

GOVP1200507151

M101KD010001-02K0401-03910

TMV (PMMV) 감염 유도 전사조절유전자 및
병저항성 관련 유전자를 이용한 복합내병성
작물개발에 관한 연구

Studies on Development of Transgenic Plants by
Using Disease-Defense Related Genes Induced by
TMV (PMMV) Infection

(주)농우바이오

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “TMV (PMMV) 감염 유도 전사조절유전자 및 병저항성 관련 유전자를 이용한 복합내병성 작물개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2003. 8. 30.

주관연구기관명 : (주) 농우바이오

주관연구책임자 : 한 지 학

연 구 원 : 최 순 호

연 구 원 : 정 민

연 구 원 : 허 남 한

연 구 원 : 이 장 하

연 구 원 : 이 미 연

연 구 원 : 김 주 연

연 구 원 : 이 상 희

연 구 원 : 박 윤 식

보고서 초록

과제관리번호		해당단계 연구기간	2000.09.16 - 2003.06.30	단계 구분	(1단계) / (총3단계)
연구사업명	중 사업명	21C 프론티어연구개발사업			
	세부사업명	자생식물이용기술개발사업			
연구과제명	중 과제명				
	세부(단위)과제명	TMV (PMMV) 감염 유도 전사조절유전자 및 병저항성 관련 유전자를 이용한 복합내병성 작물개발에 관한 연구			
연구책임자	한 지 학	해당단계 참여연구원수	총 : 27 명 내부 : 15 명 외부 : 12 명	해당단계 연구비	정부: 330,000 천원 기업: 90,000 천원 계: 420,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)농우바이오 육종연구소 연구개발팀		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :	상대국연구기관명 :			
위탁연구	연구기관명 :	연구책임자 :			
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)					보고서 면수
<p>▶ PMMV를 처리한후 고추 저항성관련 유전자 및 전사조절인자의 분리 및 특성분석: -PMMV induced EST clone 총 98점 확보 (no redundancy) -<i>PPII</i>: pathogen specific하게 반응하는 전사조절유전자/일반 phytohormone과는 signal pathway가 다름. -<i>PPI2</i>: putative 전사조절 유전자. -<i>PHZF</i>: antibiotic 관련 유전자.</p> <p>▶ 저항성 관련 전사조절인자 대량발굴시스템구축 -pLexA DNA-BD: PMMV induced cDNA library 확보 -Yeast system을 이용하여 transcription factor 대량발굴 체계 확립</p> <p>▶ 과실희유 유전자 및 전사조절인자의 분리 및 특성분석 -Red fruit induced EST clone 총206점 확보 (no redundancy) -<i>WRKY</i>: pathogen에 발현하는 전사조절유전자/SA에 dependent 발현, red fruit에만 발현 -<i>PLCI</i>: 과피와 태좌부에 특이발현하는 membrane receptor</p> <p>▶ 기능분석을 위한 형질전환체 구축 -<i>PPII</i>: 담배, 토마토, 고추 형질전환체 확보 및 저항성검정</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	저항성, 고추, 전사조절인자, 형질전환, 과실희유			
	영 어	resistance, pepper, transcription factor, transformation, fruit specificity			

요 약 문

I. 제 목

TMV (PMMV) 감염 유도 전사조절유전자 및 병저항성 관련 유전자를 이용한 복합 내병성 작물개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

식물 병원체가 기주에 침입하였을 시 식물체는 병원체에 대한 식물생체방어기작을 작동하게 된다. 병원체와 식물체간의 특이적인 인지과정 후 작동하는 식물생체방어기작은 다양한 생리, 생화학적 작용과 맞물려 있는 상당히 복잡한 체계이다. 아직 식물생체방어기작을 이끄는 다양한 신호전달체계가 완전히 밝혀져 있지는 않지만 일반적으로 병원체의 침입을 인지하고 신호를 전달하는 데 있어서 공통분모로 작용하는 주요 조절유전자에 의하여 식물생체방어기작이 조절되는 것으로 알고있다.

바이러스가 일으키는 식물병은 모든 식물에 걸리는 병중에 약 20%를 차지한다. 반면 현재까지 바이러스 병을 방제할 수 있는 약제를 개발하지 못한 실정뿐만 아니라 뚜렷한 바이러스 방제 대책이 없다. 작물인 경우 종합방제로서는 채종지를 바꾸거나, 감염지 관리, 종자 소독등이 고작이다. 그러므로 바이러스 저항성 작물을 개발한다는 것은 필연적이다. 크게 바이러스 저항성 식물을 만드는 방법은 2가지가 있는데 첫째는 바이러스에 저항성이 강한 계통을 선발하여 교배 육종을 통해 저항성 품종을 토착화한다는 것이고 둘째는 바이러스 내병성 유전자를 발굴하여 형질전환을 이용하여 gene silencing 효과를 이용한 항바이러스성 작물을 개발한다는 것이다. 첫 번째경우는 유전자원이 많지 않고 육종기간이 길어서 본 과제에서는 바이러스의 외피단백질유전자를 이용하고자 하였다. 고추는 국내 채소 종자시장의 20%를 차지하고 있으며 생산매출량은 년 1조 3천억원에 해당되며 고추 관련 기간산업의 매출량까지 합치면 년 3조원에 달한다. 또한 선진국들이 아직 고추의 유전체 사업에 착수하지 않았기에 initiative를 찾는 것이 현재 국내에서 태동하기 시작한 생명공학을 미래 산업으로 지향하는 정책에 적합하다. 그리고 고추는 국내 종묘회사가 소유하고 있는 종자의 유전자원이나 육종 기술이 세계적으로 경쟁력이 있기 때문에 병저항성 고추가 개발이 되면 교배육종을 통하여 여러 다양한 품종을 개발할 수 있다는 장점이 있다. 또한 주요 조절유전자들은 진화적으로 보존되어 있기 때문에 궁극적으로는 한 작물 뿐만 아니라 여러 작물에 응용할 수 있는 potential이 매우 크다.

따라서 본 연구의 목표는 식물체와 TMV간의 상호작용 시 관여하는 주요 조절유전자를 분리하여 식물생체방어기작을 이끄는 신호전달체계를 확립하고 이들에 의한 식물방어 관련 유전자의 발현 조절기작을 이해하고자 하는 것이다. 또한 주요 조절유전자들을 식물체에 도입하여 다양한 병원체에 대한 저항성을 갖는 복합내병성 작물을 개발하고자 하였다.

본 과제를 통하여 식물생체방어기작에 관여하는 주요 조절유전자의 pool을 다수 분리확보할 수 있기 때문에 병원체와 식물체간의 상호작용 시 작동하는 신호전달체계의 확립, 지적 재산권 확보 및 다양한 병원체에 대하여 저항성을 갖는 복합내병성 형질전환 식물체의 개발이 가능할 것으로 사려된다. 또한 그 신호전달과정에서 환경 stress 내성과 공동으로 관련되는 주요 조절유전자를 발굴할 수 있기 때문에 그 파급적 효과는 무한하다. 이 조절유전자들을 비단 고추뿐만 아니라 여러 식량작물에 이용한다면 부가가치가 높은 유용한 병저항성 형질전환 식물체를 개발할 수 있을 것으로 사려된다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- ▶ 바이러스 저항성 관련 주요 유전자 및 전사조절인자의 분리
 - 고추 TMV 저항성 inbred line에 TMV 접종후 시간경과에 따라 SSH 방법 수행하여 EST 유전자 분리 및 염기분석
- ▶ 저항성 관련 유전자 및 전사조절인자의 특성분석
 - Northern blot, Southern blot, PCR test
- ▶ pLexA DNA binding fusion library 구축
 - pLexA DNA-BD::cDNA library를 확보하여 *E.coli*에 transformation 하였고 약 4000개 정도의 colony를 획득하여 pLexA clone을 pool로 구축.
 - Yeast one-hybrid system을 이용한 특정 *cis*-element에 결합하는 DNA-binding protein 유전자의 분리확보
- ▶ 식물방어 관련 전사조절유전자의 고추에로의 도입 및 형질전환체 검정
 - 농우바이오의 상용 고추 inbred line들을 이용한 형질전환 최적 line 확보
 - Agrobacterium*-mediated transformation에 의한 고추 형질전환체계 확립
 - 전사조절인자의 담배, 토마토에 도입후 병 저항검정

IV. 연구개발결과

- ▶ PMMV를 처리한후 고추 저항성관련 유전자 및 전사조절인자의 분리 및 특성분석:
 - PMMV induced EST clone 총 98점 확보 (no redundancy)
 - PPII*: pathogen specific하게 반응하는 전사조절유전자/일반 phytohormone과는 signal pathway가 다름.
 - PPI2*: putative 전사조절 유전자의 특성분석.
 - PHZF*: antibiotic 관련 유전자의 특성분석.
- ▶ 저항성 관련 전사조절인자 대량발굴시스템구축
 - pLexA DNA-BD:: PMMV induced cDNA library 확보
 - Yeast system을 이용하여 transcription factor 대량발굴 체계 확립
- ▶ 과실특이 유전자 및 전사조절인자의 분리 및 특성분석

- Red fruit induced EST clone 총206점 확보 (no redundancy)
- WRKY*: pathogen에 발현하는 전사조절유전자/SA에 dependent 발현, red fruit에만 발현
- PLCI*: 과피와 태좌부에 특이발현하는 membrane receptor
- ▶ 기능분석을 위한 형질전환체 구축
- PPII*: 담배, 토마토, 고추 형질전환체 확보
- 병리검정: 저항성 개체 발견 못함

V. 연구개발결과의 활용계획

▶ 형질전환 방법

-고추형질전환체 완성을 위한 방법개발은 커다란 성공사례라고 할 수 있다. 이 방법을 이용하여 앞으로 많은 고추 형질전환체가 개발될 것으로 사료된다.

▶ 저항성관련 EST 분리

-고추 저항성관련 및 과실특이관련하여 유전자 및 전사조절인자 약 300여 점이 나왔다. 여기서 현재 몇점은 특성분석이 되어가고 있는데 특히 과실의 병 저항성 관련 유용유전자가 발굴되면 형질전환체를 만들어 품종화할 계획이다.

Summary

Plants resist pathogen's attack by activating a wide variety of defense mechanisms, including the hypersensitive response (HR), the induction of genes encoding pathogenesis-related (PR) and defense-related proteins, the production of antimicrobial compounds termed phytoalexins, the generation of reactive oxygen species (ROS) and the reinforcement of cell walls. The signal transduction network for the defense mechanism is complicated and one of the research targets understanding the mechanism is to study the transcription factors involved in regulation of genes or cascades related to the defense response against diseases.

Plant diseases caused by virus infection covers 20% of diseases occurring in plants. There are not many ways to defend the virus infection to plants. Once the soil is infected, not much people can do. However, there are two ways to develop the resistant plants against the virus infection. One is to find the genetic source that has a resistant characteristic from cultivars, lines, and wild types. The other one is to develop a resistant plant by inserting a resistant gene which one should do find. The latter is much easier to work with because the breeding duration is shorter and the defense related genes are present. This method, eventually producing transgenic plants, will be popular once the functional genomics reveal more information about the gene function.

Pepper is one of the most important vegetable crops in Korea and the market sales is highest. Breeding program of the pepper in Korea is excellent and competitive worldwide. If the elite varieties that are disease resistant were developed by genetic engineering, the GM marketing share in world would be promising.

We have set out a series of research program to develop a plant that holds a broad spectrum of defense response against disease or pathogen attack. The major direction is to isolate and use transcription factors that could control the expression of genes related to defense mechanism. Therefore, we have tried to isolate transcriptional factors that are in response to TMV (PMMV) pathogen infection.

In this study, we report the characteristics of transcription factors that were isolated from the TMV induced pepper plants. Some genes were transformed in tobacco and tomato to test the defense function against pathogen treatment, but so far we have not found any transgenic plant that showed resistance. The pepper was also transformed by a pepper transcription factor successfully and this could be regarded as a scientific achievement.

Contents

Part I. Introduction of Research Project.....	11-12
Chapter 1. Research Objective and Necessity.....	11-12
Chapter 2. Research Contents and Scope.....	11-12
Part II. Present View of Technology in Domestic and Foreign Countries.....	13-14
Chapter 1. Isolation of Disease Resistant-Related Genes and Transcription Factors.....	13
Chapter 2. Pepper Transformation.....	14
Part III. Results and Discussion of Research Program.....	15-44
Chapter 1. Isolation of Disease Resistant-Related Genes and Transcription Factors.....	15-17
1. Inoculation of TMV (PMMV) to PI257284 resistant against TMV.....	15
2. Isolation of disease resistant related 98 EST clones induced by TMV.....	16-17
Chapter 2. Analysis of Genes and Transcription Factors Related Disease Resistance	18-25
1. Characteristic analysis of PPI1 transcription factor.....	18-22
2. Characteristic analysis of PPI2 putative transcription factor.....	23-24
3. Isolation of PHZF gene.....	25
Chapter 3. Isolation and Characteristic Analysis of Fruit Specific Genes and Transcription Factors.....	26-38
1. Isolation of fruit specific EST clones.....	26-27
2. Characteristic analysis of WRKY transcription factor.....	28-33
3. <i>PLCI</i> : Fruit specific expression gene.....	34-38
Chapter 4. Establishment of pLexA DNA Binding Fusion Library	39

Chapter 5. Transformation of Transcription Factor into Plants and Resistant Test.....	40-44
1. Transformation of tobacco with PPI1 transcription factor and resistant test	40
2. Transformation of tomato with PPI1 transcription factor and resistant test	41
3. Regeneration rate of pepper inbred lines.....	42
4. Pepper transformation of PPI1 transcription factor.....	43-44
Part IV. Achievement and Contribution Levels of Results.....	45
Chapter 1. Achievement Levels of Results.....	45
Chapter 2. Contribution Levels of Results.....	45
Part V. Plan and Application of Results.....	46
Chapter 1. Necessity of Follow-up.....	46
Chapter 2. Application to Production.....	46
Part VI. Scientific and Technological Information Collection from Foreign Country.....	46
Part VII. Reference.....	47-48
Appendix: Application Plan.....	49-58

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	11-12
제 1 절: 연구개발의 목적과 필요성.....	11-12
제 2 절: 연구개발의 내용 및 범위.....	11-12
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	13-14
제 1 절: 병저항성관련 전사조절인자 분리.....	13
제 2 절: 고추형질전환기술.....	14
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....	15-44
제 1 절: 바이러스 저항성 관련 주요 유전자 및 전사조절인자의 분리.....	15-17
1. 고추 TMV 저항성 inbred line PI257284에 TMV(PMMV) 접종.....	15
2. PMMV induced 병저항성 관련 총 98점 EST 확보.....	16-17
제 2 절: 저항성 관련 유전자 및 전사조절인자의 특성분석...18-25	
1. PPI1 transcription factor의 특성분석.....	18-22
2. PPI2: putative 전사조절유전자.....	23-24
3. PHZF 유전자.....	25
제 3 절: 과실품이 유전자 및 전사조절인자의 분리 및 특성분석	26-38
1. 과실품이 EST clone.....	26-27
2. WRKY 전사조절유전자.....	28-33
3. PLC1: 과피 특이 발현유전자.....	34-38
제 4 절: pLexA DNA binding fusion library 구축.....	39
제 5 절: 식물방어 관련 전사조절유전자의 형질전환체 및 저항성 검정.....	40-44
1. PPI1 transcription factor의 담배 형질전환 및 저항성검정.....	40
2. PPI1 transcription factor의 토마토 형질전환 및 저항성검정.....	41
3. 고추 inbred line의 재분화효율.....	42
4. PPI1 transcription factor의 고추형질전환체 확보.....	43-44

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	45
제 1 절: 연구개발목표의 달성도.....	45
제 2 절: 기술발전예의 기여도	45
제 5 장 연구개발결과의 활용계획.....	46
제 1 절: 추가연구의 필요성.....	46
제 2 절: 기업화 추진방안을 기술.....	46
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보..	46
제 7 장 참고문헌.....	47-49
부록: 활용계획서.....	49-58

제 1 장: 연구개발과제의 개요

제 1 절: 연구개발의 목적과 필요성

▶ 바이러스가 일으키는 식물병은 모든 식물에 걸리는 병중에 약 20%를 차지한다. 반면 현재까지 바이러스 병을 방제할 수 있는 약제를 개발하지 못한 실정뿐만 아니라 뚜렷한 바이러스 방제 대책이 없다. 작물인 경우 종합방제로서는 채종지를 바꾸거나, 감염지 관리, 종자 소독등이 고작이다. 그러므로 바이러스 저항성 작물을 개발한다는 것은 필연적이다. 크게 바이러스 저항성 식물을 만드는 방법은 2가지이다. 첫째는 바이러스에 저항성이 강한 계통을 선발하여 교배 육종을 통해 저항성 품종을 토착화한다는 것이고 둘째는 바이러스 내병성 유전자를 발굴하여 형질전환을 이용하여 항바이러스성 작물을 개발한다는 것이다. 전자는 저항성 유전자를 얻는 것이 관건이다. 자생하고 있는 다양한 야생종을 확보하고 저항성 유무를 판별하기 위해서는 많은 시간과 노력이 요구된다. 또한 교배를 통한 육종은 5-10년씩의 장기간을 요하는 단점이 있다. 후자는 교배 육종보다는 시간을 빨리 단축할 수 있으며 실지 외피 단백질을 이용한 바이러스 저항성 작물 개발이 성공한 사례가 많다. 그러나 주입된 바이러스 유전자의 빠른 변형으로 생태계에 미치는 영향을 고려하여 안전성 검사가 뒤따르기 때문에 형질전환체를 상업화하는데는 오랜 시간이 걸리는 단점이 있다.

▶ 본 과제에서 추진하려는 방향은 바이러스가 감염되는 동안 식물 자체에서 반응하는 병저항성 기작에 관련된 주요 조절유전자를 분리하여 이용한다는 것이다. 일반적으로 유전자의 시간적, 공간적 발현은 전사조절인자(*trans factor*)에 의하여 조절된다. 유전자 발현의 특이성은 *cis-element*에 특이적으로 결합할 수 있는 transcriptional activator 및 repressor에 의하여 부분적으로 결정되는 바 이들은 일반적으로 DNA binding, activation 또는 repression domain으로 구성되어 있다. 따라서 식물생체방어기작 시 특이적으로 유도발현하는 DNA-binding protein 유전자를 다수 분리 확보하는 것은 식물생체방어기작을 이끄는 신호전달체계를 이해하는데 있어서 매우 중요한 일이라 사려되며 아울러 병저항성 관련 특이적 조절유전자를 식물체에 도입하였을 경우 식물방어 관련 유전자들의 발현을 포괄적으로 조절할 수 있어서 복합내병성 형질전환 식물체를 개발할 수 있는 가능성이 높을 것으로 사려된다. 위와 같은 방법은 최근 dehydration에 관계하는 전사조절인자(DRE)을 이용해서 drought, salt 및 cold에 포괄적으로 내성을 갖는 식물체의 개발에 관한 연구와 같은 맥락을 이룬다.

▶ 본 과제에서는 바이러스 저항성 고추 개발을 위해 중점적으로 연구하였는데 그 이유는 첫째, 고추가 국내 채소 종자시장의 20%를 차지하고 있으며 생산매출량은 년 1조 3천억원에 해당되며 고추 관련 기간 산업의 매출량까지 합치면 년 3조원에

달한다. 둘째, 선진국의 연구진들이 아직 고추의 유전체 사업에 착수하지 않았기에 initiative를 찾는 것이 현재 국내에서 태동하기 시작한 생명공학을 미래 산업으로 지향하는 국책에 적합하다. 셋째, 고추는 국내 종묘회사가 소유하고 있는 종자의 유전자원이나 육종 기술이 세계에서 으뜸이기 때문에 병저항성 고추가 개발이 되면 교배육종을 통하여 여러 다양한 품종을 개발할 수 있다는 장점이 있다. 또한 주요 조절유전자들은 진화적으로 보존되어 있기 때문에 궁극적으로는 한 작물 뿐만 아니라 여러 작물에 응용할 수 있는 potential이 매우 크다.

▶ 따라서 본 연구의 목표는 매년 고추 피해에 약 15%를 차지하고 있는 TMV와 고추간의 상호작용 시 관여하는 주요 조절유전자를 분리하여 식물생체방어기작을 이끄는 신호전달체계를 확립하고 이들에 의한 식물방어 관련 유전자의 발현 조절기작을 이해하고자 하는 것이다. 병저항성에 관련하는 전사조절유전자는 식물체에 도입하여 TMV 뿐만 아니라 다양한 병원체에 대한 저항성을 검정하여 복합내병성 작물을 개발하고자 하였다.

제 2 절: 연구개발의 내용 및 범위

1. 바이러스 저항성 관련 주요 유전자 및 전사조절인자의 분리
 - 고추 TMV 저항성 inbred line에 TMV 접종후 시간경과에 따라 SSH 방법 수행하여 EST 유전자 분리 및 염기분석
2. 저항성 관련 유전자 및 전사조절인자의 특성분석
 - EST 중에서 유용유전자 선별하여 full clone 확보하고 northern blot을 통해서 발현분석 동정
3. 과실특이 유전자 및 전사조절인자의 분리 및 특성분석
 - Red fruit induced EST clone 총206점 확보 (no redundancy)
 - EST 중에서 유용유전자 선별하여 full clone 확보하고 northern blot을 통해서 발현분석 동정
4. pLexA DNA binding fusion library 구축
 - pLexA DNA-BD::cDNA library를 확보하여 *E.coli*에 transformation 하였고 약 4000개 정도의 colony를 획득하여 pLexA clone을 pool로 구축.
 - Yeast one-hybrid system을 이용한 특정 cis-element에 결합하는 DNA-binding protein 유전자의 분리확보
5. 식물방어 관련 전사조절유전자의 고추에로의 도입 및 형질전환체 검정
 - 농우바이오의 상용 고추 inbred line들을 이용한 형질전환 최적 line 확보
 - Agrobacterium*-mediated transformation에 의한 고추 형질전환체 확보
 - 전사조절인자의 담배, 토마토에 도입후 병 저항검정

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절: 병저항성관련 전사조절인자 분리

국내외적으로 본 과제와 관련되어 주요 식물병저항성 관련 유전자와 전사조절유전자를 다수 분리확보하고 이를 이용한 병저항성 작물 개발에 관한 체계적 연구는 미흡하다. 저항성 관련유전자를 확보한 상태에서 각 작물에 형질전환하여 그 특성을 보고한 예는 많지만 이 역시 처음서부터 병저항성을 target으로 한 것은 아니다. 오히려 에틸렌, ABA, JA, SA 같은 phytohormone의 signal pathway와 여러 stress와의 관계를 통해서 얻어진 유전자 분석이 먼저 시작되었다 (O'Donnell et al., 1996; Lund et al., 1998; Penninckx et al., 1998). 그중 β -1,3-glucanases, defensins, PR proteins 등이 병원균 접종에서도 반응이 일어남으로서 이들 유전자들의 promoter지역을 연구하게 되었다. 예를 들어 에틸렌 responsive element라는 GCC box가 promoter안에 존재하며 이 box에 binding 하는 전사조절인자가 EREBP라는 것이 밝혀졌다 (Ohme-Takagi and Shinshi, 1995). EREBP 역시 에틸렌에 의해서 발현이 되고 defense response에 관여를 함으로서 병저항성 관련 전사조절인자와 역할이 대두되었다. 이와 비슷한 맥락으로 stress, phytohormone, 전사조절인자와의 관계는 drought stress에서 여러 결과가 도출되었다. Drought stress에 반응하는 유전자중에 CBF1 이나 DREB1 같은 전사조절인자는 DRE/CRT box 라는 cis element에 binding하면서 overexpression 될 경우 water stress에 저항하게 되었다 (Kirsten et al., 1998; Kasuga et al., 1999).

국내에서도 이런 연구가 있었는데 담배에 TMV 접종을 통해서 또 SA를 treat해서 발현되는 EST 유전자들을 분리한 경우가 있다 (Kang et al., 1998). 그리고 최근에는 EREBP/AP2 binding motif를 갖고있는 *Tsi1*이라는 전사조절인자를 담배에서 분리하여 담배에 overexpression 시켰을 경우 병에 저항할 뿐 아니라 osmotic stress에서도 저항한다고 보고하였다 (Park et al., 2001).

이렇게 전사조절인자를 이용하여 병저항성 작물을 개발하고자하는 연구 분위기가 국외는 물론 국내에서도 기초가 형성되었다. 특히 broad spectrum을 지니는 복합 저항성 작물을 개발하고자 할때 유전자 조절을 담당하는 master 전사조절인자를 overexpression 시키는 연구가 필요하다.

제 2 절: 고추형질전환기술

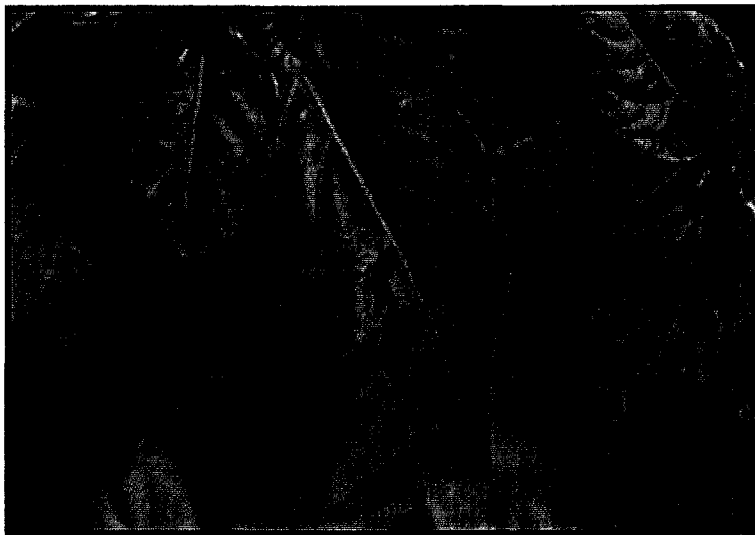
과거 십여년간 고추의 형질전환확립에 대해서 국내외 학자들의 많은 노력이 있어왔다. 그러나 현재까지 고추형질전환이 확실히 확립되어 있지 않고 몇 성공사례가 있었으나 실지 방법적으로는 explant 종류나 selection 배지 조건이나 배양환경에서 커다란 차이는 없었다 (Lee et al., 1993; Kim et al., 2001; Cai et al., 2002; Kim et al., 1997; Shin et al., 2002-a; Shin et al., 2002-b). 고추 형질전환의 문제점은 성공한 경우도 재연성이 전혀 없다는 것이다. 따라서 많은 노력과 방법들이 반복적으로 행하여지고 있고 체계적인 형질전환방법이 부재한 상황이다.

최근 발표 논문과 성공사례를 보면 국내의 연구 내용이 국외보다 훨씬 앞서있다. 그 이유는 고추 품종 개발 기술이 외국 보다 앞서 있기 때문에 수년 전서부터 고추 형질전환체 개발에 initiative를 갖고 있었기 때문이다. 고추의 형질전환체계 확립은 향후 한국의 식물생명공학의 주체성을 위하여 반드시 성공해야할 숙원 사업이기 때문에 여러 방법을 시도하여 왔다. 본 과제는 *Agrobacterium* coculture를 이용하고 callus mediated shoot induction 방법으로 전사조절인자 *PPII*를 형질전환하였다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절: 바이러스 저항성 관련 주요 유전자 및 전사조절 인자의 분리

1. 고추 TMV 저항성 inbred line PI257284에 TMV (PMMV)를 접종
고추 TMV 저항성 inbred line PI257284에 TMV (PMMV)를 접종한 후 72시간에 HR 반응이 나타난다. 이때 잎을 채취하고 control group과 상관 비교하는 SSH 방법을 수행하였다.

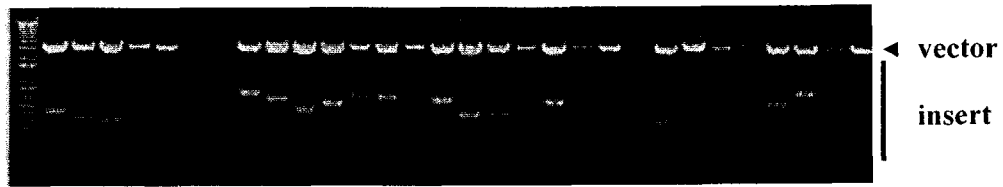
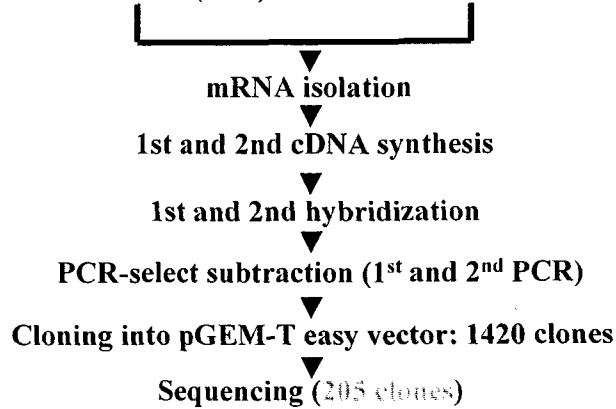


A pepper plant introgressed with *L3* gene from *C. chinense* PI257284. *L3* gene-mediated HR was induced at 3 days post-inoculation.

2. PMMV induced 병저항성 관련 EST clone 98점 확보

C. chinense PI257284 (L^3/L^3)-PMMV (P_{1,2} pathotype)

Driver: O DAI (HR-) Tester: 3 DAI (HR+)

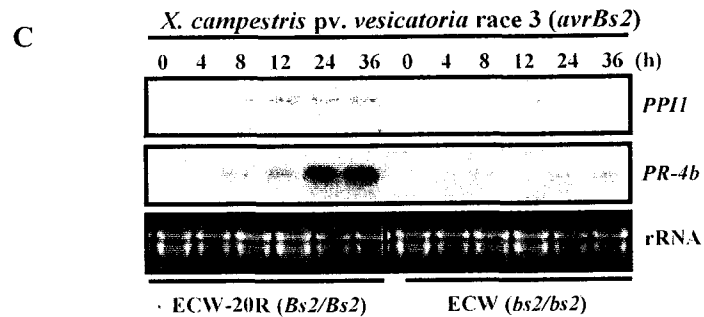
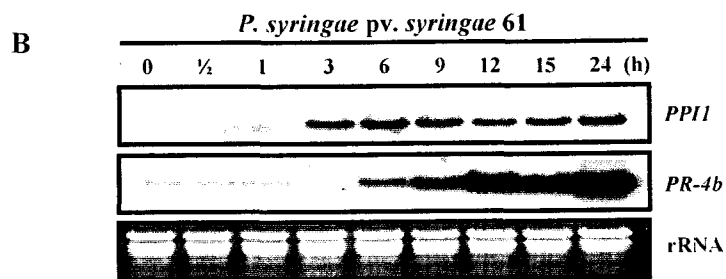
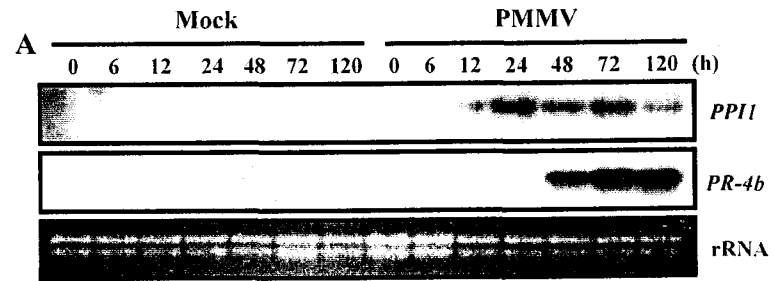


Average of insert size: ~450 bp

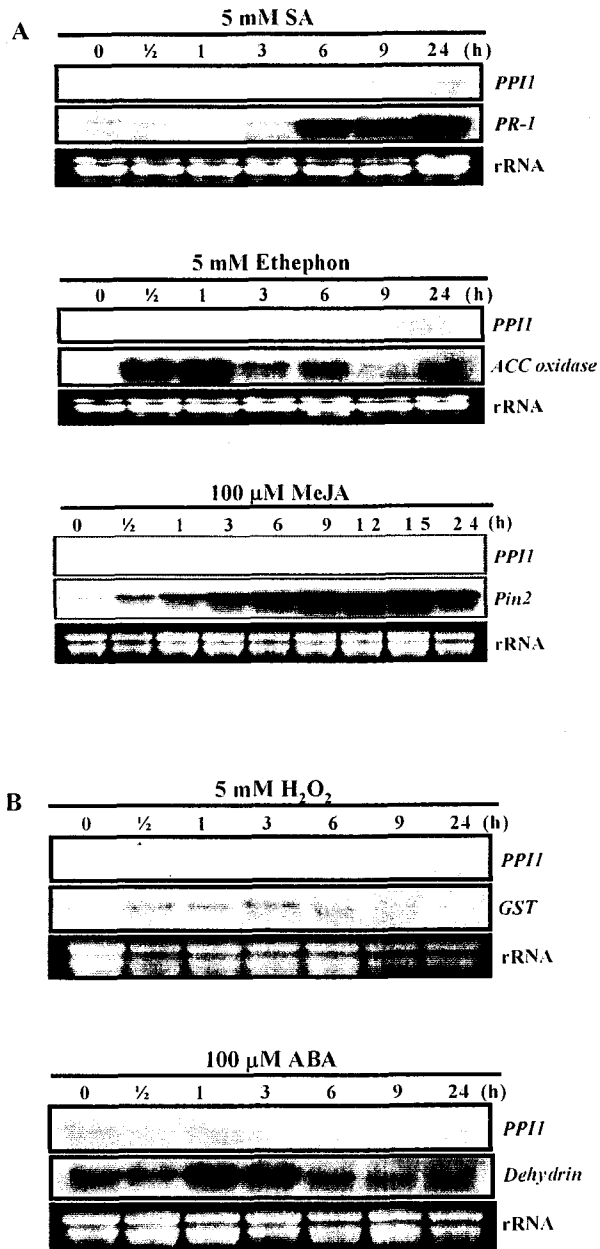
A PCR-tested cDNA subtraction method for obtaining pepper defense-related genes. 이 방법을 통해서 redundancy가 없는 유전자 총 98점을 확보하여 염기분석 하였다.

Gene	Clone #	Gene Product (Homology)	Accessio
<i>Pathogenesis-related proteins</i>			
	6	PR STH-2	M29041
	8	PR-4b	AF244122
	10	PR-2 (beta-1,3-glucanase)	AF067863
	20	SAR8.2	AF112868
	21	PR-1	AJ250136
	25	NtPRp27	AB024600
	33	Osmotin-like protein	AF199508
	35	PR-3 (Class I basic endochitinase)	U48687
	44	PR P23	X70787
	63	PR-10	AF244121
	146	Gamma -thionin 1	AF112869
	156	PR-5 (Thaumatococcus homolog NP24)	M21346
	173	Proline-rich protein	AJ006984
<i>Oxidative stress</i>			
	40	Catalase	JE0126
	74	Glutathione peroxidase	U94495
	113	Anionic peroxidase 2	X15854
	233	Glutathione S-transferase	X56265
<i>Amino acid signalling and metabolism</i>			
	5	Amino acid permease 1	U64823
	58	Asparagine synthetase	AF263432
	100	Phosphoribosylanthranilate transferase	AC008263
	238	Acetolactate synthase	X07644
<i>Fatty acid signalling and metabolism</i>			
	29	Delta12 oleate desaturase	X92847
	45	Lipoxygenase	X96405
<i>Sugar signalling and metabolism</i>			
	178	UDP-galactose 4-epimerase	AJ005081
	209	Beta-glucosidase-like protein	AL353994
	212	Putative fructose-bisphosphate aldolase	AC006200
<i>Signal, regulatory function, others</i>			
	4	Phosphate-induced gene	AB018441
	11	Unknown protein	AC018722
	17	Aluminum-induced gene	AB013447
	56	Cytochrome P450	X71657
	61	NADPH quinone oxidoreductase	AB030704
	72	NifU-like metallocluster assembly factor	AL161493
	87	Subtilisin-like protein	AJ006480
	92	ATP-citrate-lyase	AC003970
	103	Putative protein	AL163491
	106	Late-embryogenesis protein lea5	AF053076
	114	Heat shock cognate 70 kDa protein 1	X54029
	116	Aminopeptidase-like protein	Z99708
	129	Tumor-related protein NF34	U66263
	161	Unknown protein	AC004401
	195	ACC oxidase 1	L21976
	201	Proteinase inhibitor	D17332

PMMV inducible pepper defense-related genes. 98점중 48점이 위와 같다. 나머지는 EST clone 들은 unknown이며 이 table에서는 수록되어 있지 않다

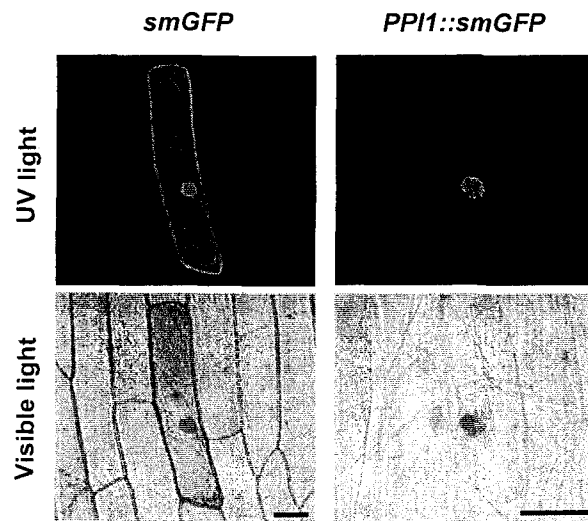


*PPI1*의 northern 분석. 고추 잎을 PMMV나 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61로 접종하면 발현된다. 또한 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* race 3 (*avrBs2*)에 저항하는 ECW-20 계통에서는 발현이 됨으로서 *PPI1*이 pathogen inducible transcription factor라는 것을 증명하였다.

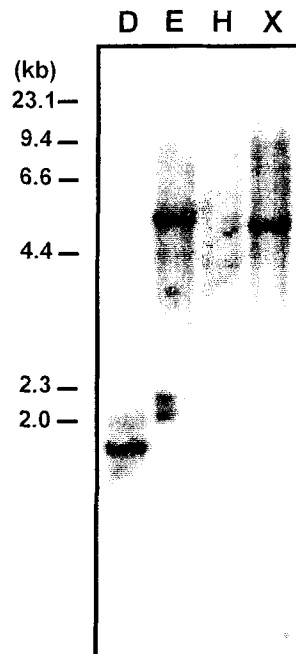


*PPII*은 phytohormone에 의하여 발현이 되지 않는다. 일반 phytohormone과는 signal pathway가 다를 것으로 사료된다.

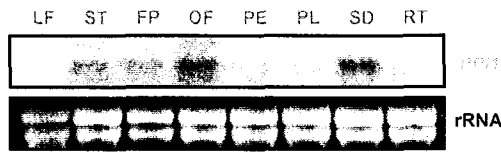
PPI1의 위치를 파악하기 위해서 GFP를 연결하여 양파세포에 gene gun을 이용
 형질전환하였다. PPI1 단백질은 핵안에 위치하고 있다.



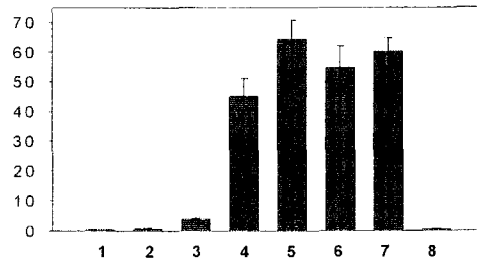
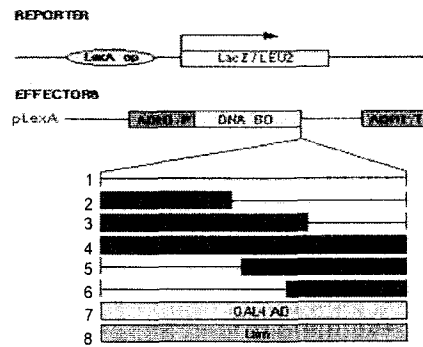
Southern blot of *PPII*. 고추 genome은 한 copy의 *PPII*를 가지고 있다.



조직별 *PPII* 발현분석. 앞에서는 발현이 안되고 open flower와 종자에서만 발현된다.



Gus Test for Transcriptional Activation of *PPII* gene. cDNA 내부중에서 3' end region이 transcriptional activation을 갖는다.



결론적으로 *PPII*는 bZIP transcription factor로서 주로 pathogen attack에서만 반응하며 다른 abiotic stress에는 반응이 없다. 앞으로 정확한 기능은 밝혀져야겠지만 식물의 병 저항성관련에 관계가 있을 것으로 사료된다.

2. *PPI2*: putative 전사조절 유전자.

Nucleotide sequence of the putative C2H2 Zinc finger transcription factor (*PPI2*) gene from pepper

```

atgggtggaggcaatggtcagaaggcaaatggctcgtgagaagaacatggaaaagatg
M G G G N G Q K A K M A R E K N M E K M
aaagccaaaaggaagtcaagcttgaggctaacaagaaggctatgagtatccagtgcaag
K A Q K G S Q L E A N K K A M S I Q _ K
gtgtgcatgcagacattcatttcaccacttctgaagttaagtgtagagaacatgctgag
V _ M Q T F I C T T S E V K C R E _ A E
cggaaacatcccaaatctgatgtgtatgcatgttccctcatctcaagaaatga
A K _ P K S D V Y A C F P H L K K -
    
```

Amino Acid Sequence Analysis of Pepper *PPI2* and Other Unknown Proteins

```

PPI2      MGGGNGQKAKMAREKNMEKMK-AQKGSQLEANKKAMSIQCKVCMQTFICTTSEVKCREHA 59
Can40-1   MGGGNGQKAKMARERNLEKQKNAGKGSQLETNKKAMSIQCKVCMQTFICTTSEVKCREHA 60
AtUnknown MGGGNAQKSAMARAKNLEKAKAAGKGSQLEANKKAMSIQCKVCMQTFICTTSEVKCREHA 60
          ***** ** : *** : * * * * * *****
          ***** ** : * * * * *

PPI2      EAKHPKSDVYACFPHLKK 77
Can40-1   EAKHPKSDVLCFPHLNK 78
AtUnknown EAKHPKADVACFPHLKK 78
          ***** ** : * * * * *
    
```

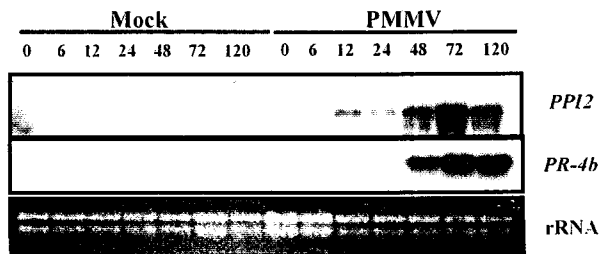
*PPI2*는 Protein kinase CK2 (casein kinase II)의 phosphorylation site를 가지고 있다.

MGGGNGQKAK	MAREKNMEKMK	KAQKGS	NKKAMSIQCK
1	11	21	31
VCMQTFIC	VKCREHAE	AKHPKSDVYA	CFPHLKK-
41	51	61	71

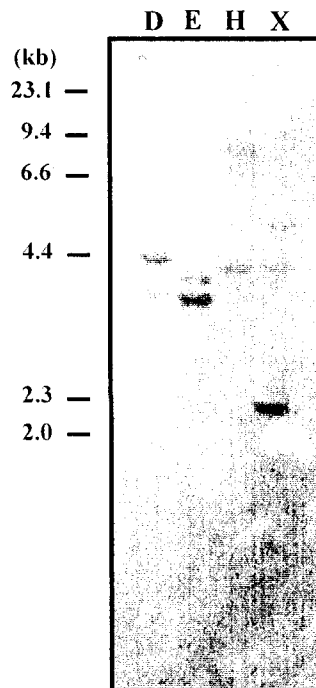
*PPI2*는 N-myristoylation site를 함유하고 있다.

M	KAK	MAREKNMEKMK	KAQKGSQLEA	NKKAMSIQCK
1	11	21	31	
VCMQTFICTT	SEVKCREHAE	AKHPKSDVYA	CFPHLKK-	
41	51	61	71	

Expression pattern of *PPI2* during pepper-PMMV interaction



Southern blot of *PPI2*. 한 copy만 존재함



3. PHZF 유전자

Antibiotic 관련 유전자로서 phenazine compound F이라고 알려져 있고 the hydroxylation of phenazine-1-carboxylic acid를 2-hydroxy-phenazine-1-carboxylic acid로 만든다. 이 Phenazine compound는 많은 bacteria and fungus에 대해서 broad-spectrum of antibiotic activity를 갖는다.

Amino acid sequence alignment of PHZF

```

*      20      *      40      *      60      *      80
AC004044 : MKK G T D P E N D N E T A I T G --- F Q A S A D : 81
NM_100203 : MAE R A E P E E D N E A T T I G --- D L P R A D : 81
CcPIG32 : -MA L T N Q L E E -- K A T T E S T M T N P R D E : 81
m KK VKYF6VDAFT 3AFKGNpAAVcFLedDne4DD WLQS6AaEFNISETC5LtP6tg pRFR6RWETP6aEVD6CG

*      100     *      120     *      140     *      160
AC004044 : H S C S N D D M V R T R S D T S E L S D G E V K G G T E L T T C D W L S V S S M I A : 165
NM_100203 : H S V S T G E T D L T H K N D --- D D G E S S --- P T Y E V Y I D D L S L F A : 158
CcPIG32 : R A I A Y K D T S R I R L E T K A L N S Q D D W Q K D Y S Q V V E T F N V P -- A I S : 163
hATLASAH LFs GLV sdtVEF 3rSGILtAKr6 t l dge IELlFPVW t evN Dv s i3kaLNGA36

*      180     *      200     *      220     *      240     *
AC004044 : D K A A T N N I P K S T E L Q R D L K C D A A G S T S Y A A E C H S I : 249
NM_100203 : D K A K K D - L S W A I D L K R E S K C E A A A S D T C A A E T H S L : 241
CcPIG32 : G N E L M G D H P G A A K C Q Q Q K N S R G P A P H G Y C L C P C K : 247
6d6kaT L66Lps Eav lqPr6D I kCpC G666Taaas GS 5DEySR5FaP4fG61EDBPvcGSAHCALAhYws 4

*      260     *      280     *
AC004044 : N F L Y Q S S T K L T H : 294
NM_100203 : N C F Y Q S G T K L T Y : 286
CcPIG32 : G C V L A P G V E F A S : 292
6nKcDF AyyqASsRgGt646HLDkEKQRV1LRGKAVtVMEG 6LV

```

AC004044 similar to PHZF [Arabidopsis thaliana] align 58%
 NM100203 unknown protein [Arabidopsis thaliana] align 59%
 CcPIG32 PMMV-induced gene from Pepper

제 3 절: 과실특이 유전자 및 전사조절인자의 분리 및 특성분석

Capsicum annuum cv. SIRO는 고추 과실의 연화현상을 가진 계통이다. 야생계통이기에 병에 저항성이 있어서 과실에 존재하는 유전자를 확보하고자 하였다. 특히 red 고추때 발현하는 유전자 분리를 위해서 SIRO-red와 SIRO red-green 과실을 이용하여 subtraction을 하였다. 총 red 과실에서만 발현하는 EST clone 총206점 확보 (no redundancy) 하였다. Table에 보이지 않는 EST clone은 unknown이며 EST 중에서 유용유전자 선별하여 full clone 확보하고 northern blot을 통해서 발현분석을 동정하였다.

1. 과실 특이 EST clone

Red 과실 특이 유전자

Gene Clone #	Gene Product (Homology)	Accession
1	Covalently-linked cell wall protein 6)	
10	Alternative oxidase	AB004813
19	Osmotin-like protein	X67121
20	Miraculin homologue	AB023648
22	Pyrophosphate-fructose-6-phosphate-1-phosphotransferase-like protein	AB016886
24	Unknown protein	AC004005
25	Class I heat shock protein (HSP 17.4)	P19036
26	NS-LTP A	P10973
27	Thioredoxin-like protein	AC012562
31	Catalase	P49317
33	Xylosidase	AB023034
41	Protein kinase-like protein	AL137189
42	Osmotin-like protein	AJ298305
43	Capsanthin/capsorubin synthase	X77289
44	Unknown protein	AC022455
47	Poly(A)-binding protein	AF190636
48	Heat shock protein 21	X07187
50	Putative protein	AL162973
51	Unknown protein	AC025814
55	Hsp20.1	AJ225046
58	Thionin-like protein	AF112443
59	Superoxide dismutase (Cu-Zn)	AF009734
61	Putative fructose-bisphosphate aldolase	AF325014
62	Aquaporin 1	AF024511
63	Fibrillarin 1	AF233443
65	MADS-box protein	AF068722
68	Capsanthin/capsorubin synthase	X77289
77	Outer membrane lipoprotein-like protein	AB024029
78	Ribosomal protein L27	AB043975
80	Cryoprotective osmotin-like protein	AY007309
81	Putative protein	AL161577
84	Metallothionein-like protein	Z68185
89	Putative splicing factor PRP8	AF092565

Red 과실 특이 유전자

Gene Clone #	Gene Product (Homology)	Accession(Related)
90	Putative phenylalanyl-tRNA synthetase beta-subunit	AC010926
94	Chlorophyll a/b-binding protein type 1	S16294
110	dnaK-type molecular chaperone hsc70	L41253
114	Putative WRKY-type DNA-binding protein	AC003337
116	Heat shock protein 83	M99431
120	Hsc70	L41253
121	Legumin-like protein	AC007171
123	Senescence-related protein	AB014457
125	Chitinase	Z15139
127	Putative gamma TIP	AF290619
128	Putative serine carboxypeptidase	AC004401
133	Heat shock protein 70	X06932
138	Cryoprotective osmotin-like protein	AY007309
139	Heat shock protein 70	U92815
140	Alternative oxidase 2	Q40578
142	Ethylene-inducible protein	M88254
143	Osmotin-like protein	X67121
144	Ethylene-responsive proteinase inhibitor 1	F20076
145	Putative oxidoreductase	AC016661
146	Thiosulfate sulfurtransferase	AF109156
150	Hsc70	L41253
151	Galactokinase	X99851
158	Alanine:glyoxylate aminotransferase	AF063901
159	Chitinase, class V	X77111
160	Heat shock protein	AC009322
161	Ubiquitin-like protein	AB023032
163	Wound-induced protein	U89764
164	Chitinase	X78325
167	Hypothetical protein	AJ012688
169	Similar to dnaJ proteins	AC009322
170	ABA and environmental stress inducible protein TAS14	X51904
171	Putative cytochrome P450	AC006193
172	Isomerase-like protein	AB022217
173	Beta-galactosidase	AJ012798

2. WRKY 전사조절인자

Sequences of *WRKY*. *WRKY*는 식물특이 병저항성 관련 전사조절인자이다

```

1      GCTAATAAAATCACTACTCTCTTAATTCCCCTTTCTTGCTTTTAT
47     CTCTACCTGATTAATGAAATGGAACCTACAAAGACATAAAAAATTGAA
           M E S Y K E I K I E      10
95     GATCATCCAATGTATTACCTTGATAATAATTTGCCAGTCACTAATAGC
           D H P M Y Y L D N N F A V T N S      26
143    CATTCAATTACAGGCCTAATCTCAGATTATTATGGTGTGGAAGGTAGG
           H S F T G L I S D Y V G V E G R      42
191    AATATTATGAATACATCGTCTCTTTTGGGTTTCATGGAGTTATTGGGT
           N I M N T S S S L G F M E L L G      58
239    TTTCAAGATTTGATGTGTTTCATCAGCTTCATTCTTTGAGTTACCA
           F Q D I L M C S S S A S F F E L P      74
287    AAAGAAGAAAACCTCCTGTCTGTCAGTTTGTGTATCTGAAGAAGTGAAG
           K E E N S C P A V C V S E E V K      90
335    CCAACTGCAGGTGAAAGCCAAAATAAGCTTATAAGTACTGTAGCAGCA
           P T A G E S Q N K L I S T V A A      106
383    GCTAACGTATTCAATACGCCATCTACCCCAAACCTGTTCTCTATTTC
           A N V F N T P S T P N C S S I S      122
431    TCCGAGACAAATGAGGGCCACACTAATACCACTCATGAGGATGCAGAG
           S E T N E G H T N T T H E D A E      138
479    GCCGGGAAGTACTAGATCATCAGGACCAACAACACACCAACACGAAA
           A G E V L D H Q D Q Q H T N T K      154
527    CAACAGTTGAAAGCGAAGAAAACAGTTAGTCAGAAGAAGCAGAGAGAG
           Q Q L K A K K T V S Q K K Q R E      170
575    CCGAGATTTCATTCATGACAAAGAGTGAAGTTGATTTCTGGAAGAT
           P R F A F M T K S E V D F L E      186
623    GGTACAGATGGAGAAAATATGGTCAAAAAGCTGTCAAAAACAGCCCA
           [REDACTED]      202
671    TTTCCAGGAAGCTATTATCGCTGCACAAGCGCAACTGCAATGTAAG
           [REDACTED]      218
719    AAGAGAGTAGAGCGATGCTTCAGTGACCCAAGCATAGTGGTACTACC
           [REDACTED]      234
767    TACGAAGCAAAAACATACCCATCTAAGTCCCATGAATACGATCATGCCC
           [REDACTED] L S P M N T I M P      250
815    CGCCCTAGCTGCTATCCAATTACTCCAGTACCCGCTTACCTGGTGGC
           R P S C Y P I T P V P A S P G A      266
863    TTCCCTTGCCGATGCCAGTTCAATATTAATCAGTCTTCAACAACCTTG
           F P L P M Q F N I N Q S F N N L      282
911    ACAAGTTCTTTAGCCATGAATAATCAGCTTGATCATGCTGCTTTTGT
           T S S L A M N N Q L D H A A F V      298
959    GCTCAAGGAAGGCGCTTTTGCCTTCCGAAATGCTGGGAGACGAGGGG
           A Q G R R F C T S E M L G D E G      314
1007   CTTCTTCAGGATCITATGCCCTCCACSTTGATTAAGAAAATTACAGA
           L L Q D L M P S T L I K E N Y R      330
1055   TGATGTATATTTAATGATGCAGTCTTAATGTATAGAGGATAATCAGT
           *
1103   TAAATAATTASCATCTAGTACTATATGCGTTATAGTACTTTCTTTAAT
1151   TATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
1199   AAAAAAAAAA

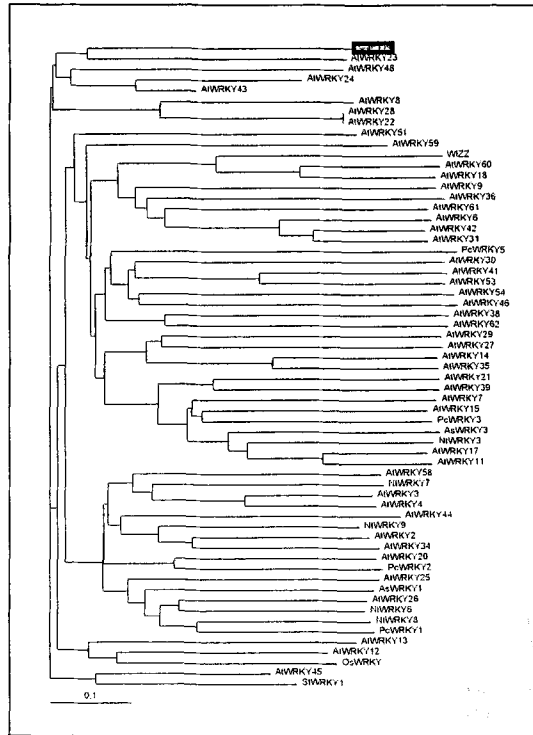
```

Dashed underline: putative nuclear localization site

Black Circle : zinc-finger motif

Gray box: WRKY DNA-binding domain

Phylogenic 분석을 통해서 WRKY는 다른 종류들과는 유연관계가 약한 것으로 나타났다.



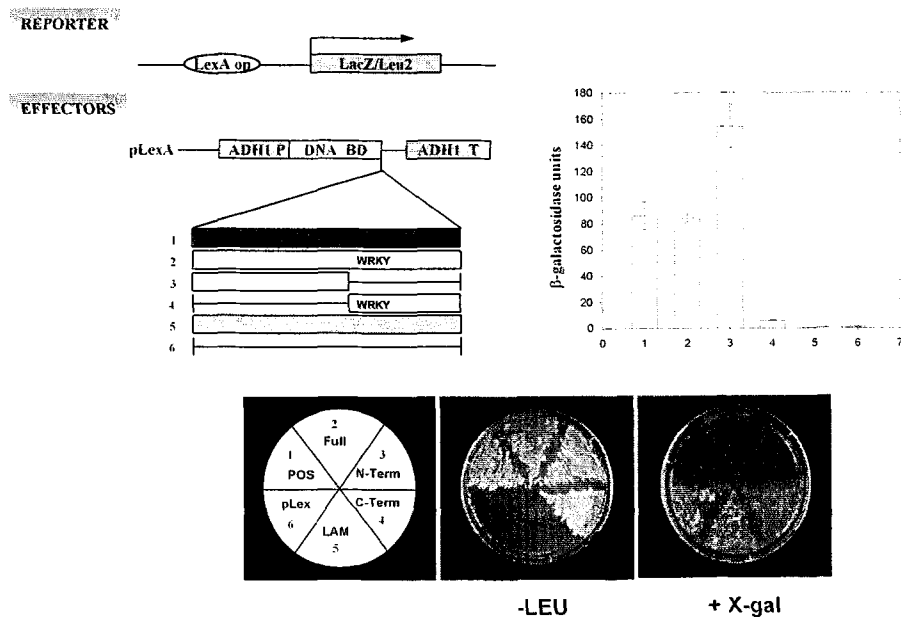
WRKY의 상호비교를 통해서 특정 domain은 보존이 잘 되어있는 것으로 나타났다

```

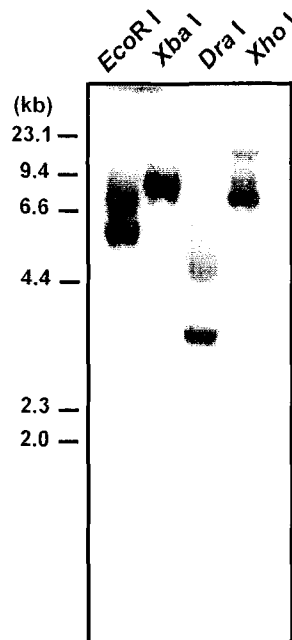
CaWRKY1 : EDCYRWRKYGOKAKNSLFRNYRCTSA--TCHVKKRVERCFSELSIVVTIYEGKHTLSPMNT
TiZZ    : KDEYHWRYGOKYTRDNLSPRAYRCSFAP--SCHVKKRVORSVECSWIVATYEGKHTLSPMNT-PSQ
TiZZ    : KDEYQWRKYGOKYTRDNLSPRAYRCSFAP--TCHVKKRVORSIECSWIVATYEGKHTLSPMNTFSK
StWRKY1 : DDCYRWRKYGOKAKNSLFRNYRCTHQ--TCHVKKRVORLSKLEEVVVTIYEGKHTLSPMNT
OsWRKY  : DDCYRWRKYGOKYTRDNLSPRAYRCSFAP--TCHVKKRVERASCLIRSVITTYEGKHTLSPALR
AsWRKY1 : DDCYRWRKYGOKYTRDNLSPRAYRCSFAP--TCHVKKRVERASCLIRAVVITTYEGKHTLSPALR
AsWRKY3 : ADDEYRWRKYGOKYTRDNLSPRAYRCSFAP--TCHVKKRVERASCLIRAVVITTYEGKHTLSPALR-Q
PcWRKY2 : DDCYRWRKYGOKYTRDNLSPRAYRCSFAP--TCHVKKRVERASCLIRAVVITTYEGKHTLSPALR
PcWRKY3 : EDCYRWRKYGOKYTRDNLSPRAYRCSFAP--TCHVKKRVERASCLIRAVVITTYEGKHTLSPALR
NtWRKY3 : GDCYRWRKYGOKYTRDNLSPRAYRCSFAP--TCHVKKRVERASCLIRAVVITTYEGKHTLSPALR
    
```

- CaWRKY1 : *Capsicum annuum* fruit clone # 114
- AsWRKY : *Avena sativa* WRKY protein
- AtWRKY : *Arabidopsis thaliana* WRKY protein
- NtWRKY, WIZZ, TiZZ : *Nicotiana tabacum* WRKY protein
- OsWRKY : *Oryza sativa* WRKY protein
- PcWRKY : *Petroselinum crispum* WRKY protein
- StWRKY : *Solanum tuberosum* WRKY protein

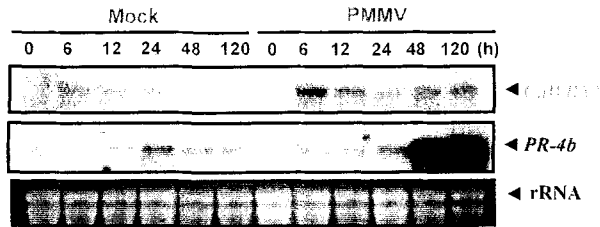
*WRKY*의 transcription activation 분석. 3' end region에 transcriptional activation이 존재한다.



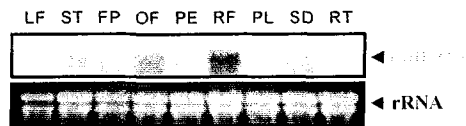
Southern analysis of *WRKY*. *WRKY* 유전자는 genome속에 한 copy로 존재한다.



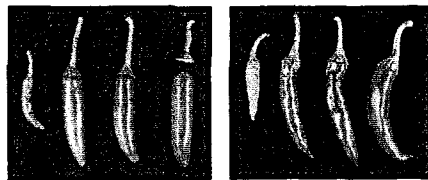
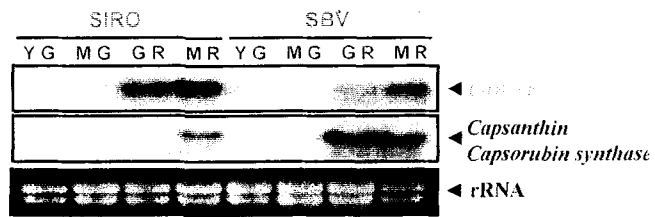
Expression of *CaWRKY* by Pathogen Induction



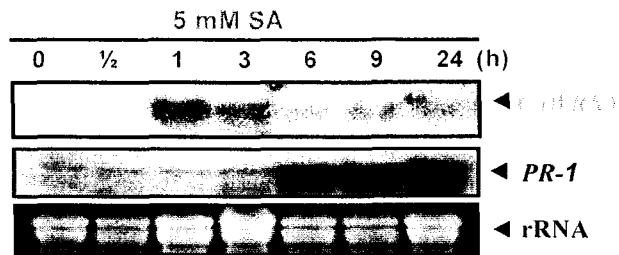
Tissue Specific Expression of *CaWRKY*



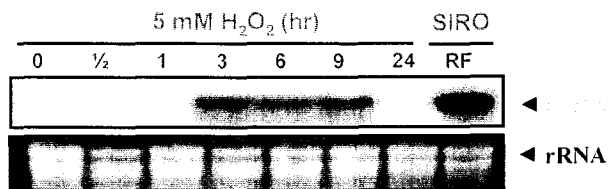
Expression during Fruit Development of *CaWRKY*



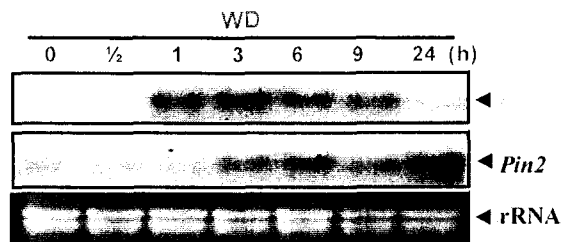
Expression of *CaWRKY* after SA Treatment



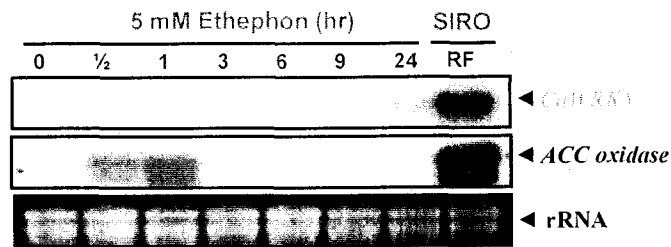
Expression of *CaWRKY* after H₂O₂ Treatment



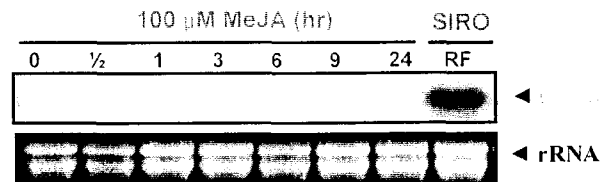
Expression of *CaWRKY* after WD Treatment



Expression of *CaWRKY* after Ethephon Treatment



Expression of *CaWRKY* after MeJA Treatment



결론적으로 고추에서 WRKY transcription factor를 분리하였다. *CaWRKY* 라고 명명하였는데 red fruit에서만 발현이 되어서 이 조절이 fruit maturation에 관여하지 않나 사료된다. *CaWRKY* 유전자는 H₂O₂, SA, WD, pathogen (PMMV)에서 발현되었으며 MeJA과 ethephon에는 발현이 안된다. 본 결과로 WRKY transcription factor가 처음으로 fruit maturation과 plant defense response에 관련이 있다고 밝혔다.

3. *PLCI*: 과피특이 발현 유전자

*PLCI*은 lipocalin이라는 단백질을 coding하는데 식물에서는 잘 알려져 있지 않으나 일반적 기능은 다음과 같다.

Lipocalin

Common molecular-recognition properties:

- ligand binding
- receptor binding
- macromolecular complexation

Functions:

- extracellular transport proteins
- pheromone activity
- olfactory & gustatory proteins
- coloration
- prostaglandin D synthesis
- immune modulation
- cell regulation

```
1 GGCACGAGGCTCCAAAATCTTGAAAACCCCTCATTTGTTAAAAATCTTC
49 AAAAAAGAAATATAGAAAATATTCCAAACCTCATTTTCTCCAAAATCT
97 TGAAAACCCCATTTGTTAAAAGATCTCCAAAATAATATATATATATAT
145 ACAATGGCATCGAAAGTGATGGAGGTGGTAAAGAATCTTGATTTGAAG
    M A S K V M E V V K N L D L K 15
193 AAGTACATGGTAGATGGTATGAAATAGCTTCATTCCATCAAGATTT
K Y I G R W Y E I A S F P S R F 31
241 CAACCAAAAGATGGTGACACACAGAGCTACATACACATTGAACCAA
    Q P K D G A D T R A T Y T L N Q 47
289 GATGGAACATACATGTGTTGAATGAGACATGGTGTATGGGAAAAGG
    D G T I H V L N E T W C N G K R 63
337 GATTATATGSAAGGACTGCTTATAAGGCTGATCCAAAAGTGAATGAG
    D Y I E G T A Y K A D P K S D E 79
385 GCAAAATTGAAGTGAAGTTTTATGTCCACCATCTTGCCCTGTATT
    A K L K V K F Y V P P F L P V I 95
433 CCTGTGTTGGTGATTAITGGGTTTGTATATGATGAGGATTATCAG
P V V G D Y W V L Y I D E D Y Q 111
481 TATGCTTTGATTGGTCAGCCTAGTAGGAGGTATCTATGGATATTATGT
    Y A L I G Q P S R R Y L W I L C 127
529 AGACGACCACATCTTGATGACGAGATTATAACCGCTTGTGAGAAG
    R R P H L D D E I Y N Q L V E K 143
577 GCTAAAGCAGAAGCCTACGATGTGAGTAAGCTTCCCAAGACACCACAA
    G K A E G Y D V S K L R K T P Q 159
625 TCCGATTCGCCCAAGTGAAGATGCCCCCAAGGACGACAAAGGAATA
    D S P P S E D G P K D D K G I 175
673 TGGTGGATCAATCAATCTCTGGAAAATAGGCAAAAGAAAGTAC
    W W I K S I L G K * 185
```

transmembrane region

Lipocalin signature

Amino acid and DNA sequences of *PLCI* full cDNA

Comparison of amino acid sequences of *PLC1*

```

BLC_Cf      ---MRILPVVAAVTAAPLVVACSSPTPPKGVTVVNNFDAKRYLGTWYEIARFDHRRFERG- 56
BLC_Ec      ---NRLLEPLVAARATAAPLVVACSSPTPPKGVTVVNNFDAKRYLGTWYEIARFDHRRFERG- 56
apoD_Ta     -----MAAKKSGSEMGLVGLDVARVYNGRWYELASFPNFFQPRD 39
OMLP_At     -----MTEKK---EMEVVKGILNVERVYNGRWYELASFPNFFQPRD 36
PLC1_Ca     -----MASKV---MEVVKNLDDKKYLGRWYELASFPNFFQPRD 35
apoD_Mn     MVTMLMFLATLAGLFTTAKGQNFHLGKCESPFVQENFDVKKYLGRWYELKIPASFEKG- 59
apoD_Rn     MATMLLLLATLAGLFTTTEGQSFHLGKCESPFVQENFDVKKYLGRWYELKIPASFEKG- 59
apoD_Hs     MVMLLLLSALAGLFGAEEGQAFHLGKCESPFVQENFDVKKYLGRWYELKIPASFEKG- 59

BLC_Cf      LDKVTATYSLRDDG-GINVINIKGYNEDREMOKTEGKAYFTGDES-TAALKVSEFG---- 110
BLC_Ec      LEKVTATYSLRDDG-GLNVINKGYNEDRMWQOSEGKAYFTGAPT-PAALKVSEFG---- 110
apoD_Ta     GRDTRATYELMEDGATVHVLNETWS--NGKRDFIEGTAYKADPASEEAKLKVKEYVPEPL 97
OMLP_At     GVDTRATYTLNFDG-TIHVLNETWS--NGKRDFIEGSAKADPKSDEAKLKVKEYVPEPL 93
PLC1_Ca     GADTRATYTLNFDG-TIHVLNETWC--NGKRDFIEGTAYKADPKSDEAKLKVKEYVPEPL 92
apoD_Mn     -NCIQANYSLMENG-NIEVLNKELEP-DGTMDQVKGAEKQS-NVSEPAKLEVQFFLMPF 115
apoD_Rn     -NCIQANYSLMENG-NIKVLNKELEP-DGTMDQVKGAEKQS-NMSEPAKLEVQFFLMPF 115
apoD_Hs     -PCIQANYSLMENG-RIKVLNQELEP-DGTMDQVKGAEKQS-NLSEPAKLEVQFFLMPF 115

BLC_Cf      ---PFYGGYVIALDPEYRHALVCGPDRDYLWILSRTPETISDEMKGQMLAIATREGFEVN 167
BLC_Ec      ---PFYGGYVIALDPEYRHALVCGPDRDYLWILSRTPETISDEVKQEMLAIVATREGFEVN 167
apoD_Ta     PIIEVYGDYVWLYVDDYQYALVGEPRRSYLWILCRKTHIEEVVHQLLEKAKEGGYDVA 157
OMLP_At     PIIEVYGDYVWLYVDDYQYALVGEPRRSYLWILSRTAQHEEETVKQVLEKAVEEGYDIS 153
PLC1_Ca     PVIEVYGDYVWLYVDDYQYALVGEPRRSYLWILCRPHLDDETVHQLVEKKAEGYDVS 152
apoD_Mn     APYWLATDYENYALVYSCTTFFPFPHVYVWILGRNPLYLPEETITYLKDIILTSNGIDIE 175
apoD_Rn     APYWLATDYENYALVYSCTTFFPFPHVYVWILGRNPLYLPEETITYLKDIILTSNDIDIA 175
apoD_Hs     APYWLATDYENYALVYSCTTCLIQLEHVDFAWILGRNPNLPEETVDSLKHIILTSNNIEVK 175

BLC_Cf      KLIRVYQFGA----- 177
BLC_Ec      KFINVYQFGS----- 177
apoD_Ta     KLHKTEQSDPPESDAAPTOSKGTWVWFKLAK 190
OMLP_At     KLHKTEQSDTPPESENTAFEDSKGVWVWFKLAK 186
PLC1_Ca     KLHKTEQSDSPF-SEDFEKDKGILWVWFKLAK 184
apoD_Mn     KHTTTEQANCPPEL----- 189
apoD_Rn     KHTTTEQANCPPEL----- 189
apoD_Hs     KHTVTEQVHCPRLS----- 189

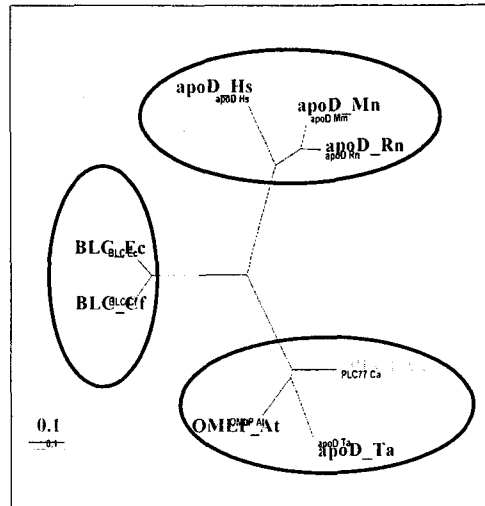
```

Comparison of amino acid sequence identities between *PLC1* and other lipocalin proteins.

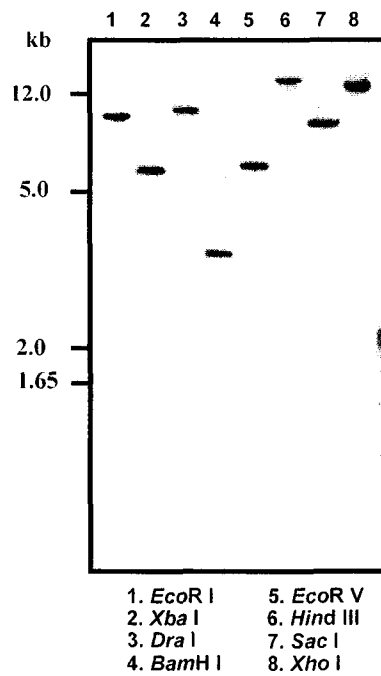
	100	75	70	33	29	23	25	25
OMLP_At		100	74	29	29	21	24	23
apoD_Ta			100	26	29	23	23	23
BLC_Cf				100	88	27	28	29
BLC_Ec					100	27	31	30
apoD_Hs						100	71	71
apoD_Mn							100	88
apoD_Rn								100

OMLP_At : *Arabidopsis thaliana* lipocalin
 apoD_Ta : wheat TaTIL
 BLC_Cf : *Citrobacter freundii* lipocalin
 BLC_Ec : *Escherichia coli* lipocalin
 apoD_Hs : *Homo sapiens* lipocalin
 apoD_Mn : *Mus musculus* lipocalin
 apoD_Rn : *Rattus norvegicus* lipocalin

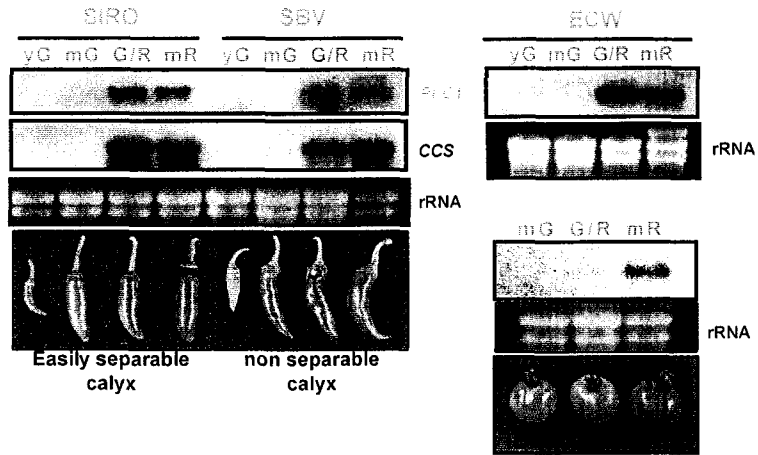
Phylogenic analysis of PLC1



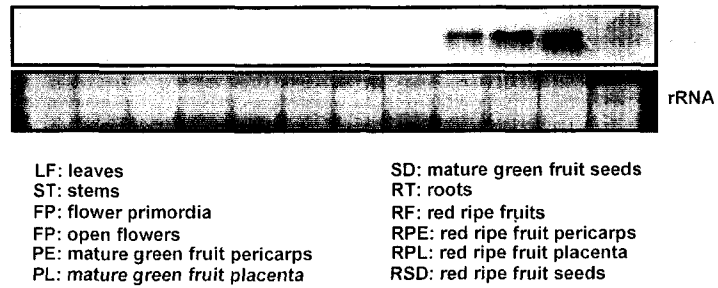
Southern blot analysis of *PLC1*. A single copy of *PLC1* gene is present in pepper genome.



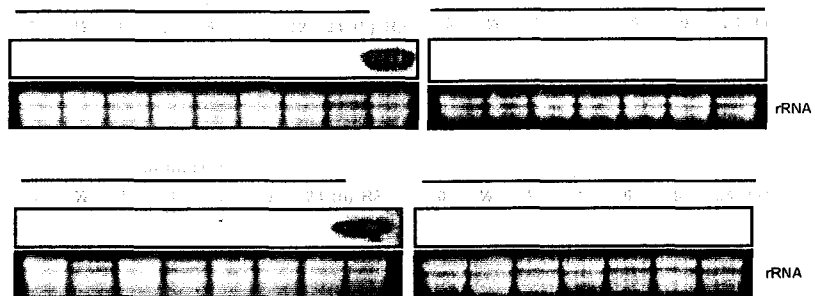
Expression pattern of *PLCI* during development. *PLCI* 유전자는 과실이 성숙될 때 발현한다.



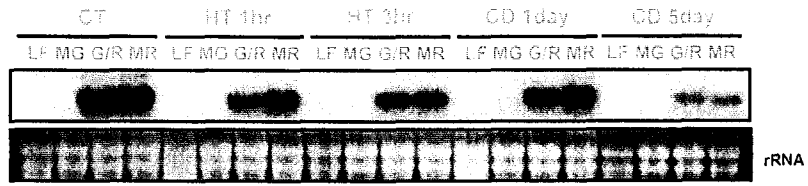
Tissue specific expression of *PLCI*. *PLCI*은 반드시 과실에서만, 그리고 성숙할 때 발현한다.



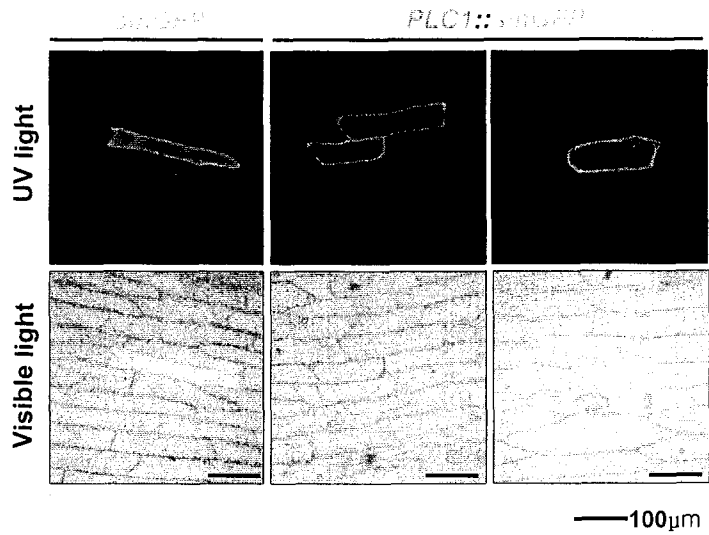
Induction profile of *PLCI*



Expression of *PLC1* after heat and cold treatment



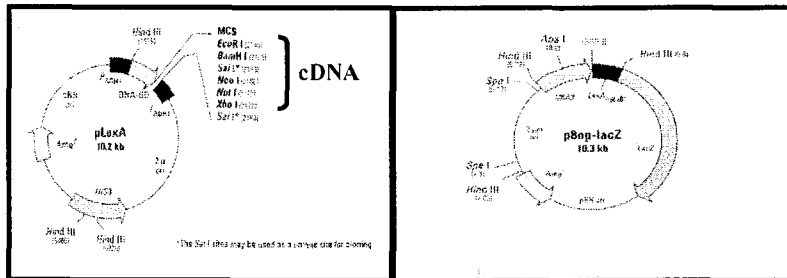
Subcellular localization of *PLC1*



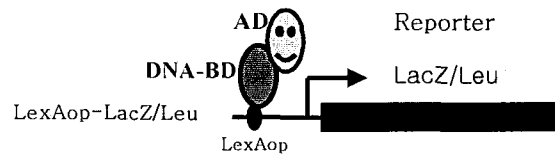
결론적으로 *PLC1*은 pepper에서 한 copy만 존재하면서 lipocalin 이라는 단백질은 형성한다. 현재 *PLC1*의 기능은 모르지만 ripening fruit에서 그리고 세포막에서만 발현함으로서 과일의 성숙단계에서 어떤 신호전달체를 인지하는 단백질이 아닌가 사료된다. 이 유전자의 promoter를 이용하여 고추과실의 변형을 유도하는 응용적 측면이 매우 기대된다.

제 4 절: pLexA DNA binding fusion library 구축

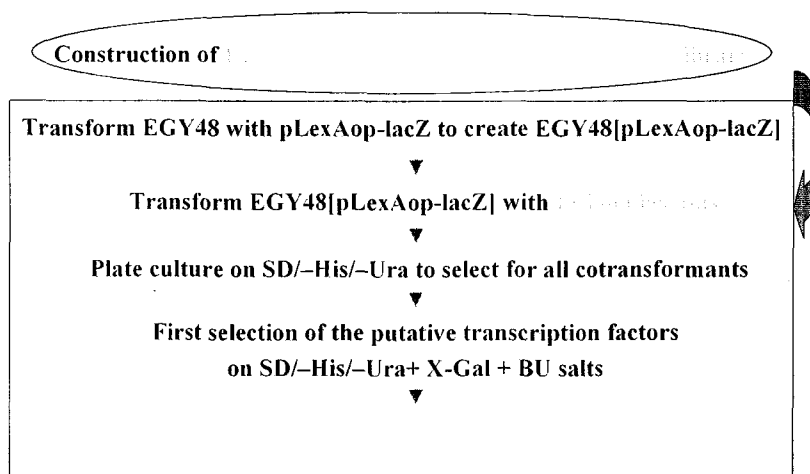
Transcriptional activation activity를 갖는 전사조절인자의 cloning하는 방법의 모식도. pLexA DNA-BD::cDNA library를 확보하여 *E.coli*에 transformation 하였고 약 4000개 정도의 colony를 획득하여 pLexA clone을 pool로 구축하였다.



cDNA library: PMMV-induced, *Phytophthora*-induced

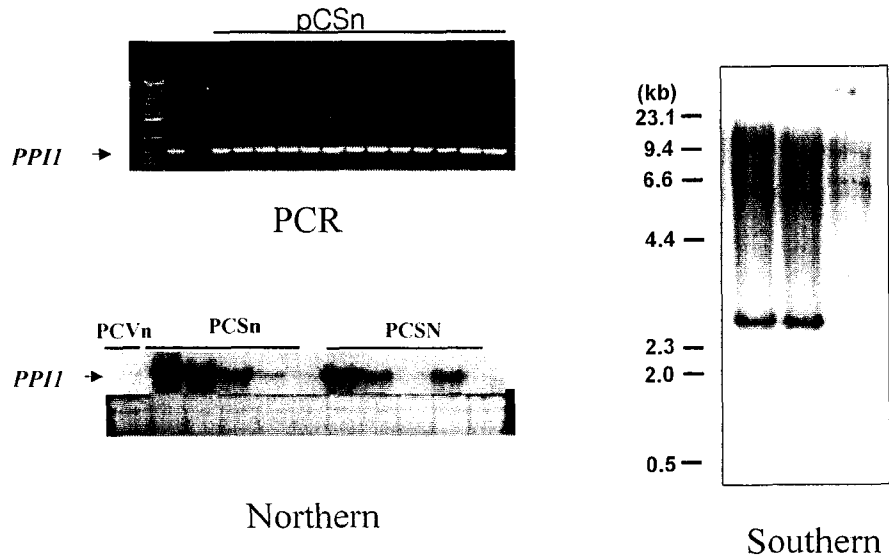


전사조절인자를 대량으로 cloning하는 방법 순서. Yeast one-hybrid system을 이용한 특정 *cis*-element에 결합하는 DNA-binding protein 유전자를 분리확보하고자 하였다. 실험은 binding protein 유전자를 분리하고 있는 과정까지 진행되었다.



제 5 절: 식물방어 관련 전사조절유전자의 고추에로의 도입 및 형질전환체 검정

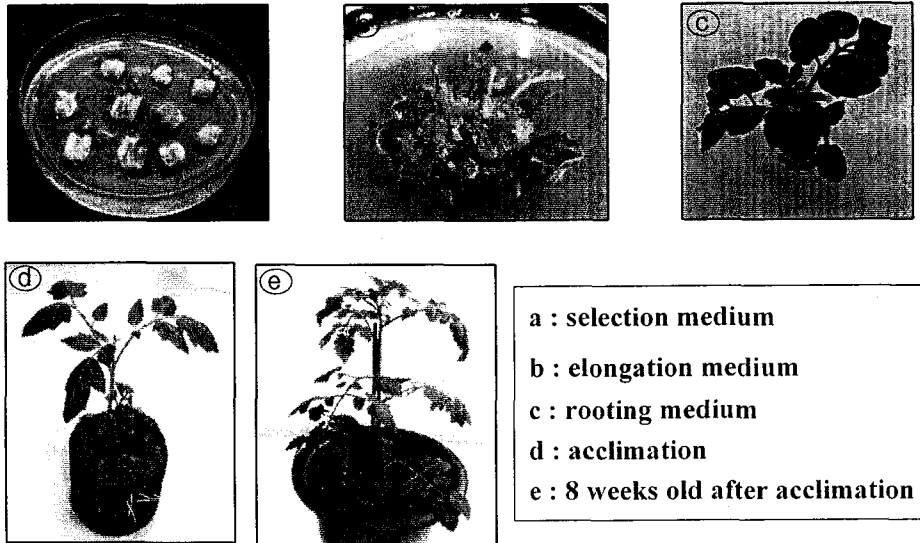
1. PPII transcription factor의 담배 형질전환 및 저항성검정



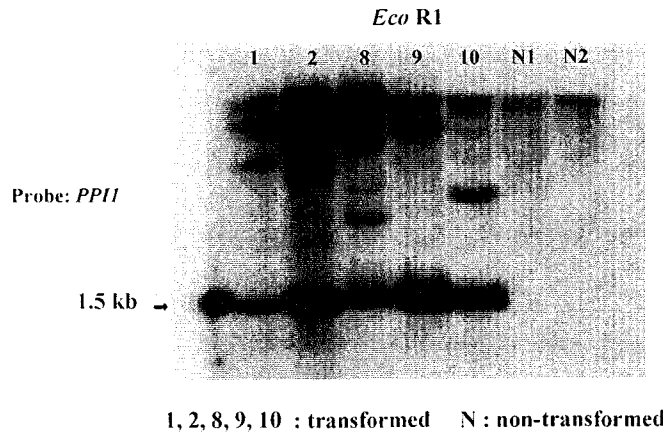
결론적으로 T0 담배 약 20개체를 확보하여 각각에서 T1 식물체를 확보한 다음 약 1400 T1 종자를 파종하여 저항성검정을 조사하였다. 약 700주에 PMMV (P0)를 접종하였고 또 다른 700주를 P. tabasi를 접종하였다. 접종 결과는 모든 T1 개체가 다 이병 되었다. 이 현상은 고추의 *PPII* 유전자가 담배에서 병저항성 관련 신호전달체계에서는 잘 통용되지 않는 것으로 사료된다.

2. PPI1 transcription factor의 토마토 형질전환 및 저항성검정

형질전환된 토마토의 발달단계



형질전환체의 Southern analysis



토마토의 *PPII* 형질전환체 T1 세대 중에서 약 500여주를 J3, TMV, 풋마름병으로 집중 test하였으나 거의 이병으로 나타났다. 따라서 고추의 PPI1 transcription factor는 담배에서처럼 토마토에서도 병저항성 관련 신호전달체계에서는 잘 통용되지 않는 것으로 사료된다.

3. 고추 inbred line의 재분화 효율

농우바이오의 상용 고추 inbred line들의 재분화율을 screening 하였다. 이들중에서 가장 재분화율이 좋은 P915를 비롯하여 P409, P410 등을 형질전환하였다.

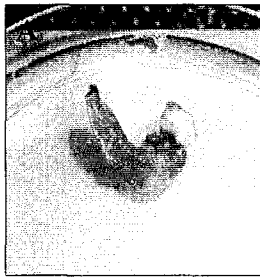
Shoot formation rates of pepper inbred lines.

<u>Line</u>	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>Line</u>	<u>C</u>	<u>H</u>
P915	95	70	P2404	60	30
P409	85	45	S800	58	16
S1622	85	4	P1557	55	30
P410	81	34	S928	54	0
P1744	80	45	P1947	50	20
P101	80	30	P0564	40	20
S841	77	59	P60	40	28
P2377	75	30	S849	38	18
P49	75	20	S48	32	14
P784	70	40	S885	27	19
Ph240	70	45	S267	20	10
P318	65	25	S788	12	0
P20123	65	22	P50	10	0
P319	60	30	P53	10	0
P2403	60	30	P57	10	0

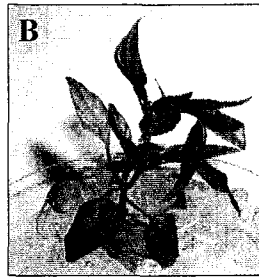
(%)

4. PPI1 transcription factor의 고추형질전환체 확보

고추형질전환의 성공비결은 shoot을 selection 하는데 있어서 direct shoot은 버리고 반드시 callus에서 나온 shoot을 screening해야한다는 것이다. 이는 처음으로 밝혀진 것으로 학문적 가치가 매우 높다.



A: callus induction

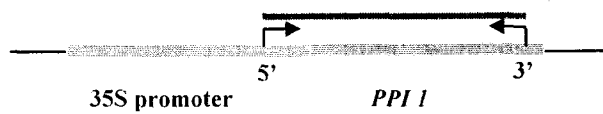
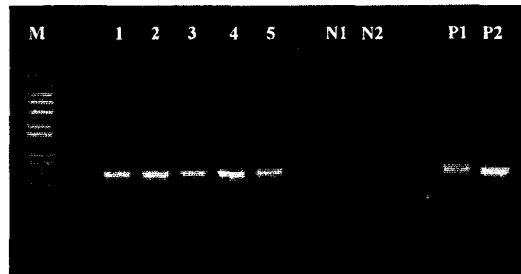


B: on root elongation media



C: one month-old stage after acclimation

고추 형질전환체의 PCR 분석



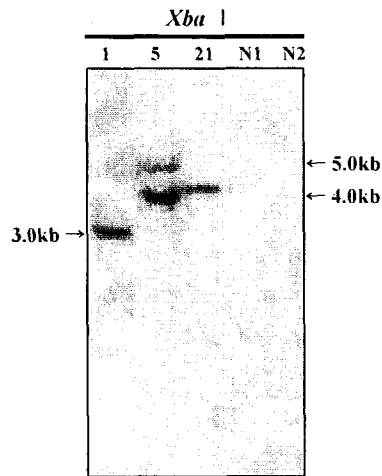
M : Marker

N1-2 : Non-transformed

1- 5 : Transformed

P1-2 : Bacterial cells harboring *PPI 1*

Southern blot analysis of *PPII*



고추형질전환 protocol

Line	P915 or P409	Duration
Germination	Germination condition under light or night did not influence the transformation (1/2MS + sucrose 1.5% + agar 0.8%, pH5.8)	10 days
Explant	Sample source from either cotyledon or hypocotyl did not make a big difference for inducing transformation.	
Pre-culture	-basic media (MS + sucrose 3.0% + agar 0.8%, pH 5.72) -zeatin 2.0 + NAA 0.05 mg/l or zeatin 2.0 + IAA 0.1 mg/l	2 - 36 hours
cDNA insert	<i>PPII</i> or <i>TMV-CP</i>	
<i>Agrobacterium</i>	EHA105 or LBA4404	
Inoculation	-basic media -addition of acetosyringone or not did not matter. -OD (600): 0.3 - 0.5	10 - 20 min
Co-culture	-basic media -zeatin 2.0 + NAA 0.05 mg/l -washing buffer (1/2MS + sucrose 1.5%, pH5.8 with cefotaxime 500 - 800mg/l + lilaciline 500 - 800mg/l)	38 - 96 hours in dark
Selection	-basic media -kanamycin 80 - 100 mg/l + cefotaxime 300 mg/l with zeatin 2.0 + NAA 0.05 mg/l or zeatin 2.0 + IAA 0.1 mg/l	-callus formation: 4 - 5 weeks -callus development: 2 - 3 weeks
Shooting	-basic media -kanamycin 60 - 100 mg/l + cefotaxime 300 mg/l with zeatin 2.0 + NAA 0.01 mg/l or zeatin 2.0 + IAA 0.01 mg/l	-shoot formation: 1 - 2 weeks -shoot development: 6 - 8 weeks
Rooting	-basic media -kanamycin 20 - 30 mg/l + cefotaxime 200 mg/l without hormone	-root formation: 4 - 5 weeks -10 cm height: 2 - 3 weeks

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

연차	연구목표	연구 결과	달성도 (%)
1년차	-PCR select subtraction 기법을 이용한 식물 방어 관련 유전자군의 분리 -식물 생체방어기작 관련 유용유전자 및 전사조절인자군의 발현분석	-총 98점의 non-redundant EST clone 발굴. 약 50%는 unknown. - <i>PPII</i> clone 발현분석 결과 병저항성 특이 발현 전사조절인자로 관명	100
2년차	-방어기작 관련 유용유전자 및 전사조절인자군의 발현분석 -과실특이 유전자군 분리 -고추 형질전환을 위한 체계확립	- <i>WRKY</i> , <i>PLCI</i> 는 red fruit에서만 발현. -206점의 non-redundant EST clone 발굴. 약 50%는 unknown. -형질전환 조건 확립	100
3년차	-병저항성관련 전사조절유전자의 기능분석을 위한 형질전환체 확립 -병저항성 관련 전사조절유전자의 pool구축 -전사조절유전자의 고추형질전환	- <i>PPII</i> 의 담배, 토마토 형질전환체 확보 및 저항성검정 -전사조절유전자 pool을 위한 library 확보 - <i>PPII</i> 고추형질전환체 확보	100

제 2 절: 기술발전예의 기여도

1. 병에 저항성관련 또한 과실특이 유전자 및 전사조절인자 발굴을 통해서 novel한 유전자를 대량발굴함.
2. 고추형질전환 기법은 재연성이 있기 때문에 형질전환 기술발전예 커다란 기여를 함

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절: 추가연구의 필요성

Novel한 유전자가 많이 있어서 특성분석이 더 필요하다. 2단계 사업에 고추가 제외됨에 따라 이어지는 funding이 없지만 다른 연구팀과 공동으로 연구를 계속할 예정이다.

제 2 절: 기업화 추진방안을 기술

PPI1, *WRKY* 또는 저항성관련 유전자들의 고추형질전환체를 특성분석을 하여 유용성이 있으면 안전성검사를 통하여 품종으로 등록할 계획이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

없음

제 7 장 참고문헌

Cai WQ, Fang RX, Zhang FL, Xhang JC, Chen Z, Wang GL, Mang KQ, Shang HS, Wang X, Li YR (2002) Virus-resistant chili pepper produced by *Agrobacterium* species-mediated transformation. *Transgenic Plants and Crops*, Marcel Dekker Inc., New York, 563-578

Kang MK, Park KS, Choi D (1998) Coordinated expression of defense-related genes by TMV infection or salicylic acid treatment in tobacco. *Mol. Cells* 8: 388-392

Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat. Biotechnol.* 17: 287-291

Kim SH, Kim SR, An CS, Hong YN, Lee KW (2001) Constitutive expression of rice MADS box gene using seed explants in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Mol Cells* 12: 221-226

Kim SJ, Lee DJ, Kim BD, Paek KH (1997) Satellite-RNA-mediated resistance to cucumber mosaic virus in transgenic plants of hot pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Golden Tower). *Plant Cell Rep.* 16: 825-830

Kirsten R, Jaglo-Ottosen SJ, Gilmour DG, Zarka OS, Thomashow MF (1998) Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280: 104-106

Lee SJ, Kim BD, Paek KH (1993) In vitro plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from cotyledon explants of hot pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Golden Tower). *Kor J Plant Tissue Cult* 20: 289-294

Lund ST, Stall RE, Klee HJ (1998) Ethylene regulates the susceptible responses to pathogen infection in tomato. *Plant Cell* 10: 371-382

O'Donnell PJ, Calvert C, Atzorn R, Wasternack C, Leyser HMO, Bowles DJ (1996) Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* 274: 1914-1917

Ohme-Takagi M, Shinshi H (1995) Ethylene-inducible DNA binding proteins

that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* 7: 173-182

Park KS, Suh MC, Cheong JJ, Choi D (1999) Isolation of defense-related genes from *Nicotiana glutinosa* infected by tobacco mosaic virus using a modified differential screening. *Plant Pathol J* 15: 295-301

Penninckx IA, Eggermont K, Terras FR, Thomma BP, DeSamblanx GW, Buchala A, Metraux JP, Manners JM, Broekaert WF (1996) Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* 8: 2309-2323

Shin R, Han JH, Lee GJ, Paek KH (2002-a) The potential use of a viral coat protein gene as a transgene screening marker and multiple virus resistance of pepper plants coexpressing coat proteins of cucumber mosaic virus and tomato mosaic virus. *Transgenic Research* 11: 215-219

Shin R, Park JM, An JM, Paek KH (2002-b) Ectopic expression of *Ts11* in transgenic hot pepper plants enhances host resistance to viral, bacterial, and oomycete pathogens. *MPMI* 15: 983-989

특정연구개발사업 연구결과 활용계획서

사업명	중사업명	21C 프론티어연구개발사업		
	세부사업명	자생식물이용기술개발사업		
과제명	TMV (PMMV) 감염 유도 전사조절유전자 및 병저항성 관련 유전자를 이용한 복합내병성 작물개발에 관한 연구			
연구기관	(주)농우바이오	연구책임자	한지학	
총연구기간	2000 년 09 월 16 일 ~ 2003년 06 월 30 일 (28개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)	정부출연금	민간부담금	합계	
	330,000	90,000	420,000	
기술분야	생명공학			
참여기업				
공동연구기관				
위탁연구기관				
연구결과활용 (해당항목에(√) 표시)	1. 기업화 ()	2. 기술이전()	3. 후속연구추진()	4. 타사업에 활용()
	5. 선행 및 기초연구(√)	6. 기타목적활용 (교육,연구)()	7. 활용중단(미활용)()	8. 기타()
<p>특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.</p> <p>첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부. 2. 기술요약서 1부</p> <p style="text-align: right;">2003년 8월 30일</p> <p style="text-align: right;">연구책임자 : 한 지 학 (인) 연구기관장 : 조 대 현 (직인)</p> <p>과학기술부장관 귀하</p>				

[첨부1]

연구결과 활용계획서

1. 연구목표 및 내용

본 연구의 목표는 매년 고추 피해에 약 15%를 차지하고 있는 TMV와 고추간의 상호작용 시 관여하는 주요 유전자 및 조절유전자를 분리하여 식물생체방어기작을 이끄는 신호전달체계를 확립하고 이들에 의한 식물방어 관련 유전자의 발현 조절기작을 이해하고자 하는 것이다. 병저항성에 관련하는 전사조절유전자는 식물체에 도입하여 TMV 뿐만 아니라 다양한 병원체에 대한 저항성을 검정하여 복합내병성 작물을 개발하고자 하였다.

- 바이러스 저항성 관련 주요 유전자 및 전사조절인자의 분리
- 저항성 관련 유전자 및 전사조절인자의 특성분석
- pLexA DNA binding fusion library 구축
- 식물방어 관련 전사조절유전자의 고추에로의 도입 및 형질전환체 검정
- 전사조절인자의 담배, 토마토에 도입후 병 저항검정

2. 연구수행결과 현황

- ▶ PMMV를 처리한후 고추 저항성관련 유전자 및 전사조절인자의 분리 및 특성분석:
 - PMMV induced EST clone 총 98점 확보 (no redundancy)
 - PPI1*: pathogen specific하게 반응하는 전사조절유전자/일반 phytohormone과는 signal pathway가 다름.
 - PPI2*: putative 전사조절 유전자의 특성분석.
 - PHZF*: antibiotic 관련 유전자ml 특성분석.
- ▶ 저항성 관련 전사조절인자 대량발굴시스템구축
 - pLexA DNA-BD:: PMMV induced cDNA library 확보
 - Yeast system을 이용하여 transcription factor 대량발굴 체계 확립
- ▶ 과실특이 유전자 및 전사조절인자의 분리 및 특성분석
 - Red fruit induced EST clone 총206점 확보 (no redundancy)
 - WRKY*: pathogen에 발현하는 전사조절유전자/SA에 dependent 발현, red fruit에만 발현
 - PLCI*: 과피와 태좌부에 특이발현하는 membrane receptor
- ▶ 기능분석을 위한 형질전환체 구축
 - PPI1*: 담배, 토마토, 고추 형질전환체 확보
 - 병리검정: 저항성 개체 발견 못함

가. 특허(실용신안) 등 자료목록

나. 프로그램 등록목록

다. 노하우 내역

라. 발생품 및 시작품 내역

마. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적

학술지 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명	SCI게재여부
MPMI	A novel pathogen-inducible bZIP transcription factor from pepper.	2002. 6	Vol 15: 540-548	미국 식물 병리학회지	미국	O
J of Plant Biotechnology	A New Selection System for Pepper Regeneration by Mannose.	2002.9	Vol 4: 129-134	식물 생명공학회	한국	X
계: 2 건수						

○ 학술회의 발표 실적(필요시 별지사용)

발 표 제 목 (공동참여자)	학회명 (발표장소)	발표일자
Molecular cloning and characterization of pepper mild mottle virus (PMMV)-inducible genes from pepper	Plant Genome (미국콜로라도)	2001년 1월 19일
Characterization of peper cDNA clones differentially expressed during induction of HR by pepper mild mottle virus (PMMV)	ASPB (미국롱아일랜드)	2001년 7월 21일
Characterization of a Novel bZIP DNA-Binding Factor from Pepper	분자생물학회 (서울교육문화회관)	2001년 9월 14일
Characterization of a WRKY cDNA Clone Differentially Expressed During Fruit Development	한독심포지움 (경상대)	2002년 1월 22일
PPII: A Novel Pathogen-Inducible bZIP Transcription Factor from Pepper	Keystone (미국 CA)	2002년 7월
Characterization of a WRKY-type Transcription Factor Differentially Expressed During Pepper Fruit Development	분자생물학회 (서울교육문화회관)	2002년 10월 18일
Development of Transgenic Peppers with TMV coat protein (CP) gene	식물생명공학회 (충남대학교)	2002년 11월 1일
Characterization of <i>PLC77</i> cDNA, Encoding a Novel Lipocalin Protein, Isolated from Pepper	Plant Winter Conference (포항공대)	2003년 1월 20-21일
Characterization of a novel WRKY-type transcription factor associated with fruit maturation and plant defense against pathogens	국제식물분자생물학회 (바셀로나,스페인)	2003년 6월 23-28일
Characterization of <i>PLC1</i> encoding a novel lipocalin protein of pepper	미국 식물생물학회 ASPB (미국하와이)	2003년 7월 26일
총 10 건		

3. 연구성과

기술이전이나 기업화 완료(추진중 포함) 실적dI 현재 없음

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

해당없음

5. 기대효과

해당없음

6. 문제점 및 건의사항(연구성과의 제고를 위한 제도·규정 및 연구관리 등의 개선점을 기재)

[첨부2]

기술 요약서

- 기술의 명칭
- 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호			
과제명			
사업명			
세부사업명			
연구기관		기관유형	
참여기관(기업)			
총연구기간			
총연구비	정부()천원	민간()천원	합계()천원
연구책임자 1	성명		주민번호
	근무기관 부서		E-mail
	직위/직급		전화번호
연구책임자 2	성명		주민번호
	근무기관 부서		E-mail
	직위/직급		전화번호
실무연락책임자	성명		소속/부서
	직위/직급		E-mail
	전화번호		FAX
	주소	(-)	

- 기술의 주요내용

[기술의 개요]

<기술적 특징>

(1)

(2)

(3)

[용도·이용분야]

(1)

(2)

(3)

■ 기술의 분류

■ 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술

[기술개요]

기술명	
개발단계	<input type="checkbox"/> 연구개발 계획 <input type="checkbox"/> 연구개발 중 <input type="checkbox"/> 연구개발 완료
기술개요	

[기술을 도출한 과제현황]

과제관리번호			
과제명			
사업명			
세부사업명			
연구기관		기관유형	
참여기관(기업)			
총연구기간			
총연구비	합계 : ()백만원 - 정부 : ()백만원 민간 : ()백만원		
연구책임자	소속		성명
	전화번호		E-mail
연구개발 주요내용			