

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 12월 1일 (01.12.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/190452 A1

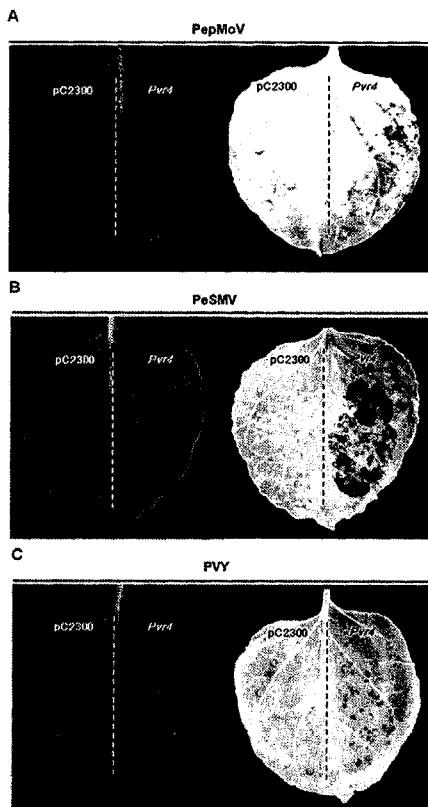
- (51) 국제특허분류:
C07K 14/415 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01) C07K 16/16 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/005133
- (22) 국제출원일: 2015년 5월 22일 (22.05.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SNU R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 151-742 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 최도일 (CHOI, Doil); 135-270 서울시 강남구 논현로 213, 104동 201호, Seoul (KR). 김셋별 (KIM, Saet-Byul); 153-764 서울시 금천구 금하로 793, 116동 1410호, Seoul (KR). 김달수 (KIM, Dalsoo); 463-737 경기도 성남시 분당구 이매로 16, 707동 101호, Gyeonggi-do (KR).

- (74) 대리인: 최규환 (CHOI, Kyu Whan); 302-868 대전시 서구 한밭대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: *Pvr4* GENE HAVING POTYVIRUS RESISTANCE AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭 : 포티바이러스 저항성을 가지는 *Pvr4* 유전자 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention provides a *Pvr4* gene having resistance to potyvirus and a use thereof. The present invention can contribute to the breeding of potyvirus-resistant chili peppers by using a molecular marker using a *Pvr4* gene sequence. In addition, the present invention can transform potatoes or tomatoes, as heterogeneous crops, showing, economically, an enormous reduction in production due to potyvirus, and an increased crop yield and an economical effect can be expected through such a transformation.

(57) 요약서: 본 발명은 포티바이러스(potyvirus)에 대하여 저항성을 가지는 *Pvr4* 유전자 및 이의 용도를 제공한다. 본 발명은 *Pvr4* 유전자 서열을 이용한 분자표지를 사용함으로써 포티바이러스 저항성 고추를 육종하는데 기여할 수 있다. 또한, 본 발명은 포티바이러스에 의해 경제적으로 막대한 생산량 감소를 나타내고 있는 이종 작물인 감자 또는 토마토까지 형질전환시킬 수 있는 특징을 가지며, 이와 같은 형질전환으로 인하여 작물의 생산량 증가 및 경제적인 효과를 기대할 수 있다.



MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, **공개:**
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 포티바이러스 저항성을 가지는 P v r 4 유전자 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 포티바이러스(Potyvirus) 저항성을 가지는 Pvr4 유전자 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 고추(*Capsicum annuum*)는 분류학적으로 가지과(Solanaceae)에 속하는 식물로, 매운맛 성분인 캡사이신(capsaicin)을 함유하고 있는 작물로 비타민 함량이 높아 생식으로 이용되고 있으며 건고추는 대부분 조미료로 사용되고 있다. FAO(United Nations Food and Agriculture Organization of the United Nations)의 통계에 따르면, 2012년 기준으로, 건고추는 전세계 생산량은 335만톤, 생식용 고추는 3100 만톤이 생산되고 있으며 생산량은 점차 증가 추세에 있다고 보고하고 있다.
- [3] 포티바이러스(Potyvirus)는 포티비리대 속(*Potyviridae* spp.) 바이러스로 식물 바이러스 중 가장 많은 종의 바이러스가 포함되며, 59 과에 포함되는 503개 식물을 감염시킨다(Quenouille *et al.*, *Mol Plant Pathol* 14, 439-452(2013), <http://pvo.bio-mirror.cn/genus039.htm#Range>). 포티바이러스에 의해 감염되는 숙주식물체(host)은 분류학적으로 주로 솔라나세아 (*Solanaceae*), 케노포디아세아(*Chenopodiaceae*), 레규미노세-파필리오노이데아(*Leguminosae-Papilionoideae*), 아마란타세아(*Amaranthaceae*), 쿠쿠르비타세아(*Cucurbitaceae*), 컴포지테(*Compositae*), 크루시페레(*Cruciferae*), 그라미니에(*Gramineae*)에 속한다고 보고되어 있다 (VIDE (Virus Identification Data Exchange) project; <http://pvo.bio-mirror.cn/genus039.htm#Range>). 포티바이러스는 진딧물에 의해 식물체에 전파되는데, 바이러스가 감염된 식물조직의 즙액(sap)에 의해서도 기주식물체에 물리적인 접촉이 가능하다. 포티바이러스는 감자(*Solanum tuberosum*), 토마토 (*Solanum lycopersicum*) 및 고추 (*Capsicum annuum*)와 같은 가지과 (*Solanaceae*) 작물 재배에 있어서 경제적으로 크게는 약 45%의 손실을 유발시킨다고 보고되어 있다(Abdalla *et al.*, *Plant disease*, 1991, vol.75, No. 10, 1019-1023). 포티바이러스 중 *pepper mottle virus* (PepMoV)는 700-900 nm의 길이, 12-15 nm의 폭으로 막대형(rod shape)이며 약 10 Kb의 (+)ssRNA 구조를 가지고 있다. PepMoV는 폴리프로테인(polyprotein)을 발현하고, 폴리프로테인 내에 존재하는 프로테이나제(proteinase)에 의해 11개의 단백질로 잘리게 된다. 그리고 5'말단에 VPg (genome-linked protein), 3'말단에 폴리(A) 테일(poly(A) tail) 구조를 가지고 있다(Quenouille *et al.*, *Mol Plant Pathol*, 2013, vol.14, 439-452). 한국, 유럽 및 미국 등지에서 고추 및 파프리카 (*Capsicum annuum*)의

포티바이러스의 자연 발생이 보고되고 있다 (Green *et al.*, Asian Vegetable Research and Development Center, 1991, vol. 9, No. 18, Technical Bulletin 18; Kenyon, L., Kumar, S., Tsai, W. S., & Hughes, J. D. A. (2014). Virus Diseases of Peppers (*Capsicum* spp.) and Their Control. *Control of Plant Virus Diseases: Seed-Propagated Crops*, vol.9, 297-354). PepMoV는 즙액 접촉에 의해 고추 및 담배에 전염이 잘 되며, 각종 진딧물에 의해서 전염된다. 이 바이러스에 감염된 고추 잎은 모틀(mottle) 현상이 나타나며 잎과 열매에 기형을 초래하고, 심하게 감염된 고추는 위축되며 고추열매 수량이 감소된다. PepMoV의 연구로써, green fluorescent protein (GFP) 가 PepMoV의 게놈안에 삽입되어 숙주식물이 PepMoV에 감염되었을 때, 자연상태에서 관찰되는 모틀현상 뿐만 아니라 UV (ultra violet) light 아래에서도 PepMoV의 감염범위를 확인할 수 있는 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스가 개발되었다 (Lee *et al.*, Virus Research, 2011, vol. 155, 487-494). SP6PepMoV-Vb1/GFP의 개발로 PepMoV의 병징이 분자생물학적 방법을 이용하여 분명하고 쉽게 분석할 수 있게 되었다.

- [4] 지금까지 고추에서 분리 보고된 포티바이러스는 PepMoV 이외에도 *Potato virus Y* (PVY), *Tobacco etch virus* (TEV) 또는 *Pepper severe mosaic virus* (PepSMV) 등 많은 바이러스가 보고되고 있으나, 현재 우리 나라의 고추에서는 PepMoV가 주로 분포하며, 큰 피해를 입히는 것으로 보고되고 있다 (Han *et al.*, Plant Pathol. J, 2006, vol.22, 155-160). PepMoV의 방제를 위해서는 진딧물 방제, 토양의 소독, 농기구와 종자의 철저한 관리가 필요하다. 그러나 방제 방법이 간접적이고, 많은 노력이 요구되므로 PepMoV에 저항성을 가진 품종을 육성하는 것이 보다 효율적이고 경제적인 방제 방법이 될 것이다.
- [5] 고추의 생산량을 감소시키는 주된 바이러스인 PepMoV (*Pepper mottle virus*), PepSMV (*Pepper severe mosaic virus*), PeYMV (*Pepper yellow mosaic virus*), ERV (*Ecuadorian rocoto virus*), PTV (*Peru tomato virus*) 그리고 PVY (*Potato virus Y*)를 포함하는 포티바이러스(potyvirus)는 고추뿐만 아니라 감자를 포함한 가지과 작물의 생산량 감소를 야기하는 바이러스이며, 이와 같은 작물의 생산성 증대를 위하여 고추 및 가지과 작물의 저항성 품종의 육종과 개발이 절실히 요구되고 있다 (SCHOLTHOF *et al.*, Mol. Plant Pathol, 2011, vol. 12, 938-954; Quenouille *et al.*, Mol. Plant Pathol., 2013, vol.14, 439-452).
- [6] 고추에서 발견된 포티바이러스 저항성은 *pvr* 유전자에 의해 유전되는 것으로 보이며, 지금까지 7개의 주요한 저항성 유전자와 몇 개의 양적인 형질에 관여하는 유전자(quantitative trait locus; QTL)가 보고되었다 (Kang *et al.*, Annu. Rev. Phytopathol, 2005, vol. 42, 392-405). 분자 표지(molecular marker)를 이용해 유전자 지도(genetic map)를 작성한 결과 염색체 3번과 10번에 각각 저항성 유전자 클러스터(gene cluster)가 존재한다는 것이 알려졌다 (Kang *et al.*, Annu. Rev. Phytopathol, 2005, vol. 42, 392-405). 염색체 3번에는 *pvr1* 및 *pvr2*와 같은 열성저항성 유전자가 위치하고 있고, 고추의 CM334의 염색체 10번에는

단일우성 저항성인 *Pvr4* 유전자의 위치가 보고되고 있다(Revers, Frédéric; and Nicaise, Valérie (August 2014) Plant Resistance to Infection by Viruses. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.DOI: 10.1002/9780470015902.a0000757.pub3). 염색체 10번의 텔로미어(telomere) 영역에 위치한다고 알려진 *Pvr4* 유전자는 기존의 연구에 의해 고추의 CM334와 이병성 개체의 F2 집단에서 3:1로 분리가 일어남을 보였고, 단일 우성 저항성 유전자로서 PepMoV, PepSMV, PeYMV, ERV, PTV 그리고 PVY 에 대해 완전저항성(extreme resistance) 또는 과민감성반응(hypersensitive response)과 같은 저항성 반응(resistance response)이 나타남이 확인되었다(Grube *et al.*, TAG, 2000, vol.101, 852-589; Janzac *et al.*, Plant Pathol., 2009, vol.58, 443-449; Kim *et al.*, TAG, 2011, vol.122, 1051-1058). *Pvr4* 유전자에 의해 유도되는 저항성은 *Pvr4* 유전자의 존재가 보고된 이후 30 여년이 지난 지금까지 PepMoV, PepSMV, PeYMV, ERV, PTV 그리고 PVY 의 바이러스에 대해서 저항성이 깨진 적이 없으며, 강력하고 지속적이다 (Kang *et al.*, Annu. Rev. Phytopathol, 2005, vol. 42, 392-405; Janzac *et al.*, Plant Pathol., 2009, vol.58, 443-449). 또한, *Pvr4* 유전자에 의한 저항성은 PepMoV, PepSMV, PeYMV, ERV 그리고 PTV 뿐만 아니라 지금까지 보고된 모든 PVY 스트레인(strain)에 대해 저항성을 나타내기 때문에 (Dogimont *et al.*, Euphytica, 1996, vol.88, 231-239), *Pvr4* 유전자를 도입하여 형질전환된 감자, 토마토 등의 식물체는 여러가지 포티바이러스에 대한 저항성을 획득할 수 있을 것으로 추측되며 이로 인한 경제적 파급 효과는 대단히 크다고 판단된다.

- [7] 최근 완성된 고추 CM334의 게놈 시퀀스(genome sequence, Kim *et al.*, Nat Genet, 2014, vol.46, 270-278)를 이용하여 PepMoV, PepSMV, PeYMV, ERV, PTV 그리고 PVY에 대해 안정적이고 광범위한 저항성을 나타내는 *Pvr4* 유전자 (Dogimont *et al.*, Euphytica, 1996, vol.88, 231-239; Janzac *et al.*, Plant Pathol., 2009, vol.58, 443-449)와 연관된 분자 표지를 개발하고, 이를 통해 동정된 *Pvr4* 유전자를 분자생물학적 방법을 이용하여 감자, 토마토 등의 식물체에 도입함으로써 포티바이러스에 대한 저항성 품종을 개발하는데 사용한다면, 전통 육종 시간과 노력을 대폭 줄일 수 있으며 결과적으로 획기적인 생산량 증대를 이룰 것으로 판단된다.
- [8] 현재까지 *Pvr4* 유전자는 PepMoV, PepSMV, PeYMV, ERV, PTV 그리고 PVY 의 포티바이러스에 대한 단일 우성 저항성을 가지는 유전자 중 하나라는 가설만 보고되어 있을 뿐이다(Kyle *et al.*, Euphytica, 1997, vol.97, 183-188; Grube *et al.*, Theor Appl Genet, 2000, vol.101, 852-859). *Pvr4* 유전자에 대한 정확한 DNA 염기서열 등에 대한 유전체적 또는 분자생물학적 수준에서의 정보는 아직까지 보고된 바 없다. 따라서, *Pvr4* 유전자를 이용한 분자표지에 대한 개발이 없었고, 분자생물학적 수준에서의 유전자에 대한 정보가 없었기 때문에, *Pvr4* 유전자를 도입하여 PepMoV, PepSMV, PeYMV, ERV, PTV, PVY 등에 대한 저항성인 감자, 토마토 등의 식물체 발명이 없었다.

- [9] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되었기 때문에 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명은 상기와 같은 배경에 의해 도출된 것으로, 본 발명자들은 PepMoV, PepSMV, PeYMV, ERV, PTV, PVY 등의 포티바이러스 감염으로 인한 고추, 감자, 토마토 등의 감염과 손상으로 인한 경제적 손실을 예방하거나 개선시킬 수 있는 식물체 유래의 포티바이러스 단일 우성 저항성 유전자인 *Pvr4* 유전자를 찾고자 노력하였다. 그 결과, 포티바이러스에 대한 저항성은 *Pvr4* 유전자와 광범위하게 관여되고 있다는 가설에 기초하여, *Pvr4* 유전자를 유전체 수준에서 탐색한 후 정확한 염기서열을 찾아내고, 본 발명에서 구체적으로 제시된 *Pvr4* 유전자로 형질전환된 식물체가 포티바이러스인 PepMoV, PepSMV, PVY 등에 대한 저항성을 직접적으로 제공한다는 객관적 사실을 구명함으로써 본 발명을 완성하게 되었다. 본 발명의 목적 및 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 설명된다.

과제 해결 수단

- [11] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 3의 아미노산 서열; 또는 서열번호 3의 아미노산 서열의 541~1745번째 서열과 85% 이상의 서열 유사성을 가지며, 포티바이러스(potyvirus) 저항성을 갖는 아미노산 서열;로 이루어진 포티바이러스저항성 단백질 *Pvr4*를 제공한다.
- [12] 본 발명은 포티바이러스 저항성 단백질 *Pvr4*를 코딩하는 유전자를 제공한다.
- [13] 본 발명은 포티바이러스 저항성 단백질 *Pvr4*를 코딩하는 유전자를 포함하는 제조합 벡터를 제공한다.
- [14] 본 발명은 포티바이러스 저항성 단백질 *Pvr4*를 코딩하는 유전자를 포함하는 제조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [15] 본 발명은 *Pvr4* 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 제조합 벡터를 식물세포에 도입하여 형질전환시켜 형질전환 식물세포에서 *Pvr4* 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는 포티바이러스에 대한 이병성 식물체 또는 비형질전환 식물체에 비해 식물체의 포티바이러스에 대한 저항성을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [16] 본 발명은 (a) 포티바이러스 저항성 단백질 *Pvr4*를 코딩하는 유전자를 포함하는 제조합 벡터로 식물세포를 형질전환시키는 단계; 및 (b) 상기 단계(a)에 의하여 제조된 형질전환된 식물세포로부터 형질전환된 식물을 재분화시키는 단계를 포함하는 포티바이러스에 대한 이병성 식물체 또는 비형질전환 식물체에 비해 포티바이러스 저항성이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

- [17] 본 발명은 상기 포티바이러스 저항성이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법에 의하여 제조된 포티바이러스 저항성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 형질전환된 종자를 제공한다.
- [18] 본 발명은 서열번호 3의 아미노산 서열; 또는 서열번호 3의 아미노산 서열의 541~1745번째 서열과 85% 이상의 서열 유사성을 가지며, 포티바이러스(potyvirus) 저항성을 갖는 아미노산 서열;로 이루어진 포티바이러스 저항성 단백질 Pvr4를 코딩하는 유전자를 포함하는, 식물체의 포티바이러스 저항성 증가용 조성물을 제공한다.
- [19] 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열 중 10개 이상의 연속 뉴클레오타이드 서열 또는 이에 상보적인 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 또는 역방향 프라이머(primer)를 제공한다.
- [20] 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열 중 10개 이상의 연속 뉴클레오타이드 서열 또는 이에 상보적인 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 프로브(probe)를 제공한다.
- [21] 본 발명은 상기 프라이머 또는 프로브를 포함하는 포티바이러스 저항성 Pvr4 유전자 검출용 키트를 제공한다.
- [22] 본 발명은 포티바이러스에 대한 이병성 식물체 또는 비형질전환 식물체에 비하여 포티바이러스 저항성을 증가시키기 위한, 서열번호 3의 아미노산 서열; 또는 서열번호 3의 아미노산 서열의 541~1745번째 서열과 85% 이상의 서열 유사성을 가지며, 포티바이러스(potyvirus) 저항성을 갖는 아미노산 서열;로 이루어진 포티바이러스 저항성 단백질 Pvr4를 코딩하는 유전자의 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [23] 본 발명은 포티바이러스(potyvirus)에 대하여 저항성을 가지는 Pvr4 유전자, Pvr4 단백질 및 이의 용도를 제공한다.
- [24] 본 발명은 Pvr4 유전자 서열을 이용한 분자표지를 사용함으로써 포티바이러스 저항성 고추를 육종하는데 기여할 수 있다.
- [25] 또한, 본 발명은 PepMoV, PepSMV, PeYMV, ERV, PTV 그리고 PVY 등의 포티바이러스에 의해 경제적으로 막대한 생산량 감소를 나타내고 있는 감자, 토마토 등의 숙주식물체까지 형질전환시킬 수 있는 특징을 가지며, 이와 같은 형질전환 식물체로 인하여 작물의 생산량 증가 및 경제적인 효과를 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [26] 도 1은 니코티아나 벤탐미아나(*Nicotiana benthamiana*: *N. benthamiana*)에서 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스에 대한 Pvr4 유전자의 저항성에 대한 결과이다(Lee *et al.*, Virus Research, 2011, vol.155, 487-494). 도 1에서 Pvr4 유전자는 저항성 유전자이며, 이병성 대립유전자인 pvr4 유전자와 빈

플라스미드인 Empty는 양성대조군으로 하였다. (A)는 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스 (Lee *et al.*, Virus Research, 2011, vol.155, 487-494)의 외피단백질을 인지하는 항체를 이용하여 ELISA를 실시한 결과이다. (B)는 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스의 VPg 검출용 프라이머를 이용하여 RT(Real-time) PCR를 실시한 결과이다. 총 5회 실시하였다.

- [27] 도 2는 *N. benthamiana*에서 감자 바이러스 Y-0 (Potato virus Y: PVY-0)와 고추 중증 모자이크 바이러스(Pepper severe mosaic virus: PepSMV)에 대한 *Pvr4* 유전자의 저항성을 나타낸 결과이다. 아그로박테리움을 이용하여 *Pvr4*와 Empty vector를 동시 침윤시킨 후, PVY-0와 PepSMV가 감염되어 있는 담배 접종액으로 루빙(rubbing)시키고 1일, 2일, 3일, 4일, 5일 및 6일째에 5개 식물체로부터 각각 5개 담배 잎 디스크를 임의적으로 샘플링하였다. 샘플들을 PVY-0와 PepSMV의 외피단백질을 각각 인지하는 항체를 이용하여 ELISA로 분석하였다. (A): PVY-O, (B): PepSMV
- [28] 도 3은 *Pvr4* 유전자로 형질전환된 감자의 PVY에 대한 저항성을 나타낸 결과이다. *Pvr4*로 형질전환된 감자에 Potato virus Y (PVY-0)를 접종한 후, PVY-0의 Vpg 검출용 프라이머를 이용하여 RT-PCR(상단 그림)과 외피단백질을 인지하는 항체를 이용하여 ELISA(하단 그래프)로 분석한 결과이다.
- [29] 도 4는 고추 *C. annuum* cv. Jupiter 및 담배 *N. benthamiana*에 아그로박테리움을 동시침윤(co-infiltration)시켜 *Pvr4* 유전자를 동정한 결과이다. (A) CM334 고추 유래 *Pvr4* 유전자인 *Pvr4-R*, 또는 이병성 대립유전자인 *Pvr4-S*를 각각 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스로부터 유래된 RNA-dependent RNA polymerase (N1b)와 함께 *C.annuum* cv. Jupiter에 아그로박테리움을 이용하여 동시침윤시켰다. 동시침윤(co-infiltration)시킨 시점에서 Jupiter 엽을 회수한 후 결과를 확인하기 위하여 에탄올로 탈염색시켰다. (B) CM334 고추 유래 *Pvr4* 유전자인 *Pvr4-R*, 또는 이병성 고추에서 유래한 대립유전자인 *Pvr4-S*와 SP6PepMoV-Vb1/GFP로부터 유래된 RNA-dependent RNA polymerase (N1b), 음성대조군으로써 tomato spotted wilt virus (TSWV)로부터 유래된 NS 유전자를 *N. benthamiana* 잎에 아그로박테리움을 이용하여 동시침윤시켰다. *R3a*과 *Avr3a*를 양성 대조군으로 이용하였다. 침윤시킨지 7일 후, *N. benthamiana* 잎을 회수하여 자외선으로 바이러스 감염을 확인하였다. *R3a*은 감자 유전자 유래 감자역병균(*Phytophthora infestans*) 저항성 유전자, *Avr3a*은 *Phytophthora infestans* 이펙터(effector), NIP은 콩역병균(*Phytophthora sojae*) 유래 괴사 유도 단백질(necrosis induced protein)를 양성대조군으로 하였다.
- [30] 도 5는 *Pvr4* 유전자와 포티바이러스인 SP6PepMoV-Vb1/GFP, PepSMV, PVY, TEV의 N1b가 *N. benthamiana*의 잎에서 아그로박테리움을 이용하여 동시침윤되어 발현된 것을 확인한 결과 이미지이다. 음성대조군으로 빈 벡터(Empty vector)와 SP6PepMoV-Vb1/GFP, PepSMV, PVY, TEV의 N1b 유전자로 하였다. 양성대조군으로써 *R3a*과 *Avr3a*을 이용하였다. 원 모양들은 잎 패넬상에

침윤된 부위를 의미한다. 이 앞은 본 실시예에서의 분석 및 실험한 것을 대표적으로 표시한 것이다. 이미지는 침윤시킨 후 4일째 사진촬영하였다.

- [31] 도 6은 포티바이러스인 PepMoV의 게놈에 형광단백질인 green fluorescent protein 이 삽입되어 PepMoV의 증식을 UV light 아래에서 형광으로 확인할 수 있는 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스에 의해 감염된 고추와 담배의 질병 증상을 나타낸 이미지이다(Lee *et al.*, Virus Research, 2011, vol.155, 487-494). A는 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스에 대해 저항성 표현형(resistance phenotype)을 나타내는 *C. annuum* landrace CM334 (TC06495, 농업유전자원정보센터, 농촌진흥청, 대한민국)와 모틀 현상을 보이는 이병성 고추인 (susceptible phenotype)인 *C. annuum* cv. ECW (TC06444, 농업유전자원정보센터, 농촌진흥청, 대한민국)와 *C. annuum* cv. Jupiter (TC05533, 농업유전자원정보센터, 농촌진흥청, 대한민국)를 나타낸다. 고추는 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스로 감염된 담배조직의 접종액으로 루빙(rubbing)시킨 후 14일째 사진촬영 하였다. B는 담배인 *Nicotiana tabaccum* cv. Xanti NC에 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스를 감염시킨 후 14일째 자외선(UV)를 조사하여 바이러스가 감염되었음을 확인하고 사진촬영 하였다.
- [32] 도 7은 본 발명에서 *Pvr4* 유전자와 가장 가까이 연관되어 있는 분자표지인 SNP61786 분자표지 결과 이미지이다. 저항성 개체로서 CM334를 사용하였고, 이병성 개체로서 ECW123R 를 사용하였다. CM334와 ECW123R의 교배체인 F1개체를 이병성 개체에 여교잡하여 얻어진 3세대인 BC1F3 를 제작하였다(Kim, Han *et al.*, TAG. 2011, vol. 122, 1051-1058). Phe는 피노타이핑(phenotyping)을 의미하며 Gen은 지노타이핑(genotyping)을 의미한다. 지노타이핑에서 R은 저항성 지노타입(resistant genotype), H는 헤테로 지노타입(hetero genotype)을 의미하며, S는 이병성 지노타입(susceptible genotype)을 의미한다. 피노타이핑에서 R은 저항성 피노타입을 의미하며, S는 이병성 피노타입을 의미한다.
- [33] 도 8은 본 발명에서 수행한 유전자 기반 클로닝을 나타낸 것이다.
- [34] 도 9는 본 발명에서 *Pvr4* 유전자와 대립유전자 *pvr4* 유전자의 상동성을 나타낸 것이다. 도 9a 에서 *Pvr4* 유전자는 coiled-coil nucleotide-binding site leucine-rich repeat (CC-NBS-LRR) 타입이며, 총 5238개의 뉴클레오타이드 (nucleotide)의 ORF (open reading frame) 서열을 가지고 있으며 1745개의 아미노산 서열을 포함한다는 것을 나타낸다. 도 9b는 *Pvr4* 유전자와 *pvr4* 유전자의 아미노산 전체 서열을 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 블라스트(Blast) 프로그램을 이용하여 비교분석한 결과이다.
- [35] 도 10은 본 발명에서 *Pvr4* 유전자의 지노믹 DNA 영역을 나타낸 것이다. 도 10(a)는 *Pvr4* 유전자의 지노믹 DNA 영역으로, 7개의 엑손(exon)과 6개의 인트론(intron)으로 이루어져 있으며, 개시코돈부터 종결코돈까지 13,870 개의 뉴클레오타이드로 구성되어 있음을 나타낸다. 도 10(b)는 *Pvr4* 유전자의 엑손

2번, 3번, 4번, 5번, 6번 염기서열이 95%의 상동성을 가진다는 것을 의미한다. 도 10(c)는 인트론 2번, 3번, 4번, 5번의 염기서열이 99%의 높은 상동성을 가진다는 것을 의미한다.

- [36] 도 11은 *N. benthamiana*에서의 세포사멸 증상을 나타낸 것이다. A는 *N. benthamiana*의 잎에 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스가 감염된 담배 접종액을 3ml/g의 농도로 하여 루빙(rubbing)시켰으며, 왼쪽에는 빈 벡터인(Empty vector) 벡터인 pCAMBIA2300와 오른쪽은 *Pvr4* 유전자를 각각 2일째에 아그로박테리움을 이용하여 침윤한 결과 이미지이다. B는 *N. benthamiana*에 PepSMV가 감염된 담배 접종액을 3ml/g의 농도로 루빙(rubbing)시키고, 왼쪽에는 빈 벡터인(Empty vector) pCAMBIA2300와 오른쪽은 *Pvr4* 유전자를 각각 2일째에 아그로박테리움을 이용하여 침윤한 결과 이미지이다. C는 *N. benthamiana*에 PVY가 감염된 담배 접종액을 3ml/g의 농도로 루빙(rubbing)시키고, 왼쪽에는 빈 벡터인(Empty vector) pCAMBIA2300와 오른쪽은 *Pvr4* 유전자를 각각 2일째에 아그로박테리움을 이용하여 침윤한 결과 이미지이다.
- [37] 도 12는 CM334에서 유래한 포티바이러스 저항성 유전자 *Pvr4*가 암호화하는 아미노산 서열과 ECW에서 유래한 이병성 대립형질인 *pvr4* 유전자가 암호화하는 아미노산 서열을 비교한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [38] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 3의 아미노산 서열; 또는 서열번호 3의 아미노산 서열의 541~1745번째 서열과 85% 이상의 서열 유사성을 가지며, 포티바이러스(potyvirus) 저항성을 갖는 아미노산 서열;로 이루어진 포티바이러스 저항성 단백질 *Pvr4*를 제공한다.
- [39]
- [40] 본 발명자들은 포티바이러스 감염으로 인한 작물의 질병과 이에 따른 작물의 손상으로 인한 경제적 손실을 개선시킬 수 있는 식물체 유래 포티바이러스 저항성 분자를 찾고자 노력하였으며, 포티바이러스에 대한 저항성과 관련하여 *Pvr4* 유전자와 광범위하게 관여되고 있다는 가설에 기초하여 *Pvr4* 유전자에 대하여 게놈(genome) 수준으로 분리 및 동정하고 *Pvr4* 유전자로 형질전환된 식물체가 포티바이러스들(*Pepper mottle virus*, *PepMoV*; *Pepper severe mosaic virus*, *PepSMV*; *Potato virus Y*, *PVY*)에 대하여 직접적으로 저항성을 가진다는 객관적 사실을 규명하였다.
- [41] 본 발명은 포티바이러스에 대하여 특이적으로 저항성을 가지는 단백질이다.
- [42] 본 발명의 명세서에서 표현 "특이적 저항성"은 포티바이러스의 증식 또는 활성 억제, 면역계(immune system) 활성화, 면역반응 증대 또는 면역반응 활성화, 또는 사멸시킬 수 있는 특성을 의미하며, 식물세포 또는 식물체로 도입되는 경우 포티바이스를 특이적으로 증식을 억제시키거나 사멸시킬 수 있는 특성을 의미한다.

- [43] 본 발명은 포티바이러스에 대하여 특이적인 저항성을 가지는 단백질로서 자연계에 존재하는 포티바이러스라면 제한없이 포함되나, 바람직하게는 포티바이러스는 PepMoV (*Pepper mottle virus*), PepSMV (*Pepper severe mosaic virus*) 및 PVY (*Potato virus Y*)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 포티바이러스를 포함한다.
- [44] 본 발명인 Pvr4 단백질은 현재 공지되지 않은 아미노산 서열을 가지고 있음에 따라, 본 발명에 따른 Pvr4 단백질의 범위는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다.
- [45] 용어 "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 3의 아미노산 서열의 541~1745번째 서열과 85% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 3로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 포티바이러스들에 대한 저항성을 의미한다. 또한, 본 발명은 Pvr4 단백질의 단편, 유도체 및 유사체 (analogues)를 포함한다. 본원에 사용된, 용어 "단편", "유도체" 및 "유사체"는 본 발명의 Pvr4 폴리펩티드와 실질적으로 같은 생물학적 기능 또는 활성을 보유하는 폴리펩티드를 말한다.
- [46]
- [47] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 포티바이러스 저항성 단백질 Pvr4를 코딩하는 유전자를 제공한다.
- [48] 본 발명인 Pvr4 유전자는 현재 공지되지 않은 뉴클레오타이드 서열을 가지고 있으며, 포티바이러스들에 대한 저항성을 가지는 것을 특징으로 한다. 본 발명인 Pvr4 유전자는 Pvr4 단백질을 코딩하는 게놈 DNA, cDNA 및 합성 DNA를 모두 포함한다.
- [49] 바람직하게는, 본 발명의 유전자는 서열번호 1(게놈 DNA) 또는 서열번호 2(cDNA)로 표시되는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 폴리뉴클레오타이드 서열과 각각 80% 이상, 더 바람직하게는 85% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.
- [50] 본 발명에서 폴리뉴클레오타이드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오타이드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열 (추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제 (즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [51]
- [52] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명에 따른 Pvr4 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 본 발명의 재조합 벡터에서, 상기 Pvr4

유전자는 바람직하게는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 폴리뉴클레오타이드 서열로 이루어질 수 있다.

- [53] 본 발명의 명세서에서, 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.
- [54] 본 발명의 명세서에서 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 재조합 DNA 분자를 의미한다. 대체로, 임의의 플라스미드 및 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다. 상기 발현 벡터의 중요한 특성은 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절 요소 (translation control element)를 가지는 것이다. 진핵세포에서 이용가능한 번역 조절 요소인 인핸서 (enhancer), 리보솜 결합 부위, 종결신호, 폴리아데닐레이션 신호 및 프로모터는 당업계에 공지되어 있다.
- [55] 본 발명에서 발현 벡터는 당업계에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관 내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 발현 벡터는 번역 개시 부위로서 리보솜 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.
- [56] 본 발명에서 재조합 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터 (EP 0116718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0120516 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 형질전환 하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

- [57] 본 발명의 재조합 벡터에서, 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.
- [58] 용어 "프로모터"는 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.
- [59] 본 발명의 재조합 벡터에서, 터미네이터는 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제 (NOS), 베타 α -아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린 (phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 튜머파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토파인 (Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 터미네이터 영역이 식물 세포에서의 유전자 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알려져 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.
- [60] 본 발명의 재조합 벡터는 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. 그 예로는 글리포세이트 (glyphosate) 또는 포스포노트리신 (phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신, G418, 블레오마이신 (Bleomycin), 하이그로마이신 (hygromycin), 클로람페니콜 (chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [61]
- [62] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다. 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있으며, 원핵세포의 예로는, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉐린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.
- [63] 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모 (*Saccharomyce 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 있다. 바람직하게는 본 발명에서의 숙주세포는 식물세포이다.

- [64] 본 발명의 제조합 벡터는 숙주 세포가 원핵세포인 경우, CaCl_2 방법, 하나의 방법 (Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기천공 방법 등에 의해 숙주세포 내로 운반될 수 있다. 또한, 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포솜-매개 형질감염법, DEAE-덱스트란 처리법 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 숙주세포 내로 벡터를 주입할 수 있다.
- [65]
- [66] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 Pvr4 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 제조합 벡터를 식물세포에 도입하여 형질전환시켜 형질전환 식물세포에서 Pvr4 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는 포티바이러스에 대한 이병성 식물체 또는 비형질전환 식물체에 비해 식물체의 포티바이러스에 대한 저항성을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [67] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명에서의 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 폴리뉴클레오타이드 서열과 각각 80% 이상, 더 바람직하게는 85% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.
- [68] 본 발명의 벡터를 식물세포에 형질전환시키는 경우에 숙주세포는 바람직하게는 고추속(*Capsicum* sp.) 또는 가지속(*Solanum* sp.) 식물세포이며, 더 바람직하게는 고추세포, 감자세포, 토마토세포 또는 가지세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 식물세포를 형질전환시키는 방법은 전술한 바와 같다.
- [69] 본 발명은 상기 Pvr4 유전자를 이용하여 식물세포 또는 식물체의 포티바이러스에 대한 저항성을 증가시키는 방법임에 따라, 본 발명의 명세서 작성에 있어서 과도한 기재를 회피하고자 이 둘 사이에 공통된 내용은 생략한다.
- [70]
- [71] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 포티바이러스 저항성 단백질 Pvr4를 코딩하는 유전자를 포함하는 제조합 벡터로 식물세포를 형질전환시키는 단계; 및 (b) 상기 단계(a)에 의하여 제조된 형질전환된 식물세포로부터 형질전환된 식물을 재분화시키는 단계를 포함하는 포티바이러스에 대한 이병성 식물체 또는 비형질전환 식물체에 비해 포티바이러스 저항성이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.
- [72] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명에서의 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기

염기 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 폴리뉴클레오타이드 서열과 각각 80% 이상, 더 바람직하게는 85% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.

- [73] 상기 식물세포를 형질전환시키는 방법은 상기 전술한 바와 같으며, 상기 형질전환된 식물세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다.
- [74] 본 발명은 상기 *Pvr4* 유전자를 이용하여 포티바이러스 저항성이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법임에 따라, 본 발명의 명세서 작성에 있어서 과도한 기재를 회피하고자 이 둘 사이에 공통된 내용은 생략한다.
- [75]
- [76] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 포티바이러스에 대한 저항성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 형질전환된 종자를 제공한다.
- [77] 바람직하게는, 본 발명에서 포티바이러스에 대한 저항성이 증가된 형질전환된 식물체는 분류학적으로 포티바이러스에 의해 감염되는 숙주식물체(host)인 솔라나세아(*Solanaceae*), 케노포디아세아(*Chenopodiaceae*), 레규미노세-파필리오노이데아(*Leguminosae-Papilionoideae*), 아마란타세아(*Amaranthaceae*), 쿠쿠르비타세아(*Cucurbitaceae*), 컴포지테(*Compositae*), 크루시페레(*Cruciferae*), 그라미니에(*Gramineae*)이며, 바람직하게는 솔라나세아과 식물체이다.
- [78]
- [79] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 3의 아미노산 서열; 또는 서열번호 3의 아미노산 서열의 541~1745번째 서열과 85% 이상의 서열 유사성을 가지며, 포티바이러스(potyvirus) 저항성을 갖는 아미노산 서열;로 이루어진 포티바이러스 저항성 단백질 *Pvr4*를 코딩하는 유전자를 포함하는, 식물체의 포티바이러스 저항성 증가용 조성물을 제공한다.
- [80] 바람직하게는, 본 발명은 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 단백질 *Pvr4*를 코딩하는 유전자를 포함하며, 상기 유전자를 식물에 형질전환시킴으로써 식물체의 포티바이러스 저항성을 증가시킬 수 있다.
- [81] 본 발명은 상기 *Pvr4* 단백질을 코딩하는 유전자를 이용함에 따라, 본 발명의 명세서 작성에 있어서 과도한 기재를 회피하고자 이 둘 사이에 공통된 내용은 생략한다.
- [82]
- [83] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열 중 10개 이상의 연속 뉴클레오타이드 서열 또는 이에 상보적인 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 또는 역방향

- 프라이머(primer)를 제공한다.
- [84] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열 중 10개 이상의 연속 뉴클레오타이드 서열 또는 이에 상보적인 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 프로브(probe)를 제공한다.
- [85] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (i) 서열번호 1 또는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열 중 10개 이상의 연속 뉴클레오타이드 서열 또는 이에 상보적인 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 또는 역방향 프라이머, 또는 (ii) 서열번호 1 또는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열 중 10개 이상의 연속 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 프로브를 포함하는 포티바이러스 저항성 *Pvr4* 유전자 검출용 키트를 제공한다.
- [86] 본 명세서에서 사용되는 용어 "프라이머"는 올리고뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 핵산쇄(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합제의 존재, 그리고 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용할 수 있다. 바람직하게는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드이며 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 이러한 프라이머의 디자인은 상술한 뉴클레오타이드서열을 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 수행할 수 있다.
- [87] 프라이머는, 중합제의 존재 하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, 응용분야 및 프라이머의 소스(source)에 따라 결정되며, 예를 들면, 10개 이상, 바람직하게는 10-100개, 더욱 바람직하게는 10-50개, 더더욱 바람직하게는 10-30개 뉴클레오타이드 서열로 이루어진다. 용어 "어닐링" 또는 "프라이밍"은 주형 핵산에 올리고디옥시뉴클레오타이드 또는 핵산이 병치(apposition)되는 것을 의미하며, 상기 병치는 중합효소가 뉴클레오타이드를 중합시켜 주형 핵산 또는 그의 일부분에 상보적인 핵산 분자를 형성하게 한다.
- [88] 본 발명에서 이용되는 프라이머는 타겟 핵산서열에 실질적으로 상보적인 서열을 포함한다. 용어 "상보적"은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 상보적인 것을 의미한다. 바람직하게는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드이며 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

- [89] 본 명세서에서 사용된 용어 "프로브(probe)"는 타겟 핵산서열에 실질적으로 상보적인 서열을 포함하는 단일쇄 핵산 분자이다. 바람직하게는, 프로브는 디옥시리보뉴클레오타이드이며 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프로브는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 프로브는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 프로브의 길이는 예를 들면, 10개 이상, 바람직하게는 10-100개, 더욱 바람직하게는 10-50개, 더더욱 바람직하게는 10-30개 뉴클레오타이드 서열로 이루어진다.
- [90] 본 명세서 용어 "혼성화(hybridization)"는 2개의 단일 가닥 핵산이 상보적인 염기 서열들의 페어링(pairing)에 의하여 이합체 구조(duplex structure)를 형성하는 것을 의미한다. 혼성화는 단일 가닥 핵산 서열 간의 상보성이 완전할 경우(perfect match) 일어나거나 일부 미스매치(mismatch) 염기가 존재하여도 일어날 수 있다. 혼성화에 필요한 상보성의 정도는 혼성화 반응 조건에 따라 달라질 수 있으며, 특히 온도에 의하여 조절될 수 있다.
- [91] 본 발명의 명세서에서 용어 "어닐링" 과 "혼성화"는 차이가 없으며, 본 명세서에서 혼용되어 사용된다.
- [92] 본 발명에서 프라이머 및 프로브에 어닐링 또는 혼성화 시키는 방법은 당업계에 공지된 혼성화 방법에 의해 실시할 수 있다. 본 발명에서, 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 이런 절차는 연구실에서 사용을 위한 프로토콜을 수립하기 위하여 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시된다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 반응 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 올리고뉴클레오타이드의 길이 및 GC 양 및 타겟 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다.
- [93] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 검출가능한 시그널을 발생하는 표지는 화학적 표지, 효소 표지, 방사능 표지, 형광 표지, 발광 표지, 화학발광 표지 또는 금속 표지(예컨대, 금)이다.
- [94] 상기 화학적 표지는 바이오틴을 포함한다. 스트렙타비딘(또는 아비딘)과 바이오틴의 결합 특이성은 타겟 핵산 서열을 나타내는 간접적인 시그널이 발생되도록 한다.
- [95] 상기 효소 표지는 알카라인 포스페이트, β -갈락토시다제, β -글루코시다제, 루시페라제, 시토크롬 P450 및 호스라디쉬 퍼옥시다제를 포함한다. 상기 효소 표지에 대한 기질을 이용함으로써, 타겟 핵산서열을 나타내는 시그널을 얻을 수 있다.
- [96] 본 발명은 본 발명에서의 서열번호 1 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드와 상보적으로 혼성화할 수 있는 프라이머, 프로브, 또는 이를 포함하는 키트임에 따라, 본 발명과 공통적인 내용은 본 명세서의 과도한 기재를 회피하기 위해 생략된다.
- [97]

- [98] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 포티바이러스 저항성 단백질 Pvr4에 대한 항체를 제공한다.
- [99] 본 발명의 명세서에서 용어 "항체"는 모노클로날 항체, 다중특이적 (multispecific) 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 카멜화 항체 (camelised antibody), 키메라 항체, 단일 체인 Fvs (scFv), 단일 체인 항체, 단일 도메인 항체, Fab 프래그먼트, F(ab) 프래그먼트, 디설피드-결합 Fvs (sdFv), 및 항이디오타입 (항-Id) 항체, 및 상기 임의의 에피토프 결합 단편을 말한다. 특히, 항체는 면역 글로불린 분자 및 면역학적으로 활성이 있는 면역글로불린 분자 단편, 즉 항원 결합부위를 함유하는 분자를 포함한다. 면역글로불린 분자는 임의의 종류 (예: IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, 및 IgY), 클래스 (예: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2) 또는 서브클래스일 수 있다.
- [100] 본 발명의 항체는 본 발명의 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현 벡터에 클로닝하여 Pvr4 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함되며, 본 발명의 부분 펩티드로는, 최소한 7개 아미노산, 바람직하게는 9개 아미노산, 더욱 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 다클론 항체, 단클론 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.
- [101]
- [102] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명에서의 Pvr4 단백질 항체를 포함하는 포티바이러스 저항성 Pvr4 단백질 검출용 키트를 제공한다.
- [103] 본 발명의 키트는 면역분석용 키트를 포함한다. 상기 면역분석은 방사능 면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [104] 예를 들어, 본 발명의 키트가 방사능면역분석에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, ^{14}C , ^{125}I , ^{32}P 및 ^{35}S)로 표지된 항체(상기 마커에 특이적으로 결합하는 항체)가 이용될 수 있다.
- [105] 본 발명에서 이차 항체를 이용하는 경우 이차 항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시퍼라아제 및 사이토크롬 P450을 포함한다.
- [106] 상기 검출 항체는 검출 가능한 시그널을 발생시키는 레이블(label)을 가지고 있다. 상기 레이블은 화학물질(예컨대, 바이오틴), 효소(알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제 및 사이토크롬 P450),

방사능물질((예컨대, ^{14}C , ^{125}I , ^{32}P 및 ^{35}S), 형광물질(예컨대, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 및 FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[107] 본 발명의 포티바이러스 저항성 Pvr4 단백질 검출용 키트는 공지된 다양한 종류의 키트로 제작될 수 있으며, 예컨대 면역분석(immunoassay)용 키트, 유전자 증폭 키트를 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[108]

[109] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 3의 아미노산 서열; 또는 서열번호 3의 아미노산 서열의 541~1745번째 서열과 85% 이상의 서열 유사성을 가지며, 포티바이러스(potyvirus) 저항성을 갖는 아미노산 서열;로 이루어진 포티바이러스에 대한 저항성을 가지는 단백질 Pvr4를 코딩하는 유전자의 식물체의 포티바이러스 저항성 증가용 용도를 제공한다.

[110] 본 발명은 상기 본 발명에서의 저항성을 가지는 단백질 Pvr4와 이를 코딩하는 유전자의 용도임에 따라, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 회피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[111]

[112] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[113]

[114] 실험재료 및 방법

[115] 식물체

[116] PepMoV에 대한 저항성 고추 식물체 개체로서 CM334 (*Pvr4/Pvr4*, TC06495, 농업유전자원정보센터, 농촌진흥청, 대한민국)가 사용되었으며, 이병성 개체로서 ECW123R (*pvr4/pvr4*, New Mexico University, USA)과 Jupiter (*pvr4/pvr4*, TC05533, 농업유전자원정보센터, 농촌진흥청, 대한민국)를 사용하였다. *Pvr4* 유전자의 게놈-기반 클로닝(genome-based cloning)을 수행하기 위한 수단으로 DNA 분석 활용 및 바이러스 저항성 분석에 2개의 고추 집단을 사용하였다. 첫 번째는 선행연구(Kim, Han *et al.*, TAG. 2011, vol, 122, 1051-1058)에서 사용된 ECW123R과 CM334의 여교잡 교배체인 BC1F3 집단을 이용하였다. 두 번째는 Jupiter와 CM334를 교배하여 생성된 F2 집단을 이용하였다. 정확한 표현형 분석을 위해 접종 후 1개월 동안 1468 개체의 개체를 유지하였다. 이들 식물체는 25°C에서 광조건 16 시간과 암조건 8 시간의 주기를 유지하면서 재배하였다.

[117]

[118] *PepMoV*, *PepSMV*, *PVY*의 증식 및 접종

[119] *PepMoV*에 GFP(green fluorescence protein)가 태그(tagged) 되어 있는 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스를 증식시키기 위하여, SP6PepMoV-Vb1/GFP

바이러스가 감염되어 있는 동결건조형태의 담배조직을 분양받아 막자사발에 포스페이트 버퍼(phosphate buffer; Phosphate buffered salts, Takara)를 약 5 ml을 넣고 상기의 담배조직을 갈아 파쇄하고 식물조직에 상처를 유도하는 carborundum (400 mesh)을 섞어 접종액을 제작하였다. 파종한 후, 4-5주 재배된 니코티아나 벤타미아나(*Nicotianabenthhamiana* : *N. benthhamiana*) 또는 니코티아나 타바쿰(*Nicotianatabaccum* : *N. tabaccum*)의 잎에 막자사발에서 파쇄된 접종액을 루빙(rubbing)을 통하여 접종하였다(Lee *et al.*, *Virus research*, 2011, vol. 155, 487-494). 같은 방법으로 PepSMV, PVY가 감염된 담배 접종액을 제작하였다.

- [120] 감염시킨 후, 14 일이 지난 후에 *N. benthhamiana*의 상업 조직을 채취하여 접종액으로 이용하였다. 바이러스의 접종액으로 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스가 감염된 *N. benthhamiana*를 10 g을 채취하여 막자사발에 넣고 포스페이트 버퍼 30 ml을 첨가하여 파쇄하여 3 ml/g의 농도로 접종액을 먼저 제작하였다. 같은 방법으로 PepSMV, PVY가 감염된 담배 접종액을 제작하였다. Jupiter와 CM334의 F2 교배체 405개와 CM334와 ECW123R의 여교잡을 통한 BC1F3의 1063 개체를 파종 후, 4-5 주 지난 시점에서 고추의 본엽에 carborundum (400 mesh)을 뿌려 상처를 유도하였다. 다음으로 상기의 3 ml/g의 농도로 만들어진 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스의 접종액을 전체 1468 개체의 고추 본엽에 루빙(rubbing)시켰다.

- [121] SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스의 감염여부는 GFP를 검출할 수 있는 UV 일루미네이터(UV illuminator)와 아그디아(Agdia)의 DAS-ELISA(double-antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay; SRA 38000)를 이용하여 확인하였다.

[122]

- [123] 고추의 핵산 추출

- [124] PepMoV 접종 후 14일이 지난 시기에, PepMoV가 접종된 상기의 1468 개체의 고추 (Jupiter와 CM334의 F2 교배체 405 개체와 CM334와 ECW123R의 여교잡을 통한 BC1F3의 1063 개체 식물체)의 상업에 해당하는 1 cm 길이의 어린 잎을 2장 따서 1.7 ml의 마이크로원심분리 튜브에 넣었다. 식물체가 들어 있는 마이크로원심분리 튜브에 4 mm의 스테인레스 비드를 2개 넣고 티슈라이저(Tissuelyser; Retsch, QIAGEN)를 이용하여 방향을 바꿔주며 2 분 동안 분쇄한 다음, 60°C의 CTAB 핵산 추출 완충액(2% CTAB, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-Cl pH 8.0, 1.4M NaCl)을 600 μ l 넣었다. 다시 PVP(Polyvinylpyrrolidone)를 0.5 g, β -머캅토에탄올을 12.5 μ l 넣어 위 아래로 잘 섞은 다음 65°C의 항온 수조에서 1-2시간 반응시켰다.

- [125] 반응이 끝나면 잠시 식힌 후, 클로로포름:이소아밀알코올(24:1) 용액을 700 μ l 넣었다. 4°C에서 12,000 rpm 으로 15 분 동안 원심분리하였고, 상정액만을 새로운 마이크로원심분리 튜브에 취하였다. 상정액과 동량의 이소프로판올을 넣고, -20°C에서 1-2 시간 반응시켰다. 반응이 끝난 뒤 4°C, 12,000 rpm 으로 10 분 동안

원심분리한 후 상정액을 버렸다. 70%의 에탄올을 800 μl 넣어, 4°C, 12,000 rpm 으로 10 분 동안 원심분리한 다음 상정액을 버렸다. 한번 더 70% 에탄올로 핵산 침전물을 씻어 준 다음 공기 중에서 5 시간 건조시켰다. 건조가 끝나면 50 μl 의 TE 완충액(1 mM EDTA, 10 mM Tris-Cl)과 RNase(10 U/ μl)을 넣어 1시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 핵산은 분광광도계(ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc)로 정량하였다.

[126]

[127] *CAPS* 분자표지를 이용한 유전자형 결정

[128] 유전자형 검사는 PCR(Polymerase Chain Reaction) 장비로 수행하였다. PCR 반응액은 2X PCR PreMix (EmeraldAmp GT PCR Master Mix), 프라이머 10 uM, 주형 핵산 50 ng으로 구성하여 총 부피가 20 μl 가 되도록 하였다. PCR 반응은 95°C에서 5 분 동안 가열한 다음 40 사이클(95°C 30 초, 58°C 30초, 72°C 1 분)을 반복한 뒤, 70°C에서 5 분 반응하고 4°C에서 보관하였다. 표기된 분자표지는 10 μl PCR 산물에 제한효소 *Mbo*I 제한효소 0.5 μl 와 제한효소 완충액 2 μl , DW 7.5 μl 를 첨가한 뒤, 37°C에서 4 시간 동안 반응시켰다. 1.5% 아가로스 겔에 제한효소 처리한 핵산 산물을 로딩한 후, 전기영동하여 밴드를 확인하였다. SNP61786 분자표지는 1000 bp와 550 bp의 밴드가 있는 것을 호모(homo) 저항성(R)으로, 500 bp와 350bp의 밴드가 있는 것을 호모 이병성(S)으로 그리고 위의 4 개의 밴드로써 1000 bp, 550 bp, 500 bp 와 350 bp의 가 있는 것을 헤테로(hetero) 저항성(H)으로 겔 사진상에 표시하여 구별하였다.

[129] (1) SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스에 저항성인 CM334와 이병성인 Jupiter를 교배한 F2 (405 개체) (2) CM334와 ECW123R를 교배한 후, 생성된 F1 개체를 다시 ECW123R에 여교잡한 3세대인 BC1F3 (1063개)의 전체 1468 개체 식물체에 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스가 감염된 담배 접종액을 3ml/g의 농도로 하여 루빙(rubbing)시켜 접종한 후, 표현형을 조사하고, 핵산을 추출하여 개발된 SNP61786 분자표지로 유전자형을 분석하였다. BC1F3는 CM334를 모계로하고 ECW123R을 부계로 하여 얻어진 F1 개체를 ECW123R에 다시 여교잡을 한 개체를 세 번 자가수분 시킨 개체를 의미한다.

[130]

[131] *게놈-기반 클로닝(Genome-based cloning)*을 위한 유전체의 비교

[132] 고추가 토마토의 게놈에서 신터니(syteny)가 잘 이루어져 있다고 보고되어 있는 것에 근거하여(Wu *et al.*, TAG, 2009, vol. 118, 1279-1293), 기존에 보고된 토마토 분자표지인 TG420을 기준으로 토마토 염색체 10 번의 시퀀스 영역에서 텔로미어(telomere) 방향에 위치한 50 Mb - 60 Mb의 영역에 해당되는 시퀀스를 확보하고, 확보된 토마토의 시퀀스를 쿼리(query)로 하여 CM334의 스케폴드(scaffold)를 분리하였다. 확보된 시퀀스를 생물정보학 기술을 이용하여 스케폴드에 위치한 유전자의 구조를 예측하였다.

[133] 고추 게놈 페이퍼(Pepper genome paper)의 NBARC 유전자 패밀리(gene family)

정보를 이용하여 선발된 스캐폴드에서 예측된 NBARC 유전자 그룹을 분석하였다(Kim *et al.*, Nat Genet, 2014, vol.46, 270-278). 예측된 NBARC 유전자의 시퀀스에서 *Pvr4* 유전자와 연관된 SNP61786 분자표지를 개발하였다.

[134]

[135] *Pvr4* 후보 유전자의 클로닝

[136] SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스의 저항성과 이병성 비율이 3:1로 분리가 일어난 1468 개체의 유전자형과 표현형이 일치했던 SNP61786 분자표지가 포함되어 있는 스캐폴드를 선발하였다. 2개의 스캐폴드를 선발하였고, 생물정보학 프로그램(FGENESH, Softberry사)을 이용하여 스캐폴드 안에 위치한 8개의 유전자의 구조를 예측하고, 개시코돈(start codon)과 정지코돈(stop codon)을 고려하여 전체 유전자(full gene)를 분리할 수 있는 프라이머를 작성하였다. *Pvr4* 후보유전자를 과발현 시키기 위해 cauliflower mosaic virus (CaMV)의 35S 프로모터가 있는 pCAMBIA2300 벡터(연구자들에게 무료로 분양되는 벡터로써 상용화되어 있는 벡터이며 호주의 <http://www.cambia.org/daisy/cambia/653.html> 에서분양받음)를 사용하였으며, 라이게이션 비의존 클로닝(ligation independent cloning)을 이용하기 위하여 5과 3영역의 프라이머에 아답터(adapter) 시퀀스를 추가하였다(Oh *et al.*, Mol Cells, 2010, vol.30, 557-562): 5'-CGACGACAAGACCCT (아답터 시퀀스) 유전자 특이적 시퀀스(Gene specific sequence)-3' 및 5'-GAGGAGAAGAGCCCT (아답터 시퀀스) 유전자 특이적 시퀀스-3'.

[137] 증폭된 PCR 단편(fragment)을 정제(purification)한 후, 5-10 μ l의 PCR 산물(product), T4 DNA 폴리머라제(NEB) 1 μ l 및 10 mM dATP 1 μ l을 각각 첨가하였다. 전체 볼륨이 20 μ l가 되도록 증류수를 넣고 22°C에서 30 분 동안 반응시킨 후 70°C에서 20 분 동안 반응시켰다. *Pst*I으로 처리된 pCAMBIA2300 벡터를 정제한 후 T4 DNA 폴리머라제 1 μ l, 10 mM dTTP 1 μ l를 첨가하였다. 전체 볼륨이 20 μ l가 되도록 증류수를 넣고 22°C에서 30 분 동안 반응시킨 후 70°C에서 20 분 동안 반응시켰다.

[138] 끝으로, 스틱키 엔드(sticky end)를 가지는 PCR 산물 5 μ l와 벡터 3 μ l를 넣고 혼합시킨 후 상온에서 30 분 동안 반응시켰다. 그 다음, 제조된 형질전환용 벡터로 DH10b에 형질전환시킨 후 NICEM(Seoul, Korea)에서 시퀀싱을 하였다. 시퀀스를 확인한 후, 식물체에서의 과발현 실험을 위해 C58C1의 아그로박테리움을 형질전환시켰다.

[139]

[140] *Pvr4* 유전자와 SP6PepMoV-Vb1/GFP, PepSMV, PVY의 Nib의 상호작용

[141] *Pvr4* 유전자를 가지고 있는 고추인 CM334에 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스의 RNA-의존 RNA 폴리머라제(Nib)를 아그로박테리움을 통하여 침윤시킨 경우, HR (hypersensitive response)-유사 세포 사멸(cell death)을 유도한다는 것에 기초하여, 선발된 8개의 *Pvr4* 후보 유전자를 SP6PepMoV-Vb1/GFP-Nib와 함께

*N. benthamiana*의 잎에서 동시침윤시켰다.

- [142] *Pvr4* 후보 유전자와 SP6PepMoV-Vb1/GFP-NIb가 형질전환되어 있는 아그로박테리움 C58C1을 각각 2 일 동안 배양하여 원심분리한 후, OD 값이 각각 1.0과 0.5가 되도록 10 mM MgCl₂, 10 mM MES pH 5.6 및 200 μM 아세토시린곤(Acetosyringone)의 조성을 가진 버퍼에 두 개의 세포를 섞은 후 현탁하였다. 상온에서 2 시간 동안 배양시켜 병원성을 증가시킨 후, 4-5 주 자란 Jupiter 또는 *N. benthamiana* 잎에 동시침윤(co-infiltrate)시켰다. 동시침윤시킨 후 2-3 일이 지나 세포괴사반응을 관찰하였다. 같은 방법으로, *Pvr4* 유전자와 SP6PepMoV-Vb1/GFP, PepSMV, PVY의 NIb의 OD(optical density, 광학농도) 값을 각각 1.0과 0.5로 하고, *A. tumefaciens* C58C1와 함께 *N. benthamiana* 잎에 동시침윤시켰다. 음성대조군으로 빈 벡터(Empty vector)인 pCAMBIA2300을 운반하는 *Agrobacterium tumefaciens* C58C1, NIbs(ATG를 포함하는 성숙된 형태의 단백질을 발현시키는)를 운반하는 *A. tumefaciens* C58C1 를 각각 *N. benthamiana*의 왼쪽부분에 침윤시켰다. 양성 대조군(Positive control)으로서 파이토프토라 소재(*Phytophthora sojae*)가 분비하는 독신(toxin)인 NIP 이 사용되었다(Qutob *et al.*, Plant J, 2002, vol.32, 361-373). 또한 감자역병균의 저항성 유전자인 R3a (OD₆₀₀:0.5)와 감자역병균이 분비하는 RxLR 이펙터인 Avr3a (Avirulence protein 3a; OD₆₀₀:0.3)가 동시침윤 되었을 때 세포괴사반응이 나타나는 것이 보고(Jorunn *et al.*, Plant J, 2006, vol.48, 165-176)되어 있는 점에 근거하여 저항성 유전자와 병원균의 분비 단백질과의 상호작용으로 인한 양성대조군으로써 사용되기 위하여 아그로박테리움을 이용하여 동시침윤 되었다. 세포괴사는 100%의 에탄올(EtOH)에 담배 또는 고추 잎을 넣어 클로로필을 제거한 후 눈으로 확인할 수 있었다.

[143]

[144] 포티바이러스에 대한 *Pvr4* 유전자의 저항성

- [145] 선발된 8 개의 *Pvr4* 유전자는 식물에서 과발현을 유도하도록 아그로박테리움 C58C1에 형질전환되었고, YEP 액체배지에서 1 일 배양된 후 원심분리를 통해 아그로박테리움을 펠렛의 형태로 분리하였다. 10 mM MgCl₂, 10 mM MES pH 5.6 및 200 μM 아세토시린곤(Acetosyringone)의 조성을 가진 버퍼를 YEP 액체배지가 제거된 펠렛이 들어 있는 튜브에 첨가하여 OD 값이 1.0 이 되도록 희석하였다. 상온에서 2 시간 동안 배양시켜 병원성을 증가시킨 후, 4-5 주 자란 *N. benthamiana* 잎에 침윤시켰다.

- [146] 1 일이 지난 후, *Pvr4* 유전자가 과발현된 잎위에 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스가 감염되어 있는 담배 접종액을 3 g/ml의 농도로 루빙(rubbing)시켰다. 접종 후, 1, 2, 3, 4 및 5 일차에 접종 잎에서 5 개의 잎 디스크(disc)를 채취한 후, ELISA 반응 및 바이러스의 VPg를 검출할 수 있는 프라이머를 이용하여 RT-PCR(real-time PCR)을 통해 PepMoV의 증식을 확인하였다.

- [147] 같은 방법으로 8 개의 *Pvr4* 유전자를 4-5주된 *N. benthamiana* 잎에

아그로박테리움을 이용하여 침윤시킨 후, 1 일이 지난 시점에 PVY-O 또는 PepSMV를 3 g/ml의 농도로 루빙(rubbing)시켰다. 접종 후, 1, 2, 3, 4, 5 및 6일차에 접종 앞에서 5 개의 잎 디스크를 채취하여 ELISA 반응을 수행하였다.

- [148] 또 다른 저항성 반응의 실험으로, SP6PepMoV-Vb1/GFP, PVY-O 및 PepSMV가 각각 감염된 담배의 접종액을 *N. benthamiana*의 잎에 3 g/ml의 농도로 루빙(rubbing)시킨 후, 2 일이 지난 시간에 잎의 왼쪽에는 빈 벡터(Empty vector)를 침윤(infiltrate)시켰으며, 오른쪽 잎에는 *Pvr4* 유전자를 아그로박테리움을 이용하여 침윤시켰다. 빈 벡터와 *Pvr4* 유전자를 포함하는 아그로박테리움의 OD 값이 1.0 이 되도록 희석하여 침윤시켰다. 접종후 3-4 일 후부터 세포괴사를 관찰할 수 있었으며, 100%의 에탄올에 넣어 클로로필을 제거한 후 눈으로 확인하였다.

[149]

[150] 총 RNA 분리

- [151] SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스가 접종된 *N. benthamiana*의 식물체(*Pvr4* 유전자, 이병성 고추인 ECW에서 분리된 *pvr4* 유전자 (*Pvr4*의 susceptible allele)와 빈 벡터(Empty vector)를 각각 아그로박테리움에 형질전환하여 침윤시킨 후, 1일 후에 과발현된 잎에 SP6PepMoV-Vb1/GFP를 3 ml/g의 농도로 만들어진 담배 접종액을 루빙(rubbing)시킴으로써 감염시킨 *N. benthamiana*의 식물체) 접종엽에서 잎 디스크 5 장을 채취하여 TRIzol(Invitrogen)을 사용하여 총 RNA를 분리한다. RT PCR(Real time PCR) 수행을 위하여 수퍼스크립트 리버스 트랜스크립타제(Superscript reverse transcriptase; Invitrogen)로 3 μ g의 총 RNA를 주형으로 하여 퍼스트(First) cDNA를 합성한다. 합성된 cDNA를 주형으로 하여 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스의 VPg를 검출할 수 있는 프라이머를 이용하여 RT PCR을 실시하였다.

- [152] RT PCR은 SYBR 그린(Invitrogen)을 이용하는 Rotor-Gene 6000(Qiagen)를 이용하여 실시하였다. 바이러스의 증식량을 측정하기 위해, *N. benthamiana* 또는 솔라눔 투베로숨(*Solanum tuberosum*)의 액틴(actin)을 기준으로 정량화하였다.

[153]

- [154] 실시예 1 : SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스에 대한 *Pvr4* 유전자의 저항성 테스트

- [155] *Pvr4* 유전자가 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스에 대한 저항성 유전자라면 *Pvr4* 유전자가 과발현되었을 때, SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스의 증식이 억제되어야 한다. 따라서, CM334가 보이는 저항성이 단일 우성저항성인 *Pvr4* 유전자에 의해 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스에 대해 저항성을 나타내는지 확인하기 위하여, 이병성인 *N. benthamiana*에 단일 우성저항성 유전자 *Pvr4*, 이병성 대립 유전자 *pvr4* 및 빈 벡터를 각각 아그로박테리움을 이용하여 침윤시킴으로써 (OD₆₀₀ 1.0) cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S 프로모터에 의해 일시적으로 과발현시킨 후, 1 일이 지난 시점에 같은 잎에 SP6PepMoV-Vb1/GFP

바이러스가 감염되어 있는 담배 접종액의 3 ml/g을 루빙(rubbing)시켰다. 접종 후, 1, 2, 3, 4 및 5 일차에 접종엽의 잎 디스크를 5개씩 채취하여 아그디아(Agdia)사의 ELISA(SRA 38000)를 이용하여 실시하였다. SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스의 증식은 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스의 외피 단백질(coat protein)을 검출할 수 있는 항체를 사용하여 ELISA(SRA 38000)를 수행하였다. 접종 후, 4 일차에 바이러스의 증식이 가장 많이 억제되었으며 저항성은 5 일차까지 유지되었다. RNA 전사 수준에서도 동일한 저항성이 유도되는지 확인하기 위하여, 같은 시기에 채취한 동일한 양의 접종엽에서 총 RNA를 분리하여 cDNA를 합성하여 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스의 VPg를 검출할 수 있는 프라이머로 RT(real time) PCR을 수행하였다.

- [156] *Pvr4* 유전자는 접종 후 4일차에 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스에 대한 저항성을 가장 크게 나타냈다. *Pvr4*의 저항성은 ELISA 와 RT PCR 결과 모두에서, 접종 후 4 일차에 가장 효과적으로 나타났다. 결과적으로, 이 실험결과는 동정된 *Pvr4* 유전자가 *N. benthamiana*에서 단독의 발현만으로 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스의 증식을 억제함으로써 저항성을 유도한다는 증거가 된다(도 1).

[157]

- [158] 실시예 2 : 다양한 종류의 포티바이러스에 대한 *Pvr4* 유전자의 저항성 테스트

- [159] *Pvr4* 유전자가 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스 이외에 다른 포티바이러스의 증식을 실제로 억제하는지 확인하기 위하여, 이병성인 *N. benthamiana*에 단일 우성저항성 유전자 *Pvr4*, 이병성 대립 유전자 *pvr4* 및 빈 벡터(Empty vector)를 각각 아그로박테리움을 이용하여 침윤시킴으로써 (OD₆₀₀ 1.0) cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S 프로모터에 의해 일시적으로 과발현시킨 후, 1 일이 지난 시점에 같은 잎에 PepSMV, PVY가 각각 감염되어 있는 담배 접종액을 3 ml/g의 농도로 루빙(rubbing)시켰다. 접종 후, 1, 2, 3, 4, 5 및 6 일차에 잎 디스크를 5 개씩 채취하여 아그디아(Agdia)의 ELISA (PepSMV: SRA 27200, PVY : SRA 20600)를 수행하였다.

- [160] *Pvr4* 유전자의 저항성은 ELISA 결과에서, 접종 후 3 일 이후부터 가장 효과적으로 나타났다. PVY의 증식은 PVY의 외피 단백질(coat protein)을 검출할 수 있는 항체를 이용한 ELISA(SRA 20600)를 사용하였으며 *Pvr4* 유전자가 PVY의 증식을 접종 후 6 일차까지 억제하는 것을 관찰하였다. PepSMV의 증식은 PepSMV를 특이적으로 검출할 수 있는 항체가 상용화되어 있지 않으므로, 포티바이러스 외피 단백질(potyvirus coat protein)을 광범위하게 검출할 수 있는 ELISA(PepSMV: SRA 27200)를 사용하였다.

- [161] PepSMV의 증식이 상대적으로 적게 억제되는 것으로 관찰된 이유는 PepSMV를 검출하기 위해 특이성이 떨어지는 항체를 사용했기 때문으로 추정된다. 그럼에도 불구하고 4 일차부터 PepSMV의 증식이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 결과적으로, *Pvr4* 유전자는 SP6PepMoV-Vb1/GFP

바이러스뿐만 아니라 기존에 *Pvr4* 유전자를 가지고 있는 고추가 보였던 저항성과 동일하게 PepSMV와 PVY에 대해서 저항성을 유도한다는 증거가 된다. 따라서, *Pvr4* 유전자를 형질전환한 작물을 개발하는 경우, *Pvr4* 유전자에 의해 PepMoV, PepSMV와 PVY의 포티바이러스에 대해 고추뿐만 아니라 감자와 토마토와 같이 분류학적인 종(species)을 넘어선 작물에서도 저항성을 유도할 것으로 추정되었다(도 2).

[162]

[163] 실시예 3 : *Pvr4* 유전자가 형질전환된 감자(*Solanum tuberosum*)의 PVY에 대한 저항성 테스트

[164] 상기 실시예 1 및 2의 결과에 근거하여 실제로 *Pvr4* 유전자가 형질전환된 감자(*Solanum tuberosum*)에 PVY를 감염시켰을 때, 저항성을 나타내는지 확인하기 위하여 cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S 프로모터에 의해 *Pvr4* 유전자를 과발현시키는 감자 형질전환체를 개발하였다. PVY에 대해 이병성을 나타내는 *S. tuberosum* spp. Daeji 감자 품종에 *Pvr4* 유전자를 형질전환하였으며, 순화 후 4-5 주 지난 시기에 감자의 본엽에 PVY가 감염된 담배조직의 접종액을 3 ml/g의 농도로 루빙(rubbing)시킴으로써 접종하였다. 양성 대조군으로서 접종액으로 사용되었던 *N. benthamiana*가 사용되었으며, 음성대조군으로서 바이러스가 접종되지 않은 *S. tuberosum* spp. Daeji가 사용되었다. 형질전환체의 양성 대조군으로서 빈 벡터(Empty vector)가 *S. tuberosum* spp. Daeji에 형질전환된 개체와 *Pvr4* 유전자와 유사성이 높은 시퀀스를 가진 *NBARC575* 유전자가 *S. tuberosum* spp. Daeji에 형질전환된 개체를 사용하였다.

[165] 유전자의 형질전환 유무는 감자의 총 RNA를 추출하여 cDNA를 합성한 후, *Pvr4* 유전자와 *NBARC575* 유전자를 검출할 수 있는 각각의 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행함으로써 확인하였다. 정량을 위해 감자의 액틴이 사용되었다. PVY 접종 후 한 달이 지난 시점에 상업의 잎 디스크를 5 개씩 채취하여 아그디아(Agdia)의 PVY 검출 ELISA(PVY: SRA 20600)를 사용하였다. *Pvr4* 유전자가 형질전환된 감자에서만 음성대조군과 비슷한 정도의 바이러스 증식이 확인되었다. PVY의 VPg를 검출할 수 있는 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. PVY의 증식은 음성대조군으로 사용된 감자와 *Pvr4* 유전자가 형질전환된 감자에서만 검출이 되지 않았음을 확인하였다(도 3).

[166] 이 결과는 *Pvr4* 유전자의 과발현이 고추나 담배뿐만 아니라 이종식물인 감자에서도 PVY에 대해서 저항성을 유도한다는 증거가 된다. 이것은 *Pvr4* 유전자가 과발현되는 형질전환체 즉 감자 또는 토마토 등에서도 포티바이러스에 대한 저항성을 가진 개체를 확보할 수 있다는 것을 의미한다. 분자표지를 이용한 육종을 통해서도 저항성 품종을 개발할 수 있지만, 시간이 오래 걸리고 원하지 않는 형질이 함께 도입된다는 단점이 있다. 또한 여러 종류의 포티바이러스에 대한 저항성 유전자로서 분리된 것은 *Pvr4* 유전자가 유일하며 고추에만 존재하기 때문에 교배가 불가능한 감자나 토마토 같은

작물로의 *Pvr4* 유전자 도입은 전통육종으로 불가능하다. 따라서, 강하고 지속적인 저항성 유전자인 *Pvr4* 유전자를 포티바이러스에 의한 피해가 큰 감자나 토마토에 형질전환하여 단기간에 효율적으로 저항성 품종을 개발한다면, 작물의 생산량이 증가함으로써 경제적으로 많은 이익을 얻을 수 있다고 예상할 수 있다.

[167]

[168] 실시예 4 : *Pvr4* 유전자의 *in planta* 기능분석

[169] 4개의 *Pvr4* 후보유전자 가운데 *Pvr4* 유전자를 동정하기 위하여, 앞선 연구에서 *Pvr4*의 이펙터(effector)라고 알려진 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스의 Nib (RNA-dependent RNA polymerase)(OD₆₀₀ 0.5)를 *Pvr4* 후보유전자(OD₆₀₀ 1.0)와 각각 동시에 아그로박테리움 C58C1을 이용하여 *N. benthamiana* 에서 동시침윤시켰다. 그 결과, 도 3의 구조를 가진 후보 유전자만이 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스의 Nib 와 동시침윤되었을 때 3 일차에 과민감성 반응 (hypersensitive response: HR)을 나타내는 것을 확인하였다. *N. benthamiana* 잎 뿐만 아니라 이병성 고추인 Jupiter 잎에 *Pvr4* 유전자 (OD₆₀₀ 1.0)와 SP6PepMoV-Vb1/GFP-Nib (OD₆₀₀ 0.5)를 아그로박테리움 C58C1을 이용하여 동시침윤시켜 과민감성 반응이 나타남을 확인하였다.

[170] 양성대조군으로서 두 개의 세트가 사용되었다. 첫 번째로 감자역병의 저항성 유전자인 R3a 와 감자역병균이 분비하는 Avr3a 를 동시침윤시켰고, 두 번째로 콩 역병균(*Phytophthora sojae*)이 분비하는 독신(toxin)을 침윤시켰다. 음성대조군으로서 이병성 고추에서 분리된 *pvr4* 유전자를 침윤시켰다. 양성 대조군으로 사용한 예처럼, 식물의 저항성 유전자(e.g. 감자역병균의 저항성 유전자, R3a)와 병원균의 이펙터(e.g. 감자역병균의 이펙터, Avr3a)를 *N. benthamiana*에서 동시침윤시키면 과민감성반응이 나타난다고 알려져 있다. Nucleotide-binding site leucine rich repeat (NBSLRR) 타입의 저항성 유전자가 이펙터를 인지함으로써 과민감성 반응을 나타내는 것은 Flor의 gene-for-gene 가설(Flor, Annual reviews, 1971)에 의한 것으로 이러한 인지관계가 저항성을 유도한다고 알려져 있다. 결론적으로 *Pvr4* 유전자가 SP6PepMoV-Vb1/GFP-Nib를 인지함으로써 과민감성 반응을 나타내며 이로써 저항성을 유도한다고 추측할 수 있었다(도 4).

[171]

[172] 실시예 5 : *Pvr4* 유전자와 포티바이러스의 Nib의 *in planta* 발현 분석

[173] 실시예 3의 실험결과에 근거하여, *Pvr4* 유전자가 보이는 광범위한 저항성이 포티바이러스의 Nib를 인지함으로써 유도되는 것이라 가설을 세웠다. 따라서, *Pvr4* 유전자가 독성을 나타내지 않는 포티바이러스의 Nib를 인지하여 과민감성반응을 유도하는지 확인하기 위하여, PepSMV 또는 PVY의 Nib와 *Pvr4* 유전자를 아그로박테리움을 이용하여 *N. benthamiana*에서 동시침윤시켰다. 실험결과, *Pvr4* 유전자가 저항성을 나타내는 바이러스의 Nib와 동시침윤된

경우에 대해서만 과민감성 반응이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. *Pvr4* 유전자는 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스 뿐만 아니라 PepSMV와 PVY에 대해서도 저항성을 나타내지만 TEV에 대해서는 저항성을 나타내지 않는다(Janzac *et al.*, Plant Pathol. 2009, vol. 58, 443-449). *Pvr4* 유전자에 대해 이병성을 나타내는 TEV의 NIb를 *Pvr4* 유전자와 동시침윤된 경우, 과민감성반응이 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 광범위한 포티바이러스의 NIb가 *Pvr4* 유전자와의 상호작용을 통해 저항성을 매개한다는 가설을 뒷받침한다고 볼 수 있었다 (도 5).

[174]

[175] 실시예 6 : SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스에 대해 저항성을 보이는 CM334 고추와 이병성을 나타내는 ECW, Jupiter 와 *N. tabaccum*

[176] PepMoV에 대한 저항성을 확인하기 위하여 CM334(TC06495, 농업유전자원정보센터, 농촌진흥청, 대한민국), ECW(TC06444, 농업유전자원정보센터, 농촌진흥청, 대한민국) 및 Jupiter(TC05533, 농업유전자원정보센터, 농촌진흥청, 대한민국)에 PepMoV의 계놈에 형광단백질인 green fluorescent protein 이 삽입되어 PepMoV의 증식을 UV light 아래에서 형광으로 확인할 수 있는 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스가 감염되어 있는 담배 접종액의 3 ml/g을 루빙(rubbing)시켰다(Lee, Song *et al.*, Virus research, 2011, vol. 155, 487-494). 고추를 받아시켜 약 4-5 주 지난 후에, SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스로 감염된 담배조직의 접종액을 3 ml/g의 농도로 고추의 본엽에 접종하였다. 접종 후, 14 일이 지나 이병성 개체의 상엽에서 모틀링(mottling) 병징이 관찰되었다. CM334는 *Pvr4* 유전자를 가지고 있어 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스의 증식을 억제시키므로, 상엽에서 ER(extreme resistance)이 나타났다. 이병성 고추인 ECW와 Jupiter는 저항성 유전자 *Pvr4* 유전자가 없기 때문에 상엽의 색이 불규칙한 모틀링(mottling) 현상을 나타내었다 (도 6의 A).

[177] 실험에 사용한 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스는 바이러스의 계놈안에 GFP가 삽입되어 있어 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스가 증식하면, UV 라이트 아래에서 GFP의 발현을 관찰할 수 있는 장점이 있다. 따라서 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스의 증식을 확인하기 위한 접종액으로 사용하기 위하여 *N. tabaccum*에 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스를 접종하여 UV 라이트 아래에서 관찰한 결과 상엽에서 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스가 증식한 증거로 GFP를 관찰할 수 있었다. 이러한 GFP의 발현은 고추의 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스 저항성을 판별할 때, 실험의 편의성을 제공하였다(도 6의 B).

[178]

[179] 실시예 7 : 저항성 고추인 CM334와 이병성 고추인 ECW123R와 Jupiter를 각각 교배하여 만들어진 집단 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스에 대한 유전학적 분석

- [180] *Pvr4* 유전자와 가장 가까이 연관되어 있는 분자표지를 개발하기 위하여 두 개의 집단을 사용하였다. 저항성 개체로서 CM334를 사용하였고, 이병성 개체로서 ECW123R과 Jupiter를 사용하였다. 첫 번째 집단으로, CM334와 ECW123R의 교배체인 F1 개체를 이병성 개체에 여교잡하여 얻어진 BC1F3의 1063 개체의 각 본엽에 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스로 감염된 담배조직의 접종액을 3 ml/g의 농도로 루빙(rubbing)한 결과 저항성과 이병성의 분리 개체수가 각각 812:251로써 3:1의 분리비가 나타남을 확인하였다(표 1).
- [181] 또한, Jupiter를 모계로 하고 CM334를 부계로 교배하여 얻어진 F1은 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스에 대해 저항성을 보였으며, 이것은 저항성 유전자가 우성유전자임을 의미하였다. F1 교배체를 자가수분하여 얻어진 405 개체의 F2 집단에 같은 방법으로 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스로 감염된 담배조직의 접종액을 3 ml/g의 농도로 루빙(rubbing)한 결과 저항성과 이병성의 분리개체수가 309:96으로 3:1의 분리비가 나타남을 확인하였다. 이러한 분리비는 SP6PepMoV-Vb1/GFP에 대한 저항성이 멘델의 유전법칙에 의거하여 단일 우성 저항성 유전자에 의해 유도된다는 것을 의미하였다. 이 결과는 *Pvr4* 유전자를 가지고 있는 CM334와 PVY를 포함한 potyvirus에 이병성을 나타내는 RNaky 또는 ECW를 교배하여 얻어진 F1 교배체가 저항성을 나타내고, F1을 자가수분하여 얻어진 F2 개체에서 단일 우성 저항성 유전자에 의해 저항성을 나타내는 분리비인 3(저항성): 1(이병성)을 나타냈던 기존의 보고와 동일한 결과를 나타냈다(Dogimont *et al.*, Euphytica, 1996, vol.88, 231-239; Boiteux *et al.*, Euphytica, 1996, vol. 87, 53-58). 따라서, 이 실험에 사용된 고추의 교배집단이 분자표지를 개발하거나 *Pvr4* 유전자를 동정하기 위해 적합한 실험재료라는 것을 알 수 있었다. 또한, 카이스퀘어 검정을 통해 분리비가 3:1 로써 통계적으로 예측치와 실측치가 다르지 않음을 확인할 수 있었다(표 1). BC1F3는 CM334를 모계로하고 ECW123R을 부계로 하여 얻어진 F1 개체를 ECW123R에 다시 여교잡을 한 개체를 세 번 자가수분시킨 개체를 의미한다. 또한 Expected ratio는 단일 우성 저항성 유전자에 의해 바이러스에 의한 저항성이 유도되는 경우 나타나는 분리비의 예상 비율을 의미하며, Observed frequency는 각각의 고추 집단에서 PepMoV 바이러스 접종 후에 ELISA를 통해 나타난 실험적 결과를 의미한다. R은 resistance phenotype을 나타낸 개체를 의미하며 S는 Susceptible phenotype을 나타낸 개체를 의미한다. Expected ratio와 Observed frequency가 통계학적으로 유의성이 있는지에 대한 결과를 나타내기 위해 카이스퀘어 검정을 하였으며 이것이 X^2 이다. 마지막으로 카이스퀘어 검정이 P value에 의해 유의한 비율로 나타났는지에 대해 검증하였다.
- [182] 표 1

[표1]

Plant materials	Expected ratio (R:S)	Observed frequency		χ^2	<i>P</i>
		<i>R</i>	<i>S</i>		
<i>CM334 (CM)</i>	<i>1:0</i>	<i>40</i>	-	-	-
<i>Jupiter (J)</i>	<i>0:1</i>	-	<i>29</i>	-	-
<i>ECW123R (E)</i>	<i>0:1</i>	-	<i>41</i>	-	-
<i>ER x (ER x CM)</i> <i>BC1F3</i>	<i>3:1</i>	<i>812</i>	<i>251</i>	<i>1.091</i>	<i>0.296</i>
<i>(J x CM) F1</i>	<i>1:0</i>	<i>19</i>	-	-	-
<i>(J x CM) F2</i>	<i>3:1</i>	<i>309</i>	<i>96</i>	<i>0.362</i>	<i>0.546</i>

[183]

[184] 실시예 8 : *Pvr4* 유전자 분리를 위한 BC1F3 32개체의 유전형 분석 결과

[185] 고추와 토마토는 가지과에 속하는 작물로 염색체간의 신터니가 잘 보존되어 있다. 염색체 12개 가운데 포티바이러스의 저항성 유전자인 *Pvr4*는 기존의 많은 논문과 앞선 실험에서 염색체 10번의 텔로미어 영역에서 토마토의 TG420 분자표지 근처에 위치한다고 보고되었다(Wu, Eannetta *et al.*, TAG, 2009, vol. 118, 1279-1293; Kim, Han *et al.*, TAG. 2011, vol. 122, 1051-1058). TG420을 포함한 영역이 토마토와 고추의 시퀀스 레벨에서 잘 보존되어 있는 것에 기반하여 염색체 10 번의 87 Mb의 전체영역에서 50-60 Mb 일부 시퀀스를 분리하였다. TG420 분자표지를 포함한 일정영역의 시퀀스를 CM334의 스캐폴드 시퀀스를 쿼리(query)로 한 블라스트를 통하여 동일성(identity)이 높은 스캐폴드를 분리하였다. 분리한 시퀀스에서 FGENESH 프로그램을 통하여 유전자를 예측하였고, 유전자의 엑손영역에서 프라이머를 작성하여 CM334와 Jupiter의 gDNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다. PCR 산물들은 시퀀싱을 통하여 SNP 및 Indel을 확인하였으며, 시퀀스의 차이를 이용하여 *Pvr4* 유전자와 공분리하는 SNP61786 분자표지를 개발하였다(도 7).

[186] SNP61786 분자표지가 실시예 6의 두 개의 집단에 적용되었을 때, 1468개의 고추개체에 대해서 표현형과 유전형이 일치하는 0cM으로 나타났다. 공-우성(Co-dominant) 분자표지로서 PCR 증폭 후 *MboI* 제한효소를 처리한 경우, 저항성 (R)은 1000 bp 와 550 bp 의 밴드가 나타나고, 이병성 (S)는 500 bp 와 350 bp의 밴드가 나타나며, 헤테로 (H)는 4종류의 밴드 (1000 bp, 550 bp, 500 bp 와 350 bp)가 모두 나타난다. 결과적으로 SNP61786 분자표지가 위치한 CM334의 스캐폴드 영역에 *Pvr4* 유전자가 위치한다는 것을 확인하였다. SNP61786 분자표지를 포티바이러스 저항성 품종 육성에 사용한다면 *Pvr4* 유전자를 보다 정확하고 빠르게 확인하여 육종과정을 단축하는데 산업적으로 이용될 수

있다(도 7).

[187]

[188] 실시예 9 : 고추의 10 번 염색체에서 *Pvr4* 유전자 영역의 유전학적 또는 물리적 거리를 나타낸 모식도

[189] *Pvr4* 유전자와 연관되어 있는 31 개의 분자표지 중에 *Pvr4* 유전자와 가장 가까이 위치한 분자표지들로 SNP20172, SNP575, SNP61786, SNP1072, SNP1983을 선발하였으며 분자표지를 포함하는 스캐폴드의 뉴클레오타이드 시퀀스를 확보한 후, FGENESH를 통해 유전자를 예측하였다. 일반적으로 식물의 저항성 유전자는 NBS(nucleotide-binding site) LRR(leucine-rich repeat)의 구조를 가지고 있다고 보고되었다(Moffett, Advances in virus research, 2009, vol. 75, 1-33, 228-229). 포테이토 바이러스 X(Potato virus X)의 저항성 유전자인 *Rx* 는 N-말단에 CC (coiled-coil) 도메인을 가진 NBSLRR 구조를 가진 유전자이며, *Xanthomonas campestris*의 저항성 유전자인 *Bs2* 또한 CC-NBS-LRR 구조를 가졌으며, 담배 모자이크 바이러스(Tobacco mosaic virus)의 저항성 유전자인 *N* 은 N-말단에 TIR(Toll/interleukin-1 receptor-like) 도메인을 가진 NBSLRR 유전자이다(Kang *et al.*, Annu. Rev. Phytopathol, 2005, vol.43, 581-621; Moffett, Advances in virus research, 2009, vol. 75, 1-33, 228-229).

[190] 따라서, *Pvr4* 유전자 역시 NBS-LRR 구조를 가졌을 것으로 추측하고, 이 영역에 위치한 NBLRR 유전자를 찾아본 결과 8개의 NBLRR 유전자가 존재하는 것으로 분석되었다. 이 영역의 8 개 *Pvr4* 저항성 후보유전자는 NBARC의 뉴클레오타이드 상동성 비교를 통해 두 개의 그룹으로 나누어지며 NBSLRR 유전자가 중복(duplication) 되어 있는 형태로 존재한다고 추정되었다. 저항성 유전자로서 기능하는데 필요한 구조를 모두 가지고 있는 NBSLRR 유전자는 끝이 네모난 화살표로 나타내었으며 4 개의 유전자가 완전한 구조를 가진 것으로 분석되었다. 또한 이 영역을 포함하고 있는 BAC을 선발하여 유전자들의 정보를 확인하였다. 빨강색으로 표시된 화살표는 *Pvr4* 유전자를 나타내고 있으며, *Pvr4* 유전자의 구조가 7 개의 엑손과 6 개의 인트론으로 이루어진 유전자임을 표시하였다(도 8). 이병성 대립유전자인 *pvr4* 유전자는 6개의 엑손과 5개의 인트론으로 이루어진 유전자임을 표시하였다(도 8).

[191]

[192] 실시예 10 : *Pvr4* 유전자의 염기 서열 및 구조적 특이성

[193] 상기의 실험을 통해 동정된 CM334에서 분리된 *Pvr4* 유전자는 coiled-coil nucleotide-binding site leucine-rich repeat (CC-NBS-LRR) 타입이며, 총 5238 개의 뉴클레오타이드 (nucleotide)의 ORF (open reading frame) 서열을 가지고 있으며 1745 개의 아미노산 서열을 포함한다는 것을 나타낸다. 포티바이러스에 대해 이병성을 나타내는 *C. annuum* cv. ECW 에서 *Pvr4* 유전자의 이병성 대립유전자로 동정된 *pvr4* 유전자는 4806 개의 뉴클레오타이드의 ORF 서열을 가지고 있으며 1601 개의 아미노산 서열을 포함한다는 것을 나타낸다(도 9a).

Pvr4 유전자와 *pvr4* 유전자의 폴리뉴클레오타이드 전체서열을 비교분석한 결과 95% 상동성을 나타내며, 이병성 대립유전자 *pvr4*는 432 개의 뉴클레오타이드가 결실된 것으로 나타났다. 도 9b 에서 *Pvr4* 유전자와 *pvr4* 유전자의 아미노산 전체서열을 비교분석한 결과, N-말단의 CC 도메인과 NBS 도메인은(1-600 아미노산 영역) 98% 이상의 상동성을 보였으나 아미노산 서열의 c-terminal 영역에서(GFKLQDDFFDGMSEL으로 시작되는 아미노산 서열부터 정지코돈의 영역의 1205개의 아미노산) 85% 이상의 서열 유사성을 나타냈다(도 12). 따라서, PepMoV에 대한 저항성이 *Pvr4* 유전자의 LRR 도메인에 의해 유도될 것이라는 추측을 할 수 있었다. 이것은 저항성 유전자의 LRR 도메인이 병원균의 이펙터(effector)를 인지함으로써 과민감성 반응이나 저항성을 매개한다는 기존의 보고를 재확인해 주는 결과이다(도 9a-9b).

[194]

[195] 실시예 11 : *Pvr4* 유전자의 genomic DNA 구조

[196] CM334의 스캐폴드와 BAC 라이브러리 스크리닝을 통해 인트론을 포함한 *Pvr4* 유전자의 전체 뉴클레오타이드 시퀀스를 확보할 수 있었다. *Pvr4* 유전자는 7 개의 엑손과 6 개의 인트론으로 이루어져 있으며 전체 13870 bp의 뉴클레오타이드를 가지는 큰 사이즈의 저항성 유전자이다(도 10a). CC-NBS를 포함하고 있는 엑손 1은 2673 bp의 뉴클레오타이드를 가지며, 마지막 엑손 2 개를 제외한 엑손 2부터 엑손 5의 4 개 엑손은 서로간의 상동성이 94%를 나타냈다(도 10b). 또한, 인트론 영역 역시 첫 인트론 1을 제외하고 인트론 2부터 인트론 5의 4 개 인트론은 서로간의 상동성이 99%를 나타냈다(도 10c). 엑손 2와 인트론 2가 하나의 반복단위로써 4번 순차 중복(tandem duplication)된 구조로 예측된다. 이러한 저항성 유전자의 구조는 현재까지 보고된 적이 없으며, 높은 상동성을 나타내는 반복성으로 인해 PCR을 통한 genomic DNA 분리는 기술적으로 불가능한 부분으로 여겨진다. 이러한 구조적 특이성으로 인해 *Pvr4* 유전자가 포티바이러스의 여러가지 바이러스에 대해서 광범위한 저항성을 유도하는 것으로 추정하고 있다(도 10a-10c).

[197]

[198] 실시예 12 : 포티바이러스에 대한 *Pvr4* 유전자의 저항성 테스트

[199] *Pvr4* 유전자가 포티바이러스의 NIB와 1:1로 동시에 과발현 시키는 경우뿐만 아니라 바이러스를 접종하는 경우에도 과민감성반응을 보이는지 확인하기 위하여, *N. benthamiana*에 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스, PepSMV와 PVY가 감염된 담배조직의 접종액을 3 ml/g 의 농도로 루빙(rubbing)시킨 후, 2 일이 지난 시기에 왼쪽에는 빈 벡터를 아그로박테리움을 이용하여 침윤시켰고, 오른쪽에는 *Pvr4* 유전자를 침윤시킴으로써 과발현시켰다. 루빙(rubbing)시키고 3 일이 지난 후에, SP6PepMoV-Vb1/GFP, PepSMV과 PVY이 각각 접종된 모든 잎의 *Pvr4* 유전자가 과발현된 오른쪽 영역에서 과민감성 반응이 유도된 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 *Pvr4* 유전자와 포티바이러스의 NIB를 *N. benthamiana*에서

동시에 과발현시켰을 때 유도된 과민감성 반응과 유사하였다. 바이러스 접종을 통해 유도된 과민감성 반응은 *Pvr4* 유전자에 의해 바이러스의 증식이 억제된 것을 의미하며, *Pvr4* 유전자가 *in vivo* 에서 SP6PepMoV-Vb1/GFP 바이러스, PepSMV 및 PVY에 대해 저항성을 나타냈음을 확인하였다(도 11).

[200]

[201] 실시예 13 : 포티바이러스에 대한 저항성을 나타내는 *Pvr4*와 이병성 대립유전자인 *pvr4*의 아미노산 서열의 차이

[202] CM334에서 유래한 포티바이러스 저항성 유전자 *Pvr4*가 암호화하는 아미노산 서열의 c-terminal에 위치한 1205개의 아미노산(서열번호 3의 아미노산 서열의 541~1745번째 서열에 해당함)과 ECW에서 유래한 이병성 대립형질인 *pvr4* 유전자가 암호화하는 아미노산 서열의 c-terminal에 위치한 1062개의 아미노산을 비교한 결과이다. NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 블라스트(Blast) 프로그램을 이용하여 *Pvr4* 아미노산과 *pvr4* 아미노산의 서열을 비교한 결과, 두 단백질의 유사도가 85%에 해당하는 것으로 분석되었다(도 12). 두 단백질의 아미노산 서열 차이는 포티바이러스에 대한 저항성을 기능하는데 중요한 아미노산 위치 및 서열을 정하는데 중요한 정보를 제공한다.

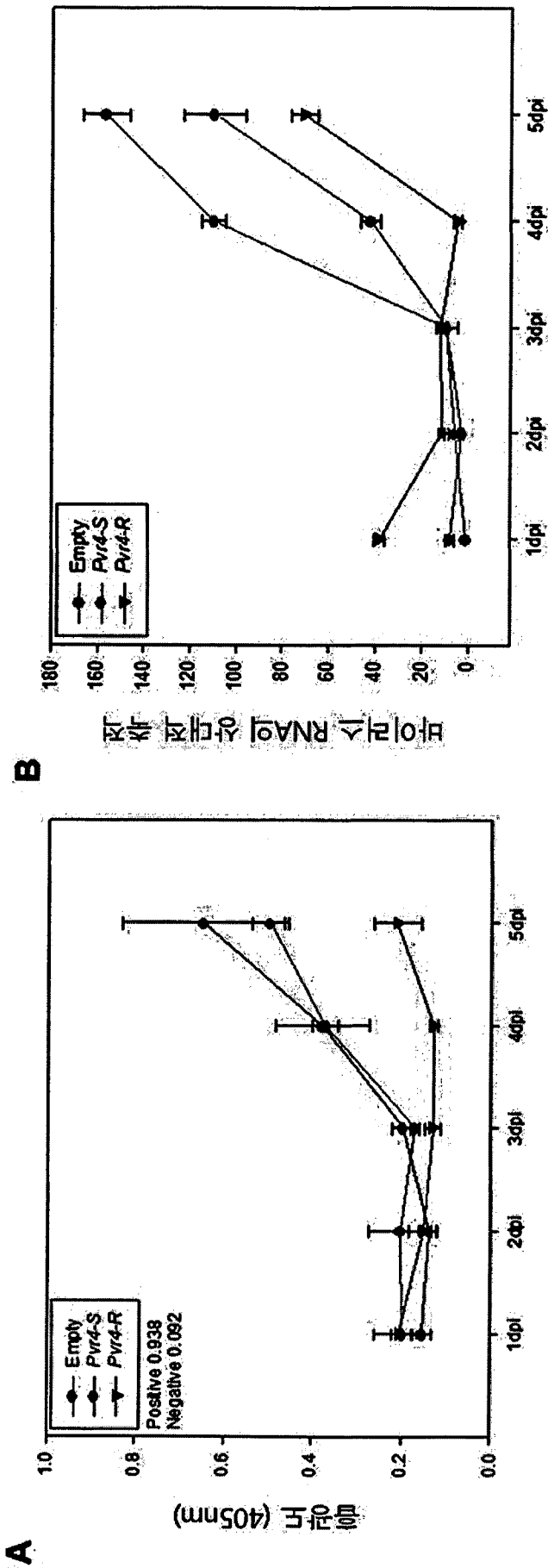
청구범위

- [청구항 1] 서열번호 3의 아미노산 서열; 또는 서열번호 3의 아미노산 서열의 541~1745번째 서열과 85% 이상의 서열 유사성을 가지며, 식물체의 포티바이러스(potyvirus)에 대한 저항성을 갖는 아미노산 서열;로 이루어진 포티바이러스 저항성 단백질 Pvr4.
- [청구항 2] 제1항의 포티바이러스 저항성 단백질 Pvr4를 코딩하는 유전자.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 유전자.
- [청구항 4] 제2항의 포티바이러스 저항성 단백질 Pvr4를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터.
- [청구항 5] 제4항의 포티바이러스 저항성 단백질 Pvr4를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포.
- [청구항 6] Pvr4 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 도입하여 형질전환시켜 형질전환 식물세포에서 Pvr4 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는 포티바이러스에 대한 이병성 식물체 또는 비형질전환 식물체에 비해 식물체의 포티바이러스에 대한 저항성을 증가시키는 방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 Pvr4 단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열; 또는 서열번호 3의 아미노산 서열의 541~1745번째 서열과 85% 이상의 서열 유사성을 가지며, 포티바이러스(potyvirus) 저항성을 갖는 아미노산 서열;로 이루어진 것을 특징으로 하는 식물체의 포티바이러스에 대한 저항성을 증가시키는 방법.
- [청구항 8] (a) 포티바이러스 저항성 단백질 Pvr4를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시키는 단계; 및
(b) 상기 단계(a)에 의하여 제조된 형질전환된 식물세포로부터 형질전환된 식물을 재분화시키는 단계를 포함하는 포티바이러스에 대한 이병성 식물체 또는 비형질전환 식물체에 비해 포티바이러스 저항성이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 Pvr4 단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열; 또는 서열번호 3의 아미노산 서열의 541~1745번째 서열과 85% 이상의 서열 유사성을 가지며, 포티바이러스(potyvirus) 저항성을 갖는 아미노산 서열;로 이루어진 것을 특징으로 하는 포티바이러스 저항성이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법.
- [청구항 10] 제8항의 방법에 의해 제조된 포티바이러스 저항성이 증가된 형질전환 식물체.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 식물체는 분류학적으로 포티바이러스에 의해 감염되는 숙주식물체(host)인 솔라나세아(Solanaceae), 케노포디아세아(

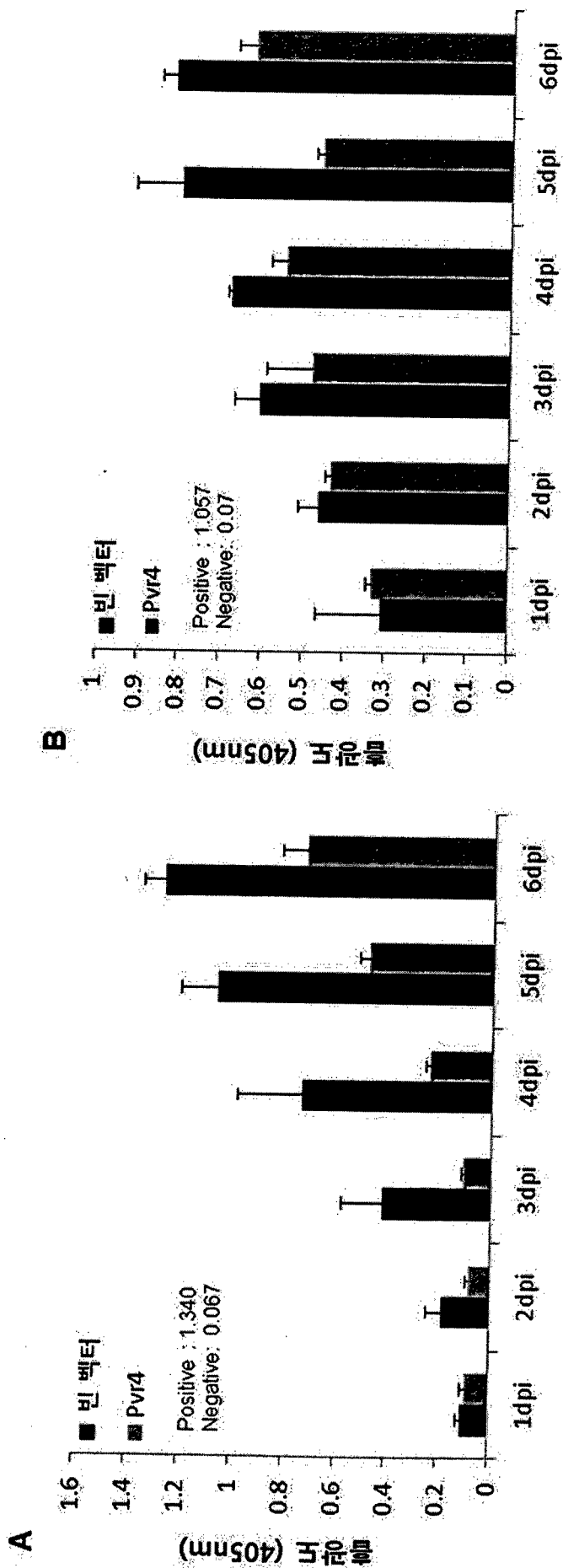
Chenopodiaceae), 레규미노세-파필리오노이데아(*Leguminosae-Papilionoideae*), 아마란타세아(*Amaranthaceae*),
 쿠쿠르비타세아(*Cucurbitaceae*), 컴포지테(*Compositae*), 크루시퍼레(*Cruciferae*), 그라미니에(*Gramineae*)인 것을 특징으로 하는 형질전환
 식물체.

- [청구항 12] 제10항에 따른 형질전환 식물체의 형질전환된 종자.
- [청구항 13] 서열번호 3의 아미노산 서열; 또는 서열번호 3의 아미노산 서열의
 541~1745번째 서열과 85% 이상의 서열 유사성을 가지며,
 포티바이러스(potyvirus) 저항성을 갖는 아미노산 서열;로 이루어진
 포티바이러스 저항성 단백질 Pvr4를 코딩하는 유전자를 포함하는
 식물체의 포티바이러스 저항성 증가용 조성물.
- [청구항 14] 서열번호 1 또는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열 중 10개 이상의 연속
 뉴클레오타이드 서열 또는 이에 상보적인 뉴클레오타이드 서열로
 이루어진 정방향 또는 역방향 프라이머(primer).
- [청구항 15] 서열번호 1 또는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열 중 10개 이상의 연속
 뉴클레오타이드 서열 또는 이에 상보적인 뉴클레오타이드 서열로
 이루어진 프로브(probe).
- [청구항 16] 제14항의 프라이머 또는 제15항의 프로브를 포함하는 포티바이러스
 저항성 Pvr4 유전자 검출용 키트.
- [청구항 17] 제1항의 포티바이러스 저항성 Pvr4 단백질에 대한 항체.

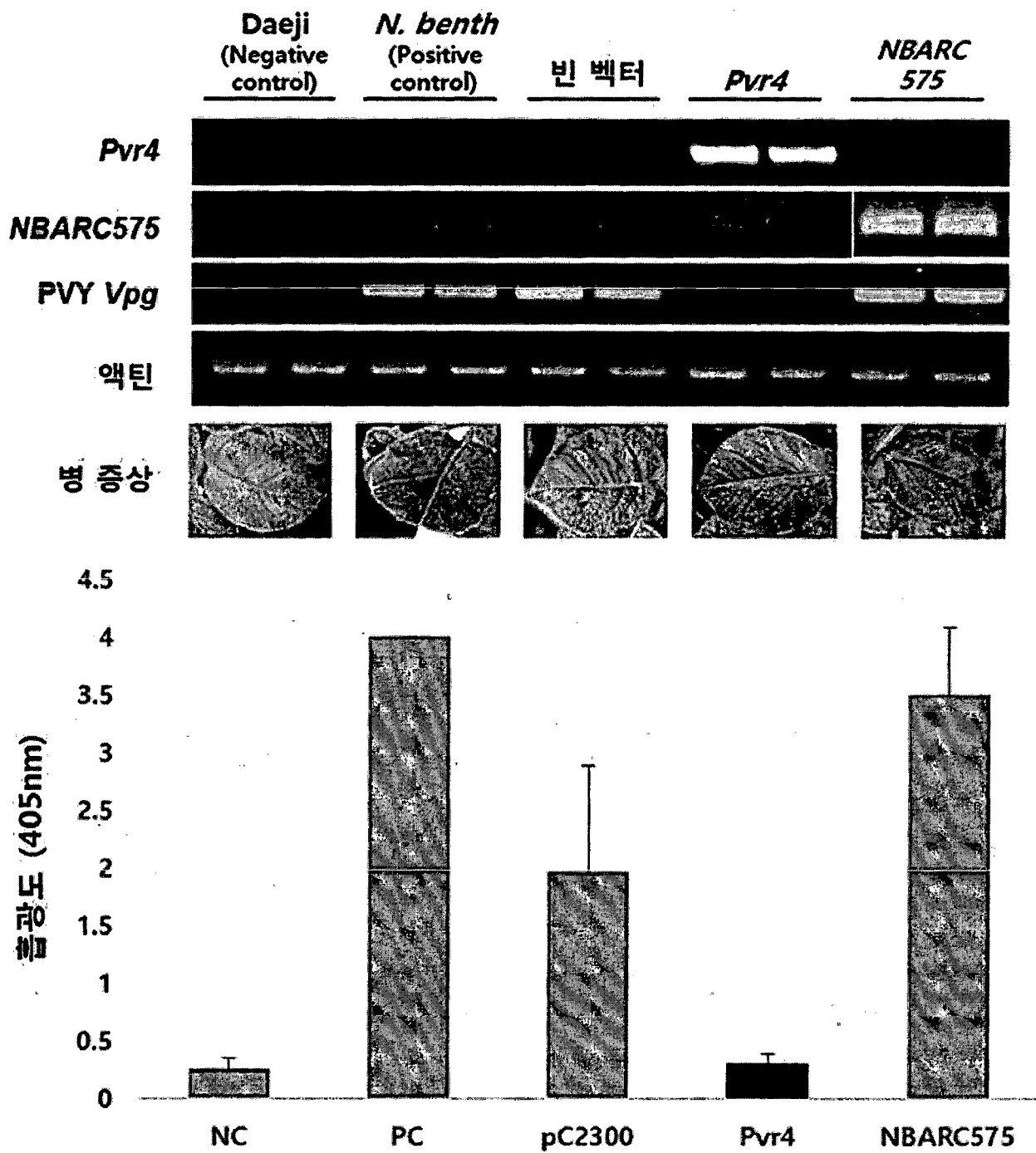
[Fig. 1]



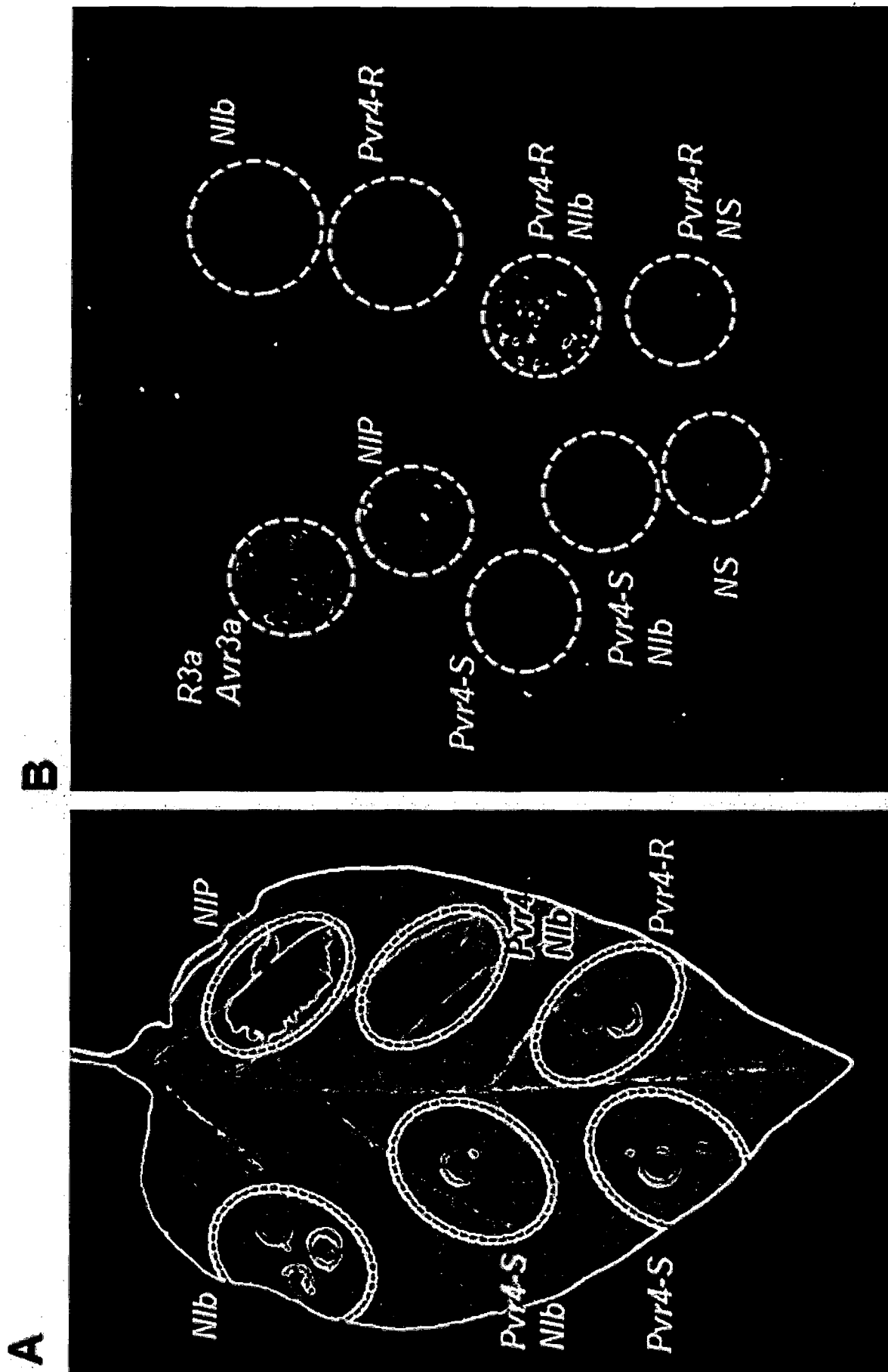
[Fig. 2]



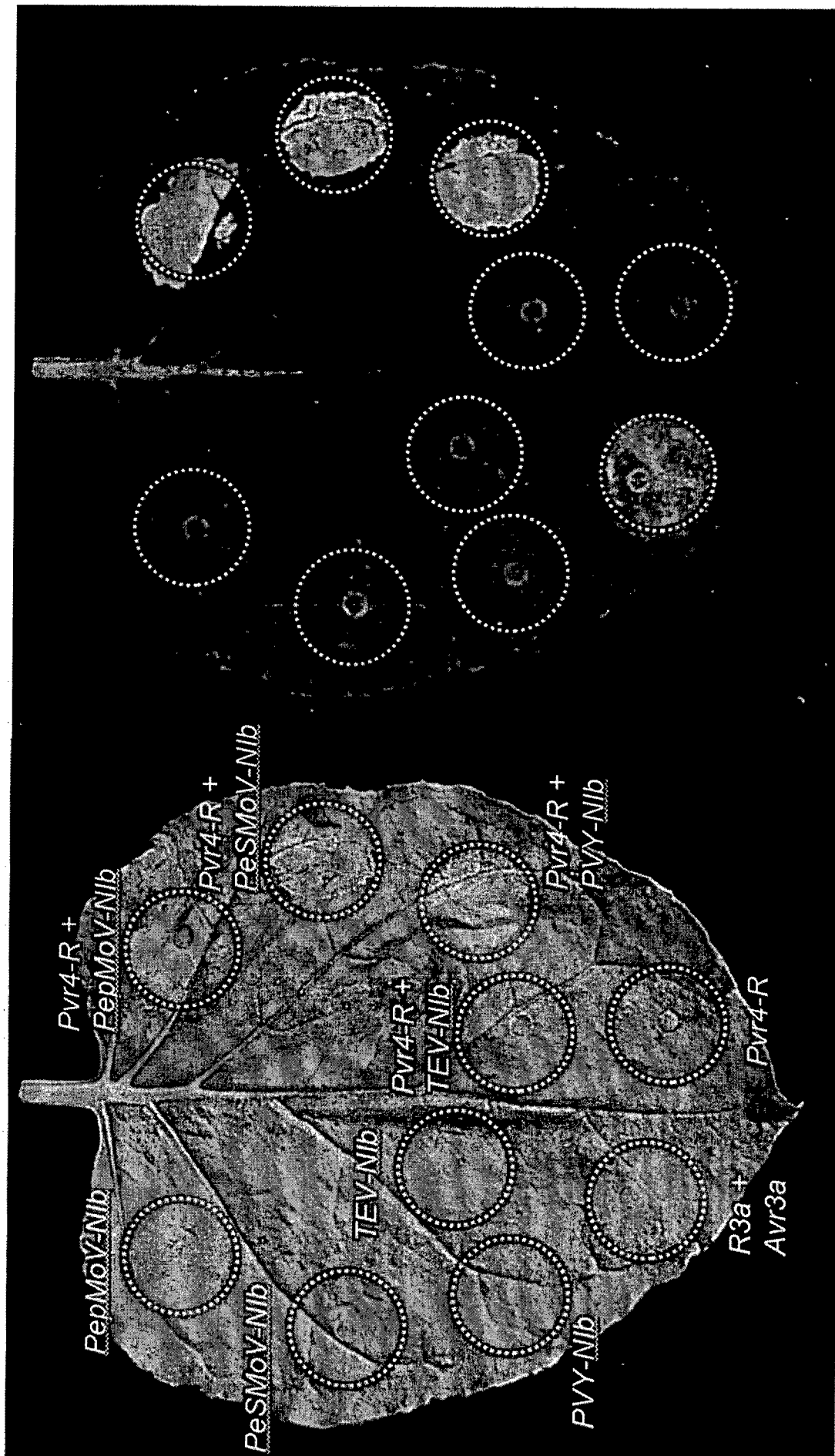
[Fig. 3]



[Fig. 4]

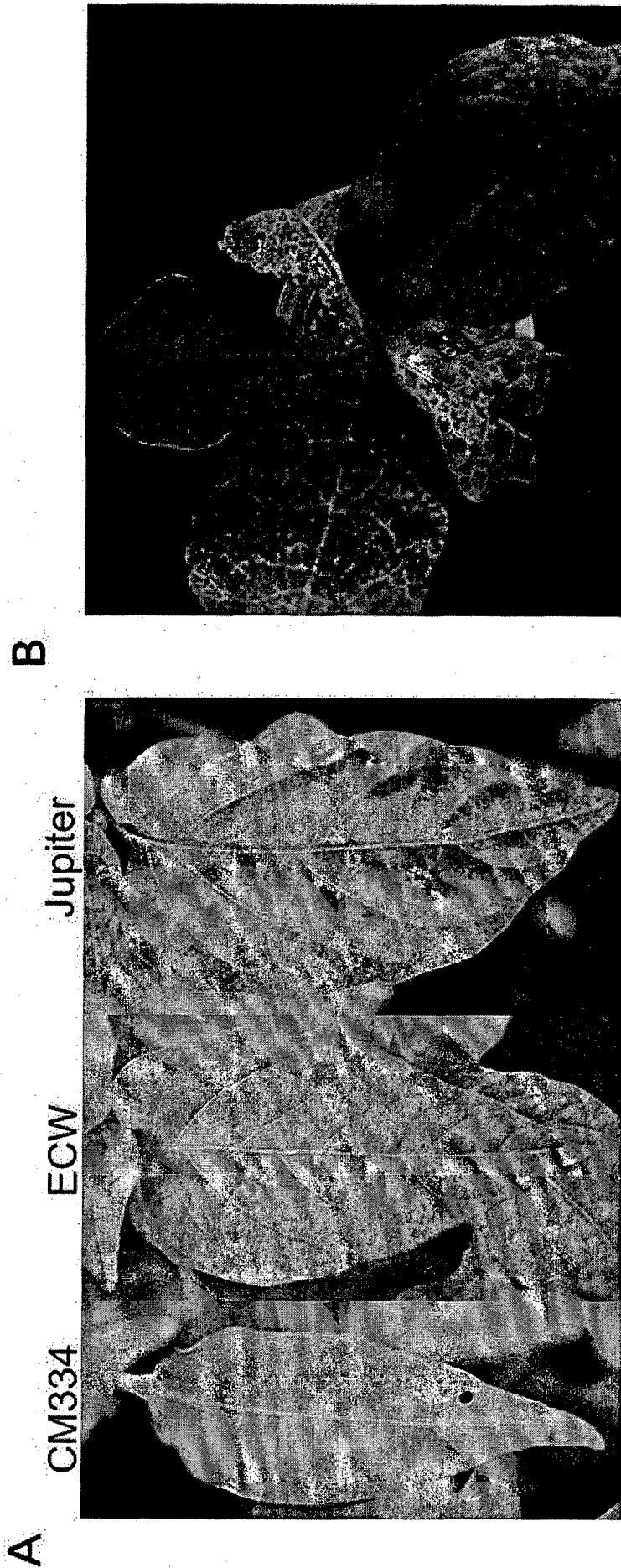


[Fig. 5]

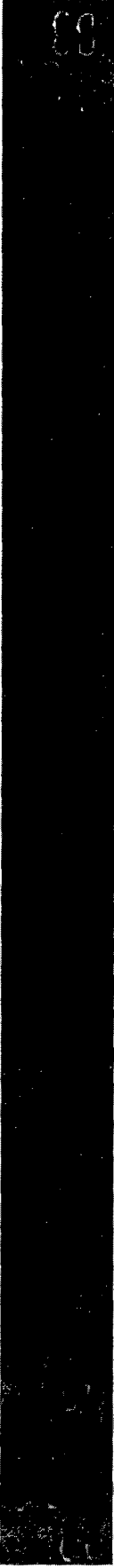


RECTIFIED SHEET (RULE 91) ISA/KR

[Fig. 6]

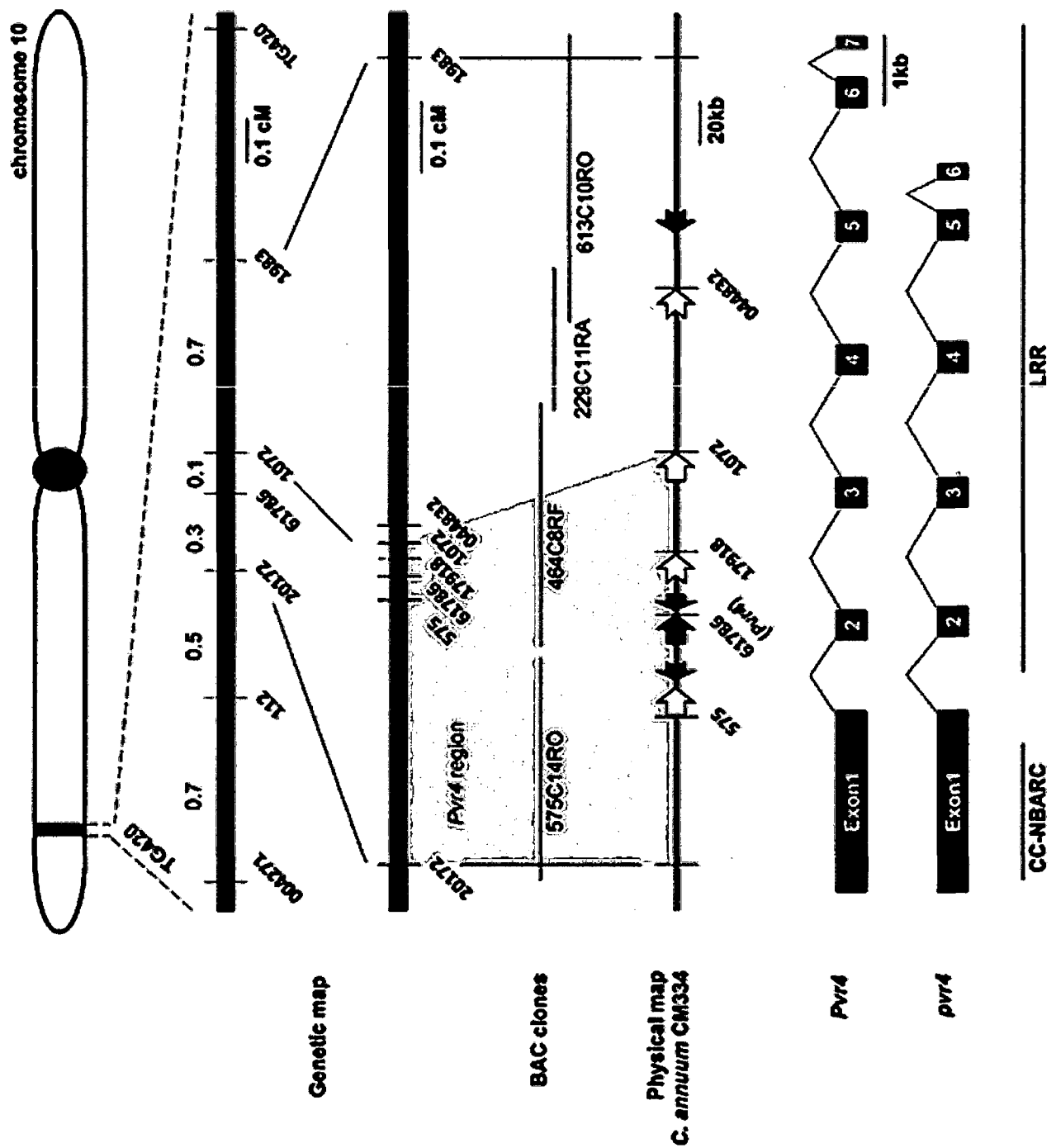


[Fig. 7]

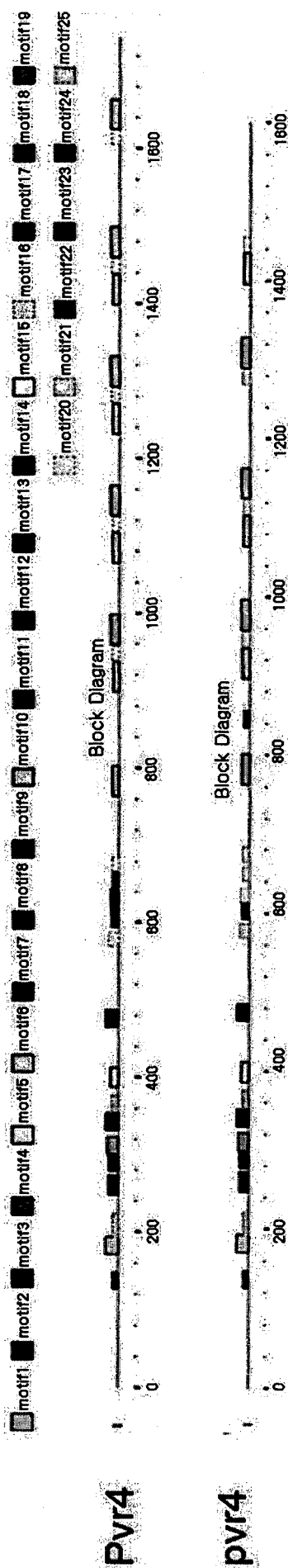


BC1F3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Phe*	S	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	H	S	S	R	R	R	R	S
Gen*	S	H	R	S	H	H	H	S	R	S	S	H	R	R	S	H	H	S	H	H	R	S	R	H	H	S	R	H	H	H	H	S

[Fig. 8]



[Fig. 9a]

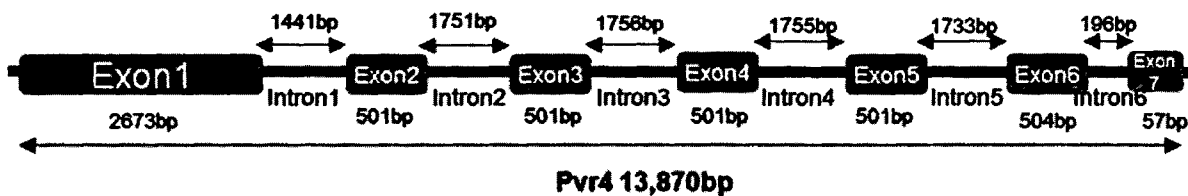


[Fig. 9b]

Query : Pvr4
Subject: pvr4_ECW

Query	1	MEVTAILSPVABEHLIPVARDIGLFIYRNIRISLEBKKLEIGIRSGVIRKQAEHR	80
Subject	1	MEVTILSVAEHLIPVARDIGLFIYRNIRISLEBKKLEIGIRSGVIRKQAEHR	59
Query	61	NLQWPHVEMHLOWMETTAEVALLRRRAEVEGFGYGNALCKSHLSKAKKLEO	120
Subject	60	NLQWPHVEMHLOWMETTAEVALLRRRAEVEGFGYGNALCKSHLSKAKKLEO	119
Query	121	AMIGLQDEGTRVAPSSAPLAVTVIHSDEFISKOKKEEEMTALQGGITTVIGIQMG	180
Subject	120	AMIGLQDEGTRVAPSSAPLAVTVIHSDEFISKOKKEEEMTALQGGITTVIGIQMG	179
Query	181	VKTTLAEKVAPAKOERLFDYWWLTISDQDPDKKIOREIAEGVLSLEGDLLEGO	240
Subject	180	VKTTLAEKVAPAKOERLFDYWWLTISDQDPDKKIOREIAEGVLSLEGDLLEGO	239
Query	241	RLRSLLMOKDSRYLVILDOVKKVOLLKRGVIPSQSDRNWKKVILITRLRVCODMEAK	300
Subject	240	RLRSLLMOKDSRYLVILDOVKKVOLLKRGVIPSQSDRNWKKVILITRLRVCODMEAK	299
Query	301	KYHVEILCEHAILFRKAGSADLSLPDIAEAVAKEXGLPLAIVVAGALKGKTR	360
Subject	300	KYHVEILCEHAILFRKAGSADLSLPDIAEAVAKEXGLPLAIVVAGALKGKTR	359
Query	361	SHEDALLEKKAAPNIRGNLADWYPLKISNHLGSEADQAFLLCSLFEEDSNWITEE	420
Subject	360	SHEDALLEKKAAPNIRGNLADWYPLKISNHLGSEADQAFLLCSLFEEDSNWITEE	419
Query	421	LLRYGKLGIFSELLENLQWRRYSNLETLKQFLLSNPQGYWYGHVWMAIHIA	480
Subject	420	LLRYGKLGIFSELLENLQWRRYSNLETLKQFLLSNPQGYWYGHVWMAIHIA	479
Query	481	SEGNHIFLVSHWNSKEPPKOSYKOSYMSIVANKFDAPRRPISCPRLKLLMLKLFEE	540
Subject	480	SEGNHIFLVSHWNSKEPPKOSYKOSYMSIVANKFDAPRRPISCPRLKLLMLKLFEE	539
Query	541	GFQLQDDFFDGKSELVYIKSVDYRNSILPPSSIOELSNLSTLWLSLDDVYSIOEL	600
Subject	540	GFQLQDDFFDGKSELVYIKSVDYRNSILPPSSIOELSNLSTLWLSLDDVYSIOEL	599
Query	601	VTEILSIRSDQLDELPEIGLANLAEVNTGYNRRISPGVLSLVEELHANG	660
Subject	600	VTEILSIRSDQLDELPEIGLANLAEVNTGYNRRISPGVLSLVEELHANG	659
Query	661	VEDCSTLRELLESRLTALTLGGSDVYVSNLGLSSQTRVALKGRWYTFSPOT	720
Subject	660	VEDCSTLRELLESRLTALTLGGSDVYVSNLGLSSQTRVALKGRWYTFSPOT	719
Query	721	YKAYLQWTKGTHLQWIRLLRNQCYSSSSQSNWVFELOKQDLSPQDSNIH	780
Subject	720	YKAYLQWTKGTHLQWIRLLRNQCYSSSSQSNWVFELOKQDLSPQDSNIH	779
Query	781	CXNNIPFKLERKNGDCHLRLFCVSLADPDEGTSRTHIRPOVIKFPALVYLEGL	840
Subject	780	CXNNIPFKLERKNGDCHLRLFCVSLADPDEGTSRTHIRPOVIKFPALVYLEGL	839
Query	841	KQTHFFSDTVEGIEPLRLKQFWSLQKQFNFRWNAITDSNPLFKYKSPNLELL	900
Subject	840	KQTHFFSDTVEGIEPLRLKQFWSLQKQFNFRWNAITDSNPLFKYKSPNLELL	899
Query	901	RLQANSJLALCSHOLPTAFVSKLVLMRLRQGLPALMSPSVARGLINLRILLEDES	960
Subject	900	RLQANSJLALCSHOLPTAFVSKLVLMRLRQGLPALMSPSVARGLINLRILLEDES	959
Query	961	MEVVIITEEDQDEIMKNEPLFPQLEELGLNPLRFFILTKQALEPFLREVQIRNP	1020
Subject	960	MEVVIITEEDQDEIMKNEPLFPQLEELGLNPLRFFILTKQALEPFLREVQIRNP	1019
Query	1021	ETKIFVQDSYSTSSLSKSWANDELKWLKNAFNKYSQPNLEMLRYKANSISALCS	1080
Subject	1020	ETKIFVQDSYSTSSLSKSWANDELKWLKNAFNKYSQPNLEMLRYKANSISALCS	1079
Query	1081	HOLPTAFVSKLELGNGCKLRHLMSPSVARGLINLRWIGECSMEEVITEEDQDE	1140
Subject	1080	HOLPTAFVSKLELGNGCKLRHLMSPSVARGLINLRWIGECSMEEVITEEDQDE	1139
Query	1141	EIMKNEPLFPQLEELGLNPLRFFILTKQALEPFLREVQIRNP	1200
Subject	1140	EIMKNEPLFPQLEELGLNPLRFFILTKQALEPFLREVQIRNP	1199
Query	1201	SSLSKSWANDELKWLKNAFNKYSQPNLEMLRYKANSISALCSHOLPTAFVSKLE	1260
Subject	1200	SSLSKSWANDELKWLKNAFNKYSQPNLEMLRYKANSISALCSHOLPTAFVSKLE	1257
Query	1261	LGWNGCKLRHLMSPSVARGLINLRWIGECSMEEVITEEDQDEIMKNEPLFPQLE	1320
Subject	1258	LGWNGCKLRHLMSPSVARGLINLRWIGECSMEEVITEEDQDEIMKNEPLFPQLE	1317
Query	1321	ELGLNPLRFFILTKQALEPFLREVQIRNP	1380
Subject	1318	ELGLNPLRFFILTKQALEPFLREVQIRNP	1377
Query	1381	WOLNKAFNKYSQPNLEMLRYKANSISALCSHOLPTAFVSKLELGWNGCKLRHLM	1440
Subject	1378	WOLNKAFNKYSQPNLEMLRYKANSISALCSHOLPTAFVSKLELGWNGCKLRHLM	1437
Query	1441	SPSVARGLINLRWIGECSMEEVITEEDQDEIMKNEPLFPQLEELGLNPLRFF	1500
Subject	1438	SPSVARGLINLRWIGECSMEEVITEEDQDEIMKNEPLFPQLEELGLNPLRFF	1497
Query	1501	ILTKQALEPFLREVQIRNP	1553
Subject	1498	ILTKQALEPFLREVQIRNP	1550

[Fig. 10a]

Pvr4 지노믹 DNA 영역

[Fig. 10b]

Exon align

```

Exon5 CTTGTCCCAACCTGGAAGTGCTACTACTCTATAAGGCTAACAGCATAAGTGCTCTATGCT 60
Exon6 CTTGTCCCAACCTGGAAGCTATATATCTATTTCG-----ACATAACTGCTCTATACT 54
Exon4 CTTGTCCCAACCTGGAAGTGCTACTACTCTATAAGGCTAACAGCATAAGTGCTCTATGCT 60
Exon2 CTTGTCCCAACCTGGAATTGCTACGACTCTGTGAGGCCAACAGCTTAAGTGCTCTATGCT 60
Exon3 CTTGTCCCAACCTGGAAGTGCTACGACTCTATAAGGCTAACAGCATAAGTGCTCTATGCT 60
*****

CTCACCAACTTCCAACCTGCCTACTTCAGCAAACCTTAAGGAACTAGGAGTATGGAATTGTG 120
CTCACCAACTTCCAACCTACCTACTTCAGCAAACCTTGGGACATTGAAAGTAGAAAATTGTG 114
CTCACCAACTTCCAACCTGCCTACTTCAGCAAACCTTAAGGAACTAGGAGTAGGGAATTGTG 120
CTCACCAACTTCCAACCTGCCTACTTCAGCAAACCTTGTAAOCTTGAATGTACTTAGGTGTG 120
CTCACCAACTTCCAACCTGCCTACTTCAGCAAACCTTAAGGAACTAGGAGTAGGGAATTGTG 120
*****

GAAAATTGAGACACTTGATGTCTCCATCAGTGGCCAGAGGTCTTCTGAATCTCCGAAAAC 180
GAAAATTGAGACACTTGATATCTCCATCAGTGGCCAGAGGTCTTCTGAATCTCCGAAAAC 174
GAAAATTGAGACACTTGATGTCTCCATCAGTGGCCAGAGGTCTTCTGAATCTCCGAAAAC 180
GAAACTGAGAACTTGATGTCTCCATCAGTGGCCAGAGGTCTTCTGAATCTCCGAATAT 180
GAAAATTGAGACACTTGATGTCTCCATCAGTGGCCAGAGGTCTTCTGAATCTCCGAAAAC 180
*****

TATGGATACGAGAATGCCAATCAATGGAAGAAGTGATCACAGAAGAGGAACAACAAGGAG 240
TACGGATAGGAGAATGCCAATCAATGGAAGAAGTGATCACAGAAGAGGAACAACAAGGAG 234
TATGGATAGGAGAATGCCAATCAATGGAAGAAGTGATCACAGAAGAGGAACAACAAGGAG 240
TACTATTAGAAGACTGTGAATCAATGGAAGAAGTGATCACAGAAGAGGAACAACAAGGAG 240
TATGGATAGGAGAATGCCAATCAATGGAAGAAGTGATCACAGAAGAGGAACAACAAGGAG 240
*****

ATGAAATCATGTGTAATGAACCCCTTATTTCCCAATTGGAAGAGCTGGGACTTGAAAATC 300
ATGAAATCATGTGTAATGAACCCCTTATTTCCCAATTGGAAGAGCTGAACTTGAAAATC 294
ATGAAATCATGTGTAATGAACCCCTTATTTCCCAATTGGAAGAGCTGGGACTTGAAAATC 300
ATGAAATCATGTGTAATGAACCCCTTATTTCCCAATTGGAAGAGCTGGGACTTGAAAATC 300
ATGAAATCATGTGTAATGAACCCCTTATTTCCCAATTGGAAGAGCTGGGACTTGAAAATC 300
*****

TGCCAAATCTGAGGCATTTTCAATTTGACAAAGCAAGCTCTTGAATTTCCATTCTCAGAG 360
TGCCAAAGCTGAGGCATTTTCAATTTGACGAAGCAAGCTCTTGAATTTCCATTCTCAGAG 354
TGCCAAATCTGAGGCATTTTCAATTTGACAAAGCAAGCTCTTGAATTTCCATTCTCAGAG 360
TGCCAAATCTGAGGCATTTTCAATTTGACAAAGCAAGCTCTTGAATTTCCATTCTCAGAG 360
TGCCAAATCTGAGGCATTTTCAATTTGACAAAGCAAGCTCTTGAATTTCCATTCTCAGAG 360
*****

AAGTGCTGATTGTAAGTGCCTGAAACGAAGATATTTGTCCAACAGAGATCTGTCAGTA 420
TAGTGGTGAATGTAAGTGCCTGAAATGAAGATATTTGTCCAACATGGAATGTCAGTA 414
AAGTGCTGATTGTAAGTGCCTGAAACGAAGATATTTGTCCAACAGAGATCTGTCAGTA 420
AAGTGCAGATTGTAAGTGCCTGAAACGAAGATATTTGTCCAACAGAGATCTGTCAGTA 420
AAGTGCTGATTGTAAGTGCCTGAAACGAAGATATTTGTCCAACAGAGATCTGTCAGTA 420
*****

CATCAAGTCTCAAAAGTGTGAACAATGATGATGAGTTGAAAGTTGTTGATCTCAACAAAG 480
CACCAAGTCTGAAATTGTGAACGATGATGATGAGTTAAAAGTAGATGATTTGAACGAAT 474
CATCAAGTCTCAAAAGTGTGAACAATGATGATGAGTTGAAAGTTGTTGATCTCAACAAAG 480
CATCAAGTCTCAAAAGTGTGAACAATGATGATGAGTTGAAAGTTGTTGATCTCAACAAAG 480
CATCAAGTCTCAAAAGTGTGAACAATGATGATGAGTTGAAAGTTGTTGATCTCAACAAAG 480
*****

```

[Fig. 10c]

Intron
align

```

Intron2  TTTGTCTTGTGCCGCTTTATAACTAAATGATATACATATTTGAGTAATGCACTAACAGAT 60
Intron5  TTTGTCTTGTGCCGCTTTATAACTAAATGATATACATATTTGAGTAATGCACTAACAGAT 60
Intron3  TTTGTCTTGTGCCGCTTTATAACTAAATGATATACATATTTGAGTAATGCACTAACAGAT 60
Intron4  TTTGTCTTGTGCCGCTTTATAACTAAATGATATACATATTTGAGTAATGCACTAACAGAT 60
*****

CCCTCGTCTATTTCTCTCTTTCTGGTTTAAAGAAATGGTGCTTATGAAAAATGCCACATAA 120
CCCTCGTCTATTTCTCTCTTTCTGGTTTAAAGAAATGGTGCTTATGAAAAATGCCACATAA 120
CCCTCGTCTATTTCTCTCTTTCTGGTTTAAAGAAATGGTGCTTATGAAAAATGCCACATAA 120
CCCTCGTCTATTTCTCTCTTTCTGGTTTAAAGAAATGGTGCTTATGAAAAATGCCACATAA 120
*****

GCAGACCATCTTGTGTTGATTGCTTGTTCATTTGCTTGTATGACAAAATTTTGAGAAITTC 180
GCAGACCATCTTGTGTTGATTGCTTGTTCATTTGCTTGTATGACAAAATTTTGAGAAITTC 180
GCAGACCATCTTGTGTTGATTGCTTGTTCATTTGCTTGTATGACAAAATTTTGAGAAITTC 180
GCAGACCATCTTGTGTTGATTGCTTGTTCATTTGCTTGTATGACAAAATTTTGAGAAITTC 180
*****

CTAACCCAAATTCAAGAATTAAACACACCCACACTAAATAAACCACAGACCAATACAAAG 240
CTAACCCAAATTCAAGAATTAAACACACCCACACTAAATAAACCACAGACCAATACAAAG 240
CTAACCCAAATTCAAGAATTAAACACACCCACACTAAATAAACCACAGACCAATACAAAG 240
CTAACCCAAATTCAAGAATTAAACACACCCACACTAAATAAACCACAGACCAATACAAAG 240
*****

CAAGCCAAAGATTTCTAGACTGAAACCATGCTATTCAGCCATTTTATGTTCAITTAGTC 300
CAAGCCAAAGATTTCTAGACTGAAACCATGCTATTCAGCCATTTTATGTTCAITTAGTC 300
CAAGCCAAAGATTTCTAGACTGAAACCATGCTATTCAGCCATTTTATGTTCAITTAGTC 300
CAAGCCAAAGATTTCTAGACTGAAACCATGCTATTCAGCCATTTTATGTTCAITTAGTC 300
*****

AAACATAGGAATGTTTTAAGTATTAGACATAGATCGGGGATGAAAGTAATATCAGCCCCC 360
AAACATAGGAATGTTTTAAGTATTAGACATAGATCGGGGATGAAAGTAATATCAGCCCCC 360
AAACATAGGAATGTTTTAAGTATTAGACATAGATCGGGGATGAAAGTAATATCAGCCCCC 360
AAACATAGGAATGTTTTAAGTATTAGACATAGATCGGGGATGAAAGTAATATCAGCCCCC 360
*****

AAGTTTGGGATTGTTTACACCAGTTCAATCTAATTGTAATAGTAATCTTCATGTAGTTAT 420
AAGTTTGGGATTGTTTACACCAGTTCAATCTAATTGTAATAGTAATCTTCATGTAGTTAT 420
AAGTTTGGGATTGTTTACACCAGTTCAATCTAATTGTAATAGTAATCTTCATGTAGTTAT 420
AAGTTTGGGATTGTTTACACCAGTTCAATCTAATTGTAATAGTAATCTTCATGTAGTTAT 420
*****

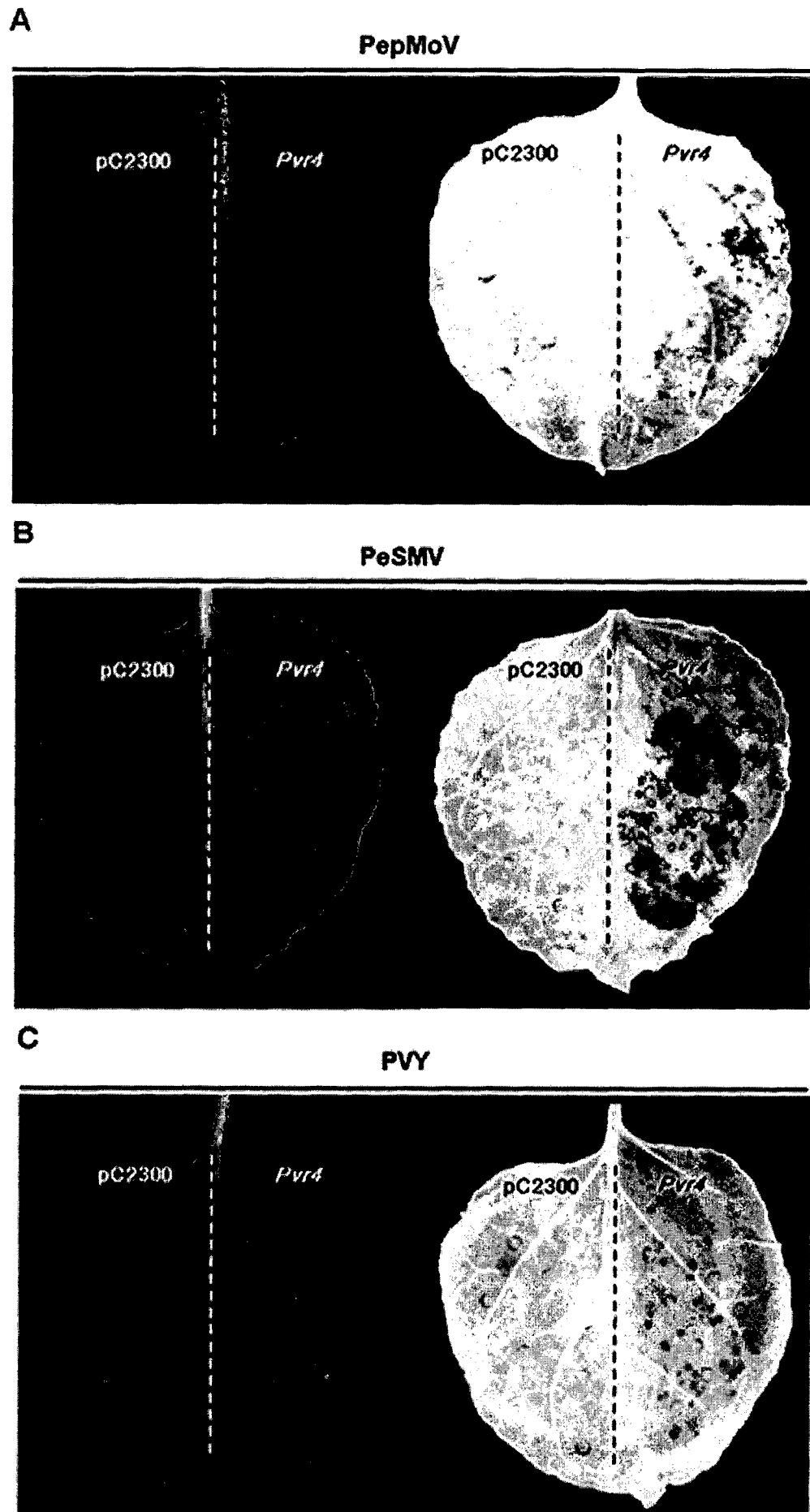
TTTTTGTITGTACCTGATACCTATGTTGATGGAGGTAACAAACATTGGTGAATCTACAA 480
TTTTTGTITGTACCTGATACCTATGTTGATGGAGGTAACAAACATTGGTGAATCTACAA 480
TTTTTGTITGTACCTGATACCTATGTTGATGGAGGTAACAAACATTGGTGAATCTACAA 480
TTTTTGTITGTACCTGATACCTATGTTGATGGAGGTAACAAACATTGGTGAATCTACAA 480
*****

TATTATAATCCAAGGGTTCATGTGAACCCAAATAACTTTTTTCAITGACTTTTTATTGT 540
TATTATAATCCAAGGGTTCATGTGAACCCAAATAACTTTTTTCAITGACTTTTTATTGT 540
TATTATAATCCAAGGGTTCATGTGAACCCAAATAACTTTTTTCAITGACTTTTTATTGT 540
TATTATAATCCAAGGGTTCATGTGAACCCAAATAACTTTTTTCAITGACTTTTTATTGT 540
*****

ATTAATAATATCTAGAGATTTCTTGAGGTCATTGAAGATTTCGATAAATTCAGATTTTA 600
ATTAATAATATCTAGAGATTTCTTGAGGTCATTGAAGATTTCGATAAATTCAGATTTTA 600
ATTAATAATATCTAGAGATTTCTTGAGGTCATTGAAGATTTCGATAAATTCAGATTTTA 600
ATTAATAATATCTAGAGATTTCTTGAGGTCATTGAAGATTTCGATAAATTCAGATTTTA 600
*****

```

[Fig. 11]



[Fig. 12a]

Query : Pvr4+ from *C. annuum* CM334 (1205 amino acids)Sbjct : pvr4- from *C. annuum* ECW (1062 amino acids)

Score	Expect Method	Identities	Positives	Gaps
1658 bits(4294) 0.0 Compositional matrix adjust. 859/1013(85%) 904/1013(89%) 2/1013(0%)				
Query 1	GFKLQDDFFDGMSELSV IKLSGYDRNS I LFPFPSS I QRLSNLSTLWLSNLR LDDVSI I GEL	60		
Sbjct 1	GFKLQDDFFDGMSELSV IKLSGYDRNS I LFPFPSS I QRLSNLSTLWLSNLR LDDVSI I GEL	60		
Query 61	VTLEILSIRSGSDLQELPVEI GNLANLTMLEYWNTGYRNMRI SPGVLSRLVRLEELHVMG	120		
Sbjct 61	VTLEILSIR S L+ELPVEI NL NL +LEYWN RMRISPGVLSRLVRLEELH+VG	120		
Query 121	VEDCSYSTLRELESLSRLTALTLDGCSKDV I YSNLGLSSKLTRYALKMGRHYTFTSFMQT	180		
Sbjct 121	VEDCSYSTLRELESLSRLTALTLDGCSKDV I YSNLGLSSKLTRYALK+GR Y +TS +T	180		
Query 181	YNKAIYLDVTKGTPLGDWIRLLLLRNSCEVSSSGKGSKNVVFELQNVKDLRLSFCDSLNIH	240		
Sbjct 181	YHK I L+VT+ T LGDWIRLLLLR SE V S GKGSKNV ELQNVK L LS CDSLNIH	240		
Query 241	CQNNIPFPKLERLKVNGCDHLRHLFCVSLACPDEGTSRRTHIRPDV IKFPNLYYLELGFL	300		
Sbjct 241	CQNNIPFPKLERLKVNGCDHLRHLFCVSLACPDEGTSRRTHIRPDV IKFPNL+ L+L L	300		
Query 301	KCFTHFFSDTVEGIEFPLLRKMHFWSLQKFQNFWPVNNAITDSNPLFNEKVSCPNELEL	360		
Sbjct 301	+CFTHF SD VEGIEFPLLR+MHF L +FQNFWP NNAITDSNPLFNEKVSCPNE+L	360		
Query 361	RLCEANSLTALCSHQLPTAYFSKLVTNLVLRGCKLRNLMSPSVARGLLNLRILLLEDCE	420		
Sbjct 361	L EANS++ALCSHQLPTAYFSKL L V C KLR+LMSPSVARGLLNLR L + +C+S	420		
Query 421	MEEVITEEQQGD EIMCNEPLFPQLEELGLENLPNLRHFILTKQALEFPFLREVQIRNCP	480		
Sbjct 421	MEEVITEEQQGD EIMCNEPLFPQLEEL L+NLNLRHFILTKQALEFPFL EV RNCP	480		
Query 481	ETKIFVQQRSVSTSSLKSVNNDDELKVVDLNKAMFNSKVSCPNEVLRLYKANSISALCS	540		
Sbjct 481	E K+FVQQRSVSTSSLKSVNNDDELKVVDLNKAMFNSKVSCPNEVL L +ANSISAL S	540		
Query 541	HQLPTAYFSKLKELGVGNCGLRHLMSPSVARGLLNLRKLWIECQSMEEVITEEQQGD	600		
Sbjct 541	HQLPTAYFSKLKEL VGNCGLRHLMSPSVARGLLNLR+LWI ECQSMEEVITEEQQGD	600		

[Fig. 12b]

Query	601	EIMCNEPLFPQLEELGLENLPNLRHFILTKQALEFPFLREVLIRNCPETKIFVQQRSVST	660
		EIMCNEPLFPQLEEL L+NLPNLRHFILTKQALEFPFL EV IRNCP E K+ VQQRSVST	
Sbjct	601	EIMCNEPLFPQLEELQNLNLPNLRHFILTKQALEFPFLIEVKIRNCPENKMLVQQRSVST	660
Query	661	SSLKSVNNDDELKVVDLNKAMFNSKVSCPNEVLLLYKANSISALCSHQLPTAYFSKLKE	720
		SSLKSVNNDDELKVVDLNKAMFNSKVSCP+LE L +Y + I+AL SHQLPTAYFSKLKE	
Sbjct	661	SSLKSVNNDDELKVVDLNKAMFNSKVSCPDEKLYIY—SDITALYSHQLPTAYFSKLKE	718
Query	721	LGVNCGKLRHLMSPSVARGLLNLRKLWIRECQSMEEVITEEEQQGDEIMCNEPLFPQLE	780
		LGV NCGKLRHLMSP+VAR LLNLRKL IR C+SMEEVITEEEQQGDEIMCNE LFP+L	
Sbjct	719	LGVNCGKLRHLMSP TVARCLLNLRKLKIRVCESMEEVITEEEQQGDEIMCNESLFPRL	778
Query	781	ELGLENLPNLRHFILTKQALEFPFLREVLIRNCPETKIFVQQRSVSTSSLKSVNNDDELK	840
		EL LENLP LRHFILTKQALEFPFL EV IRNCP E K+ VQQRSVSTSSLKSVNNDDELK	
Sbjct	779	ELKLENLPKLRHFILTKQALEFPFLIEVKIRNCPENKMLVQQRSVSTSSLKSVNNDDELK	838
Query	841	VVDLNKAMFNSKVSCPNEVLLLYKANSISALCSHQLPTAYFSKLKELGVNCGKLRHLM	900
		VVDLNKAMFNSKVSCPNE L + ANS+S+L SHQLPT YFSKL+ LGV NCGKLRHLM	
Sbjct	839	VVDLNKAMFNSKVSCPNEKLSIEMANSVSSLFSHQLPTTYFSKLET LGVENCGKLRHLM	898
Query	901	SPSVARGLLNLRKLWIRECQSMEEVITEEEQQGDEIMCNEPLFPQLEELGLENLPNLRHF	960
		SPSVARGLLNLRKLWI ECQSMEEVITEEEQ+G+E M NEPLFP LEEL L+ LP L HF	
Sbjct	899	SPSVARGLLNLRKLWIGECQSMEEVITEEEQEGEENMTNEPLFPWLEELILDOKLPKLGHF	958
Query	961	ILTKQALEFPFLREVLIRNCPETKIFVQQRSVSTSSLKSVNNDDELKVVDLNK	1013
		LTK+ALEFPFLR V IR CPE KIFVQQ SVST LK VNNDDE+KV DLN+	
Sbjct	959	FLTKRALEFPFLRGVKIRKCPENKIFVQQGSVSTPRKIVNNDDEVKVVDLNE	1011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/005133

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/415(2006.01)i, C12N 15/29(2006.01)i, C12N 15/82(2006.01)i, A01H 5/00(2006.01)i, C07K 16/16(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/415; C12N 15/11; C12Q 1/68; C12N 15/29; C12N 15/82; A01H 5/00; C07K 16/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: potyvirus, Pvr9, Capsicum annuum, virus resistance, plant transformation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NCBI, GenBank accession no. KJ868371.1 (23 March 2015) See the entire document.	14,15
A		1-13,16-17
A	KIM et al., "RNA-Dependent RNA Polymerase (NIb) of the Potyviruses is An Avirulence Factor for the Broad-Spectrum Resistance Gene Pvr4 in Capsicum Annuum cv. CM334", Plos One, vol. 10, no. 3, paper no. e0119639, inner pages 1-11 (11 March 2015) See abstract; and pages 2, 3.	1-17
A	DEVTRAN et al., "Development of Molecular Markers Tightly Linked to Pvr4 Gene in Pepper Using Next-Generation Sequencing", Molecular Breeding, vol. 35, paper no. 101, inner pages 1-9 (Published Online 17 March 2015) See the entire document.	1-17
A	NCBI, GenBank accession no. AJW77762.1 (25 March 2015) See the entire document.	1-17
A	KR 10-2013-0138000 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 18 December 2013 See the entire document.	1-17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 SEPTEMBER 2015 (17.09.2015)

Date of mailing of the international search report

17 SEPTEMBER 2015 (17.09.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/005133

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0138000 A	18/12/2013	KR 10-1354041 B1	23/01/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 14/415(2006.01)i, C12N 15/29(2006.01)i, C12N 15/82(2006.01)i, A01H 5/00(2006.01)i, C07K 16/16(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 14/415; C12N 15/11; C12Q 1/68; C12N 15/29; C12N 15/82; A01H 5/00; C07K 16/16

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 포티바이러스, Pvr9, Capsicum annuum, 바이러스 저항성, 식물 형질전환

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	NCBI, GenBank accession no. KI868371.1 (2015.03.23) 전체 문헌 참조.	14,15
A		1-13,16-17
A	KIM 등, 'RNA-dependent RNA polymerase (N1b) of the potyviruses is an avirulence factor for the broad-spectrum resistance gene Pvr4 in Capsicum annuum cv. CM334' Plos One, 10권, 3호, 논문번호 e0119639, 내부 페이지 1-11 (2015.03.11) 요약; 및 페이지 2, 3 참조.	1-17
A	DEVTRAN 등, 'Development of molecular markers tightly linked to Pvr4 gene in pepper using next-generation sequencing' Molecular Breeding, 35권, 논문번호 101, 내부 페이지 1-9 (온라인 공개 2015.03.17) 전체 문헌 참조.	1-17
A	NCBI, GenBank accession no. AJW77762.1 (2015.03.25) 전체 문헌 참조.	1-17
A	KR 10-2013-0138000 A (서울대학교산학협력단) 2013.12.18 전체 문헌 참조.	1-17

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 09월 17일 (17.09.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 09월 17일 (17.09.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 아래에 기초하여 수행되었습니다.

a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일

☐ 서면 혹은 이미지 파일

b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록

☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))

☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713)

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2013-0138000 A

2013/12/18

KR 10-1354041 B1

2014/01/23