



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0029679

(43) 공개일자 2016년03월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/82 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/8269 (2013.01)

A01H 5/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0123824

(22) 출원일자 2015년09월01일

심사청구일자 2015년09월01일

(30) 우선권주장

1020140119236 2014년09월05일 대한민국(KR)

(71) 출원인

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

(72) 발명자

김경남

경기도 성남시 분당구 정자로76번길 10, 205동 1903호(정자동, 상록마을라이프아파트)

조주혁

서울특별시 노원구 마들로 31, 118동 803호(월계3동, 그랑빌아파트)

(74) 대리인

특허법인다나

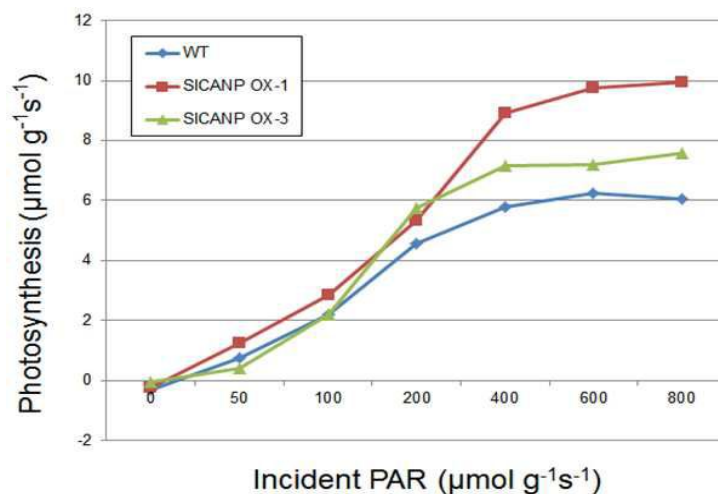
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 식물의 광합성 효율과 가뭄 및 염해 저항성을 동시에 증가시키는 방법

(57) 요약

본 발명은 왜소증 없이, 식물의 광합성 효율 증진과 건조 및 염해 스트레스에 대한 식물의 저항성을 유도하는 유전자를 포함하는 발현벡터, 이에 의해 형질전환된 형질전환 식물, 및 상기 유전자를 이용한 식물의 광합성 효율 증진 및, 건조 및 염해 스트레스에 대한 식물의 저항성 유도 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 CANP(CIPK1-Associating Nuclear Protein) 유전자는 CBL1/CBL9-CIPK1 칼슘신호전달 기작에 관여하는 것으로 밝혀졌으며, 이 유전자를 과발현하는 형질전환 식물체는 왜소증의 부작용 없이 식물의 광합성 효율 증진과 동시에 내건성 및 내염성 표현형을 나타내는 것으로 확인되었다. 따라서 이러한 CANP 유전자는 가뭄 및 염해에 내성을 가지는 작물의 개발을 위해 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도22



(52) CPC특허분류

C12N 15/8273 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 312033-05-2-SB030

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림축산식품기술기획평가원

연구사업명 생명산업기술개발

연구과제명 EMS 돌연변이체 개발 및 내재해성 카멜리나 종자 개발

기 여 율 1/1

주관기관 세종대학교산학협력단

연구기간 2013.11.26 ~ 2014.11.25

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 서열번호 13 중 어느 하나의 아미노산 서열을 코딩하거나 보존 서열(conserved sequence)인 RED_N_Superfamily 및 RED_C_Superfamily를 각각 N 말단 및 C 말단에 포함하며 540 내지 600개의 아미노산으로 이루어진 아미노산 서열을 코딩하는 CANP(CIPK1-Associating Nuclear Protein) 유전자를 포함하는, 광합성 효율이 증진되고 건조 및 염해 스트레스에 대한 저항성이 강화된 형질전환식물 제조용 재조합 벡터.

청구항 2

제1항에 따른 CANP 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 포함하는 광합성 효율이 증진되고 건조 및 염해 스트레스에 대한 저항성이 강화된 형질전환식물 제조용 조성물.

청구항 3

제1항에 따른 CANP 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된, 광합성 효율이 증진되고 건조 및 염해 스트레스에 대한 저항성이 강화된 형질전환식물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 형질전환식물은 애기장대, 쌀, 옥수수, 콩, 감자, 조, 토마토, 오이, 포도, 딸기, 오렌지, 복숭아 또는 카카오인 형질전환식물.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 따른 형질전환식물의 종자.

청구항 6

서열번호 1 내지 서열번호 13 중 어느 하나의 아미노산 서열을 코딩하거나 보존 서열(conserved sequence)인 RED_N_Superfamily 및 RED_C_Superfamily를 각각 N 말단 및 C 말단에 포함하며 540 내지 600개의 아미노산으로 이루어진 아미노산 서열을 코딩하는 CANP(CIPK1-Associating Nuclear Protein) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 숙주세포를 형질전환함으로써 숙주세포 내 CANP 유전자를 과발현시키는 것을 포함하는 광합성 효율이 증진되고, 건조 및 염해 스트레스에 대한 저항성이 강화된 형질전환식물의 제조방법.

청구항 7

서열번호 1 내지 서열번호 13 중 어느 하나의 아미노산 서열을 코딩하거나 보존 서열(conserved sequence)인 RED_N_Superfamily 및 RED_C_Superfamily를 각각 N 말단 및 C 말단에 포함하며 540 내지 600개의 아미노산으로 이루어진 아미노산 서열을 코딩하는 CANP(CIPK1-Associating Nuclear Protein) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된, 광합성 효율이 증진되고 건조 및 염해 스트레스에 대한 저항성이 강화된 형질전환식물로부터 유래되는 식물 세포.

청구항 8

다음의 단계를 포함하는, 광합성 효율이 증진되고 건조 및 염해 스트레스에 대한 저항성이 강화된 형질전환식물의 종자 제조 방법:

- (a) 서열번호 1 내지 서열번호 13 중 어느 하나의 아미노산 서열을 코딩하거나 보존 서열(conserved sequence)인 RED_N_Superfamily 및 RED_C_Superfamily를 각각 N 말단 및 C 말단에 포함하며 540 내지 600개의 아미노산으로 이루어진 아미노산 서열을 코딩하는 CANP(CIPK1-Associating Nuclear Protein) 유전자를 포함하는 벡터로 식물을 형질전환시키는 단계;
- (b) 상기 CANP 유전자가 도입되어 염해 저항성, 건조 저항성 및 광합성 효율 증가 중 하나 이상의 표현형을 나타내는 식물 개체군을 선별하는 단계; 및
- (c) 상기 선택된 식물 개체군으로부터 종자를 채종하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 왜소증 없이, 식물의 광합성 효율을 증진하고 건조 및 염해 스트레스에 대한 식물의 저항성을 유도하는 유전자를 포함하는 발현벡터, 이에 의해 형질전환된 형질전환 식물, 및 상기 유전자를 이용한 식물의 광합성 효율 증진 및 건조 및 염해 스트레스에 대한 식물의 저항성 유도 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003]

세계적으로 농작물 생산량 증대를 위한 과도한 비료 사용으로 토질의 문제가 심각한 상황이다. 이것은 농경지의 염류화작용(salinization)을 유도하여 작물의 염해에 대한 피해가 증가하고 있으며, 그밖에 염해의 피해인 해수면 상승으로 농경지 피해가 매년 약 500,000 헥타르씩 증가하고 있어 염해 피해 해결이 시급한 상황이다. 따라서, 최근에는 염해에 저항성이 있는 작물의 개발이 염해에 피해를 입은 토양에서의 작물생산에 가장 효과적인 전략으로 제안되고 있다.

[0004]

가뭄 역시 농작물 생산에 큰 영향을 미치고 있다. 전 세계적으로 농작물이 가뭄에 영향을 받은 지역은 팔머 가뭄지수 (Palmer Drought Severity Index, PDSI)에 따르면 1960년 이래로 약 15~25%가 증가하였으며, 현재 가뭄에 의한 생산량 감소율의 경우 벼는 5.82%, 옥수수는 11.98% 감소하였고, 2050까지 작물생산량이 50%이상 감소할 것으로 예상하고 있다.

[0005]

한편, 애기장대 모델식물에서 최초로 밝혀진 CBL-CIPK 칼슘신호전달 네트워크는 가뭄, 고염도, 저온 등과 같은 다양한 비생물적 환경스트레스 반응에 매우 중요한 역할을 수행하고 있는 것으로 알려져 있다. 애기장대에는 10개의 CBL과 26개의 CIPK 유전자들이 존재하며, 흥미롭게도 벼, 밀, 콩, 옥수수 등의 주요작물을 포함하는 거의 모든 식물에서 애기장대의 CBL 및 CIPK 패밀리와 매우 유사한 유전자가 발견되고 있다. 따라서 모델식물인 애기장대에서 얻어진 CBL-CIPK관련 내재해성 정보는 다른 작물에도 유사하게 적용할 수 있을 것으로 판단된다.

[0006]

현재까지 보고된 바에 의하면 칼슘센서인 CBL은 세린/트레오닌 단백질 키나아제인 CIPK와 세포질, 원형질막, 또는 액포막 등에서 복합체를 형성한다. 핵 밖에서 형성되는 CBL-CIPK 복합체가 어떠한 작용기작을 통해 핵 안으로 신호를 전달하여 스트레스 유전자의 발현을 조절하는 가에 대해서는 알려진 바가 없었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008]

본 발명은 왜소증 없이, 식물의 광합성 효율 증진과 건조 및 염해 스트레스에 대한 식물의 저항성을 유도하는 유전자를 포함하는 발현벡터, 이에 의해 형질전환된 형질전환식물 및 이의 제조방법, 상기 형질전환식물의 종자

및 이의 제조방법, 상기 형질전환 식물로부터 유래되는 식물 세포, 상기 유전자를 이용한 식물의 광합성 효율 증진 및 건조 및 염해 스트레스에 대한 식물의 저항성 유도 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명자들은 가뭄, 염해 등의 환경재해에 대한 식물 반응에 중요한 역할을 수행하고 있는 것으로 알려져 있는 애기장대 CBL1/CBL9-CIPK1 칼슘신호전달경로에 대해 지속적으로 연구를 수행해왔다. 세포의 원형질막에서 형성되는 CBL1/CBL9-CIPK1 복합체가 어떻게 핵 안으로 신호를 전달하여 스트레스 유전자의 발현을 조절하는가에 대해서는 알려진 바가 없었기 때문에, 본 발명자들은 yeast two-hybrid screening 방법으로 CIPK1과 상호작용하는 단백질을 분리하고자 하였으며, 그 결과, 가뭄 및 염해 반응에 관여하는 유전자를 동정하고, 이를 CIPK1-Associating Nuclear Protein (CANP)라고 명명한 후, 그 작용기작을 규명하였다.
- [0011] 연구 결과, 평상시 CANP는 세포질에서 CIPK1과 복합체를 형성하고 있지만, 가뭄 또는 염해 등에 의해 칼슘신호가 생성되면 이를 인식한 CBL1/CBL9 단백질이 CIPK1과 상호작용을 하게 되고 이 과정에서 CANP가 CIPK1으로부터 떨어져 나와 핵 안으로 들어가게 된다. 핵 안으로 들어간 CANP는 bZIP transcription factor인 AREB/ABF와 상호작용하여 ABRE cis-acting element를 가지는 스트레스 유전자의 프로모터 활성을 높여 내건성 및 내염성을 증가시킨다. 뿐만 아니라, 상기 유전자의 과발현은 왜소증 없이 식물의 광합성 효율 증가를 나타내는 것으로 확인되었다.
- [0012] 따라서, 본 발명은 왜소증 없이, 식물의 광합성 효율 증진과 건조 및 염해 스트레스에 대한 식물의 저항성을 유도하는 유전자 CANP(CIPK1-Associating Nuclear Protein)를 포함하는 발현벡터, 이에 의해 형질전환된 형질전환 식물, 및 상기 유전자를 이용한 식물의 광합성 효율 증진과 건조 및 염해 스트레스에 대한 식물의 저항성 유도 방법을 제공한다.
- [0013] 한 구체예에서, 본 발명은 왜소증 없이 식물의 광합성 효율 증진과 건조 및 염해 스트레스에 대한 식물의 저항성을 유도하는 유전자 CANP(CIPK1-Associating Nuclear Protein)를 포함하는 형질전환식물 제조용 재조합 벡터를 제공한다.
- [0014] 보다 구체적으로, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 13 중 어느 하나의 아미노산 서열을 코딩하거나 보존 서열(conserved sequence)인 RED_N_Superfamily 및 RED_C_Superfamily를 각각 N 말단 및 C 말단에 포함하며 540 내지 600개의 아미노산으로 이루어진 아미노산 서열을 코딩하는 CANP(CIPK1-Associating Nuclear Protein) 유전자를 포함하는, 광합성 효율이 증진되고 건조 및 염해 스트레스에 대한 저항성이 강화된 형질전환식물 제조용 재조합 벡터를 제공한다.
- [0015] 본 발명에 있어서, CANP(CIPK1-Associating Nuclear Protein) 유전자라 함은 본 발명에서 CBL1/CBL9-CIPK1 칼슘신호전달경로의 연구를 위해 사용된 애기장대 및 토마토 유래의 CANP를 비롯하여, 이와 상동성을 갖는 다양한 식물 유래의 CANP를 모두 포함하는 개념이다.
- [0016] 본 발명의 한 구체예에서, CANP(CIPK1-Associating Nuclear Protein) 유전자는 서열번호 1 내지 서열번호 13 중 어느 하나의 아미노산 서열을 코딩하거나 대부분의 식물에서 나타나는 보존 서열(conserved sequence)인 RED_N_Superfamily 및 RED_C_Superfamily를 각각 N 말단 및 C 말단에 포함하며 540 내지 600개의 아미노산으로 이루어진 아미노산 서열을 코딩하는 유전자이다.
- [0017] 여기에서, 서열번호 1 내지 서열번호 13의 아미노산 서열은 각각 애기장대(서열번호 1, NCBI No. NP_180214), 쌀(서열번호 2, NCBI No. EEC67667), 옥수수(서열번호 3, NCBI No. NP_001105988), 콩(서열번호 4, NCBI No. XP_003533803), 감자(서열번호 5, NCBI No. XP_006344564), 조(서열번호 6, NCBI No. XP_004978650), 토마토(서열번호 7, NCBI No. (서열번호 7, NCBI No. XP_004242897), 오이(서열번호 8, NCBI No. XP_004136540), 포도(서열번호 9, NCBI No. XP_002274576), 딸기(서열번호 10, NCBI No. XP_004287674), 오렌지(서열번호 11, NCBI No. K073769), 복숭아(서열번호 12, NCBI No. XP_007204321), 카카오(서열번호 13, NCBI No. XP_007012533) 유래의 아미노산 서열이다.
- [0018] 한편, 애기장대의 CANP 유전자는 인간의 RED 또는 뮤린 MuRED 유전자와 상동성이 높은 서열을 갖고 있는 것으로 보고된 바 있다(E. Assier et al., Gene 230(1999) 145-154). 상기 보고에서 애기장대의 CANP 유전자는 기능이 밝혀지지 않은 단백질로서 RED 유전자와의 상동성이 높은 “RED-like protein N-terminal region”과 “RED-like protein C-terminal region”을 보유하고 있는 것으로 밝혀졌다. “RED-like protein N-terminal region

”의 위치는 서열번호 1의 아미노산 서열 중 5번부터 214번, “RED-like protein C-terminal region”의 위치는 서열번호 1의 아미노산 서열 중 461번부터 585번에 존재한다.

[0019] 본 발명자들의 연구 결과, 애기장대에서 나타난 “RED-like protein N-terminal region”과 “RED-like protein C-terminal region”은 대부분의 식물에서 대부분의 식물에서 진화적으로 보존되어 있는 보존 서열로서, 본 발명에서 지칭하고 있는 CANP(CIPK1-Associating Nuclear Protein) 유전자의 N 말단 및 C 말단에 포함되어 있는 것으로 나타났다. 본 발명에서, 이러한 보존 서열은 각각 RED_N_Superfamily 및 RED_C_Superfamily로 지칭한다. 서열번호 1 내지 13의 아미노산 서열의 얼라인먼트 결과를 보여주는 도 16으로부터, 상기 보존 서열 RED_N_Superfamily 및 RED_C_Superfamily가 대부분의 주요 작물의 CANP 내에 공통적으로 존재함을 확인할 수 있다. CANP 유전자를 코딩하는 아미노산 서열은 이에 제한되는 것은 아니나, 540 내지 600개의 아미노산으로 고정적이다. 이는 CANP 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열이 보존 서열 RED_N_Superfamily 및 RED_C_Superfamily 외에도 서열 내에 커다란 변동이 없으며, 서열 상동성이 매우 높다는 사실을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 CANP 유전자로는 구체 서열로서 제시된 서열번호 1 내지 13의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자뿐만 아니라 이와 서열상동성이 높은 유사 유전자, 즉 보존 서열(conserved sequence)인 RED_N_Superfamily 및 RED_C_Superfamily를 각각 N 말단 및 C 말단에 포함하며 540 내지 600개의 아미노산으로 이루어진 아미노산 서열을 코딩하는 유전자가 포함된다.

[0020] 본 명세서 내에서 정의되는 RED_N_Superfamily 및 RED_C_Superfamily는 도 16에 나타난 바와 같이, 각각 7개, 4개의 보존 서열 블록을 포함할 수 있다. 이들 보존 서열 블록은 RED_N_Superfamily 또는 RED_N_Superfamily에 속하는 서열 중 보존도가 가장 높은 구역을 임의로 블록으로 표현한 것으로, 본 명세서 내에서 정의되는 RED_N_Superfamily 또는 RED_N_Superfamily가 반드시 이에 제한되는 것은 아니다. 하기 블록에서 X_n 으로 표시되는 아미노산은 n번째 위치에 존재하는 임의의 아미노산을 의미하며, X_n 이 어떠한 아미노산인지는 아래에서 별도로 표시한다. 이들 서열은 첨부된 서열목록에서는 임의의 아미노산을 나타내는 Xaa로 공통적으로 표시되며, 서열의 구체적인 설명에서 위치에 따른 아미노산의 종류를 기재하게 된다.

[0022] RED_N_Superfamily 블록 A

[0023] 서열번호 14: PKYRDRAKX₉X₁₀X₁₁ENQNPX₁₇YD

[0024] X₉= E 또는 D

[0025] X₁₀= D 또는 E

[0026] X₁₁= Q 또는 K

[0027] X₁₇= E 또는 D

[0029] RED_N_Superfamily 블록 B

[0030] 서열번호 15: FHAVAPPG

[0032] RED_N_Superfamily 블록 C

[0033] 서열번호 16: KISIEX₆SKYLGGDVEH₁₁THLVKGLDYALLX₂₉KVRSEIX₃₆KKP

[0034] X₆= K, N 또는 H

[0035] X₂₉= N, H, 또는 T

[0036] X₃₆= D, E, 또는 V

- [0038] RED_N_Superfamily 블록 D
- [0039] 서열번호 17: AKSVYX₆X₇WX₉VKPQ
- [0040] X₆= Q 또는 K
- [0041] X₇= W 또는 C
- [0042] X₉= V 또는 I
- [0044] RED_N_Superfamily 블록 E
- [0045] 서열번호 18: KX₆NEX₅FLPGRX₁₁X₁₂FVY
- [0046] X₂= S, T 또는 E
- [0047] X₅= M, T 또는 L
- [0048] X₁₁= M, T 또는 L
- [0049] X₁₂= T, A 또는 S
- [0051] RED_N_Superfamily 블록 F
- [0052] 서열번호 19: DIPX₄TLX₇RSKADC
- [0053] X₄= T 또는 M
- [0054] X₇= H 또는 Y
- [0056] RED_N_Superfamily 블록 G
- [0057] 서열번호 20: MSYLRLGSS
- [0059] RED_C_Superfamily 블록 H
- [0060] 서열번호 21: YSECYPGYQEYN
- [0062] RED_C_Superfamily 블록 I
- [0063] 서열번호 22: DLSKMDMGKAKGX₁₄LHRWDFX₂₇TEEEWE
- [0064] X₁₄= R 또는 G
- [0065] X₂₇= A 또는 E
- [0067] RED_C_Superfamily 블록 J
- [0068] 서열번호 23: QKEAMPKAAFQFGVKMQDGRKTRKQNRD
- [0070] RED_C_Superfamily 블록 K

- [0071] 서열번호 24: QKLX₄NX₆LX₈X₉INKILX₁₅RKK
- [0072] X₄= N, T, 또는 S
- [0073] X₆= E 또는 D
- [0074] X₈= H 또는 N
- [0075] X₉= K, Q 또는 R
- [0076] X₁₅= A 또는 T
- [0078] 상기 CANP 유전자를 포함하는 재조합 벡터는 식물의 형질전환에 사용되는 공지의 발현 벡터에 상기 유전자가 삽입되어 제조된 것이다. 본 발명에서, "벡터(vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드(plasmid)" 및 "벡터(vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는 것이 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 리포터 유전자, 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.
- [0079] 본 명세서에서, "형질전환"은 식물의 숙주세포 내에 도입하고자 하는 이종 유전자를 코딩하는 핵산 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터를 숙주세포 내로 도입하고 통합시켜, 유전적으로 안정한 유전을 생성시키는 것을 지칭하며, "형질전환식물"은 상기 이종 유전자가 도입 및 유전적으로 안정하게 통합되어 원하는 표현형을 얻게 된 식물을 의미한다.
- [0080] 형질전환식물을 생산하는 것과 관련하여, 식물의 유전공학 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 쌍떡잎 식물 뿐만 아니라 외떡잎 식물에 대한 생물학적 및 생리적 형질전환 프로토콜을 포함한, 식물 형질전환을 위한 수많은 방법이 개발되어 왔다 (예를 들어, 문헌 [Goto-Fumiyuki et al., *Nature Biotech* 17:282-286 (1999)]; [Miki et al., *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. and Thompson, J. E. Eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 67-88 (1993)]). 또한, 식물 세포 또는 조직 형질전환, 및 식물의 재생을 위한 벡터 및 시험관내 배양 방법은, 예를 들어 다음 문헌에서 이용 가능하다 [Gruber et al., *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. and Thompson, J. E. Eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 89-119 (1993)].
- [0081] 예를 들어, 원하는 유전자를 식물 숙주세포 내로 형질전환시키기 위한 다수의 기술이 이용 가능하다. 이들 기술은 형질전환 작용제로서 아그로박테리움 투메파시엔스 또는 아그로박테리움 리조게네스를 사용하여 비-아암 T-DNA로 형질전환시키는 것, 인산칼슘 형질감염, 폴리브렌 형질전환, 원형질체 융합, 전기천공, 초음파 방법 (예를 들어, 소노포레이션), 리포솜 형질전환, 미세주사, 있는 그대로의 DNA, 플라스미드 벡터, 바이러스성 벡터, 바이옌시스틱스 (극미립자 충격), 탄화규소 WHISKERS 매개된 형질전환, 에어로솔 비밍, 또는 PEG 형질전환뿐만 아니라 다른 가능한 방법을 포함한다.
- [0082] 본 발명은 또한 상기 CANP 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 포함하는 광합성 효율이 증진되고 건조 및 염해 스트레스에 대한 저항성이 강화된 형질전환식물 제조용 조성물을 제공한다. 상기 형질전환 식물 제조용 조성물은 본 발명에 따른 CANP 유전자를 포함하는 재조합 벡터 외에, 재조합 벡터를 숙주세포에 전달해 주기 위한 담체, 혹은 형질전환시에 필요한 배지나 버퍼 등의 성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [0083] 본 발명은 또한 상기 CANP 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 숙주세포를 형질전환함으로써 숙주세포 내 CANP 유전자를 과발현시키는 것을 포함하는 왜소증 없이 식물의 광합성 효율이 증진되고 건조 및 염해 스트레스에 대한

저항성이 강화된 형질전환식물의 제조방법을 제공한다.

- [0084] 앞서 설명한 바와 같이, 상기 CANP 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 통상의 방법을 통해 숙주세포를 형질전환시킬 수 있다. 본 발명에 따른 숙주세포는 가뭄 및 염해에 대한 내성 증가와 광합성효율 향상을 부여하고자 하는 식물의 세포로서 그 종류는 제한되지 않는다.
- [0085] 본 발명은 또한 상기 CANP 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된, 광합성 효율이 증진되고 건조 및 염해 스트레스에 대한 저항성이 강화된 형질전환식물 및 이의 종자를 제공한다. 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어, 가뭄 및 염해에 대한 내성 증가와 광합성효율 향상을 부여하고자 하는 식물로는 애기장대, 쌀, 옥수수, 콩, 감자, 조, 토마토, 오이, 포도, 딸기, 오렌지, 복숭아 또는 카카오 등이 포함된다.
- [0086] 식물 세포 내로의 이중의 외래 DNA의 도입 후, 상기 식물 계놈 내의 이중 유전자의 형질전환이나 통합은 이와 관련한 핵산, 단백질 또는 대사물의 분석과 같은 다양한 방법들로 확인된다.
- [0087] 예를 들어, PCR 분석은 토양 내로의 이식 전에 초기 단계에서 포함된 유전자의 존재에 대해 형질전환된 세포들, 조직 또는 슈트들을 스크리닝하는 신속한 방법이다(Sambrook 및 Russell의 "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001)). PCR은 관심의 대상인 유전자 또는 아그로박테리움 벡터 등에 특이적인 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide) 프라이머들을 이용하여 수행된다.
- [0088] 또한, 식물 형질전환은 계놈 DNA의 서던 블롯(Southern blot) 분석에 의해 확인될 수 있다. 일반적으로, 형질 전환체(transformant)로부터 전체 DNA를 추출하고, 적절한 제한 효소들(restriction enzymes)로 소화되며, 아가로스 겔(agarose gel) 내에서 분별되고 니트로셀룰로오스(nitrocellulose) 또는 나일론(nylon) 멤브레인으로 이송된다. 상기 멤브레인 또는 "블롯(blot)"은 이후에 표준 기술들에 따라 상기 식물 계놈 내의 도입된 유전자의 통합을 확인하도록, 예를 들면, 방사성 원소 표시된 ³²P 표적 DNA 조각으로 조사될 수 있다(앞서 언급한 Sambrook 및 Russell(2001)).
- [0089] 노던(Northern) 분석에 있어서, RNA는 형질 전환체의 특정 조직으로부터 분리되고, 포름알데히드(formaldehyde) 아가로스 겔 내에서 분별되며, 해당 기술 분야에서 일상적으로 이용되는 표준 순서들에 따라 나일론 필터 상에 블롯된다(앞서 언급한 Sambrook 및 Russell(2001)). 본 발명의 뉴클레오티드 서열들에 의해 인코딩되는 RNA의 발현은 이후에 상기 필터를 해당 기술 분야에서 알려진 방법들에 의해 GDC로부터 유래되는 방사성 프로브에 교잡시킴에 의해 테스트된다(앞서 언급한 Sambrook 및 Russell(2001)).
- [0090] 웨스턴 블롯(Western blot), ELISA, 측면 유동(lateral flow) 시험 및 생화학적 분석들과 유사한 것들이 상기 제조제 내성 단백질 상에 존재하는 하나 또는 그 이상의 에피토프들(epitopes)에 결합되는 항체들을 이용하여 표준 순서들에 의해 상기 제조제 내성 유전자로 인코딩된 단백질의 존재를 판단하도록 상기 형질전환 식물들에 대해 수행될 수 있다.
- [0091] 상기 유전적 구조물을 식물 세포 내로 도입한 후, 식물 세포는 성장할 수 있고, 싹 및 뿌리와 같은 분화성 조직의 출아시 성숙한 식물이 생성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수 개의 식물이 생성될 수 있다. 식물을 재생시키기 위한 방법론은 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 이는 예를 들어, 문헌 [Plant Cell and Tissue Culture, 1994, Vasil and Thorpe Eds. Kluwer Academic Publishers] 및 [Plant Cell Culture Protocols (Methods in Molecular Biology 111, 1999 Hall Eds Humana Press)]에서 발견될 수 있다. 본원에 기재된 유전적으로 변형된 식물은 발효 배지에서 배양하거나 또는 토양과 같은 적합한 배지에서 성장시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 고등 식물에 적합한 성장 배지는 모든 식물용 성장 배지를 포함할 수 있는데, 이는 토양, 모래, 뿌리 성장을 지지해주는 다른 모든 미립자 배지 (예를 들어, 질석, 펄라이트 등) 또는 수경 재배 뿐만 아니라 적합한 빛, 물, 및 고등 식물의 성장을 최적화시켜 주는 영양 보충제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0092] 상기 형질전환 기술 중 어느 것에 의해 생성되는 형질전환된 식물 세포를 배양하여, 형질전환된 유전자형을 보유하여 목적하는 표현형을 갖는 완전 식물을 재생시킬 수 있다. 이러한 재생 기술은 조직 배양 성장 배지 중의 특정 식물 호르몬의 조작에 좌우되는데, 전형적으로 이는 목적하는 뉴클레오티드 서열과 함께 도입시킨 살생물제 및/또는 제조제 마커에 좌우된다. 배양된 원형질체로부터의 식물 재생은 문헌 [Evans, et al., "Protoplasts Isolation and Culture" in *Handbook of Plant Cell Culture*, pp. 124-176, Macmillan Publishing Company, New York, 1983]; 및 [Binding, *Regeneration of Plants, Plant Protoplasts*, pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985]에 기재되어 있다. 재생은 또한, 식물 캘러스, 외식편, 기관, 화분, 배아 또는 그의 일부로부터 수득할 수 있다. 이러한 재생 기술은 일반적으로, 문헌 [Klee et al. (1987) *Ann. Rev. of Plant Phys.* 38:467-

486]에 기재되어 있다.

- [0093] 형질전환된 세포 또는 조직 또는 식물 부분 또는 식물을 선택하기 위한 리포터 또는 마커 유전자의 사용이 형질 전환 벡터 또는 구조물에 포함될 수 있다는 것을 통상의 기술자는 인지할 것이다. 선택 마커의 예는 항대사제, 예컨대 제초제 또는 항생제에 대한 저항성을 부여해주는 것, 예를 들어 메토크렉세이트에 대한 저항성을 부여해주는 디히드로폴레이트 환원효소 (문헌 [Reiss, Plant Physiol. (Life Sci. Adv.) 13:143-149, 1994]; [Herrera Estrella et al., Nature 303:209-213, 1983]; [Meijer et al., Plant Mol. Biol. 16:807-820, 1991] 참조); 아미노글리코시드 네오마이신, 카나마이신 및 파로마이신에 대한 저항성을 부여해주는 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 (문헌 [Herrera-Estrella, EMBO J. 2:987-995, 1983] 및 [Fraley et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 80:4803 (1983)]) 및 히그로마이신에 대한 저항성을 부여해주는 히그로마이신 포스포트랜스퍼라제 (문헌 [Marsh, Gene 32:481-485, 1984]; [Waldron et al., Plant Mol. Biol. 5:103-108, 1985]; [Zhijian et al., Plant Science 108:219-227, 1995] 참조); 세포가 트립토판 대신 인돌을 활용할 수 있게 해주는 trpB; 세포가 히스티딘 대신 히스티놀을 활용할 수 있게 해주는 hisD (문헌 [Hartman, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85:8047, 1988]); 세포가 만노스를 활용할 수 있게 해주는 만노스-6-포스페이트 이소머라제 (WO 94/20627); 오르니틴 데카르복실라제 억제제, 2-(디플루오로메틸)-DL-오르니틴 (DFMO)에 대한 저항성을 부여해주는 오르니틴 데카르복실라제 (문헌 [McConlogue, 1987, In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.]); 및 블라스티시딘 S에 대한 저항성을 부여해주는, 아스페르길루스 테레우스 (*Aspergillus terreus*)로부터의 데아미나제 (문헌 [Tamura, Biosci. Biotechnol. Biochem. 59:2336-2338, 1995])를 포함한다.
- [0094] 달리 구체적으로 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 개시내용이 속하는 기술 분야에서 통상의 기술자에 의해 흔히 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 분자 생물학에서의 통상의 용어에 관한 정의는, 예를 들어 문헌 [Lewin B., Genes V, Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9)]; [Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9)]; 및 [Meyers R.A. (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)]에서 발견될 수 있다.
- [0095] 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 서열번호 13 중 어느 하나의 아미노산 서열을 코딩하거나 보존 서열(conserved sequence)인 RED_N_Superfamily 및 RED_C_Superfamily를 각각 N 말단 및 C 말단에 포함하며 540 내지 600개의 아미노산으로 이루어진 아미노산 서열을 코딩하는 CANP(CIPK1-Associating Nuclear Protein) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된, 광합성 효율이 증진되고 건조 및 염해 스트레스에 대한 저항성이 강화된 형질전환식물로부터 유래되는 식물 세포를 제공한다. 본 발명에 따른 “형질전환식물”에는 성숙한 식물체 및 그의 일부, 즉, 잎, 줄기, 꽃, 열매 등의 조직뿐만 아니라, 식물체나 조직을 구성하고 있는 식물 세포 또한 포함되는 것이라는 점은 자명하다.
- [0096] 본 발명은 또한 다음의 단계를 포함하는, 광합성 효율이 증진되고 건조 및 염해 스트레스에 대한 저항성이 강화된 형질전환식물의 종자 제조 방법을 제공한다:
- [0097] (a) 서열번호 1 내지 서열번호 13 중 어느 하나의 아미노산 서열을 코딩하거나 보존 서열(conserved sequence)인 RED_N_Superfamily 및 RED_C_Superfamily를 각각 N 말단 및 C 말단에 포함하며 540 내지 600개의 아미노산으로 이루어진 아미노산 서열을 코딩하는 CANP(CIPK1-Associating Nuclear Protein) 유전자를 포함하는 벡터로 식물을 형질전환시키는 단계;
- [0098] (b) 상기 CANP 유전자가 도입되어 염해 저항성, 건조 저항성 및 광합성 효율 증가 중 하나 이상의 표현형을 나타내는 식물 개체군을 선별하는 단계; 및
- [0099] (c) 상기 선택된 식물 개체군으로부터 종자를 채종하는 단계.
- [0100] 형질전환의 방법, 형질전환된 식물 개체군의 선별 방법은 앞서 설명한 바와 같다.
- [0101] 선별된 형질전환식물로부터 채종된 종자는 염해 저항성, 건조 저항성, 광합성 효율 증가 중 하나 이상의 표현형을 나타낼 수 있다.

발명의 효과

[0103]

본 발명에 따라 CANP(CIPK1-Associating Nuclear Protein) 유전자는 CBL1/CBL9-CIPK1 칼슘신호전달 기작에 관여하는 것으로 밝혀졌으며, 이 유전자를 과발현하는 형질전환 식물체는 왜소증의 부작용없이, 광합성 효율 증진과 동시에 내건성 및 내염성 표현형을 나타내는 것으로 확인되었다. 따라서 이러한 CANP 유전자는 가뭄 및 염해에 내성을 가지는 작물의 개발을 위해 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0105]

도 1은 CANP 단백질 분석 결과를 도식화한 것이다.

도 2는 CANP 전장 cDNA 서열을 도식화한 것이다.

도 3은 yeast two-hybrid assay를 통해서 전장 CANP가 CIPK1과 상호작용함을 확인한 도면이다.

도 4는 pVYNE.CANP-c-myc 및 pMAS.SCYCE(R).CIPK1-HA 의 모식도 (A)와 이들 벡터를 양과(B), 애기장대(C), 담배(D)에서 발현한 후 공초점 레이저 스캐닝을 통해 CANP와 CIPK1 단백질의 복합체를 관찰한 결과를 보여준다.

도 5는 pGADT7.CANP 및 pBridge.CIPK1/CBL1 (또는 CBL9) 구조체의 모식도(A)와 yeast three-hybrid assay의 분석결과(B)를 보여준다.

도 6은 칼슘 처리에 의한 CANP-GFP의 세포 내 이동을 보여준다.

도 7은 CANP 유전자 안에 T-DNA가 삽입되어 있는 *canp* mutant line의 모식도(A), 이에 대한 Genomic Southern blot assay의 결과(B), 및 RT-PCR 분석 결과(C)를 보여준다.

도 8은 CANP 유전자에 대한 complementation 컨스트럭트의 모식도(A) 및 이를 도입한 *canp*/CANP complementation 식물체의 real-time RT-PCR 분석결과를 보여준다(B).

도 9 및 10은 염해 스트레스에 대한 *canp* 돌연변이체 및 야생형의 반응성을 보여준다.

도 11은 가뭄 스트레스에 대한 *canp* 돌연변이체 및 야생형의 반응성을 보여준다.

도 12는 CANP가 과량 발현되는 애기장대 식물체 제작을 위한 식물 형질전환용 컨스트럭트 (pBI121 ΔGUS.CANP)의 모식도(A) 및 Real-time RT-PCR을 통한 형질전환체의 선별(B)을 보여준다.

도 13은 염해 스트레스에 대한 CANP 과발현 형질전환체의 저항성을 보여준다.

도 14는 가뭄 스트레스에 대한 CANP 과발현체의 저항성을 보여준다.

도 15는 야생형에 비한 CANP 과발현체의 광합성 효율 증가를 보여주는 그래프이다.

도 16은 CANP 유전자의 진화적 보존을 보여주는 서열 분석 결과를 보여준다.

도 17은 애기장대의 CANP(AtCANP)와 토마토의 CANP(SICANP)의 아미노산 서열을 비교 분석한 결과를 보여준다.

도 18은 토마토 CANP 과발현 벡터((pATC940 vector)의 구조를 보여준다.

도 19는 토마토 야생형 (WT) 및 토마토 CANP 과발현 형질전환체들의 토양순화 모습을 보여준다.

도 20은 토마토 CANP 과발현 형질전환체에서의 SICANP 유전자 발현량을 확인한 Real-time RT-PCR결과를 보여준다.

도 21은 7주 동안 흙에서 키운 토마토 야생형 (WT)과 CANP 과발현체(SICANP OX-1 및 SICANP OX-3)의 모습을 보여준다.

도 22는 야생형에 비한 토마토 CANP 과발현체의 광합성 효율 증가를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0106]

본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의

해 정의될 뿐이다.

[실시예]

I. CANP(CIPK1-Associating Nuclear Protein) 유전자의 역할 규명, 및 애기장대 CANP 유전자를 과발현하는 형질전환 애기장대의 제작 및 표현형 검정

<실험 방법 및 재료>

1. Yeast Two-Hybrid Screening

Yeast transformation을 위해서 His, Leu, Trp의 auxotroph인 Y190의 효모 세포주를 사용하였다. YPD 배지(bacto yeast extract, bacto peptone, glucose)에 streaking 하여 Y190 세포의 단일 클로니를 얻었다. 이 클로니를 5 ml의 YPD 배지에 배양하여 30℃, 200 rpm으로 14~16시간동안 preculture 하였다. OD_{600nm} = 1.0~2.0가 될 때까지 배양한 후 50 ml YPD 배지에 5 ml의 세포를 옮긴 후 OD_{600nm} = 0.2~0.5가 될 때까지 배양하였다. 키운 세포를 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 침전 시키고 배지를 제거한 다음 20 ml의 증류수로 남은 배지를 씻어내고 1 ml의 증류수로 재현탁하였다. 그 다음 세포를 1.5 ml 튜브에 옮기고 15초간 13,200 rpm에서 원심 분리 하여 상층액을 완전히 제거 하였다. 남은 세포에 100 mM 리튬 아세테이트 (pH7.5) 400 μ l를 넣고 재현탁한 후 30℃에서 15분간 인큐베이션 하였다. 그 동안 2 mg/ml의 salmon sperm DNA를 10분간 끓이고 얼음에 꽂아 식혀 놓은 것을 사용하여 transformation mix (50% PEG solution, 1M Litume Acetate, D.I, salmon sperm DNA)를 만들어 두었다. 15분 인큐베이션 후에 세포를 50 μ l씩 분주하여 15초간 원심분리 한 후에 상층액을 제거하고 transforming DNA와 transformation mix를 잘 섞어주고 30℃에서 30분간 인큐베이션하였다. 42℃에서 20분간 heat shock을 준 후에 13,200 rpm에서 원심분리하여 transformation mix 용액을 제거 하고 증류수 1ml로 재현탁하였다. 200 μ l씩 분주하여 SC-LW (Leu과 Trp가 빠진 합성 완전 배지)배지에 spreading하여 30℃에서 3일간 키웠다.

2. β -갈락토시다아제 Filter-Lift Assay

형질전환된 효모 세포를 SC-LW plate 배지에 streaking하여 30℃에서 키운 뒤 β -갈락토시다아제 filter-lift assay를 다음과 같이 수행하였다. 먼저 Z 버퍼 (60mM Na₂HPO₄H₂O, 40mM Na₂HPO₄, 10mM KCl, 1mM MgSO₄) 1.8ml에 X-gal stock (N,N-dimethylformide에 5-bromo-4chloro-3-indolyl- β -D-galactosidase가 들어있음, 20mg/ml)을 90 μ l 넣고 4.86 μ l의 β -머캅토에탄올을 혼합한 후 이 용액을 페트리 디쉬에 부어 3MM 페이터를 올려서 적셔 놓는다. 그리고 세포가 있는 플레이트에 니트로셀룰로스 필터 (Osmonics Inc., NitroPure, 45 Micron, 82mm)를 올려놓아 세포를 멤브레인으로 이동시켰다. 이 멤브레인에 세포가 옮겨지면 멤브레인을 액체질소에 넣어서 세포를 열린 후 꺼내어 실온에서 녹였다. 이때 세포가 있는 부분이 항상 위로 오게 하였다. 녹은 멤브레인을 X-gal이 포함된 Z 버퍼에 적셔 놓은 페이퍼에 포개고 30℃에서 인큐베이션하면서 푸른색이 띄는지를 관찰하였다.

3. 플라스미드의 제작

pGAD.CANP 플라스미드를 만들기 위해 CANP-1과 CANP-2 프라이머로 CANP cDNA의 코딩 영역을 증폭했고, 그 PCR 산물을 pGAD.GH 벡터의 EcoR I, Sal I site에 클로닝하였다. pGEX.4T-3.CANP를 만들기 위해 pGAD.CANP 플라스미드를 EcoR I, Sal I 제한효소로 digestion하여 insert를 pGEX.4T-3 벡터에 삽입하였다. CANP 유전자의 프로모터 부위를 얻기 위해 Col-0 genomic DNA를 템플레이트로 사용하였고, CANP-PF와 CANP-PR 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 1,560bp 크기의 PCR 산물을 HindIII, BamHI 으로 digestion하였고, GUS 유전자가 삽입된 pBI101.1 벡터에 클로닝하여 pBI101.CANPp 플라스미드를 제작하였다. pMDDI.CANP 플라스미드를 제작하기 위해 CANP-5 와 CANP-6 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하였고, 종결코돈이 빠진 CANP PCR 산물을 얻어 Xba I, BamH I 제한효소로 digestion하였다. 이것을 sGFP (S65T)가 삽입된 binary 벡터 pMDDI (Shiu et al., 1996)에 클로닝하여 CANP-GFP 컨스트럭트를 만들었다. pMDDI.CANPC 플라스미드를 제작하기 위해 CANP cDNA 템플레이트를

이용하여 CANP-11, CANP-6 프라이머로 PCR을 수행한 후 증폭된 PCR 산물을 Xba I, BamH I 제한효소로 digestion하였다. 이 PCR 산물을 pMDDI 벡터에 삽입하여 N-말단이 결실된 CANPC-GFP 컨스트럭트를 만들었다. pCAM35S.CBL9과 pCAM35S.CIPK1을 제작하기 위해 CBL9 및 CIPK1 cDNA를 템플레이트를 이용하여 CBL9-3 / CBL9-4 프라이머와 CIPK1-14 / CIPK1-23 프라이머 세트를 이용하여 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물을 각각 Xba I, BamH I 제한효소로 digestion 하여 pCAM35S 벡터에 클로닝하였다. Complementation line을 제작하기 위해 CANP 유전자의 시작코돈과 종결코돈까지의 2,000bp와 프로모터부위의 3,700bp를 합친 5,700bp의 genomic DNA 단편을 CANPP-1 와 CANP-17 프라이머 세트를 이용하여 PCR 산물을 얻은 후에 식물형질전환 벡터인 pCAM1300 벡터에 삽입한 결과 pCAM1300.CANPG 플라스미드를 제작하였다. pVYNE.CANP-c-myc과 pMAS.SCYCE(R).CIPK1-HA 컨스트럭트를 제작하기 위해 CANP와 CIPK1 cDNA를 템플레이트로 CANP-5 / CANP-10 와 CIPK1-14 / CIPK1-23 프라이머 세트를 이용하여 증폭하였다. 각각의 얻어진 PCR 산물을 Xba I, BamH I 제한효소로 digestion하여 pVYNE-c-myc, pMAS.SCYCE(R)-HA 벡터에 클로닝하였다. CANP 과량발현체 (pBI121ΔGUS.CANP)를 얻기 위해 CANP-5 와 CANP-10 프라이머 세트를 이용한 PCR 산물을 Xba I, BamH I 제한효소로 digestion하여 CaMV 35S 프로모터가 삽입된 pBI121ΔGUS 벡터에 클로닝하였다. Yeast three hyrid를 수행하기 위해 pGADT7.CANP, pBridge.CIPK1, pBridge.CIPK1/CBL1 그리고 pBridge.CIPK1/CBL9을 제작하였다. pGADT7.CANP와 pBridge.CIPK1는 CANP와 CIPK1 cDNA를 템플레이트로 CANP-12 / CANP-2 프라이머와 CIPK1-15 / CIPK1-2 프라이머 세트를 이용하여 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물을 EcoR I, Sal I 으로 digestion을 하여 pGADT7, pBridge 벡터에 각각 클로닝하였다. 또한 pBridge.CIPK1/CBL1과 pBridge.CIPK1/CBL9는 CBL1과 CBL9 cDNA를 템플레이트로 CBL1-7 / CBL1-8 프라이머와 CBL9-5 / CBL9-6 프라이머 세트를 이용하여 증폭하여, 각각의 PCR 산물을 Not I, Bgl II로 digestion하여 pBridge.CIPK1 플라스미드에 클로닝 하였다. 사용한 모든 컨스트럭트들은 DNA 시퀀싱을 통하여 확인하였다.

4. 플라스미드 구축에 사용된 올리고뉴클레오타이드 프라이머

이 연구에서 사용한 프라이머들은 제한효소 site가 밑줄이 그어진 상태로 나열되어있다. Dimer와 hairpin의 형성 그리고 Tm 값에 영향을 고려하여 프라이머의 5' 끝부분에 세 개의 추가적인 염기를 붙이고 그 다음에는 필요에 따라 제한효소 site를 붙여서 프라이머를 제작하였다.

- CANP-1, 5'-TAAGAATTCATGAACCTTCAAAATCGC-3' (서열번호 25);
- CANP-2, 5'-GATGTCGACTCAATGCTT-GGATCTCTTA-3'(서열번호 26);
- CANP-5, 5'-TAATCTAGAATGAACCTTCAAAATCGCA-3'(서열번호 27);
- CANP-6, 5'-TTTGGATCCATGCTTGGATCTCTTAGGAG-3'(서열번호 28);
- CANP-10, 5'-TTTGGATCCTCAATGCTT-GGATCTCTTAG-3'(서열번호 29);
- CANP-11, 5'-AAATCTAGAATGCGTGCTAAAGAAAGAAG-3'(서열번호 30);
- CANP-12, 5'-TAAGAATTCATGAACCTTCAAAATCGCA-3'(서열번호 31);
- CANP-17, 5'-TTTCTAGATCAATGCTTGG-ATCTCTTAG-3'(서열번호 32);
- CANPP-1, 5'- ACTAAGCTTCTTGGTGATAAGGATTCAAT-3'(서열번호 33);
- CANP-PF, 5'-ACTAAGCTTCTTGGTGATAAGGATTCAAT-3'(서열번호 34);
- CANP-PR, 5'-ATAGGATCCTAGATTTCGT-TAATTCGATT-3'(서열번호 35);
- CIPK1-2, 5'-TTAGTCGACCTAAGTTACTATCTCTTGCT-3(서열번호 36);
- CIPK1-14, 5'-ATATCTAGAATGGTGAGAAGGCAAGAGGA-3'(서열번호 37);
- CIPK1-23, 5'-TTTGGATCCAGTTACTATCTCT-TGCTCCG-3'(서열번호 38);
- CIPK1-15, 5'-ATAGAATTCATGGTGAGAAGGCAAGAGGA-3'(서열번호 39);
- CBL1-7, 5'-ATAGCGGCCGCAATGGGCTGCTTCCACTC-3'(서열번호 40);
- CBL1-8, 5'-TAAAGATCTTCATGTGGCAATC-TCATCGA-3' (서열번호 41)

[0142] CBL9-3, 5'-TTTCTAGAAATGGGTGTTCCATTCCAC-3' (서열번호 42);

[0143] CBL9-4, 5'-AAAGGATCC-TCACGTCGCAATCTCGTCCA-3' (서열번호 43);

[0144] CBL9-5, 5'-TTAGCGGCCGCAATGGGTGTTCCATTTC-3' (서열번호 44);

[0145] CBL9-6, 5'-TTTAGATCTTCACGTCGCAATCTCGTCCA-3' (서열번호 45).

[0147] 5. Particle Bombardments

[0148] 텅스텐 microcarrier (Bio-RAD, Tungsten M-17, 11.1micron)에 pMDDI.CANP 컨스트럭트를 코팅하여 particle bombardment (Bio-RAD Laboratories)를 이용하여 양과세포에 삽입한 후 발현 양상을 관찰하였다. 우선 플라스미드를 5 μ g의 농도로 준비하였다. 그리고 3 mg의 텅스텐에 100% 에탄올 1 ml을 첨가하여 재현탁하고 10,000 rpm으로 10초간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 1 ml의 멸균수로 2번 세척한 후 원심분리하여 상층액을 제거하고 30 μ l의 멸균수를 첨가하였다. CANP 플라스미드 5 μ g을 텅스텐에 첨가하고 볼텍싱하였다. 50 μ l의 2.5M $CaCl_2$ 와 20 μ l의 0.1M spermidine을 넣으면서 3분간 볼텍싱하여 텅스텐에 DNA를 코팅시켰다. 그 후에 10,000 rpm에서 10초간 원심분리하여 상층액을 제거하고 250 μ l의 100% 에탄올을 첨가하여 세척한 후에 원심분리하여 상층액을 제거하고 60 μ l의 에탄올을 첨가하였다. macrocarrier holder에 macrocarrier를 끼운 뒤에 그 위에 플라스미드로 코팅된 텅스텐을 tapping하여 풀어준 뒤 10 μ l씩 떨어뜨린 후 말렸다. 양과의 epidermal layer를 분리하여 MS 배지에 올려 준비하였다. 1,100 psi rupture disk (Bio-RAD Laboratories)는 사용하여 bombardment를 한 후 23°C에서 16~24시간 동안 인큐베이션하였다.

[0150] 6. DAPI 염색

[0151] Particle bombardment한 시료를 DAPI 염색하기 위해 DAPI를 DMSO에 10 mg/ml로 5,000배 stock으로 만들어 두었다. DAPI를 running 버퍼 (1X PBS 버퍼, 5 mM sodium phosphate, pH 7.0, 10 mM EDTA, 0.01% Tween-80)에 1/5,000으로 희석시켜 이 버퍼에 조직을 담가 5분 동안 인큐베이션하였다. 그 후 버퍼를 제거하고 DAPI가 첨가되지 않은 버퍼로 5분씩 3번 인큐베이션 하여 염색되고 남은 DAPI를 세척하였다.

[0153] 7. Protoplast 분리와 DNA 주입

[0154] 꽃대가 올라오지 않은 4주된 애기장대 식물체로부터 잎을 얻어 0.5~1mm의 두께로 잘라주었다. 자른 잎을 즉시 Enzyme solution (20 mM MES, pH 5.7, containing 1.5% (w/v) cellulase R10, 0.4% (w/v) macerozyme R10, 0.4 M 만니톨, 20 mM KCl, 10 mM $CaCl_2$, 1 mM β -머캅토에탄올 및 0.1% BSA)이 담긴 페트리 디쉬에 넣고 호일로 감싼 후 데시케이터를 이용하여 진공상태에서 30분, 이어서 상온에서 3시간 동안 인큐베이션 하였다. 페트리 디쉬에 W5 용액(154 mM NaCl, 125 mM $CaCl_2$ 및 5 mM KCl을 함유하는 2 mM MES, pH 5.7)을 넣은 뒤 살살 흔들어서 잘 섞어주고, nylon mesh를 이용하여 용액을 걸러 protoplast를 harvest하였다. 용액을 200g에서 2분간 원심 분리하여 상층액을 제거한 뒤 MMG 용액 (0.4 M 만니톨 및 15 mM $MgCl_2$ 를 함유하는 4 mM MES (pH 5.7))을 이용하여 1×10^6 ml이 되도록 protoplast를 재현탁하였다. 40% PEG 용액 (0.2 M 만니톨 및 100 mM $CaCl_2$) 4 ml 에 2.5 μ g/ μ l의 DNA와 protoplast를 섞고 조심히 inverting하고, 10분 뒤 W5 버퍼 (154 mM NaCl, 125 mM $CaCl_2$ 및 5 mM KCl을 함유하는 2 mM MES, pH 5.7)를 넣고 다시 inverting하였다. 100g에서 2분간 원심분리하여 상층액을 제거한 뒤 곧바로 W1 버퍼 (0.5 M 만니톨 및 20 mM KCl을 함유하는 4 mM MES, pH 5.7)를 넣어주었다. 12-웰 플레이트로 옮겨 호일로 감싼 후 24°C에서 15시간 인큐베이션하였다.

[0156] 8. Agrobacterium Infiltration 및 BiFC(Bimolecular Fluorescence Complementation) 분석

[0157] 단백질이 in vivo 상에서 서로 상호 작용하는지를 알아보기 위하여 Venus N-말단 부분을 가진 pVYNE 벡터에 CANP을 클로닝하고, SCFP3A의 C-말단 부분을 가진 pMAS.SCYCE 벡터에 CIPK1을 클로닝하여 필요한 컨스트럭트를 제작하였다. pVYNE.CANP-c-myc, pMAS.SCYCE.CIPK1-HA 를 아그로박테리움 GV1301에 형질전환 시켜 단일 콜로니

를 LB Kn,Gn 액체배지를 이용하여 28℃에서 배양하였다. 각각의 유전자는 OD₆₀₀ = 0.5, p19는 OD₆₀₀ = 0.3의 농도가 되도록 세포를 harvest한 뒤 infiltration 버퍼로 재현탁하여 담배 (*N.benthamiana* 및 SR1)의 잎 뒷면에 infiltrating하고 5일 뒤 confocal laser scanning microscope (Leica TCS SP5, Microsystems)을 이용하여 관찰하였다.

9. Flower Bud Infiltration에 의한 형질전환체 제작

제작된 컨스트럭트 1 μ g을 50 μ l의 *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) competent cell과 섞어 37℃ 수조에서 5분 동안 heat shock처리 한 후 1 ml LB 배지를 첨가하였다. 28℃에서 3시간 동안 인큐베이션 한 후 30초간 원심분리(Centrifuge 5415D, 16,100g)를 하여 세포를 침전시키고 800 μ l LB 배지를 제거하고 남은 LB 배지에 세포를 재현탁하였다. 25 μ g/ml 젠타마이신과 50 μ g/ml 카나마이신 항생제가 함유되어 있는 LB 고체 배지에 도말하여 28℃에서 3일간 인큐베이션하였다. 콜로니 PCR을 통하여 컨스트럭트의 삽입여부를 확인하고 25 μ g/ml 젠타마이신과 50 μ g/ml 카나마이신 항생제가 함유되어 있는 LB 배지 200 ml에 접종하여 28℃에서 250 rpm으로 shaking하며 밤새 세포를 키웠다. 이를 상온에서 10분간 원심분리(Centrifuge 5810R, 2,129g)하여 세포를 모으고 배지는 제거하였다. 여기에 미리 준비한 infiltration 버퍼 (1/2 MS, 50g 수크로스, 1 ml 1000X Gamborg's vitamin, 10 μ l 벤질아미드 퓨린 (1 mg/ml), 250 μ l Silwet L-77)에 세포를 재현탁하여 OD₆₀₀=1.5~2.0로 맞추었다. 4주된 야생형 애기장대 (Col-0) 식물의 silique을 제거하고 분무기로 식물에 전체적으로 물을 뿌려두었다. 세포를 재현탁한 infiltration 버퍼에 식물을 뒤집어서 꽃이 잠기도록 담그고 흔들어서 공기방울을 제거해 주어 꽃이 infiltration 버퍼에 완전히 잠기도록 하였다. 2분 후 식물을 꺼내어 물기 없는 flat에 옆으로 눕히고 랩으로 감싼 뒤 빛이 들지 않도록 하여 상온에서 24시간 두었다. 그 후 랩을 벗기고 식물을 바로 세워 24℃ growth 챔버에서 키웠고 처음 3일간은 물을 주지 않았다. 식물에서 씨앗을 받은 뒤에는 selection 배지에서 키워서 형질전환된 식물체를 선별하였다.

10. Quantitative Real-Time RT-PCR

Quantitative real-time RT-PCR을 수행하기 위하여 Roter-Gene Real-Time Centrifugal DNA Amplification System (Corbett Research)과 QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Quiagen)가 이용되었다. PCR을 위한 프라이머 세트는 CANP는 CANP-RT5 (5'-TCAGTTTACCAGTGGATTGTTAAGC-3') (서열번호 46)과 CANP-RT3 (5'-TCCCCGACGACCAAGGCGAAGATA-3') (서열번호 47), RD29A는 RD29A-RT1 (5'-CAACACACACCAGCAGCACCCAGAA-3') (서열번호 48)과 RD29A-RT2 (CTTCAGGTTCTAGCTCGTCATCATC-3') (서열번호 49), RD29B는 RD29B-RT1 (5'-ACCAATCAGAATTCACCATCCAGAA-3') (서열번호 50)과 RD29B-RT2 (5'-GTTTCACCGTTACACCACCTCTCA-3') (서열번호 51), RD22는 RD22-RT1 (5'-CTGTCTTCTTGTTTCATTCATGTA-3') (서열번호 52)과 RD22-RT2 (5'-TCCACGCGTACACCTCCCTTTCCAA-3') (서열번호 53)가 사용되었다. 내부 대조군으로는, house-keeping 유전자인 actin2가 이용되었으며, 이를 위해서 actin2-1' (5'-GAGATCACCGCTCTGCACCTAGCA-3') (서열번호 54)과 actin2-2 (5'-TTCTGTGAACAATCGATGGACCT-3') (서열번호 55) 프라이머 세트가 사용되었다. Total RNA는 RNeasy Plant mini kit (Quiagen)을 이용하여 각각의 기관으로부터 추출되어 반응당 40 mg이 템플레이트로 사용되었다. 기본적으로 RNA는 50℃에서 30분간 역전사시키고 그 결과 합성된 cDNA를 다시 95℃에서 20분 동안 denaturation시켰다. PCR 반응은 다음과 같은 조건에서 35 cycles 수행하였다: denaturation은 94℃에서 20초, annealing은 58℃에서 20초, 그리고 extension은 72℃에서 30초. 증폭된 transcript의 특이성은 반응 후 생성된 melting curve를 이용하여 확인하였으며, 유전자의 발현정도는 Roter-Gene software를 이용하여 대조군인 actin2와 비교하여 분석하였다.

11. 건조(drought) 스트레스 처리

가뭄 스트레스는 4주 동안 흙에서 키운 야생형 (Col-0), 녀아웃 돌연변이(*canp*), *canp*/CANP complementation, CANP overexpression 식물체를 14 또는 16일 동안 수분 공급을 중단한 후 다시 물을 준 4일 동안 관찰한 후 생존율을 측정하였다.

12. 염 스트레스 처리

야생형 (Col-0), CANP 녹아웃 돌연변이 (*canp*), *canp*/CANP complementation, CANP 과발현 종자를 MS 배지에 발아시켜서 4일 후 125 mM 또는 150 mM NaCl이 포함된 MS 배지에 옮겨 염에 대한 민감성과 뿌리성장을 관찰하였다. 또한, 4주 동안 흙에서 키운 식물체에 150 mM 또는 300 mM NaCl 처리하여 키우면서 염에 대한 민감성을 관찰하였다.

13. Water-loss assay

4주 동안 흙에서 키운 야생형 (Col-0), 녹아웃 돌연변이 (*canp*), *canp*/CANP complementation을 가지고 생체중 (fresh weight)을 측정하여 수량손실 정도를 알아보았다. 같은 발달시기의 잎 5장을 1 set로 하여 야생형 (Col-0), 녹아웃 돌연변이 (*canp*), *canp*/CANP complementation 각각 4 set를 수행하였으며, 종류로 바람이 흐르는 hood에서 건조시켜 시간별로 (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 시간) 생체중을 측정하였다.

14. 광합성 측정

광합성 ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$) 측정은 5주 동안 흙에서 키운 식물체를 이용하였다. 휴대용 광합성 측정기 (LI-6400XT)에 이산화탄소 가스 교환 분석을 위해 Whole Plant Arabidopsis (WPA) 챔버를 직접 연결하여 식물 전체의 광합성 효율을 질량 기준으로 측정하였다. 광원으로 LI-6400-18 RGB (red, green, blue)를 사용하였으며, LI-6400-17 WPA 챔버 바로위에 연결하였다. 측정 조건은 WPA 챔버 안의 이산화탄소 농도 ($400 \mu\text{mol mol}^{-1}$), 상대습도 (70%), 기온 (25°C)을 일정하게 유지하고 인공광선은 0, 100, 200, 400, 500, 600, 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광량을 인위적으로 조사하였다. 측정 직후 식물체의 rosettes를 채취하여 질량을 측정하여 광합성 효율을 계산하였다.

15. 종자 수확

CANP 유전자 또는 CANP-유사유전자(예; SICANP 등)를 과발현하는 형질전환체 중에서 전술한 11-14의 특징 (건조 저항성, 염해 저항성, 광합성 효율 등)이 야생형에 비해 최소 20% 이상 증가된 개체를 선별하였다. 선별된 개체를 자가수분하여 종자를 채종하였으며, 채종된 종자를 다시 뿌려서 키운 형질전환체로부터 CANP 유전자(또는 SICANP)가 안정하게 유전체에 고정되어 발현되고 있는지를 real time RT-PCR 실험을 통해 확인하였다. 향후 이용을 위해 건조 저항성, 염해 저항성, 광합성 효율 중 한 가지 이상의 특징에 증가를 보인 개체로부터 종자를 채종하여 보관하였다.

<실험 결과>

실시예 1: CIPK1과 상호작용 하는 새로운 핵 단백질의 분리

애기장대 칼슘 결합 단백질인 CBL1과 CBL9는 건조 및 고염도 자극에 의해 생성된 칼슘신호를 인식하여 CBL-Interacting Protein Kinase (CIPK) family member중 하나인 CIPK1에 전달하여 식물의 스트레스 반응을 유도하는 데 관여하고 있다. 식물세포의 원형질막에 형성되는 CBL1/CBL9-CIPK1 complex가 어떻게 신호를 핵 안으로 보내 RD22와 RD29B 등과 같은 스트레스 유전자의 발현을 촉진하는가에 대해서는 알려진 바가 거의 없었다. 본 발명자는 이와 같은 기능을 수행하는 단백질을 찾고자 CIPK1을 미끼(bait)로 사용하여 애기장대 cDNA 라이브러리를 효모단백질잡종법(yeast two-hybrid method)으로 스크리닝하여 CIPK1과 상호작용하는 단백질들을 찾았다. 이들 상호작용 단백질의 아미노산 서열을 분석하여 핵 안으로 위치될 수 있는 것을 선별하고 이를 CIPK1-associated nuclear protein (CANP)으로 명명하였다. TIGR 웹사이트 (<http://www.tigr.org>)를 참조하여 CANP 단백질을 분석한 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 CANP는 N-말단 부위에 bipartite nuclear localization signal을, 그리고 중간 부위에 proline-rich region을 가지고 있다.

실시예 2: CANP 유전자의 전장 cDNA 클로닝

[0185] 효모단백질잡종법으로 스크리닝하여 분리한 CANP 클론은 전장 cDNA가 아니었다. 따라서 CANP 전장 cDNA를 CANP-1 전방 프라이머와 CANP-2 역방 프라이머 세트를 이용하여 PCR 증폭하여 pGBT.BS 벡터에 클로닝하였다. 이 전장 cDNA 클론의 염기서열을 결정하여 분석한 결과 CANP 전장 cDNA는 도 2에서 볼 수 있는 바와 같이, 1,758 bp의 오픈리딩프레임(open reading frame)을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

[0186] 또한, Yeast two-hybrid assay를 통해 CAMP가 CIPK1과 상호작용하는지 여부를 확인하고자 하였다. 도 3은 yeast two-hybrid assay를 통해서 전장 CANP가 CIPK1과 상호작용함을 확인한 도면이다. 도 3의 왼쪽 첫번째 패널은 pGBT 및 pGAD 플라스미드를 운반하는 Y190 효모 세포의 배열을 보여준다. 두번째 및 세번째 패널은 완전 배지에서 Leu 및 Trp (SC-LT)이 결핍된 합성 배지, 완전 배지에서 His, Leu, Trp (SC-HLW)이 결핍된 합성 배지에서의 효모의 성장을 보여준다. 마지막 패널은 β -갈락토시다아제 활성을 보여주는 필터-리프트 어세이(filter-lift assay)의 결과를 보여준다. 흥미롭게도 Gal4 전사 인자의 결합 도메인(binding domain, BD) 부위에 CANP가 클로닝 된 pGBT.CANP는 autoactivation 활성을 보였다.

[0188] 실시예 3: CIPK1-CANP 상호작용 분석

[0189] Yeast two-hybrid assay에서 확인된 CIPK1과 CANP의 상호작용을 BiFC assay로 검증하였다. 먼저 BiFC용 벡터로도 4A(pVYNE.CANP-c-myc 및 pMAS.SCYCE(R).CIPK1-HA 의 모식도)와 같이 제작하여 양파세포 (도 4B), 애기장대 protoplast (도 4C), 그리고 담배세포 (도 4D)에서 발현한 후 공초점 레이저 스캐닝을 통해 관찰하였다. 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이, CANP와 CIPK1 단백질은 식물세포에서도 복합체(complex)를 형성하였다. 이들의 상호작용은 주로 원형질막과 세포질에서 관찰되었으나, 흥미롭게도 핵 안에서는 관찰되지 않았다.

[0191] 실시예 4: CBL1과 CBL9가 CIPK1-CANP 복합체에 미치는 영향

[0192] CIPK1의 또 다른 상호작용 단백질로 알려진 CBL1 또는 CBL9에 의해서 CIPK1-CANP 복합체가 어떠한 영향을 받는지 알아보기 위해 yeast three-hybrid assay를 수행하였다. 이를 위해 pBridge 벡터에는 CIPK1과 CBL1 (또는 CBL9)을 클로닝하였고, pGADT7 벡터에는 CANP를 집어넣었다. 도 5(A)는 pGADT7.CANP 및 pBridge.CIPK1/CBL1 (또는 CBL9) 구조체의 모식도를 보여준다. 효모 균주 Y190을 공-형질전환시키기 위해, AD-융합 CANP를 발현하는 pGADT7.CANP 및 BD-융합 CIPK1 및 CBL1(또는 CBL9) 모두를 발현하는 bridge 벡터가 3번째 단백질로서 사용되었다. 형질전환된 효모 배양액을 600nm에서 0.2 흡광도 단위로 희석하고, 이중 형질전환에 대한 테스트에 대해 SD/-Met/-Leu/-Trp medium(-MLW) 상에(도 5(B)의 좌측 도면), 단백질 상호작용에 대해 SD/Met/-His/-Leu/-Trp medium(-MHLW) 상에(도 5(B)의 우측 도면) 스폿팅하였다. Yeast two-hybrid assay의 결과와 마찬가지로 BD-CIPK1과 AD-CANP만을 발현하는 효모 세포는 SC-MLWH 배지에서 자라는 반면, 세 가지 단백질(BD-CIPK1, AD-CANP, 그리고 CBL1 (또는 CBL9))을 동시에 발현하는 효모 세포는 SC-MLWH 배지에서 거의 성장하지 못했다. 이것은 CBL1 또는 CBL9이 CIPK1과 상호작용을 함으로써 CIPK1이 CANP와 상호작용하는 것을 방해함을 의미한다고 할 수 있다.

[0194] 실시예 5: Ca^{2+} 결합 CBL1/CBL9 의존적으로 핵 안으로 들어가는 CANP

[0195] 앞의 실험결과는 CANP는 CIPK1과 핵 밖에서 상호작용을 하고 있으며 이러한 상호작용은 CBL1 또는 CBL9에 의해 방해될 수 있음을 보여주고 있다. 이를 식물세포에서 확인하기 위하여 CBL9과 CIPK1 그리고 CANP-GFP 단백질을 발현시켜 칼슘의 유무에 따른 CANP-GFP 단백질의 위치를 관찰하였다. Particle bombardment를 이용하여 양파의 표피세포에 pCAM35S.CBL9, pCAM35S.CIPK1, pMDDI.CANP 컨스트럭트를 각각 4:2:1 비율(몰 비율)로 도입하여 해당 단백질을 발현시켰다. 칼슘이 없는 조건(1mM EGTA)에서 18시간 동안 인큐베이션하여 CANP-GFP의 세포내 위치를 확인한 후, 같은 세포에 칼슘 용액(10 mM CaCl_2 과 3.8 mM calcium ionophore A23187)을 30분 동안 처리하여 CANP-GFP의 세포내 위치의 변화를 형광 현미경을 통해 관찰하였다.

[0196] 실험 결과, 도 6에서 볼 수 있는 바와 같이, CANP-GFP는 칼슘이 없는 조건에서 주로 세포질에 존재하며(도 6(A)), 칼슘을 처리하게 되면 핵 안으로 이동해서 위치(도 6(B))하는 것을 알 수 있다. 이것은 평상시 CANP는 세포질에서 CIPK1과 복합체를 형성하고 있지만, 가뭄 또는 염해 등에 의해 칼슘신호가 생성되면 이를 인식한 CBL1/CBL9 단백질이 CIPK1과 상호작용을 원형질막에서 하게 되고, 이 과정에서 CANP가 CIPK1으로부터 떨어져 나

와 핵 안으로 들어가는 것을 의미한다.

실시에 6: CANP T-DNA 넉-아웃 돌연변이(*canp*)의 분리 및 complementation line 제작

SALK의 T-DNA tagging line을 조사하여 CANP 유전자 안에 T-DNA가 삽입되어 있는 *canp* mutant line을 얻었다 (도 7A). 우선 이 돌연변이주에 T-DNA가 몇 카피 삽입되어 있는지 알아보기 위해 카나마이신 저항성 유전자인 NPTII 유전자를 프로브를 사용하여 Genomic Southern blot assay를 수행하였다. 그 결과 T-DNA가 1 copy 존재한다는 것을 확인하였다. 또한 전장 CANP cDNA를 프로브로 다시 한 번 Genomic Southern blot assay를 수행하여 *canp* mutant가 homozygous line임을 확인하였다 (도 7B). 또한, RT-PCR을 수행하여 *canp* mutant에서 CANP 유전자의 발현이 완전히 사라진 것을 확인하였다 (도 7C).

canp mutant의 표현형이 CANP 유전자의 기능상실에 의한 결과인지 검증하기 위해서는 정상적인 CANP 유전자 도입에 따른 phenotype rescue 여부를 조사할 필요가 있다. 따라서 도 8A에 나타낸 바와 같이 complementation 컨스트럭트를 제작하였다: CANP 유전자의 시작코돈과 종결코돈까지의 2,000 bp와 프로모터부위의 3,700 bp를 합친 5,700 bp의 genomic DNA 단편을 식물형질전환 벡터인 pCAM1300에 클로닝하였다. 이 complementation 컨스트럭트를 *canp* mutant에 floral dipping method로 도입시켜 *canp*/CANP complementation 식물체를 제작하였다. 야생형 애기장대와 비슷한 수준의 CANP transcript level을 보이는 complementation line을 선별하고자 T2 세대의 형질전환 식물체들로부터 total RNA를 추출하여 real-time RT-PCR 분석을 수행하였다. 그 결과 야생형과 거의 비슷한 수준의 발현양을 보이는 complementation line pCAMBIA1300.CANPG-3-A를 확보할 수 있었다 (도 8B).

실시에 7: *canp* 돌연변이체의 표현형 분석 및 Phenotype rescue

정상적인 조건에서 애기장대 *canp* 돌연변이체는 야생형(Col-0)에 비해 다소 작은 크기로 성장하는 형태적 표현형을 보였다. 또한, *canp* 돌연변이체는 고염도(high salinity)와 가뭄(drought) 스트레스에 대해서 야생형보다 더욱 민감하게 반응하였다. 고염도 스트레스에 대한 반응성 조사는 두 가지 방법으로 수행하였다. 먼저 야생형과 *canp* 돌연변이체의 씨앗을 1/2 MS 배지에서 뿌려 4일 동안 키운 후 seedling을 0 mM, 110 mM, 125 mM, 150 mM NaCl이 각각 포함된 1/2 MS 배지로 옮겨 키우면서 표현형을 관찰하였다.

도 9에 나타난 바와 같이 *canp* 돌연변이체는 야생형에 비해 현저히 염해에 민감하였다. 110 mM의 NaCl 처리 시에 *canp* 돌연변이체의 뿌리 성장은 억제되고 잎에서는 백화현상이 나타남을 확인할 수 있었다. 한편, 이와 같은 표현형이 complementation line에서 회복되는 것으로 보아 *canp* 돌연변이체의 염해 민감성은 정상적인 CANP 유전자의 발현 상실에 기인하는 것임을 알 수 있다.

또한, 토양에서 자란 4주된 식물체에서 일에 한 번씩 150 mM NaCl 또는 300 mM NaCl을 처리하여 염해 민감성 조사를 수행하였다. 도 10A에서 볼 수 있는 바와 같이, 300 mM NaCl 처리시 야생형과는 달리 *canp*의 rosette leaf에서 백화현상이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 한편, 150mM NaCl을 처리하여 shoot growth assay를 수행하였을 때 *canp* 돌연변이체는 야생형과 달리 줄기를 제대로 형성하지 못했다 (도 10B). Complementation line에서는 이러한 표현형이 야생형처럼 회복되었다.

한편, 가뭄(drought)에 대한 민감성 실험은 다음과 같이 수행하였다. 4주 동안 흙에서 키운 식물체에 14일 동안 가뭄 처리하고 나서 4일 동안 물을 주는 회복기를 거쳐 생존율을 확인하였다. 그 결과 야생형에 비해 *canp* 돌연변이체가 가뭄에 더욱 민감해서 생존율이 약 3배 정도 감소하는 것을 확인하였다 (도 11A). 또한, 생체중(fresh weigh)을 측정하여 식물체의 수분손실을 측정한 결과 야생형에 비해 *canp* 돌연변이체가 약 17%정도 더 많이 수분을 손실하였다 (도 14C). Complementation line에서는 이러한 표현형이 야생형처럼 역시 회복되었다.

실시에 8: CANP 과발현 형질전환체 제작 및 표현형 분석

앞의 실험결과를 통해서 CANP 단백질을 발현하지 못하는 *canp* 돌연변이체가 야생형에 비해 크기가 약간 작고 염해와 가뭄 스트레스에 대한 저항성이 떨어짐을 알 수 있었다. 이것은 CANP를 과발현하는 형질전환체는 반대로 상기 스트레스에 향상된 저항성을 보일 가능성이 있음을 시사한다. 따라서 우리는 CANP 과발현 애기장대 형질전환체를 제작하여 스트레스 저항성을 조사하였다.

CANP가 과량 발현되는 애기장대 식물체를 제작하기 위하여 우선 CaMV 35S 프로모터에 의해 CANP가 발현되도록

식물 형질전환용 컨스트럭트 (pBI121ΔGUS.CANP)를 제작하였다 (도 12A). 이 컨스트럭트를 floral dipping method로 애기장대 (Col-0)에 도입하여 형질전환체를 만들었다. Real-time RT-PCR을 통해 CANP 과발현 형질전환 개체(CANP OX-4와 OX-9)를 확인하고 homozygous line을 선발하였다 (도 12B). 선발된 형질전환체를 이용하여 앞의 *canp* 돌연변이체 표현형 조사의 경우와 동일한 방법으로 스트레스 반응을 조사하였다. 우선 염해 (125 mM, 300 mM NaCl) 처리시 CANP 과발현 형질전환체는 야생형(Col-0) 보다 매우 월등한 저항성을 나타내었다 (도 13).

[0211] 또한, 가뭄 (drought) 스트레스 실험은 4주 동안 흙에서 키운 식물에 16일 동안 가뭄 스트레스를 처리한 다음 물을 주어 4일 동안 회복기를 거치도록 하였다. 도 14에서 보듯이 CANP 과발현체가 가뭄 (drought) 스트레스에 야생형(Col-0)보다 현저히 증가된 저항성을 나타냈다. 주어진 스트레스 조건에서 Col-0, CANP OX-4, CANP OX-9 식물체의 생존율은 각각 3%, 47%, 72%로 CANP 과발현체가 야생형에 비해 약 15배에서 24배 높은 생존율을 보였다. 이것으로 CANP 과발현체가 염, 가뭄 스트레스에 대해 야생형 보다 매우 증가된 저항성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0212] 한편, 다자란 CANP 과발현체는 야생형 애기장대 (Col-0) 보다 약간 크기가 컸다. 따라서 광합성 효율을 측정하였다. PAR 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서부터 야생형에 비해 CANP 과발현체의 광합성 효율이 약 20% 정도 증가함을 알 수 있었다 (도 15).

[0214] 실시예 9: 식물에서 진화적으로 보존된 CANP 유전자

[0215] GenBank 데이터베이스를 탐색한 결과, 도 16에서 볼 수 있는 바와 같이, 애기장대 CANP와 매우 유사한 유전자들이 거의 모든 식물에서 존재함을 알 수 있었다. 이와 같은 진화적 보존은 CANP가 애기장대에서처럼 다른 식물체에서도 비슷한 기능을 수행하고 있음을 의미한다. 따라서 다른 식물체에 존재하는 CANP 유사유전자들도 염해와 가뭄에 저항성을 가지고 광합성 효율이 증가된 식물체를 개발하는데 사용될 수 있을 것으로 전망된다.

[0217] 실시예 II: 토마토 CANP 유전자를 과발현하는 형질전환 토마토 제작 및 표현형 검증

[0219] 실시예 10: 토마토의 CANP 유전자의 full-length cDNA 클로닝

[0220] 토마토(*Solanum lycopersicum*) 잎으로부터 제작된 cDNA를 주형으로 사용하고 SICANP-1 (ATAACTAGTAGTGTCTTCTCAAGCGAAA)(서열번호 56)와 SICANP-2 (TTTGAGCTCTCATACACGCTGCTCTTTC)(서열번호 57) 프라이머 세트를 이용하여 SICANP 전장 cDNA를 PCR로 증폭하여 pBS 벡터에 클로닝하였다. 이 전장 cDNA 클론의 염기서열을 결정하여 분석한 결과 SICANP 전장 cDNA는 예상대로 1,677 bp의 오픈 리딩 프레임 가지고 558개의 아미노산을 지정하고 있음을 알 수 있었다. 또한, 애기장대의 CANP와 아미노산 서열을 비교한 결과 63.4% 상동성을 가지고 있음도 다시 한 번 확인하였다 (도 17).

[0222] 실시예 11: 토마토 CANP 형질전환체 제작 및 검증

[0223] 토마토는 Moneymaker 품종 (*Solanum lycopersicum* L cv.Moneymaker)을 이용하였다. 종자를 70% EtOH에서 3분, 50% bleach에서 7분 소독 한 뒤에 3차 증류수로 5번 행구어 발아배지에 치상하였다. 치상 후 9 - 12일된 토마토의 자엽 부위를 잘라내어 전배양 배지에 치상한 후 25℃에서 2일간 암배양 하였다. CANP 과발현을 시키기 위한 super promoter에 의해 CANP가 발현되도록 식물 형질전환용 construct (pATC940 vector)를 제작하였다 (도 18).

[0224] 이 플라스미드가 들어간 아그로박테리움 (Strain: LBA4404)을 공동배양 전일 50 mg/L 카나마이신과 25 mg/L 리팜피신이 들어간 LB배지에 접종하여 키워주었다. 공동배양 당일 균주를 원심분리 하여 모은 후 200 μM 아세트시론곤(acetosyringone)이 들어간 liquid MS-0.2% 액체 배지로 풀어주어 OD_{600nm} 값이 0.4가 되게 맞추어 주었다. 맞춘 균주를 28℃에서 100rpm으로 1시간동안 배양한 후 공동 배양재료로 이용하였다. 전배양한 자엽절편을 균주에 5분간 접촉한 후 필터 페이퍼에 자엽절편을 말린 후 공동배양배지에 치상하여 28℃에서 2일간 암배양하였다. 공동배양이 완료된 자엽절편은 세포탁심(cefotaxime)이 첨가된 증류수에 넣고 교반하여 세척함으로써 미 접종된 균과 잔여 아그로박테리움을 제거하였다. 이 후 재분화 및 선택배지에 치상한 후 28℃에서 키워주었다. 이후 15

일 간격으로 신선한 선택배지로 계대배양하며 키워주면서 총 8주간 배양 하였다. 재분화 과정에서 자엽부위로부터 유도된 캘러스에서 발생한 신초부위는 신초신장배지로 옮겨주어 치상한 후 28℃에서 14일간 배양하였다. 배양한 신초를 발근배지로 옮겨주어 신초로부터 뿌리를 유도하였다. 뿌리가 유도된 후 한번 더 발근배지로 옮겨주어 뿌리의 성장을 유도한 후 토양으로 옮겨 순화해주었다 (도 19).

[0225] 형질전환과정을 이용하여 얻어진 4개의 형질전환체의 SICANP 유전자 발현양을 조사하였다. Real-time RT-PCR을 수행하여 SICANP mRNA의 발현양을 확인한 결과, 토마토 야생형 (WT)에 비하여 형질전환체가 7배에서 19배까지 SICANP를 과발현하고 있음을 알 수 있었다 (도 20).

[0227] 실시예 12: 토마토 CANP 과발현체의 광합성 측정

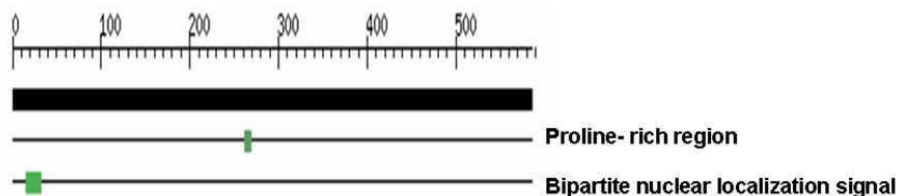
[0228] 광합성 ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$) 측정은 7주 동안 흙에서 키운 토마토 야생형 (WT)과 CANP 과발현체 중에서 발현량이 높은 1, 3번 개체를 이용하였다 (도 21). 광합성 측정기 (LI-6400XT)에 이산화탄소 가스 교환 분석을 위해 챔버를 직접 연결하여 식물 전체의 광합성 효율을 측정하였다. 챔버 안의 이산화탄소 농도 ($400 \mu\text{mol mol}^{-1}$), 상대습도 (65%), 기온 (25°C)을 일정하게 유지하고 인공광선은 0, 100, 200, 400, 500, 600, 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광량을 인위적으로 조사하였다. 그 결과 PAR 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서부터 야생형 (WT)에 비해 토마토 CANP 과발현체 1번 개체는 39%, 3번 개체는 20%가 증가하였다 (도 22). 이것은 real-time RT-PCR의 결과와 비교하여 CANP 발현이 증가할수록 광합성 효율이 증가함을 알 수 있다. 이러한 결과는 애기장대에서 확인된 CANP 유전자의 기능이 토마토에서도 동일하게 적용될 수 있음을 보여주는 증거라고 할 수 있다. 나아가 다른 식물에 존재하는 CANP 유전자들도 비슷한 기능을 수행할 수 있음을 추론할 수 있다.

[0230] 실시예 13: 토마토 종자의 수확

[0231] 상기한 특성을 소유하는 토마토 형질전환체로부터 종자를 수확하기 위해 자가수분을 실시하였다. 자가수분 결과 생성된 토마토 열매로부터 종자를 채종하였으며, 채종된 종자를 다시 뿌려서 얻은 얻은 토마토 개체로부터 SICANP 유전자가 토마토 유전체에 안정하게 통합되어 발현되고 있음을 real-time RT-PCR로 확인하였다.

도면

도면1



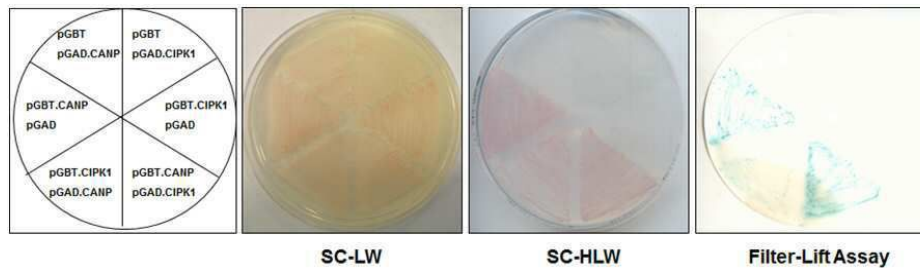
도면2

```

ATGAAACCTTCAAAATCGCATCACAAGGAGAAAAACCGCTCGTCGGAGAGAGGAGAAAACTAGAGGAATCCGATAATCCAAAATACAGAGATCGTGCTAAAG 100
M K P S K S H H K E K T A R R R E E K L E E S D N P K Y R D R A K
AAAGAAGAGAGAAATCAAAATCCTGATTATGATCCATCAGAGCTTAGTTCTTCCATGCGCTTGTCTCCCGGAGCTGTCGATATCCGTGCTGCTGATGC 200
E R R E N Q N P D Y D P S E L S S F H A V A P P G A V D I R A A D A
ACCTAAGATATCTATTGAGAACAGCAAAATATCTTGGAGGTGATGTTGAACATACCCATTAGTTAAGGGTTTGGATTATGCTTTGTTGAATAAGTACGA 300
L K I S I E N S K Y L G G D V E H T H L V K G L D Y A L L N K V R
AGCGAAATCGTTAAGAACTGATGGTGAAGATGGTATGGTGGGAAGACTAGTGGCGCTAAGGAAGATCAGCGAGTTACTTTCCGTACCATAGCTGCAA 400
S E I V K K P D G E D G D G G K T S A P K E D Q R V T F R T I A A
AGTCAGTTTACCGATGGATTGTTAAGCCTCAGACTATCATCAAGTCTAATGAGATGTTCTTCCCGGTAGAATGACATTGTTCTATGATATGGAAGGTGG 500
K S V Y Q W I V K P Q T I I K S N E M F L P G R M T F V Y D M E G G
CTATACCCATGACATACCGACACGTTATATAGGAGTAAAGCTGACTGCCCGGTGCCGAGGAATTTGTCACAGTCAATGTTGATGTTCTGTGCTAGAT 600
Y T H D I P T T L Y R S K A D C P V P E E F V T V N V D G S V L D
CGAATTGCTAAAATCATGTCTATCTTCCGCTTGGTCTCGGGGAAAGTTCTCAAGAAGAAAAAGAAAAAGATGGGAAAGGAAAGATGTCAACTA 700
R I A K I M S Y L R L G S S G K V L K K K K K E K D G K G K M S T
TTGCTAATGATTATGATGAAGACGACAATAAATCTAAGATTGAGAATGATCTTCTGTGAACATAAGTGACAGGGAAGTTTACCTCCTCCTCCGCCATT 800
I A N D Y D E D D N K S K I E N G S S V N I S D R E V L P P P P P L
ACCACCTGGGATAAACCATCTGGATTTGATACGAAACAAGAAGAACCCCTGTTGCCAGGACAGAGATGATGACATATTGTTGGTGAAGCGCTCGAT 900
P P G I N H L D L S T K Q E E P P V A R T D D D D I F V G E G V D
TACACGGTTCTCGTAAAGATGTGACACAGAGTCTATTTCTGAGGACATGGAAGAATCTCCAGGGATAAGGAGAAAGTATCTTATTTTCGATGAGCGCTG 1000
Y T V P G K D V T Q S P I S E D M E E S P R D K E K V S Y F D E F
CTTATGGTCCAGTGCCAGGAGAAGGTACCTTATTTCTGAGCGCTGCTTATGGTCCAGTGCCAGCATCTGCTGGTCAGGAATGGCAAGATATGATGCATA 1100
A Y G P V Q E K V P Y F A E P A Y G P V Q P S A G Q E W Q D M S A Y
TGGTGAATGCAAACTCAAGGACTGGCTCCTGGGTACCCCGGAGAGTGSCAGGAATACCAATATGCAGAGCAAACTGGGTATCAGGAGCAGTACCTCAA 1200
G A M Q T Q G L A P G Y P G E W Q E Y Q Y A E Q T G Y Q E Q Y L Q
CCTGGAAATGGAGGGTTACGAGGTCCAAACGAGAAACCGATGTTTACTAGATCCTCAACTCATGTCCGAGGAGAGAGAAAGATAGGGGTTTGGGATCGGTTT 1300
P G M E G Y E V Q P E T D V L L D P Q L M S Q E E K D R G L G S V
TCAAGCGTGATGACCAAGGCTTCAACAGTTGAGGGAGAGTGAOCGAAGGAGAGAAATCCAACTTTTGTATCCGAGAGTTATTCAGAGTGTATCCAGS 1400
F K R D D Q R L Q Q L R E S D A R E K D P T F V S E S Y S E C Y P G
TTACCAAGAGTACACCATGAGATTGCGGTAGTGATGAAGAACCTGATTTGCTAAAATGGACATGGGTGGAAAGGCAAAAGGTGTTTACATCGATGG 1500
Y Q E Y N H E I V G S D E E P D L S K M D M G G K A K G G L H R W
GACTTTGAGACAGAAGGAATGGGAAAAATATAATGAGCAGAAGGAAGCGATGCCAAAAGCGCGTTCCAAATTCGGGGTAAAGATGCAAGATGGTCGAA 1600
D F E T E E E W E K Y N E Q K E A M P K A A F Q F G V K M Q D G R
AGACAAGGAGCAGAACCTGACCGTGACCCAGAAGCTCAATAATGAACCTCACAGATCAATAAGATACTTACGAGAAAGAGATGGAGAAGGAGGGTGG 1700
K T R K Q N R D R D Q K L N N E L H Q I N K I L T R K K M E K E G G
GGATGTTGCTTTTGGATGCCCGCGAGGCACAACTCTAAGAGATCCAAAGCATTGA 1758
D V A S L D A A E A Q T P K R S K H .

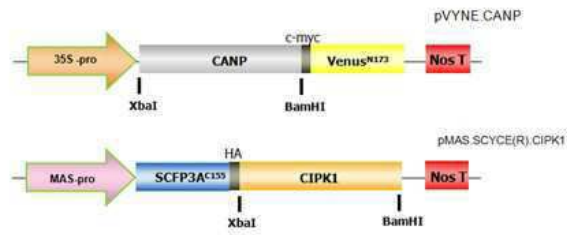
```

도면3

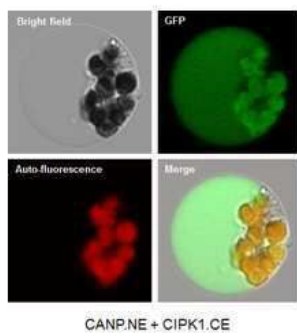


도면4

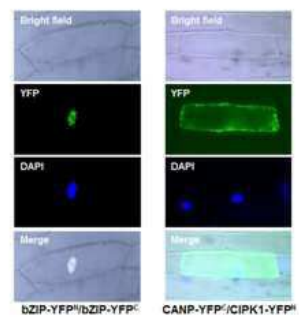
A.



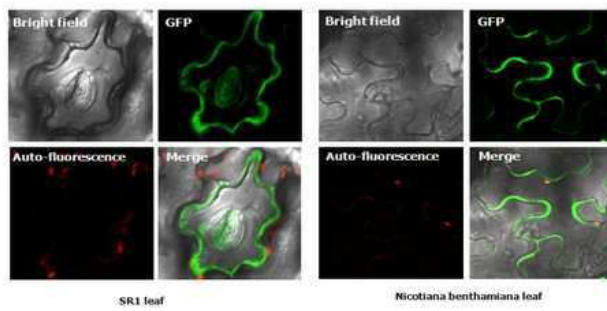
B.



C.

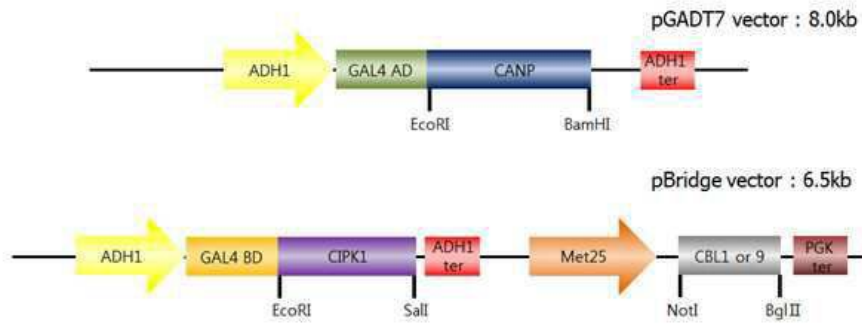


D.



도면5

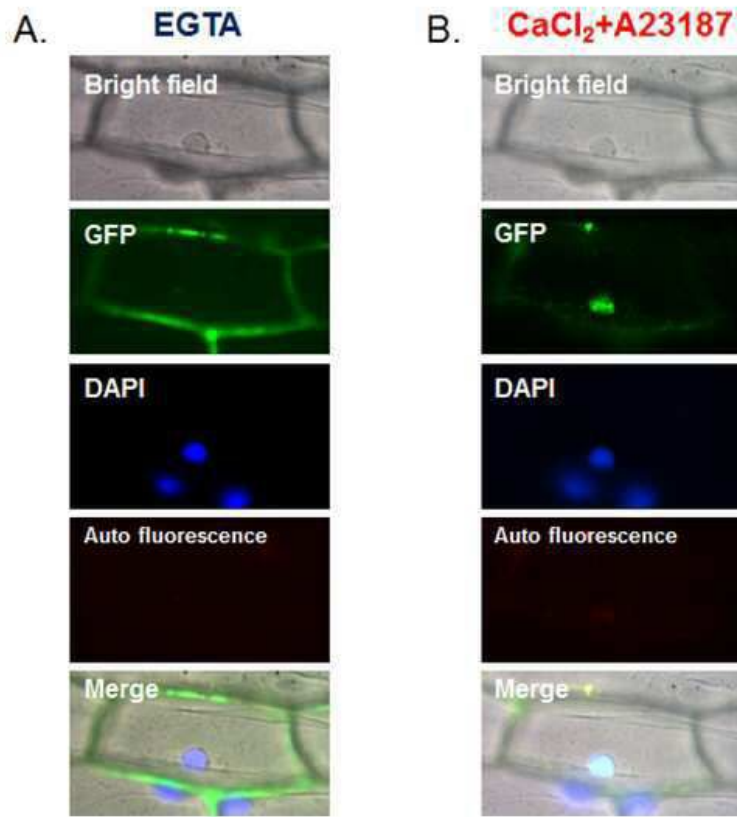
A.



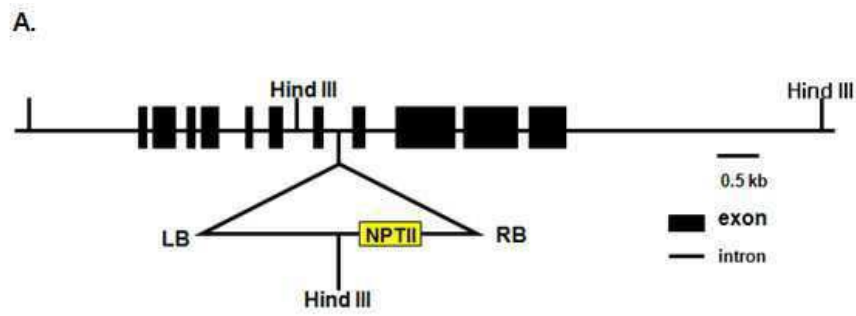
B.

BD fused	3rd protein	AD fused	-MLW (Control)	-MLWH (Selection)
-	-	-		
CIPK1	-	CANP		
CIPK1	CBL1	CANP		
CIPK1	CBL9	CANP		

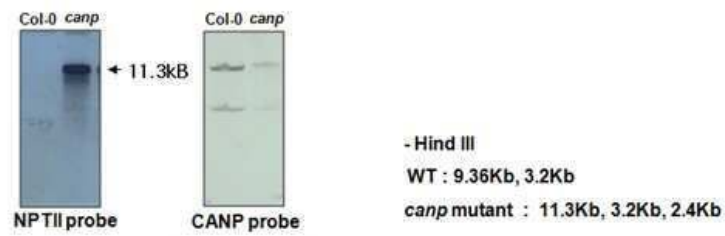
도면6



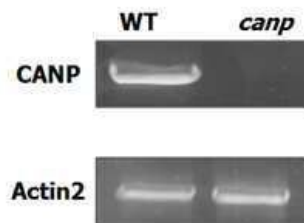
도면7



B.

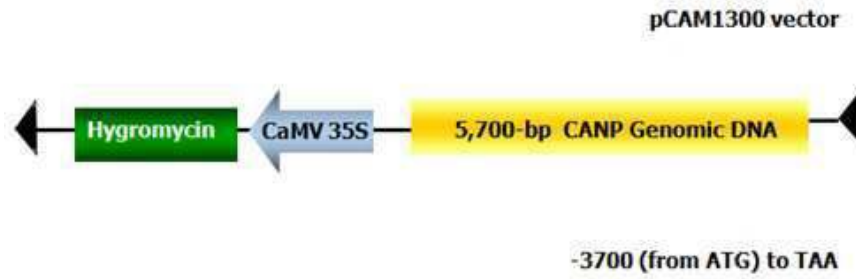


C.

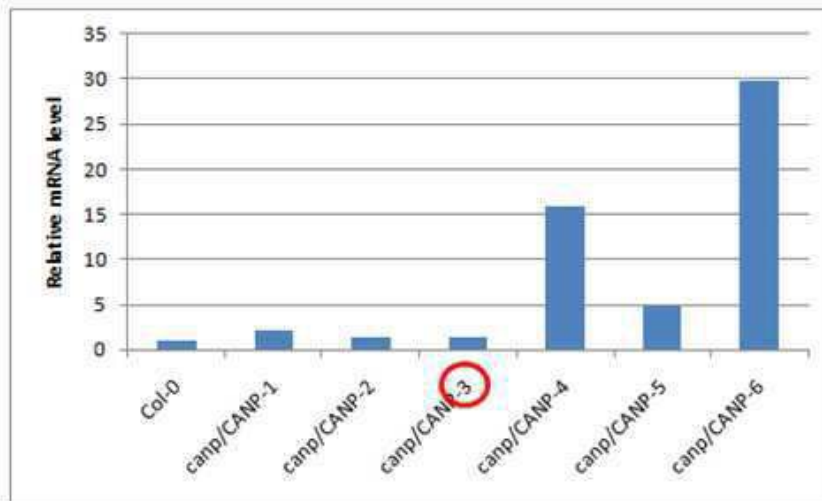


도면8

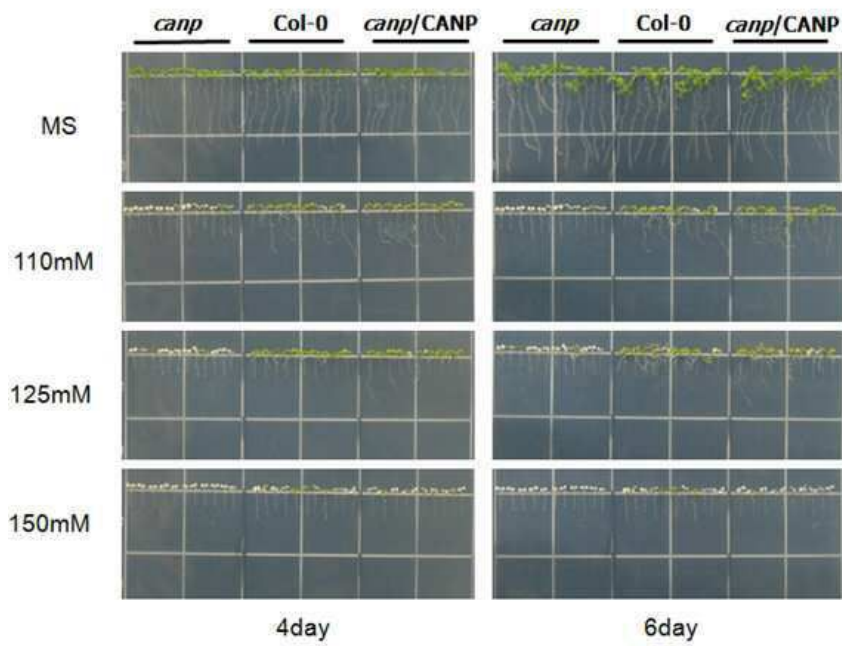
A.



B.

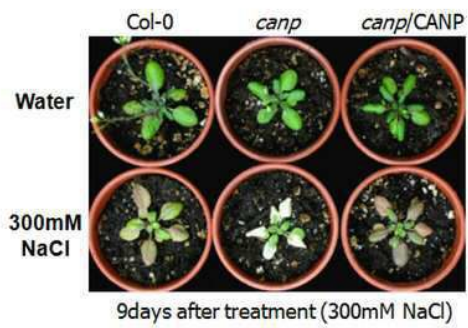


도면9

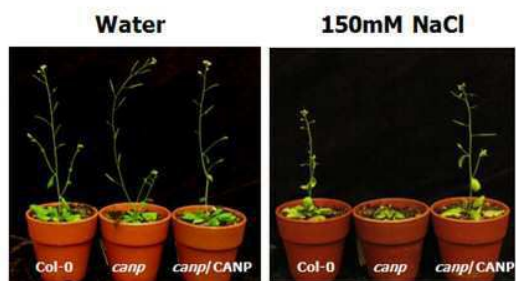


도면10

A.

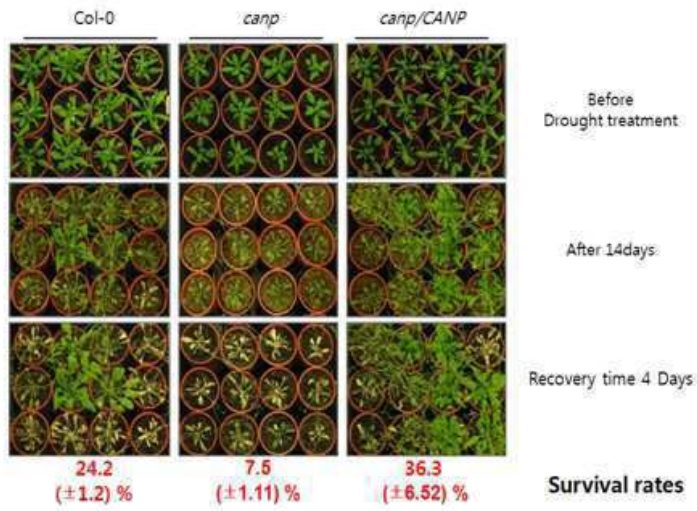


B.

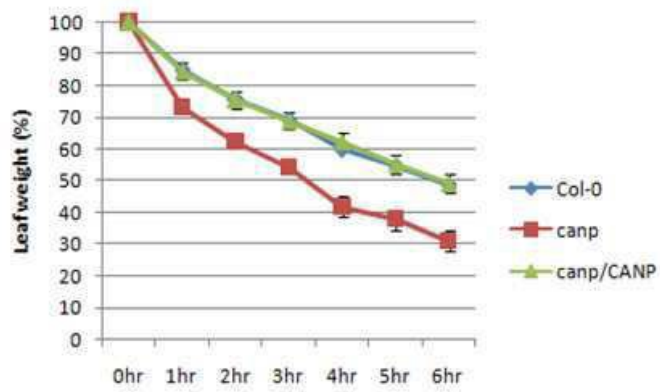


도면11

A.



B.

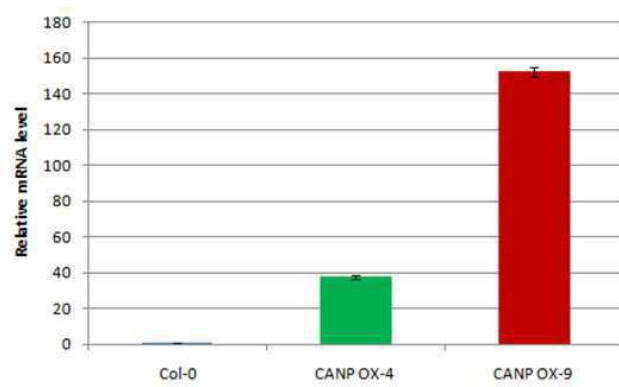


도면12

A.

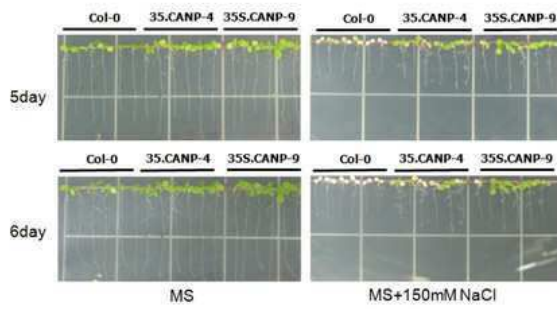


B.

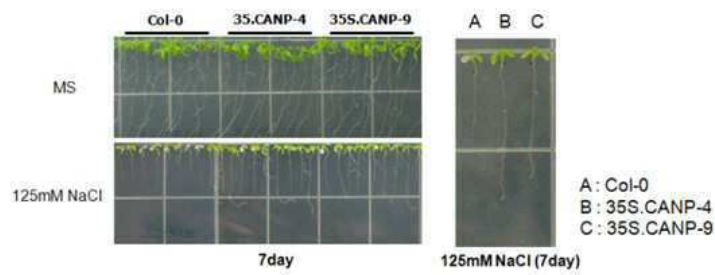


도면13

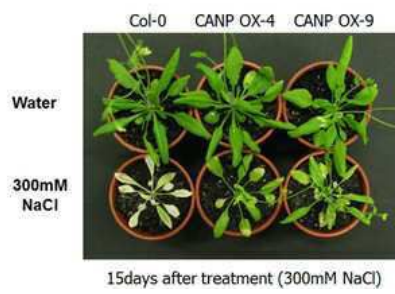
A.



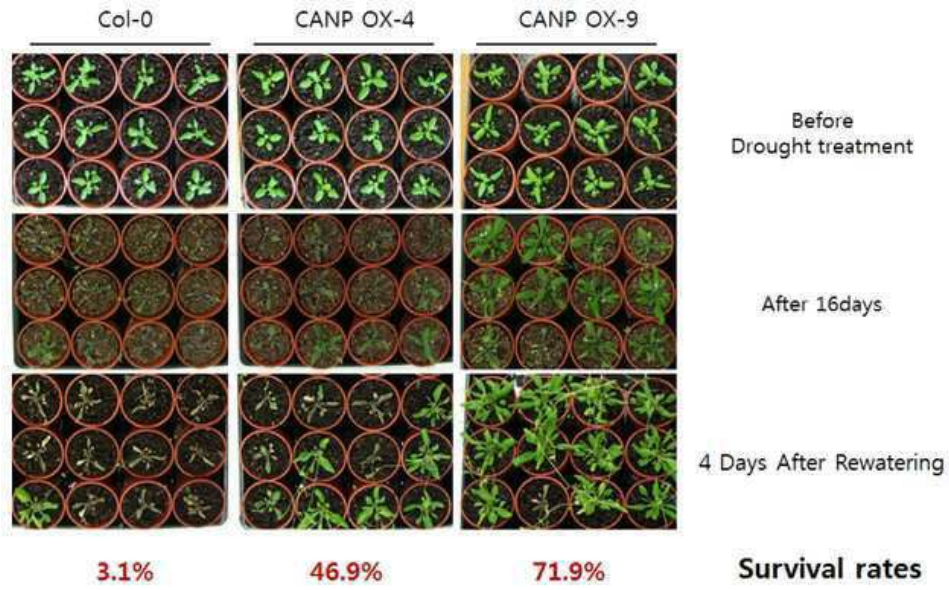
B.



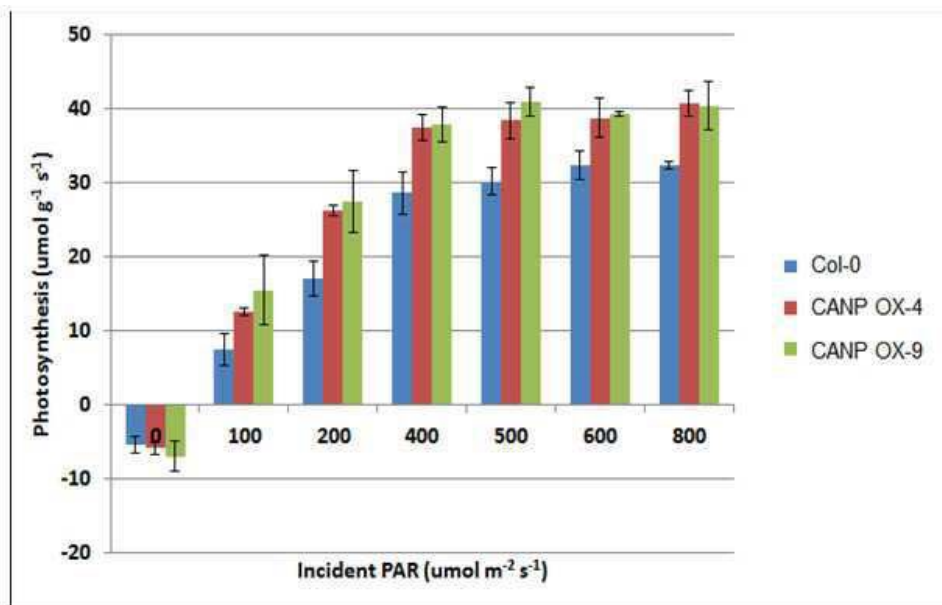
C.



도면14



도면15



도면16a

		RED_N Superfamily			
		A		B	
		C			
CAMP					
K29	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K30	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K31	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K32	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K33	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K34	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K35	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K36	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K37	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K38	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K39	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K40	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K41	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K42	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K43	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K44	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K45	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K46	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K47	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K48	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K49	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K50	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K51	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K52	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K53	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K54	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K55	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K56	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K57	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K58	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K59	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K60	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K61	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K62	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K63	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K64	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K65	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K66	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K67	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K68	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K69	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K70	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K71	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K72	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K73	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K74	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K75	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K76	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K77	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K78	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K79	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K80	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K81	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K82	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K83	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K84	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K85	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K86	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K87	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K88	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K89	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K90	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K91	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K92	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K93	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K94	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K95	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K96	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K97	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K98	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K99	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K100	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K101	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K102	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K103	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K104	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K105	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K106	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K107	SHH	SHH	SHH	SHH	SHH
K10					

도면16b

CAMP	ENKREIENSSVNI	PEPELENG	...HIDHISEHVI	RTIDIDFVGG	VHIGV	SPISIDSEH	ERSVARE	ERSPVGVCEVPEZED	YVPEQAAQ	333		
키어오	DREKNGMGNRE	BEID	PEPE	...PEK	YHDSERG	...RESDIDFG	...T	GVN	SPSIDSEH	ERSVARE	333	
오렌지	DREKANSINGED	REID	PEPE	...PEK	YHDSERG	...RESDIDFG	...T	GVN	SPSIDSEH	ERSVARE	333	
복숭아	DREKREDAIVN	REID	PEPE	...PEK	YHDSERG	...RESDIDFG	...T	GVN	SPSIDSEH	ERSVARE	333	
오이	DREKREDAIVN	KMBRE	PEPE	...PEK	YHDSERG	...RESDIDFG	...T	GVN	SPSIDSEH	ERSVARE	333	
감자	S...DAS	REKTHACAC	...KREHREDOG	...VREEDIDFG	GVN	SPSIDSEH	ERSVARE	ERSPVGVCEVPEZED	YVPEQAAQ	333		
콩	DREKGG	ANREKIDLEH	...PEK	PHISEG	...VREEDIDFG	GVN	SPSIDSEH	ERSVARE	ERSPVGVCEVPEZED	YVPEQAAQ	333	
조	VREKMSID	AS	...PEPE	PNNGSG	SVL	ANDIDFG	GVN	SPSIDSEH	ERSVARE	ERSPVGVCEVPEZED	YVPEQAAQ	333
노마토	S...DAS	REKTHACAC	...KREHREDOG	...VREEDIDFG	GVN	SPSIDSEH	ERSVARE	ERSPVGVCEVPEZED	YVPEQAAQ	333		
딸기	AREKGGAL	REKREH	...PE	PN	NSKREPS	VREEDIDFG	GVN	SPSIDSEH	ERSVARE	ERSPVGVCEVPEZED	YVPEQAAQ	333
옥수수	VREKMSID	AS	...PEPE	PNNGSG	SVL	ANDIDFG	GVN	SPSIDSEH	ERSVARE	ERSPVGVCEVPEZED	YVPEQAAQ	333
밀키	DREKGG	ANREKIDLEH	...PEK	PHISEG	...VREEDIDFG	GVN	SPSIDSEH	ERSVARE	ERSPVGVCEVPEZED	YVPEQAAQ	333	
알고	REKREIDGMS	REKREH	...PE	PN	NSKREPS	VREEDIDFG	GVN	SPSIDSEH	ERSVARE	ERSPVGVCEVPEZED	YVPEQAAQ	333
CAMP	ENKREIENSSVNI	PEPELENG	...HIDHISEHVI	RTIDIDFVGG	VHIGV	SPISIDSEH	ERSVARE	ERSPVGVCEVPEZED	YVPEQAAQ	333		
키어오	DREKNGMGNRE	BEID	PEPE	...PEK	YHDSERG	...RESDIDFG	...T	GVN	SPSIDSEH	ERSVARE	333	
오렌지	DREKANSINGED	REID	PEPE	...PEK	YHDSERG	...RESDIDFG	...T	GVN	SPSIDSEH	ERSVARE	333	
복숭아	DREKREDAIVN	REID	PEPE	...PEK	YHDSERG	...RESDIDFG	...T	GVN	SPSIDSEH	ERSVARE	333	
오이	DREKREDAIVN	KMBRE	PEPE	...PEK	YHDSERG	...RESDIDFG	...T	GVN	SPSIDSEH	ERSVARE	333	
감자	S...DAS	REKTHACAC	...KREHREDOG	...VREEDIDFG	GVN	SPSIDSEH	ERSVARE	ERSPVGVCEVPEZED	YVPEQAAQ	333		
콩	DREKGG	ANREKIDLEH	...PEK	PHISEG	...VREEDIDFG	GVN	SPSIDSEH	ERSVARE	ERSPVGVCEVPEZED	YVPEQAAQ	333	
조	VREKMSID	AS	...PEPE	PNNGSG	SVL	ANDIDFG	GVN	SPSIDSEH	ERSVARE	ERSPVGVCEVPEZED	YVPEQAAQ	333
노마토	S...DAS	REKTHACAC	...KREHREDOG	...VREEDIDFG	GVN	SPSIDSEH	ERSVARE	ERSPVGVCEVPEZED	YVPEQAAQ	333		
딸기	AREKGGAL	REKREH	...PE	PN	NSKREPS	VREEDIDFG	GVN	SPSIDSEH	ERSVARE	ERSPVGVCEVPEZED	YVPEQAAQ	333
옥수수	VREKMSID	AS	...PEPE	PNNGSG	SVL	ANDIDFG	GVN	SPSIDSEH	ERSVARE	ERSPVGVCEVPEZED	YVPEQAAQ	333
밀키	DREKGG	ANREKIDLEH	...PEK	PHISEG	...VREEDIDFG	GVN	SPSIDSEH	ERSVARE	ERSPVGVCEVPEZED	YVPEQAAQ	333	
알고	REKREIDGMS	REKREH	...PE	PN	NSKREPS	VREEDIDFG	GVN	SPSIDSEH	ERSVARE	ERSPVGVCEVPEZED	YVPEQAAQ	333

도면16c

CAMP : E I G S T E P I D I S K M D G G R A K G L I R H M D F E T E E E T E E N Q R E A M P R A A F Q E G V M Q D G R K I R K Q N H R I Q G K I N E I Q I N K I I T R K K E R G G V A S I D A . . . A E A Q T E S K . H : 565
 카키모 : E I N S D I E D I S K M D G G R A K G L I R H M D F E T E E E E N I N Q R E A M P R A A F Q E G V M Q D G R K I R K Q N H . . . Q I D I N E I H I N K I I R R K K E R L T N . . . G E G H Y O D D Q G R K R V . . : 569
 오렌지 : E I N S D I E D I S K M D G G R A K G L I R H M D F E T E E E E N I N Q R E A M P R A A F Q E G V M Q D G R K I R K Q N H . . . Q I D I N E I H I N K I I R R K K E R L T N . . . G E G H Y O D D Q G R K R V . . : 569
 복숭아 : E I N S D I E D I S K M D G G R A K G L I R H M D F E T E E E E N I N Q R E A M P R A A F Q E G V M Q D G R K I R K Q N H . . . Q I D I N E I H I N K I I R R K K E R L T N . . . G E G H Y O D D Q G R K R V . . : 574
 오이 : E I N S D I E D I S K M D G G R A K G L I R H M D F E T E E E E N I N Q R E A M P R A A F Q E G V M Q D G R K I R K Q N H . . . Q I D I N E I H I N K I I R R K K E R L T N . . . G E G H Y O D D Q G R K R V . . : 561
 감자 : E I N S D I E D I S K M D G G R A K G L I R H M D F E T E E E E N I N Q R E A M P R A A F Q E G V M Q D G R K I R K Q N H . . . Q I D I N E I H I N K I I R R K K E R L T N . . . G E G H Y O D D Q G R K R V . . : 558
 콩 : E I N S D I E D I S K M D G G R A K G L I R H M D F E T E E E E N I N Q R E A M P R A A F Q E G V M Q D G R K I R K Q N H . . . Q I D I N E I H I N K I I R R K K E R L T N . . . G E G H Y O D D Q G R K R V . . : 567
 토마토 : E I N S D I E D I S K M D G G R A K G L I R H M D F E T E E E E N I N Q R E A M P R A A F Q E G V M Q D G R K I R K Q N H . . . Q I D I N E I H I N K I I R R K K E R L T N . . . G E G H Y O D D Q G R K R V . . : 573
 쌀 : E I N S D I E D I S K M D G G R A K G L I R H M D F E T E E E E N I N Q R E A M P R A A F Q E G V M Q D G R K I R K Q N H . . . Q I D I N E I H I N K I I R R K K E R L T N . . . G E G H Y O D D Q G R K R V . . : 558
 완두콩 : E I N S D I E D I S K M D G G R A K G L I R H M D F E T E E E E N I N Q R E A M P R A A F Q E G V M Q D G R K I R K Q N H . . . Q I D I N E I H I N K I I R R K K E R L T N . . . G E G H Y O D D Q G R K R V . . : 556
 딸기 : E I N S D I E D I S K M D G G R A K G L I R H M D F E T E E E E N I N Q R E A M P R A A F Q E G V M Q D G R K I R K Q N H . . . Q I D I N E I H I N K I I R R K K E R L T N . . . G E G H Y O D D Q G R K R V . . : 565
 포도 : E I N S D I E D I S K M D G G R A K G L I R H M D F E T E E E E N I N Q R E A M P R A A F Q E G V M Q D G R K I R K Q N H . . . Q I D I N E I H I N K I I R R K K E R L T N . . . G E G H Y O D D Q G R K R V . . : 567

RED_C Superfamily

1

j

K

도면17

```

예기종대 : MKESSEHKEKTRRGREEKLEBSUNPYRDRAKERRENQNPDIIDSELSFFHAVAPPGVDIRADAKRISIBSKYLGGDVEHTHLVKGLDYALIKW : 99
트마도 : KSSSRKHKEKIVRNKEEKVEBETIPYRDRAKERREDQNPDIIDTGGGFHAVAPPGNIDLLSADAKLSIBSKYLGGDVEHTHLVKGLDYALIKW : 100

예기종대 : RSEIVKKKHQEDGDGGKTSAKKEICQVTFRIIAKSVYQWIKPCTIIRSNEMFLPGRMTFVYDMGGYTHOIPITIRSKADCFVEEBVTNVDSGV : 198
트마도 : RSEIVKKKHQEDALEGKARGVKEIHOLSFTIATAKSVYQWIKPCTVIRTNEMFLPGRMTFVYDMGGYTHOIPITIRSKADCFVEEBVTNVDSGV : 200

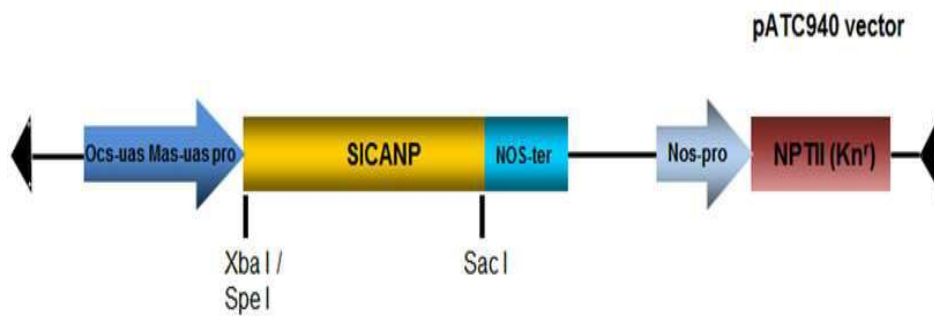
예기종대 : LDRIAKIMSYLRIGSSGKVLKKKKKEKDKGKNSTANIDEDDNKSKFENGSSVNISSREVITPPHLPGINHLULSTKQSEHVAFTDDRDIFVGG : 298
트마도 : LDRIAKIMSYLRIGSSGKVLKKKKKEKDSGHNIVISAGYDEV-----KSDASKSQDKKEVHISACLPK--KNHSEHREVIGIVVARPEEBDIFVGG : 292

예기종대 : VDITVFGKROVACSPISEDMEESPRDKERSYBDEPAYGFVQEKVPYFAEPAYGFVQPSAGQBNCDMSANGMCTGGLPGMPGKWCYCYRECTGYCEQV : 398
트마도 : VDYSVFGKROVACSPISEDMEESPRDKERSYBDEPAYGFV-----SEPS--HVMVYTNQGEPAACGAVAGVQCEWQCYCYRECTGYCEQV : 378

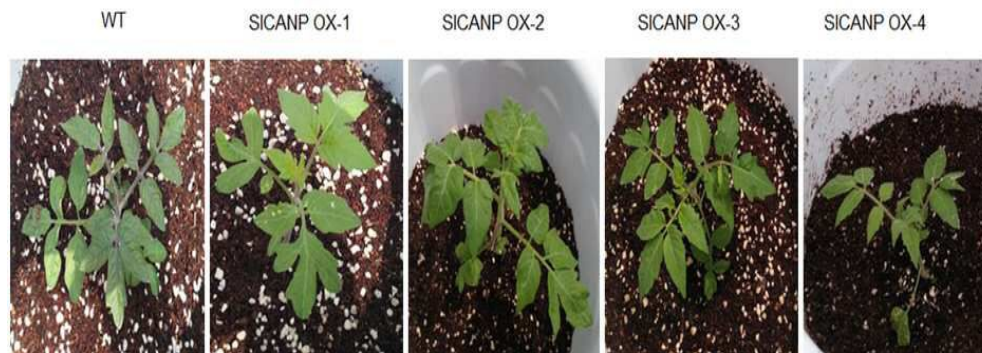
예기종대 : LQPGKEGVVVPDITVLDPCIMSQEEKDRGLGSVFKRDDQRIQLRBSQAREKDPFVSESYSYCEYFYGYEYNEIVGSEBFDLSKMDMGKAKGLH : 498
트마도 : LQ---QPMQADVGLQDPCIMSQEEKDRGLGSVFKRDDQRIQLRBSQAREKDPFVSESYSYCEYFYGYEYNEIVGSEBFDLSKMDMGKAKGLH : 475

예기종대 : RWFETEETEEWKYNECKEAMPKAAFPQFGVRMQDGRKTRKQNRDCKIINELHCKINKILTRKKMEREGCDVASDADABACTFRRSKH : 585
트마도 : RWFETEETEEWKYNECKEAMPKAAFPQFGVRMQDGRKTRKQNKLCCKIINELHCKINKILTRKKMEREGCE--AEDCEICPGKKKGV : 558
  
```

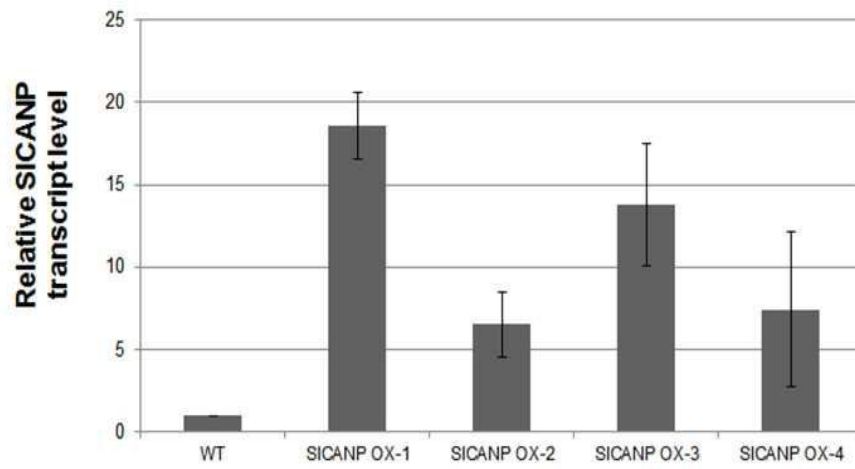
도면18



도면19



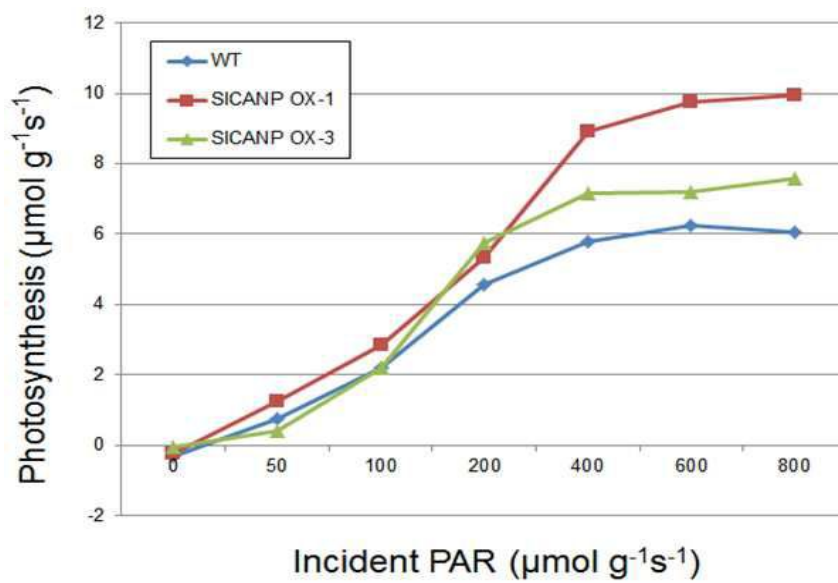
도면20



도면21



도면22



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Industry-Academia Cooperation Group Of Sejong University

<120> Method for increasing both photosynthetic rate and tolerance to drought and salt stresses in plants

<130> IP-2015-143

<150> KR10-2014-0119236

<151> 2014-09-05

<160> 57

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 585

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

Met Lys Pro Ser Lys Ser His His Lys Glu Lys Thr Ala Arg Arg Arg

1 5 10 15

Glu Glu Lys Leu Glu Glu Ser Asp Asn Pro Lys Tyr Arg Asp Arg Ala

20 25 30

Lys Glu Arg Arg Glu Asn Gln Asn Pro Asp Tyr Asp Pro Ser Glu Leu

35 40 45

Ser Ser Phe His Ala Val Ala Pro Pro Gly Ala Val Asp Ile Arg Ala

50 55 60

Ala Asp Ala Leu Lys Ile Ser Ile Glu Asn Ser Lys Tyr Leu Gly Gly

65 70 75 80

Asp Val Glu His Thr His Leu Val Lys Gly Leu Asp Tyr Ala Leu Leu

85 90 95

Asn Lys Val Arg Ser Glu Ile Val Lys Lys Pro Asp Gly Glu Asp Gly

100 105 110

Asp Gly Gly Lys Thr Ser Ala Pro Lys Glu Asp Gln Arg Val Thr Phe

115 120 125

Arg Thr Ile Ala Ala Lys Ser Val Tyr Gln Trp Ile Val Lys Pro Gln
130 135 140

Thr Ile Ile Lys Ser Asn Glu Met Phe Leu Pro Gly Arg Met Thr Phe
145 150 155 160

Val Tyr Asp Met Glu Gly Gly Tyr Thr His Asp Ile Pro Thr Thr Leu
165 170 175

Tyr Arg Ser Lys Ala Asp Cys Pro Val Pro Glu Glu Phe Val Thr Val
180 185 190

Asn Val Asp Gly Ser Val Leu Asp Arg Ile Ala Lys Ile Met Ser Tyr
195 200 205

Leu Arg Leu Gly Ser Ser Gly Lys Val Leu Lys Lys Lys Lys Lys Glu
210 215 220

Lys Asp Gly Lys Gly Lys Met Ser Thr Ile Ala Asn Asp Tyr Asp Glu
225 230 235 240

Asp Asp Asn Lys Ser Lys Ile Glu Asn Gly Ser Ser Val Asn Ile Ser
245 250 255

Asp Arg Glu Val Leu Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Gly Ile Asn
260 265 270

His Leu Asp Leu Ser Thr Lys Gln Glu Glu Pro Pro Val Ala Arg Thr
275 280 285

Asp Asp Asp Asp Ile Phe Val Gly Glu Gly Val Asp Tyr Thr Val Pro
290 295 300

Gly Lys Asp Val Thr Gln Ser Pro Ile Ser Glu Asp Met Glu Glu Ser
305 310 315 320

Pro Arg Asp Lys Glu Lys Val Ser Tyr Phe Asp Glu Pro Ala Tyr Gly
325 330 335

Pro Val Gln Glu Lys Val Pro Tyr Phe Ala Glu Pro Ala Tyr Gly Pro
340 345 350

Val Gln Pro Ser Ala Gly Gln Glu Trp Gln Asp Met Ser Ala Tyr Gly
355 360 365

Ala Met Gln Thr Gln Gly Leu Ala Pro Gly Tyr Pro Gly Glu Trp Gln

370 375 380
 Glu Tyr Gln Tyr Ala Glu Gln Thr Gly Tyr Gln Glu Gln Tyr Leu Gln
 385 390 395 400

Pro Gly Met Glu Gly Tyr Glu Val Gln Pro Glu Thr Asp Val Leu Leu
 405 410 415
 Asp Pro Gln Leu Met Ser Gln Glu Glu Lys Asp Arg Gly Leu Gly Ser
 420 425 430
 Val Phe Lys Arg Asp Asp Gln Arg Leu Gln Gln Leu Arg Glu Ser Asp
 435 440 445
 Ala Arg Glu Lys Asp Pro Thr Phe Val Ser Glu Ser Tyr Ser Glu Cys
 450 455 460

Tyr Pro Gly Tyr Gln Glu Tyr Asn His Glu Ile Val Gly Ser Asp Glu
 465 470 475 480
 Glu Pro Asp Leu Ser Lys Met Asp Met Gly Gly Lys Ala Lys Gly Gly
 485 490 495
 Leu His Arg Trp Asp Phe Glu Thr Glu Glu Glu Trp Glu Lys Tyr Asn
 500 505 510
 Glu Gln Lys Glu Ala Met Pro Lys Ala Ala Phe Gln Phe Gly Val Lys
 515 520 525

Met Gln Asp Gly Arg Lys Thr Arg Lys Gln Asn Arg Asp Arg Asp Gln
 530 535 540
 Lys Leu Asn Asn Glu Leu His Gln Ile Asn Lys Ile Leu Thr Arg Lys
 545 550 555 560
 Lys Met Glu Lys Glu Gly Gly Asp Val Ala Ser Leu Asp Ala Ala Glu
 565 570 575
 Ala Gln Thr Pro Lys Arg Ser Lys His
 580 585

<210> 2

<211> 556

<212> PRT

<213

> Oryza sativa

<400> 2

Met Ala Phe Lys Arg Glu Glu Lys Lys Glu Glu Pro Glu Thr Pro Arg

1 5 10 15

Tyr Arg Asp Arg Ala Lys Glu Arg Arg Glu Asp Gln Asn Pro Asp Tyr

20 25 30

Glu Pro Thr Glu Leu Gly Ser Phe His Ala Val Ala Pro Pro Gly Ala

35 40 45

Asp Leu Arg Leu Ala Asp Ala His Lys Ile Ser Ile Glu Lys Ser Lys

50 55 60

Tyr Leu Gly Gly Asp Leu Glu His Thr His Leu Val Lys Gly Leu Asp

65 70 75 80

Tyr Ala Leu Leu His Lys Val Arg Ser Glu Ile Glu Lys Lys Pro Glu

85 90 95

Ala Glu Asp Gly Lys Asp Thr Gln Ser Arg Ser Thr Lys Glu Asp Gln

100 105 110

Ala Val Ser Phe Arg Thr Ala Ala Ala Lys Ser Val Tyr Gln Trp Ile

115 120 125

Ile Lys Pro Gln Ser Ile Ile Lys Ser Asn Glu Met Phe Leu Pro Gly

130 135 140

Arg Met Ala Phe Ile Tyr Asn Met Glu Asp Gly Leu Thr Asn Asp Ile

145 150 155 160

Pro Thr Thr Leu His Arg Ser Lys Ala Asp Cys Ser Val Pro Glu Glu

165 170 175

Met Val Thr Val Ser Val Asp Gly Ser Val Leu Asp Arg Ile Ala Lys

180 185 190

Ile Met Ser Tyr Leu Arg Leu Gly Ser Ser Gly Lys Val Leu Lys Lys

195 200 205

Lys Lys Lys Glu Arg Asp Thr Lys Gly Lys Asn Ser Leu Ala Ser Gly

210 215 220

Asp Tyr Asp Glu Val Ala Arg Pro Gly Gln Thr Asn Gly Ser Ala Leu

225 230 235 240

Lys His Gln Phe Glu Lys Asp Met Pro Pro Pro Pro Pro Pro Arg Asn

245	250	255
Asn Asn Leu Ser Lys Asn Glu Lys Pro Ser Val Pro Val Ala Arg Ala		
260	265	270
Asp Glu Asp Asp Ile Phe Val Gly Asp Gly Val Asp Tyr Ser Val Pro		
275	280	285
Asn Lys Glu Met Ser Gln Ser Pro Val Ser Glu Asp Met Asp Glu Ser		
290	295	300
Pro His Asn His Gln Lys Gln Ser Tyr Phe Thr Glu Glu Lys Pro Ile		
305	310	315
		320
Tyr Gly Pro Ile Pro Pro Ser Asp Pro Ala Gln Ala Trp Pro Gln Pro		
325	330	335
Asn Ala Tyr Asp Ala Ile Gln Ala Gln Met Val Ala Ala Gly Tyr Gln		
340	345	350
Gly Glu Trp Ser Gly Tyr Gln Tyr Gly Glu Gln Gln Met Ala Tyr Pro		
355	360	365
Glu Gln Tyr Met Gln Gln Ser Ala Gln Asp Cys Asp Val Leu Ala Asp		
370	375	380
Pro Asn Ile Thr Gln Asp Pro Arg Leu Met Thr Gln Ala Asp Lys Asp		
385	390	395
Arg Gly Leu Gly Ser Val Phe Lys Arg Asp Asp Glu Arg Leu Lys Gln		
405	410	415
Leu Arg Glu Lys Asp Ala Arg Glu Lys Asp Pro Asn Phe Ile Ser Asp		
420	425	430
Ser Tyr Ser Glu Cys Tyr Pro Gly Tyr Gln Glu Tyr Asn His Glu Ile		
435	440	445
Ala Gly Ser Asp Glu Glu Asp Asp Leu Ser Lys Met Asp Met Gly Gly		
450	455	460
Arg Ala Lys Gly Arg Leu His Arg Trp Asp Phe Glu Thr Glu Glu Glu		
465	470	475
Trp Ala Thr Tyr Asn Asp Gln Lys Glu Ala Met Pro Lys Ala Ala Phe		
485	490	495

Gln Phe Gly Val Lys Met Gln Asp Gly Arg Lys Thr Arg Lys Gln Asn
500 505 510

Lys Asp Gln Lys Leu Thr Asn Asp Leu His Lys Ile Asn Lys Ile Leu
515 520 525

Ala Arg Lys Lys Gly Asp Lys Asp Gly Gly Asp Asp Gly Gly His Tyr
530 535 540

Asp Asp Asp Met Pro Ser Gly Lys Lys Gln Arg Ala
545 550 555

<210> 3

<211> 565

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 3

Met Ser Ser Lys Lys Asn Tyr Tyr Lys Glu Lys Leu Met Arg Arg Lys
1 5 10 15

Glu Glu Lys Lys Glu Glu Pro Glu Thr Pro Arg Tyr Arg Asp Arg Ala
20 25 30

Lys Glu Arg Arg Glu Asp Gln Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Thr Glu Leu
35 40 45

Gly Ser Phe His Ala Val Ala Pro Pro Gly Asn Asp Leu Arg Leu Ala
50 55 60

Asp Ala His Lys Ile Ser Ile Glu Lys Ser Lys Tyr Leu Gly Gly Asp
65 70 75 80

Leu Glu His Thr His Leu Val Lys Gly Leu Asp Tyr Ala Leu Leu His
85 90 95

Lys Val Arg Ser Glu Ile Glu Lys Lys Pro Glu Ala Glu Asp Gly Lys
100 105 110

Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Lys Glu Asp Gln Ala Val Ser Phe Arg
115 120 125

Thr Ala Thr Ala Lys Ser Val Tyr Gln Trp Ile Ile Lys Pro Gln Ser
130 135 140

Ile Ile Lys Glu Asn Glu Leu Phe Leu Pro Gly Arg Met Ser Phe Ile
 145 150 155 160
 Tyr Asn Met Glu Glu Gly Val Thr Asn Asp Ile Pro Thr Thr Leu His
 165 170 175
 Arg Ser Lys Ala Asp Cys Pro Val Pro Glu Glu Met Val Thr Val Ser
 180 185 190
 Val Asp Gly Ser Val Leu Glu Arg Ile Ala Lys Ile Met Thr Tyr Leu
 195 200 205

 Arg Leu Gly Ser Ser Gly Lys Val Leu Lys Lys Lys Lys Lys Glu Arg
 210 215 220
 Asp Ile Lys Gly Lys Ser Asn Leu Ala Ser Gly Asp Tyr Gly Glu Ser
 225 230 235 240
 Val Lys Pro Ser Gln Thr Asn Gly Ser Thr Leu Lys His Gln Ser Asp
 245 250 255
 Met Pro Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Arg Asn Asn Asn Phe Asn Gly
 260 265 270

 Lys Glu Lys Gln Pro Val Pro Val Ser Arg Glu Asp Asp Asp Asp Ile
 275 280 285
 Phe Val Gly Asp Gly Val Asp Tyr Leu Val Pro Asn Lys Glu Met Ser
 290 295 300
 Gln Ser Pro Val Ser Asp Met Asp Glu Ser Pro His Asn His Gln Lys
 305 310 315 320
 Gln Ser Asn Phe Thr Glu Pro Leu Tyr Gly Pro Val Pro Pro Ser Glu
 325 330 335

 Ser Ala Gln Ala Trp Gln Gln Pro Asn Thr Tyr Asp Ala Ala Val Gln
 340 345 350
 Ala Gln Met Ala Ala Ala Gly Tyr Gln Gly Asp Trp Ser Ser Tyr Val
 355 360 365
 Tyr Ala Glu Gln Gln Leu Gly Tyr Pro Glu Gln Tyr Val Gln Gln Ser
 370 375 380
 Thr Gln Glu Tyr Asp Val Leu Ala Asp Pro Ser Ile Ser Gln Asp Pro

385 390 395 400

Arg Phe Met Thr Gln Ala Asp Lys Asp Arg Gly Leu Gly Ser Val Phe

405 410 415

Lys Arg Asp Asp Gln Arg Leu Asn Gln Leu Arg Glu Lys Asp Ala Arg

420 425 430

Glu Arg Asp Pro Asn Phe Ile Ser Asp Ser Tyr Ser Glu Cys Tyr Pro

435 440 445

Gly Tyr Gln Glu Tyr Asn Asn Glu Ile Ala Gly Ser Asp Asp Glu Asp

450 455 460

Asp Leu Ser Lys Met Asp Met Gly Gly Arg Ala Lys Gly Arg Leu His

465 470 475 480

Arg Trp Asp Phe Glu Thr Glu Glu Glu Trp Ala Lys Tyr Asn Asp Gln

485 490 495

Lys Glu Ala Met Pro Lys Ala Ala Phe Gln Phe Gly Val Lys Met Gln

500 505 510

Asp Gly Arg Lys Thr Arg Lys Gln Asn Lys Asp Gln Lys Leu Thr Asn

515 520 525

Asp Leu His Lys Ile Asn Lys Ile Leu Ala Arg Lys Lys Gly Glu Lys

530 535 540

Asp Gly Ala Glu Asp Gly Gly His Tyr Asp Asp Asp Leu Pro Ser Ser

545 550 555 560

Lys Lys Gln Arg Gly

565

<210> 4

<211> 567

<212> PRT

<213> Glycine max

<400> 4

Met Thr Ala Ser Asn Lys Lys Asn Pro Lys Glu Lys Pro Ile Arg Arg

1 5 10 15

Lys Glu Glu Lys Pro Glu Glu Pro Glu Val Pro Lys Tyr Arg Asp Arg

20	25	30	
Ala Lys Glu Arg Arg Glu Asp Gln Asn Pro Asp Tyr Glu Gln Thr Glu			
35	40	45	
Leu Gly Phe His Ala Val Ala Pro Pro Gly Thr Val Asp Ile Arg Ser			
50	55	60	
Ser Asp Ala His Lys Leu Ser Ile Glu Lys Ser Lys Tyr Leu Gly Gly			
65	70	75	80
Asp Val Glu His Thr His Leu Val Lys Gly Leu Asp Tyr Ala Leu Leu			
85	90	95	
Asn Lys Val Arg Ser Glu Ile Asp Lys Lys Pro Glu Ala Gly Asp Asp			
100	105	110	
Val Glu Gly Lys Ser Arg Ser Ala Met Glu Asp Gln Gln Val Ser Ile			
115	120	125	
Arg Thr Ala Thr Ala Lys Ser Val Tyr Gln Trp Ile Val Lys Pro Gln			
130	135	140	
Thr Ile Ser Lys Thr Asn Glu Met Phe Leu Pro Gly Arg Met Thr Phe			
145	150	155	160
Ile Tyr Asn Met Glu Gly Gly Tyr His His Asp Ile Pro Thr Thr Leu			
165	170	175	
His Arg Ser Lys Ala Asp Cys Pro Val Pro Glu Glu Met Val Thr Val			
180	185	190	
Asn Val Asp Gly Ser Val Leu Asp Arg Ile Ala Lys Ile Met Ser Tyr			
195	200	205	
Leu Arg Leu Gly Ser Ser Gly Lys Ile Leu Lys Lys Lys Arg Lys Glu			
210	215	220	
Lys Asp Ala Lys Gly Lys Ile Leu Ala Val Gly Asn Gly Phe Asp Lys			
225	230	235	240
Glu Asp Lys Pro Ser Lys Val Glu Gly Gly Ala Lys Asn Gln Thr Glu			
245	250	255	
Lys Glu Ile Ile Leu Pro Pro Pro Pro Pro Ile Lys Lys Asn Pro Leu			
260	265	270	

His Ser Ile Glu Lys Gln Gly Pro Ala Val Ala Arg Ala Glu Asp Asp

275 280 285
Asp Ile Phe Val Gly Glu Gly Val Asp Tyr Asp Ile Pro Gly Lys Asp

290 295 300
Leu Ser Gln Ser Pro Val Ser Glu Asp Met Glu Glu Ser Pro Arg Asn
305 310 315 320

Lys Glu Lys Pro Ser Tyr Phe Thr Glu Pro Thr Tyr Gly Pro Val Gln
325 330 335
Pro Ser Met Val Pro Gln Gly Trp Gln Glu Thr Asn Gly Tyr Asp Val

340 345 350
Met Gln Thr Gln Ala Leu Ala Ala Gly Tyr Gln Gly Glu Trp Gln Glu
355 360 365

Tyr Gln Tyr Ala Glu Gln Leu Ala Tyr Pro Asp Gln Tyr Leu Gln Gln
370 375 380
Asn Met Gln Ala Tyr Asp Glu Gln Ala Asp Leu Asn Leu Pro Leu Asp

385 390 395 400
Pro Arg Phe Met Thr Gln Glu Glu Lys Asp Arg Gly Leu Gly Ser Val

405 410 415
Phe Lys Arg Asp Asp Gln Arg Leu Gln Gln Leu Arg Glu Lys Asp Ala
420 425 430

Arg Glu Lys Asp Pro Asn Phe Ile Ser Glu Ser Tyr Ser Glu Cys Tyr
435 440 445
Pro Gly Tyr Gln Glu Tyr Asn Arg Glu Ile Val Asp Ser Asp Asp Glu

450 455 460
Asp Asp Leu Ser Lys Met Asp Met Gly Gly Arg Ala Lys Gly Arg Leu

465 470 475 480
His Arg Trp Asp Phe Glu Thr Glu Glu Glu Trp Ala Thr Tyr Asn Glu
485 490 495

Gln Lys Glu Ala Met Pro Lys Ala Ala Phe Gln Phe Gly Val Lys Met
500 505 510
Gln Asp Gly Arg Lys Thr Arg Lys Gln Asn Lys Asp Gln Lys Leu Asn

515 520 525
 Asn Asp Leu His Lys Ile Asn Lys Ile Leu Ala Arg Lys Lys Met Glu

 530 535 540
 Lys Asp Thr Asn Gly Glu Gly Gly Asn His Tyr Asp Asp Glu Pro Thr
 545 550 555 560
 Pro Gly Lys Lys Leu Arg Ile
 565
 <210> 5
 <211> 558
 <212> PRT
 <213> Solanum tuberosum
 <400> 5
 Met Ser Ser Ser Lys Arg Asn His Lys Glu Lys Ile Val Arg Arg Asn
 1 5 10 15
 Lys Glu Glu Lys Val Glu Glu Pro Glu Leu Pro Lys Tyr Arg Asp Arg

 20 25 30
 Ala Lys Glu Arg Arg Glu Asp Gln Asn Pro Asp Tyr Glu Leu Thr Glu
 35 40 45
 Phe Gly Gly Phe His Ala Val Ala Pro Pro Gly Asn Val Asp Leu Leu
 50 55 60
 Ser Ala Asp Ala Gln Lys Leu Ser Ile Glu Lys Ser Lys Tyr Leu Gly
 65 70 75 80
 Gly Asp Val Glu His Thr His Leu Val Lys Gly Leu Asp Tyr Ala Leu

 85 90 95
 Leu His Lys Val Arg Ser Glu Ile Asp Lys Lys Pro Glu Ala Gly Asp
 100 105 110
 Glu Ala Phe Glu Gly Lys Pro Arg Gly Val Lys Glu Asp His Gln Leu
 115 120 125
 Ser Phe Arg Thr Ala Thr Ala Lys Ser Val Tyr Gln Trp Ile Ile Lys
 130 135 140
 Pro Gln Thr Val Ile Lys Thr Asn Glu Met Phe Leu Pro Gly Arg Met

145 150 155 160
 Ala Phe Ile Phe Asn Met Asp Ser Gly Tyr Ser Asn Asp Ile Pro Thr
 165 170 175
 Thr Leu His Arg Ser Lys Ala Asp Cys Pro Val Leu Glu Glu Met Val
 180 185 190
 Thr Val Ser Val Asp Gly Ser Val Leu Asp Arg Ile Ala Lys Ile Met
 195 200 205
 Ser Tyr Leu Arg Leu Gly Ser Ser Gly Lys Val Leu Lys Lys Lys Lys

 210 215 220
 Lys Glu Lys Asp Ser Lys Gly Lys Thr Val Ile Phe Asn Gly Tyr Asp
 225 230 235 240
 Glu Val Ser Lys Ser Asp Ala Ser Lys Ser Gln Ser Asp Lys Glu Thr
 245 250 255
 Val His Pro Ser Ala Gln Leu Pro Lys Lys Asn His Ser Glu Arg Arg
 260 265 270
 Glu Asp Gln Gly Pro Ala Val Ala Arg Thr Glu Glu Glu Asp Ile Phe

 275 280 285
 Ile Gly Glu Gly Val Asp Tyr Ser Val Pro Ala Gly Asp Met Gly Gln
 290 295 300
 Ser Pro Val Ser Glu Asp Met Glu Glu Ser Pro Arg Asn Lys Glu Arg
 305 310 315 320
 Thr Ser Tyr Phe Ser Glu Pro Ala Tyr Gly Pro Val Pro Pro Ser Glu
 325 330 335
 Pro Ser His Asp Trp Gln His Ala Asn Gly Tyr Asp Ala Val Gln Ala

 340 345 350
 Gln Ala Val Ala Gly Val Tyr Gln Pro Glu Trp Gln Asp Tyr Gln Tyr
 355 360 365
 Pro Glu Gln Val Ala Tyr Pro Glu Gln Tyr Leu Gln Gln Asn Tyr Asp
 370 375 380
 Met Gln Ala Gly Val Asp Gly Leu Gln Asp Pro Gln Phe Met Thr Gln
 385 390 395 400

Glu Glu Lys Asp Arg Gly Leu Gly Ser Val Phe Lys Arg Asp Asp Gln

405 410 415

Arg Leu Leu Gln Leu Arg Glu Arg Asp Ala Arg Glu Lys Asp Pro Asn

420 425 430

Phe Ile Ser Glu Ser Tyr Ser Glu Cys Tyr Pro Gly Tyr Gln Glu Tyr

435 440 445

Asn Arg Glu Val Val Asp Ser Asp Asp Glu Ala Asp Leu Ser Lys Met

450 455 460

Asp Met Gly Gly Arg Ala Lys Gly Arg Leu His Arg Trp Asp Phe Glu

465 470 475 480

Thr Glu Glu Glu Trp Ala Thr Tyr Asn Glu Gln Lys Glu Ala Met Pro

485 490 495

Lys Ala Ala Phe Gln Phe Gly Val Lys Met Gln Asp Gly Arg Lys Thr

500 505 510

Arg Lys Gln Asn Lys Asp Gln Lys Leu Thr Asn Glu Leu His Lys Ile

515 520 525

Asn Lys Ile Leu Thr Arg Lys Lys Met Glu Lys Asp Lys Gly Glu Ala

530 535 540

Leu Glu Asp Gly Glu Ile Gln Pro Gly Lys Lys Gln Arg Val

545 550 555

<210> 6

<211> 573

<212> PRT

<213> *Setaria italica*

<400> 6

Met Ser Ser Lys Lys Asn Tyr Tyr Lys Glu Lys Met Met Arg Arg Lys

1 5 10 15

Glu Glu Lys Lys Glu Glu Pro Glu Thr Pro Arg Tyr Arg Asp Arg Ala

20 25 30

Lys Glu Arg Arg Glu Asp Gln Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Thr Glu Leu

35 40 45

Gly Ser Phe His Ala Val Ala Pro Pro Gly Thr Asp Leu Arg Leu Ala
 50 55 60
 Asp Ala His Lys Ile Ser Ile Glu Lys Ser Lys Tyr Leu Gly Gly Asp
 65 70 75 80
 Leu Glu His Thr His Leu Val Lys Gly Leu Asp Tyr Ala Leu Leu His
 85 90 95

 Lys Val Arg Ser Glu Ile Asp Lys Lys Pro Asp Ala Glu Asp Gly Lys
 100 105 110
 Asp Ala Lys Ser Arg Ala Thr Lys Glu Asp Gln Ala Val Ser Phe Arg
 115 120 125
 Thr Ala Thr Ala Lys Ser Val Tyr Gln Trp Ile Ile Lys Pro Gln Ser
 130 135 140
 Ile Ile Lys Glu Asn Glu Leu Phe Leu Pro Gly Arg Met Ser Phe Ile
 145 150 155 160

 Tyr Asn Met Glu Glu Gly Phe Thr Asn Asp Ile Pro Thr Thr Leu His
 165 170 175
 Arg Ser Lys Ala Asp Cys Pro Val Pro Glu Glu Met Val Thr Val Ser
 180 185 190
 Val Asp Gly Ser Val Leu Asp Arg Ile Ala Lys Ile Met Thr Tyr Leu
 195 200 205
 Arg Leu Gly Ser Ser Gly Lys Val Leu Lys Lys Lys Lys Lys Glu Arg
 210 215 220

 Asp Thr Lys Gly Lys Asn Asn Leu Ala Ser Gly Asp Tyr Asp Glu Ala
 225 230 235 240
 Val Lys Pro Thr Gln Thr Asn Gly Ser Asp Leu Lys His Gln Ser Glu
 245 250 255
 Lys Asn Met Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Asn Asn Asn Ser
 260 265 270
 Asn Gly Lys Glu Lys Gln Ser Val Pro Leu Ala Arg Ala Asp Asn Asp
 275 280 285

 Asp Ile Phe Val Gly Asp Gly Val Asp Tyr Ser Val Pro Asn Lys Glu

290	295	300	
Met Ser Gln Ser Pro Val Ser Glu Asp Met Asp Glu Ser Pro His Asn			
305	310	315	320
His Gln Lys Gln Ser Tyr Phe Thr Glu Pro Met Tyr Gly Pro Val Pro			
	325	330	335
Pro Ser Glu Pro Ala Gln Ala Trp Gln Gln Pro Asn Gly Tyr Asp Ala			
	340	345	350
Val Gln Ala Gln Met Val Ala Ala Gly Tyr Gln Gly Asp Trp Ser Gly			
	355	360	365
Tyr Ala Tyr Ala Glu Gln Gln Leu Gly Tyr Pro Glu Gln Tyr Val Gln			
	370	375	380
Gln Ser Ile Gln Glu Tyr Asp Val Leu Ala Asp Pro Ser Ile Ala Gln			
385	390	395	400
Asp Pro Ser Ile Ala Gln Asp Pro Arg Phe Met Thr Gln Ala Asp Lys			
	405	410	415
Asp Arg Gly Leu Gly Ser Val Phe Lys Arg Asp Asp Gln Arg Leu Asn			
	420	425	430
Gln Leu Arg Glu Lys Asp Ala Arg Glu Lys Asp Pro Asn Phe Ile Ser			
	435	440	445
Asp Ser Tyr Ser Glu Cys Tyr Pro Gly Tyr Gln Glu Tyr His Asn Glu			
	450	455	460
Val Ala Gly Ser Asp Asp Glu Asp Asp Leu Ser Lys Met Asp Met Gly			
465	470	475	480
Gly Arg Ala Lys Gly Arg Leu His Arg Trp Asp Phe Glu Thr Glu Glu			
	485	490	495
Glu Trp Ala Lys Tyr Asn Asp Gln Lys Glu Ala Met Pro Lys Ala Ala			
	500	505	510
Phe Gln Phe Gly Val Lys Met Gln Asp Gly Arg Lys Thr Arg Lys Gln			
	515	520	525
Asn Lys Asp Gln Lys Leu Asn Asn Asp Leu His Lys Ile Asn Lys Ile			
	530	535	540

Leu Ala Arg Lys Lys Gly Glu Lys Asp Gly Thr Asp Asp Gly Gly His
545 550 555 560

Tyr Asp Asp Asp Leu Pro Ser Ala Lys Lys His Arg Gly
 565 570

<210> 7

<211> 558

<212> PRT

<213> Solanum lycopersicum

<400> 7

Met Ser Ser Ser Lys Arg Asn His Lys Glu Lys Ile Val Arg Arg Asn
1 5 10 15

Lys Glu Glu Lys Val Glu Glu Pro Glu Leu Pro Lys Tyr Arg Asp Arg

20 25 30

Ala Lys Glu Arg Arg Glu Asp Gln Asn Pro Asp Tyr Glu Leu Thr Glu

35 40 45

Phe Gly Gly Phe His Ala Val Ala Pro Pro Gly Asn Ile Asp Leu Leu

50 55 60

Ser Ala Asp Ala Gln Lys Leu Ser Ile Glu Lys Ser Lys Tyr Leu Gly

65 70 75 80

Gly Asp Val Glu His Thr His Leu Val Lys Gly Leu Asp Tyr Ala Leu

85 90 95

Leu His Lys Val Arg Ser Glu Ile Asp Lys Lys Pro Glu Thr Gly Asp

100 105 110

Glu Ala Leu Glu Gly Lys Ala Arg Gly Val Lys Glu Asp His Gln Leu

115 120 125

Ser Phe Arg Thr Ala Thr Ala Lys Ser Val Tyr Gln Trp Ile Ile Lys

130 135 140

Pro Gln Thr Val Ile Lys Thr Asn Glu Met Phe Leu Pro Gly Arg Met

145 150 155 160

Ala Phe Ile Phe Asn Met Asp Ser Gly Tyr Ser Asn Asp Ile Pro Thr

165 170 175

Thr Leu His Arg Ser Lys Ala Asp Cys Pro Val Leu Glu Glu Met Val

180	185	190	
Thr Val Ser Val Asp Gly Ser Val Leu Asp Arg Ile Ala Lys Ile Met			
195	200	205	
Ser Tyr Leu Arg Leu Gly Ser Ser Gly Lys Val Leu Lys Lys Lys Lys			
210	215	220	
Lys Glu Lys Asp Ser Lys Gly Lys Thr Val Ile Ser Asn Gly Tyr Asp			
225	230	235	240
Glu Val Leu Lys Ser Asp Ala Ser Lys Ser Gln Ile Asp Lys Glu Thr			
245	250	255	
Val His Pro Ser Ala Gln Leu Pro Lys Lys Asn His Ser Glu Arg Arg			
260	265	270	
Glu Val Gln Gly Pro Val Val Ala Arg Pro Glu Glu Glu Asp Ile Phe			
275	280	285	
Ile Gly Glu Gly Val Asp Tyr Ser Val Pro Ala Gly Asp Met Gly Gln			
290	295	300	
Ser Pro Val Ser Glu Asp Met Glu Glu Ser Pro Arg Asn Lys Glu Arg			
305	310	315	320
Thr Ser Tyr Phe Ser Glu Pro Ala Tyr Gly Pro Val Pro Pro Ser Glu			
325	330	335	
Pro Ser His Asp Trp Gln Tyr Thr Asn Gly Tyr Asp Ala Ala Gln Ala			
340	345	350	
Gln Ala Val Ala Gly Val Tyr Gln Pro Glu Trp Gln Asp Tyr Gln Tyr			
355	360	365	
Pro Glu Gln Val Ala Tyr Pro Glu Gln Tyr Leu Gln Gln Asn Tyr Asp			
370	375	380	
Met Gln Ala Asp Val Asp Gly Leu Gln Asp Pro Gln Phe Met Thr Gln			
385	390	395	400
Glu Glu Lys Asp Arg Gly Leu Gly Ser Val Phe Lys Arg Asp Asp Gln			
405	410	415	
Arg Leu Leu Gln Leu Arg Glu Arg Asp Ala Arg Glu Lys Asp Pro Asn			
420	425	430	

Phe Ile Ser Glu Ser Tyr Ser Glu Cys Tyr Pro Gly Tyr Gln Glu Tyr
 435 440 445
 Asn Arg Glu Val Val Asp Ser Asp Asp Glu Ala Asp Leu Ser Lys Met
 450 455 460
 Asp Met Gly Gly Arg Ala Lys Gly Arg Leu His Arg Trp Asp Phe Glu

 465 470 475 480
 Thr Glu Glu Glu Trp Ala Thr Tyr Asn Glu Gln Lys Glu Ala Met Pro
 485 490 495
 Lys Ala Ala Phe Gln Phe Gly Val Lys Met Gln Asp Gly Arg Lys Thr
 500 505 510
 Arg Lys Gln Asn Lys Asp Gln Lys Leu Thr Asn Glu Leu His Lys Ile
 515 520 525
 Asn Lys Ile Leu Thr Arg Lys Lys Met Glu Lys Asp Lys Gly Glu Ala

 530 535 540
 Leu Glu Asp Gly Glu Ile Gln Pro Gly Lys Lys Gln Arg Val
 545 550 555
 <210> 8
 <211> 561
 <212> PRT
 <213> Cucumis sativus
 <400> 8
 Met Ser Ser Ala Lys Lys His Tyr Lys Asp Lys Phe Ala Arg His Lys
 1 5 10 15
 Glu Glu Lys Thr Glu Glu Pro Glu Thr Pro Lys Tyr Arg Asp Arg Ala
 20 25 30

 Lys Glu Arg Arg Glu Asp Gln Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Thr Glu Leu
 35 40 45
 Gly Phe His Ala Val Ala Pro Pro Gly Thr Val Asp Ile Arg Ala Ala
 50 55 60
 Asp Ala His Lys Leu Ser Ile Glu Lys Ser Lys Tyr Leu Gly Gly Asp
 65 70 75 80
 Val Glu His Thr His Leu Val Lys Gly Leu Asp Tyr Ala Leu Leu Asn

85	90	95
Lys Val Arg Ser Glu Ile Asp Lys Lys Pro Asp Ala Val Gly Asp Ala		
100	105	110
Glu Gly Lys Ala Ser Ala Pro Lys Glu Asp Gln Gln Val Leu Phe Arg		
115	120	125
Thr Ala Thr Ala Lys Ser Val Tyr Lys Trp Ile Val Lys Pro Gln Thr		
130	135	140
Gly Ile Lys Ser Asn Glu Thr Phe Leu Pro Gly Arg Thr Ser Phe Ile		
145	150	155
		160
Tyr Asn Met Glu Gly Gly Tyr Ser His Asp Ile Pro Thr Thr Leu His		
165	170	175
Arg Ser Lys Ala Asp Cys Pro Val Pro Glu Glu Met Val Thr Val Asn		
180	185	190
Val Asp Gly Ser Val Leu Asp Arg Ile Ala Lys Ile Met Ser Tyr Leu		
195	200	205
Arg Leu Gly Ser Ser Gly Lys Val Leu Lys Lys Lys Lys Lys Asp Lys		
210	215	220
Asp Val Lys Gly Lys Ile Ser Ser Ile Val Asn Glu Tyr Val Gly Ile		
225	230	235
		240
Asn Lys Pro Ser Thr Leu Asp Thr Gly Val Pro Lys Lys Gln Met Glu		
245	250	255
Arg Glu Met Leu Pro Pro Pro Pro Pro Leu Lys Lys Asn Gln Ile Val		
260	265	270
Leu Lys Glu Lys Gln Gly Pro Val Val Thr Arg Val Glu Asp Asp Asp		
275	280	285
Ile Phe Val Gly Ala Gly Val Asp Tyr Thr Val Pro Gly Lys Asp Leu		
290	295	300
Ser Gln Ser Pro Leu Ser Glu Asp Met Glu Glu Ser Pro Arg Asn Lys		
305	310	315
		320
Glu Lys Pro Ser Tyr Phe Ser Glu Pro Ala Tyr Gly Pro Val Pro Pro		
325	330	335

Ser Gly Pro Pro Gln Glu Trp Gln Glu Thr Asn Gly Tyr Gly Val Met
340 345 350

Gln Pro Gln Ala Phe Pro Ala Gly Tyr Gln Gly Glu Trp Gln Asp Tyr
355 360 365

Gln Tyr Ser Glu Gln Leu Ala Tyr Ser Glu Gln Tyr Leu Gln Leu Asn
370 375 380

Met Gln Ala Tyr Asp Met Gln Thr Gly Ala Asn Ile Gln Gln Asp Pro
385 390 395 400

Arg Leu Met Thr Gln Glu Glu Lys Asp Arg Gly Leu Gly Ser Val Phe
405 410 415

Lys Arg Asp Asp Gln Arg Leu Gln Gln Leu Arg Glu Arg Asp Ala Arg
420 425 430

Glu Lys Asp Pro Asn Phe Ile Ser Glu Ser Tyr Ser Glu Cys Tyr Pro
435 440 445

Gly Tyr Gln Glu Tyr Asn Arg Glu Ile Val Asp Ser Asp Asp Glu Asp
450 455 460

Asp Leu Ser Lys Met Asp Met Gly Gly Arg Ala Lys Gly Arg Leu His
465 470 475 480

Arg Trp Asp Phe Glu Thr Glu Glu Glu Trp Ala Lys Tyr Asn Glu Gln
485 490 495

Lys Glu Ala Met Pro Lys Ala Ala Phe Gln Phe Gly Val Lys Met Gln
500 505 510

Asp Gly Arg Lys Thr Arg Lys Gln Asn Lys Asp Gln Lys Leu Asn Asn
515 520 525

Glu Leu His Lys Ile Asn Lys Ile Leu Ala Lys Lys Lys Met Glu Lys
530 535 540

Glu Met Asn Gly Asp Asp Glu Asp Ile Gln Pro Gly Lys Lys Ile Arg
545 550 555 560

Val

<210> 9

<211> 567

<212> PRT

<213> Vitis vinifera

<400> 9

Met Ala Ser Ser Lys Arg Asn His Lys Glu Lys Ile Ile Arg Arg Lys

1 5 10 15

Glu Glu Lys Pro Glu Glu Pro Glu Leu Pro Lys Tyr Arg Asp Arg Ala

20 25 30

Lys Glu Arg Arg Glu Asp Gln Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Thr Glu Leu

35 40 45

Gly Ser Phe His Ala Val Ala Pro Pro Gly Thr Val Asp Leu Arg Ser

50 55 60

Thr Asp Ala Asn Lys Ile Ser Ile Glu His Ser Lys Tyr Leu Gly Gly

65 70 75 80

Asp Val Glu His Thr His Leu Val Lys Gly Leu Asp Tyr Ala Leu Leu

85 90 95

His Lys Val Arg Ser Glu Ile Glu Lys Lys Pro Glu Val Gly Asp Asp

100 105 110

Ala Asp Gly Asn Lys Thr Ser Asn Pro Arg Lys Asp Gln Pro Leu Ser

115 120 125

Phe Arg Thr Ala Thr Ala Lys Ser Val Tyr Gln Trp Ile Val Lys Pro

130 135 140

Gln Thr Val Val Lys Ser Asn Glu Met Phe Leu Pro Gly Arg Met Ala

145 150 155 160

Phe Ile Phe Ser Met Glu Gly Gly Phe Ser Ser Asp Ile Pro Thr Thr

165 170 175

Leu His Arg Ser Lys Ala Asp Cys Pro Val Pro Glu Glu Met Val Thr

180 185 190

Val Gly Val Asp Gly Ser Val Leu Asp Arg Ile Ala Lys Ile Met Ser

195 200 205

Tyr Leu Arg Leu Gly Ser Ser Gly Lys Val Leu Lys Lys Lys Lys Lys

210 215 220

Glu Arg Asp Val Lys Gly Lys Ile Ser Thr Val Gly Asn Glu Phe Asp

225 230 235 240

Glu Glu Lys Lys Pro Ser Lys Leu Asp Gly Gly Met Ser Lys Asn Gln

245 250 255

Thr Glu Arg Glu Ser Leu Pro Pro Pro Leu Pro Pro Arg Lys Asn Tyr

260 265 270

Val Asp Ser Arg Glu Lys His Gly Pro Ser Val Ala Arg Ser Glu Gln

275 280 285

Asp Asp Ile Phe Val Gly Asp Gly Val Glu Tyr Asp Ile Pro Ser Lys

290 295 300

Asp Met Ser Gln Ser Pro Val Ser Glu Asp Met Glu Glu Ser Pro Arg

305 310 315 320

Asn Lys Glu Arg Ile Ser Tyr Leu Ser Glu Pro Ala Tyr Gly Pro Val

325 330 335

Pro Pro Ser Glu Pro Gln Glu Trp Gln Gln Thr Asn Gly Tyr Asp Ala

340 345 350

Met Gln Ala Gln Ala Leu Ala Ala Gly Tyr Gln Gly Asp Trp Gln Glu

355 360 365

Tyr Gln Tyr Ala Glu Gln Met Ala Tyr Pro Glu Gln Tyr Leu Gln Gln

370 375 380

Asn Met Gln Thr Tyr Asp Val Gln Ala Gly Met Gly Ile Pro Gln Asp

385 390 395 400

Pro Arg Phe Met Thr Gln Glu Glu Lys Asp Arg Gly Leu Gly Ser Val

405 410 415

Phe Lys Arg Asp Asp Gln Arg Leu Gln Gln Leu Arg Glu Lys Asp Ala

420 425 430

Arg Glu Lys Asp Pro Asn Phe Ile Ser Glu Ser Tyr Ser Glu Cys Tyr

435 440 445

Pro Gly Tyr Gln Glu Tyr Asn Arg Glu Val Val Asp Ser Asp Asp Glu

450 455 460

Asp Asp Leu Ser Lys Met Asp Met Gly Gly Arg Ala Lys Gly Arg Leu

465 470 475 480
His Arg Trp Asp Phe Glu Thr Glu Glu Glu Trp Ala Thr Tyr Asn Glu

 485 490 495
Gln Lys Glu Ala Met Pro Lys Ala Ala Phe Gln Phe Gly Val Lys Met

 500 505 510
Gln Asp Gly Arg Lys Thr Arg Lys Gln Asn Lys Asp Gln Lys Leu Thr

 515 520 525
Asn Glu Leu His Lys Ile Asn Lys Ile Leu Ala Arg Lys Lys Met Glu

 530 535 540
Lys Gly Glu Met Asn Asp Asp Gly Gly Arg Tyr Asp Asp Asp Ser Gln

545 550 555 560
Pro Gly Lys Lys Leu Arg Ile

565

<210> 10

<211> 567

<212> PRT

<213> *Fragaria vesca* subsp. *vesca*

<400> 10

Met Lys Ala Ser Lys Lys His Tyr Lys Asp Lys Val Val Arg Arg Lys

1 5 10 15

Asp Glu Lys Pro Glu Leu Pro Glu Leu Pro Lys Tyr Arg Asp Arg Ala

20 25 30

Lys Glu Arg Arg Asp Glu Lys Asn Pro Asp Tyr Glu Ala Asn Gln Leu

35 40 45

Gly Ser Phe His Ala Val Ala Pro Pro Gly Asn Val Asp Leu Gly Ala

50 55 60

Ala Asp Val His Lys Leu Ser Ile Glu Lys Ser Lys Tyr Leu Gly Gly

65 70 75 80

Asp Leu Glu His Thr His Leu Val Lys Gly Leu Asp Tyr Ala Leu Leu

85 90 95

Thr Lys Val Arg Ser Glu Met Asp Lys Lys Pro Asp Ala Gly Asp Asp

100	105	110	
Glu Gly Asp Ala Lys Ser Arg Ala Ser Lys Glu Asp Gln Lys Val Ser			
115	120	125	
Phe Arg Thr Ala Thr Ala Lys Ser Val Tyr Gln Trp Ile Val Lys Pro			
130	135	140	
Gln Thr Val Ile Lys Thr Asn Glu Met Phe Leu Pro Gly Arg Leu Ser			
145	150	155	160
Phe Ile Phe Asn Met Glu Gly Gly Tyr Thr His Asp Ile Pro Met Thr			
165	170	175	
Leu His Arg Ser Lys Ala Asp Cys Pro Gln Pro Glu Glu Met Ala Thr			
180	185	190	
Val Ser Phe Asp Gly Ala Val Leu Glu Lys Ile Ser Ala Ser Met Ser			
195	200	205	
Tyr Leu Arg Val Gly Ser Ser Gly Lys Ala Ala Lys Lys Lys Lys Lys			
210	215	220	
Gly Lys Asp Ala Lys Gly Lys Ile Ser Val Gly Asn Gly Tyr Ala Glu			
225	230	235	240
Glu Asp Lys Pro Ser Lys Pro Val Val Asp Val Ala Lys Asn Glu Thr			
245	250	255	
Lys Arg Glu Phe Leu Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro Arg Lys Ser Gln			
260	265	270	
Ile Asp Ser Asn Glu Lys Gln Gly Pro Thr Ile Ala Arg Ala Asp Glu			
275	280	285	
Asp Asp Ile Phe Val Gly Asp Gly Val Asp Tyr Ala Ile Pro Gly Lys			
290	295	300	
Asp Leu Ser His Ser Pro Leu Ser Glu Asp Met Glu Glu Ser Pro Arg			
305	310	315	320
Asn Lys Glu Lys Val Ser Tyr Phe Asp Glu Pro Ala Tyr Gly Pro Val			
325	330	335	
Gln Pro Gln Gly Leu Pro Asn Glu Trp Gln Glu Met Asn Gly Tyr Asp			
340	345	350	

Gly Thr Thr Gln Gln Pro Met Val Gly Pro Tyr Ser Gly Glu Trp Gln

355 360 365
Glu Tyr His Gln Tyr Thr Glu Gln Met Ala Tyr Pro Glu Gln Tyr Leu

370 375 380
Gln Pro Asn Met Glu Gly Tyr Asp Val Gln Glu Gly Pro Thr Ile Gln
385 390 395 400

Asp Pro Arg Phe Met Thr Gln Glu Glu Lys Asp Arg Gly Leu Gly Ser
405 410 415
Val Phe Lys Arg Asp Asp Gln Arg Leu Gln Gln Leu Arg Glu Lys Asp

420 425 430
Ala Arg Glu Lys Asp Pro Asn Phe Ile Ser Glu Ser Tyr Ser Glu Cys

435 440 445
Tyr Pro Gly Tyr Gln Glu Tyr Asn Arg Glu Val Val Asp Ser Asp Asp
450 455 460

Glu Asp Asp Leu Ser Lys Met Asp Met Gly Gly Arg Ala Lys Gly Arg
465 470 475 480
Leu His Arg Trp Asp Phe Glu Thr Glu Glu Glu Trp Ala Thr Tyr Asn

485 490 495
Glu Gln Lys Glu Ala Met Pro Lys Ala Ala Phe Gln Phe Gly Val Lys

500 505 510
Met Gln Asp Gly Arg Lys Thr Arg Lys Gln Asn Lys Asp Gln Lys Ile
515 520 525

Ser Asn Asp Leu Asn Arg Ile Asn Lys Ile Leu Ala Arg Lys Lys Ser
530 535 540
Glu Lys Asp Gly Asp Asp Gly Gly Gly His Tyr Asp Glu Asp Val Gln

545 550 555 560
Pro Gly Lys Lys Leu Arg Val

565

<210> 11

<211> 569

<212> PRT

<213> Citrus sinensis

<400> 11

Met Thr Ser Gly Lys Lys Tyr Tyr Lys Glu Lys Ile Ala Arg Arg Lys

1 5 10 15

Asp Glu Lys Pro Glu Glu Pro Glu Gln Pro Lys Tyr Arg Asp Arg Ala

20 25 30

Lys Glu Arg Arg Glu Asp Gln Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Thr Glu Leu

35 40 45

Gly Ser Phe His Ala Val Ala Pro Pro Gly Asn Val Asp Leu Arg Leu

50 55 60

Ala Asp Ala Gln Lys Leu Ser Ile Glu Lys Ser Lys Tyr Leu Gly Gly

65 70 75 80

Asp Val Glu His Thr His Leu Val Lys Gly Leu Asp Tyr Ala Leu Leu

85 90 95

Asn Lys Val Arg Ser Glu Ile Asp Lys Lys Pro Asp Ala Gly Asp Asp

100 105 110

Thr Asp Gly Lys Ser Arg Thr Ser Lys Glu Asp Gln Gln Leu Ser Phe

115 120 125

Arg Thr Ala Met Ala Lys Ser Val Tyr Gln Trp Ile Val Lys Pro Gln

130 135 140

Thr Val Met Lys Thr Asn Glu Met Phe Leu Pro Gly Arg Met Ser Phe

145 150 155 160

Ile Phe Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Ser Asn Asp Ile Pro Thr Thr Leu

165 170 175

His Arg Ser Lys Ala Asp Cys Pro Val Pro Asp Glu Met Val Thr Val

180 185 190

Ser Val Asp Gly Ser Val Leu Asp Arg Ile Ala Lys Ile Met Thr Tyr

195 200 205

Leu Arg Leu Gly Ser Ser Gly Lys Val Leu Lys Lys Lys Lys Lys Glu

210 215 220

Arg Asp Val Lys Val Thr Gly Lys Thr Ser Thr Val Val Asn Glu Tyr

225 230 235 240
 Asp Glu Glu Asp Lys Pro Ser Lys Ala Asn Ser Gly Ile Pro Asn Gly
 245 250 255
 Lys Thr Glu Lys Glu Ile Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Lys Lys
 260 265 270
 Asn His Val Asp Ser Arg Glu Lys Gln Gly Pro Ile Val Ala Arg Ser
 275 280 285
 Glu Glu Asp Asp Ile Phe Val Gly Ala Gly Thr Asp Tyr Thr Val Pro

 290 295 300
 Gly Lys Asp Met Asn Gln Ser Pro Val Ser Glu Asp Met Glu Glu Ser
 305 310 315 320
 Pro Arg Asn Lys Glu Lys Val Ser Tyr Phe Ser Glu Ser Val Tyr Gly
 325 330 335
 Pro Val Pro Pro Ala Glu Pro Pro Leu Ala Trp Gln Asp Thr Asn Gly
 340 345 350
 Tyr Asp Ala Met Gln Ala Gln Ala Leu Ala Gly Gly Tyr Gln Gly Glu

 355 360 365
 Trp Gln Asp Tyr Gln Tyr Ala Glu Gln Leu Ala Tyr Pro Glu Gln Tyr
 370 375 380
 Leu Gln Pro Asp Met Gln Thr Tyr Glu Met Gln Ala Gly Leu Asn Met
 385 390 395 400
 Pro Gln Asp Pro Arg Phe Met Thr Gln Glu Glu Lys Asp Arg Gly Leu
 405 410 415
 Gly Ser Val Phe Lys Arg Asp Asp Gln Arg Leu Gln Gln Leu Arg Glu

 420 425 430
 Lys Asp Ala Arg Glu Lys Asp Pro Asn Phe Ile Ser Glu Ser Tyr Ser
 435 440 445
 Glu Cys Tyr Pro Gly Tyr Gln Glu Tyr Asn Arg Glu Ile Val Asp Ser
 450 455 460
 Asp Asp Glu Asp Asp Leu Ser Lys Met Asp Met Gly Gly Arg Ala Lys
 465 470 475 480

Gly Arg Leu His Arg Trp Asp Phe Glu Thr Glu Glu Glu Trp Ala Thr

485 490 495

Tyr Asn Glu Gln Lys Glu Ala Met Pro Lys Ala Ala Phe Gln Phe Gly

500 505 510

Val Lys Met Gln Asp Gly Arg Lys Thr Arg Lys Gln Asn Lys Asp Gln

515 520 525

Lys Leu Thr Asn Glu Leu His Lys Ile Asn Lys Ile Leu Ala Arg Lys

530 535 540

Lys Met Glu Lys Asp Thr Asn Gly Glu Gly Gly His Tyr Asp Asp Asp

545 550 555 560

Val Gln Pro Gly Lys Lys Pro Arg Val

565

<210> 12

<211> 574

<212> PRT

<213> Prunus persica

<400> 12

Met Thr Ser Ser Lys Lys His His Lys Glu Lys Val Ile Arg Arg Lys

1 5 10 15

Glu Glu Lys Ala Glu Gln Pro Glu Leu Pro Lys Tyr Arg Asp Arg Ala

20 25 30

Lys Glu Arg Arg Glu Asp Gln Asn Pro Asp Tyr Glu Gln Thr Glu Leu

35 40 45

Gly Ser Phe His Ala Val Ala Pro Pro Gly Asn Val Asp Leu Arg Ala

50 55 60

Ala Glu Ala Gln Lys Leu Ser Ile Glu Lys Ser Lys Tyr Leu Gly Gly

65 70 75 80

Asp Val Glu His Thr His Leu Val Lys Gly Leu Asp Tyr Ala Leu Leu

85 90 95

Asn Lys Ile Arg Ser Glu Ile Asp Lys Lys Pro Asp Ala Glu Asp Glu

100 105 110

Ala Asp Ala Lys Ser Arg Ala Ser Lys Glu Asp Gln Lys Leu Ser Phe
115 120 125

Arg Thr Ala Thr Ala Lys Ser Val Tyr Gln Cys Ile Val Lys Pro Gln
130 135 140

Ala Val Ile Lys Thr Asn Glu Met Phe Leu Pro Gly Arg Met Ser Phe
145 150 155 160

Ile Phe Asn Met Glu Gly Gly Tyr Thr His Asp Ile Pro Thr Thr Leu
165 170 175

His Arg Ser Lys Ala Asp Cys Pro Gln Pro Glu Glu Met Val Thr Val
180 185 190

Ser Val Asp Gly Ser Val Leu Asp Arg Ile Ala Lys Ile Met Ser Tyr
195 200 205

Leu Arg Leu Gly Ser Ser Gly Lys Val Leu Lys Lys Lys Lys Lys Glu
210 215 220

Lys Asp Ala Lys Gly Lys Ile Ser Ile Ile Gly Asn Glu Phe Val Glu
225 230 235 240

Glu Asp Lys Pro Ser Lys Pro Asp Ala Gly Thr Ser Lys Asn Glu Thr
245 250 255

Lys Arg Glu Ile Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gly Pro Pro
260 265 270

Pro Arg Lys Asn His Ile Asp Ser Lys Ala Gln Gln Gly Pro Thr Met
275 280 285

Ala Arg Ala Asp Glu Asp Asp Ile Phe Val Gly Asp Gly Val Asp Tyr
290 295 300

Ala Ile Pro Gly Lys Asp Leu Ser Gln Ser Pro Leu Ser Glu Asp Met
305 310 315 320

Glu Glu Ser Pro Arg Asn Lys Glu Lys Val Ser Tyr Phe Asp Glu Pro
325 330 335

Val Tyr Gly Pro Val Gln Pro Tyr Gly Ala Pro Gln Glu Trp Gln Glu
340 345 350

Thr Asn Gly Tyr Asp Ala Thr Gln Thr Gln Met Ala Gly Ala Tyr Gln

355 360 365
 Gly Glu Trp Pro Ala Glu Tyr Gln Tyr Ala Glu Gln Met Ala Tyr Pro
 370 375 380
 Glu Gln Tyr Leu Gln Pro Asn Met Glu Gly Tyr Asp Val Glu Ala Gly
 385 390 395 400
 Leu Asn Ile Gln Asp Pro Arg Phe Met Thr Gln Glu Glu Lys Asp Arg
 405 410 415
 Gly Leu Gly Ser Val Phe Lys Arg Asp Asp Gln Arg Leu Gln Gln Leu

420 425 430
 Arg Glu Lys Asp Ala Arg Glu Lys Asp Pro Asn Phe Ile Ser Glu Ser
 435 440 445
 Tyr Ser Glu Cys Tyr Pro Gly Tyr Gln Glu Tyr Asn Arg Glu Ile Val
 450 455 460
 Asp Ser Asp Asp Glu Asp Asp Leu Ser Lys Met Asp Met Gly Gly Arg
 465 470 475 480
 Ala Lys Gly Arg Leu His Arg Trp Asp Phe Glu Thr Glu Glu Glu Trp

485 490 495
 Ala Thr Tyr Asn Glu Gln Lys Glu Ala Met Pro Lys Ala Ala Phe Gln
 500 505 510
 Phe Gly Val Lys Met Gln Asp Gly Arg Lys Thr Arg Lys Gln Asn Lys
 515 520 525
 Asp Gln Lys Ile Thr Asn Asp Leu His Lys Ile Asn Lys Ile Leu Ala
 530 535 540
 Arg Lys Lys Met Asp Lys Asp Ile Asp Gly Glu Gly Gly Gly Gly Gly

545 550 555 560
 His Tyr Asp Asp Asp Val Gln Pro Gly Lys Lys Leu Arg Val
 565 570

<210> 13

<211> 569

<212> PRT

<213> Theobroma cacao

<400> 13

Met Ser Ser Ser Lys Lys Tyr Tyr Lys Glu Lys Ile Ala Arg Arg Lys
1 5 10 15
Glu Glu Lys Ala Glu Glu Pro Glu Gln Pro Lys Tyr Arg Asp Arg Ala
20 25 30
Lys Glu Arg Arg Glu Asp Gln Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Thr Glu Leu
35 40 45
Gly Ser Phe His Ala Val Ala Pro Pro Gly Thr Val Asp Leu Arg Ser
50 55 60
Ala Asp Ala His Lys Ile Ser Ile Glu Lys Ser Lys Tyr Leu Gly Gly
65 70 75 80
Asp Val Glu His Thr His Leu Val Lys Gly Leu Asp Tyr Ala Leu Leu
85 90 95
Asn Lys Val Arg Ser Glu Ile Asp Lys Lys Pro Asp Ala Gly Glu Asp
100 105 110
Gly Asp Gly Lys Ser Arg Lys Ser Lys Glu Asp Gln Gln Ile Ser Phe
115 120 125
Arg Thr Ala Thr Ala Lys Ser Val Tyr Gln Trp Ile Val Lys Pro Gln
130 135 140
Thr Val Met Lys Thr Asn Glu Met Phe Leu Pro Gly Arg Met Ala Phe
145 150 155 160
Ile Phe Asn Met Glu Gly Gly Tyr Ser Asn Asp Ile Pro Thr Thr Leu
165 170 175
His Arg Ser Lys Ala Asp Cys Pro Val Pro Asp Glu Met Val Thr Val
180 185 190
Ser Val Asp Gly Ser Val Leu Asp Arg Ile Ala Lys Ile Leu Ser Tyr
195 200 205
Leu Arg Leu Gly Ser Ser Gly Lys Val Leu Lys Lys Lys Lys Lys Glu
210 215 220
Arg Asp Ala Lys Gly Lys Val Leu Ala Leu Gly Asn Glu Tyr Asp Glu
225 230 235 240
Glu Asp Lys Pro Ser Lys Pro Asn Gly Gly Met Ser Asn Gly Arg Thr

245	250	255
Glu Lys Glu Ile Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Arg Lys Asn Tyr		
260	265	270
Leu Asp Ser Arg Glu Lys Gln Gly Pro Thr Val Ala Arg Ala Glu Glu		
275	280	285
Asp Asp Ile Phe Val Gly Asp Gly Ile Asp Tyr Asp Ser Pro Arg Lys		
290	295	300
Asp Met Asn Pro Ser Pro Leu Ser Glu Asp Met Glu Glu Ser Pro Arg		
305	310	315
His Lys Glu Arg Val Ser Tyr Phe Ala Glu Pro Ala Tyr Gly Pro Val		
325	330	335
Gln Pro Ser Ala Ala Pro Gln Glu Trp Gln Glu Leu Ser Gly Tyr Asp		
340	345	350
Ala Leu Gln Thr Gln Ala Leu Ala Gly Gly Tyr Gln Gly Glu Trp Gln		
355	360	365
Asp Tyr Gln Tyr Thr Glu Gln Met Ala Tyr Pro Glu Gln Tyr Leu Gln		
370	375	380
Ala Asn Met Gln Gly Tyr Asp Val Gln Ala Gly Leu Asn Ile Pro Gln		
385	390	395
Asp Pro Arg Phe Met Thr Gln Glu Glu Lys Asp Arg Gly Leu Gly Ser		
405	410	415
Val Phe Lys Arg Asp Asp Gln Arg Leu Gln Gln Leu Arg Glu Lys Asp		
420	425	430
Ala Arg Glu Lys Asp Pro Asn Phe Ile Ser Glu Ser Tyr Ser Glu Cys		
435	440	445
Tyr Pro Gly Tyr Gln Glu Tyr Asn Arg Glu Ile Val Asp Ser Asp Asp		
450	455	460
Glu Asp Asp Leu Ser Lys Met Asp Met Gly Gly Arg Ala Lys Gly Arg		
465	470	475
Leu His Arg Trp Asp Phe Glu Thr Glu Glu Glu Trp Ala Thr Tyr Asn		
485	490	495

Glu Gln Lys Glu Ala Met Pro Lys Ala Ala Phe Gln Phe Gly Val Lys
500 505 510

Met Gln Asp Gly Arg Lys Thr Arg Lys Gln Asn Lys Asp Gln Lys Leu
515 520 525

Asn Asn Glu Leu His Lys Ile Asn Lys Ile Leu Ala Arg Lys Lys Met
530 535 540

Glu Lys Asp Ser Gly Gly Glu Gly Gly His His Asn Asp Asp Val Gln
545 550 555 560
Pro Gly Lys Lys Leu Arg Ile Ser Gly
565

<210> 14

<211> 19

<212> PRT

<213> Conserved sequences in plant

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> X = E or D

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X = D or E

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> X = Q or K

<220><221> MISC_FEATURE

<222>

> (17)..(17)

<223> X = E or D

<400> 14

Pro Lys Tyr Arg Asp Arg Ala Lys Xaa Xaa Xaa Glu Asn Gln Asn Pro
1 5 10 15
Xaa Tyr Asp

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> conserved sequences in plant

<400> 15

Phe His Ala Val Ala Pro Pro Gly

1 5

<210> 16

<211> 39

<212> PRT

<213> conserved sequences in plant

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> X = K, N or H

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> X = N, H or T

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (36)..(36)

<223> X = D, E or V

<400> 16

Lys Ile Ser Ile Glu Xaa Ser Lys Tyr Leu Gly Gly Asp Val Glu His

1 5 10 15

Thr His Leu Val Lys Gly Leu Asp Tyr Ala Leu Leu Xaa Lys Val Arg

20 25 30

Ser Glu Ile Xaa Lys Lys Pro

35

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213>

> conserved sequences in plant

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> X = Q or K

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)
 <223> X = W or C
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> X = V or I
 <400> 17
 Ala Lys Ser Val Tyr Xaa Xaa Trp Xaa Val Lys Pro Gln
 1 5 10
 <210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> conserved sequences in plant
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X = S, T or E
 <220><221> MISC_FEATURE

 <222> (5)..(5)
 <223> X = M, T or L
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> X = M, T or L
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> X = T, A or S
 <400> 18
 Lys Xaa Asn Glu Xaa Phe Leu Pro Gly Arg Xaa Xaa Phe Val Tyr
 1 5 10 15
 <210> 19
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> conserved sequences in plant
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> X = T or M

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> X = H or Y

<400> 19

Asp Ile Pro Xaa Thr Leu Xaa Arg Ser Lys Ala Asp Cys

1 5 10

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> conserved sequences in plant

<400> 20

Met Ser Tyr Leu Arg Leu Gly Ser Ser

1 5

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> conserved sequences in plant

<400> 21

Tyr Ser Glu Cys Tyr Pro Gly Tyr Gln Glu Tyr Asn

1 5 10

<210> 22

<211> 27

<212> PRT

<213>

> conserved sequence in plant

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> X = R or G

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> X = A or E

<400> 22

Asp Leu Ser Lys Met Asp Met Gly Gly Lys Ala Lys Gly Xaa Leu His

1 5 10 15

Arg Trp Asp Phe Xaa Thr Glu Glu Glu Trp Glu

20 25

<210> 23

<211> 28

<212> PRT

<213> conserved sequences in plant

<400> 23

Gln Lys Glu Ala Met Pro Lys Ala Ala Phe Gln Phe Gly Val Lys Met

1 5 10 15

Gln Asp Gly Arg Lys Thr Arg Lys Gln Asn Arg Asp

20 25

<210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> conserved sequences in plant

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> X = N, T or S

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> X = E or D

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> X = H or N

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> X = K, Q or R

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> X = A or T

<400> 24

Gln Lys Leu Xaa Asn Xaa Leu Xaa Xaa Ile Asn Lys Ile Leu Xaa Arg

1 5 10 15

Lys Lys

<210> 25

<211> 29

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> CANP-1 primer

<400> 25

taagaattca atgaaacctt caaaatcgc 29

<210> 26

<211> 28

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> CANP-2 primer

<400> 26

gatgtcgact caatgcttgg atctctta 28

<210> 27

<211> 29

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> CANP-5 primer

<400> 27

taatctagaa tgaaaccttc aaaatcgca 29

<210> 28

<211> 29

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> CANP-6 primer

<400> 28

tttggatcca tgcttggatc tcttaggag 29

<210> 29
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> CANP-10 primer
 <400> 29
 tttggatcct caatgcttgg atctcttag 29
 <210> 30
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> CANP-11 primer
 <400> 30
 aaatctagaa tgcgtgctaa agaaagaag 29
 <210> 31
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> CANP-12 primer
 <400> 31
 taagaattca tgaaaccttc aaaatcgca 29

 <210> 32
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> CANP-17 primer
 <400> 32
 ttttctagat caatgcttgg atctcttag 29
 <210> 33
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> CANPP-1 primer
 <400> 33

actaagcttc ttggtgataa ggattcaat	29
<210> 34	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220><223> CANP-PF primer	
<400> 34	
actaagcttc ttggtgataa ggattcaat	29
<210> 35	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220><223> CANP-PR primer	
<400> 35	
ataggatcct agatttcgtt aattcgatt	29
<210> 36	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220><223> CIPK1-2 primer	
<400> 36	
ttagtcgacc taagttacta tctcttgct	29
<210> 37	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220><223> CIPK1-14 primer	
<400> 37	
atatctagaa tggtgagaag gcaagagga	29
<210> 38	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	

<220><223> CIPK1-23 primer
 <400> 38
 tttggatcca gttactatct cttgctccg 29
 <210> 39
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> CIPK1-15 primer
 <400> 39
 atagaattca tggtagagaag gcaagagga 29
 <210> 40
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> CBL1-7 primer
 <400> 40
 atagcggccg caatgggctg cttccactc 29
 <210> 41
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> CBL1-8 primer
 <400> 41
 taaagatctt catgtggcaa tctcatcga 29
 <210> 42
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> CBL9-3 primer
 <400> 42
 ttttctagaa tgggttggtt ccattccac 29
 <210> 43
 <211> 29
 <212> DNA

<213> artificial sequence
 <220><223> CBL9-4 primer
 <400> 43
 aaaggatcct cacgtcgcaa tctcgcca 29

 <210> 44
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> CBL9-5 primer
 <400> 44
 ttagcggcgcg caatgggttg ttccattc 29
 <210> 45
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> CBL9-6 primer
 <400> 45
 tttagatctt cacgtcgcaa tctcgcca 29
 <210> 46
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> CANP-RT5 primer
 <400> 46
 tcagtttacc agtggattgt taagc 25

 <210> 47
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> CANP-RT3 primer
 <400> 47
 tccccgacga cccaaggcga agata 25
 <210> 48

<211> 25
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> RD29A-RT1 primer
 <400> 48
 caacacacac cagcagcacc cagaa 25
 <210> 49
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> RD29A-RT2 primer
 <400> 49
 cttcaggttc tagctcgtca tcatac 25

 <210> 50
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> RD29B-RT1 primer
 <400> 50
 accaatcaga attcaccatc cagaa 25
 <210> 51
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> RD29B-RT2 primer
 <400> 51
 gtttcaccgt tacaccacct ctca 24
 <210> 52
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> RD22-RT1 primer
 <400> 52

ctgtcttctt ggttcattca tggta 25

<210> 53

<211> 25

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> RD22-RT2 primer

<400> 53

tccacgcgta cacctccctt tccaa 25

<210> 54

<211> 25

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> actin2-1 primer

<400> 54

gagatcacgcg ctcttgacc tagca 25

<210> 55

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> actin2-2 primer

<400> 55

ttcctgtgaa caatcgatgg acct 24

<210> 56

<211> 29

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> SICANP-1 primer

<400> 56

ataactagta tgtcttcttc aaagcgaaa 29

<210> 57

<211> 29

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> SICANP-2 primer

<400> 57

tttgagctct catacacgct gcttctttc

29