(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0146389
(43) 공개일자 2023년10월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 6/46* (2018.01)
C07K 14/415 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8282 (2013.01)
A01H 6/4678 (2022.05)
(21) 출원번호 10-2022-0045360
(22) 출원일자 2022년04월12일
심사청구일자 2023년03월31일

(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
좌남수
서울특별시 광진구 뚝섬로36길 75, 101동 1002호 (자양동, 강변아이파크)
첸야페이
중국 후베이성 우한 430070, 화중농업대학교(식물과학기술대학 핵심 농업미생물 및 식물병리학 연구실)
왕주안
서울특별시 광진구 능동로 209, 생명과학대학 바이오 융합공학전공 식물면역학 연구실(군자동)
(74) 대리인
특허법인리채

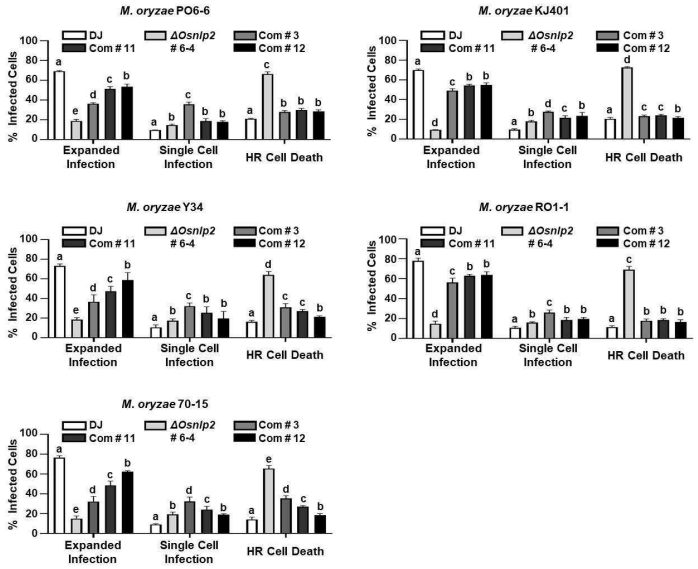
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **밀 도열병 저항성 증진 또는 개선용 조성물 및 밀 도열병 저항성 증진 또는 개선 방법**

(57) 요 약

본 발명은 밀의 감수성 유전자와 해당 유전자의 발현 결손 또는 저해제를 포함하는 밀 도열병 저항성 증진 또는 개선용 조성물 및 밀 도열병 저항성 증진 또는 개선 방법에 관한 것이다. 본 발명의 조성물 또는 방법을 이용하면, 다양한 도열병균에 대하여 레이스 비특이적인(race-nonspecific) 저항성을 갖는 밀을 얻을 수 있다.

대 표 도 - 도18c



(52) CPC특허분류
C07K 14/415 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395071921
과제번호 PJ015966012022
부처명 농촌진흥청
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 바이오그린연계농생명혁신기술개발(R&D)
연구과제명 레이스 비특이적 병저항성 육종소재의 유용성 검증 및 활용기술 연구(1주관)
기 여 율 1/2
과제수행기관명 세종대학교
연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711146957
과제번호 2019R1F1A1059830
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 철-의존성 세포사멸 기작 규명을 통한 식물면역 메커니즘 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 세종대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

밀의 NLP(Nodule inception-like protein) 유전자 발현 결손 또는 저해제를 포함하는 밀 도열병 저항성 증진 또는 개선용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 NLP 유전자는 TaNLP4(Triticum aestivum nodule inception-like protein 4) 유전자인, 밀 도열병 저항성 증진 또는 개선용 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 TaNLP4 유전자는 TaNLP4-2D, TaNLP4-2A 및 TaNLP4-2B 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자인, 밀 도열병 저항성 증진 또는 개선용 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 발현 결손 또는 저해제는 EMS(ethyl methanesulfonate), DMS(dimethyl sulfate), T-DNA(transfer-DNA), siRNA(small interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 CRISPR/Cas9뉴클레아제(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated sequences9 nuclease)인, 밀 도열병 저항성 증진 또는 개선용 조성물.

청구항 5

밀에서 NLP(Nodule inception-like protein) 유전자 발현을 결손 또는 저해하는 단계를 포함하는 밀 도열병 저항성 증진 또는 개선 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 NLP 유전자는 TaNLP4(Triticum aestivum nodule inception-like protein 4) 유전자인, 밀 도열병 저항성 증진 또는 개선 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 TaNLP4 유전자는 TaNLP4-2D, TaNLP4-2A 및 TaNLP4-2B 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자인, 밀 도열병 저항성 증진 또는 개선 방법.

청구항 8

청구항 5에 있어서, 상기 발현 결손 또는 저해는 EMS(ethyl methanesulfonate), DMS(dimethyl sulfate), T-DNA(transfer-DNA), siRNA(small interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 리보자임

(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 CRISPR/Cas9뉴클레아제(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated sequences9 nuclease)를 식물체에 도입하여 수행되는, 밀 도열병 저항성 증진 또는 개선 방법.

청구항 9

NLP(Nodule inception-like protein) 유전자 발현이 결손 또는 저해된 도열병 저항성이 증진 또는 개선된 밀.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 NLP 유전자는 TaNLP4(Triticum aestivum nodule inception-like protein 4) 유전자인, 도열병 저항성이 증진 또는 개선된 밀.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 TaNLP4 유전자는 TaNLP4-2D, TaNLP4-2A 및 TaNLP4-2B 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자인, 도열병 저항성이 증진 또는 개선된 밀.

청구항 12

청구항 9에 있어서, 상기 상기 발현 결손 또는 저해는 EMS(ethyl methanesulfonate), DMS(dimethyl sulfate), T-DNA(transfer-DNA), siRNA(small interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 CRISPR/Cas9뉴클레아제(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated sequences9 nuclease)를 식물체에 도입하여 수행된, 도열병 저항성이 증진 또는 개선된 밀.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 밀의 감수성 유전자와 해당 유전자 결손 또는 저해제를 포함하는 밀 도열병 저항성 증진 또는 개선용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 도열병균(*Magnaporthe oryzae*)에 의해 발생하는 도열병은 매년 전 세계적으로 다양한 작물의 손실을 야기하는 식물 질환이다. 특히 밀 도열병은 밀 생산에 영향을 주는 주요 병으로, 도열병균이 밀의 수확량과 곡물의 질을 크게 낮춘다. 밀 도열병은 방제하기 어렵고 위험한 병으로 여겨지며, 살균제도 제한된 효과만 보인다. 이에 밀 도열병을 제어하기 위해서 새로운 저항성 소스가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제1998-0018703호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 밀 도열병 저항성 증진 또는 개선용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 본 발명은 밀 도열병 저항성 증진 또는 개선 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 본 발명은 도열병 저항성이 증진 또는 개선된 밀을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 1. 밀의 NLP(Nodule inception-like protein) 유전자 발현 결손 또는 저해제를 포함하는 밀 도열병 저항성 증진 또는 개선용 조성물.

[0011] 2. 위 1에 있어서, 상기 NLP 유전자는 TaNLP4(Triticum aestivum nodule inception-like protein 4) 유전자인, 밀 도열병 저항성 증진 또는 개선용 조성물.

[0012] 3. 위 2에 있어서, 상기 TaNLP4 유전자는 TaNLP4-2D, TaNLP4-2A 및 TaNLP4-2B 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자인, 밀 도열병 저항성 증진 또는 개선용 조성물.

[0013] 4. 위 1에 있어서, 상기 발현 결손 또는 저해제는 EMS(ethyl methanesulfonate), DMS(dimethyl sulfate), T-DNA(transfer-DNA), siRNA(small interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 CRISPR/Cas9뉴클레아제(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated sequences9 nuclease)인, 밀 도열병 저항성 증진 또는 개선용 조성물.

[0014] 5. 밀에서 NLP(Nodule inception-like protein) 유전자 발현을 결손 또는 저해하는 단계를 포함하는 밀 도열병 저항성 증진 또는 개선 방법.

[0015] 6. 위 5에 있어서, 상기 NLP 유전자는 TaNLP4(Triticum aestivum nodule inception-like protein 4) 유전자인, 밀 도열병 저항성 증진 또는 개선 방법.

[0016] 7. 위 6에 있어서, 상기 TaNLP4 유전자는 TaNLP4-2D, TaNLP4-2A 및 TaNLP4-2B 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자인, 밀 도열병 저항성 증진 또는 개선 방법.

[0017] 8. 위 5에 있어서, 상기 발현 결손 또는 저해는 EMS(ethyl methanesulfonate), DMS(dimethyl sulfate), T-DNA(transfer-DNA), siRNA(small interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 CRISPR/Cas9뉴클레아제(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated sequences9 nuclease)를 식물체에 도입하여 수행되는, 밀 도열병 저항성 증진 또는 개선 방법.

[0018] 9. NLP(Nodule inception-like protein) 유전자 발현이 결손 또는 저해된 도열병 저항성이 증진 또는 개선된 밀.

[0019] 10. 위 9에 있어서, 상기 NLP 유전자는 TaNLP4(Triticum aestivum nodule inception-like protein 4) 유전자인, 도열병 저항성이 증진 또는 개선된 밀.

[0020] 11. 위 10에 있어서, 상기 TaNLP4 유전자는 TaNLP4-2D, TaNLP4-2A 및 TaNLP4-2B 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자인, 도열병 저항성이 증진 또는 개선된 밀.

[0021] 12. 위 9에 있어서, 상기 발현 결손 또는 저해는 EMS(ethyl methanesulfonate), DMS(dimethyl sulfate), T-DNA(transfer-DNA), siRNA(small interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 CRISPR/Cas9뉴클레아제(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated sequences9 nuclease)를 식물체에 도입하여 수행된, 도열병 저항성이 증진 또는 개선된 밀.

발명의 효과

[0023] 본 발명은 밀의 감수성 유전자인 NLP 유전자의 발현을 결손 또는 저해시켜 밀 도열병 저항성을 증진 또는 개선시키는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 *M.oryzae* P06-6 및 007 감염 동안 동진 벼의 엽초에서 *OsNLP2*의 전사 수준을 나타낸 것이다.

도 2A는 OsNLP2 유전자의 도메인을 나타낸 것이고, 도 2B는 OsNLP2:GFP와 OsNLP2기능 도메인들 중 하나가 잘린 것의 세포 내 위치를 나타낸 것이다.

도 3은 *M.oryzae* P06-6에 감염된 동진 벼 및 *ΔOsnlp2* 돌연변이 라인의 표현형을 비교한 것이다.

도 4는 *M.oryzae* P06-6에 감염 동안 동진 벼 및 *ΔOsnlp2* 돌연변이의 엽초 세포에서 ROS 및 철 이온(Fe^{3+})축적과 지질 과산화 정도를 비교한 것이다.

도 5는 *M.oryzae* P06-6에 감염된 *ΔOsnlp2* 엽초에 대한 데페록사민(DFO)의 ROS 및 철 이온(Fe^{3+})의 축적과 HR 세포 사멸 억제 효과를 확인한 것이다.

도 6은 *M.oryzae* P06-6에 감염된 *ΔOsnlp2* 엽초에 대한 페로스타틴 -1(ferrostatin-1)의 ROS 및 철 이온(Fe^{3+})의 축적, 지질 과산화 및 HR 세포 사멸 억제 효과를 확인한 것이다.

도 7은 *M.oryzae* P06-6에 감염된 *ΔOsnlp2* 엽초에 대한 사이토칼라신 A(Cyt A)의 ROS 및 철 이온(Fe^{3+})의 축적과 HR 세포 사멸 억제 효과를 확인한 것이다.

도 8은 *M.oryzae* P06-6에 감염된 *ΔOsnlp2* 엽초에 대한 DPI의 ROS 및 철 이온(Fe^{3+})의 축적과 HR 세포 사멸 억제 효과를 확인한 것이다.

도 9는 *M.oryzae* P06-6에 감염된 동진 벼 및 *ΔOsnlp2* 돌연변이(#4-2) 식물의 엽초에서 시간 경과에 따른 방어 관련 유전자 발현을 실시간 qRT-PCR 분석한 것을 나타낸다.

도 10은 다양한 *M.oryzae* 균주 KI215, KJ401, 70-15, Y34 및 RO1-1에 대한 동진 벼 및 *ΔOsnlp2* 돌연변이주의 감염 반응을 비교한 것이다.

도 11a 내지 도 11d는 벼 NLP 계열 단백질의 GAF 유사 도메인, RWP-RK 도메인 및 PB1 도메인과 다른 식물 NLP 단백질의 아미노산 서열 정렬을 나타낸 것이다.

도 12는 다른 식물 NLP 단백질과 벼 NLP 계열 단백질의 계통수를 나타낸 것이다.

도 13A는 *ΔOsnlp2* 돌연변이의 개략도이고, 도 13B는 *ΔOsnlp2* 돌연변이의 유전자형 분석 결과이며, 도 13C는 동진 벼 및 *ΔOsnlp2* 돌연변이에서 OsNLP2 발현의 RT-PCR 및 실시간 qRT-PCR 분석 결과이다.

도 14는 OsNLP2 및 PB1 및 RWP-RK-PB1 도메인을 아그로 박테리움을 사용하여 *N.benthamiana* 잎에 일시적으로 발현한 경우, *N.benthamiana* 잎에서 세포에서 세포 사멸을 유발하지 않는다는 것을 나타낸다.

도 15는 *M.oryzae* P06-6 접종 후 상이한 시점에서 동진 벼 및 *ΔOsnlp2* 돌연변이 세포에서 ROS 축적을 나타낸 것이다.

도 16은 *M.oryzae* P06-6 및 007에 감염된 동진 벼 및 *ΔOsnlp2* 돌연변이 식물 엽초에서 시간 경과에 따른 방어 관련 유전자 발현을 실시간 qRT-PCR 분석한 것을 나타낸다.

도 17은 *ΔOsnlp2* 벼에 야생형*OsNLP2* 유전자를 복원시키기 위한 보완 벡터를 나타낸 것이다.

도 18a는 *Osnlp2* 유전자가 복원된 식물의 제작 과정을 나타낸 것이고, 도 18b는 야생형 벼(DJ), *ΔOsnlp2* 벼(#6-4) 및 *Osnlp2* 유전자가 복원된 식물(Complementation No. 3, No. 11, No. 12)에서 *Osnlp2* 유전자의 발현 여부를 확인한 것이며, 도 18c는 *M.oryzae* P06-6, KJ401, 70-15, RO1-1 및 Y34 균주에 대한 야생형 벼(DJ), *ΔOsnlp2* 벼(#6-4) 및 *Osnlp2* 유전자가 복원된 식물(Com 3, 11, 12)의 감염 반응을 나타낸 것이다(n=3,

hpi(hours post inoculation)=48).

도 19는 *TaNLP4* 유전자의 염색체 별 분포를 나타낸 것이다.

도 20은 ClustalW를 이용하여 벼와 밀의 NLP 유전자 패밀리의 상동성을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0028] 본 발명은 밀의 NLP(Nodule inception-like protein) 유전자 발현 결손 또는 저해제를 포함하는 밀 도열병 저항성 증진 또는 개선용 조성물에 관한 것이다.

[0029] 본 발명에서 결손 또는 저해 대상인 NLP 유전자는 그 대상인 밀에 존재하는 유전자일 수 있다. NLP 유전자는 예를 들면 밀(Triticum aestivum)의 NLP4 (nodule inception-like protein 4) 유전자일 수 있다. NLP4는 예를 들면 NLP4-2D, NLP4-2A 및 NLP4-2B 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자일 수 있다. 밀의 NLP4-2D, NLP4-2A 및 NLP4-2B 유전자는 각각 서열번호 30, 31 및 32의 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 밀의 NLP4 유전자는 밀의 2번 염색체상에 존재하는 유전자이다. 6배체인 밀의 2번 염색체가 트리플리케이션(triplication)되어 각각의 2번 염색체 상에 NLP4-2D, NLP4-2A 또는 NLP4-2B 유전자가 존재한다(도 19). 밀의 NLP4-2D, NLP4-2A 및 NLP4-2B 유전자는 기원이 동일한바, 그 기능도 동일하다.

[0031] 밀의 NLP 유전자 패밀리는 벼의 NLP 유전자 패밀리와 상동성(homology)이 높아 유사한 기능을 할 수 있다. 구체적으로, 밀의 NLP4-2D, NLP4-2A 및 NLP4-2B 유전자는 벼의 OsNLP2 유전자의 상동체(ortholog)에 해당하므로(도 20), 벼의 NLP2 유전자와 동등한 기능을 갖는다.

[0032] 도열병은 이를 유발하는 도열병균 균주가 대상 작물에 따라 상이하다. 본 발명의 조성물은 NLP 유전자를 결손 또는 저해시켜 병원균의 잎으로의 침입 자체를 억제하여, 도열병 균주의 종류에 무관하게(race-nonspecific) 저항성을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 조성물은 다양한 균주(broad-spectrum)가 유발하는 도열병에 대해 저항성을 증진 또는 개선할 수 있다.

[0033] 용어 “발현 결손 또는 저해”는 그 유전자(DNA 또는 mRNA) 또는 단백질의 발현을 저해(발현량 감소)시키거나 그 발현을 완전히 제거하는 것을 의미하며, “완전히 제거하는 것”은 유전자 또는 단백질 발현이 탐지 불가능해지거나 무의미한 수준으로 존재하게 되는 것을 포함한다.

[0034] NLP 유전자의 발현 결손 또는 저해제는 NLP 유전자의 발현을 결손 또는 저해할 수 있는 모든 물질로서 물질의 타입이나 종류에 국한되지 않으며, 예를 들면 EMS(ethyl methanesulfonate), DMS(dimethyl sulfate), T-DNA(transfer-DNA), siRNA(small interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 CRISPR/Cas9 뉴클레아제(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated sequences9 nuclease) 등일 수 있다.

[0035] 상기 예시한 물질들은 화학적인 방법에 의해 NLP 유전자의 핵산서열 내 변형 또는 유전자 발현의 변화를 유발하는 것이거나(예컨대, EMS, DMS 등) 대상 식물의 NLP 유전자 서열에 맞추어 설계되어, 그 유전자의 발현을 저해 또는 결손 시킬 수 있는 것일 수 있다.

[0037] 본 발명은 밀에서 NLP(Nodule inception-like protein) 유전자 발현을 결손 또는 저해하는 단계를 포함하는 밀 도열병 저항성 증진 또는 개선 방법에 관한 것이다.

[0038] 본 발명에서 결손 또는 저해 대상인 NLP 유전자는 그 대상인 밀에 존재하는 유전자일 수 있다. NLP 유전자는 예를 들면 밀(Triticum aestivum)의 NLP4 (nodule inception-like protein 4) 유전자일 수 있다. NLP4는 예를 들면 NLP4-2D, NLP4-2A 및 NLP4-2B 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자일 수 있다. 밀의 NLP4-2D, NLP4-2A 및 NLP4-2B 유전자는 각각 서열번호 30, 31 및 32의 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 용어 “발현 결손 또는 저해”는 전술한 범위 내의 것일 수 있다.

[0040] NLP 유전자의 발현 결손 또는 저해는 당 분야에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있으며, 예를 들면 EMS(ethyl methanesulfonate), DMS(dimethyl sulfate), T-DNA(transfer-DNA), siRNA(small interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 CRISPR/Cas9뉴클레아제(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated sequences9 nuclease)를 식물체에 도입하여 수행될 수 있다.

[0041] 상기 예시한 물질들의 경우 화학적인 방법에 의해 NLP 유전자의 핵산서열 내 변형 또는 유전자 발현의 변화를 유발하는 것이거나(예컨대, EMS, DMS 등) 대상 식물의 NLP 유전자 서열에 맞추어 설계되어, 그 유전자의 발현을 저해 또는 결손 시킬 수 있는 것일 수 있다.

[0043] 본 발명은 NLP(Nodule inception-like protein) 유전자 발현이 결손 또는 저해된 도열병 저항성이 증진 또는 개선된 밀에 관한 것이다.

[0044] 본 발명에서 결손 또는 저해 대상인 NLP 유전자는 그 대상인 밀에 존재하는 유전자일 수 있다. NLP 유전자는 예를 들면 밀(Triticum aestivum)의 NLP4 (nodule inception-like protein 4) 유전자일 수 있다. NLP4는 예를 들면 NLP4-2D, NLP4-2A 및 NLP4-2B 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자일 수 있다. 밀의 NLP4-2D, NLP4-2A 및 NLP4-2B 유전자는 각각 서열번호 30, 31 및 32의 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 용어 “발현 결손 또는 저해”는 전술한 범위 내의 것일 수 있다.

[0046] NLP 유전자의 발현 결손 또는 저해는 당 분야에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있으며, 예를 들면 EMS(ethyl methanesulfonate), DMS(dimethyl sulfate), T-DNA(transfer-DNA), siRNA(small interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 CRISPR/Cas9뉴클레아제(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated sequences9 nuclease)를 식물체에 도입하여 수행될 수 있다.

[0047] 상기 예시한 물질들의 경우 화학적인 방법에 의해 NLP 유전자의 핵산서열 내 변형 또는 유전자 발현의 변화를 유발하는 것이거나(예컨대, EMS, DMS 등) 대상 식물의 NLP 유전자 서열에 맞추어 설계되어, 그 유전자의 발현을 저해 또는 결손 시킬 수 있는 것일 수 있다.

[0048] 밀은 성숙한 식물체뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 수 있는 식물 세포, 식물 조직, 식물 세포 또는 조직으로부터 유래된 캘러스 및 식물의 종자 등을 모두 포함하는 의미이다.

[0050] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0052] **실시예**

[0053] **<u>실험재료 및 방법</u>**

[0054] **1. 식물 재료 및 성장 조건**

[0055] 벼(*Oryza sativa L.*) 재배종인 Dongjin(DJ)의 종자는 전주 국립 식량 과학원(National Institute of Crop Science, Jeonju, Korea)에서 제공했다. *Δ Osnlp2* 녹아웃(knock-out, KO) 돌연변이 종자는 Salk Institute에서 관리하는 Rice Functional Genomic Express Database (RiceGE) 에서 획득하였다. 벼 종자는 28℃의 물 속에서 5일 간 연속 광 조건(continuous light condition, 80 μmol photons m^{-2} sec^{-1}) 하에서 발아시켰다. 발아된 벼 종자는 Baroker soil (Seoul Bio, Seoul, Korea)이 있는 화분(직경 12 ㎝, 높이 11㎝)에 심었다. 벼는 28℃, 습도 60%, 백색 형광등(150 μmol photons m^{-2} sec^{-1}), 16 시간 광 조건/ 8시간 암 조건(16-h day/8-h night)의 광주기 조건에서 생장 챔버에서 생육되었다.

[0056] *Nicotiana benthamiana* 종자는 25℃의 광 조건 하에서 7일 동안 물에서 발아시켰다. 발아된 묘목은 Baroker soil (Seoul Bio, Seoul, Korea)이 있는 화분(직경 8㎝, 높이 6㎝)에 심었다. *N. benthamiana* 식물은 25℃, 백색 형광등(150 μmol photons m^{-2} sec^{-1}), 16 시간 광 조건/ 8시간 암 조건(16-h day/8-h night)의 광주기 조건

에서 생장 챔버에서 생육되었다.

[0057] **2. ΔOsnlp2 돌연변이 유전자형 분석(genotyping)**

[0058] T-DNA 삽입 ΔOsnlp2 돌연변이 종자는 100% 에탄올로 1분 동안 살균 한 다음, 종자 껍질을 제거한 후 30분 동안 50% Clorox로 살균했다. 멸균된 종자는 25℃에서 2주 동안 연속 광 조건(continuous light condition) 하에서 half Murashige and Skoog(MS)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 배지에서 배양되었다. 각 단일 식물에서 신선한 벼 잎을 수집하여 유전자형 분석을 위한 genomic DNA를 추출했다. CTAB(cetyl trimethylammonium bromide) 방법을 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. 사용된 프라이머(*OsNLP2* Forward(F), 5'-GAGCCAAGGAATCTCCTCCTCTTC-3'(서열번호 1), *OsNLP2* Reverse(R), 5'- CTTGAGGTCCATTCTGGCACCCCA-3'(서열번호 2), T-DNA2715 RB, 5'- GTTACGTCCTGTAGAAACCCCAA-3(서열번호 3))는 돌연변이 데이터베이스의 정보를 기반으로 T-DNA 삽입 부위 근처에 설계되어, 종자 풀에서 동형 접합(homozygous) 및 이종 접합(heterozygous) 식물을 검출한다. 왼쪽 유전자 특이적 프라이머(LP, left gene-specific primer) 및 T-DNA 오른쪽 경계 프라이머(RB, T-DNA right border primer)를 역전자 PCR(RT-PCR) 분석에 사용하여 *ΔOsnlp2* 돌연변이 식물에서 T-DNA 삽입을 확인했다.

[0059] cDNA를 합성하기 위해 Trizol 시약(Invitrogen)을 사용하여 동형 접합 식물의 총 RNA를 추출했다. *OsNLP2* RT 프라이머(Forward: 5'-GCATCAAGCCACCCTACCTT-3'(서열번호 4); Reverse: -5'TCACGATTCGCGACCCTATG-3'(서열번호 5))는 RT-PCR 및 Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction(Real-time qRT-PCR)을 통해 동진 벼 및 *ΔOsnlp2* 돌연변이 라인에서 *Osnlp2* 전사 수준 분석을 위해 사용되었다. 벼 유비퀴틴(*OsUbi*) 전사 수준은 *OsNLP2*의 전사 수준을 정규화하는 데 사용하였다. 데이터는 다른 벼 식물(n=4)의 엽초에서 *OsNLP2*의 상대적 발현량의 평균 ± SD로 표시된다.

[0060] **3. 곰팡이 배양 및 성장 조건**

[0061] *M. oryzae* (*Magnaporthe oryzae*) 균주 P06-6, KI215, KJ401, 70-15, Y34, RO1-1 및 007은 서울대학교 진균 유전 자원 센터(Center for Fungal Genetic Resources, Seoul National University, Seoul, Korea)에서 입수하였다. *M.oryzae* P06-6, KI215, KJ401, 70-15, Y34 및 RO1-1은 동진 벼에 독성이 있지만, *M.oryzae* 007은 동진 벼에 독성이 없다. *M. oryzae* 균주는 -20℃에서 보관하고 쌀 겨(rice bran) 한천 배지(20 g rice bran, 20 g sucrose 및 20 g agar)에서 암 조건, 25℃에서 14일 동안 배양했다. *M.oryzae* 배양물의 포자 형성(Sporulation) 배양 플레이트를 연속적인 형광등 (80 μmol photons m^{-2} sec^{-1}) 하에서 3일 동안 배양하여 유도되었다. 0.025%(v/v) Tween 20의 분생 포자 현탁액(conidial suspensions)을 적절한 분생 포자 농도(conidial concentrations)로 조정했다.

[0062] **4. 곰팡이 접종 및 감염 평가**

[0063] 벼 잎의 질병 증상을 모니터링하기 위해 3주된 묘목의 잎에 *M. oryzae* 분생 포자 현탁액(1.0×10^5 conidia · ml^{-1})을 균일하게 뿌렸다. 접종된 벼를 25℃에서 어둡고 습한 조건에서 24시간 동안 배양한 후 정상 조건(16h day/8h night)에 두었다. 접종 5일 후 벼 잎의 질병 증상을 모니터링 하였다.

[0064] 본 실시예의 벼 엽초(leaf sheath) 시험을 위해, 6주령 묘목 단계에서 자른 벼 엽초(길이 5 ㎝)에 *M. oryzae* 분생 포자 현탁액(5.0×10^5 conidia · ml^{-1})을 접종하였다. 접종된 벼 엽초를 습한 챔버에서 2일 동안 암 조건에서 배양하였다. 표피층을 쌀 덮개에서 절제하고 형광 현미경(Zeiss equipped with Axioplan 2; Campbell, CA, USA)으로 모니터링했다. 관찰된 감염된 표피 세포는 확장 감염(다중 세포 내부에 집락화된 침습성 균사, invasive hyphae colonized inside multiple cells), 단일 세포 감염(단일 세포 내부의 제한된 균사 성장, limited hyphal growth inside a single cell) 및 과민 반응(HR, hypersensitive response) 세포 사멸의 세 가지 감염 유형으로 분류되었다. 각 감염 유형으로 감염된 세포의 계수(counting)는 세 개의 독립적인 실험 중 하나 당 네 번의 반복 실험으로 수행되었다.

[0065] **5. 클로닝 및 플라스미드 구성**

[0066] OsNLP2 및 그 기능적 도메인의 세포 내 위치(subcellular localization)를 파악하기 위해, 엔트리 클론(entry clones)은 Gateway LR Clonase II 효소 (Invitrogen)를 사용하여, Gateway green fluorescent protein (GFP) 함유 벡터 pGWB552로 재조합되었다. *OsNLP2* (LOC_Os04g41850) 및 기능적 도메인의 코딩 서열은 Gateway *attB1* 및 *attB2* 부위(full *OsNLP2* sequence Forward, 5'-AAAAAGCAGGCTTCATGGATATGCCTACG-3'(서열번호 6); full

OsNLP2 sequence Reverse, 5'-AGAAAGCTGGGTTTATGAGCTATGTGC-3'(서열번호 7)RWP-RK-PB1 domain Forward, 5'-AAAAAGCAGGCTTCATGAATATTAGCTTG-3'(서열번호 8); PB1 domain Forward, 5'-AAAAAGCAGGCTTCATGCTGACAGTTAAG-3'(서열번호 9);)를 포함하는 유전자 특이적 프라이머를 사용하여 벼 cDNA 라이브러리에서 증폭되었다. 사용된 유전자 특이적 프라이머는 Rice Genome Annotation Project에서 제공한 유전체(genome) 정보를 기반으로 설계되었다.

[0067] *N. benthamiana* 잎에서 *OsNLP2*의 일시적인 발현 테스트를 위해 *OsNLP2* 코딩 영역과 그 기능적 도메인을 Ligation Independent Cloning(LIC) 벡터 pCAM2300-LIC에 클로닝했다. 이들의 코딩 서열은 어댑터(full *OsNLP2* sequence Forward, 5'-CGACGACAAGACCCTATGGATATGCCTACGCCA-3'(서열번호 10); RWP-RK-PB1 domain Forward, 5'-CGACGACAAGACCCTATGAATATTAGCTTGGAT-3'(서열번호 11); PB1 domain Forward, 5'-CGACGACAAGACCCTATGCTGACAGTTAAGGCA-3'(서열번호 12); and full *OsNLP2* sequence Reverse, 5'-GAGGAGAAGAGCCCTTTATGAGCTATGTGCCGC-3'(서열번호 13))가 있는 프라이머를 사용하여 벼 cDNA 라이브러리에서 증폭되었다. 증폭된 PCR 산물은 T4 DNA 중합 효소(NEB)를 사용하여 *SnaB1* 제한 효소에 의해 분해된 벡터 pCAM2300-LIC에 서브클로닝되었다.

[0068] **6. 아그로박테리움(agrobacterium) 형질전환, 세포 내 위치 및 일시적 발현 에세이(transient expression assays)**

[0069] OsNLP2의 세포 내 위치를 결정하기 위해, OsNLP2의 구성과 pGWB552:GFP 내부의 기능적 도메인을 *Agrobacterium* GV3101으로 형질 전환했다. 빈 벡터 pGWB552:GFP 도 음성 대조군(negative control)으로서 형질 전환되었다. 다른 구조체를 가진 형질 전환된 아그로 박테리아를 100 $\mu g\ m\ell^{-1}$ 스펙티노마이신(spectinomycin)을 함유하는 Luria Bertani (LB) 액체 배지에서28℃에서 밤새 배양하였다. 수집된 아그로 박테리움 세포를 침투 완충액(infiltration buffer)[97.5 mg 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid sodium salt (MES), 1 M $MgCl_2$ 0.5 mℓ, 0.1 mM acetosyringone을 50 mℓ 물에 넣음]에 현탁시켰다. 아그로 박테리움 현탁액을 *N. benthamiana* 잎에 침투시켰다. 2일 동안 배양한 후 침윤된 잎을 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 용액 (1 $\mu g \cdot m\ell^{-1}$)으로 10분 동안 암 조건에서 염색하여 세포의 핵을 시각화했다. 녹색 형광(GF, green fluorescence) 필터(Ex/Em: 488 nm/505-550 nm 파장)와 DAPI 필터(Ex/Em: 405/421-523 nm)가 있는 형광 현미경(Zeiss equipped with Axioplan 2; Campbell, CA, USA)을 사용하여 표피 세포를 관찰했다.

[0070] *N.benthamiana* 잎에서 OsNLP2를 일시적으로 발현하기 위해, 이원 벡터(binary vector) pCAM2300-LIC에서 full length *OsNLP2* 및 이의 기능적 도메인을 *Agrobacterium* GV3101으로 형질 전환했다. 침투 완충액의 아그로 박테리움 현탁액은 최종 농도 OD_{600}=1.0로 조정되었다. 세 가지 다른 구조체를 각각 포함하는 아그로-형질전환체(agro-transformants)의 현탁액을 동일한 *N.benthamiana* 잎의 개별 부위에 침투시켰다. 빈 벡터 pCAM2300-LIC 및 Infestin 1(INF1):pCAM2300-LIC는 각각 음성 및 양성 대조군으로 사용되었다. 2일 동안 배양한 후 침윤된 *N.benthamiana* 잎에서 세포 사멸 증상이 관찰되었다.

[0071] **7. *Δ Osnlp2* 돌연변이 식물에서 *Osnlp2*의 복원**

[0072] *Δ Osnlp2* 돌연변이 식물에서 *Osnlp2*의 발현을 복원하기 위해, 이원 벡터 pB2GW7(선택 마커로서의 Bar 유전자) 내부의 *Osnlp2*의 코딩 서열을 *Agrobacterium* C58C1로 형질전환시켰다. *Δ Osnlp2* 돌연변이 라인 #6-4를 사용하여 *Osnlp2*가 복원된 식물을 제작하였다. 4주령 벼 캘러스(calli)를 *Osnlp2* 유전자의 full cDNA로 형질전환된 아그로박테리움과의 3일 공동 배양에 사용하였다(도 18a). 포스피노트리신(PPT, phosphinothricin, 3mg/L 및 6mg/L) 농도가 증가하는 배지에서 형질전환된 캘리를 선택하였다. 촬영 및 발근 후 캘러스는 25℃에서 빛이 있는 조건 하에서 2주간 마지막 재생 배지에서 배양하였고, 2일 동안 물에 적응시킨 후 토양으로 옮겼다. 형질전환 식물에서 *Osnlp2*를 확인하기 위해 *Osnlp2* 프라이머(forward, 5′-ATGGATATGCCTACGCCATC-3′(서열번호 27); reverse, 5′-CTTGAGGTCCATTCTGGCACCCCA-3′(서열번호 2))와 Bar 유전자 프라이머(forward, 5′-ACCACTACATCGAGACAAGCACGGTC-3′(서열번호 28); reverse, 5′-AAGTCCAGCTGCCAGAAACCCACGT-3′(서열번호 29))를 사용하였다.

[0073] **8. RT-PCR 및 실시간 qRT-PCR 분석**

[0074] *M. oryzae*에 감염된 엽초 조직에서 벼 유전자 발현 수준은 역전사 PCR (RT-PCR) 및 실시간 정량 PCR (qRT-PCR)로 분석되었다. TRIzol 시약 (Invitrogen)을 사용하여 벼 조직에서 총 RNA를 추출한 다음 제조업체의 프로토콜에 따라 cDNA 합성 키트 (Invitrogen)를 사용하여 첫 번째 가닥 cDNA 합성을 수행했다. RT-PCR 및 실시간

qRT-PCR 모두에 대해 동일한 양의 cDNA가 템플릿으로 사용되었다. *OsNLP2*, *OsPBZ1*, *OsWRKY104*, *OsRbohB*, *OsPIP-3A* 및 *OsWRKY90* 의 발현은 TOPreal™ qPCR 2X PreMIX (SYBR Green with low ROX, Enzynomics)를 사용하여 실시간 qRT-PCR에 의해 유전자 특이적 프라이머 세트로 분석되었다. 테스트 된 벼 유전자의 상대적 발현 수준은 내부 대조군인 벼 *OsUbiquitin*의 발현 수준을 정규화하여 결정하였다. 데이터는 3개의 독립적인 실험에서 엽초의 상대적인 유전자 발현 수준의 평균 ± SD에 해당한다. 이 실시예에 사용된 유전자 특이적 프라이머 목록은 하기 표 1과 같다.

표 1

[0075]

Gene name		Sequence	유전자좌	용도	서열번호
OsNLP2	F	AAAAAGCAGGCTTCATGGATATGCCTACG	Os04g41850	유전자형 분석	6
	R	AGAAAGCTGGGTTTATGAGCTATGTGC			7
RWP-RK dommian	F	AAAAAGCAGGCTTCATGAATATTAGCTTG			8
PB1 domian	F	AAAAAGCAGGCTTCATGCTGACAGTTAAG			9
OsNLP2 RT	LP	GCATCAAGCCACCCTACCTT			4
	RP	TCACGATTCGCGACCCTATG			5
OsNLP2	F	GAGCCAAGGAATCTCCTCCTCTTC			1
	R	CTTGAGGTCCATTCTGGCACCCCA			2
T-DNA2715	RB	GTTACGTCCTGTAGAAACCCCAA			3
OsPBZ1	F	GCTACAGGCATCAGTGGTCA	Os12g36880	qRT-PCR	14
	R	GACTCAAACGCCACGAGAAT			15
OsPIP 3A	F	TCATCCTCGTCTACACCGTC	Os09g36930		16
	R	CACCCAGAAGATCCAGTGGT			17
OsWRKY90	F	ATGGCCAGCAGTAGCGACCATG	Os09g30400		18
	R	CTCTCTGTTTCTCTCAAACTGA			19
OsWRKY104	F	TGCCATTACTTCCGAGCGAC	Os11g02520		20
	R	ATTGTGAGGTGCTTGAGCCA			21
OsRbohB	F	GAATTCATGGCTGACCTGGAAGCAGGCA	Os01g25820		22
	R	CTCGAGTTAGAAGTTCTCCTTGTGGAAA			23
Ubiquitin	F	GTGGTGGCCAGTAAGTCCTC	Os06g46770		24
	R	GGACACAATGATTAGGGATCA			25

[0076] **9. ROS 감지 및 정량화**

[0077] *M.oryzae*에 감염된 벼 엽초(leaf sheaths)의 세포 ROS(H_2O_2) 위치는 염료 5-(and-6) chloromethyl-2', 7' dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (CM-H_2DCFDA) 및 3,3′ (DAB) 염색 방법을 사용하여 시각화되었다. 분리된 벼 엽초의 표피층을 4℃에서 5분 동안 물에 담가 상처로 유발된 ROS(wound-induced ROS)를 씻어낸 후, 2 μM, CM-H_2DCFDA (Molecular Probes Life Technologies, Eugene, OH)에서 30분 동안 상온의 암 조건에서 염색하였다. 1 × phosphate-buffered saline (PBS) 완충액으로 3회 세척한 후, 염색된 표피 세포를 GF 필터 (Ex/Em: 488 nm/505-550 nm 파장)를 사용하여 형광 현미경(Zeiss equipped with Axioplan 2; Campbell, CA, USA)으로 관찰했다. 감염된 벼 엽초에서 분리된 표피층을 1 mg $m\ell^{-1}$ DAB 용액 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에서 실온에서 8시간 동안 배양한 다음 에탄올, 아세트산, 글리세롤 혼합물(3:1:1, v/v/v)로 용해하였다. 현미경으로 표피 세포 내부의 ROS 위치를 관찰했다.

[0078] 접종 후 벼 엽초 세포에서 ROS 생산은 화학 발광 분석(chemiluminescence assay)으로 측정되었다. 분리된 표피층을 작은 조각(0.5 cm)으로 자르고 Milli-Q 물에 5분 동안 4℃에 담가 상처로 유발된 ROS를 감소시켰다. 표피층 조각을 30 μℓ 루미놀(Bio-Rad, Hercules, CA), 1 μℓ 홀스래디쉬(horseradish) 과산화 효소(1 mg · $m\ell^{-1}$, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) 및 69 μℓ Milli-Q 물이 포함된 용액에 옮기고 암실에서 5분 동안 실온에서 배양했다. 화학 발광(RLU, relative luminescent units)은 GloMax® 96 Microplate Luminometer (Promega, Madison, WI)를 사용하여 ROS 신호로부터 검출되었다.

[0079] **10. 철 이온 검출을 위한 프러시안 블루(Prussian blue) 염색**

[0080] 벼 엽초(leaf sheaths) 세포에서 철 이온(Fe^{3+})의 축적은 프러시안 블루 염색에 의해 시각화되었다. 벼 엽초(rice sheaths)의 표피층을 분리하고 15시간 동안 프러시안 블루 용액(7% potassium ferrocyanide and 2% hydrochloric acid (HCl))으로 염색하였다. 프러시안 블루로 염색된 표피 세포를 현미경(Zeiss equipped with Axioplan 2; Campbell, CA, USA)으로 관찰했다. 세포 내부에서 Fe^{3+}와 결합하는 ferric ferrocyanides는 외피 표피 세포에서 밝은 파란색으로 보인다.

[0081] **11. 지질 과산화 에세이(lipid peroxidation assay)**

[0082] *M.oryzae*에 감염된 벼 엽초(rice sheaths)의 지질 과산화 수준을 검출하기 위해 불포화 지방산 과산화의 산물인 malondialdehyde(MDA)를 thiobarbituric acid(TBA)와 반응시킨 후 분광 광도계를 사용하여 정량화했다. 벼 엽초를 액체 질소로 분쇄한 후 동량의 조직 분말을 반응 용액[0.5 % (w/v) thiobarbituric acid (TBA), 20 % (v/v) trichloroacetic acid (TCA) and 0.25 mℓ 175 mM NaCl in total 2 ml of 50 mM Tris-Cl, pH 8.0]과 혼합하였다. 혼합된 반응 용액을 끓는 물에서 5분 동안 배양하고, 14,000 g에서 5분 동안 4℃에서 원심 분리하였다. 생성된 상층액은 SP-2000UV 분광 광도계(Woongki Science, Seoul, Korea)로 450, 532, 600 nm 파장에서 흡광도(OD, optical density)를 측정하기 위해 사용되었다. MDA 농도(C)는 식 $C_{(MDA)} = 6.45 \times (OD_{532} - OD_{600}) - (0.56 \times OD_{450})$에 따라 계산되었다.

[0083] **12. 데페록사민(deferoxamine), 페로스타틴(ferrostatin), 사이토칼라신 A(cytochalasin A) 및 다이페닐렌아이오도늄(diphenyleneiodonium) 처리**

[0084] 철 킬레이터(iron chelator)인 데페록사민(DFO, deferoxamine), 강력한 페롭토시스(ferroptosis) 억제제인 페로스타틴(Fer-1, ferrostatin), 액틴 필라멘트 억제제인 사이토칼라신 A(Cyt A, cytochalasin A) 및 산화 효소 억제제인 다이페닐렌아이오도늄(DPI, diphenyleneiodonium)을 사용하여, *M.oryzae* 감염 동안 *ΔOsnlp2* 엽초에서 철 및 ROS 의존성 페롭토시스의 억제를 조사했다. DFO, Fer-1 및 DPI는 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO에서 구입했으며 Cyt A는 Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI에서 구입했다. DFO 처리를 위해, 벼 엽초의 표피층을 42 hpi(h post infection)에서 분리하고 실온에서 6 시간 동안 3 mM DFO에서 배양했다. Fer-1 처리를 위해, 벼 엽초의 표피층을 24 hpi에서 분리하고 진공 침투 후 실온의 암실에서 24 시간 동안 10 μM Fer-1에서 배양했다. Cyt A 및 DPI 처리를 위해, 벼 엽초(길이 5-7 cm)에 분생 포자 현탁액 (5 x 105 분생 포자 ml^{-1})을 물(mock), Cyt A(20 $\mu g \cdot ml^{-1}$) 또는 DPI (5μM) 용액에 접종되었다. 접종 및 처리된 벼 엽초를 암실에서 25℃에서 48시간 동안 배양하였다. 감염되고 처리된 벼 엽초의 중간의 얇은 표피층을 다르게 염색하고 형광 현미경(Zeiss equipped with Axioplan 2, Campbell, CA)으로 관찰했다.

[0086] **결과**

[0087] **1. OsNLP2, ΔOsnlp2 돌연변이체 및 OsNLP2 복원 식물의 동정(identification)**

[0088] 잘린(truncated) RWP-RK 도메인을 포함하는 단백질을 벼 cDNA 라이브러리에서 스크리닝하였고, 이는 NCBI(National Center of Biotechnology Information)의 DNA 서열 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)에 의해 NIN-유사 단백질(OsNLP2로 명명됨)로 식별되었다. NIN 계열 단백질은 결절 및 질산염 신호 전달에서 전사 인자(TF)로 확인되었다. 본 발명자는 벼 RWP-RK 계열 단백질(NLP 하위 계열 및 RKD 하위 계열 단백질)의 아미노산 서열을 다른 식물(*Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula*, and *Brachypodium distachyon*) NLP 단백질과 정렬했다(도 11). 본 실시예에 사용된 OsNLP2는 GAF 유사 도메인, RWP-RK 도메인(N567 to V615) 및 C-말단 Phox 및 Bem1(PB1) 도메인(L835 to D915)을 가지고 있다(도 11). GAF-유사 도메인은 NLP 서브 패밀리 단백질의 N-말단 영역에서 검출되었다. NLP 단백질에서 GAF-유사 도메인의 기능은 아직 알려지지 않았다. RWP-RK 모티프에는 RWP-RK 계열 단백질의 DNA 결합을 담당하는 보존된 아미노산 서열 Arg-Trp-Pro-X-Arg-Lys (X, 모든 아미노산)이 포함되어 있다. PB1 도메인에는 양으로 하전된 라이신(K, lysine)과 음으로 하전된 OPCA 모티프(D-x-D/E-x-D/E)가 포함되어 있다(도 11). NLP에서 GAF 유사 도메인의 기능은 아직 알려지지 않았다. 정렬된 NLP 단백질의 대부분은, 표준 RWP-RK 모티프가 없는 OsNLP6을 제외하고는, 보존된 RWP-RK 도메인과 PB1 도메인을 공유한다. OsRKD 단백질에는 PB1 도메인이 없다. 또한 MEGA7 software를 사용하여 인접 결합 방법(neighbor-joining method)으로 계통 발생 트리를 구성했다(도 12). NLP 서브 패밀리 단백질은 계통 발생 트리에서 RKD 서브 패밀리 단백질과 구별된다. 본 실시예에 사용된 OsNLP2는 계통 발생적으로 BdNLP4, OsNLP5 및

BdNLP3에 매우 가깝다(도 12). 식물 RWP-RK 계열 단백질의 아미노산 서열은 rice genome annotation project, the Arabidopsis Information Resource (TAIR), Phytozome 및 NCBI의 정보를 기반으로 정렬되었다. 정렬된 식물 NPL 단백질의 수탁 번호는 하기 표 2에 나열되어 있다.

표 2

[0089]

Arabidopsis thaliana	
AtNLP1	AT2G17150
AtNLP2	AT4G35270
AtNLP3	AT4G38340
AtNLP4	AT1G20640
AtNLP5	AT1G76350
AtNLP6	AT1G64530
AtNLP7	AT4G24020
AtRKD1	AT1G18790
AtRKD2	AT1G74480
AtRKD3	AT5G66990
AtRKD4	AT5G53040
AtRKD5	AT4G35590
Medicago truncatula	
MtNLP1	Medtr2g099350
MtNLP2	Medtr4g068000
MtNLP3	Medtr1g100970
Brachypodium distachyon	
BdNLP1	Bradi1g76340
BdNLP2	Bradi4g37147
BdNLP3	Bradi 4g20717 & Bradi4g20730
BdNLP4	Bradi5g23300
BdNLP5	Bradi3g03170
BdNLP6	Bradi2g31710
BdNLP7	Bradi2g08177
Oryza sativa ssp. japonica	
OsNLP1	Os03g03900
OsNLP2	Os04g41850
OsNLP3	Os01g13540
OsNLP4	Os09g37710
OsNLP5	Os11g16290
OsNLP6	Os02g04340
OsRKD1	Os01g14420
OsRKD3	Os01g37100
OsRKD4	Os04g47640
OsRKD5	Os06g12360
OsRKD6	Os02g51090
OsRKD7	Os08g19820
OsRKD8	Os12g12970
OsRKD9	Os09g27190
OsRKD10	Os02g20530
OsUbiquitin	Os06g46770

[0090] *Δ Osnlp2* 돌연변이 라인 #4-2, #5-1 및 #6-4는 T-DNA 삽입 돌연변이 유발에 의해 야생형 벼 재배종 DJ(dongjin)로부터 생성되었다. *Δ Osnlp2* 돌연변이체의 모든 정보는 Salk Institute에서 관리하는 Rice Functional Genomic Express Database (RiceGE)에서 얻었다. T-DNA pGA2715는 OsNLP2 genomic DNA의 5'-비번역 부위(UTR, untranslated region)의 -385 bp에 삽입되었다(도 13A). 두 쌍의 프라이머(*OsNLP2* forward and *OsNLP2* reverse; *OsNLP2* forward and T-DNA pGA2715 RB reverse)는 *OsNLP2* genomic DNA와의 중합 효소 연쇄 반응(PCR)을 통해 동형 접합(homozygous) transgenic *Δ Osnlp2* 식물을 선택하도록 설계되었다. 3개의 *Δ Osnlp2*

돌연변이 라인 #4-2, #5-1 및 #6-4는 PCR 산물의 전기 영동에 의해 동형 접합 돌연변이로 확인되었다(도 13B). 야생형 동진 벼 및 *Δ Osnlp2* 돌연변이 라인에서 *OsNLP2*의 전사 수준은 역전사 중합 효소 연쇄 반응(RT-PCR) 및 RT 프라이머 세트(LP 및 RP)를 사용한 실시간 qRT-PCR을 사용하여 분석되었다. *OsNLP2*는 추가 실험에 사용된 3개의 *Δ Osnlp2* 돌연변이 라인에서는 유의하게 억제되었다(도 13C).

[0091] *Δ Osnlp2* 돌연변이 라인 # 6-4를 사용하여 아그로박테리움 매개 벼 형질전환 식물을 제작하였다. 야생형 벼 DJ, *Osnlp2* 돌연변이 라인 # 6-4 및 복원 식물의 *OsNLP* 전사 수준은 RT 프라이머 세트(LP 및 RP)를 사용하여 RT-PCR 및 실시간 qRT-PCR 분석을 수행하여 분석하였다. *OsNLP2* 발현은 야생형 벼 DJ에 비해 *Δ Osnlp2* 돌연변이 라인 #6-4에서 유의하게 낮았으나, 복원 식물(도 18b의 Complementation No. 3, No. 11, No. 12)에서는 다시 발현 수준이 높아졌다(도 18b).

[0092] **2. 벼와 M.oryzae 상호 작용에서의 OsNLP2 발현 패턴**

[0093] 질소(N) 활용의 핵심 조절자 유전자인 *OsNLP1*은 N 부족에 의해 빠르게 유도되었으며, *OsNLP1*은 질소 사용 효율(NUE, nitrogen use efficiency) 및 벼 수확량 개선을 위한 잠재적 타겟이 된다. 벼에서 *OsNLP3*는 발아 후 유도되고 열 처리에 의해 억제된다. *OsNLP4*는 여러 비생물적 스트레스에 의해 억제되고 낮은 인산염 가용성(low phosphate availability)에 의해 유도된다. 그러나 RWP-RK 계열 단백질이 식물 질병 및 면역에 관여하는지 여부는 알려져 있지 않다. 본 발명에서 발명자들은 *M.oryzae* 감염 동안 동진 벼의 엽초에서 *OsNLP2*의 전사 수준을 분석했다(도 1). 야생형 쌀로 사용된 DJ 품종의 감염된 엽초는 *M.oryzae* PO6-6 (독성) and 007 (비독성)을 접종한 후 초기 시점에 샘플링되었다. 실시간 qRT-PCR 데이터는 독성 *M.oryzae* PO6-6 감염이 초기 감염 단계(3-48hpi)에서 DJ 엽초에서 *OsNLP2* 발현을 뚜렷하게 유도했음을 보여준다. 대조적으로, 무독성 *M.oryzae* 007에 의한 감염은 벼와 M.oryzae의 비호환(incompatible) 상호 작용 동안 48hpi까지 *OsNLP2* 발현을 유발하지 않았다. 이러한 *OsNLP2* 발현 패턴(도 1)은 *OsNLP2*가 도열병(blast disease, susceptibility)에 관여하고 HR(hypersensitive response) 세포 사멸을 억제하고 *M.oryzae* 감염에 대한 벼의 방어 반응을 억제하는 음성 조절 유전자(negative regulator gene) 역할을 할 수 있음을 나타낸다.

[0094] **3. *OsNLP2*의 세포 내 위치 및 일시적 발현**

[0095] 전사 인자의 식물 특이적 RWP-RK 패밀리 단백질은 적어도 부분적으로 핵에 위치되어 있다. OsNLP2에는 특징적인 RWP-RK 도메인과 C-말단 Phox 및 Bem1(PB1) 도메인(도 2A, 도 11)이 포함되어 있으며, 이는 각각 DNA 결합 및 단백질-단백질 상호 작용에 기능할 수 있다. *OsNLP2* 코딩 서열 및 그 잘린 RWP-RK 또는 PB1 도메인 영역은 녹색 형광 단백질(GFP) 태그로 구성되고 아그로-침투법(agro-infiltration method)을 사용하여 *N.benthamiana* 잎에서 일시적으로 발현되었다. *N.benthamiana* 잎 세포 내부의 핵을 DAPI로 대조 염색하고 형광 현미경을 사용하여 관찰했다(도 2B). 대조군 GFP 구조체(OO:GFP)는 *N.benthamiana* 세포의 원형질막 및 세포질에서 편재적으로 검출되었다. OsNLP2:GFP 는 *N.benthamiana* 세포의 핵에만 위치했으며, DAPI 염색된 핵과 겹쳤다(도 2B). 그러나, RWP-RK+PB1:GFP 및 PB1:GFP는 세포질과 핵 모두에 위치하였다. 이러한 세포 내 위치 이미지는 OsNLP2가 특정 DNA 서열에 결합하는 전사 인자로 작용할 수 있는 핵 내에 위치함을 나타낸다. OsNLP2가 핵에 위치하기 위해 전체 *OsNLP2* 코딩 서열이 필요할 수 있지만 특정 RWP-RK 도메인 또는 PB1 도메인은 필요하지 않다. OsNLP2가 식물에서 세포 사멸을 유발하는지 여부를 조사하기 위해 아그로-침투법을 사용하여 *N.benthamiana* 잎에서 full length *OsNLP2*와 기능적 PB1 및 RWP-RK-PB1 도메인을 일시적으로 표현했다(도 14). 양성 대조군 인페스틴 1(INF1, Infestin 1)의 일시적 발현은 명백하게 전형적인 세포 사멸 반응을 유도했다. 그러나, full length *OsNLP2*, PB1 및 RWP-RK-PB1 도메인의 일시적인 발현은 *N.benthamiana* 잎에서 어떠한 세포 사멸 반응도 유발하지 않았다. 이 일시적 발현 여부는 *OsNLP2* 발현이 식물에서 세포 사멸을 유발하지 않음을 나타낸다.

[0096] **4. OsNLP2 돌연변이의 M.oryzae 감염에 대한 과민 반응(HR, hypersensitive response) 내성 반응 유발 효과**

[0097] 식물 질병 및 면역에서 *OsNLP2*의 역할을 조사하기 위해, 3주령 묘목에서 야생형 동진 벼 및 *Δ Osnlp2* 녹아웃(KO, knockout) 돌연변이 라인 #4-2, #5-1 및 #6-4의 잎을 *M.oryzae* PO6-6 (독성) and 007 (비독성)의 분생 포자 현탁액(1.0×10^5 conidia · $m\ell^{-1}$)과 함께 분무 접종(spary-inoculated)시켰다. 이 *Δ Osnlp2* 돌연변이 라인은 야생형 동진 벼처럼 정상적으로 잘 자랐다. M.oryzae 와 함께 접종 후 5일째에 전체 잎의 병(disease) 표현형을 관찰하고 사진을 찍었다(도 3A). 독성 *M.oryzae* PO6-6 감염은 동진 벼 잎에 크고 타원형이며 칙칙한 확장된 병변을 나타내는 전형적인 감수성 질병 반응(susceptible disease reaction)을 일으켰다. 대조적으로, *Δ Osnlp2* 돌연변이 잎은 *M.oryzae* PO6-6 감염은 작고 괴사성(necrotic)인 짙은 갈색의 제한된 반점과 함께 전형적인 과민 반응(HR) 내성 반응을 나타냈다. 무독성 *M.oryzae* 007 감염은 또한 동진 벼와 *Osnlp2* 돌연변이 잎에서 작은 크기의 갈색 병변과 저항 반응을 유도했다(도 3A). 특히, *Δ Osnlp2* 돌연변이체의 잎은 *M.oryzae* 007 감염 동안 변

색되어 황백색 또는 옅은 노란색으로 변색되었다. 이러한 감염 표현형은 *Δ0sn1p2* 돌연변이 #4-2, #5-1 및 #6-4가 *M.oryzae* PO6-6 및 007에 대해 매우 내성이 있음을 나타낸다.

[0098] 세포 수준에서 *Δ0sn1p2* 돌연변이 라인의 초기 감염 반응을 조사하기 위해, *M.oryzae* PO6-6 및 007의 분생 포자 현탁액(5.0 x 10^5 conidia · $m\ell^{-1}$)을 5주령된 식물 성장 단계의 동진 벼 및 *Δ0sn1p2* 돌연변이 라인의 엽초에 접종했다. 감염된 벼 엽초의 표피층을 잘라내어 현미경으로 48hpi에서 관찰하였다. *M.oryzae*에 대한 벼 표피 세포의 감염 반응은 세 가지 감염 유형으로 분류되었다; 1) 세포 그룹에서 구상(bulbous) 침습성 균사(IH, invasive hyphae)를 발생시키는 확장 감염, 2) 단일 세포에서 제한된 얇고 사상(filamentous)의 균사 성장이 있는 단일 세포 감염, 3) 소포(vesicles)를 포함한 세포 응집체(암갈색)에 의한 과민 반응(HR) 세포 사멸(도 3B). 독성 *M.oryzae* PO6-6는 70.4% 세포에서 확장 감염을 일으켰지만, 야생형 동진 벼의 17.6% 세포에서 HR 세포 사멸을 일으켰다(도 3B). 대조적으로, *M.oryzae* PO6-6 감염은 3개의 *Δ0sn1p2* 돌연변이 라인의 엽초에서 72% 이상의 세포에서 HR 세포 사멸 반응을 일으켰다. 그러나, *Δ0sn1p2* 복원 식물에서는 HR 세포 사멸 비율이 27.88%로 감소하여 야생형 벼 DJ과 유사하였다(도 18c). 무독성 *M.oryzae* 007 감염은 동진 벼 및 *Δ0sn1p2* 돌연변이 라인 모두 86% 이상의 표피 세포에서 HR 세포 사멸 반응을 유도했다. 이러한 초기 감염 반응 데이터는 *Δ0sn1p2* 돌연변이가 *M.oryzae* PO6-6 및 007에 대해 매우 내성이 있음을 나타낸다.

[0099] **5. *Δ0sn1p2* 돌연변이체에서 *M.oryzae*에 대한 ROS 및 철 의존성 ferroptotic 세포 사멸 효과**

[0100] *0sn1p2* knockout 돌연변이가 벼에서 HR 세포 사멸 반응을 유발하는지 여부를 조사하기 위해, 초기 *M.oryzae* PO6-6 감염 동안 동진 벼 및 *Δ0sn1p2* 돌연변이체의 엽초 세포에서 ROS 및 철 이온(Fe^{3+}) 축적과 지질 과산화를 분석했다(도 4). ROS 축적은 CM-H_2DCFDA 및 DAB 염색에 의해 감지되고 시각화되었다. ROS 민감성인 CM-H_2DCFDA 염료는 살아있는 식물 세포에서 ROS 위치를 모니터링하는 데에 사용되었다. CM-H_2DCFDA 염료는 살아있는 세포에서 ROS와 반응하여 2', 7' – dichlorofluorescein (DCF)를 생성한다. 이는 녹색 형광(GF) 필터가 있는 형광 현미경을 사용하여 검출할 수 있는 고형광(highly fluorescent) 제품이다.

[0101] CM-H_2DCFDA(녹색 형광) 및 DAB(짙은 갈색) 염색 이미지는 ROS(H_2O_2)가 *Δ0sn1p2* 표피 세포에서 침습성 균사(IH) 내부 및 주변에 강하게 축적되었지만 초기 *M.oryzae* PO6-6 감염 동안 야생형 동진 벼 세포에는 축적되지 않았음을 보여준다(도 4A). CM-H_2DCFDA에 특이적인 ROS-localized 형광은 20-48hpi에 *Δ0sn1p2* 돌연변이 세포에서 IH 내부 및 주변에서 뚜렷하게 볼 수 있었다(도 4A, 도 15). DAB는 과산화 효소의 존재 하에 H_2O_2에 의해 산화되어 식물 세포에서 암갈색 침전물을 생성한다. 세포 응집체(암갈색)를 갖는 DAB로 염색된 표피 세포는 48hpi에 *Δ0sn1p2* 돌연변이체의 엽초에서 관찰되었다. 화학 발광 분석은 ROS 축적 수준이 48hpi에 동진 벼 세포에서보다 *Δ0sn1p2* 돌연변이 세포에서 유의하게 더 높았다는 것을 보여준다(도 4B).

[0102] 벼 표피 세포에서 철 이온(Fe^{3+}) 축적 및 위치는 *M.oryzae* 007 감염 48hpi에 프러시안 블루(파란색) 염색에 의해 검출되었다(도 4A). 반응성이 높은 Fe^{2+}는 H_2O_2에 의해 산화되어 Fe^{3+} 및 독성 OH · 을 생성하여(Fenton 반응) 지질, 단백질, DNA 및 세포 성분에 심각한 손상을 초래한다. 48hpi에 Fe^{3+}의 축적 *Δ0sn1p2* 표피 세포에서 침습성 균사 내부 및 주변에서 관찰되었지만(파란색) 동진 벼 세포에서는 관찰되지 않았다(도 4A). 이러한 결과는 ROS와 철 이온(Fe^{3+})이 감염 중에 *Δ0sn1p2* 세포에 동시에 축적되었음을 나타낸다.

[0103] 다음으로, 본 발명자는 *M.oryzae* 007을 사용하여 48hpi에서 동진 벼와 *Δ0sn1p2* 엽초의 지질 과산화를 분석했다(도 4C). 지질의 산화 또는 지질 과산화는 지방산 막의 다중 불포화 지방산을 공격하는 여러 ROS(히드록실 라디칼, 과산화수소 등)의 영향에 의해 생성되어 상당한 조직 손상을 초래한다. 지질 과산화의 중요한 지표인 말론디알데히드(MDA, Malondialdehyde)는 티오바르비투르 산(TBA, thiobarbituric acid)과의 반응 후 분광 광도계를 사용하여 정량화되었다. 지질 과산화 수준(MDA 수준)은 동진 벼 세포(도 4C)보다 *Δ0sn1p2* 엽초에서 유의하게 높았으며, 이는 강화된 ROS 및 Fe^{3+} 수준이 *Δ0sn1p2* 세포에서 산화 스트레스 수준의 상승으로 이어진다는 것을 나타낸다. *Δ0sn1p2* 엽초에서 ROS 및 철 이온(Fe^{3+}) 축적 및 지질 과산화는 *M.oryzae* 감염에 대한 ROS 및 철 의존성 ferroptotic 세포 사멸 반응에 관여할 수 있다.

[0104] **6. DFO(철 킬레이터) 및 Fer-1(페롭토시스 억제제)의 *M.oryzae*에 대한 *Δ0sn1p2* 돌연변이체에서 ROS 및 철 의존성 페롭토시스 세포 사멸 억제 효과**

[0105] 철 킬레이터(chelator) 데페록사민(DFO, deferoxamine)(3 mM)을 *M.oryzae* PO6-6으로 접종한 후 *Δ0sn1p2* 돌연변이 라인 #4-2의 엽초에 처리했다. DFO 처리는 *M.oryzae* PO6-6에 감염된 *Δ0sn1p2* 엽초에서 ROS 및 철 이온의 축적과 HR 세포 사멸을 억제했다(도 5). ROS 축적은 DAB 염색에 의해 검출되었고, 철 이온(Fe^{3+}) 축적은 프러시안 블루 염색에 의해 가시화되었다(도 5A). ROS 및 철 이온(Fe^{3+}) 축적 및 HR 세포 사멸은 DFO로 처리된 *Δ0sn1p2* 엽초의 감염된 벼 세포에서 뚜렷하게 억제되었다. ROS 생산의 화학 발광 분석은 DFO 처리가 *M.oryzae* PO6-6에 감염된 *Δ0sn1p2* 엽초에서 ROS 축적을 유의하게 억제했음을 보여준다(도 5B). 다음으로, 현미경을 사용하여 48 hpi에서 DFO(3 mM)로 처리된 벼 엽초(rice sheaths)에서 감염된 세포 표현형(확장 감염, 단일 세포 감염 및 HR 세포 사멸)을 정량화했다(도 5C). DFO 처리는 *Δ0sn1p2* 엽초에서 HR 세포 사멸 반응의 유도를 강력하게 억제하여 궁극적으로 *M.oryzae*의 호환적인(compatible) IH 성장을 유도했다.

[0106] 페롭토시스(ferroptosis) 억제제인 페로스타틴-1(Fer-1, ferrostatin-1)(10 μM)을 *Δ0sn1p2* 돌연변이 라인 #4-2의 감염된 벼 엽초에 24hpi에서 처리하였다. Fer-1 처리는 *M.oryzae* PO6-6 감염 동안 *Δ0sn1p2* 엽초에서 ROS 및 Fe^{3+}의 축적, 지질 과산화 및 HR 세포 사멸을 뚜렷하게 억제했다(도 6). 현미경 이미지는 *M.oryzae* 감염 동안 Fer-1 처리가 *Δ0sn1p2* 돌연변이 #4-2의 엽초 표피 세포에서 IH 내부 및 주변의 ROS 및 Fe^{3+}의 축적을 뚜렷하게 차단했음을 보여준다(도 6A). 특히, Fer-1 처리는 *Δ0sn1p2* 엽초에서 세포 응집체(암갈색) IH 주변의 HR 세포 사멸 반응을 유의하게 억제하여 벼 엽초 세포(rice sheat cell)에서 IH의 성공적인 집락화(colonization)을 유도했다(도 6A 및 도 6D). 화학 발광 분석은 또한 Fer-1 처리가 48 hpi에서 *Δ0sn1p2* 외피 표피 세포에서 ROS 생성을 상당히 억제했음을 보여준다(도 6B). MDA 분석을 사용하여 모의(mock) 및 Fer-1 처리된 *Δ0sn1p2* 엽초 세포에서 48 hpi에서 지질 과산화 수준을 추가로 정량화했다(도 6C). *M.oryzae* PO6-6 감염은 HR 세포 사멸 반응을 나타내는 *Δ0sn1p2* 엽초 세포에서 지질 과산화를 뚜렷하게 유도했다. 그러나 10 μM Fer-1 처리는 *M.oryzae* PO6-6에 감염된 *Δ0sn1p2* 엽초에서 지질 과산화를 억제했다.

[0107] **7. Cyt A(액틴 중합 억제제) 및 DPI(NADPH 산화 효소 억제제)의 *M.oryzae*에 대한 *Δ0sn1p2* 엽초에서 ROS 및 철 이온의 축적과 HR 세포 사멸 억제 효과**

[0108] Cyt A(20 $\mu g \cdot m\ell^{-1}$) 또는 DPI(5 μM) 용액에 *M.oryzae* PO6-6의 분생 포자 현탁액(conidial suspension)(5 x 10^5 conidia $m\ell^{-1}$)을 벼 엽초(rice leaf sheaths)에 접종하였다. CM-H_2DCFDA, DAB 및 프러시안 블루 염색 이미지(도 7A)에서 볼 수 있듯이 Cyt A 처리는 *Δ0sn1p2* 엽초에서 *M.oryzae* PO6-6에 의해 유도된 ROS 및 Fe^{3+}의 축적과 HR 세포 사멸을 억제했다. 화학 발광 분석은 또한 Cyt A 처리가 48 hpi에서 *Δ0sn1p2* 엽초에서 ROS 생성을 유의하게 억제했음을 보여준다(도 7B). *M.oryzae* PO6-6은 Cyt A(20 $\mu g \cdot m\ell^{-1}$)로 처리된 *Δ0sn1p2* 엽초 세포에서 정상적인 균사 균주로 잘 자랐다(도 7C). DPI(5 μM) 처리는 *M.oryzae* PO6-6에 감염된 *Δ0sn1p2* 엽초에서 ROS 및 Fe^{3+}의 축적과 HR 세포 사멸을 뚜렷하게 억제하여 벼 엽초 세포 내부에 IH의 성공적인 집락화(colonization)을 유도했다(도 8). *Δ0sn1p2* 세포의 ROS 축적은 CM-H_2DCFDA 및 DAB 염색에 의해 검출되었으며, Fe^{3+}의 축적은 프러시안 블루 염색에 의해 시각화되었다(도 8A). 화학 발광 분석으로 정량화한 바와 같이 DPI 처리는 48hpi에서 *Δ0sn1p2* 엽초에서 ROS 생성을 현저하게 억제했다(도 8B). 그러나, DPI 처리는 *M.oryzae* PO6-6 감염을 분명하게 촉진시켰지만 *Δ0sn1p2* 엽초에서 HR 세포 사멸을 억제했다(도 8C).

[0109] **8. *M.oryzae* 감염 동안 *Δ0sn1p2* 돌연변이 세포에서 방어 관련 유전자(defense-related genes)의 시간 경과에 따른 발현**

[0110] 본 발명자들은 다음으로 *M.oryzae* PO6-6 접종 후 시간에 따라 동진 벼 및 *Δ0sn1p2* 돌연변이 라인 #4-2 엽초에서 *OsPBZ1, OsPIP-3A, OsWRKY104, OsWRKY90* 및 *OsRbohB*의 발현 수준을 정량화했다(도 9). *OsPBZ1*는 벼에서 PBZ(probenazole) 유도성 유전자로 확인되었다. 플라즈마 막 내재 단백질(PIP, plasma membrane intrinsic proteins)인 아쿠아포린(aquaporins)은 살아있는 유기체의 생물학적 막을 통해 물과 작은 중성 분자의 수송을 촉진하는 막 채널이다. *M.oryzae* PO6-6 감염은 *Δ0sn1p2* 돌연변이 라인 #4-2 엽초에서 6-36hpi에서 *OsPBZ1* 발현을 뚜렷하게 유도했지만 야생형 동진 벼에서는 거의 나타나지 않았다. *OsPIP-3A*는 동진 벼에 비해 *Δ0sn1p2* 돌연변이 라인 #4-2에서 6hpi 및 24-48hpi에서 고도로 유도되었다. OsPIP2;1은 물 수송 및 식물 성장 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 입증되었다. WRKY 단백질은 다양한 식물 과정에 관여하지만 특히 생물적 및 비생물적 스트레스에 대한 유도성 방어 반응에 관여하는 대규모 전사 인자 군이다. *OsWRKY104* 유도는 3-24hpi에서 *Δ*

Osnlp2 돌연변이 라인 #4-2의 엽초에서 명백했다. 그러나 *OsWRKY90*은 *OsWRKY104*에 비해 *ΔOsnlp2* 엽초에서 유도되지 않았다. 식물 호흡기 파열 산화 효소 동족체(PBOH, plant respiratory burst oxidase homologs)는 식물 면역에 관여하는 활성 산소 종(ROS)을 생성한다. 특히, NADPH 산화 효소 *OsRbohB*는 *ΔOsnlp2* 엽초에서 3-18hpi에서 뚜렷하게 촉발되었다. 무독성 *M.oryzae* P007 감염의 경우, 독성 *M.oryzae* P06-6 감염과 달리, 초기 감염 시 야생형 동진 벼의 엽초에서 이러한 모든 방어 관련 유전자 *OsPBZ1, OsPIP-3A, OsWRKY104, OsWRKY90* 및 *OsRbohB*를 뚜렷하게 유도했다(도 16). 종합적으로, 이러한 결과는 *M.oryzae* P06-6 감염이 *ΔOsnlp2* 엽초에서 *OsPBZ1, OsPIP-3A, OsWRKY104* 및 *OsRbohB* 발현을 유발한다는 것을 나타낸다.

[0111] **9. 다른 *M.oryzae* 균주에 대한 *ΔOsnlp2* 돌연변이 라인의 높은 저항성(resistance) 및 *Osnlp2* 복원 식물의 감수성(susceptibility)**

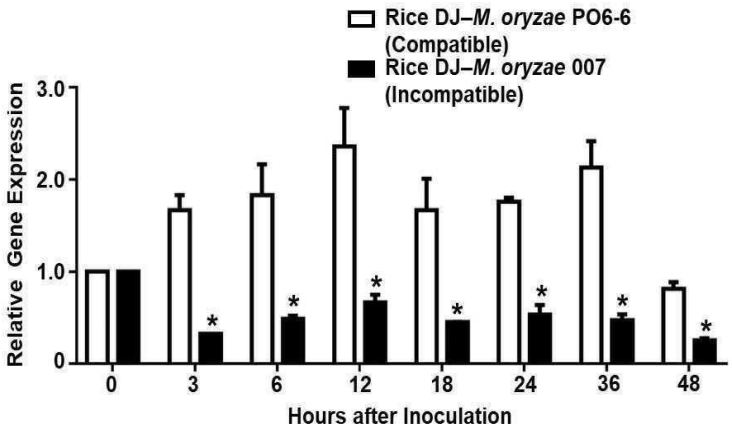
[0112] 본 발명자들은 *ΔOsnlp2* 돌연변이 라인이 야생형 동진 벼에 대해 독성이 있는 다른 *M.oryzae* 균주 KI215, KJ401, 70-15, Y34 및 RO1-1에 내성이 있는지 여부를 추가로 조사했다. *ΔOsnlp2* 돌연변이체의 초기 감염 반응은 다양한 *M.oryzae* 균주로 벼 엽초를 접종한 지 48시간 후에 현미경으로 세포 수준에서 조사되었다(도 10). 전반적으로 야생형 동진 벼는 테스트된 모든 *M.oryzae* 균주에 매우 감수성(susceptibility)을 나타냈다. 그러나, *ΔOsnlp2* 돌연변이 라인 #4-2, #5-1 및 #6-4는 이들 *M.oryzae* 균주에 대해 높은 내성을 가졌다. 테스트된 모든 *M.oryzae* 균주에 의한 초기 감염 동안, 야생형 동진 벼의 엽초 세포는 민감성 감염 유형, 즉 다중 세포에서 감연 균사 성장이 확장된 60-80%의 세포를 나타냈다. 대조적으로, *M.oryzae* KI215는 *ΔOsnlp2* 돌연변이체에서 엽초의 60% 이상이 표피 세포에서 HR 세포 사멸 반응을 유도했다. *M.oryzae* KJ401, 70-15, Y34 및 RO1-1 감염은 48hpi에서 약 80% 세포 수준으로 표피 세포에서 HR 세포 사멸 반응을 유도했다. 종합적으로, 이러한 결과는 *ΔOsnlp2* 돌연변이 라인이 다양한 *M.oryzae* 균주에 대한 광범위한 스펙트럼(broad spectrum)을 갖는 race 비특이적 저항성(race-nonspecific resistance)을 나타낸다는 것을 제시한다.

[0113] 추가로 본 발명자들은 *M.oryzae* P06-6, KJ401, 70-15, RO1-1 및 Y34 균주를 야생형 동진 벼, *ΔOsnlp2* 돌연변이 라인 #6-4 및 *Osnlp2* 유전자가 복원된 식물의 엽초에 접종하여 저항성 반응을 나타내는지 확인하였다. 벼 세포에서 세 가지 감염 유형(확장 감염, 단일 세포 감염 및 과민 반응(HR) 세포 사멸)을 나타내는 세포 수를 48 hpi에서 현미경으로 계산하였다. 도 18c에 나타난 바와 같이, 복원 식물 No. 3, No. 11, No. 12은 야생형 동진 벼와 같이 *M.oryzae* P06-6, KJ401, 70-15, RO1-1 및 Y34 균주에 의해 확장 감염을 나타냈다. 그리고 *ΔOsnlp2* 돌연변이 라인 #6-4이 *M.oryzae* P06-6, KJ401, 70-15, RO1-1 및 Y34 균주 감염에 대해 60% 이상의 세포에서 과민 반응(HR) 세포 사멸을 나타낸 것과 달리, 복원 식물 No. 3, No. 11, No. 12은 HR 세포 사멸률이 약 20%~60%로 나타나 독극성 균주에 대한 저항성이 낮은 것으로 나타났다(도 18c). 이는 복원 식물 No. 3, No. 11, No. 12가 *ΔOsnlp2* 돌연변이 라인 #6-4과 달리 *M.oryzae* P06-6, KJ401, 70-15, RO1-1 및 Y34에 대해 내성이 없음을 나타낸다.

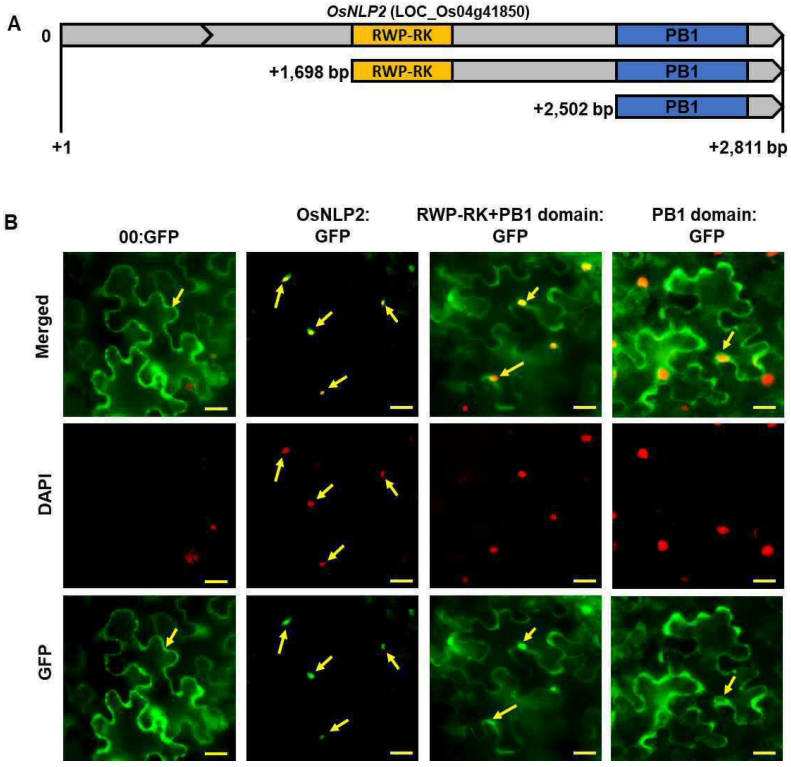
[0114] 즉, *Osnlp2* 유전자가 복원된 식물은 *Osnlp2* 유전자 결핍 돌연변이 벼가 도열병균에 대해 저항성을 보이는 것과 달리 야생형 동진 벼처럼 정상적으로 도열병균 접종에 의해 도열병이 발생하였다. 이는 *Osnlp2* 유전자가 벼의 도열병에 대해 저항성을 결정하는 음성(negative) 조절 인자임을 시사한다.

도면

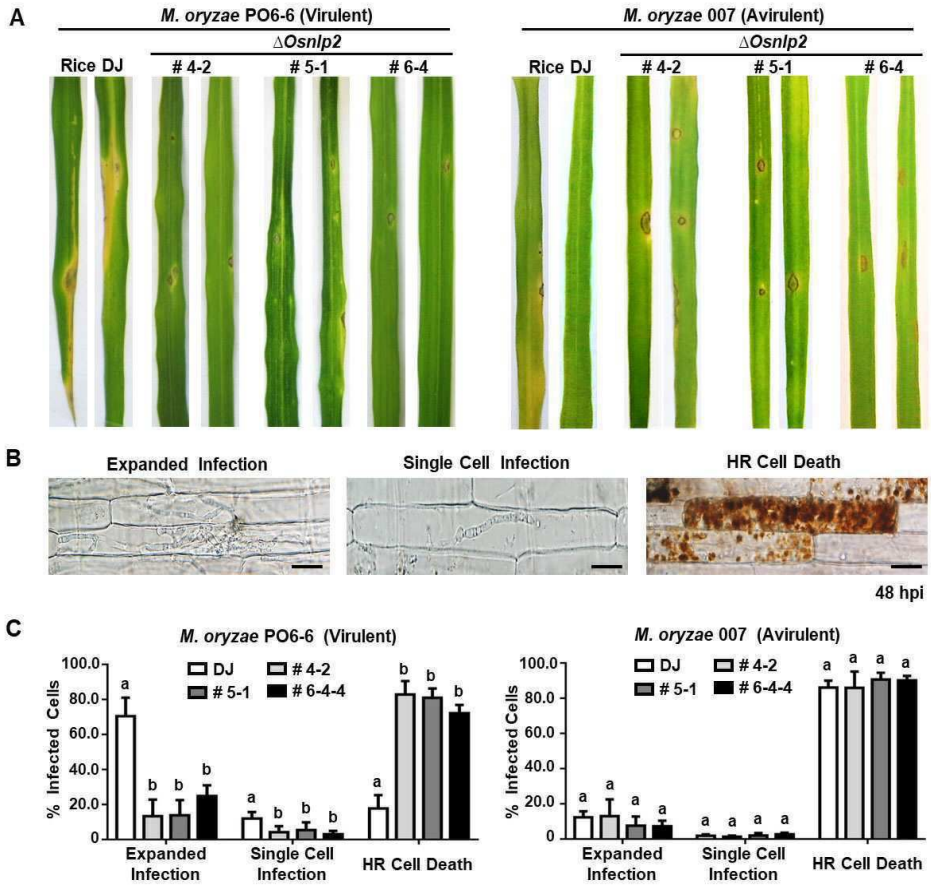
도면1


Rice DJ–M. oryzae PO6-6
(Compatible)
Rice DJ–M. oryzae 007
(Incompatible)
Relative Gene Expression
3.0
2.0
1.0
0
0
3
6
12
18
24
36
48
Hours after Inoculation

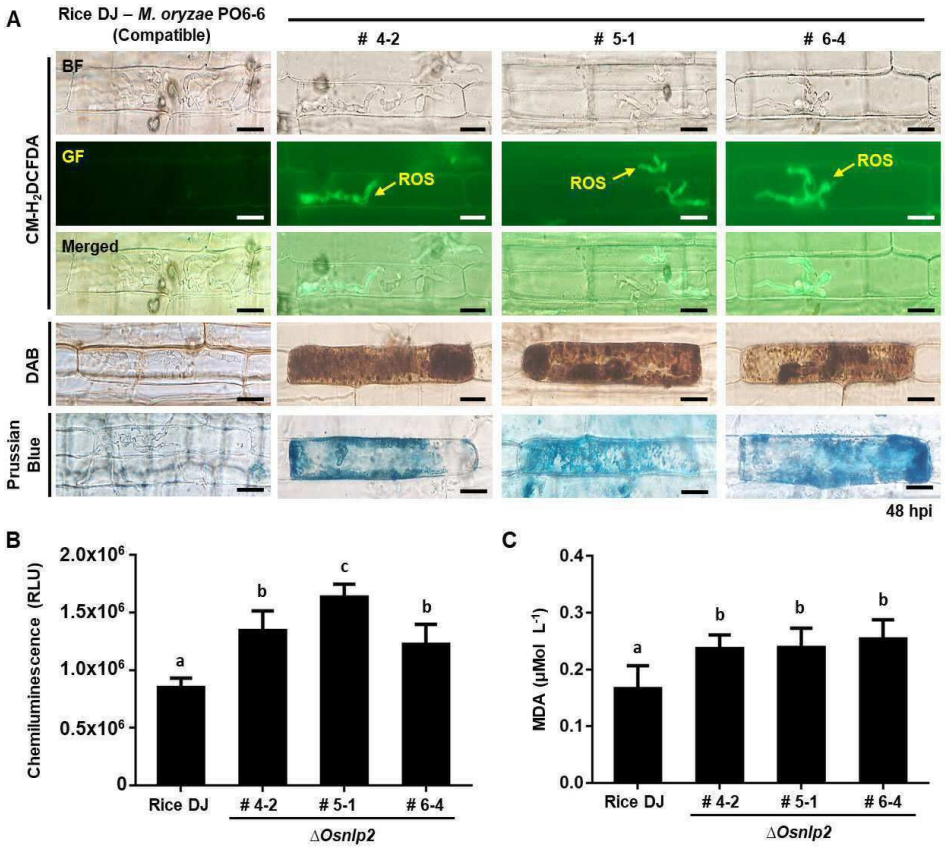
도면2


A
OsNLP2 (LOC_Os04g41850)
0
RWP-RK
PB1
+1,698 bp
RWP-RK
PB1
+2,502 bp
PB1
+1
+2,811 bp
B
00:GFP
OsNLP2: GFP
RWP-RK+PB1 domain: GFP
PB1 domain: GFP
Merged
DAPI
GFP

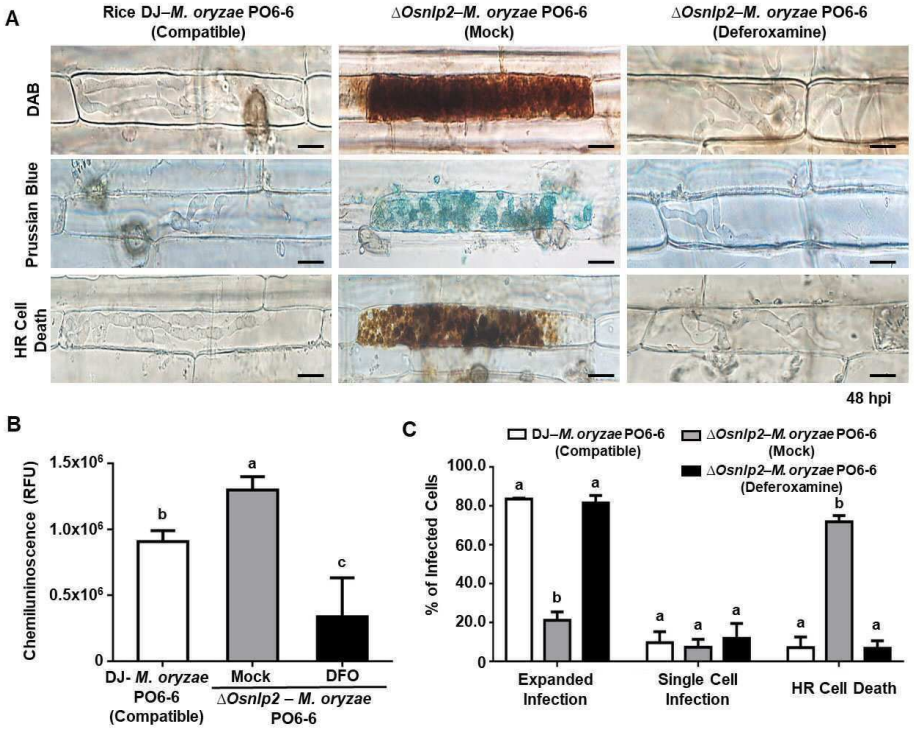
도면3


A
M. oryzae PO6-6 (Virulent)
ΔOsnlp2
Rice DJ
4-2
5-1
6-4
M. oryzae 007 (Avirulent)
ΔOsnlp2
Rice DJ
4-2
5-1
6-4
B
Expanded Infection
Single Cell Infection
HR Cell Death
48 hpi
C
M. oryzae PO6-6 (Virulent)
DJ
4-2
5-1
6-4-4
% Infected Cells
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0
Expanded Infection
Single Cell Infection
HR Cell Death
M. oryzae 007 (Avirulent)
DJ
4-2
5-1
6-4-4
% Infected Cells
Expanded Infection
Single Cell Infection
HR Cell Death

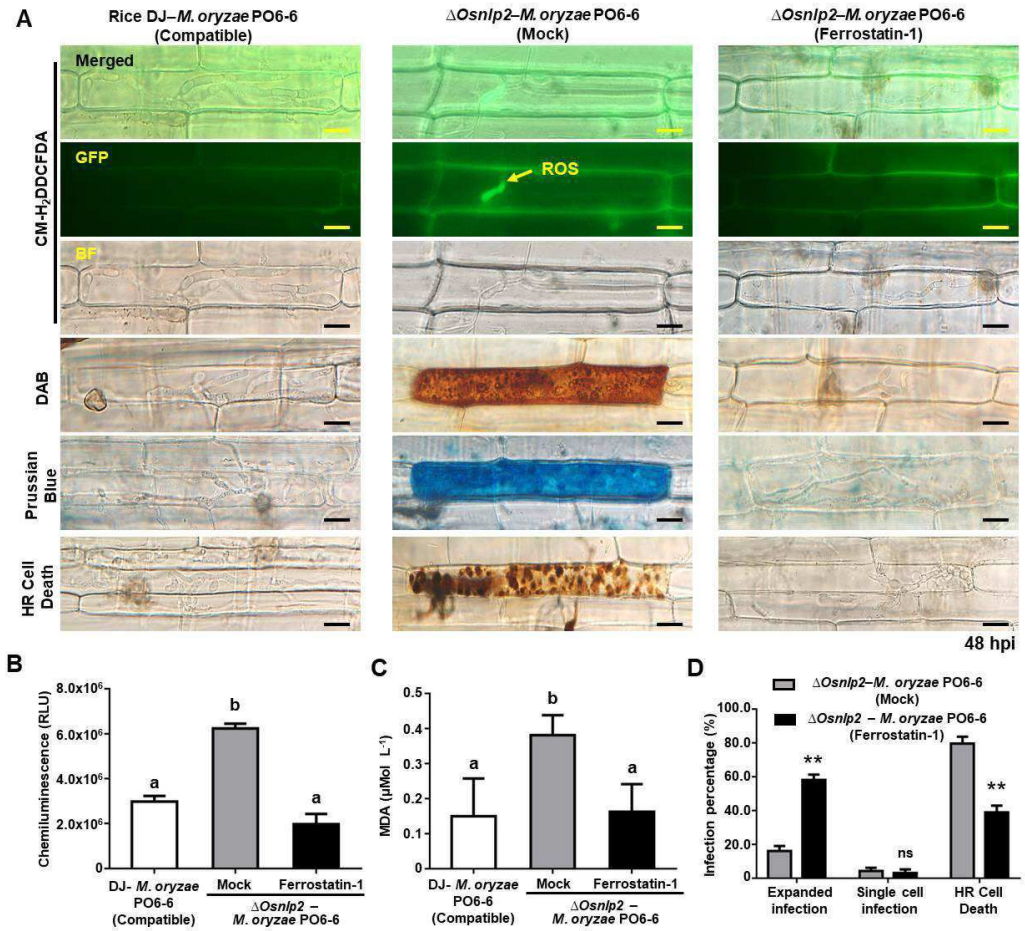
도면4


A
Rice DJ – M. oryzae PO6-6 (Compatible)
4-2
5-1
6-4
BF
GF
Merged
CM-H2DCFDA
ROS
DAB
Prussian Blue
48 hpi
B
Chemiluminescence (RLU)
2.0x10^6
1.5x10^6
1.0x10^6
0.5x10^6
0
a
b
c
b
Rice DJ
4-2
5-1
6-4
ΔOsnlp2
C
MDA (μMol L^-1)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
a
b
b
b
Rice DJ
4-2
5-1
6-4
ΔOsnlp2

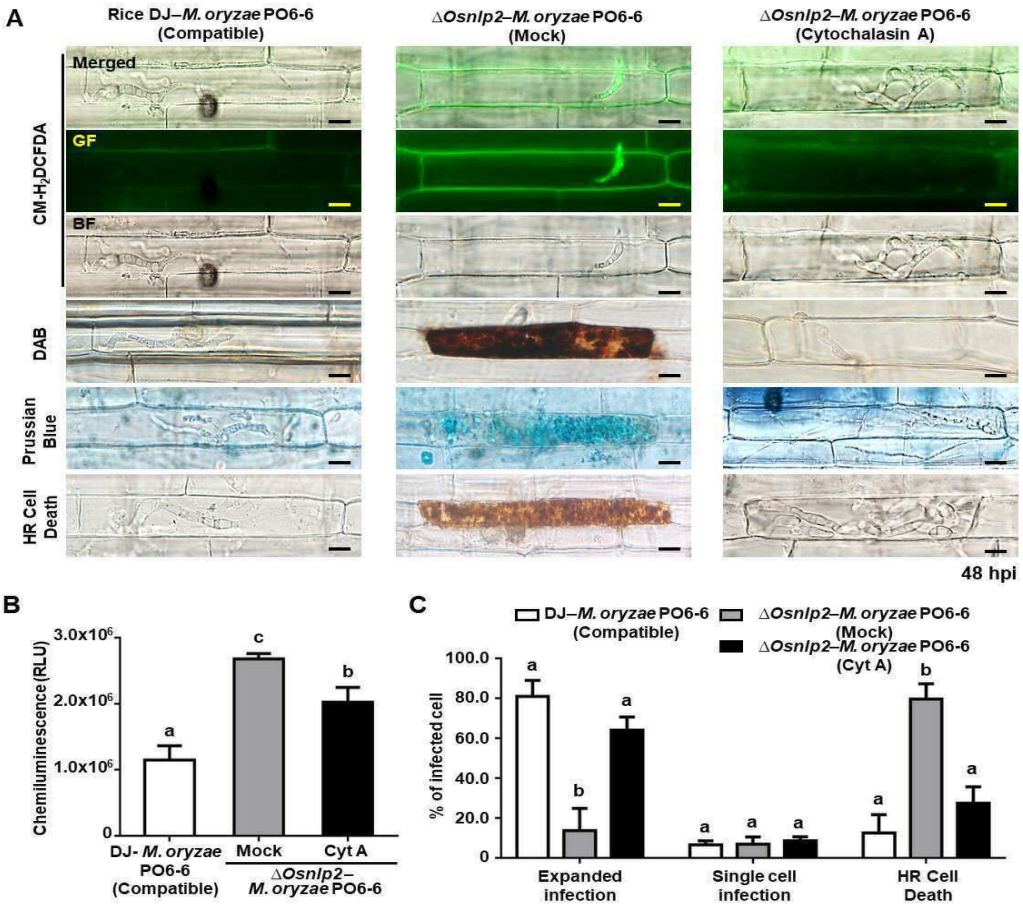
도면5


A
Rice DJ–M. oryzae PO6-6 (Compatible)
ΔOsnlp2–M. oryzae PO6-6 (Mock)
ΔOsnlp2–M. oryzae PO6-6 (Deferoxamine)
DAB
Prussian Blue
HR Cell Death
48 hpi
B
Chemiluninoscence (RFU)
1.5x10^6
1.0x10^6
0.5x10^6
0
a
b
c
DJ- M. oryzae PO6-6 (Compatible)
Mock
DFO
ΔOsnlp2 – M. oryzae PO6-6
C
DJ–M. oryzae PO6-6 (Compatible)
ΔOsnlp2–M. oryzae PO6-6 (Mock)
ΔOsnlp2–M. oryzae PO6-6 (Deferoxamine)
% of Infected Cells
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0
Expanded Infection
Single Cell Infection
HR Cell Death

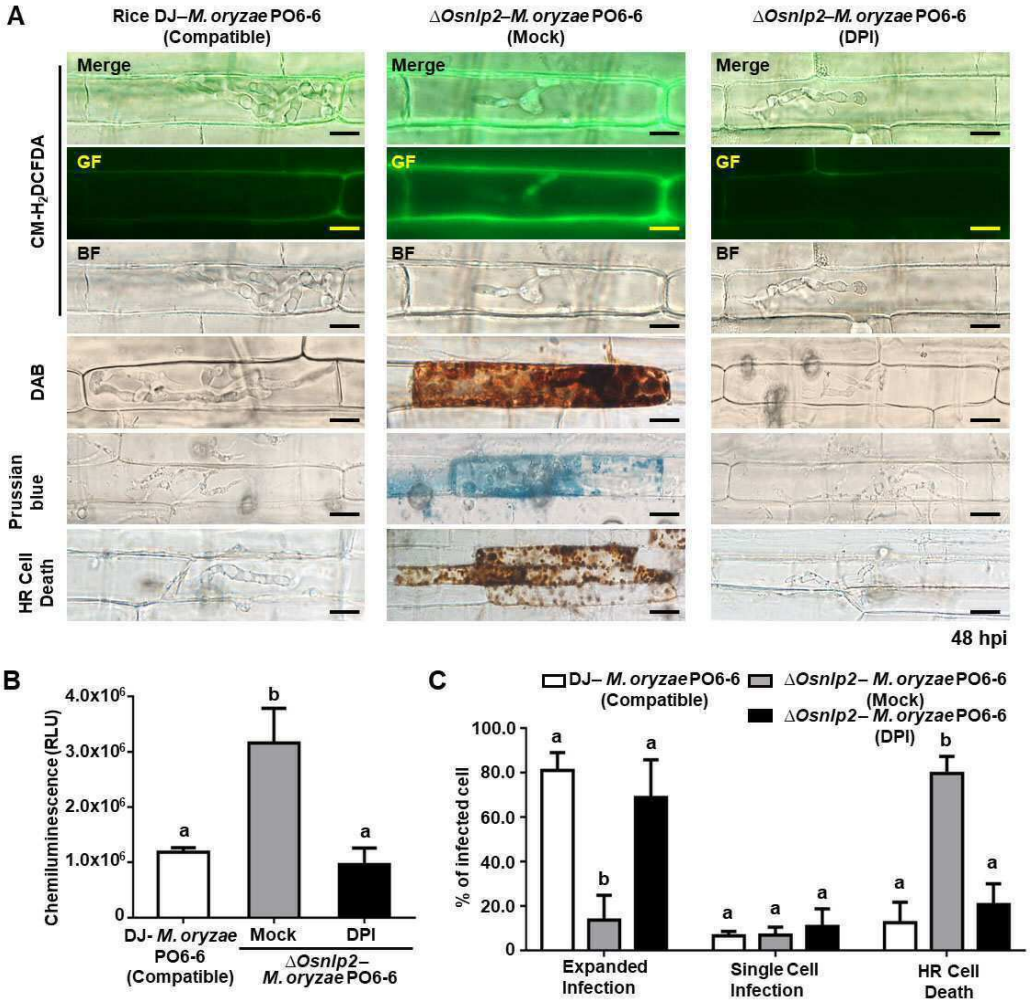
도면6


A
Rice DJ–M. oryzae PO6-6 (Compatible)
ΔOsnlp2–M. oryzae PO6-6 (Mock)
ΔOsnlp2–M. oryzae PO6-6 (Ferrostatin-1)
Merged
GFP
BF
ROS
CM-H2DDCFDA
DAB
Prussian Blue
HR Cell Death
48 hpi
B
Chemiluminescence (RLU)
8.0x10^6
6.0x10^6
4.0x10^6
2.0x10^6
0
a
b
a
DJ- M. oryzae PO6-6 (Compatible)
Mock
Ferrostatin-1
ΔOsnlp2 – M. oryzae PO6-6
C
MDA (μMol L^-1)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
a
b
a
DJ- M. oryzae PO6-6 (Compatible)
Mock
Ferrostatin-1
ΔOsnlp2 – M. oryzae PO6-6
D
ΔOsnlp2–M. oryzae PO6-6 (Mock)
ΔOsnlp2 – M. oryzae PO6-6 (Ferrostatin-1)
Infection percentage (%)
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0
**
ns
**
Expanded infection
Single cell infection
HR Cell Death

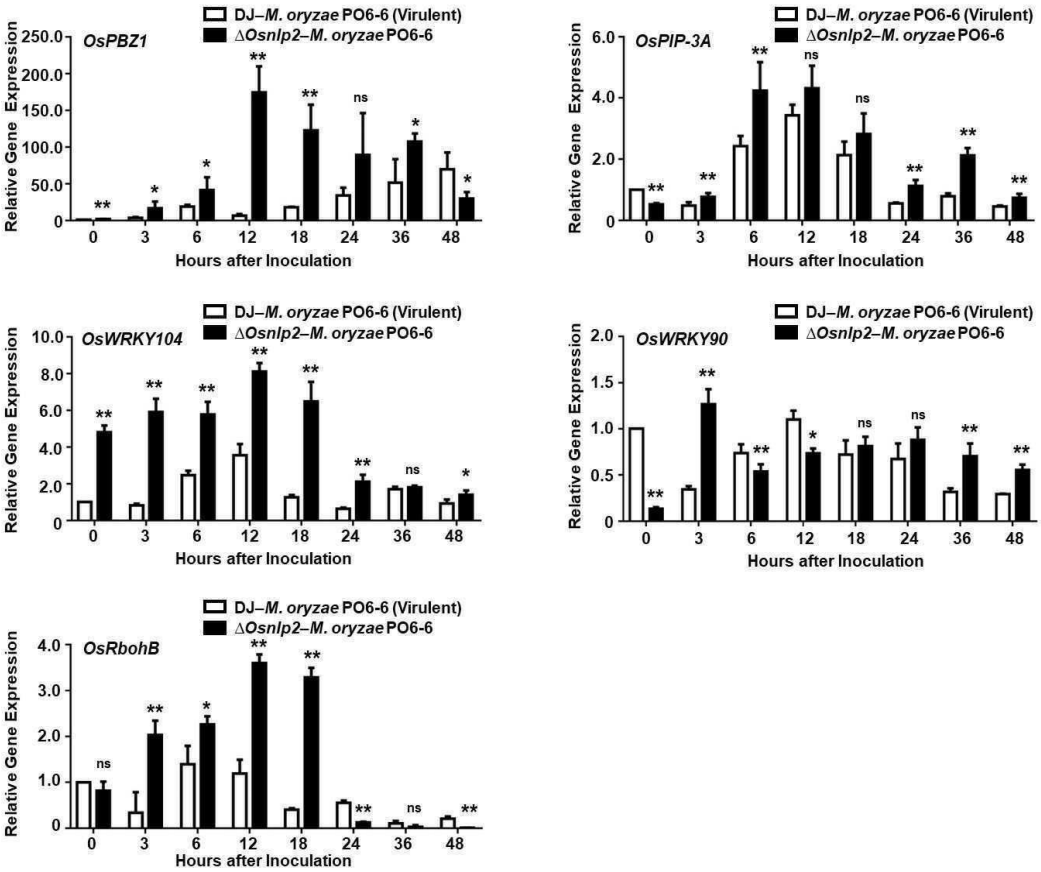
도면7


A
Rice DJ–M. oryzae PO6-6 (Compatible)
ΔOsnlp2–M. oryzae PO6-6 (Mock)
ΔOsnlp2–M. oryzae PO6-6 (Cytochalasin A)
Merged
GF
BF
CM-H2DCFDA
DAB
Prussian Blue
HR Cell Death
48 hpi
B
Chemiluminescence (RLU)
3.0x10^6
2.0x10^6
1.0x10^6
0
a
c
b
DJ- M. oryzae PO6-6 (Compatible)
Mock
Cyt A
ΔOsnlp2– M. oryzae PO6-6
C
DJ–M. oryzae PO6-6 (Compatible)
ΔOsnlp2–M. oryzae PO6-6 (Mock)
ΔOsnlp2–M. oryzae PO6-6 (Cyt A)
% of infected cell
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0
Expanded infection
Single cell infection
HR Cell Death

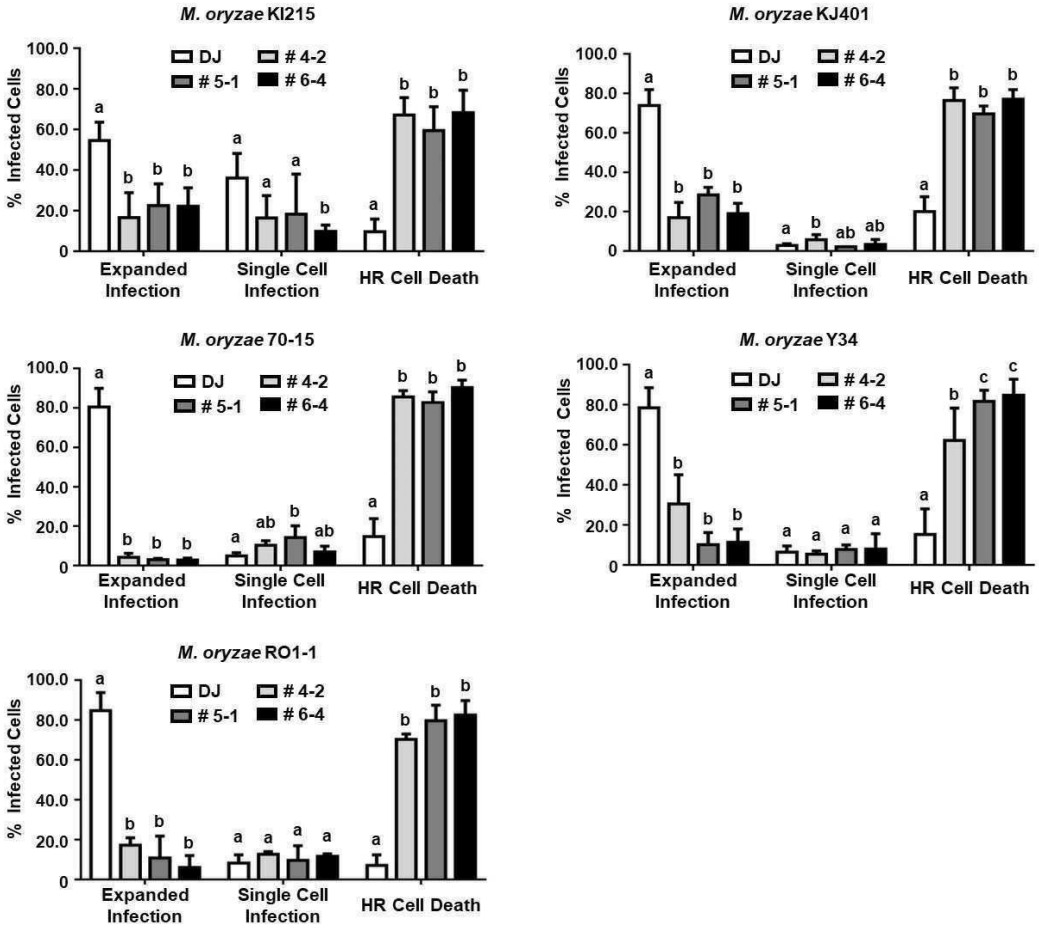
도면8


A
Rice DJ–M. oryzae PO6-6 (Compatible)
ΔOsnlp2–M. oryzae PO6-6 (Mock)
ΔOsnlp2–M. oryzae PO6-6 (DPI)
Merge
GF
BF
CM-H2DCFDA
DAB
Prussian blue
HR Cell Death
48 hpi
B
Chemiluminescence (RLU)
4.0x10^6
3.0x10^6
2.0x10^6
1.0x10^6
0
DJ- M. oryzae PO6-6 (Compatible)
Mock
DPI
ΔOsnlp2– M. oryzae PO6-6
C
DJ– M. oryzae PO6-6 (Compatible)
ΔOsnlp2– M. oryzae PO6-6 (Mock)
ΔOsnlp2– M. oryzae PO6-6 (DPI)
% of infected cell
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0
Expanded Infection
Single Cell Infection
HR Cell Death

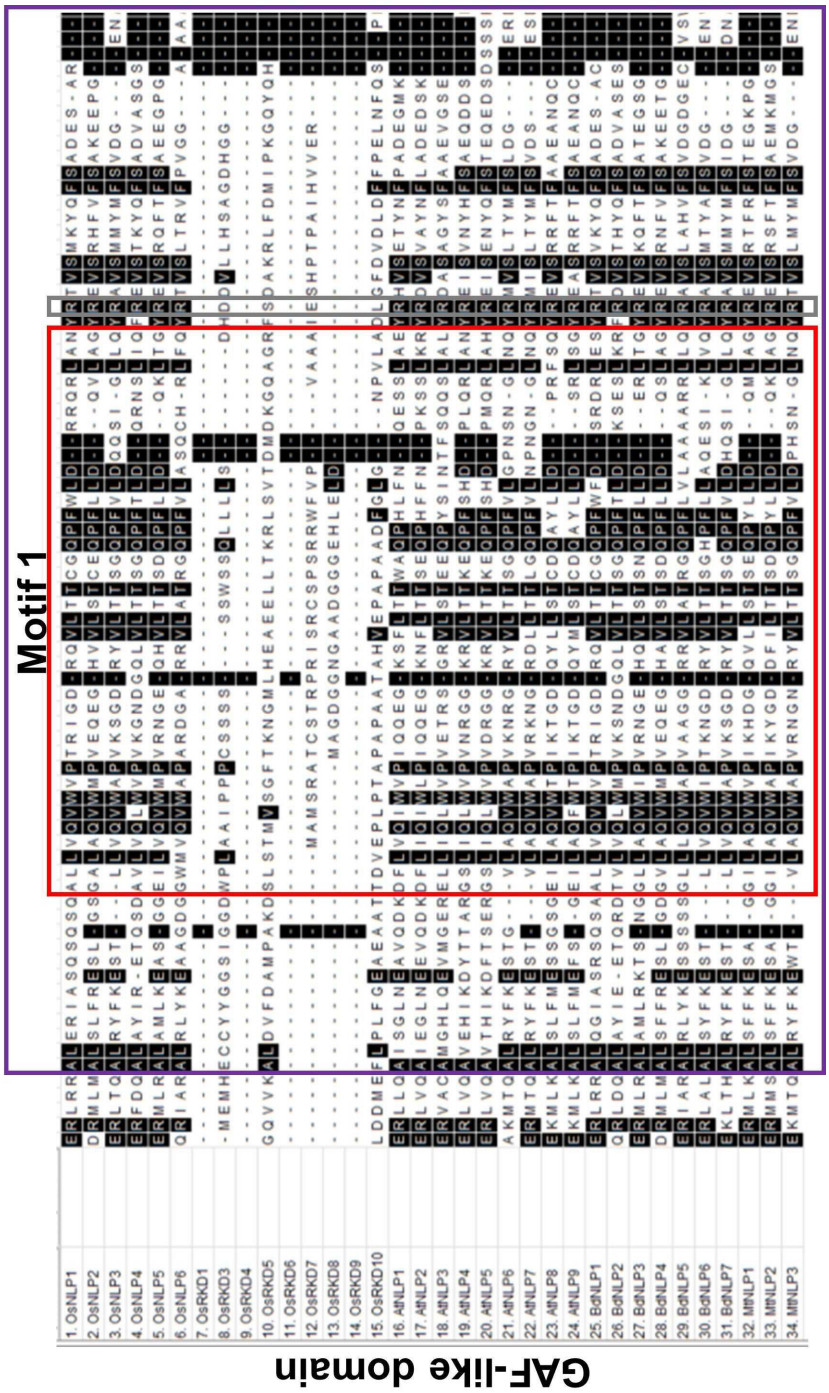
도면9


DJ–M. oryzae PO6-6 (Virulent)
ΔOsnlp2–M. oryzae PO6-6
OsPBZ1
OsPIP-3A
OsWRKY104
OsWRKY90
OsRbohB
Relative Gene Expression
Hours after Inoculation
0
3
6
12
18
24
36
48
ns

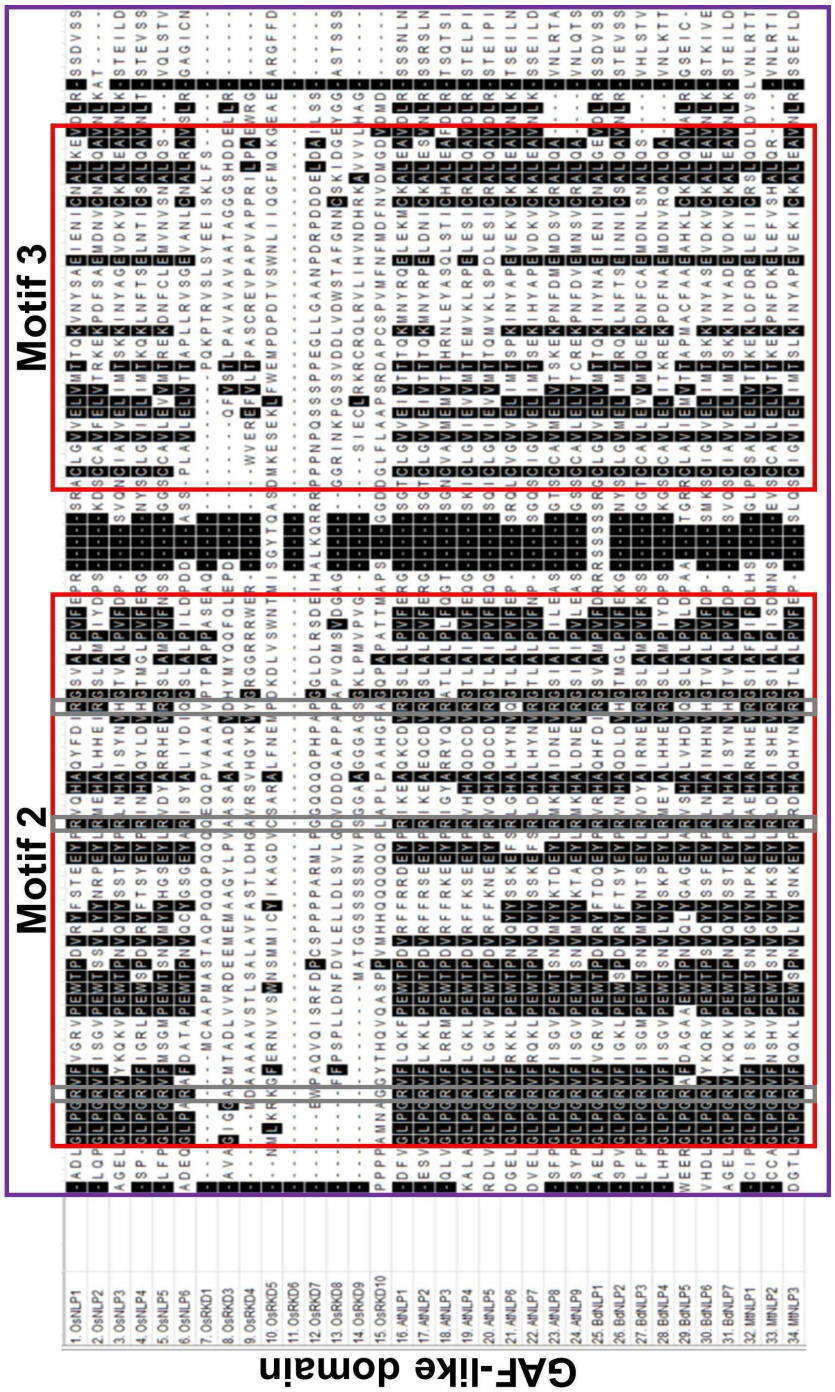
도면10


M. oryzae KI215
M. oryzae KJ401
M. oryzae 70-15
M. oryzae Y34
M. oryzae RO1-1
DJ
4-2
5-1
6-4
% Infected Cells
Expanded Infection
Single Cell Infection
HR Cell Death

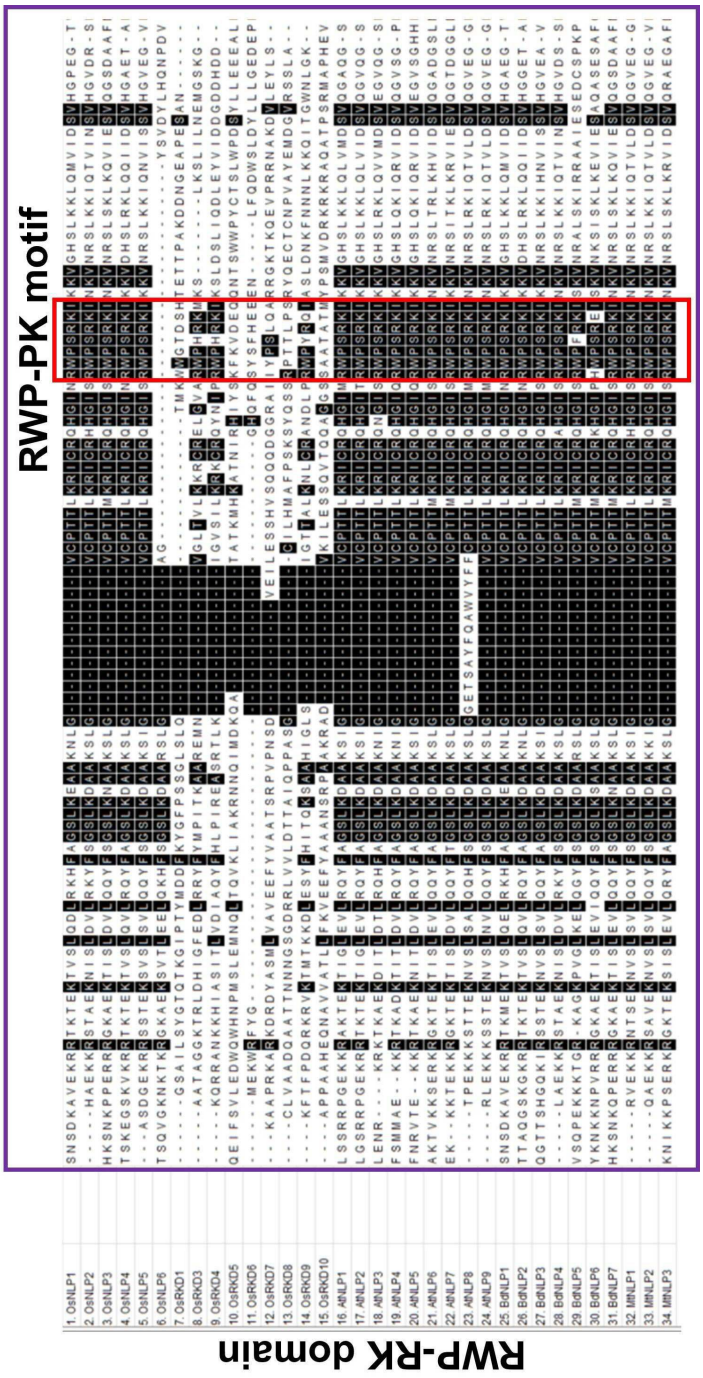
도면11a


Motif 1
GAF-like domain
1.OsNLP1
2.OsNLP2
3.OsNLP3
4.OsNLP4
5.OsNLP5
6.OsNLP6
7.OsRKD1
8.OsRKD3
9.OsRKD4
10.OsRKD5
11.OsRKD6
12.OsRKD7
13.OsRKD8
14.OsRKD9
15.OsRKD10
16.AtNLP1
17.AtNLP2
18.AtNLP3
19.AtNLP4
20.AtNLP5
21.AtNLP6
22.AtNLP7
23.AtNLP8
24.AtNLP9
25.BdNLP1
26.BdNLP2
27.BdNLP3
28.BdNLP4
29.BdNLP5
30.BdNLP6
31.BdNLP7
32.MtNLP1
33.MtNLP2
34.MtNLP3

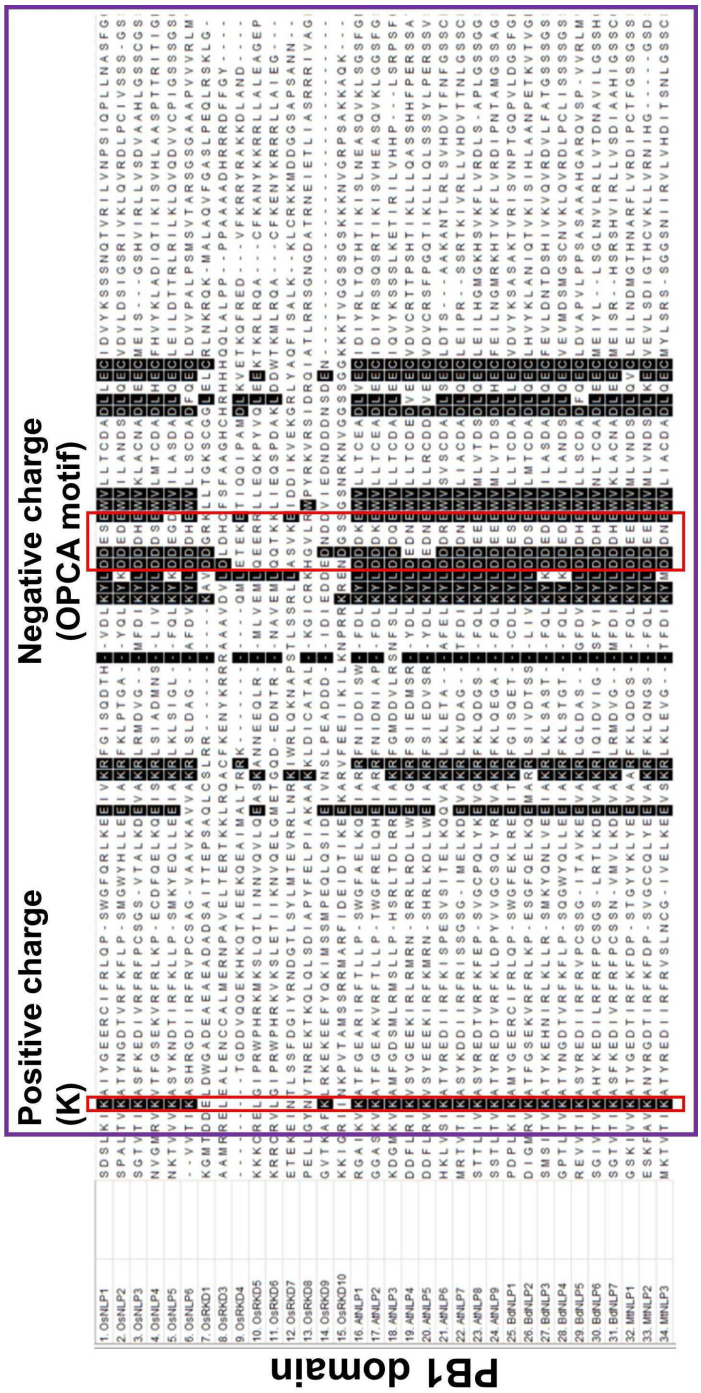
도면11b


Motif 3
Motif 2
GAF-like domain
1.OsNLP1
2.OsNLP2
3.OsNLP3
4.OsNLP4
5.OsNLP5
6.OsNLP6
7.OsRKD1
8.OsRKD3
9.OsRKD4
10.OsRKD5
11.OsRKD6
12.OsRKD7
13.OsRKD8
14.OsRKD9
15.OsRKD10
16.AtNLP1
17.AtNLP2
18.AtNLP3
19.AtNLP4
20.AtNLP5
21.AtNLP6
22.AtNLP7
23.AtNLP8
24.AtNLP9
25.BdNLP1
26.BdNLP2
27.BdNLP3
28.BdNLP4
29.BdNLP5
30.BdNLP6
31.BdNLP7
32.MtNLP1
33.MtNLP2
34.MtNLP3

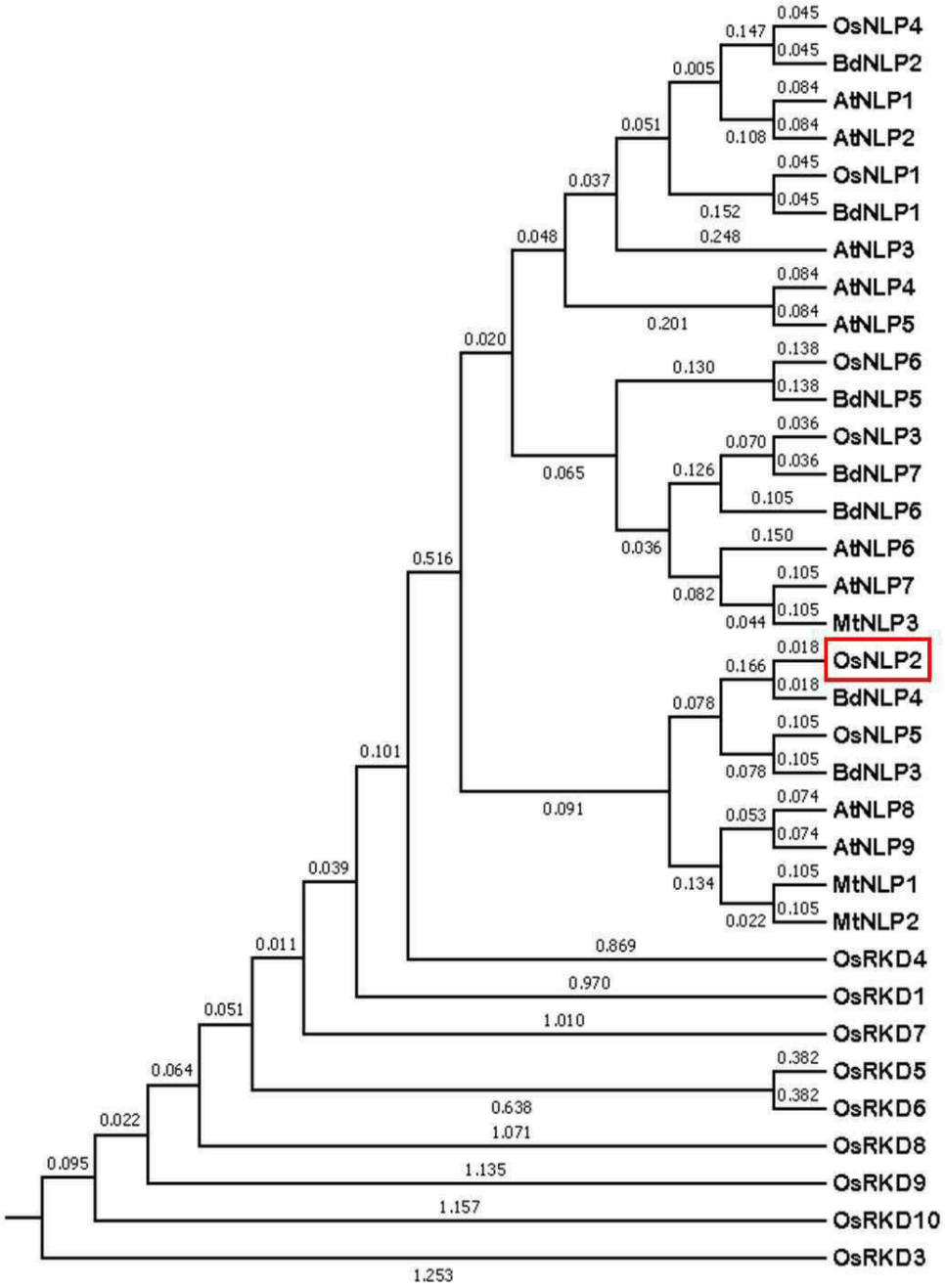
도면11c



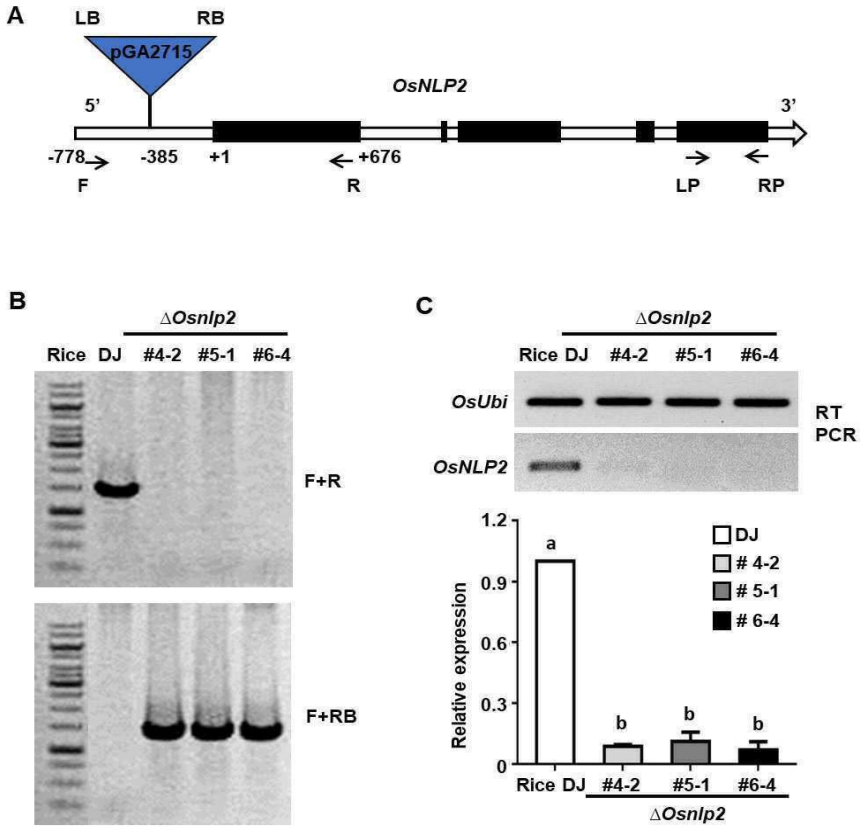
도면11d



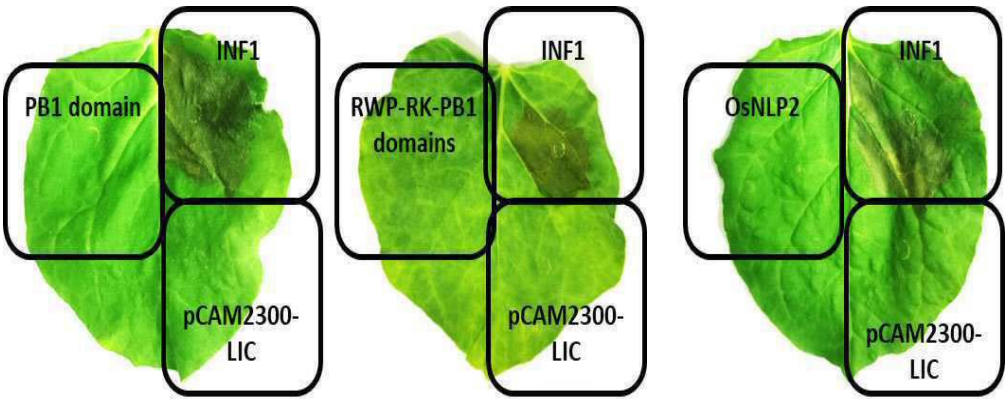
도면12


OsNLP4
BdNLP2
AtNLP1
AtNLP2
OsNLP1
BdNLP1
AtNLP3
AtNLP4
AtNLP5
OsNLP6
BdNLP5
OsNLP3
BdNLP7
BdNLP6
AtNLP6
AtNLP7
MtNLP3
OsNLP2
BdNLP4
OsNLP5
BdNLP3
AtNLP8
AtNLP9
MtNLP1
MtNLP2
OsRKD4
OsRKD1
OsRKD7
OsRKD5
OsRKD6
OsRKD8
OsRKD9
OsRKD10
OsRKD3

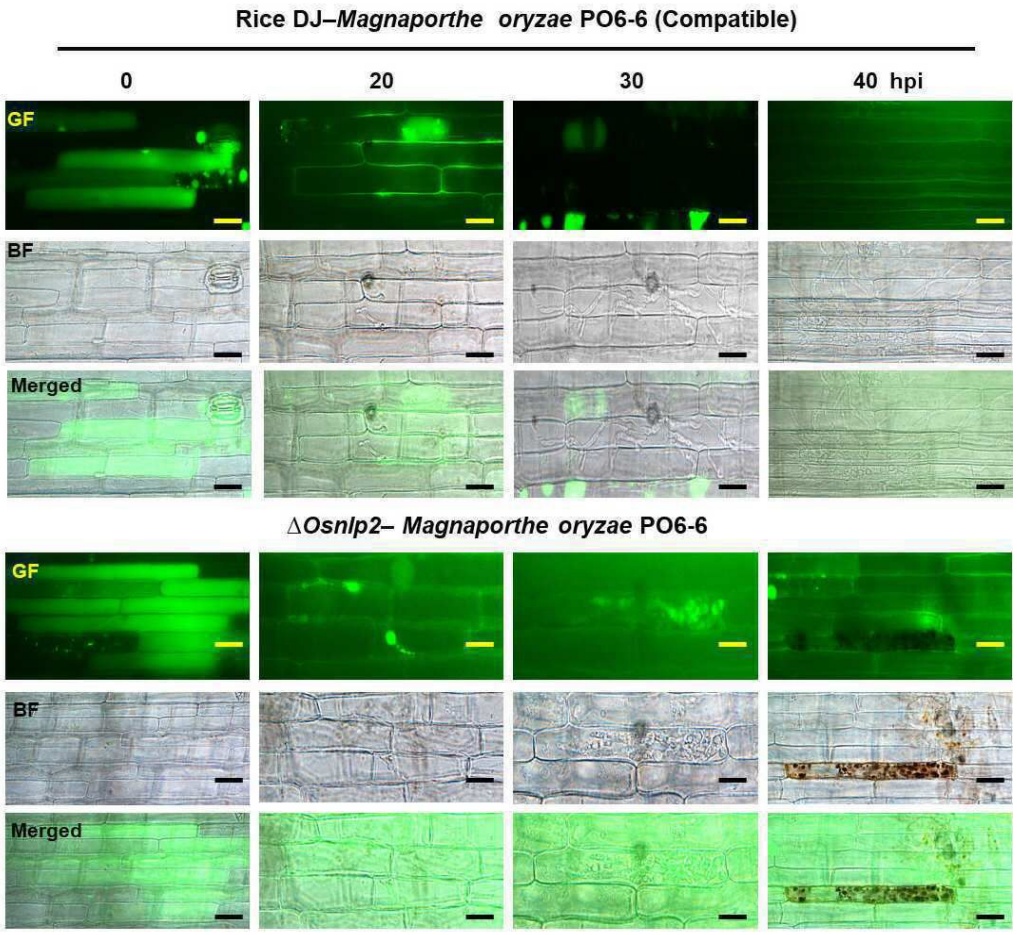
도면13


A
LB
RB
pGA2715
OsNLP2
5'
3'
-778
-385
+1
+676
F
R
LP
RP
B
ΔOsnlp2
Rice DJ #4-2 #5-1 #6-4
F+R
F+RB
C
ΔOsnlp2
Rice DJ #4-2 #5-1 #6-4
OsUbi
OsNLP2
RT PCR
Relative expression
1.2
0.9
0.6
0.3
0
a
b
b
b
DJ
4-2
5-1
6-4
Rice DJ #4-2 #5-1 #6-4
ΔOsnlp2

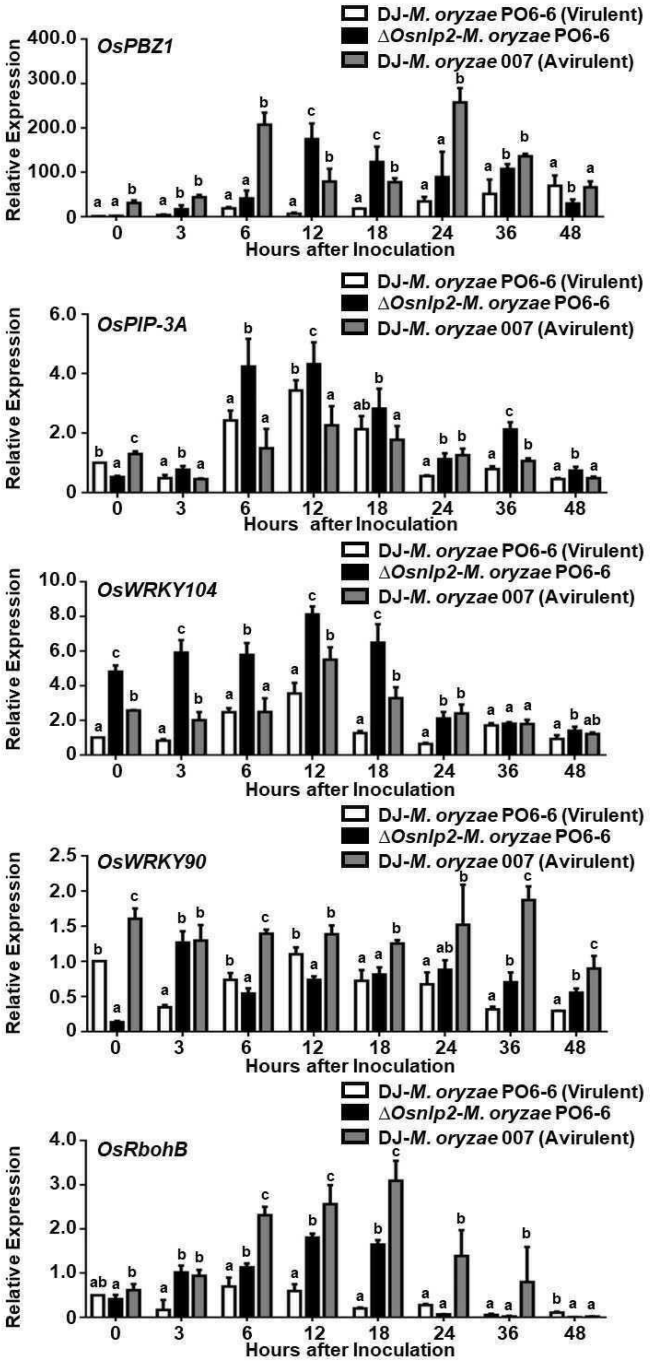
도면14


INF1
PB1 domain
pCAM2300-LIC
INF1
RWP-RK-PB1 domains
pCAM2300-LIC
INF1
OsNLP2
pCAM2300-LIC

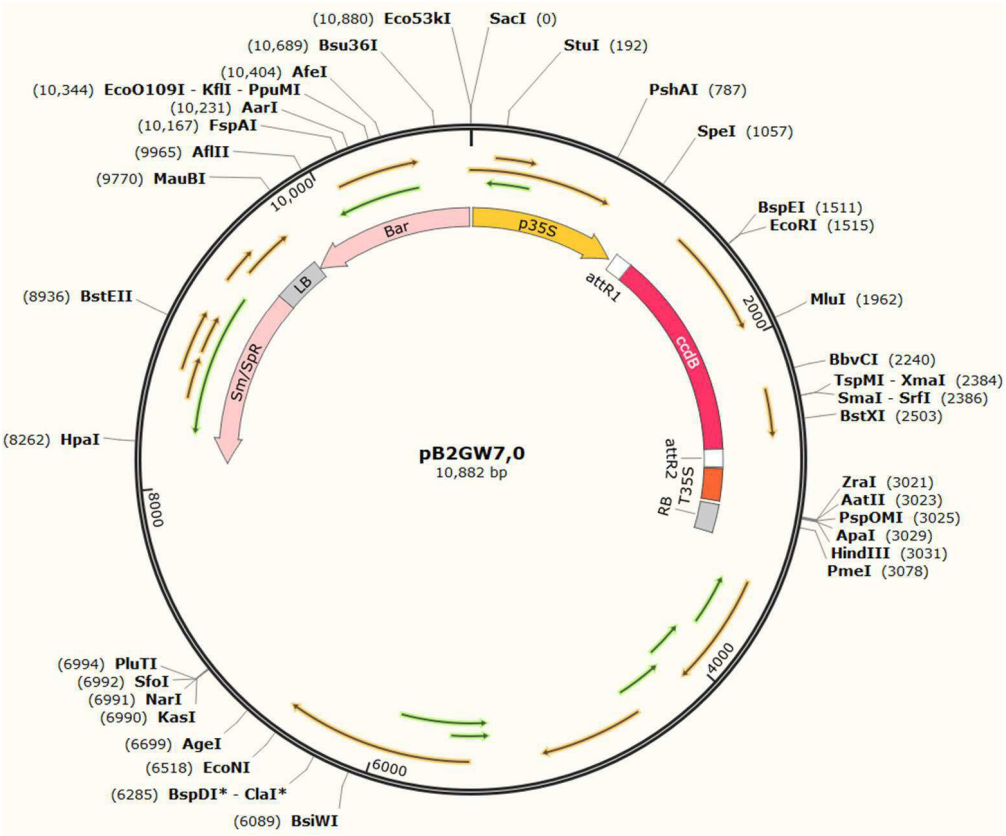
도면15


Rice DJ–Magnaporthe oryzae PO6-6 (Compatible)
0
20
30
40 hpi
GF
BF
Merged
ΔOsnlp2– Magnaporthe oryzae PO6-6
GF
BF
Merged

도면16

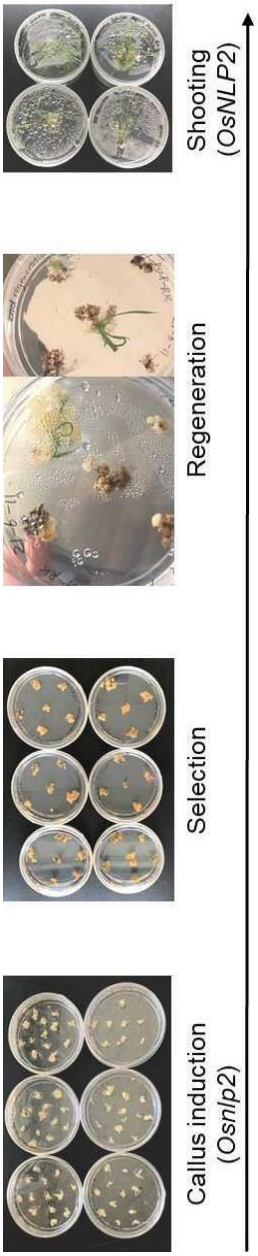

DJ-M. oryzae PO6-6 (Virulent)
ΔOsnlp2-M. oryzae PO6-6
DJ-M. oryzae 007 (Avirulent)
OsPBZ1
OsPIP-3A
OsWRKY104
OsWRKY90
OsRbohB
Relative Expression
Hours after Inoculation
0
3
6
12
18
24
36
48

도면17

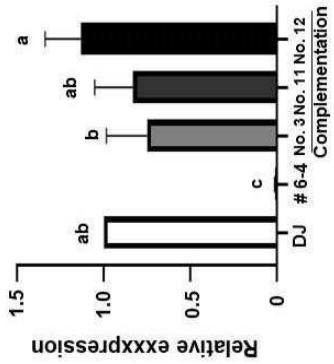


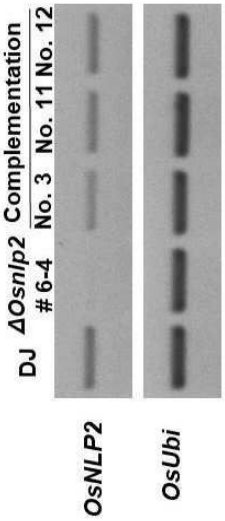
p35S	*OsNLP2* cDNA

도면18a

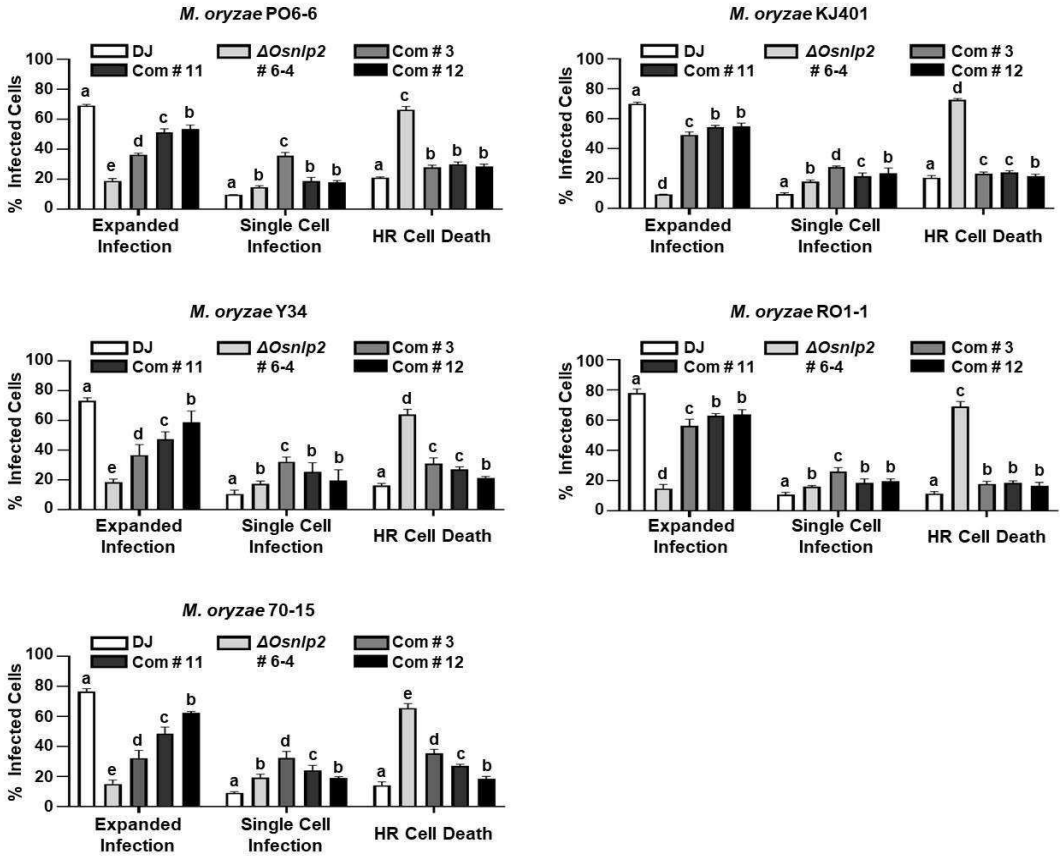

Shooting
(OsNLP2)
Regeneration
Selection
Callus induction
(Osnlp2)

도면18b

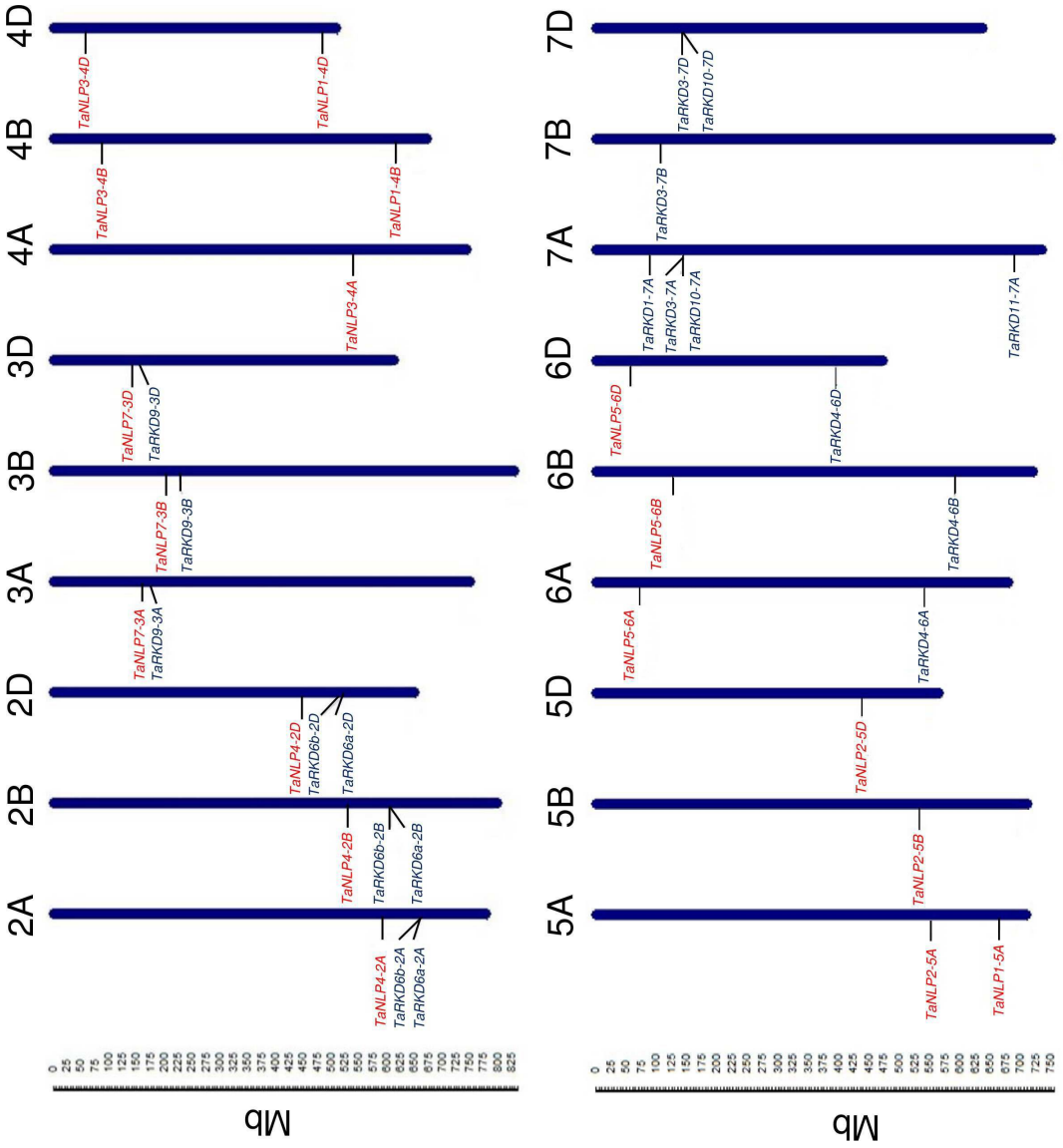

Relative exxxpression
1.5
1.0
0.5
0
ab
b
c
ab
a
DJ
6-4
No. 3
No. 11
No. 12
Complementation


DJ
ΔOsnlp2
6-4
Complementation
No. 3
No. 11
No. 12
OsNLP2
OsUbi

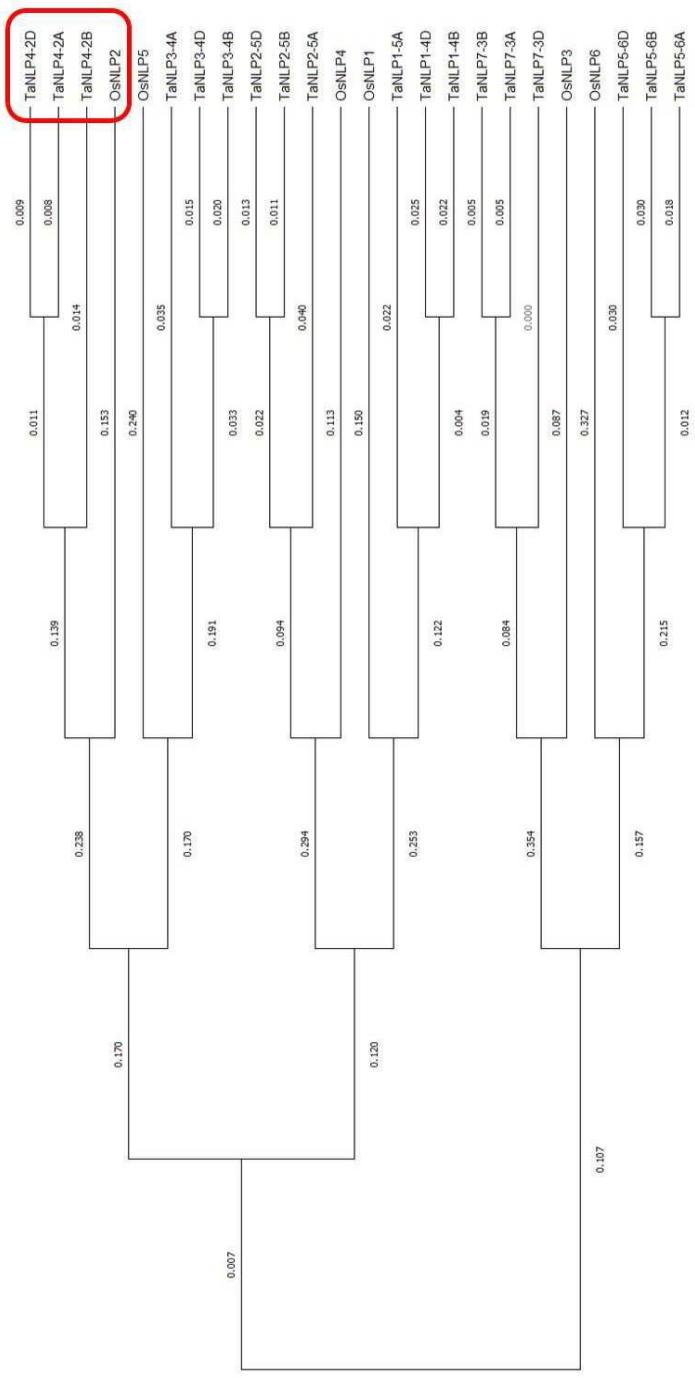
도면18c


M. oryzae PO6-6
M. oryzae KJ401
M. oryzae Y34
M. oryzae RO1-1
M. oryzae 70-15
DJ
Com # 11
ΔOsnlp2
6-4
Com # 3
Com # 12
% Infected Cells
Expanded Infection
Single Cell Infection
HR Cell Death

도면19


4D
4B
4A
3D
3B
3A
2D
2B
2A
TaNLP3-4D
TaNLP1-4D
TaNLP3-4B
TaNLP1-4B
TaNLP3-4A
TaNLP7-3D
TaRKD9-3D
TaNLP7-3B
TaRKD9-3B
TaNLP7-3A
TaRKD9-3A
TaNLP4-2D
TaRKD6b-2D
TaRKD6a-2D
TaNLP4-2B
TaRKD6b-2B
TaRKD6a-2B
TaNLP4-2A
TaRKD6b-2A
TaRKD6a-2A
Mb
7D
7B
7A
6D
6B
6A
5D
5B
5A
TaRKD3-7D
TaRKD10-7D
TaRKD3-7B
TaRKD1-7A
TaRKD3-7A
TaRKD10-7A
TaRKD11-7A
TaNLP5-6D
TaRKD4-6D
TaNLP5-6B
TaRKD4-6B
TaNLP5-6A
TaRKD4-6A
TaNLP2-5D
TaNLP2-5B
TaNLP2-5A
TaNLP1-5A
Mb

도면20



서 열 목 록

<110> SEJONG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION

<120> COMPOSITION AND METHOD FOR ENHANCING OR IMPROVING BLAST RESISTANCE OF WHEAT

<130> 22P03034

<160> 32

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

gagccaagga atctcctcct cttc 24

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400

> 2

cttgaggtcc attctggcac ccca 24

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

gttacgtcct gtagaaaccc caa 23

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

gcatcaagcc accctacctt 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

tcacgattcg cgaccctatg 20

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

aaaaagcagg cttcatggat atgcctacg 29

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

agaaagctgg gtttatgagc tatgtgc 27

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

aaaaagcagg cttcatgaat attagcttg 29

<210> 9

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

aaaaagcagg cttcatgctg acagttaag 29

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

cgacgacaag accctatgga tatgcctacg cca 33

<210> 11

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

cgacgacaag accctatgaa tattagcttg gat 33

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

cgacgacaag accctatgct gacagttaag gca 33

<210> 13

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

gaggagaaga gcccttatg agctatgtgc cgc 33

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

gctacaggca tcagtggtca 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

gactcaaacg ccacgagaat 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

tcatcctcgt ctacaccgtc 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 17

cacccagaag atccagtggt 20

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 18

atggccagca gtagcgacca tg 22

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 19

ctctctgttt ctctcaaact ga 22

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 20

tgccattact tccgagcgac 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 21

attgtgaggt gcttgagcca 20

<210> 22

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 22

gaattcatgg ctgacctgga agcaggca 28

<210> 23

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 23

ctcgagttag aagttctcct tgtggaaa 28

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 24

gtggtggcca gtaagtcctc 20

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 25

ggacacaatg attagggatc a 21

<210> 26

<211> 2811

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 26

atggatatgc ctacgccatc caaccgtgct ggctgcaatg gcaacaccgg cggtactatg 60

ggcccttcag atgatcctta tggtgcagca gccatgaacc ttgattgtta ctcggagatt 120

tacagccctt cggtggccga ccaactattc tcgctgctaa atgatccagc tgcacaccgg 180

atgtttgcta tgtggccatc catgggatca tcgccgtgtg ctgctggtac gagtgaagat 240

atgccgctcg atgcatattc tggcctaggg gaggcagtgg aagaaccttc tcaaataatg 300

tcagtgaatc caactgaagc agagaaaacg ggcaagagtt caggcgagct tggttcggac 360

gatggtgccc atcaagggag tagcatggtt ccaaggtctg ttgtgggcag ttcacttgct 420

gacaggatgc tcatggcttt gtccttgttc agggaatcat tgggcagcgg tgctcttgcc 480

caagtctgga tgcctgttga gcaggagggt catgttgtgc tgagtacatg tgagcaacct 540

tttctactcg accaggttct tgcagggtat cgagaagtat ccaggcactt tgtgttttca 600

gcgaaggagg agcctggtct acagccaggg cttccaggga gggtcttcat ctctggggtg 660

ccagaatgga cctcaagtgt cctctactat aataggccag agtatttgag gatggagcat 720

gctctccatc acgagatacg tgggtcactt gcaatgccaa tttatgaccc cagcaaggat 780

tcttgctgtg cagtgtttga gcttgttaca agaaaggaga agcctgattt cagtgcagag 840

atggacaacg tttgcaatgc cttgcaggca gtgaacttga aggctacaaa aggttctagc 900

aatcagaagt tttatacaga gaaccagaaa tttgccttca ctgagatttt agatgttctc 960

agagctattt gccatgcaca tatgcttcca ctggccctta catgggttcc tacatcaaat 1020

ggtattgatg gtggttatgt tgttggaaag gatggtgcca gtttttcaca atcagggaaa 1080

acaataatac gcatccatga atctgcatgt tatgttaacg atggaaagat gcaaggtttt 1140

cttcaagcat gtgccagacg tcatcttgag aaagggcaag gcattgcagg acgagcactc 1200

aaatctaatt tgccattttt ctcgcctgat ataagagagt acagtattga ggattaccct 1260

cttgcacacc atgcacgtaa gtttagtctg catgctgctg ttgccattcg tctaaggagc 1320

acatacactg gcaatgatga ctacatacta gaattctttc tcccggtcag ctgcaaaggc 1380

agtggagaac aacagatgtt gctgaataac ctctccagta caatgcaaag aatatgcaaa 1440

agtctgcgaa cagtttatga agcagaagtt gataatgtta atgctggtac tgcagctgtg 1500

ttcaggaaaa acaatgagag ttgcttgcca actggacaca cagaaagttc ttcacatggt 1560

gatcaatcaa tcacaggagc ttcattcgag gatacatctt tagctaacaa gccaggagtc 1620

atggaacctg agttggctga gcaggtacag cctagttcca taggacatgc agagaaaaag 1680

cgcagtacag ctgagaagaa tattagcttg gatgttcttc gtaagtactt ctctgggagc 1740

ctaaaggatg ctgcaaagag ccttggtgtt tgtccaacaa ctttgaaacg gatatgccgg 1800

catcatggaa tttcacgatg gccatctcgc aagataaaca aggttaatcg ttcattaaag 1860

aagattcaaa ctgtcataaa ctctgttcat ggtgtggaca gatccttgca atatgatcct 1920

gctactggat ctcttgttcc agtagtttct ctgccagaaa agttgacatt cccttcttgc 1980

gatggtttgc caactccatc agtcggaaaa actgtggaag agaattctga cctaaaatct 2040

gaagaagggt gttctttgcc tgatggatcg caaagacaaa gttgccagtt gcagatctct 2100

gatgtgaaga aaagtaacga ggatgaattt cacattggca gtggtaacag tgatttttat 2160

ggtgcaaatg ccacagcaaa atctaattct gaggtcacac aaggtccatt atgtcccact 2220

ggtgctttta gtgctttgca tctcaaggga acagattgca ccaatccttc tagctctctc 2280

cgcccaagtt ccgaaagcac cagaaatcaa atagttggaa gaaactcacc atctatacaa 2340

caagaagatc ttgatatgct tgacaatcat gaagccgagg acaaggacca catgcaccct 2400

tctacctctg gtatgactga ctcttctagc ggcagcgcat caagccaccc taccttcaaa 2460

cagaacacaa gaagtgctct taaagatgca gccagtcctg cactgacagt taaggcaacc 2520

tacaacggag acactgtgcg gttcaagttc ttgccatcta tgggttggta tcacctattg 2580

gaagaaatag caaagagatt taagctgcca accggagcat accagctcaa gtacaaggac 2640

gacgaggatg aatgggtcat cttggcaaac gattcagatc tccaggagtg cgtcgatgtt 2700

ctcgactcca tagggtcgcg aatcgtgaaa ctccaggtac gagatctccc ttgcatcgtc 2760

agcagctcgg gaagcagcac ctgcttgcag ttggcggcac atagctcata a 2811

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 27

atggatatgc ctacgccatc 20

<210> 28

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 28

accactacat cgagacaagc acggtc 26

<210> 29

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 29

aagtccagct gccagaaacc cacgt 25

<210> 30

<211> 2817

<212> DNA

<213> Triticum aestivum

<400> 30

atggatgtgc ctctgccttc acagtccaac cgtgctggat gcaatggaag cgtcggcagc 60

ccgtcggatg atccatatgg cgttacggcc atgatgaact ttgatgggta ctcagagctc 120

tgcggcagcc cttcgttagc tgaccagctg ttctcgttgc tgaacgactc gtcaacacac 180

cagatgtttg ctatgtggtc atccttgggc tcttcgccac gtgcttctgg tgtcagtgaa 240

gatatgcagc tcgatgccta ttccagtgta cctggggatc aaaaggttga tttggtatct 300

tcggtgaatc cagctgaaaa tgggaccggg agaatggcca agagttcagg cgaccttggc 360

tcagatggtg atcccgagca aggaagtact agcgtggttc cgaggcctat tgccggcaac 420

ttactcgctg acaggatgct catggctctg tctttgttca ggaagtcact tggcggcggt 480

gttcttgcgc aggtttggat gcctgttgag caggaggggc atgtcgtgct tagtacatgt 540

gaacagccgt ttctgcttga ccaagctctt gctgggtaca gagaagtatc caggcatttt 600

gtgttctctg ctaaggagga gacctgcctt caaccagggc ttccagggag ggtcttcatc 660

tccggtgtgc cagaatggac ctcaaatgtg ctctactaca gcaagccaga gtatttgagg 720

atggagtatg ctcttcacca tgaagttcga ggatcacttg caatgccgat atatgaccct 780

agcaagggct cttgctgtgc agtgcttgag cttatcacaa agaaggagaa acctgacttc 840

gatgcagaaa tgaacaacct tcgccatgca ttgcaggctg tgaacttgga gacagcaaaa 900

gattgtatcg atcagaaggt ttattcagca aatcagaaag ccaccttcac tgagattttg 960

gatgttctaa gagctatttg ccatgcacac atgcttcctt tggcccttac atgggtccct 1020

tcatcaaatg gcagtgatgg tggttatgtt ggacatgata atgtccttga ttctcagtca 1080

ggaaaagcga tactccgcat ccatgaatca gcgtgttatg ttaatgatgc aaagatgcaa 1140

ggtttttttc atgcatgcac tgaaactcac cttgagaaag ggcaaggtat tgcaggccga 1200

gcactcaagt ccaatctgcc gttcttctct cctaatataa gagaatacgg aattaaggat 1260

tacccactcg cacaccatgc tcgtaagttt ggtctgcatg ctgctgtagc aatccggcta 1320

aggagcacat acactggtga tgatgactac atactagaat tctttctacc aatcaactgc 1380

acaggcagtg aagaacaaca gatgttattg aataacctgt ccagtactat gcaaagaata 1440

tgcaaaagtt tgcgaacagt ttctgaagca gaggttgata aagttgacgc ttgtactgca 1500

gtaatgtata aggcaaccag tggaagttgc ttgcctactg gtcagtctgg gagttcttca 1560

catggtgatc aacctgccac agaagaggca ttccaggatc tatctttaat tgataagcaa 1620

ggggacatgt ccgagcaggc acagtctagt tcaatgcgac ttgcggagaa aaagcgcagt 1680

acagcggaga agaatattgg catggatgtt ctccgtaagt acttttctgg gagcctaaag 1740

gatgctgcaa agagcctcgg tgtttgtcca acaaccttga aacggatatg ccgcacacat 1800

ggaatttcgc gatggccatc tcgcaagata aacaaggtca accgttcgtt aaagaagatc 1860

caaactgtca ttaactcggt ccatggagtg gacagctctt tgcagtatga tccagctact 1920

ggatctcttg ttccagcagt ttctctgcca gagaagacgt cattcccttc atgtgatgct 1980

gtgtctagtc catctgttgg gaaaactgtg gatgaaaaat ctggcccaaa atctgagcaa 2040

gggtattcgt cacctgaagg atgggaaaga gatagctgtc agttgcagcg ccctgatgcg 2100

cagaaagggg aaggcgatga atttcacatg cagacaacta actatagtgg cagtggtgat 2160

cacggctctt atggtccgaa tgtcacacat catattattt ctgaaggaac acaaggacca 2220

ttatatccca ctggtgctgt tagtgcttta catgacaaag aaacaggttg catcgaacct 2280

ttgccctgtg tcctcccaag catcaagact accagggacc aaatagtggg aaggaactca 2340

ccacccatgc aacaagcaga tattgatatg tttgatgatc gcgaaggcag ggagcatact 2400

catccttcta cctctggtat gacagactct tctagcggca gtgcatcaag ccaccctaca 2460

ttcaagaaga acccagcacg cccacttaag gacaagagca gccctgcact tacggtcaag 2520

gcgacgtaca atggagacac cgtgcggttc aagttcttgc catcgatggg ctggtaccac 2580

ctgctggaag aaatagccaa gaggttcaag ctgtcgaccg gggtgttcca gctcaagtac 2640

aaggatgacg aggacgagtg ggtcatcatg gcgaacgact ccgatctcca ggagtgtgtc 2700

gacgtcatgg actcgatggg cacgcgaaac gtgaagctcc aggtccggga tctcccgtgc 2760

ctcatcagca gctcgggcag cagcagctgc ttgcagctgg aaggacacaa ttcatga 2817

<210> 31

<211> 2817

<212> DNA

<213> Triticum aestivum

<400> 31

atggatgtgc ctctgccttc acagtccaac cgtgctggat gcaatggaag cgtcggcagc 60

ccgtcggatg atccatatgg cgttacggcc atgatgaact ttgatgggta ctcagagctc 120

tgcggcagcc cttcgttagc tgaccagctg ttctcgttgc tgaacgactc gtccacacac 180

cagatgtttg ctatgtggtc atccttggga tcttcgccgc gtgcttctgg tgtcagtgaa 240

gatatgcagc tcgatgccta ttccagtgta cccggggatc aaaaggttga tttggtatct 300

tcggtgaatc cagctgaaac tgggaccggg agaatggcca agagttcagg cgaccttggc 360

tcagatggtg atcccgaaca aggaagtact agcttggttc ccaggcctat tgccggcaac 420

ttactcgctg acaggatgct catggctctg tctttgttca ggaagtcact tggcggcggc 480

attcttgcgc aggtctggat gcctgttgag caggaggggc atgtcgtgct tagtacatgt 540

gaacagccgt ttctgcttga ccaagctctt gctgggtaca gagaagtatc caggcatttt 600

gtgttctctg ctaaggagga gactggcctt caaccagggc ttccagggag ggtcttcatc 660

tccggtgtgc cagaatggac ctcaaatgtg ctctactaca gcaagccaga gtatttgagg 720

atggagtatg ctcttcacca tgaagttcga ggatcacttg caatgccgat atatgaccct 780

agcaagggct cttgctgtgc ggtgcttgag cttatcacaa agaaggagaa acctgacttc 840

gatgcagaaa tgaacaacct tcgccatgca ttgcaggctg tgaacttgga gacagcaaaa 900

gattgtatcg atcagaaggt ttattcagca aatcagaaag ccgccttcac tgagattttg 960

gatgttctaa gagctatttg ccatgcacac atgcttccgt tggcccttac atgggtccct 1020

tcatcaaatg gtagtgatgg tggttatgtt ggacatgata gtgtccttga ttctcagtca 1080

gggaaagcga tactccgcat ccatgaatca gcgtgttatg ttaatgatgc aaagatgcaa 1140

ggtttttttc atgcatgcac tgaaactcat cttgagaaag ggcaaggtat tgcaggccga 1200

gcactcaagt ccaatctgcc gttcttctct cctaatataa gagaatacgg aattaaggat 1260

tacccactcg cacaccatgc tcgtaagttt ggtctgcatg ctgctgtagc aatccggcta 1320

aggagcacat acactggtga tgatgactac atactagaat tctttctacc aatcaactgc 1380

acaggcagtg aagaacaaca gatgttattg aataacctgt ccagtactat gcaaagaata 1440

tgcaaaagtt tgcgaacagt ttctgaagca gaggttgata aagttgacgc ttgtactgca 1500

gtaatgtata aggcaaccag tggaagttgc ttgcctactg gtcagtcttg gagttcttca 1560

catggtgatc aacctgccac agaagaggca ttccaggatc tatctttaat tgataagcaa 1620

ggggacatgt ccgagcaggc acagtctagt tcaatgcgac ttgcggagaa aaagcgcagt 1680

acagcggaga agaatattgg catggatgtt ctccgtaagt acttttctgg gagcctaaag 1740

gatgctgcaa agagcctcgg tgtttgtcca acaaccttga aacggatatg ccgcacacat 1800

ggaatttcgc gatggccatc tcgcaagata aacaaggtca accgttcgtt aaagaagatc 1860

caaactgtca ttaactctgt ccatggagtg gacagctctt tgcagtatga tccagctact 1920

ggatctcttg ttccagcagt ttctctgcca gagaagactt cattcccttc atgtgatgct 1980

gtgtctagtc catctgttgg gaaaactgtg gatgaaaaat ctggcccaaa atctgagcaa 2040

gggtattcgt cacctgaagg atgggaaaga gatagctgtc agttgcagcg ctctgatgcg 2100

cagaaagggg aaggcggtga atttcacatg cagacaacta actatagtgg cagtggtgat 2160

cacggctctt atggtccgaa tatcacacat catattagtt ctgaaggaac acaaggacca 2220

ttatatccca ctggtgctgt tagtgcttta catgacaaag aaacaggttg catcgaacct 2280

ttgccctgtg tcctcccaag catcaagact accagggacc aaatagtggg aaggaactca 2340

ccacccatgc aacaagcaga tattgatatg tttgatgatc gcgaaggcag ggagcatact 2400

catccttcta cctctggtat gacagactct tctagcggca gtgcatcaag ccaccctaca 2460

ttcaagaaga acccagcacg cccacttaag gacaagagca gccctgcact tacggtcaag 2520

gcgacgtaca atggagacac cgtgcggttc aagttcttgc catcgatggg ctggtaccac 2580

ctgctggaag aaatagccaa gaggttcaag ctgttgaccg gggtgttcca gctcaagtac 2640

aaggatgacg aggacgagtg ggtcatcatg gcgaacgact ccgatctcca ggagtgcgtc 2700

gacgtcatgg actcgatggg cacgcgcaac gtgaagctcc aggtccggga tctcccgtgc 2760

ctcatcagca gctcgggcag cagcagctgc ttgcagctgg aaggacacaa ttcatga 2817

<210> 32

<211> 2817

<212> DNA

<213> Triticum aestivum

<400> 32

atggatgtgc ctatgccttc acagtccaac cgcgctggat gcaatggaag cgtcggcagc 60

ccgtcggatg atccatatgg cgttacagcc atgatgaact ttgatgggta ctcagagctc 120

tgcggcagcc cttcattagc tgaccagctg ttctcgttgc tgaacgattc gtccacacac 180

cagatgtttg ctatgtggtc atccttggga tcttcgccac gtgcttctgg tgtcagtgaa 240

gatatgcagc tcgatgccta ttccagtgta cctggggatc aaaaggttga tttggtatct 300

tcagtgaatc cagctgaaac tgggactggg agaatggcca agagttcagg cgaccttggc 360

tcagatggtg atcctgagca aggaagtact agtttggttc cgaggcctat tgccggcaac 420

ttactcgctg acaggatgct catggctctg tctttgttca ggaagtcact tggcggcggc 480

gttcttgcgc aggtctggat gcctgttgag caggaggggc atgtcgtgct tagtacatgt 540

gaacagccgt ttctgcttga ccaagctctt gctgggtaca gagaagtatc caggcatttt 600

gtgttctccg ctaaggagga gaccggcctt caaccagggc ttccagggag ggtcttcatc 660

tccggtgtgc cagaatggac ctcaaatgtg ctctactaca gcaagccaga gtatctgagg 720

atggagtatg ctcttcatca cgacgttcga ggatcacttg ctatgccgat atacgacccc 780

agcaagggct cttgctgtgc agtgcttgag cttatcacaa agaaggagaa acctgacttt 840

gctgcagaaa tggacaacct tcgccatgcc ttgcaggctg tgaacttgga gacagcaaag 900

gattgcattg atcagaaggt ttattcagca aatcagaaag ccgctttcac tgagattttg 960

gatgttctaa gagctatttg ccatgcacac atgcttccgt tggccctcac atgggtccct 1020

tcatcaaatg gcagtgatgg tggttatgtt ggacatgata gtgtccttga ttctcagtca 1080

ggaaaaacga tactccgcat ccatgaatca gcgtgttatg ttaatgatgc aaagatgcaa 1140

ggatttttc atgcatgcac tgaaactcac cttgagaaag ggcaaggtat tgcaggccga 1200

gcactcaagt ccaatctgcc gttcttctct cccaatatca gagaatacgg aattaaagat 1260

tacccactcg cacaccatgc tcgtaagttt ggcctgcatg ctgctgtagc aatccggcta 1320

aggagcacat acaccggtga tgatgactac atactagaat tctttctacc aatcaactgc 1380

acaggcagtg aagaacaaca gatgttattg aataacctct ccagtactat gcaaagaata 1440

tgcaaaagtt tacgaacagt ttctgaagca gaggttgata aagttgatgc ttgtactgca 1500

gtaatgtata aggcaaccag tggaagttgc ttgcctactg gtcagtctga gagttcttcg 1560

cgtggtgatc aaccagccac agaagaggca ttccaggatc tatctttaat tgataagcaa 1620

cggggcatgt ccgagcaggc acagtctagt acaatgcgac ttgcggagaa aaagcgcagt 1680
acagctgaga agaatattgg catggatgtt cttcgtaagt acttctctgg gagcctaaag 1740
gatgctgcaa agagccttgg tgtttgtcca acaaccttaa aacggatatg ccgcacacat 1800
ggaatttcac gatggccatc tcgcaagata aacaaggtca accgttcatt aaagaagatc 1860
caaactgtca ttaactcggt tcatggagtg gacagttctt tgcagtatga tcctgctact 1920
ggatctcttg ttccagcagt ttctctgcca gagaagactt cattcccttc gtgtgatgct 1980
gtgtccagtc catccgttgg gaaaactgtg gatgaaaaat ctggcccaaa atctgagcaa 2040

gggtattcgt cacctgaagg atgggaaaga gagagttgcc agttgcagcg ccctgatgcg 2100
cagaaagggg aaggcgatga atttcacatg cagacaagta actatagtgg cagtggtgat 2160
cacgcctctt atggtgcgaa tgtcacacat catattaatt ctgaaggaac acaagaacca 2220
ttgtatccca ttggtgctgt tagtgcttta catgacaaag aaacaggctg catcgaacct 2280
tctgcccgtg tcctcccaag catcaagact accagggacc agatagtggg aaggaactca 2340
ccgcccgcac aacaagcaga tattgatatg tttgacgacc gtgaaggcag ggagcatact 2400
catccttcca cctctggtat gacagactct tctagtggca gtgcatcaag ccaccccaca 2460

tttaagaaga acccagcacg tccacttaaa gacaagagca gccctgcact tacggtcaag 2520
gcaacgtaca acggagacac cgtgcggttc aagttcttgc catcgatggg ctggtacaac 2580
ctgctggaag aaatagccaa gaggttcaag ctgtcgatgg gggtgttcca gctcaagtac 2640
aaggacgacg aggacgagtg ggtcatcatg gcaaacgact ctgatctcca ggagtgcgtc 2700
gacgtcatgg actcgatggg cacgcgcaac gtgaagctcc aggtccggga tctcccgtgc 2760
ctcatcagca gctcgggcag cagcagctgc ttgcagctgg aaggacacaa ttcataa 2817