(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.
C12N 15/29 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0106493
(43) 공개일자 2006년10월12일

(21) 출원번호 10-2005-0029684
(22) 출원일자 2005년04월08일

(71) 출원인 고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자 황병국
서울특별시 강남구 역삼2동 개나리아파트 42동 303호
이성철
서울 구로구 구로5동 태영아파트 104동 201호

(74) 대리인 김선애

심사청구 : 있음

(54) 고추 한별 품종 유래의 병원균 유도 유전자2(ＣＡＰＩＰ2), 및 이를 이용한 식물체 병 및환경스트레스 저항성 탐색방법

요약

본 발명은 고추 한별 품종 유래의 병원균 유도 유전자 2(CAPIP2) 염기서열 및 이를 이용한 식물체 병 및 환경스트레스 저항성 탐색방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 고추 세균성 점무늬병에 대해 저항성을 가진 것으로 알려진 고추 한별 품종(*Capsicum annuum* L. cv. Hanbyul)으로부터 저항성 관련 신규 유전자인 병원균 유도 유전자 2 (CAPIP2)를 분리하여 해독(Sequencing)함으로써 그 염기서열 및 그 아미노산 서열을 제공하고, 이 유전자를 이용하여 생물적/화학적/물리적 저항성 유도 처리시 유도저항성의 발현 여부를 탐색하는 식물체 병 및 환경스트레스 저항성 탐색방법을 제공하는 것에 관한 것이다. 상기한 본 발명에 의하면, 식물체 병원균에 대한 방어반응의 표지 및 식물체의 병저항성 작물의 분자육종을 위한 유전재료를 제공할 수 있고, 식물체의 병저항성 등의 탐색을 촉진시킬 수 있는 이점이 있다.

대표도

도 1

색인어

고추, CAPIP2 유전자, 병저항성, 환경스트레스, 세균성 점무늬병

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 의한 고추 한별 품종(*Capsicum annuum* L. cv. Hanbyul)으로부터 클로닝한 CAPIP2 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

도 2는 고추 한별 품종에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때, 건전한 잎과 접종되지 않은 잎에서의 본 발명에 의한 CAPIP2 유전자의 발현유도결과를 나타낸다.

도 3은 고추 한별 품종에 에틸렌을 처리한 후 경과시간에 따른 본 발명에 의한 CAPIP2 유전자의 발현유도결과를 나타낸다.

도 4는 고추 한별 품종에 메틸 자스모네이트를 처리한 후 경과시간에 따른 본 발명에 의한 CAPIP2 유전자의 발현유도결과를 나타낸다.

도 5는 고추 한별 품종에 살리실산을 처리한 후 경과시간에 따른 본 발명에 의한 CAPIP2 유전자의 발현유도결과를 나타낸다.

도 6은 고추 한별 품종에 과산화수소를 처리한 후 경과시간에 따른 본 발명에 의한 CAPIP2 유전자의 발현유도결과를 나타낸다.

도 7은 고추 한별 품종에 상처를 처리한 후 경과시간에 따른 본 발명에 의한 CAPIP2 유전자의 발현유도결과를 나타낸다.

도 8은 고추 한별 품종에 염화나트륨을 처리한 후 경과시간에 따른 본 발명에 의한 CAPIP2 유전자의 발현유도결과를 나타낸다.

도 9는 본 발명에 의한 CAPIP2 유전자가 삽입된 재조합 벡터 pCAPIP2의 개열지도이다.

도 10은 본 발명에 의한 CAPIP2 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 세균성 병원균인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 균주에 대한 병저항성 검정결과를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명에 의한 CAPIP2 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물 종자의 염화나트륨 및 마니톨에 대한 내성 검정 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명에 의한 CAPIP2 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물의 염화나트륨에 대한 내성 검정결과를 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명에 의한 CAPIP2 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물의 건조에 대한 내성 검정결과를 나타낸 것이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 고추 한별 품종 유래의 CAPIP2 유전자, 및 이를 이용한 식물체 병 및 환경스트레스 저항성 탐색방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 고추 세균성 점무늬병에 대해 저항성을 가진 것으로 알려진 고추 한별 품종(*Capsicum annuum* L. cv. Hanbyul)으로부터 저항성 관련 신규 유전자인 CAPIP2 유전자를 분리하여 해독(Sequencing)함으로써 그 염기서열 및 아미노산 서열을 제공하고, 이 유전자를 이용하여 생물적/화학적/물리적 저항성 유도 처리시 유도저항성의 발현 여부를 탐색하는 식물체 병 및 환경스트레스 저항성 탐색방법을 제공하는 것에 관한 것이다.

담배, 토마토와 함께 대표적인 가지과 식물인 고추는 우리 나라에서 오래전부터 향신료 또는 양념으로 사용되어온 대표적인 작물이다. 고추에 대한 병으로는 바이러스병, 세균병, 진균병 등이 고루 다양하게 보고되어 있는데, 그 중 치명적인 것으로는 난균류에 의한 역병, 진균에 의한 탄저병 및 세균에 의한 세균성 점무늬병 등을 들 수 있다.

이 중 고추 세균성 점무늬병은 고추의 잎, 줄기, 과실에 반점을 형성하여 낙엽을 유발하고 수확량을 감소시키는 병으로서, 통상 더뎅이병, 반점세균병 등으로 불리며, 고추가 우리나라의 재배작물에서 차지하는 비중을 고려해 볼 때 그 피해는 심각한 수준이라고 할 수 있다.

이러한 고추 세균성 점무늬병을 방제하기 위해 지금까지는 농약을 이용한 화학적 방제법이 주로 사용되어 왔는데, 그 독성으로 인하여 병원균뿐만 아니라 주변 생태계의 생물까지도 대량 살상하여 생태계를 파괴시키고 토양과 수질을 오염시키는 폐해가 있어 왔다.

따라서 앞으로는 식물이 처해 있는 환경 및 조건을 고려하여 물리적/생물학적 방제수단을 적절히 혼용함으로써 농약의 사용을 가능한 줄이는 방법을 사용하는 것이 바람직하다고 할 수 있으며, 더 바람직한 것은 병에 대해 저항성을 가지고 있는 저항성 품종의 개량 및 육종 등을 통해 병 발생 자체를 억제하는 방법을 찾는 것이라 할 수 있다.

사실, 그 동안 농약을 사용하지 않고 병충해에 의한 피해를 감소시키기 위한 노력의 일환으로 고추를 비롯한 다양한 작물 및 병원균을 대상으로 병 저항성 작물의 육성 프로그램들이 꾸준히 진행되어 왔으며, 병 저항성에 대한 이해 및 이의 실제적 응용을 위해 병 저항성 식물에서의 저항성 기작에 대한 연구가 역시 고추를 비롯한 여러 가지 작물 및 모델식물을 대상으로 실시되어 왔다.

일단 식물이 병에 감염되면, 기주식물은 여러 가지 세포내 대사 시스템을 작동시켜 방어기작을 시작하는데, 이러한 방어기작에 의해 병원균 감염 초기에 기주식물과 식물병원균간의 반응이 친화적 반응과 불친화적 반응으로 나뉘어 결정되고, 이에 따라 병의 진전을 제한시킬 수 있는지의 여부가 결정되는 것이다.

불친화적 반응에서, 감염된 식물은 자체의 인식작용에 의해 병원균의 침입을 인지하고, 이에 대하여 감염부위의 세포에 국부적 세포 죽음과 같은 과민성 반응(hypersensitive reaction), 캘러스(calluse)의 축적, 리그닌(lignin)화에 의한 세포벽의 비후화 등의 반응을 나타내며, 피토알렉신(phytoalexin) 등 여러 종류의 항균성 물질을 생성하고, 소위 병 생성 관련 단백질(pathogenesis related(PR) protein)이라 불리는 방어단백질을 생성하는 것으로 알려져 있다.

이러한 방어 기작들은 병원균이 침입하는 경우뿐만 아니라, 에틸렌이나 메틸 자스모네이트 등 인위적인 화학적 자극에 의해서도 나타나며, 물리적 상처나 염도, 온도 등의 환경적 스트레스에 의해서도 나타난다고 보고되고 있다.

이렇게 인위적인 생물학적/물리적/환경적 스트레스를 줌으로써 유도되는 저항성을 일반적으로 유도저항성이라고 하는데, 이러한 저항성 유도 반응은 식물이 병원체에 대해 방어할 수 있는 능력에 있어서 중요한 역할을 하는 신호전달경로로써 평가된다.

이것은, 이와 같은 유도저항성이 신호전달에 대한 모형으로서 흥미가 있으며 실용적인 가치가 있을 뿐만 아니라, 저항성을 일으키는 생화학적 변화를 이해함으로써, 병 저항성이 증진되는 유전공학적 식물을 개발하거나 식물의 저항성 유전기작을 촉진하도록 작동하는 식물보호 화학물질을 개발하는 데에 이용될 수 있기 때문이다.

근래, 이러한 유도저항성 연구는 유전공학적 기술의 개입에 의해 훨씬 더 그 발전 속도가 빨라졌는데, 종래에는 저항성 유도 처리를 한 후 저항성 발현 여부를 확인하기 위해 식물을 재배하고 병을 접종한 후 저항성이 나타나는지의 여부를 확인해야 했던 반면, 지금은 유도하고자 하는 저항성 관련 단백질을 코딩하는 유전자를 밝혀내고 이를 이용하여 실험실 수준에서 저항성 발현 여부를 확인할 수 있게 됨으로써, 포장(Field)에서의 작물재배, 병 접종, 병반 출현 여부 확인 등의 절차를 생략할 수 있게 되었기 때문이다.

이것은 전체적인 저항성 유도 시험의 주기를 단축함으로써 종래에 비해 더 짧은 시간 내에 더 많은 시험을 할 수 있게 되었음을 의미하며, 결국 더 우수한 저항성 품종을 개발할 수 있게 되었음을 의미한다.

그러나 이것은 유도하고자 하는 유전자 서열이 밝혀지고 이에 따라 해당 유전자 클론이 확보되어 있다는 전제하에 가능한 것이다. 이러한 의미에서, 식물병에 저항성을 나타내는 다양한 병 생성 관련 단백질(PR protein)의 유전자 정보를 축적함으로써, 이를 이용한 식물체 병저항성 탐색을 촉진하고 나아가 식물체의 병저항성 품종의 개발을 촉진시키는 것이 시급한 당면 과제라고 할 수 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 과제를 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대한 방어반응에 관여하는 것으로 식물체 병저항성 관련 단백질 중 하나인 CAPIP2 단백질을 코딩하는 CAPIP2 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 염기서열 및 그에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 CAPIP2 유전자를 이용하여 고추 세균성 점무늬병 등 병원균, 화학물질 및 환경스트레스에 대해 저항성 유도 여부를 탐색하는 식물체 병 및 환경스트레스 저항성 탐색방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 CAPIP2 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 이에 의해 형질전환된 식물체를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명의 상기 목적은, 고추 한별 품종(*Capsicum annuum* L. cv. Hanbyul)에 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하여 감염시킨 고추잎으로부터 mRNA를 분리한 다음 cDNA 라이브러리를 제조한 후 이를 스크리닝하여 CAPIP2를 선발한 후 그 염기서열을 결정하고, 고추에 병원균, 화학물질 및 환경스트레스 중 어느 하나를 접종 또는 처리하여 상기 CAPIP2 유전자의 발현 여부를 조사함으로써 달성하였다.

본 발명은 또한 상기 CAPIP2 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열 및 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 이에 의해 형질전환된 식물체를 제공한다.

이하, 첨부된 도면들을 참조하면서 본 발명의 구성을 상세히 설명한다.

먼저, 본 발명은 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균주 접종에 대해 저항성 반응인 과민성 반응을 나타내는 한별 고추 품종으로부터 mRNA를 분리하여 cDNA 라이브러리를 제작하고, 비병원성 균주를 접종한 고추식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추식물에서 얻은 총 mRNA를 디옥시제닌(dioxygenin)으로 표지하여 프로브(Probe)를 만들고, 이 cDNA와 프로브를 이용하여 디퍼런셜 하이브리다이제이션(differential hybridization)을 수행하여 병저항성에 관련될 것으로 추정되는 유전자를 선발하여 클론을 수득하고, 이 클론 중 CAPIP2 유전자를 선발하고 그 염기서열을 해독(Sequencing)함으로써, CAPIP2로 명명된 고추 한별 품종에서 유래된 신규한 식물병 저항성 유전자 염기서열(서열번호 1) 및 그에 의해 코딩되는 아미노산 서열(서열번호 2)을 제공한다(도 1 참조).

다음으로, 본 발명은, 병원성 균주 또는 비병원성 균주를 접종한 고추 개체에서 선정된 기관에 대해 상기 CAPIP2 단백질 유전자를 프로브로 이용하여 CAPIP2 단백질 발현 여부를 확인하는 것으로 이루어지는, 식물체 병저항성 탐색방법을 제공한다.

또한, 본 발명은, 화학물질, 물리적 상처, 환경적 스트레스 등 병원성 세균이 아닌 비생물적 유도방법을 식물체에 적용하고, 이에 대하여 상기 저항성 탐색방법을 이용하여 CAPIP2 단백질 발현 여부를 확인함으로써, 더 용이하고 시간을 절약할 수 있는 새로운 저항성 유도 탐색방법을 제공한다.

나아가, 본 발명은 상기 CAPIP2 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 본 발명에 의한 CAPIP2 유전자가 과발현된 형질전환 식물을 제조하고, 상기 형질전환 식물의 병저항성 및 고염, 건조 등의 환경스트레스 저항성 생성 여부를 확인함으로써, 새로운 식물병 저항성 및 환경스트레스 저항성을 갖는 식물체를 제공한다.

이하, 실시예들을 통해 본 발명을 더 구체적으로 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예들에 의하여 한정되는 것은 아니다.

<u>실시예 1 : CAPIP2 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열 결정</u>

고추 세균성 점무늬병에 대한 병 생성 관련 단백질 중 하나인 CAPIP2 단백질 코딩 유전자 염기서열 및 그에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

고추 한별 품종(*Capsicum annuum* cv. Hanbyul)에 고추 세균성 점무늬병의 비병원성균인 BV5-4a(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strain BV5-4a)를 접종하고 18시간 동안 습실처리한 후 저항성 병반인 과민성반응이 나타난 식물체를 습실에서 꺼내어 잎을 수거하였다.

그 다음, 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 나이론막(Hybond N+)에 일정하게 흡착시킨 후, 각각 고추 세균성 점무늬병균의 비병원성 균주를 접종한 고추식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추식물의 잎에서 추출한 총 mRNA를 디옥시제닌(dioxygenin)으로 표지하여 프로브를 만든 다음, 디퍼런셜 하이브리다이제이션(differential hybridization)을 수행하였다.

하이브리다이제이션 결과 비병원성 균주 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 CAPIP2 단백질 코딩 유전자를 확인하고 CAPIP2 유전자로 명명하였다. CAPIP2 단백질은 고추세균성 점무늬병 이외에도 여러 가지 병원균에 대하여 저항성을 지니게 하는 작용을 하며, 분자량이 21.134 kD의 단백질이다.

이 유전자에서 유추한 아미노산 서열을 애기장대에서 발견된 기능이 밝혀져 있지 않은 단백질의 아미노산 서열과 비교한 결과, 72%의 상동성을 나타냄으로써 신규한 것임을 알 수 있었다. 확인된 CAPIP2 유전자의 염기서열과 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 도 1에 나타내고 서열번호 1 및 서열번호 2로 정리하였다.

<u>실시예 2 : 병원균에 의한 고추식물에서의 CAPIP2 유전자의 유도 발현</u>

상기 실시예 1에서 수득한 CAPIP2 유전자를 이용하여 병 저항성 탐색이 가능한 지 확인하기 위해 다음과 같이 시험하였다.

저항성 탐색방법을 구체적으로 세팅하여 제시하기 위하여, 가장 확실하게 저항성을 유발할 수 있을 것으로 생각되는 고추 세균성 점무늬병의 병원성 균주 및 비병원성 균주를 이용, 하기와 같이 노던블러팅(Northern Blotting) 시험을 수행하였다.

우선, 고추 세균성 점무늬병균 중 식물체와 친화적 반응을 나타내는 병원성 균주 Ds1과 불친화적 반응을 나타내는 비병원성 균주 Bv5-4a를 배양한 후, 10^8 cfu/㎖의 농도로 4엽기 고추식물체 1, 2엽의 뒷면에 주사기를 이용하여 인필트레이션(Infiltration)하여 접종하고, 28 ℃, 100 % 상대습도 조건에서 18시간 동안 습실처리하였다.

접종 0.5, 1, 2, 6, 12, 18, 24 시간 후에 각각 1, 2엽을 샘플링하여 RNA를 분리하고, 분리한 RNA를 포름알데히드를 함유하는 겔 상에서 전기영동한 후 나이론막(Hybond N+)으로 전이시켰다.

다음에, 실시예 1에서 수득된 CAPIP2 유전자를 제한효소 *Eco*RI 및 *Xho*I으로 각각 절단하고 삽입 DNA만을 회수하여 ^{32}P로 표지한 후, 이를 반응액[0.25M 인산완충액, 7% SDS, 1mM EDTA, 5% 덱스트란 황산염(Dextran Sulfate)]에서 65 ℃로 16 - 24 시간 동안 배양하여 하이브리다이제이션(hybridization)을 실시하였다.

이렇게 ^{32}P로 표지된 상기 DNA 프로브는 나이론막에 붙어있는 mRNA에 붙게 되며 이 나이론막 위에 X-ray 필름을 얹게 되면 ^{32}P로 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 같이 고추 세균성 점무늬병균의 병원성 균주 접종 후 나타나는 친화적 반응과 비병원성 균주 접종 후 나타나는 불친화적 반응에서 CAPIP2 유전자의 발현 양상을 도 2에 나타내었다.

이상과 같은 시험 결과, 병원성 균주와 비병원성 균주 모두에서 CAPIP2 유전자의 발현이 비슷한 양상으로 나타났다. 병원성 균주와 고추 식물체의 친화적 반응에서는, CAPIP2 유전자는 균 접종 후 30 분부터 발현하여 18 시간 후에 그 양이 가장 많이 관찰되었으며 그 이후로는 감소하였고, 비병원성 균주와의 불친화적 반응에서는, 30 분 후부터 발현하여 12 시간 후까지 그 양이 증가되고 그 이후 감소하는 경향을 나타내었다.

실시예 3 : 화학적 유도체에 의한 CAPIP2 유전자의 유도 발현

본 발명에 의한 CAPIP2 유전자가 통상 저항성 유도에 사용되는 화학적 유도체에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적 유도방법을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

실험예 1.

먼저, CAPIP2 유전자의 발현 유도에 유용한 유도체를 탐색하기 위하여, 식물병 저항성 발현의 유도에 관여한다고 알려진 화학물질들 중 에틸렌, 메틸 자스모네이트, 살리실산, 및 과산화수소를 사용하여 저항성 유도 시험을 실시하였다.

6엽기 고추식물 잎에 농도 100μM의 메틸 자스모네이트, 5mM의 살리실산을 분무기로 고추잎의 앞뒷면에 뿌려 처리하였고, 이중 메틸 자스모네이트를 처리한 식물체는 비닐백으로 밀봉하였다. 과산화수소는 10mM의 과산화수소를 고추 잎에 배큠인필트레이션(vacuum-infiltration)하는 방법으로 처리하였고, 에틸렌은 농도 5μl/L로 하여 기체 상태로 식물체가 있는 밀폐된 유리 용기에 주입하는 방법으로 처리하였다.

처리 18 시간 후 각각의 식물체에서 잎을 수거하였고, 대조구로 무처리한 식물체의 잎을 18 시간 후에 함께 수거한 후, 각각의 샘플에서 RNA를 추출하였고 추출된 RNA를 이용하여 다음과 같이 노던블러팅을 수행하였다.

먼저, 추출된 RNA를 포름알데히드를 함유하는 겔 상에서 전기영동한 후 나이론막(Hybond N+)으로 전이시켰다.

다음에, 실시예 1에서 수득된 CAPIP2 유전자를 제한효소 *Eco*RI 및 *Xho*I으로 각각 절단하고 삽입 DNA만을 회수하여 ^{32}P로 표지한 후, 이를 반응액[0.25M 인산완충액, 7% SDS, 1mM EDTA, 5% 덱스트란 황산염 (Dextran Sulfate)]에 첨가하고 65 에서 16 - 24 시간 동안 배양하여 하이브리다이제이션(hybridization)을 실시하였다.

이때 ^{32}P로 표지된 상기 DNA 프로브는 나이론막에 붙어 있는 상보적 mRNA에 붙게 되며 이 나이론막 위에 X-ray 필름을 얹게 되면 ^{32}P로 표지된 DNA가 X-ray 필름을 감광시키므로 이것으로 발현 여부를 알아볼 수 있다.

시험 결과, 대부분 물질의 경우에서 CAPIP2 유전자가 강하게 유도 발현되었다. 이러한 결과를 바탕으로, CAPIP2 유전자의 발현을 강하게 유도했던 에틸렌, 메틸 자스모네이트, 살리실산, 과산화수소에 대해서, CAPIP2 유전자의 더 상세한 발현 양상을 알아보기 위해 각각의 유도물질을 처리하고 시간별로 유전자 발현 양상을 관찰하는 다음의 시험을 실시하였다.

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

실험예 2.

에틸렌 처리 후 시간별 CAPIP2 저항성 유도효과를 알아보기 위하여, 농도 10μl/L로 하여 기체 상태로 식물체가 있는 밀폐된 유리 용기에 주입하는 방법으로 에틸렌을 처리하고, 각각 0.5, 1, 2, 6, 12, 18, 24 시간 후에 잎을 수거하였다.

각각의 샘플에서 RNA를 추출한 후, 상기 실험예 1에서와 동일한 방법으로 노던블러팅을 수행함으로써, 에틸렌 처리 후 CAPIP2 유전자의 시간별 발현양상을 알아보았으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

시험 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, CAPIP2 유전자는 처리 0.5 시간 후부터 축적되기 시작하여 6 시간에 가장 많이 발현하였고 그 후에 발현량이 줄어들었다.

실험예 3.

메틸 자스모네이트의 처리 후 시간별 CAPIP2 저항성 유도효과를 알아보기 위하여, 고추식물의 잎의 앞뒷면에 100μM 농도의 메틸 자스모네이트를 분무기로 골고루 분무 처리하고 비닐백으로 밀봉한 다음, 각각 0.5, 1, 2, 6, 12, 18, 24 시간 후에 잎을 수거하였다.

각각의 샘플에서 RNA를 추출한 후, 상기 실험예 1에서와 동일한 방법으로 노던블러팅을 수행함으로써, 메틸 자스모네이트 처리 후 CAPIP2 유전자의 시간별 발현양상을 알아보았으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

시험 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, CAPIP2 유전자는 처리 후 2 시간부터 축적되기 시작하여 18 시간까지 유지되었다.

실험예 4.

살리실산의 처리 후 시간별 CAPIP2 저항성 유도효과를 알아보기 위하여, 고추식물의 잎의 앞뒷면에 5 mM 농도의 살리실산을 분무기로 골고루 분무 처리하고, 각각 0.5, 1, 2, 6, 12, 18, 24 시간 후에 잎을 수거하였다.

각각의 샘플에서 RNA를 추출한 후, 상기 실험예 1에서와 동일한 방법으로 노던블러팅을 수행함으로써, 살리실산 처리 후 CAPIP2의 시간별 발현양상을 알아보았으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

시험 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, CAPIP2 유전자는 처리 6 시간 후부터 축적되기 시작하여 18 시간에 그 축적량이 가장 많았고 24 시간까지 유지되었다.

실험예 5.

과산화수소의 처리 후 시간별 CAPIP2 저항성 유도효과를 알아보기 위하여, 고추식물체의 잎에 10 mM의 과산화수소를 배큠인필트레이션 방법으로 처리하고, 각각 0.5, 1, 2, 6, 12, 18, 24 시간 후에 잎을 수거하였다.

각각의 샘플에서 RNA를 추출한 후, 상기 실험예 1에서와 동일한 방법으로 노던블러팅을 수행함으로써, 과산화수소를 처리한 후 CAPIP2의 시간별 발현양상을 알아보았으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

시험 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, CAPIP2 유전자는 처리 1 시간 후부터 축적되기 18 시간 후까지 유지되었다.

<u>실시예 4. 환경적 스트레스에 의한 CAPIP2 유전자의 유도 발현</u>

본 발명에 의한 CAPIP2 유전자가 환경적 스트레스에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적 유도방법을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

각각의 시험에서 노던블러팅 수행시 리보솜 RNA의 양을 모니터링함으로써 동일량의 RNA 시료가 로딩되었음을 확인하였으며, 대조구로서 어떤 스트레스도 처리하지 않은 건전잎을 사용하였다.

실험예 1.

본 발명의 CAPIP2 유전자가 상처 스트레스에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적 유도방법을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

고추식물에 상처 스트레스를 처리하기 위해 식물체의 잎을 바늘로 찔러 잎 전체에 걸쳐 상처를 낸 후 각각 0.5, 1, 2, 6, 12, 18, 24 시간이 지나 잎을 수거하였다.

각각의 샘플에서 RNA를 추출한 후, 상기 실시예 3의 실험예 1에서와 동일한 방법으로 노던블러팅을 수행함으로써, 상처 스트레스 처리 후 시간경과에 따른 CAPIP2의 발현양상을 알아보았으며, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

시험 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, CAPIP2 유전자는 처리 0.5 시간 후부터 발현되기 시작하여 1, 2시간에 그 축적량이 들어들고 다시 6시간에 그 축적량이 늘어나 18 시간까지 유지되었다.

실험예 2.

본 발명의 CAPIP2 유전자가 염 스트레스에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적 유도방법을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

염화나트륨 처리 후 시간별 CAPIP2 저항성 유도효과를 알아보기 위하여, 200 mM의 염화나트륨 수용액에 고추식물체의 뿌리를 담그어 흡수시키는 방법으로 염을 처리하고, 각각 0.5, 1, 2, 6, 12, 18, 24 시간 후에 잎을 수거하였다.

각각의 샘플에서 RNA를 추출한 후, 상기 실시예 3의 실험예 1에서와 동일한 방법으로 노던블러팅을 수행함으로써, 염스트레스 처리 후 CAPIP2의 시간별 발현양상을 알아보았으며, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

시험 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, CAPIP2 유전자는 잎에서 12 시간 후에 발현하여 18 시간까지 그 발현량이 유지되었다.

실시예 5 : CAPIP2 유전자 과다발현에 의한 식물체의 저항성 유도

식물체에서의 CAPIP2 유전자 과다발현시 다른 병 발생 관련 유전자들의 유도 여부, 세균성 병에 대한 저항성의 증가 여부 및 환경스트레스에 대한 내성의 증가 여부를 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 CAPIP2 유전자를 시약회사 Stratagene에서 제조한 pBIN35S 벡터에 도입시켜 재조합 벡터 pCAPIP2을 제조하고 그 개열지도를 도 9에 나타내었다.

이렇게 제조한 재조합 벡터 pCAPIP2를 아그로박테리움 튜머페이선스(*Agrobacterium tumefaciense* strain EHA105)에 전기충격법(electroporation)을 통하여 도입하고, 재조합벡터가 도입되어 있는 상기 EHA105 균주를 꽃침지(floral dipping) 방법을 이용하여 애기장대에 도입함으로써 CAPIP2 유전자를 과다발현시키고 하기와 같은 시험을 수행하였다.

실험예 1.

CAPIP2 유전자가 과다발현된 식물체에서 세균성 병에 대한 저항성이 증가하였는지의 여부를 알아보기 위하여, 상기 CAPIP2 유전자가 과다발현된 애기장대와 대조구로서의 야생형 애기장대 식물체에 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 균주를 접종하고 접종일과 3일 후에 잎을 수거하여 1 그람당 세균수를 측정하여 그 결과를 도 10에 나타내었다. 여기서 #3, #6, #8는 시험에 사용된 식물의 샘플번호를 나타낸다.

시험 결과, 0, 1, 3, 5 일 후 모든 샘플이 야생형에 비해 세균성 병에 대한 병저항성을 가지고 있는 것으로 나타났다.

실험예 2.

CAPIP2 유전자가 과다발현된 식물체에서 환경스트레스에 대한 내성이 증가되었는지 여부를 알아보기 위하여, CAPIP2 유전자가 과다발현된 식물체와 야생형 식물체의 종자를 염화나트륨 또는 마니톨이 첨가된 고체 MS 배지에서 발아시켜 발아율을 측정하고 그 결과를 도 11에 나타내었다.

시험 결과, 본 발명의 CAPIP2 유전자가 과다발현된 식물체는 염화나트륨과 마니톨에 대하여 내성을 가지는 것으로 나타났다.

실험예 3.

CAPIP2 유전자가 과다발현된 식물체에서 환경스트레스에 대한 내성의 증가하였는지 여부를 알아보기 위하여, CAPIP2 유전자가 과다발현된 식물체를 염화나트륨 또는 건조 조건에서 측정하고 그 결과를 도 12 및 도 13에 나타내었다.

시험 결과, 본 발명의 CAPIP2 유전자가 과다발현된 식물체는 염화나트륨과 건조 조건에 대하여 내성을 가지는 것으로 나타났다.

도 12 및 도 13에서 세로의 첫째열은 야생형 식물이며, 둘째열, 셋째열, 네째열은 각각 #3, #6, #8 샘플번호로 나타내지는 본 발명에 의해 형질전환된 식물종류를 나타낸다. 또한, 도 12에서 식물들은 400 mM 염화나트륨으로 처리된 것이다. 도 13은 건조 처리 후 14 일 후의 식물체들의 상태를 나타낸 것이다.

발명의 효과

상술한 바와 같이, 본 발명은 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대해 저항성을 보이는 고추 한별 품종으로부터 식물체 병저항성 관련 유전자의 하나인 CAPIP2 유전자를 분리하여 그 염기서열을 결정하고 그에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 제공함으로써, 식물체 병원균에 대한 방어반응의 표지 및 병저항성 작물의 분자육종을 위한 유전재료로 이용될 수 있는 효과를 도모할 수 있다.

또한, 본 발명은 CAPIP2 유전자의 차별적 발현을 확인하는 것으로 구성되는 식물 병원균, 화학물질 및 환경스트레스에 의한 식물체의 방어반응 여부 판별방법을 제공함으로써 저항성 품종 개발을 촉진시킬 수 있는 효과가 있으므로 식물육종산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

고추 한별 품종(*Capsicum annuum* L. cv. Hanbyul) 유래의 식물체 병저항성 단백질을 코딩하는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 분리된 유전자 CAPIP2.

청구항 2.

제1항 기재의 유전자 CAPIP2에 의해 코딩되는 서열번호 2의 아미노산 서열.

청구항 3.

제1항 기재의 CAPIP2 유전자를 pBIN35S에 삽입시켜 제조한 재조합벡터 pCAPIP2.

청구항 4.

식물체의 병 및 환경스트레스 저항성 탐색방법에 있어서,

병원균, 화학물질 및 환경스트레스 중 어느 하나를 접종 또는 처리한 고추 식물체로부터 RNA를 분리하여 전기영동시키고 나이론막(Hybond N+)으로 전이시킨 후, ^{32}P를 처리한 제1항 기재의 CAPIP2 유전자 프로브와 반응시켜 CAPIP2 유전자의 차별적 발현을 확인함을 포함하여 구성되는, 식물체의 병 및 환경스트레스 저항성 탐색방법.

청구항 5.

제4항에 있어서,

상기 병원균은 고추세균성점무늬병의 병원성 세균 또는 비병원성 세균인 것을 특징으로 하는, 식물체의 병 및 환경스트레스 저항성 탐색방법.

청구항 6.

제4항에 있어서,

상기 화학물질은 에틸렌, 메틸 자스모네이트, 살리실산 및 과산화수소 중 어느 하나임을 특징으로 하는, 식물체의 병 및 환경스트레스 저항성 탐색방법.

청구항 7.

제4항에 있어서,

상기 환경적 스트레스는 상처스트레스, 염스트레스 및 건조스트레스 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 식물체의 병 및 환경스트레스 저항성 탐색방법.

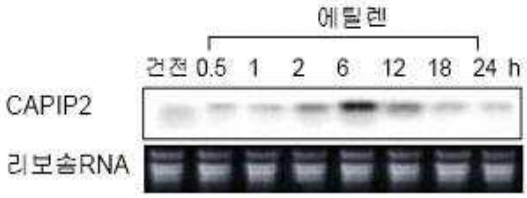
도면

도면1

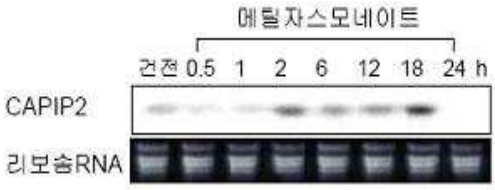
```
gagagagagagagagagggaaagttgtcgatgtcaccaaccATGATCAGACGGCCGGCA      59
                                          M  I  R  R  P  A        6
ATGCTCTTTCTTCTCATCATCACCGTTGCTTCCATAACTTGCGGTGCCCAAGCATCAAGA    119
M  L  F  L  L  I  I  T  V  A  S  I  T  C  G  A  Q  A  S  R       26
TCCATCGTGTTCTTGCCCCAGCCTTTATCATCCCTCGACATAATCAACACCACTCTGCAC    179
S  I  V  F  L  P  Q  P  L  S  S  L  D  I  I  N  T  T  L  H       46
CAGGGGCAGAATGCACGCTGTTCATTTACGGTAAGCATAAGGACAAGCTGCTCTTCTCCA    239
Q  G  Q  N  A  R  C  S  F  T  V  S  I  R  T  S  C  S  S  P       66
GCACAAACTAGAGACCAAATTAGTCTAGCCTTTGGTGATGCTTATGGAAATCAGGTATAT    299
A  Q  T  R  D  Q  I  S  L  A  F  G  D  A  Y  G  N  Q  V  Y       86
GCACCGAGGCTAGATGATCCAGCAAGCAGGGCTTTTGAGAGGTGTTCCAGGGATACGTAT    359
A  P  R  L  D  D  P  A  S  R  A  F  E  R  C  S  R  D  T  Y      106
ACAGTATACGGGCCATGTACGTATCAGATCTGTTATGTGTATCTGTACCGGAGTGGATAC    419
T  V  Y  G  P  C  T  Y  Q  I  C  Y  V  Y  L  Y  R  S  G  Y      126
GATGGATGGATACCGTATGATGTTACCATATACGGTTACAACTCCAAAGCTGTAACTTTC    479
D  G  W  I  P  Y  D  V  T  I  Y  G  Y  N  S  K  A  V  T  F      146
ACCTACAATTTTGGCATCCCTAGAGATACTTGGTATGGTCACAATTACTGCCGTTCACAT    539
T  Y  N  F  G  I  P  R  D  T  W  Y  G  H  N  Y  C  R  S  H      166
ACTGTGAAATCTGCAGGAAACTTGGCCTGGAATTTGCTTTCTATCGGTTCCACTATGTTG    599
T  V  K  S  A  G  N  L  A  W  N  L  L  S  I  G  S  T  M  L      186
TATACAGTTGCTAGCCTGTTTCGCGGTTAGtttatgggccttttgggttgtatgttcctc    659
Y  T  V  A  S  L  F  R  G  *                                    195
gttgaaagcctgcctagtccaatggatttgtgggttggctttctttcgggctaattcatg    719
tcttgctgtaataataaactgaatgctacttaggtatggttggttagttactttggttta    779
aaaaaaaaaaaaaaaaa                                               796
```

도면2

도면3

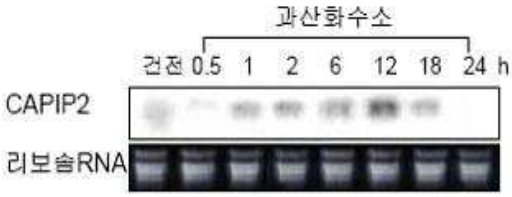


도면4

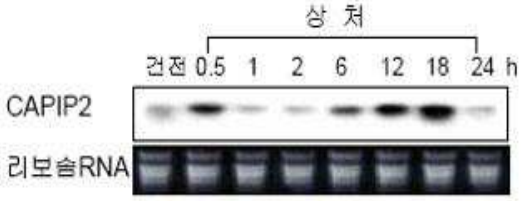


도면5

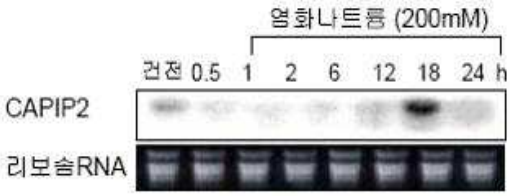
도면6



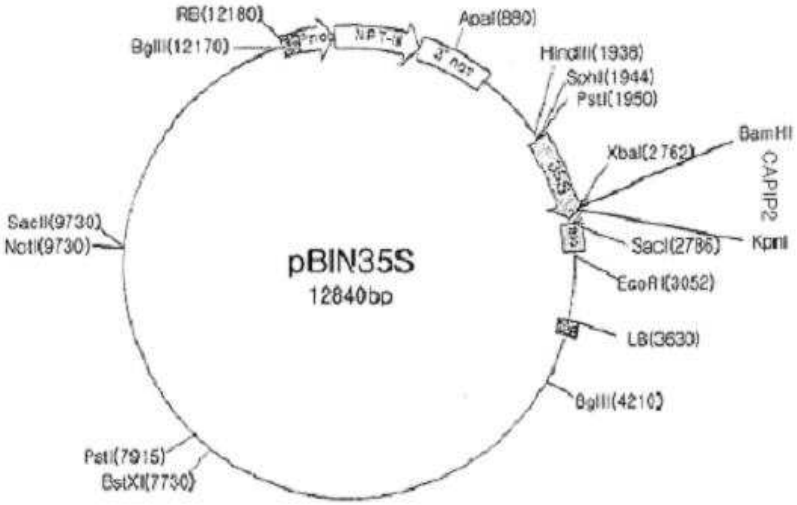
도면7



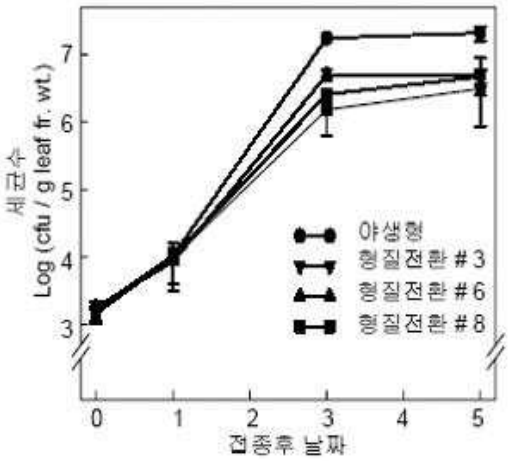
도면8


염화나트륨 (200mM)
건전 0.5 1 2 6 12 18 24 h
CAPIP2
리보솜RNA

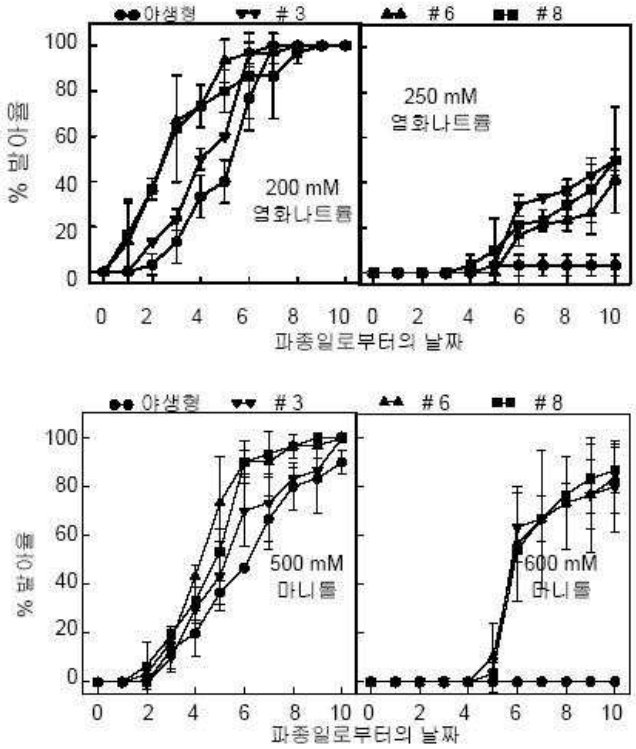
도면9


RB(12180)
BglII(12170)
ApaI(880)
HindIII(1938)
SphI(1944)
PstI(1950)
BamHI
XbaI(2762)
CAPIP2
SacII(9730)
NotI(9730)
pBIN35S
12840bp
SacI(2786)
KpnI
EcoRI(3052)
LB(3630)
BglII(4210)
PstI(7915)
BstXII(7730)

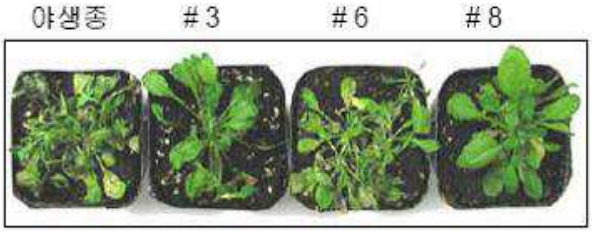
도면10


세균수
Log (cfu / g leaf fr. wt.)
7
6
5
4
3
야생형
형질전환 #3
형질전환 #6
형질전환 #8
0
1
2
3
4
5
접종후 날짜

도면11



도면12



도면13

서열목록

<110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation

<120> Pepper CAPIP2 gene from Capsicum annuum L. cv. Hanbyul, and probing method of plant disease and environmental stresses resistance using the same

<130> P11-050330-01

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 796
<212> DNA
<213> Capsicum annuum L. cv. Hanbyul

<400> 1
gagagagaga gagagaggga aagttgtcga tgtcaccaac catgatcaga cggccggcaa 60

tgctctttct tctcatcatc accgttgctt ccataacttg cggtgcccaa gcatcaagat 120

ccatcgtgtt cttgccccag cctttatcat ccctcgacat aatcaacacc actctgcacc 180

aggggcagaa tgcacgctgt tcatttacgg taagcataag gacaagctgc tcttctccag 240

cacaaactag agaccaaatt agtctagcct ttggtgatgc ttatggaaat caggtatatg 300

caccgaggct agatgatcca gcaagcaggg cttttgagag gtgttccagg gatacgtata 360

cagtatacgg gccatgtacg tatcagatct gttatgtgta tctgtaccgg agtggatacg 420

atggatggat accgtatgat gttaccatat acggttacaa ctccaaagct gtaactttca 480

cctacaattt tggcatccct agagatactt ggtatggtca caattactgc cgttcacata 540

ctgtgaaatc tgcaggaaac ttggcctgga atttgctttc tatcggttcc actatgttgt 600

atacagttgc tagcctgttt cgcggttagt ttatgggcct tttgggttgt atgttcctcg 660

ttgaaagcct gcctagtcca atggatttgt gggttggctt tctttcgggc taattcatgt 720

cttgctgtaa taataaactg aatgctactt aggtatggtt ggttagttac tttggtttaa 780

aaaaaaaaaa aaaaaa 796

<210> 2
<211> 195
<212> PRT
<213> Capsicum annuum L. cv. Hanbyul

<400> 2
Met Ile Arg Arg Pro Ala Met Leu Phe Leu Leu Ile Ile Thr Val Ala

1 5 10 15

Ser Ile Thr Cys Gly Ala Gln Ala Ser Arg Ser Ile Val Phe Leu Pro
20 25 30

Gln Pro Leu Ser Ser Leu Asp Ile Ile Asn Thr Thr Leu His Gln Gly
35 40 45

Gln Asn Ala Arg Cys Ser Phe Thr Val Ser Ile Arg Thr Ser Cys Ser
50 55 60

Ser Pro Ala Gln Thr Arg Asp Gln Ile Ser Leu Ala Phe Gly Asp Ala
65 70 75 80

Tyr Gly Asn Gln Val Tyr Ala Pro Arg Leu Asp Asp Pro Ala Ser Arg
85 90 95

Ala Phe Glu Arg Cys Ser Arg Asp Thr Tyr Thr Val Tyr Gly Pro Cys
100 105 110

Thr Tyr Gln Ile Cys Tyr Val Tyr Leu Tyr Arg Ser Gly Tyr Asp Gly
115 120 125

Trp Ile Pro Tyr Asp Val Thr Ile Tyr Gly Tyr Asn Ser Lys Ala Val
130 135 140

Thr Phe Thr Tyr Asn Phe Gly Ile Pro Arg Asp Thr Trp Tyr Gly His
145 150 155 160

Asn Tyr Cys Arg Ser His Thr Val Lys Ser Ala Gly Asn Leu Ala Trp
165 170 175

Asn Leu Leu Ser Ile Gly Ser Thr Met Leu Tyr Thr Val Ala Ser Leu
180 185 190

Phe Arg Gly
195