(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 8 월 27 일 (27.08.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/171595 A1

(51) 국제특허분류:
C12Q 1/6895 (2018.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/002412

(22) 국제출원일: 2020 년 2 월 19 일 (19.02.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2019-0020030 2019 년 2 월 20 일 (20.02.2019) KR

(71) 출원인: 씨제이제일제당 (주) (**CJ CHEILJEDANG CORPORATION**) [KR/KR]; 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR).

(72) 발명자: 이선영 (**LEE, Sun Young**); 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 김상준 (**KIM, Sang Jun**); 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 윤여홍 (**YUN, Yeo Hong**); 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 이성근 (**LEE, Sung Gun**); 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인한얼 (**HANOL INTELLECTUAL PROPERTY AND LAW**); 05836 서울시 송파구 법원로 135, 6층, Seoul (KR).

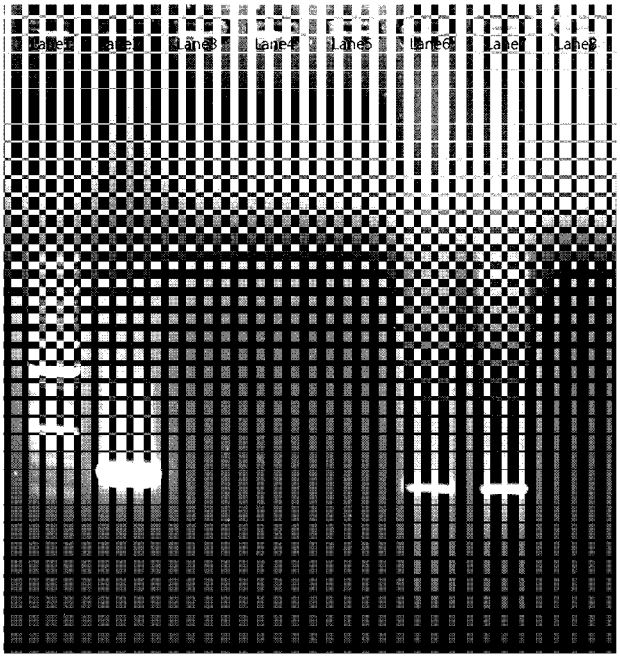
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

WO 2020/171595 A1

(54) **Title:** COMPOSITION FOR DETECTING GANODERMA GENUS MICROORGANISMS AND DIAGNOSING BASAL STEM ROT DISEASE AND METHOD USING SAME

(54) **발명의 명칭:** 가노더마 속 미생물 검출 및 뿌리 썩음병 진단을 위한 조성물 및 이를 이용한 방법

[도1]



(57) **Abstract:** The present application relates to a marker and a composition which are capable of specifically detecting Ganoderma genus microorganisms, a method for detecting Ganoderma genus microorganisms and a method for diagnosing basal stem rot disease, using the marker or the composition, and use of the marker or the composition for detecting Ganoderma genus microorganisms and for diagnosing basal stem rot disease.

(57) **요약서:** 본 출원은 Ganoderma 속 미생물을 특이적으로 검출할 수 있는 마커, 조성물, 및 상기 마커 또는 상기 조성물을 이용하여 Ganoderma 속 미생물을 검출하는 방법, 뿌리 썩음병 진단 방법, Ganoderma 속 미생물을 검출하는 용도, 및 뿌리 썩음병 진단 용도에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]

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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 가노더마 속 미생물 검출 및 뿌리 썩음병 진단을 위한 조성물 및 이를 이용한 방법

기술분야

[1] 본 출원은 뿌리 썩음병 진단을 위한 마커, 조성물, 키트, 칩 및 이를 이용하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 뿌리 썩음병(basal stem rot)은 주로 어린 뿌리가 침해되어 식물체의 활력이 떨어지는 병증을 나타내는 식물체의 병이다. 뿌리 썩음병에 감염된 식물체는 위축을 나타내고, 생육은 부진하여 과실은 작고, 수량이 감소될 뿐만 아니라, 병이 심하게 진전되면 잎은 퇴록되고, 서서히 시들다가 후에 말라죽는다. 병원균은 Ganoderma 속 미생물인 것으로 알려져 있으며, 병원균이 식물체의 뿌리를 침범함으로써 발생하는 것으로 알려져 있다.

[4] 오일팜 산업이 활발한 말레이시아에서는 Ganoderma 속 미생물에 의한 뿌리 썩음병에 의한 경제적 손실이 매우 크며 그 규모가 연간 4,600만 달러에 달하는 것으로 알려져 있다. 이에, 산업 현장에서 이용할 수 있는 뿌리 썩음병 진단이 가능한 마커 개발의 필요성이 대두되고 있다.

[5] 이와 관련하여, 종래에 인삼 뿌리 썩음병 진단을 위한 기술은 알려져 있으나(한국 등록특허 10-1570792호), 이는 인삼 뿌리 썩음 병원균인 *Cylindrocarpon destructans*을 검출하기 위한 방법으로, Ganoderma 속 미생물에 의한 뿌리 썩음병 진단을 위한 마커는 아직 개발되지 않은 실정이다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 본 발명자들은 뿌리 썩음병의 주된 병원균인 Ganoderma 속 미생물이 특이적으로 갖는 서열을 발굴하고, 이로부터 Ganoderma 속 미생물을 검출할 수 있는 신규한 마커를 개발하여 본 출원을 완성하였다.

[8]

과제 해결 수단

[9] 본 출원의 하나의 목적은 뿌리 썩음병 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[10] 본 출원의 다른 하나의 목적은 상기 조성물을 포함하는 뿌리 썩음병 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[11] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 조성물을 포함하는 뿌리 썩음병 진단용 칩을 제공하는 것이다.

[12] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 뿌리 썩음병 진단 방법을 제공하는 것이다.

[13] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 Ganoderma 속 미생물 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

[14] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 Ganoderma 속 미생물 검출 방법을 제공하는 것이다.

[15] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 뿌리 썩음병 진단 용도를 제공하는 것이다.

[16] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 Ganoderma 속 미생물 검출 용도를 제공하는 것이다.

[17]

발명의 효과

[18] 본 출원의 *Ganoderma boninense* 균을 특이적으로 검출할 수 있는 마커는 토양에서 직접 Ganoderma 속 미생물을 검출할 수 있다. 이를 통해 상기 미생물의 오염으로 인한 뿌리 썩음병을 예방 및 치료하는데 이용될 수 있고, 오일팜 농장에서의 산업적 활용을 기대할 수 있다.

[19]

도면의 간단한 설명

[20] 도 1은 말레이시아 토양에서 본 출원의 마커로 *Ganoderma boninense* 균을 검출한 결과를 나타낸 도이다.

[21]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[22] 이하, 본 출원 내용에 대하여 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시한 일 양태의 설명 및 실시형태는 공통된 사항에 대하여 다른 양태의 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 또한, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 더불어, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[23]

[24] 상술한 목적을 달성하기 위한 본 출원의 일 양태는 뿌리 썩음병 진단용 조성물을 제공한다.

[25]

[26] 하나의 구체예에서, 상기 조성물은 서열번호 1의 염기서열로 표현되는 유전자, 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자, 또는 이의 단편을 검출할 수 있는 제제를 포함하는 뿌리 썩음병 진단용 조성물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[27] 구체적으로, 상기 서열번호 1의 염기서열로 표현되는 유전자, 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자, 또는 이의 단편은 *Ganoderma* 속 미생물이 특이적으로 갖는 유전자, 또는 그의 단편일 수 있으며, Ganoderma 속 미생물을 검출하기 위한 마커와 혼용될 수 있다.

[28] 본 출원에서, "Ganoderma 속 미생물을 검출할 수 있는 마커" 또는 "마커"는

상기 서열번호 1의 염기서열로 표현되는 유전자, 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자, 또는 이의 단편을 의미하는 것으로서, Ganoderma 속 미생물에만 특이적으로 존재하는 서열로서 상기 서열의 존재 여부를 판별함으로써, 시료 내에 Ganoderma 속 미생물이 존재하는지 여부를 판별할 수 있는 서열을 의미한다. 본 출원의 마커를 이용할 경우, 채취된 시료가 Ganoderma 속 미생물에 의해 오염되었는지 여부를 빠르고 정확하게 판별할 수 있다. 본 출원에서 제공하는 마커는 서로 일정 수준 이상의 상동성을 갖거나, Ganoderma 속 미생물이 갖는 특이적 코어 서열을 공유하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[29]

[30] 본 출원에서, "서열번호 1의 염기서열로 표현되는 유전자"는 Ganoderma 속 미생물에서 특이적으로 발견되는 서열을 갖는 유전자의 하나로서, 상기 유전자의 존재 여부에 따라 Ganoderma 속 미생물이 시료(토양) 내에 존재하는지 여부를 확인할 수 있다. 또한, "서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자"는 서열번호 1의 염기서열과 80% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 유전자로서, 서열번호 1의 염기서열로 표현되는 유전자와 마찬가지로, Ganoderma 속 미생물에서 특이적으로 발견되는 서열을 갖고, 상기 유전자의 존재 여부에 따라 Ganoderma 속 미생물이 시료(토양) 내에 존재하는지 여부를 확인할 수 있다. 구체적으로, 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자는 80%, 85%, 90%, 또는 95% 이상의 상동성을 갖는 것일 수 있고, 보다 구체적으로, 서열번호 2 내지 9 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[31]

[32] 본 출원에서, 유전자 또는 단백질이 특정 서열번호의 염기서열 또는 아미노산 서열을 갖는 것으로 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 염기서열 또는 아미노산 서열로 이루어진 유전자 또는 단백질과 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 목적하는 Ganoderma 속 미생물에 특이적으로 존재하는 것인한, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 서열을 갖는 유전자 또는 단백질도 본 출원에서 사용될 수 있음은 자명하다.

[33] 또한, 특정 서열번호로 표현되는 염기서열 또는 아미노산 서열의 유전자 또는 단백질과 동일 또는 상응하는 활성을 갖는 이상, 특정 서열번호로 표현되는 염기서열 또는 아미노산 서열과 80% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 갖는 서열도 본 출원의 범주에 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로, 특정 서열번호의 염기서열 또는 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가질 수 있으며, 상응하는 효능 또는 활성을 나타내는 것으로, 목적하는 Ganoderma 속 미생물에 특이적으로 존재하는 것인한, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 서열 역시 본 출원의 범주에 포함됨은 자명하다.

[34]

[35] 본 출원에서 용어, '상동성(homology)' 또는 '동일성(identity)'은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 서로 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다.

[36] 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.

[37] 보존된 (conserved) 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나 (homologous) 또는 동일한 (identical) 서열은 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 일반적으로 서열 전체 또는 전체-길이의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이상으로 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서 코돈 대신 축퇴 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드 또한 고려된다.

[38] 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 예를 들어, Pearson et al (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다. (GCG 프로그램 패키지 (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego,1994, 및 [CARILLO ETA/.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.

[39] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 상동성, 유사성 또는 동일성은 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol Biol.48: 443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의한다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 일진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스 (또는 EDNAFULL(NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환

매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티 (또는 갭 개방 패널티 10, 갭 연장 패널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다. 따라서, 본 출원에서 사용된 것으로서, 용어 "상동성" 또는 "동일성"은 서열들간의 관련성(relevance)를 나타낸다.

[40]

[41] 본 출원에서, "단편"은 특정 서열을 갖는 유전자의 일부 서열을 의미하는 것으로, 구체적으로는, 서열번호 1의 염기서열로 표현되는 유전자, 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자의 일부 서열이면서, Ganoderma 속 미생물 특이적인 서열을 포함함으로써, Ganoderma 속 미생물 검출에 이용될 수 있는 일부 영역의 서열을 의미한다. 서열번호 1의 염기서열로 표현되는 유전자, 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자의 일부 서열이면서 Ganoderma 속 미생물을 검출할 수 있는 한, 서열이나 그 길이는 제한되지 않고, 상기 단편의 양 말단에 무의미한 서열이 부가되거나, 일부 서열이 치환된 서열 역시 본 출원의 범주에 포함됨은 자명하다. 구체적으로, 상기 단편은 서열번호 10 내지 12 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[42]

[43] 구체적으로, 본 출원의 마커는 서열번호 1 내지 12 중 어느 하나의 서열을 포함하는 것일 수 있고, 보다 구체적으로, 본 출원의 마커는 서열번호 1 내지 12 중 어느 하나의 서열로 구성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[44]

[45] 본 출원에서, "검출할 수 있는 제제"는 당업계에서 일반적으로 유전자를 검출하는데 이용하는 임의의 제제를 모두 포함하며, 상기 마커의 서열 전체를 검출하는 제제뿐 아니라, 그 일부를 검출하여 마커의 존재를 확인할 수 있는 제제를 의미한다. 본 출원에서, 상기 검출할 수 있는 제제는, 이에 제한되는 것은 아니나, 본 출원의 마커를 증폭하고 검출할 수 있는 제제를 의미할 수 있고, 구체적으로는 프로브, 프라이머 쌍, 항체, 앱타머, 및 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[46] 본 출원에서, "프라이머"는 검출하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 본 출원에서 프라이머는 PCR 반응을 통한 마커의 검출에 이용되기 위해 제작될 수 있으며, 프라이머의 구체적인 길이 및 서열은 요구되는 DNA 또는 RNA 표적의 복합도(complexity)뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 이용 조건에 따라 당업계에 알려진 방법으로 합성될 수 있다. 구체적으로, 상기 프라이머 쌍은 서열번호 13 및 14의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[47] 또한, 본 출원의 "프로브"는 공지의 방법으로 특정 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 염기 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과

엄격한 조건 하에 하이드리드화 될 수 있는 것이라면 본 출원의 범주에 제한없이 포함될 수 있다. 상기 "엄격한 조건(stringent condition)"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌 (예컨대, J. Sambrook et al., 상동)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성(homology) 또는 동일성(identity)이 높은 유전자끼리, 80% 이상, 85% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 97% 이상, 특히 구체적으로는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 유전자끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성 또는 동일성이 낮은 유전자끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화(southern hybridization)의 세척 조건인 60℃, 1 X SSC, 0.1% SDS, 구체적으로는 60℃, 0.1 X SSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로는 68℃, 0.1 X SSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로는 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다.

[48] 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치 (mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 핵산이 상보적 서열을 가질 것을 요구한다. 용어, "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 기술하는데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데노신은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 출원은 또한 실질적으로 유사한 핵산 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수 있다.

[49] 구체적으로, 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리뉴클레오티드는 55 ℃의 Tm 값에서 혼성화 단계를 포함하는 혼성화 조건을 사용하고 상술한 조건을 사용하여 탐지할 수 있다. 또한, 상기 Tm 값은 60 ℃, 63 ℃ 또는 65 ℃일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 그 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.

[50] 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(Sambrook et al., supra, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조).

[51]

[52] 본 출원에서, "진단"은 Ganoderma 속 미생물에 의해 오염되어 뿌리 썩음병이 발병되었는지 여부를 판단하는 과정을 의미한다. 본 발명의 조성물을 이용하면 시료에 Ganoderma 속 미생물 특이적인 서열이 존재하는지 여부를 확인할 수 있다.

[53]

[54] 본 출원의 뿌리 썩음병 진단용 조성물은 Ganoderma 속 미생물이 갖는 특이적인 마커, 즉, 서열번호 1의 염기서열로 표현되는 유전자, 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자, 또는 이의 단편이 채취된 시료에 존재하는지 여부를 판별하여 시료가 Ganoderma 속 미생물에 의해 오염되었는지 여부, 또는 뿌리 썩음병에 걸렸는지를 진단할 수 있도록 하는

조성물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[55] 구체적으로, 상기 뿌리 썩음병은 오일팜나무에서 *Ganoderma* 속 미생물에 의해 발병하는 것일 수 있고, 상기 뿌리 썩음병이 발병하는 식물체는 *Elaeis guineensis, Elaeis oleifera, Attalea maripa* 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[56]

[57] 본 출원에서, "Ganoderma 속 미생물"은 진균류(fungi)에 속하는 미생물로서, 아시아에서는 전통적으로 의약품으로 사용되어 왔다. 본 출원에서는 상기 Ganoderma 속 미생물이 뿌리 썩음병의 원인균이라는 점에 착안하여, 상기 미생물을 특이적으로 검출할 수 있는 마커를 제공한다. 구체적으로, 상기 Ganoderma 속 미생물은 가노더마 알바(Ganoderma alba), 가노더마 아눌라리스(Ganoderma annularis), 가노더마 아트룸(Ganoderma atrum), 가노더마 오레아(Ganoderma aurea), 가노더마 오스트랄(Ganoderma austral), 가노더마 암보이넨스(Ganoderma amboinense), 가노더마 아플라나툼(Ganoderma applanatum), 가노더마 보니넨스(Ganoderma boninense), 가노더마 브라우니(Ganoderma brownie), 가노더마 콜로서스(Ganoderma colossus), 가노더마 큐프레움(Ganoderma cupreum), 가노더마 커티시(Ganoderma curtisii), 가노더마 포르모사눔(Ganoderma formosanum), 가노더마 인크라사툼(Ganoderma incrassatum), 가노더마 로바툼(Ganoderma lobatum), 가노더마 루시둠(Ganoderma lucidum), 가노더마 메레디티애(Ganoderma meredithiae), 가노더마 미니아토신툼(Ganoderma miniatocinctum), 가노더마 멀티피레움(Ganoderma multipileum), 가노더마 니그로루시둠(Ganoderma nigrolucidum), 가노더마 오르비포르메 (Ganoderma orbiforme), 가노더마 오레고넨스(Ganoderma oregonense), 가노더마 퍼푸레아(Ganoderma purpurea), 가노더마 페이페리(Ganoderma pfeifferi), 가노더마 필리피(Ganoderma philippii), 가노더마 수도페레움(Ganoderma pseudoferreum), 가노더마 레시나세움(Ganoderma resinaceum), 가노더마 루브라(Ganoderma rubra), 가노더마 시추아넨스(Ganoderma sichuanense), 가노더마 시넨스(Ganoderma sinense), 가노더마 스테야에르타눔(Ganoderma steyaertanum), 가노더마 토르나툼(Ganoderma tornatum), 가노더마 수개(Ganoderma tsugae), 가노더마 비리디스(Ganoderma viridis), 가노더마 베버리아눔(Ganoderma weberianum), 및 가노더마 조나툼(Ganoderma zonatum)으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[58]

[59] 본 출원의 다른 하나의 양태는 뿌리 썩음병 진단용 키트를 제공한다.

[60]

[61] 하나의 구체예에서, 상기 조성물을 포함하는 뿌리 썩음병 진단용 키트를 제공한다. 구체적으로, 상기 키트는 서열번호 1의 염기서열로 표현되는 유전자, 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자, 또는

이의 단편을 검출 할 수 있는 제제를 포함할 수 있으며, 본 출원의 뿌리 썩음병 진단용 키트는 현장에서 채취한 토양 시료에 Ganoderma 속 미생물이 존재하는지 여부를 확인하는 데 이용될 수 있다.

[62] 구체적으로, 상기 키트는 RT-PCR 키트, 면역 스트립, DNA 칩 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트, 및 ELISA 진단 키트로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, Ganoderma 속 미생물이 존재하는지 여부를 확인할 수 있다면 그 작동 원리나 형태에 제한되지 않는다.

[63] 또한, 본 출원의 키트는 뿌리 썩음병 진단을 위해 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 다른 구성 성분의 일 예로, 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 발색단(chromophores), 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 표지물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 담체는 가용성 담체, 불용성 담체가 있고, 가용성 담체의 일 예로 당 분야에서 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS가 있고, 불용성 담체의 일 예로 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 덱스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로오스 및 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[64] 또한, 본 출원의 키트는 마커의 검출을 위한 프라이머 쌍, 및 검출 반응을 수행하기 위한 시약을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 출원의 키트는 마커 검출을 위해 수행되는 증폭 반응에 필요한 시약을 추가로 포함할 수 있고, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼 등을 포함할 수 있고, 또한, 실시간 PCR 반응 수행 및 분석을 위해 필요한 시약을 추가로 포함할 수 있다.

[65] 또한, 본 출원의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, PCR 버퍼 제조 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨 및 키트를 포함하는 패키지의 표면상에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.

[66]

[67] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 뿌리 썩음병 진단용 칩을 제공한다.

[68] 하나의 구체예에서, 상기 조성물을 포함하는 뿌리 썩음병 진단용 칩을 제공한다. 상기 칩은 서열번호 1의 염기서열로 표현되는 유전자, 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자, 또는 이의 단편을 검출 할 수 있는 제제를 포함할 수 있으며, 구체적으로, 상기 칩은 DNA 칩, 또는

단백질 칩일 수 있다.

[69] 상기 DNA 칩은 Ganoderma 속 미생물을 검출하기 위한 마커 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기판을 포함하는 것일 수 있고, 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 추가적으로 포함할 수 있다. 또한, 상기 기판은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[70] 상기 단백질 칩은 본 출원의 서열번호 1의 염기서열로 표현되는 유전자, 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자, 또는 이의 단편을 특이적으로 인식하는 항체를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[71]

[72] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 뿌리 썩음병 진단 방법을 제공한다.

[73]

[74] 하나의 구체예에서, 채취된 시료에서 서열번호 1의 염기서열로 표현되는 유전자, 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자, 또는 이의 단편을 검출하는 단계를 포함하는, 뿌리 썩음병 진단 방법을 제공한다. 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자는 서열번호 2 내지 9 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 것일 수 있고, 상기 단편은 서열번호 10 내지 12 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[75] 상기 시료는 Ganoderma 속 미생물에 의한 오염을 판단할 수 있는 한, 제한없이 이용될 수 있으나, 토양, 식물체 등이 될 수 있고, 토양 시료의 경우, 시료의 채취 깊이, 채취 방법 등은 제한되지 않는다.

[76] 또한, 상기 검출은 역전사효소 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 중합효소반응(competitive RT-PCR), 실시간 중합효소반응(real time RT-PCR), 실시간 역전사효소 중합효소반응(real time quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던 블랏팅(Northern blotting), 유전자 칩, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 방법으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[77]

[78] 본 출원의 진단 방법의 한 예로서,

[79] (a) 시료를 채취하는 단계;

[80] (b) 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계; 및

[81] (c) 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하여, 본 출원의 마커를 검출하기 위한 프라이머 세트를 이용하는 실시간 PCR을 수행하여 마커를 검출하는 단계를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[82]

[83] 또한, 본 출원의 진단 방법은, (d) 대조군 시료에서 본 출원의 마커를 검출하는 단계를 추가로 포함하거나, 또는, (e) 상기 대조군 시료에서 검출된 본 출원의 마커와 (c) 단계에서 확인된 시료 내 마커의 검출 결과와 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 출원의 마커 검출 방법은 마커를 증폭한 후 증폭된 마커를 검출하는 것일 수 있으나, 당업계에 알려진 마커 검출 방법이라면 특정 방법에 제한되지 않는다. 상기 검출 결과는 증폭된 유전자 또는 이의 단편의 양일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 대조군 시료는 Ganoderma 속 미생물이 존재하지 않는 시료, 또는 뿌리 썩음병이 발병하지 않은 시료 등이 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[84] 더 나아가, 본 출원의 진단 방법은 (f) 대조군 시료와 시료 내 증폭된 유전자 또는 그의 단편의 양을 비교하여, Ganoderma 속 미생물이 특이적으로 갖는 유전자 또는 그의 단편의 양이 증가할 경우, 뿌리 썩음병에 걸린 것으로 진단하는 단계를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[85]

[86] 본 출원에서, 시료 또는 시료 내 포함된 미생물에서 게놈 DNA를 분리하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, CTAB 방법을 이용할 수도 있고, wizard prep 키트 (Promega)를 이용할 수도 있다. 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 프라이머를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다. 표적 핵산을 증폭하는 방법은 중합효소연쇄반응 (PCR), 리가아제 연쇄반응 (ligase chain reaction), 핵산 서열 기재 증폭 (nucleic acid sequence-based amplification), 전사 기재 증폭 시스템 (transcription-based amplification system), 가닥 치환 증폭 (strand displacement amplification) 또는 Qβ 복제효소 (replicase)를 통한 증폭 또는 당업계에 알려진 핵산 분자를 증폭하기 위한 임의의 기타 적당한 방법이 있다. 이 중에서, PCR이란 중합효소를 이용하여 표적 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍으로부터 표적 핵산을 증폭하는 방법이다. 이러한 PCR 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 상업적으로 이용가능한 키트를 이용할 수도 있다.

[87] 실시간 PCR은 각 PCR을 지수함수적으로 증가하는 범위 내에서 비교하기 위해 매 시기의 PCR 진행 상황을 실시간으로 모니터링하는 방법이다. DNA 정량기법인 실시간 PCR 방법은 열순환기 (thermal cycler)와 분광 형광광도계가 일체화된 장치를 이용하여 실시간으로 PCR 증폭 산물의 생성 과정을 관찰함으로써 최초의 시료에 존재하는 표적 DNA 양을 정량하는 방법이다. 실시간 PCR은 미생물 배양에 기초할 수밖에 없었던 기존의 미생물 정성 및 정량 방법을 대체하여 미생물의 분리 및 배양을 수행하지 않고서도 미생물의 정성 및 정량을 가능하게 한다.

[88] 실시간 PCR 방법은 절대 정량 (absolute quantification)과 상대 정량 (relative quantification) 분석으로 구분되는데, 시료 내의 표적 DNA를 정량하기 위해서는 표준시료의 검량선 (표준곡선; standard curve) 작성이 필수적인 요소이다.

표준시료와 미지시료를 대상으로 동시에 정량적 실시간 PCR을 실시하여 표준시료로부터 검량선을 도출한 후, 이 검량선으로부터 미지시료 내 표적 DNA의 양을 정량한다. 이때 표준시료로부터의 검량선 (x축: 표준시료의 농도, y축: 역치 주기 수 (CT; threshold cycle))은 상관지수 (R^2)가 1에 가까울수록, 기울기가 -3.33에 가까울수록 이상적이다. "정량적 PCR"이란 증폭반응 개시 시의 주형 DNA 양을 정량하기 위한 PCR로서, 반응 중 임의의 시점에서 증폭대상의 분자에 대해 증폭을 확인할 수 있는 PCR을 의미한다. 정량을 위해서는 일반적으로 그와 같은 PCR과 반응 개시 시의 주형 DNA 분자 수와 그 증폭의 지표가 되는 신호를 관련짓는 검량선이 조합된다. 이 검량선은 분자 수가 알려진 표준시료를 이용하여 제작할 수 있다. 상기 검량선은 정량하고자 하는 Ganoderma 속 미생물의 유전자 또는 마커를 표준시료로 하고, 이를 특이적으로 증폭하기 위한 프라이머를 이용하여 정량적 실시간 PCR을 수행함으로써, 표준시료의 증폭으로부터 작성된 검량선을 기준으로 시료 내 존재하는 표적 유전자 또는 마커의 역치 주기 수 (CT)를 확인하는 것일 수 있다.

[89] 또한, 상기 증폭된 표적 서열은 검출가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 상기 표지 물질은 바람직하게는 형광을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 현재 실시간 PCR에 사용되는 검출 방법 (detection chemistry)은 일반적으로 Sybr Green I을 이용하는 비특이적 방법과 혼성화 프로브 (hybridization probe)를 이용하는 특이적 방법으로 나뉜다. Sybr Green I은 이중나선 DNA에 비특이적으로 결합하여 형광을 방출하며 실시간 PCR 기기는 이 형광의 양을 측정하여 DNA의 양을 확인할 수 있다. 혼성화 프로브는 특이적으로 상보적인 염기서열에 혼성화되어 PCR 반응 중에 형광을 방출한다. 예를 들어, 대표적인 혼성화 프로브로서 택맨 프로브 (taqman probe, dual labeled fluorogenic probe)는 5'-말단에는 형광 리포터가, 3'-말단에는 소광제 (quencher)가 결합되어 있다. 택맨 프로브의 형광 리포터는 소광제와 근접하여 존재하는 경우, 형광이 상쇄되어 검출되지 않는다. 택맨 프로브가 특이적 표적 염기서열에 혼성화되어 PCR 증폭이 진행되면 Taq DNA 폴리머라제의 5'-3' 엑소뉴클레아제 (exonuclease) 활성에 의해 택맨 프로브가 분해되면서 형광 리포터가 자유롭게 방출되고, 그로 인해 소광제와 멀어지면서 형광을 발산하게 된다. 이를 측정하여 실시간으로 표적 DNA 조각의 생성량을 모니터링하는 것이다.

[90]

[91] 구체적으로, 본 출원의 방법에서 이용하는 프라이머 쌍은 서열번호 13 및 14의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍일 수 있고, 본 출원의 방법의 유전자 또는 이의 단편을 검출하는 단계는 서열번호 13 및 14의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍을 이용한 PCR(Polymerase chain reaction)을 통해 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[92]

[93] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 Ganoderma 속 미생물 검출용 조성물을

제공한다.

[94] 하나의 구체예에서, 서열번호 1의 염기서열로 표현되는 유전자, 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자, 또는 이의 단편을 검출할 수 있는 제제를 포함하는, Ganoderma 속 미생물 검출용 조성물을 제공한다.

[95] 본 출원의 Ganoderma 속 미생물 검출용 조성물은 시료(예를 들어, 토양)가 Ganoderma 속 미생물에 의해 오염되었는지 여부를 판별하는 데 이용될 수 있으며, 구체적으로는 본 출원의 마커를 검출하는데 이용될 수 있다.

[96]

[97] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 Ganoderma 속 미생물 검출 방법을 제공한다.

[98] 하나의 구체예에서, 채취된 시료에서 서열번호 1의 염기서열로 표현되는 유전자, 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자, 또는 이의 단편을 검출하는 단계를 포함하는, Ganoderma 속 미생물 검출 방법을 제공한다.

[99] 본 출원의 Ganoderma 속 미생물 검출 방법은 본 출원의 마커, 또는 조성물을 이용하여 시료 내 Ganoderma 속 미생물이 존재하는지 여부를 검출하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[100]

[101] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 뿌리 썩음병 진단 용도를 제공한다.

[102] 하나의 구체예에서, (i) 서열번호 1의 염기서열로 표현되는 유전자, 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자, 또는 이의 단편의 뿌리 썩음병 진단 용도; 또는 (ii) 서열번호 1의 염기서열로 표현되는 유전자, 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자, 또는 이의 단편을 검출할 수 있는 제제의 뿌리 썩음병 진단 용도를 제공한다.

[103]

[104] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 Ganoderma 속 미생물 검출 용도를 제공한다.

[105] 하나의 구체예에서, (i) 서열번호 1의 염기서열로 표현되는 유전자, 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자, 또는 이의 단편의 Ganoderma 속 미생물 검출 용도; 또는 (ii) 서열번호 1의 염기서열로 표현되는 유전자, 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자, 또는 이의 단편을 검출할 수 있는 제제의 Ganoderma 속 미생물 검출 용도를 제공한다.

[106]

발명의 실시를 위한 형태

[107] 이하, 본 출원을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하나, 이는 본 출원의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 출원의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[108]

[109] **실시예 1: Ganoderma 균의 서열 추출 및 특이적 마커 발굴**

[110]

[111] 본 발명자들은 뿌리 썩음병의 주원인으로 알려져 있는 Ganoderma 속 미생물을 특이적으로 검출할 수 있는 마커를 발굴하고자 하였다.

[112] 이에, Ganoderma 속 미생물 중, *Ganoderma boninense G3*(GCA_002900995.2), *Ganoderma boninense NJ3*(GCA_001855635.1), *Ganoderma lucidum BCRC* (GCA_000338035.1), *Ganoderma Tsugae*(GCA_003057275.1), *Ganoderma lucidum Xiangnong*(GCA_000262775.1), *Ganoderma lucidum G260125* (GCA_000271565.1), *Ganoderma sinense*(GCA_002760635.1) 미생물은 공지된 NCBI 사이트에서 DNA 서열을 확보하였으며, *Ganoderma boninense*은 직접 미생물의 DNA 서열을 확보하여, 확보된 서열로부터 Ganoderma 속 미생물을 검출하기 위한 특이적 마커를 발굴 및 개발하였다.

[113]

[114] 구체적으로, NGS (Next Generation Sequencing) 시퀀싱을 통해 본 발명자들이 확보한 *Ganoderma boninense* 균주의 DNA 서열(2,544contig, 95,911,849bp), NCBI(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)의 nt database (2018년 5월기준, 178,448,606,127bp)에 공지된 Ganoderma 속 미생물의 DNA 서열, 및 Ganoderma 속이 아닌 fungi 균주의 DNA 서열(2,391개 strain, 80,288,864,015bp) 정보를 확보하였다.

[115]

[116] 이후, 본 발명자들이 확보한 토양 샘플 중, metagenome 분석 결과 Ganoderma 속 미생물이 존재하지 않는 것으로 확인된 토양의 gDNA서열을 NGS를 통해 확보하였다(7,724,586,454bp).

[117]

[118] 이후, Ganoderma 속 미생물, Ganoderma 속에 속하지 않는 미생물과 말레이시아 토양 DNA에서 확보한 미생물 서열 중 Ganoderma 속 미생물 특이적인 마커를 발굴하였다(표 1).

[119]

[120] [표1]

서열번호	미생물	Identity
1	*CJ Ganoderma boninense*	-
2	*Ganoderma boninense G3*	94%
3	*Ganoderma boninense NJ3*	98%
4	*Ganoderma lucidum BCRC*	83%
5	*Ganoderma Tsugae*	83%
6		84%
7	*Ganoderma lucidum Xiangnong*	83%
8	*Ganoderma lucidum G260125*	84%
9	*Ganoderma sinense*	89%

[121] 상기 서열번호 2 내지 9의 염기서열로 표현되는 Ganoderma 속 미생물 특이적 마커는 서열번호 1의 마커 서열과 최소 83%의 동일성(identity)을 갖는 것을 확인하였다.

[122]

[123] **실시예 2: Ganoderma 균 특이적 마커를 이용한 뿌리 썩음병의 진단**

[124]

[125] 상기 실시예 1에서 확보한 마커를 이용하여 토양에서 직접 Ganoderma 속 미생물을 검출할 수 있는지 확인하였다.

[126]

[127] 이를 위해, 본 출원의 서열번호 1 내지 9의 마커를 검출하기 위한 프라이머를 제작하였으며, 상기 프라이머가 결합하는 Ganoderma 속 미생물 특이적 서열 내 영역은 다음의 표 2와 같다

[128]

[129] [표2]

서열번호	미생물
10	*Ganoderma boninense* G3
11	*Ganoderma boninense* NJ3
12	CJ *Ganoderma boninense*

[130] 상기 서열번호 10 내지 12의 일부 영역을 검출하기 위한 프라이머 정보는 다음의 표 3과 같다.

[131]

[132] [표3]

서열번호	서열	
13	Forward	GCGCTCCATGACTACGCTAT
14	Reverse	CCAGTCGATCGAATAGTAGTTGG

[133] 상기 서열번호 13 및 14의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍을 이용하여, 토양에서 Ganoderma 균에 의한 감염 여부를 진단할 수 있는지 확인하였다.

[134]

[135] 구체적으로, 말레이시아에서 채취한 *Ganoderma boninense*에 오염된 토양 샘플(도 1의 레인 6 및 7)에서 얻어진 토양 DNA 300~500ng 또는 genomic DNA (G.boninense 또는 Ganoderma 속 미생물이 아닌 다른 fungi) 1~20ng을 AccuPowr® PriFi Taq PCR PreMix 튜브에 넣고, 10 pmol/uL의 서열번호 13 및 14의 프라이머를 1uL 첨가하였다. 이후, 증류수를 넣어 전체 volume이 20uL이 되도록 하고, Blue pellet을 잘 녹인 다음에 spin down하였다. 이후, Thermocycler에 setting한후 다음과 같은 조건에서 PCR을 진행하였다.

[136] 95℃에서 5분후 95℃에서 20초, 60℃에서 30초, 68℃에서 1분간 30~50cycle을 돌린다. 이후 68℃에서 5분간 두었다.

[137]

[138] [표4]

온도	시간	Cycles
95°C	5분	1cylces
95°C	20초	30~50cylces
60°C	30초	
68°C	1분	
68°C	5분	1cylces

[139]

[140] PCR 반응이 끝난 후, 4℃에서 유지시키고, 1% agrose gel에 20uL를 모두 로딩하여 전기영동으로 PCR 산물을 분석하였다. 얻어진 PCR 산물로부터 Ganoderma 속 미생물의 존재 여부를 확인하고, PCR 산물의 밴드 강도 (band intensity)로부터 상기 Ganoderma 균에 의한 토양의 오염정도를 확인하였다 (도 1).

[141]

[142] 도 1의 각 레인이 나타내는 바는 다음과 같다. 레인 1은 DNA ladder를, 레인 2는

Ganoderma boninense Genomic DNA를 이용한 PCR 산물; 레인 3은 베르칸데라 미생물(Bjerkandera sp.) Genomic DNA를 이용한 PCR 산물; 레인 4는 퓨자리움 미생물(Fusarium sp.) Genomic DNA를 이용한 PCR 산물; 레인 5는 트리코더마 미생물(Trichoderma sp.) Genomic DNA를 이용한 PCR 산물; 레인 6은 뿌리썩음병이 발생한 토양 DNA를 이용한 PCR 산물; 레인 7은 뿌리썩음병이 발생한 토양 DNA를 이용한 PCR 산물; 레인 8은 물만 넣고 진행한 PCR 산물(negative control)을 나타낸다.

[143]

[144] 도 1의 결과로부터, 본 출원의 마커를 이용하여 Ganoderma 균에 의한 뿌리썩음병을 검출할 수 있음을 확인하였다.

[145]

[146] 상술한 실시예로부터, 본 발명자들은 Ganoderma 속 미생물이 특이적으로 갖는 신규 마커를 발굴하였을 뿐만 아니라, 토양에서 Ganoderma 균에 의한 뿌리 썩음병 감염 여부를 진단할 수 있음을 확인하였다.

[147]

[148] 이상의 설명으로부터, 본 출원이 속하는 기술분야의 당업자는 본 출원이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 출원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 출원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

[청구항 1] 서열번호 1의 염기서열로 표현되는 유전자, 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자, 또는 이의 단편을 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 뿌리 썩음병 진단용 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 서열번호 1의 염기서열로 표현되는 유전자, 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자, 또는 이의 단편은 *Ganoderma* 속 미생물이 특이적으로 갖는 것인, 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자는 서열번호 2 내지 9 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 것인, 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 제제는 프로브, 프라이머 쌍, 항체, 앱타머, 및 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 단편은 서열번호 10 내지 12 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 것인, 조성물.

[청구항 6] 제4항에 있어서, 상기 프라이머 쌍은 서열번호 13 및 14의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍인 것인, 조성물.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 뿌리 썩음병은 *Ganoderma* 속 미생물에 의해 발병하는 것인, 조성물.

[청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 Ganoderma 속 미생물은 *Ganoderma alba, Ganoderma annularis, Ganoderma atrum, Ganoderma aurea, Ganoderma austral, Ganoderma amboinense, Ganoderma applanatum, Ganoderma boninense, Ganoderma brownie, Ganoderma colossus, Ganoderma cupreum, Ganoderma curtisii, Ganoderma formosanum, Ganoderma incrassatum, Ganoderma lobatum, Ganoderma lucidum, Ganoderma meredithiae, Ganoderma miniatocinctum, Ganoderma multipileum, Ganoderma nigrolucidum, Ganoderma orbiforme, Ganoderma oregonense, Ganoderma purpurea, Ganoderma pfeifferi, Ganoderma philippii, Ganoderma pseudoferreum, Ganoderma resinaceum, Ganoderma rubra, Ganoderma sichuanense, Ganoderma sinense, Ganoderma steyaertanum, Ganoderma tornatum, Ganoderma tsugae, Ganoderma viridis, Ganoderma weberianum,* 및 *Ganoderma zonatum*으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 조성물.

[청구항 9] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 뿌리 썩음병 진단용 키트.

[청구항 10] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 뿌리 썩음병 진단용 칩.

[청구항 11] 채취된 시료에서 서열번호 1의 염기서열로 표현되는 유전자, 상기

서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자, 또는 이의 단편을 검출하는 단계를 포함하는, 뿌리 썩음병 진단 방법.

[청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자는 서열번호 2 내지 9 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 것인, 방법.

[청구항 13] 제11항에 있어서, 상기 단편은 서열번호 10 내지 12 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 것인, 방법.

[청구항 14] 제11항에 있어서, 상기 유전자 또는 이의 단편을 검출하는 단계는 서열번호 13 및 14의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍을 이용한 PCR(Polymerase chain reaction)을 통해 수행되는 것인, 방법.

[청구항 15] 제11항에 있어서, 상기 방법은 대조군 시료와 채취된 시료에서 증폭된 유전자 또는 이의 단편의 양을 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

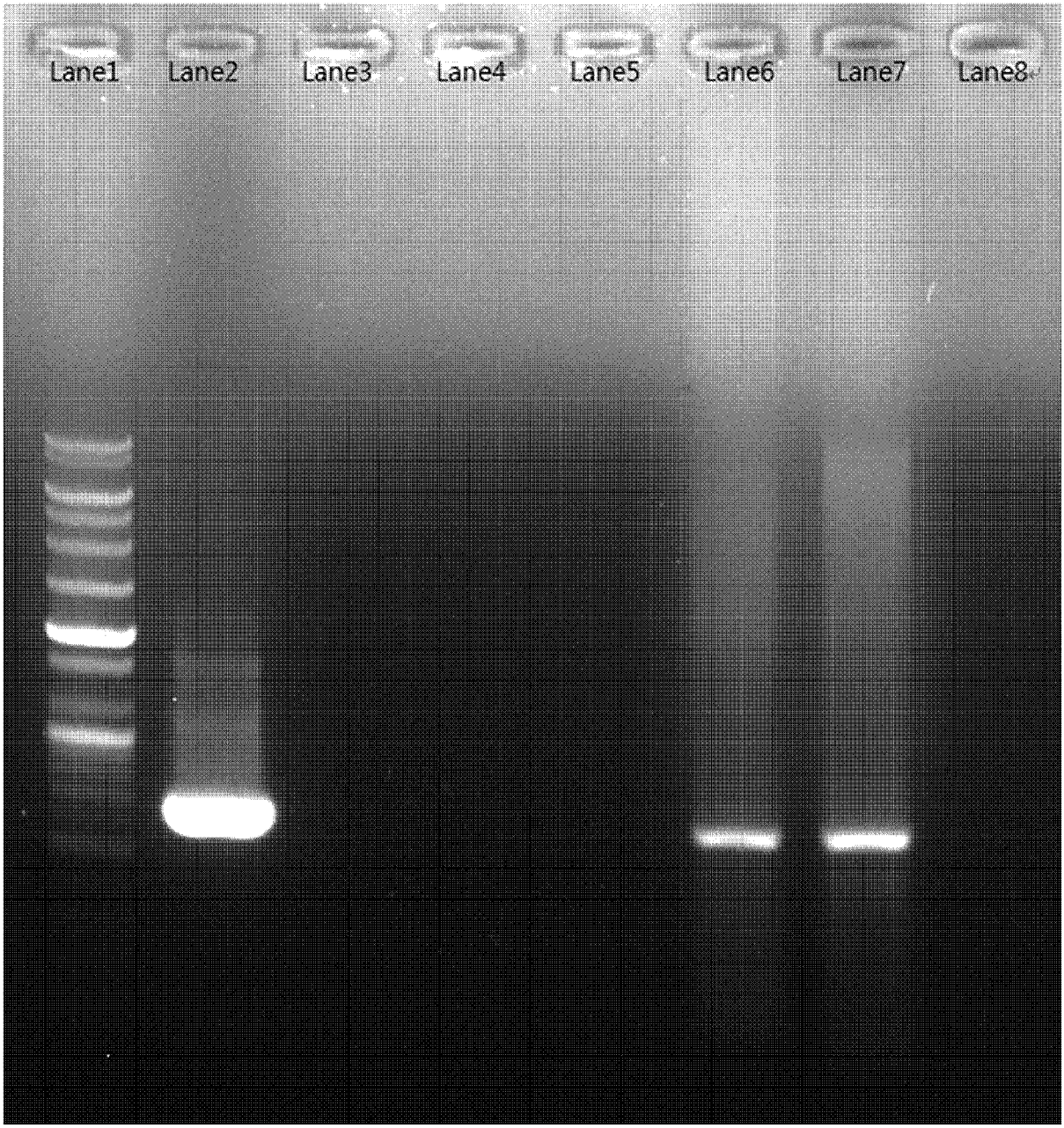
[청구항 16] 서열번호 1의 염기서열로 표현되는 유전자, 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자, 또는 이의 단편을 검출할 수 있는 제제를 포함하는, Ganoderma 속 미생물 검출용 조성물.

[청구항 17] 채취된 시료에서 서열번호 1의 염기서열로 표현되는 유전자, 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자, 또는 이의 단편을 검출하는 단계를 포함하는, Ganoderma 속 미생물 검출 방법.

[청구항 18] 서열번호 1의 염기서열로 표현되는 유전자, 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자, 또는 이의 단편의 뿌리 썩음병 진단 용도.

[청구항 19] 서열번호 1의 염기서열로 표현되는 유전자, 상기 서열번호 1의 염기서열과 최소 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자, 또는 이의 단편의 Ganoderma 속 미생물 검출 용도.

[도1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/002412

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6895(2018.01)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)
C12Q 1/6895; A01N 65/00

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: Ganoderma microorganism, basal stem rot

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KARTHIKEYAN, M. et al. Rapid Detection of Ganoderma Disease of Coconut and Assessment of Inhibition Effect of Various Control Measures by Immunoassay and PCR. Plant Protect. Sci. 2006, vol. 42, no. 2, pages 49-57 See abstract; pages 49, 50; and figures 1, 3.	1-19
A	UTOMO, C. et al. Identification of Ganoderma, the causal agent of basal stem rot disease in oil palm using a molecular method. Mycopathologia. 2005, vol. 159, pages 159-170 See the entire document.	1-19
A	NCBI. GenBank accession no. LFMK01017874.1 (28 October 2016) See the entire document.	1-19
A	NCBI. GenBank accession no. KX452685.1 (21 December 2016) See the entire document.	1-19
A	US 2010-0255124 A1 (GREEN, W. A. et al.) 07 October 2010 See the entire document.	1-19

☐ 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	Date of mailing of the international search report
26 MAY 2020 (26.05.2020)	**27 MAY 2020 (27.05.2020)**

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea
Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2020/002412

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2010-0255124 A1	07/10/2010	BR PI1010302 A2	27/06/2017
		CA 2757537 A1	07/10/2010
		CA 2757537 C	08/01/2019
		EP 2413692 A2	08/02/2012
		EP 2413692 B1	29/08/2018
		MX 2011010420 A	16/12/2011
		MY 158356 A	30/09/2016
		US 2013-0224315 A1	29/08/2013
		US 2015-0173356 A1	25/06/2015
		US 8425946 B2	23/04/2013
		US 8968798 B2	03/03/2015
		WO 2010-115162 A2	07/10/2010
		WO 2010-115162 A3	29/12/2010

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2020/002412

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/6895(2018.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12Q 1/6895; A01N 65/00

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: 가노더마 속 미생물(Ganoderma microorganism), 뿌리 썩음병(basal stem rot)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KARTHIKEYAN, M. 등, `Rapid Detection of Ganoderma Disease of Coconut and Assessment of Inhibition Effect of Various Control Measures by Immunoassay and PCR', Plant Protect. Sci., 2006, 42권, 2호, 페이지 49-57 초록; 페이지 49, 50; 및 도면 1, 3	1-19
A	UTOMO, C. 등, `Identification of Ganoderma, the causal agent of basal stem rot disease in oil palm using a molecular method', Mycopathologia, 2005, 159권, 페이지 159-170 전체 문헌	1-19
A	NCBI, GenBank accession no. LFMK01017874.1 (2016.10.28) 전체 문헌	1-19
A	NCBI, GenBank accession no. KX452685.1 (2016.12.21) 전체 문헌	1-19
A	US 2010-0255124 A1 (GREEN, W. A. 등) 2010.10.07 전체 문헌	1-19

☐ 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

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

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

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

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

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2020년 05월 26일 (26.05.2020)	2020년 05월 27일 (27.05.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
한인호
전화번호 +82-42-481-3362

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2020/002412

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2010-0255124 A1	2010/10/07	BR PI1010302 A2	2017/06/27
		CA 2757537 A1	2010/10/07
		CA 2757537 C	2019/01/08
		EP 2413692 A2	2012/02/08
		EP 2413692 B1	2018/08/29
		MX 2011010420 A	2011/12/16
		MY 158356 A	2016/09/30
		US 2013-0224315 A1	2013/08/29
		US 2015-0173356 A1	2015/06/25
		US 8425946 B2	2013/04/23
		US 8968798 B2	2015/03/03
		WO 2010-115162 A2	2010/10/07
		WO 2010-115162 A3	2010/12/29