



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0127500
(43) 공개일자 2009년12월14일

(51) Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01) *C12N 15/10* (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0053512

(22) 출원일자 2008년06월09일

심사청구일자 2008년06월09일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

전중성

경기 안양시 동안구 평촌동 인덕원 대우 아파트 115동 1004호

박동수

대구광역시 수성구 옥수동 태왕4차 아파트 101동 605호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

전체 청구항 수 : 총 7 항

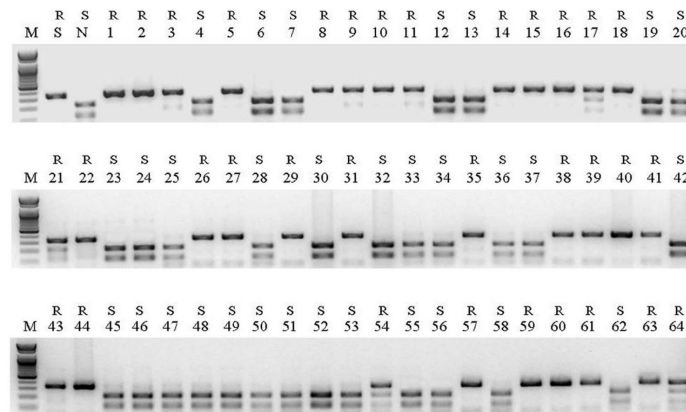
(54) 벼멸구 저항성 벼 품종을 선별하기 위한 마커

(57) 요약

본 발명은 벼멸구 저항성 벼 품종을 선별하기 위한 마커, 상기 마커를 이용하여 벼멸구 저항성 벼 품종을 선별하는 방법, 및 상기 마커를 포함하는 벼멸구 저항성 벼 품종을 선별하기 위한 키트에 관한 것이다.

본 발명의 마커를 이용하면, 벼멸구 저항성 유전자를 갖는 개체나 계통을 쉽고 간편하게 그리고 안정되게 선별할 수 있다.

대표도



(72) 발명자

송민영

경기도 수원시 영통구 영통동 1028-1 105호

박수권

경상남도 진주시 하대1동 308-18번지

이상규

경기도 용인시 기흥구 구갈동 한성아파트 110동 505호

송송이

서울특별시 송파구 방이2동 141 동우 501호

이기환

대구광역시 남구 봉덕동 효성타운 107동 207호

남민희

대구광역시 수성구 노변동 440 노변대백아파트 10 1동 1503호

왕희정

서울특별시 구로구 신도림동 296-99

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 서열 내의 15개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드들로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 및 서열번호 2의 서열 내의 15개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드들로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 프라이머 세트에 이루어진, 벼멸구 저항성 벼 품종을 선별하기 위한 마커.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 1 및 2의 프라이머 세트에 이루어진, 벼멸구 저항성 벼 품종을 선별하기 위한 마커.

청구항 3

벼 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 1 및 2의 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 벼멸구 저항성 벼 품종을 선별하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열은 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질로 표지되어 있는 것인 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 증폭 산물의 검출은 증폭 산물을 제한효소로 절단한 후, 절단 산물을 겔 전기영동함으로 써 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

서열번호 1 및 2의 프라이머 세트; 제한효소; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 벼멸구 저항성 벼 품종을 선별하기 위한 키트.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 제한효소는 SphI이며, 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs, 및 베퍼를 포함하는 것인 키트.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 벼멸구 저항성 벼 품종을 선별하기 위한 마커, 상기 마커를 이용하여 벼멸구 저항성 벼 품종을 선별하는 방법, 및 상기 마커를 포함하는 벼멸구 저항성 벼 품종을 선별하기 위한 키트에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 벼 (*Oryza sativa* L)는 세계 인구의 주요 식량원이다. 매년 벼 수확량의 현저한 감소는 곤충 침입에 의해 야기되며, 벼멸구 (brown planthopper; BPH)가 아시아에서 벼 작물에 대한 가장 파괴적인 해충이다. BPH는 종종 감수성 품종에서 벼 수확량의 60%까지의 심각한 손실을 초래한다.
- <3> 현재의 방제는 주로 화학적 방제를 사용하고 있으나 저항성 품종을 이용하여 그 피해를 줄이기 위해 다수의 저항성 품종을 육성하고 있다. 그러나 저항성 품종을 육성하고자 할 때 저항성 유전자를 보유하고 있는 계통이나 개체를 선별하는 과정이 용이한 것은 아니다.

- <4> 한편, 최근에는 분자 생물학의 발전과 함께 DNA 마커를 이용한 고밀도 분자 유전 지도가 작성되어 DNA 마커로 식물의 어떤 형질을 선발할 수 있게 되었다(gene tagging). 이 때 생물 개체의 특이적 DNA 구조의 다형성(polymorphism)을 이용한 핵산지문법(DNA fingerprinting)이 이용되며, 이 방법은 환경에 의해 거의 영향받지 않으며, DNA의 변이율도 년 1/109 정도로 낮아 매우 안정되게 유전자형을 판별하는데 사용할 수 있다. 그 중 PCR (Polymerase Chain Reaction) 방법은 10~20여 개의 뉴클레오티드로 구성된 작은 핵산 단편(이하 프라이머)을 생물체의 핵산과 결합(annealing)시킨 후, 내열성 DNA 중합 효소(Tag DNA Polymerase)를 첨가하여 합성 반응이 반복적으로 이루어지게 하는 방법이다. 이것은 다른 방법에 비해 소량의 DNA (1~50ng)만을 요구하며, 간편하고 빠르게 결과를 확인할 수 있다는 장점을 갖고 있다.
- <5> 저항성 품종은 BPH 해충과 싸우는 가장 경제적이고 효과적인 방법이다. 따라서, 곤충 저항성을 갖는 벼 품종의 육종은 작물 개선 프로그램에서 최우선 과제이다. 지금까지, 수많은 주요한 BPH 저항성 유전자가 인디카 벼 품종 및 야생 벼 품종에서 동정되었다.
- <6> 인디카 벼 품종은 자포니카 종보다 비교적 높은 수준의 BPH 저항성을 나타내며, 19가지 보고된 저항성 유전자 중에서, 11가지가 인디카 품종에서 동정되었다 (Zhang Q (2007) Proc Natl Acad Sci USA 104:16402-16409). 인디카 BPH 저항성 품종인 *Mudgo* 유래의 처음으로 동정된 우성 저항성 유전자좌인 *Bph1*은 12번 염색체의 long arm 상에 맵핑되었다 (Kim SM, Sohn JK (2005) Mol Cells 20:30-34).
- <7> BPH 저항성을 갖는 것에 관련된 많은 유전자가 다양한 분자적인 방법, 예를 들면, cDNA 어레이, SSH (suppression subtractive hybridization) 및 RDA (representational difference analysis)을 이용하여 벼에서 동정되었다 (Ren et al. (2004) Plant Breeding 123:342-348). 상기 유전자는 몇 가지 기능성 그룹, 예를 들면, 신호전달 경로, 산화 스트레스/아포토시스, 상처 반응 및 병원균 관련 단백질에 속한다. 우리는 이전에 *Bph1*을 갖는 삼강벼와 BPH 감수성 라인인 낙동벼의 역교배로부터 유래된 BPH 저항성 NIL (near isogenic line)인 *SNBC61*에서 배타적으로 발현되는 전사체를 검출하는 효율적인 RDA 방법을 개발하였다 (Park et al. (2007) Theor Appl Genet 115: 537-547). 분리된 유전자는 저항성 라인에서 상향 조절되는 것 같으며, BPH 저항성에 대해 공지된 QTL (quantitative trait loci)과 가까이에 위치한다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <8> 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 저항성 NIL (near isogenic line)인 *SNBC61*에서 차별적으로 발현되는 드문 전사체를 검출할 수 있는 변형된 RDA 방법을 이용하여, 분리된 RDA 클론의 발현 수준을 RT-PCT로 분석하고, 상기 RDA 클론의 염색체 위치를 주요한 BPH 저항성 유전자인 *Bph1*와 비교하였다. 흥미롭게도, 가상적인 리폭시게나아제를 코딩하는 RDA 클론 중의 하나는 *Bph1* 유전자좌에 가까이 맵핑되었으며, 더욱이, CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) 분석은 *Bph1* 마커가 저항성과 공분리된다는 것을 입증함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제 해결수단

- <9> 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 벼멸구 저항성 유전자를 갖는 개체나 계통을 쉽고 간편하게 그리고 안정되게 선별할 수 있는 벼멸구 저항성 벼 품종을 선별하기 위한 마커를 제공한다.
- <10> 본 발명은 또한, 상기 마커를 이용하여 벼멸구 저항성 벼 품종을 선별하는 방법을 제공한다.
- <11> 본 발명은 또한, 상기 마커를 포함하는 벼멸구 저항성 벼 품종을 선별하기 위한 키트를 제공한다.

효 과

- <12> 본 발명의 마커를 이용하면, 벼멸구 저항성 유전자를 갖는 개체나 계통을 쉽고 간편하게 그리고 안정되게 선별할 수 있다. 또한, 상기 분자 마커는 MAS (marker-assisted selection)을 통한 BPH 저항성을 개선하는 벼 육종에 유용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <13> 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 벼멸구 저항성 유전자를 갖는 개체나 계통을 쉽고 간편하게 그리고 안정되게 선별할 수 있는 벼멸구 저항성 벼 품종을 선별하기 위한 마커를 제공한다. 상기 마커는 서열번호 1

의 서열 내의 15개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드들로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 및 서열번호 2의 서열 내의 15개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드들로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 프라이머 세트에 이루어질 수 있다.

- <14> 상기 마커는 바람직하게는, 서열번호 1의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드들로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 및 서열번호 2의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드들로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 프라이머 세트일 수 있다.
- <15> 상기 마커는 가장 바람직하게는 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 세트에 이루어질 수 있다.
- <16> 본 발명에 있어서, "프라이머"는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 상기 프라이머의 길이 및 서열은 연장 산물의 합성을 시작하도록 허용해야 한다. 프라이머의 구체적인 길이 및 서열은 요구되는 DNA 또는 RNA 표적의 복잡도(complexity)뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 것이다.
- <17> 본 발명에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)을 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)을 포함할 수 있다.
- <18> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- <19> 벼 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- <20> 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 1 및 2의 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- <21> 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 벼멸구 저항성 벼 품종을 선별하는 방법을 제공한다.
- <22> 본 발명의 방법은 벼 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계를 포함한다. 상기 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, wizard prep 키트(Promega 사)를 이용할 수 있다. 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 서열번호 1 및 2의 프라이머 세트를 프라이머로 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다. 표적 핵산을 증폭하는 방법은 중합효소연쇄반응(PCR), 리가아제 연쇄반응(ligase chain reaction), 핵산 서열 기재 증폭(nucleic acid sequence-based amplification), 전사 기재 증폭 시스템(transcription-based amplification system), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 또는 Q β 복제효소(replicase)를 통한 증폭 또는 당업계에 알려진 핵산 분자를 증폭하기 위한 임의의 기타 적당한 방법이 있다. 이 중에서, PCR이란 중합효소를 이용하여 표적 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍으로부터 표적 핵산을 증폭하는 방법이다. 이러한 PCR 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 상업적으로 이용가능한 키트를 이용할 수도 있다.
- <23> 본 발명의 방법에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열은 검출가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 일 구현예에서, 상기 표지 물질은 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 표지 물질은 Cy-5 또는 Cy-3이다. 표적 서열의 증폭시 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 또한, 방사성 물질을 이용한 표지는 PCR 수행시 ³²P 또는 ³⁵S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하면 증폭 산물이 합성되면서 방사성이 증폭 산물에 혼입되어 증폭 산물이 방사성으로 표지될 수 있다. 표적 서열을 증폭하기 위해 이용된 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 상기에 기재된 바와 같다.
- <24> 본 발명의 방법은 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함한다. 상기 증폭 산물의 검출은 증폭 산물을 제한효소로 절단한 후, 절단 산물을 겔 전기영동함으로써 수행될 수 있다. 겔 전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아가로스 겔 전기영동 또는 아크릴아미드 겔 전기영동을 이용할 수 있다. 상기 제한효소는 SphI일 수 있다.
- <25> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- <26> 서열번호 1 및 2의 프라이머 세트; 제한효소; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 벼멸구 저항성 벼 품종을 선별하기 위한 키트를 제공한다.

- <27> 상기 키트에서, 제한효소는 SphI이며, 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs, 및 버퍼를 포함할 수 있다. 본 발명의 프라이머 세트는 CAPS 마커이므로, 프라이머 세트 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약 외에 제한효소를 필요로 한다. 즉, CAPS 마커는 증폭 반응을 수행한 후에, 해당하는 제한효소로 절단해야 증폭 산물을 구별할 수 있기 때문이다. 또한, 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 설명서를 추가로 포함할 수 있다.
- <28> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- <29> **실시예**
- <30> **재료 및 방법**
- <31> **식물 재료**
- <32> *Bph1* 유전자좌의 공여자로서 삼강벼 및 반복친 라인 (recurrent parental line)으로서 낙동벼 사이의 5회 역교 배로부터 유래된 64가지 *SNBC* NILs 을 이용하였다 (Park et al. (2007) Theor Appl Genet 115: 537-547). 이 중에서, *SNBC61* 을 RDA 실험에 주로 이용하였는데, 이는 그것이 RDA 실험에 대한 모든 생물분석에서 BPH 바이오 타입 1에 대한 높은 수준의 저항성을 유지했기 때문이다 (Lee et al. (2005) Korean J Breed 37:295-299).
- <33> **RDA 실험**
- <34> BPH 곤충에 대한 노출 후에 *SNBC61* 및 낙동벼로부터 추출된 총 RNA를 이용한 이전의 RDA 실험으로부터의 difference product을 테스터(tester)로서 이용하였다. 드라이버(driver)로서, 상기 실험으로부터 동정된 모든 8개 *OsBphi* (*Oryza sativa* BPH-inducible) 클론을 이용하였다 (도 1). 상기 변형된 'double-RDA' 실험을 이전에 기재된 절차에 따라 수행하였다 (Park et al. (2007) Theor Appl Genet 115: 537-547).
- <35> **DNA 서열 분석**
- <36> 차별적으로 발현된 산물을 QIAEX II 키트 (Qiagen, Valencia, CA;)를 이용하여 정제하고, 시퀀싱을 위해 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA;)를 이용하여 서브클로닝하였다. RDA 서열을 NCBI 데이터베이스 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 기탁하였다. *OsBphi* 클론의 서열 유사성을 벼 게놈 서열에 대해 query로서 RDA 서열을 이용한 BLASTN 서치를 수행함으로써 분석하였다 (Yu et al. (2002) Science 296:79-92; International 벼 Genome Sequencing Project 2005). *OsBphi* 클론에 대한 유전자좌명 및 전장 cDNA를 TIGR (<http://tigrblast.tigr.org/euk-blast/index.cgi?project=osa1>) 및 NCBI 데이터베이스에 대해 BLASTN 서치에 의해 동정하였다. *OsBphi* 유전자의 가상적인 기능을 이의 유도된 아미노산 서열을 이용한 BLASTP 서치를 수행함으로써 예측하였다.
- <37> ***OsBphi* 유전자의 염색체 위치**
- <38> *OsBphi* 유전자를 GRAMENE 데이터베이스 (<http://www.gramene.org>)에 대해 RDA 서열을 이용한 BLASTN 서치를 수행함으로써 벼 염색체 상에 위치화하였다. 관련된 마커에 대한 서열 정보를 NCBI 및 GRAMENE 데이터베이스로부터 얻었다.
- <39>
- <40> **DNA 겔-블롯 분석**
- <41> 낙동벼, 삼강벼 및 *SNBC61* 유래의 대략 3 μ g의 게놈 DNA를 *EcoRI* 또는 *HindIII*로 절단한 후, 혼성화 실험을 수행하였다. 혼성화를 높은 스트린전시 조건하에 표준 절차에 따라 [α -³²P] dCTP-표지된 *OsBphi* RDA-특이적 프로브를 이용하여 수행하였다 (Yi et al. (2004) Theor Appl Genet 109:978-985). 혼성화 시그널을 phosphor imager (Typhoon, Amersham Biosciences)를 이용하여 기록하였다.
- <42> **반정량적 RT-PCR 분석**
- <43> 반정량적 RT-PCR 분석을 위한 제1가닥 cDNA를 이전에 기재된 절차에 따라 제조하였다 (Cho et al. (2006) Planta 224:598-611). 총 RNA를 BPH 공급 후 2 내지 8일 기간 동안 낙동벼 및 *SNBC61*의 충분히 전개된 제3 또는 제4 잎의 줄기로부터 분리하였다. 각 *OsBphi* 유전자에 대한 PCR 산물을 유전자 특이적인 프라이머 (표 1)를 이용하여 증폭하였다.

표 1. RT-PCR 분석에 이용된 프라이머

클론	정방향 프라이머(5'→3')	역방향 프라이머(5'→3')
<i>OsBphi237</i>	CAGAGAACTATTTTGGCTCTGTGC(서열번호 3)	ACTGCAAGCGGGCACATCAG(서열번호 4)
<i>OsBphi252</i>	ATCTCCGCGATACTCATCATCTC(서열번호 5)	GTGCTACTAGACACGTTCCCATCG(서열번호 6)
<i>OsBphi262</i>	GGAGACAAATCAACCGAATACT(서열번호 7)	GTGTCTCTCCATCATGTGAC(서열번호 8)
<i>Ubiquitin5</i>	GACTACAACATCCAGAAGGAGTC(서열번호 9)	TCATCTAATAACCGATTTCGATTTC(서열번호 10)

Ubiquitin5 (*Ubi5*) 유전자를 유전자 발현 프로파일링에 대한 내부 표준으로서 이용하였다 (Kim et al. (2003) Plant Mol Biol 50:1203-1213). PCR 반응을 이전에 기재된 바와 같이 수행하였다 (Park et al. (2007) Theor Appl Genet 115: 537-547). PCR 사이클 수는 하기와 같다: *OsBphi237* (28 사이클); *OsBphi252* (29 사이클); *OsBphi262* (30 사이클). 실험을 3회 이상 반복하였다.

NIL의 표현형 분석

64가지 *SNBC* NIL의 BPH 저항성을 측정하기 위해, 3주령 유묘를 이전에 기재한 바와 같이 BPH 바이오타입 1로 침입하였다 (Park et al. (2007) Theor Appl Genet 115: 537-547). 곤충의 제2 또는 제3령 유충을 공급(feeding) 실험 동안 2일에 걸쳐 유묘당 대략 10마리의 곤충의 밀도로 케이지에서 유지하였다.

CAPS 분석

벼 게놈 DNA를 간단한 미니프렙 방법에 의해 어린 잎으로부터 분리하였다 (Chen DH, Ronald PC (1999) Plant Mol Biol Rep 17:53-57). CAPS 분석을 주형으로서 50 ng의 게놈 DNA를 이용하여 30 μ l의 부피 (100 pM의 각 프라이머, 200 μ M 각각의 dNTPs, 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100 및 0.5 U Taq 중합효소)에서 수행하였다. *Sph*I 절단된 PCR 산물을 이어서 1.5% 아가로스 겔 상에서 크기 분리하였다. PCR 프라이머를 *OsBphi252* CAPS 마커의 분석에 이용하였다: 5'-CCGTCAGGGTGCTACTAGA-3'(서열번호 1) 및 5'-GATACCATCTCCATCACG-3'(서열번호 2).

실시예 1: BPH 반응성 유전자의 동정

우리는 이전에 테스트로서 BPH-공급된 *SNBC61* 및 드라이버로서 낙동벼의 cDNA를 이용한 RDA에 의해 저항성 NIL *SNBC61*에서 특이적으로 상향조절된 8가지 *OsBphi* 유전자를 분리하였다 (Park et al. (2007) Theor Appl Genet 115: 537-547). 여기에서, 우리는 변형된 'double-RDA' 방법을 이용하여 BPH 반응성 유전자 중에서 부가적인 드문(rare) 전사체를 분리하려고 시도하였다. 이전의 RDA로부터의 총 최종 차이 산물을 테스트로서 재이용하고, 모든 분리된 *OsBphi* 클론을 드라이버로서 이용하였다 (도 1). 우리는 총 78개 RDA 클론을 분리하였으며, 이를 이어서 DNA 시퀀싱에 의해 분석하였다. 5개의 클론을 제외하고, 상기 RDA는 이의 서열이 하기 등록 번호로 GenBank 데이터베이스에 등록된 3가지 unique 유전자와 동일하였다: *OsBphi237*에 대해 EU513006, *OsBphi252*에 대해 EU513009 및 *OsBphi262*에 대해 EU513010. 나머지 5개 클론은 이전에 동정된 *OsBphi* 클론 중의 하나와 동일하였다 (Park et al. (2007) Theor Appl Genet 115: 537-547).

실시예 2: *OsBphi* 유전자의 서열 유사성 분석

TIGR 및 NCBI 데이터베이스에 대해 query로서 RDA 서열을 이용한 BLAST 서치를 이용하여, 2개의 *OsBphi* 유전자인 *OsBphi252* 및 *OsBphi262*의 유전자좌명, 전장 cDNA 및 가상적인 기능을 동정하였다 (표 2).

표 2. *OsBphi* 유전자의 서열 유사성 및 가상적인 기능

유전자	TIGR 유전자좌	전장 cDNA	동일성	E 값	가상적인 기능
<i>OsBphi237</i>	-	-	-	-	-
<i>OsBphi252</i>	Os12g37260	AJ270938	98%	1e-99	리폭시게나아제
<i>OsBphi262</i>	Os05g33400	AK070554	97%	1e-124	미지

OsBphi237 은 벼 또는 기타 생물체 유래의 임의의 공지된 DNA 서열과 부합하지 않았는데 (표 2), 이는 상기 RDA 서열이 BPH 저항성 *SNBC61* 및 삼강벼 게놈에 unique 하다는 것을 제시한다. 상기 분석은 *OsBphi252* 및 *OsBphi262* 가 각각 12번 및 5번 염색체 상에 위치한다는 것을 보여주었다. 2가지 *OsBphi* 클론은 공지된 전장

cDNA와 현저한 상동성을 나타내었다. *OsBphi252* 는 벼 엽록체 리폭시게나아제 유전자인 *RCI-1* (rice chemically induced cDNA1)과 유사한 단백질을 코딩하는 것 같다 (Schaffrath et al. (2000) Eur J Biochem 267: 5935-5942). *OsBphi262* 는 알려지지 않은 기능을 갖는 단백질을 코딩하였다. 대조적으로, *OsBphi237* RDA 서열은 공지된 단백질과 임의의 유사성을 보여주지 않았다.

<58> **실시예 3: *OsBphi* 유전자의 염색체 위치**

<59> 상기 *OsBphi252* 및 *OsBphi262* 유전자에 대한 정확한 염색체 위치를 결정하기 위해, *OsBphi* 서열을 인디카 93-11 (Yu et al. (2002) Science 296:79-92) 및 자포니카 니폰바레 (*japonica Nipponbare*) (International Rice Genome Sequencing Project 2005)의 벼 게놈 서열과 정렬하였다. 상기 분석은 *OsBphi252* 및 *OsBphi262*의 서열이 인디카 변종의 것과 높은 서열 유사성을 나타내며, 자포니카 변종의 것과 더 낮은 유사성을 나타낸다는 것을 보여주었다 (표 3).

<60> 표 3. *OsBphi* 유전자와 인디카 및 자포니카 벼 게놈의 서열 유사성

<61>

유전자	인디카			자포니카		
	Accession	E 값	염색체	Accession	E 값	염색체
<i>OsBphi237</i>	-	-	-	-	-	-
<i>OsBphi252</i>	AAAA02034988	6e-102	12	NC_008405.1	1e-98	12
<i>OsBphi262</i>	AAAA02017145	5e-134	5	NC_008398.1	7e-122	5

<62> 이는 인디카 벼 품종이 자포니카 종보다 비교적 높은 수준의 BPH 저항성을 나타낸다는 사실과 일치한다. 상기 결과는 또한 분리된 *OsBphi* 유전자가 *SNBC61*의 BPH 저항성 공여자인 인디카 부모 품종 삼강벼 기원일 가능성을 제시한다.

<63> *OsBphi* 유전자의 염색체 위치를 결정하고, NIL *SNBC61* 에서 저항성 공여자 부모 삼강벼의 유전자 이입된 (introgressed) SSR 마커의 이전에 동정된 위치와 비교하였다 (Park et al. (2007) Theor Appl Genet 115: 537-547). *OsBphi252* 및 *OsBphi262*는 유전자 이입된 SSR 마커 또는 이전에 보고된 *OsBphi* 유전자와 가까이 위치하는 것으로 밝혀졌으며 (도 2), 이는 우리의 RDA 방법의 효율성을 지지한다. *OsBphi262* 는 5번 염색체 상의 유전자 이입된 SSR 마커인 RM163 및 RM459 및 이전에 보고된 *OsBphi66* 근처에 맵핑되었다. *OsBphi252*는 12번 염색체 상의 RM28493를 포함하는 4개의 유전자 이입된 SSR 마커와 가까이 위치하는 것 같다. 흥미롭게도, 우리는 *OsBphi252*는 BPH 주요한 저항성 유전자좌인 *Bph1*에 가까이 위치한다는 것을 밝혔다.

<64> **실시예 4: *OsBphi* 게놈 영역의 분자 규명**

<65> BPH 저항성 공여자인 삼강벼, BPH 감수성 변종인 낙동벼 및 NIL *SNBC61*에서 *OsBphi* 유전자의 게놈 구조를 조사하였다. 게놈 DNA 겔-블롯 실험은 *SNBC61*에서 모든 *OsBphi* 유전자의 게놈 영역이 삼강벼의 것과 동일하였으나, BPH 감수성 변종인 낙동벼의 것과는 상이하다는 것을 보여주었다 (도 3). *OsBphi237* 는 *SNBC61* 및 삼강벼의 BPH 저항성 게놈과 동일한 우성 혼성화 밴드를 나타내었다. 나머지 2개의 유전자인 *OsBphi252* 및 *OsBphi262* 는 저항성 (*SNBC61* 및 삼강벼) 및 감수성 (낙동벼) 품종 사이에 다형성 밴드를 나타낸 반면, 2가지 저항성 라인에서는 단형성 (monomorphic)이었다. 상기 결과는 *SNBC61*에서 *OsBphi* 게놈 영역이 저항성 부모 라인인 삼강벼의 대립유전자에 해당한다는 것을 제시한다.

<66> **실시예 5: BPH 침입에 반응하여 *OsBphi* 유전자의 발현 분석**

<67> BPH 공격 동안 저항성 *SNBC61* 및 감수성 낙동벼 품종에서 *OsBphi* 유전자의 발현을 조사하였다 (도 4). RT-PCR 실험은 *OsBphi237* 발현은 BPH 저항성 *SNBC61* 라인에서 상향 조절된다는 것을 보여주었다. 대조적으로, *OsBphi237* 전사체는 감수성 낙동벼에서는 검출되지 않았는데, 이는 유전자 특이적 프로브가 DNA 겔-블롯 분석에서 혼성화 밴드를 나타내지 않는다는 것을 보여주는 결과와 일치한다 (도 3a). *OsBphi252*는 BPH 공급 후 1일에 매우 상향 조절되는 것 같으며, *SNBC61*에서 BPH 공급 동안 높은 발현을 유지하였다 (도 4). 대조적으로, 낙동벼에서, *OsBphi252* 발현은 BPH 공급 후 1 내지 2일에 최대 수준에 도달한 후, 감소하였다. 또한, *OsBphi262* 유전자 발현은 *SNBC61*에서는 매우 상향 조절되었으나, 낙동벼에서는 약하게 상향 조절되었다.

<68> **실시예 6: *SNBC NIL*의 CAPS 분석**

<69> 공지된 *Bph1* 유전자와 근처의 *OsBphi252* 의 염색체 위치는 *OsBphi* 유전자가 주요 BPH 저항성 유전자와 연관되는

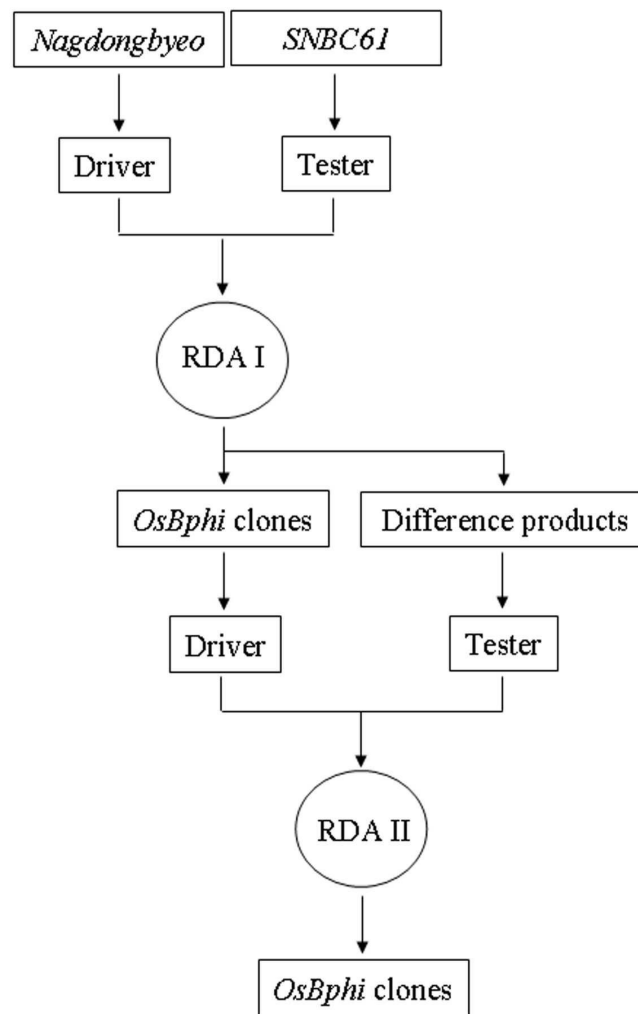
지를 조사하게 하였다. 삼강벼 및 낙동벼 유래의 64가지 BC₅F₅ 역교배시킨 순계 SNBC 를 분석하였다. 모든 NIL 의 저항성 표현형을 BPH 침입 동안 먼저 결정하였다. 그 결과, SNBC NIL은 33가지 저항성 및 31가지 감수성 라인으로서 분류되었다 (도 5). 큰 집단의 분석에서 효율적으로 이용될 수 있는 *OsBphi252* 에 대한 CAPS 마커는 유전자 특이적 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 개발하였다. 삼강벼 및 낙동벼 유래의 PCR 산물의 서열 분석은 2가지 품종 사이의 *SphI* 제한효소 자리를 포함하는 서열에서 변이를 나타내었다 (데이터 미제시). 이어서, *SphI*-절단된 PCR 산물은 저항성 품종에서는 단일 323 bp 길이 밴드를 나타내고, 감수성 품종에서는 2개의 밴드인 111 및 212 bp를 나타내었다 (도 5). *OsBphi252* 유전자좌에 대한 모든 유전형질을 이어서 CAPS 마커를 이용하여 SNBC 라인에서 결정하였다. 결과는 모든 33가지 저항성 NIL이 *OsBphi252*의 삼강벼 대립유전자를 생성하고, 모든 감수성 라인이 낙동벼 대립유전자를 생성한다는 것을 나타내었다. 33가지 저항성 라인 중에서, 4가지는 저항성 및 감수성 대립유전자 양자를 나타내었다: SNBC17, 21, 54 및 64 (도 5). 이는 *OsBphi252*이 *Bphi1* 저항성 유전자와 밀접하게 연관된다는 것을 강하게 제시한다.

도면의 간단한 설명

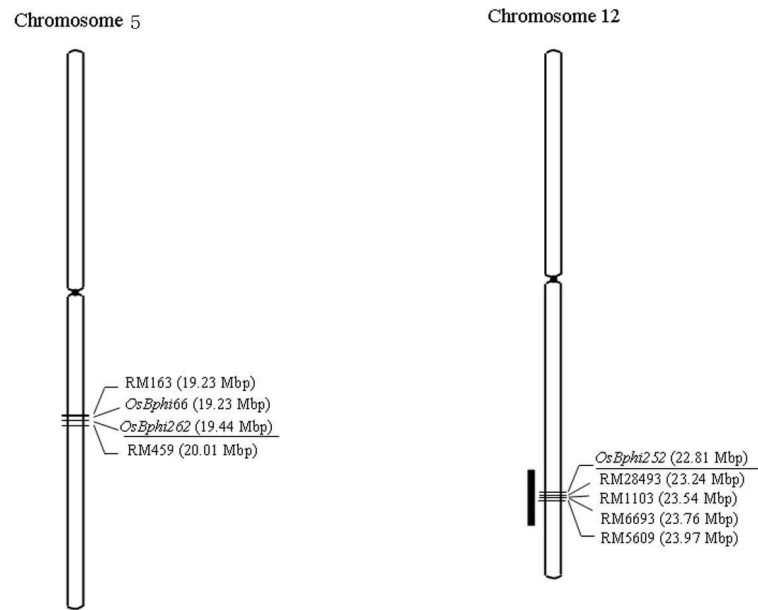
- <70> 도 1은 2단계 RDA 절차에 기초한 'double-RDA' 실험의 모식도를 보여준다. 첫번째 RDA로부터 차이 산물 (difference product) 및 모든 분리된 *OsBphi* 클론을 두번째 RDA에서 각각 테스터 및 드라이버서 이용하였다.
- <71> 도 2는 분리된 *OsBphi* 유전자 (밀줄친 이텔릭체)의 염색체 위치를 보여준다. 이전에 분리된 *OsBphi* 유전자 (Park et al. (2007) Theor Appl Genet 115: 537-547)는 이텔릭체로 보여준다. RM 마커는 낙동벼 백그라운드와 함께 NIL SNBC61에서 저항성 공여자 부모 삼강벼의 유전자 이입된 SSR 마커를 나타낸다. *Bphi1* 유전자좌 (채워진 박스로 보여줌)는 [Huang et al. (1997) Mol Breed 3:105-113] 및 [Sharma et al. (2003) Euphytica 129:109-117]로부터 개작(adapted) 하였다.
- <72> 도 3는 삼강벼 (S), 낙동벼 (N) and SNBC61 (61)의 게놈 DNA 겔-블롯 분석을 나타낸다. *EcoRI* 또는 *HindIII*로 절단된 DNA를 *OsBphi*-특이적인 프로브와 혼성화하였다: (a) *OsBphi237*, (b) *OsBphi252*, 및 (c) *OsBphi262*
- <73> 도 4는 BPH 공급 동안 저항성 SNBC61 및 감수성 낙동벼에서 *OsBphi* 유전자의 반정량적 RT-PCR 분석 결과이다. 총 RNA를 상이한 BPH 공급 시간 후에 벼 유묘로부터 추출하였다. 레인 1(대조군); BPH 공급 후 레인 2(2시간); 레인 3(1일); 레인 4(2일); 레인 5(4일); 레인 6(8일). 벼 *Ubi5* 유전자에 대한 프라이머를 내부 대조군으로서 이용하였다.
- <74> 도 5는 *OsBphi252* CAPS 마커 프라이머를 이용한 삼강벼 (S) 및 낙동벼 (N) 사이의 교배로부터 유래된 64가지 역교배된 순계의 CAPS 분석 결과이다. 모든 PCR 산물을 *SphI*으로 절단하였다. 저항성 대립유전자는 단일 밴드 (323 bp 길이)를 나타내고, 감수성 대립유전자는 2개의 밴드 (111 및 212 bp)를 나타낸다. 각 NIL에 대한 표현형은 저항성 (R) 및 감수성 (S)으로 표시한다. M, DNA 래더

도면

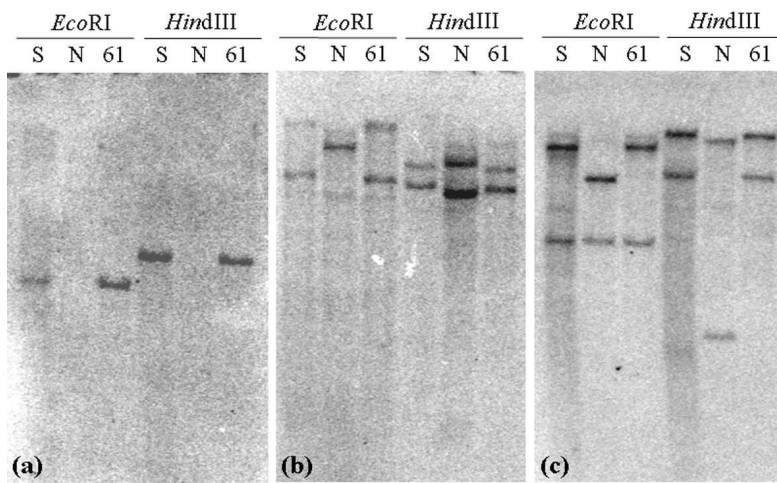
도면1



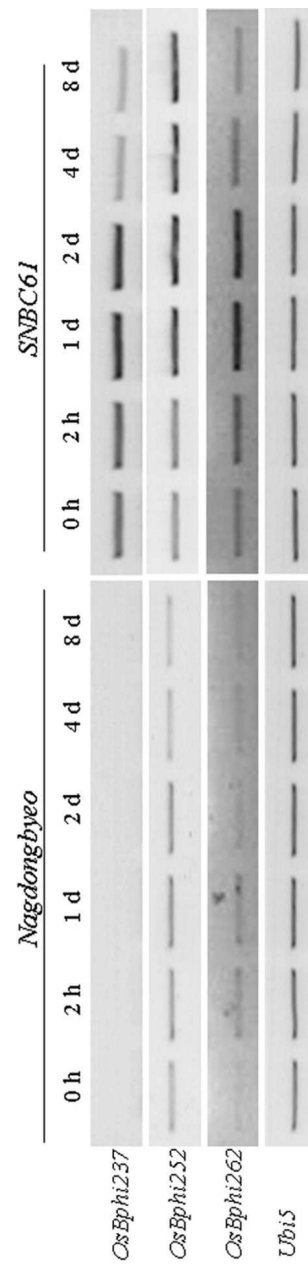
도면2



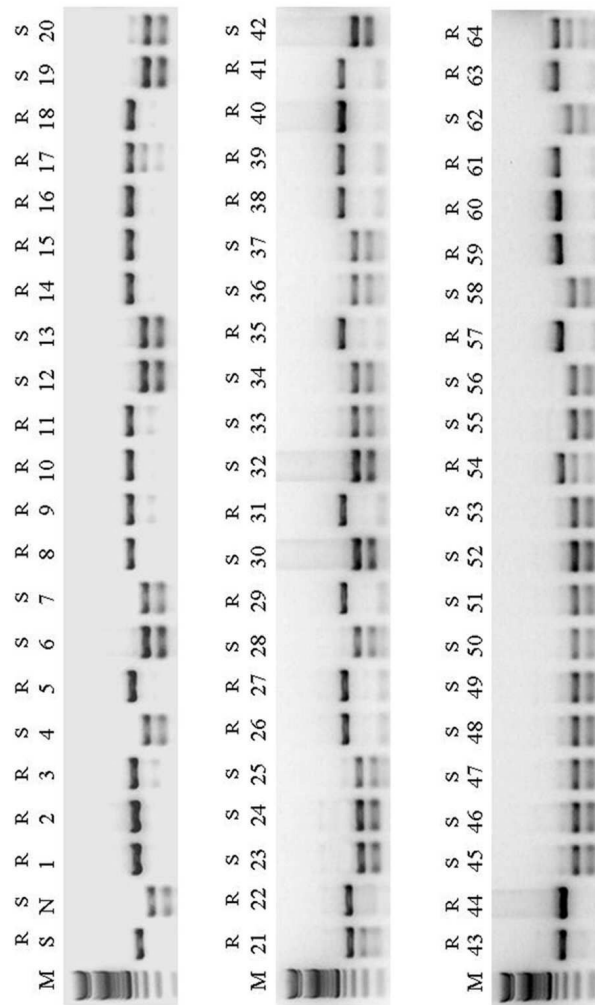
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Marker for selecting brown planthopper-resistant rice cultivar

- <130> PN08095

- <160> 10

- <170> Kopatent In 1.71

- <210> 1
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>

<223> Forward primer for CAPS marker

<400> 1
ccgtcagggt gctactaga 19

<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer for CAPS marker

<400> 2
gatacccatc tccatcacg 19

<210> 3
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 3
cagagaacta tttttgcgtc tgtgc 25

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 4
actgcaagcg ggcatcatcag 20

<210> 5
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Forward primer

<400> 5
 atctccgcga tactcatcat cctc 24

<210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Reverse primer

<400> 6
 gtgctactag acacgttccc atcg 24

<210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Forward primer

<400> 7
 ggagacaaat caaccgaata ct 22

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Reverse primer

<400> 8
gttgtcctcc atcatgtgac 20

<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 9
gactacaaca tccagaagga gtc 23

<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 10
tcattctaata accagttcga ttcc 24