

Development of Molecular Markers for Alternative Oxidase Synthesis Genes in *Brassica rapa* L.

Ye Sol Jeong and Sang-Min Chung*

Department of Life Science, Dongguk University-Seoul, Seoul, 100715, Korea

Received November 16, 2009 / Accepted November 27, 2009

The low and high temperature stress might affect the yield and quality of many crop species. Alternative oxidase (AOX) gene is known as factors related to stress resistance in plants. In order to develop molecular markers related to stress resistance in Chinese cabbage, fifteen ESTs sharing sequence similarity to arabidopsis AOX genes were found using *Brassica rapa* EST database from NCBI. The polymorphic DNA sequences using the ESTs were then screened between Chinese cabbage, 'Chiifu' and 'Kenshin'. We found four ESTs that have either insertion or deletion between the two cultivars. These polymorphic sites were then targeted for development of the four PCR based molecular markers. These molecular markers developed in this study could be useful for a test of their relationship with abiotic stress resistance in Chinese cabbage.

Key words : Chinese cabbage, abiotic stress, alternative oxidase, molecular marker

서 론

*Brassica*속은 씨앗을 이용한 오일, 야채, 및 조미료로 이용되는 작물 등을 포함한다[8,10]. 그 중 배추, *Brassica rapa* L. (2n=20, genome AA)는 김치의 주재료로 국내뿐 아니라 세계 시장에서도 식품영양학적 우수성을 인정받아 그 수요가 증가하고 있다[9,14]. 배추는 호냉성 채소로 생육적온인 20°C 이상이 되면 생육이 약해지며 이러한 고온 스트레스는 생산량 및 품질 저하를 유발할 수 있다[5,6,11]. 또한 재배 적온보다 기온이 낮아지면 동해를 입게 되며 작물의 생산력을 저하시키는 요인이 될 뿐만 아니라[5,6,7] 작물종이 생산되는 지리적 위치를 제한하는 등 수확량에 영향을 미쳐 경제적 손실을 입게 한다[17].

고온 또는 저온 스트레스가 작용하는 환경에서 활성산소종의 과다한 축적을 방지해 식물체의 활동을 개선하는 것으로 추측되는 기능성 유전자인 Alternative oxidase (AOX) gene은 식물에 있는 전자전달계의 일부분을 형성하는 효소이다[13,18]. AOX 유전자의 발현은 저온스트레스, 활성산소종, 그리고 병원체의 침입 등에 영향을 주는 것으로 알려져 있는데 아마도 산화 스트레스의 감소를 통해 환경 스트레스에 대한 내성 향상을 강화할 것으로 추측된다[12,19]. Alternative oxidase는 미토콘드리아내막에 붙어있는 필수 막단백질로 추위와 같은 스트레스가 작용하는 환경 속에서 활성 산소종의 과다한 축적을 방지함으로써 식물체의 활동을 개선할 것으로 추측된다[3]. 고베대학의 Shigeo Takumi의 연구논문에 의하

면 AOX는 스트레스를 유발하는 환경에서 모든 조직 내의 과다한 활성산소종의 형성을 방지하며 대사 작용에도 영향을 미칠 수 있는 것으로 발표하였다[16].

많은 연구진들이 작물 생산성을 증가시키고 작물의 재배 가능 지역을 확장 시키고자 스트레스를 유발하는 저온 또는 고온 환경에서 작물의 저항성을 개선시킨 새로운 품종 개발에 노력하고 있다. 스트레스 저항성 형질을 감수성 품종에 도입하기 위해서 많은 시간과 비용이 필요하므로 이를 극복하기 위해 고안된 것이 바로 DNA marker를 이용한 선발이다. 이러한 마커에는 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 마커가 많이 사용되고 있다[2,15].

이러한 경향에 맞춰 본 연구는 배추 내서성 육종에 적용이 가능한 스트레스 저항성 관련 분자마커개발을 위해 AOX 유전자와 관련된 다형성 분자 마커를 개발하였다. 이를 이용하여 장기적으로 저온 저항성에 직접적으로 연관된 DNA 마커 개발을 하여 환경 스트레스 저항성 배추품종개발에 기초연구 자료로 활용될 수 있다고 생각된다.

재료 및 방법

배추의 AOX 합성 관련 유전자 검색

애기장대의 AOX 합성 관련 유전자를 NCBI 데이터베이스를 이용하여 찾았다[4]. 애기장대에서 찾은 AOX 합성 관련 유전자의 염기서열을 이용하여 EST 데이터베이스를 이용해 검색을 하였으며, *Brassica rapa*로 제한을 두고, *Brassica rapa*가 아닌 것은 모두 제거를 하였다. 그 결과 얻은 ESTs를 서로 비교를 하였으며, 동일염기서열을 보이는 ESTs들은 제거하여 총 15개의 ESTs를 얻을 수 있었다(Table 1). '지부(Chiifu)'와 '권

*Corresponding author

Tel : +82-2-2260-8915, Fax : +82-2-2260-8915

E-mail : smchung@dongguk.edu

Table 1. Fifteen ESTs sharing sequence similarity to alternative oxidase synthesis genes in *Brassica rapa* L. and primers used for PCR amplification

EST Genbank number	Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')	Tm (°C)
EX101395	AO6-F	ATA ACG ATG ATG AGT CGC G	49
	AO6-R	TCA ATG TTA CCT TTG TCA AGC	49
EX035208	AO7-F	ACC GCC ACT ACG AGC A	49
	AO7-R	AAC TTG GGG GAG ATC AAG T	49
DN963778	AO8-F	ACC TGC TCC GGC TAT C	49
	AO8-R	ACA AGT GAA AGG AGA GGC	48
EX098853	AO9-F	ATT TCC TAT ATT CTT GGA TTT TTC G	49
	AO9-R	CTC CTT GGA CAG TGA TGA	48
ES930525	AO10-F	GAC AAC ACA AAC GTT AAC GG	50
	AO10-R	TCA AAG CGC CTG AGA GAT	48
EX037292	AO11-F	AGC AAA TTA TAA CAT TCA AGG AC	48
	AO11-R	TCA TGA CGT TCA TGG AAG TC	50
EX017473	AO12-F	AAA AGA TTT CTC TTG CTA TAT TAT TG	49
	AO12-R	TCA AAG CGC CTG AGA GAT	48
DN966218	AO13-F	CTG CTC CGG CTA TCG C	51
	AO13-R	ACA AGT GAA AGG AGA GGC	48
EX032531	AO14-F	ATT ANC CTG AGA ATA TAA TGA TAA A	46 to 48
	AO14-R	CGG CGG TGC CAG GAA	50
EX025740	AO15-F	GGC GNT TTT TAA AAA CAT AGG	47 to 49
	AO15-R	TCA TGA CCT TCA TCG AGC	48
CX269727	AO16-F	GGA CCG TGT GAC AAG ACA	50
	AO16-R	GAG ATC GGT CGG CCA A	49
BG543987	AO17-F	CCC CGC GTC CGG AAA	50
	AO17-R	ACG AAA GAT TTA CAG TCC AAT AA	48
EX094755	AO18-F	TTG GAC ATA ACC AAT CTG AAG	49
	AO18-R	GCC TCT TCG AGC AAG G	49
EX064270	AO19-F	CTC CAA ACC CAT CTG TTG	48
	AO19-R	TGA ACC GGT ATC TTC AGA G	49
EX033258	AO20-F	AGA TTT GTC CGA ACA CTC TAC	50
	AO20-R	TCG GCT CAA CNC CCC AA	49 to 52

심(Kenshin)'의 염기서열을 비교하기 위해 각 EST에 그 양 끝 염기서열을 이용하여 포워드 프라이머와 리버스 프라이머를 각각 제작하였다(Table 1).

식물 DNA 정제

한국배추계농소재은행으로부터 분양받은 고온 스트레스에 약한 품종 '지부'와 비교적 강하다고 알려진 '권심'의 배추 종자를 받아서 키운 후 어린잎을 수확하고 CTAB method를 이용해 DNA를 추출하였다. 곱게 마쇄된 시료에 CTAB buffer를 750 μ l을 가하고 30초 vortexing 하여 추가로 60°C에서 1시간 배양하였다. 750 μ l phenol:chloroform:isomyl alcohol (25:24:1)을 넣고 15초 vortexing, 5분 원심분리 하였다. 얻은 상층액을 2 ml tube로 옮긴 후 두 번에 걸쳐 chloroform:isomyl alcohol (24:1) 용액으로 세척한 후 EtOH를 900 μ l 넣고 -70°C

에서 1시간 보관 후에 4°C에서 10분간 원심분리 하였다. DNA 펠렛을 확인한 후 상층액을 버리고 자연건조를 시켰다. 추출된 DNA는 증류수 50 μ l로 현탁시켰다.

중합효소연쇄반응(PCR)과 gel 전기영동

CTAB method를 이용하여 얻은 '지부'와 '권심' DNA를 각각 디자인한 프라이머를 이용하여 PCR증폭을 하였다. PCR에 사용된 모든 시약은 솔젠트 회사의 e-taq kit를 사용하였다. 증폭에 이용된 DNA는 15 ng이고 total volume은 15 μ l로 10 mM dNTP 0.3 μ l, 10 \times buffer는 1.5 μ l, taq polymerase는 0.4 unit으로 0.08 μ l, 100 μ M의 Forward primer, Reverse primer 각각 1 μ l, '지부'와 '권심'의 DNA는 15 ng을 사용하였다. PCR은 93°C에서 3분 후 93°C에서 30초, 50°C에서 1분, 68°C에서 3분 과정을 40회 반복하고, 72°C 7분 후 종료 또는 5°C에서

보관되었다. 증폭된 DNA는 2% 아가로스 gel에서 전기영동을 이용해 DNA 조각의 크기를 확인하였다.

염기서열분석과 유전자 다형성분석

PCR 증폭을 해 얻은 DNA를 쏘렌트(주)에 염기서열분석을 의뢰하였다. 얻어진 염기서열분석 결과는 staden package 프로그램(<http://staden.sourceforge.net/>)을 이용하여 ‘지부’와 ‘권심’ 간 염기서열을 비교하였다.

결과 및 고찰

염기 서열 분석을 위해 PCR 증폭을 위해 사용한 프라이머 목록은 Table 1과 같다. PCR 증폭 후 아가로스 gel 상에서 DNA 크기 차이(Fig. 1)를 보이는 EST DNA 증폭 밴드를 확인하여 사용된 프라이머가 직접 분자 표지로 이용 가능함을 확인할 수 있었다. 아가로스 gel 상에서 DNA 크기 차이를 확인

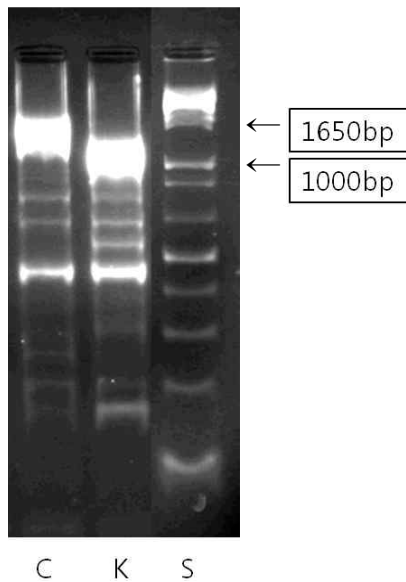


Fig. 1. Agarose gel analysis of codominant AO10 marker. C: Chiifu, K: Kenshin, S: Size-marker

할 수 없었던 나머지 AOX 관련 유전자 증폭 DNA는 염기서열 분석을 통해 insertion 또는 deletion (In/del) 및 SNP 다형성 유무를 확인하였다. 염기서열 분석은 쏘렌트(주)에 의뢰를 하였으며 얻어진 염기서열을 이용하여 SNP와 In/del 분석은 staden package program을 이용하여 수행했다. 이러한 AOX 합성 관련 유전자 염기서열 비교에서 세 개의 in/del이 추가로 발견되었다(Fig. 2).

In/del이 있는 경우(예: AO8, AO9, AO11) in/del을 대상으로 가까운 주변 염기서열에서 프라이머를 제작하였다(Table 2). PCR 증폭되는 DNA 크기는 300 bp 이하가 될 수 있도록 프라이머 위치를 제한하여 상대적으로 작은 PCR 증폭 DNA 크기에서 in/del로부터 나타나는 염기서열 크기 차이를 관찰이 가능하도록 하였다(Figs. 2, 3). AO8과 AO11의 경우 ‘지부’ ‘권심’간 5 bp 차이를 보이므로 젤 전기영동 시 200 volt에서 2시간 이상의 충분한 시간으로 이동시켜야 젤 상에서의 크기 차이를 구분할 수 있다. 이러한 결과는 염기서열 분석처럼 높은 비용과 고가의 장비 없이 다형성을 분석할 수 있으며, DNA 마커들은 유전적 다양성 및 유전자 지도 작성 등에 유용하게 활용될 수 있다.

본 연구에서 개발한 *Brassica rapa*의 AOX 마커의 경우, 각기 다른 AOX 유전자이지만 유사한 EST들이 많아 이를 마커로 개발하는데 어려움이 있었다. 다른 AOX ESTs에서 하나의 프라이머 페어를 사용해서 여러 개의 DNA 밴드가 증폭되는 경우는 추 후 클로닝을 통한 염기서열 분석을 수행하여 추가로 다형성을 확인하고 분자마커를 개발해야 할 필요성이 있는 것으로 생각된다.

AO8	Chiifu	TGACCAAATC****CTAACCCCTAACATTGTC*TGTTGTGATTA
AO8	Kenshin	TGACCAAAC CTAA CTAACCCCTTGCATTGTC TT GTGTGATTA
AO9	Chiifu	ACGAATCATCCACCGG*****AGGTAACAAAGGAATCG
AO9	Kenshin	ACGAATCATCCACTGG AGGCAACA AGGTGAGCAAAGGTATTG
AO11	Chiifu	TAATCACACA*GACAATGTTAGGGTTAG***GATTTGGTCA
AO11	Kenshin	TAATCACACA AG ACAATGCAAGGGTTAG TTAG TTTTGGTCA

Fig. 2. Nucleotide sequence alignment of AO8, AO9, and AO11 showed insertion or deletion. The bold letters indicate polymorphic sites.

Table 2. Polymorphic DNA markers of ESTs sharing sequence similarity to AOX synthesis genes in *Brassica rapa* L.

AOX marker (EST Genebank number)	Primer names	Nucleotide sequence (5' → 3')	Tm (°C)	Polymorphic pattern
AO8 (DN963778.1)	AO8-F	ACCTGCTCCGGCTATC	49	length polymorphism
	AO8-R'	CGACCTTGGTAGTGAATGT	49	
AO9 (EX098853.1)	AO9-F'	AGCGTGAACACTTGGATCT	49	length polymorphism
	AO9-R'	GTAATCATCAAGAGTAACGATTG	51	
AO10 (ES930525.1)	AO10-F	GACAACACAAACGTTAACGG	50	length polymorphism
	AO10-R	TCAAAGCGCCTGAGAGAT	48	
AO11 (EX037292.1)	AO11-F'	GCTGGAGCTTCCTTTAG	43	length polymorphism
	AO11-R'	CCATTTTGCATCTGTAAGTG	48	

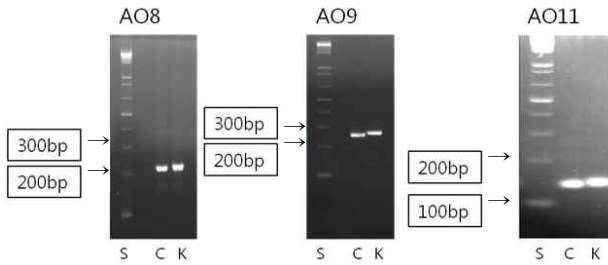


Fig. 3. Agarose gel analysis of AO8, AO9, AO11 markers. C: Chiifu, K: Kenshin, S: Size-marker

앞서 연구된 벼에서의 AOX 관련 유전자에 대한 논문에 따르면, OsAOX1a가 저온 내성에 관련되며, QTL에 매우 조밀하게 존재해 서로 연관되어 있는 것을 밝혀냈다[1]. 따라서 본 연구에서는 배추작물에서 내냉성, 내서성 및 환경 스트레스 저항성 품종 육성에 사용할 수 있는 마커개발을 위해 배추의 AOX 합성 관련 EST를 대상으로 '지부'와 '권심' 사이에서 다형성을 보이는 4개의 분자 마커를 개발하였는데 이러한 마커들은 연구자가 손쉽게 이용이 가능한 PCR 증폭 분자 마커이다. 이는 앞으로 배추작물의 AOX 유전자가 스트레스를 유발하는 환경 하에서 어떤 세포기작을 이끌어 내는 지에 대한 연구와 환경 내성 형질과 어떤 연관관계를 가지는지를 조사하는데 중요한 자료로 활용될 수 있으며 또한 환경 스트레스 저항성 배추 품종을 개발하는데 있어서 중요한 육종 도구로써 사용될 수 있다고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림기술관리센터 배추분자마커사업단 지원에 의하여 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

References

- Abe, F., K. Saito, K. Miura, and K. Toriyama. 2002. A single nucleotide polymorphism in the alternative oxidase gene among rice varieties differing in low temperature tolerance. *FEBS Lett.* **527**, 181-185.
- Ayeh, K. O. 2008. Expressed sequence tags (ESTs) and single nucleotide polymorphism (SNPs): Emerging molecular marker tools for improving agronomic traits in plant biotechnology. *Afr. J. Biotechnol.* **7**, 331-341.
- Berhold, D. A. and P. Stenmark. 2003. Membrane-bound diiron carboxylate proteins. *Annu. Rev. Plant Biology* **54**, 497-517.
- Daisuke, S., E. Nambara, S. Naito, N. Tsutsumi, A. Hirai, and M. Nakazono. 1997. Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **35**, 585-596.
- Kim, M. J. and J. S. Chun. 2005. Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis. *Int. J. Food Microbiol.* **103**, 91-96.
- Kim, Y. S., Z. B. Zheng, and D. H. Shin. 2008. Growth inhibitory effects of kimchi (Korean traditional fermented vegetable product) against *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus*. *J. Food Prot.* **71**, 325-332.
- Kreps, J. A., Y. Wu, H. S. Chang, T. Zhu, X. Wang, and J. F. Harper. 2002. Transcriptome changes for arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiology* **130**, 2129-2141.
- Labana, K. S. and M. L. Gupta. 1993. Importance and origin, pp. 1-20, In K. S. Labana, S. S. Banga, and S. K. Banga (eds.), *Breeding Oilseed Brassicas*, Springer-Verlag Press, Berlin.
- Lagercrantz, U. and D. Lydiate. 1996. Comparative genome mapping in brassica. *Genetics* **144**, 1903-1910.
- Levadoux, W. L., M. L. Kalmokoff, M. D. Pickard, and J. W. D. GrootWassink. 1987. Pigment removal from canola oil using chlorophyllase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **64**, 139-144.
- Mahmud, T. M. M., J. G. Atherton, C. J. Wright, M. F. Ramlan, and S. H. Ahmad. 1999. Pak Choi (*Brassica rapa* ssp. *Chinensis* L.) quality response to pre-harvest salinity and temperature. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 1698-1702.
- Maxwell, D. P., Y. Wang, and L. McIntosh. 1999. The alternative oxidase lower mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8271-8276.
- McDonald, A. E. and G. C. Vanlerberghe. 2004. Branched mitochondrial electron transport in the animalia: Presence of alternative oxidase in several animal phyla. *IUJMBM Life* **56**, 333-341.
- Nagaharu, U. 1935. Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Jpn. J. Bot.* **7**, 389-452.
- Prasad, M., R. K. Varshney, J. K. Roy, H. S. Balyan, and P. K. Gupta. 2000. The use of microsatellite for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. *Theor. Appl. Genet.* **100**, 584-592.
- Sugie, A., N. Naydenov, N. Mizuno, C. Nakamura, and S. Takumi. 2006. Overexpression of wheat alternative oxidase gene *Waox1a* alters respiration capacity and response to reactive oxygen species under low temperature in transgenic *Arabidopsis*. *Genes Genet. Syst.* **81**, 349-354.
- Thomashow, M. F. 1998. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol.* **118**, 1-8.
- Umbach, A. L., F. Fiorani, and J. N. Siedow. 2005. Characterization of transformed arabidopsis with altered alternative oxidase levels and analysis of effects on reactive oxygen species in tissue. *Plant Physiol.* **139**, 1806-1820.
- Vanlerberghe, G. C. and L. McIntosh. 1997. Alternative oxidase: From gene to function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 703-734.

초록 : 배추 alternative oxidase 합성 유전자와 연관된 분자마커 개발

정예슬 · 정상민*

(동국대학교-서울 생명과학과)

작물의 수량과 품질은 저온 및 고온 스트레스에 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 배추에서의 스트레스 저항성과 연관된 분자마커를 개발하기 위하여 저온에서의 스트레스 저항성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있는 alternative oxidase (AOX) 합성 유전자 관련 분자 마커를 개발하였다. 총 15개의 AOX 합성 유전자와 관련된 *Brassica rapa* ESTs를 arabidopsis AOX 합성 유전자 염기서열을 이용하여 찾을 수 있었다. 이를 이용하여 고온에서 상대적으로 약한 '지부'품종과 상대적으로 강한 '권심' 사이에서 DNA 염기서열을 조사하여 4개의 ESTs에서 insertion 또는 deletion을 찾았고 PCR로 확인 가능한 4개의 공동우성 마커를 개발하였다. 본 연구에서 개발된 분자마커는 배추 작물에서 환경스트레스 저항성과 유전적 연관성을 확인하는데 유용하게 사용될 수 있다고 기대된다.