



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0021750
(43) 공개일자 2010년02월26일

(51) Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0080336

(22) 출원일자 2008년08월18일

심사청구일자 2008년08월18일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

황병국

서울 강남구 역삼2동 개나리아파트 42동 303호

최형우

서울 동대문구 제기동 67-394 2층

(74) 대리인

김선애

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 고추 병저항성 관련 칼모듈린 유전자 씨에이씨에이엠 1 및 이를 이용한 형질전환 식물체

(57) 요약

본 발명은 식물병 저항성과 관련된 신규 유전자인 고추 칼모듈린(CaCaM1) 유전자(서열번호 1) 및 상기 유전자를 이용한 병원균 저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 유전자를 이용한 식물에서의 생물적(biotic) 및 비생물적(abiotic) 스트레스 저항성 탐색방법도 제공한다. 상기한 본 발명에 의하면, 식물체 병원균의 방어반응의 표지로 이용될 수 있고, 병 저항성 및 환경스트레스 내성 식물의 분자육종을 위한 유전재료를 제공할 수 있고, 식물병 저항성 등의 탐색을 촉진할 수 있다

대표도 - 도1

```

tctttccaaaaat aaaaaaagtagtacaaacttatctgtatgt gaaattctagaagaaa 60
ATGGCAGATCAGTTGACTGATGACCAATCTCTGAGTTTAAGGAAGCATTTAGCTTGT 120
M A D Q L T D D Q I S E F K E A F S L F
GATAAGGATGGAGATGGTTGCATCACTACTAAGGAGCTTGGGACTGTGATGAGGTG 180
D K D G D G C I T T K E L G T V M R S L
GGACAGAACCCGCTGAAGCTGAACCTCAAGGACATGATAACGAGGTGGATGCAATGGT 240
G Q N P T E A E L Q D M I N E V D A D G
AATGGAACCATGACTTCCAGAGTTTCTAAACCTCATGGCCAGAGATGAAGGATACA 300
N G T I D F P E F L N L M A K K M K D T
GATTCGAGGAGGAGCTGAAAGAGGCAATCAGGGTTTTCGACAGGATCAAAATGGCTT 360
D S E E E L K E A F R V F D K D Q N G F
ATCTCGGCTGCTGAGCTTCCGCAATGTGATGACTAACCTTGGTGAAGAGCTCACTGATGA 420
I S A A E L R H V M T N L G E K L T D E
GAAGTCGATGAGATGATTAGGGAAGCGGATTTCTGATGGTGGTCAATTAATGATGA 480
E V D E M I R E A D F D G D G Q I N Y E
GAGTTTGTAAAGGTCATGATGGCCAGTAAtccaccacctctt gttaaagttaagtt 540
E F V K V M M A K *
tagactt gttaaaattgtgaaaaaatgccaaaaatgtttcattggataggatgtactt 600
agtataatttatgtttttaccatctctagatgtattggaccttgaataaatgtaatttt 660
tattgtaaaaaataaaaaaataaaaaa 687
    
```

특허청구의 범위

청구항 1

고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* L. cv. Nockwang) 유래의 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 칼모듈린 유전자(*CaCaM1*).

청구항 2

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 칼모듈린(*CaCaM1*) 단백질.

청구항 3

제1항 기재의 *CaCaM1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 4

제1항 기재의 *CaCaM1* 유전자를 pBIN35S에 삽입시켜 제조한 재조합벡터 pBIN35S::*CaCaM1*.

청구항 5

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

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 식물체는 고추 또는 애기장대인 식물체.

청구항 7

고추 세균성 점무늬병의 병원성 또는 비병원성 세균을 접종한 식물체로부터 RNA 분리하여 노던블롯 분석으로 제1항 기재 *CaCaM1* 유전자의 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 저항성 탐색방법.

청구항 8

살리실산 (Salicylic acid), 메칠자스몬산 (Methyljasmonic acid), 앱시스산 (Abscissic acid) 및 과산화수소수 (H_2O_2) 중 어느 하나를 처리한 식물체로부터 RNA 분리하여 노던블롯 분석으로 제1항 기재 *CaCaM1* 유전자의 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 저항성 탐색방법.

청구항 9

상처스트레스, 건조 및 저온스트레스 중 어느 하나를 처리한 식물체로부터 RNA 분리하여 노던블롯 분석으로 제1항 기재 *CaCaM1* 유전자의 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 저항성 탐색방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 고추 녹광 품종 (*Capsicum annuum* L. cv. Nockwang) 식물로부터 분리된 식물병 저항성 관련 신규 유전자인 칼모듈린 유전자 *CaCaM1* (*Capsicum annuum Calmodulin 1*) 및 이를 이용한 식물에서의 생물적 (biotic) 그리고 비생물적 (abiotic) 스트레스 탐색방법과 병 저항성 형질전환 식물체 제작에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 본 발명은 고추 녹광 품종으로부터 분리된 식물병 저항성 관련 신규 유전자인 *CaCaM1* 유전자를 포함하는 cDNA 클론을 분리하여 염기서열을 해독(Sequencing)하고, 여기에서 얻어진 *CaCaM1* 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 제공하며, 이를 이용하여 생물적/화학적/물리적 저항성 유도 처리 시 해당 유전자의 차별적 발현 여부를 탐색하는 저항성 탐색방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 *CaCaM1* 유전자를 이용한 재조합 벡터 (pBIN35S::*CaCaM1*)와 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101) 균주를 이용하여, 고추 식물에서의 일시적 발현(transient expression) 방법과 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 식물에서의 형질전환 발현(transgenic expression)을 통한 *CaCaM1* 유전자의 식물체 병저항성 활성화기능을

확인하여, 이를 통한 형질전환 식물체 제공에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 담배, 토마토와 함께 대표적인 가지과 식물인 고추는 우리 식생활에 가장 많이 사용되는 채소류의 하나로, 전체 농가의 65%가 고추생산을 통한 농가소득에 의존하고 있어 주요한 경제작물이다.
- [0003] 고추 식물에서는 바이러스병, 세균병, 진균병 등이 다양하게 보고되고 있으며, 이러한 병을 방제하기 위해 지금 까지는 농약을 이용한 화학적 방제법이 주로 사용되어 왔다. 하지만, 농약의 과다한 사용은 그 독성으로 인해 생태계를 파괴하고 인류의 생존을 위협하기까지 이르렀다. 특히, 우리나라에서는 1996년 OECD 가입 후, 농약 사용의 규제에 대한 관심이 지속적으로 증가하고 있는 상황이다. 따라서 앞으로는, 병저항성 품종의 개량 및 육종 방법을 찾는 것이 지속 가능한 농업 (sustainable agriculture)을 위해 필요한 실정이다.
- [0004] 한편, 식물이 병원균에 감염되면, 기주식물은 여러 가지 세포내 대사 시스템을 작동시켜 방어 기작을 활성화하는데, 이러한 방어 기작에서 칼슘이온(Calcium ion, Ca^{2+}), 지질(lipid), 싸이클릭 뉴클레오티드(cyclic nucleotide) 등이 침입 신호를 전달하는 2차 신호전달물질(second messenger)로써 역할하는 것이 알려져 있다. 특히 Ca^{2+} 은 병원균 침입시, 액포(vacuole), 소포체 (endoplasmic reticulum) 등의 세포 소기관에서 세포질 (cytoplasm)로 급속히 분출되어 칼모듈린(Calmodulin, CaM)의 활성을 증가시키는 것으로 보고되었다. 하지만 식물체 내에는 다수의 칼모듈린 동족체(Calmodulin isoform)가 존재하고 있으며, 이들은 각각 다양한 스트레스에 대해 서로 다른 역할을 수행하는 것으로 보고되고 있어 그 기능을 밝혀내는 것이 다양한 스트레스에 반응하는 식물체의 방어 기작을 이해하는데 도움을 줄뿐 아니라, 저항성 품종 육종에 기여할 수 있게 된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0005] 본 발명은 이와 같은 종래기술상의 과제를 해결하기 위한 것으로서, 그 목적은, 고추 세균성 점무늬병 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대한 방어반응에 관여하는 것으로서 식물병 저항성 관련 유전자의 하나인 칼모듈린 (*CaCaM1: Capsicum annuum Calmodulin 1*) 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 서열 정보 및 그에 따른 아미노산 서열 정보를 제공하는 것이다.
- [0006] 또한 본 발명은 상기 *CaCaM1* 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.
- [0007] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제 해결수단

- [0008] 본 발명의 상기 목적은, 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)에 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)균을 접종한 뒤, 접종되어진 고추 잎으로부터 분리한 신규 저항성 관련 칼모듈린 유전자 *CaCaM1*을 확인하여 그 염기서열을 결정하고, 이를 이용하여 병원균, 화학물질, 환경스트레스 처리를 통하여 *CaCaM1*의 발현 여부를 조사하고, 고추식물과 형질전환 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 *CaCaM1* 유전자의 식물병 저항성 유도 기능을 확인하여 달성하였다.
- [0009] 따라서 본 발명은 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* L. cv. Nockwang)에서 유래된 식물체 병저항성과 관련된 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 칼모듈린 유전자 *CaCaM1* 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 칼모듈린 단백질(*CaCaM1*)을 제공한다.
- [0010] 또한 본 발명은 상기 유전자를 이용하여 제조한 재조합 벡터 및 형질전환 애기장대를 제공한다.
- [0011] 나아가 본 발명은 병원균, 화학물질 및 환경스트레스 중 어느 하나를 접종 또는 처리한 식물체로부터 RNA 분리하여 노던블롯 분석으로 *CaCaM1* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병저항성, 화학물질 또는 환경스트레스 저항성 탐색방법을 제공한다.
- [0012] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- [0013] 먼저, 본 발명은 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균주 접종에 대

해 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 관련된 것으로 추정되는 유전자를 선별하여 클론을 수득하고, 이 클론 중 칼모듈린(calmodulin) 유전자로 확인된 유전자의 염기서열을 해독(Sequencing)함으로써, CaCaM1으로 명명된 고추 녹광 품종의 칼모듈린 단백질 코딩 유전자 염기서열(서열번호 1) 및 그로부터 코딩되는 아미노산 서열(서열번호 2)을 제공한다(도 1 참조).

[0014] 본 발명에 의한 CaCaM1 단백질의 아미노산 서열을 분석한 결과 칼모듈린 유전자에서 전형적으로 나타나는 4개의 칼슘 이온 결합(Calcium ion, Ca^{2+} -binding) 부위를 가지는 것을 알 수 있었으며, 토마토 (*Solanum lycopersicum*)의 칼모듈린 유전자(accession no. AK246240)와는 뉴클레오타이드(nucleotide) 수준에서 89 %, 고추 (*Capsicum annuum*)의 칼모듈린 유전자 (accession no. AF108889)와는 뉴클레오타이드 수준에서 88 %의 상동성을 나타냄으로써 신규임을 알 수 있었다 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, nucleotide blast program). 확인된 CaCaM1의 유전자 염기서열과 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 도 1에 나타내었다.

[0015] 다음에, 본 발명은 고추식물에서 선정된 기관 및 생물적 또는 비생물적 유도방법을 적용하고 노던 블롯을 수행함으로써 CaCaM1 단백질 발현 여부를 확인하는 것으로 이루어지는, 식물체의 저항성 탐색방법을 제공한다. 보다 구체적으로는 본 발명은, 병원균, 화학물질 및 환경 스트레스 중 어느 하나를 접종 또는 처리한 고추 개체에서 선정된 기관에 대해 상기 CaCaM1 단백질 유전자를 프로브로 이용하여 CaCaM1 단백질 발현 여부를 확인하는 것으로 이루어지는, 식물체의 저항성 탐색방법을 제공한다.

[0016] 상기 병원균은 고추 세균성 점무늬병의 병원성 또는 비병원성 세균일 수 있고, 상기 화학물질은 살리실산, 메칠자스몬산, 앱시스산, 또는 과산화수소일 수 있고, 상기 환경스트레스는 건조, 상처 또는 저온일 수 있다.

[0017] 본 발명에 의한 CaCaM1 유전자가 다양한 식물병원균, 화학물질 또는 환경스트레스에 의해 차별적으로 유도 발현되는 것을 실험을 통해 확인하였다(도 3 내지 도 10 참조). 따라서 본 발명에 의한 CaCaM1 유전자는 식물체의 저항성 탐색방법에 이용할 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기의 CaCaM1 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 고추식물과 형질전환 애기장대 식물의 식물병 저항성 생성여부를 확인함으로써 새로운 병저항성 형질전환 식물체의 제작방법 및 저항성 분자 육종의 재료를 제공할 수 있다. 보다 구체적으로 본 발명은 CaCaM1 유전자를 포함하는 재조합 벡터(pBIN35S::CaCaM1)(도 11)와 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101) 균주를 이용하여, 고추 식물에서의 일시적 발현(transient expression) 방법과 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 식물에서의 형질전환 발현(transgenic expression)을 통한 CaCaM1 유전자의 식물체 병저항성 활성화기능을 확인하여(도 12 내지 도 19 참조), 이를 통한 형질전환 식물체를 제공한다.

효 과

[0019] 상술한 바와 같이, 본 발명이 완성됨으로써, 고추 식물 세균병인 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대한 방어반응에 관여하는 것으로서 식물병 저항성 관련 유전자의 하나인, 칼모듈린 단백질 을 코딩하는 CaCaM1 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.

[0020] 이러한 본 발명으로 칼모듈린의 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 유전 기작을 촉진하도록 작동하는 식물보호 화학물질을 개발하는 데에 실용적으로 이용될 수 있을 것이다. 따라서 본 발명은 저항성 품종 개발을 촉진할 수 있는 효과가 있으므로 식물육종 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0021] 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 실시예

에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[실시예 1] CaCaM1 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열 결정

고추 세균성 점무늬병에 대한 병 저항성 관련 단백질 중 하나인 칼모둘린(*CaCaM1: Capsicum annuum Calmoudulin1*) 단백질 코딩 유전자 염기서열 및 그로부터 추론되는 아미노산 서열을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

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

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.

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

수득된 클론들을 해독(Sequencing)한 후, 블라스트 프로그램을 이용하여 그 5'-말단 서열을 GenBank에 등록된 유전자 데이터베이스와 비교함으로써 CaCaM1 단백질 코딩 유전자를 확인하고 칼모둘린(*CaCaM1*) 유전자로 명명하였다. 본 발명에 의한 CaCaM1 단백질은 아미노산 서열의 비교결과 칼모둘린 유전자에서 전형적으로 나타나는 4개의 칼슘 이온 결합(Calcium ion, Ca^{2+} -binding) 부위를 가지는 것을 알 수 있었으며, 토마토 (*Solanum lycopersicum*)의 칼모둘린 유전자(accession no. AK246240)와는 뉴클레오타이드 수준에서 89 %, 고추 (*Capsicum annuum*)의 칼모둘린 유전자 (accession no. AF108889)와는 뉴클레오타이드 수준에서 88 %의 상동성을 나타냄으로서 신규임을 알 수 있었다 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, nucleotide blast program). 확인된 *CaCaM1*의 유전자 염기서열과 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 도 1에 나타내었다.

[실시예 2] 병원균 접종에 의한 고추식물에서의 고추 CaCaM1 유전자의 발현 탐색 방법

상기 실시예 1에서 수득한 *CaCaM1* 유전자의 저항성 탐색에의 이용방법을 확인하기 위해 다음과 같이 시험하였다.

[단계 1]

먼저 저항성 탐색방법을 구체적으로 제시하기 위하여 식물체와 친화적 반응을 나타내는 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)중 병원성 균주 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℃, 100% 상대습도 조건에서 18시간 동안 습실 처리하였다.

접종 1, 6, 12, 18, 24, 48 시간 후에 각각 1, 2엽을 샘플링하여 RNA를 분리하고, 분리한 RNA를 포름알데히드를 함유하는 겔 상에서 전기영동한 후 나일론막 (Hybond N+)으로 전이시켰다.

다음으로 실시예 1에서 수득된 *CaCaM1* 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℃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.

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

이와 같은 방법으로 고추 세균성 점무늬병균의 병원성 균주 접종 후 나타나는 친화적 반응과 비병원성 균주 접종 후 나타나는 불친화적 반응에서 *CaCaM1* 유전자의 발현 양상을 도 3에 나타내었다. 도 3에서 숫자는 접종한

후 고추잎 채취시까지의 경과시간을 나타낸다.

[0037] 도 3에 나타난 바와 같이, 실험의 결과 *CaCaM1* 유전자는 고추 세균성 점무늬병에 대한 고추식물의 저항성 반응으로 병원성 균주와 비병원성 균주에 대하여 접종 후 빠른 시간에 모두 발현을 나타냈다. 보다 구체적으로는 비병원성 균주를 접종하여 저항성 반응을 보이는 고추 식물에서 그 발현이 강하고 오랫동안 지속되었다. 즉, 친화적 반응에서는 *CaCaM1* 유전자의 발현이 1시간에 최고에 도달한 뒤 급속히 감소되었으나, 불친화적 반응에서는 접종 후 1시간에 발현이 최고조에 이르고 12시간까지 발현이 유지되었다.

[0038] [실시예 3] 화학적 유도체에 의한 *CaCaM1* 유전자의 유도 발현

[0039] 본 발명의 *CaCaM1* 유전자가 통상 저항성 유도에 사용되는 화학적 유도체에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적 유도방법을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

[0040] [단계 1]

[0041] 먼저, *CaCaM1* 유전자의 발현 유도에 유용한 유도체를 탐색하기 위하여, 식물병 저항성 발현의 유도에 관여한다고 알려진 화학물질들 중 살리실산(salicylic acid), 메칠 자스몬산 (methyljasmoic acid), 앱시스산(abscisic acid), 과산화수소수 (H_2O_2)를 사용하여 저항성 유도 시험을 실시하였다. 모든 실험에 6엽기의 고추잎이 이용되었다.

[0042] 살리실산은 5 mM, 메칠자스몬산은 100 μ M, 앱시스산은 100 μ M, 과산화수소수는 10 mM의 농도로 고추 잎에 스프레이 하는 방법으로 처리하였으며 메칠자스몬산을 처리한 후에는 밀봉 처리하였다.

[0043] 각각의 식물들은 1,5,10,15,20,25 시간 후에 잎을 수거하였고 각각의 샘플에서 RNA를 추출하였고 추출된 RNA를 이용하여 다음과 같이 노던블러팅을 수행하였다.

[0044] 다음으로 실시예 1에서 수득된 *CaCaM1* 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% 덱스트란 황산염(Dextran Sulfate)]에서 65°C로 16-24시간 동안 배양하여 하이브리다이제이션(hybridization)을 실시하였다. 이렇게 비오틴(biotin)이 표지된 상기의 DNA 프로브는 나일론막(Hybond N+)에 붙어있는 mRNA에 붙게 되며 이 나일론막(Hybond N+) 위에 X-ray 필름을 얹게 되면 비오틴(biotin)이 표지된 DNA가 X-ray 필름을 감광시키므로, 이것으로 발현 여부를 알아볼 수 있게 하였다. 상기 노던블러팅 수행시 리보솜 RNA의 양을 모니터링 함으로써 동일량의 RNA 시료가 로딩되었음을 확인하였다.

[0045] 이상의 실험결과를 도 4 - 7에 나타내었으며, 실험의 결과 *CaCaM1* 유전자는 살리실산 처리 후 발현이 1시간부터 유도되어 10시간까지 발현이 강하게 유지되고 그 이후로 서서히 감소하는 것을 관찰할 수 있었고(도 4), 메칠자스몬산 처리 후에는 1시간에 발현이 유도된 뒤 발현이 감소하는 것을 관찰할 수 있었고(도 5), 앱시스산과 과산화수소수를 처리한 후에는 발현이 25시간까지 서서히 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(도 6 및 도 7).

[0046] [실시예 4] 환경적 스트레스에 의한 *CaCaM1* 유전자의 유도 발현

[0047] 본 발명의 *CaCaM1* 유전자가 환경적 스트레스에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적 유도방법을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

[0048] 각각의 시험에서 노던블러팅 수행시 리보솜 RNA의 양을 모니터링 함으로써 동일량의 RNA 시료가 로딩 되었음을 확인하였으며, 대조구로서 어떤 스트레스도 처리하지 않은 건전 잎을 사용하였다.

[0049] [단계 1]

[0050] 본 발명의 *CaCaM1* 유전자가 건조 스트레스에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적 유도방법을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

[0051] 건조 처리 후 시간별 *CaCaM1* 저항성 유도효과를 알아보기 위하여, 고추 식물체를 건조 스트레스를 처리한 후 각각 1, 5, 10, 15, 20, 25시간째에 잎을 수거하였다.

[0052] 각각의 샘플에서 RNA를 추출한 후, 상기 실시예 3의 단계 1에서와 동일한 방법으로 노던블러팅을 수행함으로써, 건조 스트레스 처리 후 *CaCaM1*의 시간별 발현양상을 알아보았으며, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0053] 시험 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, *CaCaM1* 유전자는 1시간에 발현이 증가되었으나 그 이후로 발현이 감소하는 것으로 나타났다.

- [0054] **[단계 2]**
- [0055] 본 발명의 *CaCaM1* 유전자가 상처 스트레스에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적 유도방법을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.
- [0056] 고추식물에 상처 스트레스를 처리하기 위해 식물체의 잎을 바늘로 찔러 잎 전체에 걸쳐 상처를 낸 후 각각 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25시간이 지나 잎을 수거하였다.
- [0057] 각각의 샘플에서 RNA를 추출한 후, 상기 실시예 3의 단계 1에서와 동일한 방법으로 노던블러팅을 수행함으로써, 상처 스트레스 처리 후 시간경과에 따른 *CaCaM1* 유전자의 발현양상을 알아보았으며, 그 결과를 도 9에 나타내었다.
- [0058] 시험 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, *CaCaM1* 유전자는 처리 후 0.5~1시간에 발현이 최고조에 이르고 그 이후에는 축적량이 줄어들었다.
- [0059] **[단계 3]**
- [0060] 본 발명의 *CaCaM1* 유전자가 저온 스트레스에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적 유도방법을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.
- [0061] 저온 처리 후 시간별 *CaCaM1* 저항성 유도효과를 알아보기 위하여, 고추 식물체를 4℃에 처리한 후 각각 1, 5, 10, 15, 20, 25시간째에 잎을 수거하였다.
- [0062] 각각의 샘플에서 RNA를 추출한 후, 상기 실시예 3의 단계 1에서와 동일한 방법으로 노던블러팅을 수행함으로써, 저온 스트레스 처리 후 *CaCaM1*의 시간별 발현양상을 알아보았으며, 그 결과를 도 10에 나타내었다.
- [0063] 시험 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, *CaCaM1* 유전자는 1시간부터 발현이 시작되어 20시간에 가장 강하게 발현되는 것으로 나타났다.
- [0064] **[실시예 5] *CaCaM1* 유전자를 이용한 형질전환 식물체의 제조 및 *CaCaM1* 유전자의 과다발현에 의한 고추 식물의 병 저항성의 변화**
- [0065] 고추식물에서 *CaCaM1* 유전자가 과다발현되었을 때 병 발생과 관련된 다른 유전자들의 유도 여부 및 병에 대한 저항성의 증가 여부에 대하여 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 *CaCaM1* 유전자를 Stratagene에서 제공하는 pBIN3S 벡터에 도입시켜 pBIN35S::*CaCaM1*을 제조하였다(도 11).
- [0066] 이렇게 제조된 재조합 벡터인 pBIN35S::*CaCaM1*을 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciense* strain GV 3101)에 전기천공법(electroporation)을 통하여 도입하고 다시 재조합벡터가 들어가 있는 GV3101 균주를 고추 잎에 접종하여 *CaCaM1* 유전자를 과다 발현하는 고추 식물의 병 저항성 변화 여부를 관찰하기 위해 하기와 같은 시험을 수행하였다.
- [0067] **[단계 1]**
- [0068] *CaCaM1*을 과발현하는 재조합벡터 (35S::*CaCaM1*)와 *CaCaM1*을 과발현하지 않는 대조구 벡터 (35S:00)를 이용하여 형질전환시킨 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciense* strain GV 3101)을 Yeast-Peptone (YEP: yeast extract 10g, peptone 10g, sodium chloride 5g/L) 배지에서 진탕배양 한 뒤 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 균주 현탁액 농도를 흡광도(optical density 600, OD₆₀₀)에서 0.5, 0.2, 0.1, 0.05로 맞추고 이를 고추 잎의 엽맥을 경계로 하여 각각 접종하고 그 결과를 도 12에 나타내었다.
- [0069] 도 12에 나타난 바와 같이, 접종 4일째, *CaCaM1*을 과발현하는 아그로박테리움(*Agrobacterium*)을 접종한 부위에서 세포사멸이 일어나는 것을 관찰할 수 있었으며 (도 12의 1번째 사진), 이때 주변부위에 페놀성 화합물(phenolic compound)의 침적이 일어나는 것을 자외선 램프(ultra violet (UV) lamp) 하에서 관찰할 수 있었다 (도 12의 2번째 사진).
- [0070] 접종 부위에서 세포사멸이 일어나는 것을 더 자세히 관찰하기 위해 고추 잎의 엽록소를 에탄올을 이용하여 탈색한 결과 세포사멸이 일어난 부위가 갈변되어 있는 것을 더욱 뚜렷하게 관찰할 수 있었다 (도 12의 3번째 사진). 접종후 1일째 병저항성의 신호전달 물질로 알려진 활성산소의 발생량을 알아보기 위해 DAB 염색(3,3'-diaminobenzidine staining)을 수행하였고 그 결과를 도 12의 4번째 사진에 나타내었다. 그 결과, *CaCaM1*을 과발현하는 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 균주를 접종한 부위에서 활성산소의 축적이 강하게 일어나는 것을 관

찰할 수 있었다.

[단계 2]

*CaCaM1*이 과발현된 고추 잎에서 저항성 관련 유전자의 발현을 관찰하기 위해 식물을 수거하여 RNA를 추출하고 알티-피시알(RT-PCR)을 수행하고 그 결과를 도 13에 나타내었다. 도 13에서와 같이 *CaCaM1*을 과발현하는 아그로박테리움(*Agrobacterium*)을 접종한 잎에서 *CaCaM1*의 발현이 증가하고 병저항성 관련 유전자로 보고된 *CaBPR1* (*Capsicum annuum* basic pathogenesis-related protein 1), *CaPR10* (*Capsicum annuum* pathogenesis-related protein 10), *CaPOA1* (*Capsicum annuum* ascorbate peroxidase 1)의 발현도 함께 증가한 것을 관찰할 수 있었다 (Choi et al., 2007 Plant Physiology Vol.145: 890-904p).

[단계 3]

*CaCaM1*이 과발현된 고추 잎에서 병저항성의 증가 여부를 관찰하기 위해 고추 잎의 한쪽 부분에는 *CaCaM1*을 과발현하거나 (35S:*CaCaM1*) 과발현하지 못하는 (35S:00) 아그로박테리움(*Agrobacterium*)을 접종하고 그 반대편에 고추 세균성 점무늬병원균을 접종한 뒤 저항성 여부를 판별하였다. 그 결과를 도 14에 나타내었다.

도 14에 나타난 바와 같이, *CaCaM1*을 과발현시킨 고추 잎에서는 병징이 약해지는 것을 관찰할 수 있었으며, 세균의 생장물이 저하되는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 *CaCaM1*을 과발현한 고추 잎에서 고추 세균성 점무늬 병균에 대한 저항성이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

[실시에 6] *CaCaM1* 유전자의 과다발현에 의한 애기장대 식물의 병 저항성 변화

모델식물로 사용되는 애기장대 식물체에서 *CaCaM1* 유전자의 과다발현시 다른 병 발생과 관련된 유전자들의 유도 여부 및 병에 대한 저항성의 증가 여부에 대하여 알아보기 위하여, 실시에 1에서 수득한 *CaCaM1* 유전자를 Stratagene에서 제공하는 pBIN35S 벡터에 도입시켜 pBIN35S:*CaCaM1*을 제조하였다(도 11).

이렇게 제조된 재조합 벡터인 pBIN35S::*CaCaM1*을 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciense* strain GV 3101)에 전기천공법(electroporation)을 통하여 도입하고 다시 재조합벡터가 들어가 있는 GV3101 균주를 꽃침지(floral dipping) 방법을 통하여 애기장대 식물에 도입함으로써 형질전환시켜서 *CaCaM1* 유전자의 과다발현을 유도시킨 후 하기와 같은 시험을 수행하였다.

[단계 1]

CaCaM1 유전자가 과다 발현된 식물체에서 세균성 병에 대한 저항성이 증가하였는지의 여부를 알아보기 위하여, 상기 *CaCaM1* 유전자가 과다 발현된 애기장대와 대조구로서의 야생형 애기장대 식물체에서 *CaCaM1*과 애기장대 식물의 저항성 관련 유전자인 *PR1*, *PDF1.2*, *RD29a* 유전자의 발현을 관찰하였으며 그 결과를 도 15에 나타내었다.

도 15에서 #1, #2, #3, #4, #5 는 사용된 형질 전환 식물의 계통번호를 나타내고, 실험결과 *CaCaM1* 유전자가 과다 발현된 형질전환 애기장대 식물에서만 *CaCaM1* 유전자와 병저항성 관련 *PR1*, *PDF1.2* 이 발현됨을 관찰할 수 있었다.

[단계 2]

상기와 같이 *CaCaM1*이 과다 발현된 식물에 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000균주를 접종하고 식물체의 변화를 관찰하였다. 또한 *CaCaM1* 유전자가 과다발현된 식물체에서 저항성 반응이 나타나는 이유를 알아보기 위해 덤 염색(DAB staining) 및 트리판 블루 염색(trypan blue staining)을 수행하였다.

그 결과 도 16에 나타난 바와 같이 *CaCaM1*이 과다 발현된 식물체에서 야생형에 비하여 세균성 병에 대하여 저항성을 나타내고 있음이 관찰되었고, 도 17의 덤염색 (DAB staining) 결과와 트리판 블루 염색 (trypan blue staining) 결과를 통하여 *CaCaM1* 유전자가 과다 발현된 식물에서 저항성 식물에서 관찰되는 활성 산소 증가와 세포사멸반응이 일어나는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 이때 저항성 관련 유전자인 *PR1*의 발현이 대조구에 비해 증가되는 것을 노던블러팅을 통해 확인할 수 있었다.

[단계 3]

*CaCaM1*이 과다 발현된 식물에, 애기장대에서 노균병을 일으키는 하이알로페로노스포라 파라시티카 *Noco2* (*Hyaloperonospora parasitica* Noco 2)를 접종한 후 병저항성의 변화를 관찰하였다. *CaCaM1*이 과발현된 식물과 과발현하지 않는 야생형 대조구 식물의 떡잎 시기에 하이알로페로노스포라 파라시티카 *Noco2*를 5×10^4 spores/ml 의 농도로 스프레이접종 하였다. 접종 후 17℃의 온도에서 습실 처리하였다. 그 결과 *CaCaM1*을 과발

현하는 형질전환 애기장대 식물에서 저항성이 증가하여 노균병원균의 포자형성이 억제되는 것을 관찰할 수 있었고 그 결과를 도 18에 나타내었다.

[0087] [단계 4]

[0088] *CaCaM1*이 과다 발현된 식물의 노균병에 대한 저항성을 세포수준에서 관찰하기 위해, 댁염색 (DAB staining)과 트리판 블루 염색 (trypan blue staining)을 수행하고 그 결과를 도 19에 나타내었다. 그 결과 *CaCaM1* 유전자가 과발현된 식물에서 저항성 식물에서 관찰되는 활성 산소 증가와 세포사멸반응이 일어나는 것을 관찰할 수 있었다. 하지만 야생형의 대조구 식물, 즉 *CaCaM1*을 과발현하지 않는 식물체에서는 활성 산소 증가와 세포사멸반응이 일어나지 않는 것을 관찰할 수 있었다.

[0089] 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

[0090] 도 1은 본 발명에 의하여 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* L. cv. Nockwang)으로부터 클로닝한 고추 칼모듈린 1(*CaCaM1*) 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 도면이고,

[0091] 도 2는 고추 녹광 품종의 각 기관에서 *CaCaM1* 유전자의 발현 결과를 나타낸 도면이고,

[0092] 도 3은 고추식물에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성 균주와 비병원성 균주를 접종하였을 때 접종된 잎과 접종되지 않은 잎에서의 *CaCaM1* 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸 도면이고,

[0093] 도 4는 고추식물에 살리실산(Salicylic acid)을 처리한 후 시간의 경과에 따른 *CaCaM1* 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸 도면이고,

[0094] 도 5는 고추식물에 메칠자스몬산(Methyljasmonic acid)을 처리한 후 시간의 경과에 따른 *CaCaM1* 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸 도면이고,

[0095] 도 6은 고추식물에 앱시스산(abscisic acid)을 처리한 후 시간의 경과에 따른 *CaCaM1* 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸 도면이고,

[0096] 도 7은 고추식물에 과산화수소(H_2O_2)를 처리한 후 시간의 경과에 따른 *CaCaM1* 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸 도면이고,

[0097] 도 8은 고추식물에 건조스트레스를 처리한 후 시간의 경과에 따른 *CaCaM1* 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸 도면이고,

[0098] 도 9는 고추식물에 상처스트레스를 처리한 후 시간의 경과에 따른 *CaCaM1* 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸 도면이고,

[0099] 도 10은 고추식물에 저온스트레스를 처리한 후 시간의 경과에 따른 *CaCaM1* 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸 도면이고,

[0100] 도 11은 *CaCaM1* 유전자를 고추 및 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) 식물체에서 과발현(overexpression)하기 위한 재조합 벡터 pBIN35S:*CaCaM1*의 배열지도를 나타낸 도면이고,

[0101] 도 12는 상기의 재조합벡터 pBIN35S:*CaCaM1*와 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101) 균주를 이용하여 고추 식물에서 *CaCaM1* 유전자를 과발현하였을 때 활성산소 발생 및 과민성 세포사멸을 포함하는 저항성 반응이 유도되는 결과를 나타낸 도면이고,

[0102] 도 13은 고추식물에서 *CaCaM1* 유전자를 과발현하였을 때 고추식물의 병방어관련 유전자들의 발현을 RT-PCR을 통해 확인한 결과를 나타낸 도면이고 (*CaBPR1*: *Capsicum annuum* basic pathogenesis-related protein 1, *CaPR10*: *Capsicum annuum* pathogenesis-related protein 10, *CaPOA1*: *Capsicum annuum* ascorbate peroxidase 1),

[0103] 도 14는 고추식물에서 *CaCaM1* 유전자를 과발현한 고추 잎에서 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대한 저항성이 증가한 결과를 나타낸 도면이고,

- [0104] 도 15는 본 발명에 의한 재조합벡터 pBIN35S:CaCaM1과 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101) 균주를 이용하여 CaCaM1 유전자를 과발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 CaCaM1 유전자가 과다발현되고, 이로 인해 애기장대의 병저항성 관련 유전자인 PR1 (*Pathogenesis-related protein 1*) 및 PDF1.2 (*Defensin-like protein*) 유전자의 발현이 증가한 것을 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,
- [0105] 도 16은 CaCaM1 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 세균성 흑반병원균인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000) 균주에 대한 병저항성이 나타난 식물체의 사진과 식물체 내에서 병원균 생장을 검정한 결과를 나타낸 그래프이고,
- [0106] 도 17은 CaCaM1 유전자를 과발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 세균성 흑반병원균 접종 후 활성산소와 과민성 세포사멸반응이 증가한 것을 댁염색(DAB staining)과 트립토판 블루 염색(trypan blue staining)을 통해 각각 살펴보고, 이때 PR1의 발현이 증가한다는 결과를 나타낸 도면이고,
- [0107] 도 18은 CaCaM1 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 노균병 (*downy mildew*, *Hyaloperonospora parasitica*)에 대한 병저항성이 나타난 결과를 보인 도면이고,
- [0108] 도 19는 CaCaM1 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 노균병 (*downy mildew*, *Hyaloperonospora parasitica*)에 대한 병저항성이 나타날 때 활성산소의 축적 및 과민성 세포사멸이 동반되는 것을 댁염색(DAB staining)과 트립토판 블루 염색(trypan blue staining)을 통해 각각 살펴본 결과를 나타낸 도면이다.

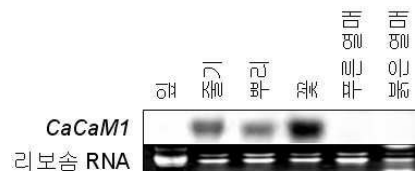
도면

도면1

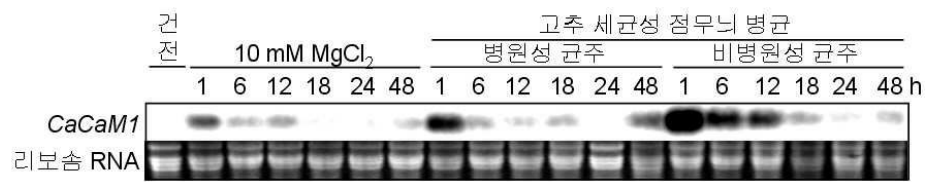
```

tctttccaaaaat aaaaacaagtagtacaacttaacttattgaatttctagaagaaa 80
ATGGCAGATCAGTTGACTGATGACCGAGTCTCTGAGTTTAAAGGAAGCATTAGCTTGT 120
M A D Q L T D D Q I S E F K E A F S L F
GATAAGGATGGAGATGGTTCATCACTACTAAGGAGCTTGGGACTGTGATGAGGTGCTG 180
D K D G D G C I T T K E L G T V M R S L
GGACAGAACCGGACTGAAAGCTGAAGTCAAGGAGATGATAAAGGAGGTGATGAGATGGT 240
G Q N P T E A E L Q D M I N E V D A D G
AATGGAAACCATCGACTTCGACAGATTTCTAAACCTCATGGCCAAAGAGATGAAGGATACA 300
N G T I D F P E F L N L M A K K M K D T
GATTCCGAGGAGGAGCTGAAAGAGGCTTCAAGGTTTTCGACAAAGGATCAAAATGGCTTC 360
D S E E E L K E A F R V F D K D Q N G F
ATCTGGCTGCTGAGCTTGGCCATGTGATGACTAACCTTGGTGAAGAGCTCACTGATGAA 420
I S A A E L R H V M T N L G E K L T D E
GAAGTCGATGAGATGATTAGGGAAGCGGATTTCGATGGTGTGTCAAATTAACATGAA 480
E V D E M I R E A D F D G D G Q I N Y E
GAGTTTGTAAAGGTGATGATGGCCAAAGTAATccaccacccctctgttaaagtttaagtt 540
E F V K V M M A K *
tagacttgttaaaatttggaaaaaatgccaaaaatgtttcattggataggatgtgctt 600
agtataatttatgttttaccatctctagatgattggaccttgaataaatgtaatttt 660
tattgtaaaaaaataaaaaaaataaaaaa 687
    
```

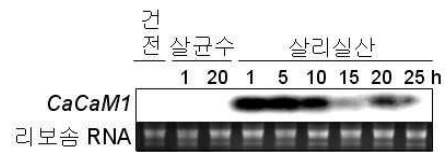
도면2



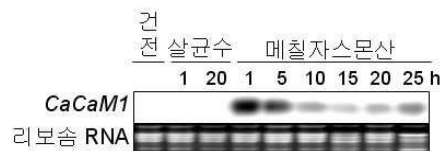
도면3



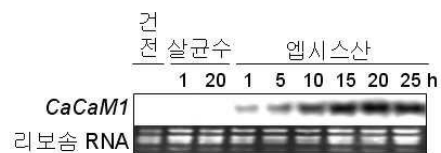
도면4



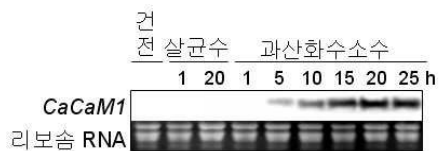
도면5



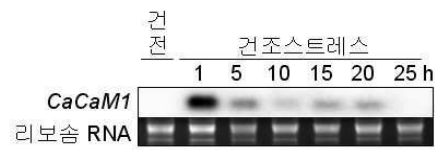
도면6



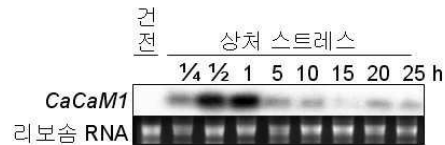
도면7



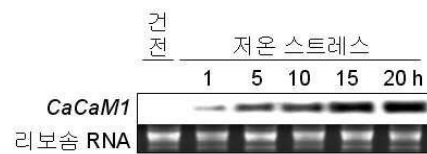
도면8



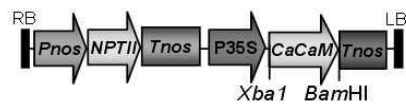
도면9



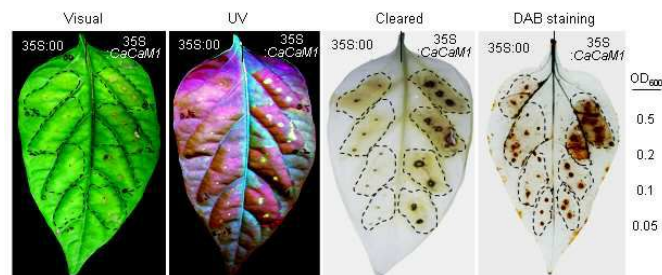
도면10



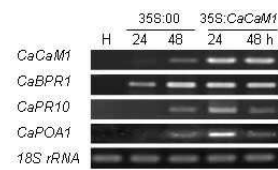
도면11



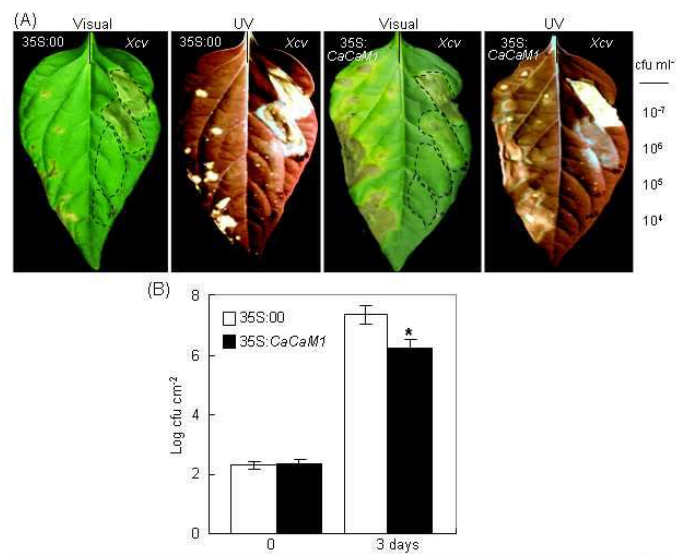
도면12



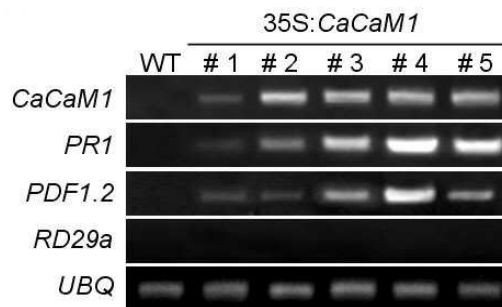
도면13



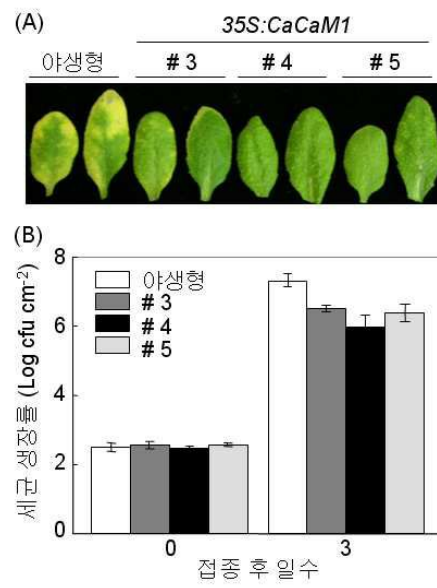
도면14



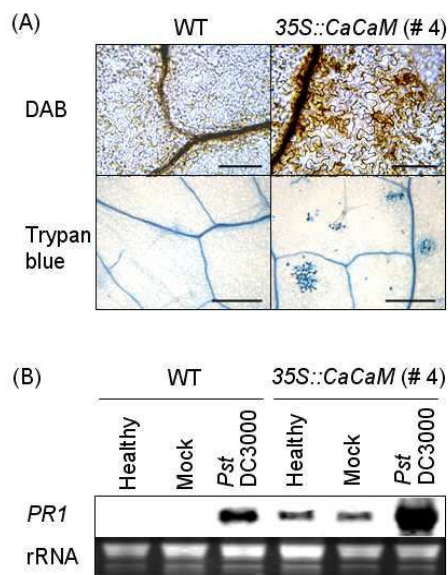
도면15



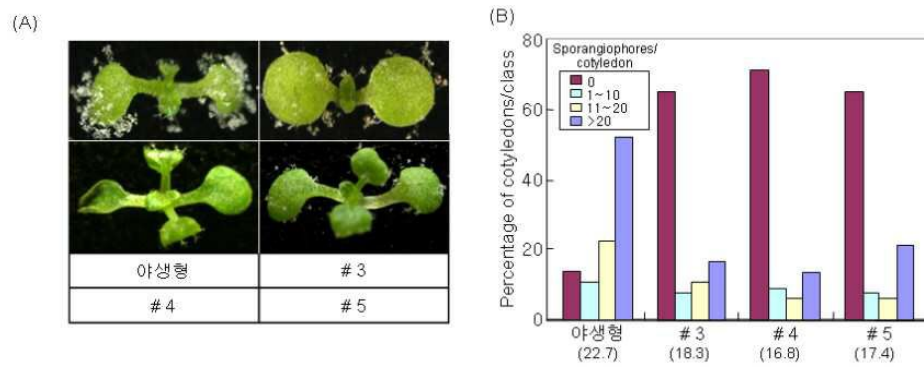
도면16



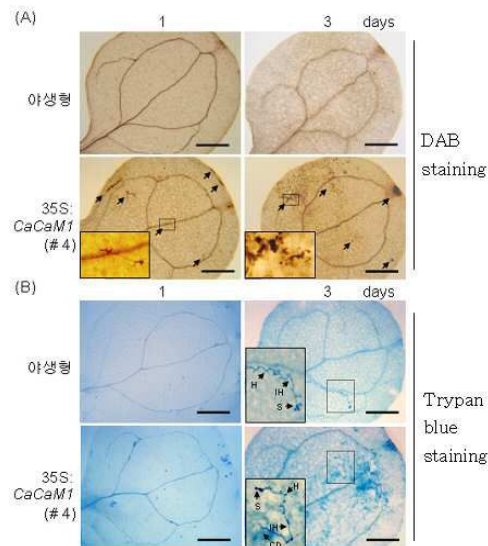
도면17



도면18



도면19



서열목록

- <110> Korea University Industrial and Academic Collaboration Foundation
 <120> Pepper disease resistance-related Calmodulin gene CaCaM1 and transgenic plants using the same
- <130> P11-080729-01
- <160> 2
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
 <211> 687
 <212> DNA
 <213> Capsicum annuum cv. Nockwang

<400> 1
tctttccaaa aataaaaaa agtagtaciaa cttatcttgt atttgaaatt ctagaagaaa 60

atggcagatc agttgactga tgaccagatc tctgagtta aggaagcatt tagcttgttt 120

gataaggatg gagatggttg catcactact aaggagcttg ggactgtgat gaggtcgctg 180

ggacagaacc cgactgaagc tgaactccag gacatgataa acgaggtgga tgcagatggt 240

aatggaacca tcgacttccc agagtttcta aacctcatgg ccaagaagat gaaggataca 300

gattccgagg aggagctgaa agagcattc agggttttcg acaaggatca aaatggcttc 360

atctcggtg ctgagcttcg ccatgtgatg actaaccttg gtgagaagct cactgatgaa 420

gaagtcgatg agatgattag ggaagcggat ttcgatggtg atggtaaat taactatgaa 480

gagtttgta aggtcatgat ggccaagtaa tccaccacce tcttgtaaa agtttaagtt 540

tagacttggt aaaatttgtg aaaaaatgcc aaaaaatgtt tcattggata ggatgtgctt 600

agtataattt atgtttttac catctctaga tgtattggac cttgaatgaa tgtaatgttt 660

tattgtaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 687

<210> 2
<211> 149
<212> PRT
<213> Capsicum annuum cv. Nockwang

<400> 2
Met Ala Asp Gln Leu Thr Asp Asp Gln Ile Ser Glu Phe Lys Glu Ala
1 5 10 15

Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Cys Ile Thr Thr Lys Glu
20 25 30

Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu
35 40 45

Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile
50 55 60

Asp Phe Pro Glu Phe Leu Asn Leu Met Ala Lys Lys Met Lys Asp Thr
65 70 75 80

Asp Ser Glu Glu Glu Leu Lys Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp
85 90 95

Gln Asn Gly Phe Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn
100 105 110

Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu
115 120 125

Ala Asp Phe Asp Gly Asp Gly Gln Ile Asn Tyr Glu Glu Phe Val Lys
130 135 140

Val Met Met Ala Lys
145