

## 배 검은별무늬병(*Venturia nashicola*) 고도 저항성 ‘93-3-98’ 유래 PR-10 유전자의 특성

천재안 · 김세희 · 조강희 · 김대현 · 최인명 · 신일섭

### Characterization of PR-10 gene derived from highly resistant ‘93-3-98’ pear inoculated with scab (*Venturia nashicola*)

Jae An Chun · Se Hee Kim · Kang Hee Cho · Dae Hyun Kim · In Myong Choi · Il Sheob Shin

Received: 18 March 2015 / Revised: 18 March 2015 / Accepted: 18 March 2015

© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** A *PyrpPR-10* gene with differentially expressed was isolated by using the suppression subtractive hybridization assay between ‘93-3-98’ (highly resistant against scab caused by *Venturia nashicola*) and ‘Sweat Skin’ (highly susceptible) and analyzed the expression pattern according to organs and cultivars. The full length of *PyrpPR-10* was cloned as 743bp with 480bp’s ORF, and was determined to encode a protein of 159 amino acid residues. On analyzing *PyrpPR-10* gene sequence compared with resistant and susceptible cultivars, ‘Hwangsilri’ (resistant), ‘Gamcheonbae’ (moderately resistant), ‘Wonhwang’ (moderately susceptible), ‘Niitaka’ (highly susceptible), and ‘Sweat Skin’ (highly susceptible) had identical gene sequence but ‘Bartlett’ (highly resistant) showed partly different sequences. The deduced amino acid sequence showed 64 ~ 98% homology and had the GXGGXG motif to known amino acid of other plants PR-10 by the BLAST X analysis. Among several organs or tissues, petal was showed highest expression level of *PyrpPR-10* gene followed by leaf, floral axis, bud, and bark. The expression level of *PyrpPR-10* gene was dramatically increased at 24 hr after inoculation in all cultivars and also up-regulated in accordance with resistant degree of cultivars. While resistant

cultivars (‘Bartlett’, ‘93-3-98’, and ‘Hwangsilri’) induced relatively high expression level of *PyrpPR-10* gene, susceptible cultivars (‘Niitaka’, and ‘Sweat Skin’) showed low expression level. *PyrpPR-10* gene is assumed that it is directly connected with defense mechanisms to pear scab.

**Keywords** *PyrpPR-10*, Gene expression, Resistant degree, Pear Scab

### 서론

식물은 곰팡이, 박테리아, 바이러스와 같은 다양한 병원체에 끊임없이 노출되며 방어반응에 관련된 단백질의 발현을 유도한다. 이러한 단백질 중 pathogenesis-related (PR) 단백질은 병원체와 환경스트레스 의해 유도되는 것으로 알려져 있으며 (Van Loon and Van Strien, 1999) 단백질의 구조와 생화학적 활성에 기초하여 17개의 family로 분류되어 있다 (Sels *et al.* 2008). 미나리 배양 세포에서 곰팡이 전구체 처리를 통해 최초로 분리된 (Somssich *et al.* 1986) PR-10 단백질은 병원체에 대한 방어 뿐만 아니라 식물의 발달에도 관여하며 (Sikorski *et al.* 1999) 대부분의 PR 단백질은 세포외에 존재하는 반면 PR-10 단백질은 일반적으로 세포내에 존재하며 16 ~ 19 kDa의 작은 크기의 산성 단백질이다 (Liu and Ekramoddoullah, 2006). 또한 PR-10 단백질은 ribonuclease-like 활성부위에 따라 100개 이상의 다른 단백질이 분리되었으나 생물학적 기능은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다 (Wen *et al.* 1997). 하지만 Moiseyev *et al.* (1994)은 인삼에서 분리한 ribonuclease의 아미노산 서열과 PR-10 단백질이 높은 상동성을 가지며 발현 양상이

J. A. Chun · S. H. Kim · K. H. Cho · D. H. Kim · I. M. Choi  
농촌진흥청 국립원예특작과학원 과수과  
(Fruit Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Suwon 440-706, Korea)

I. S. Shin (✉)  
농촌진흥청 국립원예특작과학원 배 연구소  
(Pear Research Station, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Naju, 520-821, Korea)  
e-mail: shinis3@korea.kr

유사하여 PR-10 단백질이 가지는 RNase 활성이 방어 반응과 관련된다고 하였다. 이러한 RNase 활성은 병원체 감염 부위의 세포사멸(programmed cell death) 또는 병원체에 대해 직접적으로 작용함으로써 식물체를 보호하는 것으로 생각되며 *in vitro* 실험을 통하여 Bet v 1 (Bufe *et al.* 1996), LaPR-10 (Bantignies *et al.* 2000), GaPR-10 (Zhou *et al.* 2002), CaPR-10 (Park *et al.* 2004), ZmPR-10, ZmPR-10.1 (Xie *et al.* 2010) 등 일부 PR-10 단백질이 RNase 활성을 가지는 것이 확인되었다. 또한 Fujimoto *et al.* (1998)은 PR-10 단백질의 사이토키닌 특이적 결합 활성을 보여주었으며 Srivastava *et al.* (2004)은 *Brassica napus*에서 분리한 PR-10 유전자의 구성적 발현을 통해 내염성이 증가된다고 하였다. 이들 결과로 보아 일부 PR-10 단백질은 병원체에 대한 방어반응 뿐만 아니라 내생 사이토키닌의 수준을 조절함으로써 식물의 생장과 발달에도 관여하는 것으로 생각된다. *Venturia nashicola*에 의해 발생하는 배 검은별무늬병은 남방형 동양배(*Pyrus pyrifolia*)와 북방형 동양배(*P. ussuriensis*, *P. bretschneideri*)에 많은 피해를 주며(Park *et al.* 2000), 특히 우리나라 주 품종인 ‘신고’는 본 병에 고도 감수성으로 농가에 많은 경제적 부담을 주고 있어 고도 저항성 유럽배(*Pyrus communis* L.)의 유전자를 동양배에 도입하기 위한 분자생물학적 기작을 이해하기 위해 저항성 품종과 감수성 품종간의 특이적으로 발현되는 유전자에 대한 연구가 진행되고 있다(Faize *et al.* 2004; Shin *et al.* 2012; Zheng and Ishii. 2009). 본 연구에서는 SSH 분석을 통하여 검은별무늬병 고도 저항성 ‘93-3-98’에서 차등적으로 발현하는 *PyrpPR-10* 유전자를 선별하여 염기서열을 분석하고 분자적 특성에 대하여 조사하였다. 또한 Real-time PCR를 통하여 저항성 품종 특이적 발현과 기관 특이적 발현을 분석함으로써 유전자의 기능을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

SSH 분석을 위해 *V. nashicola*에 고도 저항성 ‘93-3-98’과 고도 감수성 ‘스위트스킨’을 시험재료로 사용하였으며 접종 후 전엽 20일 미만의 유엽을 사용하였다. 시험수는 원예작물을 위한 상업적 배지(서울바이오, 순천, 한국)로 채워져 있는 7.6 L 플라스틱 포트에 재식된 *P. pyrifolia* 대목에 접종하여 병 처리까지 주야온도가 30°C/12°C로 유지되는 유리온실에 보존하였다. 차등발현 유전자의 발현은 *V. nashicola*에 대하여 저항성 정도가 다른 ‘Bartlett’ (고도 저항성), ‘93-3-98’ (고도 저항성), ‘황실리’ (저항성), ‘감천배’ (중도 저항성), ‘원황’ (감수성), ‘신고’ (고도 감수성),

‘스위트스킨’ (고도 감수성) 간 비교하였다.

### 분생포자 인공접종 및 시료채취

전남 나주에 소재한 국립원예특작과학원 배연구소에서 검은별무늬병이 발병된 ‘신고’ 잎에서 분생포자를 채취하였고 멸균수로 현탁하여 -80°C에 냉동 보관하였고 이것을 약 20°C에서 녹인 후 0.1% sucrose와 Tween 80을 첨가하여 접종원으로 사용하였다. 접종원을  $1 \times 10^5$  분생포자/mL 농도로 10개 내외의 잎이 완전히 전개된 1년생 접목묘(6주 이상/품종)의 수관 전체에 분무 접종하였으며 대조구 식물체는 0.1% sucrose와 0.005% Tween 80을 포함하는 멸균수를 분무하였다. 접종 후 각 접목묘를 20°C, 상대습도 100% 습실 내에서 48시간을 유지한 후 50% 정도 차광된 온실에 두었다. 최초 접종 후 0, 24, 48, 72, 96, 120 및 144시간 간격으로 잎을 채취하였으며 액체 질소에 담근 후 -80°C의 냉동고에 보관하였다(IIShinBioBase, Dong DuCheon, Kyenggi-do, Korea). 기관 특이성 분석을 위하여 잎, 꽃잎, 꽃대, 수피, 눈은 11년생 나무로부터 채취하였다.

### RNA 분리 및 cDNA 합성

RNA를 추출은 변형된 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 방법과 lithium chloride (LiCl) 침전방법을 사용하였다(Iandolino *et al.* 2004). 액체질소 상태에서 마쇄된 잎은 CTAB buffer [2% CTAB, 2% polyvinylpyrrolidone, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM EDTA, 2M NaCl]를 첨가한 후 65°C에서 30분간 반응하였다. 두 번의 chloroform/isoamyl alcohol를 처리하여 상징액을 추출하였으며 3M LiCl를 첨가한 후 4°C에서 overnight 처리하고 4°C, 13,000 rpm, 30 min간 원심분리하여 pellet을 형성시켰으며 상징액을 제거한 후 SSTE buffer [1M NaCl, 0.5% SDS, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), and 1 mM EDTA (pH 8.0)]를 넣어 65°C에서 완전히 용해하였다. 동량의 Chloroform:IAA (24:1)를 첨가한 후 4°C, 13,000 rpm, 30 min간 원심분리하여 상징액을 추출하였으며 100% 에탄올 2(v/v)을 첨가한 후 -20°C에서 30분간 반응시켜 RNA를 농축하였다. 전기영동을 이용하여 분리된 RNA의 분해 정도를 확인하였으며 spectrophotometer 260/280nm에서 정량하고 SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA)을 사용하여 1 µg의 RNA로부터 cDNA를 합성하였다

### SSH 라이브러리 제작 및 Mirror Orientation Selection (MOS)

PCR select cDNA subtraction kit (Clontech, Mountain View, CA, USA)를 사용하여 라이브러리를 제작하였으며 SMART cDNA synthesis kit(Clontech)를 사용하여 total RNA로부터 cDNA를 합성하였다. *V. nashicola* 분생포자를 저항성 품

중에 접종 후 2일째의 발아율, 부착기(appressorium) 형성 및 침투공(penetration-pore) 형성이 이후 7일까지와 유의적인 차이가 없었으며, 각피하층의 균사체(subcuticular hypha) 형성만 접종 3일까지 증가된다는 보고(Park *et al.* 2000)에 따라 '93-3-98'의 시간별(24, 48, 72, 96, 120 및 144시간) 병처리 엽에서 추출한 cDNA를 혼합하여 tester cDNA로 사용하였으며 driver cDNA로 무처리 '스위스트킨'을 사용하여 라이브러리를 제작한 후 제한효소 *RsaI* 를 처리하였다. 두 개의 튜브에 tester cDNA를 각각 넣고 한 쪽에는 adaptor 1, 다른 한 쪽에는 adaptor 2R을 넣은 후 DNA ligase 를 처리하였다. 각각의 tester pool에 driver cDNA를 첨가하여 hybridization 과정을 거친 후 차등 발현된 염기서열만 선택적으로 증폭하기 위하여 2번의 PCR을 하였다.

SSH가 차등 발현된 전사체를 탐색하기 위한 강력하고 일반적인 방법으로 사용되고 있지만, SSH 유래 라이브러리는 전형적으로 비 차등적 발현 전사체도 포함되어 있기 때문에 background 제거를 위하여 MOS를 실시하였다. SSH의 second nested PCR로부터 얻은 PCR 산물을 phenol/chloroform 을 처리하여 추출하였으며 MOS를 수행하기 위하여 에탄올로 농축하였다. PCR 추출물은 제한효소 *XmaI*을 처리한 후 denaturation과 5시간의 hybridization 과정을 거친 후 NP2Rs primer를 이용하여 PCR를 수행하였으며 NP2R adaptor 를 양쪽 끝에 연결하였다. MOS PCR 산물을 TOPO TA cloning vector에 삽입하여 형질 전환하였으며 agar, X-gal (Sigma, Missouri, St. Louis, USA), IPTG (Sigma, Missouri, St. Louis, USA)와 ampicillin (Sigma, Missouri, St. Louis, USA) 100 mg/mL 첨가된 LB plate에 도말하여 37°C에서 16시간 배양하였다. 각각의 흰색 colony를 무작위로 선발하였으며 ampicillin 100 mg/mL 첨가된 LB 액체배지에서 배양한 후 분석에 사용하였다. 각각의 라이브러리 set은 Macrogen Inc. (Seoul, Korea)에서 염기서열을 분석하였다.

**cDNA 염기서열 분석 및 RACE PCR**

M13 promotor primer를 사용하여 DNA 염기서열을 분석하였으며 ABI BigDye(R) Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Lincoln, CA, USA)와 DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. Fluorescent-labeled fragment은 Applied Biosystems 방법에 따라 정제되었으며 ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Lincoln, CA, USA)에서 전기영동을 실시하였으며 염기서열을 분석하였다. SSH로부터 얻은 *PyrcpPR-10* cDNA의 단편 염기서열을 바탕으로 5'-TGG-GCCTTGCTTTGCCAGCC-3' (5' 말단 RACE)과 5'-CGCC-TCAGTCATCCCTCCTGC-3' (3' 말단 RACE) primer를 제작하였으며 CapFishing full-length cDNA premix kit (Seegene, Korea)를 사용하여 5' 말단과 3' 말단의 cDNA를 증폭하

였다. 증폭된 cDNA는 pMD20 T-vector (Takara, Otsu, Shiga, Japan)에 클로닝하여 분석 후 전체 염기서열을 결정하였다. Real-time(RT) PCR 분석

*PyrcpPR-10* 유전자의 발현양상을 분석하기 위하여 PRIMER3 (Rozen and Skaletsky, 1998) 프로그램을 이용하여 forward (5'-TGGCATCTGGCAGTGGTTCC-3') 및 reverse (5'-GGCCT-TGTCTTTGCCAGCCT-3') primer를 제작하였다. Endogenous control로써 housekeeping gene인 배 actin (forward: 5'-GTG-CTGGACTCAGGTGATGG-3', reverse: 5'-GTTCTTCTCAA-CTGACGAGC-3')을 사용하였으며(Kim *et al.* 2009), standard curve 검정을 통해 안정적으로 발현되는 것을 확인하였다. PCR증폭은 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (Perfect real-time) kit (Takara, Otsu, Shiga, Japan) 10 µl, forward 및 reverse primer 0.4 µl(0.5 mM), 20x 희석된 first-strand cDNA 5 µl, ddH<sub>2</sub>O 4.2 µl를 혼합하였다. 증폭반응은 LightCycler@480 II (Roche, Rotkreuz, Zug, Switzerland)로 최초 95°C에서 15 초간 반응시키고, 95°C 5초, 60°C 45초 과정을 45회 반복하였으며 60°C에서 95°C까지 0.5°C씩 온도를 상승시켜 melting curve를 분석하였다. 분석은 3반복으로 수행하였다.

**결과 및 고찰**

*PyrcpPR-10* 유전자 분리 및 염기서열 분석

SSH 분석을 통하여 *V. nashicola* 접종 후 고도 저항성 품

```

1  tacctcaacatccatcatcctcctagcttccttcttcttaattaatt
45  tcttggatcatitttccaagcccttaaaaaatcato
80  atgggtgtcctcacatacgaactgaatagccctcagtcacccct
   M G V L T Y E T E Y A S V I P 15
125 cctgctagggtgtacaatgcccttgcttctgatgctgacaatctc
   P A R L Y N A L V L D A D N L 30
170 attccgaagatgtctccacaagcagtcacaaactgtgaaattctc
   I P K I A P Q A V K T V E I L 45
215 gagggagatgggtggttggaccatcaagaagttagtttgggt
   E G D G G V G T I K K V S F G 60
260 gaaggaagtgaatacaactatgtgaagcacaaggttgagggaatt
   E G S E Y N Y V K H K V E G I 75
305 gacaaagataaactttcactacagctatagcttgattgaaggagat
   D K D N F H Y S Y S L I E G D 90
350 gccatttctgacaaaattgagaagatcctttagagatgaagtgtg
   A I S D K I E K I S Y E I K L 105
395 gtggcatctggcagtggttccatcatcaagaacaccagcactac
   V A S G S G S I I K N T S H Y 120
440 cacaccaaggagatgttgagatcaaggaagaactgttaaggct
   H T K G D V E I K E E H V K A 135
485 ggcaagacaaggccatggttggccaactcaaaacttggcaactac
   G K D K A H G L F K L I E N Y 150
530 cttgtggccaactcctgatgctcaactcaaaacttggctggc
   L V A N P D A Y N * 159
575 aacaatcttggtttggcttctctgtttactcaaatgtgtggtt
620 taatttatatogtaccaaagcaattcttgaactgcaacttggga
665 tatgataaaggagatgtgtatttggatttaactcctaataata
710 aaacatatataactagttaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
    
```

**Fig. 1** Nucleotide and deduced amino acid sequence of *PyrcpPR-10* cDNA. P-loop motif is underlined

종 ‘93-3-98’에서 차등발현 되는 유전자의 염기서열을 분석 하였으며 사과(*Malus domestica*)의 *PR-10* 유전자(CAK93672.1)와 98%의 상동성을 가지는 480 bp 단편 크기의 *PR-10* 유전자를 확인하였다. 그러나 SSH분석을 통하여 확인한 cDNA는 단편 염기서열만을 가지고 있으므로 전체 염기서열을 확인하기 위하여 RACE PCR 분석을 수행하였다. RACE PCR 결과 501bp의 5' 말단 염기서열과 632bp의 3' 말단 염기서열을 확인하였으며 전체염기서열을 결정한 후 *PyrcpPR-10*이라 명명하였다. *PyrcpPR-10* 유전자의 전체 길이는 745bp였으며 480bp의 ORF와 159개의 아미노산을 가지는 것으로 분석되었다(Fig. 1). 단백질의 크기는 17.48 KDa이며 등점점은 5.6으로 예측되었다. 고도저항성 ‘Bartlett’

과 ‘93-3-98’, 저항성 ‘황실리’, 중도저항성 ‘감천배’, 감수성 ‘원황’, 고도 감수성 ‘신고’와 ‘스위트스킨’ 간의 *PyrcpPR-10* 유전자의 염기서열 차이를 확인하기 위하여 6개 품종에 대해 RACE PCR를 수행한 결과 ‘93-3-98’, ‘황실리’, ‘감천배’, ‘원황’, ‘신고’, ‘스위트스킨’은 동일한 염기서열을 가지고 있었다(자료 미제시). 하지만 ‘Bartlett’은 일부 염기서열의 차이와 3' 말단 UTR 부분에 36bp의 추가적인 염기서열을 가지고 있었으며 *PyrcpPR-10*이라 명명하였다 (Fig. 2). *PyrcpPR-10* 단백질은 47-52번 아미노산 잔기에서 인산기 결합에 관여하는 P-loop의 특징인 GXGGXG motif를 가지고 있었는데(Saraste *et al.* 1990), 이러한 motif는 nucleotide 결합단백질과 같은 단백질인산화효소에서 많

<i>PyrcpPR10</i>	TACCTCAACATCCATCATCCTCCTAGCTTCCTTCTTTCATTAAATTCCTTGATCAITTTTC	60
<i>PyrcPR10</i>	TACCTCAACATCCATCATCCTCCTAGCTTCCTCCTTTCATTAAATTCCTTGATCAITTTTC	60
	*****	
<i>PyrcpPR10</i>	CAAGCCCTTAAAAATCATCATGGGTGTCCTCACATACGAAACTGAATACGCCCTCAGTCAT	120
<i>PyrcPR10</i>	CAAGCCCTTAAAAATCATCATGGGTGTCCTCACATACGAAACTGAATACGCCCTCAGTCAT	120
	*****	
<i>PyrcpPR10</i>	CCCTCCTGCTAGGTTGTACAATGCCCTTGTTCCTTGATGCTGACAACTCATTCCGAAGAT	180
<i>PyrcPR10</i>	CCCCCTGCTAGGTTGTACAATGCCCTTGTTCCTTGATGCTGACAACTCATTCCGAAGAT	180
	*** *****	
<i>PyrcpPR10</i>	TGCTCCACAAGCAGTCAAAACTGTTGAAATCTCGAGGGAGATGGTGGTGTGGAAACCAT	240
<i>PyrcPR10</i>	TGCTCCACAAGCAGTCAAAACTGTTGAAATCTCGAGGGAGATGGTGGTGTGGAAACCAT	240
	*****	
<i>PyrcpPR10</i>	CAAGAAAGTTAGTTTTGGTGAAGGAAGTGAATACAATATGTGAAGCACAAGTTGAGGG	300
<i>PyrcPR10</i>	CAAGAAAGTTAGCTTTGGTGAAGGGAGTGAATACAGCTATGTGAAGCACAAGTTGAGGG	300
	*****	
<i>PyrcpPR10</i>	AATTGACAAAGATAACTTTCACTACAGCTATAGCTTGATTGAAGGAGATGCCATTTCTGA	360
<i>PyrcPR10</i>	AATTGACAAAGATAACTTTCACTACAGCTATAGCTTGATTGAAGGAGATGCCATTTCTGA	360
	*****	
<i>PyrcpPR10</i>	CAAAATTGAGAAGATCTCTTATGAGATTAAGTTGGTGGCATCTGGCAGTGGTTCCATCAT	420
<i>PyrcPR10</i>	CAAAATTGAGAAGATCTCTTATGAGATTAAGTTGGTGGCATCTGGCAGTGGTTCCATCAT	420
	*****	
<i>PyrcpPR10</i>	CAAGAACACCAGCCACTACCACCCAAGGGAGATGTTGAGATCAAGGAAGAACATGTTAA	480
<i>PyrcPR10</i>	CAAGAACACCAGCCACTACCACCCAAGGGAGATGTTGAGATCAAGGAAGAACATGTTAA	480
	*****	
<i>PyrcpPR10</i>	GGCTGGCAAAGACAAGGCCCATGGTTTTGTTCAAGCTTATTGAGAACTACCTTGTGGCCAA	540
<i>PyrcPR10</i>	GGCTGGCAAAGACAAGGCCCATGGTTTTGTTCAAGCTTATTGAGAACTACCTTGTGGCCAA	540
	*****	
<i>PyrcpPR10</i>	TCCTGATGCCTACAACATAAAACCAATTTGTCTGGCAACAATCTTGTGTTTTGCTTTCTCTG	600
<i>PyrcPR10</i>	TCCTGATGCCTACAACATAAAACCAATCGCTAGCAACAATCTTGTGTTTTGCTTTCTCTG	600
	*****	
<i>PyrcpPR10</i>	TTTACTCAAATGTGTGGTTTAAATTTAATATCGTACCAAGCAAT-----	644
<i>PyrcPR10</i>	TTTACTCATATGTGTGGTTCAATTTAATATCGTACCAAGCAATTTCTTTGACTTGCACIT	660
	*****	
<i>PyrcpPR10</i>	-----TCITTGACTTGCACITTTGGATATGATTAAGAGGATTGTT	684
<i>PyrcPR10</i>	TATTATCGTACCAAGCAATTTCTTTGACTTGCACITTTGGATATGATTAAGAGGATTGTT	720
	*****	
<i>PyrcpPR10</i>	GTATTTGATTTAATCTCAATAAATAAAACATATATATACTAGTTAAAAAAAAAAAAAAAAA	744
<i>PyrcPR10</i>	GTATTTGATTTAATCTCAATAAATAAAACATATATATACTAGTTAAAAAAAAAAAAAAAAA	780
	*****	
<i>PyrcpPR10</i>	A	745
<i>PyrcPR10</i>	A	781
	*	

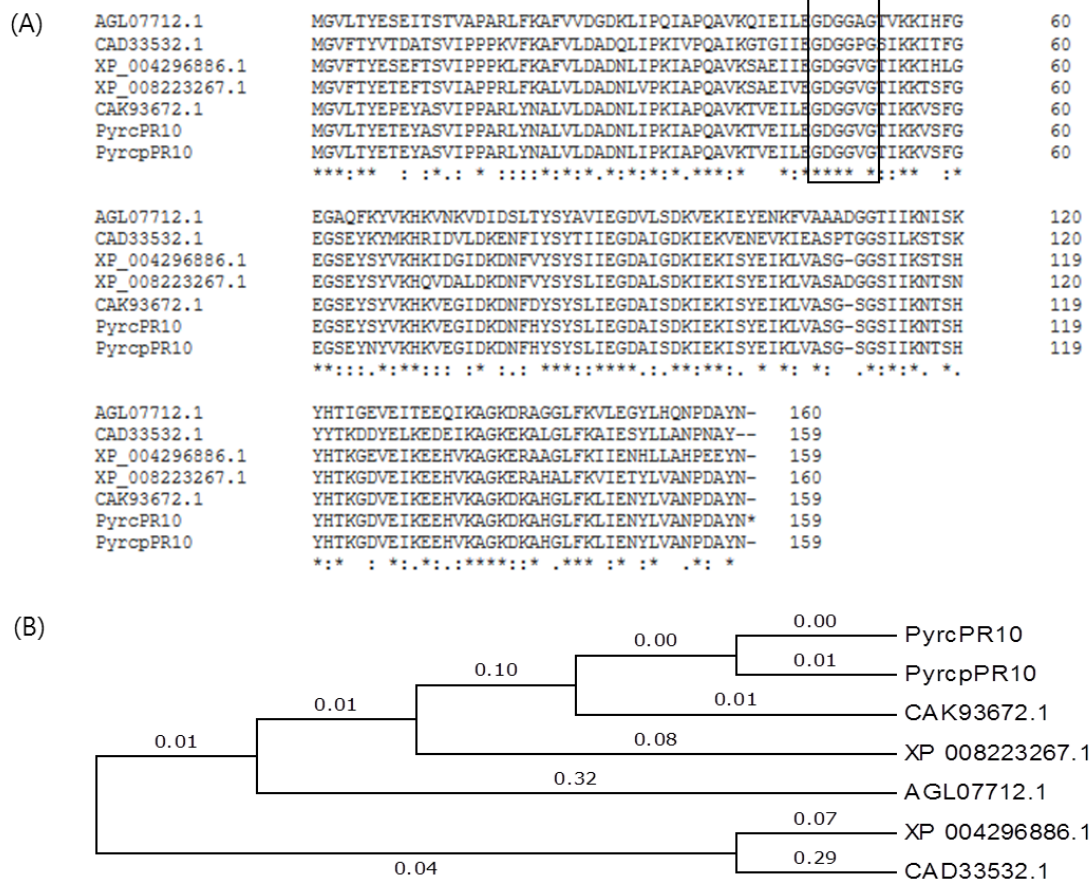
Fig. 2 Alignment of nucleotide sequence of *PyrcpPR-10* and *PyrcPR-10*

이 발견되며 PR-10 단백질의 RNase활성에 관여하는 것으로 보고되어 있다(Bantignies *et al.* 2000). PycrpPR10의 아미노산서열을 이용하여 GeneBank 데이터베이스에서 유사한 아미노산을 가지는 다른 종의 PR-10과 비교한 결과 공통적으로 GXGGXG motif가 존재하며 *Malus domestica* (CAK93672.1), *Prunus mume* (XP\_008223267.1), *Fragaria vesca* subsp. Vesca (XP\_004296886.1), *Datisca glomerata* (CAD33532.1), *Ziziphus jujube* (AGL07712.1)와의 상동성은 각각 98, 83, 79, 63, 64%였다(Fig. 3A). 7개의 유전자를 이용하여 PycrpPR-10의 계통수를 분석한 결과 크게 2개의 그룹으로 나뉘었으며 *Malus domestica* (CAK93672.1), *Prunus mume* (XP\_008223267.1), *Ziziphus jujube* (AGL07712.1)와 같은 그룹에 속했다(Fig. 3B).

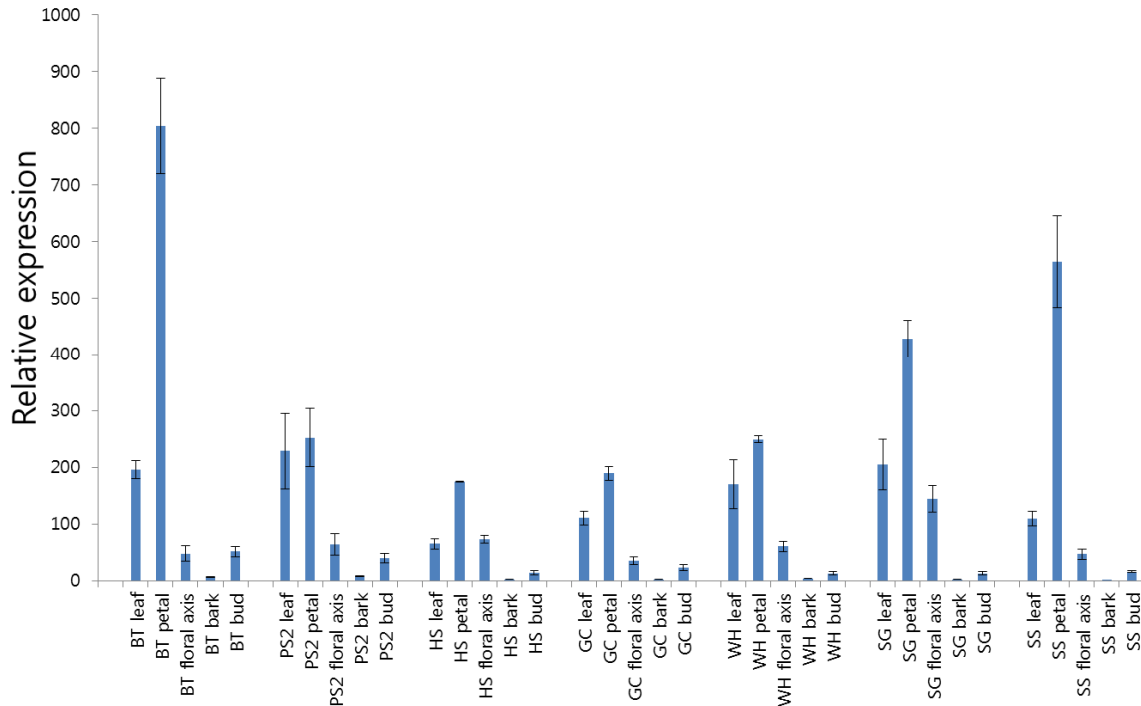
기관별 발현양상

PR-10 유전자는 화분(Breiteneder *et al.* 1989), 잎(Park *et al.* 2004), 줄기(Liu *et al.* 2005), 종자(Wu *et al.* 2003), 과일(Atkinson *et al.* 1996) 등 여러 기관에서 발현되며 형질전

환체를 이용한 PR-10 유전자의 구상적 발현은 사이토키닌의 증가를 유도하였다(Srivastava *et al.* 2006). 이러한 결과는 PR-10 유전자가 병원체에 대한 방어반응과 환경 스트레스 뿐만 아니라 식물의 생장과 발달에도 중요한 역할을 하는 것으로 보여진다. 본 연구에서는 배의 품종과 기관 및 조직별 PR-10 유전자의 발현량을 조사하기 위하여 ‘Bartlett’, ‘93-3-98’, ‘황실리’, ‘감천배’, ‘원황’, ‘신고’, ‘스위트스킨’ 7개의 품종의 꽃잎, 꽃대, 잎, 수피, 눈으로부터 RNA를 분리하여 real-time PCR 분석을 실시하였다(Fig. 4). 그 결과 꽃잎에서 가장 높은 발현을 보였으며, 특히 고도 저항성 ‘Bartlett’에서 가장 높았다. 다음으로 잎, 꽃대, 눈 순이었으며 수피는 다른 기관이나 조직에 비해 현저히 낮은 발현을 보였다. Lotan *et al.* (1989)은 PR protein의 발현이 개화에 관련되어 있다고 보고하였으며, 특히 자작나무에서 분리한 PR-10(*Betv1*)은 꽃가루에서 많이 발현되었다(Breiteneder *et al.* 1989). 그러나 알파파에서 분리한 PR-10(*PPRG2*)은 뿌리에서 가장 높은 발현을 보였으며 줄기 잎과 비교하여 꽃잎에서 높은 발현을 보이지



**Fig. 3** Alignment and phylogenetic tree analysis of the predicted amino acid sequence of PycrpPR-10 with other related plant PR-10 proteins. A, Alignment of the deduced amino acid sequences of PR-10 genes obtained from *Malus domestica* (CAK93672.1), *Prunus mume* (XP\_008223267.1), *Fragaria vesca* subsp. vesca (XP\_004296886.1), *Datisca glomerata* (CAD33532.1), *Ziziphus jujuba* (AGL07712.1) are compared. Conserved domain (GXGGXG) is boxed; B, Phylogenetic tree with other related plant PR-10 proteins. Phylogenetic tree was obtained by using the neighbor-joining tree method in Mega6



**Fig. 4** Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of *PyrcpPR-10* was conducted with various organs and tissues. BT, ‘Bartlett’; PS2, ‘93-3-98’; HG, ‘Hwangsilri’; GC, ‘Gamcheonbae’; WH, ‘Wonhwang’; NI, ‘Niitaka’; SS, ‘Sweat Skin’. Bars represent the means with standard errors from three replications. Actin gene was used as an endogenous control and the data were calibrated relative to the transcript levels in cDNA from ‘Sweat Skin’ pear bark

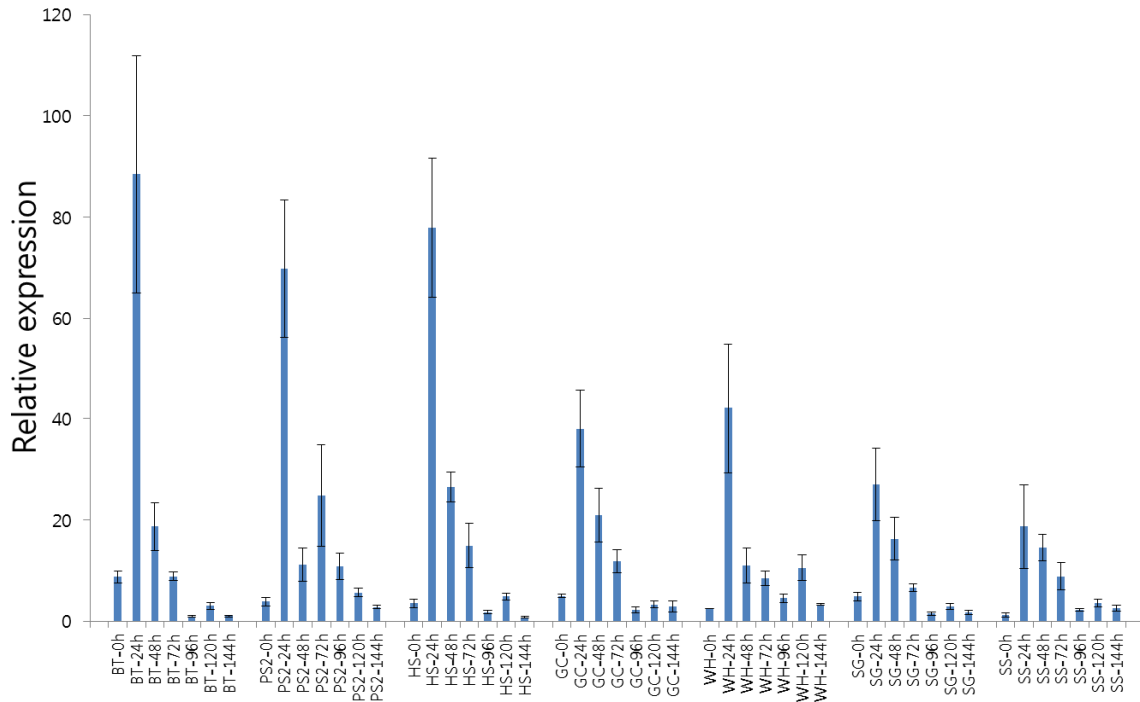
않았다(Borsics and Lados 2002). 따라서 *PyrcpPR-10* 유전자는 식물에 따라 기관 특이적으로 발현되어 각각의 기관에서 서로 다른 기능을 하는 것으로 보이며, 특히 꽃잎에서 높은 발현을 보임으로써 꽃의 발달에 관여하는 것으로 추측된다. 그러나 검은별무늬병 감수성 차이에 따른 품종 특이적 발현은 나타나지 않았다.

#### V. *nashicola*에 의해 유도된 *PR-10* 유전자의 발현양상

검은별무늬병 저항성 품종에서 특이적으로 발현하는 *PyrcpPR-10* 유전자의 발현양상을 조사하기 위해 고도저항성 ‘Bartlett’, ‘93-3-98’, 저항성 ‘황실리’, 중도저항성 ‘감천배’, 이병성 ‘원황’, 고도 이병성 ‘신고’, ‘스위트스킨’ 7개 품종에 *V. nashicola*를 접종하였으며 접종시간(24, 48, 72, 96, 120, 148 시간)에 따라 감염된 잎 조직으로부터 RNA를 추출하여 real-time PCR 분석을 실시하였다(Fig. 5) *PyrcpPR-10* 유전자는 모든 품종에서 24시간 접종 후 발현이 크게 증가하였으며 ‘Bartlett’, ‘93-3-98’, ‘황실리’, ‘원황’의 경우 접종 48시간 처리 구에서 급격히 감소한 반면 ‘감천배’, ‘신고’, ‘스위트스킨’은 급격한 감소를 보이지 않았다. ‘93-3-98’의 경우 72시간 후 다시 발현이 증가하였으나 나머지 품종들은 점차적으로 감소하였으며 96시간 이후 낮은 발현을 유지하였다. *PyrcpPR-10* 유전자의 발현은 검은별무늬병 저항성에 따라 차이를 보였는데 고도 저항성 ‘Bartlett’과 ‘93-3-98’,

저항성 ‘황실리’에서 가장 높은 발현을 보였으며 다음으로 중도저항성 ‘감천배’와 감수성 ‘원황’이 높았고 고도 감수성 ‘신고’와 ‘스위트스킨’에서는 가장 낮은 발현을 보였다. 이러한 결과는 *PR-10* 유전자가 저항성 품종에서 특이적으로 높게 발현되어 검은별무늬병에 저항성을 가지며, 특히 접종 초기에 높은 발현을 보임으로써 병원균의 침입을 억제하는데 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 다양한 *PR-10* 유전자가 바이러스(Park *et al.* 2004), 박테리아(Robert *et al.* 2001), 곰팡이(Xie *et al.* 2010) 등에 노출되었을 때 유전자의 발현이 증가하였으며 *in vitro* 실험을 통해 식물병원성 세균의 생장이 억제되었다는 보고와 같은 결과를 보였다(Flores *et al.* 2002). 또한 yellow-fruit nightshade (*Solanum surattense*)에서 분리한 재조합 SsPR10 단백질은 벼의 도열병균(*Pyricularia oryzae*)의 성장 저해와 RNase의 활성을 보여주었는데(Liu *et al.* 2006), 이러한 RNase의 활성은 많은 *PR-10* 유전자에서 보고되어져 있으며(Swoboda *et al.* 1996; Srivastava *et al.* 2006; Yan *et al.* 2008) 방어반응에 관련되어져 있는 것으로 여겨진다.

이상의 결과를 종합해보면 본 연구에서 분리한 *PyrcpPR-10* 유전자는 병 저항성에 관여하며 또한 식물의 생장과 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다. 현재까지 여러 식물에서 *PR-10* 유전자의 발현특성에 대해 많은 연구가 진행되어왔으나 정확한 메커니즘에 대한 정보는 부족한 실정이다. 따라서 향후 *PyrcpPR-10* 유전자의 단백질



**Fig. 5** Relative expression of *PycrpPR-10* in various pear cultivars having different scab-susceptibilities at 0, 24, 48, 72, 96, 120 and 144 h after inoculation with *V. nashicola*. BT, ‘Bartlett’; PS2, ‘93-3-98’; HG, ‘Hwangsilri’; GC, ‘Gamcheonbae’; WH, ‘Wonhwang’; NI, ‘Niitaka’; SS, ‘Sweat Skin’. Bars represent the means with standard errors from three replications. Quantitative real-time PCR was performed to measure the relative expression of *PycrpPR-10*. Actin gene was used as an endogenous control and the data were calibrated relative to the transcript levels in cDNA from uninoculated ‘Sweat Skin’ pear leaves

특성분석과 형질전환체 제작을 통해 기능을 밝힘으로써 *PycrpPR-10* 유전자의 발현조절을 통한 검은별무늬병 저항성 품종 개발에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

**사 사**

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(과제번호: PJ101228072014)의 지원에 의해 이루어진 것임.

**적 요**

배 검은별무늬병 고도저항성 ‘93-3-98’과 고도감수성 ‘스위트스킨’간의 suppression subtractive hybridization 분석을 통해 ‘93-3-98’에서 특이적으로 발현되는 pathogenesis-related 10 (*PR-10*) 유전자를 분리하여 *PycrpPR-10*으로 명명하고 기관 및 품종별 발현양상을 분석하였다. 단편염기서열의 rapid amplification of cDNA ends PCR을 통해 *PycrpPR-10* 유전자는 전체길이가 743bp이고, 480bp의 ORF와 159개의 아미노산을 가지는 것으로 확인되었다. *PycrpPR-10* 유전자의 염기서열은 ‘황실리’(저항성), ‘감천배’(중도저항성), ‘원황’(중도감수성), ‘신고’, ‘스위트스킨’(고도감수성)은

동일하였으나 ‘Bartlett’(고도저항성)은 일부 염기서열의 차이를 보였다. BLAST X를 통한 다른 식물 종의 PR-10 아미노산과 비교에서 64~98%의 상동성을 보였고 공통적으로 GXGGXG motif를 가지고 있었다. 기관 및 조직별 *PycrpPR-10* 유전자의 발현량은 꽃잎이 가장 높았으며 다음으로 잎, 꽃대, 눈, 수피 순이었다. 저항성과 감수성 품종에 따른 *PycrpPR-10* 유전자의 발현양상은 모든 품종에서 접종 24시간 후 급격히 증가였으며, 특히 ‘Bartlett’, ‘93-3-98’, ‘황실리’에서 높게 발현되었고 ‘감천배’, ‘원황’의 경우 저항성 품종에 비해 상대적으로 낮았으며, 고도 감수성 ‘신고’, ‘스위트스킨’은 발현이 가장 낮았다. 배에서 분리한 *PycrpPR-10* 유전자는 검은별무늬병 저항성에 직접 연관되는 것으로 추정된다.

**Reference**

Atkinson RG, Perry J, Matsui T, Ross GS, Macrae EA (1996) A stress-, pathogenesis-, and allergen-related cDNA in apple fruit is also ripening-related. NZ J Crop Hort. Sci 24 : 103-107  
 Bantignies B, Séguin J, Muzac I, Dédaldéchamp F, Gulick P, Ibrahim R (2000) Direct evidence for ribonucleolytic activity of a PR-10-like protein from white lupin roots. Plant Mol Biol 42 : 871-881

- Borsics T and Lados M (2002) Dodder infection induces the expression of a pathogenesis-related gene of the family PR10 in alfalfa. *J Exp Bot* 53 : 1831-1832
- Breiteneder H, Pettenburger K, Bito A, Valenta R, Kraft D, Rumpold H, Scheiner O, Breitenbach M (1989) The gene coding for the major birch pollen allergen *Betv1*, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *EMBO J* 8 : 1935-1938
- Bufe A, Spangfort MD, Kahlert H, Schlaak M, Becker W-M (1996) The major birch pollen allergen, *Betv1*, shows ribonuclease activity. *Planta* 199 : 413-415
- Faize M, Faize L, Ishizaka M, Ishii H (2004) Expression of potential defense responses of Asian and European pears to infection with *Venturia nashicola*. *Physiol Mol Plant Pathol* 64 : 319-330
- Flores T, Alape-Girón A, Flores-Díaz M, Flores HE (2002) Ocatin. A novel tuber storage protein from the andean tuber crop oca with antibacterial and antifungal activities. *Plant Physiol* 128 : 1291-1302
- Fujimoto Y, Nagata R, Fukasawa H, Yano K, Azuma M, Iida A, Sugimoto S, Shudo K, Hashimoto Y (1998) Purification and cDNA cloning of cytokinin-specific binding protein from mung bean (*Vigna radiata*). *Eur J Biochem* 258 : 794-802
- Iandolino A, da Silva FG, Lim H, Choi H, Williams L, Cook D (2004) High-quality RNA, cDNA, and derived EST libraries from grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol Bio Rep* 22 : 269-278
- Ishii H, Udagawa H, Nishimoto S, Tsuda T, Nakashima H (1992) Scab resistance in pear species and cultivars. *Acta Phytopathol Entomol Hung* 27 : 293-298
- Kim SH, Koh GC, Hwang B, Lee HJ and, Hong SW (2009) Identification of Differential Gene Expression in Juvenile vs. Mature Leaves of Pear (*Pyrus pyrifolia*) by Using Annealing Control Primer. *J. Korea. Soc. Appl. Biol. Chem* 52 : 121-127
- Liu J-J and Ekramoddoullah AK (2006) The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiol Mol Plant Pathol* 68 : 3-13
- Liu J-J, Ekramoddoullah AK, Piggott N, Zamani A (2005) Molecular cloning of a pathogen/wound-inducible PR10 promoter from *Pinus monticola* and characterization in transgenic *Arabidopsis* plants. *Planta* 221 : 159-169
- Liu X, Huang B, Lin J, Fei J, Chen Z, Pang Y, Sun X, Tang K (2006) A novel pathogenesis-related protein (SsPR10) from *Solanum surattense* with ribonucleolytic and antimicrobial activity is stress-and pathogen-inducible. *J Plant Physiol* 163 : 546-556
- Lotan T, Ori N, Fluhr R (1989) Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers. *Plant Cell* 1 : 881-887
- Moiseyev GP, Beintema JJ, Fedoreyeva LI, Yakovlev GI (1994) High sequence similarity between a ribonuclease from ginseng calluses and fungus-elicited proteins from parsley indicates that intracellular pathogenesis-related proteins are ribonucleases. *Planta* 193 : 470-472
- Park CJ, Kim KJ, Shin R, Park JM, Shin YC, Paek KH (2004) Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *Plant J* 37 : 186-198
- Park P, Ishii H, Adachi Y, Kanematsu S, Ieki H, Umemoto S (2000) Infection behavior of *Venturia nashicola*, the cause of scab on Asian pears. *Phytopathology* 90 : 1209-1216
- Robert N, Ferran J, Breda C, Coutos-Thévenot P, Boulay M, Buffard D, Esnault R (2001) Molecular characterization of the incompatible interaction of *Vitis vinifera* leaves with *Pseudomonas syringae* pv. pisi: Expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein. *Eur J Plant Pathol* 107 : 249-261
- Rozen S, Skaletsky HJ (1998) *Primer 3*. Code available at [http://www.enome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www.enome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html).
- Saraste M, Sibbald PR, Wittinghofer A (1990) The P-loop-a common motif in ATP-and GTP-binding proteins. *Trend Biochem Sci* 15 : 430-434
- Sels J, Mathys J, De Coninck B, Cammue B, De Bolle MF (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol Biochem* 46 : 941-950
- Shin IS, Bae KM, Nam GY, Kang B-C, Chun J, Cho KH, Kim SH, Choi HS, Kim HR, Hwang HS (2012) Identification of genes induced by *Venturia nashicola* in indigenous Korean pear 'Hwangsilri'. *Hort. Environ. Biotechnol.* 53 : 513-520
- Sikorski MM, Biesiadka J, Kasperska AE, Kopcińska J, Łotocka B, Golinowski W, Legocki AB (1999) Expression of genes encoding PR10 class pathogenesis-related proteins is inhibited in yellow lupine root nodules. *Plant Sci* 149 : 125-137
- Somssich IE, Schmelzer E, Bollmann J, Hahlbrock K (1986) Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding "pathogenesis-related" proteins in cultured parsley cells. *PNAS* 83 : 2427-2430
- Srivastava S, Emery RN, Kurepin LV, Reid DM, Fristensky B, Kav NN (2006) Pea PR 10.1 is a ribonuclease and its transgenic expression elevates cytokinin levels. *Plant Growth Regul* 49 : 17-25
- Srivastava S, Fristensky B, Kav NN (2004) Constitutive expression of a PR10 protein enhances the germination of *Brassica napus* under saline conditions. *Plant Cell Physiol* 45 : 1320-1324
- Swoboda I, Hoffmann-Sommergruber K, O'Riordáin G, Scheiner O, Heberle-Bors E, Vicente O (1996) Bet v 1 proteins, the major birch pollen allergens and members of a family of conserved pathogenesis-related proteins, show ribonuclease activity in vitro. *Physiol Plant* 96 : 433-438
- Van Loon L and Van Strien E (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* 55 : 85-97
- Wen J, Vanek-Krebitz M, Hoffmann-Sommergruber K, Scheiner O, Breiteneder H (1997) The potential of *Betv1* homologues, a nuclear multigene family, as phylogenetic markers in flowering plants. *Mol Phylogenet Evol* 8 : 317-333
- Wu F, Yan M, Li Y, Chang S, Song X, Zhou Z, Gong W (2003) cDNA cloning, expression, and mutagenesis of a PR-10 protein SPE-16 from the seeds of *Pachyrrhizus erosus*. *BBRC*



- 312 : 761-766
- Xie Y-R, Chen Z-Y, Brown RL, Bhatnagar D (2010) Expression and functional characterization of two pathogenesis-related protein 10 genes from *Zea mays*. *J Plant Physiol* 167 : 121-130
- Yan Q, Qi X, Jiang Z, Yang S, Han L (2008) Characterization of a pathogenesis-related class 10 protein (PR-10) from *Astragalus mongholicus* with ribonuclease activity. *Plant Physiol Biochem* 46 : 93-99
- Zheng Q-L and Ishii H (2009) Molecular cloning and expression analysis of genes related to phosphatidic acid synthesis in Japanese pear leaves inoculated with *Venturia nashicola*. *J Gen Plant Pathol* 75 : 413-421
- Zhou X-J, Lu S, Xu Y-H, Wang J-W, Chen X-Y (2002) A cotton cDNA (*GaPR-10*) encoding a pathogenesis-related 10 protein with in vitro ribonuclease activity. *Plant Sci* 162 : 629-636