Suppression Subtractive Hybridization을 통한 *Venturia Nashicola* 접종후 ‘93-3-98’에서 유도된 저항성 후보 유전자 선발

천재안 · 남가영 · 김세희 · 조강희 · 김대현 · 최인명 · 신일섭*

국립원예특작과학원 과수과

Candidate Gene Selection Induced by ‘93-3-98’ Pear after Inoculation of *Venturia Nashicola* by Suppression Subtractive Hybridization

Jae-An Chun, Ga-Young Nam, Se-Hee Kim, Kang-Hee Cho, Dae-Hyun Kim,
In-Myeong Choi, and Il-Sheob Shin*

Fruit Research Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Suwon, 440-706, Korea

Abstract : Suppression subtractive hybridization was carried out to identify resistant genes against to pear scab caused by *Venturia nashicola* using leaves harvested at 24 and 48 hours after inoculation into ‘93-3-98’ (highly resistant) and ‘Sweet Skin’ (highly susceptible). As a result of the ESTs analysis, nine and 14 unique genes were expressed on 24H (tester, mRNA at 24hr after inoculation of ‘93-3-98’; driver, one of ‘Sweet Skin’) and 48H (tester, mRNA at 48hr after inoculation of ‘93-3-98’; driver, one of ‘Sweet Skin’), respectively and genes related to defense or stress response were accounted for 40% (24H) and 42% (48H). Differential expressed genes classifying into PR protein family were pathogenesis-related protein 1a, major allergen *Pyr* c1 and allergen mal d 1 at 24H and major allergen Mal d 1.03B at 48H, respectively. Major allergen *Pyr* c1, F-Box/kelch-repeat protein, Flavoprotein wrbA, and hypothetical protein POPTRDRAFT_783792 are expected to closely connecting to scab resistance of pear following strongly expressed in highly resistant cv. ‘Bartlett’ and ‘93-3-98’ compared with moderately susceptible cv. ‘Gamcheonbae’, susceptible cv. ‘Wonhwang’, and highly susceptible cv. ‘Niitaka’ and ‘Sweet skin’.

Keywords : *Pyrus*, Scab resistance, Differential expressed gene, Expression analysis, Suppression subtractive hybridization

서 언

*Venturia nashicola*에 의한 배 검은별무늬병은 한국과 일본에서 재배되는 *Pyrus pyrifolia*와 중국에서 재배되는 *P. ussuriensis*, *P. bretschneideri*에 많은 피해를 준다(Park et al. 2000). 특히 *P. pyrifolia*의 품종이 높은 감수성을 보이거나(Ishii et al. 1992) *P. pyrifolia*의 ‘견착(Kinchaku)’ *P. bretschneideri*의 ‘홍리(Hongli)’와 ‘밀리(Mili)’ 그리고 *P. communis*(서양배)의 품종군은 본 병원균에 저항성을 가진다(Faize et al. 2004, Ishii et al. 1992). 우리나라의 주 품종인 ‘신고’와 일본의 주요 재배품종인 ‘이십세기’, ‘행수’, ‘풍수’는 모두 본 병원균에

감수성을 보임으로 매년 5~6회이상 약제방제를 하고 있지만, 저항성 품종개발을 위한 저항성품종과 병원균간의 분자 생물학적 기작에 대한 연구가 미미한 실정이다. 따라서 이러한 저항성 기작을 이해하기 위해 병원체에 의해 유도되는 유전자의 발현과 저항성 품종에서 특이적으로 발현되는 유전자에 대한 연구가 진행되어 왔으며(Faize et al. 2004, Shin et al. 2012, Zheng & Ishii 2009) 또한 검은별무늬병 저항성 품종에서 특이적으로 발현되는 유전자를 교배실생 조기선발 마커로 활용하기 위한 연구가 진행되고 있다(Bouvier et al. 2012, Terakami et al. 2006).

일반적으로 식물체가 병원체에 노출되거나 세포가 손상되면 특정 물질들이 용출되며 이를 감지하여 방어반응을 가지게 된다. 이러한 반응은 systemic acquired resistance (SAR) 이라고 알려진 방어 메커니즘으로 병원균에 의해 손상된 식

*Corresponding author (E-mail: shinis3@korea.kr, Tel: +82-31-240-3675, Fax: +82-31-240-3709)

(Received on September 17, 2014, 2014. Revised on November 29, 2014.
Accepted on December 17, 2014.)

물조직이 다른 조직으로 salicylic acid나 jasmonic acid, ethylene과 같은 물질을 보내어 식물이 전체적으로 방어반응을 유도하며, 감염된 조직으로부터 superoxide, peroxide, hydrogen peroxide와 같은 활성산소를 방출하여 병원균을 사멸시킨다(Sticher et al. 1997). 또한 감염된 부위의 세포들을 사멸시켜 병원균이 성장하지 못하게 하는 과민성반응과 같은 방법을 이용하기도 한다(Hammond-Kosack & Jones 1996). 이러한 SAR 메커니즘에 따라 병원체에 공격받은 식물세포에서 β -1,3-glucanase (PR-1 family), endo-chitinase (PR-3 family), 그리고 thaumatin-like protein (PR-5 family)와 같은 pathogen related (PR) protein의 발현이 유도되어지며(Paparu et al. 2007) 그 밖에 thionin, lipoxxygenase, proteinase inhibitor, ACC oxidase, peroxidase, glutathione s-transferase와 같은 유전자들의 발현이 증가됨이 보고되어 있다(Hammond-Kosack & Jones, 1996).

배 검은별무늬병 저항성에 관련된 유전자를 탐색하기 위한 방법으로 suppression subtractive hybridization (SSH)을 이용하였다. 이는 대조구와 처리구의 전사체 사이에 차등 발현되는 cDNA 단편을 PCR을 이용하여 선택적으로 증폭하는 기술로써 비특이적 증폭은 억제하고 특이적인 cDNA만을 효과적으로 증폭시켜서 차등 발현 유전자를 선별하게 된다. 이 분석방법은 housekeeping 유전자의 증폭을 억제하면서 발현되는 전사체만을 선택적으로 증폭할 수 있으며 분리하고자 하는 유전자의 염기서열과 같은 정보 없이도 원하는 유전자를 분리할 수 있는 장점이 있다. 또한 특수한 장비나 분석이 요구되지 않고 일반적인 분자생화적 기술 만으로도 분석이 가능하기 때문에(Moody 2001) 다양한 식물에서 병 저항성에 관여하는 유전자를 분리하기 위하여 사용되고 있다(Degenhardt et al. 2005, Pan et al. 2005, Xiong et al. 2001).

본 연구에서는 배 검은별무늬병에 고도 저항성으로 *Rvn2* 유전자 연관 DNA marker (Cho et al. 2009) 개발에 저항성 친으로 사용한 '93-3-98'('단배' × 'Bartlett')에서 일정하게 높은 수준으로, 감수성 품종 '스위트스킨'에서는 낮은 수준으로 전사되는 유전자들을 선별하고 염기서열 분석을 통하여 배 검은별무늬병 저항성에 관련된 유전자들을 탐색하였고 배 검은별무늬병 저항성에 차이를 보이는 품종들에서 선별 유전자들의 발현을 분석하여 후보 유전자를 선별하였다.

재료 및 방법

식물 재료

*V. nashicola*에 고도 저항성 '93-3-98'과 고도 감수성 '스위트스킨'을 시험재료로 사용하였다. 시험수는 원예작물을 위한 상업적 배지(서울바이오, 순천, 한국)로 채워져 있는 7.6 L 플라스틱 포트에 재식된 *P. pyrifolia* 대목에 접목하여 병 처리까지 주야온도가 30°C/12°C로 유지되는 유리온실에 보존하였다. *V. nashicola* 접종 후 저항성과 감수성간의 차등발현 전사체를 SSH 방법으로 선별하기 위하여 전엽 20일 미만의 유엽을 사용하였다. 차등발현 유전자의 발현은 *V. nashicola*에 대하여 저항성 정도가 다른 'Bartlett'(고도 저항성, non-host), '93-3-98'(고도 저항성), '황실리'(저항성), '감천배'(중도 저항성), '원황'(감수성), '신고'(고도 감수성), '스위트스킨'(고도 감수성)간 비교하였다.

분세포자 인공접종 및 시료채취

전남 나주 배시험장의 검은별무늬병이 발병된 '신고' 잎에서 분세포자를 채취하였고 멸균수로 현탁하여 -80°C에 냉동보관하였다가 이것을 약 20°C에서 녹인 후 0.1% sucrose와 Tween 80을 첨가하여 접종원으로 사용하였다. 접종원을 1×10^5 분세포자/mL 농도로 10개 내외의 잎이 완전히 전개된 1년생 접목묘(6주이상/품종)의 수관 전체에 분무 접종하였으며 대조구 식물체는 0.1% sucrose와 0.005% Tween 80을 포함하는 멸균수를 분무하였다. 접종은 모든 품종에서 동시에 처리하였으며 접종 후 각 접목묘를 20°C, 상대습도 100% 습실 내에서 48시간을 유지한 후 50% 정도 차광된 실외에 두었다. 접종한 잎과 접종하지 않은 잎은 24시간 간격으로 0, 24, 48, 72, 96, 120시간 샘플을 채취하여 액체질소에 담근 후 -80°C의 냉동고에 보관하였다(ilShinBioBase, Dongducheon, Gyeonggi-do, Korea)

RNA 분리 및 cDNA 합성

동결된 잎으로부터 RNA를 추출하기 위하여 변형된 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 방법과 lithium chloride (LiCl) 침전방법을 사용하였다(Iandolino et al. 2004). 잎은 액체질소에서 마쇄하여 -80°C에서 보관하였으며 RNA분리에 사용하였다. 마쇄된 조직은 CTAB buffer[2% CTAB, 2% polyvinylpyrrolidone, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM EDTA, 2M NaCl]를 첨가하여 균질화 하였으며 65°C에서 30분

간 반응 후 순도를 높이기 위하여 두 번의 chloroform/isoamyl alcohol (IAA)(24:1)를 처리하여 상등액을 추출하였다. 3M LiCl를 첨가한 후 4°C에서 overnight 처리하여 RNA를 농축하였으며 RNA pellet은 sodium dodecyl sulfate-Tris-HCl-EDTA (SSTE) buffer [1M NaCl, 0.5% SDS, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), and 1mM EDTA (pH 8.0)]를 넣어 완전히 용해하였다. Chloroform을 처리하여 상등액을 추출하였으며 100% 에탄올 2 (v/v)을 첨가한 후 -20°C에서 30분간 반응시켜 RNA를 농축하였다. Formaldehyde gel 전기영동을 이용하여 분리된 RNA의 분해 정도를 확인하였으며 Agarose gel 전기영동을 통하여 DNA가 검출되지 않음을 확인하였다. 분리된 RNA는 spectrophotometer 260/280 nm에서 정량한 후 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 RNA 2µg으로 부터 cDNA를 합성하였다. 저항성에서만 차등 발현되는 다양한 유전자를 탐색하기 위하여 분생포자의 발아 관과 균사의 신장 최성기로 병과 식물체와 상호작용이 활발한 시기인(Park et al. 2000), 24H('93-3-98' 24시간 vs '스위트스킨' 24시간), 48H('93-3-98' 48시간 vs '스위트스킨' 48시간)로 나누어 suppression subtractive hybridization (SSH)를 수행하였다. 저항성 품종에서 차등 발현되는 유전자를 탐색하기 위한 tester cDNA로 병 처리 '93-3-98'를 사용하고 대조군으로 사용되는 driver cDNA는 병 처리 '스위트스킨'을 사용하였으며 라이브러리 제작 후 제한효소 *RsaI*를 처리하였다. 두 개의 튜브에 tester cDNA를 각각 넣고 한 쪽에는 adaptor 1, 다른 한 쪽에는 adaptor 2R을 넣은 후 DNA ligase를 처리하였다. 각각의 tester pool에 driver cDNA를 첨가하여 hybridization 과정을 거친 다음 차별 발현된 염기서열만 선택적으로 증폭하기 위하여 2번의 PCR과정을 거쳤다.

비록 SSH가 차등 발현된 전사체를 탐색하기 위한 강력하고 일반적인 방법으로 사용되지만 SSH 유래 라이브러리는 전형적으로 비 차등적 발현 전사체도 포함되어 background를 제거하기 위하여 MOS를 실시하였다. SSH의 second nested PCR로부터 얻은 PCR 산물을 phenol/chloroform 처

리를 통하여 추출하였으며 MOS를 수행하기 위하여 에탄올 농축을 실시하였다. PCR 추출물은 제한효소 *XmaI* 처리를 한 후 denaturation과 5시간의 hybridization 과정을 거친 후 NP2Rs primer를 이용하여 PCR를 수행하였으며 NP2R adaptor를 양쪽 끝에 연결하였다. MOS PCR 산물을 TOPO TA cloning vector에 삽입하여 형질 전환하였으며 agar, X-gal, IPTG와 ampicillin 100mg/mL 첨가된 LB plate에 도말하여 37°C에서 16시간 배양하였다. 각각의 흰색 colony를 무작위로 선발하였으며 ampicillin 100mg/mL 첨가된 LB 액체배지에서 배양한 후 분석에 사용하였다. 각각의 라이브러리 set은 Macrogen Inc. (Seoul, Korea)에서 염기서열을 분석하였다.

cDNA 염기서열 분석

M13 promotor primer (5-CTGGCCGTCGTTTTAC-3)를 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. database 유사성 분석은 BLASTX 알고리즘(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)을 이용하였으며 best matches 염기서열은 similarity scores, E-values와 annotations을 바탕으로 선택되었다.

Real-time (RT) PCR 분석

SSH 라이브러리 제작에 사용된 동일한 RNA 샘플을 사용하여 cDNA합성 후 분석하였으며 분석에 사용된 primer는 PRIMER3 (Rozen & Skaletsky, 1998)프로그램을 이용하여 증폭산물의 크기는 100-150bp, annealing온도 60°C로 제작하였다(Table 1). Endogenous control로써 housekeeping gene인 배 actin (forward: 5-GTGCTGGACTCAGGTGATGG-3, reverse: 5-GTTCTTCTCAACTGACGA GC-3)을 사용하였으며(Kim et al. 2009) standard cuve 검정을 통해 안정적으로 발현되는 것을 확인하였다. Real-time PCR 반응은 총량 20 µl에 SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect real-time) kit (Takara, Otsu, Shiga, Japan) 10 µl, 0.5 mM의 primer, 20x 희석된 first-strand cDNA, ddH₂O를 혼합하여 최초 95°C에서 15초간 반응시키고, 95°C에서 5초와 60°C에서 45초간의

Table 1. Quantitative real-time PCR primers used for the relative expression analysis of the ESTs identified by SSH from '93-3-98' pear leaves harvested at 24 and 48hr after inoculation with *V. nashicola*.

Clone No.	Putative function	Product size (bp)	Forward	Reverse
24h_F_115	Acyl transferase/acyl hydrolase/lysophospholipase-like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	137	CGGATCCAGGAGGATGGCTT	CAGCCGGTGTGAGGTTTCAG
24h_F_008	Beta-glucosidase [<i>Malus × domestica</i>]	108	TTCCTCAAGAAGCGCAAAGGAA	AACAAGCCCCACAACATTCATCA
24h_F_140	Catalase [<i>Prunus persica</i>]	146	TGATCCTGTTCGCCATGCTG	ATCGCTCTTGCTGTGGGT
24h_F_001	Chlorophyll A/B binding protein, putative [<i>Ricinus communis</i>]	115	CGGTGACTACGGGTGGGACA	ACAGCCCAAAGCACCAAGCA
24h_F_314	Flavoprotein wrbA, putative [<i>Ricinus communis</i>]	140	AATCGGATACACGGCCGGAG	TTCCTGGTGGCAAGCAATT
24h_F_025	PREDICTED: flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase-like [<i>Glycine max</i>]	106	CCCAGCGCTCTTACCGTCCT	CAAAGGAATCCGGGACAGGC
24h_F_110	Nodulation receptor kinase precursor, putative [<i>Ricinus communis</i>]	110	GCATGCGTATCTCCAAGTCC	CAGTTTCATGCCTCGGGTGC
24h_F_317	Light harvesting chlorophyll A/B binding protein [<i>Prunus persica</i>]	115	CGGTGACTACGGGTGGGACA	ACAGCCCAAAGCACCAAGCA
24h_F_051	Pathogenesis-related protein 1a [<i>Malus × domestica</i>]	121	GGCGGAGAAAGCCGACTACAA	GCACCTCACTTTTGCGCACC
24h_F_069	RecName: Full=Major allergen Pyr c 1; AltName: Allergen=Pyr c 1 [<i>Pyrus communis</i>]	110	TTGGTGGCATCTGGAAGTGGTT	TGGGCCTCCTCTTTCCAGC
24h_F_078	Major allergen mal d 1 [<i>Malus × domestica</i>]	107	GCGGCATGTGGAAGTGGTTC	TGGGCCTCCTCTTTCCAGC
24h_F_002	Ripening-induced protein [<i>Fragaria vesca</i>]	117	ACGATGAGAACAAAGGCCGCA	TGGCAATGCAGGTGCTTTCA
24h_F_123	Conserved hypothetical protein [<i>Ricinus communis</i>]	112	CCAAGGAGCTGCTGTTGGACA	GGAACCCGTCAGTGCATTTCG
24h_F_004	Hypothetical protein POPTRDRAFT_783792 [<i>Populus trichocarpa</i>]	119	CGAGCAATGGAGGCCAATGA	CCACCTCTGCAGTTGCCCTG
24h_F_170	Hypothetical protein VITISV_016666 [<i>Vitis vinifera</i>]	115	CGTGCAACACCAGAGGCTGA	TCGCATTAGTTGGGCGGAA
24h_F_011	Predicted protein [<i>Populus trichocarpa</i>]	101	AAAAGTGGGGCAGAACGCCT	TTTCCGACTTCCAGCATCGC
24h_F_154	Unknown [<i>Populus trichocarpa</i>]	144	CCGGTGTAGGCATGGCTGAG	GCACCAGATTGGTCGGATC
24h_F_007	Unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>]	147	TCCGAAGAGCAAGGCTGGAA	TTTCCGGTCAAAGTAGCCG
24h_F_053	Unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>]	134	TTTGGCGGAGAGAAAGTTGGA	CCCGCCCATGCTGATAACAA
24h_F_080	Unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>]	125	GGCCACTTCCCCTTCTCTGC	CCAGCTCCACCATCAGGTGC
48h_F_272	Cysteine protease [<i>Prunus armeniaca</i>]	137	GCGGTATGCGATTTTCTCGG	GAGCAGCTCCCAACCTGTGC
48h_F_095	Cysteine protease inhibitor [<i>Pyrus communis</i>]	142	GGTGTGGGTAAAGCCATGGGA	CCTTGCCCTCCCTTGTTCGAC
48h_F_040	PREDICTED: dihydroflavonol-4-reductase isoform 2 [<i>Vitis vinifera</i>]	116	CGTCCCCTGGCATTGATGAT	TGCTAGAGCCCACGCTGTCC
48h_F_169	PREDICTED: glutathione transferase GST 23 [<i>Vitis vinifera</i>]	133	TTTGGCGGAGAGAAAGTTGGA	CCCGCCCATGCTGATAACAA
48h_F_003	Sesquiterpene cyclase [<i>Fragaria vesca</i>]	109	TGGAAAGTTGTTGCCCATGC	GGCTGTTACCAACAGAAGCCG
48h_F_363	GMFP5, partial [<i>Glycine max</i>]	145	GGGACGCTTTCCAACCACAA	CGTTCCGATTCTCGTCGTG
48h_F_213	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase [<i>Populus trichocarpa</i>]	115	AGCCGTGGTGAACGCAGAAA	CTTTGCCGGCTTCTTTTCGT
48h_F_082	Dormancy-associated MADS-box transcription factor [<i>Pyrus pyrifolia</i> var. <i>culta</i>]	145	GCCTTGGCCGTGTGATTCAA	TCCGGTCCGCTATCTCCTCC
48h_F_012	PREDICTED: F_box/kelch-repeat protein At3g06240-like [<i>Vitis vinifera</i>]	142	CCATCCACCAGGCAGGTTCA	CGAAAACGCCGGCCTTACTT
48h_F_031	Peptide transporter, putative [<i>Ricinus communis</i>]	123	GGATGGGCATTGGCCTCTTC	CTGACATGGGCATGTGCTCG
48h_F_053	Cytochrome P450 like_TBP [<i>Nicotiana tabacum</i>]	133	CTTGGCTGTGGTTTCGCTGG	CGGGTAAACGGCGGGAGTAA
48h_F_080	Cytochrome P450, putative [<i>Ricinus communis</i>]	145	GGGGATCGATGATTCCGAGC	CAACTCCTTTTCGACGCGCAT
48h_F_001	Light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein [<i>Prunus persica</i>]	115	CGGTGACTACGGGTGGGACA	ACAGCCCAAAGCACCAAGCA
48h_F_174	Light harvesting chlorophyll A/B binding protein [<i>Prunus persica</i>]	134	CTCTGAGGGCGGCCTTGACT	CACCGAGTGGTCTCCACCA
48h_F_033	Major allergen mal d 1 [<i>Malus × domestica</i>]	101	CAAGATTGCACCCAGGCAA	CGTATTGGCTGCCTTCACCG
48h_F_227	Major allergen Mal d 1.03B [<i>Malus × domestica</i>]	100	GCAGCGGTTCCGTCATCAAG	TGGGAGGCCCTTCTTTGCC
48h_F_026	PREDICTED: stem-specific protein TSJT1-like isoform 2 [<i>Glycine max</i>]	139	TGTATTGGGGCATTGCAGCC	TCCTTTTGGGAAAGGGGCAA
48h_F_173	Conserved hypothetical protein [<i>Ricinus communis</i>]	110	TCCCAAGAGCAAGGCTGGAA	CCCCGCTGCTCAATTCAGTG
48h_F_050	Hypothetical protein VITISV_037464 [<i>Vitis vinifera</i>]	113	CACTGAATTGAGCAGCGGGG	TGGTGCAGTCCATGGTGGAA
48h_F_102	Hypothetical protein POPTRDRAFT_783792 [<i>Populus trichocarpa</i>]	119	CGAGCAATGGAGGCCAATGA	CCACCTCTGCAGTTGCCCTG
48h_F_151	Hypothetical protein VITISV_006850 [<i>Vitis vinifera</i>]	127	CCATTGTGCAGGAGCACTGGA	TCATTTGGGCGCTGCAACTT
48h_F_002	Predicted protein [<i>Populus trichocarpa</i>]	100	TCCCAAGATACAATGGCGTGC	ACGTGCTTCGTTCCGCATGT
48h_F_051	Predicted protein [<i>Populus trichocarpa</i>]	144	GGGGGCAGTGTAGTGGCC	GGGCCCTTTGGGGTCTATCA
48h_F_158	Predicted protein [<i>Populus trichocarpa</i>]	128	AAGTAAGGCCGGCGTTTTCG	CCCCGTTGAGTAGGGTTCCG
48h_F_010	Unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>]	120	TCGCGGCAACACCTTCATTC	CAGCCGCGCCTTGGTACATA
48h_F_208	Unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>]	120	CGGCCGAGGTGTGGATATTG	CCCGCCCATGCTGATAACAA

cycle를 45회 하여 실시하였으며 마지막 반응으로써 60℃에서 95℃까지 0.5℃씩 온도를 상승시켜 melting curve분석을 수행하였다. RT PCR은 LightCycler®480 II (Roche, Rotkreuz, Zug, Switzerland)를 사용하여 3회 반복 분석하였으며 positive calibrate는 무처리 '스위트스킨' 잎 cDNA가 사용되었다. 통계적 분석 결과는 T-test를 통해 피평가 되었고, 통계적 유의성은 $P<0.05$ 로 정하였다.

결과 및 고찰

Subtracted cDNA 라이브러리 제작

24H와 48H에서 각각 146과 136개의 clone을 무작위로 선발하여 염기서열을 분석하였다(Table 2). BLASTX 분석 결과 database와 유사성을 가지지 못하는 unmatched cDNA의 비율은 24H에서 5.5%, 48H에서 2.9%였으며 두 처리군에서 차등적으로 발현되는 유전자를 비교하였을 때 9개의 유전자가 24H에서만 발현되었고 14개의 유전자가 48H에서 특이적으로 발현되었다.

차등 발현 유전자의 염기서열 및 기능 분석

각각의 cDNA 라이브러리의 염기서열을 분석한 결과, 24H와 48H에서 20개와 26개의 단일 유전자들이 차등 발현되었으며 방어와 스트레스에 관련된 유전자의 비율은 각각 40%와 42%였다(Table 1). 사과의 경우 검은별무늬병에 대한 저항성 품종과 감수성 품종간의 SSH분석을 통해 본 실험과 유사한 40%의 비율을 보고하였다(Degenhardt et al. 2005). 식물의 방어반응인 systemic acquired resistance (SAR)에 관련된 PR protein family 유전자로써 24H에서는 pathogenesis-related protein 1a, major allergen Pyr c 1과 major allergen mal d 1, 48H에서는 major allergen mal d 1과 major allergen Mal d 1.03B 유전자가 차등적으로 발현되었으며, 방어반응에 관련된 유전자로는 24H에서 beta-glucosidase, flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase-like, acyl transferase/acyl hydrolase/

lysophospholipase-like protein, catalase, flavoprotein wrbA, 48H에서 sesquiterpene cyclase, F-box/kelch-repeat protein, peptide transporter, dihydroflavonol-4-reductase isoform 2, cysteine protease inhibitor, glutathione transferase GST 23, 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, cysteine protease, GMFP5 이었다.

Real-time PCR을 이용한 선발된 유전자 발현검정

'93-3-98'에 *V. nashicola*를 접종하여 차등적으로 높게 발현되는 유전자를 탐색하기 위해 24시간 병 접종 후 샘플을 채취하였으며 real-time PCR을 이용하여 유전자의 발현을 조사하였다(Table 3). 유전자의 발현을 분석한 결과 beta-glucosidase, unknown, sesquiterpene cyclase를 제외한 ESTs에서 24시간 병 접종 후 유전자의 발현이 증가하는 것을 보여주었으며, 특히 46개의 DEGs중에서 ripening-induced protein, hypothetical protein POPTRDRAFT_783792, major allergen mal d 1, flavoprotein wrbA, unnamed protein product, hypothetical protein VITISV_037464, hypothetical protein POPTRDRAFT_783792, conserved hypothetical protein, 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase의 9개 유전자가 특이적으로 높게 발현되었다. 대부분의 PR protein 유전자는 24시간 병 접종 후 발현이 증가하였으며, major allergen Pyr c 1의 경우 배 검은별무늬병 저항성 품종 '황실리'에 *V. nashicola*를 96시간 접종하여 무처리 군과 유전자의 발현을 비교하였을 때 1.9-fold 발현이 증가 되었지만(Shin et al. 2012) 본 실험에서는 28.79-fold의 높은 발현차이를 보여주어 조사 품종의 저항성 정도와 접종 후 RNA 추출시기가 이 유전자 발현이 영향을 미치는 것을 확인하였다.

선발된 ESTs의 품종간 발현 비교분석

선행된 real-time PCR 결과를 바탕으로 5배 이상 높은 발현을 가지는 27개의 유전자를 선발하여 고도 저항성 품종 'Bartlett'부터 고도 감수성 품종 '스위트스킨'까지 7품종을

Table 2. Characteristics of SSH libraries from '93-3-98' pear leaves harvested at 24 and 48 hr after inoculation with *V. nashicola*.

Inoculation group	No. of clones sequenced	No. of BLASTX matched cDNA	No. of BLASTX unmatched cDNA	No. of differentially expressed clones
24H	146	138	8	9
48H	136	132	4	14

24H: '93-3-98' 24hr vs. 'Sweet Skin' 24hr, 48H: '93-3-98' 48hr vs. 'Sweet Skin' 48hr

Table 3. Relative expression of selected putative ESTs from ‘93-3-98’ pear leaves harvested at 24 hr after inoculation with *V. nashicola*. Quantitative real-time PCR was performed to measure the relative expression of each transcript of the ESTs. Actin gene was used as an endogenous control and the data were calibrated relative to the transcript levels in cDNA from uninoculated ‘93-3-98’ pear leaves.

Clone No.	Accession No.	Annotation	Relative expression	e-value	Identity
24h_F_115	NP_199172.1	Acyl transferase/acyl hydrolase/lysophospholipase-like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	4.65	8e-24	39
24h_F_008	AEN94900.1	Beta-glucosidase [<i>Malus × domestica</i>]	0.45	5e-36	81
24h_F_140	CAB56850.1	Catalase [<i>Prunus persica</i>]	8.07	2e-68	89
24h_F_001	XP_002515206.1	Chlorophyll A/B binding protein, putative [<i>Ricinus communis</i>]	15.18	2e-120	89
24h_F_314	XP_002518592.1	Flavoprotein wrbA, putative [<i>Ricinus communis</i>]	51.54	4e-88	81
24h_F_025	XP_003556632.1	PREDICTED: flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase-like [<i>Glycine max</i>]	8.12	5e-68	61
24h_F_110	XP_002515909.1	Nodulation receptor kinase precursor, putative [<i>Ricinus communis</i>]	2.96	9e-28	61
24h_F_317	AAC34983.1	Light harvesting chlorophyll A/B binding protein [<i>Prunus persica</i>]	7.11	3e-131	94
24h_F_051	ABC47922.1	Pathogenesis-related protein 1a [<i>Malus × domestica</i>]	35.14	6e-56	96
24h_F_069	O65200.1	RecName: Full=Major allergen Pyr c 1; AltName: Allergen=Pyr c 1 [<i>Pyrus communis</i>]	28.79	5e-55	92
24h_F_078	AAD26552.1	Major allergen mal d 1 [<i>Malus X domestica</i>]	60.14	7e-58	94
24h_F_002	CAA04770.1	Ripening-induced protein [<i>Fragaria vesca</i>]	50.89	6e-47	64
24h_F_123	XP_002509872.1	Conserved hypothetical protein [<i>Ricinus communis</i>]	39.06	3e-12	33
24h_F_004	XP_002329557.1	Hypothetical protein POPTRDRAFT_783792 [<i>Populus trichocarpa</i>]	610.00	4e-75	60
24h_F_170	CAN67843.1	Hypothetical protein VITISV_016666 [<i>Vitis vinifera</i>]	4.88	6e-53	57
24h_F_011	XP_002325312.1	Predicted protein [<i>Populus trichocarpa</i>]	5.81	2e-51	52
24h_F_154	ABK94717.1	Unknown [<i>Populus trichocarpa</i>]	0.75	4e-118	92
24h_F_007	CBI22611.3	Unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>]	24.36	2e-15	44
24h_F_053	CBI39960.3	Unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>]	15.14	8e-23	64
24h_F_080	CBI40507.3	Unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>]	22.81	1e-89	84
48h_F_272	AAB97142.1	Cysteine protease [<i>Prunus armeniaca</i>]	2.83	5e-94	91
48h_F_095	AAB71505.1	Cysteine protease inhibitor [<i>Pyrus communis</i>]	1.64	2e-31	97
48h_F_040	XP_002272488.1	PREDICTED: dihydroflavonol-4-reductase isoform 2 [<i>Vitis vinifera</i>]	2.01	6e-88	76
48h_F_169	XP_002264054.1	PREDICTED: glutathione transferase GST 23 [<i>Vitis vinifera</i>]	2.21	4e-39	65
48h_F_003	CAA04773.1	Sesquiterpene cyclase [<i>Fragaria vesca</i>]	0.05	4e-103	69
48h_F_363	AAD09514.1	GMFP5, partial [<i>Glycine max</i>]	10.56	8e-04	38
48h_F_213	XP_002330269.1	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase [<i>Populus trichocarpa</i>]	72.90	2e-68	56
48h_F_082	BAI48074.1	Dormancy-associated MADS-box transcription factor [<i>Pyrus pyrifolia</i> var. <i>culta</i>]	1.25	2e-74	97
48h_F_012	XP_002268486.1	PREDICTED: F_box/kelch-repeat protein At3g06240-like [<i>Vitis vinifera</i>]	7.27	3e-23	40
48h_F_031	XP_002520427.1	Peptide transporter, putative [<i>Ricinus communis</i>]	3.02	2e-132	74
48h_F_053	BAA10929.1	Cytochrome P450 like_TBP [<i>Nicotiana tabacum</i>]	2.05	6e-71	76
48h_F_080	XP_002529893.1	Cytochrome P450, putative [<i>Ricinus communis</i>]	11.93	1e-125	73
48h_F_001	AAA50310.1	Light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein [<i>Prunus persica</i>]	3.66	8e-93	96
48h_F_174	AAC34983.1	Light harvesting chlorophyll A/B binding protein [<i>Prunus persica</i>]	7.11	6e-135	97
48h_F_033	AAD26547.1	Major allergen mal d 1 [<i>Malus × domestica</i>]	9.35	7e-92	99
48h_F_227	AAX18314.1	Major allergen Mal d 1.03B [<i>Malus × domestica</i>]	36.57	2e-44	99
48h_F_026	XP_003543255.1	PREDICTED: stem-specific protein TSJT1-like isoform 2 [<i>Glycine max</i>]	23.81	1e-80	86
48h_F_173	XP_002513626.1	Conserved hypothetical protein [<i>Ricinus communis</i>]	53.42	5e-26	38
48h_F_050	CAN79447.1	Hypothetical protein VITISV_037464 [<i>Vitis vinifera</i>]	57.80	3e-12	43
48h_F_102	XP_002329557.1	Hypothetical protein POPTRDRAFT_783792 [<i>Populus trichocarpa</i>]	610.00	4e-75	60
48h_F_151	CAN78656.1	Hypothetical protein VITISV_006850 [<i>Vitis vinifera</i>]	9.43	5e-96	71
48h_F_002	XP_002313981.1	Predicted protein [<i>Populus trichocarpa</i>]	1.19	4e-143	92
48h_F_051	XP_002323668.1	Predicted protein [<i>Populus trichocarpa</i>]	1.86	9e-122	88
48h_F_158	XP_002328907.1	Predicted protein [<i>Populus trichocarpa</i>]	9.99	5e-21	41
48h_F_010	CBI22611.3	Unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>]	52.92	2e-19	40
48h_F_208	CBI39960.3	Unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>]	4.70	3e-23	63

대상으로 접종시간(24, 48, 72, 96, 120시간)에 따른 유전자의 발현을 조사한 결과 major allergen Pyr c 1, F-Box/kelch-repeat protein, flavoprotein wrbA, hypothetical protein POPTRDRAFT_783792 유전자에서 저항성 품종 특이적 발현 차이를 보여주었다. Major allergen Pyr c 1은 모든 품종에서 24시간 병 접종 후 발현이 높아지는 것을 보여주었는데

특히 고도 저항성 품종인 '93-3-98'에서 가장 높은 발현을 보여주었고(Fig. 1A) 높은 발현을 가지는 고도 저항성 품종 'Bartlett'의 경우 접종 24시간 처리에서 발현이 증가하다가 48시간 처리에서 가장 높은 발현을 보였으며 이후 급격히 감소하였다. 따라서 major allergen Pyr c 1은 고도 저항성 품종에서 높게 발현되며 병 접종 초기에 발현이 증가하는 경향

Fig. 1. Relative expression of Major allergen Pyr c 1 (A), F-box/kelch-repeat protein (B), Flavoprotein wrbA (C) and hypothetical protein (D) genes in various pear cultivars having different scab-susceptibilities at 0, 24, 48, 72, 96 and 120 h after inoculation with *V. nashicola*. BT, 'Bartlett'; PS, '93-3-98'; HS, 'Hwangsilri'; GC, 'Gamcheonbae'; WH, 'Wonhwang'; NI, 'Niitaka'; SS, 'Sweat Skin'. Data are expressed as mean $\pm$ standard error (A-D, n=3). *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001, ****p < 0.0001. Quantitative real-time PCR was performed to measure the relative expression of each transcript of the ESTs. 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.

을 보였다.

모든 식물들은 병원체로부터 공격을 받았을 때 다양한 방어 유전자들이 발현된다. 그 중 대표적인 단백질 중의 하나가 PR protein으로(Van Loon, 1985) SAR 메커니즘에 중요하게 관련되어 있다. PR protein은 구조적 특징과 생물학적 활성화에 기초하여 17가지의 family로 구분되며 beta-1,3-glucanase, chitinase, thaumatin-like protein, peroxidase, ribosome-inactivating protein, defense, thionins, nonspecific lipid transfer proteins, oxalate oxidase, oxalate-oxidase-like protein, protease inhibitor 등이 포함되어 있다(Van Loon & Van Strien 1999). 이들 중 chitinase와 β -1,3-glucanases는 중요한 가수분해 효소로서 특이적 가수분해 활성화와 세포벽의 파괴 등을 통해 균류의 성장을 저해할 수 있는 것으로 알려져 있다(Mauch et al. 1988). Major allergen Pyr c 1은 PR10 Group에 속하여(Lebel et al. 2010) 상처(Graham et al. 2003), 병원체 감염(Park et al. 2004), 발아(Leubner-Metzger 2002), 물리적 스트레스(Dat et al. 2000) 등에 의해 발현이 유도되어 진다. PR10은 ribonuclease 활성을 가지며(Filipenko et al. 2013) 환경적인 스트레스나 병원체에 의해 공격을 받았을 때 거의 모든 기관 및 조직에서 유전자 발현이 급격히 증가함에 따라 방어반응에 중요하게 관여하는 것으로 인식되고 있다(Liu & Ekramoddoullah 2006).

Major allergen Pyr c 1과 마찬가지로 F-Box/kelch-repeat protein 유전자의 발현을 분석한 결과 다른 품종에 비해 'Bartlett'에서 가장 높게 발현되었으며 다음으로 '93-3-98'에서 높았다(Fig. 2B). 병 접종 시간에 따른 발현양상은 24시간 처리구에서 높게 발현 되었으며 48시간 처리구에서 다소 감소하다가 72시간 이후 급격히 감소하였다.

F-box protein은 최소 하나 이상의 F-box domain을 포함하는 단백질로 Skp, Cullin, F-box containing complex (SCF complex)의 한 구성 분자로 최초로 동정되었으며(Schulman et al. 2000) F-box domain은 특징적으로 protein-protein interaction에 관여하여 다양한 기질 단백질과 결합을 통해 특정 단백질의 ubiquitination을 유도함으로써 proteasome에서 단백질 분해에 작용한다. 이를 통해 단백질의 안정성 조절과 cell cycle 조절 및 다양한 세포내 신호전달에 관여하고 있다(Craig & Tyers 1999). 뿐만 아니라 식물호르몬 신호전달에 관여함으로써 식물 세포의 분화 과정이나 스트레스 반응에서도 중요하게 작용하고 있음이 보고되고 있다(Yan et al. 2011). 최근 식물에 있어서 protease와 더불어 ubiquitin을 통

한 단백질 파괴가 스트레스 환경뿐만 아니라 병 저항성에 관여하고 있음이 많이 보고되고 있다. 쌀에서 많이 발현되는 F-box protein 중의 하나인 *OsDRF1*의 과 발현에 의해 병 저항성이 증가됨이 보고되었고(Cao et al. 2008), 병원체 인식에 중요하게 작용하는 수용체 중의 하나인 NLR의 활성화도 F-box protein에 의한 ubiquitination에 의해 조절 받고 있음이 보고되었다(Cheng et al. 2011). 자세한 기작에 대한 연구는 더 필요하겠지만, F-box protein에 의한 방어 메커니즘은 독성에 관여하는 단백질을 ubiquitin화 시켜 분해함으로써 독성에 대한 저항성을 나타낼 것으로 기대되고 있다(Hwang et al. 2009).

Flavoprotein wrbA은 고도 저항성 품종 'Bartlett', '93-3-98'에서 24시간 병 접종 이후 높은 발현을 보였고 저항성 품종 '황실리' 또한 감수성 품종과 비교하여 24시간 병 접종 처리구에서 높은 발현을 보였다(Fig. 2C). Flavoprotein wrbA은 다양한 퀴논에 의해 NAD(P)H를 NAD(P)⁺로 산화시킴으로써 활성산소를 제거하는 효소로 최근 염 저항성 잔디품종에서 특이적으로 발현됨이 보고되었다(Liu et al. 2012).

Hypothetical protein 또한 다른 품종에 비해 고도 저항성 품종 'Bartlett', '93-3-98'에서 24시간 병 접종 이후 높은 발현을 보였으며, 저항성 품종 '황실리'에서도 고도 저항성 품종과 비슷한 높은 발현을 보였다(Fig. 2D). 이 결과는 hypothetical protein의 정확한 기능을 확인할 수 없으나 저항성 품종에서 특이적으로 발현되는 것으로 보아 저항성에 관련되어 있을 것이라 보여진다.

Major allergen Pyr c 1, F-Box/kelch-repeat protein, flavoprotein wrbA, hypothetical protein 유전자가 배 검은별무늬병에 관련하여 어떠한 역할을 하는지 정확히 알 수 없다. 하지만 앞으로 배 검은별무늬병 감수성 품종의 형질전환체계를 확립하여 이러한 유전자를 도입한 후 표현형과 유전자의 발현을 분석한다면 좀더 구체적인 기능을 밝힐 수 있을 것이라 판단된다.

초 록

본 연구는 *V. nashicola*에 의해 발생하는 배 검은별무늬병에 저항성을 가지는 유전자를 선발하고자 고도 저항성 '93-3-98'과 고도 감수성 '스위트스킨'에 병 접종후 24시간, 48시간후 엽을 채취하여 suppression subtractive hybridization을 수행하였다. ESTs 분석결과 '93-3-98'에서만 발현된 유전자는 24H(tester, 24시간 '93-3-98; driver, 24시간 '스위트스

킨')과 48H(tester, 48시간 '93-3-98; driver, 48시간 '스위트 스킨')에서 각각 9개, 14개였으며 방어 또는 스트레스에 관련된 유전자의 비율은 각각 40%와 42%였다. 식물의 방어반응에 관련된 PR protein family 유전자로써는 24H에서 pathogenesis-related protein 1a, major allergen Pyr c 1과 allergen mal d 1, 48H에서는 major allergen Mal d 1.03B 유전자가 특이적으로 발현되었고 다수의 방어반응에 관련된 유전자들도 확인되었다. Major allergen Pyr c 1, F-Box/kelch-repeat protein, flavoprotein wrbA, hypothetical protein POPTRDRAFT_783792은 고도저항성 'Bartlett'과 '93-3-98'에서만 높게 발현되었으며 중도저항성 '감천배'와 감수성 '원황', 고도 감수성 '신고'와 '스위트스킨'에서는 낮게 발현되어 검은별무늬병 저항성 연관 유전자로 확인되었다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(과제번호: PJ0065952013)의 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

1. Bouvier L, Bourcy M, Boulay M, Tellier M, Guérif P, Denancé C, Durel CE, Lespinasse Y. 2012. A new pear scab resistance gene *Rvp1* from the European pear cultivar 'Navara' maps in a genomic region syntenic to an apple scab resistance gene cluster on linkage group 2. *Tree Genet. Genomes*. 8: 53-60.
2. Cao Y, Yang Y, Zhang H, Li D, Zheng Z, Song F. 2008. Overexpression of a rice defense-related F-box protein gene *OsDRF1* in tobacco improves disease resistance through potentiation of defense gene expression. *Physiol. Plantarum*. 134: 440-452.
3. Cheng YT, Li Y, Huang S, Huang Y, Dong X, Zhang Y, Li X. 2011. Stability of plant immune-receptor resistance proteins is controlled by SKP1-CULLIN1-F-box (SCF)-mediated protein degradation. *P. Natl. Acad. Sci*. 108: 14694-14699.
4. Cho KH., Shin IS, Kim KT, Suh EJ, Hong SS, Lee HJ. 2009. Development of AFLP and CAPS markers linked to the scab resistance gene, *Rvn2*, in an inter-specific hybrid pear (*Pyrus* spp.). *Hort. Sci. Biotechnol*. 84: 619-624.
5. Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life. Sci*. 57: 779-795.
6. Degenhardt J, Al-Masri AN, Kürkcüoglu S, Szankowski I, Gau AE. 2005. Characterization by suppression subtractive hybridization of transcripts that are differentially expressed in leaves of apple scab-resistant and susceptible cultivars of *Malus domestica*. *Mol. Genet. Genomics*. 273: 326-335.
7. 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.
8. Filipenko E, Kochetov A, Kanayama Y, Malinovsky V, Shumny V. 2013. PR-proteins with ribonuclease activity and plant resistance against pathogenic fungi. *Russ. J. Genet: Applied Research*. 3: 474-480.
9. Graham M, Weidner J, Wheeler K, Pelow M, Graham T. 2003. Induced expression of pathogenesis-related protein genes in soybean by wounding and the *Phytophthora sojae* cell wall glucan elicitor. *Physiol Mol. Plant Pathol*. 63: 141-149.
10. Hammond-Kosack KE, Jones J. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*. 8: 1773.
11. Hwang GW, Wada N, Kuge S, Naganuma A. 2009. Overexpression of the novel F-box protein Ymr258c confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Toxicol. Sci*. p.34.
12. 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. Biol. Rep*. 22: 269-278.
13. Ishii H, Udagawa H, Nishimoto S, Tsuda T, Nakashima H. 1992. Scab resistance in pear species and cultivars. *Acta. Phytopathol. Hun*. 27: 293-298.
14. Kim SH, Koh GC, Hwang B, Lee HJ, 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.
15. Lebel S, Schellenbaum P, Walter B, Maillot P. 2010. Characterisation of the *Vitis vinifera* PR10 multigene family. *BMC Plant Biol*. 10: 184.
16. Leubner-Metzger G. 2002. Seed after-ripening and over-expression of class I β -1, 3-glucanase confer maternal effects on tobacco testa rupture and dormancy release. *Planta*. 215: 959-968.

17. Liu JJ, 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.
18. Liu Y, Du H, He X, Huang B, Wang Z. 2012. Identification of differentially expressed salt-responsive proteins in roots of two perennial grass species contrasting in salinity tolerance. *J Plant Physiol.* 169: 117-126.
19. Mauch F, Hadwiger LA, Boller T. 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue I. Purification and characterization of two chitinases and two β -1, 3-glucanases differentially regulated during development and in response to fungal infection. *Plant Physiol.* 87: 325-333.
20. Moody D. 2001. Genomics techniques: An overview of methods for the study of gene expression. *J. Anim. Sci.* 79(Suppl): E1280-E1135.
21. Pan D, He N, Yang Z, Liu H, Xu X. 2005. Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization. *Dev. Comp. Immunol.* 29: 103-112.
22. Paparu P, Dubois T, Coyne D, Viljoen A. 2007. Defense-related gene expression in susceptible and tolerant bananas (*Musa* spp.) following inoculation with non-pathogenic *Fusarium oxysporum* endophytes and challenge with *Radopholus similis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 71: 149-157.
23. 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.
24. 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.
25. Schulman BA, Carrano AC, Jeffrey PD, Bowen Z, Kinnucan ER, Finnin MS, Elledge SJ, Harper JW, Pagano M, Pavletich NP. 2000. Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature.* 408: 381-386.
26. Shin IS, Bae KM, Nam GY, Kang BC, 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.
27. Sticher L, Mauch-Mani B, M'ettraux JP. 1997. Systemic Acquired Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 235-70.
28. Terakami S, Shoda M, Adachi Y, Gonai T, Kasumi M, Sawamura Y, Iketani H, Kotobuki K, Patocchi A, Gessler C. 2006. Genetic mapping of the pear scab resistance gene *Vnk* of Japanese pear cultivar Kinchaku. *Theor. Appl. Genet.* 113: 743-752.
29. Van Loon L. 1985. Pathogenesis-related proteins. *Plant. Mol. Biol.* 4: 111-116.
30. Van Loon L, 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.
31. Xiong L, Lee MW, Qi M, Yang Y. 2001. Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 14: 685-692.
32. Yan YS, Chen XY, Yang K, Sun ZX, Fu YP, Zhang YM, Fang RX. 2011. Overexpression of an F-box protein gene reduces abiotic stress tolerance and promotes root growth in rice. *Mol. Plant.* 4: 190-197.
33. Zheng QL, Ishii H. 2009. Molecular cloning and expression analysis of genes related to phosphatidic acid synthesis in Japanese pear leaves inoculated with *Venturia nashicola*. *J. Gem. Plant Pathol.* 75: 413-421.