

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ008027

부처명 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 고추에서 병저항성관련유전자의 분리와 기능분석

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 분리된 유전자 (*CaFDH1*).

청구항 2

서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 유전자 (*CaFDH1*).

청구항 3

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 단백질 (*CaFDH1*).

청구항 4

제1항 기재의 유전자 또는 제2항 기재의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 5

제4항 기재의 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체.

청구항 6

생물적, 화학적 또는 환경스트레스 처리를 한 식물체로부터 mRNA를 분리하여 제2항 기재의 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병저항성 탐색방법.

청구항 7

제3항 기재의 단백질에 대한 항체.

청구항 8

제3항 기재의 단백질 (*CaFDH1*)의 세포내 발현 위치와 세포사멸기능과의 연관관계를 확인하기 위한 다음에서 선택되는 재조합벡터

- 서열번호 2의 아미노산 서열 중 35~381번째의 아미노산을 코딩하는 염기서열을 이용하여 제조한 재조합벡터
pBIN35S:*CaFDH1*^{ΔMS}-GFP
- 서열번호 2의 아미노산 서열 중 1~197번째의 아미노산을 코딩하는 염기서열을 이용하여 제조한 재조합벡터
pBIN35S:*CaFDH1*^N-GFP
- 서열번호 2의 아미노산 서열 중 197~291번째의 아미노산을 코딩하는 염기서열을 이용하여 제조한 재조합벡터
pBIN35S:*CaFDH1*^{CDHS}-GFP
- 서열번호 2의 아미노산 서열 중 292~381번째의 아미노산을 코딩하는 염기서열을 이용하여 제조한 재조합벡터
pBIN35S:*CaFDH1*^C-GFP
- 서열번호 2의 아미노산 서열 중 1~291번째의 아미노산을 코딩하는 염기서열을 이용하여 제조한 재조합벡터
pBIN35S:*CaFDH1*^{ΔC}-GFP
- 서열번호 2의 아미노산 서열 중 197~381번째의 아미노산을 코딩하는 염기서열을 이용하여 제조한 재조합벡터
pBIN35S:*CaFDH1*^{ΔN}-GFP.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 세포 사멸 관련 미토콘드리아 포메이트 디하이드로게나아제 유전자 *CaFDH1* (*Capsicum annuum* *Formate dehydrogenase1*) 및 이를 이용한 형질전환 식물체와 병저항성 탐색방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 고추 세균성 점무늬병을 일으키는 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*의 비병원성 균주에 감염될 때 일어나는 저항성 반응에서 빠르고 강하게 발현되는 신규 세포사멸 관련 유전자 *CaFDH1*의 염기 및 아미노산 서열을 분석하고, 유전자 *CaFDH1* 및 이 유전자가 코딩하는 단백질을 이용한 면역반응으로 *CaFDH1*의 단백질 수준의 발현 여부를 탐색하고, 이 유전자의 과발현을 이용한 병저항성 형질전환 식물체 제작에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 병원균은 식물체내에서 증식하고 성장하기 위하여 기주의 기구와 영양을 이용한다. 기주식물은 병원균의 정착 및 증식을 억제하기 위하여 병원균 감염 지역의 세포가 스스로 사멸함으로써 추가적인 영양 공급 및 증식을 방해한다. 이러한 식물의 방어반응은 과민성반응 (Hypersensitive response, HR)으로 나타나는 급속한 세포사멸이다. 과민성 세포사멸을 일으키기 위해서 식물은 수용체를 통해 침입하는 병원균을 인식하고 하위의 신호전달 경로를 활성화 시킨다. 이러한 과민성 세포사멸은 병원균을 억제하는 최극단적인 방어기작이다. 이들에 대한 연구는 식물의 방어 생리 기작을 밝히는 데 있어 중요한 가치가 있으며 여기에서 얻어지는 병저항성 유전자는 해당 작물의 병저항성을 극대화시킬 수 있을 뿐만 아니라 다른 식물 종의 분자유종 또한 가능하게 할 수 있다.

[0003] 고추의 병저항성 및 세포사멸 유도와 관련하여 알려진 종래의 기술에는 E3유비퀴틴라이게이즈 유전자 씨에이링 1, 칼모듈린 유전자 씨에이씨에이엠1, 만노스바인당택틴1, 리폭시제나제1, 엡시스산 반응 유전자 씨에이에이비알1 등을 이용하여 병원균 침입에 보다 높은 저항성을 발현하는 형질전환 식물체를 제작하고 이를 이용해 병저항성을 탐색하는 기술이 최근에 보고가 되었다.

[0004] 한편, 포메이트 디하이드로게나아제 (Formate dehydrogenase)는 포메이트 (formate)를 산화시켜서 이산화탄소로 생성시키는 반응을 촉매하는 효소로 알려져있다. 포메이트는 세포 내에서 독성이 있기 때문에 포메이트 대사는 생리활성에 있어 중요한 부분을 차지한다. 이 효소를 코딩하는 유전자는 애기장대와 토마토 식물에서 건조, 상처, 저온, 그리고 열 등의 환경 스트레스에 의해 유도된다는 보고가 있었다. 일부 포메이트 디하이드로게나아제 중에는 세포내 미토콘드리아에 존재하며 염기서열 내에 미토콘드리아로 위치하도록 하는 관련된 신호펩타이드 (signal peptide)를 보유하고 있다. 최근에 콩의 포메이트 디하이드로게나아제가 암처리와 불친화적 병원균 *Colletotrichum lindemuthianum* C531의 감염에 의해 유도된다는 보고가 있었지만 이러한 연구결과와는 달리 FDH들이 병저항성 기작에서 어떠한 역할을 하는 지는 아직 불분명하였다.

[0005] 본 발명의 배경이 되는 기술로서 대한민국 특허등록공보 10-0679638 (2001.01.31)에 포름산을 이산화탄소와 수소로 전환시켜 주는 효소인 포메이트 디하이드로게나제 D 또는 E를 코딩하는 유전자(fdhD 또는 fdhE)를 함유하는 재조합 벡터로 형질전환된 미생물 및 상기 형질전환된 미생물을 이용하여 숙신산을 제조하는 방법에 대해 기재되어 있으나, 세포사멸과 관련된 고추 유래 FDH 유전자에 대해서는 개시되어 있지 않다.

[0006] 따라서, 고추의 미토콘드리아에 존재하는 포메이트 디하이드로게나아제 유전자를 발굴하고, 형질전환 식물체의 제작, 세포 사멸에서의 기능 분석 등을 통하여 저항성 반응에서 그 기능을 확인할 수 있다면, 식물의 병저항성 기작에 대한 지식적 정보를 축적할 뿐만 아니라 이를 이용하여 저항성 식물 육종, 개발에 이바지하여 식물보호 및 식량 자원 확보에 있어 실용적 대안을 제시하여 줄 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 특허등록공보 10-0679638 (2001.01.31)

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) David P. et al., Theor Appl Genet. 2010 Jun;121(1):87-103. Epub 2010 Feb 25.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 비록 몇몇 방어관련 유전자들이 밝혀졌지만 복잡한 상호작용에 의해 생리활성이 조절된다는 생물학적 성질을 고려할 때 본 발명은 상술한 종래 기술상의 과제를 해결하기 위한 것이다.
- [0010] 본 발명의 목적은 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 감염된 식물에서의 방어 반응 동안에 일어나는 저항성 및 세포 사멸에 관련하는 유전자 포메이트 디하이드로게나아제1 (*Formate dehydrogenase1*, *CaFDH1*)를 분리하고 해독함으로써 얻어진 염기서열 및 아미노산 서열 정보를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 유전자를 새로운 식물체에 도입하여 식물병에 저항성을 가지는 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 유전자를 이용하여 식물병에 대한 저항성 존재 여부와 식물의 효소 활성 변화 여부를 탐색하는 방법을 제공하고자 하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적과 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 분리된 유전자 (*CaFDH1*)를 제공한다.
- [0015] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 유전자 (*CaFDH1*)를 제공한다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 단백질 (*CaFDH1*)을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 본 발명의 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 이 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체를 제공한다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 생물적, 화학적 또는 환경스트레스 처리를 한 식물체로부터 mRNA를 분리하여 본 발명의 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병저항성 탐색방법을 제공한다. 바람직하게 본 발명은 식물체의 병저항성 탐색 방법에 있어서, 생물적, 화학적, 또는 환경스트레스를 처리한 식물 잎에서 RNA를 분리하여 전기영동시키고 나이론막(Hybond N+)으로 전이시키고, ³²P-dCTP로 처리한 본 발명의 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병저항성 탐색방법을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 본 발명의 단백질 (*CaFDH1*)에 대한 항체를 제공한다. 바람직하게 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열 중 353~364번째 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드(352-KDMLDRYFKGEDF-364; 서열번호 3)를 동물에 주사하여 얻어진 단백질 (*CaFDH1*)의 항체를 제공한다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 단백질 (*CaFDH1*)의 세포내 발현 위치와 세포사멸기능과의 연관관계를 확인하기 위한 다음에서 선택되는 재조합벡터를 제공한다.
- [0021] a) 서열번호 2의 아미노산 서열 중 35~381번째의 아미노산을 코딩하는 염기서열을 이용하여 제조한 재조합벡터 pBIN35S:*CaFDH1*^{ΔMS}-GFP
- [0022] b) 서열번호 2의 아미노산 서열 중 1~197번째의 아미노산을 코딩하는 염기서열을 이용하여 제조한 재조합벡터 pBIN35S:*CaFDH1*^N-GFP
- [0023] c) 서열번호 2의 아미노산 서열 중 197~291번째의 아미노산을 코딩하는 염기서열을 이용하여 제조한 재조합벡터 pBIN35S:*CaFDH1*^{CDHS}-GFP

- [0024] d) 서열번호 2의 아미노산 서열 중 292~381번째의 아미노산을 코딩하는 염기서열을 이용하여 제조한 재조합벡터 pBIN35S:CaFDH1^C-GFP
- [0025] e) 서열번호 2의 아미노산 서열 중 1~291번째의 아미노산을 코딩하는 염기서열을 이용하여 제조한 재조합벡터 pBIN35S:CaFDH1^{ΔC}-GFP
- [0026] f) 서열번호 2의 아미노산 서열 중 197~381번째의 아미노산을 코딩하는 염기서열을 이용하여 제조한 재조합벡터 pBIN35S:CaFDH1^{ΔN}-GFP.
- [0027] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- [0028] 본 발명은 고추 병관련 유전자 *CaFDH1*을 분리하고 고추 세균성 점무늬 병균 감염에 대한 발현 여부를 조사하며, 고추, *Nicotiana benthamiana*, 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) 식물 등에서 아그로박테리움 (*Agrobacterium*)을 이용한 과발현을 통하여 식물병저항성 유도를 확인하여 달성하였다.
- [0029] 따라서 본 발명은 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균주 Bv5-4a 접종에 대해 과민성 저항성 반응을 나타내는 녹광 고추 품종으로부터 mRNA를 분리하여 cDNA 라이브러리를 제작하고, 비병원성 균주를 접종한 고추식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추식물에서 얻은 총 mRNA를 디옥시제닌(digoxigenin)으로 표지하여 프로브(Probe)를 만들고, 이 cDNA와 프로브를 이용한 디퍼런셜 하이브리다이제이션(differential hybridization) 과정을 수행하여 병저항성과 관련이 있을 것으로 예상되는 클론을 선발하여, 유전자의 염기서열을 해독하여, *CaFDH1*으로 명명된 고추 녹광 품종의 FDH 코딩 유전자 염기서열(서열번호 1) 및 그에 따른 아미노산 서열(서열번호 2)을 제공한다(도 1 및 도 2 참조).
- [0030] 본 발명의 CaFDH1 단백질의 아미노산 서열의 분석결과 서열 앞 부분에 미토콘드리아 위치화에 관련하는 신호 펩타이드(signal peptide)와 미토콘드리아 타겟팅 서열(mitochondria-targeting sequence)을 가지고 있으며, 중간 부분에 효소활성에 관련하여 하나의 D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase NAD-binding signature와 두 개의 D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase signature를 가지고 있으며, 타 식물의 포메이트 디하이드로게나아제와의 아미노산 서열 비교결과를 도 2에 나타내었다 (도 1 및 도 2 참조).
- [0031] 또한, 본 발명은 상기 유전자(*CaFDH1*)를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 상기 재조합 벡터는 바람직하게는 재조합 식물 발현 벡터이다. 상기 재조합 벡터는 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 pBIN35S:CaFDH1, pBIN35S:CaFDH1:GFP 또는 pTRV2:CaFDH1이다. 바람직하게는 상기 재조합벡터는 상기 유전자(*CaFDH1*)를 바이러스-유도 유전자 사일런싱(virus-induced gene silencing, VIGS)을 위한 벡터인 TRV2(Tobacco Rattle Virus 2) 벡터에 삽입시켜 제조한 재조합벡터 TRV2:CaFDH1이다(도 19 참조).
- [0032] 본 발명은 또한 본 발명의 단백질 (CaFDH1)의 세포내 발현 위치와 세포사멸기능과의 연관관계를 알아보기 위한 다음에서 선택되는 재조합벡터를 제공한다(도 14 ~ 도 18 참조).
- [0033] a) 서열번호 2의 아미노산 서열 중 35~381번째의 아미노산을 코딩하는 염기서열을 이용하여 제조한 재조합벡터 pBIN35S:CaFDH1^{ΔMS}-GFP
- [0034] b) 서열번호 2의 아미노산 서열 중 1~197번째의 아미노산을 코딩하는 염기서열을 이용하여 제조한 재조합벡터 pBIN35S:CaFDH1^N-GFP
- [0035] c) 서열번호 2의 아미노산 서열 중 197~291번째의 아미노산을 코딩하는 염기서열을 이용하여 제조한 재조합벡터 pBIN35S:CaFDH1^{CDHS}-GFP
- [0036] d) 서열번호 2의 아미노산 서열 중 292~381번째의 아미노산을 코딩하는 염기서열을 이용하여 제조한 재조합벡터 pBIN35S:CaFDH1^C-GFP
- [0037] e) 서열번호 2의 아미노산 서열 중 1~291번째의 아미노산을 코딩하는 염기서열을 이용하여 제조한 재조합벡터 pBIN35S:CaFDH1^{ΔC}-GFP
- [0038] f) 서열번호 2의 아미노산 서열 중 197~381번째의 아미노산을 코딩하는 염기서열을 이용하여 제조한 재조합벡

터 pBIN35S: *CaFDH1*^{ΔN}-GFP.

- [0039] 나아가, 본 발명은 상기 유전자 또는 상기 재조합 벡터를 이용하여 제조한 형질전환된 식물체를 제공한다. 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 식물세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코딩된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 튜메파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다.
- [0040] 또한, 본 발명은 생물적, 화학적 또는 환경스트레스 처리를 한 식물체로부터 mRNA를 분리하여 *CaFDH1* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계 또는 *CaFDH1* 단백질의 항체를 탐침자(Probe)로 이용하여 *CaFDH1* 단백질의 발현 여부를 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병 또는 화학물질 저항성을 탐색하는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로는 상기 생물적 처리는 고추 세균성 점무늬병의 병원성, 비병원성 세균 그리고 고추 역병의 난균 등의 병원균을 예로 들 수 있다. 상기 화학적 처리는 식물 호르몬인 에틸렌 또는 살리실산(salicylic acid)을 예로 들 수 있다. 상기 환경스트레스 처리는 건조 또는 염을 예로 들 수 있다. 상기 *CaFDH1* 유전자 발현 여부 확인은 노던 블롯, 실시간 RT-PCR, 마이크로어레이법 외에도 mRNA의 발현을 측정할 수 있는 다양한 방법들이 이용될 수 있다. 바람직하게 본 발명은 식물체의 병저항성 탐색 방법에 있어서, 생물적, 화학적, 또는 환경스트레스를 처리한 식물 잎에서 RNA를 분리하여 전기영동시키고 나이론막(Hybond N+)으로 전이시키고, ³²P-dCTP로 처리한 본 발명의 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병저항성 탐색방법을 제공한다. 본 발명에 의한 *CaFDH1* 유전자가 식물 병원균, 식물 호르몬 또는 환경스트레스 처리에 의해 차별적으로 유도 발현되는 것을 실험을 통해 확인하였다(도 4 ~ 도 6 참조). 따라서 본 발명에 의한 *CaFDH1* 유전자는 식물체의 병 또는 화학물질 저항성 탐색방법에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0041] 본 발명은 본 발명의 단백질에 대한 항체를 제공한다. 본 발명의 항체는 *CaFDH1* 코딩 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩타이드도 포함되며, 본 발명의 부분 펩타이드로는, 최소한 7개 아미노산, 바람직하게는 9개 아미노산, 더욱 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 이에 한정되는 것은 아니나, 바람직하게 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열 중 353~364번째 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드(352-KDMLDRYFKGEDF-364; 서열번호 3)를 동물에 주사하여 얻어진 단백질 (*CaFDH1*)의 항체를 제공한다.
- [0042] 또한, 본 발명은 상기의 *CaFDH1* 유전자 발현을 억제하는 재조합 벡터를 이용하여 고추식물에서 특이적으로 *CaFDH1* 유전자가 억제된 식물체를 제작하고 병 저항성이 감소하는 것을 확인하고, *CaFDH1* 유전자가 과발현된 형질전환 애기장대 식물의 식물병 저항성 증대를 확인함으로써 새로운 병저항성 형질전환 식물체 및 저항성 분자 육종의 재료를 제공할 수 있다. 따라서 본 발명은 상기 *CaFDH1* 유전자 발현을 유도하는 재조합 벡터를 이용하여 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는 식물체에 병 저항성을 부여하는 방법도 제공한다.
- [0043] 보다 구체적으로 본 발명은 바이러스 유도 유전자 억제 기술(virus-induced gene silencing (VIGS))에 이용되는 TRV(Tobacco Rattle Virus)를 이용하여 *CaFDH1* 유전자를 TRV2 벡터(참고문헌: Baulcombe D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. Curr. Opin. Plant Biol. 2:109-113)에 도입시켜 재조합 벡터인 TRV2:*CaFDH1*를 제작하였다. 상기 재조합 벡터를 식물체에 도입하여 *CaFDH1*의 발현이 억제된 VIGS 식물체를 제조하여 저항성이 감소하는 것을 확인하고 형질전환 식물체를 제공할 수 있었다 (도 19 ~ 도 25

참조).

[0044] 나아가 본 발명에 의한 *CaFDH1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터(pBIN35S:*CaFDH1*)와 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101) 균주를 이용하여, 애기장대 식물에서의 형질전환 발현(transgenic expression)을 통한 *CaFDH1* 유전자의 식물체 병저항성 증가 기능을 확인하였다(도 26 ~ 도 28 참조).

[0045] 상술한 바와 같이 본 발명에서 *CaFDH1*가 고추 식물의 병저항성 조절에 중추적 역할을 한다는 것을 확인하고 *CaFDH1*의 병에 대한 반응 및 이와 관련된 병생성 관련 단백질(PR protein)의 유전자 정보를 축적할 수 있게 되어 식물의 병에 대한 신호전달에 대한 흥미로운 모형을 제공해 줄 수 있으며, 저항성을 일으키는 생화학적 변화를 이해함으로써, 병저항성이 증진되는 생명공학작 식물을 개발하는 데에 실용적으로 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0046] 상술한 바와 같이, 본 발명이 완성됨으로써, 고추 식물의 세균성 점무늬 병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균주(Bv5-4a)에 감염될 때 특이적으로 유도되는 신규 유전자인 포메이트 디하이드로게나아제(*CaFDH1*)의 염기서열 및 아미노산 서열의 분석과 세균 접종과 기타 스트레스 처리에 대한 차별적인 발현 확인을 하고 이들 단백질의 항체를 이용하여 식물체의 저항성 탐색방법을 제공함으로써 저항성 식물 품종 개발 및 형질전환식물체 제작에 기여하는 효과를 기대할 수 있게 된다.

[0047] 따라서 본 발명은 저항성 품종 개발에 있어 신규 유전자원을 제공하는 효과가 있어 식물육종 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 본 발명에 의하여 고추 녹광 품종(*Capsicum accuum* L. cm. Nockwang)으로부터 클로닝한 고추 미토콘드리아 포메이트 디하이드로게나아제 유전자(*CaFDH1*)의 염기 서열 및 아미노산 서열을 나타낸 도면이고,

도 2는 본 발명에 의한 고추 포메이트 디하이드로게나아제와 다른 식물의 포메이트 디하이드로게나아제의 아미노산 염기서열을 비교한 도면이고,

도 3은 고추녹광품종의 각 기관에서 본 발명에 의한 *CaFDH1* 유전자의 발현 결과를 나타낸 도면이고,

도 4는 고추녹광품종에 세균성 점무늬 병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성 및 비병원성 균주를 접종하였을 때, 접종된 잎과 접종되지 않은 잎에서의 *CaFDH1* 유전자의 발현 결과를 나타낸 도면이고,

도 5는 고추녹광품종에 세균성 점무늬 병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성 및 비병원성 균주를 접종하였을 때, 접종된 잎과 접종되지 않은 잎에서의 *CaFDH1*의 발현 결과를 단백질 수준에서 나타낸 도면이고,

도 6은 고추녹광품종에 식물 호르몬 혹은 환경 스트레스 처리를 했을 때와 처리하지 않았을 때 잎에서의 *CaFDH1* 유전자의 발현 결과를 나타낸 도면이고,

도 7은 *CaFDH1*을 고추녹광품종의 잎에 일시적 과발현을 시킨 후 세포사멸이 일어난 표현형, 자외선 노출 확인, 트리판블루염색, 그리고 댁염색 결과를 나타낸 도면이고,

도 8은 *CaFDH1*을 고추녹광품종의 잎에 일시적 과발현을 시킨 후 이온전도도를 측정한 결과를 나타낸 도면이고,

도 9는 *CaFDH1*을 고추녹광품종의 잎에 일시적 과발현을 시킨 후 발생한 활성산소를 측정하기 위해 댁염색을 하고 그 염색정도를 나타낸 도면이고,

도 10은 *CaFDH1*을 고추녹광품종의 잎에 일시적 과발현을 시킨 후 발현 여부를 단백질 수준에서 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 11은 *CaFDH1*을 고추 식물의 잎에 일시적 과발현을 시킨 후 병방어관련 유전자의 발현을 나타낸 도면이고

도 12는 *CaFDH1*을 고추 식물의 잎에 일시적 과발현을 시킨 후 병저항성 호르몬인 살리실산의 생성을 관찰한 결

과를 나타낸 도면이고,

도 13은 *CaFDH1*을 고추 식물의 잎에 일시적 과발현을 시킨 후 식물내 포메이트 디하이드로게나아제 효소 활성을 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

도 14는 *CaFDH1* 단백질의 미토콘드리아에 존재 가능성의 추정치를 나타낸 도표이고,

도 15는 *CaFDH1*의 세포내 위치를 *Nicotiana benthamiana* 식물의 잎에서 확인하고 유전자 아미노산 서열의 조각을 이용하여 미토콘드리아 내 위치에 중요한 역할을 하는 아미노산 서열을 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 16은 *CaFDH1*의 아미노산 염기서열 조각을 이용하여 *Nicotiana benthamiana* 식물의 잎에서 과발현시켜 어느 아미노산 서열이 세포사멸을 유도하는 지를 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 17은 *CaFDH1*의 아미노산 염기서열 조각을 이용하여 *Nicotiana benthamiana* 식물의 잎에서 과발현시킨 후 일어나는 세포사멸의 정도를 사멸 면적을 측정하여 나타낸 도면이고,

도 18은 *CaFDH1*의 아미노산 염기서열 조각을 이용하여 *Nicotiana benthamiana* 식물의 잎에서 과발현시킨 후 이온전도도를 나타낸 도면이고,

도 19는 재조합백터 TRV:*CaFDH1*을 제작하고 이를 *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 균주에 도입한 후 이것을 고추 식물이 떡잎 시기일 때 접종하여 제작한 *CaFDH1* 유전자 사일런싱 식물에 세균성 점무늬 병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종한 후 병징을 나타낸 도면이고,

도 20은 도 19에서 제조한 *CaFDH1* 유전자가 사일런싱이 된 고추 식물에서 세균성 점무늬 병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종한 후 세균 생장을 검정한 결과를 나타낸 도면이고,

도 21은 도 19에서 제조한 *CaFDH1* 유전자가 사일런싱이 된 고추 식물에서 세균성 점무늬 병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종한 후 식물내 포메이트 디하이드로게나아제 효소 활성을 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

도 22는 도 19에서 제조한 *CaFDH1* 유전자가 사일런싱이 된 고추 식물에서 세균성 점무늬 병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종한 후 트리판 블루 염색을 통해 세포 사멸을 관찰한 결과 그림과 이온전도도를 측정한 결과를 나타낸 도면이고,

도 23은 도 19에서 제조한 *CaFDH1* 유전자가 사일런싱이 된 고추 식물에서 세균성 점무늬 병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종한 후 댐 염색을 통해 활성산소의 생성을 관찰한 결과 그림과 과산화산소의 발생량을 측정한 결과 그래프이고,

도 24는 도 19에서 제조한 *CaFDH1* 유전자가 사일런싱이 된 고추 식물에서 세균성 점무늬 병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종한 후 병방어 관련 유전자의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 25는 도 19에서 제조한 *CaFDH1* 유전자가 사일런싱이 된 고추 식물에서 세균성 점무늬 병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종한 후 병저항성 호르몬인 살리실산의 생성을 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

도 26은 재조합백터(pBIN35S:*CaFDH1*)를 통해 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 식물체에서 *CaFDH1* 유전자를 과발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 *CaFDH1*의 발현을 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)으로 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 27은 도 26에서 제조한 형질전환식물에 세균성 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*의 병원성 균주 DC3000과 비병원성 균주 DC3000 (*avrRpm1*)을 접종한 후 세균 생장 수를 검정한 결과를 나타낸 도면이고,

도 28은 도 26에서 제조한 형질전환식물에 세균성 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*의 병원성 균주 DC3000과 비병원성 균주 DC3000 (*avrRpm1*)을 접종한 후 병저항성 호르몬인 살리실산의 생성을 관찰한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 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.

- [0050] [실시예 1] *CaFDH1* 유전자의 염기/아미노산 서열 결정
- [0051] 고추 세균성 점무늬병에 대한 병저항성 관련 단백질 중 하나인 포메이트 디하이드로게나아제 (*CaFDH1* : *Capsicum annuum* Formate dehydrogenase1)를 코딩하는 유전자 염기서열 및 그로부터 추론되는 아미노산 서열을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.
- [0052] 고추 녹광 품종 (*Capsicum annuum* cv. Nockwang)에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하고 18시간 동안 습실 처리한 후 저항성 병반인 과민성반응이 나타난 식물체를 습실에서 꺼내어 잎을 수거하였다.
- [0053] 다음에, 이 잎 표본으로부터 mRNA를 추출하여 역전사한 후 이를 PCR(Polymerase Chain Reaction) 증폭함으로써 cDNA 라이브러리를 제작하였다. 그리고 이렇게 제작된 cDNA 라이브러리로부터 개개의 cDNA 클론을 제조하여 나이론막(Hybond N+)에 일정하게 흡착시킨 후, 각각 고추세균성점무늬병균의 비병원성 균주를 접종한 고추식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추식물의 잎에서 추출한 총 mRNA를 디옥시제닌(digoxigenin)으로 표지하여 프로브를 만든 다음, 디퍼런셜 하이브리다이제이션 (differential hybridization)을 수행하였다.
- [0054] 하이브리다이제이션 결과 비병원성 균주가 접종된 식물체의 mRNA 프로브에 대해서만 집중적으로 증폭되어 나타난 유전자를 병 방어(저항성)에 관련된 유전자로 추정하고 클론을 획득하였다.
- [0055] 획득된 클론들을 해독(Sequencing)한 후, 블라스트(Blast) 프로그램을 이용하여 그 5'-말단 서열을 GenBank에 등록된 유전자 데이터베이스와 비교함으로써 *CaFDH1* 단백질 코딩 유전자를 확인하고 고추 포메이트 디하이드로게나아제1(*CaFDH1*) 유전자로 명명하였다. *CaFDH1* 단백질의 아미노산 서열의 분석결과 서열 앞부분에 미토콘드리아 위치화에 관련하는 신호 펩타이드(signal peptide)와 미토콘드리아 타겟팅 서열(mitochondria-targeting sequence)을 가지고 있으며, 중간부분에 효소활성에 관련하여 하나의 D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase NAD-binding signature와 두 개의 D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase signature를 가지고 있으며, 타 식물의 포메이트 디하이드로게나아제와의 아미노산 서열 비교결과를 도 2에 나타내었다(도 2 참조). 확인된 *CaFDH1*의 유전자 염기서열(서열번호 1)과 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열(서열번호 2)을 도 1에 나타내었다.
- [0056] [실시예 2] 여러 고추 기관에서의 *CaFDH1* 유전자 발현 탐색
- [0057] 상기 실시예 1에서 획득한 *CaFDH1* 유전자의 고추 기관 발현 여부를 확인하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.
- [0058] 고추의 각 기관인 잎, 줄기, 뿌리, 꽃, 푸른 열매, 붉은 열매 등에서 RNA를 분리하고, 분리한 RNA를 포름알데히드가 첨가된 겔 상에서 전기영동한 후 나이론막(Hybond N+)으로 전이시켰다.
- [0059] 실시예 1에서 획득한 *CaFDH1* 유전자를 ³²P-dCTP를 이용하여 표지한 후 이를 반응액 [0.25 M 인산완충액, 7% SDS, 1 mM EDTA, 5% 텍스트란 황산염]에서 65℃ 온도로 18시간 동안 배양하여 하이브리다이제이션(hybridization)을 실시하였다. 이렇게 ³²P가 표지된 상기의 DNA 탐침자는 나이론막의 mRNA에 붙게 되며 이 막 위에 X-ray 필름을 놓으면 ³²P가 표지된 DNA가 X-ray 필름을 감광시켜 이 유전자의 발현 여부를 알아볼 수 있게 하였다.
- [0060] 상기 RNA 겔 블롯 수행시 리보솜 RNA양이 동일하게 로딩 되었는가를 확인하는 것이 도 3에 나타났으며 실험결과 *CaFDH1* 유전자는 줄기, 뿌리, 꽃, 푸른 열매 등에서 발현하고 있는 것이 관찰되었다.
- [0061] [실시예 3] 생물적 및 무생물적 스트레스에 의한 *CaFDH1* 유전자의 발현 확인
- [0062] [단계 1]
- [0063] 상기 실시예 1에서 획득한 *CaFDH1* 유전자의 저항성 탐색에의 이용방법을 확인하기 위하여 하기와 같이 시험하였다.

- [0064] 먼저 저항성 탐색방법을 구체적으로 제시하기 위하여 식물체와 친화적 반응을 나타내는 고추 세균성 점무늬병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성균주 Ds1과 불친화적 반응을 나타내는 비병원성 균주 Bv5-4a를 배양한 후, 10^8 cfu / ml의 농도로 6엽기의 고추 녹광 품종 3, 4엽의 뒷면에 주사기를 이용하여 접종 (infiltration)하고, 28℃ 온도와 100% 상대습도 조건에서 18시간 동안 습실처리 하였다. 접종 후 1, 5, 10, 15, 20, 25 시간 후에 각각 접종한 3, 4엽을 채취하여 RNA를 분리하고, 실시예 2와 같이 RNA 겔 블롯을 수행하였다.
- [0065] 상기 RNA 겔 블롯 수행시 리보솜 RNA양이 동일하게 로딩이 되었는지 확인한 것이 도 4에 나타났으며 실험결과 *CaFDH1* 유전자는 병원성, 비병원성 균주에 접종되었을 때 모두 발현이 나타나지만 특히 비병원성 균주에 접종되었을 때 보다 빠르고 강하게 증가하다 감소하는 것을 보였다 (도 4 참조).
- [0066] [단계 2]
- [0067] 상기 단계 1에서처럼 병원균을 접종하고 단백질 수준에서의 발현을 확인하기 위해 병원균 접종식물의 잎을 접종 후 6, 18, 24, 36 시간 후에 수거한 후 단백질을 추출하고 전기영동한 후 나이론 막(Hybond P⁺)에 전이시켰다. 이전에 *CaFDH1* 아미노산 염기서열 중에서 특정 펩타이드(352-KDMLDRYFKGEDF-364; 서열번호 3)를 합성하여 이것을 토끼에 주사하여 항체를 얻었다. 이 항체를 이용하여 면역반응 (immunoblotting)을 수행하였다. 노던블로팅 결과와는 유사하게 단백질 수준에서도 *CaFDH1*의 발현이 고추 세균성 점무늬 병균의 비병원성 균주에 감염되었을 때의 불친화적 반응에서 강하게 발현되는 것으로 확인되었다 (도 5 참조).
- [0068] [단계 3]
- [0069] 무생물적 스트레스에 의한 *CaFDH1* 유전자의 발현을 확인하기 위하여 6 엽기의 고추식물을 봉인된 병에 넣고 에틸렌 5 μL/L를 주사하여 처리하였다. 살리실산 (5mM)과 염화나트륨(200mM)은 0.01%의 트윈20과 함께 살포하여 처리하였다. 건조처리를 위하여 식물을 흙에서 제거한 후 물을 주지 않은 채 두었다. 처리된 고추 식물은 처리 후 1, 5, 10, 15, 20, 25시간 후에 수거하여 상기 실시예 1에서와 같이 노던 블로팅 수행하였다. 그 결과 *CaFDH1* 유전자는 에틸렌, 살리실산, 건조, 및 염처리에서 모두 빠르고 강하게 발현이 되는 것을 확인하였다 (도 6 참조).
- [0070] [실시예 4] 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101)을 매개로 한 *CaFDH1* 유전자 일시적 발현 (*Agrobacterium*-mediated transient expression)이 식물에 미치는 영향
- [0071] [단계 1]
- [0072] 고추 식물에서 과민성 세포 사멸이 일어나는 동안에 *CaFDH1* 유전자의 발현이 강하게 일어났기 때문에 이러한 생리적 반응에서의 이 유전자의 관련성을 알아보기 위하여 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101)을 이용하여 고추 식물에서 *CaFDH1* 유전자를 일시적으로 과발현시켰다. 실시예 1에서 수득한 *CaFDH1* 유전자를 Stratagene에서 제공하는 pBIN35S 벡터에 green fluorscence protein (GFP)과 함께 도입시켜 pBIN35S:*CaFDH1*-GFP 재조합벡터를 제조한 후 이것을 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101)에 전기천공법(electroporation)으로 형질전환시키고 고추 식물 잎에 접종하여 *CaFDH1* 유전자의 과발현을 유도하였다.
- [0073] 접종 후 3일 후에 관찰한 결과 *CaFDH1*을 과발현시킨 부위에서 뚜렷한 세포사멸이 관찰이 되었고 (도 7의 첫 번째 도면), 이는 자외선 노출로서 분명히 되었다 (도 7의 두 번째 도면). 또한 트리판 블루 염색으로 죽은 세포를 시각화 하였으며 (도 7의 세 번째 도면), 댁염색을 통한 활성산소의 생성도 확인하였다 (도 7의 네 번째 도면).
- [0074] [단계 2]

[0075] 상기 실시예 4의 단계 1에서의 세포 사멸의 정도를 정량화하기 위하여 이온 측정기를 이용하여 전도도를 측정하였다. 각각의 실험구와 대조구가 접종된 앞에서 원 모양으로 잘라내서 증류수에 한 번 씻어낸 후 다시 새 증류수에 담근 후 30분 후에 전도도를 측정하였다. 그 결과 *CaFDH1* 유전자가 과발현되어 세포 사멸이 많이 일어나는 앞에서 이온 누출이 많아 전도도가 대조구보다 높은 것을 관찰할 수 있었다 (도 8 참조). 또한 이 유전자의 과발현으로 인한 활성산소의 변화를 정량한 결과 *CaFDH1* 유전자가 과발현되어 세포 사멸이 많이 일어나는 앞에서 활성산소의 생성이 증가하는 것을 확인하였다 (도 9 참조).

[0076] [단계 3]

[0077] 상기 실시예 4의 단계 1과 2에서의 시험에서 *CaFDH1* 단백질의 발현 여부를 확인하기 위하여 아그로박테리움 접종 후 24, 48시간에 잎을 수거하여 단백질을 추출한 후 항GFP 항체를 이용하여 단백질 블로팅을 실시하여 *CaFDH1* 유전자가 과발현된 식물에서만 *CaFDH1* 단백질이 코딩이 되는 것을 확인하였으며 단백질량이 동일하게 로딩이 되었는지도 확인하였다(도 10 참조).

[0078] [단계 4]

[0079] *CaFDH1* 유전자가 과발현된 고추 식물에서 병방어관련 표지 유전자들의 발현을 실시간 역전사 중합효소연쇄반응(Real-time RT-PCR) 실험을 통해 확인하였다. *CaPR1*, *CaPR10*, *CaDEF1* 유전자들의 발현이 *CaFDH1*의 과발현에 의해 모두 증가하여 *CaFDH1*의 발현이 고추 식물의 저항성에 중요한 역할을 하고 있는 것을 확인하였다 (도 11 참조).

[0080] [단계 5]

[0081] *CaFDH1* 유전자가 과발현된 고추 식물에서 병방어관련 호르몬인 살리실산을 검정하였다. 그 결과 살리실산이 *CaFDH1*의 과발현에 의해 증가하는 것을 확인하였다 (도 12 참조).

[0082] [단계 6]

[0083] *CaFDH1* 유전자가 과발현된 고추 식물에서 포메이트 디하이드로게나아제 효소 활성이 증가되는지를 확인하기 위하여 아그로박테리움 접종 후 8, 16, 32, 48시간에 잎을 수거한 뒤 효소용액 (50mM Tris-Cl, pH 8.6, 10mM NaCl, 1 mM MgSO₄, 2% (w/v) polyvinylpyrrolidone, 0.1% (v/v) 2-mercaptoethanol)으로 잎추출물을 추출하고 미라클로드(miracloth)로 걸러낸 뒤, 원심분리하고 상층액을 수거한 뒤 이것을 소듐 포메이트와 NAD⁺를 기질로 하여 100mM 포타슘 포스페이트 용액에서 반응시킨 뒤 340nm에서 흡광도를 측정함으로써 효소활성을 측정한 결과 *CaFDH1* 유전자가 과발현된 잎에서의 포메이트의 산화가 증가되는 것으로 효소 활성을 확인하였다 (도 13 참조).

[0084] [실시예 5] *CaFDH1*의 미토콘드리아 발현확인 및 세포 사멸과의 연관성 검정

[0085] [단계 1]

[0086] 감자의 포메이트 디하이드로게나아제가 미토콘드리아에 존재한다고 보고되어 있고 고추의 *CaFDH1*은 감자의 것도 상동성이 높기 때문에 *CaFDH1*도 미토콘드리아에서 발현되는 것으로 추측되어 predotar, TargetP, MitoProt 등의 웹기반 프로그램을 통해 *CaFDH1*의 세포내 위치를 예측한 결과 미토콘드리아에 존재할 가능성이 매우 높다는 것을 확인하였다 (도 14 참조).

[0087] [단계 2]

[0088] *CaFDH1*의 세포내 발현 위치와 세포 사멸 기능과의 연관 관계를 알아보기 위하여 상기 실시예 4에서 사용된 pBIN35S:*CaFDH1*-GFP를 비롯하여 도 15에 명시된 아미노산 조각들을 이용하여 여러 가지 재조합백터

(pBIN35S:CaFDH1^{MS}-GFP, pBIN35S:CaFDH1^N-GFP, pBIN35S:CaFDH1^{CDHS}-GFP, pBIN35S:CaFDH1^C-GFP, pBIN35S:CaFDH1^C-GFP, pBIN35S:CaFDH1^N-GFP)를 가진 아그로박테리아를 *Nicotiana benthamiana* 잎에 접종한 후에 공초점레이저현미경 (Confocal laser scanning microscope)를 이용하여 세포내 발현 위치를 확인하였고 미토콘드리아 신호펩타이드를 가진 조각은 미토콘드리아에, 그 외의 조각은 세포질에서 발현되는 것이 관찰되었다 (도 15 참조).

[0089] [단계 3]

[0090] 상기 실시예 5의 단계 2에서 사용된 아그로박테리아를 *Nicotiana benthamiana* 잎에 접종한 후에 세포 사멸 여부를 관찰한 결과 D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase signature를 가진 조각들에서 세포 사멸이 유도되는 것으로 확인되어 이 도메인 부분이 미토콘드리아의 위치하는 것보다는 세포사멸에 중요한 역할을 하는 것임을 알 수 있었다 (도 16 참조).

[0091] 이 세포 사멸은 접종된 부위에 비하여 일어나는 세포 사멸 면적을 측정하여 양적 정량하였고 (도 17 참조), 함께 측정한 이온전도도 (도 18 참조) 결과 CaFDH1의 세포사멸 유도 기능을 지지하여 주었다 (도 18 참조).

[0092] [실시예 6] 바이러스 유래 벡터를 이용한 CaFDH1 유전자 발현의 억제와 그에 따른 병 감수성 증가

[0093] [단계 1]

[0094] 고추 식물에서 CaFDH1 유전자의 발현이 억제되었을 때 병저항성 변화를 알아보기 위하여 이 유전자를 바이러스 유래 Tobacco rattle virus (TRV) 벡터에 도입하여 TRV2:CaFDH1 재조합 벡터를 제조하여 바이러스 유도 유전자 침묵 (virus-induced gene silencing, VIGS)을 수행하였다.

[0095] 보다 상세하게 CaFDH1의 5'-비해석부위 (untranslated region)중 26개 뉴클레오타이드 (cagctttttgctgcaaatccactcag-서열번호 4) 부위를 중합효소연쇄반응 (PCR)를 통해 증폭시킨 후 TRV2 vector에 삽입하여 TRV2:CaFDH1 재조합 벡터를 생성하였다. 유전자가 삽입되지 않은 공벡터인 TRV2는 대조구로 이용하였다 (참고문헌 : Baulcombe D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. Curr. Opin. Plant Biol. 2: 109-113).

[0096] 이 벡터를 상기 실시예에서 적용한 것처럼 아그로박테리움에 형질전환시키고 이 균주를 고추 떡잎 생육기에 떡잎에 접종하여 새로 생성되는 잎에서의 이들 유전자의 발현 억제를 유도하였다.

[0097] [단계 2]

[0098] CaFDH1의 발현이 억제된 고추식물에서 세균성 점무늬병에 대해 저항성이 감소되는지 알아보기 위하여 상기 제조된 고추 식물에 세균성 점무늬병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a를 접종한 후 각각의 식물에서 병징을 살펴본 결과 CaFDH1의 발현이 억제된 식물에서 병원성 균주 감염시 병징이 증가 되었고 비병원성 균주에 감염시 과민성 세포 사멸 반응이 감소하였다 (도 19 참조).

[0099] 또한 병원균 접종 후 0일과 3일에 세균 증식을 살펴보았다. CaFDH1의 발현이 억제된 고추식물에서 병원성 균주에 감염되었을 때는 세균 증식에 변화가 없었지만 비병원성 균주에 감염되었을 때에는 세균 증식이 대조구 식물에서보다 증가하였다 (도 20 참조). 그러므로 CaFDH1 유전자가 세균성 점무늬 병균에 대한 병저항성에 관여함을 알 수 있었다.

[0100] [단계 3]

[0101] 상기 실시예 4에서 CaFDH1 유전자의 과발현이 포메이트 디하이드로게나아제 효소 활성을 증가시켰으므로 CaFDH1 유전자가 억제된 고추 식물에서 이 효소 활성이 감소하는지를 확인해보니 대조구에서는 비병원성 세균성 점무늬 병균에 감염되었을 때에 효소 활성이 증가하였으나 CaFDH1 유전자가 억제된 고추 식물에서는 효소 활성이 억제되었다 (도 21 참조).

[0102] [단계 4]

[0103] 상기 실시예 4, 5에서 *CaFDH1*이 세포 사멸과 활성 산소 생성에 역할을 하고 있기 때문에 *CaFDH1* 유전자 발현 억제 동안에 세포 사멸 및 활성 산소의 변화를 관찰하였다. 트리판 블루 (trypan blue) 염색을 통해 죽은 세포를 관찰하여 보니 대조구 식물과 식물에서는 비병원성 균주에 감염되었을 때 과민성 세포 사멸 반응이 일어나고 있었지만 *CaFDH1* 유전자 발현이 억제된 식물에서는 세포사멸 반응이 감소하였다 (도 22 참조). 또한 이온전도도 분석을 통하여 세포 사멸을 양적으로 정량하여 *CaFDH1* 유전자 발현 억제가 세포 사멸 감소에 영향이 있음을 확인하였다 (도 22 참조).

[0104] 또한, 상기 식물에 세균성 점무늬 병균을 접종한 후 덤 염색을 통하여 활성산소를 확인한 결과 단계 4에서의 세포 사멸 결과와 일치하게 대조구 식물에서는 비병원성 균주에 감염되었을 때 강한 활성산소가 검출되었지만 *CaFDH1* 유전자 발현이 억제된 식물에서는 검출이 되지 않았다 (도 23 참조). 과산화수소의 양적 정량 결과는 덤 (DAB) 염색 시험을 지지하여 주었다 (도 23 참조).

[0105] [단계 5]

[0106] *CaFDH1* 유전자의 발현이 억제된 고추 식물에서 세균성 점무늬 병균에 대한 저항성 감소 결과에 따라 병방어관련 표지 유전자들의 발현을 실시간 역전사 중합효소연쇄반응(Real-time RT-PCR) 실험을 통해 확인하였다. *CaPR1*, *CaPR10*, 및 *CaDEF1* 유전자들의 발현이 *CaFDH1* 발현이 억제된 식물에서 모두 감소하였고 이것은 *CaFDH1*의 발현이 고추 식물의 저항성에 중요한 역할을 하고 있는 것임을 알려주었다 (도 24 참조).

[0107] [단계 6]

[0108] 상기 실시예 4에서 *CaFDH1*의 과발현이 병저항성 호르몬 살리신산을 생성하였으므로 상기 유전자 억제 실험에서 세균성 점무늬 병균이 접종된 *CaFDH1* 발현 억제 고추 식물의 잎으로부터 살리실산을 추출하여 정량한 결과 병원균이 감염된 잎에서 *CaFDH1* 유전자의 발현이 억제되었을 때 살리실산의 생성이 감소하였다 (도 25 참조).

[0109] [실시예 7] *CaFDH1* 유전자를 이용한 형질전환 식물체의 제조 및 병저항성 탐색

[0110] [단계 1]

[0111] 상기 실시예에서 이용된 pBIN35S 벡터에 *CaFDH1* 유전자를 삽입하여 만든 재조합벡터 pBIN35S:*CaFDH1*를 아그로박 테리움에 형질전환시킨 후 플로랄 딥핑(floral dipping) 방법을 통하여 애기장대 식물체에 *CaFDH1* 유전자를 도입하여 형질전환시켰다. 형질전환 애기장대 식물체에서의 *CaFDH1* 유전자가 구조적으로 과발현되는지 확인하기 위해 역전사 중합효소연쇄반응 실험을 하여 세 개의 형질전환식물체 계통을 선발하였다 (도 26 참조).

[0112] [단계 2]

[0113] 상기와 같이 *CaFDH1*이 과발현된 형질전환식물에 세균성 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*와 이 병원균의 비병원성 균주 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*avrRpm1*) 균주를 5×10^4 cfu/mL 농도로 접종하고 0, 3일에 잎을 수거하여 잎의 세균 증식을 측정한 결과 *CaFDH1* 유전자가 과발현한 식물들에서 병원성 균주와 비병원성 균주의 증식이 모두 야생형 식물에서보다 억제되었다 (도 27 참조).

[0114] [단계 3]

[0115] 상기와 같이 *CaFDH1*이 과발현된 형질전환식물에 세균성 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*와 이 병원균의 비병원성 균주 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*avrRpm1*) 균주를 5×10^4 cfu/mL 농도로 접종하고 0, 1, 3일

에 있을 수거하여 병저항성 호르몬 살리실산을 정량한 결과 *CaFDH1* 유전자가 과발현한 식물들에서 병원성 균주와 비병원성 균주의 감염시 살리실산의 생성이 대조구인 야생형 식물보다 증가하였다 (도 28 참조). 그러므로 *CaFDH1*의 과발현이 애기장대 식물에 세균성 병원균에 대한 저항성을 부여한다는 것을 알 수 있었다.

[0116]

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

도면

도면1

```

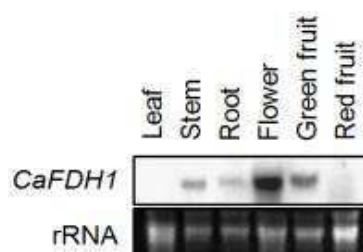
ttcttctctcactcttctctcttttttagtaagtaataaagtaacagctttttgctgcaaa 59
tccactcagatgcccgaatgagggctgtggcatctacagcagctcgtgcttttgccttcacct 119
M A M R R V A S T A A R A F A S P 17
TCATCCTTAGTTTTACCAGACAACCTCAGGCTTCCCCTGGCCCCAAAAAGATTGTGGT 179
S S L V F T P Q L Q A S P G P K K I V G 37
GTTTTCTACAAACCAAGAAATGCTGAAATGAACCCCACTTTTTGGGCTGCGCAGAA 239
V F V K A N E Y A E M N P N F L G C A E 57
AATGCCTTGGGGATACGTGAATGGTTAGAATCTAAAGGTCATGAGTACATAGTCACTCCT 299
N A L G I R E W L E S K G H E Y I V T P 77
GACAAAGACGGACAGATTCTGAGCTTGAGAAACACATTCTGATCTCCATGTGTGGATT 359
D K D G P D S E L E K H I P D L H V L I 97
TCGACCCCTTTCATCCTGCCTATGTACGGCTGAAAGAAATCAAGAAAGCAAAAAATTA 419
S T P F H P A V V T A E R I K K A K N L 117
CAACTTCTGCTGACAGCTGGAATTGGGTCAGATCATGTTGATCTGAAAGCCGCTGCTGCT 479
Q L L L L T A G I G S D H V D L K A A A A 137
GCGGGGTTGACAGTACGAGAGGTCAGTGAAGCAATACGTCTCAGTTGCGGAAGATGAA 539
A G L T V A E V T G S N T V S V A E D E 157
CTGATGCGAATCTTAATTCTTGTTCGAAATTTCTGCTGGACATCATCAGGTTATCAAT 599
L M R I L I L V R N F L P G H H Q V I N 177
GGGACTGGAATGTGCTGCACTGCTTACAGAGCTTATGATTTGGAAGGCAAGACTGTC 659
G D W N V A G I A Y R A V D L E G K T V 197
GGAAGTGTGGTGACGAGGATTTGCGAGACTTTTACTCCAAGATTGAAGCCATTTAAC 719
G T V G A G R I G R L L L Q R L K P F N 217
TGTAATCTACTTTACCATGATGCTCTTAAGATGGATCCGAGCTGGAAAGTCAAAATCGGA 779
C N L L Y H D R L K M D P E L E S Q I G 237
GCAAAGTTAGAGGAAGCTCTGATAAGATGCTCTGAAATGTGACATAGTGGTCATCAAT 839
A K L E E D L D K M L S K C D I V V I N 257
ACACCTCTTACAGAGAAAAACAAAGGGATGTTTGACAAGGAAAAAATGCAAAAGTTGAAG 899
T P L T E K T K G M F D K E K I A K L K 277
AAGGGAGTTCTAATTGTAAACAATGCTCGAGGAGCAATCATGGACACTCAAGCAGTTGTC 959
K G V L I V N N A R G A I M D T Q A V V 297
GATGCTTGTAAACAGTGGTCATATTGCGAGATACAGTGGAGATGTTTGGTACCCACAACCA 1019
D A C N S G H I A G V S G D V W V P Q P 317
GCTCCCAAGGACCATCCGTGGGCTACATGCCAAACCAAGCTATGACCCGACACATTTCT 1079
A P K D H P W R V M P N Q A M T P H I S 337
GGGACTACCATTTGATGCTCAGTTGCGGTACGAGCTGGAACGAAGGATATGCTGGACAGG 1139
G T T I D A Q L R V A A G T K D M L D R 357
TACTTCAAGGGTGAGGATTTCCCTGCTGAAATTAACATTGTCAAGGATGGGGAACTGGCA 1199
Y F K G E D F P A E N Y I V K D G E L A 377
CCCCAGTATCGCTAAatcatcaatgtacctaagggtatgtctagatttctctgtcaata 1259
P Q V R * 381
aactggcaagctgtgtcttcaataaactgataaatttggctacttatctctcttttagaac 1319
atctgggaatggagtttttctcggttgggtgtaacgtaacatttggatggaaacatgtcc 1379
gcttttggatggaggtctatgtataatcctccatgggtcttcttggatctataattgg 1439
gaacaatattttagatgttgtaagtattgtcgcaatagcttatgctaattcttgactaa 1499
gacgcgagggagaaacttgggaagaaaatcacttaattacaatggaggaaaagagaatttg 1559
acatcacatttaaaaaaataaaaaaataaaaaaataaaaaa 1594

```

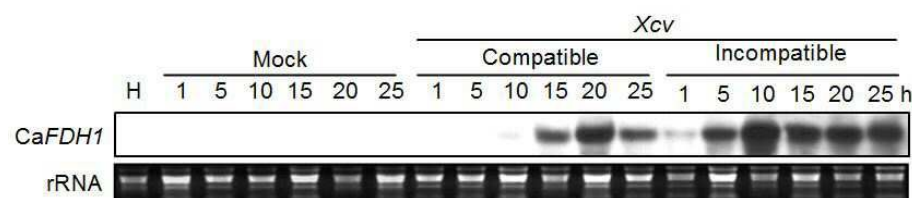
도면2

	Signal peptide	Mitochondria-targeting sequence	
Pepper CaFDH1	MA-MRRVASTAA---PAFASPSLSVF--TRQLQASGP	KKIVGVFVKANEVAENPNPF	52
Potato MFDH	MA-MSRVASTAA---PAITSPSSLVF--TRELDASGP	KKIVGVFVKANEVAENPNPF	52
Tomato FDH	MA-MRRVASTAA---PAIASPSLSVF--TRELDASGP	KKIVGVFVKANEVAENPNPF	52
Arabidopsis FDH	MA-MRDAKAT1---PACSSSSSGVFAPRQFNASSGDS	KKIVGVFVKANEVAENPNPF	55
Rice Putative FDH	MA-MWPASAAGQLLGPALASTAA---QTSAGS	KKVGVFVKGGVADKNPNF	49
Barley FDH	MAAMWFA-AARQLVD-PA---VG-SRAAHTSAGS	KKIVGVFVQAGEVADKNPNF	48
Pepper CaFDH1	UGDAENALGIPEULESKGHVIVTFOKEGPOCELBKHIFD	HMLISTPRHPAYMTAERIK	112
Potato MFDH	UGDAENALGIPEULESKGHVIVTFOKEGPOCELBKHIFD	HMLISTPRHPAYMTAERIK	112
Tomato FDH	UGDAENALGIPEULESKGHVIVTFOKEGPOCELBKHIFD	HMLISTPRHPAYMTAERIK	112
Arabidopsis FDH	UGDAENALGIPEULESKGHVIVTFOKEGPOCELBKHIFD	HMLISTPRHPAYMTAERIK	115
Rice Putative FDH	UGDAENALGIPEULESKGHVIVTFOKEGPOCELBKHIFD	HMLISTPRHPAYMTAERIK	109
Barley FDH	UGDAENALGIPEULESKGHVIVTFOKEGPOCELBKHIFD	HMLISTPRHPAYMTAERIK	108
Pepper CaFDH1	KAKNLQLLLTAGTGSDFDLKAAAAAGLTVAEITGSNTVSVAED	ELMRILILVFNFLPGH	172
Potato MFDH	KAKNLQLLLTAGTGSDFDLKAAAAAGLTVAEITGSNTVSVAED	ELMRILILVFNFLPGH	172
Tomato FDH	KAKNLQLLLTAGTGSDFDLKAAAAAGLTVAEITGSNTVSVAED	ELMRILILVFNFLPGH	172
Arabidopsis FDH	KAKNLQLLLTAGTGSDFDLKAAAAAGLTVAEITGSNTVSVAED	ELMRILILVFNFLPGH	175
Rice Putative FDH	KAKNLQLLLTAGTGSDFDLKAAAAAGLTVAEITGSNTVSVAED	ELMRILILVFNFLPGH	149
Barley FDH	KAKNLQLLLTAGTGSDFDLKAAAAAGLTVAEITGSNTVSVAED	ELMRILILVFNFLPGH	148
Pepper CaFDH1	HIVINDEWVAGTAVFAVDLEGKTIGTVGAGRTIGELL	LLQRLKPFNDLLVHCLKNDPEL	232
Potato MFDH	HIVINDEWVAGTAVFAVDLEGKTIGTVGAGRTIGELL	LLQRLKPFNDLLVHCLKNDPEL	232
Tomato FDH	HIVINDEWVAGTAVFAVDLEGKTIGTVGAGRTIGELL	LLQRLKPFNDLLVHCLKNDPEL	232
Arabidopsis FDH	HIVINDEWVAGTAVFAVDLEGKTIGTVGAGRTIGELL	LLQRLKPFNDLLVHCLKNDPEL	235
Rice Putative FDH	HIVINDEWVAGTAVFAVDLEGKTIGTVGAGRTIGELL	LLQRLKPFNDLLVHCLKNDPEL	229
Barley FDH	HIVINDEWVAGTAVFAVDLEGKTIGTVGAGRTIGELL	LLQRLKPFNDLLVHCLKNDPEL	228
Pepper CaFDH1	ESQIGAKLEEDLDMILSKDIIWINTPLTBKTGMFQKEK	IANKKGVITVNNARGAIND	292
Potato MFDH	ESQIGAKLEEDLDMILSKDIIWINTPLTBKTGMFQKEK	IANKKGVITVNNARGAIND	292
Tomato FDH	ESQIGAKLEEDLDMILSKDIIWINTPLTBKTGMFQKEK	IANKKGVITVNNARGAIND	292
Arabidopsis FDH	ESQIGAKLEEDLDMILSKDIIWINTPLTBKTGMFQKEK	IANKKGVITVNNARGAIND	295
Rice Putative FDH	ESQIGAKLEEDLDMILSKDIIWINTPLTBKTGMFQKEK	IANKKGVITVNNARGAIND	289
Barley FDH	ESQIGAKLEEDLDMILSKDIIWINTPLTBKTGMFQKEK	IANKKGVITVNNARGAIND	288
Pepper CaFDH1	TQAVWDACKSGTLAGVSGDWVFPQAPKDHWRMPN	AMTPHISGTTIDACLRYAAGTK	352
Potato MFDH	TQAVWDACKSGTLAGVSGDWVFPQAPKDHWRMPN	AMTPHISGTTIDACLRYAAGTK	352
Tomato FDH	TQAVWDACKSGTLAGVSGDWVFPQAPKDHWRMPN	AMTPHISGTTIDACLRYAAGTK	352
Arabidopsis FDH	TQAVWDACKSGTLAGVSGDWVFPQAPKDHWRMPN	AMTPHISGTTIDACLRYAAGTK	355
Rice Putative FDH	TQAVWDACKSGTLAGVSGDWVFPQAPKDHWRMPN	AMTPHISGTTIDACLRYAAGTK	349
Barley FDH	TQAVWDACKSGTLAGVSGDWVFPQAPKDHWRMPN	AMTPHISGTTIDACLRYAAGTK	348
Pepper CaFDH1	DMLDRVFKGEFFRAENVIWKQELAPQMR		381
Potato MFDH	DMLDRVFKGEFFRAENVIWKQELAPQMR (96%)		381
Tomato FDH	DMLDRVFKGEFFRAENVIWKQELAPQMR (96%)		381
Arabidopsis FDH	DMLDRVFKGEFFRAENVIWKQELAPQMR (82%)		385
Rice Putative FDH	DMLDRVFKGEFFRAENVIWKQELAPQMR (77%)		379
Barley FDH	DMLDRVFKGEFFRAENVIWKQELAPQMR (82%)		377

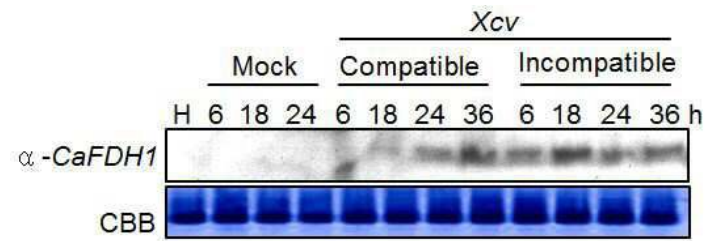
도면3



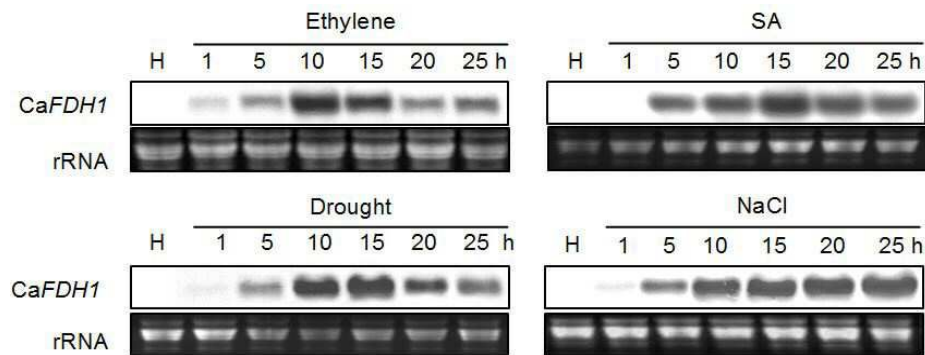
도면4



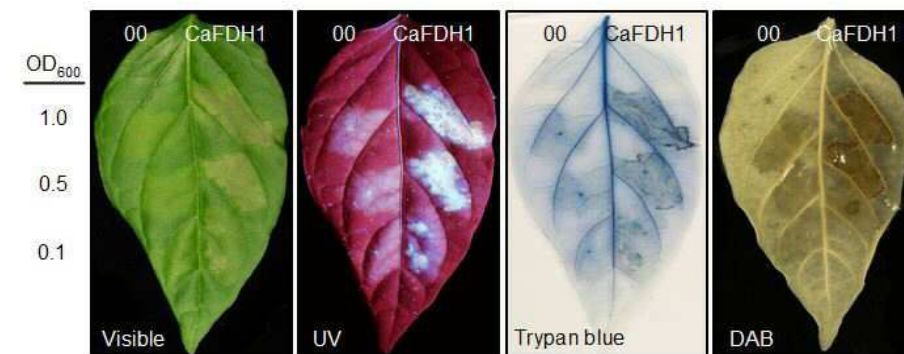
도면5



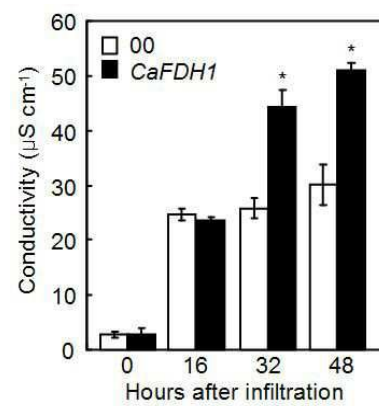
도면6



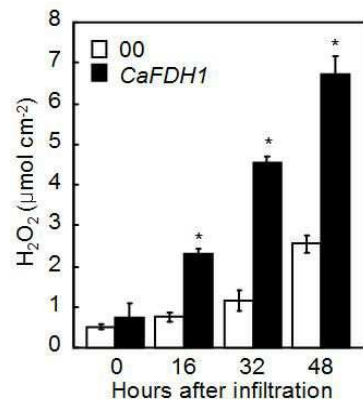
도면7



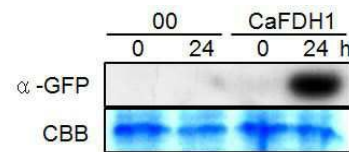
도면8



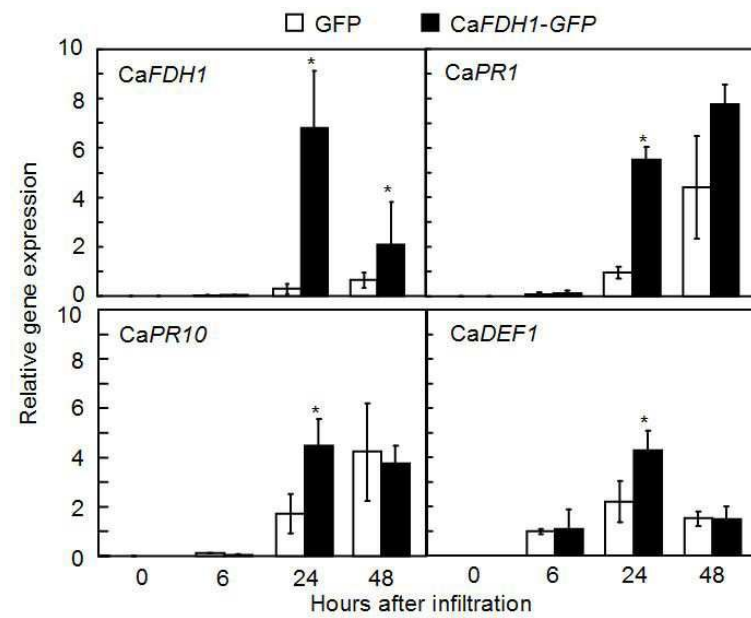
도면9



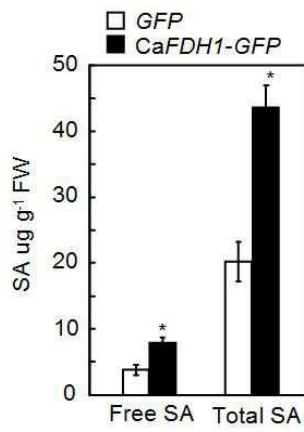
도면10



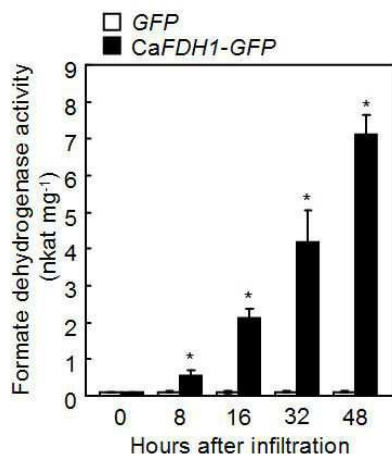
도면11



도면12



도면13



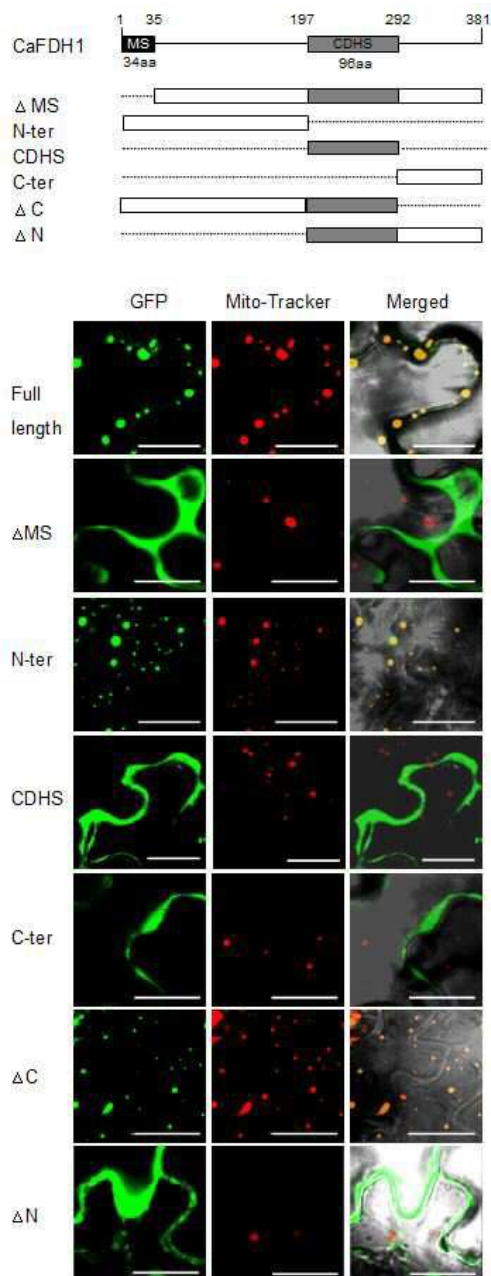
도면14

Predotar, TargetP, and MitoProt prediction for the ability of CaFDH1 deletion mutants to target to mitochondria

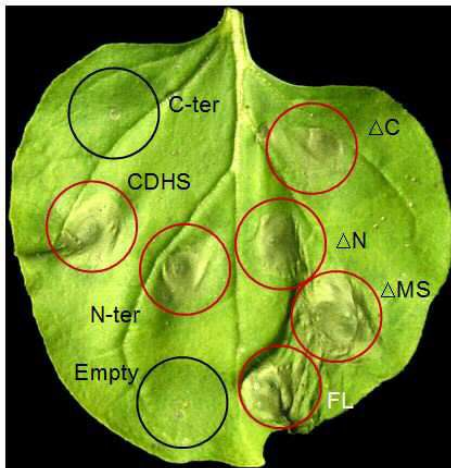
	Predotar ^a	TargetP ^b	MitoProt ^c
Full length	0.89	0.938	0.9987
ΔMS	0.01	0.083	0.0449
N-ter	0.89	0.938	0.9987
CDHS	0.3	0.623	0.8429
C-ter	0.01	0.088	0.1149
ΔC	0.89	0.938	0.9987
ΔN	0.3	0.663	0.8663

a, The number in Predotar (<http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>) provides a probability estimate as to whether the sequence contains a mitochondrial targeting sequence; b, TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) score for containing mitochondrial targeting peptides; c, MitoProt (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) calculates the N-terminal protein region that can support a mitochondrial targeting sequence and the cleavage site.

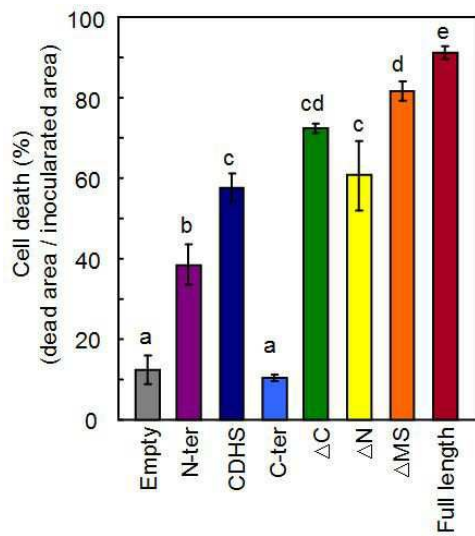
도면15



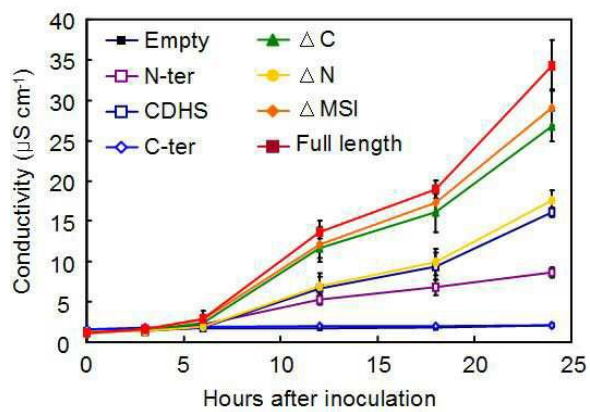
도면16



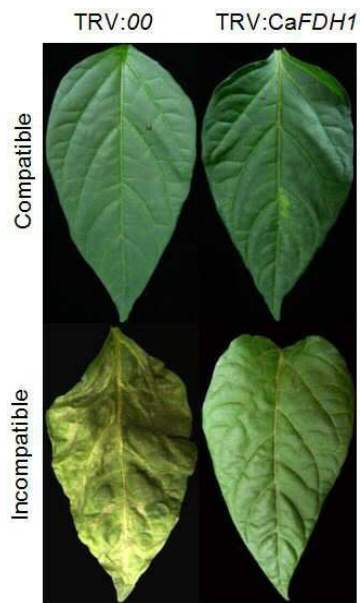
도면17



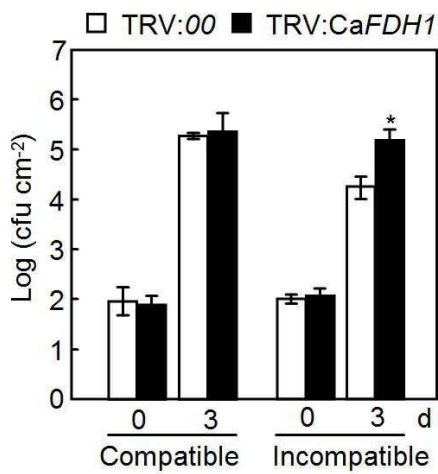
도면18



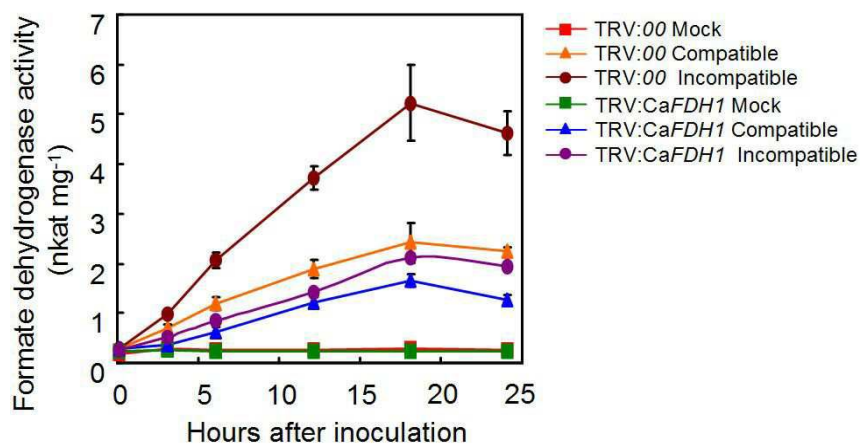
도면19



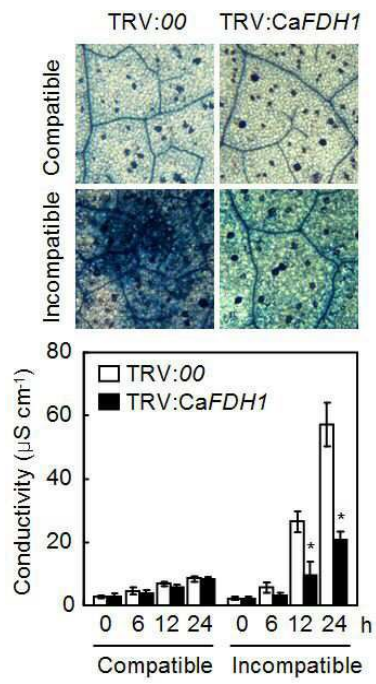
도면20



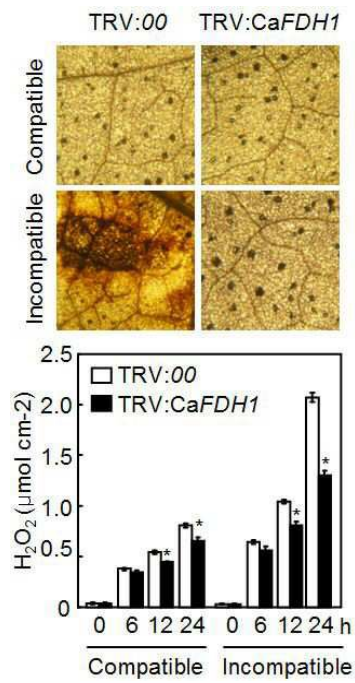
도면21



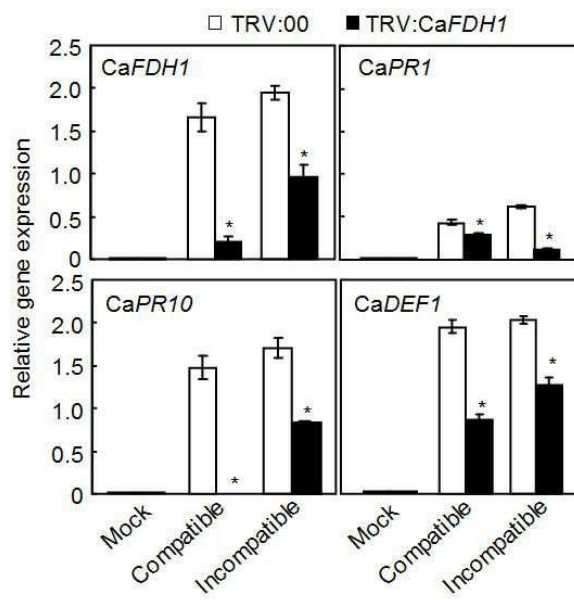
도면22



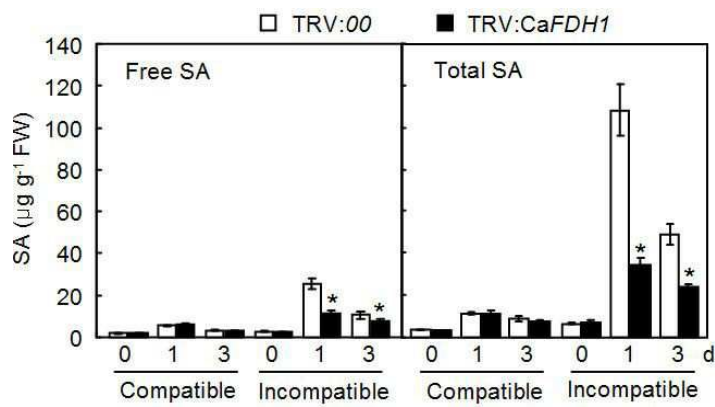
도면23



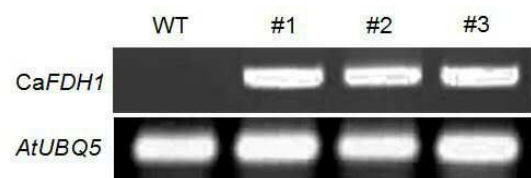
도면24



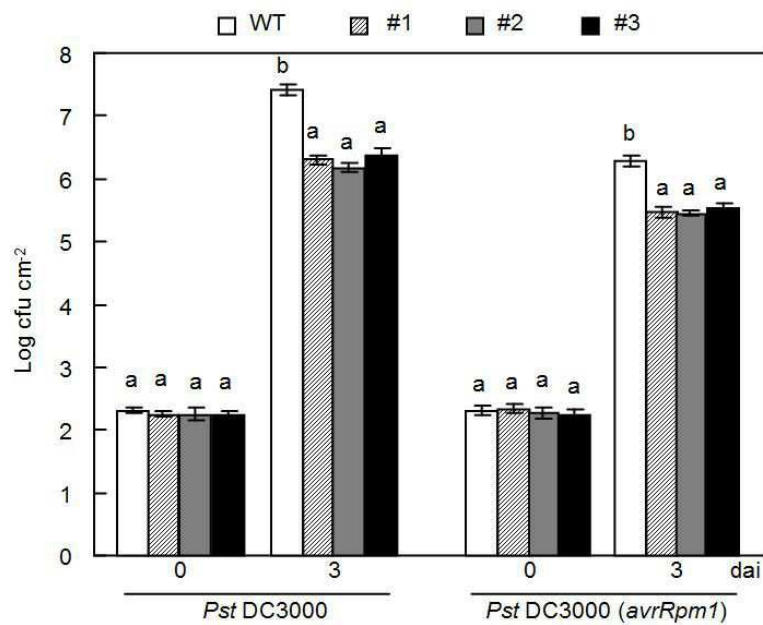
도면25



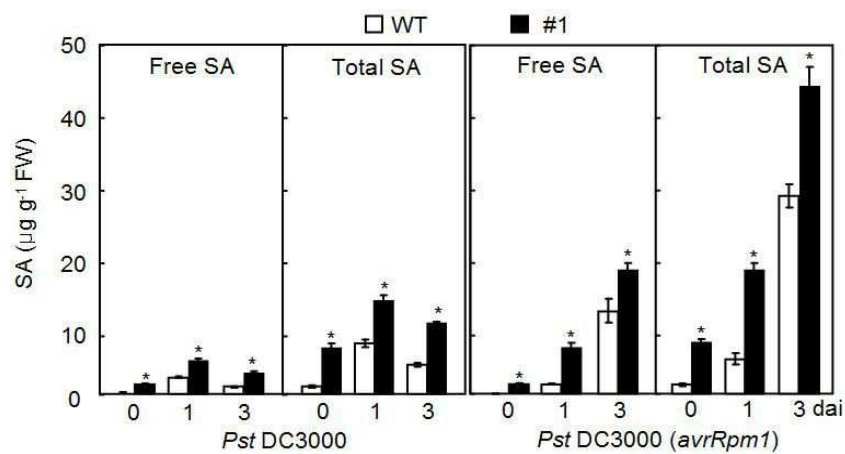
도면26



도면27



도면28



서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> Cell death-related mitochondrial Formate dehydrogenase1 gene
CaFDH1, and transgenic plants using the same
- <130> P11-120730-01
- <160> 4
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 1594
- <212> DNA
- <213> Capsicum annuum cv. Nockwang

<400> 1

ttcttctctc acttctctct ctttttagta agtaataaag tacagctttt tgctgcaaat	60
ccactcagat ggcatgagg cgtgtggcat ctacagcagc tcgtgctttt gcttcacctt	120
catccttagt tttaccaga caacttcagg ctccccctgg ccccaaaaag attgttggtg	180
ttttctacaa agcaaacgaa tatgctgaaa tgaaccccaa ctttttgggc tgcgagaaaa	240
atgccttggg gatacgtgaa tggttagaat ctaaaggcca tgaglacata gtcactcctg	300
acaaagacgg accagattct gagcttgaga aacacattcc tgatctccat gtgttgattt	360
cgacccctt tcatcctgcc tatgtcacgg ctgaaagaat caagaaggca aaaaatttac	420
aacttctgct gacagctgga attgggtcag atcatgttga tctgaaagcc gctgctgctg	480
cggggttgac agtagcagag gtcactggaa gcaatactgt ctgagttgcg gaagatgaac	540
tgatgcgaat ctttaattct gttcgaaatt ttctgcctgg acatcatcag gttatcaatg	600
gggactggaa tgttctggc attgcttaca gagcttatga tttggaaggc aagactgtcg	660
gaactgttgg tgcaggacgt attggcagac ttttactcca acgattgaag ccattttaact	720
glaacttact ttacatgat cgtcttaaga tggatccgga gctggaaagt caaatcggag	780
caaagttaga ggaagatctc gataagatgc tctcgaaatg tgacatagtg gtcacataa	840
cacctcttac agagaaaaca aaagggatgt ttgacaagga aaaaattgca aagttgaaga	900
agggagttct aattgtaaac aatgctcgag gagcaatcat ggacactcaa gcagttgtcg	960
atgcttgtaa cagtggtcat attgcaggat acagtggaga tgtttgttac ccacaaccag	1020
ctccaagga ccatcgtgg cgctacatgc caaaccaagc tatgaccccg cacatttctg	1080
ggactacat tgatgctcag ttgcgtacg cagctggaac gaaggatatg ctggacaggt	1140
acttcaaggg tgaggatttc cctgctgaaa attacattgt caaggatggg gaactggcac	1200
cccagtatcg cttaatcatc aatgtacctt gggctatgtc tagatttctc tgtcaataa	1260
actggcaagc tgtgtcttca ataaactgat aaatttggct acttatcttc ttttagaaca	1320
tctggaatgg agtttttctt cggttggttg taacgtaaca tttggatgga aacatgtccg	1380
cttttgtgat ggaggcttat gtataatcct ccattgtctt tcttgagtac tataattggg	1440
aaacaatttt atgatgttgc taagtatttg tcgcaatagc ttatgctaatt ctgactaag	1500
acgcgaggga gaacttggga agaaaatcac ttaattacaa tggaggaaaa gagaatttga	1560
catcacatta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa	1594

<210> 2

<211> 381

<212> PRT

<213> Capsicum annuum cv. Nockwang

<400> 2

Met Ala Met Arg Arg Val Ala Ser Thr Ala Ala Arg Ala Phe Ala Ser

1 5 10 15

Pro Ser Ser Leu Val Phe Thr Arg Gln Leu Gln Ala Ser Pro Gly Pro

20 25 30

Lys Lys Ile Val Gly Val Phe Tyr Lys Ala Asn Glu Tyr Ala Glu Met

35 40 45

Asn Pro Asn Phe Leu Gly Cys Ala Glu Asn Ala Leu Gly Ile Arg Glu

50 55 60

Trp Leu Glu Ser Lys Gly His Glu Tyr Ile Val Thr Pro Asp Lys Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

Ile Ser Thr Pro Phe His Pro Ala Tyr Val Thr Ala Glu Arg Ile Lys

100 105 110

Lys Ala Lys Asn Leu Gln Leu Leu Leu Thr Ala Gly Ile Gly Ser Asp

115 120 125

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

130 135 140

Val Thr Gly Ser Asn Thr Val Ser Val Ala Glu Asp Glu Leu Met Arg

145 150 155 160

Ile Leu Ile Leu Val Arg Asn Phe Leu Pro Gly His His Gln Val Ile

165 170 175

Asn Gly Asp Trp Asn Val Ala Gly Ile Ala Tyr Arg Ala Tyr Asp Leu

180 185 190

Glu Gly Lys Thr Val Gly Thr Val Gly Ala Gly Arg Ile Gly Arg Leu

195 200 205

Leu Leu Gln Arg Leu Lys Pro Phe Asn Cys Asn Leu Leu Tyr His Asp

210 215 220

Arg Leu Lys Met Asp Pro Glu Leu Glu Ser Gln Ile Gly Ala Lys Leu

[illegible]

<210>	3
<211>	13
<212>	PRT
<213>	Capsicum annuum cv. Nockwang
<400>	3
Lys Asp Met Leu Asp Arg Tyr Phe Lys Gly Glu Asp Phe	

1 5 10

<210>	4
<211>	26
<212>	DNA
<213>	Capsicum annuum cv. Nockwang
<400>	4

cagctttttg ctgcaaattc actcag