



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년07월18일

(11) 등록번호 10-1879741

(24) 등록일자 2018년07월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/415 (2006.01) A01H 5/00 (2018.01)

C12N 15/29 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-7000250

(22) 출원일자(국제) 2011년06월24일

심사청구일자 2016년06월16일

(85) 번역문제출일자 2013년01월04일

(65) 공개번호 10-2013-0114072

(43) 공개일자 2013년10월16일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2011/051192

(87) 국제공개번호 WO 2011/161466

국제공개일자 2011년12월29일

(30) 우선권주장

1010740.7 2010년06월25일 영국(GB)

(56) 선행기술조사문현

JP2006503544 A

(73) 특허권자

신젠타 파티서페이션즈 아게

스위스 4058 바젤 슈바르츠발달레 215

(72) 발명자

월시 존 앤서니

영국 코번트리 씨브이4 8유더블유 커비 코너 로드
유니버시티 하우스 더 유니버스티 오브 워릭

넬리스트 살롯 플로렌스

영국 코번트리 씨브이1 4에이알 카운든 로드 33

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 남앤드남

전체 청구항 수 : 총 19 항

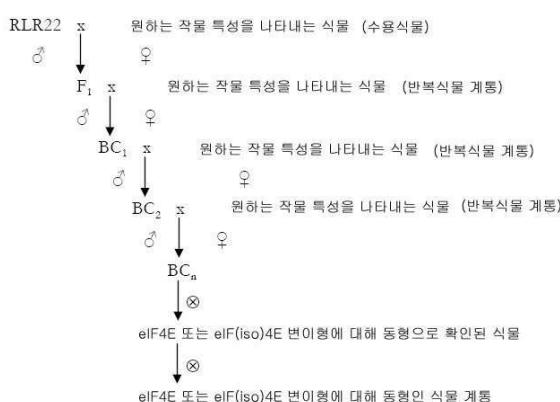
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 식물의 진핵생물 번역 개시인자 4 E

(57) 요 약

본 발명은 식물, 특히, 바이러스 저항성 식물 및 그러한 식물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 진핵생물의 번역 개시인자 변이형 및 그의 이소형까지, 그리고 그러한 변이형 인자의 스플라이싱에 관련된 핵산 및 바이러스 감염에 저항성을 나타내는 식물 생산 방법에서 이의 용도까지 이어진다.

대 표 도 - 도8



(72) 발명자

바커 가이 카메론

영국 코번트리 씨브이32 7이유 레밍턴 스파 하이랜
드 로드 49

제너 캐롤 엘리자베스

영국 브로드웨이 더블유알12 7이엑스 플리스 로드
4

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

식물의 진핵생물 번역 개시인자 4E 이소형(eIF(iso)4E) 단백질을 암호화하는 분리된 핵산 분자로서, 핵산 분자는 eIF(iso)4E 단백질이 바이러스에 대해 저항성을 부여하도록 eIF(iso)4E 단백질을 암호화하는 핵산 분자의 인트론 1, 2, 3 또는 4에서 잘못 스플라이스되고,

eIF(iso)4E 단백질을 암호화하는 잘못 스플라이스된 핵산 분자가 상기 핵산 분자의 변경에 의해 유발되고,

상기 변경은 삽입, 결실, 치환 또는 이들의 임의의 조합을 포함하고,

상기 변경은 SEQ ID No: 1 또는 55의 eIF(iso)4E 단백질을 암호화하는 핵산 분자에 이루어지고,

인트론 1은 SEQ ID No.1의 201번 내지 263번 염기에 해당하고, 인트론 2는 SEQ ID No.1의 439번 내지 509번 염기에 해당하고, 인트론 3은 SEQ ID No.1의 636번 내지 1187번 염기에 해당하며, 인트론 4는 SEQ ID No.1의

1254번 내지 1339번 염기에 해당하거나; 인트론 1은 SEQ ID No.55의 204번 내지 275번 염기에 해당하고, 인트론 2는 SEQ ID No.55의 451번 내지 526번 염기에 해당하고, 인트론 3은 SEQ ID No.55의 653번 내지 907번 염기에 해당하며, 인트론 4는 SEQ ID No.55의 1033번 내지 1115번 염기에 해당하는, 식물의 진핵생물 번역 개시인자 4E 이소형(eIF(iso)4E) 단백질을 암호화하는 분리된 핵산 분자.

청구항 13

제12항에 있어서, eIF(iso)4E 단백질은 바이러스에 대해 저항성을 부여하는, 분리된 식물의 진핵생물 번역 개시인자 4E 이소형(eIF(iso)4E) 단백질 변이형으로서, eIF(iso)4E 단백질 변이형을 암호화하는 핵산이 eIF(iso)4E 단백질 변이형을 암호화하는 핵산 서열의 인트론 1, 2, 3 또는 4에서 잘못 스플라이스(mis-spliced)되고,

eIF(iso)4E 단백질을 암호화하는 잘못 스플라이스된 핵산 서열이 상기 핵산 서열의 변경에 의해 유발되고,

상기 변경은 삽입, 결실, 치환 또는 이들의 임의의 조합을 포함하고,

상기 변경은 SEQ ID No: 1 또는 55의 eIF(iso)4E 단백질을 암호화하는 핵산 서열에 이루어지고,

인트론 1은 SEQ ID No.1의 201번 내지 263번 염기에 해당하고, 인트론 2는 SEQ ID No.1의 439번 내지 509번 염기에 해당하고, 인트론 3은 SEQ ID No.1의 636번 내지 1187번 염기에 해당하며, 인트론 4는 SEQ ID No.1의 1254번 내지 1339번 염기에 해당하거나; 인트론 1은 SEQ ID No.55의 204번 내지 275번 염기에 해당하고, 인트론 2는 SEQ ID No.55의 451번 내지 526번 염기에 해당하고, 인트론 3은 SEQ ID No.55의 653번 내지 907번 염기에 해당하며, 인트론 4는 SEQ ID No.55의 1033번 내지 1115번 염기에 해당하는, 분리된 핵산 분자.

청구항 14

제13항에 따른 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 15

제14항에 따른 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

시험 브라시카 식물에서,

(i) 바이러스에 대해 저항성을 부여하는, 식물의 진핵생물 번역 개시인자 4E 이소형(eIF(iso)4E)으로서, eIF(iso)4E 단백질 변이형을 암호화하는 핵산이 eIF(iso)4E 단백질 변이형을 암호화하는 핵산 서열의 인트론 1, 2, 3 또는 4에서 잘못 스플라이스(mis-spliced)되고,

eIF(iso)4E 단백질을 암호화하는 잘못 스플라이스된 핵산 서열이 상기 핵산 서열의 변경에 의해 유발되고,

상기 변경은 삽입, 결실, 치환 또는 이들의 임의의 조합을 포함하고,

상기 변경은 SEQ ID No: 1 또는 55의 eIF(iso)4E 단백질을 암호화하는 핵산 서열에 이루어지고,

인트론 1은 SEQ ID No.1의 201번 내지 263번 염기에 해당하고, 인트론 2는 SEQ ID No.1의 439번 내지 509번 염기에 해당하고, 인트론 3은 SEQ ID No.1의 636번 내지 1187번 염기에 해당하며, 인트론 4는 SEQ ID No.1의 1254번 내지 1339번 염기에 해당하거나; 인트론 1은 SEQ ID No.55의 204번 내지 275번 염기에 해당하고, 인트론 2는 SEQ ID No.55의 451번 내지 526번 염기에 해당하고, 인트론 3은 SEQ ID No.55의 653번 내지 907번 염기에 해당하며, 인트론 4는 SEQ ID No.55의 1033번 내지 1115번 염기에 해당하는, 식물의 진핵생물 번역 개시인자 4E

이소형(eIF(iso)4E); 및

(ii) 적어도 하나의 야생형 eIF4E 또는 eIF(iso)4E의 카페로서, 여기서 야생형 eIF4E 또는 eIF(iso)4E의 카페는 브라시카 식물에 의해 이용될 수 있지만, 바이러스에 의해 이용될 수 없는, 적어도 하나의 야생형 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 카페의 존재를 검출하는 단계를 포함하는, 바이러스 저항성 브라시카 식물의 선택 방법.

청구항 20

삭제

청구항 21

바이러스 저항성 브라시카 식물을 생산하는 방법으로, 방법은 식물의 진핵생물 번역 개시인자 4E 이소형(eIF(iso)4E) 단백질을 발현하는 모체 브라시카 식물을 수용 브라시카 식물과 교배시키는 단계를 포함하며, 식물의 진핵생물 번역 개시인자 4E 이소형(eIF(iso)4E)은 바이러스에 대해 저항성을 부여하고, eIF(iso)4E 단백질 변이형을 암호화하는 핵산이 eIF(iso)4E 단백질 변이형을 암호화하는 핵산 서열의 인트론 1, 2, 3 또는 4에서 잘못 스플라이스(mis-spliced)되고,

eIF(iso)4E 단백질을 암호화하는 잘못 스플라이스된 핵산 서열이 상기 핵산 서열의 변경에 의해 유발되고,

상기 변경은 삽입, 결실, 치환 또는 이들의 임의의 조합을 포함하고,

상기 변경은 SEQ ID No: 1 또는 55의 eIF(iso)4E 단백질을 암호화하는 핵산 서열에 이루어지고,

인트론 1은 SEQ ID No.1의 201번 내지 263번 염기에 해당하고, 인트론 2는 SEQ ID No.1의 439번 내지 509번 염기에 해당하고, 인트론 3은 SEQ ID No.1의 636번 내지 1187번 염기에 해당하며, 인트론 4는 SEQ ID No.1의 1254번 내지 1339번 염기에 해당하거나; 인트론 1은 SEQ ID No.55의 204번 내지 275번 염기에 해당하고, 인트론 2는 SEQ ID No.55의 451번 내지 526번 염기에 해당하고, 인트론 3은 SEQ ID No.55의 653번 내지 907번 염기에 해당하며, 인트론 4는 SEQ ID No.55의 1033번 내지 1115번 염기에 해당하고, 수용 브라시카 식물은 농경상 장점, 상업상 장점 및 특정 기후 또는 토양에 대한 적합성으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 특성을 포함하는, 바이러스 저항성 브라시카 식물을 생산하는 방법.

청구항 22

제21항에 따른 방법에 의해 생산되거나 얻을 수 있는 바이러스 저항성 브라시카 식물.

청구항 23

제12항에 따른 핵산을 포함하는 바이러스 저항성 브라시카 식물.

청구항 24

제22항에 있어서, 식물은 적어도 하나의 야생형 eIF4E 또는 eIF(iso)4E의 카페를 발현하며, 야생형 eIF4E 또는 eIF(iso)4E의 카페는 브라시카 식물에 의해 이용될 수 있지만, 바이러스에 의해 이용될 수 없는, 바이러스 저항성 브라시카 식물.

청구항 25

제22항에 있어서, 식물은 브라시카 올레라케아 (*Brassica oleracea*) 또는 바라시카 나푸스 (*Brassica napus*)인, 바이러스 저항성 브라시카 식물.

청구항 26

삭제

청구항 27

제22항에 있어서, 브라시카 식물은 eIF(iso)4E에 대해 동형인, 바이러스 저항성 브라시카 식물.

청구항 28

삭제

청구항 29

식물의 진핵생물 번역 개시인자 4E 이소형(eIF(iso)4E)을 암호화하는 분리된 핵산 분자로서, eIF(iso)4E는 바이러스에 대해 저항성을 부여하고, 핵산 분자는 SEQ ID No: 4, 5, 7, 9, 58 또는 59에 기재된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 식물의 진핵생물 번역 개시인자 4E 이소형(eIF(iso)4E)을 암호화하는 분리된 핵산 분자.

청구항 30

바이러스에 대해 저항성을 부여하는, 분리된 식물의 진핵생물 번역 개시인자 4E 이소형(eIF(iso)4E) 단백질 변이형으로서, eIF(iso)4E 단백질 변이형은 SEQ ID No: 6, 8, 10 또는 60에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는, 분리된 식물의 진핵생물 번역 개시인자 4E 이소형(eIF(iso)4E) 단백질 변이형.

청구항 31

제14항에 있어서, SEQ ID No: 4, 5, 7, 9, 58 또는 59에 기재된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 벡터.

청구항 32

제14항에 있어서, SEQ ID No: 6, 8, 10 또는 60에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 eIF(iso)4E 단백질 변이형을 암호화하는, 벡터.

청구항 33

제19항에 있어서, 바이러스는 순무 모자이크 바이러스(*Turnip Mosaic virus*)인, 방법.

청구항 34

제21항에 있어서, 바이러스는 순무 모자이크 바이러스(*Turnip Mosaic virus*)인, 방법.

청구항 35

제22항에 있어서, 바이러스는 순무 모자이크 바이러스(*Turnip Mosaic virus*)인, 바이러스 저항성 브라시카 식물.

청구항 36

제25항에 있어서, 바이러스는 순무 모자이크 바이러스(*Turnip Mosaic virus*)인, 바이러스 저항성 브라시카 식물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식물, 특히, 바이러스 저항성 식물 및 그러한 식물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 진핵생물의 번역 개시인자 변이형 및 그의 이소형까지, 그리고 그러한 변이형 인자의 스플라이싱에 관련된 핵산 및 바이러스 감염에 저항성을 나타내는 식물 생산 방법에서 이들의 용도까지 이어진다.

배경기술

[0002] 바이러스는 농업에 심각한 문제가 된다. 예를 들어, 포티비리대(*Potyviridae*) 과의 식물 바이러스(포티바이러스(*potyvirus*))는 식물 바이러스의 대략 30%를 차지하며, 30가지가 넘는 다양한 식물 과를 감염시켜 광범위한 작물 피해를 가져올 수 있고, 심지어 치사로 이끌 수 있다. 특히, 가지과(*Solanaceae*), 박과(*Cucurbitaceae*) 및 콩과(*Fabaceae*) 식물이 특별히 포티바이러스에 의한 감염에 민감하다. 현재, 여러 박테리아 또는 곰팡이 감염과는 대조적으로, 식물의 바이러스 감염을 방지하는 방법은 별로 없다. 식물과 종자의 국제 시장 규모의 증가로, 식물 육종업자가 바이러스, 예를 들어, 포티비리대 과 바이러스 감염에 저항성을 나타내는 식물을 개발하는 일은 점점 더 필수적인 것으로 되고 있다.

- [0003] 식물 숙주 감염 시, 식물 바이러스는 그들 자신의 생애 주기를 완성하고자 숙주의 내생성 단백질 일부를 이용한다. 예를 들어, 순무 모자이크 바이러스(*Turnip mosaic virus*, TuMV)와 같은 포티바이러스는 그들의 게놈을 더 많은 바이러스 카피를 생산하는 데 필수적인 바이러스 RNA 의존성 RNA 중합효소를 포함하는 다양한 바이러스 단백질로 번역하는 데 반드시 선행되어야 할 조건으로 식물 리보좀을 바이러스 게놈 RNA에 결합시키는 데 식물의 진핵생물 번역 개시인자를 이용한다. 따라서, 식물의 진핵생물 번역 개시인자의 결합은 식물에 바이러스 저항성을 부여할 수 있다. 그러나 진핵생물 번역 개시인자는 식물의 생존에 필수적이므로, 진핵생물 번역 개시인자의 결합은 식물에 해로우며, 보통은 생존 불가능한 식물을 초래한다.
- [0004] 포티바이러스 VPg(포티바이러스 RNA 게놈에 의해 암호화된 단백질)는 eIF4E 단백질에 결합할 수 있으며, eIF4E 유전자 패밀리 구성원의 돌연변이는 포티바이러스에 저항성을 부여할 수 있다는 사실이 다수의 식물-포티바이러스 상호 작용에서 밝혀진 바 있다. 포티바이러스에 의한 감염에 대한 열성 저항성은 eIF4E 및/또는 eIF(iso)4E를 암호화하는 유전자의 암호영역(즉, 엑손)의 염기 변화가 원인이 되어, eIF4E 및/또는 eIF(iso)4E 단백질 변이형을 초래하기 때문인 것으로 여겨진다.
- [0005] 예를 들어, 정상적으로 아라비돕시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)를 감염시킬 수 있는 순무 모자이크 바이러스(TuMV)는 기능적인 진핵생물 번역 개시인자 이소형(eIF(iso)4E) 단백질이 없는 아라비돕시스 탈리아나 식물을 더는 감염시킬 수 없다. 결손 옥수수 트랜스포존(*dSpm*)을 이용한 *At.eIF(iso)4E*의 삽입 돌연변이 유발로는, 정상적으로 자랄 수 없으며, TuMV 감염에 저항성을 나타내는 식물 계통을 생산하였다. 추가적으로, *lsp1*이라는 에틸메탄솔fon산(EMS)을 이용하여 화학적으로 유도한 아라비돕시스 탈리아나 eIF(iso)4E 유전자의 점 돌연변이 또한 TuMV 감염에 저항성을 부여하였다.
- [0006] 바이러스 저항성의 다양한 기전들이 특정 식물에서 밝혀졌지만, 이들은 대부분 바이러스 균주에 특이적이다. 우성의 식물 *R* 유전자는 주로 식물 바이러스에 균주 특이적인 저항성을 제공한다. 예를 들어, *TuRB01*은 TuMV의 병원형 1 분리주에 저항성을 제공하지만, 병원형 3, 4 및 12를 포함하는 다른 병원형에 속하는 TuMV 분리주에 의해 극복된다. eIF4E 및 eIF(iso)4E 돌연변이와 관련된 열성 저항성의 대다수 예 또한 균주 특이성을 나타내며, 바이러스 VPg 및 가끔 다른 바이러스 단백질의 돌연변이는 그러한 저항성을 극복할 수 있는 균주로 이어진다.
- [0007] 따라서, 식물에서 임의의 균주에 특이적이지 않은 바이러스 저항성을 유도하고, 그에 의해 광범위한 바이러스 저항성을 부여할 필요가 있다. 일부 바이러스에 대한 광범위한 저항성의 일부 예가 있지만, 대부분 작물 유형에서는 대다수 바이러스에 대하여 광범위한 저항성의 원천이 없다. 추가적으로, 바이러스는 끊임없이 돌연변이를 일으키며, 균주 특이적이고 광범위한 저항성을 극복할 수 있는 유전형은 민감한 식물에서 발생되어 저항성을 나타내는 식물 재배를 통해 선택된다. 대부분 식물 바이러스는 RNA 게놈이 있으며, RNA는 프루프리딩 기전의 불충실성 때문에 특별히 높은 돌연변이율을 나타낸다고 알려져 있다. 결과적으로, 그러한 저항성의 지속성을 향상시키기 위해서는 특히, 새로운 기전을 기초로 한, 광범위한 저항성의 새로운 원천이 요구된다.
- [0008] eIF4E 또는 eIF(iso)4E을 기초로 한 (포티바이러스와 같은) 바이러스에 의한 감염에 대하여 이전에 보고된 모든 열성 저항성은 엑손의 염기 변화를 통해 유발되었다. 그러한 염기 변화는 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 단백질 서열의 변형, 예를 들어, 번역된 단백질에서 변형된 아미노산 잔기, 또는 절단된 단백질을 냉는 조기 사슬 종결을 초래한다. 그러므로, 바이러스 저항성 식물 종을 개발하고자 했던 이전의 노력은 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 중 어느 하나의 엑손에만 돌연변이를 품고 있는 식물 품종을 생성하는 데 초점을 두었다. 그러나 놀랍게도, 본 발명자는 야생형 또는 천연 단백질과 비교할 때, 스플라이싱 오류 과정에서 생산된 식물의 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 단백질 변이형으로 포티바이러스와 같은 바이러스에 대한 식물 저항성을 부여할 수 있음을 최초로 확인하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

- [0009] 따라서, 본 발명의 제1 측면에서는, 바이러스에 대해 비기능적인, 분리된 식물의 진핵생물 번역 개시인자 4E(eIF4E) 변이형 또는 그의 이소형(eIF(iso)4E)으로, 이때 eIF4E 또는 eIF(iso)4E를 암호화하는 핵산이 잘못 스플라이스된, 4E(eIF4E) 변이형 또는 그의 이소형(eIF(iso)4E)이 제공된다.
- [0010] eIF4E 및 eIF(iso)4E의 이전의 예들은 모두 유전자의 암호영역에 관련된 돌연변이가 있다. 본 발명자들은 이제

인트론의 DNA 염기서열 변이가 바이러스 저항성을 유도하는 최초의 예를 제공하였다. 인트론은 번역 전에 유전자에서 스플라이스되고, 따라서 단백질에 영향을 미치지 않으므로, 인트론 DNA 염기서열에서 대부분의 변화는 저항성을 제공하리라고 예상되지 않을 것이다. 추가적으로, 유전자의 스플라이싱 오류는 일반적으로 비 기능적인 단백질을 가져오며, 기능적인 단백질의 결여는 치명적일 수 있고, 적응도 감소를 초래할 수 있고, 또는 다른 부작용을 나타낼 수 있다.

[0011] 용어 "eIF4E"는 단백질 합성 개시에서 핵심 요소인 진핵생물 번역 개시인자 4E로도 알려져 있다. 당업자에게 잘 알려지게 될 바와 같이, 식물에서 eIF4E는 (eIF4E와 eIF4G로 이루어진) 복합체 eIF4F를 형성한다. 바이러스 감염에서 식물 eIF4E 단백질의 정확한 생화학적 역할은 아직 확인되지 않았다. 그러나 임의의 이론으로 한정하고자 바라지는 않지만, 식물 eIF4E는 바이러스 RNA의 5' 캡 구조(또는 모방형)에 결합할 수 있는 능력이 있을 수 있고, 또는 식물 eIF4E가 바이러스 RNA와 직접 상호작용할 수 있다. 대안적으로는, 숙주 식물에서 감염을 일으키는 바이러스가 세포에서 세포로 이동하는 데 eIF4E가 관여할 수 있다.

[0012] 용어 "eIF(iso)4E"는 eIF4E의 이소형을 나타내고, eIF(iso)4E는 eIF4E와 비슷한 기능을 나타낸다. 아라비돕시스 탈리아나의 eIF4E 및 eIF(iso)4E 단백질은 아미노산 수준에서 44% ~ 49% 동일하다. 이는 브라시카 라파 (*Brassica rapa*) 계통 R-o-18(47 ~ 50% 동일성)과 브라시카 라파 계통 Chifu(43 ~ 50% 동일성)에 대해 알려진 수치와 비슷하다.

[0013] 바이러스의 생애 주기는 바이러스 핵산을 단백질로 변환하는 숙주 식물의 번역 기구를 이용하는 데 전적으로 좌우된다. 숙주의 번역 기구로 생산된 바이러스 단백질 없이는 어떠한 바이러스 복제효소 단백질도 생산되지 않으며, 따라서 더 이상의 바이러스 카페도 만들어지지 않는다. 다수의 바이러스가 숙주 식물의 번역 복합체에 의존적이라고 알려진 바 있으며, 식물 eIF4E 및/또는 eIF(iso)4E 단백질과 바이러스의 상호작용이 증명된 바 있다 (이용된 버전은 바이러스 종과 식물 종의 특별한 조합에 따라 달라진다).

[0014] 당업자는 스플라이싱 오류가 야생형 또는 천연 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 단백질과 비교할 때, 대안적으로 스플라이스된 변이형으로 기술될 수 있는, 제1 측면의 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 변이형을 생산할 수 있음을 인정할 것이다. eIF4E 또는 eIF(iso)4E를 암호화하는 유전자 같은, 유전자의 게놈 염기서열은 암호영역(즉, 엑손)과 비암호영역(즉, 인트론)을 포함한다. 인트론과 엑손은 "1차 전사산물, mRNA 전구체"(또는 "전구 mRNA")라는 RNA로 전사된다. 엑손에 의해 암호화된 천연 단백질이 생성될 수 있도록 인트론은 전구 mRNA로부터 반드시 제거되어야 한다. 용어 "천연 단백질"은 자연적으로 발생하는 야생형 또는 기능성 단백질을 의미할 수 있다.

[0015] 전구 mRNA로부터 인트론의 제거 및 엑손 상호 간의 후속적인 연결반응은 스플라이싱 과정에서 이루어진다. 스플라이싱 과정은 보통 스플라이싱 인자에 의해 매개되는 일련의 반응으로 이루어지며, 그것은 전사 후, 그러나 번역 전에 RNA 상에서 이루어진다. 따라서, "전구 mRNA"는 엑손과 인트론 모두를 함유하는 RNA 분자이고, "mRNA"는 인트론이 제거되고, 그 결과로서 엑손이 서로 결합되어, 그것으로부터 리보솜에 의해 단백질이 번역될 수 있는 RNA이다.

[0016] 인트론은 스플라이싱 반응을 수행하는 다양한 스플라이싱 인자와 결합하는 상대적으로 짧은, 보존된 RNA 부분인 "스플라이스 요소" 세트로 정의된다. 따라서, 각 인트론은 5' 스플라이스 부위, 3' 스플라이스 부위, 그들 사이에 위치한 분기점으로 정의된다.

[0017] 본 발명자는 (야생형과 비교할 때) 새로운 비정상적인 스플라이스 요소를 만드는, eIF4E 또는 eIF(iso)4E의 천연 DNA 및/또는 전구 mRNA의 스플라이스 요소의 변경에 의해 제1 측면의 단백질 변이형이 유발될 수 있음을 발견하였다. 따라서 본 발명의 일실시예에서, 잘못 스플라이스된, eIF4E 또는 eIF(iso)4E를 암호화하는 유전자가 스플라이스 요소의 변경으로 발생하여, 그것에 의해 비정상적인 스플라이스 요소를 생산할 수 있다. 비정상적인 스플라이스 요소는 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 전구 mRNA의 변경된 스플라이스 패턴을 유발할 수 있으며, 변경된 mRNA를 발생시킬 수 있다. 바람직하게는, 그 결과로 얻어지는 제1 측면의 eIF4E 단백질 변이형 또는 eIF(iso)4E 단백질 변이형은 식물이 바이러스 감염에 대해 실질적으로 저항성을 나타내도록 식물에서 바이러스에 대해 기능을 나타내지 않는다.

[0018] 본 발명자는 (엑손보다는) eIF4E 또는 eIF(iso)4E를 암호화하는 유전자의 인트론 변경이 스플라이싱 오류를 발생시키며, 이는 바이러스에 대해 비 기능적인 eIF4E 변이형 또는 eIF(iso)4E 변이형 단백질 생산으로 이어지고, 따라서 식물에 존재 시 바이러스 저항성을 부여함을 증명하였다.

[0019] 일실시예에서, 비정상적인 스플라이스 요소는 인트론의 5' 말단 또는 3' 말단에서(즉, 인트론의 5' 천연 스플라이스 부위에서 또는 3' 천연 스플라이스 부위에서) 천연 스플라이스 부위를 변경할 수 있으며, 그것은 새로운

비정상적인 스플라이스 부위를 만든다. 게놈 DNA 염기서열과 성숙한 전령 RNA의 염기서열 사이의 차이가 인트론을 정의함은 이해될 것이다. 인트론의 5' 말단과 3' 말단은 유전자의 천연 스플라이스 부위를 정의한다.

[0020] 비정상적인 스플라이스 부위는 천연 스플라이스 부위의 업스트림 또는 다운스트림일 수 있다. 숙련된 기술자는 용어 "업스트림"이 DNA 또는 전구 mRNA 분자의 5' 말단을 향함을 의미하며, 부호 "-"로 표시할 수 있음을 이해할 것이다. 또한, 숙련된 기술자는 용어 "다운스트림"이 DNA 또는 전구 mRNA 분자의 3' 말단을 향함을 의미하며, 부호 "+"로 표시할 수 있음을 이해할 것이다. 그러므로, 비정상적인 스플라이스 부위가 인트론 1의 5' 천연 스플라이스 부위에서 10개의 뉴클레오티드의 업스트림일 수 있는 일실시예에서, 비정상적인 스플라이스 부위를 "인트론 1의 5' 스플라이스 부위에 대해 -10bp"로도 나타낼 수 있다.

[0021] 비정상적인 스플라이스 부위가 인트론의 5' 천연 스플라이스 부위의 업스트림인 실시예에서, 인트론의 업스트림인 엑손 일부가 스플라이싱 과정 중에 절단될 수 있다. 따라서, 그 결과로 얻어지는 mRNA는 절단된 엑손의 뉴클레오티드가 없을 수 있다. 비정상적인 스플라이스 부위가 인트론의 5' 천연 스플라이스 부위의 다운스트림인 실시예에서, 인트론의 일부는 스플라이스 이벤트 중에 유지될 수 있다. 따라서, 그 결과로 얻어지는 mRNA는 유지된 인트론의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0022] 비정상적인 스플라이스 부위가 인트론의 3' 천연 스플라이스 부위의 다운스트림인 실시예에서, 인트론의 다운스트림의 엑손 일부는 스플라이싱 과정 중에 절단될 수 있다. 따라서, 그 결과로 얻어지는 mRNA는 절단된 엑손의 뉴클레오티드가 없을 수 있다. 비정상적인 스플라이스 부위가 인트론의 3' 천연 스플라이스 부위의 업스트림인 실시예에서, 인트론의 일부 또는 전부는 스플라이스 이벤트 중에 유지될 수 있다. 따라서, 그 결과로 얻어지는 mRNA는 유지된 인트론의 뉴클레오티드를 함유할 수 있다.

[0023] 대안적인 실시예에서, 변경된 스플라이스 패턴은 적어도 하나의 인트론을 유지하는 것을 포함할 수 있다. 따라서, 그 결과물인 mRNA 분자(즉, mRNA 변이형)는 유지된 인트론 또는 인트론들에 해당하는 RNA 염기서열을 함유할 수 있으며, 천연 mRNA 분자보다 더 클 수 있다.

[0024] 유지된 적어도 하나의 인트론 또는 그의 일부분에서 번역된 아미노산 염기서열은 종결 코돈을 포함할 수 있다. 그 결과로 얻어지는 단백질(즉, 단백질 변이형)은 첫 번째 종결 코돈 이후로 번역되지 않을 수 있고, 따라서 단백질 변이형은 천연 단백질과 비교할 때 크기가 더 작을 수 있다. 유지된 인트론에 의해 도입되는 종결 코돈은 mRNA의 번역을 미성숙하게 중단시키므로(유전자의 첫 번째 야생형 종결 코돈은 더 다운스트림에 위치) 미성숙 종결 코돈이라 할 수 있다. 따라서, 단백질 변이형은 야생형 또는 천연 단백질과 비교할 때 기능이 결여되거나 변경된 기능을 나타낼 수 있다. 단백질 변이형은 바이러스에 대해 기능성을 나타내지 않을 수 있다.

[0025] 유지된 적어도 하나의 인트론 또는 그의 일부분의 코돈 해독틀은 이웃하는 엑손(들)의 암호화 해독틀과 인프레임(in-frame) 또는 아웃 오브 프레임(out-of-frame)의 관계일 수 있다. 그 결과로 얻어지는 mRNA는 변경된 아미노산 염기서열을 암호화할 수 있으며, 따라서 단백질 변이형을 생산할 수 있다. 단백질 변이형은 야생형 또는 천연 단백질과 비교할 때 기능이 결여되거나 변경된 기능을 나타낼 수 있다. 단백질 변이형은 바이러스에 대해 기능성을 나타내지 않을 수 있다.

[0026] 유지된 적어도 하나의 인트론 또는 그의 일부분의 코돈 해독틀이 이웃하는 엑손(들)의 그것과 아웃 오브 프레임인 일실시예에서, 그 결과로 얻어지는 단백질(즉, 단백질 변이형)은 미성숙 종결 코돈 때문에 변경된 아미노산 염기서열을 함유할 수 있거나 절단될 수 있다. 그 결과물인 단백질 변이형은 야생형 또는 천연 단백질과 비교할 때 기능이 결여되거나 변경된 기능을 나타낼 수 있다. 단백질 변이형은 바이러스에 대해 기능성을 나타내지 않을 수 있다.

[0027] 적어도 하나의 엑손 또는 그의 일부분이 절단된 일실시예에서, 그 결과로 얻어지는 mRNA는 변경된 아미노산 염기서열을 암호화할 수 있으며, 따라서 단백질 변이형을 생산할 수 있다. 변경된 아미노산 염기서열은 미성숙 종결 코돈을 함유할 수 있다. 단백질 변이형은 야생형 또는 천연 단백질과 비교할 때 기능이 결여되거나 변경된 기능을 나타낼 수 있다. 단백질 변이형은 바이러스에 대해 기능성을 나타내지 않을 수 있다.

[0028] eIF4E 변이형 또는 eIF(iso)4E 변이형의 바뀐 기능은 번역 개시를 위한 활성의 감소를 포함할 수 있다. 스플라이싱 오류가 인트론 1에 발생할 때, 이것은 아주 절단된 버전의 단백질, 또는 단백질의 대부분이 기능성 버전과는 전적으로 다른 버전의 단백질을 초래할 수 있다. 그것은 진핵생물 개시 복합체의 기타 성분들, 특히 eIF4G 또는 eIF(iso)4G와 결합할 가능성이 아주 적고, 또한 바이러스 단백질 VPg, 또는 전령 RNA 캡과 결합할 가능성도 적으므로, 이론에 구속되지 않고, 이것은 여러 가지 결과를 나타낼 수 있다. 이는 전령 RNA 및/또는 바이러스 RNA 번역 누락을 초래할 것이다.

- [0029] 본 발명자는 식물 모델로 브라시카 라파를 이용하여 실험을 수행하였으며, 그 결과, 놀랍게도 브라시카 라파가 세 개의 *eIF(iso)4E* 유전자좌를 함유하며, 따라서 *eIF(iso)4E*의 세 가지 단백질 이소형, 즉, *eIF(iso)4E.a*, *eIF(iso)4E.b* 및 *eIF(iso)4E.c*로 표시되는 단백질 이소형을 보유함을 발견하였다. 그리하여 본 발명자는 두 식물 계통에서 *eIF(iso)4E.a*를 조사하였다. 본원에서 "R-o-18"라 한 첫 번째 식물 계통은 바이러스(즉, 순무 모자이크 바이러스, TuMV) 감염에 민감하고, 본원에서 "RLR22"라 한 두 번째 식물 계통은 바이러스 감염에 저항성을 나타낸다. 본 발명자는 아래에서 논한 바와 같이, 브라시카 라파의 *eIF(iso)4E.a* 이소형에 대한 게놈 염기서열, mRNA 염기서열 및 폴리펩티드 서열을 결정하였다.

[0030] (바이러스 감염에 민감한) 계통 R-o-18에서 천연 또는 야생형 브라시카 라파 *eIF(iso)4E.a* 이소형인 *BraA.eIF(iso)4E.a*를 암호화하는 게놈 DNA 염기서열은 본원에서 다음과 같이 SEQ ID No.1으로 제공된다.

[0031] ATGGCGACAGAGGATGTGAACGAAGCCCTGCGCGCGGAAGTACCGGCAACAGAGACGACGGAGAAGCAGCCTGCTACAAGCTCGAAAGAAAGTGGAGTTCTGGTTCGATAACCAACCAAGCAAGGCAGCGCCGCTGGGGAGCCTCCCTCGAAAGCCTATACTTCGACACCGTCCAAGACTCTGGGGTTTTGTCTCTCTCTTATTGTAGCGATCTGAAAGCTAGATCTTCTTGCAGTTGCACGAGACTATATTACATCCCTAGCAAACGCTGAGCAGCGGAAGGCTAAAGCTGGCTTGGAGATCCTGAGTGTGCTAATGGGGAAAGTGGACTTATGTTGTCACCTCCAACCGCAAGCCTGCTTAGACAAGGCTGGCTGAAACTGTACTCCTCTCTACCTCTCCCTTTTCTTTTCTGGCATCTGGTAATGACATGTTCTCTGCCAGTTGATGGCTTGTGAGAGCAATTGATGAGGGCTGATGAGATTGTCGGTGGTTGCTAGTGTGCGCCCAAAGCAGGACAAGCAGCTCTCTGTGGACAAGGCCAAATCTAATGAAGCTGTTCTGGTATGATGCTTGTCTCTCACTATGTACCTTGGTGTGTTGATAACTGTTCTACTTGTATCCGGCAAGTGTCCATTATTGTTGATTATCCTGTTCCAATTTTTGATTCGCTACTGGTGGTTACCGAAGAAGTGTCTGTACAATATGTTAGCGTTGTGAATGTTAATTGCTTACTATAGTAAACAGTTAACGCTGTGACTATGTTAATTCTCTCGATACACACACTTAAAGCTGATAACTACCTTGTCTTATCCCTTGGAGTTTCACCAGCTTATTATCGATCGAGATACTCCTCTGATTGAATTACCATTCAGATAATTATGAAAGTATATGTTGTTAACGATATATCTATTAGGCTTGTCTTTAGTTCATCGCAGTATAAACGCTGCTCTATTATAGGCTTGTCTTAACTGGCAGTAATGTAATATGTCGAAGTGTGGTTATGAACTGGTGTGATATTACTAATTGTTGTTGTTGAAATCCAGATGGGATTGGGAAGAAGTGGAAAGGAGATACTTGTATCACCAGACAAGATAACTTCAACTAACCATGTAACCTAACCTTCTCCACATAGAGGCTAATTATCTTGTCTTACGTGGCTTACTAAATGTGGCTACTTATATATAGGATGATTCTAGAAGAACTAGGTTCACTGTCTGA SEQ ID No: 1

[0033] SEQ ID No: 1은 엑손 1 내지 5를 보여주며, 인트론은 짙은 활자체로 나타내었다.

[0034] (바이러스 감염에 민감한) 계통 R-o-18에서 천연 또는 야생형 *BraA.eIF(iso)4E.a*의 mRNA 염기서열은 본원에서 다음과 같이 SEQ ID No.2로 제공된다.

[0035] AUGGCGACAGAGGAUGUGAACGAAGCCCUUGCGCGCGGAAGUACCGCAACAGAGACGACGGAGAAGCAGCUGCUACAAGCUCGAAAGAAAGUGGAGUUUCUGGUUCGUAACCAACCAAGCAAGGCAGCGCCUUGGGAGCCUCCCUUCGCAAAGCCUAUACCUUCGACACCGUCCAAGACUUCUGGGUUUCACGAGACUAAUUCAUCCUAGCAAACUGACGCCAUGCUGAAUUCACAUGUUCAAGCUGGUGUUGAGCCUAGUGGGAAAGAUCCUGAGUGCUAAUGGGAAAGUGGACUUAUGUUGUCACCUCCAAACCGCAAGCCUGCUUUAGACAAGGCUUGGUUGAAACUUUGAUGGCUUUGCUGCCGAGAGCAAAUUCAUUGAAGCUGUUCUGUUGGGAUUUGGAAAGUGGAAGGAGAUACUUGAUGUCACCGACAAGAUACUUCACUAACCAUGAUGAUUCUAGAAGAACUAGGUUCACUGUCUGAGCAGTGTGCTACTTATATATAGGATGATTCTAGAAGAACTAGGTTCACTGTCTGA SEQ ID No: 2

[0036] SEQ ID No: 2

[0037] 도 3은 *BraA.eIF(iso)4E.a*의 엑손들이 서로 접합되어 SEQ ID No:2의 mRNA를 형성함을 개략적으로 도시한 것이다.

[0038] (바이러스 감염에 민감한) 계통 R-o-18에서 천연 또는 야생형 *BraA.eIF(iso)4E.a*의 폴리펩티드 서열은 본원에서 다음과 같이 SEQ ID No.3로 제공된다.

[0039] MATEDVNEALAAAEPATETTEKQPAHKLKERKWSFWFDNQSKPKQGAAWGAISLRKAYTFDTVQDFWGLHETIFIPSKLTPNAEIHMFKAGVEPKWEDPECANGGKWTYVVTNSRKPALDKAWLELMLVGEQFDEADEICGVVASVRPKQDKLSLWTRTKSNEAVLMIGKKWKEILDVTDKIFTFTNHDDSRRTFTV.

[0040] SEQ ID No: 3

[0041] (바이러스 감염에 저항성을 나타내는) 계통 RLR22에서 브라시카 라파 *eIF(iso)4E.a* 이소형인 *BraA.eIF(iso)4E.a* 변이형을 암호화하는 게놈 DNA 염기서열은 본원에서 다음과 같이 SEQ ID No.4로 제공된다.

[0042] ATGGCGACAGAGGATGTGAACGAAGCCCTGCGCGCGGAAGTACCGGCAACAGAGACGACGGAGAAGCAGCCTGCTGACAAGCTCGAAAGAAAGTGGAGTTCTGGTTCGATAACCAACCAAGCAAGGCAGCGCCGCTGGGGAGCCTCCCTCGAAAGCCTATACTTCGACACCGTCCAAGACTCTGGGGTTTTGTCTCTCTCTTATTGTAGCGATCTGAAAGCTAGATCTTCTTGCAGTTGCACGAGACTATATTACATCCCTAGCAAACGCTGAGCAGCGGAAGGCTAAAGCTGGCTTGGAGATCCTGAGTGTGCTAATGGGGAAAGTGGACTTATGTTGTCACCTCCAACCGCAAGCCTGCTTAGACAAGGCTGGCTGAACTGTACTCCTCTACCTCTCCCTTTTCTGGCATCTGGTAATGACATGTTCTCTGCCAGTTGATGGCTTGTGAGAGCAATTGATGAGGGCTGATGAGATTGTCGGTGGTTGCTAGTGTGCGCCCAAAGCAGGACAAGCAGCTCTCTGTGGACAAGGCCAAATCTAATGAAGCTGTTCTGGTATGATGCTTGTCTCTCACTATGTACCTTGGTGTGTTGATAACTGTTCTACTTGTATCCGGCAAGTGTCCATTATTGTTGATTATCCTGTTCCAATTTTTGATTCGCTACTGGTGGTTACCGAAGAAGTGTCTGTACAATATGTTAGCGTTGTGAATGTTAATTGCTTACTATAGTAAACAGTTAACGCTGTGACTATGTTAATTCTCTCGATACACACACTTAAAGCTGATAACTACCTTGTCTTATCCCTTGGAGTTTCACCAGCTTATTATCGATCGAGATACTCCTCTGATTGAATTACCATTCAGATAATTATGAAAGTATATGTTGTTAACGATATATCTATTAGGCTTGTCTTTAGTTCATCGCAGTATAAACGCTGCTCTATTATAGGCTTGTCTTAACTGGCAGTAATGTAATATGTCGAAGTGTGGTTATGAACTGGTGTGATATTACTAATTGTTGTTGTTGAAATCCAGATGGGATTGGGAAGAAGTGGAAAGGAGATACTTGTATCACCAGACAAGATAACTTCAACTAACCATGTAACCTAACCTTCTCCACATAGAGGCTAATTATCTTGTCTTACGTGGCTTACTAAATGTGGCTACTTATATATAGGATGATTCTAGAAGAACTAGGTTCACTGTCTGA SEQ ID No: 4

TGTTGTCTCTCCTTTACTTATTGTTAGCGATCTGTAAGCTAGATCTCTTTGCAGTTGCACGAGACTATATTCACTCCCTAGCAAACGTACGCCGAA
 TGCTGAAATTACATGTTCAAAGCTGGTGTGAGCCTAAAGTGGGAAGATCTGAGTGTGCTAATGGCGAAAGTGGACTTTGTTGTTACCTCCAACCGCAA
 GCCTGCTTAGACAAGGCTTGGCTGAAACTGTAACATCTCTACCTCTCCTCTTTTTAATAGTTAGACAATTTCATCTGGTAATGACATGT
 TTTATCTGCCAGTTGATGGCTCTGCGAGAGCAATTGATGAGGCTGATGAGATCTGTTGGGTTGCTAGTGTGCGCCCAAAGCAGGACAAGCTCTC
 TTGTTGACAAGGACCAATCTAATGAAGCTGTTGATGATGCTCTCTCACTATGTAACCTTGGTGTGTTCTCTACTGTGTTACCTCGGTG
 GATGTCCTTATTGTTGATTATCCTGTTCAAATTTCCTGCGTACTGGTGGTTACGAAAGATGCTTGTACAATATGTTAGCGTTGGAAT
 GTGTTAATTGCTTACTATAGTAAACAGTTAAGCTGTTGACTATGTTAATATTCTCTCGATACACACACTAGAATGGATAACTACCTGTTCTTATC
 CTTGGAGTTTACAGCTTAAATATATTGAAAGTATATGTTGTCACGATATATCTATTAGGCTGTTTTAGTCATTGCACTGATAAAACATAG
 CTCTATTATTAGAGGCCATCTTTAGAACTGGCAGTACTGTAATATGCGAAGTGTGGTTATGAATCTGGCTGATGATATTACTACTTGTGTTGT
 TATTGTAATCCAGATGGTATTGGAGAAGTGGAGGAGATACTGATGTCACCGACAAGATAACTTCAACCAGTAACTTCAACTTCCACATA
 GAGGCTAATTATCTTGTCTTACGTGGCTACTAAATGTGGTCACTTATATATAGGATGATTCTAGAAGAACTCGGTTACTGTCGA

[0043] SEQ ID No: 4

[0044] SEQ ID No: 4는 굵은 활자체로 나타낸 인트론과 (위의 염기서열에서 밑줄 친) 인트론 1의 5' 스플라이스 부위의 +1 위치의 구아닌 삽입을 보여준다. 이러한 돌연변이는 본원에서 "삽입/결실" 돌연변이 또는 "indep"이라 한다. 본 발명가는 놀랍게도 일부 실시예에서 SEQ ID No.4로 나타낸 DNA 염기서열이 몇 가지의 서로 다른 mRNA 염기서열 형태를 유발할 수 있으며, 이를 각각이 제1 측면의 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 단백질 변이형을 생산할 수 있음을 관찰하였다. 본 발명자는 열성이라고 생각되는 바이러스 저항성 계통(RLR22)의 대립유전자 (*BraA.eIF(iso)4E.a*)를 "retr01"이라 명명하였다.

[0045] (바이러스 감염에 저항성을 나타내는) 계통 RLR22에서 *BraA.eIF(iso)4E.a* 변이형의 mRNA 염기서열의 제1 실시예는 본원에서 다음과 같이 SEQ ID No.5로 제공된다.

[0046] AUGGCGACAGAGGAUGUGAACGAAAGCCUUGCGCGCGGAAGUACCGCAACAGAGACGGAGAACGCCUGCUGACAAGCUCGAAAGAAUGGGAGU
 UUCUGGUUCGAUAACCAACCAAAGCAAGGCGCCUGGGAGCCUCCUUCGCAAAGCCUAACCUUCGACACCGUCCAAGACUUCUGGGGGGUU
 UGUUUGUCUUCUCCUUUACUUAUUGUAGCGAUCUGUAAGCUAGAUUCUUCUUUGCAGUUGCACGAGACUAUUCAUCCUAGCAAACUGACGCCAA
 UGCUGAAAUUCACAUGUCAAAGCUGGUGUUGAGGCCUAAGUGGGAGAACCCUGAGUGUGCUAAUGGCCGAAAGUGGACUUUUGUUGUACCUCAACCGCAA
 GCCUGCUUUAAGACAAGGCUUGGUUGAAACUUUGAUGGGCUCUUGUCGGAGAGCAUUUGAUGAGGCUGAUGAGAACUGUGGGGGGUUGCUAGUGUGCGCC
 AAAGCAGGACAAGCUCUCCUUGGGACAAGGACCAAAUCUAUGAAGCUGUUCUGAUGGGUAUUGGGAGAAGUGGAAGGAGAUACUUGAUGUCACCGACAA
 GAUAACUUUACUAACCAUGAUGAUUCUAGAAGAACUCGGUUCACGUGCUGA

[0047] SEQ ID No: 5

[0048] 보는 바와 같이, SEQ ID No.4(즉, 인트론 1의 5' 스플라이스 부위의 +1 위치에 구아닌 삽입을 함유하는)에서 핵산 변경의 효과는, 그 결과로 생긴, SEQ ID No: 5로 나타낸 mRNA가, 전부 유지되어 굵은 활자체로 표시된 인트론 1에 해당하는 RNA 염기서열을 함유하는 것이다. 도 4는 eIF4E DNA 또는 전구 mRNA의 변경된 스플라이스 패턴이 SEQ ID No: 5의 mRNA로 이어지는 것을 개략적으로 도시한 것이다.

[0049] 계통 RLR22에서 *BraA.eIF(iso)4E.a* 변이형의 mRNA(즉, SEQ ID No.5)의 제1 실시예에 해당하는 폴리펩티드 서열은 본원에서 다음과 같이 SEQ ID No.6로 제공된다.

[0050] MATEDVNEALAAAEPATETTEKQPADKLERKWSFWFDNQSKPKQGAAGASLRKAYTFDTVQDFWGVLSSPFTYC.RSVKLDLLQFARDYIHP.QTDAE
 C.NSHVQSWC.A.VGRS.VC.WRKVDFCCYLQPQACFRQGLA.NFDGSCRRAI..G..DLWGGC.CAPKAGQALLVDKDQI..SCSDGYWEEVEGDT.CHRQ
 DNFH.P..F.KNSVHCL

[0051] SEQ ID No: 6

[0052] SEQ ID No.6에서, 사슬 종결은 "."으로 표시된다. 보는 바와 같이, 인트론 1 전체가 유지된, SEQ ID No: 5에 도시한 mRNA의 번역은 88번째 위치에서 첫 번째 미성숙 종결 코돈을 초래하여, 그 결과 절단된 eIF(iso)4E 단백질이 생산된다.

[0053] (바이러스 감염에 저항성을 나타내는) 계통 RLR22에서 *BraA.eIF(iso)4E.a* 변이형의 mRNA 염기서열의 제2 실시예는 본원에서 다음과 같이 SEQ ID No.7로 제공된다.

[0054] AUGGCGACAGAGGAUGUGAACGAAAGCCUUGCGCGCGGAAGUACCGCAACAGAGACGGAGAACGCCUGCUGACAAGCUCGAAAGAAUGGGAGU
 UUCUGGUUCGAUAACCAACCAAAGCAAGGCGCCUGGGAGCCUCCUUCGCAAAGCCUAACCUUCGACACCGUCCAAGACUUCUGGGGGGU
 UUCUUUUGCAGUUGCACGAGACUAUUCAUCCUAGCAAACUGACGCCAAUGCUGAAUUCACAUAGCUGGUGUUGAGGCCUAAGUGGGAGAU

CCUGAGUGUGCUAAUGGCGGAAAGUGGACUUUUGUUGUACCUCGCAAGCCUGCUUAGACAAGGCUGGUUGAAACUUGAUGGCUCUUGUCGGA
GAGCAAUUUUGAUGAGGCGUGAUGAGAUCUGUGGGUGGUUGCUGAGUGUGCCCAAAGCAGGACAAGCUCUCCUUGGUGACAAGGACAAACUAUGAAGC
GUUCUGAUGGGUAUUGGGAGAAGAUGGAGAUACUUGAUGUCACCGACAAGAUACUUCACUAACCAUGAUGAUUCUAGAAGAACUAGGUUCACUGUC
UGA

[0055] SEQ ID No: 7

[0056] SEQ ID No: 7에 나타낸 mRNA 변이형은 인트론 1의 변경된 3' 스플라이스 부위가 원인이 된다. 변경된 스플라이스 부위는 인트론 1의 5' 말단에 대해 +48번째 위치(즉, 인트론 1의 천연 3' 스플라이스 부위의 15bp 업스트림)이다. 유지된 인트론 염기서열(15개의 뉴클레오티드)을 짚은 활자체로 나타내었다. 도 5는 이러한 스플라이스 이벤트를 개략적으로 도시한 것이다.

[0057] 계통 RLR22에서 *BraA.eIF(iso)4E.a* 변이형의 mRNA 변이형(즉, SEQ ID No.7)의 제2 실시예에 해당하는 폴리펩티드 서열은 본원에서 다음과 같이 SEQ ID No.8로 제공된다.

[0058] MATEDVNEALAAAEPATETTEKQPADKLERKWSFWFDNQSKPKQGAAWGASLRKAYTFDTVQDFWGIFFCSLHETIFIPSKLTPNAEIHMFKAGVEPKWED
PECANGGKWTVVTSNRKPALDKAWLETLMALVGEQFDEADEICGVVASVRPKQDKLSLWTRTKSNEAVLMGIGKKWKEILDVTDKITFTNHDDSRTRFT
V.

[0059] SEQ ID No: 8

[0060] SEQ ID No.8에서, 다섯 개의 새로운 아미노산 잔기(즉, IFFCS)가 핵산 변경의 결과로서 번역되며, 이를 짚은 활자체로 나타내었다. 보는 바와 같이, 인트론 일부분이 유지된, SEQ ID No: 7에 도시한 mRNA의 번역은 프레임시프트를 초래하지 않지만, 연장된 단백질은 바이러스에 대해 비 기능적일 수 있다.

[0061] (바이러스 감염에 저항성을 나타내는) 계통 RLR22에서 *BraA.eIF(iso)4E.a* 변이형의 mRNA 염기서열의 제3 실시예는 본원에서 다음과 같이 SEQ ID No.9로 제공된다.

[0062] AUGGCGACAGAGGAUGUGAACGAAGCCCUUGCGCGCGGAAGUACCGGCAACAGAGACGGAGAACGAGCCUGCUGACAAGCUCGAAAGAAAGUGGAGU
UUCUGGUUCGAUAACCAUCCAAACCAAGCAAGCGCCGCUUGGGAGCCUCCUUCGCAAAGCCUAUACCUUCGACACCGUCCAAGACUUCUG△UUUC
ACGAGACUAUUCAUCCUAGCAAACUGACGCCAAUGCUGAAUUCACAUGUCAAAGCUGGUGUUGAGGCCUAAGUGGGAGAACUCCUGAGUGUGCUAAG
GCGGAAAGUGGACUUUUGUUGUACCUCAACCGCAAGCCUGCUUUAGACAAGGCCUUGGUUGAAACUUGAUGGCUUUGUCGGAGAGCAUUUGAUGAGG
CUGAUGAGAUCUGUGGGUGGUUGCUAGUGUGCGCCAAAGCAGGACAAGCUCUCCUUGGUGACAAGGACAAACUAUGAAGCUGUUCUGAUGGGUAUUG
GGAAGAAGUGGAAGGAGAUACUUGAUGUCACCGACAAGAUACUUUCACUAACCAUGAUGAUUCUAGAAGAACUCGGUUCACUGUCUGA

[0063] SEQ ID No: 9

[0064] SEQ ID No: 9에 나타낸 mRNA 변이형은 인트론 1의 변경된 5' 스플라이스 부위가 원인이 된다. 변경된 스플라이스 부위는 인트론 1의 5' 천연 스플라이스 부위에 대해 -3번째 위치(즉, 3bp 업스트림)이다. 절단된 엑손 염기서열(3개의 뉴클레오티드)을 부호 "△"로 나타내었다. 도 6은 이러한 스플라이스 이벤트를 개략적으로 도시한 것이다.

[0065] 계통 RLR22에서 *BraA.eIF(iso)4E.a* 변이형의 mRNA(즉, SEQ ID No.9)의 제3 실시예에 해당하는 폴리펩티드 서열은 본원에서 다음과 같이 SEQ ID No.10으로 제공된다.

[0066] MATEDVNEALAAAEPATETTEKQPADKLERKWSFWFDNQSKPKQGAAWGASLRKAYTFDTVQDFCLHETIFIPSKLTPNAEIHMFKAGVEPKWEDPECANG
GKWTVVTSNRKPALDKAWLETLMALVGEQFDEADEICGVVASVRPKQDKLSLWTRTKSNEAVLMGIGKKWKEILDVTDKITFTNHDDSRTRFTV.

[0067] SEQ ID No: 10

[0068] SEQ ID No.10에서, 새 아미노산 잔기(즉, C)가 핵산 변경의 결과로서 번역되며, 짚은 활자체로 나타내었다. 보는 바와 같이, 인트론의 일부분이 유지된, SEQ ID No: 9에 도시한 mRNA의 번역은 프레임시프트를 초래하지 않았다. SEQ ID No.9를 SEQ ID No.3과 비교할 때, 75~77번째 위치의 아미노산 페닐알라닌(F)-트립토판(W)-글리신(G)이 시스테인(C)으로 대체되었다. 하나의 아미노산 상실과 다른 아미노산으로의 치환은 바이러스에 대해 비 기능적인 단백질을 초래할 수 있다.

[0069] 따라서, 제1 측면의 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 단백질 변이형은 대체로 SEQ ID No: 6, 8 또는 10에 기재된 바와 같은 아미노산 염기서열, 또는 이의 변이형 또는 단편을 포함할 수 있다. eIF4E 또는 eIF(iso)4E 단백질을 암호화하는 핵산은 대체로 SEQ ID No: 4, 5, 7 또는 9에 기재된 바와 같은 염기서열, 또는 이의 변이형 또는 단편을

포함할 수 있다.

[0070] 상술한 내용을 고려하면, 제1 측면의 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 단백질 변이형을 암호화하는 핵산의 스플라이싱 오류는 상기 핵산 염기서열의 변경에 의해 유발될 수 있음을 인정할 것이다. 변경은 유전자의 비암호영역에서 일어나는 것이 바람직하다. 비정상적인 스플라이스 요소를 생산하기 위하여, 변경은 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 단백질을 암호화하는 핵산 염기서열의 스플라이스 요소에 있을 수 있다. 변경은 엑손-인트론 접합지점(junction) 또는 천연 스플라이스 부위의 업스트림 또는 다운스트림에서 일어날 수 있다. 바람직하게는, 변경은 천연 스플라이스 부위의 -10번재 위치 내지 +10번재 위치 사이에서 일어난다. 더욱 바람직하게는, 변경은 천연 스플라이스 부위의 -5번재 위치 내지 +5번재 위치 사이에서 일어난다. 가장 바람직하게는, 변경은 천연 스플라이스 부위의 -1번재 위치 내지 +1번재 위치에서 일어난다. 천연 스플라이스 부위는 인트론의 5' 말단 또는 3' 말단에서 또는 5' 말단 또는 3' 말단을 향하여 있을 수 있다.

[0071] 스플라이스 요소는 3' 스플라이스 부위, 5' 스플라이스 부위 및 분기점을 포함할 수 있으며, 이들 모두가 성숙한 전령 RNA 생산 과정에서 인트론의 정확한 제거를 위해 필요하다. 이들 성분 중의 하나 이상의 변경은 인트론 일부 또는 전부의 제거 실패 또는 엑손 염기서열의 제거를 초래할 수 있다. 이는 결국 기능적일 가능성이 아주 적거나 천연 단백질보다는 덜 기능적일 수 있는, 절단되거나 연장된 단백질로 이어진다.

[0072] 변경은 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 단백질을 암호화하는 핵산 염기서열의 인트론 내에 위치할 수 있다. 변경은 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 단백질을 암호화하는 핵산 염기서열의 인트론 1, 2, 3 또는 4 내에 위치할 수 있다. 인트론 1은 SEQ ID No.1의 201번 내지 263번 염기에 해당하고, 인트론 2는 SEQ ID No.1의 439번 내지 509번 염기에 해당하고, 인트론 3은 SEQ ID No.1의 636번 내지 1187번 염기에 해당하며, 인트론 4는 SEQ ID No.1의 1254번 내지 1339번 염기에 해당한다.

[0073] 바람직하게는, 변경은 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 단백질을 암호화하는 핵산 염기서열의 인트론 1 내에서 일어난다.

[0074] 변경은 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 단백질을 암호화하는 핵산 염기서열의 어디든, 바람직하게는 인트론 내, 더욱 바람직하게는 인트론 1 내의, 적어도 하나의 핵산 염기의 삽입, 결실, 치환 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 삽입은 퓨린(아데닌 또는 구아닌) 또는 피리미딘(시토신 또는 티민)일 수 있다. 바람직하게는, 변경은 구아닌 삽입을 포함한다. 변경은 천연 단백질에 대해 코돈 해독틀의 프레임시프트를 초래할 수 있다. 변경은 미성숙 종결 코돈의 형성을 초래할 수 있다. 변경은 프레임시프트나 미성숙 종결 코돈을 초래하지 않을 수 있지만, 아미노산의 첨가 또는 삭제를 수반할 수 있다.

[0075] 바람직하게는, 변경은 SEQ ID No.1의 201번 위치에 삽입을 포함하며, 이러한 삽입은 바람직하게는 구아닌이다.

[0076] 본 발명자는 *eIF4E* 및/또는 *eIF(iso)4E*, 또는 바이러스 생애 주기 완성에 필수적인 기타 단백질의 스플라이싱 오류를 유발시킬 돌연변이를 생산하기 위해, 당해 분야에 알려진 인위적인 수단으로 식물 계놈을 변경하는 것이 가능할 수 있다고 생각한다. 인위적인 수단은 재조합 유도/촉진, 여러 가지 수단을 통한 부위 특이적 돌연변이 유도, TILLING(Targeted Induced Local Lesions in Genomes), 또는 당해 분야에 알려진 기타 수단을 포함할 수 있다.

[0077] 본 발명자는 제1 측면의 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 변이형 단백질이 순무 모자이크 바이러스(TuMV)에 대해 비 기능적임을 발견하였다. 그러나 본 발명자는 제1 측면의 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 단백질이 식물을 감염시킬 수 있는 다른 다양한 바이러스에 대해 비 기능적이라고 믿는다. 그러므로 eIF4E 또는 eIF(iso)4E는 생애 주기 완성을 위해 그들에 의존적인 임의의 식물 바이러스에 대해 비 기능적일 수 있다.

[0078] 그러나 변이형 eIF4E 또는 eIF(iso)4E는 포티비리대 과의 임의의 식물 바이러스에 대해 비 기능적인 것이 바람직하다. eIF4E 또는 eIF(iso)4E가 비 기능적일 수 있는 적당한 포티바이러스의 예로는 고추 베이널 모틀 바이러스(*Pepper veinal mottle virus*, PVMP), 콩 모자이크 바이러스(*Bean common mosaic virus*, BCMV), 감자 바이러스 Y(*Potato virus Y*, PVY) 또는 아주 키난 모자이크 바이러스(*Azukinin mosaic virus*, AzMV), 또는 *eIF4E* 및/또는 *eIF(iso)4E*에 의존적인 임의의 기타 바이러스를 포함한다.

[0079] 본원에 기술한 바와 같이, 제1 측면의 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 단백질은 브라시카 라파의 다양한 바이러스에 대해 비 기능적이다. 그러나 본 발명자는 제1 측면의 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 단백질이 광범위한 서로 다른 식물 종의 바이러스에 대해 비 기능적이라고 생각한다. 따라서, eIF4E 또는 eIF(iso)4E는 감자(모든 품종), 토마토, 고추 또는 가지와 같은 가지과 식물, 멜론, 호박 및 오이와 같은 호로과 식물, 십자화과 작물, 특히 유채와 같은 브라시카 나푸스, 배추와 같은 브라시카 라파, 그리고 더욱 특별히 브로콜리, 콜리플라워, 양배추, 사보이 양배추, 브루셀 스프라우트, 적채 등과 같은 브라시카 올레라케아, 콩과(*Fabaceae*) 완두, 콩류, 두류 등과

또한, 쌀, 옥수수, 밀, 보리 등을 포함하는 임의의 단자엽 작물의 바이러스에 대해 비 기능적일 수 있다. 바람직한 일실시예에서, 식물은 브라시카 속, 바람직하게는 브라시카 라파 및/또는 브라시카 올레라케아일 수 있다.

[0080] 제2 측면에서는, 대안적으로 스플라이스된 식물의 진핵생물 번역 개시인자 4E(eIF4E)의 변이형 또는 그의 이소형(eIF(iso)4E)을 암호화하는 분리된 핵산 염기서열로서, eIF4E 또는 eIF(iso)4E가 바이러스에 대해 비 기능적이 되도록 잘못 스플라이스되는 분리된 4E(eIF4E)의 변이형 또는 그의 이소형(eIF(iso)4E)을 암호화하는 핵산 염기서열이 제공된다.

[0081] 제2 측면의 분리된 핵산 염기서열은 DNA, cDNA, RNA 또는 mRNA를 포함할 수 있다.

[0082] 핵산 염기서열은 대체로 SEQ ID No: 4, 5, 7 또는 9 중의 어느 하나에 기재된 바와 같은 뉴클레오티드 서열, 또는 이의 변이형 또는 단편을 포함할 수 있다. 핵산 염기서열에 의해 암호화되는 eIF4E 또는 eIF(iso)4E는 대체로 SEQ ID No: 6, 8 또는 10 중의 어느 하나에 기재된 바와 같은 아미노산 염기서열, 또는 이의 변이형 또는 단편을 포함할 수 있다.

[0083] 제3 측면에서는, 제2 측면의 핵산 염기서열을 포함하는 제조합 벡터가 제공된다.

[0084] 제조합 벡터는 플라스미드, 코스미드 또는 과자일 수 있다. 그러한 제조합 벡터는 제2 측면의 핵산 분자로 숙주 세포를 형질전환시키는 데 매우 유용하다. 숙련된 기술자는 본 발명의 유전자 구성체(genetic construct)가 발현을 목적으로 하는 여러 가지 유형의 백본(backbone) 벡터와 조합될 수 있음을 인정할 것이다. 백본 벡터는 바이너리 벡터, 예를 들어, 대장균과 아그로박테리움 투미파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 모두에서 복제할 수 있는 바이너리 벡터일 수 있다. 예를 들어, 적합한 벡터는 pBIN19와 같이 pBIN 플라스미드일 수 있다.

[0085] 제조합 벡터는 본 발명의 핵산 염기서열 이외에도 프로모터를 포함한, 다양한 기타 기능성 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 제조합 벡터는 식물 세포일 수 있는 숙주 세포의 세포기질에서 독자적으로 자기 복제하도록 설계될 수 있다. 이러한 경우에, DNA 복제를 유도 또는 조절하는 요소가 제조합 벡터에 필요할 수 있다. 대안적으로, 제조합 벡터는 숙주 세포의 계놈으로 통합되도록 설계될 수 있다. 이러한 경우에, 선별 통합(예를 들어, 상동 제조합으로)을 선호하는 DNA 염기서열이 예상된다.

[0086] 또한, 제조합 벡터는 클로닝 과정에서 선택표지로 이용할 수 있는 유전자에 대한 DNA 부호, 즉, 형질감염 또는 형질전환된 세포를 선별할 수 있고 이종 DNA를 포함하는 벡터를 가진 세포를 선별할 수 있는 DNA 부호를 포함할 수 있다. 대안적으로, 선택표지 유전자는 관심 있는 유전자를 함유하는 벡터와 동시에 이용하는 다른 벡터 내에 있을 수 있다. 또한, 벡터는 암호서열의 발현 조절과 관련된 DNA 또는 숙주 세포의 특정 부분, 예를 들어, 엽록체로 발현된 폴리펩티드를 표적화하기 위한 DNA를 포함할 수 있다. 이런 이유로, 제3 측면의 벡터는 선택표지 유전자(예를 들어, 항생제 내성 유전자); 폴리펩티드 종결 신호; 및 단백질 표적화 서열(protein targeting sequence, 예를 들어, 엽록체 전이 펩티드)로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 추가적인 요소를 포함할 수 있다.

[0087] 적합한 표지 유전자의 예로는 카나마이신, 게네티신(G418) 및 히그로마이신(*npt-II*, *hyg-B*)에 대한 내성을 부여하는 것과 같은 항생제 내성 유전자; 포스피노드리신 및 술포아미드계 제초제에 내성을 부여하는 것(각각 *bar*와 *suI*; EP-A-242246, EP-A-0249637)과 같은 제초제 내성 유전자; 및 베타-글루쿠로니다아제(GB2197653), 루시페라아제 및 녹색 형광 단백질(GFP)과 같은 선발 표지를 포함한다.

[0088] 표지 유전자는 세포 내에서 발현을 가능하게 하는, 종자 내에 있거나 없을 수 있는 제2의 프로모터로 제어될 수 있어, 그에 의해 식물의 임의의 발달 단계에서 표지를 함유하는 세포 또는 조직을 선별할 수 있게 할 수 있다. 적합한 제2의 프로모터는 아그로박테리움의 노팔린 합성효소 유전자의 프로모터와 35S 콜리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 전사체를 암호화하는 유전자에서 유래된 프로모터이다. 그러나 임의의 기타 적합한 제2의 프로모터가 이용될 수 있다.

[0089] 본 발명의 벡터의 다양한 실시예가 적합한 클로닝 절차를 이용하여 제조될 수 있으며, 이는 다음과 같이 요약될 수 있다.

[0090] 제4 측면에서는, 제3 측면의 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.

[0091] 숙주 세포는 식물 세포일 수 있다. 대안적으로, 숙주 세포는 박테리아 또는 바이러스일 수 있다. 벡터는 숙련된 기술자에 알려진 기술을 이용하여 숙주 세포 내로 형질전환될 수 있다.

[0092] 제3 측면의 벡터를 식물로 도입하는 데 필요한 분자 기술이 당해 분야에 알려져 있으며, Sambrook 등과 같은 교

재에서 찾아볼 수 있음을 인정할 것이다.

[0093] 본 발명자는 바이러스 감염에 저항성을 나타내는 식물을 검출하는 일이 가능하다는 사실을 발견했다.

[0094] 본 발명의 제5 측면에서는, 식물의 진핵생물 번역 개시인자 4E(eIF4E) 변이형 또는 이의 이소형(eIF(iso)4E)을 암호화하는 핵산이 잘못 스플라이스된, 바이러스에 비 기능적인, eIF4E 또는 eIF(iso)4E의 존재를 시험 식물에서 검출하는 방법으로, 여기서 이 방법은

[0095] (i) 시험 식물에서 RNA를 분리하는 단계;

[0096] (ii) eIF4E 또는 eIF(iso)4E에 특이적인 프라이머를 이용하여 (i) 단계에서 분리된 RNA로부터 cDNA를 생산하는 단계;

[0097] (iii) (ii) 단계에서 생산된 cDNA의 염기서열을 결정하는 단계; 및

[0098] (iv) (iii) 단계에서 결정된 cDNA의 염기서열을 야생형 eIF4E 또는 eIF(iso)4E의 cDNA 염기서열과 비교하는 단계를 포함하며,

[0099] 이때, 야생형 염기서열과 비교할 때, (iii) 단계의 염기서열의 변이가, 시험 식물에서 eIF4E 또는 eIF(iso)4E를 암호화하는 핵산이 잘못 스플라이스되어, eIF4E 또는 eIF(iso)4E의 변이형임을 지시하는, 방법이 제공된다.

[0100] (i) 내지 (iv)의 검출 단계는 Sambrook 등과 같이 당해 분야에 알려진 분자 기술을 수반함을 인정할 것이다. 이 방법은 시험 식물로부터 시료를 획득하는 단계를 포함할 수 있으며, 그로부터 RNA가, 바람직하게는 mRNA가 분리될 수 있다. 이들 유전자에 상보적인 프라이머를 이용하여 eIF4E 및/또는 eIF(iso)4E RNA의 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)으로 cDNA를 얻을 수 있다. 숙련된 기술자는 RT-PCR 프라이머의 위치를 설계하는 데 당해 분야에 알려진 기술을 이용할 것임을 인정할 것이다. 바람직하게는, RT-PCR 프라이머는 그 결과로 얻어지는 증폭 산물이 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 유전자의 암호영역 전체를 포함하도록 설계된다.

[0101] 예를 들어, 역방향 전사 프라이머는

[0102] AAAAAGCAGGCT CGAGGCGACAGAGGATG – (SEQ ID No. 13);

[0103] AGAAAGCTGGGT TCAGACAGTGAACCTAGTTCTTC (SEQ ID No. 14); 및

[0104] AGAAAGCTGGGT TCAGACAGTGAACCGAGTTCTTC (SEQ ID No. 15)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0105] 제5 측면의 방법은 eIF4E 또는 eIF(iso)4E의 스플라이싱 오류를 유발하는 식물 계놈의 변경을 확인하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 상기 확인 단계는 시험 식물이 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 유전자에 대해 동형이 되도록 시험 식물을 육종하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 상기 유전자의 계놈 염기서열을 결정하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 eIF4E 또는 eIF(iso)4E의 스플라이싱 오류를 유발하는 변경을 확인하기 위해, 결정된 계놈 염기서열을 야생형 eIF4E 또는 eIF(iso)4E의 계놈 염기서열과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0106] 시험 식물이 eIF4E 또는 eIF(iso)4E에 대해 이형인 실시예에서는, 시험 식물을 자기 교배시켜 동형 접합성을 얻을 수 있다.

[0107] 본 발명자는 바이러스 감염에 저항성을 나타내는 식물을 발생시켜 선별하는 일이 가능하다는 점을 발견했다.

[0108] 따라서, 제6 측면에서는, 바이러스 저항성 식물을 선별하는 방법으로, 시험 식물에서,

[0109] (i) 제1 측면의 식물의 진핵생물 번역 개시인자 4E(eIF4E) 변이형 또는 이의 이소형(eIF(iso)4E); 및

[0110] (ii) 식물은 이용할 수 있지만, 바이러스는 이용할 수 없는, 적어도 하나의 야생형 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 카페의 존재

[0111] 를 검출하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0112] 제7 측면에서는, 식물에 바이러스 저항성을 유도하기 위한, 제1 측면의 식물 진핵생물 번역 개시인자 4E(eIF4E) 변이형 또는 그의 이소형(eIF(iso)4E), 또는 제2 측면의 핵산의 용도가 제공된다.

[0113] 제8 측면에서는, 제1 측면의 식물 진핵생물 번역 개시인자 4E(eIF4E) 변이형 또는 그의 이소형(eIF(iso)4E)을 발현하는 모체식물을, 농경상 장점, 상업상 장점 및/또는 특정 기후 또는 토양에 대한 적합성으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 특성을 포함하는 수용식물과 교배시키는 단계를 포함하는, 바이러스 저항성 식물을 생산하는 방법이 제공된다.

- [0114] 수용식물은 농작물(예를 들어, 쌀, 밀 등) 또는 채소(예를 들어, 토마토 등)와 같은, 상업적으로 유용한 식물이다. 실시예에서 기술하고, 도 8에서 도시한 바와 같이, (브라시카 라파일 수 있는) 수용식물은 제1 측면의 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 변이형을 발현하기 때문에 바이러스 감염에 저항성을 나타내는 모체식물과 교배시킬 수 있다. 이 방법은 제1대 교배 자손을 수용 모체(즉, 반복식물 계통)와 여교배시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 1 내지 10차례의 여교배가 필요할 수 있다. 제5 측면에 따른 방법은 (바이러스 저항성을 부여하는) eIF4E 또는 eIF(iso)4E 변이형 대립유전자가 각 교배의 비 반복식물에 존재함을 확실히 하는 데 이용될 수 있다. 마지막으로, 이 방법은 여교배 프로그램에서 유도된 바이러스 저항성 식물을 자가수분 또는 자가수정시키는 단계를 포함할 수 있다. 그 다음, (바이러스 저항성을 부여하는) 변경된 스플라이스 부위에 대하여 동형인 후속 세대의 식물을 확인할 수 있다.
- [0115] 바이러스 저항성을 나타내는 F₁ 잡종 식물 육종을 위해, 여교배 프로그램에서 유래되었으며, 제1 측면의 eIF4E 또는 eIF(iso)4E에 대해 동형인 두 동계 교배 모체식물 계통이 F₁ 잡종을 발생시키는 데 이용될 수 있다. 그런 다음, 이들 두 동계 교배 모체 계통을 서로 교배시켜 제1 측면의 eIF4E 또는 eIF(iso)4E에 대해 동형인 바이러스 저항성 F₁ 잡종을 발생시킬 수 있다.
- [0116] 이 방법에 이용된 모체식물은 야생형 eIF4E 또는 eIF(iso)4E를 적어도 한 카페 발현시킬 수 있는 것이 바람직하며, 야생형 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 카페는 식물이 이용할 수 있지만 바이러스는 이용할 수 없다.
- [0117] 제9 측면에서, 본 발명은 제8 측면의 방법으로 생산되거나 획득할 수 있는 바이러스 저항성 식물을 제공한다.
- [0118] 제10 측면에서, 본 발명은 제1 측면의 식물 진핵생물 변역 개시인자 4E(eIF4E) 변이형 또는 이의 이소형(eIF(iso)4E), 또는 제2 측면의 대안적으로 스플라이스된 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 변이형을 암호화하는 핵산을 포함하는 바이러스 저항성 식물을 제공한다.
- [0119] 바람직하게는, 제9 측면 및 제10 측면의 식물은 야생형 eIF4E 또는 eIF(iso)4E를 적어도 한 카페 발현시키는데, 이러한 야생형 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 카페는 식물이 이용할 수는 있지만 바이러스는 이용할 수 없다. 식물은 eIF4E 또는 eIF(iso)4E를 암호화하는 유전자의 비암호영역에 변경 또는 돌연변이를 포함할 수 있다. 변경은 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 핵산의 스플라이스 요소 내에 있을 수 있다.
- [0120] 용도, 방법 또는 식물은 eIF(iso)4E.a, eIF(iso)4E.b 또는 eIF(iso)4E.c, 바람직하게는 eIF(iso)4E.a의 이용을 포함할 수 있다.
- [0121] 식물은 감자(모든 품종), 토마토, 고추 또는 가지와 같은 가지과 식물, 멜론, 호박 및 오이와 같은 호로과 식물, 십자화과 작물, 특히 유채와 같은 브라시카 나푸스, 배추와 같은 브라시카 라파, 그리고 더욱 특별히 브로콜리, 콜리플라워, 양배추, 사보이 양배추, 브루셀 스프라우트, 적채 등과 같은 브라시카 올레라케아, 콩과 (Fabaceae) 완두, 콩류, 두류 등과 또한, 쌀, 옥수수, 밀, 보리 등을 포함하는 임의의 단자엽 작물일 수 있다. 바람직한 일실시예에서, 식물은 브라시카 속, 바람직하게는 브라시카 라파 및/또는 브라시카 올레라케아일 수 있다.
- [0122] 제5 측면, 제6 측면 또는 제8 측면의 방법 중 어느 하나의 방법, 제7 측면의 용도, 또는 제9 측면의 식물은 형질전환 식물의 활용을 포함할 수 있음을 인정할 것이다. 사실, 본원에 기술한 임의의 식물은 형질전환 식물, 즉, 재조합 DNA 기술을 이용하여 생산한 식물일 수 있다.
- [0123] 상술한 시나리오는 바이러스가 생애 주기를 완성시키고 감염을 유발하는 데 이용할 수 있는 eIF4E 및/또는 eIF(iso)4E를 단일 카페 보유하는 식물에서 바이러스 저항성을 설명한다. 따라서, 바람직한 실시예에서, 식물은 식물의 진핵생물 변역 개시인자 4E(eIF4E) 또는 이의 이소형(eIF(iso)4E)의 대안적으로 스플라이스된 변이형을 암호화하며, 바이러스에 대해 비 기능적인 eIF4E 및/또는 eIF(iso)4E에 대해 동형이다.
- [0124] 그러나 일부 식물은 이들 두 유전자 중 하나 또는 둘 다를 복수 카페/유전자좌로 보유함을 인정할 것이다. 예를 들어, 브라시카 라파는 eIF4E 및 eIF(iso)4E 둘 다를 세 카페씩 보유하며(즉, BraA.eIF4E.a, b 및 c; 그리고 BraA.eIF(iso)4E.a, b 및 c), 바이러스는 생애 주기 완성 및 숙주 식물에서 바이러스 감염을 유발시키는 데 이를 유전자 중 어느 하나를 이용할 수 있다. 따라서, eIF4E 및/또는 eIF(iso)4E를 복수 카페/유전자좌로 함유하는 식물에 바이러스 저항성을 부여하기 위해서는, 이러한 다른 유전자좌 각각에서 eIF4E 및/또는 eIF(iso)4E의 대립유전자 또한 바이러스에 대해 비 기능적인 것이 바람직하다.
- [0125] 이를 더 조사하기 위하여, 본 발명자는 바이러스 감염에 민감한 브라시카 라파 계통 R-o-18과 바이러스 저항성

계통 RLR22을 교배시켰으며, *BraA.eIF(iso)4E.a*의 RLR22 대립유전자와 *BraA.eIF4E.c*의 RLR22 대립유전자에 대해 동형이지만, *BraA.eIF(iso)4E.c* 유전자좌에서 이형인 B₁ 식물을 생산하고자 F₁ 식물을 저항성 식물의 자손(a self from the resistant plant)과 여교배시켰다. 그런 다음, 이러한 특별한 개체로부터 유도된 B₁S₁ 식물의 표현형과 유전형을 확인하였다. 놀랍게도, *BraA.eIF(iso)4E.c*의 R-o-18 대립유전자에 대해 동형인 식물은 바이러스 감염에 전적으로 민감성을 나타냈지만, *BraA.eIF(iso)4E.c*의 RLR22 대립유전자에 대해 동형인 식물은 순무 모자이크 바이러스(TuMV)에 전적으로 저항성을 나타내었고, 이형 접합체는 바이러스 감염에 매우 약하게 민감성을 나타내었다.

[0126] 따라서, 본 발명자는 브라시카 라파에서 바이러스에 대한 광범위한 저항성과 관련된 제2의 유전자좌가 A8 염색체 상의 *BraA.eIF(iso)4E.c*임을 확인하였다. 이러한 제2의 유전자좌를 본원에서는 *ConTR01*이라 한다. 본 발명자는 광범위한 바이러스 저항성을 위하여, 식물에 제1 유전자(즉, *retr01*, *BraA.eIF(iso)4E.a*의 RLR22 대립유전자) 이외에 제2 유전자(즉, *ConTR01*, *BraA.eIF(iso)4E.c*의 RLR22 대립유전자)가 필요하다고 생각한다. 이는 바이러스가 *eIF4E* 및/또는 *eIF(iso)4E*를 복수 카페/유전자좌로 활용할 수 있는 식물에서, 바이러스 저항성을 부여하기 위해서는 두 개 이상의 유전자가 중요하다는 사실을 보여준다. 브라시카 라파 계통 R-o-18과 RLR22의 *eIF4E* 및 *eIF(iso)4E* 대립유전자에 대해 결정한 계놈 DNA 염기서열과 예측한 mRNA 및 폴리펩티드 서열을 순무 모자이크 바이러스가 각 대립유전자를 이용할 수 있는지에 관한 정보와 함께 아래에 제공하였다.

[0127] R-o-18 *BraA.eIF4E.a*

[0128] TuMV가 브라시카 라파에서 이용할 수 없는, A1 염색체 상에 위치한 *BraA.eIF4E.a*의 R-o-18 대립유전자는 다음과 같은 계놈 DNA 염기서열을 나타낸다(액손 1 내지 5와 인트론(굵은 활자체로 표시)).

[0129] ATGGCGGTAGAAGACACACTCAAGCTTAATGTCGCTACGGAGAACATCGAACATCCAATTCTGCAGATCACCGATCGATCGATACCAGGAGGAAGGGAGCGATGCCGAGGAAGGAGCGACCGTAGCGAAATCCGCGTCCCTGAATCGCATCCGTTGGAGCATTCTGTGGACTCTCTGGTTGATAACCCCTCCGTCAAATCAAAGCAGACGACTTGGGAAGCTCCTTACGATCCGCTTCACCTCTCCACCGTCGAGGAGTTCTGGAGGTTGGTAGCTTACAACAAATCTTTTCC TTCTTACAGTAATCCACAATCTGGTTTTGTTAGATTTCTCACAGGAAAGTTATCTCTTGTGCTGTTAGAATCTGTTGATTTGACAACAGTACTTGTGTTGATGTTGAACAAACAGTTACTTGTGGATGCTAGTGTATTGGCTTGACATTTACTTTGATTTGAGTTGACAATAACATTCCGGCACCCGAGCAAGTTAGCTAACG GAGCTGACTTGTACTGTTCAAACACAATATTGAAACCTAAGTGGAGGATCCTATCTGTGCCAACGGAGGCAAGTGGACTATGAACCTCTAGGGAGAAGTCTGATAAGCCCTTCTTACCCGTATGTAACCTGACATTCAATAGTTCTGTTACACCACCCAGTCTCCAGTCTAAATCGGGTTGTTGTTGTTgtt gtCACTTGTAGTTGCTGTTGATTGGAGAACAGTTGACCATGGAGATGAAATCTGTGGAGTTGTTAACGTTAGGCTAACAGAAGAGAGGATATCTA TTTGGACTAAAAACTCTCCAACGAAGCGGCTCAGGTACAAGACAAAAAAACCCACATCAAACCTGTGTCTCTCGGTCTGAAGAAAAGACGTGGAAATT TTTATTTATTTAATGTTACAGGTGAGCATTGGAGAACAGTGGAGAGTCTTGTGTTAACACAGCAGCATGGTTCATCATCATGTAAAGAGCGTTCTGTTGCTAATTCTGTTTTTCTTCTATGGATGCTCACTACTTGTGTTGATGTGTTATTGGTTGGTTCTCTCAGGAGGATGCGaAGaAGC TGGACAGAGGCGCAAAGAGCGCTTACACTGCCGA

[0130] (SEQ ID No. 34)

[0131] TuMV가 브라시카 라파에서 이용할 수 없는, *BraA.eIF4E.a*의 R-o-18 대립유전자는 다음과 같은 mRNA 염기서열을 나타낸다.

[0132] AUGGCGGUAGAAGACACACUCAAGCCUAUGUCGUACGGAGAACGAAUCGAAUCCCAUUCUGCAGAUCCGAUCGAUCAGGAGGAAGGGAGCGAU GCCGAGGAAGGAGCGACGUAGCAGAAUCGAGCAAUCGCCGUCCCGUAGAACGCAUCCGUUGGAGCAUCGUGGACUCUGCUGGUUCGAUAACCCUCCGCU AAAUCAAAGCAGACGACUUGGGAAAGCUCCUACGAUCGUUACCUUCACCUUCCACCGUCGAGGAGUUCUGGUUACAUACUUCGGCACCCGAGC AAGUAGCUAACGGAGCUGACUUGUACGUUACAAACACAAUUGAACCUAAGUGGGAGGAUCUACUGUGCCAACGGAGGCAAGUGGACUAUGAACUUCU UCUAGGGAGAAGUCUGUAAGCCCUUUCUUAACCUUCUGCUUGCUUUGAUUGGAGAACAGUUGGACCAUGGAGAUGAAAUCUGUGGAGUUGUUAACGUU AGAGCUAAGCAAGAGAGGAUACUAAUUGGACUAAAACUCUACGAAGCGGCUCAGGUGAGCAUUGGGAGACAGUGGAAGGAGUUCUUGAUUACAAC AGCAGCAUUGGUUCAUCAUCCAUCAUGAGGAUCGAAGCUGGACAGAGGCGCAAAGAGCGCUUACACUGCCUGA

[0133] (SEQ ID No. 35)

[0134] TuMV가 브라시카 라파에서 이용할 수 없는, *BraA.eIF4E.a*의 R-o-18 대립유전자는 다음과 같은 폴리펩티드 서열로 코드화한다.

[0135] MAVEDTLKPNVATEESNPNSADHPIDRYHEGDDAEEGATVDESSKSAPVESHPLEHSWTLWFDNPSVSKQTTWGSSLRSVFTFSTVEEFWSLYNNIRHPS KLANGADLYCFKHNIEPKWEDPICANGGKWTMNFSSREKSDKFLYTLALLIGEQFDHGDEICGVVVNRRAKQERISIWTKNSSNEAAQVSIGRQWKEFLDYN SSIGFIIHEDAKKLDRGAKSAYTA.

TTTGTCTGTATTGGCTTGTTCAGGAGGATGCGACGAAGATGAACAAGTACAACCATACTGTTATCGATCTACAATTGAGTTAA

[0150] (SEQ ID No. 40)

[0151] 비) 가능한 *BraA.eIF4E.b*의 R-o-18 대립유전자는 다음과 같은 mRNA 염기서열을 나타낸다.

[0152] AUGCCGUAGAACACUUCAAGCCUGUUGCUAUCAaGGAAGCCAAACCUAAUUAUGUAGAGCAUCUGAUUGGACCAGGGACGAUGCGAGGAAGGA
GAGAUCGUAGACGGAGAUGUUGACAAUCUGGAAUCCACAGUUCUGAAUCGCAUCUGUUGGAGCAUUGUGGACUUCACAGUUCUCUUUAUCGU
UGACUUUCUAACGAAAAGACGACUUGGGAGACGUCCUAGAUCCGCUUCACGUUCUCCACGGUCGAGGAGUUCUGGAGUGGGAGACAAUAGAAGGAGUUC
UUGAUUACAACAGCUGCAUUGGUUCAUCAUCCAUUGAGGAUGCGACGAAGAUGAACAAUCAUCGUUAUCGAUCACAAUUGAGUUUA

[0153] (SEQ ID No. 41)

[0154] 비) 가능한 *BraA.eIF4E.b*의 R-o-18 대립유전자는 다음과 같은 폴리펩티드 서열로 코드화한다.

[0155] MAVEDTFKPVVAIKEAKPNYVEHLIGPGDDAEEGEIVDGDVDSGNPQLNRIRWSICGLSTVPLFIR.LSNEKTTWGSSLDRSRSPRSRSSGVGDNRSS
LITTAALVSSSMRMR.R.TSTTILLISIYNLSF

[0156] (SEQ ID No. 42)

[0157] RLR22 BraA.eIF4E.b

[0158] A3 염색체 상에 위치한 *BraA.eIF4E.b*의 RLR22 대립유전자에 대해서는 염기서열을 얻지 못하였다.

[0159] R-o-18 BraA.eIF4E.c

[0160] TuMV가 브라시카 라파에서 이용할 수 없는, A8 염색체 상에 위치한 *BraA.eIF4E.c*의 R-o-18 대립유전자는 다음과 같은 게놈 DNA 염기서열을 나타낸다(액손 1 내지 5와 인트론(굵은 활자체로 표시)).

[0161] ATGGCGTAGAACACACTTCAAGCCTGTCGTTGGGAAaGaAGCGAACCTAACCCACAGACCATCCGATTGATCGATACCATGAAGAACGGGACGAT
GCTGAGGAAGGAGAGATCGCCGGCGAAGGAGACGGAGACGAATCGAGCAAATCGCCGTTCCGCAGTCGATCCGTTGGAGCATTGAGCTTCTGG
TTCGATAACCCCTCTGTTAAATTAAAGCAGCGACTTGGGAGCTCCTGCGATCCGTTGCTACTTCTCCACCGTCGAGGAGTTCTGGAGGTTAGGGCTT
TTTACAAAATCAATAATTATTCTACAATTATTATTCGACATGGGTTTAGTTGGTTGCTAGATTATGTTCTCGAAGAAAGTTATGTTCTTCT
TCGTGGGTTAAGTGAATCACTTGTCTTGTGTTCTGAAATATTGCTTGTGTTGTTGTTGTTGAAATTATGAAAGGAAATCTTTGTCCTTCA
ATGACTATGCGGCATGGGTTTGGTTAGTTGTTAGATGTTATATCTCAAGGAAAGTTATGTTCTTGTGTTGGGGTAGATCCGTGAAGTCACTTGC
CTCTGTATGTTCTGAAGAACACTTAATTGGTGTGAGTTGAGCTACTGCTTATGTTAAGGTCAATTGTCGCTGTATCTTACAAGAGCT
AAAACATTGAACCAGGAATCATGGCTTATCGGTTAATGTTGGATGCTATTGTTGTTGCGTGTGTTGATATATACTTCTGTTGTTCTTCTTCT
TTTGTGAGTCTCTCAAGTCTCAATGGGTTAAGGACTTGTCTTGGCTCTATTGACTTCATCTTGTGTTGAGCTGTGTCATAACATGAGGGT
CCGAGCAAGTTACGTGGGGAGCTGACTTCAACTGTTCAAGCACAATATCGAACCTAAGTGGAGGATCTATCTGCTAATGGAGGAAATGGACTATG
AACTCCCGAAGGAGAAGTCTGATAAGCCCTGGCTTACACC**GTATGGTTGATTCTTACTTGAACACATGATTGTTTACCATCCATTGAGTC**
**TGATTGGGTTTGTGTTCTCGATGTAGTTGCTTGTGTTGATTGGAGAACAGTTGACCATGGAGATGAGATATGCGAGCTGTGTCACGTTAGAGGAAA
GCAAGAGAGGATTCCATTGGACAAAAATGTTCAACGAAGCTGTCAGT**AAAAGATCATTATTGACAATAATGTTAAATGTCCTCTCCGGC**
**TAAAAGACCTGAAATTCTGTTCTTGTGAGCTGAGGAGCATTGGAAACATGGAAGGAGTTATTGATTACAACACAGATTGGTTCATCATC
CATGTAAGAAGAGAGCTTCTCTGAATGTTTAAATCTCAACTGTCGTTGATTGTTTTTCTCAGGAGGATGCCAAGAA
GCTGGACAGGGGCGGAAGAGCCCTACACCGCTGA****

[0162] (SEQ ID No. 43)

[0163] TuMV가 브라시카 라파에서 이용할 수 없는, *BraA.eIF4E.c*의 R-o-18 대립유전자는 다음과 같은 mRNA 염기서열을 나타낸다.

[0164] AUGCCGUAGAACACUUCAAGCCUGUUGUCGUUGCGGAaGaAGCGAACCUACCCACAGACCAUCGAUUGAUCGAUAGAACGGGACGAU
GCUGAGGAAGGAGAGAUCGCCGGCGAAGGAGACGGAGACGAUUCGCGUUCGGCAGUCGAUCGGUUGGAGCAUUCGUGGACUUCUG
UUCGAUACCCUUCUGUAAAAGCAGGGACUUGGGAGCUCCUUGCGAUUCGUGUUCACUUUCUCCACCGUCGAGGAGUUCUGGAGCUGUCAA
AACAUAGGGGUCCGAGCAAGUAGCUGGCGAGCUGACUUCUCAAGCACAAUACGAACCUAAGUGGGAGGAUCUAUCUGUGCUAAUGGAGC
AAAUGGACUAGAACUCCCGAAGGAGAACGUCGAAAGCCUGGCUUACACCUUGCGUUGAUUGGAGAACAGUUUGACCAUUGGAGAUGAGAU
GGAGCUGUUGUCAACGUAGAGGAAAGCAAGAGAGGAAUUCUAGGACAAAAAUGCUUCCAACGAAGCUGCUCAGGUGAGCAUUGGGAAACA
GAGUUAUUGAUUACAACACAGCAUUGGUUCAUCAUCCAUUGAGGAUGCCAAGAAGCUGGACAGGGGCGGAAGAGCGCUUACACCGCUUGA

[0165] (SEQ ID No. 44)

- [0166] TuMV가 브라시카 라파에서 이용할 수 없는, *BraA.eIF4E.c*의 R-o-18 대립유전자는 다음과 같은 폴리펩티드 서열로 코드화한다.
- [0167] MAVEDTSKPVVVAEEANPNDHPIDRYHEEGDDAEEGEIAGGEGDGDESSKSAVPQSHPLEHSWTFWDNPSVKLQATWGSSLRSVFTFSTVEEFWSLFN
NMKGPSKLAGGADFYCFKHNIEPKWEDPICANGGKWTMNFPEKSDKPWLTYLLALIGEQFDHGDEICGAVVNVRGKQERISIWTKNASNEAQVSIGKQWK
EFIDYNNNSIGFIIHEDAKKLDRGAKSAYTA.
- [0168] (SEQ ID No. 45)
- [0169] RLR22 BraA.eIF4E.c
- [0170] TuMV가 브라시카 라파에서 이용할 수 없는, A8 염색체 상에 위치한 *BraA.eIF4E.c*의 RLR22 대립유전자는 다음과 같은 게놈 DNA 염기서열을 나타낸다(액손 1 내지 5와 인트론(굵은 활자체로 표시)).
- [0171] ATGGCGGTAGAAGACACTTCAAGCCTGTTGCGGAAGAAGCGAACCTAACCCACAGACCATCCGATTGATCGATACCATGAAGAAGGCGACGAT
GTTGAGGAAGGAGAGATCGCCGGCGCAGAACAGACGGAGACGAATCGAGCAAATCCGCGTCCCGCAGTCGCATCCGTTGGAGCATTGCGACCTCTGG
TTCGATAACCCCTCTGTTAAATTAAAGCAGGCCACTTGGGAAGCTCCTGCGATCCGTGTCACTTCTCCACCGTCGAGGAGTCTGGAGGTAGGGCTT
TTTACAAAATCAATAATTATTCTTGCATGATTATTGACATGGTTAGTTGGTTTGTCTAGATTATGTTTCTCGAGGAAAGTTATGTTCTTCT
TCGTGGGTTAAGTCAGTCAGTCACTTGTCTGTGTTCTGAAGTATGACTGTGTTGGTGTGATTATGGAGGTCAGGCCTACAAAACAATCTTGTCT
TTCTCTGATTATTCGACATGGTTTAGTTGGTTTGTCTAGATTATGTTCTCGAGGAAAGTTATGTTCTTCTGTTGGGTTAAGTGAAGTCACCT
GCTCTGCTGTTCTGAAATATTACTTGTGTTGGTGTGAAATTGAGCTACTGCTTATATGTTAAGGTCATATTGTTCACTTCTAATCTTCACAAAGAGC
TAAAACATTGAACTAGGAAATCATTGGTCTTATTGGTTAATGTTGGATGCTATTGTTGCTGTTGCTGTTGTTGCTGTTGCTGTTGCTGTTGCT
ATTGTTGAGTCTCTCAAGTCTCAATGGGATTTAAGGACTGTCTTGGCTCTATTGACTTCATCTTACTTGGTTGCAGTCGTTCAATAACATGAAGGG
TCCGAGCAAGTTAGCTGGCGAGCTGACTTCTACTGTTCAAGCACAATATCGAACCTAAGTGGGAGGATCCTATCTGCTAATGGAGGCAAATGGACTAT
GAACCTCCGAAGGAGAAGTCTGATAAGCCCTGGCTTACACTGTATGGTTGATTCTCTACTTGAAACACATGATTCTGTTGCTCCTTCACCATCC
CTGATTGGGTTTTGTTTCCATGTAGTTGCTGCGTTGATTGGAGAACAGTTGACCACGGAGATGAGATATGCGGAGCTGTTGCAACGTTAGAGGAA
AGCAAGAGGATTCCATTGGACCAAAATGCTTCAACGAAGCTCAGTAAAGATCATTTATTGACAATAAATGTTAAATTGCTCTCTTCC
CTAAAAGACCTGAAATTCTTGTGTTCTTGATGTTGCAGGTGAGCATTGGGAAACAATGGAAGGAGTTATTGATTACAACACAGCATTGGTTCATCAT
CCATGTAAGAAGAGAGCTTCTCTGAAATGCTTATTCATAAGTTTTAAATATCTCACTGTTGTTGTTTCTTCAGGAGGATGCCAAGA
AGCTGGACAGGGCGCGAAGAGCGCTTACACCGCTTGA
- [0172] (SEQ ID No. 46)
- [0173] TuMV가 브라시카 라파에서 이용할 수 없는, *BraA.eIF4E.c*의 RLR22 대립유전자는 다음과 같은 mRNA 염기서열을 나타낸다.
- [0174] AUGGCGGUAGAAGACACUCCAAGCCUGUUGUCGUUGCGGAAGAAGCGAACCCUAACCCACAGACCAUCCGAUUGAUCAUGAUACCGAAGAAGGCGACGAU
GUUGAGGAAGGAGAGAUCGCCGGCGAACAGACGGAGACGAUCGAGCAAUCGCGUUCGGCAGUCGCAUCCGUUGGAGCAUUCGUGGACCUUCUG
UUCGAUAACCCUUCUGUAAAUAAGCAGGGACUUGGGAAAGCUCUUGCGAUUCGUGUACUUUCUCCACCGUCGAGGAGUUCUGGAGUCUGUCAA
AACAUAGGGGUCCGAGCAAGUAGCUGGGCGAGCUGACUUCUAGCACAUAUCGAACCUAAGUGGGAGGAUCUAUCUGUGCUAAUGGGAGG
AAAUGGACUAUGAACUUCCGAAGGAGAAGUCUGUAAGCCUUGGUUACACUUCUGCGUUGAUUGGAGAACAGUUUGACCACGGAGAUGAGUAUGC
GGAGCUGUUGUCAACGUAGAGGAAAGCAAGAGAGGAAUUCGUUCAUUGGACCAAAAUGCUUCCAACGAAGCUGUCAGGUGAGCAUUGGGAAACAUUGGAAG
GAGUUuAUUGAUUACAACAACAGCAUUGGUUCAUCAUCCAUUGAGGAUGCCAAGAAGCUGGACAGGGCGCGAAGAGCGCUUACACCGCUUGA
- [0175] (SEQ ID No. 47)
- [0176] TuMV가 브라시카 라파에서 이용할 수 없는, *BraA.eIF4E.c*의 RLR22 대립유전자는 다음과 같은 폴리펩티드 서열로 코드화한다.
- [0177] MAVEDTSKPVVVAEEANPNDHPIDRYHEEGDDVEEGEIAGGETDGDESSKSAVPQSHPLEHSWTFWDNPSVKLQATWGSSLRSVFTFSTVEEFWSLFN
NMKGPSKLAGGADFYCFKHNIKPWEDPICANGGKWTMNFPEKSDKPWLTYLLALIGEQFDHGDEICGAVVNVRGKQERISIWTKNASNEAQVSIGKQWK
EFIDYNNNSIGFIIHEDAKKLDRGAKSAYTA.
- [0178] (SEQ ID No. 48)
- [0179] R-o-18 BraA.eIF(iso)4E.b
- [0180] TuMV가 브라시카 라파에서 이용할 수 없는, A5 염색체 상에 위치한 *BraA.eIF(iso)4E.b*의 R-o-18 대립유전자는

다음과 같은 게놈 DNA 염기서열을 나타낸다(액손 1 내지 5와 인트론(굵은 활자체로 표시)).

[0181]

ATGGCGACGGAGGATGTGAACGAAGCCCTGCGCGCGGAAGTACCGATAGTCGACAACGGAGAACGAGCCTCATAGCTGAAAGAAAATGGTGTTC
TGGTTGATAACCAATCTAACGCAAAGCAAGGCGCCGCTGGGAGCTCCCTCGTAAAGCCTACCTCGACACTGCGAAGATTCTGGGGGTGTGTC
GTGTCTCTCTCCTCCTCATTTAGATTCTCGATTAACCTCTCTGGCATCGTTTGAGTTGACGAGACTATATTCACTCCAGCAAATTGAC
ACCCATGCTGATATCCACTTGTCAAAGCTGGCGTTGAGCCAAGTGGGAAGATCCTGAGTGTGCTCACGGCGAAAGTGGACTTTGTTGTCACCAACAA
CAGGAAGCAAGCTTAGACAAGGCTGGCTGAAACTGTAATACCGCTCCCTTACTGTTTGCTTAGACAATTGCGTTATGCTCTAATGTCTG
TTTCTCTCTCTCTCGTAATTGGCGGCAGTTGATGGCTTGATTGGAGAGCAATTGATGAGGAGATGAGATTGTTGTTGCTAGTGTGCG
CCTAAAGCAAGACAAGCTCCTGTGGACACGGACTAAATCAAATGAAGCTGCTGGTAGATTACGAATCATGTTCTCTAGTGTGCTTTTTTT
TTTTTTTCATTTCTGCTTTGGTGTGCGATGAGATGCCAAGTACTATTCACTAGCTTCTGTTGAACCGTGTGATTGCTTACAGTAAAG
TAGCATAAGCTGTTAATATATAACGCTACTCTAAATTATCAACGAAAGATGTAGAGAGGTTTTATAATGAGTTAAATTAGTTTATACTGAAGG
TTTATAGGTCGTTAACTATTGATTTCTGATCTGCTTATAGTTACGCTTACGTTGTTGTTATGGTAAATTCACTAGGGTATTGAAAGAAGTGGAAAGCGCT
ACTTGACGTCACCGACAAGATAACCTTCACTAACCATGTAATTAACGTTCTCATAGAAGCTAATATTACTTTGTTCATGTTATCCTTACGTGCTTA
CTAAAATCTGGTCTACTTACTTGTGAGGATGATTCTAGAAGAAGTCGGTTACTGTCTGA

[0182]

(SEQ ID No. 49)

[0183]

TuMV가 브라시카 라파에서 이용할 수 없는 *BraA.eIF(iso)4E.b*의 R-o-18 대립유전자는 다음과 같은 mRNA 염기서열을 나타낸다.

[0184]

AUGGCGACGGAGGAUGUGAACGAAGCCUUGCGCGCGGAAGUACCGAUAGAGUCGACAACGGAGAACGAGCCUCAUAAGCUGGAAAGAAAUGGUGUUUC
UGGUUCGAUACCAACUAAGCCAAGCAAGGCGCCGCGGGAGCUUCCUUCGUAAAGCCUCAUCCUGACACUGUCGAAGAUUUCUGGGGUUUGCAC
GAGACUAAUUCAUUCCAGCAAAUUGACACCCAUGCUGAUUACCUUCAAGCUGCGUUGAGGCCAAGUGGGAGAUCCUGAGUGUCACGGC
GGAAAGUGGACUUUUGUGUUGUUGUACCAACAACAGGAAGCAAGCAGCUUAGACAAGGCUGGUUGAAGUUGAUGGCUUUGAUUGGAGAGCAUUCGAUGAGGCA
GAUGAGAUUUGUGGUGUUGUUGUACAGUGUGCGCCUAAAGCAAGACAAGCUCUCCUUGUGGACACGGACUAAAUAAGCUGUCCUGAUGGGUAUUGGA
AAGAAGUGGAAGGCGUACUUGACGUCACCGACAAGAUACUUACUAACCAUGAUGAUUCUAGAAGAAGUCGGUUCACUGUCUGA

[0185]

(SEQ ID No. 50)

[0186]

TuMV가 브라시카 라파에서 이용할 수 없는 *BraA.eIF(iso)4E.b*의 R-o-18 대립유전자는 다음과 같은 폴리펩티드서열로 코드화한다(RLR22 *BraA.eIF(iso)4E.b*와 같음).

[0187]

MATEDVNEALAAAEPPIESTTEKQPHKLERKWCWFNDNQSKPKQGAAWGAISLRKASTFDTVEDFWGLHETIFIPSKLTPNADILFKAGVEPKWEDPECAHG
GKWTFTVVTNNRKQALDKAWLETLMALIGEQFDEADEICGVVASVRLQDKLSLWTRTKSNEAVLMIGIKKKWALLDVTDKITFTNHDDSSRSRFTV.

[0188]

(SEQ ID No. 51)

[0189]

RLR22 BraA.eIF(iso)4E.b

[0190]

TuMV가 브라시카 라파에서 이용할 수 없는, A5 염색체 상에 위치한 *BraA.eIF(iso)4E.b*의 RLR22 대립유전자는 다음과 같은 게놈 DNA 염기서열을 나타낸다(액손 1 내지 5와 인트론(굵은 활자체로 표시)).

[0191]

ATGGCGACGGAGGATGTGAACGAAGCCCTGCGCGCGGAAGTACCGATAGTCGACAACGGAGAACGAGCCTCATAGCTGAAAGAAAATGGTGTTC
TGGTTGATAACCAATCTAACGCAAAGCAAGGCGCCGCTGGGAGCTCCCTCGTAAAGCCTACCTCGACACTGCGAAGATTCTGGGGGTGTGTC
GTGTCTCTCTCCTCCTCATTTAGATTCTCGATTAACCTCTCTGGCATCGTTTGAGTTGACGAGACTATATTCACTCCAGCAAATTGAC
ACCCATGCTGATATCCACTTGTCAAAGCTGGCGTTGAGCCAAGTGGGAAGATCCTGAGTGTGCTCACGGCGAAAGTGGACTTTGTTGTCACCAACAA
CAGGAAGCAAGCTTAGACAAGGCTGGCTGAAACTGTAATACCGCTCCCTTACTGTTTGCTTAGACAATTGCGTTATGCTCTAATGTCTG
TTTCTCTCTCTCGTAATTGGCGGCAGTTGATGGCTTGATTGGAGAGCAATTGATGAGGAGATGAGATTGTTGTTGCTAGTGTGCG
CCTAAAGCAAGACAAGCTCCTGTGGACACGGACTAAATCAAATGAAGCTGCTGGTAGATTACGAATCATGTTCTCTAGTGTCTTTTT
TTTTTTTCATTTCTGCTTTGGTGTGCGATGAGATGCCAAGTACTATTCACTAGCTTCTGTTGAACCGTGTGATTGCTTACAGTAAAG
TAGCATAAGCTGTTAATATATAACGCTACTCTAAATTATCAACGAAAGATGTAGAGAGGTTTTATAATGAGTTAAATTAGTTTATACTGAAGG
TTTATAGGTCGTTAACTATTGATTTCTGATCTGCTTAAATTACTGCTTGTGTTATGGTAAATTCACTAGGGTATTGAAAGAAGTGGAAAGCGCT
ACTTGACGTCACCGACAAGATAACCTTCACTAACCATGTAATTAACGTTCTCCTATAGAAGCTAATATTACTTTGTTCATGTTATCCTTACGTGCTTA
CTAAAATCTGGTCTACTTACTTGTGAGGATGATTCTAGAAGAAGTCGGTTACTGTCTGA

NGGKWTYVVTNNRKQALDKAWLELMLALVGEQFDEADEICGVVASVRQKQDKLWLWTRTKSNEAVLMLGIGKKWKEILDVTDKISFTNHDDARRSRFSV.

[0208] (SEQ ID No. 57)

[0209] RLR22 BraA.eIF(iso)4E.c

[0210] TuMV가 브라시카 라파에서 이용할 수 없고 저항성에 필수적인, A8 염색체 상에 위치한 *BraA.eIF(iso)4E.c*의 RLR22 대립유전자는 다음과 같은 게놈 DNA 염기서열을 나타낸다(액손 1 내지 5와 인트론(굵은 활자체로 표시)).

[0211] ATGGCGACAGAGGATGTGAACGAAGCCCTTGCGCGCGAGGTAAACGGCGATAGAATCGACGGAGAACGAGCAGCAGCCTCTCACAGCTCGAAAGAAAGTGGAGTTCTGGTCGATAACCAATCGAAACCCAAGCAAGGCAGCCCTGGGAGCTCCCTCGTAAAGCATGATCACCTCGATACCGTCGAAGACTCTGGGGTTTGTCTTTCTCTCGATCTAAGATTTCTGTGAAGTTACTAATAGGGGTGTGTATTGTTGAGCTTGCAGTTGCACGAGACTATCTCGTCCAGCAGATTGATACCCAACGCTGACATTACATGTTCAAAGCTGGTGTGAGGCCAAGTGGGAAGATCCCTGAGTGTGCTAACGGCGAAAGTGGACTTATGTTTACCAACAGGAAGCAAGCTTAGACAAGGCTGGCTTGAAGACTGTACTCTCTCTCTCTAACCCCTTTACTCTCTGTTCTGACTTAATAATTCTACTCTGTGTTGGCAGTTGATGGCTTAGTTGGAGAGCAGTTGATGAGGAGATCTGTGGTGTGGTGCTAGTGTCCGCCAAAGCAAGACAAGCTCCTGTGGACTAGGACTAAATCTAATGAAGCTGTTCTGATCATGCTCTCTCCCTTATATATGTTGTTGACAGTTTAAACCACCTTTGATACTTTGCTGACAGTATAATCATAAGCTATATTGCAAAGGATATGTTAGTATGTCAAAGATGGTTATGATATCTATATCTGATGAAATTGTTGTTGTTGTTGTTATTGTTATTGTTATTGTTATGATCTATCTGAGATTCTACTCTGCTATATATTAGATTGTTATGAAATTATCTGACGAACACTAACACTTGTGTAACCTAGATGGTATTGGGAAGAGTGGAGGAGATACTTGATGTCACCGACAAGAGATCTTCACTAACCATGTAATTACACTTCCCCACGTAAAAGCTAATCAATCATCCTTTGTTAGTGCCTTTAAACTGTGGTCTATGTATATGCAGGATGATGCAAGAAGAAGTCGATTAGTGTCTGA

[0212] (SEQ ID No. 58)

[0213] TuMV가 브라시카 라파에서 이용할 수 없고 저항성에 필수적인 *BraA.eIF(iso)4E.c*의 RLR22 대립유전자는 다음과 같은 mRNA 염기서열을 나타낸다.

[0214] AUGGCGACAGAGGAUGUGAACGAAGCCUUGCGCGCGAGGUACGGCGAUAGAAUCGACGGAGAACGAGCAGCAGCCUCUCAAGCUCGAAAGAAAGUGGAGUUUCUGGUUCGUAACCAAUCGAAACCCAAGCAAGGCAGCCUUGGGAGCUUCCUCGUAAAGCAUGUACCUUCGUAACCGUCGAAGACUUCUGGGGUUUGCACGAGACUAUCUUCGUCCAGCAGAUACCCAGCAGACAUUCACAGGAAGCAAGCUUAGACAAGGCUUGGAACUUGAUGGCUUUAGUUGGAGAGCAGUUGAUAGGCAGAUGAGAUCUGUGGUGGUUGCUAGUGUCGCCAAAGCAAGACAAGCUCUCCUUGUGGACUAGGACUAAUCUAUGAAGCUGUUCUGAUGGGGUAUUGGGAAAGUGGAAGGAGAUACUUGAUGUCACCGACAAGAUACUUUACUAACCAUGAUGAUGCAAGAAGUUCGAAUUAUGUCUG

[0215] (SEQ ID No. 59)

[0216] TuMV가 브라시카 라파에서 이용할 수 없고 저항성에 필수적인 *BraA.eIF(iso)4E.c*의 RLR22 대립유전자는 다음과 같은 폴리펩티드 서열로 코드화한다.

[0217] MATEDVNEALAAAETAIESTEKQQPPHKLERKWSFWFDNQSKPKQGAAGASLRKACTFDTVEDFWGLHETIFVPSRLIPNADIHMFKAGVEPKWEDPECA
NGGKWTYVVTNNRKQALDKAWLELMLALVGEQFDEADEICGVVASVRPKQDKLWLWTRTKSNEAVLMLGIGKKWKEILDVTDKISFTNHDDARRSRFSV.

[0218] (SEQ ID No. 60)

[0219] 따라서, 제10 측면에서, 식물의 진핵생물 번역 개시인자 4E(eIF4E) 또는 이의 이소형(eIF(iso)4E)을 암호화하는 분리된 핵산 염기서열로서, 이때, eIF4E 또는 eIF(iso)4E는 바이러스에 대해 비 기능적이며, 대체로 SEQ ID No: 4, 5, 7, 9, 34, 35, 37, 38, 40, 41, 43, 44, 46, 47, 49, 50, 52, 53, 58 또는 59에 기재된 바와 같은 뉴클레오티드 서열, 또는 이의 변이형 또는 단편을 포함하는 분리된 핵산 염기서열이 제공된다.

[0220] 제11 측면에서는, 바이러스에 대해 비 기능적인, 분리된 식물의 진핵생물 번역 개시인자 4E(eIF4E) 변이형 또는 이의 이소형(eIF(iso)4E)으로서, 이때, eIF4E 또는 eIF(iso)4E 단백질 변이형은 대체로 SEQ ID No: 6, 8, 10, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54 또는 60에 기재된 바와 같은 아미노산 염기서열, 또는 이의 변이형 또는 단편을 포함하는 분리된 식물의 진핵생물 번역 개시인자 4E 또는 이의 이소형이 제공된다.

[0221] 제3 측면의 벡터, 제4 측면의 숙주 세포, 제5 측면, 제6 측면 또는 제8 측면 중 어느 하나의 방법, 제7 측면의 용도 또는 제9 측면의 식물은 제10 측면에서 정의한 바와 같은 바이러스에 대해 비 기능적인, 본원에 기술한 염기서열 중 어느 하나를 포함할 수 있음을 인정할 것이다. 예를 들어, 일실시예에서, 본 발명의 벡터, 세포, 방법, 용도 또는 식물은 대체로 SEQ ID No: 4, 5, 7, 9, 34, 35, 37, 38, 40, 41, 43, 44, 46, 47, 49, 50, 52, 53, 58 또는 59에 기재된 바와 같은 뉴클레오티드 서열, 또는 이의 변이형 또는 단편을 포함할 수 있다.

- [0222] 다른 실시예에서, 본 발명의 벡터, 세포, 방법, 용도 또는 식물은 제11 측면에서 정의한 바와 같은 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 단백질 변이형을 포함할 수 있다. 따라서, 바람직하게는, 벡터, 세포, 방법, 용도 또는 식물은 대체로 SEQ ID No: 6, 8, 10, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54 또는 60에 기재된 바와 같은 아미노산 염기서열, 또는 이의 변이형 또는 단편을 포함하는 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 단백질 변이형을 포함한다.
- [0223] 본 발명의 벡터, 세포, 방법, 용도 또는 식물은 대체로 SEQ ID No: 58 또는 59에 기재된 바와 같은 뉴클레오티드 서열, 또는 이의 변이형 또는 단편의 활용, 또는 대체로 SEQ ID No: 60에 기재된 바와 같은 아미노산 염기서열, 또는 이의 변이형 또는 단편을 포함하는 eIF4E 또는 eIF(iso)4E 단백질 변이형의 활용을 포함하는 편이 바람직하다.
- [0224] 본 발명은 (기능적) 변이형 또는 (기능적) 단편을 포함하는, 본원에서 언급한 임의의 염기서열의 아미노산 또는 핵산 염기서열을 대체로 포함하는 임의의 핵산 또는 펩티드 또는 변이형, 이의 유도체 또는 유사체까지 미침을 인정할 것이다. 용어 "대체로 아미노산/폴리뉴클레오티드/폴리펩티드 서열", "(기능적) 변이형" 및 "(기능적) 단편"은 본원에서 언급한 서열 중 어느 하나의 아미노산/폴리뉴클레오티드/폴리펩티드 서열과 적어도 40%의 서열 동일성을 나타내는 서열일 수 있다.
- [0225] 언급한 임의의 서열과 65% 초과, 더욱 바람직하게는 70% 초과, 훨씬 더 바람직하게는 75% 초과, 매우 바람직하게는 80%를 초과하는 서열 동일성을 나타내는 아미노산/폴리뉴클레오티드/폴리펩티드 서열도 예상된다. 바람직하게는, 아미노산/폴리뉴클레오티드/폴리펩티드 서열은 본원에서 언급한 임의의 서열과 적어도 85% 동일성을, 더욱 바람직하게는 적어도 90% 동일성을, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 92% 동일성을, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 95% 동일성을, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 97% 동일성을, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 98% 동일성을, 그리고 가장 바람직하게는 적어도 99% 동일성을 나타낸다.
- [0226] 숙련된 기술자는 두 아미노산/폴리뉴클레오티드/폴리펩티드 서열 사이의 퍼센트 동일성을 계산하는 방법을 이해할 것이다. 두 아미노산/폴리뉴클레오티드/폴리펩티드 서열 사이의 퍼센트 동일성을 계산하기 위해서는, 먼저 두 서열을 정렬한 다음, 서열 동일성 수치를 계산해야 한다. 두 서열에 대한 퍼센트 동일성은 (i) 서열 정렬에 이용된 방법, 예를 들어, ClustalW, BLAST, FASTA, Smith-Waterman(서로 다른 프로그램에서 시행됨), 또는 3D 비교를 통한 구조적 정렬, 및 (ii) 정렬 방법이 이용한 매개변수, 예를 들어, 부분 대 전체 서열 정렬, 이용된 쌍-점수 행렬(예를 들어, BLOSUM62, PAM250, Gonnet 등), 및 캡 패널티(예를 들어, 함수 형식과 상수)에 따라 서로 다른 수치를 얻을 수 있다.
- [0227] 정렬을 마친 후에는 두 서열 사이의 퍼센트 동일성을 계산하는 여러 가지 방법이 있다. 예를 들어, 동일성 수를 (i) 가장 짧은 서열의 길이, (ii) 정렬 길이, (iii) 서열의 평균 길이, (iv) 비 캡(non-gap) 위치의 수, 또는 (v) 오버행을 제외한 동등한 위치의 수로 나눌 수 있다. 나아가, 퍼센트 동일성은 또한 강하게 길이 의존적임을 인정할 것이다. 그러므로 서열 쌍이 짧을수록, 우연히 발생하리라고 기대할 수 있는 서열 동일성은 더 높다.
- [0228] 이런 이유로, 단백질 또는 DNA 염기서열의 정확한 정렬은 복잡한 과정임을 인정할 것이다. 인기 있는 다중 서열 정렬 프로그램 ClustalW(Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research, 22, 4673-4680; Thompson et al., 1997, Nucleic Acids Research, 24, 4876-4882)는 본 발명에 따른 단백질 또는 DNA의 다중 서열정렬을 발생시키기 위한 바람직한 방식이다. ClustalW를 위한 적합한 매개변수는 다음과 같을 수 있다. DNA 서열정렬을 위한 매개변수: 캡 생성 패널티 = 15.0, 캡 확장 패널티 = 6.66 및 매트릭스 = 동일성. 단백질 서열정렬을 위한 매개변수: 캡 생성 패널티 = 10.0, 캡 확장 패널티 = 0.2 및 매트릭스 = Gonnet. DNA 및 단백질 서열정렬을 위한 매개변수: ENDGAP = -1 및 GAPDIST = 4. 당업자는 최적의 서열정렬을 위하여 이를 및 기타 매개변수에 변화를 주는 것이 필수적일 수 있음을 인지할 것이다.
- [0229] 바람직하게는, 이후 두 아미노산/폴리뉴클레오티드/폴리펩티드 서열 사이의 퍼센트 동일성 계산은 $(N/T) \times 100$ 과 같은 정렬로부터 계산될 수 있다. 이때, N은 서열이 동일한 잔기를 공유하는 위치의 수이고, T는 캡은 포함하지만 오버행은 제외한, 비교된 위치의 전체 수를 나타낸다. 이런 이유로, 두 서열 사이의 퍼센트 동일성을 계산하는 가장 바람직한 방법은 (i) 예를 들어, 상술한 바와 같은, 적합한 매개변수 세트를 이용하는 ClustalW 프로그램을 이용하여 서열정렬을 준비하는 단계 및 (ii) 다음 식: 서열 동일성 = $(N/T) \times 100$ 에 N과 T 값을 삽입하는 단계를 포함한다.
- [0230] 비슷한 서열을 확인하는 대안적인 방법이 당업자에게 알려지게 될 것이다. 예를 들어, 대체로 비슷한 뉴클레오티드 서열은 엄격한 조건에서 SEQ ID Nos: 1, 2, 4, 5, 7 또는 9에 나타낸 염기서열 또는 그들의 상보적인 서열에 혼성화하는 염기서열에 의해 암호화될 것이다. 엄격한 조건은 뉴클레오티드가 약 45°C에서 3x 염화나트륨/구

연산 나트륨(SSC)에서 필터에 결합된 DNA 또는 RNA에 혼성화된 후에, 약 20 내지 65°C에서 0.2x SSC/0.1% SDS에서 적어도 1회 세척되는 것을 의미한다. 대체로 비슷한 폴리펩티드는 SEQ ID No: 3, 6, 8 또는 10에 나타낸 서열과 적어도 1개의 아미노산, 그러나 5, 10, 20, 50 또는 100개 아미노산보다 적은 아미노산이 다를 수 있다. 숙련된 기술자는 핵산 염기서열의 단일 뉴클레오티드 변이 또는 돌연변이를 확인하는 고도로 민감한 기법에 익숙할 것이다.

[0231] 유전 암호의 퇴보 때문에, 본원에 기술된 임의의 핵산 염기서열은 (기능적) 변이형을 제공하기 위하여, 그에 의해 암호화된 단백질 서열에 대체로 영향을 미치지 아니하고 달라지거나 바뀔 수 있음을 분명하다. 적합한 뉴클레오티드 변이형은 서열 내에서 동일한 아미노산을 암호화하는 다른 코돈의 치환으로 변경되어, 침묵 변화를 가져오는 염기서열을 나타내는 것들이다. 다른 적합한 변이형은 상응하는 뉴클레오티드 서열을 나타내지만, 보존적인 변화를 가져오고자 치환하는 아미노산과 비슷한 생물물리학적 속성의 결가지가 있는 아미노산을 암호화하는 다른 코돈의 치환으로 변경된 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 것들이다. 예를 들어, 작은 비극성 소수성 아미노산은 글리신, 알라닌, 류신, 이소류신, 발린, 프롤린 및 메티오닌을 포함한다. 큰 비극성 소수성 아미노산은 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신을 포함한다. 극성 중성 아미노산은 세린, 트레오닌, 시스테인, 아스파라긴 및 글루타민을 포함한다. 양으로 하전된(염기성) 아미노산은 리신, 아르기닌 및 히스티딘을 포함한다. 흄으로 하전된(산성) 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 그러므로 어떤 아미노산이 비슷한 생물물리학적 속성을 나타내는 아미노산으로 치환될 수 있을지를 이해할 것이며, 숙련된 기술자라면 이러한 아미노산을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 알 것이다.

[0232] (임의의 첨부된 청구항, 요약 및 도면을 포함한) 본원에 기술한 특정 전부 및/또는 이렇게 개시한 임의의 방법 또는 공정의 모든 단계는 상술한 임의의 측면과 그러한 특정 및/또는 단계의 적어도 일부분이 상호간에 배타적인 조합을 제외한 임의의 조합으로 조합될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0233] 본 발명을 더 잘 이해할 수 있도록 하기 위하여 그리고 본 발명의 실시예가 어떻게 실시될 수 있는지를 보여주기 위하여, 첨부된 개략적인 도면에 대하여 한 예로서 언급하도록 하겠다.

도 1은 브라시카 라파 *eIF(iso)4E* mRNA와 아라비돕시스 탈리아나의 *eIF(iso)4E* 및 *eIF(iso)4E* mRNA의 RT-PCR 산물이 분리된 전기영동 겔을 나타낸다. R-o-18은 TuMV에 의한 감염에 민감한 브라시카 라파 계통에 해당하고, 브라시카 라파 계통 RLR22는 TuMV에 의한 감염에 저항성을 나타낸다. 바이러스 저항성 계통 RLR22의 mRNA(SEQ ID No.5)는 민감한 계통 R-o-18의 mRNA(SEQ ID No.2)보다 크다. Col-0 *eIF4E* 및 Col-0 *eIF(iso)4E*은 대조군으로, 각각 야생형 아라비돕시스 탈리아나 *eIF4E* 및 *eIF(iso)4E*에 해당한다.

도 2는 브라시카 라파 *eIF(iso)4E.a*를 암호화하는 유전자를 개략적으로 나타낸 것이다. 엑손은 검은색 상자로 나타내고 번호를 붙였고, 인트론은 흰색 상자로 나타내고 번호는 붙이지 않았다.

도 3은 TuMV에 의해 감염될 수 있는 계통 R-o-18의 브라시카 라파 *eIF(iso)4E.a* mRNA를 개략적으로 나타낸 것이다. 엑손 1 위의 화살표는 개시코돈에 해당하며, 엑손 5 위의 화살표는 종결코돈에 해당한다.

도 4는 바이러스 감염에 대해 저항성을 나타내는 계통 RLR22의 브라시카 라파 *eIF(iso)4E.a* mRNA의 일실시예(가장 흔한 변이형)(SEQ ID No.5)를 개략적으로 나타낸 것이다. 개시코돈과 종결코돈을 화살표로 나타내었다. 스플라이싱 오류는 성숙한 전령 RNA에 인트론 1 전체가 유지되도록 하고, 왼쪽의 붉은 화살표로 나타낸 미성숙 종결코돈이 도입되도록 한다.

도 5는 바이러스 감염에 대해 저항성을 나타내는 계통 RLR22의 브라시카 라파 *eIF(iso)4E.a* mRNA의 다른 실시예(SEQ ID No.7)를 개략적으로 나타낸 것이다. 개시코돈과 종결코돈을 화살표로 나타내었다. 스플라이싱 오류는 처음 48개의 뉴클레오티드만이 제거된 인트론의 부분적인 제거를 초래한다.

도 6은 바이러스 감염에 대해 저항성을 나타내는 계통 RLR22의 브라시카 라파 *eIF(iso)4E.a* mRNA의 다른 실시예(SEQ ID No.9)를 개략적으로 나타낸 것이다. 개시코돈과 종결코돈을 화살표로 나타내었다. 스플라이싱 오류는 엑손 1의 마지막 세 개의 뉴클레오티드와 인트론 1 전부의 절단을 초래한다.

도 7은 TuMV 감염에 대해 저항성을 나타내는 계통 RLR22의 브라시카 라파 *eIF(iso)4E.a*의 인트론 1에 변경이 있는 식물(좌)과 TuMV에 극도로 민감한, 이러한 변경이 없는 브라시카 라파 식물(우)의 사진을 나타낸다.

도 8은 본 발명의 *eIF4E* 또는 *eIF(iso)4E* 변이형에 대해 동형인 식물 계통을 발생시키는 육종 프로그램을 개략

적으로 나타낸 것이다.

도 9는 프라이머 BR2와 BR14를 이용하여 식물 R-o-18과 RLR22의 DNA에서 획득한 PCR 산물을 보여주는 전기영동 젤을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0234] 실시예

[0235] 실시예 1 - 바이러스 저항성을 부여하는 *eIF(iso)4E* 서열 분석 및 바이러스 저항성을 부여하는 제1 유전자와 *retro01*의 분리

[0236] 본 발명자는 식물에 TuMV에 대한 저항성을 부여하는 것과 관련된 유전자와 기전 확인을 목표로 브라시카 라파를 연구하였다.

[0237] 재료 및 방법

[0238] 브라시카 라파 계통 R-o-18은 TuMV에 의한 감염에 민감한 동계 교배 계통이다. 그러나 계통 RLR22는 지금까지 시험한 모든 TuMV 분리균에 대해 광범위한 저항성을 나타낸다. DNeasy 플랜트 미니 키트(Qiagen)를 이용하여 계통 R-o-18과 RLR22의 어린 잎으로부터 전체 게놈 DNA를 추출한 후, GenomiPhi 시스템(GE Healthcare)을 이용하여 증폭시켰다. *BraA.eIF(iso)4E.a* 유전자의 게놈 암호영역의 대부분을 *Taq* DNA 중합효소(Invitrogen)와 다음과 같은 프라이머를 이용하는 표준 PCR로 증폭시켰다:

[0239] PCR1 (ATGGCGACAGAGGATGTGAACG) - (SEQ ID No.11) 및

[0240] PCR2 (TCTCCTTCCACTTCTTCCAATAC) - (SEQ ID No.12).

[0241] *eIF(iso)4E* 유전자와 *a*에 해당하는 가장 큰 증폭 산물을 아가로스 젤과 Qiaquick 젤 추출 키트(Qiagen)를 이용하여 정제하였다. 그런 다음, 프로브 형성을 위해 PCR 산물을 RediPrime[®] I DNA 라벨링 시스템(GE Healthcare)을 이용하여 ³²P dCTP로 라벨링하였다. 그런 다음, 이렇게 방사능 표지된 프로브를 JBr BAC 라이브러리(계통 R-o-18)의 36864개 콜로니 또는 계통 RLR22의 포스미드 라이브러리(Warwick Plant Genome Libraries, UK)가 찍힌 필터에 혼성화시켜, *BraA.eIF(iso)4E.a*가 있는 플라스미드(각각 JBr043019 및 RLR021G13)를 함유하는 콜로니를 확인하고자 하였다. 두 대립유전자의 전체 게놈 서열을 결정하고자 이러한 플라스미드가 있는 섹션을 BigDye 터미네이터 시스템과 ABI 프리즘 3130x1 유전자 분석기(Applied Biosystems)를 이용하여 순차적으로 서열을 분석하였다.

[0242] RNeasy 키트(Qiagen)를 이용하여 두 식물 계통의 어린 잎으로부터 전체 RNA를 추출하였다. 게놈 DNA의 나머지를 제거하고자 전체 RNA의 일부 시료를 DNaseI(Roche)으로 처리하였다. RT-FOR 및 RT-REV 프라이머는 *BraA.eIF(iso)4E.a* 유전자의 전체 암호영역을 아우른다(개시코돈과 종결코돈은 짙은 활자체로 나타내었고, 클로닝을 위한 어댑터는 이탤릭체로 나타내었다).

[0243] RT-FOR: AAAAAGCAGGCT CGATGGCGACAGAGGATG (SEQ ID No. 13)

[0244] RT-REV (R-o-18): AGAAAGCTGGGT TCAGACAGTGAACCTAGTTCTC (SEQ ID No. 14)

[0245] RT-REV (RLR22): AGAAAGCTGGGT TCAGACAGTGAACCGAGTTCTC (SEQ ID No. 15)

[0246] Superscript II(Invitrogen)와 적절한 RT-REV 프라이머를 이용한 표준 역전사 반응으로 전체 RNA(DNaseI 처리 시와 비 처리 시, 약 10길 RNA)를 cDNA로 전환시켰다. *Taq* DNA 중합효소(Invitrogen) 또는 KOD 중합효소(Novagen)와 적절한 RT-FOR 및 RT-REV 프라이머의 조합을 이용한 표준 PCR로 cDNA를 증폭시켰다. RT-PCR 산물을 아가로스 젤 전기영동을 이용하여 분리하고, Qiaquick 젤 추출 키트(Qiagen)를 이용하여 젤에서 추출하였다. BP clonase(Invitrogen)를 이용하여 산물을 pDONR221 플라스미드에 클로닝하였다. TempliPhi 반응(GE Healthcare)을 이용하여 플라스미드를 증폭시킨 다음, 서열을 분석하였다.

[0247] 결과

[0248] 본 발명자는 전 세계 여러 지역에서 분리된 다양한 TuMV 분리주에 대해 저항성을 나타내며 서로 다른 유전자 집단을 대표하는 브라시카 라파 계통 RLR22를 발견하였다. 도 8은 *eIF(iso)4E.a*의 RLR22 대립유전자에 대해 동형인 식물은 TuMV 감염에 저항성을 나타내지만(좌), *eIF(iso)4E.a*의 브라시카 라파 R-o-18 대립유전자에 대해 동형 또는 이형인 식물은 TuMV 감염에 민감하다(우)는 점을 보여준다.

- [0249] 첫째, 본 발명자는 바이러스 저항성 표현형이 eIF(iso)E 유전자좌와 연관되어 있다는 사실을 발견했다. 민감성 계통(R-o-18)과 저항성 계통(RLR22) 사이의 교배를 이용하여, 본 발명자는 브라시카 라파가 세 가지 eIF(iso)4E 유전자좌를 함유함을 확인하였다.
- [0250] 둘째, R-o-18 및 RLR22 계통에서 *BraA.eIF(iso)4E.a*의 계놈 버전과 mRNA 버전의 서열을 비교하였다. 도 1은 브라시카 라파 eIF(iso)4E.a mRNA와 대조군으로 아라비듐시스 탈리아나 eIF4E와 eIF(iso)4E mRNA의 RT-PCR 산물의 전기영동 겔을 보여준다. 겔에서 볼 수 있듯, 바이러스 저항성 계통 RLR22의 *BraA.eIF(iso)4E.a* mRNA는 감염된 계통 R-o-18에서 얻은 *BraA.eIF(iso)4E.a*의 mRNA보다 크다.
- [0251] R-o-18 계통의 *BraA.eIF(iso)4E.a*의 계놈 염기서열은 SEQ ID No.1으로 제공되며, RLR22의 계놈 염기서열은 SEQ ID No.4로 제공된다. *BraA.eIF(iso)4E.a*의 서열 분석 후, 본 발명자는 (R-o-18 and RLR22에서) 두 대립유전자가 엑손/인트론 접합지점에서의 염기 삽입/결실(즉, "indel")로 다르다는 사실을 발견했다. 바이러스 민감성 계통 R-o-18에서 eIF(iso)4E.a 대립유전자의 단일 mRNA 염기서열을 알아내어, mRNA 염기서열을 SEQ ID No.2로 제공하였다. 이 mRNA는 도 3에서 개략적으로 나타낸 바와 같이 전체 길이의 단백질을 생산할 수 있었으며, 단백질 염기서열은 SEQ ID No.3로 제공하였다.
- [0252] 그러나 바이러스 저항성 계통 RLR22에서는, eIF(iso)4E.a mRNA의 몇몇 스플라이스 변이형을 발견하였다. eIF(iso)4E.a mRNA는 발현된 DNA에 첫 번째 인트론이 여전히 존재하는 산물(SEQ ID No.5로 나타냄)로 주로 구성되었으며, 더 긴 eIF(iso)4E.a 단백질을 형성하고, 이는 도 1에 나타낸 RLR22에서의 단편이 더 큰 이유를 설명해준다. 기타 더 희귀한 eIF(iso)4E.a의 스플라이스 변이형 또한 확인되었다. SEQ ID No.7은 도 5에 나타낸 바와 같이, 유지된 3' 말단의 15개 염기를 제외하고 첫 번째 인트론 대부분이 제거되었다. SEQ ID No.9는 도 6에 나타낸 바와 같이, 첫 번째 인트론 전부가 제거되었고, 엑손 1의 3' 말단의 3개 염기도 제거되었다. 이들 스플라이싱 변이형은 어느 것도 전체 길이의 '정확한' eIF(iso)4E.a 단백질을 생산할 수 있는 능력, 즉, 바이러스 감염에 민감한 R-o-18 계통에서와 같이, 스플라이싱이 정확하게 발생한 것처럼 전체 길이의 단백질을 생산할 수 있는 능력이 없다. SEQ ID Nos. 5, 7 및 9에서 번역된 아미노산 염기서열은 각각 SEQ ID Nos. 6, 8 및 10으로 나타내었다. 본 발명자는 모든 변경된 단백질이 TuMV에 대해 비 기능적이리라고 생각한다.
- [0253] 현재까지는, eIF(iso)4E를 기초로 한 포티바이러스에 대한 보고된 열성 저항성은 유전자의 암호영역(엑손)에서만 염기 변화를 통해 발생된 것으로, 바뀐 단백질 염기서열(변경된 아미노산 잔기 또는 미성숙 사슬 종결)을 초래하였다. 그러나 바이러스 저항성 계통 RLR22의 경우, 저항성은 놀랍게도 유전자의 비암호영역(인트론)의 변경과 관련된 것이다. 본 발명자는 eIF(iso)4E.a 대립유전자의 "indel"이 RLR22 계통에서 정확한 스플라이싱을 방해하여, 바이러스 계놈 변역 그리고 궁극적으로는 바이러스 감염에 대해 전혀 비 기능적인(또는 기능성이 상당히 감소된) eIF(iso)4Ea 단백질로 이어진다는 사실을 보여주었다. 본 발명자는 바이러스 저항성 계통 RLR22의 대립유전자 *BraA.eIF(iso)4E.a*를 *retr01*라 이름 붙였다.
- [0254] 실시예 2 - TuMV 감염에 저항성을 나타내는 식물 육종
- [0255] TuMV에 저항성을 나타내는 브라시카 라파 식물은 다음과 같은 육종 프로그램으로부터 얻을 수 있으며, 육종 프로그램은 도 8에 도시하였다.
- [0256] 도 8과 관련하여, 원하는 작물 특성을 나타내는 수용성 브라시카 라파 식물을 바이러스 저항성 RLR22 식물과 교배시키고, 자손(F₁)을 수용 모체(반복) 식물 계통과 여교배시킨다. (바이러스 저항성을 부여하는) 문자적 기법(예를 들어, PCR 및 시퀀싱 또는 기타 *BraA.eIF(iso)4E.a* 대립유전자를 식별하기 위한 특정 PCR을 기초로 한 방법)을 이용하여 RLR22에서 유래된 *BraA.eIF(iso)4E.a*의 대립유전자가 각 교배에서 비 반복식물에 존재함을 확실히 한다. 마지막으로, *BraA.eIF(iso)4E.a*의 RLR22 대립유전자를 보유한, 여교배 프로그램에서 유래한 식물을 자가생식(즉, 자가수분)시킨다. *BraA.eIF(iso)4E.a*의 RLR22 대립유전자에 대해 동형인 후속 세대의 식물을 상술한 바와 같은 문자적 기법으로 확인한다.
- [0257] 바이러스 저항성이 있는 F₁ 잡종 식물 육종을 위해서는, 별도의 여교배 프로그램에서 유도시킨 두 식물 계통은 제1 측면의 eIF4E 또는 eIF(iso)4E에 대해 동형이어야 한다. 그런 다음, 이들 계통을 교배시켜, 결과적으로 제1 측면의 eIF4E 또는 eIF(iso)4E에 대해 동형인 F₁ 잡종을 발생시킨다.
- [0258] 실시예 3 - 포티바이러스 감염에 저항성을 나타내는 식물 육종
- [0259] 특정 포티바이러스에 대해 저항성을 나타내는 식물을 다음과 같은 육종 프로그램으로부터 얻을 수 있다.

- [0260] 수용 식물을 *eIF4E* 및/또는 *eIF(iso)4E*의 스플라이싱에 결합이 있는 식물과 교배시키고, 자손을 수용 모체(반복) 식물 계통과 여교배시킨다. 문자적 기법(PCR과 시퀀싱 또는 기타 특정 PCR을 기초로 한 시험법)을 이용하여, 스플라이싱에 결합이 있어서 저항성을 부여하는 *eIF4E* 및/또는 *eIF(iso)4E* 대립유전자가 각 교배에서 비 반복식물에 존재함을 확실히 한다. 스플라이싱에 결합이 있어서 저항성을 부여하는 *eIF4E* 및/또는 *eIF(iso)4E* 대립유전자를 보유하는, 여교배 프로그램에서 유래한 식물을 자가생식시킨다. 스플라이싱에 결합이 있는 *eIF4E* 및/또는 *eIF(iso)4E* 대립유전자에 대해 동형인 후속 세대의 식물을 상술한 문자적 기법을 이용하여 확인한다. 마지막으로 이들 식물을 자가생식시켜, 원하는 *eIF4E* / *eIF(iso)4E* 대립유전자에 대해 동형인 계통/과를 제공한다.
- [0261] 바이러스 저항성이 있는 F_1 잡종 식물 육종을 위해서는, 별도의 여교배 프로그램에서 유도시킨 두 식물 계통은 제1 측면의 *eIF4E* 또는 *eIF(iso)4E*에 대해 동형이어야 한다. 그런 다음, 이들 계통을 교배시켜 F_1 잡종을 발생시키며, F_1 잡종은 결과적으로 제1 측면의 *eIF4E* 또는 *eIF(iso)4E*에 대해 동형일 것이다.
- [0262] 실시예 4 - 바이러스 저항성을 부여하는 제2 유전자좌 *ConTR01*의 분리
- [0263] 실시예 1 내지 3에서 기술한 시나리오는 특정 바이러스가 생애주기를 완성하는 데 이용할 수 있는 *eIF4E* 및/또는 *eIF(iso)4E*를 한 카페만 보유하는 식물에서 바이러스 저항성을 설명하기에 충분하다. 그러나 일부 식물은 이들 두 유전자 중 하나 또는 둘 다를 복수 카페/유전자좌로 보유한다. 예를 들어, 브라시카 라파는 *eIF4E* 및 *eIF(iso)4E* 둘 다를 세 카페씩 보유하며, 바이러스는 생애 주기를 완성하는 데 이들 유전자 중 어느 것을 이용할 수 있는 능력이 있을 수 있다. 따라서, *eIF4E* 및/또는 *eIF(iso)4E*를 복수 카페/유전자좌로 보유하는 식물에 바이러스 저항성을 부여하기 위해서는, 이러한 다른 유전자좌 각각에서 *eIF4E* 및/또는 *eIF(iso)4E* 대립유전자가 바이러스에 대해 반드시 비 기능적이어야 한다.
- [0264] 위에서 논의한 브라시카 라파 TuMV 민감성 계통 R-o-18과 TuMV 저항성 계통 RLR22 사이의 교배를 이용하여, *BraA.eIF(iso)4E.a*의 RLR22 대립유전자와 *BraA.eIF4E.c*의 RLR22 대립유전자에 대해 동형이지만, *BraA.eIF(iso)4E.c* 유전자좌에서 이형인 B_1 식물을 발견했다. 그런 다음, 이러한 특정 개체에서 유래된 B_1S_1 식물의 표현형과 유전형을 확인하였다. *BraA.eIF(iso)4E.c*의 RLR22 대립유전자에 대해 동형인 식물은 TuMV의 침투성 확산에 전적으로 저항성을 나타내었고, 이형 접합체는 바이러스 감염에 아주 가볍게 민감성을 나타냈지만, *BraA.eIF(iso)4E.c*의 R-o-18 대립유전자에 대해 동형인 식물은 바이러스 감염에 전적으로 민감했다.
- [0265] 이제 브라시카 라파에서 TuMV에 대해 광범위한 저항성과 관련된 제2의 유전자좌는 A8 염색체 상의 *BraA.eIF(iso)4E.c*로 밝혀졌으며, 본원에서는 *ConTR01*이라 한다. 이는 브라시카 라파에서 TuMV에 대한 광범위한 저항성을 위해서는 *retr01*(*BraA.eIF(iso)4E.a*의 RLR22 대립유전자) 이외에도 제2의 유전자(*ConTR01*, *BraA.eIF(iso)4E.c*의 RLR22 대립유전자)가 필요함을 확인시켜 주며, 바이러스가 *eIF4E* 및/또는 *eIF(iso)4E*의 복수 카페/유전자좌를 활용할 수 있는 식물에서 저항성을 부여하기 위해서는 둘 이상의 유전자가 중요하다는 사실을 증명한다.
- [0266] 재료 및 방법
- [0267] DNeasy 식물 미니 키트(Qiagen)를 이용하여 R-o-18과 RLR22 계통의 어린 잎에서 전체 계놈 DNA를 추출한 후, GenomiPhi 시스템(GE Healthcare)을 이용하여 증폭시켰다. *BraA.eIF4E.a*, *BraA.eIF4E.b*(R-o-18만 해당됨), *BraA.eIF4E.c*, *BraA.eIF(iso)4E.b* 및 *BraA.eIF(iso)4E.c* 유전자의 계놈 암호영역을 *Taq* DNA 중합효소(Invitrogen)와 아래에 나열한 프라이머를 이용한 표준 PCR로 증폭시켰다. 대립유전자의 완전한 계놈 서열을 결정하고자 이를 산물의 색상을 BigDye 터미네이터 시스템과 ABI 프리즘 3130x1 유전자 분석기(Applied Biosystems)를 이용하여 순차적으로 서열을 분석하였다. *BraA.eIF4E.b*는 비 기능적이어서, RLR22로부터 서열 분석되지 않았다. 획득된 염기서열에 대한 개요를 표 1로 작성하였다.

표 1

브라시카 라파 R-o-18 및 RLR22 계통에서 eIF4E 및 eIF(iso)4E 대립유전자의 염기

서열 결정

대립유전자	식물 계통에 대한 염기서열 획득 여부	
	RLR22	R-o-18
<i>BraA.eIF4E.a</i>	예	예
<i>BraA.eIF4E.b</i>	아니오	예
<i>BraA.eIF4E.c</i>	예	예
<i>BraA.eIF(iso)4E.b</i>	예	예
<i>BraA.eIF(iso)4E.c</i>	예	예

[0268]

브라시카 라파 R-o-18 및 RLR22 계통에서 eIF4E 및 eIF(iso)4E 대립유전자를 종종 또는 서열 결정하는 데 이용한 프라이머:

R-o-18 BraA.eIF4E.a:

정방향 (BR57): AAAAAGCAGGCTTTGGTCTGCAGTTATGTTATTAG (SEQ ID No.16)

역방향 (BR58): AGAAAGCTGGTAAAAGGCTTGCAGTC (SEQ ID No.17)

R-o-18 BraA.eIF4E.b:

정방향 (BR71): CAATGGCGGTAGAACACT (SEQ ID No.18)

역방향 (BR50): AGTTGAGTTTTGTTCTTAC (SEQ ID No.19)

R-o-18 BraA.eIF4E.c:

정방향 (BR59): AAAAAGCAGGCTTAGGACAAATGATATGGGAGAGT (SEQ ID No.20)

역방향 (BR60): AGAAAGCTGGTAGCTGGCGACCTTTGA (SEQ ID No.21)

R-o-18 BraA.eIF(iso)4E.b:

정방향 (BR73): TGAAAGGGCGAAAAACACAT (SEQ ID No.22)

역방향 (BR74): GCAAACCGACAAATAAGGAAGAA (SEQ ID No.23)

R-o-18 BraA.eIF(iso)4E.c:

정방향 (BR63): AAAAAGCAGGCTTTTAAGAATGGAGGTAT (SEQ ID No.24)

역방향 (BR64): AGAAAGCTGGTAGCGCGGGTCAAAAT (SEQ ID No.25)

RLR22 BraA.eIF4E.a:

정방향 (BR68): AAAAAGCAGGCTTTGGTCTGCAATTATCTTATTAG (SEQ ID No.26)

역방향 (BR58): AGAAAGCTGGTAAAAGGCTTGCAGTC (SEQ ID No.27)

RLR22 BraA.eIF4E.c:

정방향 (59): AAAAAGCAGGCTTAGGACAAATGATATGGGAGAGT (SEQ ID No.28)

역방향 (60): AGAAAGCTGGTAGCTGGCGACCTTTGA (SEQ ID No.29)

RLR22 BraA.eIF(iso)4E.b:

정방향 (BR73): TGAAAGGGCGAAAAACACAT (SEQ ID No.30)

- [0293] 역방향 (BR74): GCAAACCGACAAAATAAGGAAGAA (SEQ ID No.31)
- [0294] RLR22 BraA.eIF(iso)4E.c:
- [0295] 정방향 (BR80): AAAAAGCAGGCTCGAAGAAGTCCGCATAAAGC (SEQ ID No.32)
- [0296] 역방향 (BR81): AGAAAGCTGGTACCCGTCCGTGGATTAAATA (SEQ ID No.33)
- [0297] 실시예 5 - 광범위한 저항성과 관련된 제2 유전자(ContR01) 확인
- [0298] 브라시카 라파 R-o-18 계통은 TuMV에 민감한 동계 교배 계통이다. TuMV에 저항성을 나타내는 RLR22 계통은 현재 까지 시험한 모든 TuMV 분리주에 대해 광범위한 저항성을 나타낸다(Walsh et al. 2002, European Journal of Plant Pathology 108, 15-20). 브라시카 라파 TuMV 민감성 계통 R-o-18과 TuMV 저항성 계통 RLR22 간의 교배로 부터(Rusholme et al. 2007, Journal of General Virology 88, 3177-3186), B₁ 식물 16은 *BraA.eIF(iso)4E.a* 및 *BraA.eIF4E.c*의 RLR22 대립유전자에 대해 동형이지만, *BraA.eIF(iso)4E.c* 유전자좌에서 이형인 것으로 밝혀졌다. RLR22와 R-o-18은 *BraA.eIF(iso)4E.b* 유전자좌에서 동일한 대립유전자를 보유하지만, *BraA.eIF4E.b*에서 R-o-18 대립유전자는 많이 절단된 폴리펩티드를 제공하는 유사유전자이며, 따라서 이들 대립유전자는 이 식물에 대해 결정되지 않았다.
- [0299] B₁ 식물 16에서 유래된 B₁S₁ 종자를 파종하였다. DNeasy 식물 미니 키트(Qiagen)를 이용하여 벌아된 식물의 어린 잎에서 전체 게놈 DNA를 추출한 후, GenomiPhi 시스템(GE Healthcare)을 이용하여 증폭시켰다. 그런 다음, BR2 프라이머(TCTCCTTCCACTTCTCCCAATAC - SEQ ID No: 61)와 BR14 프라이머(TAGACAAGGCTTGGCTTGAAACTG - SEQ ID No: 62)를 이용하여 *BraA.eIF(iso)4E.c* 유전자좌에서 식물의 유전형을 확인하였다. 이들 프라이머는 RLR22에 대해 세 가지 크기의 산물(도 9)과 R-o-18에 대해 세 가지 크기의 산물을 생산한다. 가장 큰 산물은 두 식물에 대해 *BraA.eIF(iso)4E.a*에 해당하고, 중간 크기의 산물은 *BraA.eIF(iso)4E.b*에 해당하며, 가장 작은 산물은 두 식물에 대해 *BraA.eIF(iso)4E.c*에 해당한다. *BraA.eIF(iso)4E.c*의 R-o-18 대립유전자에 대한 산물(566bp)은 RLR22 대립유전자에 대한 산물(546bp)보다 크고, 쉽게 구별된다(도 9). 겔에서 볼 수 있듯, 민감성 식물 R-o-18에서 유래한 *BraA.eIF(iso)4Ec*에 대한 PCR 산물이 저항성 식물 RLR22에서 유래한 *BraA.eIF(iso)4Ec*에 대한 PCR 산물보다 크다.
- [0300] 식물을 3-5일 단계에서 TuMV 분리주 CDN1으로 기계적으로 접종하였고, 감염/저항성 표현형을 Rusholme et al. (2007)이 기술한 바와 같이 시각적 평가법과 ELISA로 결정하였다. 식물에 대한 유전형, 표현형 및 ELISA 값을 표 2에 나타내었다.

표 2

순무 모자이크 바이러스(TuMV) 저항성 식물 RLR22와 TuMV 민감성 식물 R-o-18 간

교배에서 유래된 B₁S₁ 페밀리 16으로부터 *BraA.eIF(iso)4E.c*를 분리하는 브라시카

라파 식물의 표현형

<i>BraA.eIF(iso)4E.c</i> 유전자좌에서의 식물의 유전형 (<i>BraA.eIF(iso)4E.a</i> 의 RLR22 대립유전자와 <i>BraA.eIF4E.c</i> 의 RLR22 대립유전자에 대해서는 모두 동형)	시각적 평가법으로 결정한 TuMV 시도 후의 식물의 표현형	비접종 잎을 대상으로 한 ELISA의 평균 A ₄₀₅
이형	제한된/약간의 TuMV의 침투성 확산 ¹	0.05
이형	저항성, TuMV의 침투성 확산 없음	0.02
R-o-18 대립유전자에 대해 동형	민감성, TuMV의 침투성 확산	0.30
RLR22 대립유전자에 대해 동형	저항성, TuMV의 침투성 확산 없음	0.02
비감염 식물 대조군	접종된 바이러스 없음	0.04

[0301]

¹ 침투성 확산 = 접종된 잎에서 비 접종된 잎으로 TuMV 감염의 확산.

[0303]

*BraA.eIF(iso)4E.c*의 RLR22 대립유전자에 대하여 동형인 식물은 TuMV에 대해 전적으로 저항성을 나타내었고, 이형 접합체는 겸출 가능한 감염을 나타내지 않았거나, 접종된 잎에서 제한된 수의 비 접종된 잎으로 바이러스 확산에 대해 아주 약간 민감성을 나타냈지만 그 후에는 더 이상 민감성을 나타내지 않았다. *BraA.eIF(iso)4E.c*의 R-o-18 대립유전자에 대해 동형인 식물은 전적으로 민감하였다. 그 결과, TuMV는 *BraA.eIF(iso)4E.c*의 R-o-18 대립유전자를 이용할 수 있으며, 완전한 침투성 감염을 확고히 하기 위해서는 식물을 이 대립유전자에 대해 동형이어야 하는 것으로 나타났다. 이 유전자좌에서 이형인 식물을 접종한 결과, 한 개 카피의 R-o-18 대립유전자는 TuMV가 완전히 진행된 침투성 감염을 확고히 하는 데 불충분한 것으로 나타났다. (민감성이 아니거나 제한된 민감성을 나타내는) 이형 접합체의 표현형 간의 차이는 아마도 접종된 잎에서 바이러스가 침투성 확산이 발생하도록 충분히 높은 역가를 확립해야 할 필요성과 관련이 있다.

[0304]

표 3은 TuMV가 본원에 기술한 여섯 개의 대립유전자를 이용하는 능력을 요약하여 제공한다. *BraA.eIF(iso)4E.a*는 *retrO10*이고, *BraA.eIF(iso)4E.c*는 *ConTR01*이다.

표 3

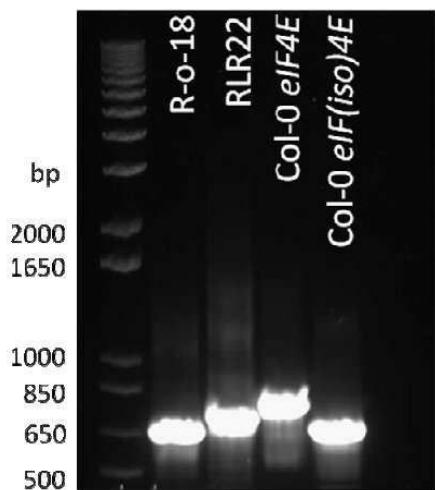
생애 주기 완성을 위해 브라시카 라파 계통 RLR 22와 R-o-18의 서로 다른 eIF4E 및 eIF(iso)4E 대립유전자를 이용하는 순무 모자이크 바이러스(TuMV)의 능력

대립유전자	브라시카 라파 계통의 대립유전자를 이용하는 TuMV의 능력	
	RLR22	R-o-18
<i>BraA.eIF4E.a</i>	없음	없음
<i>BraA.eIF4E.b</i>	없음	없음
<i>BraA.eIF4E.c</i>	없음	없음
<i>BraA.eIF(iso)4E.a</i>	없음	있음
<i>BraA.eIF(iso)4E.b</i>	없음	없음
<i>BraA.eIF(iso)4E.c</i>	없음	있음

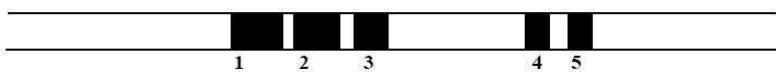
[0305]

도면

도면1



도면2



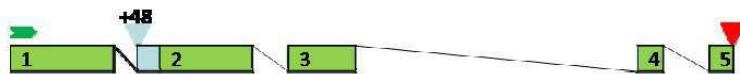
도면3



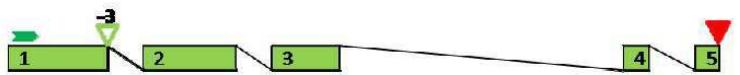
도면4



도면5



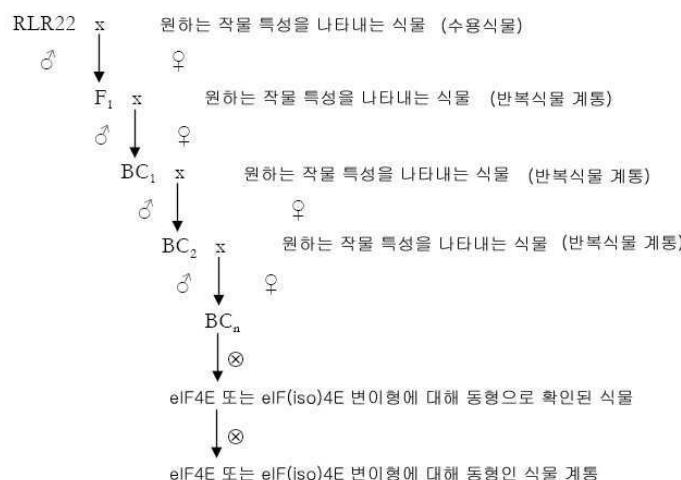
도면6



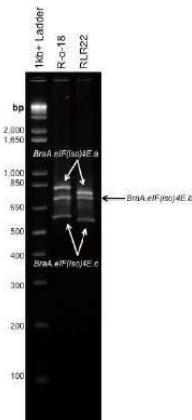
도면7



도면8



도면9



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Syngenta Participations AG

<120> PLANT EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 4E

<130> 60627PCT1

<150> GB1010740.7

<151> 2010-06-25

<160> 62

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 1372

<212> DNA

<213> Brassica rapa

<400> 1

atggcgacag aggatgtcaa cgaagccctt gcggcgccgg aagtaccggc aacagagacg 60

acggagaagc agcctgctca caagctcgaa agaaagtgga gtttctgggtt cgataaccaa 120

tccaaaccaa agcaaggcgc cgcctgggga gcctcccttc gcaaagccta tacttcgac 180

accgtccaag acttctgggg gtttgggtt cttctcctt tatttattgt tagcgatctg 240

taaagctaga tcttctttg cagttgcac gagactatat tcatccctag caaactgacg 300

ccgaatgctg aaattcacat gttcaaagct ggtgttgagc ctaagtggga agatcctgag 360

tgtgctaatt gggaaagtg gacttatgtt gtcacccca accgcaagcc tgcttttagac 420

aaggcttggc ttgaaactgt actcctcttc tacctctcct cctttttct tttttttgc 480

atctggtaat gacatgtttt ctctgccagt tcatggctct tgcggagag caatttgatg 540

aggctgatga gatttgtggc gtggttgcta gtgtgcgcc aaaggcaggac aagctctcct 600

tgtggacaag gaccaaatct aatgaagctg ttctggatg atgcttgtct tctctacta 660
 tgtacctttg gtgtgtttg ataactgttt tcttctactt gttatccgtt gcgatgtccc 720
 attattgttt gattatcctg ttccaattt tttgtattgc gtactggtgg tttacgaaga 780
 agtggcttg tacaatatgt tagcgttgcgta attgctact atagtaaaac 840
 agttaagct gttgactatg ttaatattct cttcgataca cacacttaga atggataact 900
 acctgtttc ttatcctt ggagttcac cagcttatta tcgatcgaga tactcctct 960
 gattgaatt accattcaag attaatattt atatatattg aaagtatatg tttgttaac 1020

gatatatcta ttaggcttgc ttttttagt tcattcgag tataaacgta gctctattta 1080
 ttagaggctt ctcttagaa ctggcagta atgataatgt tcgaagtgtg gttttagat 1140
 ctgggtgatg atattactaa ttttttggta tggattgtt aatccagatg ggtattggaa 1200
 agaagtggaa ggagatactt gatgtcaccc acaagataac tttcaactt catgtactt 1260
 aacttctcc acatagaggc taattatctt ttgttcttct tacgtggctt actaaaatgt 1320
 ggtctactta tataatatagg atgattctag aagaactagg ttcactgtct ga 1372

<210> 2

<211> 600

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 2

auggcgacag aggaugugaa cgaagccuu gcccggcgg aaguaccggc aacagagacg 60
 acggagaagc accugcuca caagcucgaa agaaagugga guuucugguu cgauaaccaa 120
 uccaaaccaa agaaggcgc cgcugggga gccuccuuuc gcaaagccua uaccuucgac 180
 accguccaag acuuucugggg uuugcacgag acuauauuca uccuagcaa acugacgccc 240
 aaugcugaaa uucacauguu caaagcuggu guugagccua agugggaaga uccugagugu 300
 gcuuaugggg gaaaguggac uuauguuguc accuccaacc gcaagccugc uuuagacaag 360
 gcuuggcuug aaacuuugau ggcucuuguc ggagagcaau uugaugaggc ugaugagauu 420

uguggcgugg uugcuagugu gcccggaaag caggacaagc ucuccuugug gacaaggacc 480
 aaaaucuaaug aagcuguucu gauggguau ggaaagaagu ggaaggagau acuugauguc 540
 accgacaaga uaacuuucac uaaccaugau gauucuagaa gaacuagguu cacugucuga 600

<210> 3

<211> 199

<212> PRT

<213> Brassica rapa

<400> 3

Met Ala Thr Glu Asp Val Asn Glu Ala Leu Ala Ala Ala Glu Val Pro

1 5 10 15

Ala Thr Glu Thr Thr Glu Lys Gln Pro Ala His Lys Leu Glu Arg Lys

20 25 30

Trp Ser Phe Trp Phe Asp Asn Gln Ser Lys Pro Lys Gln Gly Ala Ala

35 40 45

Trp Gly Ala Ser Leu Arg Lys Ala Tyr Thr Phe Asp Thr Val Gln Asp

50 55 60

Phe Trp Gly Leu His Glu Thr Ile Phe Ile Pro Ser Lys Leu Thr Pro

65 70 75 80

Asn Ala Glu Ile His Met Phe Lys Ala Gly Val Glu Pro Lys Trp Glu

85 90 95

Asp Pro Glu Cys Ala Asn Gly Gly Lys Trp Thr Tyr Val Val Thr Ser

100 105 110

Asn Arg Lys Pro Ala Leu Asp Lys Ala Trp Leu Glu Thr Leu Met Ala

115 120 125

Leu Val Gly Glu Gln Phe Asp Glu Ala Asp Glu Ile Cys Gly Val Val

130 135 140

Ala Ser Val Arg Pro Lys Gln Asp Lys Leu Ser Leu Trp Thr Arg Thr

145 150 155 160

Lys Ser Asn Glu Ala Val Leu Met Gly Ile Gly Lys Lys Trp Lys Glu

165 170 175

Ile Leu Asp Val Thr Asp Lys Ile Thr Phe Thr Asn His Asp Asp Ser

180 185 190

Arg Arg Thr Arg Phe Thr Val

195

<210> 4

<211> 1321

<212> DNA

<213> Brassica rapa

<400> 4

atggcgacag	aggatgtgaa	cgaagccctt	gcggcggcgg	aagtaccggc	aacagagacg	60
acggagaaggc	accctgtga	caagctcgaa	agaaaagtgga	gttctgggt	cgataaccaa	120

tccaaaccaa	agcaaggcgc	cgcctggga	gcctcccttc	gcaaaggcta	tacttcgac	180
accgtccaag	acttctgggg	ggtttgttg	tcttctcctt	ttacttattt	ttagcgatct	240
gtaaagctag	atttctttt	gcagtttgc	cgagactata	ttcatcccta	gcaaactgac	300
gccgaatgct	gaaattcaca	tgttcaaagc	tggtgtag	cctaagtgg	aagatctga	360
gtgtgctaat	ggcgaaagt	ggacttttgt	tgttaccc	aaccgcaagc	ctgctttaga	420
caaggcttgg	cttggaaactg	tactcatctt	ctacctctcc	tctttttttt	ttaatagtt	480
tagacaattt	tgcatttgtt	aatgacatgt	tttatctgcc	agttgatggc	tcttgcggaa	540

gagcaattt	ataggctga	ttagatctgt	gggggtggtg	ctagtgtgc	cccaaaggcag	600
gacaagctct	ccttgtggac	aaggacaaa	tctaatgaag	ctgttctgg	atgatgttc	660
tcttcctca	ctatgtacct	ttgggttgtt	tttcttctac	ttgttatccg	ttgcgtatgc	720
ccattattgt	ttgattatcc	tgttccaatt	tttctgtttt	gcgtactgg	ggtttacgaa	780
gaagtatgt	tgtacaatat	gttagcgtt	ttgaatgtgt	taattgctt	ctatagtaaa	840
acagtttaag	ctgttgacta	tgttaatatt	ctcttcgata	cacacactta	aatggataaa	900
ctaccttgg	tctttatcct	ttggagttt	accagttaa	tatataattt	aatgtatatgt	960

ttgttcaacg	atatactat	taggcttgc	tttttttagtt	cattcgcagt	ataaaacatag	1020
ctctatttat	tagaggccat	ctcttttagaa	cttggcagta	ctgtaatatg	tcgaagtgt	1080
gtttatgaat	ctggctgatg	atattactac	tttgggtttt	gttattgtaa	atccagatgg	1140
gtattggaa	gaagtggaa	gagatacttg	atgtcaccga	caagataact	ttcactaacc	1200
atgttaactta	actttctcca	catagaggct	aattatcttt	tgttcttctt	acgtggctta	1260
ctaaaatgt	gtctacttat	atatacttgg	tgattctaga	agaactcggt	tcactgtctg	1320
a						1321

<210> 5

<211> 664

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 5

auggcgacag	aggaugugaa	cgaagccuu	gcggcggcgg	aaguaccggc	aacagagacg	60
------------	------------	-----------	------------	------------	------------	----

acggagaagc	agccugcuga	caagcucgaa	agaaagugga	guuucugguu	cgauaaccaa	120
uccaaaccaa	agcaaggcgc	cgccugggg	gccuccuuc	gcaaagccua	uaccuucgac	180
accguccaag	acuuucugggg	gguuuguuug	uciuucuccuu	uuacuuauug	uuagcgaucu	240
guuaagcuag	aucuucuuuu	gcaguuugca	cgagacuaua	uucauccua	gcaaacugac	300
gccgaaugcu	gaaaucaca	uguucaaagc	ugguguugag	ccuaaguggg	aagaucugua	360

gugugcuaau	ggcgaaagu	ggacuuuugu	uguuaccucc	aaccgcaagc	cugcuuuaga	420
caaggcuugg	cuugaaacuu	ugauggcucu	ugucggagag	caauuugaug	aggcugauga	480
gaucuguggg	gugguugcua	gugugcgccc	aaagcaggac	aagcucuccu	uguggacaag	540
gaccaaauuc	aaugaagcug	uucugauggg	uauugggaag	aaguggaagg	agauacuuga	600
ugucaccgac	aagauaacuu	ucacuaacca	ugaugauucu	agaagaacuc	gguucacugu	660
cuga						664

<210> 6

<211> 201

<212> PRT

<213> Brassica rapa

<400> 6

Met Ala Thr Glu Asp Val Asn Glu Ala Leu Ala Ala Glu Val Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ser Phe Trp Phe Asp Asn Gln Ser Lys Pro Lys Gln Gly Ala Ala

35 40 45

Trp Gly Ala Ser Leu Arg Lys Ala Tyr Thr Phe Asp Thr Val Gln Asp

50 55 60

Phe Trp Gly Val Cys Leu Ser Ser Pro Phe Thr Tyr Cys Arg Ser Val

65 70 75 80

Lys Leu Asp Leu Leu Leu Gln Phe Ala Arg Asp Tyr Ile His Pro Gln

85 90 95

Thr Asp Ala Glu Cys Asn Ser His Val Gln Ser Trp Cys Ala Val Gly

100 105 110

Arg Ser Val Cys Trp Arg Lys Val Asp Phe Cys Cys Tyr Leu Gln Pro

115

120

125

Gln Ala Cys Phe Arg Gln Gly Leu Ala Asn Phe Asp Gly Ser Cys Arg

130

135

140

Arg Ala Ile Gly Asp Leu Trp Gly Gly Cys Cys Ala Pro Lys Ala Gly

145 150 155 160

Gln Ala Leu Leu Val Asp Lys Asp Gln Ile Ser Cys Ser Asp Gly Tyr

165

170

175

Trp Glu Glu Val Glu Gly Asp Thr Cys His Arg Gln Asp Asn Phe His

180

185

190

Pro Phe Lys Asn Ser Val His Cys Leu

195

200

<210> 7

<211> 615

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 7

auggcgacag	aggauugugaa	cgaagccuu	gcggcgccgg	aaguaccggc	aacagagacg	60
acggagaagc	agccugcuga	caagcucgaa	agaaagugga	guuucugguu	cgauaaccaa	120
uccaaaccaa	agcaaggcgc	cgccugggg	gccucccuuc	gcaaagccua	uaccuucgac	180
accguccaag	acuuucugggg	gaucuucuuu	ugcaguuugc	acgagacauu	auucauccu	240
agcaaacuga	cggcgaaugc	ugaaauucac	augucaaag	cugguguuga	gccuaagugg	300

gaagauccug	agugugcuua	uggcgaaag	uggacuuuug	uuguuaccuc	caaccgcaag	360
ccuguuuag	acaaggcuug	gcuugaaacu	uugauggcuc	uugucggaga	gcaauuugau	420
gaggcugaug	agaucugugg	ggugguugcu	agugugcgcc	caaagcagga	caagcucucc	480
uuguggacaa	ggaccaaau	uaaugaagcu	guucugaugg	guauugggaa	gaaguggaag	540
gagauacuug	augucaccga	caagauaacu	uucacuaacc	augaugauuc	uagaagaacu	600
agguucacug	ucuga					615

<210> 8

<211> 204

<212> PRT

<213> Brassica rapa

<400> 8

Met Ala Thr Glu Asp Val Asn Glu Ala Leu Ala Ala Ala Glu Val Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ser Phe Trp Phe Asp Asn Gln Ser Lys Pro Lys Gln Gly Ala Ala

35 40 45

Trp Gly Ala Ser Leu Arg Lys Ala Tyr Thr Phe Asp Thr Val Gln Asp

50 55 60

Phe Trp Gly Ile Phe Phe Cys Ser Leu His Glu Thr Ile Phe Ile Pro

65 70 75 80

Ser Lys Leu Thr Pro Asn Ala Glu Ile His Met Phe Lys Ala Gly Val

85 90 95

Glu Pro Lys Trp Glu Asp Pro Glu Cys Ala Asn Gly Gly Lys Trp Thr

100 105 110

Phe Val Val Thr Ser Asn Arg Lys Pro Ala Leu Asp Lys Ala Trp Leu

115 120 125

Glu Thr Leu Met Ala Leu Val Gly Glu Gln Phe Asp Glu Ala Asp Glu

130 135 140

Ile Cys Gly Val Val Ala Ser Val Arg Pro Lys Gln Asp Lys Leu Ser

145 150 155 160

Leu Trp Thr Arg Thr Lys Ser Asn Glu Ala Val Leu Met Gly Ile Gly

165 170 175

Lys Lys Trp Lys Glu Ile Leu Asp Val Thr Asp Lys Ile Thr Phe Thr

180 185 190

Asn His Asp Asp Ser Arg Arg Thr Arg Phe Thr Val

195 200

<210> 9

<211> 597

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 9

auggcgacag	aggaugugaa	cgaagccuu	gcggcggcgg	aaguaccgc	aacagagacg	60
acggagaagc	agccugcuga	caagcucgaa	agaaagugga	guuucugguu	cgauaaccaa	120
uccaaaccaa	agaaggcgc	cgccugggga	gccucccuuc	gcaaagccua	uaccuucgac	180
accguccaag	acuucuguuu	gcacgagacu	auauucaucc	cuagcaaacu	gacgccgaa	240
gcugaaauuc	acauguucaa	agcugguguu	gagccuaagu	gggaagaaucc	ugagugugcu	300

aauggcgaa	aguggacuuu	uguuguuacc	uccaaccgca	agccugcuuu	agacaaggcu	360
uggcuugaaa	ciuugauggc	uciugucgga	gagcaauuug	augaggcuga	ugagaucugu	420
ggggugguug	cuagugugcg	cccaaagcag	gacaagcucu	ccuuguggac	aaggacaaa	480
ucuaaugaag	cugiucugau	ggguauuggg	aagaagugga	aggagauacu	ugaugucacc	540
gacaagauaa	cuuucacuaa	ccaugaugau	ucuagaagaa	cucgguucac	ugucuga	597

<210> 10

<211> 198

<212> PRT

<213> Brassica rapa

<400> 10

Met Ala Thr Glu Asp Val Asn Glu Ala Leu Ala Ala Ala Glu Val Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ser Phe Trp Phe Asp Asn Gln Ser Lys Pro Lys Gln Gly Ala Ala

35 40 45

Trp Gly Ala Ser Leu Arg Lys Ala Tyr Thr Phe Asp Thr Val Gln Asp

50 55 60

Phe Cys Leu His Glu Thr Ile Phe Ile Pro Ser Lys Leu Thr Pro Asn

65 70 75 80

Ala Glu Ile His Met Phe Lys Ala Gly Val Glu Pro Lys Trp Glu Asp

85 90 95

Pro Glu Cys Ala Asn Gly Gly Lys Trp Thr Phe Val Val Thr Ser Asn

100 105 110

Arg Lys Pro Ala Leu Asp Lys Ala Trp Leu Glu Thr Leu Met Ala Leu

115 120 125

Val Gly Glu Gln Phe Asp Glu Ala Asp Glu Ile Cys Gly Val Val Ala

130	135	140
Ser Val Arg Pro Lys Gln Asp Lys Leu Ser Leu Trp Thr Arg Thr Lys		
145	150	155
Ser Asn Glu Ala Val Leu Met Gly Ile Gly Lys Lys Trp Lys Glu Ile		
165	170	175
Leu Asp Val Thr Asp Lys Ile Thr Phe Thr Asn His Asp Asp Ser Arg		
180	185	190
Arg Thr Arg Phe Thr Val		
195		

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 11

atggcgacag	aggatgtgaa	cg	22
------------	------------	----	----

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 12

tctccttcca	cttcttccca	atac	24
------------	------------	------	----

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT-PCT Primer

<400> 13

aaaaagcagg	ctcgatggcg	acagaggatg	30
------------	------------	------------	----

<210> 14

<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> RT-PCT Primer	
<400> 14	
agaaagctgg gttcagacag tgaacctagt tcttc	35
<210> 15	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> RT-PCR Primer	
<400> 15	
agaaagctgg gttcagacag tgaaccgagt tcttc	35
<210> 16	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 16	
aaaaagcagg cttttgtct gcagttatgt tattag	36
<210> 17	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 17	
agaaagctgg gtaaaaaggc ttgcgagtca	30
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 18	
caatggcggt agaagacact	20

<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 19	
agttagatcc ttgttcttac	20
<210> 20	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 20	
aaaaagcagg cttaggacaa atgatatggg gagagt	36
<210> 21	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 21	
agaaagctgg gtagcttggc gacccttta	30
<210> 22	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 22	
tgaaggggc gaaaaacaca t	21
<210> 23	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	

<400> 23	
gcaaaccgac aaaataagga agaa	24
<210> 24	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 24	
aaaaagcagg cttttaag aatggaggga gtat	34
<210> 25	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 25	
agaaagctgg gtgaagcgcg ggtcaaaat	29
<210> 26	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 26	
aaaaagcagg cttttgtct gcaattatct tattag	36
<210> 27	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 27	
agaaagctgg gtaaaaaggc ttgcgagtca	30
<210> 28	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> PCR Primer	
<400> 28	
aaaaagcagg cttaggacaa atgatatggg gagagt	36
<210> 29	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 29	
agaaagctgg gtagcttggc gacctttga	30
<210> 30	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 30	
tgaaagggc gaaaaacaca t	21
<210> 31	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 31	
gcaaaccgac aaaataagga agaa	24
<210> 32	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR Primer	
<400> 32	
aaaaagcagg ctgcagaag tccgcataaa gc	32
<210> 33	
<211> 32	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 33

agaagctgg gtaccgtcc gtggattaaa ta 32

<210> 34

<211> 1157

<212> DNA

<213> Brassica rapa

<400> 34

atggcggtag aagacacact caagccta at gtcgtacgg aagaatcgaa tcccaattct 60

gcagatcacc cgatcgatcg ataccatgag gaaggcgacg atgccgagga aggagcgacc 120

gtagacgaat cgagcaa atc cgccgtccct gaatcgcatc cggtggagca ttcgtggact 180

ctctggttcg ataacccttc cgtcaa atca aagcagacga ctggggaa gtccttacga 240

tccgtttca ccttccac cgtcgaggag ttctggaggt tgtagctt acaacaatct 300

tttccttct tacagtaatt ccacaatctg ggtttgtt agatttgtat ttctcacagg 360

aaagttatct tcttggatg tgctgttaga atcttggatg atgttgaac aaacagttac 420

ttgttggatg ctatgttatt ggcttgaca ttttactttt gatttggatg ttgtacaata 480

acattcggca cccgagcaag ttagcta acg gagctgactt gtactgttca aaacacaata 540

ttgaacctaa gtgggaggat cctatctgtg ccaacggagg caagtggact atgaacttct 600

ctagggagaa gtctgataag ccctttctt acaccgtatg taacttgaca ttcatatagt 660

tcttggttca caccatccag tctccagtct aatcggttg ttgttggatg tggtgtcact 720

tgttagttct tgcttgatt ggagaacagt ttgaccatgg agatgaaatc tgtggatgt 780

ttgttaacgt tagagcta ag caagagagga tatctattt gactaaaaac tcttccaacg 840

aagcggctca ggtacaagac aaaaaaaacc cacatcaa ac tgcgtctc tctcggtctg 900

aagaaaagac gtggaaat tattttattt aatgttacag gtgagcattt ggagacagt 960

gaaggagttt ctgttac a acagcagcat tggtttcatc atccatgtt a agagcgttc 1020

tgttggatg aattctgtt tttttttct ttctatggat cgctcaatc ttgttggatg 1080

tgtgtattgg ttggatgttct ctccaggagg atgcgaagaa gctggacaga ggcgcaaga 1140

gcccattacac tgcctga 1157

<210> 35

<211> 687

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 35

auggcgguag aagacacacu caagccuaau gucgcuacgg aagaaucgaa ucccaauucu	60
gcagauccacc cgaucgaucg auaccaugag gaaggcgacg augccgagga aggagcgacc	120

guagacgaaau cgagcaaauc cgccguccu gaaucgcauc cguuggagca uucguggacu	180
cucugguucg auaacccuuc cgucaaauc aagcagacga cuugggaaag cuccuuacga	240
uccgucuuca cciuucuccac cgucgaggag uucuggaguu uguacaauaa cauucggcac	300
ccgagcaagu uagcuaacgg agcugacuug uacuguuuca aacacaauau ugaaccuaag	360
ugggaggauc cuaucugugc caacggaggc aaguggacua ugaacuucuc uagggagaag	420
ucugauaagc ccuucuuua caccuugceu gcuuugauug gagaacaguu ugaccaugga	480
gaugaaaucu guggaguugu uguuaacguu agagcuaagc aagagaggau aucuaauugg	540

acuaaaaacu cuuccaacga agcggcucag gugagcauug ggagacagug gaaggaguuu	600
cuugauuaca acagcagcau ugguuucauc auccaugagg augcgaagaa gcuggacaga	660
ggcgcaaaaga ggcuuuacac ugccuga	687

<210> 36

<211> 228

<212> PRT

<213> Brassica rapa

<400> 36

Met Ala Val Glu Asp Thr Leu Lys Pro Asn Val Ala Thr Glu Glu Ser

1 5 10 15

Asn Pro Asn Ser Ala Asp His Pro Ile Asp Arg Tyr His Glu Glu Gly

20 25 30

Asp Asp Ala Glu Glu Gly Ala Thr Val Asp Glu Ser Ser Lys Ser Ala

35 40 45

Val Pro Glu Ser His Pro Leu Glu His Ser Trp Thr Leu Trp Phe Asp

50 55 60

Asn Pro Ser Val Lys Ser Lys Gln Thr Thr Trp Gly Ser Ser Leu Arg

65 70 75 80

Ser Val Phe Thr Phe Ser Thr Val Glu Glu Phe Trp Ser Leu Tyr Asn

85 90 95

Asn Ile Arg His Pro Ser Lys Leu Ala Asn Gly Ala Asp Leu Tyr Cys

100 105 110

Phe Lys His Asn Ile Glu Pro Lys Trp Glu Asp Pro Ile Cys Ala Asn

115 120 125

Gly Gly Lys Trp Thr Met Asn Phe Ser Arg Glu Lys Ser Asp Lys Pro

130 135 140

Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Ala Leu Ile Gly Glu Gln Phe Asp His Gly

145 150 155 160

Asp Glu Ile Cys Gly Val Val Val Asn Val Arg Ala Lys Gln Glu Arg

165 170 175

Ile Ser Ile Trp Thr Lys Asn Ser Ser Asn Glu Ala Ala Gln Val Ser

180 185 190

Ile Gly Arg Gln Trp Lys Glu Phe Leu Asp Tyr Asn Ser Ser Ile Gly

195 200 205

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

210 215 220

Ala Tyr Thr Ala

225

<210> 37

<211> 1189

<212> DNA

<213> Brassica rapa

<400> 37

atggcggtag aagacactct caagcctaac gtccctacgg aagaatcgaa tcccaattct	60
gtagatcacc cgatcgatcg ataccatgag gaaggcgacg atgccgagga aggagcgatc	120
gtagacgaat cgagcaaatac cgccgtccct gaatcgcatc cggtggagca ttcgtggact	180
ctctggttcg ataacccttc cgtcaaatac aagcagacga ctggggaaag ctccttacga	240
tccgtttca ctttctccac cgtcgaggag ttctggaggt tggtagctt acaacaatct	300
ttttccttct taatgttaatt ccacaatctg ggtttggtt agatttcgat ttctcacagg	360

aaagtttatct tctttatggg tgggttaaa tctcatgaag tcactgttct tctctgtcta 420

tgaagaattg cctgttttgt gtttgaacaa acagttactt gttggatgct attttattgg	480
cttcttatta tatgtgacat tgcatgttgtt acaataacat tcggcatccg agcaagttag	540
ctaacggagc tgacttgtac tatttcaaac acaatattga acctaagtgg gaggatccta	600
tctgtgcca cgaggcaag tggactatiga acttctctag ggagaagtct gataaggcct	660
ttctttacac cgtatgtaac ttgacattca tatagttctt gttcacacc atccagtctc	720
cagtcataatc gggtttgtt gtgtgtgtc acttataatgtt gttgccttg attggagaac	780

agtttgacca tggagatgaa atctgtggag ttgttgtaa cgtagagct aagcaagaaa	840
ggatatatctat ttggactaaa aactcttcca acgaagctgc tcaggtacaa gacaaaaaaa	900
gaacccccat cgaactgtat ctctctctcg gtcigaagaa aagacgtgga aattttat	960
tgttaatgt tacaggttag cattggaga cagtggagg agtttcttga ttacaacagc	1020
agcattggtt tcatcatcca tgaatagta tttctgttgt tgtaatttc tttttttt	1080
tcttctatgg atcgctcaacttggta tgggttattt ggtttgggtt ctcttcagga	1140
ggatgcgaag aagctggaca gaggcgcaaa gagcgcttac actgcctga	1189

<210> 38

<211> 687

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 38

auggcgguag aagacacucu caagccuaac gucccuacgg aagaaucgaa ucccaauucu	60
guagauccacc cgaucgaucg auaccaugag gaaggcgacg augccgagga aggagcgauc	120
guagacgaau cgagcaaauc cgccgucuccu gaaucgcauc cguuggagca uucguggacu	180
cucugguucg auaacccuuc cgucaaaauca aagcagacga cuugggaaag cuccuuacga	240
uccgucuuca cciucuccac cgucgaggag uucuggaguu uguacaauaa cauucggcau	300
ccgagcaagu uagcuaacgg agcugacuug uacuauuuca aacacaauau ugaaccuaag	360

ugggaggauc cuaucugugc caacggaggc aaguggacua ugaacuucuc uagggagaag	420
ucugauaagc ccuuucuuua cacguugcuu gcuuugauug gagaacaguu ugaccaugga	480
gaugaaauucu guggaguugu uguuaacguu agagcuaagc aagaaaggau aucuuuugg	540
acaaaaaaacu cuuccaacga agcugcucag gugagcauug ggagacagug gaaggaguuu	600
cuugauuaca acagcagcau ugguuucauc auccaugagg augcgaagaa gcuggacaga	660
ggcgcaaaaga ggcguuacac ugccuga	687

<210> 39

<211> 228

<212> PRT

<213> Brassica rapa

<400> 39

Met Ala Val Glu Asp Thr Leu Lys Pro Asn Val Pro Thr Glu Glu Ser

1 5 10 15

Asn Pro Asn Ser Val Asp His Pro Ile Asp Arg Tyr His Glu Glu Gly

20 25 30

Asp Asp Ala Glu Glu Gly Ala Ile Val Asp Glu Ser Ser Lys Ser Ala

35 40 45

Val Pro Glu Ser His Pro Leu Glu His Ser Trp Thr Leu Trp Phe Asp

50 55 60

Asn Pro Ser Val Lys Ser Lys Gln Thr Thr Trp Gly Ser Ser Leu Arg

65 70 75 80

Ser Val Phe Thr Phe Ser Thr Val Glu Glu Phe Trp Ser Leu Tyr Asn

85 90 95

Asn Ile Arg His Pro Ser Lys Leu Ala Asn Gly Ala Asp Leu Tyr Tyr

100 105 110

Phe Lys His Asn Ile Glu Pro Lys Trp Glu Asp Pro Ile Cys Ala Asn

115 120 125

Gly Gly Lys Trp Thr Met Asn Phe Ser Arg Glu Lys Ser Asp Lys Pro

130 135 140

Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Ala Leu Ile Gly Glu Gln Phe Asp His Gly

145 150 155 160

Asp Glu Ile Cys Gly Val Val Asn Val Arg Ala Lys Gln Glu Arg

165 170 175

Ile Ser Ile Trp Thr Lys Asn Ser Ser Asn Glu Ala Ala Gln Val Ser

180 185 190

Ile Gly Arg Gln Trp Lys Glu Phe Leu Asp Tyr Asn Ser Ser Ile Gly

195 200 205

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

210 215 220

Ala Tyr Thr Ala

225

<210> 40

<211> 910

<212> DNA

<213> Brassica rapa

<400> 40

atggcgttag aagacacttt caagcctgtt gttgctatca aggaagcgaa acctaattat	60
gtagagcatc tgattggacc aggcgacgat gcggaggaag gagagatcgt agacggagat	120

gttgacaaat ctggaaatcc acagttcctg aatgcattc gttggagcat ttgtggactt	180
tccacagttc ctcttttat tcgttgactt tctaacgaaa agacgacttg gggaaagctcc	240
ttagatccgc gttcacgttc tccacggctcg aggagttctg gaggttgggtg cttaaaaca	300
atctttcgt tcttccaata attctacaat ctgggtttt gtttgattt agatttctcg	360
aggaaagtta tggctttgt tggatggta gatcacatga agtcatcgtt cttatctgtt	420
tctgaagaat tggttgttg atggttgaat ttgttagctac aagcttataat gttaaagttt	480
taaaaaagata gcgaagatata tatttcgtat gtaaatcaat gtttacacc ttagtatttt	540

tgttgtaac agaagatgaa caaagagttt tttggtagt gttggatgct attgtattgc	600
tgtgcactcg tgggtgtata tgctttcttg tatttcctt tcttgagaac ctttctctca	660
atggaaataa tgaacttgcata gtttgcata ttggagaca atagaaggag ttccttgatt	720
acaacagctg cattggtttc atcatccatg tggaaagagt gcttgccttg atgctaattc	780
aaaaggctt tctttgcattt tcgttgcattt ttatttttt gtcgttattt gcttgcattt	840
ccttcaggag gatgcgacgaa agatgaacaa gtacaaccat actgttatcg atctacaatt	900
ttagtttaa	910

<210> 41

<211> 404

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 41

auggcguag aagacacuuu caagccuguu guugcuauc aggaagcgaa accuaauuu	60
guagagcauc ugauuggacc aggcgacgau gcggaggaag gagagauucg agacggagau	120
guugacaaau cuggaaaucc acaguuccug aaucgcacau guuggagcau uuguggacuu	180
uccacaguuc cucuuuuuau ucguugacuu ucuaacgaaa agacgacuug ggaaagcucc	240

uuuagauccgc guucacguuc uccacggucg aggaguucug gaguggggaga caauagaagg 300
aguuccuuga uuacaacagc ugcauugguu ucauauccca ugaggaugcg acgaagauga 360

acaaguacaa ccauacuguu aucgaucuac aauuugaguu uuaa 404

<210> 42

<211> 132

<212> PRT

<213> Brassica rapa

<400> 42

Met Ala Val Glu Asp Thr Phe Lys Pro Val Val Ala Ile Lys Glu Ala

1 5 10 15

Lys Pro Asn Tyr Val Glu His Leu Ile Gly Pro Gly Asp Asp Ala Glu

20 25 30

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

35 40 45

Phe Leu Asn Arg Ile Arg Trp Ser Ile Cys Gly Leu Ser Thr Val Pro

50 55 60

Leu Phe Ile Arg Leu Ser Asn Glu Lys Thr Thr Trp Gly Ser Ser Leu

Asp Pro Arg Ser Arg Ser Pro Arg Ser Arg Ser Ser Gly Val Gly Asp

85 90 95

Asn Arg Arg Ser Ser Leu Ile Thr Thr Ala Ala Leu Val Ser Ser Ser

100 105 110

Met Arg Met Arg Arg Arg Thr Ser Thr Thr Ile Leu Leu Ser Ile Tyr

Leu

130

<210> 43

<211> 1567

<212> DN

<213> Br

<400> 43

atggcggtag aagacacttc caagcctgtt gtcgttgcgg aagaagcgaa ccctaaccgg 60

acagaccatc cgattgtatcg ataccatgaa gaaggcgacg atgctgagga aggagagatc	120
gccggcgccg aaggagacgg agacgaatcg agcaaatccg ccgttccgca gtgcgtatccg	180
ttggagcatt cgtggacttt ctgggtcgat aacccttctg ttaaattaaa gcaggcgact	240

ctactgctta tatgttaagg tcatattgt tcgcttgtt a tttcacaag agctaaaaca	720
ttgaaccagg gaatcatcg tcttattcg ttaatgttgg atgctattgt gttgtgcgt	780
gtgtgtatat atacttctt gtgttctct tttgatttg tgagtctctc tcaagtctca	840
atgggattta aggacttgtc tttggctcta ttgacttcat cttaactttgg ttgcagtctg	900
ttcaataaca tgaggggtcc gagcaagtta gctggcggag ctgacttcta ctgttcaag	960
cacaatatcg aacctaagtgggagatcct atctgtgctatggaggcaatggactatg	1020
aacttcccgaggagaagtc tgataagcccc tggcttaca ccgtatggtt ttgattctc	1080

ttacttgaac acatgattct tggccatcca tccattcgag tctgattggg tttttgttt	1140
ctcgatgttag ttgcgttgcgt tgattggaga acagtttgac catggagatg agatatgcgg	1200
agctgttgc aacgttagag gaaaggcaaga gaggatttcc atttggacca aaaatgctc	1260
caacgaagct gctcaggtaa aagatcattt attgacaaat aaatgttaaa ttgtctct	1320
tccggctaaa agacctgaaa ttcttgcgtt ccttgcgtt tgcagggtgag cattggaaa	1380
caatggaaagg agtttattga ttacaacaac agcattggtt tcatcatcca tgtaagaaga	1440
gagctttctt cttgaatgct tattcataag tttttttta atatctcaact gtctgtattg	1500

ttttttttt cttcaggagg atgccaagaa gctggacagg ggcgcgaaga gcgcttacac 1560
cgcttga 1567

<210> 44

<211> 705

<212> RNA

<213> *Brassica rapa*

<400> 44

auggcgguag aagacacuuc caagccuguu gucguugcgg aagaagcgaa cccuaacccc	60
acagaccauc cgauugaucg auaccaugaa gaaggcgcacg augcugagga aggagagauc	120
gccggcggcg aaggagacgg agacgaaucg agcaaaucgg ccguuccgca gucgcauccg	180
uuggagcauu cguggacuuu cugguucgau aacccuucug uuuaauuaaa gcaggcgacu	240

uggggaagcu cciuugcgauc cguguucacu uucuccaccc ucgaggaguu cuggagucug	300
uucaauaaca ugaggggucc gagcaaguua gcuggcggag cugacuucua cuguuuaag	360
cacaauaucg aaccuaagug ggaggauccu aucugugcua auggaggcaa auggacuaug	420
aacuuccgga aggagaaguc ugauaagccc uggcuuuaca cciuugcuugc guugauugga	480
gaacaguuug accauggaga ugagauauggc ggagcuguug ucaacguuag aggaaagcaa	540
gagaggauuu ccauuuggac caaaaugcu uccaacgaag cugcucaggu gagcauuggg	600
aaacaauugga aggaguuuau ugauuacaac aacagcauug guuucaucau ccaugaggau	660

gccagaagc uggacagggg cgcgaagagc gciuacaccc cuuga	705
--	-----

<210> 45

<211> 234

<212> PRT

<213> Brassica rapa

<400> 45

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Asn Pro Asn Pro Thr Asp His Pro Ile Asp Arg Tyr His Glu Glu Gly

20	25	30
----	----	----

Asp Asp Ala Glu Glu Gly Glu Ile Ala Gly Glu Gly Asp Gly Asp

35	40	45
----	----	----

Glu Ser Ser Lys Ser Ala Val Pro Gln Ser His Pro Leu Glu His Ser

50	55	60
----	----	----

Trp Thr Phe Trp Phe Asp Asn Pro Ser Val Lys Leu Lys Gln Ala Thr

65	70	75	80
----	----	----	----

Trp Gly Ser Ser Leu Arg Ser Val Phe Thr Phe Ser Thr Val Glu Glu

85	90	95
----	----	----

Phe Trp Ser Leu Phe Asn Asn Met Arg Gly Pro Ser Lys Leu Ala Gly

100	105	110
-----	-----	-----

Gly Ala Asp Phe Tyr Cys Phe Lys His Asn Ile Glu Pro Lys Trp Glu

115 120 125

Asp Pro Ile Cys Ala Asn Gly Gly Lys Trp Thr Met Asn Phe Pro Lys

130 135 140

Glu Lys Ser Asp Lys Pro Trp Leu Tyr Thr Leu Leu Ala Leu Ile Gly

145 150 155 160

Glu Gln Phe Asp His Gly Asp Glu Ile Cys Gly Ala Val Val Asn Val

165 170 175

Arg Gly Lys Gln Glu Arg Ile Ser Ile Trp Thr Lys Asn Ala Ser Asn

180 185 190

Glu Ala Ala Gln Val Ser Ile Gly Lys Gln Trp Lys Glu Phe Ile Asp

195 200 205

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

210 215 220

Asp Arg Gly Ala Lys Ser Ala Tyr Thr Ala

225 230

<210> 46

<211> 1568

<212

> DNA

<213> Brassica rapa

<400> 46

atggcgttag aagacacttc caagcctgtt gtcgttgcgg aagaagcgaa ccctaacc	60
acagaccatc cgattgatcg ataccatgaa gaaggcgacg atgttgagga aggagagatc	120
gccggcggcg aaacagacgg agacgaatcg agcaaattcg ccgttccgca gtcgcattcg	180
ttggagcatt cgtggacatt ctggttcgat aacccttcgt ttaaattaaa gcaggcgact	240
tgggaagct ctttgcgatc cgtgttcaact ttctccacgg tcgaggagtt ctggaggta	300
gggcctttta caaaatcaat aatttattct tgcaatgatt atttcgacat gggtttagt	360
ttggtttgtt ctagattatg ttttctcgag gaaagttatg ttcttcttc gtgggttaag	420

tcaagtcaact tttttttgtc tttttctgaa gttttttttt gttttttttt gttttttttt	480
ggtcaggcct tacaaaacaa tttttttttc ttttttttt gttttttttt gttttttttt	540
ttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	600
gtgaagtacac ttgtttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	660

aatgggattt aaggacttgt ctggcctt attgacttca tcttactttg gttgcagtc	900
gttcaataac atgaagggtc cgagcaagtt agctggcgga gctgacttct actgtttcaa	960
gcacaatatc gaacctaaatg gggaggatcc tatctgtgct aatggaggca aatggactat	1020
gaacttcccg aaggagaagt ctgataagcc ctggctttac actgtatggt tttgatttt	1080
cttacttggaa cacatgattt cttgttccacc atccattcga gtctgattgg gttttgttt	1140
tttccatgtt gttgcttgtt ttgattggag aacagtttga ccacggagat gagatatgct	1200
gagctgttgtt caacgtttaga ggaaagcaag agaggatttc catttggacc aaaaatgctt	1260

ccaaacgaagc tgctcaggta aaagatcatt tattgacaaa taaatgttaa attgtctc	1320
ttccggctaa aagacctgaa atttcttggt tcctttgatg ttgcaggta gcattggaa	1380
acaatggaag gagtttattg attacaacaa cagcattggt ttcattatcc atgtaagaag	1440
agagctttc tcttgaatgc ttattcataa gttttttttt aatatctcac tgtctgttt	1500
gtttttttt tcttcaggag gatgccaaga agctggacag gggcgcaag agcgcttaca	1560
cccgcttga	1568

<210> 47

<211> 705

<212> RNA

<213> *Brassica rapa*

<400> 47

auggcgguaag aagacacuuc caagccuguu gucguugcgg aagaagcga	cccuuacccc 60
acagaccauc cgauugaucg auaccaugaa gaaggcgacg auguugagga aggagagau	c 120
gccggcggcg aaacagacgg agacgaaucg agcaaaucg cccguucgcga gucgcauccg	180
uuggagcauu cguggaccuu cugguucgau aacccuucug uuaauuuuaa gcaggcgacu	240
uggggaagcu cciuugcgauc cguguucacu uucuccacccg ucgaggaguu cuggagucug	300
uucaauuaaca ugaagggucc gagcaaguua gcuggcggag cugacuuucua cuguuucaag	360
cacaauaucg accuaagug ggaggauccu aucugugcua auggaggcaa auggacuaug	420

aacuuccccga aggagaaguc ugauaagccc ugguuuuaca cuuugcuuggc guugauugga 480
gaacaguuug accacggaga ugagauauggc ggagcuguug ucaacguuag aggaaagcaa 540
gagaggauuu ccauuggac caaaaaugcu uccaaacgaag cugcucaggc gagcauuggg 600

aaacaauugga aggaguuuau ugauuacaac aacagcauug guuucaucau ccaugaggau 660
gccagaaggc uggacagggg cgcaagagc gcuuacaccg cuuga 705
<210> 48
<211> 234
<212> PRT
<213> Brassica rapa
<400> 48
Met Ala Val Glu Asp Thr Ser Lys Pro Val Val Val Ala Glu Glu Ala

1 5 10 15
Asn Pro Asn Pro Thr Asp His Pro Ile Asp Arg Tyr His Glu Glu Gly
20 25 30
Asp Asp Val Glu Glu Gly Glu Ile Ala Gly Gly Glu Thr Asp Gly Asp
35 40 45
Glu Ser Ser Lys Ser Ala Val Pro Gln Ser His Pro Leu Glu His Ser
50 55 60
Trp Thr Phe Trp Phe Asp Asn Pro Ser Val Lys Leu Lys Gln Ala Thr

65 70 75 80
Trp Gly Ser Ser Leu Arg Ser Val Phe Thr Phe Ser Thr Val Glu Glu
85 90 95
Phe Trp Ser Leu Phe Asn Asn Met Lys Gly Pro Ser Lys Leu Ala Gly
100 105 110
Gly Ala Asp Phe Tyr Cys Phe Lys His Asn Ile Glu Pro Lys Trp Glu
115 120 125
Asp Pro Ile Cys Ala Asn Gly Lys Trp Thr Met Asn Phe Pro Lys

130 135 140
Glu Lys Ser Asp Lys Pro Trp Leu Tyr Thr Leu Leu Ala Leu Ile Gly
145 150 155 160
Glu Gln Phe Asp His Gly Asp Glu Ile Cys Gly Ala Val Val Asn Val
165 170 175
Arg Gly Lys Gln Glu Arg Ile Ser Ile Trp Thr Lys Asn Ala Ser Asn
180 185 190

Glu Ala Ala Gln Val Ser Ile Gly Lys Gln Trp Lys Glu Phe Ile Asp

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

Asp Arg Gly Ala Lys Ser Ala Tyr Thr Ala

225

<210> 49

<211> 1283

<212> DNA

<213> *Brassica rapa*

<400> 49

atggcgacgg aggatgtgaa cgaagccctt gcggcgccgg aagtaccgat agagtcgaca 60

acggagaagc agcctataa gctggaaaga aatggtgt tctggttcga taaccaatct 120

aagccaaagc aaggcgccgc ctggggagct tcccttcgta aagcctctac cttcgacact 180

gtcgaagatt tctgggggtg tgtcggtct tcttctccctc ctcatttta gatttcttcg 240

at aacttct tctggcatgc gttttgcag ttgcacgag actatattca ttcccagcaa 300

attgacaccc aatgctgata tccacttgtt caaagctggc gttgagccca agtggaaaga 360

tcctgagtgt gctcacggcg gaaagtggac ttttgttgc accaacaaca ggaagcaagc 420

tttagacaag gcttggcttg aaactgtaat accgtcttcc ctttactgt ttttgtctt 480

agacaattgt ggcttatgtc ctaatgtctg tttcttctct ctctctctcg taattggcg 540

gcagtgtatg gctttgattt gagagcaatt ccatggatca gatgagattt gtgggtgtgt 600

tgcgttgtcgcctaaagcaagacaagcttccttggacacggactaatcaaatga 660

agctgtccgt gtttagattac gaatcatgtt ttcttctagt tgtcttttt tttttttttt 720

ttcattttct tgcttttg gg tggtgtgcga tgagatgcc aagtactatt cactagcttc 780

cttttgtgaa cgttgtgatt gctttctaca gtaaaatagc ataagctgtt taatataatca 840

ataaacgtac tctaaattat caacgaaaga tgttagagagg tttttataa tgagttaat 9000

tagttttat actgaagggtt tatagggtcg tttaactatt catattctg tgataacctgc 960

ttttatagtt tacgcttat aaacatagca tttgacagct ctttagaaca tggcagtagtc 1020

tagatgctaa aagactagt tctgaatctg tctgtttaaa ttactgtttt gttgtttttt 1080

atggtaaatt cagatggta ttggaaagaa gtggaggcg ctacttgacg tcaccgacaa 1140

gataacttc actaaccatg taatataacgt tctcctatag aagctaataat tactttgtt 1200

catgttatac cttcacgtg cttactaaaa tctggtctac ttacttgcag gatgattcta 1260
 gaagaagtgc gttcactgtc tga 1283
 <210> 50
 <211> 597
 <212> RNA
 <213> Brassica rapa

<400> 50
 auggcgacgg aggaugugaa cgaagccuu gcggcggcgg aaguaccgau agagucgaca 60
 acggagaagc agccucauaa gcuggaaaga aaaugguguu ucugguucga uaaccaaucu 120
 aagccaaagc aaggcgccgc cuggggagcu uccuucgua aagccucuac cuucgacacu 180
 gucgaagaau ucugggguuu gcacgagagu auauucauuc ccagcaaauu gacacccaau 240
 gcugauaucc acuuguucaa agcuggcguu gagcccaagu gggagaaucc ugagugugcu 300
 cacggcggaa aguggacuuu uguugucacc aacaacagga agcaagcuuu agacaaggcu 360
 uggcuugaaa cuuugauggc uuugauugga gagcaauucg augaggcaga ugagauuugu 420

gguguuguug cuagugugcg ccuaaagcaa gacaagcucu cciuguggac acggacuaaa 480
 ucaaaugaag cuguccugau ggguaauugga aagaagugga aggcgcuac ugaugucacc 540
 gacaagauaa cuuucacuua ccaugaugau ucuagaagaa gucgguucac ugucuga 597

<210> 51
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> Brassica rapa
 <400> 51

Met Ala Thr Glu Asp Val Asn Glu Ala Leu Ala Ala Ala Glu Val Pro
 1 5 10 15
 Ile Glu Ser Thr Thr Glu Lys Gln Pro His Lys Leu Glu Arg Lys Trp
 20 25 30

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

Ala Asp Ile His Leu Phe Lys Ala Gly Val Glu Pro Lys Trp Glu Asp

85 90 95

Pro Glu Cys Ala His Gly Gly Lys Trp Thr Phe Val Val Thr Asn Asn

100 105 110

Arg Lys Gln Ala Leu Asp Lys Ala Trp Leu Glu Thr Leu Met Ala Leu

115 120 125

Ile Gly Glu Gln Phe Asp Glu Ala Asp Glu Ile Cys Gly Val Val Ala

130 135 140

Ser Val Arg Leu Lys Gln Asp Lys Leu Ser Leu Trp Thr Arg Thr Lys

145 150 155 160

Ser Asn Glu Ala Val Leu Met Gly Ile Gly Lys Lys Trp Lys Ala Leu

165 170 175

Leu Asp Val Thr Asp Lys Ile Thr Phe Thr Asn His Asp Asp Ser Arg

180 185 190

Arg Ser Arg Phe Thr Val

195

<210> 52

<211> 1283

<212> DNA

<213> Brassica rapa

<400> 52

atggcgacgg	aggatgtgaa	cgaagccctt	gcggcggcgg	aagtaccgat	agagtgcaca	60
acggagaagc	agcctataa	gctggaaaga	aatgggttt	tctggttcga	taaccaatct	120

aagccaaagc	aaggcgccgc	ctggggagct	tccctcgta	aagcctctac	cttcgacact	180
------------	------------	------------	-----------	------------	------------	-----

gtcgaagatt	tctgggggtg	tgtcggtct	tcttctccctc	ctcattttta	gatttcttcg	240
------------	------------	-----------	-------------	------------	------------	-----

attaaattct	tctggcatgc	gtttttgcag	tttgcacgag	actatattca	ttcccgcaaa	300
------------	------------	------------	------------	------------	------------	-----

attgacaccc	aatgctgata	tccacttgg	caaagctggc	gttgagccca	agtggaaaga	360
------------	------------	-----------	------------	------------	------------	-----

tcctgagtgt	gctcacggcg	gaaagtggac	ttttgttgc	accaacaaca	ggaagcaagc	420
------------	------------	------------	-----------	------------	------------	-----

tttagacaag	gcttggcttg	aaactgtaat	accgtttcc	cttttactgt	ttttgtcttt	480
------------	------------	------------	-----------	------------	------------	-----

agacaattgt	ggcttatgtc	ctaatgtctg	tttcttctct	ctctctctcg	taattggcg	540
------------	------------	------------	------------	------------	-----------	-----

gcagttgatg	gcttgattt	gagagcaatt	cgatgaggca	gatgagattt	gtgggtttgt	600
------------	-----------	------------	------------	------------	------------	-----

tgcttagtgtg cgccctaaagc aagacaagct ctccttgtt acacggacta aatcaaatga	660
agctgtcctg gtttagatttac gaatcatgtt ttcttctagt tgtctttttt tttttttttt	720
ttcattttct tgcttttgg tgggtgtgcga tgagatgccc aagtactatt cactagcttc	780
ctttgttigaa cgigtgttattt gctttctaca gtaaaatagc ataagctgtt taatataitca	840
ataacgttac tctaaatttta caacgaaaga tgttagagagg tttttataa tgagttaaat	900
tagttttat actgaagggtt tataggttcg tttaactatt catattctg tgataacctgc	960

ttttatagtt tacgcttat aaacatagca ttgacagct cttagaaca tggcagtatc	1020
tagatgctaa aagacttagtt tctgaatctg tctgcttaaa ttactgctt gttttttttt	1080
atggtaattt cagatggta ttggaaagaa gtggaaaggcg ctacttgacg tcaccgacaa	1140
gataactttc actaaccatg taattaacgt tctcctatag aagctaataat tactttttttt	1200
catgtttatc cttaacgtt cttactaaaa tctggtctac ttacttgacg gatgattcta	1260
gaagaagtcg gttcactgtc tga	1283

<210> 53

<211> 597

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 53

auggcgacgg aggaugugaa cgaagccuuu gcggcggcg aaguaccgau agagucgaca	60
acggagaagc agccucauaa gcuggaaaga aaaugguuu ucugguucga uaaccaauu	120
aagccaaagc aaggcgccgc cuggggagcu ucccuucguu aagccucuac cuucgacacu	180
gucgaagauu ucugggguuu gcacgagacu auauucauuc ccagcaauu gacacccaaau	240
gcugauaucc acuuguucaa agcuggcguu gagcccaagu gggaaaucc ugagugugcu	300
cacggcgaa aguggacuuu uguugucacc aacaacagga agcaagcuuu agacaaggcu	360
uggcuugaaa cuuugauggc uuugauugga gagcaauucg augaggcaga ugagauuugu	420

gguguuguug cuagugugcg ccuaaagcaa gacaagcucu cciuuguggac acggacuaaa	480
ucaaaugaag cuguccugau gggauuugga aagaagugga aggccuacu ugacgucacc	540
gacaagauaa cuuucacuua ccaugaugau ucuagaagaa gucgguucac ugucuga	597

<210> 54

<211> 198

<212> PRT

<213> Brassica rapa

<400> 54

Met Ala Thr Glu Asp Val Asn Glu Ala Leu Ala Ala Ala Glu Val Pro

1 5 10 15

Ile Glu Ser Thr Thr Glu Lys Gln Pro His Lys Leu Glu Arg Lys Trp

20 25 30

Cys Phe Trp Phe Asp Asn Gln Ser Lys Pro Lys Gln Gly Ala Ala Trp

35 40 45

Gly Ala Ser Leu Arg Lys Ala Ser Thr Phe Asp Thr Val Glu Asp Phe

50 55 60

Trp Gly Leu His Glu Thr Ile Phe Ile Pro Ser Lys Leu Thr Pro Asn

65 70 75 80

Ala Asp Ile His Leu Phe Lys Ala Gly Val Glu Pro Lys Trp Glu Asp

85 90 95

Pro Glu Cys Ala His Gly Gly Lys Trp Thr Phe Val Val Thr Asn Asn

100 105 110

Arg Lys Gln Ala Leu Asp Lys Ala Trp Leu Glu Thr Leu Met Ala Leu

115 120 125

Ile Gly Glu Gln Phe Asp Glu Ala Asp Glu Ile Cys Gly Val Val Ala

130 135 140

Ser Val Arg Leu Lys Gln Asp Lys Leu Ser Leu Trp Thr Arg Thr Lys

145 150 155 160

Ser Asn Glu Ala Val Leu Met Gly Ile Gly Lys Lys Trp Lys Ala Leu

165 170 175

Leu Asp Val Thr Asp Lys Ile Thr Phe Thr Asn His Asp Asp Ser Arg

180 185 190

Arg Ser Arg Phe Thr Val

195

<210> 55

<211> 1148

<212> DNA

<213> Brassica rapa

<400> 55

atggcgacag aggatgtcaa cgaagcctt gcggcgccgg aggtaacggc gatagaatcg 60

acggagaagc agcagccctcc tcacaagctc gaagaagaagt ggagtctctg gttcgataac	120
caatcgaaac ccaagcaagg cgccgcctgg ggagttccc tccgtaaagc atgtaccc	180
gataccgtcg aagacttctg ggggttgc ttttcttct tcgatctaag atttctgtg	240
aagttatact aataagggtg tgtgtattgt tgcagttgc acgagactat cttcgccc	300
agcagattga caccaacgc tgacattcac atgtcaag ctgggttga gcccaagtgg	360
gaagatcctg agtgtgctaa cggcggaaag tggacttagt ttgttaccaa caacaggaag	420
caagcttag acaaggcttg gcttgcacttgc atactttct tcttcttcta accctttta	480
ctctctgtt ttctgactta ataattttat ctctgttgc tggcaggta tggcttagt	540
tgtagagcag ttgtatgagg cagatgagat ctgtgggtg gttgctagt tccgc	600
gcaagacaag ctcccttgc ggactaggac taaatcta gaagctgtc tggtatcatg	660
cttctttctt cccttatata tgggttttgc acagttttt aaaccaccc ttgatactt	720
gctgacagta taatcataag ctatattgc caaaggatata atatataatca gtttagaaca	780
tgttagatg tcaaagatgg ttatgaatc tatctatcg atgaaattgc tgctgtgt	840
ttgtttattt ttattatgtt ttatattggt ttatgatcct atctgatgatg atttctactc	900
tgctgtatata ttatgttgc ttatgatgatg atctgatgaa actactacac tttgttgc	960
accttagatgg gtattggaa gaagtggaa gagatacttg atgtcactga caagatatct	1020
ttcactaacc atgtatattac tactccccca cgtaaaaagc taataatca tcctttgtt	1080
agttcctttt taaactgtgg tctaaatata tgcaggatga tgcaagaaga agtgcattta	1140
gtgtctaa	1148
<210> 56	
<211> 603	
<212> RNA	
<213> Brassica rapa	
<400> 56	
auggcgacag aggaugugaa cgaagccuu gcccggcg agguaacggc gauagaaucg	60
acggagaagc agcagccucc ucacaagcuc gaagaagaagu ggagucucug guucgauaac	120
caaucgaaac ccaagcaagg cgccgcctgg ggaguuuuccc uccguuaagc auguaccuu	180
gauacccgucg aagacuucug ggguuugcac gagacauuc uccguuccag cagauugaca	240
cccaacgcug acauucacau guucaagcu gguguugagc ccaaguggga agauccugag	300
ugugcuaacg gcgaaagug gacuuauuu guuaccaaca acaggaagca agcuuuagac	360
aaggcuuggc uugaaacuuu gauggcuuuu guuggagagc aguuugauga ggcagaaugag	420

aucuguggug	ugguugcuag	uguccgccaa	aagcaagaca	agcucuccuu	guggacuagg	480										
acuaaaucua	augaagcugu	ucugaugggu	auugggaaga	aguggaagga	gauacuugau	540										
gucacugaca	agauaucuuu	cacuaaccau	gaugaugcaa	gaagaagucg	auuuaguguc	600										
uaa						603										
<210> 57																
<211> 200																
<212> PRT																
<213> Brassica rapa																
<400> 57																
Met	Ala	Thr	Glu	Asp	Val	Asn	Glu	Ala	Leu	Ala	Ala	Glu	Val	Thr		
1																
Ala	Ile	Glu	Ser	Thr	Glu	Lys	Gln	Gln	Pro	Pro	His	Lys	Leu	Glu	Arg	
20																
Lys	Trp	Ser	Leu	Trp	Phe	Asp	Asn	Gln	Ser	Lys	Pro	Lys	Gln	Gly	Ala	
35																
Ala	Trp	Gly	Val	Ser	Leu	Arg	Lys	Ala	Cys	Thr	Phe	Asp	Thr	Val	Glu	
50																
Asp	Phe	Trp	Gly	Leu	His	Glu	Thr	Ile	Phe	Val	Pro	Ser	Arg	Leu	Thr	
65																
Pro	Asn	Ala	Asp	Ile	His	Met	Phe	Lys	Ala	Gly	Val	Glu	Pro	Lys	Trp	
85																
Glu	Asp	Pro	Glu	Cys	Ala	Asn	Gly	Gly	Lys	Trp	Thr	Tyr	Val	Val	Thr	
100																
Asn	Asn	Arg	Lys	Gln	Ala	Leu	Asp	Lys	Ala	Trp	Leu	Glu	Thr	Leu	Met	
115																
Ala	Leu	Val	Gly	Glu	Gln	Phe	Asp	Glu	Ala	Asp	Glu	Ile	Cys	Gly	Val	
130																
Val	Ala	Ser	Val	Arg	Gln	Lys	Gln	Asp	Lys	Leu	Ser	Leu	Trp	Thr	Arg	
145																
Thr	Lys	Ser	Asn	Glu	Ala	Val	Leu	Met	Gly	Ile	Gly	Lys	Trp	Lys		
165																
170																
175																

Glu Ile Leu Asp Val Thr Asp Lys Ile Ser Phe Thr Asn His Asp Asp

180 185 190

Ala Arg Arg Ser Arg Phe Ser Val

195 200

<210> 58

<211> 1128

<212> DNA

<213> Brassica rapa

<400> 58

atggcgacag	aggatgtgaa	cgaagccctt	gcggcgccgg	aggtaacggc	gatagaatcg	60
acggagaagc	acgagcctcc	tcacaagctc	gaaagaaggt	ggagttctg	gttcgataac	120
caatcgaac	ccaagcaagg	cgccgcctgg	ggagcttccc	tccgtaaagc	atgtaccc	180

gataccgtcg	aagacttctg	ggggtttgc	ttttcttct	tcgatctaag	attttctgtg	240
aagtatact	aataggggt	tgtgtattgt	tgcagttgc	acgagactat	cttcgttccc	300
agcagattga	tacccaaacgc	tgacattcac	atgttcaaag	ctgggttga	gcccaagtgg	360
gaagatcctg	agtgtgctaa	cggcggaaag	tggacttatg	ttgttaccaa	caacaggaag	420
caagctttag	acaaggcttg	gcttgcact	gtactctct	tcttcttcta	accctttta	480
ctcttctgtt	ttctgactta	ataattttat	ctcttgcgtt	tggcagttga	tggctttagt	540
tggagagcag	tttgcgttgg	cagatgatgt	ctgtgggtg	gttgcttagt	tccgccttcaa	600

gcaagacaag	ctctccttgc	ggactaggac	taaatcta	gaagctgttc	tggatcatg	660
cttctttct	cccttatata	tgttttttg	acagttttt	aaaccacctt	ttgatacttt	720
gctgacagta	taatcataag	ctatattgc	caaaggat	gttagtatgt	caaagatgg	780
ttatgaatct	atatatctga	tgaattttgtt	gtttttttt	tgtttattgt	tattatgttt	840
tatattggtt	tatgatccta	tctgatgaga	tttctactct	gctatataatt	tagattggtt	900
tatgaattta	tctgacgaaa	ctaatacact	ttgtttgtaa	acctagatgg	gtattggaa	960
gaagtggaaag	gagatacttg	atgtcaccga	caagatatct	ttcactaacc	atgtaaattac	1020

tacttccca	cgtaaaaagc	taatcaatca	tcctttgtt	agtgccttt	taaactgtgg	1080
tctatgtata	tgcaaggatga	tgcaagaaga	agtgcattt	gtgtctga		1128

<210> 59

<211> 603

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 59

auggcgacag	aggaugugaa	cgaagccuu	gcggcgccgg	agguaacggc	gauagaaucg	60
acggagaagc	agcagccucc	ucacaagcuc	gaaagaaagu	ggaguuucug	guucgauaac	120
caaucgaaac	ccaagcaagg	cgccgcccugg	ggagcuccc	uccguuaagc	auguaccuuc	180
gauaccgucg	aagacuucug	ggguuugcac	gagacuaucu	ucguucccag	cagauugaua	240

cccaacgcug	acauucacau	guucaaagcu	gguguugagc	ccaaguggga	agauccugag	300
ugugcuaacg	gcggaaagug	gacuuauuu	guuaccaaca	acaggaagca	agcuuuuagac	360
aaggcuuggc	uugaaacuuu	gauggcuuu	guuggagagc	aguuuuga	ggcagaugag	420
aucuguggug	ugguugcuag	uguccgccc	aagcaagaca	agcucuccuu	guggacuagg	480
acuaaaucua	augaagcugu	ucugaugggu	auugggaaga	aguggaagga	gauacuugau	540
gucacccgaca	agauaucuuu	cacuaaccau	gaugaugcaa	gaagaagucg	auuuaguguc	600
uga						603

<210> 60

<211> 200

<212> PRT

<213> Brassica rapa

<400> 60

Met Ala Thr Glu Asp Val Asn Glu Ala Leu Ala Ala Ala Glu Val Thr

1 5 10 15

Ala Ile Glu Ser Thr Glu Lys Gln Gln Pro Pro His Lys Leu Glu Arg

20 25 30

Lys Trp Ser Phe Trp Phe Asp Asn Gln Ser Lys Pro Lys Gln Gly Ala

35 40 45

Ala Trp Gly Ala Ser Leu Arg Lys Ala Cys Thr Phe Asp Thr Val Glu

50 55 60

Asp Phe Trp Gly Leu His Glu Thr Ile Phe Val Pro Ser Arg Leu Ile

65 70 75 80

Pro Asn Ala Asp Ile His Met Phe Lys Ala Gly Val Glu Pro Lys Trp

85 90 95

Glu Asp Pro Glu Cys Ala Asn Gly Gly Lys Trp Thr Tyr Val Val Thr

100 105 110

Asn Asn Arg Lys Gln Ala Leu Asp Lys Ala Trp Leu Glu Thr Leu Met

115

120

125

Ala Leu Val Gly Glu Gln Phe Asp Glu Ala Asp Glu Ile Cys Gly Val

130

135

140

Val Ala Ser Val Arg Pro Lys Gln Asp Lys Leu Ser Leu Trp Thr Arg

145

150

155

160

Thr Lys Ser Asn Glu Ala Val Leu Met Gly Ile Gly Lys Lys Trp Lys

165

170

175

Glu Ile Leu Asp Val Thr Asp Lys Ile Ser Phe Thr Asn His Asp Asp

180

185

190

Ala Arg Arg Ser Arg Phe Ser Val

195

200

<210> 61

<211> 24

<212> DNA

<213> Brassica rapa

<400> 61

tctccttcca ctctttccca atac

24

<210> 62

<211> 24

<212> DNA

<213> Brassica rapa

<400> 62

tagacaaggc ttggcttgaa actg

24