



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0011981  
(43) 공개일자 2025년01월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/82 (2006.01) A01H 5/10 (2018.01)  
A01H 6/20 (2018.01) C07K 14/415 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 15/8279 (2013.01)  
A01H 5/10 (2022.05)  
(21) 출원번호 10-2025-0000854(분할)  
(22) 출원일자 2025년01월03일  
심사청구일자 2025년01월03일  
(62) 원출원 특허 10-2022-0016474  
원출원일자 2022년02월08일  
심사청구일자 2022년02월08일

(71) 출원인  
충남대학교산학협력단  
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)  
(72) 발명자  
오만호  
세종특별자치시 나리로 38, 711동 701호 (한솔동, 첫마을7단지)  
최재한  
강원특별자치도 동해시 효자로 636-2, 103동 140 5호 (동회동, 북삼2차 웰메이트타운)  
(74) 대리인  
최규환

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 뿌리혹병 저항성을 조절하는 SWEET 유전자 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 뿌리혹병 저항성을 조절하는 SWEET 유전자 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 SWEET2 단백질을 코딩하는 유전자 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 SWEET14 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 조절하여 배추 뿌리혹병에 대한 저항성을 조절하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도6

애기장대 돌연변이체 및 배추 품종의 뿌리혹병 발생 및 저항성 검증 결과  
<1자>

| 계통    | 발병도 |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 평균  | 반응 |
|-------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|----|
| wt    | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4.0 | S  |
| #5    | 0   | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0 | R  |
| #3    | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4.0 | S  |
| #2    | 4   | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |   | 1.8 | MR |
| #15   | 0   | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |   |   | 0.5 | R  |
| 노랑김장  | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 3 | 4 | 4 | 4 | 3.7 | S  |
| 참피오   | 4   | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2.1 | S  |
| CR117 | 2   | 2 | 0 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3.2 | S  |
| 천하장군  | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2.7 | S  |

<2자>

| 계통    | 발병도 |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 평균  | 반응 |
|-------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|----|
| wt    | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4.0 | S  |
| #5    | 0   | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0 | R  |
| #3    | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4.0 | S  |
| #2    | 0   | 0 | 4 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 4 |   | 1.3 | MR |
| #15   | 0   | 4 | 0 | 0 |   |   |   |   |   |   | 1.0 | R  |
| 노랑김장  | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4.0 | S  |
| 참피오   | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4.0 | S  |
| CR117 | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4.0 | S  |
| 천하장군  | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4.0 | S  |

<3자>

| 계통   | 발병도 |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 평균  | 반응 |
|------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|----|
| wt   | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4.0 | S  |
| #5   | 0   | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0 | R  |
| #3   | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4.0 | S  |
| #2   | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.0 | MR |
| #15  | 0   | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0 | R  |
| 천하장군 | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4.0 | S  |

S: 이병성, MR: 중도저항성, R: 저항성.

(52) CPC특허분류

**A01H 6/204** (2022.05)

**C07K 14/415** (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                    |
|-------------|------------------------------------|
| 과제고유번호      | 1545023961                         |
| 과제번호        | 213006055SBC30                     |
| 부처명         | 다부처                                |
| 과제관리(전문)기관명 | 농림식품기술기획평가원                        |
| 연구사업명       | GoldenSeed프로젝트(R&D)(농림부, 산림청, 해수부) |
| 연구과제명       | 뿌리혹병 균주 유래물질 탐색 및 감염경로 차단기작 연구     |
| 기 여 율       | 1/1                                |
| 과제수행기관명     | 충남대학교 산학협력단                        |
| 연구기간        | 2021.01.01 ~ 2021.12.31            |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 SWEET14 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하여 SWEET14 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 식물세포에서 저해시키는 단계를 포함하는, 식물체의 배추 뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*)에 의해 유발되는 병에 대한 저항성을 증가시키는 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 애기장대 유래 SWEET14 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 저해는 VIGS (Virus-induced gene silencing), RNAi 또는 안티센스 RNA, T-DNA 삽입, 내생 트랜스포존(transposon), 방사선 조사 또는 유전자 교정 시스템을 통한 돌연변이 유발을 이용하여 발현을 저해하는 것을 특징으로 하는, 식물체의 배추 뿌리혹병균에 의해 유발되는 병에 대한 저항성을 증가시키는 방법.

#### 청구항 3

서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 SWEET14 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하여 SWEET14 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 식물세포에서 저해시키는 단계; 및

상기 형질전환된 식물세포로부터 식물체를 재분화하는 단계;를 포함하는, 배추 뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*)에 의해 유발되는 병에 대한 저항성이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법.

#### 청구항 4

제3항의 방법에 의해 제조된, 배추 뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*)에 의해 유발되는 병에 대한 저항성이 증가된 형질전환 식물체.

#### 청구항 5

제4항에 따른 식물체의 형질전환된 종자.

#### 청구항 6

서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 SWEET14 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 식물체의 배추 뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*)에 의해 유발되는 병에 대한 저항성 증가용 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 뿌리혹병 저항성을 조절하는 *SWEET* 유전자 및 이의 용도에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 식물은 고착생물로서 환경의 변화에 영향을 받는다. 이러한 환경의 변화는 외부 스트레스로 작용하여, 식물은 서로 다른 스트레스 요인들이 섞여 있는 환경에 적응하기 위해 다양한 노력을 기울이고 있다. 식물은 미세한 환경변화의 인지, 복잡한 스트레스 조건에 대한 반응, 그리고 생장과 생식에 필요한 중요한 자원을 유지시키기 위해 특정한 기작이 발달되었다. 스트레스에 대한 반응은 식물 생리학의 변화로 나타나는 분자 및 세포 수준에서의 반응을 포함한다.

[0003] 최근 농업과 과학적 연구에 대한 중요성 때문에 다양한 생물학적 스트레스 요인 중 균류나 바이러스에 의한 병원체와 식물의 상호 작용에 많은 연구가 이루어지고 있다. 그 중 *Plasmodiophora brassicae*는 뿌리혹병의 원인

으로 알려져 있으며, 근족충류(*Rhizaria*) 내의 *Plasmodiophorids*의 기생영양 원생생물에 속한다. 또한 이것은 토양에서 전염되어 십자화과 작물에서 병을 유발하는 것으로 보고되었다.

[0004] 배추(*Brassica rapa*)는 우리나라를 비롯하여 중국, 일본에서 주로 소비되는데, 우리나라의 경우, 김치의 주재료로 이용되는 가장 대중적이고 중요한 채소의 하나이다. 배추가 차지하는 비중을 보면 2016년 재배면적은 24,902ha, 생산량은 1,792,833톤이다(농림축산식품부 정보통계담당관실, 2017). 전체 채소 재배면적의 약 12%, 생산량의 약 24%를 차지하고 있다. 또한 소비량에 있어서도 약 31%에 해당되어 다른 채소류 중 무, 고추, 마늘, 양파보다 더 많이 생산되고 소비되는 중요한 식물자원이다(농림축산식품부 정보통계담당관실, 2016).

[0005] 배추가 *P. brassicae*에 감염되면 온도가 높은 낮에는 시들었다가 밤에는 회복되는 증상을 반복하여 정상적인 생장이 불가능하게 된다. 또한 혹(gall)을 형성하여 이는 결국 뿌리가 토양에서 영양분과 물을 흡수하지 못하게 하고 시들음, 기절, 황변, 조기 노화 등을 일으킨다. *P. brassicae*의 생활주기는 토양에서 휴면 포자의 생존, 뿌리털 감염(1차 감염) 및 피질 감염(2차 감염)의 3 단계로 나누어진다. 뿌리털을 먼저 감염시켜 피질 조직을 침범하는 운동성포자를 생산한다. 2차 감염은 옥신, 시토키닌 및 기타 식물성장 조절 물질의 생산에 관여하는 유전자의 발현을 촉진함으로써 뿌리 피질 내에서 형성되고, 뿌리 조직의 비대 성장으로 인해 혹을 형성한다. *P. brassicae*는 적어도 6-8년 동안 토양에서 포자의 형태로 생존 할 수 있기 때문에 화학 물질에 의한 제어가 어렵다. 따라서 효율적이고 친환경적인 저항성 품종의 개발은 질병을 통제하는 가장 경제적이며 효과적인 방법 중 하나이다. 하지만 다양한 저항성 유전자와 관련된 *P. brassicae* 감염에 대한 반응 메커니즘은 아직 완전히 밝혀지지 않았다.

[0006] 당류는 병원체와 숙주 식물을 포함한 살아있는 유기체의 주요 탄소원이다. 식물에서 당은 광합성 기관에서 합성되고, 합성된 당은 식물의 성장 및 발달에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 식물 표면으로 옮겨지거나 분비된다. 식물체에서 분비되는 당류는 병원체 성장을 위한 탄소원으로 사용될 수 있다. 특히, 기생영양 미생물은 숙주 세포에서 당을 추출하여 영양분을 얻는다. *P. brassicae*에서는 2%의 당 용액이 휴식 포자의 발아를 촉진할 수 있다고 보고되었고, *P. brassicae*에 감염된 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)와 브라시카 속 식물의 혹에서 옥탄당과 자당(sucrose)의 축적이 발견되었다. MSTs (monosaccharide transporters), SUTs (sucrose transporters), SWEETs (sugar transporters)와 같이 잘 알려진 당수송체는 단당류 또는 이당류의 이동을 담당한다. 그러나 SWEET 단백질은 에너지에 의존하여 수송체 역할을 하는 MST 및 SUT와 달리 에너지에 의존하지 않고 당의 유입과 유출을 조절하는 차별점이 있다.

[0007] 병원체의 주요 목표는 번식을 위해 숙주의 영양분에 접근하는 것이다. 식물은 병원체가 영양소에 대한 접근을 제한하기 위해 면역 반응을 시작하는 반면, 병원체는 숙주의 영양소에 접근하기 위해 면역을 억제하기 위해 노력한다. 그러나 성장을 위한 병원체가 숙주의 당 유출을 변화시키는데 사용되는 메커니즘은 잘 알려져 있지 않다. 식물과 병원체 사이에서 각자의 성장을 위한 당의 경쟁은 위에서 언급 한 당수송체에 의해 조절될 가능성이 높다. 따라서 이들 수송체의 조절은 병에 대한 새로운 통찰을 제공한다. *SWEET* 유전자는 세포막을 가로 질러 당을 이동시키는 역할을 하는 단백질의 한 종류로, 생식 발달, 잎의 노화, 스트레스에 대한 반응 등 다양한 식물의 생리학적 과정을 조절한다. 또한 *SWEET* 유전자는 기생충과 병원체 상호 작용에서 당류의 수송을 조절하는데 중요하다. 숙주와 미생물 상호 작용 동안, 병원체 감염은 *SWEET* 유전자의 발현 패턴을 조절하여 병원체가 당을 얻도록 촉진시킨다.

[0008] 한편, 한국공개특허 제2013-0132881호에는 '배추 무사마귀병-저항성 배추속 식물, 이의 씨앗 및 식물 부분 및 이를 수득하기 위한 방법'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2005-0115028호에는 '배추 무사마귀병균에 길항하는 신규 미생물스트렙토마이세스 카르피넨시스 AC-3 및 이를 이용하여 제조한 유기질 비료'가 개시되어 있으나, 본 발명의 '뿌리혹병 저항성을 조절하는 *SWEET* 유전자 및 이의 용도'에 대해서는 기재된 바가 없다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 배추에서 *Plasmodiophora brassicae*균에 의한 뿌리혹병 감염 메커니즘에 관여하는 유전자들을 조사하였고, 당수송체(sugar transporter) 단백질을 코딩하는 *SWEET* 유전자의 발현에 따라 뿌리혹병에 대한 내성에 변화가 있음을 확인하였다. 그 후, 배추의 뿌리혹병 저항성 품종(BrM7)에서 발현량이 증가한 *BrSWEET2*, *BrSWEET4*, *BrSWEET13* 및 *BrSWEET14* 유전자의 애기장대 상동체 유전자 knock-out line을 이용하여 뿌리혹병 저항성에 대한 검증실험을 실시한 결과, *Atsweet2* 및 *Atsweet14*

돌연변이체가 다른 돌연변이체에 비해 뿌리혹병에 저항성이 우수한 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

### 과제의 해결 수단

- [0010] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 SWEET2 단백질을 코딩하는 유전자 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 SWEET14 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 식물체의 식물병 저항성을 조절하는 방법을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 SWEET2 단백질을 코딩하는 유전자 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 SWEET14 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물체를 재분화하는 단계;를 포함하는, 식물병 저항성이 조절된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된, 식물병 저항성이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 형질전환된 종자를 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 SWEET2 단백질을 코딩하는 유전자 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 SWEET14 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 식물체의 식물병 저항성 조절용 조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

- [0014] 본 발명에서는 애기장대 유래 SWEET2 단백질 또는 SWEET14 단백질 코딩 유전자의 발현이 저해된 돌연변이체가 배추 뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*)에 의해 유발되는 식물병에 대한 저항성이 증대되는 것을 확인하였다. 따라서, 상기 애기장대 유래 SWEET 유전자의 발현 조절을 통해 뿌리혹병에 대한 저항성이 증가된 형질전환 식물체를 개발하여 농작물의 생산성을 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

### 도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 배추(*Brassica rapa*) SWEET 유전자의 계통도이다.
- 도 2는 뿌리혹병 저항성 품종인 BrM7의 뿌리에서 SWEET 유전자의 발현 경향을 qRT-PCR로 확인한 결과이다. NI: 병원균 비감염, I: 병원균 감염.
- 도 3은 뿌리혹병 저항성 품종인 BrM7의 잎에서 SWEET 유전자의 발현 경향을 qRT-PCR로 확인한 결과이다. NI: 병원균 비감염, I: 병원균 감염.
- 도 4는 뿌리혹병 이병성 품종인 BrM8의 뿌리에서 SWEET 유전자의 발현 경향을 qRT-PCR로 확인한 결과이다. NI: 병원균 비감염, I: 병원균 감염.
- 도 5는 뿌리혹병 이병성 품종인 BrM8의 잎에서 SWEET 유전자의 발현 경향을 qRT-PCR로 확인한 결과이다. NI: 병원균 비감염, I: 병원균 감염.
- 도 6은 애기장대 sweet 돌연변이체의 뿌리혹병에 대한 병증 검정 실험 결과이다. wt: 애기장대 야생형, 계통명 #5, #3, #2, #15: 각각 Atsweet2, Atsweet4, Atsweet13, Atsweet14 돌연변이체.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 SWEET2 단백질을 코딩하는 유전자 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 SWEET14 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 식물체의 식물병 저항성을 조절하는 방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명에 따른 식물체의 식물병 저항성 조절 방법에 있어서, 상기 식물병은 바람직하게는 배추 뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*)에 의해 유발되는 병일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명에 따른 애기장대 유래 SWEET2 단백질 또는 애기장대 유래 SWEET14 단백질의 범위는 각각 서열번호 2 또는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. 본 발명에 있어서, 용어 "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2 또는 서열번호

호 4로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2 또는 서열번호 4로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 식물체의 식물병, 특히 배추 뿌리혹병균(*P. brassicae*)에 의해 유발되는 병에 대한 식물체의 저항성 조절 활성을 의미한다.

[0019] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물병 저항성 조절 방법은, 상기 애기장대 유래 SWEET2 또는 SWEET14 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 식물세포에서 저해시켜 야생형에 비해 식물체의 식물병 저항성을 증가시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 상기 애기장대 유래 SWEET2 또는 SWEET14 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제는 VIGS (Virus-induced gene silencing) 시스템, RNAi 또는 안티센스 RNA, T-DNA 삽입, 내생 트랜스포존(transposon), X-레이 또는  $\gamma$ -레이 조사를 통한 돌연변이 유발, 또는 CRISPR/Cas9 유전자 교정 시스템 등을 이용하여 애기장대 유래 SWEET2 또는 SWEET14 단백질 코딩 유전자의 발현을 저해(억제)하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 유전자의 발현을 저해하는 당업계의 통상의 방법이면 모두 가능할 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 애기장대 유래 SWEET2 또는 SWEET14 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다. 본 발명의 상기 애기장대 유래 SWEET2 또는 SWEET14 단백질을 코딩하는 유전자는 각각 서열번호 1 또는 서열번호 3의 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 3의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0022] 본 명세서에서 용어 "제조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이중의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 제조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 제조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0023] 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 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 제조합 DNA 분자를 의미한다.

[0024] 본 발명의 상기 벡터는 전형적으로 클로닝 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예컨대, pL $\lambda$  프로모터, Trp 프로모터, Lac 프로모터, T7 프로모터, Tac 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 리보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 대장균(*Escherichia coli*)이 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위, 그리고 파아지  $\lambda$ 의 좌향 프로모터 (pL $\lambda$  프로모터)가 조절 부위로서 이용될 수 있다.

[0025] 본 발명의 제조합 벡터에서, 상기 프로모터는 형질전환에 적합한 프로모터들로서, 바람직하게는 CaMV 35S 프로모터, 액틴 프로모터, 유비퀴틴 프로모터, pEMU 프로모터, MAS 프로모터 또는 히스톤 프로모터일 수 있으며, 바람직하게는 CaMV 35S 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명에 있어서, "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. "항시성(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 항시성 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 항시성 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

[0027] 본 발명의 제조합 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관 내 제조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 제조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡

터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 벡터는 번역 개시 부위로서 리보솜 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명의 재조합 벡터의 바람직한 예는 VIGS 벡터 또는 RNAi 벡터이다. VIGS는 바이러스 벡터에 식물 유전자를 도입한 후 식물체를 감염시키면, 그 도입된 유전자의 내인성 유전자가 발현이 억제되는 현상을 말한다. 이는 PTGS (Post-transcriptional gene silencing)의 일종으로서, 전사-후(post-transcriptional), RNA 턴오버(RNA turnover) 및 뉴클레오티드 서열 특이적(nucleotide sequence-specific) 이라는 특징들을 가진다. 상기 VIGS 벡터는 외래 유전자를 도입한 식물체 내에서 일시적으로 발현시킬 수 있는 일시적(transient) 발현 벡터 및 외래 유전자가 도입된 식물체에서 영구적으로 발현시킬 수 있는 식물 발현 벡터로 사용할 수 있다.

[0029] 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)와 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 계놈 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.

[0030] 재조합 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 상기 마커 유전자는 항생제 저항성 유전자(dominant drug resistance gene)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주세포는 미세조류, 미생물 등을 포함한 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 쉐린겐시스(*B. thuringiensis*)와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*) 및 다양한 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

[0032] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모 (예컨대, *Saccharomyces cerevisiae*), 곤충세포, 사람세포 (예컨대, CHO 세포주(Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 식물세포이다.

[0033] 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및 (또는) 조직 배양기간을 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, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코딩된) 입자충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투머파시엔스 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.

[0034] 본 발명은 또한,

[0035] 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 SWEET2 단백질을 코딩하는 유전자 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 SWEET14 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및

[0036] 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물체를 재분화하는 단계;를 포함하는, 식물병 저항성이 조절된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0037] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 애기장대 유래 SWEET2 또는 SWEET14 단백질은 바람직하게는 각각 서열번호

2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함할 수 있으며, 구체적인 내용은 전술한 것과 같다.

[0038] 또한, 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 식물세포를 형질전환시키는 방법은 전술한 바와 같으며, 상기 형질전환된 식물세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다. 형질전환된 식물세포는 전식물로 재분화되어야 한다. 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물의 재분화를 위한 기술은 수많은 여러 가지 중에 대해서 당업계에 주지되어 있다(Handbook of Plant Cell Culture, 1-5권, 1983-1989 Momillan, N.Y.).

[0039] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물세포"는 어떤 식물세포도 된다. 식물세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양기관 또는 전체 식물이다. "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), 짝 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물 조직은 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다.

[0040] 본 발명의 일 구현 예에 따른 형질전환 식물체의 제조방법에 있어서, 상기 애기장대 유래 SWEET2 또는 SWEET14 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 식물세포에서 저해시키면 야생형에 비해 식물체의 식물병 저항성이 증가된 형질전환 식물체를 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 유전자의 발현 저해 방법은 전술한 것과 같다.

[0041] 본 발명에 따른 형질전환 식물체의 제조방법에 있어서, 상기 식물체는 바람직하게는 배추 뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*)에 의해 유발되는 병일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0042] 본 발명은 또한, 상기 제조방법에 의해 제조된, 식물병 저항성이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 형질전환된 종자를 제공한다.

[0043] 본 발명에 따른 형질전환 식물체는 애기장대 유래 SWEET2 또는 SWEET14 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 저해시켜 야생형에 비해 식물병에 대한 저항성이 증가된 것을 특징으로 한다.

[0044] 상기 식물체는 애기장대, 감자, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 당근, 미나리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이, 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 완두 등의 쌍자엽 식물 또는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 양과 등의 단자엽 식물일 수 있고, 바람직하게는 쌍자엽 식물일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 애기장대일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0045] 본 발명은 또한, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 SWEET2 단백질을 코딩하는 유전자 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 SWEET14 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 식물체의 식물병 저항성 조절용 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 유효성분으로 애기장대 유래 SWEET2 또는 SWEET14 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하며, 상기 유전자의 발현이 저해되면, 식물체의 병 저항성, 특히 배추 뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*)에 의해 유발되는 병에 대한 저항성을 증가시킬 수 있다.

[0047] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

## [0049] 재료 및 방법

### [0050] 1. SWEET 유전자의 유연관계

[0051] TAIR (<https://www.arabidopsis.org>)에 접속하여 애기장대의 SWEET 유전자를 검색한 뒤, SWEET1 부터 SWEET17 까지 각각의 아미노산 서열 정보를 얻었다. 그런 다음 Brassica data base (<http://Brassicadb.org/Brad/>)에 접속하여 *B.rapa* 단백질을 선택하여 TAIR에서 얻은 서열을 넣은 뒤 blast하였다. 도출된 결과 중 유사도(Identities)가 가장 높은 유전자를 선택하였다. Search 메뉴에서 gene sequence를 클릭한 뒤, 선택한 유전자 번호를 입력하고 유전자 서열 정보를 얻었다. 이와 같은 과정을 1번부터 17번까지 모두 진행하였다. 계통수를 그리기 위해 MEGA6 (<https://www.megasoftware.net>)를 다운로드 한 뒤, alignment 메뉴의 edit/build alignment 누르고 서열을 붙여 넣었다. 그런 후 align DNA를 클릭하고 alignment가 끝난 파일을 저장하였다. Phylogeny를 누른 뒤, construct/test neighbor joining tree 클릭하여 Bootstrap method을 1,000으로 설정하

고 Partial deletion을 95로 설정하였다.

[0053] **2. 배추(*Brassica rapa*)의 생장 및 *Plasmodiophora brassicae* 감염**

[0054] 수집된 뿌리혹으로부터 포자를 분리하기 위해 뿌리혹을 흐르는 물로 수차례 세척하여 토양입자와 불순물을 깨끗이 제거한 후 멸균된 메스를 이용하여 약 5 g씩 정량하고 균질기를 이용하여 잘게 분쇄하였다. 그 후 250 ml의 멸균수를 첨가하고 8겹의 거즈로 2회 걸러내어 50 ml 튜브에 담은 후 3,000 rpm에서 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거하였으며 2회 이상 반복하여 세척한 후, 50% 수크로스 용액을 5 ml 첨가하였다. 다시 한 번 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 펠렛을 5 ml의 멸균수로 2회 세척하였다. 마지막으로 혈구계수기(hemocytometer)를 이용하여 현미경 하에서 농도를 확인하고 -20℃에 보관하였다.

[0055] 뿌리혹병 저항성 품종인 M7과 이병성 품종인 M8 배추를 멸균된 토양을 이용하여 22~25℃ 온실에서 약 10일 정도 자엽이 완전히 전개될 때까지 생육하였다. 그런 다음 병원균 접종 2일 전에 화분에 물을 담가 토양이 충분히 수분을 흡수하도록 하였다. 그 후, 6시간, 12시간, 72시간 순으로 병원균 현탁액( $10^7$  spores  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>)을 2 ml씩 관주하였고, 6~7주 생육시켜 병을 조사하였다.

[0057] **3. RNA 추출**

[0058] RNA 추출은 SIGMA의 Spectrum<sup>TM</sup> Plant Total RNA Kit를 사용하였다. 수확하여 얼려둔 시료를 막자사발에 넣고 액체질소를 첨가하여 균질화하였다. 시료를 2 ml 튜브에 넣고 용해 버퍼 1 ml당 2-ME(mercaptoethanol)을 10  $\mu$ l 섞어준 용액을 500  $\mu$ l을 분주한 뒤 바로 30초간 볼텍싱하고, 56℃의 항온수조에서 5분간 반응시켰다. 반응 종료 후 13,500 rpm으로 3분간 원심분리 하였다. 상층액을 여과 컬럼에 분주하고, 13,500 rpm으로 1분간 원심분리 하였다. 여과 컬럼을 버리고 결합(binding) 버퍼를 500  $\mu$ l 분주하였다. 그런 다음 통과(flow through) 용액과 결합 용액이 섞인 용액을 결합 컬럼에 700  $\mu$ l 분주하였다. 13,500 rpm으로 1분간 원심분리한 뒤 통과된 용액을 버리고 세척 용액 I 500  $\mu$ l를 컬럼에 분주하였다. 다시 13,500 rpm으로 1분간 원심분리한 뒤 통과된 용액을 버리고 세척 용액 II를 500  $\mu$ l 분주하였다. 13,500 rpm으로 30초간 재원심분리한 뒤, 이 과정을 한 번 더 반복하였다. 13,500 rpm으로 2분간 공회전을 시켜 남아있는 용액을 모두 빠져나오게 하였다. 결합 컬럼을 1.5 ml 튜브에 넣고 DEPC(diethyl pyrocarbonate) 처리된 물 30  $\mu$ l를 이용하여 용출시킨 후, 13,500 rpm으로 1분간 원심분리 하였다. 내려온 용액을 다시 컬럼 위에 떨어뜨리고 최대 속도로 1분간 원심분리한 후, Nano drop을 이용하여 농도를 확인하였고, 전기영동하였다.

[0060] **4. cDNA 합성**

[0061] cDNA 합성은 TOYOBO의 ReverTra Ace- $\alpha$ -<sup>®</sup> kit를 사용하였다. 간단하게, PCR 튜브에 다음과 같이 RNA 및 시약들을 혼합하였다: 5X RT buffer 4  $\mu$ l, dNTP 2  $\mu$ l, dligo(dT)<sub>20</sub> 1  $\mu$ l, RNA 1  $\mu$ g, RNase inhibitor 1  $\mu$ l, ReverTrac Ace 1  $\mu$ l, DEPC-water ~up to 20  $\mu$ l. 그 후 PCR 기계에서 42℃, 20분간 반응시킨 후, 99℃에서 5분간 반응시켰다. 반응을 마친 후 합성된 cDNA 20  $\mu$ l를 D.W 80  $\mu$ l과 섞어 희석시켰다.

[0063] **5. qPCR 조건**

[0064] Bio-Rad의 iQ<sup>TM</sup> SYBr<sup>®</sup> Green supermix를 이용하여 진행하였다. 반응액은 주형 1  $\mu$ l, 정방향 및 역방향 프라이머 각 1  $\mu$ l, 2X SYBr<sup>®</sup> Green supermix 5  $\mu$ l, 증류수 2  $\mu$ l을 넣어 총 10  $\mu$ l로 준비하였다. PCR 조건은 증합효소를 활성화시키기 위해 95℃ 조건으로 10분 동안 진행하였고, 변성 과정을 95℃ 조건으로 30초, 결합(annealing) 과정을 60℃ 조건으로 30초, 신장(extension) 과정을 72℃ 조건으로 30초간 수행하는 과정을 43회 반복하였다. 그 후 용해곡선(melting curve)을 보기 위하여 55℃부터 95℃까지 +0.5℃/5초의 과정을 진행하였다. 모든 시료는 3 반복으로 수행되었다. 각 유전자에 대한 프라이머는 Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>)를 이용하여 디자인하였으며, 최종 선택된 프라이머 서열을 *Brassica* data base에 접속하여 blast를 통해 다른 유전자와 겹치는 것이 있는지 확인하였다. 프라이머 농도는 희석하여 최종적으로 10 pmole로 사용하였다.

표 1

| 본 발명에 사용된 프라이머 정보     |                           |                            |           |           |               |
|-----------------------|---------------------------|----------------------------|-----------|-----------|---------------|
| Gene name             | Left primer (서열번호)        | Right Primer (서열번호)        | size (bp) | TM (°C)   | GC content(%) |
| Bra017916 (ASWEET1)   | AACGGACAGAGCGCTTGAT (5)   | ATACGGTCAAGACGGCGCATG (6)  | 112       | 61.0/61.1 | 50/ 55        |
| Bra027314 (ASWEET2)   | GGACCAATCAACCGAGCAA (7)   | AAAAGTGGCTCCAAGCGAGT (8)   | 143       | 61.0/61.1 | 45/ 50        |
| Bra022636 (ASWEET3)   | CATCATGAGTGGGATCT (9)     | CGTAACCGGACCAAAACGA (10)   | 130       | 61.0/61.0 | 50/ 45        |
| Bra025317 (ASWEET4)   | TGCTCTGCCATTGACTCT (11)   | TGCGTGGAAACAATAGCAA (12)   | 147       | 60.8/61.3 | 50/ 45        |
| Bra035879 (ASWEET5)   | TGATACCAATGGCCTTGA (13)   | AGCTGGTCAAGCTGATTT (14)    | 143       | 61.2/61.3 | 45/ 50        |
| Bra035270 (ASWEET6/7) | AACGAAAAGCGTGGAGTTCA (15) | GAATGATCCAAAGCATGA (16)    | 100       | 60.8/60.8 | 45/ 45        |
| Bra025595 (ASWEET8)   | TTCGTTAAGCTGGGATTG (17)   | GGAGTAGCGTTGGGTACAA (18)   | 137       | 61.0/61.2 | 45/ 55        |
| Bra000116 (ASWEET9)   | CTTAACGCCGTCATGTGTT (19)  | TCCGTTTCTTGAATCGTG (20)    | 137       | 60.1/61.1 | 50/ 45        |
| Bra022761 (ASWEET10)  | ACCTGGGACAAAGTTTGG (21)   | GTGCTTCATGTCCGCACT (22)    | 147       | 61.1/61.2 | 50/ 55        |
| Bra018039 (ASWEET11)  | GGTGACCTCGATATGCTGA (23)  | ATTCAAGCCCTCCGATCATT (24)  | 108       | 61.0/60.8 | 55/ 45        |
| Bra026487 (ASWEET12)  | GCTGGAAACCTCATTCT (25)    | GCCACACATACGGAAGAGA (26)   | 111       | 60.5/61.1 | 50/ 55        |
| Bra040489 (ASWEET13)  | CGGTGGCTGAGAAAACAGAG (27) | TGGGAACATGTGAATAGC (28)    | 136       | 61.0/61.0 | 55/ 50        |
| Bra010477 (ASWEET14)  | GGGTTTGCCGCTATTATTC (29)  | AGACGCAACGGAATCTCT (30)    | 101       | 60.6/61.0 | 50/ 45        |
| Bra023394 (ASWEET15)  | AGTCTCTGATCGGCTGGA (31)   | GAAAGGCATGAATCCACAC (32)   | 112       | 60.1/60.5 | 55/ 55        |
| Bra021190 (ASWEET16)  | GCCGTTTTGGCTATCGTTT (33)  | GAGTTGATTTGTCCTCAAGGA (34) | 127       | 61.3/61.1 | 45/ 50        |
| Bra012752 (ASWEET17)  | ACTGTGCAATGAGTGG (35)     | TCTCACTGAACGTTGCTT (36)    | 107       | 61.0/61.0 | 50/ 50        |

## 6. 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) knock out line 선별 및 생장 조건

TAIR에 접속하여 유전자 이름을 검색한 뒤, Germplasm 리스트에 있는 것을 각각 클릭해보고 다형성 위치 (polymorphism site)가 엑손에 있는 것을 주문하였다. 종자를 심을 혹은 오토클레이브를 진행하여 멸균시켰고, 흡과 펄라이트와 버미큘라이트를 각각 5 : 0.8 : 1으로 섞은 뒤 물을 부어 흙이 물기를 머금을 수 있도록 만들어주었다. 화분에 흙이 빠지지 않도록 망을 넣은 뒤 화분에 3분의 2까지 흙을 채워 넣었다. 한 화분 당 종자는 15~20개 정도 심었다. 종자를 심은 뒤 랩을 씌어 4℃에서 2일간 춘화처리 하였다. 춘화처리가 끝난 뒤에는 22℃, 16시간/명, 8시간/암 조건인 생장실로 옮겨 생장조건을 만들어주었다.

## 7. 애기장대 돌연변이체의 뿌리혹병 검정실험

실험은 3회 수행되었으며, 재료 및 방법은 다음과 같다.

첫 번째 실험은 2020년 04월 03일 파종하여 2020년 04월 22일에 병원균을 접종하고 접종 30일 후인 2020년 06월 01일에 병증을 조사하였으며, 두 번째 실험은 2020년 06월 01일에 파종하여 2020년 06월 22일에 병원균을 접종하고 접종 31일 후인 2020년 07월 23일에 병증을 조사하였고, 세 번째 실험은 2020년 11월 13일에 파종하여 2020년 12월 01일에 병원균을 접종하고 접종 34일 후인 2021년 01월 04일에 병증을 조사하였다.

먼저, 40구 플러그 포트(40-2, 80 ml)에 원예용상토 5호(부농)를 눌러 담고, 포트당 젖은 모래와 애기장대 종자

를 잘 섞어서 40구 포트의 각 셀에 흩뿌린 후 그 위에 원예용 상토를 얇게 덮어주었다(종자를 1립 씩 파종할 수 없어 모래와 잘 섞은 뒤 흙 위에 뿌려줌). 파종한 플러그 포트는 관수상자에 물을 채워서 저면 관수하여 23℃ 항온항습실에서 19일간 재배하였다. 발아가 되면 각 샘플당 유묘 10주씩만 남겨두고 모두 솟아내었다. 병원균 접종 하루 전에 포자현탁액을 만들 때 필요한 멸균수를 미리 준비하였다. 초저온 냉동고에서 꺼내어 준비한 뿌리혹을 흐르는 물에 세척하여 흙을 제거해주었다. 큰 믹서기에 서산 군주 15g과 멸균수 200 ml를 넣어 갈고, 작은 믹서기를 이용해서 한 번 더 곱게 갈아주었다. 뿌리혹을 충분히 갈아준 뒤, 깔때기에 4겹의 거즈를 씌우고 식물 조직을 걸러 낸 후 포자현탁액 stock의 최종 부피가 각각 300 ml이 되도록 정확히 맞추었다. 여기서 포자현탁액 150 ml과 멸균수 150 ml을 섞어주어 배추 대조품종(노랑김장, 챔피언, CR117, 천하장군 각 10주)에 접종원으로 사용하였다. 희석된 포자현탁액을 고루 섞은 다음, 사전으로 자른 틈을 이용하여 포트당 5 ml씩 접종하였다. 애기장대 식물체는  $0.25\text{g/pot}$  ( $=1.3 \times 10^8$  spores/ml,  $6.5 \times 10^8$  spores/pot)의 농도로, 배추 대조품종들은  $0.125\text{g/pot}$ 의 농도로 접종하였다. 접종된 포트는 23℃ 항온항습실에서 하루에 14시간씩 광을 조사하면서 재배하였다. 배추 대조품종에 흑이 발생하였을 때 병 조사를 실시하였다. 병조사 기준은 0=뿌리혹병 발생이 없음, 1=측근에 뿌리혹이 착생되어 흑의 크기가 적고 서로 독립하여 존재, 2=측근에 뿌리혹이 착생되며 흑의 크기가 비교적 큼, 3=주근에 뿌리혹이 착생되며 서로 접합되고 흑의 크기가 큼, 4=주근에 뿌리혹이 착생되며 서로 접합되고 흑의 크기가 매우 큼 등의 5단계로 하였다. 본 발명에서는 평균 발병도가 1.0 이하인 경우에는 저항성(R), 1.1부터 2.0 이하는 중도저항성(MR), 2.1 이상은 감수성(S)으로 판정하였다.

#### [0075] 실시예 1. 배추(*Brassica rapa*)의 *SWEET* gene family 유연관계

[0076] TAIR와 *Brassica* data base에서 BLAST한 뒤 Mega6로 계통도를 만든 후 분석하였다. 해당 노드에 나타나는 숫자는 숫자가 높을수록 해당 노드에서 내려간 분류군의 추정치가 더 안정적이고, 일반적으로 70 % 이하인 노드는 신뢰도를 심각하게 고려하지 않는다. 계통(clade)은 크게 2 그룹으로 나눌 수 있었으며, 한 그룹에는 *BrSWEET11*, *BrSWEET12*, *BrSWEET13*, *BrSWEET14*, *BrSWEET10*, *BrSWEET15*, *BrSWEET9*, *BrSWEET16*, *BrSWEET17*이 포함되고, 다른 그룹에는 *BrSWEET2*, *BrSWEET3*, *BrSWEET1*, *BrSWEET8*, *BrSWEET6/7*, *BrSWEET4*, *BrSWEET5*가 포함되는 것으로 확인되었다. *BrSWEET11*과 12, *BrSWEET13*과 *BrSWEET14*, *BrSWEET16*과 *BrSWEET17*이 가장 유연관계가 유사하게 나타났다(도 1).

#### [0078] 실시예 2. *BrM7* 뿌리에서 *SWEET* 유전자 발현 분석

[0079] *Brassica rapa*의 *SWEET* 유전자 17개를 선별한 뒤, 병이 발생하지 않는 저항성 품종인 M7의 뿌리에서 RNA를 추출하고 cDNA를 합성하여 qPCR을 수행하여 유전자들의 발현양상을 확인하였다. *BrSWEET2*와 *BrSWEET4*의 경우 6시간과 12시간에서 유전자가 발현이 현저히 증가되었으며, *BrSWEET13*, *BrSWEET14*, *BrSWEET16*, *BrSWEET17*의 경우 6시간, 12시간 72시간에서 모두 발현이 증가하는 양상을 보였다. *BrSWEET1*, *BrSWEET3*, *BrSWEET10*은 12시간과 72시간에서 모두 저해되었으며, 나머지 유전자인 *BrSWEET5*, *BrSWEET6/7*, *BrSWEET8*, *BrSWEET9*, *BrSWEET11*, *BrSWEET12*, *BrSWEET15*의 경우는 72시간에서 발현 저해되었다(도 2).

#### [0081] 실시예 3. *BrM7* 잎에서 *SWEET* 유전자 발현 분석

[0082] M7 뿌리의 잎에서의 유전자 발현 비율을 분석한 결과, *BrSWEET2*은 모든 시간대에서 발현되었고, *BrSWEET11*와 *BrSWEET12*를 제외한 나머지 유전자들은 모두 72시간에서 발현되었다. *BrSWEET3*, *BrSWEET5*, *BrSWEET6*, *BrSWEET8*, *BrSWEET9*, *BrSWEET10*, *BrSWEET13*, *BrSWEET14*, *BrSWEET15*, *BrSWEET16*, *BrSWEET17*은 모두 72시간에서 다른 시간대와는 큰 차이의 발현을 나타내었다(도 3).

#### [0084] 실시예 4. *BrM8* 뿌리에서 *SWEET* 유전자 발현 분석

[0085] 병이 발생하지 않는 저항성 품종인 M7의 뿌리에서 유전자 발현을 분석한 뒤, 병이 발생하는 이병성 품종인 M8의 뿌리에서 유전자 발현을 분석하였다. 그 결과 M7 뿌리(도 2)의 결과와 반대되어 나타났다. M7 뿌리는 *BrSWEET2*와 *BrSWEET4*의 경우 6시간과 12시간에서 유전자가 발현되었고, *BrSWEET13*, *BrSWEET14*, *BrSWEET16*, *BrSWEET17*의 경우 6시간, 12시간, 72시간에서 모두 발현된 것에 비해, M8은 *BrSWEET2*와 *BrSWEET4*, *BrSWEET13*, *BrSWEET14*,

*BrSWEET16*, *BrSWEET17*의 경우 6시간에는 발현되다가도 12시간과 72시간에서는 차이를 보이지 않거나 저해되었다(도 4). 나머지 유전자인 *BrSWEET1*, *BrSWEET3*, *BrSWEET10*, *BrSWEET5*, *BrSWEET6/7*, *BrSWEET8*, *BrSWEET9*, *BrSWEET11*, *BrSWEET12*, *BrSWEET15*의 경우도 유전자 발현이 저해되는 양상을 보였다.

#### [0087] 실시예 5. *BrM8* 앞에서 *SWEET* 유전자 발현 분석

[0088] M8 뿌리의 결과를 확인한 후 잎에서의 유전자 발현 비율을 분석한 결과, 대부분의 유전자의 발현이 저해되었다. *BrSWEET3*, *BrSWEET17*과 같이 6시간에는 발현되는 패턴을 보이기는 했지만 결국 72시간에는 저해되는 양상을 나타냈다(도 5). *BrSWEET10*의 경우 72시간에서 매우 큰 발현을 보였다. *BrSWEET2*와 *BrSWEET4*, *BrSWEET13*, *BrSWEET14*, *BrSWEET16*의 경우 6시간에는 발현되다가도 12시간과 72시간에서는 차이를 보이지 않거나 저해되었다. 나머지 유전자인 *BrSWEET1*, *BrSWEET10*, *BrSWEET5*, *BrSWEET6/7*, *BrSWEET8*, *BrSWEET9*, *BrSWEET11*, *BrSWEET12*, *BrSWEET15*의 경우도 유전자 발현이 저해되는 양상을 보였다.

#### [0090] 실시예 6. *SWEET* 유전자의 돌연변이체 선발

[0091] 배추의 저항성 품종(*BrM7*)에서 *SWEET* family 유전자들 중 발현이 유도되는 유전자들을 선별하였다. *BrSWEET2*와 *BrSWEET4*의 경우 6시간과 12시간에서 유전자가 발현이 유도되었고, *BrSWEET13*, *BrSWEET14*, *BrSWEET16*, *BrSWEET17*의 경우 6시간, 12시간, 72시간에서 모두 유전자 발현이 증가되었다(도 2). *BrSWEET2*와 *BrSWEET4*, *BrSWEET13*과 *BrSWEET14*, *BrSWEET16*과 *BrSWEET17*이 짝을 이루어 유전자 발현 양상이 매우 유사하였다. 유전자들 간의 유연관계(도 1) 측면에서도 *BrSWEET2*와 *BrSWEET4*는 한 클레이드 안에 있으며 *BrSWEET13*과 *BrSWEET14*, *BrSWEET16*과 *BrSWEET17*은 가장 유사한 유연관계를 나타내고 있다. 최종적으로 *BrSWEET2*, *BrSWEET4*, *BrSWEET13*, *BrSWEET14* 유전자를 선택하였고, 애기장대에서 그 유전자들을 knockout 시킨 계통들을 선별하였다. 최종적으로 선택된 애기장대 돌연변이체는 SALK\_034042 (*Atsweet2*), SALK\_072225 (*Atsweet4*), SALK\_087791c (*Atsweet13*) 및 SALK\_010224 (*Atsweet14*) 이다.

#### [0093] 실시예 7. 애기장대 *sweet* 돌연변이체의 병 저항성 검증

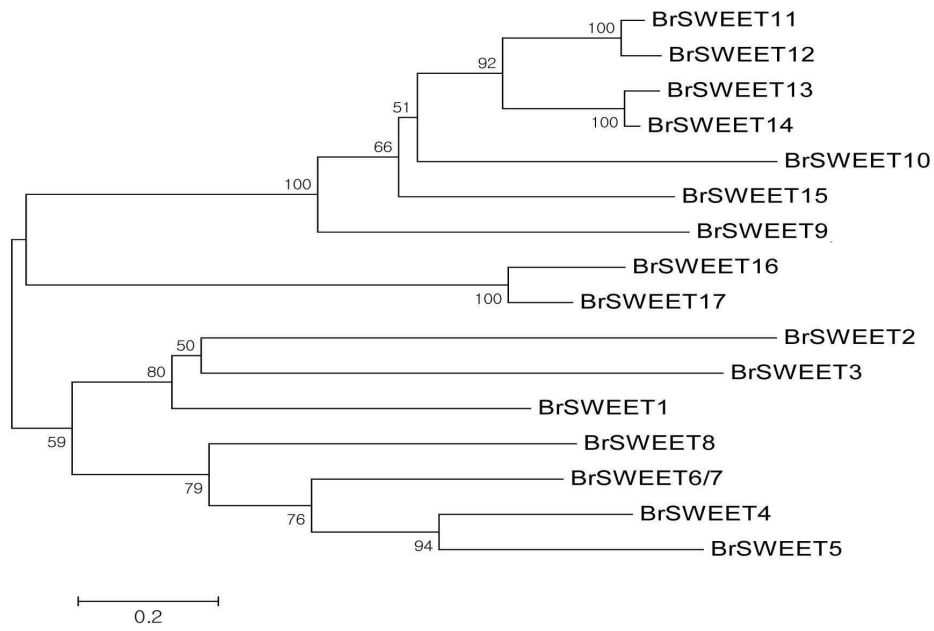
[0094] *Atsweet2*, -4, -13, -14 돌연변이 애기장대 식물체와 배추 대조품종(노랑김장, 챔피언, CR117 및 천하장군)을 이용하여 뿌리혹병에 대한 병증을 평가하였다. 실험은 xxx에 의뢰하여 수행하였으며, 애기장대 돌연변이체는 단순 코드명으로 기재하여 전달하였다. *Atsweet2*, -4, -13, -14 돌연변이체에 부여한 코드명은 각각 #5, #3, #2, #15이다.

[0095] 뿌리혹병균을 감염시킨 후 실시한 병 조사 결과, 도 6에서와 같이 애기장대 돌연변이체 #5(*Atsweet2*) 및 #15(*Atsweet14*)가 뿌리혹병에 대해 저항성을 보이는 것을 알 수 있었다. 또한, 애기장대 돌연변이체 #3(*Atsweet4*)은 뿌리혹병에 이병성을 나타내었고, 애기장대 돌연변이체 #2(*Atsweet13*)은 중도저항성을 나타내었다.

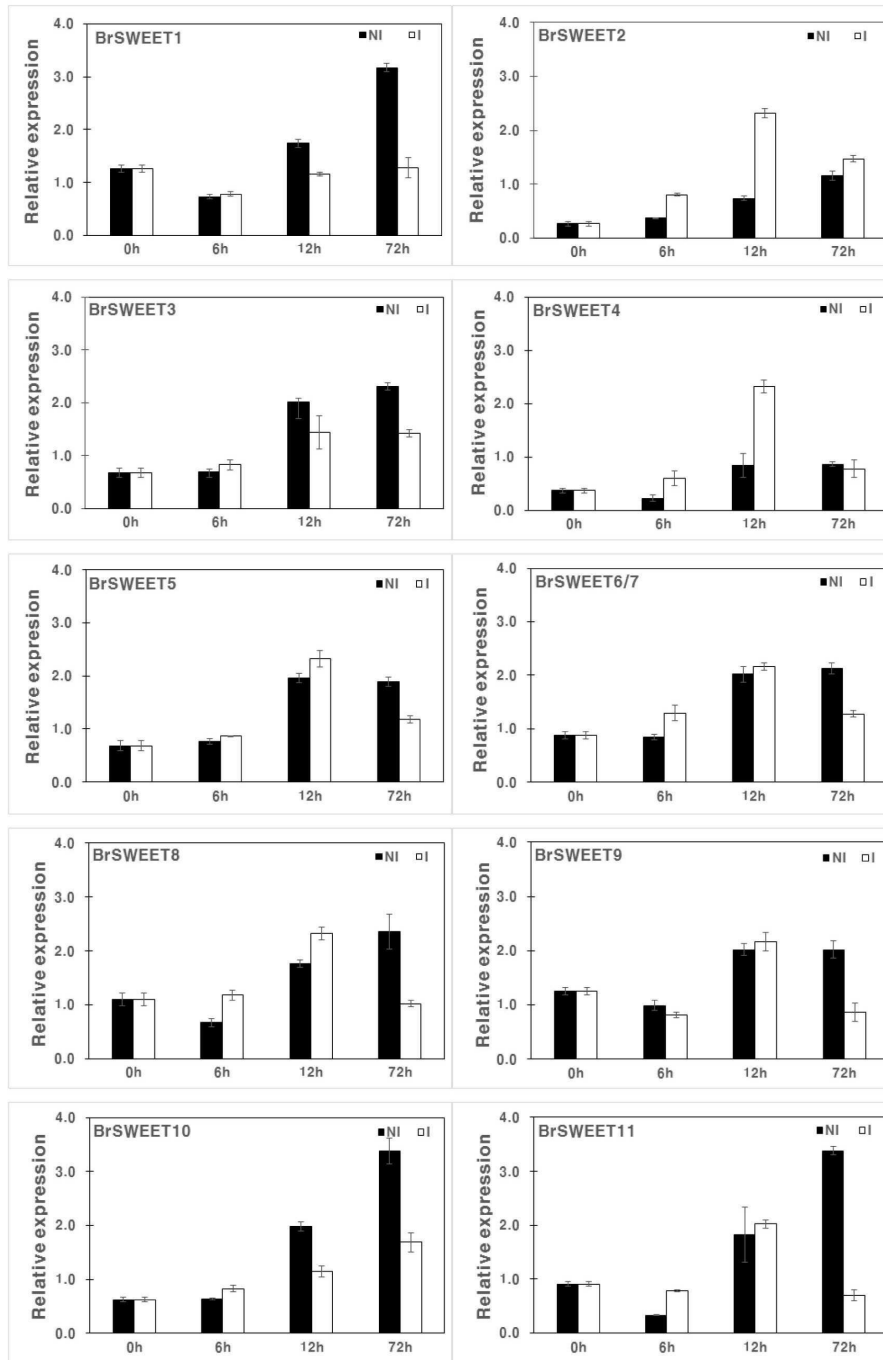
[0096] 전술한 실시예에서 배추 식물체에서는 당수송체 단백질 코딩 유전자(*BrSWEET2*, *BrSWEET4*, *BrSWEET13*, *BrSWEET14*)가 뿌리혹병균의 감염 시 발현이 증가되는 것으로 확인되었는데, 이는 식물체와 상호작용하는 토양 속 뿌리혹 병원균에 의한 당류 요구량 증가에 따른 결과로 유추할 수 있었으며, 애기장대 돌연변이체에서는 당수송체의 돌연변이로 인해 뿌리혹병균이 감염되었을 때, 병원균 증식에 필요한 에너지(당류) 요구량을 충족시키지 못해 병원균의 증식이 제대로 이루어지지 못하는 것으로 판단되었다. 상기 결과를 통해 당수송체 단백질인 *SWEET*의 발현 조절은 뿌리혹병균에 대한 병 저항성을 조절할 수 있음을 알 수 있었다.

도면

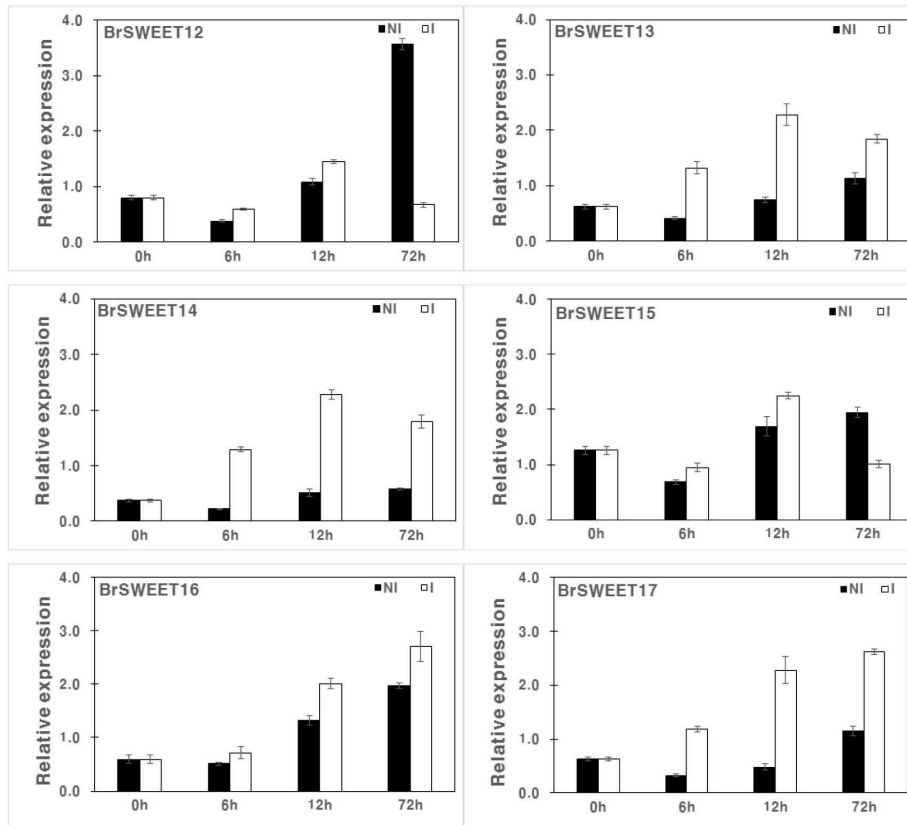
도면1



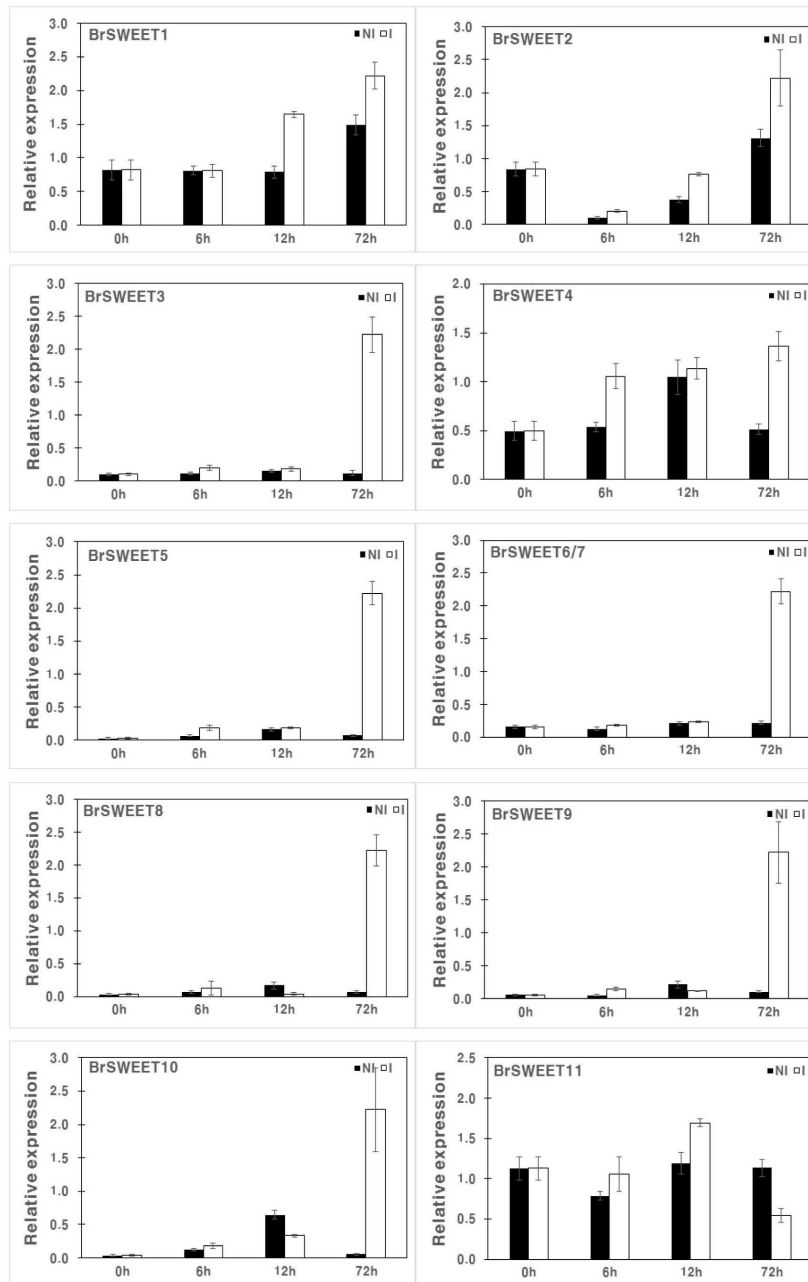
도면2a



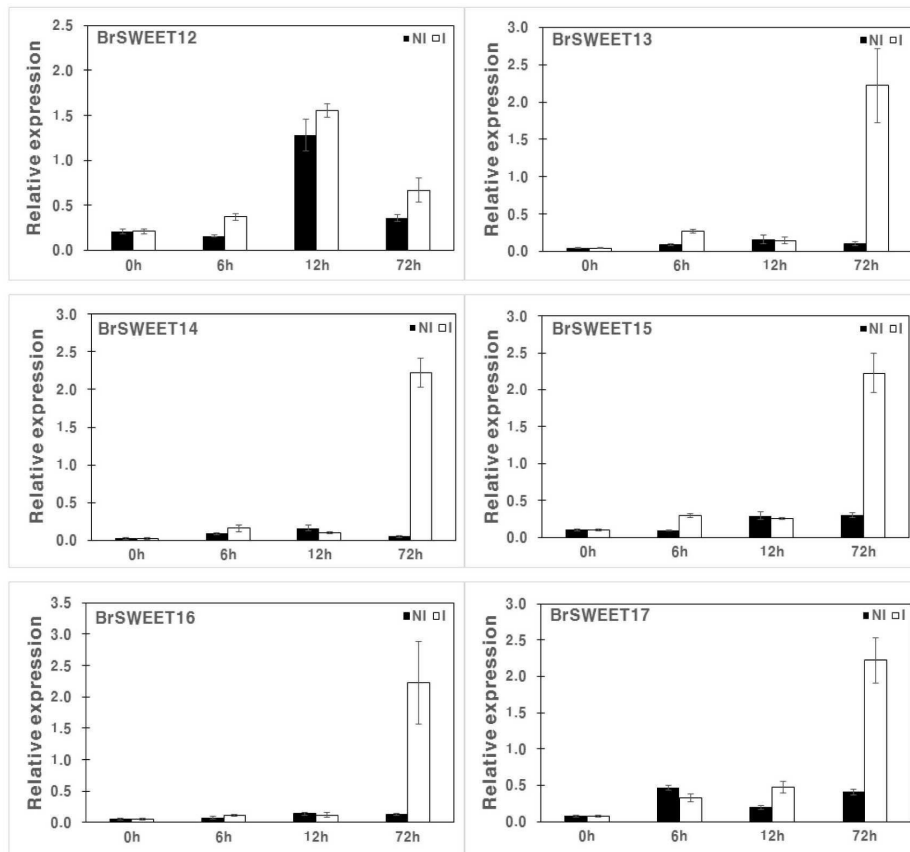
도면2b



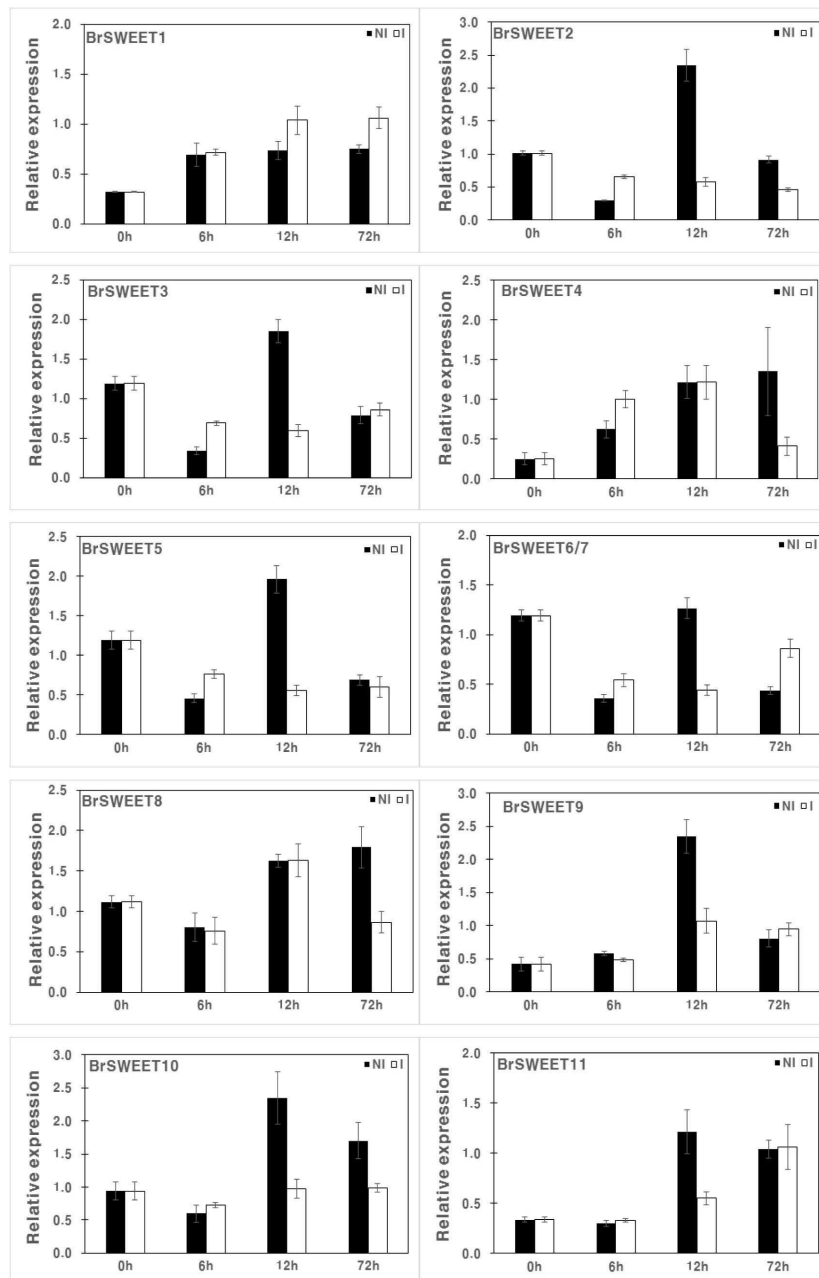
도면3a



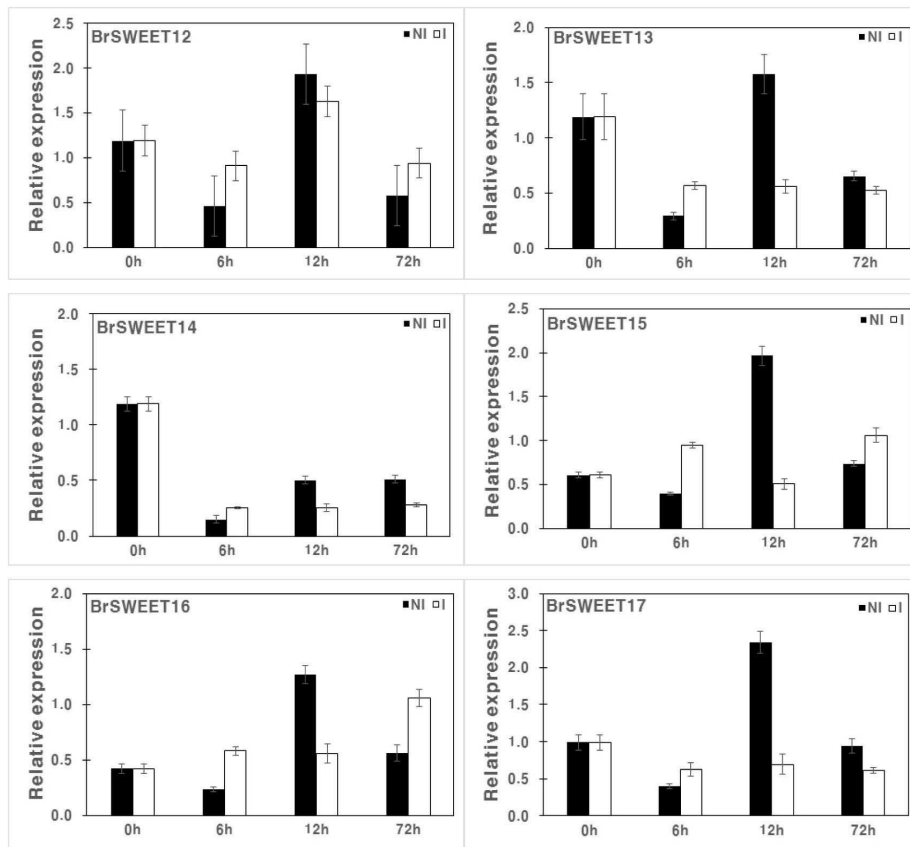
도면3b



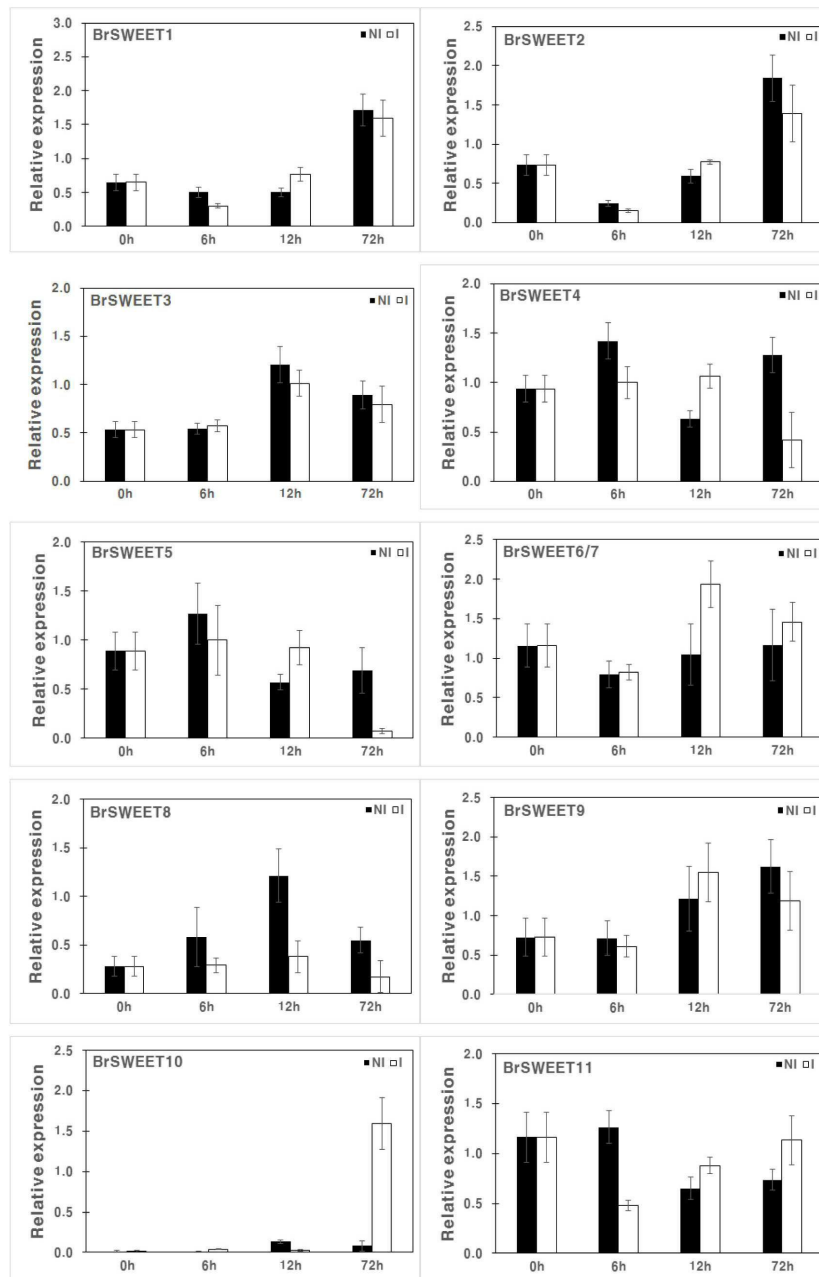
도면4a



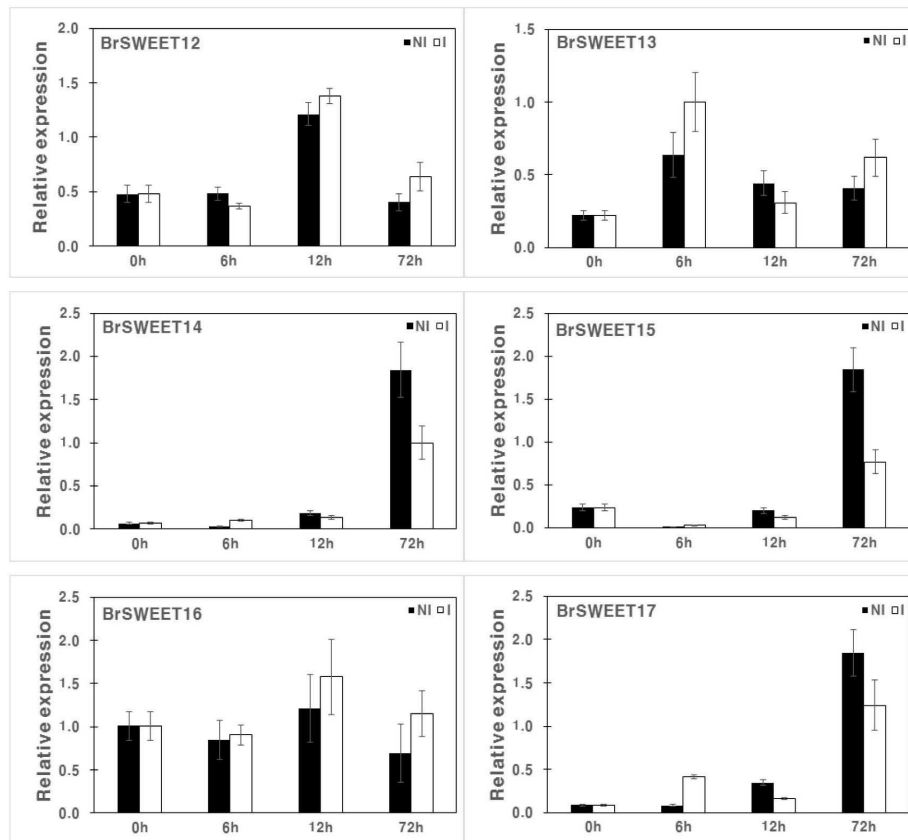
도면4b



도면5a



도면5b



## 도면6

애기장대 돌연변이체 및 배추 품종의 뿌리혹병 발생 및 저항성 검증 결과

<1차>

| 계통    | 발병도 |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 평균         | 반응 |
|-------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|------------|----|
| wt    | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |   | <b>4.0</b> | S  |
| #5    | 0   | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | <b>0.0</b> | R  |
| #3    | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |   |   |   | <b>4.0</b> | S  |
| #2    | 4   | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |   | <b>1.8</b> | MR |
| #15   | 0   | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |   |   | <b>0.5</b> | R  |
| 노랑김장  | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 3 | 4 | 4 | 4 | <b>3.7</b> | S  |
| 챔피언   | 4   | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | <b>2.1</b> | S  |
| CR117 | 2   | 2 | 0 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | <b>3.2</b> | S  |
| 천하장군  | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | <b>2.7</b> | S  |

<2차>

| 계통    | 발병도 |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 평균         | 반응 |
|-------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|------------|----|
| wt    | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |   | <b>4.0</b> | S  |
| #5    | 0   | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | <b>0.0</b> | R  |
| #3    | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |   |   |   | <b>4.0</b> | S  |
| #2    | 0   | 0 | 4 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 4 |   | <b>1.3</b> | MR |
| #15   | 0   | 4 | 0 | 0 |   |   |   |   |   |   | <b>1.0</b> | R  |
| 노랑김장  | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | <b>4.0</b> | S  |
| 챔피언   | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | <b>4.0</b> | S  |
| CR117 | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | <b>4.0</b> | S  |
| 천하장군  | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | <b>4.0</b> | S  |

<3차>

| 계통   | 발병도 |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 평균  | 반응 |
|------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|----|
| wt   | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4.0 | S  |
| #5   | 0   | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |   | 0.0 | R  |
| #3   | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4.0 | S  |
| #2   | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.0 | MR |
| #15  | 0   | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0 | R  |
| 천하장군 | 4   | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4.0 | S  |

S: 이병성, MR: 중도저항성, R: 저항성.

## 서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.