



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0065455

(43) 공개일자 2025년05월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6895 (2018.01) *A01H 3/04* (2006.01)*C12N 15/82* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6895 (2018.05)*A01H 3/04* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0150298

(22) 출원일자 2023년11월02일

심사청구일자 2023년11월02일

(71) 출원인

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

(72) 발명자

이상협

서울특별시 성동구 동일로 237, 104동 601호 (송정동, 서울숲아이파크)

마디 마드리 아나잔

서울시 광진구 군자동 124-2번지

(74) 대리인

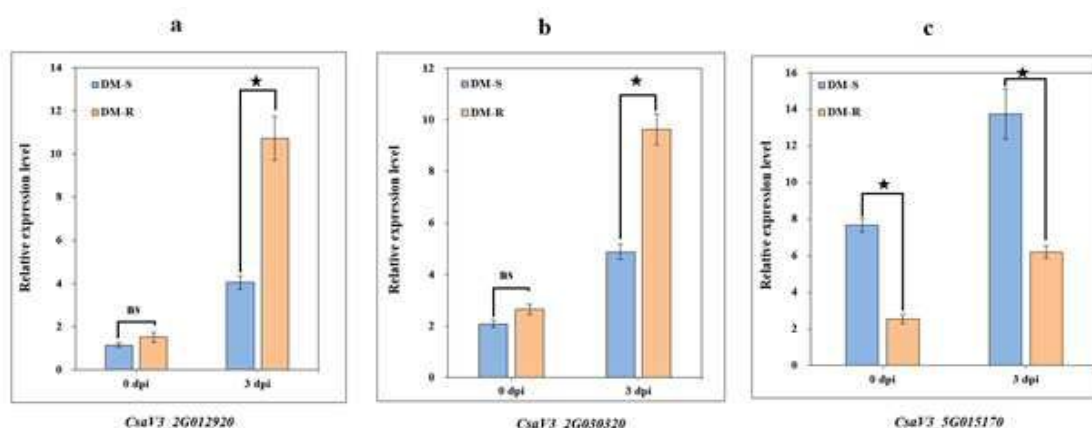
특허법인리체

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 오이 노균병 저항성 개체 선발용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 오이 노균병 저항성 개체 선발용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 오이 노균병 저항성 유전자의 발현을 측정할 수 있는 성분을 포함하는 오이 노균병 저항성 개체 선발용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도8

(52) CPC특허분류

C12N 15/8282 (2013.01)
C12Q 2600/13 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711194815
과제번호	00208020
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	오이 흰가루병 저항성 후보유전자 기능 및 작용기작 규명
기 여 율	1/2
과제수행기관명	세종대학교 산학협력단
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711199120
과제번호	2022K2A9A2A06037703
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	한국연구재단연구운영비지원(주요사업비)
연구과제명	오이 과침 형성에 관여하는 CsACO 유전자의 분자생물학적 기작 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	세종대학교 산학협력단
연구기간	2023.09.01 ~ 2024.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

오이 유래의 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 유전자의 발현을 측정할 수 있는 성분을 포함하는 오이 노균병 저항성 개체 선발용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 성분은 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머 세트; 서열번호 6 및 서열번호 7의 프라이머 세트; 및 서열번호 8 및 서열번호 9의 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 프라이머 세트인 오이 노균병 저항성 개체 선발용 조성물.

청구항 3

오이 유래의 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 유전자의 발현을 측정하는 단계를 포함하는 오이 노균병 저항성 개체의 선발 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 서열번호 1 또는 2의 유전자의 발현량이 대조군보다 높은 개체 또는 서열번호 3의 유전자의 발현량이 대조군보다 낮은 개체를 오이 노균병 저항성 개체로 선발하는 단계를 더 포함하는, 오이 노균병 저항성 개체의 선발 방법.

청구항 5

청구항 3에 있어서, 오이 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계; 상기 분리된 DNA를 주형으로 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머 세트; 서열번호 6 및 서열번호 7의 프라이머 세트; 및 서열번호 8 및 서열번호 9의 프라이머 세트;로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 프라이머 세트로 표적 서열을 증폭하는 단계; 및 상기 증폭 산물을 검출하여 오이 노균병 저항성 여부를 판단하는 단계를 포함하는 오이 노균병 저항성 개체의 선발 방법.

청구항 6

오이 유래의 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물 개체를 형질 전환시키는 단계를 포함하는 오이 노균병 저항성 식물체의 제조 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 형질 전환된 개체에 에틸렌을 처리하는 단계를 더 포함하는 오이 노균병 저항성 식물체의 제조 방법.

청구항 8

청구항 3의 방법에 따라 선발된 오이 노균병 저항성 개체에 에틸렌을 처리하는 단계를 포함하는 오이 노균병에

대한 저항성이 증가된 식물체의 재배 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 오이 노균병에 저항성을 나타내는 오이 개체를 선발할 수 있는 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 오이는 성장하는 시기 전체에 걸쳐 광범위한 질병과 해충에 취약한 식물로, 특히 노균병(Downy Mildew, DM)은 오이에서 자주 발생하는 병 중 하나이다. 오이에서 발생하는 노균병을 관리하고 예방하기 위해서는 재배 환경 통제, 살균제 처리 및 생명공학적 방법 등 다양한 접근법이 제안되지만, 오이 재배에 있어서 환경의 완벽한 제어 및 살균제 처리는 비용과 안정성 측면 등에서 한계가 있다. 따라서, 오이 노균병에 내성, 즉 노균병에 대한 저항성이 있는 오이 재배 품종의 개발이 요구된다.

[0004] 오이 노균병 저항성에 관련한 유전 양상은 매우 복잡하며, 다수의 열성 유전자가 관여한다는 점이 알려져 있다. 최근에는 오이 노균병 저항성에 관여하는 영역을 밝히는 QTL(Quantitative trait locus, 양적 형질 위치) 분석에 대한 연구가 주류를 이루고 있으며, PI 197088, PI 330628, PI 605996 오이 계통이 노균병에 대한 저항성이 있는 것으로 밝혀졌다. PI 330628 유래의 오이 노균병 저항성은 오이 염색체 2, 4, 5, 6에 위치한 4개의 QTL에 의해 제어된다는 것, PI 197085 유래의 오이 노균병 저항성은 5번 염색체의 QTL에 의해 조절된다는 것이 밝혀졌다. 또한 국내에 품종 육성에 사용되는 계통인 TH118FLM은 dm2.1, dm2.2, dm4.1, dm5.1, dm5.2 및 dm6.1의 6개 QTL을 통해 오이 노균병에 대한 저항성을 획득할 수 있음이 확인되었다. 오이 노균병 저항성과 관련된 수많은 QTL이 확인되었지만, 그 정확한 영역이 불분명하여 분자육종 프로그램으로의 적용은 아직 어려운 실정이다. 따라서 밝혀진 QTL 내에서 오이 노균병 저항성 유전자를 더 자세히 매핑할 필요가 있다. 본 발명의 발명자들은 미세 매핑 기술을 이용하여 dm2.1, dm2.2 및 dm5.1 오이 저항성 유전자 영역을 보다 정확하게 규명하였고, 이를 통하여 오이 노균병 저항성 개체 선발용 조성물과 오이 노균병 저항성 개체 선발 방법에 관한 발명을 완성하였다. 또한, 밝혀낸 오이 노균병 저항성 유전자를 이용한 오이 노균병 저항성을 갖는 식물체의 제조 방법과 저항성이 증가된 식물체의 재배 방법을 발견하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제 10-1698215 호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 오이 노균병 저항성 개체를 선발할 수 있는 저항성 유전자를 선발하여, 상기 유전자의 발현 여부를 확인할 수 있는 오이 노균병 저항성 개체 선발용 조성물 및 오이 노균병 개체 선발 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한, 상기 유전자를 포함하는 오이 노균병 저항성 식물체의 제조 방법과 오이 노균병에 대한 저항성이 증가된 식물체의 재배 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 1. 오이 유래의 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 유전자의 발현을 측정할 수 있는 성분을 포함하는 오이 노균병 저항성 개체 선발용 조성물.

- [0010] 2. 위 1에 있어서, 성분은 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머 세트; 서열번호 6 및 서열번호 7의 프라이머 세트; 및 서열번호 8 및 서열번호 9의 프라이머 세트에 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 프라이머 세트인 오이 노균병 저항성 개체 선발용 조성물.
- [0011] 3. 오이 유래의 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 유전자의 발현을 측정하는 단계를 포함하는 오이 노균병 저항성 개체의 선발 방법.
- [0012] 4. 위 3에 있어서, 서열번호 1 또는 2의 유전자의 발현량이 대조군보다 높은 개체 또는 서열번호 3의 유전자의 발현량이 대조군보다 낮은 개체를 오이 노균병 저항성 개체로 선발하는 단계를 더 포함하는, 오이 노균병 저항성 개체의 선발 방법.
- [0013] 5. 위 3에 있어서, 오이 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계; 분리된 DNA를 주형으로 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머 세트; 서열번호 6 및 서열번호 7의 프라이머 세트; 및 서열번호 8 및 서열번호 9의 프라이머 세트;로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 프라이머 세트에 표적 서열을 증폭하는 단계; 및 이 증폭 산물을 검출하여 오이 노균병 저항성 여부를 판단하는 단계를 포함하는 오이 노균병 저항성 개체의 선발 방법.
- [0014] 6. 오이 유래의 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물 개체를 형질 전환시키는 단계를 포함하는 오이 노균병 저항성 식물체의 제조 방법.
- [0015] 7. 위 6에 있어서, 형질 전환된 개체에 에틸렌을 처리하는 단계를 더 포함하는 오이 노균병 저항성 식물체의 제조 방법.
- [0016] 8. 3의 방법에 따라 선발된 오이 노균병 저항성 개체에 에틸렌을 처리하는 단계를 포함하는 오이 노균병에 대한 저항성이 증가된 식물체의 재배 방법.

발명의 효과

- [0018] 본 발명의 오이 노균병 저항성 개체 선발용 조성물 및 이를 이용한 오이 노균병 저항성 개체 선발 방법을 이용하여 노균병에 저항성이 있는 오이 개체를 선발할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 오이 노균병 저항성 유전자를 이용하여 오이 노균병 저항성 식물체를 제조할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 오이 노균병 저항성 개체 선발방법을 이용하여 선발한 오이 노균병 저항성 개체와 본 발명의 오이 노균병 저항성 유전자를 이용하여 제조한 오이 노균병 저항성 식물체에 에틸렌을 처리하여 오이 노균병에 대한 저항성이 증가하도록 재배할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 노균병에 걸린 오이 잎의 모습으로, 매핑 모집단 개체의 질병 지표를 나타낸 것이다.
- 도 2는 dm2.1-F₇, dm2.2-F₇ 및 dm5.1-BC₄F₂ 모집단의 세대에 속하는 개체별 노균병에 대한 저항성 분포를 나타낸 것이다.
- 도 3은 미세 매핑을 위한 매핑 집단 육성 모식도를 나타낸 것이다.
- 도 4는 QTL-seq을 적용한 노균병 저항성 dm2.1 미세 매핑 결과이다.
- 도 5는 QTL-seq을 적용한 노균병 저항성 dm2.2 미세 매핑 결과이다.
- 도 6는 QTL-seq을 적용한 노균병 저항성 dm5.1 미세 매핑 결과이다.
- 도 7은 QTL-seq/SNP-mining 분석을 병행 적용한 미세 매핑 결과로, 상단의 a는 기존에 알려진 QTL, 중간의 b는 QTL-seq 분석을 통한 미세 매핑 결과, c는 SNP-마이닝 결과, d는 선발한 노균병 저항성 후보 유전자를 선발한 것을 붉은 색으로 나타낸 것이다.
- 도 8은 노균병에 대해 저항성과 감수성을 보이는 개체를 대상으로 노균병원체를 접종한 후 0시간, 72시간 후 노균병 저항성 후보 유전자들의 발현을 조사한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 dm2.1에 위치한 노균병 저항성 후보 유전자가 코딩하는 CsaV3_2G012920 단백질의 3차원 단백질 구조 모델링 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 dm2.2에 위치한 노균병 저항성 후보 유전자가 코딩하는 CsaV3_2G030320 단백질의 3차원 단백질 구조 모델링 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 dm5.1에 위치한 노균병 저항성 후보 유전자가 코딩하는 CsaV3_5G015170 단백질의 3차원 단백질 구조 모델링 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 에틸렌에 의해 촉진되는 노균병 저항성 후보 유전자(CsaV3_2G012920, CsaV3_2G030320 및 CsaV3_5G015170) mRNA를 확인한 것이다.

도 13은 오이 잎에 에틸렌을 처리할 때의 기공의 개폐 여부 확인을 통해 에틸렌이 노균병 저항성에 기여하는지를 확인한 것이다.

도 14는 제안되는 오이 노균병 저항성 기작의 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 본 발명은 오이 노균병 저항성 개체 선발용 조성물 및 이의 용도를 제공한다.
- [0024] 본 발명은 오이 유래의 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 유전자의 발현을 측정할 수 있는 성분을 포함하는 오이 노균병 저항성 개체 선발용 조성물에 관한 것이다.
- [0025] 본 발명은 유전자 CsaV3_2G012920, CsaV3_2G030320 및 CsaV3_5G015170 중 어느 하나의 발현을 측정할 수 있는 성분을 포함하는 오이 노균병 저항성 개체 선발용 조성물에 관한 것이다.
- [0026] 유전자 CsaV3_2G012920는 오이의 2번 염색체에서 10,461,069bp부터 10,522,788bp까지의 서열을 의미하는 것으로, 서열번호 1로 나타난다.
- [0027] 유전자 CsaV3_2G030320는 오이의 2번 염색체에서 19,833,180bp부터 19,917,905bp까지의 서열을 의미하는 것으로, 서열번호 2로 나타난다.
- [0028] 유전자 CsaV3_5G015170는 오이의 5번 염색체에서 12,351,644bp부터 12,431,634bp까지의 서열을 의미하는 것으로, 서열번호 3로 나타난다.
- [0029] 본 발명의 오이 유래의 유전자 CsaV3_2G012920, CsaV3_2G030320 및 CsaV3_5G015170는 QTL-seq 분석을 통하여 밝혀진 것일 수 있다. 또한, SNP-마이닝을 통하여 밝혀진 것일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 서열번호 1로 나타내어지는 유전자는 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (CsACO)를 암호화할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 서열번호 2로 나타내어지는 유전자는 carbonic anhydrase (CsCA)를 암호화할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 서열번호 3으로 나타내어지는 유전자는 serine/threonine protein kinase (STPK)를 암호화할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 오이 유래의 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 유전자의 발현을 측정할 수 있는 성분은 프라이머 세트일 수 있다. 예컨대, 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머 세트; 서열번호 6 및 서열번호 7의 프라이머 세트; 및 서열번호 8 및 서열번호 9의 프라이머 세트에 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 프라이머 세트일 수 있다.
- [0034] 유전자 CsaV3_2G012920의 발현을 측정할 수 있는 물질로는 그 발현 측정이 가능하다면 그 종류는 제한되지 않으며, 예컨대, 프라이머를 사용할 수 있다.
- [0035] 일 실시예에서 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머 세트를 포함하는 것일 수 있다.
- [0036] 유전자 CsaV3_2G030320의 발현을 측정할 수 있는 물질로는 그 발현 측정이 가능하다면 그 종류는 제한되지 않으며, 예컨대, 프라이머를 사용할 수 있다.
- [0037] 일 실시예에서 서열번호 6 및 서열번호 7의 프라이머 세트를 포함하는 것일 수 있다.
- [0038] 유전자 CsaV3_5G015170의 발현을 측정할 수 있는 물질로는 그 발현 측정이 가능하다면 그 종류는 제한되지 않으며,

며, 예컨대, 프라이머를 사용할 수 있다.

- [0039] 일 실시예에서 서열번호 8 및 서열번호 9의 프라이머 세트를 포함하는 것일 수 있다.
- [0040] 본 발명의 오이 노균병 저항성 개체 선발용 조성물은 오이 노균병 저항성 개체 선발용 키트일 수 있다. 키트는 다양한 형태로 구현 될 수 있고, 예컨대 PCR 반응을 수행하기 위한 필수적인 요소를 포함하는 키트 일 수 있다. 예컨대, 역전사효소, 중합효소, 반응완충액, dNTP (dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP), Mg^{2+} 와 같은 조인자 및 버퍼 등이 더 포함될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 오이 노균병 저항성 개체의 선발 방법은 오이 유래의 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 유전자의 발현을 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 또한 상기 선발 방법은 오이 유래의 유전자 CsaV3_2G012920, CsaV3_2G030320 및 CsaV3_5G015170 중 어느 하나의 발현을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 오이 노균병 저항성 개체의 선발 방법은 오이 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계; 상기 분리된 DNA를 주형으로 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머 세트; 서열번호 6 및 서열번호 7의 프라이머 세트; 및 서열번호 8 및 서열번호 9의 프라이머 세트;로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 프라이머 세트로 표적 서열을 증폭하는 단계; 및 상기 증폭 산물을 검출하여 오이 노균병 저항성 여부를 판단하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0043] 일 실시예에서, CsaV3_2G012920 또는 CsaV3_2G030320 유전자의 발현량이 대조군보다 높은 개체를 오이 노균병 저항성 개체로 선발할 수 있다.
- [0044] 일 실시예에서, CsaV3_5G015170 유전자의 발현량이 대조군보다 낮은 개체를 오이 노균병 저항성 개체로 선발할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 오이 유래의 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 유전자의 발현의 측정은 당 분야에서 통상적으로 수행되는 방법에 의한 것일 수 있으며, 예컨대 상기 유전자, 또는 유전자에 의해 암호화되는 단백질에 특이적으로 결합하는 물질을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0046] 상기 유전자의 발현의 측정은 예컨대 중합효소반응(PCR), 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Realtime RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 방법일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0047] 상기 단백질의 발현의 측정은 예컨대 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 웨스턴 블롯, 조직 면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정분석법 (Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS) 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 방법일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0048] 본 발명은 오이 노균병 저항성 식물체의 제조방법을 제공한다. 상기 제조방법은 오이 유래의 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 형질 전환시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 오이 유래의 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 서열은 재조합 벡터 내로 삽입될 수 있다.
- [0050] 오이 유래의 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 유전자 서열 및 전사 및 번역 조절 신호를 포함하는 재조합 벡터는 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0051] 재조합 벡터는 세균 플라스미드, 파지, 식물 세포 바이러스, 동물 세포 바이러스 등 일 수 있고, 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절 요소를 갖는 것일 수 있다.
- [0052] 본 발명의 오이 유래의 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 유전자를 포함하는 재조합벡터로 식물 개체를 형질 전환시키는 단계는, 상기 유전자를 식물 개체에 전이 시키는 방법을 의미할 수 있다. 예컨대, 원형질체의 전기천공법, 식물 요소에의 현미 주사법, 식물 요소의 입자 충격법 등일 수 있다.
- [0053] 본 발명의 오이 노균병 저항성 식물체 제조방법은 오이 유래의 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질 전환된 식물 개체에 에틸렌을 처리하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0054] 일 실시예에서, 오이 노균병 저항성을 갖도록 형질 전환된 식물체에 에틸렌을 처리할 경우, 오이 노균병에 대한 저항성이 에틸렌을 처리하기 전보다 증가하였다.
- [0055] 본 발명은 오이 노균병에 대한 저항성이 증가된 식물체의 재배방법을 제공한다. 오이 유래의 서열번호 1 내지 3

중 어느 하나의 유전자의 발현을 측정하여 선발한 오이 노균병 저항성 개체에 에틸렌을 처리하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0056] 일 실시예에서, 본 발명의 선발방법에 의해 선발된 오이 노균병 저항성 개체에 에틸렌을 처리할 경우, 오이 노균병에 대한 저항성이 에틸렌을 처리하기 전보다 증가하였다.

[0058] 이하, 본 발명을 실시예로 보다 상세하게 설명한다.

[0059] 실시예

[0060] 실시예 1. 매핑(mapping) 모집단의 설정과 식물 성장 조건 분석

[0061] 오이 노균병 저항성 후보 유전자를 개발하기 위해 두 개의 재조합 동계교배 개체군 (recombinant inbred lines, RILs)인 dm2.1-F₇와 dm2.2-F₇, 준동질유전자계통(near-isogenic line)의 개체군인 dm5.1-BC₄F₂를 사용하였다. 상기 개체군들은 오이 노균병에 대해 저항성을 띄는 TH118FLM 계통과 오이 노균병에 대해 감수성을 갖는 WMEJ 계통에서 파생되었다(도 3). 2019년과 2020년의 여름 동안 대한민국 이천의 온실에서 dm2.1-F₇ 개체 100개, dm2.2-F₇ 개체 131개, dm5.1-BC₄F₂개체 146개를 재배하였다. 모든 식물체는 이탄(peat)이 담긴 주머니에서 점적 관개(drip irrigation)을 통하여 재배되었다.

[0062]

[0063] 실시예 2. 매핑 모집단의 개체의 질병지표(DI) 평가

[0064] 2019년과 2020년의 여름에 두 개의 RIL 개체군, NIL 개체군 및 두 부모 혈통의 오이 노균병 증상을 확인하기 위해 온실에서 선발 검사를 실시하였다. 재식일로부터 약 60일 후에 자연적으로 발생하는 오이 노균병이 관찰되었고 그 증상은 약 2주동안 각 식물체의 모든 부분으로 퍼졌다. 잎의 황변과 괴사를 오이 노균병에 대한 저항성을 평가하는 지표로 설정하여, 상기 개체군의 식물체들의 표현형에 1(증상없음)부터 8(최대 질병 증상)까지 점수를 부여하였다(도 1). 오이 노균병에 저항성이 있는 개체(DM-R)들은 노균병의 증상을 보이지 않았으며 질병지표(DI)를 1로 표시하고, 오이 노균병에 감수성이 있는 개체(DM-S)는 심각한 노균병 증상을 나타냈으며 DI를 8로 표시하였다. 각 개체군에 있어서 오이 노균병에 극단적인 저항성을 갖거나 감수성을 갖는 개체로 구성된 두 개의 벌크(bulk) 집단을 각각 R-Bulk와 S-Bulk로 설정하였다. dm2.1-F₇, dm2.2-F₇ 및 dm5.1-BC₄F₂ 모집단에서, 오이 노균병에 극단적인 저항성을 나타내는 집단(R-Bulk)에 각각 6개, 9개, 9개의 개체가 포함되었다. 상기 개체군들에서 오이 노균병에 극단적인 감수성을 나타내는 집단(S-Bulk)에는 각각 11개, 11개, 11개의 개체가 포함되었다(도 2).

[0066] 실시예 3. gDNA 분리 및 전체 유전체 재서열화(re-sequencing)

[0067] 세 개의 매핑 모집단의 DM-R와 DM-S 벌크에서 DNeasy Plant Mini Kit(키아젠, 독일)를 사용하여 게놈 DNA(gDNA)를 분리하였다. 분리된 gDNA의 품질과 수량은 Nanodrop ND-2000 분광 광도계를 사용하여 평가되었다. DM-R 그룹과 DM-S 그룹의 개체로부터 동일한 양의 gDNA를 혼합시켰다. Illumina HiSeq 2000 sequencer에 쌍단(pair-end) 구성을 적용하여 서열화(sequencing)을 위한 라이브러리를 구축하였다. 서열화 공정에는 HiSeq Sequencing 키트를 사용하였고, 일루미나에서 제공하는 서열화 제어 소프트웨어와 관련된 염기 결정 파이프라인을 통하여 원시 서열화 데이터를 관독 가능한 뉴클레오타이드 서열로 변환하여 후속 분석을 위한 기초를 구성하였다.

[0069] 실시예 4. QTL-seq 분석

[0070] 기존에 알려져 있던 dm2.1, dm2.2 및 dm5.1의 오이 노균병 저항성 유전자의 정확한 영역이 불분명하기 때문에, BSA-assisted QTL-seq 기법을 이용하여 오이 노균병 저항성 영역 유전자의 영역을 밝혀내고자 하였다.

[0071] Bowtie 2 tool을 이용하여 두 개의 부모 계통의 원시 쌍단 리드를 표준 유전체인 Chinese Long 게놈 서열(버전 3.0)에 정렬하고, SNP와 InDels와 같은 변이체의 차이를 비교하였다. 또한 DM-R 및 DM-S 벌크의 개체들의 서열 데이터의 균일성을 보장하기 위해 BWA 프로그램을 사용하되 두 벌크의 짧은 리드를 DM-S 유전체 서열에 정렬하

였다.

[0072] 추가적인 분석을 위해 Illumina phred와 유사 품질을 가진 리드와 30을 초과하는 매핑 점수를 선택했다. 이어서 SAM 도구를 이용하여 DM-R과 DM-S 벌크 간의 SNP와 InDel을 호출했다. QTL-seq 와 MutMap을 사용하여 각 벌크에 대해 계산된 SNP 지수를 평가하기 위해 부모 계통에 존재하는 모든 저항성 유전자의 유형의 read를 확인하였다. 오이 노균병 저항성은 짧은 리드의 전체 수에 기반하여 결정되었다. 분석의 정확성을 보장하고 서열화 또는 정렬 오류를 줄이기 위해 두 벌크 모두에서 SNP 지수가 0.3 미만이고 읽기 깊이가 7 미만인 유전자좌(loci)는 제외하였다. 한 벌크에서 SNP 지수가 0.3 미만이고 다른 벌크에서 0.3 이상인 SNP를 진정한 SNP로 간주했다. DM-S의 짧은 리드에 SNP가 포함된 경우에는 SNP 지수를 0으로 할당하였고, DM-R의 짧은 리드에서는 1이 할당되었는데, 결국 SNP 지수 값 0 또는 1은 각각 서열이 DM-S 또는 DM-R 게놈에서 비롯된 것인지 나타내었다.

[0073] SNP 지수(SNP-index) 간의 차이는 하기의 식을 이용하여 계산하였다.

[0074] $\Delta(\text{SNP-index}) = \text{SNP-index (DM-R)} - \text{SNP-index (DM-S)}$

[0075] 위와 같은 식을 통해 DM-R과 DM-S 벌크 간의 지수를 비교하고 SNP 지수의 변동을 식별하여 염색체에 매핑하였다. 또한 SNP 지수의 평균 값을 계산하기 위해, window size가 2Mb이고 증가량(increment)가 10kb인 sliding window 접근법을 사용하였다. 또한 QTL-seq를 사용한 QTL 식별의 정확성을 보장하기 위해, QTL이 없다는 귀무가설 하에서 $\Delta(\text{SNP-index})$ 에 대한 통계적 신뢰 구간을 계산하였다.

[0076] 상기의 방법을 통하여 dm2.1, dm2.2 및 dm5.1에 해당하는 게놈 영역을 좁혔다. dm2.1은 2번 염색체의 10.38 Mb에서 10.72 Mb까지 이르는 333 kb 영역 내에 존재하였고, 이 영역의 평균 SNP-index는 R-bulk에서 0.9 이상이었으나 S-bulk에서는 0.1 이하의 값을 보였다. 비슷하게, dm2.2는 2번 염색체의 19.68 Mb와 19.97Mb 사이의 296 kb 영역 내에 위치하였고, SNP 지수의 패턴은 dm2.1에서 보이는 오이 노균병 저항성 영역의 패턴과 비슷하였다. Dm5.1은 5번 염색체의 11.85Mb에서 12.55Mb까지 이르는 694 kb 영역에 존재하였으며 이 영역의 SNP 지수 패턴 또한 오이 노균병 저항성의 특성과 유사하게 관찰되었다. 표준 유전체(Chinese Long 9930 V3.0)의 유전자 주석에 의하면 dm2.1, dm2.2 및 dm5.1 영역은 잠재적으로 각각 31, 35 및 55개의 유전자가 포함된 것으로 확인하였다(도 4 내지 도 6)

[0078] **실시예 5. 미세 유전자 매핑(fine-genetic mapping)을 위한 SNP-마이닝 (SNP-mining)**

[0079] QTL-seq 분석을 통해 초기에 식별된 유전자좌 내의 더 구체적인 영역을 밝혀내기 위해 SNP-마이닝 (SNP-mining)을 실시하였다. Geneious Pro 9.1.8을 사용하여, 두 개의 부모 계통과 dm2.1, dm2.2 및 dm5.1에 관련된 영역에 해당하는 DM-R 및 DM-S 벌크에서 모든 짧은 서열을 분석하였다. DM-R 또는 DM-S에 속하는 짧은 서열들 간에 완전히 일치하는 모든 SNP 와 InDels를 추출하였다. 그 결과, dm2.1은 10.46 Mb에서 10.52 Mb에 이르는, 61.7 Kb에 달하는 영역으로 축소되었고, dm2.2는 19.83Mb에서 19.92 Mb에 이르는, 총 84.7 Kb에 달하는 영역으로 좁혀졌다. Dm5.1은 12.35 Mb에서 12.43 Mb에 이르는 80 KB 영역으로 축소되었다(도 7). 표준 유전체의 유전자 주석에 따르면 정제된 dm2.1은 7개, dm2.2는 10개, dm5.1은 5개의 유전자를 포함하는 것으로 추정된다.

[0081] **실시예 6. 노균병원체 접종 및 노균병 저항성 후보 유전자들의 발현 확인**

[0082] SNP-mining 으로 fine-mapping 된 dm2.1, dm2.2, dm5.1 영역에서 오이 노균병의 저항성을 담당하는 후보 유전자를 검출하고자 하였다. DM-R과 DM-S의 개체들은 모두 장일조건(광주기 16시간, 암기 8시간)에서 식물 성장실에서 재배되었고, 오이 노균병 병원체의 분생자는 온실에서 성장하며 자연 감염된 DM-S(오이 노균병에 대한 감수성이 있는) 식물의 잎에서 채취하였다. 감염된 잎에서 수돗물을 이용해 포자를 세척하고, 면직물로 여과하여 오이 노균병 포자의 현탁액을 획득하였다. 두 잎 단계(two-leaf stage)의 잎 표면에 고르게 오이 노균병 포자의 현탁액을 분사하여 묘목에 접종하였고, 폴리에틸렌 시트를 올려 높은 습도를 유지할 수 있도록 하였다. 접종 7일 뒤에 노균병 발병이 시작됨을 확인할 수 있었고, 세 가지 오이 노균병 저항성 QTL 영역 내에서 확인된 후보 유전자의 발현 분석을 위해 잎 샘플을 수집하였다. 접종 직후와 접종 후 72시간이 지난 시점에서 각 식물체로부터 5개의 잎을 채취했고, 식물 RNA 정제 시약 (Invitrogen)을 사용하여 잎 샘플에서 전체 RNA를 추출하였다. ReverTra Ace qPCR RT Master Mix 키트의 지침에 따라 전체 RNA에서 cDNA를 합성하였고, The CFX Real-Time Detection System을 이용하여 RT-qPCR을 진행하였다.

[0083] dm2.1에서, DM-R과 DM-S 간에 다형성 서열을 가지고 있는 4개의 유전자(CsaV3_2G012900, CsaV3_2G012210,

CsaV3_2G012920, CsaV3_2G012230)를 발견하였다. 상기 유전자 중에서, 1-아미노사이클로프로판-1-카르복실산 산화효소(ACO)를 암호화할 것으로 예측되는 CsaV3_2G012920 유전자 만이 비동의 돌연변이(non-synonymous mutation)를 보였다. dm2.2에서는, 탄산무수효소(CA)를 암호화하는 유전자 CsaV3_2G030320이 비동의 돌연변이(non-synonymous mutation)를 나타냈다. 한편 dm5.1에서는, 3개의 유전자 (CsaV3_5G015160, CsaV3_5G015170, CsaV3_5G015190)가 DM-R과 DM-S 사이의 유전자 영역에서 서열의 다형성을 보였다. 이 중, 세린/트레오닌-단백질 키나아제(STPK)를 암호화할것으로 예측되는 CsaV3_5G015170만이 비동의 돌연변이(non-synonymous mutation)를 보였고, 다른 유전자들은 동의 돌연변이(synonymous mutation)를 보였다.

[0084] 위와 같이 식별한 유전자의 발현 수준을 조사한 결과, CsaV3_2G012220 및 CsaV3_2G030320은 접종 후 72시간 (3dpi) 이내의 오이 노균병 저항성 식물체에서 mRNA 발현이 증가되는 양상을 보였다. 반면에 CsaV3_5G015170은 노균병 저항성과 감수성 오이 모두에서 노균병 접종 후 발현이 증가되는 양상을 보였고, 감수성 식물에서 저항성 식물체에 비해 보다 많은 발현량이 관찰되었다(도 8).

[0086] 실시예 7. 노균병 저항성 후보 유전자 단백질의 구조 모델링

[0087] 오이 노균병 저항성 후보유전자의 아미노산 서열을 이용하여 DM-R 및 DM-S 라인의 구조적 차이를 조사하였다. SWISS-MODEL을 사용하여 예상한 단백질 구조를 Geneious Pro 9.1.8. 에 PDB(Protein Data Bank) 파일 형태로 입력하여 노균성 저항성 후보 유전자가 만드는 단백질 구조를 시각화하고 비교하였다.

[0088] CsaV3_2G012920의 경우 단일 비동의 돌연변이(single non-synonymous mutation)가 관찰되었으며, α-helix 내 91번째 아미노산 위치에서 DM-S의 이소류신(I)이 DM-R에서는 발린(V)으로 대체되었다(도 9). 그러나 이러한 비동의 돌연변이에도 불구하고, 아미노산 서열 변화는 단백질 구조에 뚜렷한 변화를 초래하지 않았다. CsaV3_2G030320의 경우, 오이 노균병 저항성 식물체에서 4개의 비동의 돌연변이가 확인되었다. 이러한 돌연변이에는 β-시트 내 26번째 아미노산 위치에서 페닐알라닌이 이소류신(I)으로 변화하고, α-helix 내 165번째 아미노산 위치에서 트레오닌이 이소류신(I)이 되고, β-시트 내 194번째 아미노산 위치에서 글리신(G)이 아스파르트(D)로 변화하며, 루프 구조 내 287번째 아미노산 위치에서 아스파르트(D)가 아스파라긴(N)으로 바뀌었다(도 10). CsaV3_2G012920과 유사하게 CsaV3_2G030320에서도 4개의 아미노산 서열의 치환에도 불구하고, 이러한 변화가 단백질 구조적 특성에 영향을 미치지 않는 것으로 확인하였다. CsaV3_5G015170의 경우, 653번째 아미노산 위치에서 DM-S의 시스테인(C)이 DM-R에서는 아르지닌(A)으로 대체되는 비동의 서열 다형성이 발견되었다. 이 돌연변이는 오이 노균병 감수성 계통의 단백질 키나아제 도메인 내에서 발생되어, 오이 노균병 저항성 계통에 추가적인 β-시트를 형성하였을뿐만 아니라, 653번째 아미노산 위치 이후의 C 말단 단백질 구조 전체에 대하여 두 계통(DM-R과 DM-S) 사이에 큰 단백질 구조에 대한 차이를 나타냈다(도 11).

[0090] 실시예 8. 에틸렌이 오이 노균병 저항성에 미치는 영향 확인

[0091] 상기 실시예에서 밝힌 오이 노균병 저항성 후보 유전자 중에서 CsaV3_2G012920는 에틸렌 생합성에 중요한 역할을 하는 ACO를 코딩하는 유전자로, 따라서 에틸렌이 노균병 저항성에 있어서 중요한 역할을 할 것으로 추정하였다. 에틸렌이 세 가지 노균병 저항성 후보 유전자(CsaV3_2G012920, CsaV3_2G030320 및 CsaV3_5G015170) 발현을 촉진하는지 여부를 분석한 결과, 세 유전자의 mRNA 발현이 촉진됨을 확인하였다(도 12).

[0092] 한편 CsaV3_2G030320 유전자는 식물의 잎에 위치한 기공 개폐에 중요한 역할을 하는 탄산탈수효소(CA)를 암호화한다. 노균 병원체가 오이 식물체에 침입할 경우 CsaV3_2G030320 유전자 발현이 촉진되고, 이는 궁극적으로 노균병원체의 침입 통로로 활용되는 기공을 닫아 노균병 저항성에 기여하는 것으로 추정하였다. 따라서 에틸렌을 오이 잎에 처리할 경우 기공이 닫혀지는 여부를 확인하였다(도 13).

[0093] CsaV3_5G015170 유전자는 외부 환경 변화를 인식하여, 이러한 변화를 식물체에 알려주는 신호전달 과정에 중요한 역할을 하는 세린/트레오닌-단백질 키나아제(STPK)를 암호화한다. 에틸렌 처리에 의해서 STPK 유전자의 발현이 증가되므로, 오이 노균병 저항성이 에틸렌에 의한 저항성 반응을 유도하는 것으로 추정하였다. 따라서, 상기의 오이 노균병 저항성 후보 유전자들의 예측되는 유전자 기능과 유전자 발현 패턴을 분석한 결과를 바탕으로 오이 노균병 저항성의 기작을 제안하였다(도 14). 노균 병원체 침입시, CsACO 유전자 발현 증가에 의해 에틸렌 생합성이 촉진되고, CsCA 유전자와 CsSTPK 유전자 발현이 증가될 것이다. 궁극적으로 기공이 닫히도록 유도되어 병원체 침입의 물리적인 방지가 가능하며, 에틸렌 유래의 저항성 방어 기작 유도를 통하여 분자생물학적인 방어

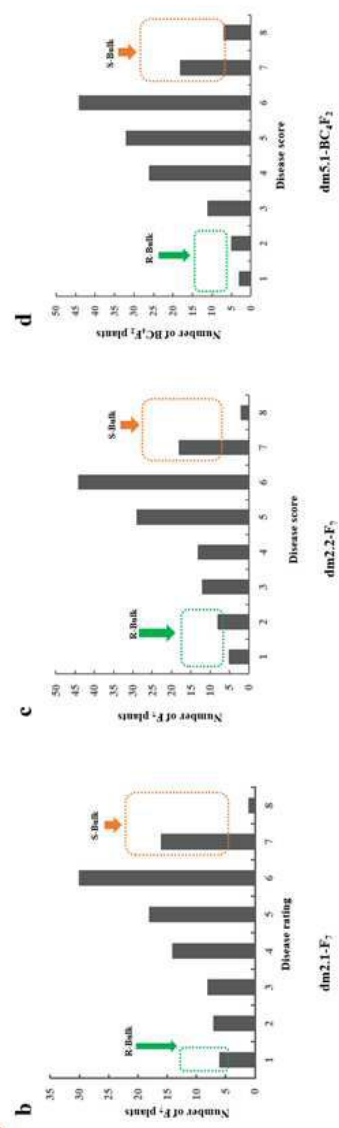
가 가능함을 제안하였다.

도면

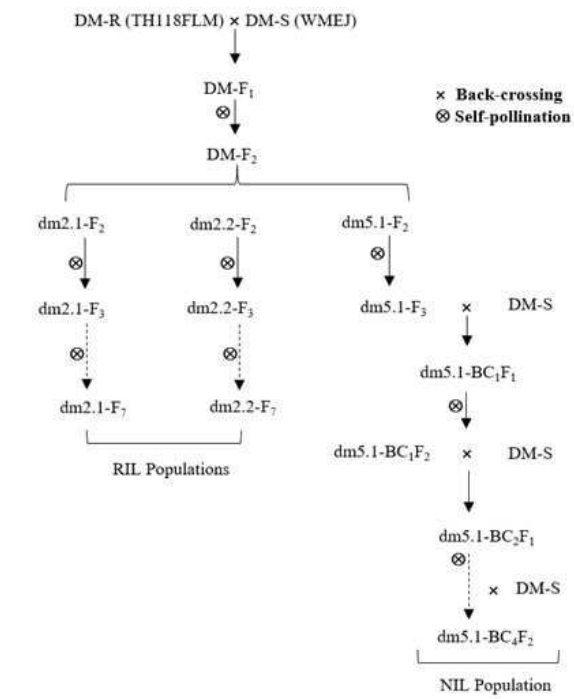
도면1



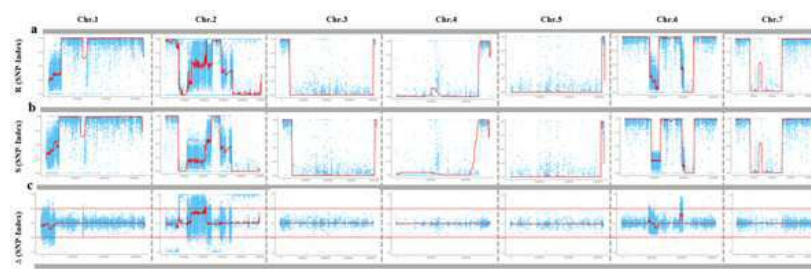
도면2



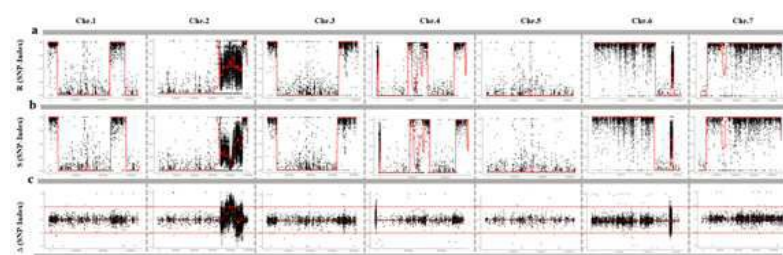
도면3



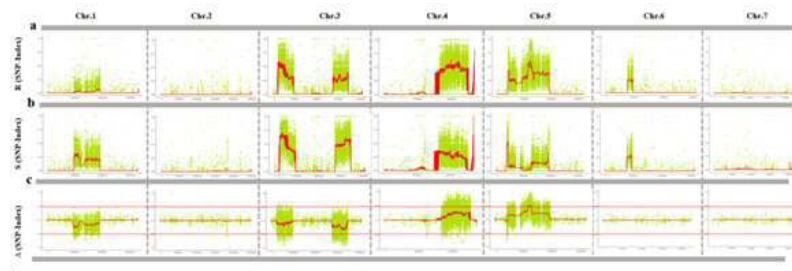
도면4



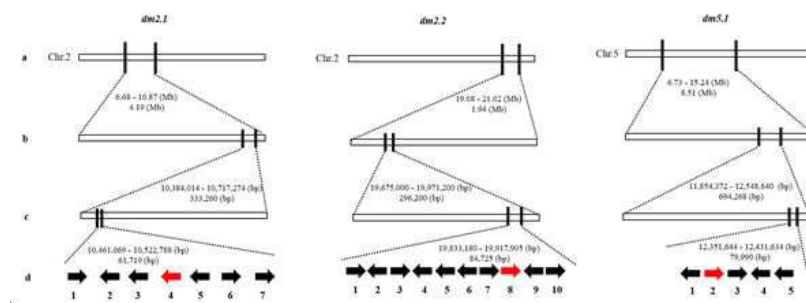
도면5



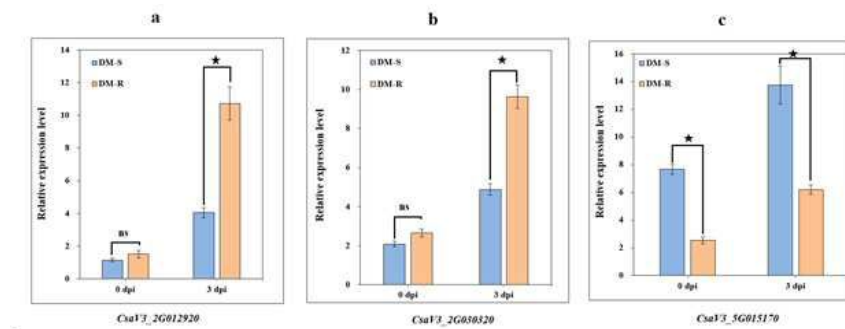
도면6



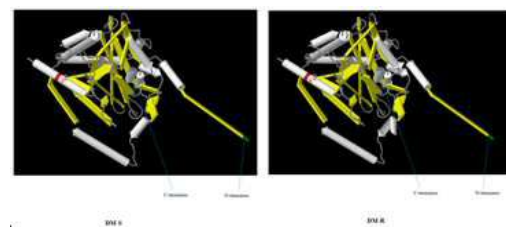
도면7



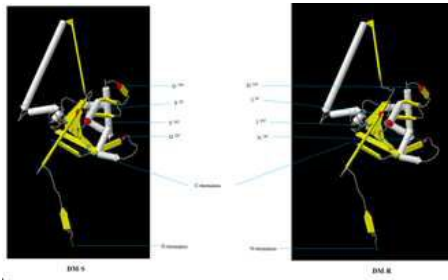
도면8



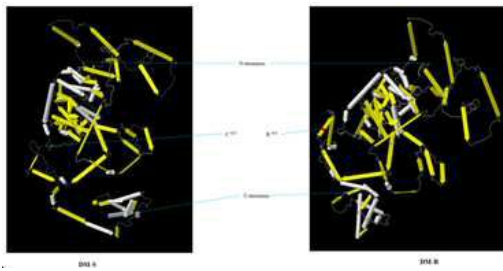
도면9



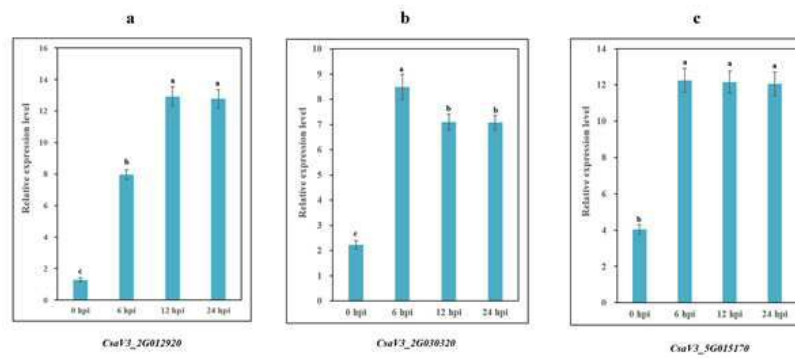
도면10



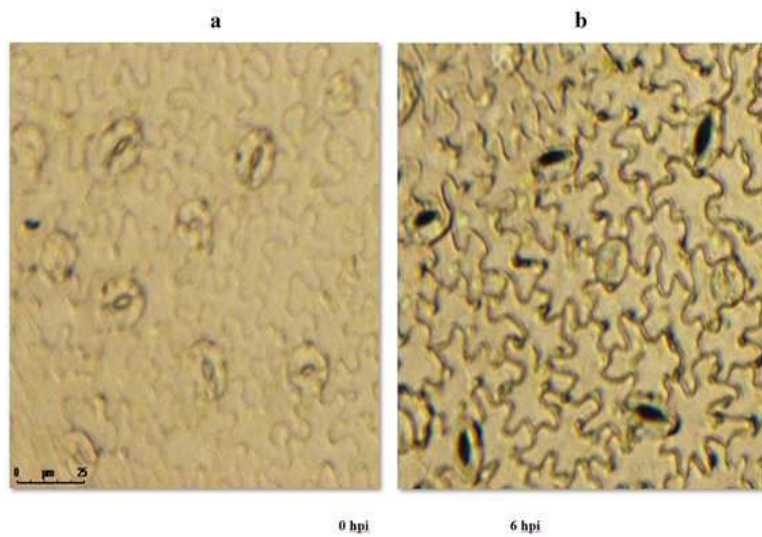
도면11



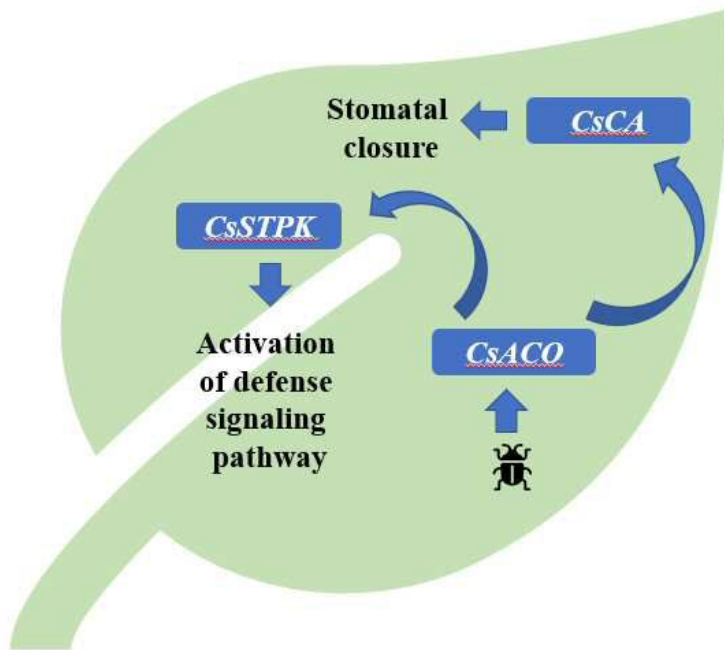
도면12



도면13



도면14



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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