(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0044100
(43) 공개일자 2011년04월28일

(51) Int. Cl.
C12N 15/31 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0100932
(22) 출원일자 2009년10월22일
심사청구일자 2009년10월22일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
황병국
서울특별시 서초구 서초1동 1641-1 서초삼성래미안 Apt 103동1405호
김낙현
서울특별시 서대문구 영천동 삼호아파트 105동 603호
(74) 대리인
김선애

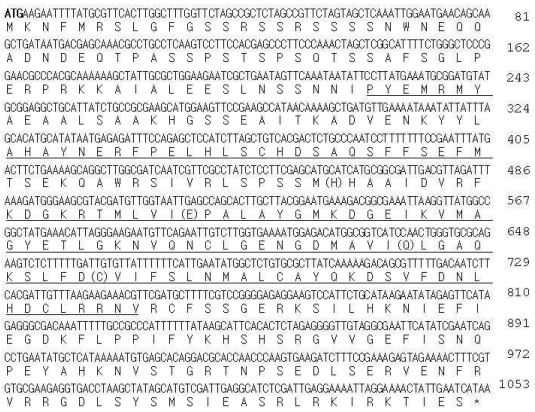
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 고추 식물의 저항성 및 토마토 식물의 감수성을 유도하는 에이브이알비에스티 유전자 및 이를 도입한 형질전환 세균

(57) 요 약

본 발명은 고추 세균성 점무늬병 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균주인 Bv5-4a 균주로부터 유래한 에이브이알비에스티 (*avrBsT*) 유전자, 상기 유전자로 형질전환된 비병원성 Ds1 균주 및 상기 균주를 이용하여 고추 식물의 저항성 및 토마토 식물의 감수성을 유도하는 방법을 제공한다. 상기한 본 발명에 의하면, 병원균 유래 물질인 AvrBsT 단백질이 저항성 품종의 친환경 육종의 재료로서 이용될 수 있고, 식물병 저항성 및 감수성의 탐색을 촉진할 수 있는 이점이 있다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

세균성 점무늬병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) 균주 Bv5-4a 유래의 비병원성 관련 에이브이알 비에스티 단백질을 코딩하는 하기 (a) 또는 (b)의 분리된 유전자(*avrBsT*):

(a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 유전자;

(b) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자.

청구항 2

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 단백질(AvrBsT).

청구항 3

제1항 기재의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 4

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

청구항 5

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

청구항 6

제1항 기재의 *avrBsT* 유전자를 pBBR1MCS-2 벡터에 삽입시켜 제조한 재조합벡터 pBBR1MCS-2:*avrBsT*.

청구항 7

제1항 기재의 유전자에 의해 형질전환된 세균성 점무늬병균 균주 Ds1.

청구항 8

제6항 기재의 재조합 벡터에 의해 형질전환된 세균성 점무늬병균 균주 Ds1 (avrBsT)(KACC91485P).

청구항 9

제8항 기재의 상기 Ds1 (avrBsT) 균주를 고추 식물체에 접종하여 병저항성을 유도하는 식물체의 병저항성 유도 방법.

청구항 10

제8항 기재의 상기 Ds1 (avrBsT) 균주를 토마토 식물체에 접종하여 병감수성을 유도하는 식물체의 병감수성 유도 방법.

청구항 11

제8항 기재의 Ds1 (avrBsT) 균주를 식물체에 처리한 후, 식물체 내의 세균 생장률 측정 단계, 전해질 측정에 의한 세포사멸 측정 단계, 아닐린 블루 염색 (aniline blue) 확인 단계, 댑염색 {DAB (3,3'-diaminobenzidine) staining} 확인 단계, 트리판 블루 염색 (trypan blue staining) 확인 단계, 및 저항성 유전자의 차별적 발현 확인 단계 중 하나 이상의 단계를 포함하여 구성되는, 식물체의 병저항성 또는 병감수성 유발 판별방법.

청구항 12

제1항 기재의 *avrBsT*가 도입된 *avrBsT:8cMyc* 플라스미드를 pBIN35S에 삽입시켜 제조한 재조합벡터 pBIN35S:*avrBsT:8cMyc*.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 고추 식물의 저항성 및 토마토 식물의 감수성을 유도하는 에이브이알비에스티 유전자 및 이를 도입한 형질전환 세균에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 본 발명은 고추 세균성 점무늬병 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균주인 Bv5-4a 균주로부터 유래한 에이브이알비에스티 (*avrBsT*) 유전자, 상기 유전자로 형질전환된 비병원성 Ds1 균주 및 상기 균주를 이용하여 고추 식물의 저항성 및 토마토 식물의 감수성을 유도하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 고추와 토마토는 대표적인 가지과 작물로 우리 식생활에 가장 많이 사용되는 채소류이며 이들 작물에서는 바이러스병, 세균병, 진균병 등이 다양하게 보고되어 있으며, 이러한 병을 방제하기 위해 지금까지는 농약을 이용한 화학적 방제법이 주로 사용되어 왔다. 그러나 농약의 과다한 사용으로 인해 생태계가 파괴되고 환경오염에 관한 관심이 증대되면서 농약 사용에 대한 규제가 강화되고 있는 실정이다. 이에 반하여 전통적 육종이나 분자 육종 방법으로 병저항성 작물을 개발하여 재배하는 것이 가장 환경친화적이고 경제적인 작물병 방제 방법이다. 특히 병원미생물 유래 유전자나 식물유래 병저항성 유전자를 고품질 작물에 도입시켜서 생명공학적으로 형질전환 병저항성 작물 개발은 지속 가능한 농업 (sustainable agriculture)을 위해 절실하게 필요하다.

[0003] 식물 병원성 세균은 식물체 감염시 여러 가지 병생성인자를 이용하여 식물체를 가해한다. 특히 이 중에서 타입 쓰리 시크리션 시스템 (type III secretion system)을 통하여 분비하는 이펙터 (effector) 단백질들이 병저항성과 병 생성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이런 이펙터를 식물체가 능동적으로 인식하면 감염된 부위는 과민성반응 (hypersensitive response)에 의해 세포사멸이 일어나고, 식물체의 나머지 부위에는 저항성 신호가 전달되어 전신획득 저항성이 형성된다. 이렇게 형성된 전신획득 저항성은 넓은 범위의 병원균에 대해 저항성을 나타내므로 이 현상을 촉발하는 병원균과 식물체의 인자를 탐색하고 그 기능을 밝혀내는 것이 식물체의 방어기작을 이해하고 저항성 품종 육종에 기여할 수 있게 된다.

[0004]

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0005] 본 발명은 이와 같은 종래기술상의 과제를 해결하기 위한 것으로서, 본 발명의 목적은, 세균성 점무늬병 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대한 방어 (저항성) 반응에 관여하는 것으로 알려진 세균의 비병원성 단백질의 하나인 에이브이알비에스티 (*avrBsT*) 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 서열정보 및 그에 따른 아미노산 서열정보를 제공하는 것이다.

[0006] 또한, 본 발명의 목적은 상기 유전자를 병원성 균주인 Ds1 균주에 도입하여 Ds1 균주와 동질 (isogenic)이나 비병원성인 균주를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 균주를 이용하여 고추 식물의 저항성 및 토마토 식물의 감수성을 유도하는 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제 해결수단

[0009] 본 발명의 상기 목적은, 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대한 방어반응에 관여하는 세균의 비병원성 단백질의 하나인 에이브이알비에스티(*avrBsT*) 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 염기서열 정보 및 그에 따른 아미노산 서열정보를 결정하고, 상기 유전자를 병원성 균주인 Ds1 균주에 도입하여 Ds1

균주와 동질 (isogenic)이나 비병원성인 균주를 제작하여 *avrBsT* 유전자의 식물병 저항성 또는 감수성 유도 기능을 확인하여 달성하였다.

[0010] 따라서 본 발명은 세균성 점무늬병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) 균주 Bv5-4a 유래의 비병원성 관련 에이브이알비에스티 단백질을 코딩하는 (a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 분리된 유전자 또는 (b) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 유전자(*avrBsT*)를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 단백질(AvrBsT)을 제공한다.

[0012] 나아가 본 발명은 상기 유전자를 이용하여 제조한 재조합 벡터 및 상기 유전자가 과발현된 형질전환 식물체를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 제1항 기재의 유전자에 의해 형질전환된 세균성 점무늬병균 균주 Ds1를 제공한다. 상기 Ds1 균주는 상기 *avrBsT* 유전자를 pBBR1MCS-2 벡터에 삽입시켜 제조한 재조합벡터 pBBR1MCS-2:*avrBsT*.에 의해 형질전환된 세균성 점무늬병 균주 Ds1 (avrBsT)(KACC91485P)일 수 있다.

[0014] 나아가 본 발명은 상기 Ds1 (avrBsT) 균주를 고추 식물체에 접종하여 병저항성을 유도하는 식물체의 병저항성 유도 방법을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 Ds1 (avrBsT) 균주를 토마토 식물체에 접종하여 병감수성을 유도하는 식물체의 병감수성 유도 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명은 Ds1 (avrBsT) 균주를 식물체에 처리한 후, 식물체 내의 세균 생장률 측정 단계, 전해질 측정에 의한 세포사멸 측정 단계, 아닐린 블루 염색 (aniline blue) 확인 단계, 댑염색 {DAB (3,3'-diaminobenzidine) staining} 확인 단계, 트리판 블루 염색 (trypan blue staining) 확인 단계, 및 저항성 유전자의 차별적 발현 확인 단계 중 하나 이상의 단계를 포함하여 구성되는, 식물체의 병저항성 또는 병감수성 유발 판별방법을 제공한다.

[0017] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다.

[0018] 먼저, 본 발명은 세균성 점무늬병균의 비병원성균주 Bv5-4a로부터 *avrBsT*를 분리하여 클로닝하여 염기서열을 해독함으로써, *avrBsT*로 명명된 세균의 비병원성 단백질 코딩 유전자 염기서열(서열번호 1) 및 그로부터 코딩되는 아미노산 서열(서열번호 2)을 제공한다(도 1 참조).

[0019] 보다 구체적으로 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) 균주 Bv5-4a를 이용하여 PCR (Polymerase Chain Reaction) 증폭함으로써 *avrBsT* DNA를 증폭하여 클론을 수득하였다. 수득된 클론을 해독(Sequencing)한 후, 블라스트 프로그램을 이용하여 그 5'-말단 서열을 GenBank에 등록된 유전자 데이터베이스와 비교함으로써 AvrBsT 단백질 코딩 유전자를 확인하고 에이브이알비에스티(*avrBsT*) 유전자로 명명하였다. AvrBsT 단백질의 아미노산 서열을 분석한 결과 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 균주 75-3의 AvrBsT 단백질 (accession no. AAD39255)와 아미노산 수준에서 99 % 상동성을 나타내었다. (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, protein blast program). 확인된 *avrBsT*의 유전자 염기서열과 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 도 1에 나타내었고 75-3 균주의 AvrBsT와 본 발명에서 분리된 AvrBsT의 차이는 도 2에 나타내었다. 본 발명에서 분리된 AvrBsT는 기존의 AvrBsT의 아미노산 서열 90번 아스파라진과 91번 아스팔틱산이 90번 라이신 그리고 91번 히스티딘으로 바뀐 형태로 나타났다. 그러므로 본 발명에서 분리된 AvrBsT는 Genbank 데이터베이스에 유일성을 인정받아 accession 번호 GQ266402를 부여받은 바 있다 (현재 비공개 상태).

[0020] 다음에, 본 발명은, 상기의 *avrBsT* 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 병원성 균주인 Ds1에 형질전환하여 동질균주이나 비병원성인 균주를 제공하여 식물의 병저항성 생성여부를 확인함으로써 새로운 육종 재료를 제공한다. 본 발명에 실시예에서는 상기 *avrBsT* 유전자를 pBBR1MCS-2(참고문헌 1: Michael E. Kovach et al., Gene, 166 (1995) 175-176) 벡터에 삽입시켜 제조한 재조합벡터 pBBR1MCS-2:*avrBsT*에 의해 형질전환된 세균성 점무늬병 균주 Ds1 (avrBsT)를 제작하여 상기 균주가 정상적으로 AvrBsT 단백질을 발현하고 분비하는지를 확인하고(도 3 참조), 국립농업과학원 농업유전자원센터에 기탁하고 수탁번호 KACC91485P를 받았다.

[0021] 본 발명에 의한 Ds1 (avrBsT) 균주는 고추 식물에 접종시 고추식물의 병저항성을 유도하며, AvrBsT 단백질이 비병원성 인자임이 확인되었다 (도 4 내지 도 9 참조).

[0022] 또한, 본 발명은 상기 *avrBsT* 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 *avrBsT* 유전자가 과발현된 형질전환 고추 식물의 식물병 저항성 생성여부를 확인함으로써 새로운 병저항성 형질전환 식물체 및 저항성 분자 육종의 재료를 제공할 수 있다. 보다 구체적으로 본 발명에 의한 *avrBsT* 유전자를 포함하는 재조합 벡터(pBIN35S::*avrBsT*)를 고추 식물에 과발현시켜 저항성 반응을 확인할 수 있었다. (도 10 내지 도 13 참조).

[0023] 본 발명에 의한 Ds1 (avrBsT) 균주는 토마토 식물에 접종시 토마토 식물의 병감수성을 유도하며, AvrBsT 단백질이 병원성 인자로 확인되었다 (도 14 내지 도 19 참조).

[0024] 다음에, 본 발명은 Ds1 (avrBsT) 균주를 식물체에 처리한 후, 식물체 내의 세균 생장률 측정 단계, 전해질 측정에 의한 세포사멸 측정 단계, 아닐린 블루 염색 (aniline blue) 확인 단계, 댑염색 {DAB (3,3'-diaminobenzidine) staining} 확인 단계, 트리판 블루 염색 (trypan blue staining) 확인 단계, 및 저항성 유전자의 차별적 발현 확인 단계 중 하나 이상의 단계를 포함하여 구성되는, 식물체의 병저항성 또는 병감수성 유발 판별방법을 제공한다.

[0025] 상술한 바와 같이 본 발명은 상기 Ds1 (avrBsT) 균주가 고추 식물에서 병저항성을 유발함을 확인하여, 병원균 유래 물질인 AvrBsT 단백질을 이용한 저항성 품종 육종의 친환경 재료로서 제공될 수 있다. 특히 고추에서 Ds1 균주와 Ds1 (avrBsT)를 이용하면 AvrBsT에 의한 과민성반응 유도가 일어나 저항성 반응이 뚜렷하여 고추 저항성 유전자 발굴과 저항성 신호전달 체계를 연구하고 이를 이용한 저항성 품종 육종에 이용될 수 있다. 또한 토마토 식물에서는 상기 균주가 병감수성을 유도하는 것을 토대로 본 발명이 토마토 식물의 육종에도 이용 가능함을 확인할 수 있었다.

효 과

[0026] 상술한 바와 같이, 본 발명이 완성됨으로써, 세균성 점무늬병 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대한 방어 (저항성) 반응에 관여하는 세균의 비병원성 단백질의 하나인 에이브이알비에스티 (*avrBsT*) 유전자 및 상기 유전자를 병원성 균주인 Ds1 균주에 도입하여 Ds1 균주와 동질성이 절대적으로 높으나 비병원성인 균주를 제공하여, 보다 정확한 대조군 설정을 가능케 하여 식물체의 병저항성 탐색방법을 제공할 뿐 아니라 저항성 식물 육종 및 형질전환 식물체 제작에 기여하는 효과를 도모할 수 있게 되었다.

[0027] 따라서 본 발명은 친환경 병저항성 식물체의 육종을 위한 재료를 제공할 수 있어 저항성 품종 개발을 촉진할 수 있는 효과가 있으므로 식물 육종 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0028] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0029] **[실시예 1] *avrBsT* 유전자의 염기/아미노산 서열 결정**

[0030] 고추 세균성 점무늬병의 비병원성 관련 단백질 중 하나인 에이브이알비에스티 (*avrBsT*) 단백질 코딩 유전자 염기서열 및 그로부터 추론되는 아미노산 서열을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

[0031] 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) 균주 Bv5-4a를 이용하여 PCR (Polymerase Chain Reaction) 증폭함으로써 *avrBsT* DNA를 증폭하여 클론을 수득하였다. 수득된 클론을 해독(Sequencing)한 후, 블라스트 프로그램을 이용하여 그 5'-말단 서열을 GenBank에 등록된 유전자 데이터베이스와 비교함으로써 AvrBsT 단백질 코딩 유전자를 확인하고 에이브이알비에스티(*avrBsT*) 유전자로 명명하였다. AvrBsT 단백질의 아미노산 서열을 분석한 결과 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 균주 75-3의 AvrBsT 단백질 (accession no. AAD39255)와 아미노산 수준에서 99 % 상동성을 나타내었다. (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, protein blast program). 확인된 *avrBsT*의 유전자 염기서열과 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 도 1에 나타내었고 75-3 균주의 AvrBsT와 본 발명에서 분리된 AvrBsT의 차이는 도 2에 나타내었다. 본 발명에서 분리된 AvrBsT는 기존의 AvrBsT의 아미노산 서열 90번 아스파라진과 91번 아스팔틱산이 90번 라이신 그리고 91번 히스티딘으로 바뀐 형태로 나타났다. 그러므로 본 발명에서 분리된 AvrBsT는 Genbank 데이터베이스에 유일성

을 인정받아 accession 번호 GQ266402를 부여받은 바 있다 (현재 비공개 상태).

[0032] **[실시예 2] *avrBsT* 유전자를 병원성 균주 Ds1에 형질전환**

[0033] 상기 실시예 1에서 수득한 *avrBsT* 유전자를 병원성 균주 Ds1에 형질전환 하여 비병원성 유도 기능을 다음과 같이 시험하였다.

[0034] **[단계 1]**

[0035] 먼저 실시예 1에서 수득한 *avrBsT* 유전자를 pBBR1MCS-2 벡터(참고문헌 1: Michael E. Kovach et al., Gene, 166 (1995) 175-176)에 도입시켜 pBBR1MCS-2:*avrBsT*를 제조한 후 재조합 벡터인 pBBR1MCS-2:*avrBsT*을 고추 세균성 점무늬병균의 균주 Ds1(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strain Ds1)에 전기천공법(electroporation)을 통하여 도입하여 형질전환된 Ds1 균주 {Ds1 (*avrBsT*)}를 제작하였다.

[0036] 상기 Ds1 (*avrBsT*) 균주가 정상적으로 AvrBsT 단백질을 발현하고 분비하는지 알아보기 위해, 세균을 배양한 뒤 세균과 배양액을 분리하여 각각 단백질을 추출하였다. AvrBsT 3'-말단에 Cmyc 에피톱 염기서열을 추가하였기 때문에 이를 통하여 검출이 가능하므로 추출한 단백질을 12% SDS-PAGE 젤에서 단백질을 전기영동하여 PVDF 멤브레인으로 트랜스퍼 하여 Cmyc 단백질에 대한 항체로 웨스턴 블롯을 수행하였다(참고문헌 2: LUCIA ESCOLAR et al., MOLECULAR PLANT PATHOLOGY (2001) 2 (5), 287 - 296). 또한 세포내에만 존재하는 단백질을 검출하기 위하여 NptII에 대한 항체 (U.S. Biological Corp.)로 웨스턴 블롯을 수행하였다(참고문헌 3: Fangming Xiao et al., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 282, NO. 42, pp. 30737-30744, October 19, 2007). 상기 웨스턴 블롯의 결과를 도 3에 나타내었다. 웨스턴 블롯 결과 AvrBsT는 정상적으로 발현되고 분비되었다 (도 3).

[0037] **[실시예 3] Ds1 (*avrBsT*) 균주에 의한 고추식물의 병저항성 유도**

[0038] 본 발명의 Ds1 (*avrBsT*) 균주가 고추식물의 병저항성을 유도하고 AvrBsT 단백질이 비병원성 인자임을 확인하기 위하여, 하기와 같은 시험을 수행하였다.

[0039] **[단계 1]**

[0040] 고추 녹광 품종에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 균주 Ds1과 Ds1 (EV: empty vector), Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a를 $5x10^4$ cfu ml^{-1} 의 농도로 접종한 후 0, 3, 6, 9일에 감염 식물조직에서의 세균 생장을 측정하였고 17일 후 병징을 관찰하였다. Ds1과 Ds1 (EV) 균주는 병원력이 강하여 급격한 세균 성장률을 보였고, 비병원성인 Bv5-4a 균주는 가장 낮은 세균 성장률을 보였다. Ds1 (*avrBsT*) 균주의 경우 AvrBsT 단백질의 도입으로 인하여 병원력이 감소하여 Ds1 또는 Ds1 (EV) 균주보다 세균 생장이 낮은 것으로 나타났다 (도 5). Ds1과 Ds1 (EV) 균주는 접종 후 17일 후 점무늬 병징을 유발하였으나 Ds1 (*avrBsT*)나 Bv5-4a 균주는 병징을 일으키지 않았다 (도 4).

[0041] **[단계 2]**

[0042] 고추 녹광 품종에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 균주 Ds1과 Ds1 (EV), Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a를 $5x10^7$ cfu ml^{-1} 로 접종하여 접종 이후 48시간 후에 병징을 관찰하고, 0, 12, 24, 36시간 후에 잎조직에서 유출되는 전해질을 검출하여 세포사멸 정도를 측정하였다. 접종 이후 48시간에 Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a 균주는 세포사멸을 일으켰고 이는 자외선을 조사한 잎을 관찰하였을 때 더욱 극명히 드러났다 (도 6). Ds1과 Ds1 (EV) 균주는 세포사멸을 일으키지 않았다. 접종 후에 잎조직에서 유출되는 전해질을 측정해 본 결과 Bv5-4a 균주는 12시간 이후부터, Ds1 (*avrBsT*) 균주는 24시간 이후부터 세포사멸을 유도하였다 (도 7).

[0043] **[단계 3]**

[0044] 상기와 같은 농도로 Ds1과 Ds1 (EV), Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a 균주를 접종하고 식물체의 변화를 관찰하였다. 접종 후 12시간 후에 아닐린 블루 염색 (aniline blue)을 수행하여 세포벽 보강 물질인 캘로스(callose) 축적 여부를 확인하였다. 접종 후 24시간 후에 댑염색 {DAB (3,3'-diaminobenzidine) staining}을 수행하여 활성산소 축적여부를 확인하였다. 그리고 36시간 후에 트리판 블루 염색 (trypan blue staining) 수행하여 세포사멸 정도를 비교하였다. Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a 균주는 병저항성을 유도하여 캘로스 (callose)와 활성산소 축적이 활발

하였다. 그리고 Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a 균주는 세포사멸을 일으킨 것을 확인할 수 있었다 (도 8).

[0045] **[단계 4]**

[0046] 상기와 같은 농도로 Ds1과 Ds1 (EV), Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a 균주를 접종하고 고추 잎에서 저항성 관련 유전자의 발현을 관찰하기 위해, 식물을 수거하여 RNA를 추출하고 리얼타임 피시알 (real-time PCR)을 수행하였다. 병저항성 관련 유전자로 보고된 *CaBPR1*(참고문헌 4: Hyong Woo Choi et al., Plant Physiology, November 2007, Vol. 145, pp. 890-904), 활성산소를 생성하여 세포사멸을 일으키는 *CaPO2*(참고문헌 4), 전신획득 저항성의 마커 유전자로 보고된 *CaSAR82A*(참고문헌 4) 그리고 병저항성과 자스몬산(jasmoic acid)과 연관되어 있다고 보고된 *CaDEF1*(참고문헌 4) 유전자의 발현 수준을 비교하였다. Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a 균주의 경우 모든 저항성 관련 유전자들의 발현을 큰 폭으로 유도하였다 (도 9).

[0047] **[실시예 4] *avrBsT* 유전자 과발현에 의한 고추 식물의 활성산소 축적 및 세포사멸**

[0048] 고추식물에서 *avrBsT* 유전자가 과발현 되었을 때 활성산소 생성 및 세포사멸을 유도함을 확인하기 위하여, 실시예 1에서 수득한 *avrBsT* 유전자를 Stratagene에서 제공하는 pBIN35S 벡터에 도입시켜 pBIN35S:*avrBsT*을 제조한 후 이렇게 제조된 재조합 벡터인 pBIN35S:*avrBsT*를 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101)에 전기천공법(electroporation)을 통하여 도입하고 이를 고추 잎에 접종하여 AvrBsT를 과다 발현하는 고추식물의 활성산소 축적과 세포사멸을 확인하였다.

[0049] **[단계 1]**

[0050] *avrBsT*를 과발현하는 재조합벡터 (35S:*avrBsT*)와 *avrBsT*를 과발현하지 않는 대조구 벡터 (35S:00)를 이용하여 형질전환 시킨 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101)를 배양한 뒤 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 균주현탁액 농도를 흡광도(optical density) 600 (OD_{600})에서 1.0, 0.5, 0.1로 맞추고 이를 고추 잎의 엽맥을 경계로 하여 각각 접종하였다. 그 결과 접종 5일째, *avrBsT*를 과발현하는 아그로박테리움(*Agrobacterium*)을 접종한 부위에서 세포사멸이 일어나는 것을 관찰할 수 있었다 (도 10).

[0051] **[단계 2]**

[0052] 세포 사멸을 측정하기 위하여 상기의 균을 균주현탁액 농도 1.0으로 고추 잎에 접종한 후 0, 1, 2, 3일 후에 유출되는 전해질을 검출하여 세포사멸 정도를 측정하였다. *AvrBsT*가 과발현된 경우 2일후부터 세포사멸이 유도되었다 (도 11).

[0053] **[단계 3]**

[0054] 상기 실험에서 AvrBsT 단백질이 정상적으로 형성되었음을 확인하기 위하여, 상기의 균을 균주현탁액 농도 1.0으로 고추 잎에 접종한 후 1, 2일 후에 잎을 수거하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질을 12% SDS-PAGE 젤에서 단백질을 전기영동하여 PVDF 멤브레인으로 트랜스퍼 하여 Cmyc 단백질에 대한 항체로 웨스턴 블롯을 수행하였다. AvrBsT는 정상적으로 발현되는 것이 확인 되었다 (도 12).

[0055] **[단계 4]**

[0056] 상기의 균을 균주현탁액 농도 1.0으로 접종 후 3일째 병저항성의 신호전달 물질로 알려진 활성산소의 발생량을 알아보기 위해, 댑 염색{3,3'-diaminobenzidine(DAB) staining}을 수행하였고 그 결과를 도 13에 나타내었다. 그 결과, *AvrBsT*가 과발현된 경우 활성산소가 축적되는 것을 확인하였다 (도 13).

[0057] **[실시예 5] Ds1 (*avrBsT*) 균주에 의한 토마토 식물의 병감수성 유도**

[0058] 본 발명의 Ds1 (*avrBsT*) 균주가 토마토 식물의 병감수성을 유도하고 AvrBsT 단백질이 병원성 인자임을 확인하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

[0059] **[단계 1]**

[0060] 토마토 선명 품종에 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 균주 Ds1과 Ds1 (EV), Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a를 $5x10^4$ cfu ml^{-1} 의 농도로 접종한 후 0, 3, 6, 9일에 감염 식물조직에서의 세균 생장을 측정하였고 14일 후 병징을 관찰하였다. Bv5-4a 균주는 가장 병원력이 강하여 급격한 세균 성장률을 보였고, Ds1

(*avrBsT*) 균주는 AvrBsT 단백질의 도입으로 인하여 병원력이 증가하여 Ds1과 Ds1 (EV) 균주보다 더 높은 세균 성장률을 보였다 (도 15). Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a 균주는 접종 후 14일 후 황화 병징을 유발하였으나 Ds1과 Ds1 (EV) 균주는 병징을 일으키지 않았다(도 14).

[0061] **[단계 2]**

[0062] 토마토 "선명" 품종에 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 균주 Ds1과 Ds1 (EV), Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a를 $5x10^{7}$ cfu ml^{-1} 로 접종하여 48시간 후에 병징을 관찰하고, 0, 24, 48, 72시간 후에 잎조직에서 유출되는 전해질을 검출하여 세포사멸 정도를 측정하였다. 접종 후 48시간에 자외선을 조사한 잎을 관찰한 결과 모든 균주에서 페놀화합물(phenolic compound)의 집적이 일어나는 것을 확인하였다. 그 중에서도 Ds1과 Ds1 (EV) 균주에서 페놀화합물(phenolic compound)의 집적이 가장 컸다 (도 16). 접종 후에 잎조직에서 유출되는 전해질을 측정해 본 결과 Ds1과 Ds1 (EV) 균주는 72시간 이후부터 세포사멸을 유도하였으나 Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a 균주는 세포사멸을 억제하였다 (도 17).

[0063] **[단계 3]**

[0064] 상기와 같은 농도로 Ds1과 Ds1 (EV), Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a 균주를 접종하고 식물체의 변화를 관찰하였다. 접종 후 12시간 후에 아닐린 블루 염색 (aniline blue), 24시간 후에 갭염색 {DAB (3,3'-diaminobenzidine) staining}, 그리고 36시간 후에 트리판 블루 염색 (trypan blue staining) 수행하였다. Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a 균주는 병감수성을 유도하여 캘로스 (callose) 축적량이 Ds1과 Ds1 (EV) 균주보다 적었다. 모든 균주에서 활성산소 축적이나 세포사멸의 흔적은 관찰되지 않았다 (도 18).

[0065] **[단계 4]**

[0066] 상기와 같은 농도로 Ds1과 Ds1 (EV), Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a 균주를 접종하고 토마토 잎에서 저항성 관련 유전자의 발현을 관찰하기 위해, 잎조직을 수거하여 RNA를 추출하고 리얼타임 피시알 (real-time PCR)을 수행하였다. 병저항성 관련 유전자로 보고된 *Senu4* (PR1)(참고문헌 5: Seastien Cunnac et al., The Plant Cell, Vol. 19: 688-705, February 2007), *Chi17* (PR3)(참고문헌 5), *Cevi16* (peroxidase)(참고문헌 6: Jose Gadea et al., MPMI Vol. 9, No. 5, 1996, pp. 409-415), *Tgas118* (defensin)(참고문헌 7: K.J.P.T. van den Heuvel et al., Journal of Experimental Botany, Vol. 52, No. 1427-1436, July 2001) 유전자의 발현 수준을 비교하였다. Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a 균주의 경우 *Senu4* (PR1), *Chi17* (PR3) 유전자의 발현을 지속적으로 억제하였고, 접종 후 48시간까지 *Cevi16* (peroxidase)의 발현을 억제하였다. *Tgas118* (defensin) 유전자의 경우 모든 균주에서 큰 차이를 보이지 않았다 (도 19).

[0067] **[실시예 6] *avrBsT* 유전자 과발현에 의한 토마토 식물의 활성산소 미축적 및 세포사멸 억제**

[0068] 토마토 식물에서 *avrBsT* 유전자가 과발현 되었을 때 활성산소 생성 및 세포사멸을 억제함을 확인하기 위하여, 실시예 4에서 사용한 방법을 통하여 AvrBsT를 과다 발현하는 토마토 식물의 활성산소 축적과 세포사멸을 확인하였다.

[0069] **[단계 1]**

[0070] *avrBsT*를 과발현하는 재조합벡터 (35S:*avrBsT*)와 *avrBsT*를 과발현하지 않는 대조구 벡터 (35S:00)를 이용하여 형질전환 시킨 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101)를 배양한 뒤 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 균주현탁액 농도를 흡광도(optical density) 600 (OD_{600})에서 1.0, 0.5, 0.1로 맞추고 이를 토마토 잎의 엽맥을 경계로 하여 각각 접종하였다. 접종 5일째, *avrBsT*를 과발현하는 아그로박테리움(*Agrobacterium*)을 접종한 부위에서 세포사멸이 일어나는 것을 관찰할 수 없었다 (도 20).

[0071] **[단계 2]**

[0072] 세포 사멸을 측정하기 위하여 상기의 균을 균주현탁액 농도 1.0으로 토마토 잎에 접종한 후 0, 1, 2, 3일 후에 유출되는 전해질을 검출하여 세포사멸 정도를 측정하였다. *AvrBsT*가 과발현된 경우에도 세포사멸이 유도되지 않았다 (도 21).

[0073] **[단계 3]**

[0074] 상기 실험에서 AvrBsT 단백질이 정상적으로 형성되었음을 확인하기 위하여 상기의 균을 균주현탁액 농도 1.0으

로 토마토 잎에 접종한 후 1, 2일 후에 잎을 수거하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질을 12% SDS-PAGE 젤에서 단백질을 전기영동하여 PVDF 멤브레인으로 트랜스퍼 하여 Cmyc 단백질에 대한 항체로 웨스턴 블롯을 수행하였다. AvrBsT는 정상적으로 발현되는 것이 확인 되었다 (도 22).

[0075] **[단계 4]**

[0076] 상기의 균을 균주현탁액 농도 1.0으로 토마토 잎에 접종 후 3일째 병저항성의 신호전달 물질로 알려진 활성산소의 발생량을 알아보기 위해, 댑 염색{3,3'-diaminobenzidine(DAB) staining}을 수행하였고 그 결과를 도 22에 나타내었다. 그 결과, *AvrBsT*가 과발현된 경우에도 활성산소가 축적되지 않는 것을 확인하였다 (도 23).

[0077] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0078] 도 1은 본 발명에 의하여 세균성 점무늬병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) 균주 Bv5-4a로부터 클로닝한 에이브이알비에스티 (*avrBsT*) 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 도면이고,

[0079] 도 2는 기존에 알려진 AvrBsT 단백질의 서열과 본 발명에서 분리된 AvrBsT의 아미노산 서열 차이를 나타내는 도면이고,

[0080] 도 3은 본 발명에 의한 *avrBsT* 유전자로 형질전환된 Ds1 균주에서 AvrBsT 단백질의 정상적인 발현과 분비를 나타낸 도면이고,

[0081] 도 4는 고추 녹광 품종에 Ds1과 Ds1 (EV), Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a 균주를 저농도로 접종한 후 병징을 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

[0082] 도 5는 고추 녹광 품종에 Ds1과 Ds1 (EV), Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a 균주를 저농도로 접종한 후 0, 3, 6, 9일에 세균 생장을 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

[0083] 도 6은 고추 녹광 품종에 Ds1과 Ds1 (EV), Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a 균주를 고농도로 접종한 후 병징을 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

[0084] 도 7은 고추 녹광 품종에 Ds1과 Ds1 (EV), Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a 균주를 고농도로 접종한 후 0, 12, 24, 36시간에 세포사멸에 의해 유출되는 전해질량을 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

[0085] 도 8은 고추 녹광 품종에 Ds1과 Ds1 (EV), Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a 균주를 고농도로 접종한 후 아닐린 블루 염색 (aniline blue), 댑염색 {DAB (3,3'-diaminobenzidine) staining}, 그리고 트리판 블루 염색 (trypan blue staining)을 한 결과를 나타낸 도면이고,

[0086] 도 9는 고추 녹광 품종에 Ds1과 Ds1 (EV), Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a 균주를 고농도로 접종한 후 저항성 관련 유전자의 차등발현을 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

[0087] 도 10은 pBIN35S:*avrBsT*과 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101) 균주를 이용하여 *avrBsT* 유전자를 과발현시킨 고추에서 병징을 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

[0088] 도 11은 *avrBsT* 유전자를 과발현시킨 고추에서 세포사멸에 의한 전해질 유출을 날짜별로 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

[0089] 도 12는 *avrBsT* 유전자를 과발현시킨 고추에서 AvrBsT 단백질이 정상적으로 발현되는 것을 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

[0090] 도 13은 *avrBsT* 유전자를 과발현시킨 고추에서 활성산소가 축적됨을 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

[0091] 도 14는 토마토 선명 품종에 Ds1과 Ds1 (EV), Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a 균주를 저농도로 접종한 후 14일에 병징을 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

[0092] 도 15는 토마토 선명 품종에 Ds1과 Ds1 (EV), Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a균주를 저농도로 접종한 후 0, 3,

6, 9일에 세균 생장을 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

[0093] 도 16은 토마토 선명 품종에 Ds1과 Ds1 (EV), Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a 균주를 고농도로 접종한 후 병징을 가시광선 및 자외선을 조사하여 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

[0094] 도 17은 토마토 선명 품종에 Ds1과 Ds1 (EV), Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a 균주를 고농도로 접종한 후 0, 24, 48, 72시간에 세포사멸에 의해 유출되는 전해질량을 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

[0095] 도 18은 토마토 선명 품종에 Ds1과 Ds1 (EV), Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a 균주를 고농도로 접종한 후 아닐린 블루 염색 (aniline blue), 댑염색 {DAB (3,3'-diaminobenzidine) staining}, 그리고 트리판 블루 염색 (trypan blue staining) 한 결과를 나타낸 도면이고,

[0096] 도 19는 토마토 선명 품종에 Ds1과 Ds1 (EV), Ds1 (*avrBsT*)와 Bv5-4a을 고농도로 접종한 후 36, 72시간에 저항성 관련 유전자의 차등발현을 확인한 결과를 타낸 도면이고,

[0097] 도 20은 pBIN35S:*avrBsT*과 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101) 균주를 이용하여 *avrBsT* 유전자를 과발현시킨 토마토에서 병징을 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

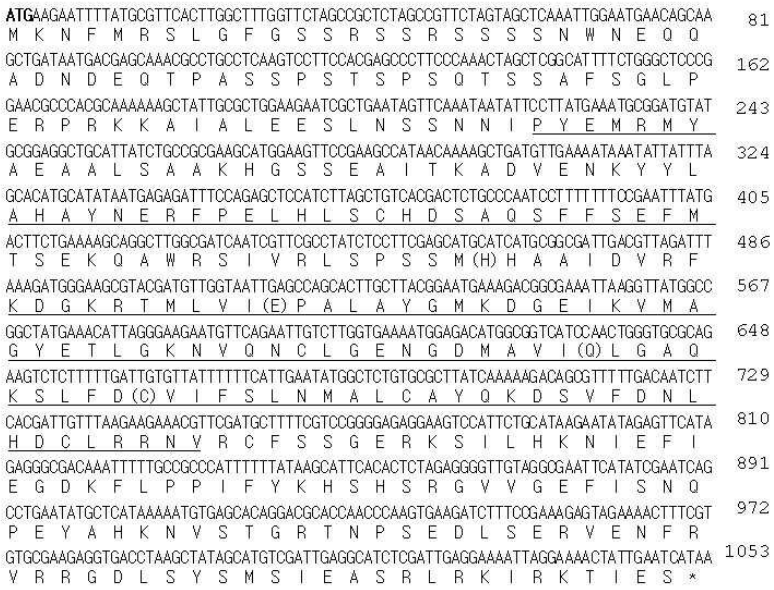
[0098] 도 21은 *avrBsT* 유전자를 과발현시킨 토마토에서 세포사멸에 의한 전해질 유출이 없음을 날짜별로 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

[0099] 도 22는 *avrBsT* 유전자를 과발현시킨 토마토에서 AvrBsT 단백질이 정상적으로 발현되는 것을 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

[0100] 도 23은 *avrBsT* 유전자를 과발현시킨 토마토에서 활성산소가 축적되지 않음을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도면

도면1



도면2

```
AvrBsT(Bv5-4a)  MKNFMRSLGFGSSRSSRSSSSNWNEQQADNDEQTPASSPSTSPSQTSSAFSGLPERPRK 60
AvrBsT(75-3)    MKNFMRSLGFGSSRSSRSSSSNWNEQQADNDEQTPASSPSTSPSQTSSAFSGLPERPRK 60

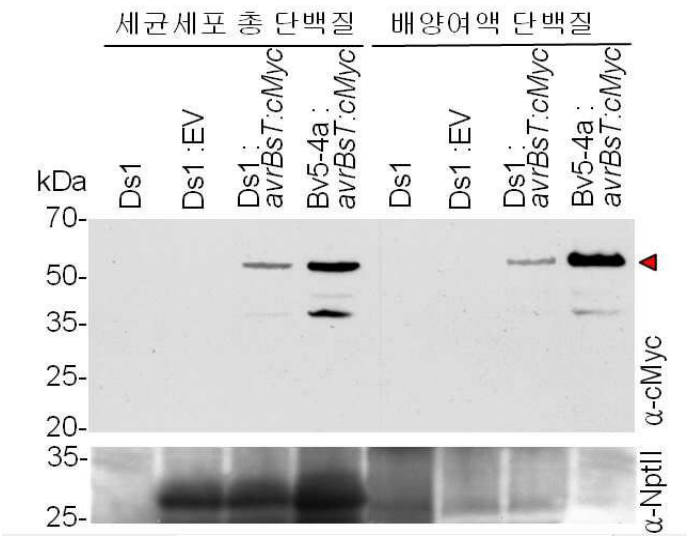
AvrBsT(Bv5-4a)  KAIALEESLNSSNNIPYEMRMYAEAALSAAKHGSSEAITKADVENKYYLAHAYNERFPE 120
AvrBsT(75-3)    KAIALEESLNSSNNIPYEMRMYAEAALSAANDGSSEAITKADVENKYYLAHAYNERFPE 120
                          Serine/threonine acetyl transferase
AvrBsT(Bv5-4a)  LHLSCHDSAQSFFSEFMTSEKQAWRSIVRLSPSSMHHAAIDVRFKDGKRTMLVIEPALA 180
AvrBsT(75-3)    LHLSCHDSAQSFFSEFMTSEKQAWRSIVRLSPSSMHHAAIDVRFKDGKRTMLVIEPALA 180

AvrBsT(Bv5-4a)  YGMKDGEIKVMAGYETLGKNVQNCLGENGDMAVIQLGAQKSLFDCVIFSLNMALCAYQK 240
AvrBsT(75-3)    YGMKDGEIKVMAGYETLGKNVQNCLGENGDMAVIQLGAQKSLFDCVIFSLNMALCAYQK 240

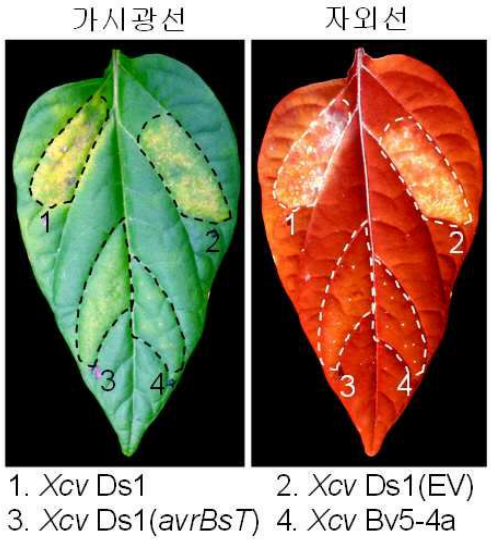
AvrBsT(Bv5-4a)  DSVFDNLHDCLRRNVRCFSSGERKSILHKNIEFIEGDKFLPPIFYKHSHSRGVVGEFIS 300
AvrBsT(75-3)    DSVFDNLHDCLRRNVRCFSSGERKSILHKNIEFIEGDKFLPPIFYKHSHSRGVVGEFIS 300

AvrBsT(Bv5-4a)  NQPEYAHKNVSTGRTNPSEDLSERVENFRVRRGDLSYSMSIEASRLRKIRKTIES- 350
AvrBsT(75-3)    NQPEYAHKNVSTGRTNPSEDLSERVENFRVRRGDLSYSMSIEASRLRKIRKTIES- 350
```

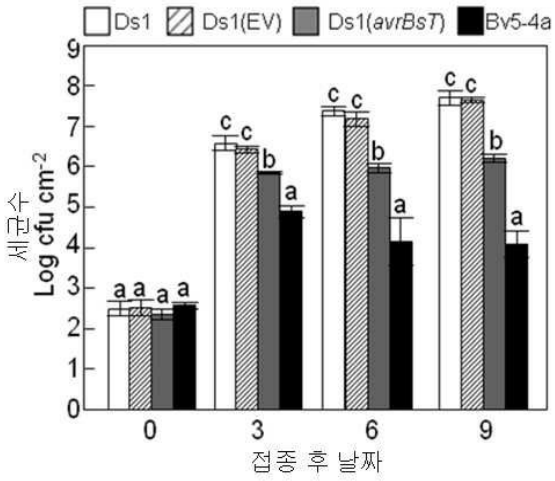
도면3



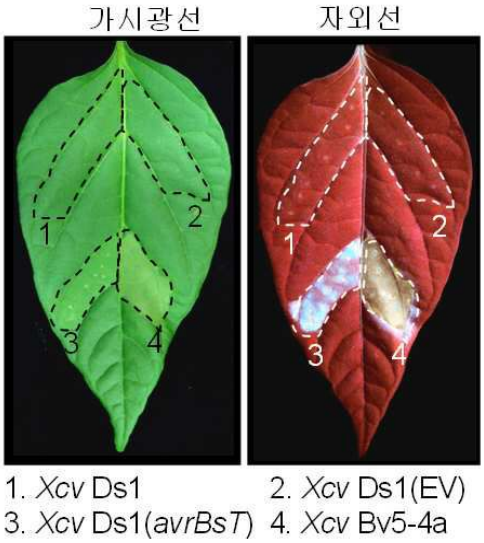
도면4


가시광선
자외선
1
2
3
4
1. Xcv Ds1
2. Xcv Ds1(EV)
3. Xcv Ds1(avrBsT)
4. Xcv Bv5-4a

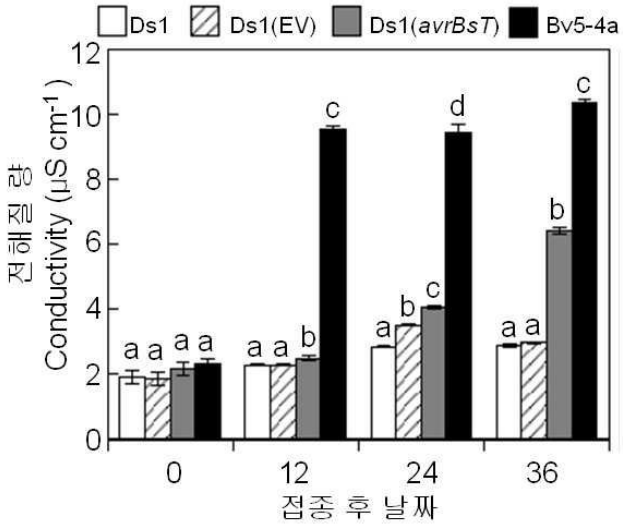
도면5


Ds1
Ds1(EV)
Ds1(avrBsT)
Bv5-4a
세균수
Log cfu cm-2
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
a a a a
c c b a
c c b a
c c b a
0
3
6
9
접종 후 날짜

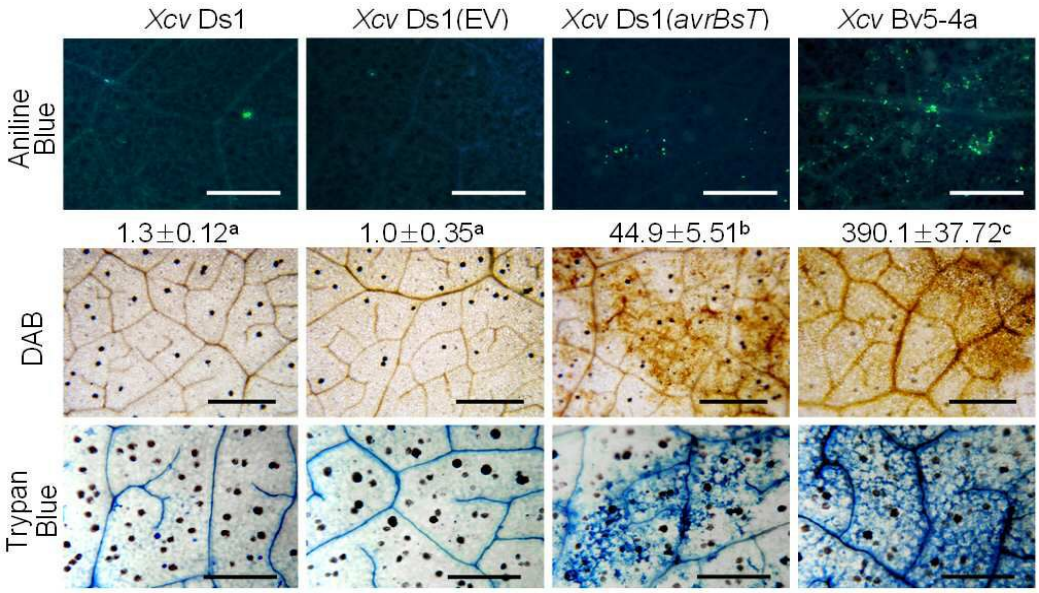
도면6


가시광선
자외선
1
2
3
4
1. Xcv Ds1
2. Xcv Ds1(EV)
3. Xcv Ds1(avrBsT)
4. Xcv Bv5-4a

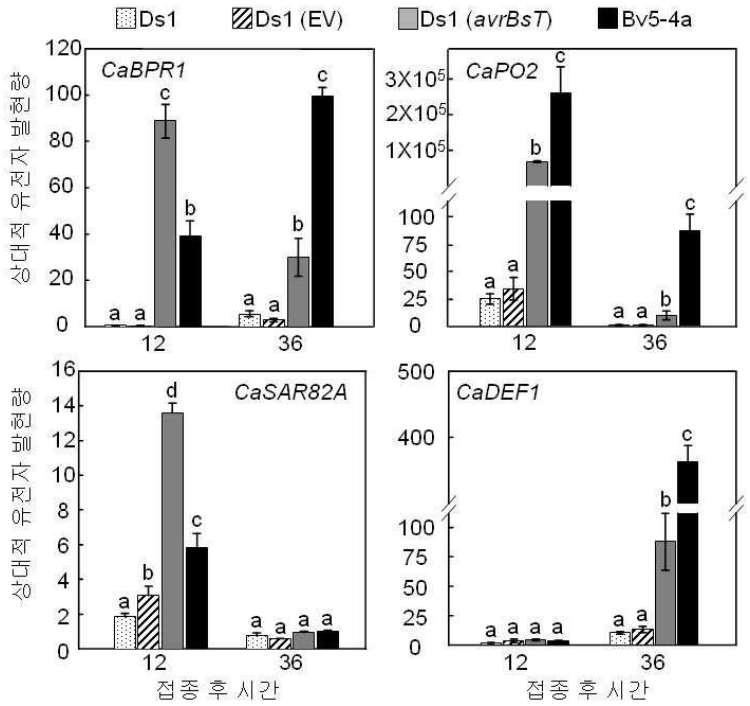
도면7


Ds1
Ds1(EV)
Ds1(avrBsT)
Bv5-4a
전해질 량
Conductivity (μS cm-1)
0
2
4
6
8
10
12
a a a a
a a b
a b c
a a b
c
d
c
b
0
12
24
36
접종 후 날짜

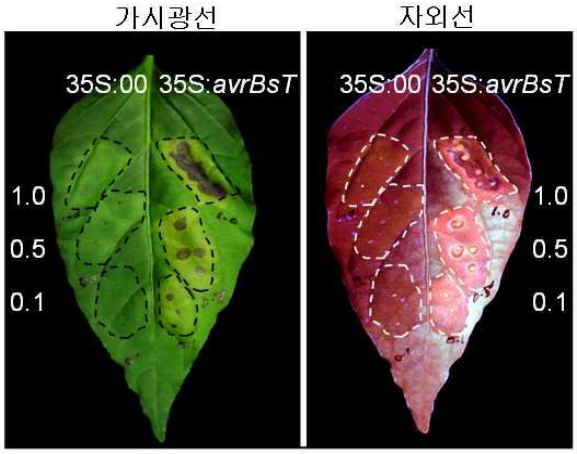
도면8


Xcv Ds1
Xcv Ds1(EV)
Xcv Ds1(avrBsT)
Xcv Bv5-4a
Aniline Blue
DAB
Trypan Blue
1.3±0.12a
1.0±0.35a
44.9±5.51b
390.1±37.72c

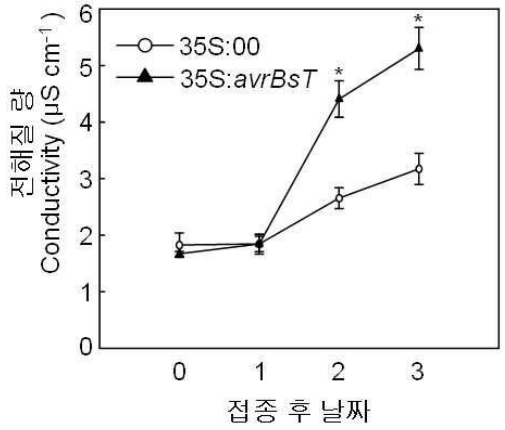
도면9


Ds1
Ds1 (EV)
Ds1 (avrBsT)
Bv5-4a
CaBPR1
CaPO2
CaSAR82A
CaDEF1
상대적 유전자 발현량
접종 후 시간

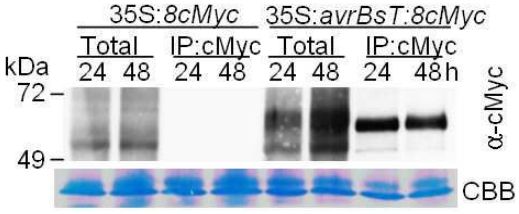
도면10



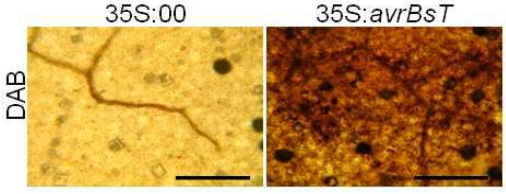
도면11



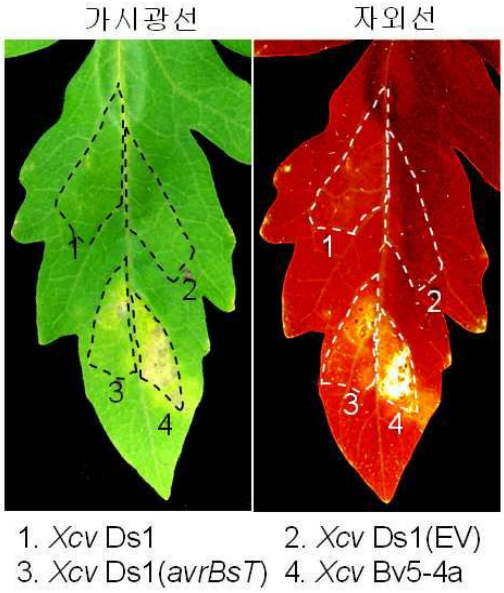
도면12



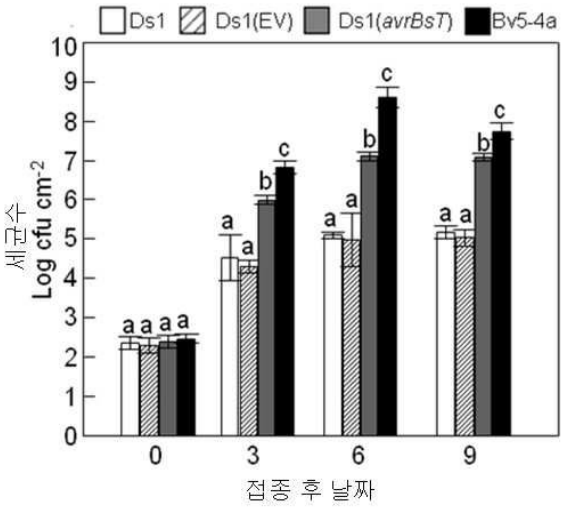
도면13



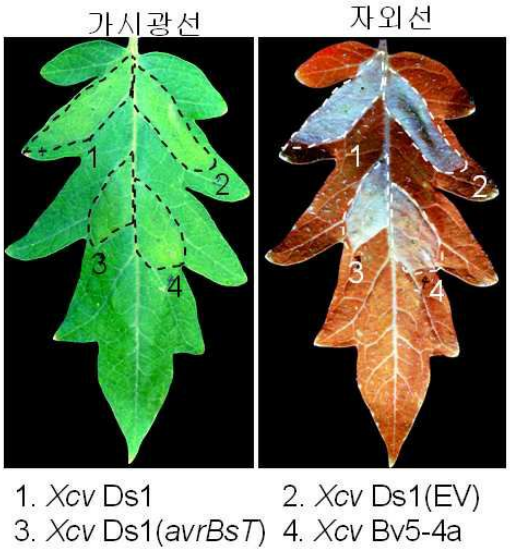
도면14


가시광선
자외선
1
2
3
4
1. Xcv Ds1
2. Xcv Ds1(EV)
3. Xcv Ds1(avrBsT)
4. Xcv Bv5-4a

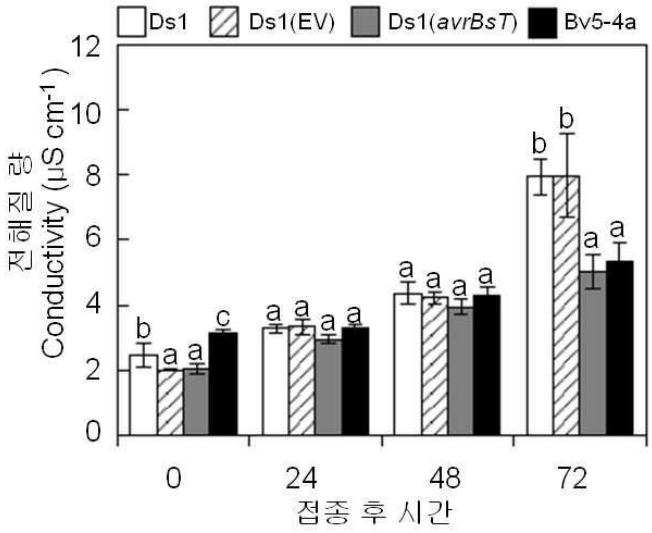
도면15


Ds1
Ds1(EV)
Ds1(avrBsT)
Bv5-4a
세균수
Log cfu cm-2
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
a a a a
a a b c
a a b c
a a b c
0
3
6
9
접종 후 날짜

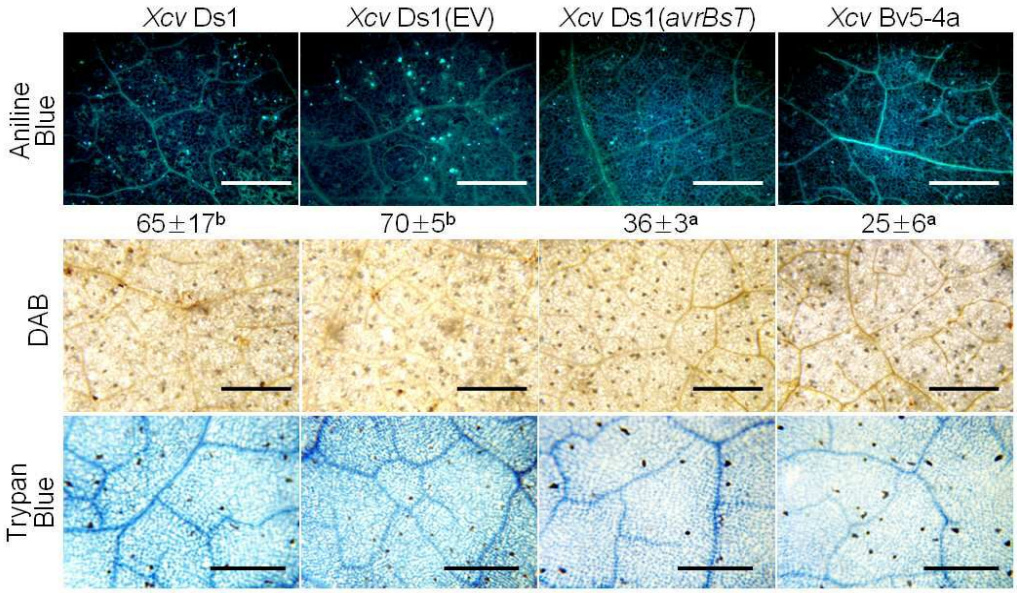
도면16


가시광선
자외선
1
2
3
4
1. Xcv Ds1
2. Xcv Ds1(EV)
3. Xcv Ds1(avrBsT)
4. Xcv Bv5-4a

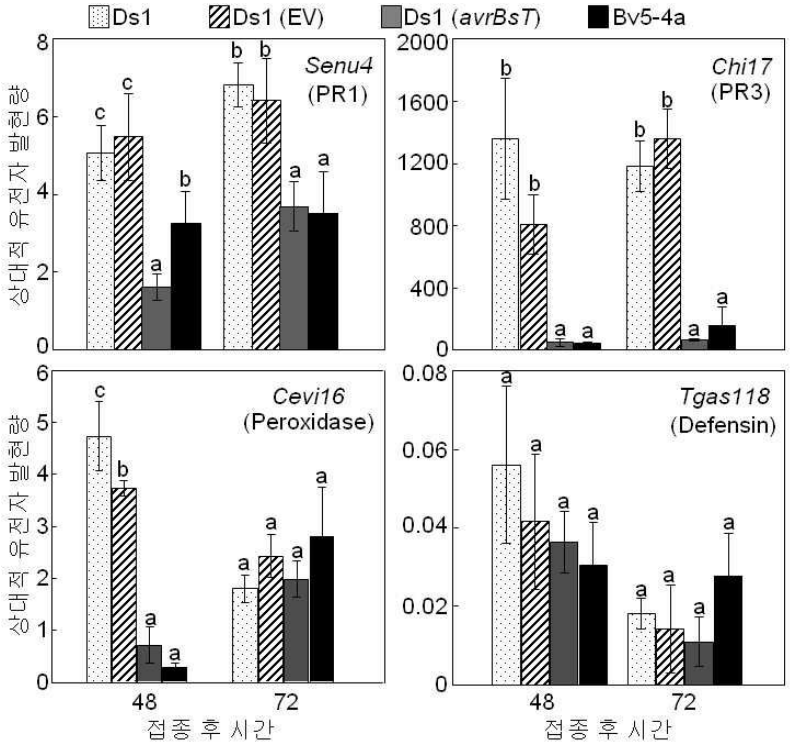
도면17


Ds1
Ds1(EV)
Ds1(avrBsT)
Bv5-4a
전해질 량
Conductivity (μS cm-1)
0
2
4
6
8
10
12
0
24
48
72
접종 후 시간

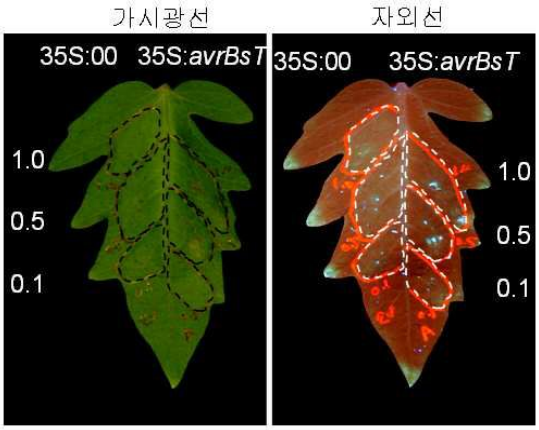
도면18


Xcv Ds1
Xcv Ds1(EV)
Xcv Ds1(avrBsT)
Xcv Bv5-4a
Aniline Blue
65±17b
70±5b
36±3a
25±6a
DAB
Trypan Blue

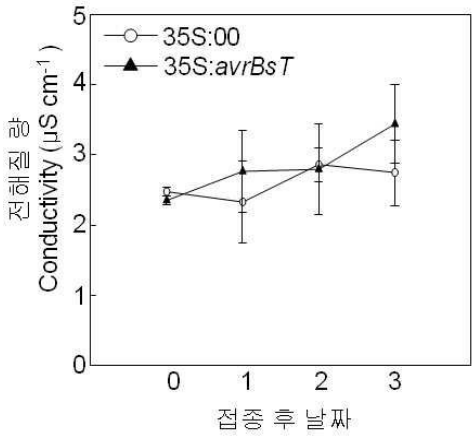
도면19


Ds1
Ds1 (EV)
Ds1 (avrBsT)
Bv5-4a
Senu4
(PR1)
Chi17
(PR3)
Cevi16
(Peroxidase)
Tgas118
(Defensin)
상대적 유전자 발현량
접종 후 시간
48
72

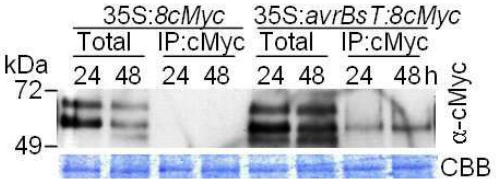
도면20



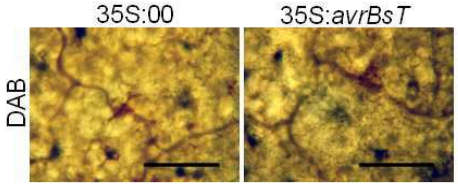
도면21



도면22



도면23



서 열 목 록

<110> Korea University Industrial and Academic Collaboration Foundation
<120> Pepper disease resistance and tomato disease susceptibility inducing avrBsT gene and transgenic bacteria using the same

<130> P11-090910-01

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 1053
<212> DNA
<213> Xanthomonas campestris pv. vesicatoria

<400> 1
atgaagaatt ttatgcgttc acttggcttt ggttctagcc gctctagccg ttctagtagc 60

tcaaattgga atgaacagca agctgataat gacgagcaaa cgcctgcctc aagtccttcc 120

acgagccctt cccaaactag ctcggcattt tctgggctcc cggaacgccc acgcaaaaaa 180

gctattgcgc tggaagaatc gctgaatagt tcaaataata ttccttatga aatgcggatg 240

tatgcggagg ctgcattatc tgccgcgaag catggaagtt ccgaagccat aacaaaagct 300

gatgttgaaa ataaatatta tttagcacat gcatataatg agagatttcc agagctccat 360

cttagctgtc acgactctgc ccaatccttt ttttccgaat ttatgacttc tgaaaagcag 420

gcttggcgat caatcgttcg cctatctcct tcgagcatgc atcatgcggc gattgacgtt 480

agatttaaag atgggaagcg tacgatgttg gtaattgagc cagcacttgc ttacggaatg 540

aaagacggcg aaattaaggt tatggccggc tatgaaacat tagggaagaa tgttcagaat 600

tgtcttggtg aaaatggaga catggcggtc atccaactgg gtgcgcagaa gtctcttttt 660

gattgtgtta ttttttcatt gaatatggct ctgtgcgctt atcaaaaaga cagcgttttt 720

gacaatcttc acgattgttt aagaagaaac gttcgatgct tttcgtccgg ggagaggaag 780

tccattctgc ataagaatat agagttcata gagggcgaca aatttttgcc gcccattttt 840

tataagcatt cacactctag aggggttgta ggcgaattca tatcgaatca gcctgaatat 900

gctcataaaa atgtgagcac aggacgcacc aacccaagtg aagatctttc cgaaagagta 960

gaaaactttc gtgtgcgaag aggtgaccta agctatagca tgtcgattga ggcatctcga 1020

ttgaggaaaa ttaggaaaac tattgaatca taa 1053

<210> 2
<211> 350
<212> PRT
<213> Xanthomonas campestris pv. vesicatoria

<400> 2
Met Lys Asn Phe Met Arg Ser Leu Gly Phe Gly Ser Ser Arg Ser Ser
1 5 10 15

Arg Ser Ser Ser Ser Asn Trp Asn Glu Gln Gln Ala Asp Asn Asp Glu
20 25 30

Gln Thr Pro Ala Ser Ser Pro Ser Thr Ser Pro Ser Gln Thr Ser Ser
35 40 45

Ala Phe Ser Gly Leu Pro Glu Arg Pro Arg Lys Lys Ala Ile Ala Leu
50 55 60

Glu Glu Ser Leu Asn Ser Ser Asn Asn Ile Pro Tyr Glu Met Arg Met
65 70 75 80

Tyr Ala Glu Ala Ala Leu Ser Ala Ala Lys His Gly Ser Ser Glu Ala
85 90 95

Ile Thr Lys Ala Asp Val Glu Asn Lys Tyr Tyr Leu Ala His Ala Tyr
100 105 110

Asn Glu Arg Phe Pro Glu Leu His Leu Ser Cys His Asp Ser Ala Gln

```
        115                 120                 125

Ser Phe Phe Ser Glu Phe Met Thr Ser Glu Lys Gln Ala Trp Arg Ser
    130                 135                 140

Ile Val Arg Leu Ser Pro Ser Ser Met His His Ala Ala Ile Asp Val
145                 150                 155                 160

Arg Phe Lys Asp Gly Lys Arg Thr Met Leu Val Ile Glu Pro Ala Leu
                165                 170                 175

Ala Tyr Gly Met Lys Asp Gly Glu Ile Lys Val Met Ala Gly Tyr Glu
            180                 185                 190

Thr Leu Gly Lys Asn Val Gln Asn Cys Leu Gly Glu Asn Gly Asp Met
        195                 200                 205

Ala Val Ile Gln Leu Gly Ala Gln Lys Ser Leu Phe Asp Cys Val Ile
    210                 215                 220

Phe Ser Leu Asn Met Ala Leu Cys Ala Tyr Gln Lys Asp Ser Val Phe
225                 230                 235                 240

Asp Asn Leu His Asp Cys Leu Arg Arg Asn Val Arg Cys Phe Ser Ser
                245                 250                 255

Gly Glu Arg Lys Ser Ile Leu His Lys Asn Ile Glu Phe Ile Glu Gly
            260                 265                 270

Asp Lys Phe Leu Pro Pro Ile Phe Tyr Lys His Ser His Ser Arg Gly
        275                 280                 285

Val Val Gly Glu Phe Ile Ser Asn Gln Pro Glu Tyr Ala His Lys Asn
    290                 295                 300

Val Ser Thr Gly Arg Thr Asn Pro Ser Glu Asp Leu Ser Glu Arg Val
305                 310                 315                 320

Glu Asn Phe Arg Val Arg Arg Gly Asp Leu Ser Tyr Ser Met Ser Ile
                325                 330                 335

Glu Ala Ser Arg Leu Arg Lys Ile Arg Lys Thr Ile Glu Ser
            340                 345                 350
```