



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월03일

(11) 등록번호 10-2790264

(24) 등록일자 2025년03월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01H 1/06 (2006.01) A01H 1/00 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01H 1/06 (2021.01)

A01H 1/1255 (2021.01)

(21) 출원번호 10-2021-0174858

(22) 출원일자 2021년12월08일

심사청구일자 2021년12월08일

(65) 공개번호 10-2022-0081310

(43) 공개일자 2022년06월15일

(30) 우선권주장

1020200170325 2020년12월08일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌

B. Jagadhesan, Genome wide analysis of NLP transcription factors reveals their role in nitrogen stress tolerance of rice, Scientific Reports, 10, Article number: 9368, 2020년 6월 발간*

Camille Chardin, The plant RWP-RK transcription factors: key regulators of nitrogen responses and of gametophyte development, Journal of Experimental Botany, Vol. 65, No. 19, pp. 5577-5587, 2014년 발간*

Yiming Wang, Comparative Secretome Investigation of Magnaporthe oryzae Proteins Responsive to Nitrogen Starvation, J. Proteome Res. 10, pp.3136-3148, 2011년 발간*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

(72) 발명자

좌남수

서울특별시 광진구 뚝섬로36길 75, 101동 1002호 (자양동, 강변아이파크)

첸야페이

중국 후베이성 우한 430070, 화중농업대학교(식물 과학기술대학 핵심 농업미생물 및 식물병리학 연구실)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인리체

전체 청구항 수 : 총 4 항

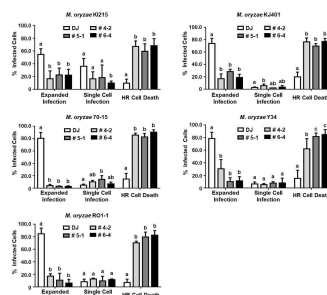
심사관 : 유진오

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

(57) 요약

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

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

C07K 14/415 (2013.01)

C12N 15/8225 (2013.01)

C12N 15/8282 (2013.01)

(72) 발명자

왕주안

서울특별시 광진구 능동로 209, 생명과학대학 바이
오 융합공학전공 식물면역학 연구실(군자동)

진중현

경기도 용인시 수지구 현암로125번길 11, 718동
803호(죽전동, 새터마을죽전힐스테이트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395067438

과제번호 PJ015966012021

부처명 농촌진흥청

과제관리(전문)기관명 농촌진흥청

연구사업명 바이오그린연계농생명혁신기술개발(R&D)

연구과제명 레이스 비특이적 병저항성 육종소재의 유용성 검증 및 활용기술 연구(1주관)

기 여 율 1/1

과제수행기관명 세종대학교

연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

벼과 식물체의 NLP(Nodule inception protein-like protein) 유전자 발현 결손 또는 저해제를 포함하고 상기 NLP 유전자는 OsNLP2(Oryza sativa nodule inception protein-like protein 2) 유전자인 도열병 저항성 증진 또는 개선용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 발현 결손 또는 저해제는 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, 도열병 저항성 증진 또는 개선용 조성물.

청구항 4

벼과 식물체에서 NLP(Nodule inception protein-like protein) 유전자 발현을 결손 또는 저해하는 단계를 포함하고 상기 NLP 유전자는 OsNLP2(Oryza sativa nodule inception potein-like protein 2) 유전자인 도열병 저항성 증진 또는 개선 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

청구항 4에 있어서,

상기 발현 결손 또는 저해는 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, 도열병 저항성 증진 또는 개선 방법.

발명의 설명

기술 분야

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

배경 기술

[0003] 도열병균(*Magnaporthe oryzae*)에 의해 발생하는 도열병은 매년 전 세계적으로 벼 생산량의 10-30% 손실을 야기

시키는 가장 파괴적인 벼 질환이다. 도열병균은 발아관의 정단에서 부착기(appressoria) 분화와 코니디아(conidia) 발아에 의해 벼 잎에 감염을 시작한 후, 좁은 침입관(penetrating peg)은 활물기생(biotrophic) 단계 동안에 세포질 막에 쌓인 침입 군사로 분화한다. 반활물기생 병원균인 도열병균은 식물 세포를 초기에 죽이지 않고, 감염 후기에 감염된 군사의 지속적인 성장으로 식물을 죽이며 병변(blast lesion)은 일반적으로 감염 7일 이내에 가시적으로 볼 수 있다. 도열병은 벼 이외에도 보리, 옥수수, 바랭이, 강아지풀 등의 약 140종의 벼과 작물들에서 발생한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2019-0047998호

발명의 내용

해결하려는 과제

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

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

과제의 해결 수단

[0009] 1. 벼과 식물체의 NLP(Nodule inception protein-like protein) 유전자 발현 결손 또는 저해제를 포함하는 도열병 저항성 증진 또는 개선용 조성물.

[0010] 2. 위 1에 있어서, 상기 NLP 유전자는 OsNLP2 (Oryza sativa nodule inception protein-like protein 2) 유전자인, 도열병 저항성 증진 또는 개선용 조성물.

[0011] 3. 위 1에 있어서, 상기 발현 결손 또는 저해제는 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 sequences)9 nuclease)인, 도열병 저항성 증진 또는 개선용 조성물.

[0012] 4. 벼과 식물체에서 NLP(Nodule inception protein-like protein) 유전자 발현을 결손 또는 저해하는 단계를 포함하는 도열병 저항성 증진 또는 개선 방법.

[0013] 5. 위 4에 있어서, 상기 NLP 유전자는 OsNLP2 (Oryza sativa nodule inception protein-like protein 2) 유전자인, 도열병 저항성 증진 또는 개선 방법.

[0014] 6. 위 4에 있어서, 상기 발현 결손 또는 저해제는 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 sequences)9 nuclease)인, 도열병 저항성 증진 또는 개선 방법.

발명의 효과

[0016] 본 발명은 벼과 식물체의 감수성 유전자인 NLP 유전자의 발현을 결손 또는 저해시켜 도열병 저항성을 증진 또는 개선시키는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 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 *OsNLP2*기능 도메인들 중 하나가 잘린 것의 세포 내 위치를 나타낸 것이다.

도 3은 *M.oryzae* P06-6에 감염된 동진 벼 및 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이 라인의 표현형을 비교한 것이다.

도 4는 *M.oryzae* P06-6에 감염 동안 동진 벼 및 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이의 엽초 세포에서 ROS 및 철 이온(Fe^{3+}) 축적과 지질 과산화 정도를 비교한 것이다.

도 5는 *M.oryzae* P06-6에 감염된 $\Delta Osnlp2$ 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 $\Delta Osnlp2$ 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 $\Delta Osnlp2$ 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 $\Delta Osnlp2$ 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 $\Delta Osnlp2$ 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 R01-1에 대한 동진 벼 및 $\Delta Osnlp2$ 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 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이의 개략도이고, 도 13B는 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이의 유전자형 분석 결과이며, 도 13C는 동진 벼 및 $\Delta Osnlp2$ 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 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이 세포에서 ROS 축적을 나타낸 것이다.

도 16은 *M.oryzae* P06-6 및 007에 감염된 동진 벼 및 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이 식물 엽초에서 시간 경과에 따른 방어 관련 유전자 발현을 실시간 qRT-PCR 분석한 것을 나타낸다.

도 17은 $\Delta Osnlp2$ 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), $\Delta Osnlp2$ 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* 70-15, R01-1 및 Y34 균주에 대한 야생형 벼(DJ), $\Delta Osnlp2$ 벼(#6-4) 및 *Osnlp2* 유전자가 복원된 식물(Com 3, 11, 12)의 감염 반응을 나타낸 것이다($n=3$, hpi(hours post inoculation)=48).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0021] 본 발명은 벼과 식물체의 NLP(Nodule inception protein-like protein) 유전자 발현 결손 또는 저해제를 포함하는 도열병 저항성 증진 또는 개선용 조성물에 관한 것이다.
- [0022] 벼과 식물은 벼, 보리, 옥수수, 조, 귀리 등 주요 식량 자원이 포함된 동시에 가장 많은 잡초가 포함된 분류군으로, 본 발명의 조성물의 대상이 되는 식물체는 도열병의 대상이 될 수 있는 벼과 식물이라면 제한 없이 적용될 수 있으며, 예를 들면 벼일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 조성물은 NLP 유전자를 결손 또는 저해시켜 병원균의 잎으로의 침입 자체를 억제하여, 도열병 균주의 종류에 무관하게(race-nonspecific) 병원균의 침입 자체를 억제하므로 다양한 균주(broad-spectrum)에 대해 저

항성을 나타낼 수 있다.

- [0024] NLP 유전자는 벼과 식물에 존재하는 것으로서, 본 발명에서 결손 또는 저해 대상인 NLP 유전자는 그 대상인 벼과 식물체에 존재하는 유전자일 수 있다. 예를 들면 대상 식물체가 벼(*Oryza sativa*)인 경우 NLP2 (nodule inception protein-like protein 2) 유전자일 수 있다. 이는 예를 들면 서열번호 26의 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 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.
- [0026] NLP 유전자의 발현 결손 또는 저해제는 NLP 유전자의 발현을 결손 또는 저해할 수 있는 모든 물질로서 물질의 타입이나 종류에 국한되지 않으며, 예를 들면 T-DNA(transfer-DNA), siRNA(small interfering RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 CRISPR/Cas9 뉴클레아제(nuclease) 등일 수 있다.
- [0027] 상기 예시한 물질들은 대상 식물의 NLP 유전자 서열에 맞추어 설계되어, 그 유전자의 발현을 저해 또는 결손시킬 수 있는 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명은 벼과 식물체에서 NLP(Nodule inception protein-like protein) 유전자 발현을 결손 또는 저해하는 단계를 포함하는 도열병 저항성 증진 또는 개선 방법에 관한 것이다.
- [0030] 본 발명의 방법의 대상이 되는 식물체는 도열병의 대상이 될 수 있는 벼과 식물이라면 제한 없이 적용될 수 있으며, 예를 들면 벼일 수 있다.
- [0031] NLP 유전자는 벼과 식물에 존재하는 것으로서, 본 발명에서 결손 또는 저해 대상인 NLP 유전자는 그 대상인 벼과 식물체에 존재하는 유전자일 수 있다. 예를 들면 대상 식물체가 벼(*Oryza sativa*)인 경우 NLP2 (nodule inception protein-like protein 2) 유전자일 수 있다. 이는 예를 들면 서열번호 26의 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] NLP 유전자의 발현 결손 또는 저해는 당 분야에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있으며, 예를 들면 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)를 식물체에 도입하여 수행될 수 있다.
- [0033] 상기 예시한 물질들의 경우 대상 식물의 NLP 유전자 서열에 맞추어 설계되어, 그 유전자의 발현을 저해 또는 결손시킬 수 있는 것일 수 있다.
- [0035] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.
- [0037] **실시예**
- [0038] **실험재료 및 방법**
- [0039] **1. 식물 재료 및 성장 조건**
- [0040] 벼(*Oryza sativa* L.) 재배종인 Dongjin(DJ)의 종자는 전주 국립 식량 과학원(National Institute of Crop Science, Jeonju, Korea)에서 제공했다. $\Delta Osnlp2$ 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, $80 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) 하에서 발아시켰다. 발아된 벼 종자는 Baroker soil (Seoul Bio, Seoul, Korea)이 있는 화분(직경 12 cm, 높이 11cm)에 심었다. 벼는 28℃, 습도 60%, 백색 형광등($150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$), 16 시간 광 조건/ 8시간 암 조건(16-h day/8-h night)의 광주기 조건에서 생장 챔버에서 생육되었다.
- [0041] *Nicotiana benthamiana* 종자는 25℃의 광 조건 하에서 7일 동안 물에서 발아시켰다. 발아된 묘목은 Baroker soil (Seoul Bio, Seoul, Korea)이 있는 화분(직경 8cm, 높이 6cm)에 심었다. *N. benthamiana* 식물은 25℃, 백색 형광등($150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$), 16 시간 광 조건/ 8시간 암 조건(16-h day/8-h night)의 광주기 조건에서 생장 챔버에서 생육되었다.

[0042] **2. $\Delta Osnlp2$ 돌연변이 유전자형 분석(genotyping)**

[0043] T-DNA 삽입 $\Delta Osnlp2$ 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'-GAGCCAAGGAATCTCCTCTCTTC-3'(서열번호 1), *OsNLP2* Reverse(R), 5'-CTTGAGGTCCATTCTGGCACCCCA-3'(서열번호 2), T-DNA2715 RB, 5'-GTTACGTCCTGTAGAAACCCCA-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 역전사 PCR(RT-PCR) 분석에 사용하여 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이 식물에서 T-DNA 삽입을 확인했다.

[0044] cDNA를 합성하기 위해 Trizol 시약(Invitrogen)을 사용하여 동형 접합 식물의 총 RNA를 추출했다. *OsNLP2* RT 프라이머(Forward: 5'-GCATCAAGCCACCTACCTT-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 $\Delta Osnlp2$ 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 \pm SD로 표시된다.

[0045] **3. 곰팡이 배양 및 성장 조건**

[0046] *M. oryzae* (*Magnaporthe oryzae*) 균주 P06-6, KI215, KJ401, 70-15, Y34, R01-1 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 R01-1은 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 ($80 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) 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.

[0047] **4. 곰팡이 접종 및 감염 평가**

[0048] 벼 잎의 질병 증상을 모니터링하기 위해 3주된 묘목의 잎에 *M. oryzae* 분생 포자 현탁액(1.0×10^5 conidia \cdot 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.

[0049] 본 실시예의 벼 엽초(leaf sheath) 시험을 위해, 6주령 묘목 단계에서 자른 벼 엽초(길이 5 cm)에 *M. oryzae* 분생 포자 현탁액(5.0×10^5 conidia \cdot ml $^{-1}$)을 접종하였다. 접종된 벼 엽초를 습한 챔버에서 2일 동안 암 조건에서 배양하였다. 표피층을 쌀 더개에서 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.

[0050] **5. 클로닝 및 플라스미드 구성**

[0051] *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'-AGAAAGCTGGGTTTTATGAGCTATGTGC-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.

[0052] *N. benthamiana* 앞에서 *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'-CGACGACAAGACCCTATGCTGACAGTTAAGCA-3'(서열번호 12); and full *OsNLP2* sequence Reverse, 5'-GAGGAGAAGAGCCCTTTATGAGCTATGTGCCG-3'(서열번호 13))가 있는 프라이머를 사용하여 벼 cDNA 라이브러리에서 증폭되었다. 증폭된 PCR 산물은 T4 DNA 중합 효소(NEB)를 사용하여 *SnaBI* 제한 효소에 의해 분해된 벡터 pCAM2300-LIC에 서브클로닝되었다.

[0053] **6. 아그로박테리움(agrobacterium) 형질전환, 세포 내 위치 및 일시적 발현 에세이(transient expression assays)**

[0054] *OsNLP2*의 세포 내 위치를 결정하기 위해, *OsNLP2*의 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 $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ 스펙티노마이신(spectinomycin)을 함유하는 Luria Bertani (LB) 액체 배지에서 28°C에서 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 ($1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)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.

[0055] *N. benthamiana* 앞에서 *OsNLP2*를 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 $\text{OD}_{600}=1.0$ 로 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.

[0056] **7. ΔOsnlp2 돌연변이 식물에서 *Osnlp2*의 복원**

[0057] ΔOsnlp2 돌연변이 식물에서 *Osnlp2*의 발현을 복원하기 위해, 이원 벡터 pB2GW7(선택 마커로서의 Bar 유전자) 내부의 *Osnlp2*의 코딩 서열을 *Agrobacterium* C58C1로 형질전환시켰다. ΔOsnlp2 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). 포스포노트리신(PPT, phosphinothricin, 3mg/L 및 6mg/L) 농도가 증가하는 배지에서 형질전환된 캘리를 선택하였다. 촬영 및 발근 후 캘러스는 25°C에서 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.

[0058] **8. RT-PCR 및 실시간 qRT-PCR 분석**

[0059] *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 세트에 분석되었다. 테스트 된 벼 유전자의 상대적 발현 수준은 내부 대조군인 벼 *OsUbiquitin*의 발현 수준을 정규화하여 결정하였다. 데이터는 3개의 독립적인 실험에서 얻은 상대적인 유전자 발현 수준의 평균 \pm SD에 해당한다. 이 실험에 사용된 유전자 특이적 프라이머 목록은 하기 표 1과 같다.

표 1

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	GTTACGTCCTGTAGAAACCCCA			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	CTCTCTGTTTCTCTCAAAGTGA			19
OsWRKY104	F	TGCCATTACTTCCGAGCGAC	Os11g02520		20
	R	ATTGTGAGGTGCTTGAGCCA			21
OsRbohB	F	GAATTCATGGCTGACCTGGAAGCAGGCA	Os01g25820		22
	R	CTCGAGTTAGAAGTTCTCCTTGTGGAAA			23
Ubiquitin	F	GTGGTGGCCAGTAAGTCTCTC	Os06g46770		24
	R	GGACACAATGATTAGGGATCA			25

9. ROS 감지 및 정량화

*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_2 DCFDA) 및 3,3' (DAB) 염색 방법을 사용하여 시각화되었다. 분리된 벼 엽초의 표피층을 4°C에서 5분 동안 물에 담가 상처로 유발된 ROS(wound-induced ROS)를 씻어낸 후, 2 μ M, CM- H_2 DCFDA (Molecular Probes Life Technologies, Eugene, OH)에서 30분 동안 상온의 암 조건에서 염색하였다. 1 \times 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 ml^{-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.

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°C에 담가 상처로 유발된 ROS를 감소시켰다. 표피층 조각을 30 μ l 루미놀(Bio-Rad, Hercules, CA), 1 μ l 홀스래디쉬(horseradish) 과산화 효소(1 mg \cdot ml^{-1} , Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 및 69 μ l 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.

10. 철 이온 검출을 위한 프러시안 블루(Prussian blue) 염색

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.

[0066] 11. 지질 과산화 에세이(lipid peroxidation assay)

[0067] *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.

[0068] 12. 데페록사민(deferoxamine), 페로스타틴(ferrostatin), 사이토칼라신 A(cytochalasin A) 및 다이페닐렌아이오도늄(diphenyleneiodonium) 처리

[0069] 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 $\Delta Osnlp2$ 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 μ M 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 μ g · ml⁻¹) 또는 DPI (5 μ M) 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.

[0071] 결과

[0072] 1. OsNLP2, $\Delta Osnlp2$ 돌연변이체 및 OsNLP2 복원 식물의 동정(identification)

[0073] 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 NLP 단백질의 수탁 번호는 하기 표 2에 나열되어 있다.

표 2

[0074]

<i>Arabidopsis thaliana</i>	
AtNLP1	AT2G17150
AtNLP2	AT4G35270
AtNLP3	AT4G38340
AtNLP4	AT1G20640
AtNLP5	AT1G76350
AtNLP6	AT1G64530
AtNLP7	AT4G24020
AtRKD1	AT1G18790
AtRKD2	AT1G74480
AtRKD3	AT5G66990
AtRKD4	AT5G53040
AtRKD5	AT4G35590
<i>Medicago truncatula</i>	
MtNLP1	Medtr2g099350
MtNLP2	Medtr4g068000
MtNLP3	Medtr1g100970
<i>Brachypodium distachyon</i>	
BdNLP1	Bradi1g76340
BdNLP2	Bradi4g37147
BdNLP3	Bradi 4g20717 & Bradi4g20730
BdNLP4	Bradi5g23300
BdNLP5	Bradi3g03170
BdNLP6	Bradi2g31710
BdNLP7	Bradi2g08177
<i>Oryza sativa ssp. japonica</i>	
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

[0075]

$\Delta Osnlp2$ 돌연변이 라인 #4-2, #5-1 및 #6-4는 T-DNA 삽입 돌연변이 유발에 의해 야생형 벼 재배종 DJ(dongjin)로부터 생성되었다. $\Delta Osnlp2$ 돌연변이체의 모든 정보는 Salk Institute에서 관리하는 Rice Functional Genomic Express Database (RiceGE)에서 얻었다. T-DNA pGA2715는 *OsNLP2* genomic DNA의 5'-비번 역 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 $\Delta Osnlp2$ 식물을 선택하도록 설계되었다. 3개의 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이 라인 #4-2, #5-1 및 #6-4는 PCR 산물의 전기 영동에 의해 동형 접합 돌연변이로 확인되었다(도 13B). 야생형 동진 벼 및 $\Delta Osnlp2$ 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 3

개의 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이 라인에서는 유의하게 억제되었다(도 13C).

[0076] $\Delta Osnlp2$ 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 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이 라인 #6-4에서 유의하게 낮았으나, 복원 식물(도 18B의 Complementation No. 3, No. 11, No. 12)에서는 다시 발현 수준이 높아졌다(도 18B).

[0077] 2. 벼와 *M.oryzae* 상호 작용에서의 $OsnLP2$ 발현 패턴

[0078] 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* P06-6 (독성) and 007 (비독성)을 접종한 후 초기 시점에 샘플링되었다. 실시간 qRT-PCR 데이터는 독성 *M.oryzae* P06-6 감염이 초기 감염 단계(3-48hpi)에서 DJ 엽초에서 $OsnLP2$ 발현을 뚜렷하게 유도했음을 보여준다. 대조적으로, 무독성 *M.oryzae* 007에 의한 감염은 벼와 *M.oryzae*의 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.

[0079] 3. $OsnLP2$ 의 세포 내 위치 및 일시적 발현

[0080] 전사 인자의 식물 특이적 RWP-RK 패밀리 단백질은 적어도 부분적으로 핵에 위치되어 있다. $OsnLP2$ 에는 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(00:GFP)는 *N.benthamiana* 세포의 원형질막 및 세포질에서 편재적으로 검출되었다. $OsnLP2$:GFP는 *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 $OsnLP2$ 가 특정 DNA 서열에 결합하는 전사 인자로 작용할 수 있는 핵 내에 위치함을 나타낸다. $OsnLP2$ 가 핵에 위치하기 위해 전체 $OsnLP2$ 코딩 서열이 필요할 수 있지만 특정 RWP-RK 도메인 또는 PB1 도메인은 필요하지 않다. $OsnLP2$ 가 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.

[0081] 4. $OsnLP2$ 돌연변이의 *M.oryzae* 감염에 대한 과민 반응(HR, hypersensitive response) 내성 반응 유발 효과

[0082] 식물 질병 및 면역에서 $OsnLP2$ 의 역할을 조사하기 위해, 3주령 묘목에서 야생형 동진 벼 및 $\Delta Osnlp2$ 녹아웃(KO, knockout) 돌연변이 라인 #4-2, #5-1 및 #6-4의 잎을 *M.oryzae* P06-6 (독성) and 007 (비독성)의 분생 포자 현탁액(1.0×10^5 conidia \cdot ml⁻¹)과 함께 분무 접종(spray-inoculated)시켰다. 이 $\Delta Osnlp2$ 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* P06-6 감염은 동진 벼 잎에 크고 타원형이며 칙칙한 확장된 병변을 나타내는 전형적인 감수성 질병 반응(susceptible disease reaction)을 일으켰다. 대조적으로, $\Delta Osnlp2$ 돌연변이 잎은 *M.oryzae* P06-6 감염은 작고 괴사성(necrotic)인 질은 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, $\Delta Osnlp2$ 돌연변이체의 잎은 *M.oryzae* 007 감염 동안 변색되어 황백색 또는 옅은 노란색으로 변색되었다. 이러한 감염 표현형은 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이 #4-2, #5-1 및 #6-4가 *M.oryzae* P06-6 및 007에 대해 매우 내성이 있음을 나타낸다.

[0083] 세포 수준에서 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이 라인의 초기 감염 반응을 조사하기 위해, *M. oryzae* P06-6 및 007의 분생 포자 현탁액(5.0×10^5 conidia \cdot ml⁻¹)을 5주령된 식물 성장 단계의 동진 벼 및 $\Delta Osnlp2$ 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* P06-6는 70.4% 세포에서 확장 감염을 일으켰지만, 야생형 동진 벼의 17.6% 세포에서 HR 세포 사멸을 일으켰다(도 3B). 대조적으로, *M. oryzae* P06-6 감염은 3개의 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이 라인의 엽초에서 72% 이상의 세포에서 HR 세포 사멸 반응을 일으켰다. 그러나, $\Delta Osnlp2$ 복원 식물에서는 HR 세포 사멸 비율이 27.88%로 감소하여 야생형 벼 DJ과 유사하였다(도 18C). 무독성 *M. oryzae* 007 감염은 동진 벼 및 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이 라인 모두 86% 이상의 표피 세포에서 HR 세포 사멸 반응을 유도했다. 이러한 초기 감염 반응 데이터는 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이가 *M. oryzae* P06-6 및 007에 대해 매우 내성이 있음을 나타낸다.

[0084] **5. $\Delta Osnlp2$ 돌연변이체에서 *M. oryzae*에 대한 ROS 및 철 의존성 ferroptotic 세포 사멸 효과**

[0085] *Osnlp2* knockout 돌연변이가 벼에서 HR 세포 사멸 반응을 유발하는지 여부를 조사하기 위해, 초기 *M. oryzae* P06-6 감염 동안 동진 벼 및 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이체의 엽초 세포에서 ROS 및 철 이온(Fe^{3+}) 축적과 지질 과산화를 분석했다(도 4). ROS 축적은 CM-H₂DCFDA 및 DAB 염색에 의해 감지되고 시각화되었다. ROS 민감성인 CM-H₂DCFDA 염료는 살아있는 식물 세포에서 ROS 위치를 모니터링하는 데 사용되었다. CM-H₂DCFDA 염료는 살아있는 세포에서 ROS와 반응하여 2', 7' - dichlorofluorescein (DCF)를 생성한다. 이는 녹색 형광(GF) 필터가 있는 형광 현미경을 사용하여 검출할 수 있는 고휘광(highly fluorescent) 제품이다.

[0086] CM-H₂DCFDA(녹색 형광) 및 DAB(갈색 갈색) 염색 이미지는 ROS(H₂O₂)가 $\Delta Osnlp2$ 표피 세포에서 침습성 균사(IH) 내부 및 주변에 강하게 축적되었지만 초기 *M. oryzae* P06-6 감염 동안 야생형 동진 벼 세포에는 축적되지 않았음을 보여준다(도 4A). CM-H₂DCFDA에 특이적인 ROS-localized 형광은 20-48hpi에 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이 세포에서 IH 내부 및 주변에서 뚜렷하게 볼 수 있었다(도 4A, 도 15). DAB는 과산화 효소의 존재 하에 H₂O₂에 의해 산화되어 식물 세포에서 암갈색 침전물을 생성한다. 세포 응집체(암갈색)를 갖는 DAB로 염색된 표피 세포는 48hpi에 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이체의 엽초에서 관찰되었다. 화학 발광 분석은 ROS 축적 수준이 48hpi에 동진 벼 세포에서보다 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이 세포에서 유의하게 더 높았다는 것을 보여준다(도 4B).

[0087] 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 H₂O₂에 의해 산화되어 Fe^{3+} 및 독성 OH \cdot 을 생성하여(Fenton 반응) 지질, 단백질, DNA 및 세포 성분에 심각한 손상을 초래한다. 48hpi에 Fe^{3+} 의 축적 $\Delta Osnlp2$ 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 $\Delta Osnlp2$ 세포에 동시에 축적되었음을 나타낸다.

[0088] 다음으로, 본 발명자는 *M. oryzae* 007을 사용하여 48hpi에서 동진 벼와 $\Delta Osnlp2$ 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 말론 디알데히드(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 $\Delta Osnlp2$ 엽초에서 유의하게 높았으며, 이는 강화된 ROS 및 Fe^{3+} 수준이 $\Delta Osnlp2$ 세포에서 산화 스트레스 수준의 상승으로 이어진다는 것을 나타낸다. $\Delta Osnlp2$ 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.

[0089] **6. DFO(철 킬레이터) 및 Fer-1(페롭토시스 억제제)의 *M. oryzae*에 대한 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이체에서 ROS 및 철 의존성 페롭토시스 세포 사멸 억제 효과**

[0090] 철 킬레이터(chelator) 데페록사민(DFO, deferoxamine)(3 mM)을 *M. oryzae* P06-6으로 접종한 후 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이 라인 #4-2의 엽초에 처리했다. DFO 처리는 *M. oryzae* P06-6에 감염된 $\Delta Osnlp2$ 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 ΔOsnlp2 엽초의 감염된 벼 세포에서 뚜렷하게 억제되었다. ROS 생산의 화학 발광 분석은 DFO 처리가 *M.oryzae* P06-6에 감염된 ΔOsnlp2 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 ΔOsnlp2 엽초에서 HR 세포 사멸 반응의 유도를 강력하게 억제하여 궁극적으로 *M.oryzae*의 호환적인(compatible) IH 성장을 유도했다.

[0091] 페롭토시스(ferroptosis) 억제제인 페로스타틴-1(Fer-1, ferrostatin-1)(10 μM)을 ΔOsnlp2 돌연변이 라인 #4-2의 감염된 벼 엽초에 24hpi에서 처리하였다. Fer-1 처리는 *M.oryzae* P06-6 감염 동안 ΔOsnlp2 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 ΔOsnlp2 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 ΔOsnlp2 엽초에서 세포 응집체(암갈색) IH 주변의 HR 세포 사멸 반응을 유의하게 억제하여 벼 엽초 세포(rice sheath cell)에서 IH의 성공적인 집락화(colonization)를 유도했다(도 6A 및 도 6D). 화학 발광 분석은 또한 Fer-1 처리가 48 hpi에서 ΔOsnlp2 외피 표피 세포에서 ROS 생성을 상당히 억제했음을 보여준다(도 6B). MDA 분석을 사용하여 모의(mock) 및 Fer-1 처리된 ΔOsnlp2 엽초 세포에서 48 hpi에서 지질 과산화 수준을 추가로 정량화했다(도 6C). *M.oryzae* P06-6 감염은 HR 세포 사멸 반응을 나타내는 ΔOsnlp2 엽초 세포에서 지질 과산화를 뚜렷하게 유도했다. 그러나 10 μM Fer-1 처리는 *M.oryzae* P06-6에 감염된 ΔOsnlp2 엽초에서 지질 과산화를 억제했다.

[0092] 7. Cyt A(액틴 중합 억제제) 및 DPI(NADPH 산화 효소 억제제)의 *M.oryzae*에 대한 ΔOsnlp2 엽초에서 ROS 및 철 이온의 축적과 HR 세포 사멸 억제 효과

[0093] Cyt A(20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 또는 DPI(5 μM) 용액에 *M.oryzae* P06-6의 분생 포자 현탁액(conidial suspension)(5×10^5 conidia mL^{-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 ΔOsnlp2 엽초에서 *M.oryzae* P06-6에 의해 유도된 ROS 및 Fe^{3+} 의 축적과 HR 세포 사멸을 억제했다. 화학 발광 분석은 또한 Cyt A 처리가 48 hpi에서 ΔOsnlp2 엽초에서 ROS 생성을 유의하게 억제했음을 보여준다(도 7B). *M.oryzae* P06-6은 Cyt A(20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)로 처리된 ΔOsnlp2 엽초 세포에서 정상적인 균사 균주로 잘 자랐다(도 7C). DPI(5 μM) 처리는 *M.oryzae* P06-6에 감염된 ΔOsnlp2 엽초에서 ROS 및 Fe^{3+} 의 축적과 HR 세포 사멸을 뚜렷하게 억제하여 벼 엽초 세포 내부에 IH의 성공적인 집락화(colonization)를 유도했다(도 8). ΔOsnlp2 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 ΔOsnlp2 엽초에서 ROS 생성을 현저하게 억제했다(도 8B). 그러나, DPI 처리는 *M.oryzae* P06-6 감염을 분명하게 촉진시켰지만 ΔOsnlp2 엽초에서 HR 세포 사멸을 억제했다(도 8C).

[0094] 8. *M.oryzae* 감염 동안 ΔOsnlp2 돌연변이 세포에서 방어 관련 유전자(defense-related genes)의 시간 경과에 따른 발현

[0095] 본 발명자들은 다음으로 *M.oryzae* P06-6 접종 후 시간에 따라 동진 벼 및 ΔOsnlp2 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* P06-6 감염은 ΔOsnlp2 돌연변이 라인 #4-2 엽초에서 6-36hpi에서 *OsPBZ1* 발현을 뚜렷하게 유도했지만 야생형 동진 벼에서는 거의 나타나지 않았다. *OsPIP-3A*는 동진 벼에 비해 ΔOsnlp2 돌연변이 라인 #4-2에서 6hpi 및 24-48hpi에서 고도로 유도되었다. *OsPIP2;1*은 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 ΔOsnlp2 돌연변이 라인 #4-2의 엽초에서 명백했다. 그러나 *OsWRKY90*은 *OsWRKY104*에 비해 ΔOsnlp2 엽초에서 유도되지 않았다. 식물 호흡기 과열 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 3-18hpi

에서 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 $\Delta Osnlp2$ 엽초에서 *OsPBZ1*, *OsPIP-3A*, *OsWRKY104* 및 *OsRbohB* 발현을 유발한다는 것을 나타낸다.

[0096] 9. 다른 *M.oryzae* 균주에 대한 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이 라인의 높은 저항성(resistance) 및 *Osnlp2* 복원 식물의 감수성(susceptibility)

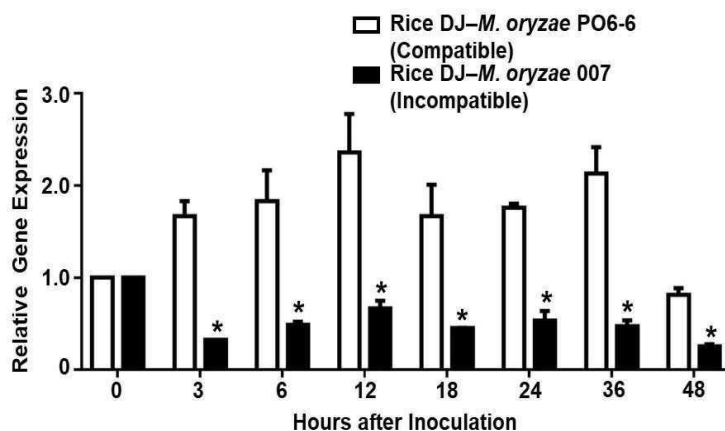
[0097] 본 발명자들은 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이 라인이 야생형 동진 벼에 대해 독성이 있는 다른 *M.oryzae* 균주 KI215, KJ401, 70-15, Y34 및 R01-1에 내성이 있는지 여부를 추가로 조사했다. $\Delta Osnlp2$ 돌연변이체의 초기 감염 반응은 다양한 *M.oryzae* 균주로 벼 엽초를 접종한 지 48시간 후에 현미경으로 세포 수준에서 조사되었다(도 10). 전반적으로 야생형 동진 벼는 테스트된 모든 *M.oryzae* 균주에 매우 감수성(susceptibility)을 나타냈다. 그러나, $\Delta Osnlp2$ 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 감염된 군사 성장이 확장된 60-80%의 세포를 나타냈다. 대조적으로, *M.oryzae* KI215는 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이체에서 엽초의 60% 이상이 표피 세포에서 HR 세포 사멸 반응을 유도했다. *M.oryzae* KJ401, 70-15, Y34 및 R01-1 감염은 48hpi에서 약 80% 세포 수준으로 표피 세포에서 HR 세포 사멸 반응을 유도했다. 종합적으로, 이러한 결과는 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이 라인이 다양한 *M.oryzae* 균주에 대한 광범위한 스펙트럼(broad spectrum)을 갖는 race 비특이적 저항성(race-nonspecific resistance)을 나타낸다는 것을 제시한다.

[0098] 추가로 본 발명자들은 *M.oryzae* 70-15, R01-1 및 Y34 균주를 야생형 동진 벼, $\Delta Osnlp2$ 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. 12는 야생형 동진 벼와 같이 *M.oryzae* 70-15, R01-1 및 Y34 균주에 의해 확장 감염을 나타냈다. 그리고 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이 라인 #6-4이 *M.oryzae* 70-15, R01-1 및 Y34 균주 감염에 대해 60% 이상의 세포에서 과민 반응(HR) 세포 사멸을 나타낸 것과 달리, 복원 식물 No. 3, No. 11, No. 12는 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 $\Delta Osnlp2$ 돌연변이 라인 #6-4과 달리 *M.oryzae* 70-15, R01-1 및 Y34에 대해 내성이 없음을 나타낸다.

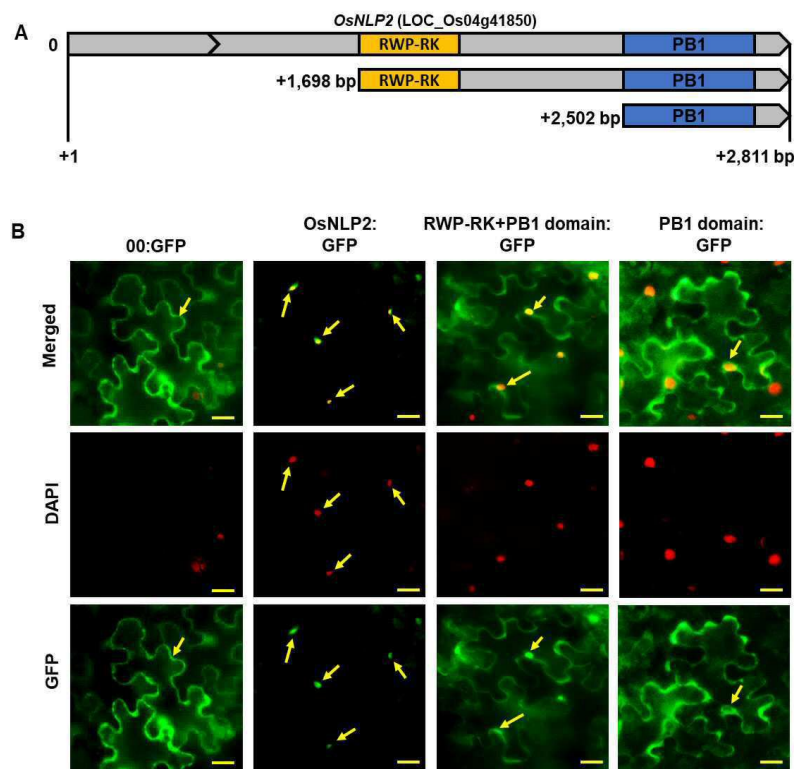
[0099] 즉, *Osnlp2* 유전자가 복원된 식물은 *Osnlp2* 유전자 결핍 돌연변이 벼가 도열병균에 대해 저항성을 보이는 것과 달리 야생형 동진 벼처럼 정상적으로 도열병균 접종에 의해 도열병이 발생하였다. 이는 *Osnlp2* 유전자가 벼의 도열병에 대해 저항성을 결정하는 음성(negative) 조절 인자임을 시사한다.

도면

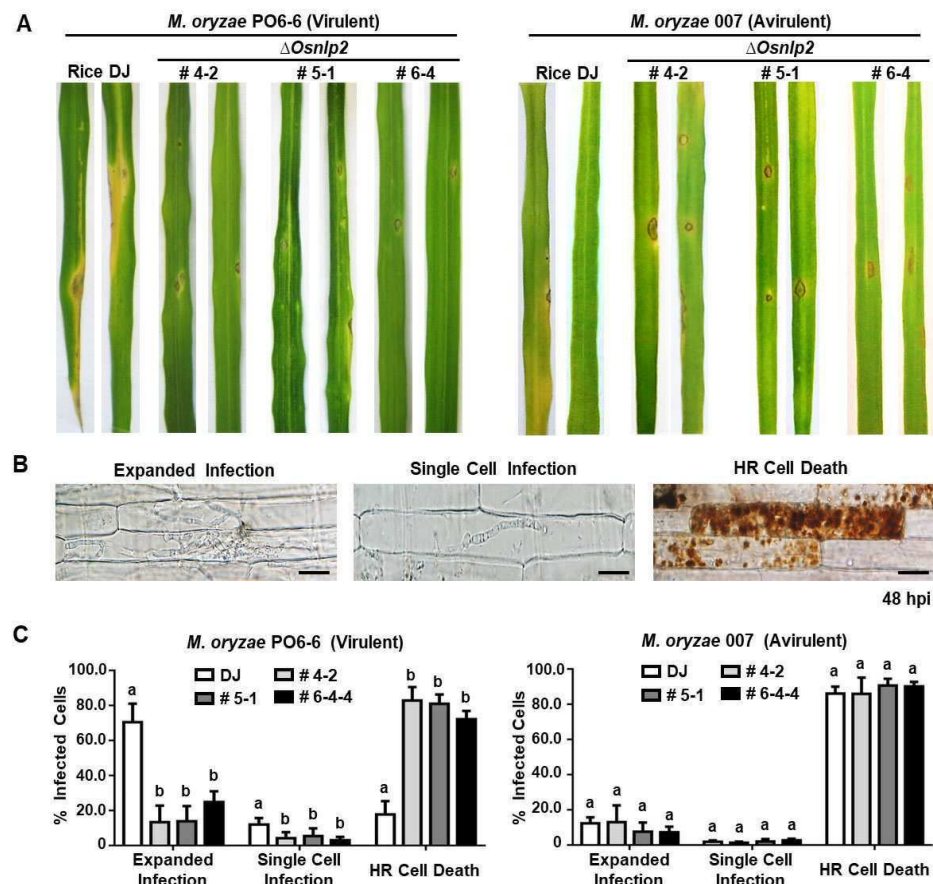
도면1



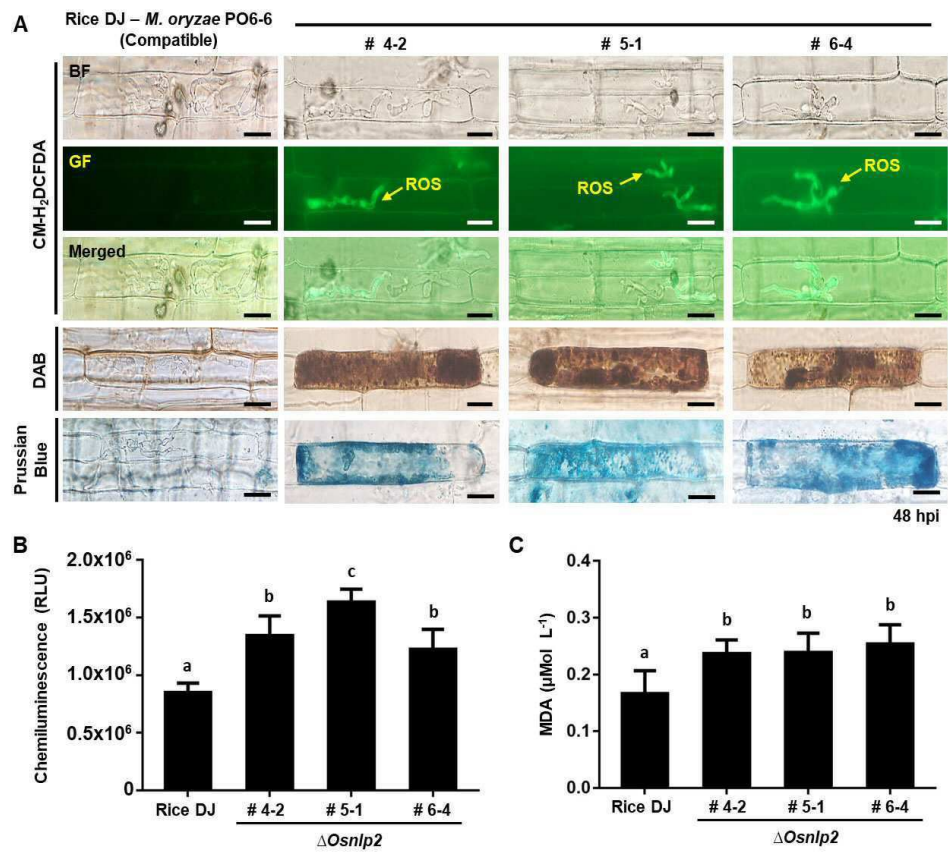
도면2



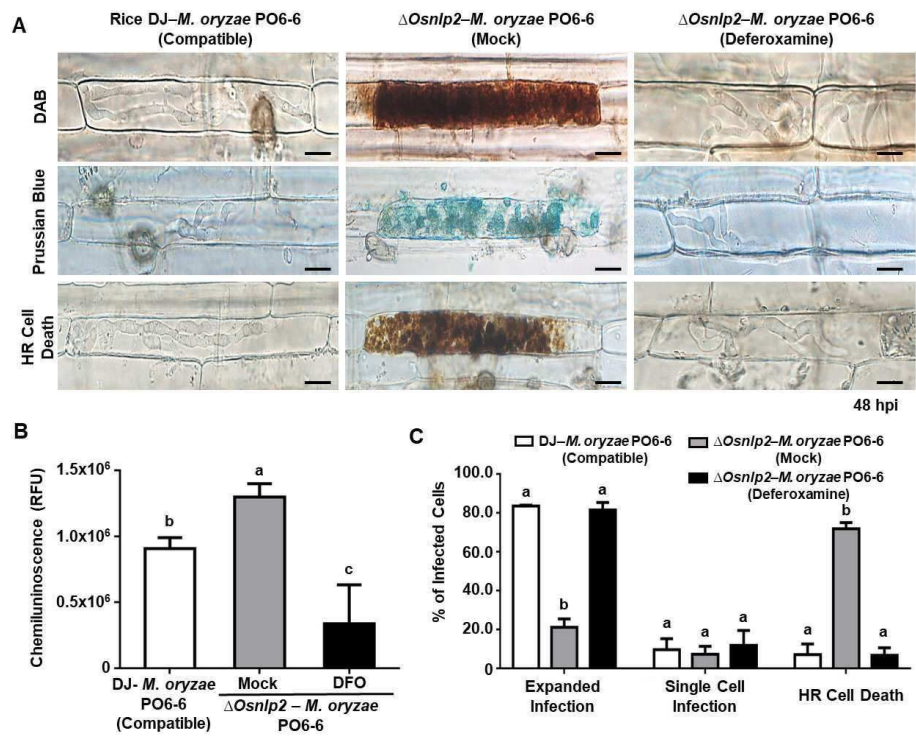
도면3



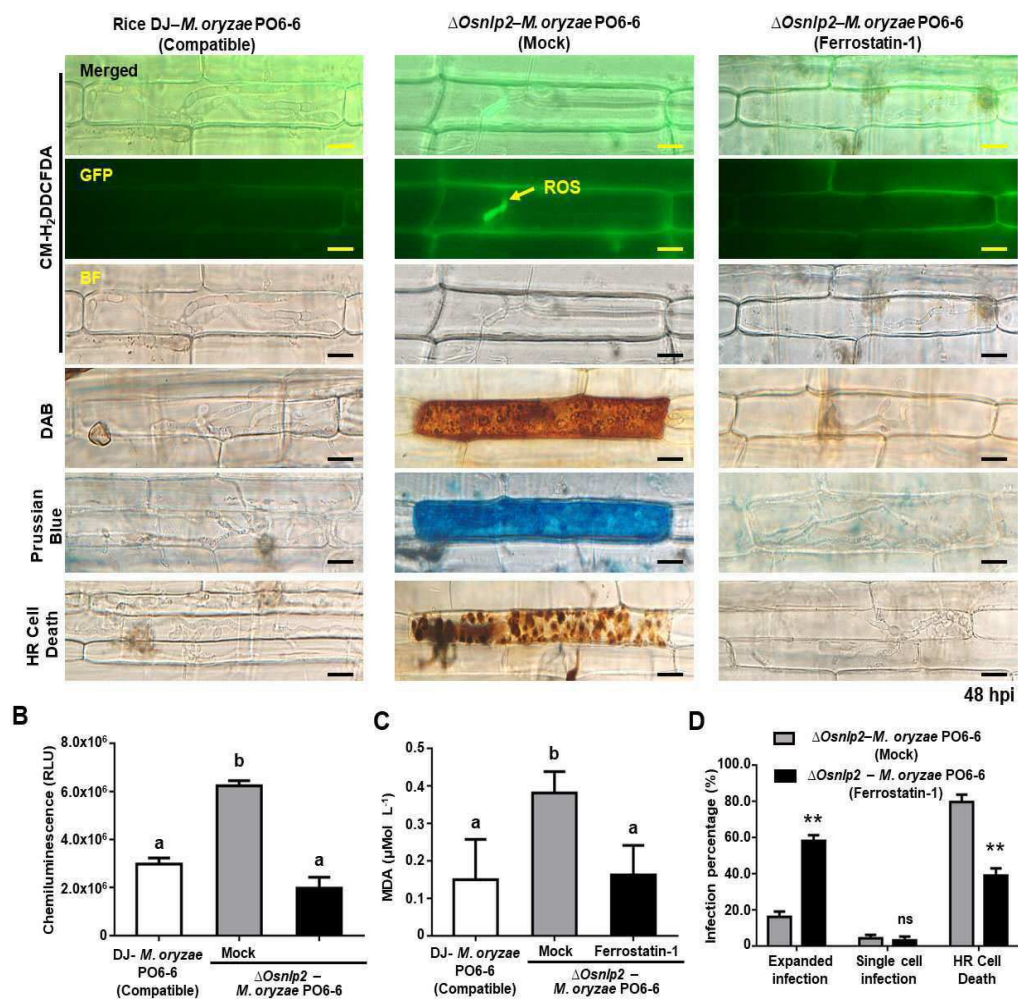
도면4



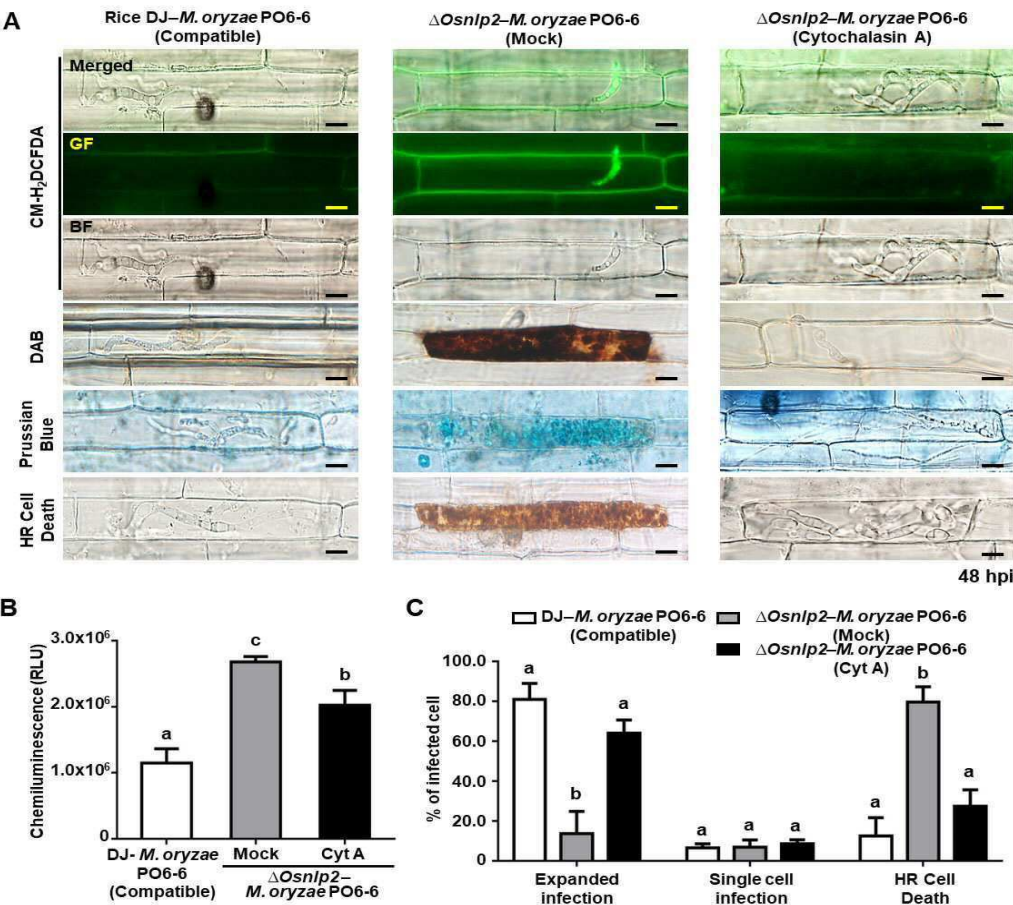
도면5



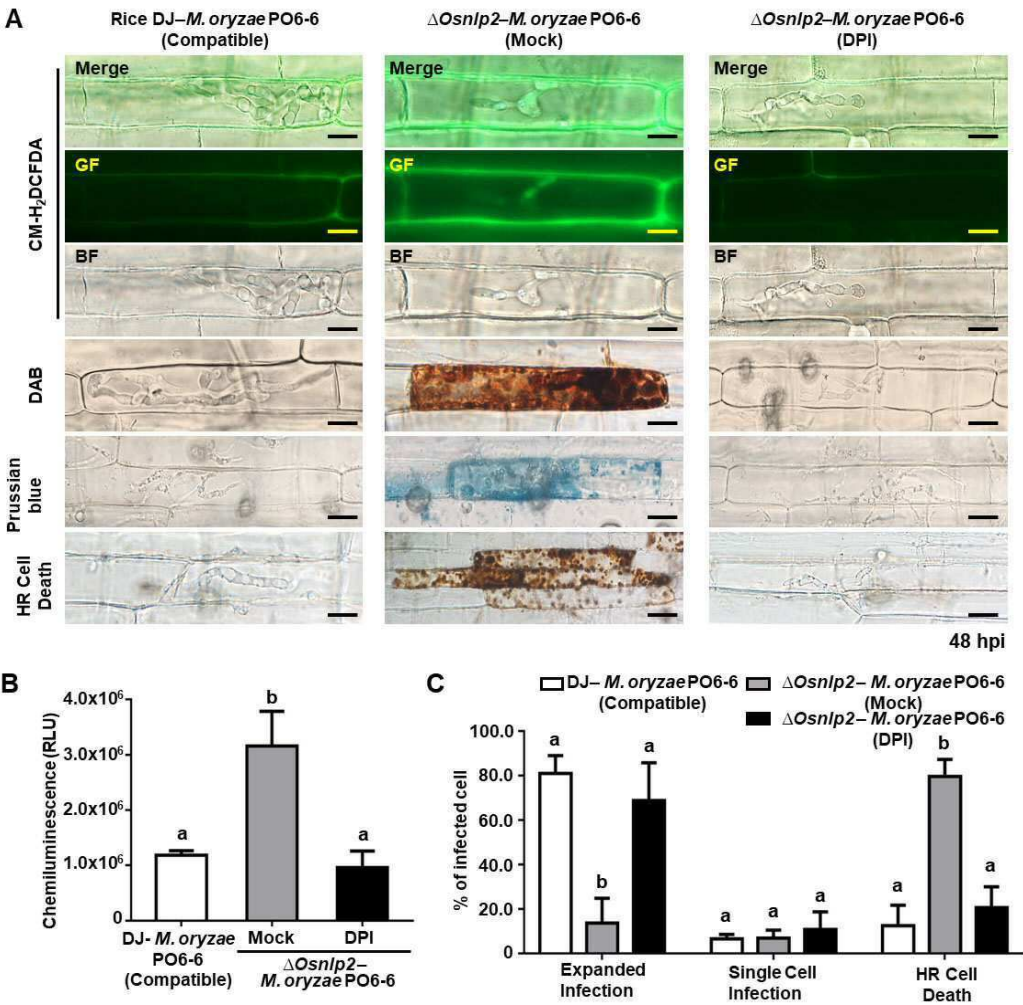
도면6



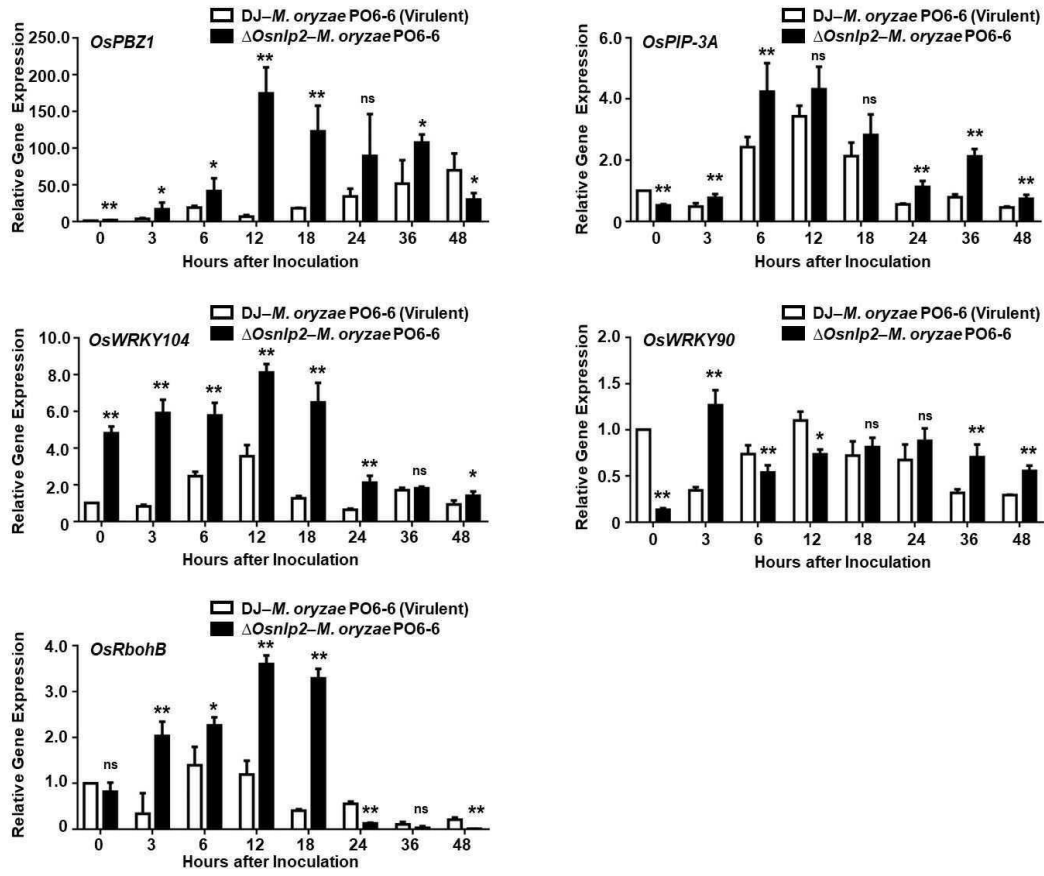
도면7



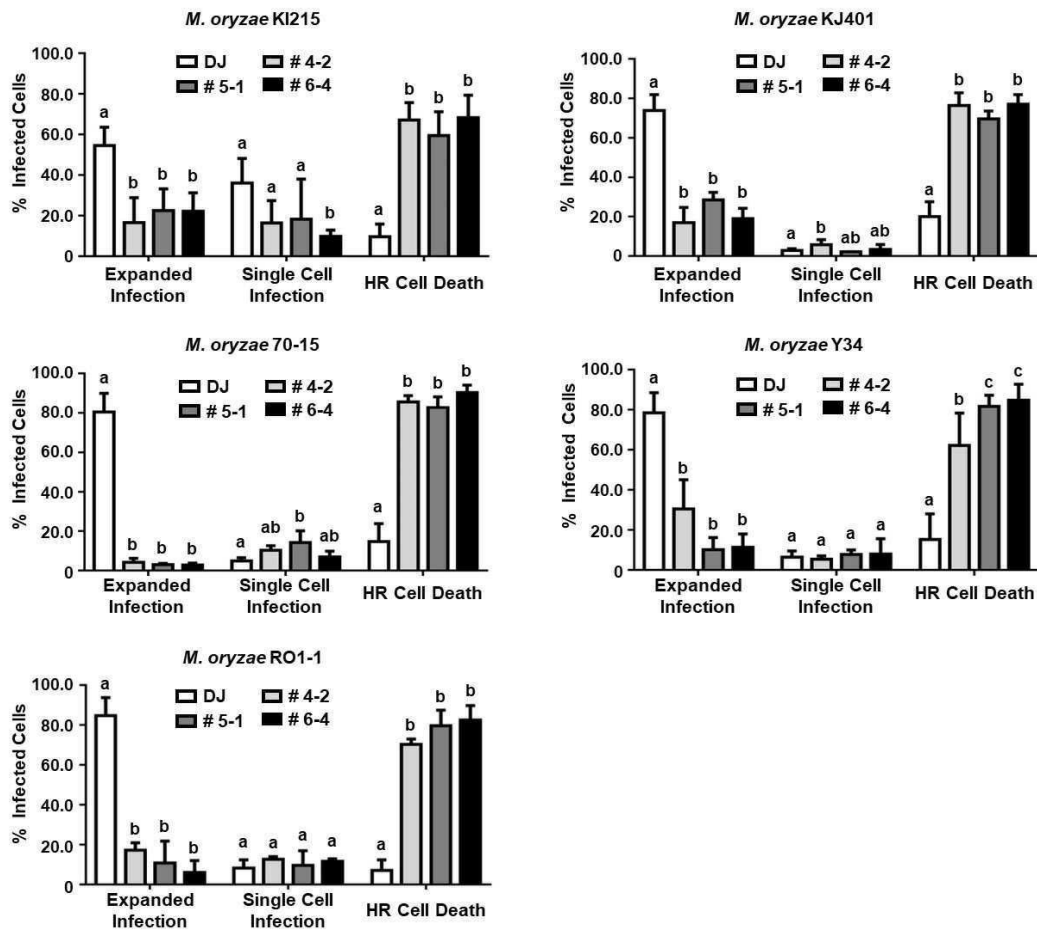
도면8



도면9



도면10



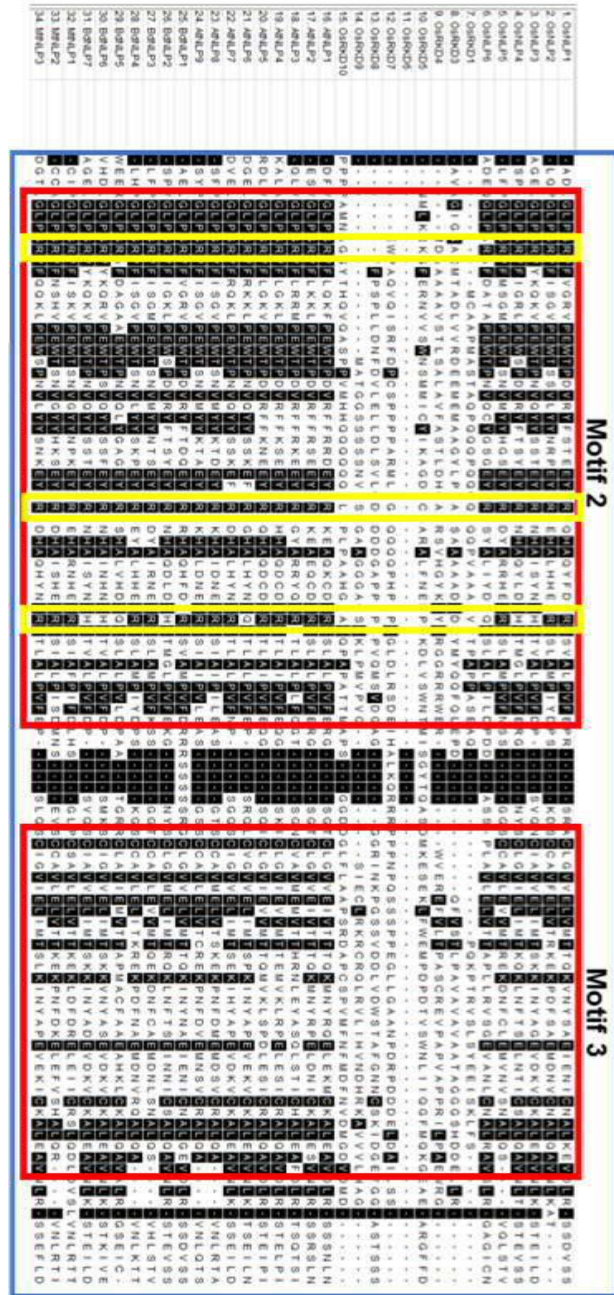
도면 11a

GAF-like domain

Motif 1

도면11b

GAF-like domain



도면 11c

RWP-RK domain

[illegible]

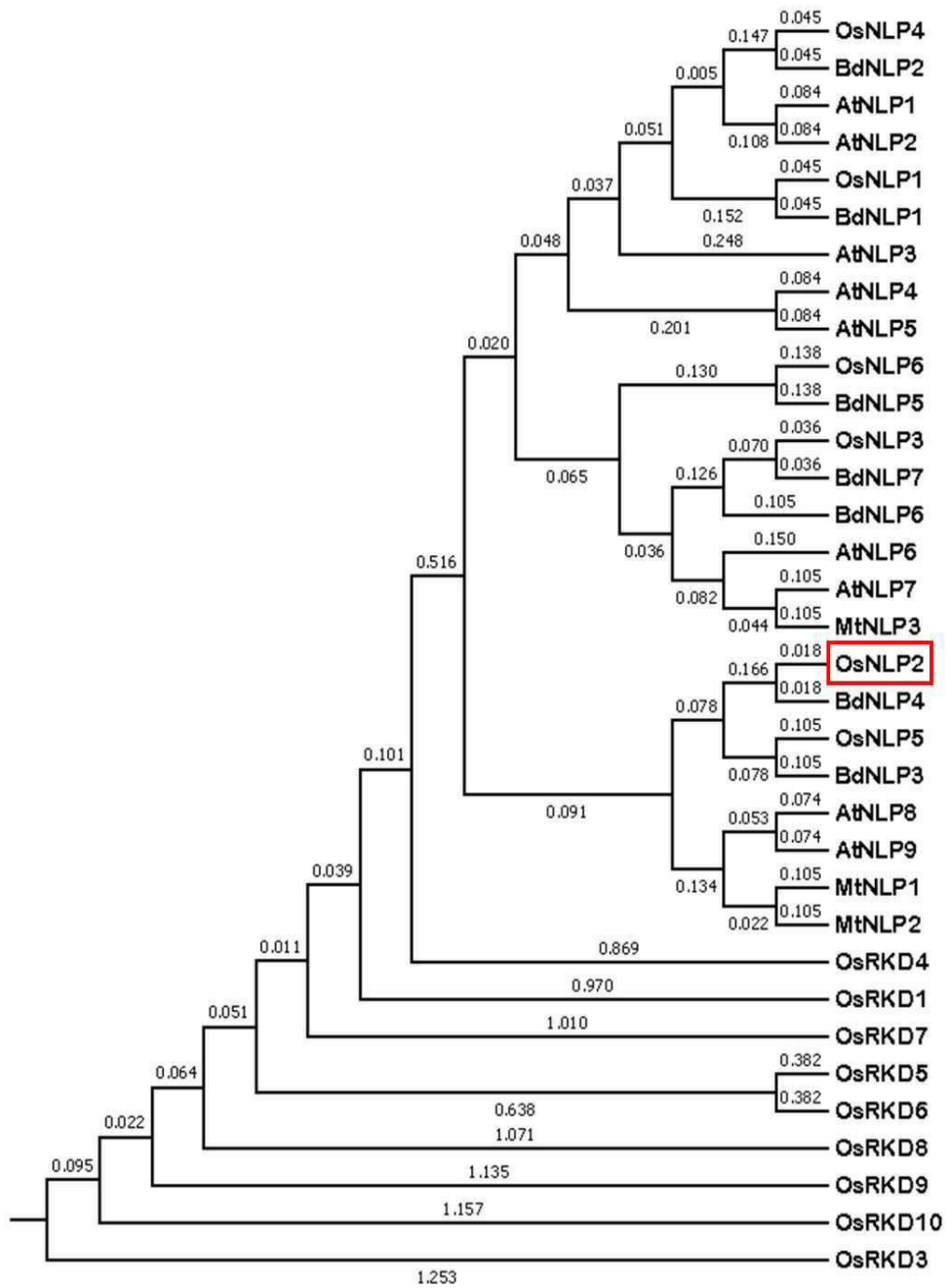
RWP-RK motif

도면11d

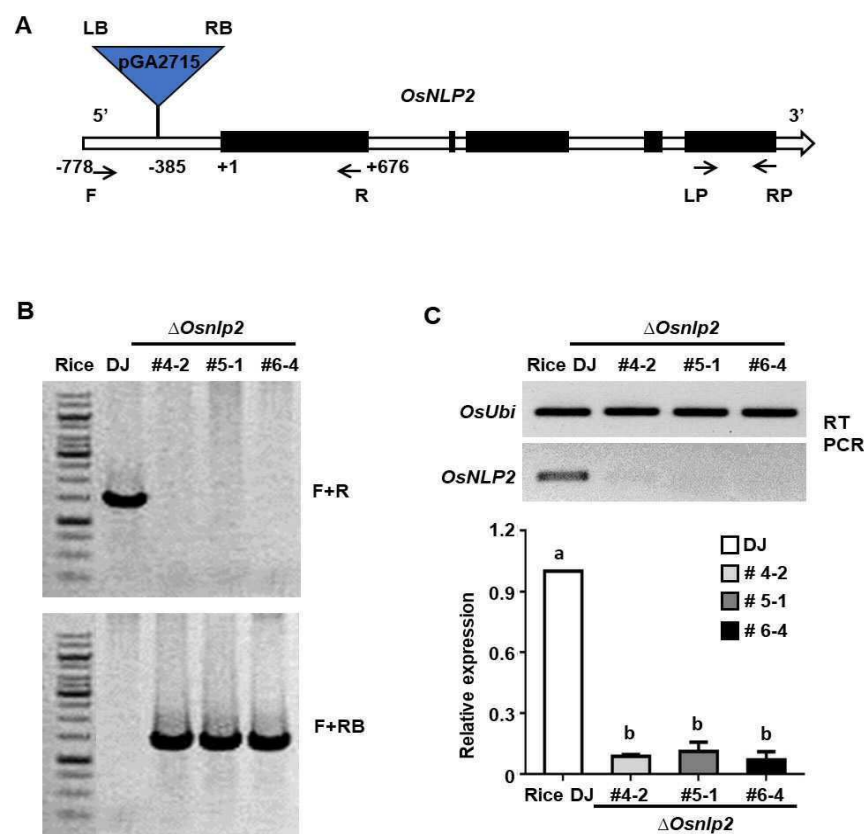
PB1 domain

		Positive charge (K)	Negative charge (OPCA motif)
1 OHLEP1	SSSL	YGEERCIPTKLP-SWGTORKE	LLTODAL
2 OHLEP2	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
3 OHLEP3	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
4 OHLEP4	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
5 OHLEP5	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
6 OHLEP6	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
7 OHLEP7	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
8 OHLEP8	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
9 OHLEP9	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
10 OHLEP10	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
11 OHLEP11	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
12 OHLEP12	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
13 OHLEP13	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
14 OHLEP14	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
15 OHLEP15	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
16 OHLEP16	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
17 OHLEP17	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
18 OHLEP18	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
19 OHLEP19	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
20 OHLEP20	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
21 OHLEP21	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
22 OHLEP22	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
23 OHLEP23	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
24 OHLEP24	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
25 OHLEP25	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
26 OHLEP26	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
27 OHLEP27	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
28 OHLEP28	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
29 OHLEP29	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
30 OHLEP30	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
31 OHLEP31	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
32 OHLEP32	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
33 OHLEP33	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL
34 OHLEP34	SSSL	YNGDITVFKLP-SMGWVHLE	LLTODAL

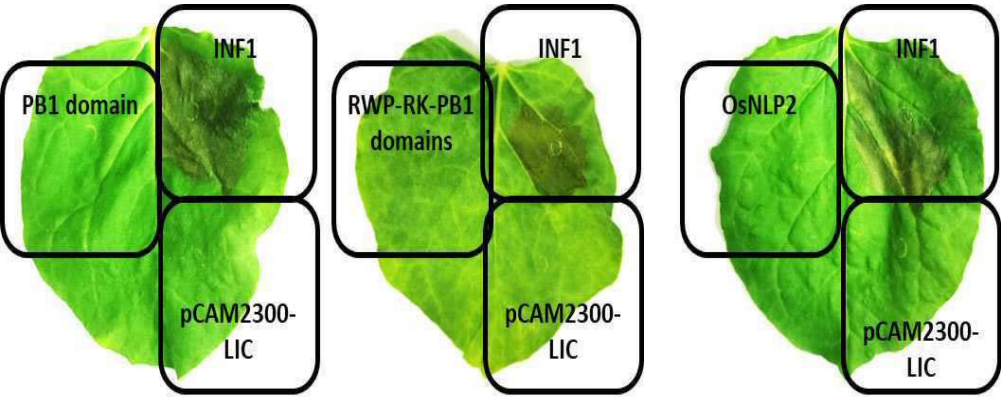
도면12



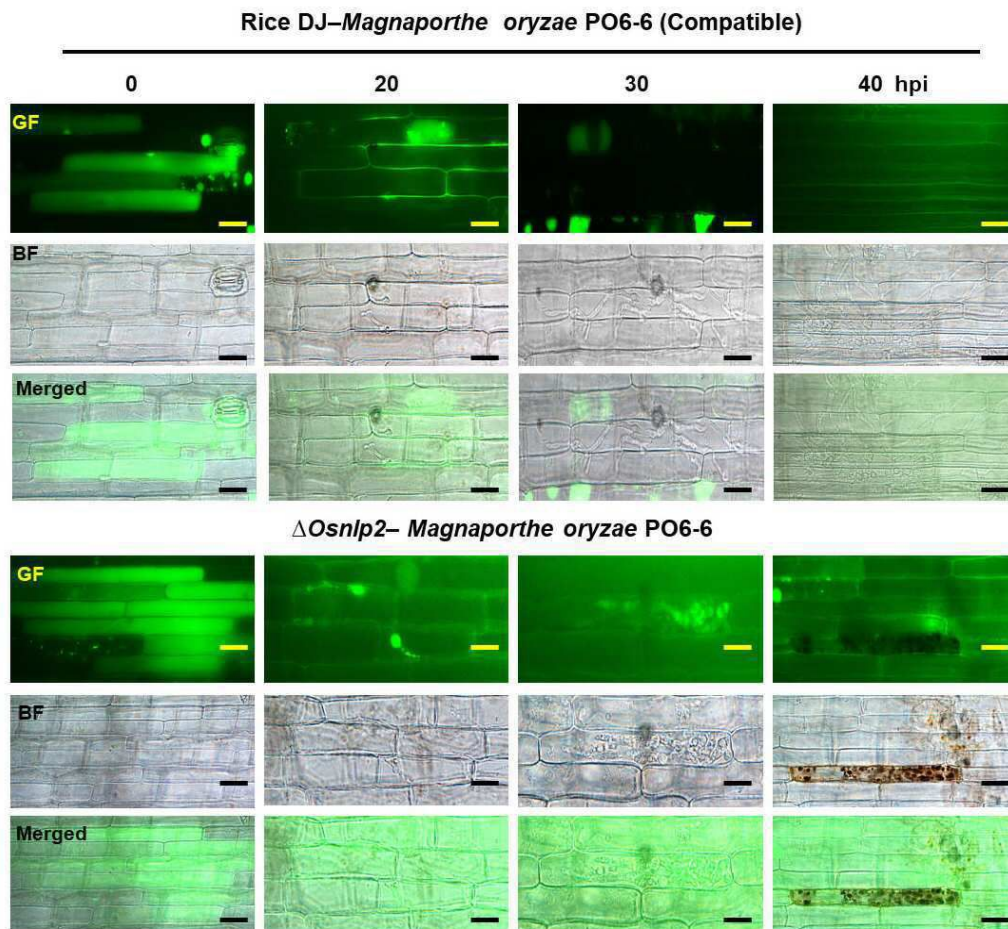
도면13



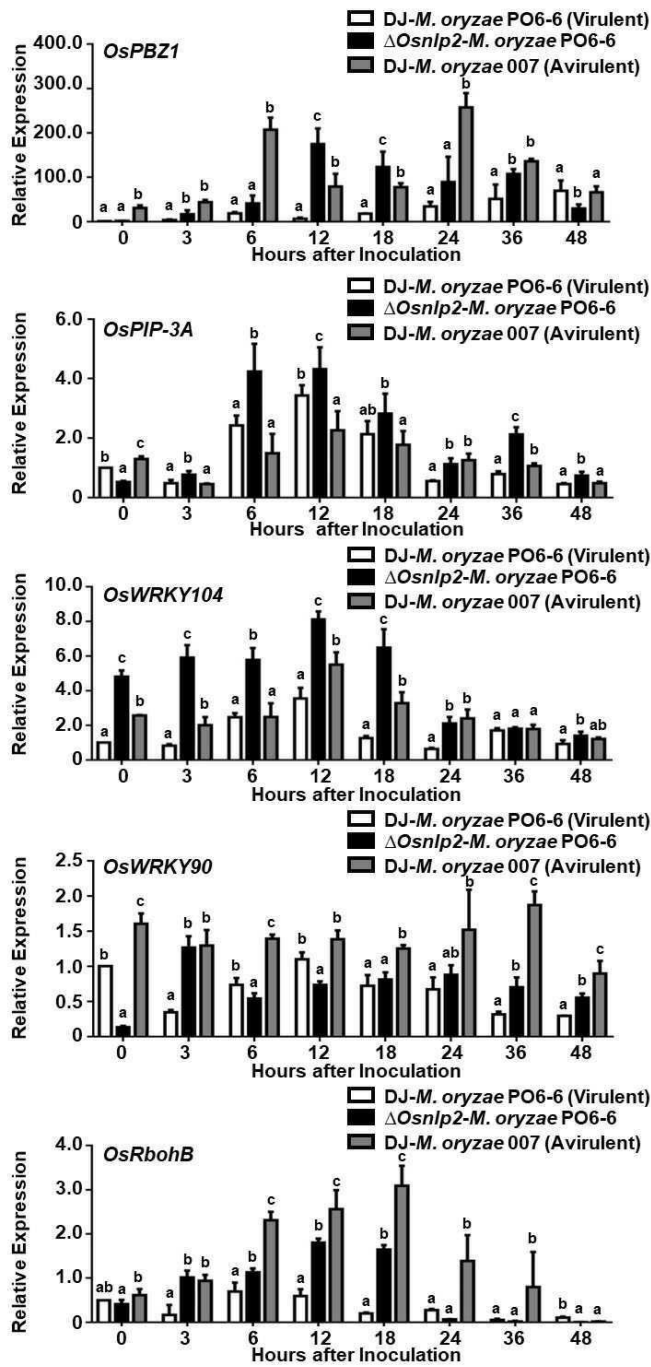
도면14



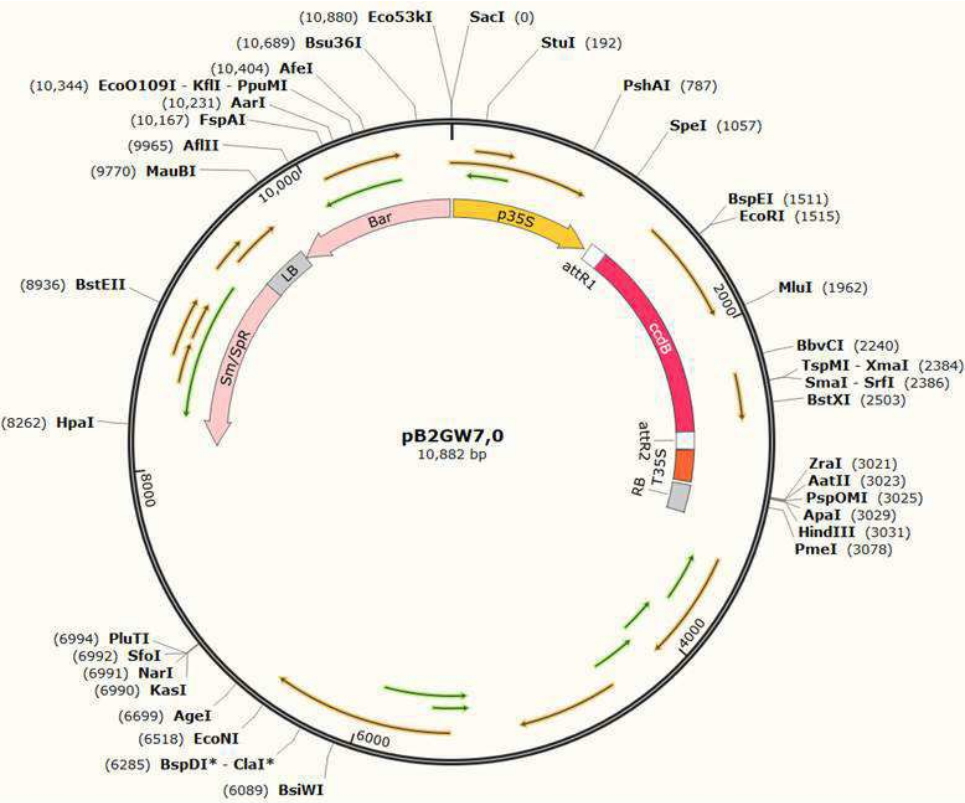
도면15



도면16

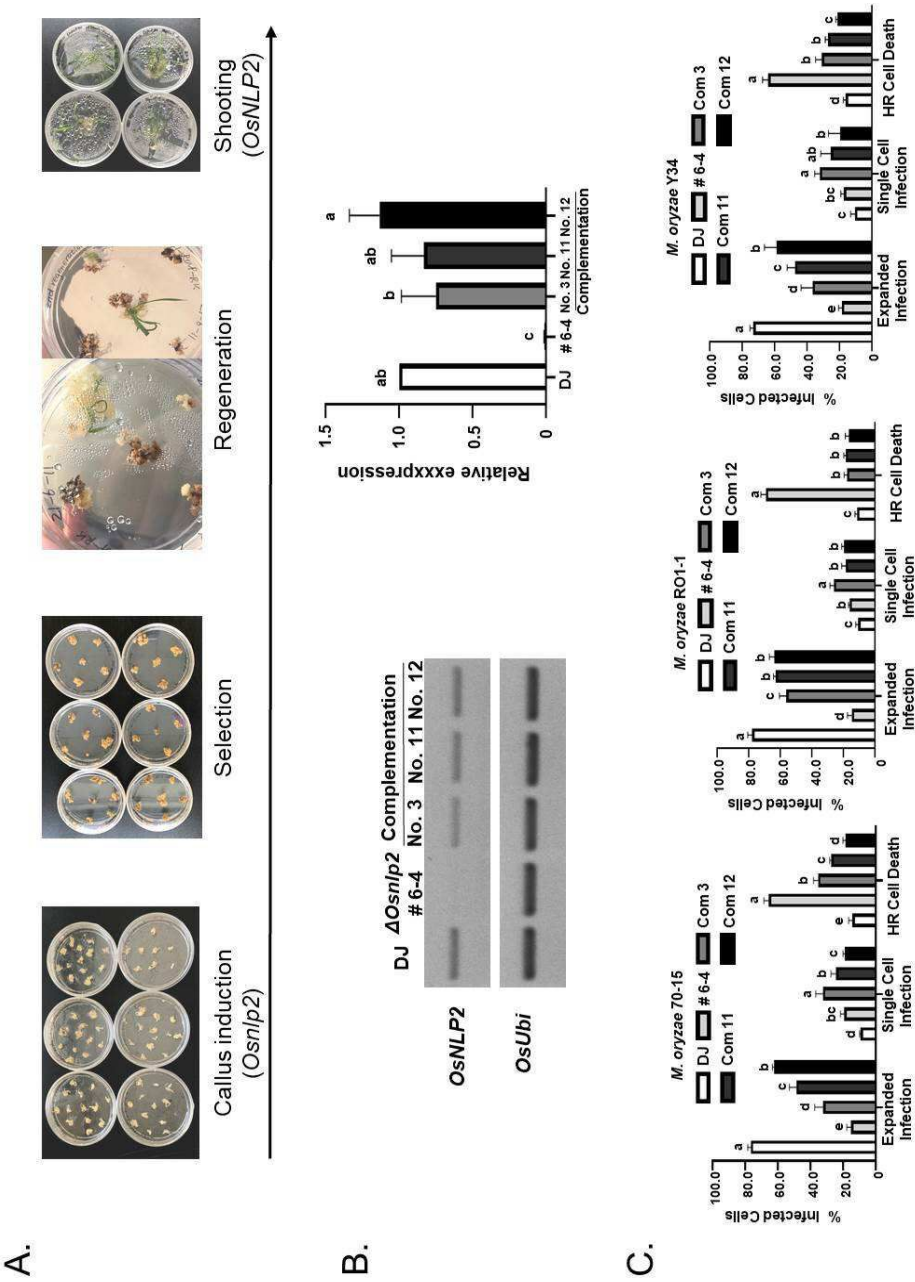


도면17



p35S	OsNLP2 cDNA
------	-------------

도면18



서열목록

- <110> SEJONG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION
- <120> COMPOSITION AND METHOD FOR ENHANCING OR IMPROVING BLAST RESISTANCE
- <130> 21P11068
- <150> KR 10-2020-0170325
- <151> 2020-12-08
- <160> 29
- <170> KoPatent In 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
 cttagaggtcc 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 accctacatt 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 gccctttatg agctatgtgc cgc 33

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 14
 gctacaggca tcagtggcca 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
 tcacctctgt ctacaccgtc 20

 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 17
 caccagaag atccagtgt 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 cggctactatg	60
ggcccttcag atgataccta tggcgcagca gccatgaacc ttgattgtta ctcgagatt	120
tacagccctt cggcggccga ccaactattc tcgctgctaa atgatccagc tgcacaccgg	180
atgtttgcta tgtggccatc catgggatca tcgccgtgtg ctgctgggtac gagtgaagat	240
atgccgctcg atgcatattc tggcctaggg gaggcagtgg aagaaccttc tcaaataatg	300
tcagtgaatc caactgaagc agagaaaacg ggcaagagtt caggcgagct tggttcggac	360
gatggcgtcc atcaaggag tagcatggtt ccaaggtctg ttgtgggcag ttcacttgct	420
gacaggatgc tcatggcttt gtccttggtc agggaatcat tgggcagcgg tgctcttgcc	480
caagtctgga tgcctgttga gcaggagggt catgtttgtc tgagtacatg tgagcaacct	540
tttctactcg accaggttct tgcagggtat cgagaagat ccaggcactt tgtgttttca	600
gcgaaggagg agcctggctc acagccaggg ctccagggg gggcttctcat ctctgggggtg	660
ccagaatgga cctcaagtgt cctctactat aataggccag agtatgtttag gatggagcat	720
gtctccatc acgagatagc tgggtcactt gcaatgcaa tttatgacct cagcaaggat	780
tcttgctgtg cagtgtttga gcttggttaca agaaaggaga agcctgattt cagtgcagag	840
atggacaacg ttgcaatgc cttgcaggca gtgaacttga aggtacaaa aggttctagc	900
aatcagaagt ttatacaga gaaccagaaa ttgccttca ctgagatttt agatgttctc	960
agagctatct gccatgcaca tatgtttcca ctggccctta catgggttcc tacatcaaat	1020
ggtattgatg gtggttatgt tgttggaag gatggtgcca gtttttaca atcagggaaa	1080
acaataatac gcatcatga atctgcatgt tatgttaacg atggaaagat gcaaggtttt	1140

cttcaagcat gtgccagacg tcatcttgag aaagggcaag gcattgcagg acgagcactc 1200

aaatctaatt tgccattttt ctgcctgat ataagagagt acagtattga ggattaccct 1260

cttgcacacc atgcacgtaa gtttagtctg catgctgctg ttgccattcg tetaaggagc 1320

acatacactg gcaatgatga ctacatacta gaattctttc tcccggtcag ctgcaaaggc 1380

agtggagaac aacagatgtt gctgaataac ctctccagta caatgcaaag aatatgcaaa 1440

agtctcgaa cagtttatga agcagaagt 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 aaggltcatt atgtccact 2220

ggtgctttta gtcttttga tctcaaggga acagattgca ccaatcttc tagctctctc 2280

cgcccaagtt ccgaaagcac cagaaatcaa atagttggaa gaaactcacc atctatacaa 2340

caagaagatc ttgatatgct tgacaatcat gaagccgagg acaaggacca catgcaccct 2400

tctacctctg gtatgactga ctcttctagc ggcagcgcat caagccaccc taccttcaaa 2460

cagaacacaa gaagtgtctt taaagatgca gccagtcttg cactgacagt taaggcaacc 2520

tacaacggag aactgtgcg gttcaagttc ttgccatcta tgggttggtg tcacctattg 2580

gaagaaatag caaagagatt taagctgcca accggagcat accagctcaa gtacaaggac 2640

gacgaggatg aatgggtcat cttggcaaac gattcagatc tccaggagtg cgtcgatgtt 2700

ctcgactcca tagggctcgg aatcgtgaaa ctccaggtac gagatctccc ttgcatcgtc 2760

agcagctcgg gaagcagcac ctgcttgacg ttggcggcac atagtcata 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