

최            중  
연구 보고서

**박과작물에 있어서 환경친화형 형질전환  
생물재해 저항성 신품종 개발**  
**Development of Environment Friendly Transgenic Plants  
Carrying Disease Resistant Gene in *Cucurbitaceae***

연구 기관  
금호생명환경과학연구소  
(단국대학교, 상명대학교)

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서는 “박과작물에 있어서 환경친화형 형질전환 생물재해 저항성 신품종 개발” 과제 (제1세부과제 “식물유래 병저항성 유전자 클로닝”, 제2세부과제 “뿌리 특이적 발현 프로모터 개발”, 제3세부과제 “박과식물의 형질전환 기술 개발”)의 최종보고서로 제출합니다.

2002년 11월 15일

주관연구기관명 : 금호생명환경과학연구소

총괄연구책임자 : 김 영 순

세부연구책임자 : 김 영 순

협동연구기관명 : 단 국 대 학 교

협동연구책임자 : 피 재 호

협동연구기관명 : 상 명 대 학 교

협동연구책임자 : 형 남 인

# 여 백

# 요 약 문

## I. 연구제목

박과작물에 있어서 환경친화형 형질전환 생물재해 저항성 신품종 개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

형질전환식물체에서 병저항성 유전자를 환경친화적 방법으로 발현하기 위하여, 1) 고추에서 병저항성 관련 유전자를 분리하여 분석하였고 2) 환경 친화적인 발현 시스템을 확립하기 위하여, 뿌리 특이적인 프로모터를 분리해서 식물발현시스템을 확립하였다. 3) 모델 식물체에 항균 단백질(defensin)의 유전자를 도입하여 식물병원균에 대한 효과를 분석하였고, 4) 생물 공학적 사용을 위해, 수박과 박에서 형질전환시스템을 확립하였다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

식물병원체에 대한 저항성을 갖는 환경 친화적 형질전환 식물시스템을 개발하기 위하여 3개 세부과제로 연구가 진행되었다. 첫째, 감염 기작을 이해하기 위해 고추와 탄저병균사이의 작용을 관찰하여 불친화적인 붉은색 고추열매에서 감염시 특이적으로 발현되는 저항성 관련유전자를 분리하고 분석하였다. 이중 3개 단백질의 기능을 조사하여, 항균성 단백질인 defensin을 식물 형질전환에 사용하였다. 둘째, *Arabidopsis*에서 두 개의 뿌리 특이적 프로모터를 분리해서, 이중에서 PRP3 프로모터를 식물발현벡터에 삽입하였다. 또한 다른 뿌리 특이적 유전자를 오이에서 대량으로 분리하였다. 셋째, 수박과 박에 목적유전자를 도입하기 위한 형질전환시스템이 확립되었다. 이 연구의 근본원리는, 식용작물로부터 인체에 안전한 병저항성단백질을 분리하여 유용작물에 발현을 유도하는 것이다. 특히, 기관 특이적인 프로모터를 사용해서 필요한 부위에서 단백질이 발현되도록 조절하면, 환경 친화적인 이 형질전환체는 다양한 병원균에 저항성을 보여줄 수 있을 것으로 기대된다.



#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### 가. 연구결과

###### 1) 식물유래 병저항성 유전자 클로닝

녹색 고추열매에 친화성이 있는 탄저병균은 부착기 및 감염군사를 형성해서 식물표피 세포로 침투한다. 곰팡이가 침입한 푸른색 고추열매에서는 병반이 형성되며, 붉은색 고추열매는 저항성으로 건강하게 유지된다. Differential display RT-PCR 방법으로 곰팡이를 접종한 푸른색과 붉은색 고추열매에서 유전자 발현양상을 조사하고, 불친화반응에서 발현이 증대되는 유전자의 cDNA를 분리하였다. 저항성 관련 유전자들은 붉은색 고추열매에서 병에 반응하여 주로 발현되며, aldehyde dehydrogenase, cytochrome P450, thaumatin, defensin, MADS, ascorbate peroxidase 및 catalase 등이 병저항성에 관련된 유전자로 분리되었다. 최종적으로 항균단백질인 defensin을 식물형질전환에 사용하였다. 그리고 형질전환된 *Arabidopsis*와 *Tobacco*에서 *Fusarium*과 *Botrytis*에 대한 저항성을 분석하였다.

###### 2) 뿌리 특이적 프로모터의 클로닝

뿌리에서 특이적으로 발현되는 유전자의 프로모터를 분리하기 위하여, PRP3와 EIR1 유전자의 프로모터를 *Arabidopsis*에서 분리하였다. PRP3 유전자의 프로모터를 GUS 유전자 또는 defensin 유전자와 연결하여 식물 형질전환벡터에 삽입하였다. 그리고 *Arabidopsis*와 담배를 형질전환해서 두 유전자가 뿌리에서 특이적으로 발현되는 것을 확인하였다.

뿌리에서 특이적으로 발현되는 유전자를 분리하기 위하여, 오이의 뿌리와 잎에서 분리한 mRNA를 사용하여 subtractive hybridization을 수행하였다. 그 결과, 분리된 147 클론들의 염기서열을 분석하여, 12 contig가 알려진 유전자와 일치하는 것을 확인하였다.

###### 3) 박과작물의 형질전환 기술 개발

신초 유도배지에서, 수박은 70%, 참박은 90%의 신초 재생율을 보였으며, 뿌리가 유도된 소식물체는 성공적으로 순화시킬 수 있었다. *Agrobacterium*를 이용한 형질전환의 적정조건을 찾기 위해서, 수박과 박을 형질전환한 다음에 GUS 조직화

학적 분석을 실시하였다. 형질전환에서는, *Agrobacterium*의 농도와 접종 온도 및 시간 그리고 acetosyringone의 첨가 등이 중요하게 작용하는 것으로 나타났다. 그러나 대부분의 형질전환체는 재생배지에서 갈변되어서 죽게된다. 최종적으로 내병성 유전자인 defensin 유전자를 도입하기 위해서 *Agrobacterium*으로 형질전환을 실시하였는데, 수박에서는 뿌리특이발현 프로모터 PRP3 그리고 참박에서는 전신발현 프로모터인 CaMV35S를 사용하였다.

#### 나. 활용에 대한 건의

고추 탄저병에 대한 연구로부터, 식물체의 병 감염과 방어 기작을 규명하는 과정에서 방어 기작에 중요한 식물유전자들을 분리할 수 있었다. 이 결과는 자연계에 존재하는 식물 방어계를 생명 공학적으로 유용작물에 도입하거나 또는 방어유전자들을 직접 과다발현 시켜서 병저항성을 증진시키는 목적으로 사용될 수 있다. 이들 유전자는 자체 개발된 자원으로 국내 및 국제특허를 출원하여 국산 기술로 보호되고 있으며, 관련된 유전자들은 박과 작물에 도입하여 병저항성 품종을 계속적으로 개발할 계획이다.

알레르기 등의 부작용을 유발하는 미생물에서 유래된 단백질에 비하여 식용열매인 고추로부터 분리된 병저항성 관련 유전자들은 식용작물에서 안전하게 사용할 수 있다. 또한, 토양병을 효과적으로 방제하고 유전자 변형 작물의 피해를 줄이기 위하여, 형질전환체의 뿌리에서만 방어유전자가 발현되도록 개발한 시스템은 다른 작물에서도 효과적으로 적용할 수 있다.

# SUMMARY

## I. Title of the Study

Development of environment friendly transgenic plants carrying disease resistant gene in *Cucurbitaceae*

## II. Objectives and Significance of the Study

The aim of this project is the development of expression strategy for disease resistant genes in the transgenic plants. For this purpose, 1) we have cloned and characterized resistant related genes and a transcription factor from an edible plant, pepper. 2) To provide the expression system in environment friendly manner, a root specific promoter was employed to restrict the expression of the resistant gene in the roots, which are very susceptible to various pathogens. 3) We have applied the gene of an antifungal protein (defensin) to model plants to elucidate the effects against phytopathogenic microorganisms. 4) For biotechnological usage, transformation system was established to develop transgenic plants carrying the antifungal protein in watermelon and bottle gourd.

## III. The Scope of the Study

Three different projects were proceeded to develop environment friendly transgenic plants which are resistant to phytopathogens. First, the interactions between pepper and anthracnose disease were observed to understand the infection mechanism. Since *C. gloeosporioides* showed incompatible interactions with the ripe pepper fruits, we have cloned and characterized resistant related genes involved specifically in the incompatible interactions of the ripe pepper fruits. Several genes were further characterized to confirm the effects on the phytopatogens and finally an antifungal protein, defensin, was used to transform plants. Second, two root specific promoters were cloned in *Arabidopsis*. A

promoter was inserted in plant expression vector to drive the target gene in transgenic plants. In addition, other root specific genes were massively screened from cucumber. Third, transformation systems were established in watermelon and bottle gourd to introduce the target genes in the plant, ultimately. The rationale of this research was the identification of safe proteins from edible plant to overexpress in the valuable crops. The expression of the gene could be regulated precisely using organ specific promoter, when/where the protection needs. In this way, the transgenic plants will be safe to the environment and especially consumers

#### IV. Results and Further Application

##### 1. Results

###### 1) Isolation of disease resistant genes form pepper

*C. gloeosporioides* produced the compatible interactions with unripe pepper fruits through high levels of appressoria and infection hypha formations. The fungal invasion and colonization continued to the epidermal cells of unripe fruits, but not to those of the ripe fruits. Dfferential display RT-PCR was applied to identify the differential gene expression in both compatible and incompatible interactions from ripe and unripe fruits with the fungus. cDNA fragments were isolated representing pepper genes whose expression was enhanced in incompatible interactions. RNA gel blots analysis with these fragments showed that the transcripts of the clones are induced highly in the ripe fruits. Sequence analysis and database searches with these clones revealed that some of clones showed significant homology to known sequences, such as aldehyde dehydrogenase, cytochrome P450, thaumatin, defensin, MADS, ascorbate peroxidase, and catalase. Three genes were further characterized to elucidate the function of the proteins and then, defensin was finally chosen to introduce into plants. *Arabidopsis* and Tobacco were transformed with defensin and then analyzed for the resistance to *Fusarium* and *Botrytis*

## 2) Cloning of root specific promoter

A root system is considered as a candidate of a main target organ for transgenes, since transgenic plants may pose public concerns about possible secondary contamination of unacceptable transgenes through pollination or disposal of metabolites. In addition, in the case of grafting plants (such as water melon) transgenic basal roots can be grafted into wild type shoots.

In order to isolate the 5' flanking regions including promoter regions of root-specifically expressed genes, genomic fragments corresponding to PRP3 and EIR1 cDNAs were amplified by PCR genome walking in *Arabidopsis*. The promoter region of the PRP3 gene was fused with the GUS reporter gene or defensin gene. Then, its expression profiles were analyzed in the transgenic *Arabidopsis* and tobacco plants to confirm the root-specific expression.

In order to isolate root-specifically expressed genes, mRNAs isolated from roots and shoots of cucumber were subjected for subtractive hybridization. 147 clones were subjected to nucleotide sequencing and 12 contigs were identified to have homology with known genes.

## 3) Establishment of transformation methods for watermelon and bottle gourd

This experiments were conducted to establish the efficient systems for plant regeneration and transformation. On the optimized shoot induction medium, the shoots were regenerated upto 70% and 90% in watermelon and bottle gourd, respectively. After the plant rooted, the plantlets were successfully acclimated.

To find optimal condition for transformation, *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 harboring pCAMBIA2301, which is containing intron GUS gene, was used. And after transformation, GUS activity was assayed in the explants with histochemical method. For the optimal transformation of watermelon, explants should be inoculated with *Agrobacterium* suspension (OD value = 0.5) at 25°C for 10 min. and cocultivated for 3 days on shoot regeneration medium with 50  $\mu$  M acetosyringone (AS). In case of bottle gourd transformation, the optimal GUS expression was obtained with the explants which inoculated with bacteria suspension (OD value = 0.8) at 25°C for 10 min. and cocultivated for 3 days on shoot regeneration medium with 50  $\mu$  M acetosyringone (AS). Transformation

with *Agrobacterium* LBA4404 harboring pBI121 or pCAMBIA2301, produced 3.0% and 4.0% of shoot regeneration in watermelon and bottle gourd, respectively. Almost all of the regenerated shoots, however, turned white or brown color and then died when they were cultured on selection medium. We assumed that they were chimeral plants. For the regeneration of true transgenic plants, the selection pressure should be elevated. Finally, the transformation of explants was conducted with *Agrobacterium* containing the antifungal gene, defensin, with a root specific promoter (PRP3) for watermelon and a constitutive promoter (CaMV35S) for bottle gourd.

## 2. Further Application

Several disease resistant genes were identified through the observation of reactions in pepper fruits infected with anthracnose disease. Since the defense system were clarified in the ripe pepper fruit, the results can be used to activate the system in the useful crops by genetic engineering. In another way, the resistant genes can be simply overexpressed in the plant to enhance the resistance to phytopathogen. We will continually effort for the establishment of the disease-resistant water melon and bottle gourd lines.

# CONTENTS

Preface .....	1
Summary (in Korea) .....	3
Summary .....	6
Contents .....	10
Contents (in Korea) .....	12
Chapter 1. Introduction .....	15
Section 1. Objective and significance of the study .....	15
Section 2. Goals and scope of the study .....	16
Chapter 2. Current Status of Technique Development .....	19
Section 1. Developmental status in other countries .....	19
Section 2. Developmental status in Korea .....	20
Section 3. Contribution of this project to technique development .....	20
Chapter 3. Identification and characterization of disease-resistant genes .....	23
Section 1. Infection mechanism of anthracnose disease .....	23
Section 2. Cloning of disease resistant genes .....	26
Section 3. Characterization of resistant genes .....	31
Chapter 4. A Cytochrome P450 Gene Is Differentially Expressed in Compatible and Incompatible Interactions Between Pepper ( <i>Capsicum annuum</i> ) and the Anthracnose Fungus, <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	43
I. Abstract .....	43
II. Introduction .....	44
III. Materials and Methods .....	45
IV. Results .....	48
V. Discussion .....	56
VI. References .....	60
Chapter 5. A thaumatin-like gene in nonclimacteric pepper fruits used as molecular marker in probing disease resistance, ripening, and sugar accumulation .....	65
I. Abstract .....	65
II. Introduction .....	66

III. Materials and methods .....	67
IV. Results .....	70
V. Discussion .....	82
VI. References .....	85
Chapter 6. Development of root specific expression system .....	89
Section 1. Introduction .....	89
Section 2. Materials and methods .....	92
Section 3. Results and Discussion .....	100
Chapter 7. Establishment of disease resistant transgenic plant .....	121
Section 1. Introduction .....	121
Section 2. Materials and methods .....	121
Section 3. Results and Discussion .....	124
Chapter 8. Establishment of transformation techniques in <i>Cucurbitaceae</i> .....	133
Section 1. Introduction .....	133
Section 2. Establishment of shoot regeneration method .....	135
Section 3. <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation .....	150



# 목 차

제출문 .....	1
요약문 .....	3
SUMMARY .....	6
CONTENTS .....	10
목차 .....	12
제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	15
제 1 절 연구의 필요성 .....	15
제 2 절 연구개발의 목표 및 내용 .....	16
제 2 장 국내외 기술 개발 현황 .....	19
제 1 절 국외 관련기술의 현황 .....	19
제 2 절 국내 기술 개발현황 .....	20
제 3 절 현 기술의 의의 .....	20
제 3 장 병저항성 특이적 유전자의 분리 .....	23
제 1 절 탄저병의 감염 기작 .....	23
제 2 절 식물유래 병저항성 유전자의 클로닝 .....	26
제 3 절 저항성 관련 유전자의 분석 .....	31
제 4 장 A Cytochrome P450 Gene Is Differentially Expressed in Compatible and Incompatible Interactions Between Pepper ( <i>Capsicum annuum</i> ) and the Anthracnose Fungus, <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	43
I. Abstract .....	43
II. Introduction .....	44
III. Materials and Methods .....	45
IV. Results .....	48
V. Discussion .....	56
VI. References .....	60
제 5장 A thaumatin-like gene in nonclimacteric pepper fruits used as molecular marker in probing disease resistance, ripening, and sugar accumulation .....	65
I. Abstract .....	65
II. Introduction .....	66

III. Materials and methods .....	67
IV. Results .....	70
V. Discussion .....	82
VI. References .....	85
제 6 장 뿌리 특이적 발현 프로모터 개발 .....	89
제 1 절 서론 .....	89
제 2 절 실험재료 및 방법 .....	92
제 3 절 연구결과 및 고찰 .....	100
제 7 장 생물재해 저항성 형질전환 식물체 .....	121
제 1 절 서론 .....	121
제 2 절 연구방법 .....	121
제 3 절 연구결과 및 고찰 .....	124
제 8 장 박과작물의 형질전환 기술개발 및 형질전환식물체 안정성 검정 .....	133
제 1 절 서론 .....	133
제 2 절 박과작물의 식물체 재생 기술 확립 .....	135
제 3 절 박과작물의 <i>Agrobacterium</i> 매개 형질전환 .....	150

여 백

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구의 필요성

진균, 세균, 바이러스, 마이코플라즈마, 선충 등에 의해 야기되는 식물병은 농업 생산과 식량공급에 커다란 손실을 야기해왔다. 이들 중에서 병원진균에 의한 피해는 나머지 병 발생요인을 합친 것 보다 큰 것으로 나타나고 있다. 이러한 병원진균에 대한 방제는 주로 살균제를 처리하는 방법으로 시행되고 있으나, 그 결과 경제적 부담과 심각한 환경오염 문제를 야기하고 있다. 또한 대부분의 치명적인 병원진균은 토양성으로 방제가 매우 어렵다. 이에 식물병 방제를 위한 효과적인 방법의 개발이 절실히 요구되고 있다.

식물은 식물병원균으로부터 자신을 보호하기 위한 고유의 방어 기작을 가지고 있다. 최근에는 이에 대한 연구가 활발하게 진행되어서, 식물의 방어 기작에 관련된 병저항성 유전자, 과민반응(hypersensitive reaction: HR) 관련 유전자, pathogenesis-related(PR) 유전자, phenylpropanoid pathway 관련 유전자 등이 보고되고 있다. 그러나 병저항성 유전자를 제외한 대부분의 유전자들은 저항성 반응과 감수성 반응에서, 정도의 차이는 있으나 모두 발현되며 식물의 정상적인 대사 과정에서도 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 식물과 병원체 사이의 불친화적 상호작용(병저항성 반응)에서 특이적으로 발현되어 작용하는 유전자를 작물에 도입하는 방법으로 새로운 병저항성 작물을 개발할 수 있다.

병저항성 반응에서만 특이적으로 발현하는 방어 유전자를 분리하기 위해서는 저항성과 감수성이 분명하게 구분되는 식물과 병원균의 상호작용 시스템이 필요하다. 최근 후대 계승을 위해서 중요한 열매의 경우, 병에 저항할 수 있는 보호 기능이 특히 발달되어 있다고 보고되고 있다. 예로써 PR 유전자와 antifungal protein 등이 과일이 익을 때 높게 발현되며 생식기관인 꽃에서도 기관형성 과정 동안 다양한 PR 유전자들의 발현이 보고되었다. 그러나 이들 유전자의 기능에 관한 연구는 미진한 실정이다. 따라서 새로운 저항성 형질을 가진 작물을 개발하기 위해서는 식물병 방어 기작에서 특이적으로 발현되는 유전자를 분리하고 그 기능을 확인하는 연구가 필수적이다.

토양 전염병은 공기전염 병해에 비하여 심각한 수확량 감소를 초래하고 있다. 이는 식물의 뿌리 부분을 가해하는 식물병원균은 지상부에 비하여 농약에 의한 방제가 훨씬 어려운 데에 기인한다. 또한 농약의 과다사용은 농가의 경제적 부담은 물론 심각한 토양 오염을 유발하고 있다. 따라서 지하부의 식물병 방제를 위하여 식물 유래의 방어 유전자를 뿌리에 발현시키는 형질전환체를 개발하고 지상부의 식

물병 방제를 위해서는 농약의 사용량을 최소화할 수 있는 종합적인 방제관리가 필요하다. 그러나 현재 개발 중인 대부분의 형질전환 작물에서는 도입된 유전자가 식물의 전체 조직에서 발현되기 때문에 발현율이 저조하고 동시에 소비자들은 유전자 조작 식물을 외면하고 있는 실정이다. 이와 같은 문제를 극복하기 위한 일환으로 비식용 부위에서 유전자를 특이적으로 발현시키는 기술의 개발이 시급하다. 특히 뿌리 특이적 발현 프로모터의 개발은 환경친화적 형질전환 식물생산의 첫 단계이며 다른 주요 작물에 활용할 수 있기 때문에 그 이용 가치가 매우 높다.

유전자 조작을 통한 작물의 개량을 위해서는 효율적인 형질전환 기술의 개발이 기초가 된다. 이와 같은 형질전환 방법으로 기존 육종 기술로는 불가능한 농업적 유용 유전자의 종간 이동을 해결할 수 있게 되었다. 급속도로 발전하는 유전공학분야의 과학기술과 농업적으로 사용 가능한 유용 유전자의 수가 증가하는 추세를 감안할 때 효율적인 유전자 형질전환 기술의 개발은 고부가 신상품 육성을 위한 농업의 미래 지향적인 발전을 위해 필수적인 과정이다. 특히 본 연구에서 지향하는 뿌리 특이적인 유전자발현과 형질전환된 수박 및 대목의 사용은 환경 친화적이며 인간의 건강을 고려한 안정적인 형질전환체의 생산으로 유전공학 기술의 농업분야 접목에 기여할 수 있다. 또한 수박과 대목용 박에서의 형질전환 체계의 확립은 대목을 사용하지 않는 수박재배 국가와 대목을 사용하는 일본과 중국에 종자 수출을 꾀할 수 있다는 점에서 그 이용가치가 크고 국내에서도 박을 대목으로 사용하는 오이 및 참외 재배 등 주변 채소 산업에도 긍정적인 영향을 미치리라고 본다. 세계 여러 선진국들이 이미 첨단 품종 개발에 활발하게 투자를 하고 있는 시점에서 경쟁력 있는 육종 기술을 양성하기 위해서 산학연 협동연구에 의한 신기술 개발은 매우 중요하다.

## 제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

### 1. 연구개발의 목표

본 과제에서는 식물과 식물병원균 사이의 상호작용에서 병저항성 반응에 기여하는 방어 유전자들을 분리하고, 동시에 작물의 비식용 부위에서 이 유전자의 발현을 유도하기 위하여 뿌리 특이적 promoter를 분리한 다음, 병저항성 유전자를 뿌리에서 국소적으로 발현시키는 시스템을 개발하는 것이 목적이다. 또한 이 발현 시스템을 실제 적용하기 위하여 토양성 병원균에 의한 피해가 심한 박과작물을 형질전환하는 기술을 개발하고자 한다.

병저항성 방어 유전자를 확보하기 위하여 고추탄저병의 저항성 기작을 일차적으로 이해하고 관련 유전자를 분리한 다음 그 기능을 조사하여 병저항성 유전자로 사용한다. 이로써 종래에 사용된 미생물 유래 유전자에 비하여 인체에 안전하도록 식용작물인 방어유전자를 분리하여 식용 작물에서 안전하게 사용할 수 있다. 또한 분리된 유전자의 지적소유권을 확보함으로써 기술 사용료의 해외유출을 방지하고 역으로 기술 사용료 수입을 추구할 수 있다. 즉 자체 개발 유전자를 사용하여 효과적인 기술을 개발하는 것을 목표로 하고 있다.

## 2. 연구개발의 내용 및 범위

본 과제는 1) 식물 유래 병저항성 유전자 클로닝, 2) 뿌리 특이적 발현 프로모터 개발 그리고 3) 박과작물의 형질전환 개발의 3개 세부과제로 구성되어 있다.

제 1 과제에서는 고추탄저병균과 붉은 고추사이의 불친화 반응을 조사하여, 병저항성 특이적 유전자를 다량 분리한다. 그리고 그 유전자를 분석하고 기능을 이해한다. 제 2 과제에서는, 뿌리에서 특이적으로 발현되는 유전자를 탐색하여 그 유전자의 promoter를 분리한다. 그리고 이 promoter를 사용하여 식물형질전환 벡터를 제작하고 유전자 발현 특성을 분석한다. 제 3 과제에서는 박과 수박의 고효율 재분화 및 형질전환 기술을 최적화하고, 생물재해 저항성 유전자를 뿌리 특이적으로 발현하는 수박 형질전환체를 개발한다.

여 백

## 제 2 장 국내외 기술 개발 현황

### 제 1 절 국외 관련기술의 현황

식물체는 병원균의 공격에 대하여 국부적 혹은 전신적으로 방어기작을 나타내는데, 병원균이 침입한 부위에서는 다양한 방어 관련 유전자들이 발현되어 병원균의 생장을 제한하게 된다. 이러한 과민반응에서는 병원균에 직접 작용하는 가수분해효소 등의 병원체 관련 단백질(PR protein)들이 합성된다. 그리고 이 국소반응은 salicylic acid(SA)에 의해 식물체 다른 부위로 전달되어서 전신적으로 반응이 진행되게 된다. 현재 SA 이외에도 jasmonic acid(JA)와 ethylene이 신호전달물질로 작용한다고 알려져 있으며 관련 유전자들이 활발하게 연구되고 있다. 그러나 현재 활용되고 있는 식물 방어 관련 유전자는 주로 PR 유전자와 R 유전자들이다.

식물병 방어기작 관련 유전자를 이용한 병저항성 식물체 생산에 대한 연구는 활발히 진행되고 있다. 미국의 칼진사에 의해 1994년 최초로 생명공학적인 기법에 의한 형질전환 토마토가 상품화된 후, 제초제 저항성 및 해충에 저항성인 유전자가 도입된 형질전환 식물체들이 속속들이 상품화되거나 상품화를 서두르고 있다. 한 예로써 내병성 형질전환 식물의 개발은 네델란드의 Mogen International사에서 항진균성 용해효소인 식물 chitinase를 이용하여 *Fusarium* 병에 저항성이 증진된 토마토를 개발하였다. 내병성 작물의 개발은 외국의 대기업 뿐만 아니라 국가적 차원으로 대대적으로 연구가 추진되고 있다. 참여하고 있는 외국의 대기업으로는 DuPont, Mogen International, Calgene, Dow Chemical, Rohn & Hass, Novatis, Monsanto, Crop Genetics, DNA Plant Technology, EcoScience, 그리고 Neogen 등이 있으며, 국가적 프로젝트는 독일의 Max-Planck 식물육종연구소, 스위스의 National Priority Program, 영국의 John Innes 연구소 등에서 수행되고 있다. 그러나 박과작물의 경우 한국, 일본, 중국 일부에서 대목을 이용한 농사재배가 행하여지고 있으나 중국과 일본에서도 품종개발에 대한 보고는 없으며 전 세계적으로 박과작물의 형질전환을 시도한 예도 없다.

본 실험에서 시도하고 있는 항균 단백질의 과다 발현에 의해서 내병성이 증가된 형질전환 식물체들은 저항성 유전자를 보유한 식물체들이 보여주는 수직저항성과는 다른 수평저항성을 보여 준다. 즉 광범위한 병원균에 대하여 저항성을 나타내기 때문에 앞으로의 작물 육종에 있어서 수평저항성을 지닌 신품종의 육종이 필요하다.



## 제 2 절 국내 기술 개발현황

국내에서도 병저항성 관련 유전자에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있어서 주로 병저항성을 조절하는 신호전달기작에 대한 연구가 담배, 벼, 배추 그리고 고추 등에서 진행되고 있다. 본 실험실에서는 탄저병균(*Colletotrichum gloeosporioides*)과 고추(*Capsicum annuum*) 열매의 상호작용에서 성숙한 푸른 고추는 친화적(감수성) 반응을 보이며, 붉은 고추는 불친화적(저항성) 반응을 나타내는 것을 관찰하였고 이때 저항성 반응에서 발현하는 식물방어 유전자들을 분리하였다.

조직 특이적인 유전자의 발현을 통한 유용작물의 형질전환 식물체 생산은 보고되어진 바가 없으며 특히 생물재해 저항성 유전자를 뿌리에서 발현시켜 어떤 품종을 개발한 경우는 없다. 이러한 기술을 개발하기 위해서는 뿌리 특이적 프로모터 확보와 발현효율을 극대화시키는 기술개발이 필수적인데, 피재호(제 2 세부과제) 박사님의 경우, Senecio 및 브로콜리 등에서 표피조직에 특이적으로 발현하는 다수의 유전자를 클로닝하였으며, 이들 유전자의 promoter를 이용하여 표피세포 특이적 발현용 유전자 운반체를 개발한 바가 있다. 또한 포도과실 발달과정에서 과피 특이적으로 발현되는 유전자를 클로닝하여 발현양상을 분석하였다.

유전자 조작에 의한 수박형질전환 연구는 류장렬 박사님에 의해 보고된 바 있으나 농업적으로 유용한 유전자를 형질전환시켜 품종을 개발한 예는 없다. 또한 박의 경우 조직배양 및 형질전환에 대한 시도가 없었다.

## 제 3 절 현 기술의 의의

형질전환 식물체에 병방어 유전자를 과다 발현시켰을 때 병에 대한 저항성이 증가되는 것이 보고되었으나 이들 유전자 산물인 단백질의 기능과 역할 등은 정확히 규명되지 않고 있다. 특히 식용작물에서 과다 발현된 이들 단백질들의 안정성 등에 대한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 불친화 반응의 결과로써 나타나는 저항성 반응에서만 특이적으로 발현되는 유전자의 기능 분석은 식물병의 저항성 기작을 이해하고 그리고 그 결과를 활용하기 위해서 필수적인 과정이다. 본 연구에서는 고추열매에서 발현되는 특이 유전자를 분리하여 발현 기작을 조사하고 항균기능을 확인한 다음 식물 형질전환에 사용하였다. 이들 유전자는 식용부위에서 축적되는 단백질이기 때문에 안전하게 작물에 사용할 수 있는 이점이 있다.

확보된 유전자들을 이용하여 형질전환 식물을 만들고자 할 경우, 유전자의 충분한 발현을 유도하기 위한 만족할 만한 식물 발현벡터가 없는 실정이다. 특히, 식물

체의 특정기관 발현 프로모터, 특정발달단계 발현 프로모터 그리고 유도성 발현 프로모터 등이 필요하다. 그러나 일부 활용되고 있는 프로모터들은 유전자의 발현 수준이 낮거나 발현이 특정하게 잘 조절되지 않는 등의 문제가 있다. 본 연구에서 사용된 뿌리 특이적 프로모터는 뿌리 조직에서 특이적으로 높게 발현되며 작물 재배 중에도 오옥신 제재 등을 처리하여 발현을 더 유도할 수 있는 이점이 있다. 또한 병원균이 최초로 접촉되는 표피에서 주로 발현되는 시스템으로 저항성 유전자 발현에 매우 적합하다.

유용 유전자를 도입을 통한 형질전환 식물체 생산에 관한 연구는 사회의 반발심을 완화하기 위하여 환경 친화적인 형질전환체 생산 쪽으로 진행할 필요가 있다. 본 연구의 의의는 단순히 식물유래 생물재해 저항성 유전자의 뿌리 특이적 발현 및 형질전환체 개발에만 국한되는 것이 아니라 생명공학 연구분야의 앞으로의 방향을 타진한다는 점에서 하나의 모델적 연구가 될 수 있다. 본 연구의 성공적인 결과를 통해서 유전자 조작 농업 생산품의 안정성을 높이고 소비자의 신뢰를 회복함으로써 생명공학연구의 활성화에 기여하리라 기대된다. 동시에, 생명공학기술을 이용한 우수품종 생산에 대규모 투자를 하고 있는 선진국들로부터 자국산업을 보호하여 국내 시장 점유율을 확보하고 우수한 품종으로 국제적 경쟁력을 보유할 수 있는 기반이 될 수 있다.

여 백

# 제 3 장 병저항성 특이적 유전자의 분리

## 제 1 절 탄저병의 감염 기작

### 1. 서론

식물 유래 병저항성 유전자를 분리하기 위해서 고추에서 탄저병균 사이의 상호작용을 관찰하였다. 고추의 발달 시기에 따라 탄저병에 대한 반응이 다르게 나타나는데, 성숙한 녹색 고추는 탄저병균과 친화반응을 나타내어 병에 감염되며 붉은색 고추는 불친화 반응으로 병에 대해 저항성을 보여준다. 따라서 저항성인 붉은색 고추에서 방어 관련 유전자를 분리하기 위해, 먼저 탄저병균의 생장에 따른 형태변화와 탄저병 증상의 발달과정을 관찰하였다. 이 관찰에서 고추열매의 저항성과 감수성 반응의 초기 시간대를 파악하고 고추열매의 반응에 따라 병의 진행과정을 조사하였다. 그 결과 탄저병균의 형태변화와 탄저병 증상의 발달과정 관찰을 근거로 접종 후 24시간과 48시간이 저항성 및 감수성 반응을 구분하는 중요한 시간 때가 됨을 알았다. 이에 따라 탄저병균의 처리방법 및 시기를 결정하였고, 식물유래의 저항성 반응에서 발현하는 유전자를 분리할 시간대를 결정하였다.

### 2. 연구방법

녹색 고추열매에만 탄저병징을 만들어내고 붉은색 고추열매에는 병징을 만들지 못하는 *C. gloeosporioides* 균주를 단세포 분리하여 potato dextrose agar 평판배지에서 암상태, 28℃에서 7일 동안 배양하였다. 곰팡이 접종원은 이 평판배지에 살균수를 부어 준비하였다. 균사조각을 제거하기 위하여 접종원은 4겹의 cheese cloth를 거쳤으며, 접종농도는 살균수를 부어  $5 \times 10^5$  포자/ml로 조정하였다.

공시된 고추품종은 녹광(홍농종묘)이며 온실에서 재배하여 접종실험, molecular work, cDNA library의 제조시 사용하였다. 접종실험을 하기 위하여 건강한 녹색 고추열매와 붉은색 고추열매를 수확한 후 접종 부위를 표시하기 위하여 짙은 dot mark의 바로 옆에 10  $\mu$ l의 접종원을 drop inoculation하였다. 대조구로 사용한 고추열매에는 살균수를 곰팡이 포자 대신 접종하였다. 접종된 고추열매들은 상대습도가 100%로 유지되는 접종상자(25 × 16 × 6 cm)에 넣은 후 암상태, 28℃에서 배양하였다. 병징의 생성 유무를 확인하기 위하여 접종 후 7-9일까지 수시로 관찰하였다.

접종 실험은 독립적으로 3번 반복 실행하였다.

접종된 열매들의 표면에서 곰팡이균들의 포자발아율, 부착기 및 침입균사 생성율을 조사하였다. 접종된 열매의 표면을 살균된 칼로 벗겨낸 후 0.1%(w/v) 락토페놀케튼블루 용액에서 염색시켰다. 접종 후 24시간까지 시간별로 준비된 시료를 현미경 관찰을 통하여 시료 당 100개 이상의 포자들 세었다. 외부 병징을 관찰하기 위하여 시간별로 stereomicroscope로 접종된 고추열매의 표면을 관찰하였다.

저항성 반응과 감수성 반응의 구별이 뚜렷한 시간을 조사하기 위하여 시간별로 접종 부위를 section하였다. 각각 건강한 혹은 접종된 고추열매들을 4%(w/v) paraformaldehyde 용액에 침지 시킨 후, 알코올로 탈수하고, 파라핀에 embed시켰다. 준비된 section에서 곰팡이의 침입균사를 관찰하기 위하여 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI) 염색을 하였고 관찰은 epifluorescence 현미경을 사용하였다.

### 3. 연구결과 및 고찰

곰팡이균 접종 결과 녹색 고추열매에서는 접종 후 2일부터 갈색의 병반이 관찰되기 시작하였고, 접종 후 5일부터는 전형적인 괴저의 탄저병 초기 증상이 관찰되었다. 그러나 붉은색 고추열매에서는 병반이 형성되지 않거나 지연되었다(Fig. 1).

분리한 병원균에 대한 열매 특이적 감염을 조사하기 위하여 녹색 고추열매와 붉은색 고추열매 표면에서의 곰팡이 형태변화를 관찰하였다. 곰팡이 포자들은 접종 후 2시간부터 발아하기 시작하였다(Fig. 2). 곰팡이가 녹색 고추열매에만 병을 나타내지만 녹색 및 붉은색 고추열매 모두에서 부착기(Fig. 2B, C)와 침입균사(Fig. 2D, E)를 생성하였다. 미성숙한 부착기는 접종 후 6시간부터 관찰이 되었고(Fig. 2B), 멜라닌 색소가 축적된 성숙한 부착기는 접종 후 12시간부터 관찰되었다(Fig. 2C, D). 부착기에서 발달되어 나온 침입균사는 접종 후 12시간부터 관찰이 되기 시작하였으며 접종 후 24시간부터는 잘 발달된 형태가 관찰되었다.

포자발아율, 부착기 및 침입균사 생성율을 녹색 및 붉은색 고추열매에서 관찰하였다. 포자생성율은 녹색 및 붉은색 고추열매에서 차이가 없었으나 부착기 및 침입균사 생성율은 녹색 고추열매에서 훨씬 높았다. 또한 침입균사의 길이도 녹색 고추열매에서 길었다. 이를 재차 확인하기 위하여 접종 후 2일된 녹색 및 붉은색 고추열매를 가지고 section 관찰을 하였다. 녹색 고추열매의 outer epidermal cell layer 바깥의 wax층에서 잘 발달되어 있는 침입균사가 관찰되었다. 그러나 붉은색 고추열매에서는 관찰되지 않았다(Fig. 3).

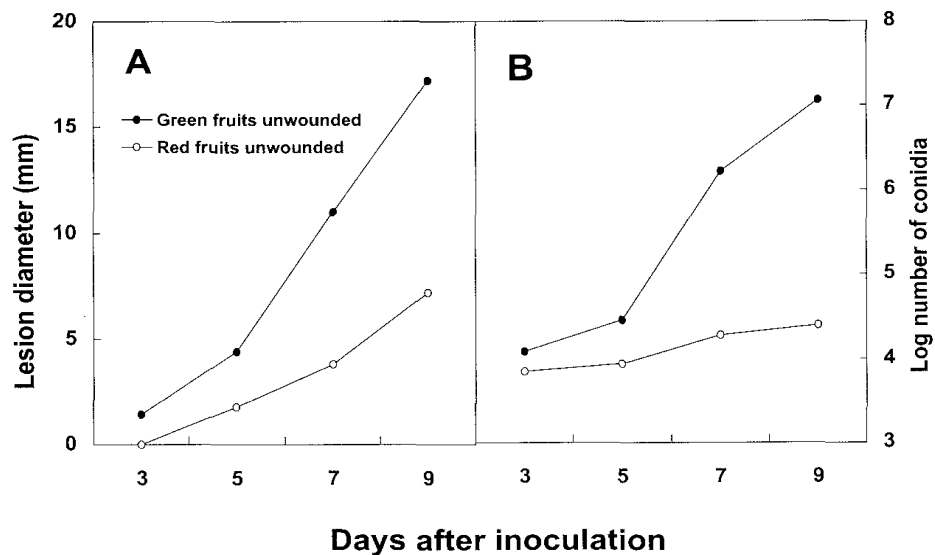


Figure 1. A. Anthracnose lesion diameter and B. conidial production caused by *C. gloeosporioides* on the unripe and ripe pepper fruits

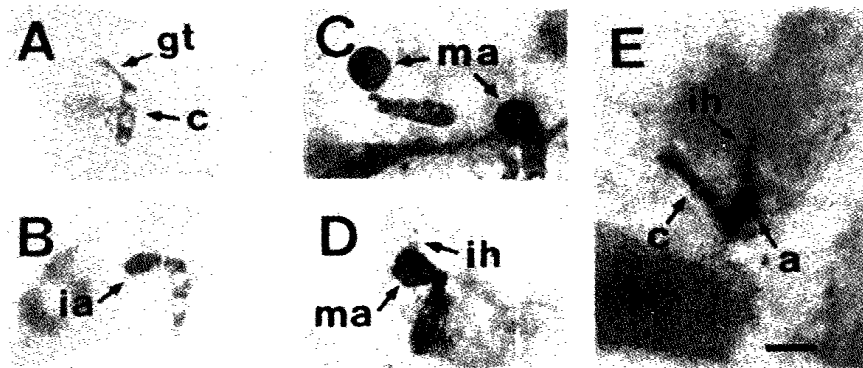


Figure 2. Development of *Colletotrichum gloeosporioides* on pepper fruits. Scale bar = 10 μm. A. Germ tube (gt) from a conidium (c). B. Immature appressorium (ia) from a germinated conidium. C. Mature appressoria (ma) from germinated conidia. D. Initial infection hypha (ih) from a mature appressorium (ma). E. Well developed infection hypha (ih) from an appressorium (a).

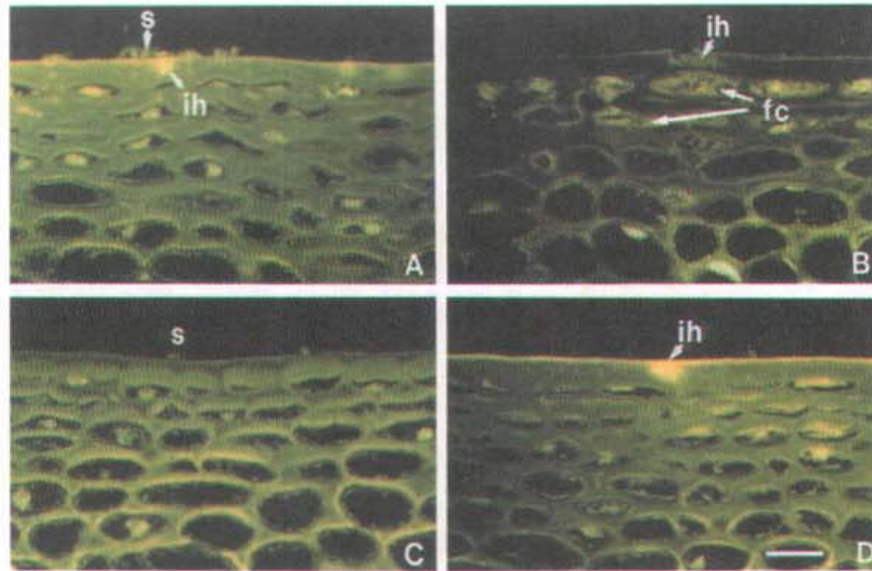


Figure 3. Transverse section of infected pepper fruits with *C. gloeosporioides*.

A. Unripe fruit at 24 HAI

B. Unripe fruit at 72 HAI

C. Ripe fruit at 24 HAI

D. Ripe fruit at 72 HAI

S : spore, ih : infection hypha, fc : fungal colonization

Scale bar = 100  $\mu$ m

이상의 탄저병원균의 형태변화와 탄저병징의 발달과정 관찰을 근거로 접종 후 24시간과 48시간이 저항성 및 감수성 반응을 구분하는 중요한 시간 때가 됨을 알았다. 따라서 분자생물학적 연구를 통하여 식물유래의 저항성 반응에서 발현하는 유전자를 분리할 시간대로 결정하였다.

## 제 2 절 식물유래 병저항성 유전자의 클로닝

### 1. 서론

고추는 조미채소로서 농가의 중요한 소득원이지만 매년 고추에 발생하는 병해로 생산량의 변동이 심하다. 고추에는 역병, 탄저병, 바이러스병 및 세균성 점무늬 병 등이 주로 발생하며 특히 탄저병은 유묘에서 열매까지 발병하는 등 피해가 크다. 고추에 탄저병을 일으키는 병원균은 *Colletotrichum capsici*, *C. coccodes* 그리고 *C. gloeosporioides* 등이 보고되어 있으나 *C. gloeosporioides*에 의한 피해가 95% 이상을 차지한다. 이 병은 균사의 발아와 부착기 형성이 기주식물의 감염에 선결조

건이 되는데 이때 병원균에 대한 식물의 반응이 병에 대한 저항성 또는 민감성을 결정하게 된다. 최근 붉은색 고추와는 불친화적인 상호작용을 하고, 녹색 고추와는 친화적인 반응을 나타내는 *C. gloeosporioides*(KG13)가 분리되었다. 이때 탄저병균에 대응하여 병이 나지 않는 붉은색 고추에서만 발현되는 유전자들을 클로닝하기 위하여 접종 안한 고추열매와 접종한 고추열매로부터 mRNA differential display에 의해서 유전자를 분리하였다(Fig. 4). 그리고 이 유전자들이 기능적으로 병의 방어와 관련이 있는지 분석한 다음 저항성유전자로 활용하였다.

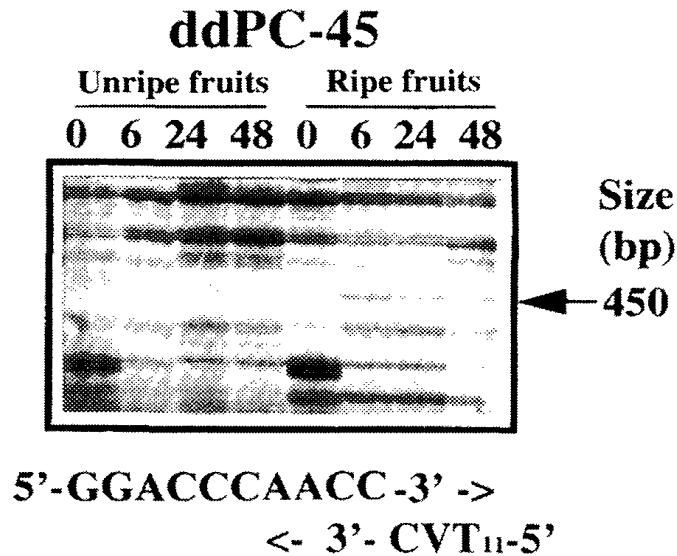


Figure 4. Autoradiograph of mRNA differential display using total RNAs isolated from both unripe and ripe fruits at 6, 24, 48h after fungal inoculation

## 2. 연구방법

고추열매 병반응 특이적 cDNA library 작성을 하였다. 고추탄저병원균을 고추열매에 접종시킨 후 초기 병징이 발현되기 전인 48시간 전에 sample을 수확하여 액체질소에 급속 냉각시켰다. RNeasy Plant kit(Qiagen, 독일)을 사용하여 total RNA를 분리한 후 Oligotex kit(Qiagen)을 사용하여 mRNA를 분리하였다. cDNA library는 lamdaZAPII(Stratagene, 독일)을 사용하여 평균사이즈가 1.2kb 이며 plaque-forming unit은  $2.5 \times 10^5$ 되게 제작하였다.

병저항성 전체 유전자 분리 ; 1 차년도에 분리된 partial cDNA의 전체 유전자



를 분리하기 위하여 이들을 probe로 사용하여 전체유전자를 클로닝하였다.  $\lambda$ ZAP II vector에 construction되어 있는 고추 cDNA library를 titering( $1.5 \times 10^6$ )하여 host cell인 XL1-Blue MRF'(600  $\mu$ l of OD<sub>600</sub>=0.5)에 접종하여 이를 37°C에서 15분 배양한 후 6.5 ml의 LB top agar/plate에 깔아 37°C에서 8시간 키운다. 그 다음 plate를 4°C에서 2시간 동안 chilling시킨 후 nitrocellulose membrane에 transfer한다. 그 후 membrane denature(1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH denaturation solution for 2 min), membrane neutralize(1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0) neutralization solution for 5 min) 그리고 membrane을 0.2M Tris-HCl (pH7.5), 2X SSC buffer solution에 두었다가 Whatman 3MM paper에서 말린 후 UV crosslinker를 이용하여 DNA를 membrane에 고정시킨다. 그리고 각 gene의 cDNA를 probe로 하여 plaque hybridization으로 3회에 걸쳐 screening을 실시하였다. Plaque southern hybridization Nylon membrane을 65°C의 prehybridization solution[20X SSC, 10% SDS, Salmon sperm DNA(final 100  $\mu$ g/ml), 50X Denhart's(각각 1%의 Ficoll, polyvinylpyrrolidone, bovine serum albumin)]에서 3시간, 상기의 prehybridization solution에 probe DNA를 첨가한 hybridization solution에서 20시간 진탕반응시킨 후 wash하였다. Membrane을 2X SSC + 0.5% SDS 용액으로 42°C에서 30분, 0.1X SSC + 0.5% SDS 용액으로 55°C, 60°C에서 각각 30분씩 순서대로 wash한 다음, X-ray film(Fuji 036052 혹은 Amersham hyper film)에 노출(-80°C, 36 ~ 120시간)하였다. 그래서 얻어진 positive plaque ExAssist/SOLA system(stratagene)를 이용하여 *in vivo* excision를 통해 phagemid Bluescript SK(-) vector를 얻어내 분리 정제하였다.

DNA sequencing and homology search ; Sequencing은 ALF express automated DNA sequencer(Pharmacia, Sweden)를 이용하여 수행하였으며 염기서열과 아미노산서열 분석은 DNASIS sequence analysis program를 이용하였다(Hitachi, Japan). DNA sequence search는 BLAST electronic mail server(Altschul et al., 1997)를 이용하여 NCBI database를 통해 비교하였다.

### 3. 연구결과

불친화 반응을 보이는 고추와 고추탄저병균 상호작용에서 병저항성 반응에 특이적으로 발현하는 유전자들을 mRNA differential display 방법으로 분리해서 PepALDH, PepAPX, catalase, defensin, PepMADS, PepCYP 그리고 thaumatin 유전자 등을 분리하였다. 이들 유전자는 partial cDNA로서 다시 cDNA library를 제작하여 full size를 클로닝 하였다. 분리된 유전자의 cDNA 염기서열은 다음과 같다.

가. Pepper aldehyde dehydrogenase (PepALDH cDNA), 1682 bp

```
1 TTCATCTCCA AAAATGGCG GCTCGTGT TTGCATCTCG CTTTTTCACT TCCTCTTCTC
61 GTCTTCTTTC AAAGGGAAAA AGATCTCATC TGGGCAGAAT AGCTGCTTAT AAATACAGCA
121 CTGCAGCTGC TGTCGAGGAG CCTATCAAGC CAGCTGTCAA TGTCGAACAT ACTAACTTTT
181 TTATCAACGG GCAATTTGTT GATGCTGCAT CAGGAAAAAC TTTCCCGACC CTCGACCCCA
241 GGACAGGGGA GGCAATAGCA CATGTTGCTG AAGGTGATGC AGAGGATATT AATCGGGCAG
301 TGGCTGCTGC TCGTAAGGCT TTTGATGAAG GACCATGGCC TAAGATGACT GCTTATGAAA
361 GGTCAAAGAT ATTGCTGCGC CTTGCTGATC TGATTGAAAA ACATAACGAT CAAATTGCAA
421 TGCTCGAGGC TTGGGACACT GGAAGCCTT ACGAACAAGC TGCTAAACTT GAAGTACCAA
481 TGGTTGTACG TGTACTCCGT TATTATGCTG GCTGGGCAGA TAAAATTCAT GGTATGACCG
541 TTCCTGCTGA TGGACCATAT CATGTTCAAA CATTGCATGA ACCAATTGGG GTTGCTGGTC
601 AGATTATCCC ATGGAATTTT CCTCTCCTCA TGCTTTCGTG GAAGATTGGC CCTGCTTTAG
661 CTTGTGGCAA CACAATCGTG CTAAAGACAG CTGAGCAGAC CCCATTATCT GCATTCTATG
721 TAGCAAATCT TTTGCAGGAG GCTGGGCTGC CTGAAGGTGT TCTGAATATC ATTTCTGGTT
781 TTGGTGCCAC AGCTGGTGCT CCTCTCTGTA GTCATATGGA TGTGGATAAG CTTGCTTTTA
841 CTGGATCAAC AGATACAGGG AAAACTATAC TTACATTGGC TGCTAAGAGC AATCTTAAGC
901 CTGTGACCTT GAAACTTGGA GGGAAATCCC CGTTTATTGT TTGTGAGGAT GCTGATATTG
961 ATACAGCCGT TGAACAGGCT CACTTCGCTT TGTTCTTTAA TCAGGGGCAA TGTTGCTGTG
1021 CTGGCTCTCG GACCTTTGTC CATGAGAAAG TTTATGATGA ATTTCTAGAG AAGGCAAAGG
1081 CACGTGCCTT GAAACGAACT GTTGGTGATC CGTTTAAATC GGGCAATGAG CAAGGTCCAC
1141 AGATTGATTC AAAACAGTTT GATAAGATCA TGAAGTACAT TAGATCTGGT GTTGAAAGTG
1201 GAGCTACTCT TGAAACTGGC GGTGAGCAAC ATGGTAAAAA GGGCTACTAT ATTAAGCCCA
1261 CCGTTTTTCTC TAAAGTTAAG GATGATATGC TGATTGCACA GGATGAGATT TTTGGTCCAG
1321 TTCAGACCAT CTTAAAATTT AAGGATCTTA ATGAAGTGGT ACAGAGAGCT AATAACAGTA
1381 GGTATGGTCT AGCTGCTGGA GTATTTACGC AGAACATTGA CACTGCAAAC ACCTTGCGCG
1441 GAGCCTTGAA AGTTGGGACG GTATGGATTA ATTGCTTTGA TGTCTTTGAT GCTGCAATTC
1501 CTTTTGGTGG CTATAAGATG AGTGGCCAGG GAAGAGAAAA GGCAGAATAC AGTCTCAAGA
1561 TTACTIONTCAA GTGAAGGCAG TTGTGACCGC ATTGCAAGAA TCCAGCATGG TTATAAACAT
1621 AATCCACCGV SGCCCATTTT TACAATAAAA ACTAAATCAT CAAGTTGCTC TAGTTTATGA
1681 TGTGATGAC GATAAATGTT GGTTCCTTTT CAAAGCTGCT TTGATATACA AACTGCATTT
1741 GGTGTATACA GGGAGCAAGT TTTATTTAAA AAAAAAAAAA AA
```

나. Pepper ascorbate peroxidase (PepAPX cDNA), 779 bp

```
1 CCAAACGTTA GAGCTAAGCA ATTACTATGG GCAAGTGCTA TCCCCTGTG AGCGAGGAGT
61 ACCTCAAGGC TGTTGACAAA TGAAAAGGA AACTCAGAGG ACTCATTGCT GAGAAGAATT
121 GTGCTCCTCT TATGCTCCGT CTGTCATGGC ACTCTGCTGG TACCTATGAT GTGTGCTCCA
181 AAACCTGGAGG TCCTTTTGGT ACCATGAGGT TCAAAACTGA GCAGTCTCAC GGAGCAAACA
241 ATGGTATTGA CATTGCTCTC AGGCTCTTGG AGCCATTAGG GGAGCAGTTT CCCATCCTCT
301 CCTATGCTGA TTICTATCAA TTGGCTGGTG TTGTTGCTGT TGAGGTGACT GGAGGACCTG
361 ATGTTCCCTT TCACCCCGGC AGAGAGGACA AGCCAGAGCC ACCTGTTGAA GGTGCTTGC
```

421 CTGATGCAAC CAAGGGCTCT GACCACTTGA GGGACGTGTT CGTGAAACAA ATGGGTCTTT  
481 CTGATCAGGA TATTGTTGCA CTCTCTGGTG GCCATACCTT GGGAAGATGC CACAAGGAGC  
541 GTTCTGGTTT TGAGGGACCT TGGACCGCCA ATCCCCTCAT TTTTGACAAC TCATACTTCA  
601 AGGAACTATT GGGTGGGGAA AAAGAAGGTC TTTTACAGTT GCCCTCAGAC AAGGCTCTCC  
661 TCTCTGATCC TGCTTTCCGT CCCCTTGTG AGAAATATGC TGCAGATGAA GATGCCTTCT  
721 TTGCTGACTA TGCTGAGGCT CACTTGAAGC TCTCTGAATT GGGATTTCGCT GAAGCTTAA

다. Pepper catalase (cDNA), 1524 bp

1 AAAAAAAGC CCTCTCTCTT CAATTTTCAT CTCATTTCAA TCACTATGGA TCTCTCTAAG  
61 TATCGCCCAT CAAGTGCATA TGATTCCCCT TTCTTGACAA CAAATGCTGG TGGTCTGTG  
121 TACAACAATG TATCTTCCTT GACTGTTGGA CCTAGAGGGC CTGTTCTTCT TGAGGATTAT  
181 CACTTAATFG AGAAGCTTGC GACTTTTGTT CGTGAGCGGA TACCTGAGCG TGTTGTTTCT  
241 GCTAGAGGTG CCAGTGCCAA GGGCTTCTTT GAAGTCACTC ATGATATTTT TCATCTTACC  
301 TGTGCTGATT TTCTCCGAGC TCCTGGTGTG CAAACACCTG TTATTTGTGCG CTTCTCTACT  
361 GTCGTCCATG AGCGTGGAA GCGCGAATCC ATCAGGGATA TTCGCGGTTT TGCTGTCAAA  
421 TTTTACACCA GAGAGGGTAA CTTTGATCTT GTTGAAACA ATGTCCCCGT CTTCTTTAAT  
481 CGTGATGCAA AGTCATTCCC TGACACGATT CGTGCATTGA AACCAAATCC AAAGTCACAC  
541 ATTCAGGAAA ACTGGAGGAT CTTGATTTTCT TTCTCTTTCC TCCCGGAGAG TTTGCATACG  
601 TTTGCTTTCT TCTACGATGA TGTTTGTCTC CCGACAGATT ACAGACACAT GGAAGGTTTT  
661 GGTGTTTACG CTTATCAATT GATCAACAAA GCTGGAAAAG CACATTATGT GAAGTTCCAC  
721 TGGAAGCCAA CTTGCGGTGT CAAGTCCATG ACGGAGGAAG AAGCTATTAG GGTGCGAGGT  
781 ACTAATCATA GCCACGCCAC CAAGGATCTC TACGATTCAA TTGCTGCTGG AAACACTCCC  
841 GAGTGGAAC TTTTATCCA AATTATGAAC CCTGAGGATG TTGACAAATT CGACTTTGAC  
901 CCTCTTGACG TAACCAAGAC CTGGCCTGAG GATATCTTGC CATTGATGCC AGTTGGTTCGA  
961 TTGGTATTGA ATAGGAACAT CGATAACTTC TTTGCAGAGA ACGAGCAGCT CGCATTAAAC  
1021 CCTGGACATA TTGTCCCTGG TGTCTACTAT TCGGAGGATA AGCTTCTCCA GACTAGGATA  
1081 TTTGCATATG CTGATACTCA GAGACACCGT ATTGGACCAA ACTATATGCA GCTCCCAGTT  
1141 AACGCTCCCA AGTGTGCTCA TCACAATAAT CACCGTGATG GTGCCATGAA CTTTATGCAT  
1201 CGCGATGAGG AGGTGGATTA TTTGCCCTCA AGGTTTGATC CTTGTCGTCC TGCCGAGCAG  
1261 TACCCAATTC CTTCTTGTGT CTTGACAGGA AGGCGTGAAA AGTGTGTCAT TCCGAAAGAG  
1321 AACAACTTCA AGCAGGCTGG GGAGAGATAC AGATCCTGGG CACCTGACAG GCAAGACAGA  
1381 TATATCAACA AATGGGTTGA GTCTTTATCC GATCCCCGAG CAACTCATGA GATACGCAGT  
1441 ATATGGATAT CATACTTGTG TCAGGCTGAC AAGTCTTGTG GTCAGAAGGT CGCTTCTCGT  
1501 CTCACTGTGA AGCCAACAAT GTGA

라. Pepper defensin (cDNA), 257 bp

1 GGCGGATCCA AAAATATTAT TATGGCTGGC TTTTCCAAAG TGGTTGCAAC TATTTTTCTT  
61 ATGATGTTGC TGGTTTTTGC TACTGATATG ATGGCGGAGG CAAAGATCTG CGAGGCGTTG  
121 AGCGGCAACT TCAAGGGGTT GTCCCTTAGT AGCCGCGATT GTGGTAATGT TTGCCGTAGA  
181 GAGGGATTTA CCGATGGCTC TTGCATTGGA TTCCGTCTTC AATGCTTCTG CACGAAGCCC  
241 TGTGCTTAAT TAACTCT

마. Pepper MADS (cDNA), 792 bp

```
1 TAATACGACT CACTATAGGG CTCGAGCGGC CGCCCGGGCA GGTATGCATT ATTTTTTTTC
61 TTCATACTAT ATTTTCATTGA GAAACCAAAA GAAAAAGAAA GCTATAGCCT ATACACAATG
121 GGTAGAGGGA AAGTAGAATT GAAGAGAATT GATAATAAAA TAAATAGACA AGTGACTTTT
181 GCAAAGAGAA GAAATGGACT CCTCAAGAAA GCTTATGAAC TTTCTGTTCT TTGTGATGCT
241 GAAATGCTC TTATTATTTT CTCTAGTCGT GGCAAGCTTT ATGAATTTTG CAGCAGCTCA
301 AGTATGTCCA AGACATTGGA GAGATACCAC AAACATAATT ATGGTGCCT TGAAGGAACC
361 CAACCATCAG CAGATTCACA GAACAACACTAC CAAGAGTATT TGAAGCTTAA AACAAGAGTG
421 GAAGTGTTAC AACAACTCTCA AAGGCATATG CTTGGAGAGG ATTTGGGAGA ATTGAACACA
481 AAAGACTTGG AACAACTTGA ACGTCAATTG GATTCATCAT TGAGGCAAAT AAGGTCAACT
541 AAGACACAAC ACATGTTTGA TCAACTTGCT GAACTTCATC AAAAGGAACA ATCTCTTACT
601 GAAATGAACA AATCTTTGAA GACAAAGTA TCAATATCAC CTTGATTATA GTTTTAATTA
661 ATTTACAGGA TAATCTAATA GTGGCACATA ACCAACATGG GTGATGATGG TTGAGATCTC
721 TTTATTTTTA ATTAATGTC TCGAATTTAA GCCAATGAAA ATGACAAAAA ATCCTGTTGG
781 AAAAAAAAAA AA
```

바. Pepper cytochrome P450, 4장 참조

사. Pepper thaumatin, 5장 참조

## 제 3 절 저항성 관련 유전자의 분석

### 1. 서론

불친화적인 고추탄저병균 KG13과 붉은색 고추열매 상호작용시 저항성 반응에서 발현이 증가되는 PepALDH, PepAPX, catalase, defensin, PepMADS, PepCYP, 그리고 thaumatin 유전자들이 분리되었다. 이 유전자들이 병저항성 반응에서 역할을 하기 위해서는 일차적으로 전사체가 만들어지고 해당 단백질이 작용하는 것이 필수적이다. 본 실험에서는 각각의 유전자들의 병과 관련된 발현 특성 및 방어관련 식물호르몬에 의한 발현 유도를 조사하였다. 그리고 PepALDH, catalase 그리고 defensin은 대장균에서 재조합단백질을 합성한 다음, 순수 분리하여 기능을 확인하였다.

MADS 유전자는 일반적으로 꽃의 발달, 화기 형성에 관련된 것으로 알려져 있으며(Lonning and Saedler, 1994; Yanofsky et al., 1990), thaumatin은 열매가 성숙될 때 축적되는 것으로 보고되었다. PepCYP 유전자는 여러 metabolic pathway에서 식물의 방어 기작과 관련된 것으로 알려진 cytochrome P450 유전자 group에

속한다(Kessmann et al., 1990; Maule and Ride, 1983). ALDH는 무산소호흡과 관련하여 alcohol 발효반응이 진행될 때 생성되는 중간산물인 acetaldehyde를 무독화시키는 효소이다. 이에, 병감염시에 alcohol 발효과정이 관련되어 있는지 조사하기 위하여, pyruvate decarboxylase, alcohol dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase 등의 유전자를 분리하여 발현 양상을 조사하였다. 이 밖에도 ascorbate dehydrogenase와 catalase는 항산화반응에서 과산화수소를 분해하는 효소이며 defensin은 항균단백질로 알려져 있다.

이들 유전자 산물은 병의 방어 기작에서 중요한 역할을 할 가능성이 높기 때문에 이들 유전자의 병저항성 특이적인 발현 양상과 단백질의 기능을 확인하였고, 이 결과는 이들 유전자들이 식물의 병을 효과적으로 방제하는 데 활용할 수 있는지 제시해 주고 있다.

## 2. 연구방법

### 가. 유전자 분석(Northern analysis)

탄저병균을 접종한 고추열매를 시간별로 채취하여 추출한 total RNA 20  $\mu$ g에 RNA loading buffer를 넣고 65°C에서 15분간 처리를 한 후, 1.8% formaldehyde가 포함되어 있는 1.25% agarose gel에서 50V로 전기영동하였다. 전기영동한 뒤 gel을 DEPC-treated water로 세척하고 10X SSPE 용액으로 20분 동안 침윤시킨 뒤 Sambrook 등의 방법에 의해 membrane에 옮긴 후 고정시켰다. Probe는 differential display clone을 random primed labeling 방법에 따라 [ $\alpha$ <sup>32</sup>P]dCTP로 labelling 하여 사용했다.

### 나. 유전자 기능 분석

분리된 유전자의 기능을 조사하기 위하여, 대장균에서 defensin, ALDH 및 catalase의 재조합단백질을 발현하기 위한 단백질 발현벡터에 클로닝하였다. 단백질 발현벡터는 pGEX 6P-1이 사용되었다. 전체 ALDH와 catalase 유전자는 각각의 cDNA에 상응하는 primer를 이용하여 PCR을 수행한 다음, 각 PCR products의 5' 말단 과 3' 말단에 내재된 제한효소 sites를 사용하여 plex 6P-1vector에 클로닝하였다. ALDH의 primer는 5'-CGGGATCCCCAAAATGGCGGCTCGTGTT 와 3'-CGGAATTCTTATAACACTGCTGGATTCTTCAATGC, catalase primer는 5'-GGAATTCGGTATGGATCTCTTAAGTATCGC와 3'-CCCTCGAGGGTCAC ATTGTTGGCTTCACAG를 사용하였다. 그리고 defensin primer는 5'-CGGAT

CCATGGCTGGCTTTTCTAAAG와 3'-CCTCGAGGTTAAGCACAGGGTTTCG TG를 사용하였다.

### 3. 연구결과 및 고찰

탄저병균이 기주식물을 감염하기 위해서는 발아관으로부터 부착기를 형성해야 하는데 부착기형성이 저항성 반응에서 현저하게 낮아지는 것으로 보아 식물 세포의 반응이 달라짐을 시사하고 있다. 이때 특이적으로 붉은색 고추에서 발현되는 다양한 유전자들이 클로닝되어 그 특성을 조사하였다.

PepMADS는 *Arabidopsis*의 AG 유전자와 유사한데 AG, AP1, AP3, PI 그리고 AGL 등 MADS-box 유전자는 꽃의 형성 및 발달에 관여한다(Jack et al., 1992; Mandel et al., 1992). 최근에는 뿌리 및 배 등의 형태형성에 MADS-box 단백질이 조절인자로 관여함이 밝혀졌다. 이와 더불어 고추에서는 새롭게 병저항성에 관련됨을 보여주어 식물에서 MADS-box 유전자의 새로운 역할을 추가할 수 있다(Fig 5).

병저항성 반응에서 특이적으로 발현되는 유전자 중에도 PepALDH가 있다. 탄저병 포자를 접종했을 때 병에 저항성을 보이는 붉은 고추에서는 3시간 이후부터 발현이 유도되는데, 녹색 고추에서는 12시간대에 미약하게 발현된다. 이밖에도 상처 또는 Salicylic acid에 의해서 발현되며 붉은색 고추에서도 jasmonic acid에 의해서 발현된다.

이 유전자들 중에는 alcohol 발효 과정에 관여하는 주요 유전자(PDC, ADH, ALDH)들이 포함되어 있다. 일반적으로 이들 유전자들은 산소의 공급이 제한되었을 때 발현되는 것으로 알려져 있다. 해당과정 중에 형성된 pyruvate는 PDC (pyruvate decarboxylase)에 의해서 acetaldehyde로 되고, 이는 ADH(alcohol dehydrogenase)에 의해서 ethyl alcohol로 된다. 그리고 acetaldehyde는 ALDH (acetaldehyde dehydrogenase)에 의해서 acetic acid로 되어서 무독화되는 과정이다. PDC 및 ALDH 유전자의 경우 감수성 반응을 보이는 녹색 고추열매에서는 탄저균 접종 후에도 거의 발현되지 않았다. 그러나 저항성 반응에서는 접종 후 3~6시간에 발현되고 다시 24시간 이후에 biphasic하게 발현되는 양상을 보였다. ALDH는 녹색 고추에서는 12시간대에 붉은 고추에서는 3시간 이후부터 계속 발현되었다 (Fig. 6). 그리고 해당과정의 downstream에 위치한 PDH(pyruvate dehydrogenase)와 ATP 합성효소를 클로닝하여 발현현상을 조사하였다(Fig. 7). PDH는 붉은색 고추에서 발현량이 많았으며 병 후기에 발현량이 증가하였다. ATPase는 감수성의 녹색 고추에서 접종 후기에 감소하는데 반하여 붉은색 고추에서는 접종 후기에 발현량이 증가

하는 것으로 보아 적극적인 방어 시스템이 가동되는 것으로 보인다.

항산화 관련유전자는 환경적인 자극이나 병원균의 침입시에 발생하는 reactive oxygen species를 제거하는 효소들을 암호화하고 있다. 식물이 병균에 감염되면 이에 대항하기 위하여 일련의 활성산소들의 양이 증가하게 된다. 이러한 활성산소들은 직접적으로 균에 작용하여 균을 사멸시키기도 하는 것으로 알려지고 있다. 또한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 증가는 세포벽단백질들의 교차결합을 유도하고 peroxidase에 의해 축매되는 lignin의 합성을 증가시킴으로써 병원균에 대한 물리적인 장벽을 구축한다. 활성산소는 방어유전자들의 발현과정에 관여하는 2차 전달자로서 기능을 갖고 있는데, 예를 들어 활성산소의 함량이 증가하면 peroxidase, catalase, glutathione-S-transferase 그리고 glutathione peroxidase 유전자 등을 유도하여 활성산소를 제거하고, 병균에 대한 내성을 유도하게 된다. 이들 유전자는 붉은 고추에서 방어기작과 관련하며 생물학적 그리고 비생물학적인 stress에 반응하여 성숙된 종자를 보호하는데 관여할 것으로 사료된다(Fig. 8).

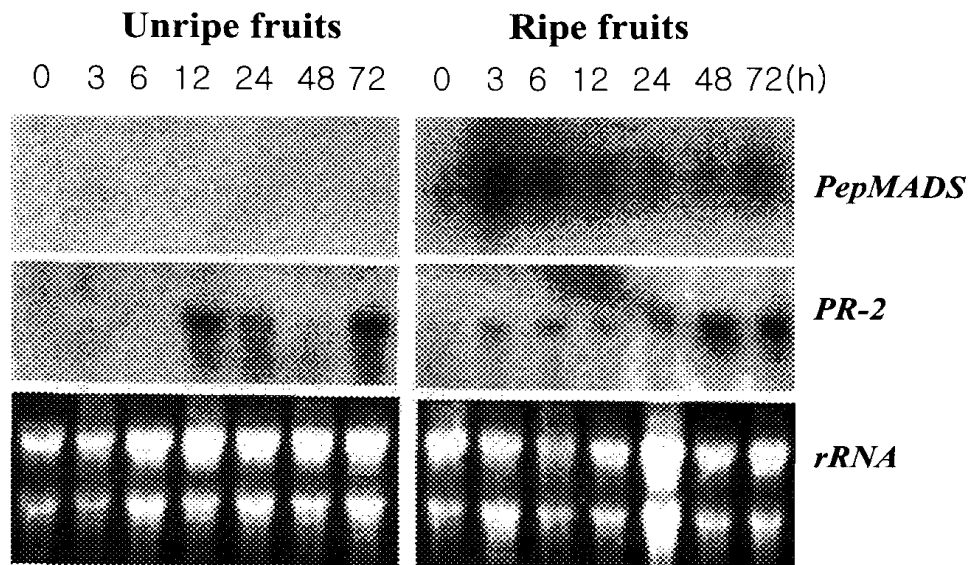


Figure 5. Northern blot analysis for differential time-course of PepMADS and PR-2 gene in pepper fruits by *C. gloeosporioides* infection. RNAs were isolated from both unripe and ripe fruits after fungal inoculation

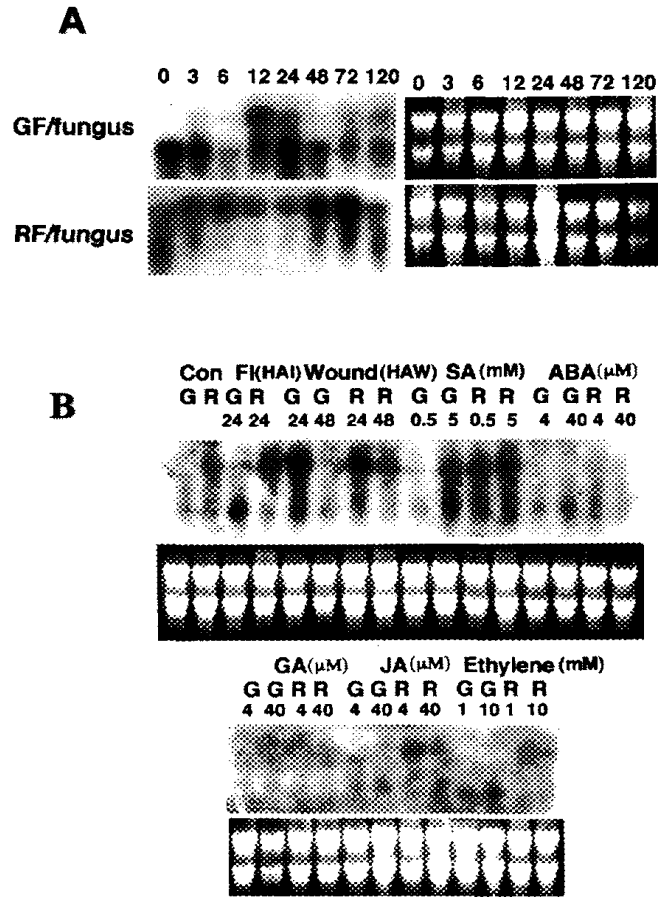


Figure 6. A. Expression and induction of PepALDH gene from pepper fruit inoculated with *C. gloeosporioides*  
 B. Induction of PepALDH from both ripe(R) and unripe (G) pepper fruit by exogenous abscisic acid (ABA), gibberellic acid (GA), jasmonic acid(JA), salicylic acid(SA) and ethylene treatments



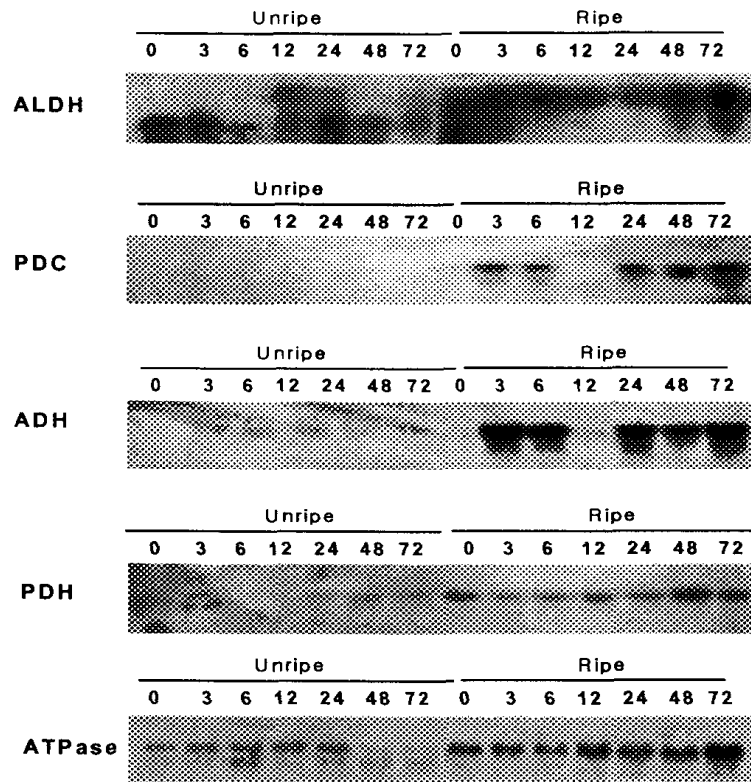


Figure 7. Transcript Levels of PepALDH, PDC, ADH, PDH and Atase which are induced in the unripe and the ripe fruits infected with *C. gloeosporioides*

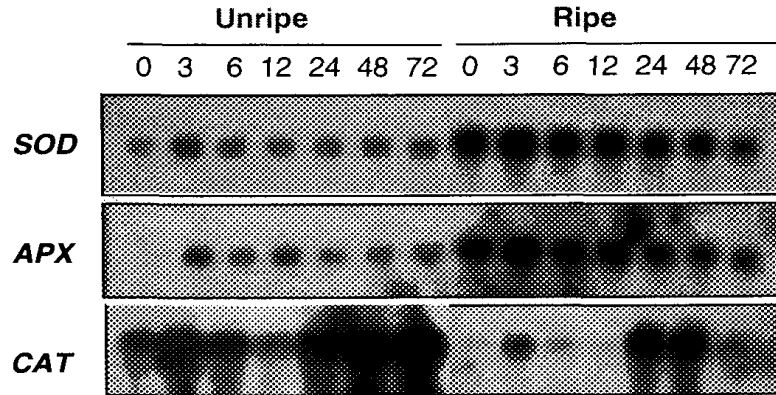


Figure 8. Expression and induction of antioxidant genes encoding SOD, APX, and CAT in pepper infected with *C. gloeosporides*

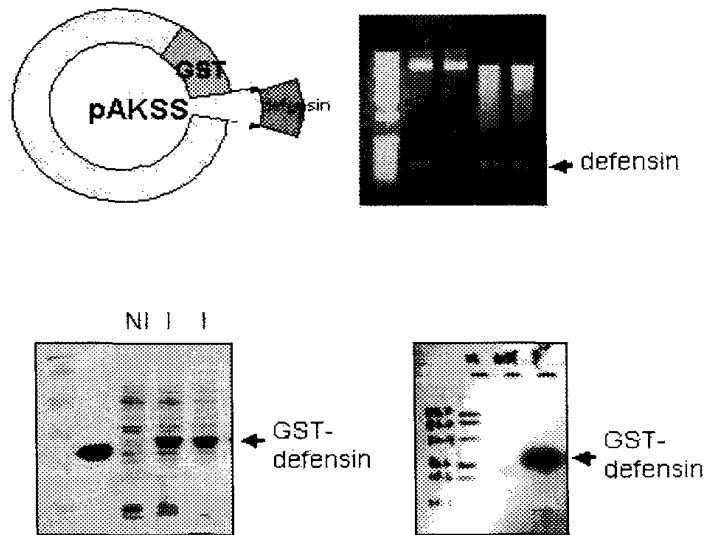


Figure 9. Expression of defensin in *E. coli*

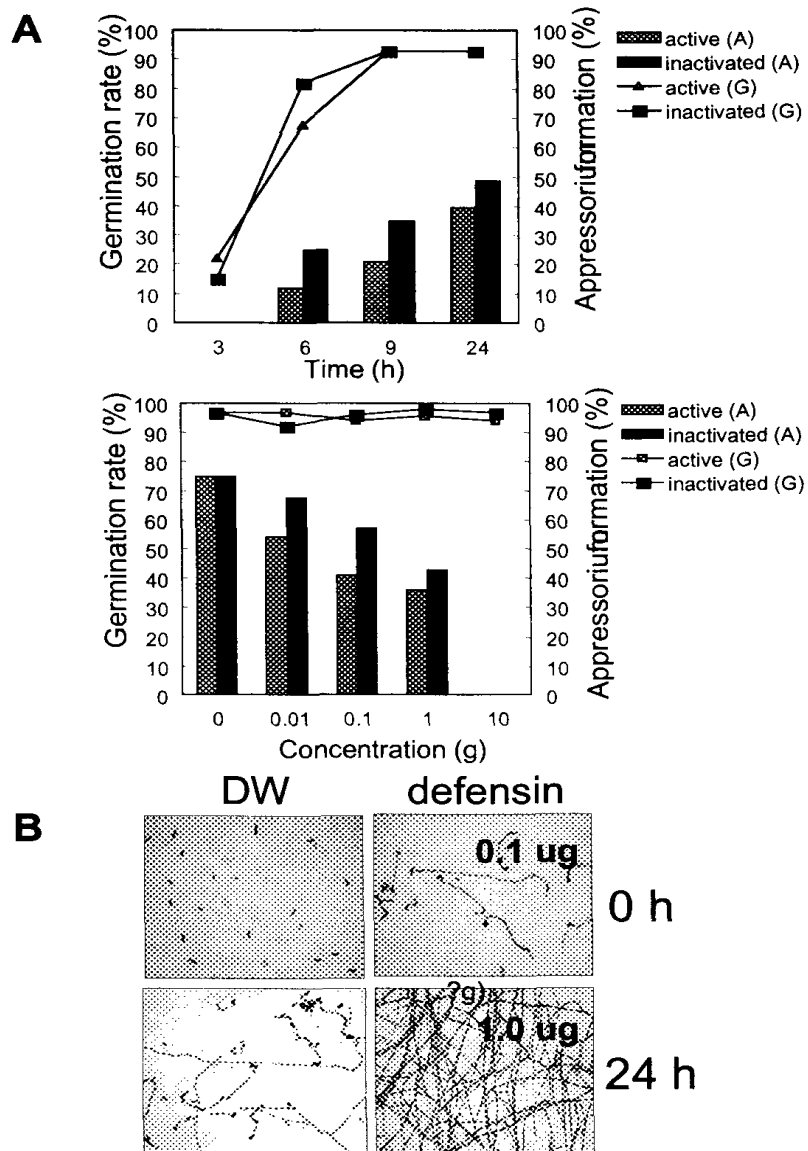


Figure 10. Inhibition of fungal growth of *C. gloeosporioides* by defensin *in vitro*

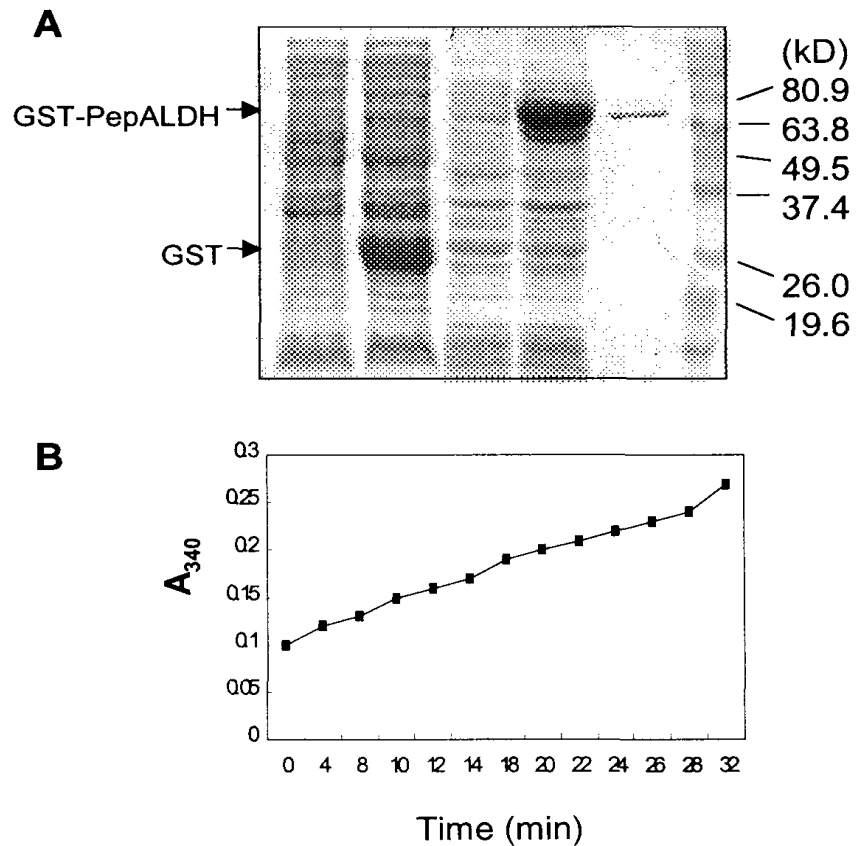


Figure 11. A. SDS-PAGE analysis of the recombinant GST-PepALDH protein produced in *E. coli*

B. *In vitro* assay of acetaldehyde dehydrogenase activity of purified GST-PepALDH (Acetaldehyde was used as the substrate)

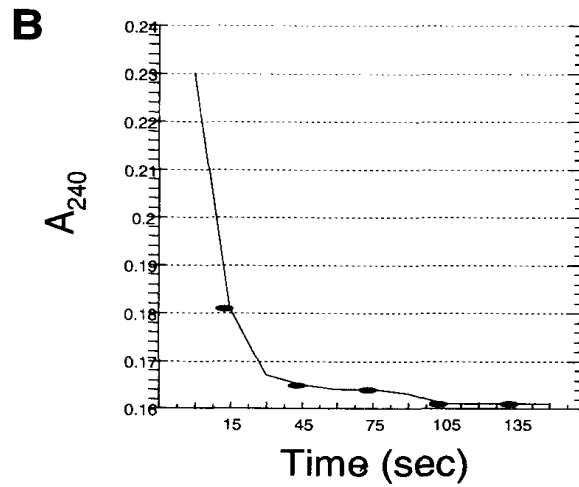
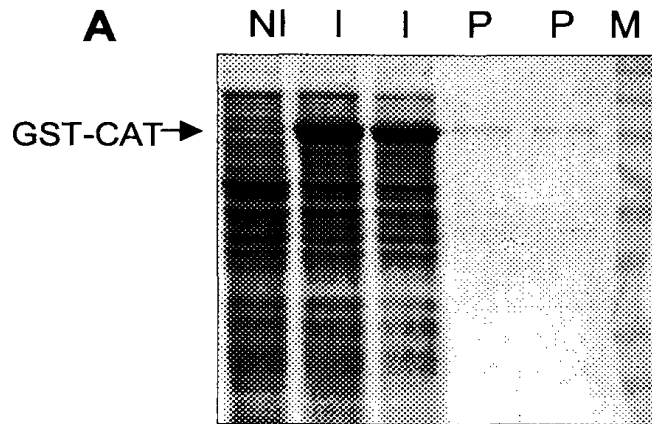


Figure 12. A. SDS-PAGE analysis of the recombinant GST-CAT protein produced in *E. coli* B. *In vitro* assay of CAT activity of purified GST-CAT(Hydrogen peroxide was used as the substrate)

Defensin은 항균단백질로 알려져 있다. 고추 defensin은 8개의 cysteine이 함유된 작은 단백질이며(5kD), 고추열매가 성숙되거나 병에 감염되었을 때 축적된다. 이 단백질의 기능을 조사하기 위하여 재조합단백질을 대장균에서 발현시킨 다음 분리하여 항균기능을 조사하였다(Fig. 9). Defensin 재조합단백질은 탄저병 포자의 appressorium 형성을 억제하여, 식물세포로 탄저병균이 침투하는 것을 방지하는 효과가 있다. 또한 열에 강해서 5분 동안 끓인 후에도 약 70% 활성이 유지된다(Fig. 10). 그 외에도 PepALDH(Fig. 11)와 catalase(Fig. 12)의 재조합단백질을 대장균에서 대량 생산한 다음 순수 분리하여 효소활성을 조사하였다. PepALDH와 catalase는 각각 acetaldehyde와 과산화수소를 기질로 사용했을 때 효소활성을 보였다.

단백질의 기능을 분석한 결과, 항균기능이 우수하고, 안정된 구조를 가지고 있는 고추 defensin을 식물체에 형질전환하여 생체내에서의 항균효과를 계속적으로 조사하였다.

## 참고문헌

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids Res* 25: 3389-3402
- Jack T, Brockman LL and Meyerowitz EM 1992. The homeotic gene APETALA3 of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell. Fed* 21;68(4): 683-97
- Kessmann H, Choudhary AD, and Dixon RA 1990. Stress response in alfalfa (*Medicago sativa* L. III. Induction of medicarpin and cytochrome P450 enzyme activities in elicitor-treated cell suspension cultures and protoplasts. *Plants Cell Rep.* 9:38-41
- Lonning WE and Saedler H, 1994 The homeotic Macho mutant of *Antirrhinum majus* reverts to wild-type or mutates to the homeotic plena phenotype. *Mol Gen Genet.* 245 : 636-43
- Maule AJ and Ride JP, 1983. Cinnamate 4-hydroxylase and hydroxycinnamate: CoA ligase in wheat leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 22 : 1113 - 1116
- Yanofsky MF, Ma H, Bowman JL, Drews GN, Feldman KA, and Meyerowitz EM, 1990. The protein encoded by the Arabidopsis homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* Jul 5; 346(6279):35-9

여 백

# 제 4 장 A Cytochrome P450 Gene Is Differentially Expressed in Compatible and Incompatible Interactions Between Pepper (*Capsicum annuum*) and the Anthracnose Fungus, *Colletotrichum gloeosporioides*

Boung-Jun Oh, Moon Kyung Ko, Young Soon Kim, Kwang Sang Kim, Igor Kostenyuk,  
and Hye Kyung Kee

Kumho Life and Environmental Science Laboratory, Korea Kumho Petrochemical Co., Ltd., 1  
Oryong-Dong, Puk-Ku, Kwangju 500-480, Korea.

*Published in j. of MPMI(Molecular Plant-Micro Interaction ) VOL. 12, NO. 12, 1999, pp. 1044-1052.*

Nucleotide and/or amino acid sequence data are to be found at the GenBank  
data base as accession number AF122821.

## I . Abstract

The anthracnose fungus, *Colletotrichum gloeosporioides*, was previously shown to have an incompatible interaction with ripe-red fruit of pepper (*Capsicum annuum*). However, the fungus had a compatible interaction with unripe-mature-green fruit. Using mRNA differential display, we isolated and characterized a *PepCYP* gene expressed in the incompatible interaction. The *PepCYP* gene encodes a protein homologous to cytochrome P450 proteins containing a heme-binding domain. The expression level of *PepCYP* is higher in the incompatible interaction than in compatible interaction, and then remains elevated in the incompatible interaction. In the compatible interaction, the expression of *PepCYP* is transient. The induction of *PepCYP* gene is up-regulated by wounding or jasmonic acid treatment during ripening. Analysis of *PepCYP* expression by in situ hybridization shows that the accumulation of *PepCYP* mRNA is localized in the epidermal cell layers, but not in the cortical cell layers. An examination of transverse sections of the fruits inoculated with the fungus shows that the fungus invades and colonizes the epidermal cell layers of the unripe fruit at 24 h and 72 h after inoculation, respectively, but not those of the ripe fruit. These results suggest that the *PepCYP* gene



product plays a role in the defense mechanism when the fungus invades and colonizes the epidermal cells of fruits in the incompatible interaction during the early fungal infection process.

Additional keywords: appressorium, biotic stresses, nonclimacteric fruits,

## II. Introduction

*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz & Sacc. in Penz. is the casual agent of anthracnose diseases on fruit crops (Daykin 1984; Dodd et al. 1991; Prusky et al. 1991) such as pepper (*Capsicum annuum L.*) (Kim et al. 1986; Manandhar et al. 1995). Infection caused by *C. gloeosporioides* is achieved through conidium germination and appressorium and infection hypha which formation that are necessary for subsequent cuticular penetration (Bailey et al. 1992). In the avocado-*C. gloeosporioides* interaction, conidium germination and appressorium formation were similar on both unripe-resistant and ripe-susceptible fruits (Prusky and Saka 1989; Prusky et al. 1991). In the pepper and *C. capsici* pathosystem, germination and appressorium formation were higher on the unripe-resistant pepper fruit than on the ripe-susceptible fruit (Adikaram et al. 1983). The germination of *C. musae* was similar on both ripe-susceptible and unripe-resistant banana fruits, but the appressorium formation was stimulated on the unripe fruit (Swinburne 1976). Taken together, in these pathosystems, although conidium germination and appressorium formation are prerequisite to infection the host plant, they may not be important factors in determining resistant or susceptible interactions between the host fruit of pre- or post-ripening stages and the *Colletotrichum* fungus. In contrast, plant responses to fungal morphogenesis during fruit ripening may be more important in determining resistant or susceptible interactions.

In *Colletotrichum* fungi, the topography of the plant surface was thought to be a physical signal for inducing appressorium formation (Staples and Macko 1980). The surface wax of avocado fruit was reported to act as a chemical signal for appressorium formation in *C. gloeosporioides* (Podila et al. 1993). In addition, the genes expressed during the appressorium formation of *C. gloeosporioides* induced by the host surface wax were cloned (Hwang and

Kollatukudy 1995). However, plant responses to the conidium germination and appressorium formation of *C. gloeosporioides* have not been studied.

In a previous study, we found that an isolate of *C. gloeosporioides* showed an incompatible interaction with the ripe-red pepper fruit and a compatible interaction with the unripe-mature-green fruit (Oh et al. 1998), even though ripe fruits are generally susceptible to pathogen infection (Prusky et al. 1991; Swinburn 1983). In this pathosystem, higher levels of appressorium and infection hypha formation, and longer infection hypha, were observed on the unripe fruit than on the ripe fruit in the early fungal infection step (Kim et al. 1999). A typical, sunken necrosis was detected only in the unripe fruit, but not in the ripe fruit at 5 days after inoculation. Based on these data of fungal morphogenesis and symptom development, we studied the gene expression in the pepper-*C. gloeosporioides* interaction.

Using a mRNA differential display method, we isolated several cDNAs that are differentially induced in the ripe fruit but not in the unripe fruit after fungal infection. In this study, we report the characterization of one of these cDNAs encoding cytochrome P450 protein (PepCYP). To our knowledge, *PepCYP* is the first cytochrome P450 gene that accumulates to high levels in an incompatible plant-fungus interaction. The expression of *PepCYP* gene was examined based on fungal behaviors in the initial infection process and on symptom development during the differential interactions. We found that the *PepCYP* gene is induced by wounding or exogenous jasmonic acid(JA) during ripening. A possible role of the *PepCYP* in pepper fruits against pathogen infection during ripening is proposed.

### III. Materials and Methods

#### **Fungal inoculum and plant material.**

Monoconidial isolate KG13 of *C. gloeosporioides* was cultured on potato dextrose agar (Difco, Detroit, MI) for 5 days in darkness at 28C. Sterile distilled water was added and conidia were harvested through four layers of cheesecloth to remove mycelial debris. Ten microliters of  $5 \times 10^5$  conidia of *C. gloeosporioides* was used for drop-inoculation on both ripe and unripe pepper

fruits as described (Oh et al. 1998).

Both ripe-red and unripe-mature-green fruits of pepper cv Nokkwang were grown and harvested under greenhouse conditions. For wound treatments, five healthy ripe and unripe fruits were deeply scratched with a knife and incubated at 100% relative humidity at 27°C in the dark. Ten microliters of ABA at 4 and 40  $\mu$ M, or JA at 4 and 40  $\mu$ M were drop-applied to both ripe and unripe sets of five fruits, respectively. After incubation under the conditions described above, the fruits were excised to 1 cm<sup>2</sup> at the drop-application site for the fungus, ABA or JA, and at the wounding site. The samples were then frozen in liquid nitrogen. Leaf, root, and stem samples were harvested from 3-week-old plants and handled as described above for fungal inoculation and wounding.

#### **mRNA differential display.**

Total RNA was extracted from healthy or infected ripe and unripe fruits using the RNeasy Plant kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. We used total RNA as template for the reverse transcriptase reaction and performed differential display with [ $\alpha$ <sup>33</sup>P]dATP instead of [ $\alpha$ <sup>35</sup>S]dATP (Liang and Pardee 1992). Anchored primers and random-arbitrary primers were purchased from Operon Technologies (Operon, Alameda, CA). Ployverase chain reaction (PCR) amplified cDNA fragments were separated on denaturing 5% polyacrylamide gels in Tris-borate buffer. cDNAs were recovered from the gel, amplified by PCR, and cloned into pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI) as described (Oh et al. 1995).

#### **Construction and screening of cDNA library.**

Poly(A)<sup>+</sup> mRNA was purified from total RNA of unripe-green fruits at 24 and 48 h after inoculation with *C. gloeosporioides* with the Oligotex mRNA Kit (Qiagen). The cDNA library (2.5 X 10<sup>5</sup> PFUs with a mean insert size of 1.2 kb) was constructed in the cloning vector  $\lambda$ ZAPII (Stratagene, Heidelberg, Germany) according to the manufacturer's instructions. A partial cDNA, designated pddICC6, from the differential display analysis was used as a probe to screen the *C. gloeosporioides*-induced pepper cDNA library. After three rounds of plaque hybridization, positive plaques were purified. The pBluescript SK phagemid containing cDNAs was excised in vivo from the ZAP Express

vector with the ExAssit helper phage.

#### **DNA sequencing and homology search.**

cDNA sequencing was performed with an ALFexpress automated DNA sequencer (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). Analysis of nucleotide and amino acid sequences was performed with the DNASIS sequence analysis software for Windows, version 2.1 (Hitachi, San Bruno, CA). The multiple sequence alignment was produced with the clustal W program. For a homology search, cDNA sequence was compared with the NCBI non-redundant databases using the BLAST electronic mail server (Altschul et al. 1997).

#### **RNA blot and hybridization.**

Total RNA (10  $\mu\text{g}$  per lane) from each plant tissue used in this study was separated on 1.2% denaturing agarose gels in the presence of formaldehyde. RNA gel-blotting, hybridization, and washing were conducted as described by the manufacturer of the positively charged nylon membrane employed (Hybond N+; Amersham Pharmacia Biotech). Radiolabeled probes were prepared with [ $^{32}\text{P}$ ]dCTP (Amersham Pharmacia Biotech) using a random primer-labeling kit (Boehringer, Mannheim, Germany).

#### **Tissue preparation and in situ hybridization.**

Pepper fruits were fixed in 1% glutaraldehyde/2% paraformaldehyde in 100 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, dehydrated in ethanol and embedded in paraffin. Tissues were transverse-sectioned at 10  $\mu\text{m}$  in thickness and stained with 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI ;10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) to examine the infection hypha of the fungus in pepper fruits (Russell et al. 1975).

pddICC6 was used to prepare gene-specific digoxigenin (DIG)-labeled antisense RNA probes with T7 RNA polymerase or sense RNA probes using sp6 RNA polymerase. Hybridization steps were performed according to the manufacture's recommendation (Boehringer, Mannheim, Germany).

## IV. RESULTS

### Cloning of a fungal-inducible cytochrome P450 gene of pepper.

To isolate genes differentially induced from the ripe fruit but not from the unripe fruit in response to the fungal infection, we used mRNA differential display (Liang and Pardee 1992). Differential display was performed with total RNAs prepared from both unripe and ripe fruits at 24 and 48 h after fungal inoculation. The cDNAs amplified from the ripe fruit were excised from the gel, re-amplified, and cloned. RNA gel blot analysis with these clones was performed to confirm their differential expression. A cDNA clone, named pddICC6 for the incompatible *Capsicum annuum/Colletotrichum gloeosporioides* interaction, hybridized to a transcript of 1.8 kb that accumulated to high levels in the incompatible interaction (data not shown).

To isolate the full-length cDNA clone, the insert of pddICC6 was used as a probe for plaque hybridization with a cDNA library prepared from mRNA extracted from the unripe fruit at 24 and 48 h after inoculation(HAI) with the fungus. A clone containing the longest insert from cDNA library screening was designated pICC6, isolated, and sequenced. The 3' region of pICC6 clone contained the nucleotide sequence of pddICC6 as expected.

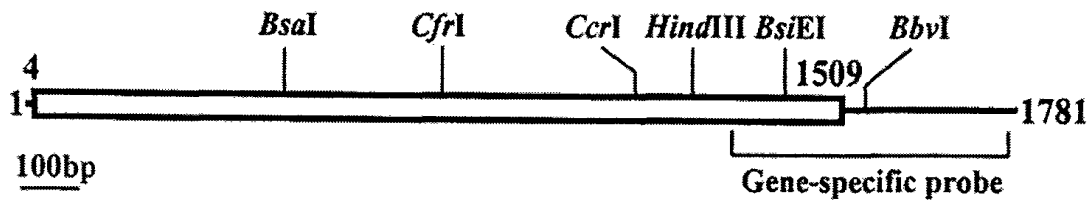


Figure 1. Restriction enzyme map of a cytochrome P450 cDNA, *PepCYP*, from pepper (*Capsicum annuum*). Numbers indicate nucleotide positions, open bar indicates coding region that is 4 to 1509 nucleotide positions. The 3' region of *PepCYP* clone contains the nucleotide sequence of the cDNA fragment, pddICC6, amplified by differential display. This partial cDNA fragment was used for gene-specific RNA probe for in situ hybridization.

### **Sequence analysis and characterization of *PepCYP* cDNA.**

The 1,781 bp, full-length sequence (Fig. 1) contains one open reading frame of 1,506 bp from the first translation start (ATG) at nucleotide position 4 to a translational stop (TGA) at position 1509 (GenBank accession no. AF122821). The nucleotide sequences of pICC6 encode a polypeptide of 502 amino acids with a calculated molecular mass of 56.8 kDa. A putative polyadenylation site was identified at 22 bp downstream of the stop codon. The amino acid sequence of this cDNA is highly homologous to the genes encoding cytochrome P450s found in plants. Therefore, the pICC6 clone was designated *PepCYP* for pepper cytochrome P450. The *PepCYP* protein contains a hydrophobic membrane anchor region in the N terminal region (amino acid residues 1 to 27) (Bozak et al.1990)(Fig. 2). A heme-binding domain (residues 435 to 440), PFGXGXRXCXG, is located in the C terminal region of the polypeptide (Frey et al. 1995).

The highest level of sequence identity was 59% with a potato cytochrome P450 protein (CYPs.ch) from a *Solanum chacoense* line rich in glycoalkaloids (Hutvagner et al. 1997) (Fig. 2). Sequence identity was 52% and 48% with CYP71D8 and CYP71D9 from soybean treated with an elicitor, respectively (Schopfer and Ebel 1998). The identities with other CYP71 subfamilies were 46% with avocado CYP71A1 (Bozak et al. 1990), 41% with catmint CYP71A5 (Clark et al. 1997), and 40% with *Arabidopsis* CYP71B6 (Mizutani et al. 1998). The minimum identity of amino acid sequence required to assign a cytochrome P450 within the same family should be higher than 40% (Nebert et al. 1991). Thus, the pepper gene belongs to the CYP71 family. In the tobacco and phytopathogenic bacterium *Pseudomonas solanacearum* interaction, the first cytochrome P450 gene *hsr515* of tobacco that was expressed during the hypersensitive reaction was isolated (Czernic et al. 1996). The *hsr515* protein shared 36% identity with the *PepCYP*.

Pepper	1	MEIQFTNLVAFLLFLSSIIILLKKMKTKLN-----LPPGPNKLPFIFGLHHLAVAGPL	54
Potato	1	HQLVSIFFLFI-FLPFLLRKWKYLNNSQT-KKLPPGPNKLPFIOGHHLAGG--L	51
Soybean	1	MEYSPLSIVITFFVPLLLHMLVKTYKQSSHKLPFGPNRPLIIGNLHQLAASL	55
Avocado	1	NAILVSLFLAIALTFPFLKLNKREKRP-----NLPPSPNLPITIGNLHQLGNL---	50
Catmint	1	NVLSYFLIALCTLPFLFLNKRRSYSG-----KTPPPSPKLPVIGNLHQLGLY---	52
Arabidopsis	1	NVLSYFLIALCTLPFLFLNKRRSYSG-----KTPPPSPKLPVIGNLHQLGLY---	52
Tobacco	1	MEGTNLTYYAAVFIQTLPFLFLSKLLRQRK-----LNLPPGPKPWPITIGNLNLIGNL---	52
Pepper	55	PHNGLKNLAKLYGPMHLRIGEIPTVIISPPRAKEVLRKTHDLAFATRPKLVVADIVHYD	114
Potato	52	PHRVLRDLAEKYGPMHLRIGELVSAVVTSPEMAKQVLRKTHDIAPASRPKLLAMDIICYN	111
Soybean	56	PDQALQKLVKRYGPMHLRIGELISTLVVSSPKMANEGKTHDVMFVQRPQLLAQPMVYG	115
Avocado	51	PHRSLRSLANLGLPLILLHGHIPTLIVSTARIAEELKTHDLIFASRPSSTTAARRIFPD	110
Catmint	53	PHRYLQSLRRYGPMLQHPGSPVPLVAVSSPEAAAREIKKQDVFVSNRPMKSIANRLEFPN	112
Arabidopsis	52	LHKCLHDLKSKIGPVMLRLGFAPMVVISSEAAAEALKTHDLKCCSRPTMARSVFSRN	111
Tobacco	53	PYRSIHLSLKYGPVHLQPGSPVVGSSVEMAKIFLKSMDINFGVGRPKTAAGKYTTYN	112
Pepper	115	STDIAPSPYGEYWRQYRKICILELLSAKIVKPFSSIRQDELSPMVSSIR---TNPMPVN	171
Potato	112	RRDIAFSPYGDYWRQNRKICIMEVLSAKSVRSPSSIRHDEVVRLIDSIQPC-FTSGELVN	170
Soybean	116	ATDIAFAPYGDYWRQYRKICILELLSAKRVQSPSHIRQDENKLLIQSIH---SSAGSPID	172
Avocado	111	CTDIAFSPYGEYWRQYRKICVLELLSIRKRVNYSRISREEVVGLNHERISQS-CSTGEAVN	169
Catmint	113	NRDVAFTQYGEYWRQYRSCVYQLLSNKRVSQSPRRVREETSINVEKIMQLGSSSTPVN	172
Arabidopsis	112	GKDIGFQYGDWRRLKLVREFFSVKRVQSPFKYIREENDLNIKKLKL-ASKQSPVD	170
Tobacco	113	YSDITWSPYGPYWRQYRMCITLSTKCLDSYEYIRAEELHSLHLLNLN---KISGKPIV	169
Pepper	172	LTDKIFWFTSSVTCRSALGKICRDQD-----KLIIFMREIISLTGGFSIADFPFTW-	222
Potato	171	PTERIWFSTSSHTCRSAFGQVLRKQE-----VFIKLIREVISLAEQGFVADIFPSY-	221
Soybean	173	LSGKLFSLGTTVSRRAAFKENDDQD-----EFNSLVKRAITHTGGFVDDMFPSL-	223
Avocado	170	LSELLLLSSGTITRVAFGKRYEGEE--ERK--NKFADLATELITLNGAFVDDYFSS-	224
Catmint	173	LSELLLSLTDVAVCRVTLGRKYGQNGSEEV--DKLKEHLTEIQNLGSIQVMEFIPWL-	229
Arabidopsis	171	LSKILFGLTASIIIRVTAFGQSPFDNKVVDQ--ESIKELMFESLSNMT-FRFSDFPFTG	226
Tobacco	170	LKDYLTTLSLNVI:SRVVLGKRYLDESENSFVNPKEFKMLDELFLNGVLNIGDISIPWID	229
Pepper	223	--KMLHDVGGSKTRLLKAHRKIDELIEHVVNENKONPADGQKNGEFGGE-DLIDVLLRV	279
Potato	222	--KFLHGFQAGAKKLLNNAHRKVDSEVVDVIEKHKONLATR-KSDDAIQGE-DLVDALVRL	277
Soybean	224	--KPLHLLTRQAKAVEHVQRADKILEDILRKHNEKTRVKEGNGSEAEQEDLVVLLRL	281
Avocado	225	--AWVDVLTGMDARLKRNHGELDAFVDVIVDOHLLSRKAN--GSDGVQKDLVDVLLHL	284
Catmint	230	--NWTRRFQGVQVDRIVKAFQGFLESVIEQHKERDQDK--DGDGDGALDFVDIILQF	279
Arabidopsis	227	LKWFIFGFVSGQHKLVNVPFRVDTFFNHIVDDHHSKKAQ-----DRPDMVDAITLDM	278
Tobacco	230	----FMDLQGYVRRKRVSKKFDKFLKRVIDEHNTRRNGVEN-----YVAKNHEDVLLQL	280
Pepper	280	RESGE--VQISITDONIKSILVDMPSAGSETSTTIWALAEHKKKPSVLAKAQAQEVRRV	337
Potato	278	MNDKS--LQPIANNDEKAVIIDLFAAGTETSSTTTVMNAEMLNKPSVFAKAQAQVREA	335
Soybean	282	RESGS--LEVPMTMENIKAVIWNIPAAQTDTASTLEWANEHMKPKVKEKAQAQELRQI	339
Avocado	280	QKSS--LGVHLNRNNLKAVIDLMPFSGTDTTAVTLEWANAELIKHPDMVKEQAQEVRRV	337
Catmint	285	QENK--NRSVVEDDVKAVIIDMFPVAGTDTTATALEWANAELIKHPRAMKRLQNEVREV	342
Arabidopsis	279	IDNEQYASFKLTVQHLKGVLSNIYHAGIDTSAITLIMAHAEVLRNPRVHKKAQAQEIIRC	338
Tobacco	281	ADOPK--LEVKLERHGVKAFQDMLAGTTESSAVTVEWAISELSKKPEIPKKAATELDRV	338
Pepper	338	LKEKKG--FQIDLDLKYLLKLVIKETLRNHPPIPLLVPRECHMDTKIDQYNIPEKTRVI	395
Potato	336	FQDKVT--FDENVVELKYLKLVIKETMRLHAPVPLLVPRECREETSINGYTIPIVKTVM	393
Soybean	340	FKKKEI--IRETDLEELSYLKSVIKETLRNHPPIPLLVPRECIISTNIDGYEIPKTKVM	396
Avocado	338	VGKKAK--VEEEDLHQLHYLLKLIKETLRNHPVAPLLVPRESTRDVIIRGVHIAKTRVL	395
Catmint	343	AGSKAE--IEEEDLEKMPYLKASIKESLRLHPVPLLVPRESTRDVIIRGVHIAKTRVL	400
Arabidopsis	339	EGIKQEGRIEEDDKLOYLKLKLVKETLRNHPVAPLLVPRETHADIKIQGVDIPQKRALL	398
Tobacco	339	IQONRW--VQEKDIPNLPYIEAIVKETHRLHPVAPKAT-ECRENSKVGVDVQKTRVL	395
Pepper	396	VNAWIGRDPESWDDPESPSPERFEN--SSVDFLGSHHQFIPFGAGRRCIPGMLFGLANVG	454
Potato	394	VNVWALGRDPKYWDDARSFKPERFEQ-CSIDFIQNNPEYLPFGGGRICPGISGLANNV	452
Soybean	397	INTWALGRDPQYWSDADRPIPERFND--SSIDFKGNSPEYIPFGAGRRCIPGMLFGLASIT	455
Avocado	396	INAWALGRDPKSWENAEELPERFVN--NSVDFKGGDFQLIPFGAGRRCIPGMLFGLASV	454
Catmint	401	INAWALGRDPKSWENAEELPERFLD--SSIDFKGNSPEYIPFGAGRRCIPGMLFGLASV	459
Arabidopsis	399	VNAWIGRDPESWDDPESPSPERFID-CPVDYKGHSCCELLPFGSRRICPGMLFGLASV	457
Tobacco	396	VNVWALGRDPTLWDEPEVFKPERFHEKASIDVYKGHYELLPPGGRRCIPGMLFGLASV	455
Pepper	455	QPLAQLLYHFDRKLPNGQSHENLDMTESPGISATRKDDLVLIATPPYP	502
Potato	453	LPLAQLLYHFDRKLPNGQSHENLDMTESAGITAAKGGDLYLIATPPQP	500
Soybean	456	LPLALLLYHFENWELPNKMKPEDLDNDEHFGMTVARKNKIPLIPTVYAS	504
Avocado	455	ISLANLLYWFNWEPLGDLTREDLDMSEAVGIVVHKFPPLQLVAKRHLS	502
Catmint	460	LALAKLVNKFDFGLPNGARMEELDMSETSGMTVHKKSPLLLPIPHRAAF	509
Arabidopsis	458	LGLLNLLYFPDWNMPE--KKMDMDEEAGDLTVDKKVPLELLPVIRISL	504
Tobacco	456	ASLANLLYHGFNWSLDMNMTPEDLDNDEIFGLSTPKKFLATVIEPRLSPKLYSV	509

Figure 2. Alignment of the deduced amino acid sequence from *PepCYP* cDNA (pepper) (GenBank accession no. AF122821) with other cytochrome P450 proteins from potato (CYPs.ch), soybean (CYP71D8), avocado (CYP71A1), catmint (CYP71A5), Arabidopsis (CYP71B6), and tobacco (hsr515). upper line indicates hydrophobic N-terminal membrane anchor region of *PepCYP* (amino acid residues 1 to 27). The conserved PFGXGXRXCXG heme-binding domain in the C-terminal region of the polypeptide is indicated by dots.

**Fruit-specific induction of *PepCYP* gene by fungal inoculation: Up-regulation during ripening, and upon wounding and jasmonic acid treatments.**

*C. gloeosporioides* causes anthracnose diseases on the fruit of various plant species (Daykin 1984; Dodd et al. 1991; Kim et al. 1986, Manandhar et al. 1995, Prusky et al. 1991). Thus, we examined whether the expression of *PepCYP* gene was fruit-specific by fungal infection or inducible by other treatments. RNA gel blot analysis was performed with total RNAs prepared from fruits, leaves, stems, and roots of the pepper plants at 24 h after fungal inoculation or wounding. The expression of *PepCYP* gene was observed in fruits but not in leaves, stems, and roots after treatments (Fig. 3A). Interestingly, the *PepCYP* mRNA was induced in both ripe and unripe fruits by fungal infection, but wounding caused the induction of this mRNA only in the ripe fruit.

JA is a plant hormone with roles in mechanical wounding responses (Creelman et al. 1992; Creelman and Mullet 1997). Abscisic acid (ABA) is hypothesized to be a key component in wound-signaling cascade leading to the activation of a defense gene (Pena-Cortes et al. 1996; Wasternack and Partheir 1997). Thus, we further examined whether the wound-inducible *PepCYP* expression is inducible by ABA or JA treatments. RNA gel blot analysis was performed with total RNAs prepared from the application sites of both ripe and unripe fruits drop-applied with ABA or JA for 24 h. *PepCYP* mRNA highly accumulated only in the ripe fruit treated with JA at 40 M (Fig. 3B). However, ABA did not affect the expression of *PepCYP* in both ripe and unripe fruits. To test whether a high concentration of JA is able to induce the expression of *PepCYP* in the unripe fruit, JA was applied to the unripe fruit at 100, 400, and 1000 M. No induction of *PepCYP* expression was observed in the unripe fruit treated with JA (data not shown).

**Differential induction of *PepCYP* gene in compatible and incompatible interactions.**

In our previous studies (Kim et al. 1999; Oh et al. 1998), higher levels of the appressorium and infection hypha formations were observed on the unripe fruit than on the ripe fruit at 12 and 24 (HAI), respectively. Initial anthracnose symptoms were detected only on the unripe fruit after 48 HAI, and typical



sunken necrosis occurred within 120 HAI. Thus, we examined whether the induction of time-course of *PepCYP* mRNA by *C. gloeosporioides* inoculation correlated with fungal morphogenesis and symptom development. RNA gel blot analysis was performed with both unripe and ripe fruits at 0, 3, 6, 12, 24, 48, and 72 HAIs. The *PepCYP* mRNA was not detected in both ripe and unripe fruits with water inoculation without fungal spores as a control. However, the accumulation of *PepCYP* mRNA was detected in both ripe and unripe fruits from 12 HAI (Fig. 4). In the unripe fruit, the expression of *PepCYP* gene is transient and peaks at 24 HAI before rapidly declining to barely detectable levels at 48 and 72 HAI. In contrast, in the ripe fruit, the expression level remains elevated. Thus, the results show that the *PepCYP* gene is inducible by fungal infection and is differentially expressed in compatible and incompatible interactions.

A cDNA for the *PR-2* gene from *Nicotiana glutinosa* was hybridized to the same blots to serve as a molecular marker for the activation of plant defense responses. In the unripe fruit, a basal level of *PR-2* mRNA was not detected, but the accumulation of *PR-2* mRNA was detected at 12 HAI (Fig. 4), and a biphasic accumulation of *PR-2* mRNA was observed at 12 and 72 HAIs. In contrast, in the ripe fruit, a basal level of *PR-2* mRNA was detected. The expression of *PR-2* gene was rapidly induced in the ripe fruit at 3 HAI and reached a maximum at 48 HAI.

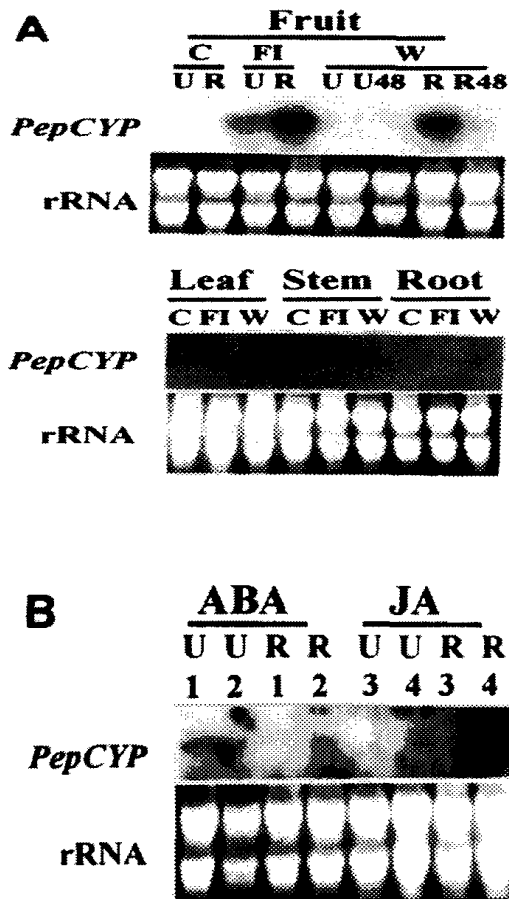


Figure 3. A. Expression and induction of *PepCYP* gene from various organs of pepper by *Colletotrichum gloeosporioides* inoculation or wounding. RNAs were isolated from the application sites of ripe fruit (R), unripe fruit (U), leaf, stem, and root at 24 h after the treatments of fungal inoculation (FI) or wounding (W). In addition, RNAs of both ripe (R) and unripe fruits (U) at 48 h after wounding were isolated. Ten microliters of  $5 \times 10^5$  conidium/ml of *C. gloeosporioides* per ml was used for drop-inoculation on various pepper organs. Organs treated with 10  $\mu$ l of sterile-water except fungal spores for 24 h were used as the control (C). B. Induction of *PepCYP* gene from both ripe and unripe fruits of pepper by exogenous abscisic acid (ABA) or jasmonic acid (JA) treatments. RNAs were isolated from the application sites of both ripe (R) and unripe fruits (U) drop-applied with 10  $\mu$ l of ABA (1 = 4 M, 2 = 40 M) and JA (3 = 4 M, 4 = 40 M) for 24 h.

### **Localization of *PepCYP* mRNA during early infection.**

To examine the localization and accumulation of *PepCYP* mRNA during early infection, we performed in situ hybridization with a gene-specific antisense or sense RNA probe of pddICC6 (Fig. 1) with sections. The transverse-sections were prepared from the infection sites of both ripe and unripe fruits at 24 and 72 HAIs, respectively. The transcript of *PepCYP* was not detectable in uninoculated unripe (Fig. 5A) and ripe fruits (Fig. 5D) hybridized with anti-sense or sense RNA probe (data not shown). In unripe fruit, fungus with infection hypha started to invade outer epidermal cells at 24 HAI (Fig. 5B) (Oh et al. 1998). The accumulation of *PepCYP* mRNA at 24 HAI was localized only in the epidermal cells that were highly vacuolated, and not in the cortical cell layers (Fig. 5B). When the fungus colonized the outer epidermal cells at 72 HAI, the induction-level of transcripts was very low or undetectable (Fig. 5C). In ripe fruit, fungal invasion was rarely observed at 24 HAI (Fig. 5E), and even at 72 HAI (Fig. 5F). This result shows that fungal invasion and colonization are inhibited in incompatible-ripe fruit during early infection. The accumulation of the transcripts in the epidermal cells at 24 HAI was sustained up to 72 HAI. These results suggest that the expression of the *PepCYP* gene is localized to the epidermal cell layers of the ripe fruit during incompatible interaction.

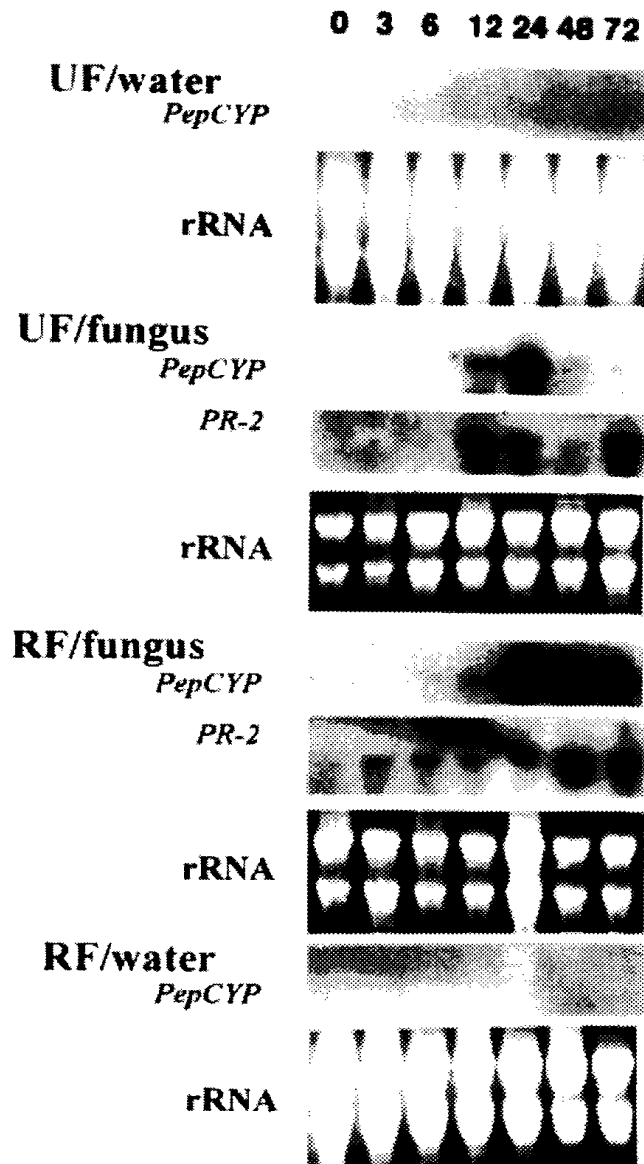


Figure 4. Differential induction of the *PepCYP* gene from the pepper fruit by *Colletotrichum gloeosporioides* inoculation. RNAs were isolated from both ripe (RF/FUNGUS - the incompatible interaction) and unripe (UF/FUNGUS - the compatible interaction) fruits after the fungal infection with time-course. Water inoculation without fungal spores on both ripe (RF/WATER) and unripe (UF/WATER) fruits was used as the control. A cDNA for the PR-2 gene was hybridized to the same blot. Numbers indicate in h after inoculation.

## V. DISCUSSION

As a first step to investigate the molecular mechanisms involved in the incompatible interaction between the ripe fruit of pepper and *C. gloeosporioides*, several cDNAs were isolated that were differentially expressed by fungal infection in the ripe fruit, but not in the unripe fruit. In this study with one of these cDNAs, we showed the characterization of the *PepCYP* gene that encodes a protein homologous to plant cytochrome P450 (Bozak et al. 1990; Frey et al. 1995). Cytochrome P450s in plants are membrane-bound proteins involved in several metabolic pathways related to the defense mechanisms (Maule and Ride 1983; Kessmann et al. 1990). Some genes encoding these proteins are induced by wounding (Batard et al. 1997; Frank et al. 1996). In a plant-phytopathogenic bacterium interaction, the tobacco cytochrome P450 gene, *hsr515*, was isolated during hypersensitive reaction (Czernic et al. 1996). In this study of a fungal-plant interaction, a pepper cytochrome P450 gene, *PepCYP*, was differentially expressed in compatible and incompatible interactions. Transcript levels of the two interactions were very different with maintenance of elevated levels in the incompatible interaction and a very substantial reduction in the compatible interaction. Together with the *hsr515* gene in a bacterial-plant interaction, the isolation of *PepCYP* in the pepper and fungus interaction suggests a new role for cytochrome P450s in plant-pathogen interactions.

Sequence comparison showed that *PepCYP* protein shared highest homology to the CYPs.ch from a *Solanum chacoense* line rich in glycoalkaloids (Hutvagner et al. 1997) as well as CYP71D8 and CYP71D9 from soybean treated with an elicitor (Schopfer and Ebel 1998). A possible role of CYPs.ch was suggested to be involved in the synthesis of stress-inducible metabolites. CYP71D8 and CYP71D9 may have a variety of functional roles in terpenoid metabolism (Christoffersen et al. 1995). The antimicrobial sesquiterpenoid phytoalexin, capsidol (Chavez-Moctezuma and Lozoya-Gloria 1996; Watson and Brooks 1984), was synthesized in pepper challenged with fungus (Ward 1976) and an abiotic elicitor, UV light (Back et al. 1998). Therefore, these data raise the possibility that *PepCYP* functions in the pepper plant's defense against fungal infection. The expression of *PepCYP* gene in the pepper fruit in response to fungal inoculation and wounding (Figs. 3 and 4) supports a possible role of *PepCYP* involved in the plant's defense mechanism.

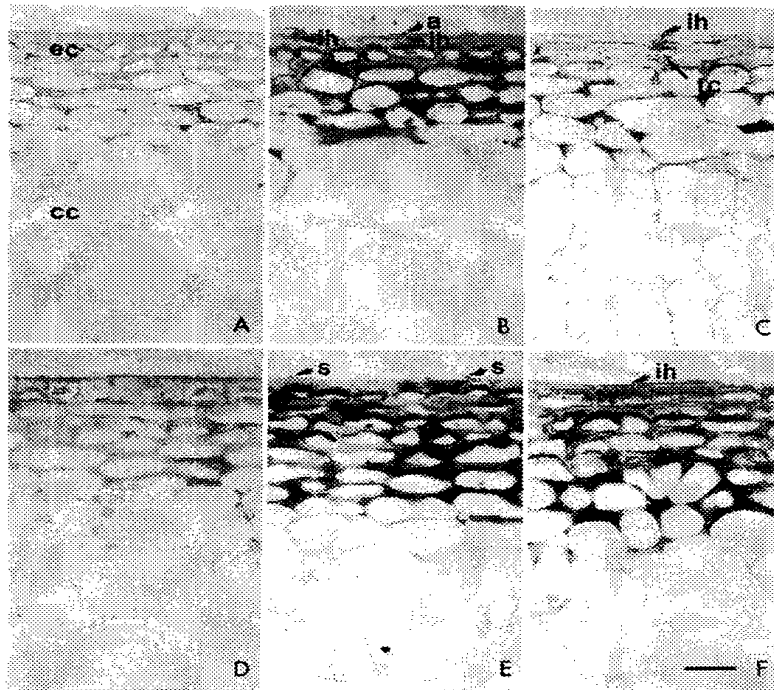


Figure 5. In situ localization of *PepCYP* mRNA in pepper fruits at 24 and 72 h after inoculation (HAI) with *Colletotrichum gloeosporioides*. The fungus with infection hypha started to invade in the outer epidermal cells of the unripe fruit at (B) 24 HAI, and subsequently (C) colonized the epidermal cells at 72 HAI . However, the fungal invasion was rarely observed in the ripe fruit at (E) 24 and (F)72 HAIs. Transverse sections were hybridized with the digoxigenin (DIG)-labeled, antisense RNA probe of pddICC6 as a gene-specific probe. In both uninoculated unripe (A) and ripe fruits used for the controls, transcripts were not detected in the epidermal and cortical cell layers. Deep-blue precipitation of transcripts were detected only in the epidermal cell layers (ec) of both (B) unripe and (E) ripe fruits at 24 HAI, and of (F) the ripe fruit at 72 HAI, but not in the cortical cell layers (cc). Transcripts were not detected in the unripe fruit that was colonized by the fungus at (C) 72 HAI . Bar represents 100  $\mu$ m. a, appressorium; cc, cortical cell layers; ec, epidermal cell layers; fc, fungal colonization; ih, infection hypha, s; spore.

The first cytochrome P450, CYP71A, in plants was identified during avocado fruit ripening (Bozak et al. 1990). In this study, a basal level of *PepCYP* mRNA was not detected in ripe or unripe fruits or other various organs of pepper, and the induction of *PepCYP* was detected only in fruit after fungal inoculation (Fig. 3A). In addition, the expression of *PepCYP* was induced only in ripe fruit by wounding and JA treatment (Fig. 3A and B). Thus, these results suggest that *PepCYP* is developmentally and fruit-specifically regulated, and the induction is up-regulated during fruit ripening in response to wounding and JA. JA is reported to have roles in mechanical wounding responses (Creelman et al. 1992; Creelman and Mullet 1997) and in activating genes for plant disease resistance (Johnson et al. 1989; Xu et al. 1994; Reinbothe et al. 1994). However, the role of JA during the fruit ripening has not been well studied, in contrast to role of ethylene (Theologis 1992). A few cases that methyl JA triggers the ripening process of climacteric fruits including tomato and apple with ethylene production were reported (Czapski and Saniewski 1992; Saniewski et al. 1987a, 1987b). However, the role of JA in nonclimacteric fruits such as pepper, grape and strawberry has not been reported.

Fruit ripening represents a genetically synchronized developmental process unique to plants. Generally, ripe fruit is accompanied by an increased susceptibility to pathogen infection (Prusky et al. 1991; Swinburn 1983). As one of the reproductive organs of the plants, the fruit must be protected from pathogens or abiotic stresses. Pathogenesis-related (PR) proteins and several antifungal proteins that are responsible for the protection against pathogens during fruit ripening have been identified (Fils-Lycaon et al. 1996; Meyer et al. 1996; Salzman et al. 1998; Tattersall et al. 1997). In the present study, the expression of *PepCYP* gene was detected only in the ripe fruit after fungal inoculation or wounding. We propose that the *PepCYP* gene is involved in the defense mechanism for the ripe fruit in order to maintain fruit integrity and to protect seed maturation against biotic and abiotic stresses.

Initial and mature infection hypha of *C. gloeosporioides* developed on pepper fruits at 12 and 24 HAIs, respectively (Oh et al. 1998). *PepCYP* mRNA in the fruit started to accumulate from 12 HAI and increased at 24 HAI (Fig. 4). Thus, it is likely that *PepCYP* gene expression occurs when the fungus directly invades the fruit by infection hypha. In microscopic and in situ

hybridization observations, although cells didn't directly contact the fungus, the induction of *PepCYP* transcript was detected throughout the epidermal cell layers. This result suggests that transcripts are induced by plant-derived defense signals generated after the fungus invasion. On the other hand, the accumulation of PR-2 mRNA in the ripe fruit at 3 HAI when the fungus germinates suggests that this gene is induced early in the incompatible interaction by fungal elicitors rather than plant-derived signals. The induction of *PepCYP* and *PR-2* mRNAs was observed to be higher and faster, respectively, in the incompatible interaction than in the compatible interaction. Similar phenomena have been reported for many other plant-pathogen interactions (Ebrahim-Nesbat et al. 1989; 1993). Thus, higher and faster expression of many defense genes including *PepCYP* and *PR-2* may confer disease resistance for the ripe fruit against fungal infection.

In summary, the present study showed that active fungal invasion and colonization processes are suppressed in the incompatible-interacting ripe fruit. Notably, *PepCYP* mRNA accumulated to higher levels in the ripe fruit in response to the fungal infection. The transcript is mainly localized in the epidermal cell layers of the pepper fruit after the fungal inoculation. We suggest that the *PepCYP* gene product plays a critical role in the plant's defense mechanism against the fungal invasion and colonization of the epidermal cells of the fruit in the incompatible interaction. It remains to be elucidated how the cytochrome P450 protein provides an effective defense against the fungal infection in pepper.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank In Seok Oh for providing the isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*, Doil Choi for providing a cDNA for the PR-2 gene, and Jung Mook Kim for helpful discussion and critical reading of the manuscript.

KLESL publication no. 31.



## VI. References

- Adikaram, N. K. B., Brown, A. E., and Swinburne, T. R. 1983. Observations on infection of *Capsicum annuum* fruit by *Glomerella cingulata* and *Colletotrichum capsici*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 80:395-401.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Back, K., He, S., Kim, K. U., and Shin, D. H. 1998. Cloning and bacterial expression of sesquiterpene cyclase, a key branch point enzyme for the synthesis of sesquiterpenoid phytoalexin capsidiol in UV-challenged leaves of *Capsicum annuum*. *Plant Cell Physiol.* 39:899-904.
- Bailey, J. A., O'Connell, R. J., Pring, R. J., and Nash, C. 1992. Infection strategies of *Colletotrichum* species. Pages 88-120 in: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. J. A. Bailey and J. A. Jeger, eds. CAB International, Wallingford, UK.
- Batard, Y., Schalk, M., Pierrel, M. A., Zimmerlin, A., Durst, F., and Werck-Reichhart, D. 1997. Regulation of the cinnamate 4-hydroxylase (CYP73a1) in Jerusalem artichoke tubers in response to wounding and chemical treatments. *Plant Physiol.* 113:951-959.
- Bozak, K. R., Yu, H., Sirevg, R., and Christoffersen, R. E. 1990. Sequence analysis of ripening-related cytochrome P-450 cDNAs from avocado fruit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3904-3908.
- Chavez-Moctezuma, M. P., and Lozoya-Gloria, E. 1996. Biosynthesis of the sesquiterpene phytoalexin capsidiol in elicited root cultures of chili pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Cell Rep.* 15:360-366.
- Christoffersen, R. E., Percival, F. W. and Bozak, K. 1995. Functional and DNA sequence divergence of the CYP71 gene family in higher plants. Pages 207-219 in: *Drug metabolism and drug interactions*. F. Durst, and D. P. O'Keefe, eds. Freund, UK.
- Clark, I. M., Forde, B. G., and Hallahan, D. L. 1997. Spatially distinct expression of two new cytochrome P450s in leaves of *Nepeta racemosa*: identification of a trichome-specific isoform. *Plant Mol. Biol.* 33:875-885.
- Creelman, R. A., and Mullet, J. E. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:355-381.
- Creelman, R. A., Tierney, M. L., and Mullet, J.E. 1992. Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4938-4941.
- Czapski, J., and Saniewski, M. 1992. Stimulation of ethylene production and

- ethylene-forming enzyme in fruits of the non-ripening nor and rin tomato mutants by methyl jasmonate. *J. Plant Physiol.* 139:265-268.
- Czernic, P., Huang, H. C., and Marco, Y. 1996. Characterization of hsr201 and hsr515, two tobacco genes preferentially expressed during the hypersensitive reaction provoked by phytopathogenic bacteria. *Plant Mol. Biol.* 31:255-265.
- Daykin, M. E. 1984. Infection in blueberry fruit by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Dis.* 68:984-950.
- Dodd, J. C., Estrada, A., Matcham, A., Jeffries, P., and Jeger, M. J. 1991. The effect of environmental factors on *Colletotrichum gloeosporioides*, the causal agent of mango anthracnose, in the Philippines. *Plant Pathol.* 40:568-575.
- Ebrahim-Nesbat, F., Behnke, S., Kleinhofs, A., and Apel, K. 1989. Cultivar-related differences in the distribution of cell-wall bound thionins in compatible and incompatible interactions between barley and powdery mildew. *Planta* 179:203-210.
- Ebrahim-Nesbat, F., Bohl, S., Heitefuss, R., and Apel, K. 1993. Thionin in cell walls and papillae of barley in compatible and incompatible interactions with *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 43:343-352.
- Fils-Lycaon, B. R., Wiersma, P. A., Eastwell, K. C., and Sautiere, P. 1996. A cherry protein and its gene, abundantly expressed in ripening fruit, have been identified as thaumatin-like. *Plant Physiol.* 111:269-273.
- Frank, M. R., Deyneka, J. M., and Schuler, M. A. 1996. Cloning of wound-induced cytochrome P450 monooxygenase expressed in pea. *Plant Physiol.* 110:1035-1046.
- Frey, M., Kliem, R., Saedler, H., and Gierl, A. 1995. Expression of a cytochrome P450 gene family in maize. *Mol. Gen. Genet.* 246:100-109.
- Giovannoni, J. J. 1993. Molecular biology of fruit developmental and ripening. Pages 253-287 in: *Methods in Plant Molecular Biology*. J. Bryant, ed. Academic Press, NY, USA.
- Hutvagner, G., Barta, E., and Banfalvi, Z. 1997. Isolation of sequence analysis of a cDNA and related gene for cytochrome P450 proteins from *Solanum chacoense*. *Gene* 188:247-252.
- Hwang, C-S., and Kolattukudy, P. E. 1995. Isolation and characterization of genes expressed uniquely during appressorium formation by *Colletotrichum gloeosporioides* conidia induced by the host surface wax. *Mol. Gen. Genet.* 247:282-294.
- Johnson, R., Narvez, J., An, G., and Ryan, C. 1989. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: Effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9871-9875.

- Kessmann, H. Choudhary, A. D., and Dixon, R. A. 1990. Stress response in alfalfa (*Medicago sativa* L.). III. Induction of medicarpin and cytochrome P450 enzyme activities in elicitor-treated cell suspension cultures and protoplasts. *Plant Cell Rep.* 9:38-41.
- Kim, K. D., Oh, B. J., and J. Yang. 1999. Differential interactions of a *Colletotrichum gloeosporioides* isolate with green and red pepper fruits. *Phytoparasitica* 27:1-10.
- Kim, W. G., Cho, E. K., and Lee, E. J. 1986. Two strains of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causing anthracnose on pepper fruits. *Korean J. Plant Pathol.* 2:107-113.
- Liang, P., and Pardee, A. B. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257:967-971.
- Manandhar, J. B., Hartman, G. L., and Wang, T. C. 1995. Conidial germination and appressorial formation of *Colletotrichum capsici* and *C. gloeosporioides* isolates from pepper. *Plant Dis.* 79:361-366.
- Maule, A. J., and Ride, J. P. 1983. Cinnamate 4-hydroxylase and hydroxycinnamate: CoA ligase in wheat leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 22:1113-1116.
- Meyer, B., Houlun, G., Pozueta-Romero, J., Schantz, M-L., and Schantz, R. 1996. Fruit-specific expression of a defensin-type gene family in bell pepper. Upregulation during ripening and upon wounding. *Plant Physiol.* 112:615-622.
- Mizutani, M., Ward, E., and Ohta, D. 1998. Cytochrome P450 superfamily in *Arabidopsis thaliana*: isolation of cDNAs, differential expression, and RFLP mapping of multiple cytochromes P450. *Plant Mol. Biol.* 37:39-52.
- Nebert, D. W., Ride, J. P., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Fuji-Kuriyama, Y., Gonzales, F. J., Guengerich F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Loper J. C. Sato, R., Waterman, M. R., and Waxman D. J. 1991. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.* 10:1-14.
- Oh, B. J., Balint, D. E., and Giovannoni, J. J. 1995. A modified procedure for PCR-based differential display and demonstration of use in plants for isolation of gene related to fruit ripening. *Plant Mol. Biol. Rep.* 13:70-81.
- Oh, B. J., Kim, K. D., and Kim, Y. S. 1998. A microscopic characterization of the infection of green and red pepper fruits by an isolate of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Phytopathol.* 146:301-303.
- Pena-Cortes, H., Prat, S., Atzorn, R., Wasternack, C., and Willmitzer, L. 1996. Abscisic acid-deficient plants do not accumulate proteinase inhibitor II following systemin treatment. *Planta* 198:447-451.

- Podila, G. K., Rogers, L. M., and Kolattukudy, P. E. 1993. Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiol.* 103:267-272.
- Prusky, D., Plumbly, R. A., and Kobiler, I. 1991. The relationship between the antifungal diene levels and fungal inhibition during quiescent infections of *Colletotrichum gloeosporioides* in unripe avocado fruits. *Plant Pathol.* 40:45-52.
- Prusky, D., and Saka, H. 1989. The role of epicuticular wax of avocado fruit in appressoria formation of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytoparasitica* 17:140.
- Reinbothe, S., Reinbothe, C., Lehman, J., Becker, W., Apel, K., and Parthier, B. 1994. JIP60, a methyl jasmonate-induced ribosome-inactivating protein involved in plant stress reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7012-7016.
- Russell, W. C., Newman, C., and Williamson, D. H. 1975. A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. *Nature* 253:461-462.
- Salzman, R. A., Tikhonova, I., Bordelon, B. P., Hasegawa, P. M., and Bressan, R. A. 1998. Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiol.* 117:465-472.
- Saniewski, M., Czapski, J., Nowacki, J., and Lange, E. 1987. The effect of methyl jasmonate on ethylene and 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid production in apple fruits. *Biol. Plant* 29:199-203.
- Saniewski, M., Nowacki, J., and Czapski, J. 1987. The effect of methyl jasmonate on ethylene production and ethylene-forming enzyme activity in tomatoes. *J. Plant Physiol.* 129:175-180.
- Schopfer, C. R., and Ebel, J. 1998. Identification of elicitor-induced cytochrome P450s of soybean (*Glycine max* L.) using differential display of mRNA. *Mol. Gen. Genet.* 258:315-322.
- Staples, R. C., and Macko, V. 1980. Formation of infection structures as a recognition response in fungi. *Exp. Mycol.* 4:2-16.
- Swinburne, T. R. 1976. Stimulants of germination and appressoria formation by *Colletotrichum musae* (Berk. & Curt.) Arx. in banana leachate. *Phytopathol. Z* 87:74-90.
- Swinburne, T. R. 1983. *Post-Harvest Pathology of Fruits and Vegetables*. Academic Press, NY, USA.
- Tattersall, D. B., van Heeswijck, R., and Bordier, Hoj P. 1997. Identification and characterization of a fruit-specific, thaumatin-like protein that accumulates at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes. *Plant Physiol.* 114:759-769.

- Theologis, A. 1992. One rotten apple spoils the whole bushel: the role of ethylene in fruit ripening. *Cell* 70:181-184.
- Ward, E. W. B. 1976. Capsidiol production in pepper leaves in incompatible interactions with fungi. *Phytopathology* 66:175-176.
- Wasternack, C., and Partheir, B. 1997. Jasmonate-signaled plant gene expression. *Trends Plant Sci.* 2:302-307.
- Watson, D. G., and Brooks, C. J. 1984. Formation of capsidiol in *Capsicum annuum* fruits in response to non-specific elicitors. *Physiol. Plant Pathol.* 24:331-337.
- Werk-Reichert, D. 1995. Cytochrome P450 in phenylpropanoid metabolism. Pages 171-187 in: *Drug metabolism and drug interactions*. F. Durst, and D. P. O'Keefe, eds. Freund, UK.
- Xu, Y., Chang, P-F. L., Liu, D., Narasimhan, M. L., Raghothama, K. G., Hasegawa, P. M., and Bressan, R. A. 1994. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* 6:1077-1085.

# 제 5 장 A thaumatin-like gene in nonclimacteric pepper fruits used as molecular marker in probing disease resistance, ripening, and sugar accumulation

Young Soon Kim, Jung Yoon Park, Kwang Sang Kim, Moon Kyung Ko, Soo Jin Cheong and Boung-Jun Oh

*Kumho Life and Environmental Science Laboratory, Korea Kumho Petrochemical Co., Ltd., 1 Oryong-Dong, Puk-Ku, Kwangju 500-712, Korea*

*Published in J.of Plant Molecular Biology 49: 125-135, 2002.*

## I . Abstract

During pepper (*Capsicum annuum*) fruit ripening, the ripe fruit interaction with the anthracnose fungus, *Colletotrichum gloeosporioides*, is generally incompatible. However, the unripe fruit can interact compatibly with the fungus. A gene, designated *PepTLP* (for pepper thaumatin-like protein), was isolated and characterized by using mRNA differential display. The *PepTLP* gene encodes a protein homologous to other thaumatin-like proteins and contains 16 conserved cysteine residues and the consensus pattern of thaumatin. *PepTLP* gene expression is developmentally regulated during ripening. The accumulation of *PepTLP* mRNA and PepTLP protein in the incompatible interaction was higher than that in the compatible one. Furthermore, *PepTLP* gene expression was stimulated by both jasmonic acid treatment and wounding during ripening, but by wounding only in the unripe fruit. Immunolocalization studies showed that it is localized to the intercellular spaces among cortical cells. The expression of the *PepTLP* gene upon fungal infection was a rise from the early-breaker fruit. The development of anthracnose became significantly prevented with beginning of fruit ripening, and the sum total of sugar accumulation increased. The results suggest that the *PepTLP* gene can be used as a molecular marker in probing for disease resistance, ripening, and sugar

accumulation in nonclimacteric pepper fruits.

*The nucleotide sequence data reported will appear in the Gen-Bank Nucleotide Sequence Database under the accession number AF297646.*

## II. Introduction

Fruit ripening is a unique developmental process accompanied by considerable physical and biochemical changes in various plant species. These changes involve pigmentation, softness, and the accumulation of sugar and aroma (Giovannoni, 1993). Peppers are nonclimacteric fruits that do not have an ethylene burst during ripening. The ethylene burst is a characteristic of climacteric fruits, such as apple, peach, and tomato. Generally, ripe fruits that are rich in macromolecules are especially susceptible to pathogen infection. To protect the reproductive organ, pathogenesis-related (PR) and antifungal proteins are being highly accumulated during fruit ripening in banana (Clendennen and May, 1997), cherry (Fils-Lycaon *et al.*, 1996), grape berries (Robinson *et al.*, 1997; Tattersall *et al.*, 1997; Salzman *et al.*, 1998), pepper (Meyer *et al.*, 1996; Oh *et al.*, 1999c), and tomato (Pressey, 1997). To inhibit pathogen invasion, plants deploy hyper-sensitive reactions (Goodman and Novacky, 1994), deposition of lignin (Dean and Kúc, 1988), and oxidative cross-linking (Brisson *et al.*, 1994) as their first line of defense. After that, PR and antifungal proteins, such as chitinase (PR-3 family), thaumatin-like proteins (TLP) (PR-5 family), and cysteine-rich proteins become involved in the defense response. Especially, TLPs were seen to accumulate during the fruit ripening of bananas (Clendennen and May, 1997), cherries (Fils-Lycaon *et al.*, 1996), grapes (Tattersall *et al.*, 1997; Salzman *et al.*, 1998), and tomato (Pressey, 1997). Also, the 126 TLPs and TLP genes are being induced in various organs of plants upon pathogen infection (Ruiz-Medrano *et al.*, 1992; Rodrigo *et al.*, 1993), abiotic stress (Zhu *et al.*, 1993), and chemical stimuli (King *et al.*, 1988). Recently, a TLP that functions as antifreeze protein has been isolated from winter rye during cold acclimation (Hiilovaara-Teijo *et al.*, 1999; Yu and Griffith, 1999). Also, several TLPs are known to exhibit antifungal activity *in vitro* and some have recently been shown to have  $\beta$ -glucanase activity (Cheong *et al.*, 1997). Although the precise

function of TLP is not yet understood, the antifungal activity of TLP appears to act by permeabilizing fungal membranes (Robert and Selitrennikoff, 1990). *Colletotrichum gloeosporioides* causes severe anthracnose diseases especially in the unripe-green pepper fruit, but not in ripe-red fruit (Oh *et al.*, 1998). In the incompatible ripe fruit, the incidence of appressorium and infection hypha formation by the fungus was lower than in the compatible unripe fruit (Kim *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 1999a). We, therefore, decided to look for a molecular mechanism that would explain the incompatibility of interactions during pepper fruit ripening. Several genes that may have an important role in the defense of the ripe fruit were therefore isolated from the ripe fruit after being challenged with the fungus (Oh *et al.*, 1999b, c). One of our research goals was to produce transgenic pepper plants with enhanced resistance to the anthracnose fungus by using those genes that might be involved in the incompatible interaction. We report here the isolation of the pepper TLP gene that is differentially expressed in compatible and

incompatible interactions during fruit ripening. The accumulation of the *PepTLP* mRNA and PepTLP protein was higher in the incompatible interaction than in the compatible interaction during the early infection process. That the *PepTLP* gene transcription could be induced by wounding, but not by jasmonic acid (JA) treatment, suggested that there is a JA-independent wound signal transduction pathway in the unripe pepper fruit. The *PepTLP* mRNA level is developmentally regulated with beginning of fruit ripening, and increases upon fungal infection. Also, anthracnose development was significantly prevented from the same fruit stage. In addition, the sum total of sugar accumulation grew significantly from the early-breaker fruit. Thus, these data indicate that there is a correlation between *PepTLP* gene expression, disease resistance, and sugar accumulation with beginning of fruit ripening of the nonclimacteric pepper.

### **III. Materials and methods**

#### **Plant material, fungus, and inoculation test**

Pepper (*Capsicum annuum*) cv. Nokkwang was used in this experiment.



Fruits were harvested at maturegreen (30 days after anthesis), early-breaker (50 days), and ripe stages (55, 58 and 65 days) at Kwangju, Korea. Samples of leaf, root, and stem were harvested from 3-week old plants. For wounding, fruits and other organs were deeply scratched with a knife and incubated under relative humidity of 100% at 27°C for 24 h under conditions as for the inoculation test. For chemical inducer applications, 10  $\mu$ l of ethephone (1 and 10 mM), JA (4 and 40  $\mu$ M), or SA (0.5 and 5 mM) were applied to the fruit for 24 h under the above-mentioned conditions. After incubation, samples of 1 cm<sup>2</sup> were excised from the application site of the chemicals, wounding, or fungus inoculation. The samples were then frozen in liquid nitrogen. *C. gloeosporioides* was cultured and harvested as described previously (Oh *et al.*, 1998). Of a spore suspension ( $5 \times 10^5$  spores/ml) 10  $\mu$ l was used for the inoculation of pepper fruits as described previously (Kim *et al.*, 1999). Lesion diameter and numbers of spores on inoculated fruits were evaluated to serve as parameters of anthracnose development as described previously (Kim *et al.*, 1999). The disease parameters were recorded 7 days after inoculation.

### **Gene cloning, sequencing, and homology search**

Modified mRNA differential display (Oh *et al.*, 1995) was performed with total RNA extracted from uninfected or infected unripe and ripe fruits 24 and 48 h after fungal inoculation. Total RNA was extracted using the RNeasy Plant kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. A partial cDNA, pddICC4, isolated by differential display screening, was used as a probe to screen a *C. gloeosporioides*-induced pepper cDNA library (Oh *et al.*, 1999c). Preliminary northern blot analysis was done to confirm the differential expression of the partial cDNA. After three rounds of plaque hybridization, a full-length cDNA was isolated and sequenced as described (Oh *et al.*, 1999b). cDNA sequencing was performed with an ALF express automated DNA sequencer (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). Analysis of nucleotide and amino acid sequences was performed with the DNASIS sequence analysis software for Windows, version 2.1 (Hitachi, 127 San Bruno, CA). For a homology search, the cDNA sequence was compared to the sequences in the

NCBI nonredundant database using the BLAST electronic mail server (Altschul et al., 1997). The multiple sequence alignment was produced using the Clustal W program.

### **Northern, Southern, and western blots analysis**

Total RNA (10  $\mu\text{g}/\text{Lane}$ ) from each plant tissue used in this study was separated in 1.2% denaturing agarose gels in the presence of formaldehyde. RNA gel blotting, hybridization, and washing was conducted as described by the manufacturer of the positively charged nylon membrane employed (Hybond N+; Amersham Pharmacia Biotech). Genomic DNA from 4-week old plants was isolated using the DNeasy Plant Mini kit (Qiagen). Aliquots of 5  $\mu\text{g}$  DNA were digested with *EcoRI*, *EcoRV*, or *HindIII* and separated in a 0.8% agarose gel. Afterwards, DNA gel blotting and hybridization were conducted according to the manufacturer's instructions (Amersham Pharmacia Biotech). Filters were washed twice with  $2\times$  SSC, 0.1% SDS at 45°C and once with  $0.1\times$  SSC, 0.1% SDS at 65°C. Radiolabeled probes were prepared with [ $^{32}\text{P}$ ] dCTP (Amersham Pharmacia Biotech), using a random primer labeling kit (Boehringer, Mannheim, Germany). SDS-PAGE was performed with total proteins separated on 15% polyacrylamide gels and electrotransferred onto PVDF membranes. The anti-TLP antibody was used at a 1:2000 dilution. A goat anti-rabbit antibody coupled to alkaline phosphatase was used as secondary antibody at a 1:5,000 dilution. The secondary antibody was visualized with luminol (ECL, USA).

### **Tissue preparation and immunohistochemistry**

Pepper fruits were fixed in 1% glutaraldehyde/2% paraformaldehyde in 100 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, dehydrated in ethanol, and embedded in paraffin. Tissues were transverse-sectioned into slices 10  $\mu\text{m}$  in thickness. For immunolabeling, deparaffinized sections were incubated with primary antibody for 12 h at 12 °C. Rabbit antiserum against a Chinese cabbage TLP was used at a dilution of 1:1,500 in 0.05 M Tris containing 1% BSA. Control tissues were

incubated with pre-immune serum. Then the sections were washed three times with 0.05 M Tris containing 0.3 M NaCl and 0.1% Tween 20 prior to incubation with biotinylated secondary antibody of goat anti-rabbit (DAKO, Carpinteria, CA). For detection, the secondary antibody complexed with peroxidase-conjugated streptavidin was colorized with 3-amino-9-ethylcarbazole as the substrate according to the manufacturer's instructions (DAKO).

### **Measurement of sugar**

Thirty fruits of five different developing stages of pepper fruits were harvested from the greenhouse. The frozen samples were then ground in liquid nitrogen. Frozen powder (500 mg) was suspended in 500  $\mu$ l of ice-cold 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0. After centrifugation, the supernatant was used to measure sugar contents. Fru, Glu, and Suc were assayed using a Sucrose/D-Glucose/D-Fructose Enzy-matic BioAnalysis kit (Boehringer) as recommended by the manufacturer.

## **IV. Results**

### **Cloning of a fungus-inducible *PepTLP* gene of pepper**

In previous studies, *C. gloeosporioides* interacted in-compatibly with the ripe fruit of pepper, but compatibly with the unripe fruit (Oh et al., 1998; Kim et al., 1999). To look for a molecular mechanism involved in the incompatible interaction (Oh et al., 1999b, c), we isolated genes differentially expressed in the ripe fruit, but not in the unripe fruit upon fungal infection using mRNA differential display (Liang and Pardee, 1992). Amplified cDNAs from the ripe fruit were excised from the gel, re-amplified, and cloned. In a preliminary RNA gel blot analysis, a cDNA clone, named pddICC4 for incompatible *Capsicum*

annuum/Colletotrichum gloeosporioides interaction, hybridized to a transcript of 0.95 kb that accumulated in the incompatible interaction (data not shown). DNA gel blot analysis under high-stringency conditions with the pddICC4 as the probe revealed one band in each enzyme digest, suggesting that pddICC4 is a single-copy gene in the pepper genome (Figure 1). To isolate the full-length cDNA clone, the insert of pddICC4 was used as probe for plaque hybridization with a cDNA library prepared from fruits 24 and 48 h after inoculation (HAI) with the fungus. A clone containing the longest insert was designated PepTLP (pepper thaumatin-like protein), isolated, and sequenced. The 3' region of the PepTLP clone contained the nucleotide sequence of pddICC4 as expected.

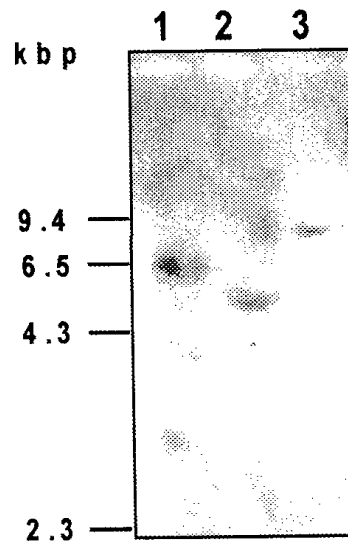


Figure 1. A pepper genomic blot probed with a PepTLP gene-specific probe, pddICC4. The restriction enzymes are EcoRI (1), HindIII (2), and EcoRV (3).

## Sequence analysis and characterization of *PepTLP* cDNA

The *PepTLP* cDNA is 937 bp in length with 8 bp of 5'-untranslated region and 191 bp of 3'-untranslated region including the poly(A) tail (GenBank AF297646). The *PepTLP* clone thus represents the full-length cDNA of the 0.95 kb transcript identified by RNA gel blot analysis before. The deduced amino acid sequence of *PepTLP* contains an N-terminal secretory signal peptide that is cleaved after alanine at position 21 (Figure 2). The cDNA except the signal peptide contains one open reading frame encoding a polypeptide of 225 amino acids with a predicted molecular mass of 24 kDa and an isoelectric point of 7.5. Also, the deduced amino acid sequence contains 16 conserved cysteine residues and the consensus pattern of thaumatin, GRGSCQTGDCGGVLQC, at amino acid positions 78-93.

Sequence alignment showed that the *PepTLP* was 91, 88, 87, 60, and 48% identical to the TLPs of potato (Zhu *et al.*, 1993), tomato (King *et al.*, 1988), tobacco (Neale *et al.*, 1990), grape berry (Tattersall *et al.*, 1997), and banana (Clendennen and May, 1997), respectively (Figure 2). These TLPs are expressed in response to various environmental and developmental stimuli. The potato TLP is induced during freezing tolerance. The tobacco TLP is induced during flowering and by abiotic (Singh *et al.*, 1989) and biotic stresses (Woloshuk *et al.*, 1991). In addition, although the tomato TLP is induced by salt stress (King *et al.*, 1988), the cherry and banana TLPs as well as the tomato TLP (Pressey, 1997) are expressed during fruit ripening.

## Differential induction during compatible and incompatible interactions

In our previous studies (Oh *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999), higher levels of appressorium and infection hypha formation were observed on the unripe fruit than on the ripe fruit at 12 h and 24 h after inoculation (HAI), respectively. After that, initial anthracnose symptoms were detected only on the unripe fruit after 48 HAI, and typical sunken necrosis occurred within 120 HAI. We then examined whether the timecourse of the accumulation of *PepTLP* mRNA after *C. gloeosporioides* inoculation correlated with fungal morphogenesis and



symptom development. RNA gel blot analysis was performed on both unripe and ripe fruits at 0, 3, 6, 12, 24, 48, and 72 HAI. In the unripe fruit, a basal level of *PepTLP* mRNA was not detected, but some accumulation of *PepTLP* mRNA was detected at 3 HAI (Figure 3). The expression of *PepTLP* mRNA was low at 3, 6, 24, and 48 HAI, but a biphasic accumulation of *PepTLP* mRNA reached a maximum at 12 and 72 HAI. In contrast, in the ripe fruit, a basal level of *PepTLP* mRNA was detected and reached a maximum already at 3 HAI, and the expression level remained elevated. Water inoculation without fungal spores as a mock test did not significantly induce the accumulation of *PepTLP* mRNA in both fruit types.

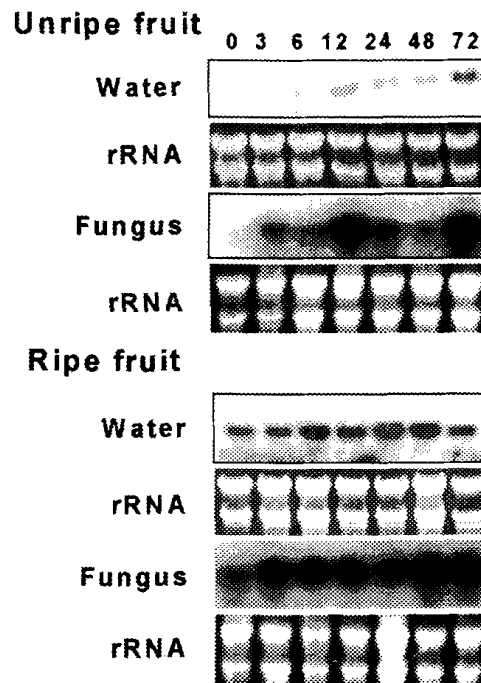


Figure 3. Differential induction of the *PepTLP* gene in pepper fruits upon *Colletotrichum gloeosporioides* inoculation. Total RNAs were isolated from both unripe and ripe fruits after fungal inoculation (Fungus) on a time-course. A water mock inoculation (Water) without fungal spores of both unripe and ripe fruits was used as a control. The RNAs were electrophoresed and allowed to hybridize with pddICC4 (*PepTLP*). Numbers indicate hours after inoculation.

## **Immunolocalization and immunoblot analysis of PepTLP during early infection**

To examine the localization and accumulation of PepTLP protein during early infection, we performed immunolocalization experiments using antibodies to Chinese cabbage TLP and sections. The transverse-sections were prepared from the infection sites of both ripe and unripe fruits at 72 HAI. The PepTLP was not detectable in the intercellular spaces of cortical cells in the uninoculated unripe fruit (Figure 4-A, E). However, it was detected in those spaces in the uninoculated ripe fruit (Figure 4-B, F). When the fungus had colonized the outer epidermal cells of the unripe fruit at 72 HAI (Kim *et al.*, 1998), the protein was significantly induced (Figure 4-C, G). And, although fungal invasion was rarely observed in the ripe fruit at 72 HAI, the PepTLP was prominently present in the intercellular spaces among cortical cells (Figure 4-D, H). Control fruit sections were treated with pre-immune serum.

## **Expression patterns upon fungal infection, wounding, and by chemical inducers**

To examine *PepTLP* gene expression in various organs after fungal inoculation or wounding, RNA gel blot analyses were performed on total RNA prepared from fruits, leaves, stems, and roots of pepper plants 24 h after treatment. In the fruit, a basal expression of the *PepTLP* gene was observed only in the ripe fruit. But *PepTLP* mRNA accumulated to high levels in both fruits upon fungal infection or wounding (Figure 5A). The accumulation of the *PepTLP* mRNA increased also in the stem after fungal infection or wounding, but in the leaf only upon wounding. In the root, a basal level of *PepTLP* mRNA was detected, but this level of *PepTLP* mRNA did not significantly change after either treatment. To examine chemical inducers of *PepTLP* gene expression in fruit, RNA gel blot analysis was performed on total RNAs prepared from the application sites of both ripe and unripe fruits of drop-applied ethephone, jasmonic acid (JA), or salicylic acid (SA) after 24 h. The *PepTLP* mRNA accumulated highly only in the ripe fruit treated with JA at 40 M



(Figure 5B), while SA and ethephone did not affect the *PepTLP* gene expression in either the ripe or unripe fruit. To test whether a high concentration of JA would be able to induce the expression of *PepTLP* in the unripe fruit, JA was applied to the unripe fruit at up to 1 mM. No induction of *PepTLP* expression was observed in the unripe fruit treated with JA (data not shown).

### **Expression during ripening stages**

To examine the expression of the *PepTLP* gene during the ripening process of the pepper fruit, RNA gel blot analysis was performed using total RNAs prepared at five stages of fruit development: unripe-mature green, early-breaker, turning, purple, and ripe-red. *PepTLP* mRNA was detected in the early-breaker fruit, and the accumulation of *PepTLP* mRNA slightly increased during ripening (Figure 6). We further examined *PepTLP* gene expression after fungal infection, JA, or wounding during fruit ripening. The *PepTLP* mRNA accumulated to low levels in the unripe fruit at 3 HAI. However, the accumulation after fungal infection was much elevated over the early-breaker stage of the fruit and continued to increase during ripening. Wounding also led to the accumulation of *PepTLP* mRNA in the unripe fruit up to the ripe fruit stage, and the accumulation was highly accelerated between the turning stage and the ripe fruit stage. Upon JA application, the *PepTLP* mRNA highly accumulated from the early-breaker fruit up to the ripe fruit stage, but not in the unripe fruit. The accumulation was not significantly different during fruit ripening stages

### **Anthracnose development on pepper fruits during ripening stages**

To examine the relationship between ripening stages and anthracnose development, five different developing stages of fruit were drop-inoculated with a spore suspension of *C. gloeosporioides*. Typical anthracnose symptoms with necrotic and sunken lesions were observed on the unripe fruit within 5 days after inoculation, just as we had previously observed (Oh et al., 1998) (Figure

7). No anthracnose symptoms were observed on the ripe fruit inoculated with the fungus. Anthracnose disease development was measured in terms of lesion diameter and number of fungal spores produced from the lesions. Anthracnose symptoms were significantly prevented with beginning of ripening. The lesion in the early-breaker fruit was similar to that of very beginning of typical anthracnose symptoms (data not shown). However, the lesion was arrested and not developed further. Lesion development was greatly arrested in the turning fruit, although spores were still produced. In the purple fruit, both lesion development and spore production were prevented.

### **Sugar accumulation of pepper fruits during different ripening stages**

Accumulation of Fru, Glu, and Suc were measured at different developmental stages of pepper fruits. Suc accumulation significantly increased between the unripe and the early breaker stage. Then it slightly decreased in the turning fruit (Figure 8). However, in the purple and ripe fruits, Suc accumulation was much lower than that in the early breaker and turning fruits. In contrast to the Suc accumulation, the amounts of Fru and Glu at the early breaker and turning fruit stages were lower than in the unripe fruit. However, Fru and Glu were increased in the purple fruit. Finally, Glu accumulation was elevated in the ripe fruit, but Fru accumulation was decreased in the ripe fruit. This result indicated that the sum total of Fru, Glu, and Suc was highly accumulated with beginning of fruit ripening.

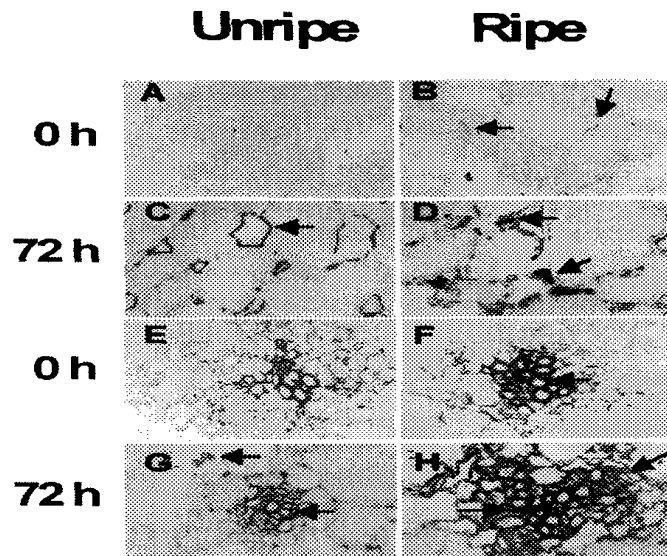


Figure 4. Immunolocalization of PepTLP protein in pepper fruits at 72 hrs after inoculation (HAI) with *Colletotrichum gloeosporioides* using an antibody to Chinese cabbage TLP. The PepTLP was not detectable in the intercellular spaces of cortical cells (A) and small vascular bundles (E) of uninoculated unripe fruits (0 HAI), but they were detected in those spaces (B and F) of uninoculated ripe fruits (0 HAI). In the unripe fruit at 72 HAI (C and G) the induction-level of the protein was low. However, the PepTLP level in intercellular spaces among cortical cells (D) and small vascular bundles (H) in the ripe fruit at 72 HAI was high. The arrow indicates accumulated PepTLP

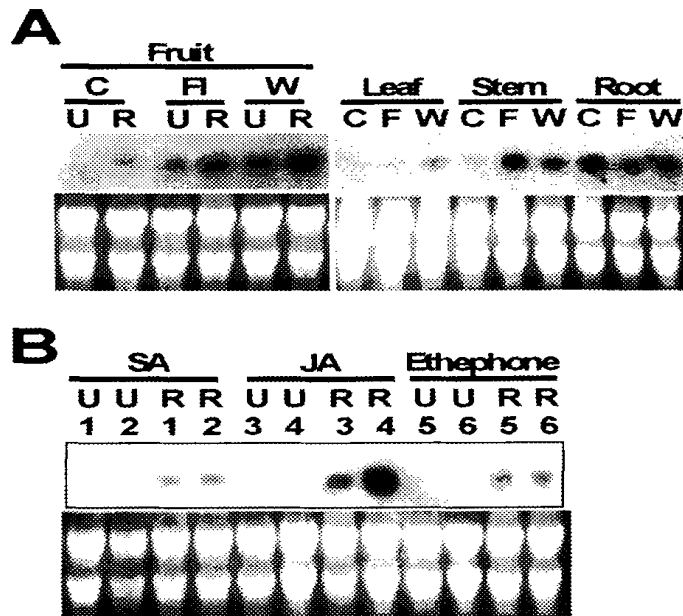


Figure 5. A. Expression and induction of the PepTLP gene from various organs of pepper by *Colletotrichum gloeosporioides* inoculation or wounding. Total RNAs were isolated from the application sites of unripe fruit (U), ripe fruit (R), leaf, stem, and root 24 h after treatments consisting of fungal inoculation (F) or wounding (W). Aliquots of 10  $\mu$ l ( $5 \times 10^5$  spores per ml) were used for drop inoculation of various pepper organs. Organs treated with 10  $\mu$ l of sterile water containing no fungal spores were used as controls (C). The RNAs were electrophoresed and probed with pddICC4 for PepTLP. B. Induction of the PepTLP gene in unripe and ripe fruits of pepper after exogenous application of salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), and ethephone treatment. Total RNAs were isolated from the application sites of both unripe (U) and ripe fruit (R). The drop inoculations consisted of 10  $\mu$ l of SA (1 = 0.5 mM, 2 = 5 mM), JA (3 = 4  $\mu$ M, 4 = 40  $\mu$ M), and ethephone (5 = 1 mM, 6 = 10 mM). The RNAs were electrophoresed and probed with pddICC4 for PepTLP.

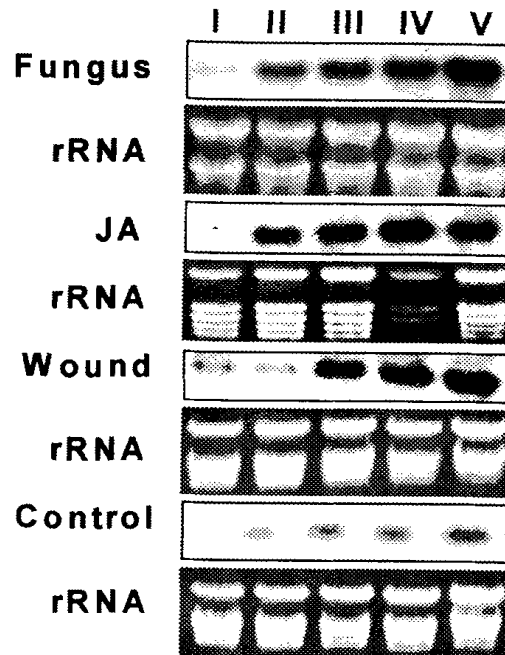


Figure 6. Expression and induction of the PepTLP gene at different developmental stages of the pepper fruit upon fungal inoculation (Fungus), JA application, or wounding. Total RNAs were isolated from the application sites 24 hrs after treatment with JA or wounding, and only 3 h after inoculation with the fungus. A  $10 \mu\text{l}$  portion of a  $5 \times 10^5$  spores/ml suspension was used for drop inoculation. Fruits treated with  $10 \mu\text{l}$  of sterile water without fungal spores were used as controls (Control). The RNAs were electrophoresed and probed with pddICC4 for PepTLP. I, mature-unripe green fruit; II, early breaker fruit; III, turning fruit; IV, purple fruit; V, ripe red fruit.

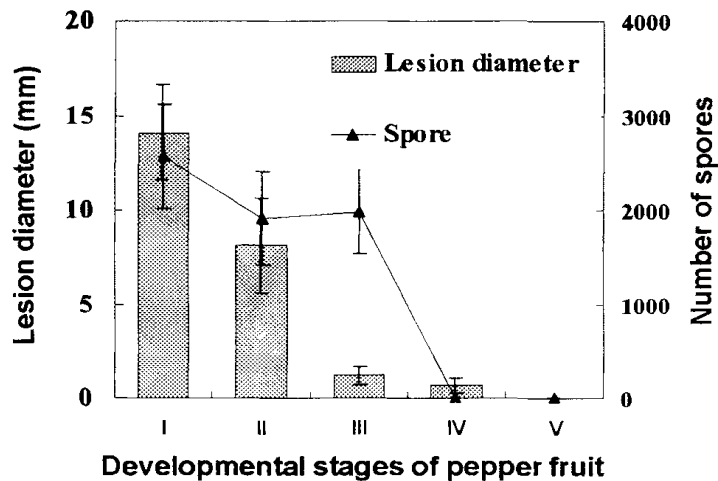


Figure 7. Diameter and spore production of anthracnose lesions caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on pepper fruits at different developmental stages. The unripe fruit (I) exhibited typical sunken necrotic symptoms, but the ripe fruit (V) showed no such symptoms. Anthracnose disease development was significantly lower in the turning fruit (III). Each value for lesion diameter and number of spores represents a mean of 30 and 15 observations, respectively ( $\pm$ SE). I, mature-unripe green fruit; II, early breaker fruit; III, turning fruit; IV, purple fruit; V, ripe red fruit.

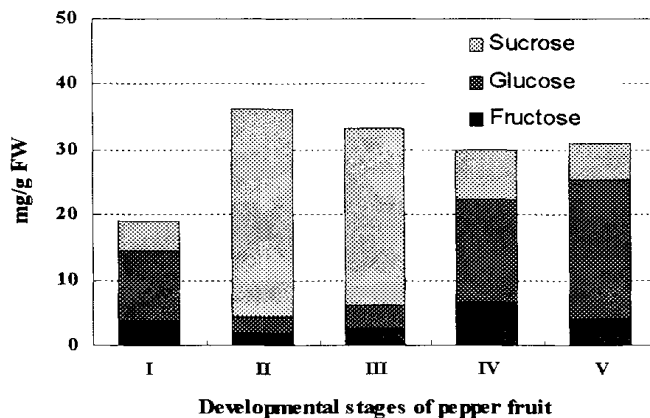


Figure 8. Each amount and the sum total of fructose, glucose, and sucrose at different developmental stages of pepper fruits. I, mature-unripe green fruit; II, early breaker fruit; III, turning fruit; IV, purple fruit; V, ripe red fruit. Data are the means of three independently performed experiments.

## V. Discussion

Fruit ripening has been mainly studied in climacteric fruit, and relatively little is known about molecular mechanisms of the ripening of nonclimacteric fruit, such as cherry (Fils-Lycaon *et al.*, 1996) and grape berry (Tattersall *et al.*, 1997; Salzman *et al.*, 1998). Especially, there have been few studies of disease susceptibility/resistance in relation to the ripening of nonclimacteric fruits. Recently, we reported anthracnose development on the unripe fruit of pepper, but not on the ripe fruit (Oh *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999). This complex pathosystem may generate significant information towards the understanding of the interaction between fruit development and disease resistance in plants. To investigate the effect of fruit maturity on the ability of *C. gloeosporioides* to develop an infection, we examined in this study *PepTLP* gene expression, disease resistance by inoculation test, and sugar content at different developmental stages of the pepper fruit. With beginning of fruit ripening, a rise in the expression of the *PepTLP* gene upon fungal infection, a drop in the incidence of anthracnose disease, and an accumulation of sugar were observed. This study shows a correlation between *PepTLP* gene expression, disease resistance, ripening, and sugar accumulation in fruits. Thus, the *PepTLP* gene may be used as a molecular marker to probe disease resistance, ripening, and sugar accumulation in nonclimacteric pepper fruits. In a pepper fruit/anthracnose fungus interaction, the expression of the *PepTLP* gene in response to fungal infection was temporally and spatially regulated during incompatible and compatible interactions. Transcript levels in the two kinds of interactions were very different, with a weak biphasic accumulation in the compatible interaction and maintenance of elevated levels in the incompatible interaction. During a previous study, a pepper thionin-like protein gene, *PepThi* (Oh *et al.*, 1999c), and a pepper cytochrome P450 gene, *PepCYP* (Oh *et al.*, 1999b), genes that were highly expressed only during an incompatible interaction, had been cloned. This differential expression has also been reported for other plant-pathogen interactions (Ebrahim-Nesbat *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1996; Gregersen *et al.*, 1997). In an observation of fungal morphogenesis, *C. gloeosporioides* started to germinate at 3 HAI, and appressorium formation was observed at 12 HAI (Oh *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999). In this study, expression

of the *PepTLP* gene was detected on both unripe and ripe fruits at 3 HAI at the time when the fungus germinates. This result suggests that the *PepTLP* gene is induced in fruits by fungal elicitors. On the other hand, the *PepThi* and *PepCYP* genes were expressed in the fruits at 12 and 24 HAI, respectively, indicating that these two genes are expressed when the fungus starts to penetrate the plants. Taken together, these observations suggest that the plant deploys different defense mechanisms in response to different stages of fungal morphogenesis during the early infection process. In an immunolocalization study, we found the PepTLP protein localized in the intercellular spaces of cortical cells. This is consistent with the nature of PepTLP, since it has an N-terminal secretory signal peptide. Once *C. gloeosporioides* successfully penetrated into the unripe fruit, the fungus invaded and colonizes other cells via the intercellular spaces and vascular bundles (unpublished data). Since no colonization of the fungus was observed in the ripe fruit, these data suggest that the fruit is protected against fungal colonization because of the presence of PepTLP in these intercellular spaces in the ripe fruit. Evidence of developmental regulation of TLPs during fruit ripening has been found in banana (Clendennen and May, 1997), cherry (Fils-Lycaon *et al.*, 1996), grape berry (Salzman *et al.*, 1998), and tomato (Pressey, 1997). In addition, TLPs were found to accumulate in tobacco flowers (Richard *et al.*, 1992) and in maize seeds (Roberts and Selitrennikoff, 1990). Antifungal activity has been suggested as a common function of TLPs (Roberts and Selitrennikoff, 1990; Vigers *et al.* 1992). In this study, the expression of the *PepTLP* gene was developmentally regulated during ripening and, in particular, elevated in the ripe fruit in response to fungal infection. Thus, the data strongly suggest that TLPs play a significant role in the protection of reproductive organs. In a previous study, *PepThi* and pepper defensin (Meyer *et al.*, 1996) were expressed during pepper fruit ripening (Oh *et al.*, 1999c). Thus, the concerted expression of several defense genes, including *PepTLP*, *PepThi*, defensin, and *PepCYP*, may confer disease resistance of the ripe fruit against *C. gloeosporioides* infection. The TLP gene is not only developmentally regulated but also controlled by biotic or abiotic stress, such as cold (Zhu *et al.*, 1993) and salt (Kononow-icz *et al.*, 1992). In addition, a TLP gene is induced in *Solanum commersonii* by abscisic acid (ABA) and wounding (Zhu *et al.*, 1993), and in tobacco seedlings by ethylene, methyl JA, and SA (Xu



*et al.*, 1994). However, the *PepTLP* gene was induced only in the ripe pepper fruit by JA, while it could be induced in both the unripe and the ripe fruit by wounding (Figure 5). It is likely that the *PepTLP* gene expression is regulated in the unripe fruit via a JA-independent wound signal transduction pathway. In *Arabidopsis*, a JA-independent wound signaling pathway that was oppositely regulated to a JA-dependent pathway, has been identified (Rojo *et al.*, 1998). These data indicate that there could be two different signaling pathways stimulated by wounding during the pre- and post-ripening stages of the pepper fruit. This is consistent with the response of fruits during ripening processes against wounding or JA treatment (Figure 6). Both ethylene and ABA are known to have significant roles in the ripening process of climacteric fruits in which they induce PR proteins including TLP (Xu *et al.*, 1994). In contrast, it is uncertain what plant chemical signals are involved in the ripening of nonclimacteric fruit. It has been suggested that the TLP induction in nonclimacteric berry fruits occurs by another SA-independent mechanism (Tattersall *et al.*, 1997). The *PepTLP* gene was highly induced from the early breaker stage by JA. Still, there is little known about the role of JA in nonclimacteric fruit. Only a few cases in which methyl JA triggered the ripening process in tomato and apple with ethylene production have been described (Saniewski *et al.*, 1987a, b; Czapski and Saniewski, 1992). The sum total of Suc, Fru, and Glu significantly accumulated with beginning of ripening. This is consistent with disease resistance enhanced from the early-breaker fruit. Vanderplank (1984) suggested that higher levels of sugar exert an osmotic stress on fungi, thus protecting the plant from fungal colonization. In particular, the efficacy of the antifungal protein activity against phytopathogens of the nonclimacteric grape berry fruit was enhanced by higher concentrations of sugar (Salzman *et al.*, 1998). In addition, although there are many examples of sugar repressed genes, sugars also induce a number of defense-related genes, such as chalcone synthase (Tsukaya *et al.*, 1991), PR genes (Herbers *et al.*, 1995), and proteinase inhibitor II (Johnson and Ryan, 1990). Taken together, these data suggest that a concerted mechanism of sugar accumulation, enhancement of antifungal protein activity, and defense-related gene expression induced by sugar enhances disease resistance of the fruit against phytopathogens with beginning of ripening.

## Acknowledgements

We thank Sang Yeol Lee (Gyeongsang National University) for providing Chinese cabbage TLP antibody. This work was supported in part by the Agricultural R&D Promotion Center in Korea (grant 299041-3) and a grant (PF003106 01) from the Plant Diversity Research Center of the 21st Century Frontier Research Program funded by the Ministry of Science and Technology of the Korean Government. KLESL Publication no. 54.

## VI. References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Brisson, L.F., Tenhaken, R. and Lamb, C. 1994. Functions of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* 6: 1703-1712.
- Cheong, N.A., Choi, Y.D., Kim, W.Y., Bae, I.S., Cho, M.J., Hwang, I., Kim, J.W. and Lee, S.Y. 1997. Purification and characterization of an antifungal PR-5 protein from pumpkin leaves. *Mol. Cell* 7: 214-219.
- Clendennen, S.K. and May, G.D. 1997. Differential gene expression in ripening banana fruit. *Plant Physiol.* 115: 463-469.
- Czapski, J. and Saniewski, M. 1992. Stimulation of ethylene production and ethylene-forming enzyme in fruits of the non-ripening nor and rin tomato mutants by methyl jasmonate. *J. Plant Physiol.* 139: 265-268.
- Dean, R.A. and Kúć, J. 1988. Rapid lignification in response to wounding and infection as a mechanism for induced systemic protection in cucumber. *Physiol. Plant Path* 31: 69-81.
- Ebrahim-Nesbat, F., Bohl, S., Heitefuss, R. and Apel, K. 1993. Thionin in cell walls and papillae of barley in compatible and incompatible interactions with *Erysiphe graminis f.sp. hordei*. *Physiol. Mol. Plant Path.* 43: 343-352.
- Fils-Lycaon, B.R., Wiersma, P.A., Eastwell, K.C. and Sautiere, P. 1996. A cherry protein and its gene, abundantly expressed in ripening fruit, have been identified as thaumatin-like. *Plant Physiol.* 111: 269-273.

- Giovannoni, J. 1993. Molecular biology of fruit developmental and ripening. In: J. Bryant (Ed.) *Methods in Plant Molecular Biology*, Academic Press, New York, pp. 253-287.
- Goodman, R.N. and Novacky, A.J. 1994. *The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens. A resistance Phenomenon*. APS Press, St. Paul, MN.
- Gregersen, P.L., Thordal-Christensen, H., Föster, H., and Collinge, D.B. 1997. Differential gene transcript accumulation in barley leaf epidermis and mesophyll in response to attack by *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (syn. *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*). *Physiol. Mol. Plant Path.* 51: 75-85.
- Herbers, K., Mönke, G., Badur, R. and Sonnewald, U. 1994. A simplified procedure for the subtractive cDNA cloning of photoassimilate-responding genes: isolation of cDNAs encoding a new class of pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* 29: 1027-1038.
- Hiilovaara Teijo, M., Hannukkala, A., Griffith, M., Yu, X-M. and Pihakaski-Maunsbach, K. 1999. Snow-mold-induced apoplastic proteins in winter rye leaves lack antifreeze activity. *Plant Physiol.* 121: 665-673.
- Johnson, R. and Ryan, C.A. 1990. Wound-inducible potato inhibitor II genes: enhancement of expression by sucrose. *Plant Mol. Biol.* 14: 527-536.
- Kim, K.D., Oh, B.J. and Yang, J. 1999. Compatible and incompatible interactions between *Colletotrichum gloeosporioides* and pepper fruits. *Phytoparasitica* 27: 97-106.
- King, G.J., Turner, V.A., Hussey, C.E., Wurtele, E.S. and Lee, S.M. 1988. Isolation and characterization of a tomato cDNA clone which codes for salt-induced protein. *Plant Mol. Biol.* 10: 402-412.
- Kononowicz, A.K., Nelson, D.E., Singh, N.K., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. 1992. Regulation of the osmotin gene promoter. *Plant Cell* 4: 513-524.
- Liang, P. and Pardee, A.B. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971.
- Lin, K.C., Bushnell, W.R., Szabo, L.J. and Smith, A.G. 1996. Isolation and expression of a host response gene family encoding thaumatin-like proteins in incompatible oat-stem rust fungus interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9: 511-522.
- Meyer, B., Houlné, G., Pozueta-Romero, J., Schantz, M.L. and Schantz, R. 1996. Fruit-specific expression of a defensin-type gene family in bell pepper. Upregulation during ripening and upon wounding. *Plant Physiol.* 112: 615-622.
- Neale, A.D., Wahleithner, J.A., Lund, M., Bonnett, H.T., Kelly, A., Meeks-Wagner, D.R., Peacock, W.J. and Dennis, E.S. 1990. Chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, osmotin, and extensin are family in tobacco explants during flower formation. *Plant Cell* 2: 673-684.

- Oh, B.J., Balint, D.E. and Giovannoni, J.J. 1995. A modified procedure for PCR-based differential display and demonstration of use in plants for isolation of gene related to fruit ripening. *Plant Mol. Biol. Rep.* 13: 70 81.
- Oh, B.J., Kim, K.D. and Kim, Y.S. 1998. A microscopic characterization of the infection of green and red pepper fruits by an isolate of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Phytopath.* 146: 301 303.
- Oh, B.J., Kim, K.D. and Kim, Y.S. 1999a. Effect of cuticular wax layers of green and red pepper fruits on infection by *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Phytopath.* 147: 547 552.
- Oh, B.J., Ko, M.K., Kim, Y.S., Kim, K.S., Kostenyuk, I. and Kee, H.K. 1999b. A cytochrome P450 gene is differentially expressed in compatible and incompatible interactions between pepper (*Capsicum annuum*) and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 1044 1052.
- Oh, B.J., Ko, M.K., Kostenyuk, I., Shin, B. and Kim, K.S. 1999c. Coexpression of a defensin gene and a thionin-like gene via different signal transduction pathways in pepper and *Colletotrichum gloeosporioides* interactions. *Plant Mol. Biol.* 41: 313 319.
- Pressey, R. 1997. Two isoforms of NP24: a thaumatin-like protein tomato fruit. *Phytochemistry* 44: 1241 1245.
- Richard, L., Arro, M., Hoebeker, J., Meek-Wagner, D.R. and Tran Thanh, Van K. 1992. Immunological evidence of thaumatin-like proteins during floral differentiation. *Plant Physiol.* 98: 337 342.
- Roberts, W.K. and Selitrennikoff, C.P. 1990. Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *J. Gen. Microbiol.* 136: 1771 1778.
- Robinson, S.P., Jacobs, A.K. and Dry, I.B. 1997. A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. *Plant Physiol.* 114: 771 778.
- Rodrigo, I., Vera, P., Tornero, P., Hernández-Yago, J. and Conejero, V. 1993. cDNA cloning of viroid-induced tomato pathogenesis-related protein P23. Characterization as a vacuolar antifungal factor. *Plant Physiol.* 102: 939 945.
- Rojo, E., Titarenko, E., Leon, J., Berger, S., Vancanneyt, G. and Sánchez-Serrano, J.J. 1998. Reversal protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 13: 153 165.
- Ruiz-Medrano, R., Jimenez-Moraila, B., Herrera-Estrella, L. and Rivera-Bustamante, R.F. 1992. Nucleotide sequence of an osmotin-like cDNA induced in tomato during viroid infection. *Plant Mol. Biol.* 20: 1199 1202.
- Salzman, R.A., Tikhonova, I., Bordelon, B.P., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A.

1998. Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiol.* 117: 465 472.
- Saniewski, M., Czapski, J., Nowacki, J. and Lange, E. 1987a. The effect of methyl jasmonate on ethylene and 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid production in apple fruits. *Biol. Plant.* 29: 199 203.
- Saniewski, M., Nowacki, J. and Czapski, J. 1987b. The effect of methyl jasmonate on ethylene production and ethylene-forming enzyme activity in tomatoes. *J. Plant Physiol.* 129: 175 180.
- Singh, N.K., Handa A.K., Hasegawa P.M. and Bressan, R.A. 1985. Proteins associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol.* 79: 126 137.
- Tattersall, D.B., van Heeswijck, R. and Bordier Hoj, P. 1997. Identification and characterization of a fruit-specific, thaumatin-like protein that accumulates at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes. *Plant Physiol.* 114: 759 769.
- Tsukaya, H., Ohshima, T., Naito, S. and Chino, M., and Komeda, Y. 1991. Sugar-dependent expression of the CHS-A gene for chalcone synthase from petunia in transgenic Arabidopsis. *Plant Physiol.* 97: 1414 1421.
- Vanderplank, J.E. 1984. Sink-induced loss of disease resistance and high-sugar disease processes and biotrophy. In: J.E. Vanderplank (Ed.) *Disease Resistance in Plants*, Academic Press, Orlando, FL, pp. 107 116.
- Vigers, A.J., Wiedemann, S., Roberts, W.K., Legrand, M., Selitren-nikoff, C.P. and Fritig, B. 1992. Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. *Plant Sci.* 83: 155 161.
- Woloshuk, C.P., Meulenhoff, J.S., Sela-Buurlage, M., van den Elzen, P.J.M. and Cornelissen, B.J.C. 1991. Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 3: 619 628.
- Xu, Y., Chang, F.L., Liu, D., Narasimhan, M.L., Raghothama, K.G., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. 1994. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* 6: 1077 1085.
- Yu, M. and Griffith, M. 1999. Antifreeze proteins in winter rye leaves form oligomeric complexes. *Plant Physiol.* 119: 1361 1369.
- Zhu, B., Chen, T.H.H. and Li, P.H. 1993. Expression of an ABA-responsive osmotin-like gene during the induction of freezing tolerance in *Solanum commersonii*. *Plant Mol. Biol.* 21: 729 735.

## 제 6 장 뿌리 특이적 발현 프로모터 개발

### 제 1 절 서론

식물에서 뿌리 조직은 일반적으로 식물체의 지지, 양분과 수분의 흡수 및 통도 등의 기능을 가지고 있으며, 뿌리털은 한 개의 표피 세포로 이루어져 있어 관찰이 용이하다. 이러한 식물체의 뿌리 조직은 지하부 세포의 형태, 분화 그리고 성장 기작의 연구에 유용한 표본으로 사용되어 왔다(Schiefelbein, 2000; Ringli et al., 2002).

대부분의 식물들은 군락을 이루며 살아가며, 군락 내에서 공간적인 점유를 통한 생존 경쟁을 하며 살아간다. 지상부와 환경이 다른 지하부의 뿌리 환경은 생존에 필수적인 양분의 공급과 같은 역할을 하므로, 그 공간적인 점유에 대한 경쟁은 더 더욱 치열하다. 식물의 뿌리는 이웃한 식물의 성장에 영향을 미치는 화학물질을 배출하는데, 이를 타감작용(allelopathy)이라 한다(Wrobel et al., 2002; Namgi et al., 1995). 타감작용이란 용어는 1937년 독일의 Molish에 의해 처음 사용되었으며, 모든 식물들 또는 미생물 사이에서 일어나는 생화학적인 상호유해작용(inhibitory interaction)과 상호유익작용(stimulatory interaction) 모두를 포함하며, 이러한 기능을 하는 화합물을 타감 물질(subterranean allelochemical)이라 한다. 타감 물질은 생물종간에 미치는 영향에 따라 나뉘어 진다. 미생물이 생산하여 타 미생물에 영향을 주는 화학적 화합물을 antibiotic, 고등 식물이 생산하여 미생물에 영향을 주는 물질을 phytocide, 미생물에 의해 생산되어 고등 식물에 영향을 미치면 marasmin, 고등 식물에 의해 생산된 물질이 고등 식물에 영향을 미치면 kolines라 한다. Acetaldehyde, malate, citrate, acetate, tartarate와 같은 수용성 유기산들은 씨의 발아와 어린 싹들의 성장을 억제하는 물질로 알려져 있으며(Evenari, 1949), Solidago altissima와 Erigeron annuus에서 생성되는 지방산과 polyacetylene의 경우 burmudagrass의 싹과 *Azotobacter*, *Rhizobium*의 성장을 방해하는 물질로 알려져 있다(Whittaker and Feeney, 1974). 그 외 대부분의 식물에 존재하는 coumarin, 소나무의 잎과 목질부에서 생성되어 토양속에 존재하는 flavonoid 그룹의 quercetin, 여러 고등 식물에서 발견된 cinnam 화합물(cinnamic compound)들이 알려져 있다.

Quinone과 phenol 화합물들은 이러한 타감 물질 중의 한 가지로, 일반적으로 세포 내 2차 대사산물로서 에너지 생산, 숙주의 방어 기작 그리고 전자전달에 관여하며 또한 식물체 근권에서 타감 물질로 작용하는 것으로 알려져 있다(Lakshmi et

al., 1999; Matvienko et al., 2001). 이 중 quinone은 cytotoxicity 기작에 의한 항균, 항말라리아 그리고 항암 물질로 사용되어왔다(O'Brien, 1991). Quinone은 nucleic acid, protein, lipid 또는 carbohydrate에 직접 결합할 뿐 아니라 reactive oxygen intermediate(ROI) system에 관여하여 세포 내 cytotoxicity를 보인다(Loconte et al., 2000). 세포 내 효소에 의하여 quinone은 semiquinone 형태로 변하는데 이것은 다시 oxygen을 superoxide로 변화시켜 hydroxyl radical과 hydroperoxyl free radical 전자를 형성시킨다. Free radical 상태의 전자는 세포 내 효소의 불활성화, DNA 가닥의 파괴 membrane lipid peroxidation을 가져와 세포 내에서 cytotoxicity 결과를 보이게 되는 것이다. 세포는 이러한 ROI에 의한 피해로부터 보호하기 위한 생화학적 경로를 가지고 있는데 이것은 공기중의 산소의 세포 내 축적에 의한 피해로부터 살아가기 위한 방법에서 기인되었다(Shirley, 1996; Morris et al., 1998; Smith, 1985; Talalay et al., 1988; Li et al., 1995).

Flavoprotein family에 속하는 일반적인 quinone reductase(QR)의 경우 NAD(P)H와 결합된 형태로 quinone에 직접 결합하여 semiquinone 상태를 거치지 않고 직접 hydroquinone 상태로 변화시키는 방법을 통하여 quinone detoxification 기작을 수행한다. 기생 식물인 *Triphysaria*의 경우 QR과 높은 상동성을 보이는 TvQR1, TvQR2 유전자가 alleopathic quinone의 일종인 2,6-dimethoxybenzoquinone(DMBQ)에 의하여 활성화된다. *Sorghum*(수수류)의 뿌리에서 발견된 DMBQ는 일반적으로 식물의 세포벽을 구성하는 물질로 알려져 있으며, phenol 화합물의 산화과정 또는 lignin의 분해시 2차산물로서 생성되어 뿌리에서 방출되며 근권에 영향을 미치는 것을 알려져 있다. 또한 DMBQ는 동물 세포에서 cytotoxic하며 antibiotic, DNA-damaging mutagen 성질을 가지고 있으며 식물체에서 기인된 antitumor agent로 연구되어왔다(Handa et al., 1983; Nishina et al., 1991). 또한, Carcinogen-detoxification 효소인 DT-diaphorase의 경우 quinone reductase family에 속하는 것으로 이에 대해 많은 연구가 되어 왔다(Hammondkosack et al., 1996; Brock et al., 1996).

최근 형질 전환 작물의 문제로 대두되는 생태계의 2차 오염은 꽃가루를 통한 근연종과의 수분 및 2차 대사산물의 전파에 의한 것으로 이러한 작용은 대부분 식물체의 지상부에서 이루어진다. 이에 전통적인 육종방법인 접목(grafting)과 DNA 형질 전환 방법을 통합한 부분형질전환 작물을 통하여 문제를 해결하려는 시도가 이루어지고 있다. 형질 전환된 강력한 뿌리 기능을 가지고 있는 박과 작물에 wild type의 작물을 접목시키는 방법이 한가지 예라 할 수 있다. 이러한 작물은 형질 전환 작물에 의한 생태계 오염 방지와 소비자로부터 보다 낮은 거부감을 가져 올 수

있다는 장점으로 앞으로 식물생명공학을 이용한 기능성 작물개발에 많이 활용될 것으로 여겨진다. 이러한 방법의 접근을 위해서는 식물체의 뿌리 조직에서 특이적으로 발현하는 유전자의 확보 및 이로부터 분리한 promoter가 절대적으로 필수적인 요소가 된다.

*Arabidopsis*의 atPRP3는 식물체에서 뿌리 특이적으로 발현되는 유전자로, 뿌리 세포벽 구조 단백질의 일종이며 물리적 자극 또는 병원물질에 반응하는 것으로 알려졌다. 또한 *Arabidopsis*의 EIR1, 토마토의 lysyl-tRNA-synthetase-like protein 그리고 *Zea may*의 zmGRP3 등이 식물체의 뿌리 조직에서 특이적으로 발현되는 것으로 알려진 유전자들이다(Bernhardt and Tierney, 2000; Gritch et al., 1997; Goddemeier et al., 1998). 이처럼 식물체에서 뿌리의 발달 단계나 세포의 구조 및 기능, 호르몬이나 stress 반응에 관한 연구는 많이 이루어졌으나 주변 식물체 반응에 의한 뿌리 조직이나 세포의 작용에 관련된 연구는 매우 부족하며 타감 작용이라 생각되어지는 반응에 관한 연구는 매우 부진한 편이다.

본 연구에서는 뿌리 특이적으로 발현하는 유전자를 찾기 위하여 우선 *Arabidopsis*에서 뿌리 특이적으로 발현되는 것으로 알려진 atPRP3 및 EIR1 cDNA에 해당하는 genomic clone을 분리하였다. 또한 atPRP3의 경우 promoter::GUS construct를 제작하여 *Arabidopsis* 및 담배 형질전환체를 만들고 이를 분석하여 유전자 발현의 뿌리 조직 특이성을 확인하였다. 한편 오이를 실험재료로 뿌리 조직에서 발현되는 유전자를 대량으로 분리하고자 suppression subtractive hybridization (SSH) 방법을 사용하였으며 실험 결과 뿌리조직에서 더 많이 발현되는 2개의 cDNA clone(각각 rootII-11, 18라고 명명)을 확보하였다. RootII-18 cDNA clone의 경우, northern blot 분석과 RT-PCR 실험을 통해 뿌리 특이적 발현을 확인하였으며 이 유전자가 암호화하는 단백질은 식물체에서 타감작용 기구로 알려진 quinone oxidoreductase와 높은 상동성을 보였다. 이에 식물체에서 뿌리 특이적으로 발현하며 타감 작용에 관여하는 rootII-18 유전자를 분리하여 구조를 밝히고자 하였다. 또한 형질전환 작물을 개발할 때 문제점으로 알려진 지상부의 2차 생태계 오염 문제를 극복하기 위해 뿌리 특이적으로 발현하는 재조합 vector 제작용 promoter 부위를 분리하고자 하였다.



## 제 2 절 실험재료 및 방법

### 1. 실험 재료

실험에 사용된 식물체로는 *Arabidopsis*와 시중에서 얻을 수 있는 동원농산종묘의 춘심백다다기 오이(*Cucumis sativus* L.)를 선택하였다. 오이로부터 뿌리, 줄기, 그리고 잎을 얻기 위하여 plant growth chamber(27°C, 16h light)에서 1주일간 재배하였다. 오이 씨앗을 paper towel 위에서 foil을 사용하여 빛을 차단시킨 상태로 48시간 incubation 시킨 후 호일을 제거한 다음에는 paper towel이 마르지 않도록 지속적으로 수분을 제공하며 발아를 시켰다. 식물체의 크기가 10 cm 정도 되었을 때 씨앗 껍질을 기준으로 뿌리 조직과 줄기와 잎이 포함된 shoot 조직을 분리하였으며 액체질소에 급냉 후 -80°C에 저장하였다.

### 2. Total RNA 분리

오이로부터 분리된 뿌리 조직과 shoot 조직으로부터 total RNA를 다음과 같은 방법으로 분리하였다. 준비된 조직의 질량을 확인한 후 막자사발로 옮겨서 액체질소와 함께 막자를 이용하여 가루로 만들었다. 조직 gram 당 5 ml의 extraction buffer (2% CTAB, w/v; 1.4 M NaCl; 1% PVP, w/v; 0.2%  $\beta$ -mercaptoethanol, v/v; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH 9.0; 0.4 g PVPP/g)를 첨가한 후 막자를 이용하여 갈려진 조직과 buffer를 잘 섞어 주었다. 그런 뒤 40 ml의 polypropylene tube로 옮겨 60°C의 항온 수조에서 5분간 정치시켰다. 동량의 phenol:chloroform :isoamylalcohol (25:24:1, v/v/v)을 첨가하여 혼합시킨 뒤 12,000 ×g로 원심분리하였으며 이 과정을 두번 반복하였다. 상층액은 새로운 tube로 옮겨서 0.6배의 isopropanol을 넣고 얼음에서 30분간 침전시킨 뒤 12,000 ×g로 10분간 원심분리 하여 nucleic acid pellet을 얻었다. Pellet은 0.6 ml의 DEPC(diethyl pyrocarbonate) 처리가 된 멸균된 증류수를 넣고 녹여서 1.5 ml의 polypropylene tube로 옮겼다. 그런 뒤 동량의 4 M LiCl를 넣고 4°C에서 침전을 시킨 뒤, 70% ethanol로 씻고 20  $\mu$ l의 DEPC 처리 멸균 증류수에 녹여서 -80°C에 보관하며 사용하였다. UV 정량은 UV spectrophotometer(Perkin elmer, USA)를 사용하였고, 1.8%의 formaldehyde가 들어있는 denaturing agarose gel에서 RNA 분리 상태를 확인하였다. Total RNA 등 RNA 시료는 UV Spectrophotometer와 RNA gel을 사

용하여 그 질을 측정하였다. *Arabidopsis* 잎(1 g)의 경우, 액체질소로 분쇄한 다음 위와 같은 방법으로 RNA만 선택적으로 분리하였다.

### 3. *Arabidopsis* genomic DNA 추출 및 genomic library 제조

*Arabidopsis* 잎(1 g)을 액체질소로 분쇄한 다음 2× CTAB용액(1.4 M NaCl, 2% CTABw/v, 100 mM Tris pH 8.0, 20 mM EDTA)을 사용하여 DNA를 추출하였다. 일부 DNA (2.5 μg)를 EcoRV, PvuII, DraI(Clontech) 등의 제한효소로 처리하고 각 절편에 Universal GenomeWalker kit(Clontech)을 사용하여 blunt end adaptor를 붙여 genomic library를 제조하였다.

### 4. PCR-based genomic walking

*Arabidopsis*의 유전자 중 뿌리에 특이적으로 발현하는 것으로 보고된 EIR1 (Luschnig et al., 1998) 및 PRP3(Tierney et al., 1999) 유전자의 염기서열을 분석하여 각각 2개씩의 antisense primer를 제작하였다. EIR1, PRP3에 대한 primer는 각각 5'GGCTTCCTCT GCGGCTAAAC GCCTGC3'(일차), 5'GCAACGTATA GCGGCACCAT AGCCGC3'(이차, nested)와 5'GGCCAAGGAG GAGCGTGTGA TCGCCAT3'(일차), 5'GCTGGGCGCT TGGCTTGTAT ATTGCC3'(이차, nested)였다. 위에서 언급한 3종류의 genomic library를 주형으로 일차 antisense primer 및 adaptor primer 1(Clontech)을 사용하여 polymerase chain reaction(PCR)을 수행하였다. 증폭된 PCR product는 희석한 다음 2차 nested antisense primer 및 adaptor primer 2(Clontech)를 사용하여 재증폭시켰다. 1, 2차 PCR 조건은 7 cycle: 94°C 30 sec, 72°C 3 min; 32 cycle: 94°C 30 sec, 67°C 3 min; 마지막으로 1 cycle: 67°C 7 min이었다.

### 5. 염기서열 분석

최종 PCR product를 pCR2.1/TOPO vector(Invitrogen)에 subcloning한 다음 automatic sequencer를 이용하여 염기서열을 작성하였으며 promoter 내 주요 putative cis element를 탐색하였다. 이때 분석용 program으로는 DNASIS/PROSIS, PCGENE, Clustal V, BLAST search 등을 사용하였다.

## 6. EIR1 및 PRP3 유전자의 reverse transcription-PCR 분석

준비한 RNA 2  $\mu\text{g}$ 에 M-MLV reverse transcriptase 200 unit(promega)을 첨가하여 37°C에서 1시간 반응하여 cDNA를 합성하고, 이를 template로 사용하여 PCR 반응을 수행하였다.

EIR1(Luschnig et al., 1998) 및 PRP3(Tierney et al., 1999) 유전자의 염기서열을 분석하여 각각 sense, antisense primer를 제작하였으며 이는 다음과 같다. EIR1 sense (5' ATGATCACCG GCAAAGACAT GT3'), EIR1 antisense (5'GCAACGTATA GCGGCACCAT AGCCGC3'); PRP3 sense (5'ATGGCGATCA CACGCTCCTC CTTG3'), PRP3 antisense (5'CTAGAATAGG GTAGGTTTCG TAGCC3'). PCR은 각각의 primer의 annealing temperature에 맞추어 3 step cycle로 수행하였다.

## 7. DNA construction

PCR 2.1 TOPO vector에 들어 있는 각각의 promoter를 제한 효소로 처리하여 분리하고(EIR1은 SmaI과 SalI, PRP3는 BamHI과 SalI), 이를 다시 pCAMBIA 1305.1 vector에 넣어 promoter::GUS construct를 제작하였다. 재조합 vector는 *E. coli*를 거쳐 *Agrobacterium*내에 삽입하였고 이 *Agrobacterium*을 사용하여 leaf disc 방법으로 *Arabidopsis* 및 담배를 형질 전환시켰다.

## 8. *Arabidopsis* 형질전환체 분석

형질전환체의 종자를 채취하여 kanamycin(200 mg/L)이 첨가된 MS 배지에서 발아시킨 다음, 유묘를 GUS 분석 용액(50 mM sodium phosphaste buffer, pH 7.0, 3 mM potassium ferricyanide, 3 mM potassium ferrocyanide, 2 mM X-glucuronic acid)에 담그어 37°C에서 overnight 동안 반응시켰다. 증류수로 유묘를 세척한 후 chlorophyll이 완전히 제거될 때까지 70% 에탄올로 처리하였다. 시료 내 GUS 발현은 해부현미경을 사용하여 확인하고 촬영하였다.

## 9. Suppression subtractive hybridization (SSH)

SSH는 PCR-select cDNA Subtraction Kit(CLONTECH)를 이용하였다.  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관된 뿌리 조직과 shoot 조직의 total RNA로부터 Oligotex mRNA mini kit(QIAGEN)를 이용하여 mRNA를 분리하였다. 뿌리 조직과 shoot 조직에서 분리된 mRNA부터 각각 tester와 driver cDNA를 합성하였다. SSH는 두 개의 population(tester & driver)을 비교하여 그 중 하나의 population에서만 발현되는 유전자를 확보하는데 있어서 기존의 differential screening과 differential display RT-PCR의 단점들을 극복한 방법으로 알려져 있다. 이 방법의 최종 산물인 PCR product는 *E. coli* 형질전환을 통하여 cDNA clone를 확보하였다.

## 10. Reverse northern analysis

SSH PCR product를 *E. coli*에 형질전환시켜 얻은 191개 cDNA clone중 일부에 대해 reverse northern blot 분석을 수행하였다. 각 clone들로부터 plasmid DNA를 분리해서, EcoRI enzyme(kosco,  $20 \mu/\mu\text{l}$ )으로 자른 후 1.25% agarose gel에서 80V로 전기영동하였다. 먼저 전기영동된 gel를 0.25 N HCl 용액에서 10분간 fragmentation 시켰다. 그런 뒤 denaturation(1.5 M NaCl; 0.5 N NaOH)용액에서 30분간 반응시켰고 증류수로 washing 했다. Neutralization(1.5 M NaCl; 0.5 M Tris-HCl, pH 8.0)용액에서 30분간 반응시킨 후  $20\times$  SSC용액에서 20분간 반응시켰다. DNA는 Nytran membrane(Schleicher & Schuell)으로 upward capillary transfer 방법을 이용하여 옮겼다. Transfer가 완료된 membrane에 well 표시를 한 후, UV cross linker(Fisher)로 DNA를 고정시켰다. Membrane은  $5\times$  SSC; 0.1% N-lauroylsarcosine, (w/v); 0.2% SDS, (w/v); 1% blocking reagent가 포함된 전혼성화 용액에서  $60^{\circ}\text{C}$ 로 2시간 동안 교반시켰다. 전혼성화가 끝나면 제조된 probe를 넣고 동일한 용액에 16시간 이상  $60^{\circ}\text{C}$ 로 혼성화시켰다. 그런 뒤 1차 washing buffer ( $2\times$  SSC, 0.1% SDS)로 실온에서 20분간 세척한 후, 2차 washing buffer ( $1\times$  SSC, 0.1% SDS)로  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 15분 세척하였다. 최종적으로 X-ray film에 CSPD detection kit (Roche)을 사용하여 감광시킨 다음 결과를 확인하였다. CSPD는 alkaline phosphatase와 반응하는 chemiluminescent substrate이다. SSH product의 probe로는 뿌리 조직과 shoot 조직의 mRNA ( $300 \text{ ng}/\mu\text{l}$ )  $4 \mu\text{l}$ 를 random primed labeling 방법에 따라 제조된 dig-labeled cDNA를 사용했다.

## 11. Northern analysis

준비된 뿌리 조직과 shoot 조직의 total RNA 20  $\mu\text{g}$ 에 2배의 loading buffer를 넣고 65°C에서 15분간 처리한 후, 1  $\mu\text{l}$ 의 ethidium bromide(1 mg/ml)를 넣고 1.8% formaldehyde가 포함되어 있는 1.25% agarose gel에서 50V로 전기영동하였다. 전기영동한 뒤 gel을 DEPC가 처리된 증류수로 세척하고 20× SSC 용액으로 20분 동안 침윤시킨 뒤 Sambrook 등의 방법에 의해 membrane에 옮긴 후 고정시켰다. 이후 혼성화 반응 조건은 reverse northern 혼성화 반응과 동일하였다. 다만, probe는 reverse northern 혼성화 반응에서 선택된 clone으로부터 특정 부위를 random primed labeling 방법에 따라 제작한 dig-labeled cDNA를 사용하였다.

## 12. 특정 DNA 절편의 순수 분리

특정 DNA 절편의 순수 분리는 Gel extraction kit(VIOGENE)을 이용하여 분리하였다. 제한효소를 이용하여 plasmid로부터 특정 부위를 잘라낸 다음 DNA 절편이 포함되어 있는 부위의 agarose gel을 절단하여 무게를 측정하였다. 잘려진 절편을 1.5 ml tube에 넣어 500  $\mu\text{l}$ 의 pGEX buffer를 넣어 60°C에서 10분 정도 방치하여 gel을 녹였다. Gel이 완전히 녹은 다음 이를 spin column과 collection tube로 구성된 unit에 옮겼다. 13,000 rpm으로 1분간 원심분리하고 collection tube에 모인 용액을 버린 다음, 다시 spin column에 washing solution(700  $\mu\text{l}$ )을 넣고 1분 동안 원심분리하였다. 그런 후 collection tube에 모인 solution을 버리고 다시 spin column에 washing solution II(500  $\mu\text{l}$ )을 넣고 2분 동안 원심분리하였다. 남아있는 ethanol residue를 제거하기 위해 2분 동안 13,000 rpm으로 원심분리하였다. Spin column을 새로운 1.5 ml tube에 넣은 다음, 이곳에 20  $\mu\text{l}$  distilled water를 넣어 2-3분 동안 방치하였다. 이 후 13,000 rpm으로 원심분리하여 원하는 DNA 절편을 순수 분리하였다.

## 13. Reverse transcription - polymerase chain reaction

DNase(Promega) 처리된 뿌리 조직과 shoot 조직의 total RNA(1  $\mu\text{g}$ )와 oligo-dT primer(0.5  $\mu\text{g}$ )를 넣고 최종 volume을 10  $\mu\text{l}$ 로 한 뒤, 75°C에서 5분간 변성시키고 상온에서 15분 동안 정치시키면서 primer를 annealing 시켰다. 그런 뒤 열

음에 tube를 두고 1 mM의 dNTP, 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT 그리고 M-MLV reverse transcriptase(200 units/1 μl, Promega)를 혼합하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 75°C에서 5분간 효소를 불활성화시켰다. PCR은 first strand cDNA template, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 pmole의 gene specific primer

(rootII-11 sense primer; 5'-AGGAGGGCAAATGCTAGTCG-3',  
rootII-11 antisense primer; 5'-CACCAAAAGGAACTGCAGCA-3',  
rootII-18 sense primer; 5'-GTTACACTTTTGGTGCTGGGA-3',  
rootII-18 antisense primer; 5'-CTTGGTGGGAAGGCTTGCTC-3'),

50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100 그리고 2.5 units의 Taq DNA polymerase (Promega)를 혼합하여 94°C에서 3분간 변성시키고, 94°C에서 30초, 55°C에서 1분, 그리고 72°C에서 1분간 30번을 반복하여 반응시켰다. 그리고 마지막으로 72°C에서 10분간 반응시켰다.

#### 14. 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE)

Full-length cDNA clone를 얻기 위해 partial RNA sequence로부터 gene-specific primer(GSP)를 제작한 후, Marathon™ cDNA Amplification Kit (CLONTECH)을 사용하여 RACE를 수행하였다. 이 방법은 23~28 nucleotide(nt) 정도의 최소한의 RNA sequence를 이용하기 때문에 expressed sequence tag(EST), differential display, RNA fingerprinting 실험을 통하여 얻어진 RNA의 동정에 사용되어왔다.

오이 뿌리 조직의 total RNA로부터 Oligotex mRNA mini kit(QIAGEN)를 이용하여 mRNA를 분리한 후, kit에서 제공하는 방법에 따라 adaptor ligated ds cDNA library를 제작하였다. 5' RACE PCR mixture는 10 μl의 diluted adaptor ligated cDNA를 주형으로 사용하였으며 AP1(10 pmole, kit제공) 1 μl, GSP 10 pmole, rootII-18-2 antisense primer; 5'-CTTTCCTTGGTGGGAAGGCTTGCTCC-3' 1 μl, 10mM dNTP 1 μl, 10× cDNA PCR reaction buffer, Advatage cDNA polymerase Mix(50×, Promega) 1 μl와 distilled water를 사용하여 최종 부피를 50 μl로 조정하였으며, 3' RACE PCR mixture로는 위와 동일하게 제조하였으며 rootII-18-2 sense primer; 5'-CCATTGGTTACACTTTTGGTGCTGGGA-3'를 GSP로 이용하였다. 각각의 PCR cycle은 94°C에서 30초 동안 최초 반응 후, 94°C에서 5초, 62°C에서 3분 동안 5번 반응, 94°C에서 5초, 59°C에서 3분 동안 5번 반응시

킨 후, 94°C에서 5초, 56°C에서 3분 동안 35번 최종 반응시켰다.

PCR product 중 각각 10  $\mu$ l를 1% agarose/ethidium bromide gel에서 확인하였으며, gel상에 보이는 band를 위에서 서술한 gel extraction kit을 이용하여 순수 분리한 후 pCR-2.1kb TOPO vector에 subcloning하였다.

## 15. GenomeWalker PCR

Universal GenomeWalker™ Kit(CLONTECH)을 사용하여 genomewalker PCR을 수행하였다. PCR-based GenomeWalker DNA walking 방법은 준비된 partial cDNA 또는 DNA sequence로부터 인접부위의 unknown genomic DNA sequence를 확보하는데 이용되어 왔다.

오이 조직으로부터 DNeasy Plant Maxi Kit(QIAGEN)을 사용하여 genomic DNA를 준비하였다. 그 후 kit에서 제공하는 방법에 따라 제한효소(DraI, EcoRV, PvuII, StuI)로 처리한 후, adaptor ligation 과정을 걸쳐 효소에 따라 4개의 library를 제작하였다. 각각의 library에 대하여 준비된 GSP를 사용하여 primary PCR과 secondary PCR 반응을 수행하였다. Primary PCR은 1  $\mu$ l의 adaptor ligated genomic DNA를 주형으로 사용하였으며, AP1(10 pmole, kit제공) 1  $\mu$ l, GSP1(10 pmole, root II-18-2 antisense primer; 5'-CCATTGGTTACACTTTTGGTGCTGGGA-3') 1  $\mu$ l, 10 mM dNTP 1  $\mu$ l, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ l, 10× Ex Taq™ buffer(Mg<sub>2</sub>+free) 5  $\mu$ l, ExTaq™(5 unit, TaKaRa) 0.5  $\mu$ l와 distilled water를 사용하여 최종 부피를 50  $\mu$ l로 조정하여, 94°C에서 5초, 65°C에서 3분 동안 7번 반응 후, 94°C에서 5초, 60°C에서 3분 동안 32번 반응, 67°C에서 4분간 최종 반응시켰다. Secondary PCR은 1  $\mu$ l의 1/50 diluted primary PCR product를 주형으로 사용하였으며, AP2(10 pmole, kit제공) 1  $\mu$ l, GSP2(10 pmole, root II-18-7 antisense primer; 5'-GCTCCCTTCT TAATCTCCTC AGCAAGT-3') 1  $\mu$ l, 10 mM dNTP 1  $\mu$ l, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ l, 10× ExTaq™ buffer(MgCl<sub>2</sub>+free) 5  $\mu$ l, Ex Taq™(5 unit, TaKaRa) 0.5  $\mu$ l와 distilled water를 사용하여 최종 부피를 50  $\mu$ l로 조정하여, 94°C에서 5초, 75°C에서 3분 동안 5번 반응 후, 94°C에서 5초, 70°C에서 3분 동안 25번 반응, 70°C에서 4분간 최종 반응시켰다.

4개의 library로부터 증폭된 PCR product 중 각각 10  $\mu$ l를 취하여 1% agarose/ethidium bromide gel에서 확인하였으며 gel상에 보이는 band를 위에서 서술한 gel extraction kit을 이용하여 순수 분리한 후 pCR-2.1kb TOPO vector에 subcloning하였다.

## 16. Stress 처리에 따른 rootII-18 유전자의 활성화유도

RootII-18 유전자의 stress 처리에 따른 induction 정도를 알아보기 위해 오이 씨앗을 아무런 영양소가 포함되지 않은 agar 고체 배지에서 길이가 10 cm 정도 되며, 뿌리 말단 조직이 agar 고체 배지의 밑까지 성장할 때까지 growth chamber에서 키웠다. Stress 조건으로는 소나무 뿌리 2 g을 마쇄한 뒤 distilled water에서 녹여 상층액을 회수한 후 최종 부피를 10 ml로 맞추었으며, 10 ml의 2% ethanol, pinosylvin 1 mg/10 ml D.W., 10 ml의 100 uM 2,6-Dimethoxy-1,4-benzoquinone (DMBQ, Aldrich Chem.)의 용액을 준비하였다. 대조군으로는 distilled water를 사용하였으며, 각각의 용액에 뿌리가 자라고 있는 agar 고체 배지를 2시간 담구어 뿌리 말단 조직을 통해 용액의 흡수가 가능하게 하였다. 그 후, growth chamber로 원위치하여 5시간을 경과한 후 각각의 식물체로부터 뿌리 조직을 절단하였다. RootII-18 유전자의 induction 여부를 확인하기 위하여, 유전자 부위의 GSP(rootII-18-6 sense primer; 5'-GTACTGCATCAATGGCAACCAAG-3', rootII-18-4 antisense primer; 5'-GGCTTGCTCCAAGTCAAGAGTAGTTGGT-3')를 제작하여 RT-PCR을 수행하였다.



### 제 3 절 연구결과 및 고찰

#### 1. *Arabidopsis* EIR1 및 PRP3 유전자의 분리 및 promoter 발현 분석

```

                                I-BOX
1   CCTCACATGAATCAGATAAGTACTTCATCAAACCTTAGCTGGGATTAAGAA   50
51  AGGCCCTTCCATCTCTCTAATTTCTTCTCTATTTGAAAACAACCTTTTA   100
101 AACTATGAATCAAACCTGCGAGCCTTAAACATTCTCTAAGCATATGAGAAA   150
                                GT-1
151 ACAAAGACGAAGAACCCTAATTCTAAGATCTAACATAAGAAAAATAACAA   200
                                GT-1          RAV
201 AAACCGAAGAGAAAAATATATCGCCGAATATATATAACAAATCTCCGATC   250
251 ATTAGTCAATCGCCGCTTGAGCTTGGATTTGAGGCAAAGACAAATATATA   300
301 GGATTTGCTTTTTTTCATCATTAGGGTTTCCAGTTTTCAATGTTTTGGGCT   350
351 TATATTATCGGGCCTTTAGGTTTAATTGGCCCATAGTTGAAACTATACA   400
    Root motif                                MYB-CORE (-)
401 CGGATGGTTTTTCTTACTTTCTAATTGCTACAAACAACAGACTAATCTGTT   450
451 TTACATATTAATGGTTCAGATGTCATCAAAGATTATCTGTCCAAATAT   500
501 TATATTATAAGATACATTTTAATATTAATTATGATTTAGTAGAGCGGC   550
                                GATA
551 CGATCCGTTTTGATATGTTTAGAACTAAAAATTGAAATATATACTAAAAT   600
                                GATA
601 CAAAATTGGCAAACATTTGAACGAGTCTCATTATATGTCCTCTGACCAT   650
651 ATTATTTAATGGGCCTATCACATTTCCCGAGCCAGATAACGTCTTTTCA   700
                                GATA
701 GTTCTCCTATCCTTTTGGTCAGCTTGTGCATGGTTGTTACTTGTTAATGA   750
751 TGGCCAACATGTTTTTGATCGTGCATTGCACTTAGGTATGAGAATCTCAA   800
801 ACATACATGATTATCATCAATTACTCACTTTTAAGATAACGTTTCTTTAT   850
                                CAAT
851 TTCATATTCAAATTTTTAATACCCCCAAACATTTTCTTATAAAGCCCCATT   900
                                TATA
901 TGGTGAATCGTTTTCCCTCATCACAAATTTAAATACAAAGAACACAACAAA   950
951 CGAACTAGCTTAAGGCAATATACAAGCCAAGCGCTCAGCAATGGCCATCA 1000
                                M A I
1001 CACGCTCCTCC                                1011
      T R S S

```

Figure 1. DNA and predicted amino acid sequences of atPRP3. The ORF for atPRP3 and the predicted amino acid sequence are presented in bold. The fragment (nucleotides No. 1 to 1011) is now in pCR2.1 TOPO vector. The potential TATA box, CAAT box and three GATA motifs are underlined. The two consensus GT-1 and light-regulated I-BOX motifs are overlined. The conserved myb recognition sequence are indicated in inverse orientation in bold. The RAV domain and six root motifs are dashed and boxed, respectively.

```

1   AAAAACAAAAATACACCGTTTCAAGATTAAGATAAGTTAATTACAATT   50
51  GTATTTTTCCTGATTAAAAATCAGATGTTTACAGGGAACCGCAGATCGCT 100
101 CAGGAAGTGTAGTAAGATGCTCGCAAAAACCATGTGCATGTCCATCAACC 150
151 TCGCCGTCTCAATAGCTTACACAAAAATCGTTTTTGTTCCTTATTAATA 200
201 TAAACCTAATCTAAATTTACAAATTTGTTTTCTTATTAAATATAAAATCT 250
                                     Root motif
251 AATCTAAATTTACAAATTTGTATTACACGTACAAGTGGATCCAAGTATCT 300
301 GACTCTACAGATATTTTGAATCTAACATTTGTGTAATTATAATTTATAAT 350
351 CTCTGAAGCATTTAATTTTACTTACAAATAATGTTAGACCACGAGACAGA 400
      GT-1                                     AuxRE
401 AGGTAAACCAATCTTCCTTATCCCAAGATAAGATTCTTCAAATTAATAT 450
      MYB-CORE (-)                               I-BOX                               MYB-CORE (-)
451 AACGGCTTTTTCGAGAAGTAATAAAAGATAGAAGGAATATCTAGTATCAAC 500
                                     GT-1       GATA
501 GGTCTAGAGCACTTCGAAAAATTATGGACCAAAGAAGATTCAGACTGAAA 550
                                     GT-1
551 TTATTACTGTATTAGTATTTGTCCATTCACAAAATACCGAGGAAGGAAAA 600
601 AGGCATTTTGGTTTATATTTTGTTTATTTGATATTCAAATGTCCAACGAT 650
651 CCTCTCTAGCTAAGCTTAGCTATAATTCAATGTTTGAACACGAATCCCAT 700
                                     CAAT
701 TATTTTAAACACAAACAACATTAATTAATATCGTCTCAAGGAACCTCACT 750
751 TCCTTGTCCATAAAATACGTTATTTACACCACATATACTCATCTATATCT 800
                                     TATA
801 CTATTTTCTTCTTCTTCTCTCTCGCCGGAAAAAGTAAATCAAAATGA 850
                                     M
851 TCACCGGCAAAGACATGTACGATGTTTTAGCGGCTATGGTGCCGCTATAC 900
      I T G K D M Y D V L A A M V P L Y

```

Figure 2. DNA and predicted amino acid sequences of atEIR1. The ORF for atEIR1 and the predicted amino acid sequence are presented in bold. The fragment (nucleotides No. 1 to 900) is now in pCR2.1 TOPO vector. The potential TATA box, CAAT box and GATA motifs are underlined. The three consensus GT-1 motifs are overlined. The two conserved myb recognition sequence are indicated in inverse orientation in bold. The auxin response element (AuxRE) and four root motifs are dashed and boxed, respectively.

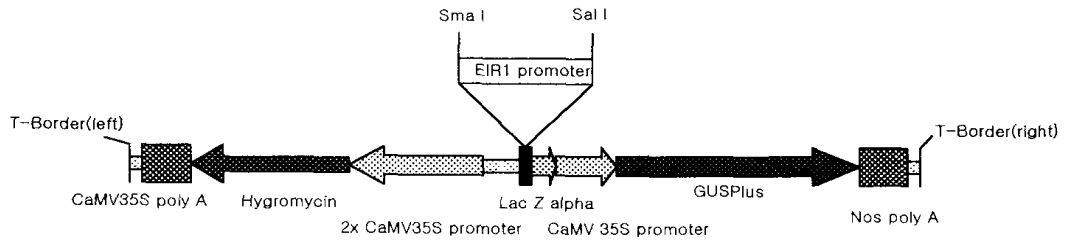


Figure 3. Physical map of EIR1 promoter::GUS construct.

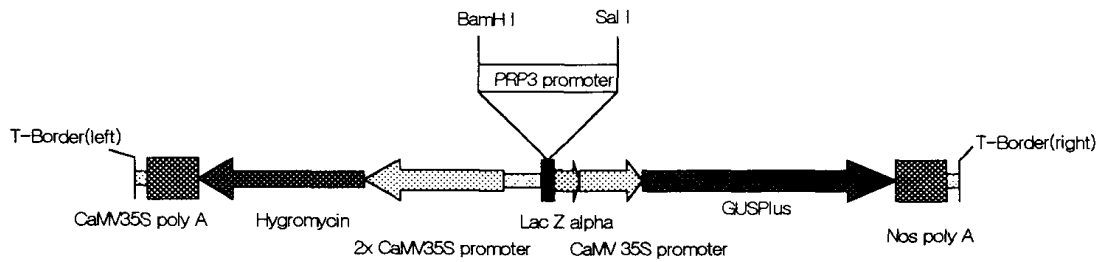


Figure 4. Physical map of PRP3 promoter::GUS construct.

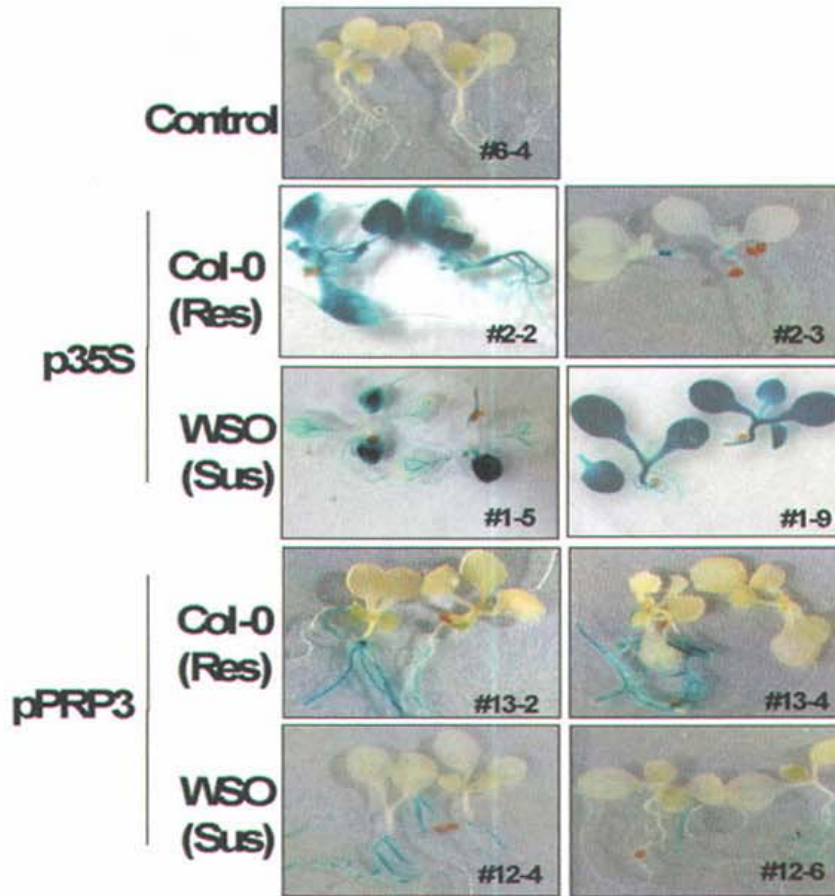


Figure 5. Root-specific expression of the PRP3 promoter::GUS fusion gene in transgenic *Arabidopsis*.

## 2. 뿌리에서 특이적으로 발현하는 유전자의 대량 탐색 및 분리

식물체에서 뿌리 특이적으로 발현하는 유전자를 분리하기 위하여 짧은 시간 내 뿌리조직의 대량 생산이 가능한 오이를 model plant로 선정하여 실험을 진행하였다. 오이 씨앗을 growth chamber에서 키워, 식물체의 길이가 10 cm 정도될 때 뿌리 조직, 줄기와 잎이 포함된 shoot 조직을 분리하여 액체 질소에 급냉 시켜  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 저장하였다. 뿌리 조직, shoot 조직의 RNA를 분리한 후 이를 SSH 방법에 이용하였다. SSH 방법에서는 뿌리 조직을 tester로, 줄기와 잎을 포함하는 shoot 부위를 driver로 사용하였다(Figure 6). SSH 방법의 PCR product를 TOPO vector에 subcloning하였으며, 최종 171개의 putative partial cDNA clone를 얻었다. 이 중 72개의 cDNA clone에 대하여 reverse northern blot 분석을 수행하였으며(data not shown, 실험재료 및 방법 참고), 그 결과 2개의 putative cDNA clone이 잎 조

직에 비해 뿌리 조직에서 많이 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 이들 clone들을 각각 rootII-11, rootII-18 이라 명명하였으며 이들을 대상으로 이후 실험을 진행하였다.

### 3. RootII-11 cDNA clone의 분석

Reverse northern blot 분석으로 1차 확인된 rootII-11 cDNA clone을 northern blot 분석과 RT-PCR 실험을 통해 발현 양상을 재확인하였다. Northern blot 분석에서는 뿌리 조직과 shoot 조직로부터 분리되어 DNase로 처리된 total RNA를 사용하였으며 cloning된 rootII-11 cDNA clone의 cDNA를 dig-labeling방법을 사용하여 probe를 제작하여 사용하였다. RT-PCR에서 뿌리 조직과 shoot 조직로부터 분리되어 DNase로 처리된 total RNA를 주형으로 PCR를 수행하였다(실험재료 및 방법 참고). 그 결과 northern blot 분석에서는 rootII-11 cDNA clone이 뿌리 조직에서만 발현되는 것을 확인할 수 있었으며, RT-PCR에서는 shoot 조직에서도 약간 발현되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 7).

또한 rootII-11 cDNA clone의 염기서열을 BLAST search를 통하여 분석한 결과 식물의 aldehyde dehydrogenase 단백질과 75% 이상 상동성을 보였으며, 인간의 aldehyde dehydrogenase 단백질과도 50% 이상 상동성을 보이는 191bp의 nucleotide를 가지고 있는 partial cDNA clone임을 확인할 수 있었다(Figure 9, A).

### 4. RootII-18 cDNA clone의 분석

RootII-18 cDNA clone의 경우, 좀 더 세분화된 발현 양상을 확인하기 위하여 뿌리, 줄기, 잎 조직을 이용하였다. 각각의 조직으로부터 분리되어 DNase로 처리된 total RNA를 사용하여 northern blot 분석과 RT-PCR 실험을 수행하였다. Northern blot 분석 실험 결과 rootII-18 cDNA clone이 뿌리 조직에서 대량 발현되는 것을 확인할 수 있었으며, 줄기 조직에서는 소량, 잎 조직에서는 발현이 되지 않는 것을 확인할 수 있었다. RT-PCR의 경우도 northern blot 분석 결과와 동일하였다(Figure 8).

또한, rootII-18 cDNA clone의 염기서열을 BLAST search를 통하여 분석한 결과, *Cicer arietinum*의 quinone oxidoreductase 단백질과 *Arabidopsis*의 1,4-benzoquinone reductase 단백질과 85%의 이상의 상동성을 보이는 146bp의

nucleotide를 가지고 있는 partial cDNA clone임을 확인할 수 있었다(Figure 9, B).

## 5. RootII-18 cDNA clone의 full-length ORF 획득

선별된 3개의 cDNA clone(rootII-11, 13, 18) 중 뿌리 조직에서 가장 높은 발현 양상을 보이는 rootII-18 cDNA clone을 선택하여 full-length ORF의 염기서열을 획득하여 분석하기 위해 RACE를 수행하였다(실험 및 방법 참고). RACE PCR 결과 5' library에서는 550bp 정도, 3' library에서는 500bp정도의 PCR product를 얻을 수 있었다(Figure 10). 이를 TOPO vector에 subcloning한 다음, SSH product로부터 얻은 clone과 중복된 염기서열 부위를 제거하고 모두 합친 결과 start codon 으로부터 시작하여 stop codon까지 full-length ORF를 포함하는 612bp 길이의 clone이며, 3' 쪽에 polyadenylation consensus sequence인 AATAA 염기 서열을 확인할 수 있었다(Figure 11).

## 6. RootII-18 유전자의 아미노산 서열 분석

RootII-18 유전자의 full-length ORF로 예상되는 염기서열을 BLAST search를 하였다. 그 결과 이미 full-length ORF의 염기서열이 알려진 *Arabidopsis*의 1,4-benzoquinone reductase, *Cicer arietinum*의 quinone oxidoreductase, *Triphysaria vesicolor*의 Tvquinone reductase2와 같은 quinone reductase 유전자들과 85% 이상의 유사성을 보였으며, QR 단백질들이 가지고 있는 conserved flavodoxin binding pattern (LIV)-(LIVFY)-(FY)-x-(ST)-x(2)-(AGL)-x-T-x(3)-A-x(2)-(LIV)을 가지고 있었다(Figure 11). Flavodoxin은 작은 oxidoreductase 단백질로 flavine mononucleotide에 결합한다. RootII-18 유전자의 경우 conserved pattern의 10번째 amino acid인 'T'가 'V'인 것을 제외하고는 모든 부분이 일치하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 rootII-18 유전자의 예상 ORF 부분을 다른 QR 유전자의 아미노산 서열과 비교한 결과 full-length ORF임을 확인할 수 있었다(Figure 12).

## 7. GenomeWalker PCR

RootII-18 cDNA에 해당하는 genomic clone의 promoter 부위를 얻기 위하여 PCR-based DNA walking 실험을 수행하였다. RACE를 통하여 얻은 612bp의 염기서열 중 +567번째 염기를 기준으로 5' 방향으로 진행하였다. PCR 결과 Stu library에서 1kb 정도의 product를 얻었으며, 이를 TOPO vector에 subcloning하여 sequencing하였다(Figure 14). 그 결과 +567번째 염기에서 +24번째 염기 서열까지 일치하는 것을 확인하였으나, 나머지 500bp 정도는 rootII-18 유전자의 ORF와 일치하지 않았다. 이에 일치하는 않는 염기 서열을 intron이라 가정하고, 이 부위를 기준으로 다시 PCR-based DNA walking을 수행하였다. 그 결과 EcoRV library에서 1kb정도의 product를 얻었으나, rootII-18 유전자 ORF의 +23번 염기와는 일치하지 않았다. 이에 intron의 길이를 알아보기 위하여 genomic DNA를 template로 이용하여 PCR을 수행하였다. Sense primer로는 +23번 염기의 앞쪽 부위를, antisense primer로는 intron 부위와 +24번 염기의 뒤쪽 부위를 사용하였다. 그 결과 2.7kb정도의 intron 부위를 확인할 수 있었다(Figure 15, A). 2회에 걸친 PCR-based DNA walking에서는 rootII-18 유전자의 promoter 부위는 얻지 못하였으나, rootII-18 유전자 ORF의 +23번째 염기와 +24번째 염기 사이에 2.7 kb길이의 intron이 있으며 이중 1193 bp의 염기서열을 작성할 수 있었다(Figure 15, B).

## 8. Automatic sequencing 및 상동성 분석

SSH 결과 얻은 171개의 putative cDNA clone 중 147개의 cDNA clone에 대하여 염기서열을 작성한 후 BLAST search를 하였다(Table 1). 여러 개의 clone들이 중복되는 염기서열을 보였으며, 이들의 동일 부위를 제거하여 집단화한 contig 염기서열을 제작하였다. 이들 contig의 염기서열을 분석한 결과, 일부 contig는 식물체의 hyphally regulated protein, phloem-specific lectin protein, seed imbibition protein 과 같은 방향성 성장과 관련된 유전자들이었다. 이에 contig를 구성하는 clone 중 일부를 임의로 선정하여 probe로 사용하여 reverse northern 분석을 수행하였으나, 뿌리 조직에서만 발현되는 clone를 선별할 수 없었다(data not shown).

## 9. Stress 처리에 따른 rootII-18 유전자의 활성유도

오이 뿌리 조직에서 rootII-18 유전자의 발현이 외부 자극에 의해 유도되는지를 알아보기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 오이 뿌리에 소나무 뿌리 추출물, ethanol, pinosylvin, 2,6-Dimethoxy-1,4-benzoquinone(DMBQ) 등을 처리하였으며, PCR product의 DNA band intensity 차이를 비교한 결과, 소나무 뿌리 추출물과 ethanol에 의해서는 도리어 발현이 감소하였으며 pinosylvin에 의해서는 차이를 보여주지 않았으며, DMBQ 처리된 sample에서는 대조군에 비해 2배 이상의 발현이 증가함을 보여주었다(Figure 16).

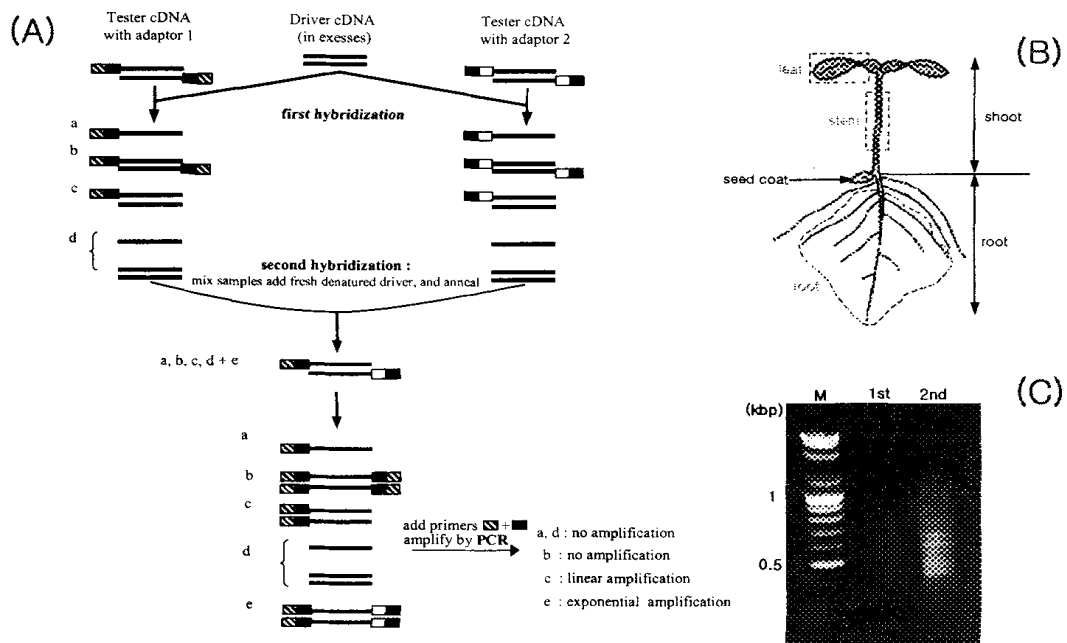


Figure 6. The scheme of SSH (Subtractive Suppression Hybridization) method.

(A) Solid lines represent the RsaI digested tester or driver cDNA. Striped boxes represent the outer part of the adaptor 1 longer strand and corresponding PCR primer P1 sequence. Shaded boxes represent the outer part of the adaptor 2 longer strand and corresponding PCR primer P2 sequence. Clear and solid boxes represent the inner part of the adaptors and corresponding nested PCR primers PN1 and PN2. (CLONTECH PCR-Select cDNA Subtraction Kit, CLONTECH)

(B) A region of model plant used in experiment.

(C) The result of SSH PCR product.



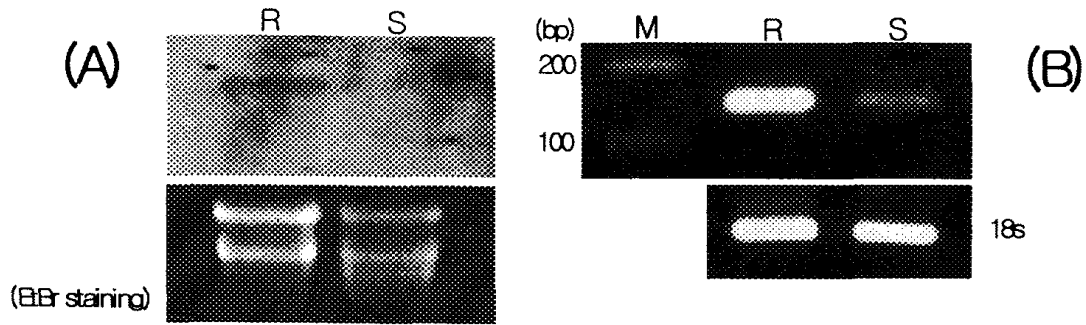


Figure 7. RootII-11 cDNA clone analysis.

(A) Northern hybridization analysis of cucumber total RNA. Hybridization was performed with the rootII-11 cDNA probe. Cucumber total RNA was checked by ethidium bromide staining.

R; root RNA, S; shoot RNA.

(B) RT-PCR analysis was performed with the rootII-11 cDNA primer. Total RNA quantity was confirmed by an 18S universal primer pair.

R; root RNA, S; shoot RNA, 18S; 18S rRNA PCR product.

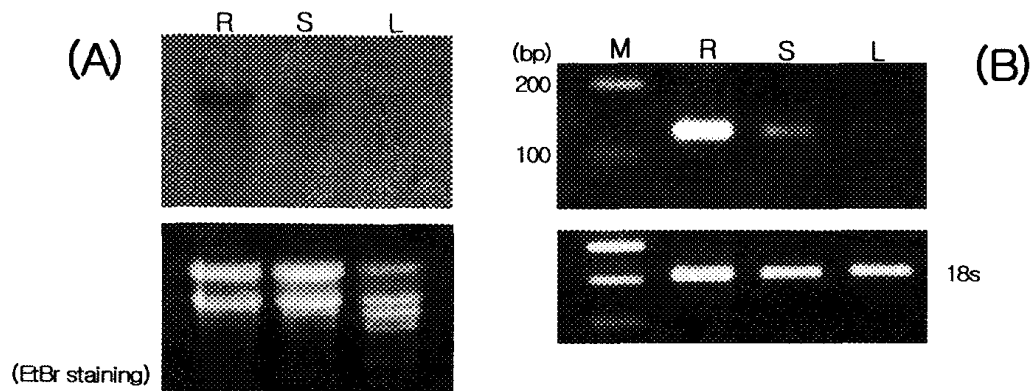


Figure 8. RootII-18 cDNA clone analysis.

(A) Northern hybridization analysis of cucumber total RNA. Hybridization was performed with the rootII-18 cDNA probe. Cucumber total RNA was checked by ethidium bromide staining.

R; root RNA, S; stem RNA, L; leaf RNA.

(B) RT-PCR analysis was performed with rootII-18 cDNA primer. Total RNA quantity was confirmed by an 18S universal primer pair. R; root RNA, S; stem RNA, L; leaf RNA, 18S; 18S rRNA PCR product.

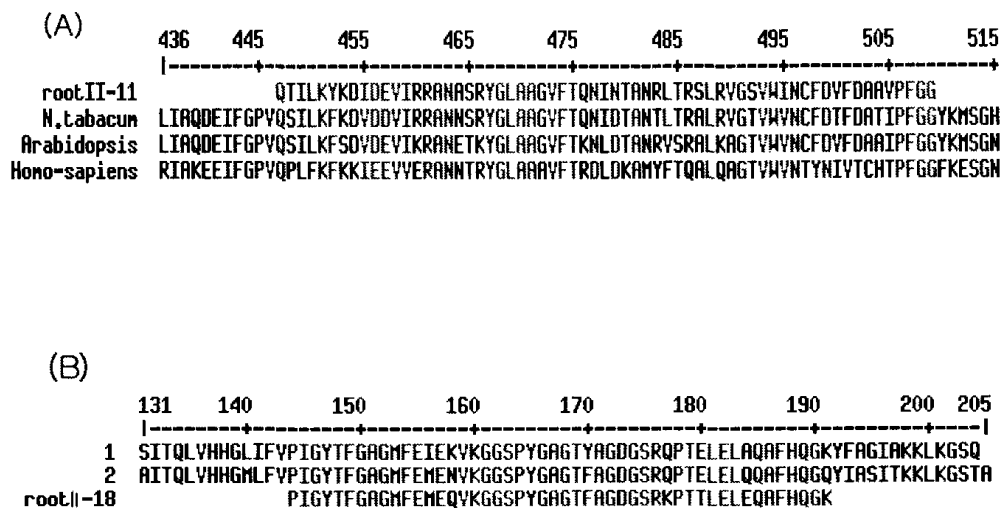


Figure 9. Amino acid sequence alignments of SSH partial cDNA clone products.

(A) Alignment of the predicted amino acid sequence of a root II-11 cDNA clone along with other aldehyde dehydrogenase proteins.

(B) Alignments of the predicted amino acid sequence of a root II-18 cDNA clone along with other homologous proteins.

1, putative quinone oxidoreductase of *cicer arietinum*;

2, 1,4-benzoquinone reductase-like protein of *Arabidopsis*

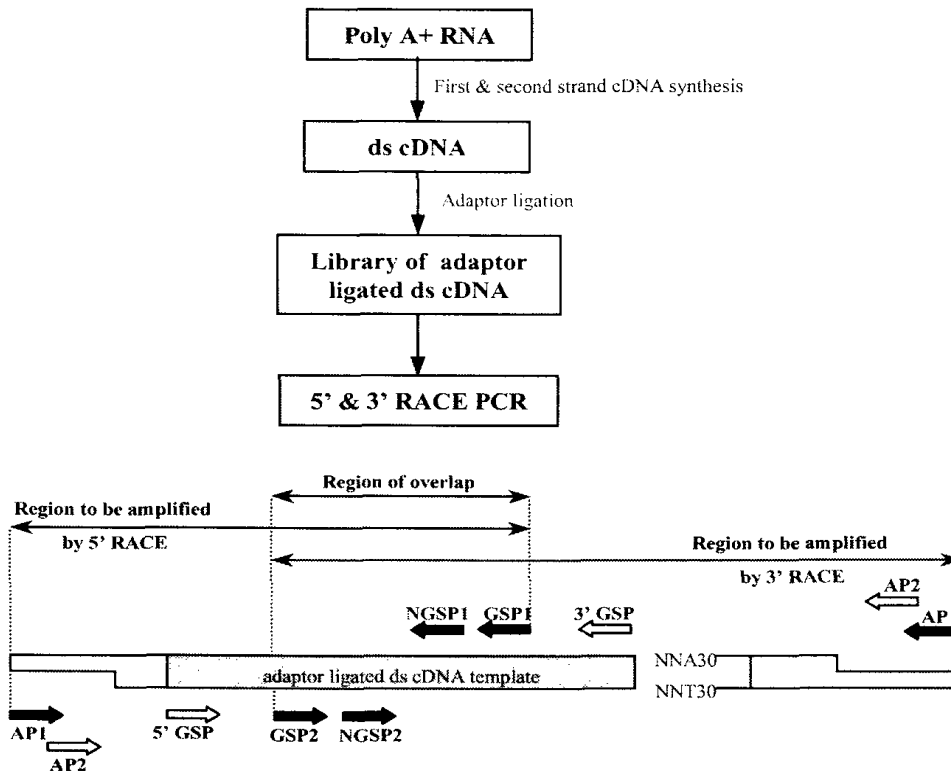
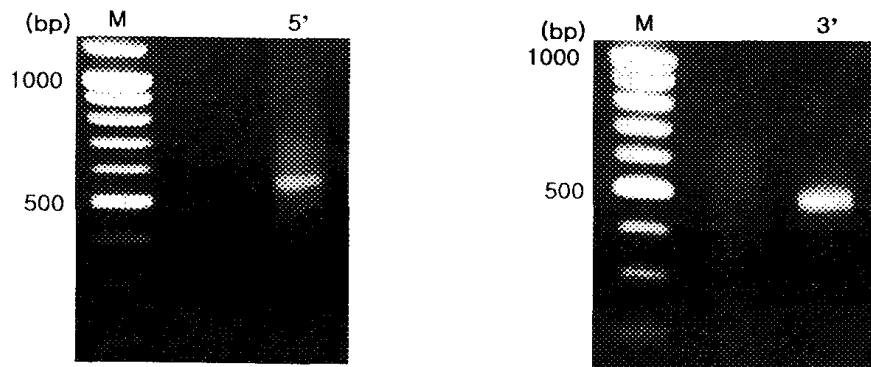


Figure 10. The scheme of RACE (rapid amplification of cDNA ends) method using the Marathon cDNA amplification kit (CLONTECH) and results of RACE-PCR of the root II-18 cDNA clone.

```

actgcatcaATGGCAACCAAAGTGTATATTGTTTACTATTCCATGTACGGACATGTTGAG
      M A T K V Y I V Y Y S M Y G H V E
AAACTTGCTGAGGAGATTAAGAAGGGAGCTCAATCGGTAGAAGGGGTGAAGCCAAGTTG
K L A E E I K K G A Q S V E G V E A K L
TGGCAGGTTCTGAAACATTAACCGAGGATGTCCTTGGCAAGATGAGTGCACCACCAAAG
W Q V P E T L T E D V L G K M S A P P K
AGTGATGTACCAATAATCACCCCAAGCGAACTCTCCGAGGCCGATGGGTTTGTTTTGGT
S D V P I I T P S E L S E A D G F V F G
TTCCCAACTAGATTCGGTATGATGGCTGCTCAATTCAAAGCATTTCTGGATGCAACTGGA
F P T R F G M M A A Q F K A F L D A T G
GGTCTTTGGAGAACCCAACAACCTTGCAGGCAAGCCTGCCGGTATTTTCTACAGTACCGGA
G L W R T Q Q L A G K P A G I F Y S T G
TCCCAAGGGGGCGCCAAGAACTACCGCGTTGACTGCCATCACTCAACTAACCCACCAT
S Q G G G Q E T T A L T A I T Q L T H H
GGAATGATTTTCGTACCCATTGGGTTACTACTTTTGGTGTGGGATGTTTCGAGATGGAGCA
G M I F V P I G L H F W C W D V R D G A
AGTTAAaggtggaagtccttacggagctggaactttcgctggcgatggctcgagaaaacc
S -
aactactcttgagttggagcaagccttccaccaaggaaagtaccttgctaccatcacaaa
gaagctcaagggatcagcctaagcttaagttaccatatcaaagttcctgttgaaaaat
ttcccattttttcaccatttgaatttcgttttgcttgcaataaatcattggattgtttt
ggttttgtgtattgtattatgttacgtgtgcctcccgcctcacaaatatagtatttttaa
gatacatgcttgataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

Figure 11. Nucleotide and deduced amino acid sequences of RACE product (rootII-18 cDNA clone).

A putative reading frame was started with ATG. Amino acid sequence is represented in one letter symbol. The consensus sequences for flavodoxins is shown by a rectangle box. The underlined sequences indicate the possible polyadenylation signal.

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
root11-18 MATKVVIVYYSMYGHVYKLAEEIKKGAQSVGVEAKLHQVPETLTEDVLGKMSAPPKSDVPITPSKLEADGFVFGFPTRFGMHAAQF
Arabi.. MATKVVIVYYSMYGHVYKLAEEIKKGAQSVGVEAKLHQVPETLHEEARLSKMSAPPKSESPITPNELAEADGFVFGFPTRFGMHAAQF
Cicer.. MATTKVYIVYYSYTYGHVYKLAEEIKKGAQSVGVEAKLHQVPETLPEDVLGKMGAPPKSDVPITPNELPEADGLLFGFPTRFGMHAAQF
Triphysaria.. MATKVVIVYYSYTYGHVYKLAEEIKKGAQSVGVEAKLHQVPETLSDVVLGKMGAPPKSDVPVITPDELVEADGIIIFGFPTRFGMHAAQF

91     100     110     120     130     140     150     160     170     180
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
root11-18 KAFLDATTGGLWRTQALAGKPAGIFYSTGSGGGQETTALTAITQLTHHGMIYVPIGYTFGAGMFEMEYKGGSPYAGTFAG-DGSRKPT
Arabi.. KAFLDATTGGLWRTQALAGKPAGIFYSTGSGGGQETTALTAITQLVHHGMLFVPIGYTFGAGMFEMEMKGGSPYAGTFAG-DGSRQPT
Cicer.. KAFDATTGGLWRTQALAGKPAGIFYSTGSGGGQETTPLTSITQLVHHGLIFVPIGYTFGAGMFEIEKYKGGSPYAGTYAG-DGSRQPT
Triphysaria.. KAFFDSTGGLWRTQALAGKPAGIFFSTGTGSGGGQETTALTAITQLTHHGMIYVPIGYTFGAGMFMMEKIKGGSPYAGTFAGADGSRQPS

181    190    200    206
|-----|
root11-18 TLELEQAFHQGKYLATITKCLKGSA
Arabi.. ELELQAFHQGQYIASITKCLKGSA
Cicer.. ELELQAFHQGKYFAGTAKCLKGSA
Triphysaria.. DIELKQAFHQGMYIAGITKKIKQTSA

```

Figure 12. Amino acid sequence alignment of the root11-18 clone with other homologues from various plants.

Arabi; 1,4-benzoquinone reductase from *Arabidopsis*, Cicer; quinone oxidoreductase from *Cicer arietinum*, *Triphysaria*; Tvquinone reductase 2 from *Triphysaria vesicolor*. The rectangle box indicates the conserved consensus sequence for binding flavodoxin .

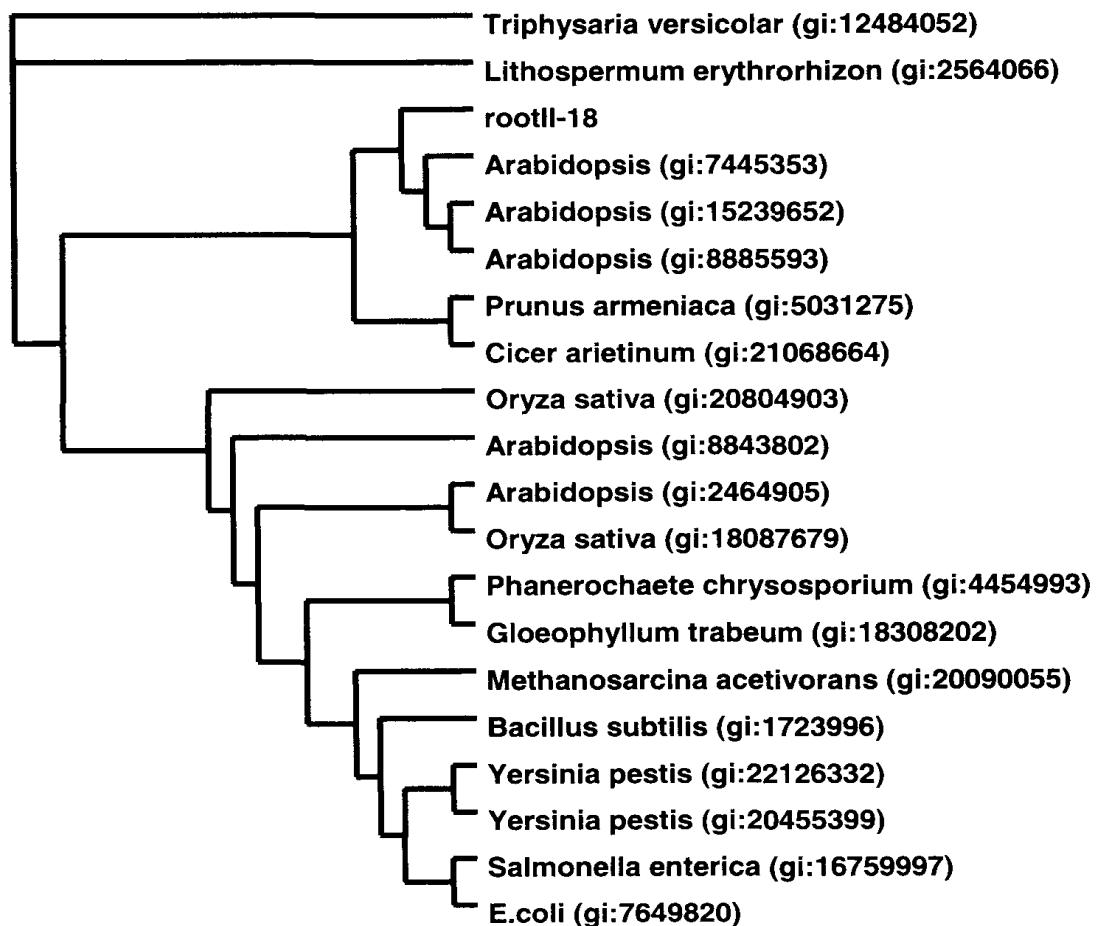


Figure 13. Phylogram of representative quinone reductase genes in plants and animals.

Phylogram of proteins related to rootII-18 gene. The ClustalX program was used to construct phylogenetic tree of quinone oxidoreductases from assorted organisms. All sequences were obtained from NCBI.

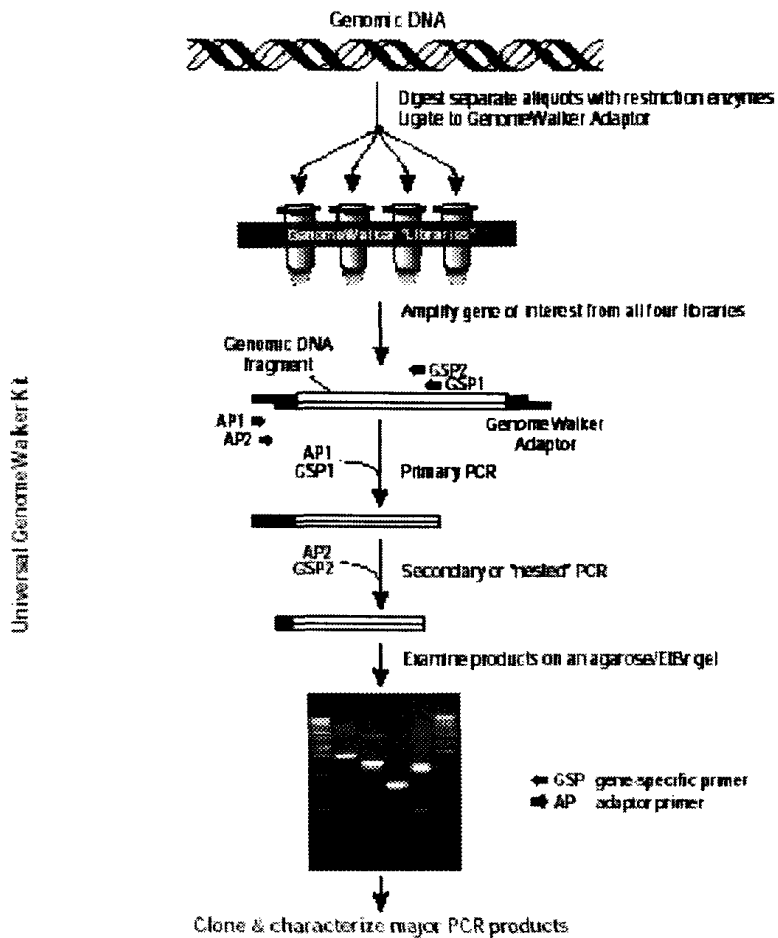
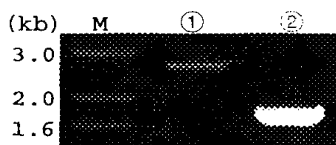
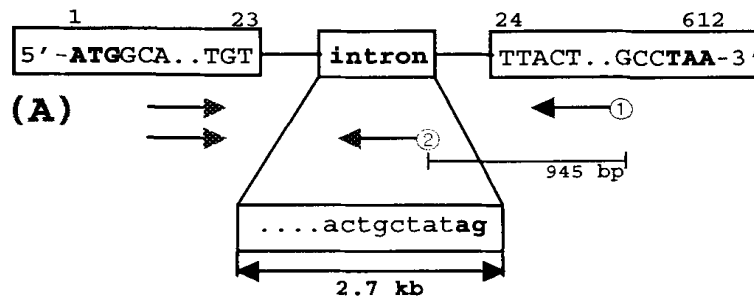


Figure 14. The scheme of the GenomeWalker method using the Universal GenomeWalker kit (CLONTECH) and amplified genomic products corresponding to root II-18 cDNA clone.



(B)

5'..aaatacgtcacctttagtacttatcaattatggctttttagaattcaactta  
 atttgagtgccatattcaacatattgtattgatttgaatactttatgcaatgttgt  
 ctttgcgctcttggatgagcaagattgagtaaacttattggtcagttgacttgt  
 ttgttggccaattatttaatacatatgtaactcataatgtacaaattacaactggca  
 ttttcttttctttcttcttctgtcactattatataaaaagcttctggaaagtga  
 aaccttgatttccattacggttgtgtacttacttgtataatcttttggatataact  
 aaattccagtaagaaagattcaggtcaaacgcctcacttcatgaatttaccagcac  
 acacatgtggacatgtttgttttcttggcattcaactgccatctaccgctacctg  
 gttccctatgcatttacctgctatagatttcttatatcacgatcttactcaagtg  
 aggtttagatggatgtgttggcaaggtcttggttactgctattctaccaatgaatt  
 tcccttttcttattttcatttgtttggatagaggaattggattatgtagcatt  
 aactggaagtatggaacattgacttccacattgattagtttggaaatgccacgtcca  
 ttcattgtgccacctttaagaaatgggtggatgaaagtcttggatcttggactca  
 tcatatcatattctgctgctgtcattattaggcttcaatgcaaagttnccttgctt  
 attttgtacaacaaattagaaacttttcaggacgtttatattggcaagttataagct  
 ttccctgattactatgcaatgagtaaaaaataacaccaacggctaaataaaaaatct  
 gtttggaaatgaattcttaagttcttaagaacacttatttactactgaaaagtgat  
 tccaatcatgtcttaagttgacaataaagagattgcatttgaaggaagtatgtct  
 tttcagtgatctagatgacatgtagcctcgtttccaccttatattctatttgta  
 atgataagattcattgctactttttctgttctgaaaagttgaaactatcattctgc  
 ttatataaattcaccctaaatattttgtgtaaggaactcctatgggtataaaatt  
 aatttgctgctactgctatag-3'

Figure 15. A GenomeWalk product from a RACE product of rootII-18 cDNA clone.

A. The intron region of rootII-18 gene by GenomeWalk confirmed by genomic DNA PCR. ①; combination primer of ORF, ②; combination primer of between ORF and intron region.

B. A partial sequence of intron is shown by a small letter.



Table 1. Functional identities of several cDNA clones by automatic sequencing and BLAST search.

<b>cDNA clone number</b>	<b>Size (bp)</b>	<b>BLAST function</b>
2	405	seed imbibition protein ( <i>Arabidopsis</i> )
2	318	csf-2 ( <i>cucumis sativus</i> )
8	518	phloem-specific lectin PP2
4	444	metallothionein-like protein type2
5	526	hyphally regulated protein type2
3	537	40s ribosomal protein s8
2	518	cytosolic glutamine synthetase
1	545	wound-induced proteinase inhibitor
1	362	stress and pathogenesis-related protein
1	453	putative protein ( <i>Arabidopsis</i> )
1	278	autolysin
1	222	actin-like protein
2	378	no hits found
3	205	no hits found

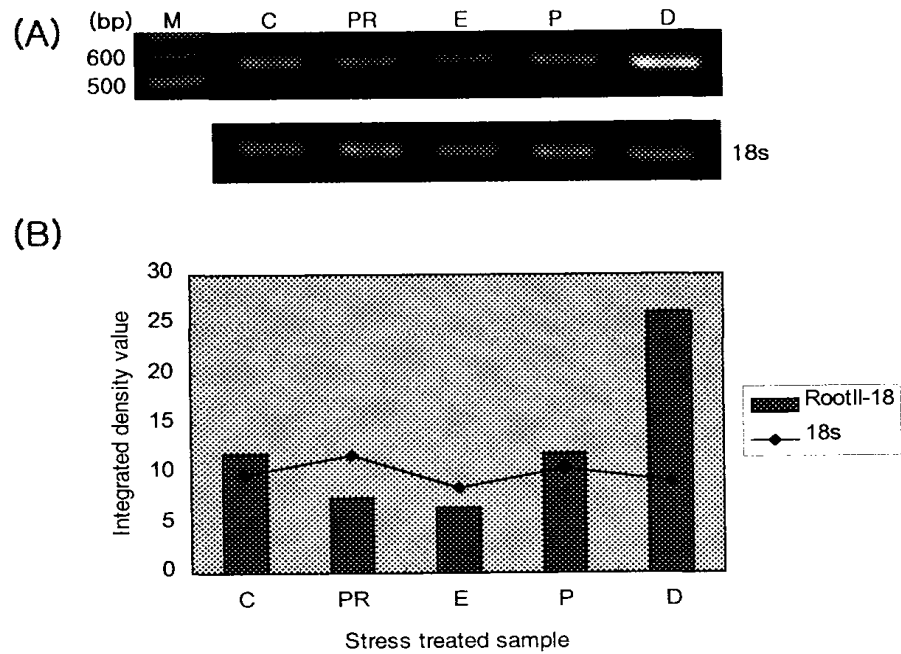


Figure 16. Induction of the rootII-18 gene transcript in the presence of various stresses.

A. RT-PCR analysis was performed with the rootII-18 cDNA-specific primers. Total RNA quantity was confirmed by an 18S universal primer pair.

C; control, PR; root extracts from *Pinus densiflora*, E; ethanol, P; pinosylvin, D; DMBQ, 18S; 18S rRNA PCR product.

B. Band intensity of PCR products measured by AlphaEaseFCTM Imaging System.

## 참고문헌

- Schiefelbein J.W. (2000) Constructing a plant cell. The genetic control of root hair development. *Plant Physiol.* 124: 1525-1531
- Ringli C., Baumberger N., Diet A., Frey B., Keller B. (2002) ACTIN2 is essential for bulge site selection and tip growth during root hair development of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129: 1464-1472
- Dolan L., Duckett C., Grierson C., Linstead P., Schneider K., Lawson E., Dean C., Poethig S., Roberts K. (1994) Clonal relations and patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development* 120: 2465-2474
- Masucci J.D., Rerie W.G., Foreman D.R., Zhang M., Galway M.E., Marks M.D., Schiefelbein J.W. (1996) The homeobox gene GLABRA2 is required for position-dependent cell differentiation in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 122: 1253-1260
- Schiefelbin J.W., Somerville C. (1990) Genetic control of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2: 235-243
- Wrobel R.L., Matvienko M., Yoder J.I. (2002) Heterologous expression and biochemical characterization of an NAD(P)H:quinone oxidoreductase from the hemiparasitic plant *Triphysaria versicolor*. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 265-272
- Namgi J., Insuk L., Jonghe K., Ungsang L., Haesun K., Inhae O. (1995) *Ecology*. Academi Press Seoul
- Lakshmi A., Barry J.B., Joan L.C., Michael H.G. (1999) 1,4-Benzoquinone reductase from *Phanerochaete chrysosporium*: cDNA cloning and regulation of expression. *Applied and Eviro. Microbio.* 65: 415-421
- Matvienko M., Wojtowicz A., Wrobel R., Jamison D., Goldwasser Y., Yoder J.I. (2001) Quinone oxidoreductase message levels are differentially regulated in parasitic and non-parasitic plants exposed to allelopathic quinones. *The Plant J.* 25(4): 375-387
- Obrien P.J. (1991) Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Biol. Interact.* 80: 1-41
- Loconte L., Ailey B., Hubbard T., Brenner S., Murzin A., Chothia C. (2000) SCOP: a structure classification of proteins database. *Nucleic Acids Res.* 28: 257-259
- Shirley B.W. (1996) Flavonoid biosynthesis-new functions for an old pathway. *Trends Plant Sci.* 1: 322-382
- Morris P.F., Bone, Tyler (1998) Chemotropic and contact responses of *Phytophthora sojae* hyphae to soybean isoflavonoids and artificial substrates.

Plant Physiol. 117: 1171-1178

- Smith, M.T. Quinones ad mutagens, carcinogens, and anticancer agents: introduction and overview. J. Toxicol. Environ. Health. 16: 665-672
- Talalay P., Long D., M.J., Prohaska H.J. (1988) Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes tha protect against chemical carcinogenesis. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 85: 8261-8265
- Li R.B., Bianchet M.A., Talalay, P. and Amzel, L.M. (1995) The three-dimensional structure of NAD(P)H: quinone reductase, a flavoprotein involved in cancer chemoprotection and Chemotherapy - mechanism of the two-electron reduction. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 92: 8846-8850
- Hammondkosack K.E., Jones J.D.G. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. Plant Cell. 8: 1773-1791
- Blake B.J., Gold M.H. (1996) 1,4-Benzoquinone reductase from the basidiomyccte *Phanerochaete chrysosporium*: spectral and kinetic analysis. Arch. Biochem. Miophys. 331: 31-40
- Evenari M. (1949) Germination inhibitors. Bot. Rev. 15: 153-194
- Whittaker R.H. and Feeney P.P. (1971) Allelochemics : Chemical interactions between species. Science 171: 757-770
- Handa S., Kinghorn A., Cordel G., Farnsworth N. (1983) Plant anticancer agents. Constituents of *Peddiea fisheri*. J. Nat. Prod. 46: 248-250
- Nishina A., Hasegawa K.I., Uchibori T., Seino H., Osawa T. (1991) 2,6-dimethoxybenzoquinone as an antibacterial substance in the bark of *Phyllostachys heterocycla* var. *pubescens*, a species of thick-stemmed bamboo. J. Agric. Food chem. 39: 266-269
- Brambilla G., Robbiano L., Cajelli E., Martelli A., Turmolini F., Mazzei M. (1998) DNA-damaging and mutagenic properites of 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone, formed by dimethoprine-nitrite interaction. J. Pharm. Exp. Therap. 224: 1011-1015
- Isse T., Oyama T., Kitagawa K., Matsuno K., Matsumoto A., Yoshida A., Nakayama K., Nakayama K.I., Kawamoto T. (2002) Diminished alcohol preference in transgenic mice lacking aldehyde dehydrogenase activity. Pharmacogenetics 12(8): 621-626
- Chung H.J. and Ferl R.J. (1991) *Arabidopsis* alcohol dehydrogenase expression in both shoots and roots is conditioned by root growth environment. Plant Physiol. 121: 429-436
- Nakazono M., Tsuji H., Li Y., Saisho D., Arimura HI., Tsutsumi N., Hirai A. (2000) Expression of a gene encoding mitochondrial aldehyde dehydrogenase in rice increases under submerged conditions. Plant Physiol. 124: 587-594

- Roel G.L., Camp, Kuhlemeier C. (1997) Aldehyde dehydrogenase in tobacco pollen. *Plant Mol. Biol.* 35: 355-365
- Brok B.J. and Gold M.H. (1996) 1,4-benzoquinone reductase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral and kinetic analysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 331: 31-40
- Grandori R. and Carey J. (1994) Six new candidate members of the alpha/beta twisted open-sheet family detected by sequence similarity to flavodoxin. *Protein Sci.* 33: 2185-2193
- Bernhardt C. and Tierney M.L. (2000) Expression of AtPRP3, a proline-rich structural cell wall protein from *Arabidopsis*, is regulated by cell-type-specific developmental pathways involved in root hair formation. *Plant Physiol.* 122: 705-714
- Giritch A., Herbik A., Balzer H.J., Ganai M., Stephan O., Baumlein H. (1997) A root-specific iron-regulated gene of tomato encodes a lysyl-synthetase-like protein. *Eur. J. Biochem.* 244: 310-317
- Goddemeier M.L., Wulff D., Feix G. (1998) Root-specific expression of a *Zea mays* gene encoding a novel glycine-rich protein, zmGRP3. *Plant Mol. Biol.* 36: 799-802

## 제 7 장 생물재해 저항성 형질전환 식물체

### 제 1 절 서론

본 실험에서는 뿌리 특이적인 promoter의 발현을 검증하기 위하여, PRP3 유전자의 promoter에 GUS 유전자를 재조합한 다음, *Arabidopsis*와 담배에 형질전환하여 형질전환체에서 조직특이적인 발현 여부를 관찰하였다. 그리고 항균단백질인 고추 defensin 유전자를 같은 시스템으로 발현시켜서 병접종 실험을 하였다. 이런 연구는 작물의 형질전환에서 조직 또는 기관 특이적인 외래유전자 발현에 대한 정보를 제공하고, 비식용 부위에서 항균단백질의 발현에 대한 좋은 전략을 제공할 수 있다.

형질전환체에 발현된 defensin이 곰팡이병 감염을 억제하는지 관찰하기 위하여, 형질전환체에 덩굴쪄짐병(*Fusarium oxysporum*)과 갯빛곰팡이(*Botrytis brioniae*)를 접종하여 항균단백질의 효과를 조사하였다. 첫째 병원균은, 1970년대에 일본에서 박을 침해하는 덩굴쪄짐병균 계통으로 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae*가 전국적으로 발생하여 수박재배에 큰 문제를 던져 주었다. 우리 나라에서도 박 대목에 덩굴쪄짐병이 발생한다는 보고가 있었으나 아직 문제된 지역은 없었다. 그런데 최근에 와서 박대목 수박의 지상부가 *Fusarium* sp. 에 의해 심히 침해되어 시들어 죽는 경우가 재배지에 따라 목격되고 있다. 수박 접목재배가 덩굴쪄짐병을 방제하는데 크게 기여하고 있지만 접목묘의 육성이 많은 노력과 경비를 수반하므로 생산비를 높이는 요인이 되고 있다. 따라서 생산비 절감을 위해서는 무접목묘를 이용해도 덩굴쪄짐병의 발생을 억제할 수 있는 방법이 절실한 실정인 것이다. 본 실험의 결과 병접종 실험에서 defensin 형질전환체는 박과작물의 주요 곰팡이병에 대해 저항성을 보여주기 때문에 이를 이용한 병저항성이 증대된 품종 개량을 위한 가능성을 시사하고 있다.

### 제 2 절 연구방법

#### 1. 식물재료 및 균주

본 실험의 식물재료는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)와 담배(*Nicotiana*

*tabacum* cv. Habana)를 사용하였다. 사용된 균주는 *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404)로서 50 mg/L의 kanamycin이 포함된 LB배지에서 28°C, 16시간 동안 배양하여 사용하였다.

재조합 식물발현 벡터로는 binary 벡터인 pBIN19의 derivatives로서 kanamycin에 저항성을 나타내는 neomycin phosphotransferase-II(NPT II) 유전자를 포함하고 있는 pBI121을 이용하였다. PRP3 promoter를 제한효소 HindIII와 BamHI으로 처리한 다음, 식물발현벡터의 CaMV35S와 치환하였다(Fig.1). 이 벡터를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환하였고, 벡터가 도입된 것이 확인된 *Agrobacterium*을 이용하여 식물형질전환에 사용하였다.

## 2. *Arabidopsis* 형질전환

*A. tumefaciens* GV3101를 재조합 식물벡터들로 형질전환시킨 후 vacuum infiltration 방법을 이용하여 *Arabidopsis*에 도입하였다. 형질전환된 *Arabidopsis*는 kanamycin이 첨가된 배지에서 선발하였고, 프로모터 활성분석을 위해 single copy를 지닌 형질전환체만을 선별하였다.

## 3. 담배 형질전환

*A. tumefaciens*의 흡광도가  $1.0(6 \times 10^5$  개/ml)될 때까지 배양한 뒤, 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리시켜 상등액을 따라내고 MS기본액체배지로 20배 희석하여 준비된 담배 잎을  $5 \times 5$  mm의 절편으로 만들어 실온에서 2시간 동안 함께 배양하였다. 배양된 재료를 멸균수로 4번 씻어서 IAA 1.0 mg/L, BAP 0.2 mg/L 및 0.8% agar을 첨가한 MS기본배지에 48시간 동안 배양한 뒤, 이를 선발배지(MS기본배지 + kanamycin 300 mg/L + cefotaxcim 100 mg/L + IAA 1.0 mg/L + BAP 0.5 mg/L)에서  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 2,000 Lux 형광하에서 광 16시간, 암 8시간 (본 실험에서 배양시 광, 온도의 조건은 모두 동일함)으로 2주간 배양하여 형질전환된 캘러스를 유도하였다. 그 후 MS기본배지에 kanamycin 300 mg/L + kinetin 0.2 mg/L을 첨가한 배지에 옮겨 동일한 조건으로 배양하여 형질전환체를 얻었다. 어린 형질전환체를 MS기본배지에서 형질전환 식물체가 3 ~ 7 cm정도 자랐을 때 순화시켜서 온실에 재배하여 꽃을 피운 뒤, 자가수분에 의하여 종자를 얻었다.

#### 4. 종자발아 및 F3 식물체

형질전환된 *Arabidopsis*와 담배의 종자를 kanamycin 50 mg/L가 함유된 MS기본배지(0.7% agar)에서 발아시킨 뒤 kanamycin 저항성 유식물과 비저항성 유식물의 비율을 조사하여 3:1의 안정된 분리비를 나타내는 line을 실험에 사용하였다. 그리고 vermiculite와 멸균된 토양혼합체(1:1)로 옮겨 온실에서 재배하였다.

#### 5. Fluorimetric GUS 정량

GUS의 생합성량 측정은 Jefferson et al.(1987)의 방법을 변형하여 이용하였으며, 형질전환체의 잎, 줄기, 뿌리 등을 실험 재료로 사용하였다. 실험재료 100 mg을 50 mM NaPO<sub>4</sub>(pH 7.0), 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 10 mM EDTA, 0.1% sarcosyl, 0.1% triton X-100을 함유한 extraction buffer 100ml에 넣어서 균질화시킨 뒤, 4°C 15,000 rpm에서 5분 동안 원심분리시켜서, extraction buffer에 1 mM 4-methyl  $\beta$ -D-unibelliferyl glucuronide(MUG)을 첨가한 reaction buffer 상등액 5  $\mu$ l을 넣어 반응을 중지시키고, spectrofluorimeter(FARRAND OPTICAL CO. INC., New York, USA)을 사용하여 365 nm에서 여기 시켜 455 nm로 방사 측정 하였다.

#### 6. Northern Hybridization

형질전환된 7개체의 식물체와 형질전환하지 않은 식물체 한 개체로부터 total RNA를 분리하였다. Probe는 PCR 산물로 random primer labeling 방법을 이용하여 labeling 하였다.

#### 7. 곰팡이 처리 조건 확립

형질전환 식물체의 생물재해 저항성을 조사하기 위하여, 곰팡이 접종원의 배양 조건과 포자 대량 생산 방법을 표준화하였다. 병원균의 배양 조건, 조사광 및 조사 시간 등을 달리하여 포자 활성을 검토한 다음, 잣빛곰팡이(*Botrytis brioniae*)와 덩굴쪄짐병(*Fusarium oxysporum* f. sp. niveum)을 접종원으로 사용하였다.



## 제 3 절 연구결과 및 고찰

### 1. Arabidopsis와 담배형질전환체에서 GUS 유전자의 발현

*Agrobacterium*을 이용한 식물형질전환방법은 식물의 형태, 생리, 유전적인 연구 뿐만 아니라, 실생활에 유용한 바이러스 저항성(Abel et al., 1986), 제초제에 대한 내성(Rieger et al., 2002), 꽃 색깔의 개량(Aida et al., 2000), 토마토 보존기간의 조절(Lanahan et al., 1994), 응성불임(Zhang et al., 2001) 저온에 대한 내성(Knight et al., 1996) 그리고 전분합성의 조절(Visser et al., 1991) 등 여러분야에 광범위하게 이용되고 있는 실정이다.

$\beta$ -glucuronidase(GUS)유전자는 대장균(*Escherichia coli*)의 uidA 유전자를 식물형질전환 reporter 유전자로 개발한 것인데, spectrophotometer 또는 fluorometer로 분석이 용이할 뿐 아니라, 조직화화적인 관찰이 가능한 장점이 있어 널리 이용되고 있다. Jefferson(1987) GUS 유전자를 이용한 식물의 형질전환 연구에 의하면 GUS 유전자의 발현량이 부위별로 많은 차이를 보이고 있는데 이와 같은 결과는 사용된 promoter의 종류와 식물재료에 따라 다양하게 나타나고 있다. CaMV35S promoter를 사용하면 형질전환체 전반적으로 GUS가 발현되는 것으로 나타나는데, 특히 유관속주변을 비롯한 각 부위의 유조직에서 높게 나타난다는 보고가 있다(Jefferson, 1987).

따라서 본 연구에서는 일차적으로 PRP3 promoter의 발현유도 양상을 확인하기 위하여, PRP3 promoter와 CaMV35S promoter를 사용하여 식물형질전환용 벡터를 재조합하였다. figure 1는 사용된 vector를 promoter 앞의 HindIII, 뒤의 BamHI 그리고 GUS 유전자 또는 defensin 유전자 뒤의 SacI enzyme으로 절단 한 뒤의 전기영동 사진이다(Fig. 1). 그리고 각 vector들에 의한 발현부위를 확인하고, 병원균에 대한 저항성을 조사하기 위하여 저항성 *Arabidopsis* line인 Col-O와 민감성 line인 Ws-O 그리고 담배에 각각 형질 전환하였다. Figure 2는 형질전환된 각각의 *Arabidopsis*(T3)에서 GUS 활성을 조사한 것이다. PRP3 promoter는 GUS 유전자를 뿌리 부위에서 특이적으로 발현시킨다. CaMV35S promoter에 의해 조절되는 GUS 유전자의 경우, 식물체 전반에 GUS 유전자의 발현부위가 파랗게 염색되어 나타났고, 특히 어린 식물조직에서 잘 발현되었다. 잎의 경우 횡단면과 관찰결과 엽맥을 따라 분포되어 있는 유관속과 주변의 유조직에서도 반응하였다. 뿌리의 경우 줄기에서와 마찬가지로 유관속의 유조직에서 발현하였다(Fig. 2). 그러나 PRP3 promoter에 의해서는 지하부인 뿌리에서만 발현이 관찰되었고, 현저하게 높은 발현량을 관찰할 수 있었다(Fig 3). 잎에서는 전혀 반응이 나타나지 않았으며, 뿌리에서

는 root hair를 포함하는 표피층에서 강하게 염색되는 것이 관찰되었다. 형질전환담배에서도 promoter에 따라서 GUS 발현이 *Arabidopsis*와 같은 양상으로 나타나는 것이 관찰되었다(Fig. 4).

그리고 재조합된 binary vector를 사용하여 defensin을 *Arabidopsis*와 담배에 형질전환하였다. 사용된 벡터는 뿌리 특이적 promoter인 PRP3에 defensin유전자를 연결하였고, control로서 CaMV35S promoter를 사용하였다. Defensin 유전자의 발현은 Northern hybridization 방법으로 확인하였다(Fig 5). CaMV35S promoter의 경우에는 defensin유전자가 잎과 뿌리에서 모두 발현되었으며, PRP3 promoter의 경우에는 뿌리에서만 발현되었다. 또한 CaMV35S promoter의 경우에는 개체간에 발현량의 차이가 심한 반면에 PRP3 promoter는 뿌리에서 강하게 발현되는 것을 알 수 있었다.

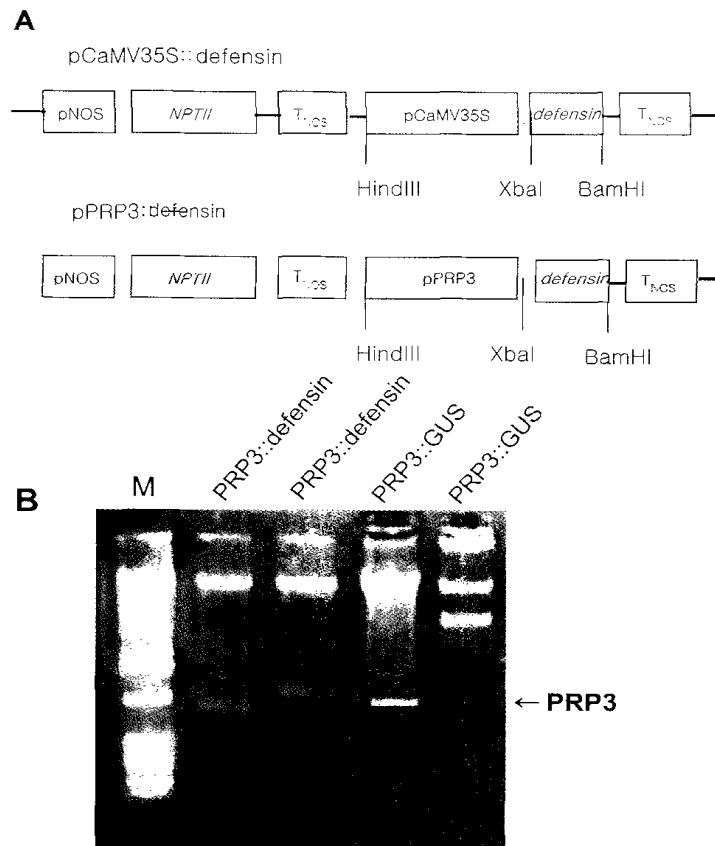


Figure 1. A. Construction of plant expression vector carrying defensin driven by PRP3 or CaMV35S promoter.  
 B. Agarose gel electrophoresis showing the construction of plant expression vectors.

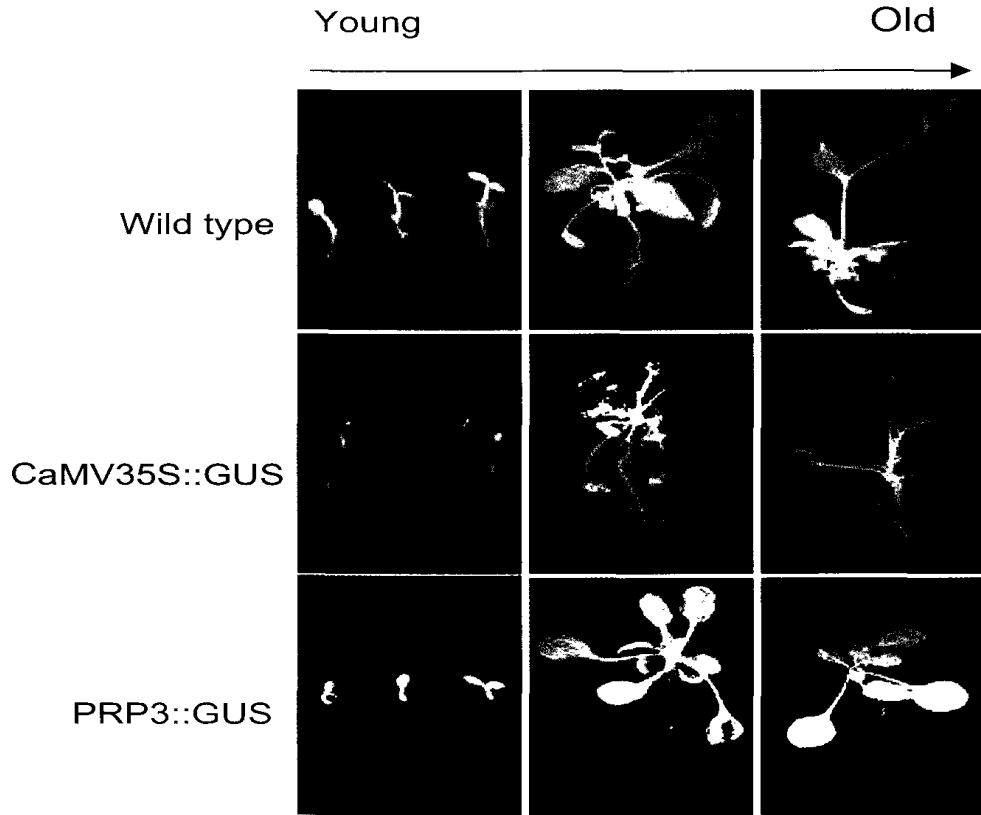


Figure 2. Histochemical localization of PRP3 expression using PRP3::GUS construct. CaMV35S::GUS construct was used as control.

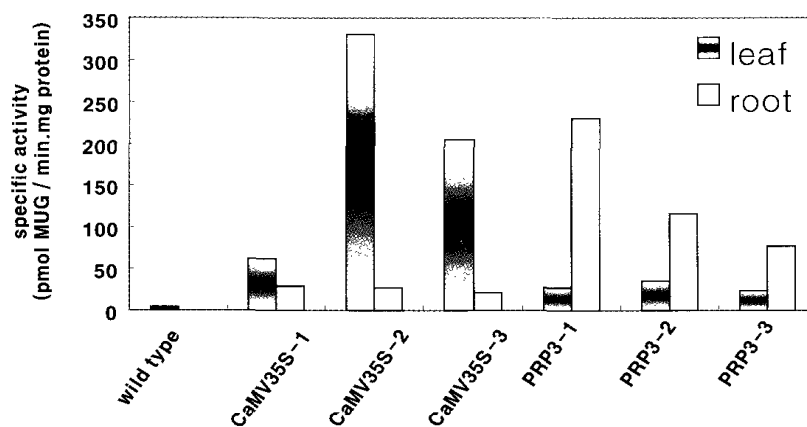


Figure 3. The level of GUS expression in 2 weeks-old transgenic Arabidopsis plant harboring PRP3 promoter or CaMV35S promoter. GUS activity was measured in root and leaf separately.

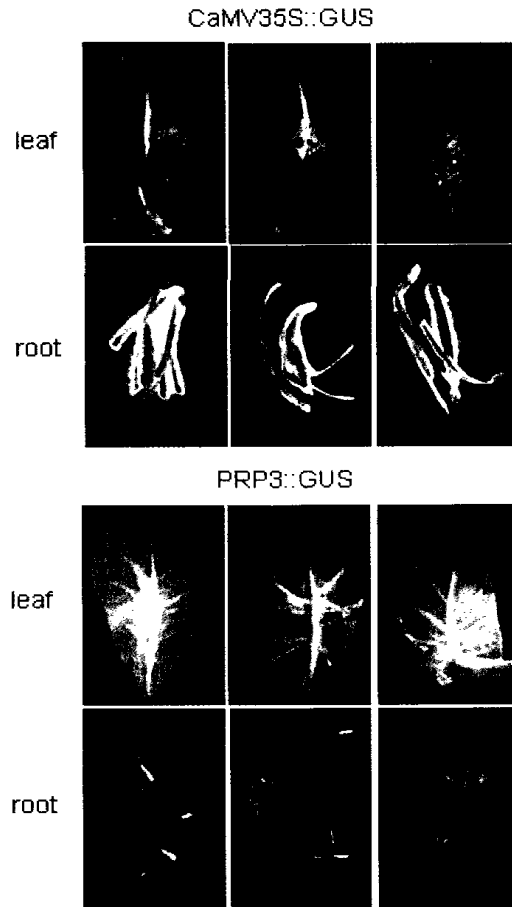


Figure 4. Strong expression of PRP3 promoter in roots of Transgenic tobacco plants. Transgenic plants harboring CaMV35S promoter show constitutive expression of GUS.

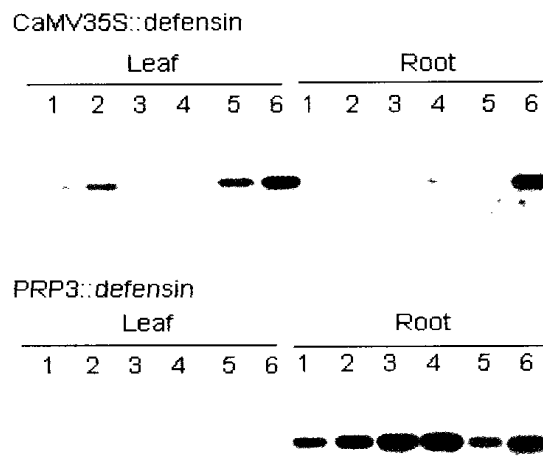


Figure 5. Expression levels in the transgenic Arabidopsis carrying defensin gene driven by PRP3 or CaMV35S promoter.

## 2. 형질전환된 식물체의 부위별 GUS 유전자 발현량 측정

형질전환된 식물체의 잎과 뿌리 등의 GUS 발현량을 측정한 결과, 형질전환되지 않은 식물체에서는 발현되지 않았고, CaMV35S promoter를 사용하여 형질전환된 식물체에서는 대체로 줄기나 뿌리에서보다도 잎에서 높게 나타났으나, PRP3 promoter의 경우, 잎에서는 아주 약하게 그리고 뿌리에서는 강한 활성을 보여주었다(Fig. 6). 이와같이 각 부위별로 발현되는 GUS량은 일정하지 않고 불규칙적인 경향이 있었지만 promoter에 따라 발현부위가 결정되었다.

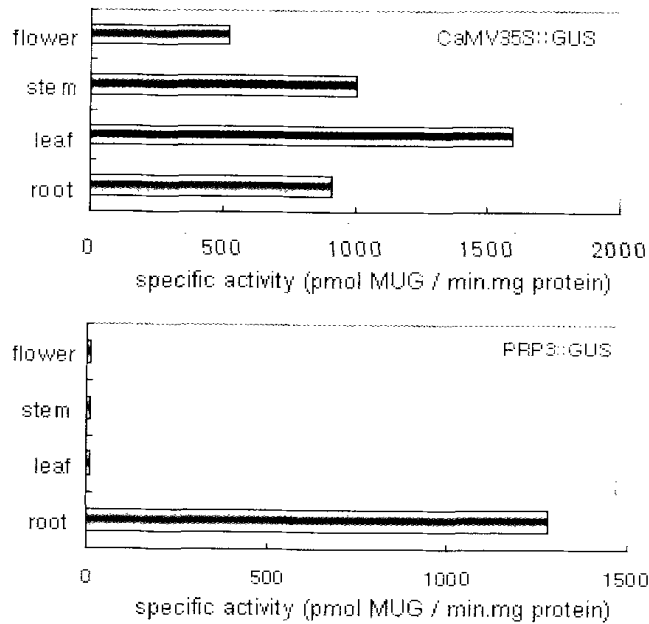


Figure 6. The level of GUS expression in transgenic Tobacco harboring PRP3 or CaMV35S promoter

## 3. 생물재해 저항성 검증

일본에서 문제가 되고 있는 박 덩굴쪼김병의 경우는 박의 뿌리를 갈변시키고, 부패하게 한다. 그래서 박의 자엽이 황화 또는 담갈색으로 변색하여 마침내 그루 전체가 시들어 죽는다. 본 실험에서는 박과작물에서 문제가 되고 있는 덩굴쪼김병 포자를 *Arabidopsis* 형질전환체의 잎과 뿌리에 접종하여 감염의 진전을 관찰하였다.

*Fusarium* 포자를 *Arabidopsis* 형질전환체에 접종하면 잎이 황변하거나 가장자리로부터 갈변하여 말라 들어간다. 그리고 잎 전체가 시들게 된다. 그러나

defensin이 발현된 형질전환체의 잎에서는 접종부위에서만 병반이 미약하게 형성된다(Fig. 7). 또한 뿌리의 경우, 다갈색으로 변색되어 부패되는데, PRP3 promoter를 사용하여 뿌리에만 defensin을 발현시켰을 경우, 병의 감염이 지연되는 효과가 있었으며 지상부위의 감염에는 차이를 보이지 않았다(Fig. 8). 병의 진행은 처음에는 식물체에 생기가 없고 점차 아래쪽부터 시들어 올라가며, 심한 경우에는 발병주의 줄기가 황갈색으로 변색되고 이 부분에는 백색의 곰팡이가 발생하는 수가 있다. *Arabidopsis* 형질전환체에 *Botrytis* 포자를 접종한 뒤, 포자의 성장상태를 관찰하였을 경우 형질전환체의 잎에서는 포자의 생장이 현저하게 지연되었고 병반형성이 미약하였다.

PRP3 promoter는 이제까지 알려진 병원균의 공격에 반응하는 promoter와는 다른 특성을 갖는다. 상처에 유도되는 promoter나 peroxidase promoter 등은 organ 특이적이거나 병원균에 의해 유도되는 signal molecule에 반응하는 등 정확하게 transgene의 발현을 조절하지 못한다. 그러나 본 실험에서 사용된 PRP3 promoter는 기관특이적으로 뿌리에서, 특히 병원균과 최초로 접촉하는 표피에서 강하게 발현되기 때문에, 병저항성 유전자의 발현을 유도하기 위해서 적합한 promoter이다. 그리고 본 실험에서 사용한 defensin 유전자는 다양한 병원균에 대하여 항균효과를 나타내므로 식물의 broad-spectrum 병저항성을 유도할 수 있을 것으로 사료된다.

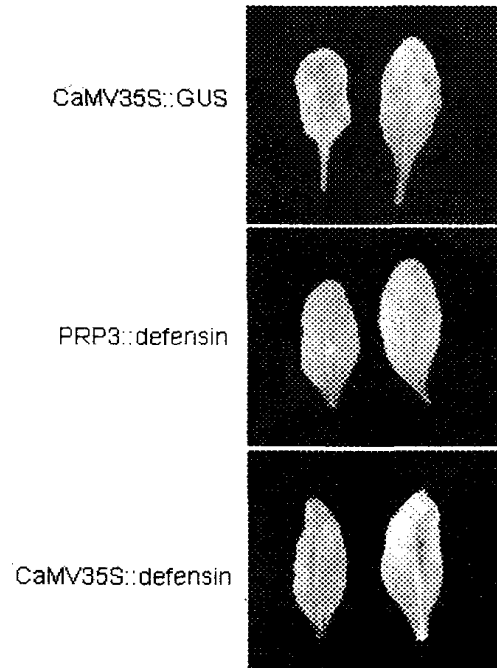


Figure 7. Disease symptoms of transgenic *Arabidopsis* inoculated with *F. oxysporum*.

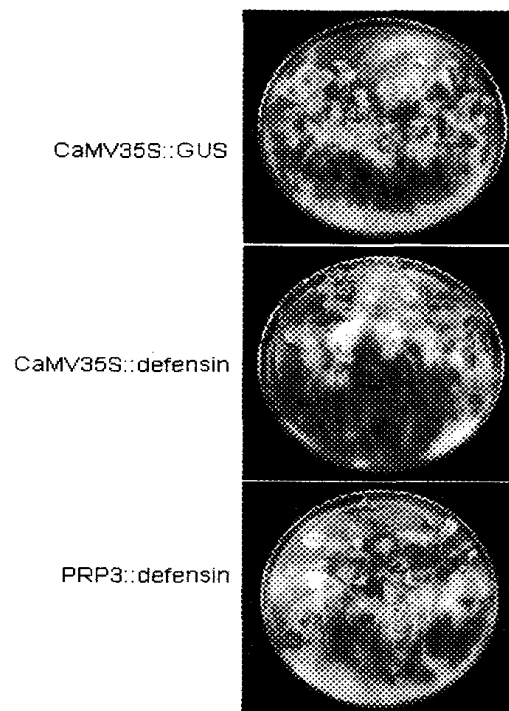


Figure 8. Disease symptoms of transgenic *Arabidopsis* inoculated with *F. oxysporum*

## 참고문헌

- Abel, PP, Nelson RS, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT and Beachy RN. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232 : 738-743
- Aida R, Yoshida K, Kondo T, Kishimoto S, Shibata M. 2000. Copigmentation gives bluer flowers on transgenic torenia plants with the antisense dihydroflavonol-4-reductase gene. *Plant Sci.* 160 :49-56.
- Jefferson RA, Kavangh TA, and Bevan MW 1987. GUS fusion :  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal.* 6:3901-3907
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR. 1996. Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell* 8 :489-503.
- Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ, Klee HJ. 1994. The never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell.* 6 :521-30.
- Rieger MA, Lamond M, Preston C, Powles SB, Roush RT. 2002. Pollen-mediated movement of herbicide resistance between commercial canola fields. *Science* 296 :2386-8.
- Visser RG, Stolte A, and Jacobsen E, 1991. Expression of a chimeric granule-bound starch synthase-GUS gene in transgenic potato plants. *Plant Mol Biol* 17 : 691-699
- Zhang Y, Shewry PR, Jones H, Barcelo P, Lazzeri PA, Halford NG. 2001. Expression of antisense SnRK1 protein kinase sequence causes abnormal pollen development and male sterility in transgenic barley. *Plant J.* 28 :431-41.



여 백

# 제 8 장 박과작물의 형질전환 기술개발 및 형질전환식물체 안정성 검정

## 제 1 절 서론

박과작물은 세계 채소 재배면적의 16.8%를 점하는 중요한 채소이다. 국내의 박과작물 재배면적은 수박, 참외, 오이, 호박 등의 순으로 중요한 위치를 차지하고 있으며, 이외의 박과작물로는 멜론, 박, 동아, 수세미 등이 재배되고 있다. 박과작물중 가장 중요한 채소라고 할 수 있는 수박은 세계적으로 재배되고 있는 중요한 채소이며 국내에서는 여름철을 대표하는 과실로 잘 알려져 있다. 참박은 우리나라에서는 옛날부터 관상용, 식용, 과피 이용의 용기를 목적으로 재배되었고, 수박, 참외 등 박과 작물의 덩굴쪄짐병(만할병)의 저항성 대목으로 가장 일반적으로 사용되고 있다.

수박은 호온성 작물로서 상당히 긴 고온을 필요로 하며 개화기에 비가 오게 되면 착과가 불량해지고 병해도 많아서 약제살포를 요하는데, 그 중에서도 치명적인 것은 덩굴쪄짐병(만할병)이다. 이 병을 회피하기 위해서는 박이나 호박을 대목으로 하여 접목재배를 실시하는 것이 일반적이다. 그러나 최근 수박과 같은 박과작물의 대목으로 많이 사용되는 참박에 만할병이나 급성위조병 등이 발생하여 큰 손실을 야기하였다. 이런 손실을 줄이기 위한 병원균에 대한 방제는 주로 살균제 처리를 하였으나 살균제를 사용한 방제는 경제적 부담과 동시에 환경오염 문제를 발생시켰다. 따라서 최근에 활발히 연구되고 있는 유전공학적 방법을 이용한 토양병 저항성이 증대된 수박이나 참박의 내병성 품종 개발이 필요하다(Dabauza 등, 1997).

박과작물의 내병성 품종 개발에 있어서 유전자 도입을 통한 형질전환이 매우 효과적인 방법이지만 현재까지 박과작물의 형질전환에 대한 보고는 오이(Chee, 1990; Sarmiento, 1992; Ando 등, 2001), 멜론(Fang과 Grumet, 1990; Valles와 Rasa, 1994)), 호박(Vesna 등, 1991; Clough와 Hamm, 1995; Fuchs, 1998), 수박(Choi 등, 1994; Dabauza 등, 1997) 등에 한정되어 있다. 또한 박과작물에서 보고유전자가 아닌 유용유전자를 이용한 형질전환은 오이, 멜론, 호박 등 소수에 머무르고 있다.

수박에 있어서는 식물체 재생(Srivastava 등, 1989; Dong과 Jia, 1991; Compton과 Gray, 1994; Compton, 2000; Chaturvedi와 Bhatnagar, 2001)에 대한 적지 않은 연구가 수행되었으며 이를 통하여 신뢰할 만한 재생 체계가 개발되었다. 그러나 수박의 형질전환은 성공하였다는 보고에도 불구하고 아직도 형질전환의 재현성에 대한 확신을 주지 못하고 있으며, 내병성 유전자와 같은 유용유전자가 도입된 형질전환체가 얻어졌다는 보고는 없는 실정이다. 참박은 식물체 재생에 대한 연구가 국내

에서 소수 진행되고 있는 수준이며, 현재까지 신뢰할 만한 형질전환에 대한 보고는 이루어진 바 없는 상황이다. 이러한 상황을 감안할 때 내병성 박 품종 개발을 위해서는 기초 연구인 효율적인 식물체 재생 및 형질전환 기술 개발이 선행되어야 할 것이다.

현재 식물의 형질전환 기술은 크게 직접적 기술과 간접적 기술로 나눌 수 있다. 직접적 기술로는 전기천공법(electroporation), 미세주사법(microinjection), 그리고 입자포격법(particle bombardment) 등이 있다. 간접적 기술로는 토양 세균인 *Agrobacterium*이 자연상태에서 식물 세포로 유전자를 전이하는 성질을 이용하여 *Agrobacterium* 내로 유용유전자를 포함한 유전자운반체를 도입하여 식물 세포나 조직으로 도입하는 *Agrobacterium* 매개 형질전환법이 있다. 식물의 형질전환에서는 다양한 형질전환 기술 가운데 *Agrobacterium* 매개 형질전환법이 가장 일반적으로 사용되고 있으며, 이 기술을 쓸 수 없는 대부분의 단자엽 식물에 한해 입자포격법이 주로 사용되고 있다.

쌍자엽 식물의 형질전환에 주로 이용되는 *Agrobacterium* 매개 형질전환법은 *Agrobacterium tumefaciens*나 *Agrobacterium rhizogenes*에 유용유전자를 포함하는 유전자 운반체를 도입한 후 식물 절편체와의 공동배양(cocultivation)으로 식물 세포의 형질전환을 유도한다. 이 후 형질전환된 세포로부터 기관형성이나 체세포배형성 경로를 거쳐 형질전환 식물체(transgenic plant)를 재생시키게 된다. 식물의 형질전환 과정에 있어서는 식물체 재생의 적정 조건을 기본으로 하여 *Agrobacterium* 과 식물 절편체와의 접촉에 있어서 접촉시간과 *Agrobacterium*의 농도, 공동배양 기간, *Agrobacterium*의 virulence를 증대하는 acetosyringone의 농도, 그리고 *Agrobacterium*과 유전자운반체의 종류 등이 형질전환 효율에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 효율적인 형질전환을 위해서는 식물체 재생 및 형질전환 과정에 영향을 미치는 다양한 요인의 최적화가 전제되어야 하며 이를 바탕으로 할 때 유용 유전자가 도입된 신품종 개발이 이루어 질 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 주요 박과작물인 수박과 참박의 형질전환을 통한 내병성 유전자 도입으로 내병성 신품종을 육성하고자 하였으며, 이를 위하여 첫째 자엽 절편으로부터 신초 기관형성 경유 식물체 재생 체계 확립, 둘째 재생 체계를 바탕으로 한 *Agrobacterium* 매개 형질전환 체계 확립, 마지막으로 앞서 개발된 기술을 이용하여 내병성 유전자를 도입한 식물체 개발을 통한 내병성 신품종 개발을 이루고자 하였다.

## 제 2 절 박과작물의 식물체 재생 기술 확립

### 1. 수박의 식물체 재생

#### 가. 재료 및 방법

##### 1) 식물재료 및 종자발아

본 실험에서는 박과작물 가운데 수박(*Citrullus vulgaris* Schrad.) ‘금천’, ‘달덩이’, ‘슈퍼금천’ 등 3개 품종을 공시재료로 사용하였다. 기내에서 종자를 발아시키고 발아된 종자의 자엽을 채취하여 신허 재생 실험에 이용하였다.

수박 종자로부터 딱딱한 종피를 완전히 제거한 후, 소독을 위하여 70% 에탄올에 40초간 침지하고, 멸균수로 세척한 다음 전착제 Tween20(4-5 방울/100mL)을 첨가한 1.2% 차아염소산나트륨(유한락스 30%) 용액에서 20분간 침지한 후 다시 멸균수로 3회 세척하였다. 소독된 종자는 종자발아용 배지에 치상하여 발아를 유도하였다. 종자발아용 배지는 1/2MS(MS 염류의 농도를 1/2 사용) (Murashige and Skoog, 1962), sucrose 30 g/L, agar 8 g/L를 첨가한 배지를 사용하였다.

파종한 종자는 25℃, 상대습도 70%로 조절된 생장상에서 발아가 이루어질 때까지 기내 배양하였다.

##### 2) 자엽 절편체로부터 신허 기관형성

기내 발아된 종자의 자엽을 절취하여 가장자리를 제거하고 엽신을 절단한 절편체를 조제하여 신허유도배지에 향측면이 배지에 닿도록 치상하였다. 신허유도배지는 MS 염류와 비타민, sucrose 30 g/L, agar 8 g/L 첨가한 배지를 기본배지로 하였으며, 특별히 언급되지 않은 경우 생장조절제 BA 1.0 mg/L, IAA 0.01 mg/L를 첨가한 배지를 사용하였다.

자엽 절편체로부터 신허 기관형성의 적정조건을 알아보기 위하여 발아기간, 유전형, 생장조절제, 치상방향 처리를 각각 실시하였다. 생장조절제는 zeatin 또는 BA 0.5, 1.0, 2.0 g/L X IAA 0, 0.01, 0.1, 1.0 g/L의 조합처리, 배양환경은 암배양 2주후 16/8h 광주기 배양 또는 16/8h 광주기 배양 등의 처리를 각각 두고, 생장조절제와 배양환경을 조합한 실험을 실시하였다.

배지에 치상한 절편체는 배양 초기부터 24시간 연속조명에서 배양하였다. 배양 2주후부터 6주까지 절편체의 상태를 1주 간격으로 조사하였는데, 신허 재생여부, 절편체당 신허수 등을 조사하였다.

### 3) 신초의 발근 및 소식물체의 활착

자엽으로부터 재생된 신초 가운데 1.0cm 이상 신장된 정상적인 신초를 절단해 낸 후 신초 하부의 잎과 액아를 완전히 잘라 내고 발근배지(MS 염류와 비타민, IBA 또는 IAA 0.03 mg/L, sucrose 30 g/L, agar 8 g/L)에 치상하여 발근을 유도하였다. 발근배지에서 약 4주 후 발근이 이루어진 소식물체는 배양용기에서 꺼내어 agar를 흐르는 물로 수세한 후 살균제에 순간 침지하였다가 건조시킨 후 고압살균된 인공토양(vermiculite: perlite = 1:1)이 들어 있는 분에 식재하고 약 1개월에 걸쳐 점차 습도를 낮추고 광도를 높이며 활착을 시켰다.

## 나. 수박 자엽 절편체로부터 신초 기관형성 적정조건

### 1) 수박의 신초 기관형성 양상

종자 치상 7-8일 후 발아된 종자의 자엽을 4등분하여 신초유도배지에 치상하였을 때, 치상 2-3주 후 상처부위에서 캘러스가 형성되었고, 3-4주 경과 후 신초의 전개가 관찰되었다(Fig. 5).

모든 자엽 절편체는 재생배지에서 1주일 후 절편체가 처음 크기에 2배 이상 커지면서 절단면 주위에 캘러스 비슷한 세포분열 조직이 관찰되었다. 2주 후에는 모든 절편체에서 세포분열조직이 보이며 그 중에 신초가 형성되는 것을 관찰하였다. 자엽 절편체로부터 재생되는 신초는 절단면을 따라 신초가 형성되었다(Fig. 5).

### 2) 성장조절제 및 배양환경이 신초 기관형성에 미치는 영향

성장조절제와 배양환경이 신초 재생에 미치는 영향에 대하여 알아본 결과 전반적으로 성장조절제는 사이토키닌중 zeatin 보다는 BA가 더 좋은 영향을 주는 것으로 나타났다. 또한 배양환경중 광조건은 초기 암처리에 비해 연속조명이 보다 효과적인 것으로 나타났다.

초기 3주간의 암처리 이후 16/8h 조명을 시작하며 배양한 경우(Fig. 1, 2), BA와 IAA 조합처리에서 BA 단독처리에 비해 BA와 함께 IAA 0.01 mg/L를 첨가하는 것이 신초 재생에 좋았으며, IAA 0.1 mg/L 또는 IAA 0.3 mg/L를 첨가하면 오히려 신초 재생이 감소하는 것으로 나타났다. BA 0.5 mg/L와 IAA 0.01 mg/L 처리구가 신초 재생율에서 가장 높았다. 신초수에 있어서는 전반적으로 큰 차이를 보이지 않았다. 그리고 zeatin과 IAA 조합처리에서는 BA 처리에 비해 전반적으로 재생율이 낮았는데, zeatin 1.0 mg/L와 IAA 0.3 mg/L 조합처리구에서 신초 재생율이 가장 높았다. 신초수에 있어서는 옥신 IAA의 농도에 관계없이 zeatin 0.5 mg/L 또는

1.0 mg/L를 첨가하는 것이 효과적이었다.

초기 암처리없이 16/8h 조명에서 배양되어진 경우(Fig. 3, 4), BA 처리에서 가장 좋은 농도는 BA 1.0 mg/L 및 BA 1.0 mg/L와 IAA 0.01 mg/L를 혼합처리구로 나타났다으며 이들 처리구에서 신초 재생률이 70%로 높게 나타났다(Fig. 3). zeatin처리에서는 zeatin 1.0 mg/L와 IAA 0.3 mg/L 조합 처리구에서 신초 재생률이 45%로 가장 높았다(Fig. 4). 옥옥신 처리에서는 사이토키닌 단독처리보다 약간의 옥옥신을 첨가하는 것이 신초 재생률을 높게 나타냈으며, 신초 재생후 신장에 있어서도 좋은 영향을 미쳤다. 이는 IAA가 신초 재생률에 효과를 준다는 Dong 과 Jia (1991)의 실험 결과와 유사하였으며, 수박에 있어서 BA나 zeatin 단독처리에 비해 옥신의 첨가가 필요하다고 판단되었다.

배양환경이 신초 재생에 미치는 영향에서는 성장조절제 처리와 관계없이 전반적으로 신초 재생률, 절편체당 재생 신초수 모두 2주 암배양 후 16/8h 광주기 배양(Fig. 1, 2)보다 계속적인 16/8h 광주기 배양(Fig. 3, 4)이 더 좋은 영향을 나타냈다. Choi 등 (1994)은 수박 자엽 절편체로부터의 신초 재생에 있어서 광이 필수요건이라고 하였는데 본 실험 결과 수박의 신초 재생에 광주기가 중요한 요인으로 작용하여 유사한 결과를 나타냄을 알 수 있었다. 이는 일반적으로 절편체로부터 신초 기관형성에 있어서 초기 2-4주간의 암처리가 신초 재생을 촉진하는 다른 식물에서의 결과가 다른 것이어서 앞으로 이에 대한 검토가 필요하다고 생각된다.

결론적으로 수박의 자엽 절편체로부터의 신초 재생에 있어서는 사이토키닌으로는 zeatin 보다 BA를 사용하고, BA 농도를 1.0 mg/L로 조절하고 IAA 0.01 mg/L 정도를 첨가하는 가장 바람직하며, 배양시 암처리없이 초기부터 지속적으로 16/8h 광주기에서 배양하는 효과적인 것으로 나타났다. 이러한 조건에서 신초 재생률 70%, 절편체당 신초수 2.0개 이상의 양호한 결과를 얻을 수 있었다.

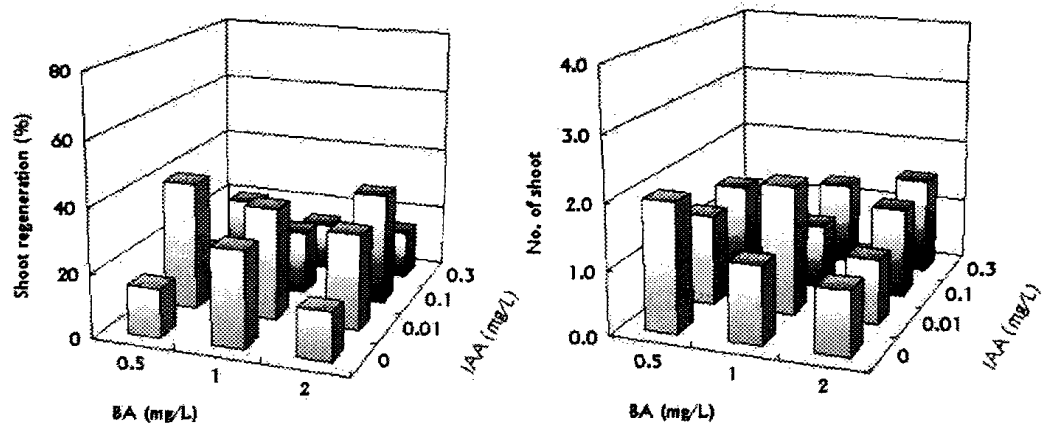


Figure 1. Effects of BA and IAA combination treatments on shoot organogenesis from cotyledon in watermelon. Explants were cultured under darkness for initial 2 weeks and then cultured under a 16/8h photoperiod for 4 weeks.

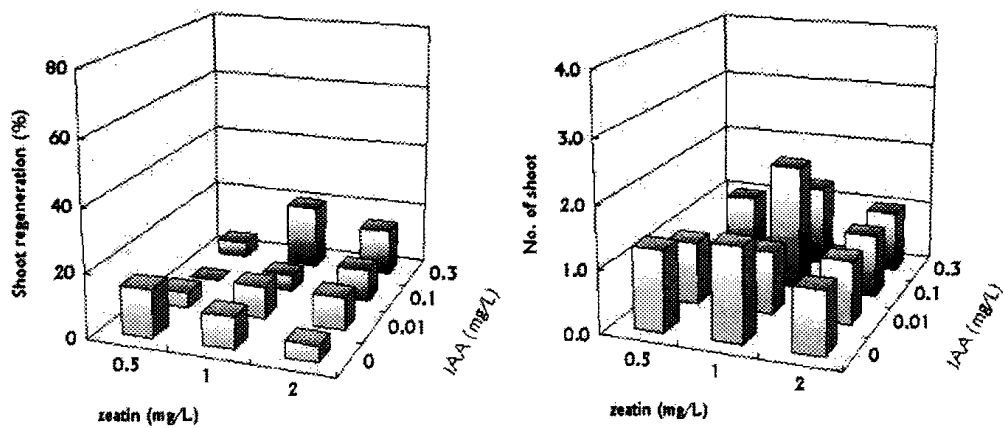


Figure 2. Effects of zeatin and IAA combination treatments on shoot organogenesis from cotyledon in watermelon. Explants were cultured under darkness for initial 2 weeks and then cultured under a 16/8h photoperiod for 4 weeks.

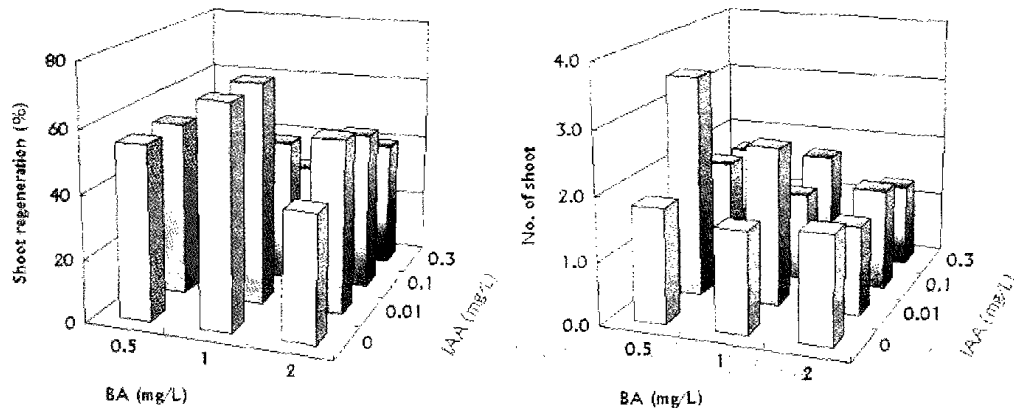


Figure 3. Effects of BA and IAA combination treatments on shoot organogenesis from cotyledon in watermelon. Explants were cultured under 16/8h photoperiod for 6 weeks.

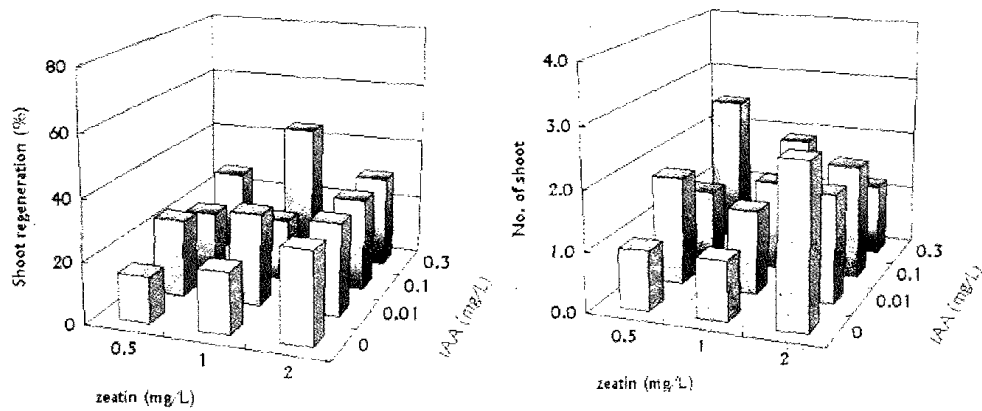


Figure 4. Effects of zeatin and IAA combination treatments on shoot organogenesis from cotyledon in watermelon. Explants were cultured under 16/8h photoperiod for 6 weeks.



다. 수박 재생 신탄의 발근 및 활착

재생된 신탄는 신탄배양용 배지로 옮겨서 신탄의 신장과 증식과정을 거친 다음 발근을 유도하였다. IBA 0.03 mg/L가 첨가된 MS배지에서 발근을 유도한 결과 약 4주후 성공적으로 발근이 이루어짐을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 성공적으로 발근된 신탄는 인공토양(vermiculite)에 식재하여 활착을 유도하고, 활착된 신탄는 토양으로 옮겨 주었다.



Figure 5. Plant regeneration via organogenesis from cotyledon explant in watermelon. (1-2) Adventitious shoots were formed in the marginal region of cotyledon explants after 4 weeks in culture on MS medium with 1.0 mg/L BA and 0.05 mg/L IBA. (3) The shoot regenerated were rooted on 1/2MS medium with 0.03 mg/L IBA after 2-4 weeks in culture. (D) The plantlet were acclimatized and transferred to soil in pot.

## 2. 참박의 식물체 재생

### 가. 재료 및 방법

#### 1) 식물재료 및 종자발아

본 실험에서는 박과작물 가운데 참박(*Lagenaria siceraria* Standl.) ‘파트너’, ‘불사조’ 등 2개 품종 및 ‘012’, ‘224’ 등 2개 내혼계(inbred line)를 사용하였다. 기내에서 종자를 발아시키고 발아된 종자의 자엽을 채취하여 신초 재생 실험에 이용하였다.

참박의 종자로부터 딱딱한 종피를 완전히 제거한 후, 소독을 위하여 70% 에탄올에 40초간 침지하고, 멸균수로 세척한 다음 전착제 Tween20(4-5방울/100mL)을 첨가한 2.4% 차아염소산나트륨(유한락스 60%) 용액에서 20분간 침지한 후 다시 멸균수로 3회 세척하였다. 소독된 종자는 종자발아용 배지에 치상하여 발아를 유도하였다. 종자발아용 배지는 1/2MS(MS 염류의 농도를 1/2 사용) (Murashige and Skoog, 1962), sucrose 30g/L, agar 8g/L를 첨가한 배지를 사용하였다. 파종한 종자는 25°C, 상대습도 70%로 조절된 성장상에서 발아를 유도하였다.

#### 2) 자엽 절편체로부터 신초 기관형성

기내 발아된 종자의 자엽을 절취하여 가장자리를 제거하고 엽신을 절단한 절편체를 조제하여 신초유도배지에 향측면이 배지에 닿도록 치상하였다. 신초유도배지는 MS 염류와 비타민, sucrose 30 g/L, agar 8 g/L 첨가한 배지를 기본배지로 하였으며, 특별히 언급되지 않은 경우 zeatin 0.5 mg/L, IAA 0.1 mg/L를 첨가한 배지를 사용하였다.

자엽 절편체로부터 신초 기관형성의 적정조건을 알아보하고자 발아기간, 유전형, 성장조절제, 치상방향 처리를 각각 실시하였다. 발아기간은 발아 3, 4, 5, 6, 7, 8일 처리를 비교하였고, 성장조절제는 zeatin 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 10 mg/L X IAA 0, 0.1, 0.3, 1.0 mg/L를 조합한 처리를 실시하였고, 치상방향 처리를 향측면 또는 배측면이 배지에 닿도록 하는 2처리를 두어 실험하였다. 또한 유전형으로 불사조, 파트너, 012, 224를 두고 이들의 유전형간 재생능을 비교하고자 하였다.

자엽을 배지에 치상한 후 배양 초기 3주간 절편체를 암상태에서 배양한 다음 이후 24시간 연속조명으로 옮겨 배양하였다. 배양 3주 후부터 6주까지 절편체의 상태를 1주 간격으로 조사하였는데, 신초 재생여부, 절편체당 신초 수 등을 조사하였다.

### 3) 신초의 발근 및 소식물체의 활착

자엽으로부터 재생된 신초 가운데 1.0 cm 이상 신장된 정상적인 신초를 절단해 낸 후 신초 하부의 잎과 액아를 완전히 잘라 내고 발근배지(MS 염류와 비타민, IBA 또는 IAA 0.03 mg/L, sucrose 30 g/L, agar 8 g/L)에 치상하여 발근을 유도하였다. 발근배지에서 약 4주 후 발근이 이루어진 소식물체는 배양용기에서 꺼내어 agar를 흐르는 물로 수세한 후 살균제에 순간 침지하였다가 건조시킨 후 고압살균된 인공토양(vermiculit: perlite = 1:1)이 들어 있는 분에 식재하고 약 1개월에 걸쳐 점차 습도를 낮추고 광도를 높이며 활착을 시켰다.

## 나. 참박 자엽 절편체로부터 신초 기관형성 적정조건

### 1) 참박의 신초 기관형성 양상

종자 치상 후 발아된 종자의 자엽을 절취하여 신초재생배지에 치상하였을 때, 치상 2-3주 후부터 신초의 형성이 관찰되기도 하였다(Fig. 13). 자엽 절편체는 재생배지에서 초기 비대 현상이 있었고, 절단면 주위에 소량의 캘러스 형성에 이어 신초가 형성되는 것을 관찰하였다. 자엽 절편체로부터 재생되는 신초는 절단면을 따라 4면에서 모두 신초가 형성되기도 하였으며, 주맥 절단부에서의 재생이 가장 많았다. 3주간의 암배양이후 명배양으로 옮긴 후 재생 신초들은 녹색을 띄면서 길이 성장을 하였다.

자엽 절편체로부터의 신초재생은 배양 초기 2주간에 걸쳐 급속히 이루어졌고, 배양 기간이 경과함에 따라 증가하여 3-4주 후에는 최대 재생율에 이르러 6주 후 절편체에서의 신초 재생은 거의 이루어지지 않았다(Fig. 6, 8). 배양 2주 후 신초 재생률(50%)은 전체 재생률(76%)의 66%를 상회하는 매우 높은 수준을 보여주었다. 이러한 경향은 절편체당 재생 신초수에 있어서도 유사하게 나타났다.

### 2) 신초 재생에 미치는 발아기간의 영향

발아기간에 따른 신초 재생률을 알아보기 위해 발아 3-8일된 자엽을 이용하여 실험을 수행한 결과, 발아일수에 따라 재생에 매우 큰 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 발아 3일째 자엽은 68.9%로 가장 높은 재생률을 나타냈으며, 4일째는 31.1%, 5일째는 8.9%로 급격히 떨어졌다. 발아 6일 이후에는 재생이 전혀 이루어지지 않았다. 또한 자엽당 재생 신초수에 있어서도 유사한 경향이 나타났다(Fig. 7). 이로 보아 참박에서는 발아 초기 종자의 자엽을 재료로 사용하여야 할 것이라 생각된다.

### 3) 신초 재생에 미치는 치상방향의 영향

향측면과 배측면이 배지에 닿도록 치상하는 치상방법이 신초 재생에 미치는 영향에 대해 알아보기 위하여 실험한 결과 배측면이 배지에 닿도록 치상한 절편체에서는 0%, 향측면이 배지에 닿도록 치상한 절편체에서는 73%의 신초 재생이 이루어졌다(Fig. 8). 또한 이러한 치상방향의 효과는 성장조절제 종류에 의해 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 즉 사이토키닌으로 BA 또는 zeatin을 사용한다해도 치상방향의 효과는 그대로 유지되었다. 이와 같이 참박의 자엽으로부터의 신초 재생에 있어서 치상방향은 매우 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 식물에 따라서 치상방향에 따라 재생율에 차이를 보이는 경우가 많으나 참박과 같이 극적인 차이를 나타내는 경우는 매우 드물다고 판단되며, 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다 판단된다.

### 4) 신초 재생에 미치는 성장조절제의 영향

참박 '파트너' 자엽의 신초 재생에 미치는 성장조절제의 영향을 알아보기 위한 BA와 zeatin 0.5 mg/L를 예비 비교 실험에서, BA가 첨가된 재생배지에서는 54%, zeatin이 첨가된 재생배지에서는 73%의 신초 재생율, 그리고 2.7개, 3.5개의 절편체당 신초수를 각각 나타내었다. 본 실험의 결과 BA보다는 zeatin에서 더 높은 재생율을 나타내었으나 두 시토키닌 모두에서 50%이상의 재생율을 얻을 수 있었다(Fig. 9).

참박 '파트너'의 신초 재생에 미치는 성장조절제의 영향을 알아보기 위하여 실시한 zeatin과 IBA 12개 조합처리에서 나타난 결과를 보면(Fig. 11), IBA 농도가 높아짐에 따라 재생율과 절편체당 신초수가 높아지는 양상을 보였고, zeatin은 0.5 mg/L 처리들이 좋은 것으로 나타났다. 전체 처리 가운데 zeatin 0.5 mg/L와 IBA 0.2 mg/L가 가장 양호한 결과를 나타내었다. 그러나 재생율이 전반적으로 높지 않아 추가적인 실험이 필요하다고 판단하였다.

이어진 참박 '불사조'의 실험에서 zeatin과 IAA 20개 조합처리를 실시하였을 때, 신초 재생은 IAA 무첨가구에 비해 첨가구들 및 다소 높은 zeatin 처리구가 전반적으로 높은 재생률과 절편체당 신초수를 보여주었다. 그리하여 전반적으로 zeatin과 IAA의 농도가 높을수록 재생률이 높아지는 경향을 나타내었는데, 신초 재생률은 zeatin 5.0 mg/L과 IAA 0.1 mg/L 조합처리에서 90%로 가장 높게 나타났으며, zeatin 10 mg/L과 IAA 0.3 mg/L 처리에서는 75%를 나타내었다. 이로 보아 박의 신초 재생에 있어서 사이토키닌과 옥신의 다소 높은 농도 배합이 필요함을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

#### 5) 신초 재생에 미치는 유전형의 영향

참박 ‘파트너’, ‘불사조’, 012, 224 등 4개 유전형에 있어서 신초 재생의 경향을 알아보았다. 재생률은 각각 ‘파트너’ 73%, ‘불사조’ 83%, ‘012’ 100%, ‘224’ 80%를 나타내었다. 각 유전형에 있어서 신초 재생배지의 적정 성장조절제 농도는 크게 차이가 나지는 않았지만 전반적으로 F1 품종에 비해 내혼계통(inbred line)들이 사이토키닌을 더 요구하는 것으로 보여진다.

참박 ‘파트너’, ‘불사조’ 등 2품종과 ‘012’, ‘224’ 등 2 내혼계통의 자엽 절편체로부터 신초 재생에 성장조절제가 미치는 영향에 대하여 알아보고자 zeatin 0.25, 0.5, 1.0 mg/L과 IBA 0, 0.05, 0.1 0.2 mg/L를 조합하여 총 12개의 처리를 하였다. 모든 절편체는 향측면이 배지에 닿도록 치상하였다. ‘파트너’ 참박 자엽 절편체로부터의 신초 재생에 있어서 성장조절제인 zeatin와 IBA의 농도에 따른 효율을 알아본 결과, zeatin 0.5 mg/L와 IBA 0.1 mg/L의 혼합처리구에서 신초 재생률이 24.4%에 이르렀고, 절편체당 신초수도 1.5개로 가장 효과적인 것으로 나타났다. ‘불사조’ 참박에서는 zeatin 0.5 mg/L와 IAA 0.1 mg/L, inbred line ‘012’에서는 zeatin 1.0 mg/L와 IAA 0.3 mg/L에서 신초 재생률이 100%, 절편체당 신초수 2.0개로 가장 효과적이었다. Inbred line ‘224’는 zeatin 1.0 mg/L와 IAA 0.1 mg/L, zeatin 0.25 mg/L와 IAA 0.3 mg/L의 혼합처리구에서 신초 재생률이 80%에 이르렀고, 절편체당 신초수도 1.5개로 가장 효과적인 것으로 나타났다. 옥신 농도 증가에 따른 신초 형성은 큰 차이가 나타나지는 않았지만 zeatin 농도가 증가할수록 옥신 농도가 증가하는 것이 좋은 결과를 나타냈다(Fig. 10).

#### 다. 재생 신초의 발근 및 활착

자엽으로부터 재생된 신초 가운데 1.0cm 이상 신장한 정상적인 신초를 절취하여 발근을 유도하였다. MS배지에 IBA 0.1 mg/L, sucrose 30 g/L, agar 8 g/L를 첨가한 발근 유도배지에서 배양하였다.

자엽으로부터 재생된 신초가운데 1.0 cm이상의 신초를 절단하여 발근배지에 배양하였을 때 배양 2-3주 후 대부분 발근이 이루어졌다. 절단 신초의 발근은 매우 양호하였으며 신초 지상부 성장도 양호하였다. 배양 약 4주 후 발근된 소식물체는 배양용기에서 꺼내어 agar를 흐르는 물로 수세한 후 살균제에 순간 침지하였다가 건조시킨 후 고압살균된 인공토양(vermiculite)이 들어 있는 분에 식재하고 광도와 습도를 조절하며 활착을 유도하였다(Fig. 13).

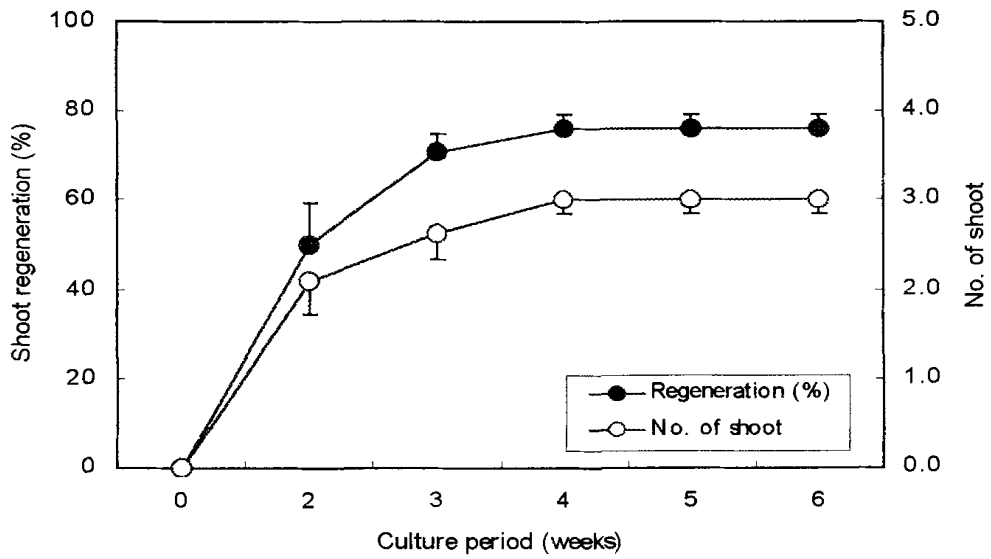


Figure 6. Changes of regeneration frequency and shoot numbers per explant from cotyledon in 'Bulsazo' gourd.

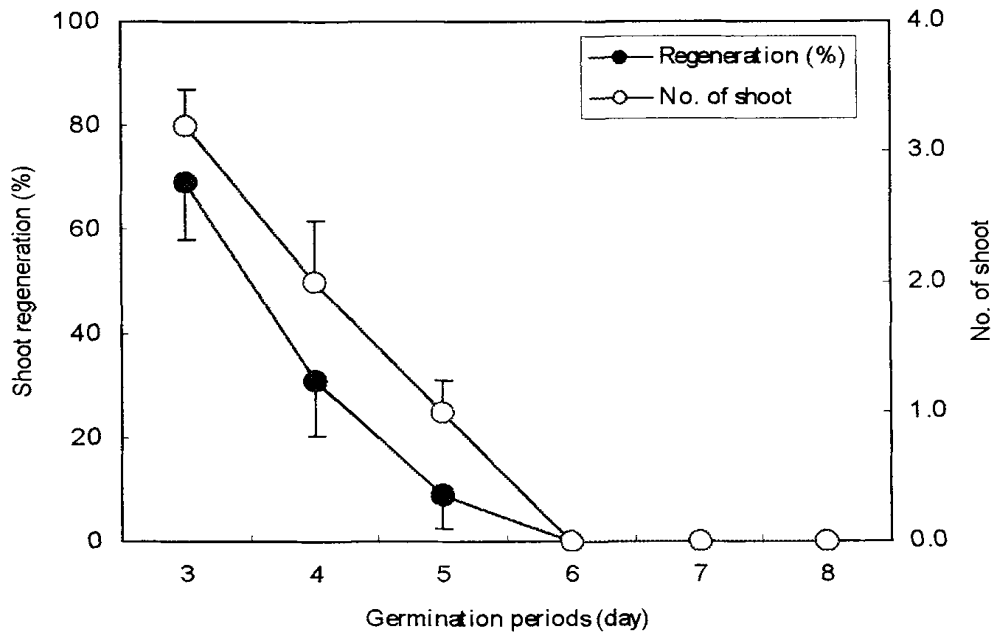


Figure 7. Effects of germination period on shoot regeneration from cotyledon in 'Bulsazo' gourd.

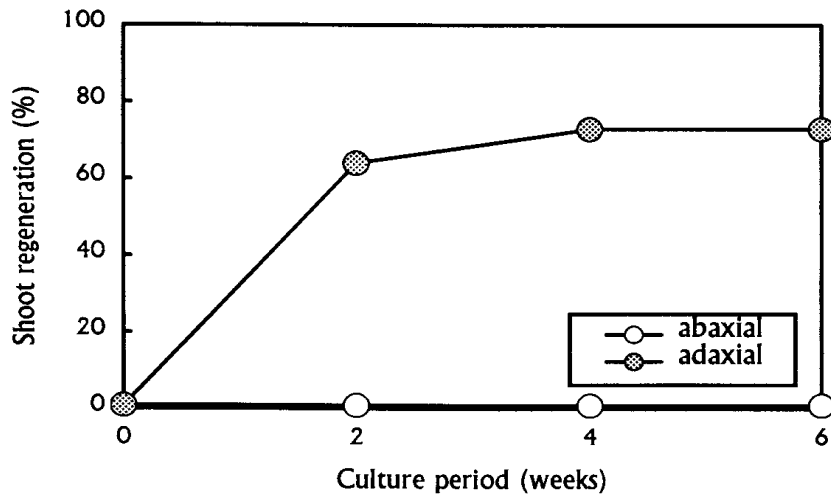


Figure 8. Effects of culture periods on the shoot regeneration from cotyledon segment explant in 'Partner' gourd. Explants were cultured on MS medium supplemented with zeatin 0.5 mg/L and IAA 0.1 mg/L.

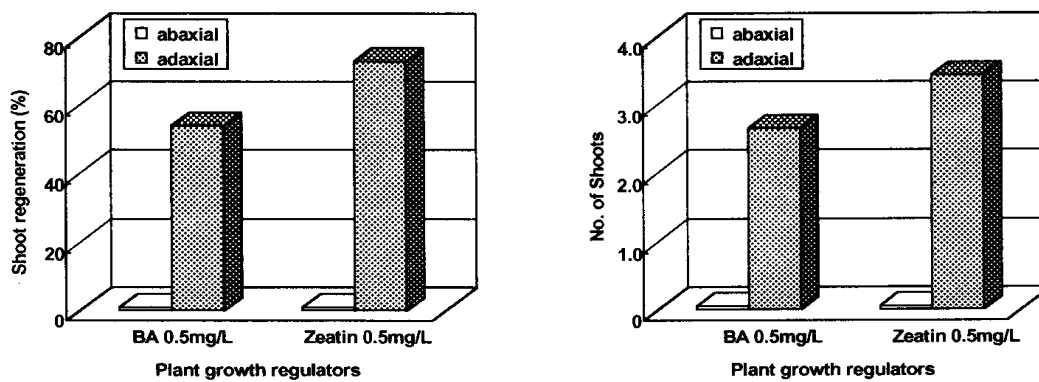


Figure 9. Effects of plant growth regulator and culture condition on shoot regeneration from cotyledon segment explants cultured on MS medium in 'Partner' gourd after 6 weeks in culture.

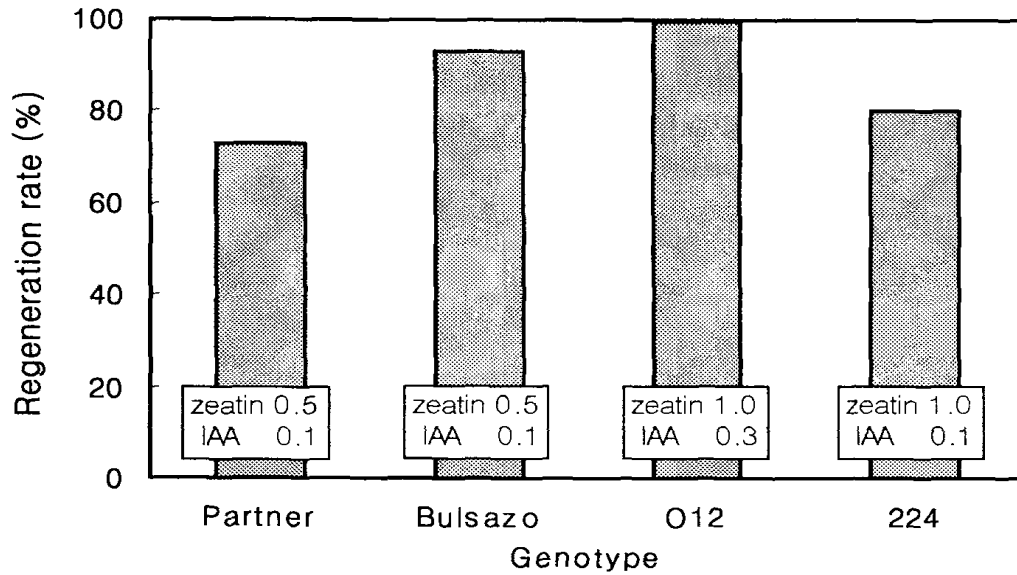


Figure 10. Shoot regeneration efficiency from cotyledon explants in different genotype of gourd.

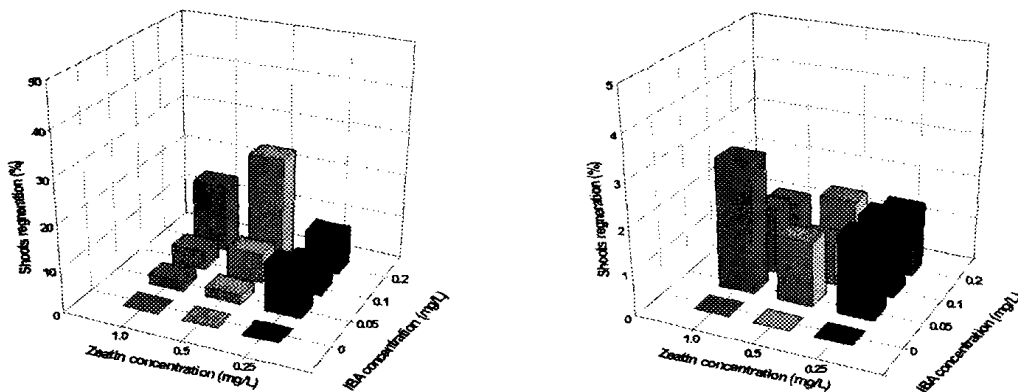


Figure 11. Effects of zeatin and IBA on shoot regeneration and shoot number from cotyledon segment explants in 'Partner' gourd.



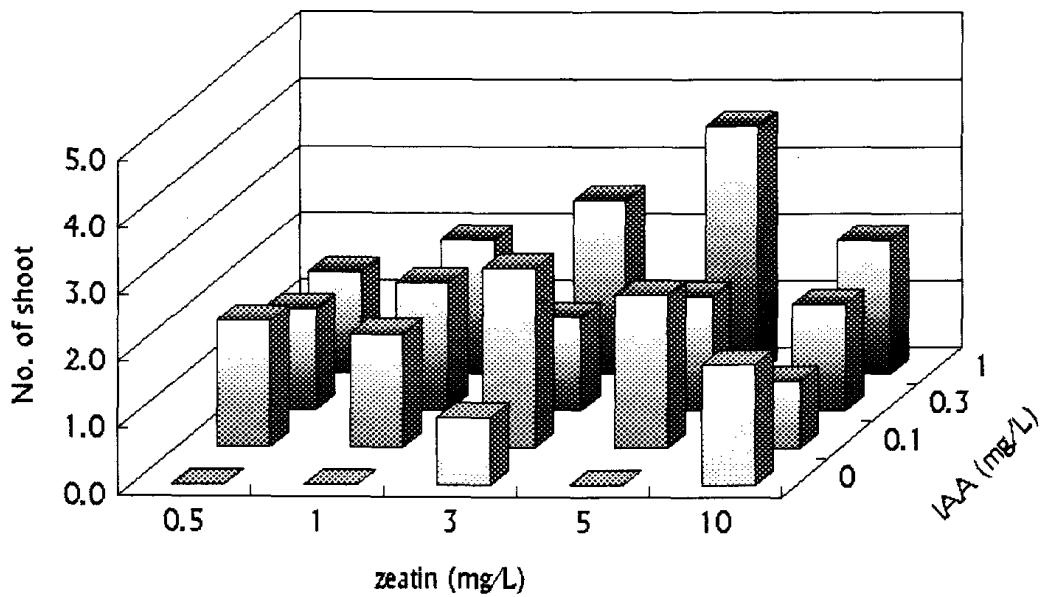
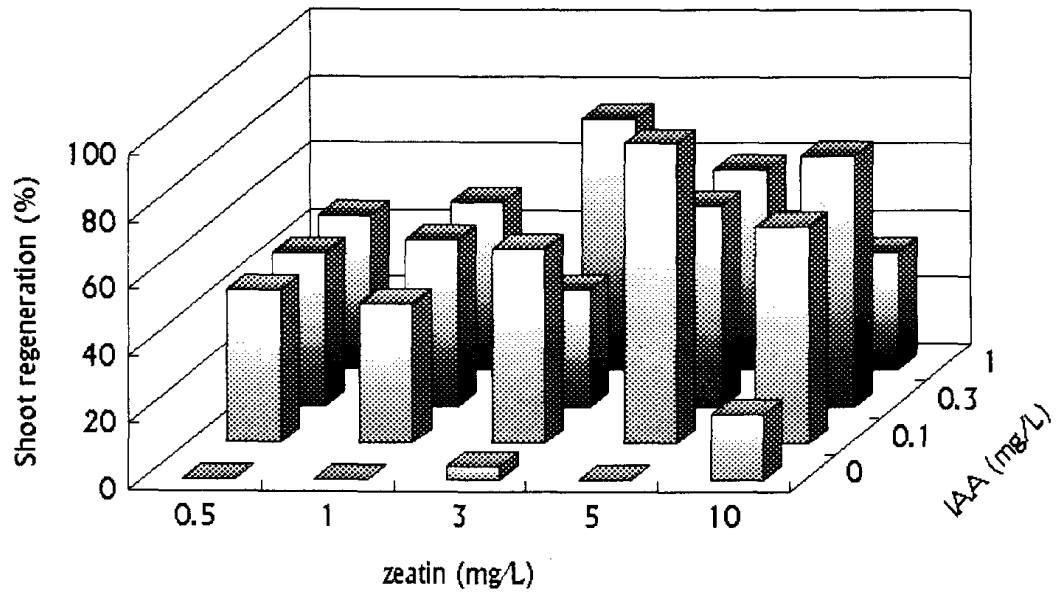


Figure 12. Effects of plant growth regulator on shoot regeneration frequency and shoots number from cotyledon in 'Bulsazo' gourd.

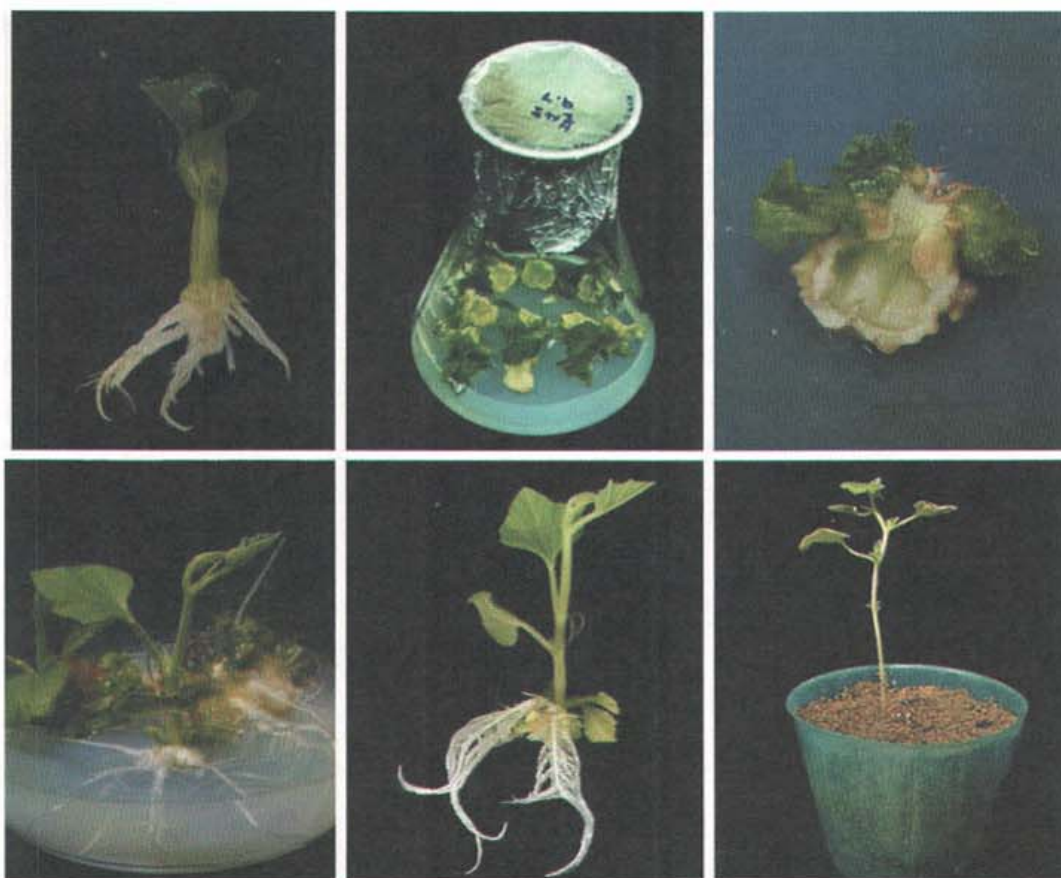


Figure 13. Plant regeneration through organogenesis from cotyledon in gourd. (A) Germinated seed after several days in germination medium. (B-C) Shoots regeneration from cotyledon explants cultured on MS medium with zeain 0.5 mg/L and IBA 0.1 mg/L. Shoots were regenerated from the marginal region of explant. (D-E) Rooting of shoot cuttings on 1/2MS medium with IBA 0.0.3 mg/L. (E) The plantlet were acclimatized and transferred to soil in pot.

## 제 3 절 박과작물의 *Agrobacterium* 매개 형질전환

### 1. 수박의 형질전환

#### 가. 재료 및 방법

##### 1) 식물재료 및 종자발아

본 실험에서는 박과작물 가운데 수박(*Citrullus vulgaris* Schrad.) ‘금천’, ‘달덩이’, ‘슈퍼금천’ 등 3개 품종을 공시재료로 사용하였다. 수박 종자의 종피를 제거한 후, 70% 에탄올과 1.2% 차아염소산나트륨(유한락스 30%) 용액으로 소독하였다. 소독된 종자는 종자발아용 배지에 치상하여 발아를 유도하였다. 종자발아용 배지는 1/2MS(MS 염류의 농도를 1/2 사용) (Murashige and Skoog, 1962), sucrose 30g/L, agar 8g/L를 첨가한 배지를 사용하였다. 과중한 종자는 25℃, 상대습도 70%로 조절된 성장상에서 발아가 이루어질 때까지 기내 배양하였다.

##### 2) *Agrobacterium* 배양

*Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404를 이용하여 형질전환을 실시하였다. *Agrobacterium*은 rifampicin 100 mg/L, kanamycin 100 mg/L, agar 15 g/L가 첨가된 YEP 고형배지가 들어있는 페트리디쉬에 28℃, 암조건에서 배양하였다. 배양 2-3일 후 왕성하게 성장하고 있는 colony를 취하여 kanamycine 50 mg/L가 첨가된 YEP 액체배지 3 mL에 접종하여 28℃에서 8시간동안 200-250 rpm으로 진탕 배양하였다. 진탕배양한 *Agrobacterium* 현탁액 1 mL를 kanamycine 50 mg/L가 첨가된 50 mL YEP 액체배지에 접종하여 상기한 조건으로 16시간동안 배양하였다. 배양을 마친 *Agrobacterium* 현탁액은 OD 값을 적당히 조절한 후 형질전환에 이용하였다.

##### 3) 형질전환의 적정조건 구명

*Agrobacterium* 매개 형질전환에 관여하는 요인들의 적정조건을 구명하고자 접종 기간, 접종온도, 공동배양기간, acetosyringone 농도, *Agrobacterium* 농도, 그리고 *Agrobacterium* 계통 및 유전자운반체의 종류에 대한 각각의 실험을 수행하였다.

형질전환의 기본과정을 보면 YEP배지에서 배양한 10 mL *Agrobacterium* 현탁액에 잎 절편체를 침지하여 접종하였다. 이 때 접종시간을 0.5, 5, 10, 20, 30, 60분으로 달리하여 처리하였고, 접종온도를 20, 25, 30, 35℃로 처리하였다. 접종후 잎 절편체를 여과지(Whatman No. 2)로 덮고 나서 신허유도배지(MS배지, BA 1.0 mg/L,

IAA 0.01 mg/L)가 들어있는 100 mL 삼각플라스크에 약 30개의 절편체씩을 넣어 온도 25°C, 습도 70%, 암상태로 성장상에서 공조배양하였다. 이 과정에서 형질전환 후 공조배양 시간 0, 1, 2, 3, 4, 5일에 따른 형질전환 효과를 알아보았으며, 공조배양시 재생배지에 첨가되는 acetosyringone(AS) 0, 25, 50, 100, 200 µM 농도가 미치는 효과를 알아보았다. 또한 접종시 *Agrobacterium*의 적정농도를 알아보려고 OD 0.3, 0.5, 0.8, 1.0, 1.3으로 처리를 실시하였다.

이외에도 *Agrobacterium* 계통 및 유전자운반체의 종류에 대한 처리로 LBA4404 (pBI121)(Hoekema 등, 1983), LBA4404(pTOK233), LBA4404(pCAMBIA2301), EHA105(pBI121), EHA105(pCAMBIA2301) 등에 따른 형질전환 효율을 비교하였다. LBA4404는 식물형질전환에서 가장 많이 이용되고 있는 *Agrobacterium* 계통이며, 그 이후 개발된 EHA105는 식물형질전환에 매우 효율적인 것으로 알려진 계통이다. 또한 유전자운반체인 pBI121은 GUS 유전자와 neomycin phosphotransferase 유전자가 삽입되어 있다(Jefferson 등, 1987). pTOK233은 intron GUS 유전자와 neomycin phosphotransferase 유전자가 삽입되어 있으며, T-DNA border 외부에 *virB*, *virC*, *virG* 유전자가 있는 크기가 큰 플라스미드이다(Hiei 등, 1994). pCAMBIA2301은 neomycin phosphotransferase 유전자, 그리고 catalase intron을 가진 GUS 유전자가 삽입되어 있다(CAMBIA, Australia).

배양 10일후 각 처리별로 12개의 절편체를 택하여 GUS 조직화학적 분석을 실시하고, 이를 통하여 형질전환 효율을 서로 비교하였다. 형질전환 효율은 각 절편체의 GUS 발현에 따른 염색여부 및 GUS Index(GUS 염색 지수; Fig. 14)를 조사하였다. GUS Index는 0-5까지 총 6단계로 구분하였으며, 0은 반응이 나타나지 않은 경우이고, 1은 주로 주맥 절단부에 몇 개의 청색 spot이 나타난 경우이며, 3은 절단면 전반에 걸쳐 청색 spot이 나타나고 일부는 청색이 번져 있는 경우이고, 마지막으로 5는 절단면에서 전반적으로 청색이 넓게 분포하는 경우로 규정하였다(Fig. 21).

#### 4) 형질전환

수박 형질전환은 *Agrobacterium* LBA4404(pBI121) 또는 LBA4404(pCAMBIA 2301)를 사용하여 실시하였다. YEP배지에서 배양한 10 mL *Agrobacterium* 현탁액에 절단한 자엽 절편체를 침지하여 25°C에서 10분간 접종한 다음, 자엽 절편체를 여과지(Whatman No. 2)로 닦고 나서 신초유도배지(MS배지, BA 1.0 mg/L, IAA 0.01 mg/L)가 들어있는 100 mL 삼각플라스크에 넣어 온도 25°C, 습도 70%의 성장상에서 4일간 공조배양하였다. 공조배양시 신초유도배지에 AS 50 µM을 첨가한 배지를 사용하였다.

*Agrobacterium*과 접종하지 않은 잎 절편체를 항생제가 첨가된 배지와 첨가되지

않은 배지에 각각 넣어 형질전환 대조구로 사용하였다. 공조배양 후 잎 절편체로부터 과다 성장한 *Agrobacterium*을 제거하기 위하여 cefotaxime(Cx) 500 mg/L가 포함된 용액으로 자엽 절편체를 3회 세척하고, 여과지로 수분을 제거한 후 선발배지(신초유도배지, kanamycin 200 mg/L, cefotaxime 200 mg/L)에 치상하였다.

#### 5) 형질전환 자엽 절편체로부터 신초 기관형성을 통한 식물체 재생

선발배지에 치상한 절편체는 배양 초기부터 24시간 연속조명에서 배양하였다. 배양 4주 간격으로 동일한 선발배지로 계대배양해 주었다.

형질전환된 것으로 추정되는 녹색의 부정아가 형성되면 이를 신초신장배지로 옮겨신초의 길이가 1.0 cm 이상되면 절단하여 발근배지(MS배지, IBA 또는 IAA 0.03 mg/L, kanamycin 200 mg/L, cefotaxime 200 mg/L)에 치상하여 발근을 유도하였다. 발근배지에서 약 4주후 발근이 이루어진 소식물체는 배양용기에서 꺼내어 수세한 후 살균제에 순간 침지 한 후 인공토양이 들어 있는 분에 식재하고, Hyponex 1000배 희석액으로 저면관수 방식으로 시비해 주었다. 용기를 밀봉하여 습도를 유지시켜 주었으며 6주 후 활착된 식물체는 일정기간동안 성장 후 토양으로 이식하여 온실로 옮겨 주었다.

#### 6) GUS 분석

형질전환 여부의 확인을 위하여 GUS 조직화학적 분석을 실시하였다. GUS 분석은 선발배지에서의 배양 10일 후 12개의 절편체를 무작위로 선택하여 GUS 발현을 조사하였고, 배양 4주 후 잎 절편체로부터 캘러스 형성 조사와 동시에 캘러스가 형성된 잎 절편체 10개를 무작위로 선택하여 GUS 발현을 조사하였다.

잎 절편체를 X-Gluc(5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide)(Duchefa)가 첨가된 GUS 용액(1.0M NaPO<sub>4</sub> buffer, 10 mM EDTA, 0.5 mM KFerricyanide, 0.5 mM KFerrocyanide, 1.0 mM X-Glucuronide, 0.1% Triton X-100)에 넣은 다음 37°C incubator에서 24시간동안 암조건에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후 잎 절편체를 꺼내어 70% 에탄올로 탈색시킨 다음 잎 절편체에 나타나는 청색의 spot을 조사하였다.

#### 7) 유전자 도입 및 발현분석

형질전환체내로의 유전자 도입을 확인하기 위하여 Polymerase chain reaction (PCR)을 실시하였다. Genomic DNA는 식물 절편체를 extraction buffer로 녹이고, polyvinylpyrrolidone(PVP)와 salt, chloroform 정제 과정을 거쳐 DNA를 추출하였다(Kim 등, 1997). 형질전환된 식물체와 형질전환되지 않은 신초 배양체를 대조구

로 하여 PCR을 수행하였다. Primer는 NPTII 유전자 말단의 465bp ends(5' end: CAA GAT GGA TTG CAC GCA GGT TC-3', 3'end: 5'-TCC AGA TCA TCC TGA TCG ACA AG-3')를 사용하였으며, Taq DNA polymerase와 dNPT(Promega)를 조합하여 PCR를 실시하였다. DNA증폭은 95℃에서 4분 초기 denaturation 한 후 94℃ 30초 denaturation, 65℃ 1분 annealing, 72℃ 1분 extension을 25cycle을 반복한 후, 최종으로 72℃ 5분간 extension하였다. 합성된 DNA를 1시간 동안 전기영동하고 UV조사로 확인하였다.

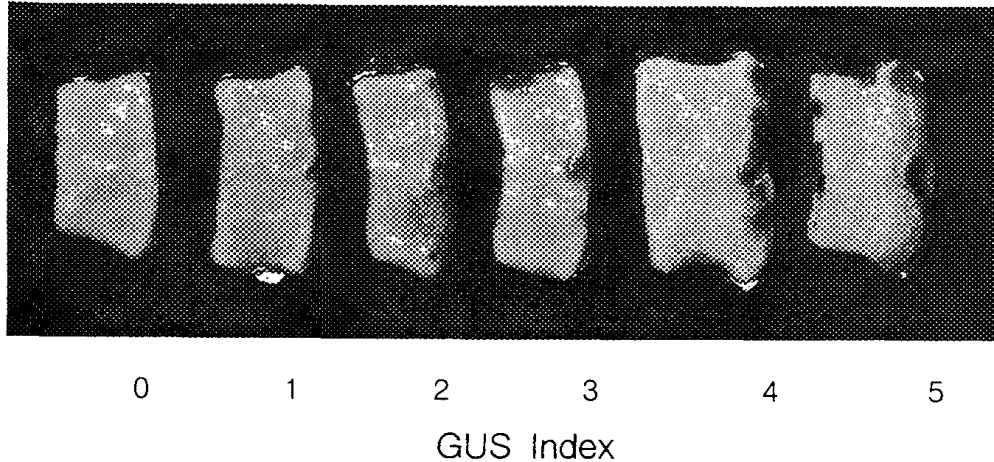


Figure 14. Standard of GUS index in watermelon. The explants were tranformed with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 containing pCAMBIA2301 vector, and then assayed GUS activity with histochemical method after 10 days in culture. After GUS staining, the explant were scored of 'GUS Index'. The Indexes were divided into 6 classes from 0(zero) to 5.

#### 나. 수박의 형질전환 적정조건 구명

*Agrobacterium* 매개 형질전환에 앞서 수박의 형질전환에 영향을 미치는 요인들의 적정조건을 구명하고자, LBA4404(pCAMBIA2301)을 이용하여 형질전환을 실시하고 배양한 다음 절편체의 GUS 발현을 조직화학적으로 분석하였다.

##### 1) 접종기간

접종 기간은 0.5-60분에 걸쳐 6개 처리에 대해 비교하였는데, GUS 양성반응을 나타내는 절편체는 20분까지 큰 차이를 보이지 않았으나 30분에서 91.7%로 최대에 이르렀고 60분에서는 오히려 50%로 많은 감소가 나타났다. GUS Index에 있어서는 전반적으로 차이가 거의 없이 1.0-1.3정도로 나타났다. 이로 보아 *Agrobacterium*과

잎 절편체의 접종시간은 30분이 적당한 것으로 생각되었다(Fig. 15).

## 2) 접종온도

*Agrobacterium*과 잎 절편체의 접종시 용액의 온도를 20-35℃까지 조절하여 접종한 후 비교한 형질전환 효율 결과를 보면(Fig. 16), 전반적으로 다소 높은 온도에서 GUS 양성반응을 보이는 절편체가 많은 것으로 나타났는데 온도 30℃와 35℃에서 GUS 양성반응 절편체가 100%에 이르렀고, 25℃에서는 91.7%이었다. 그러나 GUS Index는 오히려 25℃에서 1.8로 가장 높게 나타났다. 일반적으로 형질전환시 접종용액의 온도를 조절하지 않고 형질전환을 실시하는 경우가 많은데, 온도를 다소 높게 조절한 필요가 있다고 보여진다.

## 3) 공동배양 기간

절편체를 *Agrobacterium*으로 접종한 후 이루어지는 공동배양 기간에 따른 차이를 0-5일로 나누어 형질전환 효율을 비교하였다. 공동배양 기간이 증가함에 따라 전반적으로 형질전환 효율이 증진되는 것을 확인할 수 있었다. 그리하여 공동배양 3-5일처리에서 GUS 양성 반응 절편체가 100%이었으며, GUS Index도 4.0에 근접하였다. 그 가운데 공동배양 4일 처리에서는 GUS Index가 4.2로 가장 높았다. 이는 박과작물의 형질전환시 2-3일 정도가 일반적인 것에 비해 다소 긴 기간의 공동배양이 수박에서 효율적임을 보여주는 것이라 하겠다.

## 4) Acetosyringone 농도

Acetosyringone은 *Agrobacterium*의 virulence를 높여주는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 25-200 μM까지 처리를 실시하고 형질전환 효율을 알아보았는데, 무처리구에 비해 모든 농도에서 GUS 양성반응이 100%로 나타나 매우 양호한 결과를 얻을 수 있었다. 또한 50 μM 이상의 AS 처리에서 4.0에 가까운 GUS Index를 보였고, 그 가운데 50μM에서 가장 높은 GUS Index인 4.6을 얻을 수 있었다(Fig. 18). 이로 보아 수박의 형질전환시 AS이 형질전환 효율을 증진시키는 효과가 있음을 확인할 수 있었으며, 그 적정 농도는 50μM 정도인 것을 알 수 있었다.

## 5) *Agrobacterium* 농도

자엽 절편체와 *Agrobacterium*의 접종시 세균의 농도는 형질전환 효율에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 세균의 농도를 OD값 기준 0.3-1.3까지 조절하여 실험한 결과(Fig. 19), 세균 농도가 다소 낮은 것이 효과적임을 알 수 있었다. OD값 0.5처리에서 GUS 양성 절편체가 75%에 이르렀고, OD값 0.3 처리에서 GUS Index는 차

이는 크지 않았으나 가장 높았다.

수박에서의 결과는 식물형질전환시 OD 0.8정도를 일반적으로 사용하는 것에 비해 본다면 다소 낮은 수준이라 할 수 있다.

#### 6) *Agrobacterium* 계통 및 유전자운반체

*Agrobacterium* 계통과 유전자운반체에 따른 수박의 형질전환 효율을 비교해 보  
고자 LBA4404(pBI121) [L(B)], LBA4404(pCAMBIA2301) [L(C)],  
LBA4404(pTOK233) [L(T)], EHA105(pBI121) [E(B)], EHA105(pCAMBIA2301)  
[E(C)] 등 5개 처리를 실시하였다. EHA105는 유전자운반체 종류에 관계없이 모두  
100%의 GUS 양성반응을 나타내었고, LBA4404는 다른 유전자운반체에 비해  
pBI121에서 가장 양호한 100% 양성반응을 보여주었다. 그러나 GUS Index에서는  
세균계통과 유전자운반체간에 일정한 경향이 나타나지 않았다.

EHA105 계통은 supervirulent strain으로 식물의 형질전환에 매우 효율적으로  
알려져 있다. 그러나 본 연구의 결과를 볼 때, 수박에서는 다른 작물에서 나타난 형  
질전환 효율을 비교시 그 효과가 크지 않은 것으로 나타났으며 오히려  
LBA4404(pBI121) [L(B)] 처리에서 양호한 결과가 나타났는데, 이에 대해서는 추후  
검토가 필요하리라 판단된다(Fig. 20).



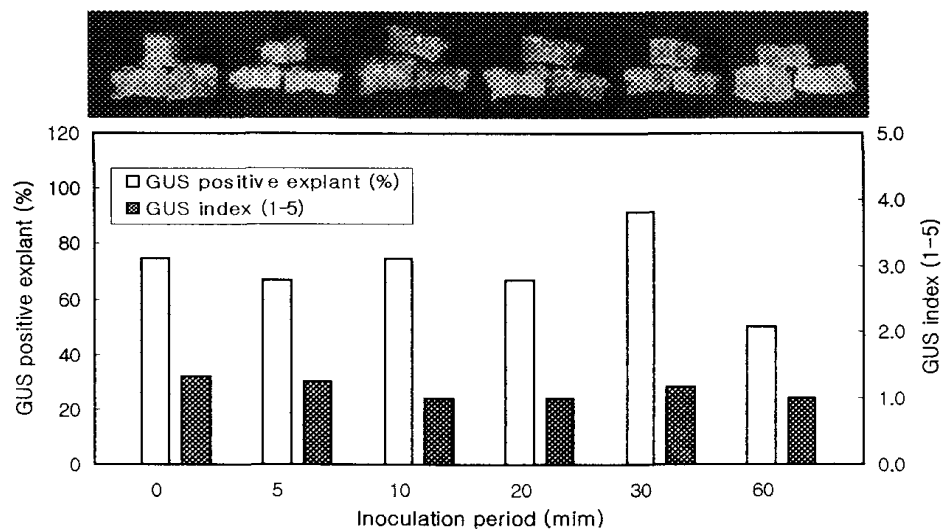


Figure 15. Effects of inoculation periods on transformation efficiency of watermelon cotyledon after *Agrobacterium* mediated transformation.

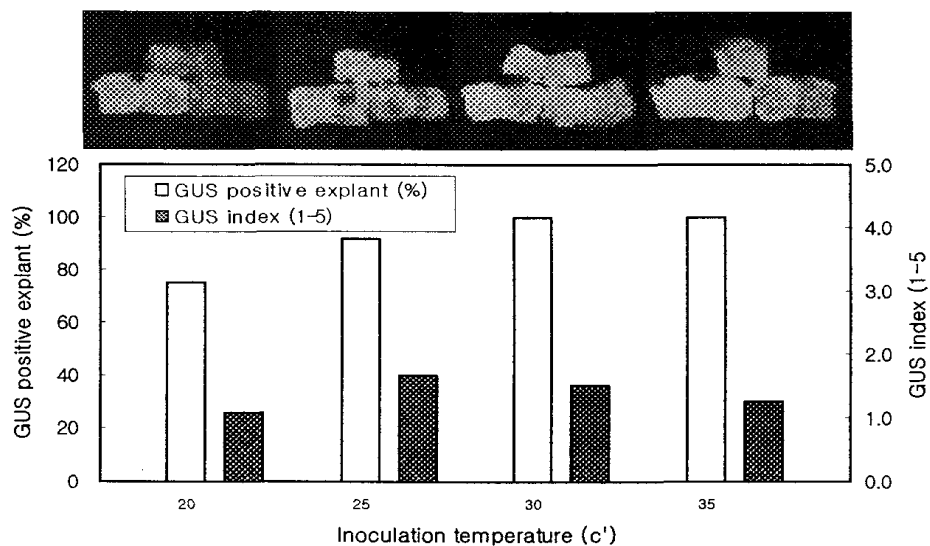


Figure 16. Effects of inoculation temperatures on transformation efficiency of watermelon cotyledon after *Agrobacterium* mediated transformation.

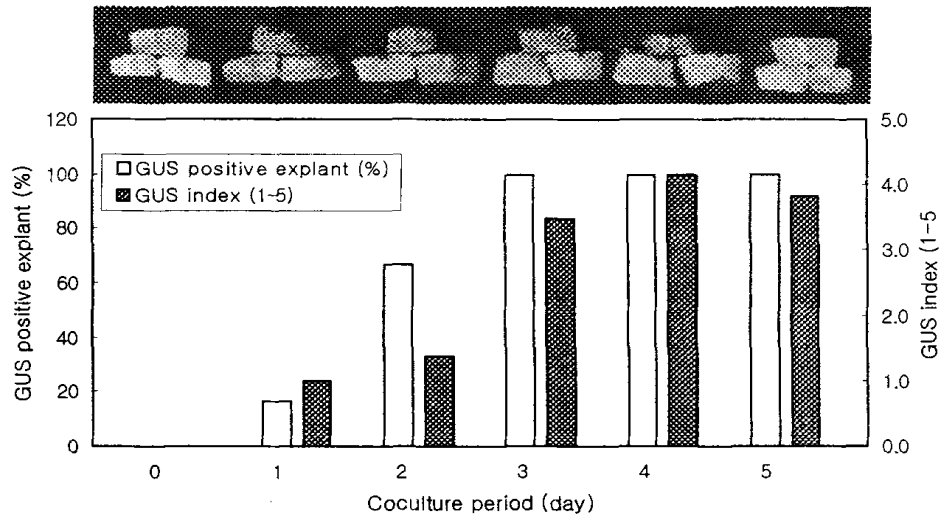


Figure 17. Effects of coculture periods on transformation efficiency of watermelon cotyledon after *Agrobacterium* mediated transformation.

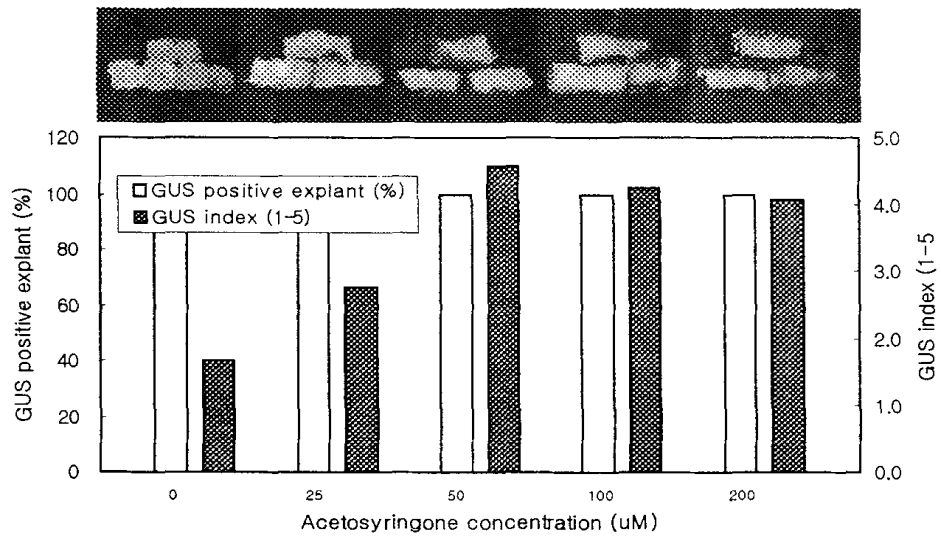


Figure 18. Effects of acetosyringone concentration on transformation efficiency of watermelon cotyledon after *Agrobacterium* mediated transformation.

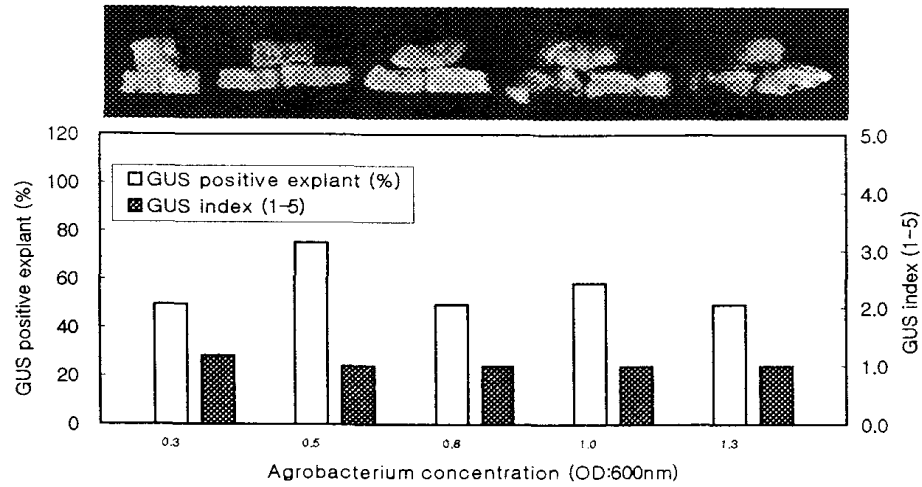


Figure 19. Effects of *Agrobacterium* concentration on transformation efficiency of watermelon cotyledon after *Agrobacterium* mediated transformation.

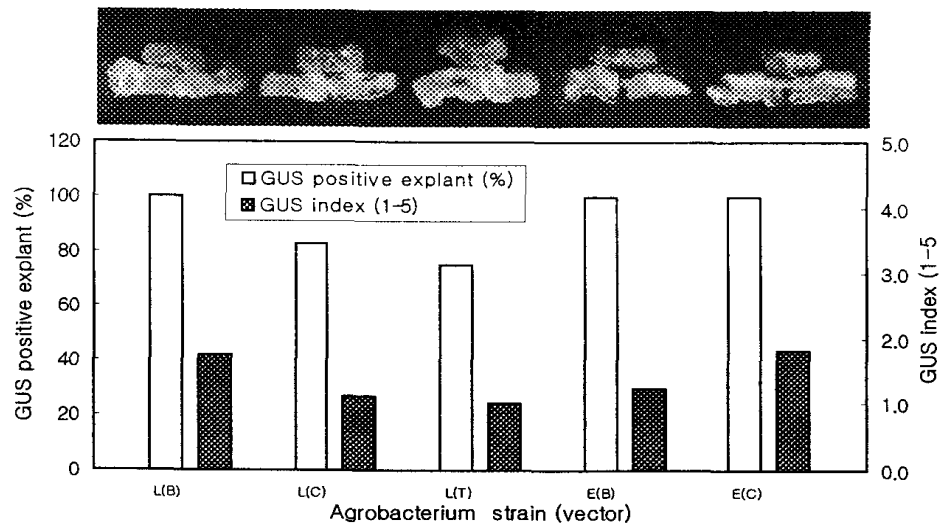


Figure 20. Effects of *Agrobacterium* strain and vector on transformation efficiency of watermelon cotyledon after *Agrobacterium* mediated transformation.

## 다. 수박 형질전환

수박의 자엽 절편체를 이용한 형질전환에서는 *Agrobacterium* strain으로 LBA4404를 사용하였는데, binary vector로 pCAMBIA2301 또는 pBI121이 도입된 것을 각각 사용하였다. *Agrobacterium* colony를 취하여 kanamycine 100 mg/L가 첨가된 YEP 액체배지 28°C에서 진탕 배양하였고, 진탕배양한 *Agrobacterium* 현탁액은 OD(optimum density) 값이 0.8이 되도록 조절한 후 수박 형질전환에 이용하였다.

절편체는 발아된 종자의 자엽을 4조각으로 절단하여 *Agrobacterium* 현탁액에 접종 후 자엽 절편체를 여과지로 닦고 나서 신초유도배지(MS 무기염과 비타민, BA 1.0 mg/L, IBA 0.01 mg/L)에 절편체를 넣어 공조배양하였다. 공조배양 후 세척하여 항생제 kanamycine 200 mg/L, Cefotaxim 200 mg/L가 첨가된 신초유도배지인 선발배지에 치상한 후 배양하였다. *Agrobacterium*과 접촉하지 않은 자엽 절편체는 항생제가 첨가된 배지와 첨가하지 않은 배지에 넣어 형질전환체 대조구로 사용하였다.

형질전환 1주일 후 절편체는 약간 뒤틀리는 현상을 보이며 처음 크기의 2배 이상 커졌다. 또한 절편체의 표면이 부풀어 오르며, 절단면 주위에 약간의 캘러스를 형성하였다. 2주 후에는 거의 모든 절편체에서 캘러스를 형성하였다. 3주 후에는 절단면에서 형질전환체라고 보여지는 작은 신초를 확인할 수 있었다(Fig. 21). 절편체에서 재생된 신초는 명조건으로 옮겨 배양하였을 때 점차 녹색을 띄었으며 신초 이외의 절편체 부위는 황백화되는 것으로 보아 형질전환된 것으로 판단되었다. 재생된 신초는 항생제의 농도를 높게 조절한 신초증식배지로 옮겨 증식하고 있다.

수박 ‘금천’, ‘달덩이’를 이용한 형질전환효율은 ‘달덩이’수박은 5%내외, ‘금천’수박은 15%를 나타냈다(Table 1). 형질전환 효율은 식물과 품종에 따라 다르게 나타났으며, 항생제도 적당한 농도를 사용하여 선발해야 될 것으로 사료된다.

LBA4404/pCAMBIA2301로 접종 후 10일 경과한 자엽 절편체 또는 접종 4주 후 캘러스가 형성된 자엽 절편체를 대상으로 GUS 유전자의 발현을 조직화학적 방법으로 분석하였다. 자엽 절편체를 X-Gluc가 첨가된 GUS 용액에 넣은 다음 37°C incubator에서 24시간동안 암상태로 반응시켰다. 반응이 끝난 후 자엽 절편체를 꺼내어 70% 에탄올로 탈색시킨 다음 청색의 spot을 조사하였다. 형질전환시킨 자엽 절편체를 선발배지에서 10일간 배양한 후 GUS 분석한 결과 자엽 절편체의 절단면에서 GUS 유전자가 부분적으로 발현되었다. 또한 소수의 자엽 절편체에서는 엽신에서 부분적으로 청색이 나타나기도 하였다(Fig. 21)

Table 1. Transformation frequency of different cultivars in watermelon. Cotyledon explants, transformed with *Agrobacterium tumefaciens*, were cultured on selection medium contained 200 mg/L kanamycin and 200 mg/L cefotaxime.

Cultivar	<i>Agrobacterium</i> strain (vector)	Number of explants	Explant with callus(%)	Explant with shoots(%)	Shoot No. per explant
Daldungi	LBA4404 (pCAMBIA2301)	117	100.0	8.4	1.0
Kumchun	LBA4404 (pCAMBIA2301)	576	100.0	15.3	2.4
Super Kumchun	LBA4404 (pBI121)	405	100.0	3.0	1.0

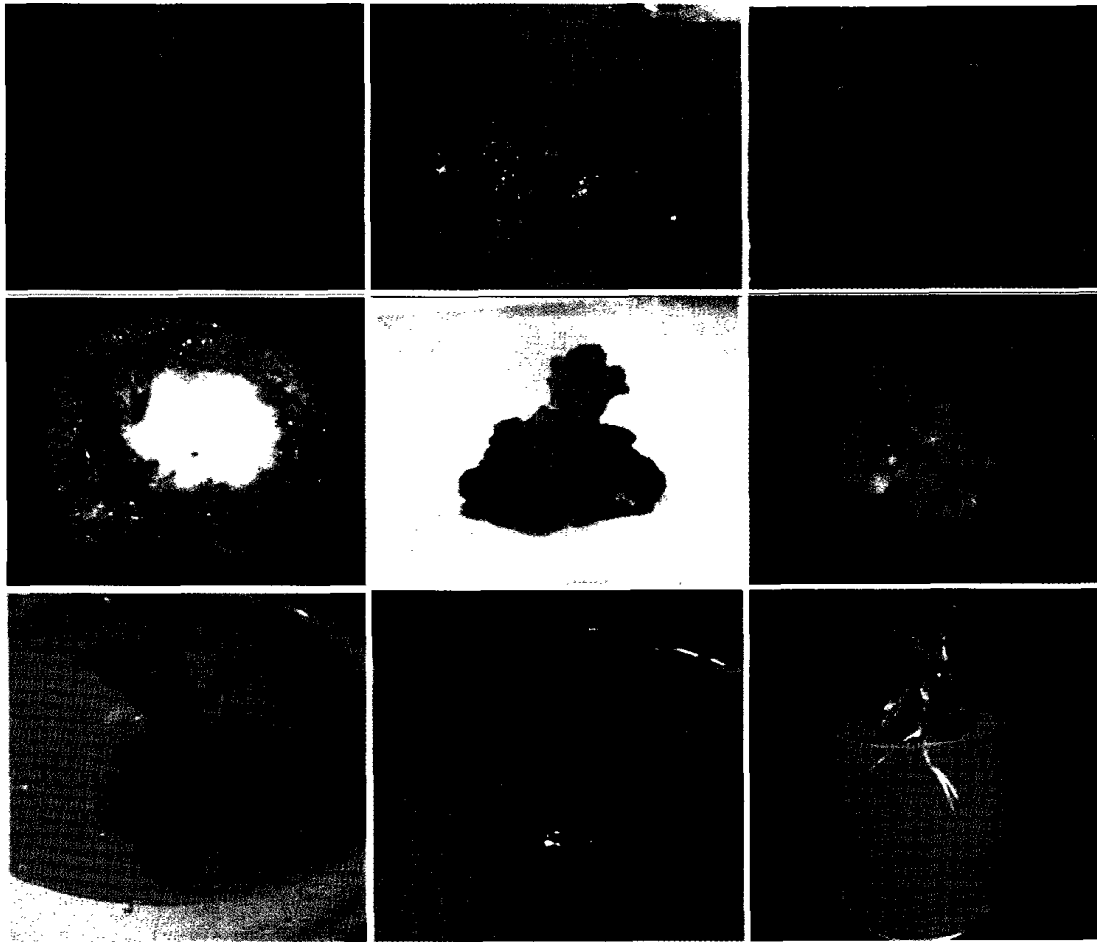


Figure 21. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledon explants and regeneration of transgenic plants in watermelon. (1) Cotyledon explants, transformed with LBA4404(pCAMBIA2301) or LBA4404(pBI121), produced adventitious shoot on selection medium contained kanamycin 200 mg/L and cefotaxime 200 mg/L. (2-3) Putatively transformed callus and shoot showed green color. (4-6) After transformation, the explant and the leaf of regenerated shoots showed successful expression of GUS gene, which produced blue color. (7-9) The regenerated shoot was elongated and rooted on selection medium.

## 라. 수박 내병성 유전자 도입 형질전환체 개발

수박의 형질전환에서는 ‘달덩이’, ‘수퍼금천’ 등 품종의 자엽 절편체를 이용하여 실시하였다. *Agrobacterium* strain으로 LBA4404 또는 GV3101을 사용하였는데, binary vector로 pBI121에서 GUS 유전자를 제거하고 그 자리에 뿌리 특이 프로모터인 PRP3 promoter와 내병성 유전자 defensin을 조합한 PRP3/defensin/nos를 도입한 pPRP3/defensin을 각각 사용하여 형질전환을 수행하였다.

절편체는 발아된 종자의 자엽을 4조각으로 절단하여 *Agrobacterium* 현탁액에 접종 후 자엽 절편체를 여과지로 덮고 나서 신초유도배지에 절편체를 넣어 공조배양하였다. 공조배양 후 세척하여 신초유도배지(MS배지 + BA 1.0 mg/L + IAA 0.01 mg/L)에 kanamycine 200 mg/L, Cx 200 mg/L를 첨가한 선발배지에 치상한 후 배양하였다. *Agrobacterium*과 접촉하지 않은 자엽 절편체는 항생제가 첨가된 배지와 첨가하지 않은 배지에 넣어 형질전환체 대조구로 사용하였다.

박과작물의 형질전환에서 수박의 신초 형성률은 품종에 따라 10% 내외를 나타내었으나(Table 2), 수박 형질전환 이후 형성된 신초들은 kanamycine 200 mg/L가 첨가된 배지로 계대배양하였을 때 대부분 발달하지 못하고 백화 또는 갈변 피사하였으며 소수의 신초는 생존하였으나 생장이 매우 늦은 상태이다. 이러한 문제를 해결하기 위해서는 형질전환 신초 재생과정에서 현재에 비해 보다 높은 농도의 항생제를 첨가한 선발배지에서 선발하는 진정한 형질전환체를 생산하는 방법이 되리라 생각되며, 이 외에 키메라 상태의 식물체를 육성한 후 후대 종자를 받아 후대에서 다시 선발을 하는 방법을 고려해 볼 수도 있을 것이다. 또한 이전의 다른 보고와 같이 수박 품종에 따라 형질전환 이후 신초형성 효율이 다르게 나타나 유전형에 따라 반응능이 다름을 확인할 수 있었다.

지속적으로 수박 ‘수퍼금천’으로 GV3101(pPRP3/defensin)를 이용한 형질전환을 수행하여 절편체로부터 신초 재생이 이루어진 상태이며, 이어서 계대배양을 통한 신초 증식과정을 거쳐 형질전환 확인 과정 및 포장 재배를 통한 내병성 검정, 종자 생산에 대한 실험을 수행하게 될 것이다.

Table 2. Transformation frequency of different cultivars in watermelon. Cotyledon explants, transformed with *Agrobacterium*, were cultured on selection medium contained 100 mg/L kanamycin and 200 mg/L cefotaxime.

Cultivar	<i>Agrobacterium</i> strain (vector)	Number of explants	Explant with callus(%)	Explant with shoots(%)	Shoot No. per explant
Daldungi	LBA4404 ( <i>PepMADS</i> )	63	100.0	1.4	1.0
Super-kumchun	GV3101 ( <i>TPS/PepMADS</i> )	408	79.6	10.0	1.0
	GV3101 ( <i>TPS/defensin</i> )	363	100.0	8.2	1.1
	GV3101 ( <i>PRP/defensin</i> )	913	89.1	6.7	1.3

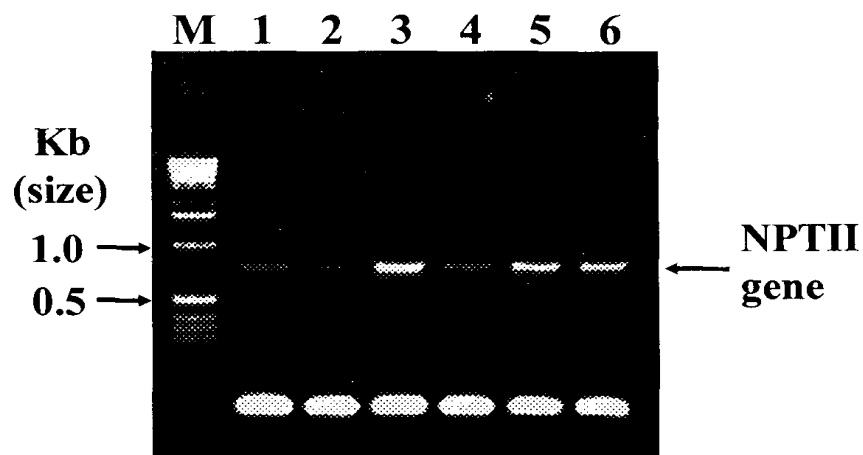


Figure 22. Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products of NPT II gene in putative transformed shoots. Lane M : 1kb ladder, Lane 1-6 : watermelon transgenic lines containing antifungal protein gene from pepper.



## 2. 참박의 형질전환

### 가. 재료 및 방법

#### 1) 식물재료 및 종자발아

본 실험에서는 박과작물 가운데 참박(*Lagenaria siceraria* Standl.) '파트너', '불사조' 등 2개 품종 및 '012', '224', 'Go-701-2', 'Go-701-3', 'Go-701S-2' 등 5개 내혼계(inbred line)를 사용하였다.

참박 종자의 종피를 제거한 후, 70% 에탄올과 2.4% 차아염소산나트륨(유한락스 60%) 용액으로 소독하였다. 소독된 종자는 종자발아용 배지에 치상하여 발아를 유도하였다. 종자발아용 배지는 1/2MS(MS 염류의 농도를 1/2 사용) (Murashige and Skoog, 1962), sucrose 30 g/L, agar 8 g/L를 첨가한 배지를 사용하였다. 파종한 종자는 25°C, 상대습도 70%로 조절된 성장상에서 발아가 이루어질 때까지 기내 배양하였다.

#### 2) *Agrobacterium* 배양

*Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404를 이용하여 형질전환을 실시하였다. *Agrobacterium*은 rifampicin 100 mg/L, kanamycine 100 mg/L, agar 15 g/L가 첨가된 YEP 고형배지가 들어있는 페트리디쉬에 28°C, 암조건에서 배양하였다. 배양 2-3일 후 왕성하게 성장하고 있는 colony를 취하여 kanamycine 50 mg/L가 첨가된 YEP 액체배지 3 mL에 접종하여 28°C에서 8시간동안 200-250 rpm으로 진탕 배양하였다. 진탕배양한 *Agrobacterium* 현탁액 1 mL를 Kanamycine 50 mg/L가 첨가된 50 mL YEP 액체배지에 접종하여 상기한 조건으로 16시간동안 배양하였다. 배양을 마친 *Agrobacterium* 현탁액은 OD 값을 적당히 조절한 후 형질전환에 이용하였다.

#### 3) 형질전환의 적정조건 구명

*Agrobacterium* 매개 형질전환에 관여하는 요인들의 적정조건을 구명하고자 접종기간, 접종온도, 공동배양기간, acetosyringone 농도, *Agrobacterium* 농도, 그리고 *Agrobacterium* 계통 및 유전자운반체의 종류에 대한 각각의 실험을 수행하였다.

형질전환의 기본과정을 보면 YEP배지에서 배양한 10 mL *Agrobacterium* 현탁액에 잎 절편체를 침지하여 접종하였다. 이 때 접종시간을 0.5, 5, 10, 20, 30, 60 분으로 달리하여 처리하였고, 접종온도를 20, 25, 30, 35°C로 처리하였다. 접종후 잎

절편체를 여과지(Whatman No. 2)로 닦고 나서 신초유도배지(MS배지, zeatin 10.0 mg/L, IAA 0.3 mg/L)가 들어있는 100 mL 삼각플라스크에 약 30개의 절편체씩을 넣어 온도 25°C, 습도 70%, 암상태로 생장상에서 공조배양하였다. 이 과정에서 형질전환 후 공조배양 시간 0, 1, 2, 3, 4, 5일에 따른 형질전환 효과를 알아보았으며, 공조배양시 재생배지에 첨가되는 acetosyringone(AS) 0, 25, 50, 100, 200 µM 농도가 미치는 효과를 알아보았다. 또한 접종시 *Agrobacterium*의 적정농도를 알아보고자 OD 0.3, 0.5, 0.8, 1.0, 1.3으로 처리를 실시하였다.

이외에도 *Agrobacterium* 계통 및 유전자운반체의 종류에 대한 처리로 LBA4404 (pBI121) (Hoekema 등, 1983), LBA4404(pTOK233), LBA4404(pCAMBIA 2301), EHA105(pBI121), EHA105(pCAMBIA2301) 등에 따른 형질전환 효율을 비교하였다. LBA4404는 식물형질전환에서 가장 많이 이용되고 있는 *Agrobacterium* 계통이며, 그 이후 개발된 EHA105는 식물형질전환에 매우 효율적인 것으로 알려진 계통이다. 또한 유전자운반체인 pBI121은 GUS 유전자와 neomycin phosphotransferase 유전자가 삽입되어 있다(Jefferson 등, 1987). pTOK233은 intron GUS 유전자와 neomycin phosphotransferase 유전자가 삽입되어 있으며, T-DNA border 외부에 virB, virC, virG 유전자가 있는 크기가 큰 플라스미드이다(Hiei 등, 1994). pCAMBIA2301은 neomycin phosphotransferase 유전자, 그리고 catalase intron을 가진 GUS 유전자가 삽입되어 있다(CAMBIA, Australia).

배양 10일후 각 처리별로 12개의 절편체를 택하여 GUS 조직화학적 분석을 실시하고, 이를 통하여 형질전환 효율을 서로 비교하였다. 형질전환 효율은 각 절편체의 GUS 발현에 따른 염색여부 및 GUS Index(GUS 염색 지수; Fig. 14)를 조사하였다. GUS Index는 0-5까지 총 6단계로 구분하였으며, 0은 반응이 나타나지 않은 경우이고, 1은 주로 주맥 절단부에 몇 개의 청색 spot이 나타난 경우이며, 3은 절단면 전반에 걸쳐 청색 spot이 나타나고 일부는 청색이 번져 있는 경우이고, 마지막으로 5는 절단면에서 전반적으로 청색이 넓게 분포하는 경우로 규정하였다(Fig. 23).

#### 4) 형질전환

참박 형질전환은 *Agrobacterium* LBA4404(pBI121) 또는 LBA4404(pCAMBIA 2301)를 사용하여 실시하였다. YEP배지에서 배양한 10 mL *Agrobacterium* 현탁액에 절단한 자엽 절편체를 침지하여 25°C에서 10분간 접종한 다음, 자엽 절편체를 여과지(Whatman No. 2)로 닦고 나서 신초유도배지(MS배지, zeatin 0.5 mg/L, IAA 0.3 mg/L)가 들어있는 100 mL 삼각플라스크에 넣어 온도 25°C, 습도 70%의 생장상에서 2일간 공조배양하였다. 공조배양시 신초유도배지에 AS 50 µM을 첨가한 배

지를 사용하였다.

*Agrobacterium*과 접촉하지 않은 잎 절편체를 항생제가 첨가된 배지와 첨가되지 않은 배지에 각각 넣어 형질전환 대조구로 사용하였다. 공조배양 후 잎 절편체로부터 과다 성장한 *Agrobacterium*을 제거하기 위하여 cefotaxime(Cx) 500 mg/L가 포함된 용액으로 자엽 절편체를 3회 세척하고, 여과지로 수분을 제거한 후 선발배지(신초유도배지, kanamycine 100 mg/L, Cx 200 mg/L)에 치상하였다.

#### 5) 형질전환 자엽 절편체로부터 신초 기관형성을 통한 식물체 재생

선발배지에 치상한 절편체는 배양 초기부터 24시간 연속조명에서 배양하였다. 배양 4주 간격으로 동일한 선발배지로 계대배양해 주었다.

형질전환된 것으로 추정되는 녹색의 부정아가 형성되면 이를 신초신장배지로 옮겨신초의 길이가 1.0 cm 이상되면 절단하여 발근배지(MS배지, IBA 또는 IAA 0.03 mg/L, kanamycine 100 mg/L, Cx 100 mg/L)에 치상하여 발근을 유도하였다. 발근배지에서 약 4주후 발근이 이루어진 소식물체는 배양용기에서 꺼내어 수세한 후 살균제에 순간 침지 한 후 인공토양이 들어 있는 분에 식재하고, Hyponex 1000배 희석액으로 저면관수 방식으로 시비해 주었다. 용기를 밀봉하여 습도를 유지시켜 주었으며 6주 후 활착된 식물체는 일정기간동안 성장 후 토양으로 이식하여 온실로 옮겨 주었다.

#### 6) GUS 분석

형질전환 여부의 확인을 위하여 GUS 조직화학적 분석을 실시하였다. GUS 분석은 선발배지에서의 배양 10일 후 12개의 절편체를 무작위로 선택하여 GUS 발현을 조사하였고, 배양 4주 후 자엽 절편체로부터 캘러스 형성 조사와 동시에 캘러스가 형성된 잎 절편체 10개를 무작위로 선택하여 GUS 발현을 조사하였다.

자엽 절편체를 X-Gluc(5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide)(Duchefa)가 첨가된 GUS 용액(1.0M NaPO<sub>4</sub> buffer, 10 mM EDTA, 0.5 mM KFerricyanide, 0.5 mM KFerrocyanide, 1.0 mM X-Glucuronide, 0.1% Triton X-100)에 넣은 다음 37°C incubator에서 24시간동안 암조건에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후 자엽 절편체를 꺼내어 70% 에탄올에 넣어 탈색시킨 다음 자엽 절편체에 나타나는 청색의 spot을 조사하였다.

#### 7) 유전자 도입 및 발현분석

형질전환체내로의 유전자 도입을 확인하기 위하여 Polymerase chain reaction (PCR)을 실시하였다. Genomic DNA는 식물 절편체를 extraction buffer로 녹이고,

polyvinylpyrrolidone(PVP)와 salt, chloroform 정제 과정을 거쳐 DNA를 추출하였다(Kim 등, 1997). 형질전환된 식물체와 형질전환되지 않은 신초 배양체를 대조구로 하여 PCR을 수행하였다. Primer는 NPTII 유전자 말단의 465bp ends(5' end: CAA GAT GGA TTG CAC GCA GGT TC-3', 3'end: 5'-TCC AGA TCA TCC TGA TCG ACA AG-3')를 사용하였으며, Taq DNA polymerase와 dNPT(Promega)를 조합하여 PCR를 실시하였다. DNA증폭은 95℃에서 4분 초기 denaturation 한 후 94℃ 30초 denaturation, 65℃ 1분 annealing, 72℃ 1분 extension을 25 cycle을 반복한 후, 최종으로 72℃ 5분간 extension하였다. 합성된 DNA를 1시간 동안 전기영동하고 UV조사로 확인하였다(Fig. 22).

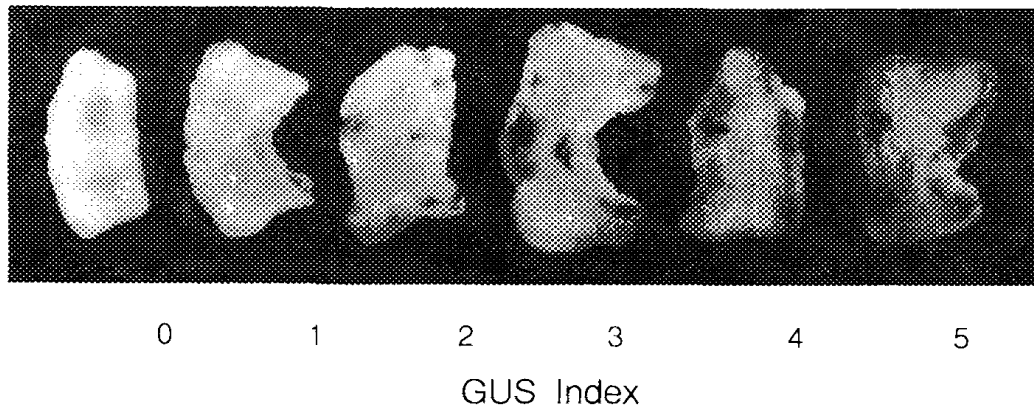


Figure 23. Standard of GUS index in bottle gourd. The explants were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 containing pCAMBIA2301 vector, and then assayed GUS activity with histochemical method after 10 days in culture. After GUS staining, the explant were scored of 'GUS Index'. The Indexes were divided into 6 classes from 0(zero) to 5.

#### 나. 참박의 형질전환 적정조건 구명

참박의 형질전환에 영향을 미치는 요인들의 적정조건을 구명하고자, LBA4404(pCAMBIA2301)을 이용하여 형질전환을 실시하고 배양한 다음 절편체의 GUS 발현을 조직화학적으로 분석하였다.

##### 1) 접종기간

*Agrobacterium*과 잎 절편체의 접종 기간을 0.5-60분에 걸쳐 6개 처리에 대해

비교하였는데(Fig. 24), 0.5분에서는 GUS 양성반응이 나타나지 않았으나 5-60분까지 100%의 GUS 양성반응을 보이는 것으로 나타났다. 또한 처리시간에 따른 GUS Index에 있어서도 1.4-1.7까지 거의 차이를 나타내지 않았다. 참박에 있어서 *Agrobacterium*과 잎 절편체의 접촉에 있어서의 적정 시간은 상당히 넓은 범위에서 이루어질 수 있다고 보여진다.

## 2) 접종온도

세균 현탁 용액의 온도를 20-35°C까지 조절하여 접종한 후 형질전환 효율을 비교하였는데, 전반적으로 모든 온도 처리에서 100% GUS 양성반응이 나타났다 (Fig. 25) 또한 GUS Index에 있어서도 전반적으로 2.3 이상으로 높게 나타났지만, 온도 35°C에서 GUS Index가 3.0으로 다른 처리에 비해 가장 양호한 결과를 보여주었다. 일반적으로 형질전환시 접종용액의 온도를 조절하지 않고 형질전환을 실시하는 경우가 많은데, 수박과 마찬가지로 참박에 있어서 다소 높은 온도가 형질전환에 효율적일 것으로 판단된다.

## 3) 공동배양 기간

공동배양 기간에 따른 차이를 절편체를 *Agrobacterium*으로 접종한 후 0-5일간 공동배양하고 형질전환 효율을 비교하였다. 공동배양 기간이 증가함에 따라 전반적으로 형질전환 효율이 증진되는 것을 확인할 수 있었다. 그리하여 공동배양 3-5일 처리에서 GUS 양성 반응 절편체가 100%이었으며, GUS Index도 4.0-4.2로 양호하였다(Fig. 26). 참박에 있어서는 공동배양의 기간을 3-5일 조절하는 것이 형질전환의 효율을 증진시키는데 바람직할 것으로 생각되었다.

## 4) Acetosyringone 농도

*Agrobacterium*의 virulence를 높여주는 것으로 알려져 있는 acetosyringone을 25-200 µM까지 처리하고 형질전환 효율을 비교한 결과(Fig. 27), 무처리구에 비해 모든 농도에서 GUS 양성반응이 90% 이상으로 매우 높게 나타났다. 무처리구에서는 GUS 양성반응이 33.3%로 다소 낮았다. GUS Index에 있어서는 무처리에서 1.3 이었고 AS 100 µM 처리에서 3.1로 가장 높은 것으로 나타났다. 참박의 형질전환에 있어서 AS에 형질전환 효율의 증진 효과가 인정되었으며, 그 적정 농도는 100 µM 정도인 것을 알 수 있었다.

## 5) *Agrobacterium* 농도

세균의 농도를 OD값 기준 0.3-1.3까지 조절하여 자엽 절편체와 *Agrobacterium*

의 접종시 세균의 농도에 따른 형질전환 효율을 알아보았다. GUS 양성반응에 있어서는 0.3-1.0처리까지 모두 100%를 나타내었으나, OD값 1.3으로 91.7%로 상대적으로 다소 낮았다. 또한 GUS Index에 있어서는 0.8에서 2.4로 최대치를 나타내었고 세균의 농도가 높거나 낮아짐에 따라 다소 감소하는 경향을 보여주어 OD값 1.3에서 1.8로 가장 낮았다(Fig. 28).

#### 6) *Agrobacterium* 계통 및 유전자운반체

참박의 형질전환 효율에 영향을 미칠 것으로 예상되는 *Agrobacterium* 계통과 유전자운반체에 따른 비교해 보고자 LBA4404(pBI121) [L(B)], LBA4404(pCAMBIA2301) [L(C)], LBA4404(pTOK233) [L(T)], EHA105(pBI121) [E(B)], EHA105(pCAMBIA2301) [E(C)] 등 5개 처리를 실시하였다. 참박의 형질전환에 있어서는 EHA105에서 유전자운반체 종류에 관계없이 모두 100%의 GUS 양성반응을 나타내었고, LBA4404는 다른 유전자운반체에 비해 pCAMBIA2301에서 유일하게 100% 양성반응을 보여주었다(Fig. 29). 즉, pCAMBIA2301 유전자운반체가 이용되면 세균 계통에 관계없이 좋은 형질전환 효율을 보임을 알 수 있었다.

식물의 형질전환에 매우 효율적으로 알려져 있는 supervirulent strain이 EHA105는 참박의 형질전환에 효과적임을 알 수 있었고, 동시에 pCAMBIA2301의 우수한 결과도 확인하였다.

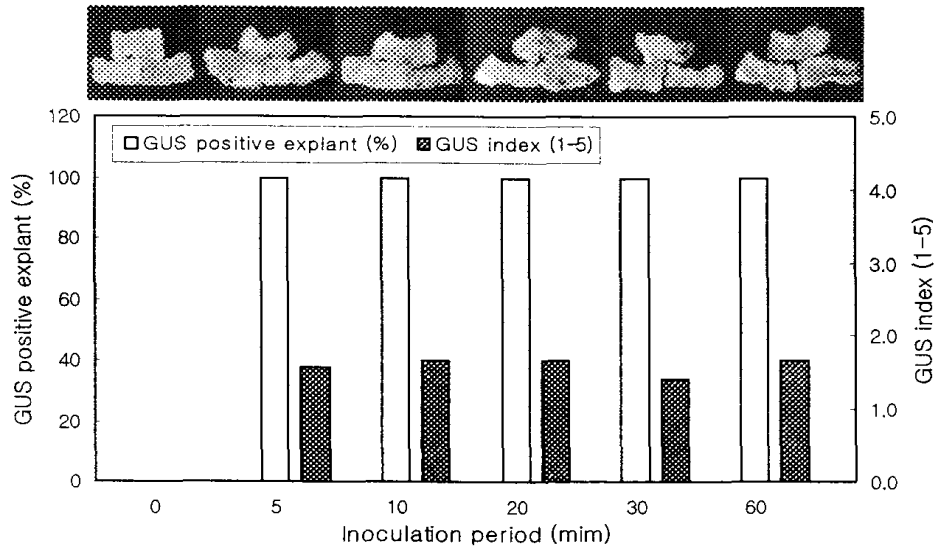


Figure 24. Effects of inoculation periods on transformation efficiency of bottle gourd cotyledon after *Agrobacterium* mediated transformation.

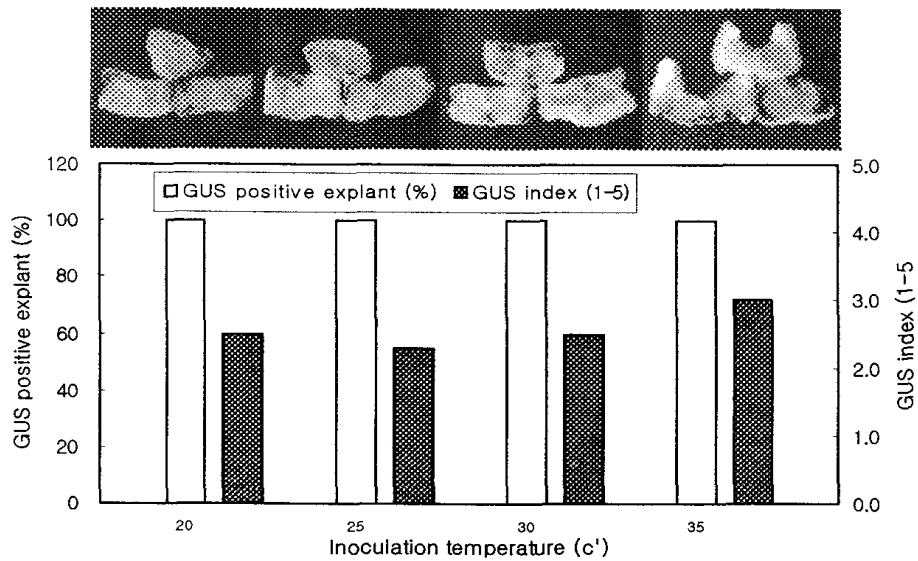


Figure 25. Effects of inoculation temperatures on transformation efficiency of bottle gourd cotyledon after *Agrobacterium* mediated transformation.

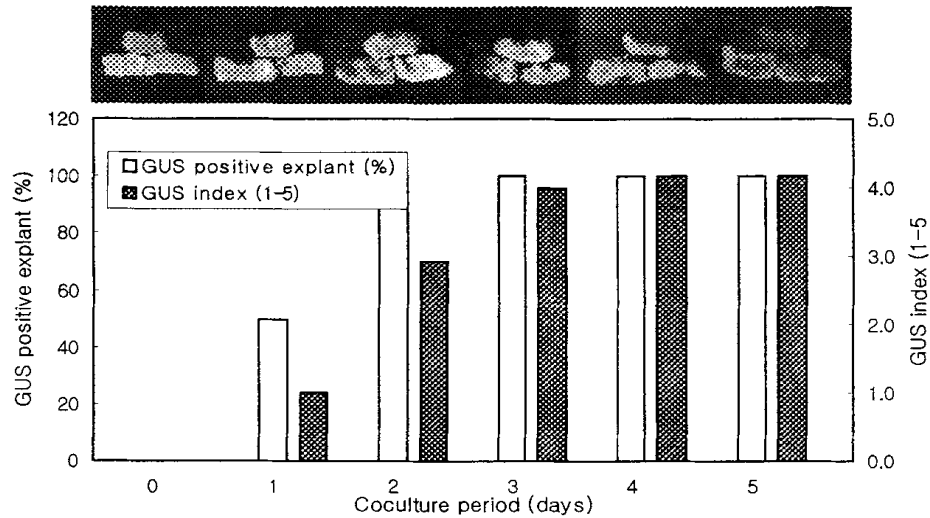


Figure 26. Effects of coculture periods on transformation efficiency of bottle gourd cotyledon after *Agrobacterium* mediated transformation.

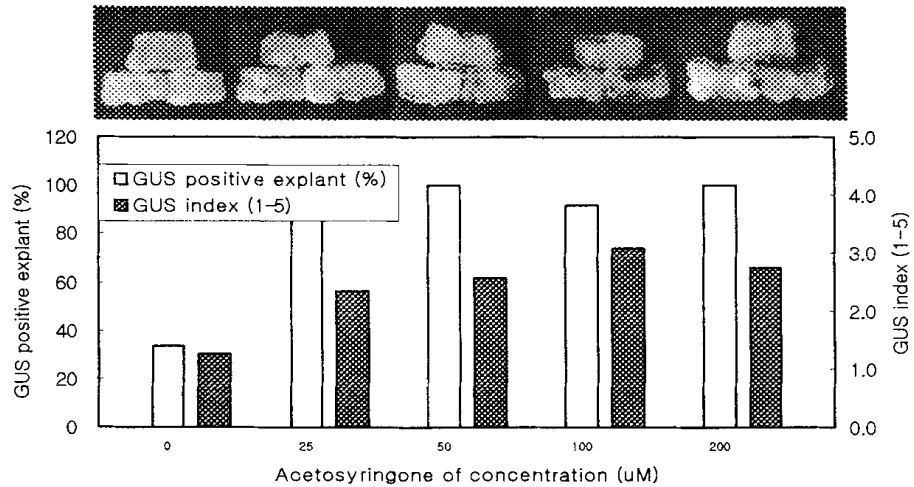


Figure 27. Effects of acetosyringone concentrations on transformation efficiency of bottle gourd cotyledon after *Agrobacterium* mediated transformation.



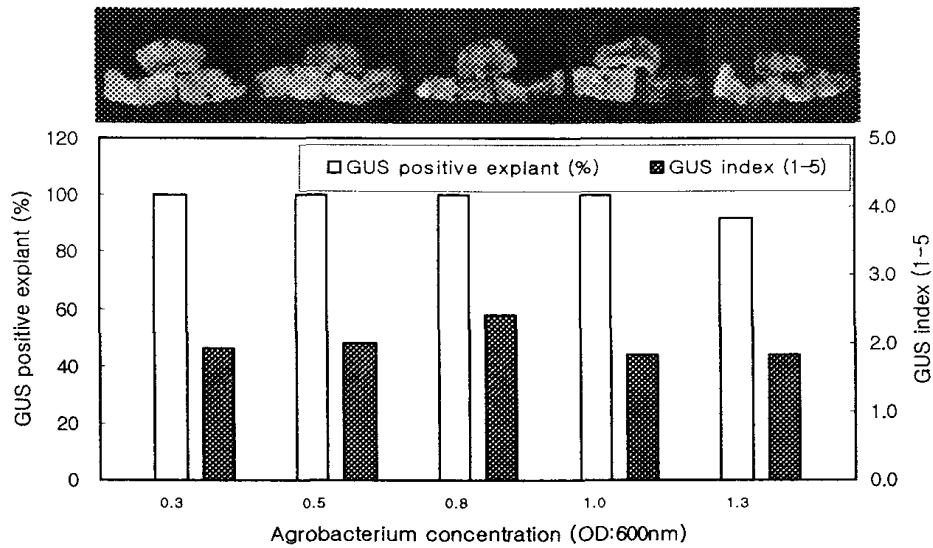


Figure 28. Effects of *Agrobacterium* concentrations on transformation efficiency of bottle gourd cotyledon after *Agrobacterium* mediated transformation.

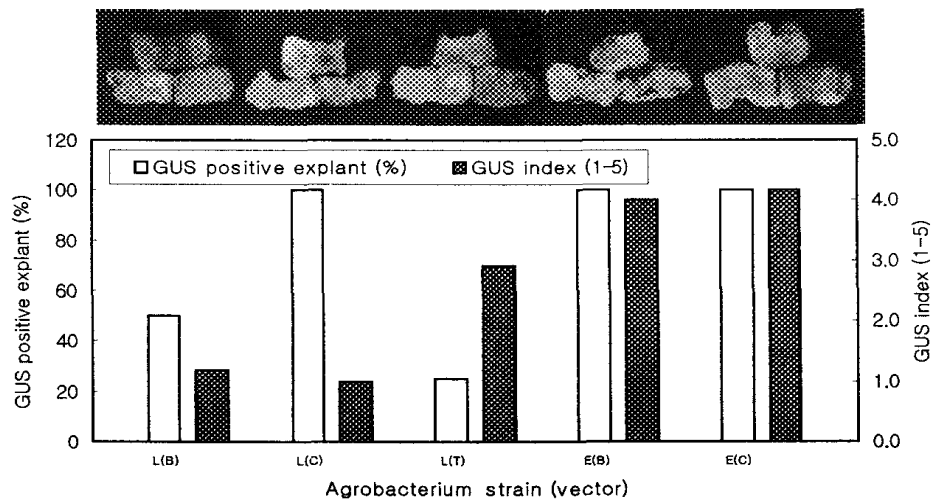


Figure 29. Effects of *Agrobacterium* strain and vector on transformation efficiency of bottle gourd cotyledon after *Agrobacterium* mediated transformation.

#### 다. 참박 형질전환

참박 형질전환에서는 pBI121 또는 pCAMBIA2301을 도입한 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 사용하였다. *Agrobacterium* 현탁액에 자엽 절편체를 침지하여 50rpm으로 25℃에서 10분간 접종하고, 여과지로 닦고 나서 항생제 무첨가 신초 재생배지에 절편체를 넣어 암상태에서 2일간 공조배양하였다. 이어서 자엽 절편체를 Cefotaxime(Cx) 500 mg/L가 첨가된 액체 신초 재생배지로 세척하고 여과지로 닦은 후 kanamycine 100 mg/L과 Cx 200 mg/L가 첨가된 재생배지에 치상하여 배양하였다. 접종 후 자엽 절편체를 X-Gluc가 첨가된 GUS 용액에 넣어 37℃에서 24시간 암상태로 반응시킨 후 청색의 spot을 조사하여 GUS 유전자의 발현을 조직화학적 방법으로 확인하였다.

참박의 자엽 절편체를 이용한 형질전환에서는 *Agrobacterium* strain으로 LBA4404를 사용하였는데, binary vector로 pBI121 또는 pCAMBIA2301가 도입된 것을 각각 사용하였다. *Agrobacterium* colony를 취하여 kanamycine 50mg/L가 첨가된 YEP 액체배지 28℃에서 진탕 배양하였고, 진탕배양한 *Agrobacterium* 현탁액은 OD(optimum density) 값이 0.8이 되도록 조절한 후 참박 형질전환에 이용하였다.

절편체는 발아된 종자의 자엽을 4조각으로 절단하여 *Agrobacterium* 현탁액에 접종 후 자엽 절편체를 여과지로 닦고 나서 신초재생배지(MS 무기염과 비타민, zeatin 0.5 mg/L, IAA 0.3 mg/L)에 절편체를 넣어 공조배양하였다. 공조배양 후 세척하여 신초재생배지에 항생제 kanamycine 100 mg/L, Cx 200 mg/L가 첨가된 선발배지에 치상한 후 배양하였다. *Agrobacterium*과 접종하지 않은 자엽 절편체는 항생제가 첨가된 배지와 첨가하지 않은 배지에 넣어 형질전환체 대조구로 사용하였다.

형질전환 1주일 후 절편체는 약간 뒤틀리는 현상을 보이며 처음 크기의 2배 이상 커졌다. 또한 절편체의 표면이 부풀어 오르며, 절단면 주위에 약간의 캘러스를 형성하였다. 2주 후에는 거의 모든 절편체에서 캘러스를 형성하였다. 3주 후에는 절단면에서 형질전환체라고 보여지는 작은 신초를 확인할 수 있었다(Fig. 30). 절편체에서 재생된 신초는 명조건으로 옮겨 배양하였을 때 점차 녹색을 띄었으며 신초 이외의 절편체 부위는 황백화되는 것으로 보아 형질전환된 것으로 판단되었다. 재생된 신초는 항생제의 농도를 높게 조절한 신초증식배지로 옮겨 증식하고 있다.

박과작물의 형질전환에서 참박 형질전환은 참박 ‘불사조’, ‘012’를 사용하였으며 5%내외로 형질전환 효율이 나타났다(Table 3). 형질전환 효율은 식물과 품종에 따라 다르게 나타났으며, 항생제도 적당한 농도를 사용하여 선발해야 될 것으로 사료

된다.

LBA4404(pCAMBIA2301)로 접종 후 10일 경과한 자엽 절편체 또는 접종 4주 후 캘러스가 형성된 자엽 절편체를 대상으로 GUS 유전자의 발현을 조직화학적 방법으로 분석하였다. 자엽 절편체를 X-Gluc가 첨가된 GUS 용액에 넣은 다음 37°C incubator에서 24시간동안 암상태로 반응시켰다. 반응이 끝난 후 자엽 절편체를 꺼내어 70% 에탄올로 탈색시킨 다음 청색의 spot을 조사하였다. 형질전환시킨 자엽 절편체를 선발배지에서 10일간 배양한 후 GUS 분석한 결과 자엽 절편체의 절단면에서 GUS 유전자가 부분적으로 발현되었다. 또한 소수의 자엽 절편체에서는 엽신에서 부분적으로 청색이 나타나기도 하였다(Fig. 30).

현재 불사조, inbred line 'GO701-2', 'GO701-3', 'GO702S-2' 참박에서 LBA4404/*PepMADS*로 형질전환을 유도한 절편체로부터 신초 재생이 이루어졌으며, 이어서 형질전환체 증식과정을 거쳐 형질전환 식물체 육성을 과정을 진행하고자 한다.

Table 3. Transformation frequency of different genotypes in bottle gourd. Cotyledon explants, transformed with LBA4404 (pBI121) or LBA4404(pCAMBIA2301) were cultured on selection medium contained 100 mg/L kanamycin and 200 mg/L cefotaxime.

Genotypes	<i>Agrobacterium</i> strain (vector)	Number of explants	Explant with callus(%)	Explant with shoots(%)	Shoot No. per explant
Bulsazo	LBA4404 (pBI121)	207	100	4.0	1.0
Go-701-2	LBA4404 (pBI121)	369	71.8	3.8	1.4
012	LBA4404 (pCAMBIA2301)	153	100	5.5	2.6

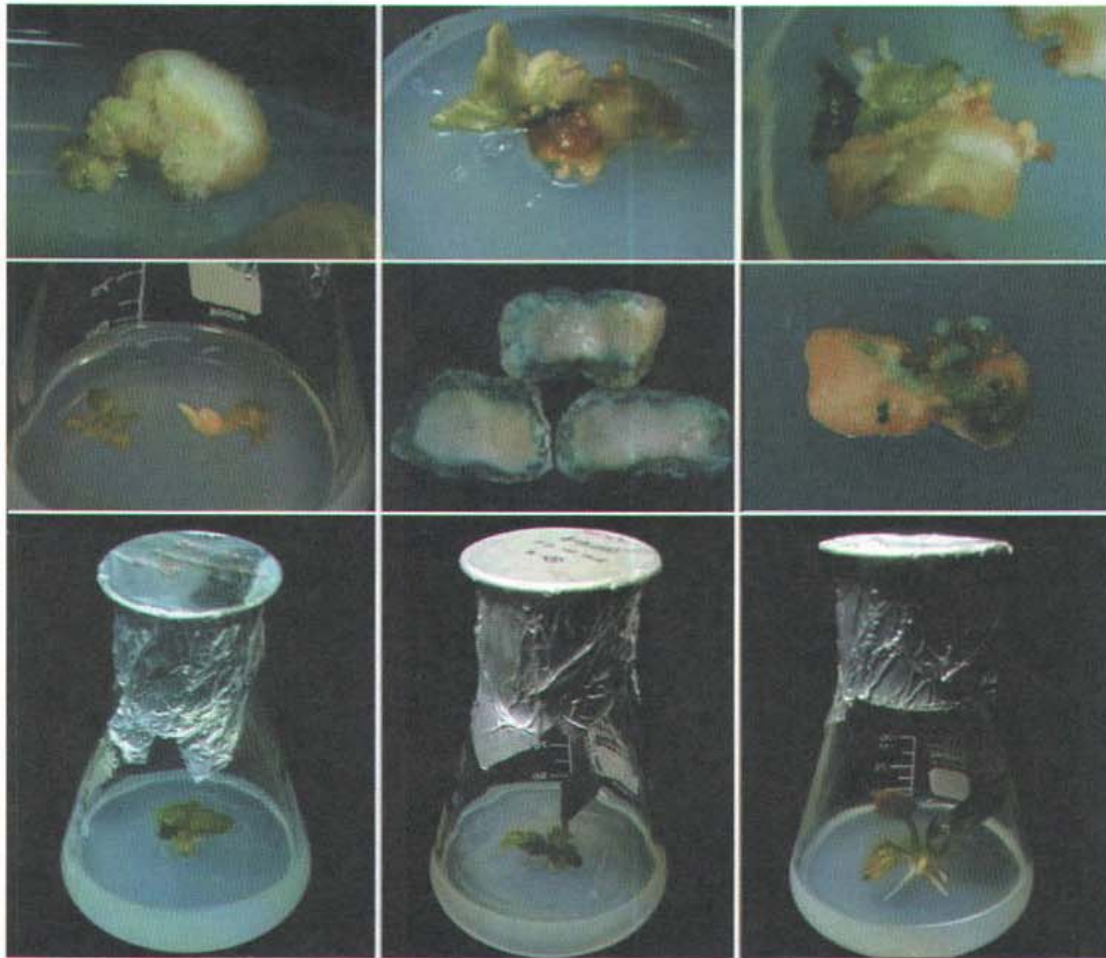


Figure 30. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledon explants and regeneration of transgenic plants in bottle gourd. (1-3) Cotyledon explant, transformed with LBA4404(pBI121) or LBA4404(pCAMBIA 2301), produced adventitious shoot on selection medium contained 100 mg/L kanamycin and 200 mg/L cefotaxime. (4) Putatively transformed shoot showed green color in selection medium. (5-6) After transformation, the explant showed successful expression of GUS gene, which produced blue color. (7-9) The regenerated shoot was elongated and rooted on selection medium.

#### 다. 참박 내병성 유전자 도입 형질전환체 개발

참박의 형질전환에서는 ‘불사조’, ‘GO701-2’ 등의 자엽 절편체를 이용하여 실시하였다. *Agrobacterium* strain으로 LBA4404 또는 GV3101을 사용하였는데, binary vector로 pBI121에 GUS 유전자를 제거하고 TPS/defensin/nos를 도입한 pTPS/defensin을 각각 사용하여 형질전환을 수행하였다.

절편체는 발아된 종자의 자엽을 절단하여 *Agrobacterium* 현탁액에 접종 후 자엽 절편체를 여과지로 덮고 나서 신초유도배지(MS배지, zeatin 0.5 mg/L, IAA 0.3 mg/L)에 절편체를 넣어 공조배양하였다. 공조배양 후 세척하여 항생제 kanamycine 100 mg/L, Cx 200 mg/L가 첨가된 신초유도배지인 선발배지에 치상한 후 배양하였다. *Agrobacterium*과 접종하지 않은 자엽 절편체는 항생제가 첨가된 배지와 첨가하지 않은 배지에 넣어 형질전환체 대조구로 사용하였다.

박과작물의 형질전환에서 참박의 신초 형성률은 ‘불사조’, ‘GO701-2’에서 5% 내외로 나타났다. 그러나, 참박에서 형질전환 이후 형성된 신초들은 kanamycine 100 mg/L가 첨가된 배지로 계대배양하였을 때 대부분 발달하지 못하고 백화 또는 갈변 피사하였으며 소수의 신초는 생존하였으나 생장이 상당히 저조하다. 이와 같이 박과작물에서 형질전환 이후 신초형성 효율은 품종과 내흔계에 따라 다르게 나타났으며, 앞으로 이를 해결하기 위해서는 현재에 비해 보다 높은 농도의 항생제를 사용하는 것이 진정한 형질전환체를 생산하는 방법이 되리라 생각된다.

참박 ‘불사조’와 ‘GO701-2’에서 GV3101(pTPS/defensin)와 GV3101(pTPS/*PepMADS*)를 이용한 형질전환을 수행하고 있다. 참박 ‘GO701-2’에서는 형질전환 이후 절편체로부터 신초 재생이 이루어진 상태이며, 이어서 계대배양을 통한 신초 증식과정을 거쳐 형질전환 확인 과정 및 포장 재배를 통한 내병성 검정, 종자생산에 대한 실험을 수행하고자 한다.

Table 4. Transformation frequency of different cultivars in bottle gourd. Cotyledon explants, transformed with GV3101 (pTPS/defensin), were cultured on selection medium contained 100 mg/L kanamycin and 200 mg/L cefotaxime.

Cultivar	<i>Agrobacterium</i> strain (vector)	Number of explants	Explants with callus(%)	Explants with shoots(%)	Shoot No. per explant
Bulsazo	GV3101 (pTPS/defensin)	894	100	3.0	1.1
Go-701-2	GV3101 (pTPS/ <i>PepMADS</i> )	252	64.2	1.0	1.0
Go-701-2	GV3101 (pTPS/defensin)	54	81.5	0	-

## 참고문헌

- Ando S., Sato Y., Kamachi S.I., Sakai S (2001) Isolation of a MADS-box gene(ERAF17)and correlation of its expression with the induction of formation of female flowers by ethylene in cucumber plants(*Cucumis sativus* L.) *Planta* 213:943-952
- Chaturvedi R., Bhatnagar S.P. (2001) High-frequency shoot regeneration from cotyledon explants of watermelon cv. Sugar Baby. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37:255-258
- Choi P.S., Soh W.Y., Kim Y.S., Yoo O.J., Liu J.R (1994) Genetic transformation and plant regeneration of watermelon using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 13: 344-348
- Chee P.P. (1990) Transformation of *Cucumis sativus* tissue by *Agrobacterium tumefaciens* and the regeneration of transformed plants. *Plant Cell Rep.* 9:245-248
- Clough G.H., Hamm P.B. (1995) Coat protein transgenic resistance to watermelon mosaic and zucchini yellows mosaic virus in squash and cantaloupe. *Plant Disea* 1107-1109
- Compton M.E. (2000) Interaction between explant size and cultivar affects shoot organogenic competence of watermelon cotyledons. *HortScience* 35:749-750
- Compton M.E., Gray D.J. (1994) Adventitious shoot organogenesis and plant

- regeneration from cotyledons of tetraploid watermelon. HortScience. 29:211-213
- Dabauza M., Bordas M., Salvador A., Roig L.A., Moreno V. (1997) Plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledon explants of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. Plant Cell Rep. 16:888-892
- Dong J.Z., Jia S.R. (1991) High efficiency plant regeneration from cotyledons of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schard.). Plant Cell Rep. 9:559-562
- Fang G, Grumet R (1990) *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of muskanamycineelon plants. Plant cell Rep. 9:160-164
- Fuchs M (1998) Comparative virus resistance and fruit yield of transgenic squash with single and multiple coat protein genes. Plant Disea. 82(12):1350-1356
- Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. Plant J. 6:271-282
- Hoekema A, Hirsch P.R., Hooykaas P.J.J., Schilperoort R.A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. Nature 303:179-180
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. (1987) GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6:3901-3907
- Kim C.S., Lee C.H., Shin J.S., Chung Y.S., Hyung N.I (1997) A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. Nucleic Acids Res. 25:1085-1086
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497
- Sarmiento G.G., Alpert K., Tang F.A., Punja Z.K. (1992) Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and expression of kanamycin resistance in pickling cucumber. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 31:185-193
- Srivastava D.R., Andrianov V.M., Piruzian E.S. (1989) Tissue culture and plant regeneration of watermelon (*Citrullus vulgaris* schrad, cv. Melitopolski). Plant Cell Rep. 8:300-302
- Valles M.P., Lasa J.M. (1994) *Agrobacterium*-mediated transformation of commercial melon (*cucumis melo* L., cv. Amarillo Oro). Plant Cell Rep. 13:145-148
- Vesna K, Sibila J, Tatjana B.P, Chantal D (1991) Host-tissue differences in transformation of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 24:35-42