



등록특허 10-2141703



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년08월05일

(11) 등록번호 10-2141703

(24) 등록일자 2020년07월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6895 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6895 (2018.05)

C12Q 2600/13 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0063283

(22) 출원일자 2019년05월29일

심사청구일자 2019년05월29일

(56) 선행기술조사문헌

GenBank accession No. HG975516 (2015.03.07.)*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 11 항

(73) 특허권자

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

(72) 발명자

심성철

서울특별시 강남구 테헤란로16길 27, B동 101호(역삼동)

(74) 대리인

특허법인리채

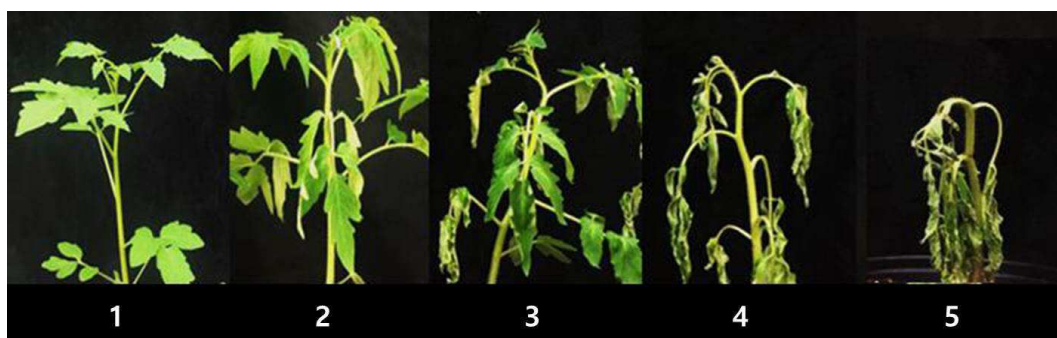
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 토마토 풋마름병 저항성 개체 선별용 분자 마커 및 이를 이용한 선별 방법

(57) 요약

본 발명은 토마토 풋마름병 저항성 개체 판별용 마커 및 이를 이용한 토마토 풋마름병 저항성 개체 선별 방법에 관한 것이다. 본 발명의 마커를 증폭시켜 토마토 풋마름병 저항성 개체를 선별할 수 있는바, 풋마름병 저항성을 가지는 토마토 선별 및 육종을 위해 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/156 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
KR101883117B1
Il Sheob Shin et al, Preprints, 2019, pp.1-20
Thoquet et al, MPMI, 1996, 9(9), pp.826-836
GenBank accession no. HG975524
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395058788
부처명	농촌진흥청
연구관리전문기관	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21(R&D)
연구과제명	Post-GWAS 연구를 통한 토마토 유전체육종 기반 구축
기 여 율	1/1
주관기관	세종대학교
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31
공지예외적용	: 있음

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드에서 231번째 염기가 C 또는 T이고, 상기 231번째 염기를 포함하는 10 내지 450 개의 연속적인 염기로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 토마토 풋마름병 저항성 판별용 마커 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 231번째 염기가 T인 경우 토마토 풋마름병 저항성 토마토인 것으로 판별하는 것인 토마토 풋마름병 저항성 판별용 마커 조성물.

청구항 3

청구항 1의 마커를 증폭시킬 수 있는 제제를 포함하는 토마토 풋마름병 저항성 개체 선별용 조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 제제는 서열번호 2 및 서열번호 3의 폴리뉴클레오타이드로 이루어지는 프라이머 세트인 토마토 풋마름병 저항성 개체 선별용 조성물.

청구항 5

청구항 3에 있어서, 서열번호 4의 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 내에서 241번째 염기가 C 또는 T이고, 상기 241번째 염기를 포함하는 10 내지 450 개의 연속적인 염기로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 토마토 풋마름병 저항성 제2 마커를 증폭시킬 수 있는 제제를 더 포함하는 토마토 풋마름병 저항성 개체 선별용 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 제2 마커를 증폭시킬 수 있는 제제는 서열번호 5 및 서열번호 6의 폴리뉴클레오타이드로 이루어지는 프라이머 세트인 토마토 풋마름병 저항성 개체 선별용 조성물.

청구항 7

청구항 3의 조성물을 포함하는 토마토 풋마름병 저항성 개체 선별용 키트.

청구항 8

토마토 시료에서 분리된 DNA로부터 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드의 SNP를 포함하는 제1 다형성 부위를 증폭시키는 단계; 및 상기 증폭된 제1 다형성 부위의 염기를 결정하는 단계;를 포함하고,

상기 제1 다형성 부위는 상기 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드의 231번째 염기인, 토마토

꽃마름병 저항성 개체 선별 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드의 231번째 염기가 T인 경우 꽃마름병 저항성 토마토 인 것으로 판별하는 토마토 꽃마름병 저항성 개체 선별 방법.

청구항 10

청구항 8에 있어서, 상기 DNA로부터 서열번호 4의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드의 SNP 를 포함하는 제2 다형성 부위를 증폭시키는 단계; 및 상기 증폭된 제2 다형성 부위의 염기를 결정하는 단계;를 더 포함하고,

상기 제2 다형성 부위는 상기 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드의 241번째 염기인 토마토 꽃마름병 저항성 개체 선별 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드의 231번째 염기가 T이고, 서열번호 4의 폴리뉴클레오타이드의 241번째 염기가 T이면, 둘 중 하나가 T인 경우보다 꽃마름병 저항성이 높은 것으로 판단하는 토마토 꽃마름병 저항성 개체 선별 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 토마토 꽃마름병 저항성 개체 선별용 마커 및 이를 이용한 토마토 꽃마름병 저항성 개체 선별 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 토마토는 종자 시장 규모가 세계적으로 약 1조원에 달하고 있는 고부가가치 글로벌 채소작물로, 국내에서도 토마토의 소비 증가로 인해 종자 시장 규모가 2017년도에 271억으로 성장하였으며, 과채류 중에서도 고추 다음으로 큰 비중을 차지하고 있다.

[0004] 한편, 국내의 토마토 재배농가에서 토마토의 안정적인 생산에 위협이 되는 주요 병인 꽃마름병은 토양 매개 세균인 람스토티아 솔라나세아룸(*Ralstonia solanacearum*)에 의해 발병된다. 병원균은 상처 또는 뿌리의 자연적 개방을 통해 토마토를 침범하고, 뿌리가 자루에서 수평으로 자라면 목부 조직을 감염시켜 감수성 식물의 혈관 시스템에서 물의 흐름을 막는다. 이 치명적인 질병을 통제하기 위해 종자 회사에서는 저항성 토마토 선별 및 육종에 많은 노력을 기울이고 있다. 표현형에 기반한 기존의 선별 및 육종 방법은 시간과 비용이 많이 요구되는 단점이 있어서, DNA 분자 마커를 활용하여 선별 효율을 증진시키고자 하는 연구가 많이 이루어져 왔다.

[0005] DNA 분자 마커는 생물종의 유전체상에서 다형성(polymorphism) 여부를 판단할 수 있는 특정 염기서열 단편으로 표현형 기반의 방법에 비해 재배환경 및 작물의 성장단계에 영향을 받지 않아 신속하고 정확도가 높다는 장점이 있다. 토마토의 경우, 다수 병에 대한 저항성 개체를 선발하기 위한 분자 마커 개발을 통한 MAS(Marker Assisted Selection) 기술의 요구도가 높으며, 연구가 활발히 이루어지고 있다. 하지만 기존에 개발된 꽃마름병 저항성에 대한 분자 마커는 육종 현장에서 제한적으로 활용되고 있어, 신규한 저항성 유전자 발굴 및 분자 마커 개발 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1970264호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 토마토 풋마름병 저항성 마커를 제공함에 그 목적이 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 토마토 풋마름병 저항성 개체 선별용 조성물을 제공함에 있다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 토마토 풋마름병 저항성 개체 선별용 키트를 제공함에 있다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 토마토 풋마름병 저항성 개체 선별 방법을 제공함에 있다.

과제의 해결 수단

- [0013] 1. 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드에서 231번째 염기가 C 또는 T이고, 상기 231번째 염기를 포함하는 10 내지 450 개의 연속적인 염기로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 토마토 풋마름병 저항성 마커.
- [0014] 2. 위 1에 있어서, 상기 231번째 염기가 T인 경우 토마토 풋마름병 저항성 토마토인 것으로 판별하는 것인 토마토 풋마름병 저항성 마커.
- [0015] 3. 위 1의 마커를 증폭시킬 수 있는 제제를 포함하는 토마토 풋마름병 저항성 개체 선별용 조성물.
- [0016] 4. 위 3에 있어서, 상기 제제는 서열번호 2 및 서열번호 3의 폴리뉴클레오타이드로 이루어지는 프라이머 세트인 토마토 풋마름병 저항성 개체 선별용 조성물.
- [0017] 5. 위 3에 있어서, 서열번호 4의 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 내에서 241번째 염기가 C 또는 T이고, 상기 241번째 염기를 포함하는 10 내지 450 개의 연속적인 염기로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 토마토 풋마름병 저항성 제2 마커를 증폭시킬 수 있는 제제를 더 포함하는 풋마름병 저항성 개체 선별용 조성물.
- [0018] 6. 위 5에 있어서, 상기 제2 마커를 증폭시킬 수 있는 제제는 서열번호 5 및 서열번호 6의 폴리뉴클레오타이드로 이루어지는 프라이머 세트인 토마토 풋마름병 저항성 개체 선별용 조성물.
- [0019] 7. 위 3의 조성물을 포함하는 토마토 풋마름병 저항성 개체 선별용 키트.
- [0020] 8. 토마토 시료에서 분리된 DNA로부터 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드의 SNP를 포함하는 제1 다형성 부위를 증폭시키는 단계; 및 상기 증폭된 제1 다형성 부위의 염기를 결정하는 단계를 포함하는 토마토 풋마름병 저항성 개체 선별 방법.
- [0021] 9. 위 8에 있어서, 상기 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드의 231번째 염기가 T인 경우 풋마름병 저항성 토마토인 것으로 판별하는 토마토 풋마름병 저항성 개체 선별 방법.
- [0022] 10. 위 8에 있어서, 상기 DNA로부터 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드의 SNP를 포함하는 제2 다형성 부위를 증폭시키는 단계; 및 상기 증폭된 제2 다형성 부위의 염기를 결정하는 단계를 더 포함하는 토마토 풋마름병 저항성 개체 선별 방법.
- [0023] 11. 위 10에 있어서, 상기 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드의 231번째 염기가 T이고, 서열번호 4의 폴리뉴클레오타이드의 241번째 염기가 T이면, 둘 중 하나가 T인 경우보다 풋마름병 저항성이 높은 것으로 판단하는 토마토 풋마름병 저항성 개체 선별 방법.

발명의 효과

- [0025] 본 발명은 토마토 풋마름병 저항성 마커 및 이를 증폭시킬 수 있는 제제를 포함하는 조성물에 관한 것으로, 풋마름병 저항성을 가지는 토마토 선별 및 육종을 위해 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 토마토 모종에서 풋마름병의 중증도를 단계별로 나타낸다.
- 도 2는 1차 분석 및 2차 분석을 통해 확인한 192점 토마토의 풋마름병 중증도의 빈도 분포를 나타낸다.
- 도 3은 모집단의 구조 평가를 위한 베이저안 클러스터링 분석(Bayesian clustering analysis) 결과를 나타낸다.
- 도 4는 192 점 토마토에서 추정된 모집단의 구조를 나타낸다.
- 도 5는 1차 분석 및 2차 분석을 통해 확인한 게놈 SNPs와 풋마름병 저항성간의 연관성을 보여주는 맨하탄 플롯(Manhattan plots)을 나타낸다.
- 도 6은 12개의 염색체에 걸친 풋마름병 저항성에 대한 QTL 후보군의 물리적 지도 위치를 나타낸다.
- 도 7은 풋마름병 저항성과 연관된 SNPs인 sjs2705, sjs2707 및 sjs7794 에서 유리한 대립 유전자를 확인한 데이터를 나타낸다.
- 도 8은 F1 토마토 품종에 대한 3 가지 CAPS 마커 sjs2705 (SspI), sjs2707 (BfaI) 및 sjs7794 (BsaAI) 유전자형을 보여주는 아가로오스 겔을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0030] 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드에서 SNP(single nucleotide polymorphism) 위치 (서열번호 1의 231번째) 염기를 포함하는 5개 이상의 연속된 뉴클레오타이드로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 토마토 풋마름병 저항성 마커를 제공한다.
- [0031] 서열번호 1의 서열은 하기와 같고, 본 명세서에서는 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드에서 SNP 위치의 염기를 Y로 표현하였다:
- GCTACAGGAGGAGGACAACCTTCGTTTGTGTTTCAACAAGGGTTGGCTCTTTCGGCAGATGCTCTGACAGTAACTCCGCAACTTGTGAGCAGGT
TTTGGCAAGTGCTTCTCTTTGGATACTGATATTTACCTTGACACCCCTTTTAGACAATCTAATTCTGATAATGCTACCTATTGTCGAGCAGCAAACTTC
AGATTAGCAACAGATAAAACATAACAYTAGACCAAAATAGTAAGTATTATATATAAAGGGAAGAACTACCATGCGCCTGTATGCCACCTCGTGAAGGTGAA
GGTGAAGTAGGCCTCTCTCTTTTATTACTGTCTGGGTGCTGCGATGAGCAGCTGGAATTCTGTGAACACACAGCAGGCTCATGTTCTCTCAGTGAGATTG
CTCCTCTCCAACCTGCTCAGGTTCA (서열번호 1).
- [0032] 본 발명의 마커를 토마토 풋마름병 저항성 선별에 사용할 수 있는 것은 토마토의 서열 중 서열번호 1로 표시되는 염기서열에서 231번째 염기(Y)가 C 또는 T로 다르게 나타나는 것에 근거한 것이다. 예를 들어, 서열번호 1의 231번째 뉴클레오타이드에 해당하는 SNP 위치의 염기(Y)는 C 또는 T로 염기 다형성(polymorphism)을 나타내는데, SNP 위치의 염기(Y)가 T인 유전자형을 가지는 개체를 토마토 풋마름병 저항성 개체로 판단할 수 있으며, SNP 위치의 염기(Y)가 C인 유전자형을 가지는 품종은 토마토 풋마름병 감수성 품종으로 판단할 수 있다.
- [0033] 용어 "마커"는 유전적으로 불특정 연관된 유전자좌를 동정할 때 참고점으로 사용되는 염기서열을 말하며, 마커(molecular marker)의 유전자 지도상의 위치는 유전자좌(genetic locus) 또는 좌위로 일컬어진다.
- [0034] 본 발명에서 제공되는 마커는 제한 증폭 다형성 서열 마커일 수 있다.
- [0035] 용어 "제한 증폭 다형성 서열(Cleaved amplified polymorphic sequence; CAPS) 마커"는 SNP처럼 한 개의 염기 서열이 변하거나 InDel에 의해 발생하는 제한효소에 의해 잘리는 부위의 변화를 해석할 수 있는 마커이다. CAPS 마커는 유전자좌에 특이적인 프라이머로 PCR 증폭을 한 후 제한효소로 잘라준 뒤 나타나는 다형성을 분석하는 방법이다.
- [0036] 또한, 본 발명은 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드에서 SNP(single nucleotide polymorphism) 위치 (서열번호 4의 241번째) 염기를 포함하는 5개 이상의 연속된 뉴클레오타이드로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 토마토 풋마름병 저항성 마커를 제공한다.
- [0037] 서열번호 4의 서열은 하기와 같으며, 본 명세서에서는 서열번호 4의 폴리뉴클레오타이드에서 SNP 위치의 염기를 Y로 표현하였다:

TGCTGCTTGCCTTTCTGACTGGAGTATGGAAGGTAAGTTGTTTTCTGCTACTATTAATCAACCGTTGGGTGATGCTTCTGTTGATAATCTTAGAGCTTTACT
ATCTGTGAAGAACCCTCTTGTGCTCAACGGTCAGTTGTTGGTCGGAAGTTGTCTTGCTCGAACTTTAAGCAGCATTGCCAAGGTGCATTTAATTTTTTGCA
TGAAACTGTTAAGAAAGTAAGAGATAGCGTCAAGTAYGTGAAAACATCAGAATTTACGAGGAAAAGTTATTGAGCTCAAACAGCAGCTTCAAGTGCCAAG
CACAAAGACTTTGGCTCTTGATGACCAGACTCAATGGAACACCACATATGAGATGTTGTTAGCTGCATCAGAGTTAAAGGAAGTGTTCATGCTTGGATAC
ATCTGATCCCGATTACAAGGATGCCC (서열번호 4).

- [0038] 상기 마커를 토마토 풋마름병 저항성 선별에 사용할 수 있는 것은 토마토의 서열 중 서열번호 4로 표시되는 염기서열에서 241번째 염기(Y)가 C 또는 T로 다르게 나타나는 것에 근거한 것이다. 예를 들어, 서열번호 4의 241번째 뉴클레오타이드에 해당하는 SNP 위치의 염기(Y)는 C 또는 T로 염기 다형성(polymorphism)을 나타내는데, SNP 위치의 염기(Y)가 T인 유전자형을 가지는 개체를 토마토 풋마름병 저항성 개체로 판단할 수 있으며, SNP 위치의 염기(Y)가 C인 유전자형을 가지는 품종은 토마토 풋마름병 감수성 품종으로 판단할 수 있다.
- [0039] 본 발명에서 제공되는 마커를 이용하면 보다 풋마름병 저항성이 높은 개체를 선별할 수 있으며, 보다 정확하고 효과적으로 풋마름병 저항성 개체를 선별할 수 있다.
- [0040] 용어 "다형성(polymorphism)"은 하나의 유전자 좌위(locus)에 두 종류 이상의 대립 유전자(allele)가 존재하는 경우를 의미하며, 다형성 중에서 개체에 따라 단일 염기만이 차이가 있는 것을 단일 염기 다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)이라 한다.
- [0041] 용어 "대립 유전자(allele)"는 상동염색체의 동일한 유전자좌에 존재하는 한 종류의 유전자의 여러 타입을 의미한다.
- [0042] 본 발명의 마커는 서열번호 1의 SNP 위치의 염기를 포함하는 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드 전체 또는 일부 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 10 내지 450개의 연속된 뉴클레오타이드 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 용어, "뉴클레오타이드"는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이며, 특별하게 다르게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오타이드의 유사체를 포함한다.
- [0044] 용어 "풋마름병 (Bacterial wilt)"은 막대 모양의 토양 매개 그람 음성세균인 랄스토니아 솔라나세아룸(*Ralstonia solanacearum*)에 의해 유발되는 질병이며, 청고병이라고도 알려져있다. 풋마름병을 유발하는 병원균은 상처 또는 뿌리의 자연적 개방을 통해 토마토에 침입하고, 뿌리가 자루에서 수평으로 자라면 도관부 조직을 감염시켜 감수성 식물의 혈관 시스템에서 물의 흐름을 막아 식물이 빠르게 시들어간다.
- [0045] 용어, "저항성"은 외부의 스트레스에 대해 견디는 성질을 의미하며, 구체적으로 질병 등의 감염에 내성을 가지거나, 해충 등의 피해를 견디는 성질을 의미한다.
- [0046] 용어 "개체"는 토마토 풋마름병 저항성을 확인하고자 하는 대상인 토마토를 의미하며, 상기 토마토로부터 얻어진 검체를 이용하여, 상기 마커의 유전자형을 분석함으로써 상기 토마토 풋마름병 저항성이 있는 토마토를 판단할 수 있다. 상기 검체로는 잎, 뿌리, 줄기, 꽃, 열매, 분리된 조직, 또는 분리된 세포와 같은 시료 등이 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0048] 또한, 본 발명은 본 발명의 마커를 증폭시킬 수 있는 제제를 포함하는 토마토 풋마름병 저항성 개체 선별용 조성물을 제공한다.
- [0049] 용어 "마커를 증폭시킬 수 있는 제제"는 증폭을 통해 다형성 부위 (polymorphic site)를 확인하여 토마토 풋마름병 저항성 토마토를 판별할 수 있는 조성물을 의미한다.
- [0050] 용어 "다형성 부위(polymorphic site)"는 다형성이 나타난 염기의 위치를 의미하며, 본 명세서에서는 다형성이 나타난 위치에 존재하는 염기와 혼용하여 사용될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 마커를 증폭시킬 수 있는 제제는 프라이머 세트일 수 있다.
- [0052] 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 염기 서열로, 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 서열을 의미하며, 주로 특정 구간을 증폭하는 프라이머 세트의 형태로 사용된다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약 (예를 들어, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소) 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 프라이머는 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 프라이머의 적합한 길이는 사용하고자

하는 프라이머의 특성에 의해 결정되며, 통상적으로 15 내지 30bp의 길이로 사용하나, 이에 제한되지 않는다. 프라이머는 주형의 염기 서열과 정확하게 상보적일 필요는 없지만, 주형과 혼성복합체(hybrid-complex)를 형성할 수 있을 정도로 상보적이어야 한다.

- [0053] 본 발명의 상기 마커를 증폭시킬 수 있는 프라이머 세트는 서열번호 2 및 서열번호 3의 폴리뉴클레오타이드로 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 서열번호 2로 표시된 폴리뉴클레오타이드는 정방향 프라이머이며, 상기 서열번호 3으로 표시된 폴리뉴클레오타이드는 역방향 프라이머이다.
- [0054] 서열번호 2의 염기서열은 다음과 같다: GCTACAGGAGGAGGACAACCTTC (서열번호 2).
- [0055] 서열번호 3의 염기서열은 다음과 같다: TGAACCTGAGCAGTTGGAGAG (서열번호 3).
- [0056] 또한, 본 발명에서 제공되는 풋마름병 저항성 토마토를 판별할 수 있는 조성물은, 서열번호 4의 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 내에서 241번째 염기가 C 또는 T이고, 상기 241번째 염기를 포함하는 5 내지 200 개의 연속적인 염기로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 토마토 풋마름병 저항성 제2 마커를 증폭시킬 수 있는 제제를 더 포함할 수 있다.
- [0057] 상기 제2 마커를 증폭시킬 수 있는 제제는 서열번호 5 및 서열번호 6의 폴리뉴클레오타이드로 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 서열번호 5로 표시된 폴리뉴클레오타이드는 정방향 프라이머이며, 상기 서열번호 6으로 표시된 폴리뉴클레오타이드는 역방향 프라이머이다.
- [0058] 서열번호 5의 염기서열은 다음과 같다: TGCTGCTTGCCTTTCTGACT (서열번호 5).
- [0059] 서열번호 6의 염기서열은 다음과 같다: GGGCATCCTTGTAAATCGGGA (서열번호 6).
- [0061] 나아가, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 토마토 풋마름병 저항성 개체 선별용 키트를 제공한다.
- [0062] 본 발명의 키트는 전술한 마커를 증폭시킬 수 있는 제제를 포함하는 조성물; 상기 증폭을 위한 시약; 및 제한효소를 포함하는 키트일 수 있다. 상기 증폭을 위한 시약은 dNTPs, DNA 폴리머라아제 및 버퍼를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 dNTPs는 dATP, dCTP, dGTP, dTTP를 포함하며, DNA 폴리머라아제는 내열성 DNA 중합효소로서 Taq DNA 폴리머라아제, Tth DNA 폴리머라아제 등 시판되는 폴리머라아제를 이용할 수 있다. 상기 제한효소는 BfaI 또는 BsaAI 중 하나 이상 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0063] 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, PCR 완충액 제조 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물일 수 있다. 안내서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함할 수 있다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함할 수 있다.
- [0065] 본 발명은 i) 토마토 시료에서 분리된 DNA로부터 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드의 SNP를 포함하는 제1 다형성 부위(polymorphic site)를 증폭시키는 단계; 및 ii) 상기 증폭된 제1 다형성 부위의 염기를 결정하는 단계를 포함하는 토마토 풋마름병 저항성 개체 선별 방법을 제공한다. 상기 제1 다형성 부위는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리펩타이드의 231번째 염기일 수 있다.
- [0066] 상기 토마토 풋마름병 저항성 개체 선별 방법은, 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드의 231번째 염기가 T인 경우 토마토 풋마름병 저항성 토마토인 것으로 선별하는 것일 수 있다.
- [0067] 또한, 본 발명은 전술한 i) 및 ii) 단계 외에도, iii) 상기 토마토 시료에서 분리된 DNA로부터 서열번호 4의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드의 SNP를 포함하는 제2 다형성 부위(polymorphic site)를 증폭시키는 단계; 및 iv) 상기 제2 다형성 부위의 염기를 결정하는 단계를 더 포함하는 토마토 풋마름병 저항성 개체 선별 방법을 제공한다. 상기 제2 다형성 부위는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 폴리펩타이드의 241번째 염기일 수 있다.
- [0068] 상기 토마토 풋마름병 저항성 개체 선별 방법은, 서열번호 4의 폴리뉴클레오타이드의 241번째 염기가 T인 경우 토마토 풋마름병 저항성 토마토인 것으로 판별하는 것일 수 있다.
- [0069] 나아가, 본 발명은 상기 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드의 231번째 염기가 T이고, 서열번호 4의 폴리뉴클레오타이드의 241번째 염기가 T이면, 상기 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드의 231번째 염기 또는 상기 서열번호 4의 241번째 염기 중 하나가 T인 경우 보다 풋마름병 저항성이 높은 것으로 판단하는 토마토 풋마름병 저항성 개

체 선별 방법을 제공한다.

[0070] 구체적으로 설명하면, 토마토 풋마름병 저항성 개체 선별 방법으로 상기 i) 단계 및 상기 ii) 단계 외에도 상기 iii) 및 상기 iv) 단계를 더 포함시키면, 상기 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드의 231번째 염기가 T이고 서열번호 4의 폴리뉴클레오타이드의 241번째 염기도 T인 토마토 풋마름병 저항성 개체를 선별할 수 있다. 전술한 선별 방법에 의해 선별된 개체가 상기 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드의 231번째 염기가 T이고 서열번호 4의 폴리뉴클레오타이드의 241번째 염기도 T인 개체인 경우, 상기 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드의 231번째 염기 또는 서열번호 4의 폴리뉴클레오타이드의 241번째 염기 중 하나가 T인 개체 보다 토마토 풋마름병 저항성이 2배 이상 높은 것으로 판단할 수 있다.

[0071] 상기 i) 단계 또는 iii) 단계의 DNA로부터 다형성 부위를 증폭시키는 단계는 당업자에게 알려진 어떠한 방법이든 사용 가능하다. 예를 들어, 중합효소연쇄반응(PCR), 리가아제 연쇄반응(ligase chain reaction), 핵산 서열기재 증폭(nucleic acid sequence-based amplification), 전사 기재 증폭 시스템(transcription-based amplification system), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 또는 Q β 복제효소(replicase)를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0073] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[실시예]

[0076] 본 발명자들은 토마토에서 풋마름병 저항성 양적 형질 유전자좌(qualitative trait loci; QTL)를 확인하였고, 상기 QTL과 연관된 마커를 SNP로부터 유래된 마커를 개발하였다.

[0077] 용어 "양적 형질 유전자좌(qualitative trait loci; QTL)"는 양적형질에 연관(association)되어 영향을 끼치는 유전체의 지역으로, 한 개의 형질에 영향을 끼치는 다수 유전자들, 또는 이들 유전자들에 강하게 연관(linkage)된 군집을 의미할 수 있다.

실험 재료

[0080] 전장유전체연관분석(GWAS; Genome-wide association study)을 위해 191점의 재배된 (*S. lycopersicum*) 토마토 accession(tomato accessions) 및 1점의 야생 (*S. pimpinellifolium*) 토마토로 구성된 맵핑 모집단(mapping population)을 사용하였다. 상기 토마토 중 98 점의 현대 토마토 육종 라인은 농촌진흥청 (RDA)의 원예 및 한방 과학 연구소 (NIHHS)에서 수집하였다. 나머지 94 점의 토마토 생식질(germplasms)은 RDA의 National Agrobiodiversity Center(NAC), 미 농무부의 Germplasm Resources Information Network (GRIN), CM Rick Tomato Genetics Resource Center (TGRC), 및 세종 대학교에서 얻었다.

[0081] 또한, 45 종의 상업용 F1 토마토 품종(cultivars) 집단(collection)을 사용하여 풋마름병의 유전자좌와 관련된 유전자 변이를 조사했다. 이 집단은 Nongwoo Bio, Koregon, Monsanto Korea, and Syngenta Korea 를 포함하는 대한민국의 15개 종자 회사로부터 유래되었다.

[0082] 하기 표 1은 GWAS에 사용된 192점의 토마토의 리스트를 나타낸다.

표 1

No.	Accession	Country of origin	No.	Accession	Country of origin
1	SJG0009	United State	97	14KT-3-4	Republic of Korea
2	SJG0046	United State	98	14KT-5-6	Republic of Korea
3	SJG0048	United State	99	14KT-6-5	Republic of Korea
4	SJG0324	United State	100	14KT-7-6	Republic of Korea
5	SJG0327	United State	101	14KT-8-1	Republic of Korea
6	SJG0333	United State	102	14KT-10-4	Republic of Korea
7	SJG0340	United State	103	14KT-11-7	Republic of Korea
8	SJG0341	United State	104	14KT-12-2	Republic of Korea
9	SJG0343	United State	105	14KT-13-3	Republic of Korea
10	SJG0346	United State	106	AVT01422	Republic of Korea
11	SJG0347	United State	107	AVT01424	Republic of Korea
12	SJG0351	United State	108	AVT01458	Republic of Korea
13	SJG0352	United State	109	AVT01219	Republic of Korea
14	SJG0355	United State	110	AVT01315	Republic of Korea

15	SJG0362	United State	111	AVT01174	Republic of Korea
16	SJG0364	United State	112	11-BA-4	Republic of Korea
17	PI 124035	Peru	113	11-BA-10	Republic of Korea
18	PI 124037	Chile	114	Maeryeok	Republic of Korea
19	PI 127820	Bolivia	115	Sarang	Republic of Korea
20	PI 128592	Chile	116	Number one	Republic of Korea
21	PI 129026	Ecuador	117	Tamina	Republic of Korea
22	PI 129033	Ecuador	118	Wonhong 3 ho	Republic of Korea
23	PI 129084	Colombia	119	Wonhong 2 ho	Republic of Korea
24	PI 129128	Panama	120	15BC10	Republic of Korea
25	PI 129142	Ecuador	121	15BC17	Republic of Korea
26	PI 155372	Peru	122	14KT-2-7	Republic of Korea
27	PI 159009	Peru	123	14KT-3-8	Republic of Korea
28	PI 196297	Nicaragua	124	14KT-3-19	Republic of Korea
29	PI 270430	Mexico	125	14KT-5-12	Republic of Korea
30	PI 272703	Guatemala	126	14KT-5-24	Republic of Korea
31	PI 270408	Mexico	127	14KT-6-10	Republic of Korea
32	SJG0404	United State	128	14KT-6-11	Republic of Korea
33	SJG0412	United State	129	14KT-8-20	Republic of Korea
34	LA2044	United State	130	14KT-9-4	Republic of Korea
35	LA2448	United State	131	14KT-9-20	Republic of Korea
36	LA2449	United State	132	14KT-10-13	Republic of Korea
37	LA2533	Peru	133	14KT-10-15	Republic of Korea
38	LA3043	United State	134	14KT-12-8	Republic of Korea
39	LA3044	United State	135	14KT-12-12	Republic of Korea
40	LA3047	United State	136	14KT-12-14	Republic of Korea
41	LA3051	United State	137	14KT-13-7	Republic of Korea
42	Summer Pink#1	Japan	138	14KT-13-14	Republic of Korea
43	Harkovskii 179	Russia	139	15BC9	Republic of Korea
44	Originalnyi	Russia	140	15TC3	Republic of Korea
45	Yantar 530	Russia	141	15TC9	Republic of Korea
46	Prometei	Russia	142	15TC18	Republic of Korea
47	Finish	Russia	143	15TC22	Republic of Korea
48	Talalikhin	Russia	144	15TC30	Republic of Korea
49	Ranny-83	Russia	145	15TC33	Republic of Korea
50	Pirson	Russia	146	15TC37	Republic of Korea
51	Vinogradnyi	Russia	147	15TC41	Republic of Korea
52	Vogogradskii skorospelyi 323	Russia	148	15TC43	Republic of Korea
53	Seet100	Netherlands	149	15TC48	Republic of Korea
54	Dachnik	Russia	150	15TC54	Republic of Korea
55	Nikola	Russia	151	15TG1	Republic of Korea
56	Utro	Russia	152	15TG9	Republic of Korea
57	UzRIPI 581	Israel	153	15TG19	Republic of Korea
58	Volgogradskiy	Uzbekistan	154	15TG22	Republic of Korea
59	300-78 F	Italy	155	15TG29	Republic of Korea
60	Sodrujestvo	Russia	156	15TG30	Republic of Korea
61	Bereg Kubana	Russia	157	15TG46	Republic of Korea
62	Linia 82-7	Russia	158	15TG49	Republic of Korea
63	Gaigapo 70	Italy	159	15TG60	Republic of Korea
64	Dar Surhana	Uzbekistan	160	15TG72	Republic of Korea
65	UzRIPI 123	Russia	161	15TG74	Republic of Korea
66	China с к и е	Russia	162	15TG111	Republic of Korea
67	Dularigin	China	163	15TG112	Republic of Korea
68	Bahodir	Uzbekistan	164	15TG113	Republic of Korea
69	UzRIPI 17	Chile	165	15TG114	Republic of Korea
70	Temnokrasniy	Uzbekistan	166	15TG115	Republic of Korea

71	Astrakhan	Uzbekistan	167	15TG117	Republic of Korea
72	Doku 2000	Uzbekistan	168	15TG123	Republic of Korea
73	Tmk 22	Uzbekistan	169	15TR1	Republic of Korea
74	Popeecubuous 202	Uzbekistan	170	15TR2	Republic of Korea
75	Wapg Hoeggzy	Uzbekistan	171	15TR3	Republic of Korea
76	Cumopa 2009	Uzbekistan	172	15TR4	Republic of Korea
77	Dycimue	Uzbekistan	173	15TR5	Republic of Korea
78	Hauyna	Uzbekistan	174	15TR10	Republic of Korea
79	Hezuo 928 fanqie	China	175	15TR12	Republic of Korea
80	Hezuo 919 dahong fanqie	China	176	15TR14	Republic of Korea
81	Hezuo 908	China	177	15TR16	Republic of Korea
82	Shen guan yi	China	178	15TR17	Republic of Korea
83	ALT516 fanqie	China	179	15TR19	Republic of Korea
84	Darizavaljiya	Russia	180	15TRY9	Republic of Korea
85	Talinskii skorospelyi	Russia	181	15TRY16	Republic of Korea
86	Slavyansky Shedevr	Russia	182	15TRY19	Republic of Korea
87	Kruiz	Russia	183	15TRY23	Republic of Korea
88	Miskovkii Delikates	Russia	184	16TB94	Republic of Korea
89	Tigrovyi	Russia	185	16TB95	Republic of Korea
90	Byche serdtse	Russia	186	15BC19	Republic of Korea
91	Gruntovoi Gribovskii	Russia	187	15BC20	Republic of Korea
92	Sibirsky Skorospely	Russia	188	15BC21	Republic of Korea
93	Moskvich	Russia	189	Tomhart	Republic of Korea
94	Tsygan	Russia	190	16TB197	Republic of Korea
95	14KT-1-3	Republic of Korea	191	16TB198	Republic of Korea
96	14KT-2-2	Republic of Korea	192	16TB199	Republic of Korea

[0085] 하기 표 2는 CAPS 마커를 사용하여 풋마름병 유전자좌와 관련된 유전자 변이를 조사하는데 사용된 45점의 상용화된 F1 토마토의 리스트를 나타낸다. 하기 표 2의 "B blocking", "Cheonggang", 및 "Shincheonggang"은 풋마름병 저항성 품종이며 접목용 rootstock로서 사용된다. 또한, 하기 표 2에 표시된 H는 SNP의 이형 접합체 (heterozygote form, CT)를 나타내며, S는 SNP의 동형 접합체 (homozygote form, CC)를 나타낸다.

표 2

[0087]

No.	Cultivar	Company	Genotype		Mean of disease rating
			sjs2707 (BfaI)	sjs7794 (BsaAI)	
1	B blocking	Koregon	H	H	1.00
2	Olleh TY	Monsanto-Korea	S	S	5.00
3	TY Smartsama	Takki-Korea	S	S	3.38
4	Yoyo captain	Konong	S	H	2.56
5	Dotaerang Dia	Takki-Korea	S	S	3.67
6	Yoyo	Konong	S	S	4.00
7	TY Endorphin	Bunong Seed	S	S	4.89
8	TY Tini	PSS	S	S	4.88
9	Escot	Bunong Seed	S	S	3.89
10	TY Candy	Bunong Seed	S	S	3.14
11	Dafnis	Syngenta Korea	S	S	3.56
12	Landolino	Syngenta-Korea	S	S	4.88
13	Vitadini	Bunong Seed	S	H	3.67
14	Sun globe	Nongwoo Bio	S	S	4.00

15	Seowang	Monsanto-Korea	S	S	5.00
16	Gayachal Plus	Syngenta-Korea	H	S	1.33
17	Venus	Dong-won Nongsan	S	H	2.11
18	Poseidon	Monsanto-Korea	S	S	3.67
19	Rokusanmaru	Sakata-Korea	S	S	5.00
20	Goangbok	Jinheung Seed	S	S	4.89
21	Black Eagle	Bunong Seed	S	S	3.67
22	Sweety Redggoma	Jinheung Seed	S	S	5.00
23	Super Dotaerang	Koregon	S	S	4.56
24	Tenten	Koregon	S	S	4.11
25	Beta Tiny	PPS	S	S	3.56
26	Dotaerang Dia	Takki-Korea	S	S	4.88
27	Cheonggang	Monsanto-Korea	H	H	1.00
28	Shincheonggang	Monsanto-Korea	H	H	1.00
29	Bacchus	Monsanto Korea	S	S	3.56
30	Bigstar	Bunong Seed	S	H	1.13
31	Styx TY	Monsanto-Korea	S	S	5.00
32	Rafito	Monsanto-Korea	S	S	5.00
33	Dotori gold	Gana Seed	H	S	3.22
34	Red Pang	Nongwoo Bio	H	S	3.22
35	SV0244TG	Monsanto-Korea	S	S	5.00
36	Unicorn	Monsanto-Korea	S	S	2.78
37	Veteran	Bunong Seed	S	S	4.44
38	Black Eagle	Bunong Seed	S	S	3.67
39	Kstar	Bunong Seed	S	S	4.22
40	TP-7 Plus	Syngenta-Korea	S	H	1.00
41	Gold Minichal	Nongwoo Bio	S	S	2.78
42	Dotori	Gana Seed	S	S	3.67
43	Sugaryellow	Asian Seed	S	S	3.89
44	Sweety	Jinheung Seed	S	S	4.11
45	Jicored	Gana Seed	S	S	4.88

[0089] 실험 방법

[0090] 1. Genotyping-by-sequencing (GBS)

[0091] DNeasy Plant mini kit (QIAGEN, Germany)를 사용하여, 제조사의 프로토콜에 따라 192점의 토마토 accession의 3주된 모종에서 게놈 DNA를 추출했다. NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA)을 사용하여 DNA 농도를 정량하고 라이브러리 구성을 위해 50ng/μl로 표준화했다.

[0092] 상기 정량화된 라이브러리는 HiSeq 2000 시스템 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA)에서 시퀀싱되었다. 시퀀싱 결과 데이터는 바코드를 기반으로 다멀티플렉싱 되었고, SolxaQA v1.13 패키지(Cox et al., 2010)를 사용하여 저품질, 어댑터 및 바코드 시퀀스가 제외되도록 트리밍 되었다. 그 후, Burrows-Wheeler Aligner (BWA) v0.6.1-r104 프로그램 (Li & Durbin, 2009)을 reference genome assembly v2.50 (The Tomato Genome, 2012)에 정리된 염기서열(cleaned read)을 맞추기 위해 적용했다. SAMtools v 0.1.16 (Li et al., 2009)을 사용하여 raw SNP를 불러냈고, 맵핑 모집단(mapping population)의 SNP 행렬을 생성하였다. 추가 적용을 위해, 최소 깊이=5, 최소 대립 유전자 빈도(minor allele frequency)≥ 5%, 누락된 데이터(missing data)<20%의 기준에 의해 SNPs를 명확화했다.

[0094] 2. 질병 평가 및 통계 분석

[0095] 192점의 토마토 accession(192 tomato accessions)의 맵핑 모집단 유묘(seedling) 단계에서 풋마름병의 심각도를 2회 평가하였다. 또한, F1 토마토 재배 품종에 대한 풋마름병의 심각도를 1회 평가하였다.

[0096] 맵핑 모집단에 대한 각 유전자형 마다 7개의 식물(7 plants/genotype)과 F1 품종에 대한 각 유전자형 마다 9개의 식물(9 plants/genotype)로 완전히 무작위로 디자인된 방법에 따라 온실에서 분석을 수행하였다.

[0097] 토마토 생식 질의 종자를 상업용 토양으로 채워진 6x12 화분(38cm³/pot)의 플라스틱 트레이에 뿌리고, 22-30℃

범위의 온도에서 키웠다. 종자에 매일 물을 뿌리고, Hyponx 6-10-5 (HYPONeX Japan Corp., LTD)를 사용하여 1부터 5 까지 true leaf 단계에서 제조업체의 프로토콜에 따라 매주 수정시켰다.

[0098] 인공 접종(artificial inoculation)을 수행하기 위해, R. solanacearum (WR-1) race 1의 독성 균주를 NIHHS(RDA)에 따라 제공하였다. 몇몇 박테리아 콜로니를 영양 한천 배지에서 쇠고기 추출물과 펩톤 (Difco™ Nutrient Broth, Sparks, MD 21152 USA)의 액체 배지로 옮겼고, 28℃에서 약 48 시간 동안 shaking incubation 했다. 배지로부터 박테리아 덩어리를 수확하고 멸균된 이중 증류수에 넣어서 접종물(inoculum)을 준비했다. 그 결과 얻어진 현탁액을 광도계를 사용하여 O.D.600 = 0.3 ~ 0.4 (approximately 108 CFU ml⁻¹)로 표준화 했다. 세균성 접종물에 뿌리 뽑힌 모종을 담그고 새로운 상업용 습지가 있는 별도의 플라스틱 화분(Ψ10 x 10cm)에 이식함으로써 인공 접종을 수행하였다. 감염된 식물을 온실 속에서 매일 물을 주며 키웠으며, 접종 후 14일 쯤 질병의 심각도를 시각적으로 평가했다.

[0099] 도 1은 질병의 심각도를 평가하는 척도를 나타낸다. 도 1에 나타난 바와 같이, 질병의 심각도 점수를 1에서 5로 나누었으며, 1은 증상 없음, 2는 1 내지 2장의 잎이 시들음, 3은 3 또는 그 이상의 잎이 시들음, 4는 모든 잎이 시들음, 5는 식물이 마르거나 죽은 것을 나타낸다.

[0100] 표현형 데이터를 수집하여, R 프로그램(Team, 2011)에서 데이터를 분석하였으며, 하기 방정식에 따라 각 증대의 평균 질병 등급을 계산 하였다: $DR = (1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4 + 5n_5)/N$ (n_1 내지 n_5 는 1 내지 5의 상이한 질병 점수 각각에서의 식물의 수, N은 확인된 식물의 총 수). 표현형 데이터와 질병의 심각도의 빈도 분포를 R 프로그램에서 수행했다.

[0102] 3. 전장유전체연관분석 (GWAS)

[0103] 마커-형질 연관을 이용하기 위해, 모집단 구조(Q 행렬)와 개체의 관련성 (Kinship matrix)을 모두 고려한 혼합 선형 모델 (MLM)을 the Tassel program v5.0 (Bradbury et al., 2007)에서 적용하고 수행하였다.

[0104] 이 모델은 $y = \mu + S\alpha + Qv + Ku + \varepsilon$ 로 표현되며, y는 표현형의 벡터, μ 는 모집단 평균, α , v, u, 및 ε 는 SNP 효과, 모집단 효과, 개별 관련성 및 잔여 벡터에 해당한다. S, Q, K는 마커 효과, 모집단 효과 (고정 효과), 혈연 관계 (랜덤 효과)의 발생 행렬이다. 모집단 구조는 Structure software v2.3.4 (Pritchard et al., 2000)에서 수행된 Bayesian Markov Chain Monte Carlo 모델 (MCMC)을 사용하여 추정되었다. 부분 모집단 (k) (k는 1에서 10까지 설정)의 각 수에 대하여 5회의 실행이 수행되었다. Burn-in 시간과 MCMC 복제 수는 각 실행마다 10,000 및 75,000으로 각각 설정하였고, ad hoc statistic delta k 방법을 이용해 가장 좋은 k 값을 결정하였다. k 부분 모집단에 해당하는 Q 행렬을 얻었으며, kinship matrix(K)을 Tassel v5.0의 마커 데이터로부터 획득하였다. 두 행렬 모두를 MLM 모델에 맞추었고, 마커-형질 연관 분석으로부터 각 SNP에 대해 관찰된 $-\log_{10}(P)$ 의 분포를 quantile-quantile plot(QQ plot)에서 null hypothesis의 예상 $-\log_{10}(P)$ 와 비교하였다. SNPs와 풋마름병 내성 사이의 중요한 관련성을 P-value=0.001에서 $-\log_{10}(P)$ 의 임계 값에 기반을 두고 맨해튼 플롯 (Manhattan plots)에 의해 시각화하였다. 임계 선 위의 value는 작은 P-value를 나타냈고, 중요한 연관성으로 고려되었다. R 프로그램 (Team, 2011)에서 "qqman" 및 "manhattan" 패키지를 사용하여, QQ 플롯 및 맨해튼 플롯을 완성했다.

[0106] 4. 풋마름병 유전자좌와 관련된 SNPs의 조사

[0107] 반복적으로 검출된 풋마름병 유전자좌와 관련된 SNPs의 flanking regions을 사용하여, CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) 마커를 디자인하였다. CTAB 방법을 사용하여 유묘기의 어린 잎으로부터 F1 토마토 재배 품종의 게놈 DNA를 분리하였다 (Kabelka et al., 2002). 총 10 μ L 부피에 포함된 20-30ng의 게놈 DNA, 0.25 μ M의 각 프라이머, 0.2mM의 dNTPs, 1X PCR buffer 및 0.5U의 DNA Taq polymerase (Geneslabs, Seongnam, Korea)를 이용하여 PCR 증폭을 수행하였다. PCR 증폭 과정은 94℃에서 3분 동안 initial denaturation하는 것을 포함하고, 그 후 94℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 45초 동안 40회 cycle을 반복하고, 72℃에서 7분 동안 1회 cycle로 extension 하는 것을 포함한다. 제조사의 프로토콜에 따라 증폭된 산물에 제한 효소를 처리하였다. 아가로오스 겔 전기영동 방법을 사용해 유전형 분석(genotyping) 결과를 시각화하였다.

[0109] 실험 결과

[0110] 1. GBS 및 SNP 검출

[0111] GBS 방식을 사용해서, 192점의 토마토 accession에 대해 총 862,036,576 개의 원본 염기서열(raw reads)을 Illumina sequencing 플랫폼에서 생성하였다. 저품질 염기서열(reads) 및 바코드 시퀀스를 제거한 후, 78bp의 평균 길이로 747,017,652 염기서열(reads)을 남겼다. 각 accession에 대한 평균 reference genome의 범위는 0.91% 였다. 정량화 된 서열을 tomato reference genome assembly v2.50에 정렬함으로써 총 1,393,704 개의 추정 SNP를 먼저 얻었다. 몇 가지 기준 (최소 깊이=5, 최소 대립 유전자 빈도(minor allele frequency)≥5%, 누락된 데이터(missing data)<20%)에 의해 필터링 한 후, 8,550 개의 SNP를 최종적으로 얻었다. 하기 표 3은 GBS로부터 얻은 192 점의 토마토의 원본 염기서열(raw sequences) 및 가공된 염기서열(processed reads)을 나타낸다. 수득한 SNP 마커들은 12개의 염색체들에 대해 균일하게 분포하지 않았고, 4번 염색체에서 최대 16.9 SNPs/Mb, 12번 염색체에서 최소 2.5 SNPs/Mb 로 분포했다.

표 3

[0113]

Content	Total
원본 염기서열 수 (Number of raw reads)	862,036,576
다듬어진 염기서열의 수 (Number of trimmed reads)	747,017,652
다듬어진 염기서열의 평균 길이 (bp)	78
평균 게놈 범위 (Average genome coverage)(%)	0.91
총 SNPs의 수	1,393,704
필터된 SNPs의 수	8,550

[0115] 표 3의 평균 게놈 범위는 각각의 accession 게놈의 평균 백분율이 시퀀싱된 것이다.

[0117]

2. 표현형 데이터(Phenotypic data) 분석

[0118]

표현형 데이터를 얻기 위해, 유묘 단계에서, *R. solanacearum* race 1 WR-1를 이용해 192 점의 토마토 accession을 감염시켰고, 질병의 중증도를 기록하였다. 이 accession은 높은 저항성(수준 1)부터 완전히 감수성(수준 5)까지 모든 수준의 질병 중증도를 나타냈다. 감수성 유목의 경우, 접종 후 7일째에 풋마름병의 전형적인 증상이 유목의 상단에 나타났으며, 접종 14일 내에 식물 전체로 급속히 진행되었다. 한편, 높고 보통의 저항성 식물은 잎사귀 하나 또는 두 개를 제외하고는 별다른 증상을 나타내지 않았다.

[0119]

총 2회의 분석(assay)을 통해 확인된 192점의 토마토 accession의 풋마름병 중증도가 각각 접종 14일 후에 기록되었다 (하기 표 4 참고).

표 4

[0120]

Assay	Min	Max	Mean of disease rating (\pm SD)	CV(%) (Coefficient of variation)	Assay effect
1 st	1	5	3.94 \pm 1.16	30	P < 2E-16
2 nd	1	5	3.00 \pm 1.03	34	P < 2E-16

[0122]

상기 표 4에 기재된 바와 같이, 질병 등급의 평균값은 assay 마다 각각 3.94 \pm 1.16과 3.0 \pm 1.03 (\pm SD; Standard deviation) 이었다. 변이 계수(CV)는 각 분석 마다 30% 에서 34%로 192 가지 토마토 사이의 질병 저항성에 상당한 변이가 있었다.

[0123]

1차 분석에 의해 수집된 유전자형의 14.7% 는 풋마름병에 높은 저항성을 보였으나, 76.3% 의 유전자형은 심한 잎마름 또는 죽음(질병 등급 3 부터 5)을 나타냈다. 또한, 2차 분석에 의해 수집된 유전자형의 22.27% 는 풋마름병에 높은 저항성을 보였으나, 50%의 유전자형은 심한 잎마름 또는 죽음 (질병 등급 3 부터 5) 을 나타냈다. 도 2의 (a)는 1차 분석에서 192점의 토마토 accession의 풋마름병 중증도의 빈도 분포를 나타낸다. 도 2의 (b) 는 2차 분석에서 192점의 토마토 accession의 풋마름병 중증도의 빈도 분포를 나타낸다.

[0124]

또한, ANOVA는 유전자형과 각 분석 환경에 의한 효과 (assay effect)가 풋마름병 저항성(P-value<0.001)에 상당한 영향을 미친다는 것을 제시했다. 이 결과는 각 분석 환경이 표현형의 변화에 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다. 결과적으로, QTL 식별을 위해 각 분석에 의한 데이터가 별도로 고려되었다.

[0126] 3. 모집단 구조 및 연관 분석 (Population structure and association analysis)

[0127] 192 점의 토마토 집단 중 모집단의 구조를 추정하기 위해, 8,550개의 SNPs를 사용하여 Structure software v2.3.4. 에서 구조 분석을 수행했다. *ad hoc* quantity (Δk)는 $k=7$ 인 첫번째 피크를 보였으며, 이는 맵핑 모집단이 7 개의 하위 모집단으로 집중 될 수 있음을 나타낸다.

[0128] 도 3은 모집단의 구조 평가를 위한 베이저안 클러스터링 분석(Bayesian clustering analysis) 결과를 나타낸다. 도 3의 그래프는 토마토 수집(tomato collection)에 제시되는 accession의 이상적인 수를 나타내는 상정 된 하위 집단 (x-축)에 대한 델타 k 값 (y-축)의 그래프이다.

[0129] 토마토 수집의 7개의 하위 모집단(클러스터 1 내지 7)이 도 4에 시각화되었다. 도 4는 STRUCTURE 프로그램을 사용하여 192 점의 토마토 accession의 수집에서 추정된 모집단의 구조이다. 각 accession의 게놈은 세로 막대 하나에 의해 표시되며, 상기 세로 막대는 7 개의 하위 모집단의 추정된 구성원 수에 비례하여 컬러 세그먼트로 구분되었다. 가장 큰 클러스터 (클러스터 2) 는 90점의 accessions으로 구성되며, 여러 나라(러시아로부터 27점의 accessions, 미국으로부터 20점의 accessions, 대한민국으로부터 17점의 accessions, 및 다른 14개 국가로부터 26점의 accessions)로부터 유래되었다. 다른 81개의 한국 육종 품종 (Korean breeding lines) 은 나머지 6개의 클러스터로 분리되었다: 클러스터 1 (11 accessions), 클러스터 3 (7 accessions), 클러스터 4 (11 accessions), 클러스터 5 (21 accessions), 클러스터 6 (12 accessions), 및 클러스터 7 (19 accessions). 이중, 클러스터 1, 6 및 7은 한국 육종 품종으로만 구성되었다. 상기 7개의 클러스터에서의 몇 가지 accession은 상대적으로 높은 혼합 수준을 나타냈다. $k = 7$ 에서 상응하는 Q 행렬은 이후의 GWAS에 사용되었다.

[0130] 풋마름병 저항성과 게놈-전체 8,550 개의 SNPs의 연관성 분석 결과, 풋마름병 저항성과 상당히 연관성 있는 총 13 개의 SNP 유전자좌가 밝혀졌다. 이러한 SNPs는 8 개의 염색체에 분포하였으며(도 5 및 도 6 참고), R^2 (유전자좌로 설명되는 총 표현형 편차의 백분율) 값은 6.12에서 17.43% 범위였다 (표 5 참고).

[0131] 표 5는 192점의 토마토 accession의 집단에서 풋마름병 저항성 유전자좌와 상당히 관련있는 단일뉴클레오타이드 다형성 마커를 나타낸다. 표 5에 기재된 physical position은 토마토 참조 게놈 어셈블리 vSL2.5 at the Sol Genomics Network 를 기반으로 한 물리적 위치이다.

표 5

[0132]

No.	SNP	Chromosome	Physical position (Mb)	1 st assay		2 nd assay	
				P-value	R^2 (%)	P-value	R^2 (%)
1	sjs574	1	97.93	6.95E-04	8.20	-	-
2	sjs747	2	40.75	9.32E-04	8.27	-	-
3	sjs764	2	41.88	7.39E-04	7.44	-	-
4	sjs2532	4	59.95	8.45E-04	7.64	-	-
5	sjs2705	4	65.66	-	-	8.75E-05	10.81
6	sjs2707	4	65.66	-	-	9.21E-04	6.12
7	sjs3141	5	19.90	8.40E-04	7.93	-	-
8	sjs5063	7	56.99	6.98E-06	11.88	-	-
9	sjs6489	9	67.99	3.87E-04	8.51	-	-
10	sjs6995	11	10.49	9.19E-05	11.08	-	-
11	sjs7622	11	54.30	4.05E-04	9.72	-	-
12	sjs7794	12	2.92	1.16E-08	17.43	1.85E-06	13.85
13	sjs7895	12	5.53	-	-	4.36E-04	9.67

[0134] 풋마름병 저항성과 관련된 13 가지 중요한 SNPs 중, 12번 염색체의 sjs7794 유전자좌는 2 회의 분석에 의해 모두 확인되었고, 가장 유의 한 연관성을 보였다 (P -value $< 1.2E-08$). sjs7794 유전자좌는 1차 분석 시 총 표현형 변이의 17.43%를 차지했고, 2차 분석 시 총 표현형 변이의 13.85%를 차지했다. 다른 12개의 SNPs는 분석 특이적 (assay-specific)이고 6.12 에서 11.88%의 저항 편차로 설명된다. 그 중 9개의 SNPs가 1차 분석에서 P -value < 0.001 값으로 1번, 2번, 4번, 5번, 7번, 9번, 및 11번 염색체에서 발견되었다. 나머지 3개의 SNPs는 2차 분석에서 4번 및 12번 염색체에서 검출되었다.

[0135] 도 5는 1차 분석 및 2차 분석에서 게놈 SNPs와 풋마름병 저항성간의 연관성을 보여주는 맨하탄 플롯 (Manhattan

plots)을 나타낸다. x-축과 y-축은 각각 염색체의 위치와 GWAS의 SNP의 $-\log_{10}(P\text{-value})$ 을 나타낸다. 파란색 선은 $P=0.001$ 에서 게놈 전체 유의성에 대한 $-\log_{10}(P\text{-value})$ 임계 값을 나타낸다.

[0136] 도 6은 12개의 염색체에 걸친 풋마름병 저항성에 대한 QTL 후보군의 물리적 지도 위치를 나타낸다. 도 6의 각각의 수직 막대는 하나의 염색체를 나타낸다. GBS로부터 얻은 염색체 당 SNP 수는 각 막대의 하단에 표시된다. 빨간색 선은 1차 및 2차 분석 모두에서 감지된 SNPs를 나타내고, 분홍색 선은 1차 분석에서 감지된 SNPs를 나타내며, 청녹색 선은 2차 분석에서 감지된 SNPs를 나타낸다. 각 막대의 왼쪽에 있는 숫자는 감지된 SNPs의 물리적인 위치를 나타낸다. 빨간색 상자는 이미 알려진 주요한 QTL인 bwr6와 bwr12를 나타낸다.

[0138] 4. 풋마름병 유전자좌와 연관된 공통 QTL의 유리한 SNP 대립 유전자 확인

[0139] 몇 번의 분석에 의해, 4번 염색체에서 3개의 SNPs (sjs2532, sjs2705 and sjs2707)를 확인하였다. 2차 분석에서 GWAS 결과에 따르면 sjs2532 유전자좌는 $P\text{-value}=0.12$ 를 보였으나, 1차 분석에서 GWAS 결과에 따르면 $0.001 < P < 0.005$ 에서 sjs2705와 sjs2707 유전자좌가 상대적으로 낮은 유의 수준을 나타내었다. 따라서, 추후 분석을 위해 12번 염색체에 있는 QTL과 강하게 연관된 공통 SNP sjs7794뿐만 아니라, sjs2705 및 sjs2707 두 SNPs를 선택하였다. 상기 3개의 SNPs는 모두 대립 유전자 C와 T를 그들의 유전자좌에 나타냈다. 각각의 SNP에 대해, 192 점의 토마토 accessions을 그들이 가지고 있는 대립 유전자의 종류에 따라 두 그룹으로 분류하였다. 분류된 두 그룹의 질병 등급의 평균을 비교하여 유리한 대립 유전자를 찾았다. 상기 세 개의 좌위의 SNP 대립 유전자(SNP alleles)에 대한 풋마름병 저항성 중증도의 분석을 R 프로그램에서 구현하였고, 도 7에 시각화하였다.

[0140] 평균 분리 분석의 박스 플롯(boxplot)은 2회의 분석에서의 모든 3개의 좌위에 대하여 대립 유전자 T를 포함하는 그룹의 질병 등급의 평균이 대립 유전자 C를 포함하는 그룹의 질병 등급의 평균 보다 현저히 낮다는 것을 보여줬다. 이 결과는 상기 3개의 좌위의 대립 유전자 T가 두 개의 QTL4 및 QTL12 모두에 대해 유리한 대립 유전자라는 것을 나타낸다.

[0141] 도 7은 풋마름병 저항성과 연관된 SNPs인 sjs2705, sjs2707 (QTL4) 및 sjs7794 (QTL12)의 유리한 대립 유전자의 확인을 보여준다. 도 7에서 코랄색은 대립 유전자 C를 포함하는 토마토 accession의 그룹을 나타내고 청녹색은 대립 유전자 T를 포함하는 토마토 accession의 그룹을 나타내며, 각 점은 각 토마토 accession을 나타낸다.

[0143] 5. F1 토마토 품종에서 QTL4와 QTL12의 존재 확인

[0144] 세 가지 SNPs(sjs2705, sjs2707 및 sjs7794)가 F1 토마토 품종에서 나타나는지 확인하기 위해, F1 재배 품종에 대한 유전자형 및 표현형 분석이 수행되었다. 세 가지 SNPs의 flanking regions을 이용해 세 가지 CAPS 마커를 디자인하였고, F1 품종의 유전자형 분석에 사용하였다 (표 6 참고). 45 종의 F1 토마토 품종과 함께, 풋마름병에 매우 저항성이 있고 민감한 것으로 알려진 15TG111과 Yellow Pear도 각각 대조군으로 분석하였다.

[0146] 표 6은 풋마름병 저항성의 QTL4 및 QTL12와 연관된 세 가지 SNPs로부터 유래된 CAPS 마커를 나타낸다.

표 6

QTL	CAPS markers (restriction endonucleases)	SNP alleles	Size of PCR product (bp)	Allele size (bp)	
				C	T
QTL4	sjs2705(SspI)	C/T	507	244/263	507
QTL4	sjs2707 (BfaI)	C/T	435	231/204	435
QTL12	sjs7794 (BsaAI)	C/T	436	241/195	436

[0148] QTL4의 CAPS 마커 (sjs2707)가 증폭하는 염기서열은 서열번호 1과 같다. 서열번호 1의 231번째 위치에 존재하는 염기(Y)는 C 또는 T일 수 있다.

[0149] QTL12의 CAPS 마커 (sjs7794)가 증폭하는 염기서열은 서열번호 4와 같다. 서열번호 4의 241번째 위치에 존재하는 염기(Y)는 C 또는 T일 수 있다.

[0150] 유전자형 분석결과, 모든 F1 토마토 재배 품종이 CAPS 마커 sjs2705 (SspI)에 대하여 대립 유전자 C로 단일형(monomorphic)인 것을 확인하였다. 한편, 6개의 품종은 sjs2707 (BfaI) 마커에 대하여 이형접합체인 것을 확인하였으며, 8개의 품종은 sjs7794 (BsaAI) 마커에 대하여 이형접합체인 것을 확인하였다. 그 중, 도 8의 1번, 27

변, 및 28번에 해당하는 "B blocking", "Cheonggang", 및 "Shincheonggang"의 3가지 유전자형이 두 가지 마커 모두에 대하여 이형접합체인 것을 확인하였다. 게다가, sjs2707 및 sjs7794 유전자좌의 유리한 대립 유전자(T)를 지닌 모든 재배 품종들은 풋마름병의 증상이 없거나 거의 없는 것으로 나타났다 (도 8 및 표 5 참고).

[0151] 도 8은 F1 토마토 품종에 대한 3 가지 CAPS 마커 sjs2705 (SspI), sjs2707 (BfaI) 및 sjs7794 (BsaAI) 유전자형을 보여주는 아가로오스 겔을 나타낸다. 도 8의 L은 래더 100bp를 나타내며, S는 감수성 대조군 (Yellow Pear) 을 나타내고, R은 저항성 대조군 (15TG111) 을 나타낸다. 또한, 도 8의 1에서 37 사이의 숫자는 표 2에서 같은 숫자의 유전자형을 나타낸다.

[0152] 상기 결과를 통해, 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드의 231번째 염기가 T인 토마토의 경우 풋마름병 저항성이 높다는 것을 확인할 수 있었으며, 서열번호 4의 폴리뉴클레오타이드의 241번째 염기가 T인 토마토의 경우 풋마름병 저항성이 높다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드의 231번째 염기와 서열번호 4의 241번째 염기 모두 T인 토마토의 경우, 둘 중 하나의 염기가 T인 토마토 보다 풋마름병 저항성이 높다는 것을 확인할 수 있었다.

[0154] 추가적인 분석을 위해, 2 개의 다형성 마커(polymorphic markers)의 유전자형을 분석하였다. QTL4와 QTL12와 연관된 sjs2707과 sjs7794 마커의 유리한 대립 유전자의 준비에 따라, 45 개의 F1 품종을 네 가지 그룹 (그룹 4, 그룹 12, 그룹 4-12, 그룹 N)으로 나누었다.

[0155] 그룹 4는 QTL4에만 유리한 대립 유전자를 가지고 있는 품종이며, 그룹 12는 QTL12에만 유리한 대립유전자를 가지고 있는 품종이다. 또한, 그룹 4-12는 QTL4와 QTL12에 모두 유리한 대립 유전자를 가지고 있는 품종이고, 그룹 N은 나머지 품종을 포함한다.

[0156] 상기 네 개의 그룹 중, 그룹 4-12이 풋마름병에 가장 저항성이 있는 것으로 나타났으며, 그룹 N이 풋마름병에 가장 취약한 것으로 나타났다. 변이의 분석 결과, $P\text{-value} < 0.001$ 에서 네 개의 그룹의 질병 등급의 평균 간에 유의한 차이가 나타났다. R 프로그램에서 실행 된 posthoc Duncan의 새로운 다중 범위 시험 (multi-range test, MRT)을 적용하여 네 개의 그룹 간의 질병 등급의 평균을 비교했다. 이 분석은 그룹 4와 그룹 12가 그룹 4-12와 그룹 N 과 유의미한 차이를 보였지만, 그룹 4와 그룹 12 각각에서는 유의미한 차이를 보이지 않았다 ($P\text{-value} < 0.05$). 또한, 그룹 12는 그룹 N과 큰 차이를 보였다 (표 7 참고).

[0157] 표 7은 네 개의 그룹 (그룹 4, 그룹 12, 그룹 4-12, 그룹 N)의 질병 등급의 평균에 대한 Duncan's multiple range test 결과를 나타낸다. 하기 표 7에 개시된 SD는 표준편차를 나타낸다. Duncan grouping에 따라 동일한 문자로 작성된 그룹의 질병 위험도는 $P\text{-value} < 0.05$ 에서 유의한 차이가 없었다.

표 7

[0158]

Group	Mean of disease rating (\pm SD)	No. of cultivars	Min	Max	Duncan grouping
4	2.59 (\pm 1.09)	3	1.33	3.22	a
4-12	1.00 (\pm 0.0)	3	1.00	1.00	b
12	2.09 (\pm 1.10)	5	1.00	3.67	a
N	4.20 (\pm 0.70)	34	2.78	5.00	c

[0160] 이러한 결과를 통해, 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드의 231번째 염기가 T인 토마토의 경우 타 품종의 토마토 보다 풋마름병 저항성이 높다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 서열번호 4의 폴리뉴클레오타이드의 241번째 염기가 T인 토마토의 경우 타 품종의 토마토 보다 풋마름병 저항성이 높다는 것을 확인할 수 있었다.

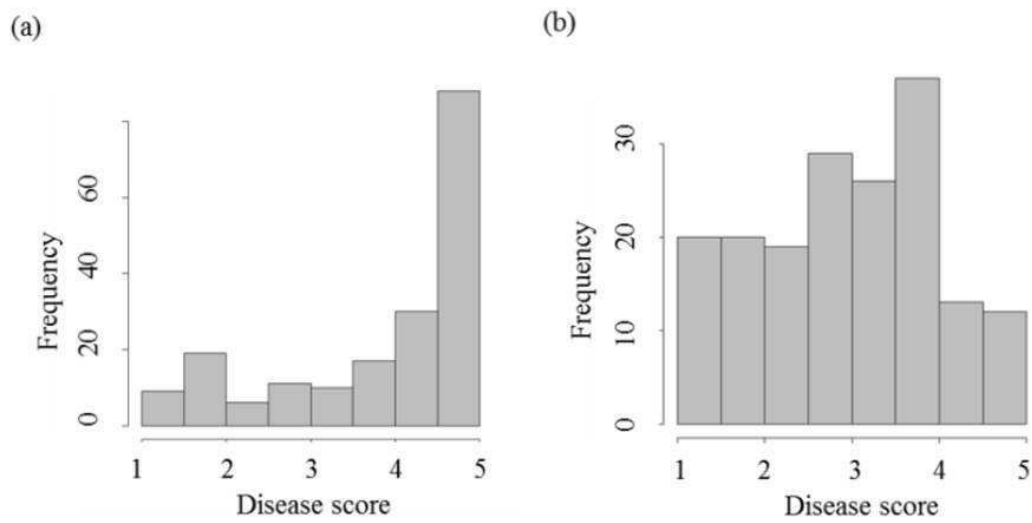
[0161] 나아가, 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드의 231번째 염기가 T이고 서열번호 4의 폴리뉴클레오타이드의 241번째 염기가 T인 토마토의 경우, 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드의 231번째 염기 또는 서열번호 4의 폴리뉴클레오타이드의 241번째 염기 중 하나가 T인 토마토 보다 풋마름병 저항성이 높다는 것을 확인할 수 있었다.

도면

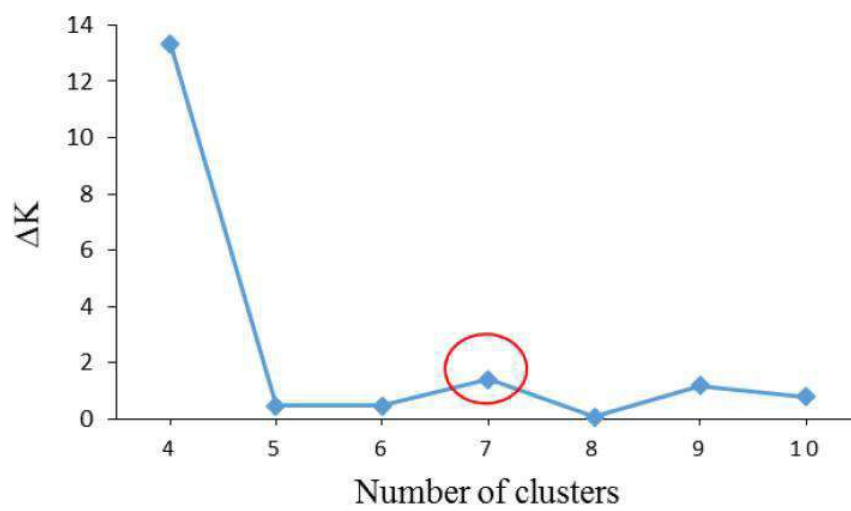
도면1



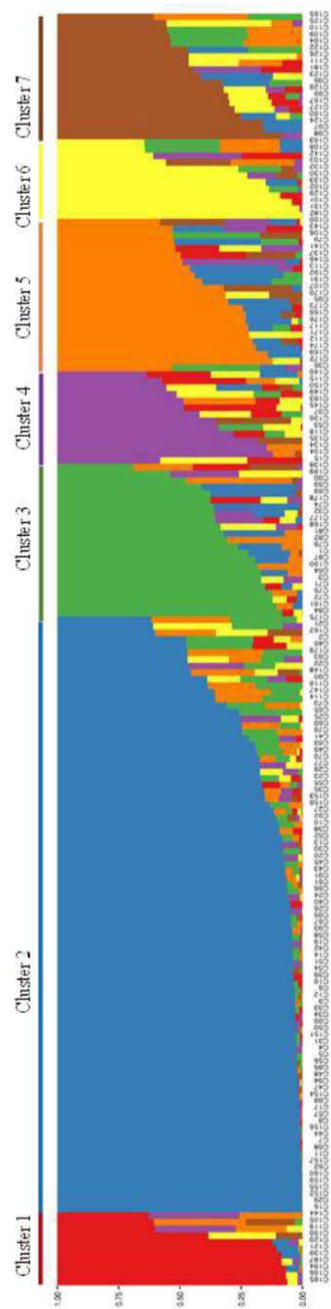
도면2



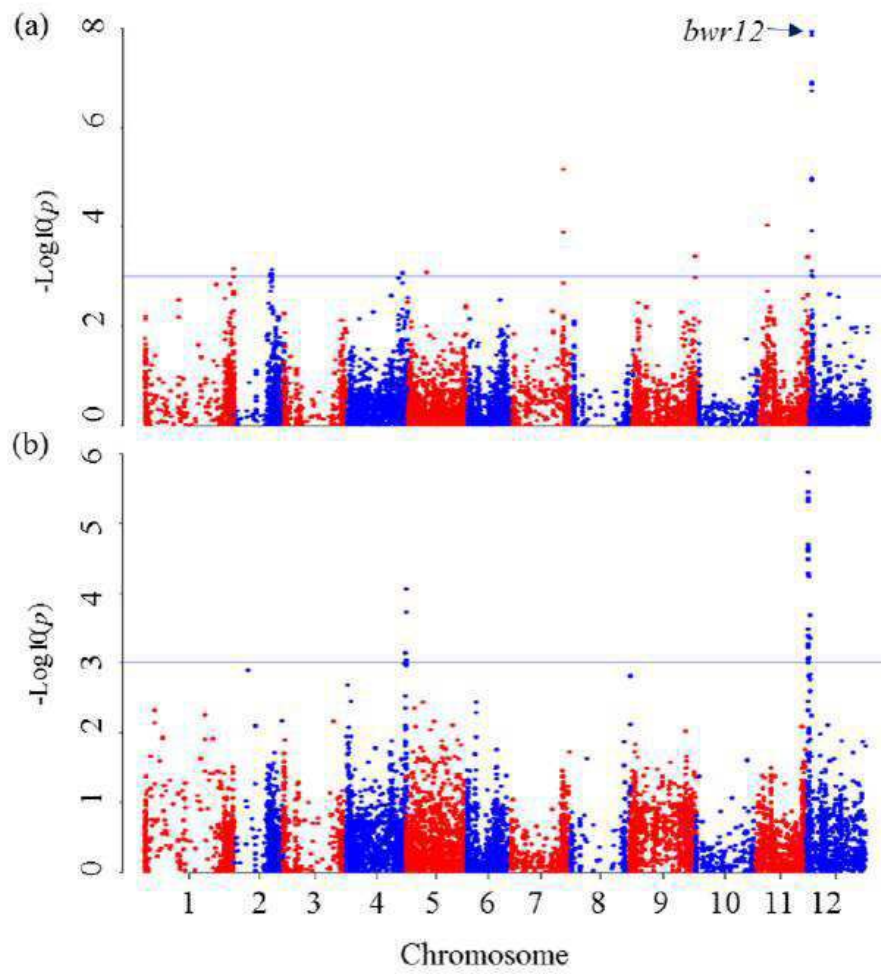
도면3



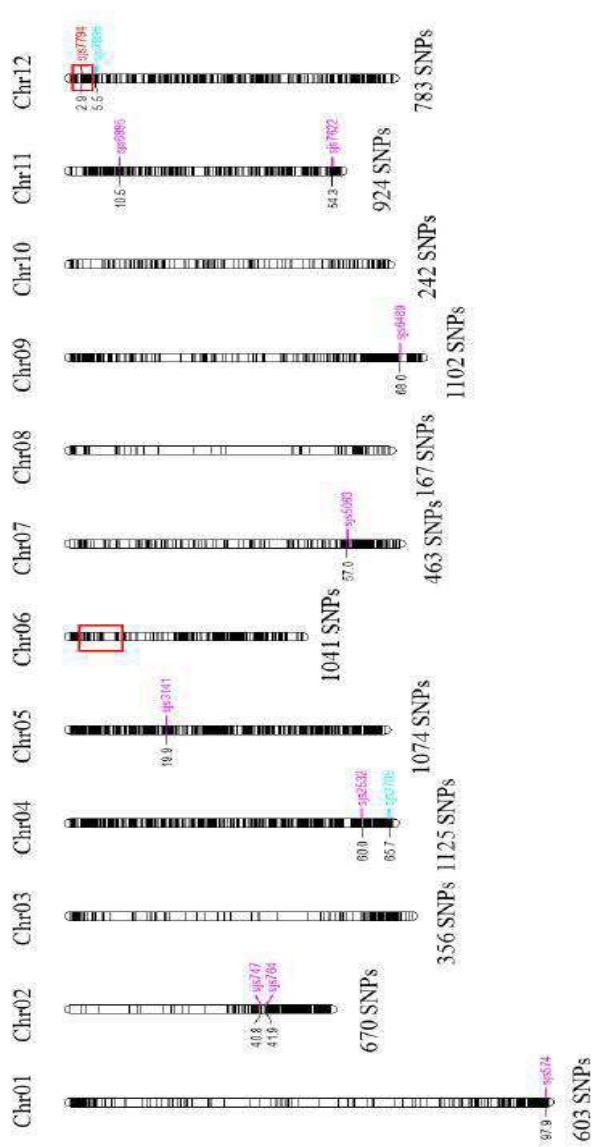
도면4



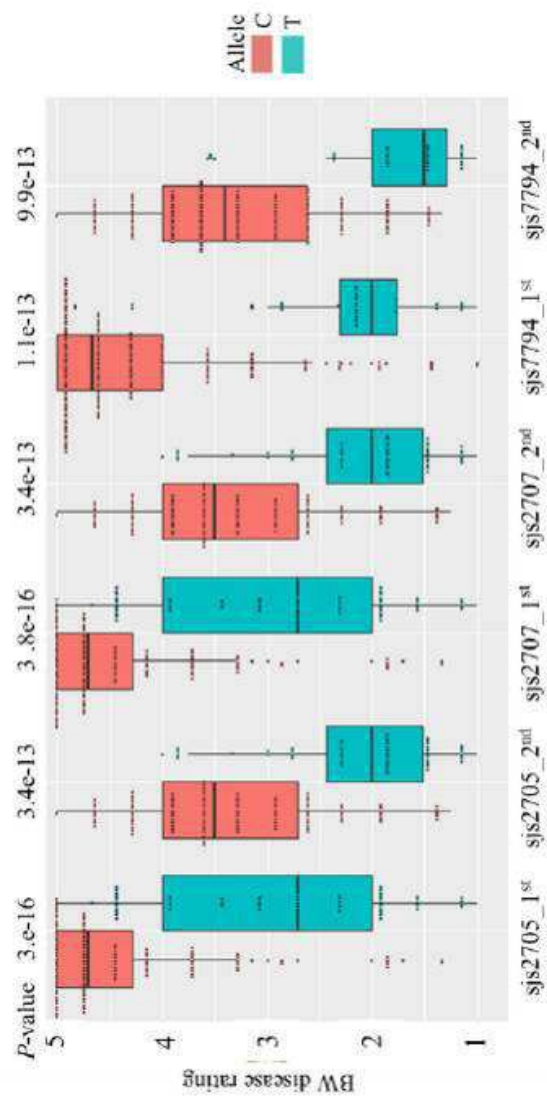
도면5



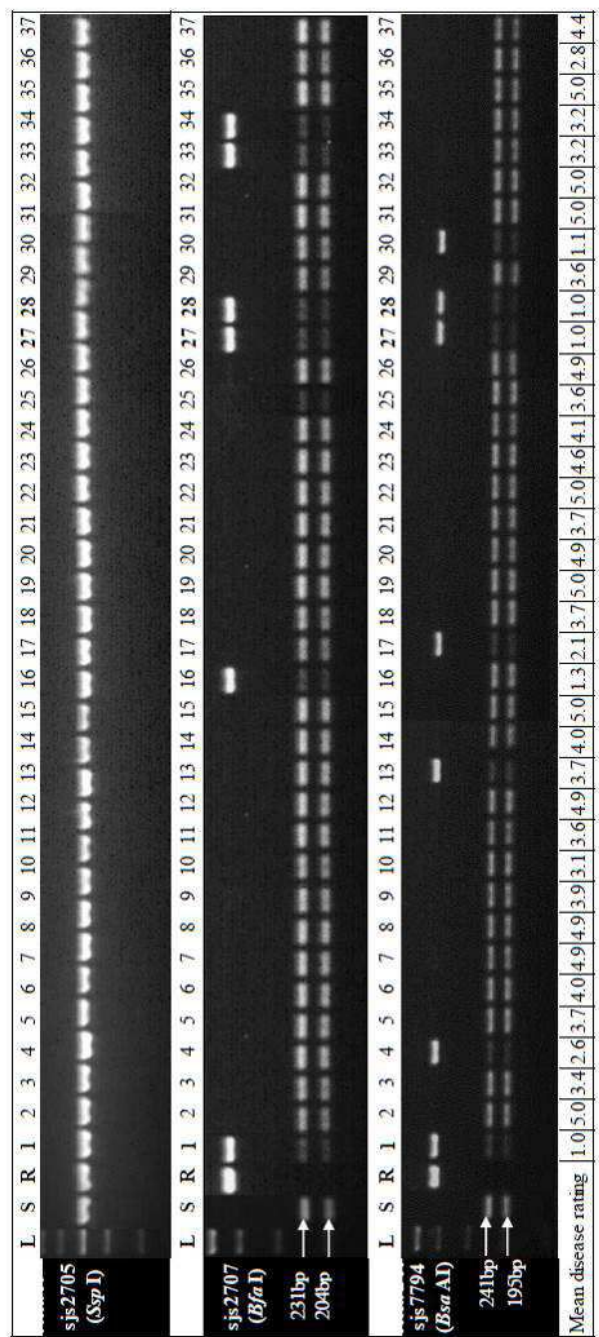
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> SEJONG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION
- <120> Molecular marker for selecting tomato cultivars resistant to tomato Bacterial wilt and selection method using the same marker
- <130> 19P05012
- <160> 6
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1

<211> 432
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> tomato_1
 <400> 1
 gctacaggag gaggacaact tcgtttgttt gtagttttca acaaagggtt ggctcttttcg 60
 gcagatgtcc tgacagtaac ttccgcaact tgttgagcag gttttggcaa gtgcttctct 120

 ttggatactg atatitcacc ttgcacaccc tttttagaca atctaattct gataatgcta 180
 cctattgtcg agcagcaaaa cttcagatta gcaacagata aaacataaca ytagaccaaa 240
 atagtaagta ttatatataa agggaaagaa ctaccatgcg cctgtatgcc acctcgtgaa 300
 ggtgaagggtg aagtaggcct cttcctttta ttactgttct ggggtgctgtc ggatgagcag 360
 ctggaattct gtgaacacac agcaggetca tgttcctcag tgagattgct cctctccaac 420
 tgctcaggtt ca 432
 <210> 2
 <211> 22
 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer_sequence1
 <400> 2
 gctacaggag gaggacaact tc 22
 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer_sequence1
 <400> 3
 tgaacctgag cagttggaga g 21
 <210> 4
 <211> 434
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> tomato_2
 <400> 4

tgctgcttgc ctttctgact ggagtatgga aggtaagttg ttttctgtca ctattaatca	60
accgttgggt gatgcttctg ttgataatct tagagcttta ctatctgtga agaaccctct	120
tgtgtcaac ggtcagttgt tggtcggaag ttgtcttgct cgaactttaa gcagcattgc	180
ccaaggtgca tttaatTTTT tgcatgaaac tgtaagaaa gtaagagata gcgtcaagta	240
ygtgaaaaca tcagaatttc acgaggaaaa gtttattgag ctcaaacagc agcttcaagt	300
gccaagcaca aagactttgg ctcttgatga ccagactcaa tggaacacca catatgagat	360
gttgtagct gcatcagagt taaaggaagt gttttcatgc ttggatacat ctgatccga	420
ttacaaggat gccc	434

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer_sequence4

<400> 5

tgctgcttgc ctttctgact	20
-----------------------	----

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer_sequence4

<400> 6

gggcatacctt gtaatcgga	20
-----------------------	----