서 16시간 이상 반응시켰다. 최종적인 hybridization 반응물은 200 μ l의 dilution buffer (20 mM Hepes, pH 8.3 / 50 mM NaCl / 0.2 mM EDTA)를 첨가한 후 72 °C에서 7분간 반응시킨 후 -20°C에 저장하였다.

3.1.1.3.4 PCR 증폭

본 실험을 위하여 두 번의 PCR 반응이 수행되었다. 첫 번째 PCR은 1 μ l의 희석한 subtracted cDNA, 1 μ l의 PCR primer 1 (10 μ M), 그리고 22 μ l의 PCR master mixture(Advantage cDNA PCR Core Kit, Clontech Co.)를 혼합하여 총 25 μ l가 되게 하였다. PCR 반응은 thermo cycler (Perkim Elmer, 2700)을 75°C에서 7분동안 초기반응하였으며, 94°C에서 10초, 66°C에서 30초, 72°C에서 1.5분간 30 cycle을 수행하였다. 첫 번째 증폭된 반응물은 멸균된 3차 증류수를 넣어 10배로 희석하여 1 μ l를 채취하여 첫 번째 PCR과 같은 방법으로 2번째 PCR을 10 cycle 수행하였으며, 이때 PCR primer 1 대신에 PN1와 PN2로 대체하였다. PCR 반응물들은 1.4% agarose gel로 전기영동하였다.

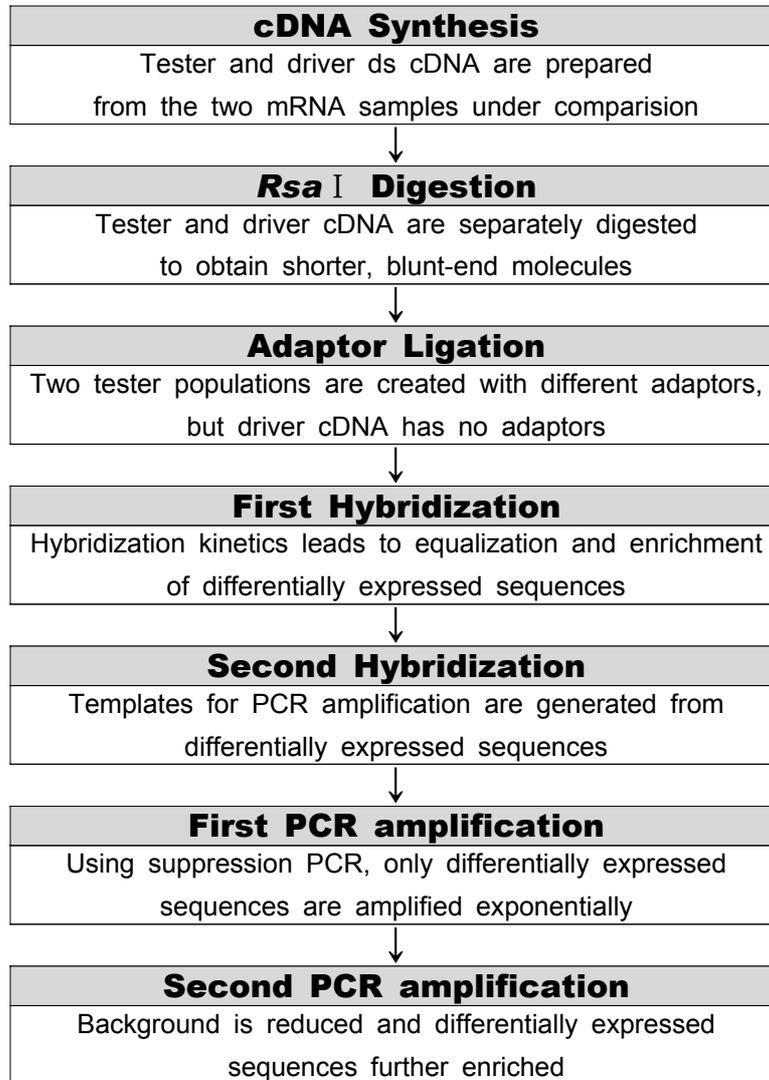


Fig. 3.1. Overview of the PCR-Select procedure. The cDNA in which specific transcripts are to be found is called “tester” and the reference cDNA is called “driver”

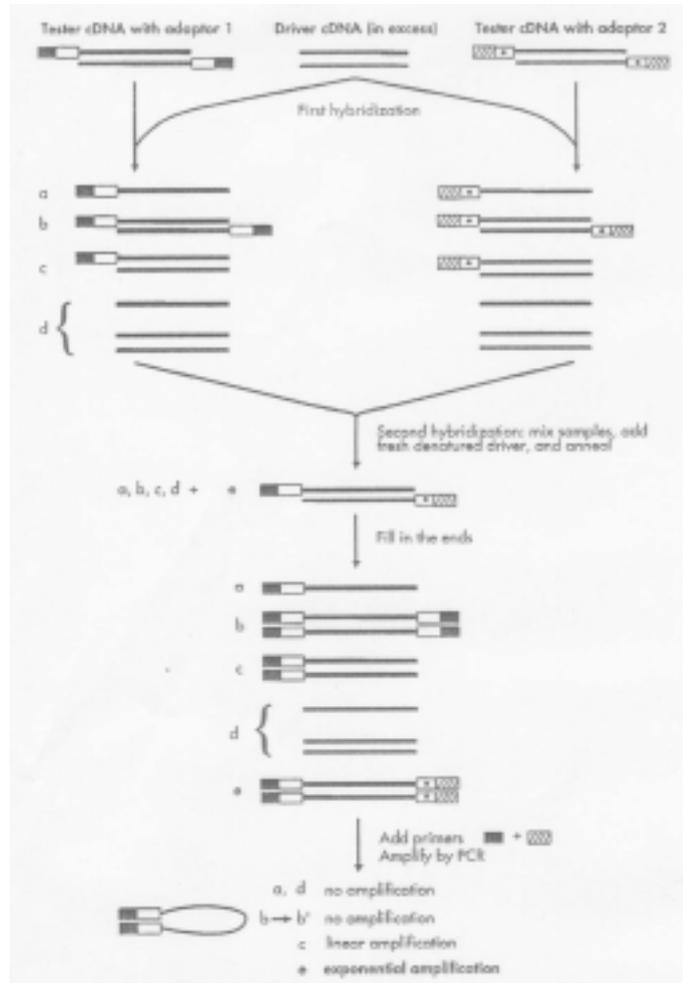


Fig. 3.2. Scheme of the suppression subtractive hybridization (SSH) method. Solid lines represents the *Rsa* I digested tester or driver cDNA. Solid boxes represent the outer part of the adaptor 1 longer strand. Shaded boxes represent the outer part of the adaptor 2R longer strand. Clear box represent the inner part of the adaptors and corresponding nested PCR primers PN1 and PN2.

3.1.1.3.5 TA vector를 이용한 cloning

Subtracted library cDNA는 subtraction efficiency를 확인한 후 pGEM-T Easy vector(Promega)를 사용하여 TA cloning하였다. 100 ng의 PCR-amplified cDNA는 50 ng vector와 ligation하여 bacterial strain JM109(Promega)에 sub-cloning하였다. Library screening은 100 µg/ml ampicillin, 100 µM IPTG, 그리고 50 µg/ml X-Gal이 포함된 10×10 cm agar plates에서 실시되었다. Plate들은 37°C에서 16시간동안 항온반응한 후 blue/white staining이 명확하게 될 때까지 4°C에 보관되었다. Insert가 확실히 들어갔다고 판단되는 colony들은 100 µg/ml의 ampicillin이 함유된 LB 배지에서 배양한 후, 염기 서열분석을 위하여 plasmid만을 분리하였다(Plasmid mini-prep kit, Quiagen Co.).

3.1.1.3.6 Analysis of the Subtracted cDNA clone

DNA 염기분석은 (주)바이오넥스(University of Hanyang, Korea)에서 automatic sequencer를 이용하여 하였으며, DNA 염기들의 homology searches는 인터넷상에서 National Centers for Biotechnology Information(National Institutes of Health, Bethesda) (Altschul et al., 1997)로 분석하였고, 유전자들의 alignment는 DNASTar program(IBM PC computer)을 사용하였다.

3.1.2 형질전환 식물체의 육성

3.1.2.1 오이 형질전환의 최적화

3.1.2.1.1 식물재료

본 실험의 공시재료는 오이(*Cucumis sativus* L.) F1 교잡 품종인 청장계와 백다다기 계인 노바티스사의 ‘청장’ 및 ‘백록다다기’ 종자를 구입하여 이용하였다. 원종은 1995년 육성된 흑침형 다다기계통을 사용하였다. 70% 에탄올에서 30초간 침지한 종자들은 1% sodium hypochloride (0.01% tween-20) 용액에서 17분간 교반하며 표면살균하였다.

살균된 종자는 1/2 MS 배지가 50 mL씩 분주된 400 mL 용량의 유리배양병에 15립씩 치상하여 발아시켰으며, 유근 출현 후 3일째, 본엽이 출현하기 전, 자엽 및 배축을 절편체로 이용하였다. 발아 및 배양온도는 25°C를 유지하였으며, 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2}$ 로 16hr/8hr 주기의 광조건을 주었다.

3.1.2.1.2 재분화 및 형질전환용 절편체 준비

가) 기관형성(organogenesis) 유도

기관형성을 유도하기 위한 절편체로는 자엽 및 하배축을 이용하였다. 자엽은 1) 자엽의 엽연부위를 제거하고 주맥을 포함시켜 4등분하여 치상하는 형태, 2) 자엽을 2등분하여 자엽병을 포함한 쪽을 치상하는 형태 그리고, 3) 자엽병 부위를 잘라 그대로 배지에 꽂는 3가지 형태로 절단하여 이용하였다.

하배축은 1) 하배축 부분만을 절단하여 치상하는 형태와 2) 양자엽의 1/2을 각각 제거된 신초의 하배축을 절단하여 배지에 꽂는 2가지 형태 (Kim 등, 2000)로 이용하였다.

나) 체세포배 형성 (somatic embryogenesis) 유도

체세포배 형성을 유도하기 위한 절편체로는 자엽을 이용하였으며, 자엽의 엽연부위를 제거하고, 주맥을 포함시켜 4등분한 형태로 이용하였다.

3.1.2.1.3 기관형성 유도용 배지

기본배지 조성물로 MS 기본무기염류, Gamborg's B5 vitamin, 3% sucrose를 첨가하였고, pH 5.6으로 조절 후 멸균하였다.

1) 생장조절제 첨가 비율에 따른 기관형성율을 비교하기 위하여, 기보고된 1mg/L ABA, 2mg/L BA (Tabei 등, 1998)와 2mg/L Zeatin (Kim 등, 2000), 그리고 1mg/L NAA, 2mg/L BA의 조합을 비교하였다.

2) AgNO₃의 첨가량에 따른 기관형성율을 비교하기 위하여 30 μM 로 처리하였다.

3) 배지 고형화물 (gelling agent)의 종류에 따른 기관형성율 및 투화 현상을 비교하기 위하여, 0.8% agar (purified, Sigma), 0.3% gelrite (Sigma), 0.3% phytagel (Sigma), 단독처리와 조합처리로서 0.4% agar + 0.15% gelrite, 0.4% agar + 0.15% phytagel, 0.15%

gelrite + 0.15% phytigel을 이용하였다.

3.1.2.1.4 신초신장 및 발근용 배지

기관이 형성된 후, 신초의 신장을 유도하기 위한 생장조절제의 농도는 1) 1/2 농도의 MS 배지, 2) 1.0mg/L IAA + 0.2mg/L BA, 3) 0.5mg/L BA로 그리고 다른 첨가물로 1), 2), 3) 각각에 30mg/L의 sodium hummate (Aldrich)를 첨가한 처리구를 비교하였다.

3.1.2.1.5 체세포배 형성 유도용 배지

기본배지 조성물로 MS 기본무기염류, Gamborg's B5 vitamin을 첨가하였고, pH를 5.6으로 조절 후, 멸균하였다.

1) 생장조절제 첨가비율에 따른 기관형성을 비교하기 위하여, 2mg/L 2,4-D, 0.5mg/L NAA, 0.5mg/L BA를 단독 및 조합처리하였고, 2mg/L 2,4-D, 1mg/L kinetin을 비교하였다.

2) Sucrose의 양을 3%, 6% 및 9%로 처리하여 비교하였다.

3.1.2.1.6 체세포배 생장용 배지

형성된 어뢰형 체세포배의 신장 및 생장을 위하여 1) 1/2 MS, 2) 1.0mg/L BA, 3) 2mg/L 2,4-D, 0.5mg/L BA, 0.5mg/L NAA의 생장조절제가 첨가된 배지에서 생장을 비교하였다.

3.1.2.1.7 형질전환 vector 및 *Agrobacterium* 배양

형질전환 방법은 상기의 오이 기관형성 유도 실험과 동일한 처리로 대조구와 병행하여 실시하였다. 형질전환 reporter로서 GUS 유전자를 이용하기 위하여 pBI121와 intron GUS를 포함한 pCAMBIA2301을 기본 형질전환 vector로서 이용하였다. 이용된 *Agrobacterium* strain은 pal 4404를 포함한 LBA4404이었다. 각 균주는 50mg/L rifampicin과 50mg/L kanamycin이 첨가된 YEP 배지에서 28°C에서 24시간 배양하였으며, 500rpm에서 5분간 원심분리한 후, 침전된 세포를 acetosyringone 100µM이 함유된 MS 액체배지 (pH 5.5)에서 재현탁하여 0.6×10^9 cell/mL로 조절 후 접종에 이용하였다.

3.1.2.1.8 전배양 기간, 공동배양 기간 및 항생제 농도 처리

전배양 기간 및 *Agrobacterium*과 절편체의 공동배양 기간이 형질전환에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 전배양은 전배양이 없는 처리구와 3일간 처리구로 구분하였고, 공동배양 기간은 전배양없이 바로 *Agrobacterium* 현탁액에서 1시간동안 교반시킨 후, 여분의 수분을 제거하였다. 치상이 끝난 후, 22-24℃의 암조건에서 3일 및 5일간 공동배양 하였다.

공동배양이 끝난 절편체들은 cefotaxime 200µg/mL, carbenicillin 250µg/mL이 함유된 액체 MS 배지에서 교반하여 제균한 후, 여분의 수분을 제거하였다. 이후, cefotaxime 200 µg/mL, kanamycin (기관형성 유도배지의 경우: 30, 50, 75, 100µg/mL, 체세포 배 유도배지의 경우: 75µg/mL)이 함유된 상기의 다양한 처리구의 재분화배지에 치상하였다.

3.1.2.1.9 형질전환 식물체의 유도 및 순화

항생제 배지로 치상 후, 발생한 신초 (약 14-18일 소요)는 동일한 kanamycin 및 cefotaxime 농도를 함유한 신초 신장용 배지로 옮겨주었으며, 약 20-25일간 신장을 시킨 후, 발근용 배지로 옮겨주었다. 이때 외형상 정상적인 식물체만을 선발하였으며, 발근이 제대로 이루어지지 않거나, 신장이 제대로 이루어지지 않고 잎의 색깔이 탈색되는 개체들은 제외하였다. 발근이 충분히 이루어진 개체들은 멸균된 peatmoss : perlite (1:1, v/v)의 포트에서 순화시켰다.

3.1.2.1.10 GUS 유전자의 발현

*Agrobacterium*의 접종 후, 기관형성 및 체세포배 형성 유도방법에 따른 형질전환 결과를 GUS 유전자 발현을 통하여 발현부위 및 발현율을 조사하였으며, 유전자의 발현 분석은 Jefferson 등 (1987)의 방법을 적용하였다.

3.1.2.1.11 PCR 검정 및 Southern, Northern blot

형질전환된 것으로 추정되는 식물체와 대조구 식물체의 잎 조직을 1g을 채취하여 액체질소를 이용하여 마쇄한 후, genomic DNA를 분리하였다. PCR 검정의 경우, 잎조

직 100mg을 채취하여 동일한 방법으로 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 주형으로 하고, pBI121 및 pCAMBIA2031은 *uidA* 및 *gusA* 유전자에 대한 primer를 이용하여 해당 유전자 부위를 증폭하였고, virus coat protein gene을 도입한 경우는 35S CaMV promoter 부위와 coat protein 말단 부위를 증폭한 후, agarose gel에서 확인하였다. Southern blot은 (Feinberg and Vogelstein, 1983)에 준하였다. DNA 30 μ g을 *Bam*HI을 이용하여 절단한 후, agarose gel에 전기영동하고 nylon membrane에 흡착시켰다. probe의 제조는 pBI121의 Gus 유전자 및 ZGMMV coat protein 유전자 부위에 대한 primer를 이용하여 alpha-³²P dCTP로 random priming 방법으로 표지하였다. Hybridization 후, film에 노출하여 결과를 얻었다.

3.1.2.2 바이러스 저항성 유도용 vector의 식물체 도입

2세부과제에서 제작한 ZGMMV의 coat protein을 발현하는 바이러스 저항성 유도용 vector (backbone: pGreenII 0029)를 *Agrobacterium* GV3101에 transformation한 후, 담배 (*N. benthamiana*) 및 오이 원종 (흑침 다다기계)에 도입하였다.

종자 파종 후 5일 이후에 암처리하여 embryo의 발생을 높이는 그물모양 cutting을 이용하여 pGA748과 pCAMBIA로 접종을 하였다. 이때 균농도는 MS solution에 OD값 (1.2×10^9)의 농도를 맞춘 다음 60rpm 24 $^{\circ}$ C에서 20min 접종하였다. Co-culture 배지에 3일간 치상한 후에, washing solution((MS + kanamycine 100mg/L + cefotaxim 200mg/L + carbenicillin 250mg/L)으로 3번 washing 후에 항생제 배지(km 50mg/L + cf 200mg/L)치상하였다. 치상한 후 16h 광/ 8h 암 26 \pm 1 $^{\circ}$ C에서 배양하였다.

embryo를 유도하는 시점부터 접종하는 방법은 다음의 조성을 이용하였다. ① NN + 2,4,-D 2mg/L + BA 0.5mg/L + NAA 0.5mg/L ② NN + BA 0.5mg/L + NAA 0.5mg/L + AH 30mg/L + picloram 1mg/L. 두 배지에 kanamycin 50 mg/L와 cefotaxim 200 mg/L의 항생제를 사용하여 선별하였다.

3.1.3 오이 특이 유전자의 분석

pTRV2의 MCS의 *Eco*RI에 ligation 시킨 후, pTRV1과 같이 *Agrobacterium* GV2201을 매개로 하여 *N. benthamiana*에 infiltration 시켜 오이 ESTs 유전자를 silencing 시켰

다. Silencing의 유무는 control로 사용한 담배의 phytoene desaturase 유전자의 phenotype (chlorosis)이 나타나는 시점 및 도입한 유전자의 RT-PCR로 확인이 가능하였다. 일단, 도입한 ESTs의 silencing이 확인되면, TMV-GFP virus를 상위엽에 접종하여 바이러스의 감염 및 이동의 정도를 UV-lamp 하에서 GFP의 발현양상으로 파악하였다.

3.2. 연구내용 및 결과

3.2.1 오이의 특이발현 유전자 선발

3.2.1.1 특이발현 유전자의 선발을 위한 SSH의 적용

앞서의 연구보고와 같이 *Arabidopsis*의 global gene에 대한 large scale microarray로 많은 유전자의 발현을 살펴볼 수 있었지만, 매우 많은 정보를 대상으로 각각에 대한 identification과 full length clone의 선별은 매우 장기간의 연구를 필요로 하였다.

따라서, 본 과제의 주 연구 식물이었던 박과채소인 cucumber (오이)를 대상으로 하여 기주 바이러스인 zucchini green mottle mosaic virus (ZGMMV)와 cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)를 각각 감염시킨 후, mock 처리식물에 대하여 감염식물체에서 특이적으로 발현하는 transcript를 선발하고, 이에 대한 microarray를 수행하여 이들의 발현양상 및 screening을 수행하고자 하였다.

전체적인 SSH의 기본 scheme은 Clontech의 기본 protocol을 따라 수행하였고 (Fig. 3.1), control로 사용되는 Driver cDNA는 mock inoculation된 식물체의 cDNA로 하였다. 한편, ZGMMV 및 CGMMV를 접종한 식물체의 cDNA는 ZGMMV-tester 및 CGMMV-tester로 따로 분리합성 하고, 명명하였다.

본 연구에서는 특별히 합성된 Nested PCR primer들을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이때, adaptor들을 *Rsa* I으로 restriction한 cDNA와 ligation 하며, 이때 *Rsa* I site는 다시 회복된다. Total RNA를 분리하여, 1% formaldehyde agarose gel에 전기영동하였는데, mock control 및 virus infected plant ribosomal RNA가 잘 분리되어 있으며, 각 lane 별로 RNA의 양이 균일함을 볼 수 있었다. 이후, 4 cut의 제한효소인 *Rsa* I을 이용하여 ds cDNA를 digestion후, 1kb 근처의 진한 band들이 완전히 분해되었음을 확인할 수 있었다.

Fig. 3.3은 rare transcript의 양을 abundant 하게 증가시키기 위하여 1차, 2차 PCR을 수행한 결과이다. 2차 PCR을 수행한 결과에서 매우 많은 양의 transcript amplification이 이루어졌음을 볼 수 있으며, 이 과정은 high- and low-abundance sequences 들의 equalization을 목표로 수행하였다. 2차 PCR 후에 subtracted DNA들은 T/A cloning vector (pGEM Eazy T-vector system; Promega)에 삽입하였고, 약 600개의 white colony들을 얻을 수 있었다.

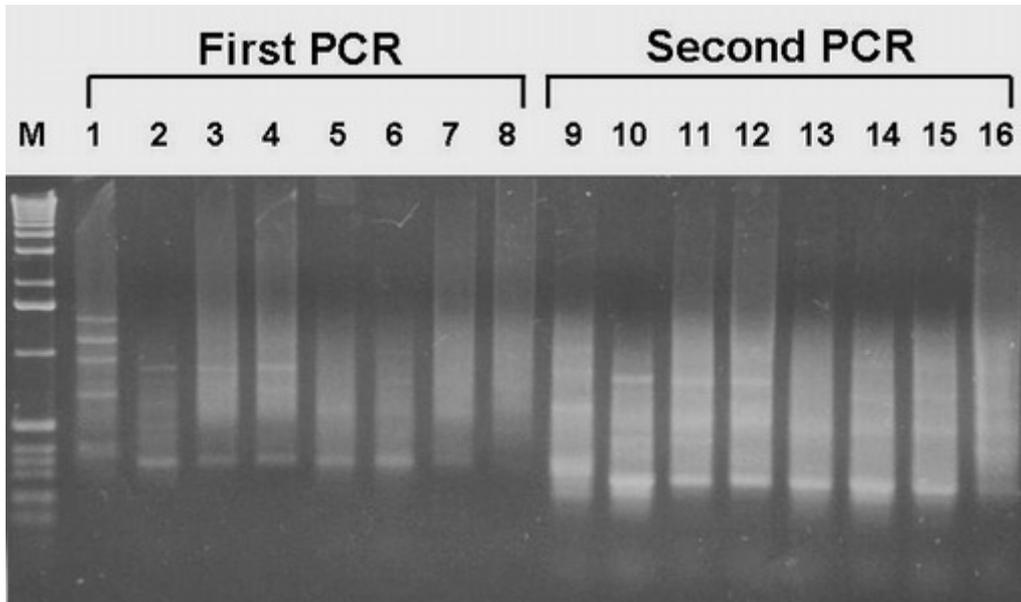


Fig. 3.3. Amplification products generated first (lane 1 to 8) and second (lane 9 to 16) PCR of unsubtract (lane 2, 3, 4, 10, 11, and 12) and subtract hybridization(lane 5, 6, 7, 8, 13, 14, 15, and 16).

M : 1kb ladder (GIBCO BRL)

Lane 1 and 9 : PCR control of subtracted skeletal muscle tester

Lane 2 and 10 : unsubtract control cDNA digested with *Rsa* I

Lane 3 and 11 : unsubtract ZGMMV-tester cDNA digested with *Rsa* I

Lane 4 and 12 : unsubtract CGMMV-tester cDNA digested with *Rsa* I

Lane 5 and 13 : forward subtract hybridization of ZGMMV-tester

Lane 6 and 14 : reverse subtract hybridization of ZGMMV-tester

Lane 7 and 15 : forward subtract hybridization of CGMMV-tester

Lane 8 and 16 : reverse subtract hybridization of CGMMV-tester

각 clone들을 *EcoR* I으로 digestion 한 결과는 Fig. 3.4, 3.5와 같은데, 매우 다양한 크기의 insert size를 보여주었고, differential 하게 발현된 sequence들은 약 200 - 1500bp의 사이의 크기로 나타났다.

본 연구를 통하여 얻어진 유전자들은 경험상 상당히 높은 redundancy를 보일 수 있기 때문에, 1세부과제를 통하여 cDNA microarray를 수행하여 스크린하였고, 그 결과물들을 sequencing한 결과가 Table 3.1에 나타나있다.

Table 3.1에 나와 있는 clone들을 분석한 결과, 몇 가지 흥미로운 사실을 발견하였다. A4-10-4 clone은 제초제의 target enzyme으로 알려진 acetohydroxyacid synthase의 단편으로 분석되었다. Lee와 Duggleby(2002)는 acetohydroxyacid synthase(AHAS; EC 4.1.3.18)가 이화(catalytic)와 조절(regulatory) 서브유닛을 가지고 있고, leucine, valine 그리고 isoleucine을 민감하게 feedback regulation하는 데에 반드시 요구된다고 보고하였다. 특히, *Arabidopsis thaliana*의 AHAS 조절 서브유닛은 반복되는 염기서열을 가지고 있으며, 이 반복적 염기서열을 mutation 한 결과 AHAS가 catalytic subunit의 signal transduction을 조절하는 데에 매우 복잡한 대사경로로 작용할 것이라고 제시한 바 있다.

A4-10-10 clone은 hypothetical glycine-rich protein mlr0585으로 분석되었으며 이는 chimeric AFGP/trypsinogen-like serine protease와 유사한 것으로 나타났다. Towatari 등(2002)은 쥐에 바이러스를 감염시킨 후 바이러스 감염도와 관련하여 ectopic anionic trypsin I을 분리한 바 있다. 그들은 Sendai 바이러스 감염후 얻은 anionic trypsin I은 pH 4.7에서 약 31 kDa의 분자량을 가지고 있었으며, ectopic anionic trypsin I이 바이러스 감염후 쥐의 폐까지의 바이러스 감염도를 감소시키는 것으로 보고하였다. 본 연구를 통하여 얻은 A4-10-10도 식물체에 있어서 바이러스 감염후 그 발현양이 증가된 것으로 사료된다.

Nucleoside diphosphate kinase I으로 분석된 A7-6-1 clone은 다기능적인 단백질로써, 세포의 번식, 발달, 그리고 분화 등을 포함하여 진핵세포의 cellular activity를 조절하는 것으로 알려져 있다. 그러나 식물에 있어서 NDP kinases (NDPKs)의 기능적인 유의성은 거의 알려진 바가 없다. Moon 등(2002)은 *Arabidopsis thaliana*에서 발견된 AtNDPK2의 mutant를 연구하여 NDPK가 식물체에 있어서 스트레스에 유기적으로 반응하는 H₂O₂-mediated mitogen-activated protein kinase를 signaling하는 것과 매우 밀접한 관련이 있다고 보고한바 있다. 더 나아가, AtNDPK2는 AtMPK3의 myelin basic protein phosphorylation 활성을 증가시키는 것으로 보고하였으며, 이는 복잡한 환경 스트레스

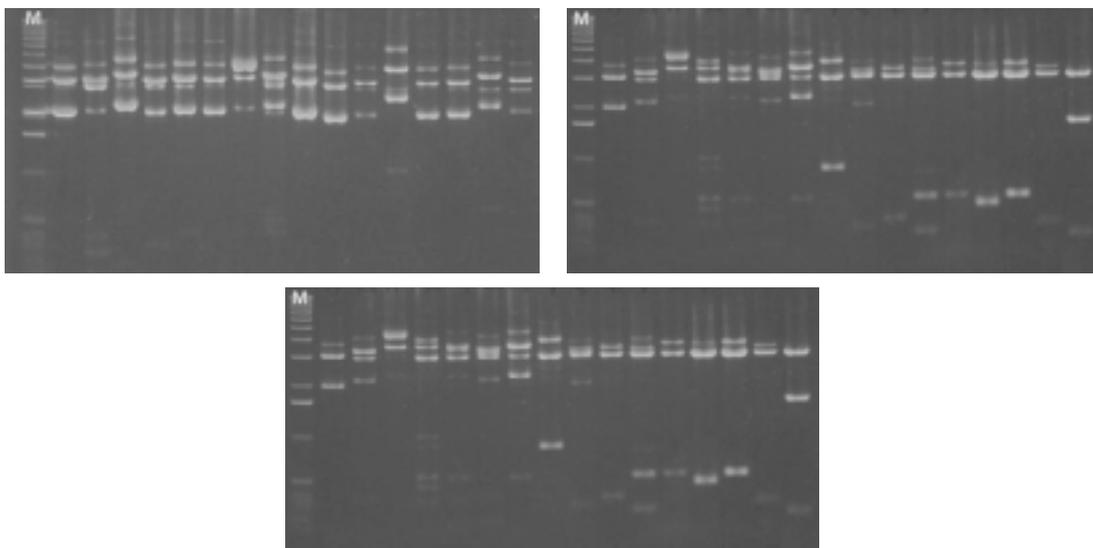


Fig. 3.4. Restriction enzymes digestion with *EcoR* I of cDNA clones obtained by suppression subtractive hybridization of ZGMMV-tester and control. M : 1kb ladder (GIBCO BRL).

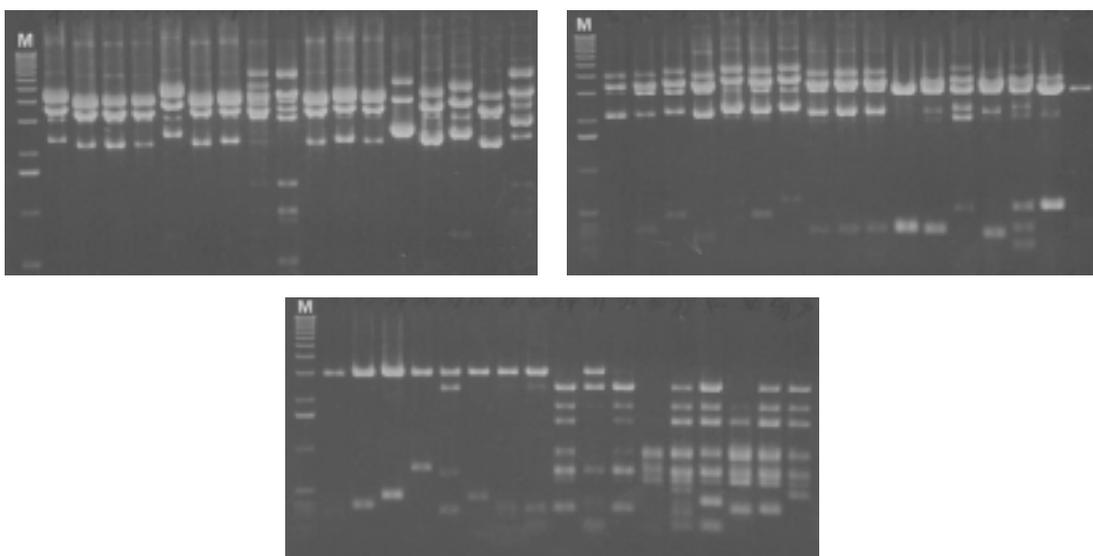


Fig. 3.5. Restriction enzymes digestion with *EcoR* I of cDNA clones obtained by suppression subtractive hybridization of CGMMV-tester and control. M : 1kb ladder (GIBCO BRL).

Table 3.1. Analysis of DDRT clone.

Clone ID	Accession No.	Best database match (WU-BlastX)	Sequencing	Score	E-value
A4-9-1	Q8L5L7	RPS2-like disease resistance protein (Fragment) (hypothetical protein)	186bp	44	0.67
A4-9-6	AAM54418	Cytochrome b (fragment)	628bp	87	0.15
A4-9-7	Q8L5L7	RPS2-like disease resistance protein (Fragment) (hypothetical protein)	179bp	52	0.95
A4-9-9	AAO72581	Hypothetical protein	461bp	171	1.1e-11
A4-10-1	Q98MG8	Hypothetical glycine-rich protein mlr0585 (Chimeric AFGP/trypsinogen-like serine protease)	646bp	724	1.1e-70
A4-10-2	Q8L5L7	RPS2-like disease resistance protein (Fragment) (hypothetical protein)	187bp	44	0.67
A4-10-4	Q42768	Acetohydroxyacid synthase (EC 4.1.3.18).	339bp	248	7.2e-19
A4-10-7	Q8ELA6	ABC transporter permease (hypothetical protein)	217bp	53	0.81
A4-10-9	Q9LIG1	Similarity to RNA polymerase transcriptional regulation mediator (Hypothetical 28.8 kDa protein)	635bp	328	2.5e-28
A4-10-10	Q98MG8	Hypothetical glycine-rich protein mlr0585 (Chimeric AFGP/trypsinogen-like serine protease)	640bp	871	3.5e-85
A7-5-2	Q09627	Probable insulin-like peptide beta-type 2 precursor (GPI8p transamidase-related (Fragment))	256bp	64	0.90
A7-5-4	Q9LHT3	N-glyceraldehyde-2-phosphotransferase-like	475bp	421	3.5e-38
A7-5-6	Q9FZK2	Hypothetical protein	411bp	265	1.2e-21
A7-6-1	P47922	Nucleoside diphosphate kinase I (EC 2.7.4.6)	512bp	474	8.4e-44
A7-6-3	Q9TXY9	Hypothetical 41.2 kDa protein.(Similar to zinc finger protein 207.)(Virus sequence)	273bp	66	0.041
A7-6-6	Q951A5	ATP synthase F0 subunit 9 (EC 3.6.1.34) (hypothetical protein)	191bp	63	0.95
A7-13-1	Q9FZK2	Hypothetical protein	415bp	265	1.2e-21
A7-13-2	Q09627	Probable insulin-like peptide beta-type 2 precursor (GPI8p transamidase-related (Fragment))	247bp	64	0.90
A7-13-4	Q9FZK2	Hypothetical protein	411bp	265	1.2e-21

Table 3.1. (continued).

Clone ID	Accession No.	Best database match (WU-BlastX)	Sequencing	Score	E-value
A7-13-10	Q98MG8	Hypothetical glycine-rich protein mlr0585 (Chimeric AFGP/trypsinogen-like serine protease)	252bp	380	6.3e-33
A19-4-1	Q98MG8	Hypothetical glycine-rich protein mlr0585 (Chimeric AFGP/trypsinogen-like serine protease)	652bp	726	9.60e-70
A19-4-2	Q8LBU1	Hypothetical protein (Unknown protein from mRNA of Arabidopsis)	592bp	154	8.2e-10
A19-4-3	O59559	Hypothetical protein (Probable ATP-dependent RNA helicase has1 ?)	225bp	56	0.021
A19-4-4	Q8F5F5	Conserved hypothetical protein (transporter?)	121bp	48	0.65
A19-4-5	PO6363	Chloroplast 30S ribosomal protein S8	643bp	601	2.9e-57
A19-4-7	PO6363	Chloroplast 30S ribosomal protein S8	640bp	601	2.9e-57
A22-17-3	AAP05800	Putative 60S ribosomal protein L19	665bp	587	8.9e-56
A22-17-4	Q8V5G0	Small hypothetic protein	371bp	49	0.33
A22-17-5	Q9LVU5	Putative 60S ribosomal protein L9 (or hypothetical protein)	423bp	217	1.4e-16
A23-15-1	CAD78064	Putative cytokinesis-specific syntaxin-related protein (Knolle)	558bp	561	5.1e-53
A23-15-4	Q8H2B9	60s acidic ribosomal protein.	320bp	228	9.8e-18
A23-15-6	Q8L5W4	RuBisCO activase beta (Fragment)	281bp	87	0.0085
A24-1-1	Q8L5W4	RuBisCO activase beta (Fragment)	281bp	87	0.0085
A24-1-5	Q98MG8	Hypothetical glycine-rich protein mlr0585 (Chimeric AFGP/trypsinogen-like serine protease)	253bp	353	4.72e-30
A24-1-6	P49690	60S ribosomal protein L23	420bp	434	1.4e-39

에 저항할 수 있는 힘을 식물체에 부여할 것이라고 제시하였다.

식물체의 병 저항성과 관련한 ribosomal protein에 관한 연구가 다양하게 시도되어 왔다. Park 등(2001)은 cauliflower mosaic virus transactivator인 TAV가 polycistronic RNA에서 주요 open reading frames의 번역을 조절한다는 것에 관한 연구를 하였다. 이 연구에서 그들은 TAV의 기능이 eukaryotic initiation factor인 eIF3과 60S ribosomal subunit에 의존한다는 사실을 보고하였다.

Salekdeh 등(2002)은 수분스트레스동안 벼의 잎에서 발견되는 단백질들을 proteomic 분석을 통하여 연구하였다. 3주간 자란 벼(Oryza sativa L. cv CT9993 and cv IR62266)를 23일 이상 수분공급을 하지 않고 수분스트레스를 준 후 proteomic analysis를 한 결과 1000개 이상의 단백질이 발견되었다. 두 품종에서 수분스트레스에서만 다량 발견하는 42개의 단백질이 공동으로 분석되었으며, 그중 chloroplast Cu-Zn superoxide dismutase 하나의 단백질만이 두 품종에서 다른 발현양상을 보여주었다. 이들 단백질을 분석한 결과, 수분 스트레스에 반응하는 4개의 기작이 밝혀졌다; 1) S-like RNase homologue의 상승 조절, 2) actin depolymerizing factor의 상승 조절, 3) rubisco activase의 상승 조절, 4) isoflavone reductase-like protein의 하강 조절. 따라서, 본 연구에서 분석한 A23-15-6 clone은 바이러스 접종 시 잎의 상처가 나면서 수분 스트레스를 받아 많이 발현된 것으로 보인다.

3.2.2 형질전환 식물체의 육성

Agrobacterium을 매개로 한 오이의 형질전환은 많은 실험실과 현장에서 실제로 어려움을 겪고 있으며, 본 연구에서도 낮은 형질전환 수율 때문에 재현성의 문제가 발생하는 경우가 많았다. 따라서, 본 연구에서는 다음 Fig. 3.6과 같이 형질전환 오이 육성을 위한 체계를 확립하고자 각 단계별 최적화 실험을 수행하였다. 기존에 많이 사용하고 있는 organogenesis 방법 외에도 embryogenesis를 이용한 방법을 추가하여 최대한 효율적이고, 재현성있는 체계를 확립하고자 보완실험을 수행하였다.

형질전환 식물체 육성에서는 다음과 같은 두 가지의 실험결과를 얻을 수 있었다.

- 1) 오이 형질전환 체계의 최적화를 위하여 reporter gene이 삽입된 pBI121 및 pCAMBIA2301을 이용하여 기내재생산 및 안정된 형질전환체 생산시스템을 확립하였다.
- 2) 바이러스 저항성 유도용 vector를 오이의 원종에 형질전환 하였고, PCR, Southern blot, Northern blot을 수행하여 유전자의 도입을 확인하였으며, 온실에서 생육시켜 원종의 F1을 생산하였다.



Fig. 3.6 Overall scheme for virus-resistant transgenic cucumber breeding.

3.2.2.1 오이 형질전환의 최적화

3.2.2.1.1 기관형성방법을 통한 재분화 및 형질전환

가) 하배축을 이용한 재분화 및 형질전환

하배축을 이용하여 재분화를 유도한 실험에서는 하배축만을 절단하여 배지에 치상하는 방법보다는 Kim 등(2000)이 발표한 양 자엽을 1/2로 절단하고, 하배축을 절단하여 배지에 꽂는 방법을 이용한 것이 재분화율이 높았다 (Fig. 3.7).

그간 오이의 재분화에 관한 실험들은 Handley와 Chambliss(1979)가 측아(axillary buds)를 절편체로 사용한 것을 시작으로, 약(anther)로부터 embryogenesis를 유기한 것(Lazarte와 Sasser, 1982), 자엽(cotyledon)을 이용한 것(Sekioka와 Tanabe, 1981; Kim과 Jang, 1984; Kim 등, 1988, Nawab 등, 1991), 배축을 사용한 것(Rajasekaran 등, 1983), 종자를 절개하여 재분화와 개화를 유도한 것(Msikita 등, 1990), 그리고 엽신과 엽병을 절편체로 이용한 것(Wehner와 Locy, 1981) 등 다양하게 이루어져 왔다.

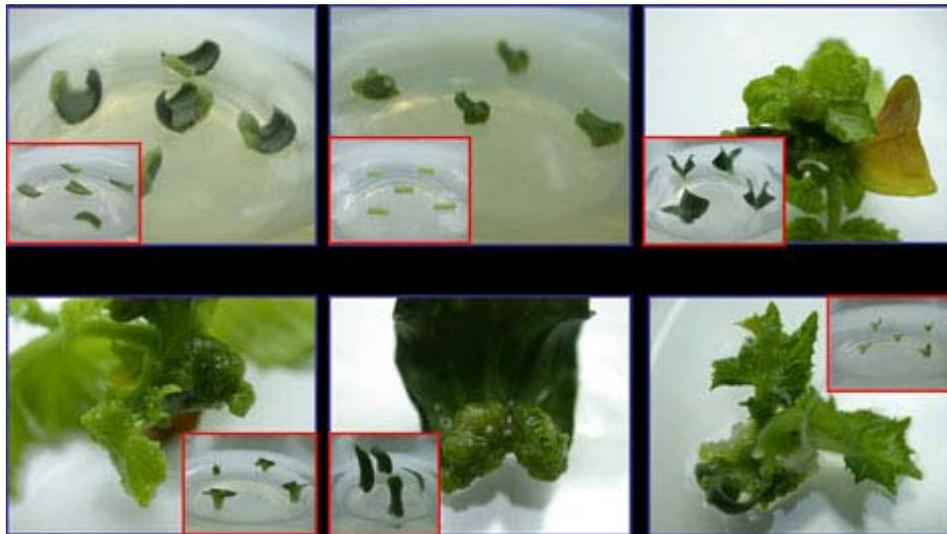


Fig. 3.7. Various explants effect on the regeneration rate and morphology in cucumber tissue culture.

특히 재분화가 잘되는 것으로 알려진 오이의 배축을 절편체로 이용한 연구들이 많이 이루어져 왔는데, Curuk 등(2003)은 세가지 멜론 품종(*Cucumis melo* L.)과 오이(*C. sativus* L. cv. Thoz)의 배축을 잘라 4.4 μM 의 benzyladenine이 첨가된 MS 배지에서 배양하여 거의 100%에 가까운 기관분화를 유도하였다.

본 연구에서 이용한 절편체는 Kim 등(2000)이 보고한 방법으로, 그들은 오이의 자엽과 배축을 절편체로 하여 MS 기본배지에 2.0 mg/L의 Zeatin을 첨가하여 기관분화를 시도하였다. 과중후 3-5일 된 자엽의 반을 자른 상태에서 배축을 2 mm로 잘라 재분화 배지에서 배양한 결과 배축아래에서 새로운 기관분화가 80-90% 이루어졌으며, 1.0 mg/L의 IAA가 첨가된 배지에 넣어 뿌리의 형성을 촉진하였다.

생장조절제별로 기내재생산 효율을 조사한 결과, 2 mg/L Zeatin 보다는, 1 mg/L ABA, 2 mg/L BA의 생장조절제 농도에서 고형화물로 0.3% gelrite 혹은 0.3% phytigel을 이용한 경우 가장 높은 재분화율 (92.3%)을 나타내었다 (Fig. 3.8).

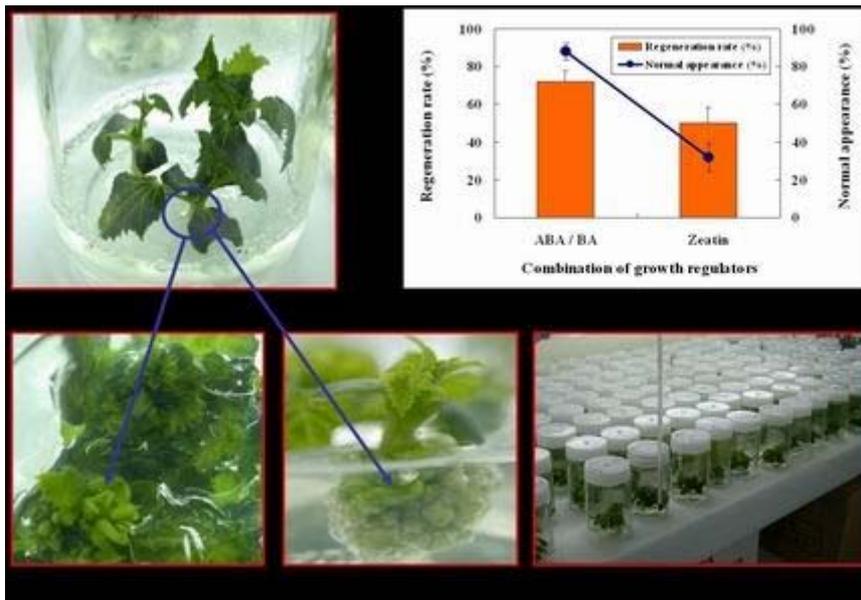


Fig. 3.8. Effect of growth regulator concentration (ABA/BA vs. Zeatin) on the cucumber plant regeneration.

*Agrobacterium*을 매개로 한 형질전환에서는 선발용 항생제인 kanamycin을 30, 50, 75, 100 mg/L로 처리하여 선발할 경우, Km 75 mg/L에서는 82.4%로 신초가 형성되었지만, 최종적으로는 대부분이 escapes 였고, 0.1%의 chimera 형태의 형질전환체 만을 얻을 수 있었다. 또한, Km 100 mg/L에서는 500개의 치상 개체 중 단 한 개체도 신초가 형성된 개체가 없었다. 이러한 원인은 gelrite로 고형화된 배지에서 kanamycin의 용해도 혹은 확산도가 낮은 것에 기인한 것으로 추론하였다. 또한, gelrite 및 phytigel의 배지에서 형성된 신초는 신장용 배지에서 투화현상(hyperhydricity)이 심화되어 정상적인 개체를 얻기 힘들었다 (Fig. 3.9). 문제해결을 위하여, agar, gelrite, phytigel을 몇가지 비율로 섞은 혼합배지를 고형화하고, 항생제를 농도별로 처리하여 비교한 결과, 0.4% agar + 0.15% gelrite 및 0.4% agar + 0.15% phytigel 에서 투화현상이 현저히 감소된 신초를 얻을 수 있었다 (Fig. 3.10, 3.11). 이러한 현상은 품종과 원종 모두에서 동일한 결과를 나타내었다.

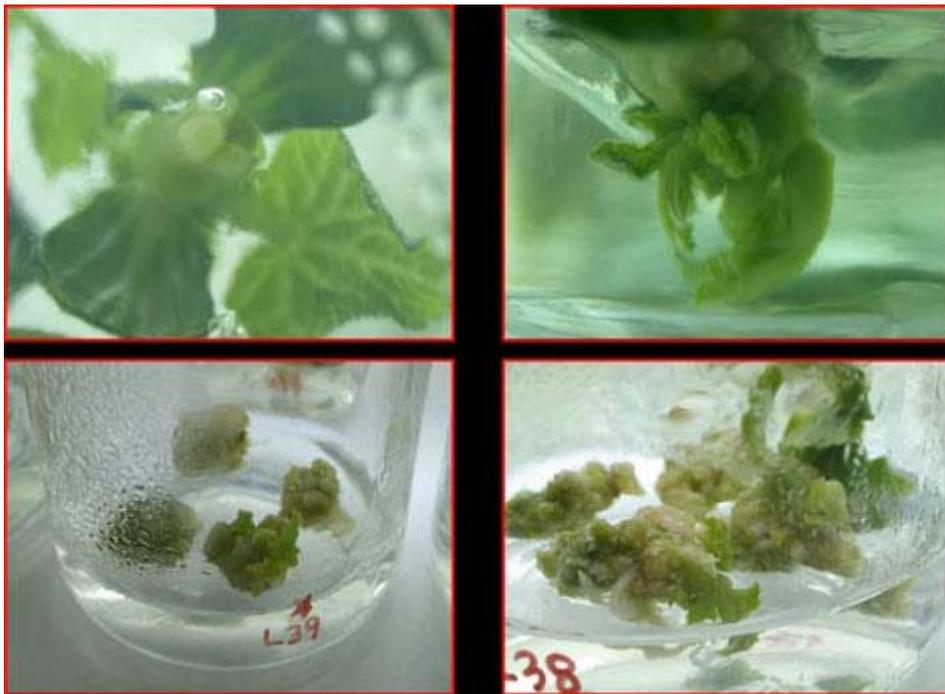


Fig. 3.9. Examples of hyperhydricity of putative transformants in gellan gum (3% phytigel or 3% gelrite).

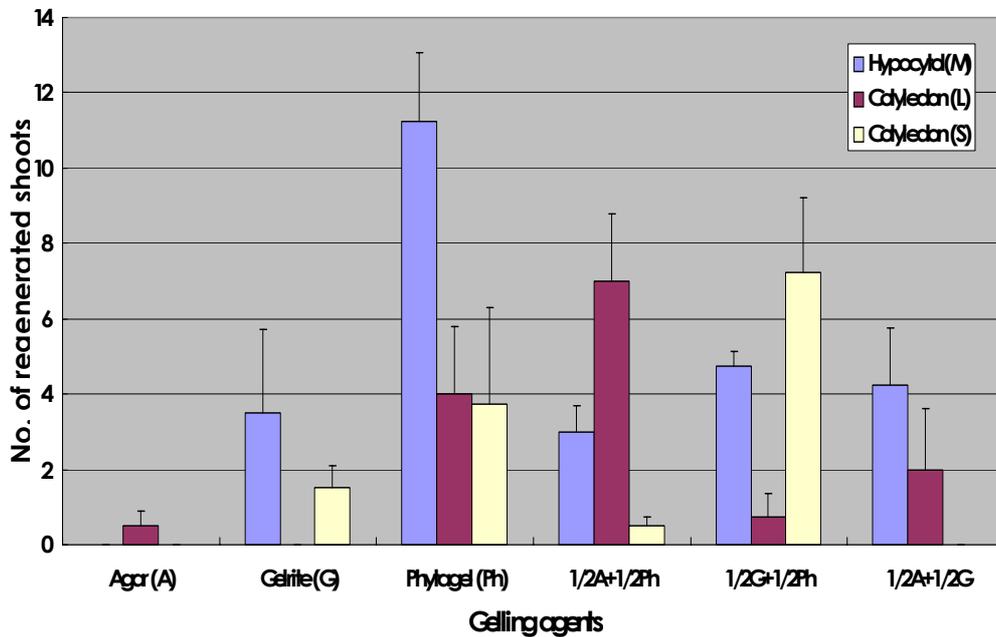


Fig. 3.10. Effect of various gelling agents on the shoot regeneration.

이러한 원인은 gelling agent의 strength와 이온 확산도의 정도에 따라 이루어지는 것으로 생각되어 그림 3.7과 3.8처럼 배지의 강도와 Ag^{3+} 및 Cl^{-} 의 확산도를 조사하였다.

배지의 강도는 regeneration 효율이 가장 높았던 1/2A + 1/2G가 가장 낮은 강도를 나타내었다. 반면, 이온의 확산도는 Agar > 1/2A+1/2Ph > 1/2A+1/2G > phytigel > gelrite > 1/2A+1/3Ph > 1/2A+1/3Ph의 순으로 느리게 확산되었다 (Fig. 3.12, 3.13, 3.14).

이러한 결과는 phytigel이나 gelrite 만으로 구성된 배지에서 발생하는 양분이동, 흡수효율의 문제점, 기관형성의 문제점, 그리고 항생제를 이용한 선발에서 고려해야 할 점 등을 부분적으로 설명하는 결과라 할 수 있다.

또한, Table 3.2와 같이 항생제를 사용시에도 고형화시키는 배지의 종류에 따라 그리고 치상하는 식물체의 기관에 따라 매우 다양한 농도가 적용되기 때문에 기관별, 그리고 배지의 고형화물 종류에 따라 반드시 최적화 실험이 필요함을 알 수 있었다.

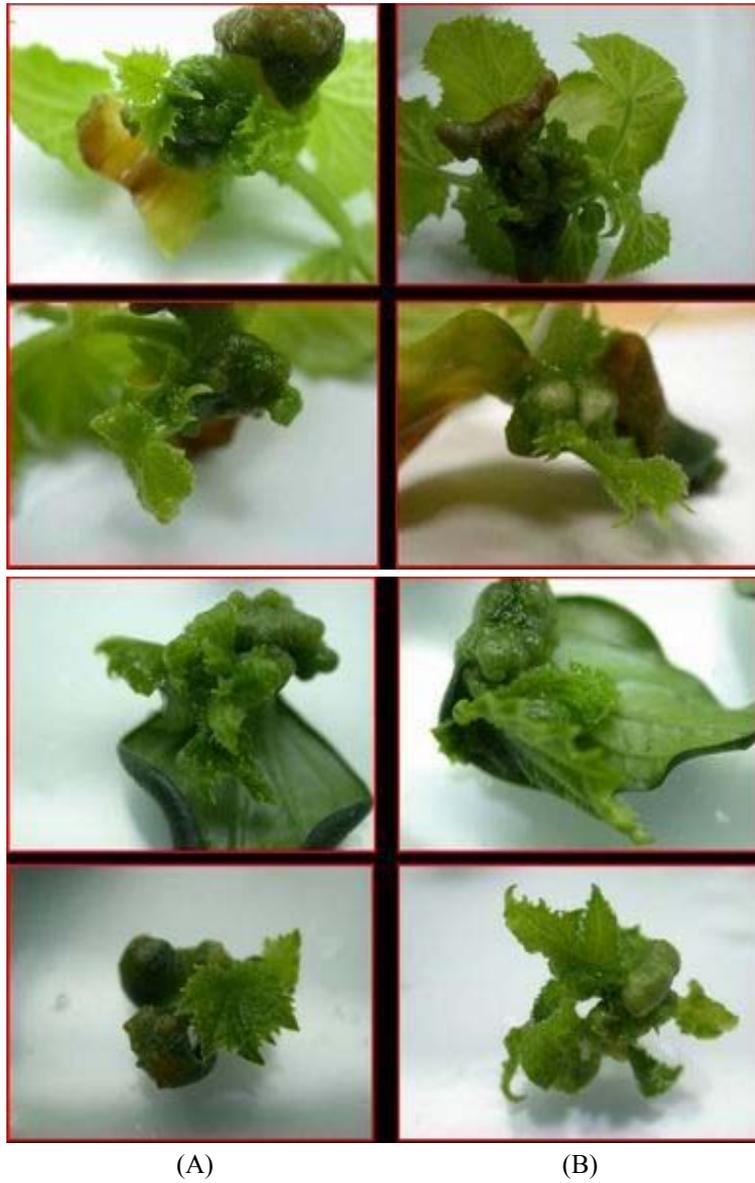


Fig. 3.11. Various regenerants of cucumber cultured in the MS medium solidified with 4g/L agar and 1.5g/L gelrite (A) and 4g/L agar and 1.5g/L phytigel (B).

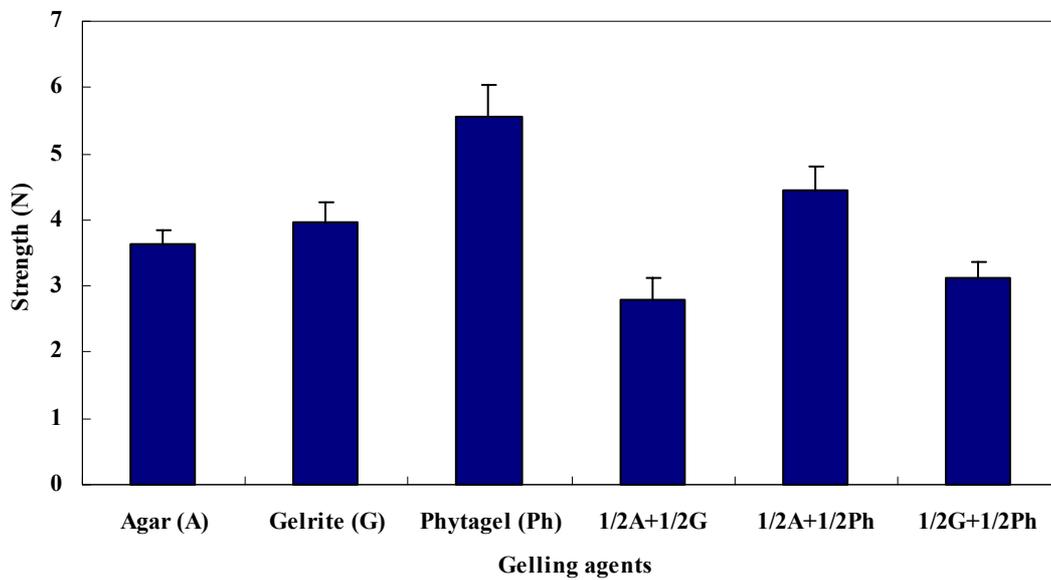


Fig. 3.12. Gelling strength(N) in accordance with the combinations of gelling agents (Agar: 8g/L, Gelrite: 3g/L, Phytigel: 3g/L).

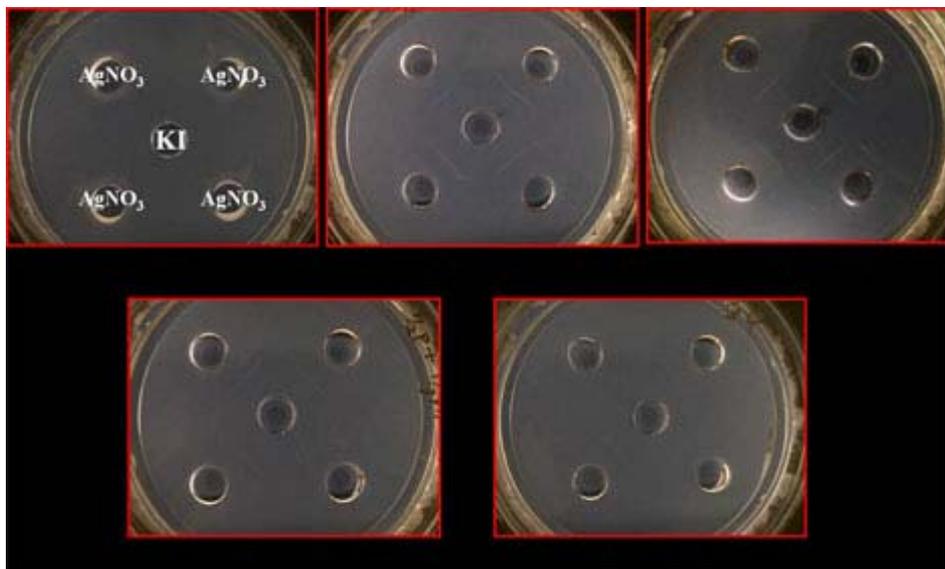


Fig. 3.13. Precipitation lines in accordance with the combinations of gelling agents (KI precipitates with AgNO_3 , Agar: 8g/L, Gelrite: 3g/L, Phytigel: 3g/L).

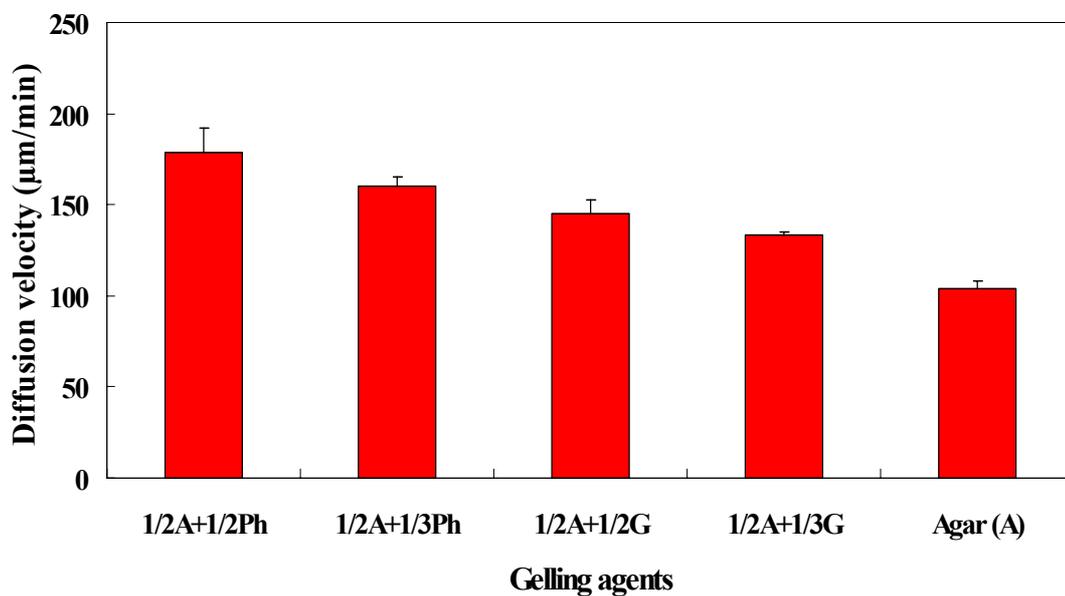


Fig. 3.14. Effect of various kinds of gelling agent on diffusion velocity of Ag³⁺ ion.
(A: 8, G: 3, Ph: 3g/L).

Table 3.2. Effect gelling agents, explants, and kanamycin concentrations (mg/L) on optimum regenerant screening.

	Hypocotyl (modified)	Hypocotyl	Cotyledon (long)	Cotyledon (short)
Phytigel (Ph)	150	–	100	100
Gelrite (G)	150	–	100	100
Agar (A)	30	–	30	30
1/2A+ 1/2Ph	85	–	75	75
1/2A+1/2G	85	–	75	75

나) 자엽을 이용한 재분화 및 형질전환

자엽을 절편체로 이용한 재분화에서는 자엽의 엽연을 제거하고 작게 등분하는 것보다는 자엽병을 절단하여 그대로 배지에 꽂는 방법이 가장 재분화율이 높았다 (62%). Burza와 Malepszy(1995)는 오이의 엽절편으로부터 유전적이 변이가 없는 기관분화를 시도하였다. 이 방법에서 *Cucumis sativus*와 *C. anguria* 두 식물체의 유엽을 $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ 비율을 조정한 식물체 유기 배지에서 4주간 배양하였으며, 6-7주 후에는 발근을 시켰다. Colijnhooymans 등(1995)은 자엽의 발달시기별로 절편체를 채취하여 기관분화를 시켰다. 그 결과 3-5일간 배양한 자엽의 절편체에서 100%의 재분화가 이루어졌으며, 7일 이상을 배양한 자엽의 절편체부터는 재분화율이 매우 낮아졌다고 보고하였다. 그러나, 본 연구에서 사용한 품종들에서는 자엽만을 절편체로 이용한 절편체에서는 재분화가 제대로 이루어지지 않아, Kim 등(2000)의 방법을 수정하여 자엽만을 이용하지 않고 자엽병을 절단한 후 그대로 배지에 꽂아 효율적인 재분화를 유도하였다(Fig. 11).

한편, 하배축의 경우와는 달리 AgNO_3 의 첨가시 정상적인 신초형성이 이루어졌다 (Fig. 3.15). AgNO_3 의 효과는 앞서의 하배축을 자엽이 달린 채로 그대로 배지에 꽂는 경우는 거의 처리효과가 없었다.

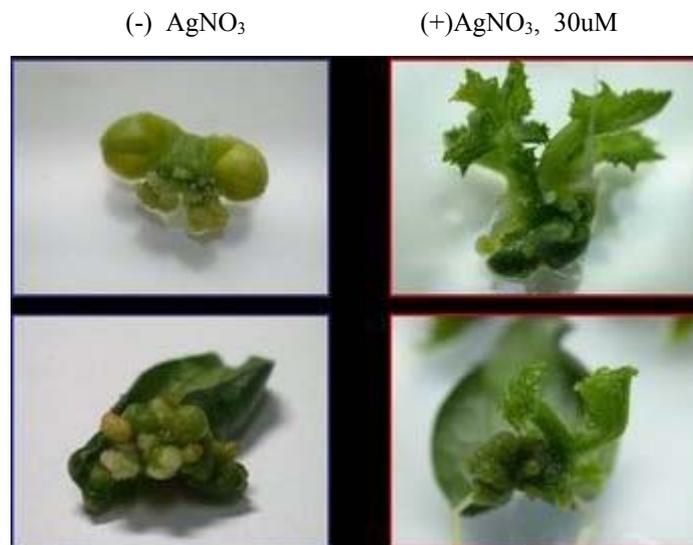


Fig. 3. 15. Effect of AgNO_3 on the regeneration and transformation of cucumber.

Mohiuddin 등(1997)의 보고에 의하면 AgNO_3 의 첨가가 오이의 재분화에서 정상적인 개체의 형성과 투화를 방지한 재분화 효율 증가에 매우 효과가 있다고 하였다. 그러나, 이 치상 방법의 경우 원래 매우 높은 기내 재분화율을 보였던 것으로 보아 자엽의 사면을 절단하는 방법에 비하여 아마도 스트레스가 매우 적었을 것으로 판단되며, 따라서 ethylene gas의 흡착제로 많이 사용되는 AgNO_3 의 처리에 큰 영향을 받지 않을 것으로 생각되었다.

치상조직의 적절한 선택, 배지의 고형화물의 조합 그리고, AgNO_3 의 처리 등에 의하여 정상적인 신초의 재생산 비율을 매우 높일 수 있었는데, 신초의 신장 및 발근 그리고 생육이 부적절한 경우가 많이 나타났다. 본 연구에서는 포도 등 기내생육이 부적절한 식물체에서 사용한 바 있었던 hummate를 처리하여 생육이 왕성하고 발근율이 좋은 환경을 만들 수 있었다.

Hummate 30mg/L의 처리에서 가장 좋은 신초의 신장, 생육, 발근이 이루어졌으며 (Fig. 3.16), 이 효과는 60mg/L 처리농도까지 동일하게 유지되었다. 또한 형질전환체의 항생제 선발에서도 식물선발 효과에는 큰 영향이 없었으며, 식물생육이 왕성하게 유지되어 잔류하는 Agrobacterium의 제균에도 도움을 주는 효과도 있었다.

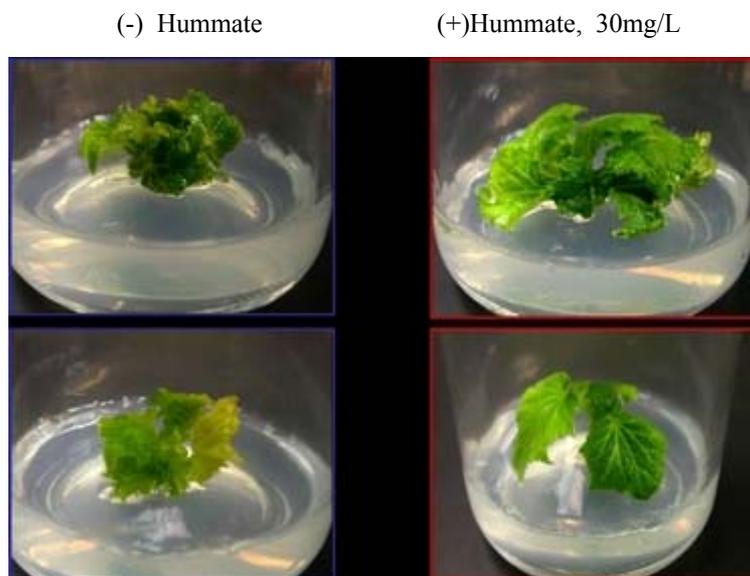


Fig. 3.16. Effect of sodium hummate on the growth of putative cucumber transformants.

최상의 재분화 효율을 얻기 위한 배지 첨가물에 관한 연구가 많이 이루어져왔다.

그중 오이에 직접적으로 관련하여 당의 농도 조절(Lou 등, 1996), glutamine의 첨가에 관한 연구(Vasudevan 등, 2004) 등이 주로 이루어져왔다. Vasudevan 등(2004)은 L-glutamine, ammonium nitrate, adenine sulphate, asparagine, ammonium succinate, potassium nitrate 그리고 sodium nitrate를 질소원으로 한 MS 배지에 0.044 mM의 benzyladenine를 첨가하여 morphogenesis를 연구하였다. 그 결과, 절편체들이 0.068 mM의 L-glutamine이 첨가된 배지에서 74.6 %에 이르는 신초형성을 보였고, 한 절편체당 신초수도 13.6개에 달하였다.

*Agrobacterium*을 매개로하는 형질전환 실험에서도 역시 동일한 경향을 나타내어 75mg/L Km에서, 1mg/L ABA, 2mg/L BA, 30 μ M AgNO₃의 농도 및 고형화물로 0.4% agar + 0.15% phytigel을 이용할 경우 가장 높은 비율로 형질전환체를 선발할 수 있었다.

또한, 오이는 매우 escapes가 많아서 전배양 (preculture)단계 없이 바로 *Agrobacterium*에 감염시키고, 22-24 $^{\circ}$ C 암소에서 3일간 공동배양하였다. 제균이 끝나고 항생제 배지로 옮겨진 후, 약 15일이 경과되면 신초들이 형성되기 시작하였다.

pBI121 및 pCAMBIA2301를 이용한 control 실험에서 X-glucuronidase를 이용한 GUS staining시 재분화 신초에서 GUS 유전자가 발현됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 3.17).

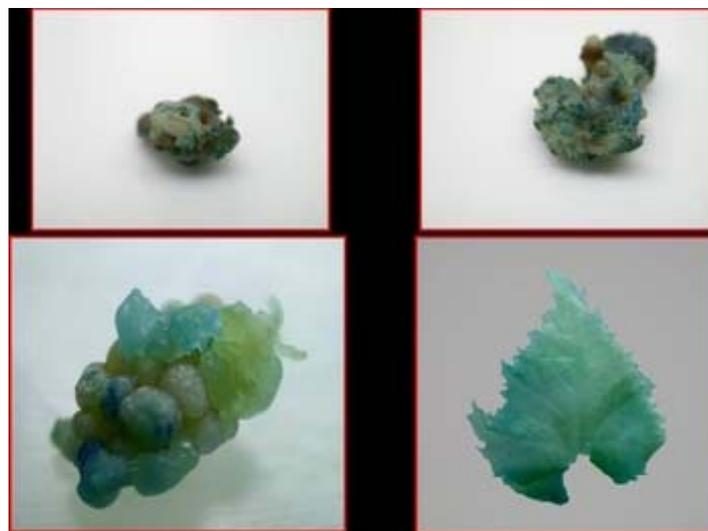


Fig. 3.17. Transgenic expression was detected by GUS activity in calli and in leaves of transgenic plants (pBI121) through histochemical assay with X-gluc reagent incubated at 37 $^{\circ}$ C overnight.

형질전환체로 추정되었던 싌초들의 정상적인 신장을 위하여 몇 가지 처리를 적용한 결과, 싌초가 발생되기 시작한 지 약 2주가 경과되면 1cm 이상 신장하게 된다. 이렇게 신장한 싌초를 절단하여 1/2농도의 MS배지에 30mg/L의 sodium hummate를 첨가한 배지로 옮겨줄 경우 가장 신장이 원활하게 이루어졌으며, 약 1주일간의 암처리 혹은 1mg/L NAA 처리를 통하여 발근이 잘 이루어질 수 있었다.

3.2.2.1.2 체세포배 형성방법을 통한 재분화 및 형질전환

기존의 기관형성 방법을 통한 오이의 형질전환은 매우 낮은 형질전환 효율 때문에 매우 다량의 싌험을 진행해야하는 어려움을 겪고 있었다. 따라서, 본 연구에서는 부가적으로 체세포배 형성방법을 통한 오이의 재분화 및 형질전환 조건을 확립하기 위하여 싌험을 진행하였다.

오이의 embryogenesis를 유도하기 위하여 파종 후 5일정도 지나서 바로 암처리를 4-5일 정도 한 상태의 자엽을 절편체로 사용하였다. 오이의 절편체로 엽연을 제거한 자엽을 2,4-D, NAA, BA가 여러 조합으로 구성된 배지에서 최적화 싌험을 수행한 결과, 2 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L NAA, 0.5 mg/L BA, 9% sucrose, 0.8% agar가 첨가된 배지에서 가장 높은 수율을 나타내었다(Fig. 3. 17).

치상후 약 4주후, 액체배지 단계를 거치지 않고 바로 구형에서부터 어뢰형 체세포 배까지 관찰할 수 있었다. 체세포배 발생 위치는 주로 자엽의 상처부위에서 분열하는 캘러스 조직에서 유래하였다. 자엽이 발달하기 시작하는 체세포배를 0.1 mg/L BA가 함유된 MS 배지로 옮겨준 결과, 높은 효율은 아니지만 정상적인 개체로 신장 및 생육이 이루어졌다. 이것은 종래의 액체배지 적용을 통한 체세포배 형성과정의 단계를 생략한 것으로 간편하게 배를 얻을 수 있는 방법이었다. 형질전환의 경우, 캘러스를 유도하는 단계에서 *Agrobacterium*을 접종하고, 50mg/L kanamycin이 함유된 체세포배 유도용 배지에 치상한 결과, 약 1%의 체세포배가 형성, 발아함을 확인할 수 있었고, 형질전환체의 gus staining도 가능하였다(Fig. 3.18).

Embryogenesis의 효율을 증진시키기 위해 다양한 방법을 시도해본 결과, cutting 방법에 따른 embryo의 발생은 그물무늬 cutting(30%)에서 embryo 발생율이 높았다. 또한, agar의 형태에 따라 embryo의 발생을 비교해보았으나, 기존의 gelrite가 가장 발생율이 높았다(25%). Salt에 따른 발생을 비교해볼 때, 청장오이는 MS salt가 더 효과적이었으며 오이 원종은 NN salt가 embryo 발생율이 높았다.

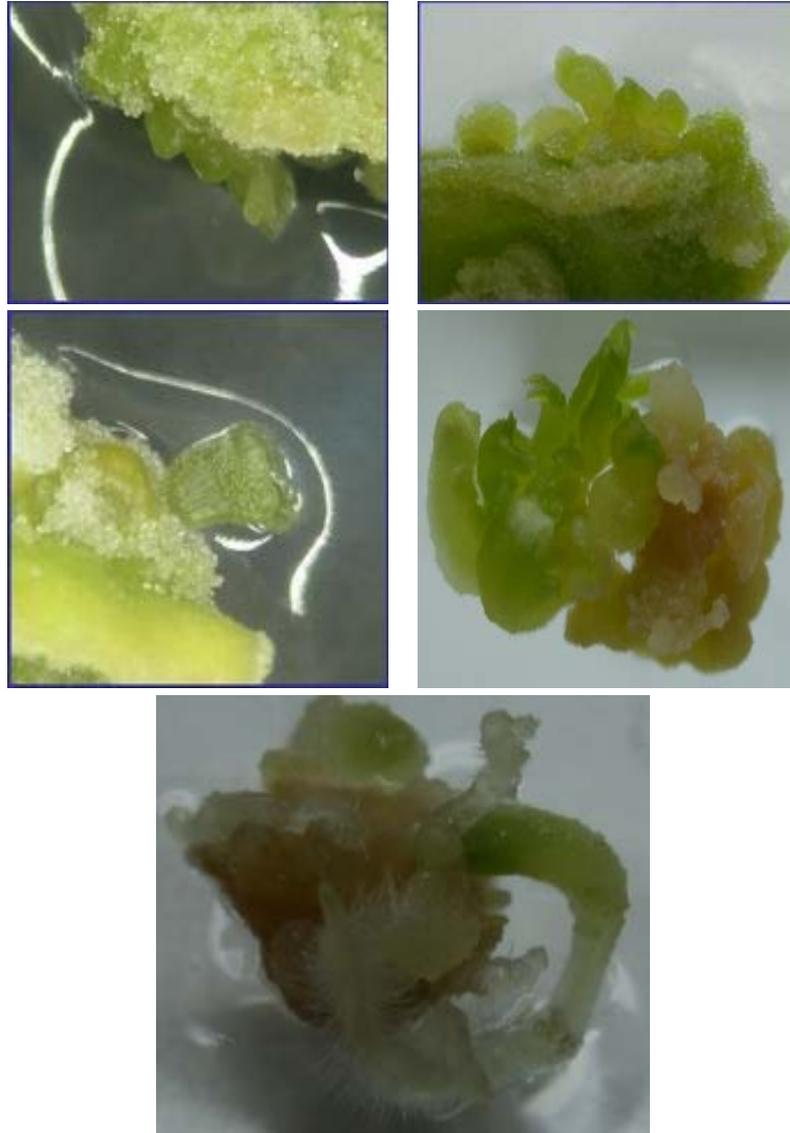


Fig. 3.17. Embryogenesis of cucumber plants.

용기에 따른 발생율은 200 ml flask보다 petri-dish에서 더 많은 embryo가 생성되었다. 탄소원의 양은 embryo를 유지하기 위해 초기에는 반드시 90g/L의 양이 요구되었다. 또한 culture의 형태는 액체보다는 고체가 embryo를 비롯한 embryo로 변환될 수 있는 callus가 더 많이 얻어졌다. Lou 등(1996)에 의하면, 오이의 자엽 절편체의 재분화에 당

의 농도가 중요하게 영향을 미친다고 보고되었는데, 그들은 4-8 μM 의 2,4-D가 첨가된 MS 배지에서는 131 mM의 sucrose 농도에서부터 embryogenesis가 유기되었고, 57.1 μM 의 IAA가 첨가된 MS 배지에서는 131 mM에서 394 mM의 당 농도까지 embryogenesis를 증가시킨다고 하였다.

치상시에는 자엽의 이면이 위로 향하게 치상한 후에 약광에 준 후 일반적인 광조건, 즉, 16h의 광조건과 8h의 암조건, 온도는 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지하였으며, 약 3-4주 정도 지난 후부터 embryo가 발생을 하기 시작하였다. embryo가 발생하기 시작하면, 그 다음 단계의 배지로 옮기는데, 발생하는 embryo의 상태가 균일하지 않기 때문에 무리하게 embryo를 분리하지 않고 그대로 배지만 바꾸어주었다.

유도된 embryo를 발달시키는 여러 가지 배지조성을 실험한 결과, negative control 용 (NN 혹은 MS 기본 배지 + 2,4,-D 2 mg/L + NAA 0.5 mg/L + BA 0.5 mg/L + Thiamin HCl 0.3 mg/L, kanamycin 70 mg/L, cefotaxim 300 mg/L, carnamicin 300 mg/L)에서 일부 embryo가 발달하는데, 이는 cefotaxime의 영향으로 보이며, 가장 적합한 배지는 NN 혹은 MS 기본배지에 1 mg/L GA, 0.02 mg/L BA, 1 mg/L AgNO_3 1mg/L, 그리고 0.1 mg/L의 ABA가 첨가된 배지로 결정되었다.

초기 embryo 형성시에는 gelrite를 사용하였으나, 두 번째 단계부터는 gum agar를 사용하여 embryo를 최대한 정상적인 식물체로 전환되게 하였다. 두 번째 단계에서 새로운 embryo가 유기되기도 하며, embryogenic callus가 발생되기도 하였다. 세 번째 단계부터는, embryo를 떼어내어 embryo elongation 배지로 옮기며, 떼어낸 초기 자엽은 그대로 embryo elongation 배지에 두었다. embryo의 모습은 뿌리의 모습은 정상이나, 윗부분이 초록빛을 가지고 있어 바로 정상적인 식물로의 전환을 이룰 것 같이 보이나, 대개는 비정상적인 모습으로 많이 발달을 하였다.

Vasudevan 등(2004)의 방법에 따라 embryogenesis의 효율을 증진시키기 위하여 아미노산 30mg/L 과 picloram 1mg/L를 초기에 처리해 보았으나, 좋은 결과는 얻을 수 없었다. 초기에 처리한 아미노산은 오히려 embryo를 유도하기 보다는 자엽의 노화를 가속화시켰다.

오이의 embryogenesis 조건을 확립한 이후 형질전환은 embryo를 유도하는 시점부터 접종하는 방법, 어느 정도 embryo가 형성되려는 시점부터 접종하는 방법, 그리고 embryogenic callus 상태에서 접종하는 방법 등 세 가지 방법으로 시도하였다.

그 결과 embryo를 유도하는 시점부터 접종하는 방법에서는 NN 기본배지에 2 mg/L의 2,4,-D와 0.5 mg/L의 BA 0.5mg/L, 그리고 0.5 mg/L의 NAA를 첨가한 배지가

transformation에 효과적이었으나, 이 경우에는 시간이 지날수록 절편체의 상태가 상당히 불량해지고 균의 번식이 증가하기 시작하였다. 어느 정도 embryo가 형성되려는 시점에서 접종을 한 경우에는 embryo가 조금이라도 유기되어 있으면 접종 후 항생제 선발에서 효과가 없어졌다. 따라서, 항생제 양을 다른 방법들과 비교하여 양을 늘려주었다. Tabei 등(1994)은 오이의 *Agrobacterium*-mediated transformation에 항생제와 배양방법이 미치는 영향을 연구하여 발표하였다. 그들은 *Agrobacterium*을 접종하지 않은 자엽을 kanamycin, geneticin (G 418) 혹은 hygromycin이 들어있는 고체 MS 배지에 넣어 callus 형성을 유도하였으며, 그 결과 G 418이나 hygromycin이 kanamycin보다 selection pressure를 주는 데에 더 효과적이라고 하였다. 그러나 G 418과 hygromycin은 배지에 닿은 절편체부분에서의 callus 형성만을 억제할 뿐이어서, 절편체를 액체배지에서 배양한 결과 보다 높은 callus 형성 억제효과를 나타내었다.

세 방법중에서 일정한 크기 이상의 embryogenic callus 상태에서 접종하는 방법이 가장 이상적이었다.



Fig. 3.18. Gus staining through the embryo growth embryogenesis in cucumber plants.

3.2.2.2 바이러스 저항성 유도용 vector의 식물체 도입 및 형질전환 식물체 육성

최종적으로 1차년도에 2세부과제에서 제작한 ZGMMV의 coat protein을 발현하는 바이러스 저항성 유도용 vector (backbone: pGreenII 0029)를 Agrobacterium GV3101에 transformation한 후, 오이 원종 (흑침 다다기계)에 도입하였다(Fig. 3.19, 3.20).

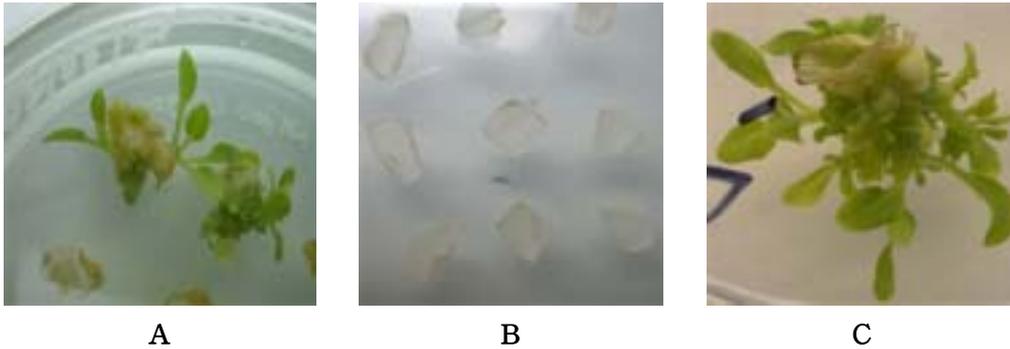


Fig. 3.19. Putative transgenic tobacco shoot production (A, C), which were transferred with ZGMMV coat protein gene and negative control as non-transgenic tobacco.



Fig. 3.20. Putative ZGMMV coat-protein expressed transgenic cucumber production.

제작한 ZGMMV의 coat protein을 발현하는 바이러스 저항성 유도용 vector를 *Agrobacterium* GV3101에 transformation한 후, 원종 오이 (흑침 다다기계)에 도입하였다. Putative transformant 들의 유전자 도입 여부를 스크린 하기 위하여 PCR한 결과는 Fig. 3.21과 같다. 증폭된 부위는 35S CaMV promoter와 ZGMMV coat protein 부위로서 약 700bp의 증폭산물을 얻을 수 있었다.

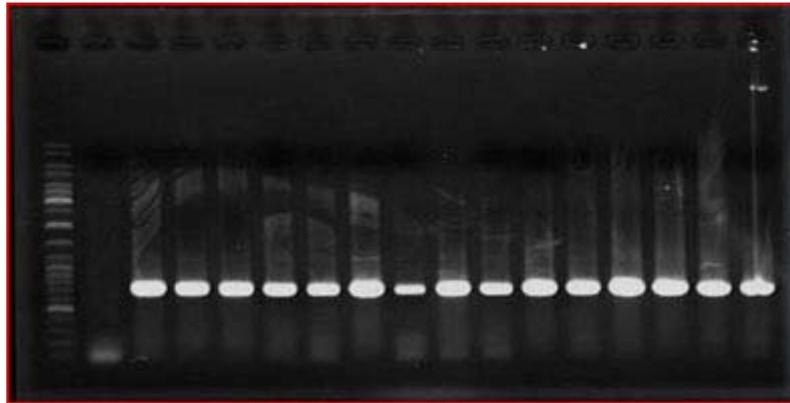


Fig. 3.21. PCR screening for ZGMMV resistant cucumber plants.

PCR로는 *Agrobacterium*이 갖고 있는 plasmid가 증폭되었을 우려가 있기 때문에, 형질전환 추정 식물체의 잎을 채취하여 DNA를 추출하고, *Hind* III로 digestion 후에 ZGMMV Coat protein 유전자를 probe로 하여 Southern blot assay를 수행하였다. 그 결과 1-3 copy의 유전자들이 다양하게 들어있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 3.22). 또한, RNA gel blot assay를 통하여 식물체 내에서 transcript가 만들어지고 있음을 확인하였다(Fig. 3.23).

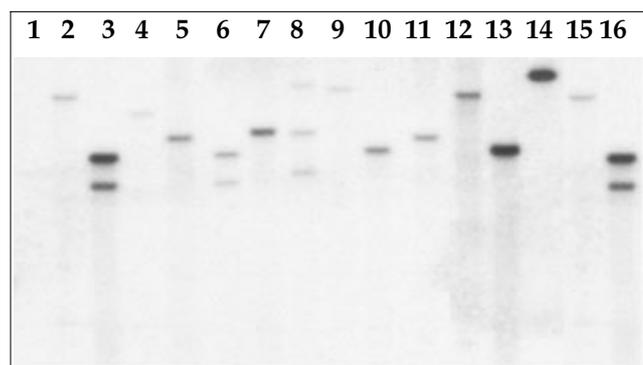


Fig. 3.22. Southern blot assay for ZGMMV-resistant transgenic cucumber plants.

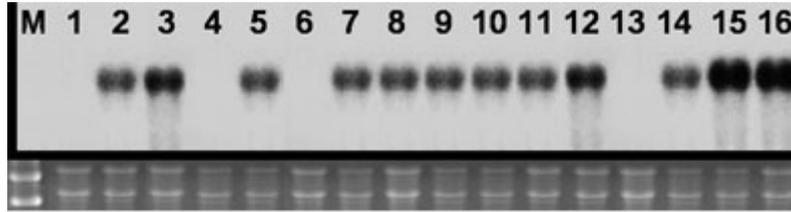


Fig. 3.23. Northern assay for ZGMMV-resistant transgenic cucumber plants.

확인된 식물체들은 F1 채종을 위하여 순화시켜 온실에서 생육하였다(Fig. 3.24).



Fig. 3.24. Hardening step of ZGMMV-resistant transgenic cucumber plants.

채종한 T1 종자들을 다시 파종하여 생육시킨 후 ZGMMV를 접종한 결과, 10개의 transgenic T1 중 ZGMMV의 coat protein이 제대로 발현되는 것은 T1 Line1, T1 Line2, T1 Line 3, T1 Line 8이 있었다(Fig. 3.25). Transgenic plant의 표현형을 확인 후 실제로 ZGMMV의 coat protein이 발현이 되는 것인지를 확인하기 위하여 Northern 분석으로 확인 한 결과, 10개의 T1 라인중 ZGMMV의 coat protein이 발현되는 것은 4개에 지나지 않아(Fig. 3.26), 표현형과 유전형이 일치함을 확인하였다.

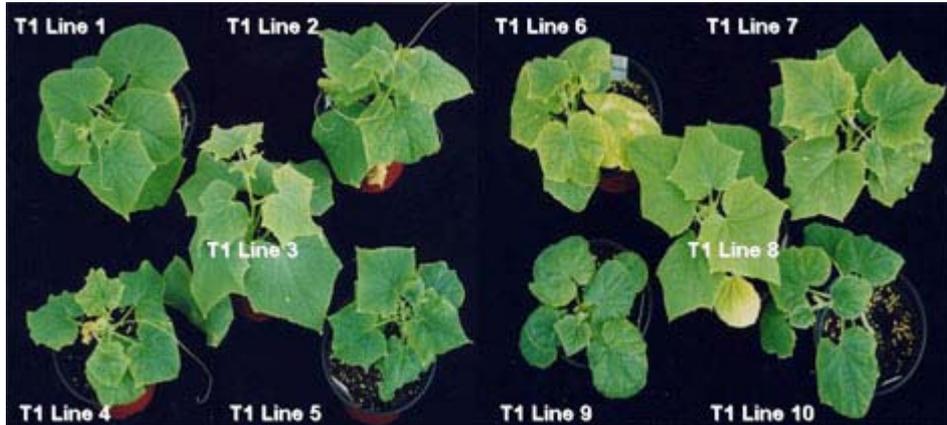


Fig. 3.25. ZGMMV virus infected T1 of ZGMMV-resistant transgenic cucumber plants.

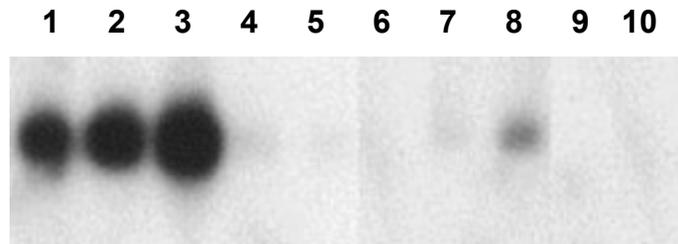


Fig. 3.26. Northern assay for ZGMMV-resistant transgenic cucumber T1 plants.

오이의 형질전환 식물체들은 GUS reporter gene을 삽입한 것을 시작으로(Schulze 등, 1995; Nishibayashi 등, 1996), chitinase-encoding genes의 도입(Raharjo 등, 1996; Tabei 등, 1998)이 이루어져 왔으나, ZGMMV 바이러스 coat protein 유전자를 도입한 것은 아직 보고된 바가 없다.

3.2.3 오이 특이 유전자의 분석

제1절에서 보고한 바와 같이 박과감염성 tobamovirus에 속하는 ZGMMV 접종 후 만들어진 cDNA library에서 ESTs를 구축하였고, 바이러스 감염과 관련성을 보이는 유전자들로 형질전환 시킨 오이 형질전환체를 분석하고자 하였으나, 완전한 형질전환 시스템을 구축하는 데에 많은 시간이 소요되어 TMV-GFP viral vector를 이용하여 바이러스 감염과 관련되는 유전자의 발현을 분석하였다

오이 ESTs에서 바이러스 감염과 관련성을 보이는 몇 가지 유전자를 VIGS (virus induced gene silencing) system을 이용하여 gene silencing을 유도하였다. 최근 VIGS는 가지과 식물에서 주로 TRV (tobacco rattle virus)를 이용한 시스템을 많이 이용하고 있는데, 이 system은 바이러스인 TRV 속에 기주 식물의 유전자 일부를 cloning하여 바이러스가 식물체 내에서 복제를 수행할 때, single strand의 도입한 유전자를 전사하게 되면, 식물체의 상응하는 동일한 sequence의 RNA와 같이 dsRNA를 형성하게 된다. 형성된 dsRNA는 식물체 내의 dicer에 의하여 25nt sequence로 잘리게 되고, 결국 도입한 RNA에 해당하는 식물 RNA의 전사 및 번역이 불가능하여 유전자의 silencing이 이루어진다. 따라서, 연구자는 형질전환의 복잡함과 표현형을 보기위하여 기다리는 오랜 시간을 단축시킬 수 있는 장점을 얻을 수 있어, 손쉽게 원하는 유전자의 기능을 스크린할 수 있게 된다.

실험내용을 간략히 설명하면, pTRV2의 MCS의 EcoRI에 ligation 시킨 후, pTRV1과 같이 Agrobacterium GV2201을 매개로 하여 *N. benthamiana*에 infiltration 시켜 오이 ESTs 유전자를 silencing 시켰다. Silencing의 유무는 control로 사용한 담배의 phytoene desaturase (PDS) 유전자의 phenotype (chlorosis)이 나타나는 시점 및 도입한 유전자의 RT-PCR로 확인이 가능하였다. 일단, 도입한 ESTs의 silencing이 확인되면, TMV-GFP virus를 상위엽에 접종하여 바이러스의 감염 및 이동의 정도를 UV-lamp 하에서 GFP의 발현양상으로 파악하였다.

3.2.3.1 M01F04 histone 2A

M01F04 histone 2A clone의 gene silencing을 확인한 후, TMV-GFP virus를 이용하여 담배에 접종한 결과, 접종 3일째부터 담배 잎 접종부위에서 GFP의 발현이 눈에 띄게 나타나기 시작하였으며, 접종 6일째에는 phloem 부위의 GFP 발현이 완전히 이루어져 잎 전체에 퍼지기 시작하였다. 즉, 기주식물인 담배의 histone 2A 유전자가 발현되지

않아도 TMV의 감염성 및 이동 그리고 병징발현에는 큰 문제가 없는 것으로 보여졌다. 한편, histone 2A의 silencing이 완전히 이루어지지 않을 수 있는 가능성이 있는데, 이 실험의 경우, silencing없이 정상적인 식물체에 TMV-GFP를 접종한 결과와 비교할 때 GFP의 발현 및 이동속도 그리고 발현부위에 큰 차이가 없었다.

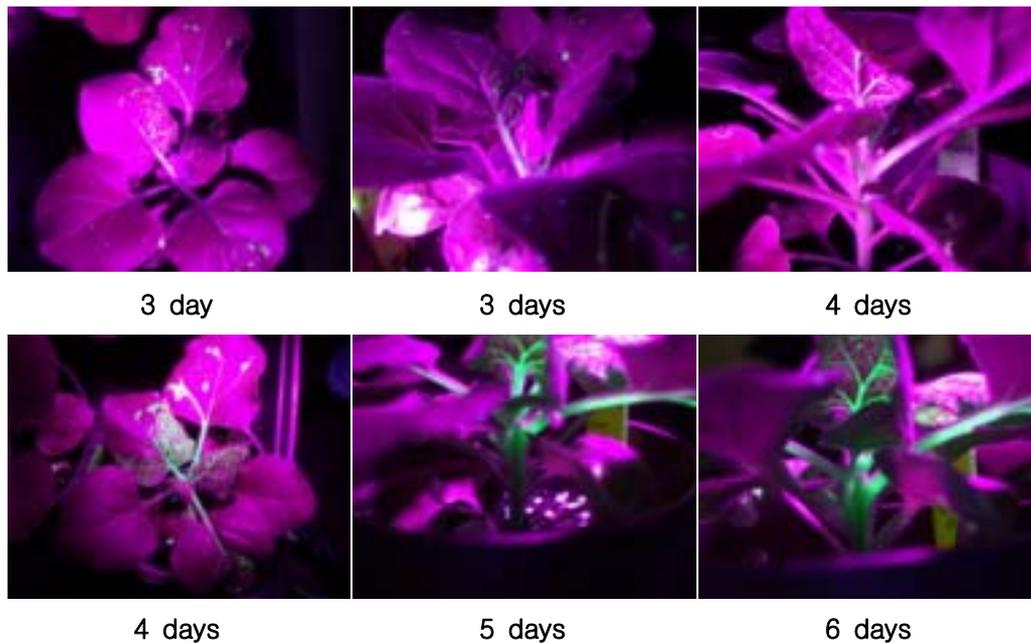


Fig. 3. 27. M01F04 histone2A gene silencing followed by TMV-GFP infection.

동식물의 histone이 가지고 있는 항바이러스성(antiviral) 특성의 기원이 식물 바이러스인 tobacco mosaic virus (TMV)를 이용하여 연구되어져 왔는데(Ladygina 등, 1998), 동식물 histone 모두 TMV 생성을 저해하는 능력이 있었다. Histone의 항바이러스성은 바이러스 도입시 농도, pH, 그리고 침투방식에 의존하였으며, 바이러스와 직접적으로 접촉을 하는 것과 감염된 잎에 노출되는 것 모두 histone의 항바이러스성이 표시되었다. 동식물 사이의 항바이러스성 보호 기작의 유사성은 구성하고 있는 단백질의 특성에 의해 결정된다고 보고된 바 있다.

3.2.3.2 M01F08 phloem protein

M01F08 phloem protein clone의 gene silencing을 확인한 후, TMV-GFP virus를 이용하여 담배에 접종한 결과, 접종 6일째까지 GFP의 발현이 완전히 이루어지지 않았다. 따라서, 기주식물인 담배의 phloem protein 유전자가 발현되었을 경우에는 TMV의 감염성 및 이동 그리고 병징 발현에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다.

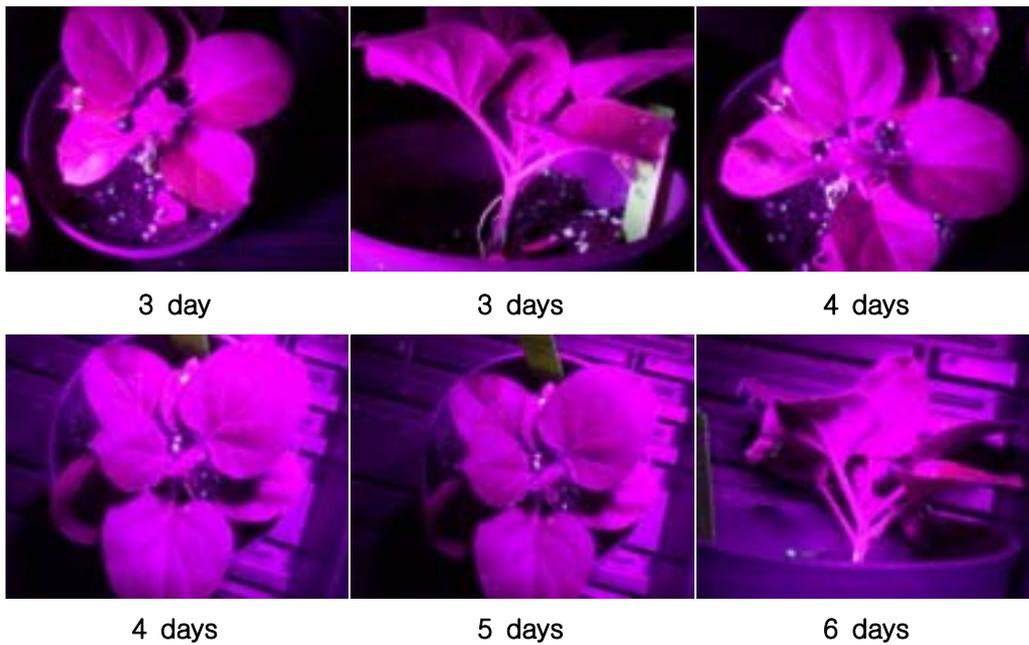


Fig. 3. 28. M01F08 phloem protein gene silencing followed by TMV-GFP infection.

Rajamaki와 Valkonen(2003)은 감자(*Solanum commersonii*)에 Potato virus A (PVA)를 접종한 초기에 potyvirus의 이동경로와 viral genome-linked 단백질에 관하여 보고하였다. In situ hybridization에 의해 viral RNA를 검색한 결과, 5개의 viral 단백질이 감자의 잎에서 추출되었다. 감염 초기의 환부는 잎의 주맥과 세맥 주위에서 나타났으며, 이 감염 부위에서 viral coat protein, cylindrical inclusion protein, 그리고 식물의 parenchyma와 mesophyll cells에 있는 viral RNA와 같이 공존하는 helper component-proteinase가 주변 세포에서는 나타나지 않았다. 반대로, viral genome-linked 단백질로 작용하는 VPg는 감염된 주변세포에서도 나타날 뿐만 아니라 바이러스가 이동하는 초기 단계에서도 나타났다. 이 VPg가 'phloem protein'으로서 감염된 잎의 주변 세포로 바이러스의 이동을

용이하게 해 주는 작용을 하는 것으로 설명되었다. 그러나, 본 연구에서 사용한 TMV의 경우 VPg를 형성하지 않기 때문에 추가적인 연구가 필요한 실정이다.

3.2.3.3 M01B08 adenine nucleotide translocator

M01B08 adenine nucleotide translocator의 gene silencing을 확인한 후, TMV-GFP virus를 이용하여 담배에 접종한 결과, 접종 3일째부터 담배 잎 접종부위에서 GFP의 발현이 눈에 띄게 나타나기 시작하였으며, 접종 6일째에는 phloem 부위의 GFP 발현이 완전히 이루어져 잎 전체에 퍼지기 시작하였다. 즉, 기주식물인 담배의 adenine translocator 유전자가 발현되지 않아도 TMV의 감염성 및 이동 그리고 병징발현에는 큰 문제가 없는 것으로 보여졌다.

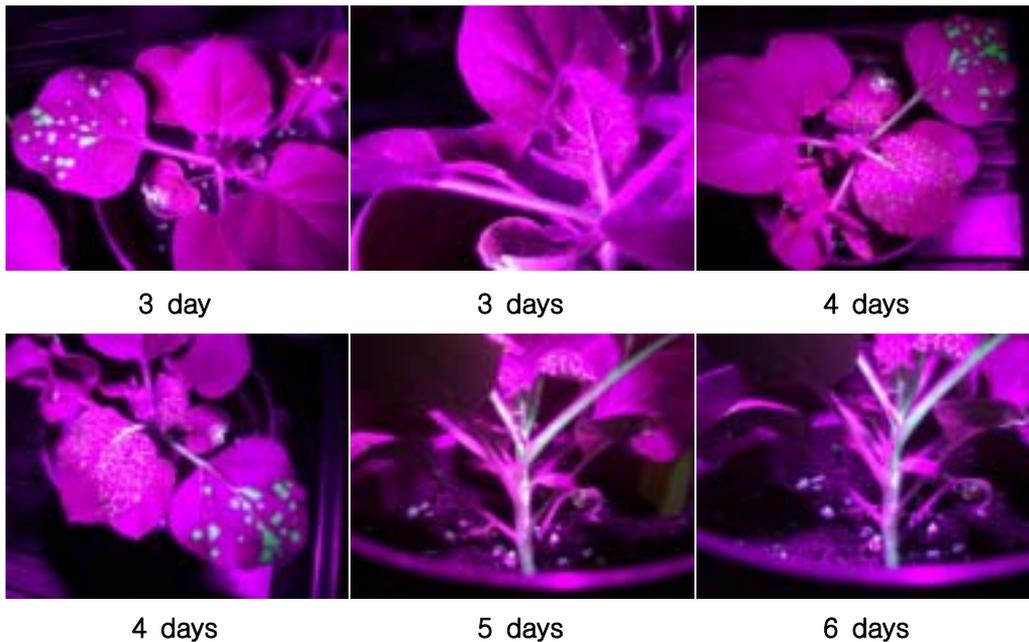


Fig. 3. 29. M01B08 adenine nucleotide translocator gene silencing followed by TMV-GFP infection.

Schultheiss 등(1996)은 adenine nucleotide translocator (ANT)가 미토콘드리아 내막으로

viral RNA를 운반하며, 그것이 에너지대사에 영향을 미치는 것으로 보고하였다. Adenine nucleotide translocator (ANT)는 미토콘드리아 내막에 주로 존재하며 세포질과 미토콘드리아 사이에서 ATP를 ADP로 전환하는 단백질이다. 인간에 있어서는 이 ANT 단백질이 3개의 isoforms으로 존재하며 서로 다른 유전자를 조절한다. ANT 유전자의 발현은 주로 인간의 세포를 이용하여 조사되어 왔다(Giraud 등, 1998; Barath 등, 1999; Schulze 등, 1999). 바이러스와 직접적으로 관련하여 Jacotot 등(2001)이 HIV-1 viral protein R(Vpr), Bcl-2와 adenine nucleotide translocator의 상호작용을 연구하였다. 그 결과 Vpr과 Bcl-2 모두 ANT와의 직접적인 상호작용을 통하여 mitochondrial membrane permeabilization(MMP)을 조절하는 것으로 판명되었다.

3.2.3.4 M01B10 phosphoglycerate kinase

M01B01 phosphoglycerate kinase 또한 TMV-GFP virus를 이용하여 담배에 접종한 결과, 접종 3일째부터 담배 잎 접종부위에서 GFP의 발현이 눈에 띄게 나타나기 시작하였으며, 접종 6일째에는 phloem 부위의 GFP 발현이 완전히 이루어져 잎 전체에 퍼지기 시작하였다. 따라서 기주식물인 담배의 phosphoglycerate kinase 유전자가 발현되지 않아도 TMV의 감염성 및 이동 그리고 병징발현에 문제가 없는 것으로 보여진다.

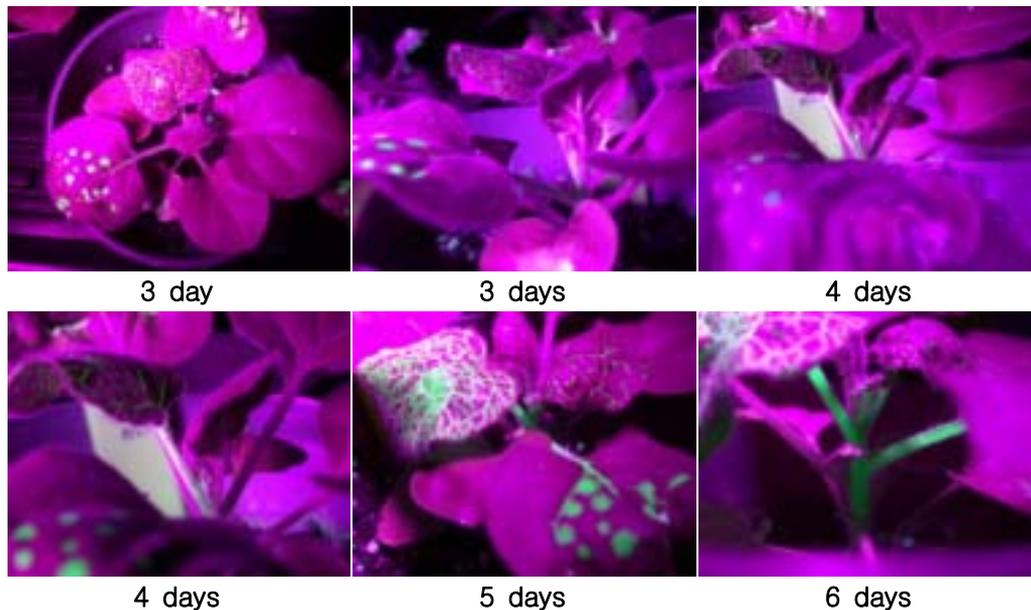


Fig. 3. 30. M01B10 phosphoglycerate kinase gene silencing followed by TMV-GFP infection.

3.2.3.5 M02A01 phloem filament protein PP

대부분 고등 현화식물의 체관요소(sieve elements)는 proteinaceous filaments와 P-protein이라 불리는 집합체로 이루어져 있다. Cucurbita 속은 phloem filament protein(PP1)과 phloem lactin(PP2) 등 두 개의 filament protein을 가지고 있다. 호박 (*Cucurbita maxima* Duch.)에서 phloem filament protein을 encoding하는 유전자를 분석한 결과, 호박의 PP1은 인트론이 없이 단백질을 만들 수 있는 염기를 2430 bp 가지고 있었다. 이 PP1 유전자는 호박의 뿌리, 배축, 자엽, 줄기, 그리고 잎에서 모두 발현되었으며, PP1과 그것의 mRNA가 배축에 축적이되면 매우 빠른 길이생장을 보여주었다. 종종 PP1은 자매세포(companion cells)에서도 나타난다(Clark 등, 1997).

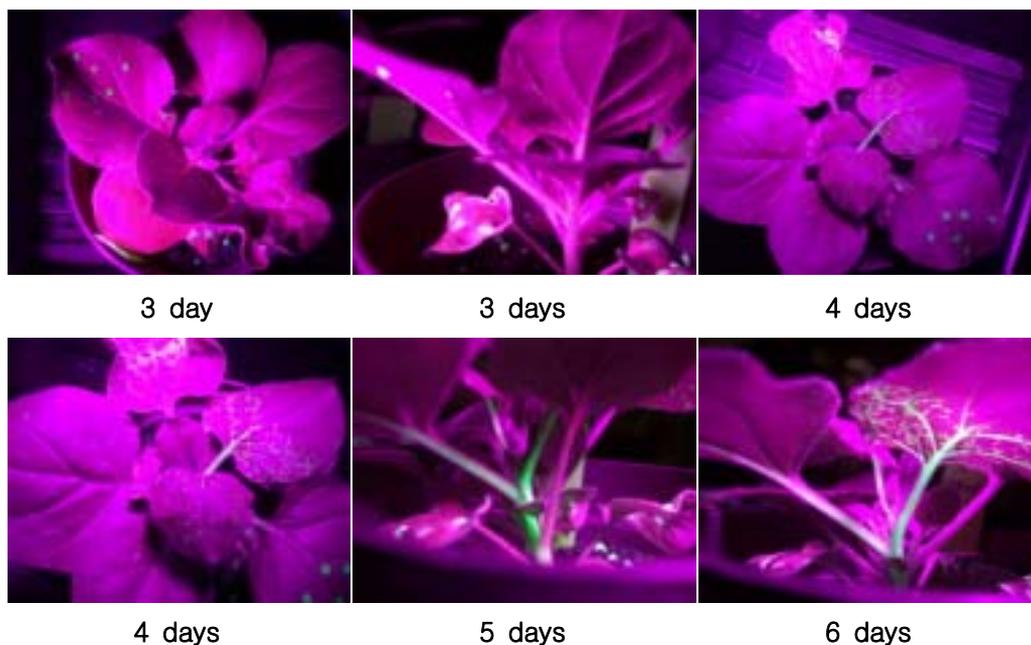


Fig. 3. 31. M02A01 phloem filament protein PP gene silencing followed by TMV-GFP infection.

바이러스 감염과 직접적으로 연관된 phloem filament protein에 관한 연구는 아직 보고된 바 없으나, 본 연구에서 M02A01 phloem filament protein clone의 gene silencing을

확인한 후, TMV-GFP virus를 이용하여 담배에 접종한 결과, 접종 3일째까지 담배 잎 접종부위에서 GFP의 발현이 나타나지 않았으며, 접종 4일째 이후에 나타난 GFP의 발현이 서서히 잎과 줄기에 걸쳐 퍼지기 시작하였다. 앞서 실험한 M01F08 phloem protein gene은 GFP의 발현을 완전히 저해한 것으로 보아, M02A01 phloem filament protein의 경우에는 GFP의 발현 및 바이러스의 이동속도에 관여하는 것으로 보여졌다.

3.2.3.6 M01A11 glycine cleavage system H protein

M01A11 glycine cleavage system H protein clone의 gene silencing을 확인한 후, TMV-GFP virus를 이용하여 담배에 접종한 결과, 접종 3일째에서는 GFP의 발현이 이루어지지 않았으나 접종 4째부터 엽맥사이로 서서히 나타난 병징이 접종 6일째에서는 줄기를 따라 나타났다.

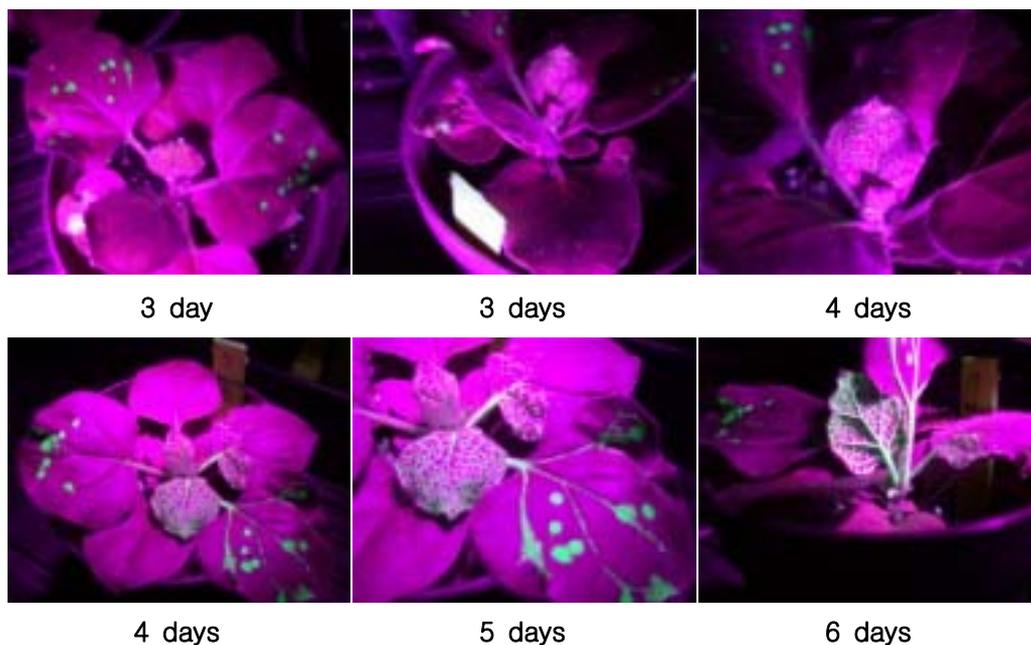


Fig. 3. 32. M01A11 glycine cleavage H protein gene silencing followed by TMV-GFP infection.

Glycine cleavage H protein과 virus와의 상관관계에 관한 연구가 현재까지는 많이 이루어져 있지 않지만, glycine cleavage complex의 구성요소인 T-protein은 H-protein-bound 중간체로부터 ammonia와 methylene-tetrahydrofolate의 형태로 이화작용을 해준다는 사실과(Orun 등, 2003), 딸기의 strawberry latent ring spot virus(SLRSV)를 통한 연구에서(Kreiah 등, 1994), serine/glycine cleavage site에 SLRSV의 capsid coding regions이 위치하는 것으로 나타났다고 보고된 바 있다.

3.2.3.7 M01A12 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

M01A12 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) clone의 gene silencing을 확인한 후, TMV-GFP virus를 이용하여 담배에 접종한 결과, 접종 4일째까지 GFP의 발현이 이루어지지 않았다가 접종 5째부터 엽맥 사이에 GFP의 발현이 조금씩 되는 것을 관찰하였다. 이는 GAPDH 유전자가 GFP의 발현 및 바이러스의 이동속도에 관여하는 것으로 사료된다.

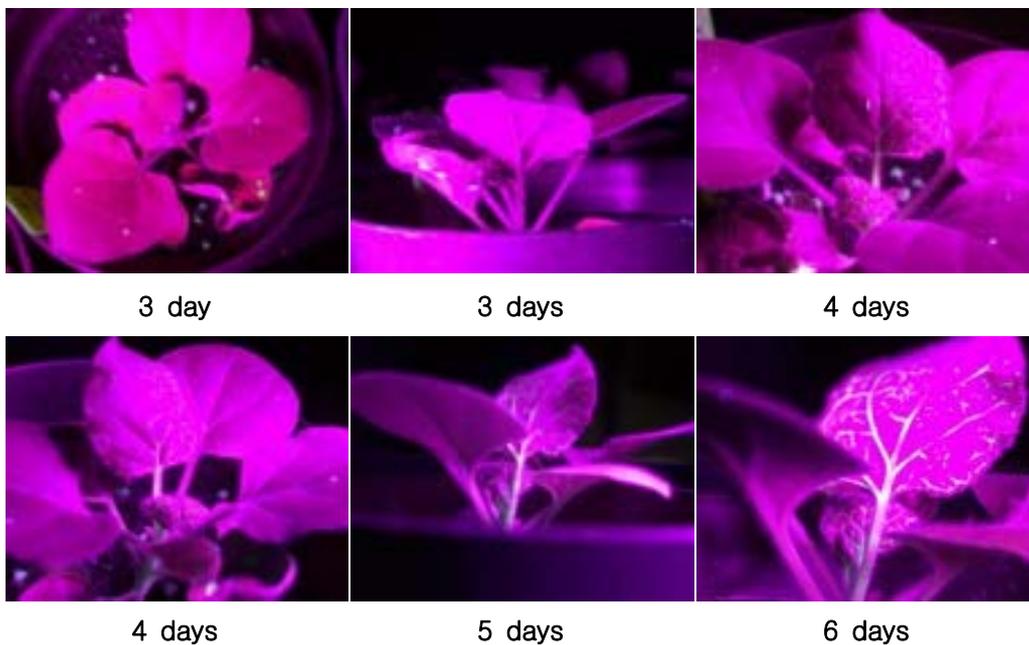


Fig. 3. 33. M01A12 GAPDH protein gene silencing followed by TMV-GFP infection.

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase는 GPD gene으로부터 encoding되는 단백질로서 다양한 비생물적 스트레스, 즉, 염, 저온, 고온, 가뭄 등에서 그 발현양이 높아지는 유전자로 알려져 있다(Jeong 등, 2000). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase의 유전자 cloning과 특성을 분석한 것은 여러 가지 식물체 및 동물에서 많이 보고되었으나 (Ridder와 Osiewacz, 1992; Jungehulsing 등, 1994; Qin 등, 1998; Varma와 Kwon-Chung, 1999; Hirano 등, 1999; Kou 등, 2004), 아직까지 바이러스 감염과 관련하여 바이러스와의 상호작용에 관하여 보고된 바는 없다.

앞서 보고한 7개의 clone이 접종된 담배들에서 시간별로 발현되는 GFP의 양상을 Northern으로 분석한 결과가 Fig. 3. 34에 표현되어 있다.

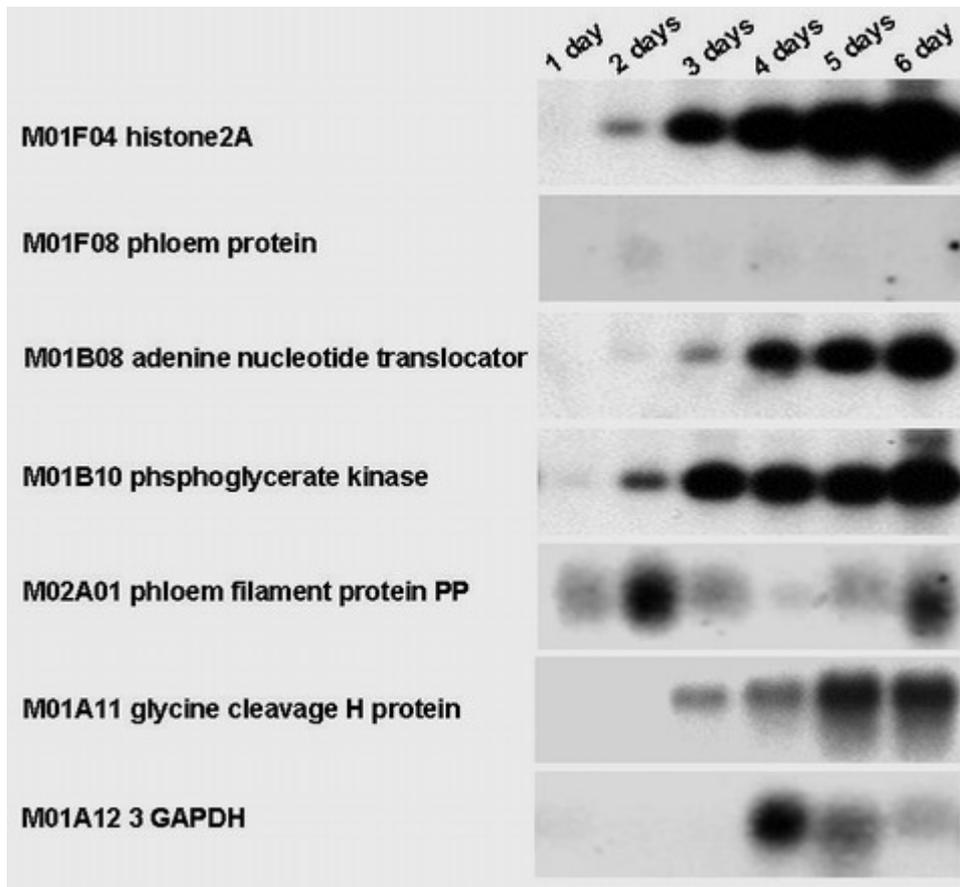


Fig. 3.34. GFP probe Northern analysis of gene silencing followed by TMV-GFP infection.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구과제의 목표인 “오이 기능성 유전체 연구를 통한 DNA-chip 제작 및 저항성 육종소재의 개발”을 달성하기 위하여 3개년 동안 연구내용을 크게 3부분으로 나누어 추진하였다. 즉, 오이 ESTs 구축을 통한 저항성 유전체 분석, 박과식물 감염 바이러스 검정을 위한 cDNA-chip 제작 및 식물과의 상호작용 이해, 바이러스 저항성 오이 육종소재 개발의 분야로 축약할 수 있으며, 각 세부과제의 결과들을 서로 유기적으로 공유하여 연구의 효율성을 높이고자 하였다.

오이 ESTs 구축을 통한 저항성 유전체 분석 분야는 국내외에서 거의 연구된 바 없는 오이 유전체 에 대한 이해와 분석 연구를 위하여 cDNA library를 제작하였고, 특히 국내에서 박과식물을 기주로 하며 생산량과 품질을 저하시키는 박과식물 감염성 바이러스들과 오이 유전체의 상호작용을 연구하기 위하여 이에 대한 연구에 집중하였다. 특히, 박과식물 감염성 바이러스 중의 하나이며, 국내에서 첫 발견되고, 국제적으로 새로이 명명된 ZGMMV (Zucchini Green Mottel Mosaic Virus)에 의하여 유도되는 다양한 cDNA library를 제조하고 이를 이용한 ESTs를 구축하였다. 염기서열 분석이 끝난 후, 분석한 결과를 보면 기존에 알려져 있지 않았던 다양한 종류의 유전자들이 확인되어 오이를 비롯한 관련 박과식물 유전자 자원 확보에 큰 역할을 할 수 있었다. 이 자료는 향후 오이 유전체 연구에 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 생각되며, 본 연구과제에서는 이를 이용한 cDNA-chip을 제작할 수 있는 토대가 되었다. 본 과제에서 구축한 ESTs는 본 연구과제의 일회성 보고로 끝나지 않고, 자체 Web-DB를 구축하여 연구자들에게 다양한 자료를 제공할 수 있는 시스템을 마련하였다 (<http://www.cgrc.wo.t>o). 이 결과는 향후 박과식물 및 바이러스 연구자들의 연구자들에게 많은 기여를 할 수 있을 것으로 기대된다.

또 다른 연구과제 분야로 바이러스의 진단방법 개선을 위한 연구를 수행하였다. 기존의 바이러스 진단법은 표준식물 검정법, 항체이용 진단법, RT-PCR법 등으로 요약될 수 있으며, 최근에는 real-time PCR을 이용한 정량적 진단법이 추가로 사용되고 있다. 이들 바이러스 진단법은 한번 반응에 몇 가지 바이러스를 진단하며, mutiplex PCR을 이용한 검정에서도 해석이 어려운 경우가 많았다. 이런 문제를 극복하고자 본 연구과제에서는 바이러스 cDNA를 심어놓은 chip을 개발하여 한번의 실험수행으로 박과식물 감염성 바이러스 대부분을 구별하고자 박과식물 감염성 바이러스 특이적 검정을 위한

cDNA-chip을 개발하였다. 개발된 cDNA-chip은 기존에 박과식물에서 보고된 ZGMMV, CGMMV, KGMMV, CFMMV 등을 확연히 구별할 수 있었으며, 바이러스간의 유전적 유사성까지 나타내고 있었다. 완성한 cDNA-chip 시험결과는 바이러스 검정 연구분야에서 국제적으로 처음 확보된 연구결과로 SCI 논문에 출판되었다 (Lee et al., 2003). 이 결과를 바탕으로, 박과식물 바이러스 검정용 chip의 상용화를 위하여 각 바이러스가 보유하고 있는 특이적 염기서열을 분석하고 이를 토대로 oligomer를 제조하고 슬라이드 글라스에 printing하여 oligo-chip을 제작후 시험하였다. 제작된 oligo-chip은 각 바이러스를 확연하게 구분할 수 있었으며, 향후 박과식물 바이러스 외에도 타 식물바이러스 검정용으로 확대 연구를 수행할 수 있을 것으로 기대하고 있다. 이 결과는 농산물 방역 검사 등에 기여할 수 있는 제품으로 기대하고 있다.

오이를 포함한 박과식물들은 최근 바이러스에 의한 감염이 큰 문제로 제기되고 있는데, 이 문제를 해결하기 위해서는 바이러스 감염시 식물-바이러스 간의 상호작용 이해가 필수적이다. 본 연구과제에서는 또 다른 시도로 오이에서 ZGMMV의 감염시 특이 발현하는 유전자를 선별 확보하고자 하였고, 다양한 유전자를 클로닝할 수 있었다. 이들 유전자를 cDNA-chip에 포함시켜 microarray를 통한 분석에 이용하였고, in planta assay의 재료 유전자로도 사용하였다.

Microarray를 이용한 식물-바이러스 상호작용 연구 부문에서는 우선 모델 식물인 Arabidopsis의 cDNA-chip 이용하여 박과감염성 바이러스 중의 하나인 CMV와 식물과의 상호작용을 profiling하였다. 저항성 ecotype인 C24와 감수성인 ecotype인 Columbia를 이용하여 microarray를 수행하였다. 접종 후 초기 3시간이내의 반응 결과를 통하여 CMV의 감염은 비생물학적 스트레스와 상당히 유사하지만, 저항성 C24에서 바이러스 특이적인 유전자의 발현이 있음을 확인하였다.

Arabidopsis의 결과를 토대로 오이 cDNA-chip을 이용한 유전자 탐색을 시도하였다. 오이 cDNA-chip의 제조를 위하여 다양한 실험을 통하여 cDNA-chip 제조 및 hybridization 기법의 최적화를 수행하였고, 확보한 오이 특이적 ESTs를 이용하여 목표한 1.2K 수준의 cDNA-chip을 제조하였다. 제조한 cDNA-chip을 이용하여 ZGMMV (tobamovirus 그룹) 및 CMV (cucumovirus 그룹) 에 접종된 오이에서 6, 12, 24, 48, 72 시간후 발현되는 mRNA를 profiling하였다. 그 결과 기존 연구에서는 볼 수 없었던 식물-바이러스 간의 상호작용 profile을 확보할 수 있었으며 시간별 및 바이러스 종류별 유전자 발현의 clustering을 통하여 심도있는 이해를 얻게 되었다. 이 microarray 결과도 Web-DB에 등록하였고, 자체 확보한 오이 유전자 DB와 다이나믹하게 연결하여 이 분

야 연구자들의 연구자료로서 쉽게 이용될 수 있도록 기여하였다.

확보된 오이 ESTs 및 microarray 데이터는 인터넷으로 쉽게 이용할 수 있도록 하기 위하여 앞서 언급한 대로 목표한 DB 구축을 달성하였는데, 중점을 두었던 부분은 확보한 유전자의 원활한 검색과 microarray 결과와의 유기적인 결합이었다. 사용한 DB는 oracle 10g 였으며, JAVA2 언어를 사용할 수 있도록 하여 대부분 JSP를 사용하여 Web application을 구현하였다. 구축된 DB는 국제적으로 오이에서는 처음으로 개발된 시스템이라 할 수 있으며, 이 분야의 유전자 탐색에 중요한 역할을 수행할 수 있으리라 기대된다 (<http://www.cgrc.wo.to>).

식물-바이러스의 상호작용 연구는 바이러스 자체에 대한 이해가 필수적인 요소이므로, 본 과제에서는 박과식물 감염성 바이러스 각각에 대한 전체 genome을 확보하고 클로닝하였으며, 시험관 내에서 바이러스를 재생산할 수 있는 시스템인 in vitro transcription system을 확립하였다. 더 나아가 이들 바이러스의 돌연변이체 (mutant)를 만들어서 식물-바이러스 간의 상호작용을 연구하였는데, 접종 결과로 오이에서 다양한 병징을 확인할 수 있었다. 또한, 바이러스는 최근 들어 원하는 유전자의 식물체내 발현에 이용될 수 있는 viral vector 시스템으로 많이 이용되는데, 본 연구과제에서도 ZGMMV를 이용하여 모델 단백질인 GFP의 발현 시스템을 확립하였다. 이 결과는 기존 viral vector 시스템이 대부분 담배 등의 가지과 식물에 한정되었던 것을 극복한 새로운 시스템의 확립이라 할 수 있으며, 앞으로 박과식물을 대상으로 유전자 발현 및 기능 검정, 그리고 박과식물에서의 단백질 발현에 획기적인 발전을 가져올 수 있는 기틀을 마련하였다고 할 수 있다.

오이의 저항성 육종소재 개발 분야에서는 오이 감염성 바이러스인 ZGMMV에 대한 저항성 분자육종에 중점을 두어 수행하였다. ZGMMV의 외피 단백질을 식물 발현용 벡터에 삽입한 후 담배에서 일차 검정하였고, 이 벡터를 다시 오이에 형질전환시켜 ZGMMV 저항성 오이를 육성하고자 하였다. 이 과정에서 현실적으로 매우 어려운 오이 형질전환 방법을 최적화하고자 다양한 연구를 수행하여 Agrobacterium을 매개로 한 기관형성 방법 및 체세포배형성 방법을 통한 오이 형질전환 방법에 대한 연구를 다각도로 탐색하였다. 최종적으로 현재 오이 형질전환체 T1 세대를 육성하고 있으며, 이 육종소재는 오이 내병성 육종에 기여할 수 있으리라 기대된다. 오이 형질전환은 다른 원예작물과 비슷하게 현재로도 형질전환율이 매우 낮고, 형질전환체를 완성하는데 장기간이 소요되어 과제에서 목표로 제안하였던 형질전환체를 이용한 오이 특이 유전자의 발현 및 확인은 어려웠다. 이에 따라 확보한 오이 유전자의 식물체내 기능

확인을 위하여 기존에 보고된 바 있는 VIGS (virus inducing gene silencing)의 시스템을 이용하여 상응하는 유전자 발현을 억제시키고, 감염성 TMV-GFP를 접종하여 TMV의 감염, 이동 및 병징을 가시적으로 확인하였다. 시도한 유전자의 silencing 결과중 오이에서 확보한 phloem protein의 경우, TMV의 감염이 이루어지지 않아 TMV의 감염성에 지대한 영향을 미치는 것으로 판단되었고, phloem filament protein의 경우는 TMV 이동이 억제되었으며, glycine cleavage system H protein의 경우는 TMV 감염시 상위 엽의 chlorosis를 유발하는 특징적인 변화가 관찰 되었다. 이 시스템의 장점은 단기간에 효율적으로 확보한 유전자의 기능을 효과적으로 관찰하는 것이 가능한 점이었고, 형질 전환체는 아니었지만 본 과제의 목적에 부합하는 연구성과를 달성하는 결과를 얻었다.

세부분으로 구성된 본 연구과제를 통하여 오이 유전체의 기능에 대한 이해를 넓혔고, 바이러스 진단용 cDNA-chip 및 oligo-chip을 개발하였으며, 바이러스 저항성 육종 소재를 개발하였다. 따라서, 재배면적이 매우 넓고 주요 채소로 이용되고 있는 오이의 유전적 연구의 폭을 넓힐 수 있는 계기가 되었으며, 본 과제의 결과는 앞으로 저항성 기작 및 식물에서의 바이러스병 신호전달체계에 대한 심도있는 연구의 뒷받침이 될 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구과제의 결과는 오이 감염성 바이러스와의 상호작용, 바이러스 진단용 chip의 개발, 오이 유전자의 기능연구, 바이러스 저항성 육종소재를 준비하는데 직접적인 도움을 줄 수 있을 것으로 기대한다.

1. 오이 ESTs 및 microarray 데이터의 Web-DB화

오이 유전자의 기능을 연구하기 위해서는 관심있는 유전자에 대한 염기서열, 기존 DB에서의 Blast 결과, full length를 확보하기 위한 cDNA-library, 그리고 식물 내에서 특정 조건에서의 발현정도에 대한 결과를 확보하여야 하는데, 본 과제에서 수행한 결과의 Web-DB를 이용하여 이 분야의 연구에 충분히 활용할 수 있을 것으로 생각된다. 본 과제에서는 ESTs blast 결과 및 바이러스 감염시 오이에서의 microarray 결과를 DB화 하였고, 공시한 유전자의 ESTs 클론을 저장하고 있어 연구자들에게의 분양이 가능하게 하였다. 따라서, 바이러스 연구자 혹은 타 박과식물 연구자의 활용이 원활할 것이며, 앞으로 이 분야 연구의 결과가 지속적으로 DB화 되어지면 더 많은 유전자 및 유전자 기능이 제공될 수 있을 것이다.

2. 박과식물 감염성 바이러스 진단용 chip의 개발

종자의 건열소독 외에 별달리 크게 방제법이 없는 박과식물 바이러스 병의 경우, 신속한 바이러스의 감염 여부 검정은 방제에 큰 역할을 하고 있다. 따라서, 본 과제에서 개발하고 확립한 바이러스 진단용 cDNA-chip 및 oligo-chip은 바이러스 검정 분야에 적극적으로 활용될 수 있는 결과로 판단되며, 현장에서도 모르고 있던 여러 가지 바이러스의 감염을 신속하고 정확하게 판단할 수 있는 시스템으로 활용이 가능할 것이다.

3. 저항성 오이 육종소재의 개발

ZGMMV의 저항성 육종소재를 개발하면서 시도했던 형질전환 최적화 수행결과들은 앞으로 오이 형질전환을 계획하는 많은 연구자들에게 직접적인 도움이 될 것이며, 개발된 T1세대의 오이 형질전환체는 육종소재로서 활용될 수 있을 것이다.

제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구개발 과정을 통하여 오이 및 오이 감염성 바이러스에 대한 해외의 과학기술 정보를 수집하였다.

오이의 육종적 연구는 국내에서 보다는 국외에서 활발히 이루어지고 있는데, 국제적으로는 Cucurbit Genetics Cooperative (<http://www.umresearch.umd.edu/CGC/>)에서 매년 박과식물의 육종에 대하여 국제 심포지움을 주관하고 있다. 이 협회에서는 오이 유전자 지도 및 marker 들에 대한 내용도 실고 있으며, 자체적인 논문발표를 수록하고 있어 세계적인 박과식물 육종가들의 연구들을 포괄하고 있다. 또한, 유전분석 내용을 토대로 박과식물 유전자의 명명법 및 유전자 리스트를 제공하여 육종에 필요한 연구교류를 활성화 시키고 있다.

North Carolina State University의 원예과학과에서는 Cucurbit Breeding 이란 제목아래 1957년부터 유전자원 (germplasm)을 분양하고 있다. 여기에는 왜성종, 피클용 오이 등 다양한 원종 및 교배종이 포함되며, 오이의 경우 매년 자체 포장에서의 시험결과 즉, 다양한 유전형질의 유전분석 및 표현형 자료들을 보고하고 있다. 타 박과식물의 육종 현황 및 자료들도 배포한다. 미국의 USDA 산하 ARS 중 Pacific West Area (pwa.ars.usda.gov)에서는 1984년부터 The Cucurbit Crop Germplasm Committee (CCGC)를 구성하여 박과식물 유전자원의 수집, 유지, 평가 등을 진행하고 있다. 이 협회에서는 종묘기업, 대학, 그리고 USDA-ARS의 연구자들을 포괄하여 현재 박과식물의 육종, 내병 및 내충성 연구에 필요한 유전자원을 지원하며 결과를 공유하고 있다. 또한 4년에 한번씩 미국 내의 박과식물 관련 컨퍼런스도 개최하여 관련 학회 (원예학회, 병리학회, 또는 곤충학회)의 활동도 지원하고 있다.

한편, 국내의 경우는 박과식물 자체에 대한 학회활동 및 연구교류는 거의 없는 실정이지만, 본 과제를 통하여 오이 유전자 자원의 확보 및 유전자 기능 연구를 토대로 많은 교류가 활성화 되기를 기대하고 있다.

바이러스 검정용 cDNA-chip 관련 분야는 식물 바이러스의 경우, 본 연구과제의 보고가 국제적으로 처음 발표된 것이었는데, 최근 학술지에는 oligo-chip을 이용한 타 식물들에서의 바이러스 검정이 추가로 속속 발표되고 있다. 따라서, 식물 바이러스 검정용 oligo-chip의 개발로 제품화 시켜 국가기관 등에서 사용할 수 있는 방안이 필요하다고 여겨진다.

제 7 장 참고문헌

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.
- Antignus, Y., Wang, Y., Pearlsman, M., Lachman, O., Lavi, N., Gal-On, A. 2001. Biological and molecular characterization of a new cucurbit-infecting *Tobamovirus*. *Phytopathology* 91: 565-571.
- Bailey-Serres, J., Vangala, S., Szick, K., Lee, C.H.K. 1997. Acidic phosphoprotein complex of the 60s ribosomal subunit of maize seedling roots (components and changes in response to flooding). *Plant Physiol.* 114(4):1293-1305.
- Barath, P., Albert-Fournier, B., Luciakova, K., Nelson, B.D. 1999. Characterization of a silencer element and purification of a silencer protein that negatively regulates the human adenine nucleotide translocator 2 promoter. *J. Biol. Chem.* 274(6):3378-3384.
- Burza, W., Malepszy, S. 1995. Direct plant-regeneration from leaf explants in cucumber (*Cucumis Sativus* L.) is free of stable genetic-variation. *Plant Breed.* 114(4):341- 345.
- Cheema, I.R., Hermann, C., Scott, T., Postell, S. 1997. The effect of histone-mRNA interaction in protein synthesis. *Cytobios.* 92(370-371):209-214.
- Choi, G.S. 2001. Occurrence of two Tobamovirus diseases on cucurbits and control measures in Korea. *Plant Pathol. J.* 17:243-248.
- Choi, G.S., Kim, J.H., Chung, B.N., Kim, H.R., Choi, Y.M. 2001. Simultaneous detection of three Tobamoviruses in cucurbits by rapid immunofilter paper assay. *Plant Pathol. J.* 17:106-109.
- Choi, S.K., Choi, J.K., Park, W.M., Ryu, K.H. 1999. RT-PCR detection and identification of three species of cucumoviruses with a genus-specific single pair of primers. *J. Virol. Methods* 83:67-73.
- Clark, A.M., Jacobsen, K.R., Bostwick, D.E., Dannenhoffer, J.M., Skaggs, M.I., Thompson, G.A. 1997. Molecular characterization of a phloem-specific gene encoding the filament protein, phloem protein 1 (PP1), from *Cucurbita maxima*. *Plant J.* 12(1):49-61.
- Colijnhooymans, C.M., Hakkert, J.C., Jansen, J., Custers, J.B.M. 1995. Competence for regeneration of cucumber cotyledons is restricted to specific developmental stages.

- Plant Cell Tissue & Organ Cult. 39(3):211-217.
- Curuk, S., Ananthakrishnan, G., Singer, S., Xia, X.D., Elman, C., Nestel, D., Cetiner, S., Gaba, V. 2003. Regeneration in vitro from the hypocotyl of *Cucumis* species produces almost exclusively diploid shoots, and does not require light. HortScience 38(1):105-109.
- Desvoyes, B., Faure-Rabasse, S., Chen, M.-H., Park, J.-W., Scholthof, H.B. 2002. A novel plant homeodomain protein interacts in a functionally relevant manner with a virus movement protein. Plant Physiol. 129(4):1521-1532.
- Foote, A., Briganti, E.M., Kipen, Y., Santos, L., Leech, M. Morand, E.F. 2004. Macrophage migration inhibitory factor in systemic lupus erythematosus. J. Rheumatol. 31 (2):268-273.
- Gendra, E., Moreno, A., Alba, M.M., Pages, M. 2004. Interaction of the plant glycine-rich RNA-binding protein MA16 with a novel nucleolar DEAD box RNA helicase protein from *Zea mays*. Plant J. 38(6):875-886.
- Gilson, P., Gaspar, Y.M., Oxley, D., Youl, J.J., Bacic, A. 2001. NaAGP4 is an arabinogalactan protein whose expression is suppressed by wounding and fungal infection in *Nicotiana glauca*. Protoplasma 215(1/4):128-139.
- Giraud, S., Bonod-Bidaud, C., Wesolowski-Louvel, M., Stepien, G. 1998. Expression of human ANT2 gene in highly proliferative cells: GRBOX, a new transcriptional element, is involved in the regulation of glycolytic ATP import into mitochondria. J. Mol. Biol. 281(3):409-18.
- Hamberg, M., Sanz, A., Rodriguez, M.J., Calvo, A.P., Castresana, C. 2003. Activation of the Fatty Acid alpha -Dioxygenase Pathway during Bacterial Infection of Tobacco Leaves: Formation of oxylipins protecting against cell death. J. Biol. Chem. 278(51): 51796-51805.
- Handley, L.W., Chambliss, O.L. 1979. In vitro propagation of *Cucumis sativus* L. HortScience 14: 22-23.
- Hemmingsen, S.M., Woolford, C., Vandervies, S.M., Tilly, K., Dennis, D.T., Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W., Ellis, R.J. 1988. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. Nature 333: 330-334.
- Hirano, T., Sato, T., Okawa, K., Kanda, K., Yaegashi, K., Enei, H. 1999. Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Lentinus*

- edodes. *Biosci Biotechnol Biochem.* 63(7):1223-7.
- Hutchins, A.P., Roberts, G.R., Lloyd, C.W., Doonan, J.H. 2004. In vivo interaction between CDKA and eIF4A: a possible mechanism linking translation and cell proliferation. *FEBS Lett.* 556(1-3):91-94.
- J. de la Cruz, Kressler, D., Linder, P. 1999. Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem. Sci.* 24:192 - 198.
- Jacotot, E., Ferri, K.F., El Hamel, C., Brenner, C., Druillennec, S., Hoebeke, J., Rustin, P., Metivier, D., Lenoir, C., Geuskens, M., Vieira, H.L., Loeffler, M., Belzacq, A.S., Briand, J.P., Zamzami, N., Edelman, L., Xie, Z.H., Reed, J.C., Roques, B.P., Kroemer, G. 2001. Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein rR and Bcl-2. *J. Exp. Med.* 193(4):509-519.
- Jakubiec, A., Notaise, J., Tournier, V., Hericourt, F., Block, M.A., Dugeon, G., van Aelst, L., Jupin, I. 2004. Assembly of turnip yellow mosaic virus replication complexes: interaction between the proteinase and polymerase domains of the replication proteins. *J Virol.* 78(15):7945-5797.
- Jeong, M.J., Park, S.C., Kwon, H.B., Byun, M.O. 2000. Isolation and characterization of the gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278(1):192-196.
- Jungehulsing, U. Arntz, C., Smit, R., Tudzynski, P. 1994. The *Claviceps purpurea* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene: cloning, characterization, and use for the improvement of a dominant selection system. *Curr. Genet.* 25(2):101-106.
- Katahira, R., Ashihara, H. 2002. Profiles of pyrimidine biosynthesis, salvage and degradation in disks of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Planta* 215(5):821-828.
- Kim, J.W., Han, S.K. Kwon, S.Y., Lee, H.S., Lim, Y.P., Liu, J.R., Kwak, S.S. 2000. High frequency shoot induction and plant regeneration from cotyledonary hypocotyl explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. *J. Plant Physiol.* 157(1):136-139.
- Kim, S.G., Chang, J.R., Cha, H.C., Lee, K.W. 1988. Callus growth and plant regeneration in diverse cultivars of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Tissue & Organ Cult.* 12-67-74.
- Kim, S.G., Jang, J.R. 1984. Regeneration of plants from callus tissue of cucumber

- (*Cucumis sativus* L.) seedling cotyledons. *Plant Physiol.* 75:15.
- Kong, L.J., Hanley-Bowdoin, L. 2002. A geminivirus replication protein interacts with a protein kinase and a motor protein that display different expression patterns during plant development and infection. *Plant Cell.* 14(8):1817-1832.
- Kreiah, S., Strunk, G., Cooper, J.I. Sequence analysis and location of capsid proteins within RNA 2 of strawberry latent ringspot virus. *J. Gen. Virol.* 75(9):2527-2532.
- Kuo, C.Y., Chou, S.Y., Huang, C.T. 2004. Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and use of the *gpd* promoter for transformation in *Flammulina velutipes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004 May 27 [Epub ahead of print].
- Ladygina, M.E., Sokolovskaia, I.V., Rubin, B.A., Grot, A.V. 1978. Comparative study of the antiviral properties of histones of animal and plant origin. *Vopr Virusol.* 6:686-690.
- Langland, J.O., Jin, S., Jacobs, B.L., Roth, D.A. 1995. Identification of a plant-encoded analog of PKR, the mammalian double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Plant Physiol.* 108(3):1259-67.
- Lazarte, J.E., Sasser, C.C. 1982. Asexual embryogenesis and plantlet development in anther culture of *Cucumis sativus* L. Cucumber, regeneration, tissue culture. *HortScience* 17(1):88.
- Lee, G.P. et al. 2003. Plant virus cDNA chip hybridization for detection and differentiation of four cucurbit-infecting Tobamoviruses. *J. Virol. Methods* 110:19-24.
- Lee, Y.-T., Duggleby, R.G. 2002. Regulatory interactions in *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase. *FEBS Lett.* 512(1-3):180-184.
- Lepiniec, L., Hodges, M., Gadal, P., Cretin, C. 1992. Isolation, characterization and nucleotide sequence of a full-length pea cDNA encoding thioredoxin-f. *Plant Mol. Biol.* 18 (5):1023-1025.
- Levy-rimler, G., Bell, R.E., Ben-tal, N., Azem, A. 2002. Type I chaperonins: not all are created equal. *FEBS Lett.* 529:1-5.
- Linder, P., Lasko, P.F., Ashburner, M., Leroy, P., Nielsen, P.J., Nishi, K., Schnier, J., Slonimski P.P. 1989. Birth of the D-E-A-D box. *Nature* 337:121 - 122.
- Mamiya, N., Worman, H.J. 1999. Hepatitis C virus core protein binds to a DEAD box RNA helicase. *J Biol Chem.* 274(22):15751-6.

- Manzur, K.L., Farooq, A., Zeng, L., Plotnikova, O., Koch, A.W., Zhou M.M. A dimeric viral SET domain methyltransferase specific to Lys27 of histone H3. *Nat Struct Biol.* 10(3):187-96.
- McGarry, R.C., Barron, Y.D., Carvalho, M.F., Hill, J.E., Gold, D., Cheung, E., Kraus, W.L., Lazarowitz, S.G. 2003. A novel Arabidopsis acetyltransferase interacts with the geminivirus movement protein NSP. *Plant Cell.* 15(7):1605-1618.
- Mikami, K., Sakamoto, A., Takase, H., Tabata, T., Iwabuchi, M. 1989. Wheat nuclear protein HBP-1 binds to the hexameric sequence in the promoter of various plant genes. *Nucleic Acids Res.* 17(23):9707-9717.
- Mohiuddin, A.K.M., Chowdhury, M.K.U., Abdullah, Z.C., Napis, S. 1997. Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber in vitro shoot regeneration. *Plant Cell Tissue & Organ Cult.* 51(1):75-78.
- Mohiuddin, A.K.M., Chowdhury, M.K.U., Abdullah, Z.C., Napis, S. 1997. Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber in vitro shoot regeneration. *Plant cell, tissue and organ culture.* 51(1):75-78.
- Moon, H., Lee, B., Choi, G., Shin, D., Prasad, D.T., Lee, O., Kwak, S.-S., Kim, D.H., Nam, J., Bahk, J., Hong, J.C., Lee, S.Y., Cho, M.J., Lim, C.O., Yun, D.-J. 2002. NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(1):358-363.
- Msikita, W., Skirvin, R.M., Juvik, J.A., Splittstoesser, W.E., Ali, N. 1990. Regeneration and flowering in vitro of 'Burpless Hybrid' cocumber cultured from excised seed. *HortScience* 25(4):474-477.
- Nakamura, T., Muramoto, Y., Yokota, S., Ueda, A., Takabe, T. 2004. Structural and transcriptional characterization of a salt responsive gene encoding putative ATP dependent RNA helicase in barley. *Plant science.* 167(1): 63-70.
- Nakayama, T., Okanami, M., Meshi, T., Iwabuchi, M. 1997. Dissection of the wheat transcription factor HBP-1a(17) reveals a modular structure for the activation domain. *Mol. Gen. Genet.* 253(5):553-561.
- Nishibayashi, S., Kaneko, H., Hayakawa, T. 1996. Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L) plants using *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration from hypocotyl

- explants. *Plant Cell Rep.* 15(11):809-814.
- Orun, O., Koch, M.H., Kan, B., Svergun, D.I., Petoukhov, M.V., Sayers, Z. 2003. Structural characterization of T-protein of the *Escherichia coli* glycine cleavage system by X-ray small angle scattering. *Cell. Mol. Biol.* .Online Pub:OL 453-459.
- Park, H.-S., Himmelbach, A., Browning, K.S., Hohn, T., Ryabova, L.A. 2001. A plant viral "reinitiation" factor interacts with the host translational machinery. *Cell.* 2001. 106(6):723-733.
- Paulsen, I., Seshadri, R., Nelson, K.E., Eisen, J.A., Heidelberg, J.F., Read, T.D., Dodson, R.J., Umayam, L.A., Brinkac, L.M., Beanan, M.J., Daugherty, S.C., Deboy, R., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., Madupu, R., Nelson, W.C., Ayodeji, B., Kraul, M., Shetty, J., Malek, J.A., Van Aken, S.E., Riedmuller, S., Tettelin, H., Gill, S., White, O., Salzberg, S.L., Hoover, D.L., Lindler, L., Halling, S.M., Boyle, S.M., Fraser, C.M. 2002. The *Brucellus suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(2):13148-13153.
- Porosnicu, M., Mian, A., Barber, G.N. 2003. The oncolytic effect of recombinant vesicular stomatitis virus is enhanced by expression of the fusion cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase suicide gene. *Cancer Res.* 63(23):8366-8376.
- Prasad, T.K., Stewart, C.R., 1992. cDNA Clones encoding Arabidopsis thaliana and Zea mays mitochondrial chaperonin HSP60 and gene expression during seed germination and heat-shock. *Plant Mol. Biol.* 18: 873-885.
- Qin, L., Smant, G., Stokkermans, J., Bakker, J., Schots, A., Helder, J. 1998. Cloning of a trans-spliced glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase gene from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* and expression of its putative promoter region in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 96(1-2):59-67.
- Raharjo, S.H.T, Hernandez, M.O., Zhang, Y.Y., Punja, Z.K. 1996. Transformation of pickling cucumber with chitinase-encoding genes using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 15(8):591-596.
- Rajamaki, M.L., Valkonen, J.P. Localization of a potyvirus and the viral genome-linked protein in wild potato leaves at an early stage of systemic infection. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 16(1):25-34.
- Rajasekaran, K., Mullins, M.G., Nair, Y. 1983. Flower formation in vitro by hypocotyl

- explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Ann. Bot. 52:417-420.
- Ridder, R., Osiewacz, H.D. 1992. Sequence analysis of the gene coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gpd) of *Podospora anserina*: use of homologous regulatory sequences to improve transformation efficiency. Curr. Genet. 21(3):207-213.
- Ryu, K.H., Min, B.E., Choi, G.S., Choi, S.H., Kwon, S.B., Noh, G.M., Yoon, J.Y., Choi, Y.M., Jang, S.H., Lee, G.P., Cho, K.H., Park, W.M. 2000. Zucchini green mottle mosaic virus is a new tobamovirus; comparison of its coat protein gene with that of kyuri green mottle mosaic virus. Arch. Virol. 145: 2325-2333.
- Ryu, K.H., Park, H.W., Choi, J.K. 2002. Characterization and sequence analysis of a lily isolate of *Cucumber mosaic virus* from *Lilium tsingtauense*. Plant Pathol. J. 18:85-92.
- Salekdeh, G. H., Siopongco, J., Wade, L.J., Ghareyazie, B., Bennett, J. 2002. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. Proteomics 2(9):1131-1145.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schultheiss, H.P., Schulze, K., Dorner, A. 1996. Significance of the adenine nucleotide translocator in the pathogenesis of viral heart disease. Mol. Cell. Biochem. 163-164:319-27.
- Schulze, J, Balko, C, Zellner, B, Koprek, T, Hansch, R, Nerlich, A, Mendel, R.R. 1995. Biolistic transformation of cucumber using embryogenic suspension cultures: Long-term expression of reporter genes. Plant Sci. 112(2):197-206.
- Schulze, K., Witzendichler, B., Christmann, C., Schultheiss, H.P. 1999. Disturbance of myocardial energy metabolism in experimental virus myocarditis by antibodies against the adenine nucleotide translocator. Cardiovasc Res. 44(1):91-100.
- Sekioka, A.J., Tanaka, J.S. 1981. Differentiation in callus cultures of cucumber (*Cucumis sativus* L.). HortScience 16:451.
- Shimizu, T., Nishihira, J., Watanabe, H., Abe, R., Honda, A., Ishibashi, T. Shimizu, H. 2004. Macrophage migration inhibitory factor is induced by thrombin and factor Xa in endothelial cells. J. Biol. Chem. 279(14):13729-13737.
- Stenbak, C.R., Linial, M.L. 2004. Role of the C terminus of foamy virus Gag in RNA packaging and Pol expression. J Virol. 78(17):9423-3940.

- Sunamura, M., Oonuma, M., Motoi, F., Abe, H., Saitoh, Y., Hoshida, T., Ottomo, S., Horii, A., Matsuno, S. 2002. Gene therapy for pancreatic cancer targeting the genomic alterations of tumor suppressor genes using replication-selective oncolytic adenovirus. *Hum Cell*. 15(3):138-150.
- Suyama, T., Yamada, K., Mori, H., Takeno, K., Yamaki, S. 1999. Cloning cDNAs for genes preferentially expressed during fruit growth in cucumber. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 124:136-139.
- Szentpetery, Z., Kern, A., Liliom, K., Sarkadi, B., Varadi, A., Bakos, E. 2004. The role of the conserved glycines of ABC signature motifs of MRP1 in the communications between the substrate binding site and the catalytic centers. *J Biol Chem*. [Epub ahead of print]
- Tabei, Y., Kitade, S., Nishizawa, Y., Kikuchi, N., Kayano, T., Hibi, T., Akutsu, K. 1998. Transgenic cucumber plants harboring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Cell Rep.* 17(3):159-164.
- Tabei, Y., Nishio, T., Kurihara, K., Kanno, T. 1994. Selection of transformed callus in a liquid-medium and regeneration of transgenic plants in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Breeding Sci.* 44(1):47-51.
- Taler, D., Galperin, M., Benjamin, I., Cohen, Y., Kenigsbuch, D. 2004. Plant eR genes that encode photorespiratory enzymes confer resistance against disease. *Plant Cell* 16(1):172-184.
- Towatari, T., Ide, M., Ohba, K., Chiba, Y., Murakami, M., Shiota, M., Kawachi, M., Yamada, H., Kido, H. 2002. Identification of ectopic anionic trypsin I in rat lungs potentiating pneumotropic virus infectivity and increased enzyme level after virus infection. *Eur J Biochem.* 269(10):2613-2621.
- Van Regenmortel, M.H.V. 1975. Antigenic relationships between strains of tobacco mosaic virus. *Virology* 64:415-420.
- Varma, A., Kwon-Chung, K.J. 1999. Characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene [correction of glyceraldehyde-3-phosphate gene] and the use of its promoter for heterologous expression in *Cryptococcus neoformans*, a human pathogen. *Gene.* 232(2):155-63.
- Vasudevan, A., Selvaraj, N., Ganapathi, A., Kasthuriengan, S., Anbazhagan, V.R.,

- Manickavasagam, M. 2004. Glutamine: a suitable nitrogen source for enhanced shoot multiplication in *Cucumis sativus* L. *Biologia Plantarum* 48(1):125-128.
- Vernet, G. 2002. DNA-chip technology and infectious diseases. *Virus Res.* 82: 65-71.
- Wang, X., Ullah, Z., Grumet, R. 2000. Interaction between zucchini yellow mosaic potyvirus RNA-dependent RNA polymerase and host poly-(A) binding protein. *Virology* 275(2):433-443.
- Watanabe, H., Shimizu, T., Nishihira, J., Abe, R., Nakayama, T., Taniguchi, M., Sabe, H., Ishibashi, T., Shimizu, H. 2004. Ultraviolet A-induced production of matrix metalloproteinase-1 is mediated by macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human dermal fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 279(3):1676-1683.
- Wehner, T.C., Locy, R.D. 1981. In vitro adventitious shoot and root formation of cultivars and lines of *Cucumis sativus* L. *HortScience* 16:759-760.
- Yoon, J.Y., Min, B.E., Choi, J.K., Ryu, K.H. 2002. Genome structure and production of biologically active in vitro transcripts of cucurbits-infecting *Zucchini green mottle mosaic virus*. *Phytopathology* 92:156-163.
- Yoon, J.Y., Min, B.E., Choi, S.H., Ryu, K.H. 2001. Completion of nucleotide sequence and generation of highly infectious transcripts to cucurbits from full-length cDNA clone of *Kyuri green mottle mosaic virus*. *Arch. Virol.* 146: 2085-2096.
- Yoshioka, H., Yamada, N., Doke, N. 1999. cDNA cloning of sesquiterpene cyclase and squalene synthase, and expression of the genes in potato tuber infected with *Phytophthora infestans*. *Plant Cell Physiol.* 40(9):993-998.
- Zitter, T.A., Hopkins, D.L., Thomas, C.E. 1996. Compendium of cucurbit diseases. The American Phytopathological Society, MN, pp.37-45.

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.