



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0001312
(43) 공개일자 2011년01월06일

(51) Int. Cl.

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

C12N 15/31 (2006.01) *A01H 1/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0058795

(22) 출원일자 2009년06월30일

심사청구일자 2009년06월30일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교

(72) 발명자

임용표

대전광역시 유성구 지족동 SK허브 914호

윤한대

경상남도 진주시 칠암동 284-2

앵키치맥 반질도리

대전광역시 유성구 궁동 220

(74) 대리인

최규환

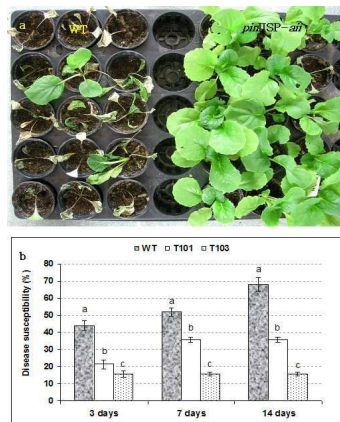
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 무름병 내성이 증진된 배추의 형질전환체 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명은 감자 유래 PinII(protease inhibitor II)의 신호 펩티드(signal peptide) 코딩 유전자 및 바실러스(*Bacillus*) sp. GH02 유래 aii(autoinducer inactivation) 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터, 상기 벡터로 형질전환되어 병충해 내성이 증진된 식물체 및 이의 종자, 상기 벡터로 식물체를 형질전환시켜, aii 유전자를 아포플라스트(apoplast)에서 발현하는 단계를 포함하는 식물의 병충해 내성을 증진시키는 방법 및 상기 PinII 신호 펩티드 코딩 유전자 및 aii 유전자를 포함하는, 식물의 병충해 내성 증진용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 607002-05

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관

연구사업명 농림기술개발연구사업

연구과제명 배추 분자마커 연구 사업단 과제 " 대량 유전자 분자표지 발굴 "

기여율

주관기관 충남대학교

연구기간 2007년 07월 30일 ~ 2012년 07월 29일

특허청구의 범위

청구항 1

감자 유래 PinII(protease inhibitor II)의 신호 펩티드(signal peptide) 코딩 유전자 및 바실러스(*Bacillus*) sp. GH02 유래 aii(autoinducer inactivation) 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 신호 펩티드는 서열번호 1의 아미노산서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 aii 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 벡터는 도 2에 기재된 pCAMBIA1302 벡터인 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 5

제1항의 벡터로 형질전환된 병충해 내성이 증진된 식물체.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 병충해는 무름병인 것을 특징으로 하는 식물체.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 식물체는 쌍자엽 식물인 것을 특징으로 하는 식물체.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 쌍자엽 식물은 배추인 것을 특징으로 하는 식물체.

청구항 9

제5항에 따른 식물체의 종자.

청구항 10

제1항의 벡터로 식물체를 형질전환시켜, aii 유전자를 아포플라스트(apoplast)에서 발현하는 단계를 포함하는 식물의 병충해 내성을 증진시키는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 병충해는 무름병인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 식물은 쌍자엽 식물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 쌍자엽 식물은 배추인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

감자 유래의 PinII 신호 펩티드 코딩 유전자 및 바실러스(*Bacillus*) sp. GH02 유래의 aii 유전자를 포함하는, 식물의 병충해 내성 증진용 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 병충해는 무름병인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 식물은 쌍자엽 식물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 쌍자엽 식물은 배추인 것을 특징으로 하는 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 PinII 신호 펩티드 코딩 유전자 및 aii 유전자를 이용하여, aii 유전자가 아포플라스트(apoplast)에서 발현되게 함으로써 무름병 내성이 증진된 배추의 형질전환체 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 배추(*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)는 37,200 ha에 이르는 광범위한 경작지로 알 수 있듯이 한국에서 가장 중요한 채소 중 하나이다. 배추는 보통 김치의 기본 재료로 사용되는 것으로, 가장 선호도가 높으며 밥과 함께 한국인의 매일의 식사에 섭취되는 흔한 반찬이다. 배추를 섭취함으로써 얻는 주요한 이점은 글루코시놀레이트(glucosinolates)와 같은 2차 대사물에 의한 대장암의 예방이다. 배추는 탄수화물, 비타민 A와 C, 엽산(folic acid)을 비롯하여 칼슘, 칼륨 및 철분을 포함한 염류의 좋은 공급원이다.

[0003] 배추 내흔계 라인인 권심(Kenshin)은 CKDH 유전자지도 작성 집단(mapping population)의 양친 라인 중의 하나이며, 브라시카 라파(*Brassica rapa*) 게놈 염기서열분석을 위한 기준 유전자지도 작성에 사용된 것이다. 기능적 게놈 연구를 위한 기준 유전적 재료로서 권심을 최대한 활용하기 위해, 단순하며 효과적인 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 매개된 형질전환 시스템을 개발할 필요가 있다.

[0004] 세균성 무름병은 브라시카 속(*Brassica*)의 구성원 전체에 있어 가장 심각하며 파괴적인 질병이다. 배추는 그람 음성 세균 *Pcc* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*)에 의한 세균성 무름병에 대한 감수성이 높다. 일반적으로, 다른 민감한 종에 비해 브라시카 라파(*B. rapa*)가 가장 높은 무름병 발병 지수를 가지며, 브라시카 라파(*B. rapa*) 중 가장 감수성이 높은 아종은 페키넨시스(*pekinensis*) 및 친넨시스(*chinensis*)이다 (Ren 등, 2001b, *Euphytica* 118: 271-280). 넓은 범위의 숙주, 토양 내에 식물체의 부스러기 속에서 생존하는 세균의 능력, 및 숙주의 감수성으로 인해 무름병의 통제는 어렵다. 화학적인 통제는 유용하지 않다. 재배 면적의 증가, 재식 밀도의 감소, 및 지연된 이식일을 포함한 재배방식은 질병 빈도 및 진행을 줄일 수는 있으나, 농업적 효율 또한 떨어질 것이다 (Fritz 및 Honma, 1987, *J Amer Soc Hort Sci* 112: 41-44). 따라서, 유전적 내성 또는 저항성이 이상적인 차선책이다. Ren 등 (2001a, *Euphytica* 117: 197-207)은 반복된 이중교배를 거쳐 배추의 무름병 저항성을 향상시켰다. 그러나, 전통적인 반복적인 선발 과정은 소모적이며 노동집약적이다. 더욱이, 무름병에 대한 자연적인 저항성 유전자의 부재로 인해, 질병 저항성 육종은 제한된다 (Li, 1995, *Progress in disease resistant breed of main vegetables*. Beijing, Science Press, pp 96-100). 따라서, 배추에 있어 무름병 내성의 유전공학은 농업적 생물공학에 있어 상당히 유익하다. 배추는 일반적으로 조직배양이 어려우며 (Zhang 등, 1998, *Plant Cell Rep* 17: 780-786), 잡종계통의 형질전환 (Zhang et al., 2000, *Plant Cell Rep* 19: 569-575; Zhao 등, 2006, *Euphytica* 150: 397-406) 및 일부 내흔계 계통 (Kim 등, 2003, *J Kor Soc Hort Sci* 44: 5-9)에 관해 소수의 보고가 있다. 그러나, 상기 연구들은 무름병 내성 또는 저항성 유전자의 전달에 관한 것은 아니다.

[0005] 식물체에 무름병을 일으키는 *Pcc*를 포함한 그람 음성(Gram-negative)균에 있어, AHL(*N*-acyl homoserine lactone)과 같은 자가유도인자(autoinducer)는 식물 및 동물에 특정한 발병성 유전자의 발현을 조절한다. aii(autoinducer inactivation gene) 패밀리의 구성원은 AHL의 방출을 상당히 줄이고, 세포 외 펙틴분해효소(pectolytic enzyme)의 활성을 감소시키며, 감자, 가지, 배추, 당근, 셀러리 및 담배에 대한 *Pcc*의 발병성을 약

화시키는 AHL 불활성화 효소 (e.g. AHL-lactonase)를 암호화한다(Dong 등, 2000, Nature 411: 813-817; 2001, PNAS 97(7): 3526-3531).

- [0006] 단백질은 감자의 PinII(proteinase inhibitor II)의 경우와 같이 신호 펩티드(signal peptide)를 필요로 하는 방식으로 세포 외부로 원형질막을 통해 수송된다. 신호 펩티드(signal peptides)는 형질전환 담배 및 감자 식물체의 아포플라스트(apoplast) 쪽으로 재조합 단백질을 표적으로 한다 (Murray 등, 2002; Transgenic Res 11: 199-214). 따라서, *pinIISP-aii* 융합 유전자는 *Pcc*가 감염을 개시하는 배추 조직의 세포간극으로 AHL-락토나아제(AHL-lactonase)를 표적으로 할 것이다. 본 발명의 목적은 병원균 정족수 인식(quorum-sensing) 신호의 차단이 가능한, 유전적으로 변형된 식물체를 생산하기 위해 융합 유전자 (*pinIISP-aii*)를 배추 내혼계 라인 권심 게놈으로 도입하는 것이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 본 발명에서는 정족수 인식(quorum-sensing) 신호의 차단이 가능한, 유전적으로 변형된 식물체를 생산하기 위해 융합 유전자 (*pinIISP-aii*)를 배추 내혼계 라인 권심 게놈으로 도입하여, *pinIISP-aii*를 발현하는 형질전환 식물체가 무름병에 대해 야생형 식물체에 비해 상당한 내성의 증진을 보이는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

과제 해결수단

- [0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 감자 유래 PinII(protease inhibitor II)의 신호 펩티드(signal peptide) 코딩 유전자 및 바실러스(*Bacillus*) sp. GH02 유래 *aii*(autoinducer inactivation) 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터를 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 벡터로 상기 벡터로 형질전환되어 병충해 내성이 증진된 식물체 및 이의 종자를 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 벡터로 식물체를 형질전환시켜 *aii* 유전자를 아포플라스트(apoplast)에서 발현하는 단계를 포함하는 식물의 병충해 내성을 증진시키는 방법을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 감자 유래의 PinII 신호 펩티드 코딩 유전자 및 바실러스(*Bacillus*) sp. GH02 유래의 *aii* 유전자를 포함하는, 식물의 병충해 내성 증진용 조성물을 제공한다.

효과

- [0012] 본 발명의 *pinIISP-aii* 융합유전자를 발현하는 형질전환 배추는 *aii* 유전자를 아포플라스트에서 발현함으로써 무름병 내성이 증진된 배추 형질전환체를 제공하는 뛰어난 효과가 있다. 따라서, 본 발명은 작물산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 감자 유래 PinII(protease inhibitor II)의 신호 펩티드(signal peptide) 코딩 유전자 및 바실러스(*Bacillus*) sp. GH02 유래 *aii*(autoinducer inactivation) 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터를 제공한다. 본 발명의 식물 발현 벡터에서, 상기 PinII 신호 펩티드는 재조합 단백질을 형질전환 식물체의 아포플라스트 쪽으로 이끌며, 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어질 수 있으며, 상기 *aii* 유전자는 바람직하게는 서열번호 2의 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0014] 상기 재조합 식물 발현 벡터는 예를 들면, 도 2에 기재된 pCambia1302 벡터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0015] 용어 "재조합"은 세포가 이중의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이중의 펩티드 또는 이중의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

- [0016] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용 가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.
- [0017] 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터(EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 DNA를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.
- [0018] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 것이다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스포노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(Kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명의 식물 발현 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "구성적(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 구성적 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.
- [0020] 본 발명의 식물 발현 벡터에서, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 베타-아밀라아제 RAmY1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(Agrobacterium tumefaciens)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알려져 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.
- [0021] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 식물 발현 벡터로 형질전환된 병충해 내성이 증진된 식물체를 제공한다. 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및(또는) 조직배양 기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens et al., 1982, Nature 296: 72-74; Negrutiu et al., 1987, Plant Mol. Biol. 8: 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito et al., 1985, Bio/Technol. 3: 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202: 179-185), 각종 식물 요소의(DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein et al., 1987, Nature 327: 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투메파시엔스 매개된 유전자 전이에서(비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다. 특히 바람직한 것은 EP A 120 516호 및 미국 특허 제4,940,838호에 기재된 바와 같은 소위 바이너리 벡터 기술을 이용하는 것이다.
- [0022] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 어떤 식물 세포도 된다. 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양 기관 또는 전체 식물이다.
- [0023] "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물 조직은 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직배양 또는 세포 배양 상태일 수 있

다.

- [0024] 본 발명에서 형질전환 식물은 전체 식물체뿐만 아니라 그로부터 수득될 수 있는 조직, 세포 또는 종자를 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 *pinIISP-aii* 융합유전자로 형질전환된 식물은 탁월한 병충해 내성을 갖는다. 본 발명의 용어 "병충해 내성"은 식물이 세균, 사상균 (곰팡이), 바이러스 또는 선충 등에 침범되었으나 병의 증세가 가볍거나 또는 거의 영향이 없는 성질을 말한다.
- [0026] 따라서, 본 발명에서 식물의 병충해 내성은 세균, 사상균 (곰팡이), 바이러스 또는 선충에 대한 식물의 내성이며, 바람직하게는 세균에 대한 식물의 내성이다. 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 상기 세균은 껍토파테리움 카로토보룸 아종 카로토보룸(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*)이다.
- [0027] 상기 병충해는 바람직하게는 무름병이다.
- [0028] 상기 식물은 바람직하게는 애기장대, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 셀러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩 및 완두 등의 쌍자엽 식물일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 배추(*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)이다.
- [0029] 본 발명은 또한, 상기 식물체의 종자를 제공한다.
- [0030] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 식물 발현 벡터로 식물체를 형질전환시켜, *aii* 유전자를 아포플라스트(apoplast)에서 발현하는 단계를 포함하는 식물의 병충해 내성을 증진시키는 방법을 제공한다.
- [0031] 본 발명의 일 구현예에 따른, 식물체에서 *aii* 유전자를 과발현시키는 방법으로는 *aii* 유전자를 포함하고 있는 식물체 또는 *aii* 유전자를 포함하고 있지 않은 식물체 내로 *aii* 유전자를 도입함으로써 수행될 수 있다. 상기에서 "유전자의 과발현"이란 야생형 식물에서 발현되는 수준 이상으로 *aii* 유전자가 발현되도록 하는 것을 의미한다. 식물체 내로 *aii* 유전자를 도입하는 방법으로는 프로모터의 조절을 받는 *aii* 유전자가 포함된 발현 벡터를 이용하여 식물체를 형질전환하는 방법이 있다. 상기에서 프로모터로는 식물체 내에 삽입 유전자를 과발현시킬 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않는다. 상기 프로모터의 예로는 이에 한정되지는 않으나, CaMV의 35S RNA 및 19S RNA 프로모터; 피크위트 모자이크 비루스(FMV)에서 유래한 전장 전사 프로모터 및 TMV의 코트 단백질 프로모터를 들 수 있다. 또한, 단자엽 식물이나 목본식물체에서 *aii* 유전자를 과발현하기 위해서는 유비퀴틴(ubiquitin) 프로모터를 사용할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 따른 방법이 적용될 수 있는 식물체로는 단자엽 식물 또는 쌍자엽 식물이 포함된다. 상기 단자엽 식물의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 벼, 밀, 보리, 죽순, 옥수수, 토란, 아스파라거스, 양파, 마늘, 파, 부추, 달래, 마 및 생강이 있다. 쌍자엽 식물의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 애기장대, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 셀러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩 및 완두가 있다. 상기 식물체는 바람직하게는 배추(*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)이다.
- [0033] 본 발명의 벡터를 식물체 내로 운반하는 방법은, 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 매개 형질전환법, 미세주입법 (Capecchi, 1980, Cell 22: 479), 칼슘포스페이트 침전법 (Graham 등, 1973, Virology 52: 456), 전기천공법 (Neumann 등, 1982, EMBO J. 1: 841), 리포솜 매개 형질감염법 (Wong 등, 1980, Gene 10: 87), DEAE-덱스트란 처리법 (Gopal, 1985, Mol. Cell Biol. 5: 1188-1190), 및 유전자 밤바드먼트 (Yang 등, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 9568-9572) 등에 의해 벡터를 식물체 내로 주입할 수 있다.
- [0034] 본 발명은 또한, 감자 유래의 PinII 신호 펩티드 코딩 유전자 및 바실러스(*Bacillus*) sp. GH02 유래의 *aii* 유전자를 포함하는, 식물의 병충해 내성 증진용 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물에서, PinII 신호 펩티드는 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산서열로 이루어질 수 있으며, 상기 *aii* 유전자는 바람직하게는 서열번호 2의 염기서열로 이루어질 수 있다. 본 발명의 조성물에서, PinII 신호 펩티드는 PinII 신호 펩티드 서열에서 특정 아미노산서열의 삽입, 치환, 결실된 것을 포함할 수 있으며, 상기 *aii* 유전자는 *aii* 유전자 서열에서 특정 염기서열의 삽입, 치환, 결실된 것을 포함할 수 있다.
- [0035] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의

내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

1. 자엽 절편체의 준비

배추(*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*, 내훈계 라인 권심) 종자를 70% 에탄올로 1 분간 표면 멸균하여, 차아염소산나트륨(Sodium Hypochlorite) (2% active chloride)으로 20 분간 처리하였다. 멸균 증류수로 수세 후, 종자를 서당 30 g/ℓ 및 파이토아가(phytoagar) 8 g/ℓ 가 포함된 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지 상에 파종하였다. 25±1℃에서 냉 백색 형광등으로 공급되는 45 μmol m⁻² s⁻¹의 조명으로 16/8 시간의 명/암 광주기로 배양되었다. 4일 후, 자엽을 절단하여 차기 실험에 사용하였다. 공동배양을 제외한 모든 배양은 상기 기재된 바와 동일한 인비트로(in vitro) 조건 하에 유지되었다.

2. 세균 균주, 플라스미드 및 배지

바실러스(*Bacillus*) 속에 속하는 GH02를 인삼 뿌리로부터 분리(Cho 등, 2007, Microbial Ecology 54: 341-351)하여 28℃에서 배양하였다. pGEM-T Easy 벡터 (Promega, WI, USA)를 클로닝 및 염기서열분석에 사용하였다.

배추의 형질전환은 바실러스(*Bacillus*) sp. GH02의 aii(autoinducer inactivation) 유전자 (GenBank 등록번호, FJ189472)에 융합된 감자의 PinII(protease inhibitor II)의 신호 펩티드(signal peptide)인 융합 유전자 (*pinIISP-aii*), *gfp*(green fluorescent protein) 유전자, 및 하이그로마이신(hygromycin)에 대해 저항성을 주는 *hptII*(hygromycin phosphotransferase II) 유전자가 포함된 바이너리(binary) 벡터 pCambia1302 (Cambia, Australia) (도 2a)로 수행되었다. 바이너리(binary) 벡터는 전기천공법(electroporation) (Gene Pulser II Electroporator, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 아그로박테리움 투머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404로 도입되었다. 아그로박테리움 투머파시엔스 균주는 형질전환에 사용 전에 YEP 배지에서 밤새 배양되었다.

3. 재조합 DNA 기술

제한효소 처리를 위한 표준 과정, 아가로스 겔 전기영동, 아가로스 겔로부터 DNA의 정제, DNA 라이게이션 (ligation), 및 다른 클로닝 관련 기술은 Sambrook 및 Russell (2001, Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA)의 기재에 따라 수행되었다. 뉴클레오티드 서열은 PRISM Ready Reaction Dye 종결신호/프라이머 사이클 염기서열분석 키트 (PerkinElmer, Norwalk, CT, USA)를 사용한 다이디옥시 사슬종결 방법(dideoxy chain termination method)을 사용하여 결정되었다. 뉴클레오티드 서열의 정렬 및 아미노산 서열 분석은 DNAMAN 분석 시스템을 사용하여 수행되었다 (Lynnon Biosoft, Quebec, Canada). 본 발명에서 DNA 및 아미노산 서열 상동성 검색은 NCBI(National Center for Biotechnology Information) 웹사이트에서 BLAST 네트워크 서비스 및 비중복(nonredundant) DNA 및 단백질 서열 데이터베이스를 사용하여 수행되었다.

4. aii 유전자의 클로닝

정족수 소멸(quorum-quenching) 세균 염색체 (*Bacillus* sp. GH02)로부터 aii(autoinducer inactivation) 유전자 상동체를 증폭하기 위해, 고도로 보존된 구간의 보존된 아미노산 서열에 근거하여 축퇴된(degenerate) 올리고뉴클레오티드 프라이머를 제작하였다. 본 발명에서 사용된 센스 및 안티센스 축퇴된(degenerate) 올리고뉴클레오티드 프라이머는 각각 5'-CAC YTR CAT YTT GAY CAY GC-3' (센스, 694F; 서열번호 3) 및 5'-ATC RAA TCC HGA YRA YGG C-3' (안티센스, 695R; 서열번호 4)이다. 바실러스(*Bacillus*) sp. GH02의 게놈 DNA를 주형으로 하여 Super-Therm DNA 중합효소 (JMR, Side Cup, Kent, UK)를 사용하여 94℃에서 30 초간 변성, 50℃에서 30 초간 어닐링(annealing), 및 72℃에서 30 초간 연장(extension)하는 과정을 30 회(cycles) 반복하여 PCR 증폭을 수행하였다. 약 300 bp의 증폭 산물을 겔 추출 키트 (Intron Biotechnology, Seongnam, Korea)를 사용하여 아가로스 겔로부터 분리하였다. PCR 산물을 서열분석하였으며, 서열을 BLAST 검색으로 확인하였다. 서열분석된 DNA로부터 5' 업스트림(upstream) 및 3' 다운스트림(downstream) 구간은 결정된 서열에 근거하여 유전자 특이적 프라이머만을 사용하여 프라이머 워킹(walking)으로 증폭되었다. 증폭된 단편을 뉴클레오티드 염기서열분석을

위해 분리하였다. 완전한 ORF(open reading frame)를 게놈 DNA로부터 특이적 프라이머 (705F 및 803R)를 사용하여 증폭하여, pGEM-T easy 벡터로 클로닝하였다 (표 1). 보고된 뉴클레오티드 서열은 *aii* 유전자에 대해 등록 번호 FJ189472, 및 바실러스(*Bacillus*) sp. GH02의 16S rDNA에 대해 DQ365557로 GenBank 데이터베이스에 등록되어 있다.

표 1. 본 발명에 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머

프라이머	서열번호	뉴클레오티드 서열 (5' → 3')
694F	7	CAC YTR CAT YTT GAY CAY GC
695R	8	ATC RAA TCC HGA YRA YGG C
705F	9	TCA AAA CTA AAT GTA AAG GTG G
803R	10	CAT ATG GGT AGT TGA YCA TC
1098F	11	AAA ATC TAG ACA AAA CTA AAT GTA AAG GTG <i>XbaI</i>
1099R	12	TTT CTC GAG TAT ACC CAT CAA CTR GTA G <i>SacI</i>
1948F	13	AAA TCT AGA ACA GAC ACT CTT CAC CCC AA <i>XbaI</i>
1949F	14	AGC GCG ATG GAG CAT TTA GAC TTA CCG GTT
1950R	15	AAC CGG TAA GTC TAA ATG CTC CAT CGC GCT
밑줄은 <i>XbaI</i> (정방향) 및 <i>SacI</i> (역방향)의 제한효소 절단부위를 표시한 것이다.		

5. *pinIISP-aii* 융합 유전자의 구축

융합 유전자 *pinIISP-aii*의 구축을 위해, 감자 *pinIISP* 유전자 및 바실러스(*Bacillus*) sp. GH02 *aii* 유전자를 프라이머 세트, *pinIISP* (1948F-1950R) 및 *aii*(1949F-1099R) (표 1)으로 각각 염색체 DNA로부터 증폭하였다. 중첩 부위는 1949F-1950R로 도입되었다. 융합 유전자의 발현을 위해, *pinIISP* 및 *aii* 유전자 단편을 프라이머 1948F-1950R 및 1949F-1099R로 증폭하여, 겔 추출 키트 (Intron Biotechnology, Seongnam, Korea)를 사용하여 정제하여, pGEM-T easy 벡터로 라이게이션하여 *E. coli* DH5a로 형질전환하였다.

6. 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 매개된 형질전환

아그로박테리움 튜머파시엔스(*A. tumefaciens*) 스톡(stock) 5 μ l를 28℃에서 100 mg/l 카나마이신(kanamycin)이 함유된 5 ml YEP 배지에서 배양하였다. 24 시간 배양 후, 10 μ l를 100 mg/l 카나마이신(kanamycin)이 함유된 10 ml YEP 배지에서 OD₆₀₀ 값이 0.6이 될 때까지 계대배양하였다. 세균 현탁액을 3500 rpm에서 15 분간 원심분리하여, 침전물을 재현탁액 배지 (MS with 50 mg/l acetosyringone) 10 ml에 재현탁하였다. 자엽 절편체 (0.3 x 0.3 cm²)를 사전 배양 배지 MSRM (MS with 5 mg/l BA, 0.5 mg/l NAA, 2 mg/l AgNO₃, 16 g/l phytoagar, pH 5.8) 상에서 명소에서 3일간 배양하였다. 공동배양을 위해, 사전 배양된 절편체를 세균 현탁액에 10 분간 침지하였다가 공동배양 배지 (MSRM with 50 mg/l acetosyringone) 상에서 25℃, 암소에서 3일간 배양하였다. 이후 절편체를 멸균 증류수로 3 회 수세하여, 카르베니실린(carbenicillin) 500 mg/l 이 포함된 멸균 증류수로 10 분간 1 회 수세하여, 멸균된 여과지 상에서 건조시켰다. 선발을 위해, 절편체를 캘러스(callus) 재분화/선발 배지 (MSRM with 250 mg/l carbenicillin 및 10 mg/l hygromycin)로 옮겼다. 선발 5주 후, 모든 하이그로마이신(hygromycin) 저항성 캘러스를 신초(shoot) 재분화/선발 배지 (MS with 2 mg/l BA, 0.5 mg/l NAA, 5 mg/l AgNO₃, 250 mg/l carbenicillin, 10 mg/l hygromycin, 8 g/l phytoagar, pH 5.8)로 옮겼다. 6 주간 배양 후, 하이그로마이신(hygromycin) 저항성인 다수의 신초(shoot)를 부정세순(adventitious shoot)을 생산하기 위한 배지 (MS with 250 mg/l carbenicillin, 10 mg/l hygromycin, 8 g/l phytoagar)로 옮겼다. 배양 2주 후, 부정세순(adventitious shoot)을 발근 배지 (1/2 MS with 250 mg/l carbenicillin, 10 mg/l hygromycin, 8 g/l phytoagar)로 옮겼다. 배양 3주 후, 발근된 식물체를 토양으로 옮겼다. 2주 후, 하이그로마이신(hygromycin) 저항성 식물체를 4℃로 옮겨, 준화처리를 위해 45일간 배양하였다. 마지막으로, 식물체를 온실로 옮겨 자가수분시켰다.

[0051] 7. T₁ 자손에서 외래도입유전자(transgene)의 분리 검정

[0052] 야생형 및 T₀ 형질전환 식물체의 자가수분 종자를 선발 배지 (MS with 25 mg/ℓ hygromycin, 8 g/ℓ phytoagar) 상에서 배양하였다. 처리는 각 형질전환 라인에서 3 회 반복되었다. 배양 5 주 후, 잎이 발달하는 하이그로마이신(hygromycin) 저항성 식물체를 세어, $p = 0.05$ 에서 χ^2 검정으로 분석하였다.

[0053]

[0054] 8. 서던(Southern) 및 노던(Northern) 블롯(blot) 분석

[0055] 게놈 DNA를 어린 잎 조직으로부터 CTAB(Cetyl trimethylammonium bromide) (Saghai-Marooof 등, 1984, PNAS 81: 8014-1018)을 사용하여 추출하였다. HindIII로 절단된 게놈 DNA 시료 약 30 μg을 0.8% (w/v) 아가로즈 겔에서 전기영동하여, 10 분간 0.25 N HCl에서 퓨린을 제거(depurinated)하여, 0.5 N NaOH 및 1.5 N NaCl에서 1 시간 동안 변성시켜, 1 M Tris (pH 7.5) 및 1.5 M NaCl에서 1 시간 동안 중화하여, 1 시간 동안 10 ×SSC로 수세하였다.

[0056] 외래도입유전자(transgene)의 발현을 관찰하기 위해, 총 RNA를 어린 잎 조직으로부터 Tri-Reagent (MRC Inc., USA)를 사용하여 추출하였다. 각 시료로부터 RNA 약 30 μg을 2.2 M 포름알데히드(formaldehyde)가 포함된 1.2% (w/v) 아가로즈 겔 상에서 전기영동하였다. 겔을 다운로드 모세관 전이법(download capillary transfer method)으로 20 ×SSC를 사용하여 양으로 하전된 나일론 멤브레인(nylon membrane) (Amersham Pharmacia Biotech, UK)으로 블롯(blot)하여, ³²P로 표지된, PCR-증폭 산물인 *pinIISP-aii* 유전자 탐침(probe)으로 프로빙(probe)하였다. *pinIISP-aii* 유전자는 프라이머 세트, 5'-TAC TTG TAA GCG CGA TGG AG-3' (정방향; 서열번호 5) 및 5'-AGA TGA AGT GCC ATT TGC G-3' (역방향; 서열번호 6)을 사용하여 증폭 시, 약 532 bp의 PCR 산물이 생성되었다. 하기의 PCR 조건이 사용되었다: 94℃, 30 초; 58℃, 30 초; 72℃, 30 초 (33 회). 혼성화(hybridization)는 65℃, Rapid-hyb 완충액 (Amersham Pharmacia Biotech, UK)에서 밤새 수행되었다. 서던(Southern) 및 노던(Northern) 블롯 분석에 잇따른 단계는 Enkhchimeg 등 (2005, Plant Cell Tiss Org Cult 83: 41-50)의 기재에 따라 수행되었다.

[0057] 9. 조직에 접종

[0058] *Pcc* 스톡(stock) (10 μℓ)을 OD₆₀₀=1.4가 1,170,000 CFU ml⁻¹가 될 때까지 25 ml 액체 YEP 배지에서 배양하여 OD₆₀₀ = 0.5로 희석하였다. 2 달 된 야생형 및 T₁ 형질전환 식물체 라인 T101 및 T103, T1 및 T3의 자손으로부터 2 번째 잎을 절단하여, 멸균수 7 ml로 적신 2 층의 와트만(Whatman) 여과지 상에 이주시게가 있는 페트리디쉬(Petri dishes)에 두었다. 식물체에 접종하기 위해, YEP 배지만을 또는 활발하게 자라는 세균 (OD₆₀₀ = 0.5 equals 420,000 CFU ml⁻¹)이 포함된 YEP 배지 100 μℓ를 잎의 주맥에 바늘로 상처 낸 부위에 접종하여, 28℃에서 6일간 배양하였다. 모든 접종은 3 회 수행되었으며, 발병성은 접종 1, 3, 및 6일 후 각각 질병 병반의 직경으로 결정되었다. SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC USA)로 자료를 분석하여 던컨의 다중범위검정(Duncan's Multiple Range Test) ($P > 0.05$)으로 ANOVA (one way)로 비교하였다.

[0059] 야생형 식물체에 대한 세균의 최소 치사 밀도 및 최적 세균 활성을 결정하기 위해, 집단 밀도 (OD₆₀₀ = 0.25, 0.5, 0.7, 1.0, 1.2, 및 1.4) 별로 분석하였다. 접종은 상기 기재된 바와 같이 수행되었다.

[0060] 10. 식물체에 접종

[0061] T1 및 T3 형질전환 라인의 T₀ 형질전환 식물체 및 야생형의 자가수분 종자를 식물체 분리 배지 (MS with 25 mg/ℓ hygromycin, 8 g/ℓ phytoagar) 상에서 배양하였다. 배양 4 주 후, T101 및 T103 형질전환 라인의 T₁ 하이그로마이신(hygromycin) 저항성 식물체를 피트모스(peat moss) 및 펄라이트(perlite) (1:1)가 함유된 플라스틱 화분으로 옮겼다. 식물체를 작은 구멍이 뚫린 랩으로 덮어 25±1℃에서 냉 백색 형광등으로 조사되는 30 μ

$\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 조명 하에 8 시간의 광주기로 배양실에서 키웠다. 이식 후 약 10일 내에, 5-7 장의 잎이 난 식물체를 무름병에 대한 내성의 평가에 사용하였다.

[0062] 식물체에 접종을 위해, *Pcc* stock ($10 \mu\text{l}$)을 액체 YEP 배지 25 ml에서 $\text{OD}_{600}=1.4$ 가 1,170,000 CFU ml^{-1} 될 때까지 배양하여, $\text{OD}_{600} = 0.1$ 까지 희석하였다. 식물체에 접종은 Lee 및 Cha (2001, *Phytopath* 91: S53-S54)의 기재에 따라 수행하였다. *Pcc* 및 멸균한 미네랄 오일 (heavy white oil, Sigma)의 4:1 혼합물 5 ml를 식물체의 중앙부위에 부어 각 식물체를 적셨다. 접종된 식물체를 작은 구멍이 뚫린 랩(wrap)으로 덮어 상기 기재된 바와 같이 배양실에서 키웠다. 토양, 피트모스(peat moss) 및 펄라이트(perlite) (1:1)는 충분한 습윤 상태로 지속적으로 유지하였다. 접종된 식물체를 *Pcc* 접종 후 매일 무름병의 유무에 대해 점검하였다. 질병 검정을 회당 25 개의 식물체에서 수행하였으며, 이를 3 회 반복하였다. 자료 분석을 SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC USA)로 수행하여 던컨의 다중범위검정(Duncan's Multiple Range Test) ($P > 0.05$)으로 ANOVA (one way)로 비교하였다.

[0063] 실시예 1. 중첩 PCR에 의한 융합 유전자의 구축

[0064] 균주 GH02로부터 *aii* 유전자를 분리하기 위해, 바실러스 세레우스 군(*Bacillus cereus* group) (Dong 등, 2000, PNAS 97: 3526-3531) 및 아그로박테리움 튜머파시엔스(*A. tumefaciens*) (Zhang 등, 2002, PNA 99: 4638-4643)로부터 AHL-락토나아제(AHL-lactonase)를 포함하여 몇 군의 금속가수분해효소(metallohydrolases)의 보존 구간에 근거하여 제작된 프라이머를 사용하였다. 바실러스(*Bacillus*) sp. GH02의 *aii*는 753 bp이고, 250 아미노산으로 구성된 분자량 28,056 Da으로 예측되는 단백질을 암호화한다. 바실러스(*Bacillus*) sp. GH02 및 바실러스(*Bacillus*) sp. 240B1 *aiiA* (Dong 등, 2002, PNAS 97: 3526-3531)의 아미노산 서열은 93% 유사성을 보였다. *pinIISP* 및 *aii* 유전자는 중첩 PCR에 의해 융합되었다. 1103 bp의 (*pinIISP-aii*) DNA 단편을 pGEM-T Easy 벡터로 라이게이션하여, *E. coli* DH5 α 로 형질전환하였다.

[0065] 실시예 2. 하이그로마이신(hygromycin) 저항성 식물체의 재분화

[0066] 무름병 내성 배추 내흔계 라인인 권심을 개발하기 위해 4일 된 자엽 외식편에 *pinIISP-aii*, *gfp*, 및 *hptII* 유전자가 포함된 바이너리(binary) 벡터 pCAMBIA1302가 든 아그로박테리움 튜머파시엔스(*A. tumefaciens*) 균주 LBA4404를 접종하였다. 2 또는 3일간의 공동배양이 최적이었다. 보통, 브라시카(*Brassica*)의 외식편은 아그로박테리움(*Agrobacterium*)과의 공동배양에 매우 민감하며, 공동배양 기간의 연장 시 과사된다.

[0067] 선발 5주 내에, 8 개의 (전체 215 개 중의) 하이그로마이신(hygromycin) 저항성 캘러스가 외식편의 절단면으로부터 재분화되어, 3.7%의 형질전환 효율을 보였다 (도 1a). 상기 캘러스를 16 g/l 파이토아가(phytoagar)가 포함된 새 배지 상에 연속적으로 계대배양 시 신초(shoot)가 재분화되지 않았으나, 16 g/l의 파이토아가(phytoagar)가 배추 내흔계 계통으로부터 신초(shoot)의 재분화에 최적이었다 (Yang 등, 2004, J Plant Biotech 6: 1-5). 상기 현상은 이전 보고 (Zhang 등, 2000, Plant Cell Rep 19: 569-575)와 일치하며, 외식편의 절단면 상에 캘러스는 보다 더 고농도의 파이토아가(phytoagar)가 포함된 배지에서 보다 잘 증식한다는 사실을 보여준다. 브라시카 라파(*B. rapa*)가 다른 브라시카(*Brassica*) 종에 비해 가장 불응성인 종이긴 하나, Zhao 등 (2006, *Euphytica* 150: 397-406)은 재분화 배지에 고농도의 질산은(silver nitrate)을 첨가하여 성공적으로 형질전환 배추를 만들었다. 따라서, 본 발명에서는 신초(shoot) 유도를 촉진하기 위해 신초(shoot) 재분화/선발 배지를 8 g/l의 파이토아가(phytoagar) 뿐 아니라 고농도 (5 mg/l)의 질산은(silver nitrate)이 함유된 배지로 변형시켰다 (재료 및 방법 참조). 배양 6주 후, 8 개의 캘러스 중 5 개에서 다수의 하이그로마이신(hygromycin) 저항성 신초(shoot)가 생성되었다 (도 1b). 부정새순(adventitious shoots)이 하이그로마이신(hygromycin)이 포함되고, 호르몬이 포함되지 않은 MS 배지에서 배양 14일 내에 생성되었고, 동시에 다수의 신초(shoot)의 생장은 완전히 중단되었다 (도 1c). 주변의 다수의 신초(shoot) 및 캘러스를 완전히 제거하고, 발근을 위해 하이그로마이신(hygromycin)이 포함된 1/2 MS 배지 상에서 부정새순(adventitious shoot)만을 배양하였다. 뿌리는 배양 3주 내에 성공적으로 생성되었다 (도 1d). 선발 배지 및 발근 배지는 1주에 1 회씩 교체하였다. 상기 과정은 생장을 상당히 촉진시켰다. 본 발명에서의 *pinIISP-aii* 형질전환 식물체는 생장 저해나 가시적인 표현형의 변형을 보이지 않았다 (도 1e). 종자 배양으로부터 인비트로(in vitro) 형질전환 식물체의 생성은 4 개월이 걸렸다.

[0068] 일반적으로, 대부분의 브라시카(*Brassica*) 종은 춘화처리에 감수성이 있다. 따라서, 5 또는 6 개의 잎이 달린

식물체를 45일간 춘화처리하였으며, 상기 기간 중에 식물체의 생장은 거의 완전히 저해되었다 (도 1f). 이후, 식물체를 온실로 옮겼으며, 10-15일 후 화아 및 웅성인 염성의 꽃이 피었다 (도 1g). 자가 수분된 T₁ 종자를 2 개월 후 수확하였다 (도 1h-i). 형질전환 식물체는 표현형적으로 조직배양 중에 정상적이었으나, 하나의 형질전환 라인 (T5)은 웅성불염이었다. 이는 조직배양 중에 체세포변이(somaclonal variation)로 인한 것일 수 있다 (Min 등, 2007, Plant Cell Rep 26:337-344).

[0069] 형질전환 식물체의 T₁ 자손에서의 외래도입유전자(transgene)의 분리는 하이그로마이신(hygromycin) 25 mg/ℓ 포함 배지에서 결정되었다. 4 개의 형질전환 라인 모두는 3:1의 분리비를 보였으며 ($\chi^2 = 0.003-0.04$, $p = 0.84-0.96$), 이는 형질전환 식물체의 T₁ 자손에 단일 카피(single copy)의 외래도입유전자(transgene)가 통합되었음을 의미한다 (표 2, 도 1j).

[0070] 표 2. *pinIISP-aii* 형질전환 식물체의 T₁ 자손에 있어 하이그로마이신(hygromycin) 저항성의 분리

[0071]

형질전환 라인	저항성 (R) 자손	감수성 (S) 자손	비율 (R:S)	기대비율	χ^2 값	p 값
T101	8.7±3.0	3.3±1.1	2.6:1	3:1	0.04	0.84
T102	12.5±2.1	4.3±1.0	2.9:1	3:1	0.003	0.96
T103	11.8±1.7	4.3±1.4	2.7:1	3:1	0.02	0.89
T104	6.7 ±0.9	2.1±0.5	3.2:1	3:1	0.007	0.93

개개 값은 3 회 반복한 값의 평균±표준편차이다. χ^2 는 기대비에 대한 유의한 적합도를 나타낸다.

[0072] 실시예 3. *pinIISP-aii* 외래도입유전자(transgene)의 통합 및 발현

[0073] 형질전환 식물체의 게놈으로 *pinIISP-aii* 외래도입유전자(transgene)의 통합은 서던 블롯 분석으로 확인되었다. 단일 카피(single copy) 외래도입유전자(transgene)는 4 개의 형질전환 라인 (T1-T4) 각각에 성공적으로 통합되었으며, 하나의 형질전환 라인 (T5)에는 외래도입유전자(transgene)가 이중(2 copy numbers)으로 통합되었다 (도 2b). 형질전환 식물체에 있어 *pinIISP-aii* 외래도입유전자(transgene)의 발현은 노던 블롯(Northern blot) 분석으로 확인되었다. *pinIISP-aii* 전사체(transcript)는 모든 형질전환 식물체에서는 검출되었으나, 야생형 식물체에서는 검출되지 않았다 (도 2c).

[0074] 식물 형질전환의 개념은 발병성 유도, T-DNA 활성화, 전달 및 통합과 같은 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 관련 매개변수 및 식물체 재분화의 양 인자들을 조합한 것이다. 형질전환 식물체의 유도 중에 상호작용하는 모든 상기 요소들에 대한 최적 조건을 수립하기는 극단적으로 어려울 수 있다. 더욱이, 브라시카(*Brassica*)에 있어 재분화 및 형질전환은 고도로 유전형 의존적이다 (Cardoza 및 Stewart 2004, Plant 40: 542-551). 배추의 점검된 123 개의 유전형에서 재분화 빈도의 변이는 95% 내지 0%였다 (Zhang 등, 1998, Plant Cell Rep 17: 780-786). 따라서, 유전형 특이성이 브라시카(*Brassica*)의 재분화 및 차기 형질전환에 있어서의 제한 인자이다. 따라서, 브라시카(*Brassica*) 유전형 의존성을 극복하기 위해 단순하며 효과적인 형질전환 방법의 개발이 필요하다. 최적 형질전환 방법은 넓은 범위에 걸친 배추의 유전형에 적용 가능해야 한다.

[0075] 본 발명에서의 형질전환 방법을 내훈계 라인 권심의 게놈으로 3 개의 유전자 (*pinIISP-aii*, *CHITINASE*, 및 pathogenicity quenching factor3-*Pqf3*)로 점검 시 각각 3.7%, 4.3%, 및 3.0%의 형질전환 효율을 보였다. 상기 방법을 내훈계 라인 치푸의 게놈 및 잡종 라인 C x K (치푸 x 권심)로 *Pqf3* 유전자에 적용 시, 각각 1.4% 및 10.5%의 형질전환 효율을 보였다. 상기 배추 계통들은 다국적 브라시카 라파(*Brassica rapa*) 게놈 염기서열분석 프로젝트 (자료 미제시)에 사용된 것이다. 내훈계 라인 간에 직접적으로 비교 시, 권심이 치푸에 비해 2 내지 3 배 높은 형질전환 효율을 보였다.

[0076] 실시예 4. 무름병에 대한 내성의 평가

[0077] 무름병의 전형적인 연화(maceration) 증상의 발생은 병원균 밀도 및 세균 활성의 2 가지 주요 요소에 의존적이었다. 식물 방어를 성공적으로 피할 수 있는 충분한 세균 밀도에 이를 때까지 *Pcc*는 식물체 조직 붕괴 효소를 생산하지 않는다. 이전 연구에서, Dong 등 (2001, Nature 411: 813-817)은 *aiiA* 형질전환 식물체에 있어 저항

성은 접종된 병원균 집단 밀도에 관련성이 있음을 보고하였다.

[0078] 세균의 장기간의 실험 배양으로 인해, 감염력에 대한 활성이 감소된다. 따라서, 식물체 접종에 앞서 본 발명에서는, 야생형 식물체에서 무름병의 전형적인 연화(maceration) 증상의 발생 시 병원균의 최소 치명 밀도 및 최적 세균 활성을 결정하였다. 본 발명에서 사용된 모든 병원균 집단 밀도는 야생형 식물체에 접종 몇 시간 후에 전형적인 연화(maceration) 증상을 보였다. 접종 6일 후, 보다 낮거나 또는 높은 병원균 밀도 (자료 미제시)에 비해 $420,000 \text{ CFU ml}^{-1}$ 에 동일한 $\text{OD}_{600} = 0.5$ 의 병원균 집단 밀도의 적용 시 야생형 식물체에서 가장 극심한 연화(maceration) 증상을 보였다. 따라서 본 발명에서 무름병에 대한 내성 점검을 위해 $420,000 \text{ CFU ml}^{-1}$ 의 병원균 밀도를 형질전환 식물체에 적용하였다.

[0079] 2 개의 T_1 형질전환 라인, T101 및 T103는 *pinIISP-aii* 유전자의 고도의 발현을 보여 (도 2c) 차기 실험을 위해 선발되었다. 초기 평가는 절단엽(detached leaf) 조직상에서 수행되었다. 접종 1일 후, 형질전환 식물체에 비해 야생형 식물체에서 훨씬 더 큰 연화(maceration) 증상 (0.3 cm^2)이 보였으며, 개별적인 형질전환 라인들 간에 차이는 보이지 않았다 (도 3b). 상기 결과는 *pinIISP-aii*를 발현하는 형질전환 식물체는 지연된 무름병 증상의 발달을 겪는다는 것을 제시한다. 상기에서 보아, 형질전환 식물체에 비해 야생형 식물체의 질병 증상은 3일 내에 급속하게 퍼져 상당히 증가하였다 (3 - 4 배) (도 3a, b). 연화(maceration) 구역은 야생형 식물체에서는 연회색으로, 형질전환 식물체에서는 갈색으로 되었다. 접종 6일 후 질병 증상은 각각 야생형에서 10.9 cm^2 , T101 식물체에서 1.3 cm^2 , T103 식물체에서 4.2 cm^2 에 이르렀다. 야생형 식물체의 연화(maceration) 구역은 완전히 붕괴되었으나, 형질전환 식물체에서는 건조되어 암갈색으로 변했다 (도 3a, b). 접종 10일 후, 야생형 식물체의 질병 증상은 잎의 전체 주맥에 걸쳐 퍼졌고, 조직이 완전히 붕괴되었으며, 한편 형질전환 식물체에서는 연화(maceration)가 중단되고 색이 검게 변했다. 검은 염색의 정도는 *Pcc*에 의한 배추 조직 감염의 정량적 마커로 사용 가능하다. 따라서, *pinIISP-aii*를 발현하는 형질전환 식물체는 무름병에 대해 야생형 식물체에 비해 내성에 있어 상당한 증가에 보였다 (도 3b). 그러나, 절제 후 더운 방에 두는 것으로 인해 절단 조직이 자발적으로 생리적으로 스트레스를 받아 변색되어 상기 실험은 더 이상 지속할 수 없었다. 따라서 차기 평가는 실생 단계의 식물체에서 수행되었다.

[0080] 인위적인 접종에 의한 무름병의 유발은 저항성 재배종의 육종, 살충제의 평가, 및 숙주와 병원균간의 상호작용의 연구와 같은 많은 영역에서 중요하다. 그러나, 접종으로 균일한 무름병을 얻기는 어렵다. Lee 및 Cha (2001, *Phytopath* 91: S53-S54)에 따라, 인위적인 접종은 식물체에 상해 없이 멸균한 미네랄 오일 (heavy white oil, Sigma) 및 세균 현탁액의 혼합물을 식물체의 중앙부 위에 부어 수행하여 습실(moist chamber)에 두었고, 한편 세균 현탁액만으로 무름병 증상을 보이는 식물체는 없었다.

[0081] 야생형 식물체의 총 44%에서, 접종 3일 후 전형적인 질병 증상이 발생하였으며, 한편 T101 형질전환 식물체의 21.4% 및 T103 형질전환 식물체의 15.8%에서 각각 이때 발병 증상이 나타났다 (도 4b). 접종 7일 후, 질병 증상을 보이는 야생형 식물체는 52%에 이르렀으며 (44% severe, 8% medium levels), 한편 T101에 있어서는 35.7% (21.4% severe, 14.3% medium levels)에 이르렀으나, T103 (도 4b)에서는 증가가 없었다. 접종 14일 후, 야생형 식물체의 68%는 거의 완전히 붕괴되었으며, 결국 식물체 세포벽을 분해하는 다량의 펙틱 효소(pectic enzyme)를 생산하는 무름병 발병 세균으로 인해 사멸하였다. 이때까지, 질병 감수성 형질전환 식물체의 백분율은 양 형질전환 라인에 있어 더 이상 증가되지 않았으나, 모든 감수성 형질전환 식물체는 야생형처럼 완전히 붕괴되었다 (도 4a, b). 이 시점에서부터는, 야생형 및 형질전환 식물체 양자에 있어 질병 감수성의 백분율은 더 이상 증가되지 않았으며, 질병 내성 식물체는 비접종 식물체처럼 잘 자랐다 (자료 미제시). 상기 결과에 근거하여, T101의 64.3%, T103의 84.2%, 그러나 야생형 식물체의 32%만이 무름병에 대한 내성을 보였으며, *pinIISP-aii* 형질전환 식물체는 야생형 식물체와 비교 시 상당히 향상된 내성 (2 - 3 배)을 보였다. 따라서, 융합 유전자 *pinIISP-aii*의 발현은 배추에 있어 무름병에 대한 감수성을 감소시킨다. 형질전환 내성은 재조합 정족수 소멸(quorum-quenching) 효소 AHL-락토나아제(AHL-lactonase) 활성의 결과이어야 한다. 이는 상기 효소가 *aii*에 의해 암호화되기 때문이다. 상기 효소는 세균 정족수 인식(quorum-sensing) 신호를 효과적으로 소멸시켜 세균의 집단 밀도 의존적 감염을 붕괴시킨다.

[0082] 세균성 무름병은 배추에 있어 심각한 질병일 뿐 아니라, 모든 십자화과(crucifer) 작물을 흔히 손상시킨다. 병원균 그 자체가 경작지 및 비경작지에 널리 퍼진다 (Kikumoto, 2000, *J Gen Plant Pathol* 66: 275-277). 병원균 관련 손실은 밭에서 또는 채소 수송 및 보존 중에 대량으로 발생한다. 따라서, 배추 산업에 있어서 무름병의

통제가 가장 우선적이다. 본 발명으로, 배추에 있어 재조합 AHL 락토나아제(lactonase) 효소를 생산하는 세균 유전자 *pinIISP-aii*를 전이시킴으로써 배추 내혼계 라인 권심에 있어 무름병에 대한 내성을 향상시킬 수 있다.

[0083] 형질전환 배추가 몇 연구가에 의해 개발되어 왔으나, 무름병 내성 또는 저항성 형질전환 배추는 아니었다. 본 발명이 내혼계 라인 권심의 형질전환에 대한 최초의 보고이며, 무름병 내성의 향상에 관한 융합 유전자 *pinIISP-aii*의 효과를 최초 기술하는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0084] 도 1은 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 매개된 형질전환을 통한 *pinIISP-aii* 형질전환 배추 내혼계 라인 권심의 재분화를 보여준다. **a**는 선발 5주 후 자엽 절편체의 가장자리에서 생성된 hygromycin(하이그로마이신) 저항성 캘러스이다. **b**는 배양 6주 후 재분화된 hygromycin 저항성인 다수의 신초(shoot)이다. **c**는 14일 내에 재분화된 hygromycin 저항성 부정새순(adventitious shoot)이다. **d**는 3 주 내에 재분화된 뿌리이다. **e**는 온실에서 자라는 형질전환 식물체이다. **f**는 4°C에서 45일간의 춘화처리를 보여준다. **g**는 개화 시의 형질전환 식물체이다. **h**는 자가수분을 보여준다. **i**는 형질전환 식물체의 종자가 성숙하는 것을 보여준다. **j**는 T₁ 자손에 있어 외래도입유전자(transgene)의 분리를 보여준다. 야생형 (좌측) 및 T₁ 형질전환 식물체 (우측)의 자가수분된 종자가 하이그로마이신 25 mg l⁻¹이 포함된 MS 배지에서 발아하는 것을 보여준다.

[0085] 도 2는 바이너리(binary) 벡터 pCambia1302의 T-DNA 영역의 모식도이다 (**a**); *gfp*, 녹색형광단백질 유전자; SP, 감자의 단백질분해효소 저해제 II 신호 펩티드(signal peptide); *aii*, 바실러스(*Bacillus*) sp. GH02로부터 자가유도인자(autoinducer) 불활성화 유전자; *hptII*, 하이그로마이신 인산전이효소 II(hygromycin phosphotransferase II) 유전자; CaMV 35S, 콜리플라워 모자이크 바이러스(cauliflower mosaic virus) 35S 프로모터; nos3, 노팔린 신타아제(nopaline synthase) 전사 종결신호의 우측(RB) 및 좌측(LB) 경계부. **b**는 야생형 (WT) 및 T₀ *pinIISP-aii* 형질전환 라인 T1-T5의 서던블롯(Southern blot) 분석을 보여준다. 각 시료로부터 *HindIII*로 절단된 게놈 DNA 약 30 μg이 ³²P로 표지된 *pinIISP-aii* 탐침(probe)으로 프로빙(probing)되었다. **c**는 야생형(WT) 및 형질전환 라인 T1-T5로부터 mRNAs의 노던 블롯(Northern blot) 분석을 보여준다. 시료당 약 30 μg의 총 RNA가 상기 탐침(probe)으로 프로빙(probe)되었다. 하부 패널(panel)은 RNA 겔을 EtBr로 염색한 것을 보여준다.

[0086] 도 3은 펙토박테리움 카로토보룸 아종 카로토보룸(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*)으로 조직 접종한 것을 보여준다. **a** 및 **b**는 YEP 배지만으로 접종된 야생형 (top row, left) 및 조직의 주맥에 바늘로 상처 낸 부위를 보여주며, 야생형 및 T₁ 형질전환 식물체 라인 T101 및 T103 양자는 활발하게 자라는 세균 (top row, right and bottom row, left and right)으로 각각 접종되었다. 접종물(inoculum) 세포 수는 420,000 CFU ml⁻¹ (OD₆₀₀=0.5)이었다. 질병 징후는 접종 후 각각 3일 (**a**) 및 6일 (**b**)에 촬영되었다. **c**는 접종 후 1, 3, 6, 및 10일째 야생형 및 형질전환 라인의 연화(maceration) 영역을 보여준다. 두꺼운 막대는 3 회 반복한 것의 평균을, 바(bars)는 평균 ± 표준편차를 나타낸다. 동일한 글자의 평균은 유의하게 다르지 않았다 (ANOVA, 던컨의 다중범위검정(Duncan's Multiple Range Test), *P* > 0.05).

[0087] 도 4는 실생 단계에서 무름병에 대한 내성을 평가한 것을 보여준다. 펙토박테리움 카로토보룸 아종 카로토보룸(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*)으로 접종 14일 후 야생형 (WT) 및 *pinIISP-aii* 형질전환 식물체의 자라는 모양을 보여준다. **b**는 각각 접종 3, 7, 및 14일 후 WT 그리고 T101 및 T103의 독립적 형질전환 라인의 질병 감수성을 보여준다. 두꺼운 막대는 3 회 반복한 것의 평균을, 에러바(error bars)는 평균 ± 표준편차를 나타낸다. 다른 글자는 독립적 라인들 간에 유의한 차이를 나타낸다 (ANOVA, 던컨의 다중범위검정(Duncan's Multiple Range Test), *P* > 0.05).

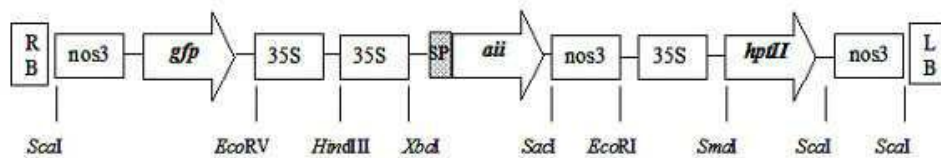
도면

도면1

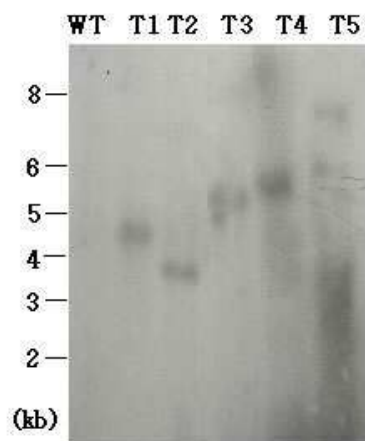


도면2

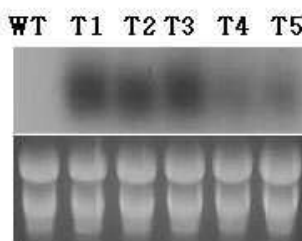
a



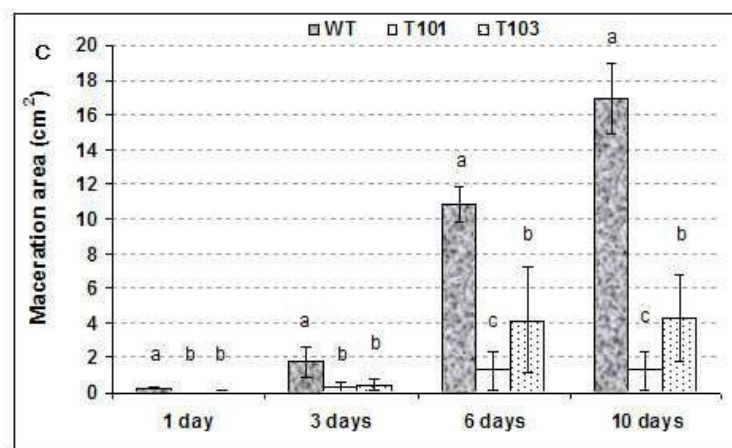
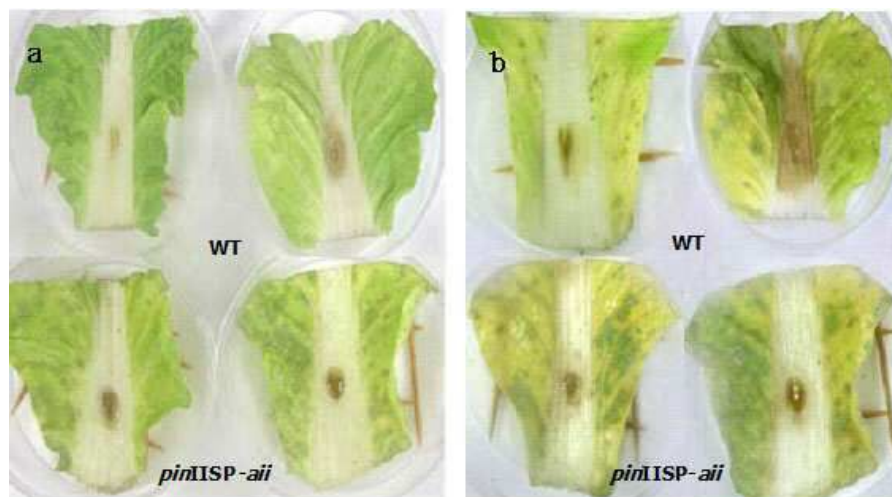
b



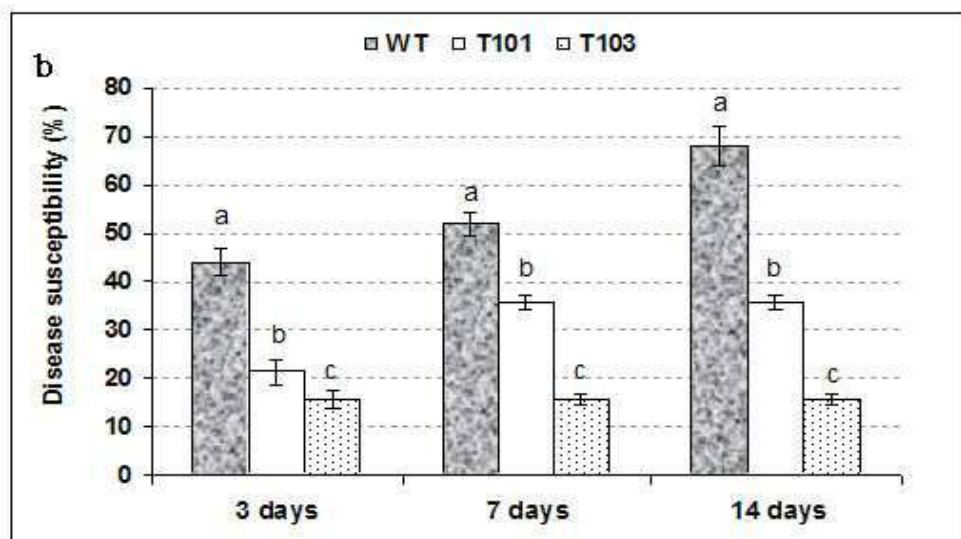
c



도면3



도면4



서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
 <120> Transgenic Chinese cabbage with enhanced tolerance to soft rot disease and production method thereof

<160> 15

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Solanum tuberosum PinII signal peptide

<400> 1
 Met Asp Val His Lys Glu Val Asn Phe Val Ala Tyr Leu Leu Ile Val
 1 5 10 15

Leu Gly Leu Leu Val Leu Val Ser Ala Met Glu His
 20 25

<210> 2
 <211> 753
 <212> DNA
 <213> Bacillus sp. GH02 N-acyl homoserine lactone hydrolase (aii) gene

<400> 2
 atgacagtaa agaagcttta tttcgtccca gcaggctcgtt gtatgttaga tcactcttct 60
 gttacacgta cattaacacc agggaaatta ttagacttac cggtttggtg ttatcttttg 120
 gagactgaag aaggacctat tttagtagat acaggatatgc cagaaagtgc agttaataat 180
 gaaggtttgt ttaacggtac atttgtcgaa ggacaggttt taccaaaaat gactgaagaa 240
 gatagaatcg tgaatatatt aaagcgcgtt ggttatgagc cggaagacct tctttatatt 300
 attagtctc acttgcatth ttgatcatgca ggaggaaatg gcgcttttat aaatacacca 360
 atcattgtac agcgtgctga atatgaggcg gcacaacata gtgaagaata tatgaaagaa 420
 tgtaaattgc ccaatttaaa ctacaaaatc attgaggggg attatgaagt cgtaccagga 480
 gttcaattat tgtatacacc aggacatact ccggggcatc agtcgctatt cattgagaca 540
 gagaactctg gtccagtgtt attaacaatc gatgcaccgt atacaaaaga aaattttgaa 600
 gatgaagtgc catttgcggg atttgatcca gaattagctt tatcttcaat taaacgttta 660

aaagaagttg tgataaaaga gaagccaatt gttttctttg ggcatgatat agagcaggaa 720

aagggatgta aagtgatccc tgaatatata tag 753

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 694F primer

<400> 3
cacytrcaty ttgaycaygc 20

<210> 4
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 695R primer

<400> 4
atcraatcch gayrayggc 19

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pinIISP-aii primerF

<400> 5
tacttgtaag cgcatggag 20

<210> 6
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pinIISP-aii primerR

<400> 6
 agatgaagtg ccatttgcg 19

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 694F primer

<400> 7
 cacytrcaty ttgaycaygc 20

<210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 695R primer

<400> 8
 atcraatcch gayrayggc 19

<210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 705F primer

<400> 9
tcaaaactaa atgtaaaggt gg 22

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 803R primer

<400> 10
catatgggta gttgaycatc 20

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 1098F primer

<400> 11
aaaatctaga caaaactaaa tgtaaaggtg 30

<210> 12
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 1099R primer

<400> 12
tttctcgagt atacccatca actrhtag 28

<210> 13

<211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 1948F primer

<400> 13
 aaatctagaa cagacactct tcaccccaa

29

<210> 14
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 1949F primer

<400> 14
 agcgcgatgg agcatttaga cttaccggtt

30

<210> 15
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 1950R primer

<400> 15
 aaccggttaag tctaaatgct ccatcgcgct

30