

특허청구의 범위

청구항 1

고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* L. cv. Nockwang)에서 유래된 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 리폭시제나제(CaLOX1) 유전자.

청구항 2

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 리폭시제나제(CaLOX1) 단백질.

청구항 3

제1항 기재의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 4

제1항 기재의 CaLOX1 유전자를 바이러스-유도 유전자침묵 현상(virus-induced gene silencing, VIGS)를 위한 벡터인 TRV2(Tobacco Rattle Virus 2) 벡터에 삽입시켜 제조한 재조합벡터 TRV2::CaLOX1.

청구항 5

제1항 기재의 CaLOX1 유전자를 pBIN35S에 삽입시켜 제조한 재조합벡터 pBIN35S::CaLOX1.

청구항 6

제1항 기재의 유전자 또는 제3항 기재의 재조합 벡터에 의해 형질전환된 애기장대.

청구항 7

고추 세균성 점무늬병의 병원성 또는 비병원성 세균을 접종한 식물체로부터 RNA 분리하여 노던블롯 분석으로 제1항 기재 CaLOX1 유전자의 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 저항성 탐색방법.

청구항 8

에틸렌, 메틸 자스모네이트, 메틸 비올로젠, 살리실산 및 염화나트륨 중 어느 하나를 처리한 식물체로부터 RNA 분리하여 노던블롯 분석으로 제1항 기재 CaLOX1 유전자의 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 저항성 탐색방법.

청구항 9

상처스트레스 또는 저온스트레스를 처리한 식물체로부터 RNA 분리하여 노던블롯 분석으로 제1항 기재 CaLOX1 유전자의 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 저항성 탐색방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1>

본 발명은 식물병 저항성과 관련된 신규 유전자인 고추 리폭시제나제(Pepper Lipoyxygenase1, CaLOX1) 유전자, 이를 이용한 병원균 저항성 형질전환 식물체 및 식물체 저항성 탐색방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 고추식물의 세균병인 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성 균주와 비병원성 균주에 감염될 때 저항성 반응에서 강하게 발현되는 신규 유전자인 리폭시제나제 (CaLOX1)를 분리하여 해독하고, 여기에서 얻어진 염기서열 및 아미노산 서열을 제공하며, 생물적/화학적/물리적 저항성 유도 처리 시 저항성 관련 유전자 CaLOX1의 차별적 발현 여부를 탐색하는 저항성 탐색방법에 관한 것이다. 또한 고추 CaLOX1 유전자를 애기장대에 형질전환을 통하여 과다발현시키고, 바이러스-유도 유전자침묵 현상(virus-induced gene silencing, VIGS)의 방법을 통하여 유전자의 발현을 불능화(knock out)시킨 고추식물과 CaLOX1 오솔로그(ortholog)인 애기장대 AtLOX1의 불활성화 돌연변이에서 병저항성에 대한 리폭시제나제 유전자의 기능을 확인한

것으로 식물병 저항성의 탐색방법을 제공하고 식물병 저항성 식물체의 제작에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 병해충에 의한 작물생산 피해를 최소화하기 위하여 고추를 비롯한 다양한 경제 작물의 병 저항성 품종의 육성 프로그램들이 꾸준히 진행되어 왔으며, 병 저항성에 대한 이해 및 이의 실제적 응용을 위해 식물에서의 저항성 기작에 대한 연구가 고추 모델식물로서 사용되고 있다.
- <3> 식물이 병에 감염되면, 기주식물은 여러 가지 세포내 대사 경로에서 방어기작을 작동시켜서, 병원균 감염 초기에 기주식물과 식물병원균간의 상호작용에서 친화적, 불친화적 반응으로 나뉘어 결정되고, 이에 따라 병의 진전을 제한시킬 수 있는지의 저항성(방어)반응 여부가 결정되는 것이다.
- <4> 불친화적 저항성 반응에서, 감염된 식물은 병원균의 침입을 인식(recognition)하고, 이에 대하여 감염부위의 세포에 국부적 세포 죽음과 같은 과민성 반응(hypersensitive response), 캘러스(callose)의 축적, 리그닌(lignin)화에 의한 세포벽의 비후화 등의 반응을 나타내며, 피토알렉신(phytoalexin) 등 여러 종류의 항균성 물질을 생성하고, 소위 병생성 관련 단백질[pathogenesis related (PR) protein]이라 불리우는 방어관련 단백질을 생성하는 것으로 알려져 있다.
- <5> 이러한 식물방어 기작들은 병원균이 침입하는 경우뿐만 아니라, 에틸렌이나 메틸 자스모네이트 등 인위적인 자극에 의해서도 나타나며, 물리적 상처나 염도, 온도 등의 환경적 스트레스에 의해서도 나타난다고 보고되고 있다.
- <6> 인위적인 생물학적/물리적/환경적 스트레스에 대하여 식물은 방어 반응을 나타내게 되는데 특히 식물이 병원체에 대하여 방어할 수 있는 능력에서 중요한 역할을 하는 것은 식물과 병원균의 상호작용에 의한 식물의 병 저항성의 발현과 이에 관련된 신호전달경로이다. 이에 관하여, 식물의 병 방어 기작 및 그와 관련된 유전자가 어떻게 병원균을 인식하고 인식의 결과 어떠한 전달 경로를 통하여 식물 전체에 반응을 하게 되는지 중요하게 연구되어져 왔으며 주된 관심사는 생물학/생화학/세포생물학적인 방법을 이용한 병 저항성(방어) 유전자의 기능에 대한 연구를 통하여 이루어져 왔다.
- <7> 이러한 병 저항성(방어) 유전자의 기능에 대한 연구는 식물의 생리 및 저항성에 관련된 기작이 연구에 대한 가치를 가짐은 물론, 연구 대상 작물의 분자유종을 통한 저항성 품종의 개발에 기여할 수 있다. 근래의 작물 분자유종기술에 대한 연구는 유전공학적인 기술의 개입에 의하여 가속화되었으며, 병 저항성(방어) 유전자를 통한 작물 분자유종은 모든 종의 유전자를 재료로 사용할 수 있으며 기존의 계통단위로 가능하던 육종기술을 유전자 수준에서 가능하도록 하여 보다 효과적인 육종 효과를 보이며 이러한 육종의 효과에 대한 조절이 가능하다는 면에서 현재의 육종의 기술을 극대화시킬 수 있다는 장점이 있다.
- <8> 따라서 식물 병에 저항성을 나타내는 다양한 병생성 관련 단백질(PR protein)의 유전자 정보를 축적함으로써, 이를 이용한 식물병 저항성 탐색을 촉진하고 나아가 식물병 저항성 품종의 개발을 촉진시키는 것은 시급한 당면 과제라고 할 수 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <9> 본 발명은 이와 같은 종래기술 상의 과제를 해결하기 위한 것으로서, 그 목적은, 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대한 방어반응에 관여하는 것으로서 식물병 저항성 관련 유전자의 하나인 리폭시제나제(CaLOX1) 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 서열 정보 및 그에 따른 아미노산 서열 정보를 제공하는 것이다.
- <10> 또한 본 발명은 상기 CaLOX1 유전자를 이용하여 식물병, 화학물질 또는 환경스트레스에 대한 저항성 존재 여부를 탐색하는 저항성 탐색방법을 제공하고자 하는 것이다. 더 나아가, 이 유전자를 이용하여 식물병 또는 환경스트레스 저항성 형질전환 식물체를 제작하는데 그 목적이 있다.
- <11> 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제 해결수단

- <12> 본 발명의 상기 목적은, 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)에 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas*

campestris pv. *vesicatoria*)균을 접종한 후 고추잎으로부터 mRNA를 분리한 다음 cDNA 라이브러리를 제조한 후 이를 스크린하여 신규 저항성 관련 유전자 리폭시제나제 CaLOX1를 확인하여 그 염기서열을 결정하고, 고추 등 식물체에 병원균, 화학물질 또는 환경 스트레스를 접종 또는 처리하여 상기 CaLOX1 유전자의 발현 여부를 조사함으로써 달성하였다.

- <13> 따라서 본 발명은 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* L. cv. Nockwang)에서 유래된 식물체 병저항성과 관련된 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 리폭시제나제(CaLOX1) 유전자 및 서열번호 2의 염기서열을 갖는 분리된 리폭시제나제(CaLOX1) 단백질을 제공한다.
- <14> 또한 본 발명은 상기 유전자를 이용하여 제조한 재조합 벡터 및 형질전환 애기장대를 제공한다.
- <15> 나아가 본 발명은 병원균, 화학물질 및 환경스트레스 중 어느 하나를 접종 또는 처리한 식물체로부터 RNA 분리하여 노던블롯 분석으로 CaLOX1 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병저항성, 화학물질 또는 환경스트레스 저항성 탐색방법을 제공한다.
- <16> 고추식물에서 바이러스-유도 유전자침묵 현상(virus-induced gene silencing, VIGS)를 이용하여 CaLOX1 유전자의 발현을 억제시키고 모델식물인 애기장대를 이용하여 식물을 형질전환시켜서 식물병 저항성을 탐색하는 방법을 제공한다.
- <17> 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- <18> 먼저, 본 발명은 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균주 접종에 대해 과민성 저항성 반응을 나타내는 녹광고추 품종으로부터 mRNA를 분리하여 cDNA 라이브러리를 제작하고, 비병원성 균주를 접종한 고추식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추식물에서 얻은 총 mRNA를 디옥시제닌(digoxigenin)으로 표지하여 프로브(Probe)를 만들고, 이 cDNA와 프로브를 이용 디퍼런셜 하이브리다이제이션(differential hybridization)을 수행하여 병저항성에 관련될 것으로 추정되는 유전자를 선발하여 클론을 수득하고, 이 클론 중 리폭시제나제(CaLOX1) 유전자로 확인된 유전자의 염기서열을 해독(Sequencing)함으로써, CaLOX1로 명명된 고추 녹광품종의 CaLOX1 단백질 코딩 유전자 염기서열(서열번호 1) 및 그로부터 코딩되는 아미노산 서열(서열번호 2)을 제공한다(도 1 참조).
- <19> 다음에, 본 발명은, 병원균, 화학물질 및 환경스트레스 중 어느 하나를 접종 또는 처리한 고추 개체에서 선정된 기관에 대해 상기 CaLOX1 단백질을 유전자로 프로브로 이용하여 CaLOX1 단백질 발현 여부를 확인하는 것으로 이루어지는, 식물체의 저항성 탐색방법을 제공한다.
- <20> 상기 병원균은 고추 세균성 점무늬병의 병원성 또는 비병원성 세균일 수 있고, 상기 화학물질은 에틸렌, 메틸자스모네이트, 메틸 비올로젠, 살리실산 또는 염화나트륨일 수 있고, 상기 환경스트레스는 건조 또는 상처일 수 있다.
- <21> 또한, 본 발명은, 물리적 상처, 환경적 스트레스 등 병원성 세균이 아닌 비생물적 유도방법을 식물체에 적용하고, 이에 대하여 상기 저항성 탐색방법을 이용하여 CaLOX1 단백질 발현 여부를 확인함으로써, 더 용이하고 시간을 절약할 수 있는 새로운 저항성 유도방법을 제공한다.
- <22> 본 발명에 의한 CaLOX1 유전자가 다양한 식물병원균, 화학물질 또는 환경스트레스에 의해 차별적으로 유도 발현되는 것을 실험을 통해 확인하였다(도 2 내지 도 10 참조). 따라서 본 발명에 의한 CaLOX1 유전자는 식물체의 저항성 탐색방법에 이용할 수 있다.
- <23> 또한 본 발명은 상기와 같이 염기서열이 제공된 CaLOX1 유전자를 이용하여 재조합 벡터를 제조하여 식물체를 형질전환시켜, 병방어반응 및 환경스트레스 내성 증가를 통해 저항성 분자 육종의 재료를 제공할 수 있다.
- <24> 또한, 본 발명은 새롭게 개발된 바이러스-유도 유전자침묵 현상(virus-induced gene silencing, VIGS)에서 이용되어지는 TRV(Tobacco Rattle Virus)를 이용하여 CaLOX1 유전자를 TRV2 벡터(참고문헌 : Baulcombe D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. Curr. Opin. Plant Biol. 2: 109-113)에 도입시켜 재조합 벡터인 TRV2::CaLOX1을 제공한다. 상기 재조합 벡터를 식물체에 도입하여 CaLOX1의 발현이 억제된 VIGS 식물체를 제조하여 병감수성이 증대되는 것을 확인할 수 있었다(도 11 내지 도 13 참조).
- <25> 나아가 본 발명에 의한 CaLOX1 유전자를 포함하는 재조합 벡터(pBIN35S::CaLOX1)를 식물체에 도입하여 본 발명에 의한 CaLOX1이 과발현된 형질전환 애기장대 식물을 제조하여 식물병 저항성 변화를 확인할 수 있었다.(도 14 내지 도 28 참조)

<26> 리폭시제나제(Lipoxygenase)는 식물을 비롯하여 동물과 곰팡이에서 발견되었으며 리폭시제나제에 의하여 형성된 산물은 세포에서 다양한 기능을 하는 것으로 알려져 있는 효소의 한 종류이다. 특히 대부분의 식물에서는 리폭시제나제 불포화 지방산의 산화를 촉매하는 효소로서 작용하고 있으며, 식물의 생장이나 발달과 같은 생리적인 면이나 곤충에 대한 저항성, 상처에 의한 반응과 노화 등에 관여하는 것으로 알려져 있으며 특히 식물병에 대한 저항성 반응에 역할을 하는 것으로 알려져 있다..

<27> 본 발명에 의한 고추 리폭시제나제(CaLOX1)는 고추식물과 리폭시제나제의 기능을 불능화 시킨 고추식물 및 리폭시제나제를 과발현시킨 애기장대 식물과 고추의 리폭시제나제와 오솔로그(orthologs)인 애기장대의 리폭시제나제(AtLOX1)를 불능화시킨 돌연변이 식물을 통하여 세균성 병 및 진균성 병에 대한 저항성 검정 평가 및 발현을 통하여 병 저항성 여부를 알아볼 수 있게 되었다. 이러한 본 발명으로 리폭시제나제의 병에 대한 반응 및 이와 관련된 병생성 관련 단백질(PR protein)의 유전자 정보를 축적이 가능해져서 식물의 병에 대한 신호전달에 대한 흥미로운 모형을 제공해 줄 수 있으며, 저항성을 일으키는 생화학적 변화를 이해함으로써, 병 저항성이 증진되는 유전공학적 식물을 개발하거나 식물의 저항성 유전기작을 촉진하도록 작동하는 식물보호 화학물질을 개발하는 데에 실용적으로 이용될 수 있을 것이다.

효 과

<28> 상술한 바와 같이, 본 발명이 완성됨으로써, 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대한 방어반응에 관여하는 것으로서 식물병 저항성 관련 유전자의 하나인, 리폭시제나제 단백질을 코딩하는 CaLOX1 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 서열 정보 및 그에 따른 아미노산 서열 정보를 제공함과 동시에, 이 유전자를 이용하여 식물병 저항성과 환경스트레스 저항성 탐색방법을 제공할 뿐 아니라 저항성 식물 육종 및 형질전환 식물체 제작에 기여하는 효과를 도모할 수 있게 되었다. 따라서 본 발명은 저항성 품종 개발을 촉진시킬 수 있는 효과가 있으므로 식물육종 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<29> 이하, 첨부된 도면을 참조하여 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

<30> [실시예 1] CaLOX1 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열 결정

<31> 고추 세균성 점무늬병에 대한 병생성 관련 단백질(PR protein)중 하나인 리폭시제나제(CaLOX1) 단백질 코딩 유전자 염기서열 및 그로부터 추론되는 아미노산 서열을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

<32> 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하고 18시간 동안 습실 처리한 후 저항성 병반인 과민성반응이 나타난 식물체를 습실에서 꺼내어 있을 수거하였다.

<33> 다음에, 수거된 잎 표본으로부터 mRNA를 추출하여 역전사한 후 이를 PCR(Polymerase Chain Reaction)증폭함으로써 cDNA 라이브러리를 제작하였다. 그리고 이렇게 제작된 cDNA 라이브러리로부터 개개의 cDNA 클론을 제조하여 나일론막(Hybond N+)에 일정하게 흡착시킨 후, 각각 고추 세균성 점무늬병균의 비병원성 균주를 접종한 고추식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추식물의 잎에서 추출한 총 mRNA를 디옥시제닌(digoxigenin)으로 표지하여 프로브를 만든 다음, 디퍼런셜 하이브리다이제이션(differential hybridization)을 수행하였다.

<34> 하이브리다이제이션 결과 비병원성 균주가 접종된 식물체의 mRNA 프로브에 대해서만 집중적으로 증폭되어 나타난 유전자를 병저항성에 관련된 유전자로 추정하고 클론을 수득하였다.

<35> 수득된 클론들을 해독(Sequencing)한 후, 블라스트 프로그램을 이용하여 그 5'-말단 서열을 GenBank에 등록된 유전자 데이터베이스와 비교함으로써 CaLOX1 단백질 코딩 유전자를 확인하고 리폭시제나제(CaLOX1) 유전자로 명명하였다. 본 발명에 의한 CaLOX1 단백질은 아미노산 서열의 비교결과 감자(*Solanum tuberosum*)의 리폭시제나제와 92%의 상동성을 나타내었고 애기장대의 리폭시제나제 아미노산 서열과 비교한 결과 68%의 상동성을 나타냄으로서 신규임을 알 수 있었다. 이 유전자는 고추세균성 점무늬병 이외에도 여러 가지 병원균에 대하여도 저항성 작용을 갖는 97.908kD의 분자량을 지닌 단백질이다. 확인된 CaLOX1의 유전자 염기서열과 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 도 1에 나타내었고, 각각 염기서열 1 및 염기서열 2로 표시하여 서열목록으로 제출하였다.

<36> [실시예 2] 병원균 접종에 의한 고추식물에서의 고추 CaLOX1 유전자의 발현 탐색 방법

<37> 상기 실시예 1에서 수득한 CaLOX1 유전자의 저항성 탐색에의 이용방법을 확인하기 위해 다음과 같이 시험하였다.

<38> [단계 1]

<39> 먼저 저항성 탐색방법을 구체적으로 제시하기 위하여 식물체와 친화적 반응을 나타내는 고추 세균성 점무늬병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)중 병원성균주 Ds1과 불친화적 반응을 나타내는 비병원성 균주 Bv5-4a를 배양한 후, 10^8 cfu/ml의 농도로 4엽기의 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)의 1, 2엽의 뒷면에 주사기를 이용하여 인필트레이션(Infiltration)하여 접종하고, 접종 후에는 28°C, 100% 상대습도 조건에서 18시간 동안 습실처리 하였다.

<40> 접종 1, 5, 10, 15, 20, 25 시간 후에 각각 1, 2엽을 샘플링하여 RNA를 분리하고, 분리한 RNA를 포름알데히드를 함유하는 겔 상에서 전기영동한 후 나일론막 (Hybond N+)으로 전이시켰다.

<41> 다음으로 실시예 1에서 수득된 CaLOX1 유전자를 14-dCTP-biotin을 이용하여 표지한 후 PCR(Polymerase Chain Reaction)로 증폭시킨 후 이를 반응액[0.25 M 인산완충액, 7% SDS, 1 mM EDTA, 5% 텍스트란 황산염(Dextran Sulfate)]에서 65°C로 16-24시간 동안 배양하여 하이브리다이제이션 (hybridization)을 실시하였다.

<42> 이렇게 비오틴(biotin)이 표지된 상기의 DNA 프로브는 나일론막에 붙어있는 mRNA에 붙게 되며 이 나일론막 위에 X-ray 필름을 얹게 되면 비오틴(biotin)이 표지된 DNA가 X-ray 필름을 감광시키므로, 이것으로 발현 여부를 알아볼 수 있게 하였다.

<43> 상기 노던블러팅 수행시 리보솜 RNA의 양을 모니터링 함으로써 동일량의 RNA 시료가 로딩되었음을 확인하였다.

<44> 이와 같은 방법으로 고추 세균성 점무늬병원균의 병원성 균주 접종 후 나타나는 친화적 반응과 비병원성 균주 접종 후 나타나는 불친화적 반응에서 CaLOX1 유전자의 발현 양상을 도 2에 나타내었다. 도 2에서 숫자는 접종한 후 고추잎 채취시까지의 경과시간을 나타낸다.

<45> 도 2에 나타난 바와 같이, 실험의 결과 CaLOX1 유전자는 고추 세균성 점무늬병에 대한 고추식물의 저항성 반응으로 병원성 균주와 비병원성 균주에 대하여 모두 발현을 나타냈다. 보다 구체적으로는 병원성 균주 즉, 친화적 반응에서는 CaLOX1 유전자의 발현이 15시간 이후에 발현이 증가하여 20시간에 최고의 발현량을 나타낸 후 25 시간에는 거의 발현이 관찰되지 않으나 불친화적 반응을 나타내는 비병원성 균주에서는 5시간에서 가장 강하게 발현되고 그 이후에도 증가된 발현량이 25 시간째까지 유지되는 것을 볼 수 있었다.

<46> [실시예 3] 화학적 유도체에 의한 CaLOX1 유전자의 유도 발현

<47> 본 발명의 CaLOX1 유전자가 통상 저항성 유도에 사용되는 화학적 유도체에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적 유도방법을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

<48> [단계 1]

<49> 먼저, CaLOX1 유전자의 발현 유도에 유용한 유도체를 탐색하기 위하여, 식물병 저항성 발현의 유도에 관여한다고 알려진 화학물질들 중 앱시스산(abscisic acid), 에틸렌, 메틸 자스모네이트, 메틸비올로젠, 살리실산, 염화나트륨을 사용하여 저항성 유도 시험을 실시하였다.

<50> 모든 실험에 6엽기의 고추잎이 이용되었다.

<51> 에틸렌은 10 μ l/L의 농도로 하여 기체상태로 식물체가 있는 밀폐된 유리 용기에 주입하는 방법으로 처리하였다. 염화나트륨은 200 mM의 농도로 수용액을 만들어 식물체의 뿌리가 담기게 하여 처리하였다. 5 mM의 살리실산, 100 μ M의 메틸 비올로젠, 100 μ M의 메틸 자스모네이트는 분무기를 이용하여 고추잎의 앞뒷면에 뿌려 처리하였고, 앱시스산은 100 μ M의 앱시스산 수용액에 식물체의 뿌리를 담고 같은 수용액을 고추잎에 스프레이하는 방법으로 처리하였다.

<52> 각각의 식물들은 1,5,10,15,20,25시간 후에 잎을 수거하였고 각각의 샘플에서 RNA를 추출하였고 추출된 RNA를 이용하여 다음과 같이 노던블러팅을 수행하였다.

<53> 다음으로 실시예 1에서 수득된 CaLOX1 유전자를 14-dCTP-biotin을 이용하여 표지한 후 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 이용하여 증폭시킨 후 이를 반응액[0.25 M 인산완충액, 7% SDS, 1 mM EDTA, 5% 텍스트란 황산염

(Dextran Sulfate)]에서 65℃로 16-24시간 동안 배양하여 하이브리다이제이션 (hybridization)을 실시하였다. 이렇게 비오틴(biotin)이 표지된 상기의 DNA 프로브는 나일론막에 붙어있는 mRNA에 붙게 되며 이 나일론막 위에 X-ray 필름을 얹게 되면 비오틴(biotin)이 표지된 DNA가 X-ray 필름을 감광시키므로, 이것으로 발현 여부를 알아볼 수 있게 하였다.

<54> 상기 노던블러팅 수행시 리보솜 RNA의 양을 모니터링 함으로써 동일량의 RNA 시료가 로딩되었음을 확인하였다.

<55> 이상의 실험결과를 도 3 - 8에 나타내었으며, 실험의 결과 CaLOX1 유전자는 도 3에서 보이는 것과 같이 에틸렌 처리 후에는 5시간부터 축적이 시작되어 25시간까지 유지되었다. 염화나트륨의 처리 후에는 5시간에 축적되는 것이 관찰되었으나 이후에는 축적량이 줄어드는 것이 관찰되었다(도 4). 살리실산의 처리 후에는 15시간 이후에 축적이 됨이 관찰되었다(도 5). 메틸 비올로젠의 처리 후에는 5시간 이후부터 축적되어 25시간에 가장 강하게 축적되었다(도 6). 도 7에서 관찰되는 것과 같이 메틸 자스모네이트의 처리 후에는 5시간에서만 축적이 되었고 이 후에는 관찰되어지지 않았다. 앱시스산 처리 후에는 거의 관찰되지 않았다(도 8).

<56> [실시예 4] 환경적 스트레스에 의한 CaLOX1 유전자의 유도 발현

<57> 본 발명의 CaLOX1 유전자가 환경적 스트레스에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적 유도방법을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

<58> 각각의 시험에서 노던블러팅 수행시 리보솜 RNA의 양을 모니터링 함으로써 동일량의 RNA 시료가 로딩되었음을 확인하였으며, 대조구로서 어떤 스트레스도 처리하지 않은 건전잎을 사용하였다.

<59> [단계 1]

<60> 본 발명의 CaLOX1 유전자가 저온 스트레스에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적 유도방법을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

<61> 저온 처리 후 시간별 CaLOX1 저항성 유도효과를 알아보기 위하여, 고추 식물체를 4℃에 처리한 후 각각 1, 5, 10, 15, 20, 25시간째에 잎을 수거하였다.

<62> 각각의 샘플에서 RNA를 추출한 후, 상기 실시예 3의 단계 1에서와 동일한 방법으로 노던블러팅을 수행함으로써, 저온 스트레스 처리 후 CaLOX1의 시간별 발현양상을 알아보았으며, 그 결과를 도 9에 나타내었다.

<63> 시험 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, CaLOX1 유전자는 15시간부터 발현이 시작되어 25시간에 가장 강하게 발현되는 것을 나타내었다.

<64> [단계 2]

<65> 본 발명의 CaLOX1 유전자가 상처 스트레스에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적 유도방법을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

<66> 고추식물에 상처 스트레스를 처리하기 위해 식물체의 잎을 바늘로 찔러 잎 전체에 걸쳐 상처를 낸 후 각각 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25시간이 지나 잎을 수거하였다.

<67> 각각의 샘플에서 RNA를 추출한 후, 상기 실시예 3의 단계 1에서와 동일한 방법으로 노던블러팅을 수행함으로써, 상처 스트레스 처리 후 시간경과에 따른 CaLOX1의 발현양상을 알아보았으며, 그 결과를 도 10에 나타내었다.

<68> 시험 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, CaLOX1 유전자는 처리 후 1시간에서 발현된 후 그 이후에는 축적량이 줄어들었다.

<69> [실시예 5] CaLOX1 유전자 발현의 억제에 의한 병 저항성의 변화

<70> 고추식물에서 CaLOX1 유전자의 발현이 억제되었을 때 병 발생과 관련 다른 유전자들의 유도 여부 및 병에 대한 저항성의 증가 여부를 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 CaLOX1 유전자를 새롭게 개발된 바이러스-유도 유전자침묵 현상(virus-induced gene silencing, VIGS)에서 이용되어지는 TRV(Tobacco Rattle Virus)를 이용하여 CaLOX1 유전자를 TRV2 벡터(참고문헌 : Baulcombe D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. Curr. Opin. Plant Biol. 2: 109-113)에 도입시켜 재조합 벡터인 TRV2::CaLOX1을 제조한다. 이렇게 제조한 재조합벡터 TRV2::CaLOX1를 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciense* strain GV 3101)에 전기천공법(electroporation)을 통하여 도입하고 다시 재조합벡터가 들어가 있는 GV3101 균주를 고추의 떡잎 시기의 잎에 주사기를 이용하여 인필트레이션(infiltration) 방법을 이용하여 고추식물에 도

입함으로써 CaLOX1 유전자의 발현의 억제를 유도시켰다.

<71> [단계 1]

<72> CaLOX1의 발현이 억제된 식물체에서 세균성 병에 대한 저항성의 변화를 알아보기 위하여, 상기의 CaLOX1의 유전자의 발현이 억제된 고추 식물과 건전한 고추 녹광품종에 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a를 배양하고 접종한 후 각각의 식물에서 5시간과 15시간에 식물잎을 수거하여 RNA를 추출하여 알티-피시알(RT-PCR)을 통하여 관찰하였다.

<73> 도 11에서와 같이 실험결과 VIGS로 CaLOX1의 발현이 억제된 식물에서 병원성균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 접종 후 CaLOX1의 발현이 건전 식물에 비하여 감소되는 결과를 나타냈으며, 고추식물에서 고추 세균성 점무늬병의 감염 후 증가되는 것으로 알려진 CaBPR1의 발현이 감소되는 결과를 나타냈다.

<74> [단계 2]

<75> CaLOX1의 발현이 억제된 식물체에서 감수성 반응의 결과를 알아보기 위하여, 트리판블루 염색(trypan blue staining), 댁 염색(DAB staining)을 수행하였다. 도 12에서와 같이 CaLOX1의 발현이 억제된 식물에서는 고추 세균성 점무늬병의 병원성균주 Ds1를 접종한 후 병의 발생이 더 심해져서 병감수성이 증대됨을 알 수 있으며, 비병원성 균주인 Bv5-4a를 접종한 후에는 건전식물에 비하여 트리판블루 염색 결과 과민성 세포사멸이 감소되었고 댁 염색결과 활성산소가 감소되는 것이 관찰되었다.

<76> [단계 3]

<77> CaLOX1의 발현이 억제된 식물체에서 병저항성 검정을 위하여, 건전식물과 CaLOX1의 발현이 억제된 식물체에 고추 세균성 점무늬병의 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주인 Bv5-4a를 접종한 후, 0일, 2일과 4일에 잎을 수거하여 식물잎의 1cm² 세균수를 측정할 수 그 결과를 도 13에 나타내었다.

<78> 실험결과 CaLOX1의 발현이 억제된 식물체에서 건전식물에 비하여 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주인 Bv5-4a 모두에서 감수성이 증대되고 있음을 나타냈다.

<79> [실시예 6] CaLOX1 유전자를 이용한 형질전환 식물체의 제조 및 CaLOX1 유전자의 과다발현에 의한 병 저항성의 변화

<80> 식물체에서 CaLOX1 유전자의 과다발현시 다른 병 발생과 관련된 유전자들의 유도여부 및 병에 대한 저항성의 증가 여부에 대하여 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 CaLOX1 유전자를 Stratagene에서 제공하는 pBIN3S 벡터에 도입시켜 pBIN35S::CaLOX1을 제조한 후 이렇게 제조된 재조합 벡터인 pBIN35S::CaLOX1을 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV 3101)에 전기천공법(electroporation)을 통하여 도입하고 다시 재조합벡터가 들어가 있는 GV3101 균주를 꽃침지(floral dipping) 방법을 통하여 애기장대 식물에 도입함으로써 형질전환시켜서 CaLOX1 유전자의 과다발현을 유도시킨 후 하기와 같은 시험을 수행하였다.

<81> [단계 1]

<82> CaLOX1 유전자가 과다발현된 식물체에서 세균성 병에 대한 저항성이 증가하였는지의 여부를 알아보기 위하여 상기 CaLOX1 유전자가 과다발현된 애기장대와 대조구로서의 야생형 애기장대 식물체에서 CaLOX1의 발현을 관찰하였으며 그 결과를 도 14에 나타내었다.

<83> #12, #15, #16는 사용된 형질 전환 식물의 계통번호를 나타내고 실험결과 애기장대 식물에서 CaLOX1이 과발현됨을 관찰할 수 있었다.

<84> [단계 2]

<85> 상기와 같이 CaLOX1이 과다발현된 식물에 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000과 비병원성 균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (에이브이알알피엠원)균주를 접종하고 식물체의 변화를 관찰하였다(도 15). 또한 CaLOX1 유전자가 과다발현된 식물체에서 저항성 반응이 나타나는 이유를 알아보기 위해 트리판블루 염색(trypan blue staining), 댁 염색(DAB staining)을 수행하였다. 도 15과 같이 CaLOX1이 과다발현된 식물체에서 야생형에 비하여 세균성 병에 대하여 저항성을 나타내고 있음이 관찰되었고, 도 16에서는 트리판블루 염색결과와 댁염색 결과를 통하여 CaLOX1 유전자가 과다발현된 식물에서 저항성 식물에서 관찰되는 세포사멸반응과 퍼옥시데이즈 활성에 의한 활성 산소가 증가되는 것을 관찰할 수 있었다.

- <86> [단계 3]
- <87> CaLOX1이 과다발현된 식물에 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000과 비병원성 균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (에이브이알알피엠원)균주를 접종하고 식물체의 저항성의 검정과 전기 전도도(이온유출) 측정(ion leakage)을 수행하였다. 접종 후 0일과 3일에 잎을 수거하여 식물잎의 1cm^2 세균수를 측정한 수 그 결과를 도 17에 나타내었다.
- <88> 도 17에서와 같이 병원성 균주와 비병원성 균주 모두에 대해 CaLOX1 유전자가 과다발현된 식물이 야생형 식물과 비교해서 병 저항성을 가지고 있는 것으로 관찰되었으며, 도 18과 같이 전기전도도 또한 야생형에 비하여 높게 나타나는 것을 볼 수 있었다.
- <89> [실시예 7] CaLOX1 오솔로그(orthologs)인 애기장대의 리폭시제나제(AtLOX1) 유전자의 발현이 불능화(knock out)되어 있는 식물에서의 병 저항성의 감소
- <90> 애기장대에서 CaLOX1 오솔로그(orthologs)인 애기장대 AtLOX1 유전자가 발현이 되지 않도록 조작되어져 있는 식물체를 Salk Institute에서 구입한 후 사용하였다.
- <91> [단계 1]
- <92> 애기장대에서 CaLOX1 오솔로그(orthologs)인 애기장대 AtLOX1 유전자가 발현이 되지 않도록 조작되어져 있는 식물체에서 AtLOX1 유전자에 T-DNA가 삽입되어져 있는 위치를 확인하였고 이에 대한 위치를 도 19에 나타내었고 T-DNA의 삽입의 위치에 따라 애기장대 계통(line)을 각각 lox1-1과 lox1-2로 명명하였다.
- <93> [단계 2]
- <94> lox1-1과 lox1-2 식물에서 AtLOX1이 발현되지 않는 것을 확인하기 위하여, 돌연변이 식물에 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (에이브이알알피엠원)균주를 접종한 후 AtLOX1 유전자의 발현을 관찰하였다. 도 20에서와 같이 실험결과 돌연변이 식물에서 야생식물에서와 달리 AtLOX1의 발현이 나타나지 않음을 관찰할 수 있었다.
- <95> [단계 3]
- <96> 상기와 같이 애기장대에서 CaLOX1 오솔로그(orthologs)인 애기장대 AtLOX1 유전자가 발현이 되지 않도록 조작되어져 있는 lox1-1과 lox1-2 돌연변이 식물체에 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000을 접종하고 식물체의 변화를 관찰하였다. 또한 야생형과 돌연변이 식물체에서 감수성 반응이 나타나는 이유를 알아보기 위해 트리판 블루 염색(trypan blue staining), 댐 염색(DAB staining)을 수행하였다. 도 21과 같이 돌연변이 식물체에서 야생형에 비하여 세균성 병에 대하여 감수성을 나타내고 있음이 관찰되었고 트리판블루 염색결과와 댐염색 결과에서도 세포사멸과 활성산소가 관찰되지 않았다.
- <97> [단계 4]
- <98> lox1-1과 lox1-2 식물에 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000을 접종하고 식물체의 저항성의 검정과 전기 전도도 측정(ion leakage)을 수행하였다. 접종 후 0일과 3일에 잎을 수거하여 식물잎의 1cm^2 세균수를 측정한 수 그 결과를 도 22에 나타내었다.
- <99> 도 22 및 도 23에서와 같이 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000접종 후에 lox1-1과 lox1-2 식물에서 야생형에 비하여 병에 대한 감수성을 나타내었고 야생형에 비하여 낮은 전기전도도를 나타내었다.
- <100> [실시예 8] 하이알로페르노스포라 Noco2의 접종 후에 CaLOX1 유전자가 과다발현된 식물 및 불능화된 lox1-1과 lox1-2 돌연변이 식물에서 병 저항성의 변화
- <101> CaLOX1이 과발현된 식물체와 애기장대에서 CaLOX1 오솔로그(orthologs)인 애기장대 AtLOX1 유전자가 발현이 되지 않도록 조작되어져 있는 식물(lox1-1과 lox1-2 식물)에서 애기장대에 노균병을 일으키는 하이알로페르노스포라 파라시티카Noco2(*Hyaloperonospora parasitica* Noco 2)를 접종한 후 시험을 수행하였다. CaLOX1이 과발현된 식물과 lox1-1과 lox1-2 식물을 떡잎시기에 하이알로페르노스포라 Noco2 를 $5 \times 10^4\text{ mL}^{-1}$ 의 농도로 스프레이를 통하여 뿌려주었다. 접종 후 17℃의 온도에서 습실 처리하였다.
- <102> [단계 1]
- <103> 각각의 식물체에서 하이알로페르노스포라균에 대한 저항성 여부를 관찰하기 위하여 접종 후 7일째에

관찰하였고, 1일, 3일, 5일에 트리판블루 염색 및 댐 염색을 수행하였다. 도 24과 같이 CaLOX1이 과다발현된 식물에서 야생형에 비하여 분생자경(sporangiophores)의 형성이 감소되어 저항성 반응을 관찰할 수 있으며 이에 반하여 lox1-1 식물에서 분생자경의 형성이 증가되어 감수성 반응을 관찰할 수 있었다. 또한 CaLOX1이 과다발현된 식물에서 댐 염색을 통한 활성산소가 관찰되었으며 트리판블루 염색을 통하여 야생형에 비하여 균사의 생장이 덜 발달하고 있음을 알 수 있었으며 lox1-1 식물에서는 활발한 균사 생장이 관찰되었다.

[단계 2]

각각의 식물체에서 하이알로페르노스포라균의 저항성 검정을 위하여 하이알로페르노스포라균의 접종 후 형성되는 분생자경의 수를 센 후 0-5, 6-10, 11-15, 16-20, 20 이상으로 그룹을 만든 후 평균값과 전체에 대한 비율(%)로 표시하였다. 도 25와 같이 건전에 비하여 CaLOX1이 과다발현된 식물에서는 평균값과 비율에서도 야생형에 비하여 저항성을 나타냄을 알 수 있었고 lox1-1과 lox1-2 식물에서는 평균값과 비율에서도 야생형에 비하여 감수성을 나타내고 있음을 관찰할 수 있었다.

[실시예 9] 알타나리아 브라시시콜라 (*Alternaria brassicicola*)를 접종한 후에 CaLOX1 유전자가 과다발현된 식물 및 lox1-1과 lox1-2 식물에서 병 저항성의 변화

CaLOX1이 과발현된 식물체와 CaLOX1 오솔로그(orthologs)인 애기장대 AtLOX1의 유전자의 발현이 불능화되어 있는 식물(lox1-1과 lox1-2 계통)에서 애기장대에 알타나리아 브라시시콜라 (*Alternaria brassicicola*)를 접종한 후 시험을 수행하였다. CaLOX1이 과발현된 식물과 lox1-1과 lox1-2 식물에 알타나리아 브라시시콜라 (*Alternaria brassicicola*)를 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 의 농도로 애기장대의 잎에 $10\mu\text{l}$ 씩 적하(dropping)해 주었다. 접종한 식물은 24℃에서 습실처리 하였다.

[단계 1]

각각의 식물체에서 알타나리아 브라시시콜라 (*Alternaria brassicicola*)에 대한 저항성의 여부를 관찰하기 위하여, 접종 후 병반 관찰 및 트리판 블루 염색 및 댐 염색을 수행하였다. 도 26과 같이 접종 후 5일째 잎을 관찰하였을 때 CaLOX1이 과다발현된 식물은 야생형에 비하여 병반의 크기에서 큰 차이는 없었으나 lox1-1과 lox1-2 식물에서는 감수성을 나타냄을 알 수 있었다. 또한 이를 트리판블루와 댐 염색을 수행해 본 결과, 도 27과 같이 lox1-1 식물에서 활발한 균사 생장이 관찰되었다.

[단계 2]

각각의 식물체에서 알타나리아 브라시시콜라 (*Alternaria brassicicola*) 접종 후 병 저항성을 검정하기 위하여, 접종 후 병반의 크기와 감염된 잎에 포함되어 있는 포자의 수를 측정하였다.

도 28에서의 결과와 같이 CaLOX1이 과다발현된 식물은 병반의 크기 및 포자의 수에서 뚜렷한 저항성 반응을 보이고 있으나, lox1-1 식물에서는 병반의 크기도 증가되었고 포자수 또한 크게 증가되어 감수성 증가가 관찰되었다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 의하여 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* L. cv. Nockwang)으로부터 클로닝한 고추 리폭시제나제1(CaLOX1) 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 도면이다.

도 2는 고추 녹광 품종에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a를 접종하였을 때 접종되지 않은 고추잎과 접종된 고추잎에서의 CaLOX1 유전자 발현 유도 결과를 나타낸다.

도 3은 고추 녹광 품종에 에틸렌(Ethylene)을 처리한 후 시간의 경과에 따른 CaLOX1 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸다.

도 4는 고추 녹광 품종에 염화나트륨(NaCl)을 처리한 후 시간의 경과에 따른 CaLOX1 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸다.

- <118> 도 5는 고추 녹광 품종에 살리실산(Salicylic acid)을 처리한 후 시간의 경과에 따른 CaLOX1 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸다.
- <119> 도 6은 고추 녹광 품종에 메칠 비올로젠 (methyl viologen)을 처리한 후 시간의 경과에 따른 CaLOX1 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸다.
- <120> 도 7은 고추 녹광 품종에 메칠 자스모네이트 (methyl jasmonate)를 처리한 후 시간의 경과에 따른 CaLOX1 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸다.
- <121> 도 8은 고추 녹광 품종에 앱시스산(abscisic acid)을 처리한 후 시간의 경과에 따른 CaLOX1 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸다.
- <122> 도 9는 고추 녹광 품종에 저온 처리한 후 시간의 경과에 따른 CaLOX1 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸다.
- <123> 도 10은 고추 녹광 품종에 상처 처리한 후 시간의 경과에 따른 CaLOX1 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸다.
- <124> 도 11은 바이러스-유도 유전자침묵 현상(virus-induced gene silencing,VIGS)의 방법을 사용하여 CaLOX1 유전자 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때 고추병방어 유전자 발현의 변화 패턴에 대한 결과를 나타낸다.
- <125> 도 12는 바이러스-유도 유전자침묵 현상(virus-induced gene silencing,VIGS)의 방법을 사용하여 CaLOX1 유전자 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때 병 감수성이 증대되어 감수성 병징 확대, 활성산소감소(DAB 염색), 과민성세포사멸(트리판블루 염색)에 대한 결과사진을 나타낸다.
- <126> 도 13은 바이러스-유도 유전자침묵 현상(virus-induced gene silencing,VIGS)의 방법을 사용하여 CaLOX1 유전자 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때 세균생장증대에 대한 검정결과를 나타낸다.
- <127> 도 14는 고추 CaLOX1 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 CaLOX1 유전자의 과다발현에 대한 결과를 나타낸다.
- <128> 도 15는 고추 CaLOX1 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에 세균성 병원균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)과 비병원성 균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (에이브이알알피엠원)을 접종하였을 때, 이 병에 대해 저항성을 보이고 있는 애기장대 잎의 사진을 나타낸다.
- <129> 도 16은 고추 CaLOX1 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에 세균성 병원균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)과 비병원성 균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (에이브이알알피엠원)을 접종하였을 때, 병저항성을 보이는 식물세포에서 활성 산소(DAB 염색) 및 과민성 세포사멸(트리판블루 염색)의 증가에 대한 결과를 나타낸다.
- <130> 도 17은 고추 CaLOX1 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에 세균성 병원균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)과 비병원성 균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (에이브이알알피엠원)을 접종하였을 때, 세균생장 감소로 병저항성 발현결과를 나타낸다.
- <131> 도 18은 고추 CaLOX1 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에 세균성 병원균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)과 비병원성 균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (에이브이알알피엠원)을 접종하였을 때, 저항성 반응으로 전기 전도도(ion-leakage) 증가의 결과를 나타낸다.
- <132> 도 19는 애기장대에서 CaLOX1의 오솔로그(orthologs)인 애기장대의 AtLOX1 유전자의 발현이 불능화(knock out)되어 있는 애기장대 돌연변이 식물체에서 AtLOX1 유전자에 T-DNA(transferred DNA)가 삽입되어져 있는 위치를 나타낸다.
- <133> 도 20은 애기장대에서 CaLOX1의 오솔로그(orthologs)인 애기장대의 AtLOX1 유전자의 발현이 불능화(knock out)되어 있는 애기장대 돌연변이 식물체에서 세균성 병원균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)을 접종한 후, 이 유전자의 무발현 결과를 나타낸다.

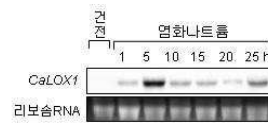
- <134> 도 21은 애기장대에서 CaLOX1의 오솔로그(orthologs)는 애기장대의 AtLOX1 유전자의 발현이 불능화(knock out)되어 있는 애기장대 돌연변이 식물체에서 세균성 병원균주인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)을 접종한 후, 감수성 병징을 보이는 식물체 잎과 활성산소 형성(덥염색) 및 과민성 세포사멸(트리판블루 염색)에 대한 결과를 나타낸다.
- <135> 도 22는 애기장대에서 CaLOX1의 오솔로그(orthologs)인 애기장대의 AtLOX1 유전자의 발현이 불능화(knock out)되어 있는 애기장대 돌연변이 식물체에서 세균성 병원균인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)을 접종한 후, 세균생장 증가로 감수성을 보이는 검정결과를 나타낸다.
- <136> 도 23은 애기장대에서 CaLOX1의 오솔로그(orthologs)인 애기장대의 AtLOX1 유전자의 발현이 불능화(knock out)되어 있는 애기장대 돌연변이 식물체에서 세균성 병원균인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)을 접종한 후, 이 균주에 대한 전기 전도도(ion-leakage)의 결과를 나타낸다.
- <137> 도 24는 고추 CaLOX1 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물과 CaLOX1 오솔로그(orthologs)인 애기장대 AtLOX1의 유전자의 발현이 불능화된 애기장대 돌연변이 식물체에 노균병균인 하이알로페르노스포라 Noco2 (*Hyaloperonospora parasitica* Noco 2)를 접종한 후, 병든 식물잎의 사진과 활성산소 형성(덥염색) 및 과민성 세포사멸(트리판블루 염색)에 대한 결과를 나타낸다.
- <138> 도 25는 고추 CaLOX1 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물과 CaLOX1 오솔로그(orthologs)인 애기장대 AtLOX1의 유전자의 발현이 불능화된 애기장대 돌연변이 식물체에 노균병균인 하이알로페르노스포라 Noco2 (*Hyaloperonospora parasitica* Noco 2)를 접종한 후, 상이한 병원균 분생자경 형성에 대한 결과를 나타낸다.
- <139> 도 26은 고추 CaLOX1 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물과 CaLOX1 오솔로그(orthologs)인 애기장대 AtLOX1의 유전자의 발현이 불능화된 애기장대 돌연변이 식물체에 병원진균인 알타나리아 브라시시콜라 (*Alternaria brassicicola*)를 접종한 후, 병든 식물잎의 병반사진에 대한 결과를 나타낸다.
- <140> 도 27은 고추 CaLOX1 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물과 CaLOX1 오솔로그(orthologs)인 애기장대 AtLOX1의 유전자의 발현이 불능화된 애기장대 돌연변이 식물체에 병원진균인 알타나리아 브라시시콜라 (*Alternaria brassicicola*)를 접종한 후, 병든 식물잎에서 활성산소 형성(덥염색) 및 과민성 세포사멸(트리판블루 염색)에 대한 결과를 나타낸다.
- <141> 도 28은 고추 CaLOX1 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물과 CaLOX1 오솔로그(orthologs)인 애기장대 AtLOX1의 유전자의 발현이 불능화된 애기장대 돌연변이 식물체에 병원진균인 알타나리아 브라시시콜라 (*Alternaria brassicicola*)를 접종한 후, 병반 크기 변화와 포자형성에 관한 결과를 나타낸다.



도면3



도면4



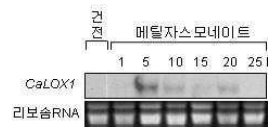
도면5



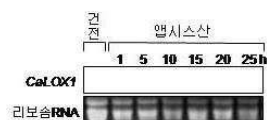
도면6



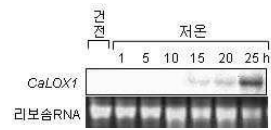
도면7



도면8



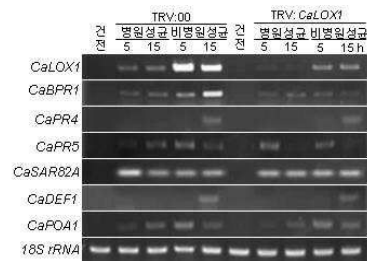
도면9



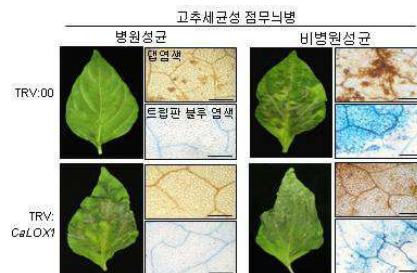
도면10



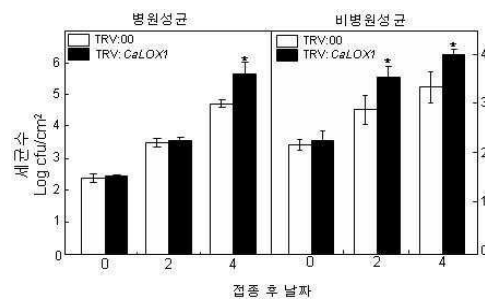
도면11



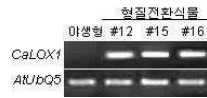
도면12



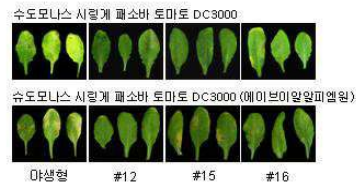
도면13



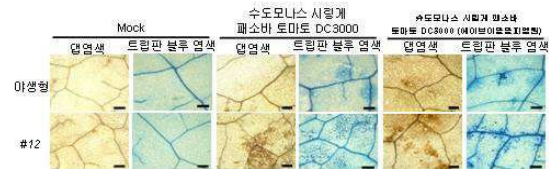
도면14



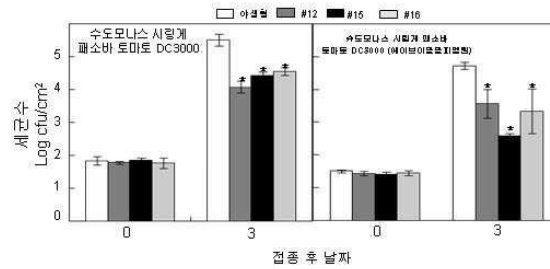
도면15



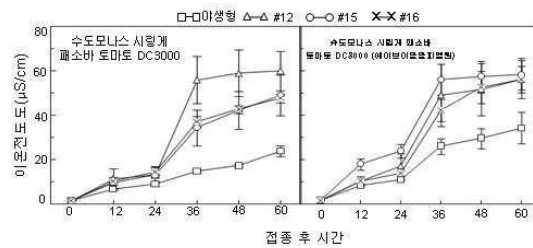
도면16



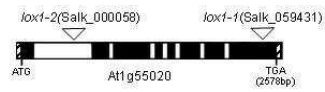
도면17



도면18



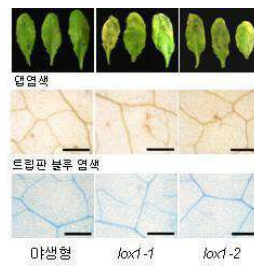
도면19



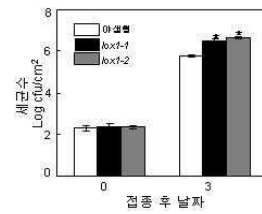
도면20



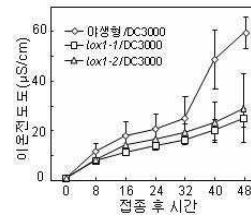
도면21



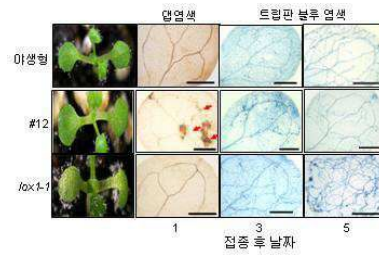
도면22



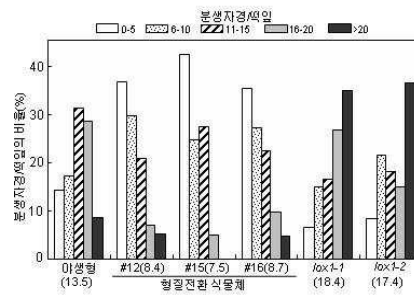
도면23



도면24



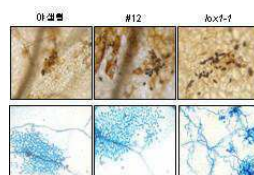
도면25



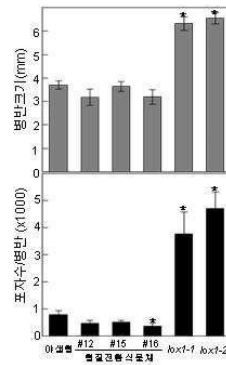
도면26



도면27



도면28



서열 목록

- <110> Korea University Industrial and Academic Collaboration Foundation
 <120> Pepper CaLOX1 gene from Capsicum annuum and screening method of plant disease resistance using the same
 <130> P11-080407-01
 <160> 2
 <170> Kopatent In 1.71
 <210> 1
 <211> 2846
 <212> DNA
 <213> Capsicum annuum cv. Nockwang

<400> 1
 gtigaaagat cgaagttta ctatatatat acatacatia ttatattttca ctcttttgtc 60
 taaaaacgta atcatcatgt tactggaaaa gattgtggac gtaatctctg ggaaaaatga 120
 cgatggaaaa aagatgaaag gaactgttgt gttgatgaag aagaatgcat tggactttaa 180
 tgatgtcaat gcttcttttc ttgatggagt tcttgagtgc cttggcaaga gagtctcttt 240
 gcagttgatc agctctgttc atggatgatcc tgcgaatggt ttacaaggga aacgtagcaa 300
 gccagcttac ttggagaact ggctcactac gcgaacccca ttagtcgcag gcgaatcagc 360

ctttgatgtc acgtttgatt gggacgagga tatggagtt ccaggggcat ttatcatcaa	420
taatttgac ttcaatgagt ttttccttaa atcactcact cttgaagacg ttcccaatca	480
tggcaagatt catTTTTgtct gtaattcttg ggtttatcct gctaaaagat acaaatcaga	540
acggatTTTc ttigctaatc aggcatactt tccccacgaa actccagaac cattgcgcga	600
atacagagaa aaagaattag tgaccttaag aggagatgga aatggaaagc ttgaggaatg	660
ggacagggtt tatgactatg ctttctacaa cgacttgggt gatccagaaa gaggcgaagc	720
glatgctagg actatcttgg gaggatctgc tgagttccca taccctcgga gaggaagaac	780
aggcagaaag tcaacaaaag cagatcctaa aagtgaaggt aggattccat tgcttatgag	840
tttagacatc tatgtaccaa gagatgagcg ttttggacac attaagttgt cggacttccc	900
gacatatgct ttgaaatcca ttgttcagtt ccttatcccc gagtttcagg ctctctttga	960
tagcactcct ggtgagtttg acagctttga ggatgtactg aggctttatg aaggaggaat	1020
caaattgccg caaggccctt ttctcaaagc cctcactgac agcatctctc tatcgattct	1080
aaaagaaatc atccgaactg atggigaagg gaaattcaaa ttcccaactc ctcaagtcac	1140
tcaagcggat aaaagtTCat ggaggactga tgaagaattt gcaagagaaa tgcttgccgg	1200
agtaaatcct gtcataatca gcagactcca agagttccct ccaaaaagca agctagatac	1260
tgaagtatat ggaacccaaa acagtacaat aaccaaagaa catatagaga atgcactgga	1320
tgggctaact atcgatgatg caatcaagac aaacaggctt tacatattaa accatcatga	1380
catgcttatg ccgtatgtga ggagaataaa cagacaaaac acaaaactct acgcctcaag	1440
aactctgctt ttcttgcaag acgatggaac aatgaagcca atagcaattg aactaagctt	1500
gccacatccg gatggagatg aacttggggc tgtagcaaa gtttataccc cagccgatcg	1560

agatgttgag ggtacgatct ggcaattggc taaagcttat gttgcagtga atgactcggg	1620
tgttcatcag ctaatcagtc actggttgaa tacacatgca gcaattgagc cgttttgat	1680
tgcaacaaac aggcaactaa gcgtgcttca cccgattcat aaacttttac atcctcattt	1740
tcgggacacg atgaacataa acgctttggc aagacagatc ttaatcaatg ctgggtggagt	1800
tcttgagctg acagtttttc cttccaaata tgcgatggaa atgtctgctg tagtttacag	1860
aaattgggtc ttccctgaac aagcacttcc ggttgatctc gttaagagag gagtgcagt	1920
agaggactcg agttccccac atggcgcttcg cttactaatt caagactacc catacgtgt	1980
tgatggttta gaaatatggt cagcaatcaa aatttgggta acagaatatt gcaacttcta	2040
ttataaatca gatgaatcag ttctgaaaga tgatgaactc caagcctggt ggaaagaagt	2100
tcgggaagaa gggcatggtg acaagaaaga tgaacctggg tggcctaaaa tgcaaacacg	2160
tcaagagcta atagattctt gcaccattat tatttggata gcatcagcac ttcatgcagc	2220
agtcaatfff gggcaatacc cttatgcagg ttacctcca aatcgcccaa cattaagtcg	2280
aagattcatg cctgagccag gaactcctga gtatgaagaa cttaagacaa atcctgatct	2340
ggcatacttg aaaacaatca ctctcaact gcagacatta ctaggaatff ctctcataga	2400
gatattgtca aggcatacat cagatgaggt ttaccttga cagagagact catctgaatg	2460
gacaaaggac caagaacctc ttgctgcttt tgagaggttt gggaaaaagt tgagtgaat	2520
cgaggatcaa attgtacaga tgaatggcga tgagaattgg aaaaataggt cggggcctgt	2580
taaggttcca tatacgttgc tctttctac aagtgaagaa ggactcacag gcaaaggaat	2640
acccaacagt gtgtgatat agtactttca tttcaatctt catggtcaag tttcatffff	2700

attcttttctt ttgttcaatt acgggtgtcaa gtttcatttt cttctttttg ttcaattaca 2760

gigtcaagtt agtgtgagtg aatttttggtt tgataaacctt tgtaatattt ctcttgcaag 2820

caagttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 2846

<210> 2
 <211> 862
 <212> PRT
 <213> Capsicum annuum cv. Nockwang

<400> 2
 Met Leu Leu Glu Lys Ile Val Asp Val Ile Ser Gly Lys Asn Asp Asp
 1 5 10 15

Gly Lys Lys Met Lys Gly Thr Val Val Leu Met Lys Lys Asn Ala Leu
 20 25 30

Asp Phe Asn Asp Val Asn Ala Ser Phe Leu Asp Gly Val Leu Glu Phe
 35 40 45

Leu Gly Lys Arg Val Ser Leu Gln Leu Ile Ser Ser Val His Gly Asp
 50 55 60

Pro Ala Asn Gly Leu Gln Gly Lys Arg Ser Lys Pro Ala Tyr Leu Glu
 65 70 75 80

Asn Trp Leu Thr Thr Arg Thr Pro Leu Val Ala Gly Glu Ser Ala Phe
 85 90 95

Asp Val Thr Phe Asp Trp Asp Glu Asp Ile Gly Val Pro Gly Ala Phe
 100 105 110

Ile Ile Asn Asn Leu His Phe Asn Glu Phe Phe Leu Lys Ser Leu Thr
 115 120 125

Leu Glu Asp Val Pro Asn His Gly Lys Ile His Phe Val Cys Asn Ser
 130 135 140

Trp Val Tyr Pro Ala Lys Arg Tyr Lys Ser Glu Arg Ile Phe Phe Ala
 145 150 155 160

Asn Gln Ala Tyr Leu Pro His Glu Thr Pro Glu Pro Leu Arg Glu Tyr

165	170	175
Arg Glu Lys Glu Leu Val Thr Leu Arg Gly Asp Gly Asn Gly Lys Leu		
180	185	190
Glu Glu Trp Asp Arg Val Tyr Asp Tyr Ala Phe Tyr Asn Asp Leu Gly		
195	200	205
Asp Pro Glu Arg Gly Glu Ala Tyr Ala Arg Thr Ile Leu Gly Gly Ser		
210	215	220
Ala Glu Phe Pro Tyr Pro Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg Lys Ser Thr		
225	230	235
Lys Ala Asp Pro Lys Ser Glu Ser Arg Ile Pro Leu Leu Met Ser Leu		
245	250	255
Asp Ile Tyr Val Pro Arg Asp Glu Arg Phe Gly His Ile Lys Leu Ser		
260	265	270
Asp Phe Pro Thr Tyr Ala Leu Lys Ser Ile Val Gln Phe Leu Ile Pro		
275	280	285
Glu Phe Gln Ala Leu Phe Asp Ser Thr Pro Gly Glu Phe Asp Ser Phe		
290	295	300
Glu Asp Val Leu Arg Leu Tyr Glu Gly Gly Ile Lys Leu Pro Gln Gly		
305	310	315
Pro Phe Leu Lys Ala Leu Thr Asp Ser Ile Pro Leu Ser Ile Leu Lys		
325	330	335
Glu Ile Ile Arg Thr Asp Gly Glu Gly Lys Phe Lys Phe Pro Thr Pro		
340	345	350
Gln Val Ile Gln Ala Asp Lys Ser Ser Trp Arg Thr Asp Glu Glu Phe		
355	360	365
Ala Arg Glu Met Leu Ala Gly Val Asn Pro Val Ile Ile Ser Arg Leu		
370	375	380
Gln Glu Phe Pro Pro Lys Ser Lys Leu Asp Thr Glu Val Tyr Gly Asn		
385	390	395
		400

Gln Asn Ser Thr Ile Thr Lys Glu His Ile Glu Asn Ala Leu Asp Gly
405 410 415

Leu Thr Ile Asp Asp Ala Ile Lys Thr Asn Arg Leu Tyr Ile Leu Asn
420 425 430

His His Asp Met Leu Met Pro Tyr Val Arg Arg Ile Asn Thr Thr Asn
435 440 445

Thr Lys Leu Tyr Ala Ser Arg Thr Leu Leu Phe Leu Gln Asp Asp Gly
450 455 460

Thr Met Lys Pro Ile Ala Ile Glu Leu Ser Leu Pro His Pro Asp Gly
465 470 475 480

Asp Glu Leu Gly Ala Val Ser Lys Val Tyr Thr Pro Ala Asp Arg Asp
485 490 495

Val Glu Gly Thr Ile Trp Gln Leu Ala Lys Ala Tyr Val Ala Val Asn
500 505 510

Asp Ser Gly Val His Gln Leu Ile Ser His Trp Leu Asn Thr His Ala
515 520 525

Ala Ile Glu Pro Phe Val Ile Ala Thr Asn Arg Gln Leu Ser Val Leu
530 535 540

His Pro Ile His Lys Leu Leu His Pro His Phe Arg Asp Thr Met Asn
545 550 555 560

Ile Asn Ala Leu Ala Arg Gln Ile Leu Ile Asn Ala Gly Gly Val Leu
565 570 575

Glu Leu Thr Val Phe Pro Ser Lys Tyr Ala Met Glu Met Ser Ala Val
580 585 590

Val Tyr Arg Asn Trp Val Phe Pro Glu Gln Ala Leu Pro Val Asp Leu
595 600 605

Val Lys Arg Gly Val Ala Val Glu Asp Ser Ser Ser Pro His Gly Val
610 615 620

Arg Leu Leu Ile Gln Asp Tyr Pro Tyr Ala Val Asp Gly Leu Glu Ile
625 630 635 640

Trp Ser Ala Ile Lys Ile Trp Val Thr Glu Tyr Cys Asn Phe Tyr Tyr
645 650 655

Lys Ser Asp Glu Ser Val Leu Lys Asp Asp Glu Leu Gln Ala Trp Trp
660 665 670

Lys Glu Val Arg Glu Glu Gly His Gly Asp Lys Lys Asp Glu Pro Trp
675 680 685

Trp Pro Lys Met Gln Thr Arg Gln Glu Leu Ile Asp Ser Cys Thr Ile
690 695 700

Ile Ile Trp Ile Ala Ser Ala Leu His Ala Ala Val Asn Phe Gly Gln
705 710 715 720

Tyr Pro Tyr Ala Gly Tyr Leu Pro Asn Arg Pro Thr Leu Ser Arg Arg
725 730 735

Phe Met Pro Glu Pro Gly Thr Pro Glu Tyr Glu Glu Leu Lys Thr Asn
740 745 750

Pro Asp Leu Ala Tyr Leu Lys Thr Ile Thr Pro Gln Leu Gln Thr Leu
755 760 765

Leu Gly Ile Ser Leu Ile Glu Ile Leu Ser Arg His Thr Ser Asp Glu
770 775 780

Val Tyr Leu Gly Gln Arg Asp Ser Ser Glu Trp Thr Lys Asp Gln Glu
785 790 795 800

Pro Leu Ala Ala Phe Glu Arg Phe Gly Lys Lys Leu Ser Glu Ile Glu
805 810 815

Asp Gln Ile Val Gln Met Asn Gly Asp Glu Asn Trp Lys Asn Arg Ser
820 825 830

Gly Pro Val Lys Val Pro Tyr Thr Leu Leu Phe Pro Thr Ser Glu Glu
835 840 845

Gly Leu Thr Gly Lys Gly Ile Pro Asn Ser Val Ser Ile ***
850 855 860

