(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0094796
(43) 공개일자 2025년06월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/37 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/37 (2013.01)
C12N 15/8242 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0184452
(22) 출원일자 2023년12월18일
심사청구일자 2024년08월13일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
오상근
대전광역시 서구 관저중로 33, 112동 1001호 (관저동, 관저에미지 명가의 풍경)
김선하
대전광역시 유성구 어은로 57, 120동 404호 (어은동, 한빛아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

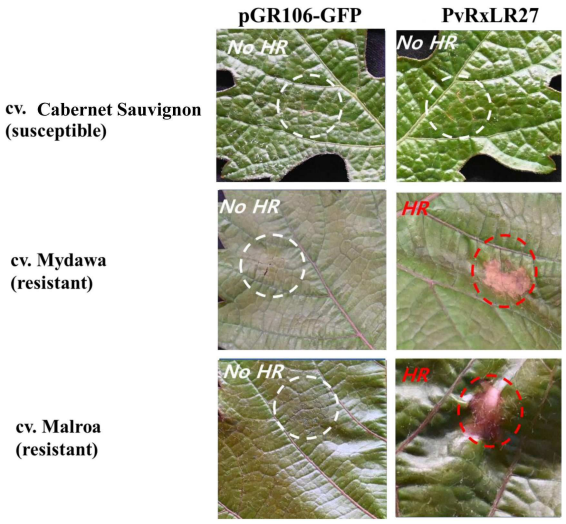
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **포도 노균병균에서 분리한 병원성 이펙터 PvRxLR27 유전자를 이용한 포도 노균병 저항성 품종 판별 방법 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 포도 노균병균에서 분리한 병원성 이펙터 PvRxLR27 유전자를 이용한 포도 노균병 저항성 품종 판별 방법 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 포도 노균병균 유래 *PvRxLR27* 유전자를 식물에 도입할 경우 면역 반응에 의해 과민성 세포사멸 반응이 유도되고, 이러한 세포사멸 반응 여부를 확인함으로써 노균병에 대해 저항성 또는 감수성을 보이는 식물을 정확하게 구별할 수 있으므로, 본 발명의 *PvRxLR27* 유전자는 포도 노균병에 대해 저항성을 가지는 포도과 식물의 품종 개발 및 육성을 위해 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
G01N 33/5097 (2022.08)
(72) 발명자
민지영
충청남도 예산군 예산읍 신흥길 48-7

마크 세문야나
대전광역시 유성구 대학로141번길 44, 102호 (궁동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395072745
과제번호	PJ014925032023
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	신농업기후 변화대응 체계 구축
연구과제명	주요과수(포도) 내재해성유전자원 특성 DB구축 및 육종소재화(3공동)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 노균병균(*Plasmopara viticola*) 유래의 PvRxLR27 단백질.

청구항 2

제1항의 단백질을 코딩하는 유전자.

청구항 3

제2항의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 4

제3항의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포.

청구항 5

노균병균(*Plasmopara viticola*) 유래의 PvRxLR27 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 식물체에서 과민성 세포사멸 반응 여부를 확인하는 단계;를 포함하는, 노균병 저항성 포도과(Vitaceae) 식물체를 판별하는 방법.

청구항 6

제2항의 유전자 또는 이를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는 노균병 저항성 포도과(Vitaceae) 식물체를 판별하기 위한 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 포도 노균병균에서 분리한 병원성 이펙터 PvRxLR27 유전자를 이용한 포도 노균병 저항성 품종 판별 방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 포도는 포도과(Vitaceae) 작물로서 진정포도 아속(*Euvitis*, 2n=30)과 머스카디니아 아속(*Muscadinia*, 2n=40)을 포함하는 80여 종의 포도속(*Vitis*)으로 진화해왔다. 특히, 진정포도 아속은 오랜 기간 기후 조건에 적응하며 형태적·생태적으로 양구분되는 지리적 종군, 서아시아 종군, 동아시아 종군, 북아메리카 종군을 형성하였으며, 서아시아 종군에 속하는 비티스 비니페라(*Vitis vinifera*)가 전 세계 재배 품종의 95% 이상을 차지하고 있다. 과실의 품질이 우수한 *V. vinifera*는 에리시페 네카터(*Erysiphe necator*)에 의해 유발된 흰가루병과 플라스모파라 비티콜라(*Plasmopara viticola*)에 의해 유발된 노균병에 매우 취약하며, 특히 포도 노균병은 포도 병해 중 가장 심각한 병이므로, 노균병에 대한 저항성을 가지는 포도 품종의 육종은 전 세계적으로 가장 핵심적인 포도 육종 프로그램으로 여겨지고 있다.

[0003] 노균병균(*P. viticola*)은 암수 성이 다른 균사체를 가지는 이질균사 난균(heterothallic oomycete)에 속하며, 각각의 균사 위에 생식기관의 접합에 의해서 유성생식을 하는 복잡한 진화 과정을 가진 곰팡이다. 노균병균은 활물기생체로서 오직 살아있는 기주에서만 생존할 수 있기 때문에 기내배양이 가능하지 않고, 균주를 보관하고 유지하기가 매우 어려워 병원성 검정이나 유전자원을 이용한 저항성 검정이 매우 어렵다. 또한, 일반적으로 낙엽 또는 죽은 잎에 난포자 형태로 월동하며 상대습도 95~100%, 적어도 4시간의 암조건에서 발아하여 포자낭을 형성하며 바람과 수분을 통해 일차 유주포자가 분산된다. 기주 침입은 기공을 통해서만 이루어지기 때문에 기공을 가진 식물체는 취약할 수밖에 없으며 25℃의 고온다습한 조건에서 대량 발생한다. 감염된 잎에서는 특징적인 반점이 나타나고, 낙엽을 촉진하여 과일의 당 축적을 감소시키고, 어린 열매에 감염되여 생산성을 감소시킨다.

포도 노균병을 예방하기 위해 적절한 배수, 겨울철 낙엽 제거, 감염된 가지 치기, 살균제 처리 등의 방제 수단을 이용하고 있지만, 화학방제는 환경오염, 관리비 상승, 소비자 수요 감소 등의 경제적 손실을 일으켜 근본적인 해결책이 되지 못한다.

[0004] 최근 기후 변화의 빈도와 강도가 심화되어 노균병 발생 양상이 다양화되고 불규칙하게 변하고 있어, 병 저항성과 환경 변화를 고려한 육종 소재의 개발과 병 저항성 관련 기작 연구가 필요하다. 병 저항성 육종 소재의 개발을 위해서는 병 저항성을 가진 다양한 유전자원을 확보하여 이들의 특성을 정밀하고 재현성있게 평가할 수 있는 체계적인 방법을 개발하고, 평가 기준을 설정하는 과정이 필수적으로 선행되어야 한다. 또한, 포도의 생산성과 품질을 지속적으로 유지하기 위해서는 포도 식물병에 대한 생물학적 또는 분자생물학적 반응에 대한 전사체 또는 유전체 분석 결과를 적극적으로 활용하여 병 저항성 기작을 구명하는 것도 필요하다.

[0005] 노균병균과 같은 난균류는 해조류, 규조류 및 기타 플랑크톤과 함께 부등편모조류(Stramenopila) 하위 계(kingdom)에 있는 원생생물(protoctista)로 분류되는 고유한 진핵생물이다. 형태적으로 사상균과 매우 유사하지만 생리학적, 유전적, 생화학적으로 곰팡이와는 매우 다르다. 난균류는 세포벽이 없기 때문에 균류 세포벽에서의 스테롤 또는 키틴 합성을 저해시킬 수 있는 화학물질로는 방제할 수 없다. 기주의 유전적 저항성 여부가 가장 친환경적이면서 효율적인 방제 전략이 될 수 있으므로, 노균병균과 기주식물 간 상호작용의 분자 기반에 대한 이해와 연구가 필요하다.

[0006] 병원균과 식물 간의 상호 작용에 있어서 병 저항성 유도 방어는 두 단계로 구성는데, 첫 번째 단계는 병원체 관련 분자 패턴(pathogen-associated molecular pattern, PAMP) 유발 면역(PAMP-Triggered Immunity, PTI)으로 알려져 있다. 병원체의 보존된 분자 또는 구조는 식물 패턴 인식 수용체(plant pattern recognition receptors, PRR)에 의해 인식되고, 이어서 방어 반응이 활성화된다. PTI를 피하기 위해 병원체는 기주 세포 내부에 이펙터(effector) 단백질을 전달하여 방어 반응을 방해한다. 식물은 저항(R, resistant) 유전자를 통해 이펙터를 인식하고, ETI(effector-triggered immunity)라고 하는 보다 강력하고 빠른 방어 반응으로서 국소적인 사멸과 같은 과민감 반응(hypersensitive response, HR)을 활성화시킨다. 하나 이상의 병원체 이펙터가 PTI를 억제하면 병원체가 감수성 기주를 성공적으로 감염시키고, 효과적인 R 유전자가 없는 경우 ETI가 억제되어 결국 이펙터 유발 감수성(effector-triggered susceptibility, ETS)으로 이어진다. 이펙터라고 불리는 저분자 단백질은 식물의 면역 반응을 조절하고 병원성에 관여한다고 알려져 있다.

[0007] 대부분의 세균과 곰팡이 이펙터는 보존된 모티프와 도메인을 갖고 있지 않지만, 난균류의 세포질 이펙터는 N-말단에 일부 보존된 모티프, 특히 RxLR 또는 LXLFLAK 모티프를 가진 모듈식 단백질임이 알려져 있다. RxLR 모티프는 말라리아 기생충에서 분비되는 이펙터에서 관찰되는 기주 타겟팅 이동 신호와 유사한 도메인으로 정의되었고, 난균류인 파이토프토라속(*Phytophthora*)과 노균병균에서도 동정되었지만 아직까지 대부분의 기능은 잘 알려지지 않았다.

[0008] RxLR(Arg-any amino acid-Leu-Arg) 이펙터 또는 CRN(Crinkler) 이펙터는 활성산소종(ROS)를 증가시키거나 MAPK 활성화와 같은 기주 면역 반응을 억제하는데 주요한 세포내 이펙터이다. 병원체는 PTI를 억제하기 위해 많은 이펙터들을 분비하고, 저항성 식물은 저항성(R) 단백질을 가지고 있는데, RxLR 이펙터가 저항성 유전자나 알려지지 않은 메커니즘에 의해 인식되면 식물에서 과민성 반응(hypersensitive response, HR)에 의한 세포사멸을 유도한다. 그러나, 아직까지 식물 면역에서 세포사멸을 유발하는 이펙터의 생물학적 중요성은 잘 알려져 있지 않았으며, 국내에서 포도 노균병의 병원성 이펙터에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았다.

[0009] 한편, 한국등록특허 제2175452호에는 '옥수수 노균병 저항성 개체 선별용 조성물 및 이를 이용한 선별방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1746413호에는 '양파 노균병 진단용 프라이머 세트, 이를 포함하는 진단용 조성물, 및 진단용 키트'가 개시되어 있으나, 본 발명의 포도 노균병균에서 분리한 병원성 이펙터 PvRxLR27 유전자를 이용한 포도 노균병 저항성 품종 판별 방법 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 국내에서 분리된 포도 노균병 원인균(*Plasmopara viticola*) 중에서 병원성이 가장 높은 *P. viticola* JN-9로부터 N-말단에 시그널 펩타이드(signal peptide)와 RxLR 모티프가 존재하고 C-말단에 이펙터(effector) 활성을 나타내는 도메인을 가진 *PvRxLR27* 유전자를 동정하였다. 상기 *PvRxLR27* 유전자의 이펙터(effector)로서 기능을 분석하기 위해, *PvRxLR27* 유전자가 포

함된 재조합 벡터로 비기주 식물인 담배(*Nicotiana benthamiana*)를 형질전환시킨 결과, 양성 대조군(세포사멸 관련 *BAX* 또는 *INF1*이 포함된 제조합 벡터로 형질전환)과 마찬가지로 담배 잎에서 세포사멸 반응이 나타난 것을 확인하였다. 이를 통해, *PvRxLR27* 유전자가 이펙터로서 작용하여 식물 내 면역반응의 과정으로 과민성 세포사멸 반응을 유도하였음을 알 수 있었다. 또한, 상기 *PvRxLR27* 유전자가 포함된 재조합 벡터로 노균병에 대해 저항성을 보이는 마이다와(Mydawa) 및 말로아(Malroa) 품종과 감수성을 보이는 카베르네 쇼비뇽(Cabernet Sauvignon) 품종을 형질전환시킨 결과, 감수성 품종에서는 세포사멸 반응이 나타나지 않았으나, 저항성 품종에서는 세포사멸 반응이 나타난 것을 확인하였고, 이를 통해 *PvRxLR27* 유전자의 접종만으로 노균병에 대한 저항성 또는 감수성 포도 품종을 판별할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 노균병균(*Plasmopara viticola*) 유래의 PvRxLR27 단백질을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 노균병균 유래의 PvRxLR27 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 식물체에서 과민성 세포사멸 반응 여부를 확인하는 단계;를 포함하는, 노균병 저항성 포도과 식물체를 판별하는 방법을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 유전자 또는 이를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는 노균병 저항성 포도과(Vitaceae) 식물체를 판별하기 위한 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 노균병균 유래 *PvRxLR27* 유전자를 식물에 도입할 경우 면역 반응에 의해 과민성 세포사멸 반응이 유도되고, 이러한 세포사멸 반응 여부를 확인함으로써 노균병에 대해 저항성 또는 감수성을 보이는 식물을 정확하게 구별할 수 있으므로, 본 발명의 *PvRxLR27* 유전자는 포도 노균병에 대해 저항성을 가지는 포도과 식물의 품종 개발 및 육성을 위해 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 국내에서 분리된 포도 노균병균(*Plasmopora viticola* JN-9)의 *in vitro* 발달 및 형태적 특징을 확인한 결과이다. A는 광학현미경으로 관찰된 계란형(레몬형)의 포장낭이고, B는 유주자로부터 균사가 발아하는 모습(24hr)이고, C는 *in vitro*에서 잎 디스크(leaf disc)에 접종하였을 때 표면에서 관찰된 포자 형성 모습(10일)이고, D는 포도 성목에 접종하였을 때 잎 표면에서 관찰된 포자 형성 모습이다.

도 2는 국내에서 분리된 *P. viticola* JN-9 균주를 이용한 leaf disc 기내 검정법의 순서를 나타낸 그림이다.

도 3은 국내에서 분리된 *P. viticola* JN-9 균주와 중국, 미국 및 유럽에서 분리된 노균병균과의 유연관계를 분석한 계통수이다.

도 4는 *P. viticola* JN-9 균주에서 분리된 PvRxLR27 단백질의 아미노산 서열 내 시그널 펩타이드, RxLR 모티프 및 이펙터 도메인 부분을 나타낸 그림이다.

도 5는 *P. viticola* JN-9 균주에서 분리된 *PvRxLR27* 유전자의 형질전환을 위한 벡터 맵(A)과 형질전환된 담배(*Nicotiana benthamiana*)의 세포 내 *PvRxLR27* 유전자 위치를 확인한 결과(B)이다.

도 6은 *GFP* 유전자(음성 대조군), *PvRxLR27* 유전자, *BAX* 또는 *INF1* 유전자(양성 대조군)가 클로닝된 pGR106 벡터(A)로 담배(*N. benthamiana*)를 형질전환시켜 담배 잎에 일시적으로 과발현시킨 후 과민성 세포사멸(hypersensitive cell death) 유도 반응을 확인한 모습(B), ROS(reactive oxygen species) 축적(C) 및 이온 누출률(D)을 확인한 결과이다.

도 7은 *GFP* 유전자 또는 *PvRxLR27* 유전자가 클로닝된 pGR106 벡터로 노균병 저항성 또는 감수성 포도(*Vitis vinifera*) 품종을 형질전환시켜 포도 잎에 일시적으로 과발현시킨 후 과민성 세포사멸 반응 여부를 통해 노균병

저항성 또는 감수성을 검정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 노균병균(*Plasmopara viticola*) 유래의 PvRxLR27 단백질을 제공한다.

[0020] 본 발명에 따른 상기 노균병균 유래 PvRxLR27 단백질의 범위는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다.

[0021] 본 발명은 또한, 노균병균 유래 PvRxLR27 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하며, 상기 유전자의 범위는 PvRxLR27 단백질을 코딩하는 게놈 DNA, cDNA 및 합성 DNA를 모두 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 PvRxLR27 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 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.

[0022] 본 발명은 또한, 상기 노균병균 유래 PvRxLR27 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0023] 본 발명에서, 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.

[0024] 본 발명에서, 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.

[0025] 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예컨대, pLλ프로모터, Trp 프로모터, Lac 프로모터, T7 프로모터, Tac 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 리보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 대장균(*Escherichia coli*)이 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위, 그리고 파아지 λ의 좌향 프로모터 (pLλ프로모터)가 조절 부위로서 이용될 수 있다.

[0026] 본 발명에 따른 식물 발현 벡터에서, 프로모터는 SRPP(small rubber particle-associated protein), CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "구성적(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 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 구성적 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

[0027] 본 발명의 재조합 벡터는 바람직하게는 식물 발현 벡터이다.

[0028] 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 튜머파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터 (EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물세포, 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 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 유전자를 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.

[0029] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함한다. 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 포스피노트리신(포스피노트리신)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신, G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명에 따른 식물 발현 벡터에서, 터미네이터는 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(Nopaline synthase, NOS), 벼 α아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseolin) 터미네이터, 아그로박테리움 튜머파시엔스의 옥토파인 신타아제(Octopine synthase) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알려져 있다. 그러므로 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.

[0031] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[0032] 본 발명의 식물 발현 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모 (예컨대, *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 있으며, 바람직하게는 식물세포이다.

[0033] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주세포가 원핵 세포인 경우, $CaCl_2$ 방법, 하나한 방법 (Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포좀-매개 형질감염법, DEAE-덱스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.

[0034] 본 발명은 또한, 노균병균 유래의 PvRxLR27 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 식물체에서 과민성 세포사멸 반응 여부를 확인하는 단계;를 포함하는, 노균병 저항성 포도과 식물체를 판별하는 방법을 제공한다.

[0035] 본 발명의 일 구현 예에 따른 노균병 저항성 포도과 식물체를 판별하는 방법은 구체적으로, 저항성(R, resistant) 유전자를 포함하는 식물 세포에서 *PvRxLR27* 이펙터 유전자가 발현되면 과민성 세포사멸 반응이 유도되는 점에 기반한 것으로, 노균병균 유래의 병원성 *PvRxLR27* 이펙터 유전자가 포함된 재조합 벡터로 노균병에 대해 저항성 또는 감수성을 보이는 포도나무를 각각 형질전환하였을 때, 이펙터 유전자 도입에 의해 저항성 유전자를 가진 노균병 저항성 포도나무의 잎에서는 세포사멸 반응이 관찰되고, 저항성 유전자를 갖고 있지 않은 노균병 감수성 포도나무의 잎에서는 세포사멸 반응이 관찰되지 않는 점을 통해, 노균병에 대한 저항성 또는 감수성 포도 품종을 구별할 수 있다.

[0036] 본 발명은 또한, PvRxLR27 단백질 코딩 유전자 또는 이를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는 노균병 저항성 포도과(Vitaceae) 식물체를 판별하기 위한 조성물을 제공한다. PvRxLR27 단백질 코딩 유전자 또는 이를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 형질전환된 식물체에서 과민성 세포사멸 반응 여부를 확인함으로써 노균병 저항성 포도과(Vitaceae) 식물체를 판별할 수 있는 것이다.

[0038] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0040] **재료 및 방법**

[0041] **1. 권역별 노균병 균주 수집**

[0042] 포도 노균병 균주(*Plasmopora viticola*)는 국내 5개 지역에서 총 11개 수집하였고, 그 중 가장 병원성이 높은

JN-9 균주를 선발하여 사용하였다. *in vitro* 발달 및 형태적 특징을 분석하기 위해 순수분리하여 포자 형성 유무와 잎 디스크를 이용한 재접종을 통해 균사 생육, 포자 형성 및 발병 조건을 확립하였다(도 1).

[0043] 포도 잎은 정단에서 4~7번째 잎을 사용하였고, 1% 차아염소산나트륨(NaClO)을 이용하여 3분간 표면 소독을 한 후 멸균수로 3회 세척하고 건조하여 잎 디스크를 제작하였다. 여과지에 20 ㎖의 멸균수를 처리하여 습도를 맞추고, 150 ㎜ 페트리디쉬에 잎 디스크의 뒷면이 위로 향하도록 여과지 위에 올려 놓은 후, *P. viticola* JN-9의 8×10^4 포자낭/㎖ 현탁액을 접종하였다. 접종된 잎 디스크를 20℃에서 24시간 동안 배양한 후 박테리아 및 부생균에 의한 오염을 방지하기 위해 디스크에 남아있는 현탁액과 수분을 제거하였다. 감염 후 잎을 관찰하여, 5개 범주의 발병 지수(disease index)를 기준으로 저항성을 조사하였다(표 1).

[0044] 하기 표 1에서 발병 지수 [1]은 포자 형성이 없고 괴사 병징(반점)이 없는 경우(very resistance); 발병 지수 [3]은 매우 적은 포자 형성과 강한 괴사 병징(반점)이 있는 경우(resistant), 발병 지수 [5]는 약한 괴사 병징(반점)이 있고 산발적으로 포자가 형성된 경우(moderately susceptible), 발병 지수 [7]은 제한되지만 포자 형성이 풍부하고 괴사 병징(반점)이 없는 경우(susceptible), 발병 지수 [9]는 매우 풍부하게 포자가 형성되어 있고 괴사 병징(반점)이 없는 경우(very susceptible)를 의미한다.

표 1

포도 노균병의 발병 지수(disease index)

[0045]

Disease index	1	3	5	7	9
Disease severity					
Susceptibility	Very resistant	Resistant	Moderately susceptible	Susceptible	Very susceptible

[0047] **2. *Plasmopara viticola* JN-9 균주의 gDNA 분리**

[0048] *P. viticola* isolate JN-9은 Javier Gomez-Zeledon(2015, Proceedings of the 36th New Phytologist Symposium/Cell biology at the plantmicrobe interface)이 고안한 시험관 기술에 따라 leaf disc에서 매주 유지 관리하였다. *P. viticola* 포자낭의 생체 내 증식 및 유지는 감수성 포도 품종의 배축 표면에 4×10^4 포자낭/㎖ 현탁액을 분무 접종하여 수행되었다. 접종된 leaf disc와 유묘를 16시간 명/8시간 암의 광주기 및 20℃ 조건에서 배양하여 포자 형성을 촉진한 후, 포자낭과 흰색 균사체를 면도날로 수확하고 멸균 튜브에 넣어 -20℃에서 보관하였다. 60~100 mg의 포자낭을 동결건조시키고, 액체 질소에서 미세 분말로 분쇄한 후 용해 완충액(50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 3% SDS, 1% 2-Mercaptoethanol)을 이용하여 gDNA를 추출하였다.

[0050] **3. 벡터 제작**

[0051] *P. viticola* isolate JN-9 유래 *PvRxLR27* 이펙터 유전자의 PCR 증폭에 사용된 프라이머 세트는 전장 유전체 서열을 고려하여 제작하였다(표 2).

표 2

[0052] *PvRxLR27* 유전자의 클로닝을 위한 프라이머 세트 정보

Primer sequence (5'-3') (서열번호)		Vector	Purpose
Foward primer	Reverse primer		
ATGCGTGGTGTGCATTACG (3)	GTCATTGAACTGACGGGGC (4)	RBCT&A	TA cloning (full length)
CAGCTAGCTAGCGGCGCGCCATGAAATC TGGACACTCGCTCCA (5) (*ASC*I)	CCGTTCATCGTCGTCGACGTCATTGAAC TGACGGGGCT (6) (*Sal I*)	pGR106	*Agrobacterium* mediated Transient expression
CAGTAGACTGGATCCATGAAATCTGGAC ACTCGCTCCA (7) (*BamH*I)	CATCAGTACGTCGACGTCATTGAACTGA CGGGGCT (8) (*Sal*I)	pCambia1302-GFP	Subcellular localization

[0054] 전변성(pre-denaturation) 95℃ 5분; 변성(denaturation) 95℃ 40초, 결합(annealing) 58℃ 45초, 신장(extension) 72℃ 1분의 과정을 총 30회 반복; 최종 신장(final extension) 72℃ 10분 조건의 PCR 과정을 통해 증폭된 *PvRxLR27* 단편을 TA 클로닝 벡터에 삽입하고, *E. coli* DH5α로 형질전환하였다. 시퀀싱을 통해 *PvRxLR27* 유전자를 확인하였고, 세포 내 위치를 관찰하기 위해 식물 발현 벡터인 pCAMBIA1302 벡터(C-terminal에 GFP 포함 벡터)에 *PvRxLR27*의 전장 시퀀스를 도입하여 pCambia1302-PvRxLR27을 제조하고, 아그로박테리움 투머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) strain GV3101에 형질전환한 후, 상기 *PvRxLR27* 유전자가 도입된 아그로박테리움 투머파시엔스 GV3101를 담배(*Nicotiana benthamiana*) 잎에 접종하여 GFP 발현을 통해 세포 내 *PvRxLR27* 위치를 확인하였다.

[0055] 또한, *PvRxLR27* 유전자의 병원성 이펙터로서의 기능을 확인하기 위해서 Potato virus X를 기반으로 하는 pGR106 벡터에 *PvRxLR27*을 도입하였다. 또한 세포사멸을 유도하는 *INF1* 또는 *BAX*(Bcl-2-associated X protein)를 포함하는 pGR106 벡터를 확보하여 양성 대조군(positive control)으로 사용하였다.

[0057] **4. 형질전환체에서 과민성 세포사멸 유도 반응, ROS 축적 및 이온 누출률 분석**

[0058] *PvRxLR27* 유전자가 포함된 재조합 벡터로 형질전환된 식물체의 잎에서 과민성 세포사멸(hypersensitive cell death) 유도 반응, ROS(reactive oxygen species) 축적 및 이온 누출률 분석을 수행하였다.

[0059] 먼저 세포사멸 여부는 *PvRxLR27* 유전자를 agrobacterium을 이용하여 일시적발현 유도를 시킨 다음 식물체 내에서 저항성 반응으로 나타나는 세포급속사멸(HR)을 검정하여 침투부위의 세포가 사멸하여 하얗게 또는 빨갛게 나타난 부위가 관찰된 경우 세포사멸 반응이 유도된 것으로 간주하였고,

[0060] ROS 축적 여부는 세포 내 H_2O_2를 갈색으로 염색시키는 DAB(3,3′-Diaminobenzidine) 염색을 수행하여 염색 후 엽록소를 제거하였을 때 나타난 부위에 갈색의 염색이 관찰될 경우 ROS가 축적된 것으로 간주하였으며,

[0061] 이온 누출률(ion lekage) 측정은 ion conductivity meter(model 455C, Istek Co., 한국)를 통해 세포 내 infiteration 전, 후 용액의 전체 전도도와 조직 파괴 후 누출된 이온 누출도를 비교하여 정량화하여 분석하였다.

[0063] **실시예 1. 노균병균의 기내 보전 방법의 개발**

[0064] 활물기생균(biotroph)인 포도 노균병은 배지 및 기내에서 보존하기 매우 어려운 병원균으로, 기내보전 방법의 개발은 병원성 검정 스크리닝뿐만 아니라 병 저항성 연구에 있어서 매우 중요하다.

[0065] 본 발명에서는 포도 노균병의 보관 유지 방법으로 leaf disc법을 확립하였다. 노균병에 이병성인 유럽종 실생 삽목묘 276주를 국립원예특작과학원에서 분양받았으며, 권역별 병원성 검정을 통해 최종 선발된 *P. viticola* JN-9 균주를 이용하여 기내 leaf disc 검정법을 구축하였다(도 2).

[0067] **실시예 2. 권역별 노균병균 수집 및 병원성 조사**

[0068] *P. viticola* JN-9 균주의 계통수(Phylogenetic tree) 분석을 통해, 국내에서 수집된 포도 노균병균을 하나의

그룹으로 형성하였고, 미국과 유럽에서 분리된 균주와는 유전적으로 다소 차이가 있음을 확인하였다. 반면, 중국에서 분리된 KF220645 균주와는 유연관계가 높았으며, 이를 통해 *P. viticola* JN-9 균주는 아시아 지역에서 발생된 균주와 유사한 특성을 가지고 있음을 알 수 있었다(도 3).

[0069] 또한, 국립원예특작과학원에 보유하고 있는 총 797개의 포도 유전자원에 대해 leaf disc 기내 검정법(도 2)으로 스크리닝하고, 표 1의 기준에 따라 노균병을 검정한 결과, 매우 저항성(발병지수 [1])인 자원은 174점(23.5%), 저항성(발병지수 [3])인 자원은 76점(10.3%), 중도 감수성(발병지수 [5])은 155점(20.9%), 감수성(발병지수 [7])은 287점(38.8%), 매우 감수성(발병지수 [9])은 48점(6.5%)인 것을 확인하였다.)

표 3

포도 유전자원에 대한 노균병 저항성 검정 결과 (1)

포도 자원명	병원성검정 (발병지수)	비 고	포도 자원명	병원성검정 (발병지수)	비 고
188.08	[3]	저항성	Naples	[1]	저항성
9601	[5]	감수성	Narsha	[7]	감수성
06 K48 (flexuosa)	[3]	저항성	흑향초	[1]	저항성
06 개인머루14	[1]	저항성	Nerona	[1]	저항성
06 개인머루17	[3]	저항성	New Niagara	[1]	저항성
06 백운머루3	[3]	저항성	New York 14013	[7]	감수성
06 삼봉머루2	[5]	감수성	New York 15302	[7]	감수성
06 속리머루5	[1]	저항성	New York 21572	[7]	감수성
06 속리유스머루6	[3]	저항성	New York 21576	[5]	감수성
06 왕머루 실생53	[3]	저항성	New York 33873	[3]	저항성
06 월악머루1	[1]	저항성	New York 33875	[1]	저항성
06 월악머루3	[5]	감수성	New York 45950	[1]	저항성
06 월악머루8	[5]	감수성	New York 65.483.2	[1]	저항성
06 월악머루9	[9]	감수성	New York Muscat	[1]	저항성
06 청계머루	[1]	저항성	Niabell Tetraploid	[1]	저항성
06 청계머루2	[3]	저항성	Niagara Rosada	[7]	감수성
06 청계머루4	[1]	저항성	Niagara Seedless	[7]	감수성
06 청산 (amurensis)	[1]	저항성	Niagara Sel. Ishii	[1]	저항성
08 영월머루2	[3]	저항성	Niunai	[7]	감수성
08 영월머루3	[1]	저항성	No. 2	[1]	저항성
08 영월머루4	[5]	감수성	NOBEL	[1]	저항성
08 영월머루6	[3]	저항성	Noir Hatif De Marseille	[7]	감수성
08 영월머루7	[3]	저항성	North Black	[7]	감수성
101.14	[3]	저항성	North Red	[1]	저항성
105-44 (Amurensis GVIT 0709)	[3]	저항성	Ohtama Poto	[1]	저항성
1103 P	[5]	감수성	Ohtsubu Campbell	[1]	저항성
140 R	[7]	감수성	Olivetta Bianca	[7]	감수성
2002호	[3]	저항성	Olympia	[9]	감수성
333 Ecole de Montpellier	[7]	감수성	Omit	[7]	감수성
41 B	[9]	감수성	Ondenc	[5]	감수성
56-100 K144680	[1]	저항성	Oneida	[7]	감수성
5BB	[7]	감수성	Ontario	[1]	저항성
71068	[7]	감수성	Opal	[7]	감수성
7623	[3]	저항성	Opale	[5]	감수성
8611	[5]	감수성	흑로	[1]	저항성
Acerifolia 0154	[1]	저항성	Othello-French	[9]	감수성

[0070]

표 4

포도 유전자원에 대한 노균병 저항성 검정 결과 (2)

포도 자원명	병원성검정 (발병지수)	비 고	포도 자원명	병원성검정 (발병지수)	비 고
Acerifolia 1267	[3]	저항성	Paglieri 5	[3]	저항성
Acerifolia GVIT 0702	[5]	감수성	Pam	[1]	저항성
Acerifolia GVIT 0800	[5]	감수성	Panomia Kincse	[5]	감수성
Acerifolia GVIT 0801	[3]	저항성	Panse Precoce	[5]	감수성
Adiron Dac	[7]	감수성	Paulsen 1103	[3]	저항성
Africa Queen	[1]	저항성	Paulsen 1447	[5]	감수성
Agawan	[5]	감수성	Paulsen 779	[7]	감수성
Agria	[7]	감수성	Pegaru	[1]	저항성
Aki Queen	[7]	감수성	Pepin D'Hispanie	[7]	감수성
Al Zeinel	[3]	저항성	Perla di csaba	[5]	감수성
Alba	[1]	저항성	Perle De Csaba	[1]	저항성
Albourlah Rose	[7]	감수성	Perle De Csaba Rouge	[3]	저항성
휠리스	[7]	감수성	Perlette	[7]	감수성
Alden #1 Tetraploid	[9]	감수성	홍화 1호	[9]	감수성
Alicant	[7]	감수성	Petit Verdot	[7]	감수성
Aligote	[5]	감수성	PI 545685	[1]	저항성
황관	[7]	감수성	Pierce	[1]	저항성
Amurensis GVIT 0689	[1]	저항성	Pinot Blanc	[7]	감수성
Amurensis GVIT 0741	[3]	저항성	Pinot Franc	[5]	감수성
Amurensis GVIT 1264	[3]	저항성	Pinot Gris	[5]	감수성
Amurensis GVIT 1265	[1]	저항성	Pinot Meunier	[5]	감수성
Amurensis GVIT 1267	[7]	감수성	Pinot Noir	[5]	감수성
Amurensis GVIT 1269	[3]	저항성	Pizzutello Bianco	[7]	감수성
Amurensis GVIT 1280	[1]	저항성	Plante Mercier	[5]	감수성
Amurensis GVIT 1282	[5]	감수성	Portland	[1]	저항성
Amurensis GVIT 1286	[1]	저항성	Precoce De Malingre	[7]	감수성
Amurensis GVIT 1290	[1]	저항성	Pride	[1]	저항성
Amurensis GVIT 1293	[1]	저항성	Princess	[7]	감수성
Amurensis GVIT 1295	[7]	감수성	Puhlyakovskiy	[5]	감수성
Aramon Rupestris Ganzin 1	[3]	저항성	Puke	[5]	감수성
Ark 1196	[5]	감수성	Queen	[7]	감수성
Askeri	[5]	감수성	Ravat 578	[3]	저항성
Athens	[1]	저항성	Record Sweet Purple	[1]	저항성
홍향밀 포도	[5]	감수성	Red Globe	[5]	감수성
Autumn Black	[7]	감수성	Red Millennium	[1]	저항성
Autumn Seedless	[7]	감수성	홍귀족	[7]	감수성

[0071]

표 5

포도 유전자원에 대한 노균병 저항성 검정 결과 (3)

포도 자원명	병원성검정 (발병지수)	비 고	포도 자원명	병원성검정 (발병지수)	비 고
B 47 (Cinerea GVIT 0270)	[1]	저항성	Regina	[7]	감수성
B 49 (Cinerea GVIT 0271)	[1]	저항성	Reliance	[7]	감수성
B 9 (Cinerea GVIT 0170)	[1]	저항성	Rem 46-77 (Aestivalis GVIT 0970)	[1]	저항성
B4-1315	[1]	저항성	Rem 48-77 (Aestivalis GVIT 1001)	[1]	저항성
B55(GVIT 0272)	[1]	저항성	Rem NE 19 (Aestivalis GVIT 0896)	[1]	저항성
홍쌍미	[7]	감수성	Rem NE 4 (Aestivalis GVIT 0994)	[1]	저항성
Baco Blanc (Baco 22A)	[7]	감수성	Remail Seedless	[9]	감수성
홍보석무핵	[3]	저항성	Rhodo Berry	[7]	감수성
Bath	[1]	저항성	Richter 110	[1]	저항성
Beauty Seedless	[9]	감수성	Richter 99	[3]	저항성
Bellino	[5]	감수성	Riesling	[7]	감수성
Beni Baladi	[7]	감수성	Riesling Italico	[7]	감수성
홍단	[1]	저항성	Riesling Vert	[1]	저항성
홍기특조매괴	[5]	감수성	Riparia Gloire de Montpellier	[1]	저항성
Beninanyo	[5]	감수성	Rizamat	[7]	감수성
Beniyamabiko	[5]	감수성	Rizamat-Bulgaria	[7]	감수성
Benizawa Seedless	[7]	감수성	Rkatcetely	[7]	감수성
Benizuiho	[5]	감수성	Rommel	[3]	저항성
Bertille Seyve 6283	[5]	감수성	Rosa Minna	[1]	저항성
Besgano Nero	[7]	감수성	Rosario Bianco	[9]	감수성
Beta	[7]	감수성	Rosario Rosso	[9]	감수성
Betulifolia GVIT 0812	[3]	저항성	Rosette	[7]	감수성
Bicane	[7]	감수성	Rougeon	[7]	감수성
Big Unicorn	[5]	감수성	Royal	[9]	감수성
Black Beet	[7]	감수성	Royal Seedless	[7]	감수성
Black Eye	[7]	저항성	Rozovii Kishmish	[7]	감수성
Black Fly	[1]	저항성	Rubaiyat	[5]	감수성
홍고봉	[5]	감수성	Rubi	[7]	감수성
향비	[7]	감수성	Rubi Red	[7]	감수성
Black Pegaru	[5]	감수성	Ruby Okuyama	[7]	감수성
Black Queen	[1]	저항성	Ruby Seedless	[9]	감수성
한흑포도	[7]	감수성	Ruggeri 140	[5]	감수성
하흑	[5]	감수성	Ruggeri 225	[3]	저항성
택향	[7]	감수성	Rupestris du Lot	[3]	저항성
Bolgaria	[1]	저항성	Russia 1	[9]	감수성
BR17	[3]	저항성	Russia 8	[7]	감수성

[0072]

표 6

포도 유전자원에 대한 노균병 저항성 검정 결과 (4)

포도 자원명	병원성검정 (발병지수)	비 고	포도 자원명	병원성검정 (발병지수)	비 고
BR21	[7]	감수성	Ryogyoku	[7]	감수성
BR5	[5]	감수성	Ryuho	[7]	감수성
컬트레베	[9]	감수성	S. 9110	[5]	감수성
타크	[1]	저항성	S. Muscat	[5]	감수성
Buakinor	[9]	감수성	S. Urbano	[7]	감수성
Buffalo	[1]	저항성	Sabalkanskoi Rosa	[7]	감수성
Buffalo Red Sport	[3]	저항성	커린바마커	[5]	감수성
Buffalo Tetraploid	[5]	감수성	Salt Creek	[5]	감수성
Bulgaria 5-2	[5]	감수성	Sangiovetto	[3]	저항성
C-66-14 (Cinerea GVIT 0236)	[5]	감수성	Sauvignon	[5]	감수성
Cabernet Franc	[9]	감수성	Sauvignon Blanc	[7]	감수성
Cabernet Sauvignon	[7]	감수성	Sauvignon Vert	[3]	저항성
Caco	[1]	저항성	Sauvignon-Italia	[7]	감수성
Campbell Early	[1]	저항성	Schuyler	[7]	감수성
Campbell Early Mutant 01	[1]	저항성	Seibel 1000	[7]	감수성
Campbell Early Mutant 02	[1]	저항성	Seibel 10076	[7]	감수성
Campbell Early Mutant 03	[1]	저항성	Seibel 10878	[7]	감수성
Campbell Early Mutant 04	[1]	저항성	Seibel 13053	[7]	감수성
Campbell Early Mutant 05	[1]	저항성	Seibel 21572	[7]	감수성
Campbell Early Mutant 06	[1]	저항성	Seibel 21572	[7]	감수성
Campbell Early Mutant 07	[1]	저항성	Seibel 34804	[7]	감수성
Campbell Early Mutant 08	[1]	저항성	Seibel 4986	[9]	감수성
Campbell Early Mutant 09	[1]	저항성	Seibel 5247	[7]	감수성
Campbell Early mutant 10	[1]	저항성	Seibel 5437	[5]	감수성
Campbell Early Mutant 11	[1]	저항성	Seibel 5455	[7]	감수성
Campbell Early Mutant 12	[1]	저항성	Seibel 5896	[7]	감수성
Campbell Early Mutant 13	[1]	저항성	Seibel 7053	[7]	감수성
Canada Muscat	[5]	감수성	Selection Oppenheim 4-California	[3]	저항성
Muscat of Alexandria	[7]	감수성	Selection Oppenheim 4-France	[5]	감수성
Caras Muskatnyja	[7]	감수성	Sélection Oppenheim 4-French-INRA	[5]	감수성
Cardinal	[7]	감수성	Selection Oppenheim 4-Germany	[5]	감수성
Carlos	[1]	저항성	Selection Oppenheim 4-Japan	[5]	감수성
Carner	[7]	감수성	Selection Oppenheim 4-NIHHS	[3]	저항성
Carolina Black Rose	[5]	감수성	Selection Oppenheim 4-NIHHS-FR	[5]	감수성
Cascade	[3]	저항성	Selezione Bruni 12	[5]	감수성
Castel 188-15	[3]	저항성	Selezione Bruni 183	[7]	감수성

[0073]

표 7

포도 유전자원에 대한 노균병 저항성 검정 결과 (5)

포도 자원명	병원성검정 (발병지수)	비 고	포도 자원명	병원성검정 (발병지수)	비 고
Castel 196-17	[5]	감수성	Semillion	[7]	감수성
Castel 216-3	[5]	감수성	Seneca	[5]	감수성
Castel 4010	[5]	감수성	Senoia	[1]	저항성
Catawba	[1]	저항성	Servant	[3]	저항성
Cayuga White	[7]	감수성	Seto Giants	[7]	감수성
Centennial	[7]	감수성	Seyval	[7]	감수성
Centennial Seedless	[7]	감수성	Seyve-Villard 18-315	[7]	감수성
CG 1481	[7]	감수성	Seyve-Villard 20-365	[3]	감수성
CG 88435	[7]	감수성	Seyve-Villard 23-410	[1]	감수성
CH-3-48	[7]	감수성	Seyve-Villard 23-512	[7]	감수성
Chabache	[7]	감수성	Seyve-Villard 5247	[7]	감수성
Champanello	[1]	저항성	Seyve-Villard 5276	[3]	저항성
Champion	[1]	저항성	Shabazenzhu	[3]	저항성
Chancellor	[7]	감수성	Sheridan	[1]	저항성
Bailey Alicante A	[7]	감수성	Rhodo Berry	[7]	감수성
Chardonnay Decoupee	[7]	감수성	Shigyoku 02	[5]	감수성
Moris Early	[1]	저항성	Shinano Smile	[7]	감수성
Morrastel	[7]	감수성	Shine Muscat	[5]	감수성
Moscatel Ruso	[7]	감수성	Sochal	[3]	저항성
Moscato D'Adda	[7]	감수성	Sochal Kara-Kash	[7]	감수성
Moscato Madresfield	[7]	감수성	Souvenir du Pulliat	[7]	감수성
Mourverdre	[5]	감수성	St. George	[3]	저항성
Muscat Bailey A	[9]	감수성	St. George (rupestris)	[7]	감수성
Muscat Flame	[7]	감수성	Moore Early	[5]	감수성
Muscat Hamburg	[7]	감수성	Morgen Schon	[1]	저항성
Chasselas Rose De Fall	[7]	감수성	Suavis	[7]	감수성
Chasselas Rose Royal	[7]	감수성	Sugar Pop	[1]	저항성
Chasselas Rouge	[7]	감수성	Molinera Gorda	[7]	감수성
Chasselas Violet	[7]	감수성	Monbadon	[5]	감수성
Chavoust	[7]	감수성	Muscat Noir de H. Marsella	[7]	감수성
Chenin Blanc	[7]	감수성	치악상지1-1	[5]	감수성
Cheongsoo	[7]	감수성	Summer Black	[1]	저항성
Christmas A	[1]	저항성	Summer Royal	[7]	감수성
Christmas Rose	[5]	감수성	Summit	[9]	감수성
Cinsaut	[3]	저항성	Sunny Rougr	[7]	감수성
Clairette	[1]	저항성	Suntory Blanc	[5]	감수성

[0074]

표 8

포도 유전자원에 대한 노균병 저항성 검정 결과 (6)

포도 자원명	병원성검정 (발병지수)	비 고	포도 자원명	병원성검정 (발병지수)	비 고
Clairette Blanc	[1]	저항성	Suok	[5]	감수성
Clairette De Limoux	[7]	감수성	Super Hamburg	[7]	감수성
Clinton	[7]	감수성	SVITKO 109	[1]	저항성
Cogneliano 218	[7]	감수성	SVITKO 114-1	[1]	저항성
추홍	[7]	감수성	SVITKO 116	[9]	감수성
추후	[1]	저항성	SVITKO 122	[1]	저항성
Conguistidator	[7]	감수성	SVITKO 123	[1]	저항성
Corazon de Angel	[7]	감수성	SVITKO 125	[1]	저항성
Corvina Veroness (ISV-CU7)	[7]	감수성	SVITKO 132-1	[1]	저항성
Couderc 299-35	[7]	감수성	SVITKO 137-2	[1]	저항성
Couderc 3306	[3]	저항성	SVITKO 16-1	[9]	감수성
Couderc 3309	[3]	저항성	SVITKO 16-2	[3]	감수성
Couderc Noir (7120 C)	[5]	감수성	SVITKO 17-1	[9]	감수성
Dabouk	[5]	감수성	SVITKO 17-2	[9]	감수성
Darkridge	[5]	감수성	SVITKO 2-1	[1]	저항성
Datal	[7]	감수성	SVITKO 21-1	[3]	저항성
Dattier	[7]	감수성	SVITKO 23-1-1	[1]	저항성
Dayho	[5]	감수성	SVITKO 28-1	[3]	저항성
Dechaunac	[7]	감수성	SVITKO 28-2-1	[1]	저항성
Delaware	[7]	감수성	SVITKO 31-1	[1]	저항성
Delight	[7]	감수성	SVITKO 36-1-1	[1]	저항성
Diamante	[7]	감수성	SVITKO 37-2-1	[1]	저항성
초조나	[7]	감수성	SVITKO 4-1	[1]	저항성
Diamond Tetraploid	[1]	저항성	SVITKO 46-1	[1]	저항성
Don Mariano	[7]	감수성	SVITKO 67-2	[7]	감수성
Doonuri	[1]	저항성	SVITKO 76-1	[7]	감수성
Dora	[7]	감수성	SVITKO 79-2	[9]	감수성
Dorona di Venezia	[5]	감수성	Swanee	[7]	감수성
Dovine	[7]	감수성	천향교	[5]	감수성
Duc D'anjou	[7]	감수성	청풍	[7]	감수성
Duca di Magenta	[7]	감수성	Sylvaner	[5]	감수성
Dutchess	[3]	저항성	Syrah	[7]	감수성
E.S. 13-22-116	[1]	저항성	Tabizi	[5]	감수성
E.S. 2-12-13	[5]	감수성	Taifi	[7]	감수성
E.S. 7-4-14	[1]	저항성	Takao	[7]	감수성
Early	[5]	감수성	Takasumi	[5]	감수성

[0075]

표 9

포도 유전자원에 대한 노균병 저항성 검정 결과 (7)

포도 자원명	병원성검정 (발병지수)	비 고	포도 자원명	병원성검정 (발병지수)	비 고
Early Cardinal	[7]	감수성	Taminga	[7]	감수성
Early Fay	[1]	저항성	Tamnara	[5]	감수성
천연기	[5]	감수성	Tampa	[1]	저항성
Edelweiss	[7]	감수성	Tankeumchu	[1]	저항성
Einset Seedless	[7]	감수성	Tano Red	[1]	저항성
Ellen Scott	[1]	저항성	Tano Red Mutant	[9]	감수성
Emerald Seedless	[7]	감수성	Tarnau	[9]	감수성
Emilia	[5]	감수성	Tchauch_from	[7]	감수성
Emperatirz	[7]	감수성	Teleki 5C-Califonia	[5]	감수성
Exotic	[7]	감수성	Teleki 8B-Califonia	[3]	저항성
Feher Szagos	[5]	감수성	Téléki sélection Kober 5 BB-French-INRA	[3]	저항성
Fercal	[7]	감수성	Tensyu	[9]	감수성
Feteasca Alba	[7]	감수성	Teresita	[7]	감수성
Feteasca Neagra	[7]	감수성	Tetra	[7]	감수성
Flame Seedless	[5]	감수성	Thompson Seedless	[9]	감수성
Fly	[1]	저항성	Tilky Rairuk	[9]	감수성
Focia	[5]	감수성	Topas	[7]	감수성
Folle Blanche	[5]	감수성	Traminette	[7]	감수성
Fredonia	[1]	저항성	Ugni Blanc	[5]	감수성
Freedom	[7]	감수성	Ungarka	[1]	저항성
Fry	[7]	감수성	Unibala Seven	[7]	감수성
Fuen	[7]	감수성	Urvana	[5]	감수성
Fujiminori	[7]	감수성	V. arizonica	[7]	감수성
Gamay	[7]	감수성	V. cariacea	[7]	감수성
GBC 12 (Aestivalis GVIT 0159)	[1]	저항성	V. longii	[3]	저항성
GBC 17 (Aestivalis GVIT 0214)	[1]	저항성	Van Buren Tetraploid	[5]	감수성
Gervan	[7]	감수성	Vanessa Seedless	[1]	저항성
Gewurztraminer	[5]	감수성	Vassarga chernaya	[9]	감수성
Glenfeld	[7]	감수성	Veeport	[5]	감수성
Glenora	[7]	감수성	Veeport 168-1	[1]	저항성
Gold	[7]	감수성	Ventura	[9]	감수성
진용대설	[7]	감수성	Venus	[1]	저항성
진주매괴	[7]	감수성	VI-17 K144617	[3]	저항성
천수향	[7]	감수성	VI-18 K144678	[3]	저항성
Golia	[1]	저항성	Vidal 50151	[5]	감수성
Gorby	[7]	감수성	Vidal 64023	[7]	감수성

[0076]

표 10

포도 유전자원에 대한 노균병 저항성 검정 결과 (8)

포도 자원명	병원성검정 (발병지수)	비 고	포도 자원명	병원성검정 (발병지수)	비 고
Granny	[1]	저항성	Vidal 65163	[5]	감수성
Green Hungarian	[5]	감수성	Vidal Blanc	[7]	감수성
Gros Vert	[5]	감수성	Villard Blanc	[5]	감수성
Guroryu	[7]	감수성	Vinfera Gdos Colman	[5]	감수성
Gurosio	[1]	저항성	Viognier	[3]	저항성
GVIT 1627 C.W. 27.58	[5]	감수성	진남조홍	[7]	감수성
GW 03	[7]	감수성	Violla	[1]	저항성
GW 10	[7]	감수성	Vivona 182	[9]	감수성
GW 8	[5]	감수성	Wardon	[1]	저항성
Harmony	[3]	저항성	적하주	[7]	감수성
Herbert	[5]	감수성	제주도 가마귀머루	[1]	저항성
Heukboseok	[5]	감수성	조연	[7]	감수성
Heukgoosul	[7]	감수성	조홍무핵-8611	[5]	감수성
Hicks	[1]	저항성	Watergate	[1]	저항성
Himrod	[5]	감수성	White Pegaru	[3]	저항성
Himrod Tetraploid	[9]	감수성	Wild	[1]	저항성
Himrod Tetraploid 02	[7]	감수성	장상사	[9]	감수성
적령	[9]	감수성	Wonkyo Ra-08	[7]	감수성
Honey Black	[7]	감수성	Wonkyo Ra-09	[5]	감수성
Honey Seedless	[7]	감수성	Wonkyo Ra-11	[1]	저항성
Honey Venus	[5]	감수성	Wonkyo Ra-13	[7]	감수성
Hongaram	[5]	감수성	Wonkyo Ra-16	[7]	감수성
Hongdan	[1]	저항성	Wonkyo Ra-21	[1]	저항성
자진향	[7]	감수성	Wonkyo Ra-22	[9]	감수성
Hongju Seedless	[9]	감수성	Wonkyo Ra-24	[7]	감수성
Hongsodam	[7]	감수성	Wonkyo Ra-25	[7]	감수성
Hunt	[1]	저항성	Wonkyo Ra-26	[1]	저항성
Husaine Bianco	[7]	감수성	Wonkyo Ra-27	[7]	감수성
Husseine	[7]	감수성	Wonkyo Ra-29	[1]	저항성
Hyuuga	[1]	저항성	Wonkyo Ra-31	[1]	저항성
Iezandari Ciorni	[7]	감수성	Wonkyo Ra-32	[7]	감수성
Ikawa 8	[5]	감수성	Wonkyo Ra-35	[5]	감수성
Ill 172-3	[1]	저항성	Wonkyo Ra-36	[1]	저항성
Ill 182-1	[1]	저항성	Wonkyo Ra-37	[5]	감수성
Ill 41 (Cinerea GVIT 0156)	[1]	저항성	Wonkyo Ra-38	[7]	감수성
Ill 45 (Cinerea GVIT 0143)	[1]	저항성	Wonkyo Ra-39	[5]	감수성

[0077]

표 11

포도 유전자원에 대한 노균병 저항성 검정 결과 (9)

포도 자원명	병원성검정 (발병지수)	비 고	포도 자원명	병원성검정 (발병지수)	비 고
Ill 46 (cinerea GVIT 0234)	[1]	저항성	Wonkyo Ra-40	[7]	감수성
Ill 65 (Cinerea GVIT 0259)	[1]	저항성	Worden	[1]	저항성
자지구	[5]	감수성	Yates	[5]	감수성
Inc. Gargiulo 102.011	[9]	감수성	Zhana	[1]	저항성
위가	[5]	감수성	가야산 새머루	[5]	감수성
Inzolia Parchitana	[7]	감수성	갑비 Blanc	[7]	감수성
Iris Chiubing	[7]	감수성	갑비 Noir	[7]	감수성
웨이커	[1]	저항성	갑비미령	[1]	저항성
Itchkimar	[7]	감수성	강한	[1]	저항성
Izumo Queen	[9]	감수성	개량머루	[7]	감수성
J.S. 23-416	[7]	감수성	개머루2_682	[1]	저항성
J.S. 26-627	[7]	감수성	개머루3_683	[3]	저항성
Jaj Izjum Belyj	[7]	감수성	거매괴	[3]	저항성
Janebell	[1]	저항성	거선	[5]	감수성
월출머루 1	[7]	감수성	거장미	[9]	감수성
Jin Shouzhi	[1]	저항성	경가정	[7]	감수성
Jingxiao	[7]	감수성	경수	[5]	감수성
Jingya	[5]	감수성	경우	[7]	감수성
Jingyu	[7]	감수성	경조정	[7]	감수성
Jingzaojing	[7]	감수성	계룡산머루 07-1	[5]	감수성
Jinok	[1]	저항성	계룡산머루 07-6	[5]	감수성
Jumbo	[7]	감수성	계룡산신머루 07-3	[3]	저항성
Jurancon	[7]	감수성	고사	[1]	저항성
K 12	[3]	저항성	그라카	[1]	저항성
K 188-2	[7]	감수성	극논생 포도	[7]	감수성
K 19	[3]	저항성	극논생무핵	[7]	감수성
K 194-2	[5]	감수성	극서삼무핵	[7]	감수성
K 65	[9]	감수성	금향밀	[7]	감수성
Kaiji	[7]	감수성	길림성	[7]	감수성
Kaitome	[7]	감수성	길림성 연변지구 삼환 야생포도	[5]	감수성
Kendaia	[1]	저항성	남항	[7]	감수성
Kener	[7]	감수성	남항 1호	[5]	감수성
King Dela	[7]	감수성	남항 3호	[5]	감수성
King Phillip	[1]	저항성	다마유타까	[5]	감수성
Kisc Ciorni Turmenia	[7]	감수성	달미나	[9]	감수성
Kishimish Chyorny	[5]	감수성	대옥로	[3]	저항성

[0078]

표 12

포도 유전자원에 대한 노균병 저항성 검정 결과 (10)

포도 자원명	병원성검정 (발병지수)	비 고	포도 자원명	병원성검정 (발병지수)	비 고
Kishmish Batir	[7]	감수성	독각수	[3]	저항성
Kishmish Belii	[5]	감수성	독일 라인강	[7]	감수성
Kishmish Irtishar	[9]	감수성	마스향	[5]	감수성
Kishmish Rozovii	[7]	감수성	마이다와	[3]	저항성
Kishmish Uzunbashli	[7]	감수성	말로아	[3]	저항성
Kishmish VIRa	[7]	감수성	매괴옥	[7]	감수성
Kishmish Votkana	[7]	감수성	매괴조	[5]	감수성
Kitasaki Red	[5]	감수성	머루실생 2	[3]	저항성
Kizil Uzum Kanibadlamskiy	[7]	감수성	머루실생 30	[3]	저항성
Kober 5BB	[3]	저항성	메리샤	[7]	감수성
Kober 5BB 02	[3]	저항성	목단장야생포도	[5]	감수성
Kocsis Irma	[5]	감수성	무가포도	[1]	저항성
Koho	[5]	감수성	무핵청제	[1]	저항성
Kokuou	[7]	감수성	미만	[3]	저항성
Kokuyou	[7]	감수성	바티르	[5]	감수성
Korapolvon	[7]	감수성	백시남	[7]	감수성
왕머루	[1]	저항성	백오림	[7]	감수성
왕사	[5]	감수성	백옥예	[9]	감수성
Krasavitsa Seglada	[7]	감수성	분홍아도밀	[9]	감수성
Kuljinskiy	[7]	감수성	사용주	[7]	감수성
Kyoho	[7]	감수성	산원 3호	[7]	감수성
Kyoho Sel. Izuka	[5]	감수성	새머루	[7]	감수성
Kyoho Sel. Sakura	[5]	감수성	서사	[7]	감수성
Kyoho Sel. Sato	[5]	감수성	서풍무핵	[7]	감수성
Kyoho Sel. Toabu	[7]	감수성	선과 1호	[7]	감수성
Kyoho Sel. Tobu	[5]	감수성	선발 140	[7]	감수성
Kyoho Sel. 하촌	[1]	저항성	선발 149	[7]	감수성
Ladyfinger Mutant of Thompson Seedless Tetraploid	[5]	감수성	선발 갑주	[7]	감수성
Lake Emerald	[1]	저항성	안예 Seedless	[7]	감수성
Linneo Nero	[7]	감수성	애모	[5]	감수성
M. Ottenel	[1]	저항성	오디아	[7]	감수성
Maddalena Salomon	[7]	감수성	오리엔탈스타	[7]	감수성
Malbec	[5]	감수성	Mid South	[5]	감수성
Maldeleine Angevine	[7]	감수성	Miklos Horthy	[9]	감수성
Malegue 44-53	[3]	감수성	Milbaune	[9]	감수성

[0079]

표 13

포도 유전자원에 대한 노균병 저항성 검정 결과 (11)

포도 자원명	병원성검정 (발병지수)	비 고	포도 자원명	병원성검정 (발병지수)	비 고
Malta Seedless	[7]	감수성	Millardet et Grasset 101-14	[5]	감수성
Marchel	[5]	감수성	Millardet et Grasset 41 B	[5]	감수성
Marechal Foch	[7]	감수성	Millardet et Grasset 420 A	[7]	감수성
Mario	[7]	감수성	Milton	[7]	감수성
Marquerite	[5]	감수성	Misket	[9]	감수성
Mars	[1]	저항성	Miss Blue	[1]	저항성
Martellata Bianca	[7]	감수성	Molar	[5]	감수성
May Zae	[1]	저항성	Molinera Gorda	[7]	감수성
McCampbell	[1]	저항성	Monbadon	[5]	감수성
Meunier	[7]	감수성	Moore Early	[5]	감수성
Michele Palieri	[7]	감수성	Morgen Schon	[1]	저항성

[0080]

[0082] **실시예 3. *Plasmopora viticola JN-9*의 유전체 분석을 통한 병원성 요소 분석**

[0083] 현재 포도 노균병균 중 한국에서 분리된 균주에 대한 전체 게놈 정보가 미비할 뿐만 아니라, 병을 일으키는 병원성 요소에 대한 정보 자체가 없는 실정이다. 이에 본 발명에서는 국내에서 분리된 노균병균 중 병원성이 가장 높았던 *P. viticola* JN-9 균주를 대상으로 유전체 서열 및 시그널 펩타이드를 분석하여, Avr 요소로서 기능할 것으로 추정되는 RxLR 모티프를 생물정보학을 바탕으로 탐색하였다. 시그널 펩타이드의 유무는 단백질이 세포밖으로 분비되는 것을 의미하여 기주식물에 영향을 줄 것으로 판단되었다.

[0084] *P. viticola* JN-9 균주의 전체 게놈 서열 분석은 나노포어(Nonopore) 기술을 통해 분석되었으며, 약 92 MB로 19,171개의 단백질을 코딩하는 것으로 확인되었다(표 14).

표 14

노균병균 감염 시 외부로 분비될 것으로 추정되는 단백질의 시그널 펩타이드 분석 결과

Representative proteins (#)	Types of signal peptide (prediction prob. ≥0.5)			
	SP(Sec/SPI)*1	LIPO(Sec/SPII)*2	TAT(Tat/SPI)*3	OTHER*4
19,171	1,701	0	0	17,470

*1) **Sec/SPI**: "standard" secretory signal peptides transported by the Sec translocon and cleaved by Signal Peptidase I (Lep)

*2) **Sec/SPII**: lipoprotein signal peptides transported by the Sec translocon and cleaved by Signal Peptidase II (Lsp)

*3) **Tat/SPI**: Tat signal peptides transported by the Tat translocon and cleaved by Signal Peptidase I (Lep)

*4) **OTHER**: No signal peptide at all

[0085]

[0087] 또한, 시그널 펩타이드 서열의 유무를 통해 1,701개의 단백질을 분리한 다음, RxLR-EER 모티프가 모두 존재하는 후보 유전자 91개, RxLR 모티프만 존재하는 후보 유전자 15개, EER 모티프만 존재하는 후보 유전자 70개가 탐색되어, RxLR 모티프를 충족하는 106개의 후보 단백질을 분리하였다(표 15). RxLR로 간주되는 각 효과기는 약 22~23개의 아미노산 서열로 이루어진 시그널 펩타이드, 시그널 펩타이드 절단 부위의 100개 미만 아미노산에 RxLR 모티프, RxLR 모티프의 40개 아미노산 내에 EER 모티프를 포함하였다.

표 15

RxLR effector로 추정되는 후보 유전자 동정

Representative proteins (#)	SP(Sec/SPI)	RxLR-EER motifs	Types of RxLR-EER motif		
			Complete*1	Only RxLR motif*2	Only EER motif*3
19,171	1,701	176	91	15	70

*1) **Complete**: 후보 ORF에 RxLR과 EER motif가 모두 존재하는 경우
*2) **Only RxLR motif**: 후보 ORF에 RxLR motif만 존재하는 경우
*3) **Only EER motif**: 후보 ORF에 EER motif만 존재하는 경우

[0088]

[0090] 상기 RxLR-EER 모티프가 모두 존재하는 후보 유전자 91개 중에서 최종 선택된 *PvRxLR27* 유전자의 염기서열 분석을 통해 구조를 확인한 결과, N-말단에는 시그널 펩타이드, RxLR 모티프 및 EER 모티프가 존재하였고, C-말단에는 다양한 아미노산 서열로 이루어진 이펙터(effector) 활성을 가진 도메인이 관찰되었다(도 4).

[0091] 또한, *PvRxLR27* 유전자의 세포 내 위치를 알아보기 위해 *PvRxLR27* 전장 유전체 서열을 pCAMBIA1302 벡터에 클로닝하여 담배(*Nicotiana benthamiana*)에 일시적으로 발현시킨 결과, *PvRxLR27* 유전자는 핵에 위치하는 것으로 확인되었다(도 5).

[0093] **실시예 4. 비기주 식물인 담배(*Nicotiana benthamiana*)에 *PvRxLR27* 이펙터 유전자의 도입**

[0094] *PvRxLR27* 유전자의 RxLR 이펙터로서 기능을 분석하기 위해 아그로박테리움 매개 일시적 유전자 발현 분석(*Agrobacterium*-mediated transient expression assay)을 수행하였다. *PvRxLR27* 유전자를 Potato virus X를 기반으로 하는 pGR106 벡터에 클로닝하고(도 6A), 모든 진핵세포의 세포사멸에 관여하는 BAX와 INF1 엘리시틴(elicitin)을 양성 대조군으로 사용하여 생체 내 과민성 세포사멸(HR) 유도 반응(도 6B), ROS 축적 여부(도 6C) 및 이온 누출률(도 6D)을 검정하였다.

[0095] 그 결과, *GFP* 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 잎에서는 과민성 세포사멸 반응이 나타나지 않았으나, *PvRxLR27* 유전자, *BAX* 또는 *INF1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 잎에서는 과민성 세포사멸 반응이 나타난 것을 확인하였다(도 6B). 또한, *GFP* 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 잎보다 *PvRxLR27* 유전자, *BAX* 또는 *INF1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 잎에서 ROS 축적(도 6C) 및 이온 누출률(도 6D)이 현저히 증가한 것을 확인하였다. 이를 통해, *PvRxLR27* 유전자가 병원성 인자로서 식물 면역 반응에 관여하고, 저항성 유전자와의 상호작용이 가능함을 알 수 있었다. 또한, 이러한 반응을 토대로 기주에 적용하였을 때 과민성 세포사멸 반응 여부를 통해 기주의 노균병 저항성 또는 감수성 여부를 판단할 수 있을 것으로 판단되었다.

[0097] **실시예 5. 기주 식물인 포도(*Vitis vinifera*)에 *PvRxLR27* 이펙터 유전자의 도입**

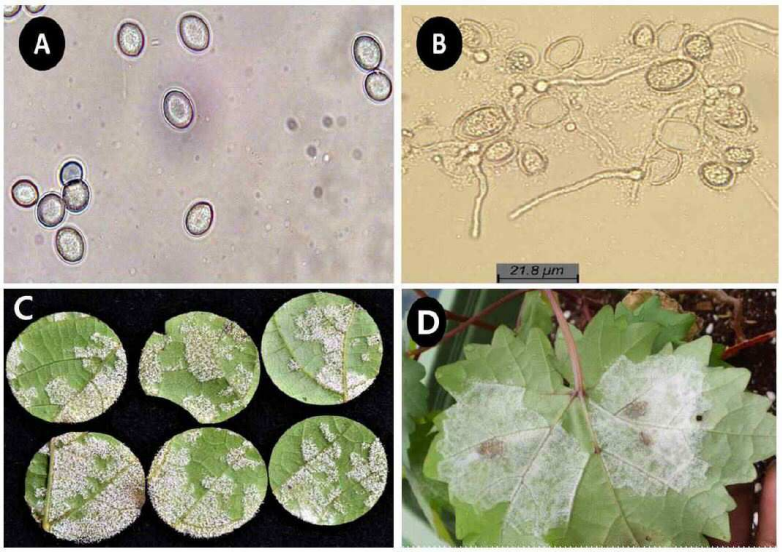
[0098] *PvRxLR27* 이펙터 유전자가 기주 식물인 포도에서도 병원성 이펙터로서 기능할 수 있을지 확인하기 위해, 아그로박테리움 매개 일시적 유전자 발현 분석을 통해 세포사멸 반응 여부를 확인하였다.

[0099] 그 결과, 상기 실시예 2에서 노균병 감수성 품종인 것으로 확인된 카베르네 쇼비뇽(Cabernet Sauvignon)의 잎에서는 과민성 세포사멸 반응이 나타나지 않았으나, 노균성 저항성 품종인 마이다와(Mydawa) 및 말로아(Malroa)에서는 과민성 세포사멸 반응이 나타난 것을 확인하였다(도 7).

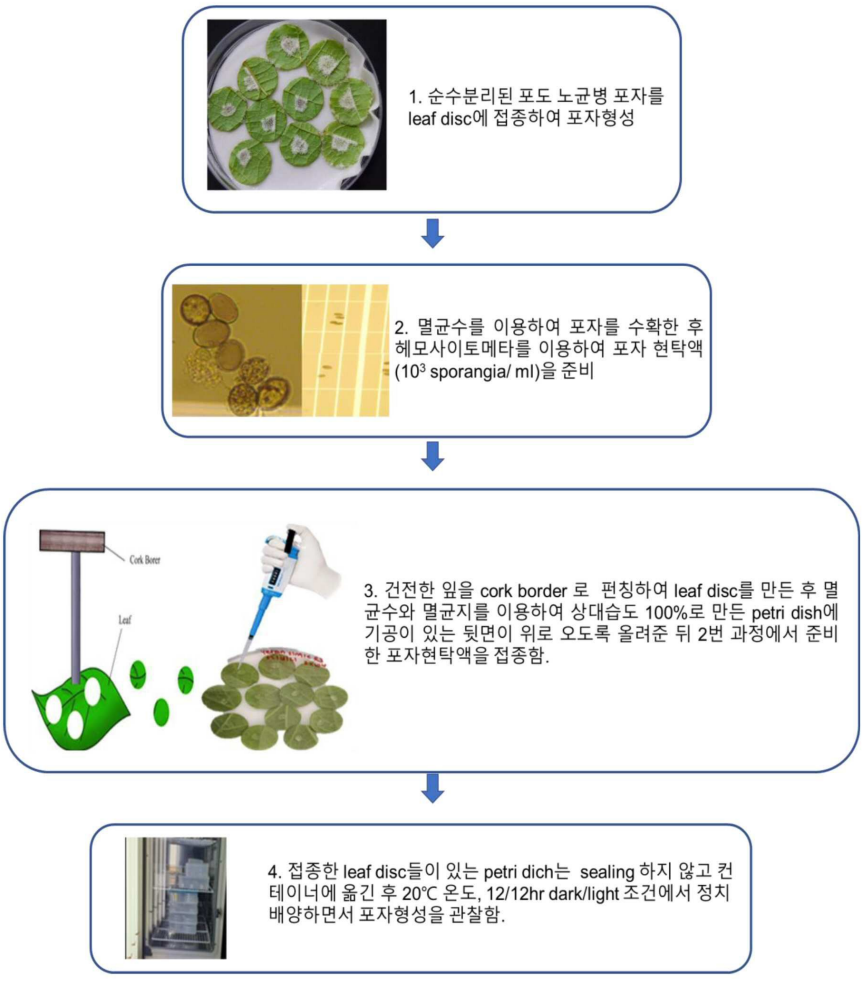
[0100] 즉, 노균병 저항성 품종의 저항성 유전자와 포도에 도입된 병원성 이펙터 *PvRxLR27* 유전자와의 상호작용에 의해 식물 면역반응이 나타났고, *PvRxLR27* 이펙터 유전자의 접종만으로 과민성 세포사멸 반응 여부를 통해 포도 노균병에 대한 저항성 또는 감수성을 판단할 수 있음을 알 수 있었다.

도면

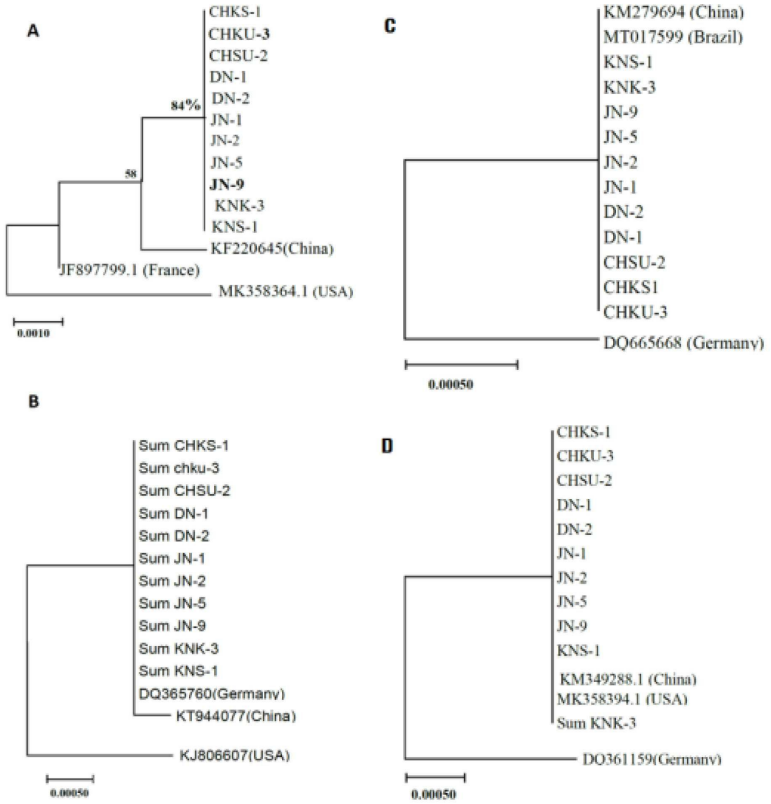
도면1


A
B
21.8 μm
C
D

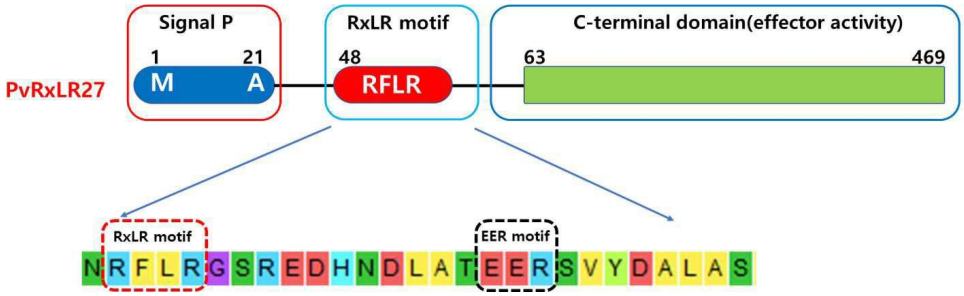
도면2


1. 순수분리된 포도 노균병 포자를 leaf disc에 접종하여 포자형성
2. 멸균수를 이용하여 포자를 수확한 후 헤모사이토메타를 이용하여 포자 현탁액 (10^3 sporangia/ ml)을 준비
Cork Borer
Leaf
3. 건전한 잎을 cork border 로 펀칭하여 leaf disc를 만든 후 멸균수와 멸균지를 이용하여 상대습도 100%로 만든 petri dish에 기공이 있는 뒷면이 위로 오도록 올려준 뒤 2번 과정에서 준비한 포자현탁액을 접종함.
4. 접종한 leaf disc들이 있는 petri dich는 sealing 하지 않고 컨테이너에 옮긴 후 20℃ 온도, 12/12hr dark/light 조건에서 정치 배양하면서 포자형성을 관찰함.

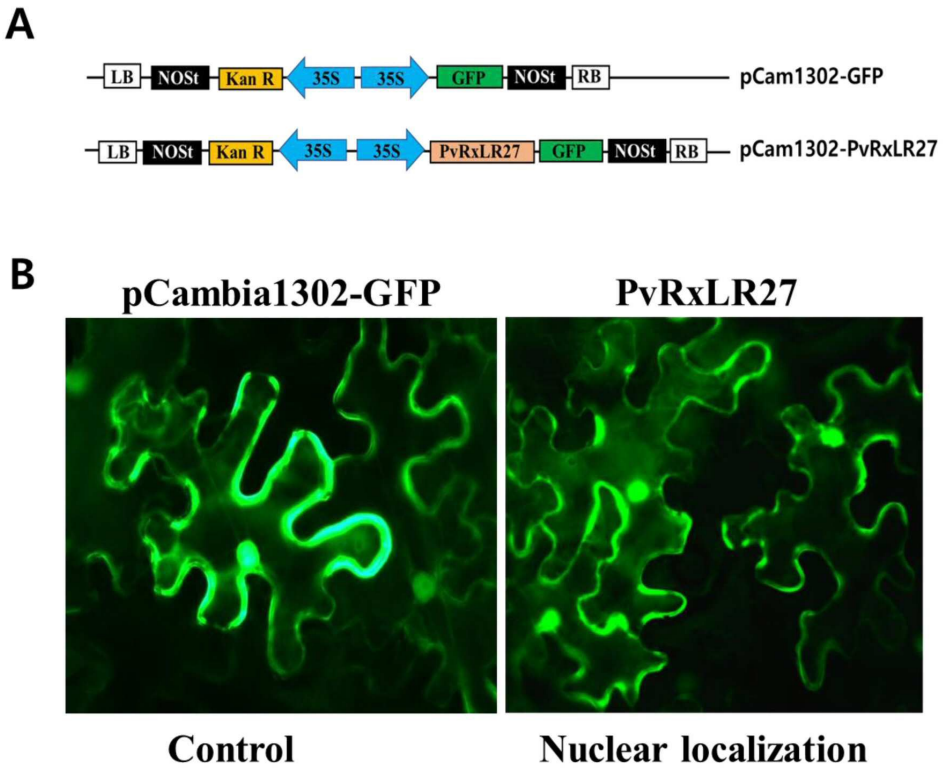
도면3


A
CHKS-1
CHKU-3
CHSU-2
DN-1
DN-2
JN-1
JN-2
JN-5
JN-9
KNK-3
KNS-1
KF220645(China)
JF897799.1 (France)
MK358364.1 (USA)
84%
58
0.0010
C
KM279694 (China)
MT017599 (Brazil)
KNS-1
KNK-3
JN-9
JN-5
JN-2
JN-1
DN-2
DN-1
CHSU-2
CHKS1
CHKU-3
DQ665668 (Germany)
0.00050
B
Sum CHKS-1
Sum chku-3
Sum CHSU-2
Sum DN-1
Sum DN-2
Sum JN-1
Sum JN-2
Sum JN-5
Sum JN-9
Sum KNK-3
Sum KNS-1
DQ365760(Germany)
KT944077(China)
KJ806607(USA)
0.00050
D
CHKS-1
CHKU-3
CHSU-2
DN-1
DN-2
JN-1
JN-2
JN-5
JN-9
KNS-1
KM349288.1 (China)
MK358394.1 (USA)
Sum KNK-3
DQ361159(Germany)
0.00050

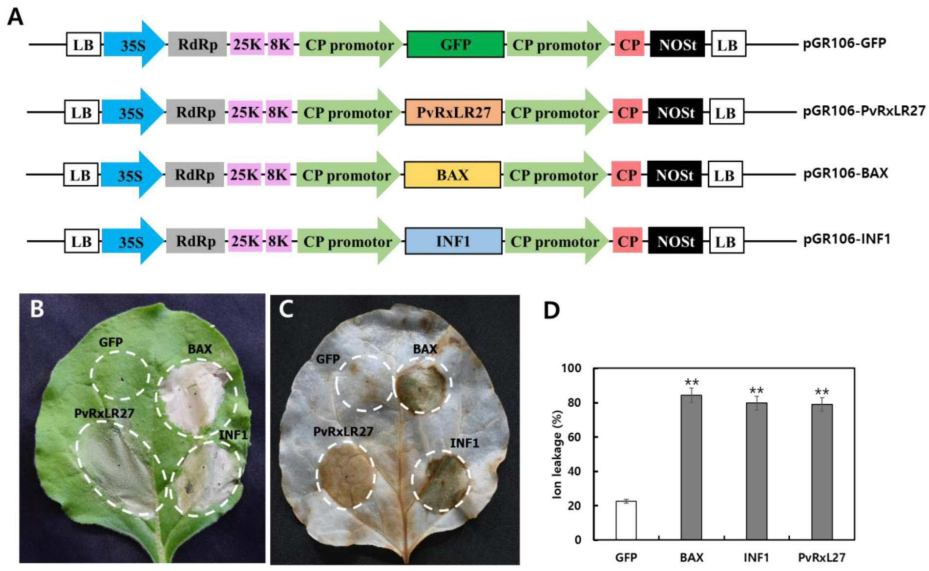
도면4


PvRxLR27
Signal P
1
21
M
A
RxLR motif
48
RFLR
C-terminal domain(effector activity)
63
469
RxLR motif
EER motif
N R F L R G S R E D H N D L A T E E R S V Y D A L A S

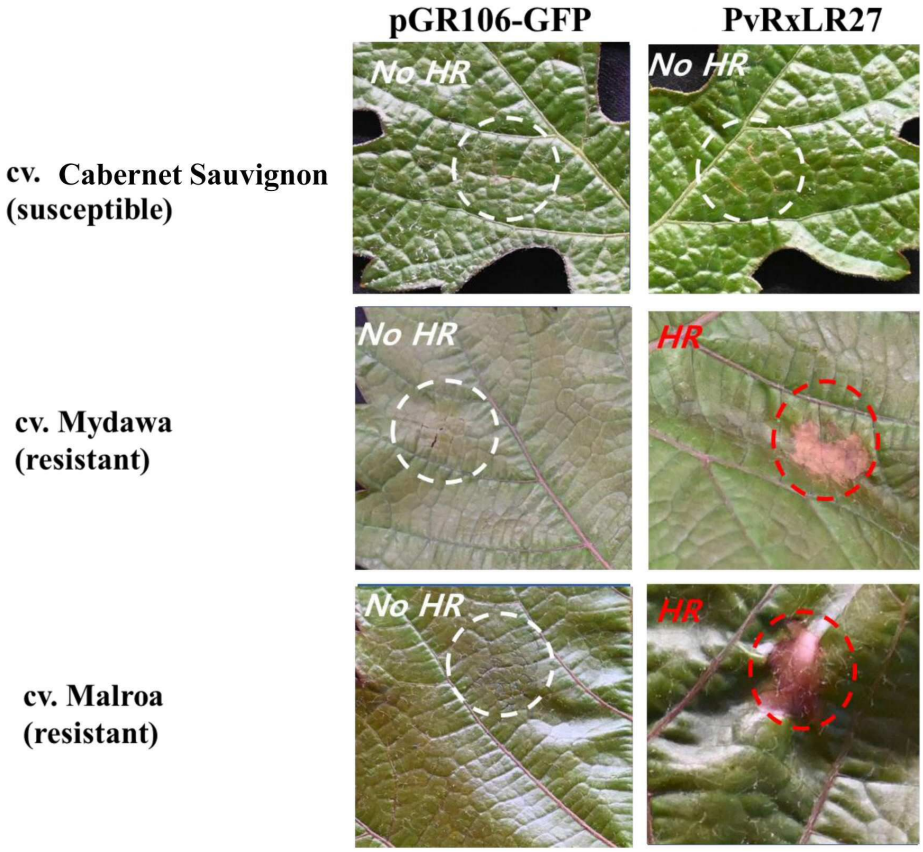
도면5


A
LB
NOSt
Kan R
35S
35S
GFP
NOSt
RB
pCam1302-GFP
LB
NOSt
Kan R
35S
35S
PvRxLR27
GFP
NOSt
RB
pCam1302-PvRxLR27
B
pCambia1302-GFP
PvRxLR27
Control
Nuclear localization

도면6


A
LB
35S
RdRp
25K
8K
CP promotor
GFP
CP promotor
CP
NOSt
LB
pGR106-GFP
PvRxLR27
pGR106-PvRxLR27
BAX
pGR106-BAX
INF1
pGR106-INF1
B
C
D
GFP
BAX
PvRxLR27
INF1
Ion leakage (%)
100
80
60
40
20
0
**
GFP
BAX
INF1
PvRxL27

도면7


pGR106-GFP
PvRxLR27
cv. Cabernet Sauvignon (susceptible)
cv. Mydawa (resistant)
cv. Malroa (resistant)
No HR
No HR
No HR
HR
No HR
HR

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.